

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102262115 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 30

(21) 申请号 201110213016. 7

(22) 申请日 2011. 07. 28

(73) 专利权人 南京师范大学

地址 210046 江苏省南京市亚东新城区文苑路1号

(72) 发明人 赵波 陈昌云 邵科峰 颜妍

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 韩朝晖

(51) Int. Cl.

G01N 27/327(2006. 01)

G01N 27/48(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

审查员 王小燕

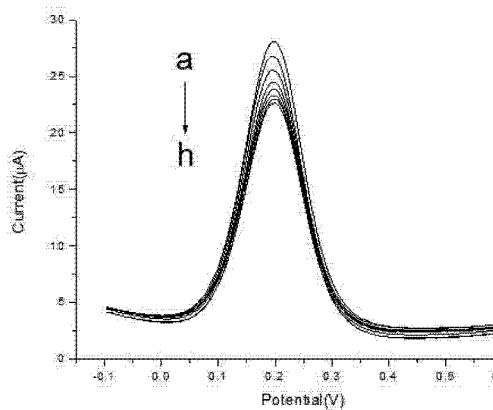
权利要求书2页 说明书6页 附图4页

(54) 发明名称

测定三聚氰胺含量的电化学免疫传感器及制备方法和应用

(57) 摘要

一种测定三聚氰胺含量的非标记电化学免疫传感器及其制备方法和应用。所述的免疫传感器，包括基底电极，基底电极表面修饰石墨烯-三聚氰胺-壳聚糖复合物，并以牛血清蛋白封闭非特异性活性位点。其制备方法是以石墨烯/壳聚糖复合材料固定三聚氰胺抗原于玻碳电极表面。所述的免疫传感器基于免疫反应的竞争模式，利用 $K_3Fe(CN)_6$ 为探针，以循环伏安法和差分脉冲伏安法监测免疫反应，可用于三聚氰胺含量的检测。本发明的传感器具有较高的灵敏度和专一性，检测方法简单，适用范围广泛，检测限可达到0.2ng/ml，线性范围 $5\sim 1500ng/ml$ ，具有快速高效、灵敏度高和特异性好、操作简单、成本低等特点。



1. 一种检测三聚氰胺的电化学免疫传感器,包括基底电极,其特征在于所述的基底电极表面修饰石墨烯-三聚氰胺-壳聚糖复合物,并以牛血清蛋白封闭非特异性活性位点。

2. 根据权利要求1所述的电化学免疫传感器,其特征在于,所述的基底电极为玻碳电极。

3. 根据权利要求1或2所述的电化学免疫传感器,其特征在于,所述免疫传感器通过下述方法制得:将石墨烯的壳聚糖悬浮液超声分散后与三聚氰胺混合,将混合液滴涂在电极表面,利用壳聚糖将石墨烯和三聚氰胺包被并固定于电极表面,并将电极浸泡在牛血清蛋白溶液中,封闭电极表面的非特异性的活性位点。

4. 根据权利要求2所述的电化学免疫传感器,其特征在于,所述免疫传感器通过下述步骤制得:

1) 石墨烯-壳聚糖悬浮液的配制:将 0.05M 的 HCl 加热至 80 ~ 90℃,加入称量好的壳聚糖,搅拌溶解,冷却后加入浓度为 0.1M 的 NaOH,调节 pH 至 5,配得 1mg/mL 的壳聚糖溶液;准确称取 5g 石墨烯样品于 2mL 壳聚糖溶液中,超声分散 1h,制得石墨烯-壳聚糖悬浮液;

2) 玻碳电极处理:直径为 3mm 的玻碳电极用 1.0 和 0.3 μ m 的 Al₂O₃ 粉乳液分别打磨抛光后,在乙醇和水中分别超声清洗 3min;

3) 电极表面修饰:将 4 μ L 石墨烯-壳聚糖悬浮液与 2 μ L 浓度为 0.2mg/mL 的三聚氰胺水溶液混合,滴涂于步骤 2) 制得的玻碳电极表面,40℃下烘干 30min;

4) 非特异性的活性位点封闭:表面修饰后的电极于 37℃下浸泡在 5% 的牛血清蛋白溶液中 30min,以封闭剩余的活性位点,制得所述的电化学免疫传感器。

5. 一种检测三聚氰胺的电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于:将石墨烯的壳聚糖悬浮液超声分散后与三聚氰胺混合,将混合液滴涂在电极表面,利用壳聚糖将石墨烯和三聚氰胺包被并固定于电极表面,并将电极浸泡在牛血清蛋白溶液中,封闭电极表面的非特异性的活性位点。

6. 根据权利要求5所述的电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述的方法包括以下步骤:

1) 石墨烯-壳聚糖悬浮液的配制:将 0.05M 的 HCl 加热至 80 ~ 90℃,加入称量好的壳聚糖,搅拌溶解,冷却后加入浓度为 0.1M 的 NaOH,调节 pH 至 5,配得 1mg/mL 的壳聚糖溶液;准确称取 5g 石墨烯样品于 2mL 壳聚糖溶液中,超声分散 1h,制得石墨烯-壳聚糖悬浮液;

2) 玻碳电极处理:直径为 3mm 的玻碳电极用 1.0 和 0.3 μ m 的 Al₂O₃ 粉乳液分别打磨抛光后,在乙醇和水中分别超声清洗 3min;

