



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104297464 B

(45) 授权公告日 2016.04.20

(21) 申请号 201410451338.9

(22) 申请日 2014.09.06

(73) 专利权人 济南大学

地址 250022 山东省济南市济微路 106 号

(72) 发明人 魏琴 黎荣霞 杜斌 马洪敏

吴丹 胡丽华

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

(56) 对比文件

CN 103048314 A, 2013.04.17,

CN 102072954 A, 2011.05.25,

Qiang Ling 等. Simple synthesis of layered CeO₂-graphene hybrid and their superior catalytic performance in dehydrogenation of ethylbenzene.. 《Applied Surface Science》. 2013, 第 274 卷

Wei-Wei Zhao 等. In Situ enzymatic ascorbic acid production as electron donor for CdS quantum dots equipped TiO₂ nanotubes: a general and efficient approach

for new photoelectrochemical immunoassay.. 《Anal. Chem.》. 2012, 第 84 卷

Meihe Zhang 等. Cerium oxide-graphene as the matrix for cholesterol sensor.. 《Anal. Biochem.》. 2013, 第 436 卷

Li-Na Feng 等. Synthesis of Cd²⁺-functionalized titanium phosphate nanoparticles and application as labels for electrochemical immunoassays.. 《Chem. Commun.》. 2012, 第 48 卷

Yafeng Wu 等. Highly specific and ultrasensitive graphene-enhanced electrochemical detection of low-abundance tumor cells using silica nanoparticles coated with antibody-conjugated quantum dots.. 《Anal. Chem.》. 2013, 第 85 卷

Lei Wang 等. Electrochemiluminescent TiO₂/CdS nanocomposites for efficient immunosensing of HepG2 cells.. 《J. Mater. Chem. B》. 2013, 第 1 卷

审查员 毕秀华

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种原位生成 CdS 真菌毒素光电化学传感器制备方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及一种原位生成 CdS 真菌毒素光电化学传感器制备方法及应用。该方法具体采用二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯作为抗体捕获基底,其优良的导电性和大的比表面积能有效减小背景信号。利用 Cd²⁺功能化的多孔 TiO₂ 纳米颗粒作为半抗原标记物载体,通过在电极表面直接滴加 Na₂S,原位生成高光电转换率的窄带隙 CdS,通过可见光波长的 LED 灯照射 CdS,产生光电流信号。载体 TiO₂ 与 CdS 能带匹配度良好,能进一步提高 CdS 的光电转换信号,从而制备超灵敏检测玉米赤霉烯酮, α-玉米赤霉醇,黄曲霉毒素 B₁、B₂,赭曲霉毒素 A、B 等多种真菌毒素的竞争型光电化学免疫传感器。

1. 一种原位生成 CdS 真菌毒素光电化学传感器制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 将导电玻璃依次用丙酮、乙醇和超纯水超声清洗, 氮气吹干; 取 6 μL 、2~4 mg/mL 二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯复合纳米材料滴加到导电玻璃的导电面, 室温下晾干, 400~500 $^{\circ}\text{C}$ 煅烧 30~60 min, 冷却, 得到二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯复合纳米材料 GS-CeO₂ 修饰的玻璃电极;

(2) 在 GS-CeO₂ 修饰的玻璃电极表面, 依次滴加 5 μL 0.1~1 $\mu\text{g/mL}$ 的真菌毒素抗体溶液、3 μL 质量分数为 1~3% 的 BSA 溶液、5 μL 真菌毒素混合溶液, 每次滴加后使用超纯水冲洗电极表面, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干, 即制得真菌毒素光电化学传感器;

所述真菌毒素混合溶液, 是由等体积的 TiO₂@Cd²⁺-Ag 真菌毒素标记物溶液分别与不同浓度待测的真菌毒素溶液混合制得;

(3) 在步骤(2)所制备的光电化学传感器电极表面, 滴加 5 μL 、0.7 mol/L 的 Na₂S 溶液, 放置 30~80 min;

(4) 利用竞争型原位生长 CdS 敏化 TiO₂ 的方法用于环境雌激素的检测, 检测步骤如下:

1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 所制备的光电化学传感器电极为工作电极, 在 10 mL、pH 7.0~7.5 的含 0.1 mol/L 抗坏血酸的 PBS 缓冲溶液中进行测试;

