



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108169473 A

(43)申请公布日 2018.06.15

(21)申请号 201711457467.9

(22)申请日 2017.12.28

(71)申请人 重庆医科大学

地址 400016 重庆市渝中区医学院路1号

(72)发明人 李朝睿 纪人月 邱景富

(74)专利代理机构 上海光华专利事务所(普通合伙) 31219

代理人 周建军

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

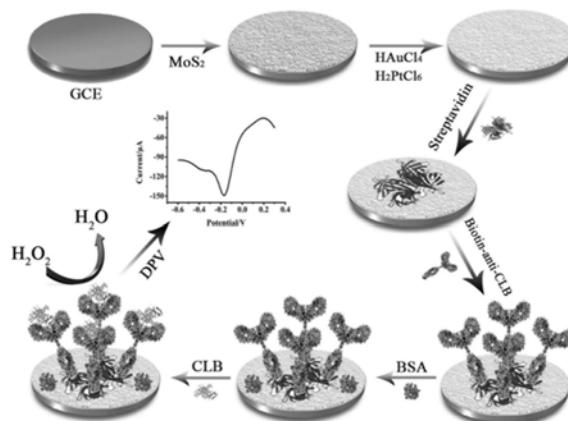
权利要求书1页 说明书9页 附图7页

### (54)发明名称

一种用于CLB检测的电化学免疫传感器及制备方法

### (57)摘要

本发明提供一种用于CLB检测的电化学免疫传感器及制备方法,该电化学免疫传感器具有基于 $\text{MoS}_2$ -AuPt纳米复合物和生物素-链霉亲和素系统的工作电极,本发明所提出的电化学免疫传感器具有良好的灵敏度(检测限为 $6.86\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),高特异性,可接受的重复性,同时也可用于实际猪肉样品中的检测。



1. 一种用于CLB检测的工作电极,其特征在于:包括基底电极,所述基底电极上修饰有L-半胱氨酸功能化的MoS<sub>2</sub>、AuPt纳米复合物、链霉亲和素水溶液、生物素标记抗体CLB;优选地,所述基底电极为玻碳电极。

2. 具有根据权利要求1所述的工作电极,其特征在于:所述工作电极上还孵育有待检测样品。

3. 具有权利要求1或2所述工作电极的电化学传感器。

4. 一种用于CLB检测的工作电极的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 在基底电极表面滴加L-半胱氨酸功能化的MoS<sub>2</sub>,再将MoS<sub>2</sub>修饰的电极浸泡在含有AuPt纳米复合物的水溶液中,电沉积,使得金铂纳米颗粒(AuPt-NPs)固定在被MoS<sub>2</sub>修饰的电极表面;

(2) 将链霉亲和素水溶液、生物素标记抗体CLB水溶液滴加至修饰电极表面,孵育,反应结束后,滴加BSA水溶液,孵育,得到所述基于MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合物和生物素-链霉亲和素系统的工作电极。

5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,L-半胱氨酸功能化的MoS<sub>2</sub>的制备方法如下:将MoS<sub>2</sub>粉末分散于水中,形成的MoS<sub>2</sub>水溶液,再与L-半胱氨酸水溶液混合,离心清洗后,反应得到MoS<sub>2</sub>;所述MoS<sub>2</sub>水溶液浓度为0.5-2.5mg/mL;优选为1.0-2.5mg/mL,更优选为1.5-2.5mg/mL,更优选为1.5mg/mL。

6. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,含有AuPt纳米复合物的水溶液的制备方法如下:将Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液分别加入HAuCl<sub>4</sub>水溶液和H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>水溶液中,再混合该两种溶液,形成体积比为1:1的混合溶液,反应得到含有AuPt纳米复合物的水溶液;优选地,所述HAuCl<sub>4</sub>水溶液的浓度、H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>水溶液的浓度均为5mg/mL,体积均为1mL;更优选地,所述HAuCl<sub>4</sub>水溶液、H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>水溶液中分别加入浓度为0.2mol/L的Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液0.5mL。

7. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,电沉积时间为10-60s,优选为30-50s,更优选为30s;

和/或,步骤(2)中,链霉亲和素水溶液的浓度为0.5-2.0μg/mL,优选为1.0-2.0μg/mL;

和/或,步骤(2)中,生物素标记抗体CLB水溶液的浓度为1-6μg/mL,优选为4-6μg/mL;

和/或,所述基底电极为玻碳电极。

8. 采用权利要求4-7任一项所述制备方法制得的工作电极制备待检测电极的方法,其特征在于,向步骤(2)制得的工作电极表面滴加样品液,孵育得到待检测的工作电极;优选地,孵育时间为10-60min;更优选地,孵育时间为20-50min;更优选地,孵育时间为30-50min。

9. 采用权利要求2所述工作电极检测CLB的方法,其特征在于,将所述工作电极接入三电极电化学电池中,结合参比电极、对电极,在背景电流稳定后,向工作缓冲液中加入10μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液,进行电化学检测;优选地,所述H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液的浓度≥16mmol/L;更优选地,所述H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液的浓度≥32mmol/L;更优选地,所述H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液的浓度为32-64mmol/L。

10. 根据权利要求1或2所述工作电极、权利要求3所得的电化学传感器在肉类食品CLB检测中的用途。

## 一种用于CLB检测的电化学免疫传感器及制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别是涉及一种用于CLB检测的电化学免疫传感器及制备方法。

### 背景技术

[0002] 克伦特罗 (CLB) 是 $\beta$ -激动剂家族的拟交感神经胺,用作哮喘的支气管溶解药物,特别是在慢性病的情况下。当用作食品生产动物的食品添加剂时,CLB还可以促进肌肉生长并降低脂肪含量。因此,CLB被称为“瘦肉精”。为了经济效益,许多生产者非法将CLB添加到牲畜饲料中以增加瘦肉的产量。然而,CLB半衰期长,在家畜体内代谢缓慢。如果人长期服用含有CLB的肉类,特别是儿童和老人,则会出现相应的临床症状和体征,如肌肉震颤、青光眼、精神焦虑、心悸,甚至死亡。为了公共卫生和食品安全,许多国家颁布法律禁止使用CLB作为家畜食品添加剂。因此,一个高灵敏度和特异性的克伦特罗检测方法对于研究和临床诊断都非常有意义。

### 发明内容

[0003] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的目的在于提供一种用于CLB检测的电化学免疫传感器及制备方法,用于解决现有技术中对克伦特罗CLB的检测限不够低、响应时间长、成本较高、灵敏度差等问题。

[0004] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明第一方面提供一种用于CLB检测的工作电极,包括基底电极,所述基底电极上修饰有L-半胱氨酸功能化的 $\text{MoS}_2$ 、AuPt纳米复合物、链霉亲和素水溶液、生物素标记抗体CLB。

[0005] 在本发明的一些实施例中,所述基底电极为玻碳电极。

[0006] 在本发明的一些实施例中,所述工作电极上还孵育有待检测样品。

[0007] 本发明第二方面提供具有上述工作电极的电化学免疫传感器。

[0008] 在本发明的一些实施例中,所述电化学免疫传感器还包括参比电极、对电极。

[0009] 本发明第三方面提供上述用于CLB检测的工作电极的制备方法,包括如下步骤:

[0010] (1) 在基底电极表面滴加L-半胱氨酸功能化的 $\text{MoS}_2$ ,再将 $\text{MoS}_2$ 修饰的电极浸泡在含有AuPt纳米复合物的水溶液中,电沉积,使得金铂纳米颗粒 (AuPt-NPs) 固定在被 $\text{MoS}_2$ 修饰的电极表面;

[0011] (2) 将链霉亲和素水溶液、生物素标记抗体CLB水溶液滴加至修饰电极表面,孵育,反应结束后,滴加BSA水溶液,孵育,得到所述基于 $\text{MoS}_2$ -AuPt纳米复合物和生物素-链霉亲和素系统的工作电极。

