



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104198714 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201410464586. 7

(22) 申请日 2014. 09. 12

(71) 申请人 重庆医科大学

地址 400016 重庆市渝中区医学院路 1 号

(72) 发明人 邱景富 李朝睿 张弦

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 郭婧婧

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 27/26(2006. 01)

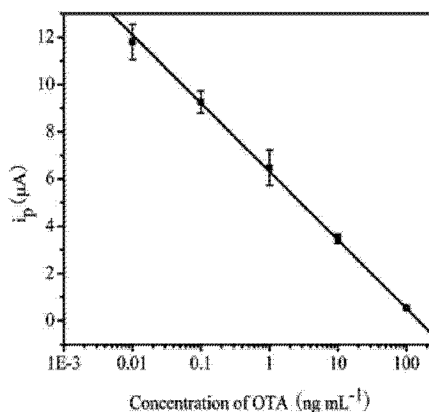
权利要求书1页 说明书9页 附图4页

(54) 发明名称

一种电化学免疫传感器及其制备与应用

(57) 摘要

本发明提供了一种检测赭曲霉毒素 A 的电化学免疫传感器,包括工作电极、参比电极和对电极,所述工作电极为先在基底电极表面修饰羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料,而后固定赭曲霉毒素 A- 牛血清白蛋白偶联物所得。应用本发明的传感器对赭曲霉毒素 A 进行检测,赭曲霉毒素 A 的浓度在 0. 01-100ng/ml 范围内呈线性关系,线性方程式为 $Y=6. 3155E^{-6}-2. 89458E^{-6}X$,相关系数为 0. 99984,最低检测限为 0. 004ng/ml。与现有技术比较,所述传感器灵敏度高、特异性好、成本低、操作简便,检测周期短,适用于实际样品的测定等,有望成为具有实际应用价值的传感器。



1. 一种检测赭曲霉毒素 A 的电化学免疫传感器,包括工作电极、参比电极和对电极,所述工作电极为先在基底电极表面修饰羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料,而后固定赭曲霉毒素 A- 牛血清白蛋白偶联物所得。

2. 根据权利要求 1 所述的电化学免疫传感器,其特征在于,所述羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料中,羧基化单壁碳纳米管与壳聚糖的质量比为 1:1 ~ 12:1。

3. 根据权利要求 1 所述的电化学免疫传感器,其特征在于,每个工作电极上,所述羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料中羧基化单壁碳纳米管的质量为 1 ~ 12ug。

4. 根据权利要求 1 所述的电化学免疫传感器,其特征在于,所述羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料中的羧基化单壁碳纳米管与所述赭曲霉毒素 A- 牛血清白蛋白偶联物的质量比为 6.67:1 ~ 2400:1。

5. 根据权利要求 1 所述的电化学免疫传感器,其特征在于,所述参比电极选自饱和甘汞电极或银氯化银电极;所述对电极为铂丝电极;所述基底电极选自玻碳电极。

6. 根据权利要求 1-5 任一项权利要求所述的电化学免疫传感器中的工作电极的制备方法,其特征在于,所述方法为先在基底电极表面修饰羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料,而后再固定赭曲霉毒素 A- 牛血清白蛋白偶联物。

7. 根据权利要求 6 所述的制备方法,其特征在于,所述工作电极具体按照以下步骤制备:

1) 制备羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料:将壳聚糖溶解于醋酸溶液中,制备壳聚糖溶液;将羧基化单壁碳纳米管溶解于所得壳聚糖溶液中,得羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料混悬液;

2) 工作电极的修饰及功能化:

(1) 基底电极表面处理:将基底电极表面进行抛光处理,使其表面光洁;

(2) 修饰单壁碳纳米管 / 壳聚糖纳米复合材料:将步骤 1) 中制备的羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料混悬液滴涂到步骤 (1) 中处理好的基底电极表面,晾干成膜,得到羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料修饰电极 SWNTs-COOH/CS/GCE;

(3) 采用活化液活化所得 SWNTs-COOH/CS/GCE 中 SWNTs-COOH 上的羧基基团;

(4) 固定赭曲霉毒素 A- 牛血清白蛋白偶联物:在活化后的 SWNTs-COOH/CS/GCE 上加 OTA-BSA,孵育,形成 OTA-BSA-SWNTs-COOH/CS/GCE, BSA 封闭非特异性吸附位点,即得工作电极。

8. 一种检测赭曲霉毒素 A 的检测体系,包括如权利要求 1-5 任一项权利要求所述的电化学免疫传感器、抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体、二抗和免疫反应缓冲体系。

9. 一种检测赭曲霉毒素 A 的方法,为采用如权利要求 1-5 任一项权利要求所述的电化学免疫传感器或如权利要求 8 所述的检测体系对样品中的赭曲霉毒素 A 进行检测。

10. 如权利要求 1-5 任一项权利要求所述的电化学免疫传感器或如权利要求 8 所述的检测体系在检测赭曲霉毒素 A 中的用途。

一种电化学免疫传感器及其制备与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及电化学领域,尤其涉及一种电化学免疫传感器及其制备与应用。

背景技术

[0002] 赭曲霉毒素是由曲霉菌属和青霉菌属几种菌产生的次生代谢产物,具有致畸、致癌、致突变、免疫学毒性等,国际癌症研究机构(IARC)将赭曲霉毒素定为2B类致癌物,分为赭曲霉毒素A、B、C等结构类似的化合物,其中以赭曲霉毒素A(OTA)毒性最大。OTA产生菌广泛分布于自然界,粮谷类、葡萄及葡萄酒、中草药、豆制品、啤酒、茶叶等多种农作物和食品均可被OTA污染。近年来关于赭曲霉毒素的危害已引起世界各国的极大关注,许多国家对其制定了最高允许量。

[0003] 高效液相色谱在最近的OTA国际标准体系中已经处于绝对的主导地位,作为定量的检测方法,在国内外实验室和检测机构得到普遍的使用。采用高效液相色谱法,或者质谱联用法对OTA进行检测,虽然具有结果准确、回收率高、精密度良好、重现性好等优点,但是成本高、操作过程复杂、时间长,无法满足现场检测的需要。