2) 用时间-电流法对真菌毒素标准溶液进行检测, 设置电压为 0.1 V, 运行时间 100 s, 照射 LED 灯波长为 400~450 nm;

3) 当背景电流趋于稳定后, 每隔 20 s 开灯持续照射 10 s, 然后记录光电流, 绘制工作曲线;

4) 将待测的真菌毒素样品溶液代替真菌毒素标准溶液进行检测;

5) 所述真菌毒素选自下列之一: 玉米赤霉烯酮, α -玉米赤霉醇, 黄曲霉毒素 B₁, 黄曲霉毒素 B₂, 赭曲霉毒素 A, 赭曲霉毒素 B。

一种原位生成 CdS 真菌毒素光电化学传感器制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种原位生成 CdS 真菌毒素光电化学传感器制备方法及应用,具体涉及一种原位生成 CdS 的竞争型真菌毒素光电化学传感器的制备方法及应用,属于新型功能材料与食品安全检测技术领域。

背景技术

[0002] 近年来,食品污染日趋严重和频繁,不仅造成巨额的经济损失,还会严重影响人类的身体健康。真菌毒素是其中的一类主要的食品污染物,它是一种由霉菌或真菌产生的次生代谢物,由于分布广泛,很容易污染农作物,通过污染的粮食或饲料以及该饲料喂养的动物等进入食物链,间接地进入人体内,最终造成神经和内分泌紊乱、免疫抑制、肝肾损伤、繁殖障碍、致癌致畸致突变等严重后果。

[0003] 监测是保证食品安全的重要环节,建立一种快速、简便、灵敏的检测方法十分重要。目前国内外对真菌毒素污染物的分析方法主要包括生物鉴定法、化学分析法、高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用技术和酶联免疫分析法等。但是,这些检测方法多数存在靶标物单一、样品前处理复杂、操作繁琐、所需样品用量大、耗时长等缺点,不能很好地满足定量分析的需求。因此,为了解决上述方法的不足之处,本发明提供了一种简单准确、快速、灵敏度和选择性高的光电化学免疫分析方法。

[0004] 光电化学传感器是基于物质的光电转换特性来确定待测物浓度的一类检测装置。光电化学检测方法具有灵敏度高、设备简单、易于微型化的特点,已经成为一种极具应用潜力的分析方法,在食品、环境、医药等领域具有广阔的应用前景。

[0005] 本发明采用二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯作为抗体捕获基底,其优良的导电性和大的比表面积能有效减小背景信号。利用 Cd^{2+} 功能化的多孔 TiO_2 纳米颗粒标记真菌毒素,通过在电极表面直接滴加 Na_2S ,原位生成高光电转换率的窄带隙 CdS。本发明制备的基于原位生成 CdS 的竞争型光电化学传感器,具有低成本、高灵敏、特异性好、快速检测等优点,且制备过程简单,在可见光区域实现了对多种真菌毒素的快速、灵敏检测,有效克服了目前真菌毒素检测方法的不足。

发明内容

[0006] 本发明的目的之一是利用导电性好、比表面积大的二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯作为抗体捕获基底,制备了一种灵敏度高、特异性强、检测速度快的传感器。

[0007] 本发明的目的之二是通过原位生成的窄带隙 CdS 与真菌毒素载体 TiO_2 之间的能带匹配,实现了可见光区域对多种真菌毒素超灵敏检测目的。

[0008] 本发明的技术方案如下:

[0009] 1. 一种原位生成 CdS 真菌毒素光电化学传感器制备方法及应用,其特征在于,包括以下步骤:

[0010] (1) 将导电玻璃依次用丙酮、乙醇和超纯水超声清洗, 氮气吹干; 取 6 μL 、2~4 mg/mL 二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯复合纳米材料滴加到导电玻璃的导电面, 室温下晾干, 400~500 $^{\circ}\text{C}$ 煅烧 30~60 min, 冷却, 得到二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯复合纳米材料 GS-CeO₂ 修饰的玻璃电极;

[0011] (2) 在 GS-CeO₂ 修饰的玻璃电极表面, 滴加 5 μL 、0.1~1 $\mu\text{g/mL}$ 的真菌毒素抗体溶液, 超纯水冲洗电极表面, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;

