



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104792772 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201510197738. 6

(22) 申请日 2015. 04. 24

(71) 申请人 张萍

地址 518000 广东省深圳市龙岗区布沙路可园四期 12 号楼 A 单元 1805

(72) 发明人 张萍

(51) Int. Cl.

G01N 21/76(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

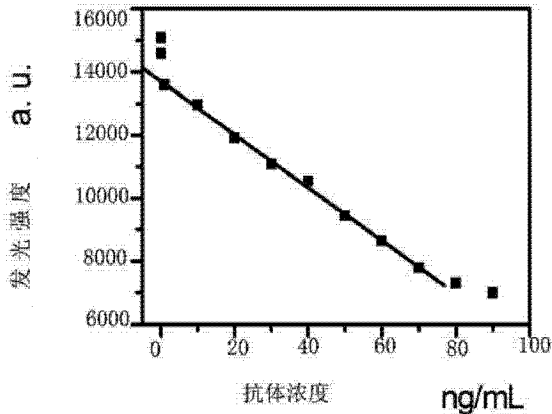
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种电化学发光传感器及其免疫分析方法

(57) 摘要

本发明公开了一种电化学发光传感器及其免疫分析方法,本发明的一种电化学发光传感器的制备方法,包括以下步骤:(1)将石英玻璃片在HCL与H2O2的水溶液中浸泡,在1%的3-(2,3环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷GPTMS的甲苯溶液中进行硅烷化反应;(2)用二甲苯和乙醇冲洗并在氩气气氛下吹干;(3)将含有(十二烷基磺酸钠)的金纳米粒子溶液和5.0wt%聚葡萄糖胺(1-4)-2-氨基-B-D葡萄糖溶液混合,与化学发光探针、抗体溶液相混合;(4)将其滴涂到石英玻璃片表面;(5)用磷酸盐缓冲液和烷基酚聚氧乙烯醚冲洗,制得电化学发光免疫传感器。本发明检测时间短便捷地无标记检测的电化学发光传感器及其免疫分析方法。



1. 一种电化学发光传感器的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 将石英玻璃片在 HCL 与 H_2O_2 的水溶液中浸泡 10-12h,用蒸馏水充分清洗后,在氩气气氛中吹干,浸泡在 1% 的 3-(2,3 环氧丙氧) 丙基三甲氧基硅烷 GPTMS 的甲苯溶液中进行硅烷化反应,在温度为 22℃ 下放置 20-24h;所述 HCL 与 H_2O_2 的体积比为 8:4;

(2) 用二甲苯和乙醇冲洗并在氩气气氛下吹干;

(3) 将含有(十二烷基磺酸钠)的金纳米粒子溶液和 5.0wt% 聚葡萄糖胺(1-4)-2-氨基-B-D 葡萄糖溶液混合后超声至完全分散,然后与化学发光探针、抗体溶液相混合;

(4) 取上述混合溶液,将其滴涂到石英玻璃片表面,并在温度为 22℃ 下反应 2-3h,然后在 10℃ 下放置 10-12h;

化学发光探针为葡萄糖氧化酶或辣根过氧化物酶;所述抗体溶液为人类免疫球蛋白 HIgG 抗体溶液或甲胎蛋白 AFP 抗体溶液;所述葡萄糖氧化酶或辣根过氧化物酶的浓度为 $6 \mu g/ml$,人类免疫球蛋白 HIgG 抗体溶液浓度为 $50 \mu g/ml$;

(5) 用磷酸盐缓冲液和烷基酚聚氧乙烯醚冲洗五次,并在 10℃ 下用封闭液封闭 15-20h,所述封闭液为含 1% 牛血清白蛋白的 0.01M 磷酸盐缓冲液, pH 为 7.3;制得电化学发光免疫传感器。

2. 根据权利要求 2 所述的电化学发光传感器的制备方法,其特征在于:在步骤(5)中,磷酸盐缓冲溶液是每 0.325-2.469g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 加 0.058-0.956g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 在 300ml 的容量瓶中定容制得。

