



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107085096 B

(45)授权公告日 2019.02.12

(21)申请号 201710391578.8

CN 104059626 A,2014.09.24,

(22)申请日 2017.05.27

CN 102539780 A,2012.07.04,

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 102288749 A,2011.12.21,

申请公布号 CN 107085096 A

Laura Trapiella-Alfonso等.Development of a quantum dot-based fluorescent immunoassay for progesterone determination in bovine milk.《Biosensors and Bioelectronics》.2011,第26卷

(43)申请公布日 2017.08.22

(73)专利权人 山东农业大学

地址 271018 山东省泰安市岱宗大街61号

Francesc A. Esteve-Turrillas, Antonio Abad-Fuentes.Applications

(72)发明人 徐志祥 刘秋蕊 姜名获 徐龙华

of quantum dots as probes in immunosensing of small-sized analytes.《Biosensors and Bioelectronics》.2012,第41卷

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

审查员 毕秀华

(56)对比文件

CN 102520152 A,2012.06.27,

CN 102495204 A,2012.06.13,

CN 104330552 A,2015.02.04,

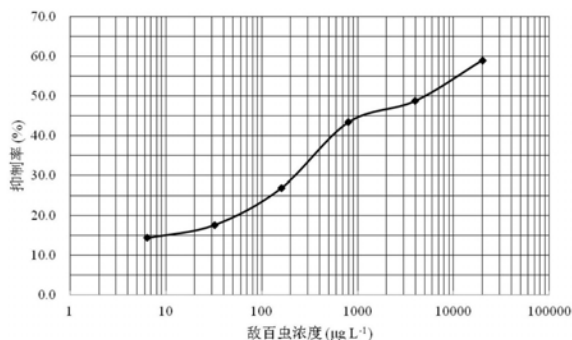
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

基于量子点标记敌百虫仿生免疫吸附检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种基于量子点标记的敌百虫快速检测方法,以量子点标记半抗原作为标记物;是以亲水性分子印迹聚合物膜作为仿生抗体,利用免疫吸附测定原理,建立对敌百虫具有广泛检测范围的快速灵敏检测方法。本发明将分子印迹技术与免疫技术联用建立对敌百虫具有高灵敏度的仿生免疫吸附检测方法,大大缩短了分析时间(比生物免疫分析缩短1.0h),适用于快速检测敌百虫。本发明成本低廉,灵敏度高,操作简单,可广泛应用于各种食品中敌百虫的检测。



1. 一种基于量子点标记的敌百虫仿生免疫吸附检测方法,其特征在于:步骤如下:

1) 以亲水性分子印迹聚合物膜作为仿生抗体,将量子点标记抗原用浓度为10%甲醇硼酸盐溶液稀释500倍作为量子点标记稀释液用于竞争反应;步骤如下:

将96孔酶标板第1行设为空白组,每孔只加200 μL 浓度10%甲醇硼酸盐溶液;第2行设为对照组,每孔加100 μL 量子点标记稀释液和100 μL 浓度10%甲醇硼酸盐溶液;第3-8行每孔均依次分别加入敌百虫标样梯度稀释液和100 μL 量子点标记物稀释液;室温竞争反应1 h,多功能酶标仪读取荧光值;

2) 样品中加入浓度10%甲醇硼酸盐溶液中超声提取3次,定容后用0.45 μm 滤膜过滤得样品提取液;将样品提取液代替步骤1)中所述的敌百虫标样梯度稀释液,重复步骤1)操作,计算出待测物中敌百虫含量;

所述量子点标记抗原采用如下方法制备:将敌百虫半抗原、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺和CdSe/ZnS氨基量子点按照200:4000:1~5的摩尔比例依次加入到反应容器中,充分混匀;加入50-100 μL pH 7.4的硼酸盐缓冲液,避光室温反应2-10 h;反应结束后,离心除团聚,将反应物超滤浓缩进行分离纯化得到量子点标记抗原,2-8 $^{\circ}\text{C}$ 下保存;

