



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102262125 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 09

(21) 申请号 201110212844. 9

(22) 申请日 2011. 07. 28

(73) 专利权人 南京师范大学

地址 210046 江苏省南京市亚东新城区文苑路1号

(72) 发明人 赵波 陈昌云 王传现 邵科峰
颜妍 张芹 陈园园

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207
代理人 韩朝晖

(51) Int. Cl.

G01N 27/48 (2006. 01)

G01N 27/30 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

审查员 许静

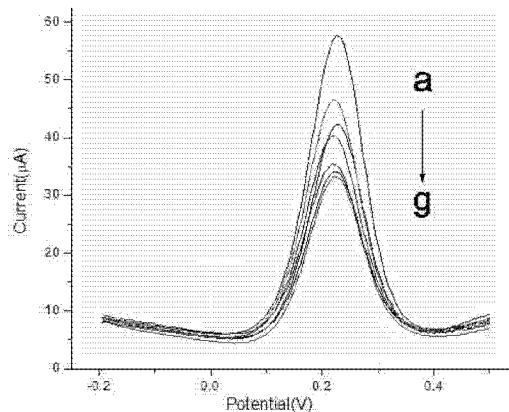
权利要求书2页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

检测己烯雌酚的电化学免疫传感器及其制备方法和应用

(57) 摘要

一种检测己烯雌酚的非标记电化学免疫传感器及其制备方法和应用。所述的免疫传感器,包括基底电极,在基底电极表面沉积纳米金后,修饰石墨烯-己烯雌酚-壳聚糖复合物,并以牛血清蛋白封闭非特异性活性位点。其制备方法是在基底电极表面沉积纳米金后,利用壳聚糖将石墨烯和己烯雌酚包被并固定于电极表面。所述的免疫传感器基于免疫反应的竞争模式,利用 $K_3Fe(CN)_6$ 为探针,以差分脉冲伏安法监测免疫反应,可用于己烯雌酚检测。本发明的传感器具有高灵敏度和专一性,检测方法简单,适用范围广泛,检测限可达到 0.1ng/ml,线性范围 0.5~1500ng/ml,具有快速现场检测、灵敏度高、成本低等特点。



1. 一种检测己烯雌酚的电化学免疫传感器,包括基底电极,其特征在于所述的基底电极表面沉积纳米金后,修饰石墨烯-己烯雌酚-壳聚糖复合物,并以牛血清蛋白封闭非特异性活性位点。

2. 根据权利要求1所述的电化学免疫传感器,其特征在于,所述的基底电极为玻碳电极。

3. 根据权利要求1或2所述的电化学免疫传感器,其特征在于,所述免疫传感器通过下述方法制得:在基底电极表面沉积纳米金,将石墨烯的壳聚糖悬浮液超声分散后与己烯雌酚混合,将混合液滴涂在电极表面,利用壳聚糖将石墨烯和己烯雌酚包被并固定于电极表面,并将电极浸泡在牛血清蛋白溶液中,封闭电极表面的非特异性的活性位点。

4. 根据权利要求2所述的电化学免疫传感器,其特征在于,所述免疫传感器通过下述步骤制得:

1) 石墨烯-壳聚糖悬浮液的配制:将 0.05M 的 HCl 加热至 80 ~ 90℃,加入称量好的壳聚糖,搅拌溶解,冷却后加入浓度为 0.1M 的 NaOH,调节 pH 至 5,配得 1mg/mL 的壳聚糖溶液;准确称取 5g 石墨烯样品于 2mL 壳聚糖溶液中,超声分散 1h,制得石墨烯-壳聚糖悬浮液;

2) 玻碳电极处理:直径为 3mm 的玻碳电极用 1.0 和 0.3 μ m 的 Al₂O₃ 粉乳液分别打磨抛光后,在乙醇和水中分别超声清洗 3min;

3) 纳米金沉积:清洗后的玻碳电极用电化学方法沉积金纳米粒子,于 100mg/L 的 HAuCl₄ 溶液中,在 -0.2V 电势下恒电位扫描 60s;

4) 电极表面修饰:将 4 μ L 石墨烯-壳聚糖悬浮液与 2 μ L 浓度为 0.2mg/mL 的己烯雌酚溶液混合,滴涂于步骤 3) 制得的玻碳电极表面,40℃下烘干 30min;

5) 非特异性的活性位点封闭:表面修饰后的电极于 37℃下浸泡在 5% 的牛血清蛋白溶液中 30min,以封闭剩余的活性位点,制得所述的电化学免疫传感器。

5. 一种检测己烯雌酚的电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于:在基底电极表面沉积纳米金,将石墨烯的壳聚糖悬浮液超声分散后与己烯雌酚混合,将混合液滴涂在电极表面,利用壳聚糖将石墨烯和己烯雌酚包被并固定于电极表面;将电极浸泡在牛血清蛋白溶液中,封闭电极表面的非特异性的活性位点。

6. 根据权利要求5所述的电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述的方法包括以下步骤:

1) 石墨烯-壳聚糖悬浮液的配制:将 0.05M 的 HCl 加热至 80 ~ 90℃,加入称量好的壳聚糖,搅拌溶解,冷却后加入浓度为 0.1M 的 NaOH,调节 pH 至 5,配得 1mg/mL 的壳聚糖溶液;准确称取 5g 石墨烯样品于 2mL 壳聚糖溶液中,超声分散 1h,制得石墨烯-壳聚糖悬浮液;

2) 玻碳电极处理:直径为 3mm 的玻碳电极用 1.0 和 0.3 μ m 的 Al₂O₃ 粉乳液分别打磨抛光后,在乙醇和水中分别超声清洗 3min;

