



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111289593 B

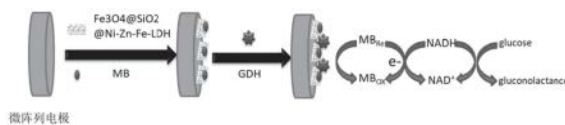
(45) 授权公告日 2022.07.19

(21) 申请号 202010134355.5	US 2019369039 A1,2019.12.05
(22) 申请日 2020.02.28	CN 102243208 A,2011.11.16
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 111289593 A	CN 110618179 A,2019.12.27
(43) 申请公布日 2020.06.16	CN 109791078 A,2019.05.21
(73) 专利权人 北京农业信息技术研究中心 地址 100097 北京市海淀区曙光花园中路 11号农科大厦A座1107 专利权人 华南农业大学	CN 108956737 A,2018.12.07
(72) 发明人 李爱学 王成 李斌 张晗 侯佩臣 王晓冬 何璐璐 崔会坤 徐子森 龙拥兵	CN 108601932 A,2018.09.28
(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002 专利代理师 陈征	US 2016166184 A1,2016.06.16
(51) Int.Cl. G01N 27/327 (2006.01) C12Q 1/54 (2006.01) C12Q 1/32 (2006.01) C12Q 1/00 (2006.01)	CN 108572209 A,2018.09.25
(56) 对比文件 CN 108593729 A,2018.09.28	US 2007131546 A1,2007.06.14
	Masumeh Gilanizadeh 等.Synthesis of Acridinediones and Biscoumarins Using Fe3O4@SiO2@Ni-Zn-Fe LDH as an Efficient Magnetically Recoverable Mesoporous Catalyst.《Polycyclic Aromatic Compounds》.2019,第1-18页.
	Seval Oren 等.Tracking of water movement dynamics inside plants using leaf surface humidity sensors.《Proceedings of the 12th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems》.2017,第402-405页.
	审查员 佟莹
	权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称
活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器及其制备与应用

(57) 摘要
本发明涉及一种活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器及其制备与应用。活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器,包括:基底;参比/对电极,为表面覆盖铂的微针阵列电极;工作电极,为表面覆盖金膜的微针阵列电极;所述金膜的表面具有纳米多孔结构;所述金膜的表面涂覆有介孔Fe₃O₄@siO₂@Ni-Zn-Fe-LDH、葡萄糖脱氢酶和亚甲基蓝;所述参比/对电极、工作电极均设置于所述基底上。本发明提供的微电极阵列传感器可用于活体植物尤其是扁平形状的植物叶片中

葡萄糖的检测。基于本发明微电极阵列传感器,可用于植物叶片中葡萄糖的活体研究。



CN 111289593 B

1. 一种活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器,包括:
基底;
参比/对电极,为表面覆盖铂的微针阵列电极;
工作电极,为表面覆盖金膜的微针阵列电极;所述金膜的表面具有纳米多孔结构;所述金膜的表面涂覆有介孔 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ni-Zn-Fe-LDH}$ 、葡萄糖脱氢酶和亚甲基蓝;
其中,所述参比/对电极、工作电极均设置于所述基底上。
2. 根据权利要求1所述的微电极阵列传感器,其中,所述微针阵列电极的表面覆盖的金膜的厚度为50-100nm;和/或,所述微针阵列电极的表面覆盖的铂的厚度为50-100nm。
3. 根据权利要求1或2所述的微电极阵列传感器,其中,每g所述金膜的表面上涂覆的所述介孔 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ni-Zn-Fe-LDH}$ 的量为0.025-0.048mg;和/或,
每g所述金膜的表面上涂覆的所述葡萄糖脱氢酶的量为0.1-0.8mg;和/或,
每g所述金膜的表面上涂覆的所述亚甲基蓝的量为0.005mg-0.01mg。
4. 根据权利要求1或2所述的微电极阵列传感器,其中,每g所述金膜的表面上涂覆的所述介孔 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ni-Zn-Fe-LDH}$ 的量为0.03mg;和/或,
每g所述金膜的表面上涂覆的所述葡萄糖脱氢酶的量为0.5mg;和/或,
每g所述金膜的表面上涂覆的所述亚甲基蓝的量为0.008mg。
5. 一种活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器的制备方法,包括:
提供基底;
制备参比/对电极;具体包括:在所述基底上通过刻蚀技术制备微针阵列;在所述微针阵列上喷涂铂;
制备工作电极;具体包括:
 - a. 在所述基底上通过刻蚀技术制备微针阵列;
 - b. 在所述微针阵列上喷涂金膜;
 - c. 在所述金膜的表面上制备纳米多孔结构;
 - d. 将介孔 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ni-Zn-Fe-LDH}$ 、葡萄糖脱氢酶和亚甲基蓝涂覆于所述金膜的表面。
6. 根据权利要求5所述的制备方法,其中,在所述金膜的表面上制备纳米多孔结构的方法包括:将洗净后的表面覆盖金膜的微针阵列浸入HCl溶液中,以铂电极作为参比/对电极,对所述金膜的表面进行阳极化处理,制备纳米多孔结构。
7. 根据权利要求6所述的制备方法,其中,
所述HCl溶液的浓度为20-50mM;和/或,
所述阳极化处理的电压为1.0-1.35V,处理时间为2-30min。
8. 根据权利要求5-7任一项所述的制备方法,其中,将介孔 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ni-Zn-Fe-LDH}$ 、葡萄糖脱氢酶和亚甲基蓝涂覆于所述金膜的表面的方法包括:
 - S1) 将 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 纳米粒子、 Na_2CO_3 和NaOH溶解在蒸馏水中;将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于另一份蒸馏水中;将这两种溶液分别超声处理,并在连续搅拌下滴加到蒸馏水中;在反应过程中,加入适量的氢氧化钠和盐酸溶液,使其pH值保持在11;产生的浆液在室温下放置,然后在80°C下老化;然后,将收集的样品冷却至室温并过滤;然后干燥,得到介孔 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ni-Zn-Fe-LDH}$;

