



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104569118 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201410767246. 1

(22) 申请日 2014. 12. 15

(71) 申请人 南京化工职业技术学院

地址 210048 江苏省南京市六合区葛关路  
625 号

(72) 发明人 宋伟 朱超云 王秋悦

(51) Int. Cl.

G01N 27/48(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

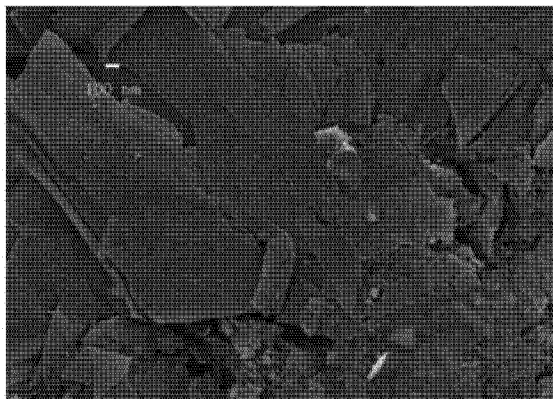
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

基于硝基还原酶的电化学酶联免疫方法测定  
三聚氰胺

(57) 摘要

本发明公开了一种电化学聚合信号放大的酶联免疫方法,用于乳制品中三聚氰胺的定量检测。方法采用竞争免疫反应,所用酶标二抗为硝基还原酶标记二抗,底物为硼氢化钠与邻硝基苯酚。在酶催化作用下,硼氢化钠将无法电聚合的邻硝基苯酚还原成可电化学聚合的邻氨基苯酚。反应后加入石墨烯作为电解质,用丝网印刷电极进行循环伏安电化学聚合。在电极表面滴加电解质溶液,检测电极表面形成的纳米复合物放大的电化学信号,从而测定样品中三聚氰胺的含量。本发明提出的方法结合了免疫反应的高特异性和纳米电聚合催化的高灵敏性,具有方法简便,准确度高,灵敏度好,检出限低的优点,可用于乳制品中三聚氰胺含量的测定。



1. 一种基于电化学聚合信号放大的酶联免疫方法,并应用在乳制品中三聚氰胺的快速、灵敏的定量检测,其特征在于:将三聚氰胺标准品或样品和三聚氰胺抗体放置在包被有三聚氰胺半抗原的多孔酶标板孔中进行竞争免疫反应,形成抗原-抗体复合物后加入酶标二抗与抗体进行反应;在酶标二抗与抗体反应后加入酶促反应底物;酶反应完成后向孔中加入石墨烯作为电解质,并将丝网印刷电极插入其中进行电化学聚合;聚合完成后将电极取出,在电极表面滴加电解质溶液,检测电极表面形成的纳米复合物放大的电化学信号,从而检测样品中三聚氰胺的含量。

2. 如权利要求1所述的电化学聚合信号放大的酶联免疫方法,其特征在于:酶标二抗为硝基还原酶标记羊抗兔 IgG 抗体,可用戊二醛偶联法将硝基还原酶与二抗偶联制得;所述酶促反应底物为硼氢化钠与邻硝基苯酚;在硝基还原酶的催化作用下,硼氢化钠将无法电聚合的邻硝基苯酚还原成可电化学聚合的邻氨基苯酚。

3. 如权利要求1所述的电化学聚合信号放大方法,其特征在于:将 1mg/mL 的石墨烯水溶液加入到酶反应后的溶液中混匀,插入丝网印刷电极,用循环伏安法在-0.2V 至 1.2V 范围内扫描 10 圈,进行电化学聚合,得到聚邻氨基苯酚-石墨烯纳米复合物膜。

4. 如权利要求1所述的所述纳米复合物放大的电化学信号检测方法如下:以 0.1mol/L 的盐酸溶液为电解质,记录-0.2V 至 0.3V 范围内示差脉冲伏安曲线,检测信号为峰电流值。

5. 如权利要求1所述检测样品中三聚氰胺的含量方法为标准曲线法。

## 基于硝基还原酶的电化学酶联免疫方法测定三聚氰胺

### 技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测和分析仪器技术领域,具体涉及利用电化学聚合信号放大和酶联免疫技术对乳制品中三聚氰胺含量的测定方法。

[0002]

