

溶胶凝胶法固定抗体制备黄曲霉毒素免疫传感器

孙秀兰² 汪忠云¹ 方银军³ 陈佩佩¹ 李在均^{* 1}

(江南大学化学与材料工程学院¹, 食品学院², 无锡 214122) ³(浙江赞宇科技股份有限公司, 杭州 310009)

摘要 利用溶胶凝胶法, 将正硅酸乙酯在 HCl 存在下水解形成的硅溶胶和黄曲霉毒素 B₁ 抗体的混合液涂于玻碳电极表面, 制备非标记型电化学阻抗免疫传感器。以 [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 的磷酸盐缓冲溶液为测试底液, 分别研究传感器的循环伏安和交流阻抗行为。实验表明, 电极因免疫反应所形成的复合物阻碍了 [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 在电极表面的扩散, 其氧化还原峰电流明显减小, 电子转移阻抗随黄曲霉毒素浓度增加而线性增大。当介质 pH = 6.5 和孵育时间为 20 min 时, 免疫前后传感器的电子转移阻抗变化值最大。在此最佳条件下, 传感器电子转移阻抗对黄曲霉毒素响应的线性范围为 1.0~10 μg/L; 检出限为 0.1 μg/L (S/N = 3)。此方法具有高的灵敏度和稳定性, 可应用于食品中黄曲霉毒素的测定。

关键词 黄曲霉毒素; 免疫传感器; 交流阻抗; 溶胶凝胶

1 引言

黄曲霉毒素是由真菌产毒菌株产生, 在结构和性质相似的一类次生代谢产物^[1], 常见的黄曲霉毒素主要有 M₁, B₁, B₂, G₁, G₂ 其中以黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 毒性最强 (相当于氰化钾的 10 倍, 砒霜的 68 倍)。AFB₁ 广泛存在于花生、玉米、大豆、大米等农作物产品中, 它可通过食物链进入动物或人体, 产生食品安全隐患。研究表明, AFB₁ 还能够引起动植物染色体的失常和 DNA 损伤^[2]。因此, 建立食品中 AFB₁ 的快速检测方法具有重要的现实意义。目前, AFB₁ 的检测方法主要有高效液相色谱法 (HPLC)、薄层色谱法、酶联免疫法 (ELISA) 和微柱筛选法^[3-8]。但 HPLC 对 AFB₁ 检测的灵敏度不高; 薄层色谱法对样品处理繁琐, 实验过程复杂, 所需时间长, 易受杂质干扰, 准确性差; ELISA 法具有特异性强、灵敏度高、成本低的特点, 但因酶促显色反应中酶的活性易受介质组成和操作条件影响, 方法准确度不高。微柱筛选法仅适用于半定量筛查之用。近年来, 电化学免疫传感器获得迅速发展和广泛应用^[9, 10]。然而, 电化学免疫传感器应用于 AFB₁ 的检测报道较少, 且电极制备过程复杂, 检测过程较繁琐^[11-13]。为了克服以上不足, 本研究将硅溶胶与 AFB₁ 抗体混合均匀后涂于玻碳电极表面制备出的非标记型免疫传感器, 通过对传感器电极表面交流阻抗行为的深入研究, 建立了阻抗型免疫传感器测定 AFB₁ 的新方法。本方法具有电极制备简便、灵敏度高、稳定性好等特点。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

99-1A 型大功率数显恒温磁力搅拌器, HH-1 数显恒温磁力搅拌水浴锅 (江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司); SK3300H 型超声分散器 (上海科导超声仪器有限公司); M6e 交流阻抗测试系统 (德国 ZAHNER Elektrik 公司)。黄曲霉毒素 AFB₁ 标准品及 AFB₁ 抗体 (Genway 公司); 四乙氧基硅 (CP, 杭州硅宝化工有限公司); 聚乙二醇辛基苯基醚 (CP, 上海凌峰化学试剂有限公司)。其它试剂均为分析纯。实验用水为超纯水 (无锡华晶电子集团公司, 18.2 MΩ·cm)。

