

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 27/327 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510033977.4

[45] 授权公告日 2007年9月12日

[11] 授权公告号 CN 100337112C

[22] 申请日 2005.4.6

[21] 申请号 200510033977.4

[73] 专利权人 暨南大学

地址 510632 广东省广州市天河区黄埔大道西 601 号

[72] 发明人 蔡继业 曾谷城 杨培慧 郑志雯

[56] 参考文献

US2003119208A1 2003.6.26

CN1101253C 2003.2.12

Covalent coupling Immunoglobulin G to self-assembled monolayers at a method for immobilizing the interfacial - recognition layer of a surface plasma resonance immunosensor Darren M D, Biosensors and Bioelectronics, Vol. 13 No. 11 1998

电流型转铁蛋白免疫传感器的研究 刘成霞, 曹轩, 雷存喜, 沈国励, 俞汝勤, 分析化学研究报告, 第 32 卷第 9 期 2004

审查员 罗倩

[74] 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司

代理人 王东亮

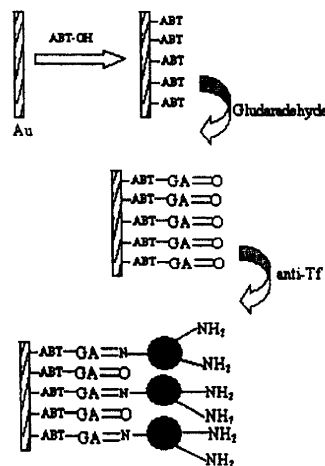
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

[54] 发明名称

用于检测转铁蛋白的免疫电极的制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种用于转铁蛋白检测的免疫电极的制备方法, 包括金电极的预处理、2-氨基苯硫醇低聚物层的形成、金电极与戊二醛偶合、金电极的免疫试剂共价固定等步骤。该方法制备的免疫电极对含铁转铁蛋白的检测灵敏度可达 0.04ng/ml 低限。



1、一种用于检测转铁蛋白的免疫电极的制备方法，其特征是：所述的制备方法按如下具体步骤进行：

(1) 金电极的预处理：

将金电极用 $<0.05\ \mu\text{m}$ 的三氧化二铝粉末抛光，然后在二次水和乙醇中超声清洗15min，最后用0.5M硫酸在-0.4~1.2V范围内反复扫描，直到获得重复性的伏安信号；

(2) 2-氨基苯硫醇低聚物层的形成：

将0.5M的2-氨基苯硫醇溶液用99.99% $\text{N}_2$ 除氧5min，将干净的金电极放在10mL0.5M的上述2-氨基苯硫醇溶液中浸泡24h，浸泡温度为26~32 $^{\circ}\text{C}$ ，然后将金电极表面用乙醇和二次水清洗，再将金电极浸入pH7.4的磷酸盐缓冲液溶液中，在-0.8~0.6V之间循环扫描25次进行聚合；

(3) 金电极与戊二醛偶合：

将含有15% (w/w) 戊二醛溶液，用5%盐酸调至pH1.84，再用99.99% $\text{N}_2$ 除氧5min.后得偶合溶液，将经步骤(2)处理后的金电极插入上述偶合溶液中24h，反应温度为26~32 $^{\circ}\text{C}$ ，进行低聚物修饰，再用二次水清洗；

(4) 金电极的免疫试剂共价固定：

在4 $^{\circ}\text{C}$ 下，将2-氨基苯硫醇与戊二醛的偶合层修饰的金电极浸泡于含有89ng/mL转铁蛋白抗血清的、pH为7.4的磷酸盐缓冲液溶液中12h，然后将嵌入抗体的金电极浸泡于5% (v/v) 乙胺溶液中，至完全阻断电极表面未反应的羰基为止，再用二次水冲洗，制得免疫电极。

---

### 用于检测转铁蛋白的免疫电极的制备方法

#### 技术领域:

本发明公开了一种免疫电极的制备方法,特别是利用分子自组装技术制备用于检测转铁蛋白的免疫电极的方法。

#### 背景技术:

2000年 G. Shen 及其合作者在《Analyst》(125卷 1595—1599页)报道了一种基于石蜡—石墨—转铁蛋白生物组分包埋的安培分析免疫传感器。他们首先将石蜡溶解于乙醚中,然后加入石墨粉,再加入转铁蛋白和牛血清白蛋白的混合物,等乙醚挥发以后,将其压入PVC管中,制得免疫电极,结果对含铁转铁蛋白的检测限为 $2.36\mu\text{g/ml}$ 。由于该法应用石蜡与石墨的混合以及转铁蛋白的包埋制得免疫电极,无法在分子水平上控制免疫电极各构造物质的最佳反应结合,从而限制了免疫电极实现更高灵敏度的检测。

#### 发明内容:

本发明的目的就是公开一种利用分子自组装技术制备高灵敏度的检测转铁蛋白免疫电极的方法。

本发明的检测转铁蛋白的免疫电极的制备方法是以如下技术方案实现的。首先制备出表面平整抛光的金电极基底,然后在金电极基底上自组装上一层2-氨基苯硫醇低聚物,然后用戊二醛偶合2-氨基苯硫醇低聚物,最后在戊二醛上自组装一层转铁蛋白抗血清。

本发明的检测转铁蛋白的免疫电极,由于制备是在单分子水平上的分子之间识别和结合,使得免疫电极具有高度平整的分子间界面,电极表面分子活性点整齐向外排列,从而能与被检测物高度结合,结果对含铁转铁蛋白的检测灵敏度大幅提高至 $0.04\text{ng/ml}$ 。

