



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107918010 A

(43)申请公布日 2018.04.17

(21)申请号 201711204563.2

(22)申请日 2017.11.27

(71)申请人 陕西科技大学

地址 710021 陕西省西安市未央区大学园
区陕西科技大学

(72)发明人 苏秀霞 霍文静 张婧 张姣
徐佳 张蓉 贺生卓 张海宁

(74)专利代理机构 西安西达专利代理有限责任
公司 61202

代理人 刘华

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测
人类 β 防御素-2的方法

(57)摘要

本发明提供了一种高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测HBD-2(人类 β 防御素-2)的方法,首先在自组装膜修饰的基底表面固定HBD-2抗体,通过直接免疫反应将HBD-2抗体结合至传感器基底表面,从而使基底表面形貌发生变化,引起液晶分子的排列取向的变化,导致光学图像信号发生变化,实现对HBD-2的检测。本发明将液晶生物传感器引入HBD-2的研究中,实现了简单快速,高灵敏性地检测HBD-2。

1. 一种高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测 HBD-2 的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 玻片的预处理

切割玻片至所需大小,用新配制的 Piranha 溶液于 80 °C 充分浸泡,然后用超纯水清洗,再在无水乙醇中充分浸泡,经 N₂ 吹干,充分干燥,防尘备用;

2) 玻片的组装

2-1) 上玻片用 DMOAP 溶液组装:将步骤1)预处理的玻片浸于DMOAP 水溶液中,在常温下充分浸泡,用超纯水冲洗, N₂ 吹干,充分干燥,防尘备用;

2-2) 下玻片用 APTES 和 DMOAP 混合溶液组装:将步骤1)预处理的玻片浸入 APTES : DMOAP 质量比为 3-5 : 1 的乙醇溶液中,于 80 °C 充分浸泡,先用无水乙醇清洗,再用超纯水清洗,N₂ 吹干,充分干燥,防尘备用;

3) HBD-2 抗体的固定

将步骤2-2)氨基化处理的下玻片用戊二醛溶液于常温下充分浸泡,用超纯水洗净,得到经醛基化修饰的下玻片;将一定浓度的 HBD-2抗体溶液加在经醛基化修饰的下玻片上,吹开,于 37 °C 温育 2 h,用缓冲液冲洗,再用超纯水洗净, N₂ 吹干备用, HBD-2 抗体即可通过戊二醛的偶联作用固定在玻片上;

4) HBD-2抗原抗体特异性反应

将一定浓度的 HBD-2 溶液滴加在步骤3)固定有 HBD-2 抗体的玻片上,吹开,于 37 °C 温育 1 h,抗原抗体即可发生反应;用缓冲液冲洗,再用超纯水冲洗, N₂ 吹干备用;

5) 液晶池的制作

液晶池由步骤2-1)得到的上玻片和步骤4)得到的下玻片组装而成,玻片之间设有 Mylar 聚酯片, Mylar 聚酯片一边设有开口,上下玻片通过设置在没有开口的三边边缘的夹子固定;先将液晶 5CB加热到 40 °C 左右使其呈各向同性的液态,然后将其从 Mylar 聚酯片的开口处注入,液晶由于毛细管作用力而布满整个空腔;自然冷却到 28 °C 左右,用偏光显微镜观察。

2. 根据权利要求1所述的一种高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测 HBD-2 的方法,其特征在于:所述的步骤1)中酸处理玻片后用无水乙醇浸泡 10 min,使基底表面固定足够的羟基。

3. 根据权利要求1所述的一种高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测 HBD-2 的方法,其特征在于:所述的步骤2-1)中上玻片用质量分数为 0.2 % 的 DMOAP 水溶液浸泡30 min。

4. 根据权利要求1所述的一种高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测 HBD-2 的方法,其特征在于:所述的步骤2-2)中下玻片用 APTES 质量分数为 3%-5% 且 DMOAP 质量分数为 1% 的乙醇溶液中处理,使基底表面氨基化。

5. 根据权利要求1所述的一种高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测 HBD-2 的方法,其特征在于:所述的步骤2-2)中下玻片于 80 °C 浸泡 2 h。

6. 根据权利要求1所述的一种高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测 HBD-2 的方法,其特征在于:所述的步骤3)中将氨基化处理的下玻片用质量分数为 1%-3% 的戊二醛溶液于常温下浸泡,使基底表面醛基化。

7. 根据权利要求1所述的一种高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测 HBD-2 的方法,其

特征在于:所述的步骤3)中将氨基化处理的玻片浸泡在戊二醛中,在恒温摇床中反应 1 h。

8.根据权利要求1所述的一种高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测 HBD-2 的方法,其特征在于:所述的步骤3)中将 80-120 nmol/L的 HBD-2 抗体溶液加在经醛基化修饰的玻片上,用洗耳球吹开,于 37 °C温育 2 h,通过戊二醛的偶联作用使基底表面固定 HBD-2 抗体。

