



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102053161 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 11

(21) 申请号 200910233416. 7

(22) 申请日 2009. 10. 29

(71) 申请人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市汉口路 22 号

申请人 江苏省肿瘤医院

南京熊猫仪器仪表有限公司

(72) 发明人 鞠焜先 严枫 赖国松 钟丹秋

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

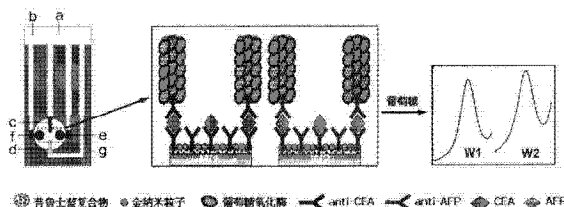
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

高灵敏一次性多通道电化学免疫传感器

(57) 摘要

本发明涉及一种高灵敏一次性多通道电化学免疫传感器。在一次性印刷电极阵列上层层组装普鲁士蓝复合物、纳米金和捕获抗体制得多通道免疫传感器。在负载金纳米粒子的碳纳米管上组装高比例的酶和二抗,设计了一种新颖的葡萄糖氧化酶功能化纳米复合物探针,用于夹心免疫分析。将纳米复合物探针与多通道免疫传感器结合,实现了双重信号放大和蛋白质的高灵敏免疫检测。普鲁士蓝作为有效的电子传递媒介催化还原葡萄糖氧化酶催化氧气氧化葡萄糖产生的过氧化氢,获得电流信号。该方法避免了检测溶液中溶解氧的干扰,安培检测过程不需除氧,具有检测浓度范围宽、重现性好、结果准确等优点,具有一定的临床应用价值。



1. 本发明涉及一种高灵敏一次性多通道电化学免疫传感器和一种新颖的葡萄糖氧化酶功能化纳米复合物探针。纳米复合物探针由葡萄糖氧化酶和二抗在金纳米粒子负载的碳纳米管上组装而制得。多通道电化学免疫传感器通过普鲁士蓝复合物、纳米金和捕获抗体在一次性丝网印刷电极阵列上层层组装而制成。纳米复合物探针上的高比例葡萄糖氧化酶与酶催化反应可双重放大夹心免疫分析的检测信号。普鲁士蓝作为有效的电子传递媒介催化还原酶催化产物过氧化氢,产生电流信号。

2. 根据权利要求1所述的检测系统,其特征在于所述的多通道电化学免疫传感器在一次性丝网印刷阵列上制成。

3. 根据权利要求1所述的检测系统,其特征在于所述的一次性多通道电化学免疫传感器通过普鲁士蓝复合物、金胶纳米粒子和单克隆捕获抗体的层层组装制得。

4. 根据权利要求1所述的检测系统,其特征在于所用的葡萄糖氧化酶功能化纳米复合物探针通过在负载金纳米粒子的碳纳米管上组装高比例葡萄糖氧化酶和二抗制得。

5. 根据权利要求1所述的检测系统,其特征在于检测溶液为含10mM葡萄糖的0.05M磷酸盐缓冲液(含0.1M KCl为支持电解质),pH 6.5;冲洗液为含0.05%吐温-20的0.05M磷酸盐缓冲液,pH 7.0;封闭液为含0.05%吐温-20的2%牛血清白蛋白(BSA)。

6. 根据权利要求1所述的检测系统,其特征在于所述的葡萄糖氧化酶功能化纳米复合物探针在普鲁士蓝电子传递媒介体作用下,放大检测信号,避免了检测过程中溶解氧的干扰。

7. 一种基于葡萄糖氧化酶功能化纳米复合物双信号放大的高灵敏一次性多通道电化学免疫传感器,其具体分析步骤如下:

- (1) 在免疫传感器表面滴加样品进行温育;
- (2) 冲洗后,进一步滴加纳米复合物探针,温育后再冲洗。
- (3) 滴加检测溶液,通过夹心免疫分析模式,用差分脉冲伏安法进行多通道电化学检测。
- (4) 从工作曲线求出样品中不同蛋白质(抗原)的浓度。

