



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107247136 A

(43)申请公布日 2017.10.13

(21)申请号 201710690158.X

(22)申请日 2017.08.14

(71)申请人 天津科技大学

地址 300222 天津市河西区大沽南路1038
号

(72)发明人 刘冰 李敏 方国臻 潘明飞
生威 王硕

(74)专利代理机构 天津合志慧知识产权代理事
务所(普通合伙) 12219

代理人 陈松

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 27/48(2006.01)

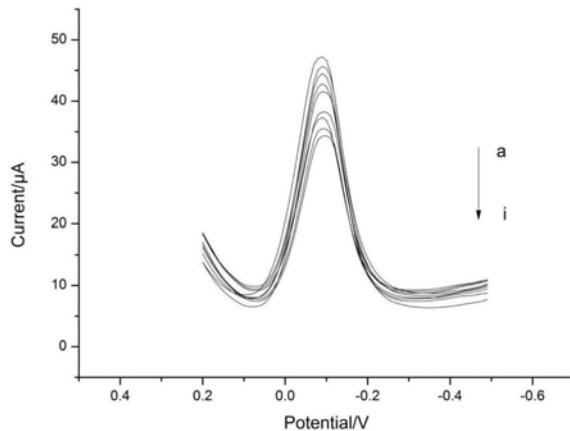
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种诺氟沙星电化学免疫传感器的制备方
法

(57)摘要

本发明公开了一种诺氟沙星电化学免疫传
感器的制备方法,通过差分脉冲方法进行检测,
线性范围为 $1 \mu\text{g L}^{-1} \sim 10\text{mg L}^{-1}$ 。本方法基于抗
原抗体特异性结合的原理,通过化学键的作用将
抗体固定在电极表面,之后滴加辣根过氧化物酶
标记的抗原和目标物的混合物,达到吸附平衡后
将电极浸入含苯酚、双氧水的PBS溶液中用差分
脉冲法进行检测。本方法将传统的免疫技术与传
感器技术相结合,为小分子物质诺氟沙星的痕量
检测提供了一种新的快速、便捷、灵敏的检测方
法,克服了原有的检测方法中检测时间长、仪器
昂贵且操作复杂、灵敏度低、特异性差、检测范围
小等技术问题。



1. 一种诺氟沙星电化学免疫传感器的制备方法,所述传感器包含工作电极、参比电极和对电极,所述工作电极的基底电极为玻碳电极,参比电极为饱和甘汞电极,对电极为铂柱电极,其特征在于,制备方法包括如下步骤:

(1) 树状大分子包裹的纳米金的制备

将2mL浓度为 1mmol L^{-1} 的HAuCl₄加入到2mL 4代氨基端PAMAM溶液和2mL甲酸的混合液中,剧烈搅拌2min,溶液由淡黄色变为酒红色,在紫外分光光度计下测得吸收峰在520nm左右,透射电镜可观察到纳米金粒径在5nm以内;

(2) 对氨基苯甲酸修饰电极的自组装

将浓盐酸稀释成 0.01mol L^{-1} 的稀盐酸,准确称取13.7mg对氨基苯甲酸,加入到50mL稀盐酸溶液中,超声加速溶解,氮气除氧2min,即得到 2mmol L^{-1} 的对氨基苯甲酸聚合液,该溶液现配现用,将预先处理干净的玻碳电极插入上述电聚合溶液中,0~1v施加电压,扫速为40mv/s,扫描5圈,即得到表面修饰有一层羧基膜的电极;

(3) 树状大分子包裹的纳米金复合材料的自组装

将10 μL 合成的树状大分子纳米复合材料均匀滴涂在修饰有羧基的电极表面,待其自然晾干,用双蒸水冲洗除去未结合的材料,利用纳米金复合材料表面丰富的氨基与电极表面大量的羧基结合,使纳米材料牢固的结合在电极表面;

(4) 抗体的自组装

将连有树状大分子纳米金复合材料的电极表面滴涂上10 μL 纯化好的浓度为 $50\mu\text{g mL}^{-1}$ 的诺氟沙星的抗体,连接好抗体之后,用10 μL 浓度为1%的BSA封闭电极表面未结合位点30min,冲掉多余的溶液,将修饰好的电极备用。

2. 权利要求1所述制备方法制备的分子印迹电化学发光传感材料,其特征在于,用于食品中诺氟沙星的检测。

一种诺氟沙星电化学免疫传感器的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于分子检测技术领域,具体涉及一种诺氟沙星电化学免疫传感器的制备方法。

