



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103399146 A

(43) 申请公布日 2013. 11. 20

(21) 申请号 201310352244. 1

(22) 申请日 2013. 08. 14

(71) 申请人 山东农业大学

地址 271018 山东省泰安市岱宗大街 61 号

(72) 发明人 徐志祥 孙卿 徐龙华

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006. 01)

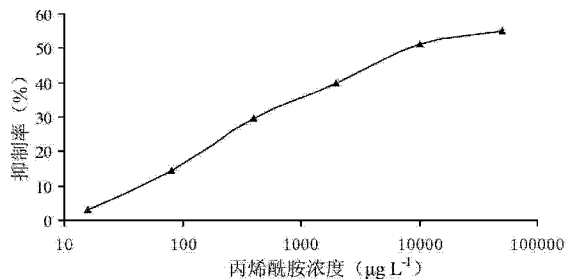
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

## (54) 发明名称

一种丙烯酰胺酶标记仿生免疫分析方法

## (57) 摘要

本发明涉及一种丙烯酰胺酶标记仿生免疫分析方法,包括半抗原的合成、酶标抗原的制备、亲水性分子印迹聚合物膜的制备以及标准曲线的建立等步骤。本发明是以制备的亲水性的丙烯酰胺分子印迹聚合物膜作为人工抗体代替生物抗体,利用酶联免疫吸附测定原理,建立对丙烯酰胺具有广泛检测范围的高灵敏检测方法。克服了传统生物抗体制备周期长、易失活、成本高等缺点,并且大大缩短了分析时间。本发明成本低廉,实验操作简单,灵敏度高,适用于各种食品中丙烯酰胺的快速检测。



1. 一种丙烯酰胺酶标记仿生免疫分析方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 将 1 ~ 2g 8-氨基辛酸溶于 5 ~ 15mL 3mol L<sup>-1</sup> 的氢氧化钾溶液,在冰浴、磁力搅拌条件下,缓慢滴加 0.5 ~ 2mL 的 10 ~ 15mmol 丙烯酰氯溶液,同时不断滴加氢氧化钾溶液,以维持反应液 pH=8 ~ 9;冰浴反应 1h,自然升温至室温继续搅拌反应 4h;停止反应后乙醚洗 2 次,醚层弃去;搅拌条件下,向水层缓慢滴加 5mol L<sup>-1</sup> 盐酸,调节 pH 值至 3,继续搅拌 10min;10 ~ 20mL 氯仿连续萃取 3 次;合并氯仿层,无水硫酸镁干燥,过滤,滤液浓缩至尽干,加入乙醚放置过夜,晶体析出,乙醚重结晶得丙烯酰胺半抗原;

2) 将步骤 1) 制备的丙烯酰胺半抗原溶于二甲基甲酰胺中,然后加入与丙烯酰胺半抗原摩尔比 1:1 的 N-羟基丁二酰亚胺和 1:2 的 N,N'-二环己基碳酰亚胺,室温搅拌反应 2 ~ 4h,离心取上清液,作为溶液 a;取辣根过氧化物酶,溶于 50mmol L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲水溶液中,作为溶液 b;取 50 ~ 200 μL 溶液 a 缓慢逐滴加入溶液 b 中,4℃ 反应 8 ~ 12h;取出后在室温下放置 1 ~ 2h,然后将混合液透析 2 ~ 3 天;收集透析液得到酶标抗原标准溶液,4℃ 保存备用;

3) 将丙烯酰胺、甲基丙烯酸和二甲基丙烯酸乙二醇酯按照摩尔比 1:2:4 混合,然后加入 10 ~ 20mg 偶氮二异丁腈,搅拌反应 1 ~ 2h;96 孔酶标板上每孔加入 200 μL 上述混合液,氮气保护条件下 38℃ 聚合反应 12 ~ 24h,用 3 ~ 9:1v/v 甲醇 / 冰乙酸溶液洗脱 4 ~ 10h,甲醇溶液洗脱 2 ~ 4h 以除去丙烯酰胺,干燥后得亲水性分子印迹聚合物膜;

