



分类号 S857.26

学 号 2018107070

南京农业大学

硕士学位论文

牛奶淀粉样蛋白 A 的原核表达、单抗制备及其电化学传
感器检测方法的建立

张 正 荣

指导教师 薛峰 教授

学科门类 农学

一级学科 兽医学

二级学科 预防兽医学

研究方向 病原快速检测

答辩日期 二〇二一年五月

**Prokaryotic Expression of Milk Serum Amyloid A, Preparation
of Monoclonal Antibody And Establishment Of Electrochemical
Sensor Detection Method**

By

ZHANG ZHENGRONG

A Thesis

Presented to Nanjing Agricultural University

in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Agronomy

In

Preventive Veterinary Medicine

Supervised by

Professor XUE FENG

Nanjing Agricultural University

Nanjing, China

May 2021

本研究由国家重点研发计划项目（2017YFF0208600）资
助

**This study is supported by the China National Key R&D
Program Project (No. 2017YFF0208600)**

目 录

第一章 文献综述	1
1 奶牛乳房炎概述.....	1
1.1 临床型乳腺炎.....	1
1.2 隐性乳腺炎.....	1
2 奶牛乳腺炎诊断方法概述.....	2
2.1 牛侧诊断.....	2
2.2 实验室诊断.....	3
3 血清淀粉样蛋白 A(SAA).....	6
3.1 血清淀粉样蛋白 A(SAA)概述.....	6
3.2 牛奶中血清淀粉样蛋白 A(MAA).....	7
4 分子印迹电化学传感器.....	7
4.1 分子印迹技术.....	7
4.2 分子印迹电化学传感器研究进展.....	10
参考文献.....	15
本研究目的与意义	25
第二章 牛奶淀粉样蛋白 A 的可溶性表达及单克隆抗体的制备	27
1 实验材料.....	28
1.1 细胞、菌株及质粒.....	28
1.2 主要试剂与设备.....	28
2 实验方法.....	29
2.1 培养基及溶液配制.....	29
2.2 重组表达质粒的构建.....	31
2.3 重组表达菌株的制备及诱导.....	34
2.4 表达条件优化.....	34
2.5 MAA 的大量表达及纯化	36
2.6 抗 MAA 单克隆抗体的制备与纯化	37
3 结果及分析.....	40
3.1 重组表达质粒的构建.....	40
3.2 SUMO-MAA 融合蛋白的表达.....	40
3.3 SUMO-MAA 表达条件优化.....	41
3.4 MAA 蛋白纯化	44
3.5 制备及纯化单克隆抗体.....	45
4 讨论.....	48
5 本章小结.....	49

参考文献.....	51
第三章 检测 MAA 蛋白的分子印迹电化学传感器的制备及初步应用.....	55
1 实验材料及方法.....	57
1.1 主要试剂及设备.....	57
1.2 AuNPs@rGO 复合材料的制备.....	58
1.3 MIP/AuNPs @rGO/GCE 的制备.....	59
1.4 MAA 传感器的条件优化.....	60
1.5 MAA 传感器的主要性能评估.....	61
1.6 实际样品应用评估.....	62
2 结果及分析.....	62
2.1 纳米材料的 TEM 和 UV-vis 表征.....	62
2.2 电极修饰过程的 SEM 表征.....	63
2.3 制备 MIP/Au NPs@r GO/GCE 过程的电化学行为.....	64
2.4 传感器条件的优化结果.....	66
2.5 传感器的性能评估结果.....	68
3 讨论.....	71
4 本章小结.....	72
参考文献.....	73
全文总结.....	77

牛奶血清淀粉样蛋白 A 的原核表达、单抗制备及其电化学传感器检测方法的建立

摘 要

奶牛乳腺炎是影响奶牛健康和乳业发展的最主要疾病之一，诱因复杂，可能是细菌、病毒、支原体、不良管理方式等原因导致的。主要类型有临床型和亚临床型两种，临床型乳腺炎可通过眼观、触诊等直观方法判断，而亚临床乳腺炎往往无法及时诊断而引起乳腺炎爆发，造成巨大损失，因此，建立一种能够对亚临床乳腺炎早期诊断的方法尤为关键。

牛奶中血清淀粉样蛋白 A (Milk amyloid A, MAA) 已被多项研究证实可以作为奶牛乳腺炎的标志物，并且在亚临床乳腺炎阶段 MAA 在奶牛中的浓度变急剧上升，不同于酶、电导率以及 pH 等其他乳腺炎标志物，MAA 受环境和季节以及奶牛健康状况影响较小，可直观的作为诊断奶牛乳腺炎的标准，且其在牛奶中的浓度与 SCC 和 CMT 呈正相关，研究建立检测 MAA 的方法，对奶牛乳腺炎尤其是亚临床乳腺炎的检测诊断具有重要意义。

分子印迹作为一种“人工抗体”技术，既具备天然抗体的特异性，又较之更加价廉、简便、灵敏。分子印迹电化学传感器 (MIECS) 将人工抗体技术与方便快捷的电化学技术联合使用，再有纳米粒子的修饰使之检测性能更优。本研究中，可溶性 MAA 的成功表达主要是通过合成 MAA 基因、构建质粒并转化、诱导表达、最后经过一系列纯化步骤获得。将获得的 MMA 一部分用于免疫小鼠制备单克隆抗体，为开发相关的免疫学检测方法做准备，另一部分用于构建分子印迹电化学传感器用于检测牛奶中的 MAA。

1. 牛奶淀粉样蛋白 A 的可溶性表达及单克隆抗体的制备

利用大肠杆菌原核表达系统对 MAA 进行表达，选择促溶表达载体 pET28a-SUMO，根据 GenBank 上查询的 MAA 序列合成目的基因 (396bp)，将 MAA 基因经同源重组法导入载体，将重组后的质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) pLySs 感受态。分别优化表达温度 16℃、28℃、37℃，选择 3、5、7、10、12h 这几个表达时间，分别为 0.3、0.5、0.7、1.0、2.0mmol/L 的诱导剂浓度，最佳表达条件下大量表达，用镍柱和蛋白纯化仪纯化目的蛋白。并得出以下结果，SUMO-MAA 蛋白在 16℃、0.5mmol/L IPTG 浓度下表达 7 小时可获得最佳上清表达量，成功纯化重组蛋白，大小为 35kDa。使用特

异性识别 SUMO 标签的 SUMO 酶切断 SUMO-MAA, 再次纯化得到 MAA 完全蛋白, 将 MAA 蛋白免疫 BALB/c 雌鼠筛选分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 制备腹水并纯化获得单克隆抗体, 测其效价和特异性。结果表明, 筛选到两株抗体 3E11 和 8G10, 抗体效价分别为 1:51200 和 1:102400。综上, 本研究成功表达了可溶性 MAA 蛋白及其两株单克隆抗体。

2. 检测 MAA 蛋白的分子印迹电化学传感器的制备及初步应用

成功的构建了一种性能优越的用于检测 MAA 的分子印迹电化学传感器。首先制备了用于修饰电极的 AuNPs@rGO 纳米复合材料, 采用柠檬酸三钠法制备 AuNPs, 然后利用 chit 修饰 rGO, 超声法将 AuNPs 负载到 rGO 上然后滴加法修饰到 GCE 电极, 模板分子即 MAA 蛋白, 吡咯为功能单体, 电聚合方式形成分子印迹聚合物, 以含 10% SDS 的 10% 乙酸 (V/V) 为洗脱液洗脱模板蛋白制成分子印迹电化学传感器。优化了聚合条件包括 AuNPs@rGO、聚合圈数、吡咯浓度、聚合速率、洗脱时间以及吸附时间, 由此制备了针对 MAA 检测的传感器。结果显示: 该分子印迹电化学传感器在 0.01 至 200 ng/mL 的 MAA 浓度范围内表现出两个良好的线性关系。检测下限约为 5 pg/mL ($S/N = 3$)。其他参数包括选择性, 重现性 (RSD 3.2%) 和回收率 (96.1-103%) 均较为优异, 在模拟实际样品检测中表现出和 ELISA 法相当精确度而检测效率更高。与传统方法相比, 本研究所建立的传感器法可以更快更灵敏地检测奶牛乳腺炎尤其是亚临床乳腺炎。

关键词: 奶牛乳腺炎; MAA; 原核表达; 分子印迹传感器; 电化学检测

PROKARYOTIC EXPRESSION OF MILK SERUM AMYLOID A, PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODY AND ESTABLISHMENT OF ELECTROCHEMICAL SENSOR DETECTION METHOD

ABSTRACT

Dairy cow mastitis is one of the most important diseases that affect the health of dairy cows and the development of the dairy industry. The causes are complex, which may be caused by bacteria, viruses, mycoplasma, and poor management methods. The main types are clinical and subclinical. Clinical mastitis can be judged by intuitive methods such as eye observation and palpation. Subclinical mastitis often fails to be diagnosed in time and causes mastitis outbreaks, causing huge losses. Therefore, the establishment a method for early diagnosis of subclinical mastitis is particularly critical.

Serum amyloid A (MAA) in milk has been confirmed by multiple studies as a marker of mastitis in dairy cows, and the concentration of MAA in dairy cows increases sharply during the subclinical mastitis stage. Unlike other mastitis markers such as enzymes, conductivity, and pH, MAA is less affected by the environment, seasons, and cow health. It can be intuitively used as a standard for diagnosing mastitis in dairy cows, and its concentration in milk is positively correlated with SCC and CMT. Researching and establishing a method for detecting MAA is of great significance for the detection and diagnosis of dairy cow mastitis, especially subclinical mastitis.

As a kind of "artificial antibody" technology, molecular imprinting not only has the specificity of natural antibodies, but also is cheaper, simpler and more sensitive. The molecularly imprinted electrochemical sensor (MIECS) combines artificial antibody technology with convenient electrochemical technology, and the modification of nanoparticles makes its detection performance better. In this study, the successful expression of soluble MAA was mainly obtained by synthesizing MAA gene, constructing plasmid and transforming, inducing expression, and finally through a series of purification steps. Part of the obtained MMA was used to immunize mice to prepare monoclonal antibodies to prepare for the development of related immunological detection methods, and

the other part is used to construct molecular imprinting electrochemical sensors for detecting MAA in milk.

1. Soluble Expression of Milk Amyloid A and Preparation of Monoclonal Antibody

The *E. coli* prokaryotic expression system was used to express MAA. The selected solubilizing expression vector is pET28a-SUMO, and the target gene (396bp) is synthesized according to the MAA sequence searched on GenBank. The MAA gene was introduced into the vector by homologous recombination, and the recombined plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) pLySs competent. The expression temperature was optimized at 16°C, 28°C, 37°C, and the expression time of 3, 5, 7, 10, 12h was selected, and the inducer concentration was 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 2.0mmol/L, respectively. Large-scale expression under optimal expression conditions, and purification of the target protein with a nickel column and a protein purifier. The following results were obtained. The SUMO-MAA protein was expressed at 16 °C and 0.5mmol/L IPTG for 7 hours to obtain the best supernatant expression. The recombinant protein was successfully purified with a size of 35kDa. The SUMO-MAA is cut by the SUMO enzyme that specifically recognizes the SUMO tag, and then purified again to obtain the complete MAA protein. The MAA protein immunized BALB/c female mice were screened to secrete the hybridoma cell lines of the monoclonal antibody, the ascites fluid was prepared and purified to obtain the monoclonal antibody, and its titer and specificity were measured. The results showed that two strains of antibodies 3E11 and 8G10 were screened, and the antibody titers were 1:51200 and 1:102400, respectively. In summary, this study successfully expressed the soluble MAA protein and its two monoclonal antibodies.

2. Preparation and preliminary application of a molecularly imprinted electrochemical sensor for the detection of MAA

Successfully constructed a molecularly imprinted electrochemical sensor with superior performance for detecting MAA. First, the AuNPs@rGO nanocomposite materials used to modify the electrode were prepared: AuNPs were prepared by the trisodium citrate method, then rGO was modified by chit, and the AuNPs were loaded on the rGO by ultrasound. Then, the material was modified to the GCE electrode by the dropping method. Using MAA as the template molecule and pyrrole as the functional monomer, a molecularly imprinted polymer is formed by electropolymerization. The template protein was eluted with 10% acetic acid (V/V) containing 10% SDS as the eluent to make a molecularly imprinted electrochemical sensor. The polymerization conditions including AuNPs@rGO,

number of polymerization cycles, pyrrole concentration, polymerization rate, elution time and adsorption time were optimized to prepare a sensor for MAA detection. The results showed that the molecularly imprinted electrochemical sensor showed two good linear relationships in the MAA concentration range of 0.01 to 200 ng/mL. The lower limit of detection is about 5 pg/mL ($S/N = 3$). Other parameters include selectivity, reproducibility (RSD 3.2%) and recovery rate (96.1-103%) are all excellent. In the simulation of the actual sample detection, the accuracy is equivalent to that of the ELISA method, but the detection efficiency is higher. Compared with traditional methods, the sensor method established in this research can detect dairy cow mastitis more quickly and sensitively, especially subclinical mastitis.

KEY WORDS: dairy cow mastitis; MAA; prokaryotic expression; molecularly imprinted sensor; electrochemical detection

符号及缩略语说明

符号	外文全称或说明	中文名称或说明
AuNPs	Gold nanoparticles	纳米金颗粒
bp	Base pair	碱基对
BTB	Bromothymol blue detection method	溴麝香草酚蓝检测法
BMT	Rapid Diagnosis Technology of Bovine Subclinical Mastitis	奶牛隐性乳腺炎快速诊断技术
Cmp	Chloramphenicol	氯霉素
chit	Chitosan	壳聚糖
CMT	California mastitis test	加州乳房炎实验
CRP	C reactive protein	C 反应蛋白
CV	Cyclic voltammetry	循环伏安法
DPV	Differential pulse voltammetry	差分脉冲伏安法
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附技术
h	Hour	小时
HP	Haptoglobin	触珠蛋白
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
ICA	Immunochromatography	免疫层析技术
Kan	Kanamycin	卡那霉素
LDH	Lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
mL	Milliliter	毫升
mmol/L	Millimoles per liter	毫摩尔每升
MIECS	Molecularly imprinted electrochemical sensor	分子印迹电化学传感器
ng / mL	Nanogram per milliliter	纳克每毫升
AMC	American mastitis council	美国乳腺炎委员会
OD _{600nm}	600nm UV absorbance	600nm 紫外吸光度
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
pH	Hydrogen ion concentration	氢离子浓度指数
pg / mL	Picogram per milliliter	皮克每毫升

PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
rGO	Reduced graphene oxide	还原氧化石墨烯
RSD	Relative standard deviation	相对标准偏差
SAA	Serum amyloid A	血清淀粉样蛋白 A
SCC	Somatic cell counts	体细胞计数
SUMO	Ubiquitin-like protein modified molecule	类泛素蛋白修饰分子
SEM	Scanning electron microscope	扫描电子显微镜
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
S/N	Signal-to-noise ratio	信噪比
TEM	Transmission electron microscope	透射电子显微镜
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
WB	Western Blot	蛋白质印迹法
V/V	Volume ratio	体积比

第一章 文献综述

1 奶牛乳房炎概述

奶牛乳腺炎（Bovine mastitis）又叫做奶牛乳房炎，是严重危害奶牛健康的主要疾病之一，能够引起奶牛产奶量严重下降、农场治疗费用激增，严重情况下甚至导致奶牛被淘汰，造成奶牛养殖业以及乳制品产业巨大的经济损失^[1]。美国乳腺炎委员会根据乳腺奶样变化和炎症的严重程度将奶牛乳腺炎分为临床型乳腺炎和亚临床型（隐性）乳腺炎^[2]。

1.1 临床型乳腺炎

临床型乳腺炎通常会使得患病奶牛伴有明显的临床症状例如乳房红、肿、热、胀等。患临床型乳腺炎奶牛的乳汁中可见絮状、奶块样物质、乳汁变得略清澈甚至出现水样状乳汁，乳汁颜色、气味、性状均呈现异常^[3]。患病的奶牛常见减少甚至停止进食症状，泌乳量严重减少严重病牛甚至失去泌乳能力^[4]，^[5]。临床型乳腺炎根据其严重程度和发病时间又可分为最急性、急性、亚急性和慢性乳腺炎几种类型^[6, 7]。

患最急性乳腺炎奶牛发病突然迅速且病情严重，且牛只乳房多出现炎症热痛反应，泌乳量急剧减少甚至停止，食欲不振，精神萎靡。最急性乳腺炎通常是由于病原微生物急性感染牛只乳腺组织所致，乳腺遭遇感染后产生大量内毒素并且不断沉积聚集引发奶牛急性败血症或脓毒血症等，严重者甚至会突然死亡^[8]。患急性乳腺炎奶牛较最急性乳腺炎稍见缓和，全身临床症状较轻，但乳汁变化明显，可见凝乳块和絮状物。患亚急性乳腺炎的牛炎症包括全身性的症状不是很明显，但会在其乳汁中发现类似絮状或片状物，牛奶中体细胞数升高，其他理化性质也发生改变。慢性乳腺炎通常是由急性乳腺炎、亚急性乳腺炎由持续数月或数年的感染转化而来，长时间不加以治疗可能会导致奶牛乳房硬化、萎缩^[9]。

1.2 隐性乳腺炎

隐性乳腺炎即亚临床乳腺炎是一种十分常见且较多发病的疾病，由于不具有肉眼可见的临床症状因而不易被及时发现和治疗^[10]。据统计，隐性乳腺炎发病率占奶牛乳腺炎总发病率达 77%~79%，由此带来的负面影响如产奶成本增加、牛奶品质下降、治疗费用增加及牛场收入下降等也日益严重^[2, 11]。

隐性乳腺炎通常通过诸如加利福尼亚乳腺炎测试（CMT）的牛侧检查、牛奶中体

细胞数（SCC）、PH 值、电导率的实验室分析或乳汁病原微生物检测法来诊断^[12, 13]。其中牛奶中 SCC 也是诊断乳腺炎的标准之一，当其数值超过 50 万/mL 时便视为患有隐性乳腺炎，SCC 值越高，表明乳腺炎程度越重^[14, 15]。诊断隐性乳腺炎最大的难题在于缺乏临床症状而容易被忽视，需要借助特殊的检测手段，因而近年来隐性乳腺炎给奶牛场带来的危害逐年增加，隐性乳腺炎的诊断的治疗也逐渐成为奶牛乳腺炎研究的热点。

2 奶牛乳腺炎诊断方法概述

奶牛乳腺炎疾病一直是困扰世界奶牛养殖产业和乳制品产业的主要问题，发病原因主要是奶牛乳房遭受病原感染，感染严重程度不同全身症状呈可见及不可见状态，据此可将其分为临床及亚临床型乳腺炎。病情严重程度可根据致病体的性质、受感染牛只的年龄、品种、健康状态以及泌乳水平等进行判断^[16]。患临床型乳腺炎的奶牛因具有明显的临床症状，例如乳房肿痛、硬块化、局部发热以及泌乳功能减退、乳汁质量降低或出现水样乳等，判断方法有简单的观察、触碰等，在诊断上较为直观容易，但进一步判断侵入病原体还需进行实验室病原微生物的分离和鉴定。隐性乳腺炎因缺乏可视性的临床症状而无法进行直接诊断，通常要借助实验室的一系列检测手段方可判断，因而在检测隐性乳腺炎的工作上也更加有难度。

2.1 牛侧诊断

2.1.1 临床检测法

临床检测法即通过肉眼观察或者用手触摸牛只判断其发病情况，在这种检测中可见病牛出现饮食不佳、神志不清、身体发热等情况，乳房区域肿胀发热，触碰患部有硬化部分且会引发奶牛因痛躲闪。并且，还可以明显观察到乳汁变异症状比如乳汁颜色、味道、表征的异常，且检查泌乳量可发现明显减少。该方法优点在于直观快速，但仅限制于已发病且症状明显的奶牛，对于隐性及慢性乳腺炎基本不能达到诊断效果，且只能做出初步判断^[17]。

2.1.2 牛奶中体细胞数（SCC）检测法

体细胞计数法（SCC）是目前较为常用的检测奶牛乳腺炎的方法之一，也是目前非常常用的牛侧诊断方法之一，体细胞数通常指的是每毫升牛奶中含有的体细胞总数，一般认为 SCC 在 2-20 万/mL 为正常奶牛，根据检测出的 SCC 数值能够了解乳腺炎的严重程度，SCC 值越高表明乳腺炎症越严重^[18]，国际上将 SCC 值 50 万/mL 作为奶牛

乳腺炎的判定指标^[19, 20]。体细胞计数法又可分为直接计数法和间接计数法，直接计数法包括直接显微镜计数法、白细胞分类计数法、体细胞计数仪自动计数法等^[21]。间接计数法的原理是裂解细胞释放出 DNA 与化学试剂形成凝胶或者沉淀，乳腺炎越严重，乳汁形成的凝胶或者沉淀的量则越多，由此间接推算出乳汁 SCC 值^[22]。间接计数法中最为常用和权威的便是加州乳腺炎检测法（CMT），CMT 法能够很好的诊断早期乳腺炎从而能够及时治疗，CMT 法应用广泛，我国根据 CMT 法衍生出了譬如中国农科院兰州兽医研究所 LMT 检测法、北京奶牛研究所 BMT 诊断法等检测方法。体细胞计数法操作简单快速，是牛旁诊断奶牛乳腺炎的有效手段，但是全自动计数仪昂贵、CMT 法主观因素影响、灵敏度低、缺乏精确性等缺点也显而易见，且奶牛体细胞数还随牛只健康状况、养殖场管理状况、气候状况等波动，只能用于早期诊断，无法实现精准判断。

2.2 实验室诊断

2.2.1 病原微生物培养鉴定法

病原微生物培养鉴定法是通过鉴别乳汁中的病原微生物鉴定引发奶牛乳腺炎的病原体，是奶牛乳腺炎病原体鉴定的“金标准”^[23]，具体操作流程包括处理奶样、增菌培养、分离培养、革兰氏染色观察以及药敏实验等，细菌、真菌、支原体、病毒等都有可能引发奶牛乳腺炎，致病因素复杂。微生物培养鉴定法是较为直观且具有说服力的奶牛乳腺炎诊断手法，从患病乳汁中分离的致病微生物能够为后续治疗提供有力依据。但是生化分析工作量大、耗时长、成本高、仪器专业复杂、人员要求高及检测结果敏感性低、受抗生素干扰等等弊端都限制的该方法的广泛使用，在规模大的奶牛场，诊断时间过长便会导致错过最佳治疗时期，造成巨大损失。

2.2.2 乳汁 PH 检测法

患乳腺炎奶牛的乳汁 PH 值较正常奶牛的 PH 值（6.4-6.7）高，乳腺炎严重程度与乳汁碱性值呈正相关。因此可通过检测乳汁 PH 值来判断奶牛是否患有乳腺炎^[24]。溴麝香草酚蓝检测法（BTB）便是检测乳汁 PH 值碱性的方法之一，国内外多种检测奶牛乳腺炎的 PH 试纸已得到奶牛场的广泛使用^[25]。检测乳汁 PH 的方法比较简单且花费低廉，但是牛只之间个体差异、其他疾病影响等也有可能引起乳汁 PH 值变化，因此 PH 检测法必须与其他检测方法结合诊断才具有较高的可信度。

2.2.3 乳汁电导率检测法

乳汁电导率检测法也是诊断奶牛乳腺炎的参考方法之一^[26]，其原理是：当奶牛乳

房产生炎症时,乳房血乳屏障被破坏,乳汁渗透压降低,从而导致血液中的 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 等离子进入乳汁,乳汁电导率因此升高,乳汁电导率可以在牛旁检测,也可以在奶牛场养殖系统中安装电导率检测仪实时监测^[27, 28]。电导率检测判断乳腺炎的方法虽然成熟方便,但是在实际应用中电导率随奶牛年龄、泌乳期以及喂养方式等波动较大,并且引发电导率升高的疾病也并非乳腺炎一种,因此借助电导率检测来临床诊断乳腺炎存在一定困难,具体结论还得借助其他手段进一步分析^[29]。如果牛场基于大数据分析,建立电导率随不同因素变化的模型,可以大大提高通过电导率监测奶牛健康的应用。

2.2.4 乳酶检测法

乳汁中含有多种乳酶,乳酸脱氢酶(LDH)、过氧化氢酶(Catalase)、N-乙酰基 β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)、碱性磷酸酶(ALP)等指标在乳房发生炎症时在乳汁中的浓度与 SCC 呈正相关^[30, 31]。乳酸脱氢酶(LDH)主要存在于乳汁中的白细胞和受损的上皮细胞,当奶牛患乳腺炎产生炎症反应时,乳汁内白细胞和受损上皮细胞自然增多,从而 LDH 也会相应增多^[32],根据这一原理,针对 LDH 的测定以此诊断乳腺炎的技术应运而生^[33]。

2.2.5 急性期蛋白检测

急性反应期蛋白(Acute phase protein, APP)是在压力、外伤、感染或炎症等刺激激发动物机体产生早期蛋白^[34, 35]。常见的 APP 有血清淀粉样蛋白 A(SAA)、触珠蛋白(HP)、C 反应蛋白(CRP)、铜蓝蛋白,在奶牛中,最主要的 APP 是 SAA 和 HP^[36]。目前研究表明 SAA 和 HP 都可作为诊断奶牛乳腺炎的标志物^[37, 38],且检测 HP 方法已在农场得以实施,提高了乳腺炎的诊断效率^[39, 40]。

2.2.6 分子生物学检测法

近年来分子生物学得快速发展也为奶牛场奶牛乳腺炎的检测带来了新的方法,随着众多微生物的全基因组序列越来越容易获得,并且分子生物学方法具有高度敏感性和特异性,各项基于 DNA 的实验也得以在奶牛场以及实验室开展^[41, 42]。目前用于诊断奶牛乳腺炎方面的分子生物学技术主要有 PCR、多重 PCR、实时荧光定量 PCR、巢氏 PCR、微阵列以及环介导等温扩增技术^[43]。但通常分子生物学检测方法要求专业的人员和较高的成本,因此更适用于商业化的实验室。

聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)是由美国科学家 Kary Mullis 等于 1983 年发明。PCR 是利用特异性序列的寡核苷酸引物在聚合酶的作用下对特异

性 DNA 序列进行体外扩增的方法^[44]，基于天然 DNA 复制原理，主要步骤有：变性、退火、延伸^[45]。PCR 技术在检测病原微生物领域得到了广泛应用，PCR 在检测病原体方面快速精准，相比于传统方法更加便捷灵敏^[46]。引物的设计是实现 PCR 反应特异性的关键，引物设计不当极易导致假阳性结果，并且 DNA 的残留或者污染同样可能导致假阳性，样品 DNA 提取不当则有可能产生假阴性结果。同时，引物的单一针对性特征也限定了 PCR 方法的广泛使用^[47]。在此基础上延伸除了巢式 PCR，即设计两对引物，PCR 的特异性和灵敏性经双轮扩增得到提高，但引物设计复杂，检测乳腺炎实际应用较少。

多重 PCR (Multiplex PCR) 是指将两对或者两对以上 PCR 引物加入到一个扩增体系中，由此扩增两种及以上目的基因序列，这样以达到同时检测多种微生物的目的^[48]。多重 PCR 的首次使用时 Jeffrey 等人在 1988 年开展，后续出现了三重乃至十重 PCR 同时检测病原体^[46, 49]。多重 PCR 相比于普通 PCR 来说，降低了试剂成本，更为重要的是，同一时间检测多种病原微生物大大减少了检测的时间。不同的引物使用同样的退火温度和时间无疑也会降低有些病原微生物的检测灵敏度，据研究表明，灵敏度要较普通单一 PCR 低 10-100 倍^[50]。

