



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103941008 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 23

(21) 申请号 201410142965. 4

(22) 申请日 2014. 04. 10

(71) 申请人 山东理工大学

地址 255086 山东省淄博市高新技术产业开  
发区高创园 D 座 1012 室

(72) 发明人 郭业民 乔璐 孙霞 王相友  
刘君峰

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页 附图4页

### (54) 发明名称

一种检测毒死蜱的免疫传感器的制备方法

### (57) 摘要

本发明公开了一种检测毒死蜱的免疫传感器的制备方法,属于生物传感器制备技术领域。本发明是在经过清洗、活化和性能测试的裸玻碳电极表面滴涂镍铝水滑石-石墨烯复合液,然后用空壳纳米金进行修饰,再在修饰后的电极上固定毒死蜱单克隆抗体,最后用牛血清蛋白封闭。本发明制备的免疫传感器具有灵敏度高,成本低,检测速度快,稳定性好,且样品回收率高的特点。本发明制备的免疫传感器的检测限可达 0.052ng/L,线性范围为 5ng/mL-2 $\mu$ g/mL,回收率可达 82.0%-118.0%,适用于果蔬中毒死蜱残留量的快速检测。

1. 一种检测毒死蜱的免疫传感器的制备方法,其特征在于,是在经过清洗、活化和性能测试的裸玻碳电极表面滴涂镍铝水滑石-石墨烯复合液,然后用空壳纳米金进行修饰,再在修饰后的电极上固定毒死蜱单克隆抗体,最后用牛血清蛋白封闭,得到检测毒死蜱的免疫传感器。

2. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,步骤如下:

清洗、活化并测试裸玻碳电极,获得预处理玻碳电极;

制备镍铝水滑石-石墨烯复合液;

将步骤2)制备的镍铝水滑石-石墨烯复合液滴涂到步骤1)的预处理玻碳电极上,分散均匀后,利用空壳纳米金进行修饰,得到修饰电极;

在步骤3)所得的修饰电极上固定毒死蜱的单克隆抗体,获得固定电极;

用牛血清蛋白封闭步骤4)所得的固定电极,得到毒死蜱免疫传感器。

3. 根据权利要求2所述方法,其特征在于,步骤1)所述清洗、活化并测试裸玻碳电极是利用热piranha溶液浸泡裸玻碳电极后,用 $Al_2O_3$ 浆抛光,再依次用去离子水、 $HNO_3$ 、无水乙醇和去离子水超声清洗,干燥后用循环伏安法活化,并通过检测金电极循环伏安曲线峰电位差测试金电极。

4. 根据权利要求2所述方法,其特征在于,步骤2)所述制备镍铝水滑石-石墨烯复合液,是采用Hummers方法制备氧化石墨,再用混合碱液溶解氧化石墨后超声处理,再加入到含有硝酸镍和硝酸铝的盐溶液中制备悬浊液,调节pH至10.5后,60°C下晶化6h,晶化完毕后,加热到83°C加入硫化钠溶液,回流4h后冷却,用去离子水洗涤三次后60°C下干燥24h,最后用壳聚糖-醋酸溶液溶解,并超声分散均匀后,得到镍铝水滑石-石墨烯复合液。

5. 根据权利要求2所述方法,其特征在于,步骤3)所述在预处理电极表面上滴涂镍铝水滑石-石墨烯复合液,是取6 $\mu$ L分散均匀的镍铝水滑石-石墨烯纳米复合液滴涂在电极表面,26°C下静置3h,然后用pH7.5的PBS缓冲液冲洗表面,氮气吹干。

6. 根据权利要求2所述方法,其特征在于,步骤3)所述利用空壳纳米金修饰,是指取6 $\mu$ L空壳纳米金溶液滴涂在电极上,26°C下静置2h,然后用pH7.5的磷酸盐缓冲液冲洗电极表面,氮气吹干。

7. 根据权利要求2所述方法,其特征在于,步骤4)所述固定毒死蜱的单克隆抗体,是将修饰电极浸入5%的戊二醛溶液中,30min后取出,冲洗吹干,沉浸在毒死蜱单克隆抗体溶液中,4°C条件下浸泡8h,取出后用PBS缓冲液冲洗表面,晾干待用。

8. 根据权利要求2所述方法,其特征在于,步骤5)所述用牛血清蛋白封闭固定电极,是指将固定电极浸入0.5%的BSA溶液中26°C下静置2h。

9. 根据权利要求2所述方法,其特征在于,具体步骤如下:

利用热piranha溶液浸泡裸玻碳电极后,用 $Al_2O_3$ 浆抛光,再依次用去离子水、 $HNO_3$ 、无水乙醇和去离子水超声清洗,干燥后用循环伏安法活化,并通过检测金电极循环伏安曲线峰电位差测试金电极,获得预处理电极;

采用Hummers方法制备氧化石墨,在用混合碱液溶解氧化石墨后超声处理,在加入到含有硝酸镍和硝酸铝的盐溶液中制备悬浊液,调节pH至10.5后,60°C下晶化6h,晶化完毕后,加热到83°C加入硫化钠溶液,回流4h后冷却,用去离子水洗涤三次后60°C下干燥24h,最后用壳聚糖-醋酸溶液溶解,并超声分散均匀后,得到镍铝水滑石-石墨烯复合液;

取 6  $\mu$  L 分散均匀的镍铝水滑石 - 石墨烯纳米复合液滴涂在步骤 1) 所得预处理电极表面, 常温下 3h, 然后用 pH7.5 的 PBS 缓冲液冲洗表面, 氮气吹干, 再取 6  $\mu$  L 空壳纳米金溶液滴涂在电极上, 26 $^{\circ}$ C 下静置 2h, 然后用 pH7.5 的磷酸盐缓冲液冲洗电极表面, 氮气吹干后得到修饰电极;

将步骤 3) 所得修饰电极浸入 5% 的戊二醛溶液中, 30min 后取出, 冲洗吹干, 沉浸在毒死蜱单克隆抗体溶液中, 4 $^{\circ}$  C 条件下浸泡 8h, 取出后用 PBS 缓冲液冲洗表面, 获得固定电极;

