



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103630687 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 12

(21) 申请号 201310410554. 4

(22) 申请日 2013. 09. 10

(71) 申请人 杭州电子科技大学

地址 310018 浙江省杭州市下沙高教园区 2 号大街

(72) 发明人 李杜娟 王剑平 周玲 盖玲

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务有限公司 33200

代理人 杜军

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

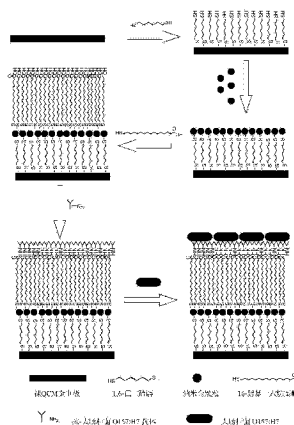
权利要求书2页 说明书4页 附图4页

(54) 发明名称

一种纳米压电免疫传感器的制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种纳米压电免疫传感器的制备方法,本发明用纳米金颗粒修饰压电石英晶体金电极,然后用酒精和去离子水冲洗后氮气干燥,采用自组装技术将抗-大肠杆菌 0157:H7 抗体修饰于纳米金表面,再将所述压电石英晶体用乙醇胺溶液处理即得到纳米压电免疫传感器。本发明纳米压电免疫传感器制备方法简单,用于大肠杆菌 0157:H7 的检测方法简易便行、响应时间短,为食源性致病菌的快速检测创造了重要条件。



1. 纳米压电免疫传感器制备方法,其特征在于:用纳米金颗粒修饰压电石英晶体金电极,然后用酒精和去离子水冲洗后氮气干燥,采用自组装技术将抗-大肠杆菌 0157:H7 抗体修饰于纳米金表面,再将所述压电石英晶体用乙醇胺溶液处理即得到纳米压电免疫传感器。

2. 如权利要求 1 所述的纳米压电免疫传感器制备方法,其特征在于:所述压电石英晶体金电极用纳米金颗粒修饰之前,依次经 1 M NaOH、1 M HCl、现配的超级 Piranha 试剂分别处理 5 分钟、2 分钟、5 分钟,每次处理后都用去离子水冲洗,进行氮气干燥。

3. 如权利要求 2 所述的纳米压电免疫传感器制备方法,其特征在于:所述超级 Piranha 试剂由 61% $\text{HNO}_3$ 、30% $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{H}_2\text{SO}_4$  以体积比为 1:10:6 的比例混合而成。

4. 如权利要求 1 所述的纳米压电免疫传感器制备方法,其特征在于:所述纳米金颗粒采用柠檬酸钠还原氯金酸制备,具体包括以下两步:

首先是金胶种子的制备:将 100 mL 质量浓度为 0.01% 的  $\text{HAuCl}_4$  溶液煮沸并不断搅拌 1 分钟;接着依次加入 1mL 质量浓度为 1% 的柠檬酸钠和 1mL 质量浓度为 0.075% 硼氢化钠的 1% 柠檬酸钠溶液,间隔一分钟;继续搅拌 5 分钟,然后在 4 ° C 下保存;

其次是不同尺寸金胶的制备:250mL 去离子水中加入 2.3mL 质量浓度为 1% 的  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  煮沸,接着加入 150  $\mu\text{L}$  金胶种子和 4mL 质量浓度为 1% 的柠檬酸钠溶液,制成 30nm 的纳米金颗粒。

5. 如权利要求 1 所述的纳米压电免疫传感器制备方法,其特征在于:所述纳米金颗粒通过 1,6-己二硫醇修饰到压电石英晶体金表面,具体是:清洗后的压电石英晶体金电极浸泡在 0.8~1 mL 的 1,6-己二硫醇酒精溶液中,在避光、常温的条件下过夜;然后依次用酒精和去离子水冲洗,氮气干燥;修饰了 1,6-己二硫醇的压电石英晶体金电极浸泡于 1 mL 的 30 nm 的纳米金颗粒溶液中,在常温下过夜;接着依次用酒精和去离子水冲洗,氮气干燥。

6. 如权利要求 1 所述的纳米压电免疫传感器制备方法,其特征在于:抗-大肠杆菌 0157:H7 抗体采用自组装 16-巯基十六烷基酸膜修饰到传感器表面,具体步骤如下:

(1) 修饰了纳米金颗粒的压电石英晶体金电极浸泡于 16-巯基十六烷基酸的乙醇溶液中过夜,然后依次用酒精和去离子水冲洗,氮气干燥。

7. (2) 将修饰了 16-巯基十六烷基酸的压电石英晶体金电极安装到流动池中,压电石英晶体金电极在流动池中时的操作如下:

注入 1 mL 去离子水,得到基线;

注入 75 mM EDC-15 mM NHS 水溶液,反应 15~30 分钟;

依次注入 1 mL 去离子水、2 mL PBS;

立即注入 250  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抗-大肠杆菌 0157:H7 抗体的 PBS 溶液,反应 1 个小时;

注入 3 mL PBS,得到基线;

注入 0.5 mL 乙醇胺溶液,反应 5 分钟;

注入 3 mL PBS,清洗压电石英晶体金电极,得到基线;

纳米压电免疫传感器在大肠杆菌 0157:H7 检测中的应用,其特征在于:

采用流动注射方法检测,大肠杆菌 0157:H7 与纳米压电免疫传感器反应时间为 1 小时。

8. 如权利要求 7 所述的应用,其特征在于:检测大肠杆菌 0157:H7 之前,纳米压电免疫传感器用 1 mL 的 1 mM NaOH 冲洗。

9. 如权利要求 7 所述的应用,其特征在于:采用 QCA 922 石英晶体分析仪实时监测大肠杆菌 O157:H7 检测过程中电极的频率和电阻变化。

## 一种纳米压电免疫传感器的制备方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种纳米压电免疫传感器,尤其涉及一种纳米压电免疫传感器制备方法及其在大肠杆菌 0157:H7 的检测方面的应用。

### 背景技术

[0002] 食源性疾病为目前国际上最突出的公共卫生问题之一。我国卫生部每年通报的年度食物中毒报告中,细菌性食物中毒的报告起数和中毒人数最多。致病菌污染已成为影响中国食品安全的罪魁祸首。最近几年,大肠杆菌 0157:H7 的暴发对我国经济造成了重大损失。因此,我国将大肠杆菌 0157:H7 列为 21 世纪对中国人卫生健康具有重大影响的 12 种病原微生物之一。对大肠杆菌 0157:H7 进行快速检测,预防大肠杆菌 0157:H7 的暴发传染,避免给社会造成严重的经济损失等具有重大意义!

快速检测致病菌一直是个挑战。检测致病菌的传统方法一般包括微生物培养和病菌的分离,然后用生物化学或者血清学的测试进行确认。虽然传统方法的检测限很低,并且能对复杂的食品样品进行检测,但是它们同时以费时和高强度的劳动著称。现有的几种快速检测方法虽比传统的培养检测方法有所改善,却存在需要较昂贵仪器、前处理时间较长、以及过程烦琐等不足,而且对实验操作人员的专业技术熟练程度也有要求。

[0003] 压电石英晶体微天平(Quartz Crystal Microbalance, QCM)免疫传感器,无需经典的免疫分析方法如放射性同位素标记法及酶联耦合方法中的标记和分离步骤,可以简化分析操作程序,提高分析速度,因此具有响应快、特异性好、小型简便等特点,在致病菌检测的实际应用中潜力巨大。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种纳米压电免疫传感器的制备方法,该纳米压电免疫传感器能够用于大肠杆菌 0157:H7 的快速检测。本发明的另一目的在于提供上述纳米压电免疫传感器应用于大肠杆菌 0157:H7 检测。

[0005] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

纳米压电免疫传感器制备方法,具体是:用纳米金颗粒修饰压电石英晶体金电极,然后用酒精和去离子水冲洗后氮气干燥,采用自组装技术将抗-大肠杆菌 0157:H7 抗体修饰于纳米金表面,再将所述压电石英晶体用乙醇胺溶液处理即得到纳米压电免疫传感器。

[0006] 上述压电石英晶体金电极用纳米金颗粒修饰之前,依次经 1 M NaOH、1 M HCl、现配的超级 Piranha 试剂分别处理 5 分钟、2 分钟、5 分钟,每次处理后都用去离子水冲洗,进行氮气干燥。

[0007] 上述超级 Piranha 试剂由 61% $\text{HNO}_3$ 、30% $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{H}_2\text{SO}_4$  以体积比为 1:10:6 的比例混合而成。

