



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112858683 A

(43)申请公布日 2021.05.28

(21)申请号 201911189720.6

(22)申请日 2019.11.28

(71)申请人 清华大学

地址 100084 北京市海淀区100084信箱82
分箱清华大学专利办公室

(72)发明人 李奕君 张天牧 何苗

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书2页 说明书20页 附图20页

(54)发明名称

一种利用免疫生物传感器同时快速检测多种抗生素的方法

(57)摘要

本发明公开了一种利用免疫生物传感器同时快速检测多种抗生素的方法。本发明保护一种同时检测31种抗生素的试剂盒,包括免疫传感芯片和荧光标记抗体溶液;免疫传感芯片上具有3个点位,1个点位修饰有林可霉素完全抗原,1个点位修饰有喹诺酮类抗生素完全抗原,1个点位修饰有磺胺类抗生素完全抗原;荧光标记抗体溶液提供的有效成分为荧光标记的林可霉素抗体、荧光标记的喹诺酮类抗生素抗体,荧光标记的磺胺类抗生素抗体;31种抗生素为林可霉素、13种喹诺酮类抗生素和17种磺胺类抗生素。本发明所需设备简单、操作简便,监测速度快、成本低、可靠性高,并具有较高的灵敏度,为抗生素污染的监管、防控提供技术支持。

1. 一种同时检测31种抗生素的试剂盒,包括免疫传感芯片和荧光标记抗体溶液;

所述免疫传感芯片上具有3个点位,1个点位修饰有林可霉素完全抗原,1个点位修饰有喹诺酮类抗生素完全抗原,1个点位修饰有磺胺类抗生素完全抗原;

所述荧光标记抗体溶液提供的有效成分为荧光标记的林可霉素抗体、荧光标记的喹诺酮类抗生素抗体,荧光标记的磺胺类抗生素抗体;

所述31种抗生素为林可霉素、13种喹诺酮类抗生素和17种磺胺类抗生素;

13种喹诺酮类抗生素为:奥比沙星、马波沙星、双氟沙星、沙拉沙星、达氟沙星、氟甲喹、环丙沙星、司帕沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、诺氟沙星、氟罗沙星、噁喹酸;

17种磺胺类抗生素为:磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噻二唑、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺氯哒嗪、磺胺甲氧哒嗪、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺二甲氧嗪、磺胺甲恶唑、磺胺二甲异唑、苯甲酰磺胺、磺胺喹噁啉、磺胺醋酰。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:

荧光标记的林可霉素抗体、荧光标记的喹诺酮类抗生素抗体和荧光标记的磺胺类抗生素抗体的质量配比依次为:2:0.6:1.25。

3. 如权利要求2所述的试剂盒,其特征在于:

所述荧光标记抗体溶液中,荧光标记的林可霉素抗体的浓度为2 μ g/mL,荧光标记的喹诺酮类抗生素抗体的浓度为0.6 μ g/mL,荧光标记的磺胺类抗生素抗体的浓度为1.25 μ g/mL。

4. 如权利要求1至3中任一所述的试剂盒,其特征在于:免疫传感芯片通过将完全抗原修饰于基片表面的点位得到;基片采用K9玻璃材料制成,基片前端设置有45度角斜面,基片后端涂黑。

5. 如权利要求1至4中任一所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括缓冲体系溶液;缓冲体系溶液:含2.5g/100ml EDTA的100mM PBS缓冲液。

6. 权利要求1至5中任一所述的试剂盒在检测所述31种抗生素中的应用。

7. 一种同时检测权利要求1中所述的31种抗生素的方法,包括如下步骤:

(1) 将权利要求1至4中任一所述的荧光标记抗体溶液与供试溶液混合孵育;所述供试溶液为待测溶液或空白溶液;所述空白溶液为PBS缓冲液;

(2) 将步骤(1)得到的混合液与权利要求1至4中任一所述的免疫传感芯片共孵育;

(3) 清洗免疫传感芯片表面;

(4) 检测免疫传感芯片表面的荧光信号;

对于修饰有林可霉素完全抗原的点位来说,如果待测溶液进行上述步骤的荧光信号显著低于空白溶液进行上述步骤的荧光信号,待测溶液中含有林可霉素;

对于修饰有喹诺酮类抗生素完全抗原的点位来说,如果待测溶液进行上述步骤的荧光信号显著低于空白溶液进行上述步骤的荧光信号,待测溶液中含有所述13种喹诺酮类抗生素中的至少一种;

对于修饰有磺胺类抗生素完全抗原的点位来说,如果待测溶液进行上述步骤的荧光信号显著低于空白溶液进行上述步骤的荧光信号,待测溶液中含有所述17种磺胺类抗生素中的至少一种。

8. 一种同时检测17种磺胺类抗生素的试剂盒,包括免疫传感芯片和荧光标记抗体溶液;

所述免疫传感芯片上具有n个点位,每个点位均修饰有磺胺类抗生素完全抗原;n为1至8之间的自然数;

所述荧光标记抗体溶液提供的有效成分为荧光标记的磺胺类抗生素抗体;

17种磺胺类抗生素为:磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噻二唑、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺氯哒嗪、磺胺甲氧哒嗪、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺二甲氧嗪、磺胺甲恶唑、磺胺二甲异唑、苯甲酰磺胺、磺胺喹噁啉、磺胺醋酐。

9.如权利要求8所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括缓冲体系溶液;缓冲体系溶液:含2.5g/100ml EDTA的100mM PBS缓冲液。

10.一种同时检测权利要求8中所述的17种磺胺类抗生素的方法,包括如下步骤:

(1)将权利要求8中所述的荧光标记抗体溶液与供试溶液混合孵育;所述供试溶液为待测溶液或空白溶液;所述空白溶液为PBS缓冲液;

(2)将步骤(1)得到的混合液与权利要求8中所述的免疫传感芯片共孵育;

(3)清洗免疫传感芯片表面;

(4)检测免疫传感芯片表面的荧光信号;

如果待测溶液进行上述步骤的荧光信号显著低于空白溶液进行上述步骤的荧光信号,待测溶液中含有所述17种磺胺类抗生素中的至少一种。

一种利用免疫生物传感器同时快速检测多种抗生素的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用免疫生物传感器同时快速检测多种抗生素的方法。

背景技术

[0002] 自19世纪发现青霉素以来,抗生素在世界范围内被广泛使用。抗生素能够干扰病原微生物的细胞发育功能,抑制细菌生长发育或者直接杀灭细菌,在人类医疗领域大发挥重要作用。近年来,更多的抗生素被应用在动物养殖产业,用于动物的治病、防病以及促进生长。

[0003] 根据普林斯顿大学的一项研究预测,2010-2030年全球抗生素消费量将增加67%,大规模集约化养殖业体系的发展将是这一增长的主要原因。相比于发达国家,发展中国家抗生素的使用并未受到有效监管,“金砖五国”的抗生素使用量更是占到全世界的76%。目前,中国是全世界最大的抗生素生产国和使用国。2013年中国抗生素的总生产量是24.8万吨,总使用量是16.2万吨,这其中动物用抗生素占到了52%,养殖业中常用的磺胺类抗生素、喹诺酮类抗生素和林可霉素使用量分别达到7890吨、25500吨和7820吨。在中国,每年有超过5万吨的抗生素经污水处理厂处理后进入环境当中,由于抗生素的难降解性及对微生物的抑制作用,现行的污水处理技术对抗生素的去除效率很低,残留的抗生素会随着处理厂出水汇入地表水或渗入地下水。随着抗生素种类及用量的不断增加,越来越多的抗生素开始进入自然环境并积累赋存,环境介质中的抗生素因此会干扰环境生态及其中生物的正常生长,同时可能诱发产生抗生素抗性细菌,因此抗生素被认为是一种具有巨大潜在危害和风险的污染物,引起了环境科研工作者和管理机构广泛关注。

[0004] 地表水中的抗生素来源主要包括养殖业、医疗行业、抗生素生产厂家和生活污水。研究表明,畜牧及水产养殖中所使用的抗生素已经成为地表水中抗生素的主要来源。相比于发达国家消灭病毒、净化空气、建立免疫区等做法,我国养殖业由于硬件设施差、养殖技术落后,养殖环境复杂等原因,大部分地区仍然停留在疫苗压制、抗生素预防、发病后抗生素治疗的阶段,对抗生素是依赖严重的。四环素、磺胺类、喹诺酮类、大环内酯类等抗生素在畜禽养殖饲料中均有添加。动物对抗生素的吸收能力有限,60%-90%的抗生素将通过粪便和尿液的形式排出体外。在中国,含有抗生素的废水和养殖固体废弃物的管理亟待加强,特别是在大部分农村地区,由于配套的市政基础设施有限,污水处理率较低。即使经过简单的处理,养殖废水中所含的大量抗生素仍会进入环境介质,低污水处理率的畜牧业可能对环境产生重大影响。水产养殖是我国渔业生产的主要手段,随着养殖规模的不断扩大,抗生素滥用情况也越来越严重,在1996-2013年间报道使用的抗生素已达20种。在水产养殖中所使用的抗生素仅有少量会被鱼类吸收,大部分将进入环境中。不仅如此,养殖户会向鱼塘中添加畜禽粪便用于促进鱼的生长,这种做法可能导致畜禽粪便中的抗生素直接进入水体。

[0005] 环境中抗生素的间接影响是导致耐药细菌和耐药基因的产生。环境中的抗生素会产生选择压力,导致耐药菌株种群数量的增加,进而发展成为优势菌株。具有耐药基因的菌株还会通过子代遗传和水平转移的方式传播耐药基因。耐药基因的传播会导致更多种耐药

菌的出现,耐药细菌已经成为人类医学所面临的难题之一。

[0006] 喹诺酮类抗生素是一类人工合成的人畜通用抗生素,作用机理是通过抑制DNA回旋酶,抑制细菌DNA合成,从而导致细菌死亡,达到抗菌目的。喹诺酮类抗生素具有高效性、类抗生素性和低副作用发生率等优点,被广泛应用于水产、畜牧养殖等行业。

[0007] 磺胺类抗生素是一类人工合成的人畜通用抗生素,作用机理是通过抑制细菌的叶酸循环达到抑菌目的。磺胺类抗生素具有类抗生素性、性质稳定、价格低廉等优点,在国内水产、畜牧养殖业中被大量应用。

[0008] 林可霉素属于林可内酰胺类抗生素,是一种由链霉菌产生的抗生素,作用机理是通过抑制细菌蛋白质合成达到抗菌目的。林可霉素具有较强的窄谱抗菌活性,对部分耐青霉素细菌仍有效,且可作为饲料添加剂用于促进牲畜生长,在畜牧养殖中应用广泛。

[0009] 当前环境中已检出多类抗生素,每一类抗生素中又包含了数种抗生素,在科学研究和政府管理的过程中,需要准确把握环境水体中一类或多类抗生素的含量,并科学分析一类或多类抗生素对生态环境产生的影响,对抗生素的管理。但是,目前现有的检测方法多是针对一种或几种特定的抗生素含量的检测研究,想要获得一类抗生素含量的检测工作量巨大。

发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一种利用免疫生物传感器同时快速检测多种抗生素的方法。

[0011] 本研究以喹诺酮类抗生素、磺胺类抗生素和林可霉素为研究对象,研究开发可以同时检测喹诺酮类抗生素、磺胺类抗生素和林可霉素三类抗生素的检测方法。

[0012] 本发明保护一种同时检测31种抗生素的试剂盒(试剂盒甲),包括免疫传感芯片(免疫传感芯片甲)和荧光标记抗体溶液(荧光标记抗体溶液甲);

[0013] 所述免疫传感芯片上具有3个点位,1个点位修饰有林可霉素完全抗原,1个点位修饰有喹诺酮类抗生素完全抗原,1个点位修饰有磺胺类抗生素完全抗原;

[0014] 所述荧光标记抗体溶液提供的有效成分为荧光标记的林可霉素抗体、荧光标记的喹诺酮类抗生素抗体,荧光标记的磺胺类抗生素抗体;

[0015] 所述31种抗生素为林可霉素、13种喹诺酮类抗生素和17种磺胺类抗生素;

[0016] 13种喹诺酮类抗生素为:奥比沙星、马波沙星、双氟沙星、沙拉沙星、达氟沙星、氟甲喹、环丙沙星、司帕沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、诺氟沙星、氟罗沙星、噁喹酸;

[0017] 17种磺胺类抗生素为:磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噻二唑、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺氯哒嗪、磺胺甲氧哒嗪、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺二甲氧嗪、磺胺甲恶唑、磺胺二甲异唑、苯甲酰磺胺、磺胺喹噁啉、磺胺醋酸。

[0018] 荧光标记的林可霉素抗体、荧光标记的喹诺酮类抗生素抗体和荧光标记的磺胺类抗生素抗体的质量配比依次为:2:0.6:1.25。

[0019] 所述荧光标记抗体溶液中,荧光标记的林可霉素抗体的浓度为 $2\mu\text{g/mL}$,荧光标记的喹诺酮类抗生素抗体的浓度为 $0.6\mu\text{g/mL}$,荧光标记的磺胺类抗生素抗体的浓度为 $1.25\mu\text{g/mL}$ 。

[0020] 所述荧光标记抗体溶液是将荧光标记的林可霉素抗体的保存液、荧光标记的喹诺

酮类抗生素抗体的保存液和荧光标记的磺胺类抗生素抗体的保存液和抗体稀释液混合得到的。

[0021] 荧光标记的林可霉素抗体的保存液中,荧光标记的林可霉素抗体的浓度为100–200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。荧光标记的喹诺酮类抗生素抗体的保存液中,荧光标记的喹诺酮类抗生素抗体的浓度为100–200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。荧光标记的磺胺类抗生素抗体的保存液中,荧光标记的磺胺类抗生素抗体的浓度为100–200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。抗体稀释液:含1g/100ml BSA、0.05g/100ml叠氮化钠,余量为PBS缓冲液。荧光标记的林可霉素抗体的保存液由荧光标记的林可霉素抗体和含0.01g/100ml叠氮化钠的PBS缓冲液组成。荧光标记的喹诺酮类抗生素抗体的保存液由荧光标记的喹诺酮类抗生素抗体和含0.01g/100ml叠氮化钠的PBS缓冲液组成。荧光标记的磺胺类抗生素抗体的保存液由荧光标记的磺胺类抗生素抗体和含0.01g/100ml叠氮化钠的PBS缓冲液组成。

[0022] 免疫传感芯片通过将完全抗原修饰于基片表面的点位得到;基片采用K9玻璃材料制成,基片前端设置有45度角斜面,基片后端涂黑。

[0023] 本发明还保护一种同时检测所述17种磺胺类抗生素的试剂盒(试剂盒乙),包括免疫传感芯片(免疫传感芯片乙)和荧光标记抗体溶液(荧光标记抗体溶液乙);所述免疫传感芯片上具有n个点位,每个点位均修饰有磺胺类抗生素完全抗原;n为1至8之间的自然数;所述荧光标记抗体溶液提供的有效成分为荧光标记的磺胺类抗生素抗体。

[0024] 所述荧光标记抗体溶液中,荧光标记的磺胺类抗生素抗体的浓度为1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。所述荧光标记抗体溶液是将荧光标记的磺胺类抗生素抗体的保存液和抗体稀释液混合得到的。荧光标记的磺胺类抗生素抗体的保存液中,荧光标记的磺胺类抗生素抗体的浓度为100–200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。抗体稀释液:含1g/100ml BSA、0.05g/100ml叠氮化钠,余量为PBS缓冲液。荧光标记的磺胺类抗生素抗体的保存液由荧光标记的磺胺类抗生素抗体和含0.01g/100ml叠氮化钠的PBS缓冲液组成。

[0025] 免疫传感芯片通过将完全抗原修饰于基片表面的点位得到;基片采用K9玻璃材料制成,基片前端设置有45度角斜面,基片后端涂黑。

[0026] 以上任一所述试剂盒还包括缓冲体系溶液;缓冲体系溶液:含2.5g/100ml EDTA的100mM PBS缓冲液。所述缓冲体系溶液可用于消除实际水样基质效应。

[0027] 本发明还保护一种同时检测所述31种抗生素的系统,包括平面波导免疫传感器和以上任一所述荧光标记抗体溶液甲。平面波导免疫传感器的传感元件为免疫传感芯片甲。

[0028] 本发明还保护一种同时检测所述17种磺胺类抗生素的系统,包括平面波导免疫传感器和以上任一所述荧光标记抗体溶液乙。平面波导免疫传感器的传感元件为免疫传感芯片乙。

[0029] 平面波导免疫传感器包括反应系统、光学系统、自动进样系统和信号处理系统。

[0030] 反应系统包括免疫传感芯片(免疫传感芯片甲或免疫传感芯片乙)和反应池;免疫传感芯片设置在反应池上部;反应池用于固定免疫传感芯片并提供反应场所;

[0031] 光学系统包括激光器、多模光纤耦合器、光电二极管和控制器。该光学系统能产生荧光激发光路和荧光收集光路,其中,荧光激发光路的工作过程为:激光器在控制器控制下发射的激光进入免疫传感芯片,在免疫传感芯片内部发生全反射,并在芯片表面预先设置的8个位点产生倏逝波,倏逝波可以激发免疫传感芯片表面的荧光物质,产生荧光信号。荧

光收集光路的工作过程为：多模光纤耦合器收集免疫传感芯片表面的荧光，并通过光电二极管将荧光信号转化为电信号，传输至信号处理系统。

[0032] 自动进样系统用于保证整个反应系统自动化运行，其包括注射泵、蠕动泵、电磁阀和六通阀。载液瓶、抗体瓶、样品瓶和活化液瓶出口均通过管路与六通阀入口连接，六通阀出口经管路与反应池一端连接，反应池另一端经管路与废液瓶连接。位于与反应池连接的管路上设置有注射泵、蠕动泵和电磁阀。使用时，通过预先设置注射泵、蠕动泵的运行时间以及电磁阀、六通阀的位置，实现每次反应各试剂精准进样，保证了反应的一致性和自动性。

