



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109596604 B

(45) 授权公告日 2021.07.09

(21) 申请号 201811579226.6

CN 105510587 A, 2016.04.20

(22) 申请日 2018.12.24

JP 6161072 B2, 2017.07.12

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 106248894 A, 2016.12.21

申请公布号 CN 109596604 A

CN 107884569 A, 2018.04.06

(43) 申请公布日 2019.04.09

CN 105424663 A, 2016.03.23

CN 204347027 U, 2015.05.20

(73) 专利权人 东北师范大学

WO 2004010855 A1, 2004.02.05

地址 130024 吉林省长春市南关区人民大街5268号

专利权人 长春市精科欧德科教仪器开发有限公司

孙霞等. 免疫传感器在牛奶抗生素残留检测中的研究进展.《食品科学》.2010,第31卷(第13期),

(72) 发明人 杨丽 聂荣彬 陈翊平 冯云祥 冯呈蔚

Xiaoxia Liu et al.. Photonic crystal fiber-based immunosensor for high-performance detection of alpha fetoprotein.《Biosensors and Bioelectronics》.2016,第91卷 (续)

(74) 专利代理机构 长春市东师专利事务所 22202

审查员 段凤

代理人 张铁生 刘延军

(51) Int. Cl.

G01N 21/76 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106290896 A, 2017.01.04

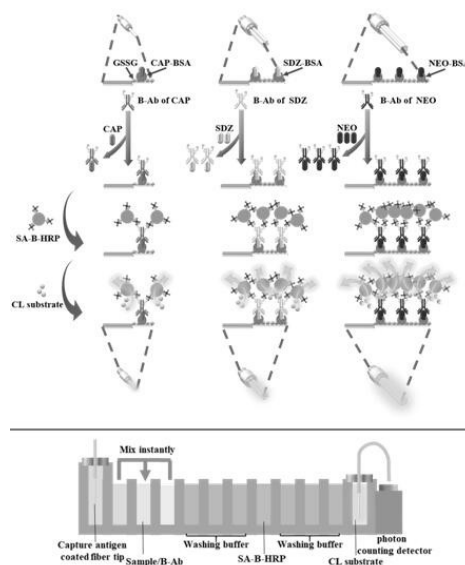
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54) 发明名称

一种线性范围可调的化学发光光纤免疫传感器及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种线性范围可调的化学发光光纤免疫传感器,它是由下述方法制备的:1)将光纤的一端分别用氯仿浸泡,剥去亚克力保护层;再浸入氢氟酸中,除去石英涂覆层,用0.1 M NaOH和水冲洗;2)浸入0.1M盐酸中浸泡,水洗,浸入0.1M NaOH浸泡,水洗,干燥;使用体积分数1%的3-ADMS乙醇溶液浸泡,乙醇洗涤,干燥;将光纤传感响应纤芯浸入含有交联剂的磷酸盐缓冲溶液,插入完全抗原的溶液中反应,PBS洗去未结合的完全抗原;3)组装成束,用热缩性套管将其固定;及其在检测食品中兽药残留方面的应用;本发明优势在于:线性范围可控调节,传感器灵敏度高,成本低廉、操作简便,抗外界干扰能力强。



[待续页]

[接上页]

(56) 对比文件

何方洋 等.氯霉素化学发光酶联免疫检测方法的建立.《中国兽药杂志》.2012,第46卷(第3期),

M. V. Cattaneo et al..A chemiluminescence fiber-optic biosensor system for the determination of glutamine in mammalian cell cultures.《Biosensors and Bioelectronics》.1992,第7卷

Namsoo Kim et al..Sulfamethazine detection with directbinding optical waveguide lightmode spectroscopy-based immunosensor.《Food Chemistry》.2008,第108卷

Javier Adrian et al..Waveguide interrogated optical immunosensor (WIOS) for detection of sulfonamide antibiotics in milk.《Biosensors and Bioelectronics》.2009,第24卷

1. 一种线性范围可调的化学发光光纤免疫传感器,它是由下述方法制备的:

1) 光纤预处理:将光纤的一端用氯仿浸泡10~15分钟,浸入长度为0.5~1.5cm,剥去浸泡过的部分的亚克力保护层;将除去保护层的一端,再浸入浓度为20~30%的氢氟酸中腐蚀18~25分钟,除去掺杂石英涂覆层,用0.1 M NaOH和水冲洗,得到光纤传感响应纤芯;

2) 固定完全抗原:将步骤1)所得传感响应纤芯,浸入0.1M 盐酸中浸泡28~35分钟,用水洗涤,再将传感响应纤芯浸入0.1M NaOH浸泡55~65分钟,用水洗涤,干燥;使用体积分数1%的3-ADMS乙醇溶液浸泡光纤传感响应纤芯55~65分钟,乙醇洗涤,干燥;将光纤传感响应纤芯浸入0.1 M、pH 7.0磷酸盐缓冲溶液,浸泡1.3~2小时,插入含有8~12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CAP-BSA、15~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SDZ-BSA和75~85 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NEO-BSA完全抗原的溶液中反应1.3~1.8小时,用PBS洗去未结合的完全抗原,得到结合抗原的光纤;

3) 组装光纤束:将步骤2)得到的光纤,按长度0.5cm、1.0cm和1.5cm光纤数量比为1~2:4~6:7~9的比例组装成束,用热缩性套管将其固定,得到一种线性范围可调的化学发光光纤免疫传感器。

