



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104459123 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 25

(21) 申请号 201410726834. 0

(22) 申请日 2014. 12. 04

(71) 申请人 济南大学

地址 250022 山东省济南市济微路 106 号

(72) 发明人 颜兆庆 魏琴 高健 吴丹 闫涛

张铁 范大伟 胡丽华

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 27/327(2006. 01)

权利要求书2页 说明书4页

(54) 发明名称

一种禽白血病病毒抗原免疫传感器的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明属于免疫分析和生物传感技术领域,其公开了一种禽白血病病毒抗原免疫传感器的制备方法及应用,用于快速检测禽白血病病毒抗原。其制作方案是:以玻碳电极为工作电极,将 β -CD/MWCNTs 对其进行修饰,然后依次加入金刚烷甲酸/捕获抗体 Ab₁、牛血清白蛋白、禽白血病病毒抗原以及 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc/Ab₂溶液。 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc 由于氧化铁纳米材料超顺磁性的特点,产品易于分离;利用环糊精具有超分子识别特性的特点,可以通过主客体作用捕获大量二茂铁甲酸 Fc,具有良好的生物相容性以及水溶性,从而有利于抗体检测量的提高,实现了较高的灵敏度,检测限可低至 0. 33pg/mL。

1. 一种禽白血病病毒抗原免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤如下:

(1) 将直径 4 mm 的玻碳电极依次用 1.0、0.3 和 0.05 mm 的三氧化二铝抛光粉抛光处理,乙醇超声清洗,再用超纯水冲洗干净,然后将电极置于 5 mmol · L⁻¹ 铁氰化钾溶液中,在 -0.2 ~ 0.6 V 电位下扫描,使峰电位差小于 80 mV;

(2) 将 pH 7.0、0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液分散的 β -CD/MWCNTs 修饰于玻碳电极表面,室温干燥,所述 β -CD/MWCNTs 的浓度为 0.5 ~ 2.5 mg · mL⁻¹;

(3) 滴涂金刚烷甲酸 / 捕获抗体 Ab₁ 于电极表面,置于 4℃ 湿润条件下晾干;

(4) 滴涂 3 μ L、100 μ g · mL⁻¹ 的牛血清白蛋白溶液至电极表面,4℃ 下湿润条件下晾干;

(5) 滴涂 6 μ L、0.001 ~ 15 ng · mL⁻¹ 的禽白血病病毒抗原标准溶液于电极表面,4℃ 下湿润条件下晾干;

(6) 滴涂 6 μ L 的 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc/Ab₂ 溶液至电极表面,4℃ 下湿润条件下晾干,制得一种禽白血病病毒抗原免疫传感器。

2. 如权利要求 1 所述的一种禽白血病病毒抗原免疫传感器的制备方法,所述 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc/Ab₂ 溶液的制备方法,步骤如下:

(1) 核壳纳米材料氨基- β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc 的制备

将 2.5~3.5g 的 Fe₃O₄ · 7H₂O 与 4.0g 的 Fe₂(SO₄)₃ 溶解于装有 200mL 超纯水的 500mL 烧瓶中,加入 50mL、质量分数为 25~28 % 的氨水调节 pH 为 10,恒温 45~55 °C 条件下搅拌 1 h,冷却至室温;加入 8~12 mL 的四乙基原硅酸盐 TEOS,搅拌 16~20 h,离心分离,50℃ 真空干燥 12h,制得 Fe₃O₄@SiO₂;

取 0.08~0.12g Fe₃O₄@SiO₂ 与 0.1 mL 氨丙基三乙氧基硅烷 APTES 及 10mL 甲苯相混合,110 °C 回流 1.5 h,用强力磁铁进行磁分离,得到的产物依次用甲醇和乙醇洗涤 3~4 次,真空干燥 12 h,制得氨基化 Fe₃O₄@SiO₂;

