



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110702898 B

(45)授权公告日 2020.07.14

(21)申请号 201911070649.X

审查员 刘莉丹

(22)申请日 2019.11.05

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110702898 A

(43)申请公布日 2020.01.17

(73)专利权人 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 何京博 高绘菊 徐龙华

王莹

(74)专利代理机构 济南誉丰专利代理事务所

(普通合伙企业) 37240

代理人 薛鹏喜

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

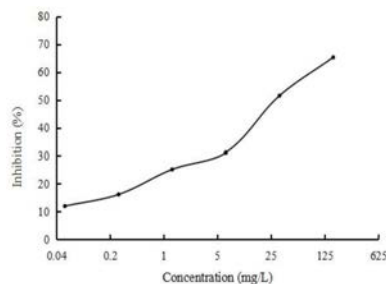
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种纳米酶标记仿生免疫分析检测磺胺嘧啶的方法

(57)摘要

本发明公开了一种纳米酶标记仿生免疫分析检测磺胺嘧啶的方法,本发明以Au@SiO₂纳米材料代替天然酶作为标记物,以分子印迹聚合物膜作为仿生抗体,实现了对磺胺嘧啶的灵敏检测;而且本发明样品前处理简单,分析时间短、实验操作简单,方法稳定,适用于食品中磺胺嘧啶的快速检测。



1. 一种纳米酶标记仿生免疫分析检测磺胺嘧啶的方法,其特征在于,以纳米酶标记抗原代替天然酶标记抗原,以分子印迹聚合物代替生物抗体;其中:

所述纳米酶标记抗原由如下方法制备而成:

将6~9mL的十六烷基三甲基溴化铵与100 μ L的氯金酸溶液混匀,用去离子水稀释至8~10mL,在搅拌条件下加入硼氢化钠溶液,搅拌3~10分钟后静置,得到金种子溶液;

将制备的金种子溶液加入到由0.1M的CTAB、0.024M的HAuCl₄、0.5M的H₂SO₄、10mM的AgNO₃和0.1mM的左旋抗坏血酸溶液按体积比100mL:(2-2.1)mL:2mL:1mL:800 μ L组成的生长液中,在25~37 $^{\circ}$ C环境下反应10~18h,制备得到纳米金棒;

将纳米金棒用去离子水配制成溶液,用NaOH溶液将纳米金棒溶液的pH调节至9~11,每隔30分钟加入10~30 μ L硅酸四乙酯/乙醇溶液,一共加三次,30 $^{\circ}$ C水浴24h,制备得到表面包覆二氧化硅层的纳米金棒;

将表面包覆二氧化硅层的纳米金棒进行氨基化处理,然后对磺胺嘧啶进行标记,即制备得到纳米酶标记抗原;

所述分子印迹聚合物膜由如下方法制备而成:

0.251g磺胺嘧啶溶于16mL乙腈中,然后加入0.253g甲基丙烯酸,磁力搅拌10~30min后加入1~3mL二甲基丙烯酸乙二醇酯和0.01~0.04g偶氮二异丁腈,磁力搅拌1h;96孔酶标板上每孔加入200 μ L上述混合溶液,在氮气环境下,30~37 $^{\circ}$ C水浴反应16~18h;用体积比为9:1的甲醇-醋酸溶液超声8h除去磺胺嘧啶,再用浓度100%甲醇洗4h至中性,37 $^{\circ}$ C干燥2h后得到带有分子印迹聚合物膜的酶标板。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述纳米酶标记仿生免疫分析检测磺胺嘧啶,具体包括以下步骤:

(1) 将带有分子印迹聚合物膜的酶标板的第1行设为空白组,每孔只加入200 μ L的甲醇;第2行设置为对照组,每孔加入100 μ L的纳米酶标记抗原溶液和100 μ L的甲醇;第3-8行每孔加入磺胺嘧啶标样梯度稀释液和100 μ L的纳米酶标记抗原溶液;室温竞争反应1h,加入TMB底物溶液进行显色反应,用酶标仪在450nm处读取紫外吸收值,计算抑制率;以磺胺嘧啶标样浓度对数值为横坐标,抑制率为纵坐标,绘制工作曲线;

