



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108827946 B

(45) 授权公告日 2021.03.02

(21) 申请号 201810406113.X

(22) 申请日 2018.04.30

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108827946 A

(43) 申请公布日 2018.11.16

(73) 专利权人 福建师范大学

地址 350108 福建省福州市闽侯县上街镇
学园路福建师大旗山校区福建师大科
技处

(72) 发明人 林欢欢 戴宏 郑祥钦 衣欢

郑红利 颜建英 林丹玫 林燕语

房丹丹 王佳妮 陈妍洁 刘楠因

(74) 专利代理机构 福州智理专利代理有限公司

35208

代理人 王义星

(51) Int.Cl.

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 33/536 (2006.01)

审查员 李韦韦

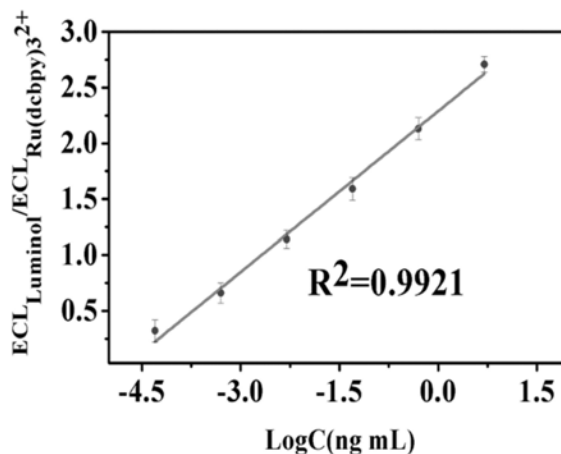
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种共用共反应试剂类型的呕吐毒素比率
型电致化学发光免疫传感器及其检测方法

(57) 摘要

本发明公开一种共用共反应试剂类型的呕吐毒素比率型电致化学发光免疫传感器的制备方法及应用,特点是基于较高孔隙率的表面活性剂辅助合成的 TiO_2 介晶(sas- TiO_2 MCs)及大比表面积的螺旋碳管(HCNTs)纳米材料作为生物传感器平台,分别引入钉联吡啶衍生物和鲁米诺两种信号探针。此外,由于二茂铁甲酸(FCA)具有猝灭钉联吡啶衍生物并同时增强鲁米诺的ECL信号特点,而被选作双功能共反应试剂用于构建一种共用共反应试剂类型的呕吐毒素比率型电致化学发光免疫传感器,该传感器具有灵敏度高、稳定性好、检测限低等优点,可用于呕吐毒素的检测,在临床应用及食品安全监控方面具有较重要的应用价值。



1. 一种共用共反应试剂类型的呕吐毒素比率型电致化学发光免疫传感器的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 玻碳电极(GCE)首先在铺有氧化铝粉末的麂皮上机械打磨抛光, 用二次水洗去表面残留粉末, 再移入超声水浴中清洗, 直至清洗干净, 最后依序用乙醇, 稀酸和水彻底洗涤;

(2) 取80 μL 0.5wt.%全氟磺酸-聚四氟乙烯共聚物(Nafion)溶液与20 μL 10 mg/mL离子液体(IL)混合, 经几分钟震荡之后形成复合物溶液, 将100 μL 2 mg/mL sas-TiO₂MCs溶液加入到上述复合物溶液中, 并在室温下震荡30 min以确保sas-TiO₂ MCs分散均匀, 最终制得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs复合物; 滴加5 μL 上述所得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs复合物悬浮液于干净的玻碳电极表面, 红外灯下烘干, 冷却至室温, 制得Nafion-IL-sas-TiO₂MCs修饰玻碳电极;

(3) 将Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs修饰电极浸入到浓度为 1.0×10^{-3} mol/L的 Ru(dcbpy)₃²⁺溶液中1 h, 后用去离子水洗去物理吸附的Ru(dcbpy)₃²⁺, 制得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs/Ru(dcbpy)₃²⁺修饰玻碳电极;

(4) 滴加5 μL 呕吐毒素抗体(Ab₁)于步骤(3)制备的修饰电极界面, 并置于4°C冰箱中孵育40 min, 用去离子水冲洗电极表面, 制得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs/Ru(dcbpy)₃²⁺/Ab₁修饰玻碳电极; 将上述修饰电极浸入浓度为1.0 wt.%的BSA溶液中孵育30 min, 以封闭电极表面上非特异性活性位点, 用去离子水冲洗电极表面洗去物理吸附, 并保存在4°C冰箱中备用;