[0004] 基于免疫学原理的酶联免疫法检测OTA具有简便、快速、灵敏等特点,为快速大规模筛检提供了极大的帮助。但由于该类方法在检测复杂基质样品时,检测结果假阳性多。因此阳性样品应该用仪器法进行复测。

[0005] 电化学免疫传感器是将免疫技术和电化学检测技术相结合的一种新分析方法,利用信号转换器(电化学工作站)把分子识别器(探针)与被测对象发生的物理或化学变化转变成电信号。该技术具有快速、灵敏、选择性高、操作简便等特点,因此应用电化学免疫传感器检测样品中OTA具有非常重要的意义。

[0006] 电化学免疫传感器自建立以来,主要应用于重大疾病标志物的检测。近年来,该技术逐步被应用于食品中真菌毒素的检测,但相对文献较少,尤其针对食品中OTA的电化学生物传感器检测技术的研究与应用尚不成熟。

[0007] 为了弥补现有技术OTA检测的不足,旨在建立一种新型电化学免疫传感器用于OTA的快速、灵敏检测。

发明内容

[0008] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的第一方面提供一种检测赭曲霉毒素A(OTA)的电化学免疫传感器,包括工作电极、参比电极和对电极,所述工作电极为先在基底电极表面修饰羧基化单壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(SWNTs-COOH/CS),而后固定赭曲霉毒素A-牛血清白蛋白偶联物(OTA-BSA)所得。

[0009] 优选地,所述基底电极选自玻碳电极。

[0010] 优选地,所述羧基化单壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(SWNTs-COOH/CS)为将羧基化单壁碳纳米管(SWNTs-COOH)分散于壳聚糖(CS)中制得。

[0011] 优选地,所述羧基化单壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(SWNTs-COOH/CS)中,羧基化

单壁碳纳米管与壳聚糖的质量比为 1:1 ~ 12:1 ;更优选为 1:1。

[0012] 优选地,每个所述工作电极上,羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料 (SWNTs-COOH/CS) 中羧基化单壁碳纳米管的质量为 1 ~ 12ug,更优选为 2ug。

[0013] 优选地,所述工作电极上,羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料 (SWNTs-COOH/CS) 中羧基化单壁碳纳米管与赭曲霉毒素 A- 牛血清清蛋白偶联物 (OTA-BSA) 的质量比为 6.67:1 ~ 2400:1,更优选为 6.67:1 ~ 80:1,最优选为 40:1。进一步地,所述电化学免疫传感器中的参比电极和对电极与工作电极构成三电极系统。

[0014] 优选地,所述参比电极选自饱和甘汞电极或银氯化银电极 (Ag/AgCl) 之任意一种 ;更优选地,所述参比电极为银 / 氯化银 (Ag/AgCl) 电极。

[0015] 优选地,所述对电极为铂丝电极。

[0016] 本发明第二方面提供了前述电化学免疫传感器中的工作电极的制备方法,所述方法为先在基底电极表面修饰羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料 (SWNTs-COOH/CS),而后再固定赭曲霉毒素 A- 牛血清清蛋白偶联物 (OTA-BSA)。

[0017] 优选地,所述工作电极按照以下步骤制备 :

[0018] 1) 制备羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料 (SWNTs-COOH/CS) :

[0019] 将壳聚糖溶解于醋酸溶液中,制备壳聚糖溶液 ;将羧基化单壁碳纳米管 (SWNTs-COOH) 溶解于所得壳聚糖溶液中,得 SWNTs-COOH/CS 复合材料混悬液 ;

[0020] 2) 工作电极的修饰及功能化 :

[0021] (1) 基底电极表面处理 :将基底电极表面进行抛光处理,使其表面光洁 ;

[0022] (2) 修饰单壁碳纳米管 / 壳聚糖纳米复合材料 (SWNTs-COOH/CS) :将步骤 1) 中制备的 SWNTs-COOH/CS 混悬液滴涂到步骤 (1) 中处理好的基底电极表面,晾干成膜,得到羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料修饰电极 (SWNTs-COOH/CS/GCE) ;

[0023] (3) 采用活化液活化所得 SWNTs-COOH/CS/GCE 中 SWNTs-COOH 上的羧基基团 ;

[0024] (4) 固定赭曲霉毒素 A- 牛血清清蛋白偶联物 (OTA-BSA) :在活化后的 SWNTs-COOH/CS/GCE 上加 OTA-BSA,孵育,形成 OTA-BSA-SWNTs-COOH/CS/GCE,BSA 封闭非特异性吸附位点,即得工作电极。

[0025] 优选地,步骤 1) 中,壳聚糖的分子式 $(C_6H_{11}NO_4)_N$,单元体的分子量为 161.2。

[0026] 优选地,步骤 1) 中,醋酸溶液的浓度为 1%。

[0027] 优选地,步骤 1) 中,壳聚糖溶液的浓度为 0.5 ~ 6mg/mL,更优选为 1mg/mL。

[0028] 优选地,步骤 1) 中,SWNTs-COOH/CS 复合材料混悬液中,羧基化单壁碳纳米管与壳聚糖的质量比为 1:1 ~ 12:1 ;更优选为 1:1。

[0029] 优选地,步骤 1) 中,SWNTs-COOH/CS 复合材料混悬液中,SWNTs-COOH 的终浓度为 0.5 ~ 6.0mg/ml ;更优选为 1.0mg/ml。

[0030] 优选地,步骤 (1) 中,所述基底电极选自玻碳电极。

[0031] 优选地,步骤 (1) 中,可采用氧化铝粉对所述基底电极进行抛光处理。

[0032] 优选地,步骤 (2) 中所修饰的单壁碳纳米管 / 壳聚糖纳米复合材料 (SWNTs-COOH/CS) 中,羧基化单壁碳纳米管与壳聚糖的质量比为 1:1 ~ 12:1 ;更优选为 1:1。

[0033] 优选地,步骤 (2) 中,每个工作电极上所修饰的羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料 (SWNTs-COOH/CS) 中羧基化单壁碳纳米管的质量为 1 ~ 12ug,更优选为 2ug。

[0034] 优选地,步骤(3)中,所述活化液为EDC和NHS的混合液EDC/NHS。更优选地,EDC/NHS中EDC的浓度为10mg/ml,NHS的浓度为4mg/ml,EDC与NHS的质量比为5mM:2mM。