9.根据权利要求1所述的一种高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测 HBD-2 的方法,其特征在于:所述的步骤4)中将一定浓度的 HBD-2 溶液加在固定有 HBD-2 抗体的玻片上,洗耳球吹开,于 37 °C 温育 1 h,抗原抗体即可实现免疫反应。

10.根据权利要求1所述的一种高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测 HBD-2 的方法,其特征在于:所述的步骤5)中先将液晶 5CB 加热到 40 °C 左右使其呈各向同性的液态,然后将其从中间开凸型空腔的 Mylar 聚酯片开孔处注入,液晶由于毛细管作用力而布满整个空腔。

一种高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测人类 β 防御素-2的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种人类 β 防御素-2的检测方法,具体涉及一种高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测人类 β 防御素-2的方法。

背景技术

[0002] 由于细菌对抗生素耐药性不断出现,研发新型抗生素已迫在眉睫。防御素(defensins)是广泛存于动植物体内的一类不含糖链的碱性阳离子多肽,具有广谱抗菌的活性,一般由(29~45)个氨基酸残基组成,是机体防御屏障的重要组成部分。人类防御素是一类阳离子抗微生物肽大家族,分子量为 4~5 k Da,分子内含有 6 个二硫键相连的半胱氨酸残基,是一种具有特殊的空间结构,具有广泛的杀菌活性、细胞毒性和免疫趋化作用的阳离子多肽,是机体天然防御体系的重要组成部分,并与一些炎症性疾病和肿瘤的发展有密切的关系。人类 β 防御素具有广谱抗微生物的活性,其作用范围包括革兰氏阴、阳性菌、分枝杆菌、真菌及螺旋体等,人类防御素还能够刺激免疫系统参与免疫反应,提高机体的免疫水平以清除致病微生物,是一种有广泛应用前景的抗菌肽,可望在抵御细菌、病毒等微生物感染中发挥重要作用。而这些问题的研究需快速、灵敏、特异、简便的人类 β 防御素检测方法。

发明内容

[0003] 为了克服现有技术的上述问题,本发明的目的是提供一种高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测 HBD-2 的方法。本发明在检测人类 β 防御素-2(HBD-2)含量的过程中引入了高灵敏液晶型非标记免疫传感器,实现了简单快速,高效检测 HBD-2 的目的。

[0004] 为了达到上述目的,本发明采用的技术方案是:

一种高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测 HBD-2 的方法,首先在自组装膜修饰的基底表面固定 HBD-2 抗体,通过直接免疫反应将HBD-2 抗体结合至传感器基底表面,从而使基底表面形貌发生变化,引起液晶分子的排列取向的变化,导致光学图像信号发生变化,实现对 HBD-2 的检测。本发明包括以下步骤:

1)将玻片切割成 2 cm $\times$ 2 cm,用新配制的 Piranha 溶液[V(H₂O₂): V(H₂SO₄)= 3 : 7]于 80 $^{\circ}$ C浸泡 1 h,然后用超纯水清洗三遍,再在无水乙醇中浸泡 10 min,经 N₂吹干,于 110 $^{\circ}$ C干燥 3 h,防尘备用。

[0005] 2)玻片的组装

上玻片用 DMOAP(N,N-二甲基-N-十八烷基(3-[三甲氧基硅烷]丙基)氯化铵)溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸 0.2 % (质量分数)的 DMOAP 水溶液中,在常温下静置 30 min,用超纯水冲洗干净,N₂吹干,于 110 $^{\circ}$ C干燥 1 h,防尘备用。

[0006] 下玻片用 APTES (3-氨丙基三乙氧基硅烷)和 DMOAP 混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入(3 % - 5 %)(质量分数) APTES 和 1 % (质量分数) DMOAP 的乙醇溶液

中,于 80 °C 恒温 2 h,先用无水乙醇洗两遍,再用超纯水冲洗干净, N₂ 吹干,于 110 °C 干燥 1 h,防尘备用。

[0007] 3)HBD-2抗体的固定

将氨基化处理的玻片用质量分数为(1 % - 3 %)的戊二醛溶液于常温下浸泡 1 h,超纯水洗净,将 (80 - 120 nmol/L)的HBD-2抗体溶液加在经醛基化修饰的玻片上,用洗耳球吹开,于 37 °C 温育 2 h,用 10 mM PBS缓冲液 (pH=7.4) 冲洗,超纯水洗净,N₂ 吹干备用。HBD-2 抗体即可通过戊二醛的偶联作用固定在玻片上。

[0008] 4)HBD-2抗原抗体特异性反应

将一定浓度的 HBD-2 溶液加在固定有 HBD-2 抗体的玻片上,洗耳球吹开,于 37 °C 温育 1 h,抗原抗体即可实现免疫反应。用10 mM PBS (pH=7.4) 缓冲液冲洗后,再用超纯水冲洗,N₂ 吹干备用。

