



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110702749 A

(43)申请公布日 2020.01.17

(21)申请号 201911066640.1

(22)申请日 2019.11.04

(71)申请人 太原理工大学

地址 030024 山西省太原市迎泽西大街79号

(72)发明人 马姣 毛晓慧 丛虹霄 张若茜

(74)专利代理机构 太原科卫专利事务所(普通合伙) 14100

代理人 朱源 曹一杰

(51)Int.Cl.

G01N 27/26(2006.01)

G01N 27/30(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

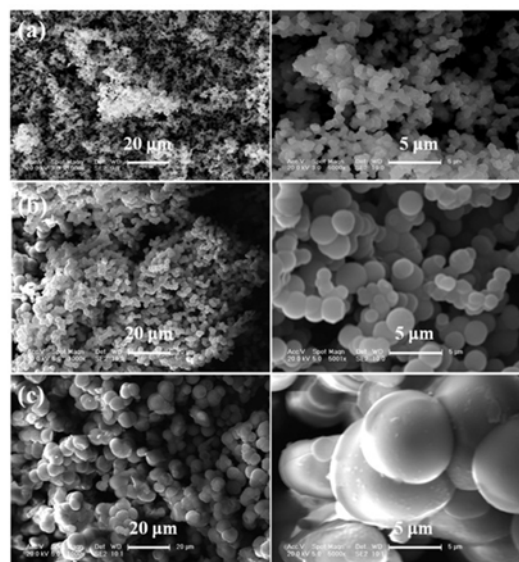
权利要求书1页 说明书4页 附图4页

(54)发明名称

基于带活性位点导电凝胶构建电化学免疫传感界面的方法

(57)摘要

本发明涉及一种利用带活性位点的导电凝胶构建电化学免疫传感界面的方法,属于免疫检测或电化学传感领域。本发明的目的是首先利用乙烯基二茂铁与单醛基环糊精主客体识别作用,获得超分子复合物,随后通过混合溶剂法共聚合成形貌可控的导电凝胶并负载到工作电极上,最后通过醛胺缩合反应化学固定抗体获得电化学免疫传感界面。本发明制备条件温和,反应快速,所获得界面不仅具有优异的导电性,同时能够实现抗体的大量固定,最终通过电流信号变化能够直接对待测抗原进行灵敏识别,因此本发明提供的电化学免疫传感界面在免疫检测及电化学传感领域必将有广阔的应用前景。



1. 一种基于带活性位点导电凝胶构建电化学免疫传感界面的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 超分子复合物的制备

将 β -环糊精与2-碘酰基苯甲酸溶于二甲基亚砜中,水浴充分反应后利用丙酮沉淀分离,所得沉淀物充分干燥后,去离子水溶解过滤,对滤液进行冷冻干燥即获得单醛基环糊精;将得到的单醛基环糊精与乙烯基二茂铁溶解于乙醇中,充分络合,即得到所需超分子复合物;

(2) 导电凝胶的制备

将超分子复合物的乙醇溶液、吡咯单体以及植酸混合,获得A溶液;将过硫酸铵溶解于水中获得B溶液;将B溶液加入A溶液中,室温静置成胶,水中充分清洗即得到含有活性位点的导电凝胶;

(3) 电化学传感界面构筑

将(2)中导电凝胶首先冷冻干燥处理,后磨成粉末,将其溶解于水中,取一定体积溶液滴涂到玻碳工作电极上,静置充分成胶;随后将抗体溶液滴加于工作电极上,室温孵育一定时间,后用磷酸缓冲液充分清洗掉未结合的抗体,最终获得带有活性位点导电凝胶电化学免疫传感界面。

2. 如权利要求1所述的基于带活性位点导电凝胶构建电化学免疫传感界面的方法,其特征在于:所述步骤(1)中 β -环糊精与2-碘酰基苯甲酸的摩尔比范围为1:1~1:1.2;所述乙烯基二茂铁与单醛基环糊精摩尔比为1:1。

3. 如权利要求1所述的基于带活性位点导电凝胶构建电化学免疫传感界面的方法,其特征在于:所述步骤(2)A溶液中乙醇,植酸与吡咯体积比为7.5:3.8:1,吡咯单体与超分子复合物的摩尔比范围在7:1~35:1;所述过硫酸铵水溶液质量浓度为0.31 g/mL;所述A溶液与B溶液体积比为4:1。

