



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102520030 B

(45) 授权公告日 2013.04.17

(21) 申请号 201110319927.8

(22) 申请日 2011.10.20

(73) 专利权人 济南大学

地址 250022 山东省济南市市中区济微路
106 号

(72) 发明人 杜斌 魏琴 杨健 吴丹 马洪敏
李贺 庞雪辉 张永芳 罗川南
李燕 闫良国 李慧芝 代玉雪
毛珂霞 李玉阳 崔振涛 冯锐

(51) Int. Cl.

G01N 27/26(2006.01)

G01N 27/416(2006.01)

G01N 27/38(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

审查员 刘畅

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测玉米赤霉醇的无标记型电化学免疫传感器的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测玉米赤霉醇的无标记型电化学免疫传感器及其制备方法。电化学免疫传感器的制备方法,包括以下步骤:石墨烯的制备;按一定摩尔比将巯基及石墨烯配制成混合溶液;利用电极表面修饰技术,将制备的混合溶液修饰至电极表面上,并修饰上抗体。将电化学免疫传感器连接到电化学工作站,可对动物源性食品提取液中的玉米赤霉醇进行检测。本发明的电化学免疫传感器的特异性强,灵敏度高,可以达到 pg 级;完成一个基本检测过程仅需 1~2min 的时间。该方法操作快速简单,反应及结果均由仪器自动完成和记录。

1. 一种检测玉米赤霉醇的无标记型电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于:步骤如下:

(1) 石墨烯的制备:首先,将氧化石墨烯放入石英管并通入氩气 10 ~ 20min,然后迅速加热至 1000°C,并持续 1min,即得石墨烯;

(2) 硫堇-石墨烯混合溶液的制备:利用步骤(1)合成的石墨烯配制浓度为 1.0mg·mL⁻¹的石墨烯溶液,另外配制浓度为 1.0mg·mL⁻¹的硫堇溶液,并将得到的石墨烯溶液和硫堇溶液按照体积比 0.6~1.3 : 1 混合 15~20h,之后超声 5~30min,即制得硫堇-石墨烯混合溶液;

(3) 建立无标记型电化学免疫传感器,测定玉米赤霉醇,绘制工作曲线;

其中步骤(3)所述的建立无标记型电化学免疫传感器,具体步骤如下:

(a) 将直径为 3mm 的玻碳电极依次用粒径为 1.0、0.3 和 0.05μm 的三氧化二铝抛光粉抛光处理,再用二次水清洗干净,吹干,最后将电极置于 0.05mol·L⁻¹ 铁氰化钾溶液中,在 -0.6~0.6 V 范围内扫描,使峰电流差达到 60 ~ 90 mA;

(b) 将 2~8 μL 步骤(2)配制的硫堇-石墨烯混合溶液滴涂到玻碳电极表面,晾干;

(c) 用 0.1 mol·L⁻¹, pH = 7.0 的磷酸盐缓冲溶液清洗电极表面,去除未结合颗粒;

(d) 滴涂 3~10μL 体积分数为 2.0% 的戊二醛溶液至电极表面,保持湿润放置 1 h,二次水清洗,晾干成膜;

(e) 采用 0.1mol·L⁻¹, pH=7.0 的磷酸盐缓冲溶液配制玉米赤霉醇抗体溶液,滴涂 3~10 μL, 10μg mL⁻¹ 的玉米赤霉醇抗体溶液至电极表面,置于 4°C 冰箱内保持湿润 1h,之后二次水清洗,晾干;

(f) 滴涂 3~10μL 质量分数为 1.5% 的牛血清白蛋白溶液至电极表面,置于 4°C 冰箱内 1 h,晾干,待用;

其中步骤(3)所述的测定玉米赤霉醇,绘制工作曲线,具体步骤如下:

(1) 采用 0.1mol·L⁻¹, pH = 7.0 的磷酸盐缓冲溶液配制不同浓度的玉米赤霉醇溶液,将 3~10μL 不同浓度的玉米赤霉醇溶液分别滴涂至所得的不同电极表面,反应 0.5~2h,晾干后连接至电化学工作站中,分别将电极浸于 pH = 7.0 的磷酸盐缓冲溶液中测定其氧化还原电流变化;

