

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 27/403 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410041175.3

[45] 授权公告日 2007 年 12 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 100357727C

[22] 申请日 2004.7.5

[21] 申请号 200410041175.3

[73] 专利权人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市汉口路 22 号

共同专利权人 江苏省肿瘤医院

[72] 发明人 戴宗严 枫 鞠焜先

[56] 参考文献

JP 57-187643 1982.11.18

CN 1438482 A 2003.8.27

审查员 李冰

[74] 专利代理机构 南京苏高专利事务所

代理人 成立珍

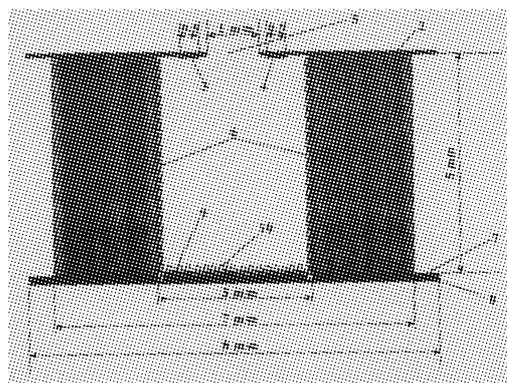
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称

肿瘤标志物的电化学免疫测定方法及微体积免疫测定芯片

[57] 摘要

肿瘤标志物的芯片电化学免疫测定方法：(1) 通过化学修饰将电子传递媒介体固定在环形碳电极内表面，将该媒介体修饰的环形电极的内腔直接作为微反应池。参比电极和对电极置于反应池上方，反应池底部固定的抗原分子功能化膜；(2) 当溶液中只存在适量辣根过氧化物酶标记肿瘤标志物抗体时，温育后酶标抗体与反应池底部固定的抗原分子功能化膜上的抗原分子发生免疫反应使其连接在反应池底部。(3) 当待测抗原溶液中含有 HRP 标记抗体和时，游离的免疫结合物可接触到反应室内壁固定的电子媒介体，从而可以在工作电极上获得催化 H_2O_2 氧化的催化电流，该催化电流与溶液中待测抗原含量成正比。本发明公开了相配合的微体积免



1. 肿瘤标志物的芯片电化学免疫测定方法：其特征是（1）通过化学修饰将电子传递媒介体固定在环形碳电极内表面，将该媒介体修饰的环形电极的内腔直接作为微反应池；参比电极和对电极置于反应池上方，反应池底部固定的抗原分子功能化膜；（2）利用待测抗原溶液中含有 HRP 标记抗体时，竞争免疫反应使部分 HRP 标记抗体与待测抗原结合形成免疫结合物而游离在溶液里，这部分游离的免疫结合物接触到反应室内壁固定的电子媒介体，从而在环形碳电极构成的工作电极上获得催化 H_2O_2 氧化的催化电流，并且该催化电流与溶液中待测抗原含量成正比；（3）通过催化电流的响应值直接获得溶液待测抗原的含量。

2. 如权利要求 1 所述的肿瘤标志物的芯片电化学免疫测定方法，其特征是所述媒介体固定在该环形碳电极内表面，制法是将该电化学预处理的电极浸泡于 20mmol/L 戊二醛溶液中 10-15 小时，用二次水冲洗除去物理吸附的戊二醛后，再浸泡于 5 mL 0.2 mmol/L 硫基媒介体溶液中 3-8 小时获得媒介体修饰电极。

3. 如权利要求 1 所述的肿瘤标志物的芯片电化学免疫测定方法，其特征是所述反应池底部固定的抗原分子功能化膜，它是将壳聚糖粉末在 1%的醋酸溶液中超声溶解配制成 1%的壳聚糖溶液后，将标准待测抗原溶液与该 1%的壳聚糖溶液混合均匀滴涂于薄膜上干燥制得。