所述分子印迹聚合物膜的制备方法为:1.028 g敌百虫溶于8 mL水和12 mL乙腈,然后加入0.688 g甲基丙烯酸磁力搅拌30 min后加入1.508 mL二甲基丙烯酸乙二醇酯和0.08 g偶氮二异丁腈,磁力搅拌1 h;在96孔酶标板上每孔加入200 μL 上述混合溶液氮气环境下反应18 h;用7:1 v/v甲醇-醋酸溶液超声8 h除去敌百虫,再用浓度100%甲醇洗4 h至中性,37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥2 h后得到分子印迹聚合物膜。

基于量子点标记敌百虫仿生免疫吸附检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全检测技术领域,特别是一种基于量子点标记敌百虫仿生免疫吸附检测方法。

背景技术

[0002] 敌百虫(trichlorphon,0,0-二甲基-(2,2,2-三氯-1-羟基乙基)膦酸酯)是一种应用广泛地有机磷光谱杀虫剂,具有高效、低毒、低残留、水溶性好等特点,因此被广泛应用于农业生产。然而敌百虫在农药生产过程中的不合理施用,也带来了农药残留危害的问题,它对动物神经系统的损害以及致癌性和致突变性也越来越引起人们的重视。GB 16319-1996规定食品中敌百虫最大残留量不得高于 0.1mg Kg^{-1} 。

[0003] 目前国内外有关食品中敌百虫检测方法大都采用气相色谱法、高效液相色谱法或液相、气相色谱与质谱联用的方法进行定性、定量的检测,但上述几种检测方法所使用的设备价格昂贵,原材料消耗大,需要复杂样品前处理技术。而酶联免疫法虽然具有高灵敏度和低检出限,但是酶是大分子物质,以酶标记抗原影响抗体对其的吸附性,且生物抗体存在制备周期长,保存不当易失活等问题,影响其对敌百虫的检测。以量子点标记抗原,分子印迹聚合物作为仿生抗体,不但提高了方法的吸附性和灵敏度,而且印迹聚合物制备周期短,不存在失活问题,因此以量子点作为标记物,印迹聚合物作为仿生抗体,建立仿生免疫吸附检测技术,用于检测农产品及食品中的敌百虫,具有重要意义。本发明与现有免疫分析方面技术相比,创新点体现在用量子点代替酶建立仿生免疫分析,提高了仿生免疫分析的灵敏度。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服传统的敌百虫检测方法存在的灵敏度低、检测时间长、仪器价格昂贵、前处理烦琐等缺陷,提供了一种基于量子点标记敌百虫仿生免疫吸附检测方法。

[0005] 本发明采取的技术方案是:

[0006] 一种基于量子点标记敌百虫仿生免疫吸附检测方法,步骤如下:

[0007] 1.量子点标记抗原的制备:将敌百虫半抗原、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺和CdSe/ZnS氨基量子点按照200:4000:1~5的摩尔比例依次加入到反应容器中,充分混匀;加入50-100 μL pH 7.4的硼酸盐缓冲液,避光室温反应2-10h。反应结束后,离心除团聚,将反应物超滤浓缩进行分离纯化得到量子点标记抗原,2-8 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

[0008] 2.亲水性印迹聚合物膜的制备:将敌百虫,功能单体,交联剂按照1:2:2的摩尔比例混匀,96孔酶标板上每孔加入200 μL 反应液在氮气环境下聚合反应18h;用7:1(体积比v/v)甲醇-醋酸混合溶液超声8h除去敌百虫,再用浓度为100%甲醇清洗4h,37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥2h后得到亲水性分子印迹聚合物膜。

[0009] 3.以亲水性分子印迹聚合物膜作为仿生抗体,将所述量子点标记抗原用浓度为10%甲醇硼酸盐溶液稀释500倍作为量子点标记稀释液用于竞争反应,具体步骤如下:

[0010] 将96孔酶标板第1行设为空白组,每孔只加200 μ L浓度10%甲醇硼酸盐溶液;第2行设为对照组,每孔加100 μ L量子点标记稀释液和100 μ L浓度10%甲醇硼酸盐溶液;第3-8行每孔均依次分别加入敌百虫标样梯度稀释液和100 μ L量子点标记物稀释液;室温竞争反应1h,多功能酶标仪读取荧光值,计算抑制率,绘制敌百虫标准曲线。