(5) 将步骤(4)获得的修饰电极浸入不同浓度的呕吐毒素(DON)标准溶液中并在4°C冰箱中孵育40 min, 用去离子水冲洗电极表面, 制得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs/Ru(dcbpy)₃²⁺/Ab₁/DON修饰玻碳电极, 并保存在4 °C冰箱中备用;

(6) 取20 μL 浓度比为4:1的(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)(EDC)及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)混合液加入到100 μL 5 mg/mL 酸化的螺旋碳管(HCNTs)溶液中, 室温震荡30 min形成混合溶液, 以达到活化羧基的目的; 然后将100 μL 10 mmol/L鲁米诺(luminol)加入到上述混合溶液中, 在室温下混合震荡4 h, 后经洗涤、离心、再分散制得HCNTs-luminol复合物溶液; 同时, 将100 μL 10 mmol/L二茂铁甲酸(FCA)与20 μL 浓度比为4:1的(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)(EDC)及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液混合, 在室温下震荡30 min后, 加入100 μL 10 mg/mL呕吐毒素二抗(Ab₂)溶液、在4 °C下震荡过夜, 制得FCA-Ab₂复合物溶液; 取体积比为1:1的上述复合物溶液HCNTs-luminol和FCA-Ab₂在室温下混合震荡3 h, 经离心、洗涤、再分散制得HCNTs-luminol@FCA-Ab₂复合物溶液, 然后在上述溶液中加入1 % BSA封闭非特异性吸附位点, 储存在4 °C冰箱中备用;

(7) 将步骤(5)获得的修饰电极浸入50 μL 按步骤(6)制得的HCNTs-luminol@FCA-Ab₂复合物溶液并在4°C冰箱中孵育40 min, 用去离子水冲洗电极表面, 制得Nafion-IL-sas-TiO₂MCs/Ru(dcbpy)₃²⁺/Ab₁/DON/Ab₂-FCA@luminol-HCNTs修饰玻碳电极, 并保存在4 °C冰箱中备用。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 表面活性剂辅助的TiO₂ 介晶(sas-TiO₂MCs)由下述方法制备的: 取1.0 g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)分散于100 mL 2.1 mol/L的HNO₃溶液中, 超声几分钟之后加入4.0 g 十二烷基硫酸钠(SDS)并在搅拌下溶解, 随后, 取2.0 mL 钛酸四异丙酯(TIP)溶液加入到上述混合溶液中并在70 °C下搅拌48 h, 最后经离

心、洗涤、干燥制得sas-TiO₂ MCs。

3. 权利要求1-2任一所述的方法制备的一种共用共反应试剂类型的呕吐毒素比率型电致化学发光免疫传感器。

4. 权利要求3所述的一种共用共反应试剂类型的呕吐毒素比率型电致化学发光免疫传感器的检测方法,其特征在于,用于呕吐毒素(DON),检测步骤如下:

(1) 使用电化学工作站采用三电极体系进行测定,以权利要求3所述的一种共用共反应试剂类型的呕吐毒素比率型电致化学发光免疫传感器为工作电极,Ag/AgCl为参比电极,铂丝电极为对电极,在pH 8.0的 PBS缓冲溶液中进行测试;

(2) 采用电位范围-0.5 V-1.8 V,扫描速率0.05 V/s电位窗口,电致化学发光设备光电倍增管800 V对不同浓度的呕吐毒素(DON)标准溶液进行检测,通过电致化学发光设备采集0.5 V的ECL信号强度(ECL_{luminol})及1.1 V的ECL信号强度(ECL_{Ru(dcbpy)³²⁺}),通过其比率值与呕吐毒素(DON)标准溶液浓度之间的关系,绘制工作曲线;