(2) 根据所得电流差值与玉米赤霉醇浓度呈线性关系,绘制工作曲线。

一种检测玉米赤霉醇的无标记型电化学免疫传感器的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测玉米赤霉醇的无标记型电化学免疫传感器及其制备方法,尤其是基于硫堇-石墨烯研制的一种检测玉米赤霉醇的无标记型电化学免疫传感器及其制备方法。

背景技术

[0002] 玉米赤霉醇属于赤霉素类生长促进剂,曾作为生长促进剂应用于反刍动物,具有促进蛋白质合成的作用。然而,玉米赤霉醇所具有的弱雌激素作用,导致其在动物体液中的残留会引起机体性机能紊乱并影响第二性征的正常发育,在外部条件诱导下,这类物质还可能致癌。同时,该物质排除动物体外后,还可经饮水和食物造成对人体健康造成影响,多国已禁止其用于所有动物食品,在所有食用组织不得检出。

[0003] 由于玉米赤霉醇具有促进蛋白质合成,提高肌肉含量,或者调节脂肪代谢的作用,用于饲养动物可以加快动物生长速度,提高肉类产量,从而达到更好的经济效益。若食用含玉米赤霉醇的食物,人类的身体健康将受到危害。因此,检测动物源性食品中此类物质的含量尤为重要。

[0004] 目前检测该类物质的方法主要有薄层色谱法、气-质联用法、高效液相色谱法、液-质联用和酶联免疫法等。这些方法的前处理利用液-液分配,常规的 SPE 柱净化和分离,都在不同程度地存在着处理过程繁琐、净化效果差、有机溶剂浪费多、所需时间长等缺点。与之相比,电化学免疫传感器分析法具有灵敏度高、选择性好和结构简单等特点,因此具有极高应用价值。

[0005] 自从 2004 年石墨烯被发明以来,由于其良好的导电性及电化学活性,已经引起了广泛关注。并且,由于其独特的纳米结构及性质,石墨烯已被广泛用于合成纳米复合材料,并且构建多种电化学设备。在进一步的研究中,石墨烯及电子媒介体之间的协同作用可被用于促进电子传递过程。硫堇是一种氧化还原染料,其两个电子和两个质子间呈现出可逆的转移过程。作为一种电子媒介体,硫堇具有良好的导电性及电化学信号。

[0006] 本发明基于硫堇与石墨烯的协同作用,构建一种检测玉米赤霉醇的无标记型电化学免疫传感器。该传感器提供了一种简易、经济、灵敏且特异性强的测定动物源性食品中玉米赤霉醇的方法。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种检测玉米赤霉醇的无标记型电化学免疫传感器及其制备方法。该方法进行测定时灵敏度高,检出限低,制备简单,其具体步骤如下:

[0008] (1) 首先,将氧化石墨烯放入石英管并通入氩气 10 ~ 20min,然后迅速加热至 1000℃,并持续 1min,即值得石墨烯;

[0009] (2) 利用步骤 (1) 合成的石墨烯配制浓度为 $1.0\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的石墨烯溶液,另外配

制浓度为 $1.0\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的硫堇溶液,并将得到的石墨烯溶液和硫堇溶液按照体积比 $0.6 \sim 1.3 : 1$ 混合 $15 \sim 20\text{h}$,之后超声 $5 \sim 30\text{min}$,即制得硫堇-石墨烯混合溶液;

[0010] (3) 将直径为 3mm 的玻碳电极依次用粒径为 1.0 、 0.3 和 $0.05 \mu\text{m}$ 的三氧化二铝抛光粉抛光处理,再用二次水清洗干净,吹干,最后将电极置于 $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 铁氰化钾溶液中,在 $-0.6 \sim 0.6\text{V}$ 范围内扫描,使峰电流差达到 $60 \sim 90\text{mA}$;

[0011] (4) 将 $2 \sim 8 \mu\text{L}$ 步骤 (2) 配制的硫堇-石墨烯混合溶液滴涂到步骤 (3) 得到的玻碳电极表面,晾干;

