



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109655618 A

(43)申请公布日 2019.04.19

(21)申请号 201910058173.1

(22)申请日 2019.01.22

(71)申请人 江苏大学

地址 212013 江苏省镇江市京口区学府路
301号

(72)发明人 曾昆 韦达理 孟辉 黄哲
张旭芸

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种同时检测多种氨基糖苷类抗生素的方法

(57)摘要

本发明属于小分子物质检测领域,具体涉及一种同时检测多种氨基糖苷类抗生素的方法。本发明利用硝酸纤维素膜固化氨基糖苷类抗生素包被原,酶标记氨基糖苷类抗生素,通过抗原-抗体特异性结合固化在膜上,因辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶与底物发生反应产生具有一定颜色的产物,且该产物能够长时间稳定存在这一特性,故可以在5~20分钟内直接肉眼判读检测结果;实现了对待测样本中多种氨基糖苷类抗生素的快速同时检测;相比于传统免疫分析方法,具有检测高效、成本低廉、耗时短等优点。同时,检测结果肉眼可判读,具有便捷性和实用性,其应用范围更为广泛,尤其适用于液体样本中的氨基糖苷类抗生素快速筛查。

1. 一种同时检测多种氨基糖苷类抗生素的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 制备氨基糖苷类抗生素包被原;

(2) 分别将氨基糖苷类抗生素包被原和抗小鼠二抗点样于硝酸纤维素膜的不同点样区域内;氨基糖苷类抗生素包被原点样区域为检测区域,抗小鼠二抗点样区域为阳性对照区域,过夜包被后,用脱脂奶粉封闭;

(3) 将与氨基糖苷类抗生素包被原对应的酶标记氨基糖苷类抗生素单克隆抗体和待测样品混匀后滴加在包被好的硝酸纤维素膜上,使酶标记的抗体与包被原特异性结合;

(4) 特异性结合反应结束后加入PBST缓冲液洗涤,加入显色液,根据显色情况判断检测结果;

(5) 结果判定:检测区域的显色深浅与相应的氨基糖苷类抗生素含量成反比,即抗生素含量越高,显色越浅,抗生素含量越低,显色越深;若对照区域没有显色出现,则检测结果无效。

2. 根据权利要求1所述的同時检测多种氨基糖苷类抗生素的方法,其特征在于,步骤(1)中所述氨基糖苷类抗生素包被原为庆大霉素包被原、卡那霉素包被原、链霉素包被原、新霉素包被原中的一种或多种。

3. 根据权利要求1所述的同時检测多种氨基糖苷类抗生素的方法,其特征在于,步骤(2)中所述检测区域为一个或多个。

4. 根据权利要求1所述的同時检测多种氨基糖苷类抗生素的方法,其特征在于,步骤(3)中所述酶标记为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记。

5. 根据权利要求1所述的同時检测多种氨基糖苷类抗生素的方法,其特征在于,步骤(3)中所述氨基糖苷类抗生素单克隆抗体为庆大霉素单克隆抗体、卡那霉素单克隆抗体、链霉素单克隆抗体、新霉素单克隆抗体中的一种或多种。

6. 根据权利要求1所述的同時检测多种氨基糖苷类抗生素的方法,其特征在于,步骤(4)中所述显色液为AEC显色液、TMB显色液或DAB显色液。

7. 根据权利要求1~6任一项所述的同時检测多种氨基糖苷类抗生素的方法,其特征在于,所述方法还包括配置不同浓度的氨基糖苷类抗生素标准溶液,依照步骤(1)~(5)对氨基糖苷类抗生素的标准溶液进行检测,利用图片灰度分析软件对检测结果进行灰度分析,建立对应的检测标准曲线,将待测样本的检测结果与标准曲线进行对比得到待测样本氨基糖苷类抗生素含量。

