

纳米免疫传感器快速测定乳品中过敏原 β -乳球蛋白

闫蓉蓉, 李书国*

(河北科技大学食品与生物学院, 河北石家庄 050018)

摘要: 该研究以壳聚糖、石墨烯和纳米金为复合修饰材料固定化 β -乳球蛋白抗体制备了纳米免疫传感器, 建立了一种快速测定乳品中 β -乳球蛋白 (β -LG) 过敏原的方法。用循环伏安法对该纳米免疫传感器进行了表征, 以 1.0 mmol/L 的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 为探针, 对试验条件进行了优化, 当复合修饰液用量为 5 μ L, 电解质 pH 值为 7.0, 抗体固载量为 40 ng, 孵育温度为 37 $^{\circ}$ C, 孵育时间 30 min 时为最佳反应条件。该纳米免疫传感器免疫响应电流与 β -LG 质量浓度的对数在 2.5~100 ng/mL 之间具有良好的线性关系, 其检出限为 0.75 ng/mL, 同时该纳米免疫传感器具有良好的稳定性、特异性和重现性。该纳米免疫传感器用于实际样品 β -乳球蛋白的检测, 其加标回收率位于 88.59%~97.64% 之间, 回收率较好, 检测结果比 ELISA 精度更高, 因此该法可用于乳制品中 β -乳球蛋白过敏原的快速、精确检测。

关键词: 免疫传感器; 乳球蛋白; 纳米材料; 乳品过敏原; 食物过敏

文章编号: 1673-9078(2022)08-319-326

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.8.1001

Preparation of Nano-immunosensor for Rapid Determination of Allergen β -Lactoglobulin in Dairy Products

YAN Rongrong, LI Shuguo*

(Hebei University of Science and Technology, College of Food and Biology, Shijiazhuang 050018, China)

Abstract: In this study, a nano-immunosensor was constructed through using chitosan, graphene and gold nanoparticles as the composite modification material to immobilize β -lactoglobulin (β -LG) antibody, to establish a rapid method for the determination of β -LG. The nano-immunosensor was characterized by cyclic voltammetry, using 1.0 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ as the probe, and the experimental conditions were optimized. The optimal conditions were as follows: amount of the composite modification solution, 5 μ L; pH of electrolyte solution, 7.0; loading amount of antibody, 40 ng; incubation temperature, 37 $^{\circ}$ C; incubation time, 30 min. There was a good linear relationship between the immune-response current of the nano-immunosensor and the logarithm of β -lactoglobulin mass concentration at 2.5~100 ng/mL, with a limit of detection of 0.75 ng/mL. The nano-immunosensor exhibited good stability, specificity and reproducibility, and had a recovery rate of the spiked standard between 88.59% to 97.64% when it was applied to the determination of lactoglobulin in dairy products. The recovery rate was good, and the results were more accurate than those obtained by ELISA. Therefore, this methods can be used for rapid and accurate determination of β -lactoglobulin allergen in dairy products.

Key words: immunosensor; β -lactoglobulin; nanomaterials; dairy allergen; food allergy

引文格式:

闫蓉蓉,李书国.纳米免疫传感器快速测定乳品中过敏原 β -乳球蛋白[J].现代食品科技,2022,38(8):319-326,+333

YAN Rongrong, LI Shuguo. Preparation of nano-immunosensor for rapid determination of allergen β -lactoglobulin in dairy products [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(8): 319-326, +333

食物过敏已成为一项严重的全球性公共卫生问题,近年来发病率在不断上升^[1]。牛乳过敏十分常见,

收稿日期: 2021-09-08

基金项目: 河北省重点研发计划项目 (17227113D)

作者简介: 闫蓉蓉 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品过敏原的快速检测与控制, E-mail: 940846286@qq.com

通讯作者: 李书国 (1969-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品加工原理与安全控制, E-mail: lishuguo602@126.com

统计研究表明,我国婴幼儿人群中近 3%的人对牛乳过敏^[2]。牛乳中有 30 种以上的蛋白质存在潜在致敏性,其中乳清蛋白和酪蛋白是牛乳中的主要过敏原。而 β -乳球蛋白在乳清蛋白中占 50%,牛乳总蛋白中占 10%,超过 80%的牛乳过敏人群对 β -乳球蛋白过敏^[3],所以检测食品中的牛乳过敏原具有十分重要的意义。

目前,食品过敏原的检测主要有高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法等仪器方法^[4,5],尽管这些方法

有着结果准确、灵敏度高的优点,但都存在着操作复杂、价格昂贵、耗时长等不足^[6]。作为一种新型生物传感器技术,免疫传感器根据标记与否,又分为标记性免疫传感器与非标记性免疫传感器^[7]。标记性免疫传感器即采用某种标记物使免疫反应产生特定的信号,通过检测这些信号定量检测待测物质。非标记性免疫传感器是通过换能器将抗原抗体结合后产生的变化转化成光电信号,记录、处理得到的光电信号即可检测待测物质。与各类仪器方法相比,免疫传感器技术具有检测速度快、成本低廉、操作简单、灵敏度高、特异性强等优点,适用于各类食品基质的检测^[8]。

在免疫传感器技术中,关于检测 β -乳球蛋白的文献并不多,Eissa等^[9]研制出的无标记电化学免疫传感器用于检测牛乳过敏原 β -乳球蛋白,检测的线性范围为1 pg/mL~100 ng/mL,检出限为0.85 pg/mL;Ruiz-Valdepenas等^[10]建立的夹心型电化学免疫方法,对 β -乳球蛋白的线性检测范围为2.8~100 ng/mL,检出限为0.8 ng/mL。本文的创新点在于用一种操作简单、检测迅速的电化学免疫传感器检测 β -乳球蛋白,石墨烯-壳聚糖-纳米金复合材料制备简便,由于石墨烯-壳聚糖-纳米金修饰电极检测过敏原的文献较少,因此本文选取了这三种修饰材料。

