



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102788877 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 22

(21) 申请号 201210324706. 4

(22) 申请日 2012. 09. 04

(73) 专利权人 南京祥中生物科技有限公司
地址 210000 江苏省南京市双龙街2号双龙科技园2栋6楼

(72) 发明人 李周敏 孙思云

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

代理人 肖明芳

CN 102539738 A, 2012. 07. 04,
CN 101398427 A, 2009. 04. 01,
KR 20100006842 A, 2010. 01. 22,
KR 20100013014 A, 2010. 02. 09,
CN 1635378 A, 2005. 07. 06,
CN 102539738 A, 2012. 07. 04,
CN 101782580 A, 2010. 07. 21,
CN 101738479 A, 2010. 06. 16,
CN 201535773 U, 2010. 07. 28,

审查员 肖吉

(51) Int. Cl.

G01N 33/552(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1715923 A, 2006. 01. 04,
CN 102095873 A, 2011. 06. 15,

权利要求书3页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种动物源性食品中残留庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种动物源性食品中残留庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法,属于间接竞争免疫法。本发明利用碳二亚胺法通过一步合成庆大霉素包被抗原,建立动物性食品中庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法。在芯片载体上固定庆大霉素包被抗原和内标物,然后在反应区内加入游离庆大霉素和庆大霉素单克隆抗体,游离的庆大霉素和芯片上固定的偶联物间进行竞争反应,待反应完毕后洗涤,再加入胶体金标记的二抗,反应完全洗涤后再加银增强显色剂,胶体金可将银原子催化成可目测的黑色银,通过扫描仪对图像进行扫描,最终可同时实现孔内半定量,定量检测。本发明方法可以快速准确测定动物源性食品中庆大霉素的残留量,灵敏度高,检测时间短,操作简单易行。

1. 一种动物源性食品中残留庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法,其特征在于,该方法依次顺序包括如下步骤:

(1) 以牛血清白蛋白为空白对照,将牛血清白蛋白和庆大霉素-载体蛋白偶联物通过生物芯片点样仪进行点样操作,点样板孔内分别加入 10 ~ 50 μL 的牛血清白蛋白和 10 ~ 50 μL 的庆大霉素-载体蛋白偶联物,将点好的玻片放在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中固定过夜;

(2) 固定后每个反应孔内加入 10 ~ 100 μL 1 ~ 50mg/mL 的牛血清白蛋白缓冲溶液对芯片进行封闭 1 ~ 3h,然后 PBST 洗涤 3-4 次,每次 3-15min;

(3) 在部分反应孔内加入 10 ~ 100 μL 庆大霉素抗体和不同浓度的游离庆大霉素的标准溶液,在剩余反应孔内加入 10 ~ 100 μL 庆大霉素抗体和样品溶液,所有反应孔 20 ~ 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 1 ~ 3h,然后 PBST 洗涤 3 ~ 4 次,每次 3 ~ 15min;

(4) 在每个反应孔内加入 10 ~ 100 μL 胶体金标记羊抗鼠 IgG, 20 ~ 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 1 ~ 3h,然后 PBST 洗涤 3 ~ 4 次,每次 3 ~ 15min;

(5) 在每个反应孔内加入 10 ~ 100 μL 银增强显色剂,避光显色反应 5 ~ 30min 后,终止反应;

(6) 用 CCD 平板扫描仪进行图像扫描,根据庆大霉素包被抗原的灰度值信号,利用外标曲线法定量检测样品中庆大霉素的含量;

其中,庆大霉素-载体蛋白偶联物按如下步骤制备得到:

(1a) 将 1 ~ 500mg 庆大霉素溶于 1 ~ 100mL PBS 缓冲液中,得到溶液 I,在冰水浴中搅拌 10 ~ 60min;

(1b) 将 1 ~ 500mg 碳二亚胺溶于 1 ~ 100mL PBS 缓冲液中,得到溶液 II,在冰水浴中搅拌 10 ~ 60min;

(1c) 称 1 ~ 200mg 载体蛋白溶于 1 ~ 100mL PBS 缓冲液中,得到溶液 III,在冰水浴中搅拌 10 ~ 60min;

(1d) 搅拌条件下将溶液 I 加入溶液 III 中,再在冰水浴下,将溶液 II 液逐滴加入上述混合液中,搅拌避光反应 1h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 ~ 24h,得到庆大霉素-载体蛋白偶联物;

(1e) 将庆大霉素-载体蛋白偶联物放入透析袋中,用 PBS 缓冲液, 4 $^{\circ}\text{C}$, 透析 1 ~ 3 天,每 8h 换一次透析液;

(1f) 透析后的庆大霉素-载体蛋白偶联物进行紫外扫描,分析鉴定庆大霉素-载体蛋白偶联物及浓度测定,分装后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用即得;

其中,所述的载体蛋白为匙孔血蓝蛋白、人血清白蛋白、牛血清白蛋白、牛丙种球蛋白、酶或卵清蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的动物源性食品中残留庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法,其特征在于,牛血清白蛋白缓冲溶液,溶剂为 PBS 缓冲液。

