



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104897748 B

(45)授权公告日 2017.12.26

(21)申请号 201510287384.4

G01N 27/30(2006.01)

(22)申请日 2015.05.29

G01N 33/53(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104897748 A

(56)对比文件

CN 101711356 A,2010.05.19,

CN 104119277 A,2014.10.29,

CN 104897897 A,2015.09.09,

CN 102788827 A,2012.11.21,

(43)申请公布日 2015.09.09

(73)专利权人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路  
483号

Chen Zhai,et al..Acetylcholinesterase

biosensor based on chitosan/prussian  
blue/multiwall carbon nanotubes/hollow  
gold nanospheres nanocomposite film by  
one-step electrodeposition.《Biosensors  
and Bioelectronics》.2012,第42卷

(72)发明人 徐振林 孙远明 董秀秀 梁祖培  
沈玉栋 杨金易 王弘 雷红涛

李姣.赭曲霉毒素A的电化学免疫传感器研  
究.《湖南大学硕士学位论文》.2011,

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限  
公司 44102

代理人 林丽明

审查员 徐妍妍

(51)Int.Cl.

G01N 27/26(2006.01)

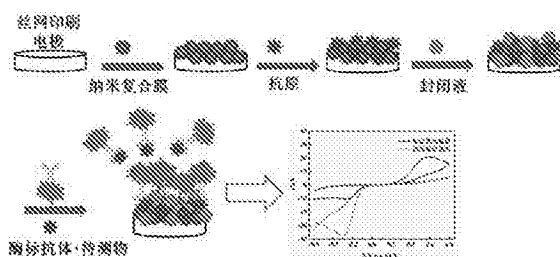
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

一种检测组胺的可抛式一步电沉积免疫生  
物传感器及其制备方法

(57)摘要

本发明属于生物传感器技术领域,具体公开  
了一种检测组胺的可抛式一步电沉积免疫生  
物传感器及其制备方法。本发明免疫生物传感器  
采用表面有普鲁士蓝-壳聚糖-纳米金复合膜的  
电极,所述电极上固定有组胺包被原;其中,复合  
膜中纳米金与普鲁士蓝的摩尔浓度比为1:2000~  
1:20,壳聚糖的质量体积含量为0.01~0.05%。  
并且,采用一步沉积电极的方式使电极表面获  
得复合膜,沉积步骤比传统高分子聚合物修饰  
电极制备步骤简便,且更容易暴露抗原结合位  
点。本发明免疫生物传感器将竞争免疫反应和  
生物传感器相结合,并可根据需要得到组胺检  
测工作曲线等一系列性能表征,具有操作简单、  
灵敏度高、快速方便等优势,可用于样品中  
组胺的现场快速检测。



1. 一种检测组胺的可抛式一步电沉积免疫生物传感器,其特征在于,采用表面有普鲁士蓝-壳聚糖-纳米金复合膜的电极,所述电极上固定有组胺包被原;其中,复合膜中纳米金与普鲁士蓝的摩尔浓度比为1:2000~1:20,壳聚糖的质量体积含量为0.01~0.05%;

所述免疫生物传感器的制备方法,包括如下步骤:

S1. 制备沉积液,在+0.4V电压下一步电沉积使电极表面获得普鲁士蓝-壳聚糖-纳米金复合膜;

S2. 在电极工作区域固定组胺包被原;

S3. 滴涂封闭液以封闭电极表面非特异性位点,冲洗、风干,制备得到所述免疫生物传感器。

2. 根据权利要求1所述的免疫生物传感器,其特征在于,所述电极为丝网印刷电极,所述丝网印刷电极将工作电极、参比电极和辅助电极集为一体。

3. 根据权利要求2所述的免疫生物传感器,其特征在于,所述工作电极、参比电极和辅助电极的电压及电流通过USB转换线与丝网印刷电极传输连接。

4. 根据权利要求1所述的免疫生物传感器,其特征在于,所述组胺包被原的包被浓度为0.001~1 mg/mL。

5. 一种权利要求1所述免疫生物传感器的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1. 制备沉积液,在+0.4V电压下一步电沉积使电极表面获得普鲁士蓝-壳聚糖-纳米金复合膜;

S2. 在电极工作区域固定组胺包被原;

S3. 滴涂封闭液以封闭电极表面非特异性位点,冲洗、风干,制备得到所述免疫生物传感器。

6. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,S1所述沉积液的制备方法为:将普鲁士蓝加入壳聚糖溶液,超声分散,得到稳定的暗绿色分散液,再向分散液中加入纳米金溶液,超声分散至完全溶解,制得沉积液。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,将0.5~5 mM  $\text{FeCl}_3/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , 0.1 M KCl以及1~10 mM HCl的复合溶液溶于0.01~0.05%壳聚糖溶液中,在室温下超声分散,得到稳定的暗绿色分散液;再向分散液中加入纳米金胶使其终浓度为2.5 ~25  $\mu\text{M}$ ,超声分散至完全溶解,制得沉积液。

8. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,S1所述电沉积的方法为:将电极浸在制得的沉积液中,沉积60~300s,再将电极浸于稳定液中,在-0.6V到+0.8V电压下进行循环扫描直至图像稳定。

9. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,S2所述固定组胺包被原的方法为:用缓冲液稀释组胺包被原,滴涂至电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10~14h。

10. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,步骤S3为在电极表面滴涂封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h,冲洗电极表面,风干,制备得到所述免疫生物传感器。

