



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107202881 A

(43)申请公布日 2017.09.26

(21)申请号 201710391582.4

(22)申请日 2017.05.27

(71)申请人 山东农业大学

地址 271018 山东省泰安市岱宗大街61号

(72)发明人 徐志祥 姜名获 孔非凡 乔旭光

(51)Int.Cl.

G01N 33/561(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

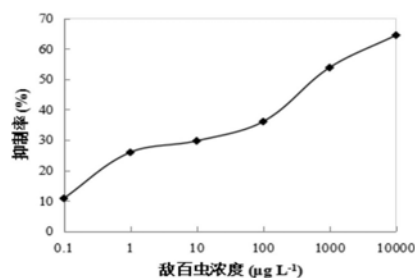
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

量子点标记仿生免疫分析-毛细管电泳检测敌百虫方法

(57)摘要

本发明涉及一种量子点标记仿生免疫分析-毛细管电泳检测敌百虫方法,是以分子印迹聚合物作为仿生抗体,量子点作为标记物;使用pH 7.4的硼酸盐溶液将量子点标记半抗原稀释300-1000倍,取1-5mL稀释后的量子点标记半抗原与2-5mL敌百虫标样梯度稀释液混合,然后加入5-10mg的分子印迹聚合物颗粒,在室温下搅拌60-100min;5000r/min离心20min,0.22 μm滤膜过滤后毛细管电泳检测;根据毛细管电泳峰面积计算抑制率,绘制敌百虫标准曲线;将样品提取液代替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。本发明使用的标记物量子点结构较小,能够促进竞争反应,因而提高了检测方法的灵敏度。



1. 一种量子点标记仿生免疫分析-毛细管电泳检测敌百虫方法,其特征在于是以分子印迹聚合物作为仿生抗体,量子点作为标记物;具体步骤如下:

使用pH 7.4的硼酸盐溶液将量子点标记半抗原稀释300-1000倍,取1-5mL稀释后的量子点标记半抗原与2-5mL敌百虫标样梯度稀释液混合,然后加入5-10mg的分子印迹聚合物颗粒,在室温下搅拌60-100min;5000r/min离心20min,0.22 μ m滤膜过滤后毛细管电泳检测;根据毛细管电泳峰面积计算抑制率,绘制敌百虫标准曲线。

2. 如权利要求1所述的一种量子点标记仿生免疫分析-毛细管电泳检测敌百虫方法,其特征在于将样品提取液代替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。

3. 如权利要求1所述的一种量子点标记仿生免疫分析-毛细管电泳检测敌百虫方法,其特征在于所述量子点标记半抗原的制备方法为:将敌百虫半抗原、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺和硒化镉/硫化锌氨基量子点按照200:4000:1-5的摩尔比例依次加入到反应容器中,充分混匀;再加入50-100 μ L pH 7.4的硼酸盐缓冲液,室温反应2-10h;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得到量子点标记半抗原。

量子点标记仿生免疫分析-毛细管电泳检测敌百虫方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种量子点标记仿生免疫分析-毛细管电泳检测敌百虫方法,属于食品安全检测技术领域,特别是一种敌百虫的快速灵敏检测方法。

背景技术

[0002] 敌百虫被广泛用于植物病虫害的防治,它很容易通过皮肤和呼吸道进入人体内。近年来,敌百虫因其高毒性和潜在的致癌特性而受到世界各国的广泛关注。GB 16319-1996规定食品中敌百虫最大残留量不得高于0.1mg/kg。

[0003] 目前国内外关于食品中敌百虫含量检测的报道有很多,包括:气相色谱;高效液相色谱;液、气相色谱与质谱联用;毛细管电泳激光诱导荧光和电化学检测方法等,但上述几种检测方法均需要昂贵的仪器和较长的分析时间。仪器检测所使用的设备价格昂贵,通常还需要复杂样品前处理技术,费时费力;酶联免疫法虽然具有高灵敏度和低检出限,但对敌百虫等小分子物质,特异性强的生物抗体制备困难,并且保存不当容易失活。分子印迹聚合物作为仿生抗体,具有选择性高,制备周期短,不失活易保存等优点,因此作为人工抗体应用于酶联免疫分析,建立仿生免疫吸附检测技术成为研究的热点。然而由于酶的复杂结构和易变的特性,导致以酶作为标记物的仿生酶联免疫检测方法的灵敏度相对较低。因此,用结构较小的纳米级粒子量子点作为标记物,以具有高效分离作用的毛细管电泳仪作为检测器建立新型仿生免疫检测方法(量子点标记仿生免疫分析-毛细管电泳方法未见报道),用于检测农产品及食品中的敌百虫,具有重要意义。