4) 步骤 3) 制备的亲水性分子印迹聚合物膜作为仿生抗体;步骤 2) 制备的酶标抗原标准溶液用 PBS 溶液稀释 3000 倍作为酶标稀释液;以丙烯酰胺标样梯度稀释液浓度的对数值为横坐标,相应的抑制率百分数为纵坐标,绘制分析方法标准曲线;

5) 称取 1 ~ 2g 待测样品,粉碎后加入 5 ~ 10mL PBS 溶液超声提取 3 次,过滤得样品提取液;将样品提取液代替上述丙烯酰胺标样梯度稀释液,进行仿生免疫分析操作,根据抑制率由标准曲线计算出待测物中丙烯酰胺的含量。

## 一种丙烯酰胺酶标记仿生免疫分析方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种丙烯酰胺酶标记仿生免疫分析方法,属于食品安全检测技术领域,特别是一种丙烯酰胺的快速、灵敏检测方法。

### 背景技术

[0002] 丙烯酰胺(Acrylamide)是一种合成聚丙烯酰胺和其他共聚物的有机单体,在食品中一般是富含淀粉类原料经过高温处理生成的有害物质,毒理学实验表明其具有神经毒性、致癌性和生殖发育毒性。2002年4月科研人员报道在油炸食品中检测到大量丙烯酰胺。因此,加强丙烯酰胺的检测和控制成为食品安全领域研究的重点。

[0003] 目前国内外有关食品中丙烯酰胺的检测方法大多采用气相色谱法、液相色谱法、气相色谱与质谱联用法、酶联免疫法进行定性、定量的检测。仪器检测所使用的设备价格昂贵,通常还需要复杂样品前处理技术,费时费力;酶联免疫法虽然具有高灵敏度和低检出限,但是丙烯酰胺是小分子物质,特异性强的丙烯酰胺生物抗体难制备,并且保存不当容易失活。丙烯酰胺分子印迹聚合物作为仿生抗体,具有选择性高,制备周期短,不失活易保存等优点,因此作为人工抗体应用于酶联免疫分析,建立仿生免疫吸附检测技术,用于检测食品中的丙烯酰胺具有重要意义。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服传统的丙烯酰胺检测方法存在检测时间长、仪器价格昂贵、特异性抗体难制备等缺陷,提供一种丙烯酰胺的快速检测方法。

[0005] 本发明采取的技术方案是:

[0006] 一种丙烯酰胺酶标记仿生免疫分析方法,其特征在于包括以下步骤:

[0007] 1. 半抗原的合成:1~2g 8-氨基辛酸溶于5~15mL 3mol L<sup>-1</sup>的氢氧化钾溶液,在冰浴、磁力搅拌条件下,缓慢滴加0.5~2mL的10~15mmol 丙烯酰氯溶液,同时不断滴加氢氧化钾溶液,以维持反应液pH=8~9。冰浴反应1h,自然升温至室温继续搅拌反应4h。停止反应后乙醚洗2次,醚层弃去。搅拌条件下,向水层缓慢滴加5mol L<sup>-1</sup>盐酸,调节pH值至3,继续搅拌10min。10~20mL 氯仿连续萃取3次。合并氯仿层,无水硫酸镁干燥,过滤,滤液浓缩至尽干,加入乙醚放置过夜,晶体析出,乙醚重结晶得丙烯酰胺半抗原。

[0008] 2. 酶标抗原的制备:将步骤1)制备的丙烯酰胺半抗原溶于二甲基甲酰胺中,然后加入N-羟基丁二酰亚胺(N-羟基丁二酰亚胺与丙烯酰胺半抗原摩尔比1:1)和N,N'-二环己基碳酰亚胺(N,N'-二环己基碳酰亚胺与丙烯酰胺半抗原摩尔比1:2),室温搅拌反应2~4h,离心取上清液,作为溶液a。取辣根过氧化物酶,溶于50mmol L<sup>-1</sup>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>缓冲水溶液中,作为溶液b。取50~200μL溶液a缓慢逐滴加入溶液b中,4℃反应8~12h。取出后在室温下放置1~2h,然后将混合液透析2~3天。收集透析液得到酶标抗原标准溶液,4℃保存备用。

