

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710025585.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 21/00 (2006.01)

G01N 27/48 (2006.01)

[43] 公开日 2008年1月23日

[11] 公开号 CN 101109749A

[22] 申请日 2007.8.7

[21] 申请号 200710025585.2

[71] 申请人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市汉口路22号

[72] 发明人 朱俊杰 崔荣静

[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所

代理人 黄嘉栋

权利要求书2页 说明书5页 附图2页

[54] 发明名称

一种多功能免疫芯片及其制法和在免疫检测中的应用

[57] 摘要

一种多功能免疫芯片，它是在ITO上吸附有金胶纳米粒子，再在其表面上覆盖有留有空洞的PDMS，上述的空洞区域为免疫反应区域。本发明的多功能免疫芯片可用于免疫检测：把10 μ L浓度为0.4-1mg/mL的羊抗人IgG抗体滴于多功能免疫芯片上，将其置于湿润的环境，4 $^{\circ}$ C过夜，然后用含有0.05%的吐温-20的50mM的PBS缓冲液清洗，干燥后的芯片浸入3-5%的脱脂奶粉室温封闭1-2小时，清洗后再滴入10 μ L要检测的样品(人的IgG)，在37 $^{\circ}$ C下温育50分钟。然后再滴入10 μ L CdTe量子点-鼠抗人IgG抗体结合物进行反应，经过50分钟的温育以后，完全清洗后的芯片进行光学检测芯片上的量子点的荧光强度，其响应与每个芯片所测的人的IgG的浓度成线性关系(在0.1-

500ng/mL范围内)。本发明公开了多功能免疫芯片的制法。

1. 一种多功能免疫芯片,其特征是:它是在铟锡氧化物半导体透明导电膜上吸附有金胶纳米粒子,再在其表面上覆盖有留有空洞的聚二甲基硅氧烷硅橡胶。

2. 一种制备权利要求 1 所述的多功能免疫芯片的方法,其特征是它由下列步骤组成:

步骤1. 将铟锡氧化物半导体透明导电膜依次经过丙酮、乙醇、水超声清洗,然后在 1: 1 的乙醇与浓度为 1M 的 NaOH 混合溶液里超声 15 分钟或者在体积比为 1:1:5 的浓度为 30% 的 H_2O_2 溶液/浓度为 30% 的 NH_4OH 溶液/ H_2O 混合溶液中浸泡 1 小时;

步骤 2. 将步骤 1 冲洗干净的铟锡氧化物半导体透明导电膜浸在质量百分比浓度为 0.05%-0.5% 的聚二烯丙基二甲基胺盐酸盐的水溶液中 20 分钟或者是浸在质量百分比浓度为 1%-5% 的硅烷偶联剂 KH550 的水溶液中 5-10 小时,然后把清洗干净的铟锡氧化物半导体透明导电膜浸入粒径为 20 nm 的金胶溶液里 20 分钟;

步骤 3. 将步骤 2 的铟锡氧化物半导体透明导电膜清洗干净,经氮气吹干后,把一个 2-3 mm 厚的、中间开有一个直径为 4-6 mm 圆形空洞的聚二甲基硅氧烷硅橡胶粘贴在铟锡氧化物半导体透明导电膜芯片表面上,即制得本发明的多功能免疫芯片。

3. 一种用权利要求 1 所述的多功能免疫芯片的免疫检测方法,其特征是它由下列步骤组成:

步骤 1. 把 10 μ L 浓度为 0.4-1mg/mL 的羊抗人 IgG 抗体滴于多功能免疫芯片的免疫反应区域,将其置于 4 $^{\circ}$ C 饱和湿润的环境,反应 12-16 小时,然后用浓度然后用 50mM 的 PBS 缓冲液与吐温-20 的混合溶液清洗,其中吐温-20 在 PBS 中的质量百分浓度为 0.05%,干燥后的芯片浸入质量百分浓度为 3-5% 的脱脂奶粉室温封闭 1-2 小时,

