1261 ~ 1266

DOI: 10.3724/SP. J. 1096, 2010, 01261

多孔"类碳糊电极"的羧基化及其对 Escherichia ocli O157: H7 的检测

许利剑¹²³ 杜晶晶³ 邓 燕¹³ 李智洋¹ 徐春祥¹² 何农跃^{*13} 汪 华⁴ 史智扬⁴

1(东南大学生物电子国家重点实验室,南京 210096) 2(东南大学电子科学与工程学院,南京 210096) 3(湖南工业大学绿色包装与生物纳米技术应用实验室,株洲 412008) 4(江苏省疾病预防控制中心卫生部肠道病原微生物重点实验室,南京 210009)

摘 要 以吡咯为前驱体 羧基化碳纳米管、石墨粉为填料和碳酸钙微球为模板直接诱导合成 制备出一种高灵敏的多孔"类碳糊电极"生物电化学传感器 讨论了羧基化碳纳米管含量、银染时间对检测结果的影响。结果表明 最佳羧基化碳纳米管含量为 8% 最佳银染时间为 12 min 银的阳极溶出峰电流与 $E.\ ocli\ O157:\ H7$ 浓度在 $1.0\times10^4\sim1.0\times10^6\ cells/mL$ 范围内呈线性关系 其线性回归方程为: $I_P=-5.582+1.972\log C$ 相关系数(R^2) 为 0.9912 检出限为 5.1×10^3 cells/mL 实现了对 $E.\ ocli\ O157:\ H7$ 快速、准确地检测。

关键词 羧基化碳纳米管;多孔"类碳糊电极";生物电化学传感器;金标银染;生物电子;大肠杆菌

1 引 言

大肠杆菌 0157: H7 是肠出血性大肠埃希氏菌(EHEC) 的一个主要菌型 ,会产生很强的毒素 ,感染后可以导致婴幼儿腹泻、出血性结肠炎、溶血性尿毒综合症和血栓性血小板减少性紫癜甚至死亡 ^[1-4]。它是最危险的病原体之一 感染剂量非常低。如何快速地检测出该菌是疫情控制的关键 因此研究快速准确地检测大肠杆菌 0157: H7 的新方法具有重要意义 ^[5-7]。已有许多分析研究工作者先后采用磁酶免疫电化学发光法 ^[8-9]、磁酶免疫电化学法 ^[10]、化学发光磁酶免疫法 ^[11]、石英晶体压电传感器(QCM)以及双抗夹心 ELISA 法 ^[12]对其检测进行了研究 ,但这些方法大多有检测时间长、操作复杂、仪器昂贵或者灵敏度不高等不足。本研究在前期工作基础上 ^[13-15] ,以吡咯为前驱体 ,石墨粉和羧基化碳纳米管为填料、碳酸钙微球为模板直接诱导合成 ,制备一种新型高灵敏的多孔功能化 "类碳糊电极"生物电化学传感器 ,该电化学生物传感器具有比表面大 ,导电性好 ,灵敏度高 ,易于长期保存等特点 ,而且避免了粘接剂的使用 ,彻底改变了传统碳糊电极的制备方法 ,为进一步提高电极的选择性和灵敏度 ,满足对一些突发性疾病(如大肠杆菌等) 快速、准确地检测 ,并利用羧基化碳纳米管掺杂方法对电极表面进行直接功能化 结合金标抗体和银染放大的方法 ,用于大肠杆菌 0157: H7 的检测 ,制备出高灵敏高选择性的电化学生物传感器。

2 实验部分

2.1 主要试剂

多壁碳纳米管(MWNT): 深圳纳米港提供 ,纯度大于 95% ,长度与直径分别为 5~15 μm 和 20~40 nm 使用前于 100 °C 真空干燥 12 h; 石墨粉(光谱纯 ,上海试剂); 液体石蜡(上海凌峰试剂厂); 吡咯 (南京化学试剂有限公司); E. ocli O157: H7 菌株和人工接种了金黄色葡萄球菌和 E. ocli O157: H7 的牛肉膏培养样品均由江苏省疾病预防控制中心提供; 纯化兔抗 E. ocli O157: H7 多克隆抗体(2 g/L)、纯化鼠抗 E. ocli O157: H7 单克隆抗体(2 g/L) 均购自宁波良瑞抗体生物技术公司; 0.05 mol/L TB(Tris-

