

• 论 著 •

一种用于检测赭曲霉毒素 A 的新型电化学免疫传感器的构建及表征分析*

张 弦, 杨弦弦, 卿 颖, 邱景富, 李朝睿[△](重庆医科大学公共卫生与管理学院/医学与社会发展研究中心/
健康领域社会风险预测治理协同创新中心 400016)

摘要:目的 建立一种新型电化学免疫传感器用于赭曲霉毒素 A(OTA)的快速检测。方法 以固载于玻碳电极(GCE)表面的单壁碳纳米管/壳聚糖(SWNTs/CS)复合物膜为基底构建 OTA 双层自组装免疫传感器,采用电镜扫描分析、方波伏安和循环伏安法对传感器进行表征分析,并研究其用于检测的特异性。结果 壳聚糖/单壁碳纳米管复合膜能够显著增加电化学免疫传感器检测 OTA 的灵敏度,能够有效地分辨不同种类的真菌毒素。结论 本研究构建的电化学免疫传感器检测 OTA 具有快速、简便、检出限低,特异性强等特点。

关键词: 电化学免疫传感器;赭曲霉毒素 A;单壁碳纳米管;壳聚糖

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.20.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)20-2950-03

Development and characterization analysis of a new type of electrochemical immunosensor for the detection of ochratoxin A*

Zhang Xian, Yang Xianxian, Qing Ying, Qiu Jingfu, Li Chaorui[△](School of Public Health, Chongqing Medical University/Research Center for Medicine and Social Development/
Innovation Center for Social Risk Governance in Health, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To develop a new type of electrochemical immunosensor for the detection of ochratoxin A(OTA). **Methods** Double layers of self-assembly immunosensor for the detection of OTA were constructed based on the composite single-walled carbon nanotubes(SWNTs)/chitosan(CS) membrane immobilized on glassy carbon electrode(GC). Scanning electron microscopy(SEM), square wave voltammetry and cyclic voltammetry were used to analyze the characterization of the sensor, then its specificity for detection was studied. **Results** SWNTs/CS composite membrane could increase the sensitivity of OTA detection significantly, and effectively distinguish the different types of mycotoxins. **Conclusion** The electrochemical immunosensor developed in the study is easy to operate and could detect OTA rapidly with good specificity and low detection limit.

Key words: electrochemical immunosensor; ochratoxin A; single-walled carbon nanotubes; chitosan

赭曲霉毒素是由曲霉菌属和青霉菌属几种菌产生的次生代谢产物,具有致畸、致癌、致突变、免疫学毒性等,国际癌症研究机构(IARC)将赭曲霉毒素定为2B类致癌物,分为赭曲霉毒素A、B、C等结构类似的化合物,其中以赭曲霉毒素A(OTA)毒性最大^[1]。OTA产生菌广泛分布于自然界,粮谷类、葡萄及葡萄酒、中草药、豆制品、啤酒、茶叶等多种农作物和食品均可被OTA污染^[2]。近年来关于赭曲霉毒素的危害已引起世界各国的极大关注,许多国家对其制定了最高允许量^[1,3]。高效液相色谱在最近的OTA国际标准体系中已经处于绝对的主导地位,作为定量的检测方法,在国内外实验室和检测机构得到普遍的使用^[4]。采用高效液相色谱法,或者质谱联用法对OTA进行检测,虽然具有结果准确、回收率高、精密度良好、重现性好等优点,但是成本高、操作过程复杂、时间长,无法满足现场检测的需要^[5]。基于免疫学原理的酶联免疫法检测OTA具有简便、快速、灵敏等特点,为快速大规模筛检提供了极大的帮助。但由于该类方法在检测复杂基质样品时,检测结果假阳性多^[6]。因此阳性样品应该用仪器法进行复测。

电化学免疫传感器是将免疫技术和电化学检测技术相结合的一种新分析方法,利用信号转换器(电化学工作站)把分子识别器(探针)与被测对象发生的物理或化学变化转变成电信号^[3]。该技术具有快速、灵敏、选择性高、操作简便等特点,因