(2) 利用步骤(1)绘制的工作曲线对经前处理的待测物中的磺胺嘧啶的含量进行检测;

步骤(2)中,所述待测物的前处理方法为:将待测物用乙酸乙酯涡旋离心重复提取2~4次,合并提取液并在40 $^{\circ}$ C下旋转蒸发,残余物用甲醇溶解,0.22 μ m滤膜过滤;所述待测物与乙酸乙酯加入量的比为1g:(3~5)mL。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,步骤(1)中,所述磺胺嘧啶标样梯度稀释液由甲醇配成而成,其梯度浓度分别为:0.0512mg/L、0.256mg/L、1.28mg/L、6.4mg/L、32mg/L和160mg/L。

4. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,步骤(1)中,所述抑制率的计算公式为:

$$\%CR = (1 - A/A_0) \times 100$$

其中,A表示标准液或样液的平均吸光度;A₀表示对照孔的平均吸光度。

一种纳米酶标记仿生免疫分析检测磺胺嘧啶的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及磺胺嘧啶的检测方法,特别是涉及一种纳米酶标记仿生免疫分析检测磺胺嘧啶的方法,属于食品安全检测技术领域。

背景技术

[0002] 磺胺类兽药是抗感染药剂,具有光谱杀菌作用,是饲料中常用的添加兽药之一。磺胺嘧啶属于磺胺类抗菌化合物,长期广泛用于治疗畜禽疾病,从而引发在动物源食品中的残留。磺胺嘧啶在食品中超标残留会带来很多危害,如人体摄入可能引起过敏反应、肝中毒、肾衰竭或形成尿结石。中华人民共和国农业部规定磺胺嘧啶在动物源性食品中的最大允许残留限量为100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0003] 目前,针对磺胺嘧啶残留的检测方法主要包括:高效液相色谱法、气相色谱与质谱联用等,这些方法既繁琐又耗时,所用的检测设备价格昂贵,不适用于现场快速检测需求。酶联免疫分析法是一种广泛用于检测磺胺嘧啶的方法,由于传统生物抗体制备困难、成本高,使得其应用受到了限制。目前,分子印迹聚合物由于其制备简单、稳定性好、可重复利用等优点,以分子印迹聚合物代替传统生物抗体,建立了仿生酶联免疫分析技术。其中,所用的天然酶稳定性差、使用寿命短、容易失活,在标记目标物时容易产生结构屏蔽效应等缺点,使得仿生酶联免疫分析技术在检测磺胺嘧啶残留中的应用受到极大限制。因此,研发一种稳定性好、催化活性高的纳米酶代替天然酶作为标记物,构建新型的仿生免疫分析方法具有重要意义。

发明内容

[0004] 针对上述现有技术所存在的问题,本发明的目的是提供一种纳米酶标记仿生免疫分析检测磺胺嘧啶的方法。本发明以Au@SiO₂纳米材料代替天然酶作为标记物,以分子印迹聚合物膜作为仿生抗体,实现了对磺胺嘧啶的灵敏检测;而且本发明样品前处理简单,分析时间短、实验操作简单,方法稳定,适用于食品中磺胺嘧啶的快速检测。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0006] 一种纳米酶标记仿生免疫分析检测磺胺嘧啶的方法,以纳米酶标记抗原代替天然酶标记抗原,以分子印迹聚合物代替生物抗体;其中:

[0007] 所述纳米酶标记抗原由如下方法制备而成:

[0008] 将Au@SiO₂纳米材料和戊二醛混合后在避光条件下反应0.5~1.5h;再加入抗原溶液,继续避光反应0.5~1.5h,反应结束后,离心,将反应物进行分离洗涤,制备得到纳米酶标记抗原;

[0009] 所述分子印迹聚合物膜由如下方法制备而成:

