



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101915792 A

(43) 申请公布日 2010.12.15

(21) 申请号 201010252374.4

(22) 申请日 2010.08.13

(71) 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 王正武 米芹

(74) 专利代理机构 上海交达专利事务所 31201

代理人 王锡麟 王桂忠

(51) Int. Cl.

G01N 27/26 (2006.01)

G01N 27/38 (2006.01)

G01N 27/48 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

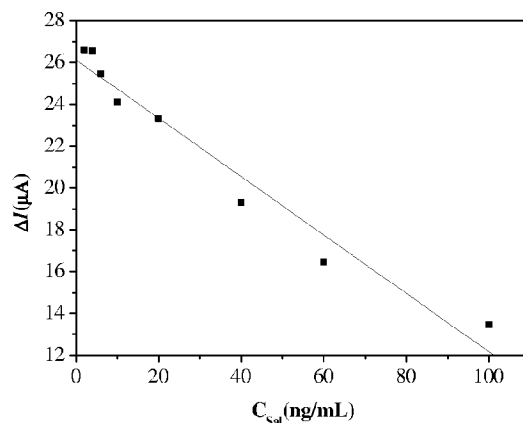
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

用于快速检测沙丁胺醇的电化学免疫传感器的制备方法

(57) 摘要

一种化学检测技术领域的用于快速检测沙丁胺醇的电化学免疫传感器的制备方法,通过用碳纳米管-聚硫堇-纳米金依次修饰玻碳电极,再通过自组装方法得到电化学免疫传感器。本发明能够制备得到灵敏度高,稳定性好,现场快速检测沙丁胺醇的电化学免疫传感器。



1. 一种用于快速检测沙丁胺醇的电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,通过用碳纳米管-聚硫堇-纳米金依次修饰玻碳电极,再通过自组装方法得到电化学免疫传感器。

2. 根据权利要求1所述的用于快速检测沙丁胺醇的电化学免疫传感器的制备方法,其特征是,所述的玻碳电极经过清洗酸洗处理。

3. 根据权利要求1或2所述的用于快速检测沙丁胺醇的电化学免疫传感器的制备方法,其特征是,所述的清洗酸洗处理是指:将玻碳电极在麂皮上用 Al_2O_3 粉抛光至镜面,用蒸馏水冲洗,再用超声波清洗10分钟~30分钟;将清洗后的玻碳电极依次放入体积比为1:1的硝酸、丙酮溶液中各浸泡3分钟~15分钟,然后用蒸馏水冲洗电极;将电极在红外灯下烘干。

4. 根据权利要求1所述的用于快速检测沙丁胺醇的电化学免疫传感器的制备方法,其特征是,所述的纳米金胶溶液的制备方法为:量取氯金酸溶液放在烧瓶中,在微波合成仪内加热至沸腾,加入一定量新鲜配制的1%柠檬酸三钠水溶液,强烈搅拌并保持微沸状态,观察溶液颜色由无色到深紫色,再到紫红色,约5min后断开电源、自然冷却。

5. 根据权利要求1所述的用于快速检测沙丁胺醇的电化学免疫传感器的制备方法,其特征是,所述的碳纳米管悬液的制备方法为:取5mg MWCNTs-COOH加入5mL二次蒸馏水中混合超声振荡20min至黑色均匀溶液。

6. 根据权利要求1所述的用于快速检测沙丁胺醇的电化学免疫传感器的制备方法,其特征是,所述的用碳纳米管-聚硫堇-纳米金依次修饰玻碳电极是指:

首先用微量取样器移取MWCNTs-COOH分散液均匀滴加到玻碳电极表面,红外灯下烘干,制成碳纳米管修饰玻碳电极;

然后将碳纳米管修饰玻碳电极浸入到含4mmol/L硫堇的4.4mmol/L乙酸溶液中,于-0.4~1.4V区间以100mV/s的扫描速度,以循环伏安法扫描30~35圈,电聚合硫堇于碳纳米管-玻碳电极表面,取出后用二次蒸馏水小心冲洗,红外灯下烘干,制成碳纳米管-聚硫堇修饰玻碳电极;

