



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109828108 A

(43)申请公布日 2019.05.31

(21)申请号 201910200448.0

(22)申请日 2019.03.16

(71)申请人 合肥学院

地址 230601 安徽省合肥市经济开发区锦
绣大道99号

(72)发明人 高大明 陈倩云 吴梦瑶

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

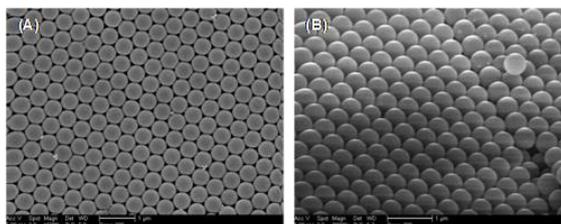
权利要求书2页 说明书12页 附图6页

(54)发明名称

一种用于咖啡因检测的人工抗体的制备方法

(57)摘要

一种用于咖啡因检测的人工抗体的制备方法,制备的人工抗体洗脱位于印迹球层中的印迹分子,内部形成与印迹分子结构、大小和功能基互补的空穴结构,具有对酶标抗原分子的特异性识别位点,实现对酶标抗原分子选择性识别,利用化学免疫发光法,实现对酶标抗原分子痕量检测,检测限为 $5.2 \times 10^{-11} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。人工抗体制备过程包括四个步骤:首先,将辣根过氧化物酶氧化,其次,辣根过氧化物酶标抗原的制备,配置一定浓度梯度的咖啡因抗原,分别滴加氧化的辣根过氧化物酶,选择发光值最大的作为酶标抗原,再次,用印迹分子、功能单体、交联剂、引发剂,制备出目标分子印迹聚合物,最后,洗脱目标分子得到能够选择性识别咖啡因的人工抗体。



1. 一种用于咖啡因检测的人工抗体的制备方法,其特征在于:所述的人工抗体中洗脱位于聚合物印迹壳层中的印迹分子,印迹壳层的内部形成具有与印迹分子结构、大小和功能基互补的空穴结构,洗脱印迹分子的人工抗体具有对酶标抗原分子的特异性识别位点,实现对酶标抗原分子选择性识别,检测液中存在化学发光剂,利用化学免疫发光法,实现对酶标抗原分子进行痕量检测,上述人工抗体的制备过程包括如下四个步骤:

1.1 第一步是辣根过氧化物酶的氧化:称取4 ~ 6mg辣根过氧化物酶溶解于1 ~ 3mL新鲜配制的含有高碘酸钠的醋酸缓冲液中,室温下避光反应20 ~ 40min,加入适量的甘油,室温下继续避光反应5 ~ 15min后,对醋酸缓冲液透析2 ~ 4h,再用的碳酸钠将透析后辣根过氧化物酶溶液的pH值调至9.5备用;

1.2 第二步是辣根过氧化物酶标抗原的制备:量取81mL的 Na_2HPO_4 和19mL的 NaH_2PO_4 配置pH为7.4的PBS缓冲液,然后用上述的PBS缓冲溶液分别配置浓度为300、30、3、0.3、0.03、0.003 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的抗原,用量程范围为10 ~ 100 μL 的微量进样器吸取40 ~ 60 μL 的上述活化后的辣根过氧化物酶,滴加到上述的不同浓度的抗原溶液中,反应2 ~ 3h后,得到了辣根过氧化物酶标抗原,再用微量进样器分别吸取酶标抗原40 ~ 60 μL ,滴加到96孔板中,每种浓度的酶标抗原滴加12个平行样,随后在加入酶标抗原的孔中加入140 ~ 160 μL 的发光液,常温避光振荡器振荡反应4 ~ 6min,用化学发光仪检测其发光值,选择最大发光值为分子印迹的酶标抗原;

1.3 第三步是分子印迹聚合物的制备:称取30 ~ 40mg印迹分子置于100mL磨口锥形瓶中,分别加入70 ~ 80mL的乙腈,60 ~ 70 μL 功能单体,室温下,用振荡器振荡1 ~ 2h,再放置11 ~ 13h,然后加入700 ~ 800 μL 交联剂和90 ~ 110mg引发剂,通氮气超声4 ~ 6min使其充分混匀后,密封后置于温度可调控的恒温箱,以转速为250 ~ 350r/min,60 $^{\circ}\text{C}$ 聚合反应18 ~ 20h后,再调节温度至65 $^{\circ}\text{C}$ 熟化反应1 ~ 3h,取出锥形瓶冷却至室温,分别用乙醇和去离子水离心超声洗涤反应混合物各三次,得到目标分子印迹聚合物;

1.4 第四步是人工抗体的制备:将上述得到的目标分子印迹聚合物用滤纸包裹后放置于洗脱装置中,再将100 ~ 160mL体积比为9:1(mL:mL)的甲醇与乙酸混合溶液加入上述装置中,反复洗脱印迹分子聚合物,直至用紫外分光光度计检测不到混合溶液中印迹分子,然后再用甲醇洗去过量乙酸,将洗脱印迹分子聚合物放置在60 $^{\circ}\text{C}$ 的干燥箱中干燥,得到了具有对辣根过氧化物酶标抗原识别的人工抗体,然后通过包被液的包被,利用化学发光剂,实现对酶标抗原的检测。

2. 根据权利要求1所述的一种用于咖啡因检测的人工抗体的制备方法,其特征是:所述的聚合物印迹壳层中的印迹分子、抗原分子和目标分子都是咖啡因。

3. 根据权利要求1所述的一种用于咖啡因检测的人工抗体的制备方法,其特征是:所述的酶标抗原分子是为标记了辣根过氧化物酶的咖啡因。

4. 根据权利要求1所述的一种用于咖啡因检测的人工抗体的制备方法,其特征是:所述的化学发光剂为所述的分子印迹聚合物中发光液为鲁米诺溶液、10mL的三羟甲基氨基甲烷-盐酸溶液和5.2 μL 的30%双氧水混合溶液。

5. 根据权利要求1所述的一种用于咖啡因检测的人工/抗体的制备方法,其特征是:所述的分子印迹聚合物制备中的功能单体是甲基丙烯酸。

6. 根据权利要求1所述的一种用于咖啡因检测的人工抗体的制备方法,其特征是:所述

的分子印迹聚合物制备中的交联剂是乙二醇二甲基丙烯酸酯。

7. 根据权利要求1所述的一种用于咖啡因检测的人工抗体的制备方法,其特征是:所述的分子印迹聚合物制备中的引发剂是偶氮二异丁腈。

8. 根据权利要求1所述的一种用于咖啡因检测的人工抗体的制备方法,其特征是:所述的酶标抗原人工抗体的制备中的包被液是5%的PVA甲醇溶液。

一种用于咖啡因检测的人工抗体的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及材料科学领域,特别是涉及咖啡因化学发光免疫检测的人工抗体的制备方法。

背景技术

[0002] 咖啡因是一种生物碱,它存在于咖啡树、茶树、可可树和可乐果等自然界中,是咖啡、茶和所谓的能量饮料的关键成分。咖啡因具有兴奋中枢神经系统的作用,使人保持兴奋状态,适度使用可以扩张冠状动脉,松弛肌肉,解除疲劳,因此深受现代压力大的年轻人的青睐。但是大剂量或长期使用也会对人体造成损伤如影响睡眠,引起局部缺血性心脏病,甚至会引起阵发性惊厥和骨骼震颤,损害肝、胃、肾等重要内脏器官,尤其是它的成瘾性,一旦停用会出现精神萎靡状态,因此,迫切需要建立一种简便快捷、高选择性的识别和高灵敏性的检测咖啡因含量的方法。

[0003] 常见的传统检测咖啡因的方法有分光光度法、荧光光谱法、生物免疫分析法、高效液相色谱法(HPLC)、电化学法、固相萃取法和气相质谱联用法等。Russo, M等人(*Food Analytical Methods*, 2018, 11(10):2637-2644)提出了一种将样品制备、分离和检测统一在一起,这是首次报道通过在线萃取测定咖啡、茶和可可中咖啡因的文献,该萃取与配备光电二极管阵列检测器的液相色谱系统相结合,该方法在灵敏度,检测限,准确度和精确度方面得到验证。该方法的优点是:(i)显著缩短分析时间(超过70%)和所用溶剂(萃取步骤集成在色谱分析中);(ii)整个过程完全自动化,大大减少了发生操作错误的可能性;(iii)使用传统的单维液相色谱系统可以方便地实现对结果的检测。Nemati, F等人(*Sensors & Actuators: B. Chemical*, 2018, 273:25-34)提出了用硫掺杂碳量子点(S-CQDs)作为探针,在真实介质中快速、简单和选择性地检测咖啡因。以柠檬酸为碳源,硫代硫酸钠为钝化剂,采用微波辅助处理合成S-CQDs,在365nm紫外光激发下发出强蓝色荧光,具有21.4%的高量子产率。由于动态猝灭,S-CQDs的荧光被 Cu^{2+} 强烈淬灭,并对其淬灭机理进行了详细研究。加入咖啡因后,由于铜-咖啡因复合物的形成,S-CQDs的荧光得以恢复,因此,设计了一种基于此现象的用于检测咖啡因的开启式荧光探针。使用基于中心复合设计的响应面法(RSM)优化传感过程中的有效参数,包括时间,温度,pH和S-CQDs的浓度。在0.2 μM 到70 μM 之间,系统的荧光强度随着咖啡因浓度增加而增加,咖啡因的检出限为0.05 μM 。该方法对咖啡因活性的选择性高于其他咖啡因干扰成分,最后,以碳量子点为基础的荧光探针成功应用于实际样品中的咖啡因检测。杜道林等人公开了发明专利(CN105301238A),“一种检测咖啡因超标的试纸的制备”,涉及用于检测过量咖啡因的试纸和试纸的制备,将液体样品吸收部分、胶体金标记部分、检测和反应部分以及吸水部分依次胶合在试纸的衬里上,并且用检测抗原作为检测线覆检测和反应部分,同时涂有抗第二种动物蛋白的免疫球蛋白(简称IgG1)条带作为参考线,快速检测试纸条特异性强,可实现半定量检测,适用于罐装饮料生产厂,食品卫生质检部门,个人家庭等中快速检测过量咖啡因,具有快速检测的特点。Rahimi, A等人(*Food Chemistry*, 2018, 262:206-214)成功合成了三维石墨烯- Fe_3O_4 (3D-Graphene- Fe_3O_4)