3. 根据权利要求 1 所述的动物源性食品中残留庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法,其特征在于,所述的银增强显色剂为 Sigma-Aldrich 公司的银增强试剂 A 和银增强试剂 B 按体积比 1 : 1 的混合液。

4. 根据权利要求 1 所述的动物源性食品中残留庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法,其特征在于,样品溶液处理方法如下:对于液体样品,取 50 μL ~ 1mL 于 10mL EP 管中,用 PBS 缓冲液稀释 10 ~ 100 倍,用于分析;对于固体样品,取粉碎样品 5g,加入 8mL PBS 缓冲

液,混合 5min,置 50℃水浴下放置 30min,室温 3000r/min 离心 10min,取 50 μL 上清液,加入 450 μL PBS 缓冲液混匀,取 50 μL 用于分析。

5. 一种动物源性食品中残留庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法,其特征在于,该方法依次顺序包括如下步骤:

(1) 以牛血清白蛋白为空白对照,将牛血清白蛋白、庆大霉素-载体蛋白偶联物 and 不同浓度鼠 IgG 内标物通过生物芯片点样仪进行点样操作,点样板孔内分别加入 10 ~ 50 μL 的牛血清白蛋白和 10 ~ 50 μL 的庆大霉素-载体蛋白偶联物,以及 10-50 μL 4 个不同浓度的鼠 IgG 内标物,将点好的玻片放在 4℃冰箱中固定过夜;

(2) 固定后每个反应孔内加入 10 ~ 100 μL 1 ~ 50mg/mL 的牛血清白蛋白缓冲溶液对芯片进行封闭 1 ~ 3h,然后 PBST 洗涤 3-4 次,每次 3-15min;

(3) 在部分反应孔内加入 10 ~ 100 μL 庆大霉素抗体和不同浓度的游离庆大霉素的标准溶液,在剩余反应孔内加入 10 ~ 100 μL 庆大霉素抗体和样品溶液,所有反应孔 20 ~ 37℃水浴反应 1 ~ 3h,然后 PBST 洗涤 3 ~ 4 次,每次 3 ~ 15min;

(4) 在每个反应孔内加入 10 ~ 100 μL 胶体金标记羊抗鼠 IgG,20 ~ 37℃水浴反应 1 ~ 3h,然后 PBST 洗涤 3 ~ 4 次,每次 3 ~ 15min;

(5) 在每个反应孔内加入 10 ~ 100 μL 银增强显色剂,避光显色反应 5 ~ 30min 后,终止反应;

(6) 用 CCD 平板扫描仪进行图像扫描,根据庆大霉素包被抗原的灰度值信号,做出外标曲线,根据内标物鼠 IgG 灰度值信号做出内标曲线,可以同时通过外标曲线和内标曲线实现定量和半定量检测样品中庆大霉素的含量;

其中,庆大霉素-载体蛋白偶联物按如下步骤制备得到:

(1a) 将 1 ~ 500mg 庆大霉素溶于 1 ~ 100mL PBS 缓冲液中,得到溶液 I,在冰水浴中搅拌 10 ~ 60min;

(1b) 将 1 ~ 500mg 碳二亚胺溶于 1 ~ 100mLPBS 缓冲液中,得到溶液 II,在冰水浴中搅拌 10 ~ 60min;

(1c) 称 1 ~ 200mg 载体蛋白溶于 1 ~ 100mLPBS 缓冲液中,得到溶液 III,在冰水浴中搅拌 10 ~ 60min;

(1d) 搅拌条件下将溶液 I 加入溶液 III 中,再在冰水浴下,将溶液 II 液逐滴加入上述混合液中,搅拌避光反应 1h,4℃反应 2 ~ 24h,得到庆大霉素-载体蛋白偶联物;

(1f) 将庆大霉素-载体蛋白偶联物放入透析袋中,用 PBS 缓冲液,4℃,透析 1 ~ 3 天,每 8h 换一次透析液;

(1g) 透析后的庆大霉素-载体蛋白偶联物进行紫外扫描,分析鉴定庆大霉素-载体蛋白偶联物及浓度测定,分装后于 -20℃冰箱保存备用即得;

其中,所述的载体蛋白为匙孔血蓝蛋白、人血清白蛋白、牛血清白蛋白、牛丙种球蛋白、酶或卵清蛋白。

6. 根据权利要求 5 所述的动物源性食品中残留庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法,其特征在于,牛血清白蛋白缓冲溶液,溶剂为 PBS 缓冲液。

7. 根据权利要求 5 所述的动物源性食品中残留庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法,其特征在于,所述的银增强显色剂为 Sigma-Aldrich 公司的银增强试剂 A 和银增强试剂 B

按体积比 1 :1 的混合液。

8. 根据权利要求 5 所述的动物源性食品中残留庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法, 其特征在于, 样品溶液处理方法如下: 对于液体样品, 取 50 μ L ~ 1mL 于 10mL EP 管中, 用 PBS 缓冲液稀释 10 ~ 100 倍, 用于分析; 对于固体样品, 取粉碎样品 5g, 加入 8mL PBS 缓冲液, 混合 5min, 置 50 $^{\circ}$ C 水浴下放置 30min, 室温 3000r/min 离心 10min, 取 50 μ L 上清液, 加入 450 μ L PBS 缓冲液混匀, 取 50 μ L 用于分析。

