



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105424926 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 23

(21) 申请号 201510814244. 8

(22) 申请日 2015. 11. 20

(71) 申请人 天津科技大学

地址 300457 天津市河西区大沽南路 1038 号

(72) 发明人 生威 王硕 张燕 王俊平 胡高爽

(74) 专利代理机构 北京金智普华知识产权代理有限公司 11401

代理人 李明卓

(51) Int. Cl.

G01N 33/559(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

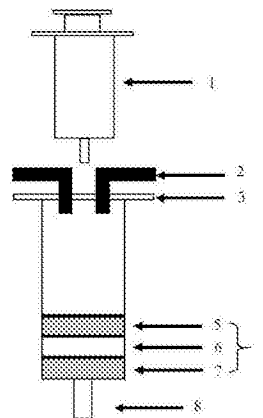
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种检测庆大霉素免疫亲和凝胶检测柱及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种可视化快速检测食品中庆大霉素残留的免疫亲和凝胶检测柱的制备方法。以琼脂糖凝胶为固相载体,将庆大霉素抗体和溴化氰活化的琼脂糖凝胶偶联制备抗体胶作为检测层,将 HRP 抗体与溴化氰活化的琼脂糖凝胶偶联制备 HRP 抗体胶作为质控层,装入 1mL 的固相萃取柱,制备免疫亲和凝胶检测柱。本发明研制了一种新型快速定性半定量检测食品中庆大霉素残留的免疫亲和凝胶柱检测产品,检测限为 10 μg/L。发明具有以下突出的优点:1、特异性高,灵敏度好;2、样品前处理简单;3、检测耗时短,准确性高;4、操作简便,不需要大型仪器的辅助。



1. 一种检测庆大霉素免疫亲和凝胶检测柱,其特征在于:

凝胶检测柱的原理是利用抗原抗体的特异性结合和辣根过氧化物酶的酶催反应,依据质控层和检测层颜色变化,进而对待测物进行定性半定量分析。

2. 根据权利要求 1 所述的一种检测庆大霉素免疫亲和凝胶检测柱,其特征在于:

在一个标准的 1mL 固相萃取柱内设有两层,上层为庆大霉素抗体胶与封闭胶混合加入形成的检测层,下层为 HRP 抗体胶与封闭胶混合加入形成的质控层,质控层和检测层之间隔开一个 3mm 的空气层。

3. 一种检测庆大霉素免疫亲和凝胶检测柱的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 抗体胶的制备:CNBr 活化的琼脂糖凝胶 0.25g 使用 1mmol/L HCl 20mL 在具砂板层析柱中溶胀清洗 15min,待凝胶完全溶胀后用偶联缓冲液调至中性;用 1mL 偶联缓冲液稀释抗体含量为 0.5mg 的缓冲液,在凝胶中悬起,室温下使用定向摇床振摇 2h。之后使用 10mL 偶联缓冲液清洗凝胶,去除未偶联上的抗体;用甘氨酸封闭液将凝胶上的残余活性基团封闭,室温下在定向摇床振摇反应 2h。反应完后清洗凝胶至少三次以调整其 pH,每次清洗先用 10mL 醋酸钠缓冲液清洗,再用 10mL 偶联缓冲液清洗。制备好的凝胶用含有 0.03% Proclin 300 的 PBS 以 1:3(v/v) 稀释重悬,4℃贮存;

(2) 抗 HRP 胶的制备:将兔抗 HRP 多克隆抗体与凝胶偶联,用于凝胶检测柱的质控层。偶联步骤同(1);

(3) 封闭胶的制备:使用封闭的凝胶稀释抗体胶对抗体胶起物理支撑和分散的作用。制备过程如下:使用 1mmol/L HCl 80mL 将 CNBr 活化的琼脂糖凝胶 1g 在具砂板层析柱中溶胀 15min,待凝胶完全溶胀后用偶联缓冲液调至中性。然后加入 20mL 甘氨酸封闭液室温反应 2h,以封闭凝胶上残余的基团。清洗和重悬步骤同(1)。

4. 根据权利要求 3 所述的抗体胶和封闭胶制备方法进行检测柱的组装,其特征在于:

制作步骤为将聚乙烯垫片加入 1mL 的固相萃取柱中,然后加入 200 μL 的 HRP 抗体胶与封闭胶比例为 1:49 的混合胶,加入第二层聚乙烯垫片,用注射器活塞将 PBS 压出,在组装好的质控层上方约 3mm 处加入第三层聚乙烯垫片,然后加入 200 μL 的庆大霉素抗体胶与封闭胶比例为 1:19 的混合胶,最后在顶部加入第四层垫片,用注射器活塞将 PBS 压出。