### 背景技术

[0003] 三聚氰胺是一种三嗪类含氮杂环有机化合物,为提高乳制品中粗蛋白含量,不法商贩在乳品原料中非法添加三聚氰胺,由于三聚氰胺在高温下可能分解产生氰化物,毒性较强,长期摄入三聚氰胺,其在动物体内代谢很快且不会存留,主要影响泌尿系统,会造成生殖、泌尿系统的损害,膀胱、肾部结石,并可进一步诱发膀胱癌。三聚氰胺传统的检测方法有色谱法、光谱法等。此类方法需要大型仪器设备,操作成本较高,不适合高通量的筛选和快速检测。而酶联免疫试剂盒检测法,虽然操作方法较为简便,但是检测手段依旧需要光学仪器,不适合于现场快速检测。电化学酶联免疫的方法就是将电化学分析与免疫学方法的优点相结合起来的生物传感检测方法,是在免疫学具有特异性强的基础上,通过检测免疫反应形成的抗原-抗体复合物,以电化学测定酶促反应底物信号从而进行样本含量分析。在电化学-酶联免疫法中一般使用辣根过氧化物酶标记二抗,检测酶反应底物的电化学信号,以电化学检测仪器易于小型化,操作简单等特点信号。而基于硝基还原酶标记二抗的电化学-酶联免疫方法未见报道。

[0004] 基于丝网印刷电极的电化学方法具有灵敏度高,仪器易于小型化,操作简单等优点,在食品安全检测领域获得应用,并且丝网印刷电极易微型化,可直接与酶联免疫反应中用到的多孔酶标板联用,形成一体化的检测装置。近年来,基于纳米材料的电化学信号放大技术成为电化学生物传感领域的研究热点,其中一种的重要方法为掺杂纳米材料如碳纳米管对电活性物质进行电聚合而获得更加灵敏的电化学信号。石墨烯由于其独特的物理和化学性质,在电子学、能量存储转换、生物科学与技术、特别是电化学传感器等各方面得到大量的应用,同时石墨烯的优良的电催化活性适用于电化学聚合信号放大策略的构建。

[0005]

### 发明内容

[0006] 本发明克服现有技术不足,提出了一种基于电化学聚合信号放大的酶联免疫方法,并应用在乳制品中三聚氰胺的快速、灵敏的定量检测中。

[0007] 为实现本发明的上述目的,本发明采用如下技术方案:

一种基于电化学聚合信号放大的酶联免疫方法检测乳制品中三聚氰胺,将三聚氰胺标准品或样品和三聚氰胺抗体一同放置在包被有三聚氰胺半抗原的多孔酶标板孔中进行竞争免疫反应,形成抗原-抗体复合物后加入酶标二抗与抗体进行反应。反应后加入酶促反应底物。酶反应完成后向孔中加入石墨烯作为电解质,并将丝网印刷电极插入其中进行电化学聚合。聚合完成后将电极取出,在电极表面滴加电解质溶液,检测电极表面形成的纳米

复合物的放大的电化学信号,从而检测样品中三聚氰胺的含量。

[0008] 所述多孔酶标板为市售 96 孔或 24 孔酶标板。

[0009] 所述三聚氰胺半抗原可采用戊二醛偶联法制备。所述三聚氰胺抗体为兔抗三聚氰胺多克隆抗体。

[0010] 所述竞争免疫反应采用如下步骤:用碳酸盐缓冲溶液稀释三聚氰胺半抗原,加入到孔板中 4℃ 静置过夜并洗涤晾干,此时三聚氰胺半抗原被包被在孔板中,用 1%BSA 在 37℃ 下封闭 1 小时,封闭完成后洗涤晾干。将三聚氰胺标准品或待检样品,加入酶标板孔内,再加入三聚氰胺抗体混匀,37℃ 反应后洗涤晾干。在此过程中,包被在酶标板上的三聚氰胺半抗原和三聚氰胺一起与抗体竞争反应,发生竞争免疫反应,在孔板上最终形成抗原-抗体复合物。