3) 电极表面修饰:将 4 μ L 石墨烯-壳聚糖悬浮液与 2 μ L 浓度为 0.2mg/mL 的三聚氰胺水溶液混合,滴涂于步骤 2) 制得的玻碳电极表面,40℃下烘干 30min;

4) 非特异性的活性位点封闭:表面修饰后的电极于 37℃下浸泡在 5% 的牛血清蛋白溶液中 30min,以封闭剩余的活性位点,制得所述的电化学免疫传感器。

7. 一种基于权利要求1所述的电化学免疫传感器检测三聚氰胺的方法,包括以下步骤:

1) 标准溶液配制:配制一组包括空白标样在内的含有不同浓度游离三聚氰胺的 pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液为标准溶液,其中含有相同浓度的三聚氰胺抗体;

2) 建立工作曲线:将所述免疫传感器分别浸入标准溶液中孵育,孵育后用磷酸缓冲溶

液冲洗所述免疫传感器,在 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描,记录响应电流;空白标样的响应电流为 I_0 ,含有游离三聚氰胺的标样的响应电流为 I_x ,响应电流的增加 $\Delta I=I_x-I_0$,所述 ΔI 值与标准溶液中三聚氰胺浓度 C 成正比,绘制 $\Delta I-C$ 标准曲线,或采用线性回归法得到 $\Delta I-C$ 线性回归方程;

3) 三聚氰胺测定:将待测样品配制为含有与步骤 1) 相同浓度三聚氰胺抗体的磷酸缓冲溶液,按照与步骤 2) 相同的方法对所述免疫传感器进行孵育和差分脉冲伏安扫描,记录响应电流;根据响应电流的增加 ΔI ,和 $\Delta I-C$ 标准曲线或 $\Delta I-C$ 线性回归方程,得到三聚氰胺含量。

8. 根据权利要求 7 所述的检测三聚氰胺的方法,其特征在于,所述的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液的浓度为 2 mM。

9. 根据权利要求 7 所述的检测三聚氰胺的方法,其特征在于,免疫反应条件为在 37°C 下孵育 60 min。

10. 根据权利要求 7 所述的检测三聚氰胺的方法,其特征在于,所述的三聚氰胺抗体的浓度为 4 μ g/mL。

测定三聚氰胺含量的电化学免疫传感器及制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测和分析化学技术领域,涉及一种三聚氰胺的检测装置和方法,具体地说是一种应用于测定食品和饲料中违禁添加物三聚氰胺的电化学免疫传感器及其制备方法,以及利用该传感器定量检测三聚氰胺含量的方法。

背景技术

[0002] 三聚氰胺(Melamine)是一种重要的化工原料,常用于制造防火阻燃材料三聚氰胺树脂,也可用作减水剂和甲醛清洁剂等,在部分亚洲国家,还被用来制造化肥。由于牛奶和饲料工业常用的蛋白质含量检测方法“凯氏定氮法”,是通过测定含氮量来估算蛋白质含量,要求蛋白质平均含氮量为16%左右,而三聚氰胺的含氮量约为66%,因此三聚氰胺常被不法商人用作添加剂,以提升牛奶和饲料中的蛋白质含量指标,使劣质牛奶和饲料通过检验机构的检测。

[0003] 研究表明,三聚氰胺能诱发动动物肾衰竭并导致死亡。三聚氰胺在体内的代谢属于不活泼代谢或惰性代谢,即它在体内不会迅速发生任何类型的代谢变化。单胃动物以原体形式或同系物形式排出三聚氰胺,而不是代谢产物的形式。2008年发生的三聚氰胺毒奶粉事件,使得分析化学领域掀起了研究三聚氰胺检测方法的热潮,国内外开始对三聚氰胺及其检测产生高度关注。

[0004] 三聚氰胺的传统检测方法有重量法、升华法等,但只限于对三聚氰胺原料的检测。近几年发展起来的方法有高效液相色谱法、液相色谱质谱联用法、气相色谱质谱联用法、酶联免疫吸附法等。但是这些分析方法需要大型分析仪器,操作过程繁琐,前处理过程复杂,不能实现现场检测。

[0005] 三聚氰胺的检测的方法中还包括电化学检测方法,如CN201020299766.1公开了一种用于快速检测三聚氰胺的修饰电极,包括:基底电极;设置于基底电极外表面的PDDA膜;以及设置于PDDA膜外表面的FDU膜。CN201010235974.X公开了一种用于三聚氰胺检测的碳纳米管修饰电极制备方法,将碳纳米管分散在DMF、四氢呋喃、甲醇、乙醇、水等溶剂中,再将此纳米管溶液和壳聚糖、Nafion、聚乙烯醇等粘合剂混合,分散均匀后将其涂在电极表面制成碳纳米管修饰电极。该电极能够检测三聚氰胺,最低检测限为10-13mol/L。CN200810234859.3披露了一种奶制品中三聚氰胺的电化学快速检测方法,其特征在于采用电化学法,以含碳的材料作为工作电极,将奶制品溶于酸性电解质溶液中,在较正的电位下作循环伏安扫描电解1~10分钟,根据所制得的伏安曲线,对奶制品中是否含有三聚氰胺进行初步定性分析和定量分析。所述检测方法,在灵敏度和特异性方面还有待进一步提高。

