

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 200510026488.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 11 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 100561227C

[22] 申请日 2005.6.6

[21] 申请号 200510026488.6

[73] 专利权人 台州金芯生物工程有限公司

地址 317602 浙江省玉环县珠港镇坎门里
澳中兴路

[72] 发明人 王华全 林荣业

[56] 参考文献

US20040023210A1 2004.2.25

US20040229216A1 2004.11.18

CN1029534C 1995.8.23

CN1156702C 2004.7.7

Selection and characterisation of membranes by means of an immunofiltration assay. Application to the rapid and sensitivedeter mination of the insecticide carbaryl. Sergi Morais et al. Journal of Immunological Methods, Vol. 224 . 1999

Stabilization of enzyme immunoassays for atrazine. Andrea Dankwardt et al. Analytica Chimica Acta, Vol. 362 . 1998

审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 台州市方圆专利事务所

代理人 张智平

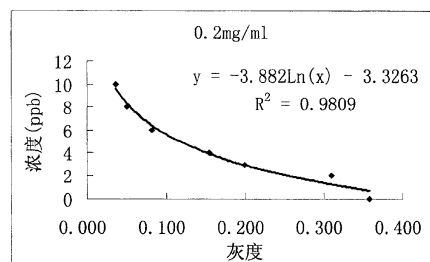
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 3 页

[54] 发明名称

一种用于快速检测食品、农副产品中兽药残留物的蛋白芯片

[57] 摘要

本发明提供了一种检测农副产品、食品中兽药(品)残留物的检测方法,属有毒物质检测的技术领域。本快速检测食品、农副产品中兽药(品)残留物的检测方法包括以下步骤:将多种兽药(品)偶联抗原按照微阵列点在固相载体上并对其进行包被;其中固相基质上固定着兽药(品)抗原;将经过稀释液稀释的生物素化抗体和待测样品混合,与固相载体上固定的多种兽药(品)包被抗原的进行竞争免疫反应,洗涤液洗涤;加入亲和素标记的胶体金进行放大和染色,通过扫描仪获得灰度结果。本发明采用免疫竞争法检测与现有技术的检测相比,主要具有灵敏度高、特异性强、操作简便的特点。免疫竞争法检测所需试剂品种少,加样程序简单、反应时间短;同时,测量和数据处理易于实现自动化。



1、一种用于快速检测食品、农副产品中兽药残留物的蛋白芯片，包括芯片盒、渗滤系统和兽药包被抗原，其特征在于，所述的兽药包被抗原按照微阵列点在渗滤系统的固相载体上，所述的兽药包被抗原是被稀释液稀释为浓度 $0.2\text{mg/ml} \sim 0.6\text{mg/ml}$ ，所述的稀释液为 $0.005\text{M} \sim 0.02\text{M}$ 的 PBS 溶液，PH 为 $7.2 \sim 7.6$ 。

2、根据权利要求 1 所述的一种用于快速检测食品、农副产品中兽药残留物的蛋白芯片，其特征在于，将固相载体上所要点制的多种兽药包被抗原溶于稀释液中，然后用芯片自动点样系统将这些蛋白质点样在固相载体上，点样密度为 $10 \sim 30$ 点/ cm^2 ，点样量 $0.8 \sim 1.6 \mu\text{g}$ /点。

3、根据权利要求 2 所述的一种用于快速检测食品、农副产品中兽药残留物的蛋白芯片，其特征在于，所述的点样密度为 $15 \sim 25$ 点/ cm^2 ，点样量 $1.0 \sim 1.4 \mu\text{g}$ /点。

