



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102879575 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 16

(21) 申请号 201210405208. 2

(22) 申请日 2012. 10. 23

(71) 申请人 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 朱盈 王相友 刘君峰  
翟晨

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

### (54) 发明名称

一种基于抗体定向固定和纳米复合材料免疫  
传感器制备方法

### (57) 摘要

本发明涉及一种基于抗体定向固定和纳米复  
合材料的免疫传感器制备方法,其特征在  
于:本发明采用谷胱甘肽作为空间手臂将  
抗克百威农药的单克隆抗体定向共价固  
定到纳米金胶表面,抗体的定向固定保  
持了抗体的生物活性以及自由的抗原结  
合位点来和农药有效的特异性结合,增  
强传感器的检测灵敏度。制备了一种新  
型纳米材料 GS-PEI-Au 纳米复合材料,  
用于改善石墨烯的水溶性、导电性以及  
稳定性。采用 MWCNTs-CS 和 GS-PEI-  
Au 两种复合纳米材料的协同作用共同  
修饰电极,显著的增强了电流响应,扩  
大了电极的有效固定面积,提高了电极  
表面抗体的有效固定量。将经过上述步  
骤修饰过的电极制成免疫传感器后,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. 一种基于抗体定向固定和纳米复合材料的免疫传感器制备方法,其特征在于:制备了一种新型的 GS-PEI-Au 纳米复合材料,用于改善石墨烯的水溶性、导电性以及稳定性;采用 MWCNTs-CS 和 GS-PEI-Au 两种复合纳米材料的协同作用共同修饰电极,显著的增强了电流响应,扩大了电极的有效固定面积,提高了电极表面抗体的有效固定量。

2. 如权利要求 1 所述的一种基于抗体定向固定和纳米复合材料的免疫传感器制备方法,其特征在于:谷胱甘肽作为空间手臂将抗克百威农药的单克隆抗体定向共价固定到纳米金胶表面,制备了一种新型的 AuNPs-Ab 共轭物,实现了抗体在玻碳电极表面的定向固定,改善了免疫传感器的检测性能。

## 一种基于抗体定向固定和纳米复合材料免疫传感器制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明提供一种基于抗体定向固定和纳米复合材料的免疫传感器制备方法,属于生物传感器技术领域。

### 背景技术

[0002] 近年来,农药残留引起的中毒事件屡屡发生,果蔬中的有害、剧毒农药的残留问题一直是人们关注的焦点,也是现今中国加入 WTO 后,农产品出口遭遇“绿色壁垒”的主要影响因素之一。克百威是氨基甲酸酯类杀虫剂主要品种之一,它作为一种光谱杀虫剂被广泛应用于当今农业中。该药剂具有内吸性,能通过根、茎、叶或种子吸收传导,并输送到植物体的各器官,也能通过径流渗透污染地下水。研究发现克百威的代谢物可引起细胞强烈的 DNA 单链断裂,具有明显的细胞毒性。虽然近年来国际上在蔬菜上已禁用该农药,但由于其对某些作物具有生长刺激作用,所以仍有不少违章使用现象。具有这样高毒性的农药残留超标的果蔬流入市场,必将会对人们健康造成严重危害,因此建立一种快速、灵敏、安全可靠的农药残留检测分析方法迫在眉睫。

[0003] 传统的用于检测农药残留的分析方法有: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(ELISA)等,这些传统的方法虽然具有高选择性和灵敏度,但其受到样品前处理耗时、仪器设备昂贵、操作人员技术要求高、检测时间长等诸多因素的限制,只能局限于实验室操作,不能满足果蔬现场速测的要求。免疫传感器是根据抗原和抗体特异性结合所引发的免疫反应的原理研制成的传感器,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。在电流型免疫传感器的制备过程中,抗体(Ab)或半抗原(hapten)的固定化并保持其良好的生物活性、空间排布以及信号的放大是制约传感器灵敏度、稳定性、选择性以及再生性能等的关键因素。

[0004] 发明的目的在于提供一种能克服上述缺陷、操作简单、灵敏度高,选择性好的检测农药残留的电流型免疫传感器的制备方法。

[0005] 其技术方案为:一种基于抗体定向固定和纳米复合材料的免疫传感器制备方法,其特征在于:实现抗体定向固定,抗克百威的单克隆抗体(Ab)以谷胱甘肽(glutathione, G-SH)作为空间手臂被定向共价固定到纳米金胶表面。

[0006] 所述的一种基于抗体定向固定和纳米复合材料的免疫传感器制备方法,其特征在于:分别制备多壁碳-壳聚糖(MWCNTs-CS)、石墨烯-聚乙烯亚胺-纳米金(GS-PEI-Au)两种纳米复合材料,并利用这两种纳米材料的协同作用共同修饰电极,以放大响应电流。

