



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104730234 A

(43) 申请公布日 2015.06.24

(21) 申请号 201510066398.3

(22) 申请日 2015.02.07

(71) 申请人 中国计量学院

地址 310018 浙江省杭州市下沙高教园区学
源街

(72) 发明人 潘家荣 帅瑞琦 方豪 冯依璠

(74) 专利代理机构 四川君士达律师事务所
51216

代理人 苟忠义

(51) Int. Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 27/30(2006.01)

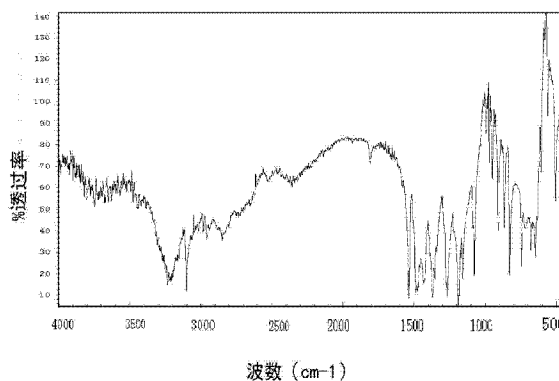
权利要求书2页 说明书10页 附图6页

(54) 发明名称

一种基于免疫金的电化学传感元件的制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种基于免疫金的电化学传感元件的制备方法,本发明制备了通用的硝基咪唑类结构半抗原,并采用活化酯法,将硝基咪唑半抗原与载体蛋白(BSA和OVA)偶联制备免疫原和包被原,偶联分子摩尔比分别为11:1和10:1。同时制备了硝基咪唑抗体,效价为1:100000,制备免疫纳米金;利用单分子膜自组装技术在金电极上形成单分子膜,再通过DCC和NHS与免疫纳米金联接,制备了传感元件。该传感元件对甲硝唑、替硝唑、地美硝唑有良好的响应,交叉反应率达90%以上,可测定0.001-100mg/L浓度范围内的甲硝唑、替硝唑、地美硝唑及其代谢物,检测限约为0.0019mg/L,回收率约为90%。



1. 一种基于免疫金的电化学传感元件的制备方法,其特征在于:所述方法的具体步骤如下:

(1) 用 0.1mol/L NaOH 和 0.1mol/L HNO₃ 分别淋洗金电极三次,每次 1min,再置于新鲜配制的 piranha 溶液,浸泡 30min;

(2) 取出金电极,超纯水淋洗 1min,置于超纯水中超声清洗 3min,无水乙醇中超声清洗 3min,重复 3 次;

(3) 依次用 0.3 μm 和 0.05 μm Al₂O₃ 粉末抛光至呈镜面后,金电极置于 piranha 溶液,浸泡 30min,重复步骤 (2),然后用高纯氮吹干金电极表面;

(4) 把金电极浸于三巯基丙酸溶液中温育 12h,依次用超纯水、无水乙醇淋洗三次,每次 1min,然后用高纯氮吹干金电极表面,即为 MPA/ 金电极,然后将金电极浸于碳二亚胺盐酸盐和 N- 羟基琥珀亚胺溶液的混合液中 12h 后,用超纯水淋洗 3min,再将金电极浸于含有免疫金的磷酸缓冲液中,4℃ 过夜,最后用超纯水清洗,高纯氮吹干金电极表面,即为免疫金 /MPA/ 金电极。

2. 如权利要求 1 所述的基于免疫金的电化学传感元件的制备方法,其特征在于:步骤 (1) 和步骤 (3) 中,所述的 piranha 溶液是由 30wt% 的 H₂O₂ 和浓硫酸组成,两者的体积比为 1:3。

3. 如权利要求 1 所述的基于免疫金的电化学传感元件的制备方法,其特征在于:步骤 (4) 中,所述的三巯基丙酸溶液的浓度为 0.1mol/L。

4. 如权利要求 1 所述的基于免疫金的电化学传感元件的制备方法,其特征在于:步骤 (4) 中,所述的碳二亚胺盐酸盐和 N- 羟基琥珀亚胺溶液的浓度均为 0.1mol/L,混合液中两者的体积比为 1:1。

5. 如权利要求 1 所述的基于免疫金的电化学传感元件的制备方法,其特征在于:步骤 (4) 中,所述的磷酸缓冲液的 pH 为 7.4。

6. 如权利要求 1 所述的基于免疫金的电化学传感元件的制备方法,其特征在于:步骤 (4) 中,所述的免疫金的制备方法如下:

(a) 胶体金的制备

将所用器皿用酸液浸泡 72h,取出,自来水冲洗,蒸馏水浸泡 24h,干燥,用含 5wt% 的二氯二甲基硅烷的三氯甲烷溶液进行硅化,硅化完成后用双蒸水冲洗,烘干,取质量浓度 0.01% 氯金酸水溶液 100mL 加热至沸,300rpm 搅拌下加入预热的质量浓度 1% 柠檬酸三钠水溶液 4mL,金黄色的氯金酸水溶液在 2min 内变为灰色,然后由灰色变为酒红色,继续搅拌煮沸,直至溶液呈透亮的红色,冷却后用双蒸水定容至 100mL,4℃ 冰箱中避光保存;

(b) 免疫金的制备

将步骤 (a) 制备的胶体金和硝基咪唑抗体溶液分别以 0.1Mol/L K₂CO₃ 调 pH 至 9.0,电磁搅拌硝基咪唑抗体溶液,加入胶体金溶液,继续搅拌 10min,加入 5wt% BSA 使溶液终浓度为 1wt%,以防止抗体蛋白与胶体金聚合发生沉淀,用 15000r/min 离心 30min,轻吸上清液,沉淀用含 1wt% PEG 的 PBS 缓冲液悬浮,恢复原体积后再离心,如此洗涤 2~4 次,以彻底除去未结合的蛋白质,最终用含 1wt% PEG 的 PBS 缓冲液悬浮并保存。

7. 如权利要求 6 所述的基于免疫金的电化学传感元件的制备方法,其特征在于:步骤 (b) 中,所述的 PBS 缓冲液的量为 0.01M, pH 为 7.4。

8. 如权利要求 6 所述的基于免疫金的电化学传感元件的制备方法,其特征在于:步骤(b)中,所述的硝基咪唑抗体的制备方法如下:

(1) 硝基咪唑半抗原 MNZ-SA 的合成

在 10mL 烧杯中加入甲硝唑 0.85g、琥珀酸酐 1.25g、无水吡啶 1mL,在磁力搅拌器上搅拌反应 4h,可得乳白色液体,将混合物置微波炉内加热约 10s 至混合物刚好沸腾,混合物变成透明的黄色液体,旋转蒸发仪减压除去吡啶得白色固体,加入 20mL 蒸馏水超声溶解,用 20mL 乙酸乙酯萃取 3 次,合并有机相,用旋转蒸发仪减压浓缩至干,加入 5mL 乙酸乙酯超声溶解后,加入 25mL 石油醚,静置,减压抽滤得白色固体粉末,即为硝基咪唑半抗原 MNZ-SA,真空干燥,放入冰箱中保存备用;

(2) 硝基咪唑免疫原 BSA-MNZ

用电子天平准确称取 0.1084g 步骤(1)制备的半抗原溶于 5mL N,N'-二甲基甲酰胺中,加入 310mg DCC,放在摇床上搅拌 10min,加入 20.0mg NHS,混合液室温避光在摇床上反应 3.5h,观察到有白色的沉淀物,用离心机进行离心,取上层清液逐滴加入到 0.1mol/L, pH8.0 的磷酸缓冲液配置的 40mL BSA 溶液中,室温避光在摇床上反应 2h,用 0.9wt% 的生理盐水透析 3 天,每天换液 3 次,冷冻干燥即得甲硝唑全抗原白色固体粉末;

