



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104459124 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 21

(21) 申请号 201410727327. 9

(22) 申请日 2014. 12. 04

(73) 专利权人 济南大学

地址 250022 山东省济南市济微路 106 号

(72) 发明人 吴丹 高健 魏琴 闫涛 马洪敏

张勇 罗川南 杜斌 庞雪辉

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 27/327(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 104122309 A, 2014. 10. 29,

Alan Le Goff 等. Enzymatic biosensors based on SWCNT-conducting polymer electrodes. 《Analyst》. 2011, 第 136 卷

Lisong Wang 等. Host−

Guest Interaction of Adamantine with a β -Cyclodextrin-Functionalized AuPd Bimetallic Nanoprobe for Ultrasensitive

Electrochemical Immunoassay of Small Molecules. 《Analytical Chemistry》. 2013, 第 85 卷

毛燕妮. β -环糊精及其衍生物和纳米碳材料在电化学中的研究与应用. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库》. 2012,

尚昆. 禽白血病病毒高灵敏电化学检测与致病菌高效控制技术研究. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库》. 2014, (第 2014/05 期),

张伟 等. 二茂铁/ β -环糊精/碳纳米管复合物修饰电极制备、表征及对尿酸的催化氧化. 《安徽师范大学学报》. 2006, 第 29 卷 (第 5 期),

审查员 毕秀华

权利要求书2页 说明书7页

(54) 发明名称

一种基于 HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物的电化学免疫传感器的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明属于免疫分析和生物传感技术领域, 其公开了一种基于 HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物的电化学免疫传感器的制备方法及应用, 用于快速检测猪瘟疫病毒抗原 CSFV。其制作方案是: 以裸铂碳电极为工作电极, 将 MWCNTs-CD-Fc-Ab₁ 对其进行修饰, 然后依次加入牛血清白蛋白、猪瘟疫病毒抗原 CSFV 以及 Ab₂-HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物。HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物可以转化葡萄糖为葡萄糖酸, 并传递两个质子和两个电子给氧分子, 产生双氧水, HS- β -CD-Ag 纳米材料作为一种模拟酶, 催化双氧水的还原, 实现了电化学信号的双重放大, 实现了较高的灵敏度, 检测限可低至 0. 33pg/mL。

CN 104459124 B

1. 一种基于 HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物的电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤如下:

(1) HS- β -CD-Ag 纳米材料的制备

将 1 mL, 0.005-0.015 mol/L 的 AgNO₃ 和 1 mL, 0.02-0.04 mol/L 的柠檬酸三钠加入到 97 mL 的高纯水中,搅拌均匀,震荡滴加 1 mL, 1.5-2.0 mg/mL 的 NaBH₄, 充分搅拌 20 min, 加入 0.0238 g 的巯基化 β 环糊精 HS- β -CD, 磁力搅拌 24 h, 转速为 11000 rpm 的条件下离心 10 min, 恒温 60 °C 真空干燥;

(2) 金刚烷甲酸功能化的葡萄糖氧化酶 ADA-GOD 的制备

称取 25-41 mg 金刚烷甲酸 ADA 于 40 mL 超纯水中, 加入 200 μ L, 0.5-1.5 mol/mL 的 NaOH 溶液, 溶液澄清后稀释至 100 mL, 在 1-3 mL 的金刚烷甲酸 ADA 溶液中加入 10 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 EDC、10 mg N-羟基丁二酰亚胺 NHS 和 2 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 室温搅拌 0.5 h, 加入 200 μ L, 0.5-1.5 mg/mL 的葡萄糖氧化酶, 恒温 4 °C 过夜, 转速为 8000 rpm 的条件下离心 8 min, 于 -20 °C 的条件下保存, 制得 100-300 μ g/mL 的金刚烷甲酸功能化的葡萄糖氧化酶 ADA-GOD 溶液;

(3) 金刚烷甲酸功能化的检测抗体 ADA-Ab₂ 的制备

称取 25-41 mg 金刚烷甲酸 ADA 于 40 mL 超纯水中, 加入 200 μ L, 0.5-1.5 mol/mL 的 NaOH 溶液, 溶液澄清后稀释至 100 mL, 在 1-3 mL 的金刚烷甲酸 ADA 溶液中加入 10 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 EDC、10 mg N-羟基丁二酰亚胺 NHS 和 2 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 室温搅拌 0.5 h, 加入 200 μ L, 0.5-1.5 mg/mL 检测抗体 Ab₂, 恒温 4 °C 过夜, 转速为 8000 rpm 的条件下离心 8 min, 加入 1 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 于 -20 °C 的条件下保存, 制得 100-300 μ g/mL 的金刚烷甲酸功能化的检测抗体 ADA-Ab₂ 溶液;