3. 利用权利要求 1 的方法制得的电化学发光传感器的免疫分析方法,其特征在于包括如下步骤:

(1) 将所述免疫传感器固定在免疫微反应器后,将带抗原样品以 0.6ml/min 的速度注入流通池,在线温育后形成免疫复合物;所述在线温育时间为 18-26min;

(2) 用缓冲液 PBST 以 1ml/min 的速度冲洗免疫复合物,除去未反应的免疫试剂;

(3) 将化学发光底物溶液以 0.5ml/min 的速度通入免疫传感器,产生的化学发光信号由光电倍增管记录。

4. 根据权利要求 1 所述的电化学发光传感器的免疫分析方法,其特征在于:在步骤(1)中,所述免疫微反应器由带有进口和出口的聚氯乙烯板,所述聚氯乙烯板的长、宽、高分别为 3.3cm、1.9cm、1.2cm;所述硅橡胶片的厚度为 3.0mm。

5. 根据权利要求 3 所述的电化学发光传感器的免疫分析方法,其特征在于:在步骤(1)中,所述抗原样品为人类免疫球蛋白 HIgG,所述人类免疫球蛋白 HIgG 测量的最佳温育时间为 26min。

一种电化学发光传感器及其免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学领域,具体涉及一种电化学发光传感器及其免疫分析方法。

背景技术

[0002] 免疫分析法利用抗原抗体特异性结合反应检测各种物质,如药物、激素、蛋白质、微生物等的分析方法。在药物分析中,免疫分析法的应用主要集中在以下几方面:(1) 在实验药物动力学和临床药理学中测定生物利用度和药物代谢动力学参数等生物药剂学中的重要数据,以便了解药物在体内的吸收、分解、代谢和排泄情况;(2) 在药物的临床检测中,对治疗指数小、超过安全剂量易发生严重不良反应或最佳治疗浓度和毒性反应浓度有交叉的药物血液浓度进行监测;(3) 在药物生产中从发酵液或细胞培养液中检测时间短测定有效组分的含量,以实现生产过程的在线监测;(4) 对药品中是否存在特定的微量有害杂质进行评价。

[0003] 免疫分析可分为无标记(直接测定)和标记(间接测定)两种类型。相对标记免疫分析,无标记免疫分析技术能够直接测定生物样品,测定过程中无需预先对抗体或抗原进行标记,具有检测成本低,样品消耗少,耗费时间短,操作简单等显著优势,适应直接、实时、原位、在线的痕量免疫分析,因此引起了人们极大的研究兴趣,成为生物传感领域发展的一个非常重要方向。目前的无标记型免疫分析主要分为光学免疫分析、压电免疫分析和电化学免疫分析。其中表面等离子共振免疫传感器、石英晶体微天平免疫传感器、电容免疫传感器及交流阻抗免疫传感器,文献中报道的较多。

[0004] 目前,化学发光免疫分析技术在医学临床应用已成为研究热点,它同时具备了化学发光法的高灵敏度和免疫分析法的高特异性,具有灵敏度高、特异性强、无放射性危害、适用面广、设备简单、线性范围宽等分析优点,日益受到人们的青睐,在生命分析、临床诊断、环境监测、食品安全、药物分析等领域得到了广泛应用,并有取代放射免疫分析和酶联免疫分析成为诊断市场上的主流趋势,而无标记化学发光免疫分析鲜有报道。因此,发展灵敏、检测时间短、成本低和便捷的新型无标记化学发光免疫分析方法,将具有非常重要的科学意义。

[0005] 目前,缺乏一种无标记的检测时间短的电化学发光传感器及其免疫分析方法。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种无标记的检测时间短的电化学发光传感器及其免疫分析方法。

