

张新爱,郑光荣,申建忠,等. 纳米复合材料标记物放大电化学免疫分析乳制品中的大肠杆菌[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):342-344.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.116

纳米复合材料标记物放大电化学免疫分析乳制品中的大肠杆菌

张新爱¹, 郑光荣², 申建忠¹, 韩 恩¹, 董晓娅¹

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013; 2. 山东省建筑设计研究院, 山东济南 250001)

摘要:将检测抗体(dAb)和二茂铁甲酸(FCA)固载于二氧化硅修饰的氧化锌(ZnO@SiO_2)表面制备纳米复合材料标记物($\{\text{dAb-ZnO-FCA}\}$),并将其用于放大电化学免疫分析乳制品中大肠杆菌(*Escherichia coli*)。采用“三明治”免疫分析模式,基于二茂铁甲酸产生的电流信号与大肠杆菌浓度之间的关系实现了对大肠杆菌的检测。结果表明,二茂铁甲酸产生的电流信号与大肠杆菌浓度的对数在 $2.0 \times 10^2 \sim 2.0 \times 10^6$ CFU/mL 范围内保持良好的线性关系,检出限为 100 CFU/mL($S/N=3$)。利用该电化学免疫分析方法对乳制品进行了大肠杆菌的加标回收试验,回收率在 95.8%~105% 之间。

关键词:纳米复合材料标记物;放大电化学免疫分析;乳制品;大肠杆菌

中图分类号: TS207.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0342-02

乳制品含有丰富的营养物质,在生产、加工、运输和储存过程中极易受到致病性细菌的污染,从而会影响人们的生活质量和健康水平^[1]。人类通过乳源性途径引起的食物中毒与乳制品中大肠杆菌(*Escherichia coli*)的数量呈现一定的相关性,因此,大肠杆菌已经成为评价乳制品卫生质量的重要指标,被世界各国乳制品微生物标准列为必检项目^[2]。目前,大肠杆菌常用的检测方法,由于耗时长在一定程度上已经不能满足快速检测的需求。因此,建立乳制品中大肠杆菌的快速、灵敏、准确的检测方法显得尤为重要。

免疫检测技术由于具有选择性好、抗干扰能力强的特点而得到了人们的普遍关注^[3-5]。其中,电化学免疫分析法具有简单快速、选择性好、易于小型化等优点^[6]。实现信号放大从而提高检测灵敏度是制约电化学免疫分析方法快速发展的关键问题^[7]。纳米材料的应用为发展新型灵敏的电化学免疫分析体系打开了一片新天地^[8-9]。纳米复合材料突破了单一组分材料性能的局限,具有体积小、比表面积大等特点,因而被广泛用于制备纳米复合材料标记物进而提高电化学分析技术的灵敏度^[10]。

采用二氧化硅修饰的氧化锌(ZnO@SiO_2)固载检测抗体(dAb)和二茂铁甲酸(FCA)制备纳米复合材料标记物($\{\text{dAb-ZnO-FCA}\}$),并将其用于放大电化学免疫分析乳制品中大肠杆菌。基于大肠杆菌与其抗体之间的特异性相互作用构建“三明治”免疫分析模式,采用示差脉冲伏安法测定结合在电极表面的二茂铁甲酸获得电流信号。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

二茂铁甲酸(FCA)、牛血清白蛋白(BSA)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐(EDC)、N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)购于 Sigma 公司;3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)、正硅酸乙酯(TEOS)由阿拉丁试剂公司(中国上海)提供。半胱氨酸(L-cysteine)购于上海晶纯实业有限公司。试验所用其他试剂均购于上海国药集团化学试剂有限公司。

1.2 $\{\text{dAb-ZnO-FCA}\}$ 的制备

1.2.1 制备氧化锌纳米棒 在搅拌条件下,将 60 mL 氢氧化钠溶液(1.0 mol/L)逐滴加到 100 mL 硝酸锌溶液(0.04 mol/L)中。随着氢氧化钠的加入,有白色沉淀生成,继续滴加,沉淀溶解。室温搅拌 2 h 后,加热至沸腾并回流 1 h。趁热用 0.45 μm 的微孔玻璃漏斗过滤,将所得白色沉淀置于空气中晾干至恒重。

1.2.2 制备二氧化硅修饰的氧化锌纳米棒 将 20 mg 氧化锌纳米棒分散于 20 mL 丙醇和 40 mL 乙醇的混合液中并超声 10 min。在搅拌条件下,依次加入 1.5 mL 氨水溶液(25%)、320 μL TEOS 和 80 μL APTES,室温下反应 8 h。将上述溶液在 8 000 r/min,离心 10 min 制得 ZnO@SiO_2 ,随后用去超纯水清洗该沉淀并将其分散于 20 mL 磷酸缓冲溶液(PBS)中。