(3) 待测样品溶液代替呕吐毒素(DON)标准溶液进行检测,检测的结果可通过工作曲线查得。

一种共用共反应试剂类型的呕吐毒素比率型电致化学发光免疫传感器及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于新型功能材料与生物传感检测技术领域,具体涉及一种共用共反应试剂类型的呕吐毒素比率型电致化学发光免疫传感器的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 比率法,一种新的分析方法,其量化取决于两信号的比率而不是绝对值,已经逐步被应用在荧光、电化学发光、光电和电化学等领域,相比其他分析技术,电化学发光具有简单、快速、灵敏度高等优点,其与比率型分析技术的结合为生物传感器的发展提供了更广阔的应用前景。电致化学发光免疫传感器,利用抗原与抗体之间特异性结合的一类生物传感器,具有灵敏度高、选择性好、操作简便、易于小型化、可连续快速、自动化检测分析等优点,具有良好的应用前景。本发明制备了一种共用共反应试剂类型的呕吐毒素比率型电致化学发光免疫传感器,实现了对呕吐毒素的高灵敏检测。

[0003] TiO_2 纳米材料因其独特的光催化活性、无毒性,优异的化学和物理稳定性,使其成为光催化和光电化学传感器的理想材料,其性能一般受晶型、晶粒大小、晶面、结晶度、比表面积、微结构等的影响。表面活性剂辅助的 TiO_2 介晶 (sas- TiO_2 MCs) 是晶体亚单元有序排列构成且表面存在分散均匀的表面活性剂聚乙烯吡咯酮烷 (PVP), 相比于传统的 TiO_2 单晶, sas- TiO_2 MCs 具有更加高度的结晶形态及更加优良的光催化活性等性能。螺旋碳管是一种新型的碳纳米材料,由于螺旋碳管呈螺旋状结构,表面具有较多的活性位点,表现出良好的电子导电性、大的比表面积和高的空隙容量等化学特性,在构建良好的电化学传感器中得到了广泛关注。本发明基于 sas- TiO_2 MCs 及螺旋碳管 (HCNTs) 纳米材料,引入钉联吡啶衍生物 ($\text{Ru}(\text{dcbpy})_3^{2+}$) 及鲁米诺 (luminol) 两种信号探针;同时,选用二茂铁甲酸 (FCA) 作为双功能共反应试剂,制备一种共用共反应试剂类型的呕吐毒素比率型电致化学发光免疫传感器。具有较高孔隙率的 sas- TiO_2 MCs 及大比表面积的 HCNTs 纳米材料作为生物传感器平台可以承载大量的生物分子及信号探针,同时,二茂铁甲酸 (FCA) 的双功能作用可以同时猝灭钉联吡啶衍生物并增强鲁米诺的 ECL 信号。因此,所制得的比率型电致化学发光免疫传感器,具有灵敏度高、稳定性好、检测限低等优点,可用于呕吐毒素 (DON) 的检测,在临床应用及食品安全监控方面具有非常重要的应用价值。

发明内容

[0004] 本发明的目的之一是基于 sas- TiO_2 MCs 及螺旋碳管 (HCNTs) 纳米材料,构建一种稳定性好,灵敏度高的比率型电致化学发光免疫传感器。

[0005] 本发明的目的之二是将该电致化学发光免疫传感器应用于呕吐毒素的高灵敏检测。

[0006] 为实现发明目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 1. 一种共用共反应试剂类型的呕吐毒素比率型电致化学发光免疫传感器及其检

测方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0008] (1)玻碳电极(GCE)首先在铺有氧化铝粉末的麂皮上机械打磨抛光,用二次水洗去表面残留粉末,再移入超声水浴中清洗,直至清洗干净,最后依序用乙醇,稀酸和水彻底洗涤;

[0009] (2)取80 μL 0.5wt.%全氟磺酸-聚四氟乙烯共聚物(Nafion)溶液与20 μL 10 mg/mL离子液体(IL)混合,经几分钟震荡之后,将100 μL 2 mg/mL sas-TiO₂ MCs溶液加入到上述复合物溶液中,并在室温下震荡30 min以确保sas-TiO₂ MCs分散均匀,最终制得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs复合物。滴加5 μL 上述所得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs复合物悬浮液于干净的玻碳电极表面,红外灯下烘干,冷却至室温,制得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs修饰玻碳电极;

[0010] (3)将Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs修饰电极浸入到浓度为 1.0×10^{-3} mol/L的 Ru(dcbpy)₃²⁺溶液中1 h,后用去离子水洗去物理吸附的Ru(dcbpy)₃²⁺,制得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs/Ru(dcbpy)₃²⁺修饰玻碳电极;

