



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106872689 A

(43)申请公布日 2017.06.20

(21)申请号 201710015266.7

(22)申请日 2017.01.10

(71)申请人 宁波大学

地址 315211 浙江省宁波市江北区风华路
818号

(72)发明人 史西志 丁浩 孙爱丽 李德祥
陈炯

(74)专利代理机构 宁波奥圣专利代理事务所
(普通合伙) 33226

代理人 何仲

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

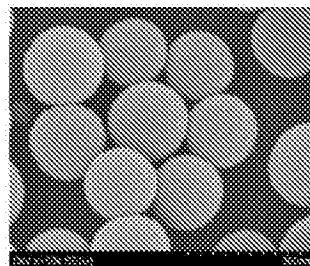
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种快速测定磺胺类抗生素残留的仿生酶联免疫检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种快速测定磺胺类抗生素残留的仿生酶联免疫检测方法,特点是包括以下步骤:(1)将环己烷和Triton X-100加入两口烧瓶中,磁力搅拌后依次加入量子点、正硅酸乙酯和氨水,磁力搅拌后加入模板分子溶液以及功能单体,室温下聚合反应后除去磺胺类抗生素,再分散于乙醇磷酸盐溶液中,得到分子印迹-量子点纳米结构人工抗体溶液;(2)在每个酶标孔中依次加入分子印迹-量子点纳米结构人工抗体溶液和样品提取液;将酶标板室温育10 min,然后用酶标仪读出发射波长在605nm下的数值,根据荧光值由标准曲线计算出样品提取液中磺胺类抗生素含量,优点是特异性强、灵敏度高、合成简单、稳定性好和检测时间短。



1. 一种快速测定磺胺类抗生素残留的仿生酶联免疫检测方法,其特征包括以下步骤:

(1) 分子印迹-量子点纳米结构人工抗体的制备

将7.5 mL环己烷和1.8 mL Triton X-100加入两口烧瓶中,于150 rpm磁力搅拌15 min,然后依次加入400 μ L浓度为2.5 nmol/mL的量子点溶液、50 μ L正硅酸乙酯和100 μ L氨水,磁力搅拌2 h;然后加入200 μ L浓度为1.0-5.0 mg/mL的模板分子溶液以及20-25 μ L的功能单体,室温下聚合反应12 h后;再加入10 mL丙酮,涡旋1 min,然后于9000 rpm离心10 min,弃掉上清液后,再加入6 mL双蒸水,充分分散后,于9000 rpm离心10 min,最后用10.0 mL由体积比为8:2的乙醇和己腈组成的混合液洗脱2 h以除去磺胺类抗生素,再分散于1.0 mL乙醇磷酸盐溶液中,得到分子印迹-量子点纳米结构人工抗体溶液,其中乙醇磷酸盐溶液中乙醇质量分数为50-80%;

(2) 待测样品检测

A. 用乙醇将酶标孔润洗3次,然后在每个酶标孔中依次加入50 μ L分子印迹-量子点纳米结构人工抗体溶液和150 μ L样品提取液;并设置空白对照酶标孔组,空白对照酶标孔组每孔加入150 μ L pH为8-10的磷酸盐缓冲液;

B. 将酶标板室温育10 min,然后用酶标仪读出发射波长在605nm下的数值,根据荧光值由标准曲线计算出样品提取液中磺胺类抗生素含量。

2. 根据权利要求1所述的一种快速测定磺胺类抗生素残留的仿生酶联免疫检测方法,其特征包括:步骤(1)中所述的模板分子为磺胺嘧啶、磺胺甲嘧啶、磺胺-5-甲氧嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲噁唑或者磺胺二甲氧嘧啶;所述功能单体为氨丙基三乙氧基硅烷或者甲基丙烯酸。

3. 根据权利要求1所述的一种快速测定磺胺类抗生素残留的仿生酶联免疫检测方法,其特征包括:步骤(1)中所述的量子点是CdS/ZnS,所述的分子印迹-量子点纳米结构人工抗体的粒径为40-50 nm。

4. 根据权利要求1所述的一种快速测定磺胺类抗生素残留的仿生酶联免疫检测方法,其特征包括:步骤(2)中所述的标准曲线以标准溶液浓度为横坐标, $(F_0/F-1)$ 为纵坐标,其中 F_0 为空白对照孔的平均荧光值, F 为磺胺标准液或样品提取液的平均荧光值。