[0011] 所述酶标二抗为硝基还原酶标记羊抗兔 IgG 抗体,可用戊二醛偶联法将硝基还原酶与二抗偶联制得。所述酶促反应底物为硼氢化钠与邻硝基苯酚。

[0012] 所述酶反应如下:在硝基还原酶的催化作用下,硼氢化钠将无法电聚合的邻硝基苯酚还原成可电化学聚合的邻氨基苯酚。

[0013] 所述丝网印刷电极制作方法如下:以聚丙烯纸为基底,依据设计图形,通过丝网印刷分层印制银浆、碳浆,氯化银浆和绝缘浆。电极是三电极体系,电极尺寸为 0.5mm×6mm×28mm。

[0014] 所述电化学聚合反应如下:将 1mg/mL 的石墨烯水溶液加入到酶促反应后的溶液中混匀,插入丝网印刷电极,用循环伏安法在 -0.2V 至 1.2V 范围内扫描 10 圈,进行电化学聚合得到聚邻氨基苯酚-石墨烯纳米复合物膜。

[0015] 所述纳米复合物的放大的电化学信号检测方法如下:以 0.1mol/L 的盐酸溶液为电解质,记录 -0.2V 至 0.3V 范围内示差脉冲伏安曲线,检测信号为峰电流值。

[0016] 所述检测方法的定量方法为标准曲线法,以三聚氰胺标准品系列标准溶液的浓度对数为横坐标,以检测峰电流值为纵坐标绘制标准曲线,可获得标准曲线方程。通过测定样品的峰电流值,利用标准曲线方程可求出样品中三聚氰胺浓度。

[0017] 所述样品处理方法为:对于乳制品样品检测前需进行样品的前处理,牛奶样品加入乙氰与样品混匀,离心吸取清液检测,奶粉样品加入甲醇与样品混匀,离心吸取清液检测。

[0018] 本发明提出的方法适用于乳制品中三聚氰胺快速、便携测定。利用本发明提出的方法对牛奶和奶粉样品中三聚氰胺进行测定,检出限分别为 1.6ng/mL 和 2.0ng/mL,低于商品化的试剂盒。与三聚氰酸,三嗪,三嗪二铵无交叉反应,同时孔间检测 CV 值低于 10%,方法精密度高,牛奶和奶粉样品的加标回收率在 87% 至 115% 之间,方法准确度高。

[0019] 本发明的有益效果:与现有采用辣根过氧化物酶标记二抗为基础的酶联免疫显色法不同的是,本发明提供了一种基于硝基还原酶标记二抗的酶联免疫电化学聚合信号放大法用于乳制品中三聚氰胺的测定。在电化学聚合的过程中,采用石墨烯溶液作为电解质,得到了具有优良导电能力的纳米复合物,获得了灵敏的电化学检测信号。本发明提出的方法结合了免疫反应的高特异性和纳米电聚合催化的高灵敏性,具有方法简便,准确度高,灵敏度好,检出限低的优点。同时采用的丝网印刷电极具有制作成本低廉,可抛性的优点,解决了传统电极重复性差的问题。本发明为三聚氰胺的检测提供了一种新的方法。

## 附图说明

[0020] 图 1 是邻氨基苯酚 - 石墨烯纳米复合物膜扫描电镜图。

[0021] 图 2 是三聚氰胺系列标准溶液检测示差脉冲伏安图, 其中曲线 a-e 对应的三聚氰胺浓度分别为: 2.5ng/mL, 5.0ng/mL, 10.0ng/mL, 25ng/mL, 100ng/mL。

[0022] 图 3 是三聚氰胺与其各种类似物质的交叉反应率图, 其中 A 为三聚氰胺, B 为三聚氰酸, C 为三嗪, D 为三嗪二铵。

## 具体实施方式

[0023] 实施例 1: 电化学酶联免疫方法测定乳制品中三聚氰胺。

[0024] (1) 丝网印刷电极印制: 丝网印刷电极采用聚丙烯合成纸作为基底, 依次分别采用银浆、碳浆、银 / 氯化银浆以及绝缘浆作为丝网印刷材料, 第一层印制银浆作为导电介质, 第二层印制导电碳浆作为指示电极和对电极, 第三层印制银 / 氯化银浆作为参考电极, 每层印制后均在 120°C 条件下固化 60min。第四层印制绝缘浆, 紫外灯下固化 30min。