[0010] 将抗原溶于乙腈和二甲基亚砷混合溶液中,再加入甲基丙烯酸、二甲基丙烯酸乙二醇酯和偶氮二异丁腈,搅拌均匀,得到混合溶液;将混合溶液加入到酶标板中,在氮气环境下,水浴反应14~18h,反应结束后用甲醇-醋酸溶液超声除去模板分子,洗涤至中性,干

燥,直接在酶标板上制备得到分子印迹聚合物。

[0011] 优选的,所述抗原/模板分子为磺胺嘧啶。

[0012] 优选的,所述Au@SiO₂纳米材料由如下方法制备而成:

[0013] 将十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)与HAuCl₄混匀,用去离子水稀释后,在快速搅拌下加入冰水制备的NaBH₄溶液,搅拌均匀,静置,得到金种子溶液;

[0014] 将金种子溶液加入到生长液中,25~37℃环境下反应10~18h,制备得到纳米金棒;

[0015] 将纳米金棒用去离子水配制成溶液,调节pH至9~11,然后分次加入硅酸四乙酯/乙醇溶液,30℃水浴24h,制备得到表面包覆二氧化硅的纳米金棒;

[0016] 将表面包覆二氧化硅的纳米金棒依次用乙醇、乙酸乙酯逐步离心,最后分散于甲苯中,加入3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES),在30℃超声2h,反应结束后依次用乙酸乙酯、乙醇逐步离心洗涤,制备得到Au@SiO₂纳米材料。

[0017] 更优选的,所述生长液由0.1M的CTAB、0.024M的HAuCl₄、0.5M的H₂SO₄、10mM的AgNO₃和0.1mM的左旋抗坏血酸溶液按体积比100mL:(2-2.1)mL:2mL:1mL:800μL组成。

[0018] 更优选的,所述硅酸四乙酯/乙醇溶液中,硅酸四乙酯和乙醇的体积比为1:4。

[0019] 更优选的,所述硅酸四乙酯/乙醇溶液分三次加入,三次总计加入的硅酸四乙酯/乙醇溶液与纳米金棒去离子水溶液的体积比为3:1000。

[0020] 优选的,所述利用纳米酶标记仿生免疫分析检测磺胺嘧啶的方法,具体包括以下步骤:

[0021] (1)将带有分子印迹聚合物膜的酶标板的第1行设为空白组,每孔只加入200μL的甲醇;第2行设置为对照组,每孔加入100μL的纳米酶标记抗原溶液和100μL的甲醇;第3-8行每孔加入磺胺嘧啶标样梯度稀释液和100μL的纳米酶标记抗原溶液;室温竞争反应1h,加入TMB底物溶液进行显色反应,用酶标仪在450nm处读取紫外吸收值,计算抑制率;以磺胺嘧啶标样浓度对数值为横坐标,抑制率为纵坐标,绘制工作曲线;

[0022] (2)利用步骤(1)绘制的工作曲线对经前处理的待测物中的磺胺嘧啶的含量进行检测。

[0023] 优选的,步骤(1)中,所述磺胺嘧啶标样梯度稀释液由甲醇配成而成,其梯度浓度分别为:0.0512mg/L、0.256mg/L、1.28mg/L、6.4mg/L、32mg/L和160mg/L。

[0024] 优选的,步骤(1)中,所述抑制率的计算公式为:%CR=(1-A/A₀)×100;其中,A表示标准液或样液的平均吸光度;A₀表示对照孔的平均吸光度。

[0025] 优选的,步骤(2)中,所述待测物的前处理方法为:将待测物用乙酸乙酯涡旋离心重复提取2~4次,合并提取液并在40℃下旋转蒸发,残余物用甲醇溶解,0.22μm滤膜过滤。

[0026] 更优选的,所述待测物与乙酸乙酯加入量的比为1g:(3~5)mL。

[0027] 本发明的纳米酶标记仿生免疫分析检测磺胺嘧啶的方法中,以所述纳米酶标记抗原和分子印迹聚合物可以作为有效成分,可以进一步开发成检测磺胺嘧啶的产品。

[0028] 本发明的有益效果:

[0029] (1)本发明以Au@SiO₂纳米材料标记磺胺嘧啶抗原作为标记物,利用其内在的过氧化物酶样活性,催化TMB底物发生显色反应,代替了天然辣根过氧化物酶(HRP)在酶联免疫分析中的应用。采用本发明的纳米酶标记仿生免疫分析方法对磺胺嘧啶的最低检出限为40

$\mu\text{g}/\text{kg}$,能够满足实际样品检测需要。

[0030] (2) 本发明的仿生免疫分析技术具有良好的稳定性,制备方法简单,在农产品和食品中的磺胺嘧啶残留测定中具有广泛的应用。

[0031] 本发明与现有其他方法检测磺胺嘧啶的比较:

	本发明检测方法	液相色谱方法
[0032] 样品前处理方法	乙酸乙酯提取、过滤,旋转蒸发	乙酸乙酯提取,正己烷除脂,MAX柱净化,氮气吹干
前处理时间	35 分钟	125 分钟
方法分析时间	2 分钟	10 分钟

附图说明

[0033] 图1:磺胺嘧啶标准曲线。

[0034] 由图1可知,该方法对磺胺嘧啶最低检出限为 $40\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

具体实施方式

[0035] 应该指出,以下详细说明都是例示性的,旨在对本申请提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本申请所属技术领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0036] 本发明中所提及的“室温”是指温度为 $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ 。

[0037] 正如背景技术部分所介绍的,目前针对磺胺嘧啶残留的检测方法主要是高效液相色谱法、气相色谱与质谱联用等,这些方法既繁琐又耗时,所用的检测设备价格昂贵,不适用于现场快速检测需求。因此,研发快速、准确、稳定的磺胺嘧啶检测方法具有重要意义。

[0038] 为实现灵敏、快速检测磺胺嘧啶,本发明是以 $\text{Au}@\text{SiO}_2$ 纳米材料模拟酶作为标记,代替天然辣根过氧化物酶。该纳米酶具有良好的催化活性,且利用分子印迹聚合物膜作为仿生抗体,具有制备简单、稳定性好、可重复利用等优点,提供了对磺胺嘧啶的专一性识别孔穴,提高了检测灵敏度。采用本发明的方法对磺胺嘧啶的最低检出限达 $40\mu\text{g}/\text{kg}$,实现了对磺胺嘧啶的超灵敏检测。

[0039] 本发明是以纳米酶标记抗原和分子印迹聚合物膜作为仿生抗体的主要组成成分,建立了纳米酶标记仿生免疫分析检测磺胺嘧啶的方法。

[0040] 在本发明的一种实施方案中,给出了纳米酶标记抗原的制备方法,包括如下步骤:

[0041] 将 $6\sim 9\text{mL}$ 的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)与 $100\mu\text{L}$ 的氯金酸溶液(HAuCl_4)混匀,用去离子水稀释至 $8\sim 10\text{mL}$,在搅拌条件下加入硼氢化钠(NaBH_4)溶液,搅拌 $3\sim 10$ 分钟后静置,得到金种子溶液;

[0042] 将制备的金种子溶液加入到由 0.1M 的CTAB、 0.024M 的 HAuCl_4 、 0.5M 的 H_2SO_4 、 10mM 的 AgNO_3 和 0.1mM 的左旋抗坏血酸溶液按体积比 $100\text{mL}:(2\sim 2.1)\text{mL}:2\text{mL}:1\text{mL}:800\mu\text{L}$ 组成的生长液中,在 $25\sim 37^{\circ}\text{C}$ 环境下反应 $10\sim 18\text{h}$,制备得到纳米金棒;

[0043] 将纳米金棒用去离子水配制成溶液,用 NaOH 溶液将纳米金棒溶液的 pH 调节至 $9\sim$

11,每隔30分钟加入10~30 μ L硅酸四乙酯/乙醇溶液,一共加三次,30 $^{\circ}$ C水浴24h,制备得到表面包覆二氧化硅层的纳米金棒;