一种同时检测多种氨基糖苷类抗生素的方法

技术领域

[0001] 本发明属于小分子物质检测领域,具体涉及一种同时检测多种氨基糖苷类抗生素的方法。

背景技术

[0002] 氨基糖苷类抗生素(Aminoglycosides,AGs),通过与细菌的沉降系数为 70s核糖体的 30s 亚基部位结合,抑制始动复合物形成,阻碍终止因子的作用,阻碍合成的蛋白质的释放,从而抑制细菌体内的蛋白质合成,从而抑制细菌生长。在动物医学领域,AGs主要用于防治牛乳腺炎、肠炎、子宫炎、腹膜炎败血症等,同时还可以促进动物的生长。然而AGs具有较明显的肾毒性、耳毒性以及前庭神经功能损害,严重时还会致人休克,甚至死亡。我国、欧盟、日本以及美国均制定了AGs的最高残留限量(Maximum Residue Limit,MRL),目前主要针对庆大霉素、卡那霉素、新霉素以及链霉素/双氢链霉素设有MRLs,其中在牛奶中卡那霉素的MRL分别为100ng/mL、150ng/mL、1500ng/mL和200ng/mL。常用的AGs的检测方法主要为仪器分析方法,包括HPLC、LC-MS等方法,具有准确性好、灵敏度高的优点,但是由于所用仪器昂贵,而且存在测试成本高、分析时间长、检测所需样品量大及前处理步骤繁琐等不足,无法实现大量样本的快速、灵敏检测。

[0003] 基于抗原抗体特异性反应的免疫分析方法,具有灵敏度高、方便快捷、高通量、低成本等优势,已广泛应用于食品与环境中小分子物质的分析检测。但是,目前免疫分析方法多用于单一物质检测,而能够在一次检测中实现多种残留物质的同时检测,一直是分析检测领域研究的重要方向。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种同时检测多种氨基糖苷类抗生素残留物质的方法,可以同时快速检测液体待测样本中是否含有氨基糖苷类抗生素。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供了一种同时检测多种氨基糖苷类抗生素的检测方法,根据本发明的实施例,所述方法包括:

- (1) 制备氨基糖苷类抗生素包被原;
- (2) 分别将氨基糖苷类抗生素包被原和抗小鼠二抗点样于在硝酸纤维素膜的不同点样区域内;氨基糖苷类抗生素包被原点样区域为检测区域,抗小鼠二抗点样区域为阳性对照区,过夜包被后,用脱脂奶粉封闭;
- (3) 将与氨基糖苷类抗生素包被原对应的酶标记氨基糖苷类抗生素单克隆抗体和待测样品混匀后滴加在包被好的硝酸纤维素膜上,使酶标记的抗体与包被原特异性结合;
- (4) 特异性结合反应结束后加入PBST缓冲液洗涤,加入显色液,根据显色情况判断检测结果;
- (5) 结果判定:检测区的深浅与相应的氨基糖苷类抗生素含量成反比,即抗生素含量越高,显色越浅,抗生素含量越低,显色越深;若对照区域没有显色出现,则检测结果无效。

[0006] 根据本发明,步骤(1)中所述氨基糖苷类抗生素包被原为庆大霉素包被原、卡那霉素包被原、链霉素包被原、新霉素包被原中的一种或多种。

[0007] 步骤(2)中所述检测区域为一个或多个。

[0008] 根据本发明,步骤(3)中所述酶标记氨基糖苷类抗生素单克隆抗体中的酶为辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酶。

[0009] 根据本发明,步骤(4)中所述氨基糖苷类抗生素单克隆抗体为庆大霉素单克隆抗体、卡那霉素单克隆抗体、链霉素单克隆抗体、新霉素单克隆抗体其中的一种或多种。

[0010] 根据本发明,步骤(4)中所述显色液为AEC显色液、TMB显色液或DAB显色液。

[0011] 本发明方法中,所述氨基糖苷类抗生素选自庆大霉素、卡那霉素、链霉素、新霉素或中的一种或多种。

[0012] 根据本发明的实施例,所述的同时检测多种氨基糖苷类抗生素的检测方法还包括配置氨基糖苷类抗生素标准溶液,依照步骤(1)~(5)对氨基糖苷类抗生素的标准溶液进行检测,利用图片灰度分析软件对检测结果进行灰度分析,建立对应的检测标准曲线,将待测样本的检测结果与标准曲线进行对比得到待测样本氨基糖苷类抗生素含量。