2009-12-07 收稿; 2010-02-08 接受

本文系国家自然科学基金(Nos. 60927001,60971045)、国家科技重大专项(No. 2009ZX10004-311)、国家重大科学研究计划(No. 2010CB933903)、国家"863"重点项目(No. 2007AA022007)、中国博士后科学基金(No. 20090461057)、江苏省博士后科研资助计划(No. 0902048C)、湖南省自然科学基金(Nos. 09JJ3017,10JJ4010)和江苏省医学重点实验室肠道致病菌实验室开放课题资助

^{*} E-mail: nyhe1958@163.com

Cl 缓冲溶液) 和牛血清白蛋白(BSA) 均购于上海生物工程有限公司; 375 mL 1 × PBS , 125 mL 乙醇; 实验用水为灭菌去离子水 ,其它缓冲液为自制。 HNO_3 , NaOH , H_2SO_4 , K_2CO_3 , NaCl , KCl , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , H_3PO_4 , NaN_3 均为分析纯 ,购于南京化学试剂有限公司; PB 缓冲溶液: Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 混合液(pH=7.0) 。

2.2 主要仪器

三电极电化学工作站 CHI-660B(上海辰华仪器公司),工作电极为自制的多孔"类碳糊电极"(PPCPE)、碳糊电极(CPE)和本研究制备的羧基化多孔"类碳糊电极"(PPCPE-COOH),参比电极为饱和甘汞电极,对电极为铂电极;扫描电镜(Hitachi S-3000N,日本);快速核酸/蛋白质分析仪(U-0080D,日本日立公司);离心机、移液器(Eppendorf 公司);电子分析天平(上海天平仪器厂);水浴锅(上海仪器厂);超纯水制备系统(北京历元公司);电热恒温水浴箱(余姚亚星仪器公司);旋涡振荡仪(上海全力电器公司);XB-K-25型血球计数板(上海医用光学仪器厂一分厂);XSP-2C-ZXC2生物显微镜(上海杰晟科学仪器有限公司);用 PE Spectrum One 红外光谱仪记录样品的红外谱图,KBr 压片测定,扫描范围为4000~500 cm⁻¹,分辨率为2 cm⁻¹;热失重利用 NETZSCH TG 209型热失重分析仪进行测定,氮气氛围中,升温速度为 10° C/min,由室温升至 100° C,保温 1° L 然后 10° C/min 升至 100° C,保温 1° L % 点

2.3 碳纳米管的羧基化

取 100 mg 直径为 20 ~ 40 nm 碳纳米管(MWNT) 加入 30 mL HNO $_3$ 超声分散 1 h 在 120 $^{\circ}$ C 下氧化回流 24 h ,反应完毕后 ,用 0. 22 μm 的过滤膜过滤产物 ,并用 5% (w/w) 的 NaOH 溶液超声洗涤 2 次 ,除去纳米管中的无定形碳以及金属催化剂; 用 1mol/L HCl 溶液洗涤 2 次 ,使溶液呈酸性 ,然后用蒸馏水洗涤至中性 (pH = 7) ,最后用无水试剂洗涤多次 ,真空干燥 24 h ,得到羧基化的碳纳米管 (MWNT–COOH) $^{16\sim17\,1}$ 。

2.4 金标记鼠抗 E. ocli O157: H7 单克隆抗体的制备

2.5 多孔"类碳糊电极"的直接表面功能化及检测实验

将内径为 4 mm 的中空玻璃管洗净 烘干备用。将石墨粉、羧基化碳纳米管与碳酸钙微球三者以质量比例为 32:8:60 装入 10 mL 的离心管中,把离心管在振荡仪上充分震荡,使管内混合物充分均匀混合,然后倒入研钵中,加入适量的聚合吡咯,将三者均匀混合并调成糊状,混匀后的碳糊填入玻璃管内,压实,管中央插入一根铜导线,烘干,然后将玻璃管浸入 0.2 mol/L 的 $FeCl_3$ 溶液中进行聚合成一个整体,用蒸馏水多次冲洗,烘干,再将玻璃管全部浸入 0.1 mol/L HCl 中,将电极中的碳酸钙微球全部溶解掉,制成羧基化的多孔 "类碳糊电极" (PPCPE-COOH) 。将 PPCPE-COOH 表面浸入到含有一定浓度捕获抗体(IgG_1) 的溶液中反应 40 min,使 IgG_1 结合到电极表面,用 100 BSA 封闭 100 min。将固定有 100 的电极浸入到含有不同浓度的 100 1