实时荧光定量 PCR 是指在将荧光探针或染料加入 PCR 反应体系，通过软件实时检测荧光信号并拟合扩增曲线，然后通过标曲实现对待测物质基因的定性定量检测^[51, 52]。实时 PCR 同传统方法或者以上 PCR 方法相比，检测出结果更快更灵敏，无需普通 PCR 琼脂糖凝胶步骤，大大节约了时间，并且实现了样品中病原微生物量的可知性，数据可分析及保留。但是缺点是实时荧光定量 PCR 仪价格昂贵，操作标准高，很难现在奶牛场一线大规模使用^[53]。

基因芯片技术基本原理仍是分子生物学技术，作为一个热点领域，该方法可以同时检测多种病原微生物的基因，主要原理是将化学染料或荧光标记的 DNA 序列与事先固定于芯片上的互补 DNA 序列杂交，最终实现反应的可视化^[54]。现代基因芯片技术可实现自动化并已研发出多重芯片，能够同时检测出多种乳腺炎致病菌，Liehr 等人建立了能够同时检测 7 种奶牛乳腺炎致病菌的基因芯片方法，检出限达 103CFU/mL^[55, 56]。微流控基因芯片 (microfluidic chips) 技术也逐渐在动物疾病检测方面发展，国内已有商品化的针对奶牛乳腺炎致病菌的微流控芯片，过程简单，易于推广。总的来说，基因芯片技术检测奶牛乳腺炎致病菌高效快速，但研发出一线使用且稳定灵敏的基因芯片需要较高的研发技术以及较长的时间。

环介导等温扩增技术 (LAMP) 最早发明于 2000 年，主要特征是引物的设计是针对基因的 6 个片段位点进行的，然后在 BstDNA 聚合酶的作用下在恒温环境下进行链置换反应，反应结果无需进行琼脂糖凝胶电泳，通过观察有无白色沉淀产生判断是

否含有靶基因。相比于普通 PCR，灵敏度高出一个数量级^[57]，LAMP 的优点：易于操作，特异性优越，结果直观简便。贺婷等建立的检测奶牛乳腺炎链球菌的 LAMP 检测方法检测限达到 52fg/μL^[58]。LAMP 在奶牛乳腺炎检测中有广阔的应用前景，但引物设计要求高，容易产生非特异性扩增。

2.2.6 免疫学检测法

免疫学检测法顾名思义即运用基于抗原抗体结合原理所衍生出的一系列检测方法。酶联免疫吸附技术(ELISA)、免疫层析技术(ICA)、免疫传感器技术(Immunosensor)等都是目前检测奶牛乳腺炎的免疫学方法。ELISA 检测法是基于抗原抗体的免疫学反应，将这个反应固定在固相表面，结果通过酶底物催化显色并可通过分光光度计测量吸光度值以检测抗原或抗体浓度。傅平等检测了检测牛血清支原体的 ELISA 检测方法^[59]。免疫层析技术是一种新兴的检测手段，这项技术中通常会结合纳米粒子结合及增强作用，配合免疫学原理和层析技术使用，使用最多的纳米粒子是胶体金，胶体金免疫层析技术(GICA)最早使用于 1980 年^[60]。商品化的试纸条操作简单，无需专业设备，结果直观，可用于一线检测，在食品检测、疾病预防等方面都有广泛的应用。近年来生物传感器技术在诊断检测领域发展广泛，从最开始的检测单糖等到后来检测复杂的多糖和蛋白质等^[61, 62]。丁守强等建立了一种检测奶牛乳腺炎触珠蛋白的免疫传感器，灵敏度 5-10mg/mL^[63]。刘骞等建立的检测奶牛孕酮的电化学免疫传感器检测孕酮线性范围为 0.16-50ng/mL^[64]。免疫传感器技术相比于普通的免疫诊断方法灵敏度高。可流程化批量检测，具有很大的应用前景，在奶牛乳腺炎诊断领域不管是针对致病微生物、酶、蛋白都能有很好的应用，提高传感器的重复性、灵敏性、稳定性是目前研究的重点。

3 血清淀粉样蛋白 A (SAA)

3.1 血清淀粉样蛋白 A (SAA) 概述

血清淀粉样蛋白 A (SAA) 是一类蛋白质的统称，这些蛋白质的共同点是含 104 个氨基酸^[65]，主要是当动物机体肝脏遭受刺激时在肝部位合成的蛋白。根据基因型分类主要有：SAA1，SAA2，SAA3，SAA4 种类型，人类 SAA 包含基因表达型 SAA 包括 SAA1 和 SAA2，人类 SAA3 基因包含单个核苷酸插入，转录会因为阅读框的变化而停止，被称为假基因^[66]。肝细胞在急性期反应期间产生的 SAA 亚型会迅速释放到血液循环中，在急性感染，发炎，受伤或手术后，SAA 的血浆水平在 24 - 48 小时内从基础水平的 1-3μg/mL 增加到 1-3mg/mL，然后迅速下降^[67, 68]。SAA 还可以激活免

疫应答中涉及的细胞受体，包括 TLR2 和 TLR4，除肝分泌外，SAA 还由各种细胞局部分泌，特别是在炎症部位^[69]。总而言之，SAA 主要有两个相互联系的功能：脂质和亲脂性分子的运输以及固有的和适应性的控制炎症的免疫信号，SAA 已成为炎症的体内平衡调节因子。

3.2 牛奶中血清淀粉样蛋白 A (MAA)

肝来源的牛淀粉样蛋白 A 和乳腺来源的牛淀粉样蛋白 A 由具有 83% 氨基酸同一性的蛋白质链组成^[70]。SAA1 和 SAA2 主要在肝脏中产生，而 SAA3 在肝外部位产生，且主要在牛奶中发现，被称为乳腺相关淀粉样蛋白 A (M-SAA3)^[70]。血清淀粉样蛋白 A (SAA) 和 M-SAA3 一起被称为牛奶淀粉样蛋白 A (MAA)，可使用市售 ELISA (Tridelta Development Ltd., Maynooth, 爱尔兰) 在牛奶样品中进行测量，目前研究发现，在奶牛发生隐性乳腺炎期间，奶牛乳中 MAA 含量显著升高，已经提出牛奶中这种蛋白质的水平作为奶牛乳腺炎感染的敏感指标^[37, 38, 71, 72]。目前检测 MAA 浓度的方法据报道只有 ELISA 试剂盒法^[73-75]，ELISA 检测准确度高，但是费用昂贵、检测时间长以及容易产生非特异性结果等都是 ELISA 检测法现有的缺点。

4 分子印迹电化学传感器

4.1 分子印迹技术

4.1.1 分子印迹技术概述

分子印迹技术 (Molecular Imprinting Technique, MIT) 是一种通过模板 (包括离子, 分子, 大分子组装和微生物) 和功能单体通过共价/非共价相互作用进行共组装, 通过各类聚合方法使之聚合, 最后采用化学法或者电方法去除模板以获得特异性识别位点的方法^[76], 其原理如图 1^[77]所示。1940 年, Pauling 提出所有抗体都具有与正常蛋白相同的一级结构, 并首次将抗原作为模板, 这一研究大大推进了分子印迹概念的萌发^[78]。“分子印迹”的概念成为发展的瓶颈, 直到 1993 年, Mosbach^[79]等人发现, 在分子模板存在下合成的交联聚合物 (例如茶碱或地西洋) 可以结合人血清中的相应模板, 表现出与抗体相当的特异性和选择性。从那时起, 分子印迹聚合物 (Molecularly Imprinted Polymer, MIP) 通常被称为“合成抗体”或“塑料抗体”。与天然抗体相比, 分子印迹聚合物具有的优点 (例如成本低, 易于观察, 批次间重现性高, 机械和化学稳健性以及不杀死动物等) 引发了该领域的研究热潮。

根据模板分子和功能单体的作用力方式, 分子印迹技术主要可分为以下三类: 共

价键法、非共价键法、半共价法。

共价键法又叫做预组装法，最早于 1972 年德国科学家 Wuff^[80]等人发表提出，主要原理是模板分子和功能单体在交联剂和引发剂的存在下通过共价键结合，再通过洗脱剂切断共价力从而形成印迹腔。共价键稳定性高、结合力强，共价键法形成的印迹腔特异性强且均匀，常用的功能单体为 4-乙烯苯胺、4-乙基苯酚等小分子物质。共价键法要求模板分子与功能单体的结合需是可逆的共价结合，因此该方法功能单体选择受限，并且高结合力的共价力使得共价聚合物形成过程的吸附和解吸时间都较长，印迹效率低，因而对目标分子分析效率低，不利于推广^[81]。

非共价键法又被成为自组装法，由 Mosbach^[82]研究小组于 1984 年提出，非共价结合力主要包括范德华力、氢键、配位键等，在自组装法中模板分子和单体通过非共价力结合。最后去除模板形成印迹空穴，印迹空穴通过相互作用力以及特异性的立体空间结构再次捕获模板分子。在这一方法中由于非共价结合力较弱，因此模板与单体的彼此结合力也相之较弱，因此特异性有所降低，但吸附和剔除模板的时间大大减少，整个分析过程效率大大提高。非共价键法较共价键法应用更加广泛，找到合适的功能单体以提高方法的特异性和稳定性是非共价键法研究的关键。

半共价法即结合法，顾名思义即将共价键法和非共价键法结合使用，Whitcombe^[83]等提出，模板先是通过共价力与功能单体结合，然而洗脱后再吸附阶段印迹腔通过非共价作用力识别模板分子，该方法结合了共价键法特异性强以及非共价键法效率高的双重优点，有效提高了分析印迹分析的准确度和灵敏度。寻找合适的功能单体和连接基团以制备更加优越的印迹聚合物仍然是工作的重点。

4.1.2 分子印迹聚合物制备方法

分子印迹聚合物的制备过程一般所要用到的原料有模板分子、功能单体、交联剂、引发剂和溶剂，分子印迹技术已经在多大领域成为研究的热点，由此促进了多种制备方法的发展，主要有：

(1) 本体聚合

本体聚合法是指将模板、功能单体、交联剂、引发剂混合在溶液中，引发剂促使块状聚合物的形成，再经过研磨、过筛、沉降等步骤制备颗粒状聚合物，最后脱模板形成印迹聚合物，该方法是最为传统的聚合物制备方法。该方法优在制备过程简单、成本低，但缺点是聚合物不均匀、模板包埋过深不易去除、耗时长等。并且多步骤处理使得过程中聚合物浪费明显，产率不高，因此该方法不适合大规模印迹聚合物生产^[84]。

(2) 原位聚合

原位聚合是指将模板、功能单体的混合溶液在固相载体如毛细管或色谱柱内通过光电等引发方式直接聚合形成 MIP 的方法。该方法也是一种操作过程和条件简单的方法，但同样存在模板洗脱困难、柱效低、使用受限等问题^[85, 86]。

(3) 沉淀聚合

沉淀聚合是一种可以控制分子印迹聚合微球粒径的方法，其原理是模板、单体、交联剂在引发剂作用下先形成低聚合物，然后在经碰撞结合其他低聚合物形成较大的聚合物微球，该方法与本体聚合法很类似，溶剂的不同导致聚合过程不同，聚合物处理的方法也不同，无需研磨、过筛等步骤，聚合物产率较高。沉淀聚合法是目前制备印迹聚合物微球最佳的方法，该方法制备过程简单，聚合物尺寸均匀，粒径可控，并且特异性吸附少，聚合物表面光滑。缺点是溶剂使用量大增加了制备成本^[87, 88]。

(4) 悬浮聚合

悬浮聚合法最早由 Mayes^[89]提出，该方法的原理是：将模板、单体、交联剂、引发剂溶于有机溶液中，然后将该混合液与加入了分散剂的水相混合，之后不停搅拌以形成聚合物。搅拌速度的调节以及有机相和水相的比例调节可以控制所制备微球的形貌粒径。该方法相比于本体聚合法可形成形貌均一的微球，制备效率高，但过程中所需要的原料价格昂贵、用量较大，并且会影响模板和单体之间的结合力，该方法并未得到较多的推广^[90]。

(5) 乳液聚合

乳液聚合法的原理是在含有乳化剂的水相中加入准备好的模板、单体、交联剂，同样在引发剂下引发形成较为均匀的聚合物，产出效率高，比表面积大且可控，缺点是过程周期长，分散剂复杂，影响其广泛应用^[91]。

(7) 表面分子印迹

表面分子印迹法顾名思义就是让聚合物在固相表面形成，这样制备的优点是能够使印迹点留在固体表面^[92, 93]，这样有利于模板分子在固体表面吸附和洗脱，同时表面印迹法制备过程简单，产物稳定，印迹位点可重复利用，由于印迹位点存在于固体表面，印迹腔不会因为环境的变化发生改变。表面分子印迹法是目前较为常用的分子印迹技术，广泛应用于检测、分离、诊断等各领域。

4.1.3 分子印迹技术的应用

天然抗体仍然遭受差的稳定性和高成本以及动物实验中的伦理问题的困扰。因此，开发抗体替代物或模拟物是科学家的长期目标。分子印迹技术是模拟抗体的最有前途的策略之一。在过去的几十年中，关键技术的突破以及化学和材料科学方面的创新导致了分子印迹技术的快速发展，其分子亲和力已变得可与天然抗体媲美。目前，从最初的吸附和分离到生物医学的不断发展，分子印迹技术的应用正在经历革命性的转变。

目前分子印迹技术广泛应用于萃取及其样品制备、催化、吸附、分离、药物释放、作为传感器识别元件等多个领域^[94]。

4.2 分子印迹电化学传感器研究进展

分子印迹电化学传感器 (Molecularly imprinted electrochemical sensor, MIECS) 是将分子印迹技术和电化学技术联合使用, 发挥分子印迹技术的人工抗体作用以及电化学传感器的高灵敏度和定量分析双重优点。MIECS 原理是将 MIP 作为传感器的识别部分, 通常是通过电聚合等方式将 MIP 固定在电极表面, 当 MIP 经历模板分子吸附、解吸、再吸附不同阶段时, 电极导电性随之发生改变, 由此产生的电信号随转换器以电流、电压、电阻等各种电形式数据输出, 通过分析数据实现对目标物质的分析^[95]。MIECS 检测法优点突出, 包括优异的特异性和灵敏度, 而且研发以及原料价格便宜, 节省人力, 为微生物和环境污染物以及各类化学物的检测提供了新兴思路, 现如今, MIECS 技术在各领域得到广泛研究和应用^[96, 97]。

4.2.1 分子印迹电化学传感器分类

电信号有多种输出形式, 根据不同的电信号输出形式, 可以将分子印迹电化学传感器分为电流型、电容型、电导型、电位型分子印迹电化学传感器。

(1) 电流型 MIECS

电流型分子印迹传感器以电流为输出信号, 主要是通过电流数据分析待测物, 根据模板分子洗脱前后以及再吸附模板分子的浓度不同所产生的电流差值, 以此来达到对待测物定性定量的目的, 该方法通常要借助氧化还原探针 ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) 观察峰电流信号。1995 年, Mosbach^[98] 等人首次使用该方法, 循环伏安法 (CV)、差分脉冲伏安法 (DPV)、方波伏安法 (SWV) 以及计时电流法 ($i-t$) 等较为常见, Alizadeh^[99] 等人通过建立方波伏安法检测异丙嗪的分子印迹电化学传感器, 检测范围为 $1.0 \times 10^{-8} - 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$, 电极响应时间 5s, 具备高灵敏度和高性能。Huang^[100] 等建立的检测双酚 A 的分子印迹电化学传感器, 以循环伏安法分析, 检测范围 $10^{-6} - 6.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 。电流型分子印迹传感器总的来说检测结果灵敏度和检测限都十分可观, 是目前最为常见的传感器分析方法, 应用广泛。

(2) 电容型 MIECS

电容型分子印迹传感器主要是通过分析电极电容值得变化以分析待测物, 与电流型一样, 不同的是分析电容差值进行检测。并且电容型传感器直接分析电极电容而无需借助电活性探针^[101, 102]。Najafi M 等用于硫代戊二醛检测的基于 MIP 的新型电容式传感器, 检测限达 $0.6 \mu\text{M}$, 传感器表现出良好的选择性和重复性。

(3) 电导型 MIECS

电导型 MIECS 检测的是电极电导的变化值, 同样根据印迹空穴被占据前后的电导值变化及其与模板分子浓度的关系建立标准关系实现对目标分子的检测。例如李峰^[103]等建立了一种检测牛乳中琥珀酸氯霉素的电导 MIECS, 检出限达 0.05 mg/L, 回收率介于 94.3%~98.5%之间。电导型 MIECS 响应快、灵敏度高, 但是存在结果受制备过程步骤影响较大等缺点, 并且电导值分子的是包括电极和电解液在内的电导值和, 因此选择性较差, 难以精确检测。

(4) 电位型 MIECS

电位型 MIECS 测量的信号是电极电位值变化, 原理同上述几种方法基本相似, 最后拟合待测物浓度和电位差的关系曲线, 以此检测待测物。电位型电化学传感器历史悠久, 这种方法中模板分子在电极上分析而无需穿透聚合膜, 因此模板使用范围更大并且缩短了响应时间。Basozabal I^[104]等设计了一种检测电位测量型分子印迹传感器, 将固相压印的 MIP 纳米粒子掺入膜中, 然后将其用于制造离子选择电极。具有高亲和力和特异性的纳米颗粒的使用允许在具有短响应时间的真实样品中对组胺进行无标记的检测, 检测限为 1.12×10^{-6} mol/L, 线性范围 10⁻⁶-10⁻²mol/L, 响应时间低于 20s, 使传感器成为食品行业中直接定量组胺的有前途的工具。

(5) 阻抗型 MIECS

顾名思义阻抗型 MIECS 便是测量信号为电极阻抗, 该种传感器的关键是选择绝缘性的聚合膜材料, 阻抗型传感器具备多种优点, 例如选择性高、监测方便、可实时性等, 可引入烷基硫醇提高其绝缘性, 但也会因此降低其灵敏性, 延长响应时间^[105]。

4.2.2 分子印迹电化学传感器的制备

分子印迹聚合物 (MIP) 可以通过多种方法固定在电极上作为电化学传感器的识别元件, 方法的不同制成的聚合膜也会有较大差异, 包括性质和厚度, 因此具体的制备方式要结合实验方法, 主要可分为直接法和间接法。

(1) 直接法

直接法就是在电极或者其他传导介质表面直接生成 MIP, 具体分为原位聚合法和电聚合法。

原位聚合法是将模板分子、功能单体、交联剂和引发剂一同涂覆到电极表面, 然后在外界条件比如光或热下引发聚合反应。白惠萍等^[106]开发一种快速简单的灵敏测定复杂基质中青蒿素 (ART) 的方法, 通过在石墨烯 (G) 修饰的玻璃质表面上原位聚合 ART 印迹膜 (ART-MIMs) 构造了新型电化学传感器碳电极 (GCE), 功能单体丙烯酰胺 (AM), 检测限低至 2.0×10^{-9} mol/L, 同时, 该传感器具有良好的再生性, 稳定

性和实用性。污染小、反应快以及可控性强等是原位聚合法的优点，但电极表面再生困难。

电聚合法是采用电扫描方法固定功能单体和模板，通常是用循环伏安法扫描聚合，扫描圈数和速率的不同决定聚合膜的厚度，可以获得很薄的聚合膜，因此该方法有利于模板分子的洗脱和吸附，电聚合法凭借其制备简单、灵敏度高、条件可控等优点作为一种很有潜力的方法被广泛研究。Cheng Liu^[107]等设计了一种 MIP 电化学传感器，用于检测可变格式构象蛋白 gp120。该传感器是吡咯作为电聚合单体，响应电流与 gp120 浓度成正比，范围为 0.0002 ng/mL 至 200 ng/mL，检测极限为 0.0003 ng/mL。

(2) 间接法

间接法是指将事先制备好的 MIP 通过滴涂或填充等方式固定到电极表面。特点是物质中的溶剂挥发便会以固态固定在电极表面，只能通过控制滴涂溶液的量控制电极覆盖膜的厚度，这种方法挥发时间长，膜厚度不好控制。并且印迹膜容易发生脱落，所以可用范围有限。填充法一般用于碳糊电极，将 MIP 均匀填充在电极中，得到 MIP 碳糊电极。总的来说，间接法制备 MIECS 耗时长、膜不易控制，难以广泛应用^[108, 109]。

4.2.3 纳米材料在传感器中的应用

由于导电和催化特性，纳米材料可以通过放大电极表面，增加电子传递并催化电化学反应来增强分子印迹电化学传感器的灵敏度。可以为特定的目标分析物设计包含特定分子识别位点的分子印迹聚合物。将纳米材料掺入分子印迹聚合物很重要，因为纳米材料可以改善响应信号，增加灵敏度，并降低传感器的检测极限^[110]。以下列举几种常用的用于改善分子印迹电化学传感器的纳米材料。

(1) 碳纳米材料

碳纳米材料常见的有富勒烯、碳纳米管、石墨烯和纳米纤维。这些碳纳米材料作为一类新型的基于碳的纳米材料近来引起了人们的极大兴趣，并已应用于纳米技术，生物传感和药物递送等多个领域^[111]。大量研究表明，碳 NMIPs 电化学传感器可以增加电活性表面积，增强电子传递并促进分子吸附^[112]。碳纳米材料是用于电化学传感器和生物传感器的优异选择。

(2) 金属纳米材料

在过去的十年中，金属由于其出色的电导率和催化性能而在电化学领域引起了广泛的关注。金属 NP 的独特化学和电子特性可以增强目标分子中氧化还原中心与电化学传感器电极表面之间的电子转移。而且，纳米金属具有高的相容性、柔韧性和增强作用，这有助于电化学传感器的生产。目前，金属纳米粒子被广泛用于修饰电极和开发新型的电化学传感器等。金属纳米粒子能够增加电极比表面积。并增强识别位点和

电化学换能器之间的电子转移^[113]。

目前在 MIECS 中修饰到的无机纳米材料主要集中在金、铂、镍、银和铜纳米颗粒^[114]。在 MIP 中引入金属纳米粒子可增强电化学传感器的响应电流，掺杂在 MIP 中的金属纳米材料可以提高电化学传感器的灵敏度。基于金属纳米材料的 MIECS 已应用于许多领域，例如生物药物和食品分析^[115]。

(1) 金属衍生物纳米材料

金属衍生物纳米材料主要包括金属氢氧化物、金属氧化物和有机金属骨架纳米材料。金属氧化物可以在气体传感器、化学需氧量传感器、生物传感器、光学传感器和电化学传感器方面应用，当前，功能性金属氧化物与 MIP 结合使用，例如 CuO、ZrO 和 SnO 纳米粒子，能够有效提高传感器电导率、催化能力以及特异性和灵敏度，并迅速放大电化学信号的强度。这些传感器已用于确定水污染物，环境污染物和重金属离子^[116]。有机金属骨架纳米材料(MOF)由金属和有机配体配位形成^[117]。MOF 由于其高度多孔和导电的复合材料，它们具有独特的电学和光学特性。因此，MOF 是电化学传感器的理想材料。此外，基于 MOF 的优异催化，高选择性，它们已被用于药物，食品等的分离和测定。

(2) 复合纳米材料

结合到 MIP 中的纳米材料已用于增强传感器的灵敏度。为了进一步改善 MIECS 信号，金属纳米材料和碳纳米材料的复合纳米材料已经被嵌入 MIP 中。在 MIP 中开发这些复合纳米材料可以增强 MIP 传感器的灵敏度，基于复合纳米材料的 MIECS 被应用于微分子和超分子的分析，Li 等^[118]设计了一种超分子印迹传感器，用于测定呋喃丹。该传感器是通过将掺杂有碳 MWCNT/Pd-Ir 颗粒和亚甲基蓝的邻苯二胺聚合而制备的。MWCNT/Pd-Ir@亚甲基蓝的这种复合物显着提高了对呋喃丹的检测灵敏度。

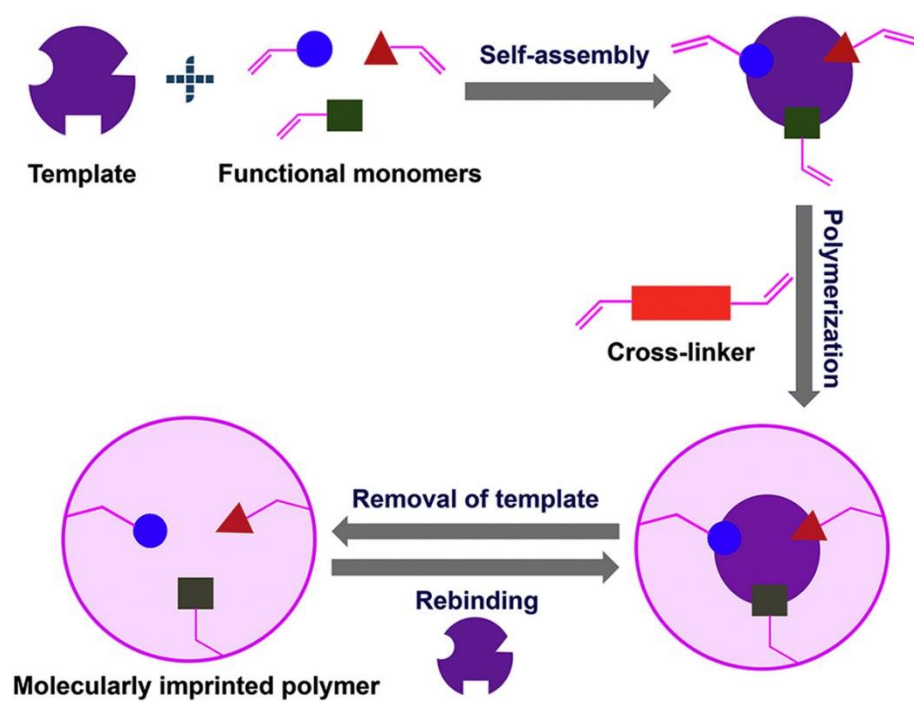


图 1-1 分子印迹技术的原理

Figure 1-1 The principle of molecular imprinting technology

参考文献

- [1] Heikkilä A M, Nousiainen J I, Pyörälä S. Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling [J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(1): 139-150.
- [2] Sender G, Pawlik A, Korwin-Kossakowska A. Current concepts on the impact of coagulase-negative staphylococci causing bovine mastitis as a threat to human and animal health - a review [J]. *Anim Sci Pap Rep*, 2017, 35(2): 123-135.
- [3] Zhao X, Lacasse P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control [J]. *J Anim Sci*, 2008, 86(13): 57-65.
- [4] 江静宜. 奶牛乳腺炎病原菌感染模式与乳品质性状的相关性及耐药基因分析[D]; 扬州大学.
Jiang JY. Correlation between infection patterns of mastitis pathogens in dairy cows and milk quality traits and analysis of drug resistance genes [D]; Yangzhou University. (in Chinese)
- [5] 肖培卫. 奶牛乳房炎的发病原因、治疗和预防[J]. *畜牧与饲料科学*, 2013, 34(004): 111-112.
Xiao PW. Causes, treatment and prevention of dairy cow mastitis [J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2013, 34(004): 111-112. (in Chinese)
- [6] 曹素娟. 不同疗法对奶牛临床型乳房炎治疗效果观察[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017, 14(No.530): 139-41.
Cao SJ. Observation on the therapeutic effect of different therapies on dairy cow clinical mastitis [J]. *Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary*, 2017, 14(No.530): 139-141. (in Chinese)
- [7] 王建军, 税丽. 奶牛乳房炎致病机理研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2009, 36(012): 100-103.
Wang JJ, Shui L. Research progress on the pathogenic mechanism of dairy cow mastitis [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2009, 36(012): 100-103. (in Chinese)
- [8] Shpigiel N Y, Levin D, Winkler M, Saran A, Ziv G, Bottner A. Efficacy of cefquinome for treatment of cows with mastitis experimentally induced using *Escherichia coli* [J]. *Journal of Dairy Science*, 1997, 80(2): 318-323.
- [9] 刘龙海, 李新圃, 杨峰, 罗金印, 王旭荣, 张哲, 李宏胜. 奶牛乳房炎综合防控关键技术研究进展[J]. *中国草食动物科学*, 2015, 05: 56-61.
Liu LH, Li XP, Yang F, Luo JY, Wang XR, Zhang Z, Li HS. Research progress on key technologies for integrated prevention and control of dairy cow mastitis [J]. *Chinese Herbivore Science*, 2015, 05: 56-61. (in Chinese)
- [10] Akerstedt M, Waller K P, Sternesjö A. Haptoglobin and serum amyloid A in bulk tank milk in relation to raw milk quality [J]. *Journal of Dairy Research*, 2009, 76(4): 483-489.