[0006] 自上世纪80年代以来,生物传感器的研究与开发呈现出突飞猛进的局面,各类传感器应运而生。其中,与测定抗原抗体反应有关的传感器称为免疫传感器。抗原抗体结合前后可导致多种信号的改变,如在重量、光学、热学、电化学等方面。免疫传感器在检测三聚氰胺上已得到广泛应用,如各种基于抗体和抗原反应的用于三聚氰胺检测的免疫试剂(盒)。

[0007] 由于电化学分析具有的以下特点和优势,如可以实现在体检测,不受样品颜色、

浊度的影响(即样品可以不经处理,不需分离),且所需仪器设备相对简单,因此应用前景看好。

[0008] 本发明旨在通过一种三聚氰胺检测的直接电化学生物免疫传感器的制备,建立一种检出限低、线性范围宽、灵敏度和特异性高、快速现场测定三聚氰胺含量的方法。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种电化学免疫传感器及其制备方法,所述的传感器具有很高的灵敏度和专一性,可用于三聚氰胺检测。

[0010] 本发明的另一目的还在于提供一种简单、快速、高效测定牛奶等食品中违禁添加物三聚氰胺残留量的检测方法。

[0011] 实现本发明目的采用的技术方案如下:

[0012] 一种检测三聚氰胺的电化学免疫传感器,包括基底电极,其特征在于所述的基底电极表面修饰石墨烯-三聚氰胺-壳聚糖复合物,并以牛血清蛋白封闭非特异性活性位点。

[0013] 所述的基底电极优选玻碳电极。

[0014] 本发明的另一目的是提供一种所述免疫传感器的制备方法,技术方案如下:

[0015] 一种检测三聚氰胺的电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于:将石墨烯的壳聚糖悬浮液超声分散后与三聚氰胺混合,将混合液滴涂在电极表面,利用壳聚糖将石墨烯和三聚氰胺包被并固定于电极表面,并将电极浸泡在牛血清蛋白(BSA)溶液中,封闭电极表面的非特异性的活性位点。

[0016] 所述的基底电极优选玻碳电极。

[0017] 所述的免疫传感器的制备,更具体和更优选的方法包括如下步骤:

[0018] 1)石墨烯-壳聚糖悬浮液的配制:将 0.05M 的 HCl 加热至 80~90℃,加入称量好的壳聚糖,搅拌溶解,冷却后加入浓度为 0.1M 的 NaOH,调节 pH 至 5,配得 1mg/mL 的壳聚糖溶液;

[0019] 准确称取 5g 石墨烯样品于 2mL 壳聚糖溶液中,超声分散 1h,制得石墨烯-壳聚糖悬浮液;

[0020] 2)玻碳电极处理:直径为 3mm 的玻碳电极用分别用 1.0 和 0.3 μ m 的 Al₂O₃ 粉乳液打磨抛光后,分别在乙醇和水中各超声清洗 3min;

[0021] 3)电极表面修饰:将 4 μ L 石墨烯-壳聚糖悬浮液与 2 μ L 浓度为 0.2mg/mL 的三聚氰胺水溶液混合,滴涂于步骤 2)制得的玻碳电极表面,40℃下烘干 30min;

[0022] 4)非特异性的活性位点封闭:表面修饰后的电极于 37℃下浸泡在 5% 的 BSA 溶液中 30min,以封闭剩余的活性位点,制得所述的电化学免疫传感器。

[0023] 所述的石墨烯的制备,可以氧化石墨(GO)作为前驱体,通过氧化石墨的还原和石墨烯的功能化得到性能优异的石墨烯。

[0024] 上述免疫传感器可用于测定三聚氰胺的含量。电极在含有三聚氰胺抗体和游离的己烯雌酚的溶液中孵育时,溶液中游离的三聚氰胺和固定在电极表面的三聚氰胺与溶液中三聚氰胺抗体发生竞争性免疫反应,三聚氰胺抗体与电极表面固定的三聚氰胺反应后,抗体吸附在电极表面。游离的三聚氰胺浓度越高,固定在电极上的三聚氰胺结合的抗体越少。以 K₃Fe(CN)₆ 为探针,进行差分脉冲伏安(DPV)扫描,抗体在电极表面的吸附,会使

$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 氧化还原峰电流值降低。因此利用竞争性免疫反应机制,不同浓度的三聚氰胺孵育后的电极,在 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液中差分脉冲伏安法 (DPV) 得到的曲线峰电流不同。实验结果显示,随着三聚氰胺浓度在孵育液中的增加,DPV 峰电流增大,且峰电流增大值与三聚氰胺浓度呈线性,从而实现对三聚氰胺的定量检测。

[0025] 因此,本发明还涉及一种基于所述的免疫传感器检测三聚氰胺的方法,包括以下步骤:

[0026] 1) 标准溶液配制:配制一组包括空白标样在内的含有不同浓度游离三聚氰胺的 pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液为标准溶液,其中含有相同浓度的三聚氰胺抗体;

[0027] 2) 建立工作曲线:将免疫传感器分别浸入标准溶液中孵育,孵育后用磷酸缓冲溶液冲洗免疫传感器,在 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安 (DPV) 扫描,记录响应电流;空白标样的响应电流为 I_0 ,含有游离三聚氰胺的标样的响应电流为 I_x ,响应电流的增加 ΔI ($\Delta I = I_x - I_0$) 与标准溶液中三聚氰胺浓度 C 成正比,绘制 $\Delta I - C$ 标准曲线,或采用线性回归法得到 $\Delta I - C$ 线性回归方程;

