



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110865071 A

(43)申请公布日 2020.03.06

(21)申请号 201911071060.1

(22)申请日 2019.11.05

(71)申请人 天津大学

地址 300072 天津市南开区卫津路92号

(72)发明人 王汉杰 张立立 常津 田雨
崔梅慧

(74)专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代
理事务所 12201

代理人 程小艳

(51)Int.Cl.

G01N 21/76(2006.01)

G01N 21/84(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

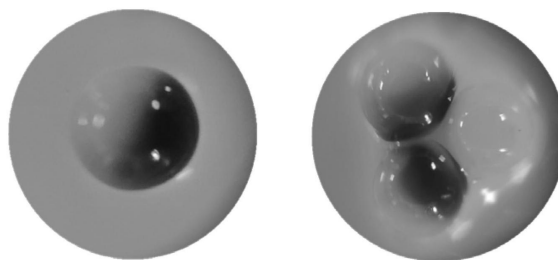
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

以多室水凝胶微粒为捕获载体的真菌毒素
可视化检测方法

(57)摘要

本发明公开以多室水凝胶微粒为捕获载体的真菌毒素可视化检测方法,主要步骤如下:以聚乙二醇200(PEG-200)、丙烯酰胺-聚乙二醇700(PEG-DA 700)、光引发剂1173、TE缓冲液为原料制备出不同粒径、不同形状的水凝胶微粒;经EDC活化后与毒素单克隆抗体进行结合反应;将菌毒素标准品与尿素酶经反应后制备成真菌毒素人工抗原;包被有抗体的微粒与人工抗原结合,加入尿素进行酶促反应,然后加入BCP显色液进行颗粒显色。



1. 以多室水凝胶微粒为捕获载体的真菌毒素可视化检测方法, 其特征在于, 主要步骤如下:

1) 以聚乙二醇200 (PEG-200)、丙烯酰胺-聚乙二醇700 (PEG-DA 700)、光引发剂1173、丙烯酸、TE缓冲液为原料制备出水凝胶微粒;

2) 利用对冲式毛细管微液滴发生装置, 以水凝胶预聚液为内相, 以二甲基硅油为外相, 通过控制注射泵流速, 内相管道的数量, 制备出不同粒径、不同形状的水凝胶微粒;

3) 制备好的水凝胶微粒经EDC活化后与毒素单克隆抗体进行结合反应;

4) 将菌毒素标准品与尿素酶经反应后制备成真菌毒素人工抗原;

5) 包被有抗体的微粒与人工抗原结合, 加入尿素进行酶促反应, 然后加入BCP显色液进行颗粒显色。

2. 根据权利要求1所述的以多室水凝胶微粒为捕获载体的真菌毒素可视化检测方法, 其特征在于, 水凝胶微粒的制备具体步骤如下:

(1) 1ml注射器每次吸取300-700ul的预聚液, 50ml注射器每次吸取二甲基硅油10-40ml;

(2) 利用注射泵将预聚液以10-30uL/min的流速泵出, 二甲基硅油以1000-3000uL/min泵出, 经塑料软管泵出后经紫外灯照射, 最终流入50ml离心管中;

(3) 回收二甲基硅油, 颗粒经双蒸水冲洗2-3遍后装入4ml离心管, 并保存于4度冰箱。

3. 根据权利要求1所述的以多室水凝胶微粒为捕获载体的真菌毒素可视化检测方法, 其特征在于, 水凝胶微粒连接毒素单克隆抗体具体步骤如下:

称取水凝胶微粒8-20mg于PBS缓冲液中, 称取1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 4-10mg和N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 8-20mg, 活化反应30min后离心清洗3次, 500ul PBS重悬, 加入4-20ul的0.02mg/ml毒素单克隆抗体, 避光反应2小时, 加入5% BSA封闭反应过夜。

4. 根据权利要求1所述的以多室水凝胶微粒为捕获载体的真菌毒素可视化检测方法, 其特征在于, 真菌毒素人工抗原的制备步骤如下:

(1) 吸取10-100ul真菌毒素标准品溶解于200ul无水乙醇中, 加入1.5-15mg EDC室温下避光震荡10min;

(2) 称取3-12mg尿素酶溶于1-4ml 0.13mol/L碳酸氢钠溶液中, 将1)中活化物加入其中, 室温下避光震荡2小时;

(3) 产物在0.01mol/L PBS溶液中透析72小时, 每隔6-8小时更换一次透析液, 透析结束后于-20℃冰箱保存。

5. 根据权利要求1所述的以多室水凝胶微粒为捕获载体的真菌毒素可视化检测方法, 其特征在于, 酶联免疫反应检测真菌毒素的具体步骤如下:

(1) 连有毒素抗体的微粒中加入25-100ul的人工抗原37℃孵育1小时, 0.128M NaCl洗微粒2-3次;

(2) 加入不同浓度梯度(0.001ng/ml-500ng/ml)的真菌毒素标准品37℃下竞争反应20-60min, 0.128M NaCl洗微粒2-3次;

(3) 加入50-100ul的100ng/ml的尿素, 37℃下孵育20-45min, 再加入1-20ul的BCP显色液避光显色1-20min, 取出微粒置于载玻片上, 智能手机进行图片捕获及分析处理。

以多室水凝胶微粒为捕获载体的真菌毒素可视化检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物学领域,具体涉及一种以多室水凝胶微粒为捕获载体的真菌毒素可视化检测方法。

背景技术

[0002] 随着我国经济水平的高速发展,人民生活水平不断提高,然而,食品安全问题也日益凸显。近年来,由真菌毒素引起的食品安全问题日益突出,真菌毒素是真菌在食品或饲料里生长所产生的代谢产物,对人类和动物都有害。真菌毒素是真菌在食品或饲料里生长所产生的代谢产物,对人类和动物都有害。据联合国粮农组织(FAO)报告,全球每年约有25%的农作物遭受真菌及其毒素污染。许多真菌毒素在体内积累后可产生致癌、致畸、致突变、类激素中毒、白细胞缺乏等症状,对机体造成永久性损害。

[0003] 食品检测技术是保障食品安全的重要手段,但传统的检测手段操作繁琐、耗时、费力、灵敏度不高,已经不适应当前社会的发展需求,因此探索快速准确、灵敏度高,且能同时分析多种组分的检测技术成为食品安全领域亟需解决的问题。基于传统检测方法的缺陷,快速检测技术已经成为近年来食品安全检测技术的发展大势。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供一种以多室水凝胶微粒为捕获载体的真菌毒素可视化检测方法。

[0005] 本发明的技术方案是一种以多室水凝胶微粒为捕获载体的真菌毒素可视化检测方法,步骤如下:

[0006] 1) 以聚乙二醇200(PEG-200)、丙烯酰胺-聚乙二醇700(PEG-DA 700)、光引发剂1173、丙烯酸、TE缓冲液为原料制备出水凝胶微粒;

[0007] 2) 利用对冲式毛细管微液滴发生装置,以水凝胶预聚液为内相,以二甲基硅油为外相,通过控制注射泵流速,内相管道的数量,制备出不同粒径、不同形状的水凝胶微粒。

[0008] 3) 制备好的水凝胶微粒经EDC活化后与毒素单克隆抗体进行结合反应;

[0009] 4) 将菌毒素标准品与尿素酶经反应后制备成真菌毒素人工抗原;

[0010] 5) 包被有抗体的微粒与人工抗原结合,加入尿素进行酶促反应,然后加入BCP显色液进行颗粒显色;最后使用智能手机进行图像采集及分析处理。

[0011] 水凝胶微粒的制备:

[0012] (1) 1ml注射器每次吸取300-700 μ l的预聚液,50ml注射器每次吸取二甲基硅油10-40ml;

[0013] (2) 利用注射泵将预聚液以10-30 μ L/min的流速泵出,二甲基硅油以1000-3000 μ L/min泵出,经塑料软管泵出后经紫外灯照射,最终流入50ml离心管中;