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检测时间长、仪器价格昂贵、灵敏度低等缺陷,提供一种量子点标记仿生免疫分析-毛细管电泳检测敌百虫方法。

[0005] 本发明采取的技术方案是:

[0006] 一种量子点标记仿生免疫分析-毛细管电泳检测敌百虫方法,包括以下步骤:

[0007] 1.量子点标记半抗原的合成:将敌百虫半抗原、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺和硒化镉/硫化锌(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;再加入50~100 μ L pH 7.4的硼酸盐缓冲液,室温反应2~10h。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得到量子点标记半抗原;量子点标记半抗原2-8 $^{\circ}$ C下保存。

[0008] 2.使用pH 7.4的硼酸盐溶液将步骤1)得到的量子点标记半抗原稀释300~1000倍,取1~5mL稀释后的量子点标记半抗原与2~5mL敌百虫标样梯度稀释液,然后加入5~10mg的分子印迹聚合物颗粒,在室温下搅拌60~100min;5000r/min离心20min后,0.22 μ m滤膜过滤后毛细管电泳检测;根据毛细管电泳峰面积计算抑制率,绘制敌百虫标准曲线。

[0009] 3.准确称取1~3g蔬菜样品,加入10~15mL的超纯水超声提取3次,0.22 μ m滤膜过滤得样品提取液;将样品提取液代替步骤2)中所述敌百虫标准溶液,重复步骤2)操作,计算

出待测物中敌百虫含量。

[0010] 本发明所使用的分子印迹聚合物颗粒根据孟玲(山东农业大学硕士学位论文),名称为“基于分子印迹技术的敌百虫新型检测方法研究”制备得到。具体为:

[0011] 将0.257g敌百虫和0.172g甲基丙烯酸(MAA)溶于3mL氯仿中,磁力搅拌30min;加入0.754mL二甲基丙烯酸乙二醇酯(EGDMA)和20mg偶氮二异丁腈(AIBN),超声15min,充氮气后58℃水浴18h;合成的聚合物研磨后,用甲醇/冰乙酸(9:1,v/v体积比)连续洗脱24h去除敌百虫,再用甲醇洗至中性,60℃真空干燥12h后得分子印迹聚合物颗粒。

[0012] 本发明的优点和积极效果是:

[0013] 1.本发明使用的标记物量子点结构较小,能够促进竞争反应,因而提高了检测方法的灵敏度(最低检出限低于酶联免疫和气相色谱)。

[0014] 2.本发明将仿生免疫技术与毛细管电泳检测方法联用,大大缩短了分析时间,并有效降低了敌百虫的检测限,适用于快速检测敌百虫。

[0015] 3.本发明使用分子印迹聚合物作为仿生抗体,可重复使用多次,大大降低了成本,且实验操作简单,分析流程短,灵敏度高且检测限低,适用于各种食品中敌百虫的快速检测。

[0016] 本发明与现有其他检测方法的比较:

[0017]

	本发明检测方法	酶联免疫法	气相检测法
样品前处理方法	超纯水提取,过滤,不需要其他前处理	PBS提取,离心,过滤	有机溶剂提取,氮吹后用丙酮复溶
最低检出限	0.35 $\mu\text{g/L}$	65 $\mu\text{g/kg}$	10 $\mu\text{g/kg}$

附图说明

[0018] 图1为敌百虫QD-BI-CE标准曲线

[0019] 由图1可知,本发明的灵敏度(抑制率50%值)为0.81mg/L,最低检测限(抑制率15%值)为0.35 $\mu\text{g/L}$ 。

具体实施方式

[0020] 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。

[0021] 本发明是将仿生免疫技术与毛细管电泳检测方法联用,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:

[0022] 1.量子点标记半抗原的合成:将16 μL 敌百虫半抗原(1mM)、32 μL 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(10mM)和10 μL 氨基量子点(8 μM)依次加入到反应容器中,充分混匀;加入72 μL pH 7.4的硼酸盐缓冲液,避光室温反应2h;反应结束后,离心(8000r/min)除团聚,并将反应物超滤浓缩进行分离纯化得到量子点标记半抗原;量子点标记半抗原在2-8℃下保存。

[0023] 2.将0.257g敌百虫和0.172g甲基丙烯酸(MAA)溶于3mL氯仿中,磁力搅拌30min;加

入0.754mL二甲基丙烯酸乙二醇酯 (EGDMA) 和20mg偶氮二异丁腈 (AIBN), 超声15min, 充氮气后58℃水浴18h; 合成的聚合物研磨后, 用甲醇/冰乙酸 (9:1, v/v 体积比) 连续洗脱24h去除敌百虫, 再用甲醇洗至中性, 60℃真空干燥12h后得分子印迹聚合物颗粒。