2. 根据权利要求1所述的一种线性范围可调的化学发光光纤免疫传感器,其特征在于:步骤2)中所述的磷酸盐缓冲溶液,包括0.015 M 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐EDC和0.03 M N-羟基丁二酰亚胺NHS;所述的干燥,是在氮气流下干燥。

3. 根据权利要求2所述的一种线性范围可调的化学发光光纤免疫传感器,其特征在于:步骤2)中所述的完全抗原,为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CAP-BSA、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SDZ-BSA和80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NEO-BSA。

4. 根据权利要求3所述的一种线性范围可调的化学发光光纤免疫传感器,其特征在于:步骤3)中所述的长度0.5cm、1.0cm和1.5cm光纤数量比为1:5:8。

5. 权利要求1所述的一种线性范围可调的化学发光光纤免疫传感器在检测牛奶中兽药残留方面的应用;所述的兽药为氯霉素、磺胺嘧啶和新霉素。

6. 根据权利要求5所述的应用,具体步骤如下:

1) 将待测实际样品与对应B-Ab溶液混合,立即将权利要求1所述的传感器插入其中进行免疫竞争反应1小时,PBST冲洗;

所述的对应B-Ab溶液为CAP 的B-Ab 、SDZ的B-Ab 、CAP 的B-Ab 溶液;

2) 将上述传感器浸入链霉亲和素和生物素标记的辣根过氧化物酶形成的复合物SA-B-HRP溶液中反应30分钟,PBST洗去未结合的复合物;

3) 将传感器插入新制备的化学发光底物溶液中,进行化学发光信号的数据采集和记录;

4) 将测得的化学发光强度代入对应的标准曲线,求出实际样品中CAP、SDZ、NEO浓度。

一种线性范围可调的化学发光光纤免疫传感器及应用

技术领域

[0001] 本发明属食品安全检测分析技术领域,具体涉及一种线性范围可调的化学发光光纤免疫传感器及应用。

背景技术

[0002] 食品安全工作是关系到国计民生和社会发展的重大事件,其中食品中兽药残留已经逐渐成为人们日益关注的热点问题,迫切需要发展针对动物源性食品中兽药残留检测的简单、通用且低成本的分析技术,以实现日常食品中的各种兽药残留的快速准确定量分析。目前,兽药残留检测所面临的主要挑战之一是不同种类的兽药残留水平差异很大。例如,氯霉素是禁止使用的抗生素,在牛奶样品中,氯霉素(CAP)的最低执法限量为300 pg/mL,需要检测方法具有很高的灵敏度。而磺胺嘧啶(SDZ)和新霉素(NEO)的最大残留限量(MRL)分别为100 ng/mL和1.5 μg/mL,这就需要检测方法具有较宽的线性范围。针对浓度跨度极大的多目标兽药残留检测不仅需要分析手段具有高灵敏度,同时其需要提供足够宽的检测线性范围,往往需要大型精密分析仪器和专业操作技能。为了满足不同浓度检测范围的多种兽药残留的检测要求,迫切需要开发具有可调控检测范围的简单且低成本的分析手段。

[0003] 石英光纤是一种以高折射率的石英玻璃材料为纤芯,以低折射率的有机或无机材料为包皮的光学纤维。由于其固有的光学性质以及机械强度大,弯曲性好,易与光源耦合等特点,石英光纤已经在构建化学/生物化学传感器中展现出独特的优势。比如,研究者们将高特异性的免疫反应和超灵敏化学发光整合到光纤尖端,用于生物标记物或微生物的快速、高特异性和低耗样量的定量分析。然而,光纤内芯的表面积小(直径通常为几百微米),导致活性蛋白质如抗原/抗体或酶的在其表面的固定量小,限制了灵敏度的提高和线性范围的扩大。如何在保证高灵敏度检测的同时,实现检测范围可控调节具有重要意义,目前尚未见线性范围可调的光纤免疫传感器用于多种兽药残留的灵敏检测报道。

发明内容

[0004] 本发明目的是为解决兽药残留检测灵敏度不高、检测线性范围小的问题,而提供一种线性范围可调的化学发光光纤免疫传感器及应用。

[0005] 一种线性范围可调的化学发光光纤免疫传感器,它是由下述方法制备的:

[0006] 1) 光纤预处理:将光纤的一端分别用氯仿浸泡10~15分钟,浸入长度为0.5~1.5cm,剥去浸泡过的部分的亚克力保护层;将除去保护层的一端,再浸入浓度为20~30%的氢氟酸中腐蚀18~25分钟,除去掺杂石英涂覆层,用0.1 M NaOH和水冲洗,得到光纤传感响应纤芯;

[0007] 2) 固定完全抗原:将步骤1)所得传感响应纤芯,浸入0.1M 盐酸中浸泡28~35分钟,用水洗涤,再将传感响应纤芯浸入0.1M NaOH浸泡55~65分钟,用水洗涤,干燥;使用体积分数1%的3-ADMS乙醇溶液浸泡光纤传感响应纤芯55~65分钟,乙醇洗涤,干燥;将光纤传感响应纤芯浸入0.1 M、pH 7.0磷酸盐缓冲溶液,浸泡1.3~2小时,插入含有8~12μg/mL CAP-BSA、15~25μg/mL SDZ-BSA和75~85μg/mL NEO-BSA完全抗原的溶液中反应1.3~1.8小时,用PBS洗

