

[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 200810031321.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

[43] 公开日 2008年9月24日

[11] 公开号 CN 101271114A

[22] 申请日 2008.5.16

[21] 申请号 200810031321.2

[71] 申请人 湖南大学

地址 410082 湖南省长沙市岳麓山

[72] 发明人 蒋健晖 黄勇 俞汝勤 沈国励
楚霞

[74] 专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责任公司
代理人 马强

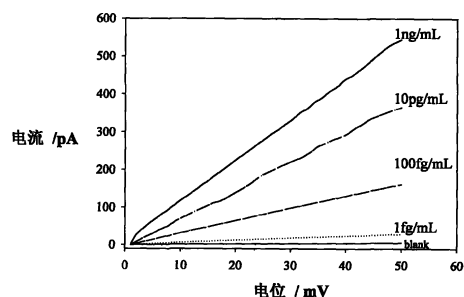
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 3 页

[54] 发明名称

基于微间隙阵列电极的酶催化电导免疫传感器及其免疫检测方法

[57] 摘要

本发明提供了一种基于微间隙阵列电极的酶催化电导免疫传感器及其免疫检测方法，免疫传感器包括微间隙阵列电极、硅烷化处理的电极基片、具有良好导电性的酶沉积物；本发明利用微间隙电极阵列免疫传感器，通过在电极间隙基片上固定待测物的抗体，利用酶标抗体夹心进行待测蛋白的检测，该方法灵敏度高，操作简单，仪器便携且价格低廉，可望为疾病早期与现场检测应用提供快速、实用、低成本、高灵敏、高通量的免疫检测技术。



1. 一种基于微间隙阵列电极的酶催化电导免疫传感器，其特征是，采用微间隙阵列金电极做基片，并采用以下步骤制得：

(1) 取常规光刻印刷法制作的微间隙阵列金电极做基片，它为叉指式双电极，正负电极均为两个梳形金电极，彼此交叉组成微间隙阵列金电极，梳形齿宽为 $1\mu\text{m}$ — $100\mu\text{m}$ ，间隙为 $1\mu\text{m}$ — $100\mu\text{m}$ ；

(2) 微间隙阵列金电极的硅烷化处理，其步骤是：

a. 将所述微间隙阵列金电极用无水乙醇清洗三次，每次 1min；

b. 将该电极浸入 1 M 的 NaOH 溶液中，静置 28min —32min；

c. 用超纯水清洗该电极三次，每次 1min；吹干；

d. 将该电极浸入含氨丙基三甲氧基硅烷 5%（体积百分数）的乙醇溶液中，室温下静置 23 小时—25 小时；

这样可在微间隙阵列金电极间的基片上形成一氨基硅烷自组装单层；

e. 用超纯水清洗三次，吹干，获得硅烷化的微间隙阵列金电极；

(3) 免疫传感器的制备步骤：

a. 将所述硅烷化的微间隙阵列金电极浸入质量分数为 5% 的戊二醛水溶液，室温下静置 0.8 小时—1.2 小时，再用超纯水清洗三次；

b. 在所述电极上滴加 $30\mu\text{L}$ 待测物的鼠单克隆或羊多克隆抗体溶液，室温下静置反应 0.8 小时—1.2 小时；这样使得抗体通过戊二醛交联剂固定在微间隙阵列金电极的基片上；所述鼠单克隆或羊多克隆抗体溶液中的抗体浓度为 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ，该抗体溶液是将所述抗体溶于 0.01M、pH 7.4 磷酸缓冲溶液而得；

c. 用超纯水清洗所述电极三次，吹干，得到免疫传感器；保存于 4°C 备用。

2、一种采用权利要求 1 所述基于微间隙阵列电极的酶催化电导免疫传感器检测有碱性磷酸酶标记的单克隆抗体的分析物方法，其特征是，它采用

以下步骤:

(1) 将分析物样品或标样溶液、碱性磷酸酶标记鼠单克隆抗体溶液各 20 μ L 混合后滴加在免疫传感器上, 室温下静置反应 0.4 小时—0.6 小时; 所述分析物样品或标样溶液是将该分析物样品或标样溶于 0.01M、pH 7.4 磷酸缓冲溶液而得; 所述碱性磷酸酶标记鼠单克隆抗体溶液是将所述抗体溶于 0.01M、pH 7.4 磷酸缓冲溶液而得, 抗体浓度为 100 μ g/mL, 该单克隆抗体与电极上固定的抗体识别不同抗原决定位点;