[0013] 与现有技术相比,本发明有益效果为:

本发明利用硝酸纤维素膜固化氨基糖苷类抗生素包被原,酶标记氨基糖苷类抗生素,通过抗原-抗体特异性结合固化在膜上,因辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶与底物发生反应产生具有一定颜色的产物,且该产物能够长时间稳定存在这一特性,故可以在5~20分钟内直接肉眼判读检测结果;实现了对待测样本中多种氨基糖苷类抗生素的快速同时检测;相比于传统免疫分析方法,具有检测高效、成本低廉、耗时短等优点。同时,检测结果肉眼可判读,具有便捷性和实用性,其应用范围更为广泛,尤其适用于液体样本中的氨基糖苷类抗生素快速筛查。

附图说明

[0014] 图1是实施例2中卡那霉素包被原、链霉素包被原和抗小鼠二抗点样示意图,图中,A为卡那霉素包被原点样区域,B为链霉素包被原点样区域,C为抗小鼠二抗点样区域;

图2是实施例2中对卡那霉素和链霉素标准品1~6的检测结果可视化对比图;图中,图1~6分别为对应滴加浓度递减的标准品1~6的硝酸纤维素膜;

图3是实施例3中建立的卡那霉素和链霉素的标准曲线图;其中,a为链霉素标准曲线,b为卡那霉素标准曲线。

具体实施方式

[0015] 以下结合实施例对本发明做进一步描述说明,下面描述的实施例仅用于解释本发明,并非对本发明的保护范围进行限制。

[0016] 实施例中所需试剂:氨基糖苷类标准品(庆大霉素、卡那霉素、链霉素、新霉素)均购自国家药品食品检定研究院;卵清蛋白、辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(ALP)、EDC、抗小鼠二抗、AEC显色液、TMB显色液、DAB显色液均购自上海索莱宝股份有限公司;所用氨基糖苷类抗生素单克隆抗体(庆大霉素、卡那霉素、链霉素、新霉素)购自Sigma-Aldrich公司。

[0017] 实施例1

本发明所述酶标记氨基糖苷类抗生素单克隆抗体的制备:

用辣根过氧化物酶对氨基糖苷类抗生素单克隆抗体进行标记。以标记的卡那霉素抗体的制备方法为例:将10mg的HRP溶于2mLPBS(0.01mol/L,pH 7.4)缓冲液中,加入2~5mg卡那霉素单克隆抗体,在冰浴中缓缓搅拌,尽量避免气泡产生,完全溶解后,缓缓滴加1%戊二醛溶液4mL,戊二醛的最终浓度为0.2%,在室温下静置2h后,PBS缓冲液充分透析,透析两天,每天换液3次,分装后-20℃冻存备用,得到辣根过氧化物酶标记的卡那霉素抗体。

[0018] 其他辣根过氧化物酶标记抗生素(庆大霉素、链霉素、新霉素)抗体与酶标卡那霉素抗体的制备过程相同,区别在于所用的抗体替换为其他特异性抗体。

[0019] 用碱性磷酸酶对氨基糖苷类抗生素单克隆抗体进行标记。以标记的庆大霉素抗体的制备方法为例:将5mg的HRP溶于4mLPBS(0.01mol/L,pH 7.4)缓冲液中,加入5mg庆大霉素单克隆抗体,室温搅拌30分钟,加入20mg EDC,继续搅拌过夜。用PBS缓冲液充分透析两天,每天换液3次,分装后-20℃冻存备用,得到酶标记的卡那霉素抗体。

[0020] 其他碱性磷酸酶标记抗生素(卡那霉素、链霉素、新霉素)抗体与碱性磷酸酶标记卡那霉素抗体的制备过程相同,区别在于所用的抗体替换为其他特异性抗体。

[0021] 实施例2

在该实施例中,通过下列步骤对卡那霉素和链霉素标准品进行检测:

(1)卡那霉素包被原和链霉素包被原的制备:称取5 mg 卡那霉素和10 mg 卵清蛋白(OVA)溶于3 mL磷酸缓冲盐溶液(PBS)中,于磁力搅拌器上搅拌形成混合液,取10 mg EDC溶于2 mL PBS后逐滴加入上述混合液中,4℃搅拌过夜,PBS(0.01mol/L,pH 7.4)透析两天,每天换液三次,透析完成后分装,-20℃冻存制备卡那霉素包被原。称取10 mg 链霉素和10 mg 卵清蛋白溶于2 mL PBS中,于磁力搅拌器上搅拌形成混合液,取20 mg EDC溶于1mL PBS中,逐滴加入上述混合液中,4℃搅拌过夜,PBS透析两天,每天换液三次。透析完成后分装,-20℃冻存制备链霉素包被原;

(2)将步骤(1)制备好的卡那霉素包被原和链霉素包被原用PBS缓冲液稀释到浓度均为0.5mg/mL,在硝酸纤维素膜上对应分为三个点样区域,三个点样区域内分别点样卡那霉素包被原、链霉素包被原和抗小鼠二抗(浓度为0.5mg/mL),点样体积均为1μL,以抗小鼠二抗点样区域为阳性对照区。图1是卡那霉素包被原、链霉素包被原和抗小鼠二抗点样示意图,如图1所示,A区域点样卡那霉素包被原,B区域点样链霉素包被原,C区域为阳性对照区,点样抗小鼠二抗;将点样后的硝酸纤维素膜放置于冰箱中4度过夜,用1%脱脂奶粉进行封闭,封闭条件为37度,2小时,取出,晾干水分;

(3)用PBS缓冲液分别将实施例1中制备的酶标卡那霉素抗体和酶标链霉素抗体稀释到浓度为2μg/mL;各取50μL稀释后的辣根过氧化物酶标卡那霉素抗体、辣根过氧化物酶标链霉素抗体、卡那霉素标准品(6个标准品,浓度分别为:24.3ng/mL、8.1 ng/mL、2.7 ng/mL、0.9 ng/mL、0.3 ng/mL、0ng/mL)、链霉素标准品(6个标准品,浓度分别为:50ng/mL、25 ng/mL、12.5 ng/mL、6.25 ng/mL、3.13 ng/mL、0ng/mL)共同混匀后滴加在包被好的硝酸纤维素膜上,室温下震荡反应30分钟,使酶标记的抗体与包被原特异性结合;标准品浓度对应关系如表1;

(4)特异性结合反应结束后,硝酸纤维素膜用PBST(0.01mol/L PBS,pH 7.4,含0.05% Tween-20)缓冲液洗涤三次,加入AEC显色液200μL,5分钟后根据显色情况判断检测结果。

[0022] 表1. 标准品浓度对照表

标准品	1	2	3	4	5	6
卡那霉素	24.3 ng/mL	8.1 ng/mL	2.7 ng/mL	0.9ng/mL	0.3ng/mL	0ng/mL
链霉素	50ng/mL	25ng/mL	12.5ng/mL	6.25ng/mL	3.13ng/mL	0ng/mL

(5) 结果判定:若对照区域没有红色显色出现,则检测结果无效;图2是对卡那霉素和链霉素标准品1~6的检测结果可视化对比图;图中,图1~图6分别为对应滴加标准品1~6的硝酸纤维素膜;由图2可见,图1~图6点样区域均有红色显色出现,随着卡那霉素和链霉素添加浓度的递减,相对应的图1~图6显色呈现灰度递增的状态。可知,检测区域显色的深浅与相对应的氨基糖苷类抗生素含量成反比,即抗生素含量越高,显色越浅;抗生素含量越低,显色越深。经过对比,本实施例中卡那霉素和链霉素检测限分别为2.7 和12.5 ng/mL。