2.6 细菌溶液的处理

(1) 细菌的培养 取 50 mL LB 液体培养基加入到一个无菌锥形瓶中; 将保存的菌种倒入少许后轻摇锥形瓶 ,使得接种的细菌分散在培养液中; 将锥形瓶封口 ,在摇床上以 300 r/min 速度 ,于 37 $^{\circ}$ C 培养24 h。(2) 细菌的灭活和前处理 将扩大培养后的菌液用 0.3% 甲醛溶液 37 $^{\circ}$ C 灭活 48 h。取灭活后的细菌溶液 0.5 mL E. ocli O157: H7 离心 5 min , 弃上清液 ,将沉淀用 TTBS-casein 清洗 3 次后分散在 0.5 mL TTBS-casein 中。

3 结果与讨论

3.1 碳纳米管的羧基化

在浓 HNO_3 和浓 H_2SO_4 的混酸中加热 ,碳纳米 管的末端或缺陷地方会被氧化 ,得到羧基 ,从而使碳

图 1 羧基化多孔 "类碳糊电极" 检测 E. ocli O157: H7 的示意图

Fig. 1 Schematic diagram of electrochemical detection of E. ocli O157: H7 at porous pseudo-carbon paste electrode (PPCPE) with carboxylic acid group

纳米管修饰上羧基。从 MWNT-COOH 的红外分光光谱图(图 2) 可以看出 在 1725 cm $^{-1}$ 处出现明显的 羰基吸收峰 同时在 1586 cm $^{-1}$ 处出现 CNTs 的 C—C 结构峰 ,表明混酸处理能够使 MWNT 表面产生 较多的羧基 图 2 中 a 和 b 曲线分别为羧基化前后的碳纳米管的热失重分析 ,结果发现 ,MWNT-COOH 失重约 6% 。

3.2 羧基化多孔电极对 E. ocli O157: H7 的检测

图 3 为 CPE , PPCPE 和 PPCPE-COOH 检测浓度为 1.0×10^4 cells/mL 的 E. ocli O157: H7 的阳极溶出伏安图 ,从图中可以看出 ,这三种电极上均于 0.27 V 附近产生银的阳极溶出信号峰。其中在 PPCPE-COOH 上的峰最高 ,信号最强 ,其峰电流大约是 CPE 上峰电流信号的 5 倍 ,而在 PPCPE 上峰电流为 CPE 上峰电流信号的 4 倍 这可能是由于多孔 "类碳糊电极"具有较大的比表面 ,而且多孔的结构有利于电极对抗体(IgG_1) 的吸附 ,提高 IgG_1 在电极上的固定效率 ,从而获得更大的阳极溶出峰电流。

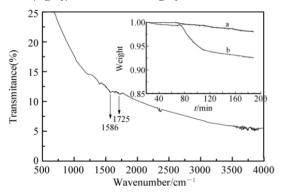


图 2 碳纳米管羧基化的红外分光光谱图和热失重分析图

Fig. 2 Infrared spectra and thermal gravimetric analysis diagrams of carbon nanotube functionalized with carboxylic acid group

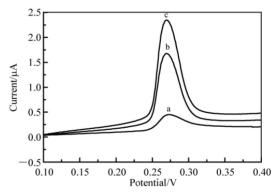


图 3 不同电极上 E. ocli O157: H7 的阳极溶出伏安响应

Fig. 3 Anodic stripping curve of *E. ocli* O157: H7 at different electrodes

a. 传统碳糊电极(Typical CPE); b. PPCPE; c. PPCPE-COOH; 扫描速度(Scanning rate): 10 mV/s。

3.3 碳纳米管的含量

图 4 为多孔电极中不同羧基化碳纳米管含量对检测电化学信号的影响。由图 1 可见 随着多孔电极中羧基化碳纳米管含量增加 银的阳极溶出峰电流也随之增大 这是由于电极中羧基化碳纳米管含量越高 对抗体(IgG_1)的吸附固定效率越高 但当羧基化碳纳米管含量超过 8% 峰电流信号增大不明显 ,

而且实验发现,电极中碳纳米管的含量过高(超过 15%),电极变得疏松,很难成型,且电极的背景极限电流变大,影响检测结果的判断。本实验采用掺杂的方法制备羧基化多孔"类碳糊电极"选择羧基化碳纳米管含量为 8%。

