

[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 200710036067.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/561 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 27/414 (2006.01)

[43] 公开日 2008年3月26日

[11] 公开号 CN 101149381A

[22] 申请日 2007.11.7

[21] 申请号 200710036067.0

[71] 申请人 湖南大学

地址 410082 湖南省长沙市河西岳麓山湖南  
大学化学化工学院

[72] 发明人 吴朝阳 沈国励 俞汝勤 吴 箭

[74] 专利代理机构 湖南兆弘专利事务所

代理人 田嘉嘉

权利要求书1页 说明书4页

[54] 发明名称

用于检测日本血吸虫的高灵敏质量放大压电  
免疫传感器及制备方法和应用

[57] 摘要

本发明提供了一种用于检测日本血吸虫的高灵敏质量放大压电免疫传感器，包括压电石英晶振，组装在压电石英晶振上的纳米金层和固定在纳米金层上的巯基化日本血吸虫抗原。本发明利用酶催化沉积效应，使传感器界面的质量响应大大的提高，增强了传感器的灵敏度，提供了一种设备简单、价格低廉的高灵敏血吸虫抗体免疫传感检测技术。

1、一种用于检测日本血吸虫的高灵敏质量放大压电免疫传感器，其特征在于包括压电石英晶振，组装在压电石英晶振上的纳米金层和固定在纳米金层上的巯基化日本血吸虫抗原。

2、一种制备权利要求1所述用于检测日本血吸虫的高灵敏质量放大压电免疫传感器的方法，其特征在于包括以下步骤：

1)、日本血吸虫抗原巯基化：将巯基化试剂在弱碱性条件下直接偶联到日本血吸虫抗原分子上，再在碱性溶液中对反应产物进行水解，反应完成后，将最终产物透析，最后得到巯基化血吸虫抗原；

2)、传感器的组装：

a、压电石英晶振预处理：将压电石英晶振进行清洗除去表面污物；

b、纳米金层自组装：将上述处理过的压电石英晶振浸泡在己二硫醇的乙醇溶液中组装己二硫醇单层，反应完成后冲洗干净，在自组装了己二硫醇的压电石英晶振上滴加适量纳米金溶液，自组装纳米金层；

c、抗原固定化：将自组装纳米金层的压电石英晶振水洗干净后，滴加上述制备的巯基化血吸虫抗原溶液到压电石英晶振上，实现血吸虫抗原的吸附固定；

d、封闭：将上述固定了血吸虫抗原的压电石英晶振清洗后，滴加BSA溶液到压电石英晶振上进行封闭，制备得到高灵敏质量放大压电免疫传感器；

e、保存：将压电免疫传感器保存在4℃的冰箱中备用。

3、根据权利要求2所述的制备高灵敏质量放大压电免疫传感器的方法，其特征在于所述巯基化试剂为SATA。

4、根据权利要求2或3所述的制备高灵敏质量放大压电免疫传感器的方法，其特征在于所述弱碱性溶液为碳酸氢钠溶液，碱性溶液为氢氧化钠溶液。

5、一种如权利要求1所述的高灵敏质量放大压电免疫传感器在检测日本血吸虫抗体中的应用。

## 用于检测日本血吸虫的高灵敏质量放大压电免疫传感器及制备方法和应用技术领域

本发明属于临床检测领域，具体涉及血吸虫的检测。

### 背景技术

血吸虫病是一种危害性很大的寄生虫传染病，在亚非拉等地区很是猖獗。现在已有一些检测方法应用于临床，例如：免疫电泳沉积，酶联免疫检测，直接荧光检测和放射性免疫分析等。但是这些方法比较复杂，费时，并且往往需要昂贵的仪器或放射性物质，更重要的是这些方法往往不能很好的对血吸虫病进行早期诊断。因此随着时间的推移，很有意义和必要开发一种快速，灵敏，价廉的血吸虫病诊断方法。

近年来，压电免疫传感器在免疫检测领域受到了人们的广泛关注。压电传感器，它对压电石英晶片物质吸附非常敏感，其频率下降值与吸附物质的质量有比例关系，对于一个9 MHz的AT切型石英晶体( $\phi=6\text{ mm}$ )来说，其气相中的质量灵敏度可达0.66 Hz/ng，是一种非常灵敏的质量检测工具，可直接监测免疫亲和吸附反应引起的质量变化，无需任何标记，被认为是最简便的免疫传感检测技术，一些压电免疫传感器已开始应用于医学临床诊断上。但是该方法对于日本血吸虫病轻度感染者和早期诊断的临床检测，仍不能很好的满足临床检测的需要，其检测灵敏度还可进一步提高。

### 发明内容

本发明目的在于克服现有血吸虫病高灵敏检测技术往往需要昂贵的仪器或放射性物质等方面的不足，利用酶催化放大效应，提供一种设备简单、价格低廉的高灵敏血吸虫抗体免疫传感检测技术。