纳米粒子,并用作磁性固相萃取(MSPE)步骤中的吸附剂,合成吸附剂的性质通过傅里叶变换红外光谱(FT-IR),扫描电子显微镜(SEM),振动样品磁强计(VSM),X射线衍射(XRD),拉曼光谱,比表面积(Brunauer-Emmett-Teller,简称BET)和孔径分布(Barrett-Joyner-Halenda,简称BJH)进行表征,优化了超声参数,纳米粒子量,pH值,盐浓度和解吸条件等主要工艺参数,在优化的实验条件下,品质因数表明线性动态范围(LDR)为 $0.5\text{--}500\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$,测定系数(R^2)高于0.996,检测限(LOD)为 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$,日内和日间相对标准偏差(RSD)分别小于5.9和7.1%,该方法已成功应用于不同食品样品中咖啡因的测定。

[0004] 上述分光光度法-液相色谱法、荧光光谱法、生物免疫分析方法和固相萃取法虽然灵敏度较高,但是采用大型仪器,成本较高,且制备方法繁琐,样品前处理复杂、耗时长,选择性较差,因此,有必要寻求一种便捷和高选择性的识别目标分析物的方法,分子印迹聚合物独特的构异性,因此具有对目标分子高选择性。当前,有些研究团队对其开展了广泛的研究,Aswini, KK等人(*Materials Science & Engineering C-Materials For Biological Applications*, 2016, 65: 116-125)通过4-氨基-5-羟基-2,7-萘二磺酸的电聚合在玻碳电极上开发分子印迹聚合物基茶碱电化学传感器。茶碱是用于哮喘和慢性阻塞性肺病药物的廉价药物,并且在较高浓度下具有毒性。研究MIP修饰增强了裸电极的茶碱识别能力,并优化了基于印迹聚合物的传感器的电聚合循环次数、预聚合混合物的组成、pH值和浸渍时间等参数和性能,使用基于密度泛函理论的从头计算,计算确定预聚合混合物中模板-单体复合物的相互作用能形成最稳定的构象,电流测量显示,在优化条件下,所开发的传感器的方法检测限为 $0.32\mu\text{M}$,动态范围为 $0.4\text{至}17\mu\text{M}$,在存在结构相似的干扰物如可可碱,咖啡因和多索茶碱的情况下,传感器具有明显的选择性,所开发的传感器显示出显著的稳定性和再现性,并且还成功地用于从市售片剂中检测茶碱。

[0005] 席小倩等人公开发明专利(CN107446087A)“一种用于三聚氰胺检测的芯-壳型表面分子印迹微球的制备方法”,其中提到一种用于三聚氰胺检测的芯-壳型表面分子印迹微球的制备方法,包括如下两个步骤:首先,将苯乙烯、甲基丙烯酸单体分散在水中,以过硫酸钾为引发剂在氮气气氛下反应制备表面富含羧基的聚苯乙烯微球;然后,再将三聚氰胺、甲基丙烯酸、亚苯基双丙烯酰胺、偶氮二异庚腈与上述所制备的聚苯乙烯微球表面反应,得到三聚氰胺分子印迹的芯-壳型微球,洗脱位于印迹微球壳层中的三聚氰胺印迹分子,壳层的内部形成具有与印迹分子结构、大小和功能基互补的空穴结构,洗脱印迹分子的芯-壳型微球拥有对目标分析物三聚氰胺分子的特异性识别和敏感性检测的功能,彼此空间相互接近时,在浓度差推动力的作用下,实现对目标分析物三聚氰胺分子选择性识别和检测。

[0006] 综上所述,分子印迹技术可以实现高效选择性识别,其原理是当模板分子(印迹分子)与聚合物单体接触时会形成多重作用点,通过聚合过程这种作用就会被记忆下来,当模板分子除去后,聚合物中就形成了与模板分子空间构型相匹配的具有多重作用点的空穴,这样的空穴将对模板分子及其类似物具有选择识别特性,所制备的洗脱目标分子的聚合物也可称之为人工抗体。

[0007] 但是传统分子印迹(人工抗体)技术存在的最大缺陷就是目标分析物进入识别位点后,由于大部分的目标分析物自身是没有检测信号输出,因此,寻求一种既能够高选择性的识别,又可以有高敏感性的信号输出的人工抗体,一直是科研工作者所追求的目标。Deng, HY等人(*International Journal Of Food Science And Technology*, 2019, 54(1):

202-211) 制备磁性分子印迹聚合物微球 (MMIP) 并在银纳米粒子 (AgNPs) 比色检测咖啡因之前预处理样品。以 Fe_3O_4 为载体, 以介孔 SiO_2 为中间壳, α -甲基丙烯酸为功能单体, 咖啡因为模板, 采用透射电子显微镜, 傅里叶变换红外光谱仪和振动样品磁强计对制备的 MMIPs 进行了表征。吸附过程遵循 Langmuir 吸附等温线, 在 298K 下最大吸附容量为 $38.8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, MMIPs 从饮料中提取咖啡因, 然后 AgNPs 比色法快速筛选和半定量 $\geq 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 咖啡因, 通过紫外-可见光谱在 393nm 处准确定量的咖啡因量为 $0.1 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 这与 HPLC 分析结果一致, 因此, 该方法可用于快速富集和分析饮料中的咖啡因。

[0008] 传统的分子印迹技术虽然选择性较高, 能够识别目标分子, 无法通过某种检测信号确定目标分析物的含量。而将分子印迹技术结合荧光分析法, 通过荧光强度的改变来检测目标分子含量, 克服了传统人工抗体无法提供信号检测的问题。Jia, MF 等人 (*Sensors And Actuators B-Chemical*, 2017, 252: 934-943) 通过在量子点 (QDs) 表面上锚定介孔结构的印迹微球, 基于光电子诱导转移机理, 高选择性和高敏感性的检测 2,4-二氯苯氧基乙酸 (2,4-D), 构建了一种新型分子印迹荧光传感器, 转移诱导荧光猝灭机制, 制备的传感器具有良好的特征, 具有理想的球形形貌和荧光特性, 在优化条件下, 传感器在 $0.66 \sim 80 \mu\text{M}$ 范围内表现出令人满意的线性关系, 在 20 分钟内检测限低至 2.1 nM , 该传感器成功应用于豆芽样品中 2,4-D 的检测, 获得了三种加标水平的 2,4-D 高回收率, 范围为 95.0-110.1%, 精度低于 4.9%。通过利用表面印迹和 QDs, 该传感器对真实食品样品中 2,4-D 的分离, 富集和检测具有高灵敏度和良好的选择性, 从而确保食品安全。本研究团队公开发明专利 (CN105136758A) “一种对农残检测的 Eu^{3+} 标记分子印记传感器制备方法”, 该发明涉及一种对农残检测的 Eu^{3+} 标记分子印记传感器制备方法, 属于环境功能材料制备技术领域。包括如下步骤: Eu^{3+} 与 APTS 中氨基和农残分子预组装, 与正硅酸乙酯 (TEOS) 水解交联缩合后得到 Eu^{3+} 标记的农残分子印记二氧化硅纳米粒子传感器, 洗脱农残分子后, 拥有对农残分子选择性的识别位点空穴, 农残分子再次进入传感器的识别位点后, 将与识别位点上的 Eu^{3+} 发生螯合, 农残分子与 Eu^{3+} 螯合后的荧光强度增加, 利用荧光强度的改变, 实现了对痕量农药分子高选择性, 高结合量和高敏感性检测。获得 Eu^{3+} 标记的分子印记传感器具有识别位点刚性强, Eu^{3+} 不易洗脱, 重复利用, 较好溶剂惰性、光的稳定性、单一分散性和均一的尺寸。江苏大学王吉祥等人公开发明专利 (CN109370565A), “一种双发射荧光分子印迹聚合物纳米粒子及其制备方法与应用”, 该发明涉及生物功能材料制备技术领域, 具体涉及一种双发射荧光分子印迹聚合物纳米粒子及其制备方法与应用。将碳量子点包覆于二氧化硅纳米球内, 作为比率荧光探针的内核, 然后将红色碲化镉量子点作为响应信号, 以丙烯酰胺和 4-乙烯基苯硼酸作为双功能单体, 以 N,N-亚甲基双丙烯酰胺为交联剂, 以多巴胺为模板分子在醇相中通过偶氮二异丁腈的引发, 合成对多巴胺 (DA) 具有特异性识别位点的双发射荧光分子印迹聚合物纳米粒子, 再采用浸渍法制备了具有可视化效果的荧光检测试纸, 从而实现对 DA 的可视化检测, 并通过将其应用于人体血清样品中 DA 的检测结果证明, 制备的荧光检测试纸可用于实际复杂样品的 DA 半定量检测。

