

[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 200810031325.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

[43] 公开日 2008年10月1日

[11] 公开号 CN 101275950A

[22] 申请日 2008.5.16

[21] 申请号 200810031325.0

[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

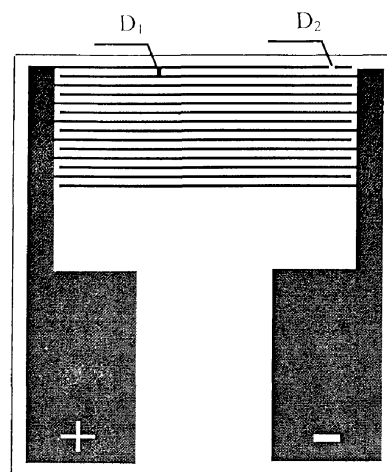
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

[54] 发明名称

一种酶催化电导免疫传感器及其检测食源性病原体的方法

[57] 摘要

本发明提供了一种用于检测食源性病原体的微间隙电极阵列免疫传感器，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及基于电导检测的酶联免疫传感器及检测方法。本发明利用微间隙电极阵列免疫传感器，对沙门氏菌和大肠杆菌 O157:H7 进行检测，该方法灵敏度高，特异性高，操作简单，仪器便携且价格低廉，可望为检测与鉴定食源性致病菌提供快速、实用、低成本、高灵敏、高通量的免疫检测技术，及时有效地控制和预防食源性疾病的传播。



1. 一种用于检测食源性病原体的酶催化电导免疫传感器，其特征是，它采用以下步骤制得：

(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) 将所述微间隙阵列金电极进行硅烷化处理，过程是：

a. 将所述微间隙阵列金电极用无水乙醇清洗三次，每次 0.8min — 1.2min ，

b. 将该微间隙阵列金电极浸入 1 M 的 NaOH 溶液中 28min — 32min ；然后超纯水清洗该微间隙阵列金电极三次，每次 0.8min — 1.2min ，吹干；

c. 将所述微间隙阵列金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 ；再用超纯水清洗三次后吹干，即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% 的戊二醛水溶液中，室温下静置 1小时 ；

b. 取出，用超纯水清洗三次；在所述电极上滴加 $30\mu\text{L}$ 食源性致病菌的单克隆抗体溶液，室温下静置反应 1小时 ；所述单抗浓度为 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ，该单抗溶液是将单抗溶于 0.01M 、 $\text{pH } 7.4$ 磷酸缓冲溶液而得；

c. 用超纯水清洗三次，吹干，得到酶催化电导免疫传感器。

2、一种采用权利要求 1 所述酶催化电导免疫传感器检测食源性致病菌的方法，其特征是，该方法采用以下步骤实现：

(1) 将分析物样品或标样溶液、待测物的单抗溶液各 $20\mu\text{L}$ 混合后滴加在所述酶催化电导免疫传感器上，室温下静置反应 0.4小时 — 0.6小时 ；所

用为 0.01M、pH 7.4 磷酸缓冲溶液；

(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 抗体溶液，抗体浓度为 10 μ g/mL，于室温下静置反应 0.45 小时—0.55 小时；所述抗体溶液是将溶碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 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，室温下静置反应 8min—12min；再由该传感器获取与分析物浓度相关的电导或电阻信号；所述银沉积溶液系将 1mM 抗坏血酸磷酸酯、2mM AgNO₃ 溶于 0.1M 甘氨酸-NaOH 缓冲溶液而得，溶液 pH9.0。

3、根据权利要求 2 所述酶催化电导免疫传感器检测食源性病原体的方法，其特征是，所述分析物与待测物为沙门氏菌或大肠杆菌 O157:H7 等食源性病原体。

一种酶催化电导免疫传感器及其检测食源性病原体的方法

技术领域

本发明属于生物分析领域，具体涉及一种基于微间隙阵列电极的免疫传感器，以及利用该免疫传感器检测食品中食源性病原体的方法。

背景技术

食源性病原体是指以食物为载体、导致人类发生疾病的一大类细菌与病毒。近年来，全球食品安全事件频频发生，如美国的“李斯特氏杆菌事件”、日本的“大肠杆菌0157 流行事件”等，对人类健康带来很大危害，引起各国政府的全力关注。传统的检测方法（如分离培养、生化鉴定等）无法对难培养或不可培养的致病菌进行检测，而且特异性不高、灵敏度低、操作烦琐耗时，不能实现有效的监测、预防作用。因此，发展新的快速检测与鉴定食源性病原体的方法是及时有效地控制和预防致病菌、病毒传播的前提。

发明内容

本发明的目的在于克服传统食源性病原体检测技术灵敏度低、特异性不高及操作繁琐耗时等不足，提出了一种酶催化电导免疫传感器及其检测食源性致病菌的方法，具有灵敏度高、特异性好、快速、低成本的特点。