[0012] 在本发明的一些实施例中,步骤(1)中,L-半胱氨酸功能化的 $\text{MoS}_2$ 的制备方法如下:将 $\text{MoS}_2$ 粉末分散于水中,再与L-半胱氨酸水溶液混合,离心清洗后,反应得到 $\text{MoS}_2$ 。

[0013] 在本发明的一些实施例中, $\text{MoS}_2$ 粉末分散于水中,形成的 $\text{MoS}_2$ 水溶液浓度为0.5-2.5mg/mL。

- [0014] 优选地,  $\text{MoS}_2$ 水溶液浓度为1.0–2.5mg/mL。
- [0015] 更优选地,  $\text{MoS}_2$ 水溶液浓度为1.5–2.5mg/mL。
- [0016] 更优选地,  $\text{MoS}_2$ 水溶液浓度为1.5mg/mL。
- [0017] 在本发明的一些实施例中, 步骤(1)中, 含有AuPt纳米复合物的水溶液的制备方法如下: 将 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 水溶液分别加入 $\text{HAuCl}_4$ 水溶液和 $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ 水溶液中, 再混合该两种溶液, 形成体积比为1:1的混合溶液, 反应得到含有AuPt纳米复合物的水溶液。
- [0018] 在本发明的一些实施例中,  $\text{HAuCl}_4$ 水溶液的浓度、 $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ 水溶液的浓度均为5mg/mL。
- [0019] 在本发明的一些实施例中,  $\text{HAuCl}_4$ 水溶液、 $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ 水溶液的体积均为1mL。
- [0020] 在本发明的一些实施例中,  $\text{HAuCl}_4$ 水溶液、 $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ 水溶液中分别加入浓度为0.2mol/L的 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 水溶液0.5mL。
- [0021] 在本发明的一些实施例中,  $\text{HAuCl}_4$ 水溶液、 $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ 水溶液的体积均为1mL。
- [0022] 在本发明的一些实施例中, 步骤(1)中, 电沉积时间为10–60s。
- [0023] 优选地, 步骤(1)中, 电沉积时间为30–50s。
- [0024] 更优选地, 步骤(1)中, 电沉积时间为30s。
- [0025] 在本发明的一些实施例中, 步骤(2)中, 链霉亲和素水溶液的浓度为0.5–2.0 $\mu\text{g}$ /mL。
- [0026] 优选地, 步骤(2)中, 链霉亲和素水溶液的浓度为1.0–2.0 $\mu\text{g}$ /mL。
- [0027] 在本发明的一些实施例中, 步骤(2)中, 生物素标记抗体CLB水溶液的浓度为1–6 $\mu\text{g}$ /mL。
- [0028] 优选地, 步骤(2)中, 生物素标记抗体CLB水溶液的浓度为4–6 $\mu\text{g}$ /mL。
- [0029] 在本发明的一些实施例中, 所述工作电极的基底电极为玻碳电极。
- [0030] 本发明第四方面提供采用上述工作电极制备待检测电极的方法, 向步骤(2)制得的工作电极表面滴加样品液, 孵育得到待检测的工作电极。
- [0031] 在本发明的一些实施例中, 孵育时间为10–60min。
- [0032] 优选地, 孵育时间为20–50min。
- [0033] 更优选地, 孵育时间为30–50min。
- [0034] 在本发明的一些实施例中, 将所述工作电极接入三电极电化学电池中, 结合参比电极、对电极, 在背景电流稳定后, 向工作缓冲液中加入10 $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 水溶液, 进行电化学检测。
- [0035] 在本发明的一些实施例中, 所述 $\text{H}_2\text{O}_2$ 水溶液的浓度 $\geq 16\text{mmol/L}$ 。
- [0036] 优选地, 所述 $\text{H}_2\text{O}_2$ 水溶液的浓度 $\geq 32\text{mmol/L}$ 。
- [0037] 更优选地, 所述 $\text{H}_2\text{O}_2$ 水溶液的浓度为32–64mmol/L。
- [0038] 本发明第五方面提供上述工作电极或电化学生物免疫传感器在肉类食品CLB检测中的用途, 肉类食品包括猪肉等。
- [0039] 如上所述, 本发明的一种用于CLB检测的电化学免疫传感器及制备方法, 具有以下有益效果: 本发明所提出的电化学免疫传感器具有良好的灵敏度(检测限为6.86 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 高特异性, 可接受的重复性, 同时也可用于实际猪肉样品中的检测。

## 附图说明

[0040] 图1显示为本发明实施例中MoS<sub>2</sub>纳米片的FE-SEM图像(图1a)、MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合材料的FE-SEM图像(图1b、图1c)、MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合材料的EDS(图1d)。

[0041] 图2显示为本发明实施例中MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合材料的FE-SEM图像(a)、MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合材料中的元素Mo(b)、S(c)、Au(d)、Pt(e)的元素扫描图。

[0042] 图3显示为本发明实施例中含有0.1M KCl的5mM[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup>溶液中不同电极的CV(a)和SWV(b)响应图,MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合物修饰电极在不同扫描速率下的CV性能图(c)以及扩散反应相对应的线性回归方程图(d)。

[0043] 图4显示为本发明实施例中用不同信号标记孵育的电化学免疫传感器的i-t曲线:GCE(a曲线);MoS<sub>2</sub>/GCE(b曲线);MoS<sub>2</sub>-Au/GCE(c曲线)和MoS<sub>2</sub>-AuPt标记的MoS<sub>2</sub>-AuPt/GCE(d曲线)。

[0044] 图5显示为本发明实施例中MoS<sub>2</sub>的浓度(a)、AuPt-NPs的电沉积时间(b)、链霉亲和素的浓度(c)、生物素标记抗体Bio-CLB的浓度(d)、CLB孵育杂交时间(e)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的浓度(f)对免疫传感器的电化学信号影响图。

[0045] 图6显示为本发明实施例中免疫传感器对不同浓度CLB的电流响应(a),从a至h:0, 0.01ng/mL, 0.05ng/mL, 0.1ng/mL, 1ng/mL, 10ng/mL, 50ng/mL, and 100ng/mL;以及适应传感器对不同浓度CLB(n=3)的标准曲线(b)。

[0046] 图7显示为本发明实施例中目标CLB(1ng/ml)与其他干扰物质:Ca<sup>2+</sup>(10ng/ml), Na<sup>+</sup>(10ng/ml), K<sup>+</sup>(10ng/ml)、沙丁胺醇(SAL, 10ng/ml)、莱克多巴胺(RAC, 10ng/ml), 及其空白溶液相比, 电化学免疫传感器的电化学信号响应图(a);检测相同浓度的CLB在7根不同电极上的组内和组间的电化学信号响应图(b)以及免疫传感器在保存不同天数(n=3)后检测1ng/ml的电化学信号反应图(c)。

[0047] 图8显示为本发明实施例中电化学免疫传感器组装及制备过程示意图。

## 具体实施方式

[0048] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0049] 须知,下列实施例中未具体注明的工艺设备或装置均采用本领域内的常规设备或装置;所有压力值和范围都是指绝对压力。

[0050] 此外应理解,本发明中提到的一个或多个方法步骤并不排斥在所述组合步骤前后还可以存在其他方法步骤或在这些明确提到的步骤之间还可以插入其他方法步骤,除非另有说明;还应理解,本发明中提到的一个或多个设备/装置之间的组合连接关系并不排斥在所述组合设备/装置前后还可以存在其他设备/装置或在这些明确提到的两个设备/装置之间还可以插入其他设备/装置,除非另有说明。而且,除非另有说明,各方法步骤的编号仅为鉴别各方法步骤的便利工具,而非为限制各方法步骤的排列次序或限定本发明可实施的范围,其相对关系的改变或调整,在无实质变更技术内容的前提下,当亦视为本发明可实施的范畴。

