

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 27/30

G01N 27/327 G01N 33/53



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03127127.8

[43] 公开日 2004 年 8 月 25 日

[11] 公开号 CN 1523346A

[22] 申请日 2003.9.3 [21] 申请号 03127127.8

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街 5625 号

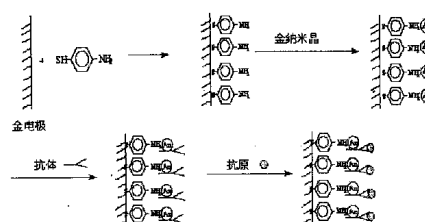
[72] 发明人 李景虹 王美佳 孙春燕

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称 纳米免疫生物传感器

[57] 摘要

本发明在金电极表面化学修饰巯基化合物，如巯基苯胺、巯基乙胺等。利用巯基化合物的巯基端可以和金电极以化学键的方式结合，将巯基端固定在金电极上而使另一端的氨基裸露在电极表面。在一定条件下裸露的氨基可以和金纳米晶以化学键结合，从而将金纳米晶固定在金电极表面。金纳米晶的表面带有电荷，在中性或生理学 pH 的环境下与抗体产生强烈的吸附作用，使抗体牢固结合在金纳米晶的表面，这样就使抗体固定在金电极表面，制成纳米免疫生物传感器。



ISSN 1008-4274

1. 一种纳米免疫生物传感器的制备方法，包括下列几个步骤：

一 金纳米晶在金电极表面的固定：

- 1) 将处理好清洁的金电极浸入含有巯基化合物的溶液中，在室温下浸泡 1~10 个小时，取出后用大量高纯水清洗干净并用高纯氮气吹干；
- 2) 将电极放入 pH 值为 3~10 的金纳米晶溶液中，在暗处组装 1~20 个小时，取出后用高纯水清洗干净；

二 抗体在金纳米晶修饰电极上的固定：

- 1) 将修饰了金纳米晶的电极放入 0.5 ml 含有 0.1 mg/ml 抗体的磷酸缓冲溶液中，pH 为 6~9，分别在 4℃ 和 37℃ 下浸泡过夜；
- 2) 将浸泡过夜的电极取出后用 0.02M 的磷酸缓冲溶液，pH 为 7.4，洗掉与金纳米晶结合不够稳定的抗体后，放入 0.5 mg/ml 的牛血清白蛋白中作用 60 分钟，并用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗。

2. 根据权利要求 1 所述的纳米免疫生物传感器，其特征在于所述巯基化合物为巯基苯胺或巯基乙胺。

## 纳米免疫生物传感器

### 技术领域

本发明涉及纳米免疫生物传感器的制备方法。

### 背景技术

利用化学方法检测抗原与抗体的相互作用是目前许多研究的发展方向。将高灵敏度的传感技术与特异性免疫反应结合起来，用以监测抗原与抗体反应的生物传感器称作免疫传感器，应用于医学诊治、环境污染监测和食物分析等方面。免疫传感器的工作原理和传统的免疫测试法相似，都属于固相免疫测试法，即把抗原或抗体固定在固相支持物表面来检测样品中的抗体或抗原。在免疫诊断领域发展的近 15 年里，人们把更多的兴趣放在了抗体固定在固相支持物表面的结合动力学方面。生物样品被固定在电极表面，将生物的相互作用转化为电信号达到检测生物活动的目的。如何在电极表面固定生物样品对构建生物传感器、免疫传感器、生物电子设备有着极其重要的实际应用价值。而生物传感器的寿命往往决定于抗体和换能器之间结合的状况。以前的工作中，Richad 等 (Richad, C.; Korri-Youssoufi, H.; Yassar, A. *Synt. Met.*, 2001, 121, 1261.) 合成了一种共轭聚合物，作为抗体和换能器的连接物，这种共轭聚合物还可以进行直接的化学取代，例如通过取代反应可以和二茂铁、冠状醚、DNA 基团等相连接。Ben-Dov 等 (Ben-Dov, I., Willner, I.,