[0033] 信号处理系统包括锁相放大器和信号处理终端，来自光电二极管的电信号经锁相放大器放大后传给信号处理终端，在信号处理终端处理后形成曲线，并显示信号。

[0034] 林可霉素完全抗原即林可霉素-BSA (林可霉素与BSA的连接产物)。

[0035] 林可霉素完全抗原：北京勤邦生物技术有限公司。

[0036] 林可霉素抗体：北京勤邦生物技术有限公司。

[0037] 喹诺酮类抗生素完全抗原即喹诺酮类抗生素-BSA (喹诺酮类抗生素与BSA的连接产物)。

[0038] 喹诺酮类抗生素完全抗原：北京谱明科技有限公司。

[0039] 喹诺酮类抗生素抗体：北京谱明科技有限公司。

[0040] 磺胺类抗生素完全抗原即磺胺类抗生素-BSA (磺胺类抗生素与BSA的连接产物)。

[0041] 磺胺类抗生素完全抗原：北京勤邦生物技术有限公司。

[0042] 磺胺类抗生素抗体：北京勤邦生物技术有限公司。

[0043] 本发明还保护以上任一所述的试剂盒或者系统在检测所述31种抗生素中的应用。

[0044] 本发明还保护以上任一所述的试剂盒或者系统在检测所述17种磺胺类抗生素中的应用。

[0045] 本发明还保护一种同时检测所述31种抗生素的方法，包括如下步骤：

[0046] (1) 将以上任一所述的荧光标记抗体溶液与供试溶液混合孵育；所述供试溶液为待测溶液或空白溶液；所述空白溶液为PBS缓冲液；

[0047] (2) 将步骤(1)得到的混合液与以上任一所述的免疫传感芯片共孵育；

[0048] (3) 清洗免疫传感芯片表面；

[0049] (4) 检测免疫传感芯片表面的荧光信号；

[0050] 对于修饰有林可霉素完全抗原的点位来说，如果待测溶液进行上述步骤的荧光信号显著低于空白溶液进行上述步骤的荧光信号，待测溶液中含有林可霉素；

[0051] 对于修饰有喹诺酮类抗生素完全抗原的点位来说，如果待测溶液进行上述步骤的荧光信号显著低于空白溶液进行上述步骤的荧光信号，待测溶液中含有13种喹诺酮类抗生素中的至少一种；

[0052] 对于修饰有磺胺类抗生素完全抗原的点位来说，如果待测溶液进行上述步骤的荧光信号显著低于空白溶液进行上述步骤的荧光信号，待测溶液中含有17种磺胺类抗生素中的至少一种。

[0053] 用林可霉素作为标准品制作标准曲线，还可以根据荧光信号强度对待测溶液中的林可霉素含量进行定量。

- [0054] 本发明还保护一种同时检测所述17种磺胺类抗生素的方法,包括如下步骤:
- [0055] (1) 将所述荧光标记抗体溶液与供试溶液混合孵育;所述供试溶液为待测溶液或空白溶液;所述空白溶液为PBS缓冲液;
- [0056] (2) 将步骤(1)得到的混合液与所述免疫传感芯片共孵育;
- [0057] (3) 清洗免疫传感芯片表面;
- [0058] (4) 检测免疫传感芯片表面的荧光信号;
- [0059] 如果待测溶液进行上述步骤的荧光信号显著低于空白溶液进行上述步骤的荧光信号,待测溶液中含有17种磺胺类抗生素中的至少一种。
- [0060] 供试待测溶液具体可为将4体积份供试水样与1体积份缓冲体系溶液混合得到的。
- [0061] 所述免疫芯片可多次重复使用。
- [0062] 所述免疫芯片可用于激光的传递,并在免疫芯片表面激发倏逝波。
- [0063] 所述免疫传感芯片具体可为按照实施例2的方法制备得到的免疫传感芯片。
- [0064] 所述荧光标记抗体具体可为按照实施例3的方法制备得到的荧光标记抗体。
- [0065] 所述同时检测所述31种抗生素的方法具体可为实施例4的方法。
- [0066] 所述同时检测所述17种磺胺类抗生素的方法具体可为实施例4的方法。
- [0067] 本发明中以林可霉素林完全抗原、磺胺类抗生素完全抗原和喹诺酮类抗生素完全抗原为生物识别分子固定在免疫芯片表面不同位点,使用荧光标记分子分别标记林可霉素抗体、磺胺类抗生素抗体和喹诺酮类抗生素抗体;将待测水样经缓冲体系缓冲后使用平面波导免疫生物传感器检测,检测过程中荧光标记抗体将与芯片表面对应抗原结合,荧光标记抗体中荧光标记分子被激发产生荧光,荧光强度与待测水样中抗生素含量成反比,通过不同点位荧光强度可计算水样中不同抗生素含量。
- [0068] 本发明解决了解决现有监测技术存在的监测种类单一,监测速度慢,监测成本高等问题。基于平面波导免疫生物传感器,通过对免疫芯片的特殊设计与加工、对特定生物材料的荧光处理等技术手段,可以实现环境水体中多种抗生素的同时定性和定量监测。该快速筛查技术所需设备简单、操作简便,监测速度快、成本低、可靠性高,并具有较高的灵敏度,为抗生素污染的监管、防控提供技术支持。

附图说明

- [0069] 图1为平面波导免疫传感器结构示意图。
- [0070] 图2为基片的结构和尺寸图。
- [0071] 图3为免疫传感芯片的制备流程示意图。
- [0072] 图4为林可霉素不同抗体浓度标准曲线。
- [0073] 图5为林可霉素不同抗体浓度下 B_{max} 、 IC_{50} 和 B_{max}/IC_{50} 。
- [0074] 图6为喹诺酮类抗生素不同抗体浓度标准曲线。
- [0075] 图7为喹诺酮类抗生素不同抗体浓度下 B_{max} 、 IC_{50} 和 B_{max}/IC_{50} 。
- [0076] 图8为磺胺类抗生素不同抗体浓度标准曲线。
- [0077] 图9为磺胺类抗生素不同抗体浓度下 B_{max} 、 IC_{50} 和 B_{max}/IC_{50} 。
- [0078] 图10为点位选择示意图。
- [0079] 图11为三种物质之间抗体-抗原交叉反应率的结果。

- [0080] 图12为喹诺酮类抗体与三类游离抗生素反应结果。
- [0081] 图13为磺胺类抗体与三类游离抗生素反应结果。
- [0082] 图14为林可霉素抗体与三类游离抗生素反应结果。
- [0083] 图15为三类抗生素同时检测标准曲线。
- [0084] 图16为不同pH条件下的免疫检测标准曲线。
- [0085] 图17为特征点位信号值差异性分析;a.空白;b.0.01 μ g/L处;c.0.1 μ g/L处;d.1 μ g/L处。
- [0086] 图18为不同pH条件下 A_0 及 IC_{50} 的变化。
- [0087] 图19为不同离子强度条件下的免疫检测标准曲线。
- [0088] 图20为特征点位信号值差异性分析:a.空白;b.0.01 μ g/L处;c.0.1 μ g/L处;d.1 μ g/L处。
- [0089] 图21为不同离子强度条件下 A_0 及 IC_{50} 的变化。
- [0090] 图22为不同重金属离子浓度下的免疫检测标准曲线。
- [0091] 图23为特征点位信号值差异性分析:a.空白;b.0.01 μ g/L处;c.0.1 μ g/L处;d.1 μ g/L处。
- [0092] 图24为不同重金属离子浓度下 A_0 及 IC_{50} 的变化。
- [0093] 图25为经过EDTA掩蔽后重金属离子浓度为0.625mg/L时标准曲线。

具体实施方式

[0094] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,如无特殊说明,均设置三个重复处理,结果取平均值。如无特殊说明,实施例中的溶液均为以水为溶剂的溶液。如无特殊说明,实施例中的PBS缓冲液pH均为7.4,浓度均为0.01mol/L。如无特殊说明,实施例中的抗体稀释液均为:含1g/100ml BSA、0.05g/100ml叠氮化钠,余量为PBS缓冲液。MTS:3-巯基丙基三甲氧基硅烷。GMBS:N-琥珀酰亚胺基-4-马来酰亚胺丁酸酯。BSA:牛血清蛋白。SDS:十二烷基硫酸钠。

[0095] 13种喹诺酮类抗生素为:奥比沙星、马波沙星、双氟沙星、沙拉沙星、达氟沙星、氟甲喹、环丙沙星、司帕沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、诺氟沙星、氟罗沙星、噁喹酸。

[0096] 17种磺胺类抗生素为:磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噻二唑、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺氯哒嗪、磺胺甲氧哒嗪、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺二甲氧嗪、磺胺甲恶唑、磺胺二甲异唑、苯甲酰磺胺、磺胺喹噁啉、磺胺醋酰。

[0097] 13种喹诺酮类抗生素储备液(同时含有13种喹诺酮类抗生素):用PBS缓冲液作为溶剂,13种喹诺酮类抗生素作为溶质,每种喹诺酮类抗生素的浓度均为100mg/L。

[0098] 17种磺胺类抗生素储备液(同时含有17种磺胺类抗生素):用PBS缓冲液作为溶剂,17种磺胺类抗生素作为溶质,每种磺胺类抗生素的浓度均为100mg/L。

[0099] 林可霉素储备液:用PBS缓冲液作为溶剂,林可霉素作为溶质,林可霉素的浓度为100mg/L。

[0100] 实施例1、平面波导免疫传感器的结构

[0101] 如图1所示,平面波导免疫传感器包括反应系统、光学系统、自动进样系统和信号处理系统。

[0102] 反应系统包括免疫传感芯片和反应池。免疫传感芯片设置在反应池上部;反应池用于固定免疫传感芯片并提供反应场所。

[0103] 光学系统包括激光器、多模光纤耦合器、光电二极管和控制器。该光学系统能产生荧光激发光路和荧光收集光路,其中,荧光激发光路的工作过程为:激光器在控制器控制下发射的激光进入免疫传感芯片,在免疫传感芯片内部发生全反射,并在芯片表面预先设置的8个位点产生倏逝波,倏逝波可以激发免疫传感芯片表面的荧光物质,产生荧光信号。荧光收集光路的工作过程为:多模光纤耦合器收集免疫传感芯片表面的荧光,并通过光电二极管将荧光信号转化为电信号,传输至信号处理系统。

[0104] 自动进样系统用于保证整个反应系统自动化运行,其包括注射泵、蠕动泵、电磁阀和六通阀。载液瓶、抗体瓶、样品瓶和活化液瓶出口均通过管路与六通阀入口连接,六通阀出口经管路与反应池一端连接,反应池另一端经管路与废液瓶连接。位于与反应池连接的管路上设置有注射泵、蠕动泵和电磁阀。使用时,通过预先设置注射泵、蠕动泵的运行时间以及电磁阀、六通阀的位置,实现每次反应各试剂精准进样,保证了反应的一致性和自动性。

[0105] 信号处理系统包括锁相放大器和信号处理终端,来自光电二极管的电信号经锁相放大器放大后传给信号处理终端,在信号处理终端处理后形成曲线,并显示信号。

[0106] 实施例2、免疫传感芯片的制备方法

[0107] 免疫传感芯片是通过将完全抗原修饰于基片表面得到。采用的修饰方法为巯基法(MTS+GMBS)。基片采用K9玻璃材料制成,如图2所示,在基片前端设置有45度角斜面(用于耦合激发光),后端由漆涂黑(用于吸收荧光)。基片宽度为15mm,厚度为1.5mm,上表面长度为63.5mm,下表面长度为65mm。免疫传感芯片的制备流程示意图如图3所示。

[0108] 1、表面引入羟基:将清洗干净的基片浸入食人鱼蚀刻液中,在120℃烘箱中反应2h;取出后用超纯水反复冲洗表面至pH为中性;用氮气吹干,放入70℃烘箱中过夜。此步骤的目的在于清洗基片表面,并引入丰富的羟基,烘箱中过夜时长大于12h,保证基片表面绝对无水。食人鱼蚀刻液由3体积份浓硫酸和1体积份双氧水组成。

[0109] 2、表面引入巯基:将步骤1处理后的基片从烘箱中取出并置于干燥皿中冷却至室温,然后放入用无水甲苯作为溶剂配制的2% (体积比) MTS溶液中,并在干燥皿中室温反应2h,然后用无水甲苯清洗表面三次,随后用无水乙醇冲洗三次,并用氮气吹干。此步骤的目的在于在表面引入巯基。此过程需严格无水。

[0110] 3、联接双功能基团:将步骤2处理后的基片放入用无水乙醇作为溶剂配制的2mM GMBS溶液中,室温反应1h,此过程中需不断补充GMBS溶液,防止基片暴露在空气中;反应完成后用无水乙醇冲洗三次,再用超纯水冲洗三次,并用氮气吹干。GMBS有马来酰亚胺和琥珀酰亚胺两个功能基团,其中马来酰亚胺端与基片表面巯基反应,暴露另一端的琥珀酰亚胺。

[0111] 4、固定完全抗原:将步骤3处理后的基片置于模具中,在特定点位滴入完全抗原溶液,每个点位滴入完全抗原溶液的体积为12 μ L,然后置于4℃冰箱中过夜,在此过程中需保证所处环境湿润。完全抗原为抗生素与BSA的连接产物,BSA基团上有丰富的氨基,可与琥珀

酰亚胺反应,从而被固定于基片表面。

[0112] 5、封闭:将步骤4处理后的基片从冰箱中取出,用移液枪吸弃表面溶液,再吸取20 μ L超纯水在修饰点位反复抽吸三次以清洗表面,并用氮气吹干;然后置于5mg/ml BSA溶液中室温封闭2h(BSA可与表面的活性基团反应,降低表面的非特异性吸附),然后用超纯水清洗并用氮气吹干,得到免疫传感芯片。免疫传感芯片置于4 $^{\circ}$ C冰箱中保存。

[0113] 实施例3、荧光标记抗体的制备方法

[0114] 采用的荧光染料为Cy5.5 HYDRAZIDE(带NHS基团的Cy5.5染料),Ge healthcare,货号PA15621。采用的透析袋均为8000-14000KD规格的透析袋。

[0115] 1、将抗体装入透析袋,将透析袋置于0.15mol/L NaCl溶液中室温透析4h,然后更换新的0.15mol/L NaCl溶液4 $^{\circ}$ C透析过夜,然后将透析袋置于pH8.3、0.1mol/L的碳酸氢钠溶液中室温透析3-4h,然后取出透析袋中的液相,用0.22 μ m滤膜过滤,收集滤液,即为抗体溶液。采用Bradford法检测抗体溶液的蛋白浓度,以总蛋白计量,抗体分子量以150KDa计,计算抗体溶液中抗体的摩尔浓度。

[0116] 2、将荧光染料溶解于DMSO,使荧光染料的浓度为10mg/mL,即为荧光染料溶液。

[0117] 3、将抗体溶液和荧光染料溶液混合(荧光染料与抗体的配比为20:1;摩尔比),置于恒温震荡器中室温反应30min。

[0118] 4、完成步骤3后,取整个液相,装入透析袋中,将透析袋置于0.15mol/L NaCl溶液中室温透析4h,然后更换新的0.15mol/L NaCl溶液4 $^{\circ}$ C透析过夜,然后将透析袋置于含0.01g/100ml叠氮化钠的PBS缓冲液中室温透析4h,然后更换新的含0.01g/100ml叠氮化钠的PBS缓冲液4 $^{\circ}$ C透析过夜,然后取出透析袋中的液相,用0.22 μ m滤膜过滤,收集滤液。

[0119] 5、取步骤4得到的滤液,使用含0.01g/100ml叠氮化钠的PBS缓冲液稀释,然后使用紫外分光光度计检测280nm处吸光度与680nm处吸光度,计算荧光标记抗体的标记比与荧光标记抗体的浓度。

[0120] $[Cy5.5] = A_{680} / 250000$; $[Ab] = (A_{280} - 0.18 * A_{680}) / 170000$; $[D/P] = [Cy5.5] / [Ab]$ 。

[0121] $[Cy5.5]$ 为荧光染料的浓度, $[Ab]$ 为荧光标记抗体的浓度, $[D/P]$ 为荧光标记抗体的标记比。Cy5.5在680nm下的摩尔吸收系数为 $250000M^{-1}cm^{-1}$,抗体在280nm下的摩尔吸收系数为 $170000M^{-1}cm^{-1}$ 。

[0122] 6、取步骤4得到的滤液,使用含0.01g/100ml叠氮化钠的PBS缓冲液稀释,得到荧光标记抗体保存液,-20 $^{\circ}$ C避光保存。荧光标记抗体保存液中,荧光标记抗体的浓度为100-200 μ g/ml。

[0123] 实施例4、采用平面波导免疫生物传感器进行检测的方法

[0124] 将免疫传感芯片放入反应池,平面波导生物传感器自动运行如下步骤:

[0125] a. 预反应。平面波导免疫生物传感器抽取800 μ L待测溶液与200 μ L荧光标记抗体溶液进入反应池,预反应4min。

[0126] b. 免疫传感芯片表面反应。经过预反应的混合溶液流经免疫传感芯片表面5min,未与待测溶液中物质反应的荧光标记抗体将与免疫传感芯片表面的完全抗原发生特异性结合反应。

[0127] c. 清洗。平面波导免疫生物传感器抽取3.2mL载液对免疫传感芯片表面进行冲洗,洗去未结合的荧光标记抗体,该过程持续约1min。载液:PBS缓冲液。

[0128] d. 信号测量。清洗完成后激光器打开,发射632.8nm的激发光并在免疫传感芯片内发生全反射,免疫传感芯片表面结合的荧光标记抗体产生荧光信号,荧光信号强度和免疫传感芯片表面荧光标记抗体含量成正相关,与待测溶液中目标物质含量成负相关。

[0129] 对检测信号用公式进行归一化处理。式中 B_i 为归一化以后的信号; B 为实际测量的信号; B_{∞} 为背景信号,背景信号为通入过量样品时所测得的信号; B_0 为空白信号,空白信号为通入PBS缓冲溶液时的信号。

[0130] 公式: $B_i = (B - B_{\infty}) / (B_0 - B_{\infty})$

[0131] e. 芯片表面活化。测量结束后激光器关闭,平面波导免疫生物传感器持续通入活化液3min对芯片表面进行活化。抗原抗体之间的结合为非共价结合,具有可逆性,通过改变溶液pH等方式可以打破这种结合,洗脱免疫传感芯片表面的荧光抗体,活化免疫传感芯片。活化液:0.5g/100ml SDS溶液(pH1.9)。