[0009] 荧光作为检测目标分析物灵敏探针外, 近年来, 生物发光法的出现也为检测分析提供了新的手段, 生物发光法是指反应底物在荧光素酶的催化下利用 ATP 产能, 生成激发态的氧化荧光素, 后者在回到基态时多余的能量以光子形式放出。Tang, CC 等人 (*Organic & Biomolecular Chemistry*, 2018, 16 (47): 9197-9203) 开发一种能够检测活细胞和活体动物

酪氨酸酶的新型生物发光探针,酪氨酸酶是一种广泛存在于植物,动物和微生物中的含铜酶,通常作为黑素瘤的重要生物标志物,并且还参与皮肤,黄褐斑,老年斑和白化病的色素沉着过度有关,目前只有一种生物发光探针应用于细胞中酪氨酸酶的成像,因此,开发一种能够检测活细胞和活体动物中酪氨酸酶的新型生物发光探针具有重要意义。该文报告了一种新的生物发光探针TyrBP-3,它不仅能够检测体外和活细胞中的酪氨酸酶,也可以显示活体动物肿瘤中酪氨酸酶活性的水平,总之,TyrBP-3是第一个可以在细胞水平上成像酪氨酸酶的生物发光探针,预计TyrBP-3可以成为未来复杂生物系统中酪氨酸酶监测的良好工具。

[0010] 山东师范大学王春等人公开发明专利(CN108507987A),“一种基于免疫磁分离技术和生物发光技术的大肠杆菌的检测方法”,公开了一种基于免疫磁分离技术和生物发光技术的大肠杆菌的检测方法,包括如下步骤:1)将生物素与大肠杆菌抗体偶联,得到生物素化的大肠杆菌抗体;2)生物素化的大肠杆菌抗体和链霉亲和素修饰的磁性纳米颗粒混合,制备磁性纳米探针;3)使用PBS缓冲液冲洗磁性纳米探针后,将磁性纳米探针加入到大肠杆菌溶液中,使大肠杆菌被磁性纳米探针捕获;4)捕获大肠杆菌后的溶液置于离心管中,将捕获有大肠杆菌的磁性纳米探针进行富集;5)采用清洗液对富集的样品进行清洗,得到用于ATP发光的溶液,磁性纳米探针被磁性分离架富集分离;向裂解后的溶液中加入荧光素和 Mg^{2+} ,通过检测溶液的荧光强度,计算得到大肠杆菌的数量。

[0011] 为了提高对目标分析物的选择性识别和专一性检测,通常生物发光使用抗体、酶等作为分子识别材料。然而,生物敏感材料如抗体、酶、特异蛋白等生物分子易受环境影响,十分脆弱,使用条件极为苛刻,且价格昂贵。因此,寻求一种新的目标分析物信号输出方法,一直是科研工作所追寻的目标。

[0012] 化学发光是指在某些特殊的化学反应中,反应的中间体或产物由于吸收了反应释放的化学能而处于电子激发态,当其回到基态时伴随产生的光辐射现象。化学发光涉及到化学反应,使用条件简单,不易受环境影响,且可以通过改性,适应不同的环境。Prolo, Carolina等人(*Free Radical Biology & Medicine*, 2018, 128(20):59-68)通过对分子探针的荧光和化学发光检测过氧亚硝酸盐的实例进行分析,揭示了分子探针与过氧亚硝酸盐或过氧亚硝酸盐自由基反应的机理。事实上,探针被分为两类:一类是通过自由基机制产生产物的氧化还原探针,另一类是通过过氧亚硝酸盐亲核攻击而产生的亲电探针。总的来说,硼基化合物正逐渐成为灵敏、特异检测和定量的首选探针。此外,基因修饰荧光蛋白与非天然氨基酸结合的新策略最近被描述为过氧亚硝酸盐传感器。分析了过氧亚硝酸盐检测中最常用的荧光和化学发光方法,为合理的实验设计和数据解释提供了指导,包括如何估计细胞中过氧亚硝酸盐的生成速率。Gang Xie等人(*Food And Agricultural Immunology*, 2018, 29(1):564-576)提出了一种简单、经济的化学发光免疫分析方法,结合磁性微粒(MPCLIA)对环境中发现的强致癌物黄曲霉毒素(AFB1)进行快速检测和分析。详细研究了几种可能影响该方法检测性能的理化因素,包括异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗体浓度、AFB1碱性磷酸酶浓度和磁性颗粒浓度。在优化的实验条件下,该方法检测结果为:(1)低限检测0.05ng/mL;(2)实际粮油样品回收率在78%~109%之间,符合残留分析要求;(3)洗涤过程灵敏度高,动态范围广,易于分离,优于酶联免疫吸附法(ELISA)。此外,所使用的设备成本较低。实际样品的MPCLIA结果与高效液相色谱法的结果一致。这些结果表明,所提出的MPCLIA方法在筛选食品工业或其他应用领域中出现的其他有毒真菌毒素方面具有潜在的应用价

值。

[0013] 化学发光法灵敏度高,线性范围宽,但是选择性差,免疫分析是直接将发光底物或者酶类物质标记在抗原或抗体上,通过抗原与抗体特异性结合形成复合物而建立起来的一种分析方法。将化学发光法结合免疫分析结合起来,又可称为化学发光免疫分析(Chemiluminescence immunoassay,CLIA),该法同时具有强选择性、高灵敏度、低成本、样品与处理简单、速度快等优点,鲁米诺是最常用的发光体系。

[0014] 本文主要制备对咖啡因具有特异性识别能力的分子印迹聚合物微球,通过化学发光免疫分析对咖啡因进行痕量检测,这就克服了化学发光的选择性差的问题。也为分子印迹识别咖啡因提供了识别信号,同时未见报道通过以咖啡因为目标分子,对其印迹制备微球,通过化学免疫发光法检测咖啡因。本发明是先将辣根过氧化物酶氧化,然后将辣根过氧化物酶标记到咖啡因上(称为酶标抗原)并确定最佳使用浓度。以咖啡因为模板分子、甲基丙烯酸为功能单体、乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂、偶氮二异丁腈为引发剂在乙腈的溶液中60℃恒温热聚合18~20h后,再调节温度至65℃熟化反应1~3h,得到咖啡因分子印迹聚合物。用甲醇与乙酸混合溶液反复洗脱印迹咖啡因聚合物,得到了具有对咖啡因特异性识别的人工抗体。因此,合成的人工抗体,基于化学发光免疫分析,实现对咖啡因的高选择性的识别和高敏感性的检测。

[0015] 在本发明中,我们报道了一种用于检测咖啡因的人工抗体的制备方法,实现对咖啡因的高选择性的识别和高敏感性的检测,以咖啡因为目标分子(印迹分子)制备的人工抗体,洗脱掉人工抗体中的目标分子(印迹分子),得到大小、形状和化学功能上与模板分子咖啡因互补的空位的分子印迹聚合物微球,实现对咖啡因的选择性识别,且结合了化学免疫发光方法,采用人工抗体和酶标抗原结合的方式,实现了高选择性的识别和高敏感性的检测。其中人工抗体为本发明所制备的分子印迹聚合物微球,酶标抗原是指辣根过氧化物酶和咖啡因标记后的产物,发光剂为鲁米诺发光体系,以一系列梯度浓度的咖啡因为横坐标,在化学发光仪下检测发光值,得到标准曲线,根据抗体和酶标抗原结合前后发光值变化,得到人工抗体对咖啡因的吸附量,实现对咖啡因高选择性的识别和高敏感性的检测。

发明内容

[0016] 发明目的:针对现有技术存在的问题,本发明制备了对咖啡因的高选择性的识别的分子印迹聚合物(人工抗体),并结合化学免疫发光分析方法,实现对咖啡因高敏感性的检测。首先,以咖啡因为印迹分子(目标分子),加入功能单体、交联剂和引发剂,制备咖啡因分子印迹聚合物微球,用洗脱剂洗脱印迹分子,得到具有印迹分子结构、大小和功能基互补的空穴结构,洗脱印迹分子的聚合物微球具有对酶标抗原分子的特异性识别位点,加入化学发光试剂和酶标抗原,化学免疫发光分析方法,实现对酶标抗原的高选择性和高敏感性的检测。