将步骤 4) 所得固定电极浸入 0.5% 的 BSA 溶液中 26 $^{\circ}$ C 下静置 2h。

## 一种检测毒死蜱的免疫传感器的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测毒死蜱的免疫传感器的制备方法,属于农产品安全检测技术领域。

### 技术背景

[0002] 我国是农业大国,农业发展对国民经济以及人民生活有着举足轻重的作用。农药是当前农业生产用于防治病、虫、杂草对农作物危害不可缺少的物质,对促进农业增产有着重要的作用。但是,农药的不合理使用,不仅造成了水环境、土壤、大气的污染,也导致了农产品中农药残留超标,引起人体中毒以及贸易壁垒。此外,我国每年因农药残留超标造成的经济损失巨大。随着我国人民生活水平不断提高,农产品的质量安全问题越来越受到关注,尤其果品、蔬菜中农药残留问题已经成为公众关注的焦点。当前,我国生产和使用的杀虫剂绝大多数为有机磷和氨基甲酸酯类农药,其中毒死蜱是目前全世界生产和销售最大的杀虫剂品种之一。毒死蜱是高效中毒的广谱杀虫剂兼除草剂,具有一定的内吸性,可以通过食物链的富集作用转移至人体,对人体具有潜在致癌作用,因此,毒死蜱一直是环境和食品中农药残留检测的重要项目。可见,加强对农产品中农药残留的检测对保护生态环境,尤其是保障人类健康有着十分深远的意义。

[0003] 传统的农药残留检测方法主要有:光谱法(红外光谱法、荧光光谱法、紫外-可见光、化学发光法等)、色谱法(气相色谱(GC)、液相色谱(LC)、高效液相色谱(HPLC)、气-质联用(GC-MS)、液-质联用(LC-MS)、酶联免疫(ELISA)等。这些方法虽然选择性好、灵敏度高、准确度高、检出限低,可同时检测多种元素或化合物,但其需要昂贵的仪器设备,样品前处理过程繁琐、费时,并且对分析人员的技术水平要求很高,不适于现场快速检测。常用的农药残留快速检测方法有酶抑制法(酶抑制试纸法和酶抑制分光光度法),可以实现有机磷农药的现场快速检测,具有较好的实用价值。但是,速测卡是通过肉眼观察卡片的颜色变化,因此一般只能用于严重超标的蔬菜样品的定性测量。酶抑制分光光度法的原理是基于吸光度的变化进行检测的,但蔬菜水果中大量的色素会影响检测结果的准确度。此外,上述方法存在回收率低、错检、漏检比例较高、重复性差、难以满足低残留和定量检测的要求等缺点。免疫传感器是基于抗原和抗体特异性结合所引发的免疫反应的原理所研制的传感器,与传统的分析方法相比,它具有特异性强、分析速度快、结构简单、成本低廉等优点。免疫传感器的关键是敏感界面的构建,其直接影响生物分子的固定化、免疫传感器的稳定性、灵敏度和选择性等主要性能。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种能克服上述缺陷以及操作简单、灵敏度高、选择性好的检测毒死蜱农药残留的免疫传感器制备方法。采取的技术方案为:

一种检测毒死蜱的免疫传感器的制备方法,其特征在于,是在经过清洗、活化和性能测试的裸玻碳电极表面滴涂镍铝水滑石-石墨烯复合液,然后再用空壳纳米金进行修饰,再

在修饰后的电极上固定毒死蜱单克隆抗体,最后用牛血清蛋白封闭,得到检测毒死蜱的免疫传感器。

[0005] 所述方法的步骤如下:

- 1) 清洗、活化并测试裸玻碳电极,获得预处理玻碳电极;
- 2) 制备镍铝水滑石-石墨烯复合液;
- 3) 将步骤 2) 制备的镍铝水滑石-石墨烯复合液滴涂到步骤 1) 的预处理玻碳电极上,分散均匀后,利用空壳纳米金进行修饰,得到修饰电极;
- 3) 在步骤 3) 所得的修饰电极上固定毒死蜱的单克隆抗体,获得固定电极;
- 4) 用牛血清蛋白封闭步骤 4) 所得的固定电极,得到毒死蜱免疫传感器。

[0006] 所述方法步骤 1) 所述清洗、活化并测试裸玻碳电极是利用热 piranha 溶液浸泡裸玻碳电极后,用  $Al_2O_3$  浆抛光,再依次用去离子水、 $HNO_3$ 、无水乙醇和去离子水超声清洗,干燥后用循环伏安法活化,并通过检测金电极循环伏安曲线峰电位差测试金电极。

[0007] 所述方法步骤 2) 所述制备镍铝水滑石-石墨烯复合液,是采用 Hummers 方法制备氧化石墨,在用混合碱液溶解氧化石墨后超声处理,在加入到含有硝酸镍和硝酸铝的盐溶液中制备悬浊液,调节 pH 至 10.5 后,60°C 下晶化 6h,晶化完毕后,加热到 83°C 加入硫化钠溶液,回流 4h 后冷却,用去离子水洗涤三次后 60°C 下干燥 24h,最后用壳聚糖-醋酸溶液溶解,并超声分散均匀后,得到镍铝水滑石-石墨烯复合液。

[0008] 所述方法步骤 3) 所述在预处理电极表面上滴涂镍铝水滑石-石墨烯复合液,是取 6  $\mu$ L 分散均匀的镍铝水滑石-石墨烯纳米复合液滴涂在电极表面,常温下 3h,然后用 pH7.5 的磷酸盐缓冲液(PBS) 冲洗表面,氮气吹干。

[0009] 所述方法步骤 3) 所述利用空壳纳米金修饰,是指取 6  $\mu$ L 空壳纳米金溶液滴涂在电极上,26°C 下静置 2h,然后用 pH7.5 的磷酸盐缓冲液冲洗电极表面,氮气吹干。