[0012] (5) 用 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{pH} = 7.0$ 的磷酸盐缓冲溶液清洗步骤 (4) 得到的电极表面,去除未结合颗粒,晾干;

[0013] (6) 滴涂 $3 \sim 10 \mu\text{L}$ 体积分数为 2.0% 的戊二醛溶液至步骤 (5) 所得的电极表面,保持湿润放置 1h ,二次水清洗,晾干成膜;

[0014] (7) 采用 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{pH} = 7.0$ 的磷酸盐缓冲溶液配制玉米赤霉醇抗体溶液,滴涂 $3 \sim 10 \mu\text{L}$ $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的玉米赤霉醇抗体溶液至步骤 (6) 所得的电极表面,置于 4°C 冰箱内保持湿润 1h ,之后二次水清洗,晾干;

[0015] (8) 滴涂 $3 \sim 10 \mu\text{L}$ 质量分数为 1.5% 的牛血清白蛋白溶液至步骤 (7) 所得电极表面,置于 4°C 冰箱内 1h ,晾干,待用;

[0016] (9) 采用 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{pH} = 7.0$ 的磷酸盐缓冲溶液配制不同浓度的玉米赤霉醇溶液,将 $3 \sim 10 \mu\text{L}$ 不同浓度的玉米赤霉醇溶液分别滴涂至步骤 (8) 所得的不同电极表面,反应 $0.5 \sim 2\text{h}$,晾干后连接至电化学工作站中,分别将电极浸于 $\text{pH} = 7.0$ 的磷酸盐缓冲溶液中测定其氧化还原电流变化;

[0017] (10) 根据所得步骤 (9) 所得电流差值与玉米赤霉醇浓度呈线性关系,绘制工作曲线。

[0018] 一种检测玉米赤霉醇的无标记型电化学免疫传感器及其制备方法,其体现的优势和特点是:

[0019] (1) 本发明中石墨烯具有优良的导电性,包含两个氨基的硫堇分子是很好的电子媒介体,它可以高效的传递电子并产生强电子信号,两者均为构建电化学免疫传感器的优良材料;

[0020] (2) 本发明的电化学免疫传感器表现出了强特异性,样品中其他非特异性分子对检测结果无影响;高灵敏性,可以达到 pg 级;检测的快速性,完成一个基本检测只需要 $1 \sim 2\text{min}$ 的时间,可用于动物源性食品中玉米赤霉醇的检测;

[0021] (3) 本发明的无标记型电化学免疫传感器测定玉米赤霉醇的方法,操作快速简单,反应及结果均由仪器自动完成和记录,避免了主观因素的影响,并保证有很好的重现性,便于现场检测。

附图说明

[0022] 附图 1 为合成得到的石墨烯透射电镜图。

具体实施方式

[0023] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明

而不用来限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明讲授的内容之后,本领域技术人员可以对本发明做各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0024] 实施例 1

[0025] 一种检测玉米赤霉醇的无标记型电化学免疫传感器及其制备方法,其具体步骤如下:

[0026] (1) 首先,将氧化石墨烯放入石英管并通入氩气 10min,然后迅速加热至 1000℃,并持续 1min,即值得石墨烯,并对制得的石墨烯进行透射电镜表征,如图 1 所示,可以看出,所得的石墨烯呈现出褶皱的片层结构,说明石墨烯已被成功制备;

[0027] (2) 利用步骤 (1) 合成的石墨烯配制浓度为 $1.0\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的石墨烯溶液,另外配制浓度为 $1.0\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的硫堇溶液,并将得到的石墨烯溶液和硫堇溶液分别取 0.5mL 混合 20h,之后超声 10min,即制得硫堇-石墨烯混合溶液;

[0028] (3) 将直径为 3mm 的玻碳电极依次用粒径为 1.0、0.3 和 0.05 μm 的三氧化二铝抛光粉抛光处理,再用二次水清洗干净,吹干,最后将电极置于 $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 铁氰化钾溶液中,在 $-0.6 \sim 0.6\text{V}$ 范围内扫描,使峰电流差达到 80mA;