(3) 硝基咪唑抗体的制备

选取两只新西兰大白兔,背部皮下多点注射 500 μ g BSA-MNZ,其中 BSA-MNZ 用生理盐水稀释,加等体积的完全弗氏佐剂充分乳化,在 15d,再次注射相同剂量经不完全弗氏佐剂充分乳化的免疫原,29d、39d 和 49d,注射 250 μ g 经不完全弗氏佐剂充分乳化的免疫原,59d 后,耳静脉取血,测定抗体效价,效价合适后,心脏完全取血,分离及纯化抗血清,得到硝基咪唑抗体。

9. 如权利要求 1-8 任一项所述的方法制备的传感元件用于检测动物性食品中硝基咪唑类药物残留的应用。

一种基于免疫金的电化学传感元件的制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及电化学技术领域,尤其涉及一种基于免疫金的电化学传感元件的制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 硝基咪唑类抗生素包括甲硝唑、替硝唑、地美硝唑、洛硝哒唑、异丙硝唑等,是畜禽饲料中常用的抗原虫感染及抗菌药,并具有促生长作用,还能与其他抗生素联合使用于治疗厌氧菌感染。但是该类药物及其某些代谢物对哺乳动物具有致癌、致畸、致突变作用和遗传毒性,被许多国家列为违禁药物。在欧盟,洛硝哒、地美硝唑和甲硝唑分别在 1993 年、1995 年和 1998 年被禁止用于食用动物,2002 年美国食品与药物管理局公布了禁止在进口动物源性食品中使用的 11 种药物,其中包括地美硝唑及其他硝基咪唑类药物。我国农业部和国家药品监督管理局第 227 号公告规定甲硝唑、地美硝唑及其盐、酯及制剂不准以促进动物生长为目的在所有食品动物饲养过程中使用。

[0003] 目前在国内,测定硝基咪唑类兽药的方法主要有气相色谱法、气相色谱质谱联用法、高效液相色谱法和高效液相色谱质谱联用法等。但是这些方法的检测设备昂贵、样品前处理复杂,同时还需要较高水平的专业人员进行操作,很难满足对批量样品进行快速检测和现场检测的要求。

[0004] 近年来,由于免疫传感器技术具有分析速度快、可信度高、适合样品初级筛选检测等优点,许多学者研究纷纷研究农药、兽药和抗生素等小分子的免疫传感器检测方法,具有灵敏度高、检测费用低、灵活快捷等优点,其关键技术是抗体固定,即把抗体固定在电极上制备高灵敏的电化学免疫传感元件。

发明内容

[0005] 甲硝唑、替硝唑、地美硝唑、洛硝哒唑、异丙硝唑等都具有相类似的咪唑结构(1、2、3 位上取代基不同),本发明针以甲硝唑的醇基为连接臂,合作半抗原和免疫原、包被原,制备抗体,同时发挥纳米材料表面积大的优势,制备免疫金,且与备金-巯基丙酸单分子膜联接,制备一种高灵敏的硝基咪唑类药物残留电化学传感元件,为抗生类药物残留的快速检测和现场检测提供支撑。

[0006] 本发明采用如下技术方案:

[0007] 本发明的基于免疫金的电化学传感元件的制备方法的具体步骤如下:

[0008] (1) 用 0.1mol/L NaOH 和 0.1mol/L HNO₃ 分别淋洗金电极三次,每次 1min,再置于新鲜配制的 piranha 溶液,浸泡 30min;

[0009] (2) 取出金电极,超纯水淋洗 1min,置于超纯水中超声清洗 3min,无水乙醇中超声清洗 3min,重复 3 次;

[0010] (3) 依次用 0.3 μm 和 0.05 μm Al₂O₃ 粉末抛光至呈镜面后,金电极置于 piranha 溶液,浸泡 30min,重复步骤 (2),然后用高纯氮吹干金电极表面;

[0011] (4) 把金电极浸于三巯基丙酸溶液中温育 12h, 依次用超纯水、无水乙醇淋洗三次, 每次 1min, 然后用高纯氮吹干金电极表面, 即为 MPA/ 金电极, 然后将金电极浸于碳二亚胺盐酸盐溶液和 N- 羟基琥珀亚胺溶液的混合液中 12h 后, 用超纯水淋洗 3min, 再将金电极浸于含有免疫金的磷酸缓冲液中, 4℃ 过夜, 最后用超纯水清洗, 高纯氮吹干金电极表面, 即为免疫金 /MPA/ 金电极。

[0012] 步骤 (1) 和步骤 (3) 中, 所述的 piranha 溶液是由 30wt% 的 H_2O_2 和浓硫酸组成, 两者的体积比为 1:3。

[0013] 步骤 (4) 中, 所述的三巯基丙酸溶液的浓度为 0.1mol/L。

[0014] 步骤 (4) 中, 所述的碳二亚胺盐酸盐溶液和 N- 羟基琥珀亚胺溶液的浓度均为 0.1mol/L, 混合液中两者的体积比为 1:1。

[0015] 步骤 (4) 中, 所述的磷酸缓冲液的 pH 为 7.4。

[0016] 步骤 (4) 中, 所述的免疫金的制备方法如下:

[0017] (a) 胶体金的制备

[0018] 将所用器皿用酸液浸泡 72h, 取出, 自来水冲洗, 蒸馏水浸泡 24h, 干燥, 用含 5wt% 的二氯二甲基硅烷的三氯甲烷溶液进行硅化, 硅化完成后用双蒸水冲洗, 烘干, 取质量浓度 0.01% 氯金酸水溶液 100mL 加热至沸, 300rpm 搅拌下加入预热的质量浓度 1% 柠檬酸三钠水溶液 4mL, 金黄色的氯金酸水溶液在 2min 内变为灰色, 然后由灰色变为酒红色, 继续搅拌煮沸, 直至溶液呈透亮的红色, 冷却后用双蒸水定容至 100mL, 4℃ 冰箱中避光保存;

[0019] (b) 免疫金的制备

[0020] 将步骤 (a) 制备的胶体金和硝基咪唑抗体溶液分别以 0.1mol/L K_2CO_3 调 pH 至 9.0, 电磁搅拌硝基咪唑抗体溶液, 加入胶体金溶液, 继续搅拌 10min, 加入 5wt% BSA 使溶液终浓度为 1wt%, 以防止抗体蛋白与胶体金聚合发生沉淀, 用 15000r/min 离心 30min, 轻吸上清液, 沉淀用含 1wt% PEG 的 PBS 缓冲液悬浮, 恢复原体积后再离心, 如此洗涤 2~4 次, 以彻底除去未结合的蛋白质, 最终用含 1wt% PEG 的 PBS 缓冲液悬浮并保存。

[0021] 步骤 (b) 中, 所述的 PBS 缓冲液的量为 0.01M, pH 为 7.4。

[0022] 步骤 (b) 中, 所述的硝基咪唑抗体的制备方法如下:

[0023] (1) 硝基咪唑半抗原 MNZ-SA 的合成

[0024] 在 10mL 烧杯中加入甲硝唑 0.85g、琥珀酸酐 1.25g、无水吡啶 1mL, 在磁力搅拌器上搅拌反应 4h, 可得乳白色液体, 将混合物置微波炉内加热约 10s 至混合物刚好沸腾, 混合物变成透明的黄色液体, 旋转蒸发仪减压除去吡啶得白色固体, 加入 20mL 蒸馏水超声溶解, 用 20mL 乙酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相, 用旋转蒸发仪减压浓缩至干, 加入 5mL 乙酸乙酯超声溶解后, 加入 25mL 石油醚, 静置, 减压抽滤得白色固体粉末, 即为硝基咪唑半抗原 MNZ-SA, 真空干燥, 放入冰箱中保存备用;