最后将碳纳米管-聚硫堇修饰玻碳电极浸入到纳米金胶体溶液中,2h后取出,二次蒸馏水小心冲洗,空气中自然干燥,制成碳纳米管-聚硫堇-纳米金修饰玻碳电极。

7. 根据权利要求1所述的用于快速检测沙丁胺醇的电化学免疫传感器的制备方法,其特征是,所述的自组装方法是指:将修饰过的玻碳电极在含有沙丁胺醇单克隆抗体的磷酸盐缓冲液溶液中进行自组装,得到稳定性高的固定沙丁胺醇抗体的免疫电化学传感器。

8. 根据权利要求1或7所述的用于快速检测沙丁胺醇的电化学免疫传感器的制备方法,其特征是,所述的自组装方法的具体步骤为:将步骤三中制备的碳纳米管-聚硫堇-纳米金修饰玻碳电极在4℃下,浸入含有沙丁胺醇单克隆抗体的磷酸盐缓冲液溶液中进行自组装,12h后取出,4℃自然干燥;再滴涂1%的BSA溶液,4℃自然干燥,得到稳定性高的固定沙丁胺醇抗体的免疫电化学传感器,储存于4℃冰箱。

用于快速检测沙丁胺醇的电化学免疫传感器的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及的是一种化学检测技术领域的方法,具体是一种用于快速检测沙丁胺醇的电化学免疫传感器的制备方法。

背景技术

[0002] 沙丁胺醇属于 β -受体兴奋剂,能使动物体内的营养成分由脂肪向肌肉转移,表现出营养再分配效应,进而调控动物体的物质代谢,增强脂肪分解,促进蛋白质合成,显著提高胴体瘦肉率和饲料报酬。但是,人类食用了残留有沙丁胺醇的动物食品后,会出现不同程度的中毒现象,它们的滥用及在动物性食品中的残留严重危害着人们的健康和生命安全,并严重影响了我国畜禽产品的出口贸易。所以我国和欧盟以及世界上大多数国家都明文禁止沙丁胺醇用作饲料添加剂。

[0003] 目前关于检测沙丁胺醇残留的方法主要有色谱法、色谱质谱联用、免疫分析法、微生物法等,但上述方法存在检测成本高、操作过程繁琐、检测耗时长、不适用现场大通量筛检等缺点。本发明通过将碳纳米管/纳米金复合纳米材料通过聚硫堇化学组装于玻碳电极表面,以此传感界面固定沙丁胺醇抗体,利用电化学传感器检测和免疫学技术的高特异性和高灵敏度,发展一种用于检测沙丁胺醇的纳米电化学免疫传感器,可快速检测食品和环境中的沙丁胺醇残留。

[0004] 碳纳米管是一种具有一维纳米管状结构的新型纳米材料,它独特的电子特性和表面微结构,能很好地促进生物电活性分子的电子传递,并易于固定生物大分子并能保持其活性。纳米金颗粒具有比表面积大、生物亲和性高等优点,并具有导电作用和加快蛋白质与电极之间的直接电子转移,适合于构建无需电子媒介物质的直接电化学生物传感器。目前,碳纳米管和纳米金作为电活性材料及载体已被广泛应用于电化学和生物传感器中,但鲜有碳纳米管和纳米金复合物用于电化学免疫传感器。

发明内容

[0005] 本发明针对现有技术存在的上述不足,提供一种用于快速检测沙丁胺醇的电化学免疫传感器的制备方法,制备得到灵敏度高,稳定性好,现场快速检测沙丁胺醇的电化学免疫传感器。

[0006] 本发明是通过以下技术方案实现的:本发明通过用碳纳米管-聚硫堇-纳米金依次修饰玻碳电极,再通过自组装方法得到电化学免疫传感器。

[0007] 所述的玻碳电极经过清洗酸洗处理;