[0010] 所述方法步骤 4) 所述固定毒死蜱的单克隆抗体,是将修饰电极浸入 5% 的戊二醛溶液中,30min 后取出,冲洗吹干,沉浸在毒死蜱单克隆抗体溶液中,4°C 条件下浸泡 8h,取出后用 pH7.5 的 PBS 缓冲液冲洗表面,晾干待用。

[0011] 所述方法步骤 5) 所述用牛血清蛋白封闭固定电极,是指将固定电极浸入 0.5% 的牛血清蛋白(BSA) 溶液中 26°C 下静置 2h。

[0012] 所述方法的具体步骤如下:

1) 利用热 piranha 溶液浸泡裸玻碳电极后,用  $Al_2O_3$  浆抛光,再依次用去离子水、 $HNO_3$ 、无水乙醇和去离子水超声清洗,干燥后用循环伏安法活化,并通过检测金电极循环伏安曲线峰电位差测试金电极,获得预处理电极;

2) 采用 Hummers 方法制备氧化石墨,在用混合碱液溶解氧化石墨后超声处理,在加入到含有硝酸镍和硝酸铝的盐溶液中制备悬浊液,调节 pH 至 10.5 后,60°C 下晶化 6h,晶化完毕后,加热到 83°C 加入硫化钠溶液,回流 4h 后冷却,用去离子水洗涤三次后 60°C 下干燥 24h,最后用壳聚糖-醋酸溶液溶解,并超声分散均匀后,得到镍铝水滑石-石墨烯复合液;

3) 取 6  $\mu$ L 分散均匀的镍铝水滑石-石墨烯纳米复合液滴涂在步骤 1) 所得预处理电极表面,常温下 3h,然后用 pH7.5 的 PBS 缓冲液冲洗表面,氮气吹干,再取 6  $\mu$ L 空壳纳米金溶液滴涂在电极上,26°C 下静置 2h,然后用 pH7.5 的 PBS 冲洗电极表面,氮气吹干后得到修饰电极;

4) 将步骤 3) 所得修饰电极浸入 5% 的戊二醛溶液中, 30min 后取出, 冲洗吹干, 沉浸在毒死蜍单克隆抗体溶液中, 4° C 条件下浸泡 8h, 取出后用 PBS 缓冲液冲洗表面, 获得固定电极;

5) 将步骤 4) 所得固定电极浸入 0.5% 的 BSA 溶液中室温下静置 2h。

[0013] 所述一种检测毒死蜍的免疫传感器的制备, 其特征在于: 免疫传感器的敏感界面组成包括镍铝水滑石-石墨烯纳米复合膜和空壳纳米金, 进而固定抗毒死蜍的单克隆抗体。

[0014] 所述一种检测毒死蜍的免疫传感器的制备, 其特征在于: 玻碳电极 (d=3mm) 的清洗, 免疫传感器敏感界面的构建及过程表征 (制备镍铝水滑石-石墨烯纳米复合材料及空壳纳米金材料并以壳聚糖作为分散剂进行分散, 利用镍铝水滑石-石墨烯及空壳纳米金的协同作用共同修饰电极), 免疫传感器工作曲线的建立, 免疫传感器性能的检测, 免疫传感器对实际样品的检测。

[0015] 所述一种检测毒死蜍的免疫传感器的制备, 其特征在于: 实验条件的优化, 主要包括抗体浓度、测试底液 pH 以及孵育时间; 所制备的免疫传感器的工作曲线为:  $\% \Delta I = -7 + 14.932 \text{ LgC (ng/mL)}$  ( $R^2=0.9913, 5-150 \text{ ng/mL}$ ),  $\% \Delta I = -57.544 + 38.724 \text{ LgC (ng/mL)}$  ( $R^2=0.9926, 150-2000 \text{ ng/mL}$ ); 免疫传感器性能检测包括特异性、重现性、稳定性、再生性以及免疫传感器对蔬菜样品回收率的测定。

[0016] 其制备原理为: 免疫传感器以免疫生物分子作为识别元件, 通过固定化技术将免疫蛋白结合到感受器表面, 发生免疫识别反应后, 生成的免疫复合物与产生的物理或化学信号相关联, 由换能器将其转化为与待测物质浓度 (或活度) 有关的可定量或者可处理的物理化学信号, 再经过二次仪表放大并且输出信号, 从而实现对待测物质的检测。本发明采用以壳聚糖作为分散剂制备的镍铝水滑石-石墨烯和空壳纳米金对玻碳电极进行修饰。镍铝水滑石-石墨烯复合材料, 通过传统的共沉淀方法在氧化石墨模板上生长镍铝水滑石再经过还原制备镍铝水滑石-石墨烯复合材料。水滑石是一种阴离子型类似于氢氧化物的多功能纳米材料, 层间阴离子的种类及数量具有可调控性, 石墨烯作为二维基底提高电子传导速率、增大电极传导面积和维持结构稳定性, 镍铝水滑石-石墨烯复合材料表现出优良的电化学性能。壳聚糖 (CS) 属于多糖类, 它具有优异的成膜性、吸附性、透气性和渗透性, 成膜后具有很好的吸附性、稳定性和良好的生物相容性, 其丰富的氨基、多孔性结构使它被广泛用于生物分子的固定和修饰电极的制备。壳聚糖的氨基端通过金氨键连接空壳纳米金, 其拥有良好的生物相容性, 可作为抗体的固定载体, 为抗体在电极表面的固定提供了一个良好的生物界面, 保持了抗体的生物活性以用来和农药进行有效的特异性结合。此外, 空壳纳米金具有较高的比表面积, 且稳定性好、密度小、成本低, 作为微小的导电中心, 充分暴露活性位点, 内外壳之间存在着电势差, 可促进电化学反应中电子的传递, 进而增大免疫传感器的响应电流。采用本发明制成的免疫传感器可以在蔬果采收、上市前, 进行农药残留的快速测定, 直接对农药残留量是否超标进行检测, 避免因食用含有残留农药的蔬果而引起中毒, 为农产品安全生产与消费提供残留检测的技术支撑。