[0025] (2) 硝基咪唑免疫原 BSA-MNZ

[0026] 用电子天平准确称取 0.1084g 步骤 (1) 制备的半抗原溶于 5mL N, N' - 二甲基甲酰胺中, 加入 310mg DCC, 放在摇床上搅拌 10min, 加入 20.0mg NHS, 混合液室温避光在摇床上反应 3.5h, 观察到有白色的沉淀物, 用离心机进行离心, 取上层清液逐滴加到 0.1mol/L, pH8.0 的磷酸缓冲液配置的 40mL BSA 溶液中, 室温避光在摇床上反应 2h, 用 0.9wt% 的生理盐水透析 3 天, 每天换液 3 次, 冷冻干燥即得甲硝唑全抗原白色固体粉末;

[0027] (3) 硝基咪唑抗体的制备

[0028] 选取两只新西兰大白兔,背部皮下多点注射 500 μg BSA-MNZ,其中 BSA-MNZ 用生理盐水稀释,加等体积的完全弗氏佐剂充分乳化,在 15d,再次注射相同剂量经不完全弗氏佐剂充分乳化的免疫原,29d、39d 和 49d,注射 250 μg 经不完全弗氏佐剂充分乳化的免疫原,59d 后,耳静脉取血,测定抗体效价,效价合适后,心脏完全取血,分离及纯化抗血清,得到硝基咪唑抗体。

[0029] 本发明的方法制备的传感元件可以用于检测动物性食品中硝基咪唑类药物残留。

[0030] 本发明的积极效果如下:

[0031] 本发明根据硝基咪唑类抗生素的结构特点,设计和制备了通用的硝基咪唑类结构半抗原,并采用活化酯法,将硝基咪唑半抗原与载体蛋白(BSA 和 OVA)偶联制备免疫原和包被原,其结构得到核磁共振图谱、红外图谱和紫外图谱的鉴定,偶联分子摩尔比分别为 11:1 和 10:1。同时制备了硝基咪唑抗体,效价为 1:100000,制备免疫纳米金;利用单分子膜自组装技术在金电极上形成单分子膜,再通过 DCC 和 NHS 与免疫纳米金联接,制备了传感元件。建立了硝基咪唑类药物电化学传感检测技术,对甲硝唑、替硝唑、地美硝有良好的响应,交叉反应率达 90% 以上,可测定 0.001-100mg/L 浓度范围内的甲硝唑、替硝唑、地美硝唑及其代谢物,检测限约为 0.0019mg/L,回收率约为 90%,为进一步建立和完善法检测动物性食品中硝基咪唑类药物残留提供了支撑。

附图说明

[0032] 图 1 是硝基咪唑半抗原的氢核磁共振图谱。

[0033] 图 2 是甲硝唑的红外光谱图。

[0034] 图 3 是硝基咪唑半抗原的红外光谱图。

[0035] 图 4 是 BSA,甲硝唑,全抗全紫外吸收光谱合并图。

[0036] 图 5 是各种修饰电极的循环伏安图;

[0037] a. 裸金电极;b. MPA/金电极;c. 免疫金/MPA/金电极。

[0038] 图 6 是不同甲硝唑浓度下响应值 ΔE 的变化图。

[0039] 图 7 是甲硝唑电化学免疫传感测定标准曲线图。

具体实施方式

[0040] 下面的实施例是对本发明的进一步详细描述。

[0041] 实施例 1

[0042] 1.1 试剂

[0043] 甲硝唑原药(Metronidazole),纯度 99%,25g, J&K Chemical 公司;替硝唑、地美硝唑、洛硝哒唑、异丙硝唑、N, N' - 二甲基甲酰胺(DMF)和 N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS),均为分析纯, Sigma 公司;N, N' - 二环己基碳酰亚胺(DCC)和碳二亚胺盐酸盐(EDC),化学纯,国药集团化学试剂有限公司;硝酸铜、三巯基丙酸(MPA),均购自阿拉丁公司。

[0044] 1.2 仪器

[0045] CHI400 系列电化学石英晶体微天平(上海辰华仪器有限公司),0.3 μm 和 0.05 μm Al_2O_3 抛光打磨仪(上海辰华仪器有限公司),氮气吹扫仪(杭州奥盛仪器有限公

司), Z50 达尔文纳米粒度仪。

[0046] 1.3 试验方法

[0047] 1.3.1 硝基咪唑抗原的制备

[0048] (1) 硝基咪唑半抗原 (MNZ-SA) 的合成及鉴定

[0049] 作为甲硝唑、替硝唑、地美硝唑,其通用结构可设计为 2-甲基-5-硝基咪唑,通过 1 位上的醇基与载体联接;对于洛硝哒唑和异丙硝唑,通用结构为 1-甲基-5-硝基咪唑,可通过 2 位与载体联接。本文先采用第一种方案进行半抗原合作,即以甲硝唑为底物,通过 1 位上的醇基与载体联接。由于 1 位活性基团较靠近咪唑环,直接联接载体,联接臂较短,不易制备高效、特异的抗体。故先用琥珀酸酐制备半抗原,延长连接臂,制备半抗原。具体方法为:在 10mL 烧杯中加入甲硝唑 0.85g、琥珀酸酐 1.25g、无水吡啶 1mL,在磁力搅拌器上搅拌反应 4h,可得乳白色液体。将混合物置微波炉内加热约 10s 至混合物刚好沸腾,混合物变成透明的黄色液体。旋转蒸发仪减压除去吡啶得白色固体。加入 20mL 蒸馏水超声溶解,用 20mL 乙酸乙酯萃取 3 次,合并有机相,用旋转蒸发仪减压浓缩至干,加入 5mL 乙酸乙酯超声溶解后,加入 25mL 石油醚,静置,减压抽滤得白色固体粉末,即为硝基咪唑半抗原 (MNZ-SA),真空干燥,放入冰箱中保存备用。产品采用核磁共振和红外进行鉴定。

[0050] (2) 硝基咪唑免疫原 (BSA-MNZ) 和包被原和 (OVA-MNZ) 的合成及鉴定

[0051] 采用活性酯法通过 DCC 和 NHS 将载体蛋白的氨基与半抗原的羧基进行联接。具体步骤为:用电子天平准确称取 0.1084g 半抗原溶于 5mL N,N'-二甲基甲酰胺中,加入 310mg DCC,放在摇床上搅拌 10min,加入 20.0mg NHS。混合液室温避光在摇床上反应 3.5h,可以观察到有白色的沉淀物。用离心机进行离心,取上层清液逐滴加到 0.1mol/L, pH8.0 的磷酸缓冲液配置的 40mL BSA 溶液 (4.75mg/mL) 中,室温避光在摇床上反应 2h。用 0.9% 的生理盐水透析 3 天,每天换液 3 次,冷冻干燥即得甲硝唑全抗原白色固体粉末。利用紫外分光光度计进行鉴定并测定计算联接摩尔分子比。同理制备得 OVA 包被原。

[0052] 1.3.2 硝基咪唑抗体的制备及鉴定

[0053] 选取两只新西兰大白兔,背部皮下多点注射 500 μ g MNZ-BSA,其中 MNZ-BSA 用生理盐水稀释,加等体积的完全弗氏佐剂充分乳化。在 15d,再次注射相同剂量经不完全弗氏佐剂充分乳化的免疫原。29d、39d 和 49d,注射 250 μ g 经不完全弗氏佐剂充分乳化的免疫原。59d 后,耳静脉取血,测定抗体效价。效价合适后,心脏完全取血,分离及纯化抗血清。采用间接非竞争 ELISA 法测定纯化后抗体效价。利用棋盘法确定甲硝唑包被抗原和抗体工作浓度。