高灵敏一次性多通道电化学免疫传感器

一、技术领域

[0001] 本发明为一种高灵敏一次性多通道电化学免疫传感器。它通过葡萄糖氧化酶功能化纳米复合物探针的信号放大与特异性识别,结合由丝网印刷电极阵列制备的一次性多通道电化学免疫传感器,进行高灵敏电化学免疫分析。

二、背景技术

[0002] 免疫分析作为一种高选择性和高灵敏度的分析方法,在临床诊断、环境监测、食品安全等领域得到了日益广泛的应用。免疫分析分为均相和异相免疫分析,后者因为能获得更高的灵敏度而被广泛应用。与基于放射分析,荧光,化学发光,电化学发光,表面等离子共振等分析技术的免疫分析方法和传统的酶联免疫分析方法相比,电化学免疫分析具有仪器便宜,操作简便,灵敏度高独特优点。肿瘤标志物的测定在肿瘤的诊断和早期筛查中具有重要的意义。各种电化学免疫传感器,尤其是安培免疫传感器在肿瘤标志物的检测中得到广泛的研究和应用。然而,在肿瘤筛查中,越来越需要高灵敏的分析方法来提高对低丰度蛋白的准确检测。在传统的电化学免疫分析方法中,大多使用单酶标记物来进行信号传导和检测,分析灵敏度提高有限。

[0003] 在临床诊断中,许多肿瘤标志物并非只与某一种疾病相关,不同的肿瘤或同种肿瘤的不同组织可能有共同的肿瘤标志物,且一种肿瘤也往往都有多种相关的肿瘤标志物。然而,传统的电化学免疫分析方法大多只能对单组份进行测定,每个分析流程只测定其中一种组分含量。该分析模式所需时间长,试剂消耗多,且工作量大,检测效率较低。同时检测多种肿瘤标志物具有检测时间较短,步骤较简化,样品量较小,检测效率较高,花费少等特点,因而在疾病诊断和肿瘤筛查中具有重要意义。基于电极阵列的电化学免疫传感器近年来在多组分免疫分析领域得到了广泛的关注。此类免疫传感阵列通常共用一个参比电极和一个对电极,而多个工作电极形成阵列,在不同的工作电极上测定不同的组分。然而,这些电极阵列多采用光刻蚀等工艺制备,价格较为昂贵,且通常的电化学检测方法建立在辣根过氧化酶催化过氧化还原,易受到检测溶液中溶解氧的干扰,需采用通氮气等方法除氧,操作十分不便,也不利于检测系统的进一步微型化。

三、发明内容

[0004] 本发明的目的是:以丝网印刷电极阵列制备多通道电化学传感器,利用葡萄糖氧化酶功能化纳米复合物探针进行双电化学信号放大,建立一种可在溶解氧存在条件下的高灵敏多通道电化学免疫检测方法。

[0005] 本发明通过以下技术方案来实现:

[0006] 在印刷电极阵列上层层组装普鲁士蓝复合物、纳米金和不同的捕获抗体制得一次性多通道免疫传感器。通过“一锅法”将高比例的葡萄糖氧化酶和二抗组装在负载金纳米粒子的碳纳米管上制备成纳米复合物探针。在多通道免疫传感器上进行两步夹心温育后,传感器表面可结合与不同待测抗原含量相关的葡萄糖氧化酶功能化纳米复合物。滴加检测

溶液后,被捕获的葡萄糖氧化酶可催化溶解氧氧化葡萄糖产生过氧化氢,过氧化氢进一步在固定的普鲁士蓝媒介体作用下在电极表面还原,产生电化学信号,通过差分脉冲伏安法进行定量测定。

[0007] 上述的葡萄糖氧化酶功能化纳米复合物是在一定条件和用量下,通过层层组装技术制得;多通道免疫传感器也是在丝网印刷电极阵列上先后固定普鲁士蓝复合物和金纳米粒子,并进一步组装捕获抗体制成。