[0007] 本发明的技术方案如下:本发明提供了一种电化学发光传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0008] (1) 将石英玻璃片在 HCL 与 H_2O_2 的水溶液中浸泡 10-12h,用蒸馏水充分清洗后,在氩气气氛中吹干,浸泡在 1% 的 3-(2,3 环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷 GPTMS 的甲苯溶液中进行硅烷化反应,在温度为 22℃ 下放置 20-24h;所述 HCL 与 H_2O_2 的体积比为 8:4;

- [0009] (2) 用二甲苯和乙醇冲洗并在氩气气氛下吹干；
- [0010] (3) 将金纳米粒子溶液和 5.0wt% 聚葡萄糖胺 (1-4)-2-氨基-B-D 葡萄糖溶液混合后超声至完全分散, 然后与化学发光探针、抗体溶液相混合；
- [0011] (4) 取上述混合溶液, 将其滴涂到石英玻璃片表面, 并在温度为 22°C 下反应 2-3h, 然后在 10°C 下放置 10-12h；
- [0012] 化学发光探针为葡萄糖氧化酶或辣根过氧化物酶；所述抗体溶液为人类免疫球蛋白 HIgG 抗体溶液或甲胎蛋白 AFP 抗体溶液；所述葡萄糖氧化酶或辣根过氧化物酶的浓度为 6 μ g/ml, 人类免疫球蛋白 HIgG 抗体溶液浓度为 50 μ g/ml；
- [0013] (5) 用磷酸盐缓冲液和烷基酚聚氧乙烯醚冲洗五次, 并在 10°C 下用封闭液封闭 15-20h, 所述封闭液为含 1% 牛血清白蛋白的 0.01M 磷酸盐缓冲液, pH 为 7.3；制得电化学发光免疫传感器。
- [0014] 进一步地, 在步骤 (5) 中, 磷酸盐缓冲溶液是每 0.325-2.469g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 加 0.058-0.956g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 在 300ml 的容量瓶中定容制得。
- [0015] 本发明的方法制得的电化学发光传感器的免疫分析方法, 包括如下步骤：
- [0016] (1) 将所述免疫传感器固定在免疫微反应器后, 将带抗原样品以 0.6ml/min 的速度注入流通池, 在线温育后形成免疫复合物；所述在线温育时间为 18-26min；
- [0017] (2) 用缓冲液 PBST 以 1ml/min 的速度冲洗免疫复合物, 除去未反应的免疫试剂；
- [0018] (3) 将化学发光底物溶液以 0.5ml/min 的速度通入免疫传感器, 产生的化学发光信号由光电倍增管记录。
- [0019] 进一步地, 在步骤 (1) 中, 所述免疫微反应器由带有进口和出口的聚氯乙烯板, 所述聚氯乙烯板的长、宽、高分别为 3.3cm、1.9cm、1.2cm；所述硅橡胶片的厚度为 3.0mm。
- [0020] 进一步地, 在步骤 (1) 中, 所述抗原样品为人类免疫球蛋白 HIgG, 所述人类免疫球蛋白 HIgG 测量的最佳温育时间为 26min。
- [0021] 有益效果：本发明以化学发光探针和无标记的抗体共固定于具有良好生物相容性的固相界面, 制得该免疫传感器, 结合流动注射, 构建了一种检测时间短便捷的一种电化学发光传感器及其免疫分析方法。检测时, 免疫传感器固定在免疫微反应器中并通入抗原, 在线温育形成免疫复合物, 冲洗后通入化学发光底物, 随后立即进行发光信号的采集, 从而实现成本低, 检测时间短, 便捷地无标记检测。将流动注射与化学发光免疫分析结合起来, 实现分析检测的简单化和自动化, 有利于加快整体分析检测时间。

附图说明

[0022] 图 1 为本发明的 HIgG 标准样品检测的线性曲线。

具体实施方式

[0023] 下面将通过附图及具体实施例对本发明做进一步的具体描述, 但不能理解为是对本发明保护范围的限定。

[0024] 实施例 1

[0025] 如图 1 所示, 本发明提供了一种电化学发光传感器的制备方法, 包括以下步骤：

[0026] (1) 将石英玻璃片在 HCL 与 H_2O_2 的水溶液中浸泡 10h, 用蒸馏水充分清洗后, 在氩

气氛中吹干,浸泡在 1%的 3-(2,3 环氧丙氧) 丙基三甲氧基硅烷 GPTMS 的甲苯溶液中进行硅烷化反应,在温度为 22℃下放置 20h;所述 HCL 与 H₂O₂ 的体积比为 8:4;