[0017] 为达到以上目的, 采取以下技术方案实现: 一种检测毒死蜍的免疫传感器的制备, 其特征在于: (1) 免疫传感器制备前裸玻碳电极的清洗、活化和性能测试, 如果测试循环伏安曲线中的峰电位差在 120mV 以下, 氧化峰和还原峰对称, 则所述玻碳电极可使用, 否则要

重新返回清洗步骤中,直到符合要求。(2) 清洗好的裸玻碳电极表面滴涂分散均匀的镍铝水滑石-石墨烯复合液,继而修饰空壳纳米金,然后固定毒死蜱单克隆抗体,最后用牛血清白蛋白(BSA)封闭非特异性结合位点。免疫传感器制备结束后,放入冰箱里4℃保存备用。

[0018] 为达到以上目的,采取以下技术方案实现:一种检测毒死蜱的免疫传感器的制备,其特征在于:(1) 将上述制备好的免疫传感器在工作底液中以不同的扫速做循环伏安方法扫描,可以得到峰值和扫速的关系,得到是受扩散控制的。(2) 配置一系列的毒死蜱标准液,进行循环伏安扫描,得到抑制率,进一步得出上述制备的免疫传感器的工作曲线、检测范围和检测限;(3) 配置一系列经常混合使用的农药溶液,以检测所制备免疫传感器的选择性;(4) 通过循环伏安扫描多段并且于冰箱中放置一段时间再次测量验证上述免疫传感器的稳定性,通过解离和再次免疫检测其再生性能;(5) 对实际果蔬样品进行分析得出该免疫传感器的回收率。

[0019] 本发明采用传统的共沉淀方法在氧化石墨模板上生长镍铝水滑石再经过还原制备镍铝水滑石-石墨烯纳米复合材料,再以具有良好生物相容性和成膜性的壳聚糖作为分散剂进行分散,得到的纳米复合物膜能够促进电化学反应中电子的传递,提高电极上的响应电流,用以制备响应信号强和灵敏度高的免疫传感器;具有大量氨基的纳米复合膜与空壳纳米金形成的金氨体系具有较高的稳定性和高度有序性,增大免疫传感器的电流响应,并且改善电极表面的微环境,作为载体材料通过戊二醛共价交联抗体,提高了传感器表面抗体的有效固定,从而增大了检测精度。

[0020] 所述免疫传感器的制备工艺如下:(1) 取6 $\mu$ L分散均匀的镍铝水滑石-石墨烯纳米复合膜滴涂在预处理好的玻碳电极表面,常温下静置3h,用pH7.5的PBS冲洗电极表面;(2) 电极表面晾干后,取6 $\mu$ L空壳纳米金滴涂在电极表面,常温下静置2h,然后用pH7.5的PBS缓冲液冲洗表面,氮气吹干;(3) 将上述经纳米材料修饰好的电极浸入5%的戊二醛溶液中,30min后取出,用pH7.5的PBS冲洗吹干,沉浸在毒死蜱单克隆抗体溶液中,4℃条件下浸泡8h,取出后用pH7.5的PBS缓冲液冲洗表面;(4) 最后将上述制备好的电极浸于0.5%的BSA溶液中,室温下静置2h,进而封闭非特异性结合位点,免疫传感器制作完成,保存在4℃条件下备用。

[0021] 本发明的有益效果:

首先,本发明引入了一种超级电容器电极材料:镍铝水滑石-石墨烯纳米复合物,以石墨烯作为基底材料生长镍铝水滑石,有效地提高了导电性及电容,该纳米复合材料与空壳纳米金协同修饰电极,显著地增强了信号响应;

其次,本发明制备的免疫传感器检测范围较宽,线性范围为5ng/mL-150ng/mL和150ng/mL-2 $\mu$ g/mL,检测限较低,达到0.052ng/mL。以毒死蜱标准液为对比,检测加入干扰物的混合农药溶液,检测结果没有明显变化,可忽略不计,特异性良好。对制备好的免疫传感器保存三周后检测,其电流响应仍可保持在初始电流的82%以上,稳定性良好,且该免疫传感器可有效地复活5次,再生性较好;

第三,本发明所制备的免疫传感器的检测结果与气相色谱法的检测结果一致,可作为蔬菜上市前农药残留快速检测的辅助手段。

附图说明

[0022] 图 1 氧化石墨、镍铝水滑石和镍铝水滑石 - 石墨烯复合物的傅立叶变换红外光谱图。

[0023] 图 2 空壳纳米金的透射电镜图。

[0024] 图 3 镍铝水滑石 - 石墨烯复合物和空壳纳米金的扫描电镜图；

(a, 低倍率下镍铝水滑石 - 石墨烯复合物的扫描电镜图 ; b, 高倍率下镍铝水滑石 - 石墨烯复合物的扫描电镜图 ; c, 空壳纳米金扫描电镜图)。

[0025] 图 4 玻碳电极修饰过程的循环伏安图；

(a, 玻碳电极 ; b, 镍铝水滑石 - 石墨烯复合物修饰后的电极 ; c, 空壳纳米金修饰后的电极 ; d, 固定抗体后的电极 ; e, 牛血清白蛋白封闭后的电极 ; f, 孵育农药后的电极)。