此应用电化学免疫传感器检测OTA具有重要价值^[7]。电化学免疫传感器自建立以来,主要应用于重大疾病标志物的检测^[3]。近年来,该技术逐步被应用于食品中真菌毒素的检测,但研究相对较少,尤其针对食品中OTA的电化学生物传感器检测技术的研究与应用尚不成熟^[8-10]。为了弥补现有技术OTA检测的不足,本研究旨在建立一种新型电化学免疫传感器用于OTA的快速、灵敏检测。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 CHI660D型电化学工作站(上海辰华仪器公司),三电极体系:工作电极为自制免疫电极,参比电极为Ag/AgCl电极,对电极为铂丝电极。

1.1.2 试剂 OTA-牛血清清蛋白偶联物(OTA-BSA)、OTA单克隆抗体(anti-OTA)购自北京华安麦科生物技术有限公司、碱性磷酸酶标记马抗小鼠IgG(H+L)购自美国Vector实验室、OTA标准品、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、 α -萘基磷酸盐(α -NP)、壳聚糖(CS)均购自美国Sigma-Aldrich公司,羧基化单壁碳纳米管购自深圳纳米港有限公司,甲醇、丙酮等其他试剂均购自重庆茂业化学试剂有限公司。

* 基金项目:重庆市渝中区科技计划项目(20140119)。 作者简介:张弦,女,硕士研究生在读,主要从事食品安全方面的研究。 [△] 通讯作者, E-mail: crli@cqmu.edu.cn。

1.2 方法

1.2.1 检测原理 在玻碳电极(GCE)表面通过直接涂覆法修饰铺上一层羧基化单壁碳纳米管/壳聚糖(SWNTs-COOH/CS)复合材料,并利用 EDC/NHS 活化 SWNTs-COOH 上的羧基。将 OTA-BSA 通过蛋白质氨基端与羧基化单壁碳纳米管 SWNTs-COOH 上的活化羧基反应连接,并通过抗原抗体反应与同时加入的 OTA 单体来竞争吸附 anti-OTA,再加入碱性磷酸酶标记马抗小鼠 IgG(H+L)二抗,通过碱性磷酸酶与底物 α -NP 反应产生的电化学信号绘制标准曲线和得到实测样品 OTA 水平。

1.2.2 SWNTs-COOH/CS 复合材料的制备 将 CS 粉末溶解于 1%醋酸溶液中,制备浓度为 1 mg/mL 的 CS 溶液。取 5.0 mL 1 mg/mL CS 溶液加入 5.0 mg 羧基化单壁碳纳米管(SWNTs-COOH)超声分散 2 h 得均匀、稳定、分散良好的 SWNTs-COOH/CS 复合材料混悬液,其中 SWNTs-COOH 的终浓度为 1 mg/mL。在使用之前,于 4 °C 低温保存。

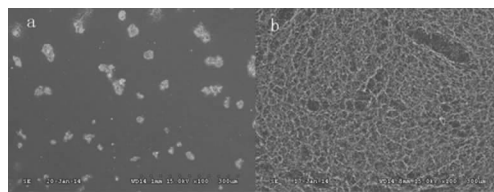
1.2.3 工作电极的修饰及功能化 (1)GCE 表面处理:GCE 在使用前用氧化铝粉抛光至镜面,先后分别在超纯水和 1:1 体积比的丙酮和硝酸中超声几分钟。随后再次将电极用超纯水超声几分钟,再用去离子水冲洗干净,在室温下晾干。(2)将 2 μ L 预先准备好的 SWNTs-COOH/CS 混悬液(1 mg/mL)小心地滴涂在处理干净的 GCE 表面。然后,在室温下将修饰的 GCE 过夜晾干得到羧基化单壁碳纳米管/壳聚糖复合材料修饰电极(SWNTs-COOH/CS/GCE)。(3)将所制备的 SWNTs-COOH/CS/GCE 用磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L, pH7.4)清洗后,浸入新鲜配制的 EDC/NHS 活化液(EDC 与 NHS 的浓度分别为 5、2 mmol/L)中,于 37 °C 温育 1 h,活化 SWNTs-COOH 上的羧基基团。(3)活化后的 SWNTs-COOH/CS/GCE 再用 PBS 缓冲液彻底清洗。将 10 μ L 的 OTA-BSA(5 μ g/mL)立即滴于电极表面,37 °C 温育 1.5 h。孵育完全之后,将制备的电极用 PBS 清洗。于室温在 10 mL 1%牛血清清蛋白(BSA)中封闭电极表面未反应的活性位点。最后,以 PBS 彻底清洗电极,得 OTA-BSA-SWNTs/CS/GCE 并置于 4 °C 的冰箱中待用。

