



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107422013 A

(43)申请公布日 2017.12.01

(21)申请号 201710513697.6

(22)申请日 2017.06.29

(71)申请人 东南大学

地址 210096 江苏省南京市四牌楼2号

(72)发明人 沈艳飞 潘登 张明明 陈慧琴
张袁健

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

代理人 肖明芳

(51) Int. Cl.

G01N 27/327(2006.01)

G01N 27/30(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

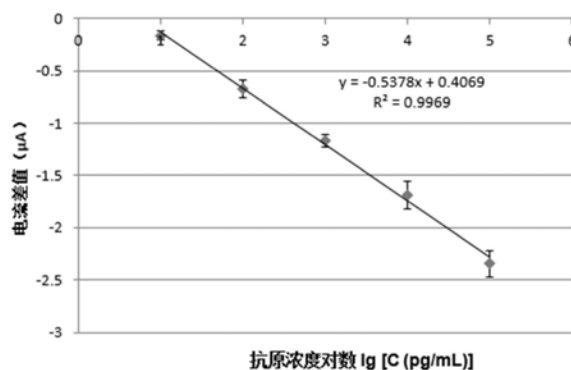
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种测定黄曲霉毒素B1的免疫生物传感器及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种测定黄曲霉毒素B1的免疫生物传感器及其制备方法与应用,基底电极表面依次经GO-PB-PTC-NH₂溶液,AuNPs溶液和黄曲霉毒素B1抗体溶液修饰,所述基底电极为玻碳电极,所述纳米金和黄曲霉毒素B1抗体通过Au-S键共价连接。氧化石墨烯和纳米金由于具有比表面积大,电导率高,生物相容性好等特点,可达到提高免疫电极的灵敏度。相比传统抗体,纳米抗体具有体积小,溶解性好,界面稳定性好,亲和力好,优化定制,简单人性化的优点。该免疫生物传感器操作简单,成本低,可应用于食品中黄曲霉毒素B1的检测,并在食品安全分析等领域具有广泛的应用前景。



1. 一种测定黄曲霉毒素B1的免疫生物传感器的制备方法,其特征在于,基底电极表面依次经GO-PB-PTC-NH₂溶液,AuNPs溶液和黄曲霉毒素B1抗体溶液修饰。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述基底电极为玻碳电极。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述GO-PB-PTC-NH₂溶液按如下步骤制备:

(1) 将PTCDA溶解于丙酮中,加入乙二胺,室温搅拌反应20~60min,离心,将沉淀用乙醇、水清洗,室温干燥,得到粉末状PTC-NH₂;

(2) 将GO溶解于超纯水中形成悬浊液,在悬浊液中加入FeCl₃、K₃[Fe(CN)₆]、KCl和HCl,室温搅拌反应12h;向其中加入步骤(1)得到的PTC-NH₂,室温搅拌反应12h,得到GO-PB-PTC-NH₂溶液。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中PTCDA与乙二胺的比例为1g:15mL~1g:5mL。

5. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中GO和PTC-NH₂的质量比为3:1~1:3。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述AuNPs溶液按如下步骤制备:在超纯水中加入0.2~2wt.%的HAuCl₄·3H₂O溶液,搅拌加热至90~100℃,向其中加入0.2~2wt.%柠檬酸钠溶液,搅拌并煮沸5~25min,待变色后取出冷却,得到AuNPs溶液。

7. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述黄曲霉毒素B1抗体为黄曲霉毒素B1纳米抗体。

8. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将基底电极进行打磨、抛光和超声清洗;

(2) 将GO-PB-PTC-NH₂溶液滴加到步骤(1)得到的电极表面,室温放置0.5~2h,用PBS溶液清洗,晾干;

(3) 将步骤(2)得到的电极浸泡在AuNPs溶液中,1~10℃放置1~5h,用PBS溶液清洗,晾干;

(4) 向步骤(3)得到的电极表面滴加黄曲霉毒素B1抗体溶液,1~10℃放置6~18h,用PBS溶液清洗,晾干;

(5) 向步骤(4)得到的电极表面滴加BSA溶液,室温放置10~60min,用PBS溶液清洗,晾干。

9. 权利要求1-8任意一项所述的制备方法制备得到的免疫生物传感器。

10. 权利要求9所述的免疫生物传感器在定量检测黄曲霉毒素B1中的应用。

一种测定黄曲霉毒素B1的免疫生物传感器及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于致病真菌快速检测技术领域,具体涉及一种测定黄曲霉毒素B1的免疫生物传感器及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素(AFT)是黄曲霉、寄生曲霉和曲霉菌主要产生的次生代谢物,目前是最强致癌物质之一。AFT不是单一的化合物,而是一组化学结构相似的化合物。已分离鉴定出12种,包括B1、B2、G1、G2、M1、M2等毒素和有毒醇。由于这些化合物的形成条件不同,因此它们具有不同的分布和毒性来源,其中M1和M2主要发现在牛奶中。黄曲霉毒素B1(AFB1)是目前已知的最强致癌物质,AFB1的毒性是氰化钾的10倍,是砷的68倍。同时,AFB1具有诱变,致癌和致畸作用,甚至可能导致人类和动物急性中毒死亡。据报道,AFB1的暴露可能对人体和动物造成多种系统的毒性作用,包括消化系统毒性、肝脏毒性、血液毒性、免疫毒性、生殖和发育毒性等。人类暴露于AFB1的临床症状是发烧,呕吐,腹痛和食欲不振,但观察到肝脾肿大,肝痛,皮肤黄染,腹水,下肢水肿,肝功能异常,心脏肿大和肺水肿。严重时甚至出现惊厥症状,昏迷和死亡。AFT中毒可导致贫血,黄疸,胃肠道疾病和生殖能力下降,特别是肝损伤。