## 一种检测组胺的可抛式一步电沉积免疫生物传感器及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物传感器技术领域,更具体地,涉及一种检测组胺的可抛式一步电沉积免疫生物传感器及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 我国鱼类资源丰富,也是水产品生产和消费大国,水产品及其加工在国民经济和消费中都占有重要地位。组胺(Histamine)是游离组氨酸在组氨酸脱羧酶的催化下发生脱羧反应形成的,是一种具有毒性的生物胺,广泛存在于各种生物体及食品中,主要为水产品,尤其是青皮红肉特征的中上层海水鱼及其加工产品。研究表明,若过量摄入组胺会引起头痛恶心、反胃呕吐、腹泻、心悸、瘙痒性皮炎、血压变化等一系列的过敏反应。摄入8 ~ 40 mg组胺会产生轻微的中毒症状,超过40 mg产生中等中毒症状,超过100 mg产生严重中毒症状。美国FDA通过对爆发组胺中毒的大量数据的研究,确定组胺的危害作用水平为500 mg/kg(食品)。近年来,我国在广东、浙江、山东等多地都爆发过组胺中毒事件,据报道,仅杭州下城区,在1997年至2006年的十年间就发生7次组胺中毒事件。因此,组胺含量对于保障消费者健康具有十分重要的意义,目前国内外把组胺列为水产品的必检项目。

[0003] 组胺作为小分子,仅有一个抗原活性位点,很难实现直接检测,目前食品中组胺测定的仪器主要有偶氮试剂比色仪、高效液相色谱仪、荧光分析仪、气相色谱仪等等。这些仪器及耗材较为昂贵,成本高,检测步骤较繁琐,耗时长,试剂有毒,有的则需要技术熟练的操作人员,都不适合现场快速检测。

[0004] 电化学免疫传感器是将高特异性的抗原抗体结合反应与高灵敏的传感技术相结合,是21世纪最有前途的检测手段之一。但是,组胺分子量极小(111 Da),而且只有一个抗原活性位点,很难利用电化学免疫传感器实现直接检测组胺。

### 发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明提供了一种检测组胺的可抛式一步电沉积免疫生物传感器。该免疫生物传感器具有操作简单、灵敏度高、快速方便等优势,可用于样品中组胺检测。本发明免疫生物传感器可通过检测海产食品和鱼组织中的组胺值来判断海产食品和鱼制品的新鲜度和腐败程度,适用于在非实验室设置中测定海产食品和鱼组织中的组胺值,实现监管部门的现场快速监测。

[0006] 本发明的另一目的在于提供一种上述免疫生物传感器的制备方法。

[0007] 本发明的上述目的是通过以下技术方案予以实现的。

[0008] 一种检测组胺的可抛式一步电沉积免疫生物传感器,采用表面有普鲁士蓝-壳聚糖-纳米金复合膜的电极,所述电极上固定有组胺包被原;其中,复合膜中纳米金与普鲁士蓝的摩尔浓度比为1:2000~1:20,壳聚糖的质量体积含量为0.01~0.05%。

[0009] 本发明采用表面有普鲁士蓝-壳聚糖-纳米金复合膜的电极,普鲁士蓝( $\text{Fe}_4[\text{Fe}$

[0010] (CN)<sub>6</sub>]<sub>3</sub>) 是非常好的导电媒介体,具有良好的电催化活性;同时壳聚糖具有较好的粘度和较小的空间位阻,使其具有良好的生物相容性和成膜性;纳米金在电化学反应中也具有突出的优良特性。本发明将普鲁士蓝、壳聚糖、纳米金组成复合膜,其电流响应比单独沉积普鲁士蓝或纳米金具有明显地稳定性,其中壳聚糖一方面利于传感器中生物分子的固定,另一方面作为导电分子,由结合有蛋白的纳米金颗粒加速生物界面与蛋白活性位点间的电子传递,同时普鲁士蓝膜加速电子的传递。这三者组成的复合膜是相互协调,缺一不可的,若复合膜中非氧化还原成分增多则会影响以普鲁士蓝为核心的复合膜的电流响应效果。专利CN102788827A采用壳聚糖-普鲁士蓝-多壁碳-空壳纳米金复合膜,如膜中增加未功能化修饰的多壁碳纳米管,其本身具有疏水性从而不适合组胺包被原的固定。

[0011] 并且,发明人经过大量的实验研究,发现只有当普鲁士蓝、壳聚糖、纳米金三者在上述浓度范围时才能发挥显著的协同效果,以普鲁士蓝为核心的复合膜的构建是为后续蛋白等的固定奠定基础的,复合膜的高稳定性是传感器构建中的重要环节。本发明复合膜三种材料的制备都相对容易,适于大批量制备并在市场中推广应用,同时,该复合材料符合可抛式传感器制备要求,即属于绿色电极制备。

[0012] 优选地,所述电极为丝网印刷电极,所述丝网印刷电极将工作电极、参比电极和辅助电极集为一体。所述丝网印刷电极是可抛式电极,一次性、成本低,非常适合快速检测,抛弃后不会对环境产生危害。

[0013] 优选地,所述工作电极、参比电极和辅助电极的电压及电流通过USB转换线与丝网印刷电极传输连接。

[0014] 优选地,所述组胺包被原的包被浓度为0.001~1 mg/mL。组胺包被原是组胺与蛋白的偶联复合物,在一定浓度范围内,调整包被原的浓度可以得到不同线性范围的工作曲线,但是包被原浓度过高的话会阻碍电子传递而使免疫传感器的灵敏度下降。

[0015] 本发明还提供一种上述免疫生物传感器的制备方法,包括如下步骤:

[0016] S1. 制备沉积液,在+0.4V电压下一步电沉积使电极表面获得普鲁士蓝-壳聚糖-纳米金复合膜;

[0017] S2. 在电极工作区域固定组胺包被原;