4、根据权利要求 1 所述的一种用于快速检测食品、农副产品中兽药残留物的蛋白芯片，其特征在于，所述的渗滤系统由吸水层、反渗透滤纸、固相载体组成。

5. 根据权利要求 4 所述的一种用于快速检测食品、农副产品中兽药残留物的蛋白芯片，其特征在于，所述的固相载体为硝酸纤维素膜。

一种用于快速检测食品、农副产品中兽药残留物的蛋白芯片

技术领域

本发明属生物芯片的技术领域，尤其涉及一种用于检测食品、农副产品中兽药残留物的蛋白芯片。

背景技术

我国是农产品生产和消费大国，农产品中兽药残留物的检测直接关系到我国农产品生产、出口和居民食品消费安全。特别是我国农产品出口因兽药残留物近年连续受到国外技术性贸易壁垒，仅浙江省农产品一年出口被禁上亿美元。近年来，食品安全问题已成为国家关注的重点内容之一，因有毒残留物质超标造成的食品污染事件以及出口受阻频频发生，已引起了国家有关部门的高度重视，并连续启动了无公害农产品及食品安全等行动计划以及农产品市场准入制度，研制开发食品中各种有害物质的快速检测技术及产品成为一项重要的需求。

生物芯片技术迅速成为目前生命科学研究领域发展最快的技术之一。生物芯片有两种主要类型：基因芯片和蛋白芯片。蛋白芯片技术是根据蛋白质-蛋白质相互作用规律而设计的高通量蛋白检测技术平台，其主要特点是将已知蛋白阵列固定在支撑物表面，用来检测相配对的未知蛋白。这种新技术使得研究人员可以在一次实验中比较生物样品中成百上千的蛋白质的相对丰度。相对于传统技术而言，其效率大大提高。固定在支撑物上的蛋白质可以是抗体、抗原、受体、配体、酶、底物以及蛋白结合因子等。在实际应用中，抗体芯片研究得最多，其次是酵母双杂交技术。后者是将表达不同蛋白的酵母单克隆分别固定，检测能与相互作用的蛋白质或细胞。

在医学等领域已有许多种蛋白芯片得到应用并发挥着重要作用，如中国专利申请（01113323.6）涉及一种采用标记链霉亲和素-生物素技术的蛋白质芯片，将蛋白质点样并制作，杂交反应采取下列步骤：在点好样的芯片上滴加待测样品，用低浓度钠离子盐为主的洗脱液洗去多余样品，加封阻液封阻并再次洗净晾干，滴加以封阻液稀释过的生物素标记的蛋白质，洗净并于室温晾干，滴加以封阻液稀释过的荧光或酶标记链霉亲和素，洗净并于室温晾干。该专利申请的蛋白质芯片技术主要用于测定抗原、抗体，用于检测与蛋白质特异性结合的物质。虽然该专利申请改进了制作方法，使得检测结果清晰、稳定，可靠性强，而且还利用不同的标记方法在不同性质的蛋白质上作标记，由此可测蛋白质的种类增多，扩大蛋白质芯片的应用范围。但是由于该专利申请主要应用的原理为蛋白杂交技术，对杂交和洗脱的条件要求比较苛刻，杂交温度、洗脱液的盐度不好控制，特异性能差，灵敏度低；很难达到连续化、集成化、微型化、高通量的要求。同时，现有的蛋白芯片主要应用于医学领域，在农产品检验领域的应用研究尚处于空白状态。

发明内容

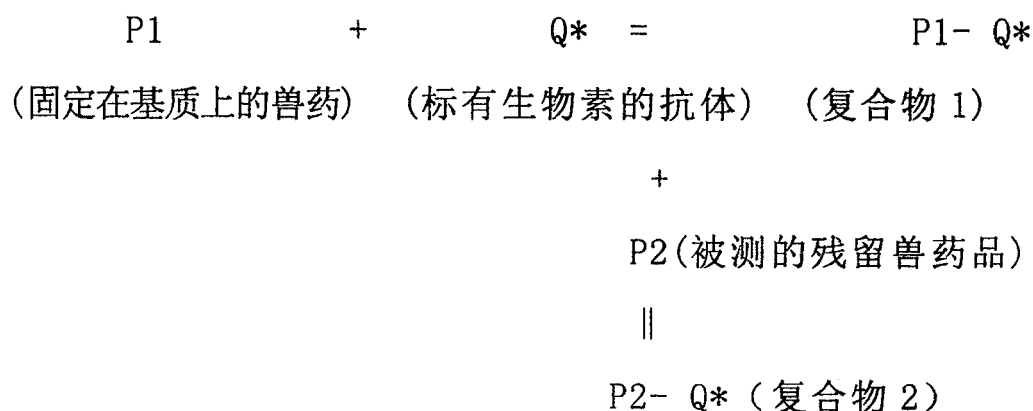
本发明针对现有技术所用的蛋白芯片存在特异性弱、灵敏度低、应用范围窄、操作复杂的缺点，提供一种结构简单、操作方便、价格便宜，检测分析过程连续化、集成化、微型化、高通量的兽药残留检测蛋白芯片。