[0132] f. 清洗。平面波导生物免疫传感器持续通入载液1min,清洗SDS溶液,随后测量过程结束,仪器可进入下一次测量过程。

[0133] 实施例5、检测林可霉素的方法的建立以及标准曲线的制备

[0134] 一、林可霉素免疫传感芯片的制备

[0135] 完全抗原溶液由林可霉素完全抗原和PBS缓冲液组成。完全抗原溶液中,林可霉素完全抗原的浓度为0.5mg/ml。林可霉素完全抗原即林可霉素-BSA(林可霉素与BSA的连接产物)。

[0136] 林可霉素完全抗原:北京勤邦生物技术有限公司。

[0137] 采用实施例2的方法,制备免疫传感芯片。

[0138] 二、荧光标记抗体溶液的制备

[0139] 抗体采用林可霉素抗体。

[0140] 林可霉素抗体:北京勤邦生物技术有限公司。

[0141] 采用实施例3的方法,制备荧光标记抗体,得到荧光标记抗体保存液。

[0142] 取荧光标记抗体保存液,用抗体稀释液进行稀释,得到不同浓度的荧光标记抗体溶液。荧光标记抗体溶液中,荧光标记抗体的浓度分别为:1 μ g/mL、2 μ g/mL或10 μ g/mL。

[0143] 三、标准品溶液的制备

[0144] 取林可霉素储备液,用PBS缓冲液作为稀释溶剂,制备不同浓度的林可霉素溶液。林可霉素溶液中,林可霉素的浓度分别为:0.0001 μ g/L、0.0005 μ g/L、0.001 μ g/L、0.005 μ g/L、0.01 μ g/L、0.05 μ g/L、0.1 μ g/L、0.5 μ g/L、1 μ g/L、5 μ g/L、10 μ g/L、100 μ g/L或1000 μ g/L。

[0145] 四、将步骤一制备的免疫传感芯片放入反应池,采用平面波导免疫生物传感器和步骤二制备的荧光标记抗体溶液对步骤三制备的标准品溶液进行检测(检测方法见实施例4)。

[0146] 结果见图4。空白信号值(B_{max})、半抑制浓度(IC_{50})和 B_{max}/IC_{50} 如图5所示。使用Logistic模型对曲线进行拟合,拟合结果如表1所示。不同浓度的抗体对检测结果存在一定影响,随着抗体浓度的提高,检测限也不断增加。当抗体浓度为1 μ g/mL时,检测限为0.001 μ g/L,灵敏度高,线性范围为0.005 μ g/L-1.02 μ g/L。当抗体浓度为2 μ g/mL时,检测限上升但线性范围变窄。当抗体浓度上升到10 μ g/mL时,检测限为0.02 μ g/L,线性范围变宽。综合分析,1 μ g/L抗体浓度检测限最低,但是其 B_{max} 数值过小,仅为1000左右,2 μ g/mL抗体浓度比10 μ g/mL

抗体浓度的 $B_{\max}/IC_{50}$ 值更大,因此选择 $2\mu\text{g/mL}$ 作为最佳抗体使用浓度。最优检测性能($2\mu\text{g/mL}$ 抗体浓度):检测限为 $0.01\mu\text{g/L}$,线性范围为 $0.01\mu\text{g/L}$ – $0.94\mu\text{g/L}$, IC_{50} 为 $0.10\mu\text{g/L}$ 。该检测方法可高灵敏度、快速、准确定量检测林可霉素,检测限比高效液相色谱法检测林可霉素含量低一个数量级。

[0147] 表1不同抗体浓度下林可霉素检测性能

抗体浓度($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/L}$)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)
1	0.07	0.001	0.005–1.02
2	0.10	0.01	0.01–0.94
10	0.28	0.02	0.04–1.85

[0149] 实施例6、检测喹诺酮类抗生素的方法的建立以及标准曲线的制备

[0150] 一、喹诺酮类抗生素免疫传感芯片的制备

[0151] 完全抗原溶液由喹诺酮类抗生素完全抗原和PBS缓冲液组成。完全抗原溶液中,喹诺酮类抗生素完全抗原的浓度为 0.5mg/mL 。喹诺酮类抗生素完全抗原即喹诺酮类抗生素–BSA(喹诺酮类抗生素与BSA的连接产物)。

[0152] 喹诺酮类抗生素完全抗原:北京谱明科技有限公司。

[0153] 采用实施例2的方法,制备免疫传感芯片。

[0154] 二、荧光标记抗体溶液的制备

[0155] 抗体采用喹诺酮类抗生素抗体。

[0156] 喹诺酮类抗生素抗体:北京谱明科技有限公司。

[0157] 采用实施例3的方法,制备荧光标记抗体,得到荧光标记抗体保存液。

[0158] 取荧光标记抗体保存液,用抗体稀释液进行稀释,得到不同浓度的荧光标记抗体溶液。荧光标记抗体溶液中,荧光标记抗体的浓度分别为: $0.6\mu\text{g/mL}$ 、 $2\mu\text{g/mL}$ 或 $5\mu\text{g/mL}$ 。

[0159] 三、标准品溶液的制备

[0160] 取13种喹诺酮类抗生素储备液,用PBS缓冲液作为稀释溶剂,制备不同浓度的喹诺酮类抗生素溶液(混标溶液)。喹诺酮类抗生素溶液中,13种喹诺酮类抗生素的浓度相同。喹诺酮类抗生素溶液中,13种喹诺酮类抗生素的浓度均为: $0.0001\mu\text{g/L}$ 、 $0.0005\mu\text{g/L}$ 、 $0.001\mu\text{g/L}$ 、 $0.005\mu\text{g/L}$ 、 $0.01\mu\text{g/L}$ 、 $0.05\mu\text{g/L}$ 、 $0.1\mu\text{g/L}$ 、 $0.5\mu\text{g/L}$ 、 $1\mu\text{g/L}$ 、 $5\mu\text{g/L}$ 、 $10\mu\text{g/L}$ 、 $100\mu\text{g/L}$ 或 $1000\mu\text{g/L}$ 。

[0161] 四、将步骤一制备的免疫传感芯片放入反应池,采用平面波导免疫生物传感器和步骤二制备的荧光标记抗体溶液对步骤三制备的标准品溶液进行检测(检测方法见实施例4)。

[0162] 结果见图6。空白信号值($B_{\max}$)、半抑制浓度(IC_{50})和 $B_{\max}/IC_{50}$ 如图7所示。使用Logistic模型对曲线进行拟合,拟合结果如表2所示。不同浓度的抗体对检测结果存在一定影响,随着抗体浓度的提高,检测限也不断增加。当抗体浓度为 $0.6\mu\text{g/mL}$ 时,检测限为 $0.01\mu\text{g/L}$,灵敏度最高,线性范围为 $0.03\mu\text{g/L}$ – $2.97\mu\text{g/L}$,线性范围最宽。当抗体浓度为 $2\mu\text{g/mL}$ 时,检测限为 $0.02\mu\text{g/L}$,线性范围为 $0.08\mu\text{g/L}$ – $2.46\mu\text{g/L}$,检测限上升,同时线性范围变窄。当抗体浓度上升到 $5\mu\text{g/mL}$ 时,检测限相比 $0.6\mu\text{g/mL}$ 增加了一倍,线性范围为 $0.08\mu\text{g/L}$ – $2.53\mu\text{g/L}$,虽然线性范围有所变宽,但仍没有 $0.6\mu\text{g/mL}$ 检测效果好。比较三条曲线 $B_{\max}/IC_{50}$, $0.6\mu\text{g/mL}$ 和 $2\mu\text{g/mL}$ 抗体浓度下 $B_{\max}/IC_{50}$ 相差不大,且 $0.6\mu\text{g/mL}$ 检测性能明显优于 $2\mu\text{g/mL}$ 。因此,将

0.6 μ g/mL作为最佳抗体使用浓度。最优检测性能(0.6 μ g/mL抗体浓度):检测限为0.01 μ g/L,线性范围为0.03 μ g/L-2.97 μ g/L,IC₅₀为0.26 μ g/L。该检测方法可高灵敏度、快速、筛查喹诺酮类抗生素,可对超过13种喹诺酮类抗生素产生响应。

[0163] 表2不同抗体浓度下喹诺酮类抗生素检测性能

[0164]	抗体浓度(μ g/mL)	IC ₅₀ (μ g/L)	LOD(μ g/L)	线性范围(μ g/L)
	0.60	0.26	0.01	0.03-2.97
	2.00	0.43	0.02	0.08-2.46
	5.00	0.43	0.02	0.08-2.53

[0165] 五、分别制备单种抗生素的标准品溶液。标准品溶液中,抗生素的浓度分别为:1 μ g/L、5 μ g/L、10 μ g/L、100 μ g/L或1000 μ g/L。抗生素分别为13种喹诺酮类抗生素。将步骤一制备的免疫传感芯片放入反应池,采用平面波导免疫生物传感器和步骤二制备的荧光标记抗体溶液对各个单种抗生素标准品溶液进行检测(检测方法见实施例4)。每种标准品溶液均可使得荧光信号强度相对空白信号显著降低。

[0166] 实施例7、检测磺胺类抗生素的方法的建立以及标准曲线的制备

[0167] 一、磺胺类抗生素免疫传感芯片的制备

[0168] 完全抗原溶液由磺胺类抗生素完全抗原和PBS缓冲液组成。完全抗原溶液中,磺胺类抗生素完全抗原的浓度为0.5mg/ml。磺胺类抗生素完全抗原即磺胺类抗生素-BSA(磺胺类抗生素与BSA的连接产物)。

[0169] 磺胺类抗生素完全抗原:北京勤邦生物技术有限公司。

[0170] 采用实施例2的方法,制备免疫传感芯片。

[0171] 二、荧光标记抗体溶液的制备

[0172] 抗体采用磺胺类抗生素抗体。

[0173] 磺胺类抗生素抗体:北京勤邦生物技术有限公司。

[0174] 采用实施例3的方法,制备荧光标记抗体,得到荧光标记抗体保存液。

[0175] 取荧光标记抗体保存液,用抗体稀释液进行稀释,得到不同浓度的荧光标记抗体溶液。荧光标记抗体溶液中,荧光标记抗体的浓度分别为:0.6 μ g/mL、1.25 μ g/mL或5 μ g/mL。

[0176] 三、标准品溶液的制备

[0177] 取17种磺胺类抗生素储备液,用PBS缓冲液作为稀释溶剂,制备不同浓度的磺胺类抗生素溶液(混标溶液)。磺胺类抗生素溶液中,17种喹诺酮类抗生素的浓度相同。磺胺类抗生素溶液中,17种喹诺酮类抗生素的浓度均为:0.0001 μ g/L、0.0005 μ g/L、0.001 μ g/L、0.005 μ g/L、0.01 μ g/L、0.05 μ g/L、0.1 μ g/L、0.5 μ g/L、1 μ g/L、5 μ g/L、10 μ g/L、100 μ g/L或1000 μ g/L。

[0178] 四、将步骤一制备的免疫传感芯片放入反应池,采用平面波导免疫生物传感器和步骤二制备的荧光标记抗体溶液对步骤三制备的标准品溶液进行检测(检测方法见实施例4)。

[0179] 结果如图8所示。空白信号值(B_{max})、半抑制浓度(IC₅₀)和B_{max}/IC₅₀如图9所示。使用Logistic模型对曲线进行拟合,拟合结果如表3所示。不同浓度的抗体对检测结果存在一定影响,随着抗体浓度的提高,检测限也不断增加。当抗体浓度为0.6 μ g/mL时,检测限为0.001 μ g/L,灵敏度高,线性范围为0.01 μ g/L-0.51 μ g/L。当抗体浓度为1.25 μ g/mL时,检测限为0.02 μ g/L,线性范围为0.05 μ g/L-1.16 μ g/L,检测限上升,同时线性范围也变宽。当抗体浓度

上升到5 $\mu\text{g/mL}$ 时,检测限为0.02 $\mu\text{g/L}$,线性范围变窄。相比而言,0.60 $\mu\text{g/L}$ 检测效果最佳,但通过图中数据可知,0.60 $\mu\text{g/L}$ 标准曲线 B_{max} 数值过小,仅为1000左右,背景信号对检测结果影响过大。比较三条曲线 B_{max}/IC_{50} ,1.25 $\mu\text{g/mL}$ 和5 $\mu\text{g/mL}$ 相差不大,从节约成本的角度考虑,选择1.25 $\mu\text{g/mL}$ 为最佳抗体使用浓度。最优检测性能(1.25 $\mu\text{g/mL}$ 抗体浓度):检测限为0.02 $\mu\text{g/L}$,线性范围为0.03 $\mu\text{g/L}$ -2.97 $\mu\text{g/L}$, IC_{50} 为0.28 $\mu\text{g/L}$ 。该检测方法可高灵敏度、快速、筛查磺胺类抗生素,可对17种磺胺类抗生素产生响应。

[0180] 表3不同抗体浓度下磺胺类抗生素检测性能

抗体浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/L}$)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)
0.60	0.06	0.0001	0.01-0.51
1.25	0.28	0.02	0.05-1.16
5.00	0.26	0.02	0.07-1.17

[0182] 五、分别制备单种抗生素的标准品溶液。标准品溶液中,抗生素的浓度分别为:1 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 或1000 $\mu\text{g/L}$ 。抗生素分别为17种磺胺类抗生素。将步骤一制备的免疫传感芯片放入反应池,采用平面波导免疫生物传感器和步骤二制备的荧光标记抗体溶液对各个单种抗生素标准品溶液进行检测(检测方法见实施例4)。每种标准品溶液均可使得荧光信号强度相对空白信号显著降低。

[0183] 实施例8、特异性

[0184] 一、三种抗原免疫传感芯片的制备

[0185] 在芯片上不同的点位修饰不同类抗生素的完全抗原。降低边界效应的影响,不选择边界上的点位,同时为了避免相邻点位之间互相干扰,修饰点位间隔1-2个点位,修饰点位选择2、4、6号点位,点位选择如图10所示。2、4、6号点位,其中1个点位的完全抗原溶液采用实施例5的步骤一中的完全抗原溶液(林可霉素完全抗原点位),其中1个点位的完全抗原溶液采用实施例6的步骤一中的完全抗原溶液(喹诺酮类抗生素完全抗原点位),其中1个点位的完全抗原溶液采用实施例7的步骤一中的完全抗原溶液(磺胺类抗生素完全抗原点位)。

[0186] 采用实施例2的方法,制备免疫传感芯片。

[0187] 二、荧光标记抗体溶液的制备

[0188] 取实施例5的步骤二制备的荧光标记抗体保存液,用抗体稀释液进行稀释,得到荧光标记抗体溶液(用LIN表示)。荧光标记抗体溶液中,荧光标记抗体的浓度为2 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0189] 取实施例6的步骤二制备的荧光标记抗体保存液,用抗体稀释液进行稀释,得到荧光标记抗体溶液(用QNS表示)。荧光标记抗体溶液中,荧光标记抗体的浓度为0.6 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0190] 取实施例7的步骤二制备的荧光标记抗体保存液,用抗体稀释液进行稀释,得到荧光标记抗体溶液(用SUL表示)。荧光标记抗体溶液中,荧光标记抗体的浓度为1.25 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0191] 三、将三种荧光标记抗体溶液分别与免疫传感芯片进行反应(方法参照实施例4),测定免疫传感芯片与三类荧光标记抗体溶液反应各点位信号。

[0192] 不同物质之间的特异性反应结果可以用交叉反应率来表示。举例来说,将QNS与免疫传感芯片反应进行反应,记录喹诺酮类抗生素修饰点反应信号为 $F_{(\text{BSA-QNS}) \text{ and } (\text{QNS-Ab})}$,磺胺类抗生素修饰点反应信号为 $F_{(\text{BSA-SUL}) \text{ and } (\text{QNS-Ab})}$,则喹诺酮类抗体和磺胺类抗原两者的交叉反应率可以通过以下公式表示:

$$[0193] \quad CR\% = \frac{F_{(BSA-SUL)and (QNS-Ab)}}{F_{(BSA-QNS) and (QNS-Ab)}} \times 100\%$$

[0194] 三种物质之间抗体-抗原交叉反应率的结果见图11。结果表明,三种物质之间交叉反应率小于10%,这说明三种物质之间的抗原-抗体几乎不发生交叉反应,特异性强。同一芯片上修饰的三种完全抗原之间不存在相互影响。

[0195] 四、标准品溶液的制备

[0196] 林可霉素溶液,同实施例5的步骤三。

[0197] 喹诺酮类抗生素溶液,同实施例6的步骤三。

[0198] 磺胺类抗生素溶液,同实施例7的步骤三。

[0199] 五、将步骤一制备的免疫传感芯片放入反应池,采用平面波导免疫生物传感器和步骤二制备的QNS对步骤四制备的各个标准品溶液进行检测(检测方法见实施例4),检测喹诺酮类抗生素完全抗原点位的荧光信号。结果见图12。当喹诺酮类抗生素浓度的增加时,检测信号值出现规律性下降。随着磺胺类抗生素和林可霉素的浓度的增加,B/B₀值一直在1附近,为检测空白信号值,说明溶液中游离的磺胺类抗生素和林可霉素不会对喹诺酮类抗体与免疫传感芯片表面喹诺酮类完全抗原的结合产生影响,不会对喹诺酮类抗生素的检测信号产生影响。

[0200] 六、将步骤一制备的免疫传感芯片放入反应池,采用平面波导免疫生物传感器和步骤二制备的SUL对步骤四制备的各个标准品溶液进行检测(检测方法见实施例4),检测磺胺类抗生素完全抗原点位的荧光信号。结果见图13。溶液中游离喹诺酮类抗生素和林可霉素不会对磺胺类的检测信号产生影响。

[0201] 七、将步骤一制备的免疫传感芯片放入反应池,采用平面波导免疫生物传感器和步骤二制备的LIN对步骤四制备的各个标准品溶液进行检测(检测方法见实施例4),检测林可霉素完全抗原点位的荧光信号。结果见图14。溶液中游离的喹诺酮类抗生素和磺胺类抗生素不会对林可霉素的检测信号产生影响。

[0202] 综上所述,表面修饰三类抗生素完全抗原对芯片表面反应不会产生影响,游离的三类抗生素也不会对芯片表面反应产生影响,可以进行三类抗生素的同步检测研究。

[0203] 实施例9、同步检测方法的建立

[0204] 一、三种抗原免疫传感芯片的制备

[0205] 同实施例8的步骤一。

[0206] 二、荧光标记抗体溶液的制备

[0207] 取实施例5的步骤二制备的荧光标记抗体保存液、实施例6的步骤二制备的荧光标记抗体保存液和实施例7的步骤二制备的荧光标记抗体保存液,混合,用抗体稀释液进行稀释,得到荧光标记抗体溶液。荧光标记抗体溶液中,荧光标记的林可霉素抗体的浓度为2μg/mL,荧光标记的喹诺酮类抗生素抗体的浓度为0.6μg/mL,荧光标记的磺胺类抗生素抗体的浓度为1.25μg/mL。