(4) Ab₂-HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物溶液的制备

将金刚烷甲酸功能化的检测抗体 ADA-Ab₂ 和金刚烷甲酸功能化的葡萄糖氧化酶 ADA-GOD 稀释至 40-60 μ g/mL, 取 200 μ L, 40-60 μ g/mL ADA-Ab₂ 和 200 μ L, 40-60 μ g/mL ADA-GOD, 加入 200 μ L, 3-5 mg/mL HS- β -CD-Ag, 恒温 4 °C 孵化过夜, 转速为 8000 rpm 的条件下离心 8 min, 弃去上清液, 加入 200 μ L, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 于 -20 °C 的条件下保存, 制得 Ab₂-HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物溶液;

(5) 多壁碳纳米管- β -环糊精-二茂铁 MWCNTs-CD-Fc 复合材料的制备

称取 0.4-0.6 g 多壁碳纳米管 MWCNTs, 加入到已配好的 H₂SO₄ 和 HNO₃ 为 3:1 的混合溶液中, 恒温 40 °C 超声 3 h, 冷却至室温, 用超纯水稀释到 500 mL, 使用 0.22 μ m 的滤膜进行真空抽滤, 超纯水洗涤到 pH 为中性, 恒温 60 °C 真空干燥, 制得羧基化多壁碳纳米管 MWCNTs-COOH;

称取 20-30 mg MWCNTs-COOH, 分散到 50 mL 超纯水中, 然后加入 150-250 mg 的 β -环糊精 CD, 震荡 12 h, 离心, 水洗 4 次, 恒温 60 °C 真空干燥, 60-100 mg 二茂铁甲酸 Fc 加入到 50 mL 的二氯甲烷中, 加入 20-30 mg MWCNTs-CD, 搅拌 12 h, 离心干燥, 得多壁碳纳米管- β -环糊精-二茂铁 MWCNTs-CD-Fc 复合材料;

(6) 多壁碳纳米管- β -环糊精-二茂铁-捕获抗体 MWCNTs-CD-Fc-Ab₁ 的制备

称取 3-5 mg 的 MWCNTs-CD-Fc 分散到 2 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液中, 加入 10 mg

1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 EDC、10 mg N-羟基丁二酰亚胺 NHS, 恒温 4 °C 搅拌 0.5 h, 加入 200 μL , 0.5-1.5 mg/mL 捕获抗体 Ab_1 , 恒温 4 °C 震荡 12h, 制得多壁碳纳米管- β -环糊精-二茂铁-捕获抗体 MWCNTs-CD-Fc-Ab_1 ;

(7) 传感器的制备

1) 将直径 4 mm 的玻碳电极依次用 1.0、0.3 和 0.05 mm 的三氧化二铝抛光粉抛光处理, 乙醇超声清洗, 再用超纯水冲洗干净, 然后将电极置于 5 mmol \cdot L⁻¹ 铁氰化钾溶液中, 在 -0.2 ~ 0.6 V 电位下扫描, 使峰电位差小于 80 mV;

2) 将 pH 7.0, 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液分散的 MWCNTs-CD-Fc-Ab_1 修饰于玻碳电极表面, 室温干燥, 所述 MWCNTs-CD-Fc-Ab_1 的浓度为 1.0 ~ 3.0 mg \cdot mL⁻¹;

3) 滴涂 3 μL 、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的牛血清白蛋白溶液至电极表面, 4°C 下湿润条件下晾干;

4) 滴涂 6 μL 、0.001 ~ 5.0 ng \cdot mL⁻¹ 的猪瘟疫病毒抗原 CSFV 标准溶液至电极表面, 4°C 下湿润条件下晾干;

5) 滴涂 6 μL 的 $\text{Ab}_2\text{-HS-}\beta\text{-CD-Ag-GOD}$ 溶液至电极表面, 4°C 下湿润条件下晾干, 制得一种基于 $\text{HS-}\beta\text{-CD-Ag-GOD}$ 共轭物的电化学免疫传感器。

2. 如权利要求 1 所述的制备方法制备的一种基于 $\text{HS-}\beta\text{-CD-Ag-GOD}$ 共轭物的电化学免疫传感器在检测猪瘟疫病毒抗原 CSFV 中的应用, 其特征在于, 包括如下步骤:

(1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 所制备的一种基于 $\text{HS-}\beta\text{-CD-Ag-GOD}$ 共轭物的电化学免疫传感器为工作电极, 在 10 mL、40~60 mmol/L 的 pH6.0 ~ 8.0 磷酸盐缓冲溶液中测定其电流变化;

(2) 根据所得电流差值与猪瘟疫病毒抗原 CSFV 浓度呈线性关系, 绘制工作曲线;

(3) 依据工作曲线的绘制方法进行样品中猪瘟疫病毒抗原 CSFV 的检测, 检测结果从工作曲线中查得。

一种基于 HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物的电化学免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析与生物传感技术领域,具体涉及一种基于 HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物的电化学免疫传感器的制备及应用,研制一种快速检测猪瘟病毒抗原 CSFV 的夹心型电化学免疫传感器。