[0009] 3. 亲水性分子印迹聚合物膜的制备:丙烯酰胺(溶于乙腈和水)、甲基丙烯酸和二

甲基丙烯酸乙二醇酯按照 1:2:4 摩尔比混合,然后加入 10 ~ 20mg 偶氮二异丁腈,搅拌反应 1 ~ 2h。96 孔酶标板上每孔加入 200  $\mu$  L 上述混合液,氮气保护条件下 38 $^{\circ}$ C 聚合反应 12 ~ 24h,用 3 ~ 9:1 (v/v) 甲醇 / 冰乙酸溶液洗脱 4 ~ 10h,甲醇溶液洗脱 2 ~ 4h 以除去丙烯酰胺,干燥后得亲水性分子印迹聚合物膜。

[0010] 4. 酶标记仿生免疫分析方法的建立:步骤 3) 制备的亲水性分子印迹聚合物膜作为仿生抗体;步骤 2) 制备的酶标抗原标准溶液用 PBS 溶液(5 倍 PBS :Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O : 68.80g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O :8.97g, NaCl :45.00g,加双蒸水至 1L。将 5 倍 PBS 用双蒸水稀释 5 倍即为 PBS 溶液。)稀释 3000 倍作为酶标稀释液。以丙烯酰胺标样梯度稀释液浓度的对数值为横坐标,相应的抑制率百分数为纵坐标,绘制分析方法标准曲线,建立仿生免疫分析方法。

[0011] 5. 称取 1 ~ 2g 待测样品,粉碎后加入 5 ~ 10mL PBS 溶液超声提取 3 次,过滤得样品提取液。将样品提取液代替上述丙烯酰胺标样梯度稀释液,进行仿生免疫分析操作,根据抑制率由标准曲线计算出待测物中丙烯酰胺的含量。

[0012] 本发明的优点和积极效果是:

[0013] 1. 本发明提供的丙烯酰胺吸附功能材料具有较高的选择性,可以代替生物抗体应用于酶联免疫技术;该吸附功能材料由化学方法制备,具有较高的稳定性、较长的使用寿命和较强的抗恶劣环境的能力,克服了传统生物抗体制备周期长、易失活、成本高等缺点。

[0014] 2. 本发明将分子印迹技术与酶联免疫技术联用,建立对丙烯酰胺具有高灵敏度的仿生酶联免疫吸附检测方法。该方法的最低检出限与酶联免疫技术最低检接近,满足检测需要。并且大大缩短了分析时间,适用于丙烯酰胺的快速检测。

[0015] 3. 本发明制备的仿生抗体可以重复使用 50 次以上,成本大大降低;并且前处理简单,灵敏度高,实验操作简单,适用于各种食品中丙烯酰胺的快速检测。

[0016] 本发明与现有其他检测方法的比较:

[0017]

	本发明检测方法	酶联免疫法	气-质联用检测法
样品前处理方法	PBS 提取, 过滤, 不需要其他前处理。	PBS 提取, 离心, 过滤。	有机溶剂提取, 加标, 溴化衍生, 萃取, 富集浓缩。
最低检出限	85 $\mu$ g L <sup>-1</sup>	65 $\mu$ g kg <sup>-1</sup>	10 $\mu$ g kg <sup>-1</sup>

#### 附图说明

[0018] 图 1 丙烯酰胺酶标记仿生免疫分析方法标准曲线

[0019] 由图 1 可知,该方法的灵敏度(抑制率 50 值)为 8mg L<sup>-1</sup>,最低检测限(抑制率 15 值)为 85  $\mu$ g L<sup>-1</sup>。