去未结合的完全抗原,得到结合抗原的光纤;

[0008] 3) 组装光纤束:将步骤2)得到的光纤,按长度0.5cm、1.0cm和1.5cm光纤数量比为1~2:4~6:7~9的比例组装成束,用热缩性套管将其固定,得到一种线性范围可调的化学发光光纤免疫传感器;

[0009] 步骤2)中所述的磷酸盐缓冲溶液,包括0.015 M 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和0.03 M N-羟基丁二酰亚胺(NHS);所述的干燥,是在氮气流下干燥;

[0010] 步骤2)中所述的完全抗原,为10 μ g/mL CAP-BSA、20 μ g/mL SDZ-BSA和80 μ g/mL NEO-BSA;

[0011] 步骤3)中所述的长度0.5cm、1.0cm和1.5cm光纤数量比为1:5:8;

[0012] 步骤1)中所述的氢氟酸,浓度为20~30%。

[0013] 所述的一种线性范围可调的化学发光光纤免疫传感器在检测牛奶中兽药残留方面的应用;

[0014] 所述的兽药为氯霉素、磺胺嘧啶和新霉素。

[0015] 本发明通过两种简单的方式,即调节光纤传感响应纤芯长度和光纤根数,来调控信号强度和检测线性范围。将完全抗原可控且定量地固定在具有不同长度的光纤传感响应纤芯上,然后将光纤以不同的根数组装成束;完全抗原与目标物竞争结合生物素化的检测抗体。信号转换单元是通过链霉抗生物素蛋白和生物素化的辣根过氧化物酶的自组装形成的复合物,其可以通过链霉抗生物素蛋白和生物素之间的强亲和力结合实现目标物检测信号的进一步放大。化学发光底物的引入将引发快速催化的化学发光反应,信号由光纤束聚集和传导,以通过小型且经济的光子计数检测器读出。为了检测浓度范围不同的三种兽药CAP、SDZ、NEO,我们利用较少数量的光纤传感响应纤芯长度较短的光纤束来检测CAP,因此只有少量完全抗原与低浓度的CAP竞争检测抗体。对于中等浓度的SDZ,使用中等根数的中等长度的光纤传感响应纤芯组成光纤束。由于NEO的高浓度,我们使用较大数量的具有较长光纤传感响应纤芯长度的光纤来聚集成束,使其提供大量完全抗原和高浓度的NEO进行竞争反应。从而通过对光纤的简单处理和组装,实现了线性范围的可控调节,并且对牛奶样品中的三种兽药残留进行了定量检测。

[0016] 本发明提供了一种线性范围可调的化学发光光纤免疫传感器,它是由下述方法制备的:1)将光纤的一端分别用氯仿浸泡,剥去亚克力保护层;再浸入氢氟酸中,除去石英涂覆层,用0.1 M NaOH和水冲洗;2)浸入0.1M 盐酸中浸泡,水洗,浸入0.1M NaOH浸泡,水洗,干燥;使用体积分数1%的3-ADMS乙醇溶液浸泡,乙醇洗涤,干燥;将光纤传感响应纤芯浸入含有交联剂的磷酸盐缓冲溶液,插入完全抗原的溶液中反应,PBS洗去未结合的完全抗原;3)组装成束,用热缩性套管将其固定;及其在检测食品中兽药残留方面的应用;本发明优势在于:线性范围可控调节,传感器灵敏度高,成本低廉、操作简便,抗外界干扰能力强。

附图说明

[0017] 图1 本发明检测氯霉素、磺胺嘧啶、新霉素的原理图;

[0018] 图2 光纤免疫传感器的表征图;

[0019] 图3 实验条件的优化图;

[0020] 图4 传感器线性范围调节图;

- [0021] 图5 本发明制备的化学发光免疫传感器测定CAP、SDZ、NEO的定量检测拟合曲线；
[0022] 图6 光纤免疫传感器的特异性评估图。

具体实施方式

[0023] 实施例1 化学发光光纤免疫传感器的制备

[0024] 1、光纤预处理

[0025] 将若干根光纤(总长度10 cm)分为三组,每组光纤的一端分别用氯仿浸泡10分钟,浸入长度分别设置为0.5cm、1.0cm和1.5cm;用刀轻轻剥去光纤浸泡过的部分的亚克力保护层;将除去保护层的一端,再浸入浓度为24%的氢氟酸中腐蚀20分钟,以除去掺杂石英涂层,暴露出一定长度的光纤内芯,即光纤传感响应纤芯的长度分别为0.5 cm、1.0 cm和1.5 cm;分别用0.1 M NaOH和水冲洗光纤传感响应部分3次。

