



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105277604 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 27

(21) 申请号 201510763169. 7

(22) 申请日 2015. 11. 10

(71) 申请人 北京盈盛恒泰科技有限责任公司
地址 100055 北京市西城区广安门外大街
168 朗琴国际大厦 B 座 603

(72) 发明人 耿利华 鲁丁强

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君

(51) Int. Cl.

G01N 27/327(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

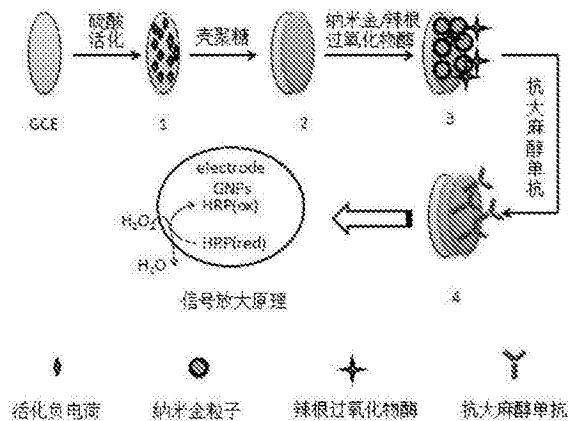
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

检测大麻醇的电化学纳米免疫传感器及其制备方法及应用

(57) 摘要

本发明提供一种检测大麻醇的电化学纳米免疫传感器及其制备方法和应用。所述传感器以壳聚糖为桥联剂将纳米金和辣根过氧化物酶固定于电极表面,所述纳米金吸附有抗大麻醇抗体。所述制备方法包括步骤:(1)对电极进行预处理,然后在电极上包被壳聚糖溶液;(2)以壳聚糖为桥联剂将纳米金和辣根过氧化物酶包被在电极上;(3)继续在电极上包被抗大麻醇抗体;(4)封闭液封闭后即得。本发明的电化学纳米免疫传感器不受样品的浊度、颜色的影响,无需对样品进行纯化、富集等预处理,操作简单,检测灵敏度高、特异性强,能够用于对大麻醇进行快速定量检测,具有良好的应用前景。



1. 一种检测大麻醇的电化学纳米免疫传感器,其特征在于,所述传感器以壳聚糖为桥联剂将纳米金和辣根过氧化物酶固定于电极表面,所述纳米金吸附有抗大麻醇抗体。

2. 根据权利要求1所述的电化学纳米免疫传感器,其特征在于,所述抗大麻醇抗体为单克隆抗体。

3. 根据权利要求1所述的电化学纳米免疫传感器,其特征在于,所述电极为玻碳电极。

4. 权利要求1~3任一项所述的电化学纳米免疫传感器的制备方法,其特征在于,其包括如下步骤:

- (1) 对电极进行预处理,然后在电极上包被壳聚糖溶液;
- (2) 以壳聚糖为桥联剂将纳米金和辣根过氧化物酶包被在电极上;
- (3) 继续在电极上包被抗大麻醇抗体;
- (4) 封闭液封闭后即得。

5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,所述壳聚糖溶液以如下方法制得:将壳聚糖溶于醋酸溶液得到壳聚糖溶液,备用;更优选地,将2g壳聚糖溶于100mL体积百分比为2%的醋酸溶液中,搅拌3h得到2%的壳聚糖溶液,备用。

6. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中,所述包被为将电极置于由纳米金溶液和辣根过氧化物酶溶液组成的混合溶液中进行包被。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述纳米金溶液以如下方法制得:取0.01g/100mL氯金酸溶液100mL,加入1g/100mL的柠檬酸钠溶液4mL混匀,置于微波炉中低火保持8-10min,待自然冷却后用超纯水补充至104mL,即得纳米金溶胶,置于4℃避光保存备用;

所述辣根过氧化物酶溶液以如下方法制得:将辣根过氧化物酶溶于磷酸缓冲液中,即得辣根过氧化物酶溶液;更优选地,将0.02g辣根过氧化物酶溶于10mL 0.01M pH值为7.4的磷酸缓冲液中,即得2.0g/L辣根过氧化物酶溶液。

8. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,步骤(4)中,所述封闭液为牛血清白蛋白。

9. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,其包括如下步骤:

(1) 将玻碳电极预处理后,取质量百分比浓度为2%的壳聚糖溶液滴满处理后的玻碳电极表面,在45℃干燥30min,使玻碳电极表面凝胶化;取出待冷却至室温,再浸于浓度为1mol/L的NaOH溶液中5min,用超纯水冲洗掉NaOH溶液,之后浸于超纯水中30min,彻底清除NaOH离子;取出,25℃干燥10min;

