



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 03113053.4

[45] 授权公告日 2005 年 4 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 1196932C

[22] 申请日 2003.3.26 [21] 申请号 03113053.4

[71] 专利权人 江苏省肿瘤医院

地址 210009 江苏省南京市百子亭 42 号

共同专利权人 南京大学

[72] 发明人 严 枫 戴 宗 鞠焜先

审查员 刘 锋

[74] 专利代理机构 南京苏高专利事务所

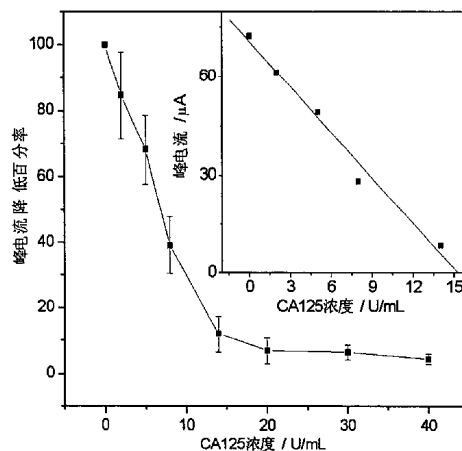
代理人 柏尚春

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称 一种无试剂安培免疫传感器的制备及其应用

[57] 摘要

本发明公开了一种无试剂安培免疫传感器的制备方法和在免疫分析中的应用，其制备步骤是将待测抗原溶解在缓冲溶液中，对载体表面进行预处理并在其表面滴涂上述溶液，悬于金属烷氧基化合物的液面上方，密闭此体系恒温水浴可获得免疫传感器。对待测抗原测定条件进行优化，然后进行一系列的处理可得到待测抗原的测定标准曲线，以及通过电化学信号的降低，在测定标准曲线上可查出相应浓度。此方法无需向待测样品溶液中加入媒介体或其它试剂，避免了媒介体等对电极的污染，简化了分析体系，分析反应也可一步完成，具有很好的精确性、重复性和稳定性。



1、一种无试剂安培免疫传感器的制备方法，其特征在于制备步骤是：

(1) 将待测抗原溶解在 pH 值为 6.5~7.0 的缓冲溶液中；

(2) 对载体表面在+1.70V~+1.80V 条件下进行恒电位电解处理 250 秒~350 秒得到富氧基团的电极表面；

(3) 在载体表面滴涂上述溶液，并将其悬于金属烷氧基化合物液面的上方，然后将此体系密闭；

(4) 将以上密闭体系置于 15℃~35℃的水浴中，恒温 2~6 小时；密闭体系中液面上的金属烷氧基化合物蒸汽与载体表面的溶液接触，发生缓慢的水解反应生成二氧化钛溶胶，胶凝化后将抗原分子包埋并固定于载体表面，获得免疫功能膜并可制成免疫传感器。

2、根据权利要求 1 所述的无试剂安培免疫传感器的制备方法，其中 (1) 所述的缓冲溶液为磷酸盐缓冲溶液或者 2-氨基-2-羟甲基-(1,3)丙二醇-盐酸溶液(Tris-HCl)缓冲溶液或者混合酸-氢氧化钠缓冲溶液 (B-R) 缓冲溶液。

3、根据权利要求 1 所述的无试剂安培免疫传感器的制备方法，其中 (1) 所述待测抗原为 CA125。

4、根据权利要求 1 所述的无试剂安培免疫传感器的制备方法，其中 (2) 所述的电压为+1.75V。

5、根据权利要求 1 所述的无试剂安培免疫传感器的制备方法，其中 (2) 所述的处理时间为 300 秒。

6、根据权利要求 1 所述的无试剂安培免疫传感器的制备方法，其中 (2) 所述载体为玻碳或者石墨电极。

7、根据权利要求 1 所述的无试剂安培免疫传感器的制备方法，其中 (3) 所述的金属烷氧基化合物为四异丙氧基钛或者四甲氧基钛。

8、一种利用权利要求 1 所述的无试剂安培免疫传感器测定待测抗原的方法，其特征在于：

(1) 在常温或体温下，经 40~70min 的温育优化；

(2) 配制浓度范围在 0~500U/ml 的待测抗原标准溶液和固定量酶标记抗体的反应溶液，通过选择量大电流响应时相应的量作为测定条件，利用竞争免疫反应，免疫传感器分别在上述反应溶液中温育 40~70min 后，取出，二次水洗涤，于 pH 值为 6.5~7.0 的磷酸盐缓冲溶液或者 Tris-HCl 缓冲溶液或者 B-R 缓冲溶液中分别测定出酶在免疫传感器上直接电化学信号的降低，得到该待测抗原的测定标准曲线；