一种动物源性食品中残留庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种动物源性食品中残留庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法,属于食品安全监督或食品分析的免疫分析技术领域。

背景技术

[0002] 庆大霉素属氨基糖苷类抗生素,抗生素作为兽药和饲料添加剂被广泛应用,可能会造成抗生素在动物源性食品中的残留。对于牛奶等乳制品,抗生素残留不仅会影响乳制品的品质,如严重影响发酵乳制品的生产,降低产量及破坏后期产品风味,给生产者造成经济损失,而且会对人体造成极大的危害,如引起人体的过敏反应(如:皮疹、过敏性休克等),抑制肠道中正常的敏感菌群的生长,使致病菌、念珠菌大量增殖而导致全身或局部感染,并且会导致人体对抗生素产生抗药性,给临床治疗带来不可估量的危害。目前,牛奶、蜂蜜、家禽、水产中的抗生素残留已引起消费者的高度重视,因此,加强抗生素的残留检测尤为重要。

[0003] 庆大霉素常用的检测方法有:理化检测法和免疫法。理化检测法以 HPLC 和 HPLC-MS 为主,但是该法对设备要求高,技术难度大,对技术人员要求高,操作繁琐,不适合现场监控和大量样本的筛查。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种可半定量或定量检测动物源性食品中庆大霉素含量的可视化蛋白芯片方法,在于弥补现有抗生素同时半定量、定量检测技术的空白。满足对该种抗生素进行快速筛选的要求,提供一种快速,高灵敏度,低成本的检测动物源性食品中庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案如下:

[0006] 方法一:定量检测方法。

[0007] 一种动物源性食品中残留庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法,该方法依次顺序包括如下步骤:

[0008] (1) 以牛血清白蛋白(BSA)为空白对照,将牛血清白蛋白和庆大霉素-载体蛋白偶联物通过生物芯片点样仪进行点样操作,点样板孔内分别加入 10~50 μ L 的牛血清白蛋白和 10~50 μ L 的庆大霉素-载体蛋白偶联物,将点好的玻片放在 4℃ 冰箱中固定过夜;

[0009] (2) 固定后每个反应孔内加入 10~100 μ L 1~50mg/mL 的牛血清白蛋白缓冲溶液对芯片进行封闭 1~3h,然后 PBST 洗涤 3~4 次,每次 3~15min;封闭的目的是防止待测样品中的蛋白质与其他活性基团非特异性结合,形成高背景或假阳性;

[0010] (3) 在部分反应孔内加入 10~100 μ L 庆大霉素抗体和不同浓度的游离庆大霉素的标准溶液,在剩余反应孔内加入 10~100 μ L 庆大霉素抗体和样品溶液,所有反应孔 20~37℃ 水浴反应 1~3h,然后 PBST 洗涤 3~4 次,每次 3~15min;

[0011] (4) 在每个反应孔内加入 10~100 μL 胶体金标记羊抗鼠 IgG, 20~37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 1~3h, 然后 PBST 洗涤 3~4 次, 每次 3~15min;

[0012] (5) 在每个反应孔内加入 10~100 μL 银增强显色剂, 避光显色反应 5~30min 后, 终止反应;

[0013] (6) 用 CCD 平板扫描仪进行图像扫描, 根据不同浓度的庆大霉素包被抗原的灰度值信号, 利用外标曲线法定量检测样品中庆大霉素的含量。

[0014] 方法二: 半定量和定量检测方法。

[0015] 一种动物源性食品中残留庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法, 该方法依次顺序包括如下步骤:

[0016] (1) 以牛血清白蛋白(BSA)为空白对照, 将牛血清白蛋白、庆大霉素-载体蛋白偶联物 and 不同浓度鼠 IgG 内标物通过生物芯片点样仪进行点样操作, 点样板孔内分别加入 10~50 μL 的牛血清白蛋白和 10~50 μL 的庆大霉素-载体蛋白偶联物, 以及 10~50 μL 4 个不同浓度的鼠 IgG 内标物, 将点好的玻片放在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中固定过夜;

[0017] (2) 固定后每个反应孔内加入 10~100 μL 1~50mg/mL 的牛血清白蛋白缓冲溶液对芯片进行封闭 1~3h, 然后 PBST 洗涤 3~4 次, 每次 3~15min; 封闭的目的是防止待测样品中的蛋白质与其他活性基团非特异性结合, 形成高背景或假阳性;

[0018] (3) 在部分反应孔内加入 10~100 μL 庆大霉素抗体和不同浓度的游离庆大霉素的标准溶液, 在剩余反应孔内加入 10~100 μL 庆大霉素抗体和样品溶液, 所有反应孔 20~37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 1~3h, 然后 PBST 洗涤 3~4 次, 每次 3~15min;

[0019] (4) 在每个反应孔内加入 10~100 μL 胶体金标记羊抗鼠 IgG, 20~37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 1~3h, 然后 PBST 洗涤 3~4 次, 每次 3~15min;

[0020] (5) 在每个反应孔内加入 10~100 μL 银增强显色剂, 避光显色反应 5~30min 后, 终止反应;