本发明的另一个目的是将蛋白芯片这种生物检测技术，应用于农产品安全生产这一领域之中，填补该领域的技术空白。

一种用于快速检测食品、农副产品中兽药残留物的蛋白芯片包括芯片盒、渗滤系统和兽药包被抗原，其特征在于，所述的兽药包被抗原按照微阵列点在渗滤系统的固相载体上。

本发明采用微列阵技术，将预先选定的几种待检测药物残留项目多种抗原，以矩阵形式固定于固相载体上，采用竞争法原理检测有关制品中的药物残留量，通过芯片识别仪识别、阅读、判定结果。

本发明采用竞争法的原理：采用免疫竞争法检测多种兽药残留，其工作原理是利用样品中的残留兽药与固定在载体上的兽药偶联抗原针对抗体进行竞争免疫反应，通过生物素-亲和素放大系统并通过纳米金染色对极微量的残留兽药品作定量分析，其中被测的残留兽药与固定在基质上的兽药对标有生物素的抗体均具有相同的结合能力，所以在标有生物素的抗体有限时，这种结合就会出现相互竞争，彼此制约。具体反应式如下：



在标有生物素的抗体的量一定时，固定在基质上的兽药和被测的残留兽药与标有生物素的抗体结合的量取决于二者浓度比，P1结合量，将随着P2的增加而减少。这说明了被测的残留兽药品抑制了固定在基质上的兽药品与标有生物素的抗体的结合，由于抗体上标记有生物素，可与亲和素结合，亲和素上有胶体金，通过扫描仪(CCD)获得灰度结果，也就是图像越黑则待测样品的兽药含量越低，反之，则越高！

在上述的蛋白芯片中，所述的渗滤系统由吸水层、反渗透滤纸、固相载体组成。

在上述的蛋白芯片中，所述的固相载体为硝酸纤维素膜。

其中，蛋白芯片的制备过程为将多种兽药包被抗原(biodesign

公司购买)按照以下阵列(array)点在硝酸纤维膜上(NC膜,德国 Schleicher & Schuell公司产品,孔径: $0.2\mu\text{m}$)包装于专用试剂芯片板中,使用垫付吸水纸制作成渗滤芯片装置。硝酸纤维素膜具有很强静电吸附力,在合适条件下即可有效地吸附蛋白质等生物大分子。因而,将抗原吸附于纤维素膜后,就可利用纤维素作为固相进行抗原抗体反应。

在上述的蛋白芯片中,所述的兽药包被抗原是被稀释液稀释为浓度 $0.2\text{mg/ml}\sim 0.6\text{mg/ml}$ 。从图2~4可以看出不同的反应浓度和灰度之间的关系;其中以灰度-1为横坐标,通过质谱分析样品中兽药的含量为纵坐标绘图,选用对数拟合,其中蛋白芯片中包被抗原浓度在 0.2mg/ml 、 0.4mg/ml 、 0.6mg/ml 浓度的线性相关系数 $r>0.97$,符合要求。

在上述的蛋白芯片中,所述的稀释液为 $0.005\text{M}\sim 0.02\text{M}$ 的 PBS 溶液,PH 为 $7.2\sim 7.6$ 。

将固相载体上所要点制的多种兽药溶于包被液中,然后用芯片自动点样系统将这些蛋白质点样在固相载体上,点样密度为 $10\sim 30$ 点/ cm^2 ,点样量 $0.8\sim 1.6\mu\text{g/点}$ 。