[0012] (3) 继续滴加 3 μL 、质量分数为 1~3% 的 BSA 溶液, 封闭电极表面上非特异性活性位点, 超纯水冲洗电极表面, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;

[0013] (4) 继续滴加 5 μL 真菌毒素混合溶液, 超纯水冲洗电极表面, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干, 制得了真菌毒素光电化学传感器。

[0014] 所述真菌毒素混合溶液, 是由等体积的 TiO₂@Cd²⁺-Ag 真菌毒素标记物溶液分别与不同浓度待测的真菌毒素溶液混合制得;

[0015] 所述不同浓度待测的真菌毒素溶液, 其浓度为 0.1 pg/mL~10 ng/mL。

[0016] 2. 二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯复合纳米材料的制备

[0017] 所述二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯复合纳米材料, 其特征在于, 制备步骤如下: 配制 1 mg/mL 的氧化石墨烯水溶液, 超声 5~10 h, 取 20~50 mL 与硝酸铈溶液混合搅拌 5 min, 转移至高压釜中, 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热反应 20~30 h, 离心洗涤, 50 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥, 制得粉末材料, 置于马弗炉中 400 $^{\circ}\text{C}$ 煅烧 2~4 h, 得到 GS/CeO₂ 复合纳米材料;

[0018] 所述硝酸铈溶液是由 0.2 g 六水合硝酸铈、8 mL 超纯水和 20 μL 、2 mol/L 的氢氧化钠溶液混合而成

[0019] 3. TiO₂@Cd²⁺-Ag 真菌毒素标记物溶液的制备

[0020] (1) TiO₂ 的制备

[0021] 钛酸四丁酯与乙二醇以体积比 1:15~30 混合, 搅拌 6~10 h, 向 50 mL 混合液中加入 150~200 mL 丙酮, 搅拌 0.5~2 h, 在乙醇中离心洗涤 3 次, 加入 10~30 mL 水, 100 $^{\circ}\text{C}$ 回流搅拌 1~3 h, 离心水洗 3 次, 50 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥, 在马弗炉中 400 $^{\circ}\text{C}$ 煅烧 2~4 h, 制得 TiO₂;

[0022] (2) TiO₂@Cd²⁺ 溶液的制备

[0023] 取 1 mL、20 mg/mL 的 TiO₂ 水溶液, 加入 10 mM Cd(NO₃)₂·4H₂O 水溶液共混, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡 4~24 h, 离心洗涤, 制得的 TiO₂@Cd²⁺; 将其分散于水中, 配制成 10 mg/mL 的 TiO₂@Cd²⁺ 溶液;

[0024] (3) TiO₂@Cd²⁺-Ag 真菌毒素标记物溶液的制备

[0025] 取 10 mL、10 mg/mL 的 TiO₂@Cd²⁺ 溶液与 1 mL、体积分数为 2.5~5% 的戊二醛水溶液, 振荡 1~3 h, 加入 100~500 μL 、10 $\mu\text{g/mL}$ 真菌毒素抗原, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中振荡孵化 20 h, 离心, 用 pH 为 7.4 的 PBS 洗涤, 分散在 1 mL pH 为 7.4 的 PBS 中, 制得 TiO₂@Cd²⁺-Ag 真菌毒素标记物溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

[0026] 4. 如上所述的制备的一种原位生成 CdS 真菌毒素光电化学传感器, 用于真菌毒素的检测, 步骤如下:

[0027] (1) 在所制备的光电化学传感器电极表面, 滴加 5 μL 、0.7 mol/L 的 Na₂S 溶液, 放置 30~80 min;

[0028] (2) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝

电极为辅助电极,所制备的光电化学传感器电极为工作电极,在 10 mL、pH 7.0~7.5 的含 0.1mol/L 抗坏血酸的 PBS 缓冲溶液中进行测试;

[0029] (3)用时间-电流法对分析物标准溶液进行检测,设置电压为 0.1 V,运行时间 100 s,照射 LED 灯波长为 400~450 nm;

[0030] (4)当背景电流趋于稳定后,每隔 20 s 开灯持续照射 10 s,然后记录光电流,绘制工作曲线;