- [11] Yalcin C. Cost of mastitis in Scottish dairy herds with low and high subclinical mastitis problems [J]. *Turk J Vet Anim Sci*, 2000, 24(5): 465-472.
- [12] Schalm O W, Noorlander D O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1957, 130(5): 199-204.
- [13] Schukken Y H, Wilson D J, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, Gonzalez R N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts [J]. *Vet Res*, 2003, 34(5): 579-596.
- [14] Forsback L, Lindmark-Mansson H, Andren A, Akerstedt M, Svennersten-Sjaunja K. Udder quarter milk composition at different levels of somatic cell count in cow composite milk [J]. *Animal*, 2009, 3(5): 710-717.
- [15] Gargouri A, Hamed H, Elfeki A. Total and differential bulk cow milk somatic cell counts and their relation with lipolysis [J]. *Livestock Science*, 2008, 113(2): 274-279.
- [16] Deb R, Kumar A, Chakraborty S, Verma A K, Kumar S. Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review [J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2013, 16(23): 1653-1661.
- [17] 赵光绪. 兽医产科学[M]. 兽医产科学, 2009.
- Zhao GX. Veterinary Obstetrics [M]. Veterinary Obstetrics, 2009. (in Chinese)
- [18] Silanikove N, Merin U, Leitner G. Physiological role of indigenous milk enzymes: An overview of an evolving picture [J]. *Int Dairy J*, 2006, 16(6): 533-545.
- [19] 邹鹏, 韩丽英, 任静波. 鲜牛乳体细胞数的常用检测方法[J]. 现代畜牧科技, 2017, (7).
- Zou P, Han LY, Ren JB. Common methods for detecting somatic cell counts in fresh cow milk [J]. *Modern Animal Husbandry Science and Technology*, 2017, (7). (in Chinese)
- [20] Seifu E, Donkin E F, Buys E M. Potential of lactoperoxidase to diagnose subclinical mastitis in goats [J]. *Small Ruminant Res*, 2007, 69(1-3): 154-158.
- [21] Filipiak, Anna, Wieczorek, Przemyslaw, Tomalak, Marek. Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection and identification of *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus* and *B. fraudulentus* - three closely related species within the *xylophilus* group [J]. *Nematology*, 2017, 19(9).
- [22] Picard F J, Ke D B, Boudreau D K, Boissinot M, Huletsky A, Richard D, Ouellette M, Roy P H, Bergeron M G. Use of *tuf* sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(8): 3686-3695.
- [23] 郑浩. 南京地区奶牛隐性乳房炎流行调查与病原分析及 PCR 检测[D]; 南京农业大学, 2004.
- Zheng H. Epidemiological investigation, pathogen analysis and PCR detection of dairy cows recessive mastitis in Nanjing area [D]; Nanjing Agricultural University, 2004. (in Chinese)
- [24] 刘朝, 王京仁, 张成栋, 吴波, 韩永佩, 赵波, 余亚军, 王建华, 刘友斌, 程贵宝. 湖北地区奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定与耐药性分析[J]. 中国奶牛, 2007, 7: 35-38.

Liu C,Wang JRn,Zhang CD,Wu B,Han YP,Zhao B,Yu YJ,Wang JH,Liu YB,Cheng GB.Isolation and identification and drug resistance analysis of pathogenic bacteria of dairy cow mastitis in Hubei area[J]. China Dairy Cattle, 2007, 7: 35-38. (in Chinese)

[25] 王俊英, 王林安. 应用奶牛乳房炎试纸监测和控制隐性乳房炎的试验观察[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1990, 000(004): 26-27.

Wang JY, Wang LA. Experimental observation on monitoring and controlling subclinical mastitis with dairy cow mastitis test paper [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 1990, 000(004): 26-27. (in Chinese)

[26] 杨柏龄. 奶牛隐性乳房炎的检测[J]. 畜牧兽医科技信息, 2013, 000(002): 55-55.

Yang BL. Detection of latent mastitis in dairy cows [J]. Animal Husbandry and Veterinary Science and Technology Information, 2013, 000(002): 55-55. (in Chinese)

[27] 李梦媛, 马卓. 牛奶酸碱度变化在奶牛隐性乳房炎检测中的应用[J]. 畜牧兽医科学(电子版), 2019, 10: 22-23.

Li MY, Ma Z. Application of milk pH changes in the detection of latent mastitis in dairy cows [J]. Animal Husbandry and Veterinary Science (Electronic Edition), 2019, 10: 22-23. (in Chinese)

[28] Kitchen B J. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests [J]. J Dairy Res, 1981, 48(1): 167-188.

[29] Milner P, Page K L, Walton A W, Hillerton J E. Detection of clinical mastitis by changes in electrical conductivity of foremilk before visible changes in milk [J]. Journal of Dairy Science, 1996, 79(1): 83-86.

[30] 尹柏双, 王秋竹, 付连军, 郝景锋, 沙万里. 乳清中淀粉样蛋白 A 与奶牛隐性乳房炎相关性研究[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(015): 3705-3707.

Yin S, Wang QZ, Fu LJ, Hao JF, Sha WL. Study on the correlation between amyloid A in whey and recessive mastitis in dairy cows [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(015): 3705-3707. (in Chinese)

[31] Babaei H, Mansouri-Najand L, Molaei M M, Kheradmand A, Sharifan M. Assessment of Lactate Dehydrogenase, Alkaline Phosphatase and Aspartate Aminotransferase Activities in Cow's Milk as an Indicator of Subclinical Mastitis [J]. Veterinary Research Communications, 2007, 31(4): 419-425.

[32] H., Ishikawa, and, T., Shimizu, and, H., Hirano, and, N. Protein Composition of Whey from Subclinical Mastitis and Effect of Treatment with Levamisole [J]. Journal of Dairy Science, 1982, 65(4): 653-658.

[33] Hiss S, Mueller U, Neu-Zahren A, Sauerwein H. Haptoglobin and lactate dehydrogenase measurements in milk for the identification of subclinically diseased udder quarters [J]. Vet Med-Czech,

2007, 52(6): 245-252.

[34] Kalmus P, Simojoki H, Pyorala S, Taponen S, Holopainen J, Orro T. Milk haptoglobin, milk amyloid A, and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in bovines with naturally occurring clinical mastitis diagnosed with a quantitative PCR test [J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(6): 3662-3670.

[35] Lisowska-Myjak B, Skarzynska E, Plazinska M, Jakimiuk A. Relationships between meconium concentrations of acute phase proteins [J]. *Clin Exp Pharmacol P*, 2018, 45(11): 1218-1220.

[36] Eckersall P D, Young F J, Nolan A M, Knight C H, McComb C, Waterston M M, Hogarth C J, Scott E M, Fitzpatrick J L. Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis [J]. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89(5): 1488-1501.

[37] Jaeger S, Virchow F, Torgerson P R, Bischoff M, Biner B, Hartnack S, Ruegg S R. Test characteristics of milk amyloid A ELISA, somatic cell count, and bacteriological culture for detection of intramammary pathogens that cause subclinical mastitis [J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(9): 7419-7426.

[38] Domanska D, Gajewski Z, Domino M, Dazbrowski M, Kroemker V, Trela M. Factors influencing Serum Amyloid A and Milk Amyloid A concentrations in the predilection period of mastitis in mares [J]. *Reprod Domest Anim*, 2015, 50:51-51.

[39] Hiss S, Mielenz M, Bruckmaier R M, Sauerwein H. Haptoglobin concentrations in blood and milk after endotoxin challenge and quantification of mammary Hp mRNA expression [J]. *Journal of Dairy Science*, 2004, 87(11): 3778-3784.

[40] Thielen M A, Mielenz M, Hiss S, Petzl W, Zerbe H, Schuberth J, Seyfert H M, Sauerwein H. Regulation of haptoglobin (Hp) mRNA expression in the bovine mammary gland parenchyma during experimental mastitis. [J]. *J Anim Sci*, 2006, 84:336-336.

[41] Reinoso E B, El-Sayed A, L?Mmler C, Bogni C, Zsch?Ck M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina [J]. *Microbiological Research*, 2008, 163(3): 314-322.

[42] Salasia S I, Khusnan Z, Lammler C, Zschock M. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany [J]. *J Vet Sci*, 2004, 5(2): 103-109.

[43] El-Sayed A, Awad W, Abdou N E, Castaeda V ázquez H. Molecular biological tools applied for identification of mastitis causing pathogens [J]. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*,

[44] Karahan M, Cetinkaya B. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey [J]. *Vet J*, 2007, 174(2): 428-431.

- [45] Mullis K B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain-Reaction [J]. *Sci Am*, 1990, 262(4): 56-&.
- [46] Shome B R, Das Mitra S, Bhuvana M, Krithiga N, Velu D, Shome R, Isloor S, Barbuddhe S B, Rahman H. Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens [J]. *J Appl Microbiol*, 2011, 111(6): 1349-1356.
- [47] Glynn B, Lahiff S, Wernecke M, Barry T, Smith T J, Maher M. Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety [J]. *Int J Dairy Technol*, 2006, 59(2): 126-139.
- [48] Chamberlain J S, Gibbs R A, Rainer J E, Nga N P, Thomas C. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification [J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(23): 11141-11156.
- [49] 陈玉霞, 林峰. 3 种奶牛乳房炎主要病原菌的 PCR 检测方法建立[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(17):
- Chen YX, Lin F. Establishment of PCR detection method for three main pathogens of dairy cow mastitis [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(17). (in Chinese)
- [50] Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, Morandi S, Lodi R, Vimercati C, Agnellini D, Caramenti G, Moroni P, Castiglioni B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products [J]. *Mol Cell Probe*, 2005, 19(5): 299-305.
- [51] Arya M, Shergill I S, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel H R H. Basic principles of real-time quantitative PCR [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2005, 5(2): 209-219.
- [52] Cai H Y, Bell-Rogers P, Parker L, Prescott J F. Development of a real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2005, 17(6): 537-545.
- [53] Koskinen M T, Wellenberg G J, Sampimon O C, Holopainen J, Rothkamp A, Salmikivi L, van Haeringen W A, Lam T J G M, Pyorala S. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria [J]. *Journal of Dairy Science*, 2010, 93(12): 5707-5715.
- [54] Lee K H, Lee J W, Wang S W, Liu L Y, Lee M F, Chuang S T, Shy Y M, Chang C L, Wu M C, Chi C H. Development of a novel biochip for rapid multiplex detection of seven mastitis-causing pathogens in bovine milk samples [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2008, 20(4): 463-471.
- [55] Liehr, Thomas. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) [M]. *Fluorescence in situ hybridization (FISH)* .
- [56] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12).

- [57] 牛振东, 孙伟, 高春. 保健食品中沙门菌的快速检测方法[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 023(001): 262-274.
- Niu ZD, Sun W, Gao C. Rapid detection method of Salmonella in health food [J]. Chinese Journal of Hygiene Inspection, 2013, 023(001): 262-274. (in Chinese)
- [58] 贺婷. 奶牛链球菌性乳房炎可视化 LAMP 检测方法的建立及应用[D]; 广西大学, 2014.
- He T. Establishment and application of visual LAMP detection method for streptococcal mastitis in dairy cows [D]; Guangxi University, 2014. (in Chinese)
- [59] Fu P, Sun Z H, Yu Z Q, Zhang Y W, Shen J J, Zhang H Y, Xu W, Jiang F, Chen H L, Wu W X. Enzyme Linked Aptamer Assay: Based on a Competition Format for Sensitive Detection of Antibodies to Mycoplasma bovis in Serum [J]. Anal Chem, 2014, 86(3): 1701-1709.
- [60] Fan D Y, Liu J W, Xu M M, Yuan Y Y, Yang J F, Chen J G. A convenient immunochromatographic test strip for rapid detection of Scylla serrata reovirus [J]. Virol Sin, 2017, 32(4): 335-337.
- [61] Kuralay F, Campuzano S, Haake D A, Wang J. Highly sensitive disposable nucleic acid biosensors for direct bioelectronic detection in raw biological samples [J]. Talanta, 2011, 85(3): 1330-1337.
- [62] Arora P, Sindhu A, Dilbaghi N, Chaudhury A. Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2011, 28(1): 1-12.
- [63] 奶牛隐性乳腺炎免疫传感器诊断技术的研究[D]; 浙江大学, 2011.
- Research on the diagnosis technology of latent mastitis in dairy cows with immunosensor [D]; Zhejiang University, 2011. (in Chinese)
- [64] 刘骞. 奶牛孕酮免疫生物传感器的研制[D]; 黑龙江八一农垦大学, 2010.
- Liu Q. Development of dairy cattle progesterone immunological biosensor [D]; Heilongjiang Bayi Land Reclamation University, 2010. (in Chinese)
- [65] Uhlar C M, Whitehead A S. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant [J]. European Journal of Biochemistry, 2010, 265(2):501-523.
- [66] Sack G H, Zachara N, Rosenblum N, Talbot C C, Kreimer S, Cole R, McDonald T L. Serum amyloid A1 (SAA1) protein in human colostrum [J]. Febs Open Bio, 2018, 8(3): 435-441.
- [67] De Buck M, Gouwy M, Wang J M, Van Snick J, Opdenakker G, Struyf S, Van Damme J. Structure and Expression of Different Serum Amyloid A (SAA) Variants and their Concentration-Dependent Functions During Host Insults [J]. Curr Med Chem, 2016, 23(17): 1725-1755.
- [68] Sack G H. Serum amyloid A - a review [J]. Mol Med, 2018, 24.
- [69] De Buck M, Gouwy M, Wang J M, Van Snick J, Proost P, Struyf S, Van Damme J. The cytokine-serum amyloid A-chemokine network [J]. Cytokine Growth F R, 2016, 30:55-69.
- [70] McDonald T L, Larson M A, Mack D R, Weber A. Elevated extrahepatic expression and secretion

of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum [J]. *Vet Immunol Immunop*, 2001, 83(3-4): 203-211.

[71] Miglio A, Moscati L, Fruganti G, Pela M, Scoccia E, Valiani A, Maresca C. Use of milk amyloid A in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy ewes [J]. *Journal of Dairy Research*, 2013, 80(4): 496-502.

[72] Kovac G, Tothova C, Nagy O, Seidel H. Milk amyloid A and selected serum proteins in cows suffering from mastitis [J]. *Acta Vet Brno*, 2011, 80(1): 3-9.

[73] O'Mahony M C, Healy A M, Harte D, Walshe K G, Torgerson P R, Doherty M L. Milk amyloid A: Correlation with cellular indices of mammary inflammation in cows with normal and raised serum amyloid A [J]. *Res Vet Sci*, 2006, 80(2): 155-161.

[74] Szczubial M, Dabrowski R, Kankofer M, Bochniarz M, Albera E. Concentration of serum amyloid A and activity of ceruloplasmin in milk from cows with clinical and subclinical mastitis [J]. *B Vet I Pulawy*, 2008, 52(3): 391-395.

[75] Thomas F C, Waterston M, Hastie P, Parkin T, Haining H, Eckersall P D. The major acute phase proteins of bovine milk in a commercial dairy herd [J]. *Bmc Vet Res*, 2015, 11.

[76] Komiyama M, Mori T, Ariga K. Molecular Imprinting: Materials Nanoarchitectonics with Molecular Information [J]. *B Chem Soc Jpn*, 2018, 91(7): 1075-1111.

[77] Dar K K, Shao S, Tan T, Lv Y. Molecularly imprinted polymers for the selective recognition of microorganisms [J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 45(3):107640.

[78] Pauling L. A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies* [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 62(10): 2643-2657.

[79] Vlatakis G, Andersson L I, Muller R, Mosbach K. Drug Assay Using Antibody Mimics Made by Molecular Imprinting [J]. *Nature*, 1993, 361(6413): 645-647.

[80] Wulff G, Sarhan A. The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 1972, 11:341-346.

[81] 武敏. 分子印迹电化学传感器检测四溴双酚 A 的研究[D]; 大连理工大学, 2019.

Wu M. Research on detection of tetrabromobisphenol A by molecularly imprinted electrochemical sensor [D]; Dalian University of Technology, 2019. (in Chinese)

[82] Norrlov O, Glad M, Mosbach K. Acrylic polymer preparations containing recognition sites obtained by imprinting with substrates [J]. *Journal of Chromatography A*, 1984, 299(01): 29-41.

[83] Michael, J., Whitcombe, M., Esther, Rodriguez, Pablo, Villar, Evgeny, N. A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol [J]. *Journal of the American*

Chemical Society, 1995, 117(27):7105-7111.

[84] Chapuis F, Pichon V, Lanza F, Sellergren B, Hennion M C. Retention mechanism of analytes in the solid-phase extraction process using molecularly imprinted polymers [J]. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B, 2004,804(1):93-101.

[85] Muchuan Niu, Chuong Pham-Huy, Hua He. Core-shell nanoparticles coated with molecularly imprinted polymers: a review [J]. Microchim Acta, 2016, 183(10):2677-2695.

[86] Pan M, Fang G, Duan Z, Kong L, Wang S. Electrochemical sensor using methimazole imprinted polymer sensitized with MWCNTs and Salen-Co(III) as recognition element [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2012, 31(1): 11-16.

[87] Pra C, Cra B, Is A, Jgp A, Hpan A, Mndsc C, Dm A. Molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensors for environmental analysis - ScienceDirect [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2020.

[88] Samarth N B, Kamble V, Mahanwar P A, Rane A V, Abitha V K. A historical perspective and the development of molecular imprinting polymer- A review [J]. Chemistry International, 2015, 1(4).

[89] Mayes A G, Mosbach K. Molecularly imprinted polymer beads: suspension polymerization using a liquid perfluorocarbon as the dispersing phase [J]. Anal Chem, 1996, 68(21): 3769-3774.

[90] Figueiredo L, Erny G L, Santos L, Alves A. Applications of molecularly imprinted polymers to the analysis and removal of personal care products: A review [J]. Talanta, 2016, 146:754-765.

[91] Bärje, Sellergren. Imprinted dispersion polymers: A new class of easily accessible affinity stationary phases [J]. Journal of Chromatography A, 1994,673(1):133-141.

[92] Chen L, Wang X, Lu W, Wu X, Li J. Molecular imprinting: Perspectives and applications [J]. Chemical Society Reviews, 2016, 2016(45): 2137-2211.

[93] Eersels K, Lieberzeit P A, Wagner P H. A Review on Synthetic Receptors for Bioparticle Detection Created by Surface-Imprinting Techniques - From Principles to Applications [J]. ACS Sensors, 2016, acssensors.6b00572.

[94] Xu J, Miao H, Wang J, Pan G. Molecularly Imprinted Synthetic Antibodies: From Chemical Design to Biomedical Applications [J]. Small, 2020, 16(27).

[95] Hulanicki A, Glab S, Ingman F. Chemical sensors: definitions and classification [J]. Pure & Applied Chemistry, 1991, 63(9): 1247-1250.

[96] Xue C, Han Q, Wang Y, Wu J, Wen T, Wang R, Hong J, Zhou X, Jiang H. Amperometric detection of dopamine in human serum by electrochemical sensor based on gold nanoparticles doped molecularly imprinted polymers [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 49(Complete): 199-203.

[97] Yang Y, Fang G, Liu G, Pan M, Wang X, Kong L, He X, Wang S. Electrochemical sensor based on

molecularly imprinted polymer film via sol-gel technology and multi-walled carbon nanotubes-chitosan functional layer for sensitive determination of quinoxaline-2-carboxylic acid [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, 47(Complete): 475-481.

[98] Kriz D, Mosbach K. Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilised molecularly imprinted polymer [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1995, 300(1-3): 71-75.

[99] Alizadeh T, Ganjali M R, Akhoundian M. Synthesis and Application of Different Nano-Sized Imprinted Polymers for the Preparation of Promethazine Membrane Electrodes and Comparison of Their Efficiencies [J]. *International Journal of Electrochemical Science*, 2012, 7(8): 7655-7674.

[100] Huang J, Zhang X, Su L, Lin Q, He X, Xing X, Lian W. Electrochemical sensor for bisphenol A detection based on molecularly imprinted polymers and gold nanoparticles [J]. *Journal of Applied Electrochemistry*, 2011, 41(11): 1323-1328.

[101] Kang J, Zhang H, Wang Z, Wu G, Lu X. A Novel Amperometric Sensor for Salicylic Acid Based on Molecularly Imprinted Polymer-Modified Electrodes [J]. *Journal of Macromolecular Science: Part D - Reviews in Polymer Processing*, 2009, 48(6): 639-645.

[102] Weetall H H, Rogers K R. Preparation and characterization of molecularly imprinted electropolymerized carbon electrodes [J]. *Talanta*, 2004, 62(2): 329-335.

[103] 李锋, 王莉, 刘国艳, 柴春彦. 基于分子印迹膜的电导型传感器检测牛乳中琥珀酸氯霉素残留[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2009, 06): 566-571.

Li F, Wang L, Liu GY, Chai CY. Conductivity sensor based on molecularly imprinted membrane for detection of chloramphenicol succinate residue in milk [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science Edition)*, 2009, 06): 566-571. (in Chinese)

[104] Itsaso, Basozabal, Antonio, Guerreiro, Alberto, Gomez-Caballero, M., Aranzazu, Goicolea, Ramón. Direct potentiometric quantification of histamine using solid-phase imprinted nanoparticles as recognition elements [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, 58:138-144.

[105] Cheng Z, Wang E, Yang X. Capacitive detection of glucose using molecularly imprinted polymers [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2001, 16(3): 179-185.

[106] Bai H, Wang C, Chen J, Peng J, Cao Q. A novel sensitive electrochemical sensor based on in-situ polymerized molecularly imprinted membranes at graphene modified electrode for artemisinin determination [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 64:352-358.

[107] Ma Y, Liu C, Wang M, Wang L S. Sensitive electrochemical detection of gp120 based on the combination of NBD-556 and gp120 [J]. *Talanta*, 2018, 196:486-492.

[108] Kobayashi T, Murawaki Y, Reddy P S, Abe M, Fujii N. Molecular imprinting of caffeine and its recognition assay by quartz-crystal microbalance [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 435(1): 141-149.

- [109] Tan Y G, Nie L H, Yao S Z. A piezoelectric biomimetic sensor for aminopyrine with a molecularly imprinted polymer coating [J]. *Analyst*, 2001, 126(5): 664-668.
- [110] Zhong C, Yang B, Jiang X, Li J. Current Progress of Nanomaterials in Molecularly Imprinted Electrochemical Sensing [J]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2018, 48(1):15-32.
- [111] Wang H J, Zhou W H, Yin X F, Zhuang Z X, Yang H H, Wang X R. Template Synthesized Molecularly Imprinted Polymer Nanotube Membranes for Chemical Separations [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006,128(50):15954-15955.
- [112] Biju, V., M., Mohan, A., M., Vinu, Aswini, K., K. Molecularly imprinted poly(4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid) modified glassy carbon electrode as an electrochemical theophylline sensor [J]. *Materials Science & Engineering C Materials for Biological Applications*, 2016,65:116-125.
- [113] Randa, Ahmad, Nô éwia, Griffete, Aazdine, Lamouri, Nordin, Felidj, Mohamed, M. Nanocomposites of Gold Nanoparticles@Molecularly Imprinted Polymers: Chemistry, Processing, and Applications in Sensors [J]. *Chemistry of Materials*, 2015,27(16):5464-5478.
- [114] Ma M, Zhu P, Pi F, Ji J, Sun X. A disposable molecularly imprinted electrochemical sensor based on screen-printed electrode modified with ordered mesoporous carbon and gold nanoparticles for determination of ractopamine [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2016,775: 171-178.
- [115] Marco, Frasconi, Ran, Tel-Vered, Michael, Riskin, Itamar, Willner. Surface Plasmon Resonance Analysis of Antibiotics Using Imprinted Boronic Acid-Functionalized Au Nanoparticle Composites [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(6): 2512–2519.
- [116] Jing, Bai, Baoxue, Zhou. Titanium Dioxide Nanomaterials for Sensor Applications [J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(19): 10131-10176.
- [117] Zhu, Q., L., Xu, Q. Metal-organic framework composites [J]. *Chemical Society Reviews*, 2014.
- [118] Li S, Liu C, Yin G, Luo J, Zhang Z, Xie Y. Supramolecular imprinted electrochemical sensor for the neonicotinoid insecticide imidacloprid based on double amplification by Pt-In catalytic nanoparticles and a Bromophenol blue doped molecularly imprinted film [J]. *Microchim Acta*, 2016, 183(12): 1-9.