5. 根据权利要求 4 所述的组装好的庆大霉素免疫亲和凝胶检测柱,其特征在于:所述的庆大霉素免疫亲和凝胶检测柱检测庆大霉素的检测限为 10 μg/L。

一种检测庆大霉素免疫亲和凝胶检测柱及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于小分子化合物免疫化学和残留分析技术领域,涉及免疫化学、酶学与分析化学技术等,尤其是涉及一种庆大霉素免疫亲和凝胶可视化检测柱的制备。

背景技术

[0002] 庆大霉素是由绛红小单孢菌、棘孢小单孢菌等发酵产生的氨基糖苷类抗生素,易溶于水,呈碱性,性质稳定。主要作用于革兰氏阴性细菌,全程阻断细菌蛋白质合成,包括抑制始动期 70S 复合物形成,干扰 DNA 复制,影响肽链延伸等,改变细胞膜通透性,从而起到抑菌和杀菌作用。庆大霉素抗菌谱广、疗效好、价格低廉,因而被广泛应用于兽医临床,并作为动物饲料的添加剂被广泛使用。但是庆大霉素在血清中的有效浓度与毒性浓度比较相近,因而在实际应用过程中较易产生毒副作用。一些不规范使用过程,常常会导致动物源性食品中庆大霉素的残留超标,对人体的健康构成危害,引起耳、肾毒性,也可能引起过敏性休克。近年来欧盟、美国等发达国家已相继禁止庆大霉素用于动物源性食品,并明确规定庆大霉素残留限量为不得检出。我国农业部已禁止使用该药,无论内销还是出口的畜产品,庆大霉素残留都是必检项目。为保障人民健康及扩大与世界各国食品贸易往来,必须建立灵敏度高、特异性强、简单快速测定方法对庆大霉素残留进行监控。

[0003] 目前报到的庆大霉素检测方法主要有:微生物法、仪器分析法、酶联免疫分析法、胶体金免疫层析分析法等。氨基糖苷类抗生素绝大多数无特征的紫外吸收,因此微生物效价法是当前各国药典测定该类抗生素含量的主要方法。微生物测定法价格低廉,所需仪器设备简单,但测定结果影响因素复杂,因此,随着各种新技术的发展,将会逐步被其它方法所取代。基于抗原抗体特异性反应建立起来的免疫学测定方法,一直是兽药残留快速检测和样品筛选方法的研究热点,其具有简单、快速、处理样品量大、灵敏度较高、特异性强等诸多优点,具有广阔的应用前景。尤其是可视化快速免疫检测技术,如试纸条,不需任何仪器设备,几分钟就可用肉眼观察实验结果,非常适合于大量样品的现场筛查和基层推广。然而试纸条检测也易受样品基质的影响,在不同食品样品检测中受到一定限制。本发明阐述的凝胶柱免疫检测产品为庆大霉素在食品样品中的残留检测分析提供一种行之有效的可视化定性半定量快速简单检测方法,为食品安全的有力监管提供可靠的技术保障。

发明内容

[0004] 本发明提出一种可以定性半定量的检测食品中的庆大霉素的简单、省时、灵敏可视化的免疫亲和凝胶检测柱产品,只要样品中含有酶标记抗原,凝胶检测柱的质控层就会出现蓝色,它可以确保检测柱可以正常检测,达到质控的作用。以凝胶检测柱的质控层为基准,通过检测层颜色深浅变化达到定性或半定量检测样品中的庆大霉素的目的。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:

[0006] 庆大霉素抗体胶的制备:

[0007] CNBr 活化的琼脂糖凝胶 0.25g 使用 1mmol/L HCl 20mL 在具砂板层析柱中溶胀清

洗 15min,待凝胶完全溶胀后用偶联缓冲液调至中性;用 1mL 偶联缓冲液稀释抗体含量为 0.5mg 的缓冲液,在凝胶中悬起,室温下使用定向摇床振摇 2h。之后使用 10mL 偶联缓冲液清洗凝胶,去除未偶联上的抗体;用甘氨酸封闭液将凝胶上的残余活性基团封闭,室温下在定向摇床振摇反应 2h。反应完后清洗凝胶至少三次以调整其 pH,每次清洗先用 10mL 醋酸钠缓冲溶液清洗,再用 10mL 偶联缓冲液清洗。制备好的凝胶用含有 0.03% Proclin300 的 PBS 以 1:3(v/v) 稀释重悬,4℃ 贮存。

