[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)
G01N 27/327 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810031324.6

[43] 公开日 2008 年 10 月 1 日

[11] 公开号 CN 101275946A

[22] 申请日 2008.5.16

[21] 申请号 200810031324.6

[71] 申请人 湖南大学

地址 410082 湖南省长沙市岳麓山

[72] 发明人 楚 霞 蒋建晖 俞汝勤 沈国励 黄 勇

[74] 专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责任公司

代理人 马 强

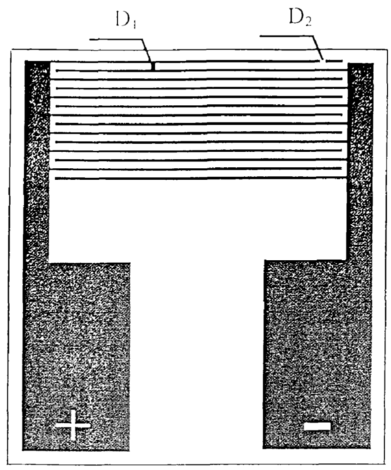
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种酶催化电导免疫传感器及其检测化学残留与毒素的方法

[57] 摘要

本发明提供了一种用于检测化学残留与生物毒素的微间隙电极阵列免疫传感器，包括微间隙阵列电极、硅烷化处理的电极基片、具有良好导电性的酶沉积物及基于电导检测的酶联免疫传感器及检测方法。 本发明利用微间隙电极阵列免疫传感器，对赭曲霉毒素 A 和植物生长调节剂吲哚乙酸进行检测，该方法灵敏度高，操作简单，仪器便携且价格低廉，可望为农产品和食品进出口检验与食品安全监督提供快速、实用、低成本、高灵敏、高通量的化学残留与生物毒素免疫检测技术。



1. 一种用于检测化学残留与毒素的酶催化电导免疫传感器，其特征是，它采用以下步骤制得：

（1）取常规光刻印刷法制作的微间隙阵列金电极做基片，它为叉指式双电极，正负电极均为两个梳形金电极，彼此交叉组成微间隙阵列金电极。梳形齿宽为1μm—100μm，间隙为1μm—100μm;；

（2）将所述微间隙阵列金电极进行硅烷化处理，过程是：

a.将所述微间隙阵列金电极用无水乙醇清洗三次，每次 0.8min—1.2min，

b.将该微间隙阵列金电极浸入1 M的NaOH溶液中28min—32min；然后超纯水清洗该微间隙阵列金电极三次，每次0.8min—1.2min，吹干；

c.将所述微间隙阵列金电极浸入含氨丙基三甲氧基硅烷 5%（体积百分数）的乙醇溶液中，室温下静置23小时—25小时；再用超纯水清洗三次后吹干，即得硅烷化的微间隙阵列金电极；

（3）免疫传感器的制备步骤：

a.将所述硅烷化的微间隙阵列金电极浸入质量分数为5%的戊二醛水溶液中，室温下静置1小时；

b.取出，用超纯水清洗三次；在所述电极上滴加30μL待测物与牛血清白蛋白或酪蛋白交联物溶液，室温下静置反应 1 小时；所述交联物浓度为100μg/mL，该交联物溶液是将牛血清白蛋白或酪蛋白交联物溶于0.01M、pH 7.4磷酸缓冲溶液而得；

c.用超纯水清洗三次,吹干，得到酶催化电导免疫传感器。

2、一种采用权利要求 1 所述酶催化电导免疫传感器检测化学残留与毒素的方法，其特征是，该方法采用以下步骤实现：

（1）将分析物样品或标样溶液、待测物的单抗溶液各20μL混合后滴加

在所述酶催化电导免疫传感器上，室温下静置反应 0.4 小时—0.6 小时；所用为 0.01M、pH 7.4 磷酸缓冲溶液；

（2）在所述传感器表面滴加 20μL 碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体溶液，抗体浓度为 10μg/mL，于室温下静置反应 0.45 小时—0.55 小时；所述抗体溶液是将溶碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体溶于 0.01M、pH 7.4 磷酸缓冲溶液而得；