(2) 将玻碳电极置于纳米金/辣根过氧化物酶混合溶液中至少24h,得到GNPs/HRP电极;

(3) 滴加5μL浓度不低于0.5mg/mL的小鼠抗大麻醇单克隆抗体于制得的GNPs/HRP电极表面,30℃孵育干燥1h;

(4) 超纯水冲洗三次,然后将玻碳电极置于1%的牛血清白蛋白溶液中,37℃温育1h,以封闭非特异性位点;

(5) 以含0.05% Tween-20的PBST溶液清洗未结合的BSA,30℃孵育干燥1h,即得用于大麻醇检测的电化学纳米免疫传感器,置于4℃PBS缓冲环境中待用。

10. 权利要求1~3任一项所述的电化学纳米免疫传感器在大麻醇检测中的应用。

检测大麻醇的电化学纳米免疫传感器及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物免疫检测技术领域,具体涉及一种检测大麻醇的电化学纳米免疫传感器及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 大麻醇 (Cannabinoid) 是大麻 (marijuana) 中影响精神状态的主要成分,它对大脑的作用主要是通过激活一个叫 CB1 的分子受体来实现的。目前大麻醇主要用于其它药物疗效不佳的某些疾病,如神经系统疾病中的多发性硬化症 (MS)、运动性神经疾病、慢性顽固性疼痛和药源性呕吐。另外,该药对青光眼、哮喘和心血管疾病也可能有一定作用,虽然尚未进入临床应用,但已引起研究者的广泛兴趣。对大麻醇的检测方法目前只能达到定性目的,如采用相应的试纸条/板/盒,灵敏度为 50ng/mL。为了便于对大麻醇进行研究和应用,亟需研究发展检测灵敏度更高的检测方法。

发明内容

[0003] 本发明的目的是针对目前无法对大麻醇进行定量检测、检测灵敏度很低的缺陷,而提供一种检测大麻醇的电化学纳米免疫传感器及其制备方法和应用。本发明的电化学纳米免疫传感器不受样品的浊度、颜色的影响,无需对样品进行纯化、富集等预处理,操作简单,检测灵敏度高、特异性强,能够用于对大麻醇进行快速定量检测。

[0004] 本发明提供下述技术方案解决上述技术问题。

[0005] 本发明提供的技术方案之一是:一种检测大麻醇的电化学纳米免疫传感器,所述传感器以壳聚糖为桥联剂将纳米金和辣根过氧化物酶固定于电极表面,所述纳米金吸附有抗大麻醇抗体。

[0006] 所述抗大麻醇抗体为本领域常规,其来源和类型均没有特殊要求,既可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体,优选单克隆抗体。

[0007] 所述电极可以是本领域常规所述各类电极,优选玻碳电极。

[0008] 本发明提供的技术方案之二是:前述电化学纳米免疫传感器的制备方法,其包括如下步骤:

[0009] (1) 对电极进行预处理,然后在电极上包被壳聚糖溶液;

[0010] (2) 以壳聚糖为桥联剂将纳米金和辣根过氧化物酶包被在电极上;

[0011] (3) 继续在电极上包被抗大麻醇抗体;

[0012] (4) 封闭液封闭后即得。

[0013] 步骤 (1) 为对电极进行预处理,然后在电极上包被壳聚糖溶液。

[0014] 其中,所述电极可以是本领域常规所述各类电极,优选玻碳电极。

[0015] 所述壳聚糖溶液优选以如下方法制得:将壳聚糖溶于醋酸溶液得到壳聚糖溶液,备用。更优选地,将 2g 壳聚糖溶于 100mL 体积百分比为 2% 的醋酸溶液中,搅拌 3h 得到 2% 的壳聚糖溶液,备用。

[0016] 步骤 (2) 为以壳聚糖为桥联剂将纳米金和辣根过氧化物酶包被在电极上。

[0017] 如本领域常规,所述包被为将电极置于溶液中进行包被。优选地,所述包被为将电极置于由纳米金溶液和辣根过氧化物酶溶液组成的混合溶液中进行包被。

[0018] 所述纳米金溶液优选以如下方法制得:取 0.01g/100mL 氯金酸溶液 100mL,加入 1g/100mL 的柠檬酸钠溶液 4mL 混匀,置于微波炉中低火保持 8-10min,待自然冷却后用超纯水补充至 104mL,即得纳米金溶胶,置于 4℃ 避光保存备用。