[0026] 2、固定完全抗原

[0027] 将上述经预处理的光纤的光纤传感响应纤芯,浸入0.1M 盐酸中浸泡30分钟以除去污染物,用水洗涤3次后,再将光纤传感响应纤芯浸入0.1M NaOH浸泡60分钟,以活化光纤传感响应纤芯的羟基,水洗3次并在氮气流下干燥;使用1% 3-ADMS乙醇溶液(v/v)浸泡光纤传感响应纤芯60分钟,通过硅烷化以引入氨基,乙醇洗涤3次并在氮气流中干燥;将光纤传感响应纤芯浸入含有0.015 M 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和0.03 M N-羟基丁二酰亚胺(NHS)的磷酸盐缓冲溶液(0.1 M, pH 7.0),浸泡1.5小时,然后立即插入含有完全抗原(CAP-BSA:10 $\mu\text{g/mL}$, SDZ-BSA:20 $\mu\text{g/mL}$, NEO-BSA:80 $\mu\text{g/mL}$)的溶液中反应1.5小时,用PBS洗去未结合的完全抗原;为了证明完全抗原成功地固定到了毛细管内壁,我们采用紫外、红外对该步处理后的毛细管进行了详细表征,如图2所示;使用10 mg/mL 的氧化型谷胱甘肽(GSSG)溶液封闭残余活性位点2小时,以减少非特异性吸附。

[0028] 3、组装光纤束

[0029] 将上述处理的光纤按以下标准组装成束:氯霉素传感器:0.5cm光纤传感响应纤芯1根;磺胺嘧啶传感器:1.0cm光纤传感响应纤芯5根;新霉素传感器:1.5cm光纤传感响应纤芯8根;用热缩性套管将其固定,-4℃保存待用。

[0030] 实施例2 化学发光光纤免疫传感器的线性范围调节

[0031] 1、条件优化

[0032] 考察了CAP-BSA、SDZ-BSA、NEO-BSA浓度,B-Ab of CAP、B-Ab of SDZ、B-Ab of NEO浓度,免疫竞争反应时间,链霉亲和素(SA)与生物素化的辣根过氧化物酶(B-HRP)的比例以及SA的浓度对信号强度的影响,并选取最强信号对应的条件为最优条件,如图3所示;同时,从图3可以看出,单纯地改变包被抗原(CAP-BSA、SDZ-BSA、NEO-BSA)的浓度,并不能大幅度地增加信号强度,因此不能作为调节线性范围的有效手段。

[0033] 2、光纤传感响应纤芯长度的影响

[0034] 使用光纤传感响应纤芯长度为0.5cm、1.0cm、1.5cm的光纤传感器对系列浓度的CAP、SDZ、NEO进行测定,以样品浓度为横坐标,以空白信号(I_0)与样品信号(I)的差值为纵坐标作图。

[0035] 3、光纤根数的影响

[0036] 对于系列浓度的CAP,分别将1、5、8根内光纤传感响应纤芯长度为0.5cm的光纤组

装成束进行测定;对于系列浓度的SDZ,分别将1、5、8根光纤传感响应纤芯长度为1.0cm的光纤组装成束进行测定;对于系列浓度的NEO,分别将1、5、8根光纤传感响应纤芯长度为1.5cm的光纤组装成束进行测定;以样品浓度为横坐标,以空白信号(I_0)与样品信号(I)的差值为纵坐标作图;线性范围调节效果如图4所示。

[0037] 4、标准曲线的制作

[0038] 根据实际样品中兽药残留的浓度范围,选择适合CAP、SDZ、NEO的线性范围,以样品浓度(pg/mL)的对数为横坐标,以 $(I_0 - I) / I_0$ 为横坐标作图,如图5所示。本专利通过改变光纤传感响应纤芯长度与根数,实现了线性范围的大幅度调节(pg/mL- μ g/mL),具有检测浓度范围跨度极大的多重目标物。

[0039] 实施例3 兽药氯霉素、磺胺嘧啶、新霉素的检测方法

[0040] 采用实施例1制备的化学发光光纤免疫传感器进行检测,具体步骤如下:

[0041] 1、检测步骤

[0042] 1) 免疫竞争反应

[0043] 将一系列浓度的CAP、SDZ、NEO与其对应的生物素化抗体(B-Ab of CAP:5 μ g/mL, B-Ab of SDZ:10 μ g/mL, B-Ab of CAP:40 μ g/mL)混合,立即将对应的光纤免疫传感器的光纤传感响应纤芯部分插入混合溶液中,37℃反应30-60分钟,然后用PBST洗去多余的兽药和B-Ab。

[0044] 2) 引入信号转换单元

[0045] 预先将SA和B-HRP按照1:4的摩尔比进行混合,反应30分钟以得到SA-B-HRP复合物,然后将上述结合B-Ab后的光纤免疫传感器的光纤传感响应纤芯部分浸入该复合物溶液中,反应30分钟,PBST洗去未结合的复合物。

[0046] 3) 化学发光过程

[0047] 将光纤免疫传感器的光纤传感响应纤芯部分浸入到新制备的化学发光底物溶液中(取鲁米诺和双氧水各10 μ L,即时混合)。

[0048] 2、样品检测

[0049] 1) 将待测实际样品与对应B-Ab溶液混合,立即将实施例1制备的传感器插入其中进行免疫竞争反应1小时,PBST冲洗。

[0050] 2) 将上述传感器浸入链霉亲和素和生物素标记的辣根过氧化物酶形成的复合物SA-B-HRP溶液中反应30分钟,PBST洗去未结合的复合物。

[0051] 3) 将传感器插入新制备的化学发光底物溶液中(取鲁米诺和双氧水各100 μ L,即时混合),进行化学发光信号的数据采集和记录。

[0052] 4) 将测得的化学发光强度代入对应的标准曲线,求出实际样品中CAP、SDZ、NEO浓度。

[0053] 4、干扰测定

[0054] 1) 配制含有20ng/mL SDZ和100 μ g/mL NEO干扰溶液,对照为1000 pg/mL的CAP溶液,分别用三种传感器测量其化学发光信号强度;

