



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 106872707 A

(43)申请公布日 2017.06.20

(21)申请号 201710186775.6

(22)申请日 2017.03.27

(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 徐玮 邱景富

(74)专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 李艳 许亦琳

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/561(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页 附图5页

(54)发明名称

一种用于检测玉米赤霉烯酮的电化学免疫传感器及其制备与应用

(57)摘要

本发明涉及电化学领域,尤其涉及一种用于检测玉米赤霉烯酮的电化学免疫传感器及其制备与应用。所述电化学免疫传感器,包括工作电极、参比电极和对电极,所述工作电极为先在基底电极表面修饰羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料,而后固定玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物所得。免疫传感器在玉米赤霉烯酮浓度为0.01至1000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 呈线性关系,线性方程为 $Y = 13.64067E^{-6} - 1.60317E^{-6}X$,最低检测限可低至4.7 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。具有良好的灵敏度、特异性、重复性及稳定性。

1. 一种用于检测玉米赤霉烯酮的电化学免疫传感器,包括工作电极、参比电极和对电极,所述工作电极为先在基底电极表面修饰羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料,而后固定玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物所得。

2. 根据权利要求1所述的用于检测玉米赤霉烯酮的电化学免疫传感器,其特征在于,所述基底电极选自玻碳电极。

3. 根据权利要求1所述的用于检测玉米赤霉烯酮的电化学免疫传感器,其特征在于,所述羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS)中,羧基化多壁碳纳米管与壳聚糖的质量比为(0.5~12):1。

4. 根据权利要求1所述的用于检测玉米赤霉烯酮的电化学免疫传感器,其特征在于,每平方毫米的工作电极上,所述羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料中羧基化多壁碳纳米管的质量为0.1~2.0 μ g。

5. 根据权利要求1所述的用于检测玉米赤霉烯酮的电化学免疫传感器,其特征在于,每个所述工作电极上,所述羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS)中羧基化多壁碳纳米管与玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEA-BSA)的质量比为(25~12000):1。

6. 如权利要求1~5任一项所述电化学免疫传感器中的工作电极的制备方法,所述方法为先在基底电极表面修饰羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料,而后再固定玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述工作电极的制备方法包括如下步骤:

(1) 制备羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料:将壳聚糖溶解于醋酸溶液中,制备壳聚糖溶液;将羧基化多壁碳纳米管溶解于所得壳聚糖溶液中,得羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料混悬液;

(2) 工作电极的修饰及功能化:

1) 基底电极表面处理:将基底电极表面进行抛光处理,使其表面光洁;

2) 修饰羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料:将步骤(1)中制备的羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料混悬液涂到步骤1)中处理好的基底电极表面,晾干成膜,得到羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料修饰电极;

3) 采用活化液活化所得羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料修饰电极中羧基化多壁碳纳米管上的羧基基团;

4) 固定玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物:在活化后的羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料修饰电极上加玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物,孵育,即得工作电极。

8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,还包括以下特征中的任一项或多项:步骤(1)中,所述羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS)混悬液中,羧基化多壁碳纳米管(cMWCNTs-COOH)的终浓度为1~6mg/ml;步骤3)中,所述活化液为EDC和NHS的混合液EDC/NHS;步骤4)中,玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物的浓度为0.001~2 μ g/ml。

9. 一种检测玉米赤霉烯酮的检测体系,包括如权利要求1~5任一项所述电化学免疫传感器ZEA单克隆抗体、二抗和免疫反应缓冲体系。

10. 根据权利要求9所述的检测体系,其特征在于,还包括以下特征中的任一项或多项:

(1) 所述二抗为碱性磷酸酶标记二抗;(2) 所述免疫反应缓冲体系为含 α -NP的二乙醇胺缓冲液。

11. 如权利要求1~5任一项所述电化学免疫传感器或如权利要求9~10任一项检测体系在检测玉米赤霉烯酮中的用途。

12. 一种检测玉米赤霉烯酮的方法,为采用如权利要求1~5任一项所述电化学免疫传感器或如权利要求9~10任一项检测体系对样品中的玉米赤霉烯酮进行检测。

13. 根据权利要求12所述的检测方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(a) 在如权利要求1~5任一项所述电化学免疫传感器的工作电极上同时加入样品溶液和一定量ZEA单克隆抗体溶液,孵育;

(b) 加入适量的碱性磷酸酶标记的二抗,孵育,通过与ZEA单克隆抗体选择性地结合到电极表面;

(c) 将工作电极置于免疫反应缓冲体系中,并将工作电极、参比电极以及对电极正确连接到电化学工作站上,用差分脉冲伏安进行测定。

14. 根据权利要求13所述的检测方法,其特征在于,还包括以下特征中的任一项或多项:

(1) 步骤(a)中,ZEA单克隆抗体溶液的浓度为1~40ug/ml;(2) 步骤(a)中,孵育时间为10~50min;(3) 步骤(b)中,所述碱性磷酸酶标记二抗为碱性磷酸酶标记兔抗人IgG;(4) 步骤(b)中,所述碱性磷酸酶标记二抗的浓度为2~20ug/ml;(5) 步骤(c)中,所述参比电极选自饱和甘汞电极或银氯化银电极之任意一种;(6) 步骤(c)中,所述对电极为铂丝电极;(7) 步骤(c)中,所述免疫反应缓冲体系为含 α -NP的二乙醇胺缓冲液;(8) 步骤(c)中,所述免疫反应缓冲体系的pH为5.6~13。

一种用于检测玉米赤霉烯酮的电化学免疫传感器及其制备与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及电化学领域,尤其涉及一种用于检测玉米赤霉烯酮的电化学免疫传感器及其制备与应用。

背景技术

[0002] 玉米赤霉烯酮(简称ZEA)是由多种镰刀菌素产生的一种霉菌毒素。通过真菌污染和水的传播,广泛存在于玉米、小麦、高粱、大米等谷物、饲料和动物产品中。人类可通过直接接触受污染的食品和间接接触动物性产品而感染真菌毒素。玉米赤霉烯酮可诱导人体产生高浓度的雌激素活性,从而对人类和动物的生殖系统产生严重的损伤。除此之外,此毒素可诱导细胞凋亡,损伤DNA,刺激激素依赖性肿瘤的产生,从而对身体各个系统造成毒害。近年来关于玉米赤霉烯酮的危害已引起世界各国的极大关注,欧洲食品安全局(EFSA)规定人类接触玉米赤霉烯酮每日耐受摄入量为 $0.25\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

[0003] 高效液相色谱在近年来的ZEA国际标准体系中已经处于绝对的主导地位,作为定量检测方法,在国内外实验室和检测机构得到普遍的应用。除此之外,质谱联用法,侧流免疫层析测定等方法对ZEA进行检测都是近年来运用较广泛的方法,这些方法虽然具有结果准确、回收率高、精确度良好、重现性好等优点,但是成本高、检测时间长、操作程序及样品前处理复杂,无法满足现场检查的需要。

[0004] 基于免疫学原理的酶联免疫法(ELISA)检测ZEA具有简便、快速、灵敏等特点,为快速大规模筛检提供了极大的帮助。但由于该方法在检测复杂基质样品时,检测结果假阳性多,因此阳性样品应该用仪器进行复测。

发明内容

[0005] 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检测玉米赤霉烯酮的电化学免疫传感器及其制备与应用。

[0006] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 本发明的第一方面提供一种用于检测玉米赤霉烯酮(ZEA)的电化学免疫传感器,包括工作电极、参比电极和对电极,所述工作电极为先在基底电极表面修饰羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS),而后固定玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEA-BSA)所得。

[0008] 优选地,所述基底电极选自玻碳电极。

[0009] 优选地,所述羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS)为将羧基化多壁碳纳米管(cMWCNTs-COOH)分散于壳聚糖(CS)中制得。

[0010] 优选地,所述羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS)中,羧基化多壁碳纳米管与壳聚糖的质量比为 $(0.5 \sim 12):1$ 。更优选为 $0.8:1$ 。

