

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510110541.0

[51] Int. Cl.

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 5 月 23 日

[11] 公开号 CN 1967228A

[22] 申请日 2005.11.18

[21] 申请号 200510110541.0

[71] 申请人 上海环轩信息技术有限公司

地址 200051 上海市中山西路 930 号云都虹桥大厦 8 楼 B 座

共同申请人 柴春彦

[72] 发明人 柴春彦 刘国艳 陈永辉

[74] 专利代理机构 上海申汇专利代理有限公司

代理人 翁若莹

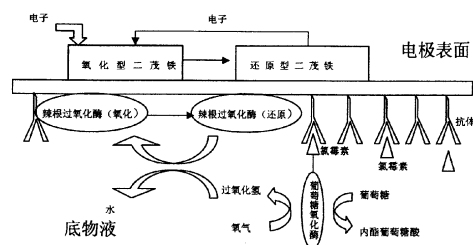
权利要求书 3 页 说明书 14 页 附图 2 页

[54] 发明名称

用于检测氯霉素残留的免疫传感电极的制作方法

[57] 摘要

本发明公开一种用于检测氯霉素残留的免疫传感电极的制作方法，涉及检测技术领域；其特征在于，所述免疫传感电极是贴有氯霉素抗体固定传感膜的纳米修饰印刷电极，所述免疫传感电极的制作方法如下：1) 氯霉素单克隆抗体的制备；2) 氯霉素抗体固定膜的制备；3) 药物酶标记的制备；4) 丝网印刷电极的制作；5) 纳米修饰电极的制作；6) 免疫传感器电极的制作；7) 最后连接电信号输出、显示和数据处理、转化的电子元件系统，在测量时可以直接显示测得残留物的含量或浓度值；使用所述免疫传感电极的生物传感器检测精确、灵敏、价廉、响应和检测迅速、选择性好、操作简单、携带方便、能重复利用并能实现现场检测和在线检测氯霉素残留的。



1、一种用于检测氯霉素残留的免疫传感电极的制作方法，其特征在于，所述免疫传感电极是贴有氯霉素抗体固定传感膜的纳米修饰印刷电极，所述免疫传感电极的制作方法如下：

1) 氯霉素单克隆抗体的制备：其制备方法为混合酸酐法，将合成的免疫原CAP-BSA 与等量福氏完全佐剂乳化后皮下注射，再选择血清效价高且特异性好的小鼠作为融合的脾细胞来源，通过与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合制备单克隆抗体；

2) 氯霉素抗体固定膜的制备：这是制备整个传感器的核心和关键，采用双酶系统来完成氧化还原反应过程中的电子传递；即用醋酸纤维素的丙酮溶液为基质液，制备成薄膜，用不同浓度的高碘酸钠、乙二胺和戊二醛处理后，加入步骤 1) 所述单克隆抗体溶液，并进行固定和聚合；

3) 药物酶标记的制备：氯霉素的酶标记制备采用重氮化法；

4) 丝网印刷电极的制作：将传统的较为复杂的 Clerk 氧电极改制成丝网印刷电极；

5) 纳米修饰电极的制作：通过反向微乳液法制备二茂铁—SiO₂ 纳米粒子并滴加于步骤 4) 所述印刷电极表面构成纳米修饰电极；

6) 免疫传感器电极（换能器）的制作：在所述纳米修饰电极贴上抗体传感膜以完成免疫传感器电极的制作；

7) 最后连接电信号输出、显示和数据处理、转化的电子元件系统，在测量时可以直接显示测得残留物的含量或浓度值。

2、根据权利要求 1 所述的用于检测氯霉素残留的免疫传感电极的制作方法，其特征是，所述步骤 2) 氯霉素抗体固定膜的制备中，在抗体传感膜经固定和聚合后，然后测定微型固定膜中抗体的亲和性和重复性；用丝素膜、聚乙烯碳酸酯膜和清蛋白-多聚甲醛膜法进行比较，选择出灵敏度高、响应快、传质好、线性范围宽的

单克隆抗体固定膜。

3、根据权利要求 1 所述的用于检测氯霉素残留的免疫传感电极的制作方法，其特征是，所述步骤 3) 药物酶标记的制备中，先将氯霉素用锌粉在稀盐酸条件下还原成含氨基的衍生物，在温度为 0°C 及 pH 为 1.0-2.0 条件下加入适量的亚硝酸钠使上述衍生物形成重氮化结构；再次调节合适的 pH 后，同相应浓度的酶进行偶联；用透析及层析（Sephadex-G50）程序纯化合成产物，以紫外扫描法测定合成产物中氯霉素与酶蛋白的结合比。

4、根据权利要求 1 所述的用于检测氯霉素残留的免疫传感电极的制作方法，其特征是，所述步骤 4) 丝网印刷电极的制作中，基底材料选用 PVC 片，在其上再贴上一块已刻制好电极形状的粘性塑料薄膜，用反复银镜法沉淀出均匀的导电底层，每次反应后再用三蒸水充分洗净以保证银膜具有足够的厚度及牢度；也可以直接用丝网印刷工艺来完成导电底层的制作；镀银完成后剥离粘性塑料薄膜，在其上覆盖硅酮胶覆盖此银膜以绝缘，保留两个端部，一端作为接线端，在另一端印刷上由石墨粉、醋酸纤维素、丙酮、环己酮调制成的电极浆液，待溶剂挥发干燥后作为工作电极，然后分别用 Ag/AgCl 导电液印制参比电极；以喷镀法制作超薄的铂片对电极。

5、根据权利要求 1 所述的用于检测氯霉素残留的免疫传感电极的制作方法，其特征是，所述步骤 5) 纳米修饰电极的制作中，先采用 Emmanuel 的反向微乳液法制备二茂铁---SiO₂ 纳米粒子，即将适量的环己烷、正己醇和聚乙二醇辛基苯基醚混合搅拌均匀，加入二茂铁及水溶液后再继续搅拌成稳定的水包油体系；在正硅酸四乙酯及氨水存在的条件下充分搅拌反应后，用丙酮分离出纳米颗粒，并分散在 PBS 溶液中，在修饰电极前加入壳聚糖溶液并超声混匀，吸取适量的上述纳米混悬液滴涂于 4) 所述印刷电极表面，制成纳米修饰电极。