背景技术

[0002] 猪瘟病毒抗原 CSFV,或称猪霍乱,是一种急性、热性、高度接触性传染病,主要特征是高温、微血管变性而引起全身出血、坏死、梗塞。由于其高度的致病性和可引起广泛的死亡,给养猪业造成严重的经济损失。许多国家制定兽医法规,将猪瘟病毒列为法定传染病之一,也就是必须列表上报的疾病。发生疫情或可疑疫情,要尽快上报,立刻对疫点及其邻近牧场采取紧急兽医卫生防疫措施。

[0003] 目前国内外绝大多数检测机构都在使用酶联免疫法对猪瘟病毒抗原 CSFV 进行检测。由于其检测周期长,程序复杂所需试剂繁多等缺点已远远不能满足现代检测要求。随着现代科学技术的不断发展,特别是免疫学生物化学,分子生物学的不断发展,电化学免疫传感器已经引起广泛的研究兴趣。

[0004] 本发明采用夹心型电化学免疫传感器,结合双重放大技术,提高了传感器的检测灵敏度,另外,电化学免疫传感器以其选择性好、结构简单、操作简便、易于小型化、可连续、快速自动化检测分析等优点,可以被广泛的应用预防检测当中。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于避免传统检测方法的仪器设备复杂、操作过程繁琐、检测人员要求高、检测成本高等缺点,提供了一种灵敏度高、特异性强、重现性好、操作简便且价廉易得的检测猪瘟病毒抗原 CSFV 的夹心型电化学免疫传感器的制备方法。

[0006] 为了实现上述目的,本发明是通过以下措施来实现的。本发明的技术方案,包括以下步骤。

[0007] 1. 一种基于 HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物的电化学免疫传感器的制备方法

[0008] (1) 将直径 4 mm 的玻碳电极依次用 1.0、0.3 和 0.05 mm 的三氧化二铝抛光粉抛光处理,乙醇超声清洗,再用超纯水冲洗干净,然后将电极置于 5 mmol \cdot L⁻¹铁氰化钾溶液中,在 -0.2 ~ 0.6 V 电位下扫描,使峰电位差小于 80 mV;

[0009] (2) 将 pH 7.0, 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液分散的 MWCNTs-CD-Fc-Ab₁ 修饰于玻碳电极表面,室温干燥,所述 MWCNTs-CD-Fc-Ab₁ 的浓度为 1.0 ~ 3.0 mg \cdot mL⁻¹;

[0010] (3) 滴涂 3 μ L、100 μ g \cdot mL⁻¹ 的牛血清白蛋白溶液至电极表面,4 $^{\circ}$ C 下湿润条件下晾干;

[0011] (4) 滴涂 6 μ L、0.001 ~ 5.0 ng \cdot mL⁻¹ 的猪瘟病毒抗原 CSFV 标准溶液至电极表面,4 $^{\circ}$ C 下湿润条件下晾干;

[0012] (5) 滴涂 6 μL 的 $\text{Ab}_2\text{-CD-Ag-GOD}$ 溶液至电极表面, 4°C 下湿润条件下晾干, 制得一种基于 $\text{HS-}\beta\text{-CD-Ag-GOD}$ 共轭物的电化学免疫传感器。

[0013] 2. 如上所述 $\text{Ab}_2\text{-HS-}\beta\text{-CD-Ag-GOD}$ 共轭物溶液的制备方法

[0014] (1) $\text{HS-}\beta\text{-CD-Ag}$ 纳米材料的制备

[0015] 将 1 mL, 0.005-0.015 mol/L 的 AgNO_3 和 1 mL, 0.02-0.04 mol/L 的柠檬酸三钠加入到 97 mL 的高纯水中, 搅拌均匀, 震荡滴加 1 mL, 1.5-2.0 mg/mL 的 NaBH_4 , 充分搅拌 20 min, 加入 0.0238 g 的巯基化 β 环糊精 $\text{HS-}\beta\text{-CD}$, 磁力搅拌 24 h, 转速为 11000 rpm 的条件下离心 10 min, 恒温 60°C 真空干燥;

[0016] (2) 金刚烷甲酸功能化的葡萄糖氧化酶 ADA-GOD 的制备

[0017] 称取 25-41 mg 金刚烷甲酸 ADA 于 40 mL 超纯水中, 加入 200 μL , 0.5-1.5 mol/mL 的 NaOH 溶液, 溶液澄清后稀释至 100 mL, 在 1-3 mL 的金刚烷甲酸 ADA 溶液中加入 10 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐 EDC 、10 mg N- 羟基丁二酰亚胺 NHS 和 2 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 室温搅拌 0.5 h, 加入 200 μL , 0.5-1.5 mg/mL 的葡萄糖氧化酶, 恒温 4°C 过夜, 转速为 8000 rpm 的条件下离心 8 min, 于 -20°C 的条件下保存, 制得 100-300 $\mu\text{g/mL}$ 的金刚烷甲酸功能化的葡萄糖氧化酶 ADA-GOD 溶液;