背景技术

[0002] 诺氟沙星为第三代喹诺酮类抗菌药,会阻碍消化道内致病细菌的DNA旋转酶(DNA Gyrase)的作用,阻碍细菌DNA复制,对细菌有抑制作用,是治疗肠炎痢疾的常用药。但此药对未成年人骨骼形成有延缓作用,会影响到发育。

[0003] 电化学免疫传感器将电化学检测技术和免疫检测技术相结合,来监测免疫分析过程。它是以抗原抗体的特异性反应为基础,可以用来进行特异性定量或者半定量的集成器件,抗原或者抗体作为分子的识别性原件和电化学的传感性元件直接接触,然后通过传感性元件把待测的物质的浓度信号转变成响应的电信号。其能特异性识别目标物,增加了检测结果的准确性。

发明内容

[0004] 本发明在于树状大分子包裹的纳米金复合材料在增强电信号的同时利用表面大量的氨基来固定更多的抗体,从而增加检测方法的灵敏度及扩大检测范围。通过辣根过氧化物酶标记抗原与目标物竞争抗体来实现电信号的变化,从而达到对目标物的定量检测。

[0005] 原理:在固定了辣根过氧化物酶标记诺氟沙星的抗原的浓度、体积以及目标物的体积之后,通过改变目标物的浓度来形成抗原与酶标抗原之间的竞争关系,实现对目标物的定量检测。随着目标物浓度的增大,与抗体结合的酶标抗原的量会相应减少,从而催化双氧水的能力减弱,产生的电信号会有所降低。

[0006] 这种电化学免疫传感器的制备方法具体步骤为:

[0007] (1) 树状大分子包裹的纳米金的制备

[0008] 将2mL浓度为 1mmol L^{-1} 的HAuCl₄加入到2mL 4代氨基端PAMAM溶液和2mL甲酸的混合液中,剧烈搅拌2min,溶液由淡黄色变为酒红色,在紫外分光光度计下测得吸收峰在520nm左右,透射电镜可观察到纳米金粒径在5nm以内。

[0009] 树状大分子分为半代和整代,0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4代等,代数越大表面带有的基团越多。还分为氨基端和羧基端的,本方法中为了更好的与抗体的羧基端相连,选取了4代氨基端的树状大分子。4代大分子为球形结构,内部有空腔,内径在5nm左右,氯金酸进入其空腔后在还原剂的作用下形成小于5nm的树状大分子包裹的纳米金。

[0010] (2) 对氨基苯甲酸修饰电极的自组装

[0011] 将浓盐酸稀释成 0.01mol L^{-1} 的稀盐酸,准确称取13.7mg对氨基苯甲酸,加入到50mL稀盐酸溶液中,超声加速溶解,氮气除氧2min,即得到 2mmol L^{-1} 的对氨基苯甲酸聚合液,该溶液现配先用。将预先处理干净的玻碳电极插入上述电聚合溶液中,0~1V施加电压,扫速为40mv/s,扫描5圈,即得到表面修饰有一层羧基膜的电极。

[0012] (3) 树状大分子包裹的纳米金复合材料的自组装

[0013] 将10 μ L合成的树状大分子纳米复合材料均匀滴涂在修饰有羧基的电极表面,待其自然晾干,用双蒸水冲洗除去未结合的材料。利用纳米金复合材料表面丰富的氨基与电极表面大量的羧基结合,使纳米材料牢固的结合在电极表面。

[0014] (4) 抗体的自组装

[0015] 将连有树状大分子纳米金复合材料的电极表面滴涂上10 μ L纯化好的浓度为50 μ g mL⁻¹的诺氟沙星的抗体,纳米复合材料表面丰富的氨基可以连接更多的抗体。连接好抗体之后,用10 μ L浓度为1%的BSA封闭电极表面未结合位点30min,冲掉多余的溶液,将修饰好的电极备用。

[0016] (5) 检测方法:

[0017] 将稀释1000倍的辣根过氧化物酶标记的诺氟沙星抗原分别与不同浓度的目标物诺氟沙星标准液等体积混合,取10 μ L混合液,均匀滴涂在制备好的电极表面,待电极表面的抗体与抗原吸附50min,达到吸附平衡状态,此时,抗原与抗体的结合量达到最大值,用PBS冲洗未结合的溶液。之后,将修饰有辣根过氧化物酶标记的诺氟沙星抗原与目标物的电极放在3mL含双氧水和苯酚的pH为7.4的PBS溶液中进行差分脉冲检测,电位范围为-0.5~0.3v。

[0018] 本发明分别在10、25、50、100 μ g mL⁻¹的抗体浓度与酶标抗原稀释500、1000、1500、2000倍的条件下进行4×4试验,最后得到在抗体浓度为50 μ g mL⁻¹,酶标抗原稀释1000倍时结果最佳。