4. 微体积免疫测定芯片：其特征是内壁固定有电子媒介体的环形碳电极或贵金属电极为工作电极，环形碳电极组装在基片上，将该媒介体修饰的环形电极的内腔直接作为微反应池，Ag/AgCl 参比电极和碳对电极置于反应池上方的盖上，形成容积为 20-100 μL 的微反应室，反应池底部基片固定有抗原分子功能化膜，并将该膜剪裁成圆形并组装在基片(8)上，组成集温育和检测于一体的一次性免分离微体积免疫芯片。

5. 由权利要求 4 所述的微体积免疫测定芯片：其特征是微体积免疫测定芯片的微反应室容积为 40 μL 的微反应室。

肿瘤标志物的电化学免疫测定方法及微体积免疫测定芯片 技术领域

本发明涉及肿瘤标志物的免疫测定方法及其微体积免疫测定芯片，尤其是以电化学分析技术建立的肿瘤标志物的芯片免疫测定方法。

背景技术

免疫分析是利用抗原/抗体反应来测定痕量物质的一种高灵敏度、高选择性的方法，它为血清肿瘤标志物的临床免疫测定提供了有力手段。通常血清肿瘤标志物的临床免疫测定方法大多采用“双抗体夹心”法，如放射免疫分析法、酶标法、时间分辨荧光法、化学发光和电化学发光法等。放射免疫分析法由于其标记简便，灵敏度高，干扰少，应用范围宽等特点，一度成为临床免疫学检验中最常用的方法。但它需进行放射性操作，对人体构成危害，试剂寿命也有限等局限性，促使人们不断探索非放射性标记的免疫分析方法，因而酶免疫分析、荧光和时间分辨免疫分析、化学发光免疫分析和电化学免疫分析等一系列非放射性标记的新方法相继得到发展。这些方法极大地促进了临床免疫检测项目的推陈出新和检测手段的自动化、智能化和网络化。然而，这些方法需采用专用包被板（管），检测过程需要较长时间的温育、多次洗板和专用仪器检测，检测周期长，操作步骤繁琐，成本高。尽管已出现全自动免疫分析仪，但可检测项目有限，仪器和试剂相当昂贵，难以推广使用，因而在恶性肿瘤的早期诊断、预后监测和大规模筛查方面的应用受到限制。如何简化操作步骤，缩短分析时间，降低测定成本，发展新的免疫检测技术，提高检测手段的灵敏度、准确性，研制微型便携式检测仪器以应对恶性肿瘤的大规模筛查、早期诊断和预后监测的需要是亟待解决的问题。

目前，可用于对恶性肿瘤早期诊断的血清肿瘤标志物进行免疫测定的微型便携式检测仪器及其相关检测芯片少见报道。电化学分析具有许多优越性，如测试探头可微型化，不受体系浊度和颜色影响，方法灵敏度高、速度快、花费低、危害小等。它还具有检测仪器简单、易于微型化的特点，且其中的安培检测信号强度与待测物质的浓度有线性关系，线性范围宽、灵敏度高，因而可直接将检测信号转换为直观易读的浓度值，便于非专业人士使用。通过改变传感器件和施加电位，可方便地实现一机多用。

丝网印刷技术以其墨层厚覆盖力强、适合各种类型的油墨、印刷方式灵活多样、不受承印物大小和性状的限制等特点已广泛用于电化学传感器制备方面，所获得的一次性电极成本低，相互间重复性好，结果准确、可靠，在25℃干燥条件下，传感器的稳定性可保持一年之久。因此用电化学分析方法发展便携式血清肿瘤标志物免疫检测的快速检测仪是目前可选用的最佳途径。

将常规的溶液操作和检测集成于一芯片，它不仅将样品和试剂的耗量降至纳或微升，也提高了分离效率和检测速度，因而近年来备受人们关注。然而，这一技术目前主要用于基因分析和表达研究，如 CN03126932.X 涉及一种生物芯片检测肿瘤基因，对于免疫检测则涉及甚少。由于临床诊断需要，用于肿瘤标志物检测的蛋白芯片已引起关注，但已见报道方法价格昂贵、难以普及。用于对恶性肿瘤早期诊断的血清肿瘤标志物进行免疫测定的微型便携式检测仪器及其相关检测芯片尚未见报道。因此，发展新的免疫检测方法，为实现恶性肿瘤的早期诊断、疗效与预后观察的室外化、普及化和家庭化提供必要的手段非常有意义。