本文以壳聚糖、石墨烯和纳米金为复合修饰材料固定化 β -乳球蛋白抗体制备一种纳米免疫传感器,石墨烯(GS)具有优良的性能与特殊的结构,壳聚糖(CS)具有优秀的生物相容性与成膜性,因此石墨烯和壳聚糖广泛应用于修饰电极领域,然而由于石墨烯材料易发生不可逆团聚,因此具有较低的分散性,将石墨烯与壳聚糖按照合适的比例混合能够使石墨烯更均匀地分散在壳聚糖溶液中,增强电子传递性能,制备的纳米金对探针的氧化还原反应具有催化作用,因此对免疫响应电流具有放大作用,可提高该免疫传感器的灵敏度,以该纳米免疫传感器为基础,建立了一种快速测定乳品中 β -乳球蛋白过敏原的方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

β -乳球蛋白(β -LG)标准品,美国Sigma公司; β -乳球蛋白多克隆抗体(1 mg/mL),美国Abcam公司;氯金酸(48%),上海麦克林生化科技有限公司;壳聚糖,北京索莱宝科技技术有限公司;99%石墨烯,北京德科岛金科技有限公司;牛血清白蛋白,上海翊圣生物科技有限公司;对氨基苯甲酸、冰乙酸、柠檬酸三钠,AR,天津市永大化学试剂有限公司;乳清蛋白

粉,美国Leprino;水解乳清蛋白粉,TATUA;乳粉,新西兰安佳全脂奶粉。

1.2 仪器与设备

LK98B II型微机电化学分析系统,天津兰力科化学电子高技术有限公司;FRESCO21型冷冻离心机,美国赛默飞世尔公司;RHD-S025型恒温磁力搅拌器,德国IKA公司;GZX-9070 MBE型电热鼓风干燥箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

1.3 方法

1.3.1 CS/GS/AuNPs 免疫传感器的制备

1.3.1.1 玻碳电极预处理

将玻碳电极(GCE)用超纯水冲洗一遍,采用粒径0.05 μm 的氧化铝抛光粉打磨抛光至电极表面光滑,超纯水冲洗电极,再将其依次放置于硝酸溶液(体积分数50%)、丙酮和超纯水中分别超声2 min,氮气吹干备用。

1.3.1.2 免疫传感器的复合修饰材料制备

分别配制1 mg/mL的壳聚糖溶液和1 mg/mL的石墨烯溶液;制备纳米金颗粒(AuNPs)的方法,即把所有玻璃器皿均用王水浸泡过夜,取100 mL 0.01%氯金酸溶液于锥形瓶中,封口膜封口,100 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌加热至沸腾,快速冲破封口膜并加入3 mL 1%的柠檬酸三钠,较短时间内溶液颜色由淡黄色变为酒红色,持续搅拌10 min不变色,移去加热源,待降至室温存于玻璃容器,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

分别移取壳聚糖溶液、石墨烯溶液各1.5 mL,混匀超声10 min。随后加入纳米金溶液3 mL,超声分散处理15 min,制取壳聚糖-石墨烯-纳米金(CS/GS/AuNPs)悬浮液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.1.3 β -乳球蛋白免疫传感器制备

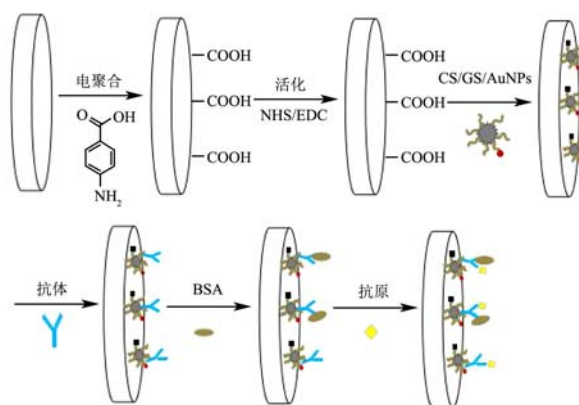


图1 β -LG 免疫传感器制备流程

Fig.1 The preparation process of β -LG immunosensor

关于检测 β -乳球蛋白的免疫传感器制备流程如图

1 所示。利用三电极系统,以预处理的玻碳电极为工作电极、Ag/AgCl 电极为参比电极、铂丝电极为辅助电极。首先进行电聚合处理,在-1.5~0.8 V 区间内,以 50 mV/s 的扫速,在新鲜配制的 1 mmol/L 对氨基苯甲酸溶液中循环伏安(CV)扫描 15 圈。冲洗电极晾干,在表面滴加 5 μ L 的 1-乙基(二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)混合溶液活化处理 1 h,其中 EDC 为 400 mmol/L, NHS 浓度为 100 mmol/L,现配现用。冲洗晾干,再在其表面滴加 5 μ L 分散均匀的 CS/GS/AuNPs 修饰液,CS 中氨基与玻碳电极表面活化后的羧基发生酸胺缩合反应,可将修饰液固定在电极表面,室温晾干后滴加 4 μ L β -乳球蛋白抗体(浓度为 10 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 下温育 1 h,冲洗后滴加 5 μ L 质量分数为 1%的牛血清白蛋白溶液,用于封闭剩余的未反应活性位点,4 $^{\circ}$ C 下封闭 30 min,制得 anti- β -LG/CS/GS/AuNPs 修饰的电化学免疫传感器,4 $^{\circ}$ C 下保存备用。