[0008] 所述的清洗酸洗处理是指:将玻碳电极在麂皮上用 Al_2O_3 粉抛光至镜面,用蒸馏水冲洗,再用超声波清洗 10 分钟~30 分钟;将清洗后的玻碳电极依次放入体积比为 1:1 的硝酸、丙酮溶液中各浸泡 3 分钟~15 分钟,然后用蒸馏水冲洗电极;将电极在红外灯下烘干。

[0009] 所述的纳米金胶溶液的制备方法为:量取氯金酸溶液放在烧瓶中,在微波合成仪

内加热至沸腾,加入一定量新鲜配制的 1% 柠檬酸三钠水溶液,强烈搅拌并保持微沸状态,观察溶液颜色由无色到深紫色,再到紫红色,约 5min 后断开电源、自然冷却。配制好的溶胶置于冰箱内在 4℃ 保存(所得胶体金呈深红色,电子显微镜下观察平均直径约 20nm)。

[0010] 所述的氯金酸溶液取量为 50mL,浓度为 0.01%。

[0011] 所述的微波合成仪使用条件为 400W,100℃。

[0012] 所述的 1% 柠檬酸三钠水溶液取量为 3mL。

[0013] 所述的碳纳米管悬液的制备方法为:取 5mg MWCNTs-COOH 加入 5mL 二次蒸馏水中混合超声振荡 20min 至黑色均匀溶液。

[0014] 所述的用碳纳米管-聚硫堇-纳米金依次修饰玻碳电极是指:

[0015] 首先用微量取样器移取 MWCNTs-COOH 分散液均匀滴加到玻碳电极表面,红外灯下烘干,制成碳纳米管修饰玻碳电极;

[0016] 然后将碳纳米管修饰玻碳电极浸入到含 4mmol/L 硫堇的 4.4mol/L 乙酸溶液中,于 -0.4 ~ 1.4V 区间以 100mV/s 的扫描速度,以循环伏安法扫描 30 ~ 35 圈,电聚合硫堇于碳纳米管-玻碳电极表面,取出后用二次蒸馏水小心冲洗,红外灯下烘干,制成碳纳米管-聚硫堇修饰玻碳电极;

[0017] 最后将碳纳米管-聚硫堇修饰玻碳电极浸入到纳米金胶体溶液中,2h 后取出,二次蒸馏水小心冲洗,空气中自然干燥,制成碳纳米管-聚硫堇-纳米金修饰玻碳电极。

[0018] 所述的自组装方法是指:将修饰过的玻碳电极在含有沙丁胺醇单克隆抗体的 PBS(磷酸盐缓冲液)溶液中进行自组装,得到稳定性高的固定沙丁胺醇抗体的免疫电化学传感器,具体是:将步骤三中制备的碳纳米管-聚硫堇-纳米金修饰玻碳电极在 4℃ 下,浸入含有沙丁胺醇单克隆抗体的 PBS(磷酸盐缓冲液)溶液中进行自组装,12h 后取出,4℃ 自然干燥;再滴涂 1% 的 BSA 溶液,4℃ 自然干燥,得到稳定性高的固定沙丁胺醇抗体的免疫电化学传感器,储存于 4℃ 冰箱。

[0019] 本发明有如下的有益效果:由于碳纳米管和纳米金颗粒能很好地促进生物电活性分子的电子传递,并易于固定生物大分子并能保持其活性,沙丁胺醇有效地固定在碳纳米管-聚硫堇-纳米金修饰玻碳电极表面,并保持较高活性。因此,本发明的固定沙丁胺醇抗体的免疫电化学传感器可以在常温下,稳定而迅速地检测残留沙丁胺醇的浓度。

附图说明

[0020] 图 1 为碳纳米管-聚硫堇-纳米金修饰玻碳电极的扫描电镜图像。

[0021] 图 2 为免疫传感器修饰过程的循环伏安表征图。

[0022] 图 3 为免疫传感器对沙丁胺醇的线性响应图。

具体实施方式

[0023] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0024] 实施例 1

[0025] 步骤一,电极的预处理:将玻碳电极在麂皮上用 Al_2O_3 粉抛光至镜面,用蒸馏水冲

洗,再用超声波清洗 10 分钟;将清洗后的玻碳电极依次放入体积比为 1 : 1 的硝酸、丙酮溶液中各浸泡 15 分钟,然后用蒸馏水冲洗电极;将电极在红外灯下烘干。