5. 根据权利要求1所述的一种快速测定磺胺类抗生素残留的仿生酶联免疫检测方法,其特征包括:步骤(2)中所述的样品提取液制备方法如下:准确称取待测样品2.0 g,于18000 rpm匀浆,然后加入2.0 mL乙腈,涡旋震荡10 min,超声15min,5000 rpm离心5min;然后取上清液至离心管中,加入3 mL乙腈饱和正己烷;手动震荡15~20s,于5000 rpm离心5 min,取下层液体用0.22 μ m滤膜过滤得到样品提取液。

一种快速测定磺胺类抗生素残留的仿生酶联免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种磺胺类抗生素残留检测方法,尤其是涉及一种快速测定磺胺类抗生素残留的仿生酶联免疫检测方法。

背景技术

[0002] 由于养殖规模、养殖密度和养殖环境等的恶化,养殖过程中病害频发,对水产养殖业发展造成严重危害。磺胺类抗生素(Sulfonamides,SAs)是一类广谱抗菌药,主要用于预防和治疗细菌感染性疾病,或者作为饲料添加剂在动物生产中长期应用。但是,不合理使用易造成耐药性增加,在食品中残留的药物对人类健康造成潜在的危害,如诱发癌症等。因此,其在环境及食品中的残留问题引起了国内外的高度重视。因此,为保护食品安全和人类健康,必须加强对磺胺类抗生素的检测,尤其是快速检测技术。

[0003] 目前,磺胺类抗生素残留的检测方法主要有微生物学法、仪器分析方法和免疫法等。其中,微生物学方法虽然具有简单、费用低等特点,但是存在操作费时、敏感性和特异性都较差等问题,不能满足现在残留检测的需要。仪器分析方法主要有气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)及液质联用(LC-MS)等,这些方法具有准确、特异性好、可同时测定多种药物等优点,但是通常需要复杂、昂贵的仪器设备、操作复杂,限制了其广泛应用,且不适合现场大规模筛选检测。常规酶联免疫(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)方法,具有灵敏度高、特异性高、操作简便、适用于大批量样品检测等优点,受到了高度重视,但是现有的酶联免疫主要是基于生物抗体和显色反应,其中,生物抗体具有制备繁琐、周期长、稳定性差以及显色反应灵敏度低等缺点。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种特异性强、灵敏度高、合成简单、稳定性好和检测时间短的快速测定磺胺类抗生素残留的仿生酶联免疫检测方法。

[0005] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为:一种快速测定磺胺类抗生素残留的仿生酶联免疫检测方法,包括以下步骤:

(1) 分子印迹-量子点纳米结构人工抗体的制备

将7.5 mL环己烷和1.8 mL Triton X-100加入两口烧瓶中,于150 rpm磁力搅拌15 min,然后依次加入400 μ L浓度为2.5 nmol/mL的量子点溶液、50 μ L正硅酸乙酯(TEOS)和100 μ L氨水,磁力搅拌2 h;然后加入200 μ L浓度为1.0-5.0 mg/mL的模板分子溶液以及20-25 μ L的功能单体,室温下聚合反应12 h后;再加入10 mL丙酮,涡旋1 min,然后于9000 rpm离心10 min,弃掉上清液后,再加入6 mL双蒸水,充分分散后,于9000 rpm离心10 min,最后用10.0 mL由体积比为8:2的乙醇和己腈组成的混合液洗脱2 h以除去磺胺类抗生素,再分散于1.0 mL乙醇磷酸盐溶液中,得到分子印迹-量子点纳米结构人工抗体溶液,其中乙醇磷酸盐溶液中乙醇质量分数为50-80%;

(2) 待测样品检测

A. 用乙醇将酶标孔润洗3次,然后在每个酶标孔中依次加入50 μL 分子印迹-量子点纳米结构人工抗体溶液和150 μL 样品提取液;并设置空白对照酶标孔组,空白对照酶标孔组每孔加入150 μL pH为8-10的磷酸盐缓冲液;

B. 将酶标板室温育10 min,然后用酶标仪(Tecan, Switzerland)读出发射波长在605nm下的数值,根据荧光值由标准曲线计算出样品提取液中磺胺类抗生素含量。

[0006] 步骤(1)中所述的模板分子为磺胺嘧啶、磺胺甲嘧啶、磺胺-5-甲氧嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲噁唑或者磺胺二甲氧嘧啶;功能单体为氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)或者甲基丙烯酸(MAA)。

