



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107449899 A

(43)申请公布日 2017.12.08

(21)申请号 201710690169.8

(22)申请日 2017.08.14

(71)申请人 天津科技大学

地址 300222 天津市河西区大沽南路1038号

(72)发明人 张燕 生威 刘冰 王硕 陈义元

(74)专利代理机构 天津合志慧知识产权代理事务所(普通合伙) 12219

代理人 陈松

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种孔雀石绿免疫亲和凝胶检测柱及其制备方法

(57)摘要

本发明以ZnCdSe/ZnS量子点为供体,孔雀石绿为受体建立了能量共振转移体系,并将该体系用于孔雀石绿含量的测定。本发明提供了一种可视化快速检测食品中孔雀石绿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,将孔雀石绿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,装入1mL的检测柱,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孔雀石绿的免疫亲和凝胶柱检测产品,检测限为 $10\mu\text{g/L}$ 。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. 一种孔雀石绿免疫亲和凝胶检测柱,其特征在于:所述检测柱包括一层检测层,所述检测层是首先孔雀石绿抗体胶与封闭胶按体积比3:1混合加入检测柱,然后加入ZnCdSe/ZnS量子点形成的。

2. 根据权利要求1所述的一种孔雀石绿免疫亲和凝胶检测柱,其特征在于:

所述封闭胶的制备:使用溴化氰活化琼脂糖凝胶,之后加入HCl溶液,搅拌溶胀后转移到具砂板层析柱中,用1mM/L PH=3.0的HCl溶液进行淋洗,再用偶联缓冲液冲洗柱子,调解柱子至中性,加入甘氨酸封闭液室温反应2h,再用偶联缓冲液和醋酸钠缓冲液反复冲洗,待清洗液抽空,将制备好的封闭胶用含有0.3ml/L抑菌素的PBS悬起,封闭胶与PBS体积比1:3,放置于4℃保存待用;

所述孔雀石绿抗体胶的制备:方法同封闭胶,差别仅在于加入封闭液之前,在溴化氰活化琼脂糖凝胶中加入孔雀石绿特异性抗体,室温偶联2h;

所述ZnCdSe/ZnS量子点的制备:将8uM以巯基乙酸作为稳定剂合成的ZnCdSe/ZnS量子点,用PH=7.4的PBS溶液稀释40000倍,避光待用。

3. 根据权利要求1所述的一种孔雀石绿免疫亲和凝胶检测柱,其特征在于:

所述检测层的制备方法:孔雀石绿抗体胶和封闭胶按3:1比例混合后装入检测柱,用注射器压出混合胶中PBS液体,加入50u1制备好的ZnCdSe/ZnS量子点溶液形成检测层。

4. 一种孔雀石绿免疫亲和凝胶检测柱的组装,其特征在于:

制作步骤为:将聚乙烯垫片加入1mL的检测柱中,然后加入200uL雀石绿抗体胶和封闭胶的混合胶,二者混合比例为3:1,用注射器将PBS压出,加入第二层聚乙烯垫片,加入待测物后再用注射器活塞将待测物中的PBS压出,然后加入50u1制备好的ZnCdSe/ZnS量子点溶液,并将量子点恰好全部压入孔雀石绿抗体胶和封闭胶的混合胶中。

5. 权利要求1或2所述孔雀石绿免疫亲和凝胶检测柱,其特征在于:所述的孔雀石绿免疫亲和凝胶检测柱的检测限为10μg/L。

一种孔雀石绿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,涉及免疫化学与分析化学技术等,尤其是涉及孔雀石绿免疫亲和凝胶可视化检测柱的制备。

背景技术

[0002] 孔雀石绿(Malachite green, MG)属于人工合成的有机化合物,最初作为工业三苯甲烷类染料被用于纺织业、皮革业和造纸业等行业,也作为生物染色剂,可将细胞或其组织染成蓝绿色,方便在显微镜下研究。但是因1993年起孔雀石绿被证实发现可以作为水产类动物体内外的驱虫剂、防腐剂 and 杀菌剂,例如水产动物体外的寄生虫,原生动物和鱼卵中的霉菌等。后来被广泛用于治疗与预防各类水产动物的疾病,包括水霉病、鳃霉病、烂鳍病、寄生虫病及其他的一些细菌性疾病。有时也会在运输途中作为消毒剂使用来延长鲜活水产品长途运输中的存活时间。