[0011] 4.样品中加入浓度10%甲醇硼酸盐溶液中超声提取3次,定容后用0.45 μ m滤膜过滤得样品提取液。将样品提取液代替步骤3)中所述敌百虫标准溶液,重复步骤3)操作,计算出待测物中敌百虫含量。

[0012] 本发明的优点和积极效果是:

[0013] 1.本发明提供的量子点的光化学性质较好,具有光稳定性和生物相容性好,量子产率高等优点;该标记物为半导体纳米晶体,分子小,可代替传统的酶标记物应用于免疫技术,克服了传统酶联免疫标记物分子大,吸附性能差的缺点。

[0014] 2.本发明提供的敌百虫吸附功能材料具有较高的选择性,由化学方法制备,具有较高的稳定性、较长的使用寿命和较强的抗恶劣环境的能力,克服了生物抗体制备周期长,易失活等缺点。

[0015] 3.本发明将分子印迹技术与免疫技术联用建立对敌百虫具有高灵敏度的仿生免疫吸附检测方法(最低检出限比现有酶联免疫吸附检测法低),大大缩短了分析时间(比生物免疫分析缩短1.0h),适用于快速检测敌百虫。

[0016] 4.本发明成本低廉,前处理简单,灵敏度高,实验操作简单,适用于各种食品中敌百虫的快速检测。

[0017] 本发明与现在其他检测方法的比较:

[0018]

	本发明检测方法	酶联免疫吸附检测法	气-质联用检测法
样品前处理方法	PBS提取,过滤,不需要其他前处理。	甲醇提取,离心,过滤。	有机溶剂提取,氮吹后,丙酮复溶。
最低检出限	9 μ g L ⁻¹	17 μ g L ⁻¹	2 μ g L ⁻¹

附图说明

[0019] 图1为敌百虫仿生免疫标准曲线

[0020] 由图1可知,该方法的灵敏度(抑制率50%值)为5mg L⁻¹,最低检测限(抑制率15%值)为9 μ g L⁻¹。

具体实施方式

[0021] 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,不能以下述实施例来限定本发明的保护范围。

[0022] 本发明是将敌百虫分子印迹聚合物膜作为仿生抗体与酶联免疫技术联用,从而建立对敌百虫具有高灵敏度的快速检测方法。其具体实施例为:

[0023] 1.量子点标记抗原的制备:将16 μ L敌百虫半抗原(1mM)、32 μ L 1-乙基-3-(3-二甲

基氨基丙基)碳二亚胺(10mM)和10 μ L CdSe/ZnS氨基量子点(8 μ M)依次加入到反应容器中,充分混匀;加入70 μ L的硼酸盐缓冲液(pH 7.4),避光室温反应2h。反应结束后,离心除团聚,并将反应物超滤浓缩进行分离纯化,2-8 $^{\circ}$ C下保存。

[0024] 2.分子印迹聚合物膜的制备:1.028g(4mmol)敌百虫溶于8mL水和12mL乙腈,然后加入0.688g(8mmol)甲基丙烯酸(MAA)磁力搅拌30min后加入1.508mL(8mmol)二甲基丙烯酸乙二醇酯(EGDMA)和0.08g偶氮二异丁腈(AIBN),磁力搅拌1h。在96孔酶标板上每孔加入200 μ L上述混合溶液氮气环境下反应18h;用7:1(v/v)甲醇-醋酸溶液超声8h除去敌百虫,再用浓度100%甲醇洗4h至中性,37 $^{\circ}$ C干燥2h后得到分子印迹聚合物膜。

[0025] 3.以所述分子印迹聚合物膜作为仿生抗体,将所述量子点标记抗原用浓度10%甲醇硼酸盐溶液稀释500倍作为量子点标记稀释液用于竞争反应,具体步骤如下:

[0026] 将96孔酶标板第1行设为空白组,每孔只加200 μ L浓度10%甲醇硼酸盐溶液;第2行设为对照组,每孔加100 μ L量子点标记抗原稀释液和100 μ L浓度10%甲醇硼酸盐溶液;第3-8行每孔均依次分别加入100 μ L敌百虫标样梯度稀释液和100 μ L量子点标记抗原稀释液;室温竞争反应1h,多功能酶标仪读取荧光值,计算抑制率。