3) 纳米金沉积:清洗后的玻碳电极用电化学方法沉积金纳米粒子,于 100mg/L 的 HAuCl₄ 溶液中,在 -0.2V 电势下恒电位扫描 60s;

4) 电极表面修饰:将 4 μ L 石墨烯-壳聚糖悬浮液与 2 μ L 浓度为 0.2mg/mL 的己烯雌酚溶液混合,滴涂于步骤 3) 制得的玻碳电极表面,40℃下烘干 30min;

5) 非特异性的活性位点封闭:表面修饰后的电极于 37℃下浸泡在 5% 的牛血清蛋白溶液中 30min,以封闭剩余的活性位点,制得所述的电化学免疫传感器。

7. 一种基于权利要求 1 所述的电化学免疫传感器检测己烯雌酚的方法,包括以下步骤:

1) 标准溶液配制:配制一组包括空白标样在内的含有不同浓度游离己烯雌酚的 pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液为标准溶液,其中含有相同浓度的己烯雌酚抗体;

2) 建立工作曲线:将所述免疫传感器分别浸入标准溶液中孵育,孵育后用磷酸缓冲溶液冲洗所述免疫传感器,在 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描,记录响应电流;空白标样的响应电流为 I_0 ,含有游离己烯雌酚的标样的响应电流为 I_x ,响应电流的增加 $\Delta I = I_x - I_0$,所述 ΔI 值与标准溶液中己烯雌酚浓度 C 成正比,绘制 $\Delta I-C$ 标准曲线,或采用线性回归法得到 $\Delta I-C$ 线性回归方程;

3) 己烯雌酚测定:将待测样品配制为含有与步骤 1) 相同浓度己烯雌酚抗体的磷酸缓冲溶液,按照与步骤 2) 相同的方法对所述免疫传感器进行孵育和差分脉冲伏安扫描,记录响应电流;根据响应电流的增加 ΔI ,和 $\Delta I-C$ 标准曲线或 $\Delta I-C$ 线性回归方程,得到己烯雌酚含量。

8. 根据权利要求 7 所述的检测己烯雌酚的方法,其特征在于,所述的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液的浓度为 2 mM。

9. 根据权利要求 7 所述的检测己烯雌酚的方法,其特征在于,免疫反应条件为 37°C 下孵育 60 min。

10. 根据权利要求 7 所述的检测己烯雌酚的方法,其特征在于,所述的步骤 3) 采用标准加入法测定。

检测己烯雌酚的电化学免疫传感器及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测和分析化学技术领域,涉及一种己烯雌酚的检测装置和方法,具体地说是一种应用于测定食品中人工合成雌激素己烯雌酚(Diethylstilbestrol, DES)的电化学免疫传感器及其制备方法,以及利用该传感器测定己烯雌酚的方法。

背景技术

[0002] 己烯雌酚是一种人工合成的非甾体雌激素,1938年在伦敦被人工合成,它能产生与天然雌二醇相同的药理与治疗作用,主要用于雌激素低下症及激素平衡失调引起的功能性出血、闭经,还可用于死胎引产前,以提高子宫肌层对催产素的敏感性。己烯雌酚还具有促进蛋白质代谢合成、提高动物日增重和减少脂肪合成等作用,曾经一度作为促生长剂广泛应用于畜牧养殖业。然而随后人们逐渐发现添加高浓度己烯雌酚会在生物体中残留,并且对生物体具有潜在的致畸致癌等危害,世界各国纷纷禁止在食用性动物中使用。

[0003] 目前用于DES残留检测的方法主要有气相色谱法、高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用法、液相色谱-质谱联用法、放射免疫法和酶联免疫吸附法。但这些方法的技术要求高,需要大型分析仪器,操作过程繁琐,测定样品的成本也高,不能实现现场检测。

[0004] DES残留检测的方法中还包括电化学检测方法,如CN200710040472.X公开了一种己烯雌酚的玻碳电极修饰的电化学检测方法,包括:电极的预处理;纳米金溶胶液的制备;聚乙烯亚胺-纳米金修饰玻碳电极的制备;先后分为聚乙烯亚胺修饰玻碳电极的制备与聚乙烯亚胺-纳米金修饰电极的制备两个步骤;用聚乙烯亚胺-纳米金修饰电极测试己烯雌酚的含量。该发明的工作电极的修饰过程简单且能重复利用,测试的重现性良好及灵敏度高,检测限可达到1ng/g,但是该方法的特异性不好。

[0005] 自上世纪80年代以来,生物传感器的研究与开发呈现出突飞猛进的局面,各类传感器应运而生。其中,与测定抗原抗体反应有关的传感器称为免疫传感器。抗原抗体结合前后可导致多种信号的改变,如在重量、光学、热学、电化学等方面。免疫传感器在检测己烯雌酚上已得到广泛应用,如各种基于抗体和抗原反应的用于己烯雌酚检测的免疫试剂(盒)。

[0006] 由于电化学分析具有的以下特点和优势,如可以实现在体检测,不受样品颜色、浊度的影响(即样品可以不经处理,不需分离),且所需仪器设备相对简单,因此应用前景看好。

[0007] 本发明旨在综合利用复合纳米技术、表面化学修饰技术、免疫分析技术和电化学传感技术等,通过一种己烯雌酚检测的直接电化学免疫传感器的制备,建立一种高灵敏度、特异性好、低成本、可现场检测的快速检测己烯雌酚的方法,有效地解决目前己烯雌酚检测方法所存在的不足。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种电化学免疫传感器及其制备方法,所述的传感器具有很高的灵敏度和专一性,可用于己烯雌酚检测。

