



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101655473 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 05

(21) 申请号 200910153183. X

(22) 申请日 2009. 09. 24

(73) 专利权人 浙江大学

地址 310029 浙江省杭州市凯旋路 268 号

(72) 发明人 谭勋 丁守强 潘韬

(74) 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有
限公司 33100

代理人 徐关寿

(51) Int. Cl.

G01N 27/327(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2005/088287 A1, 2005. 09. 22, 全文.

傅小红. 纳米金修饰金电极固载抗体电流
型乙型肝炎免疫传感器的研究. 《宜宾学院学
报》. 2006, (第 12 期), 全文.

李娜. 新型纳米材料用于电化学免疫传感界
面的构建. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库
信息科技辑》. 2008, (第 9 期), 第 12 页 2. 1. 2 免

疫传感器的制备.

Mohamed s. EL-Deab et al..

An extraordinary electrocatalytic
reduction of oxygen on gold
nanoparticles-electrodeposited
gold electrodes. 《Electrochemistry
Communications》. 2002, (第 4 期), 第 289 页第
一栏 2. Experimental 和附图 Fig. 1.

覃柳等. 纳米金固定酶标抗体的免疫传感
器. 《医疗卫生装备》. 2007, 第 28 卷 (第 6 期),
第 3 页第一栏倒数第 3-4 行.

审查员 刘畅

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

纳米金免疫电极的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种纳米金免疫电极的制备方
法,包括步骤:将圆盘金电极用氧化铝粉末抛光、
用浓硫酸、过氧化氢混合液浸泡、超声波清洗、在
0. 5M 硫酸溶液中用循环伏安法抛光、以氯金酸电
解液为底液,用线性循环伏安扫描法在圆盘金电
极上沉积纳米金颗粒、连接特异性抗体、封闭。本
发明融合了电沉积技术和纳米金技术,直接运用
电沉积方法将氯金酸钠溶液中的金离子用过电化
学工艺控制直接氧化形成纳米金颗粒组装在金电
极表面,制备出的免疫电极与参比电极和辅助电
极一起形成的传感器不但保留了传感器的灵敏度
高、特异性强、重复性好、稳定性强的优点,而且
大幅缩短了工作电极的制备时间。

CN 101655473 B

1. 纳米金免疫电极的制备方法,其特征在于包括以下步骤:
 - a. 将圆盘金电极依次用直径为 $1\ \mu\text{m}$ 、 $0.3\ \mu\text{m}$ 和 $0.05\ \mu\text{m}$ 的氧化铝粉末抛光至光亮;
 - b. 抛光后的电极用浓硫酸和过氧化氢混合液浸泡 10 分钟;所述浓硫酸和过氧化氢混合液为 98% 浓硫酸和 30% 过氧化氢溶液按体积比 3 : 1 的比例配制;
 - c. 取出电极,依次于无水乙醇和双蒸水中用超声波清洗 15 分钟;
 - d. 将清洗后的电极放入 0.5M 硫酸溶液中,用循环伏安法在 $-0.3\sim 1.5\text{V}$ 电压下抛光 30 分钟,晾干备用;
 - e. 以氯金酸电解液为底液,采用线性循环伏安扫描法,在圆盘金电极上沉积纳米金颗粒,得纳米金电极;所述线性循环伏安扫描法的起始电压为 1.1V,末电压为 0V,扫面速度 0.1V/s ,扫描圈数为 1 圈;
 - f. 将纳米金电极浸入 $0.5\ \mu\text{g/ml}$ 的抗体溶液中,室温下孵育 20 分钟后取出,用 0.25% 小牛血清封闭 15 分钟,纯水洗净后晾干备用,得纳米金免疫电极。

纳米金免疫电极的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物化学及电化学技术领域,特别涉及一种采用电沉积方法在金电极表面快速组装纳米金粒子及连接特异性抗体的方法。