(2) 将所述传感器置于银沉积溶液中, 该银沉积溶液为 1mM 抗坏血酸磷酸酯, 2mM AgNO₃ 的 0.1M 甘氨酸-NaOH 缓冲溶液, pH9.0; 室温下静置反应 8min—12min; 然后从该传感器获取与分析物浓度相关的电导或电阻信号。

3、一种采用权利要求 1 所述基于微间隙阵列电极的酶催化电导免疫传感器检测无碱性磷酸酶标记的单克隆抗体的分析物方法, 其特征是, 它采用以下步骤:

(1) 将分析物样品或标样溶液、单抗溶液各 20 μ L 混合后滴加在固定有待测物多克隆抗体的免疫传感器上, 室温下静置反应 0.5 小时;

(2) 在所述传感器表面滴加 20 μ L 碱性磷酸酶标记的第二抗体溶液, 于室温下静置反应 0.4 小时—0.6 小时; 所述第二抗体溶液为碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体溶液, 抗体浓度为 10 μ g/mL, 系将所述抗体溶于 0.01M、pH 7.4 磷酸缓冲溶液而得;

(3) 将所述传感器置于银沉积溶液中, 该银沉积溶液为 1mM 抗坏血酸磷酸酯, 2mM AgNO₃ 的 0.1M 甘氨酸-NaOH 缓冲溶液, pH9.0, 室温下静置反应 8min—12min; 再从所述传感器获取与分析物浓度相关的电导或电阻信号。

基于微间隙阵列电极的酶催化电导免疫传感器及其免疫检测方法

技术领域

本发明涉及微间隙电极阵列免疫传感器件的制备及其免疫检测方法。

背景技术

免疫分析是生物医学分子检测最常用的技术之一，对于病原体（致病菌、病毒）、疾病标志物、药物与化学生物毒素等的快速筛查与检测具有极其重要的意义，是临床诊断、医学研究、食品与公共安全、药毒物分析、环境监测等领域主要的研究工具。目前较为普遍使用的免疫分析技术主要是酶联免疫法、荧光免疫法、金标侧流免疫层析法等。这些检测方法灵敏度不高，难以实现早期疾病的诊断与研究，且这些方法大都需要使用精密仪器进行定量分析，不适宜现场快速检测的需求。

发明内容

本发明的目的在于克服传统免疫分析技术灵敏度低、需精密仪器定量检测的不足，提出一种基于微间隙阵列电极的酶催化电导免疫传感器及其免疫检测方法，具有高灵敏、快速、低成本的特点。

本发明的技术方案之一是，所述基于微间隙阵列电极的酶催化电导免疫传感器采用微间隙阵列金电极做基片，并采用以下步骤制得：

- 1、取常规光刻印刷法制作的微间隙阵列金电极做基片，它为叉指式双电极，正负电极均为两个梳形金电极，彼此交叉组成微间隙阵列金电极。梳形齿 D_1 宽为 $1\mu\text{m}$ — $100\mu\text{m}$ ，间隙 D_2 为 $1\mu\text{m}$ — $100\mu\text{m}$ ；
- 2、微间隙阵列金电极的硅烷化处理，其步骤是：
 - a. 将所述微间隙阵列金电极用无水乙醇清洗三次，每次 1min；
 - b. 将该电极浸入 1 M 的 NaOH 溶液中，静置 28min —32min；
 - c. 用超纯水清洗该电极三次，每次 1min；吹干；

d. 将该电极浸入含氨丙基三甲氧基硅烷 5% (体积百分数) 的乙醇溶液中, 室温下静置 23 小时—25 小时;

这样可在微间隙阵列金电极间的基片上形成一氨基硅烷自组装单层;

e. 用超纯水清洗三次, 吹干, 获得硅烷化的微间隙阵列金电极;

3. 免疫传感器的制备步骤:

a. 将所述硅烷化的微间隙阵列金电极浸入质量分数为 5% 的戊二醛水溶液, 室温下静置 0.8 小时—1.2 小时, 再用超纯水清洗三次;

b. 在所述电极上滴加 30 μL 待测物的鼠单克隆或羊多克隆抗体溶液, 抗体浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 室温下静置反应 0.8 小时—1.2 小时; 这样使得抗体通过戊二醛交联剂固定在微间隙阵列金电极的基片上; 所述鼠单克隆或羊多克隆抗体溶液是将所述抗体溶于 0.01M、pH 7.4 磷酸缓冲溶液而得;

c. 用超纯水清洗所述电极三次, 吹干, 得到免疫传感器; 保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

