



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108152485 B

(45)授权公告日 2019.11.15

(21)申请号 201711316296.8

(22)申请日 2017.12.12

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108152485 A

(43)申请公布日 2018.06.12

(73)专利权人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道1800号

(72)发明人 王光丽 袁芳 杨高霞 董玉明

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 27/30(2006.01)

审查员 刘莉丹

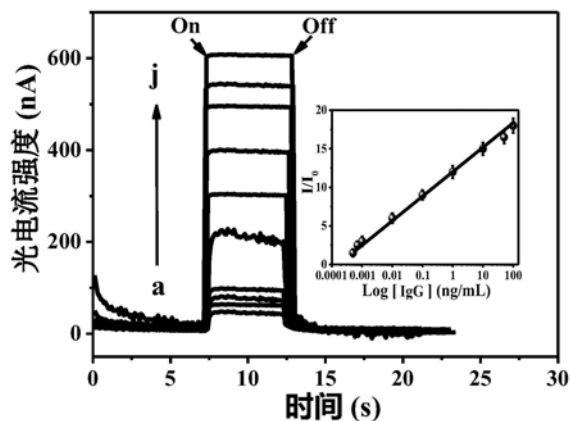
权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54)发明名称

一种基于碱性磷酸酯酶催化反应触发CdS光电流的免疫分析方法

(57)摘要

本发明发现碱性磷酸酯酶的催化反应产物导致沉积在CdS电极表面的金属氧化物或者水合金属氧化物分解,从而大大激发了CdS材料修饰电极的阳极光电流。据此现象,以小鼠IgG为模型,建立了一种免疫反应与光电化学检测分离的高通量光电化学免疫分析方法。通过96微孔板进行夹心免疫反应,采用Au纳米粒子固载的碱性磷酸酯酶的催化反应产生信号分子激发CdS电极的光电流,从而实现高通量、高灵敏度、选择性地测定。并且,该方法成功避免了常规光电化学免疫检测中电极表面固定的生物大分子对信号的不利影响。



1. 一种基于碱性磷酸酯酶催化反应触发CdS光电流的免疫分析方法,其特征在于:

a、采用化学沉积法制备CdS修饰的光电极,具体步骤为:将2%质量浓度的Triton-X 100溶液与0.5-1.2mol/L的CdSO<sub>4</sub>溶液混合后加入氨水溶液调节溶液的pH为10-13;然后往上述反应溶液中加入0.5M的硫脲溶液;之后将清洗过的ITO电极浸入到上述溶液中90℃下反应5-15分钟,取出冲洗电极,过夜晾干后即制得CdS修饰的光电极;

b、将制得的CdS修饰电极浸没在含有10mM的金属离子溶液、20mM的六次亚甲基四胺、0.2M的氧化剂形成的混合溶液中,90℃下反应10分钟后取出,小心洗涤;

c、以小鼠IgG为模型物,进行了光电化学免疫测定:吸取0.5mg/mL小鼠IgG捕获抗体滴加到96微孔板里,4℃孵育过夜后用Tris-HCl缓冲溶液将96微孔板进行洗涤;然后,加入牛血清蛋白封闭液4℃孵育2h,用Tris-HCl缓冲溶液洗涤;随后,将不同浓度的小鼠IgG加入到固定了捕获抗体的微孔板中,37℃孵育1小时后洗涤;将负载了小鼠IgG检测抗体和碱性磷酸酯酶的Au纳米颗粒加入到微孔板中,37℃孵育1小时后洗涤;最后,将抗坏血酸磷酸酯加入上述完成免疫反应的微孔板中,37℃反应30分钟;

d、将b步骤得到的电极浸泡在c步骤产生的溶液中一段时间,之后将电极小心洗涤干净;最后,将电极放入含有0.05mol/L KCl和0.1mol/L三乙醇胺的pH为7.0的Tris缓冲溶液中,以银/氯化银电极作为参比电极,铂丝作为对电极,+0.1V电位下在自制的光电化学测定仪器上进行光电流测定。

2. 根据权利要求1所述的一种基于碱性磷酸酯酶催化反应触发CdS光电流的免疫分析方法,其特征在于步骤b中所述的金属离子为Fe<sup>2+</sup>或Co<sup>2+</sup>或Mn<sup>2+</sup>。

3. 根据权利要求1所述的一种基于碱性磷酸酯酶催化反应触发CdS光电流的免疫分析方法,其特征在于步骤b中所述的氧化剂为H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>或者NaClO。