[0018] S3. 滴涂封闭液以封闭电极表面非特异性位点,冲洗、风干,制备得到所述免疫生物传感器。

[0019] 现有技术中,有些研究是将普鲁士蓝在+0.45 v电压下进行沉积,同时,用氯金酸在-0.2v电压下沉积得到纳米金,需经两步沉积才能得到复合膜。专利CN102788827A采用壳聚糖-普鲁士蓝-多壁碳-空壳纳米金复合膜,多壁碳纳米管本身是不能通过电沉积方法固定在电极表面,因此将其添加到电沉积液中会干扰沉积效果。空壳纳米金与本发明提到的纳米金无本质区别,只是在金颗粒大小和形貌上有所区别。本发明使用的纳米金粒径在15~25 nm相对Sun Xia等文献报道的50 nm空壳纳米金具有更大的比表面积易于生物界面与蛋白间电子的传递。该方法材料制备较复杂,不适合大批量生产应用。而本发明通过制备沉积液,将电极浸入沉积液中,施加电压后,铁离子会发生自身的氧化还原反应,而纳米金和壳聚糖分子则依附离子运动一起沉积到电极表面,一步沉积形成普鲁士蓝-壳聚糖-纳米金复合膜,可以得到较好的电流响应,沉积步骤比传统高分子聚合物修饰电极制备步骤简便,且更容易暴露抗原结合位点。并且,通过在电极工作区域固定组胺包被原制备所述免疫生物

传感器,检测时,仅需添加等体积的酶标抗体和待测样液,固定在电极表面的组胺包被原和样液中衍生的组胺会竞争结合酶标组胺抗体,然后添加测试液并通过前后峰电流值变化的大小来定量测定组胺浓度。应用OriginPro8.5软件对四参数对数函数进行曲线拟合: $y = (A + D) / [1 + (x/C)^B] + D$ 。其中,A和D分别代表药物浓度最小和最大时的峰电流变化值;C为中点标准品浓度,当标准品浓度等于C时的OD值为(A+D)/2,正处于曲线的拐点处,即半数抑制量浓度为 $1C_{50}$ ;B表示曲线的陡峭程度,称斜率因子;以 $1C_{10}$ 为检测限,以 $1C_{20} \sim 1C_{80}$ 为检测范围。

[0020] 优选地,S1所述沉积液的制备方法为:将普鲁士蓝加入壳聚糖溶液,超声分散,得到稳定的暗绿色分散液,再向分散液中加入纳米金溶液,超声分散至完全溶解,制得沉积液。

[0021] 优选地,将0.5~5 mM  $FeCl_3/K_3[Fe(CN)_6]$ ,0.1 M KCl以及1~10 mM HCl的复合溶液溶于0.01~0.05%壳聚糖溶液中,在室温下超声分散,得到稳定的暗绿色分散液;再向分散液中加入纳米金胶使其终浓度为2.5 ~25 $\mu$ M,超声分散至完全溶解,制得沉积液。

[0022] 优选地,S1所述电沉积的方法为:将电极浸在制得的沉积液中,沉积60~300s,再将电极浸于稳定液中,在-0.6V到+0.8V电压下进行循环扫描直至图像稳定。更优选地,所述沉积时间为60~120s。

[0023] 优选地,S2所述固定组胺包被原的方法为:用缓冲液稀释组胺包被原,滴涂至电极表面,4 $^{\circ}$ C孵育10~14 h。

[0024] 优选地,步骤S3为在电极表面滴涂封闭液,37 $^{\circ}$ C孵育1h,冲洗电极表面,风干,制备得到所述免疫生物传感器。

[0025] 优选地,一种上述免疫生物传感器的制备方法,包括如下步骤:

[0026] S1. 将0.5~5 mM  $FeCl_3/K_3[Fe(CN)_6]$ ,0.1 M KCl以及1~10 mM HCl的复合溶液溶于0.01~0.05%壳聚糖溶液中,在室温下超声分散,得到稳定的暗绿色分散液;再向分散液中加入纳米金胶使其终浓度为2.5 ~25 $\mu$ M,超声分散至完全溶解,制得沉积液;

[0027] 将丝网印刷电极分别在乙醇和超纯水中超声处理,再将丝网印刷电极在+0.4V电压下浸在配制好的沉积液中,沉积时间为60 ~300 s;

[0028] 将电极浸在稳定液中在-0.6 V到+0.8V之间扫描循环伏安图直至图像稳定,使电极表面获得普鲁士蓝-壳聚糖-纳米金复合膜;

[0029] S2. 在电极表面滴涂用0.1 M的碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释的包被原,使其在微碱的环境下能更好地将包被原固定在电极表面,4 $^{\circ}$ C孵育10~14h;

[0030] S3. 滴涂封闭液以封闭电极表面非特异性位点,37 $^{\circ}$ C孵育1h,用0.01 M磷酸盐冲洗、风干,制备得到所述免疫生物传感器。

[0031] 优选地,稳定液为含0.1 M KCl/0.1 M HCl的水溶液。

[0032] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

[0033] (1)本发明提供一种将竞争免疫反应和生物传感器相结合的免疫生物传感器,并得到该传感器组胺检测工作曲线等一系列性能表征。该免疫生物传感器具有操作简单、灵敏度高、快速方便等优势,可用于样品中组胺检测。本发明免疫生物传感器可通过检测海产食品和鱼组织中的组胺值来判断海产食品和鱼制品的新鲜度和腐败程度,适用于在非实验室设置中测定海产食品和鱼组织中的组胺值,实现监管部门的现场快速监测。

[0034] (2)本发明将普鲁士蓝、壳聚糖、纳米金组成复合膜用于修饰免疫生物传感器的工

作电极,其电流响应比单独沉积普鲁士蓝或纳米金具有明显地稳定性,复合膜比表面积大,易于电子传递。

[0035] (3)本发明通过制备沉积液,采用一步沉积电极的方式使电极表面获得普鲁士蓝-壳聚糖-纳米金复合膜,沉积步骤比传统高分子聚合物修饰电极制备步骤简便,且更容易暴露抗原结合位点。