6、一种使用权利要求 1 所述的免疫传感电极组装的生物传感器，包括：

一检测部分：包括自动定时、数据采集、显示、打印接口等部分，对恒电位仪

的给定电位、保护电位、输出电压、输出电流等参数进行自动测量、显示及打印；

一控制部分：为晶闸管型直流稳压电源的恒电位系统、数模转换器及程序存储器等关键部件；

一数据采集：采用模拟开关选送 A/D 芯片及 IC 数字变量，使读入的数据经软件处理后送 LED 显示和打印机打印；

一主机系统：检测部分采用单片机系统、E²PROM 芯片、扩展的程序存储器以及扩展的 I/O 接口；

一应用软件系统：包括时间采集、数制转换、数据处理、显示及打印程序；

其特征在于，还包括一免疫传感电极以及连接所述免疫传感电极的输出显示和微型化微分脉冲微电流显示计和微型数据采集卡组成的信号处理系统。

7、一种用权利要求 1 所述的用于检测氯霉素残留的免疫传感电极的制作方法，其特征在于，

1) 将氯霉素的单克隆抗体微型化膜固定于换能器表面；

2) 测定时在待测的样品中加入已知浓度经酶标记的氯霉素，待测抗原与标记抗原竞争性地结合电极上的抗体，使经洗涤后的传感电极与底物溶液接触，标记酶催化底物产生氧化电流；

3) 通过连接的电信号输出、显示和数据处理、转化的电子元件系统，直接显示测得残留物的含量或浓度值。

用于检测氯霉素残留的免疫传感电极的制作方法

技术领域

本发明涉及一种检测技术，具体涉及一种快速检测动物性食品中氯霉素残留的生物免疫测试技术。

背景技术

牛奶中含有人体生长发育和保持健康的全部营养素，而深受广大群众的喜爱，如上海的牛奶年人均消费达到了 25 公斤。然而在牛奶的安全问题中首要问题即是抗生素在牛奶中的残留。氯霉素是养殖业当中经常用到的抗生素，农户在出售牛奶时很少能按照国家的标准进行，这给消费者造成的很大的食品安全隐患。同时长时间的摄取抗生素会造成细菌的耐药性。目前对氯霉素的检测方法非常的繁琐，耗时且检测成本很高，同时还需要昂贵的仪器，很难进行推广。

当前国内外检测氯霉素的方法主要有：

①仪器分析法。如高效液相色谱、气相色谱、凝胶渗透色谱、气相色谱—质谱联用技术、液相色谱—质谱联用技术、毛细管区域电泳技术等。仪器分析法具有较高的精确性、准确性和敏感性，但因其流程繁琐、设备昂贵、检测速度慢等原因，很难实现现场检测和普及推广；

②免疫分析法。如荧光免疫分析、放射免疫检测、酶免疫技术。免疫分析技术灵敏度高（检测限可达 $10^{-9} \sim 10^{-12} \text{g}$ ）、特异性强及样品容量大、仪器化程度高等优点，近年来迅速发展，是目前最理想的残留筛选性分析方法之一。但开发过程投入资金多，时间长，样品前处理较复杂、假阳性率高，较难实现现场检测的要求；

③微生物检测法。该方法是测定抗生素残留的经典方法，具有前处理简单、经济、批量大等优点，但精确度、准确度和特异性不高。生物传感器技术被列为迈向 21 世纪五大医学检验技术之一。具有精确度、灵敏度高（检测下限可达 0.003ng/g ）、

特异性强、样品前处理简单（有的样品无须前处理）、响应和检测迅速（每个样品只需几十秒~几分钟），选择性好、操作简单、携带方便、能重复利用并能实现现场检测和在线检测等优点，有望开发成检测激素、抗生素或农药残留的最有效的新技术。国外已开发出检测黄曲霉素、甲醇、硝酸盐的传感器等，但用于检测氯霉素等抗生素的传感器的研究处于起步阶段。

经对现有专利技术文献的检索发现，专利申请号为 CN02137940.8，一种动物性食品中氯霉素酶免疫检测试剂盒及其检测方法，在此发明中通过 ELISA 的方法对肉制品当中的氯霉素残留进行检测，检测过程中涉及到 10 种试剂，使用过程较为繁琐。并且 ELISA 方法存在假阳性及假阴性较高、重复性不好等问题，在现场检测过程中需要其它的仪器进行读板，给快速检测带来了一定的麻烦。同时，通过搜索其它的相关资料发现氯霉素的检测现在较多的还是依靠液相及 ELISA 的方法，未有使用免疫传感器进行检测的报道；迫切需要开发研制简便、快速、高效、准确、微型、便携、适合现场和在线检测的检测仪器和检测工具。

发明内容

针对上述现有技术中存在的缺陷，本发明所要解决的技术问题是提供一种用于检测氯霉素残留的免疫传感电极的制作方法；所述免疫传感电极用于能精确、灵敏、价廉、响应和检测迅速、选择性好、操作简单、携带方便、能重复利用并能实现现场检测和在线检测的氯霉素残留的生物（免疫）传感器中。

本发明所要进一步解决的技术问题是提供一种操作简单、检测迅速、准确、灵敏的、能实现现场检测和在线检测的用免疫传感电极检测氯霉素残留的方法。

为了解决上述技术问题，本发明所提供的一种用于检测氯霉素残留的免疫传感电极的制作方法，其特征在于，所述免疫传感电极是贴有氯霉素抗体固定传感膜的纳米修饰印刷电极，所述免疫传感电极的制作方法如下：

1) 氯霉素单克隆抗体的制备：其制备方法为混合酸酐法，将合成的免疫原

CAP-BSA 与等量福氏完全佐剂乳化后皮下注射，再选择血清效价高且特异性的小鼠作为融合的脾细胞来源，通过与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合制备单克隆抗体；