[0009] 本发明的另一目的还在于提供一种快速、高灵敏度、低成本、可用于现场测定的食品中己烯雌酚残留量的检测方法。

[0010] 实现本发明目的采用的技术方案如下：

[0011] 一种检测己烯雌酚的电化学免疫传感器，包括基底电极，其特征在于所述的基底电极表面沉积纳米金后，修饰石墨烯-己烯雌酚-壳聚糖复合物，并以牛血清蛋白封闭非特异性活性位点。

[0012] 所述的基底电极优选玻碳电极。

[0013] 本发明的另一目的是提供一种所述免疫传感器的制备方法，技术方案如下：

[0014] 一种检测己烯雌酚的电化学免疫传感器的制备方法，其特征在于：在基底电极表面沉积纳米金，将石墨烯的壳聚糖悬浮液超声分散后与己烯雌酚混合，将混合液滴涂在电极表面，利用壳聚糖将石墨烯和己烯雌酚包被并固定于电极表面，并将电极浸泡在牛血清蛋白(BSA)溶液中，封闭电极表面的非特异性的活性位点。

[0015] 所述的基底电极优选玻碳电极。

[0016] 所述的免疫传感器的制备，更具体和更优选的方法包括如下步骤：

[0017] 1) 石墨烯-壳聚糖悬浮液的配制：将 0.05M 的 HCl 加热至 80 ~ 90℃，加入称量好的壳聚糖，搅拌溶解，冷却后加入浓度为 0.1M 的 NaOH，调节 pH 至 5，配得 1mg/mL 的壳聚糖溶液；

[0018] 准确称取 5g 石墨烯样品于 2mL 壳聚糖溶液中，超声分散 1h，制得石墨烯-壳聚糖悬浮液；

[0019] 2) 玻碳电极处理：直径为 3mm 的玻碳电极用分别用 1.0 和 0.3 μ m 的 Al₂O₃ 粉乳液打磨抛光后，分别在乙醇和水中各超声清洗 3min；

[0020] 3) 纳米金沉积：清洗后的玻碳电极用电化学方法沉积金纳米粒子，于 100mg/L 的 H₂AuCl₄ 溶液中，在 -0.2V 电势下恒电位扫描 60s；

[0021] 4) 电极表面修饰：将 4 μ L 石墨烯-壳聚糖悬浮液与 2 μ L 浓度为 0.2mg/mL 的己烯雌酚溶液混合，滴涂于步骤 3) 制得的玻碳电极表面，40℃ 下烘干 30min；

[0022] 5) 非特异性的活性位点封闭：表面修饰后的电极于 37℃ 下浸泡在 5% 的 BSA 溶液中 30min，以封闭剩余的活性位点，制得所述的电化学免疫传感器。

[0023] 所述的石墨烯的制备，可以氧化石墨(GO)作为前驱体，通过氧化石墨的还原和石墨烯的功能化得到性能优异的石墨烯。

[0024] 上述免疫传感器可用于测定己烯雌酚的含量。修饰电极在含有己烯雌酚抗体和游离的己烯雌酚的溶液中孵育时，溶液中游离的己烯雌酚和固定在电极表面的己烯雌酚与溶液中己烯雌酚抗体发生竞争性免疫反应，己烯雌酚抗体与电极表面固定的己烯雌酚反应后，抗体吸附在电极表面。游离的己烯雌酚浓度越高，固定在电极上的己烯雌酚结合的抗体越少。以 K₃Fe(CN)₆ 为探针，进行差分脉冲伏安(DPV)扫描，抗体在电极表面的吸附，会使 Fe(CN)₆^{3-/4-} 氧化还原峰电流值降低。因此利用竞争性免疫反应机制，不同浓度的己烯雌酚孵育后的电极，在 K₃Fe(CN)₆ 溶液中差分脉冲伏安法(DPV)得到的曲线峰电流不同。实验结果显示，随着己烯雌酚浓度在孵育液中的增加，DPV 峰电流增大，且峰电流增大值与己烯雌酚浓度呈线性，从而实现己烯雌酚的定量检测。

[0025] 因此，本发明还涉及一种基于所述的免疫传感器检测己烯雌酚的方法，包括以下

步骤：

[0026] 1) 标准溶液配制：配制一组包括空白标样在内的含有不同浓度游离己烯雌酚的 pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液为标准溶液，其中含有相同浓度的己烯雌酚抗体；

[0027] 2) 建立工作曲线：将免疫传感器分别浸入标准溶液中孵育，孵育后用磷酸缓冲溶液冲洗免疫传感器，在 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安 (DPV) 扫描，记录响应电流；空白标样的响应电流为 I_0 ，含有游离己烯雌酚的标样的响应电流为 I_x ，响应电流的增加 ΔI ($\Delta I = I_x - I_0$) 与标准溶液中己烯雌酚浓度 C 成正比，绘制 $\Delta I - C$ 标准曲线，或采用线性回归法得到 $\Delta I - C$ 线性回归方程；

[0028] 3) 己烯雌酚测定：将待测样品配制为含有与步骤 1) 相同浓度己烯雌酚抗体的磷酸缓冲溶液，按照与步骤 2) 相同的方法对免疫传感器进行孵育和差分脉冲伏安扫描，记录响应电流；根据响应电流的增加 ΔI 和标准曲线，得到己烯雌酚含量。