[0028] 3) 三聚氰胺测定:将待测样品配制为含有与步骤 1) 相同浓度三聚氰胺抗体的磷酸缓冲溶液,按照与步骤 2) 相同的方法对免疫传感器进行孵育和差分脉冲伏安扫描,记录响应电流;根据响应电流的增加 ΔI 和标准曲线,得到三聚氰胺含量。

[0029] 所述的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液的浓度优选为 2 mM。

[0030] 免疫反应条件优选在 37°C 下孵育 60 min。

[0031] 所述的三聚氰胺抗体的浓度优选 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0032] 所述的步骤 3) 优选采用标准加入法测定。

[0033] 上述方法检测三聚氰胺含量,最低检测限为 0.2 ng/ml,线性范围 5~1500 ng/ml。

[0034] 本发明的免疫传感器及其三聚氰胺含量检测方法基于以下原理。

[0035] 由于石墨烯拥有优异的电学性能,其重要用途之一是可以用来制备高性能的纳米复合材料,但石墨烯难溶于水及常用的有机溶剂。有研究表明,石墨烯在壳聚糖中分散时,两者之间将发生有效的负荷转移,两者之间的相互作用使得石墨烯在壳聚糖中呈分子水平分散,具有很好的分散效果。本发明将石墨烯的壳聚糖溶液超声分散后,与三聚氰胺混合并滴涂在电极上,利用壳聚糖的粘性将石墨烯和三聚氰胺包被并固定于电极上,并将电极浸泡在 BSA 溶液中,以封闭非特异性的活性位点。免疫传感器的电极表面修饰见图 1。

[0036] 同时,本发明对三聚氰胺的检测是基于抗体和抗原之间特定反应的竞争模式。(a) 当电极浸入含有三聚氰胺抗体和游离三聚氰胺的溶液中时,固定在电极上的三聚氰胺抗原与溶液中游离的三聚氰胺与三聚氰胺抗体发生竞争反应。(b) 基于三聚氰胺抗体和抗原之间特定反应的竞争模式,当电极浸入到含有特定抗体的溶液时,三聚氰胺抗体与抗原的特异反应使抗体吸附在电极上。(c) 抗体-抗原复合物在电极表面的形成导致电极产生位阻,减少了电极活动区域,阻碍了探针离子到达电极,峰值电流下降。因此,可以根据免疫传感器各阶段电化学信号的差异对溶液中游离的三聚氰胺进行检测。本发明的免疫传感器检测三聚氰胺的原理如图 2 所示。

[0037] 本发明通过石墨烯/壳聚糖复合纳米材料固定三聚氰胺抗原于基底电极上,制备一种三聚氰胺的非标记电化学免疫传感器,利用 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 为探针,以循环伏安法和差分脉冲伏安法监测免疫反应,实现对三聚氰胺进行定性定量检测。本发明的传感器具有高度

的灵敏度和专一性,检测方法简单、高效,适用范围广泛,检测限可达到 0.2 ng/ml,线性范围 5~1500 ng/ml,是一种简单、快速、高效测定牛奶等食品中违禁添加物三聚氰胺残留量的检测方法。

附图说明

[0038] 图 1 本发明的免疫传感器电极表面修饰示意图。

[0039] 图 2 本发明的免疫传感器检测三聚氰胺的原理,(a)将修饰好的电极浸入含有游离三聚氰胺和三聚氰胺抗体的溶液中进行孵育,(b)以 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 为探针进行电化学检测,(c)通过监测电信号的变化检测三聚氰胺浓度。

[0040] 图 3 石墨烯的 SEM 电镜照片。

[0041] 图 4 不同修饰电极(a)裸电极,(b)三聚氰胺/壳聚糖修饰电极,(c)石墨烯/三聚氰胺/壳聚糖修饰电极,(d)石墨烯/三聚氰胺/壳聚糖修饰电极在含有三聚氰胺的抗体中孵育后,在 2mM 的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的 PBS 溶液中的 CV 曲线图,扫速为 50mv/s。

[0042] 图 5 修饰电极在孵育液中的孵育时间对 DPV 峰电流的影响。

[0043] 图 6 孵育液中抗体含量对 DPV 峰电流的影响。

[0044] 图 7 (a)石墨烯/三聚氰胺/壳聚糖修饰电极,及其在含有相同浓度的三聚氰胺抗体和不同浓度的游离的三聚氰胺(b) 1500ng/mL,(c) 1000ng/mL,(d) 500ng/mL,(e) 100ng/mL,(f) 20ng/mL,(g) 5ng/mL,(h) 0ng/mL 的孵育液中孵育后,在 2mM 的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的 PBS 溶液中的 DPV 曲线图。

[0045] 图 8 为响应电流的变化 ΔI 与三聚氰胺浓度的标准曲线图。

具体实施方式

[0046] 下面结合具体实施例对本发明进行详细描述,所述的实施例有助于对本发明的理解和实施,并非构成对本发明的限制。本发明的保护范围并不以具体实施方式为限,而由权利要求加以限定。

[0047] 以下实施例中使用上海辰华公司的电化学工作站(CHI660D),以修饰的玻碳电极为工作电极,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极进行电化学测量。所使用的三聚氰胺抗体为北京博奥森生物技术有限公司生产的三聚氰胺单克隆抗体。