2) 氯霉素抗体固定膜的制备：这是制备整个传感器的核心和关键，采用双酶系统来完成氧化还原反应过程中的电子传递；即用醋酸纤维素的丙酮溶液为基质液，制备成薄膜，用不同浓度的高碘酸钠、乙二胺和戊二醛处理后，加入 1) 所述单克隆抗体溶液，并进行固定和聚合；

3) 药物酶标记的制备：氯霉素的酶标记制备采用重氮化法；

4) 丝网印刷电极的制作：将传统的较为复杂的 Clerk 氧电极改制成丝网印刷电极；

5) 纳米修饰电极的制作：通过反向微乳液法制备二茂铁—SiO₂ 纳米粒子并滴加于 4) 所述印刷电极表面构成纳米修饰电极；

6) 免疫传感器电极（换能器）的制作：在所述纳米修饰电极贴上抗体传感膜以完成免疫传感器电极的制作；

7) 最后连接电信号输出、显示和数据处理、转化的电子元件系统，在测量时可以直接显示测得残留物的含量或浓度值。

所述步骤 2) 氯霉素抗体固定膜的制备中，在抗体传感膜经固定和聚合后，然后测定微型固定膜中抗体的亲和性和重复性；用丝素膜、聚乙烯碳酸酯膜和清蛋白-多聚甲醛膜法进行比较，选择出灵敏度高、响应快、传质好、线性范围宽的单克隆抗体固定膜。

所述步骤 3) 药物酶标记的制备中，先将氯霉素用锌粉在稀盐酸条件下还原成含氨基的衍生物，在温度为 0°C 及 pH 为 1.0-2.0 条件下加入适量的亚硝酸钠使上述衍生物形成重氮化结构；再次调节合适的 pH 后，同相应浓度的酶（本实验拟采用葡萄糖氧化酶或过氧化氢酶）进行偶联；用透析及层析（Sephadex-G50）程序纯化合成产物，以紫外扫描法测定合成产物中氯霉素与酶蛋白的结合比。

所述步骤 4) 丝网印刷电极的制作中, 基底材料选用 PVC 片, 在其上再贴上一块已刻制好电极形状的粘性塑料薄膜, 用反复银镜法沉淀出均匀的导电底层, 每次反应后再用三蒸水充分洗净以保证银膜具有足够的厚度及牢度; 也可以直接用丝网印刷工艺来完成导电底层的制作; 镀银完成后剥离粘性塑料薄膜, 在其上覆盖硅酮胶覆盖此银膜以绝缘, 保留两个端部, 一端作为接线端, 在另一端印刷上由石墨粉、醋酸纤维素、丙酮、环己酮调制成的电极浆液, 待溶剂挥发干燥后作为工作电极; 然后分别用 Ag/AgCl 导电液印制参比电极; 以喷镀法制作超薄的铂片对电极。

所述步骤 5) 纳米修饰电极的制作中, 先采用 Emmanuel 的反向微乳液法制备二茂铁---SiO₂ 纳米粒子, 即将适量的环己烷、正己醇和聚乙二醇辛基苯基醚混合搅拌均匀, 加入二茂铁及水溶液后再继续搅拌成稳定的水包油体系; 在正硅酸四乙酯及氨水存在的条件下充分搅拌反应后, 用丙酮分离出纳米颗粒, 并分散在 PBS 溶液中, 在修饰电极前加入壳聚糖溶液并超声混匀, 吸取适量的上述纳米混悬液滴涂于 4) 所述印刷电极表面, 制成纳米修饰电极。

为了进一步解决上述技术问题, 本发明提供一种使用免疫传感电极组装的生物传感器, 包括:

一检测部分: 包括自动定时、数据采集、显示、打印接口等部分, 对恒电位仪的给定电位、保护电位、输出电压、输出电流等参数进行自动测量、显示及打印;

一控制部分: 为晶闸管型直流稳压电源的恒电位系统、数模转换器及程序存储器等关键部件;

一数据采集: 采用模拟开关选送 A/D 芯片及 IC 数字变量, 使读入的数据经软件处理后送 LED 显示和打印机打印;

一主机系统: 检测部分采用单片机系统、E²PROM 芯片、扩展的程序存储器以及扩展的 I/O 接口;

一应用软件系统: 包括时间采集、数制转换、数据处理、显示及打印程序;

其特征在于, 还包括一免疫传感电极以及连接所述免疫传感电极的输出显示和

微型化微分脉冲微电流显示计和微型数据采集卡组成的信号处理系统。

为了解决上述技术问题，本发明提供一种用免疫传感电极检测氯霉素残留的方法，其特征在于，

1) 将氯霉素的单克隆抗体微型化膜（感受器，或分子识别物）固定于换能器表面；

2) 测定时在待测的样品中加入已知浓度经酶标记的氯霉素，待测抗原与标记抗原竞争性地结合电极上的抗体，使经洗涤后的传感电极与底物溶液接触，标记酶催化底物产生氧化电流；

3) 通过连接的电信号输出、显示和数据处理、转化的电子元件系统，直接显示测得残留物的含量或浓度值。

利用本发明提供的用于检测氯霉素残留的免疫传感电极的制作方法，由于免疫生物传感器是现代高科技的产物，是现代生物学、物理学、化学等多学科、多领域相交叉和结合的产物，具有灵敏度高、特异性强和样品前处理简单（有的样品无须前处理）等优点，同时还具有响应和检测迅速（每个样品只需几十秒~几分钟）、操作简单、所需设备成本低等特点。本发明的免疫传感器电极制作方法给免疫传感器真正应用于检测提供了便利，简化了传感器的构造，提高了便携性，使传感器在检测中的应用得以真正的实现；而且生物传感器分析技术的前景广阔、市场潜力巨大，是多领域应用研究开发的热点。本发明的有益效果：

1) 应用生化电子、生物免疫技术检测动物性食品中残留的抗生素，方便、精确、灵敏、价廉，并将纳米材料修饰丝网印刷电极应用于免疫传感器，简化了测试过程及提高了仪器的灵敏度；