发明内容

本发明目的是：提供一种涉及肿瘤标志物的芯片免疫测定方法及测定装置——微体积检测芯片，以电化学分析技术建立肿瘤标志物的芯片免疫测定方法及微体积免疫测定芯片。本发明目的还在于：利用电化学分析和丝网印刷技术建立肿瘤标志物的芯片免疫分析新方法和检测技术，并研制微型便携式电化学免疫检测装置。

本发明目的的实现：本发明微体积免疫测定芯片的结构如下：

微体积免疫测定芯片包括内壁修饰有电子媒介体的环形碳电极为工作电极，环形碳电极组装在基片上，将该媒介体修饰的环形电极的内腔直接作为微反应池，Ag/AgCl 参比电极和碳对电极置于反应池上方的盖上，形成容积为 40 μL 左右，一般容积范围控制在 20-100 μL 的微反应室，反应池底部基片固定有抗原分子功能化膜，并将该膜剪裁成圆形并组装在基片 8 上，如图 1 所示。

电化学分析技术建立肿瘤标志物的芯片免疫测定方法：

(1) 当溶液中只存在适量 HRP 标记抗体时，温育后 HRP 标记抗体与反应池底部固定的抗原分子功能化膜上的抗原分子发生免疫反应使 HRP 标记抗体连接在反应池底部，此时固定化的 HRP 无法接触修饰在反应室内壁的电子媒介体，因而无法催化溶液中 H_2O_2 氧化，工作电极上得不到催化电流信号。

(2) 当待测抗原溶液中含有辣根过氧化酶 (HRP) 标记抗体时，竞争免疫反应使部分 HRP 标记抗体与待测抗原结合形成免疫结合物而游离在溶液里，另一部分 HRP 标记抗体连接在反应池底部。游离在溶液里的免疫结合物可接触到反应室内壁固定的电子媒介体，从而可以在工作电极上获得催化 H_2O_2 氧化的催化电流，并且该催化电流与溶液中待测抗原含量成正比。

(3) 通过催化电流的响应值可以直接获得溶液待测抗原的含量。

(4) 通常的媒介体包括氧化还原染料、金属配合物等。

(5) 本发明通过媒介体修饰环形碳电极内壁组成集温育和检测于一体的一次性免分离微体积免疫芯片，利用安培分析法，结合固定化媒介体技术与竞争免疫分析方法，能对肿瘤标志物进行快速免分离测定。

本发明的特点是：

通过化学修饰技术将媒介体固定在该环形碳电极内表面，利用环形碳电极的内腔直接作为微反应池，整合参比电极和对电极于反应池，结合竞争免疫分析方法，利用酶标抗体与待测抗原结合生成的免疫结合物游离在反应池中，测定游离免疫结合物上标记酶催化氧化 H_2O_2 的催化电流，直接获得待测抗原的浓度。该方法较现有的免疫分析方法及免疫传感器具有以下优点：

(1) 无需向待测样品溶液中加入媒介体，避免了媒介体及其反应产物等对电极的污染，简化了分析步骤，缩短分析时间，工作电极可重复使用，降低成本；

(2) 将温育和检测集成于一微体积芯片，样品和试剂的耗量少，温育时间短，且测定中无需分离洗涤步骤，一步完成，降低测定成本，提高检测速度和效率；

(3) 利用化学修饰和丝网印刷等技术制备免疫芯片，制备简单，成本低廉，携带方便，具有很好的精确性、重复性和稳定性，不仅在理论上为肿瘤标志物的免分离快速测定建立一种新方法，而且适合于人们对免疫传感器件的迫切需求，具有一定市场竞争力。

本发明提供了方法和装置，克服现有免疫分析方法的缺点，避免在免疫分析中媒介体（稳定液或培养液等）的加入，简化分析步骤。将固定化媒介体技术用于无试剂生物传感器的开发，获得的传感器在测定时无需向样品溶液中加入媒介体，避免了媒介体及其反应产物对电极表面的污染，简化分析体系及操作，缩短分析时间；通过将温育和检测集成于一微体积芯片，不仅将样品和试剂的耗量降至微升，缩短温育时间，减少样品消耗，且测定中无需分离洗涤步骤，测定一次完成，降低测定成本，提高检测速度和效率，实现临床肿瘤标志物的快速分析。

