



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117330552 B

(45) 授权公告日 2024. 02. 02

(21) 申请号 202311587323.0

(22) 申请日 2023.11.27

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 117330552 A

(43) 申请公布日 2024.01.02

(73) 专利权人 中国科学院烟台海岸带研究所
地址 264003 山东省烟台市莱山区春晖路
17号

(72) 发明人 齐骥 相佳雯 李博伟 陈令新

(74) 专利代理机构 北京中济纬天专利代理有限公司 11429
专利代理师 段志远

(51) Int. Cl.

- G01N 21/64 (2006.01)
- C08F 222/14 (2006.01)
- C08F 220/34 (2006.01)
- C08F 220/06 (2006.01)
- C08J 9/26 (2006.01)
- C08L 35/02 (2006.01)
- C09K 11/02 (2006.01)
- C09K 11/88 (2006.01)
- B82Y 20/00 (2011.01)
- B82Y 30/00 (2011.01)

(56) 对比文件

- WO 2018062686 A1, 2018.04.05
- WO 2023277807 A2, 2023.01.05
- CN 103389303 A, 2013.11.13
- CN 104792852 A, 2015.07.22
- CN 105203516 A, 2015.12.30
- CN 106324154 A, 2017.01.11
- CN 106770520 A, 2017.05.31
- CN 107024523 A, 2017.08.08
- CN 114225976 A, 2022.03.25
- US 2023114400 A1, 2023.04.13
- WO 2013044222 A2, 2013.03.28

曲景.分子印迹膜在海水膝沟藻毒素检测中的应用.《中国优秀硕士学位论文全文数据库(工程科技I辑)》.2021,(第2期),第B027-2278页.

Lian, ZR et al..Selective isolation of gonyautoxins 1,4 from the dinoflagellate *Alexandrium minutum* based on molecularly imprinted solid-phase extraction.《MARINE POLLUTION BULLETIN》.2017,第122卷(第1-2期),第500-504页. (续)

审查员 谢树语

权利要求书2页 说明书9页 附图6页

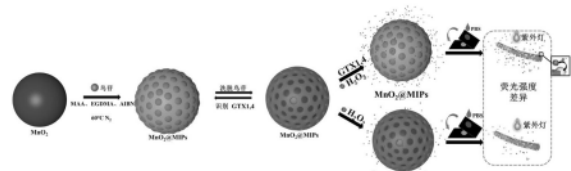
(54) 发明名称

分子印迹传感纸芯片检测膝沟藻毒素1,4的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种分子印迹传感纸芯片检测膝沟藻毒素1,4的方法,属于检测分析技术领域。所述方法的步骤包括:在分子印迹传感纸芯片的反应区滴加待测样品,反应1~60 min后干燥;再在所述反应区滴加H₂O₂,干燥箱中干燥并避光反应0.5~60 min;最后在所述反应区滴加pH为7.5的PBS缓冲液并使两区域贴合,0.5~10 min后检测传感区的荧光光度值,完成检测。本发明将印迹技术与基于CdTe量子点的纸芯片相结合,构建

了一种用于简单快速检测海水中GTX1,4的新型荧光传感纸芯片,检测用时短,操作简单且灵敏度高。荧光传感纸芯片稳定性好,可以实现纸芯片的高产量制备。



CN 117330552 B

[接上页]

(56) 对比文件

Zhang, YW et al..Molecularly imprinted polymer solid phase extraction coupled with liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for the detection of gonyautoxins 2&3 in

seawater.《MARINE POLLUTION BULLETIN》.2020,第157卷全文.

梅晓颀 等.分子印迹固相萃取联用高效液相色谱分离测定海水中的膝沟藻毒素GTX1,4.《分析化学》.2016,第44卷(第2期),第212-217页.

1. 一种分子印迹传感纸芯片检测膝沟藻毒素1,4的方法,其特征在于,所述方法的步骤包括:

(1) 在分子印迹传感纸芯片的存储有 MnO_2 @MIPs的反应区滴加待测样品,反应1~60 min后干燥;

(2) 再在所述反应区滴加 H_2O_2 ,干燥箱中干燥并避光反应0.5~60 min;

(3) 最后在所述反应区滴加pH为7.5的 PBS缓冲液并使存储有QDs-SiO₂的传感区与反应区贴合,0.5~10 min后检测所述传感区的荧光光度值,完成检测;

所述分子印迹传感纸芯片包括两相互独立设置的反应芯片部和传感芯片部,反应芯片部与传感芯片部在连接处具有折痕线,且两者在折痕线处具有小于180度的夹角,使得在纸张本身存在的弹性作用下,反应芯片部与传感芯片部在连接处以外的区域相互分离;

反应芯片部上具有若干反应区通孔,所述反应区通孔相互独立,不相连通,反应区通孔之外的反应芯片部为涂有蜡质的疏水区域,使用时,疏水区域作为按压区按压;

与传感芯片部连接的反应芯片部上包含与反应区通孔数量相同且相互独立设置的 MnO_2 @MIPs反应区,若干 MnO_2 @MIPs反应区之间为涂有蜡质的疏水区域, MnO_2 @MIPs反应区与反应区通孔的位置相对应,使得由反应区通孔注入的试剂能够滴落至 MnO_2 @MIPs反应区;

传感芯片部上具有若干传感位通孔,传感位通孔相互独立,不相连通,传感位通孔之外的传感芯片部为涂有蜡质的疏水区域,使用时,疏水区域作为按压区按压;

与反应芯片部连接的传感芯片部上包含与传感位通孔数量相同且相互独立设置的QDs-SiO₂传感区,若干QDs-SiO₂传感区之间为涂有蜡质的疏水区域,QDs-SiO₂传感区与传感位通孔的位置相对应,使得由传感位通孔注入的试剂能够滴落至QDs-SiO₂传感区。

2. 如权利要求1所述的分子印迹传感纸芯片检测膝沟藻毒素1,4的方法,其特征在于,所述反应区通孔、传感位通孔的数量均与折痕线的数量相同,且以折痕线所在平面对称设置;按压区域受到按压力后,沿折痕线所在平面对称设置的传感位通孔和反应区通孔可相互重叠并贴合,以实现反应区与传感点位的连通。

3. 如权利要求2所述的分子印迹传感纸芯片检测膝沟藻毒素1,4的方法,其特征在于,所述反应芯片部和传感芯片部均包括正六边形平面;反应区通孔和传感位通孔均设置在以正六边形中心为圆心的圆上,且均布。

4. 如权利要求3所述的分子印迹传感纸芯片检测膝沟藻毒素1,4的方法,其特征在于,所述反应区通孔和传感位通孔均为圆形通孔。

5. 如权利要求1所述的分子印迹传感纸芯片检测膝沟藻毒素1,4的方法,其特征在于,所述待测样品: H_2O_2 :PBS缓冲液的体积比为1: 1: 1。

6. 如权利要求1所述的分子印迹传感纸芯片检测膝沟藻毒素1,4的方法,其特征在于,所述反应芯片部的 MnO_2 @MIPs的浓度为0.1~1g/L。

7. 如权利要求1所述的分子印迹传感纸芯片检测膝沟藻毒素1,4的方法,其特征在于,所述传感芯片部的QDs-SiO₂的浓度为1~30g/L。

8. 如权利要求1所述的分子印迹传感纸芯片检测膝沟藻毒素1,4的方法,其特征在于,所述 MnO_2 @MIPs的制备步骤如下:

① MnO_2 纳米球合成

将0.06 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 与0.03 g KMnO_4 分别分散于同体积的pH=2的水溶液中,超声溶解

后将两溶液混合均匀,连续超声2 h,将合成的产物用超纯水洗涤三次烘干备用,即得 MnO_2 纳米球;

② MnO_2 @MIPs印迹聚合物的合成

将1 mL 1g/L的2-氨基乙基甲基丙烯酸酯盐酸盐分散于79 mL超纯水中,加入22 mg 步骤①制备的 MnO_2 纳米球后避光搅拌,将产物用DMSO洗脱后再次分散于75 mL DMSO中,同步加入56.3 mg鸟苷、51.4 mg 甲基丙烯酸,连续搅拌1 h以形成预聚合物;