[0055] 2) 配制含有1000pg/mL CAP和100 μ g/mL的干扰溶液,对照为20ng/mL的SDZ溶液,分别用三种传感器测量其化学发光信号强度;

[0056] 3) 配制含有1000pg/mL CAP和20ng/mL SDZ的干扰溶液,对照为100 μ g/mL的NEO溶

液,分别用三种传感器测量其化学发光信号强度;

[0057] 根据测得的信号强度计算浓度,并进行对比,如图6所示,CAP、SDZ、NEO三种兽药之间的相互干扰在-5.9%-9.0%的范围内,说明并不影响同一样品中三种兽药的同时检测。

[0058] 实施例4实际样品检测

[0059] 取三种市售牛奶样品,每种分别加入不同已知浓度的CAP、SDZ、NEO标样,计算加标回收率;结果列于下表;结果表明,用本专利制备的传感器在实际样品中测得的加标回收率在85.0%-109.4%之间,说明可用于实际样品中兽药残留的定量检测。

表1 实际样品的加标回收率(%)

	Sample 1				Sample 2			Sample 3		
	Spiked	Found	Recovery	RSD(n=3)	Found	Recovery	RSD(n=3)	Found	Recovery	RSD(n=3)
			rate (%)	(%)		rate (%)	(%)		rate (%)	(%)
CAP (pg/mL)	0	ND*			ND			ND		
	20	17.94	89.7	6.33	18.70	93.5	5.11	18.45	92.2	5.22
	200	201.39	100.7	7.36	193.89	96.9	3.93	187.32	93.7	1.88
	2000	2168.54	108.4	4.82	2045.04	102.2	1.21	2017.02	100.9	4.95
SDZ (ng/mL)	0	ND			ND			ND		
	2	1.90	95.0	3.42	2.01	100.5	3.52	1.86	93.0	3.62
	20	19.91	99.6	1.56	17.84	89.2	1.59	20.82	100.4	4.72
	200	174.46	87.3	3.39	208.75	104.4	3.15	180.53	90.3	8.63
NEO (µg/mL)	0	ND			ND			ND		
	1	1.04	104.0	2.40	0.91	91.0	4.15	0.85	85.0	2.56
	10	10.50	105.0	5.92	10.94	109.4	11.28	10.63	106.3	3.67
	100	109.20	109.2	7.14	101.44	101.4	4.89	92.32	92.32	8.13

[0061] *ND表示未检测到。

[0062] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的工艺方法,但本发明并不局限于上述工艺步骤,即不意味着本发明必须依赖上述工艺步骤才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明所选用原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