将 40~60 mg 的氨基化 Fe₃O₄@SiO₂ 分散至 1mL 无水乙醇中,加入 250~350 μ L、质量分数为 25% 的戊二醛,室温下搅拌 6~10 h,用强力磁铁进行磁分离;加入 18~22 mg 氨基化 β -环糊精 β -CD,5mL 超纯水搅拌过夜;磁分离,加入 5.8~6.2 mg 二茂铁甲酸 Fc 混合,加入 10mL、体积分数为 5% 的乙醇水溶液混合,得到混合液;超声 10 min,磁力搅拌 6 h,磁分离后将所得产物进行真空干燥,制得氨基化 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc;

(2) 氨基化 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc/Ab₂ 制备

将 3.5~4.5mg 氨基化 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc 分散于 1mL 的 pH7.0 的 PBS 溶液中,超声,得到氨基化 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc 悬浮液,加入 10mg 的 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐 EDC 和 10mg 的 N-羟基丁二酰亚胺 NHS,室温震荡 15 min,加入 0.5 mL、80~120 μ g · mL⁻¹ 的检测抗体 Ab₂ 溶液,4℃ 下,振荡孵化 12 ~ 24 h,离心弃去上层液,用 pH=7.0 的 PBS 溶液洗涤分离,加入 200 μ L PBS 溶液,置于 4 °C 冰箱中备用。

3. 如权利要求 1 所述的制备方法制备的一种禽白血病病毒抗原免疫传感器,用于禽白血病病毒抗原检测,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,所制备的一种禽白血病病毒抗原免疫传感器为工作电极,在 10 mL、40~60 mmol/L 的 pH6.0 ~ 8.0 磷酸盐缓冲溶液中测定其电流变化;

(2) 根据所得电流差值与禽白血病病毒抗原标准溶液浓度呈线性关系,绘制工作曲

线；

(3) 依据工作曲线的绘制方法进行样品中禽白血病病毒抗原的检测,检测结果从工作曲线中查得。

一种禽白血病病毒抗原免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析与生物传感技术领域,具体涉及一种基于 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc 的电化学免疫传感器的制备及应用,研制一种快速检测禽白血病病毒抗原的夹心型电化学免疫传感器。

背景技术

[0002] 禽白血病病毒是以主要引起禽各种造血细胞肿瘤性增生为特征的一类反转录病毒群,其中 J 亚群禽白血病病毒 ALV-J 作为一类主要感染肉用型鸡的反转录病毒,自上世纪九十年代以来,对全世界范围内的禽类动物造成了巨大影响,引起了巨大的经济损失。目前已经有一系列分析方法致力于 ALV-J 的检测,例如免疫组织化学,酶联免疫吸附试验以及表面等离子体共振等。然而,这些方法往往耗时过长,相比之下,夹心型电化学免疫分析凭借其预处理简单、检测周期短、成本低和灵敏度高的特点,已成为定量检测的一个重要分析技术。

[0003] 本发明以 β -环糊精功能化的羧基化多壁碳纳米管复合材料 β -CD/MWCNTs 修饰的玻碳电极作为金刚烷甲酸/捕获抗体 Ab₁ 的固载界面,氨基化 β -环糊精修饰的二氧化硅包裹的氧化铁负载二茂铁甲酸 Fc 核壳纳米材料氨基- β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc 来标记检测抗体,构建一种用于检测禽白血病病毒抗原的夹心型免疫传感器。首先, β -CD/MWCNTs 凭借其良好的导电性提高了电极表面的电子转移速率并以其大的比表面积的特点大大提高了一抗的负载量。其次,核壳纳米材料氨基- β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc 增加了其分子识别的特性,其表面可进而形成稳定的 CD-Fc 主客体包合配合物,为与二抗的结合提供更大的自由空间。实验结果表明,制备的免疫传感器对 J 亚群禽白血病病毒 ALV-J 的检测在 0.001 ~ 15 ng/mL 范围内呈现良好的线性响应,其检测限低至 0.33 pg/mL。实际检测呈现出良好的选择性、再现性和稳定性。

发明内容

[0004] 1. 一种禽白血病病毒抗原免疫传感器的制备方法

(1) 将直径 4 mm 的玻碳电极依次用 1.0、0.3 和 0.05 mm 的三氧化二铝抛光粉抛光处理,乙醇超声清洗,再用超纯水冲洗干净,然后将电极置于 5 mmol·L⁻¹ 铁氰化钾溶液中,在 -0.2 ~ 0.6 V 电位下扫描,使峰电位差小于 80 mV;