4. 如权利要求1中所述的基于带活性位点导电凝胶电化学免疫传感界面的方法,其特征在于:所述步骤(3)中导电凝胶粉末浓度范围在0.09~0.24 g/mL;所述成胶温度为4 °C。

基于带活性位点导电凝胶构建电化学免疫传感界面的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用带活性位点的导电凝胶构建电化学免疫传感界面的方法,属于免疫检测或电化学传感领域。

背景技术

[0002] 电化学免疫传感是将电化学分析技术与免疫检测相结合,通过利用抗原抗体的特异性识别作用以及电化学中电信号的变化来实现对待测物的分析,凭借其特异性强,灵敏度高,准确性好以及易操作的优点,电化学免疫传感在癌症、心脏病以及各种代谢类疾病的检测中展现出巨大的发展前景。如何提高其检测效果一直是研究者最为关注的热点之一。其中,由于抗体与待测抗原识别以及电极与电解质间电子传输均发生在传感界面处,因此传感界面对于最终检测效果至关重要。研究者认为理想的传感界面应具有比表面积大、导电性高、生物相容性好的特点。

[0003] 导电凝胶是近几年最为引人关注的新材料之一,凭借其优异的导电性,加工性,良好的生物相容性,以及相比于零维纳米粒子,一维纳米管,二维纳米片层结构,呈三维结构的导电凝胶具有极高的比表面积,能够保证抗体分子的高负载量,同时凝胶中大量的结合水有助于生物分子活性的保持。目前,研究者已成功制备了聚吡咯、聚苯胺、聚噻吩等多种导电凝胶及其复合物,实现了对癌症等疾病标志物的检测。但是目前这些导电凝胶通常采用物理吸附的方法固定抗体,存在抗体易失活、易迁移、负载量偏低的问题,从而削弱检测灵敏度与准确度。相比于物理固定方法,化学固定抗体具有抗体结合更加牢固,结合位点更容易暴露,有效抗体负载量显著提高的优点。因此,如何在具有多种优异性能的理想传感界面-导电凝胶中引入抗体活性结合位点,进一步提高其检测效果,拓展其应用范围,具有重要的意义。

[0004] 然而,导电凝胶通常呈反应惰性,在其分子骨架上引入结合位点十分困难。虽然将导电单体与丙烯酸等含活性位点单元共聚能够容易地引入结合点,但是,不导电的活性单元会破坏凝胶中连续的 π 共轭网络结构,阻碍电子传输,严重削弱其导电性。因此,如何制备带有活性位点且保持优异导电性的导电凝胶电化学传感界面仍面临很大的挑战。

发明内容

[0005] 本发明的目的是首先利用乙烯基二茂铁与单醛基环糊精主客体识别作用,获得超分子复合物,随后通过混合溶剂法共聚合成形貌可控的导电凝胶并负载到工作电极上,最后通过醛胺缩合反应化学固定抗体获得电化学免疫传感界面。

[0006] 一种基于带活性位点导电凝胶构建电化学免疫传感界面的方法,包括如下步骤:

(1) 超分子复合物的制备

将 β -环糊精与2-碘酰基苯甲酸溶于二甲基亚砜中,水浴充分反应后利用丙酮沉淀分离,所得沉淀物充分干燥后,去离子水溶解过滤,对滤液进行冷冻干燥即获得单醛基环糊精;将得到的单醛基环糊精与乙烯基二茂铁溶解于乙醇中,充分络合,即得到所需超分子复

合物；

(2) 导电凝胶的制备

将超分子复合物的乙醇溶液、吡咯单体以及植酸混合，获得A溶液；将过硫酸铵溶解于水中获得B溶液；将B溶液加入A溶液中，室温静置成胶，水中充分清洗即得到含有活性位点的导电凝胶；

(3) 电化学传感界面构筑

将(2)中导电凝胶首先冷冻干燥处理，后磨成粉末，将其溶解于水中，取一定体积溶液滴涂到玻碳工作电极上，静置充分成胶；随后将抗体溶液滴加于工作电极上，室温孵育一定时间，后用磷酸缓冲液充分清洗掉未结合的抗体，最终获得带有活性位点导电凝胶电化学免疫传感界面。