最后加入375 mL乙二醇二甲基丙烯酸酯和30 mg 偶氮二异丁腈,将水浴温度提高到60 °C搅拌24 h,反应结束后,将产物用甲醇乙酸混合溶液洗脱三次以去除模板分子,得到 MnO_2 @MIPs印迹聚合物;其中单次洗脱时间为0.1~3 h。

9.如权利要求1所述的分子印迹传感纸芯片检测膝沟藻毒素1,4的方法,其特征在于,所述QDs- SiO_2 的制备步骤如下:

①巯基乙酸修饰的CdTe QDs合成

称取38.4 mg碲粉和40 mg硼氢化钠于一个2 mL的密封小瓶中,快速加入1.5 mL乙醇和0.5 mL水的混合溶液,迅速盖上瓶盖并缠上封口膜,瓶盖插入针头方便排气并用超纯水液封;在40 °C水浴加热4小时至黑色碲粉消失,得到淡紫色的上清液NaHTe;

将68.4 mg氯化镉溶解在75 mL水中,加入63 mL巯基乙酸,用1 mol/L的氢氧化钠将溶液pH调至9;在氮气保护下将1 mL合成的淡紫色上清液NaHTe快速加入此溶液中,加热至沸腾冷凝回流,得到发射波长在550 nm的橘黄色CdTe QDs分散液;

②氨基修饰的 SiO_2 纳米球合成

将30 mL无水乙醇、50 mL超纯水、10 mL氨水剧烈搅拌混合5 min,用恒压漏斗慢速滴加25 mL体积比为1:4的TEOS/乙醇混合物,反应6小时;加入5 mL APTES,反应12小时,用水洗三次后,将产品烘干,得到氨基修饰的 SiO_2 纳米球粉末;

③QDs- SiO_2 合成

5 mL步骤①制备的巯基乙酸修饰的CdTe QDs和80 mg步骤②制备的氨基修饰的 SiO_2 纳米球分散在15 mL水中,然后加入3 mL 20 g/L的EDC和3 mL 10 g/L的N-羟基丁二酰亚胺,在室温下搅拌30分钟后,用水洗涤三次,并加入5 mL水备用,将得到的QDs- SiO_2 置于4 °C冰箱中冷藏保存备用。

分子印迹传感纸芯片检测膝沟藻毒素1,4的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种分子印迹传感纸芯片检测膝沟藻毒素1,4的方法,属于检测分析技术领域。

背景技术

[0002] 赤潮毒素是一种广泛分布于温暖、受污染、营养水平高水域的常见毒素,其中,麻痹性贝类毒素(Paralytic shellfish toxins,PSTs)毒性强、分布广,近年来一直是重点检测毒素之一。在海洋中,PSTs会积聚在以产生PSTs的甲藻为食的贝类体内,当人类误食含有PSTs的贝类时就会出现包括头痛、呼吸困难等麻痹症状,严重时可导致死亡。及时开展对GTX1,4的分析检测至关重要。

[0003] 目前,已有多种方法检测GTX1,4,如小鼠生物测定法、高效液相色谱法、酶联免疫吸附法等等。

[0004] ①小鼠生物测定法

[0005] 小鼠生物毒性检测法是将含有赤潮毒素的提取液注射到小鼠体内,通过比较小鼠的存活时间和中毒症状对赤潮毒素的毒性及含量进行评估。此方法能够直接体现生物对毒素反应,通常作为毒性前期判断和其它检测方法的参比试验。

[0006] ②高效液相色谱法

[0007] 根据赤潮毒素的结构特征,高效液相色谱分别与紫外检测器或荧光检测器联合测定不同赤潮毒素。紫外检测法具有无需对样品进行衍生,分析速度快、便于自动化等优点。高效液相色谱-紫外检测法(HPLC-UV)特别适用于贝类组织中DA含量的测定,尤其适用于毒素含量超过20 $\mu\text{g/g}$ 的情况。

[0008] ③免疫学检测法

[0009] 免疫学检测法由于具有选择性强、检出限低、分析速度快等优点,在检测赤潮毒素方面一直为研究热点。目前,免疫学检测赤潮毒素最常用的方法是酶联免疫吸附法(ELISA),其核心反应是抗原抗体反应。

[0010] ④质谱法

[0011] 质谱法(MS)检测赤潮毒素通常采用液相色谱-质谱联用技术,其集成了色谱的高分辨能力与质谱的高选择性和高灵敏度的优点,不仅可以测定赤潮毒素的含量和组分,而且可以提供化学结构信息。目前,已成为分离和鉴定赤潮毒素的重要手段。

[0012] ⑤毛细管电泳法

[0013] 毛细电泳(capillary electrophoresis, CE)法主要是根据各种毒素分子所带电荷量不同将其分离进行检测,主要有毛细管电泳-紫外(CE-UV)检测法和毛细管电泳-质谱(CE-MS)法。

[0014] ⑥生物传感器法

[0015] 生物传感器法通过生物材料来检测毒素的浓度,并产生可通过电化学或光学方法检测的信号。

[0016] 现有检测技术的缺陷：

[0017] 小鼠生物测定法是世界上公认的赤潮毒素检测的标准方法,但该方法选择性低,又因产生大量动物废弃物正逐步被取代。高效液相色谱法是一种使用液体流动相和固定相来分离和分析贝类提取物中GTX1,4和其他麻痹性贝类毒素的方法,它可以与荧光或质谱检测相结合,以获得更高的灵敏度和特异性,但该方法需要复杂的设备和操作,需要经常维护,耗时耗力。酶联免疫吸附法的工作原理是抗原-抗体的相互作用,该抗体通常与一种能催化比色反应的酶相连,加入该酶的底物产生对应的颜色变化,颜色的强度与抗体结合的GTX1,4数量成正比,这种方法简单快速,但特异性和灵敏度较低。质谱法、毛细管电泳法及生物传感器法等需要复杂操作和专业人员合成,不适合大面积普及使用。

发明内容

[0018] 针对毒性强的膝沟藻毒素1,4分析耗时耗力、操作复杂等难题,本发明开发了一种快速、方便、低成本且高选择性的分子印迹传感纸芯片检测膝沟藻毒素1,4的方法。

[0019] 本发明提供一种分子印迹传感纸芯片检测膝沟藻毒素1,4的方法,所述方法的步骤包括:

[0020] (1) 在分子印迹传感纸芯片的存储有 MnO_2 @MIPs的反应区滴加待测样品,反应1~60 min后干燥;

[0021] (2) 再在所述反应区滴加 H_2O_2 ,干燥箱中干燥并避光反应0.5~60 min;

[0022] (3) 最后在所述反应区滴加pH为7.5的 PBS缓冲液并使存储有QDs-SiO₂的传感区与反应区贴合,0.5~10 min后检测所述传感区的荧光光度值,完成检测;

[0023] 所述分子印迹传感纸芯片包括两相互独立设置的反应芯片部和传感芯片部,反应芯片部与传感芯片部在连接处具有折痕线,且两者在折痕线处具有小于180度的夹角,使得在纸张本身存在的弹性作用下,反应芯片部与传感芯片部在连接处以外的区域相互分离;

[0024] 反应芯片部上具有若干反应区通孔,所述反应区通孔相互独立,不相连通,反应区通孔之外的反应芯片部为涂有蜡质的疏水区域,使用时,疏水区域作为按压区按压;

[0025] 与传感芯片部连接的反应芯片部上包含与反应区通孔数量相同且相互独立设置的 MnO_2 @MIPs反应区,若干 MnO_2 @MIPs反应区之间为涂有蜡质的疏水区域, MnO_2 @MIPs反应区与反应区通孔的位置相对应,使得由反应区通孔注入的试剂能够滴落至 MnO_2 @MIPs反应区;