[0031] (5)将待测的真菌毒素样品溶液代替真菌毒素标准溶液进行检测。

[0032] 5. 如权利要求 1 所述的一种 CdS 敏化 TiO₂ 光电化学传感器制备方法,其特征在于,所述真菌毒素选自下列之一:玉米赤霉烯酮,α-玉米赤霉醇,黄曲霉毒素 B₁,黄曲霉毒素 B₂,赭曲霉毒素 A,赭曲霉毒素 B。

[0033] 本发明的有益成果

[0034] (1)利用导电性好、比表面积大的二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯作为抗体捕获基底,有效降低背景信号 2 倍,显著提高了检测的灵敏度。

[0035] (2)利用 Cd²⁺ 功能化的 TiO₂ 纳米颗粒作为真菌毒素标记物,采用在电极表面直接滴加 Na₂S 原位生成窄带隙的 CdS 半导体纳米材料,原料低廉、方法简单,使电极修饰更加均匀,并缩短了传感器的制作时间。

[0036] (3)电极表面原位生成的 CdS 与作为真菌毒素载体的 TiO₂ 具有良好的能带匹配,有效的提高了 CdS 的光电转换效率,使制得的传感器实现了对真菌毒素的超灵敏检测。

[0037] (5)本发明利用抗原、抗体的免疫反应,提高了检测方法的特异性。

[0038] (6)本发明制备的竞争型光电化学免疫传感器,用于多种真菌毒素的检测,响应时间短,检测限低,线性范围宽,可以实现简单、快速、高灵敏和特异性检测。

具体实施方式

[0039] 实施例 1 一种原位生成 CdS 真菌毒素光电化学传感器制备方法及应用

[0040] (1)将导电玻璃依次用丙酮、乙醇和超纯水超声清洗,氮气吹干;取 6 μL、2 mg/mL 二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯复合纳米材料滴加到导电玻璃的导电面,室温下晾干,400℃煅烧 30min,冷却,得到二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯复合纳米材料 GS-CeO₂ 修饰的玻璃电极;

[0041] (2)在 GS-CeO₂ 修饰的玻璃电极表面,滴加 5 μL、0.1 μg/mL 的真菌毒素抗体溶液,超纯水冲洗电极表面,4℃冰箱中晾干;

[0042] (3)继续滴加 3 μL、质量分数为 1% 的 BSA 溶液,封闭电极表面上非特异性活性位点,超纯水冲洗电极表面,4℃冰箱中晾干;

[0043] (4)继续滴加 5 μL 真菌毒素混合溶液,超纯水冲洗电极表面,4℃冰箱中晾干,制得了真菌毒素光电化学传感器。

[0044] 所述真菌毒素混合溶液,是由等体积的 TiO₂@Cd²⁺-Ag 真菌毒素标记物溶液分别与不同浓度待测的真菌毒素溶液混合制得;

[0045] 所述不同浓度待测的真菌毒素溶液,其浓度为 0.1 pg/mL~10 ng/mL。

[0046] 实施例 2 一种原位生成 CdS 真菌毒素光电化学传感器制备方法及应用

[0047] (1)将导电玻璃依次用丙酮、乙醇和超纯水超声清洗,氮气吹干;取 6 μL、3 mg/

mL 二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯复合纳米材料滴加到导电玻璃的导电面, 室温下晾干, 450℃煅烧 45 min, 冷却, 得到二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯复合纳米材料 GS-CeO₂ 修饰的玻璃电极;

[0048] (2) 在 GS-CeO₂ 修饰的玻璃电极表面, 滴加 5 μL、0.5 μg/mL 的真菌毒素抗体溶液, 超纯水冲洗电极表面, 4℃冰箱中晾干;

[0049] (3) 继续滴加 3 μL、质量分数为 2% 的 BSA 溶液, 封闭电极表面上非特异性活性位点, 超纯水冲洗电极表面, 4℃冰箱中晾干;

[0050] (4) 继续滴加 5 μL 真菌毒素混合溶液, 超纯水冲洗电极表面, 4℃冰箱中晾干, 制得了真菌毒素光电化学传感器。

[0051] 所述真菌毒素混合溶液, 是由等体积的 TiO₂@Cd²⁺-Ag 真菌毒素标记物溶液分别与不同浓度待测的真菌毒素溶液混合制得;