1.2.3 制备 $\{\text{dAb-ZnO-FCA}\}$ 取 1.0 mL ZnO@SiO_2 溶液,依次向其中加入 1.0 mL 0.40 mol/L EDC-0.10 mol/L NHS 混合液、4.0 mg/mL 检测抗体(dAb)和 1.0 mL 二茂铁甲酸饱和溶液,在 37 $^\circ\text{C}$ 搅拌 2 h。经离心分离并洗涤后,将制得的 $\{\text{dAb-ZnO-FCA}\}$ 用 PBS 分散并置于冰箱中 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

1.3 免疫传感器的制备

金电极($\Phi=3$ mm)修饰前需进行预处理:首先依次用 0.30、0.05 μm 的 Al_2O_3 粉末在金相砂纸上打磨抛光,再依次

收稿日期:2014-07-14

基金项目:国家自然科学基金(编号:21205051);中国博士后科学基金(编号:2013M541605);江苏大学高级专业人才科研启动基金(编号:11JDG144)。

作者简介:张新爱(1982—),女,博士,讲师,从事食品质量与安全研究。E-mail:zhangxinai@mail.ujs.edu.cn。

用乙醇、水超声清洗,最后置于 0.50 mol/L 硫酸溶液中在 $-0.30 \sim 1.5$ V 电位范围内进行循环伏安扫描,直至得到稳定的循环伏安图。把预处理过的金电极浸入 0.02 mol/L 半胱氨酸的乙酸缓冲溶液(pH 值 5.0)中自组装 6 h。取出电极用水清洗后,置于 0.40 mol/L EDC-0.10 mol/L NHS 的溶液中反应 1 h 用于活化电极末端的羧基,然后用 PBS 清洗电极表面并用氮气吹干。将 10 μ L 捕获抗体(Ab)溶液(1.0 mg/mL)滴涂在金电极表面并在 37 $^{\circ}$ C 下培养 1 h 后,用 PBS 清洗电极以除去未结合的抗体并晾干。在电极表面滴加 1.0% BSA-PBS 溶液并培养 30 min 以封闭活性位点。

2 结果与分析

2.1 免疫测定条件的优化

温度对免疫蛋白分子的活性有一定的影响,本试验研究了在 20 ~ 45 $^{\circ}$ C 范围内对电化学免疫分析方法检测大肠杆菌的影响。响应电流随反应温度的升高而逐渐增大,说明大肠杆菌和其抗体结合的速度随着温度的增加而提高。在 35 $^{\circ}$ C 时,免疫反应最充分,电流响应最大。当温度继续上升,响应电流逐步下降,表明过高的反应温度使少数免疫分子变性或失活,导致修饰电极表面的大肠杆菌和其抗体部分脱落,因此选择 35 $^{\circ}$ C 为最佳免疫反应温度。

抗体与抗原发生免疫反应与时间有关。本研究考察了免疫时间在 20 ~ 70 min 范围内对电化学免疫分析方法检测大肠杆菌的影响。结果表明,响应电流随着免疫反应时间的增加而增强,在 50 min 时,响应电流趋于稳定,因此选择 50 min 为最佳免疫反应时间。

2.2 免疫测定的工作曲线

电化学免疫分析方法用于大肠杆菌检测的原理,首先将捕获抗体固定在半胱氨酸修饰的金电极表面,然后免疫结合大肠杆菌,进而吸附 $\{Ab-ZnO-FCA\}$ 构建“三明治”免疫分析模式,最后用示差脉冲伏安法测定电极表面的二茂铁甲酸获得电流信号。随着待测溶液中大肠杆菌浓度的增大,固定在电极表面的 $\{Ab-ZnO-FCA\}$ 就越多,因此产生的电流信号就越强。

在优化的试验条件下,将该分析方法用于检测不同浓度的大肠杆菌标准溶液。二茂铁甲酸产生的响应电流随着待测大肠杆菌浓度对数的线性关系见图 1。结果表明,二茂铁甲酸产生的响应电流与大肠杆菌浓度的对数在 $2.0 \times 10^2 \sim 2.0 \times 10^6$ CFU/mL 的浓度范围内呈线性关系,线性回归方程为 $I = 1.52 \times \lg C - 0.77$, $r = 0.984$,检出限为 100 CFU/mL ($S/N = 3$)。