本发明的技术方案之二是, 采用上述基于微间隙阵列电极的酶催化电导免疫传感器检测有碱性磷酸酶标记的单克隆抗体的分析物方法采用以下步骤:

1. 将分析物样品或标样溶液 (该分析物样品或标样溶液是将所述分析物样品或标样溶于 0.01M、pH 7.4 磷酸缓冲溶液而得)、碱性磷酸酶标记鼠单克隆抗体溶液 (该单克隆抗体与电极上固定的抗体识别不同抗原决定位点, 溶液中抗体浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 该溶液是将所述抗体溶于 0.01M、pH 7.4 磷酸缓冲溶液而得,) 各 20 μL 混合后滴加在免疫传感器上, 室温下静置反应 0.4 小时—0.6 小时; 这样, 样品中分析物和碱性磷酸酶标记单抗分别通过免疫反应被捕获到传感器表面上, 并形成一种单抗-分析物-酶标第二单抗的夹心复合物;

2. 将所述传感器置于银沉积溶液中, 该银沉积溶液为 1mM 抗坏血酸磷酸酯, 2mM AgNO_3 的 0.1M 甘氨酸-NaOH 缓冲溶液, pH9.0; 室温下静置反应 8min—12min; 然后从该传感器获取与分析物浓度相关的电导或电阻信号。

上述步骤（2）中，传感器表面上碱性磷酸酶催化其底物抗坏血酸磷酸酯水解产生还原剂抗坏血酸，后者将溶液中银离子还原成银金属并沉积在微间隙阵列金电极上，使微间隙阵列金电极正负电极部分导通，从而增大微间隙阵列金电极的电导（或降低电阻），获得与分析物浓度相关的电导（或电阻）信号。

本发明的技术方案之三是，采用上述基于微间隙阵列电极的酶催化电导免疫传感器检测无碱性磷酸酶标记的单克隆抗体的分析物方法采用以下步骤：

1. 将分析物样品或标样溶液（该溶液是将所述分析物样品或标样溶于0.01M、pH 7.4 磷酸缓冲溶液而得）、待测物鼠单克隆抗体溶液（抗体浓度为100 μ g/mL，该溶液是将所述单克隆抗体溶于0.01M、pH 7.4 磷酸缓冲溶液而得）各 20 μ L 混合后滴加在固定有待测物羊多克隆抗体的免疫传感器上，室温下静置反应 0.5 小时；这样样品中分析物和单抗分别通过免疫反应被捕获到传感器表面上，并形成一种多抗-分析物-单抗的夹心复合物；

2. 在所述传感器表面滴加 20 μ L 碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体，浓度为 10 μ g/mL，溶于磷酸缓冲溶液，其中 Na₃PO₄ 为 0.01M，pH 7.4，于室温下静置反应 0.4 小时—0.6 小时；酶标二抗通过与夹心复合物中的单抗发生反应而被捕获到传感器表面上；

3. 将所述传感器置于银沉积溶液中，该银沉积溶液为 1mM 抗坏血酸磷酸酯，2mM AgNO₃ 的 0.1M 甘氨酸-NaOH 缓冲溶液，pH9.0，室温下静置反应 8min—12min；再从所述传感器获取与分析物浓度相关的电导或电阻信号。

上述步骤（3）中，传感器表面上碱性磷酸酶催化其底物抗坏血酸磷酸酯水解产生还原剂抗坏血酸，后者将溶液中银离子还原成银金属并沉积在微间隙阵列金电极上，使微间隙阵列金电极正负电极部分导通，从而增大微间隙阵列金电极的电导（或降低电阻），获得与分析物浓度相关的电导（或电阻）信号。

本发明建立的基于微间隙阵列电极的酶催化电导免疫传感检测技术，灵敏度高，可实现 fg/mL 蛋白分子的检测，且无需精密仪器进行定量检测，可望为疾病早期与现场检测应用提供有效的技术依据。

由以上可知，本发明为一种基于微间隙阵列电极的酶催化电导免疫传感器及其免疫检测方法，它的优点有：

1. 微间隙阵列电极制备简单，可大批量、低成本生产；
2. 检测步骤简单，检测时间在 1h 内，检测所需的仪器可用万用电表或自行研制的电阻量测装置，便携且价格低廉；
3. 本免疫传感器灵敏度高，可实现 fg/mL 蛋白分子的检测，且背景干扰很小。