[0011] (4)滴加5 μL 呕吐毒素抗体(Ab₁)于步骤(3)制备的修饰电极界面,并置于4°C冰箱中孵育40 min,用去离子水冲洗电极表面,制得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs/Ru(dcbpy)₃²⁺/Ab₁修饰玻碳电极;将上述修饰电极浸入浓度为1.0 wt.%的BSA溶液中孵育30 min,以封闭电极表面上非特异性活性位点,用去离子水冲洗电极表面洗去物理吸附,并保存在4°C冰箱中备用;

[0012] (5)将步骤(4)获得的修饰电极浸入不同浓度的呕吐毒素(DON)标准溶液中并在4°C冰箱中孵育40 min,用去离子水冲洗电极表面,制得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs/Ru(dcbpy)₃²⁺/Ab₁/DON修饰玻碳电极,并保存在4°C冰箱中备用;

[0013] (6)取20 μL 浓度比为4:1的(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)(EDC)及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)混合液加入到100 μL 5 mg/mL 酸化的螺旋碳管(HCNTs)溶液中,室温震荡30 min,以达到活化羧基的目的;然后将100 μL 10 mmol/L鲁米诺(luminol)加入到上述混合溶液中,在室温下混合震荡4 h,后经洗涤、离心、再分散制得HCNTs-luminol复合物溶液;同时,将100 μL 10 mmol/L二茂铁甲酸(FCA)与20 μL 浓度比为4:1的(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)(EDC)及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液混合,在室温下震荡30 min,后加入100 μL 10 mg/mL Ab₂溶液在4°C下震荡过夜,制得FCA-Ab₂复合物溶液;取体积比为1:1的上述复合物溶液HCNTs-luminol和FCA-Ab₂在室温下混合震荡3 h,经离心、洗涤、再分散制得HCNTs-luminol@FCA-Ab₂复合物溶液,然后在上述溶液中加入1% BSA封闭非特异性吸附位点,储存在4°C冰箱中备用;

[0014] (7)将步骤(5)获得的修饰电极浸入50 μL 按步骤(6)制得的HCNTs-luminol@FCA-Ab₂复合物溶液并在4°C冰箱中孵育40 min,用去离子水冲洗电极表面,制得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs/Ru(dcbpy)₃²⁺/Ab₁/DON/Ab₂-FCA@luminol-HCNTs修饰玻碳电极,并保存在4°C冰箱中备用。

[0015] 2. 上述sas-TiO₂ MCs由下述方法制备的:取1.0 g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)分散于100 mL 2.1 mol/L的HNO₃溶液中,超声几分钟之后加入4.0 g十二烷基硫酸钠(SDS)并在搅拌下溶解,随后,取2.0 mL钛酸四异丙酯(TIP)溶液加入到上述混合溶液中并在70°C下搅拌48 h,最后经离心、洗涤、干燥制得sas-TiO₂ MCs。

[0016] 3. 上述全氟磺酸-聚四氟乙烯共聚物(Nafion)、离子液体(IL)、sas-TiO₂ MCs复合物溶液由下述方法制备的:将80 μ L 0.5wt.%全氟磺酸-聚四氟乙烯共聚物(Nafion)溶液与20 μ L10 mg/mL离子液体(IL)混合,经几分钟震荡之后,将100 μ L 2 mg/mL sas-TiO₂ MCs溶液加入到上述复合物溶液中,并在室温下震荡30 min以确保Sas-TiO₂ MCs分散均匀,最终制得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs 复合物溶液。

[0017] 4. 上述的螺旋碳管(HCNTs)、鲁米诺(luminol)、二茂铁甲酸(FCA)和呕吐毒素二抗(Ab₂) (HCNTs-luminol@FCA-Ab₂)复合物溶液由下述方法制备的:(1)取20 μ L浓度比为4:1的(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)(EDC)及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)混合液加入到100 μ L 5 mg/mL 酸化的螺旋碳管(HCNTs)溶液中,室温震荡30 min,以达到活化羧基的目的;然后将100 μ L 10 mmol/L鲁米诺(luminol)加入到上述混合溶液中,在室温下混合震荡4 h,后经洗涤、离心、再分散制得HCNTs-luminol复合物溶液;(2)将100 μ L10 mmol/L二茂铁甲酸(FCA)与20 μ L浓度比为4:1的(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)(EDC)及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液混合,在室温下震荡30 min,后加入100 μ L 10 mg/mL Ab₂溶液在4 $^{\circ}$ C下震荡过夜,制得FCA-Ab₂复合物溶液;(3)取体积比为1:1的上述复合物溶液HCNTs-luminol和FCA-Ab₂在室温下混合震荡3 h,经离心、洗涤、再分散制得HCNTs-luminol@FCA-Ab₂复合物溶液,然后在上述溶液中加入1 % BSA封闭非特异性吸附位点,储存在4 $^{\circ}$ C冰箱中备用。

