



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103472220 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 07

(21) 申请号 201310407855. 1

(22) 申请日 2013. 09. 10

(73) 专利权人 山东理工大学

地址 255086 山东省淄博市高新技术产业开
发区高创园 D 座 1012 室

(72) 发明人 孙霞 王相友 乔璐 郭业民
赵文苹

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

审查员 许珊萍

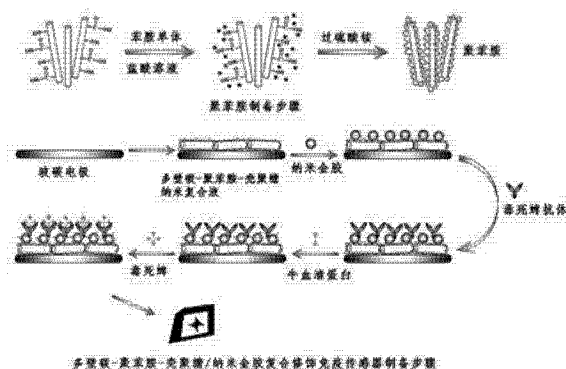
权利要求书1页 说明书4页 附图6页

(54) 发明名称

多壁碳-聚苯胺-壳聚糖/纳米金胶复合修
饰免疫传感器的制备

(57) 摘要

本发明涉及一种多壁碳-聚苯胺-壳聚糖/纳米金胶复合修饰免疫传感器的制备,属于生物传感器制备领域。本发明第一步为多壁碳-聚苯胺-壳聚糖纳米复合材料及纳米金胶的制备:以多壁碳、苯胺、壳聚糖为原料,利用多壁碳-聚苯胺-壳聚糖复合材料的良好电化学氧化还原活性、好的生物相容性以及高度的化学稳定性,修饰工作电极以促进电子转移;第二步为纳米金胶和多壁碳-聚苯胺-壳聚糖纳米复合液共同修饰电极的免疫传感器制备。具大量氨基的纳米复合液与纳米金胶形成的金氨体系有较高的稳定性和高度有序性,保持了抗体的生物活性且提高了抗体有效固定量。本发明的免疫传感器,检测时间较短,灵敏度高,选择性、稳定性好,再生能力好,回收率符合要求。



1. 多壁碳-聚苯胺-壳聚糖/纳米金胶复合修饰免疫传感器的制备方法,其特征在于:一种新型的多壁碳-聚苯胺-壳聚糖纳米复合材料和纳米金胶的制备和多壁碳-聚苯胺-壳聚糖/纳米金胶复合修饰免疫传感器的制备,制备步骤为:

1) 多壁碳-聚苯胺-壳聚糖纳米复合液的制备:

采用原位聚合的方法制备聚苯胺包裹的多壁碳纳米复合材料,苯胺单体在使用之前在低压真空下提纯,120mg 多壁碳以及 1g 苯胺单体同时加入到 20mL 1M 的盐酸溶液中,超声 2h 形成均匀分散的溶液,然后将溶液置于冰浴搅拌,待溶液冷却后加入溶有过硫酸铵的盐酸溶液,其中过硫酸铵的物质的量与苯胺单体物质的量比例为 1:1,为了能让苯胺单体完全聚合,溶液在 0-5°C 冰浴中持续恒力搅拌反应 12h,聚合后的溶液抽滤收集产物,并依次用去离子水、甲醇和丙酮洗涤,最后真空干燥 12h,将壳聚糖溶于 1.0% 的醋酸溶液中,配制成 0.5% 壳聚糖溶液,室温下磁力搅拌至壳聚糖完全溶解,称取 10mg 多壁碳-聚苯胺加入到 10mL 0.5% 壳聚糖溶液中,超声分散 8h 得到分散均匀的多壁碳-聚苯胺-壳聚糖纳米复合液;

2) 纳米金胶的制备:

采用柠檬酸三钠热还原氯金酸的方法,所有的玻璃器皿均用王水浸泡过夜,再用 12mol/L 的氢氧化钠水溶液浸泡 2h,洗涤干净备用,将 98mL 去离子水和 2mL 50mM 氯金酸溶液混合,快速搅拌下加热至亚沸状态,即产生回流时,迅速加入 10mL 38.8mM 的柠檬酸三钠溶液,混合物加热至沸腾后,继续搅拌 20min,这个过程中溶液由淡黄色转为无色,然后变灰黑色,最后成酒红色,除去热源后继续搅拌至室温下慢慢冷却,将冷却后的金胶溶液置于干净的棕色玻璃瓶中于 4°C 冰箱中避光保存备用,数月有效;

3) 多壁碳-聚苯胺-壳聚糖/纳米金胶复合修饰免疫传感器的制备步骤:

在预处理好的玻碳电极表面滴涂 7 μ L 制备好的多壁碳-聚苯胺-壳聚糖纳米复合液,常温下静置 2h,用 pH=7.5 的 PBS 缓冲液冲洗电极表面;电极表面晾干后,取 7 μ L 纳米金胶滴涂在电极表面,常温下静置 1.5h,然后用 pH=7.5 的 PBS 缓冲液冲洗表面,氮气吹干;之后将电极沉浸在毒死蜱单克隆抗体溶液中,4°C 条件下浸泡 8-12h,取出后用 PBS 冲洗表面,晾干待用;最后将上述制备好的电极浸于 0.5%BSA 溶液中,室温下静置 2h,以封闭非特异性结合位点,取出置于室温下晾干,免疫传感器制作完成,保存在 4°C 条件下备用。