步骤 2. 将步骤 1 所得的芯片清洗后再滴入 10 μ L 要检测的样品,在 37 $^{\circ}$ C 下温育 50 分钟。然后再滴入 10 μ L CdTe 量子点-鼠抗人 IgG 抗体结合物进行反应,经过 50 分钟的温育以后,完全清洗后的芯片进行下一步的测试,

步骤 3. 光学检测方法:用凝胶成像体系检测步骤 2 得到的芯片上量子点的荧光强度,光强度可用 Quantity One 软件计算,其响应与每个芯片所测的抗原的浓度成线性关系。

4. 根据权利要求 3 所述的多功能免疫芯片的免疫检测方法,其特征是:所述的步骤 3 可以用下列步骤替代:

步骤3. 溶出伏安检测方法：将步骤2得到的芯片上的CdTe光量子用100 μL 浓度为0.10 M的 HNO_3 溶液超声溶解，使 Cd^{2+} 释放出来，然后把 HNO_3 溶液移入900 μL 浓度为0.2 M、pH为4.6的醋酸缓冲溶液中，然后采用方波溶出伏安法测定 Cd^{2+} 的浓度，其浓度与芯片上所测的抗原的量成线性关系。

一种多功能免疫芯片及其制法和在免疫检测中的应用

技术领域

本发明涉及一种多功能免疫芯片以及一种用该芯片以 CdTe 量子点为光学或电化学生物标记物的免疫检测方法。

背景技术

在免疫芯片的研究领域，在固体载体上保持所固定的生物分子的活性与稳定性是一个长期存在的目标。在所发展的多种固定方法上，自组装法可以有效地控制其物理与化学性质，因此，可对生物分子选择性固定、有效地消除非特异性结合。金胶纳米粒子已经广泛地应用于生物分子的固定基质，[参见：(a) K. R. Brown, A. P. Fox, M. J. Natan. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1154-1157. (b) I. Willner, N. Lapidot, A. Riklin, R. Kasher, E. Zahavy, E. Katz. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1428-1441. (c) M. Dequarie, C. Degrand, B. Limoges. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5521-5528.]. 但是金纳米粒子自组装在铟锡氧化物半导体透明导电膜 (ITO) 上同时用于光学与电化学生物芯片还未见报道。

量子点 (quantum Dots, 以下简称 QDs) 是一种具有优良的光谱特征和光化学稳定性半导体纳米晶体，因其具有发光效率高、宽的激发谱线范围、窄的发射谱线、粒径与生物分子相近、表面修饰的多功能化，利用量子点作为生物荧光探针，在免疫生物学和临床检验学等研究中将会有广阔的应用前景 [参见：(d) K. Jaiswal J, H. Mattoussi, J. M. Mauro, S. M. Simon, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 47-51. (e) J. K. Jaiswal, S. M. Simon, *Trends Cell. Biol.* **2004**, *14*, 497-504. (f) B. Ballou, B. C. Lagerholm, L. A. Ernst, M. P. Bruschez, A. S. Waggoner, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 79-86.]. 一系列量子点，如：CdS、PbS、CuS、ZnS 因其具有固有的小型化、高灵敏性、低消耗等优良的特性，在电化学生物分析中也具有一定的应用前景 [参见：(g) J. A. Hansen, R. Mukhopadhyay, J. Hansen, K. V. Gothelf, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3860-3861. (h) J. A. Hansen, J. Wang, A.-N. Kawde, Y. Xiang, K. V. Gothelf, G. Collins, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2228-2229. (i) G. Liu, J. Wang, J. Kim, M. R. Jan, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 7126-7130. (j) J. Wang, G. Liu, A. Merkoci, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3214-3215.]. 目前，利用 CdTe 量子点同时作为电化学生物分析与光学生物分析探针还未见报道。