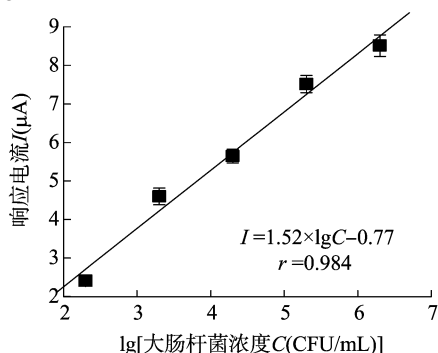


图1 大肠杆菌浓度对数与响应电流的线性关系

2.3 回收率试验

为了进一步研究电化学免疫分析方法的实用性,本研究采用该方法对乳制品进行了大肠杆菌加标回收检测。选择加标浓度分别为 5.0×10^2 、 1.0×10^3 、 1.0×10^4 CFU/mL,测定结果见表 1,该免疫分析方法与平板计数法的相对误差在 $\pm 8\%$ 以内,计算得到其回收率为 95.8% ~ 105.0%,表明该电化学免疫分析方法用于乳制品中大肠杆菌检测具有可靠性好、准确度高优点。

表 1 乳制品加标回收率测定

样品	加标回收量 (CFU/mL)			回收率 (%)
	检出量	加入量	测出量	
酸奶	未检出	5.0×10^2	479	95.8
婴儿奶粉	未检出	1.0×10^3	1 050	105.0
纯奶	未检出	1.0×10^4	9 720	97.2

3 结论

采用 $ZnO@SiO_2$ 作为载体固定检测抗体和二茂铁甲酸制备了金纳米棒标记物,并将其用于电化学免疫分析乳制品中大肠杆菌。 $ZnO@SiO_2$ 具有生物相容性好、比表面积大的优点,能够固载大量二茂铁甲酸,从而放大电流信号提高大肠杆菌检测的灵敏度。将该电化学免疫分析方法应用于乳制品的加标回收试验,结果令人满意。

参考文献:

- [1] Yilma Z, Faye B, Loiseau G. Occurrence and distribution of species of Enterobacteriaceae in selected Ethiopian traditional dairy products: a contribution to epidemiology [J]. Food Control, 2007, 18 (11): 1397 - 1404.
- [2] Martín M C, Martínez N, del Rio B, et al. A novel real-time polymerase chain reaction-based method for the detection and quantification of lactose-fermenting Enterobacteriaceae in the dairy and other food industries [J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93 (3): 860 - 867.
- [3] Rieger M, Cervino C, Saucedo J C, et al. Efficient hybridoma screening technique using capture antibody based microarrays [J]. Analytical Chemistry, 2009, 81 (6): 2373 - 2377.
- [4] 张军瑞, 陈健, 刘仲明. 电化学发光免疫检测技术研究进展 [J]. 分析化学, 2010, 38 (8): 1219 - 1226.
- [5] Wang J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2006, 21 (10): 1887 - 1892.
- [6] Lou Y, He T, Jiang F, et al. A competitive electrochemical immunosensor for the detection of human interleukin-6 based on the electrically heated carbon electrode and silver nanoparticles functionalized labels [J]. Talanta, 2014, 122: 135 - 139.
- [7] 刘慧杰, 滕瑛巧, 张新爱, 等. 基于 $Fe_3O_4@Au$ 复合纳米粒子标记抗体的电化学免疫方法用于水体中大肠杆菌的检测 [J]. 高等学校化学学报, 2010, 31 (6): 1131 - 1136.
- [8] Zhang X A, Teng Y Q, Fu Y, et al. Lectin-based electrochemical biosensor constructed by functionalized carbon nanotubes for the competitive assay of glycan expression on living cancer cells [J]. Chemical Science, 2011, 2 (12): 2353 - 2360.

姜洪芳, 石宝骏, 张峰伦, 等. 高效液相色谱法同时测定凤仙花中的萘醌类和黄酮类成分[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(12): 344–346.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.117

高效液相色谱法同时测定凤仙花中的萘醌类和黄酮类成分

姜洪芳^{1,2}, 石宝骏², 张峰伦², 赵伯涛², 施国新¹, 张卫明^{1,2}

(1. 南京师范大学, 江苏南京 210046; 2. 南京野生植物综合利用研究院, 江苏南京 210042)

摘要:建立反相高效液相色谱, 测定不同花色单瓣凤仙花和多重瓣茶凤仙茎、叶、花中指甲花醌、槲皮素、2-甲氧基-1,4-萘醌、山奈酚含量。采用 Agilent Eclipse XDB-C18 色谱柱, 乙腈-2.5% 乙酸水为流动相, 梯度洗脱进行分离, 检测波长 245 nm。指甲花醌、槲皮素、2-甲氧基-1,4-萘醌、山奈酚在选定浓度范围内线性关系良好, 平均回收率分别为 101.3%、98.93%、101.17%、101.59%, *RSD* 分别为 0.986%、1.96%、2.37%、1.27%, 该方法简单、快速、准确, 可作为凤仙花中萘醌类和黄酮类物质同时测定的方法。