[0019] 所述辣根过氧化物酶溶液优选以如下方法制得:将辣根过氧化物酶 (HRP) 溶于磷酸缓冲液 (PBS) 中,即得辣根过氧化物酶溶液。更优选地,将 0.02g 辣根过氧化物酶 (HRP) 溶于 10mL 0.01M pH 值为 7.4 的磷酸缓冲液 (PBS) 中,即得 2.0g/L 辣根过氧化物酶溶液。

[0020] 所述封闭液为免疫检测领域常规的封闭液,优选牛血清白蛋白 (BSA)。

[0021] 所述抗大麻醇抗体为本领域常规,其来源和类型均没有特殊要求,既可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体,优选单克隆抗体,更优选 Balb/c 小鼠单克隆抗体,且纯化后抗体的浓度不低于 0.5mg/mL。

[0022] 在所述包被的操作过程中,如本领域常规,一般都需要经过恒温孵育和清洗的步骤。

[0023] 在所述封闭的操作过程中,如本领域常规,一般也需要经过恒温孵育和清洗的步骤。

[0024] 所述制备方法较佳地包括如下步骤:

[0025] (1) 将玻碳电极预处理后,取质量百分比浓度为 2% 的壳聚糖溶液滴满处理后的玻碳电极表面,在 45℃ 干燥箱中干燥 30min,使玻碳电极表面凝胶化;取出待冷却至室温,再浸于浓度为 1mol/L 的 NaOH 溶液中 5min,用超纯水冲洗掉 NaOH 溶液,之后浸于超纯水中 30min,彻底清除 NaOH 离子;取出,在 25℃ 干燥箱干燥 10min;

[0026] (2) 将玻碳电极置于纳米金 (GNPs)/辣根过氧化物酶 (HRP) 混合溶液中至少 24h,得到 GNPs/HRP 电极;

[0027] (3) 滴加 5 μ L 浓度不低于 0.5mg/mL 的小鼠抗大麻醇单克隆抗体于制得的 GNPs/HRP 电极表面,30℃ 孵育干燥 1h;

[0028] (4) 超纯水冲洗三次,然后将玻碳电极置于 1% 的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液中 37℃ 温育 1h,以封闭非特异性位点;

[0029] (5) 以含 0.05% (v/v) Tween-20 的 PBST 溶液清洗未结合的 BSA,30℃ 孵育干燥 1h,即得用于大麻醇检测的电化学纳米免疫传感器,置于 4℃ PBS 缓冲环境中待用。

[0030] 本发明的电化学纳米免疫传感器利用循环伏安法、交流阻抗法,原子力显微镜等表征电极组装的各个阶段。利用电流时间曲线法等方法可以实现对复杂样品中大麻醇的定量检测,实验结果表明该传感器灵敏度、特异性、稳定性、重现性以及使用寿命等技术参数均良好。

[0031] 本发明提供的技术方案之三是:前述电化学纳米免疫传感器的在大麻醇检测中的应用。

[0032] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。

[0033] 本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0034] 本发明的积极进步效果在于：

[0035] 本发明的电化学纳米免疫传感器不受样品的浊度、颜色的影响，无需对样品进行纯化、富集等预处理，操作简单，检测灵敏度高、特异性强，能够用于对大麻醇进行快速定量检测，且灵敏度、特异性、稳定性、重现性以及使用寿命等技术参数均良好，具有非常好的应用前景。

附图说明

[0036] 图 1 为实施例 1 所制备的电化学纳米免疫传感器的结构图。

具体实施方式

[0037] 以下实施例用于说明本发明，但并不用来限制本发明的范围。下述各实施例中，所使用的各类设备、试剂和材料若无特别说明，均为常规市售可得。

[0038] 实施例 1 电化学纳米免疫传感器的制备

[0039] 1、玻碳电极的预处理：

[0040] 将玻碳电极依次分别用 1.0 μm 、0.3 μm 、0.05 μm 粒径的 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 浆在麂皮上抛光三次，且每次抛光后在超声水浴中清洗 30s，最后依次用 HNO_3 和 H_2O 按体积比 1 : 1 配制的混合液、无水乙醇和超纯水清洗。在 1mol/L H_2SO_4 溶液中用扫描范围为 1.0 ~ -1.0V，扫描速度为 100mV/s 的循环伏安法活化电极，重复扫描直至出现稳定的循环伏安曲线。上述稳定的循环伏安曲线满足下述要求：在实验室条件下预处理后的电极的循环伏安曲线的峰电位差应在 80mV 以下，并尽可能地接近 64mV，电极方能使用，最后置于氮气环境中干燥待用。