[0008] 检测溶液为含 10mM 葡萄糖的 0.05M 磷酸盐溶液(含 0.1M KCl 支持电解质);夹心免疫每一步都用含 0.05%吐温-20 的 pH 7.0 磷酸盐冲洗液洗去多余组分;固定捕获抗体后用含 0.05%吐温-20 的 BSA 封闭液封闭非特异性位点。

[0009] 基于葡萄糖氧化酶功能化纳米复合物双信号放大的超高灵敏一次性多通道电化学免疫传感器,其具体分析步骤如下:

[0010] (1) 通过层层组装的方法,利用聚电解质 PDDA 在羧基化碳纳米管上负载一层金纳米粒子,进而一步组装高比例的葡萄糖氧化酶和二抗制备成用作示踪标记物的纳米复合物探针(图 1)。

[0011] (2) 利用微量移液器准确移取一定量的普鲁士蓝复合物修饰于工作电极表面,再移取一定量的金纳米粒子进行组装,最后用金纳米粒子在不同的工作电极表面固定不同的捕获抗体制成多通道免疫传感器(图 2)。

[0012] (3) 用冲洗液洗去免疫传感器表面多余的捕获抗体,封闭液封堵非特异性位点后待用。

[0013] (4) 在免疫传感器表面滴加样品进行温育,结合待测抗原后进一步冲洗液洗去样品并滴加纳米复合物探针,继续温育形成夹心免疫复合物。

[0014] (5) 在免疫传感器表面滴加检测溶液,通过夹心免疫分析模式,用差分脉冲伏安法进行多通道电化学检测。

[0015] (6) 从工作曲线求出样品中不同蛋白质(抗原)的浓度。

[0016] 基于葡萄糖氧化酶功能化纳米复合物双信号放大的高灵敏一次性多通道电化学免疫检测系统的构成:

[0017] 本多通道检测系统的结构原理如图 3 所示,在多通道电化学免疫传感器上,通过两步夹心免疫反应,结合葡萄糖氧化酶功能化纳米复合物探针,然后滴加检测溶液于传感器表面,对应工作电极上捕获的葡萄糖氧化酶催化溶解氧氧化葡萄糖产生过氧化氢,由于高比例的酶/二抗的存在,以及酶的催化作用,产生了双信号放大。过氧化氢在工作电极上固定的普鲁士蓝媒介体作用下还原产生电流,通过差分脉冲伏安法检测该电流即可实现高灵敏定量分析。

[0018] 本检测系统测定多种肿瘤标志物的原理:

[0019] 当待测样品中含有几种蛋白质(肿瘤标志物)时,这些待测肿瘤标志物(抗原)在温育过程中与传感器表面对应的捕获抗体发生抗原-抗体特异性免疫结合,进一步与纳米复合物探针进行温育,在传感器上形成相应的双抗体夹心复合物。滴加含有葡萄糖的检测溶液,免疫复合物上结合的葡萄糖氧化酶可催化氧气氧化葡萄糖产生过氧化氢,而固定在传感器上的普鲁士蓝媒介体催化过氧化氢的电化学还原产生电流信号,该信号与待测样品中相应的肿瘤标志物浓度成正相关,通过工作曲线即可同时得到几种待测肿瘤标志物的

浓度。

[0020] 本发明与现有技术相比,具有以下特点:

[0021] 本发明结合多通道电化学检测手段,利用制备的纳米复合物探针作为示踪标记物进行电化学信号放大,通过一次性多通道电化学免疫传感器建立了一种高灵敏的多通道电化学免疫检测方法。相对现有检测系统,具有以下特点:

[0022] (1) 通过电化学手段进行检测,不需要昂贵仪器设备,操作简单。

[0023] (2) 整个电化学检测建立在以丝网印刷电极阵列为基底构建的一次性多通道电化学免疫传感器上,可一次进行多个肿瘤标志物的同时测定,检测通量高,成本低廉。