2.2 修饰电极制备

修饰电极制备方法如下: (1) 电极前处理 将直径 2 mm 的玻碳电极先用金相砂纸抛光, 然后依次用 0.3 和 0.05 μm Al₂O₃ 粉末抛光至镜面, 水浴超声清洗, 再分别用 6 mol/L HNO₃、无水乙醇和蒸馏水

2009-04-28 收稿; 2009-07-07 接受

本文系国家自然科学基金资助 (Nos. 20771045, 20676052, 20806033)、国家高技术计划“863”项目 (No. 2007AA10Z428) 和江南大学食品科学技术国家重点实验室开放引进课题 (No. SKLFG-2060204) 资助

* E-mail: zaijun@263.net

超声各清洗 3 min, 将清洗好的裸玻碳电极放入 0.5 mol/L H_2SO_4 中, 于 $-1.0 \sim 1.0$ V 范围内循环伏安扫描至稳定以进一步清洗和活化电极, 然后用水冲洗干净后备用; (2) 硅溶胶制备 在 25 mL 烧杯中, 加入 2 mL 四乙氧基硅、1 mL 超纯水、25 μ L 0.1 mol/L HCl 和 50 μ L 10% 聚乙二醇辛基苯基醚, 混合均匀后, 搅拌至溶胶澄清透明为止; (3) 免疫传感器制备 将稀释后的 0.1 mL AFB_1 抗体和 0.1 mL 硅溶胶混合制得 AFB_1 抗体包被液, 再将 0.7 μ L 此包被液涂于玻碳电极表面制成免疫传感器。将制备的免疫传感器保存在 4 $^{\circ}C$ 冰箱中, 备用; (4) 抗体-抗原复合电极制备 在 20 mL 磷酸盐缓冲溶液 ($Na_2HPO_4 \cdot KH_2PO_4 \cdot NaCl$, 0.01 mol/L, pH 6.5) 中加入适量 AFB_1 , 配制不同浓度的 AFB_1 磷酸盐缓冲溶液, 插入上述制备的免疫传感器, 在 37 $^{\circ}C$ 下 100 r/min 磁力搅拌 20 min 用水冲洗电极, 氮气吹干后备用。

2.3 实验方法

采用三电极体系 (裸玻碳电极、免疫传感器或抗体-抗原复合电极为工作电极, $Ag/AgCl$ 标准电极为参比电极, 铂丝为辅助电极), 以 1×10^{-3} mol/L $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.5) 为测试底液, 分别采用循环伏安法 (电压: $-0.1 \sim 0.6$ V, 扫描速度: 100 mV/s) 和交流阻抗法 (频率: $10^{-1} \sim 10^5$ Hz, 交流微扰信号幅度: 5 mV, 直流偏置电压: 0.2 V) 研究电极的电化学特性。

3 结果讨论

3.1 电极表面的电化学性质

以 $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 为氧化还原探针, 采用循环伏安法 (CV) 和交流阻抗法 (EIS) 考察了裸玻碳电极、免疫传感器和抗体-抗原复合电极的电化学性质, 结果分别列于图 1A 和图 1B。从图 1 可见, 当 $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 在裸玻碳电极表面发生氧化还原反应时, CV 图上有一对可逆性较好的氧化还原峰, 且交流阻抗值较小。尽管免疫传感器表面被含 AFB_1 抗体的凝胶膜所覆盖, 但其 CV 图上仍出现与裸电极相似的氧化还原峰, 仅电流峰稍有降低, 这表明凝胶膜上存在良好的微孔结构, 允许电活性的铁氰化钾通过其孔道进行扩散传质。由于电子转移阻力增加, 导致阻抗变大。抗体-抗原复合电极因非电活性的 AFB_1 吸附于凝胶膜堵塞了部分微孔, 妨碍了 $K_3Fe(CN)_6$ 的扩散过程, 导致峰电流进一步减小, 交流阻抗增大。当 AFB_1 浓度为 10 μ g/L 时, CV 图上的氧化还原峰几乎消失, 阻抗显著增大。这也可证实 AFB_1 在免疫传感器表面形成了稳定的抗体-抗原复合物。