为解决上述技术问题，本发明采用以下技术方案。

一种用于检测日本血吸虫的高灵敏质量放大压电免疫传感器，包括压电石英晶振，组装在压电石英晶振上的纳米金层和固定在纳米金层上的巯基化日本血吸虫抗原。

一种制备上述用于检测日本血吸虫的高灵敏质量放大压电免疫传感器的方法，包括以下步骤：

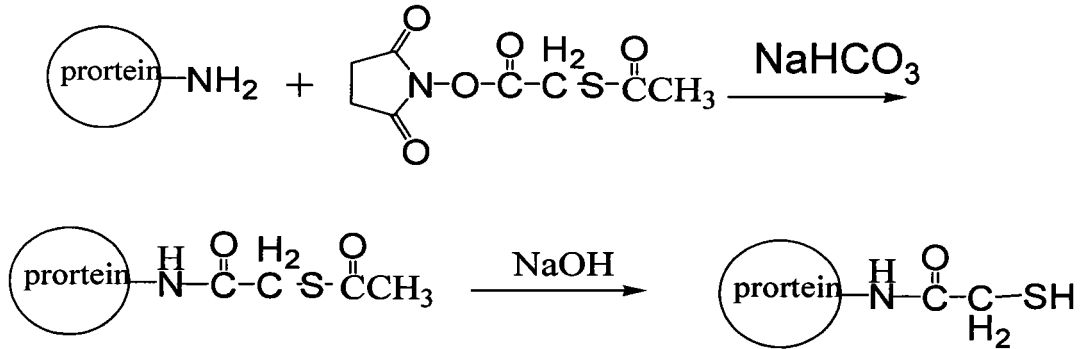
#### 1、日本血吸虫抗原(SjAg)巯基化

将巯基化试剂 SATA (S-acetylthioglycolic Acid N-hydroxysuccinimide ester) 在弱

碱性条件下直接偶联到日本血吸虫抗原分子上，再在碱性溶液中对反应产物进行水解，反应完成后，将最终产物透析，最后得到巯基化血吸虫抗原（SjAg-SH）。

所述弱碱性溶液为碳酸氢钠溶液，碱性溶液为氢氧化钠溶液。

巯基化抗原制备方法反应原理如下：



## 2、传感器的组装

1)、压电石英晶振预处理：将压电石英晶振进行清洗除去表面污物。

2)、纳米金层自组装：将上述处理过的压电石英晶振浸泡在己二硫醇的乙醇溶液中组装己二硫醇单层，反应完成后冲洗干净，在自组装了己二硫醇的压电石英晶振上滴加适量纳米金溶液，自组装纳米金层。

3)、抗原固定化：将自组装纳米金层的压电石英晶振水洗干净后，滴加 SjAg-SH 溶液到压电石英晶振上，实现血吸虫抗原的吸附固定。

4)、封闭：将上述固定了血吸虫抗原的压电石英晶振清洗后，滴加 BSA 溶液到压电石英晶振上进行封闭，制备得到高灵敏质量放大压电免疫传感器。

5)、保存：将压电免疫传感器保存在 4℃ 的冰箱中备用。

本发明高灵敏质量放大压电免疫传感器用于检测日本血吸虫抗体的方法，包括以下步骤：

1、免疫反应过程：将所述高灵敏质量放大压电免疫传感器置于不同浓度的血吸虫抗体溶液中，反应完成后，清洗压电免疫传感器去除没有结合的抗体，再在压电免疫传感器压电石英晶振上滴加酶标二抗（protein A-HRP），反应完成后，再用 PBS 清洗干净。

## 2、检测过程：

将清洗干净的压电石英晶振放入压电检测槽中，并向槽中加入一定量 4-氯-1-萘酚，待频率稳定时，记下起始频率值，再向检测槽中加入适量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液，记录相应的频率变化值，传感器可在 10~200 ng/mL 范围内定量检测血吸虫抗体，检测下限 5 ng/mL。

本发明的优点是：1、免疫传感器构造简单，通过将抗原事先巯基化，直接吸附固定

于石英晶振的纳米金层上，简化了固定步骤。2、采用纳米金层作为血吸虫抗原固定化媒介层，为压电免疫传感器提供一个均一且全新的重现性好的固定界面，从而与传统自组装胶联比较，在灵敏度和重现性方面都有较大的提高。3、检测所需的压电仪器设备简单，价格低廉，易于实现微型化、自动化、数字化等。4、本传感器对血吸虫抗体的具有良好的响应特异性，对其他蛋白质几乎没有频率响应。5、本传感器结合了酶催化沉积效应，使传感器界面的质量响应大大的提高，提高了传感器的灵敏度。6、本技术结合酶催化放大和纳米金的高生物兼容性，可用于日本血吸虫抗体的定性和定量测试，实现对日本血吸虫病进行早期诊断。这种高灵敏检测技术无须昂贵的仪器设备，易于自动化，可望成为一个日本血吸虫新的诊断方法，适合用于日本血吸虫病轻度感染者和早期诊断的临床检测。