S2) 将亚甲基蓝与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ni-Zn-Fe-LDH}$ 混合, 孵育, 离心洗涤, 干燥, 然后将制得的材料分散于PBS中, 然后将该修饰液均匀滴涂于所述金膜的表面, 干燥后, 将葡萄糖脱氢酶滴涂于所述金膜的表面, 制成GDH/MB/ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ni-Zn-Fe-LDH}/\text{Au}$ 微阵列电极。

9. 权利要求5-8任一项所述方法制备的活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器。

10. 一种活体检测植物葡萄糖的装置, 包括:

反应池, 其内设有孔槽;

权利要求1-4、9任一项所述活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器, 设置在所述孔槽中;

流路, 设于所述孔槽上, 用于向所述孔槽中灌注液体;

电极连线, 其一端与所述微电极阵列传感器的电极相连, 另一端延伸至所述孔槽外。

11. 权利要求1-4、9任一项所述活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器在活体检测植物葡萄糖中的应用。

12. 一种活体检测植物葡萄糖的方法, 包括:

1) 将权利要求1-4、9任一项所述微电极阵列传感器连接至电化学工作站, 与不同浓度的葡萄糖标准溶液反应, 在工作电压下通过计时电流法进行连续检测, 由浓度与电流关系获得稳定的监测葡萄糖的工作曲线;

2) 将所述微电极阵列传感器连接至电化学工作站和含有烟酰胺腺嘌呤二核苷酸辅酶的等渗溶液;

将待测植物的待测部位置于所述的等渗溶液 中, 使待测部位内的液体流至所述等渗溶液中; 在烟酰胺腺嘌呤二核苷酸辅酶的辅助下, 通过葡萄糖脱氢酶将葡萄糖氧化;

在工作电压下通过计时电流法进行连续检测, 获得电流;

根据所述工作曲线和所述电流得到所述待测植物的待测部位的葡萄糖的浓度。

活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器及其制备与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微电极生物传感技术领域,具体涉及一种活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器及其制备与应用。

背景技术

[0002] 葡萄糖是植物体内的重要能源物质,在植物生长过程中起着至关重要的作用。最近研究发现,葡萄糖还具有激素类的信使功能。因此,对植物中的葡萄糖进行定量分析是非常重要的。传统的植物可溶性糖的测定方法包括气相色谱法、液相色谱法、近红外光谱法等。然而,这些方法属于离体检测方法,对植物体本身会造成较大的损伤。而且这些方法经常会造成生物信息的丢失。因此,急需建立活体的研究方法来实现实时检测植物中的葡萄糖。

[0003] 电化学传感器目前被广泛应用于活体研究中,但是目前应用于活体检测植物生理信息的电化学传感器还非常少。而且电化学传感器通常需要电解质支持电化学反应,因此需要一定的水分。葡萄糖的光合作用主要发生在叶片,因此研究叶片中葡萄糖的含量变化非常重要。而植物叶片较小,其中的水分含量普遍较少,因此开发针对叶片的活体应用的光电化学传感器就更加困难。目前国内外还没有此类传感器研发出来。

发明内容

[0004] 本发明实施例提供一种微电极阵列传感器,可用于活体植物尤其是扁平形状的植物叶片中葡萄糖的检测。基于本发明的微电极阵列传感器,可用于植物叶片中葡萄糖的活体研究。

[0005] 一种活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器,包括:

[0006] 基底;

[0007] 参比/对电极,为表面覆盖铂的微针阵列电极;

[0008] 工作电极,为表面覆盖金膜的微针阵列电极;所述金膜的表面具有纳米多孔结构;所述金膜的表面涂覆有介孔 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2@ \text{Ni-Zn-Fe-LDH}$ (Layered double hydroxides,层状双氢氧化物)、葡萄糖脱氢酶(GDH)和亚甲基蓝(MB);