[0208] 三、标准品溶液的制备

[0209] 取林可霉素储备液、13种喹诺酮类抗生素储备液,17种磺胺类抗生素储备液,混合,用PBS缓冲液作为稀释溶剂,制备不同浓度的标准品溶液(混标溶液)。标准品溶液中,31种抗生素(林可霉素、13种喹诺酮类抗生素、17种磺胺类抗生素)的浓度相同。标准品溶液中,

31种抗生素的浓度均为:0.0001 μ g/L、0.0005 μ g/L、0.001 μ g/L、0.005 μ g/L、0.01 μ g/L、0.05 μ g/L、0.1 μ g/L、0.5 μ g/L、1 μ g/L、5 μ g/L、10 μ g/L、100 μ g/L或1000 μ g/L。

[0210] 四、将步骤一制备的免疫传感芯片放入反应池,采用平面波导免疫生物传感器和步骤二制备的荧光标记抗体溶液对步骤三制备的标准品溶液进行检测(检测方法见实施例4)。

[0211] 结果见图15。

[0212] 三种物质单独检测和同时检测性能对比见表4。喹诺酮类抗生素、磺胺类抗生素、林可霉素三类物质同时检测与单独检测相比三种物质的检测限和定量检测区间均未发生明显变化,三种物质的同时检测的检测限分别为:0.02 μ g/L、0.01 μ g/L、0.03 μ g/L。说明三类抗生素同时检测具有可行性。

[0213] 表4三类抗生素同时检测与单独检测性能对比

[0214]	检测方法	物质	检测限 (μ g/L)	定量检测区间 (μ g/L)
	单独检测	喹诺酮类抗生素	0.01	0.03-2.97
		磺胺类抗生素	0.02	0.05-1.16
		林可霉素	0.01	0.01-0.94
	同时检测	喹诺酮类抗生素	0.02	0.04-4.24
		磺胺类抗生素	0.01	0.03-1.33
		林可霉素	0.03	0.05-0.82

[0215] 实施例10、pH对传感器检测性能的影响

[0216] 配制10mM PBS缓冲液,使用1mol/L盐酸溶液或1mol/L氢氧化钠溶液调pH,使pH分别为4、5、6、7.4、8、9或10。

[0217] 一、免疫传感芯片的制备

[0218] 同实施例6的步骤一。

[0219] 二、荧光标记抗体溶液的制备

[0220] 用本实施例制备的PBS缓冲液制备抗体稀释液。取实施例6的步骤二制备的荧光标记抗体保存液,用抗体稀释液进行稀释,得到荧光标记抗体溶液。荧光标记抗体溶液中,荧光标记抗体的浓度为0.6 μ g/mL。

[0221] 三、标准品溶液的制备

[0222] 取13种喹诺酮类抗生素储备液,用本实施例制备的PBS缓冲液作为稀释溶剂,制备不同浓度的喹诺酮类抗生素溶液(混标溶液)。喹诺酮类抗生素溶液中,13种喹诺酮类抗生素的浓度相同。喹诺酮类抗生素溶液中,13种喹诺酮类抗生素的浓度均为:0.0001 μ g/L、0.001 μ g/L、0.01 μ g/L、0.1 μ g/L、1 μ g/L、10 μ g/L、100 μ g/L或1000 μ g/L。

[0223] 步骤二和步骤三的PBS缓冲液采用相同pH。

[0224] 四、将步骤一制备的免疫传感芯片放入反应池,采用平面波导免疫生物传感器和步骤二制备的荧光标记抗体溶液对步骤三制备的标准品溶液进行检测(检测方法见实施例4)。

[0225] 结果见图16。不同pH条件下的免疫检测标准曲线差异明显,pH值对检测性能影响较大。pH7.4与生物体内环境pH相似,因此选择pH7.4的曲线为空白对照组。

[0226] 通过对不同pH下空白值,0.01 μ g/L处信号值(约为80%最大信号值),0.1 μ g/L处信

号值(约为50%最大信号值),1 μ g/L处信号值(约为20%最大信号值)进行显著性差异分析,评价不同pH下标准曲线差异,见图17。不同pH条件下A₀及IC₅₀的变化见图18。不同pH条件下平面波导免疫检测性能见表5。

[0227] pH值在5-7.4之间时,四个点位均不存在显著性差异,pH值为8时仅有1个点存在显著性差异,说明曲线较为接近,标准曲线受pH值变化影响较小。A₀变化在15%以内,IC₅₀变化在10%以内,检测限及定量检测区间均未发生明显变化,说明pH值在5-8之间时检测性能基本能保持一致,pH值在5-8之间为平面波导免疫生物传感器适用检测区间。

[0228] pH值为9时,四个点位信号值和pH值在5-7.4之间时的四个点位信号值存在一个*的显著性差异,说明曲线和pH值在5-7.4之间时的四条曲线存在较大差异。虽然Logistic曲线拟合r²较好,曲线仍能保持反S形状,但是A₀下降了约50%,变化明显,检测限上升,定量检测区间右移,说明pH值为9时平面波导免疫生物传感器检测性能受到了一定的影响。

[0229] pH值为4和10时,四个点位信号值和pH值在5-7.4之间时的四个点位信号值存在两个*的显著性差异,说明曲线和pH值在5-7.4之间时的四条曲线存在极大差异。直观上可以看出,当pH为4和10的时候曲线几乎为一条直线,信号值消失,失去检测能力,说明在极端pH条件下平面波导免疫传感器无法工作。

[0230] 在实际水样的检测中,样品pH未知,因此不可直接检测,需要对实际样品进行缓冲,之前的研究均建立在10mM PBS体系上,10mM PBS缓冲能力有限,为了使检测方法能适应更多水样,缓冲体系考虑使用更高浓度的PBS溶液。提高PBS溶液浓度的同时也加强了反应体系的离子强度,因此需要进行离子强度对传感器检测性能的影响研究。

[0231] 表5不同pH条件下平面波导免疫检测性能

pH值	LOD (μ g/L)	定量检测区间 (μ g/L)
4	无	无
5	0.02	0.02-1.74
6	0.01	0.02-3.40
7.4	0.01	0.02-2.50
8	0.01	0.03-2.01
9	0.03	0.04-4.03
10	无	无

[0233] 实施例11、离子强度对传感器检测性能的影响

[0234] 配制不同浓度的PBS缓冲液。浓度分别为:50mM、20mM、10mM。

[0235] 一、免疫传感芯片的制备

[0236] 同实施例6的步骤一。

[0237] 二、荧光标记抗体溶液的制备

[0238] 用本实施例制备的PBS缓冲液制备抗体稀释液。取实施例6的步骤二制备的荧光标记抗体保存液,用抗体稀释液进行稀释,得到荧光标记抗体溶液。荧光标记抗体溶液中,荧光标记抗体的浓度为0.6 μ g/mL。

[0239] 三、标准品溶液的制备

[0240] 取13种喹诺酮类抗生素储备液,用本实施例制备的PBS缓冲液作为稀释溶剂,制备不同浓度的喹诺酮类抗生素溶液(混标溶液)。喹诺酮类抗生素溶液中,13种喹诺酮类抗生

素的浓度相同。喹诺酮类抗生素溶液中,13种喹诺酮类抗生素的浓度均为:0.0001 $\mu\text{g/L}$ 、0.001 $\mu\text{g/L}$ 、0.01 $\mu\text{g/L}$ 、0.1 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 或1000 $\mu\text{g/L}$ 。

[0241] 步骤二和步骤三的PBS缓冲液采用相同浓度。

[0242] 四、将步骤一制备的免疫传感芯片放入反应池,采用平面波导免疫生物传感器和步骤二制备的荧光标记抗体溶液对步骤三制备的标准品溶液进行检测(检测方法见实施例4)。

[0243] 结果见图19。不同离子强度条件下的免疫检测标准曲线存在一定差异,离子强度值对平面波导免疫传感器的检测性能存在一定影响。本研究中的实验体系是建立在10mM PBS体系基础上,因此选择10mM PBS的曲线为空白对照组。

[0244] 通过对不同离子强度条件下空白值,0.01 $\mu\text{g/L}$ 处信号值(约为80%最大信号值),0.1 $\mu\text{g/L}$ 处信号值(约为50%最大信号值),1 $\mu\text{g/L}$ 处信号值(约为20%最大信号值)进行显著性差异分析,评价不同离子强度下标准曲线差异,结果见图20。不同离子强度条件下 A_0 及 IC_{50} 的变化见图21。不同pH条件下平面波导免疫检测性能见表6。

[0245] 离子强度为10mM PBS和20mM PBS时,四个点位均不存在显著性差异,说明曲线较为接近,标准曲线受离子强度值变化影响较小。比较空白信号值和0.01 $\mu\text{g/L}$ 处信号值,离子强度为50mM PBS时和离子强度为10mM PBS和20mM PBS时的信号值存在一个*的显著性差异,说明检测曲线发生明显变化。

[0246] 离子强度为10mM PBS和20mM PBS时 A_0 变化在5%以内, IC_{50} 变化在15%以内,变化较小,说明20mM PBS不会对检测性能产生影响。离子强度为50mM PBS时 A_0 下降42%, IC_{50} 增加一倍,检测限及定量检测区间均为发生明显变化,说明离子强度为50mM PBS时平面波导免疫生物传感器检测性能受到了一定的影响。

[0247] 研究结果表明,20mM PBS不会对检测性能产生影响,因此初步提出缓冲体系建立方案:将实际水样与100mM PBS混合后进行平面波导免疫生物传感器检测,混合体积比为4:1,此方案既不会将实际水样被稀释太多,导致抗生素浓度太低,使检测结果不准确,又能保证反应体系离子强度为20mM PBS。

[0248] 表6不同pH条件下平面波导免疫检测性能

离子强度	LOD ($\mu\text{g/L}$)	定量检测区间 ($\mu\text{g/L}$)
10mM PBS	0.01	0.02-2.50
20mM PBS	0.01	0.03-2.73
50mM PBS	0.05	0.08-3.19

[0250] 实施例12、重金属对传感器检测性能的影响及消除

[0251] 一、制备PBS缓冲液

[0252] 取市售的27种重金属离子混标储备液(Agilent Technologies,货号5190-9418)(每种重金属离子的浓度均为1g/L)(27种重金属为:Al、Sb、As、Ba、Be、B、Cd、Ca、Cr、Co、Cu、Fe、Pb、Mg、Mn、Mo、Ni、K、Se、Si、Ag、Sr、Na、Tl、Ti、V、Zn),用PBS缓冲液稀释,得到含梯度浓度重金属离子的PBS缓冲液。含重金属离子的PBS缓冲液中,27种重金属离子的浓度相同。含重金属离子的PBS缓冲液中,27种重金属离子的浓度均为:0.313mg/L、0.625mg/L、1.25mg/L或2.5mg/L。

[0253] 二、免疫传感芯片的制备

[0254] 同实施例6的步骤一。

[0255] 三、荧光标记抗体溶液的制备

[0256] 用步骤一制备的PBS缓冲液制备抗体稀释液。取实施例6的步骤二制备的荧光标记抗体保存液,用抗体稀释液进行稀释,得到荧光标记抗体溶液。荧光标记抗体溶液中,荧光标记抗体的浓度为 $0.6\mu\text{g/mL}$ 。

[0257] 四、标准品溶液的制备

[0258] 取13种喹诺酮类抗生素储备液,用步骤一制备的PBS缓冲液作为稀释溶剂,制备不同浓度的喹诺酮类抗生素溶液(混标溶液)。喹诺酮类抗生素溶液中,13种喹诺酮类抗生素的浓度相同。喹诺酮类抗生素溶液中,13种喹诺酮类抗生素的浓度均为: $0.0001\mu\text{g/L}$ 、 $0.001\mu\text{g/L}$ 、 $0.01\mu\text{g/L}$ 、 $0.1\mu\text{g/L}$ 、 $1\mu\text{g/L}$ 、 $10\mu\text{g/L}$ 、 $100\mu\text{g/L}$ 或 $1000\mu\text{g/L}$ 。

[0259] 步骤三和步骤四采用的PBS缓冲液相同。

[0260] 五、将步骤二制备的免疫传感芯片放入反应池,采用平面波导免疫生物传感器和步骤三制备的荧光标记抗体溶液对步骤四制备的标准品溶液进行检测(检测方法见实施例4)。

[0261] 结果见图22。不同重金属离子浓度条件下的免疫检测标准曲线存在较大差异, 0.313mg/L 重金属离子浓度即可对平面波导免疫传感器的检测性能产生影响。选择未添加重金属的曲线为空白对照组。

[0262] 通过对不同离子强度条件下空白值, $0.01\mu\text{g/L}$ 处信号值(约为80%最大信号值), $0.1\mu\text{g/L}$ 处信号值(约为50%最大信号值), $1\mu\text{g/L}$ 处信号值(约为20%最大信号值)进行显著性差异分析,评价不同离子强度下标准曲线差异,结果见图23(每个柱形图中自左至右第2个至第6个柱形)。不同重金属离子浓度下 A_0 及 IC_{50} 的变化见图24。不同重金属离子浓度下平面波导免疫检测性能见表7。

[0263] 重金属离子浓度为 0.313mg/L 时,四个点位和空白对照组均不存在显著性差异,曲线较为接近,但是误差棒增加明显,说明数据波动较大,重金属离子对检测性能产生一定影响。重金属离子浓度 $\geq 0.625\text{mg/L}$ 时,三组数据中的四个点位信号值和空白对照组的四个点位信号值均存在显著性差异,说明检测曲线发生明显变化。

[0264] 重金属离子浓度为 0.313mg/L 时 A_0 变化为8%, IC_{50} 增加20%,出现较大变化,说明重金属离子浓度为 0.313mg/L 时即可对检测性能产生影响。重金属离子浓度为 0.625mg/L 时, A_0 下降约50%,检测限及定量检测区间均发生明显变化,说明重金属离子浓度为 0.625mg/L 时平面波导免疫生物传感器检测性能受到了较大的影响。当重金属离子浓度 $\geq 1.25\text{mg/L}$, A_0 下降超过80%,荧光信号微弱,平面波导免疫生物传感器无法正常工作。当重金属离子浓度达到 1.25mg/L 时,抗体溶液出现明显浑浊,抗体变性,产生沉淀;进行完 2.5mg/L 检测研究后,芯片报废,说明重金属离子导致芯片表面完全抗原蛋白质结构变化,完全抗原失活或者脱落。

[0265] 六、制备PBS缓冲液

[0266] 取市售的27种重金属离子混标储备液(Agilent Technologies,货号5190-9418)(每种重金属离子的浓度均为 1g/L)(27种重金属为:Al、Sb、As、Ba、Be、B、Cd、Ca、Cr、Co、Cu、Fe、Pb、Mg、Mn、Mo、Ni、K、Se、Si、Ag、Sr、Na、Tl、Ti、V、Zn),加入EDTA和PBS缓冲液,得到含重金属离子和 $0.5\text{g}/100\text{ml}$ EDTA的PBS缓冲液。含重金属离子的PBS缓冲液中,27种重金属离子的

浓度相同。含重金属离子的PBS缓冲液中,27种重金属离子的浓度均为:0.625mg/L。

[0267] 七、荧光标记抗体溶液的制备

[0268] 用步骤六制备的PBS缓冲液制备抗体稀释液。取实施例6的步骤二制备的荧光标记抗体保存液,用抗体稀释液进行稀释,得到荧光标记抗体溶液。荧光标记抗体溶液中,荧光标记抗体的浓度为0.6 μ g/mL。

[0269] 八、标准品溶液的制备

[0270] 取13种喹诺酮类抗生素储备液,用步骤六制备的PBS缓冲液作为稀释溶剂,制备不同浓度的喹诺酮类抗生素溶液(混标溶液)。喹诺酮类抗生素溶液中,13种喹诺酮类抗生素的浓度相同。喹诺酮类抗生素溶液中,13种喹诺酮类抗生素的浓度均为:0.0001 μ g/L、0.001 μ g/L、0.01 μ g/L、0.1 μ g/L、1 μ g/L、10 μ g/L、100 μ g/L或1000 μ g/L。

[0271] 九、将步骤二制备的免疫传感芯片放入反应池,采用平面波导免疫生物传感器和步骤七制备的荧光标记抗体溶液对步骤八制备的标准品溶液进行检测(检测方法见实施例4)。

[0272] EDTA掩蔽后的重金属离子实验结果见图23(每个柱形图中自左至右第1个柱形),可以看出4个点位和空白对照组均无显著性差异,曲线接近。 A_0 及 IC_{50} 的变化见图24。图25中比较了在添加EDTA后的Logistic拟合曲线与空白对照组的检测曲线,在0.625mg/L重金属离子条件下,两者检测性能几乎一致,说明经过EDTA掩蔽后,平面波导传感器对于重金属离子适用的边界条件为0mg/L-0.625mg/L。

[0273] 研究表明,EDTA不仅能掩蔽重金属离子,对硬度(钙镁离子)也有一定的掩蔽效果,因此进一步提出缓冲体系建立方案:将实际水样与100mM PBS缓冲液混合,混合体积比为4:1,反应体系中EDTA浓度为0.5g/100ml。

[0274] 表7不同重金属离子浓度下平面波导免疫检测性能

[0275]	重金属离子浓度 ug/L	LOD ug/L	定量检测区间 ug/L
	0	0.01	0.02-2.5
	0.313	0.02	0.03-2.4
	0.625	0.02	0.04-2.4
	1.25	0.03	0.03-3.8
	2.5	无	无
	0.625+EDTA	0.01	0.03-2.2

[0276] 实施例13、实际水样的检测

[0277] 三个水样分别为:两处地表水和一处鱼塘养殖水体。

[0278] 一、三种抗原免疫传感芯片的制备

[0279] 同实施例8的步骤一。

[0280] 二、荧光标记抗体溶液的制备

[0281] 取实施例5的步骤二制备的荧光标记抗体保存液、实施例6的步骤二制备的荧光标记抗体保存液和实施例7的步骤二制备的荧光标记抗体保存液,混合,用抗体稀释液进行稀释,得到荧光标记抗体溶液。荧光标记抗体溶液中,荧光标记的林可霉素抗体的浓度为2 μ g/mL,荧光标记的喹诺酮类抗生素抗体的浓度为0.6 μ g/mL,荧光标记的磺胺类抗生素抗体的浓度为1.25 μ g/mL。