(2) 将 pH 7.0, 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液分散的 β -CD/MWCNTs 修饰于玻碳电极表面,室温干燥,所述 β -CD/MWCNTs 的浓度为 0.5 ~ 2.5 mg·mL⁻¹;

(3) 滴涂金刚烷甲酸/捕获抗体 Ab₁ 于电极表面,置于 4℃ 湿润条件下晾干;

(4) 滴涂 3 μ L、100 μ g·mL⁻¹ 的牛血清白蛋白溶液至电极表面,4℃ 下湿润条件下晾干;

(5) 滴涂 6 μ L、0.001 ~ 15 ng·mL⁻¹ 的禽白血病病毒抗原标准溶液于电极表面,4℃ 下湿润条件下晾干;

(6) 滴涂 6 μ L 的 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc/Ab₂ 溶液至电极表面,4℃ 下湿润条件下晾干,制

得一种禽白血病病毒抗原免疫传感器。

[0005] 2. 所述 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc/Ab₂ 溶液的制备方法

(1) 核壳纳米材料氨基- β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc 的制备

将 2.5~3.5g 的 Fe₃O₄·7H₂O 与 4.0g 的 Fe₂(SO₄)₃ 溶解于装有 200mL 超纯水的 500mL 烧瓶中,加入 50mL、质量分数为 25~28 % 的氨水调节 pH 为 10,恒温 45~55 °C 条件下搅拌 1 h,冷却至室温;加入 8~12 mL 的四乙基原硅酸盐 TEOS,搅拌 16~20 h,离心分离,50°C 真空干燥 12h,制得 Fe₃O₄@SiO₂;

取 0.08~0.12g Fe₃O₄@SiO₂ 与 0.1 mL 氨丙基三乙氧基硅烷 APTES 及 10mL 甲苯相混合,110 °C 回流 1.5 h,用强力磁铁进行磁分离,得到的产物依次用甲醇和乙醇洗涤 3~4 次,真空干燥 12 h,制得氨基化 Fe₃O₄@SiO₂;

将 40~60 mg 的氨基化 Fe₃O₄@SiO₂ 分散至 1mL 无水乙醇中,加入 250~350 μ L、质量分数为 25% 的戊二醛,室温下搅拌 6~10 h,用强力磁铁进行磁分离;加入 18~22 mg 氨基化 β -环糊精 β -CD,5mL 超纯水搅拌过夜;磁分离,加入 5.8~6.2 mg 二茂铁甲酸 Fc 混合,加入 10mL、体积分数为 5% 的乙醇水溶液混合,得到混合液;超声 10 min,磁力搅拌 6 h,磁分离后将所得产物进行真空干燥,制得氨基化 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc;

(2) 氨基化 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc/Ab₂ 制备

将 3.5~4.5mg 氨基化 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc 分散于 1mL 的 pH7.0 的 PBS 溶液中,超声,得到氨基化 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc 悬浮液,加入 10mg 的 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 EDC 和 10mg 的 N-羟基丁二酰亚胺 NHS,室温震荡 15 min,加入 0.5 mL、80~120 μ g·mL⁻¹ 的检测抗体 Ab₂ 溶液,4°C 下,振荡孵化 12~24 h,离心弃去上层液,用 pH=7.0 的 PBS 溶液洗涤分离,加入 200 μ L PBS 溶液,置于 4 °C 冰箱中备用。

[0006] 3. 禽白血病病毒抗原检测

(1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,所制备的一种禽白血病病毒抗原免疫传感器为工作电极,在 10 mL、40~60 mmol/L 的 pH6.0 ~ 8.0 磷酸盐缓冲溶液中测定其电流变化;

(2) 根据所得电流差值与禽白血病病毒抗原标准溶液浓度呈线性关系,绘制工作曲线;

(3) 依据工作曲线的绘制方法进行样品中禽白血病病毒抗原的检测,检测结果从工作曲线中查得。

[0007] 本发明具备的优势

(1) 本发明快速、准确,不需前处理,可用于禽血清样品中的禽白血病病毒的检测;

