



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106018779 B

(45)授权公告日 2018.05.29

(21)申请号 201610315662.7

(22)申请日 2016.05.12

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106018779 A

(43)申请公布日 2016.10.12

(73)专利权人 天津科技大学
地址 300457 天津市河西区大沽南路1038号

专利权人 江南大学 华中师范大学
中国特种设备检测研究院

(72)发明人 陆旻 丁敏玲 李梦娟 张燕
刘国珍 李翔 王硕

(74)专利代理机构 北京金智普华知识产权代理有限公司 11401

代理人 李明卓

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 27/48(2006.01)

(56)对比文件

CN 101609063 A, 2009.12.23, 全文.

US 2003/0119208 A1, 2003.06.26, 说明书第0030段-0054段.

王术皓等.电化学免疫分析方法测定双酚A.《南昌大学学报》.2006,第30卷(第9期),第884-885页.

yang lu等.Development of sensitive direct and indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for monitoring bisphenol-A in canned foods and beverages.《Aanal.Bioanal.Chem.》.2012,第403卷第1607-1618页.

审查员 陈伟潘

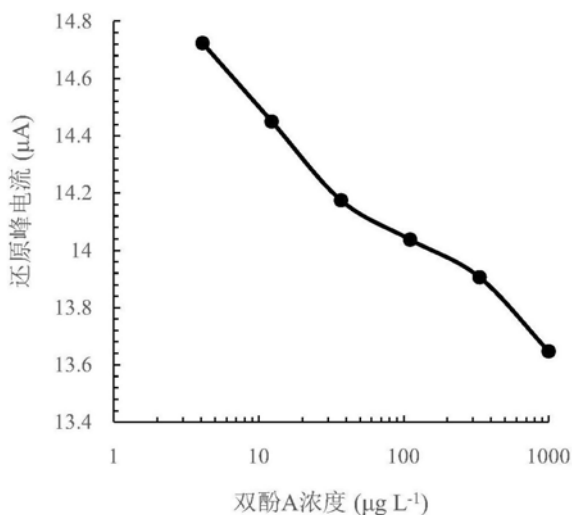
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种用于双酚A检测的电化学免疫分析方法

(57)摘要

本发明提供了一种用于双酚A检测的电化学免疫分析方法,包括如下步骤,1)竞争反应:向封闭电极表面滴加5~20 μL等体积混合的梯度稀释好的待测物样溶液或样品提取液和磷酸盐缓冲溶液稀释的酶标抗原溶液,置于20~35℃条件下孵育0.5~1.5h之后,冲洗并吹干;2)检测还原峰电流值:将步骤1)洗好的电极浸入2~6mL 0.2~1.5mM二茂铁甲醇溶液中,同时加入20~60 μL 5~15mM双氧水,以饱和甘汞电极为参比电极、铂电极为对电极,进行循环伏安法测定还原峰电流值.使用本发明建立的免疫分析方法对待测物进行检测.本发明克服了传统酶联免疫分析方法检测耗时的缺点,降低了酶联免疫检测所需时间。



1. 一种用于双酚A检测的电化学免疫分析方法,包括如下步骤,

1) 竞争反应:向封闭电极表面滴加5~20 μ L等体积混合的梯度稀释好的待测物样溶液或样品提取液和磷酸盐缓冲溶液稀释的酶标抗原溶液,置于20~35 $^{\circ}$ C条件下孵育0.5~1.5h之后,冲洗并吹干;所述酶标抗原溶液制备包括如下步骤:

a) 双酚A半抗原的制备,称取0.5~2.0g双酚A和0.5~2.5g碳酸钾溶于5~15mL无水二甲基甲酰胺中,并加入0.5~1.5g 4-溴丁酸乙酯,反应体系在在65~80 $^{\circ}$ C温度下搅拌8~16h;随后反应混合物利用乙酸乙酯萃取、硫酸钠干燥、减压旋干;生成物用体积比为1/198~2/98的甲醇与二氯甲烷的混合液做为展开剂,进行过硅胶柱分离纯化,得到双酚A中间产物a1;将1.0~2.5ga1溶解在3~7mL甲醇中,然后将其加入到1~5mL 3~5mol/L的氢氧化钠水溶液中,20~30 $^{\circ}$ C下搅拌8~16h;用乙酸乙酯洗涤后,水相用28~35% HCl酸化至pH2~4,酸化后的水相用乙酸乙酯萃取;接着,合并萃取所得的有机相,用硫酸钠对所合并的有机相进行干燥,并减压浓缩,得到双酚A半抗原;