[0017] 本发明的技术方案是:一种用于咖啡因检测的人工抗体的制备方法,其特征在于:所述的人工抗体中洗脱位于聚合物印迹壳层中的印迹分子,印迹壳层的内部形成具有与印迹分子结构、大小和功能基互补的空穴结构,洗脱印迹分子的人工抗体具有对酶标抗原分子的特异性识别位点,实现对酶标抗原分子选择性识别,检测液中存在化学发光剂,利用化学免疫发光法,实现对酶标抗原分子进行痕量检测,上述人工抗体的制备过程包括如下四

个步骤:

第一步是辣根过氧化物酶的氧化:称取4 ~ 6mg辣根过氧化物酶溶解于1 ~ 3mL新鲜配制的含有高碘酸钠的醋酸缓冲液中,室温下避光反应20 ~ 40min,加入适量的甘油,室温下继续避光反应5 ~ 15min后,对醋酸缓冲液透析2 ~ 4h,再用的碳酸钠将透析后辣根过氧化物酶溶液的pH值调至9.5备用;

第二步是辣根过氧化物酶标抗原的制备:量取81mL的 Na_2HPO_4 和19mL的 NaH_2PO_4 配置pH为7.4的PBS缓冲液,然后用上述的PBS缓冲溶液分别配置浓度为300、30、3、0.3、0.03、0.003 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的抗原,用量程范围为10 ~ 100 μL 的微量进样器吸取40 ~ 60 μL 的上述活化后的辣根过氧化物酶,滴加到上述的不同浓度的抗原溶液中,反应2 ~ 3h后,得到了辣根过氧化物酶标抗原,再用微量进样器分别吸取酶标抗原40 ~ 60 μL ,滴加到96孔板中,每种浓度的酶标抗原滴加12个平行样,随后在加入酶标抗原的孔中加入140 ~ 160 μL 的发光液,常温避光振荡器振荡反应4 ~ 6min,用化学发光仪检测其发光值,选择最大发光值为分子印迹的酶标抗原;

第三步是分子印迹聚合物的制备:称取30 ~ 40mg印迹分子置于100mL磨口锥形瓶中,分别加入70 ~ 80mL的乙腈,60 ~ 70 μL 功能单体,室温下,用振荡器振荡1 ~ 2h,再放置11 ~ 13h,然后加入700 ~ 800 μL 交联剂和90 ~ 110mg引发剂,通氮气超声4 ~ 6min使其充分混匀后,密封后置于温度可调控的恒温箱,以转速为250 ~ 350r/min,60 $^{\circ}\text{C}$ 聚合反应18 ~ 20h后,再调节温度至65 $^{\circ}\text{C}$ 熟化反应1 ~ 3h,取出锥形瓶冷却至室温,分别用乙醇和去离子水离心超声洗涤反应混合物各三次,得到目标分子印迹聚合物;

第四步是人工抗体的制备:将上述得到的目标分子印迹聚合物用滤纸包裹后放置于洗脱装置中,再将100 ~ 160mL体积比为9:1 (mL:mL)的甲醇与乙酸混合溶液加入上述装置中,反复洗脱印迹分子聚合物,直至用紫外分光光度计检测不到混合溶液中印迹分子,然后再用甲醇洗去过量乙酸,将洗脱印迹分子聚合物放置在60 $^{\circ}\text{C}$ 的干燥箱中干燥,得到了具有对辣根过氧化物酶标抗原识别的人工抗体,然后通过包被液的包被,利用化学发光剂,实现对酶标抗原的检测。

[0018] 作为对现有技术的进一步改进,所述的聚合物印迹壳层中的印迹分子、抗原分子和目标分子都是咖啡因;所述的酶标抗原分子是为标记了辣根过氧化物酶的咖啡因;所述的化学发光剂为所述的分子印迹聚合物中发光液为鲁米诺溶液、10mL的三羟甲基氨基甲烷-盐酸溶液和5.2 μL 的30%双氧水混合溶液;所述的分子印迹聚合物制备中的功能单体是甲基丙烯酸;所述的分子印迹聚合物制备中的交联剂是乙二醇二甲基丙烯酸酯;所述的分子印迹聚合物制备中的引发剂是偶氮二异丁腈;所述的酶标抗原人工抗体的制备中的包被液是5%的PVA甲醇溶液。

[0019] 相对于现有技术的有益效果:邓发亮等人公开了发明专利(CN102796102A),“咖啡因半抗原、偶联物及应用、咖啡因检测或测定方法”,公开一种咖啡因半抗原、偶联物及应用、咖啡因检测或测定方法,应用在免疫层析技术上,具有高灵敏度、高特异性、简单快捷、易于操作和无需任何仪器设备等优点。李光煌等人公开发明专利(CN107064253A),“一种检测饮品中咖啡因含量的水杯”,该发明提供一种检测饮品中咖啡因含量的水杯,包括水杯本体,所述水杯本体内侧底部设置咖啡因分子印迹电化学传感器、温度传感器;所述水杯本体底部设置空腔结构;所述空腔中设置有恒电位电路、D/A转换器、微处理器、A/D转换器、存储

器、无线传输模块、电源装置；所述水杯外侧面设置有显示屏，不需要专业的操作以及仪器，简单、快速的测定饮品中咖啡因的含量，为不宜饮用含咖啡因饮品的使用者，提供健康保障，也为经常摄入咖啡因的使用者进行健康提醒。栗晖等人公开发明专利(CN103675147A)，“一种饮料中咖啡因的快速测定的方法”，该发明提供了一种饮料中咖啡因的快速测定的方法，采集饮料样本以及咖啡因标准溶液的多波长色谱数据，扣除饮料样本色谱数据中与咖啡因标准溶液中具有相同出峰保留时间的数据，合并多个饮料样本并扣除待测组分的色谱数据，得到不含咖啡因组分的本底光谱数据库，计算主成分数目，用奇异值分解结合主成分数目对本底数据库降维，即可得到数据量较小的本底数据库，运用空间夹角判据计算饮料样本中待测组分的含量，从而实现饮料样本中咖啡因的定量检测。Ghani, M等人首次采用水热法在阳极氧化镍箔上生长了一层非常薄的镍纳米微孔(*Analytical Methods*, 2018, 10(48):5803-5810)，以制备的NiO纳米微孔为吸附剂，进行了薄膜微萃取(TFME)的研究。在水热法之前，对镍箔基体进行了阳极氧化，将制备的膜通过TFME分析咖啡因作为各种咖啡因饮料和尿液样品的模型化合物，萃取后用甲醇洗脱萃取膜，对目标物进行解吸，提取的分析物通过高效液相色谱-紫外检测(HPLC-UV)进行分析，在最佳条件下，该方法的线性动态范围(LDR)为 $0.5\text{-}500\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，测定系数(R^2)为0.9954。检出限(LOD)为 $0.07\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，定量限(LOQ)为 $0.25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，但是该法制备步骤繁琐，耗时。

[0020] 本发明首先是辣根过氧化物酶的氧化：称取4 ~ 6mg辣根过氧化物酶溶解于1 ~ 3mL新鲜配制的含有高碘酸钠的醋酸缓冲液中，室温下避光反应20 ~ 40min，加入适量的甘油，室温下继续避光反应5 ~ 15min后，对醋酸缓冲液透析2 ~ 4h，再用的碳酸钠将透析后辣根过氧化物酶溶液的pH值调至9.5备用；

然后是辣根过氧化物酶标抗原的制备：量取81mL的 Na_2HPO_4 和19mL的 NaH_2PO_4 配置pH为7.4的PBS缓冲液，然后用上述的PBS缓冲溶液分别配置浓度为300、30、3、0.3、0.03、0.003 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的抗原，用量程范围为10 ~ 100 μL 的微量进样器吸取40 ~ 60 μL 的上述活化后的辣根过氧化物酶，滴加到上述的不同浓度的抗原溶液中，反应2 ~ 3h后，得到了辣根过氧化物酶标抗原，再用微量进样器分别吸取酶标抗原40 ~ 60 μL ，滴加到96孔板中，每种浓度的酶标抗原滴加12个平行样，随后在加入酶标抗原的孔中加入140 ~ 160 μL 的发光液，常温避光振荡器振荡反应4 ~ 6min，用化学发光仪检测其发光值，选择最大发光值为分子印迹的酶标抗原；

其次是分子印迹聚合物的制备：称取30 ~ 40mg印迹分子置于100mL磨口锥形瓶中，分别加入70 ~ 80mL的乙腈，60 ~ 70 μL 功能单体，室温下，用振荡器振荡1 ~ 2h，再放置11 ~ 13h，然后加入700 ~ 800 μL 交联剂和90 ~ 110mg引发剂，通氮气超声4 ~ 6min使其充分混匀后，密封后置于温度可调控的恒温箱，以转速为250 ~ 350r/min，60 $^\circ\text{C}$ 聚合反应18 ~ 20h后，再调节温度至65 $^\circ\text{C}$ 熟化反应1 ~ 3h，取出锥形瓶冷却至室温，分别用乙醇和去离子水离心超声洗涤反应混合物各三次，得到目标分子印迹聚合物；