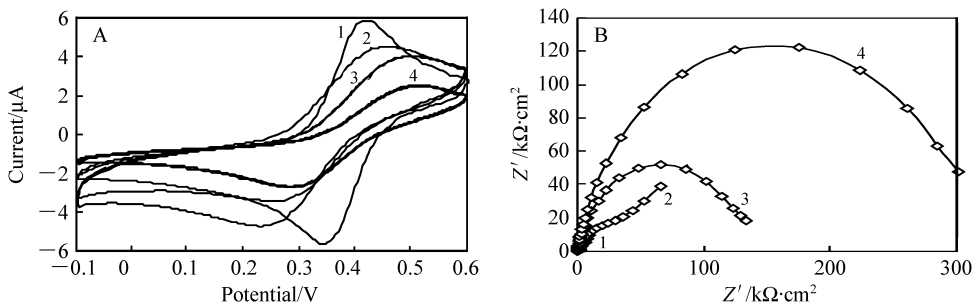


图 1 不同电极的循环伏安图 (A) 和交流阻抗图 (B)

Fig. 1 Cyclic voltammety (A) and Nyquist diagram (B) of different electrodes

1. 裸玻碳电极 (Bare glass carbon electrode); 2. 免疫传感器 (Immunosensor); 3. 抗体-抗原复合电极 (AFB_1 complex 1 μ g/L AFB_1); 4. 抗体-抗原复合电极 (AFB_1 complex 10 μ g/L AFB_1).

电化学交流阻抗谱作为一种有效的检测手段, 常被用来检测修饰电极表面膜的界面性质。图 1B-1 为裸电极的阻抗曲线为一条直线, 表明此时是电极过程受扩散过程的控制。当修饰 AFB_1 抗体-凝胶膜后, 图谱中实数轴上出现半圆, 即图 1B-2, 表明电极表面存在较大的电子转移电阻, 电极上的 AFB_1 抗体-凝胶膜为一绝缘层, 阻碍了电子转移。从图 1B-3 和图 1B-4 可以看出, 二者的半圆直径发生急剧增加, 表明吸附在电极表面的免疫反应复合物层可显著地降低界面上电子转移速率。在免疫反应前后, CV 曲线上氧化还原探针的氧化峰电位值和还原峰电位值分别右移和左移, 并且峰电流值减小, 表明免疫反应复合物层可有效抑制氧化还原探针和电极间的电子传递, 从而导致电子转移电阻 R_e 值的增加。

3.2 介质酸度的影响

考察了此免疫传感器在 pH 5.0~8.0 的磷酸盐缓冲溶液中对 1 μg/L AFB₁ 的电子转移阻抗响应情况。从图 2 可知, 当 pH 在 5.0~6.5 时, 电子转移阻抗随 pH 增加而增加; 在 pH=6.5 时, 免疫传感器响应最大; 当缓冲液的 pH>6.5 时, 随着 pH 增加, 电子转移阻抗的变化值迅速减小, 可能是由于碱性条件下抗体/抗原结合力下降所致。因此, 选择 pH 6.5 作为本实验中反应体系的酸度。

3.3 孵育时间及温度影响

抗原-抗体发生免疫反应的完全程度与免疫反应时间直接相关。将免疫传感器置于 1 μg/L AFB₁ 溶液中, 反应不同时间后进行交流阻抗测试。实验表明, 免疫传感器的响应信号随孵育时间增加而迅速增加。但随着免疫反应的进行, 电子转移阻抗的增加逐渐减缓以至到反应进行 20 min 时不再增加, 说明电极表面抗体活性位点已基本结合完全。鉴于免疫传感器的寿命及实用性, 本实验的反应时间选择 20 min。

实验表明, 传感器的电子转移阻抗值起初随温度升高而增大, 但当温度超过 37 °C 时, 阻抗响应又开始缓慢下降。这是因温度较高导致抗体/抗原结合力下降的缘故。因此, 反应温度确定为 37 °C。

