



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104849442 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 19

---

(21) 申请号 201410055094. 2

(22) 申请日 2014. 02. 18

(71) 申请人 周亚民

地址 523808 广东省东莞市松山湖大学路 1  
号东莞理工学院教师村 12 栋 2 单元  
702 房

(72) 发明人 周亚民

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

---

权利要求书1页 说明书2页

(54) 发明名称

一种检测爱德华氏菌病抗体的电化学发光免疫传感器

(57) 摘要

本发明公开了一种检测爱德华氏菌病抗体的电化学发光免疫传感器。通过 Nafion 膜将失活爱德华氏菌组织固定在电极表面，在含 1%BSA 的磷酸盐缓冲液清洗，构置出检测爱德华氏菌病抗体的电化学发光免疫传感器，传感器利用竞争酶联免疫检测原理和电化学发光方法实现对爱德华氏菌病抗体的测定。传感器放入含有爱德华氏菌病抗体和葡萄糖氧化酶(GOD)标记爱德华氏菌病抗体培养液中培育，通过免疫反应结合到电极上的葡萄糖氧化酶(GOD)标记爱德华氏菌病抗体随待测物质浓度增加而降低，标记的 GOD 催化氧化葡萄糖产生  $H_2O_2$ ，并促使鲁米诺(Luminol)产生电化学发光(ECL)信号，电化学发光信号随爱德华氏菌病抗体浓度的增加而降低。该传感器对爱德华氏菌病抗体响应良好。

1. 一种检测爱德华氏菌病抗体的电化学发光免疫传感器,其特征在于通过 Nafion 膜将失活爱德华氏菌组织固定在电极表面,在含 1%BSA 的磷酸盐缓冲液清洗,构置出检测爱德华氏菌病抗体的电化学发光免疫传感器,具体包括如下步骤:

(a) 将失活爱德华氏菌组织加入到 Nafion 乙醇溶液中,然后分一步或者多步取适量的溶液涂覆在电极表面上,在空气中干燥后在含 1%BSA 的磷酸盐缓冲液清洗即得电化学发光传感器的工作电极;

(b) 将传感器的工作电极放入含有爱德华氏菌病抗体和葡萄糖氧化酶(GOD)标记爱德华氏菌病抗体培养液中培育,用洗液冲洗传感器表面,去掉非特异性吸附物质后,放入电化学测试溶液中,溶液为包含 1mol/L 的葡萄糖、0.6mmol/L 的鲁米诺的 0.05mol/L 的 Tris-HCl (pH 为 8.5),采用三电极系统进行测试,测量 ECL 的强度。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述在 Nafion 乙醇溶液中的 Nafion 含量在 0.1%~2% 范围内选择。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述 Nafion 乙醇溶液中失活爱德华氏菌组织的含量在 0.1%~2% 范围内选择。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述含有失活爱德华氏菌组织的 Nafion 乙醇溶液在电极表面的铺展量在 0.1ml/cm<sup>2</sup>~10ml/cm<sup>2</sup> 范围内选择。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述工作电极为玻碳电极、金电极、铂电极中的任意一种。

## 一种检测爱德华氏菌病抗体的电化学发光免疫传感器

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于检测爱德华氏菌病抗体的电化学发光免疫传感器

### 背景技术

[0002] 爱德华氏菌病又称肝肾病,是由爱德华氏菌感染鳗鲡、红鳍东方鲀、斑点叉尾鮰、罗非鱼、加州鲈、鲻鱼等多种鱼类,引起肾脏、肝脏脓疡病灶的疾病。爱德华氏菌分布广泛,全国各地都有发生。爱德华氏菌病流行于高水温期,自晚春至秋季均有发生,夏季为流行盛期,严重时可引起病鱼大批死亡。电化学发光 (ECL) 是一种在电极表面由电化学引发的特异性化学发光反应,包括了电化学和化学发光两个过程。将 ECL 和免疫反应相结合的电化学发光免疫传感器检测灵敏度高、特异性强、检测速度快。

### 发明内容

[0003] 本发明目的在于制作一种用于检测爱德华氏菌病抗体的电化学发光免疫传感器,通过 Nafion 膜将失活爱德华氏菌组织固定在电极表面,在含 1%BSA 的磷酸盐缓冲液清洗,构置出检测爱德华氏菌病抗体的电化学发光免疫传感器,具体包括如下步骤:

[0004] (a) 将失活爱德华氏菌组织加入到 Nafion 乙醇溶液中,然后分一步或者多步取适量的溶液涂覆在电极表面上,在空气中干燥后在含 1%BSA 的磷酸盐缓冲液清洗即得电化学发光传感器的工作电极;

[0005] (b) 将传感器的工作电极放入含有爱德华氏菌病抗体和葡萄糖氧化酶 (GOD) 标记爱德华氏菌病抗体培养液中培育,用洗液冲洗传感器表面,去掉非特异性吸附物质后,放入电化学测试溶液中,溶液为包含 1mol/L 的葡萄糖、0.6mmol/L 的鲁米诺的 0.05mol/L 的 Tris-HCl (pH 为 8.5),采用三电极系统进行测试,测量 ECL 的强度。

[0006] 标记在爱德华氏菌病抗体上的葡萄糖氧化酶 (GOD) 催化氧化葡萄糖生成过氧化氢,并促使溶液中的 Luminol 产生电化学发光 (ECL) 信号。通过竞争吸附免疫反应,随着爱德华氏菌病抗体浓度的增大,吸附到电极表面的 GOD 量降低,电化学发光信号变弱,在一定范围内可以用来检测爱德华氏菌病抗体浓度。

