



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104914238 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201510316827. 8

(22) 申请日 2015. 06. 11

(71) 申请人 山东理工大学

地址 255086 山东省淄博市高新技术开发区
高创园 A 座 313 室

(72) 发明人 孙霞 陈栋菲 徐建光 郭业民
王相友

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种微流控免疫传感器的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种微流控免疫传感器的制备方法,其特征在于:将聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA)和纳米金胶通过层层自主装与蛋白A定向固定抗体结合来改善传感器的检测性能,用聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA)和纳米金胶通过层层自主装来修饰微流控芯片内置的叉指阵列电极,提高电极稳定性和电极表面的生物亲和性,用蛋白A可以和抗体的Fc端特异性结合来定向固定抗体,提高了抗体固定量。采用注射泵将液体注入微流控通道,达到准确定量的目的,避免在传感器制备过中的人工差异。将经过上述步骤修饰过的电极制成微流控免疫传感器后,检测时间较短,灵敏度高,选择性稳定性好,回收率符合要求。

1. 一种微流控免疫传感器的制备方法,其特征在于:在清洗干净的通入微流控通道内先后通入聚二烯丙基二甲基氯化铵 (PDDA) 和纳米金胶,并重复两次,然后通入蛋白 A 液,获得修饰电极,再将毒死蜱抗体通入微通道内,干燥清洗后获得基于聚二烯丙基二甲基氯化铵 (PDDA)/ 纳米金胶和蛋白 A 的微流控免疫传感器。

2. 如权利要求 1 所述,其特征在于:(1) 微流控通道的清洗;(2) 将聚二烯丙基二甲基氯化铵 (PDDA)、纳米金胶和蛋白 A、毒死蜱抗体通入并固定在微流控通道内。

3. 如权利要求 2 所述,其特征在于:微流控通道的清洗,首先,用注射泵通入 1M 的氢氧化钠溶液 15 分钟后通入 5 分钟去离子水,氮气吹干,然后通入 1M 的盐酸溶液 15 分钟后通入 5 分钟去离子水后氮气吹干,在 pH7.5 的铁氰化钾溶液中扫描 Bode 曲线,如果能和电极初始时的 Bode 曲线重合则电极清洗干净,否则重新清洗。

4. 如权利要求 2 所述,其特征在于:在清洗干净的微流控通道内通入并固定聚二烯丙基二甲基氯化铵 (PDDA)、纳米金胶和蛋白 A,是先通入聚二烯丙基二甲基氯化铵 (PDDA) 10 分钟,干燥 30 分钟后通入去离子水冲洗 5 分钟去掉未固定的 PDDA,氮气吹干后通入纳米金胶 10 分钟,干燥 30 分钟后通入去离子水冲洗 5 分钟去掉未固定的纳米金胶,将上述过程重复一次。

5. 然后通入蛋白 A 液 10 分钟,干燥 45 分钟后通入去离子水冲洗 5 分钟去掉未固定的蛋白 A,氮气吹干,通入毒死蜱抗体 10 分钟,干燥 90 分钟后通入去离子水冲洗 5 分钟去掉未固定的抗体,制备好聚二烯丙基二甲基氯化铵 (PDDA)/ 纳米金胶和蛋白 A 修饰的微流控免疫传感器。

6. 权利要求 1-4 所述的方法,其特征在于检测农药毒死蜱。

一种微流控免疫传感器的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种微流控免疫传感器的制备方法,属于生物传感器技术领域。

背景技术

[0002] 农业生产中超剂量滥用农药,造成农产品中农药残留的多样性和复杂性,对食品安全及人类健康构成了很大威胁。毒死蜱为一种广谱杀虫剂,被用于防治水稻、玉米、果树、蔬菜等方面的螟虫、蚜虫和螨类等害虫。毒死蜱在人体内累聚后,倘若高浓度可致使生命受到威胁。而近年来,毒死蜱的比例份额没有下降,反之,其需求量与日俱增。在大范围推广毒死蜱的同时,必然对人类健康构成了严重的威胁,因而有必要寻找一种现场、快速、准确且自动化程度高的农药多残留检测技术是保障农产品安全的有效途径。