3.4 分析特性

配制一系列不同浓度的 AFB₁ 标准溶液, 按实验方法测定电极表面交流阻抗。以免疫反应前后电子转移阻抗的增加值为纵坐标, AFB₁ 浓度为横坐标绘制工作曲线。从图 3 可知, AFB₁ 浓度在 1.0~10 μg/L 之间, 电子转移阻抗增加与 AFB₁ 浓度呈线性关系: $\Delta R_{et} (k\Omega \cdot cm^2) = 64.149 + 18.304c (\mu g/L)$, 相关系数 $r = 0.9990$ 。检出限为 0.1 μg/L。结果表明, 本方法的灵敏度高于常用的 ELISA 和 HPLC 法。

3.5 免疫传感器的稳定性与再生

将新制备的传感器在 4 °C 下保存 10 d 后, 在免疫反应前后, 分别测定其交流阻抗, 发现其电子转移阻抗值与新制备的电极响应基本一致, 表明此传感器有较好的稳定性。另在相同实验条件下, 用 3.0 μg/L AFB₁ 浸泡免疫传感器, 利用 0.1 mol/L 甘氨酸-盐酸缓冲液 (pH 2.8) 对抗原-抗体复合物进行解离。该免疫传感器再生 6 次, 其电子转移阻抗的变化值的相对标准偏差仅为 5.1%, 免疫传感器可重复使用。

3.6 AFB₁ 样品的测定

将购自超市的玉米、大米、花生捣碎后, 各取 5 g 加 100 μL 磷酸盐缓冲液及适量 AFB₁ 标准溶液, 漩涡混和 1 min 加入 25 mL 萃取剂 (70% 甲醇 + 29% PBS + 1% DMF), 以 100 r/min 搅拌 15 min 以 4000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 用磷酸盐缓冲液稀释 10 倍, 待用。按实验方法测定样品中 AFB₁ 含量, 结果见表 1。从表 1 可知, AFB₁ 加标回收率在 93.3%~106.7% 之间, 表明本方法具有较高的准确度。

表 1 食品中 AFB₁ 测定结果

Table 1 Results for determination of AFB₁ in food

样品 Sample	加入量 Added (ng/g)	测定值 Found (ng/g)	回收率 Recovery (%)	样品 Sample	加入量 Added (ng/g)	测定值 Found (ng/g)	回收率 Recovery (%)
玉米 Maize	0.0	0.0	93.3	大米 Rice	0.0	0.1	106.7
	1.5	1.4			1.5	1.7	
花生 Peanut	0.0	0.2	100.0				
	1.5	1.7					

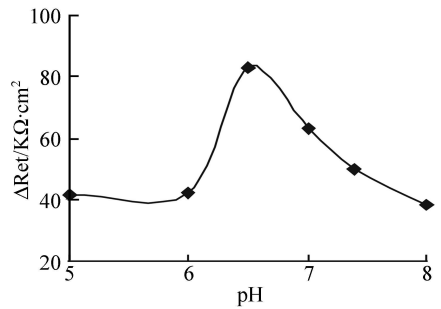


图 2 介质酸度对免疫反应的影响

Fig 2 Effect of acidity on immunoreaction

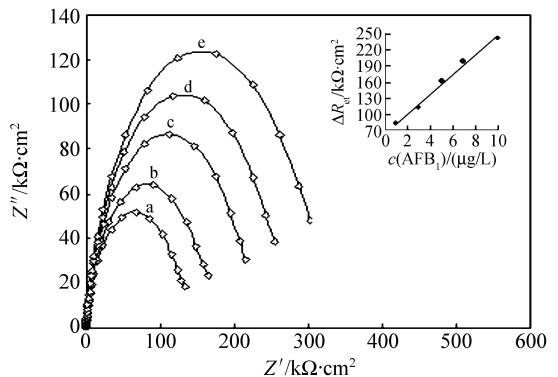


图 3 免疫传感器交流阻抗图

Fig 3 Complex impedance plots of immunosensor
AFB₁ 浓度 (Concentration, μg/L): 1.0 (a), 3.0 (b), 5.0 (c), 7.0 (d), 10.0 (e).