本研究目的与意义

奶牛乳腺炎严重奶牛健康以及奶牛养殖业和乳制品产业的发展，尤其是隐性乳腺炎由于缺乏临床症状而不易被及时发现和治疗，传统的检测奶牛乳腺炎的方法如加州乳腺炎检测法（CMT）、体细胞计数法（SCC）、乳汁病原微生物检测法、电导率法、PH 分析等。这些方法存在耗时长、成本高、灵敏度低等缺点。目前急需一种能够经济、快速、灵敏的检测奶牛乳腺炎的检测方法。

牛奶淀粉样蛋白 A（MAA）已被提出可作为奶牛乳腺炎的相关炎症指标，人血清淀粉样蛋白 A 已成为成熟的炎症疾病的诊断指标，而在奶牛中的诊断国内未见报道，国外已存在商业化检测 MAA 的 ELISA 试剂盒，ELISA 法耗时过长并且价格昂贵，因此建立一种经济、快速的检测 MAA 的方法对于隐性乳腺炎的尽早监测与治疗具有重要意义。

分子印迹作为一种“人工抗体”技术，既具备天然抗体的特异性，又较之更加价廉、简便、灵敏。分子印迹电化学传感器将人工抗体技术与方便快捷的电化学技术联合使用，再有纳米粒子的修饰使之检测性能更优。而且研发以及原料价格便宜，节省人力，为微生物和环境污染物以及各类化学物的检测提供了新兴思路，在各领域得到广泛研究和应用。

本研究的目的在于实现国内缺乏的 MAA 可溶性表达、抗 MAA 单克隆抗体的制备并且建立一中能够快速、灵敏、经济地检测 MAA 的方法。本研究对于奶牛乳腺炎急性期蛋白的研究与探索以及奶牛隐性乳腺炎的及时诊断与治疗具有重要意义，为奶牛乳腺炎检测手段提供新兴思路，对于我国奶牛养殖业和乳制品产业的健康发展具有促进作用。

第二章 牛奶淀粉样蛋白A的可溶性表达及单克隆抗体的制备

摘要：奶牛乳腺炎严重危害奶牛健康，是全世界乳业的经济负担来源。牛奶中血清淀粉样蛋白 A（MAA）是表征奶牛乳腺炎的重要生物标志物，研究 MAA 具有重要意义。为了获得进一步深入研究 MAA 的原料，本研究旨在表达可溶性 MAA 蛋白，本研究中首先通过 NCBI 查找了 MAA 的基因编码区序列，并交由公司优化后合成 MAA 基因。为了增加 MAA 蛋白的可溶性以及为后续研究提供完全天然蛋白，我们在载体构建的过程中加入了促溶基因 SUMO 片段，构建了携带 MAA 基因的重组原核表达质粒 pET28a-SUMO-MAA，表达菌株选用大肠杆菌 BL21(DE3)pLySs 感受态，经 IPTG 诱导表达后优化表达时间、IPTG 浓度、表达温度，表达后的菌液经破碎、离心、过滤、镍柱纯化，获得可溶性重组蛋白 SUMO-MAA，用特异性 SUMO 酶切除重组蛋白上的 SUMO 标签然后通过亲和层析纯化获得可溶性 MAA。结果显示，诱导时间 7h、IPTG 浓度 0.5 mmol/L、诱导温度 16℃ 为最佳诱导条件，成功表达融合蛋白 SUMO-MAA，大小为 35kDa，经 SUMO 酶切、纯化后获得完全 MAA 蛋白，大小 15kDa，纯度达 90% 以上。用纯化后的 MAA 免疫 BALB/c 小鼠，制备抗 MAA 的单克隆抗体，测定其效价和特异性判断其可用性，本研究筛选到了两株分泌单克隆抗体的融合细胞株，命名为 3G11 和 8E10。综上所述，我们成功表达了不含任何标签的可溶性的 MAA 蛋白并成功制备单克隆抗体，为 MAA 研究奠定了基础。

关键词：MAA 蛋白；原核表达；SUMO 标签；蛋白纯化；单克隆抗体

奶牛乳腺炎（Bovine mastitis）是一种影响奶牛健康、乳业发展的主要疾病之一，乳腺炎的控制是全球性的挑战，这给乳品业带来了风险，并使动物健康管理变得困难，全球对这一问题的关注是显而易见的，因为它不仅对动物致命，而且对奶农构成严重的经济威胁^[1, 2]。根据临床表现的类型，该疾病具有临床和亚临床分类。在临床乳腺炎中，感染的特征是可见迹象，如乳凝块，奶头的硬度和肿胀^[3]，通过目视检查和触诊确定。在亚临床感染中，没有可见的外部变化，并且通过辅助测试例如加利福尼亚乳腺炎测试（CMT）或通过体细胞计数的实验室分析来进行诊断^[4]。其中亚临床乳腺炎对奶牛的影响往往更加严重，奶牛养殖业和乳业领域都深受其害，最主要的是不过关的乳制品可能会危害人类生命健康^[5]，因此，目前奶牛场、乳制品产业、各研发人员都在致力于寻找种敏感有效的早期诊断指标^[6]。

血清淀粉样蛋白 A 是一种具有多种蛋白质种类的 APP，肝脏遭受刺激是其主要产

生原因,它的主要同种型 SAA1, SAA2 和 SAA3, SAA1 和 SAA2 主要在肝脏中产生,而 SAA3 在肝外部位产生,且主要在牛奶中发现,被称为乳腺相关淀粉样蛋白 A (M-SAA3)^[7]。血清淀粉样蛋白 A (SAA) 和 M-SAA3 一起被称为牛奶淀粉样蛋白 A (MAA),可在牛奶样品中进行测量,目前研究发现,在奶牛发生隐性乳腺炎期间,奶牛乳中 MAA 含量显著升高,已经提出牛奶中这种蛋白质的水平作为奶牛乳腺炎感染的敏感指标^[8-11]。目前对于牛中 MAA 的研究与检测较少,现有的成熟的检测方法只有 ELISA 法^[12, 13]。为了进一步深入奶牛乳腺炎检测技术以及 MAA 免疫学功能研究,制备具有免疫原性的 MAA 蛋白对于开展后续研究具有重要意义。

本研究通过合成基因、构建重组表达质粒、大肠杆菌原核表达、纯化等一系列工作成功表达了具备活性的上清表达 MAA 蛋白,纯度达 90%以上,并使用其作为免疫原制成功制备单克隆抗体。可为后面开展机制研究或者检测方法开发提供有力基础。

1 实验材料

1.1 细胞、菌株及质粒

本研究所用细胞、菌株、质粒见表 2-1,其中 MAA 基因序列由 Genbank 中查找获得。

表 2-1 实验菌株及质粒

Table 2-1 Bacterial strains and plasmid for detection

名称 Name	来源 Source
pET28a-SUMO 载体	淼灵质粒平台
大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3) pLySs	北京百灵威科技有限公司
MAA 基因质粒及菌株	金斯瑞生物科技有限公司

1.2 主要试剂与设备

在整个实验过程中,如无特殊说明,溶液配制均使用电阻率为 18.2 M Ω /cm 的超纯水。实验所用试剂及耗材见表 2-2,仪器设备见表 2-3。

表 2-2 主要试剂及耗材

Table 2-2 Main reagent and consumables

名称 Name	来源 Source
限制性核酸内切酶 BamHI、SacI、Ecnase 连接酶、 PrimeSTAR®HS 高保真酶	宝日医生物技术有限公司 (Takara)
2×PCR PreMix、DNA Marker	南京诺唯赞生物科技有限公司
质粒提取试剂盒 Mini Plasmid Purification Kit、胶回收试 剂盒 DNA Gel Purification Kit	美国 Omega Bio-Tek 公司
酵母浸出粉 Yeast 、胰蛋白(Tryptone)	OXOID 公司
PageRuler 蛋白预染 Marker	赛默飞 (Thermo) 世尔科技公司
SUMO 酶	通用生物系统 (安徽) 有限公司
GoldView™ 核酸染料	北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司
脱脂奶, 牛血清白蛋白 (BSA), Tween 20、3-吗啉丙磺 酸 (MOPS)	南京鼎思生物技术有限公司
TMB 单组份显色液	美国默克 Sigma 公司
辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG、兔抗羊 IgG	北京中杉金桥生物公司
DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、胰酶 (Trpsin)	Gibco 公司
SPF 级 BALB/c 小鼠	北京斯贝福生物技术有限公司
20×PBS、Protein A 填料纯化试剂盒、BCA 法蛋白质浓 度测定试剂盒	生工生物工程 (上海) 股份有限公司
ELISA 板	美国康宁公司
亚型鉴定试剂盒 (小鼠单抗 Ig 类/亚类 鉴定用酶标二抗即用套装)	北京博奥龙免疫技术有限公司

表 2-3 主要仪器

Table 2-3 Main instruments

仪器名称 The name of the instrument	厂家 Factory
移液枪、高速冷冻离心机	Eppendorf 中国有限公司
Ni2+ 亲和层析柱、GE AKTA Pure 蛋白质分离纯化系 统	美国 GE 公司
Protein A 预装重力柱	上海斯信生物技术有限公司
分析天平	上海精天电子仪器有限公司
Millipore 超纯水发生系统	密理博 (中国) 有限公司
核酸电泳仪、凝胶成像分析仪	上海天能 (Tanon) 科技有限公司
冰箱、超低温冷冻冰箱	长虹美菱股份有限公司
超微量紫外分光光度计 Nanodrop 2000、PCR 扩增仪、 恒温培养箱、全自动化学发光分析仪	赛默飞 (Thermo) 世尔科技有限公司
酶标仪	西班牙基立福公司
涡旋混合器 QL-866	其林贝尔公司
高压灭菌器购	厦门市致微仪器有限公司
恒温摇床	上海知楚仪器有限公司

2 实验方法

2.1 培养基及溶液配制

2.1.1 LB 培养基

LB 培养基营养丰富，配制简单，可用于大肠杆菌菌株的培养和扩增，配方：酵母浸出粉（Yeast）5g、胰蛋白（Tryptone）10g、氯化钠（NaCl）10g，上述试剂加超纯水定容 1000mL 混匀，塞住瓶口后于高温灭菌器 115℃，20 min 条件下高压灭菌后冷却至室温待用。固体 LB 培养基即在液体配方中加入 15g 琼脂粉，混匀后同样条件高压灭菌后于 60℃恒温水浴锅中冷却，在超净工作台中将液体凝胶 LB 固体培养基倒入平板，在超净台中放至完全凝固后收取密封保存待用。

2.1.2 抗性 LB 培养基

本研究中重组表达载体含卡那霉素（Kan）抗性基因，BL21（DE3）pLySs 质粒含抗氯霉素（Cmp）的基因，所以本实验将用到抗性培养基。

- （1）Kan 抗性 LB 培养基：首先制备 50mg/mL 的 Kan 水溶液，0.22 μ m 滤器过滤备用，无菌条件下按 1:1000 向 LB 液体培养基加入上述 Kan 溶液可得 Kan 抗性 LB 液体培养基。固体 LB 培养基在冷却至 60℃后趁热按 1:1000 比例加入上述 Kan 溶液混匀之后倒平板，待凝固后收取备用。
- （2）Kan、Cmp 双抗性 LB 培养基：事先配制 50mg/mL 的 Kan 水溶液、15mg/mL 的 Cmp 乙醇溶液，0.22 μ m 滤器过滤备用，添加至培养基中，方法同（1），配制 Kan、Cmp 双抗性 LB 液体和固体培养基。

2.1.3 50×TAE

称取 Tris 242g、Na₂EDTA 2H₂O 37.2g、冰醋酸 57.1mL，先加水定容至 800mL，固体彻底溶解后再加水定容至 1L，即得到 50×TAE。通常稀释 50 倍成 1×TAE 使用。

2.1.4 IPTG 预备液（1mol/L）

天平称取 3.76g 的 IPTG 粉末，溶于 20mL 超纯水，0.22 μ m 滤器过滤除菌后 1mL 每管分装待用，使用时按所需比例添加诱导。

2.1.5 MOPS SDS-PAGE 缓冲液

称取 Tris 6.06g、MOPS 10.46g、SDS 1g、EDTA 0.3g，加水定容至 1L 待用。

2.1.6 膜转印液

称取 Glycine 2.9g、Tris 5.8g、SDS 0.37g、甲醇 200mL，先将固体加入 600mL 水，待固体完全溶解后加入 200mL 甲醇，混匀后定容至 1L。

2.1.7 上清 BindingBuffer

称量 Na₃PO₄ 7.6g、NaCl 29.22g、咪唑 1.36g、甘油 100mL、Tween20 2mL 加水定

容至 1L，使用 0.22 μ m 滤器过滤后备用。

2.1.8 AKTA 纯化仪 A 液

称量 Na₃PO₄ 7.6g、NaCl 29.22g、甘油 100mL、Tween20 2mL 加水定容至 1L，使用 0.22 μ m 滤器过滤后备用。

2.1.9 AKTA 纯化仪 B 液

称量 Na₃PO₄ 7.6g、NaCl 29.22g、咪唑 68.07g、甘油 100mL、Tween20 2mL 加水定容至 1L，使用 0.22 μ m 滤器过滤后备用。

2.1.10 ELISA 实验溶液

(1) 碳酸盐缓冲液 (CBS) (PH9.6, 0.05mol/L)：1.59g 的 Na₂CO₃、2.93g 的 NaHCO₃ 加水至 800mL，调 PH9.6 后定容至 1L。

(2) 抗体稀释液：商品化 PH7.4 的 20 $\times$ PBS 稀释为 1 $\times$ PBS，以 1 $\times$ PBS 配制 1%BSA 溶液。

(3) PBST：1L 的 1 $\times$ PBS 加入 1ml Tween20。

2.2 重组表达质粒的构建

2.2.1 MAA 基因合成

查询到 GenBank 上的 MAA 基因序列 (GenBank 登录号：AF540564.1)，优化密码子后有金斯瑞生物科技有限公司合成，合成基因片段大小为 396bp，并连接在 pET28a 载体质粒上保存。经 PCR 鉴定及 NCBI 比对，合成基因准确。优化后的 MAA 基因序列如下：

```
ATGAACCTGAGCACCGGTATCATTTTCTGCTTTCTGATCCTGGGTGTGAGCA
GCCAGCGTTGGGGCACCTTCCTGAAAGAGGCGGGTCAGGGCGCGAAAGACATG
TGGCGTGCGTACCAAGATATGAAGGAAGCGAACTACCGTGCGCGGACAAATAT
TTTACGCGCGTGGTAACTATGATGCGGCGCGTCGTGGTCCGGGTGGCGCGTGG
GCGGCGAAAGTGATTAGCAACGCGCGTGAAACCATCCAAGGTATTACCGACCCG
CTGTTCAAGGGCATGACCCGTGATCAGGTTCGTGAGGACAGCAAAGCGGATCAA
TTCGCGAACGAATGGGGTCGTAGCGGCAAGGACCCGAACCACTTTCGTCCGGC
GGGTCTGCCGGATAAATACTAA
```

结合 pET28a-SUMO 载体序列、MAA 基因序列以及 BamHI、SacI 酶切位点设计引物，将载体及目的基因导入 Primer6.0 中生成引物，合成 MAA 鉴别引物以及同源

臂引物（表 2-4）。

表 2-4 引物序列

Table2-4 Primers sequence				
引物名称 Prime names	序列（5'→3'） Sequences	扩增长度/bp Amplification	Tm/°C	引物性质 Prime natures
MAA-F	ATGAACCTGAGCACCGGT ATCATTT	25	55	MAA 鉴别引物
MAA-R	TTAGTATTTATCCGGCAG ACCCGCC	25		
28a-SUMO-M AA-F	AGAGAACAGATTTTTGGT TCCATGAACCTGAGCACC GGTATCATTTTC	48	55	同源臂引物
28a-SUMO-M AA-R	GCAACTTGTCGACGGAG CTCTTAGTATTTATCCGGC AGACCCGCCGGA	49		

2.2.2 连接片段获取

（1）pET28a-SUMO 质粒提取

为了获得 pET28a-SUMO 载体质粒，我们需要对含 pET28a-SUMO 基因的菌液扩增及提取质粒 DNA。具体流程如下：

a.将购买的 pET28a-SUMO 菌液用接种环蘸取适量，在超净台中划线接种于 Kan 抗性 LB 固体培养基上，把平板放入 37℃培养箱直到能够挑出清晰的单个菌落。

b.随后从长出的菌落中挑取单个接入抗 Kan LB 培养基中，37℃恒温摇床中培养 12 小时以上。部分冻存储备用。抽提 pET28a-SUMO 质粒的过程按照试剂盒说明书进行。

c.紫外分光光度计测定质粒的浓度，标记日期和浓度用于后续实验或置于-20℃冰箱待用。

（2）MAA 基因扩增

以合成的含 MAA 基因片段的菌液为模板，反应体系中用含高保真酶的 PrimeSTAR®HS（Premix），上下游引物为含酶切位点同源臂的 28a-SUMO-MAA-F、28a-SUMO-MAA-R。用胶回收试剂盒把扩增出来的 PCR 产物回收，获得的含同源臂的 MAA 基因片段，测浓度用于下步实验或于-20℃保存待用。PCR 扩增体系：50 μL 体系，其中 PCR 预混液 25 μL，上下游引物各 2 μL，模板 2 μL，加 ddH₂O 19 μL。PCR 扩增条件：95℃下预变性 5min；95℃变性 30s，55℃退火 30s，72℃延伸 30s，扩增 3 个循环，充分延伸 72℃，10min。

（3）pET28a-SUMO 双酶切

以设计好的 SacI 和 BamHI 双酶切载体质粒以暴露同源臂，双酶切体系见表 2-5，将配置好的 200 μL 酶切体系混匀后每 20 μL 分装于一个 EP 管，放在 37℃水浴锅中 2h，酶切之后把产物用琼脂糖电泳分离，切掉胶上片段大的那部分，用胶回收试剂盒把切

下的片段纯化，按试剂盒说明书操作，测其浓度并保存于-20℃待用。

表 2-5 双酶切体系

Table2-5 Double enzyme digestion system	
体系成分 System composition	用量 (μL) Dosage
SacI	10
BamHI	10
10×K buffer	20
pET28a-SUMO DNA	10/浓度 (μg/mL)
ddH ₂ O	Up to 200

2.2.3 片段连接及转化 DH5 α

(1) 双酶切产物与 MAA 连接

用 Exnase®II 重组酶连接扩增的含同源臂的 MAA 基因和酶切后回收的 pET28a-SUMO 质粒，具体连接体系见表 2-6。

表 2-6 连接体系

Table2-6 The connection system	
体系成分 System composition	用量 (μL) Dosage
Exnase®II	2
5×CE II Buffer	4
MAA	核酸序列长度(bp)×0.04/浓度(ng/μL)
pET28a-SUMO	核酸序列长度(bp)×0.02/浓度(ng/μL)
ddH ₂ O	Up to 20

将上述连接体系置于 37℃ 水浴锅孵育 30min，然后快速置于冰上冷却 3min。(2)(2) 连接产物转化 DH5 α

将 100μL 的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞置于冰上解冻，加入 10μL 连接重组产物，轻弹管壁混匀，先放冰上 30min，随后立即放在 42℃ 水浴中 90s。然后快速放回冰中放置 3min。冷却后在超净台中加入 1mL 的 LB 培养基，接下来放于 37℃ 摇床上晃 1h，Kan 抗性 LB 固体培养基平板在 37℃ 培养箱预热。1h 后取出重组质粒菌液于 5000rpm 离心 10min，弃上清，在超净台中底物用 100μL 液体 LB 培养基重悬，混匀后用涂菌棒均匀涂覆在 Kan 抗性 LB 固体培养基平板上，37℃ 下培养 12-16h，长出来的菌落挑选单个的接入抗 Kan 液体培养基培养。

(3) 重组质粒鉴定

a. PCR 鉴定 将上述培养菌液用设计好的 MAA 鉴别引物进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳后观察有无特异性条带。

b. 双酶切鉴定 首先提取重组菌株质粒，方法参照试剂盒说明，测定浓度并于-20℃ 保存。按照 (1) 中所述的双酶切体系进行双酶切，电泳后观察结果。

c. 测序 将 a、b 中鉴定阳性的含重组质粒的 DH5α 菌株培养后送往公司测序，

比对测序结果与 MAA 序列，一致的话说明重组表达质粒构建成功，将比对正确的菌液标记为 pET28a-SUMO-MAA(DH5 α)并于-40℃冻存，冻存方法为：无菌超净台中向冻存管中加入 700 μ L 菌液和 300 μ L 70%的甘油，震荡混匀，写上菌株名称、冻存人姓名、冻存日期。

2.3 重组表达菌株的制备及诱导

2.3.1 重组质粒转化至 BL21 (DE3) pLySs

(1) 将上述冻存于-40℃的 pET28a-SUMO-MAA(DH5 α)菌株复苏，复苏步骤：将冻存菌取出在超净台中按 1:50 转接于 50mL 的 Kan 抗性 LB 液体培养基中，37℃，180rpm 摇床条件下过夜。次日按照质粒提取试剂盒抽提菌液质粒。

(2) 将上述提取的 pET28a-SUMO-MAA 重组质粒转化至表达菌株 BL21 (DE3)pLySs 中，方法参照 2.2.3 步骤 (2)，其中筛选平板为 Kan、Cmp 双抗性 LB 固体培养基。培养单菌落后进行 PCR 及测序鉴定，序列正确的菌株-40℃冻存备用，标记名称为 pET28a-SUMO-MAA (BL21)。

2.3.2 诱导表达

(1) 将上述测序正确的菌液吸取 100 μ L 转接到 5mL 双抗性 LB 培养基中，37℃，180rpm 摇床培养至 OD_{600nm} 约为 0.6 左右，抽取 1mL 作为未诱导对照，随后加入 4 μ L 1 mol/L 的 IPTG 诱导剂（终浓度 1mmol/L）继续培养约 8h。

(2) 时间到后把菌液 5000rpm 离心 10min，去上清，菌体沉淀用 PBS 洗三次，然后用相同体积 PBS 重悬，20 μ L 菌液与 5 μ L 的蛋白上样缓冲液加在一起并混匀，固定在漂浮板上置于沸水中煮沸 10min 以此制成蛋白样，同样方法制备 pET28a-SUMO-MAA (BL21) 未诱导产物、pET28a-SUMO 诱导产物、pET28a-SUMO 未诱导产物、BL21 诱导产物蛋白样作为对照，SDS-PAGE 电泳几种产物，鉴定目的蛋白表达情况。

(3) 根据购买的预制蛋白胶的性质，电泳条件为：选用 MOPS 缓冲液，处理好的样品分别吸取 10 μ L 加入胶孔中，设置蛋白 Maker 对照，先 90V 电压跑 30min 后改为 120V 电压继续跑 1h 左右，随时观察直至条带达到分离胶底部时停止电泳。将电泳结束的蛋白胶清水冲洗干净后置于放有考马斯亮蓝染色液的染色皿中，染色 30min 以上，去除染色液后观察结果并拍照记录。

2.4 表达条件优化

为了获得可溶性目的蛋白，温度、诱导时间以及 IPTG 的浓度这几个条件需要优化，选择上清表达量最多时的条件扩大培养。

2.4.1 诱导温度的选择

(1) 不同温度诱导表达

按照上述方法同时复苏 3 管 5mL 的菌液，37℃，180rpm 下培养至 OD_{600nm} 大约 0.6，随后添加 5μL 1 mol/L 的 IPTG，将 3 个摇床温度分别设置为 16、28、37℃，转速都是 180rpm，诱导时间都是 8h。

(2) SDS-PAGE 鉴定

a. 诱导后的 3 管菌液按 2.3.2 (2) 中方式洗涤并在上清 Binding Buffer 重悬后，细胞超声破碎仪设置程序：超声时间 30min；超声 6s，间歇 4s，一定要在冰上超声。超声后的产物在 10000g 条件下离心 30min，分离上清和沉淀，沉淀用同体积 PBS 重悬。

b. 将 a 中分离后的上清和沉淀样品采用 2.3.2 (2) 中方法制备蛋白样，上样 20μL，按步骤 2.3.2 (3) 进行 SDS-PAGE 蛋白电泳染色后观察不同温度下上清和包涵体表达情况，拍照留存。

(3) WesternBlot 验证上述结果

a. 样品按 2.4.1 (2) 电泳后不加以染色，切去蛋白胶多余部分，留出转印区域，并剪出与待转印胶大小一致的 PVDF 转印膜。

b. PVDF 膜和电泳槽内的气垫板都置于转印液中预泡 5min，转印前取出 PVDF 膜在甲醇中浸润 15s 后取出，按照从上到下顺序为白色气垫板、PVDF 膜、蛋白胶、黑色气垫板相叠组装，注意排除气泡，将组装后的气垫板卡入加满转印液的电泳槽，设置程序 400mA 恒流转印 1h。

c. 转印结束后将 PVDF 膜于 5%脱脂乳封闭液中 4℃过夜。

d. 过夜后把封闭液倒掉，在孵育容器中倒入 PBST 洗膜，在 70rpm 的摇床上晃洗 4 次，室温下每次洗足 10min。

e. 一抗反应：用封闭液按 1: 5000 配制抗 His 标签的抗体溶液，把膜放进里面，摇晃孵育 2h。

f. 把抗 His 抗体溶液倒掉，按 d 方法再次洗涤。

g. 二抗反应：加入封闭液配制得 HRP 标记羊抗鼠二抗 (1:5000)，再孵育 2h。

h. 弃二抗，PBST 洗涤同上。

I. 膜上均匀涂覆 ECL 发光液，避光显色，全自动化学发光分析仪曝光拍摄结果并保存。

2.4.2 诱导时间的选择

(1)按照 2.4.1 同样的方法复苏 5 管 5mL 菌液,37℃培养至 $OD_{600nm}=0.6$ 后加 5 μ L IPTG 预备液,将摇床设置成 2.4.1 优化后的温度,分别将 5 管表达菌液放入摇床诱导表达 3h、5h、7h、10h、12h。

(2)诱导后的菌液用 PBS 洗涤上清 Binding Buffer 重悬后超声破碎(同 2.4.1),离心收集上清,SDS-PAGE 电泳鉴定表达时间不同的几个上清样品,保证原始上样量均为 20 μ L,染色后拍照留存。

2.4.3 诱导剂 IPTG 浓度的选择

(1)按照按照 2.4.1 同样的方法复苏 5 管 5mL 菌液, $OD_{600nm}=0.6$ 后分别加入终浓度 0.3 mmol/L、0.5 mmol/L、0.7mmol/L、1.0 mmol/L、2.0 mmol/L 的 IPTG 诱导表达,在优化后的诱导温度和时间下表达。

(2)诱导结束后同样洗涤并重悬,超声破碎,破碎后产物离心留下上清,制样进行 SDS-PAGE 电泳鉴定,染色后拍照留存。

2.5 MAA 的大量表达及纯化

2.5.1 融合蛋白 SUMO-MAA 的大量表达及纯化

(1) SUMO-MAA 大量表达

按照 2.4 优化的条件培养表达菌液 3L,离心收集菌体,PBS 洗三次后在约 200 mL 上清 Binding Buffer 重悬,超声破碎 60min 左右,超声过程中随时观察菌液浑浊度,发现菌体破碎完全并且菌液变清后停止超声,离心收集上清置于冰上。

(2) SUMO-MAA 蛋白纯化

a. 将(1)中收集的上清蛋白液分别用 0.45 μ m 和 0.22 μ m 滤器过滤去除杂质,过滤过程保持蛋白液一直在冰上以防蛋白降解。

b. 在 1 mL 镍离子亲和层析柱上利用 AKTA pure 蛋白纯化仪纯化目的蛋白,在系统中设置上样 A 液与 B 液混合比例设置梯度咪唑洗脱程序,实时检测系统紫外吸收峰,洗脱时出峰位置即有蛋白洗出,用 1.5 mL 的 EP 管收集洗脱液,对出峰位置进行 SDS-PAGE 分析以选择最佳的咪唑洗脱浓度。

c. 将收集到的 SUMO-MAA 融合蛋白透析纯化,用截留分子量为 7kDa 的透析袋,烧杯中倒入 PBS 作为透析液,放入搅拌子和装着 MAA 的透析袋,4℃冰箱中透析 12h,PBS 要每隔 3h 换一次,透析结束后以截留分子量为 3kDa 的超滤管简单浓缩,BCA 试剂盒法测浓度并于-40℃保存。

2.5.2 MAA 蛋白纯化

SUMO 酶能够切断 SUMO 与 MAA 的连接, 并且 SUMO 酶、切下的 SUMO 标签都携带 His 标签, 能够与 Ni 柱结合, 而 MAA 不带任何标签, 可利用 Ni 柱对其进行分离, 含 His 标签的 SUMO 与 SUMO 酶被 Ni 柱捕获, MAA 蛋白作为流出液回收, 具体操作如下。

(1) 将已知浓度的 SUMO-MAA 融合蛋白酶切, 每 100 μg 蛋白以 5U 的 SUMO 酶于 4°C 酶切 16h。

(2) 将酶切产物加入 PBS 稀释 10 倍以减慢纯化速度使之与 Ni 柱充分结合, 收集流出液。

(3) 将酶切前样品、酶切后产物以及纯化后流出液产物进行 SDS-PAGE 分析鉴定蛋白纯化情况。

(4) BCA 试剂盒法测 MAA 蛋白浓度, 按照说明书以 PBS 作为阴性对照建立标准曲线, 计算出 MAA 浓度并标记, -40°C 保存待用。

2.6 抗 MAA 单克隆抗体的制备与纯化

2.6.1 免疫小鼠并筛选

将上述获得的 MAA 作为抗原与弗氏佐剂按照 1:1 混合, 皮下注射免疫 6 周龄 BALB/c 雌鼠, 免疫程序如表 2-7 所示。分别于第二次免疫后一周以及第三次免疫后一周于小鼠眼静脉丛采血检测血清效价, 继续免疫效价高的。最终筛选效价高、特异强的小鼠准备细胞融合。