1.3.1.4 电化学分析方法

在本文构建的无标记电化学免疫传感器中,当电极表面滴加修饰液、抗原、抗体以及抗原抗体发生免疫复合反应生成络合物时,电极表面的阻抗、电导率等均会产生变化。传感器会将电极表面发生的电子转移变化转化成可记录的电信号,通过检测这些电信号来标识修饰后的电流变化。

在电化学分析过程中,均采用三电极系统进行,即玻碳电极为工作电极,Ag/AgCl 电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,在 1.0 mmol/L 的 $K_3[Fe(CN)_6]$ +0.1 mol/L KCl+0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH=7.0)中反应。针对玻碳电极在修饰以及免疫过程中的电化学特征,应以修饰免疫后的玻碳电极(anti- β -LG/CS/GS/AuNPs/GCE)为工作电极,运用 CV 法(电压: -0.2~0.6 V,扫描速度: 50 mV/s)记录峰值变化。

1.3.2 免疫传感器检测条件优化

1.3.2.1 复合修饰液的配比及用量的筛选

将制备的壳聚糖和石墨烯按照体积比为 0.5、1.0 和 1.5 均匀混合为 2 mL 修饰液,修饰电极采用循环伏安法扫描得到壳聚糖与石墨烯的最佳体积比,随后将壳聚糖石墨烯混合物与纳米金按照 0.5、1.0 和 1.5 体积比混合,循环伏安法扫描可得免疫传感器修饰液配比。将修饰液 CS/GS/AuNPs 按照 1、3、5、7、9 μ L 体积分别滴涂在玻碳电极上,CV 扫描记录峰电流响应值。

1.3.2.2 底液 pH 值的选择

将制备好的免疫传感器在 pH 值为 6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0 的 PBS 溶液中进行 CV 扫描测试,记录电流

响应值。

1.3.2.3 抗体固定量的筛选

在免疫传感器制备过程中,将 β -LG 抗体分别以 20、30、40、50、60 ng 滴涂在电极表面,随后与同一浓度 β -LG 温育后采用 DPV 扫描并记录免疫前后的峰电流变化。

1.3.2.4 孵育温度与时间的筛选

抗原抗体分别在温度 26、32、37、42 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min,运用 DPV 扫描并记录免疫前后的峰电流值变化。抗原抗体在 37 $^{\circ}$ C 下,分别温育 10、20、30、40、50、60 min,DPV 扫描并记录免疫前后的峰电流值变化。

1.3.3 标准曲线的建立

将 β -乳球蛋白标准品配制为 2 倍梯度稀释浓度的溶液,并滴涂在制备好的免疫传感器上,得到 β -LG/anti- β -LG/CS/GS/AuNPs 电极,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,通过三电极系统,运用差分脉冲伏安法(DPV,电位: -0.2~0.6 V)测定并记录不同浓度下的 β -乳球蛋白峰电流值 I。通过分析 β -LG 免疫前后的峰电流差值(ΔI)与对应质量浓度对数($\log C_{\beta-LG}$)的关系,绘制 β -LG 免疫传感器的标准曲线,建立线性回归方程。

1.3.4 实际样品的检测

1.3.4.1 样品处理

选取市售乳粉、乳清蛋白粉和水解乳清蛋白粉 3 种样品进行检测。乳粉预处理方法:取 0.5 g 样品置于 5 mL PBS 溶液中,剧烈震荡 5 min 混匀,在 4 $^{\circ}$ C 冷冻离心机 2500 G 转速下离心 20 min,弃脂肪层,取上清备用。乳清蛋白粉和水解乳清蛋白粉均用 PBS 配制为 25 mg/mL 的溶液,振荡 5 min 充分混匀备用。

1.3.4.2 样品检测方法

将待测样品稀释到最佳检测范围,并吸取 5 μ L 滴涂在制备好的电化学免疫传感器上,置于 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min,采用 DPV 扫描记录峰电流变化,将测得的峰电流值代入标准曲线,求得待测样品中 β -LG 浓度。同时用 ELISA 试剂盒检测,与免疫传感器的检测结果做对比。

1.4 数据处理

以上试验均为 3 次平行测定并取其平均值,通过 SPSS 软件开展数据统计分析,利用 Origin Pro v8.0 软件绘制相关数据图。

2 结果与分析

2.1 免疫传感器的表征

2.1.1 CS/GS/AuNPs 修饰电极的 electrochemical 表征

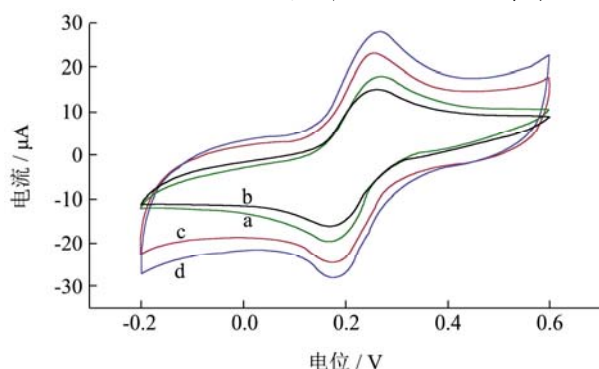


图2 不同修饰电极的循环伏安图

Fig.2 Cyclic Voltammetry of different modified electrodes

注: a: GCE; b: CS/GCE; c: CS/GS/GCE; d: CS/GS/AuNPs/GCE.