发明内容

本发明的目的是提供一种多功能免疫芯片，用该芯片以 CdTe 量子点作为光学或电化学标记物的免疫检测方法。

本发明的技术方案如下：

一种多功能免疫芯片，它是在铟锡氧化物半导体透明导电膜（ITO）上吸附有金胶纳米粒子，再在其表面上覆盖有留有空洞的聚二甲基硅氧烷（PDMS）硅橡胶，上述的空洞区域为免疫反应区域。

一种上述多功能免疫芯片的制法，它由下列步骤组成：

步骤1. 将铟锡氧化物半导体透明导电膜（ITO）依次经过丙酮、乙醇、水超声清洗，然后在1：1的乙醇与1M的NaOH混合溶液里超声15分钟或者在1:1:5 (v/v) $H_2O_2(30\%)/NH_4OH(30\%)/H_2O$ 混合溶液中浸泡1小时；

步骤2. 将步骤1冲洗干净的ITO浸在质量百分比浓度为0.05%-0.5%的聚二烯丙基二甲基胺盐酸盐（PDDA）的水溶液中20分钟或者是浸在质量百分比浓度为1%-5%的硅烷偶联剂KH550的水溶液中5-10小时，然后把清洗干净的ITO浸入粒径为20nm左右的金胶溶液里20分钟；

步骤3. 将步骤2的ITO芯片清洗干净，经氮气吹干后，把一个2-3mm厚的、中间开有一个直径为4-6mm圆形空洞的聚二甲基硅氧烷（PDMS）片粘贴在ITO芯片表面上，即制得本发明的多功能免疫芯片，所述的PDMS片上的圆形空洞为免疫反应区域。

一种用本发明的多功能免疫芯片的免疫检测方法，它由下列步骤组成：

步骤1. 把10 μ L浓度为0.4-1mg/mL的羊抗人IgG抗体滴于多功能免疫芯片的免疫反应区域，将其置于4 $^{\circ}$ C、饱和的湿度环境下，反应12-18小时，然后用50mM的PBS缓冲液与吐温-20的混合溶液清洗，其中吐温-20在PBS中的质量百分浓度为0.05%，干燥后的芯片浸入质量百分浓度为3-5%的脱脂奶粉室温封闭1-2小时，

步骤2. 将步骤1所得的芯片清洗后再滴入10 μ L要检测的样品（人的IgG），在37 $^{\circ}$ C下温育50分钟。然后再滴入10 μ L CdTe量子点-鼠抗人IgG抗体结合物进行反应，经过50分钟的温育以后，完全清洗后的芯片进行下一步的测试，

步骤3. 光学检测方法：用凝胶成像体系检测步骤2得到的芯片上量子点的荧光强度，光强度可用Quantity One软件计算，其响应与每个芯片所测的抗原（人的IgG）的

浓度成线性关系（在 0.1-500ng/mL 范围内）。

上述的多功能免疫芯片的免疫检测方法，所述的步骤 3 可以用下列步骤替代：

步骤 3. 溶出伏安检测方法：将步骤 2 得到的芯片上的 CdTe 量子点用 100 μL 浓度为 0.10 M 的 HNO_3 溶液超声溶解，使 Cd^{2+} 释放出来，然后把其溶液移入 900 μL 浓度为 0.2 M、pH 为 4.6 的醋酸缓冲溶液中，然后采用方波溶出伏安法测定 Cd^{2+} 的浓度，其浓度与芯片上所测的抗原（人的 IgG）的量成线性关系。所述的方波溶出伏安法是以玻碳电极为工作电极、Pt 电极为对电极、甘汞电极为参比电极的三电极体系，电化学过程包括在 0.6V 预处理 1 分钟，在 -1.00 V 处富集 10 分钟，然后以 4 mV 的电位阶跃、25 Hz 的频率、25 mV 的振幅从 -1.00 V 到 -0.45 V 进行伏安扫描。