### 具体实施方式

实施例 1：用于检测日本血吸虫的高灵敏质量放大压电免疫传感器的制备

#### 1、巯基化抗原的制备。

先将 0.2 mg SATA 和 0.75 mL 0.1 M 的碳酸氢钠加入到 1 mL 2 mg/mL S<sub>j</sub>Ag 溶液中，在室温下反应 1 h。再加入 0.25 mL 0.1 M 的氢氧化钠溶液，对反应产物进行水解。然后，将最终产物于 4℃ 下用 pH 7.4 磷酸缓冲溶液透析 24 h，最后得到浓度为 1 mg/mL 的 S<sub>j</sub>Ag-SH。

#### 2、传感器的组装。

压电石英晶振预处理：石英晶体谐振器为北京晨星无线电器材厂产品，AT-切型（JA5 型），9 MHz，两面镀金电极，晶片直径 12 mm，电极直径 6 mm。将压电石英晶振用 piranha（浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:3/1, v/v）进行清洗除去表面污物，并用无水乙醇和去离子水冲洗。

纳米金层自组装：将处理过的压电石英晶振浸泡在己二硫醇（0.5%，v/v）的乙醇溶液中组装 40 min，得到己二硫醇单层。用乙醇冲洗干净后，在自组装了己二硫醇的压电石英晶振上滴加 40 μL 的纳米金溶液，自组装纳米金层。

抗原固定化：将自组装纳米金层水洗干净后，滴加 10 μL S<sub>j</sub>Ag-SH 溶液到压电石英晶振上，37℃ 下温育 1 h，实现血吸虫抗原的吸附固定。

封闭：用磷酸盐缓冲盐水（PBS，pH 7.4，用 0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 配制）清洗后，滴加 20 μl BSA 溶液（0.1%，w/w）到压电石英晶振上封闭半小时，制备得到压电免疫传感器。

保存：将压电免疫传感器制保存在 4℃ 的冰箱中备用。

### 实施例 2：日本血吸虫抗体的检测

将制备的压电石英晶振传感器浸入一系列不同浓度的日本血吸虫抗体溶液中，37℃下培育1 h，然后用含0.1%（w/w）的氯化钠的PBS在磁力搅拌下清洗10 min，去除没有结合的抗体。再在压电石英晶振上滴加40 μL浓度为0.02 mg/mL的protein A-HRP，37℃下温育1 h，经PBS清洗后的压电石英晶振被放入压电检测槽中，并向槽中加入180 μL浓度为 $10^{-3}$  mol/L的4-氯-1-萘酚，当频率稳定时，用CN3165型高分辨计数器（石家庄无线电四厂）记下起始频率值。再向检测槽中加入20 μL的 $H_2O_2$ 溶液（ $10^{-3}$  M），20分钟后，记录压电石英晶振的频率变化值。通过线性回归分析，本传感器可在10~200 ng/mL范围内定量检测血吸虫抗体，检测下限5 ng/mL。结果表明，本传感器可以对血吸虫抗体进行准确的检测。

### 实施例 3：

利用本传感器对3例血吸虫病人和1例正常人的血液样品进行检测。将制备的压电石英晶振传感器浸入1:640倍稀释的血浆样品中，37℃下培育1 h，然后用含0.1%（w/w）的氯化钠的PBS在磁力搅拌下清洗10 min，去除没有结合的抗体。再在压电石英晶振上滴加40 μL浓度为0.02 mg/mL的protein A-HRP，37℃下温育1 h，经PBS清洗后的压电石英晶振被放入压电检测槽中，并向槽中加入180 μL浓度为 $10^{-3}$  mol/L的4-氯-1-萘酚，当频率稳定时，记下起始频率值。再向检测槽中加入20 μL的 $H_2O_2$ 溶液（ $10^{-3}$  M），20分钟后，记录压电石英晶振的频率变化值。正常血浆样品所引起的频率响应为5 Hz，为背景频率响应。病人血浆样品的响应频率分别为122、158和176 Hz，结果显示1:640倍稀释的血吸虫病人血浆样品仍有显著的响应频率，表明本传感器可以对血吸虫感染病人血浆样品进行准确的检测。

专利名称(译)	用于检测日本血吸虫的高灵敏质量放大压电免疫传感器及制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101149381A</a>	公开(公告)日	2008-03-26
申请号	CN200710036067.0	申请日	2007-11-07
[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	吴朝阳 沈国励 俞汝勤 吴箭		
发明人	吴朝阳 沈国励 俞汝勤 吴箭		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/561 G01N33/544 G01N33/531 G01N27/414		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检测日本血吸虫的高灵敏质量放大压电免疫传感器，包括压电石英晶振，组装在压电石英晶振上的纳米金层和固定在纳米金层上的巯基化日本血吸虫抗原。本发明利用酶催化沉积效应，使传感器界面的质量响应大大的提高，增强了传感器的灵敏度，提供了一种设备简单、价格低廉的高灵敏血吸虫抗体免疫传感检测技术。