[0003] 传统的用于检测农药残留的分析方法有:气相色谱(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、色谱/质谱联用技术(GC/LC-MS)、毛细管电泳法(CE)、荧光分析、酶联免疫(ELISA)等,这些检测方法虽然精确度高,定量准确,但其样品的前处理复杂、检测耗时长、仪器设备昂贵、需要专业技术的操作人员,只适合实验室操作,不适宜现场快速检测。目前常用的酶抑制法(酶抑制试纸法和酶抑制分光光度法),可以实现有机磷农药的现场快速检测,具有较好的实用价值。但是,速测卡检测结果准确度低,一般只能用于严重超标的蔬菜样品的定性测量。酶抑制分光光度法的准确度低,检测结果受到蔬菜水果中色素和气味的影响。免疫传感器是基于抗原和抗体特异性结合所引发的免疫反应的原理所研制的传感器,与传统的分析方法相比,它具有特异性强、分析速度快、结构简单、成本低廉等优点。但目前免疫传感器的制备过程中,抗体(Ab)或半抗原(hapten)的固定化并保持其良好的生物活性、空间排布、信号的放大以及人工差异是制约传感器灵敏度、稳定性、选择性和重复性的关键因素。

发明内容

[0004] 发明的目的在于提供一种能克服上述缺陷、操作简单、灵敏度高,选择性好的检测农药残留的免疫传感器的制备方法。

[0005] 其技术方案为:一种微流控免疫传感器的制备方法,其特征在于:在清洗干净的通入微流控通道内先后通入聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA)和纳米金胶,并重复两次,然后通入蛋白A液,获得修饰电极,再将毒死蜱抗体通入微通道内,干燥清洗后获得基于聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA)/纳米金胶和蛋白A。毒死蜱抗体修饰的微流控免疫传感器。

[0006] 所述方法步骤为:

- 1) 微流控通道的清洗;
- 2) 将聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA)、纳米金胶和蛋白A、毒死蜱抗体通入并固定在微流控通道内。

[0007] 步骤1)所述,微流控通道的清洗:过程是,首先,用注射泵通入1M的氢氧化钠溶液15分钟后通入5分钟去离子水,氮气吹干,然后通入1M的盐酸溶液15分钟后通入5分钟

去离子水后氮气吹干,在 pH7.5 的铁氰化钾溶液中扫描 Bode 曲线,如果能和电极初始时的 Bode 曲线重合则电极清洗干净,否则重新清洗。

[0008] 步骤 2)所述,将聚二烯丙基二甲基氯化铵 (PDDA)、纳米金胶和蛋白 A、毒死蜱抗体通入并固定在微流控通道内:是先通入聚二烯丙基二甲基氯化铵 (PDDA) 10 分钟,干燥后通入去离子水冲洗 5 分钟去掉未固定的 PDDA,氮气吹干后通入纳米金胶 10 分钟,干燥后通入去离子水冲洗 5 分钟去掉未固定的纳米金胶,将上述过程重复一次。然后通入蛋白 A 液 10 分钟,干燥后通入去离子水冲洗 5 分钟去掉未固定的蛋白 A,氮气吹干,通入毒死蜱抗体 10 分钟,干燥后通入去离子水冲洗 5 分钟去掉未固定的抗体,制备好聚二烯丙基二甲基氯化铵 (PDDA)/ 纳米金胶和蛋白 A 修饰的微流控免疫传感器。

[0009] 所述的一种微流控免疫传感器的制备方法,其特征在于:微流控芯片的清洗,免疫传感器敏感界面的构建及过程表征,免疫传感器工作曲线的建立,免疫传感器性能的检测,免疫传感器对实际样品的检测。

[0010] 所述的一种微流控免疫传感器的制备方法,其特征在于:实验条件的优化,主要包括测试底液的 pH、通入检测时间以及孵育时间;所制备的免疫传感器的工作曲线为: $\Delta Z = 163.0 + 70.000 \lg C (\text{ng/mL})$, ($R^2=0.9745.$);免疫传感器性能检测包括特异性、稳定性、以及免疫传感器对多种果蔬样品回收率的测定。

