



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 109387554 A

(43)申请公布日 2019.02.26

(21)申请号 201710650260.7

(22)申请日 2017.08.02

(71)申请人 张迎阳

地址 215000 江苏省苏州市高新区竹园路
209号

(72)发明人 张静 张迎阳 刘钢桥

(74)专利代理机构 北京志霖恒远知识产权代理
事务所(普通合伙) 11435

代理人 申绍中 郭栋梁

(51)Int.Cl.

G01N 27/327(2006.01)

G01N 27/48(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种赭曲霉毒素A的无酶免疫传感器的制备及其检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种赭曲霉毒素A(OTA)的无酶免疫传感器的制备及其检测方法,属于免疫分析化学技术领域。本发明在玻碳电极表面层层组装石墨烯和聚乙二醇,构筑高密度OTA抗原传感界面,合成金纳米粒子并制备金纳米粒子探针,采用间接竞争免疫分析原理,包被OTA抗原和OTA目标抗原竞争OTA抗体形成免疫复合物,将金纳米粒子探针与免疫复合物进行反应,电极表面键合的金纳米粒子氧化生成 AuCl_4^- ,通过电化学测定 AuCl_4^- 还原峰峰电流值的大小达到检测OTA的目的。本发明有利于高灵敏在线检测OTA,样品不必提纯处理,简单快速,检测体系无需酶的使用,降低了检测成本。

1. 一种赭曲霉毒素A (OTA) 的无酶免疫传感器的制备方法, 其特征在于包括石墨烯修饰电极的制备, 聚乙二醇的修饰, 包被OTA抗原的修饰; 具体制备方法如下:

(1) 石墨烯修饰电极的制备:

a、0.5 mg 石墨烯分散在 1 mL 乙醇中, 超声10分钟, 得到0.5 mg/mL 石墨烯分散液;
b、在直径为3 mm玻碳电极表面修饰5 μ L 0.5 mg mL⁻¹石墨烯分散液, 放入干燥器干燥处理;

(2) 聚乙二醇的修饰:

在石墨烯修饰电极表面滴涂5 μ L 2 mg/mL 聚乙二醇, 用于固定OTA, 清洗晾干, 保存于4 °C备用;

(3) 包被OTA抗原的修饰:

在工作电极表面滴加10 μ L 300 μ g/L OTA抗原, 湿盒温育1小时后, 用0.01 M pH 7.4 (0.05% Tween-20) 磷酸缓冲溶液 (PBST) 淋洗修饰电极, 滴涂10 μ L 5% 牛血清蛋白, 封闭电极上的非特异性活性位点, 保存于4 °C备用。

2. 利用权利要求1制得的OTA无酶免疫传感器检测OTA的方法, 其特征在于包括金纳米粒子探针的制备, 抗体和样品溶液的温育, 抗体浓度的优化, 金纳米粒子探针和免疫复合物的反应, 电化学检测方法的构建, 检测条件的优化, 标准曲线的绘制, 实际样品的检测。

3. 根据权利要求2构建的OTA无酶免疫传感器检测OTA的方法, 其特征在于金纳米粒子探针的制备:

a、将50 mL 0.01%氯金酸加热至沸, 剧烈搅拌下向其中迅速加入1.75 mL 1%柠檬酸三钠溶液, 继续反应10 min, 即可得到粒径13 nm 金纳米粒子溶液;

b、取权利要求6步骤a得到的金纳米粒子溶液用0.1 M K₂CO₃调至pH 9.0后, 加入25 μ L 1 mg/mL羊抗鼠抗体, 于室温搅拌2 h;

c、将上述混合液用0.01 M (pH 7.4) 磷酸缓冲溶液离心洗涤三次; 随后沉淀物用含1%牛血清蛋白的磷酸缓冲溶液分散, 即得所需金纳米粒子标记羊抗鼠抗体 (金纳米粒子探针), 保存于4 °C备用。