[0029] 所述的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液的浓度优选为 2 mM。

[0030] 免疫反应条件优选在 37°C 下孵育 60 min。

[0031] 所述的己烯雌酚抗体的浓度优选 10 μ L/50 μ L 标准溶液。

[0032] 所述的步骤 3) 优选采用标准加入法测定。

[0033] 上述方法检测己烯雌酚含量，检测限可达到 0.1 ng/ml，线性范围 0.5~1500 ng/ml。

[0034] 本发明的免疫传感器及其己烯雌酚检测方法基于以下原理。

[0035] 所述的免疫传感器系一种纳米金 / 石墨烯 / 己烯雌酚 / 壳聚糖修饰电极，结合纳米金比表面积大、导电性能和生物相容性高等优点，石墨烯超强的导电性能和较大的比表面积等特性，以及壳聚糖可吸附固定生物分子和对石墨烯优异的分散效果等特性构建而成。在电极上沉积纳米金后，将石墨烯的壳聚糖溶液超声分散，与己烯雌酚混合并滴涂在电极上，利用壳聚糖的粘性将石墨烯和己烯雌酚包被并固定于电极上，并将电极浸泡在 BSA 溶液中，以封闭非特异性的活性位点。免疫传感器的电极表面修饰见图 1。

[0036] 基于本发明的免疫传感器，利用抗原与抗体的特异性反应，可对己烯雌酚进行检测，其原理如图 2。

[0037] 所述的免疫传感器对溶液中己烯雌酚的检测是基于抗体和抗原之间特定免疫反应的竞争模式。(a) 当电极浸入含有己烯雌酚抗体和游离己烯雌酚的溶液中时，固定在电极上的己烯雌酚抗原与溶液中游离的己烯雌酚与溶液中的己烯雌酚抗体发生竞争反应。(b) 基于己烯雌酚抗体和抗原之间特定反应的竞争模式，当电极浸入到含有特定抗体的溶液时，己烯雌酚抗体与抗原的特异反应使抗体吸附在电极上。(c) 抗体 - 抗原复合物在电极表面的形成导致电极产生位阻，减少了电极活动区域，阻碍了探针离子到达电极，峰值电流下降。因此，可以根据免疫传感器各阶段电化学信号的差异对溶液中游离的己烯雌酚进行检测。

[0038] 本发明通过纳米金 / 石墨烯 / 壳聚糖复合纳米材料固定己烯雌酚抗原于基底电极上，制备一种雌激素药物己烯雌酚的非标记电化学免疫传感器，利用 $K_3Fe(CN)_6$ 为探针，以循环伏安法和差分脉冲伏安法监测免疫反应，实现对己烯雌酚进行定性定量检测。本发明的传感器具有高度的灵敏度和专一性，检测方法简单、高效，适用范围广泛，检测限可达到 0.1 ng/ml，线性范围 0.5~1500 ng/ml。

[0039] 总之,本发明综合利用复合纳米技术、表面化学修饰技术、免疫分析技术和电化学传感技术等,解决了当前己烯雌酚检测中迫切存在的问题,具有快速现场检测、灵敏度高、成本低等特点。

附图说明

[0040] 图 1 本发明的免疫传感器电极表面修饰示意图。

[0041] 图 2 本发明的免疫传感器检测己烯雌酚的原理,(a)将修饰好的电极浸入含有游离己烯雌酚和己烯雌酚抗体的溶液中进行孵育,(b)以 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 为探针进行电化学检测,(c)通过监测电信号的变化检测己烯雌酚浓度。

[0042] 图 3 石墨烯的 SEM 电镜照片。

[0043] 图 4 不同修饰电极(a)裸电极,(b)石墨烯/己烯雌酚/壳聚糖修饰电极,(c)纳米金/石墨烯/己烯雌酚/壳聚糖修饰电极,(d)石墨烯/己烯雌酚/壳聚糖修饰电极在含有己烯雌酚的抗体中孵育后,在 2mM 的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的 PBS 溶液中的 CV 曲线图,扫速为 100 mv/s。

[0044] 图 5 本发明的免疫传感器在孵育液中的孵育时间对 DPV 峰电流的影响。

[0045] 图 6 孵育液中抗体含量对 DPV 峰电流的影响。

[0046] 图 7 本发明的免疫传感器的 DPV 曲线图。(a)纳米金/石墨烯/己烯雌酚/壳聚糖修饰电极的 DPV 曲线图;在含有不同浓度的己烯雌酚:(b)1500 ng/mL,(c)1000 ng/mL,(d)500 ng/mL,(e)25 ng/mL,(f)0.5 ng/mL,(g)0 ng/mL 的孵育液中孵育后,在 2 mM 的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的 PBS 溶液中的 DPV 曲线图。

[0047] 图 8 响应电流的变化 ΔI 与己烯雌酚浓度的标准曲线图。

具体实施方式

[0048] 下面结合具体实施例对本发明进行详细描述,所述的实施例有助于对本发明的理解和实施,并非构成对本发明的限制。本发明的保护范围并不以具体实施方式为限,而由权利要求加以限定。

[0049] 以下实施例中使用上海晨华公司的电化学工作站(CHI660D),以修饰的玻碳电极为工作电极,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极进行电化学测量。所使用的己烯雌酚抗体是北京华安麦科生物技术有限公司生产的己烯雌酚试剂盒,其效价浓度为 1:20 万。

[0050] 实施例 1 免疫传感器制备

[0051] 一种检测己烯雌酚的电化学免疫传感器,是在玻碳电极表面沉积纳米金后,修饰石墨烯-己烯雌酚-壳聚糖复合物而得。

[0052] 其制备方法如下:

[0053] 1) 氧化石墨的制备:50 mL 浓 H_2SO_4 +10 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ +10 g P_2O_5 混合,将 12 g 石墨粉加入到上述混合液中,反应 6 h。加入 2 L 水,过夜。460 mL 浓 H_2SO_4 (冰箱冰冻处理),将氧化的石墨粉加入到浓 H_2SO_4 中搅拌。温度控制在 10 °C 以下,缓慢加入 60 g KMnO_4 ,混合物在 35 °C 反应 2 h,缓慢加入 920 mL 去离子水,保持 50 °C 以下,搅拌反应 2 h。加入 2.8 L 水以及 50 mL 30 % H_2O_2 ,搅拌反应一天。使用 5 L 10% 的 HCl 冲洗,离心。然后再用 5 L 水