[0035] 优选地,步骤(4)中,赭曲霉毒素A-牛血清清蛋白偶联物(OTA-BSA)的浓度为0.5~15.0ug/ml;更优选地,OTA-BSA的浓度为5.0ug/ml。

[0036] 优选地,步骤(2)中所修饰的单壁碳纳米管/壳聚糖纳米复合材料(SWNTs-COOH/CS)中羧基化单壁碳纳米管与步骤(4)中所固定的赭曲霉毒素A-牛血清清蛋白偶联物(OTA-BSA)的质量比为6.67:1~2400:1,更优选为6.67:1~80:1,最优选为40:1。

[0037] 本发明第三方面提供了一种检测赭曲霉毒素A的检测体系,包括本发明第一方面所述的电化学免疫传感器、OTA单克隆抗体、二抗和免疫反应缓冲体系。

[0038] 优选地,所述二抗为碱性磷酸酶标记二抗。

[0039] 进一步的,可选择碱性磷酸酶标记的马抗鼠,兔抗鼠,羊抗鼠等任意来源的抗鼠的二抗,更优选为碱性磷酸酶标记马抗小鼠IgG(H+L)。

[0040] 优选地,所述免疫反应缓冲体系为含 α -NP的二乙醇胺(DEA)缓冲液。

[0041] 本发明第四方面提供了一种检测赭曲霉毒素A的方法,为采用前述的电化学免疫传感器或检测体系对样品中的赭曲霉毒素A进行检测,所述方法具体包括以下步骤:

[0042] (a) 在前述构建的电化学免疫传感器的工作电极上同时加入样品溶液和一定量OTA单克隆抗体溶液;

[0043] (b) 加入适量的碱性磷酸酶标记的二抗,孵育,通过与OTA单克隆抗体选择性地结合到电极表面;

[0044] (c) 将工作电极置于免疫反应缓冲体系中,并将工作电极、参比电极以及对电极正确连接到电化学工作站上,用差分脉冲伏安(DPV)进行测定。

[0045] 优选地,步骤(a)中,OTA单克隆抗体溶液的浓度为1.25~20.0ug/ml;更优选为5.0ug/ml。

[0046] 优选地,步骤(b)中,所述碱性磷酸酶标记二抗为碱性磷酸酶标记马抗小鼠IgG(H+L)。

[0047] 更优选地,所述碱性磷酸酶标记马抗小鼠IgG(H+L)的稀释比例为:1:50~1:400;最佳为1:200。

[0048] 优选地,步骤(c)中,所述参比电极选自饱和甘汞电极或银氯化银电极(Ag/AgCl)之任意一种;更优选地,所述参比电极为银/氯化银(Ag/AgCl)电极。

[0049] 优选地,步骤(c)中,所述对电极为铂丝电极。

[0050] 优选地,步骤(c)中,所述免疫反应缓冲体系为含 α -NP的二乙醇胺(DEA)缓冲液。

[0051] 更优选地,所述免疫反应缓冲体系中 α -NP的浓度为0.25~1.5mg/ml;最佳为0.75mg/mL。

[0052] 本发明第五方面提供了前述电化学免疫传感器或检测体系在检测赭曲霉毒素A中的用途。

[0053] 本发明的有益效果为:

[0054] (1) 本发明研制了一种基于单壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(SWNTs-COOH/CS)固定抗原(OTA-BSA)的间接竞争电化学免疫传感器,可以用于灵敏地检测OTA。首先制得稳

定性良好的单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料 (SWNTs-COOH/CS) 修饰于玻碳电极表面, 再通过吸附作用将赭曲霉毒素 - 牛血清白蛋白交联物 (OTA-BSA) 固定到修饰过的电极表面。检测时, 加入样品与一定量的 OTA 单克隆抗体 (anti-OTA), 样品中的游离 OTA 与工作电极表面一定量的固定化的 OTA-BSA 耦合物竞争结合单克隆抗体, 竞争反应过后, 再加入碱性磷酸酶标记的二抗, 二抗特异性地与电极表面所捕获的一抗反应, 进而碱性磷酸酶催化底物 α -萘基磷酸盐水解, 在电极表面产生电信号。所述电化学免疫传感器的线性范围为 0.01—100ng/ml, 线性方程式为 $Y = 6.3155E^{-6} - 2.89458E^{-6}X$, 检测限位 4pg/ml, 线性相关系数为 0.99984。

[0055] (2) 众所周知, OTA-BSA 只有在生物相容性的环境中才能保持其活性。将其直接固定到电极表面通常会引起抗体的构想改变, 从而导致丧失生物活性。因此, 如何有效地把 OTA-BSA 固定在电极上是本发明的电化学免疫传感器制备的一个关键步骤。由于本发明中工作电极表面修饰的 SWNTs-COOH/CS 复合材料具有非常大的比表面积以及良好的生物相容性, 所以能够牢固地吸附 OTA-BSA, 检测时, 能够有效增加抗体的负载量, 并保持抗体的生物活性。

[0056] 此外, SWNTs-COOH/CS 复合材料还具有较好的电子传导作用, 能够增加 GCE 和样品溶液之间的电子转移, 提高导电性能, 显著增加了 OTA 测定的灵敏度, 很好地降低 OTA 分析的检测下限。

[0057] (3) 与此同时, 信号放大是影响检测灵敏度的另一个重要因素。本发明采用了基于碳纳米管和碱性磷酸酶的双放大策略, 极大地实现了信号放大。在本发明中, 碱性磷酸酶 (AP) 被引进电极表面催化 α -萘基磷酸盐 (α -NP) 水解而产生电化学信号, 增强了电化学响应信号, 可对样品中的 OTA 浓度进行准确的定量。

[0058] (4) 综上所述, 本发明成功构建了可用于检测赭曲霉毒素 A (OTA) 的电化学免疫传感器及检测体系, 应用本发明的传感器, 对 OTA 的测定显示了灵敏度高、稳定、重现性好的能力。与现有技术比较, 本发明的传感器成本低, 操作简单方便, 检测周期短, 特异性好, 假阳性率和假阴性率低。适用于实际样品的测定等, 有望成为具有实际应用价值的传感器。