4. 根据权利要求2构建的OTA的无酶免疫传感器检测OTA的方法, 其特征在于OTA抗体和样品的温育:

5 μ L不同浓度的OTA标准溶液或样品与5 μ L 稀释一定倍数OTA抗体混合制备温育液; 将温育液滴到OTA免疫传感器表面, 将其置于25 °C 温育1 h, 小心地用0.01 M pH 7.4 PBST冲洗, 保存于4 °C备用。

5. 根据权利要求2构建的OTA的无酶免疫传感器检测OTA的方法, 其特征在于OTA抗体的优化:

对OTA抗体的浓度进行优化, 采用稀释100倍数的OTA抗体为最佳抗体浓度。

6. 根据权利要求2构建的OTA的无酶免疫传感器检测OTA的方法, 其特征在于金纳米粒子探针和免疫复合物的反应:

将10 μ L的金纳米粒子探针滴涂到根据权利要求7 制备的修饰电极表面, 将其置于25 °C 湿盒中温育1 h, 小心地用0.01 M pH 7.4 PBST冲洗, 保存于4 °C备用。

7. 根据权利要求2构建的OTA的无酶免疫传感器检测OTA的方法, 其特征在于电化学检测方法的构建:

电化学检测OTA体系采用经典三电极工作体系:工作电极、参比电极和对电极,工作电极为根据权利要求9制备的修饰电极,对电极为铂丝电极,参比电极为饱和甘汞电极,测定液为2 mL 0.1 M HCl溶液;对电化学检测时的氧化电位和氧化时间进行优化,1.40 V为最佳氧化电位,30 s为最佳氧化时间。

8.根据权利要求2构建的OTA的无酶免疫传感器检测OTA的方法,其特征在于标准曲线的绘制:

利用间接竞争免疫原理,将不同浓度的OTA标准液加入到稀释100倍的OTA抗体溶液中;温育液中OTA与修饰电极表面固定的OTA竞争结合OTA抗体形成免疫复合物;电极上形成的免疫复合物捕获金纳米粒子探针,金纳米粒子在0.1 M HCl中氧化生成 AuCl_4^- ,随后, AuCl_4^- 在电极表面还原,建立还原峰峰电流值-OTA浓度标准曲线。

9.根据权利要求2构建的OTA的无酶免疫传感器检测OTA的方法,其特征在于实际样品的检测:将权利要求1和权利要求2制备的免疫传感器和构建的电化学检测体系用于小麦样品中OTA浓度,根据测定到的还原峰峰电流值对应标准曲线得到样品中OTA的浓度。

一种赭曲霉毒素A的无酶免疫传感器的制备及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种赭曲霉毒素A的无酶免疫传感器的制备及其检测方法,属于免疫分析化学技术领域。

背景技术

[0002] 赭曲霉毒素(Ochratoxins, OTs)是对人类健康威胁最大的霉菌毒素之一。赭曲霉毒素包含有赭曲霉毒素 A(OTA)、赭曲霉毒素 B(OTB)、赭曲霉毒素 C(OTC)等 7 种结构类似的化合物,其中以赭曲霉毒素 A(OTA)毒性最大,在农作物中分布最广泛,对人畜的影响最大。世界卫生组织(WHO)的国际癌症研究机构(IARC)于 1993 年将 OTA 列为可能引起人类癌症的物质即 II B 类致癌物。OTA 的毒性作用主要表现为肾脏毒性、肝脏毒性、遗传毒性、致畸性、致癌性、致突变作用、神经毒性和免疫毒性。世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会(JECFA)和联合国粮食及农业组织于 1991 年拟定了 OTA 每人每周最大允许摄入量为 112 ng/kg(按 体重计),最小有毒剂量为每日 8 $\mu\text{g/kg}$,在随后的会议当中,又将每周最大允许摄入量降低到 100 ng/kg。此外,许多相关国际组织和机构都制定了不同的限量标准,对OTA 的在粮食作物中的污染进行监测和控制,以保证食品安全。此外,许多相关国际组织和机构都制定了不同的限量标准,对 OTA 在食品和粮食作物中的污染进行监测和控制,以保证食品安全。因此,OTA的鉴定和定量检测在环境分析中具有重要的意义。