(2) 本发明采用环糊精功能化的氨基化 Fe₃O₄@SiO₂,通过交联剂戊二醛进行交联,由于氧化铁纳米材料超顺磁性的特点,产品易于分离;利用环糊精具有超分子识别特性的特点,可以通过与二茂铁甲酸的主客体作用在其疏水性内腔的捕获大量二茂铁甲酸,具有良好的生物相容性、水溶性以及稳定性,从而有利于抗体检测量的提高;

(3) 环糊精的外腔表面具有亲水性的特点,利用环糊精功能化的多壁碳纳米管,使其更易分散在水中,同时利用多壁碳纳米管高比表面积的特点,通过环糊精内腔主客体作用捕获大量金刚烷甲酸功能化的抗体,提高了本发明传感器的灵敏度,使检测限可低至 0.33 pg/mL;

(4) 本发明印刷电极制备简单、成本低、便于携带、试剂消耗少,且对环境无污染,符合当今提倡环保的趋势,易于微型化和集成化,可应用在众多领域。

具体实施方式

[0008] 实施例 1 核壳纳米材料氨基- β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc 的制备

将 2.5g 的 Fe₃O₄·7H₂O 与 4.0g 的 Fe₂(SO₄)₃ 溶解于装有 200mL 超纯水的 500mL 烧瓶中,加入 50mL、质量分数为 25 % 的氨水调节 pH 为 10,恒温 45 °C 条件下搅拌 1 h,冷却至室温;加入 8 mL 的四乙基原硅酸盐 TEOS,搅拌 16 h,离心分离,50°C 真空干燥 12h,制得 Fe₃O₄@SiO₂;

取 0.08g Fe₃O₄@SiO₂ 与 0.1 mL 氨丙基三乙氧基硅烷 APTES 及 10mL 甲苯相混合,110 °C 回流 1.5 h,用强力磁铁进行磁分离,得到的产物依次用甲醇和乙醇洗涤 3 次,真空干燥 12 h,制得氨基化 Fe₃O₄@SiO₂;

将 40 mg 的氨基化 Fe₃O₄@SiO₂ 分散至 1mL 无水乙醇中,加入 250~350 μ L、质量分数为 25% 的戊二醛,室温下搅拌 6 h,用强力磁铁进行磁分离;加入 18 mg 氨基化 β -环糊精 β -CD,5mL 超纯水搅拌过夜;磁分离,加入 5.8 mg 二茂铁甲酸 Fc 混合,加入 10mL、体积分数为 5% 的乙醇水溶液混合,得到混合液;超声 10 min,磁力搅拌 6 h,磁分离后将所得产物进行真空干燥,制得氨基化 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc。

[0009] 实施例 2 核壳纳米材料氨基- β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc 的制备

将 3.5g 的 Fe₃O₄·7H₂O 与 4.0g 的 Fe₂(SO₄)₃ 溶解于装有 200mL 超纯水的 500mL 烧瓶中,加入 50mL、质量分数为 28 % 的氨水调节 pH 为 10,恒温 55 °C 条件下搅拌 1 h,冷却至室温;加入 12 mL 的四乙基原硅酸盐 TEOS,搅拌 20 h,离心分离,50°C 真空干燥 12h,制得 Fe₃O₄@SiO₂;

取 0.12g Fe₃O₄@SiO₂ 与 0.1 mL 氨丙基三乙氧基硅烷 APTES 及 10mL 甲苯相混合,110 °C 回流 1.5 h,用强力磁铁进行磁分离,得到的产物依次用甲醇和乙醇洗涤 4 次,真空干燥 12 h,制得氨基化 Fe₃O₄@SiO₂;

将 60 mg 的氨基化 Fe₃O₄@SiO₂ 分散至 1mL 无水乙醇中,加入 350 μ L、质量分数为 25% 的戊二醛,室温下搅拌 6~10 h,用强力磁铁进行磁分离;加入 22 mg 氨基化 β -环糊精 β -CD,5mL 超纯水搅拌过夜;磁分离,加入 6.2 mg 二茂铁甲酸 Fc 混合,加入 10mL、体积分数为 5% 的乙醇水溶液混合,得到混合液;超声 10 min,磁力搅拌 6 h,磁分离后将所得产物进行真空干燥,制得氨基化 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc。