Zisman, E. Anal. Chem. 1997, 69, 3506) 采用顺丁烯二酰亚胺单层膜来固定抗体, 但这种传感器是一次性的, 不能重复使用。

## 发明内容

本发明的目的是提出一种纳米免疫生物传感器的制备方法。

本发明在金电极表面化学修饰巯基化合物, 如巯基苯胺、巯基乙胺等。利用巯基化合物的巯基端可以和金电极以化学键的方式结合, 将巯基端固定在金电极上而使另一端的氨基裸露在电极表面。在一定条件下裸露的氨基可以和金纳米晶以化学键结合, 从而将金纳米晶固定在金电极表面。金纳米晶的表面带有电荷, 在中性或生理学 pH 的环境下与抗体产生强烈的吸附作用, 使抗体牢固结合在金纳米晶的表面, 这样就使抗体固定在金电极表面, 制成纳米免疫生物传感器。

纳米免疫生物传感器的制备, 包括下列几个步骤:

### 一 金纳米晶在金电极表面的固定:

- 1) 处理好清洁的金电极浸入含有巯基化合物的溶液中, 在室温下浸泡 1~10 个小时, 取出后用大量高纯水清洗干净并用高纯氮气吹干;
- 2) 电极放入 pH 值为 3~10 的金纳米晶溶液中, 在暗处组装 1~20 个小时, 取出后用高纯水清洗干净;

### 二 抗体在金纳米晶修饰电极上的固定:

- 3) 将修饰了金纳米晶的电极放入 0.5 ml 含有 0.1 mg/ml 抗体的磷酸缓冲溶液中, pH 为 6~9, 分别在 4°C 和 37°C 下浸泡过夜;

- 4) 将浸泡过夜的电极取出后用 0.02M 的磷酸缓冲溶液, pH 为 7.4, 洗掉与金纳米晶结合不够稳定的抗体后, 放入 0.5 mg/ml 的牛血清白蛋白 (BSA) 中作用 60 分钟, 并用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗。

### 三 免疫检测:

将电极放入不同浓度的抗原中, 在 37 °C 下作用 30 分钟, 取出后用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗, 用电化学阻抗谱进行检测。结果表明这种方法具有很好的灵敏度, 在检测乙肝病毒表面抗原时, 浓度线性范围为 0.5~200  $\mu\text{g}/\text{l}$ , 检测限为 50 ng/l。与其他的方法相比灵敏度有很大的提高。

本发明制备的纳米免疫生物传感器制备方法简单, 利用金纳米晶固定抗体, 最大程度上保持了抗体的活性。而且这种传感器可以重复使用, 是纳米技术与免疫技术相结合的产物。同时利用电化学的方法检测, 可以获得很高的灵敏度。

### 附图说明

图 1 是采用 4-巯基苯胺将金纳米晶固定在金电极表面示意图。图中可见金纳米晶的表面带有电荷, 在中性或生理学 pH 的环境下可与抗体产生强烈的吸附作用, 使抗体牢固结合在金纳米晶的表面, 这样就使抗体固定在金电极表面。用固定抗体的金电极检测不同浓度的抗原。

附图 2 是用本发明的传感器检测不同浓度的乙肝病毒表面抗原的曲线图, 用交流阻抗检测, 结果表明这种方法具有很好的灵敏度, 检测乙肝病毒表面抗原的浓度线性范围为 0.5~200  $\mu\text{g}/\text{l}$ , 检测限

为 50 ng/l。

具体实施方式

实施例 1:

一 金纳米晶在金电极表面的固定:

- 1) 将处理好清洁的金电极浸入 0.1 M 的 4-巯基苯胺溶液中, 在室温下浸泡 1 个小时, 取出后用无水乙醇清洗, 将物理吸附在电极表面的 4-巯基苯胺清洗干净。最后用大量高纯水清洗干净并用高纯氮气吹干。
- 2) 电极放入 pH 值为 3 的金纳米晶溶液中, 在暗处组装 1 个小时, 取出后用高纯水清洗干净。

二 抗体在金纳米晶修饰电极上的固定:

- 1) 将修饰了金纳米晶的电极放入 0.5 ml 含有 0.1 mg/ml 抗体的磷酸缓冲溶液中, pH 为 6。并在微型旋涡混合仪充分混合 20 分钟后, 在 4℃ 下浸泡过夜。
- 2) 取出后用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液洗掉与金纳米晶结合不够稳定的抗体, 放入 0.5 mg/ml 的牛血清白蛋白 (BSA) 中作用 60 分钟, 并用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗。

三 免疫检测:

将电极放入不同浓度的抗原中, 在 37 °C 下作用 30 分钟, 取出后用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗。用电化学阻抗谱进行检测。检测乙肝病毒表面抗原的浓度线性范围为 0.5~2  $\mu$ g/l。结果表明抗体活性受到影响, 很少的抗体被固定。

## 实施例 2:

### 一 金纳米晶在金电极表面的固定:

- 1) 将处理好清洁的金电极浸入 0.1 M 的 4-巯基苯胺溶液中, 在室温下浸泡 4 个小时, 取出后用无水乙醇清洗, 将物理吸附在电极表面的 4-巯基苯胺清洗干净。最后用大量高纯水清洗干净并用高纯氮气吹干。
- 2) 将电极放入 pH 值为 10 的金纳米晶溶液中, 在暗处组装 5 个小时, 取出后用高纯水清洗干净。

### 二 抗体在金纳米晶修饰电极上的固定:

- 1) 将修饰了金纳米晶的电极放入 0.5 ml 含有 0.1 mg/ml 抗体的磷酸缓冲溶液中, pH 为 6。并在微型旋涡混合仪充分混合 20 分钟后, 在 37°C 下浸泡过夜。
- 2) 取出后用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液洗掉与金纳米晶结合不够稳定的抗体, 放入 0.5 mg/ml 的牛血清白蛋白(BSA) 中作用 60 分钟, 并用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗。

### 三 免疫检测:

将电极放入不同浓度的抗原中, 在 37 °C 下作用 30 分钟, 取出后用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗。用电化学阻抗谱进行检测。检测乙肝病毒表面抗原的浓度线性范围为 0.5~1  $\mu$ g/l。

## 实施例 3:

### 一 金纳米晶在金电极表面的固定:

- 1) 处理好清洁的金电极浸入 0.1 M 的 4-巯基苯胺溶液中，在室温下浸泡 6 个小时，取出后用无水乙醇清洗，将物理吸附在电极表面的 4-巯基苯胺清洗干净。最后用大量高纯水清洗干净并用高纯氮气吹干。
- 2) 将电极放入 pH 值为 8 的金纳米晶溶液中，在暗处组装 10 个小时，取出后用高纯水清洗干净。

## 二 抗体在金纳米晶修饰电极上的固定：

- 1) 修饰了金纳米晶的电极放入 0.5 ml 含有 0.1 mg/ml 抗体的磷酸缓冲溶液中，pH 为 7.4。并在微型旋涡混合仪充分混合 20 分钟后，在 37℃ 下浸泡过夜。
- 2) 取出后用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液洗掉与金纳米晶结合不够稳定的抗体，放入 0.5 mg/ml 的牛血清白蛋白(BSA) 中作用 60 分钟，并用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗。

## 三 免疫检测：

将电极放入不同浓度的抗原中，在 37 °C 下作用 30 分钟，取出后用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗。用电化学阻抗谱进行检测。检测乙肝病毒表面抗原的浓度线性范围为 1~5  $\mu$ g/l。

## 实施例 4：

### 一 金纳米晶在金电极表面的固定：

- 1) 处理好清洁的金电极浸入 0.1 M 的 4-巯基苯胺溶液中，在室温下浸泡 4 个小时，取出后用无水乙醇清洗，将物理吸附在电极表面的 4-巯基苯胺清洗干净。最后用大量高纯水清洗

干净并用高纯氮气吹干。

- 2) 将电极放入 pH 值为 3.5 的金纳米晶溶液中，在暗处组装 5 个小时，取出后用高纯水清洗干净。

## 二 抗体在金纳米晶修饰电极上的固定：

- 1) 将修饰了金纳米晶的电极放入 0.5 ml 含有 0.1 mg/ml 抗体的磷酸缓冲溶液中，pH 为 8。并在微型旋涡混合仪充分混合 20 分钟后，在 4℃ 下浸泡过夜。
- 2) 取出后用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液洗掉与金纳米晶结合不够稳定的抗体，放入 0.5 mg/ml 的牛血清白蛋白(BSA) 中作用 60 分钟，并用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗。

## 三 免疫检测：

将电极放入不同浓度的抗原中，在 37 °C 下作用 30 分钟，取出后用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗。用电化学阻抗谱进行检测。检测乙肝病毒表面抗原的浓度线性范围为 1~20  $\mu$ g/l。结果表明抗体固定量不大。