本发明的多功能免疫芯片经原子力显微镜（AFM）测定，结果表明有序的金胶纳米粒子均匀的吸附在 ITO 上（见图 1a）。羊抗人 IgG 抗体也均匀的吸附在金胶纳米粒子上（见图 1b）。光学检测方法表明抗原浓度在 0.1 到 500 ng/mL 范围内，芯片的荧光强度随着浓度的增大而增大，检测限达到 0.03 ng/mL。溶出伏安检测方法表明抗原浓度范围在 0.005~100 ng/mL，伏安峰电流随着抗原浓度的增大而增大，成线性关系，检测限达到 1.5 pg/mL。

本发明的多功能免疫芯片对于光学检测方法和电化学检测方法都表现出了优良的准确性、高灵敏性与重现性，此芯片可用于实际样品的检测。另外，采用凝胶成像技术的光学免疫分析检测迅速、方便，而电化学检测方法更加灵敏。

附图说明

图 1（a）为本发明的多功能免疫芯片的原子力显微镜（AFM）表征结果；（b）为本发明的羊抗人 IgG 抗体固定在本发明的多功能免疫芯片上后的原子力显微镜（AFM）的表征结果。

图2 采用凝胶成像技术，在检测范围内，一系列不同浓度的人的IgG（0、0.1、1.0、10、100、500 ng mL⁻¹）的光学免疫分析结果，及标准曲线；

图3 采用溶出伏安检测方法，在检测范围内，一系列不同浓度的人的IgG（0、0.005、0.01、0.1、1.0、10、50、100 ng mL⁻¹）的电化学免疫分析结果及标准曲线。

具体实施方式

实施例 1. 多功能免疫芯片的制备及免疫检测

首先ITO（江苏省金坛康达克应用薄膜中心提供，下同）依次经过丙酮、乙醇、水超声清洗后，在1:1的乙醇与1M的NaOH混合溶液里超声15分钟。然后将冲洗干净的ITO浸在质量百分浓度为0.05% PDDA的水溶液中20分钟，然后把清洗干净的ITO浸入20 nm左右的金胶溶液（上海华美生物工程公司提供，下同）中20分钟，其形貌见图1a。清洗干净的ITO芯片经氮气吹干后，把一个3 mm厚的PDMS（Sylgard 184, Dow Corning 提供，前聚物与固化剂比例为 10:1，下同）粘在ITO芯片上，PDMS上有个直径为 6mm 的圆形空洞作为免疫反应区域，即得本发明的多功能免疫芯片。

将 10 μ L 0.4 mg/mL 羊抗人 IgG 抗体滴入多功能免疫芯片上，将其置于 4 $^{\circ}$ C 饱和的湿度环境反应 12 小时，然后用含有质量百分比浓度为 0.05% 吐温-20 的 PBS (50mM) 缓冲液清洗，其形貌见图 1b。干燥后的芯片浸入 3%的脱脂奶粉 25 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时，清洗后再滴入 10 μ L 要检测的样品（人的 IgG），在 37 $^{\circ}$ C 下温育 50 分钟。抗体与抗原反应后，与 10 μ L CdTe QDs -鼠抗人 IgG 抗体结合物(武汉珈源量子点开发技术有限公司提供，下同)反应。经过 50 分钟的温育以后，完全清洗后的芯片可用于光学与电化学检测。

芯片用光学检测：用凝胶成像体系检测上述得到的芯片上量子点的荧光强度，光强度可用 Quantity One 软件计算，其响应与每个芯片所测的抗原（人的 IgG）的浓度成线性关系（在 0.1-500ng/mL 范围内）。

芯片用电化学检测：将上述得到的芯片上的 CdTe 量子点用 100 μ L 浓度为 0.10 M 的 HNO₃ 溶液超声溶解，使 Cd²⁺ 释放出来，然后把其溶液移入 900 μ L 浓度为 0.2 M、pH 为 4.6 的醋酸缓冲溶液中，然后采用方波溶出伏安法测定 Cd²⁺ 的浓度，其浓度与芯片上所测的抗原（人的 IgG）的量成线性关系。所述的方波溶出伏安法是以玻碳电极为工作电极、Pt 电极为对电极、甘汞电极为参比电极的三电极体系，电化学过程包括在 0.6V 预处理 1 分钟，在 -1.00 V 处富集 10 分钟，然后以 4 mV 的电位阶跃、25 Hz 的频率、25 mV 的振幅从 -1.00 V 到 -0.45 V 进行伏安扫描。