1.3 电化学免疫传感器检测样品 将 5 μ L 用 PBS (pH7.4) 稀释到一定浓度的 OTA(0~500 ng/mL)和 5 mL 10 μ g/mL 的 anti-OTA 均匀混合,滴加在修饰了 OTA-BSA 的电极 OTA-BSA-SWNTs/CS/GCE 表面,37 °C 温育 90 min,得 anti-OTA-OTA-BSA-SWNTs/CS/GCE。在反应过程中,电极上固定的 OTA-BSA 与游离在混合液中的 OTA 共同竞争固定量的 anti-OTA。然后用 PBS 缓冲液(pH 7.4)清洗电极,置于 10 μ L 1:200 稀释的碱性磷酸酶标记马抗小鼠 IgG(H+L)二抗中,37 °C 温育 90 min,PBS 缓冲液(pH 7.4)清洗后,再以现配制的含 0.75 mg/mL α -NP 的二乙醇胺(DEA)缓冲液作为免疫反应缓冲体系,将工作电极置于其中,Ag/AgCl 电极为参比电极,铂丝电极为对电极,在室温下,用差分脉冲伏安法(DPV)进行测定。为了评价本免疫传感器的特异性,本研究对在检测 OTA 时可能会出现其他的 3 种真菌毒素黄曲霉毒素 B1 (AFB1)、玉米赤霉烯酮(ZEA)、伏马菌素 B1(FB1)进行了检测。将 AFB1、ZEA、FB1 各 1 μ g/mL 以及 100 ng/mL OTA 分别采用构建的电化学免疫传感器进行测定。

2 结果

2.1 对 SWNTs-COOH/CS 复合材料膜的表征 用 S-300N 扫描电镜进行扫描观察,纯纳米碳管呈明显的管状,在溶液中分散不均匀(图 1a),而在 CS 存在下,纳米碳管复合材料则均

匀分散(图 1b)。在 GCE 表面滴涂 SWNTs-COOH/CS,在室温晾干成膜后,肉眼观察电极:SWNTs-COOH/CS/GCE 表面可见一层均匀的膜状物质。

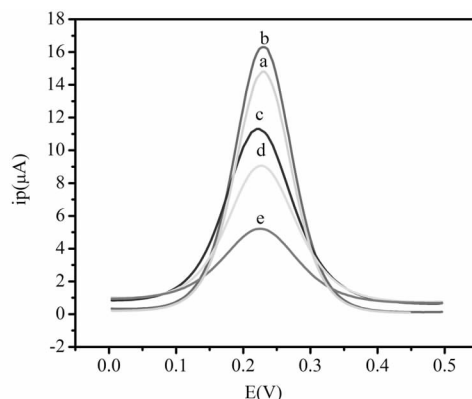


a: 纯纳米管在溶液中; b: SWNTs-COOH/CS 复合材料。

图 1 SWNTs-COOH/CS 复合材料混悬液电镜扫描

2.2 不同修饰电极的电化学表征 每一步不同修饰电极在 5 mmol/L 的铁氰化钾溶液中的方波伏安响应曲线,见图 2。当裸 GCE 表面修饰 SWNTs-COOH/CS 之后,峰值电流明显增大(图 2-曲线 b),说明 SWNTs-COOH/CS 薄膜能够促进溶液中的电子在电极表面的转移。当 OTA-BSA 滴加到活化的电极表面后,由于蛋白质的空间位阻现象和绝缘作用对电子转移构成了阻碍,峰值电流呈现明显的降低(图 2-曲线 c)。当电极通过 anti-OTA 的进一步修饰孵育后,增加的电阻使得峰值电流进一步降低(图 2-曲线 d),表明制备的电化学免疫传感器工作电极中 OTA-BSA 对 anti-OTA 进行了成功的识别与结合作用。当把一定浓度的 AP 标记的二抗滴加到修饰后的电极表面孵育过后,峰值电流再一步降低(图 2-曲线 e),表明 AP 标记的二抗成功地引入电化学免疫传感器的工作电极上。