### 具体实施方式

[0007] 实施例 1

[0008] 电极为玻碳电极, Nafion 乙醇溶液中的 Nafion 含量在 1%, 失活爱德华氏菌组织在 Nafion 乙醇溶液中的含量为 1%, 含有失活爱德华氏菌组织的 Nafion 乙醇溶液在电极表面的铺展量为 0.5ml/cm<sup>2</sup>, 涂覆在电极表面上溶液在空气中干燥, 然后在含 1%BSA 的磷酸盐缓冲液清洗即得电化学发光传感器的工作电极。将传感器放入含有爱德华氏菌病抗体和葡萄糖氧化酶 (GOD) 标记爱德华氏菌病抗体培养液中培育, 培育液中葡萄糖氧化酶 (GOD) 标记爱德华氏菌病抗体浓度为 160 μg/ml, 培育温度为 40℃, 培育 50 分钟, 用洗液冲洗传感器表面, 去掉非特异性吸附物质后, 放入电化学测试溶液中, 溶液为包含 1mol/L 的葡萄

糖、0.6mmol/L 的鲁米诺的 0.05mol/L 的 Tris-HCl (pH 为 8.5), 采用三电极系统进行测试, 测量 ECL 的强度, 绘制标准曲线, 对爱德华氏菌病抗体检测范围为 3.5 ~ 500  $\mu$  g/ml。

[0009] 实施例 2

[0010] 电极为玻碳电极, Nafion 乙醇溶液中的 Nafion 含量在 1%, 失活爱德华氏菌组织在 Nafion 乙醇溶液中的含量为 2%, 含有失活爱德华氏菌组织的 Nafion 乙醇溶液在电极表面的铺展量为 2ml/cm<sup>2</sup>, 涂覆在电极表面上溶液在空气中干燥, 然后在含 1%BSA 的磷酸盐缓冲液清洗即得电化学发光传感器的工作电极。将传感器放入含有爱德华氏菌病抗体和葡萄糖氧化酶(GOD)标记爱德华氏菌病抗体培养液中培育, 培育液中葡萄糖氧化酶(GOD)标记爱德华氏菌病抗体浓度为 120  $\mu$  g/ml, 培育温度为 40℃, 培育 90 分钟, 用洗液冲洗传感器表面, 去掉非特异性吸附物质后, 放入电化学测试溶液中, 溶液为包含 1mol/L 的葡萄糖、0.6mmol/L 的鲁米诺的 0.05mol/L 的 Tris-HCl (pH 为 8.5), 采用三电极系统进行测试, 测量 ECL 的强度, 绘制标准曲线, 对爱德华氏菌病抗体检测范围为 1.5 ~ 330  $\mu$  g/ml。

[0011] 实施例 3

[0012] 电极为玻碳电极, Nafion 乙醇溶液中的 Nafion 含量在 1%, 失活爱德华氏菌组织在 Nafion 乙醇溶液中的含量为 0.5%, 含有失活爱德华氏菌组织的 Nafion 乙醇溶液在电极表面的铺展量为 5ml/cm<sup>2</sup>, 涂覆在电极表面上溶液在空气中干燥, 然后在含 1%BSA 的磷酸盐缓冲液清洗即得电化学发光传感器的工作电极。将传感器放入含有爱德华氏菌病抗体和葡萄糖氧化酶(GOD)标记爱德华氏菌病抗体培养液中培育, 培育液中葡萄糖氧化酶(GOD)标记爱德华氏菌病抗体浓度为 180  $\mu$  g/ml, 培育温度为 40℃, 培育 30 分钟, 用洗液冲洗传感器表面, 去掉非特异性吸附物质后, 放入电化学测试溶液中, 溶液为包含 1mol/L 的葡萄糖、0.6mmol/L 的鲁米诺的 0.05mol/L 的 Tris-HCl (pH 为 8.5), 采用三电极系统进行测试, 测量 ECL 的强度, 绘制标准曲线, 对爱德华氏菌病抗体检测范围为 7 ~ 800  $\mu$  g/ml。

专利名称(译)	一种检测爱德华氏菌病抗体的电化学发光免疫传感器		
公开(公告)号	<a href="#">CN104849442A</a>	公开(公告)日	2015-08-19
申请号	CN201410055094.2	申请日	2014-02-18
[标]申请(专利权)人(译)	周亚民		
申请(专利权)人(译)	周亚民		
当前申请(专利权)人(译)	周亚民		
[标]发明人	周亚民		
发明人	周亚民		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/76		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种检测爱德华氏菌病抗体的电化学发光免疫传感器。通过Nafion膜将失活爱德华氏菌组织固定在电极表面，在含1%BSA的磷酸盐缓冲液清洗，构置出检测爱德华氏菌病抗体的电化学发光免疫传感器，传感器利用竞争酶联免疫检测原理和电化学发光方法实现对爱德华氏菌病抗体的测定。传感器放入含有爱德华氏菌病抗体和葡萄糖氧化酶(GOD)标记爱德华氏菌病抗体培养液中培育，通过免疫反应结合到电极上的葡萄糖氧化酶(GOD)标记爱德华氏菌病抗体随待测物质浓度增加而降低，标记的GOD催化氧化葡萄糖产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，并促使鲁米诺(Luminol)产生电化学发光(ECL)信号，电化学发光信号随爱德华氏菌病抗体浓度的增加而降低。该传感器对爱德华氏菌病抗体响应良好。