[0024] (3) 设计了一种新颖的纳米复合物探针,作为夹心免疫分析的示踪标记物可实现双信号放大,大大提高了检测灵敏度,适合于低丰度蛋白质(肿瘤标志物)的检测。

[0025] (4) 将普鲁士蓝电子媒介体固定在传感器表面,可消除工作电极之间的交叉干扰。

[0026] (5) 利用葡萄糖氧化酶作为示踪标记酶,可以有效地排除传统的辣根过氧化酶作为示踪标记酶检测体系中存在的溶解氧的干扰,检测过程无需除氧,操作方便,有利于检测系统的进一步微型化。

四、附图说明

[0027] 图 1. 葡萄糖氧化酶功能化纳米探针复合物的制备示意图

[0028] 图 2. 免疫传感器的制备及夹心免疫分析过程示意图

[0029] 图 3. 传感器阵列上多通道免疫分析示意图

[0030] (a) 尼龙片 (b) 银墨 (c) 石墨辅助电极 (d) Ag/AgCl 参比电极 (e) 工作电极 1 (f) 工作电极 2 (g) 绝缘层

五、具体实施方式

[0031] 实施例 1:结合附图 1,葡萄糖氧化酶功能化纳米探针的制备

[0032] 将多壁碳纳米管在 3 : 1H₂SO₄/HNO₃ 中超声处理四小时,水洗至中性,烘干得羧基化碳纳米管。接着,将 0.75mg 预处理过的碳纳米管分散于 1.5mL 含有 0.5MNaCl 的 0.20% 聚电解质 PDDA 中,超声 30 分钟,高速离心弃去多余的 PDDA,水洗三次得到 PDDA 功能化碳纳米管。将该 PDDA 功能化碳纳米管分散于 9.0mL 13-nm 金胶纳米粒子中,搅拌反应 20 分钟,离心,水洗三次得到浅紫色负载金纳米粒子的碳纳米管复合物。接下来,将该复合物分散于 2.5mL 50mM pH 9.0Tris-HCl 溶液中,加入 1.9mL 2mg/mL 葡萄糖氧化酶和 75 μ L 0.5mg/mL 二抗,均匀搅拌反应 3 小时,3500rpm 离心 15 分钟,弃去上清液,用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液洗涤,离心三次后将其分散于 500 μ L 含有 0.2% BSA 的冲洗液中保存,即得所需葡萄糖氧化酶功能化纳米复合物探针。使用前用冲洗液 5 倍稀释。

[0033] 实施例 2:结合附图 2,一次性多通道免疫传感器的制备

[0034] 在室温、不断搅拌情况下,向 16mL 含有 6.25mM FeCl₂,0.4% 聚电解质 PDDA 和 0.15% 壳聚糖的溶液中,缓缓滴加 4mL 25mM K₃Fe[(CN)₆] 溶液,溶液逐渐变为深蓝色,从而生成所需的普鲁士蓝复合物。将丝网印刷电极阵列用 0.1mol/L 的稀硫酸于 1.3V 恒电位预氧化处理 120s,洗净晾干后于工作电极上滴加 1 μ L 的普鲁士蓝复合物,室温放置晾干后室温吸附 13-nm 金纳米粒子 6 小时,先后用冲洗液,pH 7.0 的磷酸盐缓冲液洗净,晾干。在不同

的普鲁士蓝复合物 / 金纳米粒子修饰的工作电极表面, 分别滴加 0.5 μ L 0.5mg/mL 不同的捕获抗体, 4 $^{\circ}$ C 100%湿度条件下吸附过夜, 用冲洗液洗净, 晾干后滴加封闭液封闭 60min, 冲洗液后晾干即得所需一次性多通道免疫传感器。

[0035] 实施例 3 : 结合附图 3, 多通道免疫分析方法

[0036] (1) 在制成的多通道免疫传感器上, 滴加 10 μ L 不同浓度的标准抗原或待测血清, 室温温育 40min, 用冲洗液洗净 ;

