



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110887964 A

(43)申请公布日 2020.03.17

(21)申请号 201911081355.7

(22)申请日 2019.11.07

(71)申请人 西北农林科技大学

地址 712100 陕西省西安市杨凌示范区邠
城路3号

(72)发明人 王丽 贾珮 补彤 李睿 孙新玉
刘英男

(74)专利代理机构 西安恒泰知识产权代理事务
所 61216

代理人 孙雅静

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/551(2006.01)

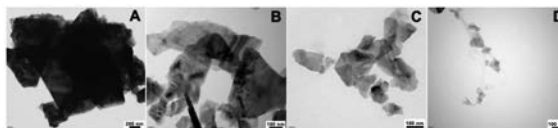
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种灵敏探针、检测四环素的方法及应用

(57)摘要

本发明公开了一种灵敏探针、检测四环素的方法及应用,包括信号载体和四环素单克隆抗体,信号载体为二硫化钼纳米片,所述的二硫化钼纳米片的粒径为450~550nm、200~300nm和40~60nm。本发明在免疫检测中将二维二硫化钼纳米片作为信号载体以构建探针,控制非常有限量的抗体是提高灵敏度的关键,二硫化钼比表面积大,表面易于修饰官能团,吸附能力强,生物相容性良好,用较少量的抗体标记二硫化钼作为检测探针,实现高灵敏目标物检测,裸眼检测限可低至0.023ng/mL,与传统金标试纸条的灵敏度相比,至少提高100倍,能成功应用于牛奶、蜂蜜和牛肉样品中的四环素检测。



1. 一种灵敏探针, 其特征在于, 包括信号载体和四环素单克隆抗体, 信号载体为二硫化钼纳米片, 所述的二硫化钼纳米片的粒径为450~550nm、200~300nm和40~60nm。

2. 如权利要求1所述的灵敏探针, 其特征在于, 所述的灵敏探针的制备方法包括以二硫化钼纳米片为信号载体, 加入四环素单克隆抗体即得。

3. 如权利要求1或2所述的灵敏探针, 其特征在于, 制备该灵敏探针的方法包括:

(1) 制备二硫化钼纳米片: 将含有二硫化钼和胆酸钠的混合水溶液超声处理, 采用差速区带离心法进行分级处理即得;

(2) 制备灵敏探针: 将四环素单克隆抗体加入步骤(1)中的二硫化钼纳米片溶液中混合反应, 离心制得。

4. 如权利要求3所述的灵敏探针, 其特征在于, 所述的步骤(1)中, 二硫化钼和胆酸钠的浓度比为1: (0.2~0.4)。

5. 如权利要求3所述的灵敏探针, 其特征在于, 所述的步骤(2)中, 二硫化钼纳米片与四环素单克隆抗体的浓度比为1:0.001~0.003, 二硫化钼纳米片与四环素单克隆抗体混合震荡30~60分钟, 再加入100 μ L的10%牛血清蛋白反应30分钟, 封闭2~2.5小时。

6. 一种检测四环素的方法, 其特征在于, 包括将试纸条浸入含有权利要求1~5任一权利要求所述的灵敏探针中进行检测。

7. 如权利要求6所述的检测四环素的方法, 其特征在于, 所述的试纸条包括衬板, 衬板上贴有硝酸纤维素膜, 硝酸纤维素膜的一端覆盖吸水垫, 另一端依次覆盖样品垫和结合垫, 硝酸纤维素膜的非覆盖面上沿横向设置检测线和质控线; 所述检测线上喷涂有四环素-牛血清白蛋白偶联物, 所述质控线上喷涂有羊抗鼠免疫球蛋白。

8. 如权利要求7所述的检测四环素的方法, 其特征在于, 检测线上喷涂有四环素-牛血清白蛋白偶联物的制备方法包括: 1mg/mL四环素-牛血清白蛋白偶联物溶液以1 μ L/cm的划线速率喷涂在检测线上得检测线;

质控线上喷涂有羊抗鼠免疫球蛋白的制备方法包括: 1mg/mL羊抗鼠单克隆抗体包被溶液以1 μ L/cm的速度喷涂于硝酸纤维素膜上形成质控线, 检测线和质控线之间的距离为5mm。