通过研究不用修饰材料的玻碳电极在 1.0 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ +0.1 mol/L KCl+0.2 mol/L PBS (pH=7.0) 的测试底液中变化, 采用 CV 法分别对裸 GCE (a)、CS/GCE (b)、CS/GS/GCE (c) 和 CS/GS/AuNPs/GCE (d) 进行表征, 结果如图 2 所示。 $[Fe(CN)_6]^{3-}$ 在裸玻碳 GCE 上出现一对较好的氧化还原峰, 当修饰 CS 后, 可明显观察到峰电流减小, 表明 CS 已成功固定在裸 GCE 表面, 并阻碍了电子的转移。当修饰了 CS/GS 后, 发现其氧化还原峰的电流迅速增大, 表明通过导电材料修饰后电子更加容易在底液和电极之间转移。利用成膜性较好的壳聚糖溶液分散高比表面积的石墨烯和纳米金^[11], 较小的石墨烯粒子和球形态的纳米金为氧化还原探针提供了更快的电子转移速度和更多的结合位点, 增加 β -LG 抗体在传感器表面的固定量。当再次修饰 CS/GS/AuNPs 材料后, 由于纳米金的大比表面积和高传导性能特点, 进一步加快电子传递速率, 氧化还原峰电流值达到最大。可依据 Randles-Sevcik 方程进行计算^[12], 电极的电极活性面积由公式求出:

$$I = 2.69 \times 10^5 AD^{1/2} n^{3/2} \gamma^{1/2} C$$

式中:

A—有效电极面积, cm^2 ;

I—阳极峰电流, μA ;

D—扩散系数, $7.6 \times 10^{-6} cm^2/s$;

n—参与氧化还原反应的电子数, $n=1$;

γ —电位变化速率, 0.05 V/s;

C— $K_3Fe(CN)_6$ 的浓度, 1 mmol/L;

通过计算可得裸 GCE 电极、CS/GS 电极和 CS/GS/AuNPs 电极的有效电极面积分别为 $0.089 cm^2$ 、 $0.136 cm^2$ 和 $0.170 cm^2$ 。表明经过石墨烯和纳米金修饰后的电极活性表面面积明显增大, 同时也表明纳米金对该修饰电极具有电信号放大作用, 使电化学免疫传感器

具有更灵敏的检测度。

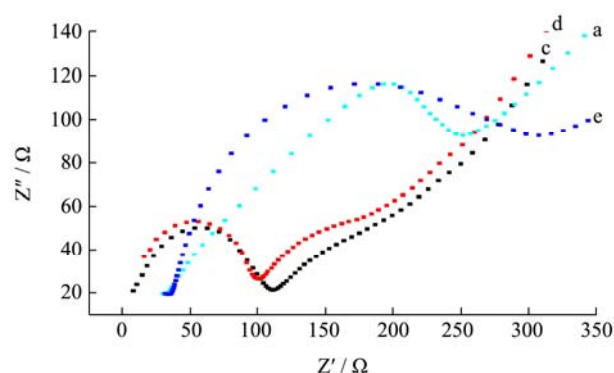


图3 不同修饰电极交流阻抗曲线

Fig.3 Impedance spectra curves of different modified electrodes

注: a: GCE; c: CS/GS/GCE; d: CS/GS/AuNPs/GCE; e: anti- β -LG/CS/GS/AuNPs/GCE.

图 3 是在 1.0 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ +0.1 mol/L KCl +0.2 mol/L PBS (pH=7.0) 的测试底液中进行得到的交流阻抗图。当电极表面滴涂不同的修饰液后, 阻抗值会发生相应的变化。与玻碳电极的阻抗图(曲线 a)相比, 电极表面滴加 CS/GS 后(曲线 c), 阻抗值会变小, 说明 CS-GS 修饰液能够提高电极的导电率; 当滴加 CS/GS/AuNPs 修饰液后(曲线 d), 电极表面的阻抗值进一步降低, 表明 CS-GS 修饰液与纳米金修饰到了电极表面, 能够显著提高电极表面的导电性, 促进 $K_3[Fe(CN)_6]$ 与电极界面间的电子转移; 当 β -LG 抗体与电极表面结合后(曲线 e), 由于抗体属于大分子蛋白, 在电极表面作用后使电子转移速度降低, 因此阻抗值变大。

2.1.2 免疫反应的 electrochemical 表征

在制备好的 CS/GS/AuNPs/GCE 表面滴加 8 μL β -乳球蛋白抗体, 孵育一定时间后, 通过循环伏安法扫描可明显观察到其氧化还原峰电流相比修饰电极有明显下降, 由于抗体属大分子蛋白, 电阻率相对较大, 阻碍了铁氰化钾分子在电极表面和底液之间的传递, 导致电流值下降, 同时也表明 β -LG 抗体固定在了电极表面。随后在其表面再滴加 1% BSA 溶液封闭电极上剩余的活性位点, 最后滴加一定浓度 β -乳球蛋白标准品, 氧化峰电流值进一步下降, 表明抗原抗体发生了特异性免疫结合反应, 会进一步增大电子传递较高稳定性阻力。如图 4 所示。

anti- β -LG/CS/GS/AuNPs/GCE 在 1.0 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ +0.1 mol/L KCl+0.2 mol/L PBS (pH 为 7.0) 测试底液和 -0.2~0.6 V 的电位范围内, 进行不同扫描速度 (a-h: 20~160 mV/s) 的循环伏安法处理。由图 5 可知, 免疫传感器的循环伏安氧化还原峰电流随着扫描速率的增大而增大, 氧化峰和还原峰的电流值都

分别与各自的扫描速度平方根呈现以下线性关系：氧化峰 $y_1=2.0675x+3.4279$ ，线性相关系数 $R_1^2=0.9960$ ；还原峰 $y_2=2.24104x+1.86741$ ，线性相关系数 $R_2^2=0.9946$ 。由此表明发生在该电极上的反应受扩散过程控制。