附图说明

[0059] 图 1 为本发明实施例 1 的 SWNTs-COOH/CS 复合材料混悬液用 S-300N 扫描电镜观察结果。

[0060] 图 2 为本发明实施例 1 每一步不同修饰电极在 5mM 的铁氰化钾溶液中的方波伏安响应曲线, 其中

[0061] a 为裸 GCE ;

[0062] b 为 SWNTs-COOH/CS/GCE ;

[0063] c 为 OTA-BSA-SWNTs-COOH/CS/GCE ;

[0064] d 为 anti-OTA/OTA-BSA-SWNTs-COOH/CS/GCE ;

[0065] e 为 AP-anti-antibody/anti-OTA/OTA-BSA-SWNTs-COOH/CS/GCE。

[0066] 图 3 为本发明实施例 1 每一步不同修饰电极所对应的循环伏安响应曲线, 其中

[0067] a 为裸 GCE ;

[0068] b 为 SWNTs-COOH/CS/GCE ;

- [0069] c 为 OTA-BSA-SWNTs-COOH/CS/GCE ;
- [0070] d 为 anti-OTA/OTA-BSA-SWNTs-COOH/CS/GCE ;
- [0071] e 为 AP-anti-antibody/anti-OTA/OTA-BSA-SWNTs-COOH/CS/GCE。
- [0072] 图 4 为对比试验中各个传感器的电流响应曲线图,其中曲线 a, b, c 分别为在裸玻碳电极,玻碳电极修饰 SWNTs-COOH/CS/GCE,玻碳电极修饰 SWNTs-COOH/GCE 基础上构建传感器之后的电流信号响应曲线。
- [0073] 图 5 为不同浓度的 OTA-BSA 所构建的电化学免疫传感器差分脉冲伏安扫描结果。
- [0074] 图 6 为不同浓度的 anti-OTA 所构建的电化学免疫传感器差分脉冲伏安扫描结果。
- [0075] 图 7 为不同稀释比例的 AP-anti-antibody 所构建的电化学免疫传感器差分脉冲伏安扫描结果。
- [0076] 图 8 为不同浓度的 α -NP 所构建的电化学免疫传感器差分脉冲伏安扫描结果。
- [0077] 图 9 为本发明的电化学免疫传感器在五个不同浓度 (100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml, 0.1ng/ml, 0.01ng/ml) 的 OTA 标准品溶液中孵育, DPV 法记录电流值 i_p 所得曲线图。
- [0078] 图 10 为本发明的电化学免疫传感器检测 OTA 时的标准曲线。
- [0079] 图 11 为本发明制备的免疫传感器的特异性分析实验结果。

具体实施方式

[0080] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0081] 须知,下列实施例中未具体注明的工艺设备或装置均采用本领域内的常规设备或装置;所有压力值和范围都是指绝对压力。

[0082] 此外应理解,本发明中提到的一个或多个方法步骤并不排斥在所述组合步骤前后还可以存在其他方法步骤或在这些明确提到的步骤之间还可以插入其他方法步骤,除非另有说明;还应理解,本发明中提到的一个或多个设备/装置之间的组合连接关系并不排斥在所述组合设备/装置前后还可以存在其他设备/装置或在这些明确提到的两个设备/装置之间还可以插入其他设备/装置,除非另有说明。而且,除非另有说明,各方法步骤的编号仅为鉴别各方法步骤的便利工具,而非为限制各方法步骤的排列次序或限定本发明可实施的范围,其相对关系的改变或调整,在无实质变更技术内容的前提下,当亦视为本发明可实施的范畴。

[0083] 实施例 1 制备电化学免疫传感器

[0084] 1. 材料与方法

[0085] 1.1 材料

[0086] 赭曲霉毒素 A-牛血清清蛋白偶联物 (OTA-BSA)、OTA 单克隆抗体 (anti-OTA) 购自北京华安麦科生物技术有限公司、碱性磷酸酶标记马抗小鼠 IgG(H+L) 购自美国 Vector 实验室、OTA 标准品、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、 α -萘基磷酸盐 (α -NP)、壳聚糖 (CS) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司,羧基化单壁碳纳米管购自深圳纳米港有限公司,甲醇、丙酮等其他试剂均购自重庆茂业化学试剂有限

公司。

[0087] 1.2 检测仪器

[0088] CHI660D 型电化学工作站为上海辰华仪器公司产品。

[0089] 1.3 检测原理

[0090] 在玻碳电极表面通过直接涂覆法修饰铺上一层羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料 (SWNTs-COOH/CS), 并利用 EDC/NHS 活化 SWNTs-COOH 上的羧基。将 OTA-BSA 通过蛋白质氨基端与羧基化单壁碳纳米管 SWNTs-COOH 上的活化羧基反应连接, 并通过抗原抗体反应与同时加入的 OTA 单体来竞争吸附 OTA 单克隆抗体 (anti-OTA), 再加入碱性磷酸酶标记马抗小鼠 IgG(H+L) 二抗, 通过碱性磷酸酶与底物 α -萘基磷酸盐 (α -NP) 反应产生的电化学信号绘制标准曲线和得到实测样品 OTA 水平。

[0091] 2. 工作电极的制备

[0092] 2.1 羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖 (SWNTs-COOH/CS) 复合材料的制备

[0093] 将壳聚糖粉末溶解于 1% 醋酸溶液中, 制备浓度为 1mg/ml 的壳聚糖溶液;

[0094] 取 5.0ml 1mg/ml 壳聚糖溶液加入 5.0mg 羧基化单壁碳纳米管 (SWNTs-COOH) 超声分散 2h 得均匀稳定分散良好的 SWNTs-COOH/CS 复合材料混悬液, 其中 SWNTs-COOH 的终浓度为 1mg/ml。在使用之前, 于 4℃ 低温保存。

[0095] 2.2 工作电极的修饰及功能化

[0096] (1) 玻碳电极表面处理: 玻碳电极 (GCE) 在使用前用氧化铝粉抛光至镜面, 先后分别用超纯水和体积比为 1:1 的丙酮和硝酸中超声几分钟。随后再次将电极用超纯水超声几分钟, 再用去离子水冲洗干净, 在室温下晾干。

[0097] (2) 将 2 μ L 预先准备好的 SWNTs-COOH/CS 混悬液 (1mg mL⁻¹) 小心地滴涂在处理干净的玻碳电极表面。然后, 在室温下将修饰的玻碳电极过夜晾干得到羧基化单壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料修饰电极 (SWNTs-COOH/CS/GCE)。