[0026] 图 5 免疫传感器的工作曲线图。

## 具体实施方式

[0027] 实施例 1 镍铝水滑石 - 石墨烯纳米复合液的制备

采用 Hummers 方法制备氧化石墨。具体的工艺流程 : 在冰水浴中装配好 250mL 的反应瓶, 加入 1g 石墨粉、1g 硝酸钠和 46mL 硫酸, 搅拌 30min, 再分次加入 5g 高锰酸钾, 控制反应温度不超过 20℃, 搅拌反应一段时间, 然后升温至 35℃左右, 继续搅拌 30min, 再缓慢加入 80mL 去离子水, 续拌 20min 后, 加入 6mL 30% 的双氧水还原残留的氧化剂, 使溶液变为亮黄色。趁热过滤, 并用 5% HCl 溶液和去离子水洗涤直到滤液中无硫酸根被检测到为止。最后将滤饼置于 60℃ 的真空干燥箱中充分干燥, 即得氧化石墨。30mg 氧化石墨加入 50mL 含有氢氧化钠 (0.2M) 和无水碳酸钠 (0.05M) 的混合碱溶液里超声 30min, 在室温剧烈搅拌下加入 50mL 含有硝酸镍 (0.075M) 和硝酸铝 (0.025M) 的盐溶液得到悬浮液。0.2M 的氢氧化钠溶液加入到上述悬浮液里调节溶液的 pH 值到 10.5。然后悬浮液在 60℃ 下晶化 6 小时, 接着溶液于剧烈搅拌下被继续加热到 83℃, 34mg/mL 的硫化钠溶液快速加入到上述溶液中, 回流 4 小时后溶液冷却至室温, 用去离子水洗涤三次离心, 60℃ 下干燥 24h。同时, 作为对比, 在不加入基底氧化石墨的情况下按照上述相同合成条件合成镍铝水滑石材料。将壳聚糖 (CS) 溶于 1.0% 的醋酸溶液中, 配制 0.3% CS 溶液, 室温下磁力搅拌至壳聚糖完全溶解。称取 2mg 镍铝水滑石 - 石墨烯加入到 1mL 0.3% CS 溶液中, 超声分散 8h 得到分散均匀的镍铝水滑石 - 石墨烯纳米复合液。图 1 为氧化石墨、镍铝水滑石和镍铝水滑石 - 石墨烯复合物的傅立叶变换红外光谱图。观察红外特征吸收峰, 可看到镍铝水滑石 - 石墨烯复合物的吸收峰与镍铝水滑石相似, 略有偏移是由于石墨烯的存在, 证实了镍铝水滑石 - 石墨烯复合物的形成

### 实施例 2 空壳纳米金的制备

以 Co 纳米粒子作为牺牲模板合成空壳纳米金。首先向 50mL 水中通高纯 N<sub>2</sub> 除氧, 搅拌下加入 8.4mg 柠檬酸和 15mg 硼氢化钠。然后注入 50 μL 0.4M CoCl<sub>2</sub> 溶液 (反应始终在氮气的保护下进行以防止生成的 Co 纳米颗粒被氧化)。20min 后停止通 N<sub>2</sub> 取 30mL 钴纳米胶体溶液加入到 18mL 的氯金酸溶液中 (1mM), 继续搅拌 30min。最后将产物离心, 弃去上清液, 所得沉淀分散于 5mL pH7.5 PBS 中备用。取 2mL 空壳纳米金胶体溶液加入到 5mL 0.5% 的壳聚糖溶液中, 室温下搅拌 2h, 用以作电极修饰材料。图 2 为制备好的空壳纳米金的透射电镜图, 从图中可看到空壳纳米金呈现球状, 中心颜色浅, 边缘颜色暗, 证实了其空心结构, 有

利于免疫传感器的构建。图 3 为镍铝水滑石 - 石墨烯复合物和空壳纳米金的扫描电镜图, 从图 a 及 b 中可看到结构规则、大小均匀、结晶度高的六边形块状晶体, 晶体结构完整。从图 c 中可看到空壳纳米金呈现分布均匀、致密的球状形态

### 实施例 3 玻碳电极的清洗、活化和测试

玻碳电极修饰前, 首先浸入热的“piranha”溶液 ( $\text{H}_2\text{SO}_4:30\% \text{H}_2\text{O}_2 = 3:1$ ) 中浸泡 15min, 用水清洗干净, 接下来用  $0.3 \mu\text{m}$ 、30nm 的  $\text{Al}_2\text{O}_3$  浆在麂皮上抛光至镜面, 抛光后用去离子水清洗去除表面污物, 然后依次用 6mol/L 的  $\text{HNO}_3$ 、无水乙醇和去离子水各自超声清洗 5min, 氮气环境下干燥。

[0028] 玻碳电极的活化: 彻底清洗后, 电极在 0.5mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液中用循环伏安法活化, 扫描范围 1.0V ~ -1.0V, 反复扫描直至达到稳定的循环伏安图为止。

[0029] 预处理好的玻碳电极的测试: 在含有  $1 \times 10^{-3}$  mol/L  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  的 0.20 mol/L  $\text{KNO}_3$  溶液中跑循环伏安曲线, 扫描速度 50mV/S, 扫描范围为 -0.1V ~ 0.6V, 以测试玻碳电极的性能; 当循环伏安曲线中的峰电位差在 80mV 以下, 并尽可能接近 64mV, 所述玻碳电极可使用, 否则要重新进行清洗, 处理所述玻碳电极, 直到符合要求。图 4 为玻碳电极修饰过程的循环伏安图。在玻碳电极表面修饰镍铝水滑石 - 石墨烯纳米复合物及空壳纳米金之后, 电流依次增大, 由于二者均具有良好的导电性。固定抗体、封闭牛血清白蛋白及孵育农药之后, 电流逐步减小, 是由于其均为惰性蛋白分子, 修饰在电极表面会阻碍电子的传递。

### [0030] 实施例 4 免疫传感器的制备

取  $6 \mu\text{L}$  分散均匀的镍铝水滑石 - 石墨烯纳米复合液滴涂在电极表面, 常温下 3h, 然后用 pH7.5 的 PBS 缓冲液冲洗表面, 氮气吹干。再取  $6 \mu\text{L}$  制备好的空壳纳米金溶液滴涂在电极上, 常温下 2h, 然后用 pH7.5 的磷酸盐缓冲液冲洗电极表面, 氮气吹干。再将上述经纳米材料修饰的电极浸入 5% 的戊二醛溶液中, 30min 后取出, 冲洗吹干, 沉浸在 1.5mL  $5 \mu\text{g/mL}$  的毒死蜱单克隆抗体溶液中。4°C 条件下浸泡 8h, 取出后用 PBS 缓冲液冲洗表面, 晾干待用。最后将上述电极浸入 0.5% 的 BSA 溶液中室温下静置 2h, 以封闭电极上非特异性结合位点, 免疫传感器制作完成, 保存在 4°C 条件下备用。