[0008] HRP 抗体胶的制备:

[0009] 将兔抗 HRP 多克隆抗体与凝胶偶联,用于凝胶检测柱的质控层。偶联步骤同庆大霉素抗体胶。

[0010] 封闭胶的制备:

[0011] 使用封闭的凝胶稀释抗体胶对抗体胶起物理支撑和分散的作用。制备过程如下:使用 1mmol/L HCl 80mL 将 CNBr 活化的琼脂糖凝胶 1g 在具砂板层析柱中溶胀 15min,待凝胶完全溶胀后用偶联缓冲液调至中性。然后加入 20mL 甘氨酸封闭液室温反应 2h,以封闭凝胶上残余的基团。清洗和重悬步骤同抗体胶的制备过程。

[0012] 所述封闭胶和抗体胶按一定比例混合制备凝胶检测柱的质控层和检测层,即:

[0013] (1) 质控层是由 HRP 抗体胶与封闭胶以一定比例混合好后,取 200 μ L 混合胶加入到 1mL 的 SPE 塑料柱中,用注射器活塞将 PBS 压出;

[0014] (2) 检测层是由优化好的抗体胶与封闭胶以一定的比例混合好后,取 200 μ L 加入其中,用注射器活塞将 PBS 压出;

[0015] 进一步的,所述质控层和检测层,制备检测柱,即:

[0016] (1) 检测柱由下到上,分别是对照层和检测层,对照层和检测层之间隔开一个 3mm 的空气层,可以防止加入底物显色后试剂和颜色从对照层迁移到检测层中。

[0017] (2) 首先将聚乙烯垫片加入 1mL 的塑料柱中,然后加入对照层混合胶,加入第二层聚乙烯垫片,在对照层上方约 3mm 处加入第三层聚乙烯垫片,然后加入其检测层的混合胶,最后在顶部加入第四层垫片。

[0018] 本发明创造所述的免疫检测柱相对于现有技术具有以下优势:

[0019] (1) 本发明提供的庆大霉素免疫亲和凝胶检测柱,可专一识别庆大霉素,具有非常高的选择性。

[0020] (2) 本发明庆大霉素免疫亲和凝胶检测柱是一种可视化的定性半定量检测产品。对目标待测物的检测,检测柱会以检测层颜色的有无给出检测结果,即以是/否的可视定性信号给予应答,操作方便,结果判断简单。

[0021] (3) 本发明制得的庆大霉素免疫亲和凝胶检测柱既可以使之与净化柱串联,消除样品基质影响;又可容纳较大体积的清洗缓冲液和样品溶液,提高了方法灵敏度。检测产品不需要任何复杂的前处理,及大型仪器的辅助,具有很好的易用性和准确性,满足现场快速检测的要求。

附图说明

[0022] 构成本发明创造的一部分的附图用来提供对本发明创造的进一步理解,本发明创造的示意性实施例及其说明用于解释本发明创造,并不构成对本发明创造的不当限定。在

附图中：

[0023] 图 1 为本发明创造实施例所述的凝胶检测柱的组装示意图；

[0024] 1-注射器,2-转接头,3-进样口,4-聚乙烯垫片,5-检测层,6-空气层,7-质控层,8-出口。

[0025] 图 2 为本发明创造实施例所述的庆大霉素凝胶检测柱检测限的判定(庆大霉素浓度从左向右依次为:0,1,5,10 $\mu\text{g/L}$)。

[0026] 图 3 为本发明创造实施例所述的食物样品中庆大霉素凝胶检测柱检测结果的判定,庆大霉素添加浓度(a)牛奶:0,100 $\mu\text{g/L}$, (b)猪肉:0,100 $\mu\text{g/kg}$, (c)牛肉:0,100 $\mu\text{g/kg}$, (d)鸡肉:0,100 $\mu\text{g/kg}$ ；