## 实施例 5：

### 一 金纳米晶在金电极表面的固定：

- 1) 处理好清洁的金电极浸入 0.1 M 的 4-巯基苯胺溶液中，在室温下浸泡 10 个小时，取出后用无水乙醇清洗，将物理吸附在电极表面的 4-巯基苯胺清洗干净。最后用大量高纯水清洗干净并用高纯氮气吹干。
- 2) 将电极放入 pH 值为 3.5 的金纳米晶溶液中，在暗处组装

5 个小时，取出后用高纯水清洗干净。

## 二 抗体在金纳米晶修饰电极上的固定：

- 1) 将修饰了金纳米晶的电极放入 0.5 ml 含有 0.1 mg/ml 抗体的磷酸缓冲溶液中，pH 为 9。并在微型旋涡混合仪充分混合 20 分钟后，在 37℃ 下浸泡过夜。
- 2) 取出后用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液洗掉与金纳米晶结合不够稳定的抗体，放入 0.5 mg/ml 的牛血清白蛋白(BSA) 中作用 60 分钟，并用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗。

## 三 免疫检测：

将电极放入不同浓度的抗原中，在 37 °C 下作用 30 分钟，取出后用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗。用电化学阻抗谱进行检测。检测乙肝病毒表面抗原的浓度线性范围为 1~10  $\mu$ g/l，结果表明抗体固定量很少

## 实施例 6：

### 一 金纳米晶在金电极表面的固定：

- 1) 将处理好清洁的金电极浸入 0.1 M 的 4-巯基苯胺溶液中，在室温下浸泡 4 个小时，取出后用无水乙醇清洗，将物理吸附在电极表面的 4-巯基苯胺清洗干净。最后用大量高纯水清洗干净并用高纯氮气吹干。
- 2) 将电极放入 pH 值为 3.5 的金纳米晶溶液中，在暗处组装 5 个小时，取出后用高纯水清洗干净。

### 二 抗体在金纳米晶修饰电极上的固定：

- 1) 修饰了金纳米晶的电极放入 0.5 ml 含有 0.1 mg/ml 抗体的磷酸缓冲溶液中, pH 为 7。并在微型旋涡混合仪充分混合 20 分钟后, 在 4℃ 下浸泡过夜。
- 2) 取出后用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液洗掉与金纳米晶结合不够稳定的抗体, 放入 0.5 mg/ml 的牛血清白蛋白(BSA) 中作用 60 分钟, 并用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗。

### 三 免疫检测:

将电极放入不同浓度的抗原中, 在 37 °C 下作用 30 分钟, 取出后用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗。用电化学阻抗谱进行检测。检测乙肝病毒表面抗原的浓度线性范围为 0.5~100  $\mu$ g/l, 检测限为 100 ng/l。

### 实施例 7:

#### 一 金纳米晶在金电极表面的固定:

- 1) 处理好清洁的金电极浸入 0.1 M 的 4-巯基苯胺溶液中, 在室温下浸泡 4 个小时, 取出后用无水乙醇清洗, 将物理吸附在电极表面的 4-巯基苯胺清洗干净。最后用大量高纯水清洗干净并用高纯氮气吹干。
- 2) 将电极放入 pH 值为 3.5 的金纳米晶溶液中, 在暗处组装 5 个小时, 取出后用高纯水清洗干净。

#### 二 抗体在金纳米晶修饰电极上的固定:

- 1) 饰了金纳米晶的电极放入 0.5 ml 含有 0.1 mg/ml 抗体的磷酸缓冲溶液中, pH 为 7.4。并在微型旋涡混合仪充分混合

20 分钟后，在 4℃ 下浸泡过夜。

- 2) 取出后用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液洗掉与金纳米晶结合不够稳定的抗体，放入 0.5 mg/ml 的牛血清白蛋白 (BSA) 中作用 60 分钟，并用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗。

### 三 免疫检测：

将电极放入不同浓度的抗原中，在 37 °C 下作用 30 分钟，取出后用 0.02M pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗。用电化学阻抗谱进行检测。结果表明这种方法具有很好的灵敏度，检测乙肝病毒表面抗原的浓度线性范围为 0.5~200  $\mu$ g/l，检测限为 50 ng/l。