[0052] 所述不同浓度待测的真菌毒素溶液, 其浓度为 0.1 pg/mL~10 ng/mL。

[0053] 实施例 3 一种原位生成 CdS 真菌毒素光电化学传感器制备方法及应用

[0054] (1) 将导电玻璃依次用丙酮、乙醇和超纯水超声清洗, 氮气吹干; 取 6 μL、4mg/mL 二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯复合纳米材料滴加到导电玻璃的导电面, 室温下晾干, 500℃煅烧 60min, 冷却, 得到二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯复合纳米材料 GS-CeO₂ 修饰的玻璃电极;

[0055] (2) 在 GS-CeO₂ 修饰的玻璃电极表面, 滴加 5 μL、1 μg/mL 的真菌毒素抗体溶液, 超纯水冲洗电极表面, 4℃冰箱中晾干;

[0056] (3) 继续滴加 3 μL、质量分数为 3% 的 BSA 溶液, 封闭电极表面上非特异性活性位点, 超纯水冲洗电极表面, 4℃冰箱中晾干;

[0057] (4) 继续滴加 5 μL 真菌毒素混合溶液, 超纯水冲洗电极表面, 4℃冰箱中晾干, 制得了真菌毒素光电化学传感器。

[0058] 所述真菌毒素混合溶液, 是由等体积的 TiO₂@Cd²⁺-Ag 真菌毒素标记物溶液分别与不同浓度待测的真菌毒素溶液混合制得;

[0059] 所述不同浓度待测的真菌毒素溶液, 其浓度为 0.1 pg/mL~10 ng/mL。

[0060] 实施例 4 二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯复合纳米材料的制备

[0061] 配制 1 mg/mL 的氧化石墨烯水溶液, 超声 5 h, 取 20 mL 与硝酸铈溶液混合搅拌 5 min, 转移至高压釜中, 100℃加热反应 20 h, 离心洗涤, 50℃真空干燥, 制得粉末材料, 置于马弗炉中 400℃煅烧 2 h, 得到 GS/CeO₂ 复合纳米材料;

[0062] 所述硝酸铈溶液是由 0.2 g 六水合硝酸铈、8 mL 超纯水和 20 μL、2 mol/L 的氢氧化钠溶液混合而成。

[0063] 实施例 5 二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯复合纳米材料的制备

[0064] 配制 1 mg/mL 的氧化石墨烯水溶液, 超声 8 h, 取 30 mL 与硝酸铈溶液混合搅拌 5 min, 转移至高压釜中, 100℃加热反应 25 h, 离心洗涤, 50℃真空干燥, 制得粉末材料, 置于马弗炉中 400℃煅烧 3 h, 得到 GS/CeO₂ 复合纳米材料;

[0065] 所述硝酸铈溶液是由 0.2 g 六水合硝酸铈、8 mL 超纯水和 20 μL、2 mol/L 的氢氧化钠溶液混合而成。

[0066] 实施例 6 二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯复合纳米材料的制备

[0067] 配制 1 mg/mL 的氧化石墨烯水溶液, 超声 10 h, 取 50 mL 与硝酸铈溶液混合搅拌 5 min, 转移至高压釜中, 100℃ 加热反应 30 h, 离心洗涤, 50℃ 真空干燥, 制得粉末材料, 置于马弗炉中 400℃ 煅烧 4 h, 得到 GS/CeO₂ 复合纳米材料;

[0068] 所述硝酸铈溶液是由 0.2 g 六水合硝酸铈、8 mL 超纯水和 20 μL、2 mol/L 的氢氧化钠溶液混合而成。

[0069] 实施例 7 TiO₂@Cd²⁺-Ag 真菌毒素标记物溶液的制备

[0070] (1) TiO₂ 的制备

[0071] 钛酸四丁酯与乙二醇以体积比 1:15 混合, 搅拌 6 h, 向 50 mL 混合液中加入 150 mL 丙酮, 搅拌 0.5 h, 在乙醇中离心洗涤 3 次, 加入 10 mL 水, 100℃ 回流搅拌 1 h, 离心水洗 3 次, 50℃ 真空干燥, 在马弗炉中 400℃ 煅烧 2 h, 制得 TiO₂;