### [0031] 实施例 5 免疫传感器使用条件的优化及测定

从抗体浓度、测试底液 pH 和孵育时间三方面对所制备的免疫传感器的实验条件进行优化, 抗体浓度的范围为 50ng/mL-50  $\mu\text{g/mL}$ , pH 的范围为 5.0-8.5, 孵育时间的范围为 5-45min。经过试验分析, 确定最优抗体浓度为  $5 \mu\text{g/mL}$ , 测试底液的最佳 pH 值为 7.0, 最佳孵育时间为 30min。

[0032] 配置 5-2000 ng/mL 的毒死蜱标准溶液, 将上述制备好的免疫传感器分别浸入不同浓度的毒死蜱标准溶液, 在常温下孵育 30min, 检测免疫反应前后电流变化得到其工作曲线 (图 5)。

[0033] 将免疫传感器在久效磷、西维因、克百威、3-羟基克百威等干扰物存在的情况下对 200ng/mL 的毒死蜱进行测试, 以检测其选择性; 选 5 根于相同条件下制备好的免疫传感器检测其重现性; 连续 15 天依次检测相同浓度的毒死蜱溶液以检测其稳定性; 将免疫后的传感器用甘氨酸-HCl 缓冲液 (pH2.8) 解离毒死蜱农药 5min 后再次免疫, 检测其再生能力。

[0034] 把蔬菜彻底清洗干净并用去离子水清洗 3 次, 喷洒上一定浓度的农药, 放置 5h 后, 用 10mL 丙酮 / 0.1M pH7.5 磷酸盐缓冲溶液 (1/9, v/v) 做溶剂超声处理 20min, 然后

再离心 10min (10000rpm), 得到的上清液用来检测实际样品的回收率, 其回收率可以达到 82.0%-118.0%。加标回收率检测的相对标准偏差为 3.68-5.82%, 且传感器的重现性良好, 批内和批间变异系数分别为 3.9% 和 6.2%。

[0035] 此种免疫传感器检测毒死蜱农药残留的检测方法操作工艺简单, 检测时间较短, 检测农药浓度范围广, 灵敏度高, 稳定性好, 再生能力高以及对实际样品分析有较好的回收率和重现性, 符合我国农药残留快速检测技术发展和国际化要求。