9. 权利要求1-5任一权利要求所述的灵敏探针用于检测牛奶、蜂蜜或牛肉中的四环素。

10. 权利要求6-8任一权利要求所述的检测四环素的方法用于检测牛奶、蜂蜜或牛肉中的四环素。

一种灵敏探针、检测四环素的方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,涉及一种灵敏探针、四环素的检测方法及应用,具体涉及一种用二硫化钼纳米片作为信号载体并标记单克隆抗体的灵敏探针,与试纸条共同快速检测四环素类抗生素及应用。

背景技术

[0002] 四环素等抗生素的过量使用在肉制品和海鲜产品中已造成了严重的药物残留,成为危害人类身体健康的食品安全隐患,目前,国内外对四环素进行定性、定量检测比较经典的方法有液相色谱-质谱/质谱法(LC-MS/MS)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、高效液相色谱法(HPLC),这些方法虽然准确性高,但仪器价格昂贵,且前处理过程复杂,分析速度慢,专业性要求较高,不适用于大批量样品或现场快速检测。此外,还有常用的酶联免疫法(ELISA),化学发光法。酶联免疫法可以一次性处理多个样品,灵敏度高但需要操作者具有较高的专业知识,不利于普及使用。化学发光法容易实现自动化,但对环境要求较高不利于现场使用。

[0003] 与之相比,免疫层析法稳定性好、操作简单、无需其它仪器设备且检测速度快、结果直观可靠,适用于现场快速检测。然而,传统的基于胶体金的试纸条,其低灵敏度仍然阻碍了它们的广泛应用,特别是在痕量分析中。

发明内容

[0004] 针对现有技术中的缺陷和不足,本发明为解决免疫层析检测低灵敏度的技术问题,提供一种灵敏探针、四环素的检测方法及应用。

[0005] 为了达到上述目的,本发明采取的技术方案包括:

[0006] 一种灵敏探针,包括信号载体和四环素单克隆抗体,信号载体为二硫化钼纳米片,所述的二硫化钼纳米片的粒径为450~550nm、200~300nm和40~60nm。

[0007] 具体地,所述的灵敏探针的制备方法包括以二硫化钼纳米片为信号载体,加入四环素单克隆抗体即得。

[0008] 进一步地,制备该灵敏探针的方法包括:

[0009] (1) 制备二硫化钼纳米片:将含有二硫化钼和胆酸钠的混合水溶液超声处理,采用差速区带离心法进行分级处理即得;

[0010] (2) 制备灵敏探针:将四环素单克隆抗体加入步骤(1)中的二硫化钼纳米片溶液中混合反应,离心制得。

[0011] 进一步地,所述的步骤(1)中,二硫化钼和胆酸钠的浓度比为1:(0.2~0.4)。

[0012] 进一步地,所述的步骤(2)中,二硫化钼纳米片与四环素单克隆抗体的浓度比为1:0.001~0.003,二硫化钼纳米片与四环素单克隆抗体混合震荡30~60分钟,再加入100μL的10%牛血清蛋白反应30分钟,封闭2~2.5小时。

[0013] 一种检测四环素的方法,包括将试纸条浸入含有本发明所述的灵敏探针中进行检

测。

[0014] 进一步地,所述的试纸条包括衬板,衬板上贴有硝酸纤维素膜,硝酸纤维素膜的一端覆盖吸水垫,另一端依次覆盖样品垫和结合垫,硝酸纤维素膜的非覆盖面上沿横向设置检测线和质控线;所述检测线上喷涂有四环素-牛血清白蛋白偶联物,所述质控线上喷涂有羊抗鼠免疫球蛋白。

[0015] 进一步地,检测线上喷涂有四环素-牛血清白蛋白偶联物的制备方法包括:1mg/mL四环素-牛血清白蛋白偶联物溶液以1 μ L/cm的划线速率喷涂在检测线上得检测线;

[0016] 质控线上喷涂有羊抗鼠免疫球蛋白的制备方法包括:1mg/mL羊抗鼠单克隆抗体包被溶液以1 μ L/cm的速度喷涂于硝酸纤维素膜上形成质控线,检测线和质控线之间的距离为5mm。

[0017] 本发明所述的灵敏探针用于检测牛奶、蜂蜜或牛肉中的四环素。

[0018] 本发明所述的检测四环素的方法用于检测牛奶、蜂蜜或牛肉中的四环素。

[0019] 与现有技术相比,其优点与积极效果在于:

[0020] (1)首次在免疫检测中将二维二硫化钼纳米片作为信号载体以构建探针,控制非常有限量的抗体是提高灵敏度的关键,这项工作为牛奶、蜂蜜和牛肉的实际样品检测四环素类抗生素开发了便宜,灵敏,便携和快速读出的分析系统;

[0021] (2)本发明中制备的二硫化钼比表面积大,表面易于修饰官能团,吸附能力强,生物相容性良好,用较少量的抗体标记二硫化钼作为检测探针,实现高灵敏目标物检测,裸眼检测限可低至0.023ng/mL,与传统金标试纸条的灵敏度相比,至少提高100倍,还具有好的特异性,整个过程在11分钟内完成,并且能成功应用于牛奶、蜂蜜和牛肉样品检测,说明食品基质对于该试纸条几乎没有影响。这种新颖的基于二维材料的纳米探针在检测抗生素残留方面显示出了巨大的应用潜力。

附图说明

[0022] 图1为本发明制备的二硫化钼纳米片信号载体的透射电镜表征图;

[0023] 图2为本发明制备分级二硫化钼纳米片信号载体的示意图;

[0024] 图3为本发明的快速检测四环素的免疫层析试纸条组装示意图;

[0025] 图4为实施例3中1)的结果图;

[0026] 图5为实施例3中2)的结果图;

[0027] 图6为实施例4的结果图;

[0028] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步的详细说明。

具体实施方式

[0029] 本发明为了解决免疫层析检测低灵敏度的这个问题,构建了一个新型的二维信号载体,在保证信号物强度的同时,降低了抗体用量,从而提高分析系统的灵敏度,这对于监控动物源性食品中的四环素类抗生素具有很重要的意义和应用价值。为了获得最佳的测定性能,发明人挑选了最适合作为信号载体的纳米材料,研究了信号载体偶联抗体的最佳制备方法,并确定了最优的分析条件。最终制得的试纸条用于检测四环素(TET),特别是对牛奶、蜂蜜和牛肉中的四环素的检测应用,具有可靠、灵敏、稳定、便携、快速和操作简单的特

点。

[0030] 作为新型信号载体,二硫化钼纳米片不仅具有适当的尺寸,良好的均匀性,分散性和稳定性,而且具备独特的生物相容性,吸附能力强,所以赋予了它超高的生物分子负载能力。与碳纳米管、二氧化锰纳米花和金属有机骨架等材料相比,合成不受严苛的条件限制,而且化学性质稳定,与抗体的结合方法简单。本发明利用超声辅助液相剥离法合成二硫化钼纳米片,差速区带离心法(DZC)可以将不同大小的纳米片加以区分,较大的颗粒会比较小的颗粒更快地沉降,这样就可以把剥离的 MoS_2 纳米片按照大小区分,得到更均一的产物。

[0031] 制备该灵敏探针的方法包括:

[0032] (1) 制备二硫化钼纳米片:将含有二硫化钼和胆酸钠的混合水溶液超声处理,采用差速区带离心法进行分级处理即得;二硫化钼和胆酸钠的浓度比为1:(0.2~0.4);

[0033] (2) 制备灵敏探针:将四环素单克隆抗体加入步骤(1)中的二硫化钼纳米片溶液中混合,反应离心制得。二硫化钼纳米片与四环素单克隆抗体的浓度比为1:(0.001~0.003),二硫化钼纳米片与四环素单克隆抗体混合震荡30~60分钟,再加入100 μL 的10%牛血清蛋白反应30分钟,封闭2~2.5小时。

[0034] 本发明的工作原理为:非蛋白质小分子化合物的免疫测定是基于竞争原理,即样品中的分析物与固定在检测线上的抗原竞争结合信号标记的抗体。测试区域的颜色强度取决于信号材料的积累。在检测过程中,随着样品中四环素浓度增加,更多探针的结合位点被四环素占据,导致与检测线上抗原结合的探针数量减少,从而检测线逐渐褪色,直到完全消失。无论样品中四环素浓度如何,过量的探针都会与控制线上的羊抗鼠免疫球蛋白结合,使得控制线总是显色。我们构建的探针,满足了强信号标记极其有限的抗体,因此在相同的信号材料显色效果下,本发明的探针需要更少的抗体,对于竞争性免疫测定,这是提高灵敏度的关键。当检测到弱阳性样品时,普通的金标抗体探针没有被完全竞争,剩余的可以被检测线上的抗原结合,显示出红色呈阴性结果,表现为阴性测试结果。本发明的试纸条,较少抗体很容易被分析物充分结合,在检测线上没有信号显示,代表阳性结果。这表明该探针的灵敏度会远远优于传统探针试纸条的灵敏度。