多壁碳－聚苯胺－壳聚糖 / 纳米金胶复合修饰免疫传感器的制备

技术领域

[0001] 本发明提供多壁碳－聚苯胺－壳聚糖 / 纳米金胶复合修饰免疫传感器的制备,属于生物传感器制备领域。

背景技术

[0002] 我国是一个农业大国,农业发展对国民经济以及人民生活有着举足轻重的作用,而农药是当前农业生产用于防治病、虫、杂草对农作物危害不可缺少的物质,对促进农业增产有着重要的作用。但是,如果农药使用不当,农药造成的污染可以通过生物富集或食物链进入人体,给人类健康带来危害。随着我国人民生活水平不断提高,农产品的质量安全问题越来越受到关注,尤其果品、蔬菜中农药残留问题已经成为公众关注的焦点。全国每年都有上百起因食用被农药污染的农产品而引起的急性中毒事件,严重影响广大消费者的身体健康,因此由农药残留超标导致的食品安全问题,已越来越受到各国政府和公众的重视。有机磷农药是我国应用最为广泛的一类农药,其中毒死蜱是目前全世界生产和销售最大的杀虫剂品种之一。毒死蜱是高效中毒的广谱杀虫剂兼除草剂,具有一定的内吸性,可以通过食物链的富集作用转移至人体,对人体具有潜在致癌作用。可见,加强对农产品中农药残留的检测对保护生态环境,尤其是保障人类健康有着十分深远的意义,其中毒死蜱一直是环境和食品中农药残留检测的重要项目。

[0003] 传统的农药残留检测方法主要有:气相色谱(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、色谱/质谱联用技术(GC/LC-MS)、毛细管电泳法(CE)、荧光分析、酶联免疫法(ELISA)。这些方法虽然选择性好、灵敏度高、准确度高、检出限低,可同时检测多种元素或化合物,但其需要昂贵的仪器设备,样品前处理过程繁琐、费时,并且对分析人员的技术水平要求很高,不适于现场快速检测。常用的农药残留快速检测方法有酶抑制法(酶抑制试纸法和酶抑制分光光度法),可以实现有机磷农药的现场快速检测,具有较好的实用价值。但是,速测卡是通过肉眼观察卡片的颜色变化,因此一般只能用于严重超标的蔬菜样品的定性测量。酶抑制分光光度法的原理是基于吸光度的变化进行检测的,但蔬菜水果中大量的色素会影响检测结果的准确度。并且上述方法存在回收率低、错检、漏检比例较高、重复性差、难以满足低残留和定量检测的要求等缺点。免疫传感器是基于抗原和抗体特异性结合所引发的免疫反应的原理所研制的传感器,与传统的分析方法相比,它具有特异性强、分析速度快、结构简单、成本低廉等优点。免疫传感器的关键是敏感界面的构建,其直接影响生物分子的固定化、免疫传感器的稳定性、灵敏度和选择性等主要性能。

发明内容

[0004] 发明的目的在于提供一种能克服上述缺陷以及操作简单、灵敏度高、选择性好的检测毒死蜱农药残留的免疫传感器制备方法。

[0005] 其技术方案为:多壁碳－聚苯胺－壳聚糖 / 纳米金胶复合修饰免疫传感器的制备,

其特征在于：电流型免疫传感器的敏感界面组成包括由功能化多壁碳-聚苯胺-壳聚糖制备的三维纳米复合液和纳米金胶 (AuNPs)，进而固定抗毒死蜱的单克隆抗体 (Ab)。

[0006] 所述的多壁碳-聚苯胺-壳聚糖/纳米金胶复合修饰免疫传感器的制备，其特征在于：玻碳电极 ($d=3\text{mm}$) 的清洗，免疫传感器敏感界面的构建及过程表征 (制备多壁碳-聚苯胺纳米复合材料并以壳聚糖作为分散剂进行分散，利用多壁碳-聚苯胺的协同作用共同修饰电极)，免疫传感器工作曲线的建立，免疫传感器性能的检测，免疫传感器对实际样品的检测。

[0007] 所述的多壁碳-聚苯胺-壳聚糖/纳米金胶复合修饰免疫传感器的制备，其特征在于：实验条件的优化，主要包括抗体浓度、测试底液的 pH 以及孵育时间；所制备的电流型免疫传感器的工作曲线为： $\% \Delta I = 9.2401 + 6.1659 \text{ LgC (ng/mL)}$ ($R^2=0.9913$, $0.1-40 \text{ ng/mL}$)， $\% \Delta I = -22.436 + 27.235 \text{ LgC (ng/mL)}$ ($R^2=0.9904$, $40-500 \text{ ng/mL}$)；免疫传感器性能检测包括重现性、稳定性、再生性、特异性以及免疫传感器对蔬菜样品回收率的测定。

[0008] 其制备原理为：免疫生物传感器以免疫生物分子作为识别元件，通过固定化技术将免疫蛋白结合到感受器表面，发生免疫识别反应后，生成的免疫复合物与产生的物理或化学信号相关联，由换能器将其转化为与待测物质浓度 (或活度) 有关的可定量或者可处理的物理化学信号，再通过二次仪表放大并且输出信号，从而实现对待测物质的检测。本发明采用以壳聚糖作为分散剂制备的多壁碳-聚苯胺复合物和纳米金胶对玻碳电极进行修饰。功能化的多壁碳纳米管 (MWCNTs) 拥有独特的电化学特性、较高的化学稳定性和机械强度，被广泛用于免疫传感器敏感界面的制作。采用原位聚合的方法合成聚苯胺包裹的碳纳米管复合材料拥有良好的电化学氧化还原活性、强的导电能力、好的生物相容性以及高度的化学稳定性。壳聚糖 (CS) 属于多糖类，它具有优异的成膜性、吸附性、透气性和渗透性，成膜后具有很好的吸附性、稳定性和良好的生物相容性，其丰富的氨基、多孔性结构使它被广泛用于生物分子的固定和修饰电极的制备。壳聚糖的氨基端通过金氨键连接纳米金胶，为抗体在电极表面的固定提供了一个良好的生物界面，保持了抗体的生物活性以用来和农药进行有效的特异性结合。此外，纳米金胶较高的比表面积、稳定性和导电性可以增大电极表面电子的传导能力和生物相容性，进而增大免疫传感器的响应电流。采用本发明制成的电流型免疫传感器可以在蔬果采收、上市前，进行农药残留的快速测定，直接对农药残留量是否超标进行检测，避免因食用含有残留农药的蔬果而引起中毒，为农产品安全生产与消费提供残留检测的技术支撑。