[0098] (3) 将所制备的 SWNTs-COOH/CS/GCE 用磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.01mol/L, pH7.4) 清洗后, 浸入新鲜配置的 EDC/NHS 活化液 (EDC 与 NHS 的浓度比为, 5mM:2mM) 中, 于 37℃ 温育 1h, 活化 SWNTs-COOH 上的羧基基团。

[0099] (4) 活化后的 SWNTs-COOH/CS/GCE 再用 PBS 缓冲液彻底清洗。将 10 μ L 的 OTA-BSA (5 μ g mL⁻¹) 立即滴于电极表面, 37℃ 温育 1.5h。孵育完全之后, 将制备的电极用 PBS 清洗。于室温在 10 μ L 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 中封闭电极表面未反应的活性位点。最后, 以 PBS 彻底清洗电极, 得 OTA-BSA-SWNTs/CS/GCE 并置于 4℃ 的冰箱中待用。

[0100] 3. 电化学免疫传感器的使用

[0101] (1) 将 5 μ L 用 PBS (pH7.4) 稀释到一定浓度的 OTA (0 ~ 500ng mL⁻¹) 和 5 μ L 10 μ g mL⁻¹ 的 OTA 单克隆抗体 (anti-OTA) 均匀混合, 滴加在修饰了 OTA-BSA 的电极 OTA-BSA-SWNTs/CS/GCE 表面, 37℃ 温育 90min, 得 anti-OTA-OTA-BSA-SWNTs/CS/GCE。在反应过程中, 电极上固定的 OTA-BSA 与游离在混合液中的 OTA 共同竞争固定量的 anti-OTA。

[0102] (2) 然后再用 PBS 缓冲液 (pH7.4) 清洗电极, 置于 10 μ L 1:200 稀释的碱性磷酸酶标记马抗小鼠 IgG(H+L) 二抗中, 37℃ 温育 90min, PBS 缓冲液 (pH7.4) 清洗后, 得 AP-anti-antibody/anti-OTA/OTA-BSA-SWNTs-COOH/CS/GCE。

[0103] (3) 以现配制的含 0.75mg mL⁻¹ α -NP 的二乙醇胺 (DEA) 缓冲液作为免疫反应缓冲

体系,将工作电极置于其中,Ag/AgCl 电极为参比电极,铂丝电极为对电极,在室温下,用差分脉冲伏安法 (DPV) 进行测定。

[0104] 4. 对比试验

[0105] 在同一实验条件下,以裸玻碳电极和玻碳电极表面只羧基化单壁碳纳米管 (SWNTs-COOH) 所得工作电极 GCE、SWNTs-COOH/GCE 所构建的电化学免疫传感器为对照。

[0106] 实施例 2 电化学免疫传感器的表征和检验

[0107] 1. 对 SWNTs-COOH/CS 复合材料膜的表征

[0108] 对实施例 1 中所得 SWNTs-COOH/CS 复合材料混悬液用 S-300N 扫描电镜进行扫描观察,如图 1a 和 1b 显示,该纳米复合材料中碳管成明显的管状,在溶液中分散均匀。

[0109] 在玻碳电极表面滴涂 SWNTs-COOH/CS,在室温晾干成膜后,肉眼观察在电极: SWNTs-COOH/CS/GCE 表面可见一层均匀的膜状物质。

[0110] 2. 不同修饰电极的电化学表征

[0111] 如图 2 所示,是每一步不同修饰电极在 5mM 的铁氰化钾溶液中的方波伏安响应曲线:

[0112] a 为裸 GCE;

[0113] b 为 SWNTs-COOH/CS/GCE;

[0114] c 为 OTA-BSA-SWNTs-COOH/CS/GCE;

[0115] d 为 anti-OTA/OTA-BSA-SWNTs-COOH/CS/GCE;

[0116] e 为 AP-anti-antibody/anti-OTA/OTA-BSA-SWNTs-COOH/CS/GCE。

[0117] 当裸 GCE 表面修饰 SWNTs-COOH/CS 之后,峰值电流明显增大(图 2-曲线 b),结果说明 SWNTs-COOH/CS 薄膜能够促进溶液中的电子在电极表面的转移。当 OTA-BSA 滴加到活化的电极表面后,由于蛋白质的空间位阻现象和绝缘作用对电子转移构成了阻碍,峰值电流呈现明显的降低(图 2-曲线 c)。当电极通过 anti-OTA 的进一步修饰孵育后,增加的电阻使得峰值电流进一步降低(图 2-曲线 d),表明制备的电化学免疫传感器工作电极中 OTA-BSA 对 anti-OTA 进行了成功的识别与结合作用。当把一定浓度的 AP-anti-antibody 滴加到修饰后的电极表面孵育过后,峰值电流再一步降低(图 2-曲线 e),表明 AP-anti-antibody 成功的引入电化学免疫传感器的工作电极上。

[0118] 图 3 为每一步不同修饰电极所对应的循环伏安响应曲线,

[0119] a 为裸 GCE;

[0120] b 为 SWNTs-COOH/CS/GCE;

[0121] c 为 OTA-BSA-SWNTs-COOH/CS/GCE;

[0122] d 为 anti-OTA/OTA-BSA-SWNTs-COOH/CS/GCE;

[0123] e 为 AP-anti-antibody/anti-OTA/OTA-BSA-SWNTs-COOH/CS/GCE。

[0124] 结果与图 2 呈现出有良好的一致性,有效地证明我们成功地对电极进行了每一步的修饰。

[0125] 3. 对比实验:

[0126] 如图 4 所示,曲线 a, b, c 分别为在裸玻碳电极,玻碳电极修饰 SWNTs-COOH/CS/GCE,玻碳电极修饰 SWNTs-COOH/GCE 基础上构建传感器之后的电流信号响应曲线。曲线 a 表明蛋白质不能直接有效地固定在裸玻碳电极表面,所以响应电流很低;曲线 c 表明仅碳