## 一种基于碱性磷酸酯酶催化反应触发CdS光电流的免疫分析方法

### 技术领域：

[0001] 本发明涉及纳米分析检测领域，尤其涉及通过碱性磷酸酯酶的催化反应触发CdS纳米材料光电极的光电流，从而实现高通量的光电化学免疫分析。

### 背景技术：

[0002] 免疫分析在临床疾病诊断、生物医药、食品安全和环境保护等诸多领域有着十分重要的地位。但是，传统的免疫分析方法并不能满足低含量目标物检测的需求，因此建立简便、灵敏的检测方法仍然非常必要。光电化学(PEC)分析是一种新的检测手段，其具有诸多优势，如设备简单、价格低廉、易实现微型化和灵敏度高，使得该技术自出现以来在生物检测领域得到了热切关注和迅猛发展。

[0003] 目前的PEC免疫检测主要集中在两大类型：第一，利用在电极表面形成捕获抗体/抗原/酶标记检测抗体的三明治结构进行检测，免疫反应发生后，三明治结构上的检测抗体所连接的天然酶会催化底物产生电子供体，增强电极表面修饰的光电化学活性材料的光电流[Zhao W W, Ma Z Y, Yan D Y, Xu J J, Chen H Y. *Anal. Chem.*, 2012, 84:10518-10521; Zhuang J Y, Tang D Y, Lai W Q, Xu M D, Tang D P. *Anal. Chem.*, 2015, 87:9473-9480; Zhang N, Ma Z Y, Ruan Y F, Xu J J, Chen H Y. *Anal. Chem.*, 2016, 88:1990-1994.]。另外一类光电化学免疫分析是利用电极表面固定的抗体抗原所导致的空间位阻增加，抑制了电子供体和光电化学活性材料的反应，光电流信号被抑制来实现目标物的测定[Wang G L, Xu J J, Chen H Y, Fu S Z. *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 25:791-796; Li W, Sheng P, Cai J, Feng H, Cai Q. *Biosens. Bioelectron.*, 2014, 61:209-214.]。上述基于电极表面固定抗体/抗原的光电化学免疫检测存在一定的缺陷：①在信号增强型的检测方法中，固定在电极表面的抗体、抗原、酶标记抗体作为生物大分子具有较大的空间位阻效应，会抑制电子供体和光电化学活性材料之间的识别反应，从而降低检测的灵敏度；②免疫反应和光电化学检测的信号输出是在同一片电极上进行的，这就导致了在一定的时间内，只能进行光电化学检测或生物反应，从而导致了方法的低通量；③生物大分子固定在电极表面会导致光的吸收/散射等，影响检测的准确性。因此，开发将免疫反应与光电化学检测分离的高通量检测很有必要。

[0004] 本发明利用碱性磷酸酯酶的催化反应触发CdS光电极的光电流，建立了一种免疫反应与光电极分离的、高通量的免疫分析方法。表面沉积了金属氧化物或水合金属氧化物的CdS光电极基本没有光电流信号，而碱性磷酸酯酶的催化水解反应产生的还原剂使金属氧化物或水合金属氧化物分解，从而导致CdS光电极光电流的大幅提高。以小鼠IgG为模型，通过碱性磷酸酯酶标记检测抗体，对在96微孔板里进行的夹心结构免疫反应实现了检测。该方法的最大的优势在于将免疫反应从电极表面分离，避免了电极表面固定的生物分子对光电化学测定的灵敏度和准确度的影响。更为重要的是，微孔板反应的引入以及免疫反应与光电检测的分离大大提高了检测效率。

**发明内容：**

[0005] 本发明的目的是提供一种高效、简便、高通量的光电化学免疫测定方法；尤其是提供一种利用碱性磷酸酯酶的催化反应触发CdS电极的光电流的策略，开辟了光电化学免疫测定的新途径。本发明所制备CdS材料修饰电极光照后可以产生较大的阳极光电流；而通过进一步沉积金属氧化物或水合金属氧化物后，电极的光电流发生了明显的抑制。通过在微孔板中进行的碱性磷酸酯酶标记的免疫反应后，酶催化反应产生出能够分解电极表面沉积了的金属氧化物或水合金属氧化物，从而导致光电流得到明显的恢复。光电流恢复的程度和免疫反应中抗原的含量有关，据此建立了信号增强型免疫分析方法。

[0006] 本发明的目的可通过如下技术措施来实现：

[0007] a、采用化学沉积法制备CdS修饰的光电极，具体步骤为：将2%质量浓度的Triton-X 100溶液与一定浓度的CdSO<sub>4</sub>溶液混合后加入氨水溶液调节溶液的pH为一定范围；然后往上述反应溶液中加入0.5M的硫脲溶液；之后将清洗过的ITO电极浸入到上述溶液中90℃下反应5-15分钟，取出冲洗电极，过夜晾干后即制得CdS修饰的光电极；