（3）将所述传感器置于银沉积溶液中，室温下静置反应 8min—12min；再由该传感器获取与分析物浓度成负相关的电导或电阻信号；所述银沉积溶液为 1mM 抗坏血酸磷酸酯，2mM $AgNO_3$ 的 0.1M 甘氨酸-NaOH 缓冲溶液，pH9.0。

3、根据权利要求 2 所述检测化学残留与毒素的方法，其特征是，所述分析物与待测物为赭曲霉毒素 A 或植物生长调节剂吲哚乙酸等化学毒素与残留物。

一种酶催化电导免疫传感器及其检测化学残留与毒素的方法

技术领域

本发明属于生物分析领域，具体涉及一种基于微间隙阵列电极的免疫传感器，以及利用该免疫传感器检测农产品和食品中化学残留与毒素方法。

背景技术

在食品的生产、加工、贮存、流通过程中，由于受到农药、兽药、生物毒素等化学有机物的污染而造成的潜在食源性危害已成为人们关注的焦点，是影响农产品品质和食品安全的主要问题。目前检测食品中化学残留与生物毒素的方法主要有薄层色谱法、高效液相色谱法、质谱法、免疫亲和柱荧光法和酶联免疫吸附法等。这些检测方法中，有的灵敏度不高，分析结果重复性较差，易出现假阳性结果，有的样品处理烦琐，操作复杂，需要精密贵重仪器，不能满足现场快速筛查的需要。

发明内容

本发明的目的在于克服传统的化学残留与生物毒素检测技术灵敏度低、需精密仪器定量检测的不足，提出了一种酶催化电导免疫传感器及其检测化学残留与毒素的方法，具有高灵敏、快速、低成本的特点。

本发明的技术方案之一是，用于检测化学残留与毒素的所述酶催化电导免疫传感器采用以下步骤制得：

1、取常规光刻印刷法制作的微间隙阵列金电极做基片，它为叉指式双电极，正负电极均为两个梳形金电极，彼此交叉组成微间隙阵列金电极。梳形齿 D_1 宽为 1μm—100μm，间隙 D_2 为 1μm—100μm（参见图 1）；

2、将所述微间隙阵列金电极进行硅烷化处理，过程是：

a.将所述微间隙阵列金电极用无水乙醇清洗三次，每次 0.8min—

1.2min，

b.将该微间隙阵列金电极浸入 1 M 的 NaOH 溶液中 28min—32min；然后超纯水清洗该微间隙阵列金电极三次，每次 0.8min—1.2min，吹干；

c.将所述微间隙阵列金电极浸入含氨丙基三甲氧基硅烷 5%（体积百分数）的乙醇溶液中，室温下静置 23 小时—25 小时；再用超纯水清洗三次后吹干，即得硅烷化的微间隙阵列金电极；

以上过程可在微间隙阵列金电极间的基片上形成一氨基硅烷自组装单层。

3、免疫传感器的制备步骤：

a.将所述硅烷化的微间隙阵列金电极浸入质量分数为 5%的戊二醛水溶液中，室温下静置 1 小时；

b.取出，用超纯水清洗三次；在所述电极上滴加 30 μL 待测物与牛血清白蛋白（或酪蛋白）交联物溶液，室温下静置反应 1 小时；所述交联物浓度为 100μg/mL，溶于磷酸缓冲溶液（Na_3PO_4为 0.01M，pH 7.4）；这样使得交联物通过戊二醛交联剂固定在微间隙阵列金电极的基片上；

c.用超纯水清洗三次,吹干，得到酶催化电导免疫传感器；保存于 4℃备用。

本发明的技术方案之二是，采用所述酶催化电导免疫传感器检测化学残留与毒素的方法采用以下步骤实现：

1. 将分析物样品或标样溶液、待测物的单抗溶液各 20 μL 混合后滴加在所述酶催化电导免疫传感器上，室温下静置反应 0.4 小时—0.6 小时；所用为磷酸缓冲溶液（Na_3PO_4为 0.01M，pH 7.4）；