b) 将0.5~2.0g双酚A半抗原,0.5~2.0g N,N'-二环己基碳二亚胺和0.3~1.0g N-羧基琥珀酰亚胺溶解在15~25mL无水四氢呋喃中,将混合物在20~30 $^{\circ}$ C下搅拌8~16h,离心取上清液,并利用体积比为1/9~2/98的甲醇与二氯甲烷的混合液做为展开剂对上清液进行过硅胶柱分离纯化,得到黄色油状物即为双酚A半抗原活化酯;随后将5~15mg双酚A半抗原活化酯溶于0.5~1.5mL无水二甲基甲酰胺中制得甲液;

c) 准确称量11~12mg辣根过氧化物酶,加入到3~5mL的碳酸氢钠缓冲液中,缓冲溶液的pH为6~8,待完全溶解,得乙液,在冰浴条件下将甲液缓慢加入到乙液中,待完全加入后,3~6 $^{\circ}$ C避光搅拌8~12h,然后将反应液在3~6 $^{\circ}$ C、pH为6~8的磷酸盐缓冲溶液中透析2~4天,即得到酶标抗原溶液;

2) 检测还原峰电流值:将步骤1)洗好的封闭电极浸入2~6mL0.2~1.5mM二茂铁甲醇溶液中,同时加入20~60 μ L5~15mM双氧水,以饱和甘汞电极为参比电极、铂电极为对电极,进行循环伏安法测定还原峰电流值,

其特征在于,所述封闭电极封闭方法包括如下步骤:

a) 纳米金颗粒在玻碳电极表面沉积:电极经Al₂O₃粉末打磨洗净冲干后,置于0.1~0.5mM HAuCl₄的0.05~0.15M NaNO₃溶液中,以饱和氯化钾甘汞电极作为参比电极,铂丝电极为对电极,加0~2V恒电压5~25s;

b) 双酚A抗体在玻碳电极表面的自组装修饰:电极洗净冲干后,浸入0.2~1.5mL5~15mM硫辛酸的乙醇溶液中,室温静置2~6h,随后电极用50~90%乙醇水溶液冲洗并吹干,浸在0.2~1.5mL含5~15mM EDC和5~15mM NHS的50~90%乙醇水溶液中,室温静置0.5~2h;之后,电极用50~90%乙醇水溶液冲洗,经吹干后浸在5~15 μ L 0.2~1.5mgmL⁻¹的抗体溶液中,2~6 $^{\circ}$ C静置过夜;

c) 电极表面封闭:电极浸在0.5~2%的BSA溶液中15~45min。

一种用于双酚A检测的电化学免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于小分子化合物免疫化学和残留分析技术领域,尤其是涉及一种用于双酚A检测的电化学免疫分析方法。

背景技术

[0002] 双酚-A是来源于工业化学品的内分泌干扰素。作为重要的有机化工原料,双酚A主要用于生产聚碳酸酯、环氧树脂等多种高分子材料和增塑剂、阻燃剂、涂料等精细化工产品。从矿泉水瓶、医疗器械到食品包装,大多都含有双酚A。然而,由于其成品在强洗涤剂,酸性或高温液体作用下表面易降解,所以在环境水体,饮用水,水产品,蔬菜,水果和罐装食品中均有残留。毒理学实验表明,双酚A能够通过模拟雌激素激动剂和雄激素拮抗剂作用,影响人体正常细胞功能,阻碍生殖系统发育,增加造血系统患癌几率。

[0003] 目前,比较常见的高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱法(GC)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)和酶联免疫吸附法(ELISA)都有被用来检测双酚A残留。传统仪器方法存在前处理复杂,仪器和相应配套费用昂贵,无法大规模进行平行样同时检测等缺点。而酶联免疫的检测往往较为耗时。因此迫切需要开发更加简便、快速、灵敏的分析技术。

[0004] 电化学生物传感器是一类结合生物识别元件(例如:酶,抗体,核酸适配体,人工受体和分子印记等)和电化学传输元件的集成检测装置,它将传统免疫分析方法的高特异性和电化学测量系统的低成本和低检测限相结合。相比仪器检测法和酶联免疫检测法,该方法具有操作简便、结果易读、对环境和设备要求低,体积小等优点,是一种极具应用潜力的快速检测技术。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明旨在提出一种用于双酚A检测的电化学免疫分析方法,以克服传统仪器检测和酶联免疫分析方法检测时间长,仪器昂贵,难以实现实时实地检测等问题。