洗,至溶液呈中性。

[0054] 2) 石墨烯的制备:称取上述氧化石墨 0.05 g,加入到 100 mL pH=11 的 NaOH 溶液中;在 150 W 下超声 90 min 制备氧化石墨烯分散液;在 4000 rpm 下离心 3 min 除去极少量未剥离的氧化石墨;向离心后的氧化石墨烯分散液中加入 0.1 mL 水合肼,在 90 °C 搅拌反应 2 h,得到石墨烯的分散液。

[0055] 如图 3 所示为制得的石墨烯的扫描电镜照片,由图中可以看出,石墨烯呈很薄的片状。石墨烯由一层密集的、包裹在蜂巢晶体点阵上的碳原子组成,是世界上最薄的二维材料,其厚度仅为 0.335 nm。结构完整的石墨烯是由不含任何不稳定键的苯六元环组合而成的二维晶体,化学稳定性高,表面呈惰性状态,与其它介质(如溶剂等)的相互作用较弱,并且由于石墨烯片与片之间有较强的范德华力的作用,使其容易产生聚集,难溶于水及常用的有机溶剂。

[0056] 由于石墨烯拥有优异的电学性能,其重要用途之一是可以用来制备高性能的纳米复合材料,但石墨烯难溶于水及常用的有机溶剂。有研究表明,石墨烯在壳聚糖中分散时,两者之间将发生有效的负荷转移,两者之间的相互作用使得石墨烯在壳聚糖中呈分子水平分散,具有很好的分散效果。

[0057] 3) 石墨烯-壳聚糖悬浮液的配制:将 0.05 M 的 HCl 加热至 80 ~ 90 °C,加入称量好的壳聚糖,搅拌溶解,冷却后加入浓度为 0.1M 的 NaOH,调节 pH 至 5,配得 1 mg/mL 的壳聚糖溶液,置于 4 °C 冰箱备用。

[0058] 准确称取 5 mg 石墨烯样品于 2 mL 壳聚糖溶液中,超声分散 1 h,制得石墨烯-壳聚糖悬浮液。

[0059] 4) 电极修饰:直径为 3mm 的玻碳电极用分别用 1.0 和 0.3 μ m 的 Al₂O₃ 粉乳液打磨抛光后,分别在乙醇和水中各超声 3min。清洗后的玻碳电极先沉积金纳米粒子(gold nanoparticles),于 100mg/L 的 HAuCl₄ 溶液中在 -0.2V 电势下恒电位扫描 60s;再将 4 μ L 石墨烯-壳聚糖悬浮液与 2 μ L 浓度为 0.2 mg/mL 的己烯雌酚溶液(乙醇:水=1:4)混合,滴涂于表面沉积纳米金的玻碳电极表面,40 °C 下烘干 30min。表面修饰后的电极于 37 °C 下浸泡在 5 % 的 BSA 溶液中 30min,以封闭剩余的活性位点。

[0060] 实施例 2 修饰电极循环伏安扫描

[0061] 对不同修饰电极进行循环伏安研究,其结果如图 4。裸电极(曲线 a)在 2mM 的 K₃[Fe(CN)₆] 溶液中的循环伏安曲线表现出一对明显的 Fe(CN)₆^{3-/4-} 氧化还原峰;当电极上修饰了石墨烯/己烯雌酚/壳聚糖后(曲线 b),峰电流明显增大,石墨烯显示出优异的电化学活性,增强了电子的传递;当电极上修饰了纳米金/石墨烯/己烯雌酚/壳聚糖后(曲线 c),峰电流更加增大,纳米金与石墨烯复合材料具有更加优越的电化学性能;将纳米金/石墨烯/己烯雌酚/壳聚糖修饰电极放入含有己烯雌酚抗体的孵育液中孵育后(曲线 d),峰电流下降,这是由于己烯雌酚抗体与电极上的抗原反应,吸附在电极上,阻碍了电子的传递造成的,这也说明己烯雌酚抗原已经修饰在了电极上。

[0062] 实施例 3 检测条件优化

[0063] 不同检测条件的影响,如免疫反应的时间和抗体浓度,由 DPV 法进行确定。

[0064] 1、免疫反应时间

[0065] 实施例 1 制得的免疫传感器使用含有相同的抗体浓度的孵育液分别孵育 0, 10,

20, 40, 60 和 70 分钟后, 用 PBS 清洗, 在 2 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安 (DPV) 扫描, 结果如图 5。纳米金 / 石墨烯 / 己烯雌酚 / 壳聚糖修饰电极 (免疫传感器) 的 DPV 峰电流随孵育时间增加在 60 分钟内快速下降, 到 70 分钟时略微回升 (图 5)。孵育时间再增加电流响应不再降低。因此, 选择 60 分钟作为免疫反应的最佳孵育时间。

[0066] 2、孵育溶液中抗体浓度的影响

[0067] 纳米金 / 石墨烯 / 己烯雌酚 / 壳聚糖修饰电极, 浸在 50 μ L 加入不同体积抗体的 PBS 溶液中, 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, PBS 清洗后, 在 2 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安 (DPV) 扫描, 结果如图 6。由图 6 可知当在溶液中抗体体积由 0 μ L 增加至 5 μ L 时, DPV 峰值电流显著下降。随着进一步增加抗体浓度, 在 15-20 μ L 范围内, 电流减少很小。结果表明, 孵化溶液中抗体量大于 15 μ L 后抗体的吸附量不再增加, 表明结合位点基本上达到饱和。对于竞争的免疫反应, 选择一个有足够高的信号并小于饱和浓度的浓度。因此, 选择 10 μ L 为最佳的抗体量。