表 2-7 免疫程度

Table2-7 Immunization program						
免疫次数	首次免疫	二次免疫	三次免疫	四次免疫	五次免疫	六次免疫
免疫日期	0 d	14 d	28 d	42 d	56 d	73 d
免疫剂量	100 μg /只	100 μg /只	200 μg /只	200 μg /只	300 μg /只	300 μg /只
免疫佐剂	弗氏完全佐剂	弗氏不完全佐剂	弗氏不完全佐剂	弗氏不完全佐剂	弗氏不完全佐剂	无
免疫方法	皮下及肌肉	皮下及肌肉	皮下及肌肉	皮下及肌肉	皮下及肌肉	腹腔注射

间接 ELISA 法筛选阳性血清, 具体如下:

(1) 用 CBS 包被液稀释 MAA 至 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 并以 100 μL /孔加入酶标板, 4°C 过夜。

(2) 次日倒掉包被液, PBST 洗涤 (同 2.4.1 (3)) 并拍干酶标板, 每孔加入 200 μL 的 1% 明胶封闭, 37°C, 2h。然后同样弃液体并 PBST 洗涤并拍干。

(3) 一抗反应: 将抗血清用 1% BSA 先按 1:400 稀释, 随后 2 倍倍比稀释, 100 μL /孔加入酶标板, 以 PBS 作为阴性对照, 37°C 反应 2h。

(4) 弃一抗, 同样方法洗涤酶标板。

(5) 二抗反应参照 2.4.1 (3)。

(6) 显色及终止参照 2.4.1 (3), 读取 OD_{450nm} 的值并判断阳性血清效价。

(7) 同样用间接 ELISA 检测血清特异性, 选择酪蛋白、BSA、 α -乳清蛋白和 β -乳清蛋白等牛源蛋白以及实验室保存的其他蛋白共 10 种蛋白作为干扰蛋白, 筛选特异性较佳的血清的小鼠细胞融合。

2.6.2 细胞融合及筛选

(1) 细胞准备: 参考文献^[14, 15]进行骨髓瘤细胞、饲养细胞以及脾细胞的准备。

(2) 细胞融合: 在 50mL 融合管中加入以 1:20 混合的骨髓瘤细胞和脾细胞, 用 DMEM 基础培养基稀释后 1000rpm 离心 5min 并去上清。然后缓慢加入 1mL 在 37℃ 预热过多的 50% PEG 溶液, 轻摇混匀, 置于 37℃ 热反应 90s, 再加入 30mL 的 DMEM 培养基。置于 37℃ 水浴 10min, 离心 5min, 去上清后加入 5mL HAT 培养基重悬并转移到细胞瓶内加入 HAT 培养基至 60mL, 融合后的细胞加入到铺好饲养细胞的 96 孔细胞培养板中, 培养 5 天后换培养基, 8-10 天后用换成 HT 培养基, 观察细胞状态, 生长至占满培养板底部 30%-50% 时开始筛选。

(3) 间接 ELISA 法筛选阳性杂交瘤细胞, 方法同 2.6.1, 以杂交瘤细胞上清作为一抗, PBS 为阴性对照, 筛选阳性细胞株并进行亚克隆。

(4) 间接 ELISA 法筛选亚克隆产物, 直至检测出 100% 阳性孔, 挑出单克隆孔扩大培养, 同上特异性实验筛选最终可供后续使用的杂交瘤细胞株, 并将阳性杂交瘤细胞株加入冻存液冻存。

2.6.3 单抗腹水的制备及纯化

(1) 腹水制备

a. 将冻存的杂交瘤细胞复苏, 具体步骤为: 42℃ 水浴快速溶解细胞, 然后转移至细胞培养瓶中, 加入 10mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 置于 CO₂ 细胞培养箱培养, 观察细胞状态并扩大培养用于后续实验。

b. 对 8-10 周龄的 BALB/c 雌鼠腹腔注射无菌液体石蜡以抑制其免疫反应, 0.5mL/只。

c. 注射石蜡 7 日后将生长状态良好的处于对数期的细胞 800rpm 离心 5min 后用不含 FBS 的 DMEM 培养基重悬, 将悬浮细胞以大概 10^6 细胞/只的量液注射小鼠腹腔

d. 注射约 7 日后待小鼠腹部明显隆起, 采集腹水, 2500rpm 离心 10min 弃去沉淀部分, 保留上清并冻存于 -20℃, 待小鼠腹部肿大后继续采集腹水, 一般可进行 2-3 次采集^[16, 17]。

(2) 纯化腹水

腹水纯化过程按照 Protein A 预装重力柱说明书进行，纯化后进行 SDS-PAGE 电泳分析。具体如下：

- a. 将离心后的腹水分别用 0.45 μm 、0.22 μm 滤器过滤去除杂质。
- b. 用同体积腹水结合 BindingBuffer 稀释腹水。
- c. 用 BindingBuffer 平衡预装柱，用量约为 5 倍柱体积，控制流速大约为 3-5s/滴。
- d. 将上述稀释后的腹水过柱，流速同上。
- e. 先用 Binding Buffer 过柱洗脱杂蛋白，然后用 10 倍柱体积的洗脱液(Elution buffer)洗脱抗体蛋白。
- f. 收集上述抗体并对其进行 SDS-PAGE 分析，纯化后的腹水测浓度后加入 50% 甘油冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.6.4 单抗效价及特异性测定

(1) 效价测定

采用间接 ELISA 法测定单克隆抗体效价，具体方法如下：

- a. 将 MAA 抗原 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 包被于 ELISA 板，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。
- b. 次日弃 MAA 溶液并拍干 ELISA 板，PBST 洗法同上，结束后加入 300 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的 1%BSA 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2h。
- c. 弃封闭液，同样方法洗板，以 CBS 为包被液 2 倍倍比稀释抗体，把 PBS 作为阴性对照，置 37 $^{\circ}\text{C}$ ，2h。
- e. 倒出抗体液拍干并洗板，每孔加入 100 μL HRP 标记羊抗鼠二抗(1:5000 稀释)，置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h。
- f. 取出 ELISA 板，同样用 PBST 洗后加入 TMB 显色液，100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，避光下让其反应 15min。
- g. 加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 2M 的 H_2SO_4 终止显色。
- h. 在 5min 内完成在酶标仪上 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值测定，当 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值读数约为 PBS 阴性对照的 2.1 倍 (P/N=2.1) 时稀释的最大倍数作为抗体的效价。
- i. 对抗原包被浓度进行优化，从 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 开始倍比稀释并测定每个浓度的效价，选择效价最高的抗原浓度包被。

(2) 特异性测定

分别以 MAA、BSA 以及两株 his 标签蛋白 his-1694、his-1683 为包被抗原，调整几株蛋白的浓度都为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，以 CBS 按 1:5000 分别稀释两株抗体，同时进行间接 ELISA 实验，测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 的值并进行比较。

2.6.5 单克隆抗体亚型鉴定

亚型鉴定原理同 2.6.3 间接 ELISA 方法,以 CBSA 按稀释 MAA 蛋白至 $10\mu\text{g/mL}$, 包被酶标板,纯化后的抗体稀释 1000 被作为一抗,单抗亚型鉴定试剂盒内的羊抗鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA、Ig κ 、Ig λ 作为二抗,最后用 TMB 显色 15min, H_2SO_4 终止显色,颜色最深或 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值最高对应的小鼠单抗亚型即为该待测抗体的亚型。

3 结果及分析

3.1 重组表达质粒的构建

利用 MAA 特异性引物对重组表达质粒 pET28a-SUMO-MAA 进行 PCR 鉴定,PCR 扩增结果如图 2-1 A 所示,与目的片段大小 396bp 相符合,图 2-1 B 为重组质粒的 SacI、BamHI 双酶切鉴定结果,结果显示酶切后质粒由环形变为线形,且在 396bp 处出现目的条带,重组质粒测序结果显示目的基因连接成功并且与 NCBI 基因比对同源性达 100%,表明重组表达质粒构建成功。

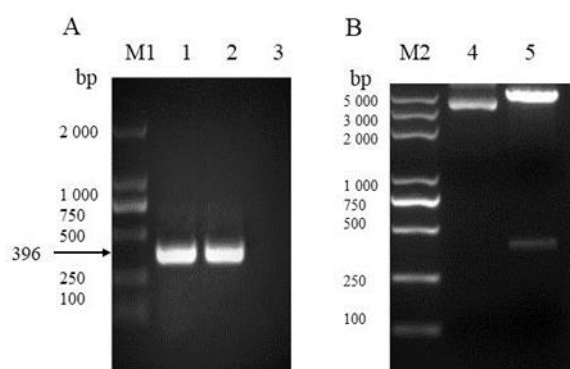


图 2-1 重组质粒的鉴定结果

Figure 2-1 Identification result of recombinant plasmid

A. 重组质粒的 MAA 基因 PCR 扩增结果; B. 重组质粒双酶切鉴定。M1.DL2000 DNA Maker; 1-2.MAA 基

因 PCR 产物; 3.空白对照; M2.DL5000 DNA Maker; 4.重组质粒酶切前; 5.重组质粒酶切后

A. The results of PCR amplification of the MAA gene of the recombinant plasmid; B. Identification of the recombinant plasmid by double enzyme digestion. M1.DL2000 DNA Maker; 1-2. MAA gene PCR product; 3. Blank control;

M2.DL5000 DNA Maker; 4. Before digestion of recombinant plasmid; 5. After digestion of recombinant plasmid

3.2 SUMO-MAA 融合蛋白的表达

测序正确的菌株经 IPTG 诱导后,与 pET28a-SUMO-MAA (BL21) 未诱导产物、

pET28a-SUMO 诱导产物、pET28a-SUMO 未诱导产物以及 BL21 (DE3) pLySs 培养产物进行 SDS-PAGE 对照分析,如图 2-2,重组表达菌株 pET28a-SUMO-MAA(BL21) 诱导后在 35kDa 左右出现目的 SUMO-MAA 融合蛋白条带,发现没有加诱导剂的菌株同样在 35kDa 处出现蛋白条带,说明在未诱导的菌株存在本底表达。空载体诱导前后和 BL21 在 35kDa 均无目的条带。

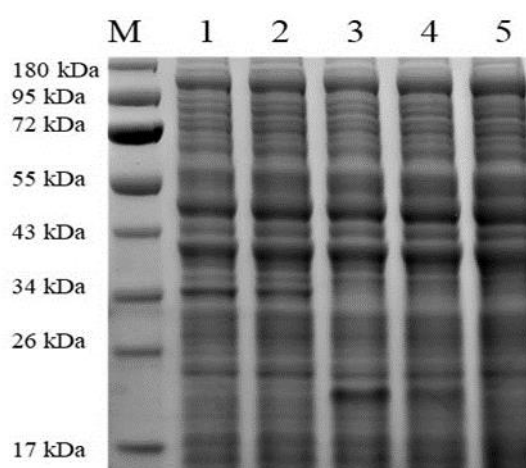


图 2-2 SUMO-MAA 蛋白表达情况 SDS-PAGE 验证

Figure 2-2 SDS-PAGE verification of SUMO-MAA protein expression

M. PageRuler 蛋白 Marker; 1. pET28a-SUMO-MAA 诱导表达产物; 2. pET28a-SUMO-MAA 未诱导产物; 3.pET28a-SUMO 诱导表达产物; 4.pET28a-SUMO 未诱导产物; 5.BL21 产物

M. PageRuler protein Marker; 1. pET28a-SUMO-MAA induced expression product; 2. pET28a-SUMO-MAA uninduced product; 3. pET28a-SUMO induced expression product; 4. pET28a-SUMO uninduced product; 5. BL21 product

3.3 SUMO-MAA 表达条件优化

3.3.1 最佳诱导温度

研究表明低温条件有利于大肠杆菌诱导表达重组融合蛋白,提高蛋白质稳定性,然而,诱导温度降低又极大限制了宿主菌的生长,导致蛋白质总体产量下降^[18]。我们选择三个常用表达温度分别为 16℃、28℃、37℃作为优化条件,如图 2-3 所示,SDS-PAGE 电泳结果显示在其他表达条件相同的情况下,融合蛋白在 16℃上清表达量最多,Western Blot 显示相同结果。所以我们选择 16℃为表达温度。

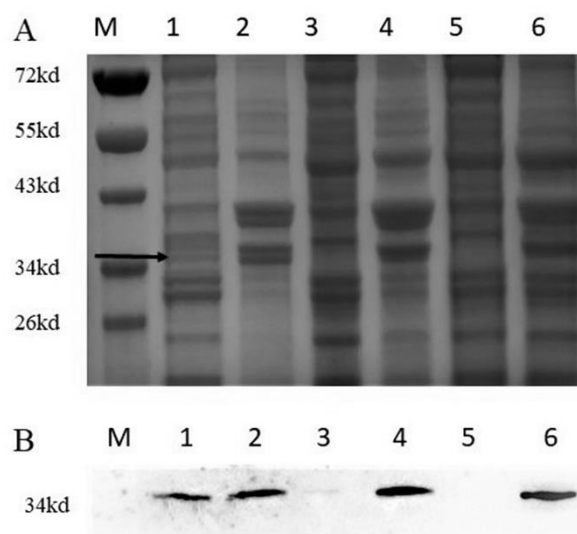


图 2-3 融合蛋白在不同诱导温度下的表达情况

Figure 2-3 The expression of the fusion protein at different induction temperatures

A. 不同诱导温度下的 SDS-PAGE 结果; B. 不同诱导温度下的 WB 结果; M. PageRuler 蛋白 Marker; 1.16°C 诱导上清样品; 2.16°C 诱导沉淀样品; 3.28°C 诱导上清样品; 4.28°C 诱导沉淀样品; 5.37°C 诱导上清样品; 6.37°C 诱导沉淀样品

A. SDS-PAGE results at different induction temperatures; B. Western Blot results at different induction temperatures; M. PageRuler protein Marker; 1.16 °C induced supernatant samples; 2.16 °C induced precipitation samples; 3.28 °C induced precipitation samples; 4.28 °C induced precipitation Sample; 5.37°C induced supernatant sample; 6.37°C induced precipitation sample

3.3.2 最佳诱导时间

从图 2-4 可以看出, 保证其他条件相同, 诱导 7h 时融合蛋白的上清表达量相对最多, 时间过长蛋白表达多的同时由于 MAA 蛋白的毒性作用菌体裂解减少, 相同体积菌液的蛋白量也相对减少。所以最终选择 7h 为最佳诱导时间。

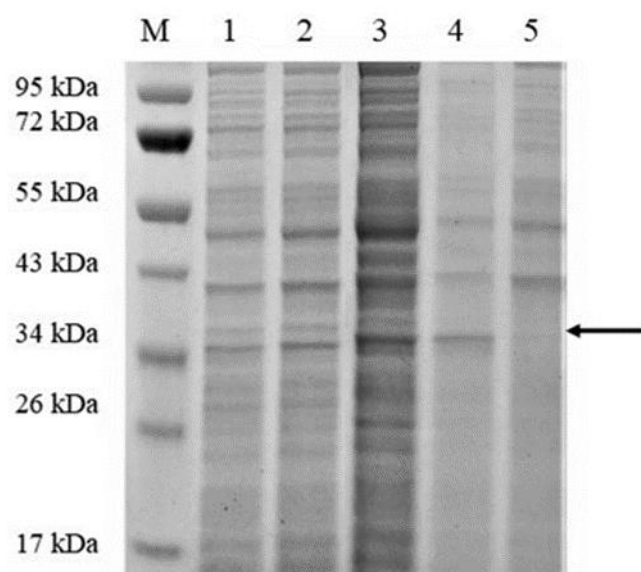


图 2-4 融合蛋白在不同诱导时间下 SDS-PAGE 结果

Figure 2-4 SDS-PAGE results of fusion protein under different induction time

M. PageRuler 蛋白 Marker; 1-5.分别是 3、5、7、10、12h 诱导时间下融合蛋白的表达产物

M. PageRuler protein Marker; 1-5. are the expression products of the fusion protein under the induction time of 3, 5, 7, 10, and 12h

3.3.3 最佳 IPTG 浓度

乳糖类似物 IPTG 在诱导蛋白表达的同时也会对菌体带有毒性作用^[19]。从蛋白表达量以及稳定性, 根据图 2-5 中 SDS-PAGEd 电泳结果, 0.5 mmol/L 是最佳的 IPTG 浓度。

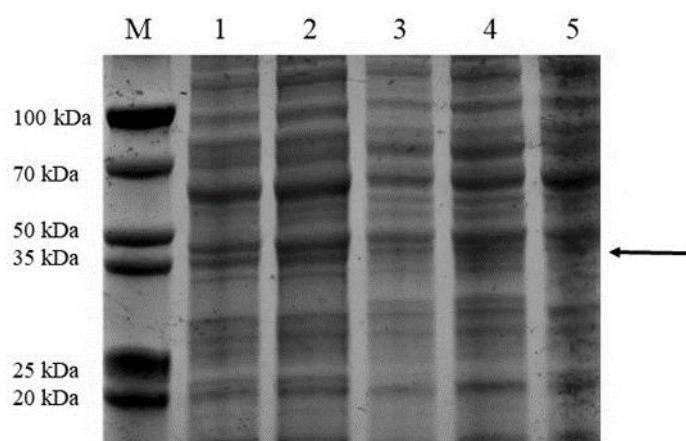


图 2-5 不同 IPTG 浓度诱导下蛋白表达情况

Figure 2-5 Protein expression induced by different IPTG concentrations

M. PageRuler 蛋白 Marker; 1-5 分别为 0.3、0.5、0.7、1.0、2.0mmol/Lol/L 的 IPTG 浓度诱导下的蛋白表达

SDS-PAGE 结果

M. PageRuler Protein Marker; 1-5 are respectively 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 2.0mmol/L IPTG concentration induced protein expression SDS-PAGE results

3.4 MAA 蛋白纯化

3.4.1 SUMO-MAA 融合蛋白纯化

通过镍（Ni）亲和层析柱以及 AKTA pure 蛋白纯化仪对融合蛋白进行纯化，从 AKTA pure 蛋白纯化仪峰图（图 2-6A）以及出峰位置洗脱液的 SDS-PAGE（图 2-6B）分析可以看出，在咪唑浓度高于 0.30 mol/L 便可洗出目的蛋白，所以我们选择咪唑浓度 0.20 mol/L 作为杂蛋白清洗液 Wash Buffer，蛋白洗脱液 Elution Buffer 设置为咪唑浓度 0.5 mol/L，分别收集蛋白原液、蛋白样品流出液、Wash Buffer 流出液、Elution Buffer 蛋白洗脱液进行 SDS-PAGE 分析，如图 2-6C 所示，样品流出液里基本不存在目的蛋白说明融合蛋白已大部分结合在镍柱上，Wash Buffer 流出液也基本未出现目的蛋白条带，而蛋白洗脱液的电泳结果表明其明显是目的蛋白条带，说明选择的 Wash Buffer 与 Elution Buffer 中咪唑浓度合适。

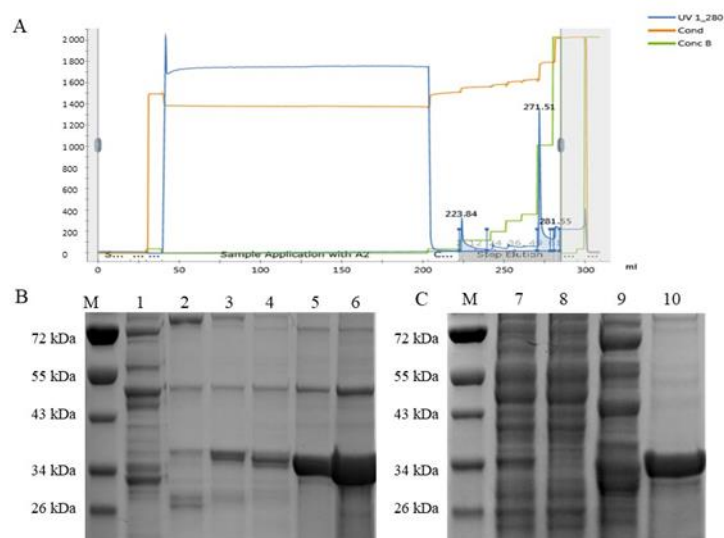


图 2-6 融合蛋白的纯化结果

Figure 2-6 Purification result of fusion protein

A.不同咪唑浓度洗脱的蛋白纯化仪峰图；B.不同咪唑浓度蛋白洗脱液的 SDS-PAGE 结果；C.融合蛋白纯化情况；M. PageRuler 蛋白 Marker；1-6 分别为 0.15、0.20、0.30、0.40、0.45、0.50mmol/L 咪唑蛋白洗脱液流出产物；

7.纯化前蛋白样品；8.样品流出液；9.Wash Buffer 流出液；10.蛋白洗脱液

A. Peak diagrams of protein purifiers eluted with different imidazole concentrations; B. SDS-PAGE results of protein eluates with different imidazole concentrations; C. Purification of fusion protein; M. PageRuler Protein Maker; 1-6 are respectively 0.15 and 0.20 , 0.30, 0.40, 0.45, 0.50mmol/L imidazole protein elution product; 7. Protein sample before purification; 8. Sample effluent; 9. Wash Buffer effluent; 10. Protein eluate

3.4.2 酶切 SUMO-MAA 并纯化

我们将纯化后的融合蛋白用透析袋二次纯化并脱盐，然后用 SUMO 酶切断 SUMO-His 标签后过 Ni 柱二次纯化，带有 His 标签的 SUMO 蛋白以及 SUMO 酶与镍柱结合，无 His 标签的 MAA 蛋白流出 Ni 柱，将酶切前后、过镍柱后的样品 SDS-PAGE 电泳分析。结果如图 2-7,酶切后的蛋白液过柱后流出液中基本只含有 17kDa 左右的 MAA 蛋白，纯度达 90%以上。

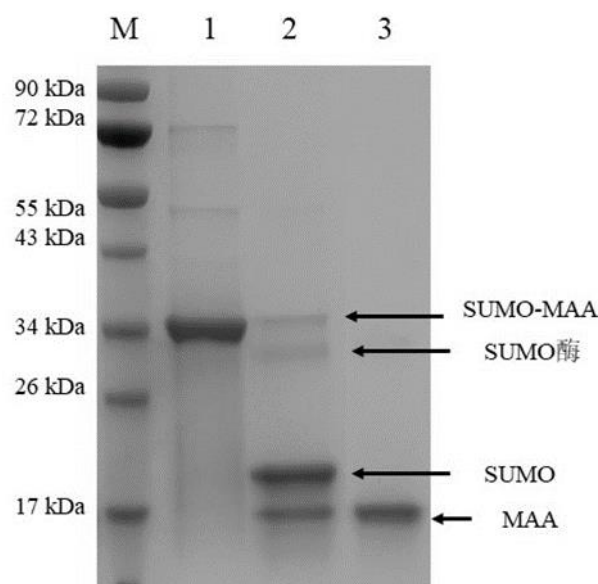


图 2-7 融合蛋白的酶切以及纯化 SDS-PAGE 结果

Figure 2-7 SDS-PAGE results of restriction digestion and purification of fusion protein

M.PageRuler 蛋白 Marker; 1.酶切前样品; 2.酶切后样品; 3.过镍柱纯化后样品

Figure 2-7 SDS-PAGE results of digestion and purification of fusion protein M. PageRuler protein Marker; 1. Sample before digestion; 2. Sample after digestion; 3. Sample after purification by nickel column

3.5 制备及纯化单克隆抗体

3.5.1 筛选杂交瘤细胞株

第三次免疫后一周小鼠抗血清效价检测结果见表 2-8，共有 4 只小鼠效价较高，

效价均在 1:25600 以上。特异性检测发现 3 号小鼠的抗血清特异性最强，所以我们选择 3 号小鼠进行细胞融合。

表 2-8 抗血清效价测定结果

Table 2-8 Antiserum titer determination results				
血清稀释度 Serum titers	OD450nm			
	1 号	2 号	3 号	4 号
1:400	2.817	3.178	3.019	2.937
1:800	2.230	2.991	2.796	2.153
1:1600	1.697	2.620	2.087	1.641
1:3200	1.068	1.887	1.135	1.530
1:6400	0.734	1.023	0.875	0.922
1:12800	0.590	0.799	0.676	0.556
1:25600	0.197	0.368	0.253	0.197
1:51200	0.153	0.146	0.167	0.133
1:102400	0.098	0.011	0.128	0.109
阴性对照	0.070	0.065	0.078	0.081
效价	1:51200	1:51200	1:51200	1:25600

3.5.2 筛选杂交瘤细胞株

将 3 号小鼠细胞融合后，用间接 ELISA 法筛选阳性细胞株，我们共筛选到了 3 株分泌单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞株，编号为 3G11、8E10、7H9，细胞液上清效价检测结果见表 2-9，扩大培养后进行特异性实验，考虑效价和特异性，我们选择 3G11 和 8E10 两株细胞制备腹水并纯化单抗。

表 2-9 单克隆细胞株上清效价检测结果

Table 2-9 Supernatant titer test results of monoclonal cell lines	
细胞株名称 Cell line name	上清效价 Supernatant titer
3G11	1:51200
8E10	1:102400
7H9	1:25600

3.5.3 单克隆抗体腹水的纯化

将筛选到的两株分泌单克隆抗体的细胞命名为 3G11、8E10。采用 ProteinA 预装重力柱纯化腹水后对其进行 SDS-PAGE 电泳分析，如图 2-8 所示，纯化后蛋白胶上出现两条条带，分别为鼠 IgG 重链和轻链，表明腹水纯化效果可观。

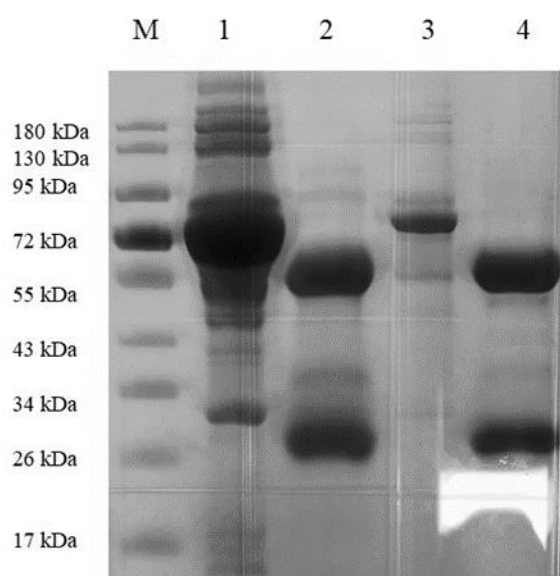


图 2-8 腹水 ProteinA 纯化前后 SDS-PAGE 情况

Figure 8 SDS-PAGE of ascites before and after the purification of ProteinA

M. PageRuler 蛋白 Marker; 1.纯化前 3G11; 2.纯化后 3G11; 3.纯化前 8E10; 4.纯化后 8E10

M. PageRuler protein Marker; 1. 3G11 before purification; 2. 3G11 after purification; 3. 8E10 before purification; 4. 8E10 after purification

3.5.2 单抗效价测定结果

3G11、8E10 两株抗体的效价测定结果如表 2-10 所示，MAA 浓度优化结果得出当 MAA 抗原包被浓度为 $2.5\mu\text{g/mL}$ 时 3G11 和 8E10 的效价测定最高，所以以抗原浓度 $2.5\mu\text{g/mL}$ 的效价测定为准，3G11、8E10 两株抗体的效价分别为 1:51200 和 1:102400，效价满足于后续实验使用。

