



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101980018 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 23

(21) 申请号 201010523705. 3

(22) 申请日 2010. 10. 29

(71) 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 王正武 赵波 陈昌云 颜妍
米芹

(74) 专利代理机构 上海交达专利事务所 31201

代理人 王锡麟 王桂忠

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 27/26 (2006. 01)

B82B 1/00 (2006. 01)

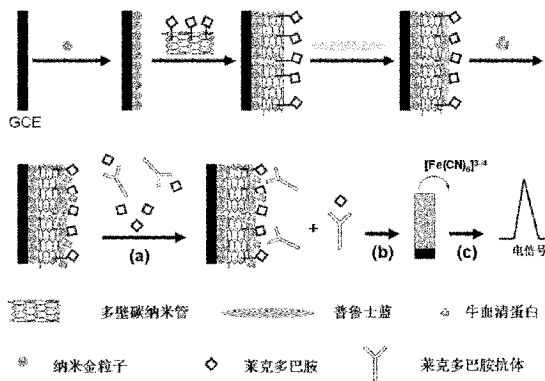
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 2 页

(54) 发明名称

用于测定莱克多巴胺的免疫生物传感器的制备方法

(57) 摘要

一种化学检测技术领域的用于测定莱克多巴胺的免疫生物传感器的制备方法, 通过将纳米金、具有共轭键合偶联莱克多巴胺-牛血清白蛋白的碳纳米管以及普鲁士蓝依次修饰到玻碳电极上, 得到电化学免疫传感器。本发明能够制备得到灵敏度高, 稳定性好, 现场快速检测莱克多巴胺的电化学免疫传感器。



1. 一种用于测定莱克多巴胺的免疫生物传感器的制备方法,其特征在于,通过将纳米金、具有共轭键合偶联莱克多巴胺-牛血清白蛋白的碳纳米管以及普鲁士蓝依次修饰到玻碳电极上,得到电化学免疫传感器。

2. 根据权利要求1所述的用于测定莱克多巴胺的免疫生物传感器的制备方法,其特征是,所述的具有共轭键合偶联莱克多巴胺-牛血清白蛋白(BSA)的碳纳米管通过以下方式制备得到:

第一步、将多壁碳纳米管在70℃的 H_2SO_4 : HNO_3 体积比为3:1的溶液中超声震荡6小时,得到功能化多壁碳纳米管,将功能化多壁碳纳米管分散在pH值为7.4的磷酸缓冲溶液中并超声振荡分散,得到碳纳米管分散液;

第二步、将上述分散物与2ml含有6mM的1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐溶液混合,然后在室温下搅拌20分钟。由此产生的混合物在13000r/m离心15分钟,丢弃上清液,重复第二步若干次以消除过量EDC;

第三步、将0.1mg/mL的莱克多巴胺抗原-BSA与上述溶液以体积比1:1混合并搅拌后,置于13000r/m下离心15分钟并转移上清液,得到共轭的莱克多巴胺抗原-BSA-多壁碳纳米管结合物;

第四步、将第三步得到的结合物置于1mL5% BSA溶液中浸泡30分钟后,使用PBS缓冲溶液离心3次以上以消除游离的莱克多巴胺抗原与BSA,并将得到莱克多巴胺抗原-BSA-多壁碳纳米管在1mL的PBS缓冲溶液中重新溶解,搅拌形成均匀分散的具有共轭键合偶联莱克多巴胺-牛血清白蛋白的碳纳米管。

3. 根据权利要求1所述的用于测定莱克多巴胺的免疫生物传感器的制备方法,其特征是,所述的玻碳电极是指:直径为3mm且分别经1.0和0.3 μm 的 Al_2O_3 粉乳液打磨抛光后,在乙醇和水中各超声3min的玻碳电极。

4. 根据权利要求1或3所述的用于测定莱克多巴胺的免疫生物传感器的制备方法,其特征是,所述的依次修饰是指:将玻碳电极先沉积金纳米粒子后置于100mg/L的 $H AuCl_4$ 溶液中在-0.2V电势下恒电位扫描60s;然后在电极表面滴涂4 μL 莱克多巴胺抗原-BSA-多壁碳纳米管结合物并在室温下干燥5h;再将电极插入含有2.5mM $FeCl_3$ 、2.5mM $K_3[Fe(CN)_6]$ 、0.1M KCl以及0.1M HCl的普鲁士蓝溶液中在0.4V电势下恒电位扫描40s,再将电极插入含有0.1M KCl和0.1M HCl的溶液中在-0.2至1.1V的电势范围内,以100mv/s的扫速,循环伏安扫描10圈;最后置于37℃下浸泡在5%的BSA溶液中30min。

