



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101109749 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 30

(21) 申请号 200710025585. 2

(22) 申请日 2007. 08. 07

(73) 专利权人 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 32207

代理人 黄嘉栋

(56) 对比文件

CN 1786269 A, 2006. 06. 14, 全文.

CN 1540349 A, 2004. 10. 27, 全文.

CN 1553188 A, 2004. 12. 08, 全文.

CN 1540346 A, 2004. 10. 27, 全文.

CN 1563951 A, 2005. 01. 12, 全文.

CN 1356543 A, 2002. 07. 03, 全文.

审查员 姚进孝

(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)

权利要求书 1 页 说明书 4 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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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 20nm 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 2-3mm 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,即制得所述的多功能免疫芯片。

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

步骤 1. 把 10  $\mu$  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°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  $\mu$  L 要检测的样品,在 37°C 下温育 50 分钟。然后再滴入 10  $\mu$  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非疾病诊断目的的免疫检测方法,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  $\mu$  L 浓度为 0.10M 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  $\mu$  L 浓度为 0.2M、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

[0001] 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

[0002] 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免疫芯片还未见报道。

[0003] 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. Emst, 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,在电化学免疫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与光学免疫分析探针还未见报道。

### 发明内容

[0004] 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生物标记物的免疫检测方法。

[0005] 本发明的技术方案如下:

[0006] 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。

[0007] 一种上述多功能免疫芯片的制法,它由下列步骤组成:

[0008] 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;

[0009] 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;

[0010] 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。

[0011] 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:

[0012] 步骤 1. 把 10  $\mu$ 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°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,

[0013] 步骤 2. 将步骤 1 所得的芯片清洗后再滴入 10  $\mu$ L 要检测的样品 (人的 IgG), 在 37°C 下温育 50 分钟。然后再滴入 10  $\mu$ 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,

[0014] 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)。

[0015] 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:

[0016] 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  $\mu$ L 浓度为 0.10M 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  $\mu$ L 浓度为 0.2M、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 -1.00V 处富集 10 分钟, 然后以 4mV 的电位阶跃、25Hz 的频率、25mV 的振幅从 -1.00V 到 -0.45V 进行伏安扫描。

[0017] 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 500ng/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 0.03ng/mL。溶出伏安检测方法表明抗原浓度范围在 0.005 ~ 100ng/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 1.5pg/mL。

[0018] 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

[0019] 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。

[0020] 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、500ng mL<sup>-1</sup>) 的光学免疫分析结果,及标准曲线 ;

[0021] 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、100ng mL<sup>-1</sup>) 的电化学免疫分析结果及标准曲线。

## 具体实施方式

[0022] 实施例 1. 多功能免疫芯片的制备及免疫检测

[0023] 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 20nm 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 3mm 厚的 PDMS(Sylgard184, 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。

[0024] 将 10 μL 0.4mg/mL 羊抗人 IgG 抗体滴入多功能免疫芯片上,将其置于 4℃ 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℃ 封闭 1 小时,清洗后再滴入 10 μL 要检测的样品(人的 IgG),在 37℃ 下温育 50 分钟。抗体与抗原反应后,与 10 μL 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。

[0025] 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)。

[0026] 芯片用电化学检测:将上述得到的芯片上的 CdTe 量子点用 100 μL 浓度为 0.10M 的 HNO<sub>3</sub> 溶液超声溶解,使 Cd<sup>2+</sup> 释放出来,然后把其溶液移入 900 μL 浓度为 0.2M、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<sup>2+</sup> 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 -1.00V 处富集 10 分钟,然后以 4mV 的电位阶跃、25Hz 的频率、25mV 的振幅从 -1.00V 到 -0.45V 进行伏安扫描。

[0027] 实施例 2. 多功能免疫芯片的制备及免疫检测

[0028] 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)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(30%)/NH<sub>4</sub>OH(30%)/H<sub>2</sub>O 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。