2) 本发明的免疫生物传感器具有操作简便、携带方便，准确、特异、能实现现场检测及能重复利用等优点（如检测下限可达 0.3 ppb 以下，检测时间为 45 秒至 2 分钟）；

3) 本发明的免疫生物传感器具有通用性。在标记不同药物抗体的条件下特异、快速地检测相应的残留药物。为农产品中其他各类残留药物的系列传感器研制打下基础;

因此, 本发明的免疫生物传感器具有精确、灵敏、价廉、响应和检测迅速、选择性好、操作简单、携带方便、能重复利用并能实现现场检测和在线检测的氯霉素残留的特点。

附图说明

图 1 是本发明实施例电极工作原理示意图;

图 2 是本发明实施例电极的改制示意图;

图 3 是本发明实施例电子传递链示意图;

图 4 是本发明实施例抗原与酶标抗原与膜的竞争结合示意图;

图 5 是本发明实施例中免疫传感电极的制作方法示意框图。

具体实施方式

以下结合附图说明对本发明的实施例作进一步详细描述, 但本实施例并不用于限制本发明, 凡是采用本发明的相似结构、方法及其相似变化, 均应列入本发明的保护范围。

参见图 5 所示, 本发明实施例所提供的一种用于检测氯霉素残留的免疫传感电极的制作方法:

1、氯霉素单克隆抗体的制备: 其制备方法为混合酸酐法, 将合成的免疫原 CAP-BSA 与等量福氏完全佐剂乳化后皮下注射, 再选择血清效价高且特异性的小鼠作为融合的脾细胞来源, 通过与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合制备单克隆抗体; 具体如下:

所述混合酸酐法中: 首先制备氯霉素半琥珀酸酯, 即将氯霉素、琥珀酸酐、丙酮、吡啶按一定比例混合后 (1: 0.31: 2: 0.1), 搅拌溶解, 并在适宜的温度下回流数小时。蒸去丙酮后加入乙酸乙酯和稀盐酸, 用碱转溶后再加酸溶解, 水洗后再溶

于碳酸氢钾液及醋酸钡。80℃条件下搅拌反应，冷却及真空干燥后得单酯粗品。然后以二甲基甲酰胺为溶剂，在氯甲酸乙酯及正丁醇胺存在的条件下，将上述制得的单酯同卵清蛋白连接成全抗原。用紫外吸收光谱推算卵清蛋白与氯霉素的偶联率。经彻底透析后，再用红外光谱法检测合成物的特征谱线及峰形。具体步骤如下：

① 将氯霉素琥珀酸酐、丙酮、吡啶按 1: 0.31: 2: 0.1 的比例混合均匀后，于 58~ 60℃条件下回流 2 小时；

② 蒸去丙酮，加乙酸乙酯和稀盐酸的混合液 (2: 1, V/V)，振荡后弃去酸层，再用 10%NaHCO₃ 转溶，加入浓盐酸并调节 pH 到 3，放置 2 小时，等待析出糖浆状物；

③ 再次弃去酸层，用三蒸水洗涤后将析出物溶于 10%碳酸钾溶液中，并加入醋酸钡，在 80℃条件下加热搅拌 20 分钟；

④ 冷却后滤出沉淀得钡盐粗品，将此钡盐加蒸馏水加热溶解，再次冷却后用盐酸调 pH 到 3；

⑤ 滤出沉淀，蒸馏水洗，真空干燥后得单酯粗品。用乙醇活性炭脱色并再次过滤，经蒸馏水洗重结晶后得单酯纯品；

⑥ 牛血清白蛋白 (BSA) 与氯霉素单酯衍生物的偶联 (CAP-BSA)：取上述衍生物 384 mg，溶于 22.5 mL 的 N, N- 2 二甲基甲酰胺 (DMF) 中，置 4℃下 10 分钟后加入三正丁胺 212.5μL，混合后再加入氯甲酸乙酯 160μL，于 4℃磁力搅拌 30 分钟，以此为甲液；

⑦ 称取 BSA 113 g，溶于 45 mL 50% DMF 中，置冰浴上边搅拌边用 1M 的 NaOH 调 pH 到 8.0，此为乙液；

⑧ 随后将乙液倾入甲液中，在 4℃下搅拌反应 4 小时，用灭菌的 0.85% NaCl 在 4℃下透析，换水 16 次后冻干保存。用红外吸收光谱法推算 BSA 与氯霉素单酯衍生物的偶联率。

动物免疫试验：将合成的免疫原 CAP-BSA 与等量福氏完全佐剂乳化后皮下注射 6-8 周龄雄性 BALB/C 小鼠，剂量为 200μg/只。二免、三免及四免改为福氏不完全佐剂，每隔两周皮下加强免疫一次，剂量仍为 200μg/只。最后一次免疫后 7-10 天

采血检测抗体效价。

单克隆抗体的制备：

- ① 建立间接 ELISA 法检测血清抗体效价；
- ② 选择血清效价高及特异性好的小鼠于融合前 3 天腹腔注射加强免疫，不用佐剂；
- ③ 将 SP2/0 骨髓瘤细胞与免疫脾细胞在 50% 的 PEG 作用下融合。并用 HAT 选择性培养基进行悬浮培养（37℃，5%CO₂）；
- ④ 杂交瘤细胞的筛选与克隆化：经 2-3 次检测均为阳性的细胞采用有限稀释法进行亚克隆培养，同时把阳性细胞扩大培养并及时冻存；
- ⑤ 单克隆抗体的生产及效价鉴定：用诱生腹水法制备大量的单抗，并用已建立好的间接 ELISA 法测定效价；
- ⑥ 单克隆抗体性质的鉴定：主要是鉴定单抗分子量、亚型、染色体、单抗亲和力及特异性。