[0041] 2、纳米金 (Nano-Au) 溶胶的制备：

[0042] 根据 Frens 法取 0.01g/100mL 氯金酸溶液 100mL，加入 1g/100mL 的柠檬酸钠溶液 4mL 混匀，置于微波炉中低火保持 8-10min，待其自然冷却后用超纯水补充至 104mL 即得纳米金溶胶，置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用。利用分光光度计对所制备的纳米金溶胶在可见光范围内 (400-700nm) 进行扫描，光吸收性胶体金在可见光范围内有一单一光吸收峰，且光吸收峰的波长 λ_{max} 在 518nm，可粗略确定纳米金平均粒径为 15nm。用透射电镜对所制纳米金溶胶颗粒的大小、形状及分散情况进行进一步精确的表征，所合成的纳米金形状规则，粒度均匀，平均粒径约为 15nm，且没有聚集现象。

[0043] 3、壳聚糖溶液的制备：

[0044] 将 2g 壳聚糖溶于 100mL 体积百分比为 2% 的醋酸溶液中搅拌 3h 得到 2% 的壳聚糖溶液。

[0045] 4、纳米金吸附辣根过氧化物酶的制备：

[0046] (1) 将 0.02g 辣根过氧化物酶 (HRP) 溶于 10mL 0.01M pH 值为 7.4 的磷酸缓冲液 (PBS) 中，配置 2.0g/L 辣根过氧化物酶溶液。

[0047] (2) 用 0.1M K_2CO_3 调节步骤 2 制备的纳米金溶胶的 pH 值至 7.0 后，取 1mL 上述 pH 值为 7.0 的纳米金溶胶与 1mL 上述 2.0g/L 辣根过氧化物酶溶液搅拌 2h 混匀，4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜，并利用分光光度计对此混合液在 350 ~ 700nm 范围内进行扫描，获得 HRP/Nano-Au 聚合物的吸收光谱，通过最大吸收波长对 Nano-Au 与 HRP 相互作用后所发生的变化情况进行表征。

[0048] 5、传感器的制备：

[0049] (1) 将玻碳电极预处理后,取质量百分比浓度为 2% 的壳聚糖溶液滴满处理后的玻碳电极表面,在 45℃ 干燥箱中干燥 30min,使玻碳电极表面凝胶化;取出待冷却至室温,再浸于浓度为 1mol/L 的 NaOH 溶液中 5min,用超纯水冲洗掉 NaOH 溶液,之后浸于超纯水中 30min,彻底清除 NaOH 离子;取出,在 25℃ 干燥箱干燥 10min;

[0050] (2) 然后置于纳米金 (GNPs)/ 辣根过氧化物酶 (HRP) 混合溶液中至少 24h,得到 GNPs/HRP 电极;

[0051] (3) 滴加 5 μ L 浓度不低于 0.5mg/mL 的 Ba1b/c 小鼠抗大麻醇单克隆抗体于制得的 GNPs/HRP 电极表面,30℃ 孵育干燥 1h;

[0052] (4) 超纯水轻轻冲洗三次,将该修饰电极置于 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 溶液中 37℃ 温育 1h,以封闭非特异性位点;

[0053] (5) 以含 0.05% (v/v) Tween-20 的 PBST 溶液清洗未结合的 BSA,30℃ 孵育干燥 1h,即得可用于大麻醇检测的电化学纳米免疫传感器,置于 4℃ PBS 缓冲环境中待用。

[0054] 本发明的电化学纳米免疫传感器的结构图如图 1 所示。

[0055] 实施例 2 用电化学纳米免疫传感器检测大麻醇

[0056] 1、制备标准曲线:

[0057] 将制备好的大麻醇电化学纳米免疫传感器分别在 0.01M pH7.4 的 PBS 缓冲液梯度稀释的大麻醇溶液中,37℃ 孵育 15min (从低浓度到高浓度) 后进行电流-时间扫描 (扫描电位-0.38V),经比较选择稳态电流值 (一般为第 50s) 为标准,以电流在检测前后的变化量 ΔI 与大麻醇浓度作图,得到 ΔI 与大麻醇浓度之间的线性关系。

[0058] 2、样品制备:

[0059] 选择浓度约为 100ng/mL 的 PBS 稀释大麻醇溶液,从中吸取 1mL 加入到 9mL PBS 缓冲液中,吹打摇匀,记为 1,此时浓度约为 10ng/mL;再从 1 中吸取 1mL 溶液滴加到 9mL PBS 缓冲液中,吹打摇匀,记为 2,此时菌浓度约为 1ng/mL;依次类推,直至稀释成 0.001ng/mL 大麻醇溶液。以 PBS 缓冲液作为空白对照,并从低浓度向高浓度依次检测。

[0060] 3、检测结果:

[0061] 利用电流时间曲线法测定 PBS 稀释的大麻醇溶液,结果表明响应电流与大麻醇溶液在 0.001 ~ 100ng/mL 范围内线性相关,最低检测限为 0.001ng/mL。并利用该传感器检测含大麻醇的小鼠血清样品,结果显示良好。

[0062] 实施例 3 传感器稳定性和重现性检测

[0063] 将组装好的大麻醇电化学纳米免疫传感器在 0.1ng/mL 大麻醇 PBS 稀释液中连续测定 12 次,结果相对标准偏差 R. S. D 分别为 3.13%、3.89%;将该传感器于 0.01mol/L pH7.4 PBS 溶液上方 4℃ 保存,每隔 3 天检测一次大麻醇溶液 (0.1ng/mL),第 13 天电流响应信号为初始电流的 88.24%,表明该传感器具有较好的稳定性。

[0064] 取不同批次制备的免疫传感器 5 支,在相同条件下对同一浓度大麻醇悬液 (0.01ng/mL) 进行测定,结果响应电流的相对标准偏差 R. S. D. 分别为 3.32%,说明该传感器重现性良好。

[0065] 虽然,上文中已经用一般性说明、具体实施方式及试验,对本发明作了详尽的描述,但在本发明的基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护

的范围。

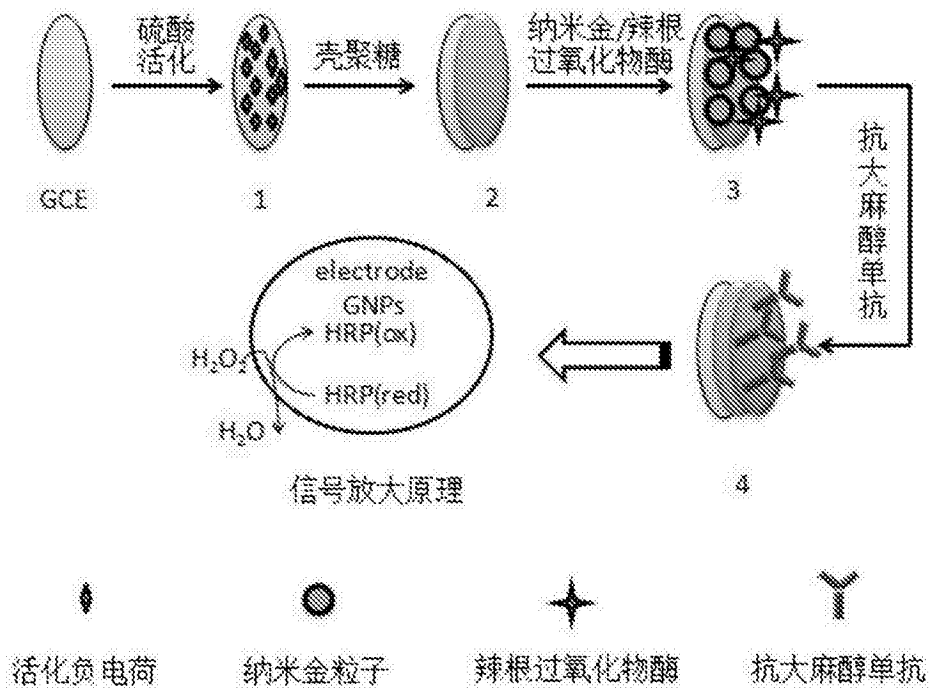


图 1

专利名称(译)	检测大麻醇的电化学纳米免疫传感器及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN105277604A	公开(公告)日	2016-01-27
申请号	CN201510763169.7	申请日	2015-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	北京盈盛恒泰科技有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	北京盈盛恒泰科技有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京盈盛恒泰科技有限责任公司		
[标]发明人	耿利华 鲁丁强		
发明人	耿利华 鲁丁强		
IPC分类号	G01N27/327 G01N33/53		
代理人(译)	王文君		
其他公开文献	CN105277604B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测大麻醇的电化学纳米免疫传感器及其制备方法和应用。所述传感器以壳聚糖为桥联剂将纳米金和辣根过氧化物酶固定于电极表面，所述纳米金吸附有抗大麻醇抗体。所述制备方法包括步骤：(1)对电极进行预处理，然后在电极上包被壳聚糖溶液；(2)以壳聚糖为桥联剂将纳米金和辣根过氧化物酶包被在电极上；(3)继续在电极上包被抗大麻醇抗体；(4)封闭液封闭后即得。本发明的电化学纳米免疫传感器不受样品的浊度、颜色的影响，无需对样品进行纯化、富集等预处理，操作简单，检测灵敏度高、特异性强，能够用于对大麻醇进行快速定量检测，具有良好的应用前景。