[0008] 上述纳米金颗粒采用柠檬酸钠还原氯金酸制备。首先是金胶种子的制备。将 100 mL 质量浓度为 0.01% 的  $\text{HAuCl}_4$  溶液煮沸并不断搅拌 1 分钟;接着依次加入 1 mL 质量浓度

为 1% 的柠檬酸钠和 1mL 质量浓度为 0.075% 硼氢化钠的 1% 柠檬酸钠溶液, 间隔一分钟; 继续搅拌 5 分钟, 然后在 4℃ 下保存。其次是不同尺寸金胶的制备。250mL 去离子水中加入 2.3mL 质量浓度为 1% 的  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  煮沸, 接着加入 150  $\mu\text{L}$  金胶种子和 4mL 质量浓度为 1% 的柠檬酸钠溶液, 制成 30nm 的纳米金颗粒。

[0009] 上述纳米金颗粒通过 1,6-己二硫醇修饰到压电石英晶体金表面。清洗后的压电石英晶体金电极浸泡在 0.8 ~ 1 mL 的 1,6-己二硫醇酒精溶液 (0.5%, v/v) 中, 在避光、常温的条件下过夜; 然后依次用酒精和去离子水冲洗, 氮气干燥。修饰了 1,6-己二硫醇的压电石英晶体金电极浸泡于 1 mL 的 30 nm 的纳米金颗粒溶液中, 在常温下过夜; 接着依次用酒精和去离子水冲洗, 氮气干燥。

[0010] 上述抗-大肠杆菌 0157:H7 抗体采用自组装 16-巯基十六烷基酸膜修饰到传感器表面。步骤如下:

(1) 修饰了纳米金颗粒的压电石英晶体金电极浸泡于 16-巯基十六烷基酸的乙醇溶液中过夜, 然后依次用酒精和去离子水冲洗, 氮气干燥。

[0011] (2) 将修饰了 16-巯基十六烷基酸的压电石英晶体金电极安装到流动池中, 电极在流动池中时的操作如下:

注入 1 mL 去离子水, 得到基线;

注入 75 mM EDC-15 mM NHS 水溶液, 反应 15 ~ 30 分钟;

依次注入 1 mL 去离子水、2 mL PBS;

立即注入 250  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抗-大肠杆菌 0157:H7 抗体的 PBS 溶液, 反应 1 个小时;

注入 3 mL PBS, 得到基线;

注入 0.5 mL 乙醇胺溶液, 反应 5 分钟;

注入 3 mL PBS, 清洗电极, 得到基线;

本发明的另一个目的是这样实现的: 纳米压电免疫传感器应用于大肠杆菌 0157:H7 的检测, 采用流动注射方法检测, 大肠杆菌 0157:H7 与传感器反应时间为 1 小时。

[0012] 上述的纳米压电免疫传感器用于大肠杆菌 0157:H7 的检测方法检测大肠杆菌 0157:H7 之前, 传感器用 1 mL 的 1 mM NaOH 冲洗。

[0013] 上述的纳米压电免疫传感器用于大肠杆菌 0157:H7 的检测方法采用 QCA 922 石英晶体分析仪实时监测大肠杆菌 0157:H7 检测过程中电极的频率和电阻变化。

[0014] 本发明的有益效果是:

本发明制备纳米压电免疫传感器的自组装技术, 方法简单、操作简便。制备的纳米压电免疫传感器结构简单, 使用方便。

[0015] 本发明制备的纳米压电免疫传感器用于大肠杆菌 0157:H7 的检测方法简便易行、响应时间短且检测成本低, 实现了对大肠杆菌 0157:H7 的快速检测。

[0016] 本发明加快了该免疫传感器商业化的步伐; 在未来应用中, 能够促进食品安全领域相应致病菌的及时检测, 以降低食物中毒的发生, 从而减小由此造成的社会生产力和经济损失。

## 附图说明

[0017] 图 1 是本发明所采用的 AT 切石英晶片 (8 MHz);

图 2 是本发明合成的纳米金颗粒的 TEM 图；

图 3 是本发明所述纳米压电免疫传感的制备和检测流程图；

图 4 是本发明所制备的纳米压电免疫传感器检测到大肠杆菌 0157:H7 的 SEM 图；

图 5 是本发明所制备的纳米压电免疫传感器对大肠杆菌 0157:H7 ( $10^6$  cfu/ml) 的频率、电阻响应；

图 6 是未结合纳米金颗粒的压电免疫传感器对大肠杆菌 0157:H7 ( $10^6$  cfu/ml) 的频率、电阻响应。

## 具体实施方式

[0018] 本发明纳米压电免疫传感器的制备及用于大肠杆菌 0157:H7 的检测方法过程如图 3 所示,具体操作过程如下:

1、QCM 金电极(图 1 所示)的清洗

1 M NaOH 浸泡 5 分钟；

去离子水冲洗、氮气干燥；

1 M HCl 浸泡 2 分钟；

去离子水冲洗、氮气干燥；

滴加现配的超级 Piranha 试剂到金表面,保持 5 分钟；

去离子水冲洗、氮气干燥；

2、纳米金颗粒(30 nm)(图 2 所示)的固定

清洗后的电极浸泡在 0.8 ~ 1 mL 的 1,6-己二硫醇酒精溶液(0.5%, v/v)中,在避光、常温的条件下过夜;然后依次用酒精和去离子水冲洗,氮气干燥。修饰了 1,6-己二硫醇的电极浸泡于约 1 mL 的 30 nm 的纳米金颗粒溶液中,在常温下过夜;接着依次用酒精和去离子水冲洗,氮气干燥。

[0019] 3、抗 - 大肠杆菌 0157:H7 抗体的固定

修饰了纳米金颗粒的电极浸泡于 16-巯基十六烷基酸的乙醇溶液中过夜,然后依次用酒精和去离子水冲洗,氮气干燥。接下来的制作过程在流动池中进行。首先将修饰了 16-巯基十六烷基酸的电极安装到流动池中,电极和仪器连接并实时监测电极的频率和电阻变化。电极在流动池中时的操作如下:

注入 1 mL 去离子水,得到基线；

注入 75 mM EDC-15 mM NHS 水溶液,反应 15 ~ 30 分钟；

依次注入 1 mL 去离子水、2 mL PBS；

立即注入 250  $\mu$ L 100  $\mu$ g/mL 抗 - 大肠杆菌 0157:H7 抗体的 PBS 溶液,反应 1 个小时；

注入 3 mL PBS,得到基线；

注入 0.5 mL 乙醇胺溶液,5 分钟；

注入 3 mL PBS,清洗电极,得到基线；

4、大肠杆菌 0157:H7 的检测

依次注入 1 mL 的 1 mM NaOH、2 mL PBS,得到基线；

注入大肠杆菌 0157:H7,反应一个小时；

注入 3 mL PBS,得到基线；

大肠杆菌 0157:H7 注射前后的两次 PBS 基线频率之间的差值,就是由该菌引起的传感器的频率响应。

**[0020] 实施例:**

未结合纳米金颗粒的压电免疫传感器制备及检测过程如实施方式中第一、三、四步所述。纳米压电免疫传感器的制备及对大肠杆菌 0157:H7 的检测过程如实施方式所述。纳米压电免疫传感器捕获的大肠杆菌 O 157:H7 如图 4 所示。检测结果如图 5、6 所示。从图 5 可以看出,纳米压电免疫传感器是完全能够检测到  $10^6$  CFU/mL 数量级的大肠杆菌 0157:H7 ; 而图 6 说明未结合纳米金颗粒的压电免疫传感器不能够检测到  $10^6$  CFU/mL 数量级的大肠杆菌 0157:H7。该试验说明本发明所制备的纳米压电免疫传感器在大肠杆菌 0157:H7 检测上更具有优势。