本发明的技术方案之一是，用于检测食源性病原体的所述酶催化电导免疫传感器采用以下步骤制得：

- 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 $1\mu\text{m}$ — $100\mu\text{m}$ （参见图 1）；

- 2、将所述微间隙阵列金电极进行硅烷化处理，过程是：

- a. 将所述微间隙阵列金电极用无水乙醇清洗三次，每次 0.8min — 1.2min ，

b. 将该微间隙阵列金电极浸入 1 M 的 NaOH 溶液中 28min—32min；然后超纯水清洗该微间隙阵列金电极三次，每次 0.8min—1.2min，吹干；

c. 将所述微间隙阵列金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；再用超纯水清洗三次后吹干，即得硅烷化的微间隙阵列金电极；

以上过程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。

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% 的戊二醛水溶液中，室温下静置 1 小时；

b. 取出，用超纯水清洗三次；在所述电极上滴加 30 μ L 食源性病原体的单克隆抗体溶液，室温下静置反应 1 小时；所述单克隆抗体溶液的抗体浓度为 100 μ g/mL，该溶液系将所述单克隆抗体溶于 0.01M、pH 7.4 磷酸缓冲溶液而得；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；

c. 用超纯水清洗三次，吹干，得到酶催化电导免疫传感器；保存于 4 $^{\circ}$ C 备用。

本发明的技术方案之二是，采用所述酶催化电导免疫传感器检测食源性致病菌的方法采用以下步骤实现：

1. 将分析物样品或标样溶液、待测病原体的单抗溶液各 20 μ L 混合后滴加在所述酶催化电导免疫传感器上，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系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，所述待测致病菌的单抗溶液系将所述待测致病菌的单抗体溶于 0.01M、pH 7.4 磷酸缓冲溶液而得；

由此通过样品中的分析物将两种单抗连接起来，在传感器表面形成单抗—分析物—单抗的夹心免疫复合物；

2. 在所述传感器表面滴加 20 μ L 碱性磷酸酶标记的第二抗体溶液（即碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体溶液，亦即酶标二抗），于室温下静置反应

0.45 小时—0.55 小时；所述第二抗体溶液是将溶碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体溶于 0.01M、pH 7.4 磷酸缓冲溶液而得；溶液中抗体浓度为 10 μ g/mL；

此过程中，酶标二抗通过与免疫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，室温下静置反应 8min—12min；再由该传感器获取与分析物浓度成负相关的电导或电阻信号；所述银沉积溶液系将 1mM 抗坏血酸磷酸酯、2mM AgNO₃ 溶于 0.1M 甘氨酸-NaOH 缓冲溶液而得，溶液 pH9.0。

所述分析物与待测物为沙门氏菌或大肠杆菌 O157:H7 等食源性病原体。

该步骤中，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。

上述步骤的技术原理是，采用分析物和固定化的单抗以及游离的另一单抗发生夹心免疫分析步骤，形成单抗-分析物-单抗免疫复合物；再利用第二抗体的酶标记催化沉积溶液中底物分解产生导电材料沉积在微间隙阵列金电极间，改变微间隙阵列金电极正负电极的电导（或电阻）；通过电导或电阻检测测定食源性病原体的浓度。

由以上可知，本发明为一种酶催化电导免疫传感器及其检测食源性病原体的方法，可望为快速检测与鉴定食源性病原体提供快速、实用、低成本、高灵敏、高特异的免疫检测技术，及时有效地控制和预防致病菌、病毒的传播，其优点有：

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 10cfu/mL 病原体的检测，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 $1\mu\text{m}$ — $100\mu\text{m}$ 。

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沙门氏菌。

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1M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 $30\mu\text{L}$ 抗沙门氏菌的单克隆抗体溶液(溶液中单抗浓度为 $100\mu\text{g}/\text{mL}$,该溶液系将所述单克隆抗体溶于0.01M、pH 7.4磷酸缓冲溶液而得),室温下静置反应1小时。用超纯水清洗三次后吹干备用。

2. 沙门氏菌的检测:

将含有沙门氏菌的样品溶液或标样溶液、单抗溶液各 $20\mu\text{L}$ (所述样品溶液或标样溶液、单抗溶液系将相应的样品或标样、单抗溶于0.01M、pH 7.4

磷酸缓冲溶液而得)混合后滴加在免疫传感器上,室温下静置反应 0.5 小时。然后在传感器表面滴加 20 μ L 碱性磷酸酶标记的二抗(碱性磷酸酶标记羊抗鼠 IgG 抗体)溶液(酶标抗体浓度为 10 μ g/mL,系将所述酶标二抗溶于 0.01M、pH 7.4 磷酸缓冲溶液而得),于室温下静置反应 0.5 小时;将传感器置于银沉积溶液(该银沉积溶液系将 1mM 抗坏血酸磷酸酯、2mM AgNO₃溶于 0.1M 甘氨酸-NaOH 缓冲溶液而得,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,并计算其斜率(即电导值)。根据不同浓度沙门氏菌标样的电导值,获得与浓度相关的工作曲线。