[0008] b、将制得的CdS修饰电极浸没在含有10mM的金属离子溶液、20mM的六次亚甲基四胺、0.2M的氧化剂形成的混合溶液中，90℃下反应10分钟后取出，小心洗涤；

[0009] c、以小鼠IgG为模型物，进行了光电化学免疫测定：吸取0.5mg/mL小鼠IgG捕获抗体滴加到96微孔板里，4℃孵育过夜后用Tris-HCl缓冲溶液将96微孔板进行洗涤；然后，加入牛血清蛋白封闭液4℃孵育2h，用Tris-HCl缓冲溶液洗涤；随后，将不同浓度的小鼠IgG加入到固定了捕获抗体的微孔板中，37℃孵育1小时后洗涤；将负载了小鼠IgG检测抗体和碱性磷酸酯酶的Au纳米颗粒复合物加入到微孔板中，37℃孵育1小时后洗涤；最后，将抗坏血酸磷酸酯加入上述完成免疫反应的微孔板中，37℃反应30分钟；

[0010] d、将b步骤得到的电极浸泡在c步骤产生的溶液中一段时间，之后将电极小心清洗干净；最后，将电极放入含有0.05mol/L KCl和0.1mol/L三乙醇胺的pH为7.0的Tris缓冲溶液中，以银/氯化银电极作为参比电极，铂丝作为对电极，+0.1V电位下在自制的光电化学测定仪器上进行光电流测定。

[0011] 本发明步骤a所述的一定浓度的CdSO<sub>4</sub>溶液为0.5-1.2mol/L；加入氨水后所调节的反应溶液的pH的范围为10-13；发明步骤b所述的金属离子溶液为Fe<sup>2+</sup>或Co<sup>2+</sup>或Mn<sup>2+</sup>；所述的氧化剂溶液为H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>或者NaClO。

**附图说明：**

[0012] 图1曲线a是CdS材料修饰电极的光电流，曲线b是浸没在MnSO<sub>4</sub>、六次亚甲基四胺、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的混合溶液中反应后再浸没在1.0×10<sup>-4</sup>mol/L抗坏血酸磷酸酯、5U碱性磷酸酯酶混合溶液中3min后电极的光电流，曲线c是浸没在MnSO<sub>4</sub>、六次亚甲基四胺、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的混合溶液中反应后的光电流。

[0013] 图2是体系的光电流随小鼠IgG浓度的变化(a-j)：0, 5.0×10<sup>-4</sup>, 7.0×10<sup>-4</sup>, 1.0×10<sup>-3</sup>, 1.0×10<sup>-2</sup>, 0.1, 1.0, 10, 50, 100ng/mL的关系图；插图是与光电流图对应的线性曲线。

[0014] 图3是该方法对小鼠IgG测定的选择性。

**具体实施方式：****[0015] 实例1**

[0016] a、采用化学沉积法制备CdS修饰的光电极，具体步骤为：将2%质量浓度的Triton-X 100溶液与1.0M的CdSO<sub>4</sub>溶液混合后加入氨水溶液调节溶液的pH为13；然后往上述反应溶液中加入0.5M的硫脲溶液；之后将清洗过的ITO电极浸入到上述溶液中90℃下反应5分钟，取出冲洗电极，过夜晾干后即制得CdS修饰的光电极；

[0017] b、将制得的CdS修饰电极浸没在含有10mM的FeSO<sub>4</sub>溶液、20mM的六次亚甲基四胺、0.2M的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>形成的混合溶液中，90℃下反应10分钟后取出，小心洗涤；

[0018] c、以小鼠IgG为模型物，进行了光电化学免疫测定：吸取0.5mg/mL小鼠IgG捕获抗体滴加到96微孔板里，4℃孵育过夜后用Tris-HCl缓冲溶液将96微孔板进行洗涤；然后，加入牛血清蛋白封闭液4℃孵育2h，用Tris-HCl缓冲溶液洗涤；随后，将不同浓度的小鼠IgG加入到固定了捕获抗体的微孔板中，37℃孵育1小时后洗涤；将负载了小鼠IgG检测抗体和碱性磷酸酯酶的Au纳米颗粒复合物加入到微孔板中，37℃孵育1小时后洗涤；最后，将抗坏血酸磷酸酯加入到上述完成免疫反应的微孔板中，37℃反应30分钟；