本发明结合化学修饰、微加工和丝网印刷等技术发展可批量制备的一次性免分离肿瘤标志物快速测定免疫芯片，该芯片廉价，便携，用于临床肿瘤标志物的检测，将推进免疫检测技术和恶性肿瘤早期诊断普及化和室外化以及在大规模筛查和预后监测方面具有广阔的应用前景，对免疫科学、临床医学、分析化学和材料科学的发展具有重要的意义。

附图说明

图 1 为本发明微反应室俯视图

图 2 为本发明一次性免分离微体积免疫测定芯片的结构示意图

如图所示：1、内壁修饰有电子媒介体的环形碳电极；2、整合有 Ag/AgCl 参比电极和碳对电极的上盖；3、Ag/AgCl 参比电极；4、碳对电极；5、加样孔；6、电子媒介体；7、安装环形碳电极的基片；8、安装抗原功能化膜的基片；9、固定有抗原分子的功能化膜；10、固定化抗原分子。

具体实施方式

1.1 一次性免疫芯片的制备

一次性免分离微体积免疫测定芯片由图1所示部件组成。环形碳电极内径 3 mm，

外径 7 mm, 厚 5 mm, 其内壁修饰电子媒介体6后作为工作电极。固定有待测抗原分子的功能化膜9在PVC膜上制备, 将该膜剪裁成外径 2.5 mm的圆形并组装在基片8上。基片8与基片7重合后, 将环形碳电极组装在基片7上形成容积为40 μL 左右的微反应室。最后将整合有Ag/AgCl参比电极和碳对电极的上盖2固定在环形碳电极上部, 使该微反应室底部具有不导电的抗原功能化膜, 顶部为Ag/AgCl参比电极和碳对电极, 与媒介体修饰环形碳电极内壁组成集温育和检测于一体的一次性免分离微体积免疫芯片。

1.2 丝网印刷电极的制备

利用丝网印刷技术在0.025 mm 厚的PVC薄膜上印刷整合有Ag/AgCl参比电极和碳对电极的上盖(1)和安装环形碳电极的基片(2)两组电极。电极的制作是通过在印刷的银浆基层上覆盖印刷碳层(碳浆层宽度比银浆基层略大0.5-1 mm), 其中上盖包括参比电极、对电极和加样孔。上部未印刷碳浆的银电极使用前在饱和KCl溶液中电化学氧化制备Ag/AgCl参比电极; 完全印刷有碳浆的电极直接作为对电极。基片上部有一个与环形碳电极相同内、外径的未被印刷碳浆的银环, 其下部为完全印刷有碳浆的条带作为导线。印刷好的电极按需要剪裁成形。

1.3 媒介体修饰环形碳工作电极的制备

将直径7 mm 的光谱纯碳棒加工成厚5 mm, 内径3 mm的碳环, 碳环内表面依次用4、5、6号均相砂纸和丝绸抛光后, 用二次水冲洗, 并在二次水中超声30 秒。

用502胶将获得的干净碳环粘在基片上组成电极。该电极在0.1 mol/L pH 5.0 的磷酸盐缓冲溶液中于+1.75 V恒电位扫描300秒后, 再在+0.3 V到+1.3 V之间循环扫描直至获得稳定的电流。将该电化学预处理的电极浸泡于20 mmol/L 戊二醛溶液中10-15小时, 用二次水冲洗除去物理吸附的戊二醛后, 再浸泡于5 mL 0.2 mmol/L 硫堇媒介体溶液中3-8小时获得媒介体修饰电极。制备好的修饰电极浸泡于pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液中静置待用。除硫堇外, 还可以将其它媒介体固定在该环形电极内。