[0027] (2) 用二甲苯和乙醇冲洗并在氩气气氛下吹干;

[0028] (3) 将金纳米粒子溶液和 5.0wt% 聚葡萄糖胺 (1-4)-2- 氨基 -B-D 葡萄糖溶液混合后超声至完全分散,然后与化学发光探针、抗体溶液相混合;

[0029] (4) 取上述混合溶液,将其滴涂到石英玻璃片表面,并在温度为 22℃下反应 2h,然后在 10℃下放置 10h;

[0030] 化学发光探针为葡萄糖氧化酶或辣根过氧化物酶;所述抗体溶液为人类免疫球蛋白 HIgG 抗体溶液或甲胎蛋白 AFP 抗体溶液;所述葡萄糖氧化酶或辣根过氧化物酶的浓度为 6 μg/ml,人类免疫球蛋白 HIgG 抗体溶液浓度为 50 μg/ml;

[0031] (5) 用磷酸盐缓冲液和烷基酚聚氧乙烯醚冲洗五次,并在 10℃下用封闭液封闭 15h,所述封闭液为含 1%牛血清白蛋白的 0.01M 磷酸盐缓冲液, pH 为 7.3;制得电化学发光免疫传感器。磷酸盐缓冲液是每 0.325g Na₂HPO₄ · 12H₂O 加 0.058g NaH₂PO₄ · 2H₂O 在 300ml 的容量瓶中定容制得。

[0032] 本发明的方法制得的电化学发光传感器的免疫分析方法,包括如下步骤:

[0033] (1) 将所述免疫传感器固定在免疫微反应器后,将带抗原样品以 0.6ml/min 的速度注入流通池,在线温育后形成免疫复合物;所述在线温育时间为 18-26min;

[0034] (2) 用缓冲液 PBST 以 1ml/min 的速度冲洗免疫复合物,除去未反应的免疫试剂;

[0035] (3) 将化学发光底物溶液以 0.5ml/min 的速度通入免疫传感器,产生的化学发光信号由光电倍增管记录。

[0036] 在步骤 (1) 中,所述免疫微反应器由带有进口和出口的聚氯乙烯板,所述聚氯乙烯板的长、宽、高分别为 3.3cm、1.9cm、1.2cm;所述硅橡胶片的厚度为 3.0mm。

[0037] 在步骤 (1) 中,所述抗原样品为人类免疫球蛋白 HIgG,所述人类免疫球蛋白 HIgG 测量的最佳温育时间为 26min。

[0038] 本发明以化学发光探针和无标记的抗体共固定于具有良好生物相容性的固相界面,制得该免疫传感器,结合流动注射,构建了一种成本低、检测时间短、便捷的无标记化学发光免疫分析方法。本发明具有如下优点:

[0039] (1) 本发明首先将带有羟基的石英玻璃片进行环氧硅烷化,再将化学发光探针和抗体利用具有良好生物相容性的金纳米粒子-壳聚糖复合膜固定于玻璃表面,将剩余活性位点封闭后即制得免疫传感器。检测时,免疫传感器固定在免疫微反应器中并通入抗原,在线温育形成免疫复合物,冲洗后通入化学发光底物,随后立即进行发光信号的采集,从而实现成本低,检测时间短,便捷地无标记检测。将流动注射与化学发光免疫分析结合起来,实现分析检测的简单化和自动化,有利于加快整体分析检测时间。

[0040] (2) 本发明的无标记化学发光免疫分析方法,能够直接测定生物样品,测定过程中无需预先对抗体或抗原进行标记,具有检测成本低,耗费时间短,操作简单等显著优势。