背景技术

[0002] 免疫传感器检测技术是将免疫检测技术与传感检测技术相结合而形成的一类新型检测技术,是生物传感器领域发展最迅速的技术之一,具有灵敏度高、特异性强、检测快速、使用简便、低成本和容易实现在线检测等许优点。电流型免疫传感器是免疫传感器的一种类型,通常由转换元件(支持电极)、生物敏感元件(抗体或抗原修饰的工作电极)、电解池以及数据采集与处理系统组成,通过检测抗原-抗体反应前后电流的变化而实现定性/定量检测。近十余年来,电流型免疫传感器在医学、动物医学、环境分析和食品安全检测等多领域中得到了广泛的研究,其中工作电极上生物分子的组装技术一直是该研究领域的关键内容。

[0003] 目前,纳米金颗粒因具有比表面积大、表面活性位点多、吸附力强、光电特性优良、生物亲和性强以及能在一定程度上保持蛋白质活性等优点,已被作为吸附和支撑生物分子的良好载体而应用于免疫传感器的研究中。已报道的将纳米金组装到免疫传感器工作电极表面的常用方法为:首先用某些带活性官能团(如 $-COOH$ 、 $-SH$ 、 $-S-S-$ 、 $-OH$ 等)的分子(如巯基乙胺,L-半胱氨酸,半胱胺)修饰工作电极,再利用这些小分子活性官能团与纳米金的共价结合而将纳米金粒子组装到工作电极表面。通过共价键作用吸附的纳米金粒子能稳定地结合在金电极表面,但是,这种组装纳米金粒子的方法耗时较长,不但延长试验周期,而且增加了试验的不确定因素,影响试验结果的准确性。比如,在以金电极为工作电极的免疫传感器制作过程中,通常需要将金电极在半胱氨酸溶液中浸泡 12 小时才能使半胱氨酸修饰到电极上,此后又需要在预先制备的纳米金胶体溶液中放置 6-12 小时才能使纳米金粒子结合到电极表面。而且半胱氨酸易被空气氧化成胱氨酸,直接影响到免疫传感器的稳定性。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术的上述缺陷,本发明提供了一种在免疫传感器工作电极表面组装纳米金颗粒和连接特异性抗体来制备纳米金免疫电极的方法。

[0005] 纳米金免疫电极的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

[0006] a. 将圆盘金电极依次用直径为 $1\ \mu\text{m}$ 、 $0.3\ \mu\text{m}$ 和 $0.05\ \mu\text{m}$ 的氧化铝粉末抛光至光亮;

[0007] b. 抛光后的电极用浓硫酸和过氧化氢混合液浸泡 10 分钟;

[0008] c. 取出电极,依次于无水乙醇和双蒸水中用超声波清洗 15 分钟;

[0009] d. 将清洗后的电极放入 0.5M 硫酸溶液中,用循环伏安法在 $-0.3\sim 1.5\text{V}$ 电压下抛光 30 分钟,晾干备用;

[0010] e. 以氯金酸电解液为底液,采用线性循环伏安扫描法,在圆盘金电极上沉积纳米金颗粒,得纳米金电极;

[0011] f. 将纳米金电极浸入 0.5 μg/ml 的抗体溶液中,室温下孵育 20 分钟后取出,用 0.25% 小牛血清封闭 15 分钟,纯水洗净后晾干备用,得纳米金免疫电极。

[0012] 本发明以三电极系统的金电极为免疫传感器的工作电极,先对工作电极表面进行抛光等预处理,再以氯金酸溶液为电解质溶液,用循环伏安法使金离子在电极表面发生还原反应产生金单质,通过控制扫描电压和扫描时间使金单质以纳米粒子形态沉积在电极表面,获得的金粒子直径约为 20nm,最后通过纳米金粒子吸附特异性抗体、用小牛血清封闭非特异性结合位点,制得纳米金免疫电极。

[0013] 本发明的纳米金免疫电极,在纳米金组装过程中不使用半胱氨酸等中介连接物质,也不需预先制备纳米金胶体溶液,而是直接运用电沉积方法将氯金酸钠溶液中的金离子用过电化学工艺控制直接氧化形成纳米金颗粒组装在金电极表面,制备出的免疫电极与参比电极和辅助电极一起形成的传感器不但保留了传感器的灵敏度高、特异性强、重复性好、稳定性强的优点,而且在很大程度上缩短了工作电极的制备时间。