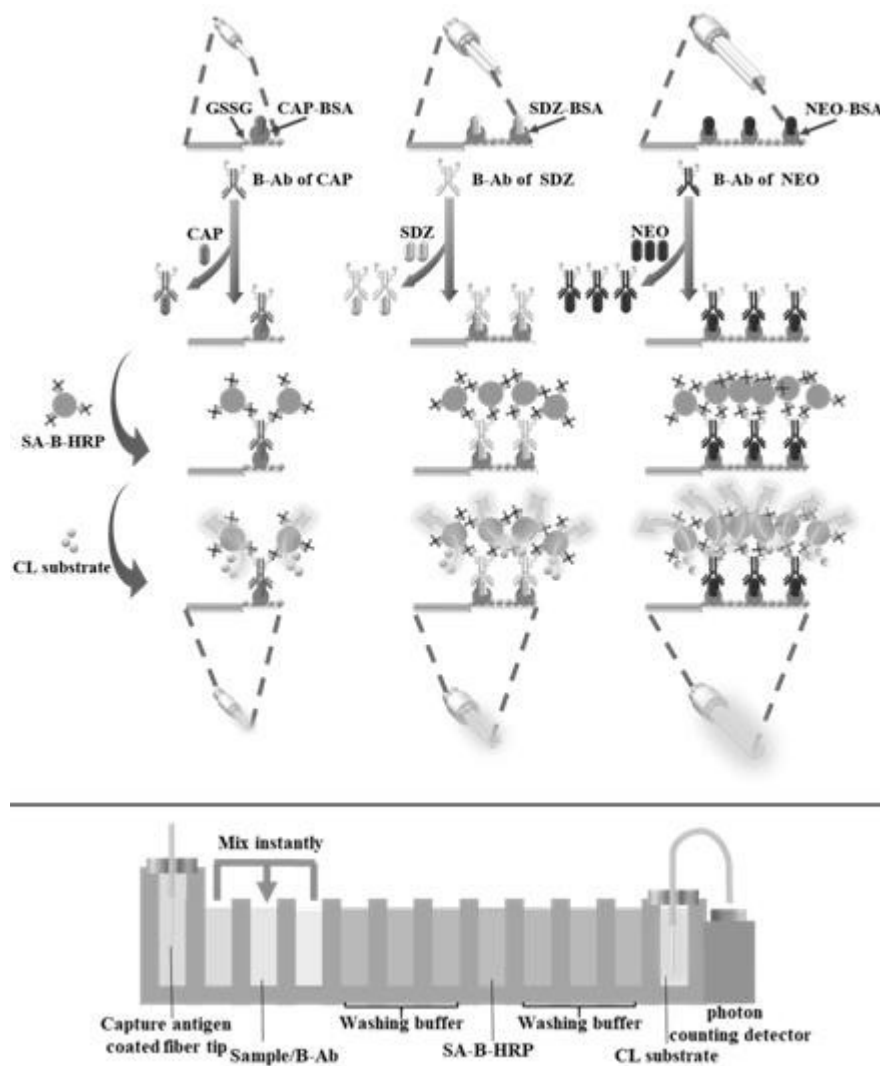


图1

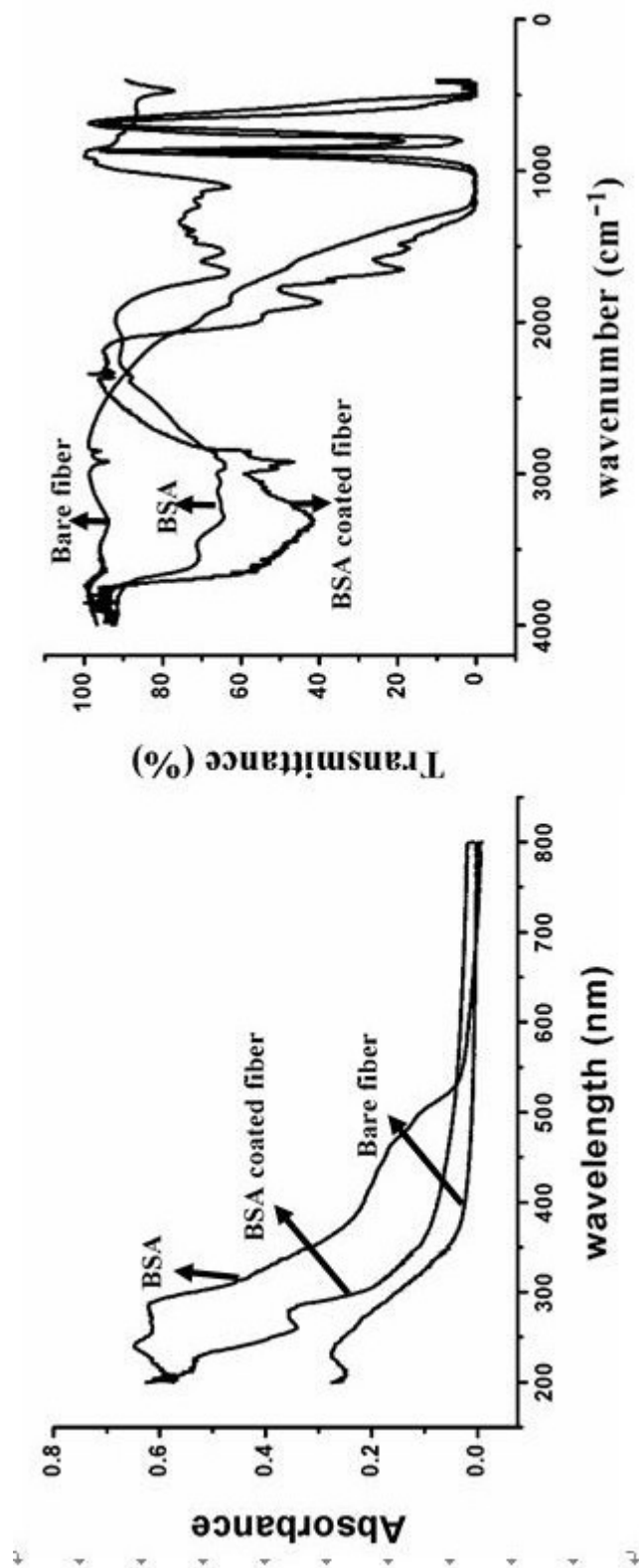


图2