表 2-10 单克隆抗体效价测定结果

Table 2-10 Results of monoclonal antibody titer determination		
稀释度	OD _{450nm}	
Dilution	3G11 抗体	8E10 抗体
1:200	3.303	3.396
1:400	3.003	3.447
1:800	2.378	3.221
1:1600	1.641	3.001
1:3200	1.231	2.836
1:6400	0.671	2.108
1:12800	0.372	1.348
1:25600	0.213	0.882
1:51200	0.151	0.246
1:102400	0.106	0.179
1:204800	0.095	0.121
阴性对照	0.071	0.062
效价	1: 512000	1:102400

3.5.3 单克隆抗体特异性分析

分别以 MAA、BSA 以及两株 his 标签蛋白 his-1694、his-1683 相同浓度为包被抗原，ELISA 测定后结果如图 2-9 所示，抗体 3G11 与 8E10 与 MAA 反应 OD450nm 值均达 0.9 以上，而与其他干扰蛋白均小于 0.2。ELISA 结果证明抗体特异性较好。

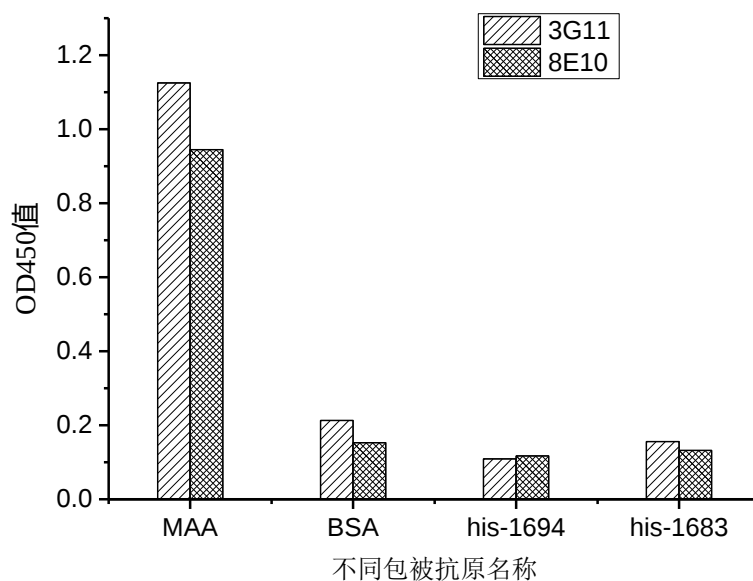


图 2-9 两株抗体特异性测定鉴定结果

Figure 2-9 Results of the specificity determination of the two strains of antibodies

3.5.4 单克隆抗体亚型鉴定结果

使用购买的单克隆抗体亚型鉴定试剂盒测定两株抗体的亚型结果如表 2-9 所示，两株抗体的亚型均为 IgG 型，轻链均为 κ 型。

表 2-9 单克隆抗体亚型鉴定结果

Table 2-9 Identification results of monoclonal antibody subtypes		
抗体名称 Antibody name	抗体亚型 Antibody subtype	轻链 Light chain
3G11	IgG	κ
8E10	IgG	κ

4 讨论

乳业参与者都深知奶牛乳腺炎所带来的经济负担和牛奶质量的负面影响，在这种

形式下, 目前有大量已有或者正在 研发的检测技术以尽快发现乳腺炎。目前存在几种乳腺炎指示标志包括体细胞数 (SCC)、酶活性、电导率以及 pH 值, 一些研究还发现 SCC 受多种因素影响包括动物压力, 营养, 泌乳阶段, 胎次和所采样牛奶的质量^[20]。其他方法大多存在不稳定、对低 SCC 敏感度低等缺点, 环境温度等条件也会多少影响酶活性。炎症初发时, 乳汁中牛奶淀粉样蛋白 A 明显升高, 能够有效指示隐性奶牛乳腺炎且不受其他条件的影响, MAA 作为奶牛乳腺炎生物标志物早已得到证实, 早在 2001 年研究发现 MAA 对于区分健康奶牛和乳腺炎奶牛有重要价值, 在牛奶中, 敏感性达 93%, 特异性达 100%^[21, 22]。血淀粉样蛋白 A 在人类医院临床诊断方面已达成成熟, 但对于奶牛方面的研究较少, 为了进一步深入 MAA 的研究包括基理、检测方法等方面, 获得天然活性蛋白及其单克隆抗体具有重要意义。

在本研究中我们使用目前应用最广的大肠杆菌原核表达系统对 MAA 进行表达, 大肠杆菌表达系统具有易于纯化、表达量高、成本低等优点^[23]。SUMO 广泛分布于真核生物细胞内, SUMO 化修饰可以保持融合蛋白基因的稳定性, 使多肽正常折叠, 能够促使融合蛋白可溶性表达^[24, 25]。同时 SUMO 酶可以高效地将 SUMO 从融合蛋白上切除且不残留氨基酸残基。因此, 我们在构建重组表达质粒的时候引入 SUMO 基因获得可溶性融合蛋白, 再利用 SUMO 酶切除制得天然型 MAA 蛋白。重组蛋白的可溶性表达十分关键, 若蛋白无法在上清表达而表达与包涵体中, 表达在包涵体中的蛋白为变性蛋白, 需要复性才能恢复其活性, 操作繁琐, 最主要的是经复性的包涵体蛋白不能保证具有与可溶性表达蛋白一致的免疫原性^[26]。因此, 本研究致力于在增加蛋白在上清中的表达。

BL21 (DE3) pLySs 大肠杆菌感受态细胞含有促进毒性蛋白表达的 pLySs 质粒, 可用于炎症蛋白 MAA 的表达, 为成功获得 MAA 可溶性蛋白及其单克隆抗体, 本研究对其进行了重载表达质粒的构建并优化了表达条件。结果表明, 我们成功表达出了可溶性的 MAA 蛋白, 大小约为 15kDa, 并成功制备出两株抗 MAA 单克隆抗体。

5 本章小结

本研究在前期已尝试 BL21 (DE3)、Rosetta、Rosetta-gami 几种感受态作为表达菌株, 可溶性表达效果均不理想, 最终选择 BL21 (DE3) pLySs 作为表达菌株。在对融合蛋白的表达温度、诱导时间、IPTG 浓度进行优化后大量表达, 纯化过程均利用镍亲和层析柱获得纯度高、均一性好的 SUMO-MAA 蛋白, SUMO 酶切纯化后我们获得了纯度较高的完全天然 MAA 蛋白。同时我们将制备 MAA 蛋白注射小鼠, 通过细胞融合、亚克隆筛选、扩增培养获得两株分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株 3G11、8E10,

细胞培养至对数期后于小鼠腹腔注射杂交瘤细胞，经收集腹水、ProteinA 柱纯化获得单克隆抗体。本研究成功表达了高纯度、高均一性的 MAA 蛋白以及高敏感性和特异性的单克隆抗体，获得 MAA 天然蛋白对于后续的研究十分有意义，单克隆抗体的成功制备能够有效促进例如免疫荧光法、免疫阻抗、胶体金免疫层析等基于免疫原理的技术研发。在后续的研究中将探索基于 MAA 蛋白及其单克隆抗体的奶牛乳腺炎检测系统以期实现奶牛乳腺炎及时准确的检测。

参考文献

- [1] Fernanda G, Jos é S, Mariana H. Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms [J]. *Pathog Dis*, 2016, 74(3): ftw006.
- [2] Ruegg P L. Monitoring milk quality, milking management and udder health [J]. *Cattle Pract*, 2014, 22(Pt.2):169-175.
- [3] Blowey R, Edmondson P. Mastitis Control in Dairy Herds [J]. *cabi*, 2010,67(3):243-246.
- [4] Sadek K, Saleh E, Ayoub M. Selective, reliable blood and milk bio-markers for diagnosing clinical and subclinical bovine mastitis [J]. *Tropical Animal Health & Production*, 2017, 49(2): 1-7.
- [5] 朱战波, 任宪刚, 崔玉东, 朴范泽. 牛源金黄色葡萄球菌凝固酶基因的分型[J]. *中国兽医学报*, 2007, 27(005): 728-730.
- Zhu ZB, Ren XG, Cui YD, Piao FZ. Typing of coagulase genes from bovine *Staphylococcus aureus* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2007, 27(005): 728-730. (in Chinese)
- [6] 郭昌明, 张乃生, 周昌芳, 杨正涛, 魏东, 张志刚. 髓过氧化物酶检测奶牛隐性乳房炎研究进展[J]. *动物医学进展*, 2006, 27(006): 54-57.
- Guo CM, Zhang NS, Zhou CF, Yang ZT, Wei D, Zhang ZG. Research progress on detection of myeloperoxidase in dairy cows with recessive mastitis [J]. *Advances in Veterinary Medicine*, 2006, 27(006): 54-57. (in Chinese)
- [7] McDonald T L, Larson M A, Mack D R, Weber A. Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum [J]. *Vet Immunol Immunop*, 2001, 83(3-4): 203-211.
- [8] Jaeger S, Virchow F, Torgerson P R, Bischoff M, Biner B, Hartnack S, Ruegg S R. Test characteristics of milk amyloid A ELISA, somatic cell count, and bacteriological culture for detection of intramammary pathogens that cause subclinical mastitis [J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(9): 7419-7426.
- [9] Domanska D, Gajewski Z, Domino M, Dazbrowski M, Kroemker V, Trela M. Factors influencing Serum Amyloid A and Milk Amyloid A concentrations in the predilection period of mastitis in mares [J]. *Reprod Domest Anim*, 2015, 50(3):51-51.
- [10] Miglio A, Moscati L, Fruganti G, Pela M, Scoccia E, Valiani A, Maresca C. Use of milk amyloid A in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy ewes [J]. *Journal of Dairy Research*, 2013, 80(4): 496-502.
- [11] 薛永康, 闫磊, 张震, 赵玉玺, 虎啸, 朱邯豫, 王新庄. 乳清急性期蛋白,乳酶作为奶牛隐性乳腺炎诊断指标的研究[J]. *中国兽医学报*, 2018, 38(008): 1592-1597.

Xue YK, Yan L, Zhang Z, Zhao YX, Hu X, Zhu HY, Wang XZ. Study on whey acute phase protein and lactase as diagnostic indicators for dairy cows recessive mastitis[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2018, 38 (008): 1592-1597. (in Chinese)

[12] 杨德英. 奶牛乳房炎对乳酶活性、急性期蛋白含量的影响及其作为隐性乳房炎诊断指标的研究[D]; 四川农业大学.

Yang DY. The effect of dairy cow mastitis on lactase activity and protein content in the acute phase and its use as a diagnostic index for recessive mastitis [D]; Sichuan Agricultural University. (in Chinese)

[13] Thomas F C, Waterston M, Hastie P, Parkin T, Haining H, Eckersall P D. The major acute phase proteins of bovine milk in a commercial dairy herd [J]. BMC Vet Res, 2015, 11.

[14] 王雯. 小反刍兽疫病毒武威分离株 N 蛋白单克隆抗体的制备[D]; 甘肃农业大学.

Wang W. Preparation of monoclonal antibody against N protein of Peste des ruminants virus Wuwei isolate[D]; Gansu Agricultural University. (in Chinese)

[15] 钟红. TA 毒素高灵敏度定量速测试剂盒研究及单克隆抗体制备[D]; 西南大学.

Zhong H. TA Toxin High Sensitivity Quantitative Rapid Test Kit Research and Monoclonal Antibody Preparation [D]; Southwest University. (in Chinese)

[16] 张文娟. REV 囊膜糖蛋白 env 基因的原核表达及单克隆抗体的制备与应用[D]; 山东农业大学.
Zhang WJ. Prokaryotic expression of REV envelope glycoprotein env gene and preparation and application of monoclonal antibodies [D]; Shandong Agricultural University. (in Chinese)

[17] 杨娟. 猪轮状病毒 GD-01-2015 的全基因序列分析及双夹心 ELISA 方法的建立[D]; 扬州大学, 2017.

Yang J. Whole gene sequence analysis of porcine rotavirus GD-01-2015 and establishment of double sandwich ELISA method [D]; Yangzhou University, 2017. (in Chinese)

[18] Vera A, Gonzalez-Montalban N, Aris A, Villaverde A. The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures [J]. Biotechnol Bioeng, 2007, 96(6): 1101-1106.

[19] 陈亮. 乳糖替代 IPTG 诱导脱色酶 TpmD 基因在大肠杆菌中的高效表达[J]. 微生物学通报, 2009, 36(004):0551-0556.

Chen. Replacement of IPTG with lactose induces high-level expression of decolorizing enzyme TpmD gene in Escherichia coli [J]. Microbiology Bulletin, 2009, 36(4): 0551-6. (in Chinese)

[20] 姜媛媛, 刘铭瑶, 任桂萍, 朱慧萌, 李德山. 高效可溶性重组蛋白表达载体的构建[J]. 生物工程学报, 2010(01):121-129.

Jiang YY, Liu MY, Ren GP, Zhu HM, Li DS. Construction of high-efficiency soluble recombinant protein expression vector [J]. Chinese Journal of Bioengineering, 2010(01): 121-129. (in Chinese)

- [21] Lam T, Riekerink R O, Sampimon O C, Smith H. Mastitis diagnostics and performance monitoring: a practical approach [J]. Irish Vet J, 2009, 62(Suppl 4):34-39.
- [22] Eckersall P D, Young F J, Mccomb C, Hogarth C J, Fitzpatrick J L. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis [J]. The Veterinary record, 2001, 148(2): 35-41.
- [23] Raquel L, Alice A, Amauri A. Update on Senecavirus Infection in Pigs [J]. Viruses, 2017, 9(7): 170.
- [24] 刘微, 姚杨, 马萧萧, 邓裕宣, 梅迪, 刘磊, 王会岩. 融合表达载体 pET22b-SUMO-FGFR4 的构建及其在大肠杆菌中表达条件的优化[J]. 吉林大学学报(医学版), 2016, 042(004): 642-647.
- Liu W, Yao Y, Ma XX, Deng YX, Mei D, Liu L, Wang HY. Construction of fusion expression vector pET22b-SUMO-FGFR4 and optimization of its expression conditions in *E. coli* [J]. Journal of Jilin University (Medical Edition), 2016, 042(004): 642-647. (in Chinese)
- [25] 张素玲, 吴芑, 岳亚男, 白晨雨, 郝丽影, 李向东, 逢文强, 田克恭. 非洲猪瘟病毒 MGF505-5R 蛋白表达与纯化[J]. 河南农业科学, 2020, (10).
- Zhang SL, Wu P, Yue YN, Bai CY, Hao LY, Li XD, Pang WQ, Tian Kegong. Expression and purification of African swine fever virus MGF505-5R protein [J]. Henan Agricultural Sciences, 2020, (10). (in Chinese)
- [26] 蔡琴, 张文举, 陈沁. 花生过敏原 Ara h 2.02 原核表达方法条件的研究[J]. 食品与机械, 2015, 031(002): 48-51.
- Cai Q, Zhang WJ, Chen Q. Study on the conditions of prokaryotic expression method of peanut allergen Ara h 2.02 [J]. Food and Machinery, 2015, 031(002): 48-51. (in Chinese)

第三章 检测MAA蛋白的分子印迹电化学传感器的制备及初步应用

摘要：乳腺发炎会导致农场和乳业重大损失，为了更好地控制和制备治疗策略，建立及时诊断技术具有重要意义。本研究建立了一种分子印迹电化学传感器，用于检测牛奶中的 MAA，以早期诊断奶牛的亚临床乳腺炎。首先使用纳米复合材料（还原的氧化石墨烯/金纳米颗粒，AuNPs @ rGO）构建电化学传感器，以修饰工作电极。然后使用吡咯作为功能单体固定模板蛋白 MAA，循环伏安法以进行电聚合。最后，洗脱剂去除模板蛋白以形成具有定性和定量信号转导 MAA 的能力的分子印迹膜。采用循环伏安法（CV），差分脉冲伏安法（DPV）和扫描电子显微镜（SEM）用于表征分子印迹传感器电极（MIPs/GCE）的修饰过程，同时构建非分子印迹传感器电极（NIPs/GCE）作为对照表征修饰过程。优化传感器的复合材料用量、吡咯浓度、电聚合圈数、电聚合速率、洗脱时间、再吸附时间几个条件以提高传感器的性能及效率。在优化条件下，传感器在 0.01 至 200 ng / mL 的 MAA 浓度范围内表现出两个良好的线性关系。检测下限约为 5 pg / mL ($S/N = 3$)。其他参数包括选择性，重现性（RSD 3.2%）和回收率（96.1-103%）均令人满意。与传统方法相比，可以有效地诊断检测 MAA 以确定奶牛的亚临床乳腺炎，从而防止了奶牛乳腺炎的爆发。与基于 ELISA 的 MAA 检测相比，电化学传感器可以更快、更灵敏、更经济地检测 MAA。这些优点表明该方法有望用于奶牛乳腺炎的早期诊断。

关键词：亚临床乳腺炎；MAA；电化学传感；分子印迹；纳米粒子

奶牛乳腺炎在国际上被视为对动物福利和公共卫生有重大恶劣影响的问题。临床乳腺炎的死亡率较低，但是由于乳汁产量和质量下降，诊断测试、药物治疗、废弃牛奶、兽医服务、奶牛淘汰和死亡因素，患有乳腺炎问题的农场遭受了巨大的经济损失^[1]。根据它的持续时间和症状，乳腺炎可分为临床性乳腺炎、亚临床（隐性）乳腺炎两种。其中隐性乳腺炎占比最大，由于缺乏明显的症状，奶牛隐性乳腺炎很难被发现。隐性乳腺炎发病率占奶牛乳腺炎总发病率的 77%~79%^[2, 3]，由于无法及时诊断和治疗，隐性乳腺炎带来的潜在危害无法估量。

亚临床乳腺炎（SM）是一种缺乏全身或局部炎症迹象的疾病^[4]，亚临床乳腺炎通常通过诸如加利福尼亚乳腺炎测试（CMT）^[5]的牛侧检查、通过对 SCC 的实验室分析或乳汁病原微生物检测法来诊断^[6]。在某些挤奶系统中，电导率可用于乳腺炎的在线监测^[7, 8]或者是直接进行牛奶的检测^[9]，然而，这种方法在检测慢性亚临床乳腺炎病例

中比在急性临床病例中效率低^[10]。还开发了比色法和荧光测定法用于测量乳腺炎期间乳汁中升高的酶浓度^[11](例如 NAGase 或 LDH),但是灵敏度不高且受多种因素影响。CMT 和 SCC 法优点在于较为准确,但检测周期较长,从而延误最佳治疗时机。乳汁病原微生物检测法是目前对于奶牛乳房炎检测的“金标准”,缺点在于该方法较为复杂繁琐、耗时较长、成本较高。当前急需研究和开发更加灵敏可靠的奶牛乳腺炎预测生物标志物,乳汁急性期蛋白、乳酶、乳成分等指标,以及血常规指标已经成为这方面的研究热点^[12]。

急性期反应期蛋白(Acute phase protein,APP)是在压力、外伤、感染或炎症等刺激激发动物机体产生早期蛋白^[13-15],血清淀粉样蛋白 A(SAA)、触珠蛋白(HP)、C 反应蛋白(CRP)、铜蓝蛋白等是常见的 APP,人类医学中,APP 在炎症性疾病的诊断和预后中已被使用了很长一段时间,近年来 APP 的测定在兽医学诊断中占重要地位,部分 APP 已经成功应用到商业检测^[16]。

在奶牛中,最主要的 APP 是 SAA 和 Hp^[17],血清淀粉样蛋白 A 是一种具有多种蛋白质种类的 APP,肝脏受急性刺激时主要产生,它的主要同种型 SAA1, SAA2 和 SAA3, SAA1 和 SAA2 主要在肝脏中产生,而 SAA3 在肝外部位产生,且主要在牛奶中发现,被称为乳腺相关淀粉样蛋白 A(M-SAA3)^[18]。血清淀粉样蛋白 A(SAA)和 M-SAA3 一起被称为 MAA,可使用市售 ELISA(Tridelta Development Ltd., Maynooth, 爱尔兰)在牛奶样品中进行测量,目前研究发现,在奶牛发生隐性乳腺炎期间,奶牛乳中 MAA 含量显著升高,已经提出牛奶中这种蛋白质的水平作为奶牛乳腺炎感染的敏感指标^[19-21]。目前检测 MAA 浓度的方法据报道只有 ELISA 试剂盒法^[22-24], ELISA 检测准确度高,但是费用昂贵、检测时间长以及容易产生非特异性结果等都是 ELISA 法检测现有的缺点。

电化学传感器是一种基于待测物的电化学性质并将其与待测物之间相互作用的化学能转变成可记录的电信号,从而实现对被测物分析检测的器件^[25]。生抗原抗体免疫反应是检测生物大分子的最常用方法^[26, 27],然后抗体难得并且免疫性无法保证。作为天然分子识别元件的替代方法,分子印迹聚合物(MIP)受到国内外越来越多科研人员的青睐^[28, 29]。基于 MIP 的电化学传感器具有 MIP 和电化学传感器的优点,包括设备简单易学、检测原料成本低、检测性能好等优点,已广泛应用于各种物质的检测,例如金属离子,小分子和蛋白质^[25, 30]。目前应用于蛋白印迹的分子印迹技术包括本体印迹、表位印迹以及表面印迹三种方式,其中表面印迹法具有识别速度快、吸附和洗脱方便快捷、印迹准确等优点,广泛应用于蛋白质印迹^[31, 32]。纳米粒子尤其是金属纳米粒子广泛用来修饰电极以增加传感器的性能,将负载金纳米粒子的还原氧化石墨烯(AuNPs@rGO)作为 MIP 传感器的电极修饰复合材料,两者产生协同作用能够有效

提高生物分子固定效率、提高传感器灵敏度和降低背景电流等^[33]。

本研究采用具有良好导电性和生物相容性的还原氧化石墨烯和金纳米粒子复合材料修饰玻碳电极，以 MAA 蛋白作为模板分子、吡咯为功能单体，在石墨烯-金纳米粒子、壳聚糖、戊二醛、MAA 层层修饰的电极表面电聚合吡咯，制备了 MAA 分子印迹聚合膜，构建的分子印迹电化学传感器对 MAA 具有特异性识别和较高的灵敏性，并将该方法与 ELISA 试剂盒测定结果进行比较发现本方法具有更加简单快速的操作方法以及更低的检测限，本研究原理见图 3-1。

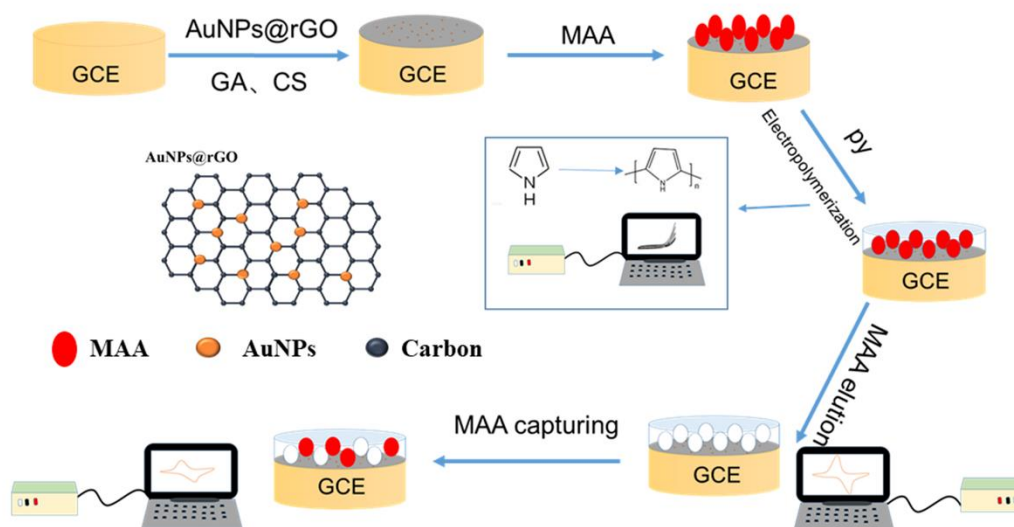


图 3-1 检测 MAA 的电化学传感器制造原理

Figure 3-1 Scheme of the electrochemical sensor fabrication for MAA detection

1 实验材料及方法

1.1 主要试剂及设备

1.1.1 实验试剂

还原氧化石墨烯(rGO)购自南京先丰纳米材料科技有限公司；氯金酸(HAuCl_4)，柠檬酸三钠，乙醇，戊二醛(GA, 25%水溶液)，铁氰化钾($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)和亚铁氰化钾($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)等购自国药集团化学试剂有限公司；MAA 本实验室制备并测得浓度保存；壳聚糖(chit)、酪蛋白(CS)、牛血清白蛋白(BSA)、 α -乳白蛋白(α -Lactalbumin)、 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin)均购于 Sigma-Aldrich 试剂公司(美国)；乙酸、磷酸盐缓冲液($20 \times \text{PBS}$)购自生工生物工程股份有限公司；在整个实验过程

中使用超纯水（电阻率=18.2MΩcm），该仪器购自密理博（中国）有限公司。

1.1.2 试剂配制

- (1) H₂AuCl₄ 预存液 (5g/L): 称取 1g 金, 用 200mL 超纯水溶解, 4℃ 避光保存, 配制时氯金酸、瓶口及内部勿接触金属物件。
- (2) 1%柠檬酸三钠: 称取 2g 柠檬酸三钠固体溶解于 20mL 超纯水, 用 0.22μm 滤器过滤后于 4℃ 保存待用 (最好一周内使用)。
- (3) 0.25mg/mL 的壳聚糖溶液: 以配好的 0.02mol/L 的乙酸溶液为溶剂, 然后称取 2.5mg 壳聚糖溶解于 10mL 0.02mol/L 的乙酸溶液。
- (4) 0.01mol/L 吡咯: 吸取 355μL 分析纯吡咯试剂溶解于 50mL 的 0.01mol/L PBS (即购买的 20×PBS 稀释为 1×)。
- (5) 模板洗脱液: 洗脱液为含 10% SDS 的 10% (V/V) 乙酸溶液, 10ml 乙酸加 90mL 超纯水, 混匀后加入 10g 的 SDS 溶解。
- (6) 氧化还原探针溶液 (10mmol/L K₃[Fe(SCN)₆]、10mmol/L K₄[Fe(CN)₆] 和 0.1mol/L KCl 的 PBS 溶液): 配制如下: 将 0.658 g 的 K₃[Fe(SCN)₆]、0.845g 的 K₄[Fe(CN)₆] 以及 1.49g 的 KCl 溶解于 200mL 的 0.01mol/L PBS 中。

1.1.3 实验仪器

循环伏安法 (CV) 和差分脉冲伏安法 (DPV) 在 CHI660D 电化学工作站 (上海辰华仪器有限公司) 进行。在 CV 测量中, 扫描范围为 -0.1-0.6 V, 扫描速率为 50 mV/s。在 DPV 测量中, 扫描范围为 -0.1-0.6 V, 扫描速率为 50 mV/s, 脉冲宽度、脉冲周期和静默时间分别为 0.2 s、0.5 s 和 2 s。测量是在三电极电池中进行的, 该电池由铂丝 (Pt) 辅助电极, 饱和甘汞 (Hg₂Cl₂) 参比电极和裸露或修饰的玻璃碳电极 (GCE, Φ=3mm) (武汉高仕睿联科技有限公司) 组成。当前所有测试均在含有 10 mmol/L [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 和 0.1mol/L KCl 的 PBS 溶液中进行。所有测量在室温下进行 3 次。分别在 S8010 和 H7650 (日本日立 (中国) 有限公司) 上进行了扫描电子显微镜 (SEM) 和透射电子显微镜 (TEM) 表征。超声清洗机购自昆山超声波仪器有限公司, 超微量紫外分光光度计 Nanodrop 2000 (Thermo 世尔科技有限公司) 扫描粒子复合过程。