具体实施方式

[0027] 下面结合实施例,对本发明进一步说明;下述实施例是说明性的,不是限定性的,不能以下述实施来限定本发明的保护范围。

[0028] 下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明创造。

[0029] 实施例 1

[0030] 1、庆大霉素抗血清的纯化

[0031] 采用 Protein A - Sepharose 4B 作亲和层析介质纯化庆大霉素抗血清,可一次性获得接近纯度较高的特异性抗体。具体操作步骤为(1)平衡:用平衡缓冲液(0.2mol/L 的磷酸缓冲液)冲洗管路,平衡柱子,至基线平稳。(2)上样:用平衡缓冲液将庆大霉素特异性抗血清等体积稀释后上柱。(3)洗杂:用平衡缓冲液洗杂至杂蛋白的紫外吸收峰出现后继续冲洗至基线平稳。(4)洗脱收集:用 0.1mol/L pH 2.7 的甘氨酸缓冲液洗脱特异性 IgG 抗体。当紫外吸收曲线呈上升趋势,收集特异性抗体。并迅速用 Tris-HCl 中和抗体至中性。(5)封柱:抗体收集完成后迅速用醋酸缓冲液酸化纯化柱后,用平衡缓冲液中和纯化柱,最后用 20%乙醇饱和封柱。将纯化收集的抗体,用 pH7.4 的磷酸缓冲液 4℃透析三天后取出,测定抗体蛋白浓度,添加 0.1% (w/v) 的叠氮钠,4℃储存备用。利用该抗体与活化琼脂糖凝胶结合制备庆大霉素抗体胶。

[0032] 2、庆大霉素酶标抗原的制备

[0033] 10mg HRP 溶于 2mL 50mmol/L 的 K₂HPO₄(pH 9.3) 溶液中,将 25 μL 50%戊二醛加入 500 μL 双蒸水配制成 2.5%的戊二醛水溶液,逐滴加入蛋白溶液中,4℃连续搅拌 12h, PBS 透析 48h 除去多余的戊二醛;取 30mg 庆大霉素溶于 500 μL 双蒸水,将已活化的蛋白逐滴加入到庆大霉素溶液中,室温搅拌反应 2h,放于 4℃连续搅拌过夜,向反应液中加入 12mg 硼氢化钠,室温搅拌 4h 以封闭未反应的醛基;PBS 中透析 72h,测定蛋白质偶联物溶液的浓度,在每毫升中加 10%的叠氮钠 10 μL ,4℃保存。

[0034] 3、庆大霉素检测柱的制备和组装方法

[0035] (1) 制备封闭胶、庆大霉素抗体胶和 HRP 抗体胶

[0036] 抗体胶的制备:CNBr 活化的琼脂糖凝胶 0.25g 使用 1mmol/L HCl 20mL 在具砂板层析柱中溶胀清洗 15min,待凝胶完全溶胀后用偶联缓冲液调至中性;用 1mL 偶联缓冲液稀释抗体含量为 0.5mg 的缓冲液,在凝胶中悬起,室温下使用定向摇床振摇 2h。之后使用 10mL 偶联缓冲液清洗凝胶,去除未偶联上的抗体;用甘氨酸封闭液将凝胶上的残余活性基团封

闭,室温下在定向摇床振摇反应 2h。反应完后清洗凝胶至少三次以调整其 pH,每次清洗先用 10mL 醋酸钠缓冲溶液清洗,再用 10mL 偶联缓冲液清洗。制备好的凝胶用含有 0.03% Proclin 300 的 PBS 以 1:3(v/v) 稀释重悬,4℃ 贮存。

[0037] HRP 抗体胶的制备:将兔抗 HRP 多克隆抗体与凝胶偶联,用于凝胶检测柱的质控层。偶联步骤同抗体胶的制备。

[0038] 封闭胶的制备:使用封闭的凝胶稀释抗体胶对抗体胶起物理支撑和分散的作用。制备过程如下:使用 1mmol/L HCl 80mL 将 CNBr 活化的琼脂糖凝胶 1g 在具砂板层析柱中溶胀 15min,待凝胶完全溶胀后用偶联缓冲液调至中性。然后加入 20mL 甘氨酸封闭液室温反应 2h,以封闭凝胶上残余的基团。清洗和重悬步骤同抗体胶的制备。

[0039] (2) 制备免疫亲和凝胶检测柱质控层与检测层

[0040] 质控层是由 HRP 抗体胶与封闭胶以一定比例混合好后,取 200 μ L 混合胶加入到 1mL 的 SPE 塑料柱中,用注射器活塞将 PBS 压出得到;检测层是由优化好的抗体胶与封闭胶以一定的比例混合好后,取 200 μ L 加入其中,用注射器活塞将 PBS 压出得到;