[0003] 孔雀石绿等药物进入人体或动物机体后,可对人体产生致癌、致畸、致突变等危害。孔雀石绿对鱼体毒性影响会受到环境的温度、酸碱度、水的硬度、还有溶氧量等其他多种因素影响,研究表明孔雀石绿对大口鲈鱼和蛙鱼的鱼卵鱼苗有着致死的作用。孔雀石绿可在环境中长期存在并对水生生物和陆生生物产生各种毒性。孔雀石绿在水生动物体内通常会迅速代谢成隐性孔雀石绿(LMG),而隐性孔雀石绿的毒性甚至超过孔雀石绿。因此,为了保障消费者健康必须建立灵敏度高、特异性强、简单快速的测定方法对孔雀石绿残留进行监控。

[0004] 目前,常用的检测蛋白同化激素的方法有高效液相色谱法(HPLC)、超高效液相色谱-质谱联用法(LC-MS)、分光光度计法和免疫检测法等。仪器检测方法是目前应用最多的检测方法,具有准确度高、灵敏度好等优点。但该方法的缺点是,需要昂贵的仪器及专业的人员进行操作,样品处理步骤繁琐,需要衍生,回收率低等,所以不适合广泛的推广使用。可视化快速免疫检测技术,像试纸条、凝胶检测柱等,是相对独立的快速检测方法。不需任何仪器设备,分析过程特别是前处理的步骤大大简化了,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。因此技术具有巨大的发展潜力和应用前景。

发明内容

[0005] 本发明提出一种可以定性半定量的检测水产品中的孔雀石绿的简单、省时、灵敏的可视化免疫亲和凝胶检测柱。孔雀石绿免疫亲和凝胶检测柱利用了抗原抗体的特异性结合,以及ZnCdSe/ZnS量子点与待测物孔雀石绿共振能量转移荧光猝灭的原理,依据检测层量子点颜色变化,进而对待测物进行定性半定量分析。本发明首先使孔雀石绿与抗体发生特异性结合,利用ZnCdSe/ZnS量子点的荧光发射光谱与孔雀石绿的吸收光谱能有效重叠,且满足荧光共振能量转移的条件。以ZnCdSe/ZnS量子点为供体,孔雀石绿为受体建立能量共振转移体系,孔雀石绿与ZnCdSe/ZnS量子点共振能量转移荧光猝灭,即首先将垫片装入1ml塑料柱中,然后加入200 μ l孔雀石绿抗体胶与封闭胶的混合胶(3:1),用加压注射器将混

合胶中PBS液体压出,加入上层垫片,组装好检测柱,然后将不同浓度、一定体积的待测物加入检测柱,用注射器压出检测层中PBS液体,加入50 μ l制备好的ZnCdSe/ZnS量子点溶液至检测层,根据检测层荧光颜色变化,利用单层检测层可达到检测孔雀石绿的目的。相比于HPLC、LC-MS等方法,本文所建立的方法操作简单;而与无机稀土纳米材料荧光探针法相比,本方法更简便。本发明为孔雀石绿的检测提供了一种新方法,同时拓宽了FRET(荧光能量共振转移)在食品检测方面的应用。

[0006] 为实现上述技术效果,本发明采用的技术方案是:

[0007] 一种孔雀石绿免疫亲和凝胶检测柱,所述检测柱包括一层检测层,所述检测层是首先孔雀石绿抗体胶与封闭胶按体积比3:1混合加入检测柱,然后加入ZnCdSe/ZnS量子点形成的。

[0008] 进一步,所述封闭胶的制备:使用溴化氰活化琼脂糖凝胶,之后加入HCl溶液,搅拌溶胀后转移到具砂板层析柱中,用1mM/L PH=3.0的HCl溶液进行淋洗,再用偶联缓冲液(NaHCO₃:4.2g,NaCl:14.6g,双蒸水定容至500mL,用NaOH调节PH至8.3)冲洗柱子,调解柱子至中性,加入甘氨酸封闭液(甘氨酸0.6g,溶于20ml偶联缓冲液中)室温反应2h,再用偶联缓冲液和醋酸钠缓冲液(CH₃COOH:0.58ml,NaCl:2.92g,双蒸水定容至100ml,用无水乙酸钠调节PH至4.0)反复冲洗,待清洗液抽空,将制备好的封闭胶用含有0.3ml/L抑菌素的PBS悬起,封闭胶与PBS体积比1:3,放置于4℃保存待用;

[0009] 所述孔雀石绿抗体胶的制备:方法同封闭胶,差别仅在于加入封闭液之前,在溴化氰活化琼脂糖凝胶中加入孔雀石绿特异性抗体,室温偶联2h;

[0010] 所述ZnCdSe/ZnS量子点的稀释:将商品化的8 μ M以巯基乙酸作为稳定剂合成的ZnCdSe/ZnS量子点用PH=7.4的PBS溶液稀释40000倍,避光待用。

