



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103913571 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 09

(21) 申请号 201410164371. 3

(22) 申请日 2014. 04. 22

(71) 申请人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市鼓楼区汉口路
22 号

申请人 南通明芯微电子有限公司

(72) 发明人 潘建斌 徐静娟 周明 陈洪渊

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 黄嘉栋

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 27/26 (2006. 01)

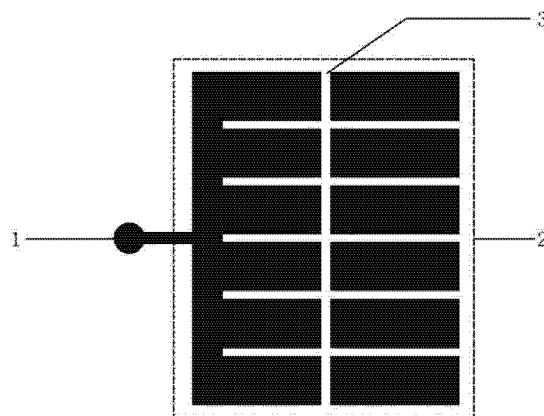
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

一种阵列断裂电极的免疫检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种阵列断裂电极的免疫检测方法,该方法以芯片为分析平台以阵列断裂电极作为检测电极,标记有贵金属纳米粒子的针对分析物的抗体在检测电极的间隙处形成二元或三元免疫复合物,银增强溶液在贵金属纳米粒子的催化作用下形成银沉积,形成具有不同阻抗的电极以形成不同的光电流信号,进而对待测物进行定量测量。本发明方法信号稳定、可比性强、灵敏度高、激发光波长和光电活性材料可选范围大,可以实现通量化分析。



1. 一种阵列断裂电极的免疫检测方法,其特征是利用银离子在不同浓度的贵金属纳米粒子的催化下沉积在断裂电极(gap electrode 或 split electrode)的间隙处,形成具有不同阻抗的电极,表达为不相同的光电流;它具体包括以下步骤:

步骤 1. 准备一台光致电化学分析仪;

步骤 2. 以覆盖有导电材料玻璃为芯片基材制作出所需的光电极和阵列断裂电极图形,其图形为光电极和阵列断裂电极的一端相连,所述的光电极为直径为 $5 \pm 1\text{mm}$ 的圆形,所述的阵列断裂电极宽度为 $8 \pm 2\text{mm}$,所述的断裂电极为具有小于 1mm 宽形成电断路间隙的断裂电极;(见图 1)

步骤 3. 将带有光致电化学池圆孔和阵列检测池小孔的聚二甲基硅氧烷(PDMS)薄片与芯片键合并使光致电化学池圆孔与光电极对齐形成光致电化学池,检测池小孔与芯片的检测位置对齐形成检测池,所述的检测位置是在每条阵列断裂电极相对于光致电化学池的断裂间隙另一端的断裂电极上;

步骤 4. 制备贵金属纳米粒子并将该粒子标记在针对待测物的一种抗体上;

步骤 5. 在检测池的底部固定上针对待测物的另一抗体分子或直接固定待测物分子;

步骤 6. 在检测池中加入待测物分子和步骤 4 中制备的标记有贵金属的抗体分子形成:标记有贵金属的抗体分子-待测分子-步骤 5 的另一抗体分子组成的三元夹心免疫复合物或只加入步骤 4 中制备的标记有贵金属的抗体分子以形成标记有贵金属的抗体分子和待测物分子组成的二元免疫复合物;

步骤 7. 在检测池中加入银增强溶液,15-20 分钟后去除检测池中的液体并用氮气吹干检测池;

步骤 8. 在光电化学池底部的电极上修饰光电活性物质;