[0003] 目前,检测AFB1的主要方法是薄层色谱(TLC)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、荧光免疫测定和高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS)。由于这些设备价格昂贵,技术要求高,样品前处理复杂的不足,这些方法无法实现AFB1的快速检测。电化学分析方法可以简单,实时,快速的筛选鉴定,近来已成为分析检测AFB1的研究热点。

[0004] 氧化石墨烯(GO)具有比表面积大,导电性好,生物相容性强等优点,因此在传感器领域使用后,可获得具有优异性能的新型纳米电极。PTC-NH₂具有独特的化学和电化学性质从而可以降低背景电流信号,用于修饰电极增强导电性。普鲁士蓝(PB)作为一种分子膜材料,因具有稳定性好,增强的电子传递速率和高的表面活性的优势,因此被广泛应用于光电转换,分子识别,离子选择电极,生物传感器,防腐蚀等领域。

[0005] 纳米抗体是一种缺失轻链只包含一个重链可变区(VHH)和两个常规的CH2与CH3区的天然抗体,主要存在骆驼和羊驼等外周血液中,该抗体不像人工改造的单链抗体片段(scFv)那样容易粘连甚至团聚。更重要的是单独克隆并表达出来的VHH结构具有与原重链抗体相当的结构稳定性以及与抗原的结合活性,是目前已知的可结合目标抗原的最小单位。其具有体积小,溶解性好,界面稳定性好,亲和力好,易穿越血脑屏障和靶向效应,优化定制,简单人性化,纳米抗体在肿瘤、传染病、炎性肠病、阿尔茨海默病、血栓形成和动脉粥样硬化病等多种疾病的诊断和治疗上具有广泛的利用前景。

发明内容

[0006] 发明目的:为解决现有技术存在的缺陷,本发明提供了一种黄曲霉毒素B1残留检测的免疫生物传感器及其制备方法。本发明还提供了一种黄曲霉毒素B1残留检测的免疫生

物传感器检测方法,所述的方法灵敏度高、特异性好、具有很宽的线性范围和较低检测限且成本低廉,可应用于食品中黄曲霉毒素B1的检测。

[0007] 本发明中技术术语的缩写如下:

[0008] 黄曲霉毒素B1:AFB1;氧化石墨烯:GO;普鲁士蓝:PB;玻碳电极:GCE;纳米金:AuNPs或GNP;茚四羧酸二酐:PTCDA;黄曲霉毒素B1纳米抗体:Nbs

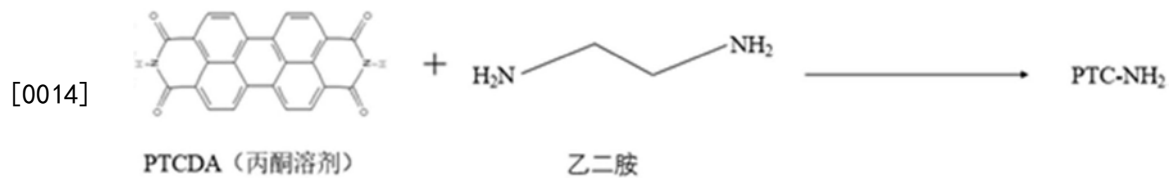
[0009] 技术方案:本发明所述的一种测定黄曲霉毒素B1的免疫生物传感器的制备方法,基底电极表面依次经GO-PB-PTC-NH₂溶液、AuNPs溶液和黄曲霉毒素B1抗体溶液修饰。

[0010] 所述AuNPs和黄曲霉毒素B1抗体通过Au-S键共价连接。

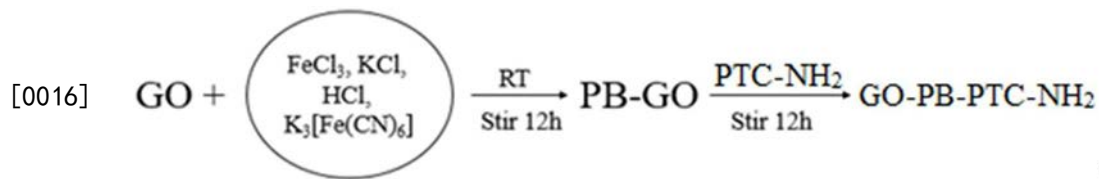
[0011] 优选地,所述基底电极为玻碳电极。

[0012] 所述GO-PB-PTC-NH₂溶液按如下步骤制备:

[0013] (1) 将PTCDA溶解于丙酮中,加入乙二胺,室温搅拌20~60min,离心,将沉淀用乙醇、水清洗,室温干燥,得到红色粉末状PTC-NH₂;



[0015] (2) 将GO溶解于超纯水中形成悬浊液,在悬浊液中加入FeCl₃、K₃[Fe(CN)₆]、KCl和HCl,室温搅拌12h;再加入步骤(1)得到的PTC-NH₂,室温搅拌12h,得到GO-PB-PTC-NH₂溶液;