实施例 2. 多功能免疫芯片的制备及免疫检测

将实施例 1 的“1:1 的乙醇与 1M 的 NaOH 混合溶液里超声 15 分钟”改为“浸泡在 1:1:5 (v/v) H₂O₂(30%)/NH₄OH(30%)/H₂O 混合溶液 1 小时”，“3mm 厚的 PDMS”改为“2mm 厚的 PDMS”，“6mm 的圆形空洞”改为“4mm 的圆形空洞”，制备的其他条件同实施例 1，得到形貌与性质类似于实施例 1 的芯片。免疫检测结果同实施例 1。

实施例 3. 多功能免疫芯片的制备

将 PDDA 的浓度改为 0.5%，制备的其他条件同实施例 1，得到形貌与性质类似于实施例 1 的芯片。免疫检测结果同实施例 1。

实施例 4. 多功能免疫芯片的制备

将“PDDA 溶液浸泡 20 分钟”改为“质量百分比浓度 1% KH550 的水溶液中浸泡 5 小时”，制备的其他条件同实施例 1，得到形貌与性质类似于实施例 1 的芯片。免疫检测结果同实施例 1。

实施例 5. 多功能免疫芯片的制备及免疫检测

将“PDDA 溶液浸泡 20 分钟”改为“质量百分比浓度 1% KH550 的水溶液中浸泡 10 小时”，制备的其他条件同实施例 1，得到形貌与性质类似于实施例 1 的芯片。免疫检测结果同实施例 1。

实施例 6. 多功能免疫芯片的制备及免疫检测

将“PDDA 溶液浸泡 20 分钟”改为“质量百分比浓度 5% KH550 的水溶液中浸泡 5 小时”，制备的其他条件同实施例 1，得到形貌与性质类似于实施例 1 的芯片。免疫检测结果同实施例 1。

实施例 7. 多功能免疫芯片的制备及免疫检测

将“10 μ L 0.4mg/mL 羊抗人 IgG 抗体 滴入 ITO 芯片上”改为“10 μ L 1.0 mg/mL 羊抗人 IgG 抗体”，制备的其他条件同实施例 1，得到形貌与性质类似于实施例 1 的芯片。免疫检测结果同实施例 1。

实施例 8. 多功能免疫芯片的制备及免疫检测

将“置于 4 $^{\circ}$ C 饱和的湿度环境反应 12 小时”改为“置于 4 $^{\circ}$ C 饱和的湿度环境反应 16 小时” 制备的其他条件同实施例 1，得到形貌与性质类似于实施例 1 的芯片。免疫检测结果同实施例 1。