[0023] 实施例3

在该实施例中,对不同浓度下的显色进行拍照,基于应用软件Quantity One对实施例2的检测结果进行灰度分析,通过灰度分析数值,在对数坐标纸上以标准品浓度为横坐标, B/B_0 (%)为纵坐标分别绘制卡那霉素和链霉素的标准曲线,其中B是标准品为某一浓度时对应的灰度值, B_0 是标准品为0ng/mL时对应的灰度值;图3是卡那霉素和链霉素的标准曲线图;其中,a为链霉素标准曲线,b为卡那霉素标准曲线;如图3所示,随着卡那霉素/链霉素浓度增加, B/B_0 依次递减,其中B是标准品为某一浓度时对应的灰度值, B_0 是标准品为0ng/mL时对应的灰度值。经过四参数拟合,公式为 $Y=A_2+(A_1-A_2)/[1+(X/X_0)^p]$,可得卡那霉素和链霉素的线性范围和检测限。本实施例中,卡那霉素标准曲线的相关参数为: $A_1=1$; $A_2=-0.0873$; $X_0=3.8251$; $p=0.5993$ 。计算可得卡那霉素线性范围为0.38-38.66 ng/mL,检测限为0.09ng/mL。本实施例中,链霉素标准曲线的相关参数为: $A_1=1$; $A_2=-0.1407$; $X_0=8.8770$; $p=1.0839$ 。计算可得链霉素线性范围为2.47-31.90 ng/mL,检测限为1.37ng/mL。

[0024] 实施例4

在该实施例中,对市售纯牛奶样品中卡那霉素和链霉素残留量进行检测;

选取5个不同批次的市售纯牛奶样品,用PBS缓冲液(0.01mol/L, pH 7.4)将牛奶样品稀释2倍,记作样品1~5。按照实施例2的方法分别对样品1~5进行检测。步骤(1)、步骤(2)与实施例2相同,区别在于步骤(3)为用PBS缓冲液分别将制备的酶标卡那霉素抗体和酶标链霉素抗体稀释到浓度为2 μ g/mL;各取50 μ L稀释后的HRP标卡那霉素抗体、HRP标链霉素抗体、市售纯牛奶样品(样品1~5)共同混匀后滴加在包被好的硝酸纤维素膜上,室温下震荡反应30分钟,使酶标记的抗体与包被原特异性结合;

(4) 特异性结合反应结束后,硝酸纤维素膜用PBST(0.01mol/L PBS, pH 7.4, 含0.05% Tween-20)缓冲液洗涤三次,加入DAB显色液200 μ L,5分钟后根据检测区域和对照区域的显色情况判断检测结果;

通过结果判定发现样品1~5中卡那霉素和链霉素检测区域颜色与对照区域无显著差异,表明样品中卡那霉素和链霉素的含量低于本方法的检测限(卡那霉素2.7 ng/mL 和链霉素12.5 ng/mL),均低于MRL限量标准;进一步,利用图片灰度分析软件Quantity One对样品1~5的检测结果进行灰度分析,将结果与实施例3获得的标准品的标准曲线进行对比,得到检测结果如表2所示,在样品1~5中均未检出链霉素,在样品2和样品4中检测到的卡那霉素含量分别为0.51ng/mL和1.47ng/mL,均远低于MRL限量标准。

[0025] 表2. 5款市售牛奶样品中卡那霉素和链霉素含量测定

样品	链霉素 (ng/mL)	卡那霉素 (ng/mL)
样品1	ND	ND
样品2	0.51 ± 0.01	ND
样品3	ND	ND
样品4	1.47 ± 0.12	ND
样品5	ND	ND

实施例5

在该实施例中,通过下列步骤同时对庆大霉素、卡那霉素、链霉素以及新霉素进行检测:

(1) 按照实施例2的方法分别制备庆大霉素包被原和新霉素包被原;称取5 mg 庆大霉素和10 mg OVA溶于4 mL PBS中,于磁力搅拌器上搅拌,取8 mg EDC溶于2 mL PBS中,逐滴加入上述混合液中,4℃搅拌过夜,PBS(0.01mol/L,pH 7.4)透析两天,每天换液三次。透析完成后,分装,-20℃冻存制备庆大霉素包被原。新霉素包被原:称取7mg 新霉素和10 mg OVA溶于2 mL PBS中,于磁力搅拌器上搅拌,取20 mg EDC溶于5mL PBS中,逐滴加入上述混合液中,4℃搅拌过夜,PBS透析两天,每天换液三次。透析完成后,分装,-20℃冻存制备新霉素包被原(OVA-STR)。

[0026] (2) 将步骤(1)制备好的庆大霉素包被原、新霉素包被原以及实施例1中制备的卡那霉素包被原、链霉素包被原用PBS缓冲液稀释到浓度均为2mg/mL,在硝酸纤维素膜上对应分为五个点样区域,五个点样区域内分别点样庆大霉素包被原、卡那霉素包被原、链霉素包被原、新霉素包被原和抗小鼠二抗(浓度为2mg/mL),点样体积均为1μL,以抗小鼠二抗点样区域为阳性对照区。将点样后的硝酸纤维素膜放置于4度冰箱中过夜,然后用1%脱脂奶粉进行封闭,封闭条件为37度,2小时,将硝酸纤维素膜取出后晾干水分。

[0027] (3) 用PBS(0.01mol/L,pH 7.4)缓冲液分别将实施例1中制备的碱性磷酸酶标抗生素抗体(碱性磷酸酶标庆大霉素抗体、碱性磷酸酶标卡那霉素抗体、碱性磷酸酶标链霉素抗体和碱性磷酸酶标新霉素抗体)稀释到浓度为80μg/mL;各取25μL稀释后的酶标抗生素抗体、以及100μL待测样本,共同混匀后滴加在包被好的硝酸纤维素膜上,室温下震荡反应30分钟,使酶标记的抗体与包被原特异性结合。

[0028] (4) 特异性结合反应结束后,硝酸纤维素膜用PBST缓冲液洗涤三次,加入TMB显色液200μL,10分钟后根据显色情况判断检测结果。

[0029] (5) 结果判定:对照区域没有蓝色显色出现,则检测结果无效;对照区域有蓝色显色出现,显示结果有效;待测样本中庆大霉素/卡那霉素/链霉素/新霉素含量越高,相对于的蓝色显色越浅;反之,则蓝色显色越深。该实施例对庆大霉素、卡那霉素、链霉素、新霉素的检测限分别为1 ng/mL、2.7 ng/mL、12.5 ng/mL、9.7 ng/mL。

[0030] (6) 通过应用软件Quantity One对步骤(4)中得到的检测的结果进行灰度分析,通过灰度分析数值,建立庆大霉素、卡那霉素、链霉素、新霉素检测标准曲线。通过实施例三中的四参数拟合标准曲线,获得其检测的线性范围分别为0.18-22.67ng/mL、0.38-38.66ng/mL、2.47-31.90 ng/mL和1.47-17.21 ng/mL ;检测限分别为0.07、0.09、1.37和0.78 ng/mL。

[0031] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,在不相互矛盾的情况下,本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