[0007] 优选地，上述技术方案中，所述步骤(1)中 β -环糊精与2-碘酰基苯甲酸的摩尔比范围为1:1~1:1.2；所述乙烯基二茂铁与单醛基环糊精摩尔比为1:1。

[0008] 优选地，上述技术方案中，所述步骤(2)A溶液中乙醇，植酸与吡咯体积比为7.5:3.8:1，吡咯单体与超分子复合物的摩尔比范围在7:1~35:1；所述过硫酸铵水溶液质量浓度为0.31 g/mL；所述A溶液与B溶液体积比为4:1。

[0009] 优选地，上述技术方案中，所述步骤(3)中导电凝胶粉末浓度范围在0.09~0.24 g/mL；所述成胶温度为4℃。

[0010] 本发明中提供的乙烯基二茂铁与单醛基环糊精超分子复合物具备多重功能，一方面乙烯基二茂铁上的双键能够与吡咯等单体实现共聚，且二茂铁特有的导电性能够保证凝胶中形成连续的 Π 共轭网络结构，实现电子的快速传输。另一方面二茂铁能够插入 β 环糊精的空腔中，且 β 环糊精易修饰，可以引入醛基，能够与抗体上大量的氨基发生希夫碱反应，最终实现快速温和的抗体化学固定。此外，由于乙烯基二茂铁的疏水性，目前很难获得其含量超过10%的导电水凝胶，本发明通过选取合适共溶剂-乙醇，且严格控制其比例，一方面使得吡咯与乙烯基二茂铁超分子复合物能够共溶于混合溶剂，而且更为关键的是能够充分的形成凝胶。最终获得不同组成比例及形貌的导电凝胶，为灵活调节导电凝胶相关性能提供了方法。总之，本发明提供的带有活性位点的导电凝胶电化学免疫传感界面兼具优异导电性与大量抗体结合位点的优点，同时制备条件温和，反应快速，因此在免疫检测及电化学传感领域必将有广阔的应用前景。

附图说明

[0011] 图1表示本发明所制备的导电凝胶扫描电子显微镜图(a为纯吡咯，b,c为调控吡咯与超分子复合物不同比例得到的导电凝胶)。

[0012] 图2表示不同组成比例导电凝胶的阻抗图。

[0013] 图3表示玻碳电极负载凝胶前后电极表面。

[0014] 图4表示所构筑的电化学免疫传感界面用于不同浓度抗原(a)0.5 ng/mL, (b)1.0 ng/mL, (c)5.0 ng/mL, (d) 10.0 ng/mL, (e) 100.0 ng/mL)识别的方波伏安图。

具体实施方式

[0015] 现在结合附图和以下实例对本发明做进一步详细的说明，但应了解的是，这些实

施例仅为例示说明之用,而不应被解释为本发明实施的限制。

[0016] 本实施例中,利用乙烯基二茂铁与单醛基环糊精超分子复合物,与吡咯共聚得到导电凝胶,负载到工作电极上并固定抗体,从而获得电化学免疫传感界面。具体步骤如下:

(1) 超分子复合物的制备

称取2.33 g β -环糊精,0.523 g 2-碘酰基苯甲酸于100 mL 锥形瓶中,向其中加入20 mL 二甲基亚砜,超声2 min充分溶解,室温下反应24 h,反应完毕后,用冷却丙酮沉降,析出白色沉淀。随后用离心机离心,4500转速下转5 min,将上清液倒掉,再加入丙酮清洗,离心,如此重复三次,将所得白色沉淀物放入真空干燥箱中,50 °C下干燥24 h.待充分干燥后,将白色沉淀加入100 mL超纯水中,超声5 min充分溶解后,抽滤,随后将所得滤液进行冷冻干燥处理,即可得到单醛基环糊精。