[0026] 步骤二,纳米金胶溶液和碳纳米管悬液的制备:量取 0.01% 氯金酸溶液 50mL 放在烧瓶中,在微波合成仪(400W,100℃)内加热至沸腾,加入 3mL 新鲜配制的 1% 柠檬酸三钠水溶液,强烈搅拌并保持微沸状态,观察溶液颜色由无色到深紫色,再到紫红色,约 5min 后断开电源、自然冷却,配制好的溶胶置于冰箱内在 4℃ 保存(所得胶体金呈深红色,电子显微镜下观察平均直径约 20nm);取 5mg MWCNTs-COOH 加入 5mL 二次蒸馏水中混合超声振荡 20min 至黑色均匀溶液,制成碳纳米管悬液。

[0027] 步骤三,碳纳米管-聚硫堇-纳米金修饰玻碳电极:用微量取样器移取 5 μ L 的 MWCNTs-COOH 分散液均匀滴加到经步骤一预处理过的玻碳电极表面,红外灯下烘干,制成碳纳米管修饰玻碳电极;再浸入到含 4mmol/L 硫堇的 4.4mol/L 乙酸溶液中,于 -0.4 ~ 1.4V 区间以 100mV/s 的扫描速度,以循环伏安法扫描 30 圈,电聚合硫堇于碳纳米管-玻碳电极表面,取出后用二次蒸馏水小心冲洗,红外灯下烘干,制成碳纳米管-聚硫堇修饰玻碳电极;再浸入到纳米金胶体溶液中,2h 后取出,二次蒸馏水小心冲洗,空气中自然干燥,制成碳纳米管-聚硫堇-纳米金修饰玻碳电极。

[0028] 步骤四,免疫传感器的制备:将步骤三中制备的碳纳米管-聚硫堇-纳米金修饰玻碳电极在 4℃ 下,浸入含有沙丁胺醇单克隆抗体的磷酸盐缓冲液溶液中进行自组装,12h 后取出,4℃ 自然干燥;再滴涂 1% 的 BSA 溶液,4℃ 自然干燥,得到稳定性高的固定沙丁胺醇抗体的免疫电化学传感器,储存于 4℃ 冰箱。

[0029] 步骤五,用制备好的免疫传感器检测沙丁胺醇:室温下,取 5mL pH6.0 的 0.1M HAc-NaAc 缓冲液置于测试杯中,将不同浓度的沙丁胺醇与固定浓度的沙丁胺醇-BSA 溶液混合,沙丁胺醇与沙丁胺醇-BSA 竞争性地结合电极上的抗体,反应前后电流发生变化,在 -0.5 ~ 0.1V 区间,以 50mV/s 的扫描速度,用循环伏安法记录电流变化大小,间接反映沙丁胺醇的浓度值。

[0030] 图 1 可以看出碳纳米管较好的分散于电极表面(图 1A),与硫堇结合后,其外壁明显变厚或不光滑借助硫堇的氨基与纳米金的亲和作用,纳米金均匀分散于碳纳米管-聚硫堇膜上(图 1B)。

[0031] 图 2 可以看出修饰电极每一步的循环伏安图。在 5mL pH6.0 的 0.1M HAc-NaAc 缓冲液中,在 -0.5 ~ 0.1V 区间,以 50mV/s 的扫描速度,用循环伏安法记录电流变化大小,裸玻碳电极(曲线 a)和碳纳米管修饰玻碳电极(曲线 b)响应曲线平滑,未见波峰,但碳纳米管修饰玻碳电极响应曲线较裸电极强,其原因是碳纳米管有增加电极表面积和电子传递作用;碳纳米管-聚硫堇修饰玻碳电极(曲线 c)可见对称氧化还原峰,说明硫堇稳定修饰于碳纳米管-玻碳电极表面;纳米金-聚硫堇-玻碳电极修饰玻碳电极(曲线 d)响应曲线中,波峰较曲线 c 增大,说明纳米金有增强电子传递作用;在修饰电极吸附沙丁胺醇抗体后(曲线 e),波峰明显降低,其原因是抗体分子阻碍了电极表面的电子传递;同样,在滴涂 BSA 后波峰较前降低(曲线 f);免疫传感器与沙丁胺醇及沙丁胺醇-BSA 共孵育后,波峰进一步降低(曲线 g),其原因是沙丁胺醇-BSA 与沙丁胺醇竞争性结合沙丁胺醇抗体,由于位阻作用,影响了电极表面的电子传递。