[0011] 其制备原理为:用聚二烯丙基二甲基氯化铵 (PDDA) 和纳米金胶通过层层自主装来修饰微流控芯片内置的叉指阵列电极,提高电极稳定性和电极表面的生物亲和性;然后将蛋白 A 固定在纳米金胶上,再通过蛋白 A 与抗体 Fc 端的特异性结合定向将抗体牢固的固定在电极上。抗体的定向固定保持了抗体的生物活性以及自由的抗原结合位点来和农药有效的特异性结合。采用本发明制备的微流控免疫传感器可以在蔬果采收、上市前,进行农药毒死蜱残留的快速测定,直接对农药残留是否超标量进行检测,为农产品安全生产与消费提供残留检测的技术支撑。

[0012] 为达到以上目的,采取以下技术方案实现:一种微流控免疫传感器的制备方法,其特征在于:(1) 微流控通道的清洗;(2) 将聚二烯丙基二甲基氯化铵 (PDDA)、纳米金胶和蛋白 A、毒死蜱抗体通入并固定在微流控通道内。

[0013] 所述微流控免疫传感器的制备工艺如下:(1) 将清洗干净的微流控芯片通入 PDDA 10 分钟,干燥后通入去离子水 5 分钟冲洗;(2) 通入纳米金胶 10 分钟,干燥后通入去离子水 5 分钟冲洗;(3) 将 (1) 和 (2) 重复一次;(4) 通入蛋白 A 10 分钟,待干燥 45 分钟后通入 5 分钟去离子水冲洗去未固定上的蛋白 A,通入毒死蜱抗体 10 分钟,干燥 90 分钟后通入去离子水冲洗 5 分钟去掉未固定的抗体。氮气吹干,微流控免疫传感器制作完成,保存在 4℃ 条件下备用。

附图说明

[0014] 图 1 PA/AuNPS/PDDA/AU 传感器的 Nyquist 组装图

a、裸电极, b、修饰 PDDA/AuNPS 后的电极, c、修饰蛋白 A 后的电极, d、固定抗体后的电极, e、结合毒死蜱后的电极;

本试验在包含 5.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 和 0.1 mol/L KCl 的 0.1 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液中进行 EIS 表征。如图 1 所示,微流控芯片未经修饰的裸电极阻抗值(曲线 a),

当 PDDA/AuNPS 自主修饰后电极后, 阻抗值明显减小(曲线 b), 因为 AuNPS 具有优良的导电性。当蛋白 A 修饰电极后, 阻抗值明显增大(曲线 c), 纳米金胶提高了电极的稳定性和生物亲和性, 使得蛋白 A 更好地结合在电极上, 因蛋白 A 大分子物质阻碍了电子传递, 电流减小阻抗增大; 当毒死蜱抗体在蛋白 A 的定向固定作用下固定在电极上后, 阻抗值明显增大(曲线 d), 当毒死蜱农药与毒死蜱抗体特异性结合后阻抗值明显增大(曲线 e)。

[0015] 图 2 底液 pH 值对阻抗差值的影响

测试底液的 pH 值是影响传感器性能的关键因素之一。将 PA/AuNPS/PDDA/AU 电极在不同 pH 值 (5.5 到 8.5) 的含有 5.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 和 0.1 mol/L KCl 的 0.1 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液中进行阻抗响应的测试。如图 2 所示, 响应阻抗值随 pH 的变化而变化。pH 值在 5.5~7.5 之间, 响应阻抗随 pH 的增大而增加; pH 值在 7.5~8.5 之间, 响应阻抗随 pH 的增大而减小。所以, 选择 pH 值为 7.5 为最佳测定 pH 值。

[0016] 图 3 孵育时间对响应阻抗值的影响

抗体抗原孵育时间也是影响传感器性能的关键因素之一。将 PA/AuNPS/PDDA/AU 电极在不同 pH 值 (5.5 到 8.5) 的含有 5.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 和 0.1 mol/L KCl 的 0.1 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液中进行阻抗响应的测试。如图 3 所示, 响应阻抗值随孵育时间的变化而变化。孵育时间在 10~40 分钟之间, 响应阻抗值随孵育时间的增大而增加; 孵育时间在 40~55 分钟之间, 响应阻抗没有明显变化所以, 选择孵育时间为 40 分钟为最佳孵育时间。