[0011] 优选地,每平方毫米的工作电极上,所述羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料

(cMWCNTs-COOH/CS) 中羧基化多壁碳纳米管的质量为0.1~2.0ug,更优选为1~1.5ug。

[0012] 优选地,每个所述工作电极上,所述羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS)中羧基化多壁碳纳米管的质量为1~12ug,更优选为8ug。

[0013] 优选地,每个所述工作电极上,所述羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS)中羧基化多壁碳纳米管与玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEA-BSA)的质量比为(25~12000):1。更优选为800:1。

[0014] 进一步地,所述电化学免疫传感器中的参比电极和对电极与工作电极构成三电极系统。

[0015] 优选地,所述参比电极选自饱和甘汞电极或银氯化银电极(Ag/AgCl)之任意一种;更优选地,所述参比电极为银/氯化银(Ag/AgCl)电极。

[0016] 优选地,所述对电极为铂丝电极。

[0017] 本发明第二方面,提供了前述电化学免疫传感器中的工作电极的制备方法,所述方法为先在基底电极表面修饰羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS),而后再固定玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEA-BSA)。

[0018] 优选地,所述工作电极的制备方法包括如下步骤:

[0019] (1) 制备羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS):

[0020] 将壳聚糖溶解于醋酸溶液中,制备壳聚糖溶液;将羧基化多壁碳纳米管(cMWCNTs-COOH)溶解于所得壳聚糖溶液中,得羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS)混悬液;

[0021] (3) 工作电极的修饰及功能化:

[0022] 1) 基底电极表面处理:将基底电极表面进行抛光处理,使其表面光洁;

[0023] 2) 修饰羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS):将步骤(1)中制备的羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS)混悬液滴涂到步骤1)中处理好的基底电极表面,晾干成膜,得到羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS)修饰电极(cMWCNTs-COOH/CS/GCE);

[0024] 3) 采用活化液活化所得羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS)修饰电极(cMWCNTs-COOH/CS/GCE)中cMWCNTs-COOH上的羧基基团;

[0025] 4) 固定玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEA-BSA):在活化后的羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS)修饰电极(cMWCNTs-COOH/CS/GCE)上加玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEA-BSA),孵育,形成ZEA-BSA-cMWCNTs-COOH/CS/GCE,即得工作电极。

[0026] 优选地,步骤(1)中,壳聚糖的分子式 $(C_6H_{11}NO_4)_n$,单元体的分子量为161.2。

[0027] 优选地,步骤(1)中,醋酸溶液的浓度为1%。

[0028] 优选地,步骤(1)中,壳聚糖溶液的浓度为0.5~6mg/mL,更优选为5mg/mL。

[0029] 优选地,步骤(1)中,所述羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS)混悬液中,羧基化多壁碳纳米管与壳聚糖的质量比为(0.5~12):1。更优选为0.8:1。

[0030] 优选地,步骤(1)中,所述羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS)混悬液中,羧基化多壁碳纳米管(cMWCNTs-COOH)的终浓度为(1~6)mg/mL;更优选为4mg/mL。

- [0031] 优选地,步骤1)中,所述基底电极选自玻碳电极。
- [0032] 优选地,步骤1)中,可采用氧化铝粉对所述基底电极进行抛光处理。
- [0033] 优选地,步骤2)中所修饰的羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS)中,羧基化多壁碳纳米管与壳聚糖的质量比为(0.5~12):1。更优选为0.8:1。
- [0034] 优选地,步骤2)中,每平方毫米的工作电极上,所述羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS)中羧基化多壁碳纳米管的质量为0.1~2.0 μ g,更优选为1~1.5 μ g。
- [0035] 优选地,步骤2)中,每个工作电极上所修饰的羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS)中羧基化多壁碳纳米管的质量为1~12 μ g,更优选为8 μ g。
- [0036] 优选地,步骤3)中,所述活化液为EDC和NHS的混合液EDC/NHS。
- [0037] 更优选地,EDC与NHS的质量比为5:2。
- [0038] 优选地,步骤4)中,玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEA-BSA)的浓度为0.001~2 μ g/ml。更优选地,玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEA-BSA)的浓度为0.5~2 μ g/ml。进一步优选地,ZEA-BSA的浓度为1 μ g/ml。
- [0039] 优选地,步骤2)中所修饰的多壁碳纳米管/壳聚糖纳米复合材料(cMWCNTs-COOH/CS)中羧基化多壁碳纳米管与步骤4)中所固定的玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物(ZEA-BSA)的质量比为(0.5~12000):1。更优选为4:1。
- [0040] 本发明的第三方面提供了一种检测玉米赤霉烯酮(ZEA)的检测体系,包括本发明第一方面所述的电化学免疫传感器、ZEA单克隆抗体、二抗和免疫反应缓冲体系。
- [0041] 优选地,所述二抗为碱性磷酸酶标记二抗。
- [0042] 进一步的,可选择碱性磷酸酶标记的马抗人,兔抗人,羊抗人等任意来源的抗人的二抗,更优选为碱性磷酸酶标记兔抗人IgG。
- [0043] 优选地,所述免疫反应缓冲体系为含 α -NP的二乙醇胺(DEA)缓冲液。
- [0044] 本发明第四方面提供了一种检测玉米赤霉烯酮(ZEA)的方法,为采用前述的电化学免疫传感器或检测体系对样品中的玉米赤霉烯酮(ZEA)进行检测。
- [0045] 优选地,所述方法包括以下步骤:
- [0046] (a) 在前述构建的电化学免疫传感器的工作电极上同时加入样品溶液和一定量ZEA单克隆抗体溶液,孵育;
- [0047] (b) 加入适量的碱性磷酸酶标记的二抗,孵育,通过与ZEA单克隆抗体选择性地结合到电极表面;
- [0048] (c) 将工作电极置于免疫反应缓冲体系中,并将工作电极、参比电极以及对电极正确连接到电化学工作站上,用差分脉冲伏安(DPV)进行测定。
- [0049] 优选地,步骤(a)中,ZEA单克隆抗体溶液的浓度为1~40 μ g/ml。更优选地,ZEA单克隆抗体溶液的浓度为5~20 μ g/ml。进一步更优选为10 μ g/ml。
- [0050] 优选地,步骤(a)中,孵育时间为10~50min。更优选为30min。
- [0051] 优选地,步骤(b)中,所述碱性磷酸酶标记二抗为碱性磷酸酶标记兔抗人IgG。
- [0052] 优选地,步骤(b)中,所述碱性磷酸酶标记二抗的浓度为2~20 μ g/ml。更优选地,所述碱性磷酸酶标记二抗的浓度为2.5~10 μ g/ml。进一步优选地,所述碱性磷酸酶标记二抗的浓度为5 μ g/ml。

[0053] 优选地,步骤(c)中,所述参比电极选自饱和甘汞电极或银氯化银电极(Ag/AgCl)之任意一种;更优选地,所述参比电极为银/氯化银(Ag/AgCl)电极。

[0054] 优选地,步骤(c)中,所述对电极为铂丝电极。

[0055] 优选地,步骤(c)中,所述免疫反应缓冲体系为含 α -NP的二乙醇胺(DEA)缓冲液。

[0056] 更优选地,所述免疫反应缓冲体系中 α -NP的浓度为0.25~1.5mg/ml。进一步优选为0.5~1.5mg/ml。更优选为0.75mg/ml。

[0057] 优选地,步骤(c)中,所述免疫反应缓冲体系的pH为5.6~13。更优选为7.4~11.4。进一步优选为9.6。

[0058] 本发明第五方面提供了前述电化学免疫传感器或检测体系在检测玉米赤霉烯酮(ZEA)中的用途。

[0059] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0060] (1) 电化学免疫传感器是将免疫技术与电化学检测技术相结合的一种新分析方法,利用信号转换器(电化学工作站)把分子识别器(探针)与被测对象发生的物理或化学变化转变成电信号。该技术具有高灵敏性,快速反应时间,成本低,操作简便,且可用于现场快速检查。因此应用电化学免疫传感器检测实际样品中的ZEA具有重大的意义。