[0041] (3) 本发明简化免疫分析过程,无需大量的优化过程,先后通入试样和化学发光底物可直接检测。开创性地提出了无标记化学发光免疫分析新思想,将引领化学发光免疫分析技术的革新,并对疾病诊断等领域的发展具有重要的意义。

[0042] (4) 利用免疫微反应器,反应试剂和样品消耗少,操作简便,速度快。通入分析试样

后,抗原抗体的特异性结合将在界面上形成免疫复合物,该复合物会阻碍化学发光底物向界面扩散的速度,从而引起化学发光强度的减弱;利用化学发光信号变化和抗原浓度的关系进行定量检测的分析方法。

[0043] (5) 本发明方法所述的检测抗原的定量方法为标准曲线法,随着抗原浓度逐渐增加,更多的免疫复合物的形成使得化学发光强度随之减小,由此制得标准样品的线性曲线,而后进行实际样品的检测。

[0044] 如图 1 所示,测定不同浓度的 HIgG 标准样品,制得 HIgG 标准样品的线性曲线。实验优化过程中,对温育时间进行优化的最佳温育时间选择为 25min。制得标准曲线后,为考察该无标记化学发光免疫分析新方法的实际应用的可靠性。

[0045] 实施例 2

[0046] 实施例 2 与实施例 1 的区别在于:

[0047] 本发明提供了一种电化学发光传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0048] 在步骤 (1) 中,将石英玻璃片在 HCL 与 H_2O_2 的水溶液中浸泡 11h,用蒸馏水充分清洗后,在氩气气氛中吹干,浸泡在 1% 的 3-(2,3 环氧丙氧) 丙基三甲氧基硅烷 GPTMS 的甲苯溶液中进行硅烷化反应,在温度为 22°C 下放置 22h;

[0049] 在步骤 (4) 中,取上述混合溶液,将其滴涂到石英玻璃片表面,并在温度为 22°C 下反应 2.5h,然后在 10°C 下放置 11h;

[0050] 在步骤 (5) 中,用磷酸盐缓冲液和烷基酚聚氧乙烯醚冲洗五次,并在 10°C 下用封闭液封闭 18h。

[0051] 在步骤 (5) 中,酸盐缓冲溶液是每 0.350g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 加 0.0591g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 在 300ml 的容量瓶中定容制得。

[0052] 本发明的方法制得的电化学发光传感器的免疫分析方法,包括如下步骤:

[0053] 在步骤 (1) 中,将所述免疫传感器固定在免疫微反应器后,将带抗原样品以 0.6ml/min 的速度注入流通池,在线温育后形成免疫复合物;所述在线温育时间为 20min;

[0054] 实施例 3

[0055] 实施例 3 与实施例 1 的区别在于:

[0056] 本发明的一种电化学发光传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0057] 在步骤 (1) 中,将石英玻璃片在 HCL 与 H_2O_2 的水溶液中浸泡 12h,用蒸馏水充分清洗后,在氩气气氛中吹干,浸泡在 1% 的 3-(2,3 环氧丙氧) 丙基三甲氧基硅烷 GPTMS 的甲苯溶液中进行硅烷化反应,在温度为 22°C 下放置 24h;

[0058] 在步骤 (4) 中,取上述混合溶液,将其滴涂到石英玻璃片表面,并在温度为 22°C 下反应 3h,然后在 10°C 下放置 12h;