1.2 AuNPs@rGO 复合材料的制备

1.2.1 AuNPs 的制备

AuNPs 的制备采用柠檬酸钠还原法^[34, 35], 要制备稳定的 AuNPs, 容器的清洁十分重要, 因此我们前期需要对涉及 AuNPs 的容器进行预处理: 将实验用到的锥形瓶、

搅拌子及其他玻璃器皿置于含有重铬酸钾和浓硫酸的酸缸中浸泡 36h 以上, 由此除去容器上附着的杂质和离子, 浸泡后分别用蒸馏水、去离子水、超纯水各洗涤三次, 然后将玻璃器皿和搅拌子一同煮沸 3 次, 烘干后待用。AuNPs 制备步骤如下:

(1) 在处理后的锥形瓶内加入合适的搅拌子以及 50mL 超纯水, 在磁力加热搅拌加热煮沸, 加热温度 300°C , 转速 1100rpm, 爆沸后立即瓶中加入 1mL (1) 中 HAuCl_4 溶液, 使 HAuCl_4 终浓度为 1%。

(2) 继续煮沸然后向溶液中加入 1mL 1% 柠檬酸三钠溶液, 保持加热搅拌。

(3) 煮沸搅拌 15min 左右, 期间溶液经历黑色、紫色、红色的变化, 最终稳定在酒红色, 关闭加热电源, 继续搅拌冷却至室温, 完成后 4°C 保存待用。

(4) 柠檬酸三钠最为还原剂, 它的用量决定制备出的 AuNPs 的质量包括粒径、均匀度、稳定性等, 因此我们对 1% 柠檬酸三钠用量进行了探索, 并通过 TEM 表征结果。

1.2.2 复合材料的制备

壳聚糖的修饰能够使石墨烯 (rGO) 表面带正电, 而制备的 AuNPs 表面带负电, 二者在超声条件下通过静电吸附结合[36]。具体方法如下: 将购得的 rGO 称取 2mg 分散于 2mL 超纯水, 超声分散均匀, 然后与 1ml 0.25mg/mL 壳聚糖溶液混合超声结合 15min 制成 rGO/chit 分散液; 再取 1mL 上述 AuNPs 分散液与 1mL rGO/chit 分散液混合超声 30min 制成 AuNPs@rGO 复合材料, 避光保存。可用紫外分光光度计 (UV-vis) 扫描 AuNPs、rGO、AuNPs@rGO 材料的吸收峰变化以表征复合过程。

1.3 MIP/AuNPs @rGO/GCE 的制备

1.3.1 工作电极预处理

(1) 玻碳电极(GCE)用适量的不同粒径 (1.0、0.3、0.05 μm) 的 Al_2O_3 于麂皮打磨纸上抛光处理以除去表面颗粒, 打磨手法按照“8”字型绕圈且保持电极竖直打磨, 绕 80-100 圈左右。

(2) 抛光后的玻碳电极用超纯水、乙醇、超纯水的顺序超声洗涤 3min, 将电极置于 0.5mol/L 的硫酸中活化, 以 CV 法在 -1.5V-1.5V 范围内, 扫描速率 0.1V/s 循环 50 圈活化电极。

(3) 将三电极系统置于探针溶液 (10mmol/L $[\text{Fe}(\text{SCN})_6]^{3-/4-}$ 和 0.1mol/L KCl 的 PBS 溶液) 中 CV 扫描, 除非出现对称可逆的氧化还原峰, 否则继续打磨或者活化电极。

1.3.2 传感器电极制备

- (1) 将 5 μ L AuNPs@rGO 纳米材料均匀滴涂在 GCE 表面, 室温自然晾干。
- (2) 在上述修饰电极表面滴加 5 μ L 2.5% 的戊二醛 (GA) 水溶液, 室温下活化 2h, 时间到后戊二醛基本交联于电极表面, 先后用超纯水和 PBS 轻轻冲洗电极表面以除去残留的戊二醛, 自然晾干待用。
- (3) 然后将 5 μ L 100 μ g/mL 的 MAA 滴加到电极表面, 室温结合 1h 后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中反应 12h, 最后用水、pH=7.4 的 PBS 溶液洗涤以除去未结合的 MAA 蛋白。
- (4) 将 MAA 修饰后电极的浸入含有 0.1mol/L 吡咯的 0.01mol/L PBS (pH7.4) 溶液中, 并通过在扫描电势范围-0.3-0.8V、扫描速率 50mV/s 条件下扫描 10 圈形成吡咯聚合膜, 该溶液已经用氮气 (N₂) 连续通气 30 分钟以去除氧气。
- (5) 然后通过将聚合物覆盖的电极浸入 2mL 的含 10%SDS 的 10% (v/v) 乙酸溶液中洗脱 1h, 进行模板蛋白 MAA 的去除。
- (6) 将最终电极用 PBS (pH 7.4) 洗涤以获得分子印迹电极 MIP/AuNPs @rGO/GCE, 由此制成分子印迹传感器电极 (MIPs/GCE), 其赋予目标 MAA 识别和信号传导能力。
- (7) 作为对照, 按照相同的步骤, 但在没有模板分子的情况下, 制备了非印迹聚合物 (NIP) 修饰的 GCE, 并记为 NIP/AuNPs@rGO/GCE。
- (8) 为了检查传感器的吸收性能, 将 MIP/AuNPs@rGO/GCE 和 NIP/AuNPs@rGO/GCE 均浸入一定浓度的 MAA 溶液中并孵育 20 分钟。测试了清洗前, 清洗后和再吸附 MAA 后的电流响应。

1.4 MAA 传感器的条件优化

基于 MIP 的电化学传感器的制造和操作参数对测定性能有很大影响, 例如灵敏度, 选择性和重现性。为了实现 MAA 的最有效结合, 使用单因素实验研究了 AuNPs@rGO 的量, 吡咯的浓度, 电聚合扫描的次数, 电聚合速率以及洗脱时间和吸附时间等条件的优化。

1.4.1 AuNPs@rGO 用量优化

纳米粒子具有提高电极灵敏度、响应度以及生物相容性的作用, 纳米粒子用量过少时对电极的增强作用不能达到最佳, 而纳米粒子过多的话交联力度不够很容易发生脱落影响测试, 因此需要选择合适的纳米粒子用量。分别添加 0 μ L、3 μ L、6 μ L、9 μ L、12 μ L、16 μ L、18 μ L 纳米材料, 选择 MAA 洗脱前和洗脱后的 DPV 峰电流差值 ΔI_p 作为考察因素, ΔI_p 越大表明印记效果越好。

1.4.2 吡咯浓度、聚合圈数、聚合速率优化

在保证其它条件相同的条件下,选择上述优化后的 AuNPs@rGO 用量修饰电极。吡咯浓度的大小、聚合圈数、聚合速率直接影响聚合膜的厚度,聚合膜厚度不够时无法完全固定模板蛋白导致印迹位点不清晰,而速率扫描过快也会使得印迹膜不均匀、松散而影响电流测试效果。因此我们先后对吡咯浓度、聚合圈数和聚合速率进行优化,选择 MAA 洗脱前和洗脱后的 DPV 峰电流差值 ΔI_p 作为考察因素, ΔI_p 越大表明印记效果越好。吡咯浓度优化范围 20、40、60、80、100、150、200mmol/L,聚合圈数分别选择 5、10、15、20、25、30 圈进行测量优化,扫描速率选取 25、50、75、100、125、150 和 200mV/s。分别测试各个条件下的 ΔI_p 选择最佳条件。

1.4.3 洗脱时间和吸附时间优化

模板蛋白 MAA 洗脱不彻底的情况下会影响结果判断,并且影响电极吸附性能。洗脱彻底后电流会达稳定状态,过长时间的洗脱无疑是对时间的浪费,降低实验效率。因此我们探究洗脱时不同时间点 5、10、15、20、25、30、35、40min 的电流 I_p 变化,寻找洗脱平衡点以实验 MAA 充分洗脱和时间的充分利用。同样的分子印迹电极对蛋白的吸附也具有平衡点,时间不够则吸附不充分,MAA 和印迹位点作用不够,影响传感器的性能判断,吸附时间同样选择上述时间点测量 I_p 。

1.5 MAA 传感器的主要性能评估

1.5.1 电极形貌表征

分别用扫描电镜 (SEM) 表征电极表面形态,包括裸电极 (GCE)、纳米材料修饰电极 (AuNPs@rGO/GCE)、分子印迹聚合物电极 (MIP/AuNPs@rGO/GCE) 洗脱前和洗脱后。

1.5.2 测试性能评估

由于我们测试的分子为蛋白不具备导电活性,测试仍然在探针溶液中进行,当目标蛋白浓度越大时,占据位点越多,因而阻碍了铁氰化钾在电极上的吸附和传导,反应出的氧化还原电流越小。将 MIPs/GCE 分别于不同浓度的 MAA 模板蛋白溶液中孵育,MAA 浓度范围设置为 0.01-200ng/mL。测试蛋白吸附后的 DPV 电流值并计算不同浓度下吸附前和吸附后的峰电流差值 ΔI_p ,拟合 ΔI_p 和浓度之间的关系以评估传感器的测试性能。

1.5.3 特异性评估

为了评估传感器的特异性,我们将制备好的分子印迹传感器电极 (MIPs/GCE)

放置于同样浓度(100 $\mu\text{g/mL}$)目标蛋白 MAA 以及牛奶中其它干扰蛋白如酪蛋白(CS)、牛血清白蛋白(BSA)、 α -乳白蛋白(α -Lactalbumin)和 β -乳球蛋白(β -lactoglobulin)中孵育,分别测试不同蛋白吸附前和吸附后的 DPV 峰电流的差值 ΔI_p ,判断 MIPs/GCE 对不同蛋白的吸附力评估传感器的特异性。

1.5.4 重现性和稳定向评估

我们将同一批制作的 5 根电极(标记 a、b、c、d、e),标记为在最优的条件下制备分子印迹传感器,分别对含有相同浓度 MAA 蛋白溶液进行检测以此评估传感器的重现性。

为了评估传感器的稳定性,我们将上述制备好的 5 根电极放到 4°C 冰箱中放置 14 天,开始每天对电极进行 DPV 电流测试,后面每两天测试一次,最后通过观察 DPV 信号变化测试传感器的稳定性能。

1.6 实际样品应用评估

为了验证传感器的可行性,我们采用标准添加法对传感器进行评估,将已知一定浓度的 MAA 蛋白标准品添加到市场所购得鲜牛奶中。首先按照上述方法制备分子印迹电极,然后将电极放入 0.5mL 的鲜牛奶中,鲜牛奶中 MAA 浓度分别为 0.01-100ng/mL,记录其 DPV 响应,计算出检测出的 MAA 浓度、样品的回收率。同时我们将结果和所购买的 MAA 检测 ELISA 试剂盒 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit 的检测结果进行对比。

2 结果及分析

2.1 纳米材料的 TEM 和 UV-vis 表征

通过优化还原剂柠檬酸三钠的剂量,我们获得了具有更好形貌和分散性的均匀 AuNPs (图 3-2B),粒径约 15nm。如果不进行优化,则 AuNPs 将粒径不一,甚至发生聚集(图 3-2A);从 UV-vis 表征(图 3-2C),我们可以看到 rGO (曲线 a)在 400-700 nm 的波长范围内没有吸收峰,AuNPs 在 520nm 附近显示出明显的特征吸收峰(曲线 b),AuNPs@rGO 在 520 nm 处仍有较弱吸收。但是,在 550-700 nm 范围内可以看到更宽的吸收峰(曲线 c),这表明 rGO 和 AuNPs 结合后出现了一个新的特征吸收峰。由于 AuNPs@rGO 较宽的粒径分布和颗粒结构的变化,该吸收峰明显向右移动,并且比 AuNPs 的特征峰宽。

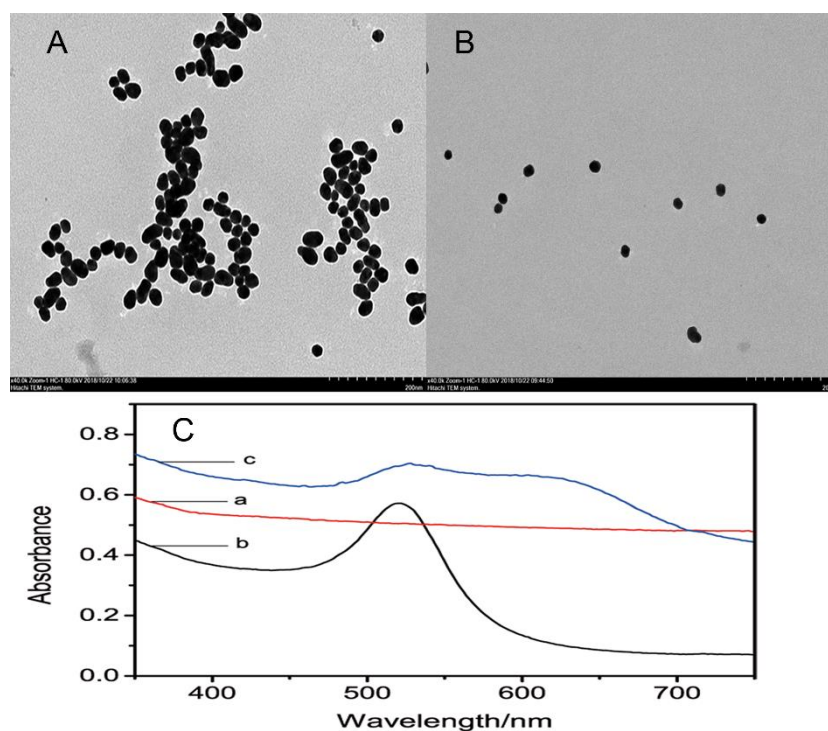


图 3-2 AuNPs 优化前 (A) 和优化后 (B) 的 TEM 图; 纳米粒子的紫外吸收峰 (C) (a-rGO; b-AuNPs; c-AuNPs@rGO)

Figure3- 2 TEM images of AuNPs before (A) and after optimization (B). The UV-vis absorption spectrum of nanocomposites (C) (a-rGO; b-AuNPs; c-AuNPs@rGO)

2.2 电极修饰过程的 SEM 表征

如图 3-3A 所示,裸露的 GCE 的表面是光滑且无颗粒的,表明电极已被完全抛光。图 3-3B 表示的是 AuNPs@rGO 修饰的 GCE,其明显不同于图 3-3A。可以看出,AuNPs@rGO在 GCE 的表面均匀生长。图 3-3C 显示了洗脱前的 MIP/AuNPs@rGO/GCE,此时,电极表面高度交联以形成致密的聚吡咯 (ppy) 膜,表明成功制备了印迹聚合物。相比之下,图 3-3D 中的 MIP/AuNPs@rGO/GCE 在被洗脱液去除 MAA 之后形成了一些压印腔,导致表面比图 3-3C 更为粗糙。

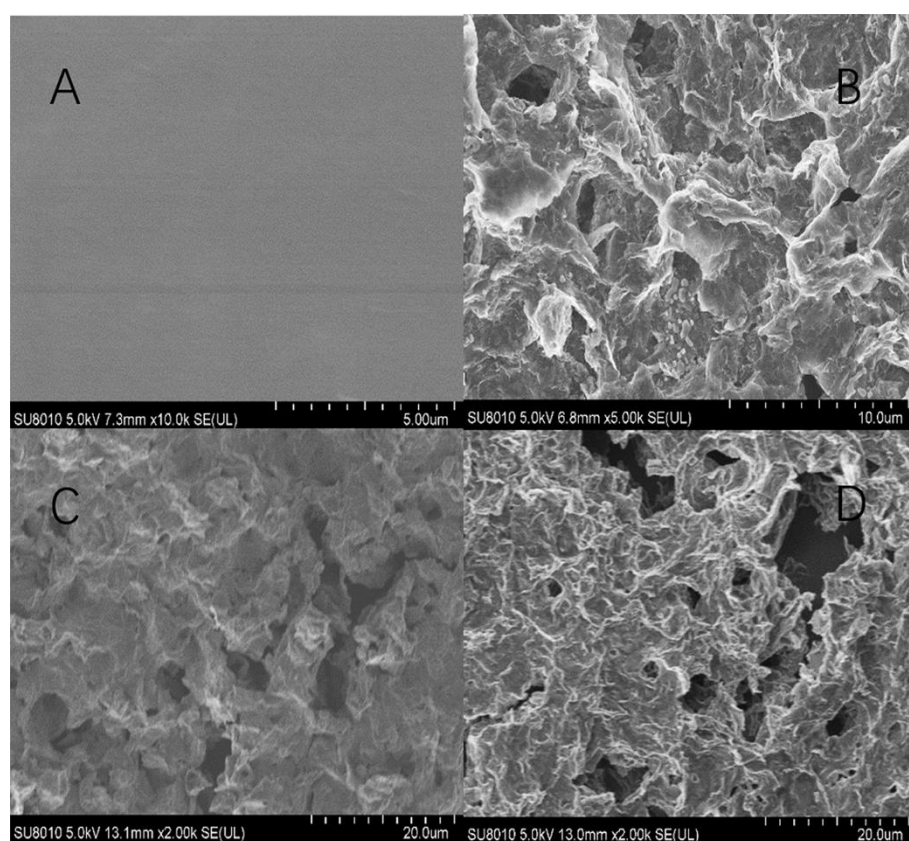


图 3-3 GCE (A)、AuNPs@rGO/GCE (B)、MAA 洗脱前的 MIP/AuNPs@rGO/GCE (C) 和 MAA 洗脱后的 MIP/AuNPs@rGO/GCE (D)

Figure3-3 SEM images of GCE (A),AuNPs@rGO/GCE (B),MIP/AuNPs@rGO/GCE with MAA (C),and MIP/AuNPs@rGO/GCE after elution (D)

2.3 制备 MIP/AuNPs@rGO/GCE 过程的电化学行为

2.3.1 吡咯聚合过程

图 3-4 展示出了电极表面上的电聚合过程。可以看出，在整个电聚合过程中，电流响应随着扫描次数的增加而增加。扫描次数越多则电极表面的聚吡咯膜越厚，聚吡咯膜具有导电性质，增加了电极的导电性，因此在电聚合过程中电流大小呈上升趋势。

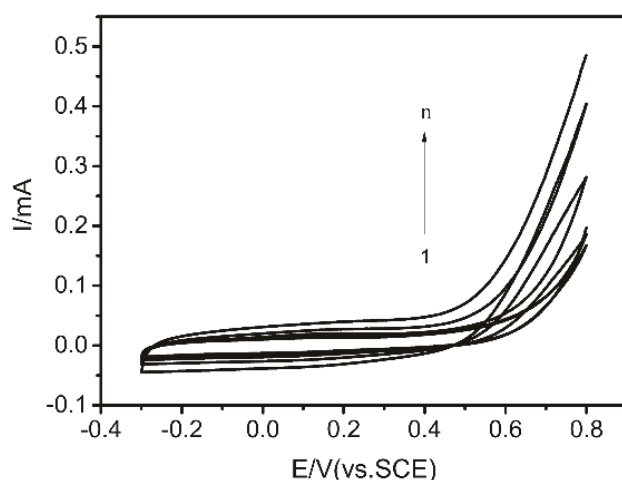


图 3-4 在含有 0.1 mol / L 吡咯的 0.01 mol / L PBS (pH 7.4) 溶液中进行电聚合过程的 CV 图像。

Figure3- 4 CV image of the process of electropolymerization in 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) solution containing 0.1 mol/L pyrrole.

2.3.2 电极修饰过程的 CV 和 DPV

使用 CV 和 DPV 来表征裸 GCE 的逐步修改过程。图 3-5A 显示了在探针溶液 10mmol[Fe(CN)₆]^{3-/4-}(1:1)的 0.1mol/L 的 KCl 溶液中,裸 GCE(a), AuNPs@ rGO/GCE (b), GA/AuNPs@rGO/GCE (c) 和 MAA/GA/AuNPs@rGO/GCE (d) 的 CV 曲线。裸露的 GCE 显示了一对明确定义的氧化还原峰 (曲线 a), 当用 AuNPs@rGO 修饰裸电极时, 由于纳米复合材料的优异电导率, 氧化还原峰值电流显著增加 (曲线 b)。随后, 非电活性 GA 通过其醛基和壳聚糖的氨基交联形成亚胺键固定在电极上, 导致氧化还原峰值电流明显降低 (曲线 c)。通过基于 GA 的交联作用附着在电极上的模板分子 MAA 导致氧化还原峰值电流 (曲线 d) 显著降低, 这是因为该蛋白质是具有绝缘特性的生物大分子, 在电极上产生了受阻的电子传输层。结果, 这些变化趋势证明了成功的逐步修饰了 GCE 电极。图 3-5B 展示出了在相同的修改条件下的电极的 DPV 图, 电流变化趋势图 3-5A 中的结果一致, 进一步证明了电极的修改。

MIP/AuNPs@rGO/GCE 和 NIP/AuNPs@rGO/GCE 的 DPV 行为如图 3-5C 和图 3-5D 所示。可以清楚地看出, 在相同条件下, 它们的电流响应也存在很大差异。从 MIP/AuNPs@rGO/GCE 电极上去除模板 MAA (图 3-5C, 曲线 b) 以形成空腔, 比原始 MIP/AuNPs@rGO/GCE (图 3-5C, 曲线 a) 产生更高的峰值电流。该结果表明, 去除模板后, 在膜中产生的压印腔可以增强[Fe (CN)₆]^{3-/4-}向传感器表面的扩散。将电极与 100 ng/mL MAA 孵育 30 分钟后, 峰值电流降低 (图 3-5C, 曲线 c), 这表明 MAA

能够重新占据印迹位置并再次阻挡电子的自由流动。相比之下, 同样方式合成的 NIP/AuNPs@rGO/GCE 电极(图 3-5D, 曲线 a), 将电极放入洗脱剂中孵育后(图 3-5D, 曲线 b) 并与 MAA 再次孵育(图 3-5D, 曲线 c) 只能引起细微的峰电流差异。这意味着在没有 MAA 模板的情况下, 在 NIP 中不会形成压印腔。

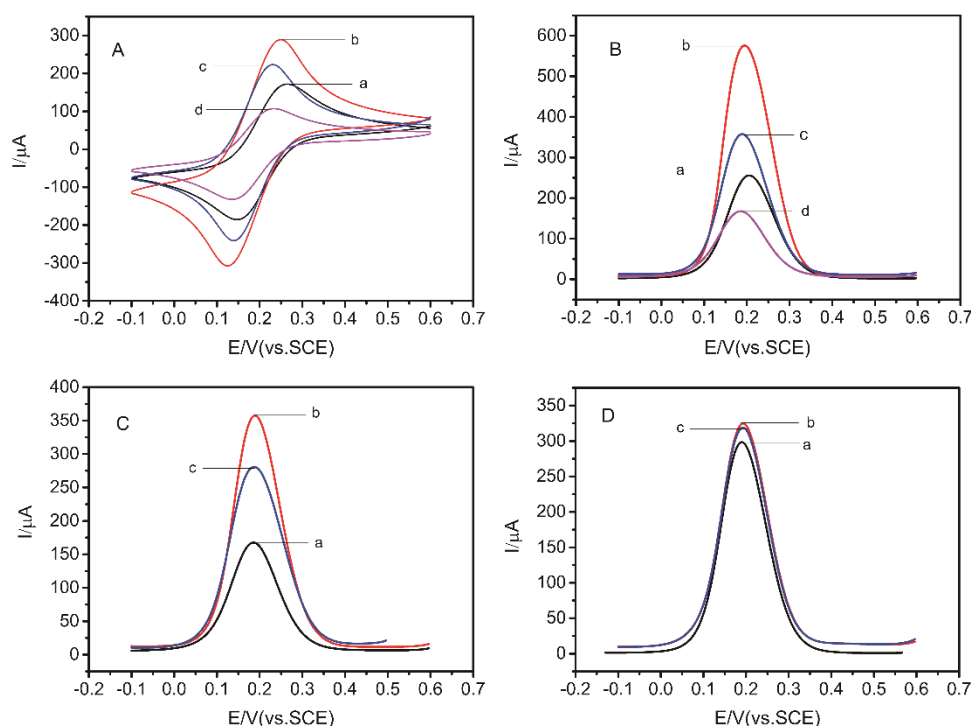


图 3-5 逐步修饰电极的 CV (A) 和 DPV (B) 表征 (a-裸 GCE;b-AuNPs@rGO/GCE; c-GA/AuNPs@rGO/GCE;d-MAA/GA/AuNPs@rGO/GCE); MIP/AuNPs@rGO/GCE (C) 和 NIP/AuNPs@rGO/GCE (D) 的 DPV 曲线: (a) 从聚合物中除去 MAA 之前; (b) 从聚合物中除去 MAA 后; (c) 在 100ng/mL MAA 溶液中孵育 20min 后

Figure3-5 The CV(A) and DPV(B) characterization of the stepwise modified electrodes(a-bare GCE;b-AuNPs@rGO/GCE;c-GA/AuNPs@rGO/GCE;d-MAA/GA/AuNPs@rGO/GCE);DPV curves of MIP/AuNPs@rGO/GCE (C) and NIP/AuNPs@rGO/GCE (D): (a) before removal of MAA from polymer; (b) after removal of MAA from polymer; (c) after incubating in 100 ng/mL MAA solution for 20 min

2.4 传感器条件的优化结果

2.4.1 AuNPs@rGO 用量优化结果

纳米粒子的用量决定电极的导电能力、蛋白吸附能力及其在电极上的固定效果, 如图 3-6 所示, AuNPs@rGO 用量为 12 μ L 时, ΔI_p 达到最高, 低于 12 μ L 显然用量不

足，增强效果没有达到最佳，但超过 12 μL 时纳米粒子固定效果不佳，电极性能呈下降趋势，因此我们选择 AuNPs@rGO 的修饰量为 12 μL 。

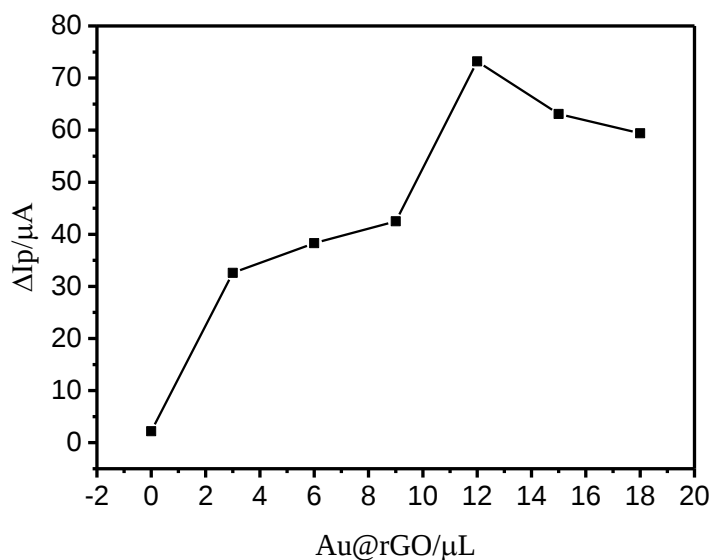


图 3-6 AuNPs@rGO 用量对传感器性能的影响

Figure 3-6 The influence of the amount of AuNPs@rGO on the performance of the sensor