[0017] 图 4 标准曲线图

固定在电极表面的毒死蜱浓度对微流控免疫传感器的性能有很大影响。图 4 显示了电极表面修饰不同浓度毒死蜱的阻抗差值变化。随着毒死蜱浓度的增加, 阻抗差值逐渐增大;

在最优条件下测量, 得到的标准曲线方程为: $\Delta Z = 163.0 + 70.000 \lg C$ (ng/mL), 相关系数为: 0.9745。

具体实施方式

[0018] 实施例: (1) 纳米金胶的制备: 采用柠檬酸三钠热还原氯金酸 (HAuCl_4) 的方法。所有的玻璃器皿均用王水浸泡过夜, 再用 12mol/L 的氢氧化钠水溶液浸泡 2h, 洗涤干净备用。将 98mL 去离子水和 2mL 50mM 氯金酸溶液混合, 快速搅拌下加热至亚沸状态 (即产生回流) 时, 迅速加入 10mL 38.8mM 的柠檬酸三钠溶液, 混合物加热至沸腾后, 继续搅拌 20min (此间溶液由淡黄色转为无色, 然后变灰黑色, 最后成酒红色), 除去热源后继续搅拌至室温下慢慢冷却。将冷却后的; (2) 通入 1M 的氢氧化钠溶液 15 分钟后通入 5 分钟去离子水, 氮气吹干, 通入 1M 的盐酸溶液 15 分钟后通入 5 分钟去离子水冲洗, 氮气吹干; (3) 微流控免疫传感器的制备: 是在清洗干净的微流控通道内先通入聚二烯丙基二甲基氯化铵 (PDDA) 10 分钟, 干燥后通入去离子水冲洗 5 分钟去掉未固定的 PDDA, 氮气吹干后通入纳米金胶 10 分钟, 干燥后通入去离子水冲洗 5 分钟去掉未固定的纳米金胶, 将上述过程重复一次。然后通入蛋白 A 液 10 分钟, 干燥 45 分钟后通入去离子水冲洗 5 分钟去掉未固定的蛋白 A, 氮气吹干, 通入毒死蜱抗体 10 分钟, 干燥 90 分钟后通入去离子水冲洗 5 分钟去掉未固定的抗体; (4) 从测试底液 pH 和孵育时间对所制备的免疫传感器的实验条件进行优化, pH 的范围为

5.5-8.5, 孵育时间的范围为 10-55 分钟 ;(5) 配制 0.5ng/ml、1ng/ml、10ng/ml、100ng/ml、500ng/mL 的农药毒死蜱标准溶液,将上述制备好的免疫传感器分别通入不同浓度的毒死蜱标准溶液,在常温下孵育 40min,检测免疫前后阻抗变化得到其工作曲线 ;(6) 将免疫传感器在久效磷、西维因、3- 羟基克百威、克百威等干扰物存在的情况下对 100ng/mL 的毒死蜱进行测试,以检测特异性 ;(7) 把多种果蔬样品彻底清洗干净,进行实际样品加标回收率的测试。

[0019] 此种免疫传感器检测毒死蜱农药残留的检测方法操作工艺简单,检测时间较短,检测农药浓度范围广,灵敏度高,稳定性好,对实际样品分析有较好的回收率,符合我国农药残留快速检测技术发展和国际化要求。