[0018] (3) 金刚烷甲酸功能化的检测抗体 ADA-Ab_2 的制备

[0019] 称取 25-41 mg 金刚烷甲酸 ADA 于 40 mL 超纯水中, 加入 200 μL , 0.5-1.5 mol/mL 的 NaOH 溶液, 溶液澄清后稀释至 100 mL, 在 1-3 mL 的金刚烷甲酸 ADA 溶液中加入 10 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐 EDC 、10 mg N- 羟基丁二酰亚胺 NHS 和 2 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 室温搅拌 0.5 h, 加入 200 μL , 0.5-1.5 mg/mL 检测抗体 Ab_2 , 恒温 4°C 过夜, 转速为 8000 rpm 的条件下离心 8 min, 加入 1 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 于 -20°C 的条件下保存, 制得 100-300 $\mu\text{g/mL}$ 的金刚烷甲酸功能化的检测抗体 ADA-Ab_2 溶液;

[0020] (4) $\text{Ab}_2\text{-HS-}\beta\text{-CD-Ag-GOD}$ 共轭物溶液的制备

[0021] 将金刚烷甲酸功能化的检测抗体 ADA-Ab_2 和金刚烷甲酸功能化的葡萄糖氧化酶 ADA-GOD 稀释至 40-60 $\mu\text{g/mL}$, 取 200 μL , 40-60 $\mu\text{g/mL}$ ADA-Ab_2 和 200 μL , 40-60 $\mu\text{g/mL}$ ADA-GOD , 加入 200 μL , 3-5 mg/mL $\text{HS-}\beta\text{-CD-Ag}$, 恒温 4°C 孵化过夜, 转速为 8000 rpm 的条件下离心 8 min, 弃去上清液, 加入 200 μL , pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 于 -20°C 的条件下保存, 制得 $\text{Ab}_2\text{-HS-}\beta\text{-CD-Ag-GOD}$ 共轭物溶液;

[0022] (5) 多壁碳纳米管- β -环糊精-二茂铁 MWCNTs-CD-Fc 复合材料的制备

[0023] 称取 0.4-0.6 g 多壁碳纳米管 MWCNTs , 加入到已配好的 H_2SO_4 和 HNO_3 为 3:1 的混合溶液中, 恒温 40°C 超声 3 h, 冷却至室温, 用超纯水稀释到 500 mL, 使用 0.22 μm 的滤膜进行真空抽滤, 超纯水洗涤到 pH 为中性, 恒温 60°C 真空干燥, 制得羧基化多壁碳纳米管 MWCNTs-COOH ;

[0024] 称取 20-30 mg MWCNTs-COOH , 分散到 50 mL 超纯水中, 然后加入 150-250 mg 的 β -环糊精 CD , 震荡 12 h, 离心, 水洗 4 次, 恒温 60°C 真空干燥, 60-100 mg 二茂铁甲酸 Fc 加入到 50 mL 的二氯甲烷中, 加入 20-30 mg MWCNTs-CD , 搅拌 12 h, 离心干燥, 得多壁碳纳米管- β -环糊精-二茂铁 MWCNTs-CD-Fc 复合材料;

[0025] (6) 多壁碳纳米管- β -环糊精-二茂铁-捕获抗体 MWCNTs-CD-Fc-Ab_1 的制备

[0026] 称取 3-5 mg 的 MWCNTs-CD-Fc 分散到 2 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液中, 加入 10 mg 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 EDC、10 mg N-羟基丁二酰亚胺 NHS, 恒温 4 °C 搅拌 0.5 h, 加入 200 μ L, 0.5-1.5 mg/mL 捕获抗体 Ab₁, 恒温 4 °C 震荡 12h, 制得多壁碳纳米管- β -环糊精-二茂铁-捕获抗体 MWCNTs-CD-Fc-Ab₁。

[0027] 3. 猪瘟疫病毒抗原 CSFV 的检测方法

[0028] (1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 所制备的一种基于 HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物的电化学免疫传感器为工作电极, 在 10 mL、40~60 mmol/L 的 pH6.0 ~ 8.0 磷酸盐缓冲溶液中测定其电流变化;

[0029] (2) 根据所得电流差值与猪瘟疫病毒抗原 CSFV 浓度呈线性关系, 绘制工作曲线;

[0030] (3) 依据工作曲线的绘制方法进行样品中猪瘟疫病毒抗原 CSFV 的检测, 检测结果从工作曲线中查得。

[0031] 本发明的有益成果

[0032] (1) 本发明是基于 HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物, 构建了一种夹心型电化学免疫传感器, 金刚烷甲酸功能化的葡萄糖氧化酶 ADA-GOD 可以转化葡萄糖为葡萄糖酸, 并传递两个质子和两个电子给氧分子, 产生双氧水, HS- β -CD-Ag 纳米材料作为一种模拟酶, 催化双氧水的还原, 实现了电化学信号的双重放大;