[0036] (4)本发明免疫传感器灵活可调,可根据需要通过调整包被原及抗体浓度从而得到不同的工作曲线和检测限,进行对多种浓度范围进行测试。

### 附图说明

[0037] 图1为本发明免疫生物传感器检测组胺的原理示意图。

[0038] 图2为本发明免疫传感器电沉积后的电化学表征图。

[0039] 图3为本发明实施例1免疫传感器检测组胺的标准曲线图。

[0040] 图4为本发明实施例2免疫传感器检测组胺的标准曲线图。

[0041] 图5为本发明实施例3免疫传感器检测组胺的标准曲线图。

### 具体实施方式

[0042] 下面结合说明书附图和具体实施例对本发明做进一步详细说明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0043] 实施例1

[0044] 本实施例提供一种检测组胺的可抛式一步电沉积免疫生物传感器,采用表面有普鲁士蓝-壳聚糖-纳米金复合膜的电极,所述电极上固定有组胺包被原。

[0045] 所述复合膜中纳米金与普鲁士蓝( $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ )的摩尔浓度比为1:1000,壳聚糖含量为0.05%。

[0046] 一种上述免疫生物传感器的制备方法,包括如下步骤:

[0047] S1. 将0.05g壳聚糖溶于100 mL 1.0%的醋酸溶液中,室温下搅拌3h,使壳聚糖完全溶解,配制成0.05%壳聚糖溶液。将0.0406 g  $\text{FeCl}_3$ ,0.0822g  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ,0.7455g  $\text{KCl}$ 以及1mL浓盐酸加入100 mL上述壳聚糖溶液中,在室温下超声分散,直至得到稳定的暗绿色分散液;再将制备好的1mL的纳米金胶加入已混合好的上述溶液中,再在室温下超声分散0.5h至完全溶解,制备得到沉积液;

[0048] 将丝网印刷电极分别在乙醇和超纯水中超声处理1min,氮气吹干,再将丝网印刷电极在+0.4V电压下浸在配制好的沉积液中,沉积时间为60 s;

[0049] 电极浸在0.1 M  $\text{KCl}$ /0.1 M  $\text{HCl}$ 溶液中在-0.6 V到+0.8V之间扫描循环伏安图直至图像稳定,使电极表面获得普鲁士蓝-壳聚糖-纳米金复合膜。

[0050] S2. 在电极表面滴涂用0.1 M的碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释后浓度为10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的包被原,使其在微碱的环境下能更好地将包被原固定在纳米膜修饰的电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育12h。

[0051] S3. 滴涂5%脱脂奶粉以封闭电极表面非特异性位点,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h,用0.01 M磷酸盐冲洗、风干,制备得到所述免疫生物传感器。

[0052] 制备得到的免疫生物传感器检测组胺的原理示意图见图1,电沉积后该免疫传感器的电化学表征图见图2。

[0053] 进一步地,分别配制浓度为0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ng/mL的组胺标准液,按照上述制备方法进行循环伏安扫描,得到该免疫传感器线性检测范围为0.085~0.95 ng/mL (1C<sub>20</sub>~1C<sub>80</sub>)及检测限为0.042 ng/mL (1C<sub>10</sub>), R<sup>2</sup>=0.993,见图3。

[0054] 实施例2

[0055] 本实施例提供一种检测组胺的可抛式一步电沉积免疫生物传感器,采用表面有普鲁士蓝-壳聚糖-纳米金复合膜的电极,所述电极上固定有组胺包被原。

[0056] 所述复合膜中纳米金与普鲁士蓝 (Fe<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sub>3</sub>)的摩尔浓度比为1:2000,壳聚糖含量为0.05%。

[0057] 一种上述免疫生物传感器的制备方法,包括如下步骤:

[0058] S1. 将0.05 g壳聚糖溶于100 mL 1.0%的醋酸溶液中,室温下搅拌3 h,使壳聚糖完全溶解,配制成0.05%壳聚糖溶液。将0.0813 g FeCl<sub>3</sub>,0.1644 g K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>],0.7455g KCl以及1 mL浓盐酸加入100 mL 上述壳聚糖溶液中,在室温下超声分散,直至得到稳定的暗绿色分散液;再将制备好的1 mL的纳米金胶加入已混合好的上述溶液中,再在室温下超声分散0.5 h至完全溶解,制备得到沉积液;

[0059] 将丝网印刷电极分别在乙醇和超纯水中超声处理1min,氮气吹干,再将丝网印刷电极在+0.4V电压下浸在配制好的沉积液中,沉积时间为120 s;

[0060] 电极浸在0.1 M KCl/0.1 M HCl溶液中在-0.6 V到+0.8V之间扫描循环伏安图直至图像稳定,使电极表面获得普鲁士蓝-壳聚糖-纳米金复合膜。

[0061] S2. 在电极表面滴涂用0.1 M的碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释后浓度为5 ug/mL的包被原,使其在微碱的环境下能更好地将包被原固定在纳米膜修饰的电极表面,4°C孵育10 h。

[0062] S3. 滴涂5%脱脂奶粉以封闭电极表面非特异性位点,37°C孵育1 h,用0.01 M磷酸盐冲洗、风干,制备得到所述免疫生物传感器。

[0063] 进一步地,分别配制浓度为0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ng/mL的组胺标准液,按照上述制备方法进行循环伏安扫描,得到该免疫传感器检测范围为0.037~0.404 ng/mL (1C<sub>20</sub>~1C<sub>80</sub>)及检测限为0.0094 ng/mL (1C<sub>10</sub>), R<sup>2</sup>=0.998,见图4。

[0064] 实施例3

[0065] 本实施例提供一种检测组胺的可抛式一步电沉积免疫生物传感器,采用表面有普鲁士蓝-壳聚糖-纳米金复合膜的电极,所述电极上固定有组胺包被原。

[0066] 所述复合膜中纳米金与普鲁士蓝 (Fe<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sub>3</sub>)的摩尔浓度比为1:400,壳聚糖含量为0.01%

