



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103698383 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 02

(21) 申请号 201310696498. 5

(22) 申请日 2013. 12. 18

(71) 申请人 济南大学

地址 250022 山东省济南市南辛庄西路 336  
号

(72) 发明人 黄加栋 李杰 刘素

(51) Int. Cl.

G01N 27/48 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种检测己烯雌酚的电化学免疫传感器的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明提供了一种检测己烯雌酚的电化学免疫传感器。该免疫传感器利用电极表面修饰技术,将制备碳纳米管-离子液体-壳聚糖(MWCNTs-IL-CS)复合物修饰在电极表面,再滴加合成的基金纳米粒子(AuNPs)在修饰的电极表面,在修饰己烯雌酚的完全抗原 DES-BSA 在表面,同时修饰抗体复合物(PRGO-Au-Ab-HRP)和己烯雌酚标准品在电极表面,DES-BSA 和标准品同时竞争结合抗体复合物上抗体的结合位点,改变标准品的浓度,在检测底液添加过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)前后,通过信号变化和标准品浓度之间的关系,绘制工作曲线。可用于检测食品中的己烯雌酚。本发明的电化学免疫传感器选择性强、灵敏度高、操作简单快速,适合检测食品中的己烯雌酚。

1. 一种检测己烯雌酚的电化学免疫传感器,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 碳纳米管-离子液体-壳聚糖纳米复合物(MWCNTs-IL-CS)和金纳米粒子的制备:  
50 mg 的壳聚糖溶于 20 ml 的 1% 的乙酸中,得到壳聚糖溶于,一定量的碳纳米管和粒子通过超声溶于得到的壳聚糖溶液中,得到 MWCNTs-IL-CS;取 1 ml,1% 的  $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  溶于 99 ml 水中,加入一定量的柠檬酸钠溶液,100℃回流 1 h,得到 AuNPs 纳米粒子;

(2) 抗体复合物的制备:

10 mg DA 和 1 mg GO 溶于 10 ml pH 为 8.5 的 PBS 中,超声 2 min,形成均匀的分散液;60℃搅拌 24 h,得到 PRGO,重新溶于 10 ml 水中;500  $\mu\text{l}$   $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (10 mg/mL) 加如上述得到的溶液中,搅拌 2 h 后,再加入一定量的柠檬酸钠溶液,搅拌 2 h,离心清洗,再溶于 10 ml 水中;最后,100  $\mu\text{l}$ ,1 mg/mL 的 HRP 和 100  $\mu\text{l}$ ,5  $\mu\text{g/mL}$  的 Ab 加入到 2 ml 上述溶液中,4℃搅拌一夜,用 PBS 缓冲液离心清洗,溶于 2 ml 含有 1%BSA 的 PBS 中备用;

(3) 检测己烯雌酚免疫传感器的制备:

滴加 10  $\mu\text{l}$  的 MWCNTs-IL-Cs 在处理好的金电极表面,室温下干燥;再滴加 20  $\mu\text{l}$  的 AuNPs 在修饰的电极表面,室温下干燥;再滴加一定量的己烯雌酚完全抗原 DES-BSA 在修饰电极表面,室温下干燥,每一步修饰后用 PBS 缓冲溶液曲线电极。

2. 如权利要求 1 所述的制备的一种检测己烯雌酚的电化学免疫传感器,用于检测己烯雌酚的步骤如下:(1) 以 Ag/AgCl 电极为参比电极,铂丝电极为对电极,在修饰电极表面同时滴加己烯雌酚标准品和抗体复合物并作为工作电极,连接电化学工作站,在含有  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 HQ 的 PBS 底液中,通过循环伏安法检测,扫描电压是 0.6—-0.6 V,检测添加  $\text{H}_2\text{O}_2$  前后电化学信号的变化和己烯雌酚标准品浓度之间的关系,绘制工作曲线;

(2) 将待测物代替己烯雌酚标准品,按照工作曲线的方法进行检测。

## 一种检测己烯雌酚的电化学免疫传感器的制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于纳米材料和食品添加剂,提供了一种检测己烯雌酚的电化学免疫传感器,可以用于食品中己烯雌酚的检测。