[0025] (2) 酶标板包被半抗原: 采用碳酸盐包被液 (0.05mol/L 的碳酸盐缓冲溶液, PH=9.6) 将三聚氰胺包被抗原按 1:5000 倍稀释, 包被在酶标板孔中 (每孔 80  $\mu$ L), 放置于冰箱, 4°C 过夜; 用 1×PBST 溶液 (含有 0.05% 吐温 -20) 作为洗涤液, 将包被后的酶标板孔清洗 3 次, 并晾干。为避免非特异性的吸附, 向排干的各孔内加入 1mg/mL 的 BSA 封闭液封闭, 37°C 水浴中孵育 1h, 封闭完成后用 1×PBST 溶液 (含有 0.05% 吐温 -20) 洗涤 3 次并晾干。

[0026] (3) 样品前处理: 本实施例中, 对于乳制品样品检测前需进行样品的前处理。对于牛奶样品, 加入乙氰与样品混匀, 离心吸取清液检测; 对于奶粉样品, 加入甲醇与样品混匀, 离心吸取清液检测。取牛奶样品 1mL 放入离心管中, 加入 2mL 乙氰 (分析纯) 震荡 10min 混匀, 以每分钟 3000 转的转速在离心机上离心分离, 吸取上层清液 50  $\mu$ L, 用 PBS 缓冲溶液稀释 10 倍。称取 1g 奶粉样品, 加入 5mL 甲醇 (分析纯), 以每分钟 5000 转的转速在离心机上离心分离, 吸取上层清液 50  $\mu$ L, 用 PBS 缓冲溶液稀释 10 倍。

[0027] (3) 标准曲线绘制: 将三聚氰胺标准品原液用 1×PBS 缓冲溶液倍比稀释后, 加入酶标板孔内, 加入量为每孔 60  $\mu$ L, 同时将处理后的样品加入其余孔中, 加入体积每孔 60  $\mu$ L。再将 1:5000 倍稀释的三聚氰胺抗体加入到酶标板孔内 (60  $\mu$ L / 孔) 充分混合均匀, 在 37°C 水浴中, 湿盒孵育 50min。反应完成后用 1×PBST 溶液 (含有 0.05% 吐温 -20) 洗涤 3 次, 并晾干。再将 1:5000 倍稀释的硝基还原酶标记二抗加入到反应孔中, 加入量为每孔 60  $\mu$ L, 充分混合均匀, 在 37°C 水浴中, 湿盒孵育 50min。反应完成后用 1×PBST 溶液 (含有 0.05% 吐温 -20) 洗涤 3 次, 并晾干。将酶促反应底物硼氢化钠 (10mmol/L) 和邻硝基苯酚 (100mmol/L) 等体积加入反应孔中, 加入总量为每孔 100  $\mu$ L, 充分混合均匀, 在 37°C 水浴中, 湿盒孵育 10min。反应完成后加入 1mg/mL 的石墨烯水溶液, 加入量为每孔 50  $\mu$ L, 混合均匀。将丝网印刷电极插入孔中, 并连接电化学工作站。采用循环伏安法以 50 mV/S 的速率进行电位扫描, 扫描范围为 -0.2V 至 1.2V, 共扫描 10 圈。在循环伏安扫描的过程中完成电化学聚合, 在电极表面可获得一层邻氨基苯酚与石墨烯的纳米聚合物。将电极取出用蒸馏水洗涤 3 次, 晾干。准确吸取 30  $\mu$ L 的 0.1mol/L 的盐酸溶液, 滴至电极工作区域, 用示差脉冲伏安法进行电化学检测, 记录峰电流值。每个浓度的标准品及样品平行测定 3 次。

以三聚氰胺标准品系列标准溶液浓度对数为横坐标,以检测峰电流值为纵坐标绘制标准曲线,可获得标准曲线方程,将牛奶样品或奶粉样品测定值带入线性方程中,可获得处理后样品中三聚氰胺的含量,按照样品稀释倍数可计算出原样品中三聚氰胺浓度。本实施例中,三聚氰胺测定标准曲线线性范围为:2.5ng/mL至100ng/mL。

**[0028] 实施例 2 :方法特异性**

本实施例考察了本发明提出的方法对检测三聚氰胺的特异性,由于三聚氰酸,三嗪,三嗪二铵可能与三聚氰胺的抗体发生交叉反应,对三聚氰胺的测定产生干扰,所以将上述 3 种物质和三聚氰胺的标准品分别稀释至浓度为 30 ng/mL,分别与三聚氰胺抗体竞争包被的三聚氰胺半抗原,按实例 1 的方法进行测定,结果表明各物质的交叉反应率均小于 1 %。