用于测定莱克多巴胺的免疫生物传感器的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及的是一种化学检测技术领域的装置和方法,具体是一种采用三元复合纳米材料,应用于测定溶液中 β -兴奋剂激素莱克多巴胺(RAC)的免疫生物传感器及其制备方法。

背景技术

[0002] 莱克多巴胺(ractopamine,RAC),属于 β -兴奋剂,能使动物体内的营养成分由脂肪向肌肉转移,表现出营养再分配效应,进而调控动物体的物质代谢,增强脂肪分解,促进蛋白质合成,显著提高胴体瘦肉率和饲料报酬。但是,人类食用了残留有莱克多巴胺的动物食品后,会出现不同程度的中毒现象,它们的滥用及在动物性食品中的残留严重危害着人们的健康和生命安全,并严重影响了我国畜禽产品的出口贸易。所以我国和欧盟以及世界上大多数国家都明文禁止莱克多巴胺用作饲料添加剂。国家已经建立了《进出口动物源性食品中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布他林残留量的检测方法液相色谱-质谱/质谱法,SN/T 1924-2007》标准。但是与克伦特罗(瘦肉精)的检测相比,莱克多巴胺的检测还彰显不足,需亟待丰富和提高。因此,寻找莱克多巴胺快速准确的测定技术仍是人们的迫切期望,研究意义重大。

[0003] 目前应用最多的莱克多巴胺测定方法主要有液相色谱法、气质联用法、高效液相色谱法和酶联免疫法等。但是这些分析方法需要大型分析仪器,操作过程繁琐,不能实现现场检测。本发明结合碳纳米管独特的电子特性和表面微结构,能很好地促进生物电活性分子的电子传递,并易于固定生物大分子并能保持其活性的特点;和纳米金颗粒具有比表面积大、生物亲和性高等优点;以及普鲁士蓝优异的电催化活性,和高稳定性、易制备等特点,建立了对莱克多巴胺检测的直接电化学生物传感器,得到较低的检出限和较宽的线性范围。

发明内容

[0004] 本发明针对现有技术存在的上述不足,提供一种用于测定莱克多巴胺的免疫生物传感器的制备方法,能很好地促进生物电活性分子的电子传递,并易于固定生物大分子并能保持其活性的特点;和纳米金颗粒具有比表面积大、生物亲和性高等优点;以及普鲁士蓝优异的电催化活性,和高稳定性、易制备等特点,建立了对莱克多巴胺检测的免疫电化学生物传感器,具有高选择性、低检出限和宽线性范围的特点。

[0005] 本发明是通过以下技术方案实现的,本发明通过将纳米金、具有共轭键合偶联莱克多巴胺-牛血清白蛋白(BSA)的碳纳米管以及普鲁士蓝依次修饰到玻碳电极上,得到电化学免疫传感器。

[0006] 所述的具有共轭键合偶联莱克多巴胺-牛血清白蛋白(BSA)的碳纳米管通过以下方式制备得到:

[0007] 第一步、将多壁碳纳米管在 70°C 的 H_2SO_4 : HNO_3 体积比为 3 : 1 的溶液中超声震

荡 6 小时,得到功能化多壁碳纳米管,将功能化多壁碳纳米管分散在 pH 值为 7.4 的磷酸缓冲溶液中并超声振荡分散,得到碳纳米管分散液;

[0008] 第二步、将上述分散物与 2ml 含有 6mM 的 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 溶液混合,然后在室温下搅拌 20 分钟。由此产生的混合物在 13000r/m 离心 15 分钟,丢弃上清液,重复第二步若干次以消除过量 EDC;

[0009] 第三步、将 0.1mg/mL 的莱克多巴胺抗原-BSA 与上述溶液以体积比 1 : 1 混合并搅拌后,置于 13000r/m 下离心 15 分钟并转移上清液,得到共轭的莱克多巴胺抗原-BSA-多壁碳纳米管结合物;