[0014] (3) 回收二甲基硅油,颗粒经双蒸水冲洗2-3遍后装入4ml离心管,并保存于4度冰箱。

[0015] 水凝胶微粒连接毒素单克隆抗体:

[0016] 称取水凝胶微粒8-20mg于PBS缓冲液中,称取1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC) 4-10mg和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 8-20mg,活化反应30min后离心清洗3次,500ul PBS重悬,加入4-20ul的0.02mg/ml毒素单克隆抗体,避光反应2小时,加入5%BSA封闭反应过夜。

[0017] 真菌毒素人工抗原的制备:

[0018] (1)吸取10-100ul真菌毒素标准品溶解于200ul无水乙醇中,加入1.5-15mg EDC室温下避光震荡10min;

[0019] (2)称取3-12mg尿素酶溶于1-4ml 0.13mol/L碳酸氢钠溶液中,将1)中活化物加入其中,室温下避光震荡2小时;

[0020] (3)产物在0.01mol/L PBS溶液中透析72小时,每隔6-8小时更换一次透析液,透析结束后于-20℃冰箱保存。

[0021] 酶联免疫反应检测真菌毒素

[0022] (1)连有毒素抗体的微粒中加入25-100ul的人工抗原37℃孵育1小时,0.128M NaCl洗微粒2-3次;

[0023] (2)加入不同浓度梯度(0.001ng/ml-500ng/ml)的真菌毒素标准品37℃下竞争反应20-60min,0.128M NaCl洗微粒2-3次;

[0024] (3)加入50-100ul的100ng/ml的尿素,37℃下孵育20-45min,再加入1-20ul的BCP

[0025] 显色液避光显色1-20min,取出微粒置于载玻片上,智能手机进行图片捕获及分析处理。有益效果:基于微流控设备及紫外光固化原理可制备出用于真菌毒素检测用的捕获载体,结合酶联免疫反应直接在微球上显现颜色,再结合智能手机图像捕获及图像分析,可方便快捷的进行真菌毒素的定量检测。

附图说明

[0026] 图1:不同粒径的水凝胶微粒图;

[0027] 图2:不同形状的水凝胶微粒图;

[0028] 图3:微粒用于真菌毒素检测图。

具体实施方式

[0029] 为进一步说明本发明,现通过具体实施实施例对本发明进行详细阐述。

[0030] 实施例1水凝胶微粒的制备

[0031] 1)不同粒径水凝胶微粒的形成:

[0032] (1)1ml注射器每次吸取300ul的预聚液,50ml注射器每次吸取二甲基硅油30ml;

[0033] (2)利用注射泵将预聚液分别以10、20、30uL/min的流速泵出,二甲基硅油以3000uL/min泵出,经塑料软管泵出后经紫外灯照射,最终流入50ml离心管中;

[0034] (3)回收二甲基硅油,不同粒径的颗粒经双蒸水冲洗3遍后装入4ml离心管;

[0035] 2)不同粒径的水凝胶微粒的放置在载玻片上,显微镜观察并拍照。

[0036] 实施例2双室水凝胶微粒的制备:

[0037] 1)双通道三相微流控平台的搭建:

[0038] 将两条内径为0.5mm的塑料软管胶连在一起,经三通管汇聚到内径为1.5cm的输液管中,三通管另一口与含有二甲基硅油的注射器相连,将装置与注射泵连接;

[0039] 2) 双室水凝胶微粒的产生:

[0040] (1) 两只1ml注射器分别吸取300ul的预聚液,50ml注射器吸取二甲基硅油30ml;

[0041] (2) 利用注射泵将预聚液分别以30uL/min的流速泵出,二甲基硅油以3000uL/min泵出,经塑料软管泵出后经紫外灯照射,最终流入50ml离心管中;

[0042] (3) 回收二甲基硅油,不同粒径的颗粒经双蒸水冲洗3遍后装入4ml离心管;