#### 具体实施方式

[0020] 下面结合实施例,对本发明进一步说明;下述实施例是说明性的,不是限定性的,不能以下述实施例来限定本发明的保护范围。

[0021] 本发明是将丙烯酰胺分子印迹聚合物膜作为仿生抗体应用于酶联免疫技术,从而建立一种丙烯酰胺酶标记仿生免疫分析方法。其具体实施例为:

[0022] 1. 半抗原的合成:将 1.59g 8-氨基辛酸置于三颈瓶中,用 10mL  $3\text{mol L}^{-1}$  氢氧化钾溶液溶解;冰水浴、磁力搅拌条件下,缓慢滴加 1mL (15mmol) 丙烯酰氯,同时不断滴加  $3\text{mol L}^{-1}$  氢氧化钾溶液,以维持反应液 pH=8~9。滴加完毕后冰浴反应 1h,自然升温至室温继续搅拌反应 4h。停止反应后用 20mL 乙醚洗 2 次,醚层弃去。搅拌条件下,向水层缓慢滴加  $5\text{mol L}^{-1}$  盐酸,调节 pH 值至 3,继续搅拌 10min。用 20mL 氯仿连续萃取 3 次。合并氯仿层,无水硫酸镁干燥,过滤。滤液浓缩至尽干,加入乙醚放置过夜,晶体析出,乙醚重结晶得烯酰胺半抗原。

[0023] 2. 酶标抗原的制备:准确称取 6.39mg 烯酰胺半抗原溶于 639  $\mu\text{L}$  二甲基甲酰胺中。准确称取 3.4mg N-羟基丁二酰亚胺和 12.4mg N,N'-二环己基碳酰亚胺溶于上述溶液中,室温下搅拌反应 4h,离心取上清液,作为溶液 a。准确称取 10mg 辣根过氧化酶,溶于 2.0mL  $50\text{mmol L}^{-1}\text{K}_2\text{HPO}_4$  缓冲液中,作为溶液 b。取 100  $\mu\text{L}$  溶液 a 缓慢逐滴加入溶液 b 中,  $4^\circ\text{C}$  反应 10h,取出后室温下放置 1~2h。将混合液装入透析袋, PBS 溶液透析三天。收集透析液,得到酶标抗原标准溶液,  $4^\circ\text{C}$  保存备用。

[0024] 3. 亲水性分子印迹聚合物膜的制备:2mmol 丙烯酰胺溶于 8mL 水和 12mL 乙腈中,然后加入 4mmol 甲基丙烯酸、8mmol 二甲基丙烯酸乙二醇酯和 20mg 偶氮二异丁腈,磁力搅拌反应 2h。96 孔酶标板上每孔加入 200  $\mu\text{L}$  上述混合液,氮气保护条件下  $38^\circ\text{C}$  聚合反应 18h。弃去反应液,用 7:1 (v/v) 甲醇/醋酸溶液洗脱 8h 以除去丙烯酰胺,再用甲醇洗脱 4h。  $38^\circ\text{C}$  干燥 4h,得分子印迹聚合物膜。

[0025] 4. 酶标记仿生免疫分析方法的建立:步骤 3) 制备的分子印迹聚合物膜作为仿生抗体;步骤 2) 制备的酶标抗原标准溶液用 PBS 溶液稀释 3000 倍,作为酶标稀释液。