[0007] 所述的一种基于抗体定向固定和纳米复合材料的免疫传感器制备方法,其特征在于:实验条件的优化,主要包括测试底液的 pH、孵育温度以及孵育时间;所制备的免疫传感器的工作曲线为: $\% \Delta I = 14.275 + 11.087 \lg C$  (ng/mL), ( $R^2=0.9889.$ ),其检测限为 0.03ng/mL;免疫传感器性能检测包括特异性、稳定性、重现性、再生性以及免疫传感器对多

种果蔬样品回收率的测定。

[0008] 其制备原理为：本发明采用谷胱甘肽 (glutathione, G-SH) 作为空间手臂将抗克百威的单克隆抗体 (Ab) 定向共价固定到纳米金胶表面, 其中 G-SH 通过金硫键牢固的固定到纳米金胶表面, G-SH 末端羧基 (-COOH) 经 1- 乙基 -3-(3- 二甲氨基丙基) - 碳二亚胺 (EDC) 和 1, 6- 己二胺 (DAH) 活化后, 共价结合抗体 C 末端的 -COOH, 从而实现了 Ab 定向连接在纳米金胶表面。抗体的定向固定保持了抗体的生物活性以及自由的抗原结合位点来和农药有效的特异性结合。采用多壁碳 - 壳聚糖 (MWCNTs-CS)、石墨烯 - 聚乙烯亚胺 - 纳米金 (GS-PEI-Au) 两种纳米复合材料共同修饰电极, 显著的增强了电流响应, 扩大了电极的有效固定面积, 提高了电极表面抗体的有效固定量。将经过上述步骤修饰过的电极制成免疫传感器后, 检测农药的精度更高、实现小型、便捷、适用于现场检测的目的。采用本发明制成的免疫传感器可以在蔬果采收、上市前, 进行农药克百威残留的快速测定, 直接对农药残留是否超标量进行检测, 避免因食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：一种基于抗体定向固定和纳米复合材料的免疫传感器制备方法, 其特征在于：(1) 通过共价方法将抗体定向的固定在纳米金胶表面, 抗体的定向固定保持了抗体的生物活性以及自由的抗原结合位点来和农药有效的特异性结合；(2) 基于 MWCNTs-CS 和 GS-PEI-Au 两种纳米复合材料的协同作用, 将其共同修饰电极。

[0010] 本发明制备了一种新型纳米材料 GS-PEI-Au 纳米复合材料, 用于改善 GS 的水溶性、导电性以及稳定性。采用 MWCNTs-CS 和 GS-PEI-Au 两种复合纳米材料的协同作用共同修饰电极, 放大响应信号, 增大电极的有效面积用于固定更多的抗体。另外, 通过抗体的定向固定保持了抗体的生物活性以及自由的抗原结合位点, 增强传感器的检测灵敏度。

[0011] 所述电流型免疫传感器的制备工艺如下：(1) 制备 MWCNTs-CS 纳米复合材料、GS-PEI-Au 纳米复合材料以及 AuNPs-Ab 共轭物；(2) 将 MWCNTs-CS 纳米复合材料修饰到清洗好的裸玻碳电极修饰上, 烘干；(3) 修饰 GS-PEI-Au 纳米复合材料, 烘干；(5) 修饰 AuNPs-Ab 共轭物, 4℃ 孵育 12h；(6) 将上述制备好的电极最后浸入 1% 的 BSA 溶液中室温下静置 30min, 以封闭电极上非特异性结合位点, 室温下晾干, 免疫传感器制作完成, 保存在 4℃ 条件下备用。

### 具体实施方式

[0012] 实施例：(1) MWCNTs-CS 纳米复合材料的制备：将壳聚糖 (CS) 溶于 1.0% 的醋酸溶液中, 配成 0.25% CS 溶液, 室温下磁力搅拌 1h, 使壳聚糖完全溶解, 然后用 NaOH 将混合液的 pH 调到 5.0。称取 1mg MWNTs, 加入 1mL 0.25% 壳聚糖溶液, 再超声分散 2h, 最后得到稳定的黑色分散液 (MWCNTs-CS 纳米复合材料)。(2) GS-PEI-Au 纳米复合材料的制备：称取 3mg GS, 加入 10mL 去离子水, 超声分散 10min, 得到 GS 分散液。在 GS 分散液中加入 0.2 mL 1.0 M PEI 水溶液, 超声分散 10min, 然后加入 1.6 mL 21mM HAuCl<sub>4</sub>, 将此混合液 70℃ 水浴 2h, 取出, 冷却至室温。15,000 rpm 离心 10 min, 去除上清液, 反复离心, 将离心所得沉淀物溶解在 1.5 mL 去离子水中, 超声分散 5min, 得到稳定的黑色分散液 (GS-PEI-Au 纳米复合材料)。该分散液在室温下可保持一个月的稳定性。(3) AuNPs-Ab 共轭物的制备：取 5 mL 制备好的 AuNPs