[0018] 5. 呕吐毒素(DON)的检测步骤:

[0019] (1)使用电化学工作站采用三电极体系进行测定,以权利要求3所述的一种共用共反应试剂类型的呕吐毒素比率型电致化学发光免疫传感器为工作电极,Ag/AgCl为参比电极,铂丝电极为对电极,在pH 8.0的 PBS缓冲溶液中进行测试;

[0020] (2)采用电位范围-0.5 V-1.8 V,扫描速率0.05 V/s电位窗口,电致化学发光设备光电倍增管800 V对不同浓度的呕吐毒素(DON)标准溶液进行检测,通过电致化学发光设备采集0.5 V的ECL信号强度(ECL_{luminol})及1.1 V的ECL信号强度(ECL_{Ru(dcbpy)³²⁺}),通过其比率值与呕吐毒素(DON)标准溶液浓度之间的关系,绘制工作曲线;

[0021] (3)待测样品溶液代替呕吐毒素(DON)标准溶液进行检测,检测的结果可通过工作曲线查得。

[0022] 本发明的显著优点为:

[0023] (1)比率法,一种新的分析方法,其量化取决于两信号的比率而不是绝对值,已经逐步被应用在荧光、电化学发光、光电和电化学等领域。相比其他分析技术,电化学发光具有简单、快速、灵敏度高等优点,其与比率型分析技术的结合为生物传感器的发展提供了更广阔的应用前景。

[0024] (2)具有较高孔隙率和光催化活性的sas-TiO₂ MCs及大比表面积的HCNTs作为生物传感器平台可以承载大量的生物分子及信号探针,同时,二茂铁甲酸(FCA)的双功能作用可以同时猝灭钌联吡啶衍生物并增强鲁米诺的ECL信号,从而提高该比率型电致化学发光免疫传感器的灵敏度。

[0025] (3)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。

附图说明

[0026] 图1A为螺旋碳管(HCNTs)、鲁米诺(luminol)及HCNTs-luminol复合物溶液的紫外光谱(UV-vis)图。

[0027] 图1B为呕吐毒素二抗(Ab_2)、二茂铁甲酸(FCA)及FCA- Ab_2 复合物溶液的紫外光谱(UV-vis)图。

[0028] 图2为免疫传感器的电致化学发光响应信号与呕吐毒素(DON)标准溶液浓度的线性关系图。

具体实施方式

[0029] 本发明用下列实施例来进一步说明本发明,但本发明的保护范围并不限于下列实施例。

[0030] 实施例1

[0031] 一种基于sas-TiO₂ MCs及螺旋碳管构制的比率型电致化学发光免疫传感器的制备方法:

[0032] (1)玻碳电极(GCE)首先在铺有氧化铝粉末的麂皮上机械打磨抛光,用二次水洗去表面残留粉末,再移入超声水浴中清洗,直至清洗干净,最后依序用乙醇,稀酸和水彻底洗涤;

[0033] (2)取80 μ L 0.5wt.%全氟磺酸-聚四氟乙烯共聚物(Nafion)溶液与20 μ L 10 mg/mL离子液体(IL)混合,经几分钟震荡之后,将100 μ L 2 mg/mL sas-TiO₂ MCs溶液加入到上述复合物溶液中,并在室温下震荡30 min以确保sas-TiO₂ MCs分散均匀,最终制得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs 复合物。滴加5 μ L上述所得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs复合物悬浮液于干净的玻碳电极表面,红外灯下烘干,冷却至室温,制得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs修饰玻碳电极;

[0034] (3)将Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs修饰电极浸入到浓度为 1.0×10^{-3} mol/L的 Ru(dcbpy)₃²⁺溶液中1 h,后用去离子水洗去物理吸附的Ru(dcbpy)₃²⁺,制得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs/Ru(dcbpy)₃²⁺修饰玻碳电极;