[0026] 将 96 孔酶标板第 1 行酶标孔设为空白组,每孔只加 200  $\mu\text{L}$  PBS 溶液;第 2 行设为对照组,每孔只加 200  $\mu\text{L}$  酶标稀释液;第 3-8 行每孔依次加入 100  $\mu\text{L}$  50000, 10000, 2000, 400, 80 和 16  $\mu\text{g L}^{-1}$  丙烯酰胺标样梯度稀释液 (PBS 稀释),然后立即每孔再加入 100  $\mu\text{L}$  酶标稀释液。室温孵育 1h 后用磷酸盐吐温缓冲液 PBST (5 倍 PBS : 200mL, 10% 的 Tween-20 : 5mL, 加双蒸水定容至 1L。)洗板五次。96 孔酶标板每孔加入 150  $\mu\text{L}$  底物液 (底物 A : 8.2g 无水醋酸钠, 2.5g  $\beta$ -环糊精, 150mg 过氧化氢脲, 加双蒸水至 1000mL, 调 pH 至 5.0,  $4^\circ\text{C}$  保存;底物 B : 50mg 3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶于 5mL 二甲基亚砜,室温避光保存。使用前 15 分钟, 14.6mL 底物 A 和 0.45mL 底物 B 混合成底物液),室温下反应 30min。每孔加入 50  $\mu\text{L}$   $1.25\text{mol L}^{-1}$  硫酸,终止反应。

[0027] 在双波长 (450-650nm) 下用酶标仪读取 96 孔酶标板第 1-8 行吸光度值 A。以上述丙烯酰胺标样梯度稀释液浓度的对数值为横坐标,抑制率百分数为纵坐标,绘制分析方法的标准曲线,建立仿生免疫分析方法。

[0028] 5. 准确称取薯片 2g,切碎后加入 10mL PBS 溶液超声提取 3 次,提取液用双蒸水定容至 30mL, 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。将得到的样品提取液代替丙烯酰胺标样梯度稀释液,重复步骤 4 的操作。根据吸光度值计算出薯片提取液的抑制率,由步骤 4 中绘制的标准曲线查出所测薯片提取液中丙烯酰胺浓度为 29.3  $\mu\text{g L}^{-1}$ ,因此薯片中丙烯酰胺含量为 0.44mg  $\text{kg}^{-1}$ 。

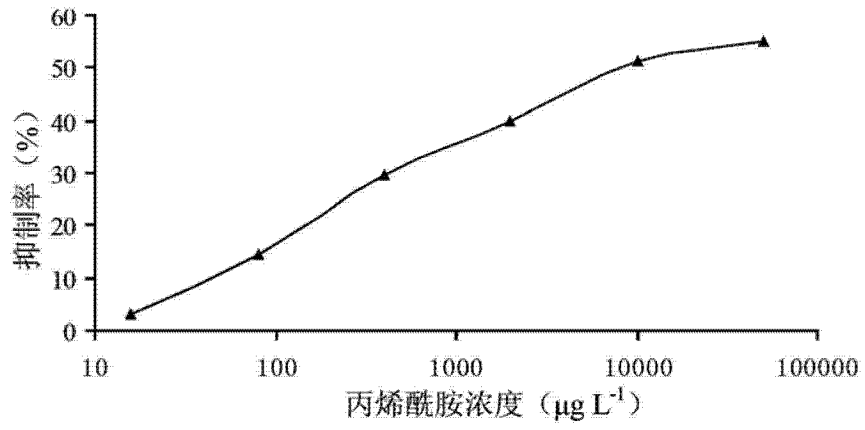


图 1

专利名称(译)	一种丙烯酰胺酶标记仿生免疫分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103399146A</a>	公开(公告)日	2013-11-20
申请号	CN201310352244.1	申请日	2013-08-14
[标]申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东农业大学		
[标]发明人	徐志祥 孙卿 徐龙华		
发明人	徐志祥 孙卿 徐龙华		
IPC分类号	G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种丙烯酰胺酶标记仿生免疫分析方法，包括半抗原的合成、酶标抗原的制备、亲水性分子印迹聚合物膜的制备以及标准曲线的建立等步骤。本发明是以制备的亲水性的丙烯酰胺分子印迹聚合物膜作为人工抗体代替生物抗体，利用酶联免疫吸附测定原理，建立对丙烯酰胺具有广泛检测范围的高灵敏检测方法。克服了传统生物抗体制备周期长、易失活、成本高等缺点，并且大大缩短了分析时间。本发明成本低廉，实验操作简单，灵敏度高，适用于各种食品中丙烯酰胺的快速检测。