[0021] (6) 用 CCD 平板扫描仪进行图像扫描, 根据不同浓度的庆大霉素包被抗原的灰度值信号, 做出外表曲线, 根据不同浓度的内标物鼠 IgG 灰度值信号做出内标曲线, 可以同时通过外表曲线和内标曲线实现定量和半定量检测样品中庆大霉素的含量。

[0022] 对于方法一和方法二, 庆大霉素是小分子半抗原, 不具备免疫原性, 因其结构不同, 也不便于直接固定在片基表面上, 因而要首先将小分子半抗原与载体蛋白偶联, 制备成人工抗原。所述的庆大霉素-载体蛋白偶联物按如下步骤制备得到:

[0023] (1) 将 1~500mg 庆大霉素溶于 1~100mL PBS 缓冲液(0.1M, pH7.4)中, 得到溶液 I, 在冰水浴中搅拌 10~60min;

[0024] (2) 将 1~500mg 碳二亚胺溶于 1~100mL PBS 缓冲液(0.1M, pH7.4)中, 得到溶液 II, 在冰水浴中搅拌 10~60min;

[0025] (3) 称 1~200mg 载体蛋白溶于 1~100mL PBS 缓冲液(0.1M, pH7.4)中, 得到溶液 III, 在冰水浴中搅拌 10~60min;

[0026] (4) 搅拌条件下将溶液 I 加入溶液 III 中, 再在冰水浴下, 将溶液 II 液逐滴加入上述混合液中, 搅拌避光反应 1h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2~24h, 得到庆大霉素-载体蛋白偶联物;

[0027] (5) 将庆大霉素-载体蛋白偶联物放入透析袋中, 用 PBS 缓冲液(0.1M, pH7.4), 4 $^{\circ}\text{C}$, 透析 1~3 天, 每 8h 换一次透析液。

[0028] (6) 透析后的庆大霉素-载体蛋白偶联物进行紫外扫描,分析鉴定庆大霉素-载体蛋白偶联物及浓度测定,分装后于 -20°C 冰箱保存备用即得;

[0029] 其中,所述的载体蛋白为匙孔血蓝蛋白、人血清白蛋白、牛血清白蛋白、牛丙种球蛋白、酶或卵清蛋白。

[0030] 本发明所述的动物源性食品包括牛奶、奶粉、奶酪、饲料、尿液、组织(如猪肉、牛肉、鸡肉、猪肝或鸡肝)、血清、蜂蜜、蜂皇浆、鸡蛋、水产品(如鱼或虾)。

[0031] 对于方法一和方法二,所述的牛血清白蛋白缓冲溶液,溶剂为 0.1mol/L pH7.4 PBS 缓冲液。

[0032] 对于方法一和方法二,所述的银增强显色剂为 Sigma-Aldrich 公司的银增强试剂 A 和银增强试剂 B 按体积比 1:1 的混合液。银增强试剂 A 主要成分为硝酸银,银增强试剂 B 主要成分为氢醌(即对苯二酚)。

[0033] 对于方法一和方法二, PBST 配方如下:

[0034] PBS (0.1M , pH7.4 的磷酸盐缓冲液)

[0035]

NaCl	80g
KCl	2g
KH_2PO_4	2g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	36.2g
蒸馏水	800ml

[0036] 全部溶解后,冷却至室温,定容至 1000ml。

[0037] 对于方法一和方法二,样品溶液处理方法如下:对于液体样品,取 $50\ \mu\text{L}$ -1ml 样品于 10mLEP 管中,用 PBS 缓冲液(0.1M , pH7.4)稀释 10~100 倍,用于可视化蛋白芯片测定。对于固体样品,取粉碎样品 5g,加入 8ml PBS 缓冲液(0.1M , pH7.4),混合 5min,置 50°C 水浴下放置 30min,室温 3000r/min 离心 10min,取 $50\ \mu\text{L}$ 上清液,加入 $450\ \mu\text{L}$ PBS 缓冲液(0.1M , pH7.4)混匀,取 $50\ \mu\text{L}$ 用于分析。

[0038] 本发明的有益效果:

[0039] 本发明采用蛋白芯片法测定动物源性食品中庆大霉素的含量,该方法对庆大霉素的检测限为 0.1ng/ml ,远远低于国家规定的最大允许残留量(MRL) 200ng/ml 。庆大霉素抗体的特异性较好,和其它 29 种不同抗生素(除硫酸依替米星外)均无交叉性反应。并且孔间 CV 值低于 15%,孔内 CV 值低于 10%,方法精密度高。对牛奶加样回收率在 95%-130% 之间,方法的准确度高,适于实际样品的检测。根据内标曲线可半定量求出抗生素浓度。因此,在实际样品检测时,无需每次实验都重新绘制标准曲线,可根据一个孔内的不同浓度鼠 IgG 的信号值,半定量求出抗生素的含量。该方法可大大降低了操作步骤,减少试剂用量,降低了成本,无需特殊昂贵的实验仪器,同时也为现场快速检测提供了一种思路。