管在电极表面成膜之后,能够通过其羧基端与蛋白质氨基端形成稳定的结合,把抗原固定在电极表面,所以其电流响应值比用裸玻碳电极构建的传感器高,但如图所示,运用单一 SWNTs-COOH 修饰电极构建传感器有一个缺点,即其响应电流的基线很高,而且不稳定;曲线 b 运用 SWNTs-COOH/CS 复合材料修饰电极之后构建的传感器,不仅能够高效地固定检测抗原,而且还能有效降低和稳定该传感器电流响应的基线,并且该复合材料修饰电极之后对响应电流的大小并不影响。因此,采用 SWNTs-COOH/CS 修饰电极作为工作电极构建用于检测 OTA 的电化学免疫传感器具有不可比拟的优势。

[0127] 实施例 3 电化学免疫传感器及其使用条件的优化

[0128] 我们还对实验过程中几个重要的条件即 SWNTs-COOH/CS 复合混悬液中 SWNTs-COOH 的终浓度、OTA-BSA 的浓度、anti-OTA 的浓度、AP-anti-antibody 的稀释比例、 α -NP 的浓度这几个测定条件进行了进一步的优化。对每一个条件都由低浓度到高浓度分别选取五个点进行一系列实验。

[0129] 1. 为考察 SWNTs-COOH/CS 复合材料混悬液中 SWNTs-COOH 的终浓度大小对电化学免疫传感器的影响,本实验采用了不同浓度的 (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0mg/ml) SWNTs-COOH/CS 复合混悬液构建电化学免疫传感器。结果表明,SWNTs-COOH 的终浓度太低,其成膜性差,不能很好地吸附 OTA-BSA 及固定抗体,而且如果膜中分散的 SWNTs-COOH 较少,促进电子传递的作用较弱;若 SWNTs-COOH 的终浓度太大,则成膜厚度增加,也会阻碍电子传递。实验发现,SWNTs-COOH 终浓度为 0.5 ~ 6.0mg/ml 的 SWNTs-COOH/CS 复合混悬液均能够实现构建符合要求的传感器,其中以 SWNTs-COOH 终浓度为 1.0mg/ml 的 SWNTs-COOH/CS 复合混悬液为最佳。

[0130] 2. 为考察 OTA-BSA 浓度大小对电化学免疫传感器的影响,本实验采用了不同浓度的 (0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0ug/ml) OTA-BSA 构建免疫电化学免疫传感器,然后进行差分脉冲伏安扫描。如图 5 可见,响应电流随着 OTA-BSA 浓度的增加而增加,当 OTA-BSA 浓度达到 5.0ug/ml 的以后,再增大 OTA-BSA 的浓度,响应电流增大不明显,说明 5.0ug/ml 已经达到 OTA-BSA 的最佳浓度。

[0131] 3. 同理,为考察 anti-OTA 浓度大小对使用电化学免疫传感器的影响,本实验采用了不同浓度的 (1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0ug/ml) anti-OTA, 然后进行差分脉冲伏安扫描。如图 6 可见,anti-OTA 最佳浓度为 5.0ug/ml。

[0132] 4. 同理,为考察 AP-anti-antibody 浓度大小对使用电化学免疫传感器的影响,本实验采用了不同稀释比例的 (1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400V/V) AP-anti-antibody, 然后进行差分脉冲伏安扫描。如图 7 可见,AP-anti-antibody 最佳稀释比例为 1:200 (V/V)。

[0133] 5. 同理,为考察 α -NP 浓度大小对使用免疫传感器的影响,本实验采用了含不同浓度 α -NP (0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5mg mL⁻¹) 的免疫反应缓冲体系,然后进行差分脉冲伏安扫描。如图 8 可见, α -NP 的最佳浓度为 0.75mg mL⁻¹。

[0134] 实施例 4 制备的电化学免疫化学传感器的性能分析

[0135] 为了评估电化学免疫传感器的性能,对以 PBS (pH7.4) 配备的不同浓度的 OTA 标准品进行分析。具体的,在最优实验条件下,(1) 将 5 μ L 用 PBS (pH7.4) 稀释到五个不同浓度的 OTA (200ng/ml, 20ng/ml, 2ng/ml, 0.2ng/ml, 0.02ng/ml) 和 5 μ L 10 μ g mL⁻¹ 的 OTA 单克

隆抗体 (anti-OTA) 均匀混合,滴加在修饰了 OTA-BSA 的电极 OTA-BSA-SWNTs/CS/GCE 表面, 37°C 温育 90min。在反应过程中,电极上固定的 OTA-BSA 与游离在混合液中的 OTA 共同竞争固定量的 anti-OTA。(2) 然后再用 PBS 缓冲液 (pH7.4) 清洗电极,置于 10 μ L 1:200 稀释的碱性磷酸酶标记马抗小鼠 IgG(H+L) 二抗中,37°C 温育 90min, PBS 缓冲液 (pH7.4) 清洗。采用 DPV 法记录电流值 i_p (如图 9 所示), 绘制标准曲线,如图 10 所示。实验结果显示,当 OTA 浓度在 10pg mL^{-1} 到 100ng mL^{-1} 之间时,得到的峰电流与 OTA 浓度的对数呈线性相关,回归方程为: $Y = 6.3155E^{-6} - 2.89458E^{-6}X$ 。相关系数为 0.999。将传感器在只含有 5ug mL^{-1} 的 anti-OTA 而不含 OTA 标准品进行竞争的空白溶液中连续扫描 10 次,根据空白信号加上 3 倍标准差所对应的信号值估计检出限,计算得 4pg mL^{-1} 。