[0006] 为达到上述目的,本发明的技术方案是这样实现的:

[0007] 一种用于双酚A检测的电化学免疫分析方法,包括如下步骤,

[0008] 1) 竞争反应:向封闭电极表面滴加5~20 μ L等体积混合的梯度稀释好的待测物样溶液或样品提取液和磷酸盐缓冲溶液稀释的酶标抗原溶液,置于20~35 $^{\circ}$ C条件下孵育0.5~1.5h之后,冲洗并吹干;

[0009] 2) 检测还原峰电流值:将步骤1)洗好的电极浸入2~6mL0.2~1.5mM二茂铁甲醇溶液中,同时加入20~60 μ L5~15mM双氧水,以饱和甘汞电极为参比电极、铂电极为对电极,进行循环伏安法测定还原峰电流值。

[0010] 本发明将样品的还原峰电流值检测参数与标准品的还原峰电流值检测参数图比较而获得样品中双酚A的含量。

[0011] 进一步,所述酶标抗原溶液制备包括如下步骤:

[0012] 1) 双酚A半抗原的制备,称取0.5~2.0g双酚A和0.5~2.5g碳酸钾溶于5~15mL无水二甲基甲酰胺中,并加入0.5~1.5g 4-溴丁酸乙酯,反应体系在65~80℃温度下搅拌8~16h;随后反应混合物利用乙酸乙酯萃取、硫酸钠干燥、减压旋干;生成物用体积比为1/198~2/98的甲醇与二氯甲烷的混合液做为展开剂,进行过硅胶柱分离纯化,得到双酚A中间产物a1;将1.0~2.5g a1溶解在3~7mL甲醇中,然后将其加入到1~5mL 3~5mol/L的氢氧化钠水溶液中,20~30℃下搅拌8~16h;用乙酸乙酯洗涤后,水相用28~35% HCl酸化至pH2~4,酸化后的水相用乙酸乙酯萃取;接着,合并萃取所得的有机相,用硫酸钠对所合并的有机相进行干燥,并减压浓缩,得到双酚A半抗原;

[0013] 2) 将0.5~2.0g双酚A半抗原,0.5~2.0g N,N'-二环己基碳二亚胺和0.3~1.0g N-羟基琥珀酰亚胺溶解在15~25mL无水四氢呋喃中,将混合物在20~30℃下搅拌8~16h,离心取上清液,并利用体积比为1/9~2/98的甲醇与二氯甲烷的混合液做为展开剂对上清液进行过硅胶柱分离纯化,得到黄色油状物即为双酚A半抗原活化酯;随后将5~15mg双酚A半抗原活化酯溶于0.5~1.5mL无水二甲基甲酰胺中制得甲液;

[0014] 3) 准确称量11~12mg辣根过氧化酶,加入到3~5mL的碳酸氢钠缓冲液中,缓冲溶液的pH为6~8,待完全溶解,得乙液,在冰浴条件下将甲液缓慢加入到乙液中,待完全加入后,3~6℃避光搅拌8~12h,然后将反应液在3~6℃、pH为6~8的磷酸盐缓冲溶液中透析2~4天,即得到酶标抗原溶液。

[0015] 进一步,所述封闭电极封闭方法包括如下步骤:

[0016] 1) 纳米金颗粒在玻碳电极表面沉积:电极经Al₂O₃粉末打磨洗净冲干后,置于0.1~0.5mM HAuCl₄的0.05~0.15M NaNO₃溶液中,以饱和氯化钾(KCl)甘汞电极作为参比电极,铂丝电极为对电极,加0~2V恒电压5~25s;

[0017] 2) 双酚A抗体在玻碳电极表面的自组装修饰:电极洗净冲干后,浸入0.2~1.5mL 5~15mM 硫辛酸的乙醇溶液中,室温静置2~6h,随后电极用50~90%乙醇水溶液冲洗并吹干,浸在0.2~1.5mL含5~15mM EDC和5~15mM NHS的50~90%乙醇水溶液中,室温静置0.5~2h;之后,电极用50~90%乙醇水溶液冲洗,经吹干后浸在5~15μL 0.2~1.5mgL⁻¹的抗体溶液(磷酸缓冲盐溶液PBS, pH=5~9)中,2~6℃静置过夜;