[0072] (2) TiO₂@Cd²⁺ 溶液的制备

[0073] 取 1 mL、20 mg/mL 的 TiO₂ 水溶液, 加入 10 mM Cd(NO₃)₂ · 4H₂O 水溶液共混, 50℃ 水浴振荡 4 h, 离心洗涤, 制得的 TiO₂@Cd²⁺; 将其分散于水中, 配制成 10 mg/mL 的 TiO₂@Cd²⁺ 溶液;

[0074] (3) TiO₂@Cd²⁺-Ag 真菌毒素标记物溶液的制备

[0075] 取 10 mL、10 mg/mL 的 TiO₂@Cd²⁺ 溶液与 1 mL、体积分数为 2.5% 的戊二醛水溶液, 振荡 1 h, 加入 100 μL、10 μg/mL 真菌毒素抗原, 在 4℃ 冰箱中振荡孵化 20 h, 离心, 用 pH 为 7.4 的 PBS 洗涤, 分散在 1 mL pH 为 7.4 的 PBS 中, 制得 TiO₂@Cd²⁺-Ag 真菌毒素标记物溶液, 4℃ 下保存备用。

[0076] 实施例 8 TiO₂@Cd²⁺-Ag 真菌毒素标记物溶液的制备

[0077] (1) TiO₂ 的制备

[0078] 钛酸四丁酯与乙二醇以体积比 1:20 混合, 搅拌 8 h, 向 50 mL 混合液中加入 170 mL 丙酮, 搅拌 1 h, 在乙醇中离心洗涤 3 次, 加入 20 mL 水, 100℃ 回流搅拌 2 h, 离心水洗 3 次, 50℃ 真空干燥, 在马弗炉中 400℃ 煅烧 3 h, 制得 TiO₂;

[0079] (2) TiO₂@Cd²⁺ 溶液的制备

[0080] 取 1 mL、20 mg/mL 的 TiO₂ 水溶液, 加入 10 mM Cd(NO₃)₂ · 4H₂O 水溶液共混, 50℃ 水浴振荡 18 h, 离心洗涤, 制得的 TiO₂@Cd²⁺; 将其分散于水中, 配制成 10 mg/mL 的 TiO₂@Cd²⁺ 溶液;

[0081] (3) TiO₂@Cd²⁺-Ag 真菌毒素标记物溶液的制备

[0082] 取 10 mL、10 mg/mL 的 TiO₂@Cd²⁺ 溶液与 1 mL、体积分数为 3.5% 的戊二醛水溶液, 振荡 2 h, 加入 300 μL、10 μg/mL 真菌毒素抗原, 在 4℃ 冰箱中振荡孵化 20 h, 离心, 用 pH 为 7.4 的 PBS 洗涤, 分散在 1 mL pH 为 7.4 的 PBS 中, 制得 TiO₂@Cd²⁺-Ag 真菌毒素标记物溶液, 4℃ 下保存备用。

[0083] 实施例 9 TiO₂@Cd²⁺-Ag 真菌毒素标记物溶液的制备

[0084] (1) TiO₂ 的制备

[0085] 钛酸四丁酯与乙二醇以体积比 1:30 混合, 搅拌 10 h, 向 50 mL 混合液中加入 200 mL 丙酮, 搅拌 2 h, 在乙醇中离心洗涤 3 次, 加入 30 mL 水, 100℃ 回流搅拌 3 h, 离心水洗 3 次, 50℃ 真空干燥, 在马弗炉中 400℃ 煅烧 4 h, 制得 TiO₂;

[0086] (2) TiO₂@Cd²⁺ 溶液的制备

[0087] 取 1mL、20 mg/mL 的 TiO_2 水溶液, 加入 10 mL $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 水溶液共混, 50°C 水浴振荡 24 h, 离心洗涤, 制得的 $\text{TiO}_2@\text{Cd}^{2+}$; 将其分散于水中, 配制成 10 mg/mL 的 $\text{TiO}_2@\text{Cd}^{2+}$ 溶液;

[0088] (3) $\text{TiO}_2@\text{Cd}^{2+}$ -Ag 真菌毒素标记物溶液的制备

[0089] 取 10mL、10mg/mL 的 $\text{TiO}_2@\text{Cd}^{2+}$ 溶液与 1 mL、体积分数为 5% 的戊二醛水溶液, 振荡 3 h, 加入 500 μL 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 真菌毒素抗原, 在 4°C 冰箱中振荡孵化 20h, 离心, 用 pH 为 7.4 的 PBS 洗涤, 分散在 1 mL pH 为 7.4 的 PBS 中, 制得 $\text{TiO}_2@\text{Cd}^{2+}$ -Ag 真菌毒素标记物溶液, 4°C 下保存备用。