实施例 9. 多功能免疫芯片的制备及免疫检测

将 3%的脱脂奶粉改为 5%，制备的其他条件同实施例 1，得到形貌与性质类似于实施例 1 的芯片。免疫检测结果同实施例 1。

实施例 10. 多功能免疫芯片的制备及免疫检测

将封闭 1 小时改为封闭 2 小时，制备的其他条件同实施例 1，得到形貌与性质类似于实施例 1 的芯片。免疫检测结果同实施例 1。

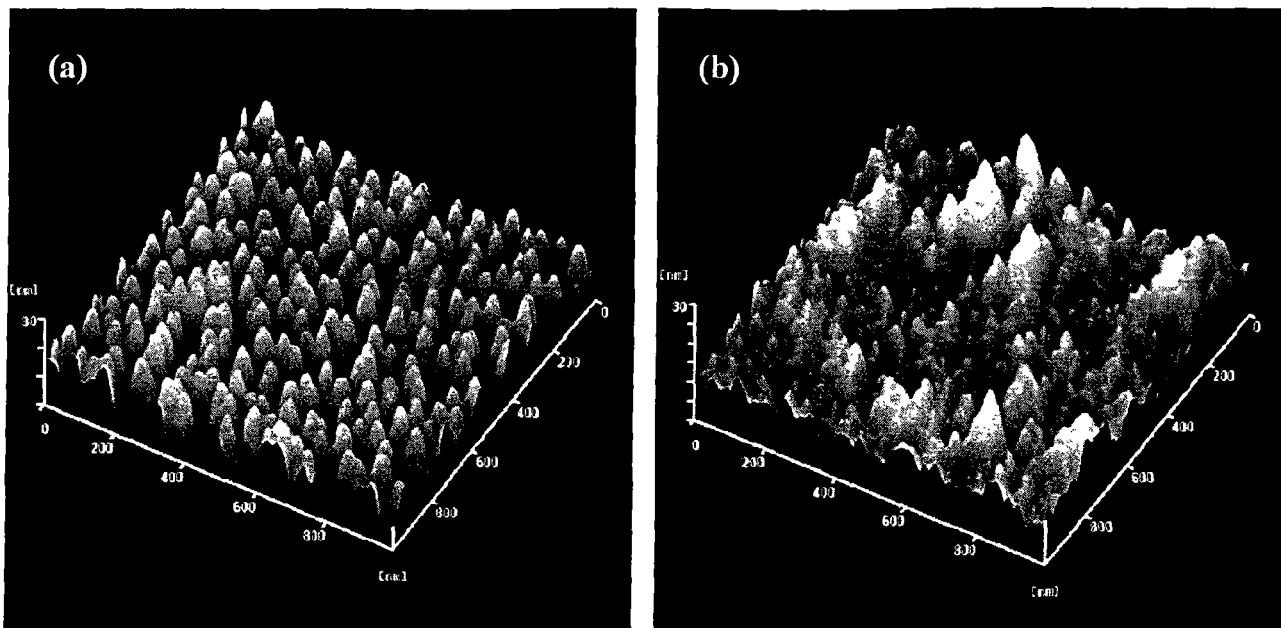


图 1

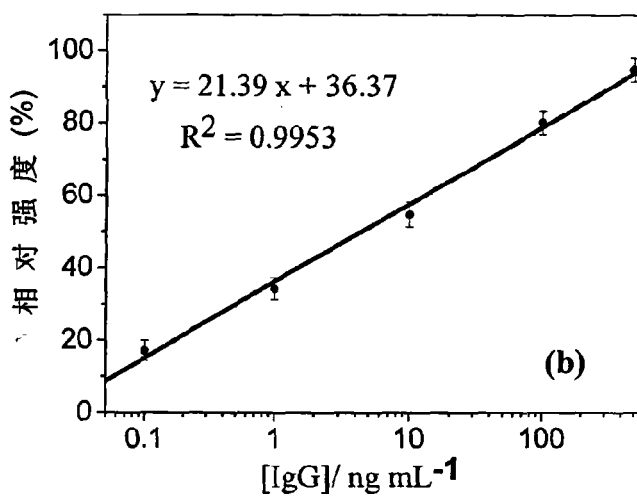
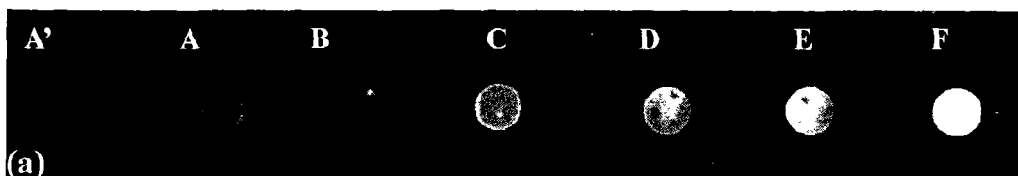