[0007] 步骤(1)中所述的量子点是CdS/ZnS。

[0008] 步骤(1)中所述的分子印迹-量子点纳米结构人工抗体的粒径为40-50 nm。

[0009] 步骤(2)中所述的标准曲线以标准溶液浓度为横坐标, $(F_0/F-1)$ 为纵坐标,其中 F_0 为空白对照孔的平均荧光值, F 为磺胺标准液或样品提取液的平均荧光值。

[0010] 步骤(2)中所述的样品提取液制备方法如下:准确称取待测样品2.0 g,于18000 rpm匀浆,然后加入2.0 mL乙腈,涡旋震荡10 min,超声15min,5000 rpm离心5min;然后取上清液至离心管中,加入3 mL乙腈饱和正己烷;手动震荡15~20s,于5000 rpm离心5 min,取下层液体用0.22 μm 滤膜过滤得到样品提取液。

[0011] 与现有技术相比,本发明的优点在于:本发明一种快速测定磺胺类抗生素残留的仿生酶联免疫检测方法,其采用的分子印迹人工抗体(Molecularly imprinted polymers, MIPs)与常规生物抗体相比,具有特异性高、合成简单、稳定性好、可长期保存等优点。量子点(Quantum dots, QDs)具有较好的稳定性、宽的激发光谱和窄的发射谱、荧光寿命长等优点,因此,将量子点和分子印迹人工抗体相结合,获得对磺胺类抗生素具有特异荧光响应的分子印迹-量子点纳米结构材料(MIP-QDs),并基于酶联免疫技术原理,建立基于MIP-QDs的磺胺类抗生素仿生酶联免疫检测方法,优点如下:

1) 本发明获得的磺胺类抗生素分子印迹-量子点纳米结构人工抗体具有较高的选择性和荧光响应性能,可以代替生物抗体和显色剂应用于酶联免疫技术。同时该人工抗体由表面接枝反应制备,具有较高的稳定性和较好的荧光性能,克服了传统生物抗体制备周期长、易失活和常规显色剂灵敏度低等缺点。

[0012] 2) 本发明制备的分子印迹-量子点纳米结构人工抗体,具有较好的荧光响应性能,将对分析物的特异识别和信号响应相结合,灵敏度高,同时,成本大大降低,且显著降低了分析所需时间,仅需约0.5 h(常规酶联免疫时间为1-2 h),适用于快速检测磺胺类抗生素残留。

[0013] 3) 本发明将获得的磺胺类抗生素分子印迹-量子点纳米结构人工抗体与酶联免疫技术联用,建立对磺胺类抗生素具有高灵敏度的仿生酶联免疫检测方法。该方法对水产品中磺胺类抗生素的最低检测限为0.004 $\mu\text{g}/\text{kg}$,能够满足检测需要。

附图说明

[0014] 图1为磺胺类抗生素分子印迹-量子点纳米结构人工抗体MIP-QDs的扫描电镜图;

图2为磺胺类抗生素分子印迹-量子点纳米结构人工抗体MIP-QDs的透射电镜图;

图3为 MIP-QDs和NIP-QDs对SDZ及其类似物SM、SMZ、SMX、SDM、SME特异性,其中NIP-QDs

为不加模板的空白对照分子印迹-量子点纳米结构人工个抗体；

图4为磺胺类抗生素ELISA标准曲线。

具体实施方式

[0015] 以下结合附图实施例对本发明作进一步详细描述。

[0016] 一、具体实施例

本发明是将磺胺类抗生素分子印迹-量子点纳米结构人工抗体作为仿生抗体和信号响应物质,基于酶联免疫技术原理,建立对磺胺类抗生素具有高灵敏度和选择性的快速检测方法,具体过程如下:

1、分子印迹-量子点纳米结构人工抗体的制备

将7.5 mL环己烷和1.8 mL Triton X-100加入两口烧瓶中,150 rpm磁力搅拌15 min,然后依次加入400 μ L浓度为2.5 nmol/mL的量子点溶液(量子点是CdS/ZnS)、50 μ L正硅酸乙酯(TEOS)和100 μ L氨水,磁力搅拌2 h;然后加入200 μ L浓度为1.0-5.0 mg/mL的模板分子溶液以及20-25 μ L的功能单体,室温下聚合反应12 h后;再加入10 mL丙酮,涡旋1 min,然后于9000 rpm离心10 min,弃掉上清液后,再加入6 mL双蒸水,充分分散后,于9000 rpm离心10 min,最后用10.0 mL由体积比为8:2的乙醇和己腈组成的混合液洗脱2 h以除去磺胺类抗生素,再分散于1.0 mL乙醇磷酸盐溶液中,得到分子印迹-量子点纳米结构人工抗体溶液,其中乙醇磷酸盐溶液中乙醇质量分数为50-80%;同时,制备空白印迹聚合物(NIP),除不加模板分子外,其制备过程同上述MIP-QDs制备方法。

[0017] 图1为分子印迹-量子点纳米结构人工抗体MIP-QDs的扫描电镜,图2为分子印迹-量子点纳米结构人工抗体MIP-QDs的透射电镜图,由图1、2表明获得的MIP-QDs高度分散,大小均一,粒径约150 nm。

[0018] 2、标准曲线绘制

1)用乙醇将酶标孔润洗3次,然后在每个酶标孔中加入50 μ L分子印迹-量子点纳米结构人工抗体溶液作为仿生抗体和荧光标记;第1行酶标孔设为空白对照,每孔加入150 μ L磷酸盐缓冲液;第2-7行酶标孔依次加入150 μ L标样梯度稀释液,标样梯度稀释液为0.05、1.0、5.0、10.0、15.0 mg/L,采用乙醇磷酸盐缓冲溶液作为稀释液;

2)将上述酶标板室温育10 min,然后用酶标仪(Tecan, Switzerland)读出发射波长在605nm下的数值;以标准溶液浓度为横坐标, ($F_0/F-1$)为纵坐标,绘制标准曲线,其中 F_0 为空白对照孔的平均荧光值, F 为磺胺标准液平均荧光值;

3、待测样品检测

1)样品提取液制备:准确称取待测样品2.0 g,18000 rpm匀浆,然后加入2.0 mL乙腈,涡旋震荡10 min,超声15min,5000 rpm离心5min;然后取上清液至离心管中,加入3 mL乙腈饱和和正己烷;手动震荡15~20s,5000 rpm离心5 min,取下层液体用0.22 μ m滤膜过滤得到样品提取液。

[0019] 2)用乙醇将酶标孔润洗3次,然后在每个酶标孔中依次加入50 μ L分子印迹-量子点纳米结构人工抗体溶液和150 μ L样品提取液;并设置空白对照酶标孔组,空白对照酶标孔组每孔加入150 μ L pH为8-10的磷酸盐缓冲液;

3)将酶标板室温育10 min,然后用酶标仪(Tecan, Switzerland)读出发射波长在

605nm下的数值,根据荧光值由标准曲线计算出样品提取液中磺胺类抗生素含量。

[0020] 二、特异性试验

对以磺胺嘧啶(SDZ)为模板分子合成的分子印迹-量子点纳米结构人工抗体,选择磺胺甲嘧啶(SM)、磺胺二甲基嘧啶(SMZ)、磺胺甲噁唑(SMX)和磺胺二甲氧嘧啶(SDM)、磺胺对甲氧基嘧啶(SME)作为结构类似物,对获得的M1P-QDs的特异性进行了分析,结果如图3所示,M1P-QDs的 K_{sv} 值大于N1P-QDs的 K_{sv} 值,且M1P-QDs对SDZ的 K_{sv} 远高于其结构类似物,表明M1P-QDs具有较好的特异印迹效果。进一步如图3所示,M1P-QDs对SDZ具有最高的印迹效果,表明获得的M1P-QDs对SDZ具有较好的特异性。

[0021] 三、灵敏度试验

将获得的分子印迹-量子点纳米结构人工抗体作为仿生抗体和荧光标记,对建立的仿生酶联免疫检测方法线性及灵敏度进行分析,结果表明,在0.005-15 mg/L浓度范围内,如图4所示,磺胺类抗生素荧光响应值与浓度之间具有较好的现行相关性,曲线标准方程: $y=0.1435x-0.017, R^2 = 0.9971$;检测限为0.79 $\mu\text{g/L}$ 。