[0009] 其中,所述参比/对电极、工作电极均设置于所述基底上。

[0010] 在本发明一些实施例中,所述基底的材料选自聚二甲基硅氧烷(PDMS)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)等。

[0011] 在本发明一些实施例中,所述微针阵列电极通过刻蚀技术在所述基底上制备而成。其中,在一些实施例中,呈 4×4 微针阵列,也可以设计成其他的阵列形式。在一些实施例中,所述微针阵列电极呈金字塔形,其优点在于可以增加电极的活性表面积,从而提高反应灵敏度。

[0012] 本发明中,所述参比/对电极是指该电极既可做参比又可做对极。

[0013] 在本发明一些实施例中,对于上述工作电极,所述微针阵列电极的表面覆盖的金膜的厚度为50-100nm。可通过溅射的方式在所述微针阵列电极的表面喷涂该金膜。其优点

在于即可保证金膜的稳定,又较为节省成本。

[0014] 在本发明一些实施例中,对于上述参比/对电极,所述微针阵列电极的表面覆盖的铂的厚度为50-100nm。可通过溅射的方式在所述微针阵列电极的表面喷涂铂。其优点在于即可保证铂膜的稳定,又较为节省成本。

[0015] 在本发明一些实施例中,所述工作电极与参比/对电极之间保留一定间隔,例如间隔0.2-1mm(例如间隔0.5mm),从而实现绝缘。

[0016] 在本发明一些实施例中,所述微电极阵列传感器的面积为0.1-1.28平方厘米,例如0.25平方厘米。

[0017] 在本发明一些实施例中,所述微针阵列为金字塔状、圆柱状或其它形状。

[0018] 在本发明一些实施例中,所述微针电极的底部的面积(指每个微针的底部面积)为0.005-0.05平方厘米,例如0.01平方厘米;高度为0.12-1.2mm,例如0.8mm。

[0019] 在本发明一些实施例中,每g所述金膜的表面上涂覆的所述介孔 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ni-Zn-Fe-LDH}$ 的量为0.025-0.048mg,例如0.03mg。

[0020] 在本发明一些实施例中,每g所述金膜的表面上涂覆的所述葡萄糖脱氢酶(GDH)的量为0.1-0.8mg,例如0.5mg。

[0021] 在本发明一些实施例中,每g所述金膜的表面上涂覆的所述亚甲基蓝(MB)的量为0.005mg-0.01mg,例如0.008mg。

[0022] 本发明实施例所提供的微电极阵列传感器,其工作电极为阵列式,首先通过阳极化,构建纳米多孔金结构,增强电极的活性表面积,然后在其上修饰 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ni-Zn-Fe-LDH}$ 材料,增加电极的催化性能,进一步采用MB作为电子媒介体,并利用葡萄糖脱氢酶GDH,在辅因子 NAD^+ 的帮助下,实现葡萄糖的氧化还原检测。

[0023] 本发明还提供活体检测植物葡萄糖的装置,包括:

[0024] 反应池,其内设有孔槽;

[0025] 上述活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器,设置于所述孔槽中;

[0026] 流路,设于所述孔槽上,用于向所述孔槽中灌注液体;

[0027] 电极连线,其一端与所述微电极阵列传感器的电极(参比/对电极、工作电极)相连,另一端延伸至所述孔槽外。

[0028] 利用上述活体检测植物葡萄糖的装置可对活体植物的葡萄糖进行检测。

[0029] 在本发明一些实施例中,制备所述反应池的材料为聚乳酸(PLA),可通过3D打印技术进行制备。

[0030] 在本发明一些实施例中,所述活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器通过密封圈卡在所述孔槽内。

[0031] 在本发明一些实施例中,所述孔槽的容积为50-125 μl ,例如100 μl 。

[0032] 在本发明一些实施例中,所述孔槽的高度为0.2-0.5厘米,例如0.2或0.4厘米。

[0033] 在本发明一些实施例中,所述流路为孔道或管道。

[0034] 在本发明一些实施例中,所述流路设于上述孔槽的上部,目的是在孔内溶液不足时,通过外面的注射器向孔内灌注液体,使孔槽内液体保持不变。

[0035] 在本发明一些实施例中,所述电极连线的另一端延伸至所述孔槽外,并与电化学工作站连接,这样可以进行检测。

[0036] 在本发明一些实施例中,所述活体检测植物葡萄糖的装置还包括微型注射泵,用于通过所述流路向所述孔槽内补充电解质或等渗溶液(电解质溶液),从而实现连续监测。