(3) 在最大电流响应时相应的量的测定条件下，将免疫传感器在含待测抗原和固定量酶标记抗体的反应溶液中温育 40~70min,取出，二次水洗涤后，于 pH 值为 6.5~7.0 的磷酸盐缓冲溶液或者 Tris-HCl 缓冲溶液或者 B-R 缓冲溶液中测定出酶在免疫传感器上直接电化学信号的降低，在该抗原的测定标准曲线上查出相应浓度。

一种无试剂安培免疫传感器的制备及其应用

一、技术领域

本发明涉及一种免疫传感器的制备及其应用，特别是涉及一种无试剂安培型免疫传感器的制备及其在免疫分析上的应用。

二、背景技术

近几十年来，免疫分析技术结合了抗原、抗体分子间的特异性识别反应和电化学、光谱学、声学等技术的灵敏、方便等特性，以其对肿瘤标志物等分析物的高选择性和高灵敏性，成为临床、生物化学、环境分析等各个领域重要分析手段之一。常规的免疫分析方法主要有：放射免疫分析法、酶联免疫分析法、荧光免疫分析法、化学发光免疫分析法、流动注射免疫分析法等。上述方法主要是利用在抗体上标记放射性同位素、酶分子、荧光物质等，当待测抗原与标记抗体经过特异性反应，洗板分离后，通过测定标记的放射性同位素或荧光物质的信号，或是测定标记酶作用于底物所产生的电活性物质、发光物质等的信号进行测定。其操作步骤主要包括第一抗体对测定抗原识别，洗涤，与标记二抗反应，洗板，加入底物测定等。

免疫传感器结合了免疫分析和光谱或电化学技术等诸多特点，在对分析样品的测定时可不经预处理，操作中无需洗涤、分离步骤等，受到了广泛重视。许多种传感器，特别是各种电化学传感器，已在各个领域发挥了重要的作用。

电化学免疫传感器通常分为电位型免疫传感器和安培型免疫传感器。电位型免疫传感器是将抗原或抗体分子固定在电极表面上，当该免疫传感器在含有待测抗原和标记抗体的溶液中温育后，待测抗原的量可通过在该免疫传感器上电位的变化进行测定。安培型免疫传感器则将抗原或抗体分子固定在电极表面上，当该传感器在含有待测抗原和标记抗体的溶液中温育后，通过测定标记在抗体上的酶作用于底物所产生的电活性物质的氧化还原信号来测定待测抗原含量。辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、漆酶和葡萄糖氧化酶等经常被用作抗体的标记酶，利用它们催化相应底物产生电活性物质来制备安培免疫传感器。如：将单克隆抗体固定在传感器表面，利用辣根过氧化物酶标记的抗体，通过夹心反应，测定标记在抗体上的辣根过氧化物酶催化待测溶液中的氧气或过氧化氢等底物的电流信号进行测定；将抗体固定在传感器表面，通过竞争免疫分析法，利用碱性磷酸酶标记抗体对溶液中萘酚、对氨基苯酚磷酸盐等底物的电流信号进行测定等。

可见，常规的免疫分析方法操作步骤繁琐，分析时间较长，样品消耗量大，测定成本较高，而已有的安培免疫传感器需要在待测溶液中加入媒介体或是底物等非免疫试剂，即使是利用待测溶液中溶解的氧气作为媒介体，其测定结果也受到环境温度、压力、溶液组成等变化的影响。如何避免媒介体和底物的加入，简化测定体系，从而简化操作步骤，缩短分析时间，降低测定成本已成为人们关注的问题。