步骤 9. 将芯片与光电流测量仪连接好并将芯片置于光致电化学平台上,启动光源即可以测量信号。

2. 根据权利要求 1 所述的阵列断裂电极的免疫检测方法,其特征是:所述的断裂电极的间隙为纳米至微米级。

3. 根据权利要求 1 所述的阵列断裂电极的免疫检测方法,其特征是:所述的贵金属纳米粒子的直径为纳米级。

4. 根据权利要求 1 所述的阵列断裂电极的免疫检测方法,其特征是:所述的贵金属纳米粒子为金纳米粒子或银纳米粒子。

5. 根据权利要求 1 所述的阵列断裂电极的免疫检测方法,其特征是:所述的电极上修饰的光电活性物质是 CdS 量子点。

6. 根据权利要求 1 所述的阵列断裂电极的免疫检测方法,其特征是:所述的待测物是有机化合物、核苷酸、核糖核酸、脱氧核糖核酸、单糖、多糖、氨基酸、多肽或蛋白质。

一种阵列断裂电极的免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及光电免疫检测技术,是一种利用光电技术和银增强效应的免疫检测方法。

背景技术

[0002] 高通量、微型化、便携化一直是免疫分析的研究热点之一。光致电化学过程是指光电活性材料因吸收光子而使电荷产生转移,从而形成光电流。

[0003] 迄今为止用于光致电化学分析的装置均为自行搭建,存在体积庞大、结构复杂等缺点。难以实现高通量、微型化、便携化。

[0004] 芯片装置具有试剂消耗少,方便快捷等优点,另外,多种功能可以实现集成在一块芯片上。目前,未见有将芯片技术应用于光致电化学检测的报道。

[0005] 利用光电技术进行免疫检测都是将抗原抗体直接固定在在光电极上,激发光直接照射在被分析物上。这种做法一方面会导致免疫分析被光照照射后产生变性,而致其实光电信号不能真实地反应出分析物的量;另一方面,免疫分析直接固定在电极表面上的光电材料时容易影响其表面形貌,而致光电信号前后的可比性降低。

发明内容

[0006] 本发明的目的是公开一种阵列断裂电极的免疫检测方法,通过克服现有技术信号不稳定、操作烦琐、不能高通量及体系复杂的问题。建立一种可以实现高灵敏度检测的新型光致电化学免疫检测方法,该方法背景信号低,信噪比高,可以满足痕量物质的检测要求。

[0007] 为达到上述目的,本发明的技术解决方案是:

[0008] 一种阵列断裂电极的免疫检测方法,其利用银离子在不同浓度的贵金属纳米粒子的催化下沉积在断裂电极(gap electrode 或 split electrode)的间隙处,形成具有不同阻抗的电极,表达为不相同的光电流;包括以下步骤:

[0009] 步骤 1. 准备一台光致电化学分析仪;

[0010] 步骤 2. 以覆盖有导电材料玻璃为芯片基材制作出所需的光电极和阵列断裂电极图形,其图形为光电极和阵列断裂电极的一端相连,所述的光电极为直径为 $5 \pm 1\text{mm}$ 的圆形,所述的阵列断裂电极宽度为 $8 \pm 2\text{mm}$,所述的断裂电极为具有小于 1mm 宽形成电断路间隙的断裂电极;(见图 1)

[0011] 步骤 3. 将带有光致电化学池圆孔和阵列检测池小孔的聚二甲基硅氧烷(PDMS)薄片与芯片键合并使光致电化学池圆孔与光电极对齐形成光致电化学池,检测池小孔与芯片的检测位置对齐形成检测池,所述的检测位置是在每条阵列断裂电极相对于光致电化学池的断裂间隙另一端的断裂电极上;

[0012] 步骤 4. 制备贵金属纳米粒子并将该粒子标记在针对待测物的一种抗体上;

[0013] 步骤 5. 在检测池的底部固定上针对待测物的另一抗体分子或直接固定待测物分子;

[0014] 步骤 6. 在检测池中加入待测物分子和步骤 4 中制备的标记有贵金属的抗体分子形成：标记有贵金属的抗体分子-待测分子-步骤 5 的另一抗体分子组成的三元夹心免疫复合物或只加入步骤 4 中制备的标记有贵金属的抗体分子以形成标记有贵金属的抗体分子和待测物分子组成的二元免疫复合物；