[0061] (2) 在此发明中,基于间接竞争法,成功构建运用 α -NP作为酶底物催化产生信号,cMWCNTs/CS作为电子传递介质的电化学免疫传感器用于检测谷物和饲料中的ZEA。由于ZEA-BSA作为抗原结合在cMWCNTs/CS后,电极表面存在大量的BSA,继而封闭了未结合的活性位点,因此本方法中可省略封闭步骤,使此方法有更简单的操作过程。实验表明,GCE结合cMWCNTs/CS复合物可使ZEA的检测浓度具有更大的检测范围,更低的检测限。此免疫传感器在玉米赤霉烯酮浓度为0.01至1000ng·mL⁻¹呈线性关系,线性方程为 $Y=13.64067E^{-6}-1.60317E^{-6}X$,最低检测限可低至4.7pg·mL⁻¹。具有良好的灵敏度、特异性、重复性及稳定性。在实际样品检测也具有可观的回收率。同时,设计的电化学免疫传感器具有高的灵敏度,特异度,快速的检测反应时间,还可应用于阴性添加样品以及天然污染样品的检测中。

附图说明

[0062] 图1:cMWCNTs-COOH与cMWCNTs-COOH/CS复合材料粉末用Hitachi S4800场发射扫描电镜结果。

[0063] 图2:JEOL JSM-6700F型原子力显微镜逐步表征电极结果,其中,

[0064] a为cMWCNTs-COOH/CS/GCE;

[0065] b为:ZEA-BSA-cMWCNTs-COOH/CS/GCE;

[0066] c为ZEA-BSA-cMWCNTs-COOH/CS/GCE;

[0067] d为ZEA-BSA-cMWCNTs-COOH/CS/GCE。

[0068] 图3:逐步修饰电极的循环伏安响应曲线,其中

[0069] a为裸电极;

[0070] b为cMWCNTs/CS/GCE;

[0071] c为ZEA-BSA-cMWCNTs/CS/GCE;

[0072] d为anti-ZEA-ZEA-BSA-cMWCNTs/CS/GCE;

[0073] e为AP-anti-antibody-anti-ZEA-ZEA-BSA-cMWCNTs/CS/GCE。

[0074] 图4:逐步修饰电极的阻抗图谱:

[0075] a为裸电极;

[0076] b为cMWCNTs/CS/GCE;

[0077] c为ZEA-BSA-cMWCNTs/CS/GCE;

[0078] d为anti-ZEA-ZEA-BSA-cMWCNTs/CS/GCE;

[0079] e为AP-anti-antibody-anti-ZEA-ZEA-BSA-cMWCNTs/CS/GCE。

[0080] 图5:各优化条件下所构建的电化学免疫传感器差分脉冲伏安扫描结果,其中:

[0081] a为ZEA-BSA浓度;

[0082] b为anti-ZEA浓度;

[0083] c为AP-anti-antibody浓度

[0084] d为 α -NP浓度

[0085] e为底液pH

[0086] f为竞争反应时间。

[0087] 图6:本发明制备的电化学传感器在六个不同浓度(1000,100,10,1,0.1,0.01ng · mL⁻¹)的ZEA标准品溶液中孵育,记录其DPV记录电流值 i_p 所得曲线图。

[0088] 图7:本发明制备的电化学传感器检测ZEA标准曲线。

[0089] 图8:本发明制备的电化学传感器特异性分析。

[0090] 图9本发明制备的电化学传感器稳定性分析。

具体实施方式

[0091] 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。

[0092] 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。

[0093] 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。

[0094] 实施例1制备电化学免疫传感器

[0095] 1.试剂与仪器

[0096] 1.1试剂

[0097] 玉米赤霉烯酮(ZEA)标准品、玉米赤霉烯酮-牛血清蛋白偶联物(ZEA-BSA)、ZEA单克隆抗体(anti-ZEA)、ZEA玉米阴性样品、ZEA免疫亲和柱购自北京华安麦科生物技术有限

公司,羧基化多壁碳纳米管(直径<8nm)购自南京先丰纳米材料科技有限公司,碱性磷酸酶标记兔抗人IgG、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、 α -萘基磷酸盐(α -NP)、壳聚糖(CS)均购自美国Sigma-Aldrich公司,ZEA天然污染的阳性样品(玉米、小麦、牛精饲料)购自青岛普瑞邦科技有限公司。甲醇、丙酮、等其他试剂均购自重庆茂业化学试剂有限公司。0.1M磷酸盐缓冲剂(PBS)作为工作液,是14mM KH_2PO_4 ,2.7mM KCl,87mM Na_2HPO_4 and 136.7mM NaCl的混合溶液。0.1M二乙醇胺(DEA)为DPV测定反应溶液,是1M MgCl_2 and 100nM KCl的混合溶液。

[0098] 1.2检测仪器

[0099] AUTOLAB PGSTAT302N型电化学工作站购自瑞士万通科技有限公司,Hitachi S4800型场发射扫描电镜购自日本日立有限公司,JEOL JSM-6700F型原子力显微镜购自布鲁克科技有限公司。

[0100] 1.3电化学测量方法

[0101] 电化学实验包括差分脉冲伏安法(DPV)、循环伏安法(CV)和电化学阻抗谱(EIS)。电化学电池由传统的三电极化学系统组成。CV测试条件:电压-0.1V至+0.6V,扫描速率为0.1V/S。EIS测试条件:扫描频率为0.1至 10^5 赫兹。CV,EIS底液为都在5.0mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 和0.1M KCl混合溶液的缓冲体系中进行。DPV检测中,底液为0.1M DEA (pH 9.6), $0.75\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ α -NP的反应体系,检测电压-0.05V至+0.55V,扫描速率为0.025V/S,振幅0.07V,脉冲宽度为0.05S,静置时间为0.2S。所有的实验都在室温下进行。

[0102] 1.4检测原理

[0103] 在玻碳电极表面通过直接涂覆法修饰铺上一层羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料(cMWCNTs-COOH/CS),并利用EDC/NHS活化cMWCNTs-COOH上的羧基。将ZEA-BSA通过蛋白质氨基端与羧基化多壁碳纳米管cMWCNTs-COOH上的活化羧基反应连接,并通过抗原抗体反应与同时加入的ZEA单体来竞争吸附ZEA单克隆抗体(anti-ZEA),再加入碱性磷酸酶标记兔抗人IgG二抗,通过碱性磷酸酶与底物 α -萘基磷酸盐(α -NP)反应产生的电化学信号绘制标准曲线和得到实测样品ZEA水平。

[0104] 2.工作电极的制备

[0105] 2.1羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖(cMWCNTs-COOH/CS)复合材料的制备

[0106] 将壳聚糖粉末溶解于1%醋酸溶液中,剧烈震荡2分钟,并超声1h至壳聚糖溶解,制备获得浓度为5mg/ml的壳聚糖溶液。

[0107] 随后,在10.0ml 5mg/ml壳聚糖溶液中加入40.0mg羧基化多壁碳纳米管(cMWCNTs-COOH)超声分散至少2h,得均匀稳定分散良好的cMWCNTs-COOH/CS复合材料混悬液,其中cMWCNTs-COOH的终浓度为4mg/ml。在使用之前,于4℃低温保存。

[0108] 2.2工作电极的修饰及功能化

[0109] (1) 玻碳电极表面处理:玻碳电极(GCE)的直径为3mm,在使用前分别用0.3 μm 和0.05 μm 的氧化铝粉抛光至镜面,随后分别用超纯水,体积比为1:1的丙酮和硝酸混合液中超声清洗。最后用去离子水冲洗干净,在室温下氮气干燥。

[0110] (2) 将2 μL 预先准备好的cMWCNTs-COOH/CS混悬液($4\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)小心地滴涂在处理干净的玻碳电极表面。然后,在室温下将修饰的玻碳电极过夜晾干得到羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料修饰电极(cMWCNTs-COOH/CS/GCE)。

[0111] (3) 将所制备的cMWCNTs-COOH/CS/GCE用磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01mol/L, pH7.4)清洗后, 浸入50 μ l新鲜配置的EDC/NHS活化液(EDC与NHS的浓度比为5mM:2mM)中, 于37℃温育1h, 活化cMWCNTs-COOH上的羧基基团。