### 背景技术

[0002] 己烯雌酚 (DES) 是一种合成的非甾体类激素,广泛用于临床医学和作为动物生长促进剂。近来,许多研究表明己烯雌酚是一种潜在的致癌物质,在美国和许多欧盟国家,己烯雌酚被禁止用于促进动物生长等方面。因此,建立一种快速、灵敏的,简单的检测方法是非常有必要的,目前报道的检测己烯雌酚的方法主要包括气相色谱-质谱分析法、化学发光法和加压毛细管电色谱非法等,这些方法往往需要复杂的处理步骤,并且一起操作复杂,检测时间较长。

### 发明内容

[0003] 本研究实现了一种利用免疫反应结合电化学检测食品中的己烯雌酚的方法,具有灵敏度高,操作简单及成本低廉等优势。通过在金电极表面修饰一层纳米复合物,用来放大传感器的电信号,然后在将己烯雌酚完全抗原修饰在电极表面,通过其与己烯雌酚的标准品竞争结合被标记的抗体复合物,这样结合在电极表面的抗体复合物上的酶就可以催化底物产生电信号。利用电信号变化和己烯雌酚标准品浓度之间的关系,绘制工作曲线,这样就可以达到检测己烯雌酚含量的目的。

### 发明内容

[0004] 本发明的内容之一是提供了一种检测食品中己烯雌酚的电化学免疫传感器的制备方法。

[0005] 本发明的内容之二是将构建的免疫传感器,用于检测食品中的己烯雌酚。

[0006] 本发明的技术方案,包括以下步骤:

1、一种检测食品中己烯雌酚的电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 碳纳米管-离子液体-壳聚糖纳米复合物 (MWCNTs-IL-CS) 和金纳米粒子的制备:  
50 mg 的壳聚糖溶于 20 ml 的 1% 的乙酸中,得到壳聚糖溶于,一定量的碳纳米管和粒子通过超声溶于得到的壳聚糖溶液中,得到 MWCNTs-IL-CS。

[0007] 取 1 ml, 1% 的  $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  溶于 99 ml 水中,加入一定量的柠檬酸钠溶液,100℃ 回流 1 h, 得到 AuNPs 纳米粒子。

[0008] (2) 抗体复合物的制备:

10 mg DA 和 1 mg GO 溶于 10 ml pH 为 8.5 的 PBS 中,超声 2 min, 形成均匀的分散液。60℃ 搅拌 24 h, 得到 PRGO, 重新溶于 10 ml 水中; 500  $\mu\text{l}$   $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (10 mg/mL) 加如上述得到的溶液中, 搅拌 2 h 后, 再加入一定量的柠檬酸钠溶液, 搅拌 2 h, 离心清洗, 再溶

于 10 ml 水中;最后,100  $\mu$ l, 1 mg/mL 的 HRP 和 100  $\mu$ l, 5  $\mu$ g/mL 的 Ab 加入到 2 ml 上述溶液中,4 $^{\circ}$ C 搅拌一夜,用 PBS 缓冲液离心清洗,溶于 2 ml 含有 1%BSA 的 PBS 中备用。

[0009] (3) 检测己烯雌酚免疫传感器的制备:

滴加 10  $\mu$ l 的 MWCNTs-IL-CS 在处理好的金电极表面,室温下干燥;再滴加 20  $\mu$ l 的 AuNPs 在修饰的电极表面,室温下干燥;滴加一定量的己烯雌酚完全抗原 DES-BSA 在修饰电极表面,室温下干燥,每一步修饰后用 PBS 缓冲溶液清洗电极。

[0010] 如上所述制备的一种检测己烯雌酚的电化学免疫传感器,用于检测己烯雌酚的步骤如下:

(1) 以 Ag/AgCl 电极为参比电极,铂丝电极为对电极,在修饰电极表面同时滴加己烯雌酚标准品和抗体复合物并作为工作电极,连接电化学工作站,在含有 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 HQ 的 PBS 底液中,通过循环伏安法检测,扫描电压是 0.6—-0.6 V,检测添加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 前后电化学信号的变化和己烯雌酚标准品浓度之间的关系,绘制工作曲线;