[0033] (2) 本发明采用的 HS- β -CD-Ag 纳米材料具有良好的分子识别能力, 可以有效地捕捉金刚烷甲酸功能化的葡萄糖氧化酶 ADA-GOD 和金刚烷甲酸功能化的检测抗体 ADA-Ab₂;

[0034] (3) 本发明利用 MWCNTs-CD-Fc 复合材料大的比表面积, 良好的生物相容性和高的导电性, 来有效地固定捕获抗体 Ab₁, 提高免疫传感的检测灵敏度;

[0035] (4) 本发明将该传感器应用于猪瘟疫病毒抗原 CSFV 的高灵敏、特异性检测, 线性范围为 0.001-5 ng/mL, 检出限为 0.33 pg/mL。

具体实施方式

[0036] 实施例 1 HS- β -CD-Ag 纳米材料的制备

[0037] 将 1 mL, 0.005 mol/L 的 AgNO₃ 和 1 mL, 0.02 mol/L 的柠檬酸三钠加入到 97 mL 的高纯水中, 搅拌均匀, 震荡滴加 1 mL, 1.5 mg/mL 的 NaBH₄, 充分搅拌 20 min, 加入 0.0238 g 的巯基化 β -环糊精 HS- β -CD, 磁力搅拌 24 h, 转速为 11000 rpm 的条件下离心 10 min, 恒温 60 °C 真空干燥;

[0038] 实施例 2 HS- β -CD-Ag 纳米材料的制备

[0039] 将 1 mL, 0.01 mol/L 的 AgNO₃ 和 1 mL, 0.03 mol/L 的柠檬酸三钠加入到 97 mL 的高纯水中, 搅拌均匀, 震荡滴加 1 mL, 1.79 mg/mL 的 NaBH₄, 充分搅拌 20 min, 加入 0.0238 g 的巯基化 β -环糊精 HS- β -CD, 磁力搅拌 24 h, 转速为 11000 rpm 的条件下离心 10 min, 恒温 60 °C 真空干燥;

[0040] 实施例 3 HS- β -CD-Ag 纳米材料的制备

[0041] 将 1 mL, 0.015 mol/L 的 AgNO₃ 和 1 mL, 0.04 mol/L 的柠檬酸三钠加入到 97 mL 的高纯水中, 搅拌均匀, 震荡滴加 1 mL, 2.0 mg/mL 的 NaBH₄, 充分搅拌 20 min, 加入 0.0238 g 的巯基化 β -环糊精 HS- β -CD, 磁力搅拌 24 h, 转速为 11000 rpm 的条件下离心 10 min,

恒温 60 °C 真空干燥；

[0042] 实施例 4 金刚烷甲酸功能化的葡萄糖氧化酶 ADA-GOD 的制备

[0043] 称取 25 mg 金刚烷甲酸 ADA 于 40 mL 超纯水中, 加入 200 μ L, 0.5 mol/mL 的 NaOH 溶液, 溶液澄清后稀释至 100 mL, 在 1 mL 的金刚烷甲酸 ADA 溶液中加入 10 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 EDC、10 mg N-羟基丁二酰亚胺 NHS 和 2 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 室温搅拌 0.5 h, 加入 200 μ L, 0.5 mg/mL 的葡萄糖氧化酶, 恒温 4 °C 过夜, 转速为 8000 rpm 的条件下离心 8 min, 于 -20 °C 的条件下保存, 制得 100 μ g/mL 的金刚烷甲酸功能化的葡萄糖氧化酶 ADA-GOD 溶液；

[0044] 实施例 5 金刚烷甲酸功能化的葡萄糖氧化酶 ADA-GOD 的制备

[0045] 称取 33 mg 金刚烷甲酸 ADA 于 40 mL 超纯水中, 加入 200 μ L, 1 mol/mL 的 NaOH 溶液, 溶液澄清后稀释至 100 mL, 在 2 mL 的金刚烷甲酸 ADA 溶液中加入 10 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 EDC、10 mg N-羟基丁二酰亚胺 NHS 和 2 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 室温搅拌 0.5 h, 加入 200 μ L, 1 mg/mL 的葡萄糖氧化酶, 恒温 4 °C 过夜, 转速为 8000 rpm 的条件下离心 8 min, 于 -20 °C 的条件下保存, 制得 200 μ g/mL 的金刚烷甲酸功能化的葡萄糖氧化酶 ADA-GOD 溶液；

[0046] 实施例 6 金刚烷甲酸功能化的葡萄糖氧化酶 ADA-GOD 的制备

[0047] 称取 41 mg 金刚烷甲酸 ADA 于 40 mL 超纯水中, 加入 200 μ L, 1.5 mol/mL 的 NaOH 溶液, 溶液澄清后稀释至 100 mL, 在 1-3 mL 的金刚烷甲酸 ADA 溶液中加入 10 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 EDC、10 mg N-羟基丁二酰亚胺 NHS 和 2 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 室温搅拌 0.5 h, 加入 200 μ L, 1.5 mg/mL 的葡萄糖氧化酶, 恒温 4 °C 过夜, 转速为 8000 rpm 的条件下离心 8 min, 于 -20 °C 的条件下保存, 制得 300 μ g/mL 的金刚烷甲酸功能化的葡萄糖氧化酶 ADA-GOD 溶液；