[0037] 本发明一些实施例所提供的活体检测植物葡萄糖的装置,通过3D打印技术制备聚乳酸(PLA)的反应池,中间含有孔槽,将微阵列电极通过密封圈卡在孔槽内,孔内容积为100 μ l,高度为0.4厘米。一侧设置流路,流路位于孔槽的上部,目的是在孔内溶液不足时,通过外面的注射器向孔内灌注液体,使孔槽内液体保持不变。电极连线一端与所述微电极阵列传感器的电极(参比/对电极、工作电极)相连,另一端延伸至所述孔槽外,以便与电化学工作站连接,进行检测。在反应池的流路前设置微型注射泵,根据水分蒸发器测算的水分蒸发的速度,通过流路向孔槽内补充电解质,从而保持较长的连续监测时间。

[0038] 本发明还提供一种活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器的制备方法,包括:

[0039] 提供基底;

[0040] 制备参比/对电极;具体包括:在所述基底上通过刻蚀技术制备微针阵列;在所述微针阵列上喷涂铂;

[0041] 制备工作电极;具体包括:

[0042] a. 在所述基底上通过刻蚀技术制备微针阵列;

[0043] b. 在所述微针阵列上喷涂金膜;

[0044] c. 在所述金膜的表面上制备纳米多孔结构;

[0045] d. 将介孔 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ni-Zn-Fe-LDH}$ 、葡萄糖脱氢酶(GDH)和亚甲基蓝(MB)涂覆于所述金膜的表面。

[0046] 其中,

[0047] 在一些实施例中,所述基底与上文相同;

[0048] 在一些实施例中,通过现有常规方法在所述基底上通过刻蚀技术制备微针阵列;

[0049] 在一些实施例中,通过溅射的方法在所述微针阵列的表面上喷涂金膜;

[0050] 在一些实施例中,通过如下方法在所述金膜的表面上制备纳米多孔结构:将洗净后的表面覆盖金膜的微针阵列浸入HCl溶液中,以铂电极作为参比/对电极,对所述金膜的表面进行阳极化处理,制备纳米多孔结构。具体地,所述HCl溶液的浓度为20-50mM。所述参比/对电极与上文相同。所述阳极化处理的电压为1.0-1.35V,例如1.21V,处理时间为2-30min,例如15min。

[0051] 在本发明一些实施例中,上述制备方法中所述活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器与上文相同。

[0052] 在本发明一些实施例中,上述制备方法中将介孔 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ni-Zn-Fe-LDH}$ 、葡萄糖脱氢酶(GDH)和亚甲基蓝(MB)涂覆于所述金膜的表面的方法包括:

[0053] s1) 将 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 纳米粒子、 Na_2CO_3 和NaOH按一定比例(例如重量比1:1:1-1:6:6)溶解在蒸馏水中(例如30mL);将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 按一定比例(例如重量比1:1:1-1:3:3)溶解于另一份蒸馏水中(例如30mL);将这两种溶液分别超声处理(例如处理30分钟),并在连续搅拌下滴加到蒸馏水中(例如30mL);在反应过程中,加入适量的氢氧化钠和盐酸溶液,使其pH值保持在11左右;产生的浆液在室温下放置(例如30分钟),然后在80 $^\circ\text{C}$ 下老化(例如20小时);然后,将收集的样品冷却至室温并过滤;然后干燥(例如150 $^\circ\text{C}$),得到介孔 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ni-Zn-Fe-LDH}$;

[0054] s2) 将10mM亚甲基蓝 (MB) 与5mg/mL的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ni-Zn-Fe-LDH}$ 按一定比例(例如重量比1:5-1:9)混合, 孵育1-12小时(优选8h), 离心洗涤几次, 60°C干燥, 然后将制得的材料分散于0.2M PBS中, 然后将5 μl 该修饰液均匀滴涂于所述金膜的表面, 干燥后, 将10 μl 10-80mg/mL的葡萄糖脱氢酶 (GDH) 滴涂于所述金膜的表面, 记为GDH/MB/ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Ni-Zn-Fe-LDH}/\text{Au}$ 微阵列电极。室温干燥, 冲洗, 4°C保存。

[0055] 上述制备方法中,

[0056] $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 纳米粒子可通过现有常规方法制备。本发明实施例提供一种具体的制备方法: 将一定比例的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶解于100ml蒸馏水中。搅拌后向制备的溶液中加入适量氨水(15-50wt%, 10mL), 将所得混合物在65-100°C下加热30分钟, 在氮气气氛下搅拌, 然后冷却至室温, 制得 Fe_3O_4 纳米粒子。将纳米颗粒从反应混合物中磁选出来, 用蒸馏水和氯化钠溶液(0.02M)进行双重洗涤。然后将一定量(1-3.5g) Fe_3O_4 溶解在20毫升蒸馏水中; 将该溶液加入2-丙醇(200毫升)中, 并超声波(30-60分钟)均匀化。然后分别加入聚乙二醇(5.36g)、蒸馏水(20mL)、氨水(28wt%、10mL)和正硅酸乙酯(2mL)。室温下搅拌反应24-48h。反应完成后, 用外部磁场收集产物, 用乙醇洗涤, 得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 纳米粒子。