[0009] 5)液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用 Mylar 聚酯片隔开,Mylar 聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶 5CB 加热到 40 °C 左右使其呈各向同性的液态,然后将其从 Mylar 聚酯片开孔处注入,液晶由于毛细管作用力而布满整个空腔。自然冷却到 28 °C 左右用偏光显微镜观察。

[0010] 所述的步骤1)中酸处理玻片并用无水乙醇浸泡 10 min,使基底表面固定足够的羟基。

[0011] 所述的步骤2)中上玻片用 0.2 % (质量分数)的 DMOAP 水溶液浸泡。

[0012] 所述的步骤2)中上玻片浸泡时间为 30 min。

[0013] 所述的步骤2)中下玻片用(3 % - 5 %) (质量分数) APTES 和 1 % (质量分数) DMOAP 的乙醇溶液中处理,使基底表面氨基化。

[0014] 所述的步骤2)中下玻片于 80 °C 浸泡 2 h。

[0015] 所述的步骤3)中将氨基化处理的玻片用质量分数为(1 % - 3 %)的戊二醛水溶液于常温下浸泡,使基底表面醛基化。

[0016] 所述的步骤3)中将氨基化处理的玻片浸泡在戊二醛溶液中,恒温摇床中于 37 °C 反应 1 h。

[0017] 所述的步骤3)中将 (80 - 120 nmol/L)的HBD-2抗体溶液加在经醛基化修饰的玻片上,用洗耳球吹开,于 37 °C 温育 2 h,使基底表面固定 HBD-2 抗体。

[0018] 所述缓冲液为 10 mM、pH=7.4的PBS缓冲液。

[0019] 所述的步骤4)中将一定浓度的 HBD-2 溶液加在固定有 HBD-2 抗体的玻片上,洗耳球吹开,于 37 °C 温育 1 h,抗原抗体即可实现免疫反应。

[0020] 所述的步骤5)中将上玻片和下玻片面对面组装成液晶盒,玻片之间用 Mylar 聚酯片隔开。

[0021] 所述的步骤5)中先将液晶 5CB 加热到 40 °C 左右使其呈各向同性的液态,然后将其从中间开凸型空腔的 Mylar 聚酯片开孔处注入,液晶由于毛细管作用力而布满整个空腔。

[0022] 所述的步骤5)中将制作好的液晶池自然冷却到 28 °C 左右用偏光显微镜观察其光学现象。

[0023] 优选的,本发明高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测 HBD-2 的方法包括以下几个步骤:

为了达到上述目的,本发明采用的技术方案包括以下步骤:

1)将玻片切割成 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$,用新配制的 Piranha 溶液 $[V(\text{H}_2\text{O}_2) : V(\text{H}_2\text{SO}_4) = 3 : 7]$ 于 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 浸泡 1 h,然后用超纯水清洗三遍,再在无水乙醇中浸泡 10 min,经 N_2 吹干,于 $110\text{ }^\circ\text{C}$ 干燥 3 h,防尘备用。

[0024] 2)玻片的组装

上玻片用 DMOAP 溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸 0.2 % (质量分数)的 DMOAP 水溶液中,在常温下静置 30 min,用超纯水冲洗干净, N_2 吹干,于 $110\text{ }^\circ\text{C}$ 干燥 1 h,防尘备用。

[0025] 下玻片用 APTES 和 DMOAP 混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入(3 % - 5 %)(质量分数) APTES 和 1 % (质量分数) DMOAP的乙醇溶液中,于 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温 2 h,先用无水乙醇洗两遍,再用超纯水冲洗干净, N_2 吹干,于 $110\text{ }^\circ\text{C}$ 干燥 1 h,防尘备用。

[0026] 3)HBD-2抗体的固定

将氨基化处理的玻片用质量分数为(1 % -3 %)的戊二醛溶液于常温下浸泡 1 h,超纯水洗净,将 (80 - 120 nmol/L)的HBD-2抗体溶液加在经醛基化修饰的玻片上,用洗耳球吹开,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 温育2 h,用10 mM PBS (pH=7.4) 液冲洗,超纯水洗净, N_2 吹干备用。HBD-2抗体即可通过戊二醛的偶联作用固定在玻片上。

[0027] 4)HBD-2抗原抗体特异性反应

将一定浓度的 HBD-2 溶液加在固定有 HBD-2 抗体的玻片上,洗耳球吹开,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 温育 1 h,抗原抗体即可实现免疫反应。用缓冲液冲洗后,再用超纯水冲洗, N_2 吹干备用。

[0028] 5)液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用 Mylar 聚酯片隔开,Mylar 聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶 5CB 加热到 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 左右使其呈各向同性的液态,然后将其从 Mylar 聚酯片开孔处注入,液晶由于毛细管作用力而布满整个空腔。自然冷却到 $28\text{ }^\circ\text{C}$ 左右用偏光显微镜观察。