[0009] 为达到以上目的，采取以下技术方案实现：多壁碳-聚苯胺-壳聚糖/纳米金胶复合修饰免疫传感器的制备，其特征在于：(1) 免疫传感器制备前裸玻碳电极的清洗、活化和性能测试，如果测试循环伏安曲线中的峰电位差在 120mV 以下，氧化峰和还原峰对称，则所述玻碳电极可使用，否则要重新返回清洗步骤中，直到符合要求。(2) 清洗好的裸玻碳电极表面滴涂分散均匀的多壁碳-聚苯胺-壳聚糖复合液，继而修饰纳米金胶，然后固定毒死蜱单克隆抗体，最后用牛血清白蛋白 (BSA) 封闭非特异性结合位点。免疫传感器制备结束后，放入冰箱里 4°C 保存备用。

[0010] 为达到以上目的，采取以下技术方案实现：多壁碳-聚苯胺-壳聚糖/纳米金胶复合修饰免疫传感器的制备，其特征在于：(1) 将上述制备好的免疫传感器在工作底液中以不同的扫速做循环伏安方法扫描，可以得到峰值和扫速的关系，得到是受扩散控制的。(2)

配置一系列的毒死蜱标准液,进行循环伏安扫描,得到抑制率,进一步得出上述制备的免疫传感器的工作曲线、检测范围和检测限;(3) 配置一系列经常混合使用的农药溶液,以检测所制备免疫传感器的选择性;(4) 通过循环伏安扫描多段验证上述免疫传感器的稳定性,通过解离和再次免疫检测其再生性能;(5) 对实际果蔬样品进行分析得出该免疫传感器的回收率。

[0011] 本发明采用简单的原位聚合法合成聚苯胺均匀包裹多壁碳的纳米复合材料,再以具有良好的生物相容性和成膜性的壳聚糖作为分散剂所制备成的多壁碳-聚苯胺-壳聚糖纳米复合液能够促进电化学反应中电子的传递,提高电极上的响应电流,改善电极表面的微环境,因而可以作为载体材料,用以制备响应信号强和灵敏度高的免疫传感器;具有大量氨基的纳米复合液与纳米金胶形成的金氨体系具有较高的稳定性和高度有序性,增大了免疫传感器的电流响应并提高了传感器表面抗体的有效固定,从而增大了检测精度。

[0012] 所述免疫传感器的制备工艺如下:(1) 取 7 μ L 制备好的多壁碳-聚苯胺-壳聚糖纳米复合液滴涂在预处理好的玻碳电极表面,常温下静置 2h,用 pH=7.5 的 PBS 缓冲液冲洗电极表面;(2) 电极表面晾干后,取 7 μ L 纳米金胶滴涂在电极表面,常温下静置 1.5h,然后用 pH=7.5 的 PBS 缓冲液冲洗表面,氮气吹干;(3) 将上述经纳米材料修饰好的电极沉浸在毒死蜱单克隆抗体溶液中,4 $^{\circ}$ C 条件下浸泡 8-12h,取出后用 PBS 缓冲液冲洗表面,晾干待用;(4) 最后将上述制备好的电极浸于 0.5% 的 BSA 溶液中,室温下静置 2h,以封闭非特异性结合位点,取出置于室温下晾干,免疫传感器制作完成,保存在 4 $^{\circ}$ C 条件下备用。

附图说明

[0013] 图 1 免疫传感器修饰过程的循环伏安图。

[0014] 图 2 多壁碳-壳聚糖的扫描电镜图。

[0015] 图 3 多壁碳-聚苯胺-壳聚糖的扫描电镜图。

[0016] 图 4 纳米金胶的扫描电镜图。

[0017] 图 5 多壁碳-聚苯胺的 X-射线衍射图。

[0018] 图 6 免疫传感器的工作曲线图。

具体实施方式

[0019] 实施例:(1) 多壁碳-聚苯胺-壳聚糖纳米复合液的制备:采用原位聚合的方法制备聚苯胺包裹的多壁碳纳米复合材料。苯胺单体在使用之前在低压真空下提纯。120mg 多壁碳以及 1g 苯胺单体同时加入到 20mL 1M 的盐酸溶液中,超声 2h 形成均匀分散的溶液。然后将溶液置于冰浴搅拌,待溶液冷却后向其中加入溶有一定量过硫酸铵的盐酸溶液(其中过硫酸铵的物质的量:苯胺单体物质的量=1:1)。为了能让苯胺单体完全聚合,溶液在 0-5 $^{\circ}$ C 冰浴中持续恒力搅拌反应 12h。聚合后的溶液抽滤收集产物,并依次用去离子水、甲醇和丙酮洗涤,最后真空干燥 12h。将壳聚糖(CS)溶于 1.0% 的醋酸溶液中,配制成 0.5% CS 溶液,室温下磁力搅拌至壳聚糖完全溶解。称取 10mg 多壁碳-聚苯胺加入到 10mL 0.5% CS 溶液中,超声分散 8h 得到分散均匀的多壁碳-聚苯胺-壳聚糖纳米复合液。(2) 纳米金胶的制备采用柠檬酸三钠热还原氯金酸(HAuCl_4)的方法。所有的玻璃器皿均用王水浸泡过夜,再用 12mol/L 的氢氧化钠水溶液浸泡 2h,洗涤干净备用。将 98mL 去离子水和