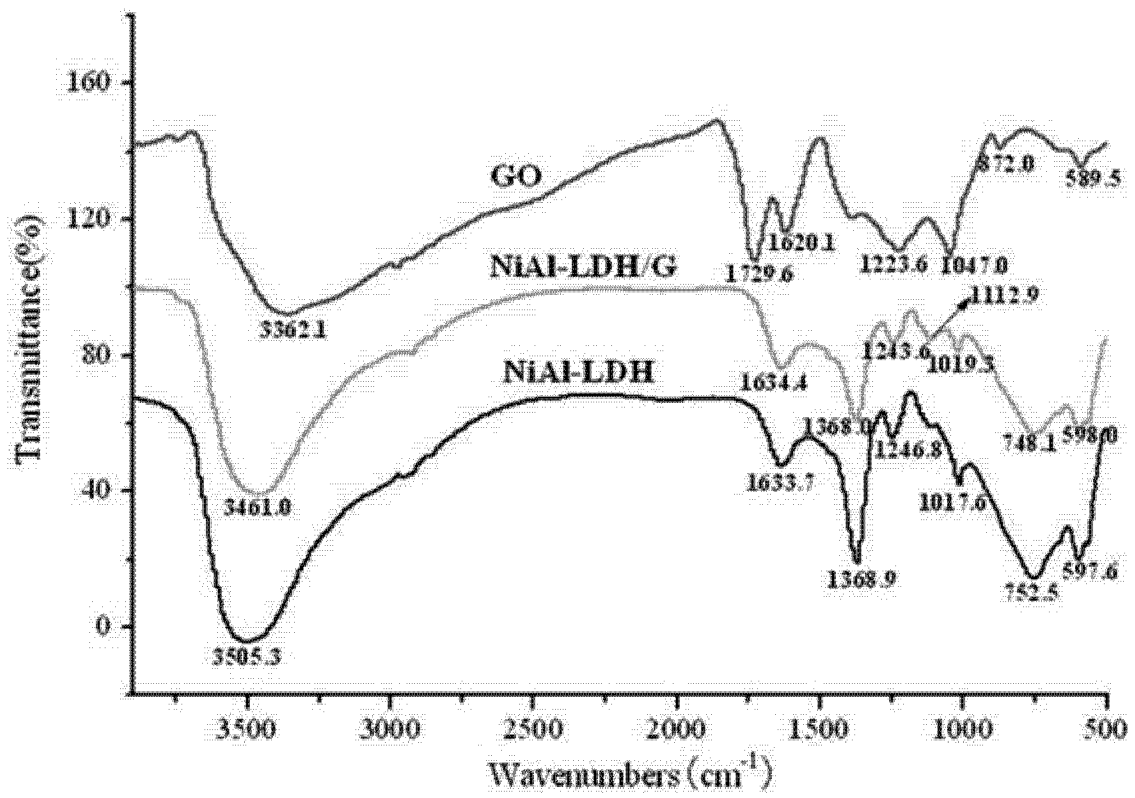


图 1

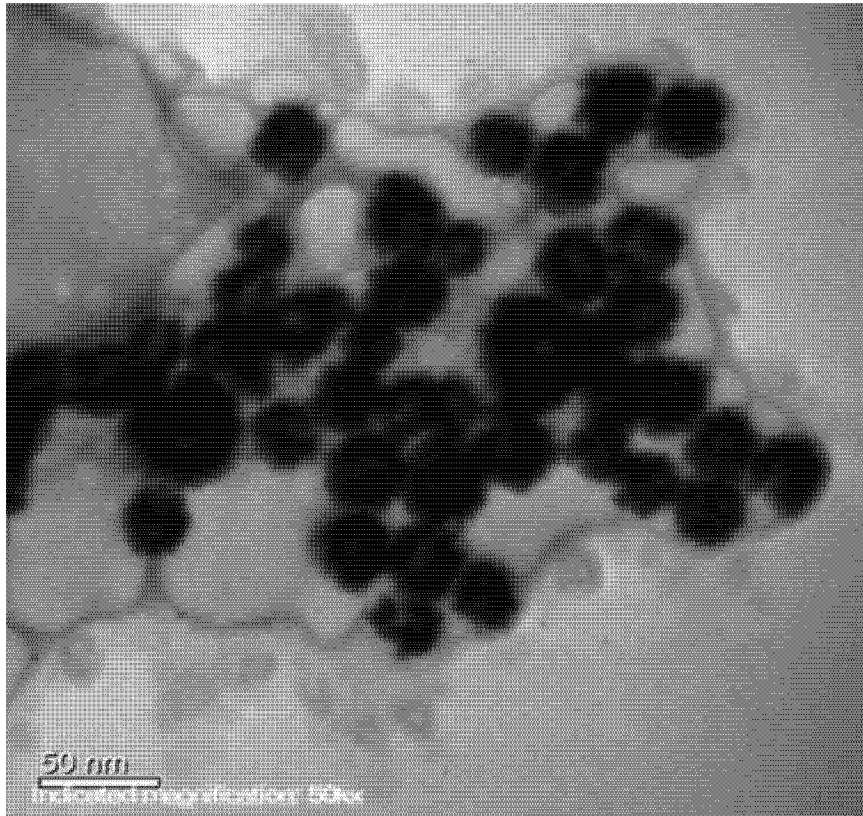


图 2

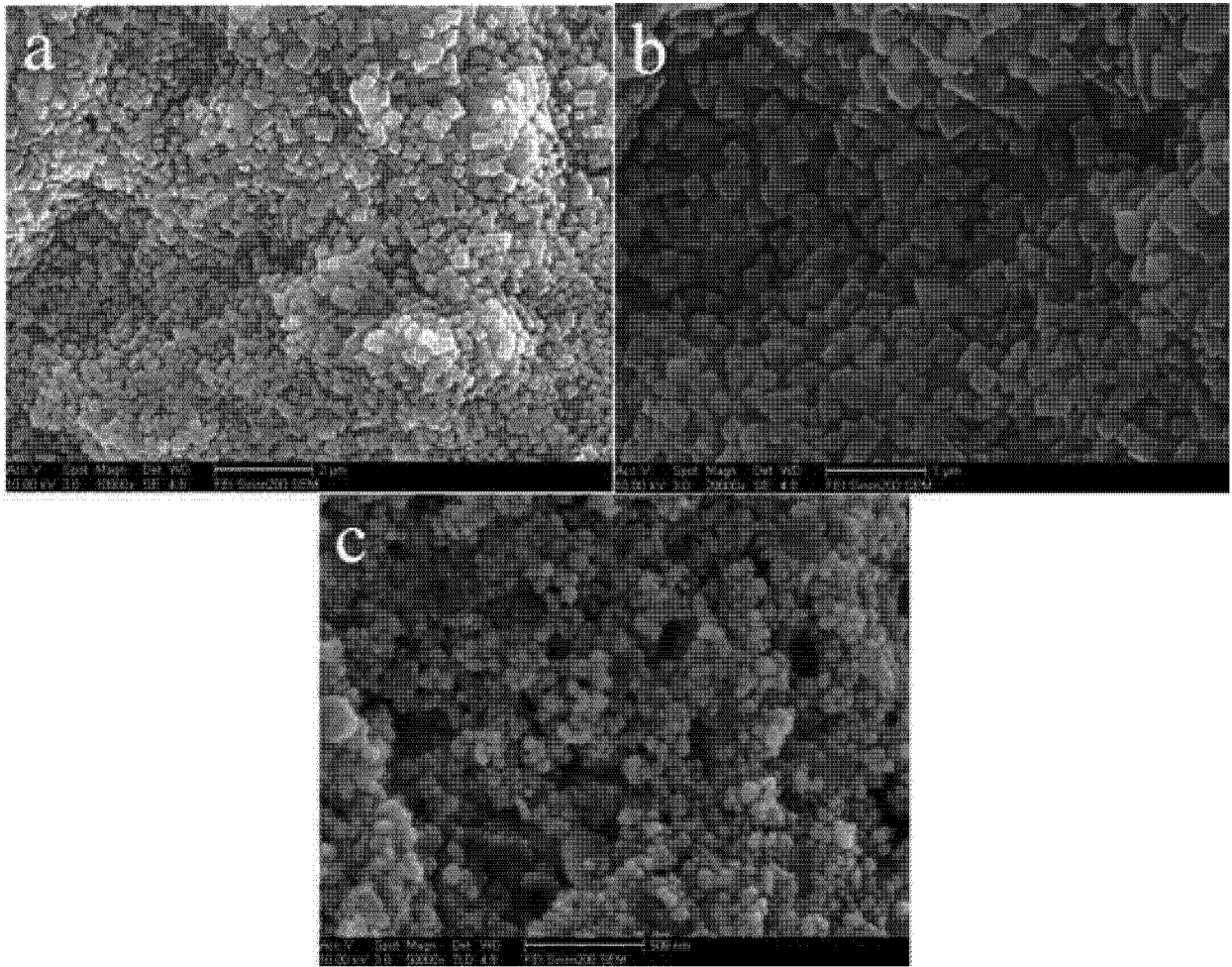


图 3

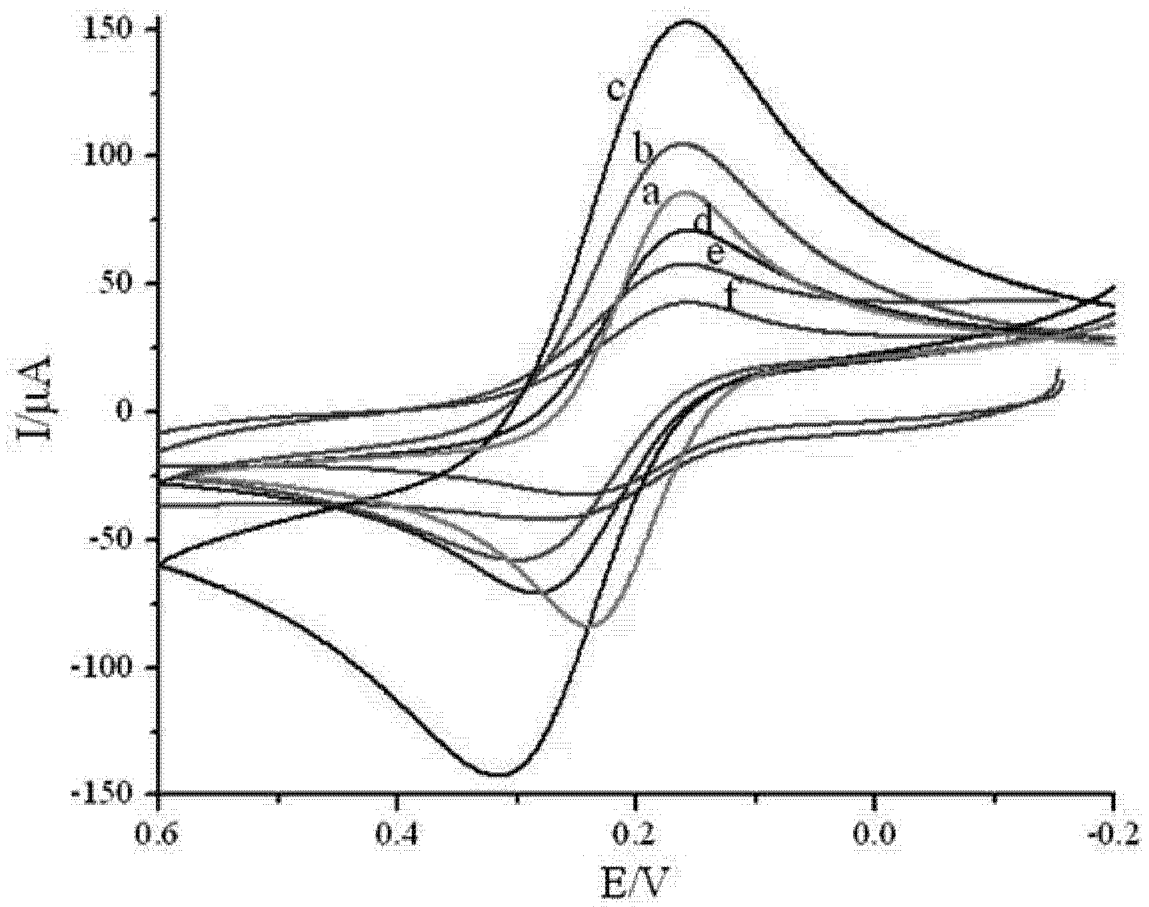


图 4

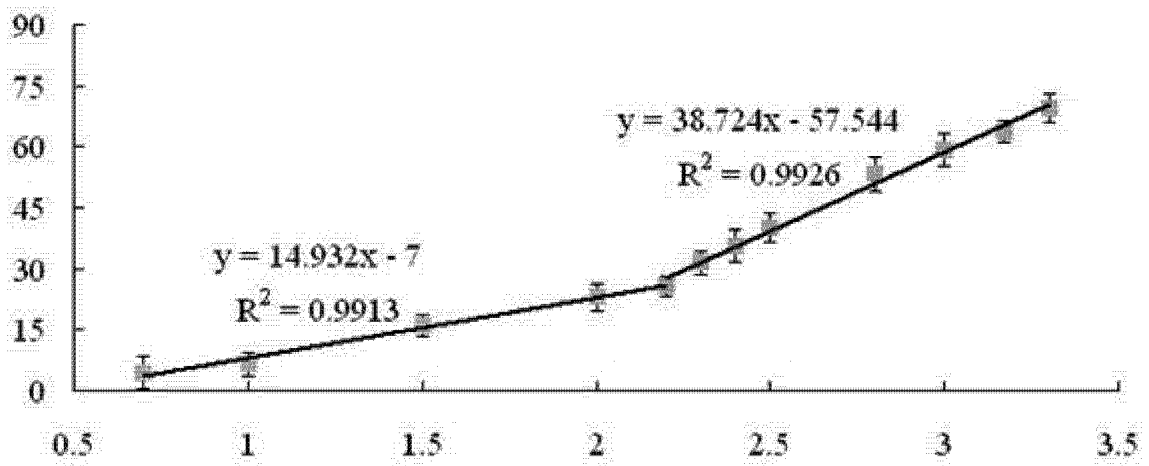


图 5

专利名称(译)	一种检测毒死蜱的免疫传感器的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103941008A</a>	公开(公告)日	2014-07-23
申请号	CN201410142965.4	申请日	2014-04-10
[标]申请(专利权)人(译)	山东理工大学		
申请(专利权)人(译)	山东理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东理工大学		
[标]发明人	郭业民 乔璐 孙霞 王相友 刘君峰		
发明人	郭业民 乔璐 孙霞 王相友 刘君峰		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/54366 G01N33/5438 G01N33/54393 G01N2430/10 G01N2430/20		
其他公开文献	CN103941008B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测毒死蜱的免疫传感器的制备方法，属于生物传感器制备技术领域。本发明是在经过清洗、活化和性能测试的裸玻碳电极表面滴涂镍铝水滑石-石墨烯复合液，然后用空壳纳米金进行修饰，再在修饰后的电极上固定毒死蜱单克隆抗体，最后用牛血清蛋白封闭。本发明制备的免疫传感器具有灵敏度高，成本低，检测速度快，稳定性好，且样品回收率高的特点。本发明制备的免疫传感器的检测限可达0.052ng/L，线性范围为5ng/mL-2μg/mL，回收率可达82.0%-118.0%，适用于果蔬中毒死蜱残留量的快速检测。