[0027] 4.配制浓度为20000,4000,800,160,32,6.4 μ g/L的敌百虫标样梯度稀释液。在室温竞争反应条件下,按照仿生免疫分析流程得到不同的荧光值,按照下列公式计算不同浓度敌百虫对抗原抗体结合反应的抑制率值:

$$[0028] \quad IC\% = \left[1 - \frac{F_{\text{样品}} - F_{\text{空白}}}{F_{\text{对照}} - F_{\text{空白}}} \right] \times 100$$

[0029] 式中:

[0030] IC%——敌百虫对抗原抗体结合反应的抑制率;

[0031] $F_{\text{对照}}$ ——对照孔平均荧光值;

[0032] $F_{\text{样品}}$ ——敌百虫标样梯度稀释液或样品提取液的平均荧光值(3-8行);

[0033] $F_{\text{空白}}$ ——空白孔的平均荧光值;

[0034] 以浓度为横坐标,抑制率为纵坐标,绘制敌百虫标准曲线。

[0035] 5.准确称取韭菜3g,加入15mL浓度10%甲醇硼酸盐溶液超声提取3次,合并提取液并定容到50mL,0.45 μ m滤膜过滤。将得到的样品提取液代替敌百虫标样梯度稀释液,重复步骤3)操作,得到样品提取液的荧光值,根据上述公式计算得出韭菜提取液抑制率为25.9%。根据敌百虫仿生免疫标准曲线求出敌百虫提取液浓度140 μ g L $^{-1}$,计算出韭菜中敌百虫含量为2.3mg kg $^{-1}$ 。

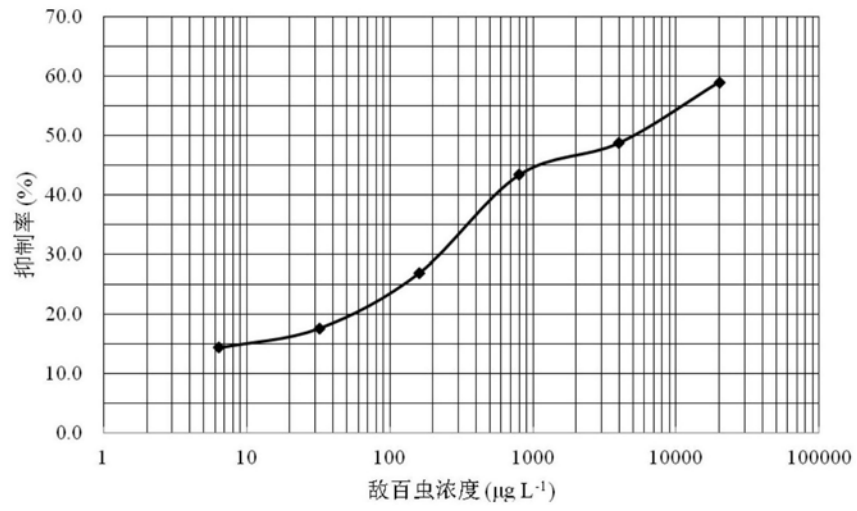


图1

专利名称(译)	基于量子点标记敌百虫仿生免疫吸附检测方法		
公开(公告)号	CN107085096B	公开(公告)日	2019-02-12
申请号	CN2017110391578.8	申请日	2017-05-27
[标]申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
[标]发明人	徐志祥 刘秋蕊 姜名荻 徐龙华		
发明人	徐志祥 刘秋蕊 姜名荻 徐龙华		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/532		
其他公开文献	CN107085096A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于量子点标记的敌百虫快速检测方法，以量子点标记半抗原作为标记物；是以亲水性分子印迹聚合物膜作为仿生抗体，利用免疫吸附测定原理，建立对敌百虫具有广泛检测范围的快速灵敏检测方法。本发明将分子印迹技术与免疫技术联用建立对敌百虫具有高灵敏度的仿生免疫吸附检测方法，大大缩短了分析时间(比生物免疫分析缩短1.0 h)，适用于快速检测敌百虫。本发明成本低廉，灵敏度高，实验操作简单，可广泛应用于各种食品中敌百虫的检测。