[0035] 差速区带离心法:事先在离心管中用某种低分子溶质调配好密度梯度,在密度梯度之上加待处理的料液后进行离心操作。差速区带离心的密度梯度中的最大密度小于待分离的目标产物的密度,离心操作中,料液中的各种组分在密度梯度中以不同的速度沉降,根据各组分沉降系数的差别,形成各自的区带。经过一定时间后,从离心管中分别汲取不同的区带,得到纯化的各个组分。

[0036] 本发明的免疫层析试纸条由五部分构成,依次将硝酸纤维素膜、样品垫、结合垫和吸收垫贴至衬板上,其中硝酸纤维素上划线包被有四环素-牛血清白蛋白偶联物(TET-BSA)和羊抗鼠免疫球蛋白(IgG)分别做检测线(T)和控制线(C)。

[0037] 本发明中所用的实验试剂均为市售所得,并未做进一步处理,检测仪器设备等均为常用的仪器。

[0038] 实施例1:

[0039] 遵从上述技术方案,本实施例给出灵敏探针 $\text{MoS}_2\text{-Abs}$ 及制备方法,包括将二硫化钼纳米片作为信号载体,与四环素单克隆抗体结合成灵敏探针,具体包括以下步骤:

[0040] (1) 信号载体的制备

[0041] 将含有2g MoS₂粉末和0.6g胆酸钠的400mL混合水溶液在室温下超声处理20h,超声波产生空化气泡,有助于高能射流,破坏块状晶体,形成墨绿色的分散溶液。MoS₂晶体纵向剥离成2D薄纳米片,稳定分散在表面活性剂溶液中。

[0042] 利用差速区带离心途径可以将MoS₂的尺寸分级并且除去活性剂。分级后的MoS₂尺寸分别为:450~550nm (L-MoS₂)、200~300nm (M-MoS₂) 和40~60nm (S-MoS₂),透射电镜结果见图1,A为块状MoS₂,B为L-MoS₂,C为M-MoS₂,D为S-MoS₂。

[0043] 差速区带离心的具体步骤如下,将20mL超声剥离的灰绿色MoS₂纳米片溶液低速离心30min,然后收集18mL墨绿色的上清液以除去大尺寸纳米片。将上清液以中速离心30min并收集沉淀物实现尺寸筛选。为了更加完全的除去表面活性剂,将沉淀物重悬高速离心,超声分散在纯水中,并在12000rpm下离心20min,收集沉淀分散在确定体积的超纯水中以制备纯层状MoS₂水溶液。就L-MoS₂样品而言,低速和中速分别为1500和3000rpm。对于M-MoS₂样品,低速和中速分别为3000和6000rpm。对于S-MoS₂样品,低速和中速分别为6000和12000rpm。操作流程见图2。

[0044] (2) 信号载体偶联抗体

[0045] 将2μL的1mg/mL四环素抗体加入到步骤1中的1mL MoS₂ (1mg/mL) 溶液中震荡30min,使四环素抗体与载体结合,然后把100μL的10%牛血清蛋白滴入MoS₂混合物中混匀反应30min,然后4℃静置2h以封闭MoS₂表面上的多余位点。再将复合物以10000rpm离心30min,除去过量的BSA,并用去离子水洗涤三次以收集纯化的MoS₂-Abs,即得3种不同尺寸的灵敏探针。最后获得的沉淀物分散在去离子水中,在4℃下储存以保持稳定性和生物活性备用。

[0046] 下述实施例2-4使用的检测四环素的探针为实施例1制备得到的。

[0047] 实施例2:快速检测四环素类抗生素的免疫层析试纸条的制备

[0048] 快速检测四环素的高灵敏度免疫层析试纸条的制备方法,包括以下步骤:

[0049] 免疫层析试纸条传感器由五部分组成,包括衬板,硝化纤维(NC)膜,结合垫,样品垫和吸收垫。首先,将由玻璃纤维制成的结合垫和样品垫浸泡在2%牛血清蛋白中,以封闭微孔,并在37℃下干燥过夜。接下来,然后将1mg/mL抗原(TET-BSA四环素-牛血清白蛋白偶联物)和1mg/mL羊抗鼠免疫球蛋白分别以1μL/cm的划线速率涂覆在NC膜上作为检测(T)线和控制(C)线,检测(T)线与控制(C)线之间的距离为5mm。将NC膜、结合垫、样品垫和吸收垫依次连接到衬板上,重叠1-2mm,见图3。最后将组装的条板切成试纸,然后在干燥器中室温条件下储存直至使用。

[0050] 实施例3:快速检测四环素的免疫层析试纸条的性能评价

[0051] 如上所述的快速检测四环素的免疫层析试纸条的性能评价:

[0052] (1) 灵敏度测定

[0053] 将四环素溶于去离子水中,连续稀释使其为0.012~3ng/mL范围内不同浓度的测试溶液,去离子水为空白对照。将试纸条的样品垫浸入含有MoS₂-Abs探针的100μL测试溶液中,免疫层析之后,在11min内观察可视结果。对于灵敏度评估,这些标准溶液分别通过普通试纸条和新开发的试纸条检测。当通过肉眼观察到T线明显比阴性对照条浅时,相应的最小四环素浓度定义为视觉检测限(VDL),当T线完全消失时,考虑相应的最小浓度作为阈值浓度。

[0054] 检测结果见图4,溶液中四环素含量较低时,在试纸条上可清晰地观察到色带,并且随着四环素浓度的增加,T线的强度逐渐下降。对于L-MoS₂来说,在0.023ng/mL的浓度下可以观察到T线上颜色开始变浅,0.75ng/mL处消线。通过使用试纸条读数器记录在T线处条带的光强度来进一步证实相应的结果,在0.012到0.75ng/mL范围之间呈现出良好的线性关系 ($R^2=0.974$),裸眼视觉检测限达到0.023ng/mL。M-MoS₂在1.5ng/mL处消线,视觉检测限为0.047ng/mL;S-MoS₂在1.5ng/mL处消线,视觉检测限为0.094ng/mL。将传统的金标试纸条用于检测四环素,裸眼视觉检测限为3ng/mL,结果表明MoS₂构建的免疫层析试纸条在灵敏度方面远远优于传统的金标方法。

[0055] (2) 特异性测定

[0056] 使用金霉素 (CTE)、土霉素 (OXY)、头孢曲松钠 (CTR)、阿奇霉素 (AZM)、氟苯尼考 (FF)、链霉素 (STR)、新霉素 (NEO)、氨苄青霉素 (AMP)、阿莫西林 (AML)、红霉素 (EM) 和卡那霉素 (KM) 作为干扰物质测试评估特异性,它们的终浓度设定为100ng/mL,远远大于TET的终浓度1.5ng/mL。所有实验重复三次进行。

[0057] 检测结果见图5,除了四环素类抗生素之外,其它抗生素在T线不能消线。该优异的结果归因于对目标物具有良好特异性识别功能的抗体。说明该发明能高度特异性检测四环素类抗生素。

[0058] 实施例4:快速检测四环素的免疫层析试纸条的应用

[0059] 如上所述的快速检测四环素的L-MoS₂免疫层析试纸条的应用,

[0060] 牛奶、蜂蜜和牛肉作为实际样品。在样品中分别加入四环素,以达到3至0.012ng/mL (或ng/g) 的连续浓度。充分混合后,加标样品在4℃保持过夜。对于牛奶和牛肉样品,将1mL加标牛奶或1g加标牛肉放入2mL 3%三氯乙酸中并涡旋5min。然后将混合物以10000rpm离心20min以除去蛋白质,脂肪和其他样品杂质。最后,分析收集的上清液。对于蜂蜜样品,使用涡旋混合器将1g样品与5mL PBS混合5min,并以10000rpm离心20min,分析收集的上清液。以PBS为空白对照,将测试条的样品垫浸入100μL测试溶液中,经毛细作用,样品流过试纸条,在15min内可以得到可视化结果。

[0061] 检测结果见图6,牛奶、蜂蜜和牛肉检测溶液中试纸条的裸眼视觉检测限均为0.023ng/mL,与标准四环素溶液检测限一致,说明样品基质对试纸条试验的分析能力没有影响或影响不大。因此,由于优异的灵敏度,特异性和适用性,开发的免疫层析试纸条可以很好地满足在实际样品中快速筛选四环素类抗生素的需要。