[0017] 所述步骤(1)中PTCDA与乙二胺的比例为1g:15mL~1g:5mL,PTCDA和丙酮的比例为1g:3mL~1g:7mL。

[0018] 所述步骤(2)中GO悬浮液中GO浓度为0.5~1mg/mL,GO、FeCl₃、K₃[Fe(CN)₆]和KCl的质量比为2.1:1:1:46~8.4:1:4:46。

[0019] 所述步骤(2)中加入盐酸起到维持酸性环境的作用。

[0020] 所述步骤(2)中GO和PTC-NH₂的质量比为3:1~1:3。

[0021] 优选地,所述步骤(2)中GO和PTC-NH₂的质量比为1:1。

[0022] 所述AuNPs溶液按如下步骤制备:在超纯水中加入0.2~2wt.%的HAuCl₄·3H₂O溶液,搅拌加热至90~100℃,向其中加入0.2~2wt.%柠檬酸钠溶液,搅拌并煮沸5~25min,待变色后取出冷却,得到AuNPs溶液。

[0023] 优选地,所述AuNPs溶液按如下步骤制备:在超纯水加入1wt.%的氯金酸溶液,搅拌加热至95℃,向氯金酸溶液中加入1wt.%的柠檬酸钠溶液,搅拌并煮沸15min,待变色后取出冷却,得到AuNPs溶液。

[0024] 所述超纯水、HAuCl₄·3H₂O溶液和柠檬酸钠溶液的体积比为100:1:1~100:1:3。

[0025] 所述HAuCl₄·3H₂O溶液的溶剂为超纯水,柠檬酸钠溶液的溶剂为超纯水。

[0026] 优选地,所述黄曲霉毒素B1抗体为黄曲霉毒素B1纳米抗体。

[0027] 一种测定黄曲霉毒素B1的免疫生物传感器的制备方法,包括以下步骤:

- [0028] (1) 电极预处理:将基底电极进行打磨、抛光和超声清洗;
- [0029] (2) 将GO-PB-PTC-NH₂溶液滴加到步骤(1)得到的电极表面,室温放置0.5~2h,直至GO-PB-PTC-NH₂完全结合在电极表面,用PBS溶液清洗,晾干;
- [0030] (3) AuNPs的固定:将步骤(2)得到的电极浸泡在AuNPs溶液中,1~10℃放置1~5h,用PBS溶液清洗,晾干;
- [0031] (4) 共价连接黄曲霉毒素B1抗体:向步骤(3)得到的电极表面滴加黄曲霉毒素B1抗体溶液,1~10℃放置6~18h,使黄曲霉毒素B1抗体和AuNPs充分连接,用PBS溶液清洗,晾干;
- [0032] (5) 封闭非特异性位点:向步骤(4)得到的电极表面滴加BSA溶液,室温放置10~60min,封闭未被纳米抗体结合的位点,用PBS溶液清洗,晾干。
- [0033] 所述步骤(1)中基底电极分别用0.05和0.03μm Al₂O₃粉末抛光,然后分别用无水乙醇、超纯水超声清洗5min。
- [0034] 所述步骤(2)中GO-PB-PTC-NH₂溶液的浓度为1~2mg/mL。GO-PB-PTC-NH₂溶液是过量的,用PBS溶液清洗未结合的GO-PB-PTC-NH₂。
- [0035] 所述步骤(3)中AuNPs溶液的浓度为0.2~1mg/mL。AuNPs溶液是过量的,用PBS溶液清洗未结合的AuNPs。
- [0036] 所述步骤(4)中黄曲霉毒素B1抗体的溶剂为0.1M PBS,浓度为1~3mg/mL。黄曲霉毒素B1抗体溶液是过量的,用PBS溶液清洗未结合的黄曲霉毒素B1抗体。
- [0037] 所述步骤(5)中BSA溶液的溶剂为0.1M PBS,浓度为2~20mg/mL。BSA溶液是过量的,用PBS溶液清洗未结合的BSA。
- [0038] 上述任一制备方法制备得到的免疫生物传感器。
- [0039] 上述任一制备方法制备得到的免疫生物传感器在定量检测黄曲霉毒素B1中的应用。
- [0040] 有益效果:与现有技术相比,本发明具有如下优点:
- [0041] (1) 氧化石墨烯和纳米金由于具有比表面积大,电导率高等特点,可提高免疫电极的灵敏度。
- [0042] (2) 本实验采用绿色无毒害化学试剂,对检测样品无损害。
- [0043] (3) 相比传统抗体,纳米抗体具有体积小,溶解性好,界面稳定性好,亲和力好,优化定制,简单人性化的优点。
- [0044] (4) 本发明的免疫生物传感器操作简单,成本低,可应用于食品中黄曲霉毒素B1的检测,并在食品安全分析等领域具有广泛的应用前景。

附图说明

- [0045] 图1为本发明的制备示意图;
- [0046] 图2为本发明的循环伏安图;
- [0047] 图3为本发明的峰电流强度与抗原浓度之间的线性关系图;
- [0048] 图4为本发明的选择性和特异性研究。