1.4 抗原分子功能化膜的制备

将壳聚糖粉末在1%的醋酸溶液中超声溶解配制成1%的壳聚糖溶液。将一定浓度的标准待测肿瘤标志物(抗原)溶液与该1%的壳聚糖溶液以一定比例混合均匀并在4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置12小时。吸取5 μL 该混合溶液滴涂于0.025 mm 厚的PVC薄膜上在室温下干燥5~6小时, 获得的抗原膜修饰PVC薄膜经二次水反复冲洗除去表面吸附的抗原分子后, 浸泡于pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液中于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

1.5 肿瘤标志物的测定

测定原理 该一次性肿瘤标志物免疫芯片利用安培分析法, 结合固定化媒介体技术与竞争免疫分析方法, 对肿瘤标志物进行快速免分离测定。当溶液中只存在适量辣根过氧化酶标记肿瘤标志物抗体(酶标抗体)时, 温育后酶标抗体与反应池底部固定的抗原分子功能化膜上的抗原分子发生免疫反应使其连接在反应池底部。此

时固定化的 HRP 无法接触到修饰在反应室内壁的电子媒介体, 因此不能催化溶液中 H_2O_2 氧化, 在工作电极上得不到该催化电流信号; 当待测抗原溶液中含有 HRP 标记抗体和时, 竞争免疫反应使部分 HRP 标记抗体与待测抗原结合形成免疫结合物而游离在溶液里, 这部分游离的免疫结合物可接触到反应室内壁固定的电子媒介体, 从而可以在工作电极上获得催化 H_2O_2 氧化的催化电流, 并且该催化电流与溶液中待测抗原含量成正比。通过催化电流的响应值可以直接获得溶液待测抗原的含量。

测定过程 (1) 免疫测定条件的优化, 包括温育时间、测定溶液中 H_2O_2 的浓度和反应溶液中酶标抗体的量。(2) 配制一系列含不同浓度的待测抗原标准溶液和固定量酶标记抗体和 H_2O_2 的反应溶液, 在最佳测定条件下, 分别测定出标记酶催化氧化溶液中 H_2O_2 的催化电流, 得到该待测抗原的测定标准曲线。(3) 在最佳测定条件下, 测定温育含待测抗原、固定量酶标记抗体和 H_2O_2 的反应溶液后标记酶催化氧化溶液中 H_2O_2 的催化电流, 在该抗原测定的标准曲线上查出相应的浓度。

检测实施例:

下面以癌胚抗原 (CEA) 为例说明肿瘤标志物微体积免疫测定芯片制备和电化学芯片免疫测定新方法的应用。血清 CEA 的临床意义是对消化道恶性肿瘤有较高阳性率。

2.1 CEA 免疫传感器的制备

按上述步骤制备戊二醛修饰电极, 将该电极浸泡于 5 mL 0.2 mmol/L 硫基溶液中 5 小时获得硫基修饰电极。制备好的硫基修饰电极浸泡于 pH 7.0 磷酸盐缓冲溶液中待用。

将壳聚糖粉末在 1% 的醋酸溶液中超声溶解配制成 1% 的壳聚糖溶液。500 ng/mL CEA 标准溶液与该 1% 的壳聚糖溶液以 1:1 (V:V) 混合均匀并在 4 °C 下放置 12 小时。吸取 5 μ L 该混合溶液滴涂于 0.025 mm 厚的 PVC 薄膜制备 CEA 膜修饰 PVC 薄膜, 并浸泡于 pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液中在 4 °C 保存待用。

将制备的 CEA 膜修饰 PVC 薄膜剪成直径 2.5 mm 的圆形薄片并按上述步骤完成 CEA 免疫测定芯片的组装。

2.2 CEA 的测定

(a) 测定条件的优化: 分别改变温育时间、反应溶液中 H_2O_2 及 HRP 标记 CEA 抗体的量, 选择最大电流响应时相应的量作为最佳测定条件。

(b) CEA 的测定: 在优化的实验条件下, 分别将一系列标准 CEA 抗原和固定量 HRP-CEA 抗体和 H_2O_2 的反应溶液加入 CEA 免疫芯片中, 测定标记 HRP 催化氧化 H_2O_2 的催化电流, 获得 CEA 测定的标准曲线, 从而测定样品中 CEA 抗原的浓度。