2、**氯霉素抗体固定膜的制备**：这是制备整个传感器的核心和关键，采用双酶系统来完成氧化还原反应过程中的电子传递（参见图 1 所示）；具体如下：

用 5%醋酸纤维素的丙酮溶液为基质液，制备成 0.007mm—0.01mm 厚的薄膜，用不同浓度的高碘酸钠、乙二胺和戊二醛处理后，加入 1) 所述单克隆抗体溶液，并进行固定和聚合，然后测定微型固定膜中抗体的亲和性和重复性。在研制载体膜方面，可用丝素膜、聚乙烯碳酸酯膜和清蛋白-多聚甲醛膜法进行比较，选择出灵敏度高、响应快、传质好、线性范围宽的单克隆抗体固定膜。

为提高传感器的灵敏度，本发明欲采用双酶系统来完成氧化还原反应过程中的电子传递（参见图 3 所示）。在抗体膜制作程序中，将一定浓度的抗体及辣根过氧化物酶同时包被于纳米材料修饰电极表面，在竞争性反应时，酶标氯霉素与被检物中的氯霉素在竞争性结合过程中与感应器上的单克隆抗体结合后（参见图 4 所示），同已经包被的辣根过氧化物酶组成双酶传电子体系。

掺和法制备传感膜的具体方案如下：

- ① 将 15 克的乙酸纤维素溶解于 200mL 二氯甲烷与无水乙醇的混合液中 (V: V=4:1), 在 4℃ 条件下静置 4 小时, 使醋酸纤维素完全溶解;
- ② 在上述溶液中加入 30g 1,6-己二胺, 边加边搅拌, 使 1,6-己二胺完全溶解;
- ③ 逐滴加入 9.6mL 含有乙醇的戊二醛溶液 (25%戊二醛: 无水乙醇: 纯水的体积比为 1: 1: 1), 搅拌均匀, 8 层纱布过滤, 并减压抽去气泡;
- ④ 每次取上述反应液 10mL 倾倒在规格为 10cm×10cm 的方形玻璃模具上, 自然晾干成膜;
- ⑤ 将制得的传感膜切成直接为 8mm 的圆形小片, 并浸泡在的磷酸盐缓冲液中 (0.01M, pH7.0) 4℃ 冷藏待用;
- ⑥ 传感膜性能鉴定: 主要包括感观质量评定、活性测试、灵敏度测试及仪器测试;
- ⑦ 抗体在传感膜上的固定: 用戊二醛交联法将 1) 所述单克隆抗体共价固定于传感膜上;
- ⑧ 封闭及保存: 选择合适的封闭剂 (如高分子聚合物、脱脂奶粉、明胶) 等封闭传感膜上的活性基团。

3、药物酶标记的制备: 氯霉素的酶标记制备采用重氮化法: 具体如下:

即先将氯霉素用锌粉在稀盐酸条件下还原成含氨基的衍生物, 在温度为 0℃ 及 pH 为 1.0--2.0 条件下加入适量的亚硝酸钠使上述衍生物形成重氮化结构。再次调节合适的 pH 后, 同相应浓度的酶 (本实验拟采用葡萄糖氧化酶或过氧化氢酶) 进行偶联。用透析及层析 (Sephadex-G50) 程序纯化合成产物, 以紫外扫描法测定合成产物中氯霉素与酶蛋白的结合比。具体步骤如下 (以葡萄糖氧化酶为例):

- ① 称取氯霉素标准品 3.9mg, 加入 1mL 1 mol/L 的盐酸 3mL, 再加入锌粉 20mg, 于 80℃ 水浴中加热 15 分钟;
- ② 将上清液冷却到 0 至 5℃, 在 pH 1-2 的条件下逐滴加入加入含 10mgNaNO₂ 的水溶液 100mL, 操作时不要离开冰水复合物, 放置 30min 后, 加入 5 mL 氨基磺酸铵 (125mg), 直至无 N₂ 放出为止, 即得到重氮化的 CLB;
- ③ 将上述重氮化的氯霉素溶液 20mL 加入到 190mL 0.01mol/L 的 pH7.0 PBS 液

(含 0.1M NaCl, 1mM MgCl₂) 和 10 mL 含葡萄糖氧化酶 (GOD) 224.75mg 的混合物中, 充分混匀;

④ 用 1N 的 NaOH 调 pH 至 7.5 后, 4℃ 黑暗条件下放置过夜, 加入 280 mL 上述缓冲液;

⑤ 将上述溶液装入预先浸泡和洗净的透析袋中, 在 0.01mol/L 的 pH7.5 PBS 液中, 4℃ 黑暗条件下透析 3 天 (每隔 4 小时换一次 PBS 液)。再用 Sephadex-G50 进行柱层析纯化;

⑥ 收集并浓缩层析液, 与等体积甘油混合, -20℃ 储存;

⑦ 以紫外扫描法测定合成产物中氯霉素与酶蛋白的结合比, 并鉴定标记酶的活性。

4、丝网印刷电极的制作: 将传统的较为复杂的 Clerk 氧电极改制成丝网印刷电极 (参见图 2 所示); 具体如下:

参见图 2 所示, 本发明改变传统的结构较为繁杂的 Clerk 氧电极结构, 自行设计及制备丝网印刷电极来代替原有电极模式; 基底材料选用 PVC 片, 在其上再贴上一块已刻制好电极形状的粘性塑料薄膜, 用反复银镜法沉淀出均匀的导电底层, 每次反应后以用三蒸水充分洗净以保证银膜具有足够的厚度及牢度。也可以直接用丝网印刷工艺来完成导电底层的制作。镀银完成后剥离粘性塑料薄膜, 在其上覆盖硅酮胶覆盖此银膜以绝缘, 保留两个端部, 一端作为接线端, 在另一端印刷上由石墨粉、醋酸纤维素、丙酮、环己酮调制成的电极浆液, 待溶剂挥发干燥后作为工作电极。然后分别用 Ag/AgCl 导电液印制参比电极; 以喷镀法制作超薄的铂片对电极。丝网印刷电极制作的具体工艺流程如下:

① 电极基板的准备, 可选用高质量的聚氯乙烯板, 按照该材料的要求进行表面洁净化处理。

② 导电油墨的选择及准备: 在厚膜型印刷电路中主要需要导体浆料、电阻浆料和绝缘浆料, 在制作过程中要注意各种浆料的材质、粘度及膨胀系数等。在本项目研究中主要应用导电银浆、高纯碳粉浆及导电金浆。