[0026] 传感芯片部上具有若干传感位通孔,传感位通孔相互独立,不相连通,传感位通孔之外的传感芯片部为涂有蜡质的疏水区域,使用时,疏水区域可以作为按压区按压;

[0027] 与反应芯片部连接的传感芯片部上包含与传感位通孔数量相同且相互独立设置的QDs-SiO₂传感区,若干QDs-SiO₂传感区之间为涂有蜡质的疏水区域,QDs-SiO₂传感区与传感位通孔的位置相对应,使得由传感位通孔注入的试剂能够滴落至QDs-SiO₂传感区。

[0028] 优选的,所述反应区通孔、传感位通孔的数量均与折痕线的数量相同,且以折痕线所在平面对称设置;按压区域受到按压力后,沿折痕线所在平面对称设置的传感位通孔和反应区通孔可相互重叠并贴合,以实现反应区与传感点位的连通。

[0029] 优选的,所述反应芯片部和传感芯片部均包括正六边形平面;反应区通孔和传感位通孔均设置在以正六边形中心为圆心的圆上,且均布。

[0030] 优选的,所述反应区通孔和传感位通孔均为圆形通孔。

- [0031] 优选的,所述待测样品:H₂O₂:PBS缓冲液的体积比为1: 1: 1。
- [0032] 优选的,所述反应芯片部的MnO₂@MIPs的浓度为0.1~1g/L。
- [0033] 优选的,所述传感芯片部的QDs-SiO₂的浓度为1~30g/L。
- [0034] 优选的,所述MnO₂@MIPs的制备步骤如下:
- [0035] ①MnO₂纳米球合成
- [0036] 将0.06 g MnSO₄·H₂O与0.03 g KMnO₄分别分散于同体积的pH=2的水溶液中,超声溶解后将两溶液混合均匀,连续超声2 h,将合成的产物用超纯水洗涤三次烘干备用,即得MnO₂纳米球;
- [0037] ②MnO₂@MIPs印迹聚合物的合成
- [0038] 将1 mL 1g/L的2-氨基乙基甲基丙烯酸酯盐酸盐分散于79 mL超纯水中,加入22 mg 步骤①制备的MnO₂纳米球后避光搅拌,将产物用DMSO洗脱后再次分散于75 mL DMSO中,同步加入56.3 mg鸟苷、51.4 mg 甲基丙烯酸,连续搅拌1 h以形成预聚合物;
- [0039] 最后加入375 mL乙二醇二甲基丙烯酸酯和30 mg 偶氮二异丁腈,将水浴温度提高到60 °C搅拌24 h,反应结束后,将产物用甲醇乙酸混合溶液洗脱三次以去除模板分子,得到MnO₂@MIPs印迹聚合物;其中单次洗脱时间为0.1~3 h。
- [0040] 优选的,所述QDs-SiO₂的制备步骤如下:
- [0041] ①巯基乙酸修饰的CdTe QDs合成
- [0042] 称取38.4 mg碲粉和40 mg硼氢化钠于一个2 mL的密封小瓶中,快速加入1.5 mL乙醇和0.5 mL水的混合溶液,迅速盖上瓶盖并缠上封口膜,瓶盖插入针头方便排气并用超纯水液封;在40 °C水浴加热4小时至黑色碲粉消失,得到淡紫色的上清液NaHTe;
- [0043] 将68.4 mg氯化镉溶解在75 mL水中,加入63 mL巯基乙酸,用1 mol/L的氢氧化钠将溶液pH调至9;在氮气保护下将1 mL合成的淡紫色上清液NaHTe快速加入此溶液中,加热至沸腾冷凝回流,得到发射波长在550 nm的橘黄色CdTe QDs分散液;
- [0044] ②氨基修饰的SiO₂纳米球合成
- [0045] 将30 mL无水乙醇、50 mL超纯水、10 mL氨水剧烈搅拌混合5 min,用恒压漏斗慢速滴加25 mL体积比为1:4的 TEOS/乙醇混合物,反应6小时。加入5 mL APTES,反应12小时,用水洗三次后,将产品烘干,得到氨基修饰的SiO₂纳米球粉末;
- [0046] ③QDs-SiO₂合成
- [0047] 5 mL步骤①制备的巯基乙酸修饰的CdTe QDs和80 mg步骤②制备的氨基修饰的SiO₂纳米球分散在15 mL水中,然后加入3 mL 20 g/L的EDC和3 mL 10 g/L的N-羟基丁二酰亚胺,在室温下搅拌30分钟后,用水洗涤三次,并加入5 mL水备用,将得到的QDs-SiO₂置于4 °C冰箱中冷藏保存备用。

有益效果

- [0048] (1) 本发明制备得到的QDs-SiO₂,解决了CdTe量子点滴加到纸芯片上不均匀,且检测结果不准确等问题。
- [0049] (2) 本发明制备的MnO₂@MIPs性质稳定,易于保存,识别GTX1,4的效果好。
- [0050] (3) 本发明将印迹技术与基于CdTe量子点的纸芯片相结合,构建了一种用于简单快速检测海水中GTX1,4的新型荧光传感纸芯片,检测用时短,操作简单且灵敏度高。荧光传

感纸芯片稳定性好,可以实现纸芯片的高产量制备。

[0051] (4)本发明设计得到的纸芯片可同时用于6个样品的快速检测,实现对于GTX1,4的多通路检测。

附图说明

[0052] 图1为本发明 MnO_2 @MIPs的制备过程及基于 MnO_2 @MIPs的荧光传感纸芯片传感机制图。

[0053] 图2为本发明分子印迹传感纸芯片立体结构图,其中A为第一视角立体结构图,B第二视角立体结构图。其中1、反应芯片部;2、传感芯片部;3、反应区通孔;4、传感位通孔;5、 MnO_2 @MIPs反应区;6、QDs-SiO₂传感区。

[0054] 图3 为本发明制备的 MnO_2 及 MnO_2 @MIPs的扫描电子显微镜表征图像。其中A为实施例1中 MnO_2 纳米球的SEM图像,比例尺为300 nm;B为 MnO_2 @MIPs的SEM图像,比例尺为300 nm。

[0055] 图4为本发明实施例1中模板分子单次洗脱时间对 MnO_2 @MIPs纸芯片传感效果的影响(实验条件为激发波长396 nm,发射狭缝宽度5 nm,激发狭缝宽度10 nm,GTX1,4浓度30 mg/L)。

[0056] 图5为本发明实施例2中GTX1,4在纸芯片上的平衡时间(实验条件为激发波长396 nm,发射狭缝宽度5 nm,激发狭缝宽度10 nm,GTX1,4浓度30 mg/L)。

[0057] 图6为本发明实施例2中 H_2O_2 在纸芯片上的平衡时间对传感效果的影响(实验条件为激发波长396 nm,发射狭缝宽度5 nm,激发狭缝宽度10 nm,GTX1,4浓度30 mg/L)。

[0058] 图7为本发明实施例1中 MnO_2 @MIPs浓度对纸芯片传感效果的影响(实验条件为激发波长396 nm,发射狭缝宽度5 nm,激发狭缝宽度10 nm,GTX1,4浓度30 mg/L)。

[0059] 图8 为QDs发射波长对 H_2O_2 的淬灭效果的影响(实验条件为激发波长396 nm,发射狭缝宽度5 nm,激发狭缝宽度10 nm)。

[0060] 图9 为pH值对 MnO_2 @MIPs纸芯片传感效果的影响(缓冲溶液为PBS,实验条件为激发波长396 nm,发射狭缝宽度5 nm,激发狭缝宽度10 nm,GTX1,4浓度30 mg/L)。

[0061] 图10 为本发明滴加PBS后 MnO_2 @MIPs纸芯片的分析检测时间对荧光值的影响(实验条件为激发波长396 nm,发射狭缝宽度5 nm,激发狭缝宽度10 nm,GTX1,4浓度30 mg/L)。