[0040] 本发明利用免疫测定原理建立庆大霉素可视化蛋白芯片检测方法。灵敏度高,检测时间短(大约 2-3h),操作简单易行,检测结果可视化,无需特殊昂贵的检测仪器,目视即可达到孔内半定量检测,大大降低了检测成本,适用于现场大规模样品的初筛。

附图说明

[0041] 图 1 为可视化蛋白芯片法所得的标准曲线图。

[0042] 曲线在 0.1ng/ml-200ng/ml 范围内线性良好, $R^2 > 0.95$, 并且孔间 CV 值低于 15%, 孔内 CV 值低于 10%, 方法精密度高。且牛奶加样回收率在 95%-130% 之间, 方法的准确度高。

[0043] 图 2 为可视化蛋白芯片法所得的标准曲线与内标曲线的相关性图。

[0044] 根据内标曲线可半定量求出抗生素浓度。因此, 在实际样品检测时, 无需每次实验都重新绘制标准曲线, 可根据一个孔内的不同浓度鼠 IgG 的信号值, 半定量求出抗生素的含量。

具体实施方式

[0045] 根据下述实施例, 可以更好地理解本发明。然而, 本领域的技术人员容易理解, 实施例所描述的内容仅用于说明本发明, 而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

[0046] 以下实施例所需试剂来源如下:

[0047] 庆大霉素单克隆抗体(美国 biodesign 公司), 羊抗鼠 IgG- 胶体金, 鼠 IgG(北京博奥森生物科技有限公司), 银增强显色剂(美国 sigma 公司), 牛血清白蛋白(BSA)(美国 sigma 公司)。

[0048] 实施例 1: 庆大霉素包被抗原的制备。

[0049] 1) 将 5mg GM 溶于 10mL PBS 缓冲液(0.1M, pH7.4) 中, 得溶液 I, 在冰水浴中搅拌 10min。

[0050] 2) 将 20mg 碳二亚胺溶于 10mLPBS 缓冲液(0.1M, pH7.4) 中, 得溶液 II, 在冰水浴中搅拌 10min。

[0051] 3) 称取 10mg 载体蛋白溶于 20mLPBS 缓冲液(0.1M, pH7.4) 中, 得溶液 III, 在冰水浴中搅拌 10min。

[0052] 4) 将溶液 I 加入溶液 III 中并放磁力搅拌器上搅拌, 再在冰水浴下, 将溶液 II 缓慢逐滴加入上述混合液中, 搅拌避光反应 1h, 4℃ 反应 3h, 合成庆大霉素 - 载体蛋白偶联产物。

[0053] 5) 将庆大霉素 - 载体蛋白偶联产物放入透析袋中, 用 PBS 缓冲液(0.1M, pH7.4), 4℃, 透析 3 天, 每 8h 换一次透析液。

[0054] 6) 透析后的偶联产物进行紫外扫描, 分析鉴定偶联产物及浓度测定, 分装后于 -20℃ 冰箱保存备用。

[0055] 实施例 2: 庆大霉素包被抗原的制备。

[0056] 1) 将 200mg GM 溶于 50mL PBS 缓冲液(0.1M, pH7.4) 中, 得溶液 I, 在冰水浴中搅拌 10min。

[0057] 2) 将 100mg 碳二亚胺溶于 50mL PBS 缓冲液(0.1M, pH7.4) 中, 得溶液 II, 在冰水浴中搅拌 10min。

[0058] 3) 称取 50mg 载体蛋白溶于 100mL PBS 缓冲液(0.1M, pH7.4) 中, 得溶液 III, 在冰水浴中搅拌 10min。

[0059] 4) 将溶液 I 加入溶液 III 中并放磁力搅拌器上搅拌, 再在冰水浴下, 将溶液 II 缓慢逐滴加入上述混合液中, 搅拌避光反应 1h, 4℃ 反应 3h, 合成庆大霉素 - 载体蛋白偶联产

物。

[0060] 5) 将庆大霉素 - 载体蛋白偶联产物放入透析袋中, 用 PBS 缓冲液(0.1M, pH7.4), 4℃, 透析 3 天, 每 8h 换一次透析液。

[0061] 6) 透析后的偶联产物进行紫外扫描, 分析鉴定偶联产物及浓度测定, 分装后于 -20℃ 冰箱保存备用。

[0062] 实施例 3: 可视化蛋白芯片法定量检测庆大霉素含量的方法 1。

[0063] (1) 以牛血清白蛋白(BSA)为空白对照, 将牛血清白蛋白和庆大霉素 - 载体蛋白偶联物通过生物芯片点样仪按照不同规格的矩阵进行点样操作, 点样板孔内分别加入 30 μL 的牛血清白蛋白和 30 μL 的庆大霉素 - 载体蛋白偶联物, 将点好的玻片放在 4℃ 冰箱中固定过夜;

[0064] (2) 固定后每个反应孔内加入 20 μL 10mg/mL 的牛血清白蛋白缓冲溶液对芯片进行封闭 1h, 然后 PBST 洗涤 3 次, 每次 5min; 包被抗原固定后将载体上其他无蛋白质样品区域封闭以防止待测样品中的蛋白质与其他活性基团非特异性结合, 形成高背景或假阳性;