[0048] 实施例 1 免疫传感器制备

[0049] 一种检测三聚氰胺的电化学免疫传感器,是在玻碳电极表面修饰石墨烯-三聚氰胺-壳聚糖复合物而得。

[0050] 其制备方法如下:

[0051] 1)石墨烯的制备主要以氧化石墨(GO)作为前驱体,通过氧化石墨的还原和石墨烯的功能化得到性能优异的石墨烯。

[0052] 氧化石墨的制备:50 mL 浓 H_2SO_4 +10 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ +10 g P_2O_5 混合,将 12 g 石墨粉加入到上述混合液中,反应 6 h。加入 2 L 水,过夜。460 mL 浓 H_2SO_4 (冰箱冰冻处理),将氧化的石墨粉加入到浓 H_2SO_4 中搅拌。温度控制在 10 °C 以下,缓慢加入 60 g KMnO_4 ,混合物在 35 °C 反应 2 h,缓慢加入 920 mL 去离子水,保持 50 °C 以下,搅拌反应 2 h。加入 2.8 L 水以及 50 mL 30 % H_2O_2 ,搅拌反应一天。使用 5 L 10% 的 HCl 冲洗,离心。然后再用 5 L 水洗,

至溶液呈中性。

[0053] 石墨烯的制备:称取上述氧化石墨 0.05 g,加入到 100 mL pH=11 的 NaOH 溶液中;在 150 W 下超声 90 min 制备氧化石墨烯分散液;在 4000 rpm 下离心 3 min 除去极少量未剥离的氧化石墨;向离心后的氧化石墨烯分散液中加入 0.1 mL 水合肼,在 90 °C 搅拌反应 2 h,得到石墨烯分散液。

[0054] 如图 3 所示为石墨烯的扫描电镜照片,由图中可以看出石墨烯呈很薄的片状。

[0055] 2) 石墨烯-壳聚糖悬浮液的配制:将 0.05 M 的 HCl 加热至 80 ~ 90 °C,加入称量好的壳聚糖,搅拌溶解,冷却后加入浓度为 0.1M 的 NaOH,调节 pH 至 5,配得 1 mg/mL 的壳聚糖溶液,置于 4 °C 冰箱备用。

[0056] 准确称取 5 mg 石墨烯样品于 2 mL 壳聚糖溶液中,超声分散 1 h,制得石墨烯-壳聚糖悬浮液。

[0057] 3) 电极修饰:直径为 3mm 的玻璃碳电极用分别用 1.0 和 0.3 μ m 的 Al₂O₃ 粉乳液打磨抛光后,分别在乙醇和水中各超声 3min。将 4 μ L 上述悬浮液与 2 μ L 浓度为 0.2 mg/mL 的三聚氰胺水溶液混合后,滴涂于处理过的玻璃碳电极表面,40 °C 下烘干 30 min。表面修饰后的电极于 37 °C 下浸泡在 5 % 的 BSA 溶液中 30 min,以封闭剩余的活性位点。

[0058] 实施例 2 修饰电极循环伏安扫描

[0059] 对不同修饰电极的进行循环伏安研究,其结果如图 4。

[0060] 裸电极(曲线 a)在 2 mM 的 K₃[Fe(CN)₆] 溶液中的循环伏安曲线表现出一对明显的 Fe(CN)₆^{3-/4-} 氧化还原峰,氧化峰电流值为 11.1 μ A;当电极上只修饰壳聚糖溶液时(曲线 b),氧化还原峰电势差变宽,同时峰电流有所下降,氧化峰电流值为 9.931 μ A,可能是由于电极表面的不具有电化学活性的壳聚糖阻碍了电子传递;当电极上修饰了石墨烯/三聚氰胺/壳聚糖后(曲线 c),峰电流明显增大,氧化峰电流值为 21.71 μ A,石墨烯优异的电化学活性极大的增强了电子的传递;将石墨烯/三聚氰胺/壳聚糖修饰电极(免疫传感器)放入含有三聚氰胺抗体的孵育液中孵育后(曲线 d),峰电流下降,氧化峰电流值为 10.31 μ A,这是由于三聚氰胺抗体与电极上的抗原反应,吸附在电极上,阻碍了电子的传递造成的,这也说明三聚氰胺抗原已经修饰在了电极上。

[0061] 实施例 3 检测条件优化

[0062] 不同检测条件的影响,如免疫反应的时间和抗体浓度,由 DPV 法进行确定。

[0063] 1、免疫反应时间

[0064] 实施例 1 制得的免疫传感器使用含有相同的抗体浓度的孵育液分别孵育 0, 10, 20, 40 和 60 分钟后用 PBS 清洗,在 2 mM K₃[Fe(CN)₆] 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描,结果如图 5。石墨烯/三聚氰胺/壳聚糖修饰电极(免疫传感器)的 DPV 峰电流随孵育时间增加在 40 分钟内快速下降,到 60 分钟时略微下降(图 5)。孵育时间再增加对电流响应没有明显的影响。因此,选择 40 分钟作为免疫反应的最佳孵育时间。

[0065] 2、孵育溶液中抗体浓度的影响

[0066] 石墨烯/三聚氰胺/壳聚糖修饰电极,浸在 50 μ L 加入不同抗体浓度的 PBS 溶液中,在 37 °C 孵育 40 min, PBS 清洗后,在 2 mM K₃[Fe(CN)₆] 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描,结果如图 6。由图 6 可知,当在溶液中抗体浓度由 0 μ g/mL 增加至 4 μ g/mL 时,DPV 峰值电流显著下降。随着进一步增加抗体浓度,在 4-10 μ g/mL 范围内,几乎没有观察到减