[0067] 一种上述免疫生物传感器的制备方法,包括如下步骤:

[0068] S1. 将0.01g壳聚糖溶于100 mL 1.0%的醋酸溶液中,室温下搅拌2 h,使壳聚糖完全溶解,配制成0.01%壳聚糖溶液。将0.0163 g FeCl<sub>3</sub>,0.0329 g K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>],0.7455 g KCl以及1 mL浓盐酸加入100 mL 上述壳聚糖溶液中,在室温下超声分散,直至得到稳定的暗绿色分散液;再将制备好的1 mL的纳米金胶加入已混合好的上述溶液中,再在室温下超声分散0.5 h至完全溶解,制备得到沉积液;

[0069] 将丝网印刷电极分别在乙醇和超纯水中超声处理1min,氮气吹干,再将丝网印刷电极在+0.4V电压下浸在配制好的沉积液中,沉积时间为120 s;

[0070] 电极浸在0.1 M KCl/0.1 M HCl溶液中在-0.6 V到+0.8V之间扫描循环伏安图直至图像稳定,使电极表面获得普鲁士蓝-壳聚糖-纳米金复合膜。

[0071] S2. 在电极表面滴涂用0.1 M的碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释后浓度为10 ug/mL的包被原,使其在微碱的环境下能更好地将包被原固定在纳米膜修饰的电极表面,4℃孵育14 h。

[0072] S3. 滴涂5%脱脂奶粉以封闭电极表面非特异性位点,37℃孵育1h,用0.01 M磷酸盐冲洗、风干,制备得到所述免疫生物传感器。

[0073] 进一步地,分别配制浓度为0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ng/mL的组胺标准液,按照上述制备方法进行循环伏安扫描,得到该免疫传感器检测范围为0.044~1.91 ng/mL ( $IC_{20} \sim IC_{80}$ )及检测限为0.00818 ng/mL ( $IC_{10}$ ),  $R^2=0.996$ ,见图5。

[0074] 对比例1

[0075] 本对比例所述免疫生物传感器及其制备方法基本与实施例1相同,不同之处在于本对比例采用如下几种复合膜电极:处理①采用表面有壳聚糖-普鲁士蓝复合膜的电极;处理②采用表面有壳聚糖-纳米金复合膜的电极;处理③采用表面有普鲁士蓝-壳聚糖-多壁碳-纳米金复合膜的电极。

[0076] 按上述①处理得到的免疫生物传感器,电流响应值较小,且对0.001~100ng/mL不同比例组胺标准品检测无法获得标准曲线,原因可能是蛋白与传感器界面间的电子传递局部受阻,使得电流响应值变小,传感器灵敏度下降。按上述②处理得到的免疫生物传感器,电沉积后电极表面负载纳米金的量比较少,电流响应值较小,且膜易脱落,原因可能是小粒径纳米金不适合单组分修饰电极,且在实验操作容易被冲洗离开电极表面。处理③的电化学表征结果说明多壁碳纳米管并不能高效修饰在电极表面,原因可能是它不适合通过电沉积的方法来修饰在电极表面,而含多壁碳纳米管的复合膜在传感器的准确性及灵敏度并无明显优势。

[0077] 对比例2

[0078] 本对比例所述免疫生物传感器及其制备方法基本与实施例1相同,不同之处在于本对比例复合膜中普鲁士蓝、壳聚糖、纳米金采取如下几种比例:处理①普鲁士蓝和纳米金的比例与实施例1相同,壳聚糖质量浓度为20%;处理②纳米金与普鲁士蓝( $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ )的摩尔浓度比为1:2,壳聚糖浓度与实施例1相同。

[0079] 按上述①处理得到的免疫生物传感器,很难溶解制备均一稳定的电沉积溶液,且生物膜晾干后易脱落,原因可能是虽然壳聚糖具有粘度成膜性好,但是浓度过高超出电极表面的负载能力。按上述②处理得到的免疫生物传感器,电沉积后对电极表面进行循环伏安测试,表征显示峰电流值与原比例对比并不会持续变大,且有变小的趋势,不能实现信号放大,因此在检测过程中无法提高系统的灵敏度。

[0080] 对比例3

[0081] 本对比例所述免疫生物传感器及其制备方法基本与实施例1相同,不同之处在于本对比例所述电沉积步骤采用如下处理方式:处理①首先在电极表面电沉积壳聚糖-普鲁士蓝,然后按同样的方法电沉积壳聚糖-纳米金;处理②首先在电极表面电沉积壳聚糖-纳