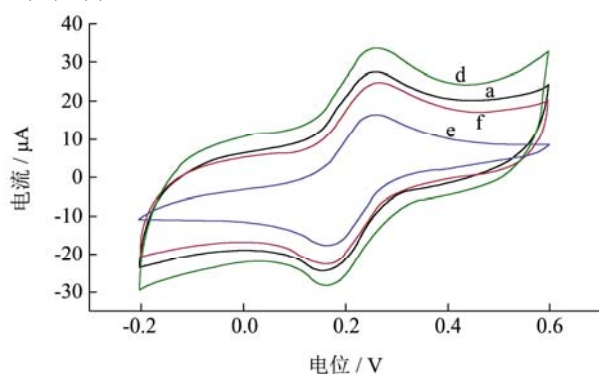


图4 免疫传感器发生免疫响应前后的循环伏安图

Fig.4 Cyclic voltammetry before and after immune response of immunosensor

注：a: GCE; d: CS/GS/AuNPs/GCE; e: anti-β-LG/CS/GS/AuNPs/GCE; f: β-LG/anti-β-LG/CS/GS/AuNPs/GCE。

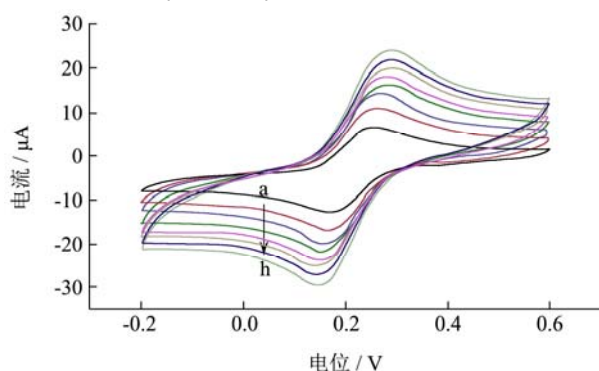


图5 免疫传感器在不同扫描速度下的循环伏安图

Fig.5 Cyclic voltammetry of immunosensor at different scanning speeds

注：扫描速度 a-h: 20、40、60、80、100、120、140、160 mV/s。

2.2 实验条件优化

2.2.1 修饰液的配比及用量的确定

将不同配比的修饰液等体积滴涂电极表面，结果如图6所示，壳聚糖和石墨烯体积比为1:1时，电流最大，随后加入纳米金，体积比为1.0时峰电流也达到最大，当再增加体积比时，峰电流变化缓慢，因此配制修饰液时，选择壳聚糖和石墨烯体积比为1.0，随后纳米金再以体积比1.0加入其余两个的混合液。将制备好的修饰液以不同体积修饰玻碳电极，结果如图6所示，峰电流先快速增大后又基本维持不变，当CS/GS/AuNPs为5 μL时，达到最大峰电流值，表明

此时修饰材料最大程度地吸附在电极表面，当再增大修饰量，电极吸附量已经饱和，因此电流值基本保持不变，故选择5 μL作为电极表面修饰量。

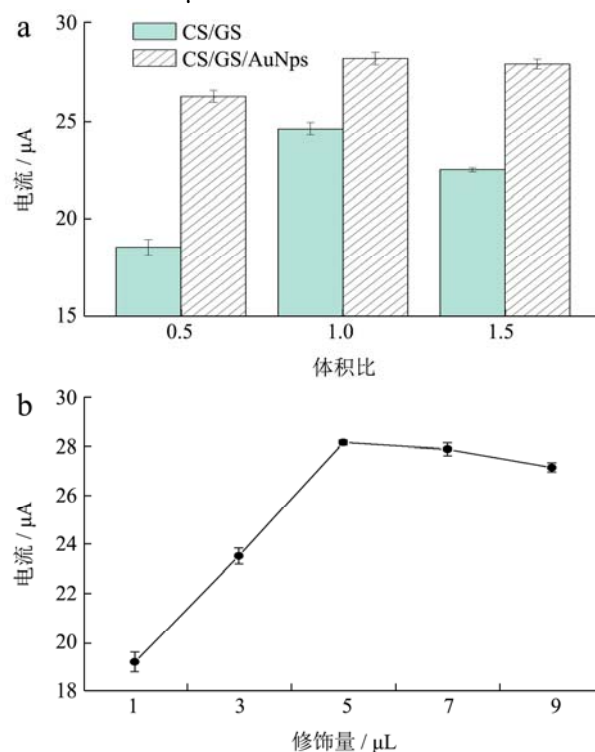


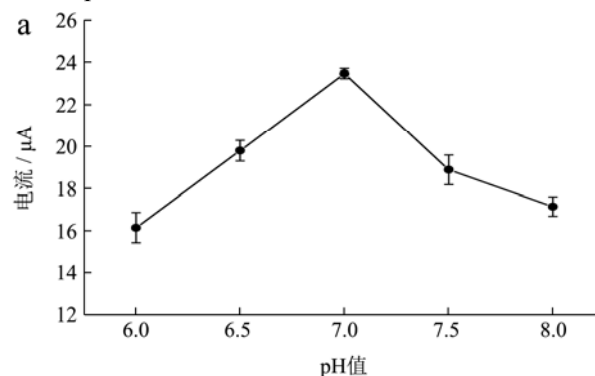
图6 不同修饰液配比及不同修饰量对免疫传感器的响应峰电流影响

Fig.6 Effects of different modification solution ratio and different modification amount on the response peak current of immunosensor

2.2.2 不同反应条件对免疫传感器响应电流的影响

2.2.2.1 底液 pH 值对免疫传感器的影响

底液 pH 值对免疫传感器检测精确度密切相关，pH 值可直接影响吸附在电极表面的 β-乳球蛋白抗体的活性，导致检测结果的变化。如图7a所示，随着底液 pH 值增大，免疫响应电流值先增大后减少，当 pH 值为7.0时峰电流值达到最大。表明 pH 值过大过小都抑制了 β-乳球蛋白抗体的活性，导致电流值下降，因此选择 pH 值7.0作为最佳测试底液。