少电流的反应。结果表明, 孵化溶液中抗体浓度大于 $4 \mu\text{g/mL}$ 后抗体的吸附量不再增加, 表明结合位点基本上达到饱和。对于竞争的免疫反应, 选择一个有足够高的信号并小于饱和浓度的浓度。因此, 选择 $4 \mu\text{g/mL}$ 为最佳的抗体浓度。

[0067] 实施例 4 DPV 扫描结果及工作曲线的绘制

[0068] 以 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 为探针, 通过 DPV 检测方法, 利用单克隆抗体特异结合三聚氰胺的能力, 可以实现对三聚氰胺的检测。

[0069] 配制标准溶液(孵育液), 标准溶液为一组总量为 $50 \mu\text{L}$ 、含有浓度不一的三聚氰胺标准液、 $4 \mu\text{g/mL}$ 相同浓度的三聚氰胺抗体的 PBS 的溶液($\text{pH}=7.4$)。

[0070] 将石墨烯 / 三聚氰胺 / 壳聚糖修饰电极浸入孵育溶液, 溶液中游离的三聚氰胺与固定在电极表面的三聚氰胺竞争与溶液中三聚氰胺抗体的反应。经过 37°C 下 40 min 孵育后, 用 PBS 冲洗。冲洗后的电极为工作电极, 在 $2\text{mM } \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描, 记录响应电流, 如图 7 所示。

[0071] 结果表明, 随着三聚氰胺在孵育液中的增加, DPV 峰电流增大。定义石墨烯 / 三聚氰胺 / 壳聚糖修饰电极在只含 $4 \mu\text{g/mL}$ 抗体的 PBS 缓冲溶液(空白)中孵育后的响应电流为 I_0 , 在含有游离三聚氰胺的孵育液孵育后的响应电流为 I_x , 响应电流的增加 ΔI ($\Delta I = I_x - I_0$) 与三聚氰胺浓度在 5 到 1500ng/mL 范围内是成正比。

[0072] 绘制 $\Delta I-C$ 标准曲线如图 8 所示。

[0073] 以大于噪音信号 3 倍的电流信号对应的浓度为最低检出限, 重复 5 次以上实验得出最低检出限为 0.2 ng/mL 。

[0074] 实施例 5 牛奶中三聚氰胺含量的测定

[0075] 根据实施例 4 所建立的三聚氰胺检测的标准曲线, 采用本发明的方法测定牛奶样品中三聚氰胺含量, 定量方法为标准加入法。

[0076] 1) 牛奶样品前处理

[0077] 称取 $2 \pm 0.0050 \text{ g}$ 牛奶(约 2 mL) 于到 10 mL 的样品管中, 加入三聚氰胺标准液, 和 7 mL 新配的乙腈 -0.05 M HCl 提取液($V:V, 1:1$), 混合物超声振荡 30 min , 于 5000 r/min 下离心 10 min , 将上清液转移至容积为 25 mL 的容量瓶中, 残渣用 6 mL 、 6 mL 和 6 mL 的相同提取液重复提取 3 次, 上清液合并于容量瓶中。

[0078] 取 1 mL 的上清液转移到 5 mL 的样品管中在氮吹条件下于 55°C 温度下浓缩蒸发, 浓缩物加入 1 mL 的 pH 为 7.4 磷酸缓冲溶液溶解后用于电化学分析。

[0079] 2) 对四种加入不同量三聚氰胺标准液的牛奶样品按照步骤 1) 所述的方法进行前处理, 制得不加入三聚氰胺的空白样品, 和 3 个含有不同三聚氰胺浓度的加标样品(标准加入法), 进而按照与实施例 4 相同的方法对修饰电极进行孵育及测定, 对每个加标样品测定三次, 根据标准曲线得到样品中三聚氰胺的实际浓度, 三聚氰胺的回收率在 90.8% 到 117% 之间, 平均为 104.8% , 统计结果见表 1。

[0080] 表 1

[0081]

三聚氰胺添加量(ng/mL)	三聚氰胺测定量(ng/mL)	回收率(%)
20	22.1, 18.2, 23.4	106.2
200	195.3, 218.2, 210.7	104
1200	1325.6, 1113.2, 1307.2	104.1