最后是人工抗体的制备：将上述得到的目标分子印迹聚合物用滤纸包裹后放置于洗脱装置中，再将100 ~ 160mL体积比为9:1(mL:mL)的甲醇与乙酸混合溶液加入上述装置中，反复洗脱印迹分子聚合物，直至用紫外分光光度计检测不到混合溶液中印迹分子，然后再用甲醇洗去过量乙酸，将洗脱印迹分子聚合物放置在60 $^\circ\text{C}$ 的干燥箱中干燥，得到了具有对辣根过氧化物酶标抗原识别的人工抗体，然后通过包被液的包被，利用化学发光剂，实现对酶

标抗原的检测。

[0021] 综上所述,所得的化学发光免疫(人工抗体)分析可用来检测咖啡因

其一:上述制备的以咖啡因为印迹分子的人工抗体经洗脱过后得到具有与酶标抗原相对应的空穴结构,可以高选择性的识别咖啡因,不需修饰,并且人工抗体成微球状且大小可以控制。

[0022] 其二:所制备的人工抗体成球状具有大的比表面积,且识别位点可轻易识别咖啡因,具有较快的吸附能力。

[0023] 其三:与传统的分子印迹技术相比,本法结合了化学免疫发光分析方法,通过加入化学发光试剂(鲁米诺发光体系),酶(辣根过氧化物酶)、清洗液(PBST)等,加入酶的作用是提高反应活性,加快抗体和抗原结合的速度,提高检测效率。

[0024] 其四:酶标抗原进入到所制备的人工抗体的识别位点,用化学发光检测仪检测酶标抗原与抗体结合前后发光强度变化,实现对痕量咖啡因检测,该法灵敏度高,选择性好和方便快捷。

附图说明

[0025] 图1是本发明中咖啡因分子印迹微球制备的示意图。

[0026] 图2是本发明所制备的空白(A)和咖啡因分子印迹(B)聚合物微球SEM图。

[0027] 图3是本发明所制备的咖啡因分子印迹聚合物微球以及空白聚合物微球红外光谱图。

[0028] 图4是本发明中咖啡因与所制备的被洗脱的咖啡因分子印迹聚合物微球红外光谱图。

[0029] 图5是本发明中辣根过氧化物酶作用下的鲁米诺发光机理(A)及鲁米诺发光原理示意图(B)。

[0030] 图6是本发明中氧化的辣根过氧化物酶(HRP)与咖啡因相互作用的紫外-可见光谱图。

[0031] 图7是本发明中的白色酶标板(a)和黑色酶标板(b)发光值随着酶标抗原浓度变化曲线图。

[0032] 图8是本发明所制备的咖啡因分子印迹聚合物用化学发光免疫分析法测定的咖啡因标准曲线(A)和茶碱标准曲线(B)。

[0033] 图9是本发明所制备的洗脱了咖啡因分子印迹聚合物紫外-可见光谱图。

[0034] 图10是本发明所制备的咖啡因分子印迹聚合物对咖啡因和茶碱以及空白印迹聚合物对咖啡因的吸附等温线。

[0035] 图11是本发明所制备的咖啡因分子印迹聚合物微球分别对咖啡因和茶碱的吸附动力学曲线。

[0036] 根据附图进一步解释具体实施方式

图1是本发明中咖啡因分子印迹微球制备的示意图。1-2:将咖啡因溶于乙腈溶液中与功能单体甲基丙烯酸反应,咖啡因分子结构中的氨基、羰基与甲基丙烯酸的羧基以氢键的形式排列形成氢键复合物。2-3:在该氢键复合物中加入交联剂乙二醇二甲基丙烯酸酯、引发剂偶氮二异丁腈,聚合反应得到印迹咖啡因的分子聚合物微球。3-4:利用V(甲醇):V(乙

酸)=9:1溶液洗掉印迹分子,反向过程是再结合咖啡因过程。

[0037] 图2是本发明所制备的空白(A)和咖啡因分子印迹(B)聚合物微球SEM图。图2(A)空白聚合物微球SEM图,图2(B)咖啡因分子印迹聚合物微球SEM图。由图2(A)和(B)可见,所制备的人工抗体聚合物呈现颗粒状态,分散性较好,表面光滑,在同等条件下制备出的两种聚合物,形态无明显差异。

[0038] 图3是本发明所制备的咖啡因分子印迹聚合物微球以及空白聚合物微球红外光谱图。MIP线和NIP线分别表示咖啡因分子印迹聚合物和空白聚合物的傅里叶红外光谱图。由图可以明显观察到咖啡因分子印迹聚合物(MIP)在 1606cm^{-1} 处羰基吸收峰,空白聚合物(NIP)中未出现羰基吸收峰。分子印迹聚合物(MIP)与空白聚合物(NIP)相比较,其红外光谱波数沿着高波数的方向略微移动,其他特征的吸收也相应地沿着高波数的方向移动,这可能是由于在印迹聚合过程中咖啡因和甲基丙烯酸之间的氢键结合从而均衡了电子云密度。MIP的每个特征吸收峰的相对强度也显著大于NIP的相对强度,其原因也可能是在印迹聚合过程中,咖啡因分子的氨基、羰基通过氢键与甲基丙烯酸的羧基相互作用的结果。

[0039] 图4是本发明中咖啡因与所制备的被洗脱的咖啡因分子印迹聚合物微球红外光谱图。图4中洗脱咖啡因的印迹聚合物,可以看出咖啡因的特征峰(1660cm^{-1})几乎完全消失,这表明通过非共价键作用印迹到聚合物中模板咖啡因分子,可以通过V(甲醇):V(乙酸)=9:1的混合溶液洗涤的方法将占据在识别位点上的绝大部分印迹咖啡因分子洗脱下来,留在大小、形状和化学功能上与模板分子咖啡因互补的孔位。

[0040] 图5是本发明中辣根过氧化物酶作用下的鲁米诺发光机理(A)及鲁米诺发光原理示意图(B)。图5(A)中鲁米诺类物质的发光机理为氧化反应发光,鲁米诺在碱性溶液中可被 H_2O_2 氧化,因为其发光反应速度较慢,故需添加酶类,如辣根过氧化物酶(HRP)可以加快其反应,鲁米诺经酶的催化和氧化形成激发态的中间体,当这种激发态中间体回到稳定的基态时,发射出光子($h\nu$),用化学发光仪可以高敏感性的检测到光信号。图5(B)中鲁米诺发光原理示意图,在Tris溶液中,酶标抗原与抗体结合后,通过鲁米诺化学发光信号输出,实现了对目标分析物的高选择性识别和高敏感性的检测。

[0041] 图6是本发明中氧化的辣根过氧化物酶(HRP)与咖啡因相互作用的紫外-可见光谱图。在图6的曲线中所对应的加入咖啡因的浓度从下至上依次是为 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 3×10^{-5} , 4×10^{-5} , 5×10^{-5} , $6 \times 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。从紫外光谱曲线可知,当在辣根过氧化物酶溶液中加入咖啡因后,在204nm处出现了吸收峰,而且随着咖啡因的量增大吸收峰的强度也逐渐增大,这表明模板分子咖啡因与氧化的辣根过氧化物酶之间产生较强的作用。根据咖啡因与辣根过氧化物酶的分子结构分析,HRP表面的糖分子被高碘酸钠氧化成醛基,醛基同咖啡因的上的氨基结合,辣根过氧化物酶标记到咖啡因上。

[0042] 图7是本发明中的白色酶标板(a)和黑色酶标板(b)发光值随着酶标抗原浓度变化曲线图。分别使用不同酶标板在2min、4min、6min内进行酶标抗原的发光检测,根据图7可知,发光值随着酶标抗原浓度的变化而变化,有峰值和谷值等差异,曲线趋势也不同。但是,可以看出,在 $30\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右有峰值,发光值达到最强。由图7(a)知,当使用白板时,发光范围约为50000;由图7(b)知,黑板的范围为4000。因此,在检测白板时,检测的发光值范围更宽。黑板板可能是因为黑色能够吸收光,从而产生使得发光值变小,故而检测范围窄,不适合本实验的检测。

[0043] 图8是本发明所制备的咖啡因分子印迹聚合物用化学发光免疫分析法测定的咖啡因标准曲线(A)和茶碱标准曲线(B)。图中可以看出,标准曲线走势大体相同,呈线性。咖啡因标准曲线方程为: $y=23885x+582964, R^2=0.9834$;茶碱的标准曲线方程为: $y=15867x+271310, R^2=0.9831$ 。

[0044] 图9是本发明所制备的洗脱了咖啡因分子印迹聚合物紫外-可见光谱图。图9中点线是未洗脱印迹聚合物中含有咖啡因的紫外可见光谱图,紫外吸收波长在272nm,如图9中箭头所指,用体积比为V(甲醇):V(乙酸)=9:1的洗脱液,洗去咖啡因印迹聚合物(MIP)中的咖啡因,期间不断更换洗脱液,最后用过量的甲醇洗去多余的乙酸,图9中箭头所示的咖啡因的吸收峰消失,如图9中的连续线所示。