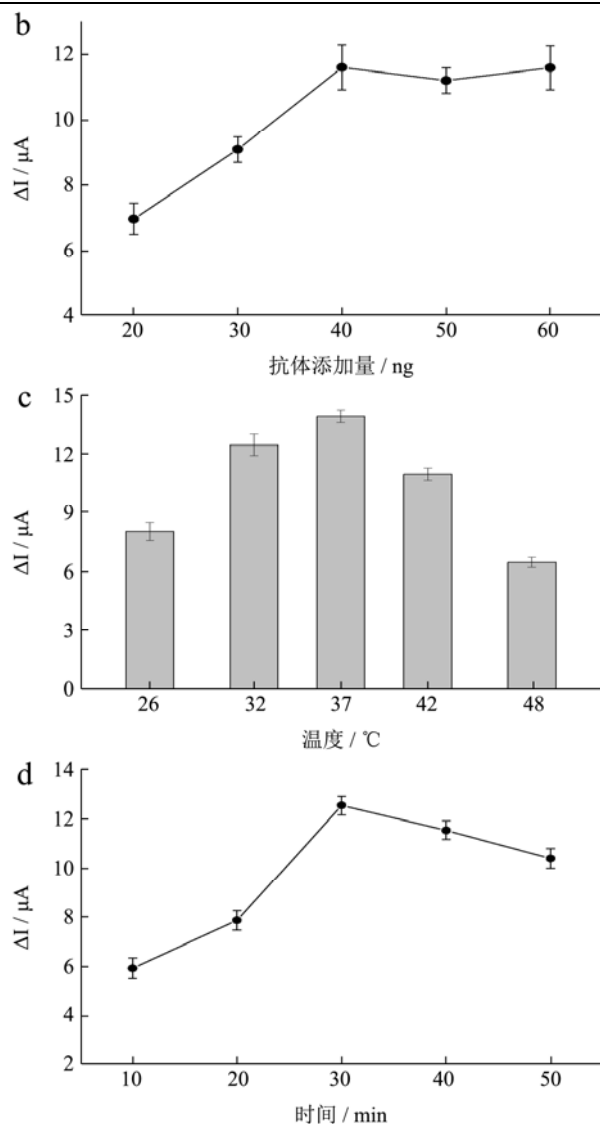


图7 不同反应条件对免疫传感器响应电流的影响

Fig.7 Effects of different reaction conditions on the response current of immunosensor

注: a: 底液 pH 对 CV 氧化峰电流影响; b: 抗体固载量对免疫前后峰电流差值影响; c: 孵育温度对免疫前后峰电流差值影响; d: 孵育时间对免疫前后峰电流差值影响。

2.2.2.2 抗体固载量对免疫传感器的影响

抗体固载量影响抗原抗体在免疫传感器表面的吸附量进而影响电流响应, β -乳球蛋白抗体分别以 20、30、40、50、60 ng 质量滴涂在电极表面, DPV 扫描结果如图 7b 所示。增加抗体滴涂量, 免疫响应峰电流差值 ΔI 迅速增大随后逐渐趋于平缓。当固载量较少时, 抗原抗体吸附在电极表面的数量较少, 同样电子传递阻力也较小, 峰电流值较大; 当抗体固载量达到 40 ng 后, 抗原抗体完全结合达到饱和, 导电能力下降, DPV 峰电流差值达到顶峰, 当再增加滴涂量其电流响应值变化不大, 因此选择 40 ng 作为 β -乳球蛋白最适抗体固载量。

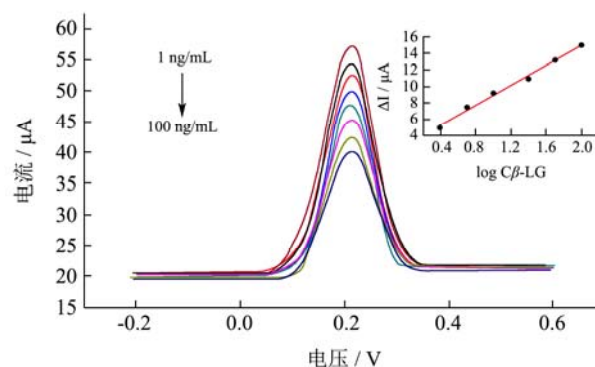
2.2.2.3 孵育温度对免疫传感器的影响

抗原抗体的孵育温度在免疫传感器检测中尤为重要, 在一定范围内升高孵育温度可加快抗原抗体充分结合, 但温度过高亦可破坏抗体蛋白结构影响 DPV 峰电流响应。将 β -乳球蛋白标准品与免疫传感器在 26~48 $^{\circ}C$ 温育, 结果显示免疫前后峰电流变化值 ΔI 随着温度升高也逐渐增大, 这是由于抗原抗体复合物的不断增多导致电子传递阻力增大, 造成免疫前后峰电流变化值也变大。如图 7c 所示, 当温度为 37 $^{\circ}C$ 时, ΔI 达到最大, 随后温度升高 ΔI 随之减小, 这是由于温度过高致使抗体失活, 抗原抗体复合物减少, 因此选择 37 $^{\circ}C$ 为最佳孵育温度。