附图说明

图 1 是微间隙阵列电极图样(黑色区域为金膜,白色区域为裸露的基片)。掩膜图样与此相反(黑色区域为透明区,白色区域为不透明区)。它为叉指式双电极,正负电极均为两个梳形金电极,彼此通过微米级绝缘间隙交叉组成阵列式金电极。正负电极的梳形齿数 5 至 20 个,宽为 $1\mu\text{m}$ — $100\mu\text{m}$ 。电极间隙为 $1\mu\text{m}$ — $100\mu\text{m}$ 。

图 2 是基于微间隙阵列电极的免疫传感器实物照片(黑色区域为金膜,白色区域为裸露的基片,其中箭头指向区域固定分析物抗体,金电极两端通过导线连接到检测装置)。

图 3 是基于微间隙阵列电极的免疫传感器对不同浓度 hIgG 对应的响应曲线(电位—电流曲线,其斜率代表响应电导);由该图可见,传感器的电导响应随分析物 hIgG 浓度增大而增大,检测下限可达 1fg/mL。

具体实施方式

实施例 1: 基于微间隙阵列电极的免疫传感器检测人免疫球蛋白 G (hIgG)。

1. 免疫传感器的制备:

取常规光刻印刷法制作的微间隙阵列金电极做基片，它为叉指式双电极，正负电极均为两个梳形金电极，彼此交叉组成微间隙阵列金电极。梳形齿宽为 $1\mu\text{m}$ — $100\mu\text{m}$ ，间隙为 $1\mu\text{m}$ — $100\mu\text{m}$ ；

将微间隙阵列金电极用无水乙醇（100%）清洗三次（每次 1min）后，将电极浸入 1 M 的 NaOH 溶液中 30min；再用超纯水清洗电极三次（每次 1min），吹干。然后，将电极浸入含氨丙基三甲氧基硅烷 5%（体积百分数）的乙醇溶液中，室温下静置 24 小时。用超纯水清洗三次后吹干，获得硅烷化的微间隙阵列金电极。

将硅烷化的微间隙阵列金电极浸入戊二醛水溶液（质量分数 5%），室温下静置 1 小时；用超纯水清洗三次后，在电极上滴加 $30\mu\text{L}$ hIgG 的羊抗人 IgG 多克隆抗体溶液（抗体浓度为 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ，溶于磷酸缓冲溶液，其中 Na_3PO_4 为 0.01M，pH 7.4），室温下静置反应 1 小时。用超纯水清洗三次后吹干备用。

2. hIgG 的检测：

将 hIgG 的标样溶液、鼠抗 hIgG 单克隆抗体溶液各 $20\mu\text{L}$ 混合后滴加在如上制备的免疫传感器上，室温下静置反应 0.5 小时；在传感器表面滴加 $20\mu\text{L}$ 碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体溶液（酶标抗体浓度为 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ，磷酸缓冲溶液， Na_3PO_4 为 0.01M，pH 7.4），于室温下静置反应 0.5 小时。将传感器置于银沉积溶液（1mM 抗坏血酸磷酸酯，2mM AgNO_3 的 0.1M 甘氨酸-NaOH 缓冲溶液，pH9.0）中，室温下静置反应 10min。然后，将免疫传感器正负极分别与电化学工作站（CHI 760C）的工作电极与对电极（参比电极与对电极复合）连接，采用线性扫描伏安法在 0~50mV 电位范围检测，记录传感器电流随电位变化的响应曲线（如图 3 所示），并计算其斜率（即电导值）。根据不同浓度 hIgG 标样的电导值，获得工作曲线。

我们使用所研制的免疫传感器如上法对 10 个 hIgG 血清样品进行测定，根据样品的电导响应值与工作曲线，求得对应的 hIgG 浓度。与 ELISA 方法

对照，所研制的免疫传感器的结果与 ELISA 的测定值的相对误差都在 5.6% 以内。

实施例 2：基于微间隙阵列电极的免疫传感器检测前列腺特异性抗原 (PSA)。

1. 免疫传感器的制备：

将微间隙阵列金电极用无水乙醇 (100%) 清洗三次 (每次 1min) 后，将电极浸入 1 M 的 NaOH 溶液中 30min；再用超纯水清洗电极三次 (每次 1min)，吹干；然后，将电极浸入含氨丙基三甲氧基硅烷 5% (体积百分数) 的乙醇溶液中，室温下静置 24 小时。用超纯水清洗三次后吹干，获得硅烷化的微间隙阵列金电极。