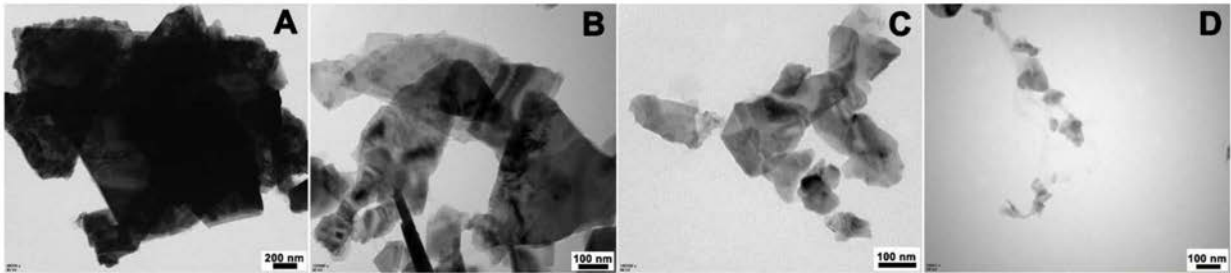


图1

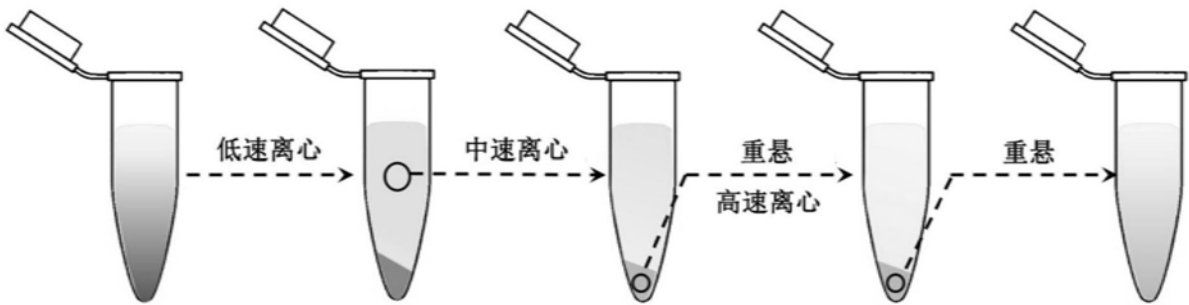


图2

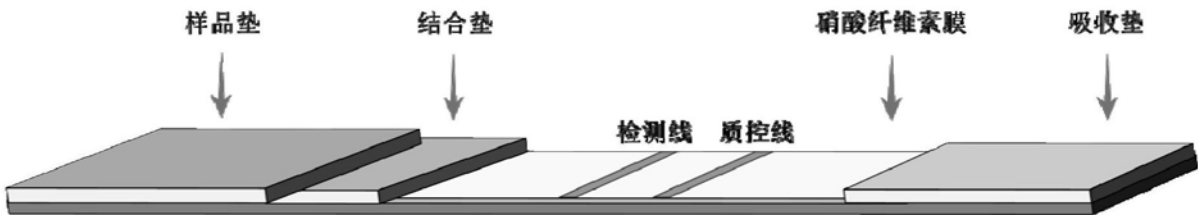


图3

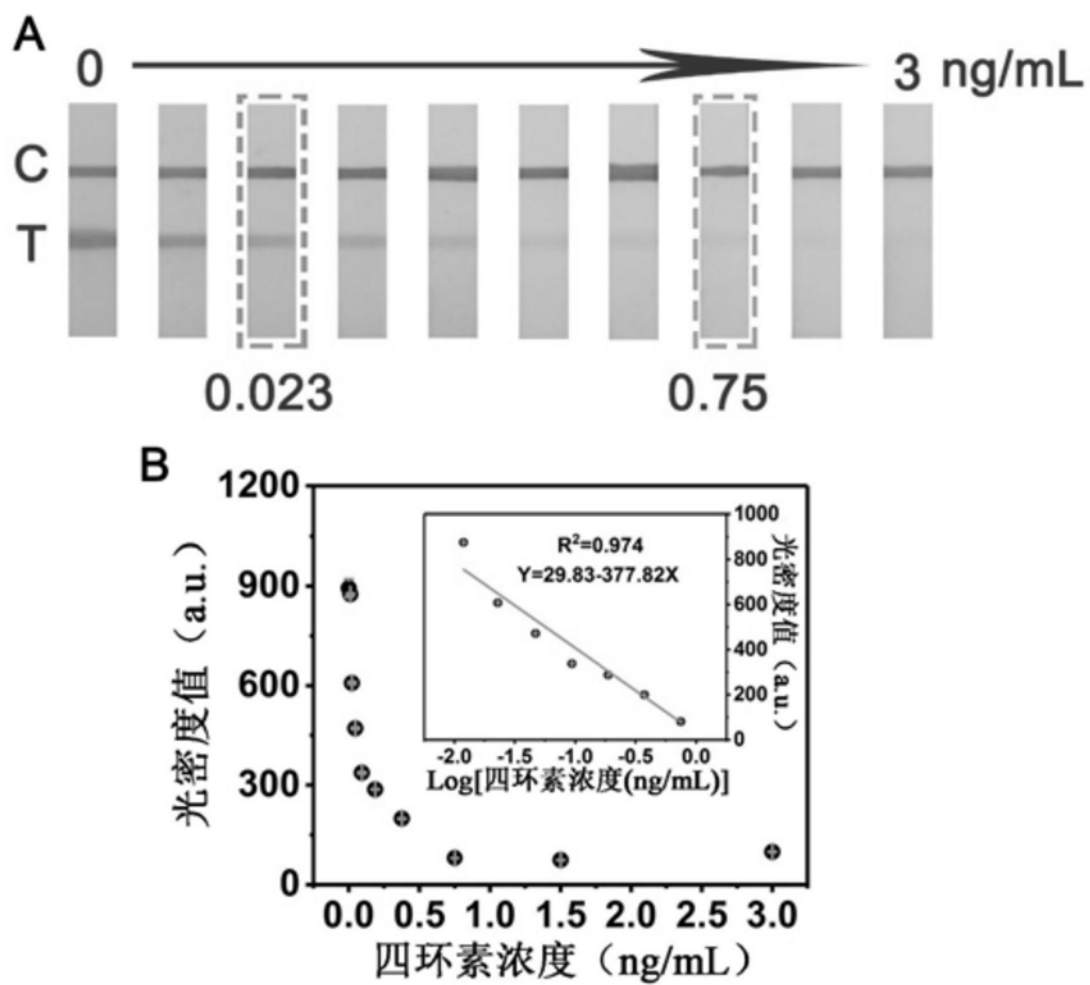


图4

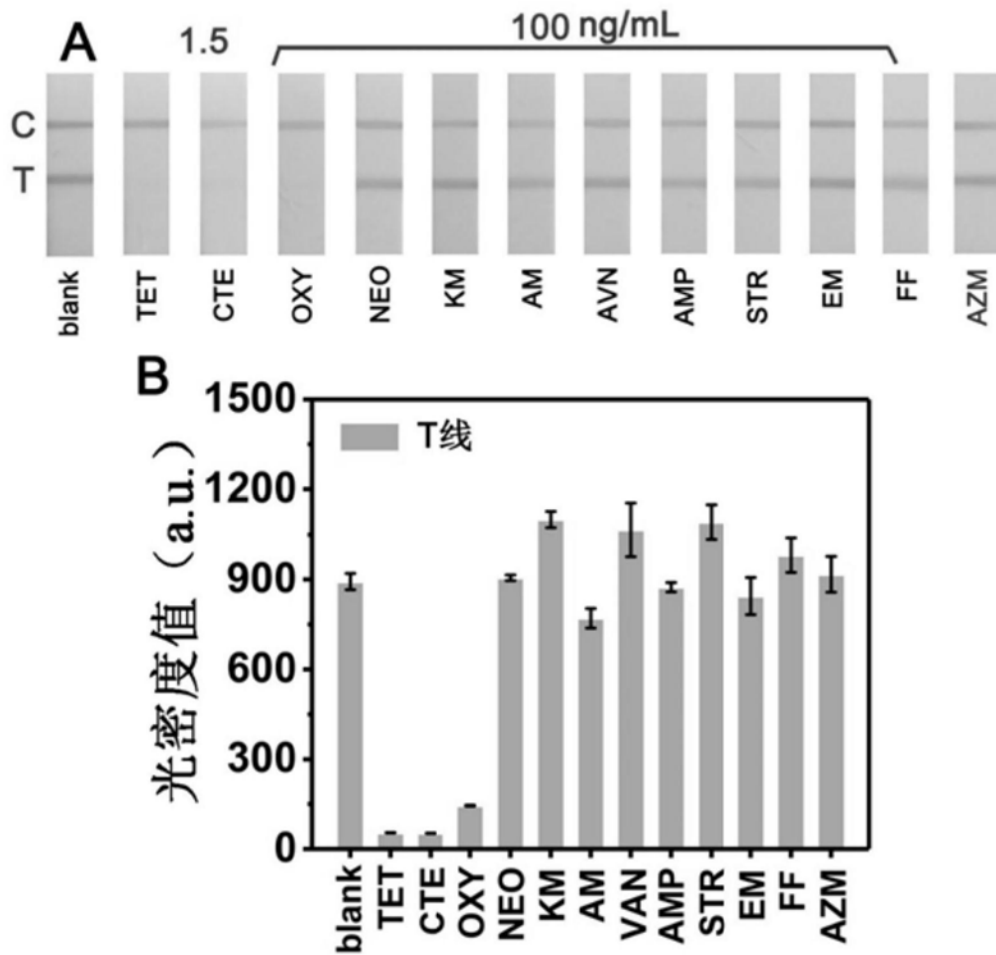


图5

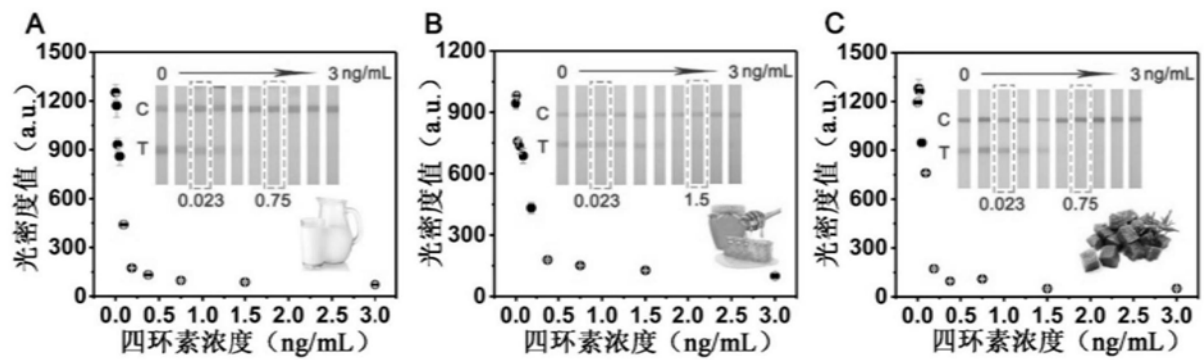


图6

| | | | |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种灵敏探针、检测四环素的方法及应用 | | |
| 公开(公告)号 | CN110887964A | 公开(公告)日 | 2020-03-17 |