2.4.2 聚合膜厚度优化

吡咯浓度、电聚合扫描圈数和扫描速率决定吡咯聚合膜的厚度，结果如图 3-7 所示。图 3-7A 是吡咯浓度的选择，可以得出结论，当吡咯浓度为 80 mmol/L 是，分子印迹电极的识别性能最佳。同样的，图 3-7B 和图 3-7C 表明最佳扫描圈数为 10 圈，最佳扫描速率为 75mV/s。

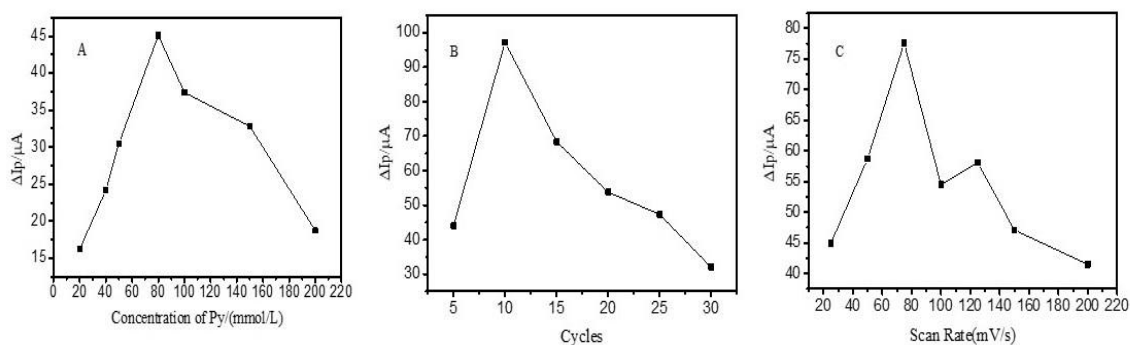


图 3-7 决定聚合膜厚度的条件的优化：吡咯浓度优化结果 (A)；电聚合圈数优化结果 (B)；电聚合速率优化结果 (C) (所有测试均在含有 10 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 和 0.1mol/L KCl 的 PBS 溶

液中进行)

Figure 3-7 Optimization of the conditions that determine the thickness of the polymer film: pyrrole concentration optimization result: (A); electropolymerization circle number optimization result (B); electropolymerization rate optimization result (C) (All tests contain 10 mmol/L [Fe(CN)₆]^{3-/4-} and 0.1mol/L KCl in PBS solution)

2.4.3 洗脱时间和吸附时间优化

时间上的优化见图 3-8, 印迹膜里面包埋的模板蛋白需要再洗脱液的浸泡下去除, 含 10% SDS 的 10%乙酸 (V/V) 溶液能够破坏蛋白质的结构从而使之脱离印迹空腔, 蛋白去除后电极导电性增加, 电流呈上升趋势, 从图 3-8A 看出 25min 后电流不在发生变化, 表明 25min 模板蛋白的洗脱达到平衡。同样当再吸附蛋白时, 绝缘性质的蛋白质大分子能够占据电极位点阻碍导电物质的传播, 电极电流自然降低, 吸附越多电流下降越多直至吸附平衡, 图 3-8B 表明同样在大约 20min 后蛋白吸附达到平衡。因此我们选择洗脱时间 25min 和吸附时间 20min。

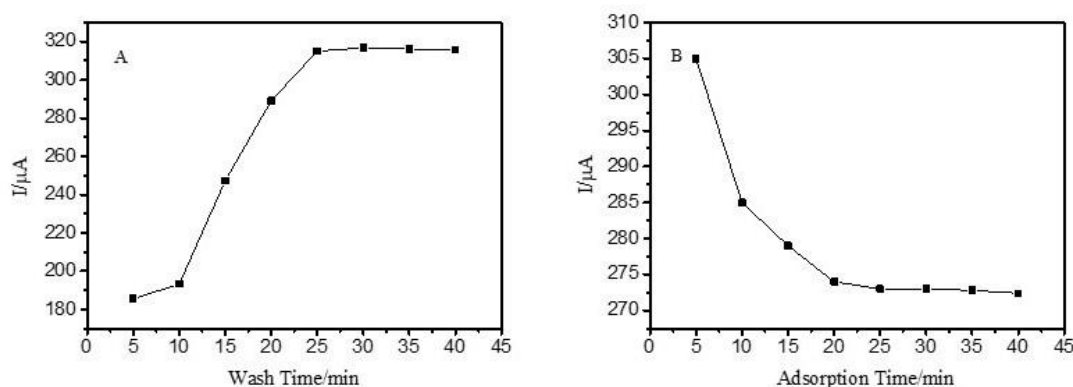


图 3-8 洗脱 (A) 和吸附 (B) 时间的优化结果

Figure 3-8 Optimization of elution (A) and adsorption (B) time

2.5 传感器的性能评估结果

2.5.1 测试性能评估

我们分别将制备好的分子印迹电极浸入不同浓度放入标准 MAA 溶液中, 选择浓度范围 0.01-200ng/mL, 测试不同孵育浓度下的 MIPs 电极在探针溶液中的 DPV 峰电流响应值, 蛋白浓度越高, 电流响应值越低 (图 3-9A), 记录所有的电流值并与吸附蛋白前的电流值做差计算 ΔI_p 。拟合 ΔI_p 和 MAA 浓度的关系得出的结论见图 3-9B, 显示出了两条线性曲线, 在蛋白浓度为 0.01-1ng/mL 时, 得出的曲线方程为 ΔI_p (μA)

$=10.14+22.93 C_{\text{MAA}} (\text{ng/mL}) (R^2=0.991)$, 蛋白浓度 1-200ng/mL 范围下, 方程为 $\Delta I_p (\mu\text{A}) = 31.42+0.119 C_{\text{MAA}} (\text{ng/mL}) (R^2=0.994)$ 。低蛋白浓度条件下的线性曲线显示出比高蛋白浓度下更高的斜率, 这表明分子印迹传感器对不同目标浓度的亲和力不同, 当浓度越低是吸附越快, 浓度增加到一定程度后, 压印腔被很快占据, 再增加浓度响应性也会稍微减小。

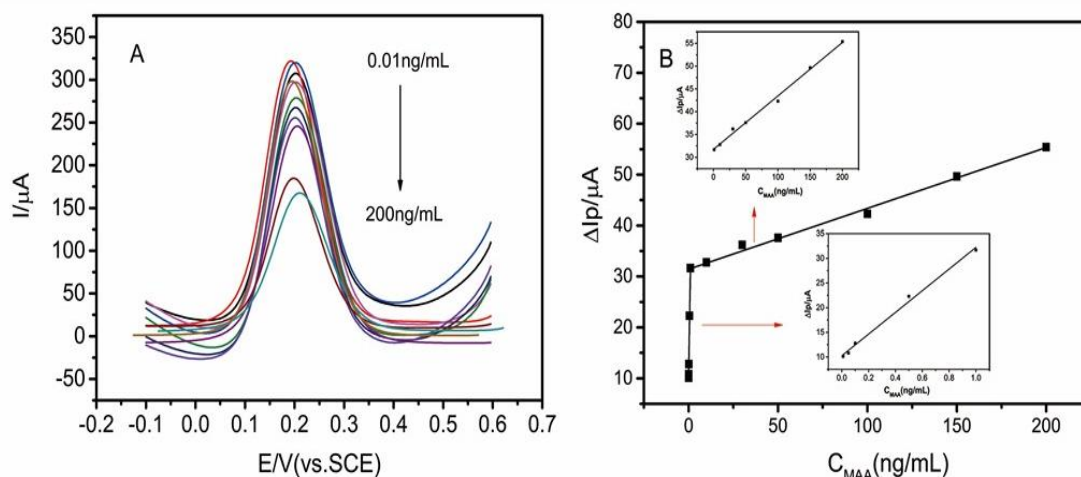


图 3-9 MIPs 对不同浓度的 MAA 的 DPV 响应 (A); MIP / AuNPs @ rGO / GCE 电流响应的校准图 (B) (MAA 的浓度范围为 0.01-200ng / mL, $S / N = 3$)

Figure3-9 DPV response of MIPs to different concentrations of MAA (A); The calibration plot of MIP/AuNPs@rGO/GCE electrode (B)(The concentration of MAA ranges from 0.01-200ng/mL, $S/N=3$)

2.5.2 MIPs 特异性评估结果

如图 3-10,在同样条件下用 MIPs 和 NIPs 测量相同浓度的 MAA 蛋白、酪蛋白(CS)、牛血清白蛋白 (BSA)、 α -乳白蛋白 (α -Lactalbumin) 和 β -乳球蛋白 (β -lactoglobulin) 发现 MIPs 对 MAA 的 DPV 信号是对其他干扰蛋白的 3 倍以上,而 NIPs 对 MAA 及其它蛋白的电流响应均较低,这说明本研究制备的分子印迹传感器对目的蛋白的识别特异性良好。

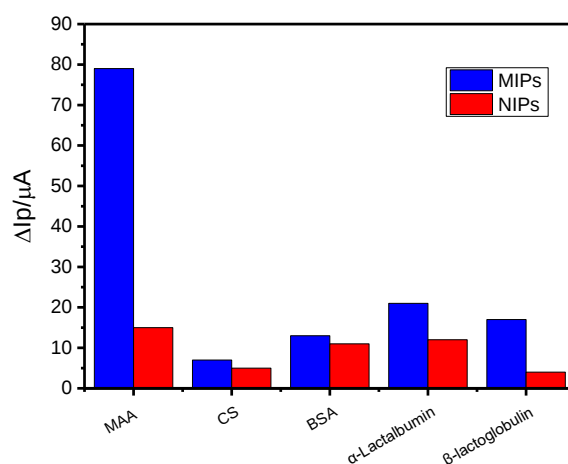


图 3-10 MIPs 和 NIPs 对不同蛋白的响应度

Figure 3-10 The responsiveness of MIPs and NIPs to different proteins

2.5.3 MIPs 重现性和稳定性评估

本研究用同样方法制备了 5 根分子印迹电极 a、b、c、d、e，5 根电极检测结果标准偏差 (RSD) 约为 2.2%，其中每根电极重复检测 5 次的 RSD 值平均约为 3.2%，显示出良好的重现性。图 3-11 显示出了五个电极的 DPV 信号在两周内仅显示出轻微变化，并且测试电流的最终峰值为初始值的 91%-95%。14 天后，将五个电极浸入 0.05、0.1、1、50 和 100 ng / mL MAA 溶液中进行吸收测试。测试结果的 RSD 值为 3.6%，4.1%，2.4%，1.9% 和 1.5%，表明该传感器具有良好的稳定性。

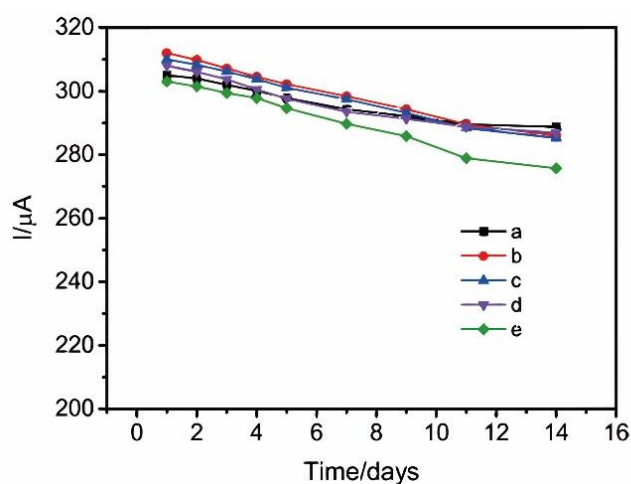


图 3-11 两周内 MIPs 电极的 DPV 信号变化 (a、b、c、d、e 为 5 根电极的编号)

Figure 3-11 Change of DPV responses within two weeks of five MIP-modified electrodes (a, b, c, d and e are the numbers of the electrodes which we tested).

2.5.4 传感器的实际样品应用评估

标准添加法制备模拟样品溶液,测试结果如表 3-1 所示,基于 MIP 的电化学传感器在加标牛奶中获得的 MAA 回收率为 96.1%-103%, RSD 值低于 4.1%。实际样品也用 ELISA 方法进行了分析,以验证所开发技术的效率。根据试剂盒说明, $OD_{450nm}=0.0075+0.003C_{MAA} (ng/mL)$ 描述了 450nm (OD_{450nm}) 处的吸光度与 MAA 浓度之间的线性关系。由于商业化 ELISA 试剂盒指示的牛奶中 MAA 的检测范围是 8.76-150 ng/mL,因此以 20、30、40、50、80 和 100 ng/mL 的浓度制备了模拟 MAA 样品。从表 3-1 可以看出,传感器的检测性能与 ELISA 方法没有显著差异。然而,就操作的简便性和节省时间而言,传感器方法是更有利的。从孵育到检测只需不到半小时,而且操作简单,而 ELISA 需要 2-3 个小时,并且对技术要求更高。

表 3-1 电化学传感器法与 ELISA 检测 MAA 的比较

Table3- 1 Comparison of MAA detection in milk by this electrochemical sensor and ELISA kit.

样品 Sample	添加 Added (ng mL ⁻¹)	传感器检测 Detected by this sensor			ELISA 检测 Detected by ELISA		
		检测值 Found (ng mL ⁻¹)	重复率 Recovery (%)	标准 偏差 RSD (%)	检测值 Found (ng mL ⁻¹)	重复率 Recovery (%)	标准偏 差 RSD (%)
1	20	19.67	98.4	4.1	19.56	97.8	1.9
2	30	29.21	97.3	1.8	30.48	102	3.2
3	40	41.2	103	2.7	40.8	102	2.4
4	50	50.53	101	2.4	50.33	101	1.4
5	80	76.84	96.1	1.9	79.87	99.8	1.7
6	100	98.68	98.7	2.6	99.5	99.5	2.3

3 讨论

奶牛乳腺炎是公认的严重影响奶牛福利和乳业经济的疾病,目前有大量已有或者正在研发的检测技术以尽快发现乳腺炎。包括 CMT、SCC 检测以及酶、PH、乳汁蛋白等各类指标的检测,分子生物学技术包括 PCR 法、ELISA 法、免疫传感器、LAMP 等等,虽然很多技术已经能够精确的检测出乳腺炎及其病原体,但隐性乳腺炎仍不能及时防治,因此乳业工作者迫切的需要一种能够及时诊断奶牛隐性乳腺炎的技术。

急性期蛋白 MAA 作为奶牛乳腺炎生物标志物早已得到证实, Hussein HA 等人在 2018 年通过对 68 头弗里斯兰奶牛中收集的 272 份四分之一的牛奶样本进行细菌学、SCC 以及 MAA 浓度研究,发现 MAA 浓度与 SCC 之间具有很强的正相关关系,并且呈正比关系^[37]。G Gerardi 等在 2009 年分别对临床乳腺炎(CM)、亚临床乳腺炎(SM)

以及健康奶牛（HEC）的 SCC、微生物检查和 MAA 包括 SAA 检测，数据分析同样显示 MAA 与 SCC 呈很大的相关性。Eckersall PD 等也早在 2001 年研究发现 MAA 对于区分健康奶牛和乳腺炎奶牛有重要价值，在牛奶中的敏感性和特异性分别为 93% 和 100%^[38]。但对于 MAA 的检测研究目前只有 ELISA 法，对于偏远地方的奶牛养殖户来说，以上传统的乳腺炎检测方法或耗时长或费用昂贵，便捷灵敏的生物传感器逐渐成为农场检测的理想选择。本研究建立的分子印迹电化学传感器充分利用了传感器与纳米材料以及分子印迹的联合作用，实现了较 ELISA 法更加稳定、灵敏的检测，能够充分降低奶牛乳腺炎的检测成本。

生物传感器的应用由来已久，电化学传感器凭借其设备、操作简单、成本低、灵敏度优越等优点而在分析检测领域备受青睐。并且随着纳米材料合成技术的发展，电化学传感器的性能得以改善，对于生物大分子的检测也越来越精确灵敏^[39]。分子印迹技术作为制备“人工抗体”的先进手段，成本低、效率高、吸附性和稳定性强，目前在物质分离、分析检测等各大领域研究广泛^[40-42]，将其配合电化学传感器技术以实现低成本高效率的物质分析成为大势所趋。

为实现 MAA 有效、灵敏地检测以诊断奶牛隐性乳腺炎，本研究将分子印迹技术与方便快捷的电化学传感器技术联合使用，建立特异性检测 MAA 的分子印迹电化学传感器。结果表明，该传感器性能优越，检测限低，能够有效达到精准快捷的检测 MAA 浓度。

4 本章小结

在本研究中，基于分子印迹电化学传感器技术，我们成功制备了用于奶牛亚临床乳腺炎生物标志物 MAA 检测的传感器。目前国内外已有大量研究证实 MAA 可作为奶牛亚临床乳腺炎的生物标志物，但对于牛奶中 MAA 电化学检测方法建立以及运用到亚临床乳腺炎监测国内外未见报道，并且我们采用一种“人工受体”即分子印迹来取代传统抗体制备的繁琐以及昂贵，相对于 ELISA 法传感器检测法耗时短、检测限低、操作简单。在优化条件的情况下，该传感器在 0.01-200ng/mL 范围内表现出两段良好的线性关系，分别表示分子印迹的高低亲和力结合位点段，评估后表明该传感器具有较好的选择性、重复性和稳定性，对于实际样品检测也展现了优良的检测性能，证明该传感器有很大的实际应用前景。该研究对于奶牛急性期蛋白研究和亚临床乳腺炎早期诊断具有重要的指导意义，为奶牛乳腺炎检测提供新的思路。

参考文献

- [1] Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds [J]. *Vet Res*, 2003, 34(5): 475-491.
- [2] Yalcin C. Cost of mastitis in Scottish dairy herds with low and high subclinical mastitis problems [J]. *Turk J Vet Anim Sci*, 2000, 24(5): 465-472.
- [3] Sender G, Pawlik A, Korwin-Kossakowska A. Current concepts on the impact of coagulase-negative staphylococci causing bovine mastitis as a threat to human and animal health - a review [J]. *Anim Sci Pap Rep*, 2017, 35(2): 123-135.
- [4] Akerstedt M, Waller K P, Sternesjo A. Haptoglobin and serum amyloid A in bulk tank milk in relation to raw milk quality [J]. *Journal of Dairy Research*, 2009, 76(4): 483-489.
- [5] Schalm O W, Noorlander D O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1957, 130(5): 199-204.
- [6] Schukken Y H, Wilson D J, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, Gonzalez R N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts [J]. *Vet Res*, 2003, 34(5): 579-596.
- [7] Zaninelli M, Rossi L, Costa A, Tangorra F M, Agazzi A, Savoini G. Signal spectral analysis to characterize gland milk electrical conductivity in dairy goats [J]. *Ital J Anim Sci*, 2015, 14(3).
- [8] Zaninelli M, Tangorra F M, Costa A, Rossi L, Dell'Orto V, Savoini G. Improved Fuzzy Logic System to Evaluate Milk Electrical Conductivity Signals from On-Line Sensors to Monitor Dairy Goat Mastitis [J]. *Sensors (Basel)*, 2016, 16(7).
- [9] Samara E M, Ayadi M, Aljumaah R S. Feasibility of utilising an infrared- thermographic technique for early detection of subclinical mastitis in dairy camels (*Camelus dromedarius*) [J]. *Journal of Dairy Research*, 2014, 81(1): 38-45.
- [10] Nielsen M, Schukken Y H, Brand A, Deluyker H A, Maatje K. Detection of Subclinical Mastitis from Online Milking Parlor Data [J]. *Journal of Dairy Science*, 1995, 78(5): 1039-1049.
- [11] Pyorala S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis [J]. *Vet Res*, 2003, 34(5): 565-578.
- [12] Viguier C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K, O'Kennedy R. Mastitis detection: current trends and future perspectives [J]. *Trends Biotechnol*, 2009, 27(8): 486-493.
- [13] Kalmus P, Simojoki H, Pyorala S, Taponen S, Holopainen J, Orro T. Milk haptoglobin, milk amyloid A, and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in bovines with naturally occurring clinical mastitis diagnosed with a quantitative PCR test [J]. *Journal of Dairy Science*, 2013, 96(6): 3662-3670.
- [14] Weng X, Ahmed S R, Neethirajan S. A nanocomposite-based biosensor for bovine haptoglobin on a

3D paper-based analytical device [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2018, 265:242-248.

[15] Lisowska-Myjak B, Skarzyska E, Plazinska M, Jakimiuk A. Relationships between meconium concentrations of acute phase proteins [J]. *Clin Exp Pharmacol P*, 2018, 45(11): 1218-1220.

[16] McDonald T L, Weber A, Smith J W. A Monoclonal-Antibody Sandwich Immunoassay for Serum Amyloid-a (Saa) Protein [J]. *J Immunol Methods*, 1991, 144(2): 149-155.

[17] Eckersall P D, Young F J, Nolan A M, Knight C H, McComb C, Waterston M M, Hogarth C J, Scott E M, Fitzpatrick J L. Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis [J]. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89(5): 1488-1501.

[18] McDonald T L, Larson M A, Mack D R, Weber A. Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum [J]. *Vet Immunol Immunop*, 2001, 83(3-4): 203-211.

[19] Jaeger S, Virchow F, Torgerson P R, Bischoff M, Biner B, Hartnack S, Ruegg S R. Test characteristics of milk amyloid A ELISA, somatic cell count, and bacteriological culture for detection of intramammary pathogens that cause subclinical mastitis [J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(9): 7419-7426.

[20] Domanska D, Gajewski Z, Domino M, Dabrowski M, Kroemker V, Trela M. Factors influencing Serum Amyloid A and Milk Amyloid A concentrations in the predilection period of mastitis in mares [J]. *Reprod Domest Anim*, 2015, 50:51-51.

[21] Miglio A, Moscati L, Fruganti G, Pela M, Scoccia E, Valiani A, Maresca C. Use of milk amyloid A in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy ewes [J]. *Journal of Dairy Research*, 2013, 80(4): 496-502.

[22] O'Mahony M C, Healy A M, Harte D, Walshe K G, Torgerson P R, Doherty M L. Milk amyloid A: Correlation with cellular indices of mammary inflammation in cows with normal and raised serum amyloid A [J]. *Res Vet Sci*, 2006, 80(2): 155-161.

[23] Szczubial M, Dabrowski R, Kankofer M, Bochniarz M, Albera E. Concentration of serum amyloid A and activity of ceruloplasmin in milk from cows with clinical and subclinical mastitis [J]. *B Vet I Pulawy*, 2008, 52(3): 391-395.

[24] Thomas F C, Waterston M, Hastie P, Parkin T, Haining H, Eckersall P D. The major acute phase proteins of bovine milk in a commercial dairy herd [J]. *Bmc Vet Res*, 2015, 11.

[25] Bakker E, Telting-Diaz M. Electrochemical sensors [J]. *Anal Chem*, 2002, 74(12): 2781-800.

[26] Borrebaeck C. Antibodies in diagnostics—From immunoassays to protein chips [J]. *Immunology Today*, 2000, 21(8): 379-382.

[27] Gao Q, Han J, Ma Z. Polyamidoamine dendrimers-capped carbon dots/Au nanocrystal

- nanocomposites and its application for electrochemical immunosensor [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, 49C(Complete): 323-328.
- [28] Nestora S, Merlier F, Beyazit S, Prost E, Duma L, Baril B, Greaves A, Haupt K, Tse?Sum?Bui B. Plastic Antibodies for Cosmetics: Molecularly Imprinted Polymers Scavenge Precursors of Malodors [J]. *Angewandte Chemie*, 2016, 128(21): 6360-6364.
- [29] Attieh D M D, Zhao Y, Elkak A, Falcimaigne-Cordin A, Haupt K. Enzyme-Initiated Free-Radical Polymerization of Molecularly Imprinted Polymer Nanogels on a Solid Phase with an Immobilized Radical Source [J]. *Angewandte Chemie*, 2017, 56(12):3339-3343.
- [30] Hansen D E. Recent developments in the molecular imprinting of proteins [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(29): 4178-4191.
- [31] Yang H H, Zhang S Q, Tan F, Zhuang Z X, Wang X R. Surface Molecularly Imprinted Nanowires for Biorecognition [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(5): 1378-1379.
- [32] Guo J, Wang Y, Liu Y, Zhou Y. The synthesis of imprinted polymers based on Fe₃O₄ nanomaterials and the recognition of proteins [J]. *Analytical Methods*, 2015, 7(23): 10018-10025.
- [33] Wang X, Dong J, Ming H, Ai S. Sensing of glycoprotein via a biomimetic sensor based on molecularly imprinted polymers and graphene–Au nanoparticles [J]. *Analyst*, 2013, 138(4): 1219.
- [34] Coleman S E, Brady L J, Boyle M. Colloidal gold immunolabeling of immunoglobulin-binding sites and beta antigen in group B streptococci [J]. *Infection & Immunity*, 1990, 58(2): 332-340.
- [35] Frens G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions [M]. Macmillan company, 1973.
- [36] 张谦, 吴抒遥, 何茂伟, 张玲, 刘洋, 李景虹, 宋溪明. 金纳米粒子-壳聚糖-石墨烯纳米复合材料的制备及其在生物电化学中的应用[J]. *化学学报*, 2012, 21: 24-30.
- Zhang Q, Wu SY, He MW, Zhang L, Liu Y, Li JH, Song XM. Preparation of gold nanoparticle-chitosan-graphene nanocomposite and its application in bioelectrochemistry[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2012, 21: 24-30. (in Chinese)
- [37] Hussein H A, El-Razik E H A, Gomaa A M, Elbayoumy M K, Hosein H I. Milk amyloid A as a biomarker for diagnosis of subclinical mastitis in cattle [J]. *Vet World*, 2018, 11(1): 34-41.
- [38] Eckersall P D, Young F J, McComb C, Hogarth C J, Fitzpatrick J L. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis [J]. *The Veterinary record*, 2001, 148(2): 35-41.
- [39] 梁刚, 满燕, 贾文坤, 潘立刚. 电化学生物传感器在有机磷农药分析中的应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(002): 433-438.
- Liang G, Man Y, Jia WS, Pan LG. Application of electrochemical biosensors in the analysis of organophosphorus pesticides [J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2016, 7(002): 433-438.

(in Chinese)

[40] M., S á nchez-Polo, I., Velo-Gala, Jes ú s, J., L ópez-Pe ñalver, J., Rivera-Utrilla. Molecular imprinted polymer to remove tetracycline from aqueous solutions [J]. *Microporous & Mesoporous Materials*, 2015,203:32-40.

[41] Chen P Y, Nien P C, Wu C T, Wu T H, Lin C W, Ho K C. Fabrication of a molecularly imprinted polymer sensor by self-assembling monolayer/mediator system [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 643(1-2): 38-44.

[42] Ashley J, Shahbazi M A, Kant K, Chidambara V A, Yi S. Molecularly Imprinted Polymers for Sample Preparation and Biosensing in Food analysis: Progress and Perspectives [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 91:606-615.

全文总结

1. 成功构建了牛奶中血清淀粉样蛋白 A(MAA)的重组质粒，通过优化表达条件和纯化条件获得了纯度较高的可溶性 MAA 蛋白。
2. 将 MAA 蛋白免疫 BALB/c 雌鼠，成功获得单克隆抗体 3G11、8E10，效价分别为 1:51200 和 1:102400，抗体特异性和效价较好。
3. 本研究成功制备了特异性检测 MAA 的分子印迹电化学传感器。对于奶牛急性期蛋白研究和亚临床乳腺炎早期诊断具有重要的指导意义，为奶牛乳腺炎检测提供新的思路并且若能付诸应用能够很大程度上减少养殖场因奶牛乳腺炎造成的经济损失。