[0054] 1.3.3 基于免疫金和巯基丙醇自组装膜的传感元件制备

[0055] (1) 纳米金的制备

[0056] 将所用器皿用酸液浸泡 72h,取出,大量自来水冲洗,蒸馏水浸泡 24h,干燥,用含 5% 的二氯二甲基硅烷的三氯甲烷溶液进行硅化,硅化完成后用双蒸水冲洗多次,烘干。取质量浓度 0.01% 氯金酸水溶液 100mL 加热至沸,300rpm 搅拌下加入预热的质量浓度 1% 柠檬酸三钠水溶液 4mL,金黄色的氯金酸水溶液在 2min 内变为灰色,然后由灰色变为酒红色,继续搅拌煮沸,直至溶液呈透亮的红色,冷却后用双蒸水定容至 100mL,4 $^{\circ}$ C 冰箱中避光保存。用 Z50 达尔文纳米粒度仪测定粒子的直径分布。

[0057] (2) 免疫金的制备

[0058] 将胶体金和硝基咪唑抗体溶液分别以 0.1mol/L K_2CO_3 调 pH 至 9.0, 电磁搅拌 IgG 溶液, 加入胶体金溶液, 继续搅拌 10min, 加入 5% BSA 使溶液终浓度为 1%, 以防止抗体蛋白与胶体金聚合发生沉淀。用 15000r/min 离心 30min, 轻吸上清液。沉淀用含 1% PEG 的 PBS 缓冲液悬浮, 恢复原体积后再离心。如此洗涤 2~4 次。以彻底除去未结合的蛋白质。最终用含 1% PEG 的 PBS (0.01M, pH7.4) 缓冲液悬浮并保存。

[0059] (3) 传感元件制备

[0060] 依靠自组装单层膜 (SAMs) 技术, 利用巯基丙酸的巯基金电极形成 Au-S 键, 其表面的羧基与抗体偶联, 从而将抗体固定在金电极表面。具体方法如下: ①用 0.1mol/L NaOH 和 0.1mol/L HNO_3 分别淋洗金电极三次, 每次 1min, 再置于新鲜配制的 piranha 溶液 (30% H_2O_2 : 浓硫酸 = 1:3), 浸泡 30min。②取出金电极, 超纯水淋洗 1min, 置于超纯水中超声清洗 3min, 无水乙醇中超声清洗 3min。重复 3 次。③依次用 0.3 μm 和 0.05 μm Al_2O_3 粉末抛光至呈镜面后, 金电极置于 piranha 溶液, 浸泡 30min。重复步骤②, 高纯氮吹干金电极表面。④把金电极浸于 MPA 溶液 (0.1mol/L) 中温育 12h, 依次用超纯水、无水乙醇淋洗三次, 每次 1min。高纯氮吹干金电极表面, 即为 MPA/ 金电极。然后将金电极浸于 0.1mol/L NHS 和 0.1mol/L EDC 的 1:1 混合液中 12h 后, 用超纯水淋洗 3min。再将金电极浸于免疫金溶液 (PBS, pH7.4), 4°C 过夜。最后用超纯水小心清洗, 高纯氮吹干金电极表面, 即为免疫金 / MPA/ 金电极。

[0061] (4) 敏感元件的电化学表征

[0062] 以 CHI400 传感器, 分别以裸金电极、MPA/ 金电极和免疫金 / MPA/ 金电极为工作电极, 以 Ag/AgCl 电极为参比电极, 以铂丝电极为辅助电极, 在 0.001mol/L $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 的 PBS (pH7.4) 溶液中, 进行电位扫描, 扫描速度为 10mV/s, 电位范围为 -0.2 ~ 0.6V。获得各种金电极的循环伏安曲线。

[0063] 1.3.4 免疫传感器的电位响应性能和标准曲线制作

[0064] 电化学免疫传感器测定方法: 以修饰有免疫金的金电极为工作电极, 以 Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 三种电极均插入含 0.001mol/L $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 的 PBS (pH7.4) 溶液中, 测出稳态时的空白电位, 记为 E_0 。然后将工作电极分别插入 100、10、1、 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 和 1×10^{-4} $\mu g/mL$ 甲硝唑标准溶液, 待其充分反应后, 用超纯水小心清洗, 高纯氮吹干金电极表面, 再与参比电极和辅助电极插入 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 溶液中, 分别记录下稳态时的电位, 记为 E_n ($n = 1, 2, 3, \dots$)。电位差 ΔE ($\Delta E = E_n - E_0$), 作为对不同浓度甲硝唑标准溶液的响应值。以甲硝唑标准溶液浓度的对数值为横坐标, 以响应值 ΔE 为纵坐标, 建立甲硝唑对数标准曲线。

[0065] 1.3.5 免疫传感器的性能评价

[0066] (1) 检测限的确定

[0067] 修饰有甲硝唑抗体的金电极对不含甲硝唑的 PBS 溶液 (1mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$) 重复测试 20 次。按下式计算检测限^[22]:

$$[0068] \quad LOD = \sigma / D$$

[0069] 其中 σ 为空白测定响应值 ΔE 的标准偏差 σ , 即为噪音值; D 为标准曲线的斜率。

[0070] (2) 回收率的确定

[0071] 取市售猪肉, 捣碎, 称取 50g, 加入 200mL 蒸馏水用匀浆机匀浆, 煮沸 10min, 过滤得

样品液。

[0072] 用固定有免疫金的电极对含有已知浓度的甲硝唑（根据标准曲线选取低中高 3 个浓度）的样品液进行测量，将得到的电极电位响应值代入拟合曲线中得出对应的甲硝唑浓度，为甲硝唑浓度的测量值，再根据公式： $\text{加标回收率} = \text{测量值} / \text{真实值} \times 100\%$ 计算出回收率。

[0073] (3) 稳定性的测定

[0074] 将修饰有免疫金的电极置于 37℃ 温度下（所用试剂在 37℃ 存放 24h 相当于在 4℃ 存放 45d）每隔 24h 进行电化学传感测定。阳性样品为样品液中加入 10 μg/mL 甲硝唑，阴性样品为样品。测定电势响应值，计算 ΔE ，以 $\Delta E_{\text{阴}} / \Delta E_{\text{阳}} \geq 2.1$ 为有效； $1.5 < \Delta E_{\text{阴}} / \Delta E < 2.1$ 为可疑； $\Delta E_{\text{阴}} / \Delta E < 1.5$ 为失效^[19]。

[0075] (4) 特异性测定

[0076] 选用与呋喃唑酮具有类似结构的甲硝唑、替硝唑、地美硝唑、洛硝哒唑、异丙硝唑等作为研究对象，以确定所制备的电化学免疫传感器是否具有特异性。用修饰有 AOZ 抗体的电极分别对含有已知浓度（100、10、1、 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 和 1×10^{-4} μg/mL）的 AOZ 结构类似物进行检测，计算交叉反应率。计算方法为：

[0077]

$1/2\Delta E_{\text{max}}$ 的类似物浓度

$$\text{交叉反应率} (\%) = \frac{\text{类似物浓度}}{\text{AOZ 浓度}} \times 100\%$$

$1/2\Delta E_{\text{max}}$ 的 AOZ 浓度

[0078] 2. 结果与分析

[0079] 2.1 硝基咪唑抗原的鉴定

[0080] (1) 硝基咪唑半抗原的鉴定

[0081] 图 1 是硝唑咪唑半抗原的氢核磁共振图谱，从图中可以看出，7.97ppm、4.49-4.63ppm、4.48-4.51ppm、2.61-2.73ppm、2.55-2.59ppm 处分别发生了化学位移，表明半抗原中含有 -CH、-CH₂-O-、-N-CH₂-、-CH₂-COOH 和 -CH₂-COO-C- 基团，因此初步断定这种物质是甲硝唑半抗原。

[0082] 图 2 为甲硝唑的红外光谱图，在 3500-3200cm⁻¹ 有吸收峰，表明存在 -OH 结构；在 1600cm⁻¹ 左右存在一个吸收峰，表明存在 -NO₂ 结构，羟基结构硝基结构是甲硝唑重要的结构，说明红外光谱仪器检测出了甲硝唑的特征基团。