[0029] 优选的,所述的步骤2)中上玻片用 0.2 % (质量分数)的 DMOAP 水溶液浸泡30 min。

[0030] 优选的,所述的步骤2)中下玻片用(3 % - 5 %)(质量分数) APTES 和 1 % (质量分数) DMOAP 的乙醇溶液中于 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 浸泡 2 h,使基底表面氨基化。

[0031] 优选的,所述的步骤3)中戊二醛的质量分数为 1 % - 3 %。

[0032] 优选的,所述的步骤3)中将氨基化处理的玻片浸泡在戊二醛中,在恒温摇床中于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 1 h。

[0033] 优选的,所述的步骤3)中通过戊二醛交联作用固定在玻片上HBD-2抗体的浓度为(80 - 120 nmol/L)。

[0034] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

本发明在检测 HBD-2 含量的过程中引入了高灵敏液晶型非标记免疫传感器,实现了简单快速,高效检测 HBD-2 的目的。

附图说明

[0035] 图1为不同体积比的APTES/DMOAP基底自组装膜制备的液晶池光学成像；

图2为 GA 含量对液晶池光学成像的影响对比照片；

图3为不同浓度的固定 HBD-2 抗体制备的液晶池光学成像；

图4为不同浓度的待测 HBD-2 制备的液晶池光学成像。

具体实施方式

[0036] 下面结合实施例对本发明作进一步阐述,但是本发明不局限于以下实施例。

[0037] 实施例一

1) 将玻片切割成 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$,用新配制的 Piranha 溶液 $[V(\text{H}_2\text{O}_2) : V(\text{H}_2\text{SO}_4)] = 3 : 7$]于 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 浸泡 1 h,然后用超纯水清洗三遍,再在无水乙醇中浸泡 10 min,经 N_2 吹干,于 $110\text{ }^\circ\text{C}$ 干燥 3 h,防尘备用。

[0038] 2)玻片的组装

上玻片用 DMOAP 溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸 0.2 % (质量分数)的 DMOAP 水溶液中,在常温下静置 30 min,用超纯水冲洗干净, N_2 吹干,于 $110\text{ }^\circ\text{C}$ 干燥 1 h,防尘备用。

[0039] 下玻片用 APTES 和 DMOAP 混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入3 % (质量分数) APTES 和 1 % (质量分数) DMOAP 的乙醇溶液中,于 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温 2 h,先用无水乙醇洗两遍,再用超纯水冲洗干净, N_2 吹干,于 $110\text{ }^\circ\text{C}$ 干燥 1 h,防尘备用。

[0040] 3)HBD-2抗体的固定

将氨基化处理的玻片用体积分数为 1 %的戊二醛溶液于常温下浸泡 1 h,超纯水洗净,将 80 nmol/L 的HBD-2抗体溶液加在经醛基化修饰的玻片上,用洗耳球吹开,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 温育 2 h,用 10 mM PBS ($\text{pH}=7.4$) 缓冲液冲洗,超纯水洗净, N_2 吹干备用。HBD-2 抗体即可通过戊二醛的偶联作用固定在玻片上。

[0041] 4)HBD-2抗原抗体特异性反应

将一定浓度的 HBD-2 溶液加在固定有 HBD-2 抗体的玻片上,洗耳球吹开,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 温育 1 h,抗原抗体即可实现免疫反应。用 10 mM PBS ($\text{pH}=7.4$)缓冲液冲洗后,再用超纯水冲洗, N_2 吹干备用。

[0042] 5)液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用 Mylar 聚酯片隔开,Mylar 聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶 5CB 加热到 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 左右使其呈各向同性的液态,然后将其从 Mylar 聚酯片开孔处注入,液晶由于毛细管作用力而布满整个空腔。自然冷却到 $28\text{ }^\circ\text{C}$ 左右用偏光显微镜观察。

[0043] 实施例二

1)将玻片切割成 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$,用新配制的 Piranha 溶液 $[V(\text{H}_2\text{O}_2) : V(\text{H}_2\text{SO}_4)] = 3 : 7$]于 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 浸泡 1 h,然后用超纯水清洗三遍,再在无水乙醇中浸泡 10 min,经 N_2 吹干,于 $110\text{ }^\circ\text{C}$ 干燥 3 h,防尘备用。

[0044] 2)玻片的组装

上玻片用 DMOAP 溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸 0.2 % (质量分数) 的 DMOAP 水溶液中,在常温下静置 30 min,用超纯水冲洗干净,N₂ 吹干,于 110 °C 干燥 1 h,防尘备用。

[0045] 下玻片用 APTES 和 DMOAP 混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入 3.5 % (质量分数) APTES 和 1 % (质量分数) DMOAP 的乙醇溶液中,于 80 °C 恒温 2 h,先用无水乙醇洗两遍,再用超纯水冲洗干净,N₂ 吹干,于 110 °C 干燥 1 h,防尘备用。