[0051] 1. 概述

[0052] 目前,电化学生物传感器具有成本低、操作方便、检测简单快速、灵敏度和选择性好等优点,已被广泛应用于食品安全分析。纳米材料具有独特的性质,如表面积与体积之比比较大,生物相容性好,电导率高,受体分子负载量高,催化能力强。如今,纳米材料已广泛用作信号放大分子和纳米载体,以提高传感器的灵敏性。在不同类型的纳米材料中,MoS<sub>2</sub>由于其独特的纳米片结构特征及性能,如较大的比表面积和良好的电学性能而被认为是广泛应用流行的电极材料。同时,MoS<sub>2</sub>纳米片能很容易地被金属纳米粒子修饰,从而合成具有优异性能的纳米复合材料。此外,导电纳米材料,如双金属纳米粒子,由于其优良的电化学催化性能也受到了普遍的关注。因此,我们开发了一种结合MoS<sub>2</sub>纳米片和AuPt-NPs形成MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合材料的新策略。由于比表面积大,MoS<sub>2</sub>纳米片被用作传感平台来增加AuPt-NPs的负载。作为双金属电催化剂的选项,AuPt-NPs在促进电化学转移和反应速率方面具有协同效应。因此,MoS<sub>2</sub>纳米片和AuPt-NPs的组合可能会进一步增加免疫传感器的电化学电导率和灵敏度。在电极表面使用MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合材料不仅具有更大比表面积、优异的生物相容性,而且在还原H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>方面也具有高度的催化活性。

[0053] 此外,生物素-链霉亲和素系统表现出高特异性,同时链霉亲和素(SA)对生物素也具有非常高的亲和力。同时,因为SA是一个四聚体蛋白,故一个SA分子可以提供四个生物素结合位点。因此,为了进一步提高检测信号和免疫传感器的灵敏度,采用生物素-链霉亲和素系统作为连接MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合物和生物素标记抗体CLB(简称Bio-CLB)的桥梁,则可以更加明显的固定更多的靶CLB。

[0054] 在这项研究中,我们开发了一种基于MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合物和生物素-链霉亲和素系统的用于CLB测定的新型无标记电化学免疫传感器。首先,由于具有良好的导电性和独特的层状片结构,将L-半胱氨酸官能化的MoS<sub>2</sub>纳米片滴落到GCE的表面上,以有效地扩大电极的比表面积。同时,AuPt-NPs可以显著加速电子传递,实现信号放大,电沉积在MoS<sub>2</sub>电极上,为识别探针装载提供了稳定的表面。为了进一步提高构建的免疫传感器的灵敏度,采用生物素-链霉抗生物素蛋白系统来富集电极上的活性位点并增加固定的生物素-CLB的量。MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合材料和生物素-链霉亲和素体系具有以下两个主要优点:(1)与单独的MoS<sub>2</sub>纳米片和MoS<sub>2</sub>-Au纳米复合材料相比,合成的MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合材料具有最高的催化能力和最大的比表面积;(2)使用生物素-链霉抗生物素蛋白系统是富集活性部位以固定靶CLB并进一步提高免疫传感器的灵敏度和选择性的有效方式。最后,所提出的免疫传感器通过MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合物催化还原H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>来放大电化学信号,并获得了优异的电化学信号响应。本发明制得的无标记电化学免疫传感器具有特异性高、线性范围宽、检测限低、重现性和稳定性好等优点,可用于实际猪肉样品的CLB检测。

## [0055] 2. 实验方法

### [0056] 2.1 试剂和化学品

[0057] MoS<sub>2</sub>纳米片购买自南京吉仓纳米科技有限公司(中国);氯金酸(HAuCl<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O)、氯铂酸(H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>)、链霉亲和素(SA)和牛血清白蛋白(BSA)均购买自Sigma-Aldrich Chemical(St.Louis,USA,www.sigmaaldrich.com);L-半胱氨酸和CLB购买自阿拉丁试剂(上海)有限公司。以含有0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>和0.1M KCl的磷酸盐缓冲盐水(PBS,pH=6.8)作为所有电化学测量的工作缓冲液。所有化学品均为分析试剂级。超纯蒸馏水和去离子水(18.2MΩ)用于所有溶液制剂。

## [0058] 2.2仪器设备

[0059] 电化学测量包括计时电流法 (i-t)、循环伏安法 (CV)、方波伏安法 (SWV) 和差分脉冲伏安法 (DPV) 均在AUTOLAB PGSTAT302N电化学工作站 (瑞士万通科技有限公司) 上进行。场发射扫描电子显微镜FE-SEM) 图像使用Hitachi S4800 (Hitachi Limited, Japan) 获得。使用JEOL JSM-6700F显微镜 (日本) 对能量色散X射线光谱 (EDS) 进行标定。常规的三电极系统用于所有电化学测量, 由铂丝电极作为对电极, Ag/AgCl (包含3M KCl) 作为参比电极, 以及改性玻璃碳电极 (GCE, 4mm直径) 作为工作电极。使用PBS作为所有电化学测量的工作缓冲液, 使用前用氮气吹扫30分钟以除去PBS中的溶解氧。所有实验在室温 ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) 环境下进行。

## [0060] 2.3L-半胱氨酸功能化的MoS<sub>2</sub>的合成

[0061] 首先, 在室温条件下将10mg的MoS<sub>2</sub>纳米片粉末加入到10mL超纯水中, 使其分散, 然后再加入1mL的10mM的L-半胱氨酸水溶液, 将其混合。接着用超声机对该混合物进行超声处理, 处理时间为0.5小时。然后将混合物溶液以5000rpm离心5分钟, 并用10mL超纯水洗涤3次以除去未反应的化学物质。最后, L-半胱氨酸功能化的MoS<sub>2</sub>在4°C下保存备用。

## [0062] 2.4AuPt-NPs的制备

[0063] 首先, 将0.5mL 0.2M的Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液分别加入1mL的5mg/ml的HAuCl<sub>4</sub>溶液和1mL的5mg/ml的H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>溶液中。然后混合该两种溶液, 使之形成体积比为1:1的混合溶液。从而得到AuPt纳米复合物, 并将其保存在4°C下以备用。

## [0064] 2.5免疫传感器的制备

[0065] 电化学免疫传感器的制备过程如图8所示。将裸GCE用0.3μm和0.05μm氧化铝浆料重复抛光成镜面, 并用去离子水彻底冲洗。然后, 将GCE在无水乙醇中超声清洗5分钟, 随后在水中超声清洗5分钟。待GCE在室温下干燥后, 在其表面滴加7.5μL的L-半胱氨酸功能化的MoS<sub>2</sub>溶液并在室温下干燥。然后将其浸泡在AuPt-NPs溶液中, 并在-0.2V下电沉积30秒, 金铂纳米颗粒 (AuPt-NPs) 成功固定在被MoS<sub>2</sub>修饰的GCE表面上。将修饰电极用超纯水轻轻清洗并在空气中干燥。接下来, 将10μL的1μg/mL SA滴加到MoS<sub>2</sub>-AuPt修饰的GCE表面上, 在4°C下孵育过夜。反应后, 用超纯水洗涤电极以除去松散结合的反应物, 然后在氮气中干燥。接着通过链霉亲和素系统, 将10μL的4μg/mL的生物素标记抗体CLB滴加到MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合物修饰电极表面, 在37°C下孵育1h。为了阻止电极表面的非特异性结合, 将5μL BSA溶液 (w/w, 1%) 滴加到电极表面上孵育30分钟。然后将10μL不同浓度的 (如图6a所示) CLB标准溶液在室温下滴加到修饰电极上孵育30分钟, 然后洗涤。最终经过大量清洗以除去未结合的信号标签后, 电极准备进行测量。

## [0066] 2.6电化学测试

[0067] 所有电化学测试在含有三电极布置的常规电化学电池中进行。CV和SWV测量在含有0.1M KCl的5mM[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup>溶液中逐渐进行。CV测量以100mV/s的扫描速率和-0.2至0.6V的电压范围进行, SWV测量在室温下扫描范围为0.0V至+0.5V。DPV测量在0.1M PBS缓冲液 (pH=7.4) 中进行。为了进行电化学测量, 在室温和-0.4V电压条件下, 记录8mL工作缓冲液 (pH=6.8) 中的电流-时间曲线, 在背景电流稳定后, 向溶液中加入10μL 5M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 记录电化学信号变化。