[0018] 3) 电极表面封闭:电极浸在0.5~2%的BSA溶液中15~45min。

[0019] 本发明中合成了小分子目标分析物的半抗原,并与载体蛋白质偶联,制备有效的酶标抗原。该技术研究的关键是半抗原的分子设计、合成和酶标抗原的制备。其中半抗原的设计、合成是影响免疫分析成败的关键。

[0020] 双酚A结构中不具有合适的基团,因此要对双酚A的结构进行改造,在双酚A的羟基上引入羧基,形成可以与载体蛋白连接的臂。因此,本发明在设计合成双酚A人工半抗原时,采用双酚A与4-溴丁酸乙酯反应,来引入活性侧链,合成双酚A半抗原,这样既保持了双酚A半抗原与双酚A在结构上的相似性,又使半抗原分子具有了与载体蛋白连接的合适结构。

[0021] 相对于现有技术,本发明所述的一种用于双酚A电化学免疫分析的酶标抗原及分析方法,具有以下优势:

[0022] (1) 本发明所述的分析方法使检测时间缩短30min以上。

[0023] (2) 本发明所述的分析方法使样品用量缩小为传统酶联免疫方法的五分之一。

[0024] (3) 本发明所述的人工半抗原合成方法不仅简便,且所用主要原料4-溴丁酸乙酯

价格较为低廉、容易获得,在一般化学试剂公司都可购买。由于合成效率高、反应步骤少,从而提高了反应的可控性。

附图说明

[0025] 构成本发明的一部分的附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0026] 图1为本发明实施例一所述的双酚A电化学免疫分析方法标准曲线。

具体实施方式

[0027] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本发明中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

[0028] 下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明创造。

[0029] 实施例一

[0030] 双酚A的合成

[0031] 称取0.5~2.0g双酚A和0.5~2.5g碳酸钾溶于5~15mL无水二甲基甲酰胺中,并加入0.5~1.5g 4-溴丁酸乙酯。反应体系在在65~80℃温度下搅拌8~16h。随后反应混合物利用乙酸乙酯萃取、硫酸钠干燥、减压旋干。生成物用体积比为1/198~2/98的甲醇与二氯甲烷的混合液做为展开剂,进行过硅胶柱分离纯化,得到双酚A中间产物a1。将1.0~2.5g a1溶解在3~7mL甲醇中,然后将其加入到1~5mL 3~5mol/L的氢氧化钠水溶液中。20~30℃下搅拌8~16h。反应混合物用乙酸乙酯洗涤后,水相用28~35% HCl酸化至pH 2~4。然后酸化后的水相用乙酸乙酯萃取。接着,合并有机相,硫酸钠干燥,并减压浓缩,得到双酚A半抗原。

[0032] 酶标抗原的合成

[0033] 1) 将0.5~2.0ga2,0.5~2.0g N,N'-二环己基碳二亚胺和0.3~1.0g N-羟基琥珀酰亚胺溶解在15~25mL无水四氢呋喃中。将混合物在20~30℃下搅拌8~16h,离心取上清液,并利用体积比为1/9~2/98的甲醇与二氯甲烷的混合液做为展开剂对生成物进行过硅胶柱分离纯化,得到黄色油状物即为双酚A半抗原活化酯。随后将5~15mg双酚A半抗原活化酯溶于0.5~1.5mL无水二甲基甲酰胺中制得甲液;

[0034] 2) 准确称量11~12mg辣根过氧化酶,加入到3~5mL的碳酸氢钠缓冲液中,缓冲溶液的pH为6~8,待完全溶解,得乙液,在冰浴条件下将甲液缓慢加入到乙液中,待完全加入后,3~6℃避光搅拌8~12h,然后将反应液在3~6℃、pH为6~8的磷酸盐缓冲溶液中透析2~4天,即得到酶标抗原溶液。

[0035] 用于双酚A电化学免疫分析的电极封闭方法包括如下步骤:

[0036] 1) 纳米金颗粒在玻碳电极表面沉积:电极经Al₂O₃粉末打磨洗净冲干后,置于0.1~0.5mM HAuCl₄的0.05~0.15M NaNO₃溶液中,以饱和氯化钾(KCl)甘汞电极作为参比电极,铂丝电极为对电极,加0~2V恒电压5~25s。