[0024] 3. 以分子印迹聚合物颗粒作为仿生抗体, 仿生免疫分析-毛细管电泳方法流程如下: 5mL量子点标记半抗原 (用pH值7.4的硼酸盐溶液稀释至1:300) 与5mL敌百虫标准溶液, 然后加入5mg的分子印迹聚合物颗粒, 室温下搅拌80min; 5000r/min离心20min, 0.22μm滤膜过滤后毛细管电泳检测。

[0025] 4. 分别配制浓度为10000, 1000, 100, 10, 1, 0.1μg/L的敌百虫标准溶液, 按照毛细管电泳-仿生免疫分析方法流程得到一系列不同的峰面积, 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:

$$[0026] \quad IC\% = \left[1 - \frac{S_{\text{样品总}} - S_{\text{样品未反应}}}{S_{\text{对照总}} - S_{\text{对照未反应}}} \right] \times 100$$

[0027] 式中:

[0028] IC%——敌百虫对抗原抗体结合反应的抑制率;

[0029] $S_{\text{样品总}}$ —5mL (一定浓度) 敌百虫标准溶液与5mL量子点标记半抗原 (1/300) 混合后进毛细管电泳, 量子点标记半抗原的峰面积;

[0030] $S_{\text{样品未反应}}$ —5mL (一定浓度) 敌百虫标准溶液与5mL量子点标记半抗原 (1/300) 与5mg仿生抗体反应, 达到平衡后, 离心取上清液进毛细管分析后, 量子点标记半抗原的峰面积;

[0031] $S_{\text{对照总}}$ —5mL超纯水与5mL量子点标记半抗原 (1/300) 混合后进毛细管电泳, 量子点标记半抗原的峰面积;

[0032] $S_{\text{对照未反应}}$ —5mL超纯水与5mL量子点标记半抗原 (1/300) 与5mg仿生抗体反应, 达到平衡后, 离心取上清液进毛细管分析后, 量子点标记半抗原的峰面积;

[0033] 以敌百虫标准溶液浓度为横坐标, 抑制率为纵坐标, 绘制标准曲线。

[0034] 5. 分别称取油菜和韭菜各1g, 切碎, 加入10mL超纯水超声提取3次, 提取液定容至50mL, 0.22μm滤膜过滤得到样品提取液。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, 根据上述公式计算得出油菜和韭菜提取液的抑制率分别为18.34%和29.66%, 从而计算出所测油菜和韭菜中敌百虫含量分别为0.0274mg/kg和0.507mg/kg。

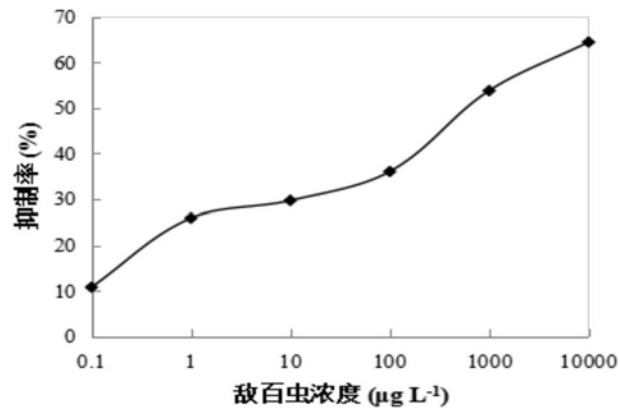


图1

专利名称(译)	量子点标记仿生免疫分析-毛细管电泳检测敌百虫方法		
公开(公告)号	CN107202881A	公开(公告)日	2017-09-26
申请号	CN201710391582.4	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 姜名荻 孔非凡 乔旭光		
发明人	徐志祥 姜名荻 孔非凡 乔旭光		
IPC分类号	G01N33/561 G01N33/58 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/561 G01N33/588		
其他公开文献	CN107202881B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种量子点标记仿生免疫分析-毛细管电泳检测敌百虫方法，是以分子印迹聚合物作为仿生抗体，量子点作为标记物；使用pH 7.4的硼酸盐溶液将量子点标记半抗原稀释300-1000倍，取1-5mL稀释后的量子点标记半抗原与2-5mL敌百虫标样梯度稀释液混合，然后加入5-10mg的分子印迹聚合物颗粒，在室温下搅拌60-100min；5000r/min离心20min，0.22μm滤膜过滤后毛细管电泳检测；根据毛细管电泳峰面积计算抑制率，绘制敌百虫标准曲线；将样品提取液代替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。本发明使用的标记物量子点结构较小，能够促进竞争反应，因而提高了检测方法的灵敏度。