[0035] (4)滴加5 μ L呕吐毒素抗体(Ab_1)于步骤(3)制备的修饰电极界面,并置于4°C冰箱中孵育40 min,用去离子水冲洗电极表面,制得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs/Ru(dcbpy)₃²⁺/ Ab_1 修饰玻碳电极;将上述修饰电极浸入浓度为1.0 wt.%的BSA溶液中孵育30 min,以封闭电极表面上非特异性活性位点,用去离子水冲洗电极表面洗去物理吸附,并保存在4°C冰箱中备用;

[0036] (5)将步骤(4)获得的修饰电极浸入不同浓度的呕吐毒素(DON)标准溶液中并在4°C冰箱中孵育40 min,用去离子水冲洗电极表面,制得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs/Ru(dcbpy)₃²⁺/ Ab_1 /DON修饰玻碳电极,并保存在4°C冰箱中备用;

[0037] (6)取20 μ L浓度比为4:1的(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)(EDC)及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)混合液加入到100 μ L 5 mg/mL 酸化的螺旋碳管(HCNTs)溶液中,室温震荡30 min,以达到活化羧基的目的;然后将100 μ L 10 mmol/L鲁米诺(luminol)加入到上述混合溶液中,在室温下混合震荡4 h,后经洗涤、离心、再分散制得HCNTs-luminol复合物溶液;同时,将100 μ L 10 mmol/L二茂铁甲酸(FCA)与20 μ L浓度比为4:1的

(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐) (EDC) 及N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶液混合,在室温下震荡30 min,后加入100 μL 10 mg/mL Ab_2 溶液在4 $^{\circ}\text{C}$ 下震荡过夜,制得FCA- Ab_2 复合物溶液;取体积比为1:1的上述复合物溶液HCNTs-luminol和FCA- Ab_2 在室温下混合震荡3 h,经离心、洗涤、再分散制得HCNTs-luminol@FCA- Ab_2 复合物溶液,然后在上述溶液中加入1 % BSA封闭非特异性吸附位点,储存在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用;图1B为呕吐毒素二抗(Ab_2)、二茂铁甲酸(FCA)及FCA- Ab_2 复合物溶液的紫外光谱(UV-vis)图;

[0038] (7)将步骤(5)获得的修饰电极浸入50 μL 按步骤(6)制得的HCNTs-luminol@FCA- Ab_2 复合物溶液并在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵育40 min,用去离子水冲洗电极表面,制得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs/Ru(dcbpy)₃²⁺/ Ab_1 /DON/ Ab_2 -FCA@luminol-HCNTs修饰玻碳电极,并保存在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

[0039] 实施例2

[0040] 上述实施例1所用的表面活性剂辅助的TiO₂ 介晶(sas-TiO₂ MCs)的制备:取1.0 g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)分散于100 mL 2.1 mol/L的HNO₃溶液中,超声几分钟之后加入4.0 g 十二烷基硫酸钠(SDS)并在搅拌下溶解,随后,取2.0 mL钛酸四异丙酯(TIP)溶液加入到上述混合溶液中并在70 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌48 h,最后经离心、洗涤、干燥制得sas-TiO₂ MCs。

[0041] 实施例3

[0042] 上述实施例1所用的全氟磺酸-聚四氟乙烯共聚物(Nafion)、离子液体(IL)、sas-TiO₂ MCs复合物溶液的制备:将80 μL 0.5wt.%全氟磺酸-聚四氟乙烯共聚物(Nafion)溶液与20 μL 10 mg/mL离子液体(IL)混合,经几分钟震荡之后,将100 μL 2 mg/mL sas-TiO₂ MCs溶液加入到上述复合物溶液中,并在室温下震荡30 min以确保sas-TiO₂ MCs分散均匀,最终制得Nafion-IL-sas-TiO₂ MCs 复合物溶液。