[0019] d、将b步骤得到的电极浸泡在c步骤产生的溶液中一段时间，之后将电极小心洗涤干净；最后，将电极放入含有0.05mol/L KCl和0.1mol/L三乙醇胺的pH为7.0的Tris缓冲溶液中，以银/氯化银电极作为参比电极，铂丝作为对电极，+0.1V电位下在自制的光电化学测定仪器上进行光电流测定。

**[0020] 实例2**

[0021] a、采用化学沉积法制备CdS修饰的光电极，具体步骤为：将2%质量浓度的Triton-X 100溶液与0.5M的CdSO<sub>4</sub>溶液混合后加入氨水溶液调节溶液的pH为11；然后往上述反应溶液中加入0.5M的硫脲溶液；之后将清洗过的ITO电极浸入到上述溶液中90℃下反应10分钟，取出冲洗电极，过夜晾干后即制得CdS修饰的光电极；

[0022] b、将制得的CdS修饰电极浸没在含有10mM的MnSO<sub>4</sub>溶液、20mM的六次亚甲基四胺、0.2M的NaClO形成的混合溶液中，90℃下反应15分钟后取出，小心洗涤；

[0023] c、以小鼠IgG为模型物，进行了光电化学免疫测定：吸取0.5mg/mL小鼠IgG捕获抗体滴加到96微孔板里，4℃孵育过夜后用Tris-HCl缓冲溶液将96微孔板进行洗涤；然后，加入牛血清蛋白封闭液4℃孵育2h，用Tris-HCl缓冲溶液洗涤；随后，将不同浓度的小鼠IgG加入到固定了捕获抗体的微孔板中，37℃孵育1小时后洗涤；将负载了小鼠IgG检测抗体和碱性磷酸酯酶的Au纳米颗粒复合物加入到微孔板中，37℃孵育1小时后洗涤；最后，将抗坏血酸磷酸酯加入到上述完成免疫反应的微孔板中，37℃反应30分钟；

[0024] d、将b步骤得到的电极浸泡在c步骤产生的溶液中一段时间，之后将电极小心洗涤干净；最后，将电极放入含有0.05mol/L KCl和0.1mol/L三乙醇胺的pH为7.0的Tris缓冲溶液中，以银/氯化银电极作为参比电极，铂丝作为对电极，+0.1V电位下在自制的光电化学测定仪器上进行光电流测定。