米金,然后按同样的方法电沉积壳聚糖-普鲁士蓝。

[0082] 按上述处理①~②得到的免疫生物传感器电极间差异较大,原因可能是电沉积过程中操作步骤增多,影响了电极沉积的稳定性,整个检测系统的准确度显著降低。

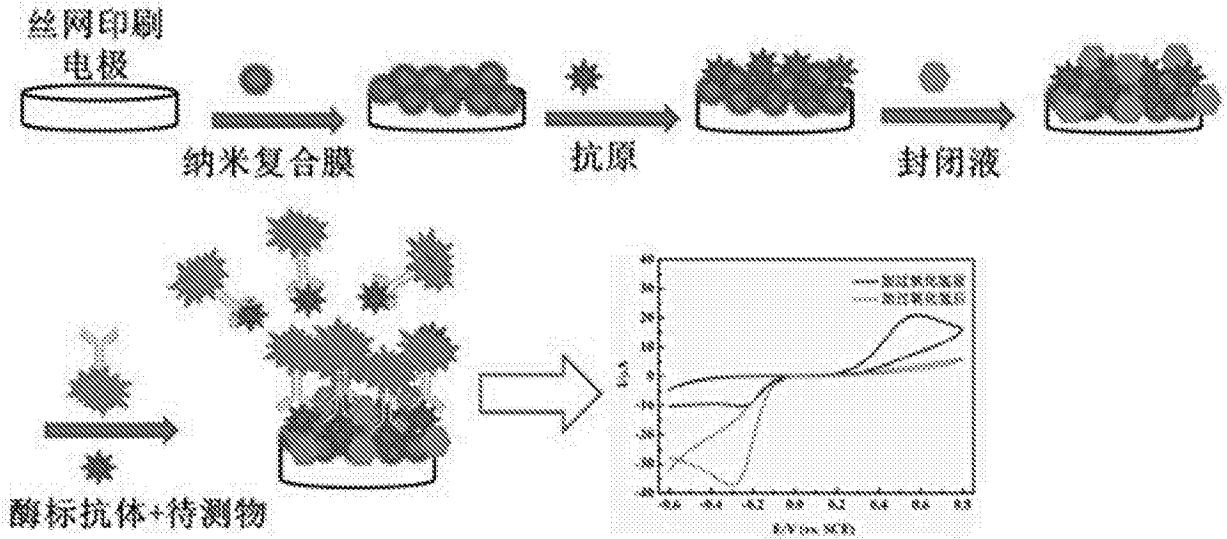


图 1

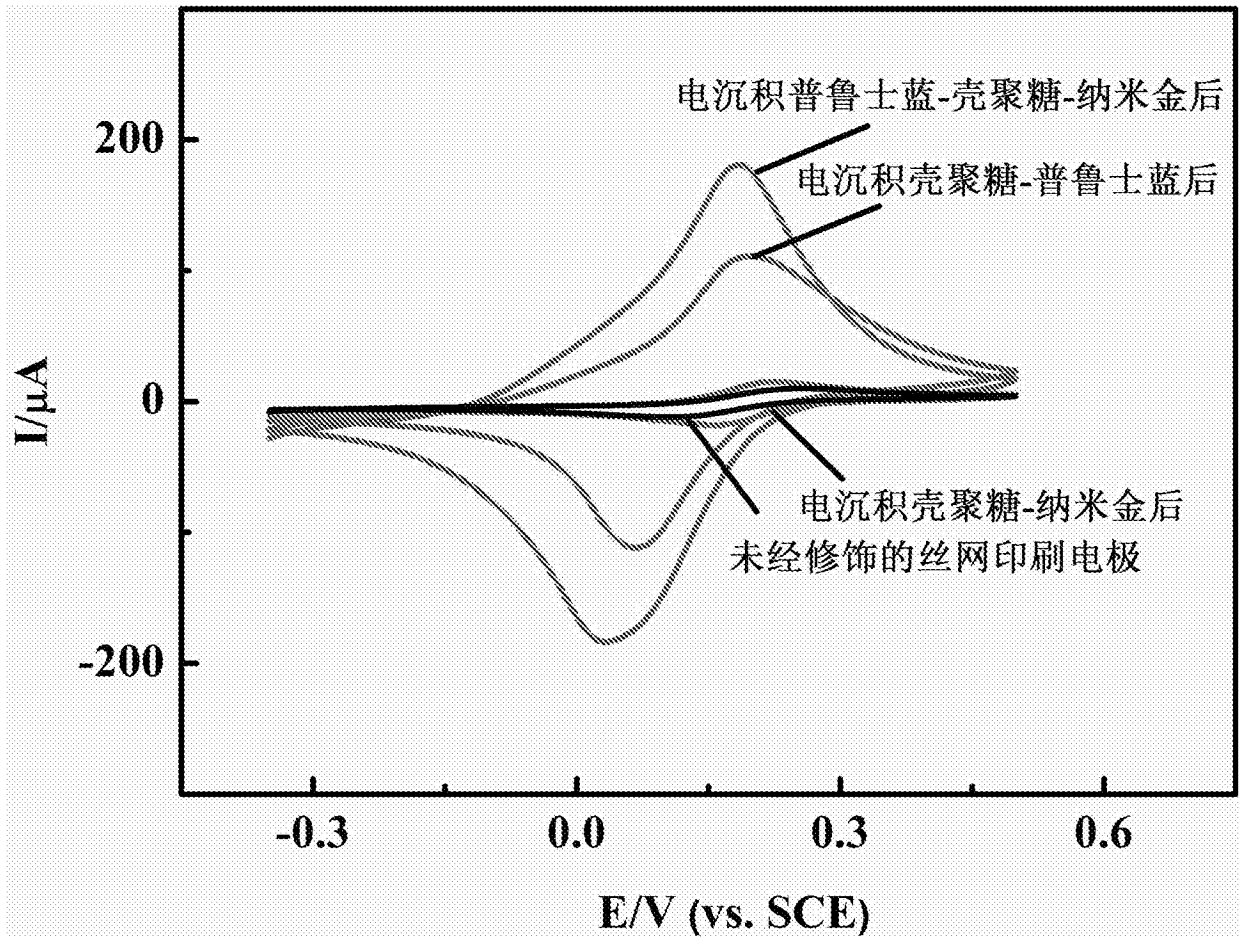


图 2

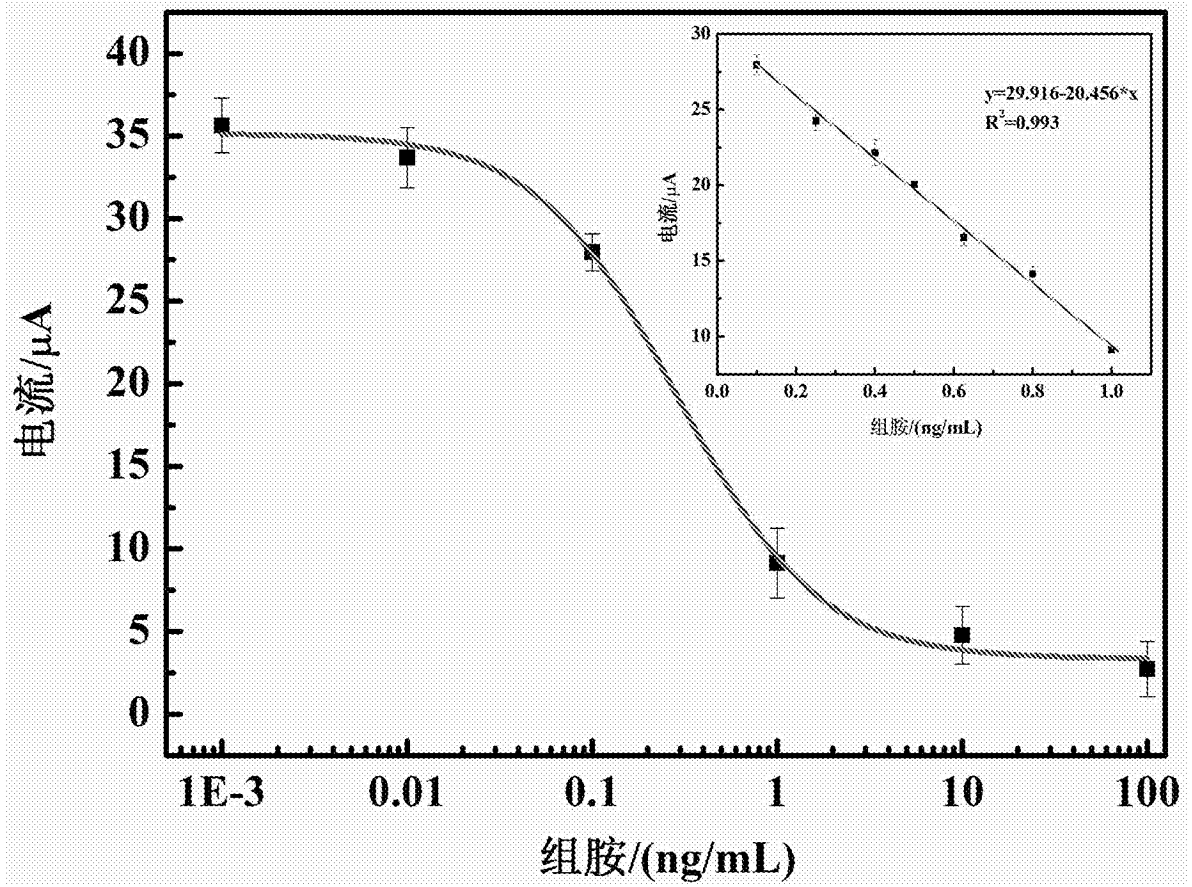


图 3

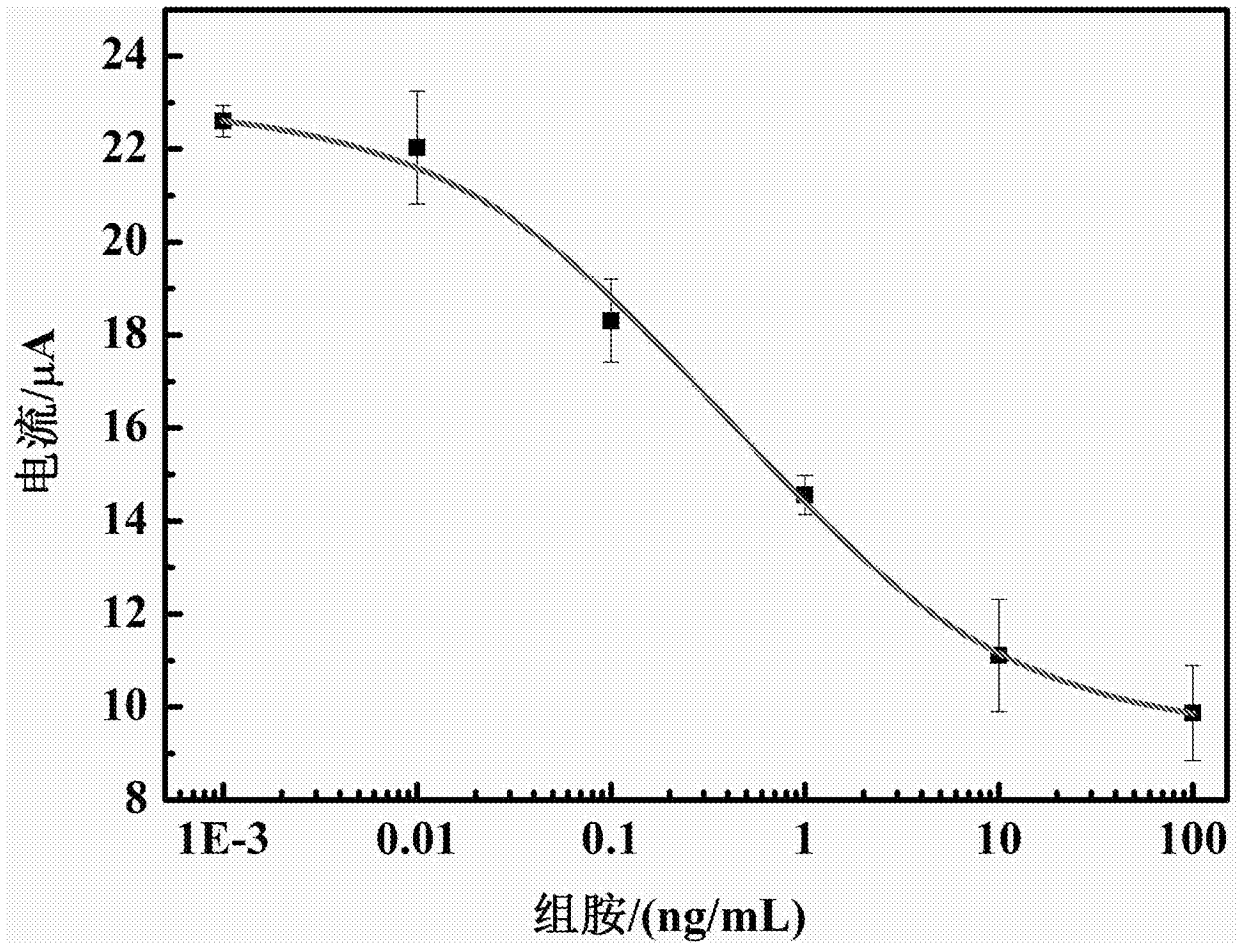


图 4

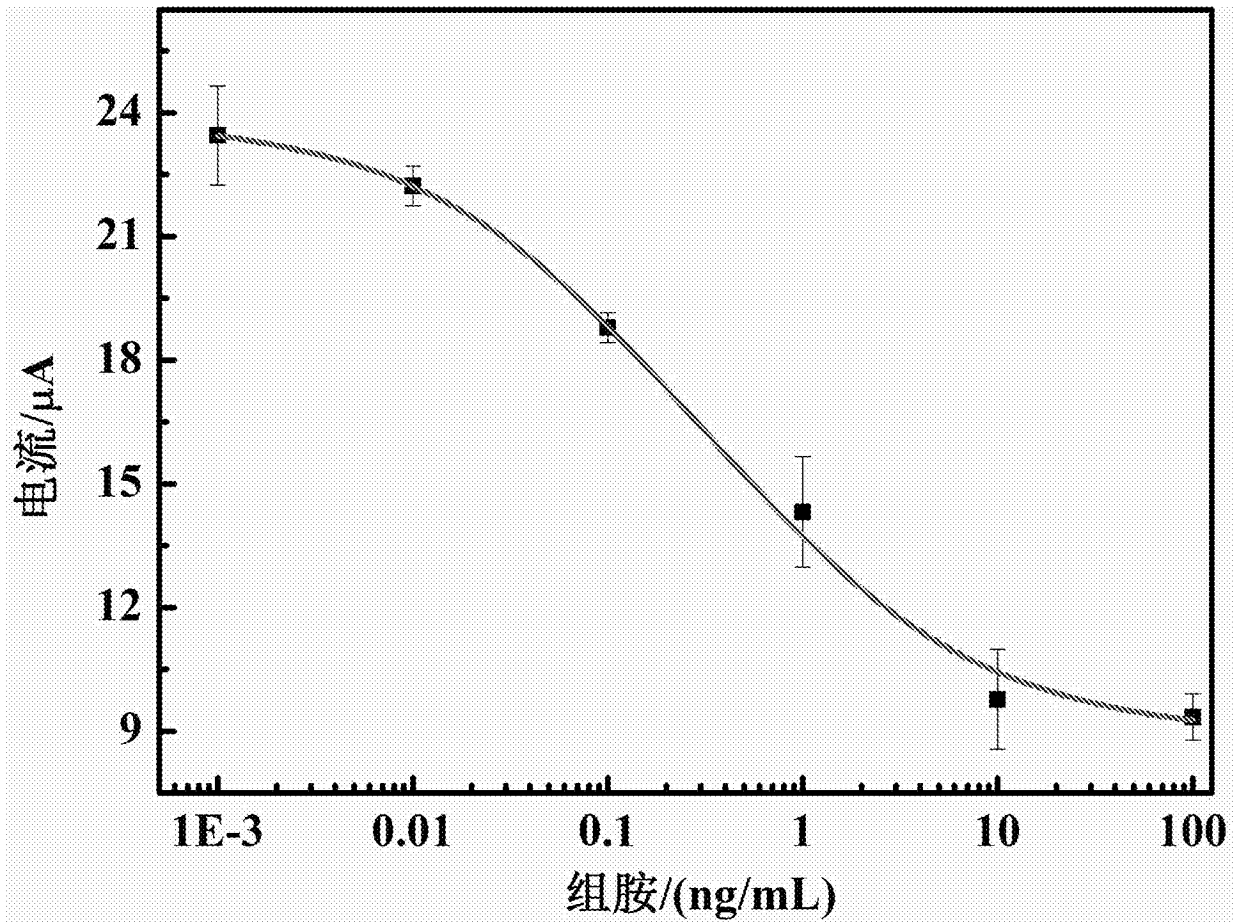


图 5