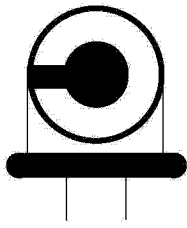


图 1

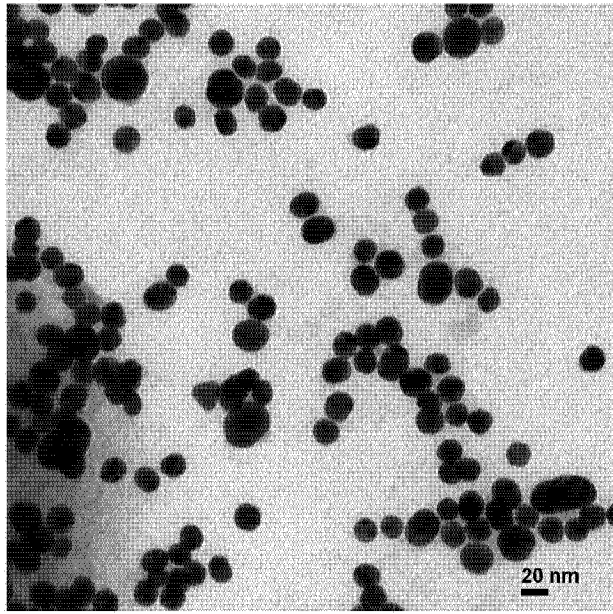


图 2

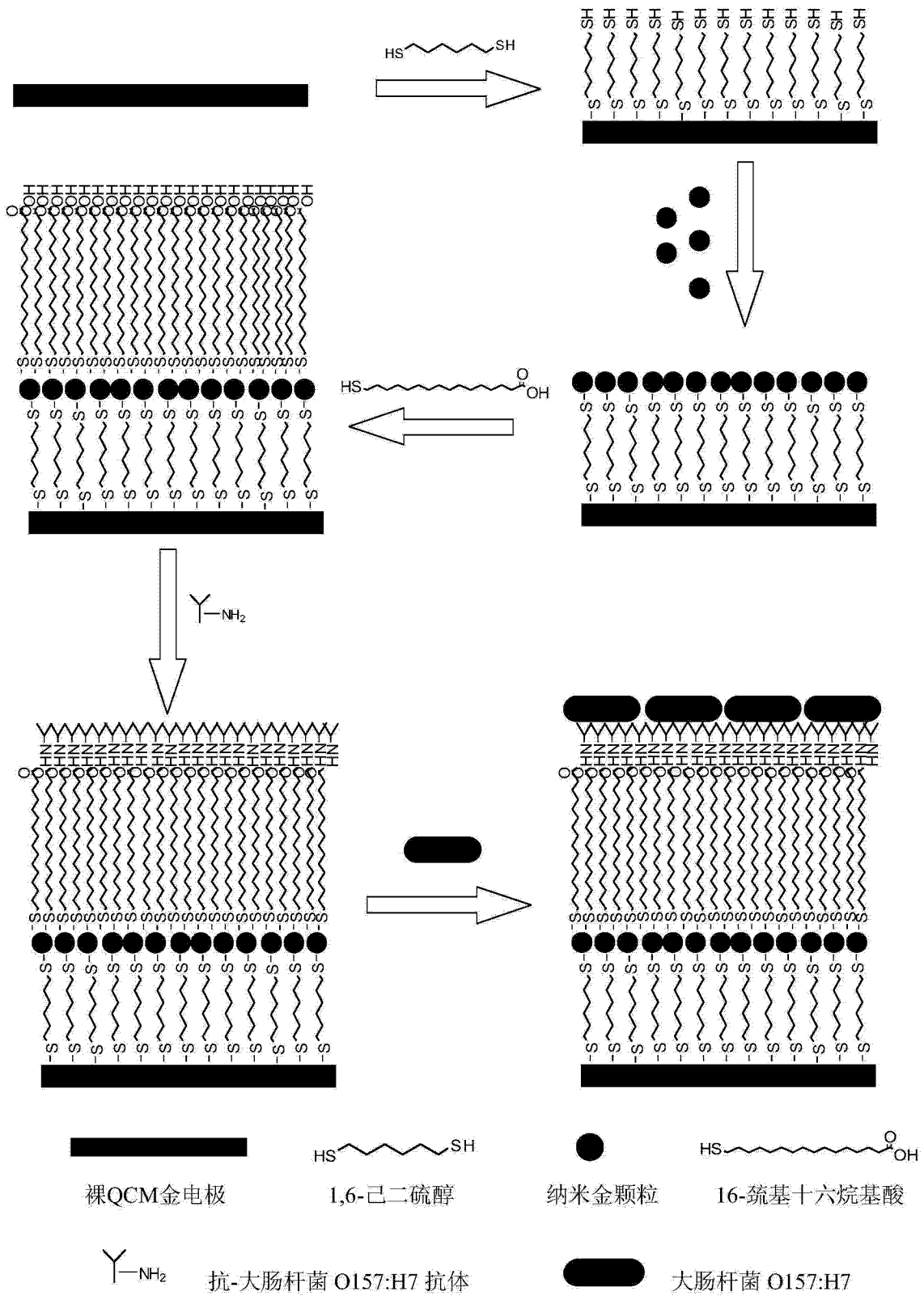


图 3

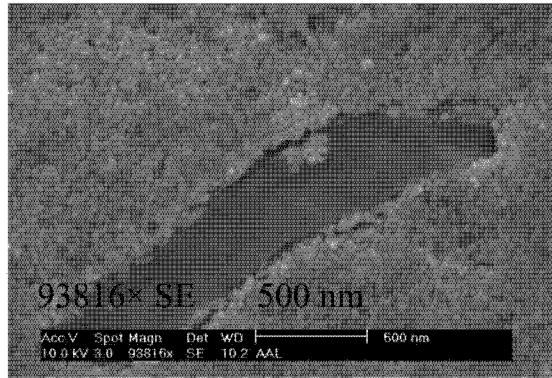


图 4

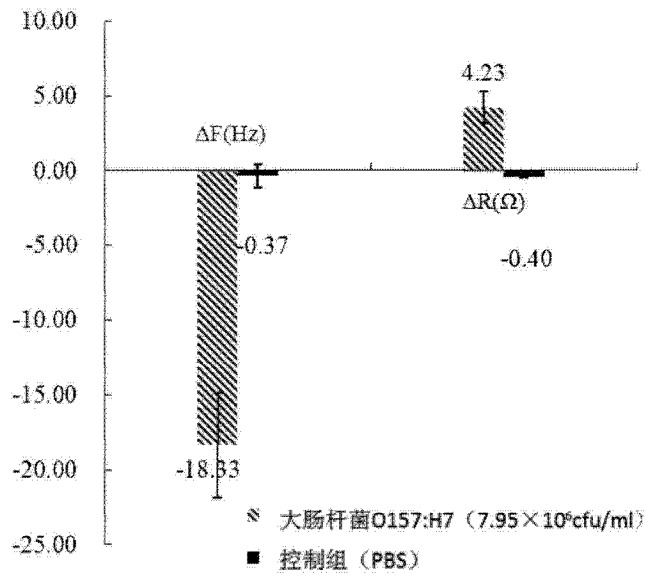


图 5

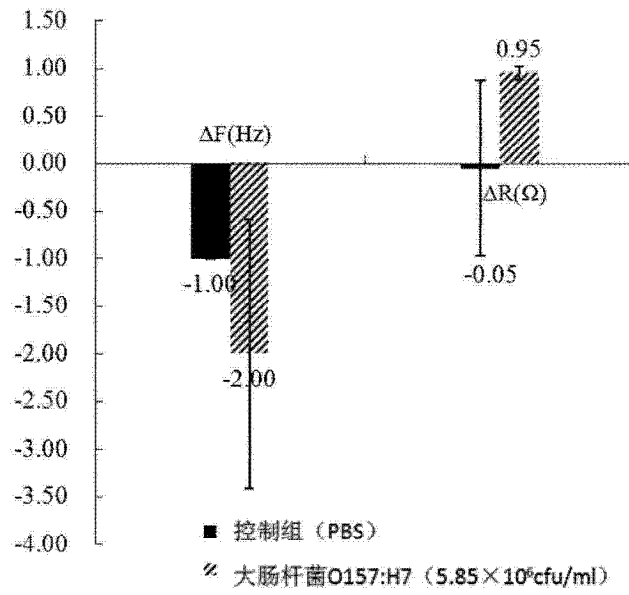


图 6

专利名称(译)	一种纳米压电免疫传感器的制备方法及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN103630687A</a>	公开(公告)日	2014-03-12
申请号	CN201310410554.4	申请日	2013-09-10
[标]申请(专利权)人(译)	杭州电子科技大学		
申请(专利权)人(译)	杭州电子科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	杭州电子科技大学		
[标]发明人	李杜娟 王剑平 周玲 盖玲		
发明人	李杜娟 王剑平 周玲 盖玲		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56916 G01N33/531 G01N2333/265		
代理人(译)	杜军		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种纳米压电免疫传感器的制备方法，本发明用纳米金颗粒修饰压电石英晶体金电极，然后用酒精和去离子水冲洗后氮气干燥，采用自组装技术将抗-大肠杆菌O157:H7抗体修饰于纳米金表面，再将所述压电石英晶体用乙醇胺溶液处理即得到纳米压电免疫传感器。本发明纳米压电免疫传感器制备方法简单，用于大肠杆菌O157:H7的检测方法简易便行、响应时间短，为食源性致病菌的快速检测创造了重要条件。