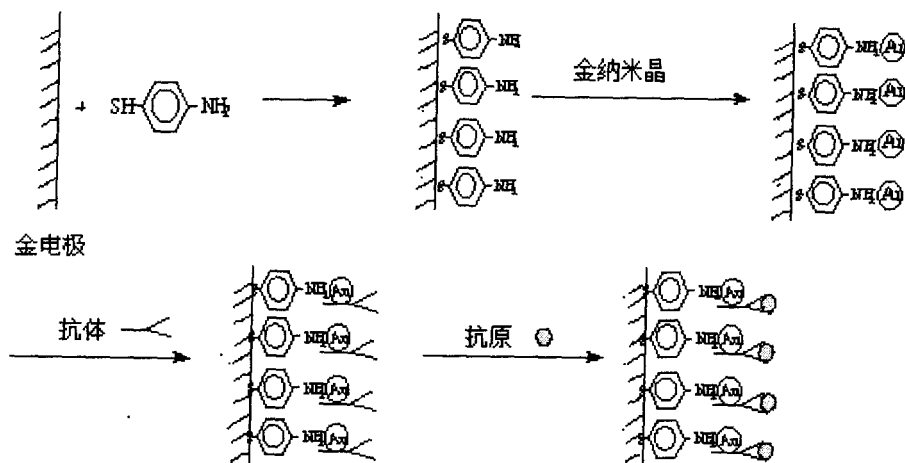


图 1

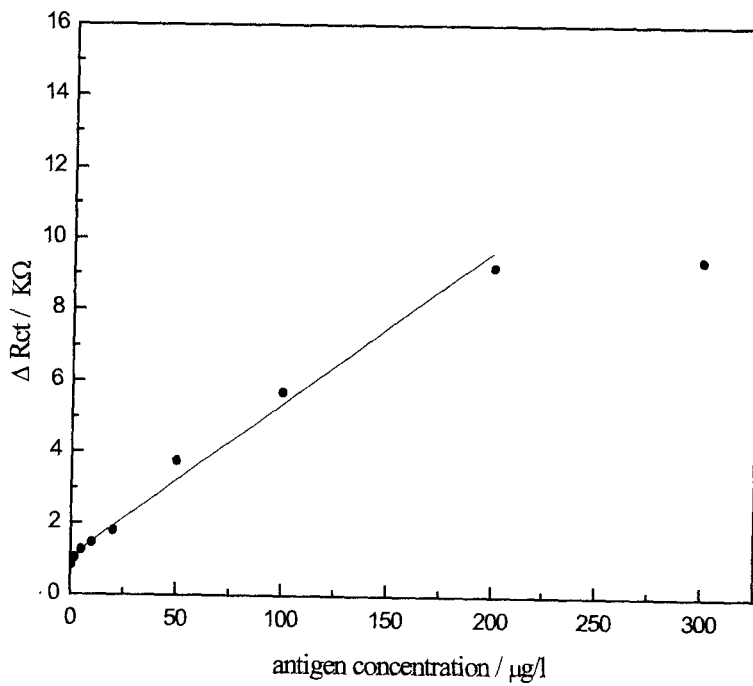


图 2

专利名称(译)	纳米免疫生物传感器		
公开(公告)号	<a href="#">CN1523346A</a>	公开(公告)日	2004-08-25
申请号	CN03127127.8	申请日	2003-09-03
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院长春应用化学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院长春应用化学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院长春应用化学研究所		
[标]发明人	李景虹 王美佳 孙春燕		
发明人	李景虹 王美佳 孙春燕		
IPC分类号	G01N27/02 G01N27/30 G01N27/327 G01N33/53		
其他公开文献	CN1226614C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明在金电极表面化学修饰巯基化合物，如巯基苯胺、巯基乙胺等。利用巯基化合物的巯基端可以和金电极以化学键的方式结合，将巯基端固定在金电极上而使另一端的氨基裸露在电极表面。在一定条件下裸露的氨基可以和金纳米晶以化学键结合，从而将金纳米晶固定在金电极表面。金纳米晶的表面带有电荷，在中性或生理学pH的环境下与抗体产生强烈的吸附作用，使抗体牢固结合在金纳米晶的表面，这样就使抗体固定在金电极表面，制成纳米免疫生物传感器。