[0046] 3)HBD-2的固定

将氨基化处理的玻片用体积分数为 1.5 % 的戊二醛溶液于常温下浸泡 1 h,超纯水洗净,将 90 nmol/L 的 HBD-2 抗体溶液加在经醛基化修饰的玻片上,用洗耳球吹开,于 37 °C 温育 2 h,用 10 mM PBS (pH=7.4) 缓冲液冲洗,超纯水洗净,N₂ 吹干备用。HBD-2 抗体即可通过戊二醛的偶联作用固定在玻片上。

[0047] 4)HBD-2抗原抗体特异性反应

将一定浓度的 HBD-2 溶液加在固定有 HBD-2 抗体的玻片上,洗耳球吹开,于 37 °C 温育 1 h,抗原抗体即可实现免疫反应。用 10 mM PBS (pH=7.4) 缓冲液冲洗后,再用超纯水冲洗,N₂ 吹干备用。

[0048] 5)液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用 Mylar 聚酯片隔开,Mylar 聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶 5CB 加热到 40 °C 左右使其呈各向同性的液态,然后将其从 Mylar 聚酯片开孔处注入,液晶由于毛细管作用力而布满整个空腔。自然冷却到 28 °C 左右用偏光显微镜观察。

[0049] 实施例三

1)将玻片切割成 2 cm × 2 cm,用新配制的 Piranha 溶液[V (H₂O₂) : V (H₂SO₄) = 3 : 7]于 80 °C 浸泡 1 h,然后用超纯水清洗三遍,再在无水乙醇中浸泡 10 min,经 N₂ 吹干,于 110 °C 干燥 3 h,防尘备用。

[0050] 2)玻片的组装

上玻片用 DMOAP 溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸 0.2 % (质量分数) 的 DMOAP 水溶液中,在常温下静置 30 min,用超纯水冲洗干净,N₂ 吹干,于 110 °C 干燥 1 h,防尘备用。

[0051] 下玻片用 APTES 和 DMOAP 混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入 4 % (质量分数) APTES 和 1 % (质量分数) DMOAP 的乙醇溶液中,于 80 °C 恒温 2 h,先用无水乙醇洗两遍,再用超纯水冲洗干净,N₂ 吹干,于 110 °C 干燥 1 h,防尘备用。

[0052] 3)HBD-2抗体的固定

将氨基化处理的玻片用体积分数为 2 % 的戊二醛溶液于常温下浸泡 1 h,超纯水洗净,将 100 nmol/L 的 HBD-2 抗体溶液加在经醛基化修饰的玻片上,用洗耳球吹开,于 37 °C 温育 2 h,用 10 mM PBS (pH=7.4) 缓冲液冲洗,超纯水洗净,N₂ 吹干备用。HBD-2 抗体即可通过戊二醛的偶联作用固定在玻片上。

[0053] 4)HBD-2抗原抗体特异性反应

将一定浓度的 HBD-2 溶液加在固定有 HBD-2 抗体的玻片上,洗耳球吹开,于 37 °C 温育 1 h,抗原抗体即可实现免疫反应。用 10 mM PBS (pH=7.4) 缓冲液冲洗后,再用超纯水

冲洗, N₂ 吹干备用。

[0054] 5) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成, 玻片之间用 Mylar 聚酯片隔开, Mylar 聚酯片中间开凸型空腔, 除开孔方向外, 其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶 5CB 加热到 40 °C 左右使其呈各向同性的液态, 然后将其从 Mylar 聚酯片开孔处注入, 液晶由于毛细管作用力而布满整个空腔。自然冷却到 28 °C 左右用偏光显微镜观察。

[0055] 实施例四

1) 将玻片切割成 2 cm × 2 cm, 用新配制的 Piranha 溶液[V(H₂O₂) : V(H₂SO₄) = 3 : 7] 于 80 °C 浸泡 1 h, 然后用超纯水清洗三遍, 再在无水乙醇中浸泡 10 min, 经 N₂ 吹干, 于 110 °C 干燥 3 h, 防尘备用。

[0056] 2) 玻片的组装

上玻片用 DMOAP 溶液组装: 将清洗烘烤后的玻片浸 0.2 % (质量分数) 的 DMOAP 水溶液中, 在常温下静置 30 min, 用超纯水冲洗干净, N₂ 吹干, 于 110 °C 干燥 1 h, 防尘备用。

[0057] 下玻片用 APTES 和 DMOAP 混合溶液组装: 将清洗烘烤后的玻片浸入 4.5 % (质量分数) APTES 和 1 % (质量分数) DMOAP 的乙醇溶液中, 于 80 °C 恒温 2 h, 先用无水乙醇洗两遍, 再用超纯水冲洗干净, N₂ 吹干, 于 110 °C 干燥 1 h, 防尘备用。

[0058] 3) HBD-2 抗体的固定

将氨基化处理的玻片用体积分数为 2.5 % 的戊二醛溶液于常温下浸泡 1 h, 超纯水洗净, 将 110 nmol/L 的 HBD-2 抗体溶液加在经醛基化修饰的玻片上, 用洗耳球吹开, 于 37 °C 温育 2 h, 用 10 mM PBS (pH=7.4) 缓冲液冲洗, 超纯水洗净, N₂ 吹干备用。HBD-2 即可通过戊二醛的偶联作用固定在玻片上。