将硅烷化的微间隙阵列金电极浸入戊二醛水溶液 (质量分数 5%)，室温下静置 1 小时；用超纯水清洗三次后，在电极上滴加 30 μ L 鼠抗人 PSA 单克隆抗体溶液 (浓度为 100 μ g/mL，溶于磷酸缓冲溶液，其中 Na₃PO₄ 为 0.01M，pH 7.4)，室温下静置反应 1 小时；用超纯水清洗三次后，吹干，备用。

2. PSA 的检测：

将分析物 PSA 标样溶液、碱性磷酸酶标记鼠抗人 PSA 单克隆抗体溶液 (该单克隆抗体与电极上固定的单克隆抗体识别不同抗原决定位点，抗体浓度为 100 μ g/mL，溶于磷酸缓冲溶液，其中 Na₃PO₄ 为 0.01M，pH 7.4) 各 20 μ L 混合后滴加在免疫传感器上，室温下静置反应 0.5 小时；将传感器置于银沉积溶液 (1mM 抗坏血酸磷酸酯，2mM AgNO₃ 的 0.1M 甘氨酸-NaOH 缓冲溶液，pH9.0) 中，室温下静置反应 10min。按照实施案例 1 的方法测定传感器的电导，得到工作曲线，且传感器的电导在 1fg~10ng/mL 范围内与 PSA 浓度呈线性关系。

本发明使用所研制的免疫传感器如上法对 8 个正常人与 10 个前列腺癌病人的血清样品进行测定，根据样品的电导响应值与工作曲线，求得对应的

PSA 浓度。与 ELISA 方法对照，所研制的免疫传感器的结果与 ELISA 的测定值的相对误差都在 7.9% 以内。

微间隙阵列电极制备采用传统的光刻印刷方法：在清洁的 $4 \times 6\text{mm}$ 的基片（石英、普通陶瓷或玻璃材料）上用甩胶机上涂上一层光刻胶（正胶），转速 $3000\text{r}/\text{min}$ ， 80°C 烘 15min 。在光刻机中将掩膜版与基片对准，紫外曝光将掩膜版上的图形（如图 1）转移到基片上。显影去掉曝光部分的光刻胶，氮气流吹干后，采用真空溅射在基片上依次喷涂 30nm 厚的 Ti 层和 120nm 厚的 Au 层。然后用有机溶剂氯仿除去基片上的感光胶后，即可得到如图 1 所示的微间隙阵列金电极。其中单个金带宽度及相邻两根金带之间的宽度可根据需要，在 $1 \sim 100 \mu\text{m}$ 之间调整。