[0062] 图11为本发明芯片用于检测不同浓度的GTX1,4的荧光光谱图及标准曲线。其中A、B分别为 MnO_2 @MIPs纸芯片和 MnO_2 @NIPs纸芯片随目标物浓度变化的荧光光谱淬灭效果;C、D分别为对应MIP和NIP的线性曲线和线性方程(GTX1,4的浓度为0,0.5,1,2,5,10,20,30,40,50 mg/L。实验条件为pH = 7.5,激发波长396 nm,发射狭缝宽度5 nm,激发狭缝宽度10 nm)。

[0063] 图12 为本发明不同干扰物质对 MnO_2 @MIPs及 MnO_2 @NIPs纸芯片传感效应的影响(实验条件为pH=7.5,激发波长396 nm,发射狭缝宽度5 nm,激发狭缝宽度10 nm,GTX1,4浓度30 mg/L)。

具体实施方式

[0064] 本发明将分子印迹技术与基于CdTe量子点(Quantum dots, QDs)的纸芯片相结合,构建了一种分子印迹传感纸芯片,用于简单、快速检测海水中的膝沟藻毒素1,4

(Gonyautoxin 1,4,GTX1,4)。

[0065] 本发明以鸟苷为虚拟模板,甲基丙烯酸为功能单体,通过自由基聚合的方法在 MnO_2 纳米酶表面合成分子印迹聚合物(MnO_2 @MIPs)。具体的,MIPs包覆 MnO_2 的制备过程如图1所示。首先甲基丙烯酸MAA和鸟苷在预聚合过程中结合在一起,加入交联剂乙二醇二甲基丙烯酸酯EGDMA并在引发剂偶氮二异丁腈AIBN的作用下引发在 MnO_2 表面的聚合反应,将功能单体连接起来完成对 MnO_2 的包覆,将模板洗脱后形成 MnO_2 @MIPs。

[0066] MnO_2 @MIPs纸芯片检测GTX1,4的传感机理进一步在图1中展示为:以 MnO_2 纳米酶催化 H_2O_2 分解使得 H_2O_2 对QDs的淬灭作用减弱形成荧光传感。当GTX1,4存在时, MnO_2 @MIPs表面的印迹孔穴被占据,阻止其内核 MnO_2 纳米酶继续催化 H_2O_2 分解,使QDs荧光强度降低。当GTX1,4的浓度越高时, MnO_2 @MIPs表面的印迹孔穴被占据的比例越高,未被分解的 H_2O_2 越多,其对QDs的淬灭作用越强。最终本发明通过检测纸芯片传感芯片部2荧光强度的变化实现对GTX1,4的定量检测。

实施例1

[0067] 一种分子印迹传感纸芯片,包括两相互独立设置的反应芯片部1和传感芯片部2。反应芯片部1与传感芯片部2均为纸质材料,在连接处具有折痕线,且两者在折痕线处具有小于180度的夹角,使得在纸张本身存在的弹性作用下,反应芯片部1与传感芯片部2在连接处以外的区域相互分离。

[0068] 反应芯片部1上具有若干反应区通孔3,反应区通孔3相互独立,不相连通,反应区通孔3之外的反应芯片部1为涂有蜡质的疏水区域,使用时,疏水区域可以作为按压区按压。

[0069] 与传感芯片部2连接的反应芯片部1上包含与反应区通孔3数量相同且相互独立设置的 MnO_2 @MIPs反应区5,若干 MnO_2 @MIPs反应区5之间为涂有蜡质的疏水区域。 MnO_2 @MIPs反应区5与反应区通孔3的位置相对应,使得由反应区通孔3注入的试剂能够滴落至 MnO_2 @MIPs反应区5。

[0070] 传感芯片部2上具有若干传感位通孔4,传感位通孔4相互独立,不相连通,传感位通孔4之外的传感芯片部2为涂有蜡质的疏水区域。使用时,疏水区域可以作为按压区按压。

[0071] 与反应芯片部1连接的传感芯片部2上包含与传感位通孔4数量相同且相互独立设置的QDs- SiO_2 传感区6,若干QDs- SiO_2 传感区6之间为涂有蜡质的疏水区域。QDs- SiO_2 传感区6与传感位通孔4的位置相对应,使得由传感位通孔4注入的试剂能够滴落至QDs- SiO_2 传感区6。

[0072] MnO_2 @MIPs反应区5和QDs- SiO_2 传感区6的数量均与折痕线的数量相同,且以折痕线所在平面对称设置。反应芯片部1与传感芯片部2受到按压力后, MnO_2 @MIPs反应区5和QDs- SiO_2 传感区6可相互重叠并贴合,以实现反应芯片部1与传感芯片部2的连通。

[0073] 作为本发明的一个实施例,反应芯片部1和传感芯片部2均包括正六边形平面;反应区通孔3和传感位通孔4均设置在以正六边形中心为圆心的圆上,且均布。

[0074] 作为本发明的一个实施例,反应区通孔3和传感位通孔4均为圆形通孔。

[0075] 作为本发明的一个实施例, MnO_2 @MIPs印迹聚合物的制备步骤如下:

[0076] ① MnO_2 纳米球合成

[0077] 将0.06 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 与0.03 g KMnO_4 分别分散于同体积的pH=2的水溶液中,超声

溶解后将两溶液混合均匀,连续超声2 h,将合成的产物用超纯水洗涤三次烘干备用,如图3 A所示,即得 MnO_2 纳米球。

[0078] ② MnO_2 @MIPs印迹聚合物的合成

[0079] 将1 mL 1g/L的2-氨基乙基甲基丙烯酸酯盐酸盐(2-Aminoethyl methacrylate hydrochloride,AMA)分散于79 mL超纯水中,加入22 mg 步骤①制备的 MnO_2 纳米球后避光搅拌,将产物用DMSO洗脱后再次分散于75 mL DMSO中,同步加入56.3 mg鸟苷、51.4 mg 甲基丙烯酸(methacrylic acid,MAA),连续搅拌1 h以形成预聚合物;

[0080] 最后加入375 mL乙二醇二甲基丙烯酸酯(Ethylene glycol dimethacrylate,EGDMA)和30 mg 偶氮二异丁腈(Azobisisobutyronitrile,AIBN),将水浴温度提高到60 °C搅拌24 h,反应结束后,将产物用甲醇乙酸混合溶液(9:1,v:v)洗涤三次以去除模板分子,如图3B所示,得到 MnO_2 @MIPs印迹聚合物。

[0081] 将 MnO_2 纳米球、 MnO_2 @MIPs通过扫描电子显微镜(SEM)进行了表征。如图3 A所示, MnO_2 纳米球的表面呈现花簇状,粒径分布在200~400 nm之间,这种结构使得 MnO_2 纳米球具有较大的比表面积。图3 B显示, MnO_2 @MIPs呈现出更加饱满的花簇状,整体堆积更加紧密,这证明MIPs成功包覆在了 MnO_2 纳米球表面。

[0082] 作为本发明的一个实施例,QDs-SiO₂的制备步骤如下:

[0083] ①巯基乙酸修饰的CdTe QDs合成

[0084] 称取38.4 mg碲粉和40 mg硼氢化钠于一个2 mL的密封小瓶中,快速加入1.5 mL乙醇和0.5 mL水的混合溶液,迅速盖上瓶盖并缠上封口膜,瓶盖插入针头方便排气并用超纯水液封;在40 °C水浴加热4小时至黑色碲粉消失,得到淡紫色的上清液NaHTe;

[0085] 将68.4 mg氯化镉溶解在75 mL水中,加入63 mL巯基乙酸,用1 mol/L的氢氧化钠将溶液pH调至9;在氮气保护下将1 mL合成的淡紫色上清液NaHTe快速加入此溶液中,加热至沸腾并冷凝回流,通过控制加热冷凝回流时间得到发射波长在525 nm~620 nm的橘黄色CdTe QDs分散液。其中CdTe QDs的发射波长选为550 nm,由于H₂O₂对不同发射波长的CdTe QDs有不同的淬灭效果,因此使用不同发射波长的CdTe QDs进行传感检测,确定当其发射波长为550 nm时传感效果最佳,具体的:

[0086] H₂O₂对不同发射波长的CdTe QDs有不同的淬灭效果,通过控制加热冷凝回流的时间,合成了五种发射波长的CdTe QDs:525 nm、530 nm、550 nm、570 nm、616 nm。传感效率以 F_0/F 表示, F_0 为空白对照的荧光强度值, F 为传感芯片工作时的荧光强度值。如图8所示,滴加同等浓度的H₂O₂后发现,H₂O₂对不同发射波长的CdTe QDs的淬灭效果存在差异,在525~550 nm,CdTe QDs的淬灭效果大幅上升,在550 nm处到达最佳淬灭效果,550 nm之后淬灭效果骤降并逐渐稳定。原因是发射波长小的CdTe QDs粒径较小,导致其本身不够稳定,纸基芯片的传感效率降低,波长较大的CdTe QDs电子跃迁释放的能量低,导致其荧光强度较低,使纸芯片传感效率较低。所以选用550 nm左右的CdTe QDs作为最佳条件。

[0087] ②氨基修饰的SiO₂纳米球合成

[0088] 将30 mL无水乙醇、50 mL超纯水、10 mL氨水剧烈搅拌混合5 min,用恒压漏斗慢速滴加25 mL TEOS/乙醇(v:v,1:4)混合物,反应6小时。加入5 mL APTES,反应12小时,用水洗三次后,将产品烘干,得到氨基修饰的SiO₂纳米球粉末。

[0089] ③QDs-SiO₂合成

[0090] 5 mL步骤①制备的巯基乙酸修饰的CdTe QDs和80 mg步骤②制备的氨基修饰的SiO₂纳米球分散在15 mL水中,然后加入3 mL 20 g/L的EDC和3 mL 10 g/L的N-羟基丁二酰亚胺(N-hydroxysuccinimide,NHS),在室温下搅拌30分钟后,用水洗涤三次,并加入5 mL水备用,将得到的QDs-SiO₂置于4 °C冰箱中冷藏保存备用。

[0091] 作为本发明的一个实施例,步骤②中的MnO₂@MIPs的模板分子洗脱时间是关键条件之一。在洗脱过程中,将单次洗脱时间分别定为10 min、20 min、30 min、45 min、60 min,共洗脱三次后,利用其制成纸芯片后检测传感效率。如图4所示,单次洗脱时间为30 min时效果最好。当单次洗脱时间为10~20 min时传感效率较差,原因是模板分子洗脱不充分,在MnO₂@MIPs表面没有留下足够空腔,识别并捕获GTX1,4能力差;当单次洗脱时间超过30 min后,随着洗脱时间的延长,洗脱液中的乙酸逐渐破坏了MnO₂纳米球表面的MnO₂@MIPs,使得对GTX1,4的识别及捕获能力下降,传感效率降低。所以,选择单次洗脱时间为30 min为最佳洗脱时间。

[0092] 作为本发明的一个实施例,反应芯片部1的MnO₂@MIPs的浓度为0.1~1g/L,MnO₂@MIPs浓度对传感效率是重要的。如图7所示,MnO₂@MIPs浓度在50~200 mg/L时,传感效率逐渐增强,而浓度超过200 mg/L后,传感效率不再有明显变化。原因是随着MnO₂@MIPs浓度的逐渐提高,MnO₂催化H₂O₂分解越来越剧烈,传感效率也随之提高,当MnO₂@MIPs浓度达到200 mg/L时传感效果达到饱和。所以选择200 mg/L的MnO₂@MIPs作为最佳浓度。

[0093] 作为本发明的一个实施例,在构建纸芯片时滴加到传感芯片部2的传感区的QDs-SiO₂的用量浓度为1~30g/L,该用量使得纸芯片传感点位上的荧光强度均匀稳定,对H₂O₂的淬灭作用响应效果更佳。

[0094] 本发明三维按压式纸芯片的设计可以达到存储有MnO₂@MIPs的反应区和存储有QDs-SiO₂的传感区不会互相干扰、不会直接污染的目的,并在需从反应区进样到传感点位时,只需轻轻按压即可实现两区域的精准贴合,进样准确迅速。

[0095] 本发明纸芯片的设计可实现同时检测多个样品。本方法对传感时间控制要求高,该芯片设计可以通过按压操作达到各个反应区和相应传感点位同时接触的效果,反应时间精准且检测效果好。对芯片中间按压区施加向下的作用力后,六个区域受到的力效果相同,因此可以实现六个存储有MnO₂@MIPs的反应区和六个存储有QDs-SiO₂的传感区的同时接触。其他结构的芯片例如折叠式、翻页式等,在进行两个区域接触操作时只能做到一排或者一列少部分通道同时接触,很难做到所有通道同时接触。因此每个检测通道对应的反应时间会存在差异,本发明芯片检测效果更精准。

[0096] 本发明纸芯片利用纸张本身存在的弹性通过按压操作实现反应区与传感点位的接触,不进行按压操作时,纸张回弹实现反应区与传感点位的分离。该芯片的设计不用外加其他部件及设备,操作简单。其他结构的芯片若实现两区域的贴合,需增加外部部件如夹子、弹簧等或增加其他操作,并且在分离两区域时也需要增加其他操作,导致检测流程复杂化,增加检测操作难度。

[0097] 本发明纸芯片的设计提高了纸张的空间利用率,在尽量小的纸上完成多个样品检测,达到芯片体积较小且便携的目的。其他结构的芯片很难既保证检测效果又做到节省空间。

实施例2

[0098] 一种分子印迹传感纸芯片检测膝沟藻毒素1,4的方法,用于快速检测膝沟藻毒素1,4,其检测方法步骤如下:

[0099] 首先取含有GTX1,4的样品7 μL 滴加到反应区5,反应15 min后再次在该区域滴加7 μL H_2O_2 ,烘箱中干燥并避光反应12 min,最后将分子印迹传感纸芯片从中间按压,使存储有 MnO_2 @MIPs的反应区和存储有QDs-SiO₂的传感区贴紧,在反应区滴加7 μL 的pH为7.5的PBS缓冲液,3 min后检测荧光光度值,完成检测。

[0100] 本发明设计传感芯片部2与反应芯片部1相互独立的按压式多通路纸芯片。通过滴加PBS缓冲液,将反应芯片部1未被分解的 H_2O_2 洗脱到传感芯片部2中并与QDs作用,进而完成传感过程。通过测定传感芯片部2荧光强度的变化实现对GTX1,4的定量检测。实现基于 MnO_2 纳米球介导分子印迹荧光传感的膝沟藻毒素1,4纸基快速检测方法。

[0101] 作为本发明的一个实施例,GTX1,4在纸芯片上的平衡时间是重要的。如图5可以看出,吸附时间在0~15 min内,传感效率逐渐上升,当吸附时间超过15 min后,传感效率逐渐趋于平缓,原因是在吸附时间超过15 min后, MnO_2 @MIPs处于吸附平衡的状态,无法再对荧光强度产生影响。所以为了达到最佳的传感效果并尽量节约时间,选择15 min做为最佳吸附时间。

[0102] 作为本发明的一个实施例, H_2O_2 在纸上的平衡时间对传感效应的影响是重要的。如图6所示,传感效率在10~15 min时趋于稳定。在0~10 min时传感效率处于不断上升的趋势,原因是GTX1,4占据了分子印迹空穴阻碍了 H_2O_2 的催化分解;而15 min后传感效率逐渐下降,原因是较长的平衡时间使 MnO_2 @MIPs过度催化 H_2O_2 ,纸芯片传感效率降低。所以,选择12 min作为最佳的 H_2O_2 平衡时间。