[0059] 4) HBD-2 抗原抗体特异性反应

将一定浓度的 HBD-2 溶液加在固定有 HBD-2 抗体的玻片上, 洗耳球吹开, 于 37 °C 温育 1 h, 抗原抗体即可实现免疫反应。用 10 mM PBS (pH=7.4) 缓冲液冲洗后, 再用超纯水冲洗, N₂ 吹干备用。

[0060] 5) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成, 玻片之间用 Mylar 聚酯片隔开, Mylar 聚酯片中间开凸型空腔, 除开孔方向外, 其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶 5CB 加热到 40 °C 左右使其呈各向同性的液态, 然后将其从 Mylar 聚酯片开孔处注入, 液晶由于毛细管作用力而布满整个空腔。自然冷却到 28 °C 左右用偏光显微镜观察。

[0061] 实施例五

1) 将玻片切割成 2 cm × 2 cm, 用新配制的 Piranha 溶液[V(H₂O₂) : V(H₂SO₄) = 3:7] 于 80 °C 浸泡 1 h, 然后用超纯水清洗三遍, 再在无水乙醇中浸泡 10 min, 经 N₂ 吹干, 于 110 °C 干燥 3 h, 防尘备用。

[0062] 2) 玻片的组装

上玻片用 DMOAP 溶液组装: 将清洗烘烤后的玻片浸 0.2 % (体积分数) 的 DMOAP 水溶液中, 在常温下静置 30 min, 用超纯水冲洗干净, N₂ 吹干, 于 110 °C 干燥 1 h, 防尘备用。

[0063] 下玻片用 APTES 和 DMOAP 混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入 5 % (质量分数) APTES 和 1 % (质量分数) DMOAP 的乙醇溶液中,于 80 °C 恒温 2 h,先用无水乙醇洗两遍,再用超纯水冲洗干净,N₂ 吹干,于 110 °C 干燥 1 h,防尘备用。

[0064] 3)HBD-2抗体的固定

将氨基化处理的玻片用质量分数为 3 %的戊二醛溶液于常温下浸泡 1 h,超纯水洗净,将 120 nmol/L的HBD-2抗体溶液加在经醛基化修饰的下玻片上,用洗耳球吹开,于 37 °C 温育 2 h,用10 mM PBS (pH=7.4) 缓冲液冲洗,超纯水洗净,N₂ 吹干备用。HBD-2 即可通过戊二醛的偶联作用固定在玻片上。

[0065] 4)HBD-2抗原抗体特异性反应

将一定浓度的 HBD-2 溶液加在固定有 HBD-2 抗体的玻片上,洗耳球吹开,于 37 °C 温育 1 h,抗原抗体即可实现免疫反应。用10 mM PBS (pH=7.4) 缓冲液冲洗后,再用超纯水冲洗,N₂ 吹干备用。

[0066] 5)液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用 Mylar 聚酯片隔开, Mylar 聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶 5CB 加热到 40 °C左右使其呈各向同性的液态,然后将其从 Mylar 聚酯片开孔处注入,液晶由于毛细管作用力而布满整个空腔。自然冷却到 28 °C左右用偏光显微镜观察。

[0067] 实施例六

1)APTES/DMOAP体积比的选择

按实施例五中步骤2)所记载的方法,分别将下玻片用 APTES 和 DMOAP 混合溶液组装,将组装后的玻片制成液晶池,在偏光显微镜下观察下液晶池光学成像,结果如图1所示。图中, APTES/DMOAP 体积比分别为(a) 25:1; (b) 10:1; (c) 5:1; (d) 3:1; (f) 1:1。

[0068] 从图1可以看出,当 APTES/DMOAP 比例较高时(25:1,图a),由于 DMOAP 含量较少,不能有效诱导液晶分子垂直排列,光学成像中亮斑大且多,随着 APTES/DMOAP 比例减小,光学成像中亮斑逐渐减少,当两者比等于或小于5:1时,光学成像均为均一黑色图案。为了使基底固定有既能诱导液晶垂直排列又能提供足够的氨基固定生物分子,我们选择 APTES/DMOAP 比例在 5:1 - 3:1之间,此例对5:1 作详细说明。

[0069] 2)戊二醛浓度的选择

以 APTES/DMOAP 体积比5:1制备 APTES 和 DMOAP 混合溶液组装的下玻片,按实施例五中步骤3)所记载的方法,分别将下玻片置于体积分数为3%~5%的戊二醛(GA)固定液中,充分醛基化修饰后,将醛基化的玻片制成液晶池,在偏光显微镜下观察液晶池光学成像,结果如图2所示。图中, (a) APTES/DMOAP 为5:1,GA 含量为5%(v/v); (b) APTES/DMOAP 为5:1,GA含量为4%(v/v); (c) APTES/DMOAP 为5:1,GA含量为3%(v/v)。