[0282] 三、供试溶液的制备

[0283] 1、配制缓冲体系溶液。缓冲体系溶液：含2.5g/100ml EDTA的100mM PBS缓冲液。

[0284] 2、将4体积份水样与1体积份缓冲体系混合。

[0285] 3、制备供试溶液。

[0286] 取步骤2得到的混合液和13种喹诺酮类抗生素储备液，混合，得到喹诺酮类抗生素供试溶液。喹诺酮类抗生素供试溶液中，13种喹诺酮类抗生素的浓度相同。喹诺酮类抗生素供试溶液中，13种喹诺酮类抗生素的浓度均为：0.06 μ g/L、0.5 μ g/L或1.25 μ g/L。[0287] 取步骤2得到的混合液和17种磺胺类抗生素储备液，混合，得到磺胺类抗生素供试溶液。磺胺类抗生素供试溶液中，17种磺胺类抗生素的浓度相同。磺胺类抗生素供试溶液中，17种喹诺酮类抗生素的浓度均为：0.08 μ g/L、0.25 μ g/L或1 μ g/L。[0288] 取步骤2得到的混合液和林可霉素储备液，混合，得到林可霉素供试溶液。林可霉素供试溶液中，林可霉素的浓度为：0.01 μ g/L、0.05 μ g/L或0.5 μ g/L。

[0289] 四、将步骤一制备的免疫传感芯片放入反应池，采用平面波导免疫生物传感器和步骤二制备的荧光标记抗体溶液对步骤三制备的供试溶液进行检测（检测方法见实施例4）。获得荧光信号，根据实施例5、实施例6和实施例7的标准曲线，获得测量值。

[0290] 结果见表8、表9和表10。平面波导传感器对实际水样检测性能较好，三种水样加标回收率在80%–136%之间，变异系数小于10%，准确度与精密度均较好能够用于养殖区域地表水中喹诺酮类抗生素、磺胺类抗生素和林可霉素的检测。

[0291] 表8实际水样中喹诺酮类抗生素平面波导免疫检测

水样	加标浓度 (μ g/L)	三次重复试验的检测浓度 (μ g/L)			平均浓度 (μ g/L)	回收率 (%)
		1	2	3		
地表水 1	0.06	0.060	0.062	0.063	0.062	102.81
	0.5	0.415	0.509	0.567	0.497	99.42
	1.25	1.260	1.150	1.242	1.217	97.39
地表水 2	0.06	0.065	0.062	0.066	0.064	106.90
	0.5	0.510	0.524	0.540	0.525	105.01
	1.25	1.390	1.302	1.288	1.327	106.13
鱼塘养殖水体 1	0.06	0.075	0.075	0.072	0.074	123.09
	0.5	0.595	0.568	0.569	0.577	115.47
	1.25	1.463	1.422	1.422	1.436	114.85

[0293] 表9实际水样中磺胺类抗生素平面波导免疫检测

水样	加标浓度 (μ g/L)	三次重复试验的检测浓度 (μ g/L)			平均浓度 (μ g/L)	回收率 (%)
		1	2	3		
地表水 1	0.08	0.079	0.085	0.086	0.083	104.14
	0.25	0.229	0.237	0.243	0.237	94.60
	1	0.776	0.797	0.822	0.799	80.85
地表水 2	0.08	0.087	0.090	0.106	0.094	117.74
	0.25	0.226	0.249	0.263	0.246	98.44
	1	0.719	0.849	0.954	0.840	84.05
鱼塘养殖水体 1	0.08	0.075	0.094	0.114	0.094	117.94
	0.25	0.285	0.335	0.344	0.321	128.58
	1	0.997	1.058	1.114	1.057	105.65

[0295] 表10实际水样中林可霉素平面波导免疫检测

[0296]

水样	加标浓度 ($\mu\text{g/L}$)	三次重复试验的检测浓度 ($\mu\text{g/L}$)			平均浓度 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 (%)
		1	2	3		
地表水 1	0.01	0.011	0.010	0.014	0.012	119.12
	0.05	0.074	0.065	0.045	0.062	123.32
	0.5	0.455	0.455	0.446	0.452	90.49
地表水 2	0.01	0.013	0.010	0.013	0.012	124.56
	0.05	0.070	0.080	0.050	0.067	133.90
	0.5	0.449	0.550	0.388	0.463	92.51
鱼塘养殖水体 1	0.01	0.007	0.014	0.016	0.013	128.95
	0.05	0.052	0.072	0.078	0.068	135.87
	0.5	0.452	0.424	0.415	0.431	86.19