2.2.2.4 孵育时间对免疫传感器的影响

免疫传感器的电信号输出也受抗原抗体孵育时间的影响。如图 7d 所示, 随着 β -乳球蛋白抗原与抗体免疫反应时间的增加, 其免疫前后 DPV 峰电流差值 ΔI 也逐渐增大, 抗原抗体结合需要一定时间, 该过程并没有形成稳定的复合物固定在电极表面。但当孵育时间到达 30 min 以后, 其免疫前后 ΔI 趋于平缓, 表明此时电极表面的抗原抗体已充分反应结合, 因此选择 30 min 为最佳孵育时间。

2.3 β -乳球蛋白标准曲线的建立

图8 β -LG 浓度对免疫传感器响应电流的影响Fig.8 Effect of β -LG concentration on response current of immunosensor

用制备好的电化学免疫传感器通过差分脉冲伏安法测定在浓度为 0、1、2.5、5、10、25、50、100 ng/mL 的 β -乳球蛋白标准品溶液的峰电流值。结果如图 8 所示, 免疫前后的峰电流差值 ΔI 与 β -乳球蛋白质量浓度的对数 ($\log C_{\beta-LG}$) 在 2.5 ng/mL~100 ng/mL 范围内成正比关系, 线性方程为 $y=5.998x+2.937$, $R^2=0.99064$, 检出限 ($S/N=3$) 为 0.75 ng/mL。Boitz 等^[13]建立了一种 UPLC 用于检测热处理牛乳样品中的 β -乳球蛋白, 此方法的线性检测范围为 20 $\mu g/mL$ ~560 $\mu g/mL$, 检出限为 7 $\mu g/mL$, 检测共耗时 3 min。Ji 等^[14]开发和验证了一种

基于液相色谱-串联质谱法的方法用于检测食品中的牛奶过敏原, 此方法对 β -乳球蛋白的线性检测范围为 0.48~31.25 $\mu\text{g/mL}$, 检出限为 0.20 $\mu\text{g/mL}$ 。如表 1 所示,

与其他方法相比, 本文制备的免疫传感器具有更低的检测限, 可用于牛乳过敏原 β -乳球蛋白的痕量检测。

表 1 β -乳球蛋白三种检测方法的对比

性能	电化学免疫传感器	超高效液相色谱法 ^[13]	液相色谱-串联质谱法 ^[14]
线性范围	2.5~100 ng/mL	20~560 $\mu\text{g/mL}$	0.48~31.25 $\mu\text{g/mL}$
检出限	0.75 ng/mL	7 $\mu\text{g/mL}$	0.20 $\mu\text{g/mL}$
加标回收率	88.59%~97.64%	103%	-
检测时间	15 s	3 min	-