[0019] (6) 诺氟沙星含量的测定

[0020] 根据辣根过氧化物酶标记的抗原与目标物对抗体的竞争作用,来实现目标物的定量检测。随着目标物浓度的增加,与抗体结合的酶标抗原就会减少,连接在电极表面的辣根过氧化物酶就会减少,其对苯酚-双氧水体系的催化能力会降低,从而呈现出来的电信号有所降低。所以,随着目标物浓度的增加,响应的电流值会降低。差分脉冲的响应值与诺氟沙星的浓度在1 μ g L⁻¹~10mg L⁻¹之间呈良好的线性关系:y=-3.33442x+47.84746,斜率为-3.33442,相关系数R²为0.99237,最低检出限为0.3837 μ g L⁻¹。

[0021] 本发明优点是:本发明采用的树状大分子包裹的纳米金复合材料不但能增强电信号还能利用表面丰富的氨基连接更多的诺氟沙星抗体,采用苯酚-双氧水体系,通过诺氟沙星酶标抗原与目标物对抗体的竞争反应,来产生不同的电信号,从而更准确的对小分子目标物的定量检测。该方法克服了其他原有方法检测时间长、仪器昂贵且操作复杂、灵敏度低、特异性差、检测范围小等技术问题。

附图说明

[0022] 图1本发明的实施例诺氟沙星浓度与相应差分脉冲电流值的关系图。

具体实施方式

[0023] 实施例1

[0024] (1) 树状大分子包裹的纳米金的制备

[0025] 将2mL浓度为1mmol L⁻¹的HAuCl₄加入到2mL 4代氨基端PAMAM溶液和2mL甲酸的混

合液中,剧烈搅拌2min,溶液由淡黄色变为酒红色,在紫外分光光度计下测得吸收峰在520nm左右,透射电镜可观察到纳米金粒径在5nm以内。

[0026] (2) 对氨基苯基酸修饰电极的自组装

[0027] 将浓盐酸稀释成 0.01mol L^{-1} 的稀盐酸,准确称取13.7mg对氨基苯甲酸,加入到50mL稀盐酸溶液中,超声加速溶解,氮气除氧2min,即得到 2mmol L^{-1} 的对氨基苯甲酸聚合液,该溶液现配先用。将预先处理干净的玻碳电极插入上述电聚合溶液中,0~1v施加电压,扫速为40mv/s,扫描5圈,即得到表面修饰有一层羧基膜的电极。

[0028] (3) 树状大分子包裹的纳米金复合材料的自组装

[0029] 将 $10\mu\text{L}$ 合成的树状大分子纳米复合材料均匀滴涂在修饰有羧基的电极表面,待其自然晾干,用双蒸水冲洗除去未结合的材料。利用纳米金复合材料表面丰富的氨基与电极表面大量的羧基结合,使纳米材料牢固的结合在电极表面。

[0030] (4) 抗体的自组装

[0031] 将连有树状大分子纳米金复合材料的电极表面滴涂上 $10\mu\text{L}$ 纯化好的浓度为 $50\mu\text{g mL}^{-1}$ 的诺氟沙星的抗体,纳米复合材料表面丰富的氨基可以连接更多的抗体。连接好抗体之后,用 $10\mu\text{L}$ 浓度为1%的BSA封闭电极表面未结合位点30min,冲掉多余的溶液,将修饰好的电极备用。

[0032] (5) 检测方法:

[0033] 将稀释1000倍的辣根过氧化物酶标记的诺氟沙星抗原分别与不同浓度的目标物诺氟沙星标准液等体积混合,取 $10\mu\text{L}$ 混合液,均匀滴涂在制备好的电极表面,待电极表面的抗体与抗原吸附50min,达到吸附平衡状态,此时,抗原与抗体的结合量达到最大值,用PBS冲洗未结合的溶液。之后,将修饰有辣根过氧化物酶标记的诺氟沙星抗原与目标物的电极放在3mL含双氧水和苯酚的pH为7.4的PBS溶液中进行差分脉冲检测,电位范围为-0.5~0.3v。