具体实施方式

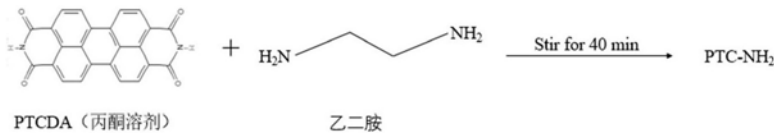
[0049] 根据下述实施例,可以更好地理解本发明。本领域的技术人员容易理解,实施例所描述的内容仅用于说明本发明,而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

[0050] 实施例1 GO-PB-PTC-NH₂的制备

[0051] (1) PTC-NH₂的制备

[0052] 将1g PTCDA溶于5mL丙酮中,逐滴加入10mL乙二胺,在通风橱中室温搅拌反应40min。离心分离,所得沉淀产物经乙醇、去离子水分别洗涤后室温干燥,即得红色粉末状PTC-NH₂。

[0053] 所述合成过程如式I所示:



[0054]

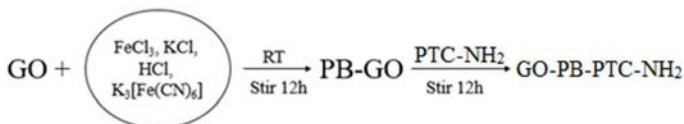
式 1

[0055] (2) GO-PB-PTC-NH₂的制备

[0056] 称取10.15mg GO溶于15mL超纯水中形成悬浮液,在上述悬浮液中加入4.05mg FeCl₃·6H₂O,4.94mg K₃[Fe(CN)₆],111.825mg KCl和0.075mL 2M HCl(提供酸性环境),在上述悬液中制备PB并和GO结合。将PB与GO室温下磁力搅拌12h,第二天预期混合液呈暗青色并且悬液分布均匀。加入10.15mg PTC-NH₂,室温下搅拌过夜12h,第三天收取制备的混合液(颜色呈暗红色),即得所需的GO-PB-PTC-NH₂溶液(1.64mg/mL),室温储存待用。

[0057] 浓度的计算过程:K₃[Fe(CN)₆]的质量4.94mg求出[Fe(CN)₆]³⁻的摩尔质量为0.015mM。根据质量守恒定律生成的PB即普鲁士蓝(分子式:Fe₄[Fe(CN)₆]₃,859.25g/mol)其摩尔质量为0.005mM即4.30mg,再加上GO(10.15mg)和PTC-NH₂(10.15mg)其复合物总质量为24.60mg,总体积为15ml,计算GO-PB-PTC-NH₂浓度为1.64mg/ml。

[0058] 所述合成过程如式2所示:



[0059]

式 2

[0060] 实施例2 GO-PB-PTC-NH₂的制备

[0061] (1) PTC-NH₂的制备

[0062] 将1g PTCDA溶于3mL丙酮中,逐滴加入5mL乙二胺,在通风橱中室温搅拌反应20min。离心分离,所得沉淀产物经乙醇、去离子水分别洗涤后室温干燥,即得红色粉末状PTC-NH₂。

[0063] (2) GO-PB-PTC-NH₂的制备

[0064] 称取5.25mg GO溶于10.5mL超纯水中形成悬浮液,在上述悬浮液中加入4.05mg FeCl₃·6H₂O,2.47mg K₃[Fe(CN)₆],111.825mg KCl和0.075mL 2M HCl(提供酸性环境),在上述悬液中制备PB并和GO结合。将PB与GO室温下磁力搅拌12h,第二天预期混合液呈暗青色并且悬液分布均匀。加入15.75mg PTC-NH₂,室温下搅拌过夜12h,第三天收取制备的混合液(颜色呈暗红色),即得所需的GO-PB-PTC-NH₂溶液,室温储存待用。

[0065] 实施例3 GO-PB-PTC-NH₂的制备

[0066] (1) PTC-NH₂的制备

[0067] 将1g PTCDA溶于7mL丙酮中,逐滴加入15mL乙二胺,在通风橱中室温搅拌反应60min。离心分离,所得沉淀产物经乙醇、去离子水分别洗涤后室温干燥,即得红色粉末状PTC-NH₂。

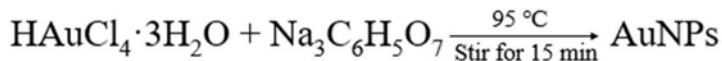
[0068] (2) GO-PB-PTC-NH₂的制备

[0069] 称取20.3mg GO溶于20.3mL超纯水中形成悬浮液,在上述悬浮液中加入4.05mg FeCl₃·6H₂O,9.88mg K₃[Fe(CN)₆],111.825mg KCl和0.075mL 2M HCl(提供酸性环境),在上述悬液中制备PB并和GO结合。将PB与GO室温下磁力搅拌12h,第二天预期混合液呈暗青色并且悬液分布均匀。加入6.77mg PTC-NH₂,室温下搅拌过夜12h,第三天收取制备的混合液(颜色呈暗红色),即得所需的GO-PB-PTC-NH₂溶液,室温储存待用。

[0070] 实施例4 AuNPs的制备

[0071] 在50mL超纯水中加入0.5mL HAuCl₄·3H₂O(1wt.%)溶液,搅拌均匀,加热至95℃,加入1.25mL柠檬酸钠溶液(1wt.%),搅拌并持续15min,待混合液颜色变成紫红色即可,停止煮沸,将混合液搅拌15min至冷却,获得15nm左右大小的纳米金颗粒,保存于4℃备用。