[0048] 实施例 7 金刚烷甲酸功能化的检测抗体 ADA-Ab₂ 的制备

[0049] 称取 25 mg 金刚烷甲酸 ADA 于 40 mL 超纯水中, 加入 200 μ L, 0.5 mol/mL 的 NaOH 溶液, 溶液澄清后稀释至 100 mL, 在 1-3 mL 的金刚烷甲酸 ADA 溶液中加入 10 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 EDC、10 mg N-羟基丁二酰亚胺 NHS 和 2 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 室温搅拌 0.5 h, 加入 200 μ L, 0.5 mg/mL 检测抗体 Ab₂, 恒温 4 °C 过夜, 转速为 8000 rpm 的条件下离心 8 min, 加入 1 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 于 -20 °C 的条件下保存, 制得 100 μ g/mL 的金刚烷甲酸功能化的检测抗体 ADA-Ab₂ 溶液；

[0050] 实施例 8 金刚烷甲酸功能化的检测抗体 ADA-Ab₂ 的制备

[0051] 称取 33 mg 金刚烷甲酸 ADA 于 40 mL 超纯水中, 加入 200 μ L, 1 mol/mL 的 NaOH 溶液, 溶液澄清后稀释至 100 mL, 在 2 mL 的金刚烷甲酸 ADA 溶液中加入 10 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 EDC、10 mg N-羟基丁二酰亚胺 NHS 和 2 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 室温搅拌 0.5 h, 加入 200 μ L, 1 mg/mL 检测抗体 Ab₂, 恒温 4 °C 过夜, 转速为 8000 rpm 的条件下离心 8 min, 加入 1 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 于 -20 °C 的条件下保存, 制得 200 μ g/mL 的金刚烷甲酸功能化的检测抗体 ADA-Ab₂ 溶液；

[0052] 实施例 9 金刚烷甲酸功能化的检测抗体 ADA-Ab₂ 的制备

[0053] 称取 41 mg 金刚烷甲酸 ADA 于 40 mL 超纯水中, 加入 200 μ L, 1.5 mol/mL 的 NaOH 溶液, 溶液澄清后稀释至 100 mL, 在 1-3 mL 的金刚烷甲酸 ADA 溶液中加入 10 mg 1-乙

基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 EDC、10 mg N-羟基丁二酰亚胺 NHS 和 2 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 室温搅拌 0.5 h, 加入 200 μ L, 1.5 mg/mL 检测抗体 Ab₂, 恒温 4 $^{\circ}$ C 过夜, 转速为 8000 rpm 的条件下离心 8 min, 加入 1 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 于 -20 $^{\circ}$ C 的条件下保存, 制得 300 μ g/mL 的金刚烷甲酸功能化的检测抗体 ADA-Ab₂ 溶液。

[0054] 实施例 10 Ab₂-HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物溶液的制备

[0055] 将金刚烷甲酸功能化的检测抗体 ADA-Ab₂ 和金刚烷甲酸功能化的葡萄糖氧化酶 ADA-GOD 稀释至 40 μ g/mL, 取 200 μ L, 40 μ g/mL ADA-Ab₂ 和 200 μ L, 40 μ g/mL ADA-GOD, 加入 200 μ L, 3 mg/mL HS- β -CD-Ag, 恒温 4 $^{\circ}$ C 孵化过夜, 转速为 8000 rpm 的条件下离心 8 min, 弃去上清液, 加入 200 μ L, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 于 -20 $^{\circ}$ C 的条件下保存, 制得 Ab₂-HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物溶液;

[0056] 实施例 11 Ab₂-HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物溶液的制备

[0057] 将金刚烷甲酸功能化的检测抗体 ADA-Ab₂ 和金刚烷甲酸功能化的葡萄糖氧化酶 ADA-GOD 稀释至 50 μ g/mL, 取 200 μ L, 50 μ g/mL ADA-Ab₂ 和 200 μ L, 50 μ g/mL ADA-GOD, 加入 200 μ L, 4 mg/mL HS- β -CD-Ag, 恒温 4 $^{\circ}$ C 孵化过夜, 转速为 8000 rpm 的条件下离心 8 min, 弃去上清液, 加入 200 μ L, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 于 -20 $^{\circ}$ C 的条件下保存, 制得 Ab₂-HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物溶液;