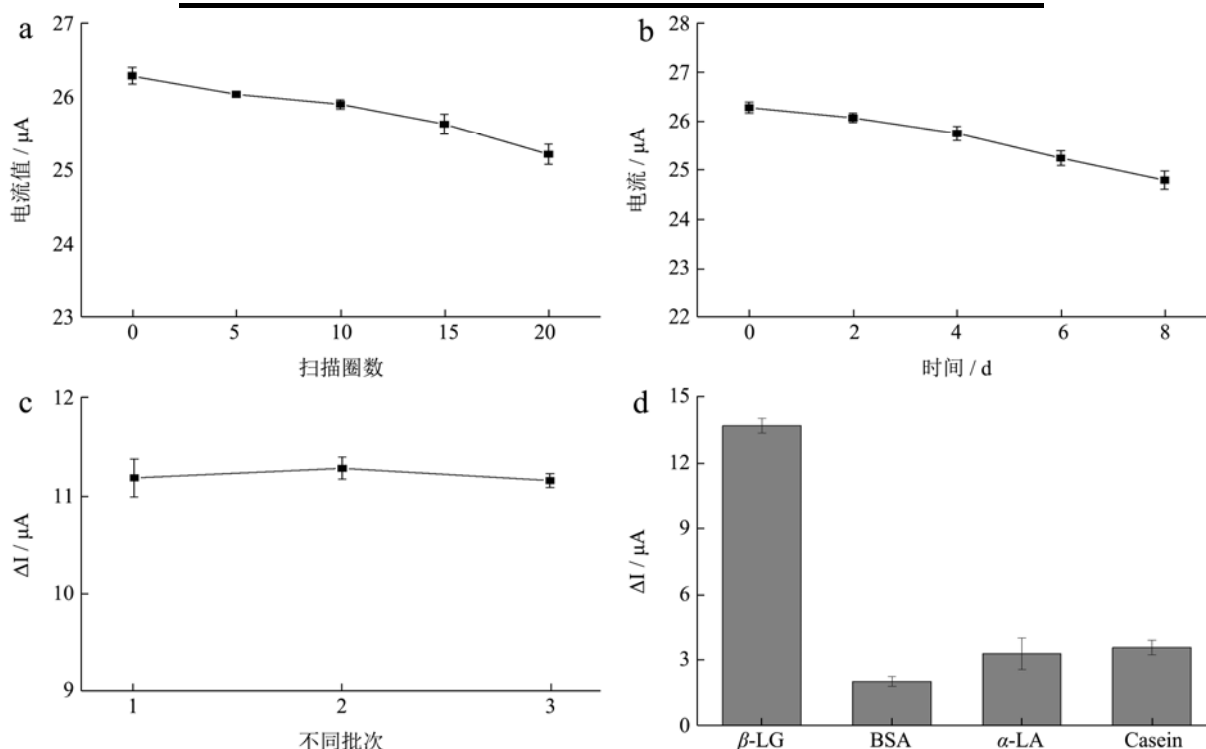


图 9 免疫传感器的稳定性、重现性与特异性数据图

Fig.9 Data diagram of stability, reproducibility and specificity of immunosensor

注: a: 扫描圈数对免疫响应电流的影响; b: 贮存天数对免疫响应电流的影响; c: 免疫传感器的重现性结果; d: 免疫传感器的特异性结果。

2.4 免疫传感器的稳定性、重现性与特异性

在完全相同的检测条件下, 将制备的 anti- β -LG/CS/GS/AuNPs 免疫传感器分别扫描 5 圈、10 圈、15 圈、20 圈, 结果如图 9a 所示, 连续扫描 20 圈, 电流响应值仅下降 4.01%, 同样将制备好的免疫传感器于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 每隔 2 d 检测其电流值, 结果如图 9b 所示, 1 周后电流下降率为 5.66%, 表明制备的免疫传感器拥有较高稳定性。分别制备不同批次的 3 支免疫传感器并检测同一浓度 β -乳球蛋白, 记录免疫前后的峰电流变化值 ΔI , 结果如图 9c 所示, 其平均变化率仅为 5.40%, 表明该传感器重现性较好。

将免疫传感器与 3 种非特异性蛋白 BSA、 α -LA

和 Casein 孵育, 与特异性蛋白 β -乳球蛋白对照, 其中 β -乳球蛋白浓度为 100 ng/mL, 其余 3 种为 1000 ng/mL, 采用差分脉冲伏安法扫描测得免疫前后峰电流差值 ΔI , 结果如图 9d, BSA、 α -LA 和 Casein 免疫前后的峰电流变化远小于 β -乳球蛋白, 因此表明该免疫传感器的特异性较好。

2.5 样品检测及其加标回收实验

经过 1.3.4 处理后的 3 种样品, 在免疫传感器的最优检测条件下进行 DPV 扫描, 记录对应的免疫前后峰电流差值, 代入线性回归方程计算待测样品中 β -乳球蛋白的浓度。此外再向 3 种样品中分别加入不同浓度 β -乳球蛋白标准品进行加标回收实验, 平行试验 3

次,按照公式计算,同时也采用 ELISA 法测定比对,结果见表 2。

由表 2 测定结果和加标回收率可知,采用免疫传感器测定 3 种样品的回收率都在 88.59%~97.64%之间,

相对偏差在 2.47%~6.06%范围内,与 ELISA 法比较,两者结果基本一致,表明该方法可以用于实际样品检测。由此可得,相比于其他分析方法,本法建立的电化学免疫传感器检测 β -乳球蛋白具有较高的灵敏度。

表 2 样品中 β -LG 的测定结果及其加标回收率

样品	加标量/(ng/mL) (n=3)	测定值/(ng/mL)		回收率/%		相对标准偏差/%	
		本法	ic-ELISA	本法	ic-ELISA	本法	ic-ELISA
乳粉	0	23.91	22.47	-	-	-	-
	10	33.15	31.83	92.39	93.58	3.29	5.28
	20	41.63	40.94	88.59	92.34	3.69	4.40
	50	71.12	72.59	94.41	100.25	2.47	3.27
乳清蛋白粉	0	22.10	23.31	-	-	-	-
	10	31.50	32.04	93.97	87.32	6.06	3.93
	20	40.05	42.21	89.76	94.52	4.13	3.49
	50	70.92	71.83	97.64	97.04	2.87	2.34
水解乳清蛋白粉	0	2.68	2.59	-	-	-	-
	1	3.59	3.50	90.13	91.03	4.47	4.06
	3	5.47	5.44	92.74	94.96	2.47	2.20
	5	7.51	7.33	96.47	94.87	2.92	4.81

3 结论

本文制备了一种用于检测 β -乳球蛋白的高灵敏度的无标记电流型免疫传感器,针对构建的 β -乳球蛋白免疫传感器进行电化学行为表征,并优化了其试验条件。结果表明,该纳米免疫传感器在 2.5~100 ng/mL 范围内,免疫响应电流值与 β -乳球蛋白质量浓度的对数成正比关系,其检出限为 0.75 ng/mL,具有较高的灵敏度和良好的稳定性、重现性和特异性。在实际乳品样品检测中,该法的加标回收率位于 88.59%~97.64%之间,回收率较好,经 ELISA 验证,结果基本一致,因此该法可用于乳制品中 β -乳球蛋白抗原的快速检测。

参考文献

- [1] Sicherer S H, Sampson H A. Food allergy: a review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention and management [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 141(1): 41-58
- [2] Yang M, Tan M, Wu J, et al. Prevalence, characteristics, and outcome of cow's milk protein allergy in Chinese infants: a population - based survey [J]. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 2019, 43(2): 803-808
- [3] 党慧杰,刘振民,郑远荣.牛乳主要过敏原及其检测技术研究进展[J].*食品安全质量检测学报*,2020,11(3):111-116
DANG Huijie, LIU Zhenmin, ZHENG Yuanrong. Research progress of main milk allergens and their detection technology [J]. *Journal of Food Safety and Quality Detection*, 2020, 11(3): 111-116
- [4] Chen Q, Zhu L, Chen J, et al. Recent progress in nanomaterial-based assay for the detection of phytotoxins in foods [J]. *Food Chemistry*, 2019, 277(MAR.30): 162-178
- [5] Samsidar A, Siddiquee S, Shaarani S M. A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 71: 188-201
- [6] 王延新,谢书宇,陈冬梅,等.电化学免疫传感器在食品安全检测中的研究进展[J].*畜牧兽医学报*,2018,49(7):1334-1342
WANG Yanxin, XIE Shuyu, CHEN Dongmei, et al. Research progress of electrochemical immunosensor in food safety detection [J]. *Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2018, 49(7): 1334-1342
- [7] Zhu G Y, Yin X D, Jin D L, et al. Paper-based immunosensors: Current trends in the types and applied detection techniques [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 111: 100-117

(下转第 333 页)