## [0068] 3.结果与讨论

### [0069] 3.1 MoS<sub>2</sub>-AuPt 纳米复合材料的表征

[0070] 从FE-SEM图像(图1a)可以直观的看出,大多数合成的MoS<sub>2</sub>纳米片表现出清晰的片层结构。从图1b和图1c中可以明显观察到在AuPt-NPs电沉积后,MoS<sub>2</sub>纳米片表面均匀覆盖了大量高密度的AuPt-NPs,表明MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合材料已经被成功合成。此外,应用EDS进一步证实了MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合材料的合成。如图所示,在图1d中,EDS图像中显示的峰值与Mo、S、Au和Pt的元素峰值一致。同时,元素扫描图也用于检测MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合材料的元素组成,图2中的四种元素(Mo, S, Au和Pt)都有明显的信号。结合上述实验结果证明MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合材料已经成功合成。

### [0071] 3.2 逐步修饰电极的电化学表征

[0072] 为了表征改性电极的界面性质,通过CV和SWV测量在每个步骤后对感应界面的组装步骤进行了研究。不同步骤制备电极的CV谱如图3a所示。随着铁氰化物离子在玻碳电极表面的可逆氧化还原反应,记录了明确的氧化还原波(曲线a)。随着MoS<sub>2</sub>纳米片固定在电极上(曲线b),氧化还原峰电流有了明显增加。接下来,当AuPt-NPs电沉积到MoS<sub>2</sub>/GCE电极表面后,由于AuPt-NPs电子转移性能快,峰电流明显增加(曲线c)。然而,当SA固定在MoS<sub>2</sub>-AuPt/GCE电极上时,峰电流急剧下降(曲线d),表明SA降低了电子转移速率。接着当生物素标记抗体CLB被涂覆到SA表面时,由于生物素标记抗体CLB具有强电子电阻力,可以观察到峰电流显著降低(曲线e)。类似地,当使用非导电性BSA阻断非特异性位点时,峰电流进一步降低(曲线f)。此外,当修饰电极与CLB孵育时,由于CLB与生物素标记抗体CLB的特异性结合,电流峰值连续降低(曲线g)。使用SWV进一步验证修饰电极的逐步过程,发现CV结果与SWV获得的结果一致(图3b)。以上所有结果表明,免疫传感器的每一步电极修饰都是成功的。

[0073] 图3c显示的是MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合物的电极修饰在不同扫描速率下的CV性能。随着扫描速率逐步增加,在25-275mV/s的范围内,阳极峰值电流(I<sub>pa</sub>)和阴极峰值电流(I<sub>pc</sub>)也随之增加,两个线性回归方程如下:I<sub>pa</sub>(μA) = 7.5533 + 10.9548x (mV/s) (R = 0.9973) 和 I<sub>pc</sub>(μA) = -17.7968 - 10.5747x (mV/s) (R = 0.9928) (图3d)。这个结果表明在电化学过程中存在扩散控制反应。

### [0074] 3.3 比较不同纳米材料的电化学信号放大策略

[0075] 这种无标记免疫传感器的灵敏度主要是由于MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合材料在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>还原过程中具有良好的电催化活性。作为对比,在10mL PBS缓冲液中(pH = 7.4)加入10μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (32mM),用计时电流评价裸GCE, MoS<sub>2</sub>/GCE, MoS<sub>2</sub>-Au/GCE和MoS<sub>2</sub>-AuPt/GCE的电催化性质和催化活性。如图4所示,裸电极几乎没有表现出电催化特性(曲线a)。电极涂覆MoS<sub>2</sub>纳米片后,电流响应稍有变化(曲线b)。当用MoS<sub>2</sub>-Au修饰电极时,电化学信号急剧增加(曲线c)。此外,当使用MoS<sub>2</sub>-AuPt修饰电极时,信号增加得更大(曲线d)。因此,上述结果表明,MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合材料具有较高的电催化活性,可作为电化学信号放大平台,用于制备无标记免疫传感器。

### [0076] 3.4 优化实验条件

[0077] 以下优化实验,除了优化参数不同以外,其他步骤、参数均与步骤2.1-2.6一致。

[0078] 免疫传感器的电化学信号受许多因素的影响。为了提高所提出的电化学生物免疫传感器的催化效率和灵敏度,有必要优化其中的关键参数,如MoS<sub>2</sub>的浓度、AuPt-NPs的电沉



积时间、链霉亲和素SA的浓度、生物素标记抗体CLB的浓度、CLB孵育杂交时间以及 $H_2O_2$ 的浓度。

[0079]  $MoS_2$ 的浓度是一个影响适体传感器催化功效的重要因素。合成 $MoS_2$ -AuPt纳米复合材料中的 $MoS_2$ 浓度不同,表现出电化学信号响应也不同,如图5a所示。随着 $MoS_2$ 的浓度从0.5mg/mL增加到1.5mg/mL,电化学信号响应的变化迅速增加,随后逐渐降低。推测, $MoS_2$ -AuPt纳米复合材料膜厚度的增加可能导致界面电子转移电阻的增加;在这种情况下,电子转移变得更加困难。因此,选择1.5mg/mL的 $MoS_2$ 浓度作为合成 $MoS_2$ -AuPt纳米复合材料的最佳浓度。

[0080] AuPt-NPs电沉积时间决定了AuPt-NPs层的厚度和AuPt-NPs的数量,进而对链霉亲和素的固定也起着关键作用。图5b显示了AuPt-NPs不同电沉积时间的影响。电化学信号变化随着电沉积时间的增加而增加,30s时可以观察到最大电化学信号,随后降低。这个现象的原因是长的电沉积时间形成过量的AuPt-NPs,其阻碍了电子转移。因此,免疫传感器的AuPt-NPs电沉积时间优选为30s。

[0081] SA的浓度也是Bio-CLB固定和影响生物传感器性能的重要因素。SA的浓度在0.0-2.0 $\mu$ g/mL范围内进行测试。图5c显示,随着SA浓度的增加,电流变化首先降低,然后保持稳定状态。最小电流变化出现在1 $\mu$ g/mL,表明传感器表面的抗SA的量达到最大值,基于AuPt-NPs和SA之间的氨基金亲和力。因此,选择1 $\mu$ g/mL作为SA的最佳浓度。

[0082] 生物素标记抗体CLB的浓度是捕获CLB和影响检测范围的另一个重要因素。因此,研究了Bio-CLB的浓度,如图5d所示。伴随着Bio-CLB浓度的增加,电流变化首先快速降低并且在大约4 $\mu$ g/mL保持稳定,这是由于生物素-链霉亲和素结合饱和,表明获得了Bio-CLB的最大固定化。为了在下一步有效结合CLB,选择4 $\mu$ g/mL作为最佳的固定时间。

[0083] CLB孵育杂交时间是影响电化学生物免疫传感器响应的另一个重要因素。如图5e所示,电流变化随着孵育杂交时间从10分钟降低到30分钟,然后在30分钟后平稳化,表明Bio-CLB与靶CLB的结合是饱和的。因此选择30分钟作为最佳孵育杂交时间。

[0084] 此外, $H_2O_2$ 的浓度也是影响免疫传感器催化功效的重要因素,为了获得最佳的电化学信号,研究了 $H_2O_2$ 的浓度,结果示于图5f。电流变化随着 $H_2O_2$ 的增加而增加,然后加入32mM达到饱和,表明此时生物电催化的效率最高。因此,在整个检测过程中选择32mM的 $H_2O_2$ 作为最佳浓度。