(2) 将待测物代替己烯雌酚标准品,按照工作曲线的方法进行检测。

[0011] 所述的一种检测己烯雌酚的电化学免疫传感器,所用材料均在化学试剂公司购买。

[0012] 本发明体现的优势和特点是:

(1) 本发明采用的 MWCNTs-IL-CS 复合物导电能力强,生物相容性好,成为构建电化学免疫传感器的优良材料;

(2) 本发明制备的传感器灵敏度高、检测速度快、操作简单;

(3) 本发明检测己烯雌酚的方法,操作简单、快速,便于实际检测。

## 具体实施方式

[0013] 下面结合实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外,还应理解,在阅读了本发明所讲述的内容以后,本领域技术人员可以对本发明做各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所述权利要求书所限定的范围。

[0014] 实施例 1

一种检测己烯雌酚的电化学免疫传感器的制备方法,步骤如下:

(1) 10  $\mu$ l 的 MWCNTs-IL-CS 在处理好的金电极表面,室温下干燥;

(2) 滴加 20  $\mu$ l 的 AuNPs 在修饰的电极表面,室温下干燥;

(3) 滴加一定量的己烯雌酚完全抗原 DES-BSA 在修饰电极表面,室温下干燥,每一步修饰后用 PBS 缓冲溶液清洗电极。

[0015] (4) 以 Ag/AgCl 电极为参比电极,铂丝电极为对电极,在 (3) 修饰电极表面同时滴加己烯雌酚标准品和抗体复合物并作为工作电极,连接电化学工作站,在含有 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 HQ 的 PBS 底液中,通过循环伏安法检测。

[0016] 实施例 2

一种检测己烯雌酚的电化学免疫传感器的制备方法,步骤如下:

(1) 20  $\mu$ l 的 MWCNTs-IL-CS 在处理好的金电极表面,室温下干燥;

(2) 滴加 20  $\mu$ l 的 AuNPs 在修饰的电极表面,室温下干燥;

(3) 滴加一定量的己烯雌酚完全抗原 DES-BSA 在修饰电极表面, 室温下干燥, 每一步修饰后用 PBS 缓冲溶液清洗电极。

[0017] (4) 以 Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂丝电极为对电极, 在 (3) 修饰电极表面同时滴加己烯雌酚标准品和抗体复合物并作为工作电极, 连接电化学工作站, 在含有  $H_2O_2$  和 HQ 的 PBS 底液中, 通过循环伏安法检测电化学信号的变化。

[0018] 实施例 3

(1) 20  $\mu$  l 的 MWCNTs-IL-CS 在处理好的金电极表面, 室温下干燥;

(2) 滴加 10  $\mu$  l 的 AuNPs 在修饰的电极表面, 室温下干燥;

(3) 滴加一定量的己烯雌酚完全抗原 DES-BSA 在修饰电极表面, 室温下干燥, 每一步修饰后用 PBS 缓冲溶液清洗电极。

[0019] (4) 以 Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂丝电极为对电极, 在 (3) 修饰电极表面同时滴加己烯雌酚标准品和抗体复合物并作为工作电极, 连接电化学工作站, 在含有  $H_2O_2$  和 HQ 的 PBS 底液中, 通过循环伏安法检测电化学信号的变化。

[0020] 实施例 4

(1) 10  $\mu$  l 的 MWCNTs-IL-CS 在处理好的金电极表面, 室温下干燥;

(2) 滴加 20  $\mu$  l 的 AuNPs 在修饰的电极表面, 室温下干燥;

(3) 滴加一定量的己烯雌酚完全抗原 DES-BSA 在修饰电极表面, 室温下干燥, 每一步修饰后用 PBS 缓冲溶液清洗电极。

[0021] (4) 以 Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂丝电极为对电极, 在 (3) 修饰电极表面同时滴加己烯雌酚标准品和抗体复合物并作为工作电极, 连接电化学工作站, 在含有  $H_2O_2$  和 HQ 的 PBS 底液中, 通过循环伏安法检测。扫描电压是 0.6—-0.6 V, 检测添加  $H_2O_2$  前后电化学信号的变化和己烯雌酚标准品浓度之间的关系, 绘制工作曲线;