[0015] 步骤 7. 在检测池中加入银增强溶液，15-20 分钟后去除检测池中的液体并用氮气吹干检测池；

[0016] 步骤 8. 在光电化学池底部的电极上修饰光电活性物质；

[0017] 步骤 9. 将芯片与光电流测量仪连接好并将芯片置于光致电化学平台上，启动光源即可以测量信号。

[0018] 上述的阵列断裂电极的免疫检测方法，所述的断裂电极的间隙为纳米至微米级。

[0019] 上述的阵列断裂电极的免疫检测方法，所述的贵金属纳米粒子的直径为纳米级。

[0020] 上述的阵列断裂电极的免疫检测方法，所述的贵金属纳米粒子为金纳米粒子或银纳米粒子。

[0021] 上述的阵列断裂电极的免疫检测方法，所述的电极上修饰的光电活性物质是 CdS 量子点。

[0022] 上述的阵列断裂电极的免疫检测方法，所述的待测物是有机化合物、核苷酸、核糖核酸、脱氧核糖核酸、单糖、多糖、氨基酸、多肽、或蛋白质。

[0023] 上述的阵列断裂电极的免疫检测方法，所述的光致电化学分析仪为一种光致电化学光电流检测装置，它有一个暗室箱体，在暗室的底部装置有光路向上的发光二极管 LED 灯，此 LED 灯有导线连接的设在暗室外的 LED 灯光强控制单元，在 LED 灯的光路上有 LED 灯聚光单元，该聚光单元能调节 LED 灯的聚光光斑的大小，在聚光单元的光路前方有一光电化学池支架，支架上平稳的、自由的放有光电化学池，光电化学池为石英材质制成，其受光面对准 LED 灯发出的激发光的中心，在光电化学池中置有工作电极、参比电极和对电极组成的三电极体系，该三电极体系与设置在暗室外的电化学工作站相连；电化学工作站向三电极体系提供能预设的恒定电压，并可记录相应产生的电化学电流（光电流）；电化学工作站与计算机相连，计算机用于光电流实验参数的设置和数据采集（参见：专利申请“一种光致电化学光电极检测装置”（申请号：201310473553.4）相同。

[0024] 本发明与现有其它方法相比具有以下优点：

[0025] 1) 目前光致电化学免疫检测方法，均是将免疫分子固定在光电活性材料上，这种检测方法的信号前后可比性、重现性不佳。本发明将检测电极与光电极分离，光电材料表面不受损伤，大大提高了数据的可比性和重现性。

[0026] 2) 在目前流行的光致电化学免疫检测中，均没有将芯片与之相结合，很难实验高通量分析。本发明将芯片与光致电化学相结合，实现了通量化免疫检测。

[0027] 3) 在现有光致电化学免疫分析中，检测过程中，分析物均被激发光照射，一些分析物易被照射而变性而影响检测信号，故这种方法限制了一些波长的光和一些光电活性物质的应用。本发明实现了检测电极与光电极的有效分离，有效地防止了分析物被光照、提高了信号的稳定性、扩展了光电活性物质的选择范围。

附图说明

[0028] 图1为本发明的基材上光电极和阵列断裂电极示意图。1为光电极；2为断裂电极（6个），3为断裂电极间隙。

[0029] 图2为本发明的布局结构图，其中4为芯片；5为光致电化学分析仪；6为光致电化学池；7为检测池；8为参比电极；9为对电极；10为电化学工作站。

[0030] 图3为本发明的断裂电极导通原理图，其中11为玻璃；12为前列腺癌第一抗体；13为前列腺癌抗原；14为前列腺癌第二抗体；15为导体部分；16为贵金属纳米粒子；17为沉积银。

[0031] 图4为本发明的阵列断裂电极的免疫检测方法流程图。

[0032] 图5为本发明的检测信号图，其中a为没有加入分析物时的曲线；b为分析物浓度为10ng/ml时的信号；c为析物浓度为100ng/ml时的信号。

具体实施方式

[0033] 实施例1：

[0034] 本发明方法在实施过程中使用的试剂包括以下几种成分：标记有贵金属的纳米粒子的抗体，抗体及待测抗原，光致电化学反应所需的电子供体溶液以及银增强溶液。使用的装置包括光致电化分析仪、多通道电化学工作站。