2mL 50mM 氯金酸溶液混合,快速搅拌下加热至亚沸状态(即产生回流)时,迅速加入 10mL 38.8mM 的柠檬酸三钠溶液,混合物加热至沸腾后,继续搅拌 20min(此间溶液由淡黄色转为无色,然后变灰黑色,最后成酒红色),除去热源后继续搅拌至室温下慢慢冷却。将冷却后的金胶溶液置于干净的棕色玻璃瓶中于 4°C 冰箱中避光保存备用,数月有效。(3) 玻碳电极的清洗:玻碳电极修饰前,首先浸入热的“piranha”溶液($\text{H}_2\text{SO}_4:30\% \text{H}_2\text{O}_2 = 3:1$)中浸泡 15min,用水清洗干净,接下来用 0.3 μm 、30nm 的 Al_2O_3 浆在麂皮上抛光至镜面,抛光后用去离子水洗去除表面污物,再移入超声水浴中清洗,每次 5min,重复二次,然后依次用 6mol/L 的 HNO_3 、无水乙醇和去离子水超声清洗,氮气环境下干燥。(4) 玻碳电极的活化:彻底清洗后,电极在 0.5mol/L H_2SO_4 溶液中用循环伏安法活化,扫描范围 1.0V ~ -1.0V,反复扫描直至达到稳定的循环伏安图为止。(5) 预处理好的玻碳电极的测试:在含有 1×10^{-3} mol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的 0.20 mol/L KNO_3 溶液中跑循环伏安曲线,以测试所述玻碳电极的性能,扫描速度 50mV/S,扫描范围为 -0.1V ~ 0.6V;当所述循环伏安曲线中的峰电位差在 80mV 以下,并尽可能接近 64mV,所述玻碳电极可使用,否则要重新返回步骤(3)中,处理所述玻碳电极,直到符合要求。(6) 取 7 μL 分散均匀的多壁碳-聚苯胺-壳聚糖纳米复合液滴涂在电极表面,常温下 2h,然后用 pH7.5 的磷酸盐缓冲液冲洗表面,氮气吹干。(7) 取 7 μL 制备好的纳米金胶溶液滴涂在电极上,常温下 1.5h,然后用 pH7.5 的磷酸盐缓冲液冲洗电极表面,氮气吹干。(8) 将上述经纳米材料修饰的电极沉浸在毒死蜱单克隆抗体溶液中,4°C 条件下浸泡 8-12h,取出后用 PBS 缓冲液冲洗表面,晾干待用。(9) 最后将上述制备好的电极浸入 0.5% 的 BSA 溶液中室温下静置 2h,以封闭电极上非特异性结合位点,取出置于室温下晾干,免疫传感器制作完成,保存在 4°C 条件下备用。(10) 从抗体浓度、测试底液 pH 和孵育时间三方面对所制备的免疫传感器的实验条件进行优化,抗体浓度的范围为 0.1-20 $\mu\text{g/mL}$,pH 的范围为 5.0-8.5,孵育时间的范围为 10-60min。(11) 配置 0.1-500 ng/mL 的毒死蜱标准溶液,将上述制备好的免疫传感器分别浸入不同浓度的毒死蜱标准溶液,在常温下孵育 40min,检测免疫反应前后电流变化得到其工作曲线。(12) 将免疫传感器在久效磷、西维因、克百威、3-羟基克百威等干扰物存在的情况下对 200ng/mL 的毒死蜱进行测试,以检测其选择性;选 5 根于相同条件下制备好的免疫传感器检测其重现性;连续 7 天依次检测相同浓度的毒死蜱溶液以检测其稳定性;将免疫后的传感器用甘氨酸-HCl 缓冲液(pH2.8)解离毒死蜱农药 5min 后再次免疫,检测其再生能力。(13) 把蔬菜彻底清洗干净并用去离子水清洗 3 次,喷洒上一定浓度的农药,放置 24h 后,用 10mL 丙酮 / 0.1M pH7.5 磷酸盐缓冲溶液(1/9, v/v)做溶剂超声处理 20min,然后再离心 10min (10000 rpm),得到的上清液用来检测实际样品的回收率,其回收率可以达到 80.6%-108.9%。

[0020] 此种免疫传感器检测毒死蜱农药残留的检测方法操作工艺简单,检测时间较短,检测农药浓度范围广,灵敏度高,稳定性好,再生能力高以及对实际样品分析有较好的回收率和重现性,符合我国农药残留快速检测技术发展和国际化要求。