[0043] 3) 双室水凝胶微粒的放置在载玻片上,显微镜观察并拍照。

[0044] 实施例3三室水凝胶微粒的制备:

[0045] 1) 双通道四相微流控平台的搭建:

[0046] 将三条内径为0.5mm的塑料软管胶连在一起,经三通管汇聚到内径为4cm的输液管中,三通管另一口与含有二甲基硅油的注射器相连,将装置与注射泵连接;

[0047] 2) 三室水凝胶微粒的产生:

[0048] (1) 三只1ml注射器分别吸取300ul的预聚液,50ml注射器吸取二甲基硅油30ml;

[0049] (2) 利用注射泵将预聚液分别以10uL/min的流速泵出,二甲基硅油以1500uL/min泵出,经塑料软管泵出后经紫外灯照射,最终流入50ml离心管中;

[0050] (3) 回收二甲基硅油,不同粒径的颗粒经双蒸水冲洗3遍后装入4ml离心管;

[0051] (4) 三室水凝胶微粒的放置在载玻片上,显微镜观察并拍照。

[0052] 实施例4水凝胶微粒为捕获载体的真菌毒素可视化检测

[0053] 1) 水凝胶微粒的制备:

[0054] (1) 1ml注射器吸取300ul的预聚液,50ml注射器吸取二甲基硅油30ml;

[0055] (2) 利用注射泵将预聚液以30uL/min的流速泵出,二甲基硅油以3000uL/min泵出,经塑料软管泵出后经紫外灯照射,最终流入50ml离心管中;

[0056] (3) 回收二甲基硅油,颗粒经双蒸水冲洗3遍后装入4ml离心管,并保存于4度冰箱。

[0057] 实施例5水凝胶微粒连接毒素单克隆抗体:

[0058] 称取水凝胶微粒8mg于PBS缓冲液中,称取1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC) 4mg和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 8mg,活化反应30min后离心清洗3次,500ul PBS重悬,加入4ul的0.02mg/ml毒素单克隆抗体,避光反应2小时,加入5%BSA封闭反应过夜。

[0059] 实施例6真菌毒素人工抗原的制备:

[0060] (1) 吸取20ul真菌毒素标准品溶解于200ul无水乙醇中,加入3mg EDC室温下避光震荡10min;

[0061] (2) 称取3mg尿素酶溶于1ml 0.13mol/L碳酸氢钠溶液中,将1)中活化物加入其中,室温下避光震荡2小时;

[0062] (3) 产物在0.01mol/L PBS溶液中透析72小时,每隔6小时更换一次透析液,透析结束后于-20℃冰箱保存。

[0063] 实施例7酶联免疫反应检测真菌毒素

[0064] (1) 连有毒素抗体的微粒中加入50ul的人工抗原37℃孵育1小时,0.128M NaCl洗微粒3次;

[0065] (2) 加入不同浓度梯度(0.001ng/ml-500ng/ml)的真菌毒素标准品37℃下竞争反

应45min,0.128M NaCl洗微粒3次;

[0066] (3) 加入100ul的100ng/ml的尿素,37℃下孵育20-45min,再加入10ul的BCP显色液避光显色5min,取出微粒置于载玻片上,智能手机进行图片捕获及分析处理。