[0065] (3) 在部分反应孔内加入 20 μL 庆大霉素抗体和不同浓度的游离庆大霉素的标准溶液, 在剩余反应孔内加入 20 μL 庆大霉素抗体和样品溶液, 所有反应孔 37℃ 水浴反应 1h, 然后 PBST 洗涤 3 次, 每次 5min;

[0066] (4) 在每个反应孔内加入 20 μL 胶体金标记羊抗鼠 IgG, 37℃ 水浴反应 1h, 然后 PBST 洗涤 3 次, 每次 5min;

[0067] (5) 在每个反应孔内加入 20 μL 银增强显色剂(A+B 液体积比 1:1, 现配现用), 避光显色反应 10min 后, 终止反应;

[0068] (6) 用 CCD 平板扫描仪进行图像扫描, 并用计算机相关软件进行结果处理分析, 根据不同浓度的庆大霉素包被抗原的灰度值信号, 利用外标曲线法定量检测样品中庆大霉素的含量。

[0069] 本实施例方法中, 对方法检测线、精密度等进行了考察。数据见图 1。从图中可以看出, 该方法对庆大霉素的检测限为 0.1ng/ml, 远远低于国家规定的最大允许残留量(MRL) 200ng/ml。并且孔间 CV 值低于 15%, 孔内 CV 值低于 10%, 方法精密度高。实施例 4: 可视化蛋白芯片法定量检测庆大霉素含量的方法 2。

[0070] (1) 以牛血清白蛋白为空白对照, 将牛血清白蛋白和庆大霉素 - 载体蛋白偶联物通过生物芯片点样仪进行点样操作, 点样板孔内分别加入 10 μL 的牛血清白蛋白和 10 μL 的庆大霉素 - 载体蛋白偶联物, 将点好的玻片放在 4℃ 冰箱中固定过夜;

[0071] (2) 固定后每个反应孔内加入 10 μL 50mg/mL 的牛血清白蛋白缓冲溶液对芯片进行封闭 1h, 然后 PBST 洗涤 3 次, 每次 5min;

[0072] (3) 在部分反应孔内加入 10 μL 庆大霉素抗体和不同浓度的游离庆大霉素的标准溶液, 在剩余反应孔内加入 10 μL 庆大霉素抗体和样品溶液, 所有反应孔 37℃ 水浴反应 1h, 然后 PBST 洗涤 3 次, 每次 5min;

[0073] (4) 在每个反应孔内加入 10 μL 胶体金标记羊抗鼠 IgG, 37℃ 水浴反应 1h, 然后 PBST 洗涤 3 次, 每次 5min;

[0074] (5) 在每个反应孔内加入 10 μL 银增强显色剂, 避光显色反应 30min 后, 终止反应;

[0075] (6) 用 CCD 平板扫描仪进行图像扫描, 根据不同浓度的庆大霉素包被抗原的灰度值信号, 利用外标曲线法定量检测样品中庆大霉素的含量。

[0076] 实施例 5 : 可视化蛋白芯片法定量检测庆大霉素含量的方法 3。

[0077] (1) 以牛血清白蛋白为空白对照, 将牛血清白蛋白和庆大霉素 - 载体蛋白偶联物通过生物芯片点样仪进行点样操作, 点样板孔内分别加入 50 μ L 的牛血清白蛋白和 50 μ L 的庆大霉素 - 载体蛋白偶联物, 将点好的玻片放在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中固定过夜;

[0078] (2) 固定后每个反应孔内加入 100 μ L 1mg/mL 的牛血清白蛋白缓冲溶液对芯片进行封闭 3h, 然后 PBST 洗涤 3 次, 每次 5min;

[0079] (3) 在部分反应孔内加入 100 μ L 庆大霉素抗体和不同浓度的游离庆大霉素的标准溶液, 在剩余反应孔内加入 100 μ L 庆大霉素抗体和样品溶液, 所有反应孔 20 $^{\circ}$ C 水浴反应 3h, 然后 PBST 洗涤 3 次, 每次 5min;

[0080] (4) 在每个反应孔内加入 100 μ L 胶体金标记羊抗鼠 IgG, 20 $^{\circ}$ C 水浴反应 3h, 然后 PBST 洗涤 3 次, 每次 5min;

[0081] (5) 在每个反应孔内加入 100 μ L 银增强显色剂, 避光显色反应 5min 后, 终止反应;

[0082] (6) 用 CCD 平板扫描仪进行图像扫描, 根据不同浓度的庆大霉素包被抗原的灰度值信号, 利用外标曲线法定量检测样品中庆大霉素的含量。

[0083] 实施例 6 : 可视化蛋白芯片法定量和半定量检测庆大霉素含量的方法 4。

[0084] (1) 以牛血清白蛋白 (BSA) 为空白对照, 将牛血清白蛋白、庆大霉素 - 载体蛋白偶联物和不同浓度鼠 IgG 内标物通过生物芯片点样仪按照不同规格的矩阵进行点样操作, 点样板孔内分别加入 30 μ L 的牛血清白蛋白 30 μ L 的庆大霉素 - 载体蛋白偶联物, 以及 30 μ L 4 个不同浓度的鼠 IgG 内标物, 将点好的玻片放在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中固定过夜;