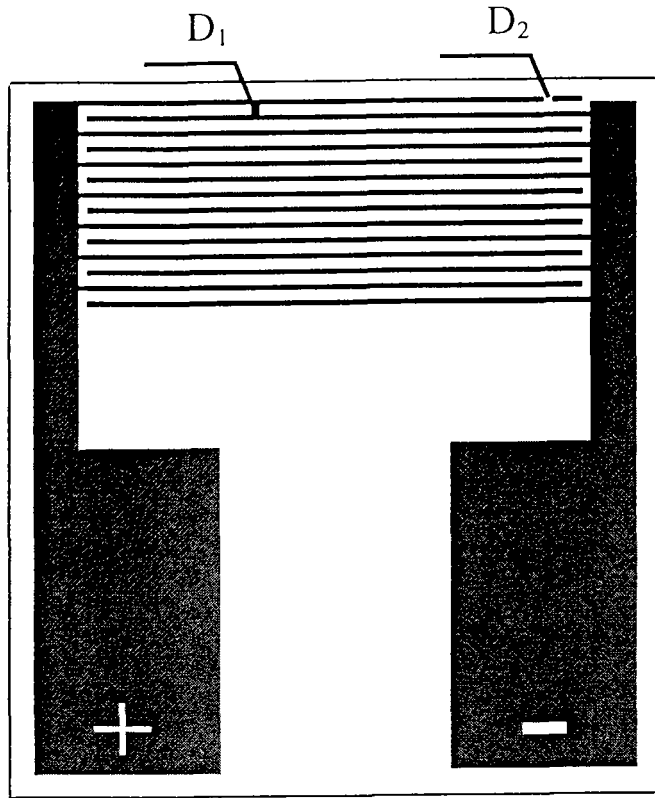


图 1

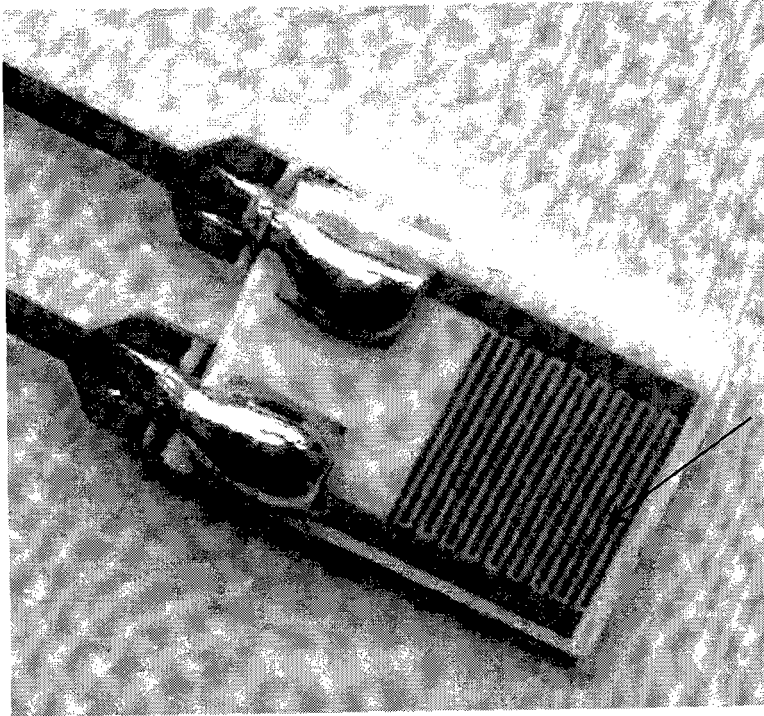


图 2

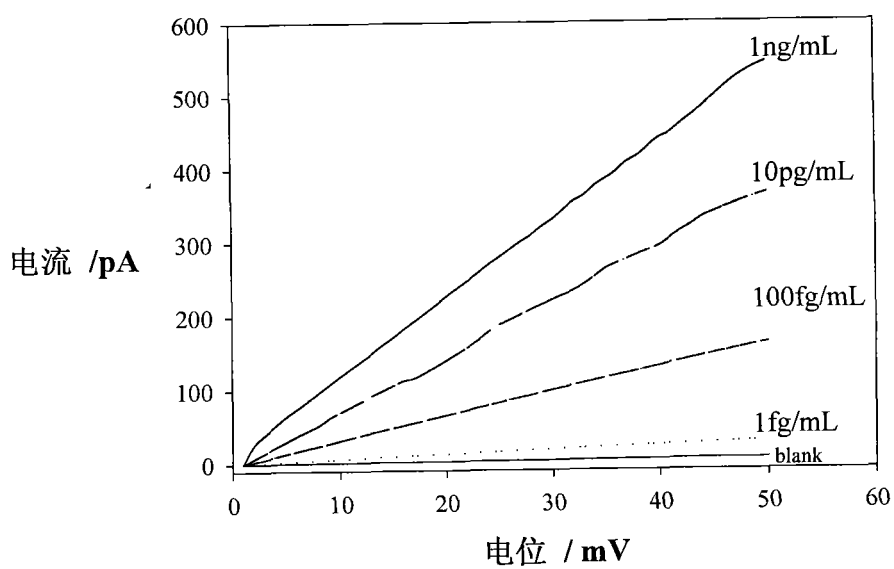


图 3

专利名称(译)	基于微间隙阵列电极的酶催化电导免疫传感器及其免疫检测方法		
公开(公告)号	CN101271114A	公开(公告)日	2008-09-24
申请号	CN200810031321.2	申请日	2008-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	湖南大学		
申请(专利权)人(译)	湖南大学		
当前申请(专利权)人(译)	湖南大学		
[标]发明人	蒋健晖 黄勇 俞汝勤 沈国励 楚霞		
发明人	蒋健晖 黄勇 俞汝勤 沈国励 楚霞		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N33/53 G01N27/327		
代理人(译)	马强		
其他公开文献	CN101271114B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种基于微间隙阵列电极的酶催化电导免疫传感器及其免疫检测方法，免疫传感器包括微间隙阵列电极、硅烷化处理的电极基片、具有良好导电性的酶沉积物；本发明利用微间隙电极阵列免疫传感器，通过在电极间隙基片上固定待测物的抗体，利用酶标抗体夹心进行待测蛋白的检测，该方法灵敏度高，操作简单，仪器便携且价格低廉，可望为疾病早期与现场检测应用提供快速、实用、低成本、高灵敏、高通量的免疫检测技术。