其它肿瘤标志物的抗原的使用类同上述实施例, 也没有超出本发明方法的范围。

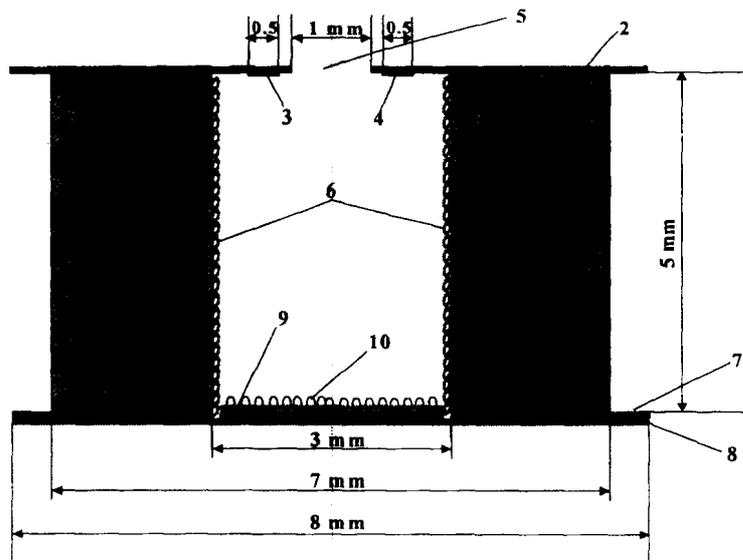


图 1

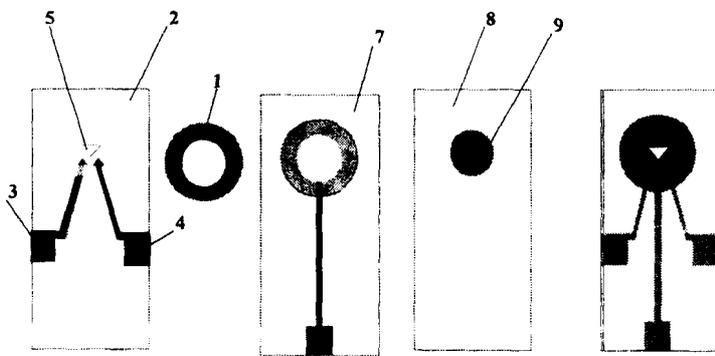


图 2

专利名称(译)	肿瘤标志物的电化学免疫测定方法及微体积免疫测定芯片		
公开(公告)号	CN100357727C	公开(公告)日	2007-12-26
申请号	CN200410041175.3	申请日	2004-07-05
[标]申请(专利权)人(译)	南京大学 江苏省肿瘤医院		
申请(专利权)人(译)	南京大学 江苏省肿瘤医院		
当前申请(专利权)人(译)	南京大学 江苏省肿瘤医院		
[标]发明人	戴宗 严枫 鞠焯先		
发明人	戴宗 严枫 鞠焯先		
IPC分类号	G01N27/403 G01N27/327 G01N33/53		
代理人(译)	成立珍		
审查员(译)	李冰		
其他公开文献	CN1614405A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

肿瘤标志物的芯片电化学免疫测定方法：(1)通过化学修饰将电子传递媒介体固定在环形碳电极内表面，将该媒介体修饰的环形电极的内腔直接作为微反应池。参比电极和对电极置于反应池上方，反应池底部固定的抗原分子功能化膜；(2)当溶液中只存在适量辣根过氧化物酶标记肿瘤标志物抗体时，温育后酶标抗体与反应池底部固定的抗原分子功能化膜上的抗原分子发生免疫反应使其连接在反应池底部。(3)当待测抗原溶液中含有HRP标记抗体和时，游离的免疫结合物可接触到反应室内壁固定的电子媒介体，从而可以在工作电极上获得催化H₂O₂氧化的催化电流，该催化电流与溶液中待测抗原含量成正比。本发明公开了相配合的微体积免疫测定芯片。