[0072] 所述合成过程如式3所示:



[0073]

式 3

[0074] 实施例5纳米抗体的制备方法

[0075] 使用AFB1-BSA进行六次骆驼免疫后,构建了针对AFB1的免疫噬菌体文库。之后,以噬菌体展示技术为基础进行AFB1特异性纳米抗体选择的生物筛选。噬菌体表面呈现文库在2×TY培养基(含有100μg/mL氨苄青霉素和2%葡萄糖的胰蛋白胨和酵母提取物)中生长,并在室温下孵育30min的VCSM13辅助噬菌体感染。将培养物离心并除去上清液。将沉淀重悬于2×TY培养基中,37℃培养过夜12h,富集噬菌体文库。然后,对抗原包被的微量滴定板(每孔20μg AFB1-BSA)进行文库的选择。用20μg BSA包被阴性对照。将从抗原包被的和阴性孔洗脱的噬菌体颗粒连续稀释并用于感染TG1大肠杆菌细胞。通过计数在正方形陪替氏培养皿上生长的菌落的数目来确定每个生物平移轮的相对富集。随机挑选来自富集轮的95个独立的菌落,并通过周质提取酶联免疫吸附测定(PE-ELISA)进行分析。最终通过阳性菌落的测序证实AFB1特异性纳米抗体,并对纳米抗体进行纯化,获得了高纯度和高产量的抗体。

[0076] 实施例6纳米抗体与商品化的AFB1单抗性能比较

[0077] (1) 研究商品化的AFB1单抗与AFB1纳米抗体的热稳定性。分别于0℃,50℃,65℃,80℃,90~100℃水浴10min,结果表明纳米抗体生物活性高于AFB1单抗,纳米抗体的热稳定性优于AFB1单抗。此外,将AFB1纳米抗体与AFB1单抗置于90℃分别进行不同时间的处理,采用ELISA法对抗体活性进行分析,在405nm测其吸光度,以吸光度大小来评价抗体的活性。结果亦表明纳米抗体的高热稳定性。AFB1纳米抗体与商品化的AFB1单抗热稳定实验的结果见表1和表2。

[0078] (2) 研究商品化的AFB1单抗与AFB1纳米抗体对有机溶剂的耐受性。使用不同有机溶剂如甲醇,乙醇,丙酮和二甲基亚砜处理,高浓度情况下,AFB1纳米抗体的活性均高于

AFB1单抗,采用ELISA法对抗体活性进行分析,在405nm测其吸光度,以吸光度大小来评价抗体的活性。结果显示纳米抗体具有更好的有机溶剂耐受性,纳米抗体与商品化的AFB1单抗对有机溶剂的耐受性结果见表3。

[0079] 表1 AFB1纳米抗体与商品化的AFB1单抗在不同温度下的相对活性

[0080]

	0 °C	20 °C	50 °C	65 °C	80 °C	90 °C
纳米抗体	100%	99%	98%	96%	95%	93%
单抗	100%	98%	82%	21%	25%	20%

[0081] 表2 AFB1纳米抗体与商品化的AFB1单抗在90°C不同时间下的相对活性

[0082]

	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
纳米抗体	100%	96%	98%	98%	91%	90%	85%
单抗	100%	23%	17%	20%	19%	19%	18%

[0083] 表3 AFB1纳米抗体与商品化的AFB1单抗对有机溶剂的耐受性实验的相对活性

[0084]

浓度 (wt.%) 有机溶剂种类		0	10	20	30	40	50
甲醇	纳米抗体	100%	100%	98%	95%	93%	90%
	单抗	100%	95%	93%	83%	65%	60%
乙醇	纳米抗体	100%	99%	93%	92%	88%	83%
	单抗	100%	98%	95%	90%	85%	78%
丙酮	纳米抗体	100%	98%	95%	93%	88%	85%
	单抗	100%	95%	95%	94%	74%	61%
二甲基亚砜	纳米抗体	100%	96%	92%	89%	87%	84%
	单抗	100%	95%	94%	88%	79%	65%

[0085] 实施例7测定黄曲霉毒素B1的免疫生物传感器的制备

[0086] 制备示意图如图1所示,包括以下步骤:

[0087] (1) 电极预处理:将玻碳电极分别用0.05和0.03 μm Al_2O_3 粉末处理,然后分别用无水乙醇、超纯水超声清洗5min;

[0088] (2) GO-PB-PTC-NH₂修饰电极:用移液枪取10 μL 的1.64mg/mL GO-PB-PTC-NH₂溶液滴加在预处理后的玻碳电极表面,室温放置2h,用PBS溶液清洗未结合的复合材料,晾干,利用碳纳米复合材料较大的比表面积优势使AuNPS更多的富集在电极上;

[0089] (3) AuNPS的固定:将步骤(2)得到的电极浸泡在AuNPS溶液中,在4°C冰箱中放置3h,用PBS溶液清洗未结合的AuNPS,晾干;

[0090] (4) 共价连接纳米抗体:滴加10 μL 2mg/mL黄曲霉毒素B1纳米抗体到步骤(3)得到的

电极上,利用Au-S键将黄曲霉毒素B1纳米抗体固定在电极表面,4℃冰箱中放置过夜,使黄曲霉毒素B1纳米抗体充分地 and AuNPS 相连接,用PBS溶液清洗未结合的纳米抗体,晾干;