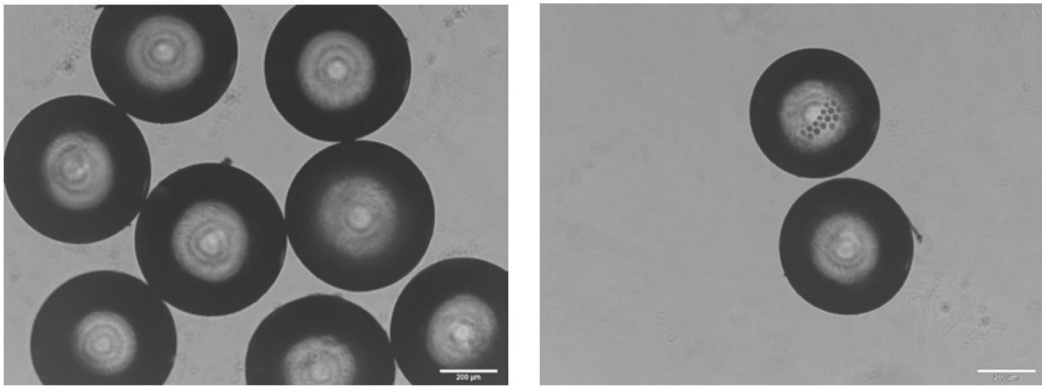


图1

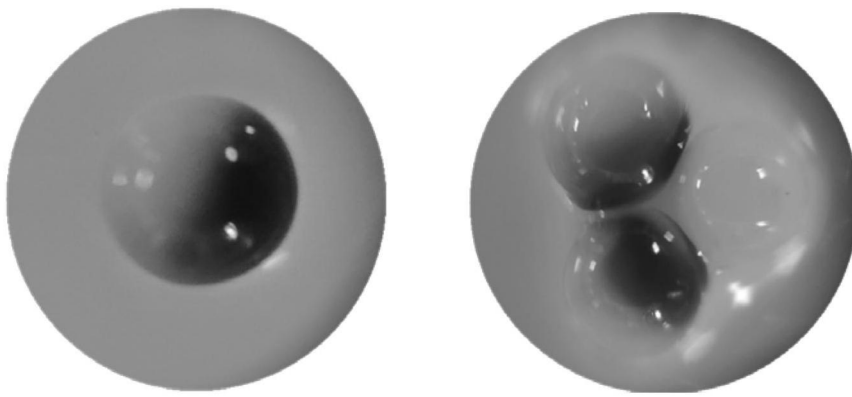


图2

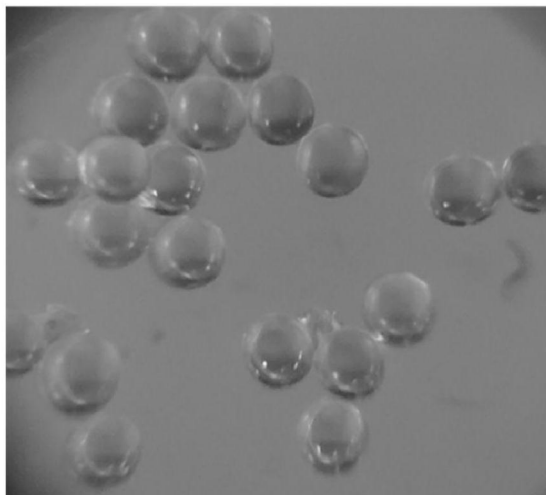


图3

专利名称(译)	以多室水凝胶微粒为捕获载体的真菌毒素可视化检测方法		
公开(公告)号	CN110865071A	公开(公告)日	2020-03-06
申请号	CN201911071060.1	申请日	2019-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	天津大学		
申请(专利权)人(译)	天津大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津大学		
[标]发明人	王汉杰 张立立 常津 田雨 崔梅慧		
发明人	王汉杰 张立立 常津 田雨 崔梅慧		
IPC分类号	G01N21/76 G01N21/84 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N21/763 G01N21/84 G01N33/531 G01N33/54306 G01N33/54313		
代理人(译)	程小艳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开以多室水凝胶微粒为捕获载体的真菌毒素可视化检测方法，主要步骤如下：以聚乙二醇200(PEG-200)、丙烯酰胺-聚乙二醇700(PEG-DA 700)、光引发剂1173、TE缓冲液为原料制备出不同粒径、不同形状的水凝胶微粒；经EDC活化后与毒素单克隆抗体进行结合反应；将菌毒素标准品与尿素酶经反应后制备成真菌毒素人工抗原；包被有抗体的微粒与人工抗原结合，加入尿素进行酶促反应，然后加入BCP显色液进行颗粒显色。