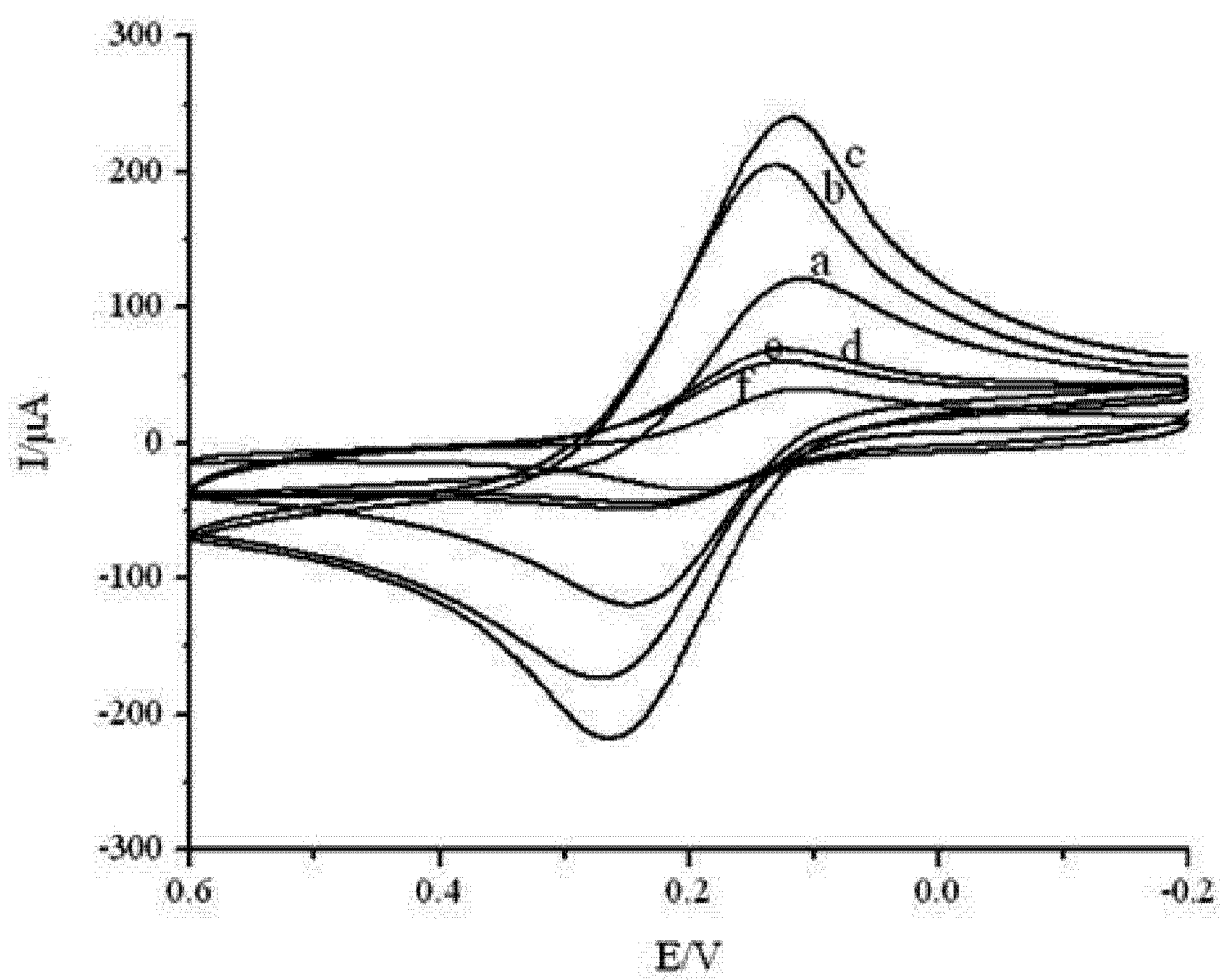


图 1

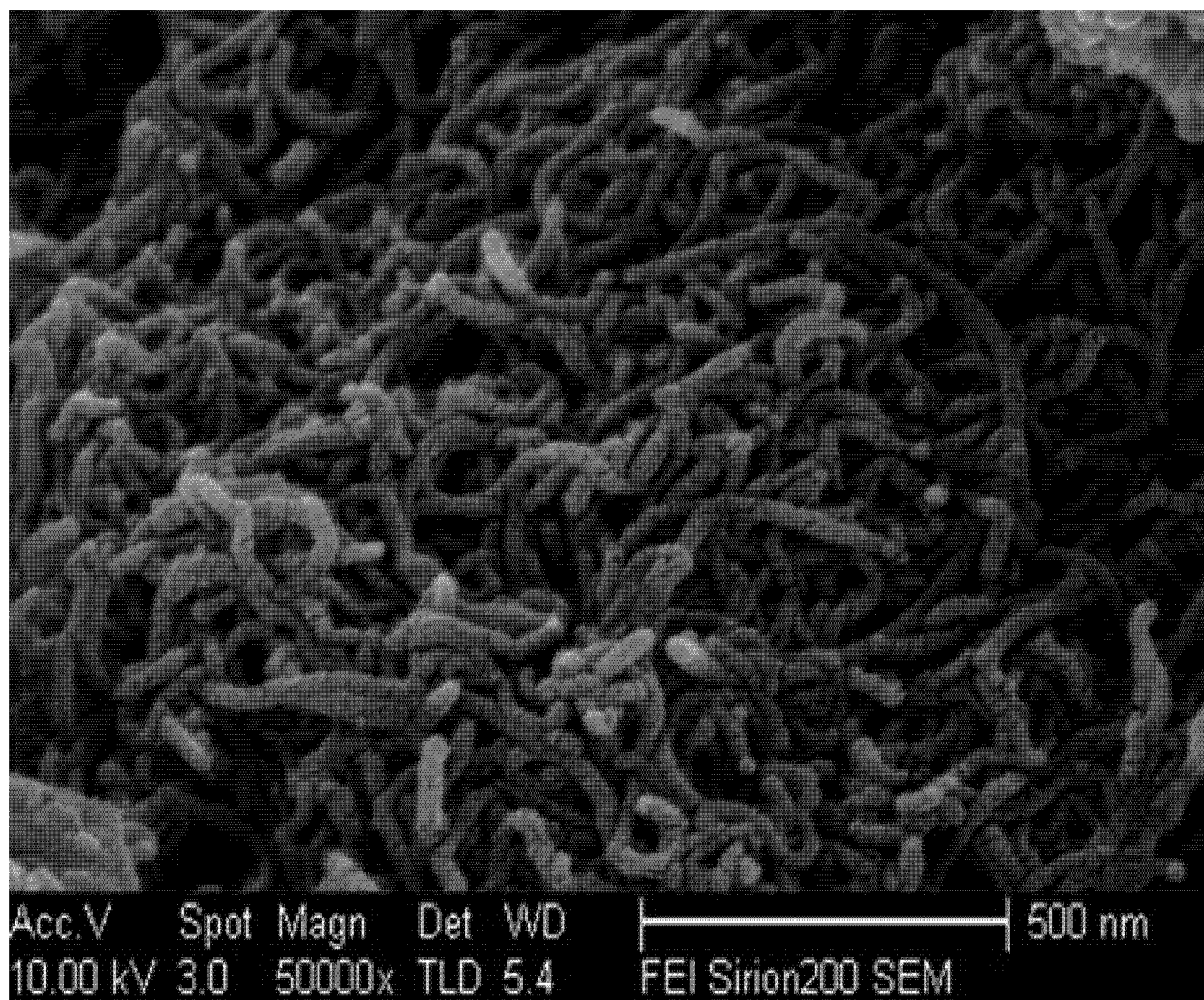


图 2

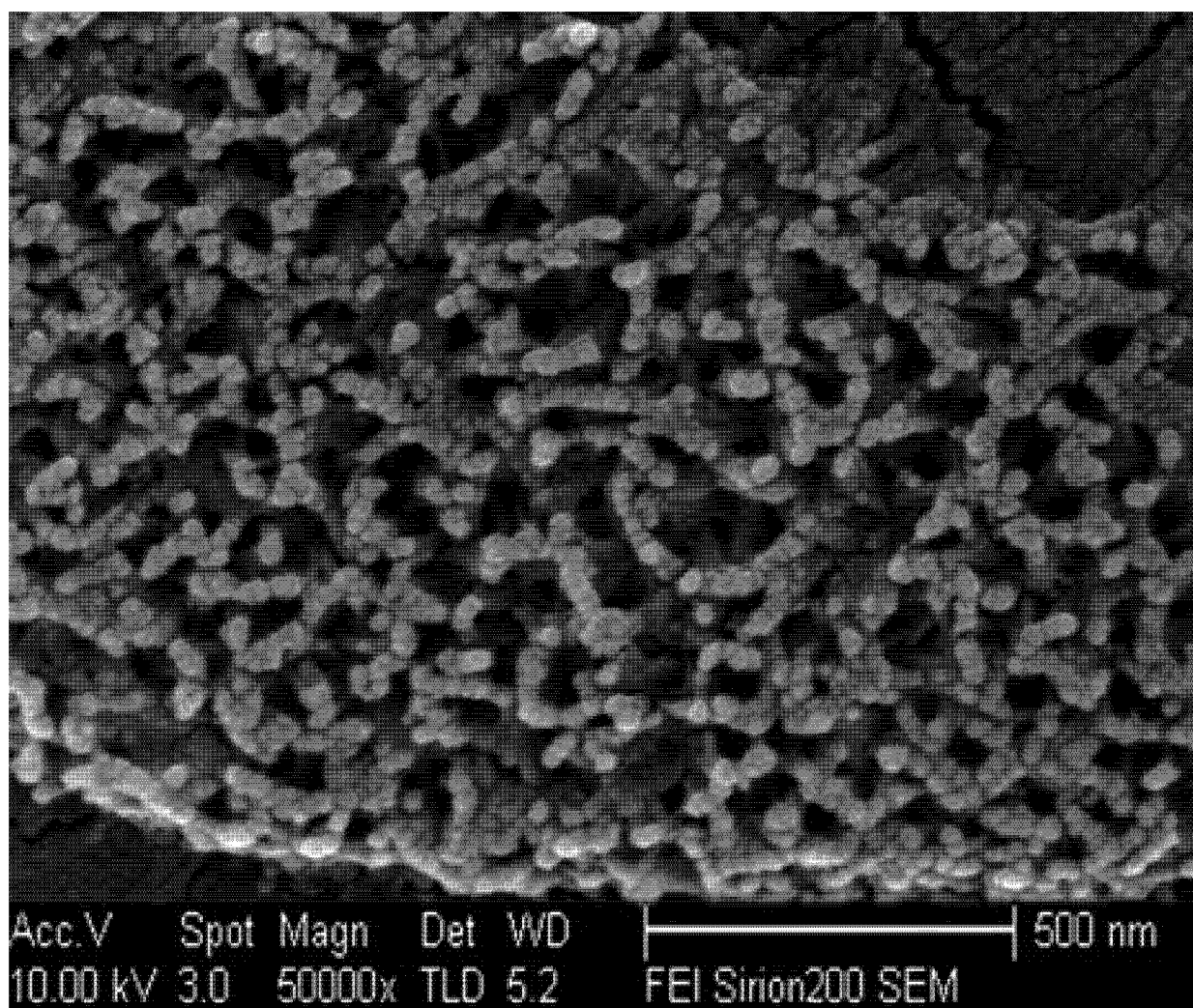


图 3

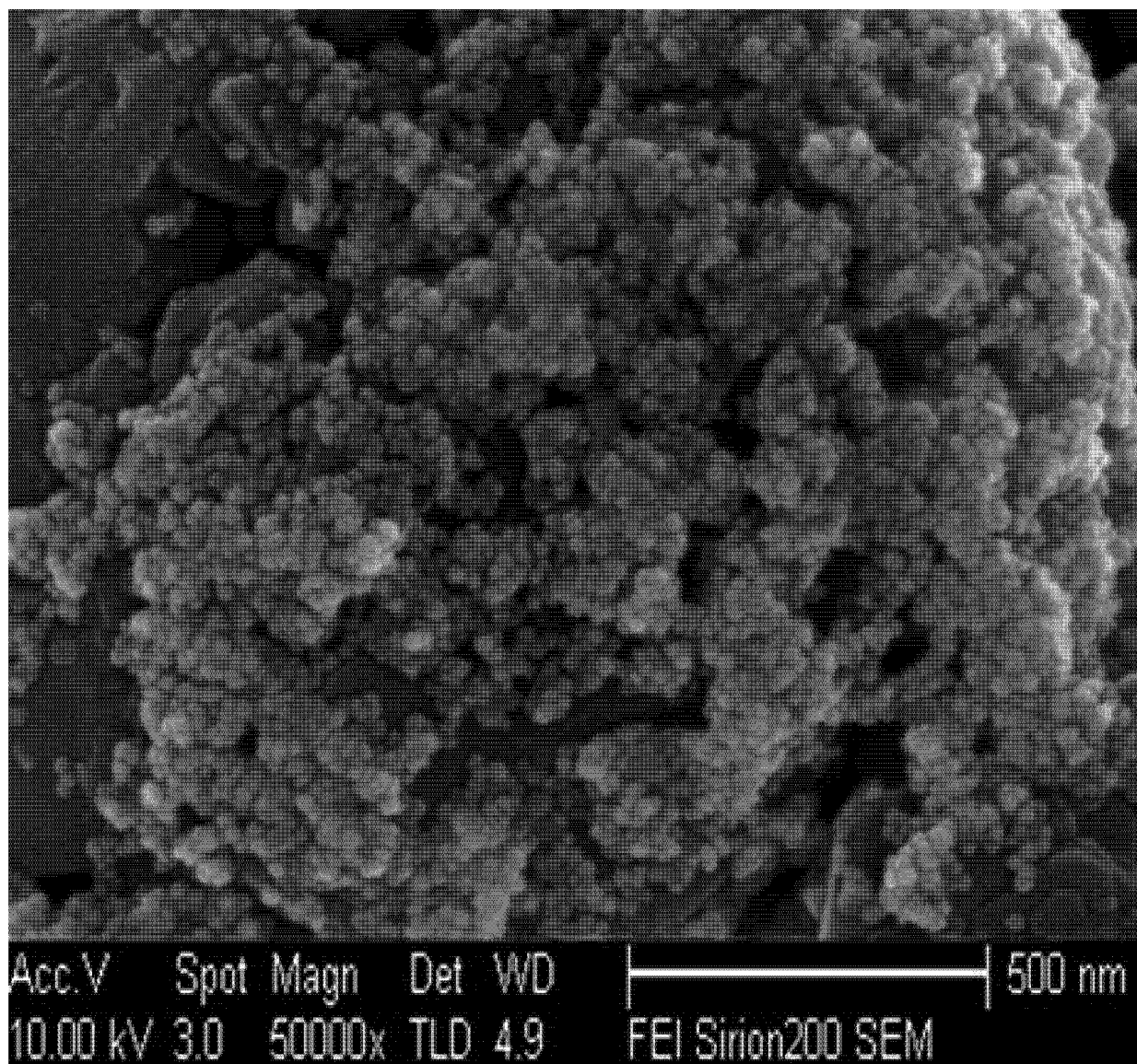


图 4

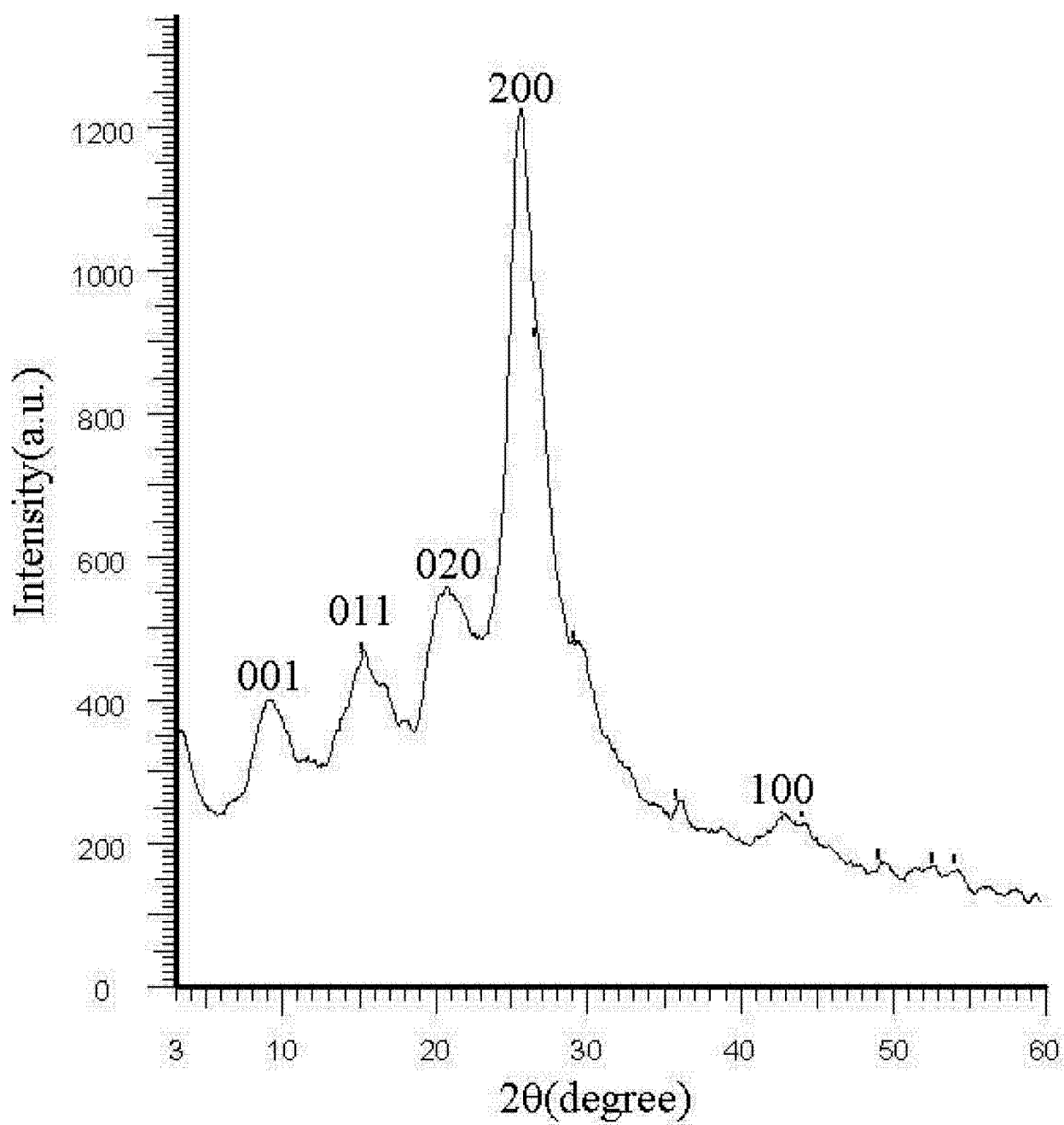


图 5