[0032] 图 3 中,不同浓度的沙丁胺醇与固定浓度的沙丁胺醇-BSA 溶液混合,沙丁胺醇与

沙丁胺醇-BSA 竞争性地结合电极上的抗体,反应前后电流发生变化,在 5mL pH6.0 的 0.1M HAc-NaAc 缓冲液中,在 -0.5~0.1V 区间,以 50mV/s 的扫描速度,用循环伏安法记录电流变化大小(反应前电流记为 I_0 ,反应后记为 I ,电流变化为 $\Delta I = I_0 - I$),在 2-100ng/mL 范围内成线性关系,相关系数达 0.9798。同时,该固定沙丁胺醇抗体的免疫电化学传感器对沙丁胺醇的检测限达 0.32ng/mL。

[0033] 实施例 2

[0034] 步骤一,电极的预处理:将玻碳电极在麂皮上抛光及蒸馏水冲洗过程同实施例 1,再用超声波清洗 20 分钟;将清洗后的玻碳电极依次放入体积比为 1:1 的硝酸、丙酮溶液中各浸泡 10 分钟,然后用蒸馏水冲洗电极;将电极在红外灯下烘干。

[0035] 步骤二,纳米金胶溶液和碳纳米管悬液的制备:量取 0.01% 氯金酸溶液 50mL 放在烧瓶中,在微波合成仪(400W,100℃)内加热至沸腾,加入 5mL 新鲜配制的 1% 柠檬酸三钠水溶液,强烈搅拌并保持微沸状态,观察溶液颜色由无色到深紫色,再到紫红色,约 5min 后断开电源、自然冷却,配制好的溶胶置于冰箱内在 4℃ 保存(所得胶体金呈深红色,电子显微镜下观察平均直径约 18nm);取 5mg MWCNTs-COOH 加入 5mL 二次蒸馏水中混合超声振荡 20min 至黑色均匀溶液,制成碳纳米管悬液。

[0036] 步骤三,碳纳米管-聚硫堇-纳米金修饰玻碳电极:用微量取样器移取 6 μ L 的 MWCNTs-COOH 分散液均匀滴加到经步骤一预处理过的玻碳电极表面,红外灯下烘干,制成碳纳米管修饰玻碳电极;再浸入到含 4mmol/L 硫堇的 4.4mol/L 乙酸溶液中,于 -0.4~1.4V 区间以 100mV/s 的扫描速度,以循环伏安法扫描 30 圈,电聚合硫堇于碳纳米管-玻碳电极表面,取出后用二次蒸馏水小心冲洗,红外灯下烘干,制成碳纳米管-聚硫堇修饰玻碳电极;再浸入到纳米金胶体溶液中,3h 后取出,二次蒸馏水小心冲洗,空气中自然干燥,制成碳纳米管-聚硫堇-纳米金修饰玻碳电极。

[0037] 步骤四,免疫传感器的制备:将步骤三中制备的碳纳米管-聚硫堇-纳米金修饰玻碳电极在 4℃ 下,浸入含有沙丁胺醇单克隆抗体的磷酸盐缓冲液溶液中进行自组装,12h 后取出,4℃ 自然干燥;再滴涂 1% 的 BSA 溶液,4℃ 自然干燥,得到稳定性高的固定沙丁胺醇抗体的免疫电化学传感器,储存于 4℃ 冰箱。