[0034] (6) 诺氟沙星含量的测定

[0035] 根据辣根过氧化物酶标记的抗原与目标物对抗体的竞争作用,来实现目标物的定量检测。随着目标物浓度的增加,与抗体结合的酶标抗原就会减少,连接在电极表面的辣根过氧化物酶就会减少,其对苯酚-双氧水体系的催化能力会降低,从而呈现出来的电信号有所降低。所以,随着目标物浓度的增加,响应的电流值会降低。差分脉冲的响应值与诺氟沙星的浓度在 $1\mu\text{g L}^{-1}$ ~ 10mg L^{-1} 之间呈良好的线性关系: $y = -3.33442x + 47.84746$,斜率为-3.33442,相关系数 R^2 为0.99237,最低检出限为 $0.3837\mu\text{g L}^{-1}$ 。

[0036] 实施例2

[0037] 实际样品中诺氟沙星含量的测定:

[0038] 利用本发明的纳米金复合材料修饰的工作电极对实际样品(牛奶、鸡蛋、猪肉)中的诺氟沙星进行了分析测定,检出一定含量的诺氟沙星,采用标准加入法进行加标回收实验。选用LK2006型电化学工作站系统中的循环伏安法和差分脉冲法进行检测,循环伏安法扫描电压为0.6~-0.2v,差分脉冲法的扫描范围为0.3~-0.5v。读取电流响应值,带入 $y = -3.33442x + 47.84746$,计算出 C_{nor} 。平行测定三次,得到回收率为91.6~106.1%,说明利用本发明的制备方法得到的树状大分子包裹的纳米金复合材料所构建的电化学免疫传感器具有较高的准确度。

[0039] 以上所述仅为本发明创造的较佳实施例而已，并不用以限制本发明创造，凡在本发明创造的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明创造的保护范围之内。

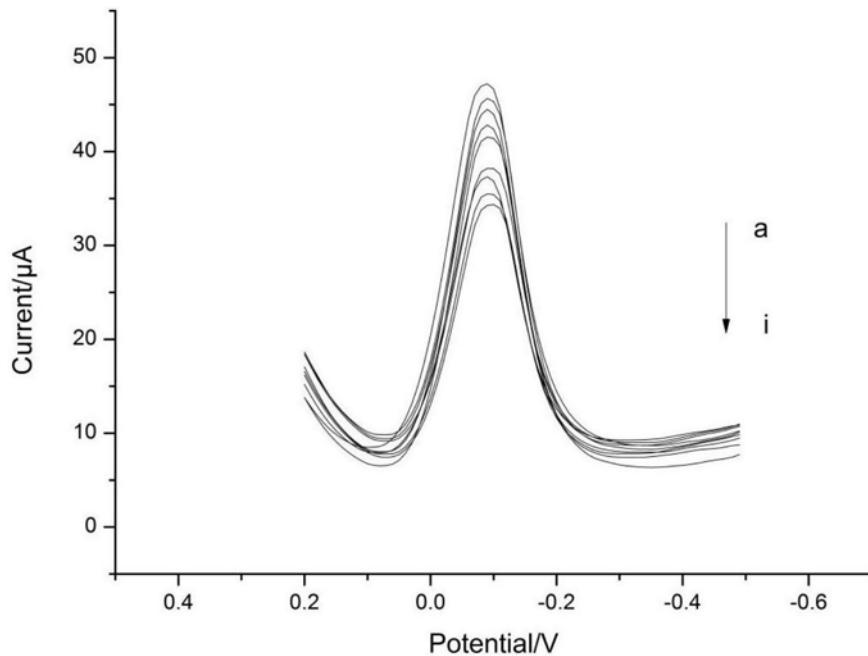


图1

专利名称(译)	一种诺氟沙星电化学免疫传感器的制备方法		
公开(公告)号	CN107247136A	公开(公告)日	2017-10-13
申请号	CN201710690158.X	申请日	2017-08-14
[标]申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津科技大学		
[标]发明人	刘冰 李敏 方国臻 潘明飞 生威 王硕		
发明人	刘冰 李敏 方国臻 潘明飞 生威 王硕		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/48		
CPC分类号	G01N33/53 G01N27/48		
代理人(译)	陈松		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种诺氟沙星电化学免疫传感器的制备方法，通过差分脉冲方法进行检测，线性范围为 $1\mu\text{g L}^{-1}$ ~ 10mg L^{-1} 。本方法基于抗原抗体特异性结合的原理，通过化学键的作用将抗体固定在电极表面，之后滴加辣根过氧化物酶标记的抗原和目标物的混合物，达到吸附平衡后将电极浸入含苯酚、双氧水的PBS溶液中用差分脉冲法进行检测。本方法将传统的免疫技术与传感器技术相结合，为小分子物质诺氟沙星的痕量检测提供了一种新的快速、便捷、灵敏的检测方法，克服了原有的检测方法中检测时间长、仪器昂贵且操作复杂、灵敏度低、特异性差、检测范围小等技术问题。