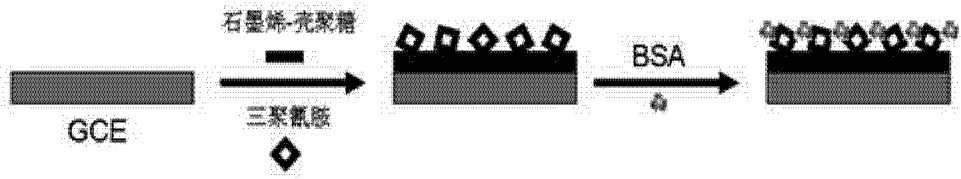


图 1

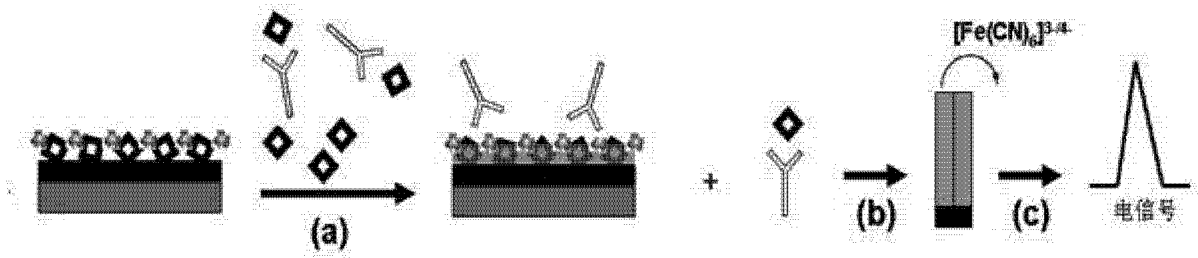


图 2

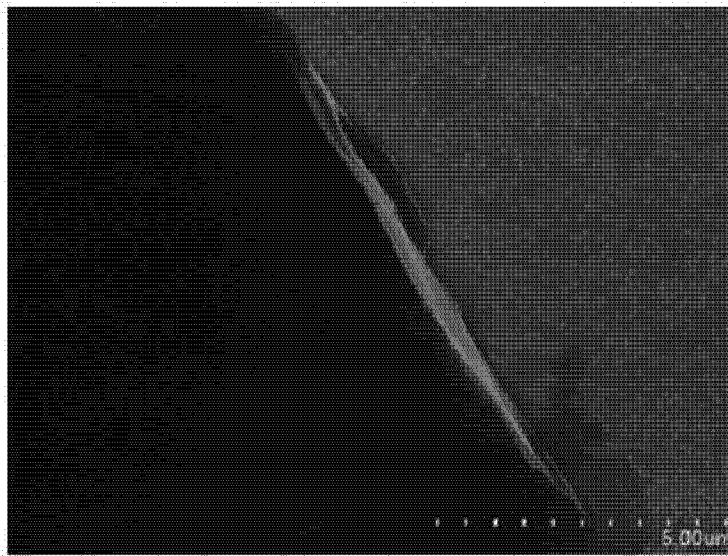


图 3

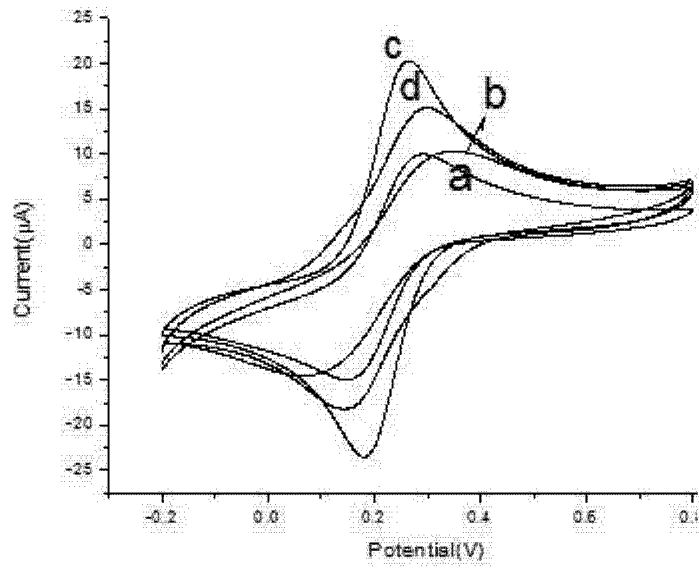


图 4

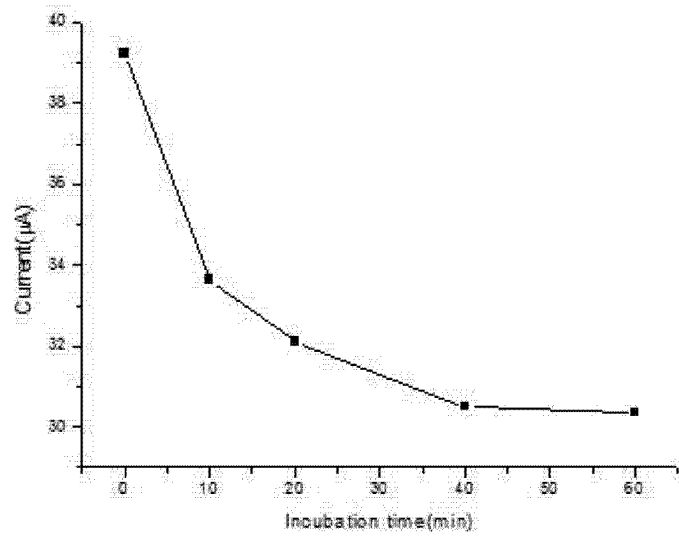


图 5

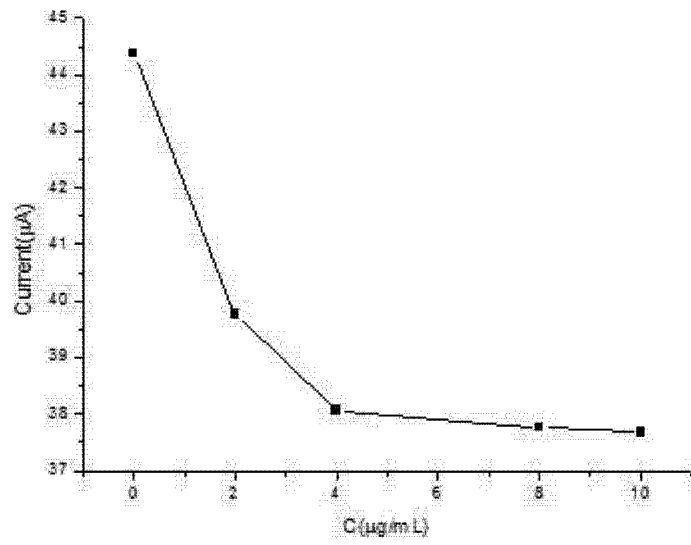


图 6

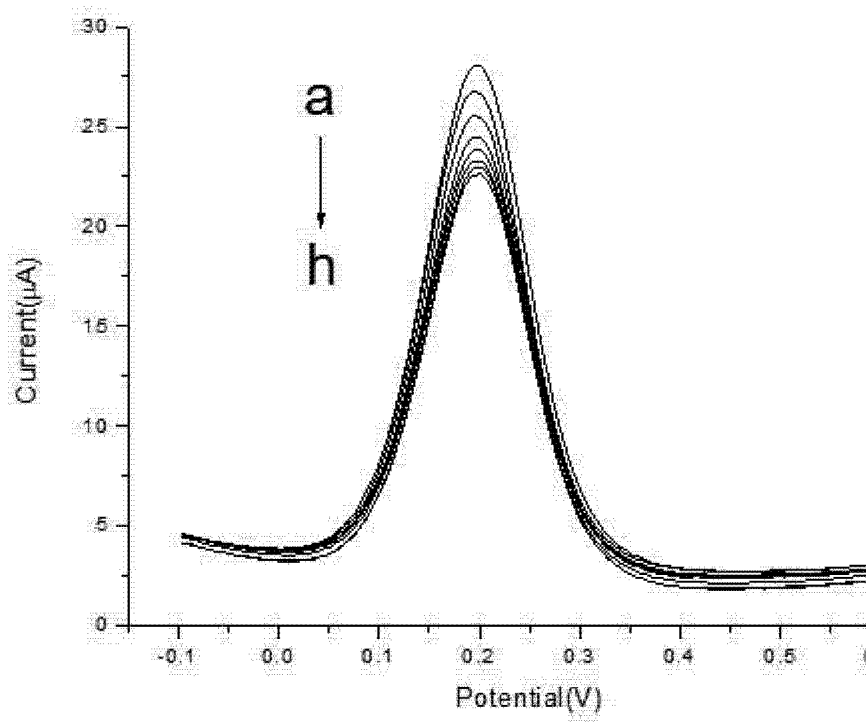


图 7

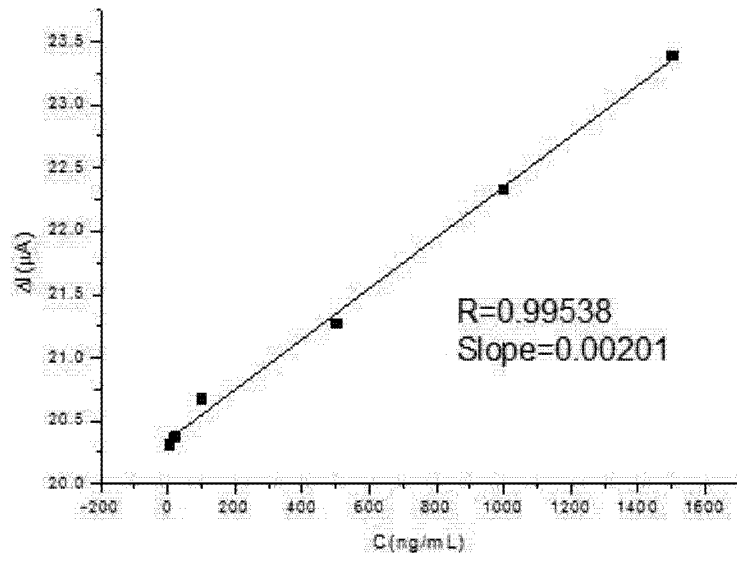


图 8

专利名称(译)	测定三聚氰胺含量的电化学免疫传感器及制备方法和应用		
公开(公告)号	CN102262115B	公开(公告)日	2013-10-30
申请号	CN201110213016.7	申请日	2011-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
[标]发明人	赵波 陈昌云 邵科峰 颜妍		
发明人	赵波 陈昌云 邵科峰 颜妍		
IPC分类号	G01N27/327 G01N27/48 G01N33/53		
代理人(译)	韩朝晖		
审查员(译)	王小燕		
其他公开文献	CN102262115A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种测定三聚氰胺含量的非标记电化学免疫传感器及其制备方法和应用。所述的免疫传感器，包括基底电极，基底电极表面修饰石墨烯-三聚氰胺-壳聚糖复合物，并以牛血清蛋白封闭非特异性活性位点。其制备方法是石墨烯/壳聚糖复合材料固定三聚氰胺抗原于玻碳电极表面。所述的免疫传感器基于免疫反应的竞争模式，利用K₃Fe(CN)₆为探针，以循环伏安法和差分脉冲伏安法监测免疫反应，可用于三聚氰胺含量的检测。本发明的传感器具有较高的灵敏度和专一性，检测方法简单，适用范围广泛，检测限可达到0.2ng/ml，线性范围5~1500ng/ml，具有快速高效、灵敏度高和特异性好、操作简单、成本低等特点。