[0090] 实施例 10 玉米赤霉烯酮的检测

[0091] (1) 在所制备的光电化学传感器电极表面, 滴加 5 μL 、0.7 mol/L 的 Na_2S 溶液, 放置 30~80 min;

[0092] (2) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 所制备的光电化学传感器电极为工作电极, 在 10 mL、pH 7.0~7.5 的含 0.1 mol/L 抗坏血酸的 PBS 缓冲溶液中进行测试;

[0093] (3) 用时间-电流法对分析物标准溶液进行检测, 设置电压为 0.1 V, 运行时间 100 s, 照射 LED 灯波长为 400~450 nm;

[0094] (4) 当背景电流趋于稳定后, 每隔 20 s 开灯持续照射 10 s, 然后记录光电流, 绘制工作曲线;

[0095] (5) 按照绘制工作曲线的方法进行玉米赤霉烯酮样品分析, 测得线性范围为 0.5 pg/mL~10 ng/mL, 检测限为 0.2 pg/mL。

[0096] 实施例 11 α -玉米赤霉醇的检测

[0097] 绘制工作曲线步骤同实施例 10, 按照绘制工作曲线的方法进行 α -玉米赤霉醇样品分析, 测得线性范围为 0.5 pg/mL~8ng/mL, 检测限为 0.15pg/mL。

[0098] 实施例 12 黄曲霉毒素 B_1 的检测

[0099] 绘制工作曲线步骤同实施例 10, 按照绘制工作曲线的方法进行黄曲霉毒素 B_1 样品分析, 测得线性范围为 0.1pg/mL~5ng/mL, 检测限为 0.04pg/mL。

[0100] 实施例 13 黄曲霉毒素 B_2 的检测

[0101] 绘制工作曲线步骤同实施例 10, 按照绘制工作曲线的方法进行黄曲霉毒素 B_2 样品分析, 测得线性范围为 0.1pg/mL~7ng/mL, 检测限为 0.05pg/mL。

[0102] 实施例 14 赭曲霉毒素 A 的检测

[0103] 绘制工作曲线步骤同实施例 10, 按照绘制工作曲线的方法进行赭曲霉毒素 A 样品分析, 测得线性范围为 0.2pg/mL~7ng/mL, 检测限为 0.08pg/mL。

[0104] 实施例 14 赭曲霉毒素 B 的检测

[0105] 绘制工作曲线步骤同实施例 10, 按照绘制工作曲线的方法进行赭曲霉毒素 B 样品分析, 测得线性范围为 0.3pg/mL~7ng/mL, 检测限为 0.1pg/mL。

专利名称(译)	一种原位生成CdS真菌毒素光电化学传感器制备方法及应用		
公开(公告)号	CN104297464B	公开(公告)日	2016-04-20
申请号	CN201410451338.9	申请日	2014-09-06
[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	魏琴 黎荣霞 杜斌 马洪敏 吴丹 胡丽华		
发明人	魏琴 黎荣霞 杜斌 马洪敏 吴丹 胡丽华		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/327		
CPC分类号	G01N27/26 G01N33/53 G01N33/54346 G01N33/5438		
其他公开文献	CN104297464A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种原位生成CdS真菌毒素光电化学传感器制备方法及应用。该方法具体采用二氧化铈掺杂的还原氧化石墨烯作为抗体捕获基底，其优良的导电性和大的比表面积能有效减小背景信号。利用Cd²⁺功能化的多孔TiO₂纳米颗粒作为半抗原标记物载体，通过在电极表面直接滴加Na₂S，原位生成高光电转换率的窄带隙CdS，通过可见光波长的LED灯照射CdS，产生光电流信号。载体TiO₂与CdS能带匹配度良好，能进一步提高CdS的光电转换信号，从而制备超灵敏检测玉米赤霉烯酮， α -玉米赤霉醇，黄曲霉毒素B₁、B₂，赭曲霉毒素A、B等多种真菌毒素的竞争型光电化学免疫传感器。