由图 3 可以看出,曲线 a 为裸 GCE 在 Fe(CN)₆^{3-/4-}溶液中呈现的可逆氧化还原峰;当裸 GCE 修饰 SWNTs-COOH/CS 后,氧化还原电流明显增大(曲线 b),这是由于铺上 SWNTs 后促进电子的传递并增大了比表面积,溶液中的 Fe(CN)₆^{3-/4-}更易在电极表面发生电荷转移;当电极修饰 OTA-BSA(曲线 c)、OTA 抗体(曲线 d)、AP 标记二抗(曲线 e)之后,氧化还原电位依次逐步减小,这是因为 OTA-BSA、OTA 抗体、AP 标记二抗覆盖电极表面,膜厚度层层加大,溶液中的 Fe(CN)₆^{3-/4-}离子在电极表面发生电荷转移的难度也随之加大。结果与图 2 呈现出一致性,证明对电极的每一步修饰是成功的。

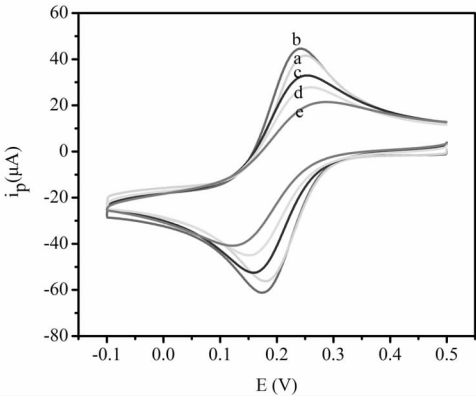


a: 未修饰的裸 GCE; b: 裸 GCE 表面修饰 SWNTs-COOH/CS 后; c: OTA-BSA 滴加到 GCE 表面后; d: GCE 通过 anti-OTA 的进一步修饰; e: 把一定浓度的 AP 抗 anti-OTA 抗体滴加到修饰后的电极表面孵育后。

图 2 自组装免疫传感器所对应的方波伏安响应曲线

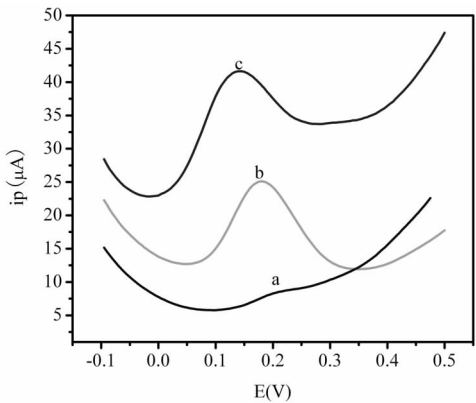
2.3 SWNTs/CS 复合膜对电流响应信号的影响 如图 4 所示,曲线 a 表明蛋白质不能直接有效地固定在裸 GCE 表面,所以响应电流很低;曲线 c 表明仅碳管在电极表面成膜之后,能够通过其羧基端与蛋白质氨基端形成稳定的结合,把抗原固定

在电极表面,所以其电流响应值比用裸 GCE 构建的传感器高,运用单一 SWNTs-COOH 修饰电极构建传感器有一个缺点,即其响应电流的基线很高,而且不稳定;曲线 b 运用 SWNTs-COOH/CS 复合材料修饰电极之后构建的传感器,不仅能够高效地固定检测抗原,而且还能有效降低和稳定该传感器电流响应的基线,并且该复合材料修饰电极之后对响应电流的大小并不影响。因此,采用 SWNTs-COOH/CS 修饰电极作为工作电极构建用于检测 OTA 的电化学免疫传感器具有优势。



a: 未修饰的裸 GCE; b: 裸 GCE 表面修饰 SWNTs-COOH/CS 后; c: OTA-BSA 滴加到 GCE 表面后; d: GCE 通过 anti-OTA 的进一步修饰; e: 把一定浓度的 AP 抗 anti-OTA 抗体滴加到修饰后的电极表面孵育后。