③ 制作丝网印版, 严格按照实验设计的电极规格制作丝网模具, 材料选用尼

龙丝网。

④ 导体浆料丝网印刷，拟采用半自动丝网印刷机来印制电极；电极条由三部分组成，分别为电接触端、支路及工作电极端，各部分均由导电浆液印刷制得，浆料的厚度控制在 30-50 μm 之间；

⑤ 干燥，可在 80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下干燥处理 15-20 分钟；

⑥ 电阻浆料准备，选用商品化的标准电阻浆料，根据实验要求调整组分后备用；

⑦ 电阻浆料丝网印刷及电阻调整，印制程序基本同导体浆料的丝网印刷，按具体要求可重复印刷 2-3 次，并及时检查电阻和调整电阻；

⑧ 丝网印刷电极的质量检验，主要检查印刷电极的导电性、电极的均一性、稳定性。

5、**纳米修饰电极的制作**：通过反向微乳液法制备二茂铁— SiO_2 纳米粒子并滴加于 4) 所述印刷电极表面构成纳米修饰电极；具体如下：

先采用 Emmanuel 的反向微乳液法制备二茂铁- SiO_2 纳米粒子，即将适量的环己烷、正己醇和聚乙二醇辛基苯基醚混合搅拌均匀，加入二茂铁及水溶液后再继续搅拌成稳定的水包油体系；在正硅酸四乙酯及氨水存在的条件下充分搅拌反应后，用丙酮分离出纳米颗粒，并分散在 PBS 溶液中，在修饰电极前加入壳聚糖溶液并超声混匀，吸取适量的上述纳米混悬液滴涂于 4) 所述印刷电极表面，制成纳米修饰电极；具体步骤如下：

① 取 7.5mL 环己醇、1.8mL 正丁醇及 1.77mL 聚乙二醇辛基苯基醚，旋涡混匀 10 分钟。

② 在搅拌情况下缓慢地逐滴加入 400 μL 二茂铁甲醇液（二茂铁浓度为 $1.0 \times 10^{-2} \text{mol/L}$ ）及 100 μL 去离子水。

③ 在上述溶液中加入 100 μL 正硅酸四乙酯，室温下搅拌 30 分钟。

④ 缓慢加入 60 μL 的浓氨水启动聚合反应，在室温及黑暗条件下搅拌反应 24 小时。

⑤ 将上述反应产物——二茂铁- SiO_2 纳米颗粒用丙酮提取，6000 转/分离心分

离后进行超声处理。

⑥ 分别用乙醇及去离子水洗涤纳米离子数次，以除去二茂铁-SiO₂ 纳米颗粒表面的未反应的二茂铁及表面活性剂。最后得到淡黄色的纳米颗粒。

⑦ 将制得的纳米颗粒用超声法悬浮于 2mL 磷酸盐缓冲盐水中（PBS，pH 6.9, 0.01M）。

⑧ 将 100 μ L 含 10%壳聚糖的溶液与 1mL 含有二茂铁-SiO₂ 纳米颗粒的 PBS 液混合，使壳聚糖上的基团与纳米颗粒共价结合。

⑨ 取上述反应物用阵列法点于丝网印刷电极上，每个电极片上加样 4 μ L，自然晾干。

6、免疫传感器电极（换能器）的制作：在 5）所述纳米修饰电极贴上 2）所述抗体传感膜以完成免疫传感器电极的制作；

最后连接电信号输出、显示和数据处理、转化的电子元件系统，在测量时可以直接显示测得残留物的含量或浓度值。

本发明实施例中连接免疫传感电极的输出显示和数据处理系统的研制，安装微型化微分脉冲微电流显示计和微型数据采集卡组成信号处理系统；

本发明拟根据电磁耦合原理对微电流传感器进行设计，主要目的是为了减少外界干扰对微弱电流传感器测试的影响。在本发明的实验中主要设计电磁耦合单元及信号处理单元。

1) 微电流检测系统整体设计：内容主要涉及恒电位系统、基底补偿、I/V 变换、50Hz 陷波、低通滤波、电压放大及输出等。

2) 电磁耦合单元设计：电磁耦合单元的设计是微电流型传感器设计的核心，设计步骤主要包括以下三个部分：

① 传感器磁芯材料的选择：可选择高性能、高质量的坡莫合金。

② 磁芯长度 L 及截面积 S 设计：在准确计算磁芯内外径比的基础上，确定磁芯平均磁路长度及线圈匝数。

③ 耦合阻抗 Z 设计及二次匝数设计：在实验中可选择不同的匝数进行对比试

验，并用不同的定值电阻来测试电信号，使理想信号曲线与实际测试曲线吻合。

3) 测量系统的噪声抑制：主要选用低噪声高输入阻抗的 IC 器件，同时采用金属膜电阻来降低过量的噪声。

4) 传感器屏蔽设计：拟采用 2 层高导磁铁材料和坡莫合金多层屏蔽系统，使各层之间互相独立，各屏蔽层之间用聚四氟乙烯绝缘。

5) 信号调理单元设计：本项目研究拟采用超低噪声精密放大器，且要求电路板布线规则，信号线长度适宜，走线平直，每级放大倍数限制在 100 倍之内，同时加覆铜层以提高抗干扰能力。

6) 数据处理系统，拟采用 ZF-10 型数据采集卡对测试的电信号进行采集。

7) 微电流显示计的性能试验：主要分析输出电压-输入电流线性关系和输出-输出角差变化关系。

本发明实施例中使用免疫传感电极的生物传感器的组装：

将免疫传感换能器、恒电位系统、输出显示装置及单片机系统进行组装，研制成检测抗生素的便携式免疫传感器测试系统。生物传感器组装主要分为硬件组装及应用软件安装两大部分。组装部件的名称及要求如下：