[0057] 本发明还包括上述方法制备的活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器。

[0058] 本发明还包括上述活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器在活体检测植物葡萄糖中的应用。其中, 所述植物包括作物、花卉、蔬菜或林木。尤其包括植物叶片, 例如扁平形状的植物叶片。

[0059] 本发明还提供一种活体检测植物葡萄糖的方法, 包括:

[0060] 1) 将上述微电极阵列传感器连接至电化学工作站, 与不同浓度的葡萄糖标准溶液反应, 在工作电压下通过计时电流法进行连续检测, 由浓度与电流关系(电流时间曲线(I-T))获得稳定的监测葡萄糖的工作曲线;

[0061] 2) 将上述微电极阵列传感器连接至电化学工作站和含有烟酰胺腺嘌呤二核苷酸辅酶(NAD^+)的等渗溶液;

[0062] 将待测植物的待测部位于所述等渗溶液中, 使待测部位内的液体流至所述等渗溶液中; 在 NAD^+ 的辅助下, 通过葡萄糖脱氢酶(GDH)将葡萄糖氧化;

[0063] 在工作电压下通过计时电流法进行连续检测, 获得电流;

[0064] 根据所述工作曲线和所述电流得到所述待测植物的待测部位的葡萄糖的浓度。

[0065] 在本发明一些实施例中, 用含有烟酰胺腺嘌呤二核苷酸辅酶(NAD^+)的等渗溶液配制葡萄糖标准溶液。

[0066] 在本发明一些实施例中, 所述待测植物的待测部位为植物的叶片。

[0067] 在本发明一些实施例中, 可将所述待测植物的待测部位打洞或撕破, 以使其中的液体流至所述缓冲液中。

[0068] 在本发明一些实施例中, 所述等渗溶液与待测植物的待测部位等渗。

[0069] 所述等渗溶液中烟酰胺腺嘌呤二核苷酸辅酶(NAD^+)的浓度为10-50mg/ml, 例如10mg/ml或25mg/ml。

[0070] 由于待测植物的待测部位(例如叶片)内外渗透压不同会造成其内部的葡萄糖分子的主动向外运输。为了避免发生这种情况, 可以配置含多种离子及糖类的等渗溶液或电解质溶液, 使之与待测部位(例如叶片)内部渗透压一致。在本发明一些实施例中, 通过在双

蒸水中加入适量浓度的氯化钾(例如0.05-0.5mM,优选0.2mM)、氯化钠(例如0.1-1mM,优选0.7mM)、硫酸钠(例如0.1-1mM,优选0.2mM)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸辅酶(NAD⁺,10-50mg/ml,优选20mg/ml)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)溶液(例如0.1-1mM,优选0.3mM)及甘露醇(例如0.05-5%,优选0.2%),通过渗透压仪配成与待测部位(例如叶片)内渗透压相等的等渗溶液。在本发明一些实施例中,以此等渗溶液作为检测葡萄糖的电解质。在本发明一些实施例中,以该等渗溶液配制葡萄糖标准溶液。

[0071] 在本发明一些实施例中,可在上述活体检测植物葡萄糖的装置中实施活体检测植物葡萄糖。例如,进行植物叶片的活体检测时,先在孔槽内灌注含有10-50mg/ml烟酰胺腺嘌呤二核苷酸辅酶(NAD⁺)的等渗溶液(pH值为5-7),将叶片平铺于反应池的孔槽上方,在叶片上通过打孔器打一小洞,使叶片内液体流至孔槽的溶液内,在NAD⁺的辅助下,通过GDH将葡萄糖氧化。通过标准曲线确定葡萄糖的浓度。

[0072] 叶片是植物进行光合作用、合成葡萄糖的主要部位,但叶片中水分相对较少,而且是扁平形状,用普通的圆柱状电极难以实现检测。本发明上述活体检测植物葡萄糖的方法尤其适用于活体连续监测扁平形状的植物叶片中葡萄糖。

[0073] 本发明实施例采用平面的微阵列电极,并在其上构建反应池,将叶片贴于池上进行检测,在池的一侧设置流路,通过流路向里面灌注液体,保持一定水分含量,从而可以进行长时间监测。

[0074] 为了保持叶片内外渗透压一致,本发明实施例还配制含多种离子及糖类的电解质溶液作为等渗溶液,使之与叶片内部渗透压一致。以此等渗溶液作为检测葡萄糖的电解质。

[0075] 本发明检测方法的检测目标材料可以是具有扁平叶片的不同植物的不同生长期和不同外界环境。

[0076] 本发明实施例可以实现对植物的扁平状叶片中葡萄糖的活体连续监测,避免了因叶片中水分不足或蒸发过快造成的无法检测或信号不稳定。并且叶片中葡萄糖浓度相对较少,通过微阵列方式可大大增强传感器的灵敏度。