[0010] 第四步、将第三步得到的结合物置于 1mL5% BSA 溶液中浸泡 30 分钟后,使用 PBS 缓冲溶液离心 3 次以上以消除游离的莱克多巴胺抗原与 BSA,并将得到莱克多巴胺抗原-BSA-多壁碳纳米管在 1mL 的 PBS 缓冲溶液中重新溶解,搅拌形成均匀分散的具有共轭键合偶联莱克多巴胺-牛血清白蛋白 (BSA) 的碳纳米管。

[0011] 所述的玻碳电极是指:直径为 3mm 且分别经 1.0 和 0.3 μm 的 Al_2O_3 粉乳液打磨抛光后,在乙醇和水中各超声 3min 的玻碳电极;

[0012] 所述的依次修饰是指:将玻碳电极先沉积金纳米粒子后置于 100mg/L 的 HAuCl_4 溶液中在 -0.2V 电势下恒电位扫描 60s;然后在电极表面滴涂 4 μL 莱克多巴胺抗原-BSA-多壁碳纳米管结合物并在室温下干燥 5h;再将电极插入含有 2.5mM FeCl_3 、2.5mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、0.1M KCl 以及 0.1M HCl 的普鲁士蓝溶液在 0.4V 电势下恒电位扫描 40s,再将电极插入含有 0.1M KCl 和 0.1M HCl 的溶液在 -0.2 至 1.1V 的电势范围内,以 100mv/s 的扫速,循环伏安扫描 10 圈;最后置于 37 $^\circ\text{C}$ 下浸泡在 5% 的 BSA 溶液中 30min。

[0013] 本发明通过以下方式实现莱克多巴胺的测试:将修饰好的电极浸入总体积为 50 μL 的含有不同浓度的游离莱克多巴胺,和 8 $\mu\text{g/mL}$ 的莱克多巴胺多克隆抗体的磷酸缓冲溶液中,在 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 40min,用磷酸缓冲溶液冲洗后于 2mM 的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安 (DPV) 扫描。

[0014] 实验结果显示,随着莱克多巴胺浓度在孵育液中的增加,DPV 峰电流增大。定义在只含有莱克多巴胺抗体的孵育液中孵育的修饰电极 DPV 峰电流为 I_0 ,孵育后的修饰电极 DPV 峰电流为 I_x ,并计算 $\Delta I = I_x - I_0$,以 ΔI 对莱克多巴胺浓度 (C) 作图可得到线性曲线。莱克多巴胺浓度在 1-1000ng/mL 范围内与 ΔI 成正比,斜率为 0.00301,线性相关系数为 0.9954。

[0015] 本发明有如下的有益效果:由于碳纳米管和纳米金颗粒能很好地促进生物电活性分子的电子传递,并易于固定生物大分子并能保持其活性,莱克多巴胺有效地固定在碳纳米管-聚硫堇-纳米金修饰玻碳电极表面,并保持较高活性。因此,本发明的固定莱克多巴胺抗体的免疫电化学传感器可以在常温下,稳定而迅速地检测残留莱克多巴胺的浓度。

附图说明

[0016] 图 1 为免疫传感器的竞争机制工作原理示意图;

[0017] 图中:(a) 溶液中游离的莱克多巴胺与固定在电极上的莱克多巴胺竞争与溶液中抗体的反应,(b) 电极清洗后置于 2mM 的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液中,(c) 电化学检测。

[0018] 图 2 为不同条件下的循环伏安图。

[0019] 图中:(a)裸玻碳电极,(b)MWCNT-莱克多巴胺抗原-BSA修饰电极,(c)MWCNT-莱克多巴胺抗原-BSA/金纳米粒子复合物修饰电极,(d)普鲁士蓝/MWCNT-莱克多巴胺抗原-BSA/金纳米粒子复合物修饰电极,(e)普鲁士蓝/MWCNT-莱克多巴胺抗原-BSA/金纳米粒子复合物修饰电极在含有 $8\mu\text{g/mL}$ 的莱克多巴胺抗体的溶液中孵育40min后,在 2mM 的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的溶液中的循环伏安图,扫速为 50mV/s 。