1、检测部分：主要包括自动定时、数据采集、显示、打印接口等部分，对恒电位仪的给定电位、保护电位、输出电压、输出电流等参数进行自动测量、显示及打印。

2、控制部分：主要为晶闸管型直流稳压电源的恒电位系统、数模转换器及程序存储器等关键部件。

3、数据采集：采用模拟开关 CD4051 选送 12 位 A/D 芯片 ICL7109 数字变量，使读入的数据经软件处理后送 LED 显示和打印机打印。

4、主机系统：检测部分采用 8031 单片机系统、E²PROM 芯片及 2864 为扩展的程序存储器，8255 为扩展的 I/O 接口。

5、应用软件系统：包括时间采集、数制转换、数据处理、显示及打印程序。

本发明实施例中利用免疫传感电极检测氯霉素残留的方法：将氯霉素的单克隆抗体微型化膜（感受器，或分子识别物）固定于换能器表面，测定时在待测的样品

中加入已知浓度经酶标记的氯霉素，待测抗原与标记抗原竞争性地结合电极上的抗体（参见图 3 所示），使经洗涤后的传感电极与底物溶液接触，标记酶催化底物产生氧化电流，再通过连接的电信号输出、显示和数据处理、转化的电子元件系统，直接显示测得残留物的含量或浓度值。

1、抗体及抗体膜的制备、电极的修饰、缓冲液的配制及酶标抗原的合成与纯化等如前述。

2、氯霉素标准品的准备：将事先准备好的 0 μ g/L、0.1 μ g/L、0.3 μ g/L、0.9 μ g/L、2.7 μ g/L、8.1 μ g/L 的六个浓度的氯霉素标准品分别取 30 μ L 放入 6 个 1.5mL 的小离心管中，并做好标记，然后在每个小离心管中加入 30 μ L 的酶标抗原，充分混匀，即为检测所需的氯霉素的标准品溶液。

3、抗体测试膜的制备：分别取 30 μ L 上述配制好的氯霉素标准品加到不同的抗体酶膜上，密封，37 $^{\circ}$ C 条件下，孵育 30 分钟，蒸馏水冲洗。

4、准备 10mL 葡萄糖底物液。

5、将未贴上抗体酶膜的电极与换能器和输出显示系统相连后，在电极上滴加葡萄糖物液，进行循环伏安扫描，进至显示屏上的读数稳定。

6、用水清洗工作电极，然后将抗体酶膜贴于工作电极上，同样条件下扫描记录电流值作为基底值。再次清洗后的工作电极上分别贴上不同的抗体测试膜，进行扫描，记录得到的电流值。

7、以浓度为横坐标，相应的标准品的浓度为纵坐标，利用仪器自带功能绘制标准曲线。

8、样品中氯霉素的提取，取 5mL 牛奶与 20mL 乙酸乙酯混和，震荡 3 分钟，离心 10 分钟（15、3000g/m）取 4mL 上清液至 10mL 玻璃管中，用氮气在 50 度水浴中吹干，加入 1mL 异辛烷/三氯甲烷（2：3）混合液溶解残渣，加入 1mL 缓冲溶液，充分震荡混匀，离心 10 分钟（6000g/m），取上层水相 50 μ L 备用。

将提取的氯霉素样品溶液与等体积的酶标抗原充分混匀后，加到抗体酶膜上，37 $^{\circ}$ C 条件下，孵育 30 分钟，蒸馏水冲洗后，贴于工作电极上，与上述条件相同测量电流值，并根据标准曲线计算所得出的值即为样品中所含有的氯霉素浓度。