[0003] 目前粮食作物中的OTA的检测技术大多采用基于实验室分析的高效液相色谱、液相色谱-质谱及气象色谱-质谱联机检测方法,样品前处理过程复杂、耗时长,需要专业技术人员操作,检测费用高。

[0004] 本发明将具有优良性能的石墨烯和聚乙二醇用于OTA的电化学免疫传感器的制备,并针对OTA高灵敏定量检测的需求,引入金纳米粒子的信号放大功能,构建超灵敏的OTA的电化学免疫分析方法,实现了OTA的无酶检测,降低了成本。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有技术中存在的OTA检测方法的灵敏度低、检出限高和成本高的问题,提供一种OTA的无酶免疫传感器的制备及其检测方法,实现OTA的高灵敏、低成本而在线检测。

[0006] 本发明的技术方案:一种OTA的无酶免疫传感器的制备及其检测方法,包括石墨烯修饰电极的制备,聚乙二醇的修饰,包被OTA抗原的修饰,金纳米粒子探针的制备,抗体和样品混合液的温育,抗体浓度的优化,金纳米粒子探针和免疫复合物的反应,电化学检测方法的构建,电化学检测条件的优化,标准曲线的绘制,实际样品的检测;

(1)石墨烯修饰电极的制备:

a、0.5 mg 石墨烯分散在 1 mL 乙醇中,超声10分钟,得到0.5 mg/mL 石墨烯分散液;

b、在直径为3 mm玻碳电极表面修饰5 mL 0.5 mg mL^{-1} 石墨烯分散液,放入干燥器干燥处理。

[0007] (2) 聚乙二醇的修饰:

在步骤(1)制备的石墨烯修饰电极表面滴涂5 μL 2 mg/mL 聚乙二醇分散液,用于固定OTA,清洗晾干,保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

[0008] (3) 包被OTA抗原的修饰:

在步骤(2)制备的电极表面滴加10 μL 300 $\mu\text{g/L}$ OTA抗原,在湿盒中温育1小时后,用0.01 M pH 7.4 (0.05% Tween-20) 磷酸缓冲溶液(PBST)淋洗修饰电极,滴涂10 μL 5% 牛血清蛋白用于封闭电极上的未结合的活性位点,保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

[0009] (4) 金纳米粒子探针的制备:

a、将50mL 0.01%氯金酸加热至沸,剧烈搅拌下向其中迅速加入1.75mL 1%柠檬酸三钠溶液,继续反应10 min,即可得到粒径13 nm 金纳米粒子溶液;

b、取步骤(4)a得到的金纳米粒子溶液用0.1 M K_2CO_3 调至pH 9.0后,加入25 μL 1 mg/mL羊抗鼠抗体,于室温搅拌2 h;

c、将上述混合液先过滤,再用0.01 M (pH 7.4) 磷酸缓冲溶液离心洗涤三次;随后沉淀物用含1% 牛血清蛋白的磷酸缓冲溶液分散,即得所需金纳米粒子标记羊抗鼠抗体(金纳米粒子探针),保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

[0010] (5) OTA抗体和样品混合液的温育:

5 mL 不同浓度的OTA标准溶液或样品混合制备温育液。将温育液滴到步骤(3)制备的修饰电极表面,将其置于25 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中温育1 h,小心地用0.01 M pH 7.4 PBST冲洗,保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

[0011] (6) OTA抗体浓度的优化:

对OTA抗体的浓度进行优化,采用稀释100倍数的OTA抗体为最佳抗体浓度。

[0012] (7) 金纳米粒子探针和免疫复合物的反应:

将10 mL步骤(4)制备的金纳米粒子探针的分散液滴涂到根据步骤(5) 制备的电极表面,将其置于25 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中温育1 h,小心地用0.01 M pH 7.4 PBST冲洗,保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

[0013] (8) 电化学检测方法的构建:

电化学检测OTA体系采用经典三电极工作体系:工作电极、参比电极和对电极,工作电极为根据权利要求9制备的修饰电极,对电极为铂丝电极,参比电极为饱和甘汞电极,测定液为2 mL 0.1 M HCl溶液。

[0014] (9) 电化学检测条件的优化:

对电化学检测时的氧化电位和氧化时间进行优化,1.40 V为最佳氧化电位,30 s为最佳氧化时间。

[0015] (10) 标准曲线的绘制:

利用间接竞争免疫原理,将不同浓度的OTA标准液加入到稀释100倍的OTA抗体溶液中,温育液中OTA与电极表面固定OTA竞争结合OTA抗体形成免疫复合物。电极上形成的免疫复合物,捕获金纳米粒子探针,金纳米粒子在0.1 M HCl中氧化生成 AuCl_4^- ,随后, AuCl_4^- 在电极表面还原,建立还原峰峰电流值-OTA浓度标准曲线。

[0016] (11) 实际样品的检测:将步骤1-10制备的OTA免疫传感器和构建的电化学检测体系用于两个小麦样品中OTA浓度,根据测定到的还原峰峰电流值对应标准曲线得出样品中OTA的浓度。

[0017] 本发明的有益成果：在玻碳电极表面层层组装石墨烯和聚乙二醇，构筑高密度OTA抗原免疫传感界面，合成金纳米粒子并构筑金纳米粒子探针，采用间接竞争免疫分析原理，包被OTA抗原和OTA目标抗原竞争OTA抗体免疫复合物，将金纳米粒子探针与免疫复合物进行反应，通过电化学测定金纳米粒子还原峰峰电流值的大小达到检测OTA的目的。该方法简单快速，成本低，灵敏度高，其检测限为8 ng/L，利于OTA的在线检测。

附图说明

[0018] 图1为不同温育OTA浓度(0.02,0.05,0.1,0.5,1,5,8,10 mg/L)时OTA传感器脉冲伏安图(曲线从上到下)。

[0019] 图2为金纳米粒子的还原峰峰电流值与OTA浓度的标准曲线图。

具体实施方式

[0020] 现在结合附图和以下实施例对本发明作进一步详细的说明，但应了解的是，这些实施例仅为例示说明之用，而不应被解释为本发明实施的限制。

[0021] 实验过程中使用的水均为去离子水，OTA与OTA抗体购于伊普瑞斯科技有限公司，羊抗鼠抗体和牛血清蛋白购于武汉博士德生物工程有限公司，石墨烯购于南京先丰纳米材料科技有限公司，所有其它试剂均为分析纯，实验均在25℃下进行。

[0022] 实施例1：石墨烯修饰电极的制备

a、0.5 mg 石墨烯分散在 1 mL 乙醇中，超声10分钟，得到0.5 mg/mL 石墨烯分散液；

b、在直径为3 mm玻碳电极表面修饰5 mL 0.5 mg mL⁻¹石墨烯分散液，放入干燥器干燥处理。

[0023] 实施例2：金纳米粒子及其标记羊抗鼠抗体的制备

制备直径13 nm 金纳米粒子溶液的具体方法为：50 mL 0.01%氯金酸加热至沸，剧烈搅拌下向其中迅速加入1.75 mL 1%柠檬酸三钠溶液，继续反应10 min，即可生成砖红色的金纳米粒子溶液。将其搅拌冷却至室温后，4℃保存于玻璃瓶中备用。