[0045] 图10是本发明所制备的咖啡因分子印迹聚合物对咖啡因和茶碱以及空白印迹聚合物对咖啡因的吸附等温线。从图10中可以看出,咖啡因印迹聚合物的吸附能力远大于空白印迹聚合物,并且两种聚合物吸附能力都随着咖啡因初始浓度的增加而增加。当咖啡因浓度为 $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,分子印迹聚合物的最大吸附量为 $542.16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,此时空白分子印迹聚合物的吸附量为 $386.18 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。可以看出分子印迹聚合物的吸附容量几乎是空白聚合物的2倍,所制备的分子印迹聚合物对咖啡因吸附性能良好,这是因为咖啡因和甲基丙烯酸是通过非共价键相结合,即咖啡因中的氨基、羰基与甲基丙烯酸的羧基以氢键的形式排列形成氢键复合物;交联剂和引发剂通过热聚合结合以形成具有高度交联刚性和具有特异结合位点的三维结构,去除模板分子,此时分子印迹聚合物具有与咖啡因相对应的空穴结构,此分子印迹聚合物对模板分子表现出特定的识别性质,允许模板分子在结合混合物中选择性吸附。空白印迹聚合物的制备过程与印迹聚合物的制备过程相同,但由于缺乏模板分子咖啡因,故由它制备的聚合物微球不具有特定的识别位点,且不能选择性吸附咖啡因,因此其吸附量低。图10可知,咖啡因分子印迹对咖啡因的最大吸附量为 $542.16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,而对茶碱的最大吸附量为 $340.23 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,前者明显大于后者的吸附量,表明所制备的“人工抗体”分子印迹聚合物能够特异性的识别咖啡因,其原因是茶碱的结构式与咖啡因的结构式有较大差异,故“人工抗体”的识别位点不能特异性识别茶碱,实现了对咖啡因的高选择性的识别。

[0046] 图11是本发明所制备的咖啡因分子印迹聚合物微球分别对咖啡因和茶碱的吸附动力学曲线。称取洗脱了印迹分子咖啡因后的人工抗体20mg,共计24份,分别加入20mL浓度为 $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 酶标咖啡因和茶碱,在不同的时间下测定其化学发光值。绘制吸附量为纵坐标,时间为横坐标绘图可得吸附动力学曲线。咖啡因印迹的人工抗体对咖啡因的吸附速率为 $17.57 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,对茶碱的吸附速率为 $11.93 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,人工抗体对咖啡因的吸附速率大约是茶碱的1.5倍,表明了所制备的人工抗体对咖啡因具有高选择性的识别。同时,这种人工抗体对咖啡因检测限为 $5.2 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,因此,实现了对咖啡因分子的高灵敏性的痕量检测。

具体实施方式

[0047] 一种用于咖啡因检测的人工抗体的制备方法,其特征在于:所述的人工抗体中洗脱位于聚合物印迹壳层中的印迹分子,印迹壳层的内部形成具有与印迹分子结构、大小和功能基互补的空穴结构,洗脱印迹分子的人工抗体具有对酶标抗原分子的特异性识别位点,实现对酶标抗原分子选择性识别,检测液中存在化学发光剂,利用化学免疫发光法,实

现对酶标抗原分子进行痕量检测,上述人工抗体的制备过程包括如下四个步骤:

第一步是辣根过氧化物酶的氧化:称取4 ~ 6mg辣根过氧化物酶溶解于1 ~ 3mL新鲜配制的含有高碘酸钠的醋酸缓冲液中,室温下避光反应20 ~ 40min,加入适量的甘油,室温下继续避光反应5 ~ 15min后,对醋酸缓冲液透析2 ~ 4h,再用的碳酸钠将透析后辣根过氧化物酶溶液的pH值调至9.5备用;

第二步是辣根过氧化物酶标抗原的制备:量取81mL的 Na_2HPO_4 和19mL的 NaH_2PO_4 配置pH为7.4的PBS缓冲液,然后用上述的PBS缓冲溶液分别配置浓度为300、30、3、0.3、0.03、0.003 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的抗原,用量程范围为10 ~ 100 μL 的微量进样器吸取40 ~ 60 μL 的上述活化后的辣根过氧化物酶,滴加到上述的不同浓度的抗原溶液中,反应2 ~ 3h后,得到了辣根过氧化物酶标抗原,再用微量进样器分别吸取酶标抗原40 ~ 60 μL ,滴加到96孔板中,每种浓度的酶标抗原滴加12个平行样,随后在加入酶标抗原的孔中加入140 ~ 160 μL 的发光液,常温避光振荡器振荡反应4 ~ 6min,用化学发光仪检测其发光值,选择最大发光值为分子印迹的酶标抗原;

第三步是分子印迹聚合物的制备:称取30 ~ 40mg印迹分子置于100mL磨口锥形瓶中,分别加入70 ~ 80mL的乙腈,60 ~ 70 μL 功能单体,室温下,用振荡器振荡1 ~ 2h,再放置11 ~ 13h,然后加入700 ~ 800 μL 交联剂和90 ~ 110mg引发剂,通氮气超声4 ~ 6min使其充分混匀后,密封后置于温度可调控的恒温箱,以转速为250 ~ 350r/min,60 $^{\circ}\text{C}$ 聚合反应18 ~ 20h后,再调节温度至65 $^{\circ}\text{C}$ 熟化反应1 ~ 3h,取出锥形瓶冷却至室温,分别用乙醇和去离子水离心超声洗涤反应混合物各三次,得到目标分子印迹聚合物;

第四步是人工抗体的制备:将上述得到的目标分子印迹聚合物用滤纸包裹后放置于洗脱装置中,再将100 ~ 160mL体积比为9:1 (mL:mL)的甲醇与乙酸混合溶液加入上述装置中,反复洗脱印迹分子聚合物,直至用紫外分光光度计检测不到混合溶液中印迹分子,然后再用甲醇洗去过量乙酸,将洗脱印迹分子聚合物放置在60 $^{\circ}\text{C}$ 的干燥箱中干燥,得到了具有对辣根过氧化物酶标抗原识别的人工抗体,然后通过包被液的包被,利用化学发光剂,实现对酶标抗原的检测。

具体实施例

[0048] 将咖啡因溶于乙腈溶液中与功能单体甲基丙烯酸反应,咖啡因分子结构中的氨基、羰基与甲基丙烯酸的羧基以氢键的形式排列形成氢键加合物。在该氢键加合物中加入交联剂乙二醇二甲基丙烯酸酯、引发剂偶氮二异丁腈,得到印迹咖啡因的分子聚合物微球。利用 $V(\text{甲醇}):V(\text{乙酸})=9:1$ 溶液洗掉印迹分子,得到具有选择性识别咖啡因人工抗体分子印迹聚合物微球。

[0049] 第一步是辣根过氧化物酶的氧化:称取5mg辣根过氧化物酶溶解于2mL新鲜配制的含有高碘酸钠的醋酸缓冲液中,室温下避光反应30min,加入适量的甘油,室温下继续避光反应10min后,对醋酸缓冲液透析3h,再用的碳酸钠将透析后辣根过氧化物酶溶液的pH值调至9.5备用;

第二步是辣根过氧化物酶标抗原的制备:量取81mL的 Na_2HPO_4 和19mL的 NaH_2PO_4 配置pH为7.4的PBS缓冲液,然后用上述的PBS缓冲溶液分别配置浓度为300、30、3、0.3、0.03、0.003 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的抗原,用量程范围为10 ~ 100 μL 的微量进样器吸取50 μL 的上述活化后的辣根过氧

化酶,滴加到上述的不同浓度的抗原溶液中,反应2.5h后,得到了辣根过氧化物酶标抗原,再用微量进样器分别吸取酶标抗原50 μ L,滴加到96孔板中,每种浓度的酶标抗原滴加12个平行样,随后在加入酶标抗原的孔中加入150 μ L的发光液,常温避光振荡器振荡反应5min,用化学发光仪检测其发光值,选择最大发光值为分子印迹的酶标抗原;

第三步是分子印迹聚合物的制备:称取35mg印迹分子置于100mL磨口锥形瓶中,分别加入75mL的乙腈,65 μ L功能单体,室温下,用振荡器振荡1.5h,再放置12h,然后加入750 μ L交联剂和100mg引发剂,通氮气超声5min使其充分混匀后,密封后置于温度可调控的恒温箱,以转速为300r/min,60 $^{\circ}$ C聚合反应19h后,再调节温度至65 $^{\circ}$ C熟化反应2h,取出锥形瓶冷却至室温,分别用乙醇和去离子水离心超声洗涤反应混合物各三次,得到目标分子印迹聚合物;

第四步是人工抗体的制备:将上述得到的目标分子印迹聚合物用滤纸包裹后放置于洗脱装置中,再将130mL体积比为9:1 (mL:mL)的甲醇与乙酸混合溶液加入上述装置中,反复洗脱印迹分子聚合物,直至用紫外分光光度计检测不到混合溶液中印迹分子,然后再用甲醇洗去过量乙酸,将洗脱印迹分子聚合物放置在60 $^{\circ}$ C的干燥箱中干燥,得到了具有对辣根过氧化物酶标抗原识别的人工抗体,然后通过包被液的包被,利用化学发光剂,实现对酶标抗原的检测。