[0020] 图3为纳米粒子的电子扫描显微镜照片。

[0021] 图中:(a)金纳米粒子,(b)MWCNT-金纳米粒子复合物,(c)普鲁士蓝-MWCNT-金纳米粒子复合物的电子扫描显微镜照片。

[0022] 图4为修饰电极在含有 $8\mu\text{g/mL}$ 的莱克多巴胺抗体和(a) 0ng/mL ,(b) 1ng/mL ,(c) 5ng/mL ,(d) 25ng/mL ,(e) 100ng/mL ,(f) 500ng/mL ,(g) 1000ng/mL 游离莱克多巴胺的PBS溶液中孵育后,于 2mM 的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的溶液中的差分脉冲伏安曲线,脉冲振幅 50mV ,脉冲宽度 50ms 。插入图为游离莱克多巴胺浓度对 ΔI 的工作曲线。

具体实施方式

[0023] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0024] 实施例1

[0025] 步骤一,免疫传感器的构建:先将多壁碳纳米管羧基化,再将偶联了BSA的莱克多巴胺抗原以共轭键合的形式固定在功能化的碳纳米管上,制得碳纳米管-莱克多巴胺抗原-BSA共轭物。玻碳电极抛光打磨、清洗后,依次沉积纳米金、碳纳米管-莱克多巴胺抗原-BSA共轭物、普鲁士蓝,将修饰好的电极于 37°C 下浸泡在5%的BSA溶液中30min。

[0026] 步骤二,免疫传感器对莱克多巴胺的检测:将修饰好的电极浸入总体积为 $50\mu\text{L}$ 的含有不同浓度的游离莱克多巴胺,和 $8\mu\text{g/mL}$ 的莱克多巴胺多克隆抗体的磷酸缓冲溶液中,在 37°C 下孵育40min,用磷酸缓冲溶液冲洗后于 2mM 的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安(DPV)扫描。实验结果显示,随着莱克多巴胺浓度在孵育液中的增加,DPV峰电流增大。

[0027] 如图1,为免疫传感器检测莱克多巴胺的原理图,当修饰电极浸入含有莱克多巴胺抗体的孵育液中时,孵育液中游离的莱克多巴胺与固定在电极上的莱克多巴胺竞争与溶液中的莱克多巴胺抗体反应,抗体附着在电极上引起以 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 为探针的电化学信号的变化,从而实现溶液中莱克多巴胺的检测。

[0028] 1 循环伏安结果:

[0029] 如图2,裸电极(2a)在 2mM 的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液中的循环伏安曲线表现出一对明显的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 氧化还原峰,当电极上修饰了MWCNT-莱克多巴胺抗原-BSA后(2b),氧化还原峰电势差变宽,同时峰电流有所下降,可能是由于电极表面的抗原-BSA阻碍了电子传递;当电极上修饰了MWCNT-莱克多巴胺抗原-BSA/金纳米粒子复合物后(2c),峰电流增大,说明金纳米粒子有增强电子传递的功能;电极上修饰了普鲁士蓝/MWCNT-莱克多巴胺抗原-BSA/金纳米粒子复合物后(2d),峰电流更大,说明普鲁士蓝的电催化效果较好。

[0030] 2 扫描电子显微镜结果

[0031] 如图 3,图 3a 显示金纳米粒子沉积在电极表面,图 3b 显示金纳米粒子附着在了多壁碳纳米管上,图 3c 显示普鲁士蓝在电极表面沉积成膜。

[0032] 3 工作曲线的绘制

[0033] 如图 4,在不同莱克多巴胺的浓度下,传感器浸入含有 $K_3[Fe(CN)_6]$ 的 PBS 的缓冲溶液得 DPV 图。正如所料,随着莱克多巴胺浓度在孵育液中的增加,DPV 峰电流增大。也就是说,游离的莱克多巴胺浓度越高,固定在电极上的莱克多巴胺分子结合的抗体越少。定义在只含有莱克多巴胺抗体的孵育液中孵育的修饰电极 DPV 峰电流为 I_0 ,孵育后的修饰电极 DPV 峰电流为 I_x ,并计算 $\Delta I = I_x - I_0$,以 ΔI 对莱克多巴胺浓度 (C) 作图可得到线性曲线。莱克多巴胺浓度在 1-1000ng/mL 范围内与 ΔI 成正比,斜率为 0.00301,线性相关系数为 0.9954。