[0058] 实施例 12 Ab₂-HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物溶液的制备

[0059] 将金刚烷甲酸功能化的检测抗体 ADA-Ab₂ 和金刚烷甲酸功能化的葡萄糖氧化酶 ADA-GOD 稀释至 60 μ g/mL, 取 200 μ L, 60 μ g/mL ADA-Ab₂ 和 200 μ L, 60 μ g/mL ADA-GOD, 加入 200 μ L, 5 mg/mL HS- β -CD-Ag, 恒温 4 $^{\circ}$ C 孵化过夜, 转速为 8000 rpm 的条件下离心 8 min, 弃去上清液, 加入 200 μ L, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液, 于 -20 $^{\circ}$ C 的条件下保存, 制得 Ab₂-HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物溶液;

[0060] 实施例 13 多壁碳纳米管- β -环糊精-二茂铁 MWCNTs-CD-Fc 复合材料的制备

[0061] 称取 0.4g 多壁碳纳米管 MWCNTs, 加入到已配好的 H₂SO₄ 和 HNO₃ 为 3:1 的混合溶液中, 恒温 40 $^{\circ}$ C 超声 3 h, 冷却至室温, 用超纯水稀释到 500 mL, 使用 0.22 μ m 的滤膜进行真空抽滤, 超纯水洗涤到 pH 为中性, 恒温 60 $^{\circ}$ C 真空干燥, 制得羧基化多壁碳纳米管 MWCNTs-COOH;

[0062] 称取 20mg MWCNTs-COOH, 分散到 50 mL 超纯水中, 然后加入 150 mg 的 β -环糊精 CD, 震荡 12 h, 离心, 水洗 4 次, 恒温 60 $^{\circ}$ C 真空干燥, 60 mg 二茂铁甲酸 Fc 加入到 50 mL 的二氯甲烷中, 加入 20 mg MWCNTs-CD, 搅拌 12 h, 离心干燥, 得多壁碳纳米管- β -环糊精-二茂铁 MWCNTs-CD-Fc 复合材料;

[0063] 实施例 14 多壁碳纳米管- β -环糊精-二茂铁 MWCNTs-CD-Fc 复合材料的制备

[0064] 称取 0.5 g 多壁碳纳米管 MWCNTs, 加入到已配好的 H₂SO₄ 和 HNO₃ 为 3:1 的混合溶液中, 恒温 40 $^{\circ}$ C 超声 3 h, 冷却至室温, 用超纯水稀释到 500 mL, 使用 0.22 μ m 的滤膜进行真空抽滤, 超纯水洗涤到 pH 为中性, 恒温 60 $^{\circ}$ C 真空干燥, 制得羧基化多壁碳纳米管 MWCNTs-COOH;

[0065] 称取 25 mg MWCNTs-COOH, 分散到 50 mL 超纯水中, 然后加入 200 mg 的 β -环糊精 CD, 震荡 12 h, 离心, 水洗 4 次, 恒温 60 $^{\circ}$ C 真空干燥, 80 mg 二茂铁甲酸 Fc 加入到 50 mL 的二氯甲烷中, 加入 25 mg MWCNTs-CD, 搅拌 12 h, 离心干燥, 得多壁碳纳米管- β -环糊精-二

茂铁 MWCNTs-CD-Fc 复合材料；

[0066] 实施例 15 多壁碳纳米管-β-环糊精-二茂铁 MWCNTs-CD-Fc 复合材料的制备

[0067] 称取 0.6 g 多壁碳纳米管 MWCNTs, 加入到已配好的 H₂SO₄和 HNO₃为 3:1 的混合溶液中, 恒温 40 °C 超声 3 h, 冷却至室温, 用超纯水稀释到 500 mL, 使用 0.22 μm 的滤膜进行真空抽滤, 超纯水洗涤到 pH 为中性, 恒温 60 °C 真空干燥, 制得羧基化多壁碳纳米管 MWCNTs-COOH；

[0068] 称取 30 mg MWCNTs-COOH, 分散到 50 mL 超纯水中, 然后加入 250 mg 的 β-环糊精 CD, 震荡 12 h, 离心, 水洗 4 次, 恒温 60 °C 真空干燥, 100 mg 二茂铁甲酸 Fc 加入到 50 mL 的二氯甲烷中, 加入 30 mg MWCNTs-CD, 搅拌 12 h, 离心干燥, 得多壁碳纳米管-β-环糊精-二茂铁 MWCNTs-CD-Fc 复合材料；

[0069] 实施例 16 多壁碳纳米管-β-环糊精-二茂铁-捕获抗体 MWCNTs-CD-Fc-Ab₁ 的制备

[0070] 称取 3 mg 的 MWCNTs-CD-Fc 分散到 2 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液中, 加入 10 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 EDC、10 mg N-羟基丁二酰亚胺 NHS, 恒温 4 °C 搅拌 0.5 h, 加入 200 μL, 0.5 mg/mL 捕获抗体 Ab₁, 恒温 4 °C 震荡 12h, 制得多壁碳纳米管-β-环糊精-二茂铁-捕获抗体 MWCNTs-CD-Fc-Ab₁；