[0037] (2) 滴加 10 μ L 5 倍稀释的纳米复合物探针温育反应 40min, 用冲洗液洗净 ;

[0038] (3) 滴加含有 10mM 葡萄糖的检测溶液, 于 0.30V 至 -0.20V 电位范围进行差分脉冲伏安测定, 脉冲振幅为 50mV, 脉冲宽度为 50ms。根据记录的电化学信号, 获得不同待测组分的工作曲线, 并对待测组分进行多通道同时测定。

[0039] (4) 该多通道免疫传感器为一次性使用。

[0040] 实施例 4 : 以两种重要的肿瘤标记物 : 癌胚蛋白 (CEA) 和甲胎蛋白 (AFP) 为例, 说明该多通道免疫传感器的应用

[0041] 所用葡萄糖氧化酶和二抗 : 鼠单克隆抗癌胚蛋白 (anti-CEA) 和鼠单克隆抗甲胎蛋白 (anti-AFP) 抗体分别组装到负载金纳米粒子的碳纳米管上, 以 BSA 封闭残余活性位点, 制成两种纳米复合物探针, 作为免疫分析的示踪抗体。将鼠单克隆 anti-CEA 捕获抗体固定在传感器阵列的工作电极 1 上, 将鼠单克隆 anti-AFP 捕获抗体固定在传感器阵列的工作电极 2 上, 与 CEA 和 AFP 标准抗原混合物或血清样品温育 40 分钟, 进一步与含 anti-CEA 和 anti-AFP 二抗的纳米复合物探针混合溶液温育 40 分钟。最后滴加含 10mM 葡萄糖的检测液, 进行差分脉冲伏安测定, 收集所得电化学信号。先后检测一系列标准溶液的信号, 分别得到 CEA 和 AFP 的工作曲线, 再利用该工作曲线和检测样品所得的电化学信号, 得到临床血样中两种肿瘤标志物的浓度。