[0103] 作为本发明的一个实施例,PBS缓冲液是重要的。一是,选用pH为7.5的PBS缓冲液进行后续检测很重要。如图9所示,pH为5~7.5时纸芯片的传感效率逐渐上升,原因有两点,一是当溶液处于酸性时会导致QDs荧光强度下降;二是溶液偏酸时, MnO_2 @MIPs的结合位点与GTX1,4的相互作用下降。而当pH超过7.5时,传感效率急剧下降,主要原因是 MnO_2 @MIPs表面识别位点质子化。二是,在反应区域滴加7 μL PBS缓冲液,3 min后检测荧光光度值很重要,即滴加PBS缓冲液后 MnO_2 @MIPs纸芯片的分析检测时间也是本发明的重要因素。如图10所示,在30~180 s内,荧光强度逐渐增高,180 s后荧光强度趋于稳定。所以选择180 s作为 MnO_2 @MIPs纸芯片的最佳分析检测时间。

[0104] 对比例1

[0105] 对比例1的制备步骤与实施例1相同,不同之处仅在于在步骤②中不加入鸟苷,得到非印迹聚合物 MnO_2 @NIPs。

[0106] 由图11可以看出, MnO_2 @MIPs纸芯片的传感效率明显优于 MnO_2 @NIPs纸芯片。在相同条件下, MnO_2 @MIPs的荧光淬灭值远高于 MnO_2 @NIPs,这种明显的荧光淬灭差异可以有效证明 MnO_2 @MIPs纸芯片形成了具有针对GTX1,4的识别位点。由图11 C可以看出,GTX1,4浓度在0.5~50 mg/L的情况下, MnO_2 @NIPs纸芯片荧光强度值随GTX1,4浓度的增加而降低,线性回归方程为 $y=0.0169x+1.1072$,相关系数 $R^2=0.996$,检出限(LOD)为0.14 mg/L(公式为 $3*\sigma/m$, σ 为空白组灰度值的标准偏差, m 为校准曲线的斜率)。这证明此方法可以很有效地完成对目标物GTX1,4的定量检测。

[0107] MnO_2 @MIPs纸芯片具有优秀的选择性。为了评价 MnO_2 @MIPs纸芯片对海水中GTX1,4的选择性,综合海水中相关离子的真实浓度,选择了1 g/L的7种离子:钾离子(K^+)、钙离子(Ca^{2+})、钠离子(Na^+)、镁离子(Mg^{2+})、碳酸根(CO_3^{2-})、氯离子(Cl^-)、硫酸根离子(SO_4^{2-}),1 mg/L的4种离子:铵离子(NH_4^+)、锰离子(Mn^{2+})、硅酸根离子(SiO_3^{2-})、硝酸根离子(NO_3^-),和30 mg/L的3种干扰毒素:OA、DA、PTX-2来验证 MnO_2 @MIPs纸芯片的抗干扰能力。由图12可以看出, MnO_2 @MIPs纸芯片只对GTX1,4显示出最佳的传感效率,而 MnO_2 @NIPs几乎没有任何选择性,传感效率基本一致。这表明 MnO_2 @MIPs纸芯片具有优秀的选择性。

[0108] 应用例 实际水样检测

[0109] 为了测试 MnO_2 @MIPs纸芯片对海水中GTX1,4的实际检测情况,选取中国黄海烟台海岸带水域的四处不同取样点进行海水取样。用pH为7.5的PBS缓冲液对水样稀释十倍后进行加标处理,GTX1,4加标浓度分别为10、50 $\mu\text{g/L}$ 。如表1所示,样品的回收率在96.8~103.2%,相对标准偏差在4.5~6.1%。实验结果表明, MnO_2 @MIPs纸芯片能够有效检测海水中的GTX1,4。

[0110] 表1 MnO_2 @MIPs纸芯片检测实际海水样品中加标GTX1,4的回收率 (n = 5)

[0111]

样品种类	加标值 ($\mu\text{g/L}$)	检出值 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 \pm RSD (%)
海水样品 1	10	10.11	101.1 \pm 4.8
	50	47.8	97 \pm 5.8
海水样品 2	10	10.03	100.3 \pm 4.4
	50	48.44	96.8 \pm 5.2
海水样品 3	10	9.73	97.3 \pm 6.1
	50	49.13	98.3 \pm 4.5
海水样品 4	10	10.32	103.2 \pm 4.7
	50	50.59	101.2 \pm 5.6