[0043] 实施例4

[0044] 上述实施例1所用的螺旋碳管(HCNTs)、鲁米诺(luminol)、二茂铁甲酸(FCA)和呕吐毒素二抗(Ab_2) (HCNTs-luminol@FCA- Ab_2) 复合物溶液的制备:(1)取20 μL 浓度比为4:1的(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐) (EDC) 及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)混合液加入到100 μL 5 mg/mL 酸化的螺旋碳管(HCNTs)溶液中,室温震荡30 min,以达到活化羧基的目的;然后将100 μL 10 mmol/L鲁米诺(luminol)加入到上述混合溶液中,在室温下混合震荡4 h,后经洗涤、离心、再分散制得HCNTs-luminol复合物溶液;(2)将100 μL 10 mmol/L二茂铁甲酸(FCA)与20 μL 浓度比为4:1的(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐) (EDC) 及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液混合,在室温下震荡30 min,后加入100 μL 10 mg/mL Ab_2 溶液在4 $^{\circ}\text{C}$ 下震荡过夜,制得FCA- Ab_2 复合物溶液;(3)取体积比为1:1的上述复合物溶液HCNTs-luminol和FCA- Ab_2 在室温下混合震荡3 h,经离心、洗涤、再分散制得HCNTs-luminol@FCA- Ab_2 复合物溶液,然后在上述溶液中加入1 % BSA封闭非特异性吸附位点,储存在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。图1A为螺旋碳管(HCNTs)、鲁米诺(luminol)及HCNTs-luminol复合物溶液的紫外光谱(UV-vis)图。

[0045] 实施例5

[0046] 上述实施例1所用的钌联吡啶衍生物(Ru(dcbpy)₃²⁺)购买于上海化学科技有限公司;二茂铁甲酸(FCA)及Nafion均购买于美国西格玛公司;离子液体(IL)购买于上海麦克林生化有限公司;呕吐毒素标准品(DON)以及呕吐毒素一抗(Ab_1)、二抗(Ab_2)均购买于无锡百

奥森科技有限公司;螺旋碳管(HCNTs)购买于南京先丰纳米材料科技有限公司。

[0047] 实施例6

[0048] 呕吐毒素(DON)的检测步骤:

[0049] (1)使用电化学工作站采用三电极体系进行测定,以实施例1所制备的一种共用共反应试剂类型的呕吐毒素比率型电致化学发光免疫传感器为工作电极,Ag/AgCl为参比电极,铂丝电极为对电极,在pH 8.0的 PBS缓冲溶液中进行测试;

[0050] (2)采用电位范围-0.5 V-1.8 V,扫描速率0.05 V/s电位窗口,电致化学发光设备光电倍增管800 V对不同浓度的呕吐毒素(DON)标准溶液进行检测,通过电致化学发光设备采集0.5 V的ECL信号强度(ECL_{luminol})及1.1 V的ECL信号强度(ECL_{Ru(dcbpy)³²⁺}),通过其比率值与呕吐毒素(DON)标准溶液浓度之间的关系,绘制工作曲线,见图2;