[0070] GA含量决定基底表面醛基密度,图2结果显示,当 GA 含量为5%时,APTES/DMOAP 比例为 5:1光学成像中出现均匀分布的较大彩色亮斑。当 GA 含量减少到4%时,图像中亮斑减少;当 GA 含量减少到 3 %时,图案呈现全黑背景,不干扰生物分子检测,因此此处选择APTES/DMOAP比例为 5:1 ,GA 含量为 3%(v/v)。

[0071] 3)固定化HBD-2抗体浓度的选择

以实施例五所述方法制备 APTES/DMOAP 体积比为 5:1 ,GA含量为3%(v/v)的下玻片,

按照实施例五步骤3)中记载的方法,分别将500、200、120、80 nmol/L的HBD-2抗体溶液加在经醛基化修饰的下玻片上。将HBD-2抗体固定在可通过戊二醛的偶联作用固定在玻片上后,将其制成液晶池,在偏光显微镜下观察液晶池光学成像,结果如图3所示。图中,HBD-2抗体溶液分别为(a) 500 nmol/L; (b) 200 nmol/L; (c) 120 nmol/L; (d) 80 nmol/L。

[0072] 随着固定化 HBD-2 抗体浓度的减小,对液晶分子取向扰乱减小,液晶池光学成像逐渐变暗,图3结果显示,当固定化 HBD-2 抗体浓度为120、80 nmol/L时,光学成像呈现全黑(图中c、d),由于需要足够的抗体与抗原反应,因此选择能够使光学成像背景保持黑暗的最高固定化 HBD-2 抗体浓度120 nmol/L固定于基底表面。

[0073] 4) HBD-2抗原抗体特异性反应监测效果

按照实施例五中步骤4)记载的方法,分别将不同浓度的 HBD-2 溶液滴加在固定有HBD-2 抗体的玻片上,免疫反应完全后,将其制成液晶池,在偏光显微镜下观察液晶池光学成像,结果如图4所示。

[0074] 图4显示,随着 HBD-2 浓度的增加,液晶池光学成像逐渐变亮,当浓度达到 10 nmol/L 时,图像中出现亮斑,表明可检测低至 10 nmol/L的人类β防御素-2。