图 2

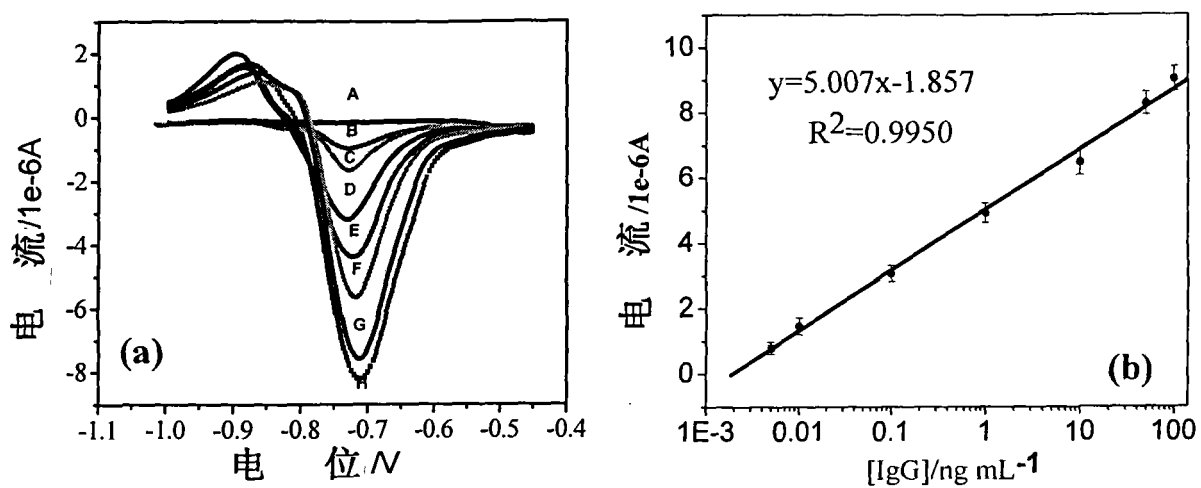


图 3

专利名称(译)	一种多功能免疫芯片及其制法和在免疫检测中的应用		
公开(公告)号	CN101109749A	公开(公告)日	2008-01-23
申请号	CN200710025585.2	申请日	2007-08-07
[标]申请(专利权)人(译)	南京大学		
申请(专利权)人(译)	南京大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京大学		
[标]发明人	朱俊杰 崔荣静		
发明人	朱俊杰 崔荣静		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/52 G01N21/00 G01N27/48		
其他公开文献	CN101109749B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种多功能免疫芯片，它是在ITO上吸附有金胶纳米粒子，再在其表面上覆盖有留有空洞的PDMS，上述的空洞区域为免疫反应区域。本发明的多功能免疫芯片可用于免疫检测：把10 μ L浓度为0.4 - 1mg/mL的羊抗人IgG抗体滴于多功能免疫芯片上，将其置于湿润的环境，4 $^{\circ}$ C过夜，然后用含有0.05%的吐温 - 20的50mM的PBS缓冲液清洗，干燥后的芯片浸入3 - 5%的脱脂奶粉室温封闭1 - 2小时，清洗后再滴入10 μ L要检测的样品(人的IgG)，在37 $^{\circ}$ C下温育50分钟。然后再滴入10 μ L CdTe量子点 - 鼠抗人IgG抗体结合物进行反应，经过50分钟的温育以后，完全清洗后的芯片进行光学检测芯片上的量子点的荧光强度，其响应与每个芯片所测的人的IgG的浓度成线性关系(在0.1 - 500ng/mL范围内)。本发明公开了多功能免疫芯片的制法。

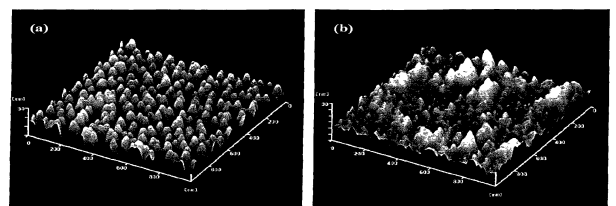


图 1

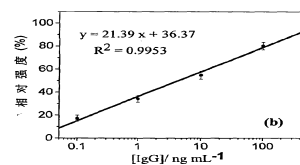


图 2