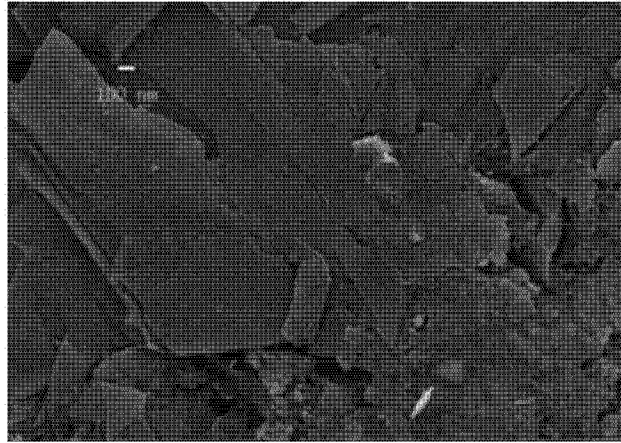


图 1

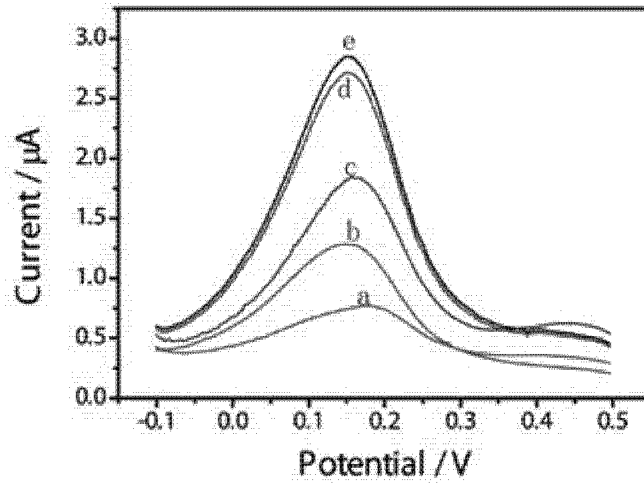


图 2

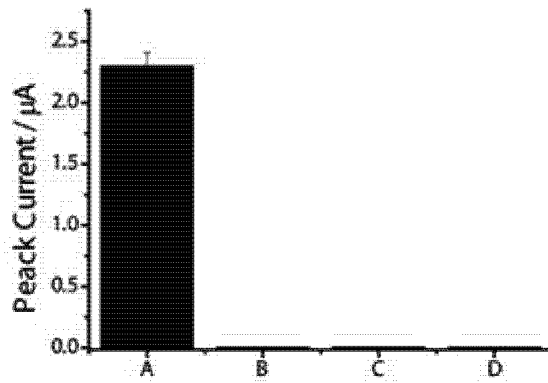


图 3

专利名称(译)	基于硝基还原酶的电化学酶联免疫方法测定三聚氰胺		
公开(公告)号	<a href="#">CN104569118A</a>	公开(公告)日	2015-04-29
申请号	CN201410767246.1	申请日	2014-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	南京化工职业技术学院		
申请(专利权)人(译)	南京化工职业技术学院		
当前申请(专利权)人(译)	南京化工职业技术学院		
[标]发明人	宋伟 朱超云 王秋悦		
发明人	宋伟 朱超云 王秋悦		
IPC分类号	G01N27/48 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种电化学聚合信号放大的酶联免疫方法，用于乳制品中三聚氰胺的定量检测。方法采用竞争免疫反应，所用酶标二抗为硝基还原酶标记二抗，底物为硼氢化钠与邻硝基苯酚。在酶催化作用下，硼氢化钠将无法电聚合的邻硝基苯酚还原成可电化学聚合的邻氨基苯酚。反应后加入石墨烯作为电解质，用丝网印刷电极进行循环伏安电化学聚合。在电极表面滴加电解质溶液，检测电极表面形成的纳米复合物放大的电化学信号，从而测定样品中三聚氰胺的含量。本发明提出的方法结合了免疫反应的高特异性和纳米电聚合催化的高灵敏性，具有方法简便，准确度高，灵敏度好，检出限低的优点，可用于乳制品中三聚氰胺含量的测定。