[0112] (4) 活化后的cMWCNTs-COOH/CS/GCE再用PBS缓冲液彻底清洗。将10 μ L的ZEA-BSA (1 μ g mL⁻¹) 快速滴于电极表面, 37℃温育1.5h。孵育完全之后, 将制备的电极用PBS清洗。最后, 以PBS彻底清洗电极, 得ZEA-BSA-cMWCNTs/CS/GCE并置于4℃的冰箱中待用。

[0113] 3. 电化学免疫传感器的使用

[0114] (1) 将5 μ L用PBS (pH7.4) 稀释到一定浓度的ZEA (0~1000ng mL⁻¹) 和5 μ L10 μ g mL⁻¹的ZEA单克隆抗体(anti-ZEA) 均匀混合, 在冰上反应40分钟后, 将竞争液滴加在修饰了ZEA-BSA的电极ZEA-BSA-cMWCNTs/CS/GCE电极表面, 37℃温育90min, 得anti-ZEA-ZEA-BSA-cMWCNTs/CS/GCE。在反应过程中, 电极上固定的ZEA-BSA与游离在混合液中的ZEA共同竞争固定量的anti-ZEA。

[0115] (2) 然后再用PBS缓冲液(pH 7.4) 清洗电极, 置于10 μ L 1:200稀释的碱性磷酸酶标记兔抗人IgG二抗中, 37℃温育90min, PBS缓冲液(pH 7.4) 清洗后, 得AP-anti-antibody/anti-ZEA/ZEA-BSA-cMWCNTs-COOH/CS/GCE。

[0116] (3) 以现配制的含0.75mg mL⁻¹ α -NP的二乙醇胺(DEA) 缓冲液作为免疫反应缓冲体系, 将工作电极置于其中, Ag/AgCl电极为参比电极, 铂丝电极为对电极, 在室温下, 用差分脉冲伏安法(DPV) 进行测定。

[0117] 4. 对比试验

[0118] 在同一实验条件下, 以裸玻碳电极GCE和玻碳电极表面只修饰羧基化多壁碳纳米管(cMWCNTs-COOH) 所得工作电极cMWCNTs-COOH/GCE所构建的电化学免疫传感器为对照。

[0119] 实施例2电化学免疫传感器的表征和检验

[0120] 为得到纳米复合材料合成过程中形态和大小的变化, 采用FE-SEM对cMWCNTs-COOH和cMWCNTs-COOH/CS复合材料表面形态进行表征。

[0121] 1. 对cMWCNTs-COOH的表征

[0122] 如图1a所示, 用Hitachi S4800场发射扫描电镜观察, 在没有CS存在时, cMWCNTs-COOH为弯曲和螺旋管状结构, 形成了一个三维网状多孔结构, 展示了较大的表面积, 但各管状结构之间产生了堆叠效应, 阻碍电子传递。

[0123] 2. 对cMWCNTs-COOH/CS的表征

[0124] 对实施例1中所得cMWCNTs-COOH/CS复合材料粉末用Hitachi S4800场发射扫描电镜进行扫描观察, 如图1b显示, 由于CS含有多氨基基团, 与cMWCNTs-COOH结合后, 能抑制cMWCNTs-COOH的聚集, 形成致密的3D结构, 从而显著增加在水溶液中的分散性, 能更有效的与其他聚合物结合。

[0125] 在玻碳电极表面滴涂cMWCNTs-COOH/CS, 在室温晾干成膜后, 采用AFM观察:

[0126] 图2a:

[0127] 为cMWCNTs-COOH/CS/GCE, 电极表面有一层密集的单层隆起, 表明cMWCNTs-COOH/CS表面可能存在丰富的结合位点。

[0128] 图2b:

[0129] 为ZEA-BSA-cMWCNTs-COOH/CS/GCE, 表面隆起消失, 表面呈光滑的形态。可能是

ZEA-BSA共价链接到cMWCNTs-COOH/CS上,从而结合并封闭了可结合的位点。

[0130] 图2c-d可以观察到隆起显著增加,这是由于发生了抗原抗体间的特异性结合,从而使表面隆起愈加明显。

[0131] 3.不同修饰电极的电化学表征

[0132] 采用了CV、EIS对电极构建过程中内部的电化学变化进行表征。

[0133] a为裸GCE;

[0134] b为cMWCNTs-COOH/CS/GCE;

[0135] c为ZEA-BSA-cMWCNTs-COOH/CS/CS/GCE;

[0136] d为anti-ZEA/ZEA-BSA-cMWCNTs-COOH/CS/GCE;

[0137] e为AP-anti-antibody/anti-ZEA/ZEA-BSA-cMWCNTs-COOH/CS/GCE。

[0138] 当裸GCE表面(图3-曲线a)修饰cMWCNTs-COOH/CS后(图3-曲线b),氧化还原峰值明显增大,说明cMWCNTs-COOH/CS复合物能促进溶液中电子在电极表面的转移。当共价结合ZEA-BSA后(图3-曲线c),由于蛋白质的空间位阻现象和绝缘作用对电子转移构成的障碍,峰值电流呈现明显的降低。当电极通过anti-ZEA的进一步修饰孵育后(图3-曲线d),增加的电阻使得峰值电流进一步的降低。表明制备的电化学免疫传感器工作电极中ZEA-BSA对anti-ZEA进行了成功的识别与结合作用。当把一定浓度的AP-anti-antibody滴加到修饰后的电极表面孵育过后,峰值电流降至最低点(图3-曲线e),电流进一步减小,表明AP-anti-antibody成功的引入电化学免疫传感器的工作电极上。

[0139] EIS表征中,半圆的直径等于电子转移电阻 R_{et} ,控制还原探针在电极界面的电子转移动力学。EIS的表征结果与CV结果相符。当裸GCE表面(图4-曲线a)有一个直径较小的半圆,意味着电极表面可以进行较快的电子转移。当修饰cMWCNTs-COOH/CS后(图4-曲线b),半圆直径明显减小,斜率增大。说明cMWCNTs-COOH/CS复合物能促进 $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 缓冲溶液中电子转移速率。当共价结合ZEA-BSA、anti-ZEA、AP-anti-antibody后(图4-曲线c-e),半圆直径依次增大,是由于抗原抗体特异性结合后,形成的蛋白质层作为惰性电子和传质阻挡层,导致电阻增大,并显著阻碍了铁氰化物向电极表面扩散。

[0140] 实施例3电化学免疫传感器及其使用条件的优化

[0141] 为构建一种高灵敏度、高特异度,低检测限的电化学免疫传感器,我们还对实验过程中几个重要的条件即ZEA-BSA的浓度、anti-ZEA的浓度、AP-anti-antibody的浓度、 α -NP的浓度、底液pH、竞争反应时间这几个测定条件进行了进一步的优化。对每一个条件都由低浓度到高浓度分别选取多个不同的点进行一系列实验。

[0142] 1.为考察ZEA-BSA浓度大小对电化学免疫传感器反应信号的影响,本实验采用了不同浓度的ZEA-BSA(0.001,0.1,0.5,1.0,1.5,2.0 μ g/ml)构建免疫电化学免疫传感器,然后进行差分脉冲伏安扫描。如图5a可见,响应电流随着ZEA-BSA浓度的增加而增加,当ZEA-BSA浓度达到1.0 μ g $\cdot$ ml $^{-1}$ 的以后,响应电流达到平台期,说明1.0 μ g $\cdot$ ml $^{-1}$ 已经达到ZEA-BSA的最佳浓度。

[0143] 2.同理,为考察anti-ZEA浓度大小对使用电化学免疫传感器反应信号的影响,anti-ZEA浓度的原始浓度为1mg/ml,本实验采用了不同稀释倍数(1:25,1:50,1:100,1:200,1:500,1:1000V/V)的anti-ZEA,亦即稀释后的anti-ZEA的浓度为40 μ g/ml,20 μ g/ml,10 μ g/ml,5 μ g/ml,2 μ g/ml,1 μ g/ml,随后进行DPV检测。如图5b可见,anti-ZEA最佳稀释倍数