由此使样品中分析物与固定在传感器上的交联物竞争反应溶液中一定量的单抗，在传感器表面上形成交联物-单抗的免疫复合物；

2. 在所述传感器表面滴加 20μL 碱性磷酸酶标记的第二抗体溶液（即碱

性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体溶液，亦即酶标二抗），于室温下静置反应 0.45 小时—0.55 小时；所述第二抗体溶液是将溶碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体溶于 0.01M、pH 7.4 磷酸缓冲溶液而得；溶液中抗体浓度为 10μg/mL；

此过程中，酶标二抗通过与免疫复合物中的单抗发生反应而被捕获到传感器表面上；

3.将所述传感器置于银沉积溶液中，室温下静置反应 8min—12min；再由该传感器获取与分析物浓度成负相关的电导或电阻信号；所述银沉积溶液为 1mM 抗坏血酸磷酸酯，2mM $AgNO_3$ 的 0.1M 甘氨酸-NaOH 缓冲溶液，pH9.0；

所述分析物与待测物为赭曲霉毒素 A 或植物激素吲哚乙酸。

该步骤中，传感器表面上碱性磷酸酶催化其底物抗坏血酸磷酸酯水解产生还原剂抗坏血酸，后者将溶液中银离子还原成银金属并沉积在微间隙阵列金电极上，使微间隙阵列金电极正负电极部分导通，从而增大微间隙阵列金电极的电导（或降低电阻），获得与分析物浓度成负相关的电导（或电阻）信号。

上述步骤的技术原理是，采用分析物和固定化的交联物竞争反应一定量单抗的间接竞争免疫分析步骤，形成抗原-单抗免疫复合物；再利用第二抗体的酶标记催化沉积溶液中底物分解产生导电材料沉积在微间隙阵列金电极间，改变微间隙阵列金电极正负电极的电导（或电阻）；通过电导或电阻检测测定化学残留与生物毒素的浓度。

由以上可知，本发明为一种酶催化电导免疫传感器及其检测化学残留与毒素的方法，可望为农产品和食品进出口检验与食品安全监督提供快速、实用、低成本、高灵敏、高通量的免疫检测技术，其优点有：

1. 微间隙阵列电极制备简单，可大批量、低成本生产；
2. 检测步骤简单，检测时间在 1h 内，检测所需的仪器可用万用电表或自行研制的电阻量测装置，便携且价格低廉；
3. 本免疫传感器灵敏度高，可实现 0.1fg/mL 小分子的检测，且背景干

扰很小。

附图说明

图1是微间隙阵列电极图样(黑色区域为金膜,白色区域为裸露的基片)。掩膜图样与此相反（黑色区域为透明区，白色区域为不透明区）。它为叉指式双电极，正负电极均为两个梳形金电极，彼此通过微米级绝缘间隙交叉组成阵列式金电极。正负电极的梳形齿数 5 至 20 个，宽为 1μm—100μ。电极间隙为 1μm—100μm。

具体实施方式

实施例 1：基于微间隙阵列电极的免疫传感器检测赭曲霉毒素 A（OA）。

1．免疫传感器的制备：

取常规光刻印刷法制作的微间隙阵列金电极做基片，它为叉指式双电极，正负电极均为两个梳形金电极，彼此交叉组成微间隙阵列金电极。梳形齿宽为 1μm—100μm，间隙为 1μm—100μm;

将微间隙阵列金电极用无水乙醇（100％）清洗三次（每次 1min）后，将电极浸入 1 M 的 NaOH 溶液中 30min;再用超纯水清洗电极三次(每次 1min),吹干；然后，将电极浸入含氨丙基三甲氧基硅烷 5%（体积百分数）的乙醇溶液中，室温下静置 24 小时；用超纯水清洗三次后吹干，获得硅烷化的微间隙阵列金电极;

将硅烷化的微间隙阵列金电极浸入戊二醛水溶液（质量分数 5％），室温下静置 1 小时；用超纯水清洗三次后，在电极上滴加 30 μL 牛血清白蛋白与赭曲霉毒素交联物（BSA-OA）溶液（BSA-OA 浓度为 100μg/mL，溶于磷酸缓冲溶液，其中 Na_3PO_4 为 0.01M，pH 7.4），室温下静置反应 1 小时。用超纯水清洗三次后吹干备用。