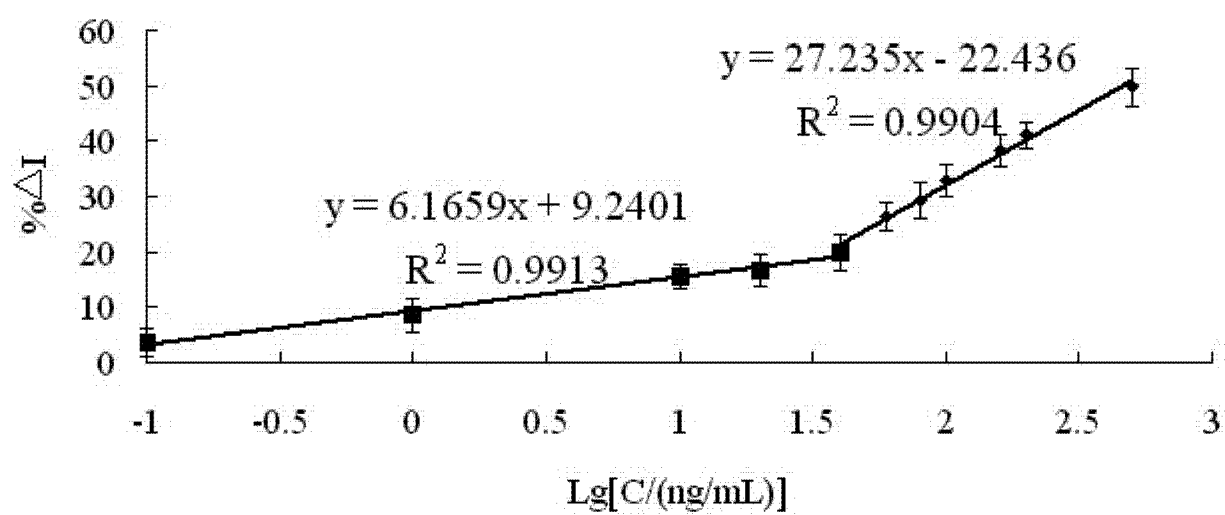


图 6

专利名称(译)	多壁碳-聚苯胺-壳聚糖/纳米金胶复合修饰免疫传感器的制备		
公开(公告)号	CN103472220B	公开(公告)日	2015-01-07
申请号	CN201310407855.1	申请日	2013-09-10
[标]申请(专利权)人(译)	山东理工大学		
申请(专利权)人(译)	山东理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东理工大学		
[标]发明人	孙霞 王相友 乔璐 郭业民 赵文萃		
发明人	孙霞 王相友 乔璐 郭业民 赵文萃		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/577		
其他公开文献	CN103472220A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种多壁碳-聚苯胺-壳聚糖/纳米金胶复合修饰免疫传感器的制备,属于生物传感器制备领域。本发明第一步为多壁碳-聚苯胺-壳聚糖纳米复合材料及纳米金胶的制备:以多壁碳、苯胺、壳聚糖为原料,利用多壁碳-聚苯胺-壳聚糖复合材料的良好电化学氧化还原活性、好的生物相容性以及高度的化学稳定性,修饰工作电极以促进电子转移;第二步为纳米金胶和多壁碳-聚苯胺-壳聚糖纳米复合液共同修饰电极的免疫传感器制备。具大量氨基的纳米复合液与纳米金胶形成的金氨体系有较高的稳定性和高度有序性,保持了抗体的生物活性且提高了抗体有效固定量。本发明的免疫传感器,检测时间较短,灵敏度高,选择性、稳定性好,再生能力好,回收率符合要求。