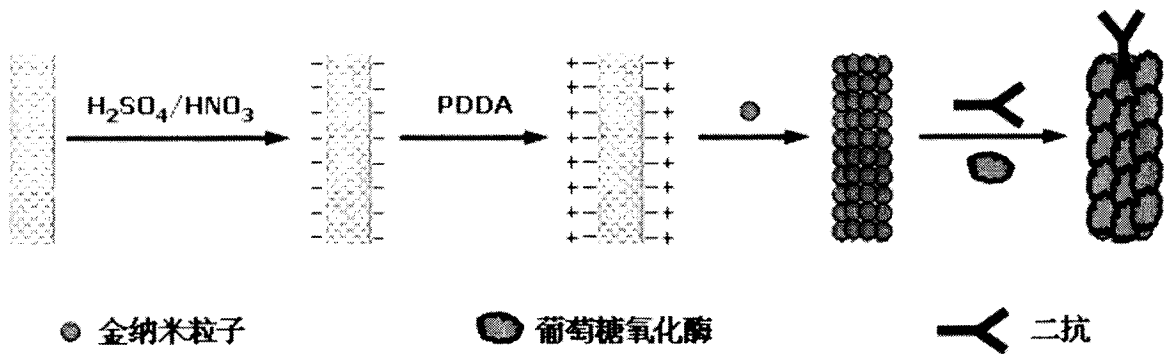


图 1

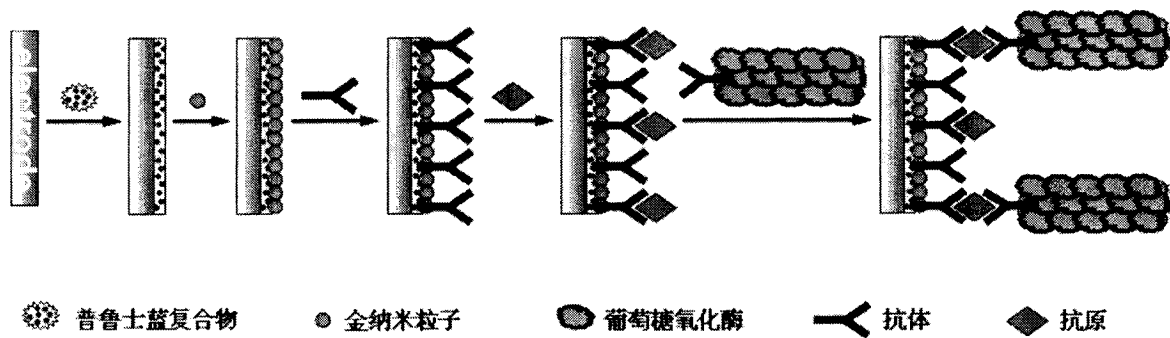


图 2

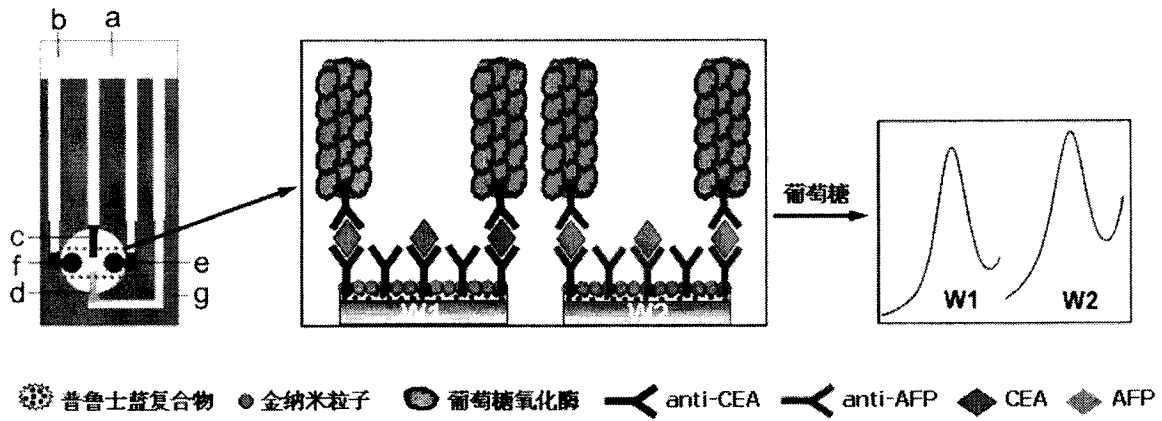


图 3

专利名称(译)	高灵敏一次性多通道电化学免疫传感器		
公开(公告)号	CN102053161A	公开(公告)日	2011-05-11
申请号	CN200910233416.7	申请日	2009-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	南京大学 江苏省肿瘤医院 南京熊猫仪器仪表有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京大学 江苏省肿瘤医院 南京熊猫仪器仪表有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京大学 江苏省肿瘤医院 南京熊猫仪器仪表有限公司		
[标]发明人	鞠焯先 严枫 赖国松 钟丹秋		
发明人	鞠焯先 严枫 赖国松 钟丹秋		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种高灵敏一次性多通道电化学免疫传感器。在一次性印刷电极阵列上层层组装普鲁士蓝复合物、纳米金和捕获抗体制得多通道免疫传感器。在负载金纳米粒子的碳纳米管上组装高比例的酶和二抗，设计了一种新颖的葡萄糖氧化酶功能化纳米复合物探针，用于夹心免疫分析。将纳米复合物探针与多通道免疫传感器结合，实现了双重信号放大和蛋白质的高灵敏免疫检测。普鲁士蓝作为有效的电子传递媒介催化还原葡萄糖氧化酶催化氧气氧化葡萄糖产生的过氧化氢，获得电流信号。该方法避免了检测溶液中溶解氧的干扰，安培检测过程不需除氧，具有检测浓度范围宽、重现性好、结果准确等优点，具有一定的临床应用价值。