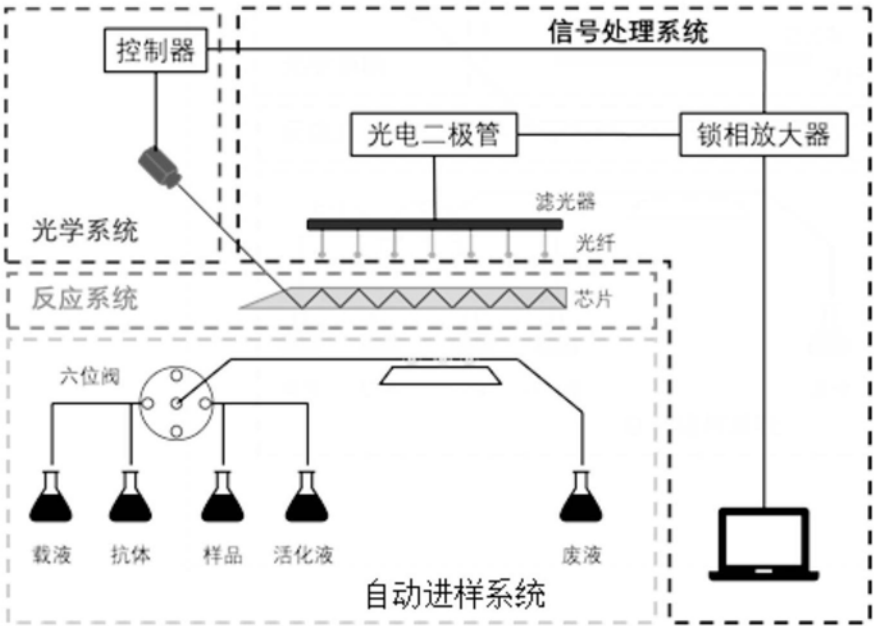


图1

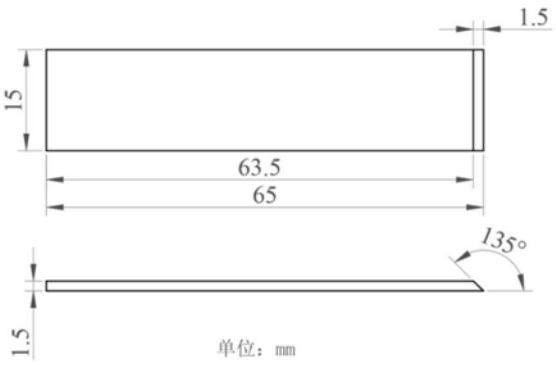


图2

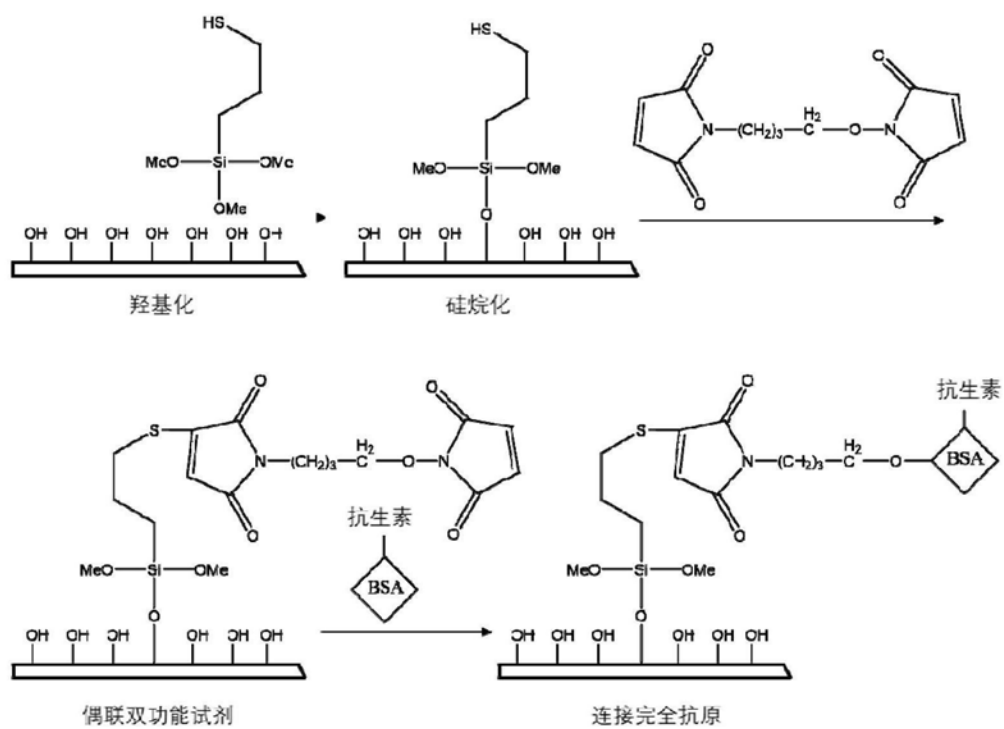


图3

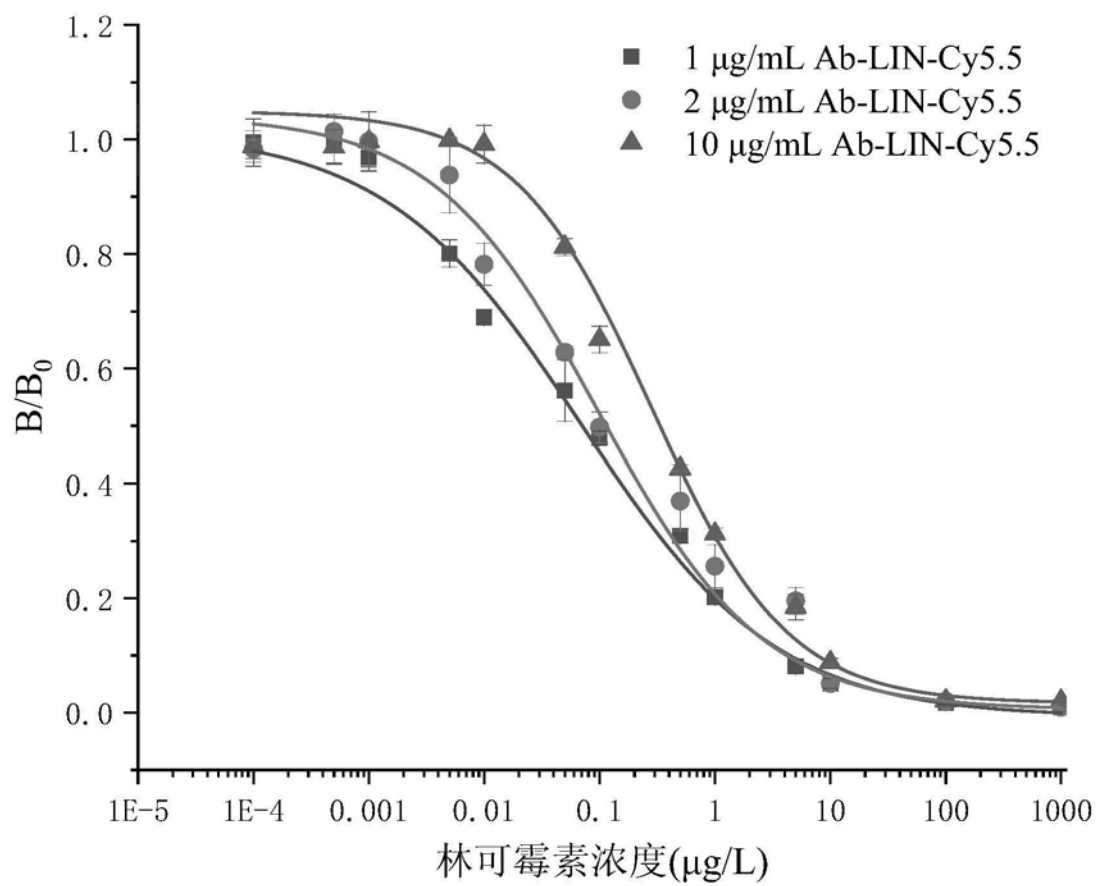


图4

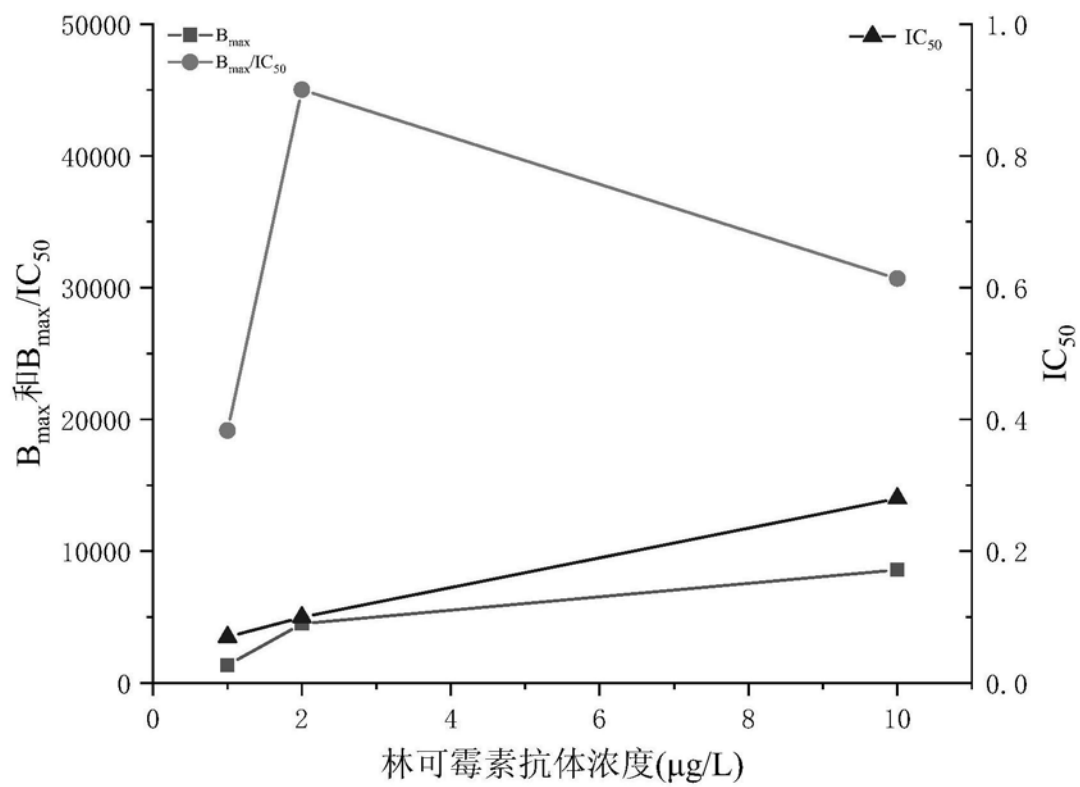


图5

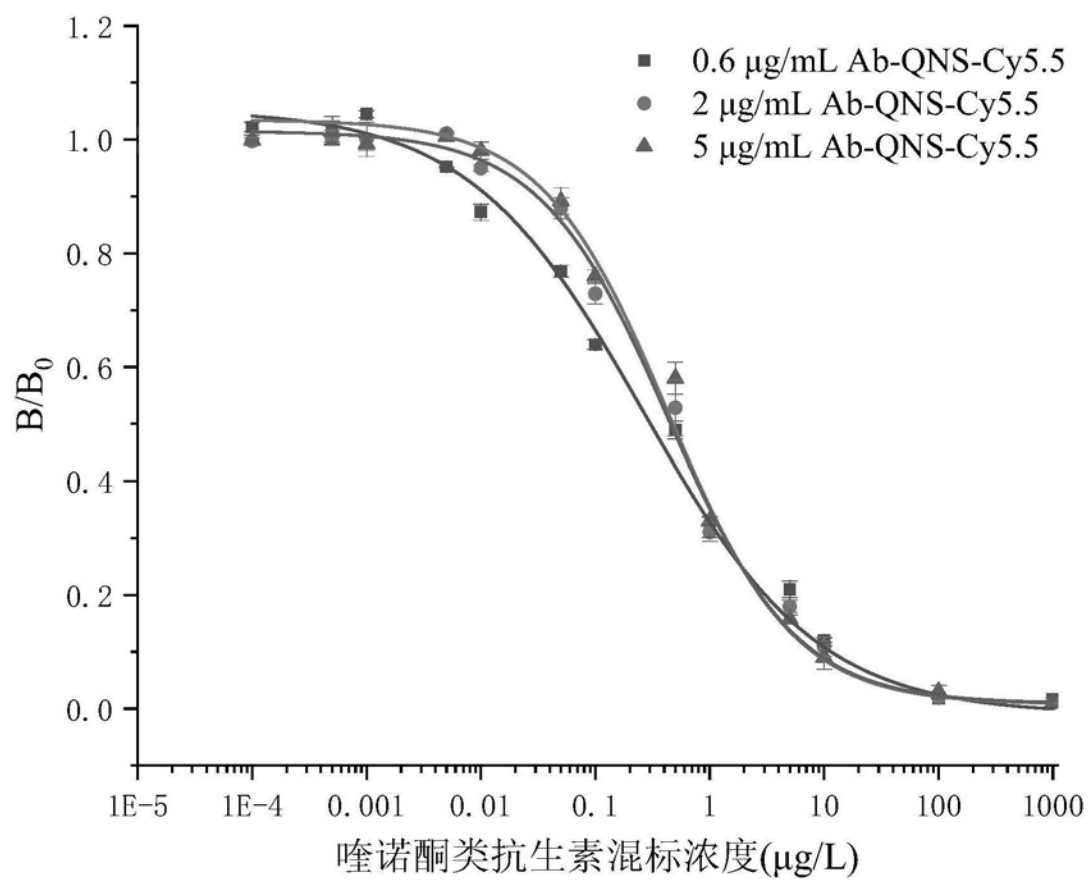


图6

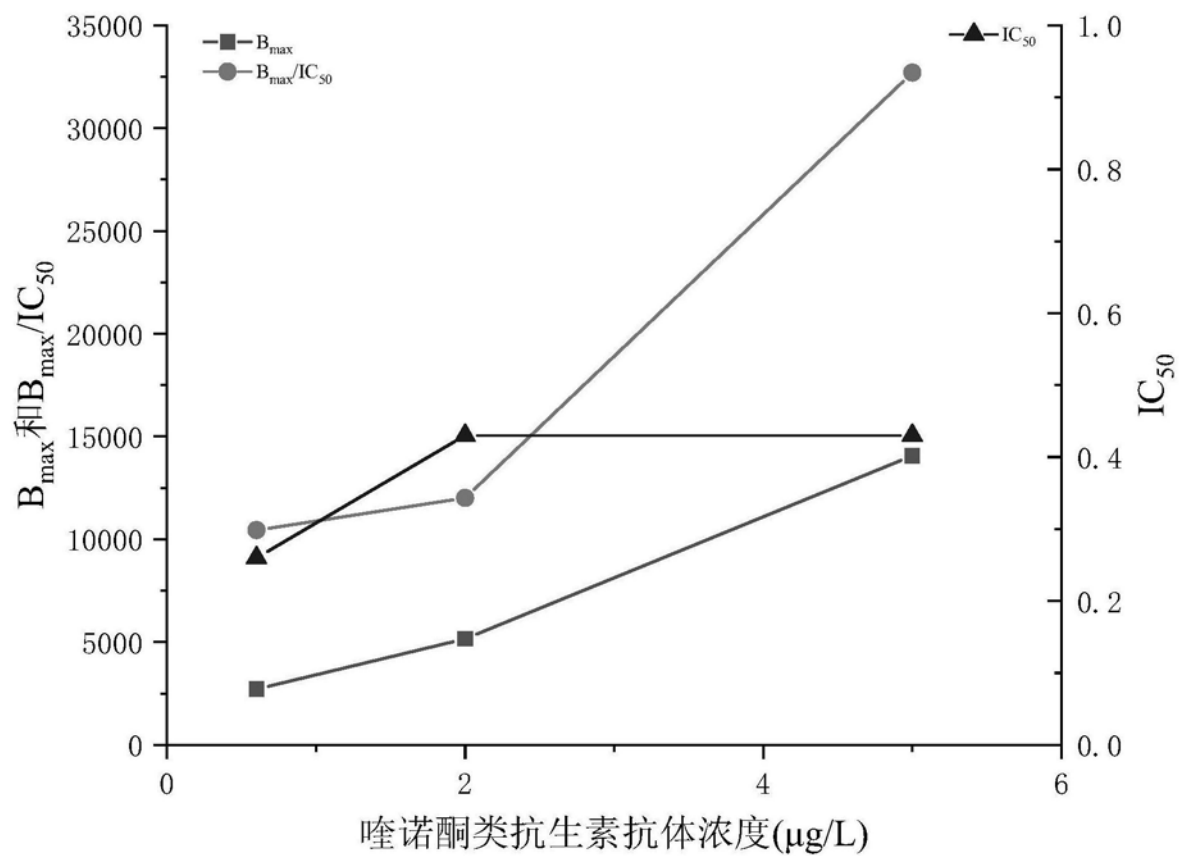


图7

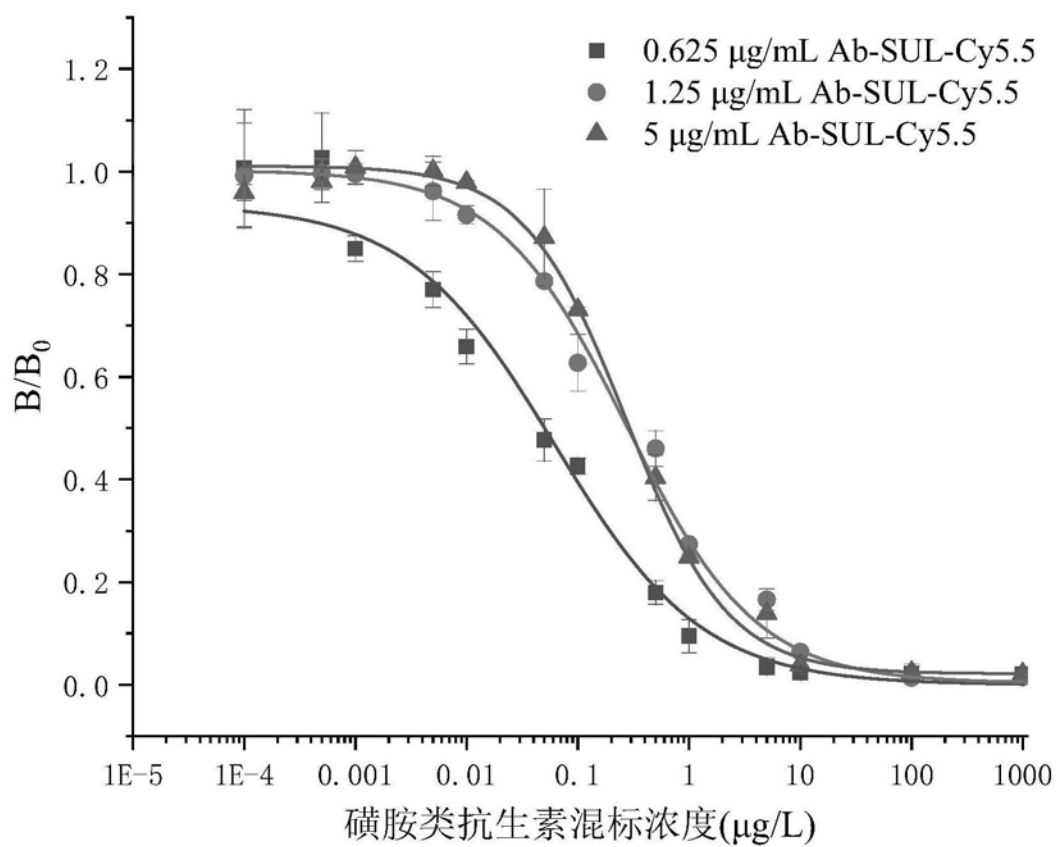


图8