实施例 5

(1) 10  $\mu$  l 的 MWCNTs-IL-CS 在处理好的金电极表面, 室温下干燥;

(2) 滴加 20  $\mu$  l 的 AuNPs 在修饰的电极表面, 室温下干燥;

(3) 滴加一定量的己烯雌酚完全抗原 DES-BSA 在修饰电极表面, 室温下干燥, 每一步修饰后用 PBS 缓冲溶液清洗电极。

[0022] (4) 以 Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂丝电极为对电极, 在 (3) 修饰电极表面同时滴加己烯雌酚标准品和抗体复合物并作为工作电极, 连接电化学工作站, 在含有  $H_2O_2$  和 HQ 的 PBS 底液中, 通过循环伏安法检测。扫描电压是 0.6—-0.6 V, 检测添加  $H_2O_2$  前后电化学信号的变化和己烯雌酚标准品浓度之间的关系, 绘制工作曲线;

(5) 将待测物代替己烯雌酚标准品, 按照工作曲线的方法进行检测。

[0023] (6) 采用电化学免疫传感器检测从市场购买的牛奶样品 1, 平均检测 6 次, 未检测出含有己烯雌酚, 属于合格样品; 加标回收试验, 其相对标准偏差为 4.5%。

[0024] 实施例 6

(1) 10  $\mu$  l 的 MWCNTs-IL-CS 在处理好的金电极表面, 室温下干燥;

(2) 滴加 20  $\mu$  l 的 AuNPs 在修饰的电极表面, 室温下干燥;

(3) 滴加一定量的己烯雌酚完全抗原 DES-BSA 在修饰电极表面, 室温下干燥, 每一步修饰后用 PBS 缓冲溶液清洗电极。

[0025] (4) 以 Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂丝电极为对电极, 在 (3) 修饰电极表面同时滴加己烯雌酚标准品和抗体复合物并作为工作电极, 连接电化学工作站, 在含有  $H_2O_2$  和 HQ 的 PBS 底液中, 通过循环伏安法检测。扫描电压是 0.6—-0.6 V, 检测添加  $H_2O_2$  前后电化学信号的变化和己烯雌酚标准品浓度之间的关系, 绘制工作曲线;

(5) 将待测物代替己烯雌酚标准品, 按照工作曲线的方法进行检测。

[0026] (6) 采用电化学免疫传感器检测从市场购买的牛奶样品 2, 平均检测 6 次, 未检测出含有己烯雌酚, 属于合格样品; 加标回收试验, 其相对标准偏差为 5.3%。

专利名称(译)	一种检测己烯雌酚的电化学免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN103698383A</a>	公开(公告)日	2014-04-02
申请号	CN201310696498.5	申请日	2013-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	济南大学		
申请(专利权)人(译)	济南大学		
当前申请(专利权)人(译)	济南大学		
[标]发明人	黄加栋 李杰 刘素		
发明人	黄加栋 李杰 刘素		
IPC分类号	G01N27/48 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种检测己烯雌酚的电化学免疫传感器。该免疫传感器利用电极表面修饰技术，将制备碳纳米管-离子液体-壳聚糖 (MWCNTs-IL-CS) 复合物修饰在电极表面，再滴加合成的基金纳米粒子 (AuNPs) 在修饰的电极表面，在修饰己烯雌酚的完全抗原DES-BSA在表面，同时修饰抗体复合物 (PRGO-Au-Ab-HRP) 和己烯雌酚标准品在电极表面，DES-BSA和标准品同时竞争结合抗体复合物上抗体的结合位点，改变标准品的浓度，在检测底液添加过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 前后，通过信号变化和标准品浓度之间的关系，绘制工作曲线。可用于检测食品中的己烯雌酚。本发明的电化学免疫传感器选择性强、灵敏度高、操作简单快速，适合检测食品中的己烯雌酚。