[0051] (3)待测样品溶液代替呕吐毒素(DON)标准溶液进行检测,检测的结果可通过工作曲线查得。

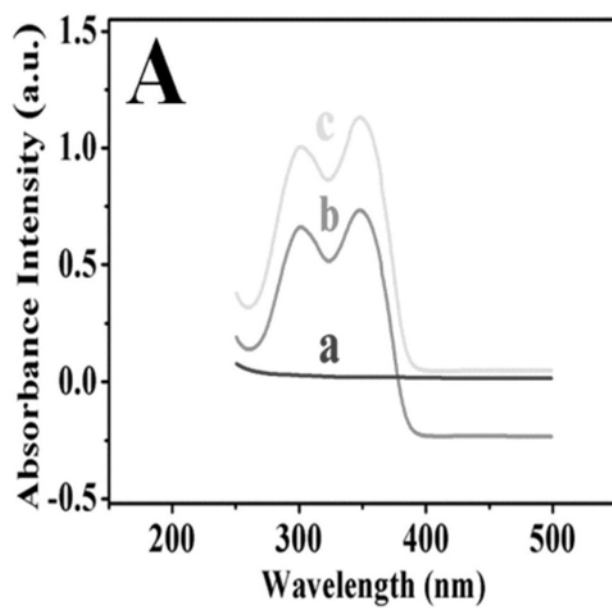


图1A

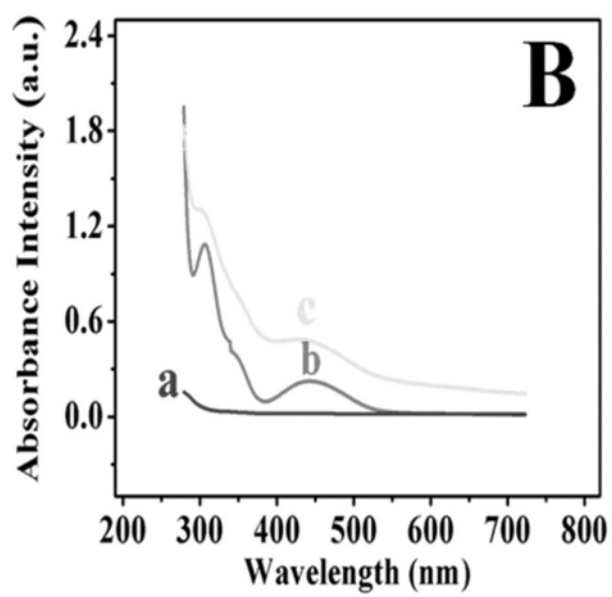


图1B

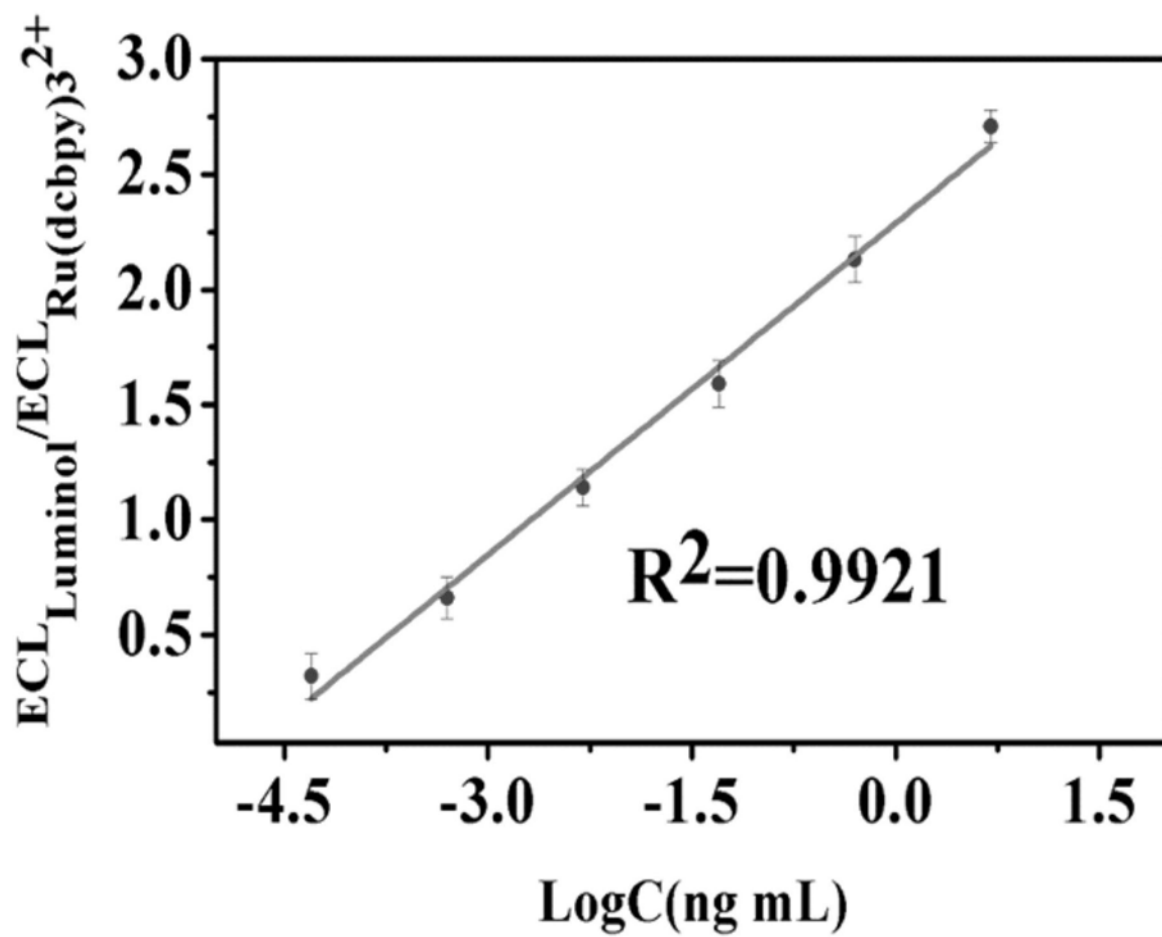


图2