[0085] 3.5适配体传感器的性能

[0086] 在最佳实验条件下( $MoS_2$ 浓度优选为1.5mg/mL,AuPt-NP电沉积时间为30s,SA浓度为1.0 $\mu$ g/mL,Bio-CLB浓度为4 $\mu$ g/mL,CLB孵育杂交时间实际为30分钟, $H_2O_2$ 浓度为32mM),采用基于 $MoS_2$ -AuPt纳米复合物和生物素-链霉亲和素体系制备的免疫传感器,通过在-0.4V电压下,在含有32mM  $H_2O_2$ 的PBS缓冲液(pH=7.4)中进行DPV测量,从而对不同浓度的CLB进行定量检测。电化学信号和CLB浓度的关系如图6a所示。随着CLB浓度的增加,得到的DPV曲线逐渐下降。如图6b所示,在0.01ng/mL到100ng/mL的范围内观察到电化学信号与CLB浓度的对数值之间的线性关系,通过计算可得检测极限为6.86pg/mL(基于 $S/N=3$ )。回归方程为 $Y=66.29-21.02 \times \lg C_{CLB} (ng/mL)$ ,其中 $R=0.9978$ 。较低的检测限可能归因于几个因素。一方面,合成的 $MoS_2$ -AuPt纳米复合材料具有较高的催化能力和较大的比表面积;另一方面,使用生物素-链霉亲和素系统,可以富集活性部位来固定靶CLB,从而进一步提高免疫传感

器的灵敏度和选择性。与先前检测CLB的方法的比较如表1所示,从表中数据可以看出,本发明所提出的免疫传感器具有比现有传感器更低的检测限。

[0087] 表1 CLB免疫传感器的比较

[0088]

Materials	Detection technology	Linear range	Limit of detection
Gold nanoparticles	Colorimetry	0.28–80 nM	0.028 nM
GO/SWCNTs-Nafionpolymer	Differential pulse	10–6000 nM	6 nM
[0089]			
composite	voltammetry		
Carbon nanotube	Amperometric immunoassay	0.1–10 ng.mL <sup>-1</sup>	0.1 ng.mL <sup>-1</sup>
Gold film	Surface plasmon resonance	2–20 µg.L <sup>-1</sup>	2 µg.L <sup>-1</sup>
Carbon dots	Fluorescence	8–200 nM	3 nM
MoS <sub>2</sub> -AuPt nanocomposite	Differential pulse voltammetry	0.01–100 ng.mL <sup>-1</sup>	6.86 pg.mL <sup>-1</sup>

[0090] 3.6电化学免疫传感器的特异性,稳定性和重复性

[0091] 免疫传感器的特异性在分离生物样品中起着非常重要的作用。一些非靶标物质,如Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、SA和RAC被作为干扰物质检测免疫传感器的特异性。图7a显示了五种干扰物、CLB和一个空白的当前电流响应。很明显,这些干扰物的当前响应值几乎与空白物相同,而CLB则显示出明显不同的电流响应。这些结果表明提出的免疫传感器具有很高的特异性。

[0092] 另外,通过重复测量相同浓度的CLB来测试设计的免疫传感器的批内和批间重复性,如图7b所示。批内和批间相对标准偏差(RSD)值分别为1.76%和2.32%。这些结果表明提出的免疫传感器具有可接受的重复性。

[0093] 为了研究免疫传感器的稳定性,将制备的免疫传感器储存在4℃环境下,使用时再取出。图7c显示在储存的前5天仅有轻微变化,免疫传感器的电化学信号为初始电化学信号的98.5%。如图7c所示,储存20天后,设计的免疫传感器保持其初始电化学信号的87.0%。因此,这些结果证实制造的电化学免疫传感器对于检测CLB具有良好的稳定性。

[0094] 3.7实际猪肉样品分析应用

[0095] 为了评估提出的免疫传感器的实际适用性和准确性,在猪肉样品(当地市场获得)中加入标准的CLB溶液以获得不同的所需储存浓度,然后在最优实验条件下与所述电化学方法对样品进行检测。如表2所示,检测结果的相对标准偏差(RSD)范围为1.44%至4.01%,所有样品的CLB回收率为87.57%至109.78%。结果表明,本发明制得的免疫传感器对于检测CLB是可行的,可以满足实际分析的需要。

[0096] 表2 采用本发明制得的免疫传感器测定实际猪肉中的CLB(n=3)

[0097]

样品 编号	添加的 CLB ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	检测的 CLB ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	相对标 准偏差 (%)	回收率 (%)
1	0	0.00286	2.066	0
2	0.05	0.04378	3.947	87.57

[0098]

3	0.1	0.09547	2.49	95.47
4	1	1.051	2.88	105.1
5	10	9.115	1.44	91.15
6	50	54.89	4.01	109.78

[0099] 4. 结论

[0100] 基于 $\text{MoS}_2$ -AuPt纳米复合物和生物素-链霉亲和素体系,发明制备了灵敏的电化学生物免疫传感器,用于检测CLB。归功于 $\text{MoS}_2$ -AuPt纳米复合材料良好的电子转移速率和电催化活性,此外,生物素-链霉亲和素体系因其含有大量的用于固定捕获探针的活性位点,大大提高了免疫传感器的灵敏度。结合这些优点,所提出的电化学免疫传感器具有良好的灵敏度(检测限为 $6.86\text{pg/mL}$ ),具有高特异性和可接受的重复性,同时也可用于实际猪肉样品中的检测。