3.4 银染时间的确定

图 5 为当 $E.\ ocli\ O157$: H7 浓度为 $1.0\times10^4\ cells/mL$ 时,银的阳极溶出峰电流测量信号和背景信号随银染时间的变化曲线。由图 5 可见,随银染时间的延长,银的阳极溶出峰电流不断增加,这是由于银染时间的增长,因胶体金催化作用而被还原于电极表面的银增多造成,有利于提高检测的灵敏度;对于未经过 $cAu-IgG_2$ 反应时,在银染时间较短时几乎不产生明显的溶出峰背景电流信号,但当银染时间大于 $12\ min$,该背景信号会迅速增大,这是由于没有纳米金参加时,对苯二酚对 Ag^+ 的还原作用进行非常缓慢,但如果时间足够长时,该还原过程仍能进行并产生一定量的单质银,而这些银单质会进一步催化对苯二酚对 Ag^+ 的还原。当时间达到 $20\ min$ 背景信号非常明显,干扰了检测信号,因此,选择 $12\ min$ 的银染时间以获得高的测定信噪比。

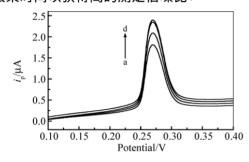


图 4 不同羧基化碳纳米管含量对检测 E. ocli 0157: H7 电化学信号的影响

Fig. 4 Anodic stripping curve of E. ocli O157: H7 at different contents of carbon nanotube functionalized with carboxylic acid group (a) 2%, (b) 5%, (c) 8%, (d) 10%, Other conditions as in Fig 4

3.5 检测范围、检出限和电极的稳定性

图 6 是银的阳极溶出峰电流与 E.~ocli~O157:~H7 浓度对数的关系曲线 ,由图 6 可以看出 ,随着E.~ocli~O157:~H7 浓度浓度的增加 ,银的阳极溶出峰电流不断增加 ,且在 $1.0\times10^4\sim1.0\times10^6~cells/mL$ 范围之间呈线性关系 ,其线性回归方程为: $I_P=-5.582+1.972\log C$,相关系数 (R^2)为 0.9912 ,检出限为 $5.1\times10^3~cells/mL$ 。

该电极彻底摒弃粘接剂的使用,改变了传统碳糊电极的制备方法,具有导电性好,易于长期保存,灵敏度高等特点。将 PPCPE-COOH 在相同的条件下,对不同浓度的 E. ocli O157: H7 分别进行连续多次扫描,发现伏安曲线的峰形和峰值均基本没有变化,表明 PPCPE-COOH 具有良好的重复使用性。为

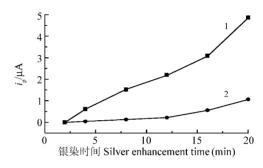


图 5 银染时间对电化学检测信号和背景信号的影响 Fig. 5 Influence of silver enhancement time on the electrochemical detection and background current signals 1. 检测信号(Electrochemical respose signals); 2. 背景信号 (Background signals)。

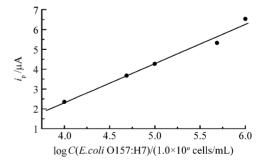


图 6 银的阳极溶出峰电流与 *E. ocli* O157: H7 浓度对数的关系曲线

Fig. 6 Relation curve between anodic stripping peak current of silver and the log of the concentration of *E. ocli* O157: H7

研究 PPCPE-COOH 的稳定性 将同一个电极在常温下 在空气中分别放置 0.15, 30.60 和 120 天后 对不同浓度的 E. ocli 0157: H7 进行电化学检测 发现所得的伏安曲线峰形和峰值几乎不变 说明 PPCPE-COOH 易于保存 具有很好的稳定性。