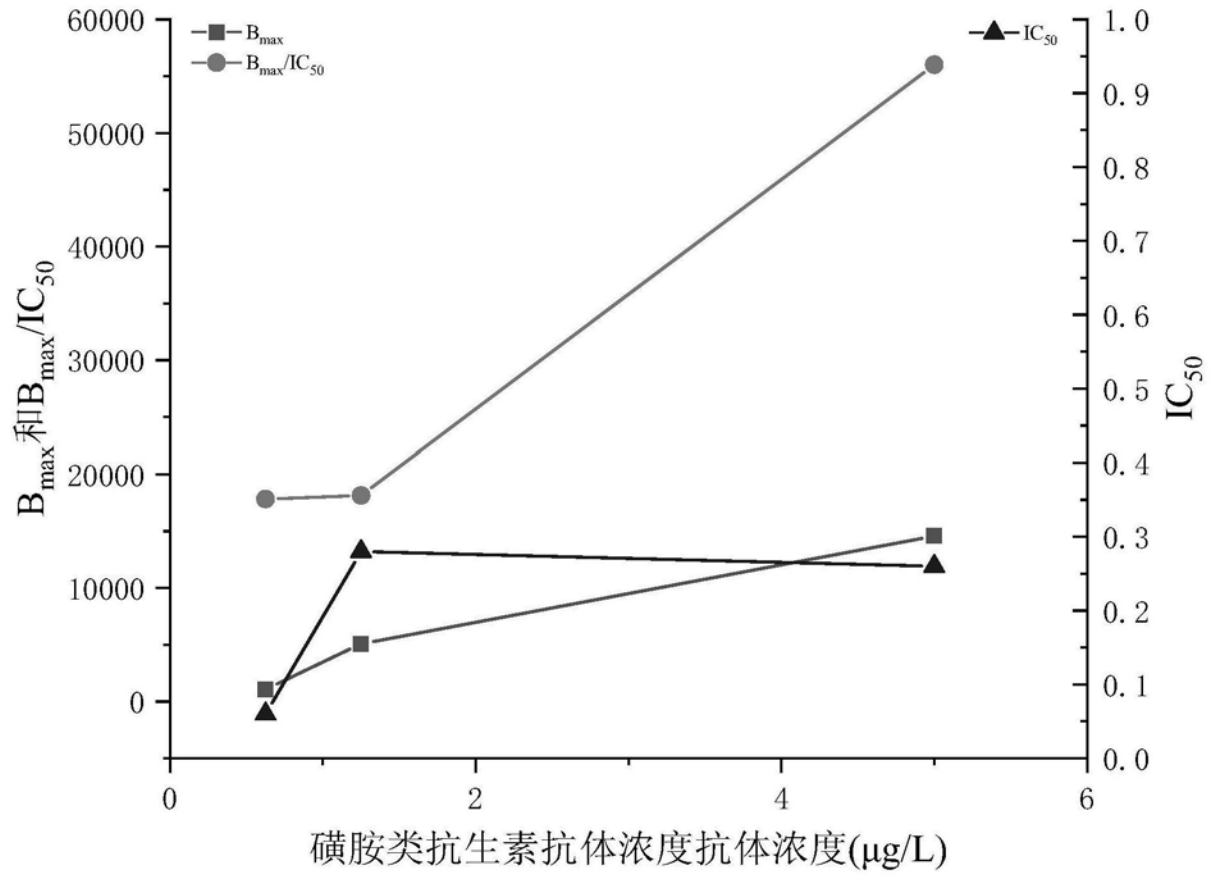


图9

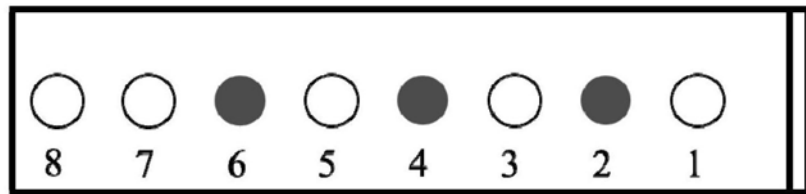


图10

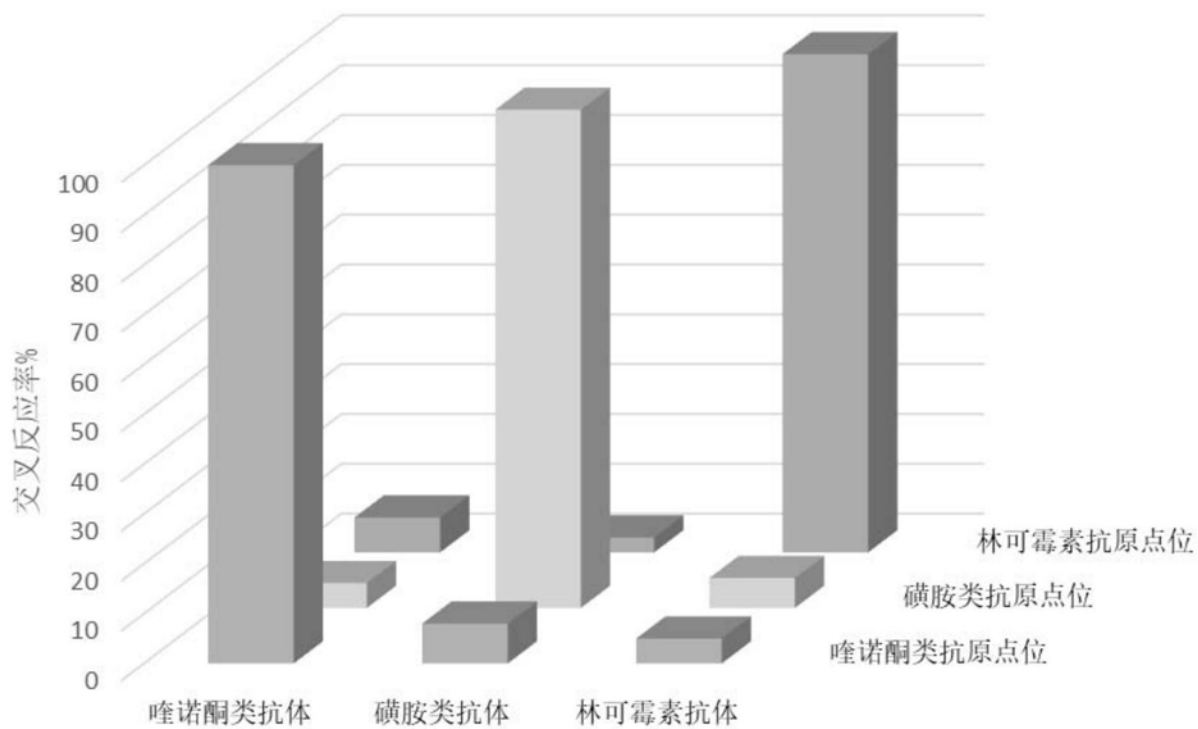


图11

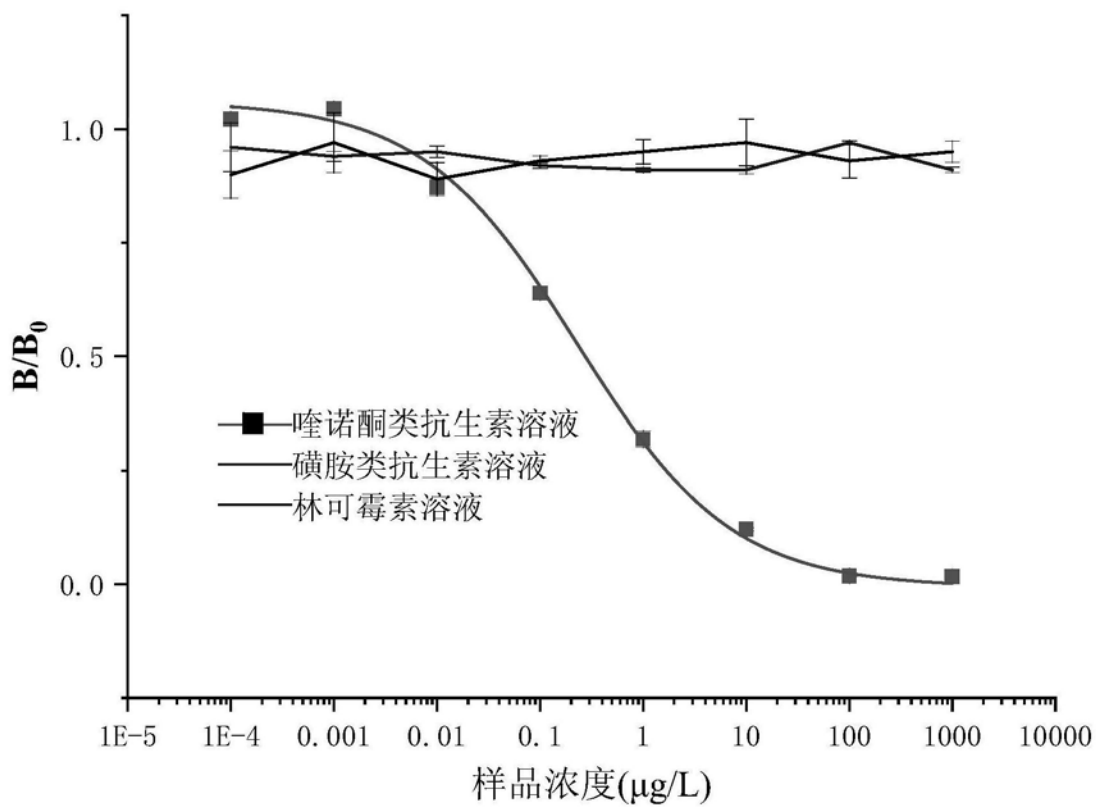


图12

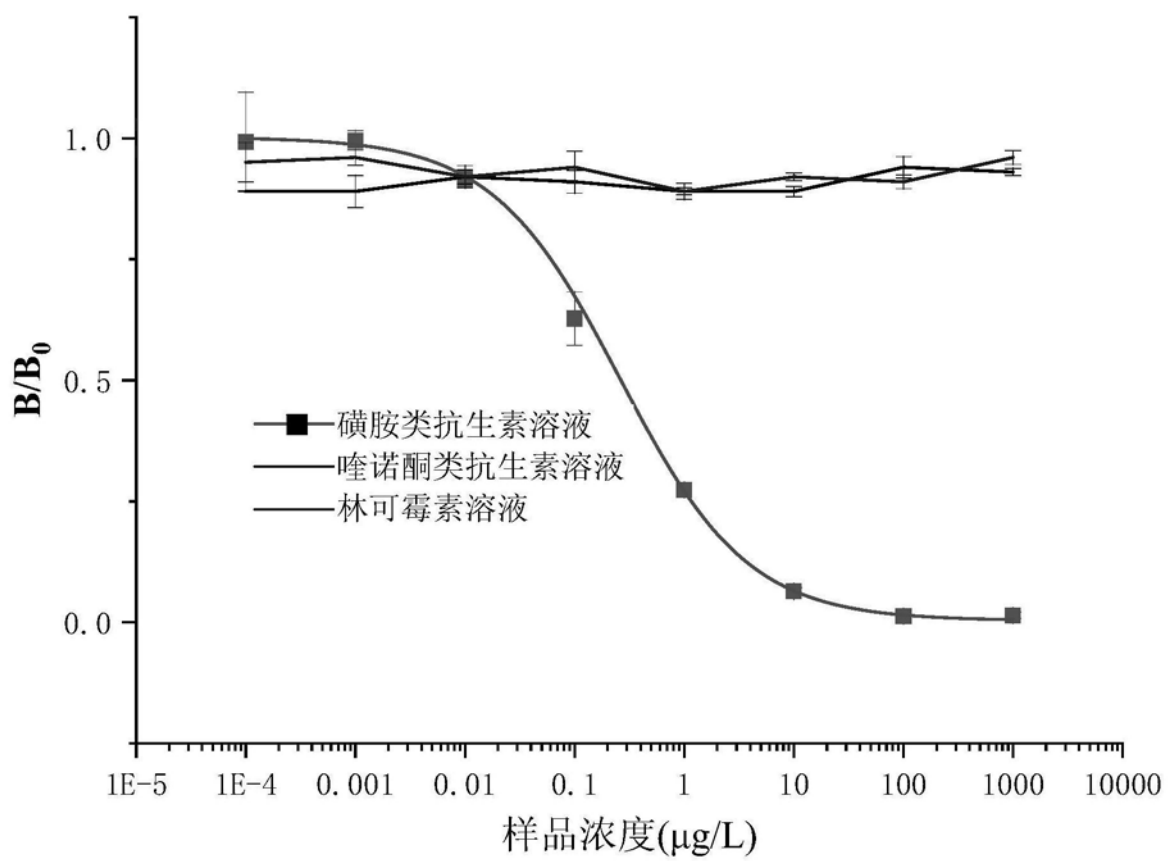


图13

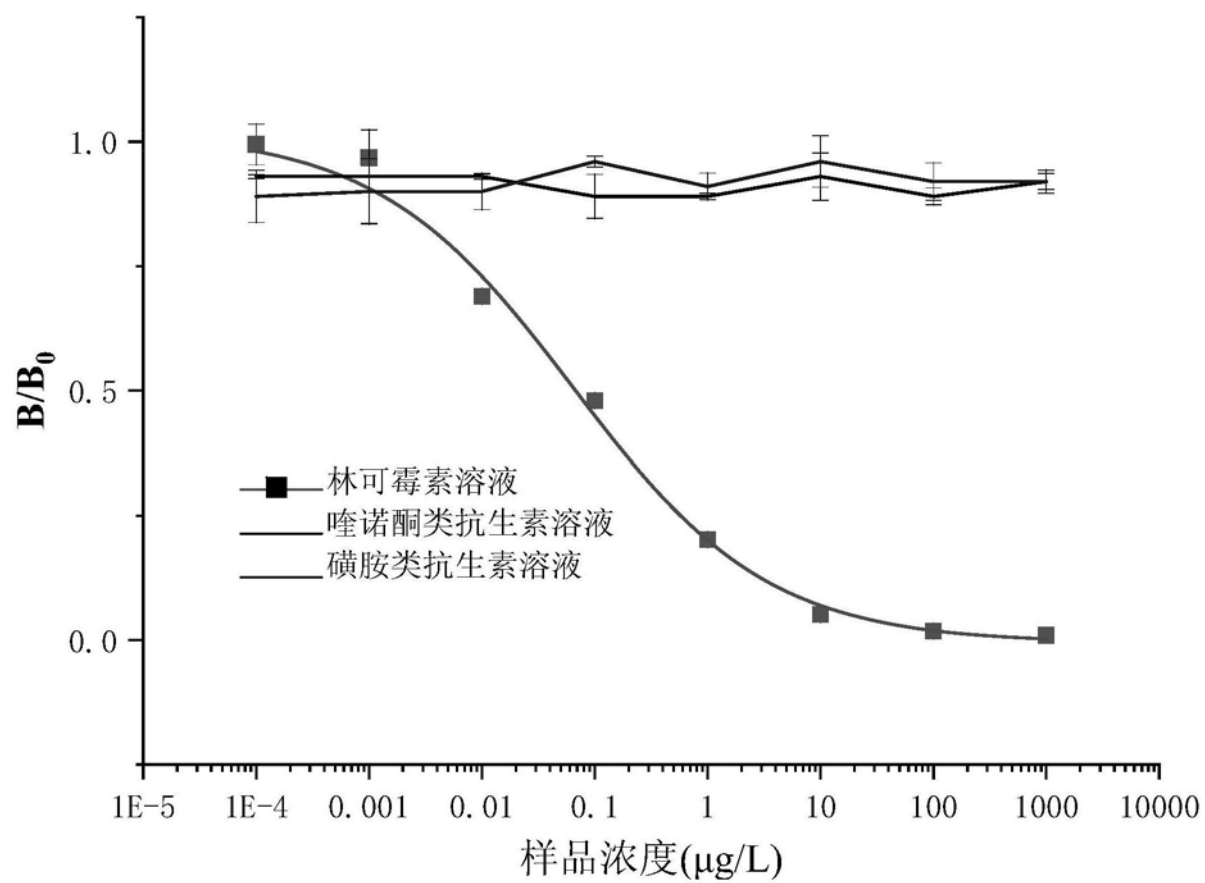


图14

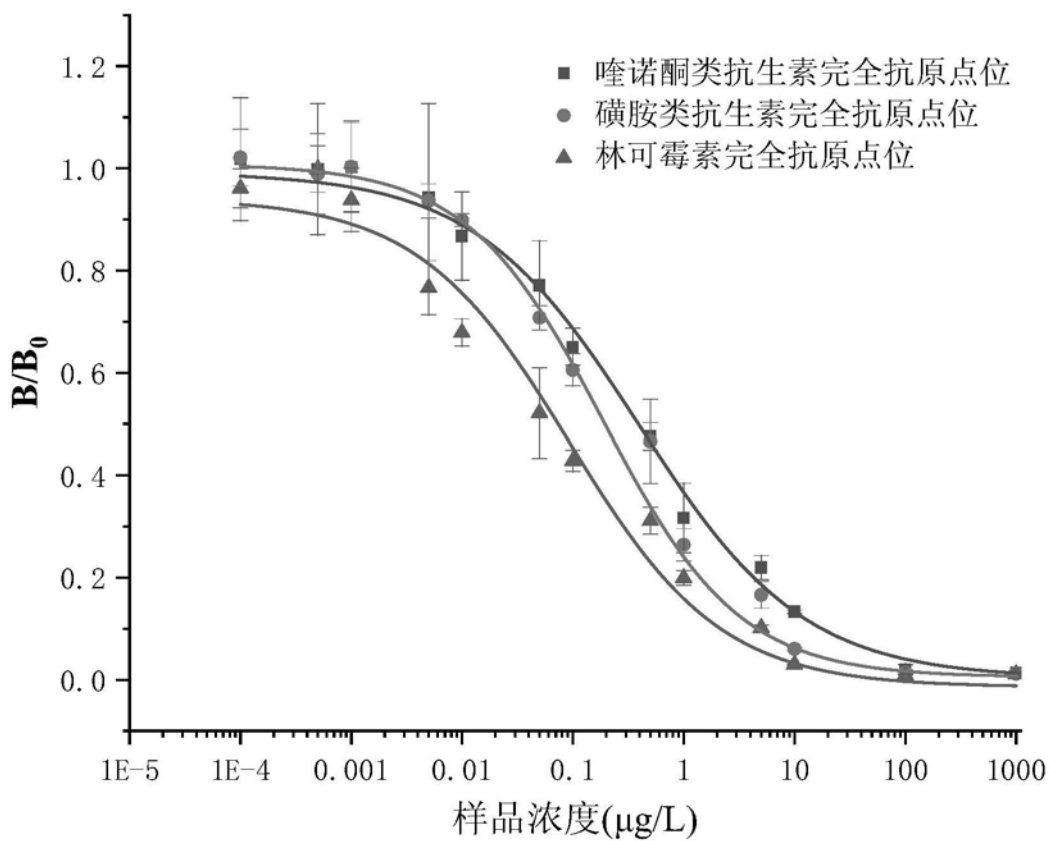


图15

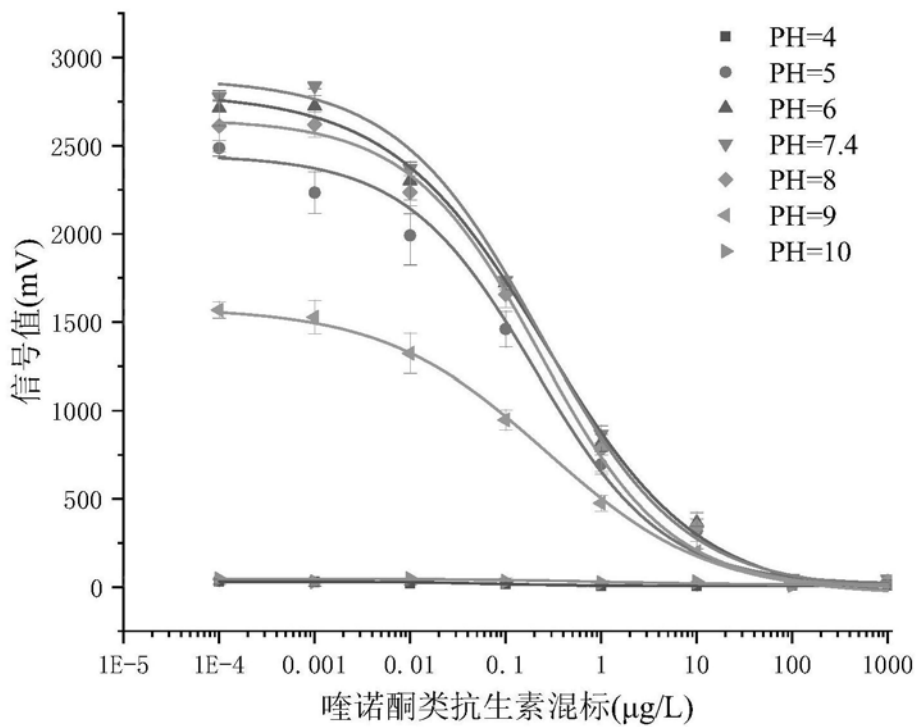


图16

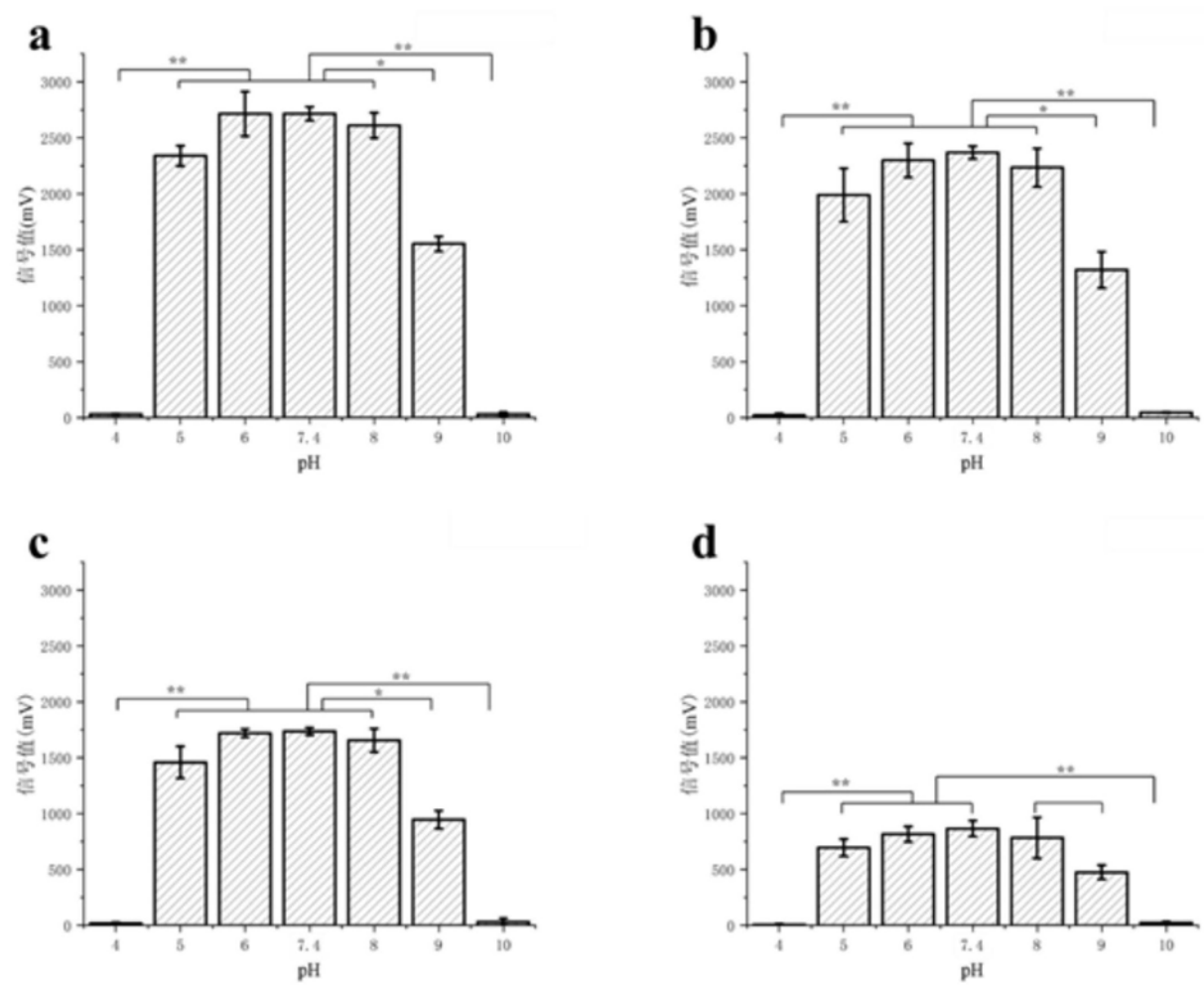