[0035] 以金纳米粒子、前列腺癌抗原和抗体、CdS量子点为例，来说明本发明方法的具体实施流程：

[0036] 芯片的制作

[0037] 断裂电极是一段用于检测的不连续导体，在其间隙处，当分析物参与的反应对断裂电极产生一定程度的导通时，可测量通过该导体的电流来度量分析物的量（参见：Chia-Hsien Yeh；Wei-Ting Chen；Hong-Ping Lin；Tsung-Chain Chang；Yu-Cheng Lin, Development of an immunoassay based on impedance measurements utilizing an antibody-nanosilver probe, silver enhancement, and electro-microchip. Sensors and Actuators B-Chemical 2009, 139(2), 387-393.）。

[0038] （一）芯片基材电极的制备和二甲基硅氧烷（PDMS）薄片的键合

[0039] （1）图形绘制

[0040] 用Coreldraw绘图软件画好光电极的图形，一个直径5mm光电极和6个宽度为8mm检测电极分布在两侧，光电极和6个检测电极的一端都是相联的，检测电极的中间有一间隙，其间距大小为0-1mm。

[0041] （2）印刷

[0042] 将（1）中制好的图形转移到丝网上，把63mm×63mm氧化铟锡（ITO）导电玻璃固定在带有电极图形的丝网下面，在丝网的上面刷上油墨即将电极图形转移到在ITO导电玻璃上，在阴处凉干油墨。

[0043] （3）腐蚀

[0044] 将上述附有油墨的ITO玻璃浸入37℃ITO腐蚀液（15%盐酸溶液）15分钟，取出ITO玻璃并用水冲洗干净。

[0045] （4）去油墨

[0046] 把（3）中的ITO玻璃浸入到10%氢氧化钠溶液中约15分钟，取出用水冲洗干净即

得 ITO 电极的玻璃芯片。

[0047] (5) 二甲基硅氧烷 (PDMS) 薄片制作

[0048] 取 PDMS15g, 固化剂 1.5g, 混合均匀, 真空脱气倒入培养皿中, 水平地置于 80℃ 的加热台上加热 1 小时, 待其冷却后将 PDMS 从培养皿中剥离并用手术刀切成约 50mm×63mm 大小。用打孔器在对应用于光电极的位置开直径为 6mm 的圆形孔, 在对应用于检测位置开 3mm×6mm 的孔。

[0049] (6) 键合

[0050] 将洁净的 ITO 电极的玻璃基片和带有孔的 PDMS 薄片进行可逆性键合形成光电池和检测池, 即得芯片。

[0051] (二) 平均直径为 16nm 的金纳米粒子的合成:

[0052] 将 100ml 的质量百分浓度为 0.01% 的氯金酸水溶液搅拌加热至微沸状态, 迅速加入 5ml 质量百分浓度为 1% 的柠檬酸三钠水溶液, 溶液会变成酒红色, 继续搅拌并自然冷却, 4℃ 保存备用。

[0053] (三) 前列腺癌第二抗体的标记:

[0054] 取浓度为 100 μg/ml 的前列腺癌二抗 100 μl 加入 2ml 的上述金纳米粒子中, 充分振摇后于 25℃ 放置 20min, 再加入 150 μl 浓度为 1mg/ml 的牛血清蛋白 (BSA), 充分振摇, 25℃ 放置 20min。然后将其在转速为 14000rpm 离心 10min, 弃去上清液, 将沉淀物重新分散于 500 μl 的纯水中, 4℃ 贮藏备用。

[0055] (四) 芯片的修饰和免疫复合物的制备:

[0056] 在芯片的检测池中加入 5% (3-氨基丙基) 三乙氧基硅烷 (APTES) 乙醇溶液, 37℃ 放置 2 小时, 用乙醇清洗二次并用氮气吹干。加入 5% 戊二醛 (GA) (以 50mM 磷酸盐缓冲液, pH7.6 为溶剂), 37℃ 放置 2 小时, 用水清洗两次, 氮气吹干。再加入浓度为 20 μg/ml 的前列腺癌第一抗体, 37℃ 孵化 4 小时, 用磷酸盐缓冲液清洗两次, 氮气吹干, 在五个检测池中加入不同已知浓度 (1ng, 10ng, 100ng, 1000ng, 10000ng, 100000ng) 的前列腺癌抗原 (待测物), 一个检测池中加入未知浓度的前列腺癌抗原 (待测物), 于 37℃ 孵化 2 小时, 用磷酸盐缓冲液清洗两次, 氮气吹干, 注入 (3) 中的标记有金纳米粒子的第二抗体, 37℃ 孵化 2 小时, 用磷酸盐缓冲液清洗两次, 氮气吹干, 最后加入银增强溶液。用水清洗两次, 氮气吹干。

[0057] (五) CdS 量子点的合成:

[0058] 取 50ml 浓度为 1.0×10^{-2} mol/L 的氯化镉 (CdCl₂) 水溶液, 置 100ml 三颈瓶中, 搅拌并通入氮气, 再注入 250 μl 巯基乙酸, 搅拌均匀后, 用 1.0mol/L 的氢氧化钠 (NaOH) 溶液调节上述溶液 pH 至 11.0, 氮气持续 30min 后, 加入 5.0mL 浓度为 0.1mol/L 的硫化钠水溶液, 回流 4 小时, 然后撤去热源自然冷却即得。4℃ 贮藏备用。

[0059] (六) 光电极的修饰:

[0060] 在光致电化学池中加入 2% 聚 (二烯丙基二甲基氯化铵) (PDMA) 溶液 50 μl, 10 分钟后, 小心用水清洗三次, 氮气吹干, 加入 (5) 中制备的 CdS 量子点, 10 分钟后, 小心用水清洗三次, 氮气吹干后加入 2% (PDMA) 溶液 50 μl, 10 分钟后, 小心用水清洗三次, 氮气吹干, 如此反复三次即得。

[0061] (七) 光电流的测量:

[0062] 将处理好的芯片置于光致电化学分析平台上, 按图 1 连接好 1030a 型电化学工作

站和各导线,在光致电化学池中注入 0.1mol/L 的抗坏血酸水溶液,开启光源和电化学工作站测量光电流信号,根据五个已知浓度的前列腺癌抗原的电流信号制作标准曲线,根据未知浓度的前列腺癌抗原的电流信号测得待测前列腺癌抗原的浓度。

[0063] 本发明通过特异性的生物亲和反应和贵金属纳米粒子对银离子的催化沉积作用,形成具有不同阻抗的电极,表达为不同的光电流信号,进而对待测物进行定量测量。与现有光致电化学分析方法相比,该方法具有激发光和光电活性物质的选择范围宽,信号稳定、可比性强并可进行实现高通量检测等优点,可以用于环境化学污染、药物、激素、抗体、蛋白质、核酸等各类物质的高灵敏检测。