[0022] 上述说明并非对本发明的限制,本发明也并不限于上述举例。本技术领域的普通技术人员在本发明的实质范围内,作出的变化、改型、添加或替换,也应属于本发明的保护范围,本发明的保护范围以权利要求书为准。

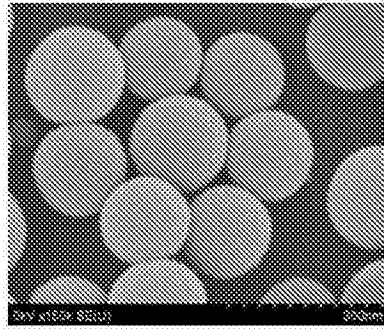


图1

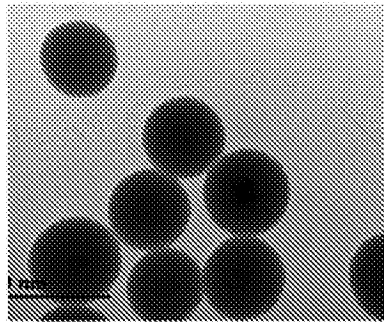


图2

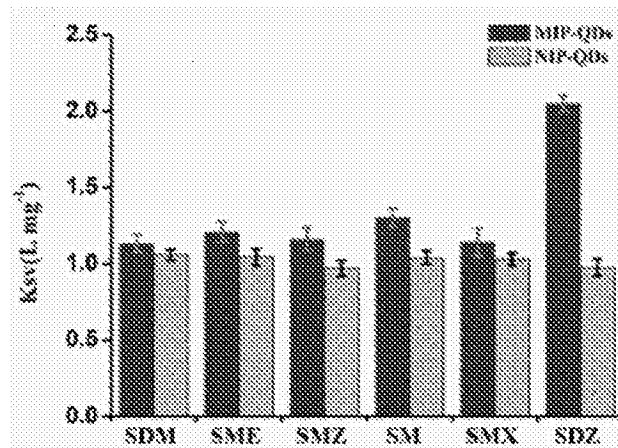


图3

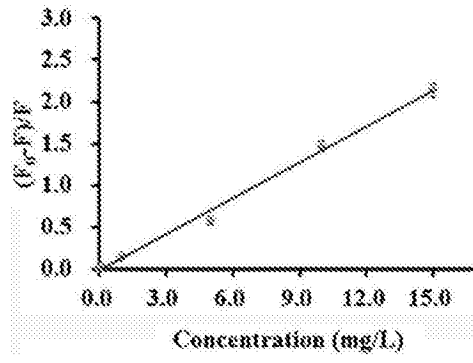


图4

专利名称(译)	一种快速测定磺胺类抗生素残留的仿生酶联免疫检测方法		
公开(公告)号	CN106872689A	公开(公告)日	2017-06-20
申请号	CN201710015266.7	申请日	2017-01-10
[标]申请(专利权)人(译)	宁波大学		
申请(专利权)人(译)	宁波大学		
当前申请(专利权)人(译)	宁波大学		
[标]发明人	史西志 丁浩 孙爱丽 李德祥 陈炯		
发明人	史西志 丁浩 孙爱丽 李德祥 陈炯		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/543		
代理人(译)	何仲		
其他公开文献	CN106872689B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种快速测定磺胺类抗生素残留的仿生酶联免疫检测方法，特点是包括以下步骤：（1）将环己烷和Triton X-100加入两口烧瓶中，磁力搅拌后依次加入量子点、正硅酸乙酯和氨水，磁力搅拌后加入模板分子溶液以及功能单体，室温下聚合反应后除去磺胺类抗生素，再分散于乙醇磷酸盐溶液中，得到分子印迹-量子点纳米结构人工抗体溶液；（2）在每个酶标孔中依次加入分子印迹-量子点纳米结构人工抗体溶液和样品提取液；将酶标板室温育10 min，然后用酶标仪读出发射波长在605nm下的数值，根据荧光值由标准曲线计算出样品提取液中磺胺类抗生素含量，优点是特异性强、灵敏度高、合成简单、稳定性好和检测时间短。