[0014] 进一步地,步骤 b 所述浓硫酸和过氧化氢混合液为 98% 浓硫酸和 30% 过氧化氢溶液按体积比 3 : 1 的比例配制。

[0015] 更进一步地,步骤 e 所述线性循环伏安扫描法的起始电压为 1.1V,末电压为 0V,扫描速度 0.1V/s,扫描圈数为 1 圈。

[0016] 本发明所制得的纳米金免疫电极,可用于检测特异性抗原。采用循环伏安法检测抗体与被检抗原反应前后传感器的电流响应变化,从而确定被检抗原的含量,具体检测方法是:

[0017] 将标准浓度的抗原溶液按照绘制标准曲线的要求进行系列稀释,分别用本发明的电极对上述抗原溶液进行循环伏安扫描检测,得到一系列氧化峰电流 (i) 下降百分比数据 k :

$$[0018] \quad k = (i_1 - i_2) / i_1 \times 100\%$$

[0019] 式中 i_1 为免疫反应前的氧化峰电流, i_2 为免疫反应后的氧化峰电流。

[0020] 分别以峰电流下降百分比 K 及与其相对应的抗原浓度为纵坐标和横坐标,用 Excel 软件处理绘制标准曲线图,获得其相应的回归方程,并对该方法组装的免疫传感器检测的灵敏性、特异性和稳定性进行分析。

[0021] 当检测样品中的抗原含量时,用本发明的电极对待测溶液进行循环伏安扫描检测,计算得出氧化峰电流 (i) 下降百分比 k ,根据 k 值,用标准作曲线的回归方程,可出待测样品中抗原的含量。

[0022] 本发明制备纳米金免疫电极的方法融合了电沉积技术和纳米金技术,具有简单、快速、有效的优点,可大幅缩短试验周期、降低试验成本,并提高免疫传感器的稳定性和灵敏度。利用该方法组装的工作电极灵敏度高,特异性强,稳定性好,制作成本低,可大幅提高免疫传感器制作效率和质量。

附图说明

[0023] 图 1 为本发明纳米金免疫电极在结合珠蛋白检测中的工作曲线。

具体实施方式

[0024] 下面结合具体实施例对本发明的内容作进一步的说明。

[0025] 实施例 1

[0026] 1. 所需溶液的配制

[0027] Piranha 溶液 :98%浓硫酸和 30%过氧化氢溶液按体积比为 3 : 1 的比例配制。

[0028] 氯金酸电解液溶液 :将 1g 氯金酸溶解到 100ml 纯水中配制成 1%氯金酸溶液,再取 1ml 1%的氯金酸溶液加入到 30ml 0.5M 稀硫酸溶液中,混合均匀。

[0029] 电解池溶液 :称取 0.0832g 铁氰化钾,0.1056g 亚铁氰化钾,0.3728g 氯化钾溶解到 50ml 纯水中。

[0030] 2. 制备纳米金免疫电极

[0031] 将圆盘金电极依次用直径为 $1\mu\text{m}$ 、 $0.3\mu\text{m}$ 和 $0.05\mu\text{m}$ 的氧化铝粉末抛光至光亮,用上述配制好的 Piranha 溶液浸泡 10 分钟,再依次浸泡于无水乙醇和双蒸水中超声波清洗 15 分钟,将清洗后的电极放入 0.5M 硫酸溶液中,用循环伏安法在 $-0.3\sim 1.5\text{V}$ 电压下抛光 30 分钟,晾干备用。

[0032] 以上述配制的氯金酸电解液为底液,采用线性循环伏安扫描法,设置起始电压为 1.1V,末电压为 0V,扫面速度 0.1V/s ,扫描圈数为 1 圈,在圆盘金电极上沉积纳米金颗粒,得纳米金电极。

[0033] 将纳米金电极浸入 $0.5\mu\text{g/ml}$ 的牛结合珠蛋白抗体溶液中,室温下孵育 20 分钟后取出,用 0.25%小牛血清封闭 15 分钟,纯水洗净后晾干备用,得纳米金免疫电极。