[0034] 实施例 2

[0035] 动物饲料实际样品中加标莱克多巴胺的测定

[0036] 步骤一,动物饲料样品的处理:分别取 1g 猪饲料样品磨细,精确称量到 10mL 的样品管中,用标准加入法配制不含有莱克多巴胺的空白样品,和 3 个含有不同莱克多巴胺浓度的加标样品,加入 8mL 新鲜的磷酸-甲醇提取液 (0.2M),混合物超声振荡 30min,于 3000r/m 下离心 10min,将上清液转移至容积为 25mL 的容量瓶中,残渣用 8mL、5mL 和 4mL 的相同提取液重复提取 3 次,上清液合并并在容量瓶中。取 1mL 的上清液转移到 5mL 的样品管中在氮吹条件下于 55℃ 温度下浓缩蒸发,浓缩物加入 1mL 的 pH 为 7.4 磷酸缓冲溶液溶解后用于电化学分析。

[0037] 步骤二,免疫传感器的构建:先将多壁碳纳米管羧基化,再将偶联了 BSA 的莱克多巴胺抗原以共轭键合的形式固定在功能化的碳纳米管上,制得碳纳米管-莱克多巴胺抗原-BSA 共轭物。玻碳电极抛光打磨、清洗后,依次沉积纳米金、碳纳米管-莱克多巴胺抗原-BSA 共轭物、普鲁士蓝,将修饰好的电极于 37℃ 下浸泡在 5% 的 BSA 溶液中 30min。

[0038] 步骤三,动物饲料实际样品中加标莱克多巴胺的测定:分别取等量的不同饲料提取液样品,和莱克多巴胺多克隆抗体溶液及磷酸缓冲溶液混合配成孵育液,使得总体积为 50 μ L,且莱克多巴胺多克隆抗体浓度均为 8 μ g/mL,将修饰好的电极浸入孵育液中,在 37℃ 下孵育 40min,用磷酸缓冲溶液冲洗后于 2mM 的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安 (DPV) 扫描。取空白样品的峰电流为 I_0 ,其余样品峰电流为 I_x ,并计算 $\Delta I = I_x - I_0$,查工作曲线得到莱克多巴胺浓度。回收率结果如表 1。

[0039] 表 1 为免疫传感器检测加标饲料中的莱克多巴胺浓度的回收率及误差结果。

[0040]

莱克多巴胺加入量 (ng/mL)	莱克多巴胺测定量 (ng/mL)	回收率 (%)	误差 (%)
36.0	33.2, 37.4, 38.9	101.4	±4.7
72.0	73.4, 78.7, 63.4	99.8	±6.2
144.0	115.3, 154.8, 130.9	92.8	±7.9

[0041] 实施例 3

[0042] 猪肉实际样品中加标莱克多巴胺的测定

[0043] 步骤一,猪肉实际样品的处理:分别取 2g 猪肉样品打碎,精确称量到 10mL 的样品管中,用标准加入法配制不含有莱克多巴胺的空白样品,和 3 个含有不同莱克多巴胺浓度的加标样品,加入 7mL 乙酸乙酯,混合物超声振荡 30min,于 4000r/m 下离心 15min,将上清液转移至容积为 25mL 的容量瓶中,残渣分别用 6mL 的乙酸乙酯重复提取 3 次,上清液合并并在容量瓶中。取 1mL 的上清液转移到 5mL 的样品管中在氮吹条件下于 55℃ 温度下浓缩蒸发,浓缩物加入 1mL 的 pH 为 7.4 磷酸缓冲溶液溶解后用于电化学分析。

[0044] 步骤二,免疫传感器的构建:先将多壁碳纳米管羧基化,再将偶联了 BSA 的莱克多巴胺抗原以共轭键合的形式固定在功能化的碳纳米管上,制得碳纳米管-莱克多巴胺抗原-BSA 共轭物。玻碳电极抛光打磨、清洗后,依次沉积纳米金、碳纳米管-莱克多巴胺抗原-BSA 共轭物、普鲁士蓝,将修饰好的电极于 37℃ 下浸泡在 5% 的 BSA 溶液中 30min。

[0045] 步骤三,猪肉实际样品中加标莱克多巴胺的测定:分别取等量的不同猪肉提取液样品,和莱克多巴胺多克隆抗体溶液及磷酸缓冲溶液混合配成孵育液,使得总体积为 50 μ L,且莱克多巴胺多克隆抗体浓度均为 8 μ g/mL,将修饰好的电极浸入孵育液中,在 37℃ 下孵育 40min,用磷酸缓冲溶液冲洗后于 2mM 的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中进行差分脉冲伏安 (DPV) 扫描。取空白样品的峰电流为 I_0 ,其余样品峰电流为 I_x ,并计算 $\Delta I = I_x - I_0$,查工作曲线得到莱克多巴胺浓度。回收率结果如表 2。