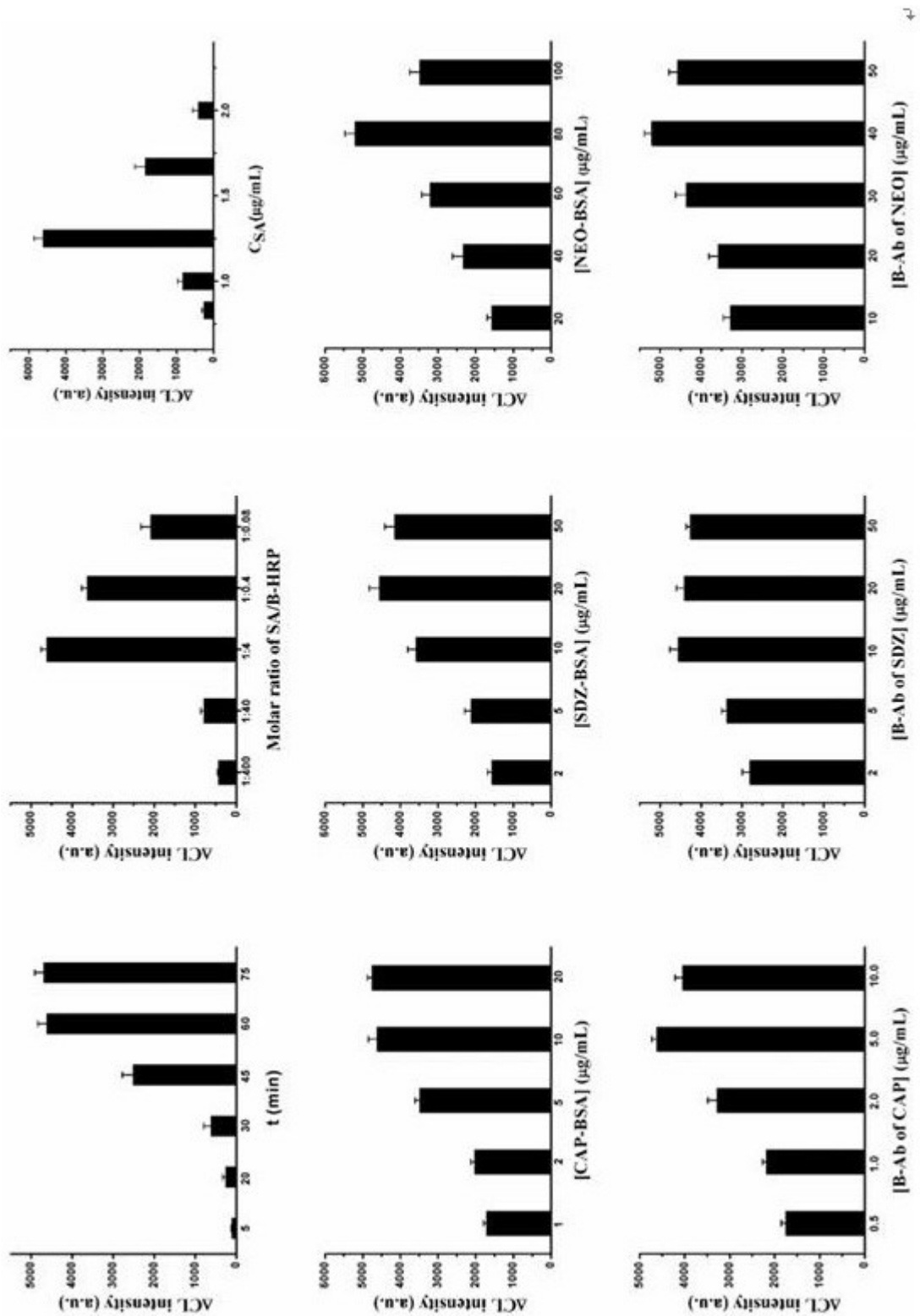


图3

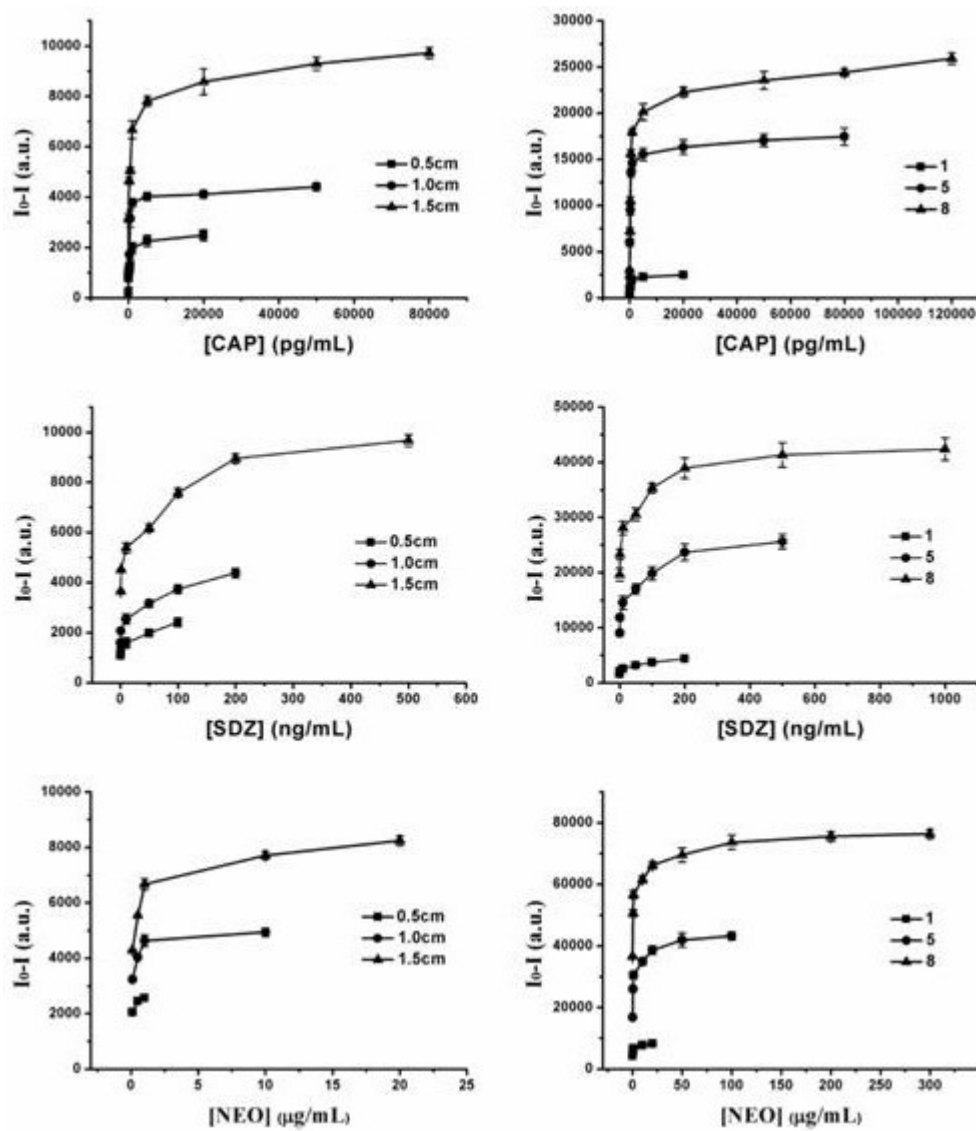


图4