| 申请号 | CN201911081355.7 | 申请日 | 2019-11-07 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 西北农林科技大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 西北农林科技大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 西北农林科技大学 | | |
| [标]发明人 | 王丽 贾珮 补彤 李睿 孙新玉 刘英男 | | |
| 发明人 | 王丽 贾珮 补彤 李睿 孙新玉 刘英男 | | |
| IPC分类号 | G01N33/577 G01N33/558 G01N33/53 G01N33/551 | | |
| CPC分类号 | G01N33/551 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/9446 | | |
| 代理人(译) | 孙雅静 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种灵敏探针、检测四环素的方法及应用，包括信号载体和四环素单克隆抗体，信号载体为二硫化钼纳米片，所述的二硫化钼纳米片的粒径为450~550nm、200~300nm和40~60nm。本发明在免疫检测中将二维二硫化钼纳米片作为信号载体以构建探针，控制非常有限的抗体是提高灵敏度的关键，二硫化钼比表面积大，表面易于修饰官能团，吸附能力强，生物相容性良好，用较少量的抗体标记二硫化钼作为检测探针，实现高灵敏目标物检测，裸眼检测限可低至0.023ng/mL，与传统金标试纸条的灵敏度相比，至少提高100倍，能成功应用于牛奶、蜂蜜和牛肉样品中的四环素检测。