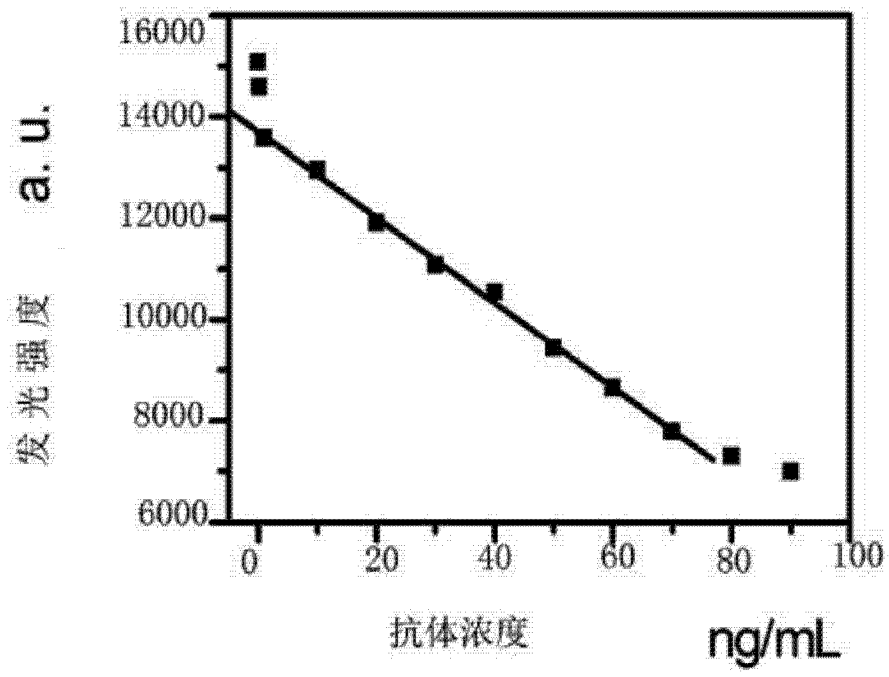
[0059] 在步骤 (5) 中,用磷酸盐缓冲液和烷基酚聚氧乙烯醚冲洗五次,并在 10°C 下用封闭液封闭 20h,所述封闭液为含 1% 牛血清白蛋白的 0.01M 磷酸盐缓冲液,pH 为 7.3;制得电化学发光免疫传感器。磷酸盐缓冲溶液是每 2.469g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 加 0.956g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 在 300ml 的容量瓶中定容制得。

[0060] 本发明的方法制得的电化学发光传感器的免疫分析方法,包括如下步骤:

[0061] 在步骤 (1) 中,将所述免疫传感器固定在免疫微反应器后,将带抗原样品以 0.6ml/min 的速度注入流通池,在线温育后形成免疫复合物;所述在线温育时间为 26min。

[0062] 如此测定不同浓度的 AFP 标准样品, 制得 AFP 标准样品的线性曲线。所述化学发光探针为葡萄糖氧化酶或辣根过氧化物酶; 所述抗体溶液为甲胎蛋白 AFP 抗体溶液。

[0063] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解, 本发明不受上述实施例的限制, 上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理, 在不脱离本发明精神和范围的前提下, 本发明还会有各种变化和改进, 本发明要求保护范围由所附的权利要求书、说明书及其等效物界定。



专利名称(译)	一种电化学发光传感器及其免疫分析方法		
公开(公告)号	CN104792772A	公开(公告)日	2015-07-22
申请号	CN201510197738.6	申请日	2015-04-24
[标]申请(专利权)人(译)	张萍		
申请(专利权)人(译)	张萍		
当前申请(专利权)人(译)	张萍		
[标]发明人	张萍		
发明人	张萍		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种电化学发光传感器及其免疫分析方法，本发明的一种电化学发光传感器的制备方法，包括以下步骤：(1)将石英玻璃片在HCL与H2O2的水溶液中浸泡，在1%的3-(2,3环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷GPTMS的甲苯溶液中进行硅烷化反应；(2)用二甲苯和乙醇冲洗并在氩气氛下吹干；(3)将含有(十二烷基磺酸钠)的金纳米粒子溶液和5.0wt%聚葡萄糖胺(1-4)-2-氨基-B-D葡萄糖溶液混合，与化学发光探针、抗体溶液相混合；(4)将其滴涂到石英玻璃片表面；(5)用磷酸盐缓冲液和烷基酚聚氧乙烯醚冲洗，制得电化学发光免疫传感器。本发明检测时间短便捷地无标记检测的电化学发光传感器及其免疫分析方法。