[0085] (2) 固定后每个反应孔内加入 20 μ L 10mg/mL 的牛血清白蛋白缓冲溶液对芯片进行封闭 1h, 然后 PBST 洗涤 3 次, 每次 5min; 包被抗原固定后将载体上其他无蛋白质样品区域封闭, 以防止待测样品中的蛋白质与其他活性基团非特异性结合, 形成高背景或假阳性;

[0086] (3) 在部分反应孔内加入 20 μ L 庆大霉素抗体和不同浓度的游离庆大霉素的标准溶液, 在剩余反应孔内加入 20 μ L 庆大霉素抗体和样品溶液, 所有反应孔 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 1h, 然后 PBST 洗涤 3 次, 每次 5min;

[0087] (4) 在每个反应孔内加入 20 μ L 胶体金标记羊抗鼠 IgG, 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 1h, 然后 PBST 洗涤 3 次, 每次 5min;

[0088] (5) 在每个反应孔内加入 20 μ L 银增强显色剂 (A+B 液体积比 1:1, 现配现用), 避光显色反应 10min 后, 终止反应;

[0089] (6) 用 CCD 平板扫描仪进行图像扫描, 并用计算机相关软件进行结果处理分析, 根据不同浓度的庆大霉素包被抗原的灰度值信号, 做出外表曲线, 根据不同浓度的内标物鼠 IgG 灰度值信号做出内标曲线, 可以同时通过外表曲线和内标曲线实现定量和半定量检测样品中庆大霉素的含量。

[0090] 本实施例方法中, 对内标曲线和外表曲线的相关性进行了考察, 数据见图 2, 其中图中虚线是外表曲线, 实线是内标曲线。从图中可以看出, 两者相关性很好, 可根据内标曲

线可半定量求出抗生素浓度。因此,在实际样品检测时,无需每次实验都重新绘制标准曲线,可根据一个孔内的不同浓度鼠 IgG 的信号值,半定量求出抗生素的含量。实施例 7:可视化蛋白芯片法定量和半定量检测庆大霉素含量的方法 5。

[0091] (1) 以牛血清白蛋白(BSA)为空白对照,将牛血清白蛋白、庆大霉素-载体蛋白偶联物 and 不同浓度鼠 IgG 内标物通过生物芯片点样仪按照不同规格的矩阵进行点样操作,点样板孔内分别加入 10 μ L 的牛血清白蛋白 10 μ L 的庆大霉素-载体蛋白偶联物,以及 10 μ L 4 个不同浓度的鼠 IgG 内标物,将点好的玻片放在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中固定过夜;

[0092] (2) 固定后每个反应孔内加入 10 μ L 50mg/mL 的牛血清白蛋白缓冲溶液对芯片进行封闭 1h,然后 PBST 洗涤 3 次,每次 5min;

[0093] (3) 在部分反应孔内加入 10 μ L 庆大霉素抗体和不同浓度的游离庆大霉素的标准溶液,在剩余反应孔内加入 10 μ L 庆大霉素抗体和样品溶液,所有反应孔 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 1h,然后 PBST 洗涤 3 次,每次 5min;

[0094] (4) 在每个反应孔内加入 10 μ L 胶体金标记羊抗鼠 IgG,37 $^{\circ}$ C 水浴反应 1h,然后 PBST 洗涤 3 次,每次 5min;

[0095] (5) 在每个反应孔内加入 10 μ L 银增强显色剂,避光显色反应 30min 后,终止反应;

[0096] (6) 用 CCD 平板扫描仪进行图像扫描,根据不同浓度的庆大霉素包被抗原的灰度值信号,利用外标曲线法定量检测样品中庆大霉素的含量。

[0097] 实施例 8:可视化蛋白芯片法定量和半定量检测庆大霉素含量的方法 6。

[0098] (1) 以牛血清白蛋白(BSA)为空白对照,将牛血清白蛋白、庆大霉素-载体蛋白偶联物 and 不同浓度鼠 IgG 内标物通过生物芯片点样仪按照不同规格的矩阵进行点样操作,点样板孔内分别加入 50 μ L 的牛血清白蛋白 50 μ L 的庆大霉素-载体蛋白偶联物,以及 50 μ L 4 个不同浓度的鼠 IgG 内标物,将点好的玻片放在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中固定过夜;

[0099] (2) 固定后每个反应孔内加入 100 μ L 1mg/mL 的牛血清白蛋白缓冲溶液对芯片进行封闭 3h,然后 PBST 洗涤 3 次,每次 5min;

[0100] (3) 在部分反应孔内加入 100 μ L 庆大霉素抗体和不同浓度的游离庆大霉素的标准溶液,在剩余反应孔内加入 100 μ L 庆大霉素抗体和样品溶液,所有反应孔 20 $^{\circ}$ C 水浴反应 3h,然后 PBST 洗涤 3 次,每次 5min;

[0101] (4) 在每个反应孔内加入 100 μ L 胶体金标记羊抗鼠 IgG,20 $^{\circ}$ C 水浴反应 3h,然后 PBST 洗涤 3 次,每次 5min;