[0017] 称取1.10g 单醛基环糊精,0.22 g乙烯基二茂铁加到1.96 mL 乙醇中,超声2 min,充分溶解,即可得到超分子复合物溶液。

[0018] (2) 导电凝胶的制备

取131 μ L吡咯,随后加入500 μ L植酸,分别向其中加入上述超分子复合物的乙醇溶液0,490 μ L,98 μ L,乙醇溶剂980 μ L,490 μ L,882 μ L,获得A溶液,放在4°C冰箱备用。称取0.1240 g过硫酸铵,加入400 μ L水中,充分溶解,得到B溶液,置于冰箱中。将上述A溶液与B溶液混合,待其充分成胶,后用超纯水清洗3次,每次12 h.清洗后样品进行冷冻干燥处理。获得纯吡咯,吡咯与超分子复合物摩尔比为7:1,35:1三种凝胶。从图1可以看出,本发明通过选用乙醇水混合溶剂,并控制其比例,可以制备得到组成比例范围很宽的导电凝胶。且导电凝胶的微观结构与乙烯基二茂铁与单醛基环糊精超分子复合物的含量紧密相关。图1表明随着超分子复合物的比例增加,组成凝胶的微球尺寸增大,比表面积减小,但是结合点密度增加。因此可以通过调节超分子复合物的比例,实现抗体负载量的优化。此外,通过电化学阻抗法(图2)对上述三种凝胶的导电性进行研究发现,首先纯吡咯导电凝胶负载于玻碳电极(GCE)表面后,几乎看不到阻抗图中半圆,且其法拉第阻抗值最小,而随着超分子复合物的比例增加,共聚导电凝胶的法拉第阻抗值相比于纯吡咯凝胶确实会有所增加,导电性略有下降。这是因为吡咯是十分优异的导电单体,对其掺杂通常会导致导电性降低。但是从图中可以看出与纯吡咯导电凝胶一样,与超分子复合物共聚的导电凝胶的阻抗谱图中也均看不到半圆,法拉第阻抗值相比玻碳电极也明显降低,导电性显著改善,而玻碳电极本身就具备良好的导电性,因此这一结果说明本发明提供的超分子复合物可以保证共聚后的导电凝胶依然保持十分优异的导电性。综上所述,本发明制备的导电凝胶成功实现了在保持优异的导电性基础上引入其他新功能,为下一步免疫传感提供了材料基础。

[0019] (3) 电化学传感界面构筑

将上述导电凝胶(吡咯与超分子复合物摩尔比为7:1)冷冻干燥后的粉末称取0.1g,超声溶解于0.5 mL 水中,用移液枪移取10 μ L溶液滴加于玻碳电极(GCE)表面,冰箱4°C放置待其充分成胶。通过图3可以直观看到,玻碳电极表面覆盖着一层黑色凝胶层。配置抗体溶液anti-molitin 200 μ g/mL,室温孵育 30 min,待充分结合后,PBS溶液清洗10min,重复三次,这样多次清洗后,物理吸附的抗体由于结合力弱被清洗掉,而通过与醛基化学反应固定的抗体则可以牢固结合在电极表面,能够识别抗原(图4与抗原接触后电极表面电流减小表明电极表面有牢固结合的抗体存在)。因此本发明提供的导电凝胶能够实现化学固定抗

体,使得抗体不迁移,不损失,有利于保证检测结果的准确性。

[0020] (4) 电化学免疫识别

将(3)中所获得的电极浸入1 mg/mL的牛血清白蛋白溶液中,封闭30 min,用纯PBS溶液充分清洗备用。配置不同浓度的molitin抗原溶液,浓度分别为0.5 ng/mL,1.0 ng/mL,5.0 ng/mL, 10.0 ng/mL,100.0 ng/mL,将负载抗体后的玻碳电极浸入上述抗原溶液中,识别30 min后,PBS清洗三次,用于电流检测。其中,本发明采用三电极体系检测,将上述负载抗体抗原的玻碳电极作为工作电极,Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝电极作为对电极。将三电极置于PH = 7.0 的三电极体系中,利用方波伏安法在- 0.2 V 到0.8V的电位范围内扫描,以扫描电位为横坐标,电流值为纵坐标,获得方波伏安曲线。从图4可以看到,首先对于不同浓度的抗原,所制备的修饰电极能够做出相应变化的电流响应,表明本发明提供的带活性位点的导电凝胶能够成功用于电化学免疫传感界面。此外,图4 表明随着识别抗原浓度增加,电流减小。这是由于抗原识别浓度的增大,使得抗原与界面上固定抗体的结合几率大大增加,因此更多的抗原被结合在传感界面上,而且由于抗原不具有导电性,因此传感界面层电阻增大,电流减小。随后以抗原浓度为对数横坐标,峰电流值为纵坐标,绘制标准曲线,推算出对应的线性回归方程,计算得到检测限。