固定化酶的直接电化学已经被广泛用作生物传感器和无介质生物传感器的开发，该

方法避免了向样品溶液中加入媒介体以及媒介体对电极表面的污染。为了克服现有免疫分析方法的缺点，避免在免疫分析中媒介体和底物的加入，简化分析步骤，缩短分析时间，减少样品消耗，进而降低测定成本，实现临床上的在线快速分析，我们首次将固定化酶的直接电化学性质应用于免疫分析中，发展无试剂免疫分析方法并制备了免疫传感器，用于临床肿瘤标志物的检测。

三、发明内容

1、发明的目：本发明是利用钛溶胶气相沉积制备技术（已申请专利，申请号为01138059.4），将钛溶胶的胶凝化过程用于抗原分子在载体表面的包埋，构造新型免疫传感器，并利用标记在抗体上的辣根过氧化物酶在与固定在电极表面上的抗原发生免疫反应后表现出的直接电化学性质，开发了一种新的无试剂免疫分析技术。

2、技术方案：本发明的具体实施方法如下：无试剂安培免疫传感器的制备方法，其特征在于该制备步骤是：

(1) 将待测抗原如 CA125 溶解在 pH 值为 6.5~7.0 的缓冲溶液中，缓冲溶液可选择磷酸盐缓冲溶液或者 Tris~HCl 缓冲溶液或者 B~R 缓冲溶液；所选择的缓冲溶液因抗原种类而异，标准是使免疫反应的活性和电化学响应最大。

(2) 对载体如玻碳或者石墨电极的表面在+1.70V~+1.80V，优选+1.75V，进行恒电位电解处理 250 秒—350 秒，优选 300 秒，得到富氧基团的电极表面；对载体表面预处理的要求是，应得到平整、干净、亲水性的表面；

(3) 在载体表面滴涂上（1）中所得的溶液，并将其悬于金属烷氧基化合物如四异丙氧基钛或四甲氧基钛液面的上方，然后将此体系密闭；

(4) 将以上密闭体系置于 15°C~35°C 的水浴中，恒温 2~6 小时；密闭体系中液面上的金属烷氧基化合物蒸汽与载体表面的溶液接触，发生缓慢的水解反应生成二氧化钛溶胶，胶凝化后将抗原分子包埋并固定于载体表面，获得新型免疫功能膜并可制成免疫传感器。

利用上述制取的无试剂安培免疫传感器测定待测抗原的方法，其特征在于：

(1) 在常温或体温下，经 40~70min 的温育优化；

(2) 配制浓度范围在 0~500U/ml 的待测抗原标准溶液和固定量酶标记抗体的反应溶液，在最大电流响应时相应的量的测定条件下，免疫传感器分别在这些反应溶液中温育 40~70min 后，取出，二次水洗涤，于 pH 值为 6.5—7.0 的缓冲溶液如磷酸盐缓冲溶液或者 Tris—HCl 缓冲溶液或者 B—R 缓冲溶液中分别测定出酶在免疫传感器上直接电化学信号的降低，得到该待测抗原的测定标准曲线；见附图 1。

(3) 在最大电流响应时相应的量的测定条件下，将免疫传感器在含待测抗原和固定量酶标记抗体的反应溶液中温育 40~70min，取出，二次水洗涤后，于 pH 值为 6.5~7.0

的缓冲溶液如磷酸盐缓冲溶液或者 Tris-HCl 缓冲溶液或者 B-R 缓冲溶液中测定出酶在免疫传感器上直接电化学信号的降低，在该抗原的测定标准曲线上查出相应浓度。

影响所获得的免疫功能膜和免疫传感器性能的主要因素有四个方面：

(1) 缓冲溶液的 pH 值：只有在一定的酸度下，抗原才具有最佳活性。如果缓冲溶液的酸度偏离这一数值，将抗原分子溶解于其中就会伤害它的活性，从而影响免疫功能膜和免疫传感器的性能。

(2) 载体表面性质：载体表面是否亲水性，对能否生成均匀、有效的免疫功能膜至关重要。若载体表面显疏水性，含待测抗原溶液滴涂在载体表面后会自动聚集形成微滴，溶胶胶凝化以后，生成的免疫功能膜膜厚、干脆且不均匀，最终影响免疫功能膜及免疫传感器的性能。