[0037] 2) 抗体在玻碳电极表面的自组装修饰:电极洗净冲干后,浸入0.2~1.5mL 5~15mM 硫辛酸的乙醇溶液中,室温静置2~6h。随后电极用50~90%乙醇水溶液冲洗并吹干,浸在0.2~1.5mL含5~15mM EDC和5~15mM NHS的50~90%乙醇水溶液中,室温静置0.5~2h。之

后,电极用50~90%乙醇水溶液冲洗,经吹干后浸在5~15 μ L 0.2~1.5mgmL⁻¹的抗体溶液(PBS,pH=5~9)中,2~6℃静置过夜。

[0038] 3) 电极表面封闭:电极浸在0.5~2%的BSA溶液中15~45min。

[0039] 双酚A电化学免疫分析方法检测步骤:

[0040] 1) 竞争反应:向封闭电极表面滴加5~20 μ L等体积混合的梯度稀释好的待测物样溶液或样品提取液和磷酸盐缓冲溶液稀释的酶标抗原溶液,置于20~35℃条件下孵育0.5~1.5h之后,冲洗并吹干。

[0041] 2) 检测还原峰电流值:将上一步洗好的电极浸入2~6mL0.2~1.5mM二茂铁甲醇溶液中,同时加入20~60 μ L5~15mM双氧水,以饱和甘汞电极为参比电极、铂电极为对电极,进行循环伏安法测定还原峰电流值。

[0042] 根据还原峰电流值建立双酚A的电化学免疫分析方法标准曲线,如图1所示。

[0043] 以上所述仅为本发明创造的较佳实施例而已,并不用以限制本发明创造,凡在本发明创造的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明创造的保护范围之内。

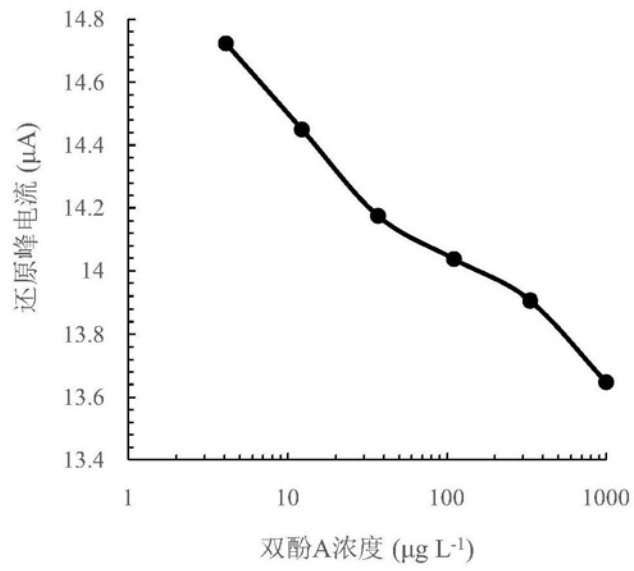


图1

专利名称(译)	一种用于双酚A检测的电化学免疫分析方法		
公开(公告)号	CN106018779B	公开(公告)日	2018-05-29
申请号	CN201610315662.7	申请日	2016-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学 江南大学 华中师范大学 中国特种设备检测研究院		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学 江南大学 华中师范大学 中国特种设备检测研究院		
当前申请(专利权)人(译)	天津科技大学 江南大学 华中师范大学 中国特种设备检测研究院		
[标]发明人	陆旸 丁敏玲 李梦娟 张燕 刘国珍 李翔 王硕		
发明人	陆旸 丁敏玲 李梦娟 张燕 刘国珍 李翔 王硕		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/48		
CPC分类号	G01N27/48 G01N33/53		
其他公开文献	CN106018779A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于双酚A检测的电化学免疫分析方法，包括如下步骤，1)竞争反应：向封闭电极表面滴加5~20μL等体积混合的梯度稀释好的待测物样溶液或样品提取液和磷酸盐缓冲溶液稀释的酶标抗原溶液，置于20~35°C条件下孵育0.5~1.5h之后，冲洗并吹干；2)检测还原峰电流值：将步骤1)洗好的电极浸入2~6mL0.2~1.5mM二茂铁甲醇溶液中，同时加入20~60μL5~15mM双氧水，以饱和甘汞电极为参比电极、铂电极为对电极，进行循环伏安法测定还原峰电流值。使用本发明建立的免疫分析方法对待测物进行检测。本发明克服了传统酶联免疫分析方法检测耗时的缺点，降低了酶联免疫检测所需时间。