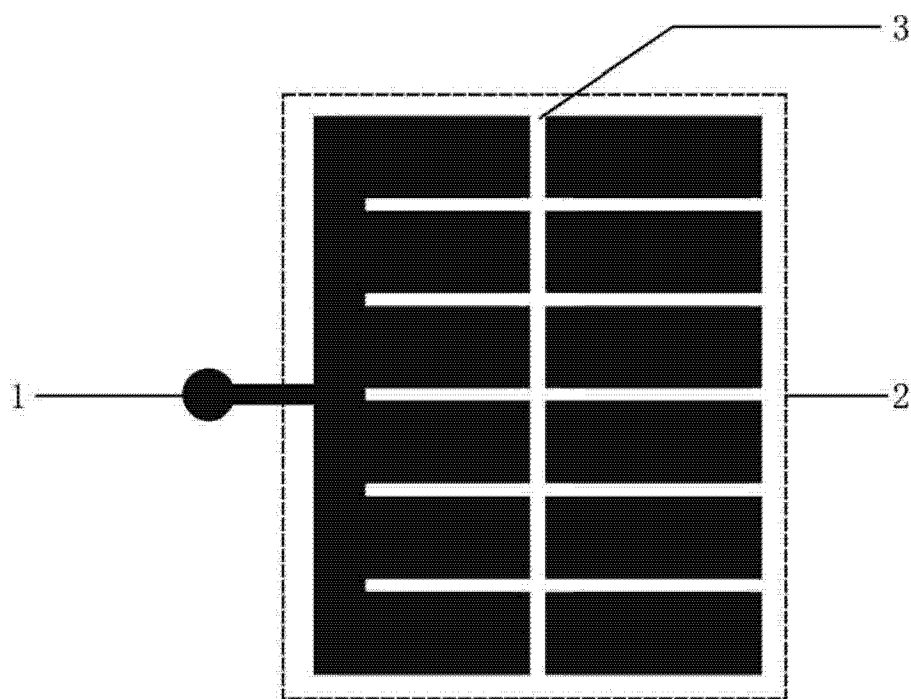


图 1

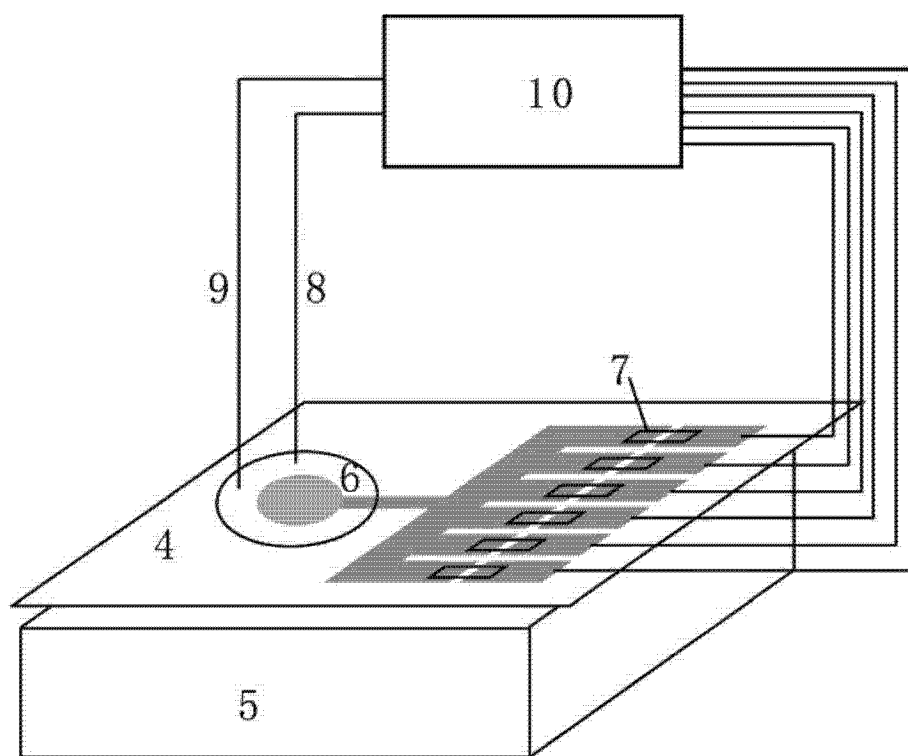


图 2

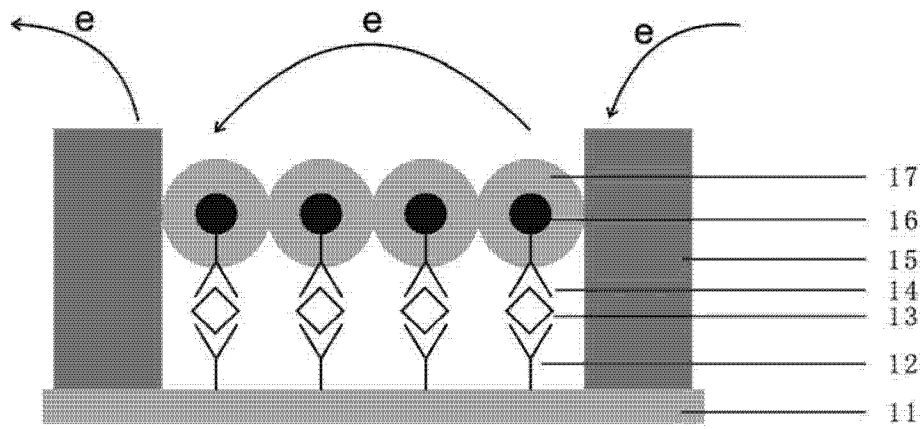


图 3

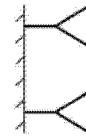
1) 制备贵金属纳米粒子



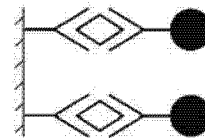
2) 抗体的标记



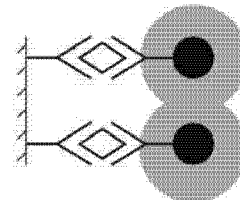
3) 抗原或抗体在检测池中固定



4) 加入待测物和标记的抗体



5) 加入银增强溶液



6) 用光电材料修饰光电极，信号测量

图 4

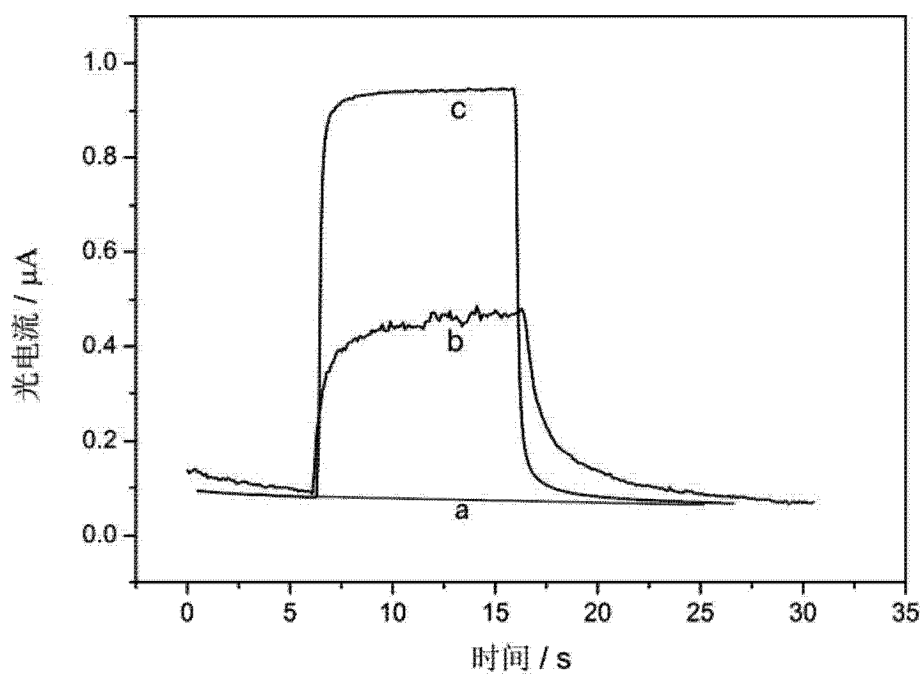


图 5

专利名称(译)	一种阵列断裂电极的免疫检测方法		
公开(公告)号	CN103913571A	公开(公告)日	2014-07-09
申请号	CN201410164371.3	申请日	2014-04-22
[标]申请(专利权)人(译)	南京大学 南通明芯微电子有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京大学 南通明芯微电子有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京大学 南通明芯微电子有限公司		
[标]发明人	潘建斌 徐静娟 周明 陈洪渊		
发明人	潘建斌 徐静娟 周明 陈洪渊		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531 G01N27/26		
CPC分类号	G01N33/54346 G01N33/54393 G01N33/588		
其他公开文献	CN103913571B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种阵列断裂电极的免疫检测方法，该方法以芯片为分析平台以阵列断裂电极为检测电极，标记有贵金属纳米粒子的针对分析物的抗体在检测电极的间隙处形成二元或三元免疫复合物，银增强溶液在贵金属纳米粒子的催化作用下形成银沉积，形成具有不同阻抗的电极以形成不同的光电信号，进而对待测物进行定量测量。本发明方法信号稳定、可比性强、灵敏度高、激发光波长和光电活性材料可选范围大，可以实现通量化分析。