为1:100,亦即稀释后的anti-ZEA浓度为10ug/ml。

[0144] 3.同理,为考察AP-anti-antibody浓度大小对使用电化学免疫传感器的影响,AP-anti-antibody的原始浓度为1mg/ml,本实验采用了不同稀释比例的(1:50,1:100,1:200,1:300,1:400,1:500V/V) AP-anti-antibody,亦即稀释后的AP-anti-antibody的浓度为20ug/ml,10ug/ml,5ug/ml,3.33ug/ml,2.5ug/ml,2ug/ml,然后进行差分脉冲伏安扫描。如图5c可见,AP-anti-antibody最佳稀释比例为1:200 (V/V),亦即稀释后的AP-anti-antibody的浓度为5ug/ml。

[0145] 4.同理,为考察 α -NP浓度大小对使用免疫传感器的影响,本实验采用了含不同浓度 α -NP(0.25,0.5,0.75,1,1.5mg mL⁻¹)的免疫反应缓冲体系,然后进行差分脉冲伏安扫描。如图5d可见, α -NP的最佳浓度为0.75mg mL⁻¹。

[0146] 5.为考察DPV检测底液pH对免疫传感器反应信号的影响,本实验采用了不同pH(5.6,7.4,9.6,11.4,13.0)的检测底液进行DPV检测,结果图5e可见,随着pH增大,电流值逐渐增大,pH为9.6时电流值达到最大,随后电流值快速下降,因此最佳底液pH为9.6。

[0147] 6.为考察竞争时间对免疫传感器反应信号的影响,本实验对不同的竞争时间(10,20,30,40,50min)进行DPV检测,结果图5f可见,随着竞争时间增加,反应信号逐渐减小,证明ZEA与anti-ZEA逐渐产生特异性结合。30min时信号值达到最小,因此最佳竞争时间为30min。

[0148] 实施例4制备的电化学免疫化学传感器的性能分析

[0149] 为了评估电化学免疫传感器的性能,对以PBS(pH7.4)配备的不同浓度的ZEA标准品进行分析。具体的,在优化后的实验条件下,(1)将5uL稀释到不同浓度的ZEA标准品(2000,200,20,2,0.2,0.02ng • mL⁻¹)与5uL anti-ZEA(1:100V/V)均匀混合,并在冰上反应30min后,滴加在ZEA-BSA-cMWCNTs/CS/GCE,37℃温育90min。(2)然后再用PBS缓冲液(pH 7.4)清洗电极,置于10μL 1:200稀释的AP-anti-antibody中,37℃温育90min,PBS缓冲液(pH 7.4)清洗。采用DPV法记录电流值 i_p (如图6a),并以ZEA浓度的对数值为横坐标,电流响应值 i_p 为纵坐标绘制标准曲线(如图6b)。实验结果显示,在ZEA浓度为0.01至1000ng • mL⁻¹呈线性关系,线性方程为 $Y=13.64067E^{-6}-1.60317E^{-6}X$, ($R^2=0.9992$)。将传感器在只含有5ug • mL⁻¹的anti-ZEA而不含ZEA标准品进行竞争的空白溶液中连续扫描10次,根据空白信号加上3倍标准差所对应的信号值估计检出限,计算得最低检测限为4.7pg • mL⁻¹。将本实验得到的传感器与已报道的检测ZEA的方法相对比,本实验构建的电化学传感器具有更低的检测限和更宽的检测范围(如表1)。

[0150] 表1

[0151]

方法	检测范围 (ng·mL ⁻¹)	检测限 (ng·mL ⁻¹)	参考文献
HPLC-MS/MS	0.54-42.5	0.04	[17]
Multiplex lateral flow immunoassay	—	0.42	[18]
Recombinant cell fluorescence biosensor	10-100	3.2	[39]
Magnetic nanoparticle based enzyme-linked immunosorbent assay	0.07-2.41	0.04	[40]
AuNPs/MWCNTs/PVP immunosensor	0.05-50	0.016	[41]
Electrochemical immunosensor	0.01-1000	0.0047	本发明

[0152] 实施例5制备的电化学免疫传感器的特异性分析

[0153] 电化学免疫传感器的特异性,在分析不分离的生物样本中的生物标志物时具有重要的作用,主要取决于抗体的特异性。我们使用的是ZEA单克隆抗体。为了评价本免疫传感器的特异性,我们对在检测OTA时可能会出现的其他的四种真菌毒素黄曲霉毒素B1 (AFB1)、伏马菌素B1 (FB1)、呕吐毒素 (DON) 和赭曲霉毒素 (OTA) 进行了检测。具体的, (1) 将 AFB1、FB1、DON、OTA各100ug·mL⁻¹ (2) 1ug·mL⁻¹ZEA (3) 四种毒素 (100ug·mL⁻¹) 与ZEA的混合物 (1ug·mL⁻¹) 分别采用所构建的电化学免疫传感器进行测定。进行测定结果如图7所示,其它的四真菌毒素的DPV响应电流接近于空白样 (不含ZEA),然而ZEA与混合物的DPV响应电流有明显的下降。结果说明制备的电化学免疫传感器能够有效地分辨不同种类的真菌毒素,其他毒素对传感器的影响也可忽略不计,传感器有良好的特异性。

[0154] 实施例6制备的电化学免疫传感器的稳定性和重现性分析

[0155] 在最优实验条件下,用不同批次的免疫传感器对10pg·mL⁻¹、1ng·mL⁻¹、1ug·mL⁻¹的ZEA进行了5次平行测定 (如表2),相对标准差分别为2.43%, 2.39%和1.88%。表明本发明制备的电化学免疫传感器具有良好的重现性。将制备好的电极 (cMWCNTs-COOH/CS/GCE) 置于4℃保存,15天内cMWCNTs-COOH/CS具有良好的电化学活性,如图8。表明本发明制备的电化学免疫传感器具有良好的稳定性。

[0156] 表2

[0157]

ZEA 浓度	电流值 (uA)					Average	RSD (%)
	1	2	3	4	5		
10pg	17.76	17.28	16.7	17.58	17.62	17.39	2.43
1ng	12.54	13.29	13.14	12.95	13.28	13.04	2.39
1ug	9.32	9.25	8.91	9	9.09	9.11	1.88

[0158] 实施例7传感器运用于实际样品检测

[0159] (一) 样品前处理:

[0160] 以玉米赤霉烯酮阴性样品为例。取20g样品,加入100mL提取液 (体积比为1:4的水和乙腈溶液) 混匀;随后加入需测定浓度的ZEA标准品,剧烈震荡20min后,高速离心

(12000r/min) 10min, 上清液颜色有无色变为浅黄色。将上清液用快速定型滤纸过滤。随后, 取10mL滤液加入40mL 0.1M PBS (pH 7.4) 与0.05% Tween-20混合稀释液, 再用微纤维滤纸过滤, 并收集滤液作为免疫亲和柱上样液。取25mL上样液过免疫亲和柱净化, 液体流速为1滴/秒, 液体排干后, 用10mL去离子水清洗亲和柱两次, 最后加1mL甲醇收集ZEA, 定容至1mL。阳性(玉米、小麦、牛饲料)样品的前处理方式除了无添加ZEA标准品步骤, 其余处理步骤与阴性样品一样。最后将样品液存于-20℃保存。

[0161] (二) 检测:

[0162] 将本发明制备的电化学免疫传感器用于检测阴性添加的玉米样品、天然污染的玉米、小麦及牛饲料各五个不同浓度的样品。样品实际浓度用HPLC定量。结果如表3, 回收率范围为93.97%至109.49%, 其中标准差均小于0.2%。表明所发明的电化学免疫传感器可以准确地定量检测不同样品的不同浓度, 是一种具有发展前景的检测食品中ZEA的方法。

[0163] 表3

[0164]

添加样品	添加浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	检测浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) ^a	回收率 (%)
玉米	0	2 ± 0.003	0
	10	9 ± 1	93.97
	100	101 ± 27	101.18
	1000	1064 ± 121	106.37
	10000	9983 ± 824	99.83
玉米阳性样品 ^b			
1	0.01649	0.0169 ± 0.002	102.66
2	0.1649	0.17 ± 0.005	105.16
3	1.649	1.71 ± 0.39	103.47
4	16.49	16.61 ± 4.99	100.79
5	164.9	164.2 ± 16.06	99.58
小麦阳性样品 ^b			
1	0.0245	0.0238 ± 0.007	97.14
2	0.245	0.23 ± 0.009	95.46
3	2.45	2.68 ± 0.91	109.49
4	24.5	25.79 ± 3.64	105.26
5	245	247 ± 32.67	100.97
牛饲料阳性样品 ^b			
1	0.0474	0.049 ± 0.01	103.77
2	1.58	1.56 ± 0.17	99.02
3	4.74	5.01 ± 0.22	105.72
4	15.8	16.51 ± 3.02	104.52
5	47.4	47.29 ± 6.03	99.76