[0044] 将表面包覆二氧化硅层的纳米金棒进行氨基化处理,然后对抗原(磺胺嘧啶)进行标记,即制备得到纳米酶标记抗原。

[0045] 本发明所制备的纳米酶标记抗原中,纳米金棒具有良好的水溶性及较高的催化活性,SiO₂作为壳结构,可以使纳米金棒具有良好的分散性,不易聚集,还提供了较大的比表面积和易修饰的识别位点,便于与抗原进行连接。

[0046] 在本发明的另一实施方案中,给出了带有分子印迹聚合物膜酶标板的制备方法,包括以下步骤:

[0047] 0.251g磺胺嘧啶溶于16mL乙腈中,然后加入0.253g甲基丙烯酸,磁力搅拌10~30min后加入1~3mL二甲基丙烯酸乙二醇酯和0.01~0.04g偶氮二异丁腈,磁力搅拌1h。96孔酶标板上每孔加入200 μ L上述混合溶液,在氮气环境下,30~37 $^{\circ}$ C水浴反应16~18h;用9:1v/v甲醇-醋酸溶液超声8h除去磺胺嘧啶,再用浓度100%甲醇洗4h至中性,37 $^{\circ}$ C干燥2h后得到带有分子印迹聚合物膜的酶标板。

[0048] 为了使得本领域技术人员能够更加清楚地了解本申请的技术方案,以下将结合具体的实施例详细说明本申请的技术方案。

[0049] 本发明实施例中所用的未进行具体说明试验材料均为本领域常规的试验材料,均可通过商业渠道购买得到。

[0050] 实施例1:

[0051] 1. 纳米酶标记抗原的制备:

[0052] (1) 纳米金棒的制备:7.5mL的CTAB与100 μ L的HAuCl₄混匀,并用去离子水稀释至9.4mL,在快速搅拌下快速加入冰水制备的NaBH₄溶液。搅拌3分钟之后停止,静置30分钟,得到金种子溶液。

[0053] 生长液的制备:100mL CTAB(0.1M),2.04mL HAuCl₄(0.024M),2mL H₂SO₄(0.5M),1mL AgNO₃(10mM)和800 μ L的左旋抗坏血酸溶液(L-AA)(0.1mM)。

[0054] 将240 μ L的金种子溶液加入到制备的生长液中,30 $^{\circ}$ C条件下生长12h之后,在转速12000转/分钟下离心五分钟,离心洗涤两次,沉淀用去离子水溶解,并定容至100mL。

[0055] (2) 纳米金棒表面二氧化硅层的包覆方法:用NaOH溶液将纳米金棒溶液的pH调节至10.6,磁力搅拌20分钟。然后每隔30分钟加入10 μ L硅酸四乙酯/乙醇溶液(硅酸四乙酯与乙醇体积比为1:4),一共加三次,30 $^{\circ}$ C水浴24h,制备得到表面包覆二氧化硅的纳米金棒。

[0056] (3) 二氧化硅表面氨基化:取20mL上述制备的Au@SiO₂离心洗涤(8000转/分钟,10分钟),沉淀先用乙醇溶解,再离心取沉淀用乙酸乙酯溶解,最后离心取沉淀分散于5mL甲苯中。加入20 μ L APTES溶液,在30 $^{\circ}$ C下超声2h。反应结束后,离心洗涤,沉淀先用乙酸乙酯溶解,再离心取沉淀用乙醇溶解,最后离心取沉淀分散于5mL去离子水中,得到氨基化的Au@SiO₂水溶液。

[0057] (4) 纳米酶标记抗原的制备:

[0058] 将10mL氨基化的Au@SiO₂纳米材料和10 μ L戊二醛(质量浓度为25%水溶液)加入到反应容器中,充分混匀,避光反应1h,再加入0.1M磺胺嘧啶甲醇溶液,继续避光反应1h。反应结束后,离心除团聚,将反应物进行分离洗涤得到纳米酶标记抗原,4 $^{\circ}$ C条件下保存。

[0059] 2. 带有分子印迹聚合物膜酶标板的制备:

[0060] 0.251g磺胺嘧啶溶于16mL乙腈和4mL二甲基亚砜中,然后加入0.253g甲基丙烯酸磁力搅拌30min后加入1.130mL二甲基丙烯酸乙二醇酯和0.02g偶氮二异丁腈,磁力搅拌1h,得到混合溶液;在96孔酶标板上每孔加入200 μ L上述混合溶液,在氮气环境下,30 $^{\circ}$ C水浴反应16h;用9:1 (v/v) 甲醇-醋酸溶液超声8h除去磺胺嘧啶,再用浓度100%甲醇洗4h至中性,37 $^{\circ}$ C干燥2h后得到分子印迹聚合物膜。

[0061] 3. 利用纳米酶标记仿生免疫分析方法检测磺胺嘧啶,具体如下:

[0062] (1) 将带有分子印迹聚合物膜的酶标板的第1行设为空白组,每孔只加入200 μ L的甲醇;第2行设置为对照组,每孔加100 μ L的纳米酶标记抗原溶液和100 μ L甲醇;第3-8行每孔加入100 μ L磺胺嘧啶标样梯度稀释液和100 μ L的纳米酶标记抗原溶液;室温竞争反应1h,加入TMB底物液进行显色反应,用多功能酶标仪在450nm处读取紫外吸收值,计算抑制率。以磺胺嘧啶标准溶液浓度对数值为横坐标,抑制率为纵坐标,绘制工作曲线。

[0063] 抑制率的计算公式如下:

$$[0064] \%CR = (1 - A/A_0) \times 100$$

[0065] 其中,A表示标准液或样液的平均吸光度; A_0 表示对照孔的平均吸光度。

[0066] 其中,用甲醇配制磺胺嘧啶标准溶液,梯度浓度分别为0.0512mg/L、0.256mg/L、1.28mg/L、6.4mg/L、32mg/L和160mg/L。

[0067] (2) 准确称取猪肉 5 ± 0.05 g,加入20mL乙酸乙酯溶液涡旋离心,重复提取三次,合并提取液并在40 $^{\circ}$ C下旋转蒸发。用1mL甲醇溶解残余物,0.22 μ m滤膜过滤得样品提取液。

[0068] (3) 将样品提取液代替标样稀释液,重复步骤3操作,根据上述计算公式计算出猪肉中磺胺嘧啶含量为62.2 μ g/kg。

[0069] 以上所述仅为本申请的优选实施例而已,并不用于限制本申请,对于本领域的技术人员来说,本申请可以有各种更改和变化。凡在本申请的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本申请的保护范围之内。

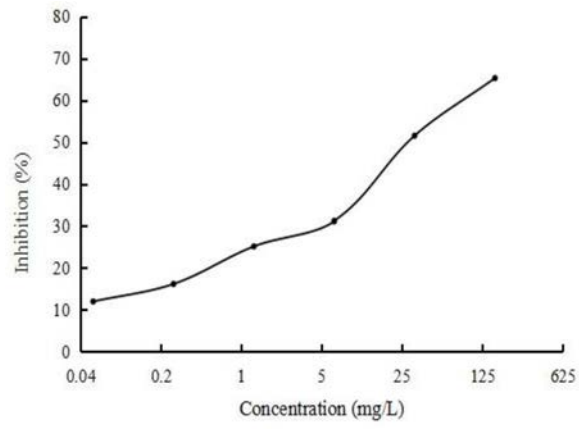


图1

专利名称(译)	一种纳米酶标记仿生免疫分析检测磺胺嘧啶的方法		
公开(公告)号	CN110702898B	公开(公告)日	2020-07-14
申请号	CN201911070649.X	申请日	2019-11-05
[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 高绘菊 徐龙华 王莹		
发明人	徐志祥 何京博 高绘菊 徐龙华 王莹		
IPC分类号	G01N33/531		
其他公开文献	CN110702898A		
外部链接	SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种纳米酶标记仿生免疫分析检测磺胺嘧啶的方法，本发明以Au@SiO₂纳米材料代替天然酶作为标记物，以分子印迹聚合物膜作为仿生抗体，实现了对磺胺嘧啶的灵敏检测；而且本发明样品前处理简单，分析时间短、实验操作简单，方法稳定，适用于食品中磺胺嘧啶的快速检测。