[0101] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

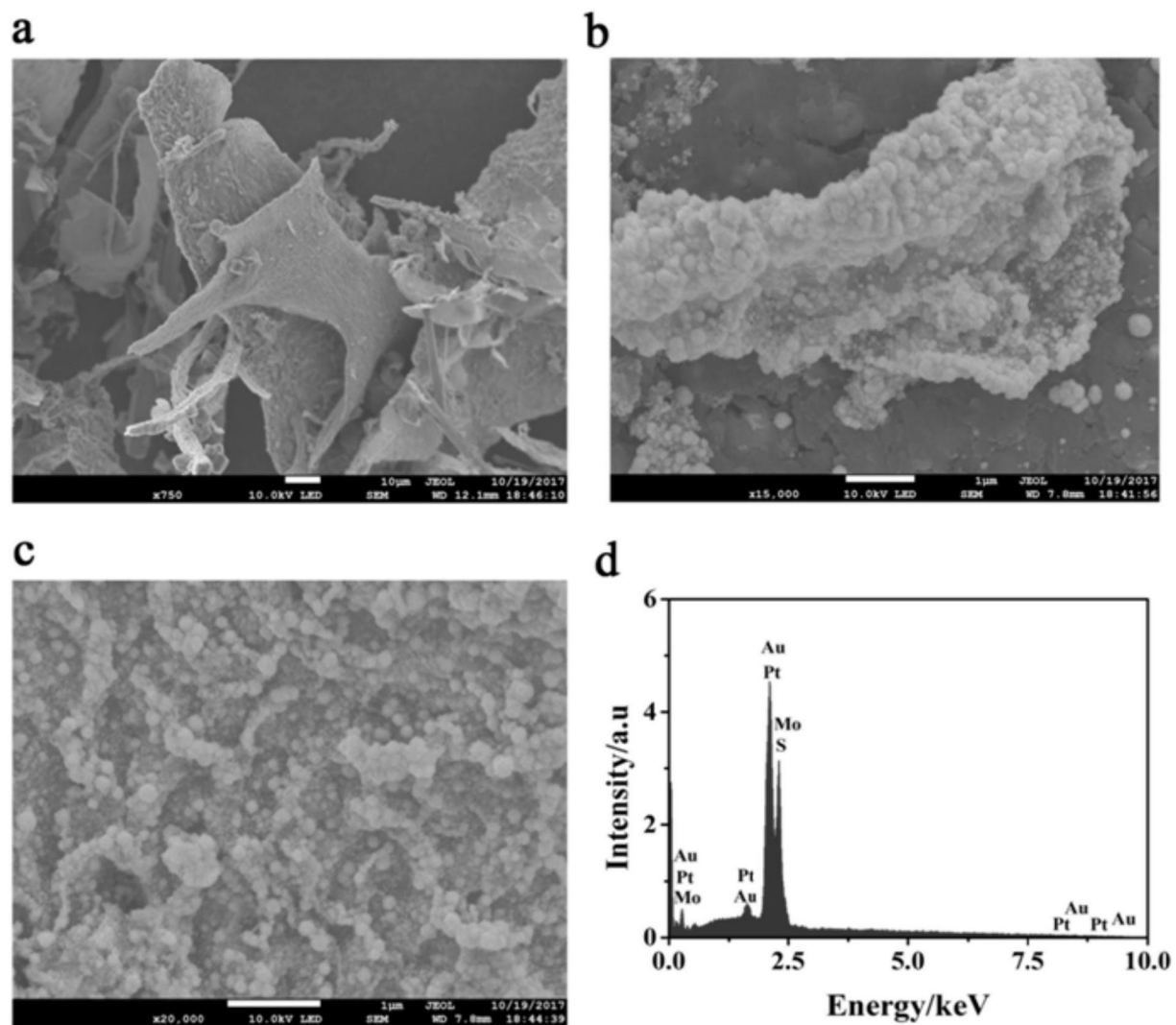


图1

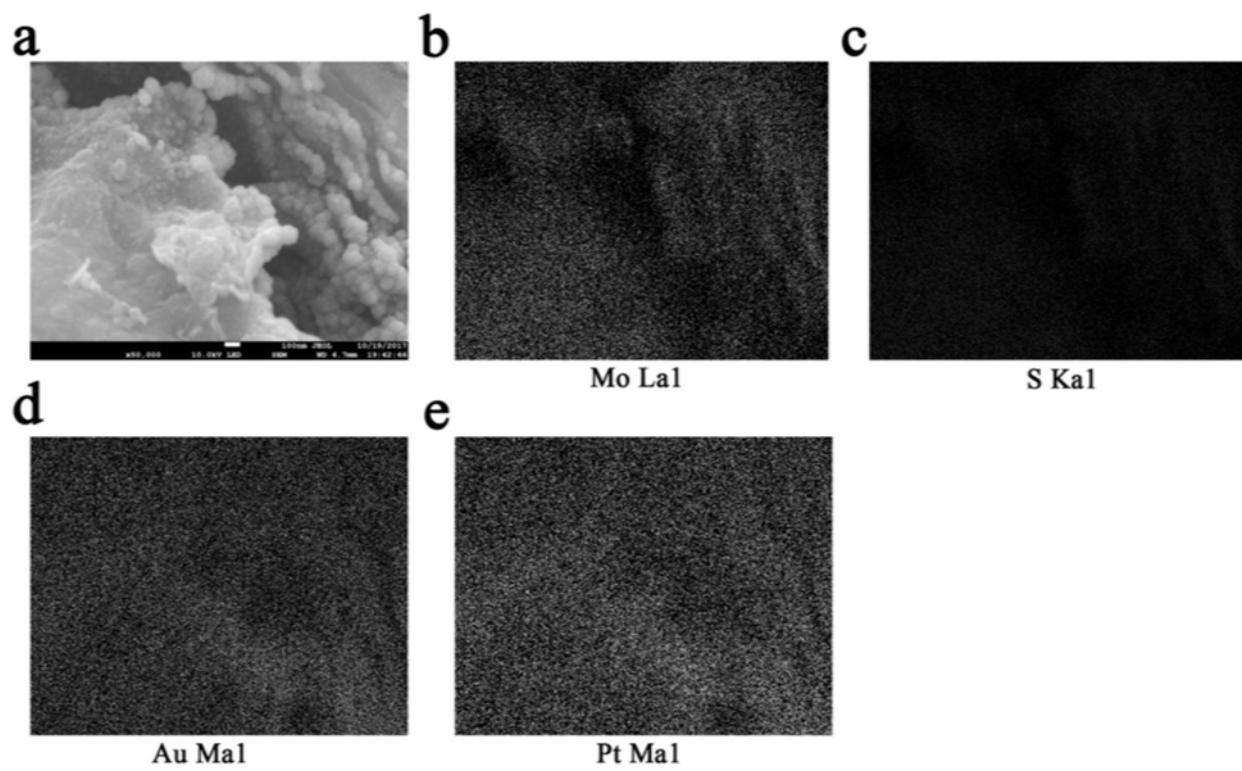


图2

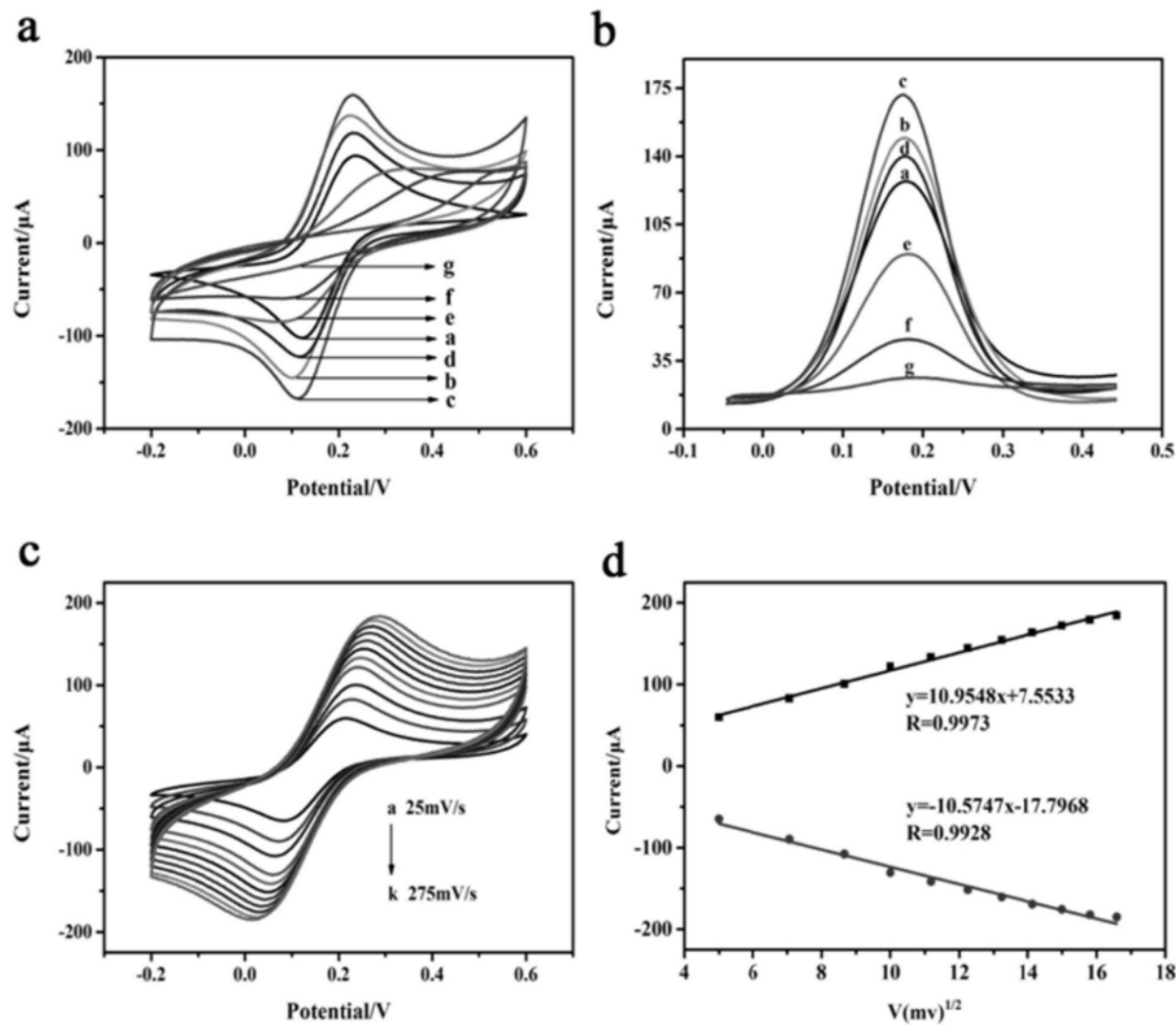


图3

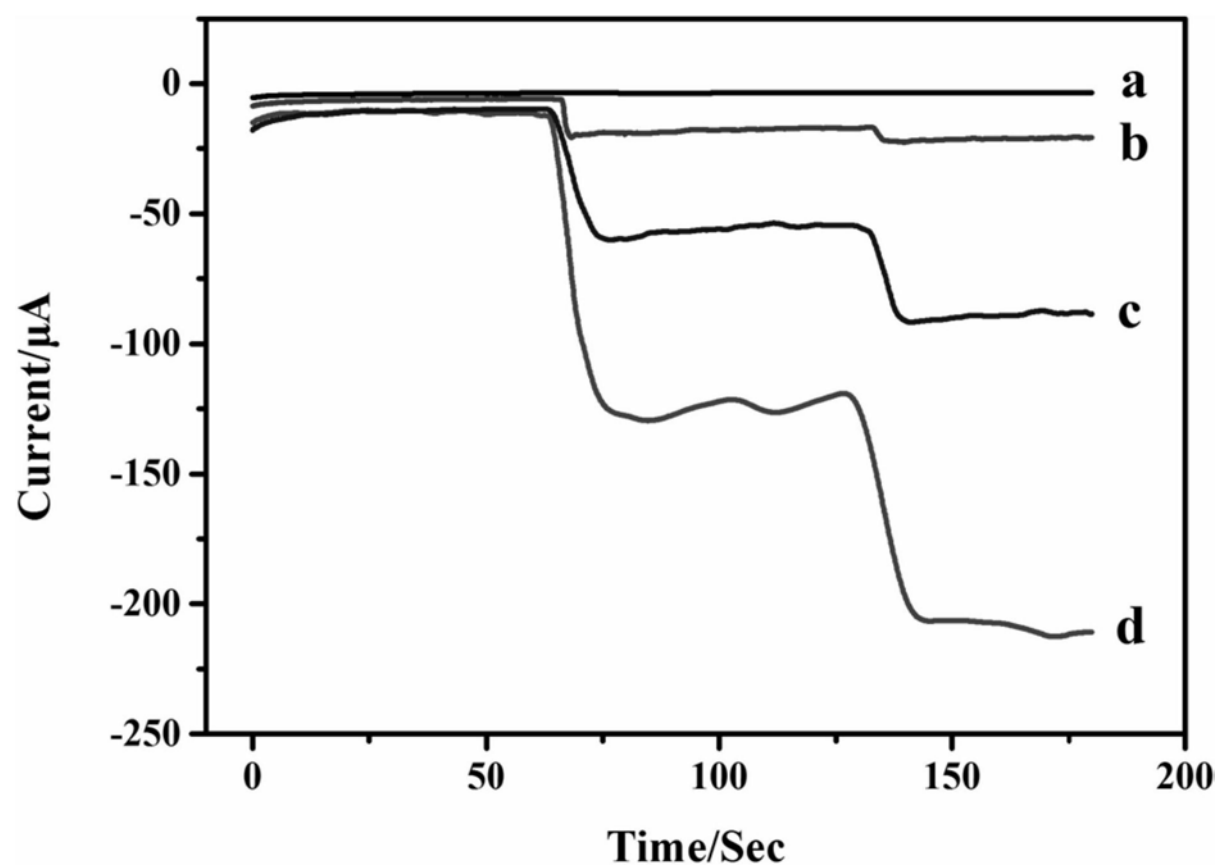


图4

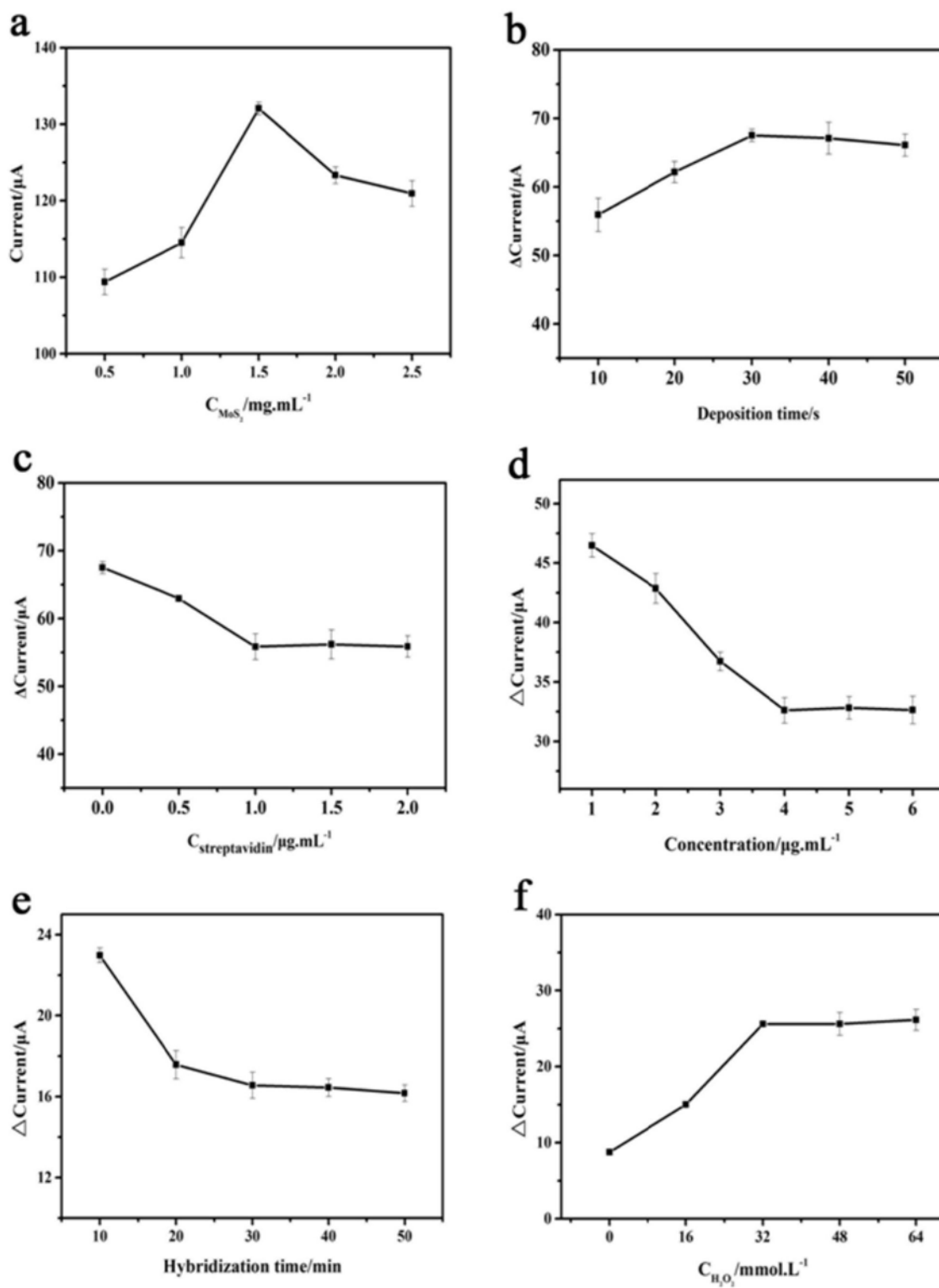


图5



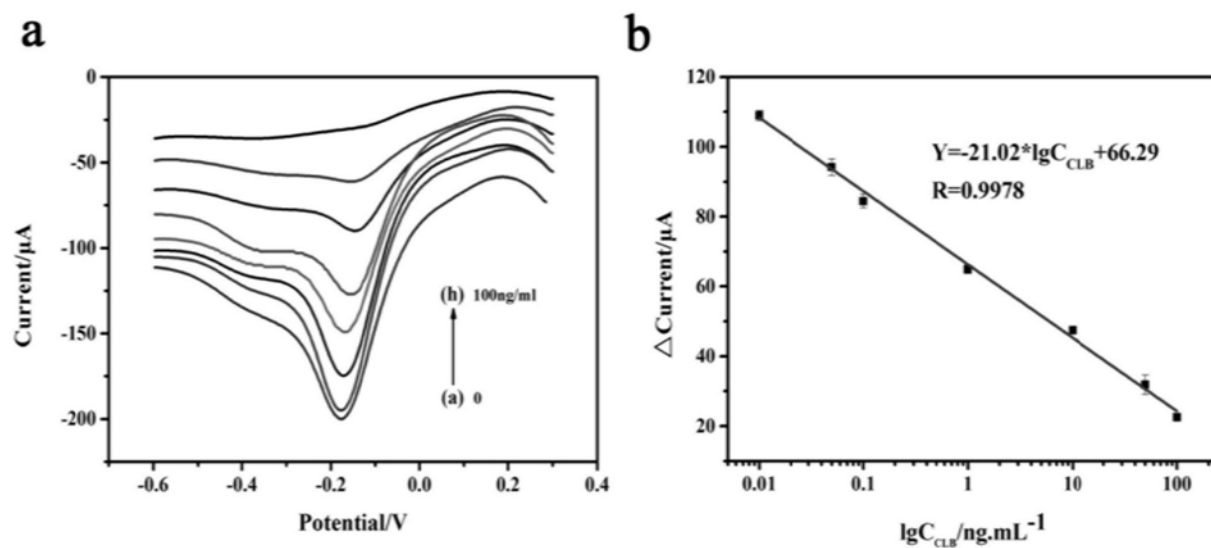


图6