附图说明

[0077] 图1为本发明实施例制备微电极阵列传感器的过程示意图。

[0078] 图2为本发明实施例活体检测植物葡萄糖的装置示意图;其中,1注射泵;2流路;3孔槽;4微电极阵列传感器;5连接线。

具体实施方式

[0079] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件,或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可通过正规渠道商购买得到的常规产品。

[0080] 以下实施例及对比例分别对经不同光照强度处理的黄瓜幼苗中的葡萄糖进行检测:

[0081] 处理一:日光温室内不遮光栽培,做为对照,经实测光照强度约为自然光照强度的75%,简称75%处理;

[0082] 处理二:双层遮阳网遮光,经实测光照强度为自然光照强度的15%,简称15%处

理。

[0083] 以下实施例制备微电极阵列传感器的过程可参见图1。图1中,MB为亚甲基蓝;GDH为葡萄糖脱氢酶;NAD⁺为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸辅酶;glucose为葡萄糖;gluconolactone为葡萄糖酸内酯。

[0084] 以下实施例所用的活体检测植物葡萄糖的装置可参见图2。

[0085] 实施例1

[0086] 如图1、图2所示,本实施例提供一种活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器,包括:基底;参比/对电极,为表面覆盖铂的微针阵列电极;工作电极,为表面覆盖金膜的金膜微针阵列电极;所述金膜的表面具有纳米多孔结构;所述金膜的表面涂覆有介孔Fe₃O₄@SiO₂@Ni-Zn-Fe-LDH(Layered double hydroxides,层状双氢氧化物)、葡萄糖脱氢酶(GDH)和亚甲基蓝(MB);其中,所述参比/对电极、工作电极均设置于所述基底上。

[0087] 本实施例提供的活体检测植物葡萄糖的微电极阵列传感器,制备方法如下:

[0088] 1) 微阵列电极以聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)作为基底材料,通过刻蚀制备4×4微针阵列。然后通过溅射在微针(例如图2中微阵列电极4的左侧三排微针)上喷100nm厚度的金膜,作为工作电极;在微针电极(例如图2中微阵列电极4的右侧一排微针)喷80nm厚度的铂,制成铂阵列电极,作为参比/对电极。每个微阵列电极的面积为0.25平方厘米,每个微针底部面积为0.01平方厘米,高度为0.8mm。

[0089] 2) 将清洗后的微阵列电极浸入35mM的HCl溶液中,并以铂阵列电极作为参比/对电极,采用1.21V电压对所述工作电极的金膜表面阳极化15min,制备纳米多孔结构。

[0090] 3) 将5.82g FeCl₃·6H₂O和2.91g FeCl₂·4H₂O溶解于100ml蒸馏水中,搅拌后再向这个溶液中加入适量氨水(25wt%,10mL),将所得混合物在85℃下加热30分钟,在氮气气氛下搅拌,然后冷却至室温,得到Fe₃O₄纳米粒子。将Fe₃O₄纳米颗粒从反应混合物中磁选出来,用蒸馏水和氯化钠溶液(0.02M)进行双重洗涤。然后将一定量(2g)Fe₃O₄溶解在20毫升蒸馏水中;将该溶液加入2-丙醇(200毫升)中,并超声30分钟)均匀化。然后分别加入聚乙二醇(5.36g)、蒸馏水(20mL)、氨水(28wt%、10mL)和正硅酸乙酯(2mL)。室温下搅拌反应28h。反应完成后,用外部磁场收集产物,用乙醇洗涤,得到Fe₃O₄@SiO₂纳米粒子。

[0091] 4) Fe₃O₄@SiO₂纳米粒子(0.25g)、Na₂CO₃(1.06g)和NaOH(0.16g)溶解在30mL蒸馏水中。将FeCl₃·6H₂O(1.35g)、Ni(NO₃)₂·6H₂O(2.62g)和Zn(NO₃)₂·6H₂O(1.78g)溶解于另外30mL蒸馏水中。将这两种溶液分别超声30分钟,并在连续搅拌下滴加到30毫升蒸馏水中。在反应过程中,加入适量的氢氧化钠和盐酸溶液,使其pH值保持在11。产生的浆液在室温下放置30分钟,在80℃下老化20小时。然后,将收集的样品冷却至室温并过滤。150℃干燥后,得到介孔Fe₃O₄@SiO₂@Ni-Zn-Fe-LDH(Layered double hydroxides,层状双氢氧化物)。

[0092] 5) 将10mM亚甲基蓝(MB)与5mg/ml的Fe₃O₄@SiO₂@Ni-Zn-Fe-LDH按一定体积比(1:6)混合,孵育8h,离心洗涤几次,60℃干燥,然后将制得的材料分散于0.2M PBS中,然后将5ul该修饰液均匀滴涂于金工作电极表面,干燥后,将10ul的10mg/ml的葡萄糖脱氢酶(GDH)滴涂于上述金工作电极表面,记为GDH/MB/Fe₃O₄@SiO₂@Ni-Zn-Fe-LDH/Au微阵列电极。室温干燥,冲洗,4℃保存。