[0068] 实施例 4 建立标准曲线

[0069] 以 $K_3Fe(CN)_6$ 为探针, 通过 DPV 扫描, 利用抗体特异结合己烯雌酚的能力, 可以实现对己烯雌酚的检测。

[0070] 配制标准溶液 (孵育液), 标准溶液为一组总量为 50 μ L、含有浓度不一的己烯雌酚标准液、10 μ L 己烯雌酚抗体的 PBS 溶液 (pH=7.4)。

[0071] 将纳米金 / 石墨烯 / 己烯雌酚 / 壳聚糖修饰电极浸入孵育溶液, 溶液中游离的己烯雌酚与固定在电极表面的己烯雌酚竞争与溶液中己烯雌酚抗体的反应。经过 37 $^{\circ}$ C 下 60 min 孵育后, 用 PBS 冲洗。冲洗后的电极为工作电极, 在 2 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安 (DPV) 扫描, 记录响应电流, 如图 7 所示。

[0072] 结果表明, 随着己烯雌酚浓度在孵育液中的增加, DPV 峰电流增大。定义纳米金 / 石墨烯 / 己烯雌酚 / 壳聚糖修饰电极在只含 10 μ L 抗体的 PBS 缓冲溶液 (空白) 中孵育后的响应电流为 I_0 , 在含有游离己烯雌酚的孵育液孵育后的响应电流为 I_x , 响应电流的增加 ΔI ($\Delta I = I_x - I_0$) 与己烯雌酚浓度在 0.5 到 1500ng/mL 范围内成正比。

[0073] 绘制 ΔI -C 标准曲线如图 8 所示。线性回归方程为:

[0074] $Y = 0.78035 + 0.00785X$ 。

[0075] 以大于噪音信号 3 倍的电流信号对应的浓度为最低检出限, 重复 5 次以上实验得出, 上述方法的最低检测限为 0.1 ng/mL。

[0076] 实施例 5 猪肉中己烯雌酚检测

[0077] 根据实施例 4 所建立的己烯雌酚检测的标准曲线, 采用本发明的方法测定猪肉样品中己烯雌酚含量, 定量方法为标准加入法。

[0078] 1) 猪肉样品前处理

[0079] 称取 1 ± 0.0050 g 猪肉于到 10 mL 的样品管中, 加入己烯雌酚标准液, 和 3 mL 乙腈-丙酮提取液 (V:V, 4:1), 混合物超声振荡 30 min, 于 2000 r/m 下离心 10 min, 将上清液转移至氮吹管中, 残渣用 3 mL 的相同提取液重复提取 1 次, 上清液合并并在氮吹管中。提取物在氮吹条件下于 50 $^{\circ}$ C 温度下浓缩蒸发, 浓缩物加入 1 mL 的 pH 为 7.4 磷酸缓冲溶液, 溶解后用于电化学分析。

[0080] 2) 按照步骤 1) 的方法配制不加入己烯雌酚的空白样品, 和 3 个含有不同己烯雌酚

浓度的加标样品(标准加入法),并按照与实施例 4 相同的方法对修饰电极进行孵育及检测,根据工作曲线得到样品中己烯雌酚的实际浓度,所得数据结果及回收率见表 1。

[0081] 表 1

[0082]

己烯雌酚添加量 (ng/mL)	己烯雌酚测定量 (ng/mL)	回收率 (%)
50.0	39.4, 37.1, 35.6	74.8
500.0	436.9, 588.5, 503.1	101.9
1000.0	1006.3, 1021.6, 901.9	97.7

[0083] 实施例 6 奶粉中己烯雌酚检测

[0084] 检测方法同实施例 5,奶粉样品按下述方法预处理:

[0085] 称取 0.3 g 奶粉于到 10 mL 的样品管中,加入己烯雌酚标准液,和 2 mL 正己烷,混合物超声振荡 30 min,于 4000 r/m 下离心 5 min,将上清液转移至氮吹管中,残渣用 2mL 的相同提取液重复提取 1 次,上清液合并并在氮吹管中。提取物在氮吹条件下于 50 °C 温度下浓缩蒸发,浓缩物加入 1 mL 的 pH 为 7.4 磷酸缓冲溶液,溶解后用于电化学分析。

[0086] 所得数据结果及回收率如表 2。

[0087] 表 2

[0088]

己烯雌酚添加量 (ng/mL)	己烯雌酚测定量 (ng/mL)	回收率 (%)
200.0	156.6, 226.7, 229.2	102.1
500.0	510.78, 518.4, 500.59	101.9
1000.0	1058.5, 992.3, 928.6	99.3