在上述的蛋白芯片中,点样密度为 $15\sim 25$ 点/ cm^2 ,点样量 $1.0\sim 1.4\mu\text{g/点}$ 。

本发明所述的快速检测食品、农副产品中残留兽药的蛋白芯片的一个显著优点是采用免疫竞争法检测多种兽药残留,使得检测的准确性、灵敏性、特异性大大增加,而且本发明是在一个空白领域里进行的研究,在以下方面有所创新:实现蛋白芯片对农副产品、食品中兽药残留的高通量快速检测;是一种纳米金与链霉亲和素染色的信号放大技术制造的芯片。

以下为本发明的应用指标:

稳定性:芯片和试剂的保存时间大于6个月

准确性：回收率 89%~98%

灵敏度：0.1ppb~5ppb

特异性：无任何交叉反应

精密性：CV<10%

附图说明

附图 1 为本发明的一种蛋白芯片图。

附图 2 为本发明蛋白芯片中包被抗原浓度在 0.2mg/ml 通过质谱分析样品中兽药的含量和灰度之间的对数拟合曲线。

附图 3 为本发明蛋白芯片中包被抗原浓度在 0.4mg/ml 通过质谱分析样品中兽药的含量和灰度之间的对数拟合曲线。

附图 4 为本发明蛋白芯片中包被抗原浓度在 0.6mg/ml 通过质谱分析样品中兽药的含量和灰度之间的对数拟合曲线。

附图 5 为三种兽药包被抗原的微列阵点样图。

具体实施方式

下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步的说明：

实施例 1

蛋白芯片的制备

将 0.005M PBS PH7.2 稀释的抗原液 2 μ l 点于硝酸纤维素膜上，置 37℃温箱中干燥 20~30 分钟，滴加封闭液 37℃温盒中封闭 10 分钟用洗涤液洗 1~2 次，滤纸吸干。

其中固相载体为：硝酸纤维素膜；固相载体上所用的兽药品为：氯霉素、链霉素、四环素。

稀释液：0.005M PBS PH7.2。

封闭液及其浓度：5%的脱脂牛奶。

洗涤液：含 0.5%Tween20 的 0.01M PBS PH7.4，

0.2M Na₂HPO₄ 87ml

0.2M NaH₂PO₄ 13ml

NaCl 15.2g

Tween 20 6ml

加双蒸 H₂O 至 2000ml。

将硝酸纤维素膜上所要点制的兽药偶联抗原溶于包被液中浓度为 0.8mg/ml,然后用芯片自动点样系统将这些兽药品按照所用量为 1.6 μg/点,点样密度为10点/cm²点制在硝酸纤维素膜上;其中点样的形式如图5所示:其中1,3,6,8是质量控制点;2为氯霉素检测点;4为链霉素检测点;8为四环素检测点。

点样后放置 20 分钟,用封闭液将蛋白芯片封闭冻干处理,储存于 4℃。

实施例2:

蛋白芯片的制备

将 0.01M PBS PH7.4 稀释的抗原液 2 μl 点于硝酸纤维素膜上,置 37℃温箱中干燥 20~30 分钟,滴加封闭液 37℃温盒中封闭 10 分钟用洗涤液洗 1~2 次,滤纸吸干。

其中固相载体为:硝酸纤维素膜;固相载体上所用的兽药品为:氯霉素、链霉素、四环素。

稀释液: 0.01M PBS PH7.4。

封闭液及其浓度: 5%的脱脂牛奶。

洗涤液同实施例 1

将硝酸纤维素膜上所要点制的兽药偶联抗原溶于包被液中浓度为 0.8mg/ml,然后用芯片自动点样系统将这些兽药品按照所用量为 1.2 μg/点,点样密度为 20 点/cm²点制在硝酸纤维素膜上;放置 25 分钟,用封闭液将蛋白芯片封闭冻干处理,储存于 4℃。