(3) 温度：当滴涂有抗原溶液的载体悬于金属烷氧基化合物如四异丙氧基钛或者四甲氧基钛液面之上时，会有两个过程同时发生，一是金属烷氧基化合物蒸汽在载体表面沉积，另一个是载体表面溶液中水分的挥发。如果温度太高，金属烷氧基化合物的蒸汽压太大，水解的速度太快，此时形成的就不是溶胶，而是二氧化钛的颗粒沉淀；如果温度太低，金属烷氧基化合物的蒸汽压太小，水分挥发的速度就会比蒸汽沉积的速度快，载体表面以致没有足够的水与金属烷氧基化合物的蒸汽发生水解反应来生成想要的溶胶。

(4) 时间：足够的时间能使水解反应充分，同时也能保证溶胶完全胶凝化。太短的时间会使反应不充分，胶凝化不完全；太长的时间，在溶胶完全胶凝化以后就毫无意义了。

利用无试剂免疫传感器测定抗原条件的优化包括以下三个方面：

(1) 温育温度：免疫反应一般在人体或高等动物体内发生，其对温度较敏感。在适合的温度下如常温或人体温度，免疫反应达到最大效率。低于该温度，抗原、抗体分子活性较低，反应较慢；高于该温度，抗原、抗体分子容易变性直至失活。

(2) 温育时间：免疫反应中抗原、抗体间的识别、结合通常需要一定时间来完成，为保证测定的准确性和灵敏性，要求提供足够长的反应时间确保免疫反应完全，此时间一般为 40—70min。

(3) 反应溶液中酶标抗体的量：该测定利用竞争免疫分析方法，即通过反应溶液中游离待测抗原与固定在免疫传感器上的抗原产生竞争，使反应溶液中酶标抗体与固定在免疫传感器上的抗原发生的反应量减少从而产生信号降低间接来测定待测抗原的量。反应溶液中酶标抗体的量应等于传感器表面固定的抗原的量，此时，获得最大检测范围且检测最灵敏。若酶标抗体的量小于该值，会使检测范围缩小；若酶标抗体的量大于该值，会使测定结果偏小。

3、有益效果

该方法利用特异性免疫反应和标记抗体的酶在二氧化钛溶胶凝胶膜上表现的直接电化学响应，发展了新颖的无试剂免疫分析方法并制备了免疫传感器。利用二氧化钛溶胶凝胶气相沉积法固定抗原分子，并利用竞争免疫分析方法，通过直接测定反应到免疫传感器表面上标记抗体的酶的直接电化学响应信号的降低直接得到待测抗原的浓度。该方法较现有的免疫分析方法，具有以下优点：

(1) 无需向待测样品溶液中加入媒介体或其它试剂，避免了媒介体等对电极的污染，简化了分析体系；

(2) 分析测定中免疫反应一步完成，减少样品消耗，且无需洗涤，分离等步骤，简化了免疫分析的操作步骤，缩短了分析时间，适用于临床上在线快速检测；

(3) 通过对不同标记抗体的酶的直接电化学的检测或将电活性物质直接标记在抗体上，可以完成多种不同抗原分子的直接测定；

(4) 该传感器表现出很好的精确性，重复性和稳定性，可发展成为一次性免疫测定传感器并向市场推广。

四、附图说明：

附图 1 是 CA125 测定标准曲线。

五、实施方式

1、实施例 1：CA125 免疫传感器的制备

选择直径 4 mm 的盘状平面玻碳电极作载体材料，以 CA125 为例作为包埋固定的对象：

(a) 电极抛光：先将电极表面用金相砂纸打磨，然后分别用 1.0, 0.3, 0.05 μm 的 γ -氧化铝浆在麂皮上抛光，接着用二次水冲洗干净，电极表面依次用 1:1 硝酸、丙酮、二次水超声清洗，得到新鲜干净的电极表面。

(b) 电极表明预处理：将抛光后的电极在 pH 值为 5.0 的磷酸盐缓冲溶液中于 +1.75 V 恒电位下电解 300 秒后，再分别在 +0.3V ~ +1.3 V 和 +0.3V ~ -1.3 V 电位范围内循环扫描直至得到稳定电流值。取出电极，二次水冲洗后，氮气吹干。