2．OA 的检测:

将 OA 的标样溶液、单抗溶液（各 20μL，磷酸缓冲溶液，Na_3PO_4 为 0.01M，pH 7.4）混合后滴加在免疫传感器上，室温下静置反应 0.5 小时。然后在传

感器表面滴加 20μL 碱性磷酸酶标记的二抗（碱性磷酸酶标记羊抗鼠 IgG 抗体）溶液（酶标抗体浓度为 10μg/mL，磷酸缓冲溶液，Na_3PO_4为 0.01M，pH 7.4），于室温下静置反应 0.5 小时；将传感器置于银沉积溶液（1mM 抗坏血酸磷酸酯，2mM $AgNO_3$的 0.1M 甘氨酸-NaOH 缓冲溶液，pH9.0）中，室温下静置反应 10min；然后，将免疫传感器正负极分别与电化学工作站（CHI 760C）的工作电极与对电极（参比电极与对电极复合）连接，采用线性扫描伏安法在 0～50mV 电位范围检测，记录传感器电流随电位变化的响应曲线，并计算其斜率（即电导值）。根据不同浓度 OA 标样的电导值，获得与浓度成负相关的工作曲线。

使用所研制的免疫传感器如上法对 10 个可能含有 OA 的大豆、花生样品进行测定，根据样品的电导响应值与工作曲线，求得对应的 OA 浓度。与 ELISA 方法对照，所研制的免疫传感器的结果与 ELISA 的测定值的相对误差都在 6.7%以内。

实施例 2：基于微间隙阵列电极的免疫传感器检测植物激素吲哚乙酸（IAA）。

1. 免疫传感器的制备：

取常规光刻印刷法制作的微间隙阵列金电极做基片，它为叉指式双电极，正负电极均为两个梳形金电极，彼此交叉组成微间隙阵列金电极。梳形齿宽为 1μm—100μm，间隙为 1μm—100μm；

将微间隙阵列金电极用无水乙醇（100%）清洗三次（每次 1min）后，将电极浸入 1 M 的 NaOH 溶液中 30min。再用超纯水清洗电极三次（每次 1min），吹干。然后，将电极浸入含氨丙基三甲氧基硅烷 5%（体积百分数）的乙醇溶液中，室温下静置 24 小时；用超纯水清洗三次后吹干，获得硅烷化的微间隙阵列金电极；

将硅烷化的微间隙阵列金电极浸入戊二醛水溶液（质量分数 5%），室温下静置 1 小时；用超纯水清洗三次后，在电极上滴加 30μL 牛血清白蛋白与

吲哚乙酸交联物（BSA-IAA）（BSA-IAA 浓度为 100μg/mL，溶于磷酸缓冲溶液，其中 Na_3PO_4 为 0.01M，pH 7.4），室温下静置反应 1 小时；用超纯水清洗三次后吹干备用。

2. IAA 的检测：

将 IAA 的标样溶液、单抗溶液（各 20μL，磷酸缓冲溶液，Na_3PO_4 为 0.01M，pH 7.4）混合后滴加在免疫传感器上，室温下静置反应 0.5 小时；然后在传感器表面滴加 20μL 碱性磷酸酶标记的二抗（碱性磷酸酶标记羊抗鼠 IgG 抗体）溶液（酶标抗体浓度为 10μg/mL，溶于磷酸缓冲溶液，其中 Na_3PO_4 为 0.01M，pH 7.4），于室温下静置反应 0.5 小时；将传感器置于银沉积溶液（1mM 抗坏血酸磷酸酯，2mM $AgNO_3$ 的 0.1M 甘氨酸-NaOH 缓冲溶液，pH9.0）中，室温下静置反应 10min；按照实施案例 1 的方法测定传感器的电导，得到工作曲线，传感器的电导在 0.1fg/mL～100pg/mL 范围内与 IAA 浓度呈负线性相关。