References

- 1 FENG Jian-Lei(冯建蕾). *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine* (中国畜牧兽医), **2005**, 32(12): 5~7
- 2 XIONG Li(熊丽), LU Lin(陆琳), LUO Chao(罗超), CHENG Tian-Yin(程天印). *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine* (畜牧兽医杂志), **2008**, 7(3): 39~42
- 3 Fu ZH, Huang X X, Min S G. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1209(1-2): 271~274
- 4 Shin W B, Kim J S, Kim J Y, Won-Bo S, Kim J S, Kim J Y, Choi J G, Je J H, Sergeevna K N, Alexandrovich E S, Chung D H. *Food Science and Biotechnology*, **2008**, 17(3): 623~630
- 5 Mary T, Weaver Carol M, Oles Carolyn J, Fry Frederick S Jr, Noonan Gregory O, Betz Joseph M, Rader Jeanne I. *J. AOAC Int*, **2008**, 91(3): 511~523
- 6 Omurtag Gulden Z, Gulin A, Turkan Y, Omer E. *Acta Pharmaceutica Turcica*, **1998**, 40(3): 125~130
- 7 WANG Cai-Yun(王彩云), WANG Zheng-Gang(王政纲), YUN Zhan-You(云战友). *Food Engineering* (食品工程), **2007**, (4): 58~60
- 8 LI Zuo-Qing(李佐卿), XIE Dong-Jun(谢东军), SUN Da-Wei(孙大为). *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory* (光谱实验室), **2001**, 18(1): 28~31
- 9 LIAO Yao-Zu(廖耀祖), HUANG Mei-Rong(黄美荣), LI Xin-Gui(李新贵). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(2): 291~298
- 10 LI Ting(李庭), ZENG Guang-Ming(曾光明), TANG Liu(汤琳), GAO Hui(高慧), LI Jian-Bing(李建兵). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(1): 122~126
- 11 LONG Feng(龙峰), SHI Han-Chang(施汉昌), HE Miao(何苗), ZHU An-Na(朱安娜), FENG Li-Xia(冯丽霞). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(6): 919~923
- 12 Piemarini S, Micheli L, Ammidia N H S, Paleschi G, Moscone D. *Biosensors and Bioelectronics*, **2007**, 22(7): 1434~1440
- 13 Adanyi N, Levkovets IA, Rodriguez-Gil S, Rona H A, Varadi M, Szendro I. *Biosensors and Bioelectronics*, **2007**, 22(6): 797~802

Immunosensor Based on Immobilizing Antibody of Aflatoxin B₁ Using Silica Sol-Gel Technology

SUN Xiu-Lan², WANG Zhong-Yun¹, FANG Yin-Jun³, CHEN Pei-Pei¹, LI Zai-Jun^{*1}

(¹School of Chemical and Material Engineering, ²School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122)

³(Zhejiang Zanyu Technology Co LTD., Hangzhou 310009)

Abstract In the presence of hydrochloric acid tetraethoxysilane was hydrolyzed and formed silica sol. Non-labeled immunosensor was fabricated by dropping the mixture solution of the silica sol and antibody of aflatoxin B₁ on the surface of glassy carbon electrode. In this work, a Fe(CN)₆^{3-/4-} phosphate buffer solution was employed as base solution for investigating cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopic (EIS) performances of the sensor, respectively. The experimental results indicated that because of the complex formed by the immunoreaction hindered the diffusion of Fe(CN)₆^{3-/4-} on the electrode surface, the redox peak current of the immunosensor in CV obviously decreased and its electron transfer impedance linearly increased with increasing the concentration of aflatoxin B₁ (AFB₁). When the medium acidity and incubation time were pH 6.5 and 20 min, respectively, the biggest electron transfer impedance changed value before and after the immunoreaction was obtained. Under the optimal conditions, a linear range to concentration of aflatoxin B₁ was 1~10 μg/L with a detection limit of 0.1 μg/L (S/N = 3). Proposed method is of high sensitivity and stability, it has been successfully applied to determine AFB₁ in maize, rice and peanut.

Keywords Aflatoxin B₁; Immunosensor; Electrochemical impedance spectroscopy; Sol-gel

(Received 28 April 2009; accepted 7 July 2009)