使用所研制的免疫传感器如上法对 20 个可能含有沙门氏菌的鸡蛋样品进行测定,根据样品的电导响应值与工作曲线,求得对应的沙门氏菌浓度。与 ELISA 方法对照,所研制的免疫传感器的结果与 ELISA 的测定结果的符合率为 100%。

实施例 2: 基于微间隙阵列电极的免疫传感器检测大肠杆菌 0157:H7。

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 μ m—100 μ m,间隙为 1 μ m—100 μ 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 μ L 抗大肠杆菌 0157:H7

的单克隆抗体溶液（溶液中抗体浓度为 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ，该溶液系将所述单克隆抗体溶于 0.01M 、 $\text{pH} 7.4$ 磷酸缓冲溶液而得），室温下静置反应 1 小时；用超纯水清洗三次后吹干备用。

2. 大肠杆菌 0157:H7 的检测：

将大肠杆菌 0157:H7 的标样溶液或样品溶液、另一单抗溶液各 $20\mu\text{L}$ （所述标样溶液或样品溶液、另一单抗溶液系将相应的标样或样品、另一单抗溶于 0.01M 、 $\text{pH} 7.4$ 磷酸缓冲溶液而得）混合后滴加在免疫传感器上，室温下静置反应 0.5 小时；然后在传感器表面滴加 $20\mu\text{L}$ 碱性磷酸酶标记的二抗（碱性磷酸酶标记羊抗鼠 IgG 抗体）溶液（溶液中酶标抗体浓度为 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ，该溶液系将所述酶标二抗溶于 0.01M 、 $\text{pH} 7.4$ 磷酸缓冲溶液而得），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， $\text{pH} 9.0$ ）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，传感器的电导在 $10\text{cfu}/\text{mL} \sim 10000\text{cfu}/\text{mL}$ 范围内与大肠杆菌 0157:H7 浓度呈线性相关。

使用所研制的免疫传感器如上法对 20 个可能含有大肠杆菌 0157:H7 的样品进行测定，根据样品的电导响应值与工作曲线，求得对应的大肠杆菌 0157:H7 浓度。与 ELISA 方法对照，所研制的免疫传感器的结果与 ELISA 的测定结果的符合率为 100%。

微间隙阵列金电极的制备采用传统（常规）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。

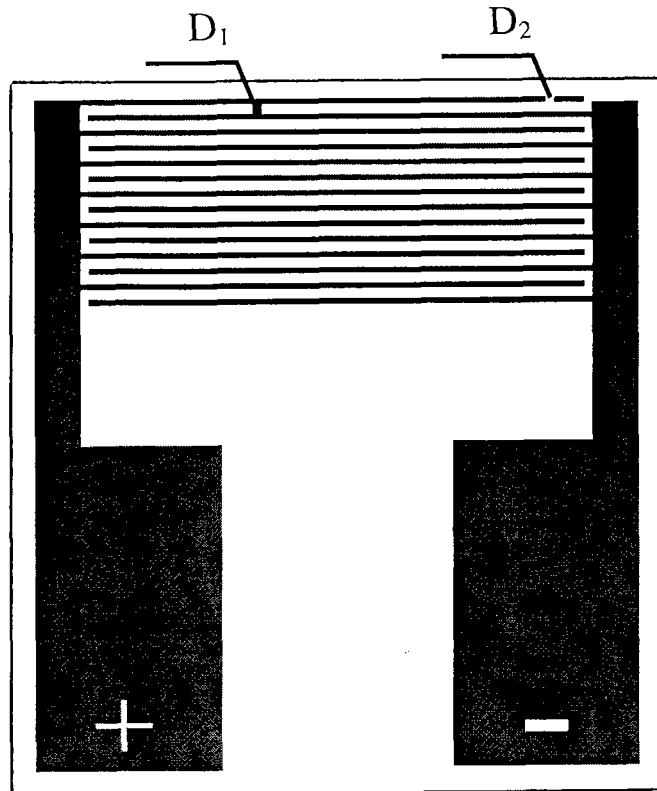


图 1

专利名称(译)	一种酶催化电导免疫传感器及其检测食源性病原体的方法		
公开(公告)号	CN101275950A	公开(公告)日	2008-10-01
申请号	CN200810031325.0	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 G01N33/569 G01N33/535 G01N27/327		
代理人(译)	马强		
其他公开文献	CN101275950B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检测食源性病原体的微间隙电极阵列免疫传感器，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及基于电导检测的酶联免疫传感器及检测方法。本发明利用微间隙电极阵列免疫传感器，对沙门氏菌和大肠杆菌O157:H7进行检测，该方法灵敏度高，特异性高，操作简单，仪器便携且价格低廉，可望为检测与鉴定食源性致病菌提供快速、实用、低成本、高灵敏、高通量的免疫检测技术，及时有效地控制和预防食源性疾病的传播。