[0091] (5) 封闭非特异性位点:滴加10 μ L 10mg/mL BSA溶液到步骤(4)得到的电极上,室温下放置30min,封闭未被黄曲霉毒素B1纳米抗体结合的一些位点,防止待测样品中某些物质与之发生非特异性结合,提高背景信号,用PBS清洗未结合的BSA,晾干;

[0092] (6) 检测抗原:滴加待测抗原溶液10 μ L到步骤(5)得到的电极上,4℃下反应12h,使抗原充分地 and 黄曲霉毒素B1纳米抗体发生特异性反应,通过免疫电极获得的峰值电流强弱变化来检测抗原的浓度。

[0093] 实施例8测定黄曲霉毒素B1的免疫生物传感器的制备

[0094] 制备示意图如图1所示,包括以下步骤:

[0095] (1) 电极预处理:将玻碳电极分别用0.05和0.03 μ m Al₂O₃粉末处理,然后分别用无水乙醇、超纯水超声清洗5min;

[0096] (2) GO-PB-PTC-NH₂修饰电极:用移液枪取20 μ L的1mg/mL GO-PB-PTC-NH₂溶液滴加在预处理后的玻碳电极表面,室温放置0.5h,用PBS溶液清洗未结合的复合材料,晾干,利用碳纳米复合材料较大的比表面积优势使AuNPS更多的富集在电极上;

[0097] (3) AuNPS的固定:将步骤(2)得到的电极浸泡在0.2mg/mL AuNPS溶液中,在10℃放置5h,用PBS溶液清洗未结合的AuNPS,晾干;

[0098] (4) 共价连接纳米抗体:滴加20 μ L 1mg/mL黄曲霉毒素B1纳米抗体到步骤(3)得到的电极上,利用Au-S键将黄曲霉毒素B1纳米抗体固定在电极表面,10℃放置6h,使黄曲霉毒素B1纳米抗体充分地 and AuNPS 相连接,用PBS溶液清洗未结合的纳米抗体,晾干;

[0099] (5) 封闭非特异性位点:滴加10 μ L 20mg/mL BSA溶液到步骤(4)得到的电极上,室温下放置10min,封闭未被黄曲霉毒素B1纳米抗体结合的一些位点,防止待测样品中某些物质与之发生非特异性结合,提高背景信号,用PBS清洗未结合的BSA,晾干;

[0100] (6) 检测抗原:滴加待测抗原溶液10 μ L到步骤(5)得到的电极上,4℃下反应12h,使抗原充分地 and 黄曲霉毒素B1纳米抗体发生特异性反应,通过免疫电极获得的峰值电流强弱变化来检测抗原的浓度。

[0101] 实施例9测定黄曲霉毒素B1的免疫生物传感器的制备

[0102] 制备示意图如图1所示,包括以下步骤:

[0103] (1) 电极预处理:将玻碳电极分别用0.05和0.03 μ m Al₂O₃粉末处理,然后分别用无水乙醇、超纯水超声清洗5min;

[0104] (2) GO-PB-PTC-NH₂修饰电极:用移液枪取10 μ L的2mg/mL GO-PB-PTC-NH₂溶液滴加在预处理后的玻碳电极表面,室温放置2h,用PBS溶液清洗未结合的复合材料,晾干,利用碳纳米复合材料较大的比表面积优势使AuNPS更多的富集在电极上;

[0105] (3) AuNPS的固定:将步骤(2)得到的电极浸泡在1mg/mL AuNPS溶液中,在10℃放置1h,用PBS溶液清洗未结合的AuNPS,晾干;

[0106] (4) 共价连接纳米抗体:滴加10 μ L 3mg/mL黄曲霉毒素B1纳米抗体到步骤(3)得到的电极上,利用Au-S键将黄曲霉毒素B1纳米抗体固定在电极表面,4℃放置18h,使黄曲霉毒素B1纳米抗体充分地 and AuNPS 相连接,用PBS溶液清洗未结合的纳米抗体,晾干;

[0107] (5) 封闭非特异性位点:滴加100 μ L 2mg/mL BSA溶液到步骤(4)得到的电极上,室

温下放置60min,封闭未被黄曲霉毒素B1纳米抗体结合的一些位点,防止待测样品中某些物质与之发生非特异性结合,提高背景信号,用PBS清洗未结合的BSA,晾干;

[0108] (6) 检测抗原:滴加待测抗原溶液10 μ L到步骤(5)得到的电极上,4 $^{\circ}$ C下反应12h,使抗原充分地和黄曲霉毒素B1纳米抗体发生特异性反应,通过免疫电极获得的峰值电流强弱变化来检测抗原的浓度。