[0024] 1 mL的上述金纳米粒子溶液用0.1 M K₂CO₃调至pH 9.0后，加入25 μL 1 mg/mL 羊抗鼠抗体，于室温搅拌2h。过滤后用0.01 M (pH 7.4) 磷酸缓冲溶液离心洗涤三次；随后沉淀物用300 μL含1% 牛血清蛋白的磷酸缓冲溶液分散。制得的金纳米粒子标记抗体可在4℃保存一周左右而无明显活性降低。

[0025] 实施例3：OTA免疫传感器的制备和检测步骤

直径3 mm的玻碳电极分别经过0.3 μm,0.05 μm的Al₂O₃粉末上抛光后，依次在乙醇，去离子水中超声彻底洗涤，得到平滑光洁的电极表面。在晾干的电极上修饰5 μL 0.5 mg/mL 石墨烯分散液，将修饰电极放入干燥器中干燥处理。在修饰电极表面滴加5 μL 2 mg/mL 聚乙二醇-20000，修饰电极于4℃饱和水蒸气环境中放置过夜，通过物理吸附形成一层聚乙二醇薄膜。

[0026] 在上述修饰电极表面滴加10 μL 300 μg/L OTA抗原，25℃湿盒中物理吸附1 h。用0.01 M pH 7.4 (0.05% Tween-20) PBS(PBST)淋洗修饰电极后，用含5% 牛血清蛋白的0.01 M pH 7.4 磷酸缓冲溶液封堵修饰电极1 h。用0.01 M pH 7.4 PBST淋洗该修饰电极，所得OTA免疫传感器保存于4℃待用。

[0027] 5 mL 不同浓度的OTA标准溶液或样品与5 mL 稀释100倍的OTA抗体混合制备温育液。如图1所示,将温育液滴到上述OTA免疫传感器表面,将其置于25 °C湿盒中温育1 h,小心地用0.01 M pH 7.4 PBST冲洗,保存于4 °C备用。将10 mL的金纳米粒子探针滴涂到传感器表面,将其置于25 °C 湿盒中温育1 h,小心地用0.01 M pH 7.4 PBST冲洗,保存于4 °C准备检测。电化学检测OTA体系采用经典三电极工作体系:工作电极、参比电极和对电极,工作电极为制备的修饰电极,对电极为铂丝电极,参比电极为饱和甘汞电极,测定液为2 mL 0.1 M HCl溶液。电化学检测采用示差脉冲伏安法,扫描电位从0.6 V到0.1 V,脉冲振幅50 mV、脉冲宽度100 ms。

[0028] 实施例4:电化学免疫传感器的工作曲线的绘制

将浓度为0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 和 10 $\mu\text{g/L}$ 的OTA标准液加入到稀释100倍的OTA抗体溶液中。温育液中OTA与电极表面固定的OTA竞争结合OTA抗体形成免疫复合物。电极上形成的免疫复合物捕获金纳米粒子探针,金纳米粒子在0.1 M HCl中氧化生成 AuCl_4^- ,随后, AuCl_4^- 在电极表面还原。还原峰峰电流值随着温育液OTA浓度的增加而减小(图1)。如图2所示,还原峰峰电流值的降低与温育溶液中待测OTA浓度对数在0.02 $\mu\text{g/L}$ -10 $\mu\text{g/L}$ 范围内成正比,线性相关系数为0.997,该免疫传感器的检出限为8 ng/L。

[0029] 实施例5:实际样品的检测

实际样品为两个发霉的小麦样品,将小麦样品粉碎至20目,取1 g样品放入样品管中,加入抽提液5 mL,震荡3分钟,1500 rpm离心5分钟,取上清液,取上清液0.5 mL备用。5 μL 稀释了一定倍数的样品与5 μL 稀释了100倍的OTA抗体混合,混合液滴到OTA免疫传感器上,随后10 μL 金纳米粒子探针溶液滴在免疫传感器表面。用该方法测得OTA的浓度为 $0.035 \pm 0.0006 \mu\text{g/L}$ 和 $0.068 \pm 0.001 \mu\text{g/L}$,用回收率实验来鉴定所提出方法的可靠性,所得回收率均分别为 $97.0 \pm 1.8\%$ 和 $99.8 \pm 2.1\%$,说明此方法准确度很好,该方法能用于小麦样品中OTA免疫分析。