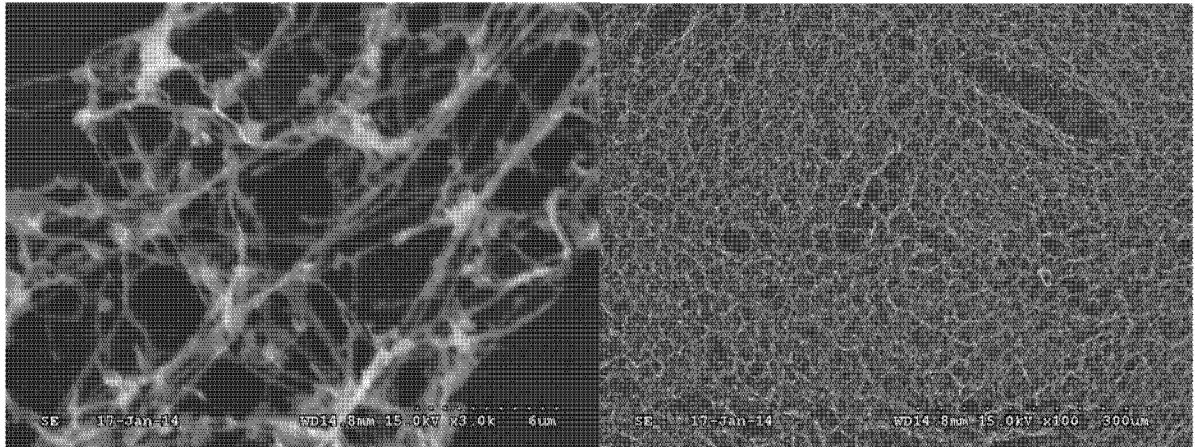
[0136] 实施例 5 制备的电化学免疫传感器的特异性分析

[0137] 电化学免疫传感器的特异性,在分析不分离的生物样本中的生物标志物时具有重要的作用,主要取决于抗体的特异性。我们所使用的是 OTA 单克隆抗体。为了评价本免疫传感器的特异性,我们对在检测 OTA 时可能会出现的其他三种真菌毒素黄曲霉毒素 B_1 (AFB₁)、玉米赤霉烯酮 (ZEA)、伏马菌素 B_1 (FB₁) 进行了检测。具体的,将黄曲霉毒素 B_1 (AFB₁)、玉米赤霉烯酮 (ZEA)、伏马菌素 B_1 (FB₁) 各 1 μ g mL^{-1} 以及 100ng mL^{-1} OTA 分别采用同实施例 4 所构建的电化学免疫传感器进行测定。结果如图 10 所示,其它的三种真菌毒素的 DPV 响应电流接近于空白样 (不含 OTA),然而 OTA 的 DPV 响应电流有明显的下降。这些结果说明制备的电化学免疫传感器能够有效地分辨不同种类的真菌毒素,具有良好的特异性。

[0138] 实施例 6 制备的电化学免疫传感器的稳定性和重现性分析

[0139] 在最优实验条件下,制备免疫传感器。用不同批次的免疫传感器对 100ng mL^{-1} 和 100pg mL^{-1} 的 OTA 进行了 3 次平行测定,变异系数分别为 3.56% 和 5.20%。表明,本发明制备的电化学免疫传感器具有良好的稳定性和重现性。