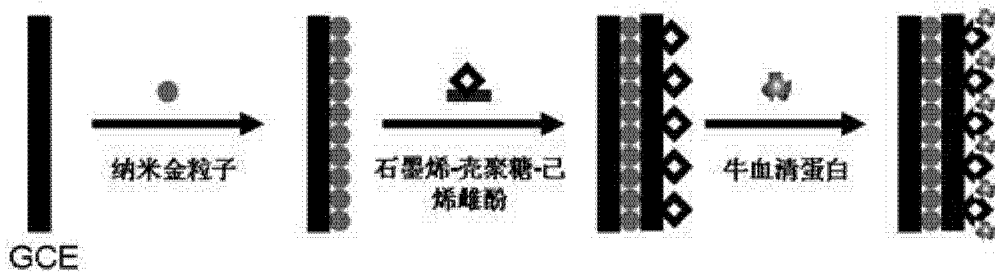


图 1

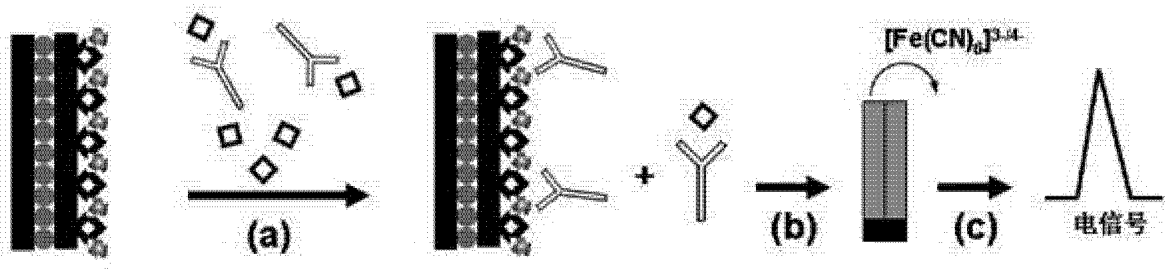


图 2

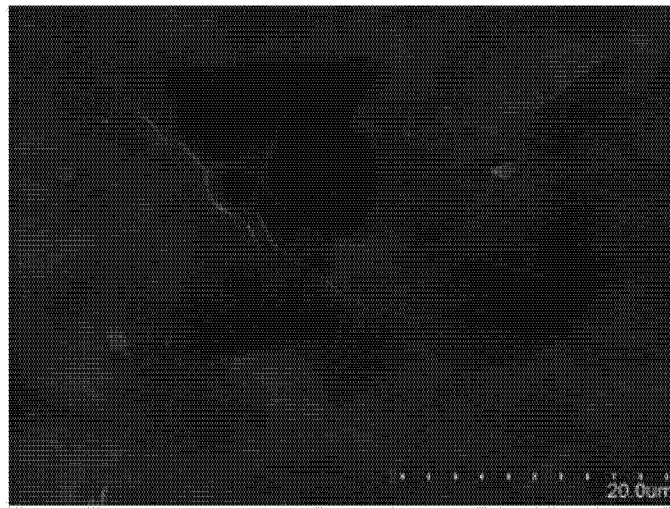


图 3

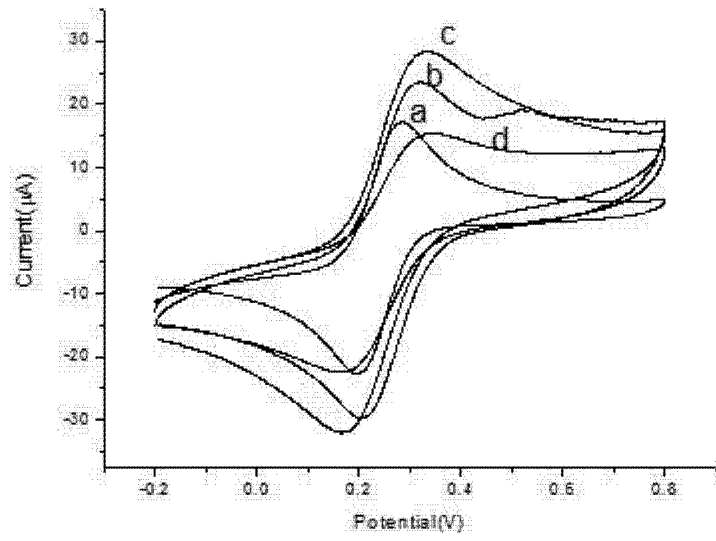


图 4

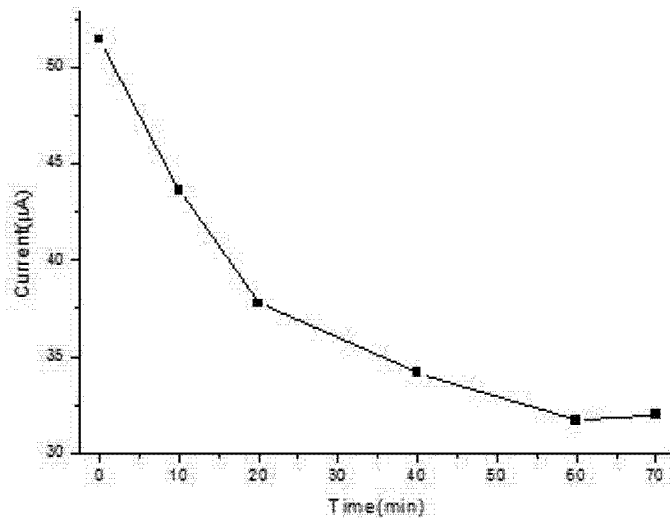


图 5

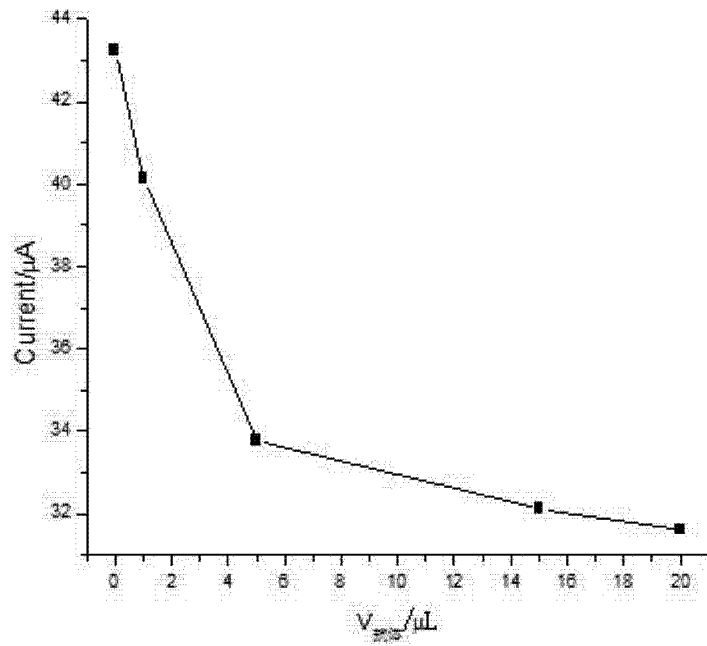


图 6

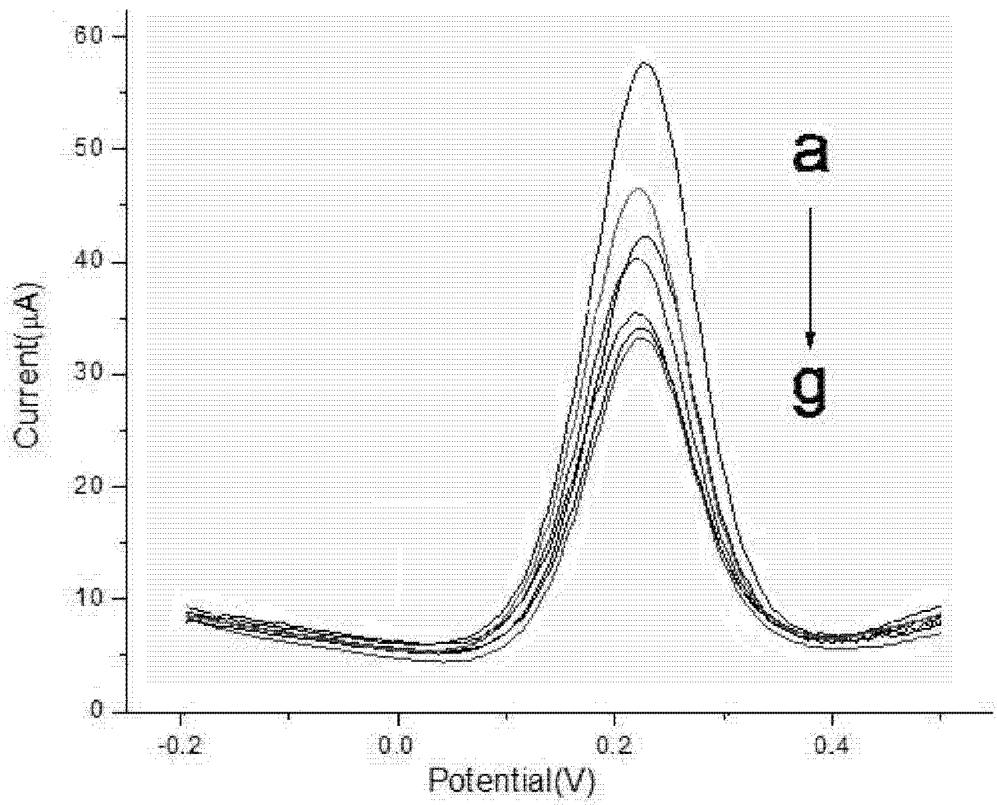


图 7

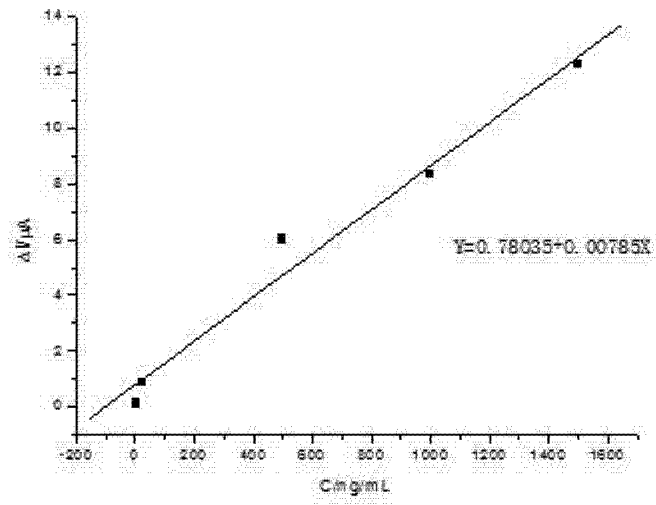


图 8

专利名称(译)	检测己烯雌酚的电化学免疫传感器及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN102262125B	公开(公告)日	2013-10-09
申请号	CN201110212844.9	申请日	2011-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
[标]发明人	赵波 陈昌云 王传现 邵科峰 颜妍 张芹 陈园园		
发明人	赵波 陈昌云 王传现 邵科峰 颜妍 张芹 陈园园		
IPC分类号	G01N27/48 G01N27/30 G01N33/53		
代理人(译)	韩朝晖		
审查员(译)	许静		
其他公开文献	CN102262125A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测己烯雌酚的非标记电化学免疫传感器及其制备方法和应用。所述的免疫传感器，包括基底电极，在基底电极表面沉积纳米金后，修饰石墨烯-己烯雌酚-壳聚糖复合物，并以牛血清蛋白封闭非特异性活性位点。其制备方法是在基底电极表面沉积纳米金后，利用壳聚糖将石墨烯和己烯雌酚包被并固定于电极表面。所述的免疫传感器基于免疫反应的竞争模式，利用K₃Fe(CN)₆为探针，以差分脉冲伏安法监测免疫反应，可用于己烯雌酚检测。本发明的传感器具有高灵敏度和专一性，检测方法简单，适用范围广泛，检测限可达到0.1ng/ml，线性范围0.5~1500ng/ml，具有快速现场检测、灵敏度高、成本低等特点。