[0029] 实施例 3. 多功能免疫芯片的制备

[0030] 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。

[0031] 实施例4. 多功能免疫芯片的制备

[0032] 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。

[0033] 实施例5. 多功能免疫芯片的制备及免疫检测

[0034] 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。

[0035] 实施例6. 多功能免疫芯片的制备及免疫检测

[0036] 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。

[0037] 实施例7. 多功能免疫芯片的制备及免疫检测

[0038] 将“10  $\mu$  L 0.4mg/mL 羊抗人IgG抗体滴入ITO芯片上”改为“10  $\mu$  L 1.0mg/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。

[0039] 实施例8. 多功能免疫芯片的制备及免疫检测

[0040] 将“置于4℃饱和的湿度环境反应12小时”改为“置于4℃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。

[0041] 实施例9. 多功能免疫芯片的制备及免疫检测

[0042] 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。

[0043] 实施例10. 多功能免疫芯片的制备及免疫检测

[0044] 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。

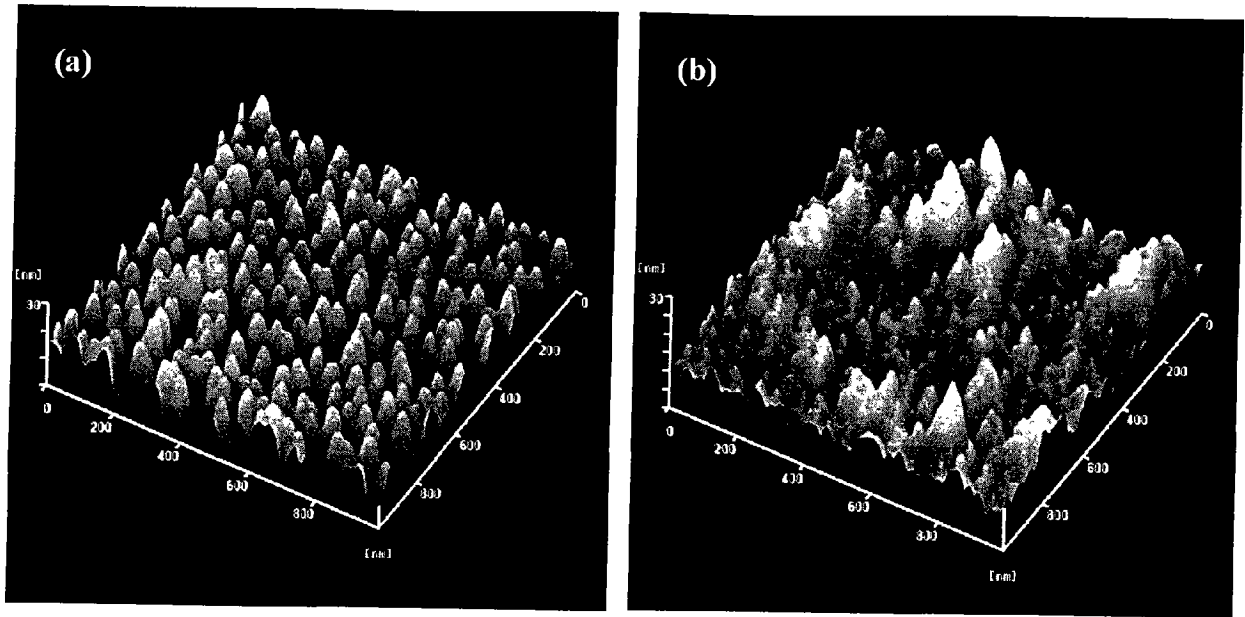


图 1

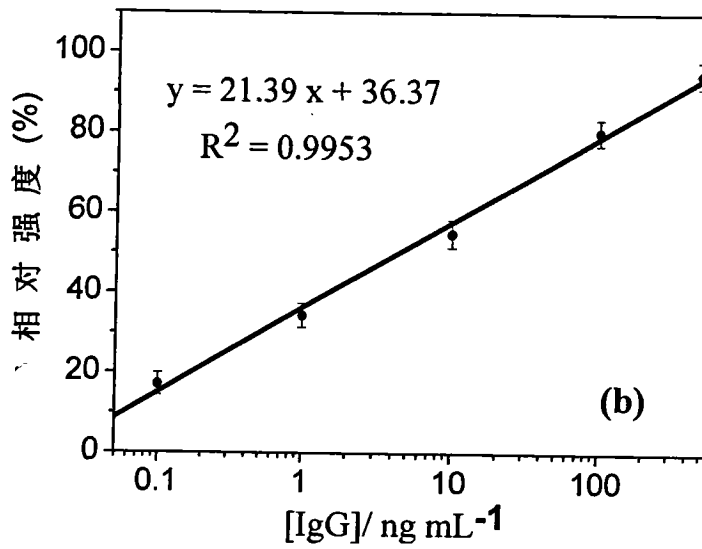
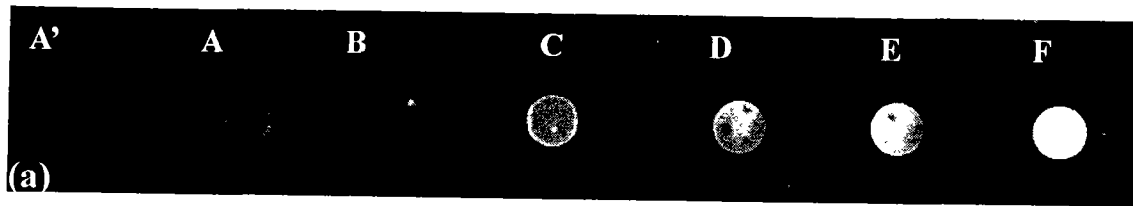


图 2

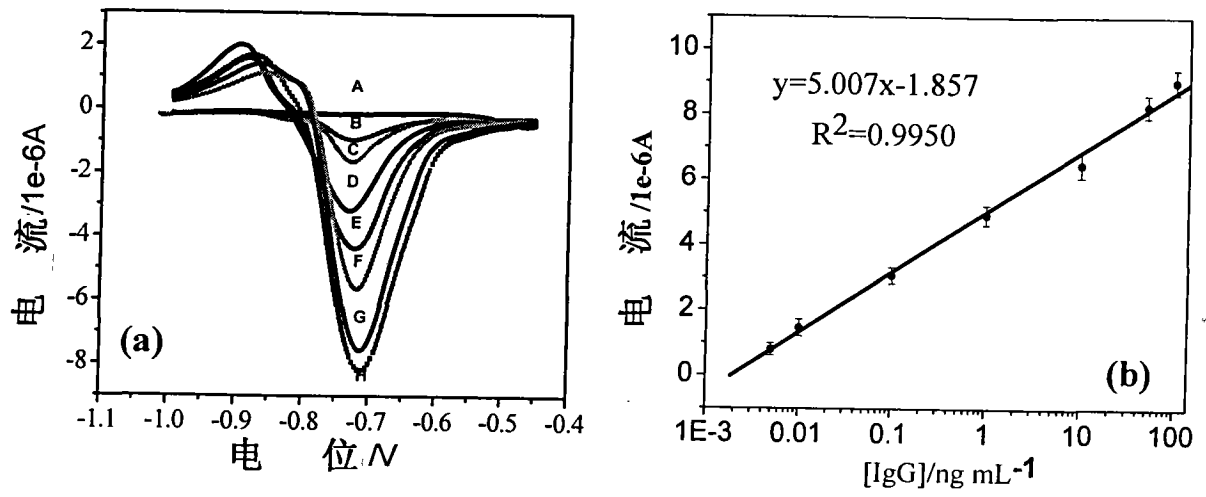


图 3

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	<a href="#">CN101109749B</a>	公开(公告)日	2012-05-30
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	CN101109749A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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。