[0011] 通常使用购置的Q3系列(增加了PEG层,应用中可以有效的避免非特异性吸附)羧基水溶性ZnCdSe/ZnS量子点。

[0012] 进一步,所述检测层的制备方法:孔雀石绿抗体胶和封闭胶按3:1比例混合后装入检测柱,用注射器压出混合胶中PBS液体,加入50 μ l制备好的ZnCdSe/ZnS量子点溶液形成检测层。

[0013] 一种孔雀石绿免疫亲和凝胶检测柱的组装,制作步骤为:将聚乙烯垫片加入1mL的塑料柱中,然后加入200 μ L制备的孔雀石绿抗体胶和封闭胶的混合胶,二者混合比例为3:1,用注射器将PBS压出,加入第二层聚乙烯垫片,加入待测物后再用注射器活塞将待测物中的PBS压出,然后加入50 μ l制备好的ZnCdSe/ZnS量子点溶液,并将量子点恰好全部压入检测层中。

[0014] 所述的孔雀石绿免疫亲和凝胶检测柱的检测限为10 μ g/L。

[0015] 本发明借鉴凝胶柱免疫检测技术,为水产品性食品中的孔雀石绿残留进行检测分析,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。

[0016] 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:

[0017] (1) 本发明通过孔雀石绿与抗体发生特异性结合,利用ZnCdSe/ZnS量子点的荧光发射光谱与孔雀石绿的吸收光谱能有效重叠,且满足荧光共振能量转移的条件。以ZnCdSe/ZnS量子点为供体,孔雀石绿为受体建立能量共振转移体系,并将该体系用于孔雀石绿含量

的测定。相比于HPLC、LC-MS等方法,本文所建立的方法操作简单;而与无机稀土纳米材料荧光探针法相比,本方法更简便。本发明为孔雀石绿的检测提供了一种新方法,同时拓宽了FRET(荧光能量共振转移)在食品检测方面的应用。

[0018] (2) 本发明提供的孔雀石绿免疫亲和凝胶检测柱,利用孔雀石绿与ZnCdSe/ZnS量子点共振能量转移荧光猝灭,并结合抗原抗体特异性反应的原理,利用单层检测层可达到检测孔雀石绿的目的。

[0019] (3) 本发明孔雀石绿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。

[0020] (4) 本发明制得的孔雀石绿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。检测产品前处理方法简便,快速,稳定性好,所用试剂均无毒、无污染,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

[0021] 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:

[0022] 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;

[0023] 图2分别为本发明创造实施例所述的孔雀石绿检测柱加标品图:孔雀石绿浓度从左到右分别为:0 μ g/L,5 μ g/L,10 μ g/L,and 20 μ g/L;

[0024] 图3为本发明创造实施例所述的孔雀石绿胶检测柱加入量子点后检测限的判定:孔雀石绿浓度从左到右分别为:0 μ g/L,5 μ g/L,10 μ g/L,and 20 μ g/L;图中:

[0025] 1-加压注射器 2-垫片 3-检测层

具体实施方式

[0026] 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。

[0027] 下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明创造。

[0028] 实施例1

[0029] 1、孔雀石绿抗血清的纯化

[0030] 采用Protein A-Sephrose 4B作亲和层析介质纯化孔雀石绿抗血清,可一次性获得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:用平衡缓冲液将孔雀石绿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 $^{\circ}$ C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孔雀石绿抗体胶。

[0031] 2、孔雀石绿检测柱的制备和组装方法

[0032] (1) 制备封闭胶、孔雀石绿抗体胶

[0033] 制备封闭胶,首先称取1.00g溴化氰活化琼脂糖凝胶,加入到80mL的配制好的HCl溶液中,搅拌溶胀10min(溶胀后胶的终体积约为3.5mL)。将溶胀好的琼脂糖凝胶转移到在具砂板层析柱中,再加入200mL HCl淋洗,然后用偶联缓冲液冲洗柱子,调节柱子pH至中性。加入9mL甘氨酸封闭液,密封柱子,室温下震荡反应2h。之后先加入10mL的偶联缓冲液淋洗一次,然后用10mL的醋酸钠缓冲溶液和10mL的偶联缓冲液分别冲洗3遍。待清洗液抽空,制备好的封闭胶用PBS悬起,约10mL PBS(含有0.3ml/L的抑菌素),放置于4℃保存待用。