关键词:凤仙花; 萘醌; 黄酮; 高效液相色谱法

中图分类号: O657.7+2

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2014)12-0344-03

凤仙花 (*Impatiens balsamina* L.) 为凤仙花科 (Balsaminaceae) 凤仙花属 (*Impatiens*) 一年生草本植物。凤仙花属共有植物 900 余种, 全球均有分布。凤仙花作为观赏植物在国内外均有种植, 也是该属植物的常见品种, 其花、茎、叶、种子在民间有悠久的药用历史, 被广泛用于治疗腰腿痛、蛇咬伤、鹅掌风、风湿性关节炎、痈疽疮疖、胎衣不下、溃疡日久不愈和经闭腹痛等, 2010 年版《中国药典》记载其种子急性子作为药用部位。凤仙花的化学成分主要有黄酮、萘醌、香豆素、有机酸、花青素和甾醇类, 其中黄酮和萘醌有很强的抗炎、抗菌、抗过敏和抑制 Wnt 信号通道等活性; 据报道指甲花醌和 2-甲氧基-1,4-萘醌是该植物抗细菌和抗真菌的活性成分, 2-甲氧基-1,4-萘醌具有很强的对抗 HepG2 细胞的抗肿瘤活性^[1-3]。国内外已有文献报道, 用高效液相色谱法 (HPLC) 分别定量测定凤仙花中的黄酮和萘醌类成分^[4-7], 但对于 2 类成分含量的同时测定还未见报道, 本研究应用 HPLC 对常见品种单瓣凤仙花和多重瓣茶凤仙在 7 月盛开期的茎、叶、花中指甲花醌、2-甲氧基-1,4-萘醌、槲皮素、山奈酚进行了测定, 为该属植物的开发应用提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料

高效液相色谱仪 Agilent 1200 HPLC (美国安捷伦公司生产), G1354A 四元泵, G1313A 自动脱气机, G1316 柱温箱,

收稿日期: 2014-07-18

基金项目: 国家科技支撑计划 (编号: 2012BAD36B01)。

作者简介: 姜洪芳 (1974—), 女, 博士研究生, 副研究员, 从事天然产物活性物质应用与开发。E-mail: jhf74@163.com。

通信作者: 张卫明, 研究员, 从事植物活性物质的应用与开发。E-mail: botanyzh@163.com。

G1315B 二极管阵列检测器。KQ-600DE 型超声波清洗器, 江苏省昆山市超声仪器有限公司生产; 高效液相色谱 (HPLC) 分析用甲醇、乙腈为色谱纯 (美国天地); 试验用水为超纯水, 提取用试剂均为分析纯。

对照品包括指甲花醌、2-甲氧基-1,4-萘醌、槲皮素、山奈酚, 均购于中国食品药品检定研究院, 纯度大于 98%。单瓣凤仙花及多重瓣茶凤仙的茎、叶、花均于 2012 年 7 月采自南京, 经南京野生植物研究院张玖教授鉴定为凤仙花 (*Impatiens balsamina* L.)。

1.2 HPLC 分析条件

Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 分离柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-2.5% 醋酸水, 梯度洗脱条件: 0~10 min, 25:75; 10~20 min, 32:68; 20~35 min, 25:75, 流速 1.0 mL/min, 进样量 20 μL, 柱温为 25 °C, DAD 检测器, 检测波长 245、250、280、360 nm。

1.3 对照品溶液的制备

分别称取指甲花醌、2-甲氧基-1,4-萘醌、槲皮素、山奈酚对照品 10 mg, 精确称定, 甲醇溶解并定容, 稀释成浓度为 50、40、25、12.5、10、6.25、3.12 μg/mL 的溶液, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 供 HPLC 测定, 并绘制每种物质的标准曲线。

1.4 供试品溶液的制备

称取样品粉末 (50 °C 烘干 12 h, 磨碎过 40 目筛) 5.0 g, 精确称定, 加入 55% 乙醇水溶液 80 mL, 室温浸泡 2 h, 超声提取 1 h, 定容至 100 mL, 滤液经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 供 HPLC 测定。

2 结果与分析

2.1 标准品与样品的 HPLC 测定

在“1.2”节色谱条件下, 样品中指甲花醌、槲皮素、2-甲

[9] Du D, Wang L M, Shao Y Y, et al. Functionalized graphene oxide as a nanocarrier in a multienzyme labeling amplification strategy for ultrasensitive electrochemical immunoassay of phosphorylated p53 (S392) [J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(3): 746–752.

[10] Teng Y Q, Zhang X A, Fu Y, et al. Optimized ferrocene-functionalized ZnO nanorods for signal amplification in electrochemical immunoassay of *Escherichia coli* [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26(12): 4661–4666.