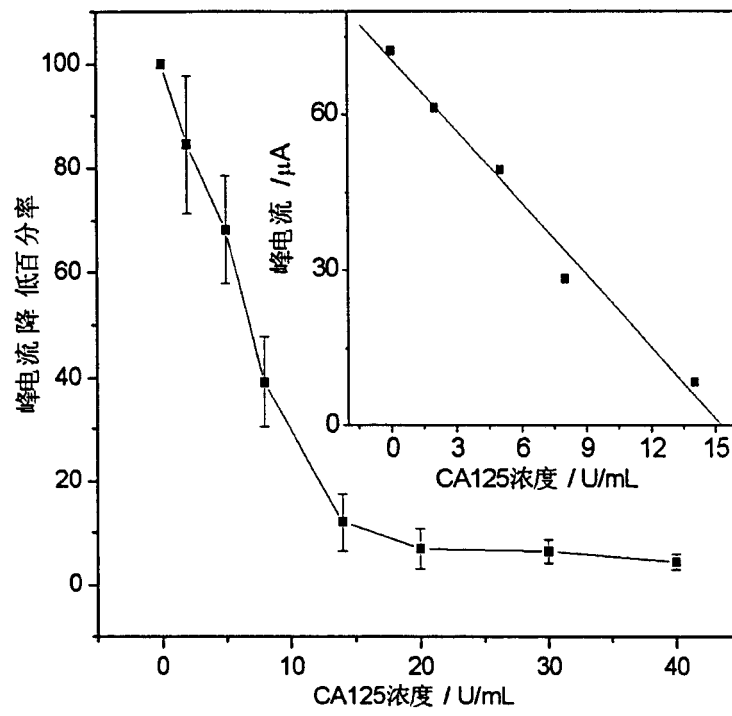
(c) 取 5 微升 500 U/mL 标准 CA125 抗原溶液，滴涂在经 (b) 步骤处理的电极表面，然后将此电极悬于四异丙氧基钛液面的上方，将体系密闭后于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 4 小时。

(d) 在密闭体系中，四异丙氧基钛蒸汽与电极表面的抗原溶液接触，发生缓慢的水解反应生成二氧化钛溶胶。溶胶在胶凝成膜的过程中将 CA125 抗原包埋凝胶膜内，从而被固定在电极表面，制成 CA125 免疫传感器。

2. 实施例 2：CA125 的测定

(a) 测定条件的优化: 分别改变温育温度, 温育时间及反应溶液中 HRP 标记 CA125 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, 实验结果显示, 当在 33 °C 下温育 40 min, 得到最大电流响应, 当 50 微升反应溶液中 HRP 标记 CA125 抗体量大于 83% 时, 电流响应达到最大值。

(b) CA125 的测定: 在优化实验条件下, 利用竞争免疫分析方法, 测定一系列标准 CA125 抗原浓度, 确定 CA125 测定的标准曲线, 再利用标准曲线法, 测定样品中 CA125 抗原的浓度。



专利名称(译)	一种无试剂安培免疫传感器的制备及其应用		
公开(公告)号	CN1196932C	公开(公告)日	2005-04-13
申请号	CN03113053.4	申请日	2003-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	江苏省肿瘤医院 南京大学		
申请(专利权)人(译)	江苏省肿瘤医院 南京大学		
当前申请(专利权)人(译)	江苏省肿瘤医院 南京大学		
[标]发明人	严枫 戴宗 鞠焯先		
发明人	严枫 戴宗 鞠焯先		
IPC分类号	G01N27/26 G01N33/53 G01N33/535		
其他公开文献	CN1438482A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种无试剂安培免疫传感器的制备方法和在免疫分析中的应用，其制备步骤是将待测抗原溶解在缓冲溶液中，对载体表面进行预处理并在其表面滴涂上述溶液，悬于金属烷氧基化合物的液面上方，密闭此体系恒温水浴可获得免疫传感器。对待测抗原测定条件进行优化，然后进行一系列的处理可得到待测抗原的测定标准曲线，以及通过电化学信号的降低，在测定标准曲线上可查出相应浓度。此方法无需向待测样品溶液中加入媒介体或其它试剂，避免了媒介体等对电极的污染，简化了分析体系，分析反应也可一步完成，具有很好的精确性、重复性和稳定性。