[0034] 制备孔雀石绿抗体胶,首先称取1.00g溴化氰活化琼脂糖凝胶,加入到80mL的配制好的HCl溶液中,搅拌溶胀10min(溶胀后胶的终体积约为3.5mL)。将溶胀好的琼脂糖凝胶转移到在具砂板层析柱中,再加入200mL HCl淋洗,然后用偶联缓冲液冲洗柱子,调节柱子pH至中性。取纯化后的孔雀石绿抗体(1.33mg/mL) 1.0mg,用4mL的偶联缓冲液稀释,然后加入具砂板层析柱中,密封柱子,室温下震荡反应2h。用10mL偶联缓冲液冲洗3次柱子,加入10mL甘氨酸封闭液,密封柱子,室温下震荡反应2h。之后先加入10mL的偶联缓冲液淋洗一次,然后用10mL的醋酸钠缓冲溶液和10mL的偶联缓冲液分别冲洗3遍。待清洗液抽空,制备好的封闭胶用PBS悬起,约10mL PBS(含有0.3ml/L的抑菌素),放置于4℃保存待用。

[0035] ZnCdSe/ZnS量子点的稀释:将商品化的8uM的Q3系列(增加了PEG层,应用中可以有效避免非特异性吸附)羧基水溶性ZnCdSe/ZnS量子点用PH=7.4的PBS溶液稀释40000倍,避光待用。

[0036] (2) 制备免疫亲和凝胶检测柱检测层

[0037] 孔雀石绿抗体胶和封闭胶按3:1比例混合后装入检测柱,用注射器压出混合胶中PBS液体,加入50uL制备好的ZnCdSe/ZnS量子点溶液形成检测层。

[0038] (3) 组装孔雀石绿免疫亲和凝胶检测柱

[0039] 孔雀石绿免疫亲和凝胶检测柱只由单层检测层组成,首先将聚乙烯垫片加入1mL的塑料柱中,然后加入混合胶,压出混合胶中PBS液体,加入第二层聚乙烯垫片。

[0040] 实施例2

[0041] 孔雀石绿凝胶检测柱使用方法

[0042] 1、检测步骤

[0043] (1) 加样:加入5mL的待测物样品液,每次加1mL,用注射器控制其流速,在1min中内推出液体;

[0044] (2) 洗柱:为了除去偶联物残留,用PBS清洗一遍。

[0045] (3) 显色:加入50μL优化好的发射波长585nm的量子点,用注射器活塞注入空气,将量子点溶液完全推入混合胶中,反应30s后,在紫外分析仪中观察结果。

[0046] 2、结果判定

[0047] 在紫外分析仪中,目测凝胶柱的检测层颜色。空白对照检测柱在紫外下有明显量子点颜色,说明检测柱可以正常使用。使用检测柱检测不同浓度的孔雀石绿(0μg/L, 5μg/L, 10μg/L, and 20μg/L),在紫外下,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。图3结果表明,当孔雀石绿浓度大于等于10 μ g/L时,检测层颜色完全消失,因此确定孔雀石绿免疫亲和凝胶检测柱检测限为10 μ g/L。

[0048] 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

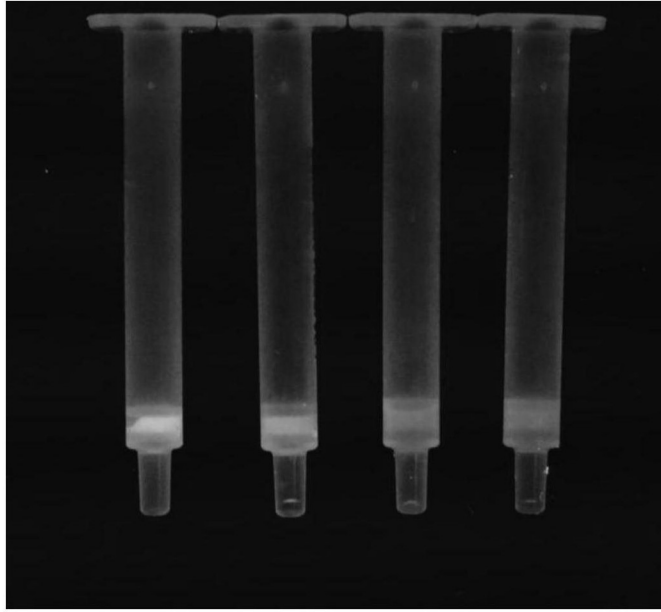


图3

专利名称(译)	一种孔雀石绿免疫亲和凝胶检测柱及其制备方法		
公开(公告)号	CN107449899A	公开(公告)日	2017-12-08
申请号	CN201710690169.8	申请日	2017-08-14
[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	张燕 生威 刘冰 王硕 陈义元		
发明人	张燕 生威 刘冰 王硕 陈义元		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/533 G01N21/6486		
代理人(译)	陈松		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明以ZnCdSe/ZnS量子点为供体，孔雀石绿为受体建立了能量共振转移体系，并将该体系用于孔雀石绿含量的测定。本发明提供了一种可视化快速检测食品中孔雀石绿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，将孔雀石绿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，装入1mL的检测柱，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孔雀石绿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。