[0041] (3) 组装庆大霉素免疫亲和凝胶检测柱

[0042] 检测柱由下到上,分别是质控层和检测层,质控层和检测层之间隔开一个 3mm 的空气层,可以防止加入底物显色后试剂和颜色从质控层迁移到检测层中。首先将聚乙烯垫片加入 1mL 的塑料柱中,然后加入质控层混合胶,加入第二层聚乙烯垫片,在质控层上方约 3mm 处加入第三层聚乙烯垫片,然后加入其检测层的混合胶,最后在顶部加入第四层垫片。

[0043] 实施例 2

[0044] 庆大霉素凝胶检测柱使用方法

[0045] 1、检测步骤

[0046] (1) 加样:用 1mL PBS 将按一定比例稀释酶标抗原与庆大霉素样品溶液预混合,通过进样口通过柱子,控制流速在 1min 流完。

[0047] (2) 洗柱:用 PBST 3mL 由进样口加入冲洗柱子,再用 PBS 2mL 冲洗去除未与抗体结合的抗原与残留的 Tween 20。

[0048] (3) 显色:从底端吸入 300 μ L 底物液,反应 30s 后,用注射器活塞注入空气,将底物液完全排出,继续显色 4min 后,观察结果。

[0049] 2、结果判定

[0050] 目测凝胶柱的质控层和检测层颜色。质控层呈明显蓝色,说明检测柱可以正常使用。使用检测柱检测不同浓度的庆大霉素 (0、1、5、10 μ g/L),当目测检测层颜色完全消色时待测物的最低浓度作为检测柱的检出限。由图 2 结果表明,随着加入的庆大霉素的浓度的升高,检测层颜色逐渐变浅,当浓度达到 10 μ g/L 时,检测层变为无色。因此确定免疫亲和凝胶检测柱的检测限为 10 μ g/L。

[0051] 实施例 3

[0052] 本发明的应用效果举例

[0053] 1、样品处理方法

[0054] 取 2mL (牛奶) 或 2g (组织) 样品加入 2mL PBS 缓冲液,2000r/min 振荡 4min,然后 5000r/min 离心 15min,取上清液 1mL,进行 10 倍稀释。取最终的样品处理液 1mL,并在其中加入酶标抗原,过柱显色,观察显色结果。

[0055] 2、有效性实验

[0056] 向阴性样品中添加庆大霉素使样品中庆大霉素最终浓度为 0、100 $\mu\text{g/L}$ ($\mu\text{g/kg}$)。目测凝胶柱的检测层颜色,检测实际样品的检出限是检测层颜色消失时的待测物最低浓度。如图 3 所示,可以得出牛奶、猪肉、牛肉和鸡肉中的检测限为 100 $\mu\text{g/L}$ ($\mu\text{g/kg}$)。

[0057] 实验表明本发明的凝胶检测柱准确性好、灵敏度高、特异性好,而且样品前处理方法简单,整个检测过程不超过 10min,可作为是庆大霉素残留快速检测的有效筛检手段。

[0058] 以上所述仅为本发明创造的较佳实施例而已,并不用以限制本发明创造,凡在本发明创造的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明创造的保护范围之内。