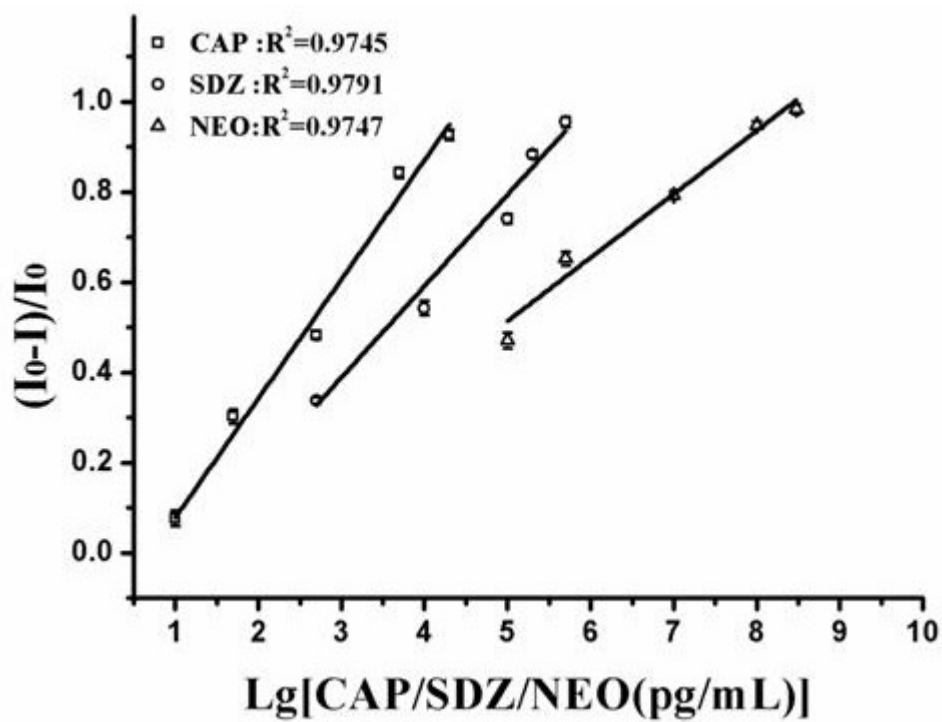


图5

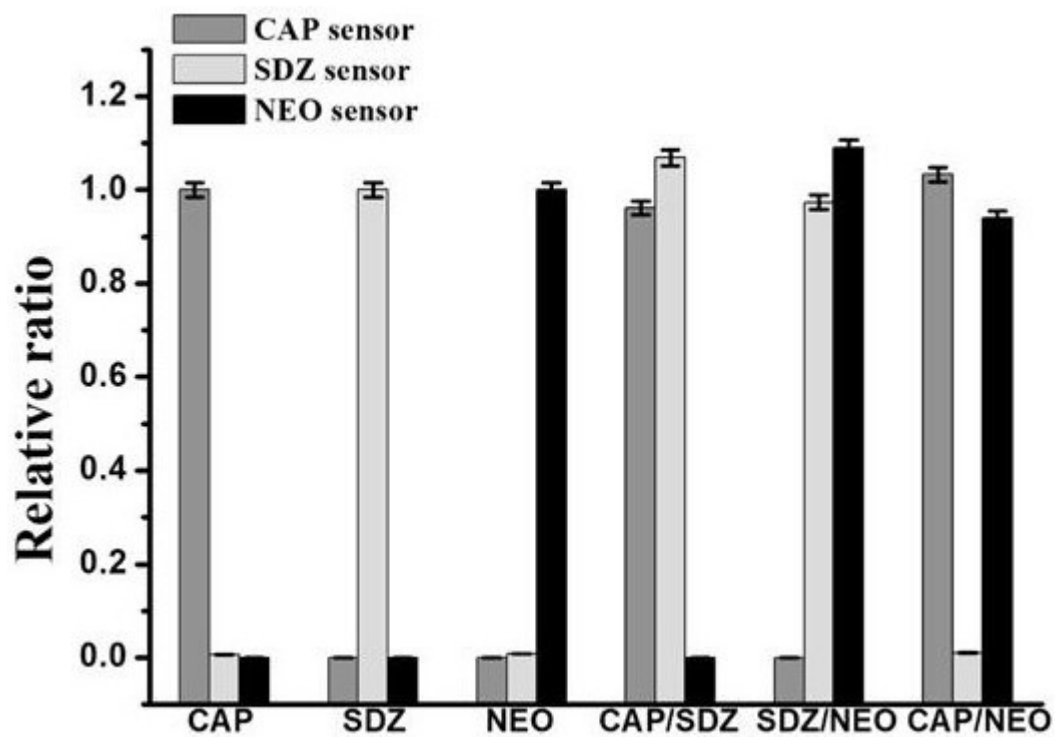


图6