3.6 实际样品检测

 $E.\ ocli\ O157$: H7 常见于污染的食品中。本实验中分别利用人工接种金黄色葡萄球菌和 $E.\ ocli\ O157$: H7 的牛肉膏样品进行比较 检验该方法在实际样本检测中的可行性。先按照 2.6 节的步骤 \ref{charge} 分别对样品中的 $E.\ ocli\ O157$: H7 和人工接种金黄色葡萄球菌进行提取 ,取灭活后的菌液 ,用 TTBS-casein 稀释 100 倍,避免样品中 $E.\ ocli\ O157$: H7 浓度过高超出线性检测范围,然后按照 2.5 节中的步骤进行电化学检测 结果如图 7 所示。由图 7 可以看出,接种了 $E.\ ocli\ O157$: H7 的牛肉膏样品(b) 有明显的阳极溶出峰电流,多次检测的平均值为 6.12 μ A,可以根据线性方程计算出牛肉膏样品中 $E.\ ocli\ O157$: H7 浓度 ,而接种了金黄色葡萄球菌的样品(a) 的阳极溶出电流很小,仅 0.82 μ A,可能是由于非特异性吸附造成,可视为背景电流,说明该方法对 $E.\ ocli\ O157$: H7 检测具有实用性。

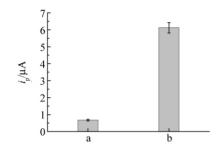


图 7 接种金黄色葡萄球菌样品(a) 和接种 $E.\ ocli\ O157$: H7 的 牛肉膏样品(b) 的电化学检测

Fig. 7 Electrochemical detection of practical samples: staphylococcus aureus(a) and E. ocli O157: H7(b)

References

- 1 Crawford C G, Wijey C, Fratamico P M. J. Rapid Methods Autom Microbiol. , 2000, 8(4): 249 ~ 264
- 2 ZHOU Da-We(周大炜), HU Bo(胡 波), LIU Bin(刘 斌), WU Jun-Li(吴俊丽), HAN Yan-Fang(韩艳芳). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学), 2010, 38(2): 225~228
- 3 Li Z Y , He L , Shi Z Y , Wang H , Li S , Liu H N , Wang Z F , He N Y. J. Biomed. Nanotechnol. , 2009 , 5 (5): 505 ~ 510
- 4 Gehring A G , Patterson D L , Tu S I. Anal. Biochem. , 1998 , 258(2): 293 ~ 298
- 5 Park S , Durst R A. Anal. Biochem. , 2000 , 280(1): 151 ~ 158
- 6 Su X , Li Y. Biosens. Bioelectron. , 2004 , 19(6): 563 ~ 574
- 7 Perez F , Tryland I , Mascini M. Anal. Chim. Acta , 2001 , 427(2): 149 ~ 154
- 8 YUN Wen(云雯), WANG Xiao-Ying(王晓英), DONG Ping(董平), ZHU Jin-Kun(朱金坤), XU Ying(徐颖), HE Pin-Gang(何品刚), FANG Yu-Zhi(方禹之). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学), 2009, 37(1): 8~12
- 9 Huang C C, Lin T Y, Yu W S, Chen C T, Chang H T. J. Biomed. Nanotechnol., 2009, 5(5): 579 ~585
- 10 Gehring A G, Brewster J D, Irwin P L. J. Electroanal. Chem., 1999, 469(1): 27 ~ 33
- 11 Gehring A. G., Irwin P. L., Reed S. A. J. Immunol. Methods., 2004, 293(1): 97 ~ 106
- 12 GE Cui-Cui(葛萃萃) ,ZHONG Qing-Ping(钟青萍) ,ZHANG Wang(张 旺) ,OUYANG Xin(欧阳鑫) . Food Science(食品科学) , 2007 ,28(1): 171~175
- 13 He N Y , Xu L J , Wang T , Du J J , Li Z Y , Deng Y , Li S , Ge S X. J. Biomed. Nanotechnol. , 2009 , 5(5): 607 ~610
- 14 Xu L J , He N Y , Du J J , Deng Y , Li Z Y , Wang T. Anal. Chim. Acta , 2009 , 634(1): 49 ~53
- 15 Xu L J , He N Y , Du J J , Deng Y , Li S , Liu H N. Anal. Lett. , 2008 , 41(13): 2402 ~ 2411
- 16 GUAN Wen-Chao(官文超), WAN Si-Hua(万四华), KE Gang(柯刚), HAN Shou-Cheng(韩守臣). J. Functional Materials(功能材料), 2007, 38(7): 1363~1369
- 17 Pillai S K , Ramontja J , Ray S S. Adv. Sci. Lett. , 2010 , 3(2): 117 ~ 122
- 18 Guo H S , He N Y , Ge S X. Talanta , 2005 , 68(1): 61 ~66