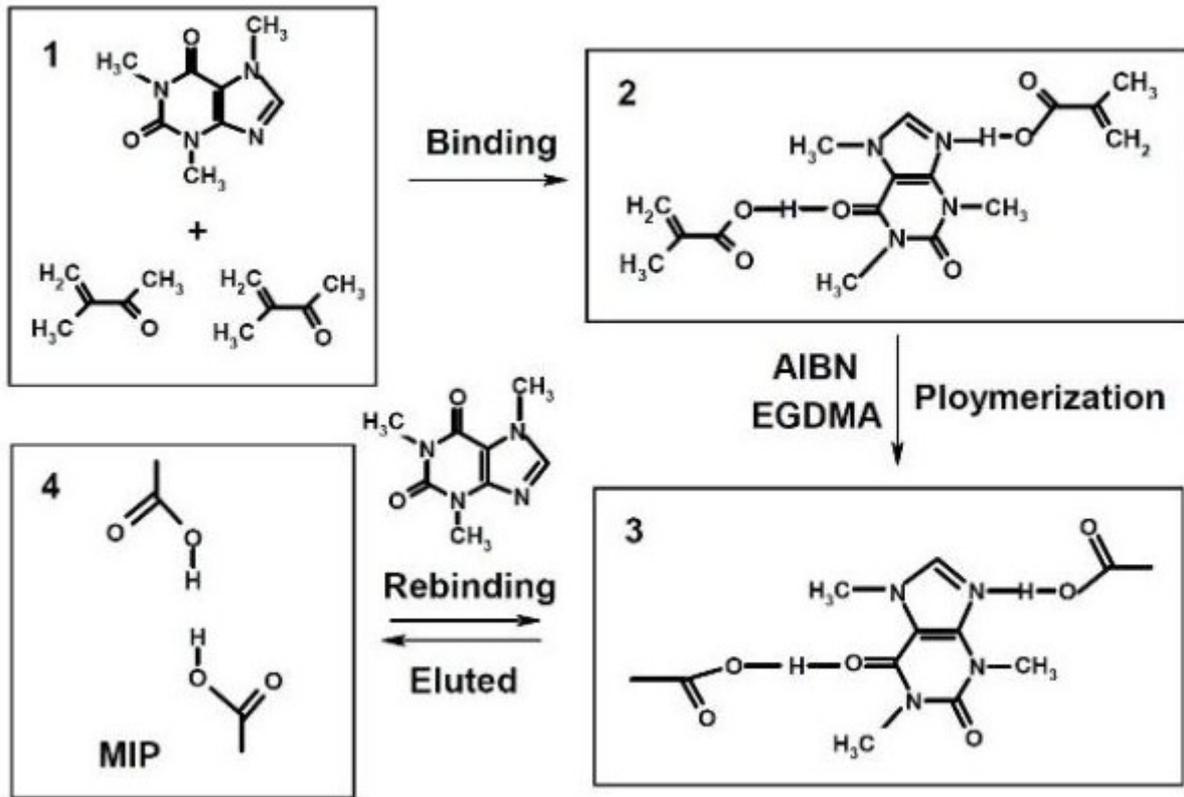


图1

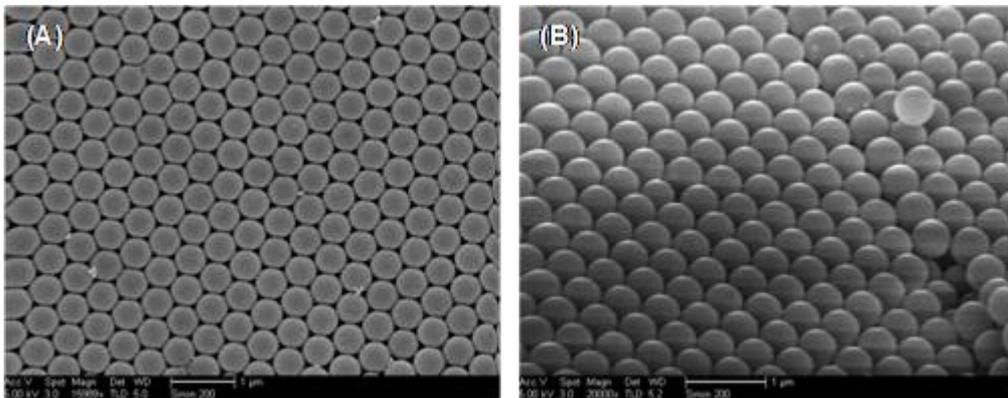


图2

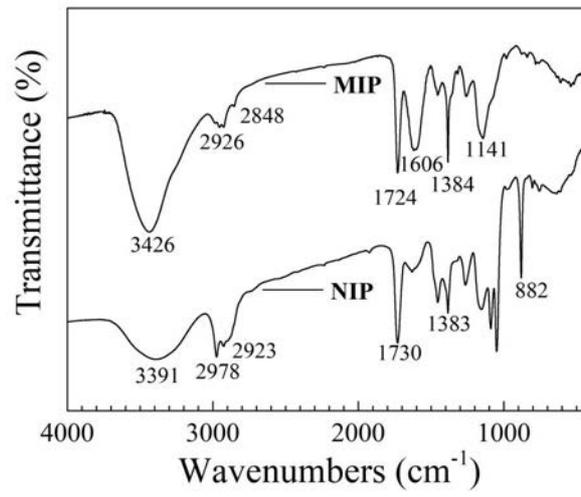


图3

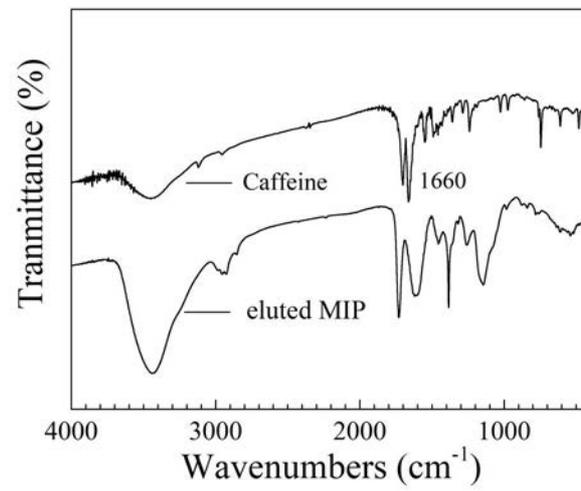


图4

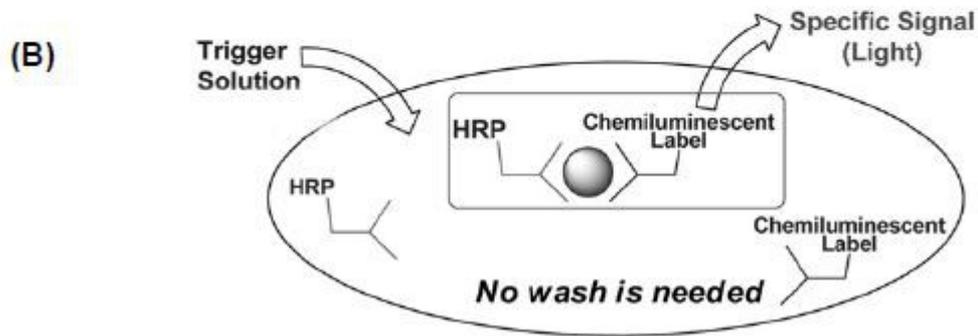
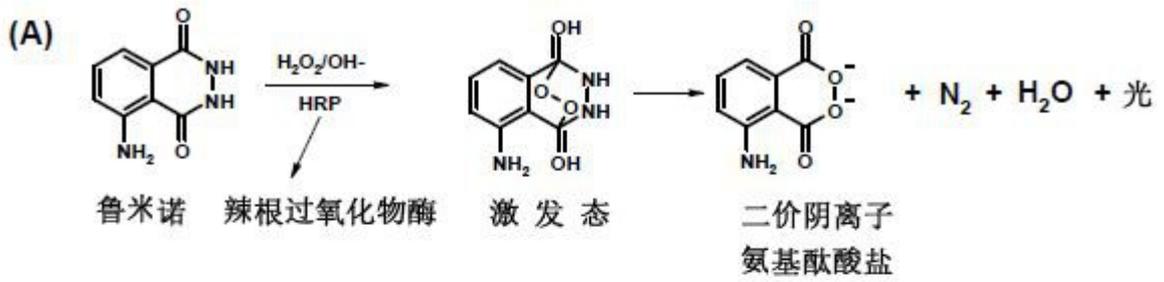