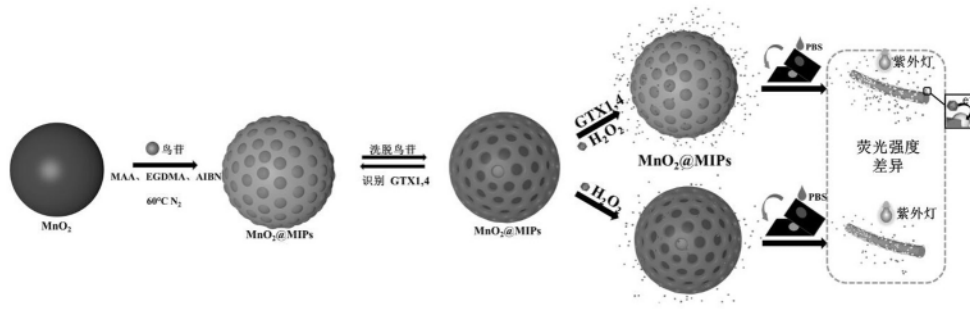


图 1

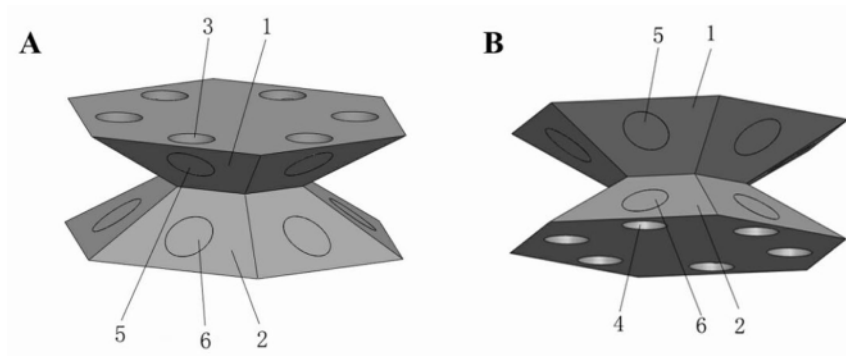


图 2

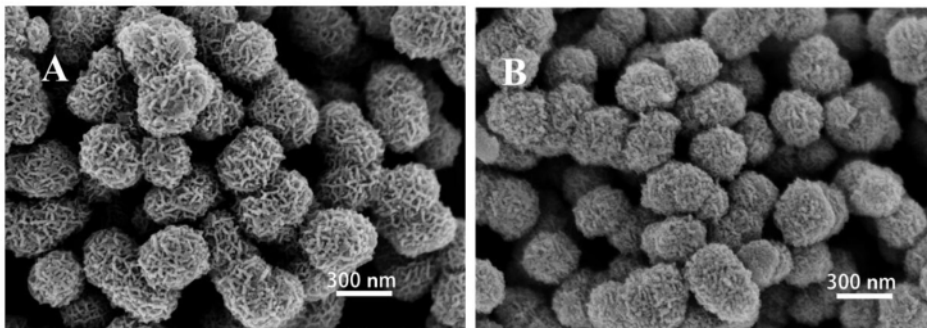


图 3

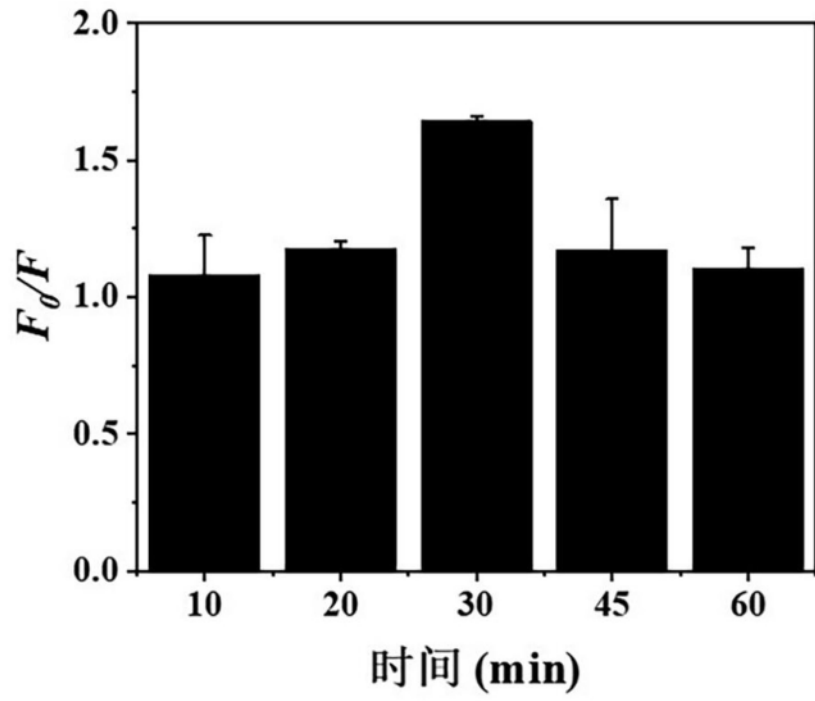


图 4

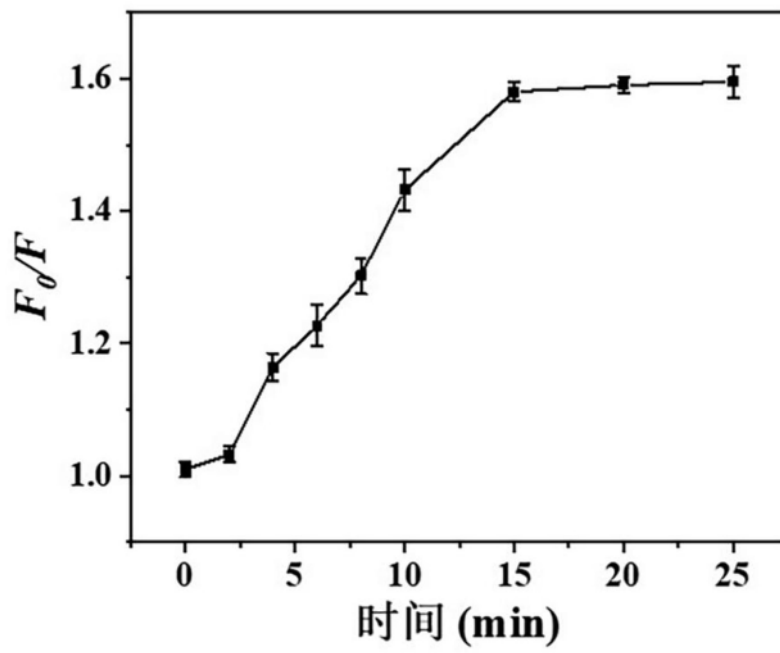


图 5

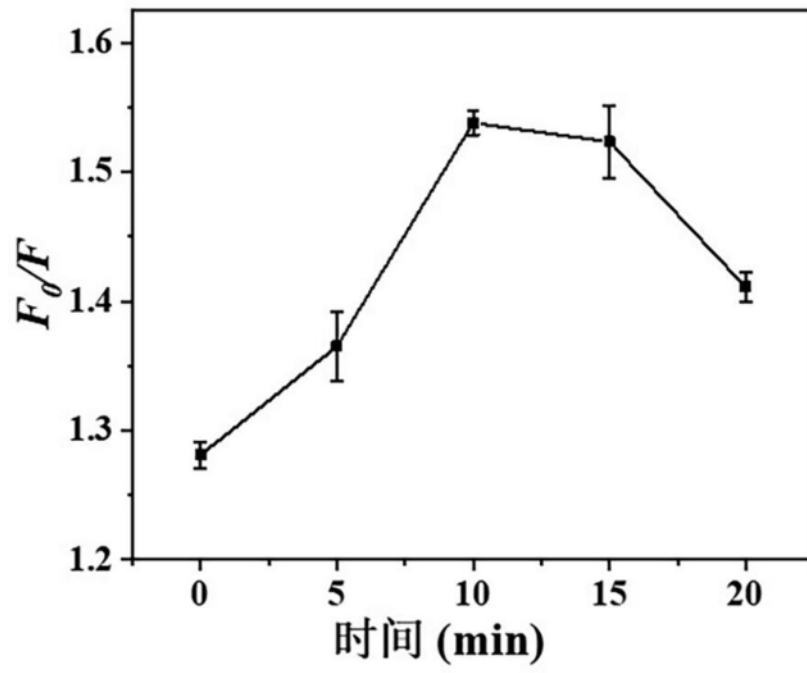


图 6