[0038] 步骤五,用制备好的免疫传感器检测沙丁胺醇:室温下,取 6mL pH6.0 的 0.1M HAc-NaAc 缓冲液置于测试杯中,将不同浓度的沙丁胺醇与固定浓度的沙丁胺醇-BSA 溶液混合,沙丁胺醇与沙丁胺醇-BSA 竞争性地结合电极上的抗体,反应前后电流发生变化,在 -0.5~0.1V 区间,用微分脉冲伏安法(DPV 法)记录氧化峰电流变化大小,间接反映沙丁胺醇的浓度值。该方法的调试参数为:脉冲幅度为 50mV,脉冲宽度为 20ms,脉冲期为 200ms,扫描速度为 50mV/s。测试结果表明,该免疫电化学传感器对沙丁胺醇的检测限达 0.4ng/mL,在 6-80ng/mL 范围内成线性关系。

[0039] 实施例 3

[0040] 步骤一,电极的预处理:将玻碳电极在麂皮上抛光及蒸馏水冲洗过程同实施例 1,再用超声波清洗 30 分钟;将清洗后的玻碳电极依次放入体积比为 1:1 的硝酸、丙酮溶液中各浸泡 10 分钟,然后用蒸馏水冲洗电极;将电极在红外灯下烘干。

[0041] 步骤二,纳米金胶溶液和碳纳米管悬液的制备:量取 0.01% 氯金酸溶液 50mL 放在烧瓶中,在微波合成仪(400W,100℃)内加热至沸腾,加入 3mL 新鲜配制的 1% 柠檬酸三钠

水溶液,强烈搅拌并保持微沸状态,观察溶液颜色由无色到深紫色,再到紫红色,约 5min 后断开电源、自然冷却,配制好的溶胶置于冰箱内在 4℃ 保存(所得胶体金呈深红色,电子显微镜下观察平均直径约 20nm);取 3mg MWCNTs-COOH 加入 3mL 二次蒸馏水中混合超声振荡 20min 至黑色均匀溶液,制成碳纳米管悬液。

[0042] 步骤三,碳纳米管-聚硫堇-纳米金修饰玻碳电极:用微量取样器移取 5 μ L 的 MWCNTs-COOH 分散液均匀滴加到经步骤一预处理过的玻碳电极表面,红外灯下烘干,制成碳纳米管修饰玻碳电极;再浸入到含 4mmol/L 硫堇的 4.4mol/L 乙酸溶液中,于 -0.4~1.4V 区间以 100mV/s 的扫描速度,以循环伏安法扫描 35 圈,电聚合硫堇于碳纳米管-玻碳电极表面,取出后用二次蒸馏水小心冲洗,红外灯下烘干,制成碳纳米管-聚硫堇修饰玻碳电极;再浸入到纳米金胶体溶液中,2h 后取出,二次蒸馏水小心冲洗,空气中自然干燥,制成碳纳米管-聚硫堇-纳米金修饰玻碳电极。

[0043] 步骤四,免疫传感器的制备:将步骤三中制备的碳纳米管-聚硫堇-纳米金修饰玻碳电极在 4℃ 下,浸入含有沙丁胺醇单克隆抗体的磷酸盐缓冲液溶液中进行自组装,12h 后取出,4℃ 自然干燥;再滴涂 1% 的 BSA 溶液,4℃ 自然干燥,得到稳定性高的固定沙丁胺醇抗体的免疫电化学传感器,储存于 4℃ 冰箱。

[0044] 步骤五,用制备好的免疫传感器检测沙丁胺醇:室温下,取 5mL pH6.0 的 0.1M HAc-NaAc 缓冲液置于测试杯中,将不同浓度的沙丁胺醇与固定浓度的沙丁胺醇-BSA 溶液混合,沙丁胺醇与沙丁胺醇-BSA 竞争性地结合电极上的抗体,反应前后电流发生变化,在 -0.5~0.1V 区间,用微分脉冲伏安法(DPV 法)记录电流变化大小,间接反映沙丁胺醇的浓度值。该方法的调试参数为:脉冲幅度为 25mV,脉冲宽度为 10ms,脉冲期为 100ms,扫描速度为 25mV/s。测试结果表明,该免疫电化学传感器对沙丁胺醇的检测限达 0.36ng/mL,在 8-80ng/mL 范围内成线性关系。