[0093] 如图2所示,本实施例还提供一种活体检测植物葡萄糖的装置,包括注射泵1;流路2;孔槽3;微电极阵列传感器(同上文)4;连接线5。具体如下:通过3D打印技术制备聚乳酸

(PLA) 反应池, 中间含有孔槽, 将本实施例制备的微电极阵列传感器通过密封圈卡在孔槽内, 孔内容积为50 μ l, 高度为0.2厘米。一侧设置流路, 在流路前设置微型注射泵, 流速为15.2cm/min(根据20 $^{\circ}$ C时水的蒸发速度设定), 通过流路向孔槽内补充电解质。

[0094] 本实施例还提供一种活体检测植物葡萄糖的方法, 采用本实施例制备的微电极阵列传感器, 在一些实施例中还采用本实施例所述装置。具体检测如下:

[0095] 在双蒸水中加入0.2mM浓度的氯化钾、0.7mM氯化钠、0.2mM硫酸钠, 0.3mM, 10mg/ml 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸辅酶(NAD⁺)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)溶液及0.2%甘露醇, 通过渗透压仪配成叶片内渗透压的等渗溶液(pH值为6.5)。以此等渗溶液作为检测葡萄糖的电解质。

[0096] 葡萄糖标准溶液测试: 用修饰的金阵列电极做工作电极, 铂阵列电极做参比电极, 连接电化学工作站, 通过电流时间曲线(I-T)测试由上述等渗溶液配置的葡萄糖的标准溶液, 制备葡萄糖检测的标准曲线。所使用的葡萄糖标准溶液浓度分别为1mM, 5mM, 10mM, 50mM, 100mM, 150mM, 200mM, 得到葡萄糖的标准曲线为 $y=0.5739x-7.1887$ ($R^2=0.9956$)。

[0097] 进行植物叶片的活体检测: 分别用电化学工作站对两个处理组的黄瓜叶片中葡萄糖的浓度变化进行连续监测。先在孔槽内灌注50 μ l上述等渗溶液(pH值为6.5), 将不同处理组的黄瓜叶片分别平铺于反应池上方, 在叶片上通过打孔器打一小洞, 使叶片内汁液渗出, 流至孔槽的溶液内, 通过I-T曲线实时测试黄瓜叶片中葡萄糖的电流响应, 连续测量48h。通过标准曲线确定葡萄糖浓度。

[0098] 实验结果对比: 在上述检测过程中, 每隔12小时取同一株植物上的与检测叶片相近位置的不同叶片, 处理后, 利用高压液相色谱(HPLC-MS)进行葡萄糖含量的测试, 进行对比分析。其中, 所用的HPLC-MS方法参考文献RSC Adv., 2017, 7, 54416-54421。

[0099] 实验结果如表1所示。结果表明本实施例微电极传感检测结果的变化趋势与HPLC-MS的趋势一致, 但结果更为准确, 并且反应了植物活体内即时的葡萄糖浓度, 结果更加可靠。

[0100] 表1传感器活体检测的黄瓜叶片葡萄糖含量与HPLC-MS离体检测结果的对比

Time(h)	处理一 (自然光强75%)		处理二 (自然光强15%)	
	Sensor (ng mL ⁻¹)	HPLC-MS (ng mL ⁻¹)	Sensor (ng mL ⁻¹)	HPLC-MS (ng mL ⁻¹)
[0101] 0	23.5 \pm 1.7	18.2 \pm 1.1	22.6 \pm 1.3	19.6 \pm 2.4
12	25.4 \pm 2.3	17.5 \pm 2.3	29.5 \pm 3.2	22.1 \pm 1.8
24	26.8 \pm 1.9	19.3 \pm 1.7	36.8 \pm 2.7	29.6 \pm 3.2
[0102] 36	27.2 \pm 3.1	22.7 \pm 2.1	44.3 \pm 1.9	36.8 \pm 2.7
48	28.4 \pm 2.2	23.5 \pm 3.0	49.2 \pm 5.1	39.7 \pm 2.9

[0103] 注: 表1中, Sensor表示本实施例微电极阵列传感器。

[0104] 对比例1

[0105] 本对比例提供一种微电极阵列传感器, 其制备方法中步骤1)、2) 与实施例相同, 接

下来步骤为:取5 μ l 10mM亚甲基蓝(MB)均匀滴涂于金工作电极表面,干燥后,将10 μ l的10mg/ml的葡萄糖脱氢酶(GDH)滴涂于金工作电极表面,记为GDH/MB/Au微阵列电极。室温干燥,冲洗。