[0010] 实施例 3 氨基化 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc/Ab₂ 制备

将 3.5mg 氨基化 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc 分散于 1mL 的 pH7.0 的 PBS 溶液中,超声,得到氨基化 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc 悬浮液,加入 10mg 的 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 EDC 和 10mg 的 N-羟基丁二酰亚胺 NHS,室温震荡 15 min,加入 0.5 mL、80 μ g·mL⁻¹ 的检测抗体 Ab₂ 溶液,4°C 下,振荡孵化 12 h,离心弃去上层液,用 pH=7.0 的 PBS 溶液洗涤分离,加入 200 μ L PBS 溶液,置于 4 °C 冰箱中备用。

[0011] 实施例 4 氨基化 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc/Ab₂ 制备

将 4.5mg 氨基化 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc 分散于 1mL 的 pH7.0 的 PBS 溶液中,超声,得到氨基化 β -CD@Fe₃O₄@SiO₂-Fc 悬浮液,加入 10mg 的 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺

盐酸盐 EDC 和 10mg 的 N- 羟基丁二酰亚胺 NHS, 室温震荡 15 min, 加入 0.5 mL、 $120\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的检测抗体 Ab_2 溶液, 4°C 下, 振荡孵化 12 ~ 24 h, 离心弃去上层液, 用 pH=7.0 的 PBS 溶液洗涤分离, 加入 200 μL PBS 溶液, 置于 4°C 冰箱中备用。

[0012] 实施例 5 禽白血病病毒抗原的检测方法

(1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 所制备的一种禽白血病病毒抗原免疫传感器为工作电极, 在 10 mL、40 mmol/L 的 pH6.0 磷酸盐缓冲溶液中测定其电流变化;

(2) 根据所得电流差值与禽白血病病毒抗原标准溶液浓度呈线性关系, 绘制工作曲线;

(3) 依据工作曲线的绘制方法进行样品中禽白血病病毒抗原的检测, 检测结果从工作曲线中查得。

[0013] 实施例 6 禽白血病病毒抗原的检测方法

(1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 所制备的一种禽白血病病毒抗原免疫传感器为工作电极, 在 10 mL、40~60 mmol/L 的 pH6.0 ~ 8.0 磷酸盐缓冲溶液中测定其电流变化;

(2) 根据所得电流差值与禽白血病病毒抗原标准溶液浓度呈线性关系, 绘制工作曲线;

(3) 依据工作曲线的绘制方法进行样品中禽白血病病毒抗原的检测, 检测结果从工作曲线中查得。

专利名称(译)	一种禽白血病病毒抗原免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN104459123A	公开(公告)日	2015-03-25
申请号	CN201410726834.0	申请日	2014-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	济南大学		
申请(专利权)人(译)	济南大学		
当前申请(专利权)人(译)	济南大学		
[标]发明人	颜兆庆 魏琴 高健 吴丹 闫涛 张铁 范大伟 胡丽华		
发明人	颜兆庆 魏琴 高健 吴丹 闫涛 张铁 范大伟 胡丽华		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N27/327		
CPC分类号	G01N27/3278 G01N33/54366 G01N33/54386 G01N33/56983 G01N33/57426		
其他公开文献	CN104459123B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫分析和生物传感技术领域，其公开了一种禽白血病病毒抗原免疫传感器的制备方法及应用，用于快速检测禽白血病病毒抗原。其制作方案是：以玻碳电极为工作电极，将 β -CD/MWCNTs 对其进行修饰，然后依次加入金刚烷甲酸/捕获抗体Ab1、牛血清白蛋白、禽白血病病毒抗原以及 β -CDFe₃O₄SiO₂-Fc/Ab2溶液。 β -CDFe₃O₄SiO₂-Fc由于氧化铁纳米材料超顺磁性的特点，产品易于分离；利用环糊精具有超分子识别特性的特点，可以通过主客体作用捕获大量二茂铁甲酸Fc，具有良好的生物相容性以及水溶性，从而有利于抗体检测量的提高，实现了较高的灵敏度，检测限可低至0.33pg/mL。