[0075] 以上结果显示,本发明利用直接免疫法检测人类β防御素-2可低至 10 nmol/L,从而实现了简单快速、高灵敏性检测人类β防御素-2的目的。

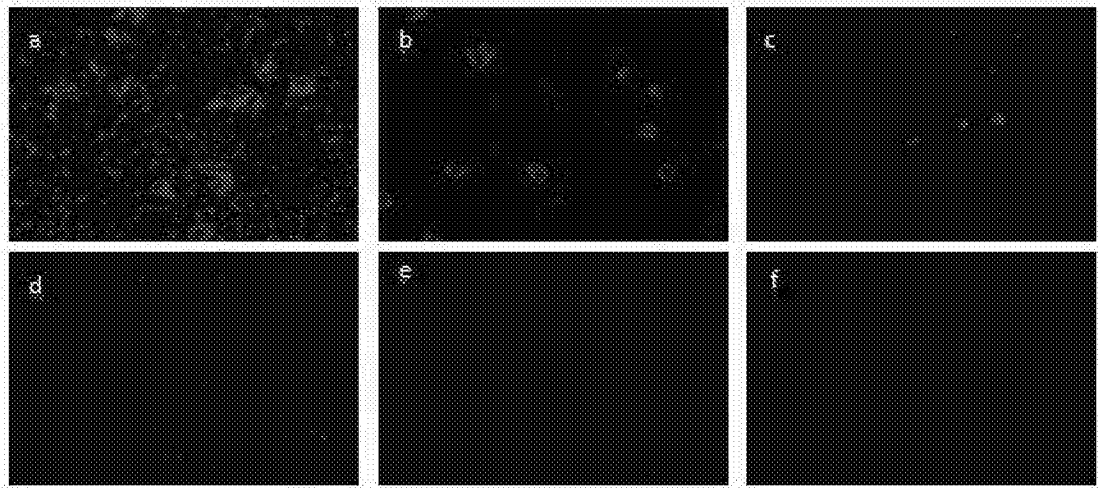


图1

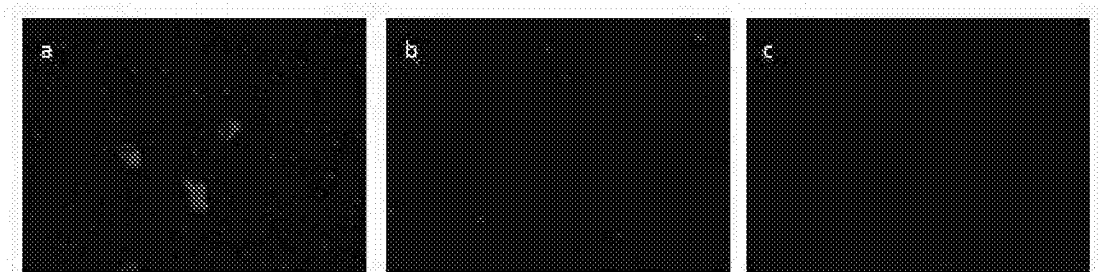


图2

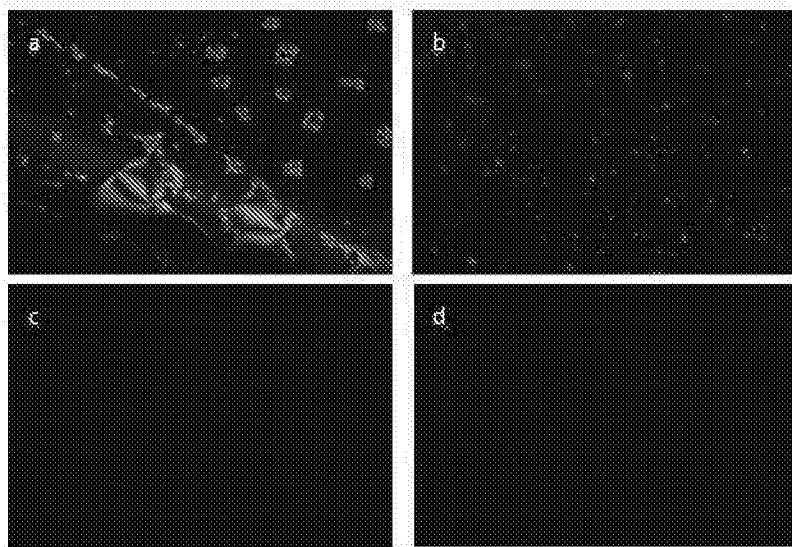


图3

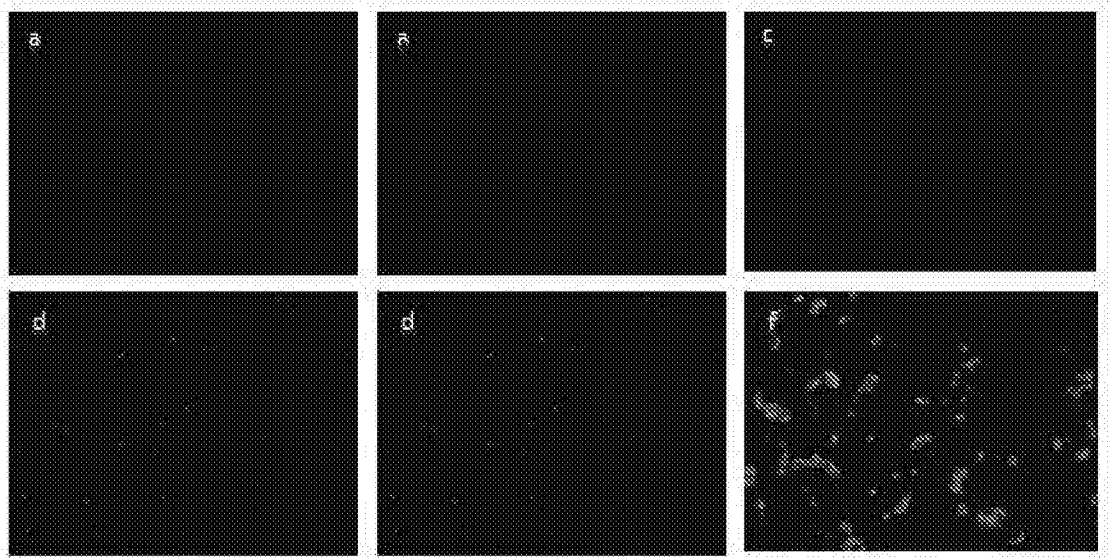


图4

专利名称(译)	一种高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测人类 β 防御素-2的方法		
公开(公告)号	CN107918010A	公开(公告)日	2018-04-17
申请号	CN201711204563.2	申请日	2017-11-27
[标]申请(专利权)人(译)	陕西科技大学		
申请(专利权)人(译)	陕西科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	陕西科技大学		
[标]发明人	苏秀霞 霍文静 张婧 张姣 徐佳 张蓉 贺生卓 张海宁		
发明人	苏秀霞 霍文静 张婧 张姣 徐佳 张蓉 贺生卓 张海宁		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	刘华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种高灵敏液晶型非标记免疫传感器检测HBD-2 (人类 β 防御素-2) 的方法, 首先在自组装膜修饰的基底表面固定HBD-2抗体, 通过直接免疫反应将HBD-2抗体结合至传感器基底表面, 从而使基底表面形貌发生变化, 引起液晶分子的排列取向的变化, 导致光学图像信号发生变化, 实现对HBD-2的检测。本发明将液晶生物传感器引入HBD-2的研究中, 实现了简单快速, 高灵敏性地检测HBD-2。