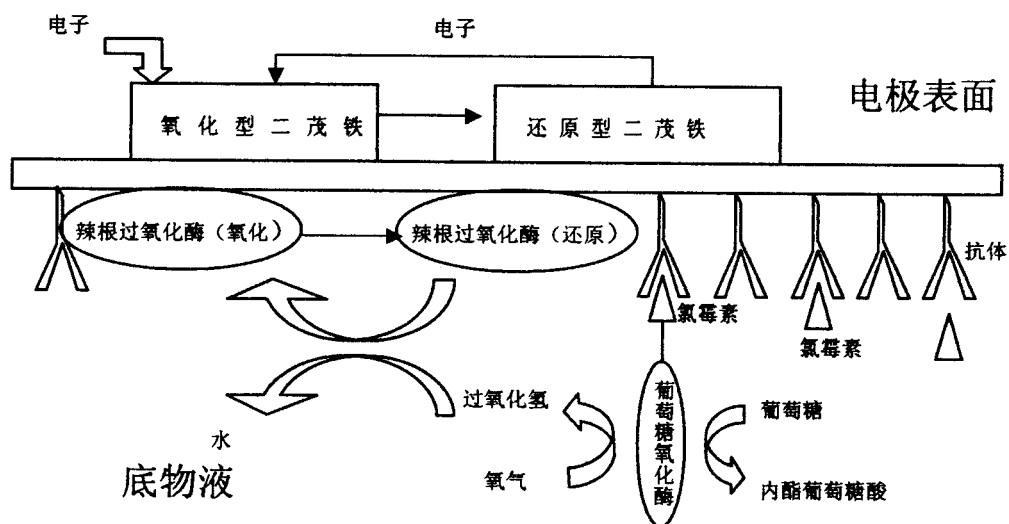


图 1

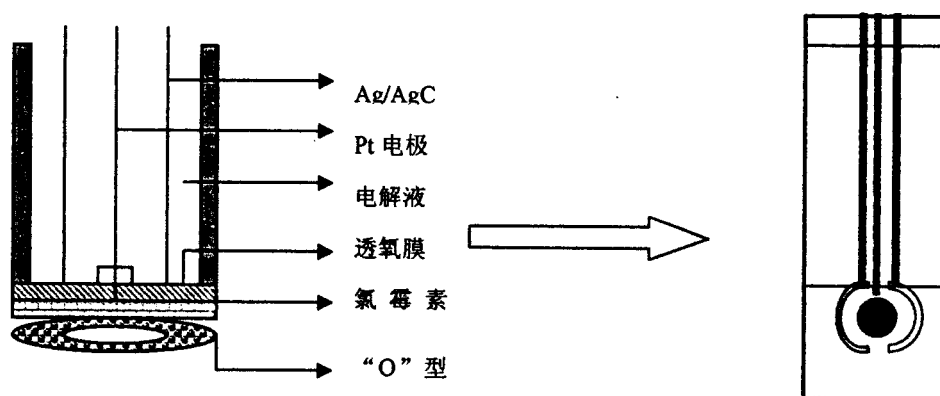


图 2

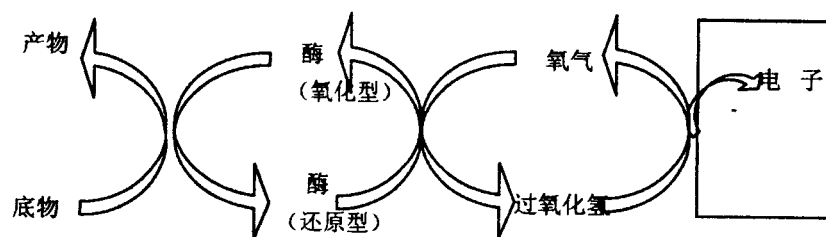


图 3

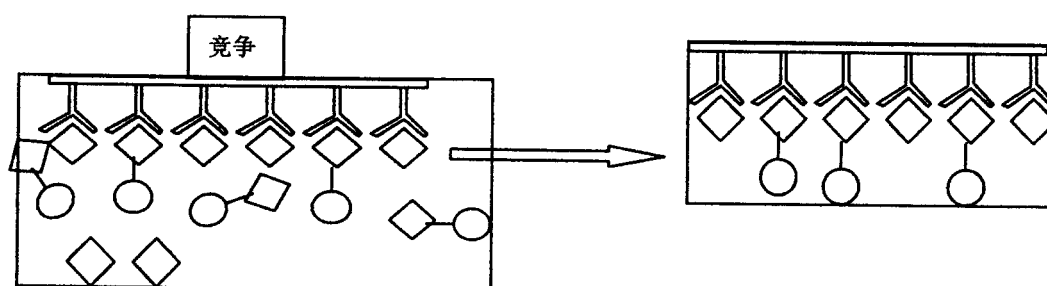


图 4

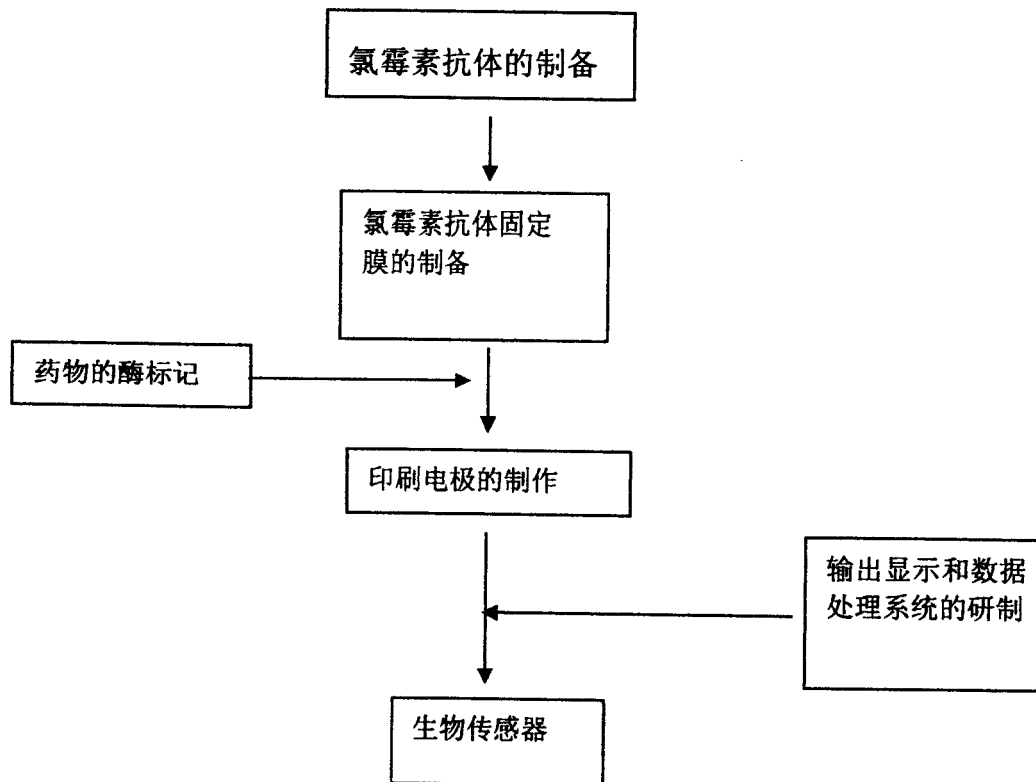


图 5

专利名称(译)	用于检测氯霉素残留的免疫传感电极的制作方法		
公开(公告)号	CN1967228A	公开(公告)日	2007-05-23
申请号	CN200510110541.0	申请日	2005-11-18
[标]申请(专利权)人(译)	柴春彦		
申请(专利权)人(译)	柴春彦		
当前申请(专利权)人(译)	柴春彦		
[标]发明人	柴春彦 刘国艳 陈永辉		
发明人	柴春彦 刘国艳 陈永辉		
IPC分类号	G01N27/327 G01N33/577 G01N33/531 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种用于检测氯霉素残留的免疫传感电极的制作方法，涉及检测技术领域；其特征在于，所述免疫传感电极是贴有氯霉素抗体固定传感膜的纳米修饰印刷电极，所述免疫传感电极的制作方法如下：1)氯霉素单克隆抗体的制备；2)氯霉素抗体固定膜的制备；3)药物酶标记的制备；4)丝网印刷电极的制作；5)纳米修饰电极的制作；6)免疫传感器电极的制作；7)最后连接电信号输出、显示和数据处理、转化的电子元件系统，在测量时可以直接显示测得残留物的含量或浓度值；使用所述免疫传感电极的生物传感器检测精确、灵敏、价廉、响应和检测迅速、选择性好、操作简单、携带方便、能重复利用并能实现现场检测和在线检测氯霉素残留的。