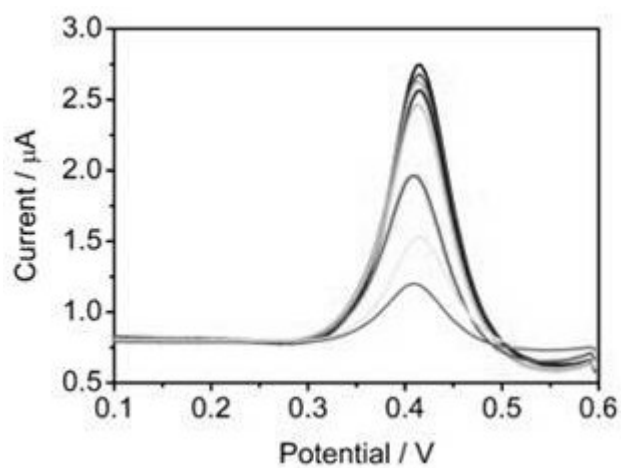


图1

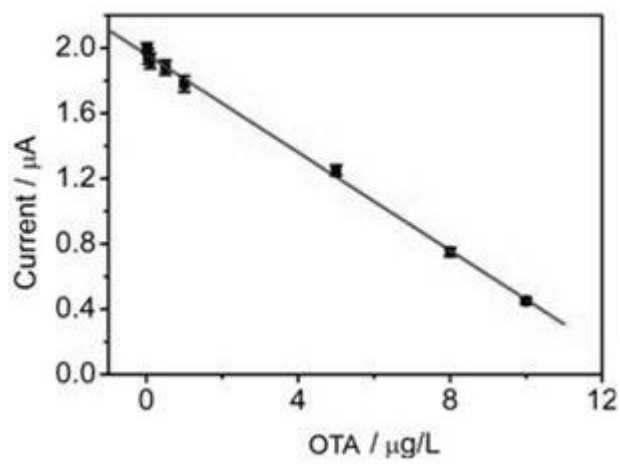


图2

专利名称(译)	一种赭曲霉毒素A的无酶免疫传感器的制备及其检测方法		
公开(公告)号	CN109387554A	公开(公告)日	2019-02-26
申请号	CN2017110650260.7	申请日	2017-08-02
[标]申请(专利权)人(译)	张迎阳		
申请(专利权)人(译)	张迎阳		
当前申请(专利权)人(译)	张迎阳		
[标]发明人	张静 张迎阳		
发明人	张静 张迎阳 刘钢桥		
IPC分类号	G01N27/327 G01N27/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N27/3277 G01N27/3278 G01N27/48 G01N33/53		
代理人(译)	郭栋梁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种赭曲霉毒素A (OTA) 的无酶免疫传感器的制备及其检测方法, 属于免疫分析化学技术领域。本发明在玻碳电极表面层层组装石墨烯和聚乙二醇, 构筑高密度OTA抗原传感界面, 合成金纳米粒子并制备金纳米粒子探针, 采用间接竞争免疫分析原理, 包被OTA抗原和OTA目标抗原竞争OTA抗体形成免疫复合物, 将金纳米粒子探针与免疫复合物进行反应, 电极表面键合的金纳米粒子氧化生成AuCl₄⁻, 通过电化学测定AuCl₄⁻还原峰峰电流值的大小达到检测OTA的目的。本发明有利于高灵敏在线检测OTA, 样品不必提纯处理, 简单快速, 检测体系无需酶的使用, 降低了检测成本。