1266 分析化学 第38卷

Carboxylation of Porous Pseudo-carbon Paste Electrode and Its Application to Detection of *Escherichia coli* O157: H7

```
XU Li-Jian<sup>1</sup> <sup>2</sup> <sup>3</sup> , DU Jing-Jing<sup>3</sup> , DENG Yan<sup>1</sup> <sup>3</sup> , LI Zhi-Yang<sup>1</sup> , XU Chun-Xiang<sup>2</sup> ,

HE Nong-Yue <sup>1</sup> <sup>3</sup> * , WANG Hua<sup>4</sup> , SHI Zhi-Yang<sup>4</sup>

<sup>1</sup> (State Key Laboratory of Bioelectronics , Southeast University , Nanjing 210096)

<sup>2</sup> (School of Electronic Science and Engineering , Southeast University , Nanjing 210096)

<sup>3</sup> (Hunan Key Laboratory of Green Packaging and Application of Biological Nanotechnology ,

Hunan University of Technology , Zhuzhou 412007)

<sup>4</sup> (Jiangsu Centers for Disease Prevention and Control ,

Key Laboratory of Enteric Pathogenic Microbiology , Ministry Health , Nanjing 210009)
```

Abstract A novel and sensitive electrochemical biosensor based on porous pseudo-carbon paste electrode (PPCPE) was described. PPCPE was fabricated by mixing calcium carbonate microspheres as the template, graphite powders and carbon nanotubes as the fillers, pyrrole as the precursor of polymer which actually acted as the pastE. The effects of content of carbon nanotube functionalized with carboxyl group (NWCNT-COOH) in carboxylated of porous pseudo-carbon paste electrode (PPCPE-COOH) and the silver enhancement time were investigated. The results showed that the optimal contents of NWCNT-COOH was 8%, the optimal silver enhancement time was 12 min. A linear relationship between the silver anodic stripping peak current and the concentration logarithm of E. ocli O157: H7 from 1.0×10^4 to 1.0×10^6 cells/mL was obtained, with a correlation coefficient of 0.9912 and a detection limit of 5.1×10^3 cells/mL.

Keywords Carbon nanotube functionalized with carboxy group; Porous pseudo-carbon paste electrode; Electrochemical biosensor; Gold nanoparticle-catalyzed silver enhancement; Bioelectronics; *Escherichia coli*

(Received 7 December 2009; accepted 8 February 2010)

中国科技核心期刊 CODEN: YACEEK 《岩矿测试》 ISSN 0254 - 5357 CN 11 - 2131/TD

欢迎订阅 欢迎投稿 承接广告

《岩矿测试》1982年创刊,由中国地质学会岩矿测试专业委员会和国家地质实验测试中心共同主办。宗旨是根据国家地质工作的重点由单一资源向资源环境并重的转变。突出服务于地球科学、矿产资源、生态环境地球化学研究和地质找矿事业,促进岩矿测试技术的发展。主要报道国内外与分析科学、资源环境、地球科学相关领域的地质矿产、环境保护、石油化工、冶金工业、矿产品检验、煤炭等行业的新理论、新方法、新技术的研究成果、评述及实践经验。适合于地质、冶金、环保、石油、化工、煤炭等部门从事分析测试的科技工作者及大专院校师生阅读。

《岩矿测试》近年来刊物地位不断提高 是中文核心期刊 ,中国科技核心期刊 ,中国期刊方阵双效期刊 ,中国科技论文统计源期刊 ,美国《化学文摘》、美国《剑桥科学文摘》、英国《分析文摘》、俄罗斯《文摘杂志》等数据库收录期刊。

《岩矿测试》在《中文核心期刊要目总览》2008 年版的 88 种矿业工程类期刊中排名第一 在我国地质分析测试领域有较高的知名度。近年来本刊的投稿数量、论文质量、审稿周期、学术影响力明显提升。

《岩矿测试》为双月刊 大 16 开版本 逢双月出版; 国内外公开发行 国内邮发代号 2-313; 国际书店发行代号 BM4089; 广告经营许可证: 京西工商广字第 0227 号; 定价 10.00 元/本 全年 60.00 元。漏订的读者可直接与编辑部联系。

《岩矿测试》编辑部地址: 北京西城区百万庄大街 26 号 国家地质实验测试中心(邮编 100037)

电话: 010 - 68999562; 68999563 传真: 010 - 68999563

E - mail: ykcs_zazhi@ 163. com; ykcs_zazhi@ sina. com 《岩矿测试》网站(在线投稿): http://www.ykcs.ac.cn