[0083] 图 3 为硝基咪唑半抗原的红外光谱图。由图 2 和图 3 可得到看到两幅图的出峰位置以及形状都不同。根据图 3 出峰时间可以推断半抗原中存在的基团，如表 1。

[0084] 表 1 红外光谱中不同种类基团的出峰波数

[0085]

基团	波数 (cm ⁻¹)
Groups	Wave number
ν =C-H	3182.78
羧酸 ν C=O	1888.27
ν C=O in carboxylic acid	
酯 ν C=O	
ν C=O in Ester	1687.99
咪唑环上 ν NO ₂	
ν NO ₂ at imidazole ring	1540.69
咪唑环上的 ν CH ₃	2734.16
ν CH ₃ at imidazole ring	
ν s NO ₂	1314.00
酸 ν C-O	1264.71
ν C-O in carboxylic acid	
咪唑环与硝基间的 ν C-N	1155.32
ν C-N between imidazole ring and Nitro	
咪唑环上两个双键间的 ν C-N	1213.74
ν C-N between two double bond in imidazole ring	
咪唑环与酯间的 ν C-N	1235.18
ν C-N between imidazole ring and ester	
酯和咪唑环间的 ν CH ₂	1419.76
ν CH ₂ between imidazole ring and ester	

[0086] 可知,样品的结构中存在羧酸基团,酯基团,咪唑环连接在碳链上,由于甲硝唑和琥珀酸酐中不存在羧酸基团和酯基团,而硝基咪唑半抗原中这些都是重要的基团结构,因此可以初步推断半抗原合成成功结合氢核磁共振图谱和红外光谱结构和基团分析表明半抗原甲硝唑半琥珀酸酯合成成功,可以为后面的实验奠定基础。

[0087] (2) 硝基咪唑全抗原紫外吸收光谱鉴定分析

[0088] 图4为BSA、硝基咪唑半抗原MNZ-SA和免疫原MNZ-BSA紫外吸收光谱。由图可知,BSA在280nm处有吸收峰,甲硝唑在该波长吸收较弱,而甲硝唑全抗原在该波长附近有一肩峰,推测为载体和偶联于载体上的甲硝唑的吸收累加所致;320nm为甲硝唑的特征吸收波

长, BSA 在该波长几乎无吸收, 而全抗原在该波长却表现出与甲硝唑类似的特征吸收峰, 故该吸收峰应为连接于载体上的甲硝唑所贡献。从而证明甲硝唑半琥珀酸酯连接在了载体蛋白上, 全抗原合成成功。

[0089] 经计算, BSA 和 OVA 与半抗原的偶联分子比分别为 11:1 和 10:1, 符合免疫和包被要求。

[0090] 2.2 抗体的鉴定及其工作浓度的确定

[0091] 抗血清效价测定的结果见表 3, 从表中可以看出, 5 只免疫新西兰大白兔中, X4 号效价较高, 约 100000 左右。

[0092] 根据棋盘法测得最佳工作浓度为包被抗原 0.25 μg 和抗体稀释 1000 倍。

[0093] 表 2. 不同稀释度下硝基咪唑免疫原免疫新西兰大白兔的血清滴度鉴定

[0094]

免疫新西兰大白兔编号 Rabbit No.	抗血清稀释度 Dilution ratios of Antiserum				
	1: 1000	1: 10000	1: 25000	1: 100000	1:160000
X1	+	+	-	-	-
X2	+	+	+/-	-	-
X3	+	-	-	-	-
X4	+	+	+	+	+/-
X5	+	+	+	+/-	-

[0095] 注: 效价测定的结果 + 为阳性, - 为阴性 +/- 为可疑

[0096] 2.3 传感元件的性能测定

[0097] (1) 纳米金的粒径分布

[0098] 采用 Z20 马尔文纳米粒度仪测定了纳米金粒径分布, 纳米金粒径符合正态分布, 约 85% 分布于 50-100 μm , 95% 分布于 25-120 μm 。

[0099] (2) 传感元件的电化学表征

[0100] 利用循环伏安法分别对 4 种电极 (金电极、MPA/ 金电极和免疫金 /MPA/ 金电极) 进行扫描, 结果如图 5 所示。从图中可以看出, 曲线 a 是裸金电极循环伏安图, 峰电流为 1.85 μA 。曲线 b 是 MPA/ 金电极循环伏安图, 明显低于曲线 a, 由于共价结合了 MPA, 在表面形成单分子层, 妨碍了电极表面与的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 溶液电荷交换, 峰电流明显减小。曲线 c 是免疫金 /MPA/ 金电极循环伏安图, 峰电流为 5.15 μA , 低于曲线 b, 但下降幅度不大, 说明抗体固定成功, 因为偶联上免疫金后, 金电极表面就覆盖了一层大分子物质, 有效截面积降低,

[0101] 2.4 免疫传感器对游离抗原的电位响应

[0102] 分别把工作电极依次插入浓度在 1000、100、10、1、 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 和 1×10^{-4} $\mu\text{g/mL}$ 浓度 CPAOZ 标准溶液的梯度溶液, 分别测定其电位, 与空白对照电位之差记为响应值 ΔE 。 ΔE 对浓度对数作图见图 6。从结果看出, 在 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 免疫传感器对甲硝唑均有电位相应, 响应值 ΔE 与甲硝唑浓度之间显“S”型关系。但在 $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 响应值 ΔE 与甲硝唑浓度之间显线性关系, 可作标准曲线图, 如图 7, 标准曲线方程为

$$[0103] \quad \Delta E = 0.29311g(c) + 1.1079 (R^2 = 0.9989^{**})$$

[0104] 2.5 免疫传感器检出限

[0105] 修饰有甲硝唑抗体的金电极对不含甲硝唑的 PBS 溶液 (1mmol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) 重复测试 20 次, 计算出响应值 ΔE 的标准偏差为 0.0006V, 即为噪音值。以三倍噪音值作为信号响应, 即 0.0018V。将其代入标准曲线方程, 计算出检测限约为 0.0005 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0106] 2.6 回收率

[0107] 从表 3 可知, 在添加 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 甲硝唑条件下, 猪肉样品中的加标平均回收率分别为 89.62%, 91.33% 和 90.16%, 符合检测技术要求 (75 ~ 120%), 在理想回收率 (90 ~ 105%) 范围之内。

[0108] 表 3 样品的回收率测定

[0109]

加标水平	虾仁
($\mu\text{g/mL}$)	平均回收率 (%)
0.05	89.62
1	91.33
10	90.16

[0110]

[0111] 2.7 重复性

[0112] 配制浓度为 0.1、1 和 2 $\mu\text{g/mL}$ 的甲硝唑标准液进行测定, 每个浓度做 6 个平行组, 计算其变异系数。结果见表 4, 得出该试剂和变异系数小, 精确度较高, 适合检测。

[0113] 表 4 变异系数测定

[0114]

加标水平 ($\mu\text{g/mL}$)	变异系数 (%)
0.1	3.21
1	4.72
2	3.84
平均值 CV	3.92

[0115] 2.8 免疫传感器稳定性

[0116] 电化学传感器作为一种快速检测方法,其稳定性是方法评估的重要指标之一,更是影响应用的重要因素。本方法中金电极表面的单分子层和抗体活性能否长时间保持,极大影响了稳定性。将修饰了免疫金的金电极密封后置于 4°C 下保存,每隔 10 天对 $0.10 \mu\text{g/mL}$ 甲硝唑标准溶液进行检测。在第 40 天时,响应值 ΔE 为最初的 90.7%;第 50 天时,响应值 ΔE 为最初的 88.5%。因此,40 天以内该电极仍保持良好性能。

2.9 免疫传感器特异性

[0117] 用修饰有甲硝唑抗体的金电极分别测试了甲硝唑、替硝唑、地美硝唑、洛硝哒唑、异丙硝唑等药物的交叉反应率,交叉反应率分别为 100%、105%、95%、36% 和 41%。