[0165] ^a 3组测量数据的平均值 $\pm$ 标准差

[0166] ^b HPLC定量所得浓度

[0167] 综上所述: 本发明提供了一种检测玉米赤霉烯酮(ZEA)的电化学传感器, 包括工作电极、参比电极(Ag/AgCl)和对电极(Pt), 所述工作电极为玻碳电极(GCE)表面修饰羧基化的多壁碳纳米管和壳聚糖的复合纳米材料(cMWCNTs/CS), 而后固定玉米赤霉烯酮-牛血清蛋白偶联物(ZEA-BSA)、ZEA单克隆抗体及碱性磷酸酶标记的兔抗人IgG(AP-anti-antibody)所得。底物(α -NP)催化碱性磷酸酶产生信号, cMWCNTs/CS增强电化学反应信号。

运用场发射扫描电子显微镜 (FE-SEM)、原子力显微镜 (AFM)、差分脉冲伏安法 (DPV)、循环伏安法 (CV) 和电化学阻抗谱 (EIS) 进行形态学表征。优选地,所述羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料 (cMWCNTs-COOH/CS) 中,羧基化多壁碳纳米管与壳聚糖的质量比为 (0.5~12):1。每平方毫米的工作电极上,所述羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料 (cMWCNTs-COOH/CS) 中羧基化多壁碳纳米管的质量为 0.1~2.0 μg ,更优选为 1~1.5 μg 。每个所述工作电极上,所述羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料 (cMWCNTs-COOH/CS) 中羧基化多壁碳纳米管与玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物 (ZEA-BSA) 的质量比为 (25~12000):1。与传统的方法相比,免疫传感器操作过程简单且具有更高敏感度。在优化后的实验条件下,此免疫传感器在 ZEA 浓度为 0.01 至 1000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈线性关系,线性方程为 $Y = 13.64067E^{-6} - 1.60317E^{-6}X$,最低检测限可低至 4.7 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。与现有的技术相比,所述传感器灵敏度高、特异度好、成本低、操作简便,检测周期短,并能适用于实际样品的检测等,有望成为具有实际应用价值的检测 ZEA 的方法。