使用所研制的免疫传感器如上法对 10 个可能含有 IAA 的植物样品进行测定，根据样品的电导响应值与工作曲线，求得对应的 IAA 浓度。与 ELISA 方法对照，所研制的免疫传感器的结果与 ELISA 的测定值的相对误差都在 5.8%以内。

微间隙阵列金电极的制备采用传统（常规）的光刻印刷方法：在清洁的 4×6mm 的基片（石英、普通陶瓷或玻璃材料）上用甩胶机上涂上一层光刻胶（正胶），转速 3000r/min， 80℃烘 15min。在光刻机中将掩膜版与基片对准，紫外曝光将掩膜版上的图形转移到基片上。显影去掉曝光部分的光刻胶，氮气流吹干后，采用真空溅射在基片上依次喷涂 30nm 厚的 Ti 层和 120nm 厚的 Au 层。然后用有机溶剂氯仿除去基片上的感光胶后，即可得到微间隙阵列金电极。其中单个金带宽度及相邻两根金带之间的宽度可根据需要，在 1～100 μm 之间调整。

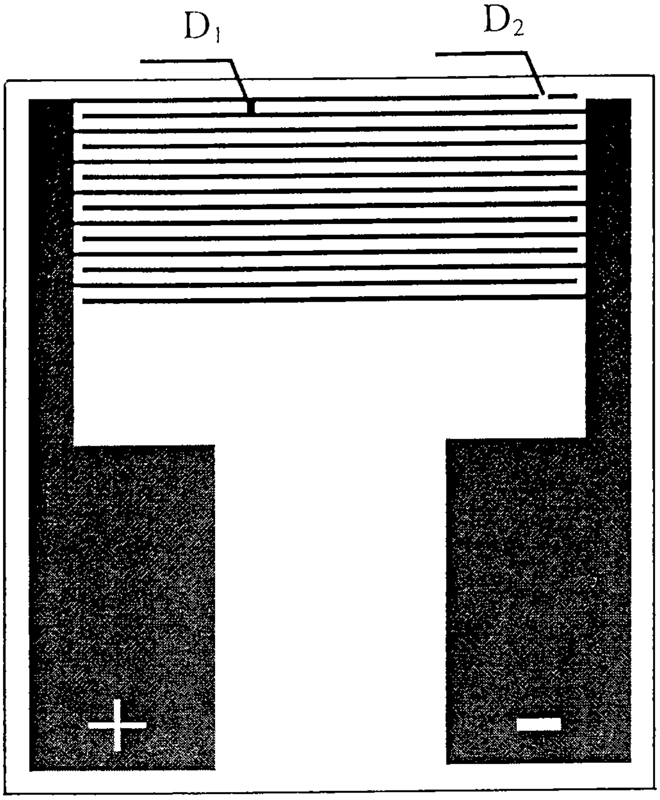


图 1

专利名称(译)	一种酶催化电导免疫传感器及其检测化学残留与毒素的方法		
公开(公告)号	CN101275946A	公开(公告)日	2008-10-01
申请号	CN200810031324.6	申请日	2008-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	湖南大学		
申请(专利权)人(译)	湖南大学		
当前申请(专利权)人(译)	湖南大学		
[标]发明人	楚霞 蒋建晖 俞汝勤 沈国励 黄勇		
发明人	楚霞 蒋建晖 俞汝勤 沈国励 黄勇		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N27/327		
代理人(译)	马强		
其他公开文献	CN101275946B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检测化学残留与生物毒素的微间隙电极阵列免疫传感器，包括微间隙阵列电极、硅烷化处理的电极基片、具有良好导电性的酶沉积物及基于电导检测的酶联免疫传感器及检测方法。本发明利用微间隙电极阵列免疫传感器，对赭曲霉毒素A和植物生长调节剂吲哚乙酸进行检测，该方法灵敏度高，操作简单，仪器便携且价格低廉，可望为农产品和食品进出口检验与食品安全监督提供快速、实用、低成本、高灵敏、高通量的化学残留与生物毒素免疫检测技术。