[0071] 实施例 17 多壁碳纳米管-β-环糊精-二茂铁-捕获抗体 MWCNTs-CD-Fc-Ab₁ 的制备

[0072] 称取 4 mg 的 MWCNTs-CD-Fc 分散到 2 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液中, 加入 10 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 EDC、10 mg N-羟基丁二酰亚胺 NHS, 恒温 4 °C 搅拌 0.5 h, 加入 200 μL, 1 mg/mL 捕获抗体 Ab₁, 恒温 4 °C 震荡 12h, 制得多壁碳纳米管-β-环糊精-二茂铁-捕获抗体 MWCNTs-CD-Fc-Ab₁；

[0073] 实施例 18 多壁碳纳米管-β-环糊精-二茂铁-捕获抗体 MWCNTs-CD-Fc-Ab₁ 的制备

[0074] 称取 5 mg 的 MWCNTs-CD-Fc 分散到 2 mL, pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液中, 加入 10 mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 EDC、10 mg N-羟基丁二酰亚胺 NHS, 恒温 4 °C 搅拌 0.5 h, 加入 200 μL, 1.5 mg/mL 捕获抗体 Ab₁, 恒温 4 °C 震荡 12h, 制得多壁碳纳米管-β-环糊精-二茂铁-捕获抗体 MWCNTs-CD-Fc-Ab₁；

[0075] 实施例 19 猪瘟疫病毒抗原 CSFV 的检测方法

[0076] 实施例 1~18 中任一所述的一种高灵敏猪瘟疫病毒抗原 CSFV 免疫传感器, 用于猪瘟疫病毒抗原 CSFV 的检测, 包括以下步骤：

[0077] (1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 所制备的一种基于 HS-β-CD-Ag-GOD 共轭物的电化学免疫传感器为工作电极, 在 10 mL、40mmol/L 的 pH6.0 磷酸盐缓冲溶液中测定其电流变化；

[0078] (2) 根据所得电流差值与猪瘟疫病毒抗原 CSFV 浓度呈线性关系, 绘制工作曲线；

[0079] (3) 依据工作曲线的绘制方法进行样品中猪瘟疫病毒抗原 CSFV 的检测, 检测结果从工作曲线中查得。

[0080] 实施例 20 猪瘟疫病毒抗原 CSFV 的检测方法

[0081] (1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电

极为辅助电极,所制备的一种基于 HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物的电化学免疫传感器为工作电极,在 10 mL、50 mmol/L 的 pH7.0 磷酸盐缓冲溶液中测定其电流变化;

[0082] (2) 根据所得电流差值与猪瘟病毒抗原 CSFV 浓度呈线性关系,绘制工作曲线;

[0083] (3) 依据工作曲线的绘制方法进行样品中猪瘟病毒抗原 CSFV 的检测,检测结果从工作曲线中查得。

[0084] 实施例 21 猪瘟病毒抗原 CSFV 的检测方法

[0085] (1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,所制备的一种基于 HS- β -CD-Ag-GOD 共轭物的电化学免疫传感器为工作电极,在 10 mL、60 mmol/L 的 pH 8.0 磷酸盐缓冲溶液中测定其电流变化;

[0086] (2) 根据所得电流差值与猪瘟病毒抗原 CSFV 浓度呈线性关系,绘制工作曲线;

[0087] (3) 依据工作曲线的绘制方法进行样品中猪瘟病毒抗原 CSFV 的检测,检测结果从工作曲线中查得。

专利名称(译)	一种基于HS-β-CD-Ag-GOD共轭物的电化学免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN104459124B	公开(公告)日	2015-10-21
申请号	CN201410727327.9	申请日	2014-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	济南大学		
申请(专利权)人(译)	济南大学		
当前申请(专利权)人(译)	济南大学		
[标]发明人	吴丹 高健 魏琴 闫涛 马洪敏 张勇 罗川南 杜斌 庞雪辉		
发明人	吴丹 高健 魏琴 闫涛 马洪敏 张勇 罗川南 杜斌 庞雪辉		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N27/327		
CPC分类号	G01N27/3278 G01N33/54366 G01N33/54386 G01N33/56983 G01N2333/185		
其他公开文献	CN104459124A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫分析和生物传感技术领域，其公开了一种基于HS-β-CD-Ag-GOD共轭物的电化学免疫传感器的制备方法及应用，用于快速检测猪瘟病毒抗原CSFV。其制作方案是：以裸铂碳电极为工作电极，将MWCNTs-CD-Fc-Ab1对其进行修饰，然后依次加入牛血清白蛋白、猪瘟病毒抗原CSFV以及Ab2-HS-β-CD-Ag-GOD共轭物。HS-β-CD-Ag-GOD共轭物可以转化葡萄糖为葡萄糖酸，并传递两个质子和两个电子给氧分子，产生双氧水，HS-β-CD-Ag纳米材料作为一种模拟酶，催化双氧水的还原，实现了电化学信号的双重放大，实现了较高的灵敏度，检测限可低至0.33pg/mL。