[0106] 本对比例还提供一种活体检测植物葡萄糖的装置,与实施例的区别仅在于采用本对比例制备的微电极阵列传感器。

[0107] 本对比例还提供一种活体检测植物葡萄糖的方法,采用本对比例制备的微电极阵列传感器及本对比例所述装置,具体如下:

[0108] 所用等渗溶液同实施例。

[0109] 葡萄糖标准溶液测试:用修饰的金阵列电极做工作电极,铂阵列电极做参比电极,连接电化学工作站,通过电流时间曲线(I-T)测试由等渗的电解质溶液配置的葡萄糖的标准溶液,制备葡萄糖检测的标准曲线。所使用的葡萄糖标准溶液浓度分别为1mM,5mM,10mM,50mM,100mM,150mM,200mM,得到葡萄糖的标准曲线为 $y=0.0129x-5.6998$ ($R^2=0.9974$)。本对比例传感器的灵敏度比实施例降低。

[0110] 进行植物叶片的活体检测:方法基本参照上文实施例。

[0111] 实验结果对比:在上述检测过程中,每隔12小时取同一株植物上的与检测叶片相近位置的不同叶片,处理后,利用高压液相色谱(HPLC-MS,方法与实施例相同)进行葡萄糖含量的测试,进行对比分析。结果如表2所示。有些时间段的结果检测不到。取某一时间点的即时浓度与同一时间点的HPLC的检测结果相比,偏差变大。

[0112] 表2传感器活体检测的黄瓜叶片葡萄糖含量与HPLC-MS离体检测结果的对比

Time(h)	处理一		处理二	
	(自然光强75%)		(自然光强15%)	
	Sensor	HPLC-MS	Sensor	HPLC-MS
	(ng mL ⁻¹)	(ng mL ⁻¹)	(ng mL ⁻¹)	(ng mL ⁻¹)
0	12.5 \pm 1.9	18.2 \pm 1.1	##	19.6 \pm 2.4
12	13.4 \pm 1.3	17.5 \pm 2.3	##	22.1 \pm 1.8
[0114] 24	16.8 \pm 2.1	19.3 \pm 1.7	18.8 \pm 2.1	29.6 \pm 3.2
36	15.6 \pm 1.9	22.7 \pm 2.1	23.4 \pm 2.3	36.8 \pm 2.7
48	14.6 \pm 2.1	23.5 \pm 3.0	29.2 \pm 3.2	39.7 \pm 2.9

[0115] 注:表2中,Sensor表示本对比例微电极阵列传感器。

[0116] 虽然,上文中已经用一般性说明、具体实施方式,对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

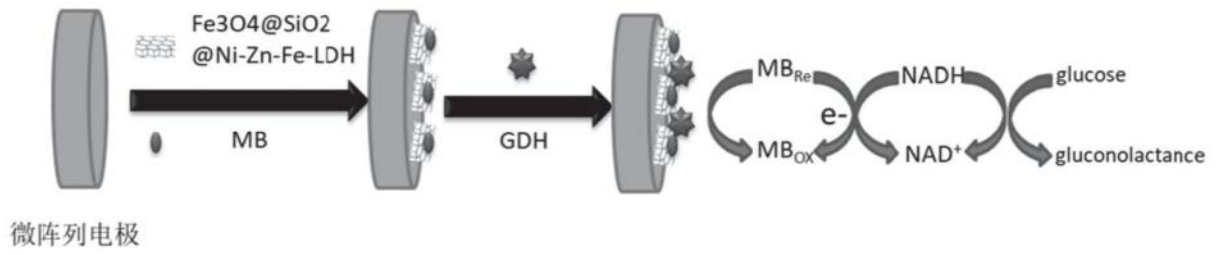


图1

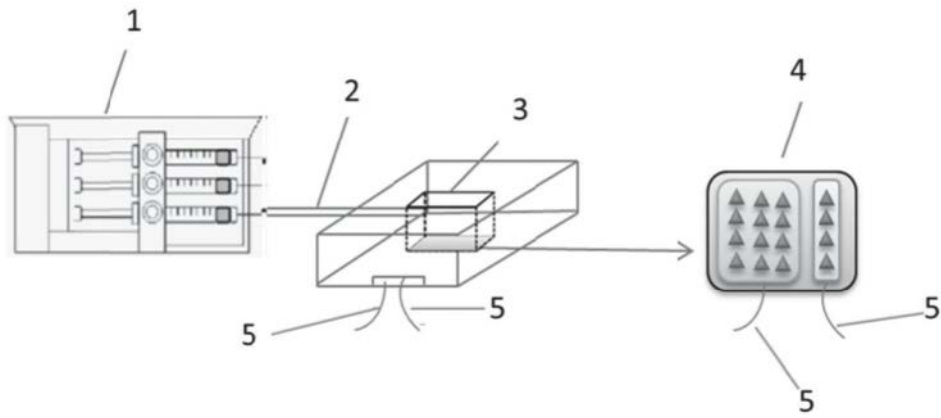


图2