[0168] 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。

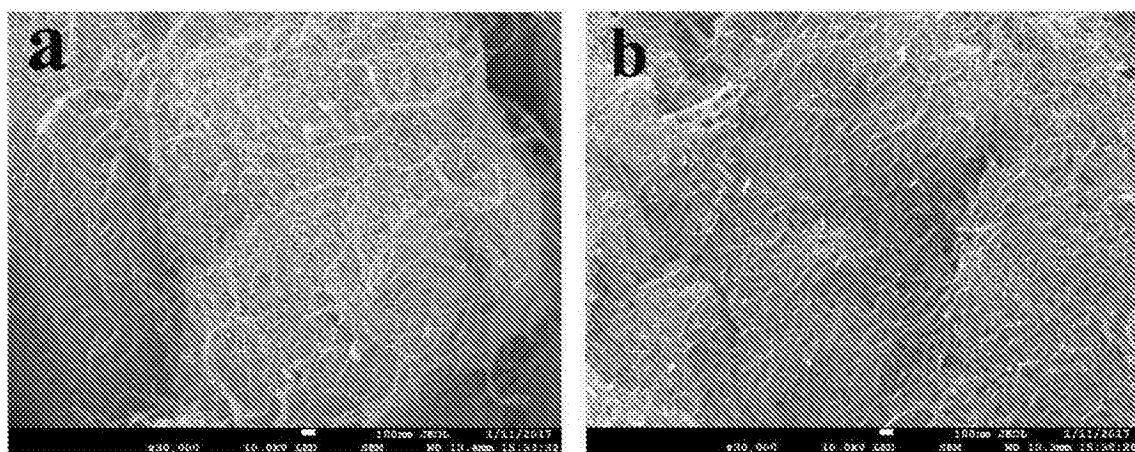


图1

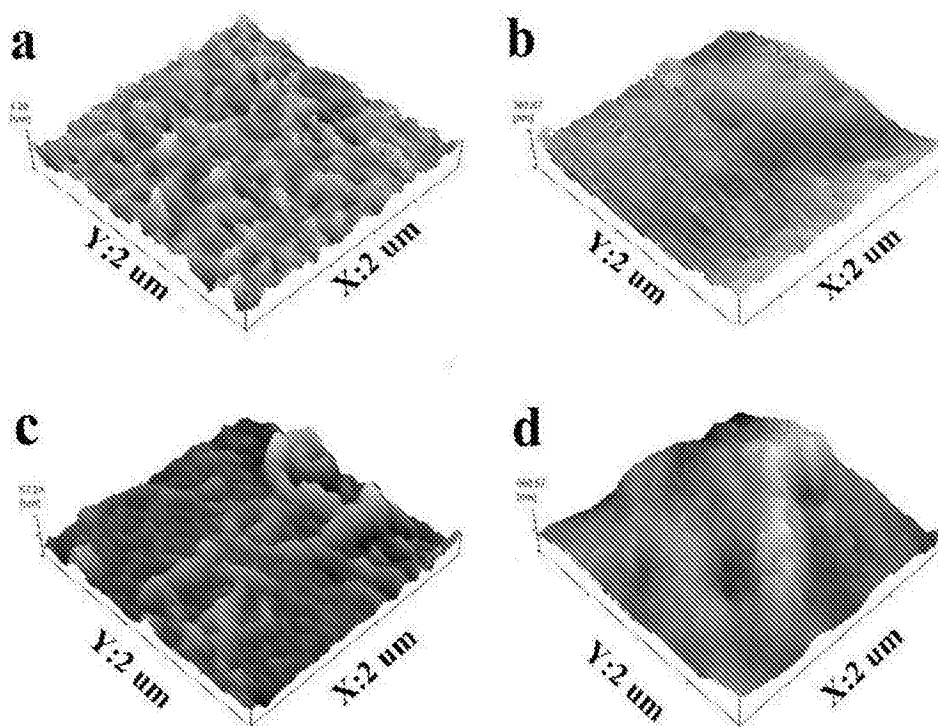


图2

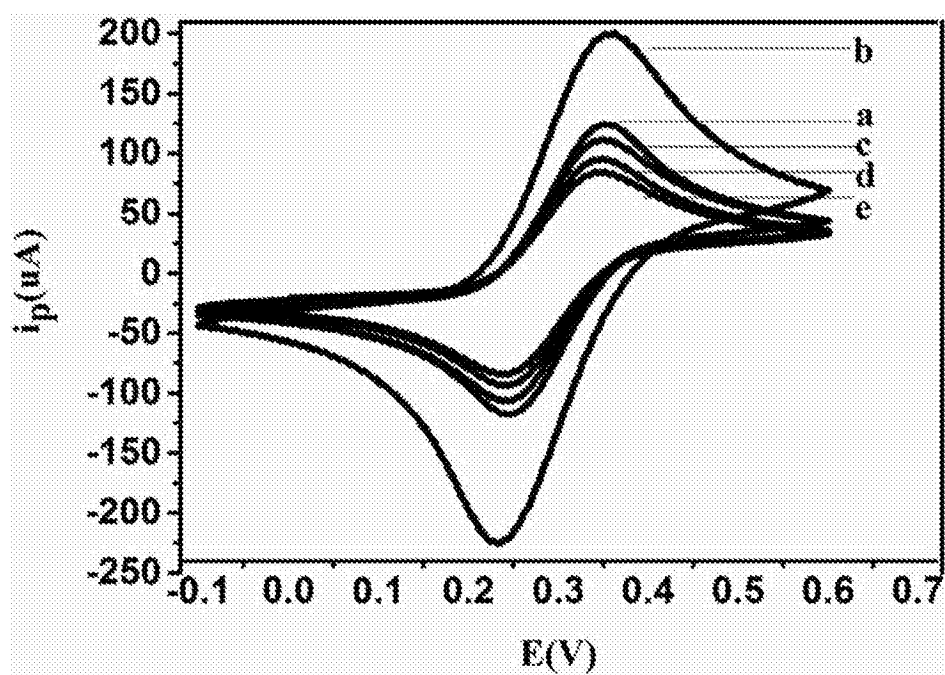


图3

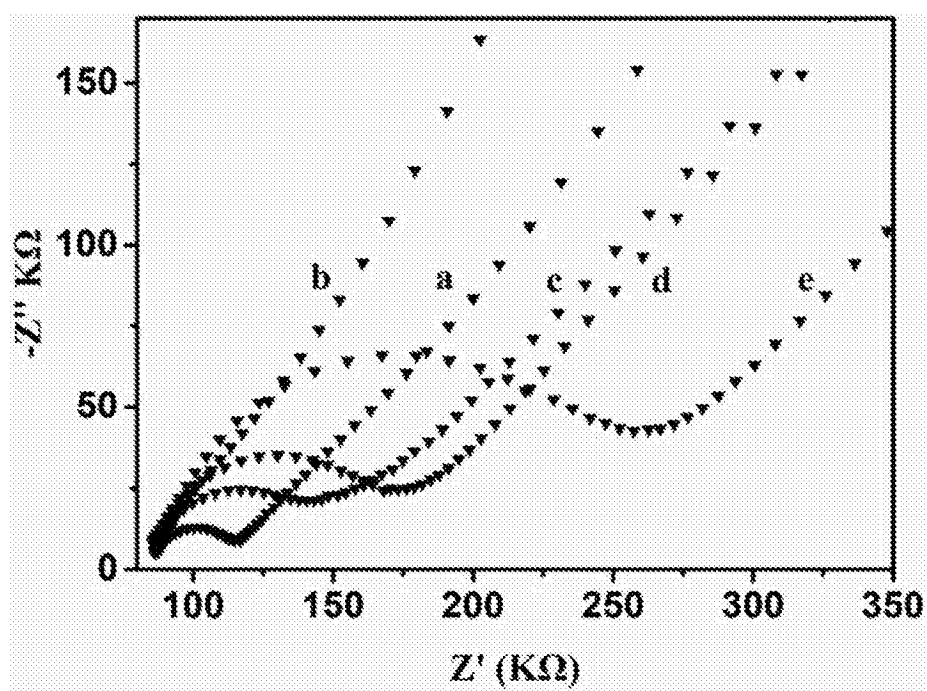


图4

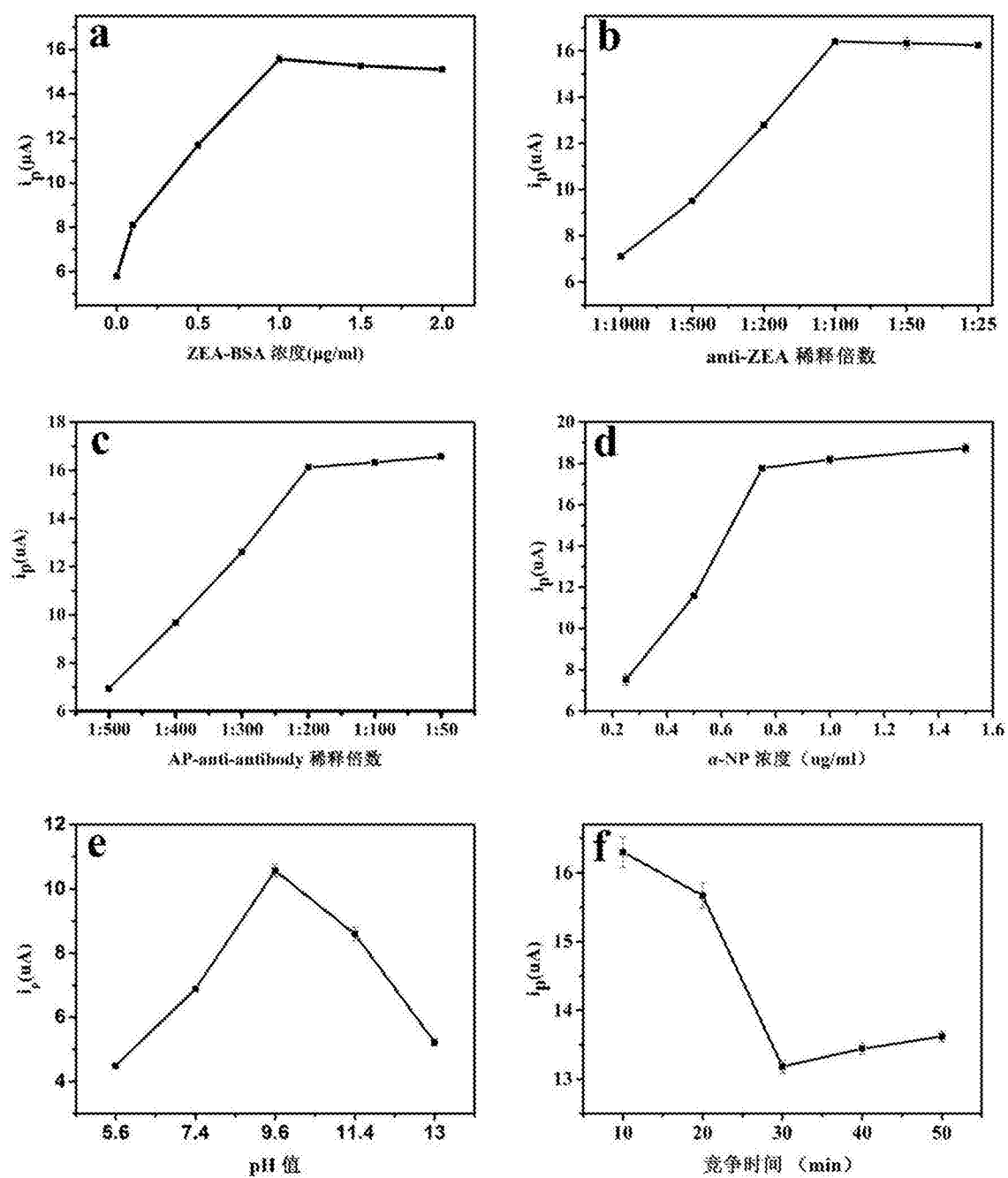


图5

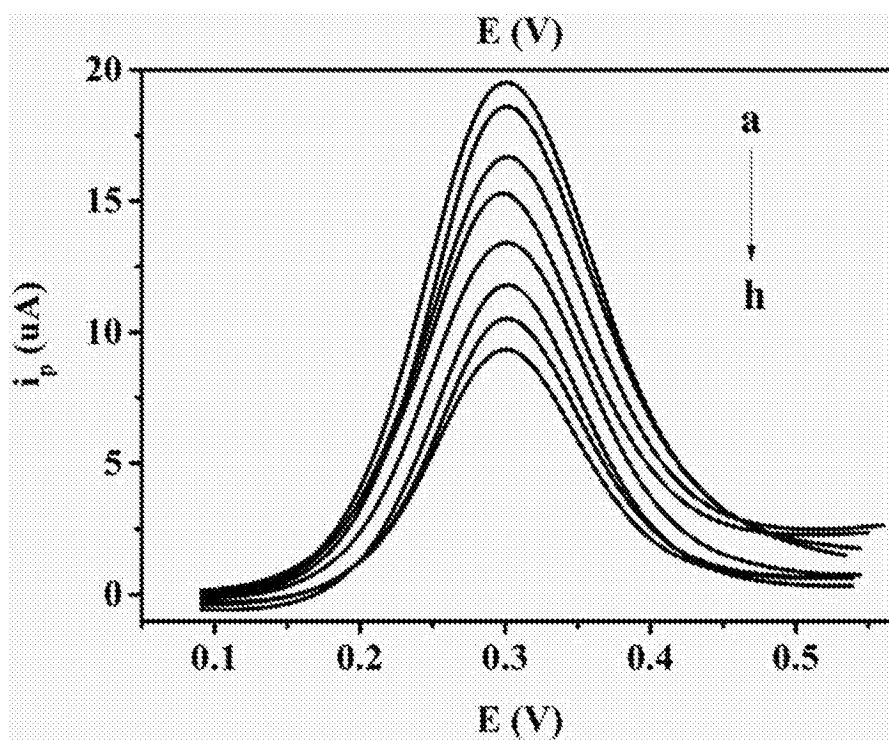


图6

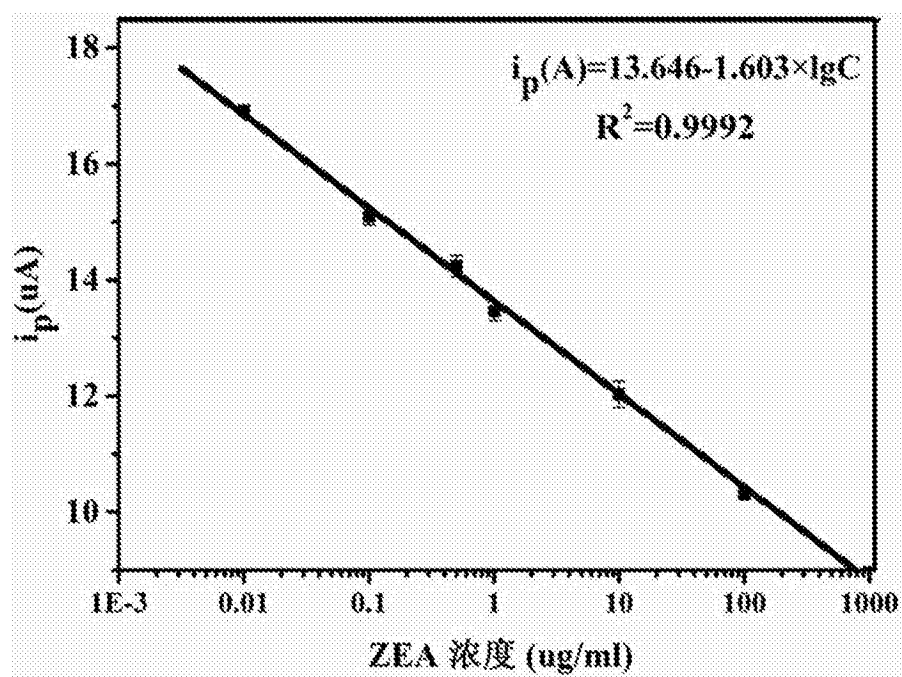


图7

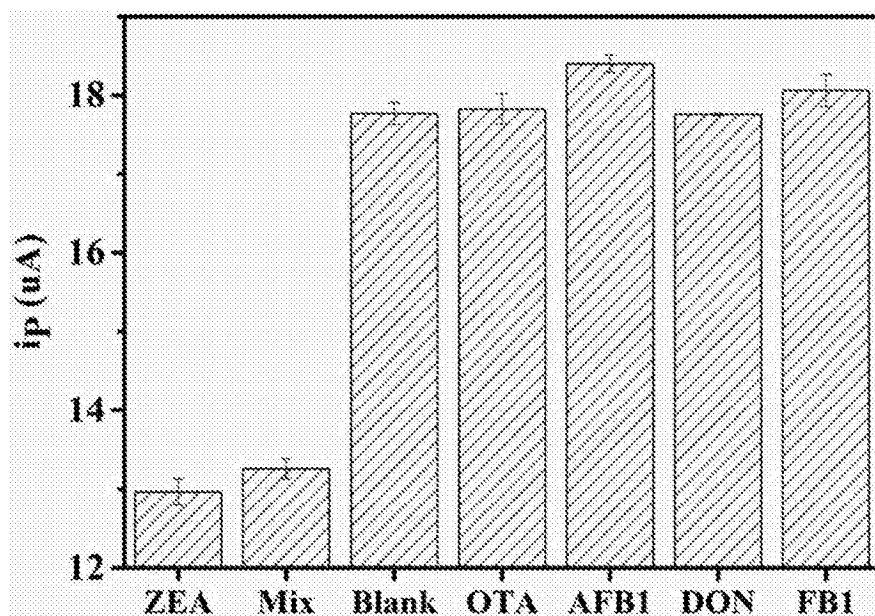


图8

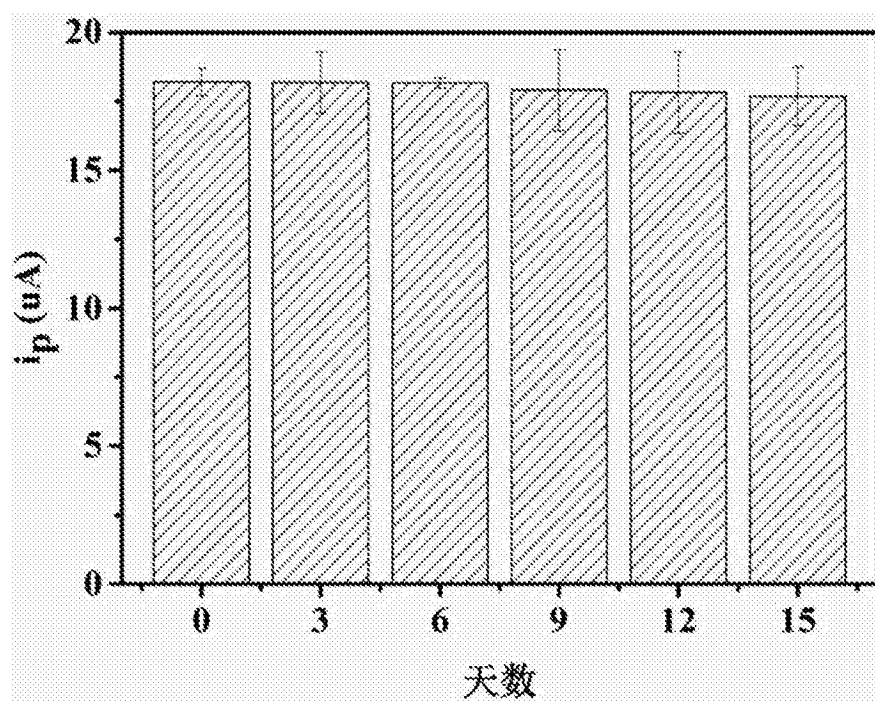


图9

专利名称(译)	一种用于检测玉米赤霉烯酮的电化学免疫传感器及其制备与应用		
公开(公告)号	CN106872707A	公开(公告)日	2017-06-20
申请号	CN201710186775.6	申请日	2017-03-27
[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 徐玮 邱景富		