[0021] 总之,本发明提供的混合溶剂法制备吡咯与乙烯基二茂铁与单醛基环糊精超分子复合物的导电凝胶,既保证了所制备凝胶具有优异的导电性,同时在导电凝胶中引入了活性可结合抗体位点,实现了抗体的化学固定。而且所采用混合溶剂方法能实现两组分的灵活调控,有助于优化所制备凝胶性能,获得最优检测效果的电化学传感界面,因此具有重要的应用价值。

[0022] 上述较佳实施方式仅用于说明本发明的内容,但这并非是对本发明的限制,本领域的相关技术人员,在不脱离本发明的范围的情况下,还可以做出相应的调整和变型,因此所有等同替换或等效变型的方式形成的技术方案均属于本发明的保护范围。

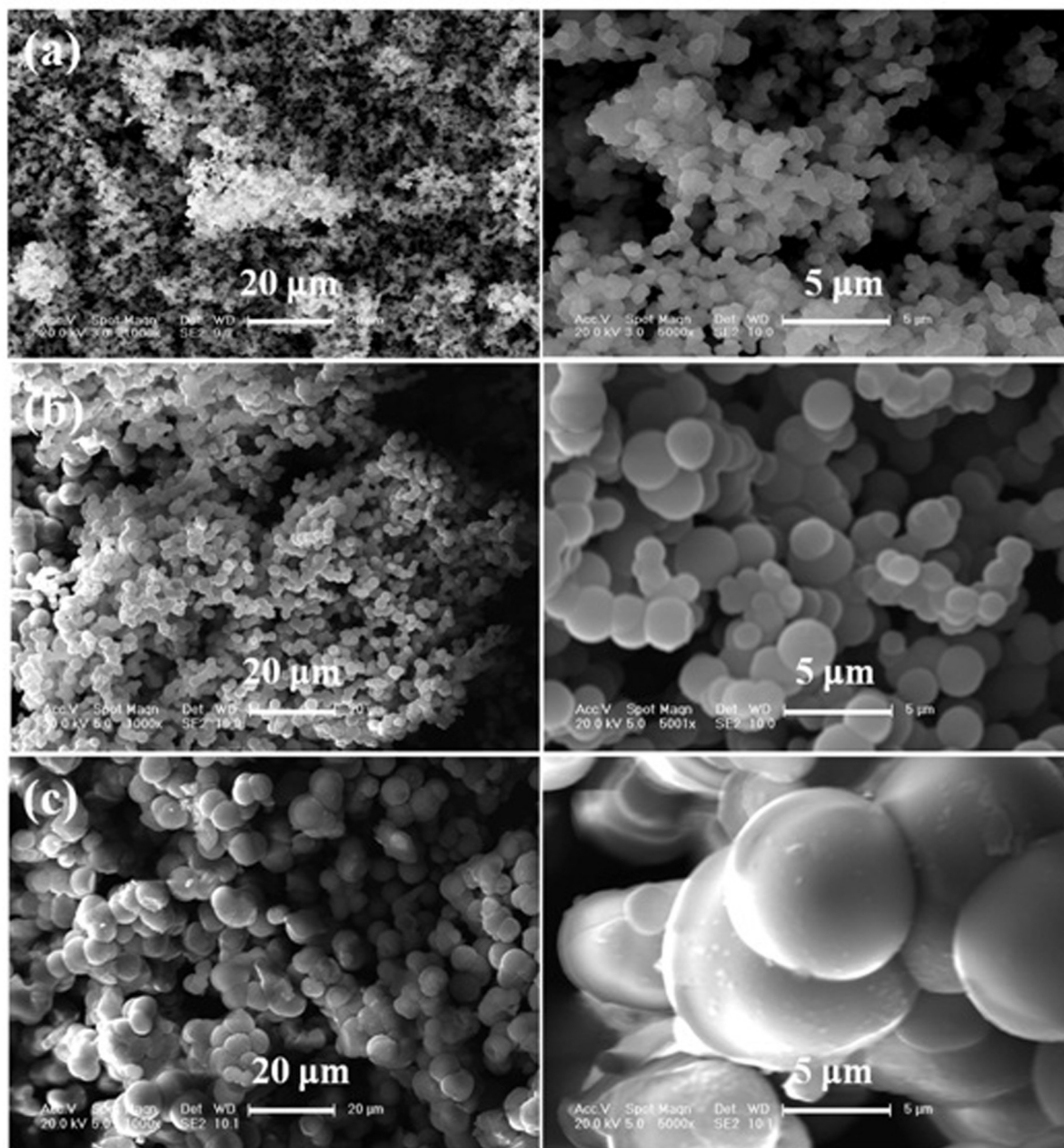


图1

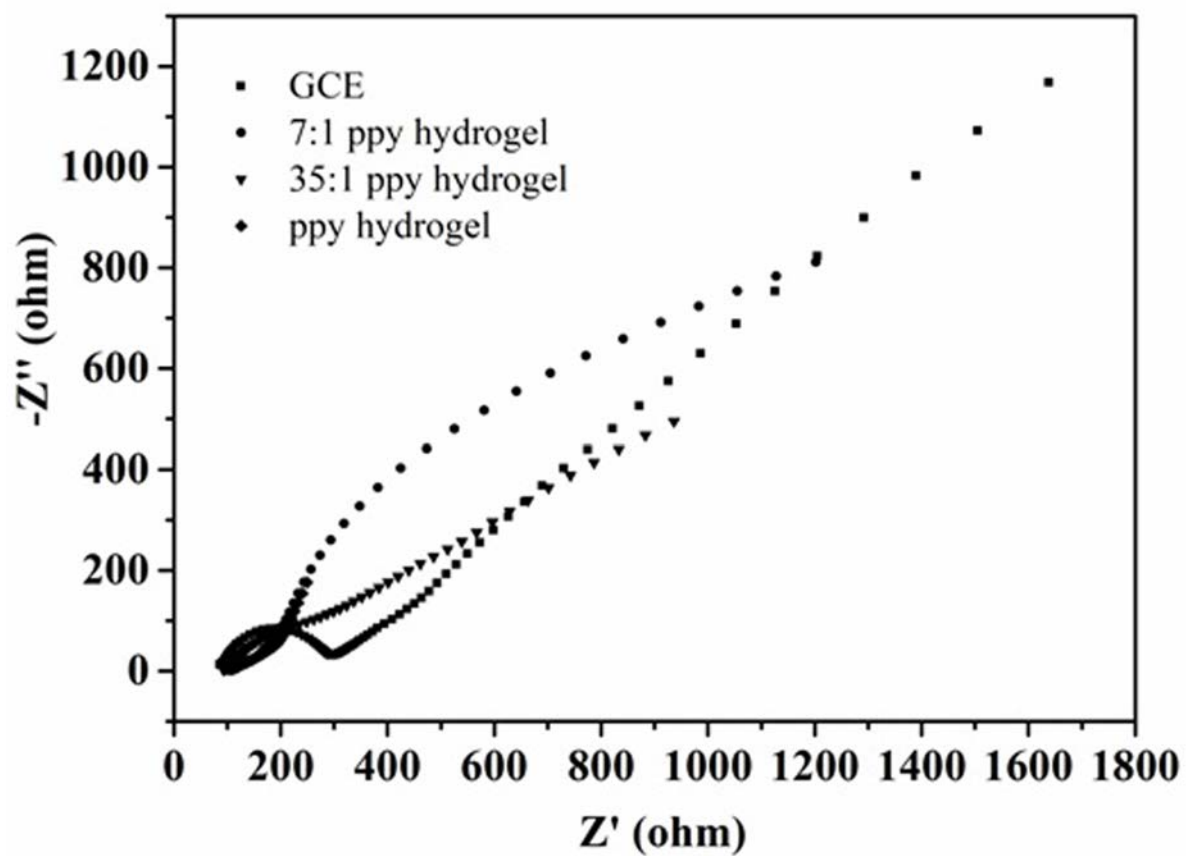


图2

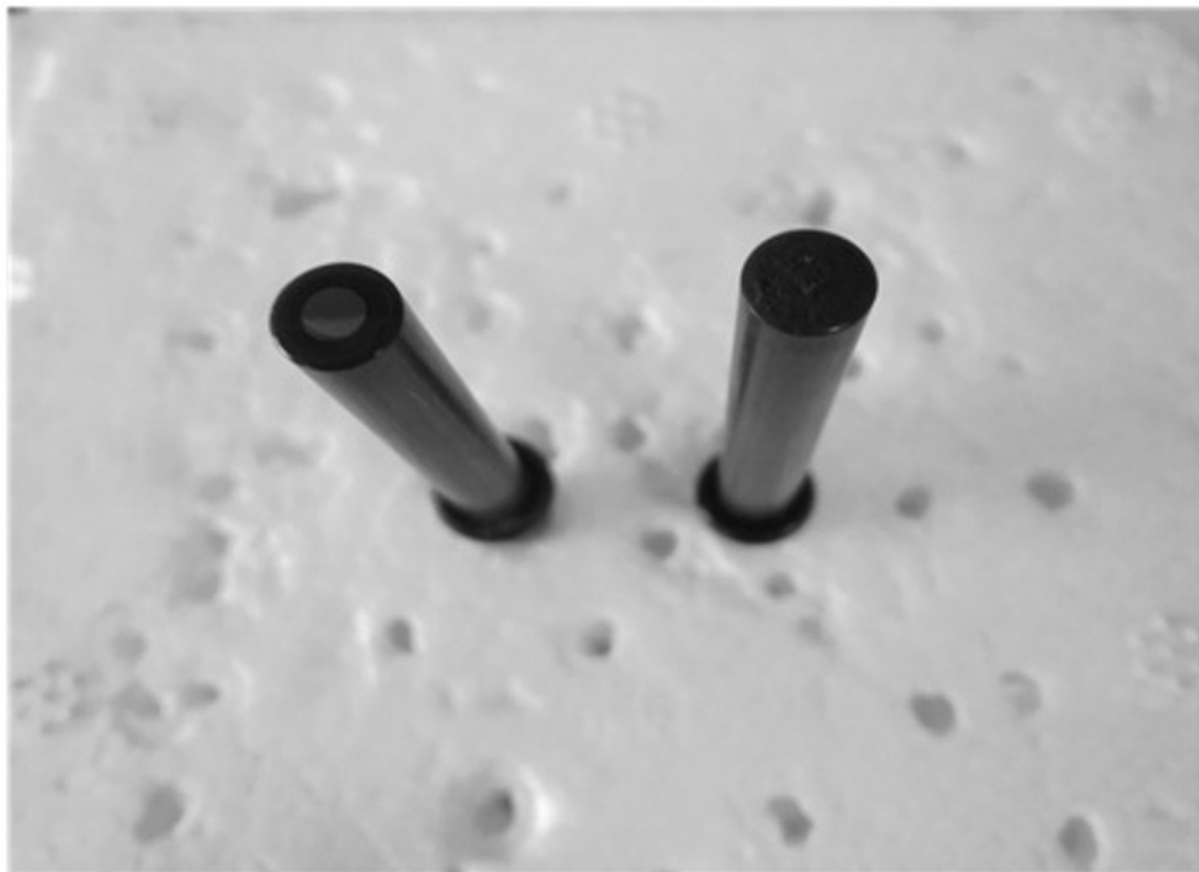


图3

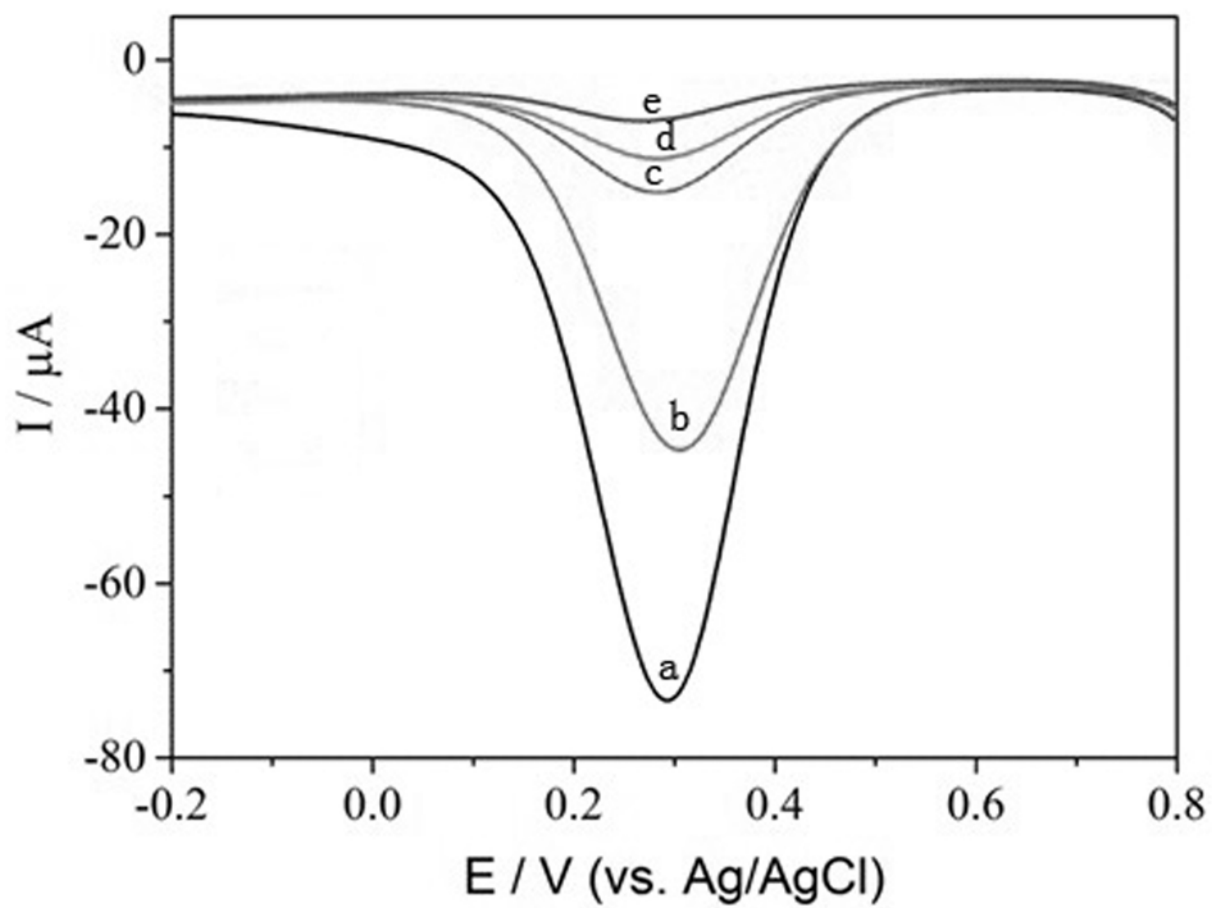


图4

专利名称(译)	基于带活性位点导电凝胶构建电化学免疫传感界面的方法		
公开(公告)号	CN110702749A	公开(公告)日	2020-01-17
申请号	CN201911066640.1	申请日	2019-11-04
[标]申请(专利权)人(译)	太原理工大学		
申请(专利权)人(译)	太原理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	太原理工大学		
[标]发明人	马姣 毛晓慧		
发明人	马姣 毛晓慧 丛虹霄 张若茜		
IPC分类号	G01N27/26 G01N27/30 G01N33/531		
CPC分类号	G01N27/26 G01N27/30 G01N33/531		
代理人(译)	朱源		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种利用带活性位点的导电凝胶构建电化学免疫传感界面的方法，属于免疫检测或电化学传感领域。本发明的目的是首先利用乙烯基二茂铁与单醛基环糊精主客体识别作用，获得超分子复合物，随后通过混合溶剂法共聚成形貌可控的导电凝胶并负载到工作电极上，最后通过醛胺缩合反应化学固定抗体获得电化学免疫传感界面。本发明制备条件温和，反应快速，所获得界面不仅具有优异的导电性，同时能够实现抗体的大量固定，最终通过电流信号变化能够直接对待测抗原进行灵敏识别，因此本发明提供的电化学免疫传感界面在免疫检测及电化学传感领域必将有广阔的应用前景。