实施例3

蛋白芯片的制备

将0.02M PBS PH7.6稀释的抗原液2 μ l点于硝酸纤维素膜上，置37℃温箱中干燥20~30分钟，滴加封闭液37℃温盒中封闭10分钟用洗涤液洗1~2次，滤纸吸干。

其中固相载体为：硝酸纤维素膜；固相载体上所用的兽药品为：氯霉素、链霉素、四环素。

稀释液：0.02M PBS PH7.6。

封闭液及其浓度：5%的脱脂牛奶。

洗涤液同实施例1

将硝酸纤维素膜上所要点制的兽药偶联抗原溶于包被液中浓度为0.8mg/ml，然后用芯片自动点样系统将这些兽药品按照所用量为0.8 μ g/点，点样密度为25点/cm²点制在硝酸纤维素膜上；放置30分钟，用封闭液将蛋白芯片封闭冻干处理，储存于4℃。

应用实施例1

蜂蜜样品的前处理：取1g蜂蜜，放入离心管中，加入2mL蒸馏水溶解；加2mL乙酸乙酯振荡10min；室温3000g离心10min；移取1mL上层乙酸乙酯（相当于0.5g样品）至另一试管中，60℃下N₂吹干；残留物用0.5mL缓冲液1溶解；取50 μ L分析。

虾样的前处理：虾样去外壳，用均质器均质样品；取3g均质过的样品，放入离心管中，加入6mL乙酸乙酯振荡10min；室温3000g离心10min；取出2mL上层乙酸乙酯（相当于1g样品）60℃下N₂吹干。

洗涤液的配制：Tris54g，硼酸27.5g，用少量DD-H₂O溶解，加入20ml 0.5mol/L EDTA-Na₂ (PH 8.0)，加DD-H₂O定容至1000ml。加入200ml饱和(NH₄)₂SO₄溶液，40ml Tween-20及480ml DD-H₂O，混匀。

试剂生物素化抗体的制备：取生物素1g，混悬于12ml N,N-二甲基甲酰胺DMF，加入0.6g N-羟基丁二酰亚胺HOSU和0.8g的二环己基碳二亚胺DCC，置于密闭容器中，室温磁力搅拌作用过夜。过滤液经过过

旋转蒸干。加10ml乙醚洗涤，继而加入200ml异丙醇结晶，获得白色粉末状活化生物素晶体。用DMF将BNHS配成1mg/mL溶液；将待标记抗体稀释至2mg/ml，透析后，以1mg/ml BNHS：待标记抗体=1：5的比例混合，不时振摇2小时。置透析袋中加入0.05mol/L, pH7.2PBS溶液, 4°C透析过夜，使用时稀释至工作浓度。

试剂亲和素胶体金制备：按照文献制备粒径为30nm胶体金蛋白质最适用量的选择：将待标记的蛋白质储存液作系列稀释后，分别取0.1ml(含蛋白质5~40ug)加到1ml胶体金溶液中，另设一管不加蛋白质的对照管，5分钟后加入0.1ml 10%NaCl溶液，混匀后静置2小时，不稳定的金溶胶将发生聚沉，能使胶体金稳定的最适蛋白量再加10%即为最佳标记蛋白量。

取抗体浓度为5.94mg/ml，将抗体生物素化，生物素化抗体原浓度为1.67mg/ml，用PBS稀释液至0.02mg/ml。

取100ul生物素化抗体(0.02mg/ml)与500ul待测样品充分混匀后于37度温育5min，加入洗涤液4滴于实施例1所制的蛋白芯片上，加入亲和素标记的胶体金溶液500ml，充分反应后，加入洗涤液六滴，将蛋白芯片放入芯片扫描仪上读取结果。

本文中所描述的具体实施例仅仅是对本发明精神作举例说明。本发明所属技术领域的技术人员可以对所描述的具体实施例做各种各样的修改或补充或采用类似的方式替代，但并不会偏离本发明的精神或者所附权利要求书所定义的范围。