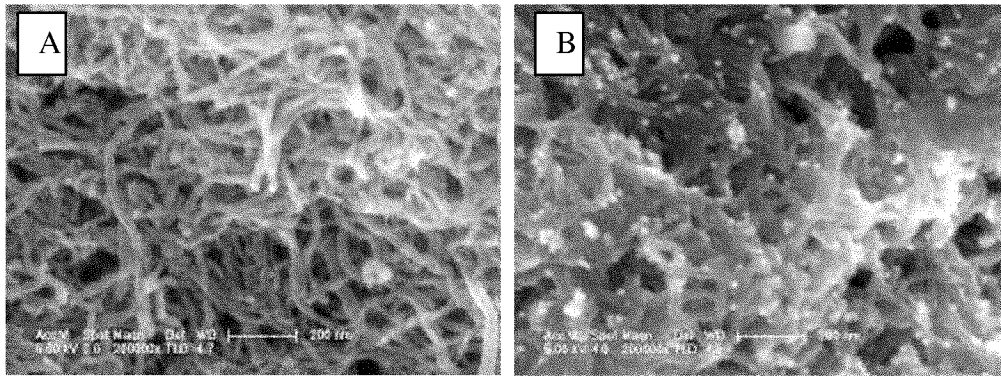


图 1

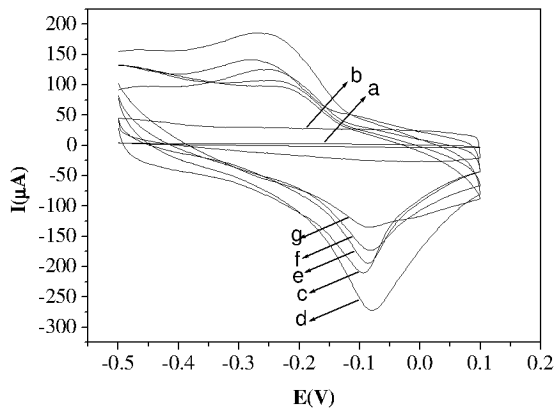


图 2

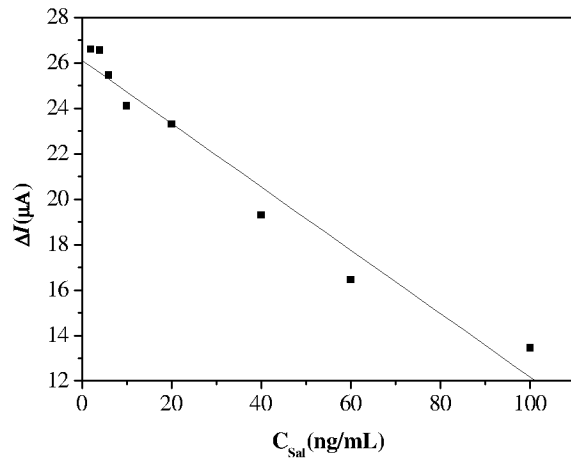


图 3

专利名称(译)	用于快速检测沙丁胺醇的电化学免疫传感器的制备方法		
公开(公告)号	CN101915792A	公开(公告)日	2010-12-15
申请号	CN201010252374.4	申请日	2010-08-13
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	王正武 米芹		
发明人	王正武 米芹		
IPC分类号	G01N27/26 G01N27/38 G01N27/48 G01N33/53		
代理人(译)	王锡麟 王桂忠		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种化学检测技术领域的用于快速检测沙丁胺醇的电化学免疫传感器的制备方法，通过用碳纳米管-聚硫堇-纳米金依次修饰玻碳电极，再通过自组装方法得到电化学免疫传感器。本发明能够制备得到灵敏度高，稳定性好，现场快速检测沙丁胺醇的电化学免疫传感器。