[0109] 实施例10检测黄曲霉毒素B1的免疫生物传感器循环伏安图

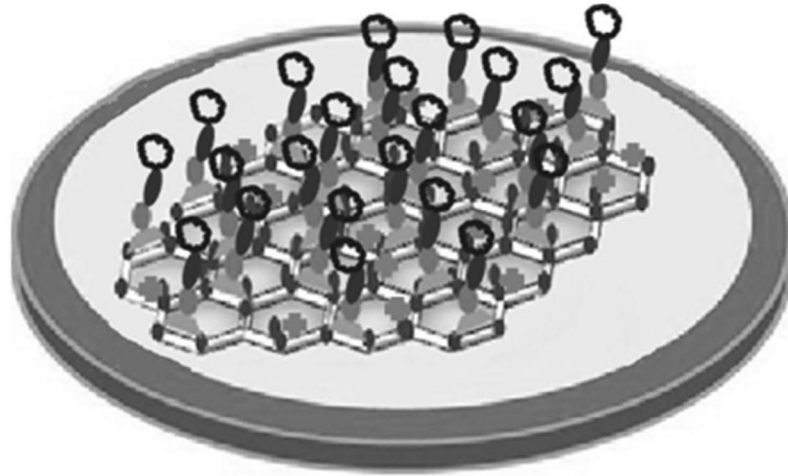
[0110] 将实施例7中每个步骤得到的玻碳电极置于含有2mM $K_3[Fe(CN)_6]$ 的0.01M PBS溶液中以0.1V/s的速度进行循环伏安扫描,结果见图2所示,随着G0-PB-PTC-NH₂-AuNPs复合物修饰在玻碳电极表面,获得了一个增大的峰电流信号。因为G0-PB-PTC-NH₂-AuNPs复合材料可以降低电极表面阻抗值,提高电子传递,进而提高传感器的灵敏度。然而,随着纳米抗体、BSA封闭和抗原的滴加,峰值电流越来越小,是因为上述均为蛋白质,不是导电物质,增大了电极表面的阻抗值,使得电流信号逐渐降低。以上结果说明各修饰阶段的修饰物成功固定在电极表面。

[0111] 实施例11检测黄曲霉毒素B1的免疫生物传感器峰电流强度与抗原浓度之间的线性关系研究

[0112] 免疫生物传感器的制备方法同实施例7,不同的是步骤(6)中抗原浓度。配制不同浓度的黄曲霉毒素B1标准溶液,分别为0.01ng/mL、0.1ng/mL、1ng/mL、10ng/mL和100ng/mL,每个浓度平行对照三次,检测峰电流强度。通过数据分析,得到峰电流强度与抗原浓度之间的线性关系,结果见图3。黄曲霉毒素B1浓度的对数与峰电流强度之间呈良好的线性关系,随着黄曲霉毒素B1浓度的不断增大,免疫传感器的峰电流强度随之不断减小,具有较低检测下限(10pg/mL)。《NY/T 2550-2014饲料中黄曲霉毒素B1的测定-胶体金法》中黄曲霉毒素B1的检测限为1.0ng/mL。本发明所述传感器的检测限要比农业标准高出三个数量级,说明该传感器具有较高的灵敏度。

[0113] 实施例12检测黄曲霉毒素B1的免疫生物传感器的抗干扰性能

[0114] 考察AFB1的结构类似物AFB2和AFG1以及溶剂PBS溶液对黄曲霉毒素B1检测的影响。免疫生物传感器的制备方法同实施例7,不同的是抗原,结果见图4。相同浓度下即100ng/mL的AFB1测定信号分别是AFB2,AFG1信号和空白PBS对照溶液的5.2倍,9.4倍和23.5倍,说明本发明所述的免疫传感器具有较高的特异性性能,并且对AFB1的测定具有很高的选择性。