溶液,加入 4 mL 65  $\mu$ M 的 G-SH,搅拌 10-15min,混合液于 4500 rpm 离心 30min,离心产物悬浮在 1 mL PBS 中,获得 G-SH 修饰的 AuNPs。向此产物中加入 300  $\mu$ L 58 mM EDC 和 3 mL MES 缓冲溶液 (pH 5.0),在一个悬臂装置中 4 $^{\circ}$ C 下放置 1.5 h,然后于 15,000 rpm 下离心 1 h 分离出 EDC 活化了的 AuNPs (EDC/AuNPs),此反应物悬浮在 1 mL PBS 中。向此反应物中加入 50  $\mu$ L 500  $\mu$ M DAH,室温下混合 30min,所得的反应混合物再次离心,获得 DAH 活化了的 AuNPs (DAH/EDC/AuNPs),悬浮在 1 mL PBS 中。取 500  $\mu$ L 10  $\mu$ g/mL Ab 加入 3 mL MES 缓冲溶液 (pH 5.0) 和 300  $\mu$ L 58 mM EDC,在一个悬臂装置中 4 $^{\circ}$ C 下放置 1.5 h。将 EDC 活化后的 Ab 加入 DAH/EDC/AuNPs 中,4 $^{\circ}$ C 反应 6h。反应物于 5,000 rpm 离心 30 min,获得 AuNPs-Ab 共轭物。[4]免疫传感器的制备:取 10  $\mu$ L 制备好的 MWCNTs-CS 纳米复合物滴涂在清洗好的 GCE 表面,红外烘干,然后用 pH=7.0 的 PBS 缓冲液冲洗表面,晾干,该修饰电极记作 MWCNTs-CS/GCE;取 10  $\mu$ L 制备好的 GS-PEI-Au 纳米复合物滴涂在 MWCNTs-CS/GCE 表面,红外烘干,然后用 pH=7.0 的 PBS 缓冲液冲洗表面,晾干,记作 GS-PEI-AuMWCNTs-CS/GCE;取 10  $\mu$ L AuNPs-Ab 共轭物滴涂在 GS-PEI-AuMWCNTs-CS/GCE 上,4 $^{\circ}$ C 孵育 12h;将上述组装好的电极浸入 1%的 BSA 溶液中室温下静置 30min,以封闭电极上非特异性结合位点,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。(5)从测试底液 pH、孵育温度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,pH 的范围为 4.0-8.0,孵育时间的范围为 10-40min。[6]配置 0.1-1.0 $\times 10^4$  ng/mL 的农药克百威标准溶液,将上述制备好的免疫传感器分别浸入不同浓度的克百威标准溶液,在常温下孵育 25min,检测免疫前后电流变化得到其工作曲线;[7]将免疫传感器在毒死蜱、敌敌畏、3-羟基克百威、西维因等干扰物存在的情况下对 100ng/mL 的克百威进行测试,以检测其选择性;选 5 根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克百威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 (pH 2.8) 解离克百威农药 5min 后再次免疫,检测其再生能力;[8]把多种果蔬样品彻底清洗干净,进行实际样品加标回收率的测试。

[0013] 此种电流型免疫传感器检测农药残留的检测方法操作工艺简单,检测时间较短,灵敏度高,选择性稳定性好,再生能力好和回收率符合要求,符合我国农药残留快速检测技术发展和国际化要求。

专利名称(译)	一种基于抗体定向固定和纳米复合材料免疫传感器制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102879575A</a>	公开(公告)日	2013-01-16
申请号	CN201210405208.2	申请日	2012-10-23
[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 朱盈 王相友 刘君峰 翟晨		
发明人	孙霞 朱盈 王相友 刘君峰 翟晨		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/531		
其他公开文献	CN102879575B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种基于抗体定向固定和纳米复合材料的免疫传感器制备方法，其特征在于：本发明采用谷胱甘肽作为空间手臂将抗克百威农药的单克隆抗体定向共价固定到纳米金胶表面，抗体的定向固定保持了抗体的生物活性以及自由的抗原结合位点来和农药有效的特异性结合，增强传感器的检测灵敏度。制备了一种新型纳米材料GS-PEI-Au纳米复合材料，用于改善石墨烯的水溶性、导电性以及稳定性。采用MWCNTs-CS和GS-PEI-Au两种复合纳米材料的协同作用共同修饰电极，显著的增强了电流响应，扩大了电极的有效固定面积，提高了电极表面抗体的有效固定量。将经过上述步骤修饰过的电极制成免疫传感器后，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。