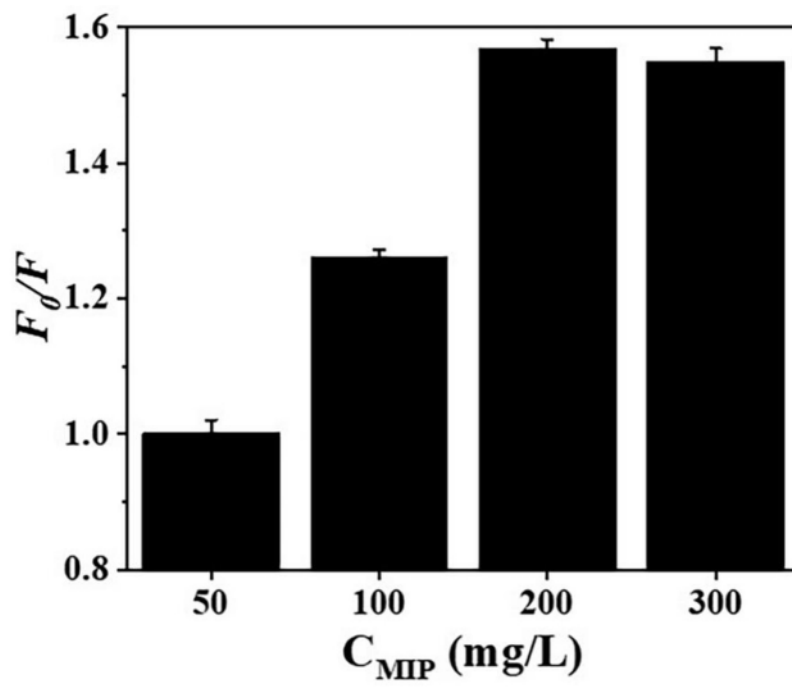


图 7

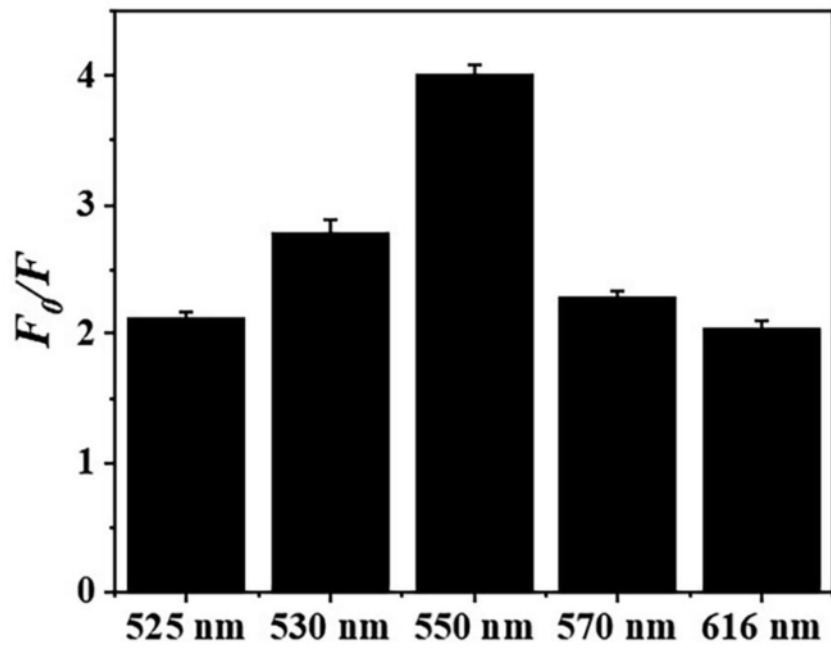


图 8

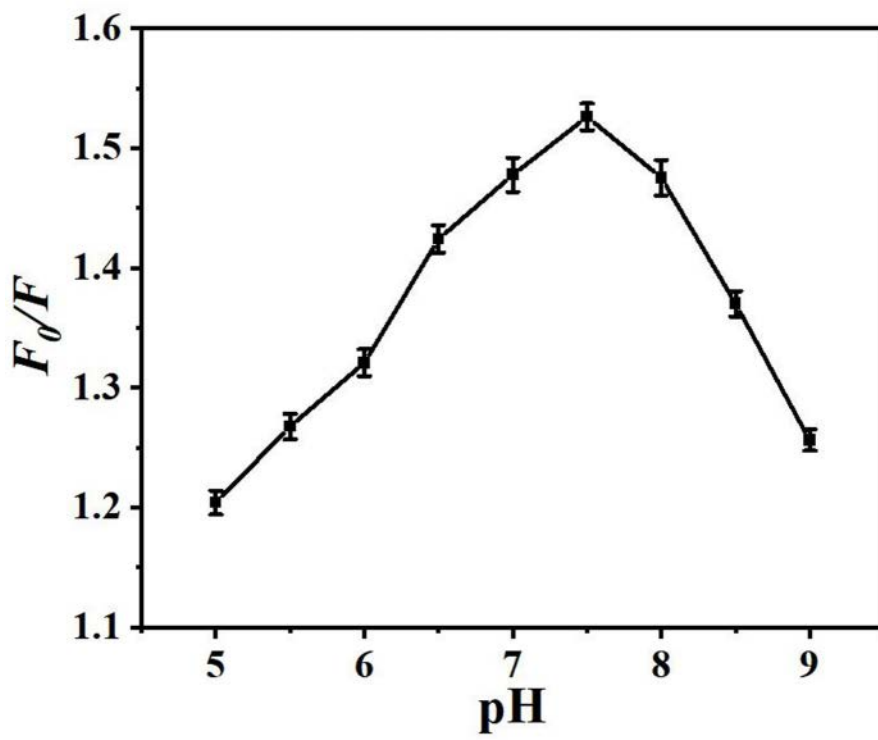


图 9

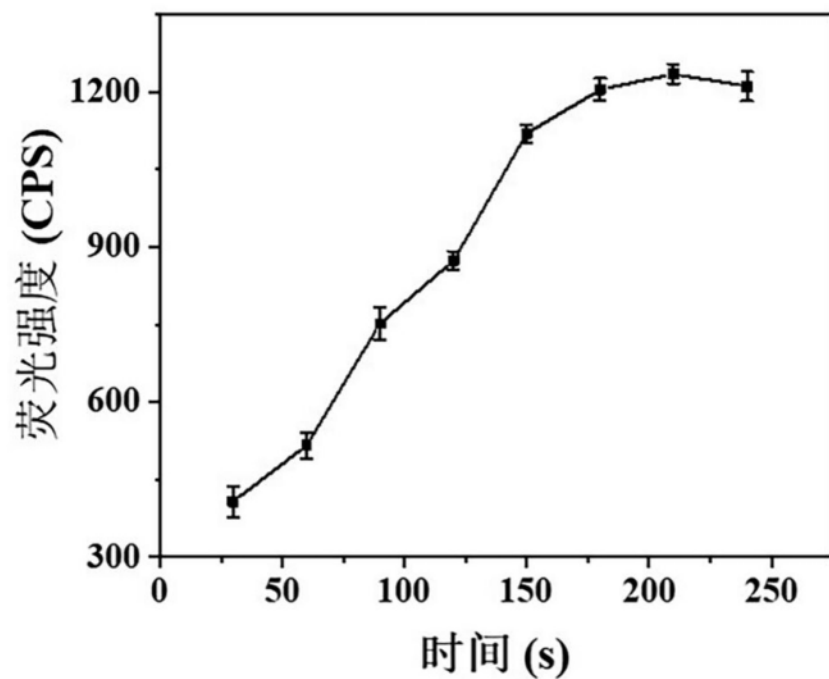


图 10

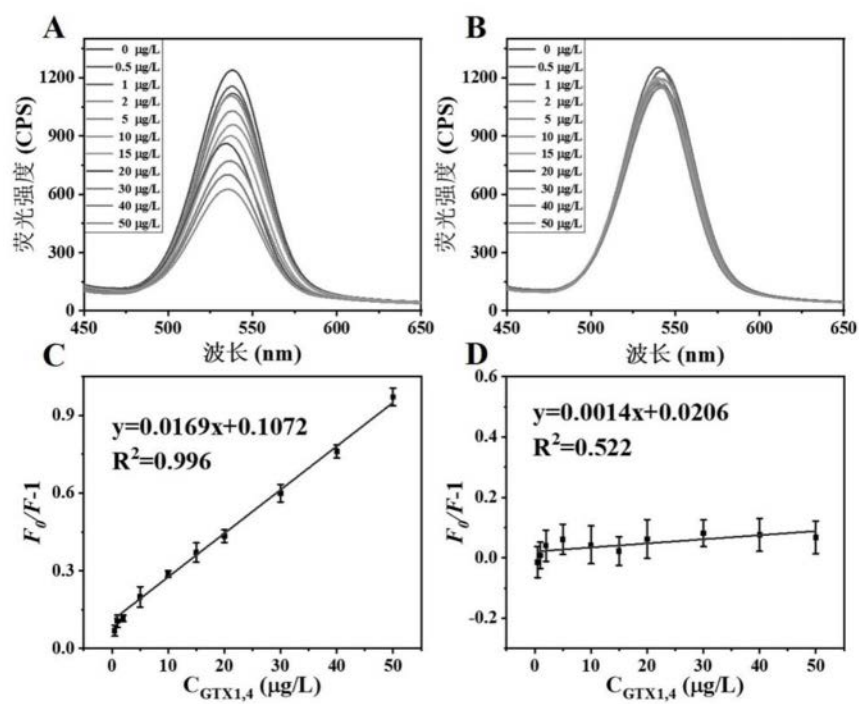


图 11

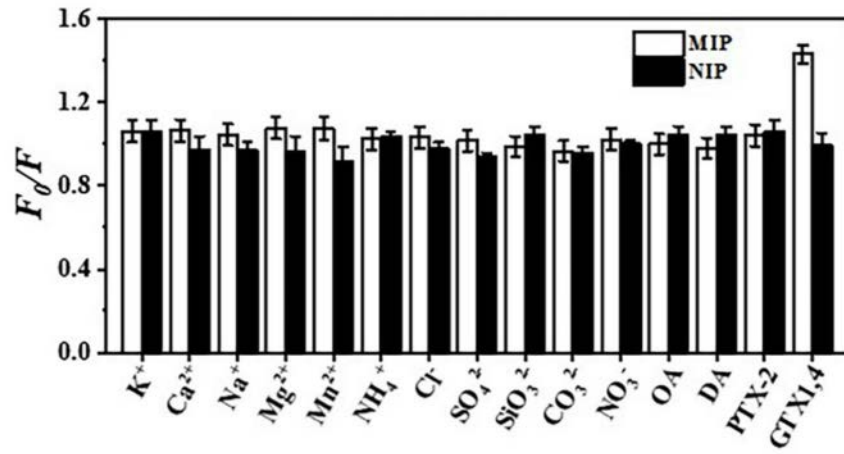


图 12