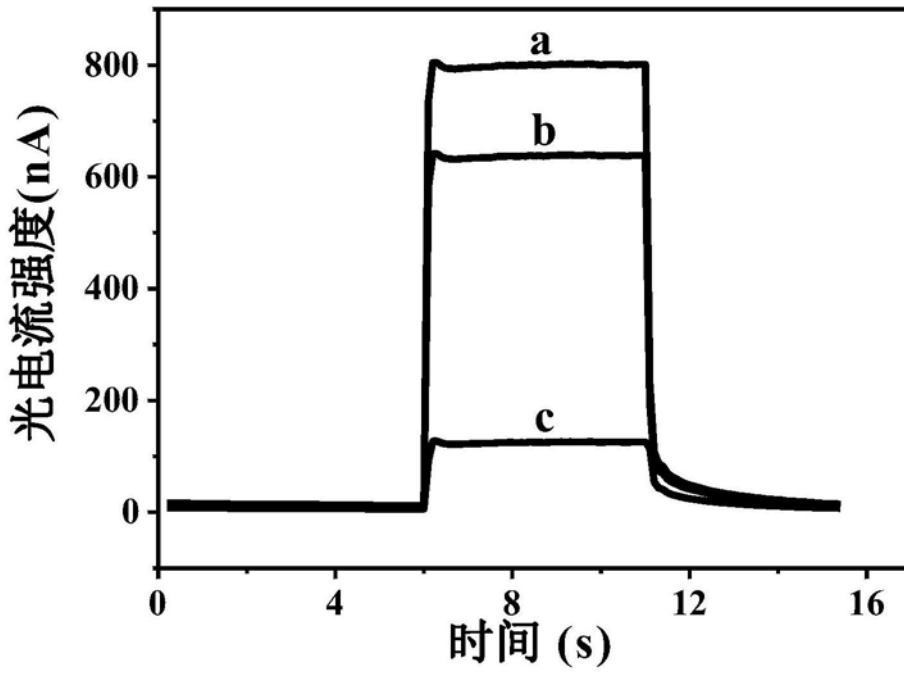


图1

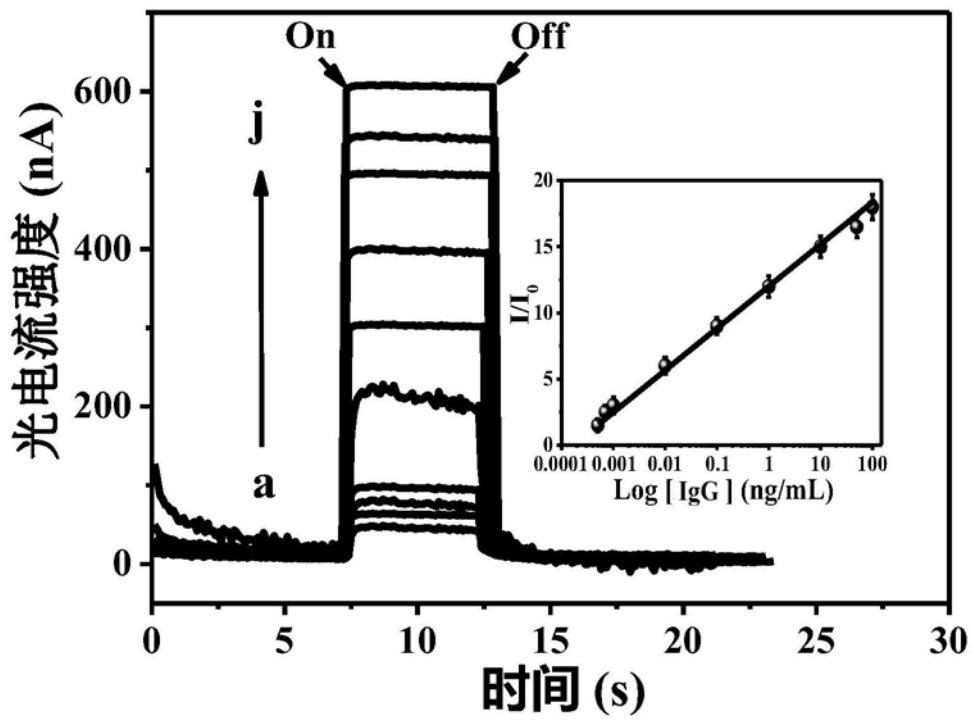


图2

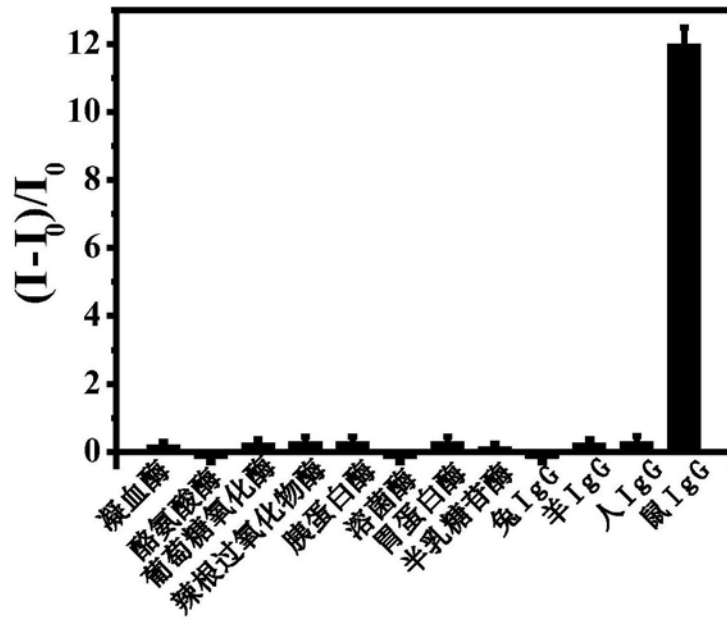


图3

专利名称(译)	一种基于碱性磷酸酯酶催化反应触发CdS光电流的免疫分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108152485B</a>	公开(公告)日	2019-11-15
申请号	CN2017111316296.8	申请日	2017-12-12
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	王光丽 袁芳 董玉明		
发明人	王光丽 袁芳 杨高霞 董玉明		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/30		
CPC分类号	G01N27/305 G01N33/53		
其他公开文献	CN108152485A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明发现碱性磷酸酯酶的催化反应产物导致沉积在CdS电极表面的金属氧化物或者水合金属氧化物分解，从而大大激发了CdS材料修饰电极的阳极光电流。据此现象，以小鼠IgG为模型，建立了一种免疫反应与光电化学检测分离的高通量光电化学免疫分析方法。通过96微孔板进行夹心免疫反应，采用Au纳米粒子固载的碱性磷酸酯酶的催化反应产生信号分子激发CdS电极的光电流，从而实现高通量、高灵敏度、选择性地测定。并且，该方法成功避免了常规光电化学免疫检测中电极表面固定的生物大分子对信号的不利影响。