图 3 自组装免疫传感器所对应的循环伏安响应曲线



a: 裸 GCE 构建传感器的电流信号响应曲线; b: SWNTs-COOH/CS/GCE 构建传感器的电流信号响应曲线; c: SWNTs-COOH/GCE 构建传感器的电流信号响应曲线。

图 4 电极电流信号响应曲线

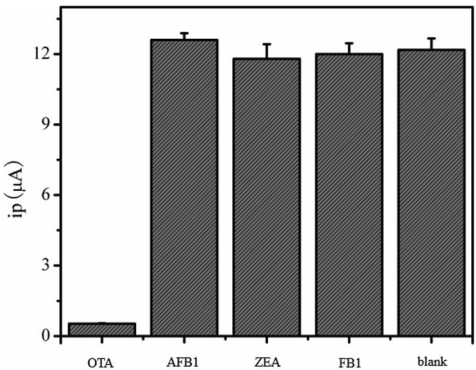


图 5 免疫传感器特异性分析

2.4 电化学免疫传感器的特异性分析 3 种真菌毒素的 DPV 响应电流接近于空白样(不含 OTA),然而 OTA 的 DPV 响应电流有明显的下降。这些结果说明制备的电化学免疫传感器能够有效地分辨不同种类的真菌毒素,具有良好的特异性,见图 5。

3 结 论

近年来,食品安全问题引起了全世界的普遍关注,尤其是毒素污染问题。OTA 在自然界中分布广泛,是目前花生等油料作物污染较严重并且毒性最强的天然污染物之一[1]。

本研究发明的电化学免疫传感器,利用了 SWNTs/CS 复合膜具有非常大的比表面积及良好的生物相容性,所以能够牢固地吸附 OTA-BSA,检测时能够有效增加抗体的负载量,并保持抗体的生物活性。此外,SWNTs-COOH/CS 复合材料还具有较好的电子传导作用,能够增加电极和样品溶液之间的电子转移,提高导电性能,明显增加了 OTA 测定的灵敏度,降低了 OTA 分析的检测下限。

参考文献

[1] Bui-Klimke TR, Wu F. Ochratoxin a and human health risk: a review of the evidence critical reviews in food science and nutrition [J/OL]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2014 [2015-03-01]. http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2012.724480#.VVBn_dJmTFg.

[2] Kuiper-Goodman T, Hiltz C, Billiard SM, et al. Health risk assessment of ochratoxin A for all age-sex strata in a market economy [J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2010, 27(2): 212-240.

[3] Ricci F, Volpe G, Micheli L, et al. A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis[J]. Anal Chim Acta, 2007, 605(2): 111-129.

[4] Grieshaber D, Mackenzie R, Voros J, et al. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures[J]. Sensors, 2008, 8(3): 1400-1458.

[5] Farré M, Kantiani L, Pérez S, et al. Sensors and biosensors in support of EU Directives[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2009, 28(2): 170-185.

[6] Laschi S, Centi S, Mascini M. Electrochemical arrays coupled with magnetic separators for immunochemistry[J]. Bioanal Rev, 2011, 3(1): 11-25.

[7] Kong W, Wei R, Logrieco AF, et al. Occurrence of toxigenic fungi and determination of mycotoxins by HPLC-FLD in functional foods and spices in China markets[J]. Food Chem, 2014, 146(3): 320-326.

[8] Haighton LA, Lynch BS, Magnuson BA, et al. A reassessment of risk associated with dietary intake of ochratoxin A based on a life-time exposure model[J]. Crit Rev Toxicol, 2012, 42(2): 147-168.

[9] 冯甜, 张弦, 杨弦弦, 等. 电化学免疫传感器检测样品中黄曲霉毒素 B1 的误差分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014(8): 947-948.

[10] 王利兵. 快速检测赭曲霉毒素 A 的可视金纳米棒试纸条及制备方法: 中国, 2011102794789[P]. 2011-09-20.

(收稿日期: 2015-04-08)