[0029] (4) 将 $6\mu\text{L}$ 步骤 (2) 配制的硫堇-石墨烯混合溶液滴涂到步骤 (3) 得到的玻碳电极表面,晾干;

[0030] (5) 用 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH = 7.0 的磷酸盐缓冲溶液清洗步骤 (4) 得到的电极表面,去除未结合颗粒,晾干;

[0031] (6) 滴涂 $5\mu\text{L}$ 体积分数为 2.0% 的戊二醛溶液至步骤 (5) 所得的电极表面,保持湿润放置 1h,二次水清洗,晾干成膜;

[0032] (7) 采用 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH = 7.0 的磷酸盐缓冲溶液配制玉米赤霉醇抗体溶液,滴涂 $5\mu\text{L}$ $10\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的玉米赤霉醇抗体溶液至步骤 (6) 所得的电极表面,置于 4℃ 冰箱内保持湿润 1h,之后二次水清洗,晾干;

[0033] (8) 滴涂 $3\mu\text{L}$ 质量分数为 1.5% 的牛血清白蛋白溶液至步骤 (7) 所得电极表面,置于 4℃ 冰箱内 1h,晾干,待用;

[0034] (9) 采用 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH = 7.0 的磷酸盐缓冲溶液配制不同浓度的玉米赤霉醇溶液,将 $5\mu\text{L}$ 0.02、0.04、0.10、0.30、0.50、0.80、1.0、1.5、2.0、2.5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的玉米赤霉醇溶液分别滴涂至步骤 (8) 所得的不同电极表面,反应 1h,晾干后连接至电化学工作站中,分别将电极浸于 pH = 7.0 的磷酸盐缓冲溶液中测定其氧化还原电流变化;

[0035] (10) 根据所得步骤 (9) 所得电流差值与玉米赤霉醇浓度呈线性关系,绘制工作曲线。

[0036] 本发明中石墨烯具有优良的导电性,硫堇是很好的电子媒介体,它可以高效的传递电子并产生强电子信号,两者均为组装免疫传感器的良好材料,测定结果表明,玉米赤霉醇在 $0.04 \sim 2.0\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内成线性关系,线性相关系数为 0.991,检出限为 $6.24\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,与其它玉米赤霉醇的检测方法相比,该免疫传感器分析法具有检测限低、灵敏度高、选择性好和结构简单等特点,因此具有极高应用价值。



图 1 石墨烯透射电镜图

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种检测玉米赤霉醇的无标记型电化学免疫传感器的制备方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN102520030B | 公开(公告)日 | 2013-04-17 |
| 申请号 | CN201110319927.8 | 申请日 | 2011-10-20 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 济南大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 济南大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 济南大学 | | |
| [标]发明人 | 杜斌 魏琴 杨健 吴丹 马洪敏 李贺 庞雪辉 张永芳 罗川南 李燕 闫良国 李慧芝 代玉雪 毛珂霞 李玉阳 崔振涛 冯锐 | | |
| 发明人 | 杜斌 魏琴 杨健 吴丹 马洪敏 李贺 庞雪辉 张永芳 罗川南 李燕 闫良国 李慧芝 代玉雪 毛珂霞 李玉阳 崔振涛 冯锐 | | |
| IPC分类号 | G01N27/26 G01N27/416 G01N27/38 G01N33/53 | | |
| 审查员(译) | 刘畅 | | |
| 其他公开文献 | CN102520030A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种检测玉米赤霉醇的无标记型电化学免疫传感器及其制备方法。电化学免疫传感器的制备方法，包括以下步骤：石墨烯的制备；按一定摩尔比将硫堇及石墨烯配制成混合溶液；利用电极表面修饰技术，将制备的混合溶液修饰至电极表面上，并修饰上抗体。将电化学免疫传感器连接到电化学工作站，可对动物源性食品提取液中的玉米赤霉醇进行检测。本发明的电化学免疫传感器的特异性强，灵敏度高，可以达到pg级；完成一个基本检测过程仅需1~2min的时间。该方法操作简单，反应及结果均由仪器自动完成和记录。