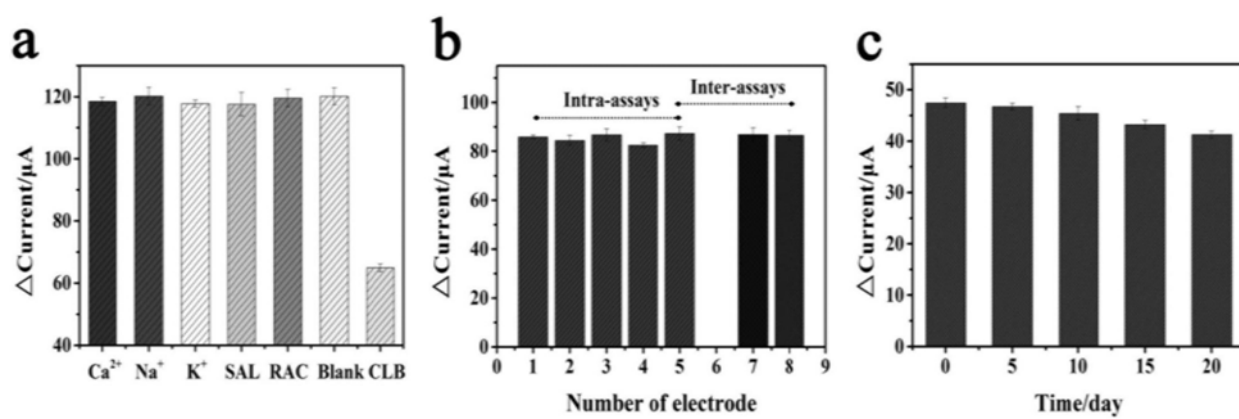


图7

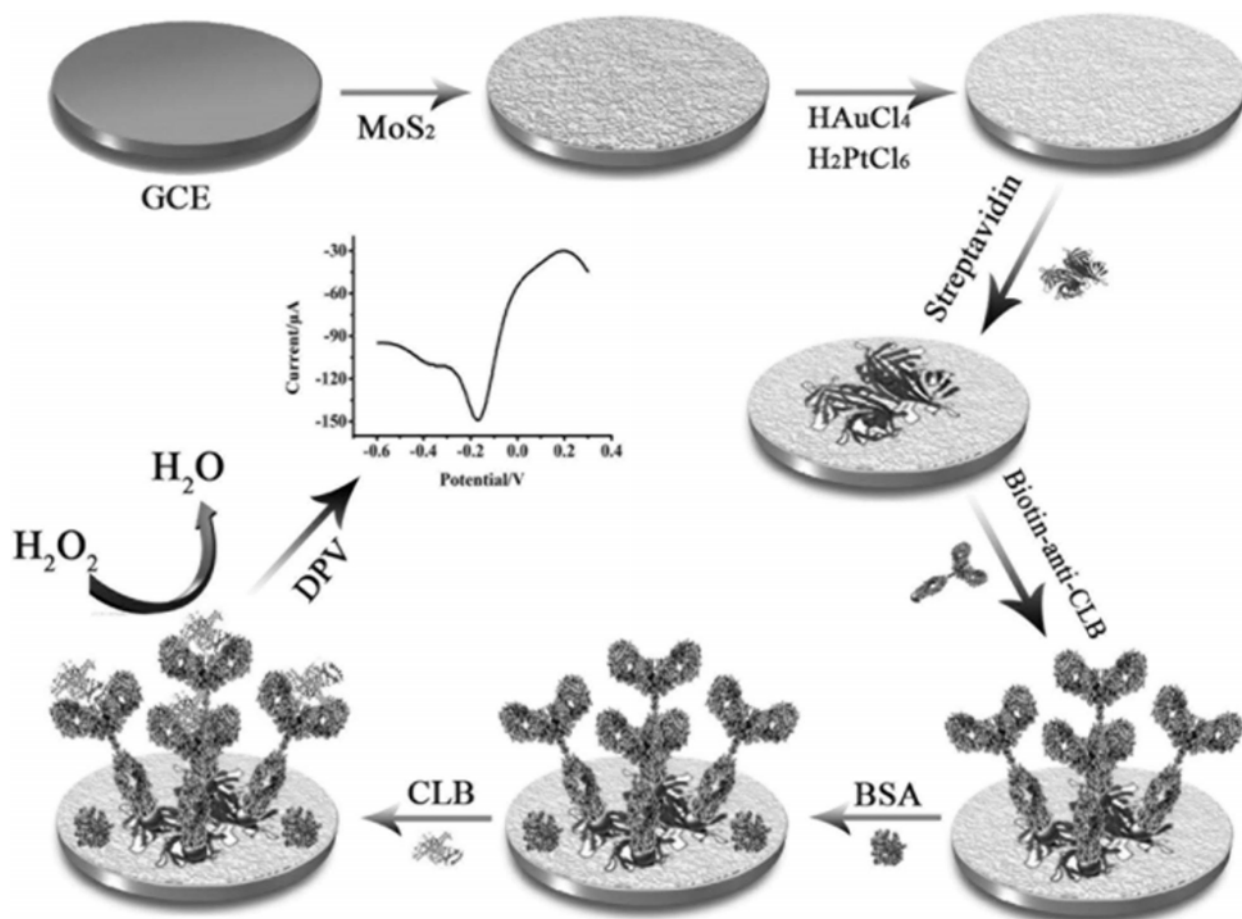


图8

专利名称(译)	一种用于CLB检测的电化学免疫传感器及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108169473A</a>	公开(公告)日	2018-06-15
申请号	CN2017111457467.9	申请日	2017-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	重庆医科大学		
申请(专利权)人(译)	重庆医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	重庆医科大学		
[标]发明人	李朝睿 纪人月 邱景富		
发明人	李朝睿 纪人月 邱景富		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/327		
CPC分类号	G01N27/327 G01N33/53		
代理人(译)	周建军		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供一种用于CLB检测的电化学免疫传感器及制备方法，该电化学免疫传感器具有基于MoS<sub>2</sub>-AuPt纳米复合物和生物素-链霉亲和素系统的工作电极，本发明所提出的电化学免疫传感器具有良好的灵敏度(检测限为6.86pg·mL<sup>-1</sup>)，高特异性，可接受的重复性，同时也可用于实际猪肉样品中的检测。