[0118] 3. 结论

[0119] 本发明设计和合成了具有通用结构的硝基咪唑半抗原,制备了硝基咪唑抗体,效价达到 1:100000;建立了硝基咪唑类药物分析技术,对甲硝唑、替硝唑、地美硝有良好的响应,交叉反应率达 90% 以上,可测定 $0.001\text{--}100\text{mg/L}$ 浓度范围内的甲硝唑、替硝唑、地美硝及其代谢物,检测限约为 0.0019mg/L ,回收率约为 90%。

[0120] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

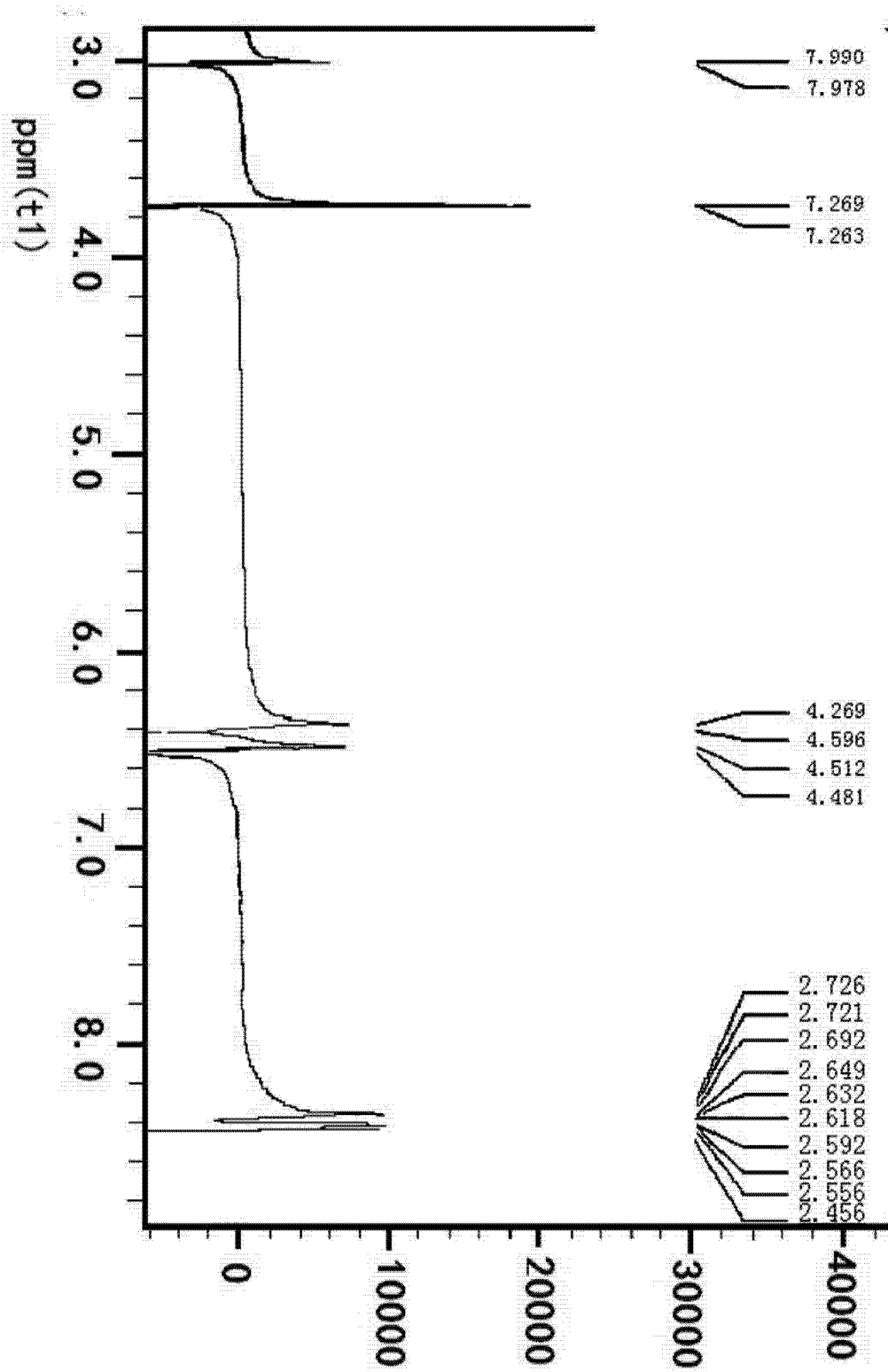


图 1

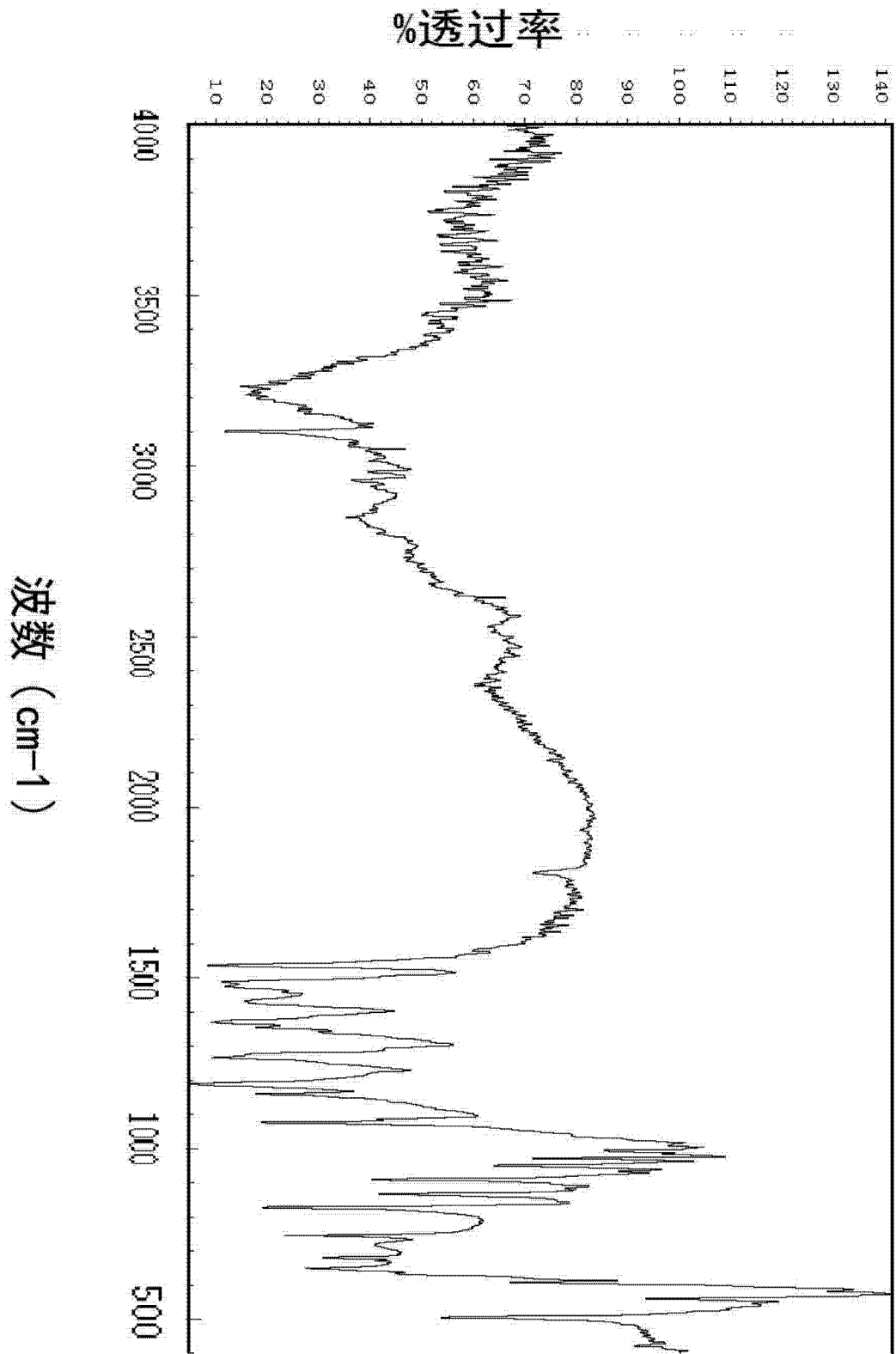


图 2

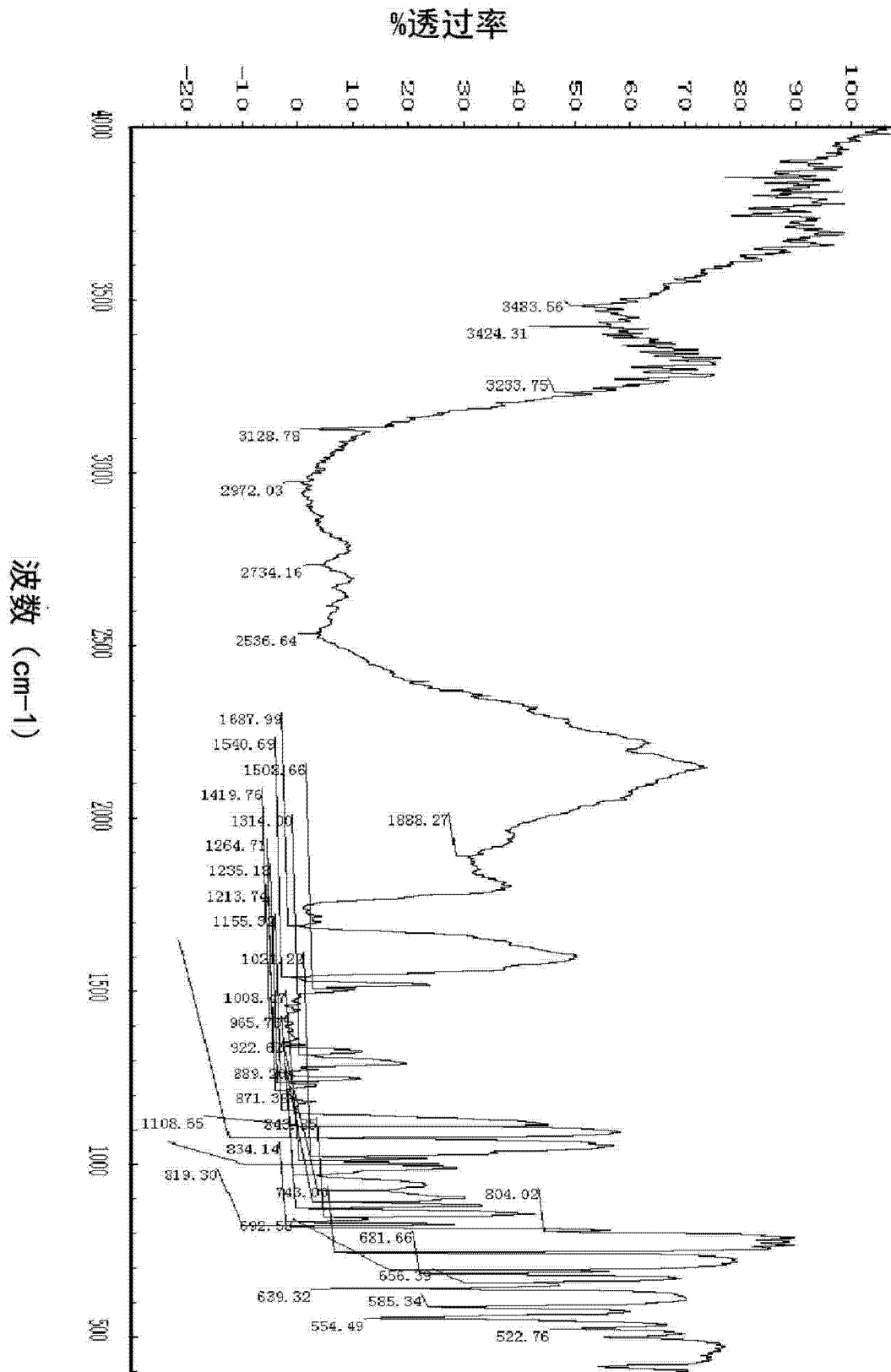


图 3