图17

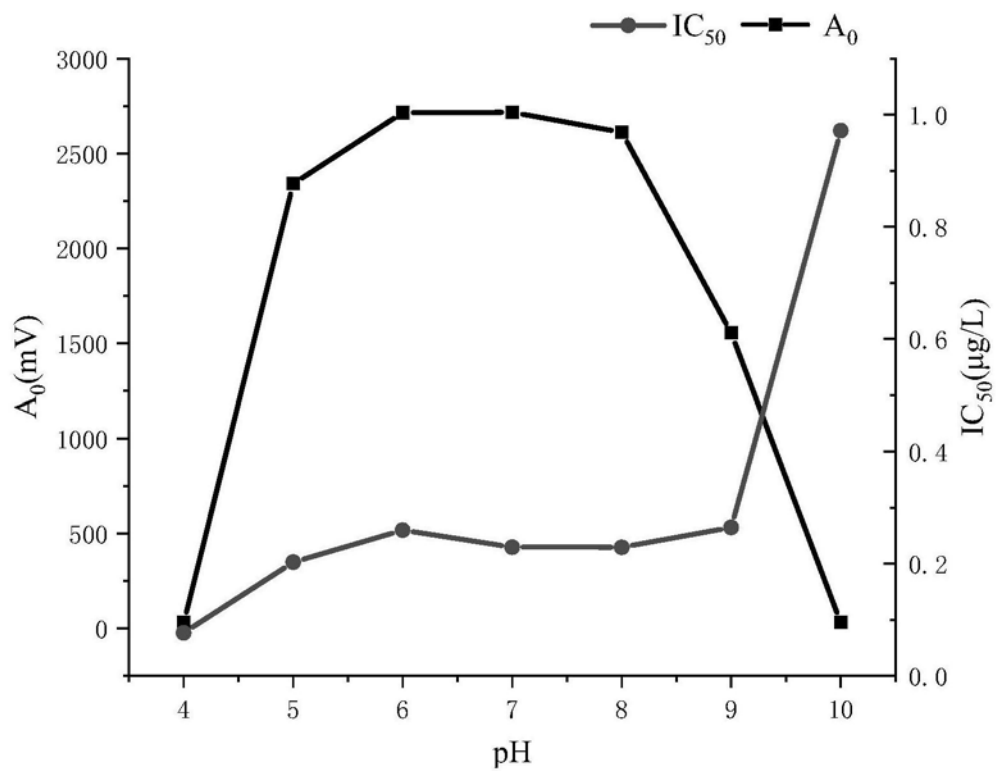


图18

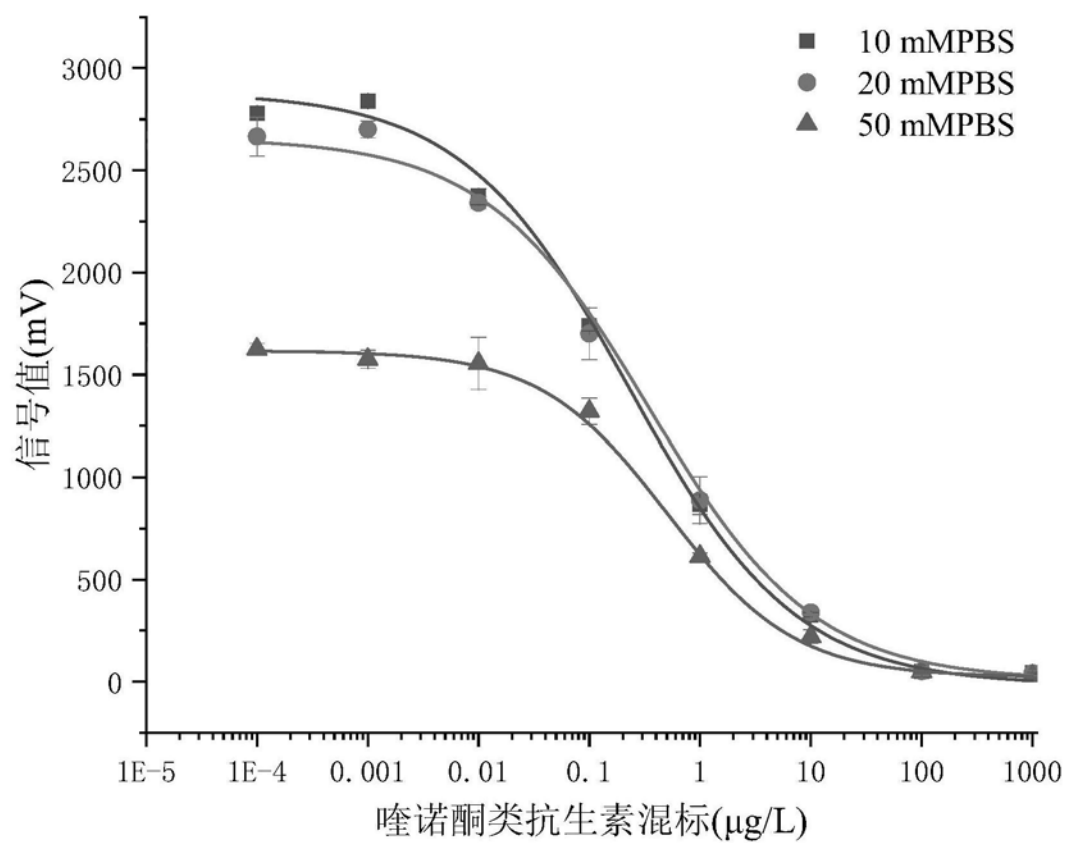


图19

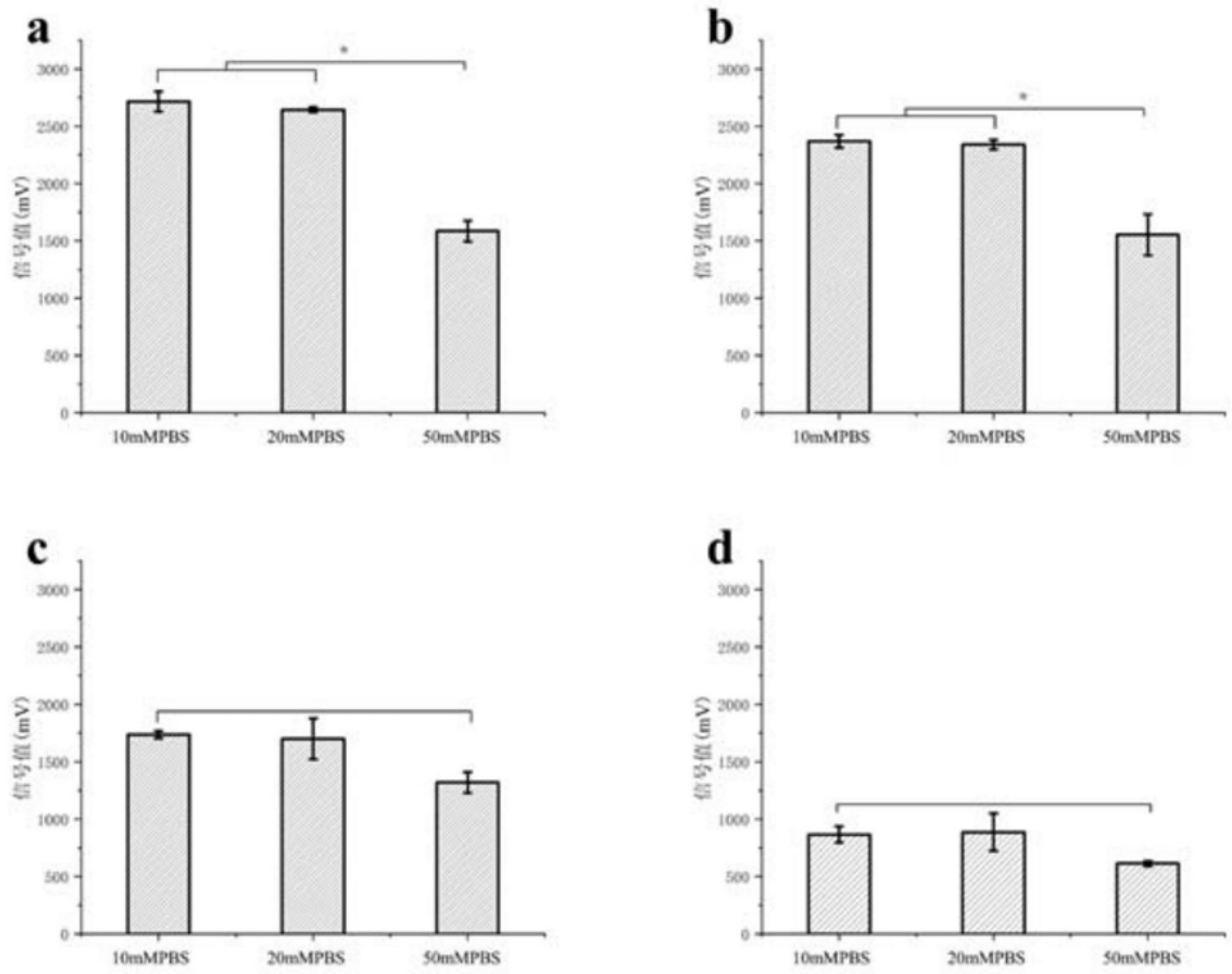


图20

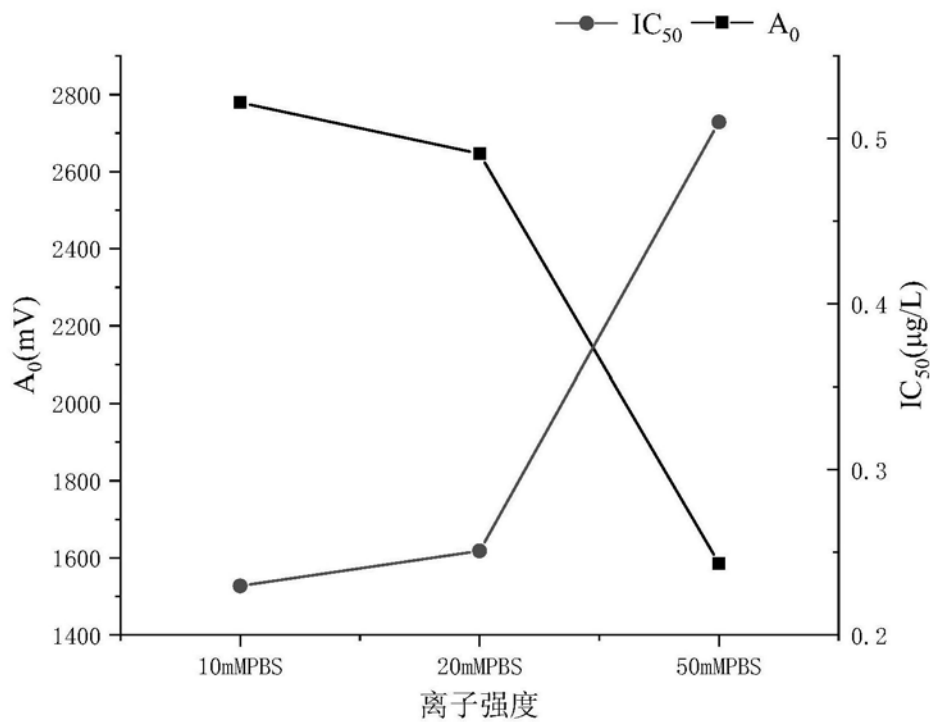


图21

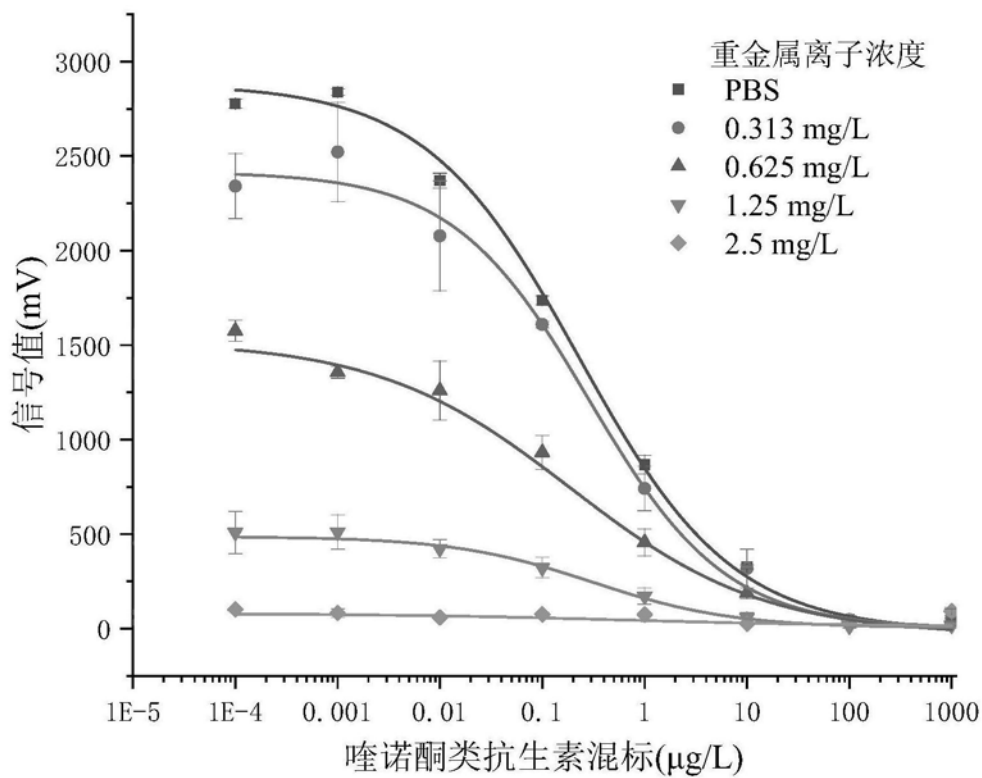


图22

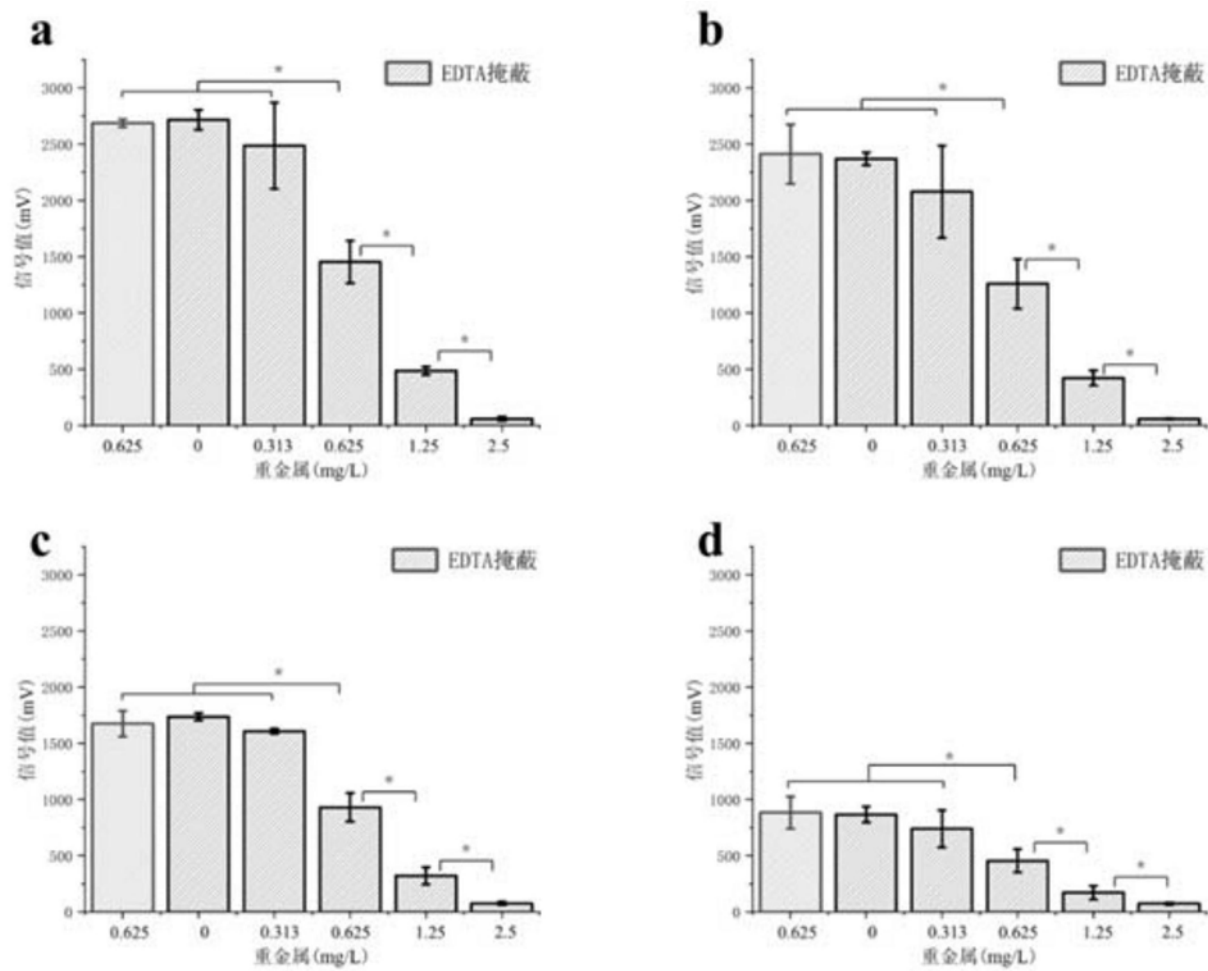


图23

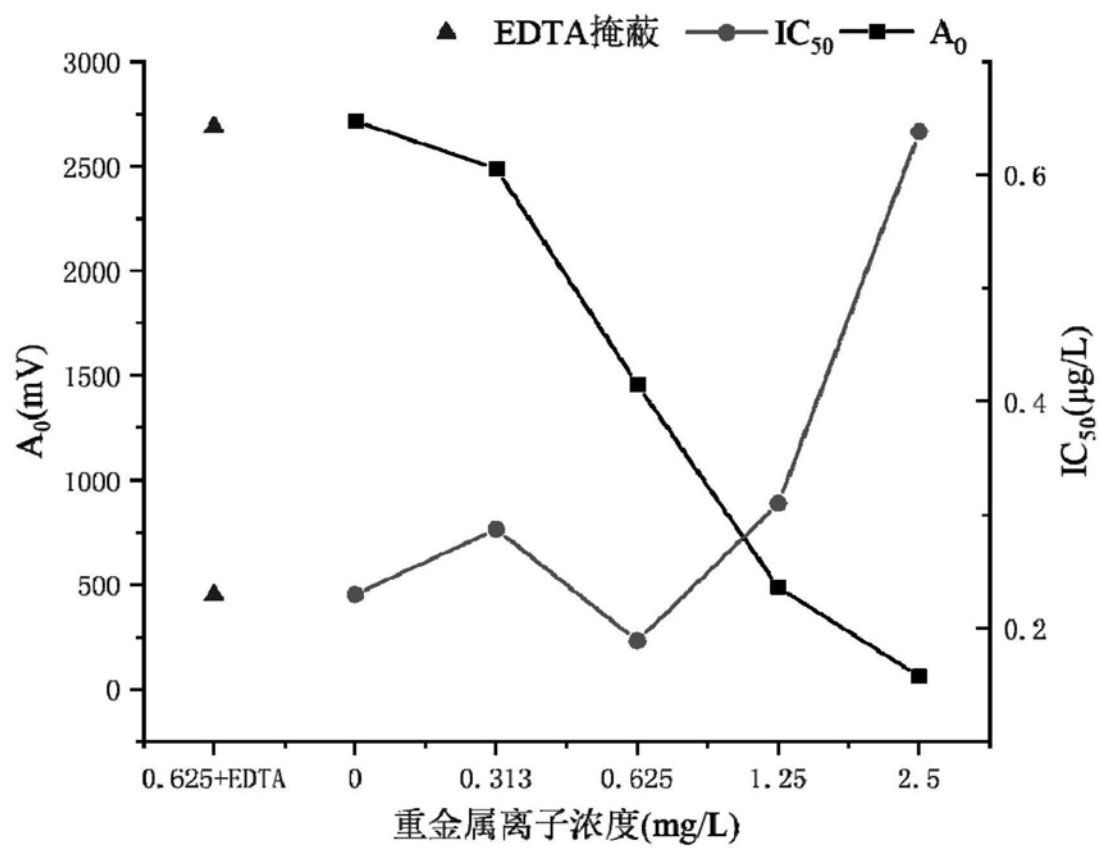


图24

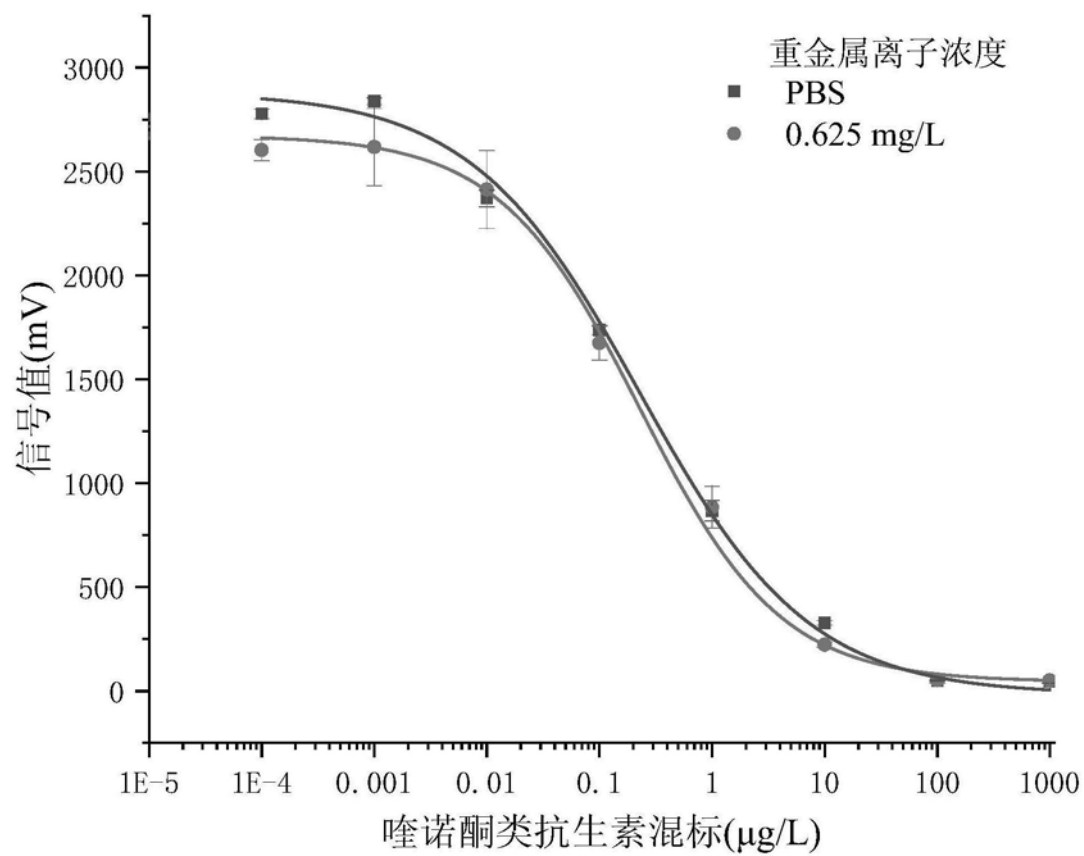


图25