[0046] 表 2 为免疫传感器检测加标猪肉中的莱克多巴胺浓度的回收率及误差结果。

[0047]

莱克多巴胺加入量 (ng/mL)	莱克多巴胺测定量 (ng/mL)	回收率 (%)	误差(%)
20.0	17.3,16.3,17.6	85.2	±2.1
100.0	110.3,118.3,107.0	111.9	±3.4
400.0	385.4,384.4,386.4	96.3	±1.3

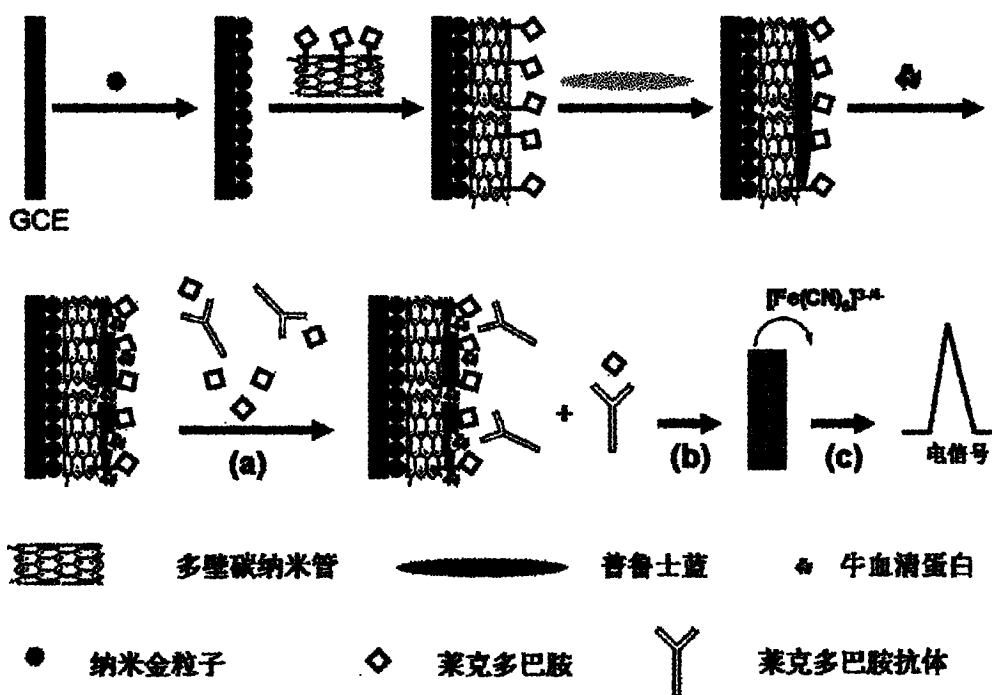


图 1

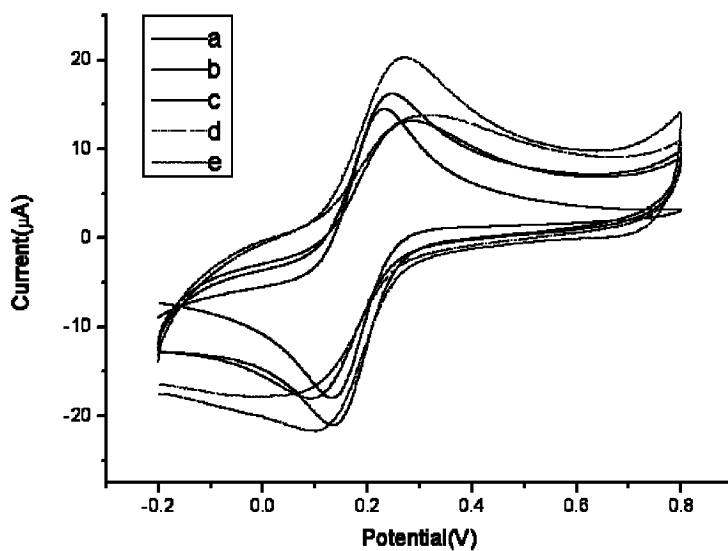


图 2

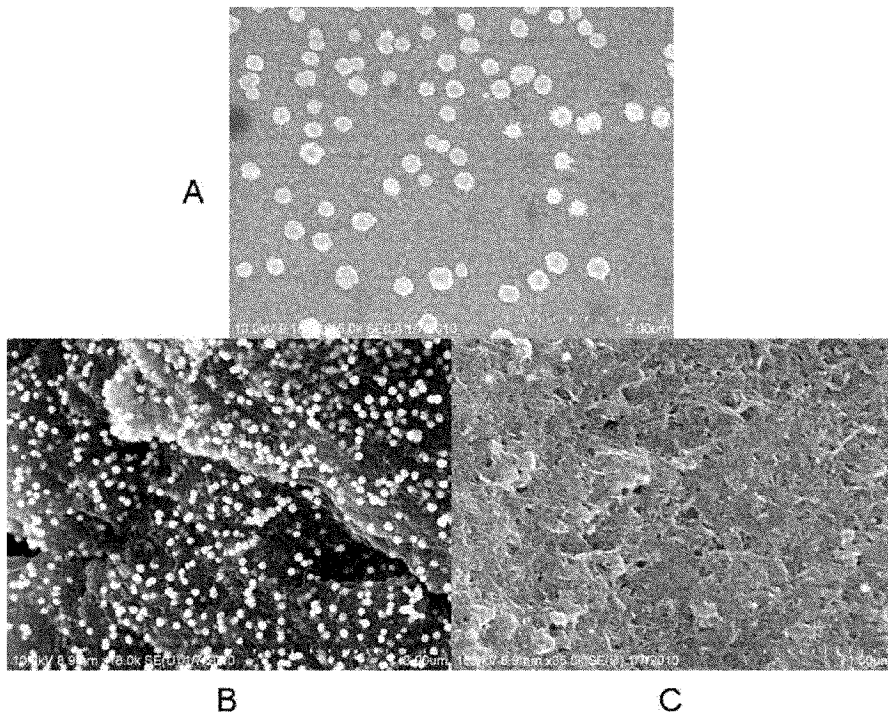


图 3

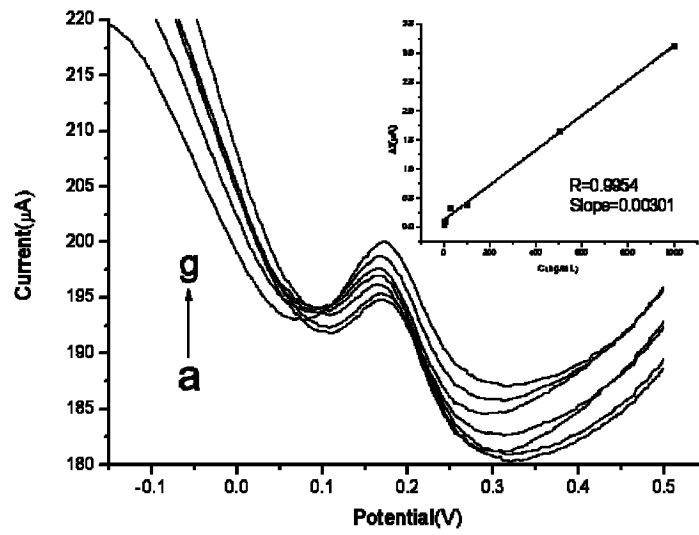


图 4

专利名称(译)	用于测定莱克多巴胺的免疫生物传感器的制备方法		
公开(公告)号	CN101980018A	公开(公告)日	2011-02-23
申请号	CN201010523705.3	申请日	2010-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	王正武 赵波 陈昌云 颜妍 米芹		
发明人	王正武 赵波 陈昌云 颜妍 米芹		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/26 B82B1/00		
代理人(译)	王锡麟 王桂忠		
其他公开文献	CN101980018B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种化学检测技术领域的用于测定莱克多巴胺的免疫生物传感器的制备方法，通过将纳米金、具有共轭键合偶联莱克多巴胺-牛血清白蛋白的碳纳米管以及普鲁士蓝依次修饰到玻碳电极上，得到电化学免疫传感器。本发明能够制备得到灵敏度高，稳定性好，现场快速检测莱克多巴胺的电化学免疫传感器。

莱克多巴胺加入量 (ng/mL)	莱克多巴胺测定量 (ng/mL)	回收率(%)	误差(%)
36.0	33.2, 37.4, 38.9	101.4	±4.7
72.0	73.4, 78.7, 63.4	99.8	±6.2
144.0	115.3, 154.8, 130.9	92.8	±7.9