#### 附图说明:

图1是本发明的用于检测转铁蛋白的免疫电极的制备原理图。

具体实施例：

高灵敏度是免疫电极的最终要求，下面结合附图对本发明的用于转铁蛋白检测的高灵敏度免疫电极的制备作进一步的详细描述。本发明可以选择如下所述仪器与试剂：

1、970CRT 荧光分光光度计（上海分析仪器总厂）；UV-1100 紫外可见分光光度计（北京瑞利分析仪器公司）；CHI 660A 电化学工作站（上海辰华仪器公司）；Autolab serial nr. AUT71374（Eco Chemied B.V.Urecht, The Netherlands），GPES 4.8 电位处理软件；PHS-3C 型精密 pH 计（上海雷磁仪器厂）；DL-120 超声波清洗机；十万分之一天平（德国 Sartorius）；三电极体系：金电极（直径 1mm）为工作电极，饱和甘汞电极为参比电极，铂丝电极为辅助电极。

2、含铁转铁蛋白（holo-Tf），纯度>98%，美国 Sigma 公司生产；脱铁转铁蛋白（apo-Tf），美国 Sigma 公司生产；转铁蛋白抗血清（anti-Tf），效价 1：40，上海生化试剂公司生产；戊二醛（Glutaraldehyde, GA）（25%水溶液）；2-氨基苯硫醇（O-ABT），纯度 99%，浙江寿尔福化学有限公司。

3、磷酸盐缓冲液（PBS）（pH7.4）：8mMNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-2mMNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>；Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>或 Fe(CN)<sub>6</sub><sup>2-</sup>溶液用含有 1mM 的 Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>或 Fe(CN)<sub>6</sub><sup>2-</sup>PBS 溶液（pH7.4）；甘氨酸，其余试剂除注明外均为分析纯，实验用水为二次蒸馏水。

本发明的免疫电极的具体制备步骤如下：

### 1、金电极的预处理

金电极用<0.05 μm 的 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 粉末抛光，然后在二次水和乙醇中超声清洗 15min，最后用 0.5MH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 在-0.4~1.2V 范围内反复扫描，直到获得重复性的伏安信号。

这些处理过程，确保了免疫电极有一个结构均匀平整的基底。

### 2、2-氨基苯硫醇低聚物层的形成

将 0.5M 的 2-氨基苯硫醇溶液用 99.99%N<sub>2</sub> 除氧 5min，把干净的金电极放在 10mL0.5M 的 2-氨基苯硫醇溶液中、温度为 26~32℃，浸泡 24h 后，再将金电极表面用乙醇和二次水清洗，然后将金电极浸入 pH7.4PBS 溶液中，在-0.8~0.6V 之间循环扫描 25 次进行聚合。

### 3、金电极与戊二醛偶合：

将含有 15% (w/w) 戊二醛的溶液用 5% HCl 调至 pH 1.84, 用 99.99% N<sub>2</sub> 除氧 5min., 将金电极插入偶合溶液中 24h, 反应温度为 26~32°C, 之后再用二次水清洗。

#### 4、金电极的免疫试剂共价固定:

在 4°C 下, 将上述 2-胺基苯硫醇与戊二醛的偶合层修饰的金电极浸泡于含有 89ng/mL 转铁蛋白抗血清 (anti-Tf)、pH 为 7.4 的 PBS 溶液中 12h, 然后将嵌入抗体后的金电极浸泡于 5% (v/v) 乙胺溶液中, 至完全阻断电极表面未反应的羰基为止, 再用二次水冲洗后, 制得免疫电极。

#### 免疫电极的检验:

将含有一定量的脱铁转铁蛋白或含铁转铁蛋白的 5ml 电解池中插入三电极, 用电位阶跃法测得电流与时间的变化, 然后用 Metlab 语言程序根据最小二乘法原理将数据进行拟和后得出直线, 求出线性方程中的电容值。结果表明: 利用分子自组装, 调节分子浓度和组装时间, 去除非特异性组装分子, 从而使得分子实现在单分子水平上的最佳结合比, 活性基团结尾整齐排列, 活性点比率高, 从而实现免疫电极灵敏度大幅提高。本发明首次对脱铁转铁蛋白进行了检测, 获得了目前为止对转铁蛋白目前为止最低的检测限: 脱铁转铁蛋白为 0.15ng/ml; 含铁转铁蛋白为 0.04ng/ml。达到了大幅度提高免疫电极检测能力的目的, 利用分子自组装技术制得的免疫电极解决了如何提高免疫电极灵敏度的问题。

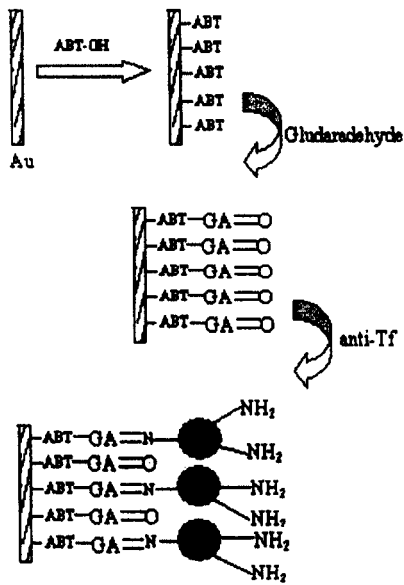


图 1