GO-PB-PTC-NH₂/GNP/Nb/BSA/AFB1/GCE

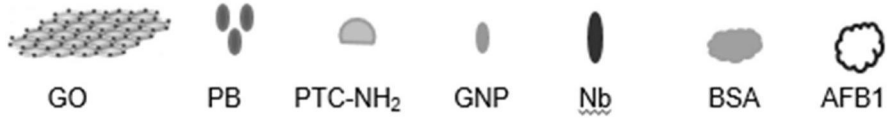


图1

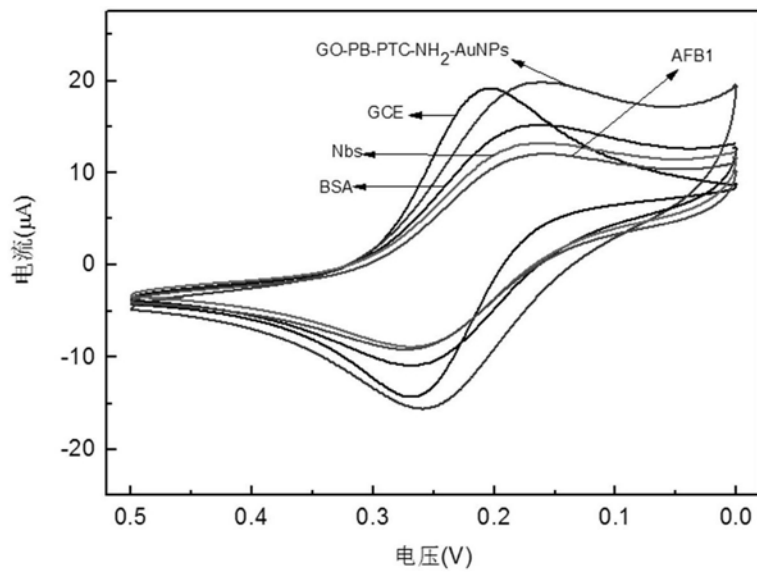


图2

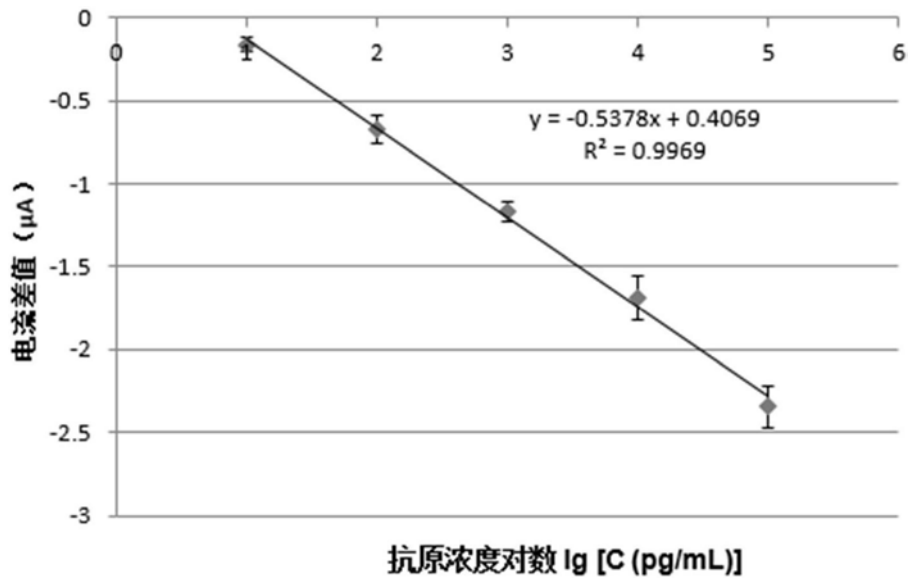


图3

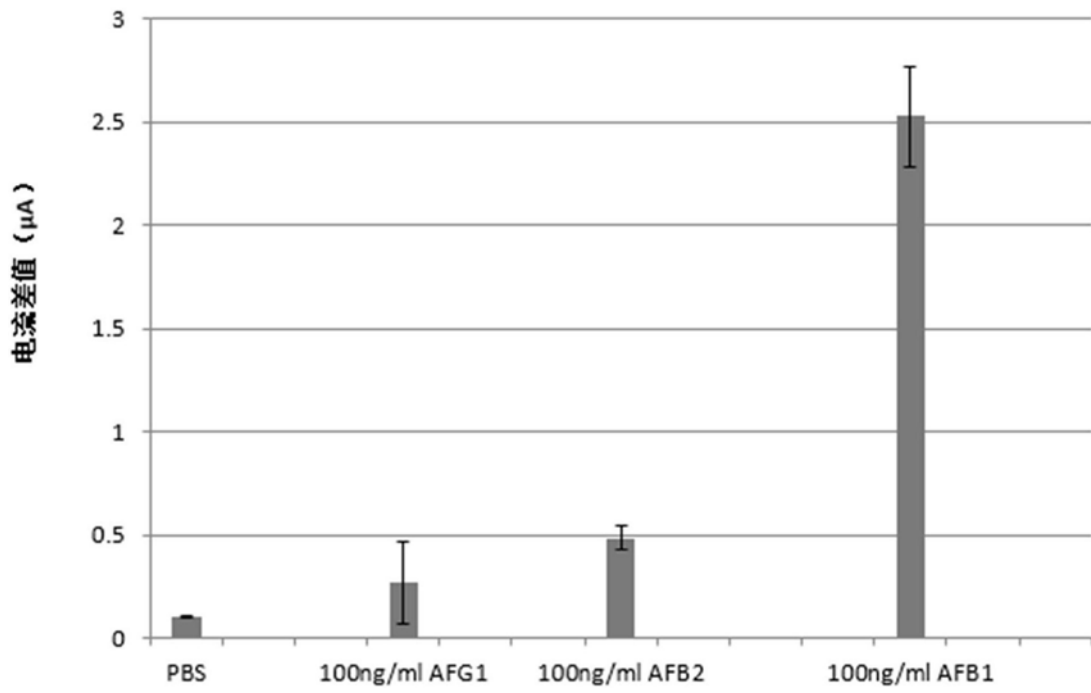


图4

专利名称(译)	一种测定黄曲霉毒素B1的免疫生物传感器及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN107422013A	公开(公告)日	2017-12-01
申请号	CN2017110513697.6	申请日	2017-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	东南大学		
[标]发明人	沈艳飞 潘登 张明明 陈慧琴 张袁健		
发明人	沈艳飞 潘登 张明明 陈慧琴 张袁健		
IPC分类号	G01N27/327 G01N27/30 G01N33/53		
CPC分类号	G01N27/3278 G01N27/308 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种测定黄曲霉毒素B1的免疫生物传感器及其制备方法与应用，基底电极表面依次经GO-PB-PTC-NH₂溶液，AuNPs溶液和黄曲霉毒素B1抗体溶液修饰，所述基底电极为玻碳电极，所述纳米金和黄曲霉毒素B1抗体通过Au-S键共价连接。氧化石墨烯和纳米金由于具有比表面积大，电导率高，生物相容性好等特点，可达到提高免疫电极的灵敏度。相比传统抗体，纳米抗体具有体积小，溶解性好，界面稳定性好，亲和力好，优化定制，简单人性化的优点。该免疫生物传感器操作简单，成本低，可应用于食品中黄曲霉毒素B1的检测，并在食品安全分析等领域具有广泛的应用前景。