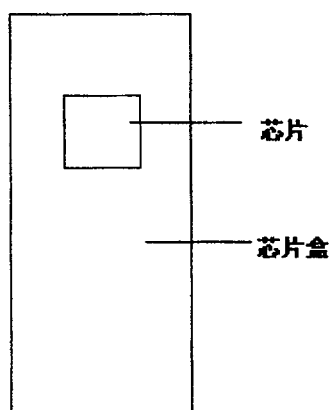


图 1

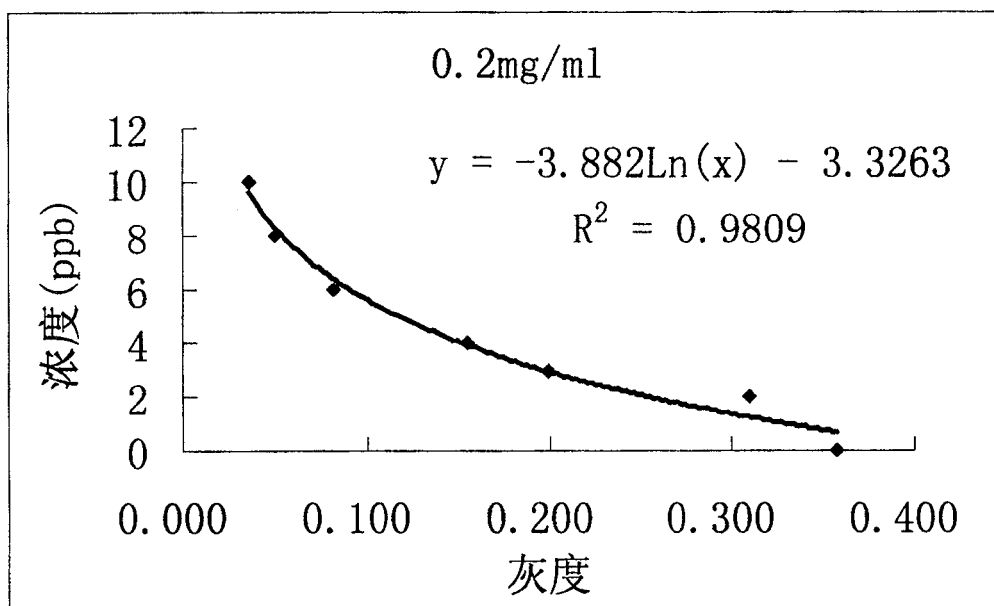


图 2

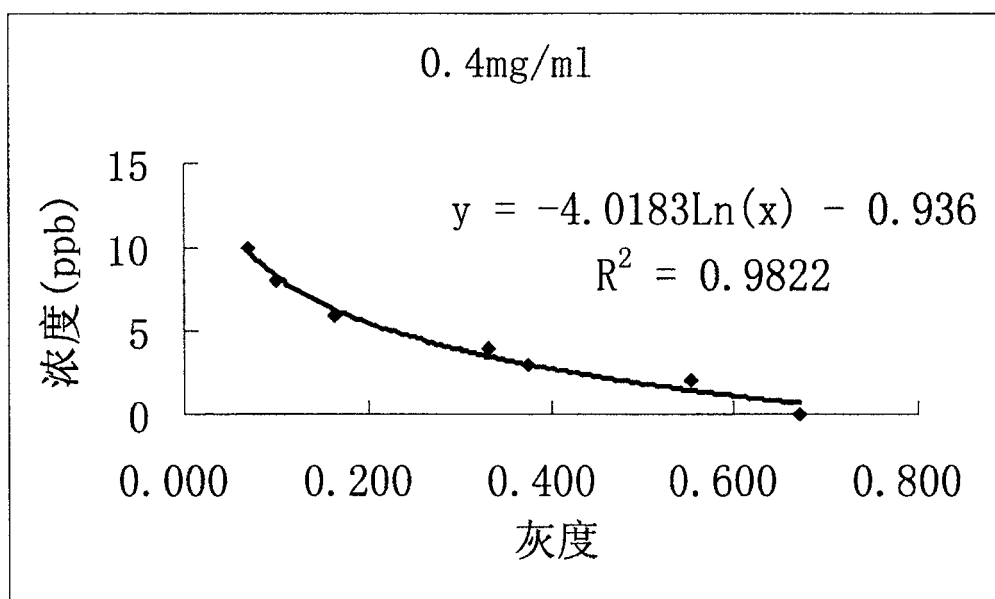


图 3

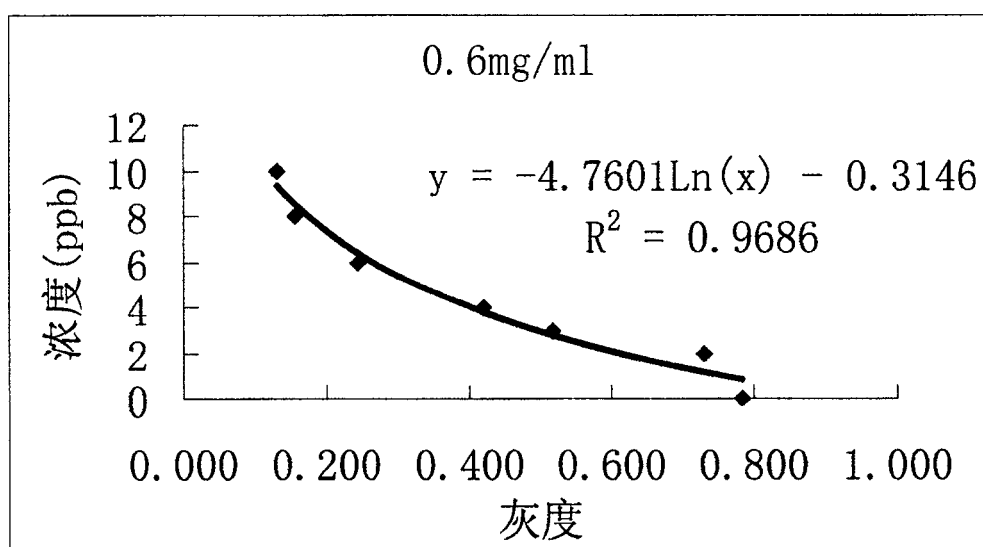


图 4

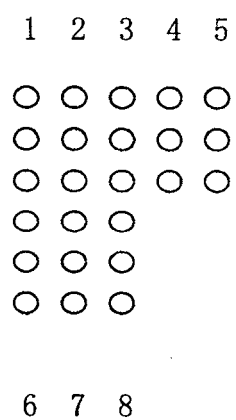


图 5

专利名称(译)	一种用于快速检测食品、农副产品中兽药残留物的蛋白芯片		
公开(公告)号	CN100561227C	公开(公告)日	2009-11-18
申请号	CN200510026488.6	申请日	2005-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	台州金芯生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	台州金芯生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	台州金芯生物工程有限公司		
[标]发明人	王华全 林荣业		
发明人	王华全 林荣业		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
代理人(译)	张智平		
其他公开文献	CN1715923A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测农副产品、食品中兽药(品)残留物的检测方法,属有毒物质检测的技术领域。本快速检测食品、农副产品中兽药(品)残留物的检测方法包括以下步骤:将多种兽药(品)偶联抗原按照微阵列点在固相载体上并对其进行包被;其中固相基质上固定着兽药(品)抗原;将经过稀释液稀释的生物素化抗体和待测样品混合,与固相载体上固定的多种兽药(品)包被抗原的进行竞争免疫反应,洗涤液洗涤;加入亲和素标记的胶体金进行放大和染色,通过扫描仪获得灰度结果。本发明采用免疫竞争法检测与现有技术的检测相比,主要具有灵敏度高、特异性强、操作简便的特点。免疫竞争法检测所需试剂品种少,加样程序简单、反应时间短;同时,测量和数据处理易于实现自动化。

74] 专利代理机构 台州市方圆专利事务所
代理人 张智平

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 3 页