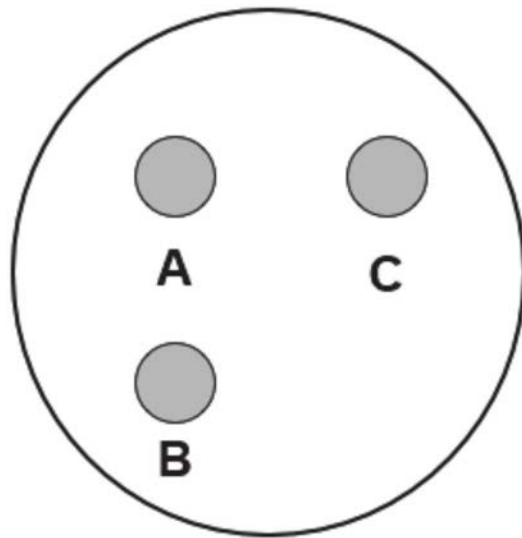


图1

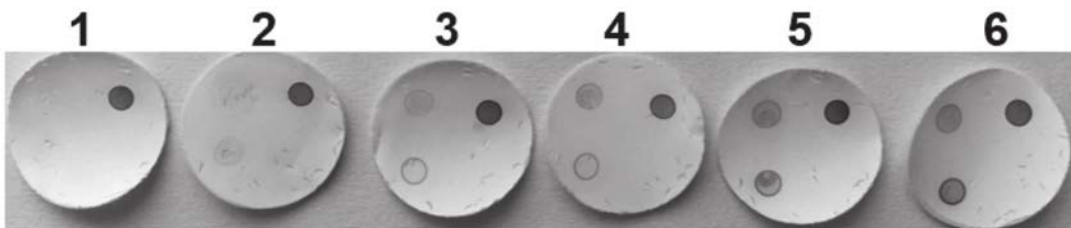


图2

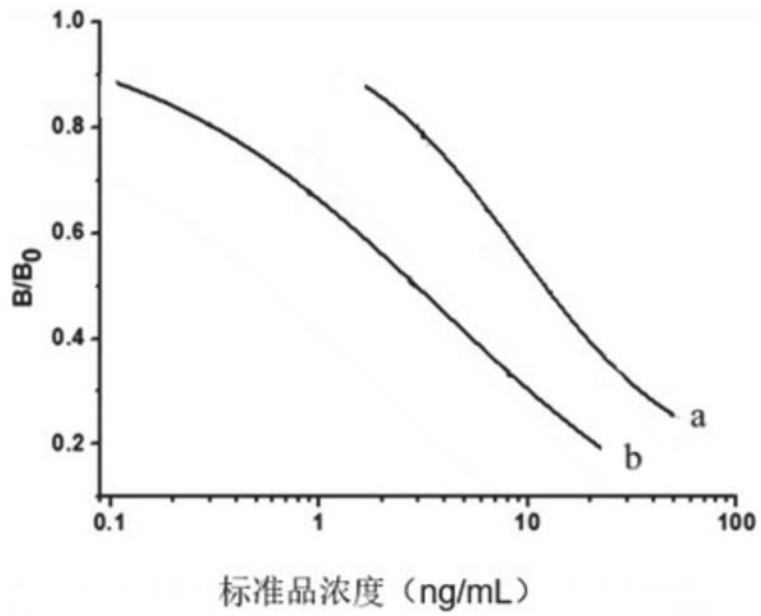


图3

专利名称(译)	一种同时检测多种氨基糖苷类抗生素的方法		
公开(公告)号	CN109655618A	公开(公告)日	2019-04-19
申请号	CN201910058173.1	申请日	2019-01-22
[标]申请(专利权)人(译)	江苏大学		
申请(专利权)人(译)	江苏大学		
当前申请(专利权)人(译)	江苏大学		
[标]发明人	曾昆 韦达理 孟辉 黄哲		
发明人	曾昆 韦达理 孟辉 黄哲 张旭芸		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于小分子物质检测领域，具体涉及一种同时检测多种氨基糖苷类抗生素的方法。本发明利用硝酸纤维素膜固化氨基糖苷类抗生素包被原，酶标记氨基糖苷类抗生素，通过抗原-抗体特异性结合固化在膜上，因辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶与底物发生反应产生具有一定颜色的产物，且该产物能够长时间稳定存在这一特性，故可以在5~20分钟内直接肉眼判读检测结果；实现了对待测样本中多种氨基糖苷类抗生素的快速同时检测；相比于传统免疫分析方法，具有检测高效、成本低廉、耗时短等优点。同时，检测结果肉眼可判读，具有便捷性和实用性，其应用范围更为广泛，尤其适用于液体样本中的氨基糖苷类抗生素快速筛查。