[0140] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。



a

b

图 1

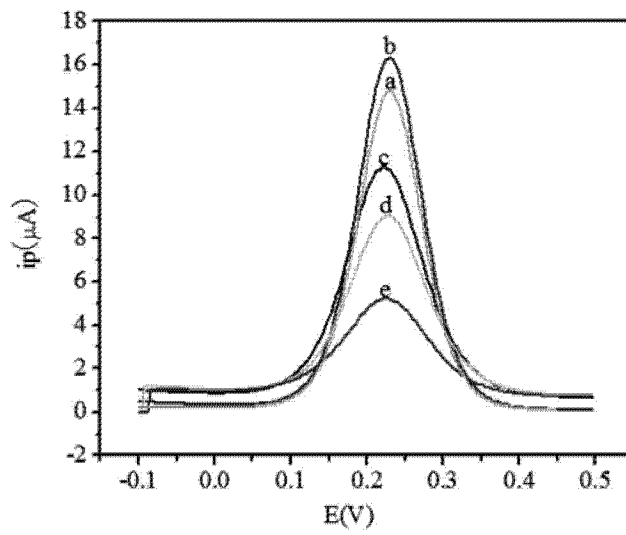


图 2

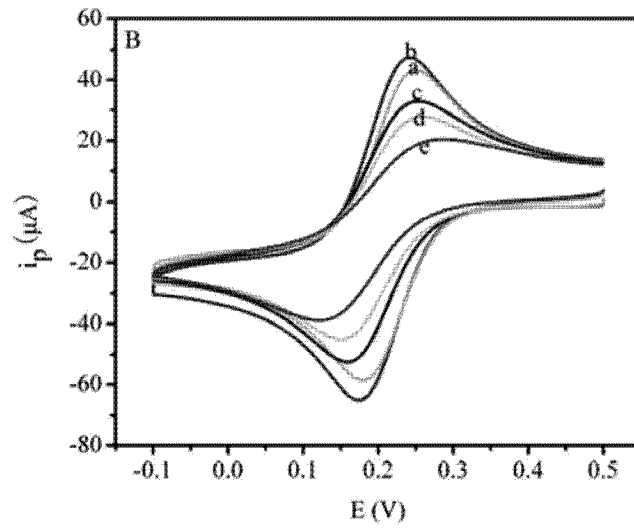


图 3

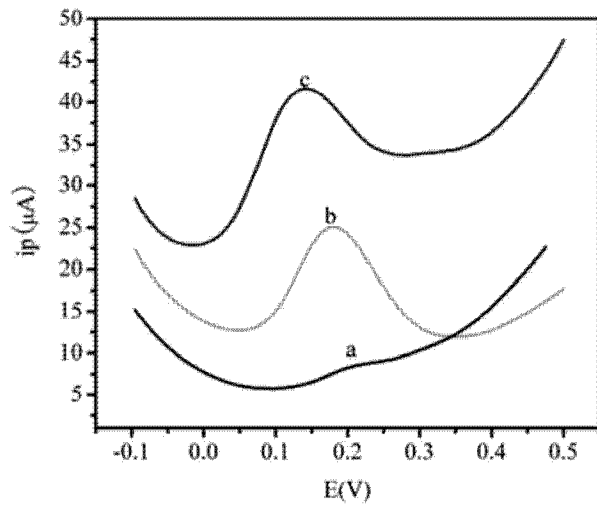


图 4

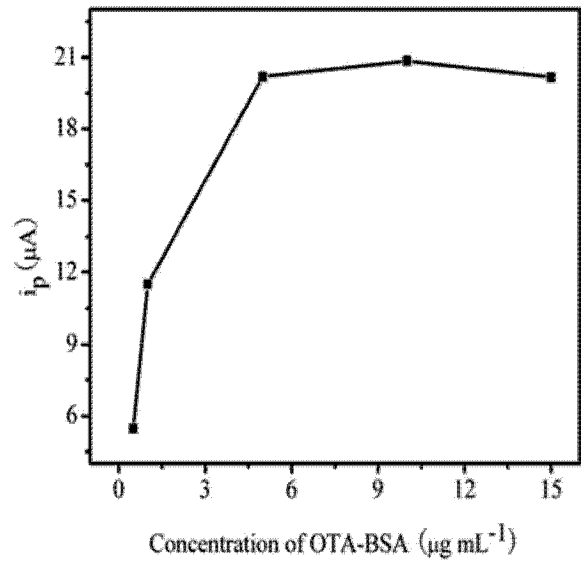


图 5

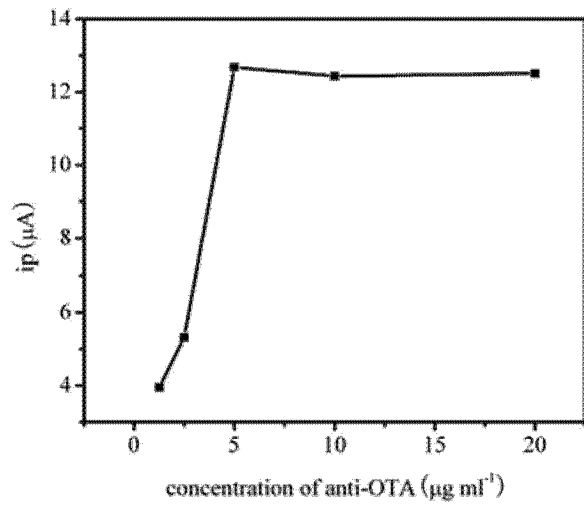


图 6

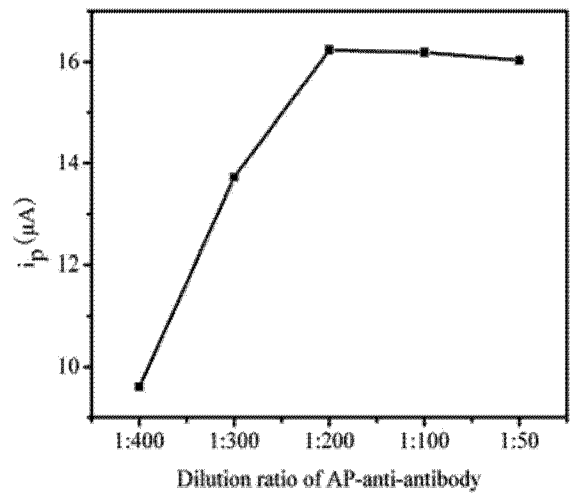


图 7

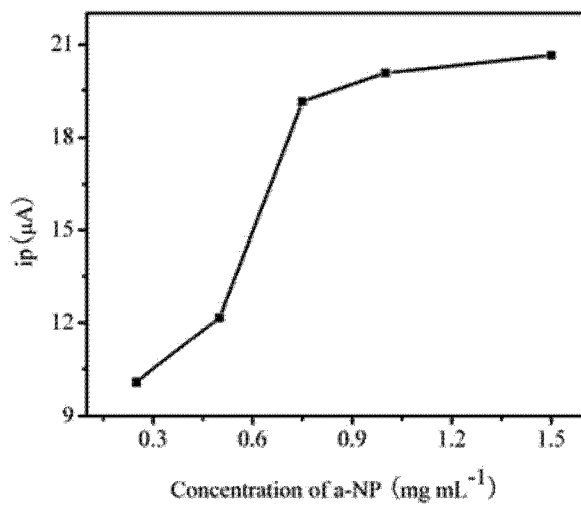


图 8

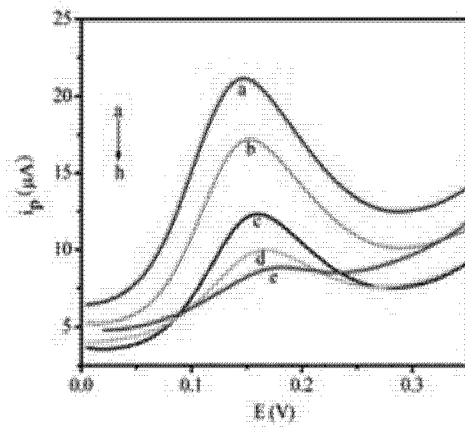


图 9

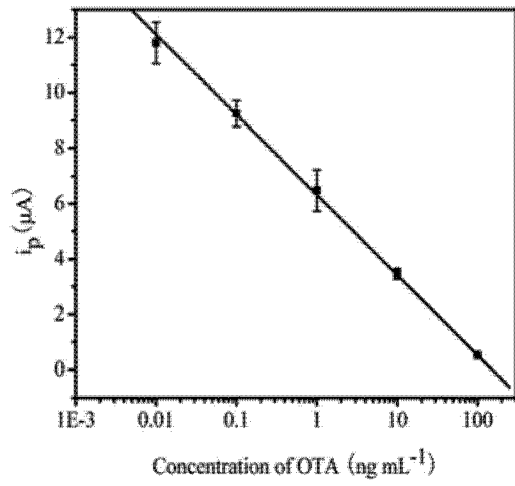


图 10

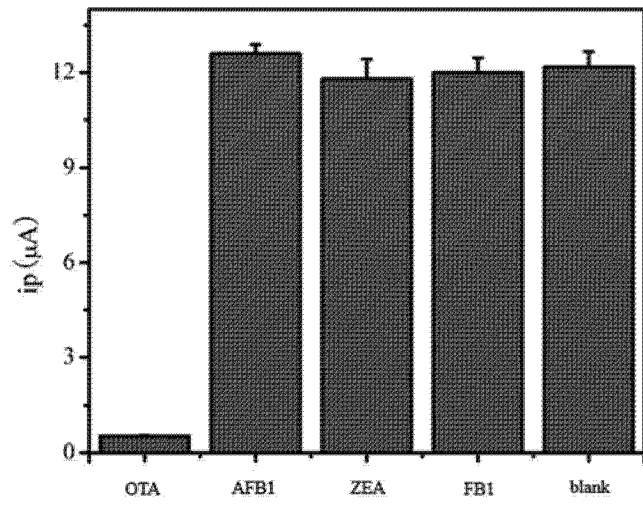


图 11