图5

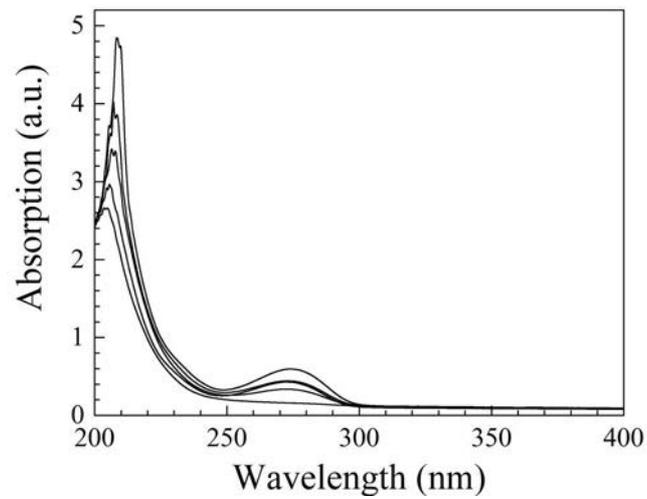


图6

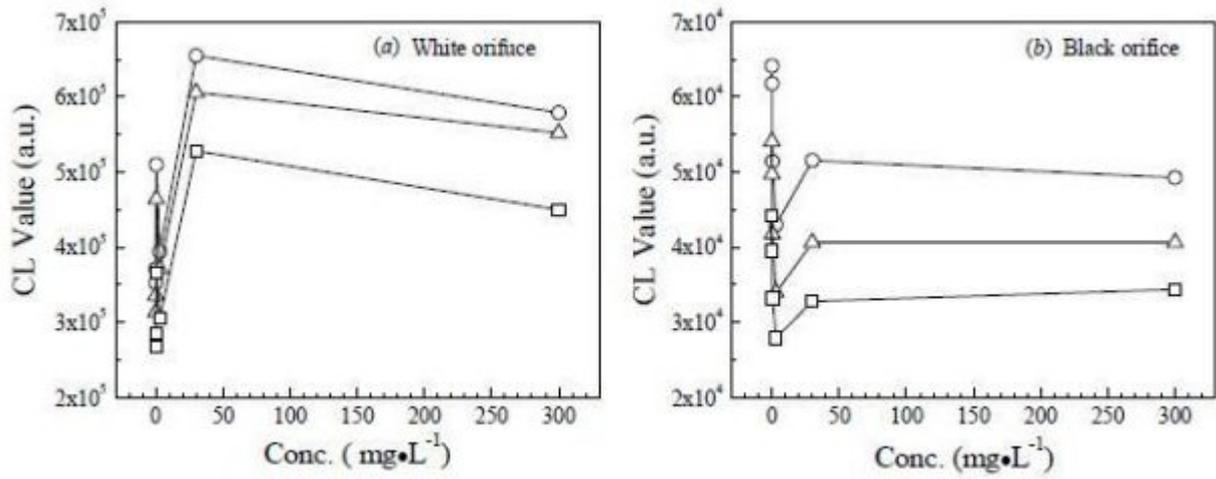


图7

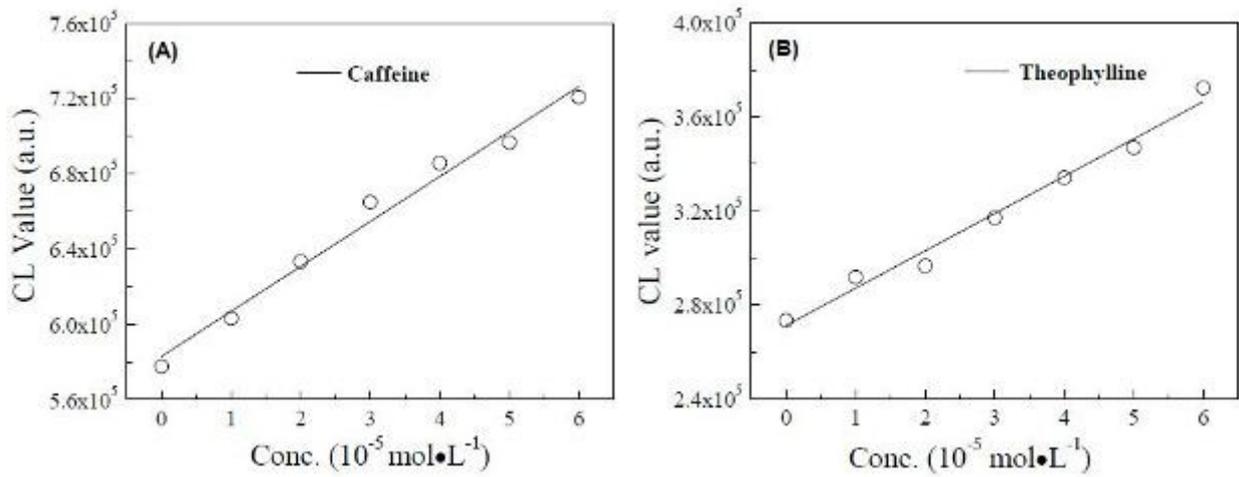


图8

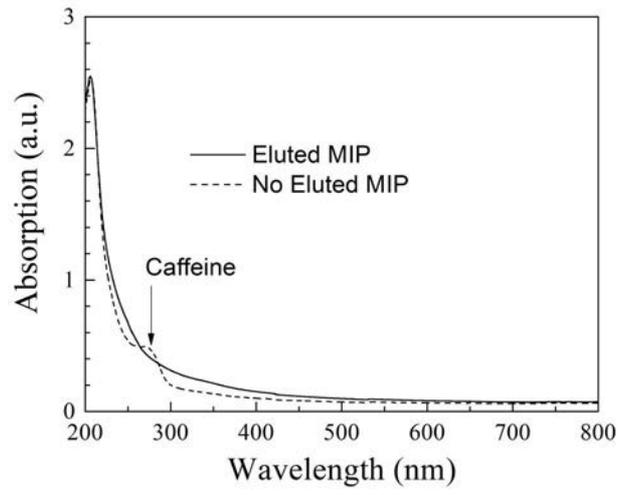


图9

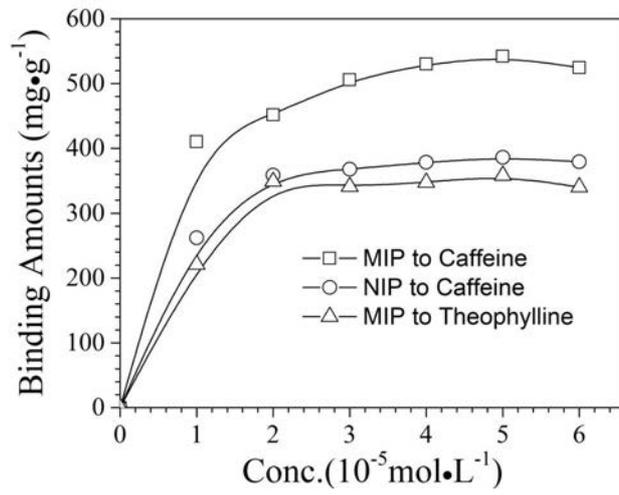


图10

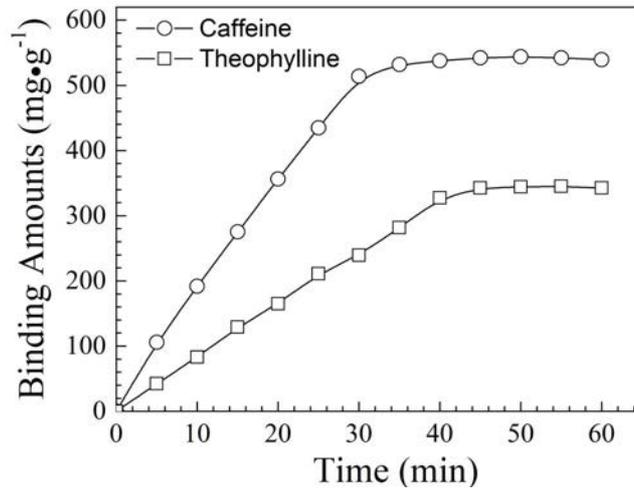


图11

专利名称(译)	一种用于咖啡因检测的人工抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN109828108A	公开(公告)日	2019-05-31
申请号	CN201910200448.0	申请日	2019-03-16
[标]申请(专利权)人(译)	合肥学院		
申请(专利权)人(译)	合肥学院		
当前申请(专利权)人(译)	合肥学院		
[标]发明人	高大明 陈倩云 吴梦瑶		
发明人	高大明 陈倩云 吴梦瑶		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/544		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于咖啡因检测的人工抗体的制备方法，制备的人工抗体洗脱位于印迹球层中的印迹分子，内部形成与印迹分子结构、大小和功能基互补的空穴结构，具有对酶标抗原分子的特异性识别位点，实现对酶标抗原分子选择性识别，利用化学免疫发光法，实现对酶标抗原分子痕量检测，检测限为 $5.2 \times 10^{-11} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。人工抗体制备过程包括四个步骤：首先，将辣根过氧化物酶氧化，其次，辣根过氧化物酶标抗原的制备，配置一定浓度梯度的咖啡因抗原，分别滴加氧化的辣根过氧化物酶，选择发光值最大的作为酶标抗原，再次，用印迹分子、功能单体、交联剂、引发剂，制备出目标分子印迹聚合物，最后，洗脱目标分子得到能够选择性识别咖啡因的人工抗体。