[0102] (5) 在每个反应孔内加入 100 μ L 银增强显色剂,避光显色反应 5min 后,终止反应;

[0103] (6) 用 CCD 平板扫描仪进行图像扫描,根据不同浓度的庆大霉素包被抗原的灰度值信号,利用外标曲线法定量检测样品中庆大霉素的含量。

[0104] 实施例 5:样品处理方法

[0105] 牛奶样品:取 100 μ L 牛奶样品于 10mLEP 管中,用 PBS 缓冲液(0.1M, pH7.4)稀释 50 倍,用于可视化蛋白芯片测定。

[0106] 结果发现,牛奶样品加样回收率在 95%-130% 之间,方法准确度高,适于实际样品的检测。

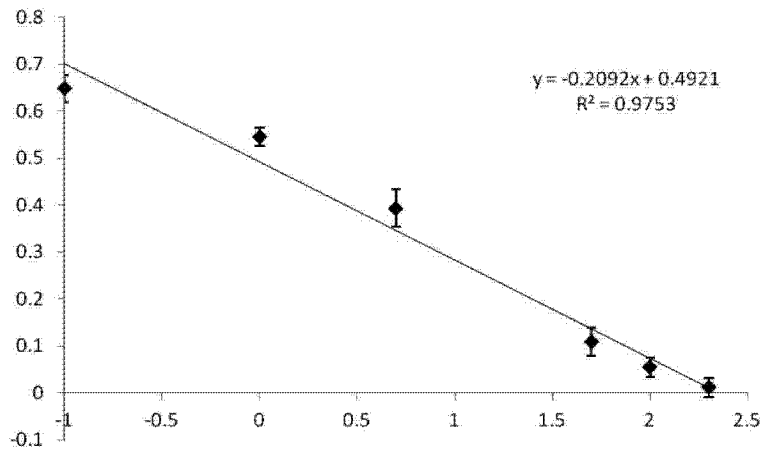


图 1

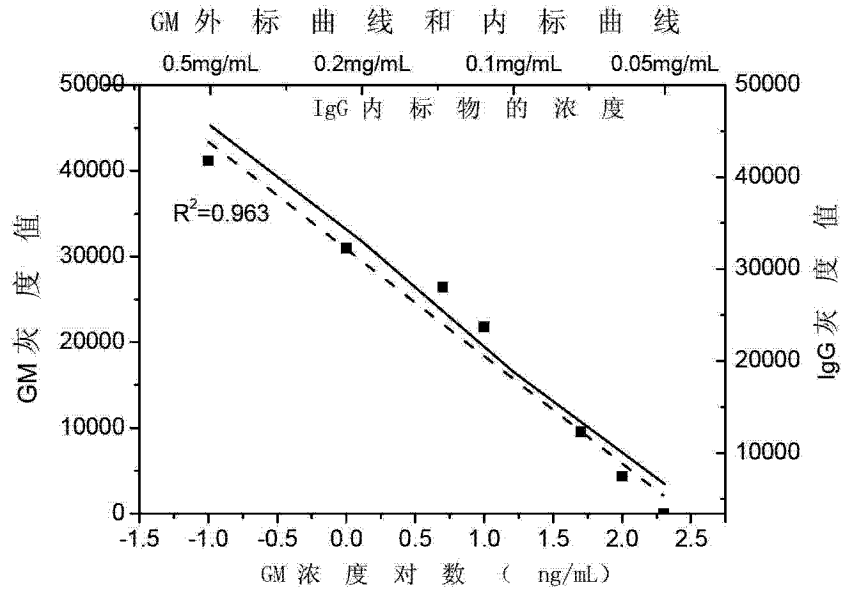


图 2

专利名称(译)	一种动物源性食品中残留庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法		
公开(公告)号	CN102788877B	公开(公告)日	2015-04-22
申请号	CN201210324706.4	申请日	2012-09-04
[标]申请(专利权)人(译)	南京祥中生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京祥中生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京祥中生物科技有限公司		
[标]发明人	李周敏 孙思云		
发明人	李周敏 孙思云		
IPC分类号	G01N33/552 G01N33/531		
审查员(译)	肖吉		
其他公开文献	CN102788877A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)
 本发明公开了一种动物源性食品中残留庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法，属于间接竞争免疫法。本发明利用碳二亚胺法通过一步合成庆大霉素包被抗原，建立动物性食品中庆大霉素的可视化蛋白芯片检测方法。在芯片载体上固定庆大霉素包被抗原和内标物，然后在反应区内加入游离庆大霉素和庆大霉素单克隆抗体，游离的庆大霉素和芯片上固定的偶联物间进行竞争反应，待反应完毕后洗涤，再加入胶体金标记的二抗，反应完全洗涤后再加银增强显色剂，胶体金可将银原子催化成可目测的黑色银，通过扫描仪对图像进行扫描，最终可同时实现孔内半定量，定量检测。本发明方法可以快速准确测定动物源性食品中庆大霉素的残留量，灵敏度高，检测时间短，操作简单易行。

NaCl	80g
KCl	2g
KH ₂ PO ₄	2g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	36.2g
蒸馏水	800ml