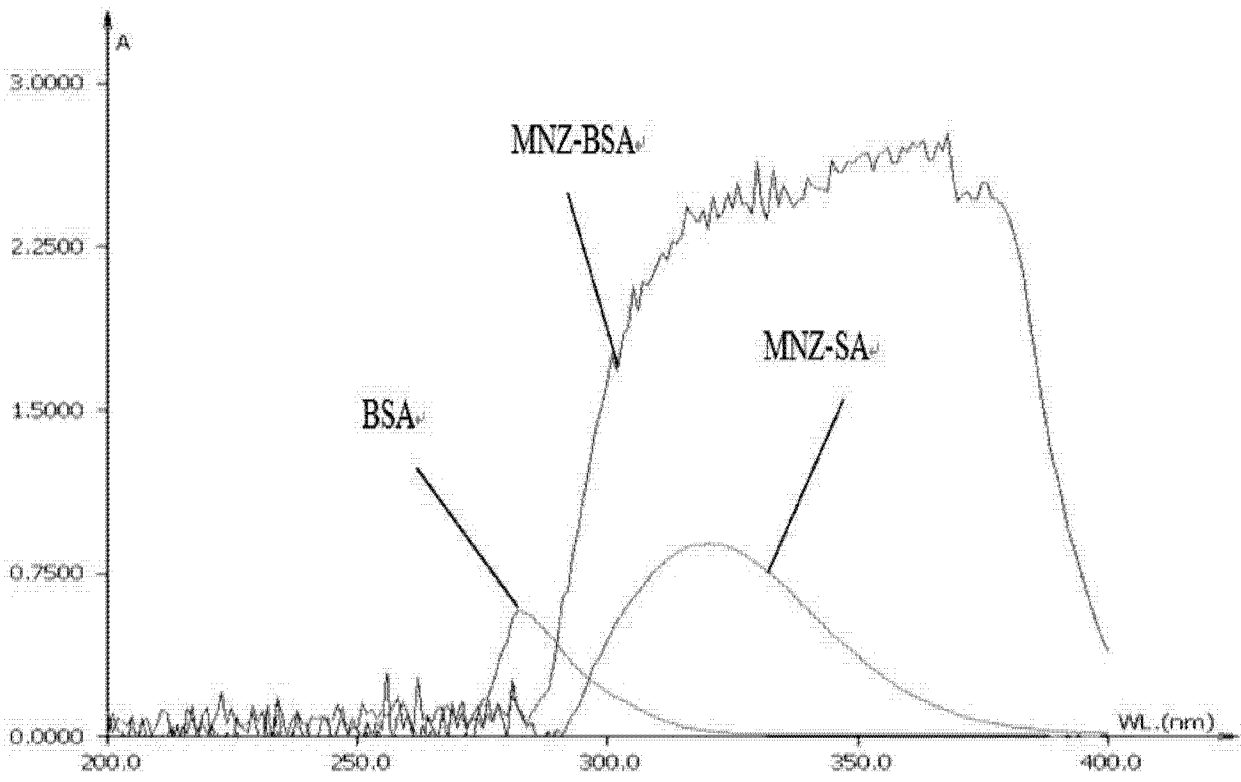


图 4

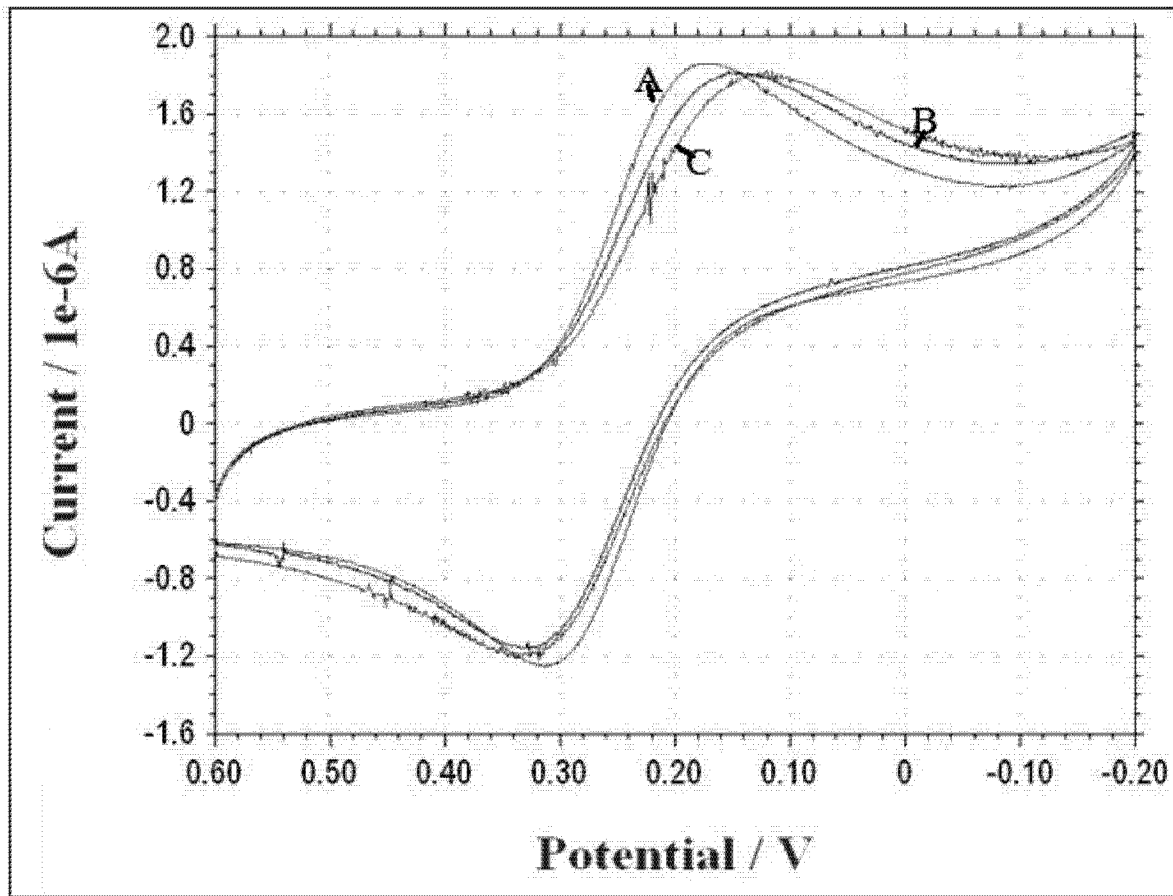


图 5

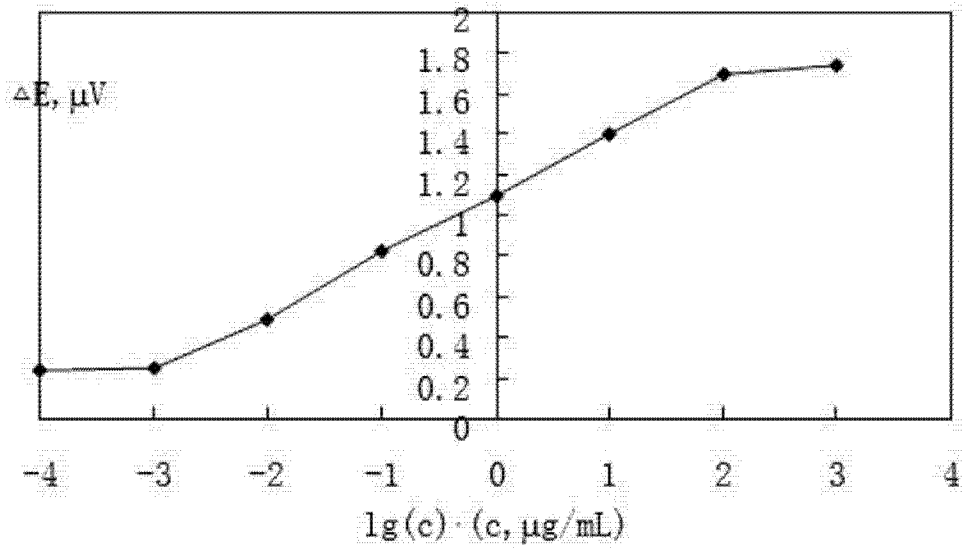


图 6

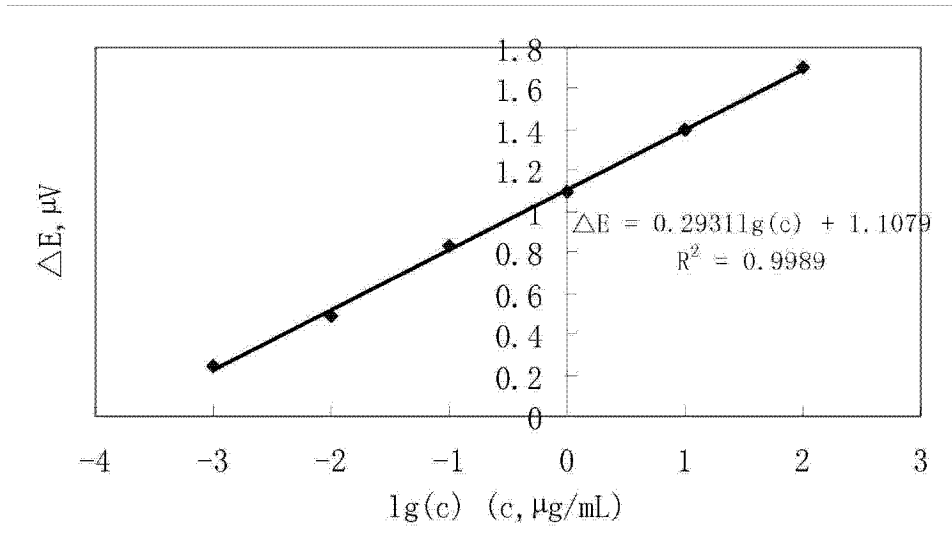


图 7

专利名称(译)	一种基于免疫金的电化学传感元件的制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN104730234A	公开(公告)日	2015-06-24
申请号	CN201510066398.3	申请日	2015-02-07
[标]申请(专利权)人(译)	中国计量大学		
申请(专利权)人(译)	中国计量学院		
当前申请(专利权)人(译)	中国计量学院		
[标]发明人	潘家荣 帅瑞琦 方豪 冯依璠		
发明人	潘家荣 帅瑞琦 方豪 冯依璠		
IPC分类号	G01N33/532 G01N27/30		
CPC分类号	G01N33/5438		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于免疫金的电化学传感元件的制备方法，本发明制备了通用的硝基咪唑类结构半抗原，并采用活化酯法，将硝基咪唑半抗原与载体蛋白(BSA和OVA)偶联制备免疫原和包被原，偶联分子摩尔比分别为11:1和10:1。同时制备了硝基咪唑抗体，效价为1:100000，制备免疫纳米金；利用单分子膜自组装技术在金电极上形成单分子膜，再通过DCC和NHS与免疫纳米金联接，制备了传感元件。该传感元件对甲硝唑、替硝唑、地美硝唑有良好的响应，交叉反应率达90%以上，可测定0.001-100mg/L浓度范围内的甲硝唑、替硝唑、地美硝唑及其代谢物，检测限约为0.0019mg/L，回收率约为90%。