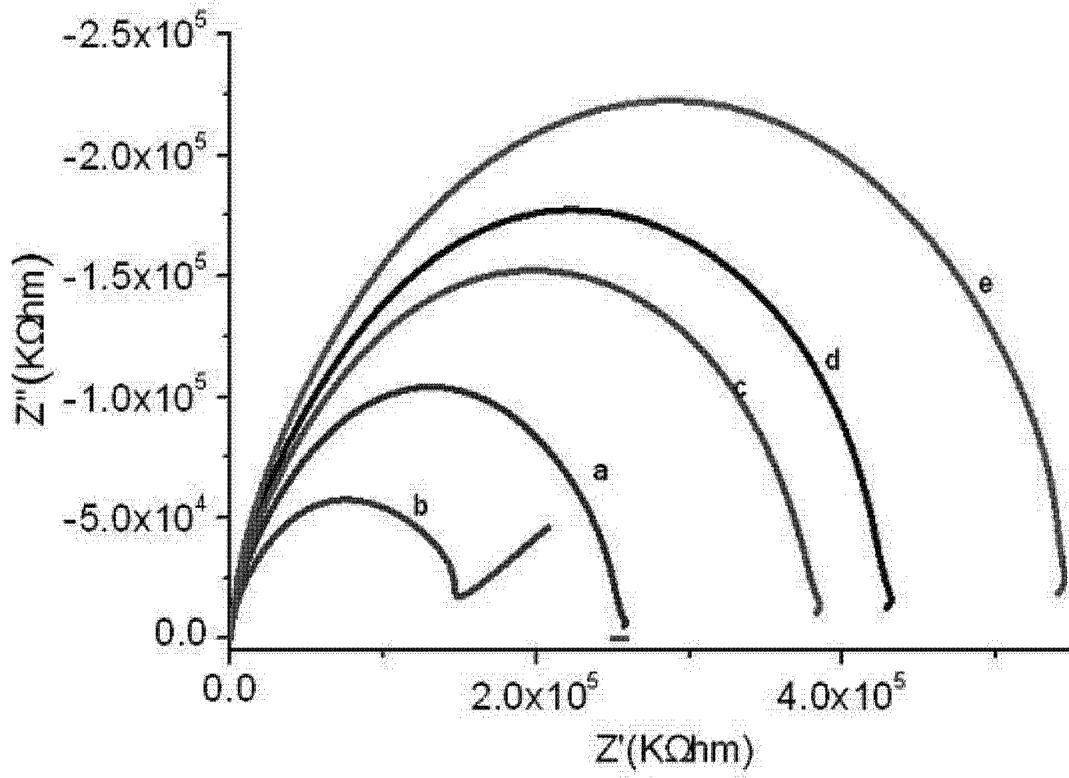


图 1

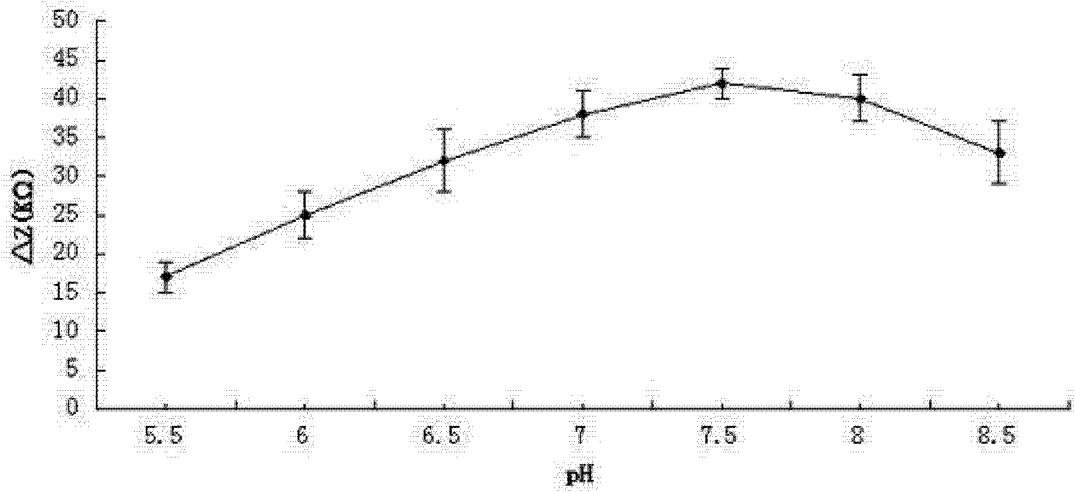


图 2

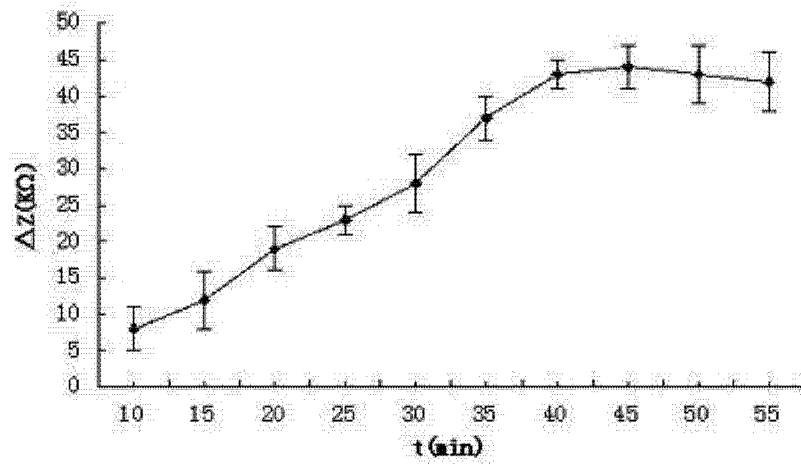


图 3

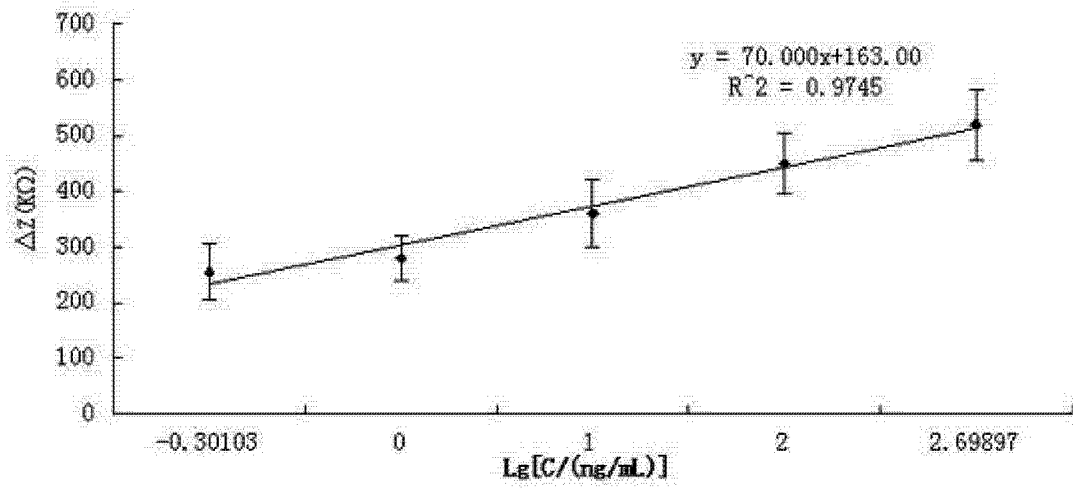


图 4

专利名称(译)	一种微流控免疫传感器的制备方法		
公开(公告)号	CN104914238A	公开(公告)日	2015-09-16
申请号	CN201510316827.8	申请日	2015-06-11
[标]申请(专利权)人(译)	山东理工大学		
申请(专利权)人(译)	山东理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东理工大学		
[标]发明人	孙霞 陈栋菲 徐建光 郭业民 王相友		
发明人	孙霞 陈栋菲 徐建光 郭业民 王相友		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种微流控免疫传感器的制备方法，其特征在于：将聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA)和纳米金胶通过层层自主装与蛋白A定向固定抗体结合来改善传感器的检测性能，用聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA)和纳米金胶通过层层自主装来修饰微流控芯片内置的叉指阵列电极，提高电极稳定性和电极表面的生物亲和性，用蛋白A可以和抗体的Fc端特异性结合来定向固定抗体，提高了抗体固定量。采用注射泵将液体注入微流控通道，达到准确定量的目的，避免在传感器制备过中的人工差异。将经过上述步骤修饰过的电极制成微流控免疫传感器后，检测时间较短，灵敏度高，选择性稳定性好，回收率符合要求。