发明人	李朝睿 徐玮 邱景富		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/561 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N33/561		
代理人(译)	李艳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及电化学领域，尤其涉及一种用于检测玉米赤霉烯酮的电化学免疫传感器及其制备与应用。所述电化学免疫传感器，包括工作电极、参比电极和对电极，所述工作电极为先在基底电极表面修饰羧基化多壁碳纳米管/壳聚糖复合材料，而后固定玉米赤霉烯酮-牛血清白蛋白偶联物所得。免疫传感器在玉米赤霉烯酮浓度为0.01至1000 ng·mL⁻¹呈线性关系，线性方程为Y=13.64067E-6-1.60317E-6X，最低检测限可低至4.7 pg·mL⁻¹。具有良好的灵敏度、特异性、重复性及稳定性。

方法	检测范围 (ng·mL ⁻¹)	检测限 (ng·mL ⁻¹)	参考文献
HPLC-MS/MS	0.54-42.5	0.04	[17]
Multiplex lateral flow immunoassay	—	0.42	[18]
Recombinant cell fluorescence biosensor	10-100	3.2	[39]
Magnetic nanoparticle based enzyme-linked immunosorbent assay	0.07-2.41	0.04	[40]
AuNPs/MWCNTs/PVP immunosensor	0.05-50	0.016	[41]
Electrochemical immunosensor	0.01-1000	0.0047	本发明