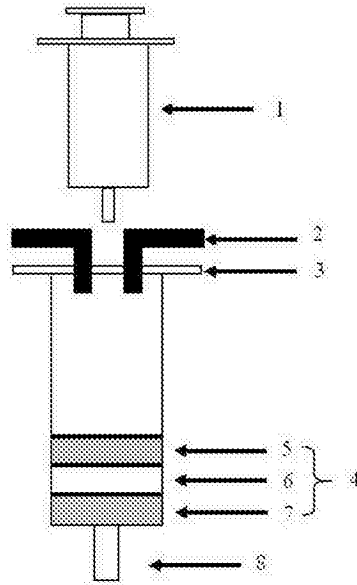


图 1

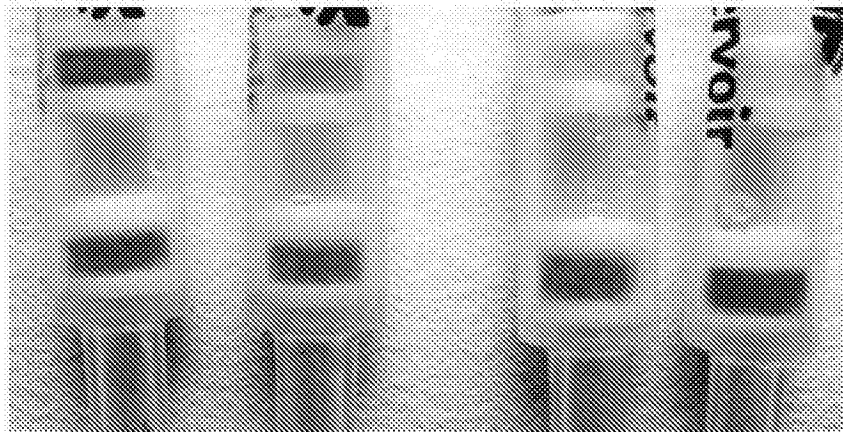


图 2

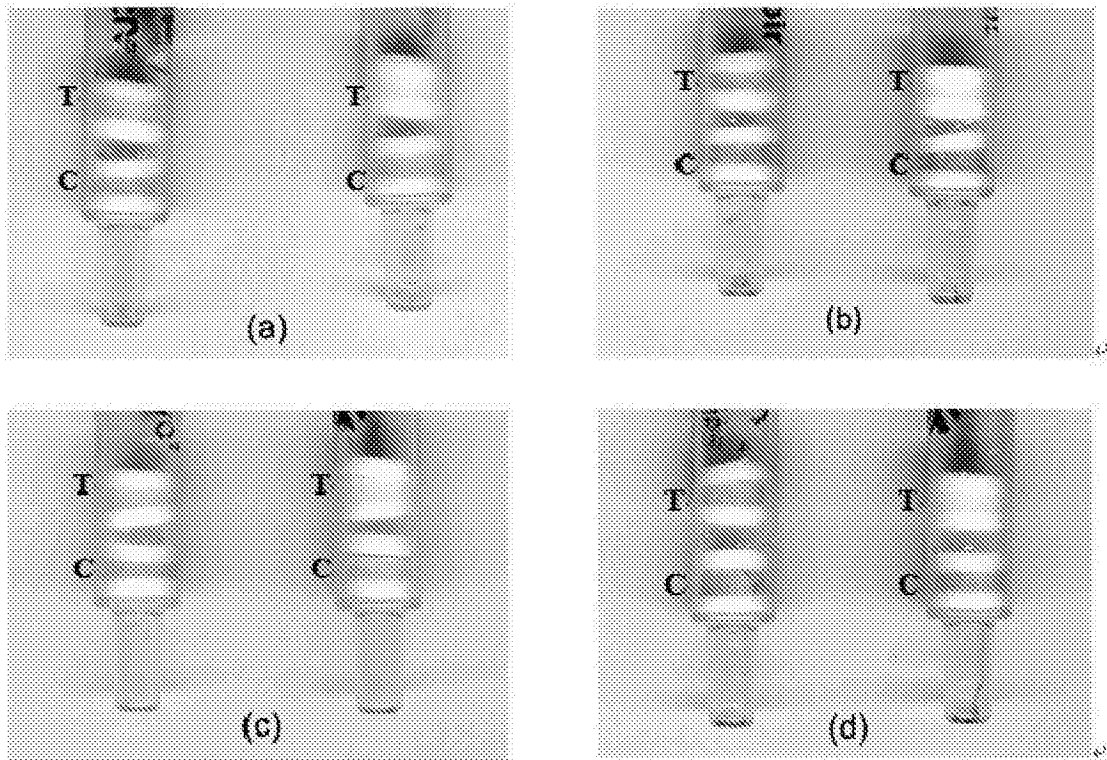


图 3

专利名称(译)	一种检测庆大霉素免疫亲和凝胶检测柱及其制备方法		
公开(公告)号	CN105424926A	公开(公告)日	2016-03-23
申请号	CN201510814244.8	申请日	2015-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
[标]发明人	生威 王硕 张燕 王俊平 胡高爽		
发明人	生威 王硕 张燕 王俊平 胡高爽		
IPC分类号	G01N33/559 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/559 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种可视化快速检测食品中庆大霉素残留的免疫亲和凝胶检测柱的制备方法。以琼脂糖凝胶为固相载体，将庆大霉素抗体和溴化氰活化的琼脂糖凝胶偶联制备抗体胶作为检测层，将HRP抗体与溴化氰活化的琼脂糖凝胶偶联制备HRP抗体胶作为质控层，装入1mL的固相萃取柱，制备免疫亲和凝胶检测柱。本发明研制了一种新型快速定性半定量检测食品中庆大霉素残留的免疫亲和凝胶柱检测产品，检测限为10μg/L。发明具有以下突出的优点：1、特异性高，灵敏度好；2、样品前处理简单；3、检测耗时短，准确性高；4、操作简便，不需要大型仪器的辅助。