专利名称(译)	一种检测组胺的可抛式一步电沉积免疫生物传感器及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104897748B</a>	公开(公告)日	2017-12-26
申请号	CN201510287384.4	申请日	2015-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	徐振林 孙远明 董秀秀 梁祖培 沈玉栋 杨金易 王弘 雷红涛		
发明人	徐振林 孙远明 董秀秀 梁祖培 沈玉栋 杨金易 王弘 雷红涛		
IPC分类号	G01N27/26 G01N27/30 G01N33/53		
代理人(译)	林丽明		
审查员(译)	徐妍妍		
其他公开文献	CN104897748A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于生物传感器技术领域，具体公开了一种检测组胺的可抛式一步电沉积免疫生物传感器及其制备方法。本发明免疫生物传感器采用表面有普鲁士蓝-壳聚糖-纳米金复合膜的电极，所述电极上固定有组胺包被原；其中，复合膜中纳米金与普鲁士蓝的摩尔浓度比为1:2000~1:20，壳聚糖的质量体积含量为0.01~0.05%。并且，采用一步沉积电极的方式使电极表面获得复合膜，沉积步骤比传统高分子聚合物修饰电极制备步骤简便，且更容易暴露抗原结合位点。本发明免疫生物传感器将竞争免疫反应和生物传感器相结合，并可根据需要得到组胺检测工作曲线等一系列性能表征，具有操作简单、灵敏度高、快速方便等优势，可用于样品中组胺的现场快速检测。