[0034] 在纳米金免疫电极的制备过程中,采用循环伏安法(电压 $-0.2\text{V}\sim 0.6\text{V}$,扫描速度 0.1V/s ,电解池溶液为 5mM 铁氰化钾,5mM 亚铁氰化钾,0.1M 氯化钾溶液)对每一步处理进行表征。

[0035] 将免疫电极与参比电极、辅助电极组装形成纳米金免疫传感器。

[0036] 3、检测

[0037] 1) 绘制工作曲线:

[0038] 将牛结合珠蛋白标准抗原(浓度为 0.77mg/ml) 分别稀释至 1540ng/ml 、 770ng/ml 、 385ng/ml 、 154ng/ml 、 77ng/ml 、 38.5ng/ml 、 7.7ng/ml 、 3.85ng/ml 、 1.54ng/ml 和 0.77ng/ml 。

[0039] 用制得的纳米金免疫传感器分别在上述浓度的标准抗原溶液中浸泡 30 分钟后,采用循环伏安法对牛结合珠蛋白标准抗原进行定量检测,以免疫反应前后氧化峰电流 (i) 下降的百分比 K 作为定量依据。

[0040] $k = (i_1 - i_2) / i_1 \times 100\%$,

[0041] 式中 i_1 为免疫反应前的氧化峰电流, i_2 为免疫反应后的氧化峰电流。

[0042] 对每一浓度标准抗原检测三次,取氧化峰的平均值作为每一标准抗原浓度所对应的峰电流值。以标准抗原浓度的对数值为横坐标 (X), k 值为纵坐标 (Y),用 Excel 软件处理并绘制标准曲线,即得到标准抗原溶液的工作曲线图(如图 1 所示)和其相关的线性回归方程:

[0043] $Y = 0.2672X - 0.0567$

[0044] 其中 $X = \log_{10}C$, C 为抗原浓度, Y 为氧化峰下降百分比),线性相关系数 $R^2 =$

0.9959, 满足定量分析方法对精密度的要求。

[0045] 牛结合珠蛋白抗原的稀释浓度 ($V = V$ 标准抗原 : V 水) 在 7ng/ml ($V = 1 : 100000$) $\sim 350\text{ng/ml}$ ($V = 1 : 2000$) 时, 免疫传感器氧化峰电流 (i) 下降的百分数 k 与抗原浓度的以 10 为底的对数呈良好的线性关系。

[0046] 2) 回收率研究 :

[0047] 取 3 份牛结合珠蛋白抗原溶液进行稀释后, 按以上步骤测定其含量, 测定结果如下表 :

[0048]

样号	加入浓度(ng/ml)	回收量(ng/ml)	回收率 (%)
1	15.4	14.85	96.44
2	77	71.96	93.45
3	154	137.26	89.13

[0049] 其平均回收率为 93.01%, 相应的回收率的标准偏差 (RSD) 为 0.09%, 符合定量分析方法的精密度要求。

[0050] 3) 稳定性研究 :

[0051] 取 3 份牛结合珠蛋白标准抗原溶液进行稀释后, 按以上步骤测定其含量 ; 重新制备纳米金免疫电极, 置 4°C 冰箱中保存 48h 后, 重新测定 3 份同样浓度标准抗原溶液, 测定结果如下表 :

[0052]

样号	第一次测量浓度 (ng/ml)	放置 48h 后测量浓度 (ng/ml)	偏差%
1	14.85	14.02	5.59
2	137.26	149.35	8.10
3	71.96	75.12	4.21

[0053] 平均偏差为 6.07%, 说明电极稳定性良好。

[0054] 4) 重复性研究 :

[0055] 制备 2 个纳米金免疫电极, 分别标记为 1#, 2# 电极。取 3 份牛结合珠蛋白标准抗原溶液进行稀释后, 分别用 1#, 2# 电极检测, 测量结果如下表 :

[0056]

样号	1#电极测量浓度(ng/ml)	2#电极测量浓度(ng/ml)	偏差%
1	57.98	63.29	8.39
2	74.06	83.47	11.27
3	7.311	7.590	3.68

[0057] 用 2 个电极一起检测三组抗原溶液,同一浓度下电极之间检测偏差分别为 8.39%,11.27%和 3.68%。平均偏差为 7.79%,符合免疫传感器重复性要求。

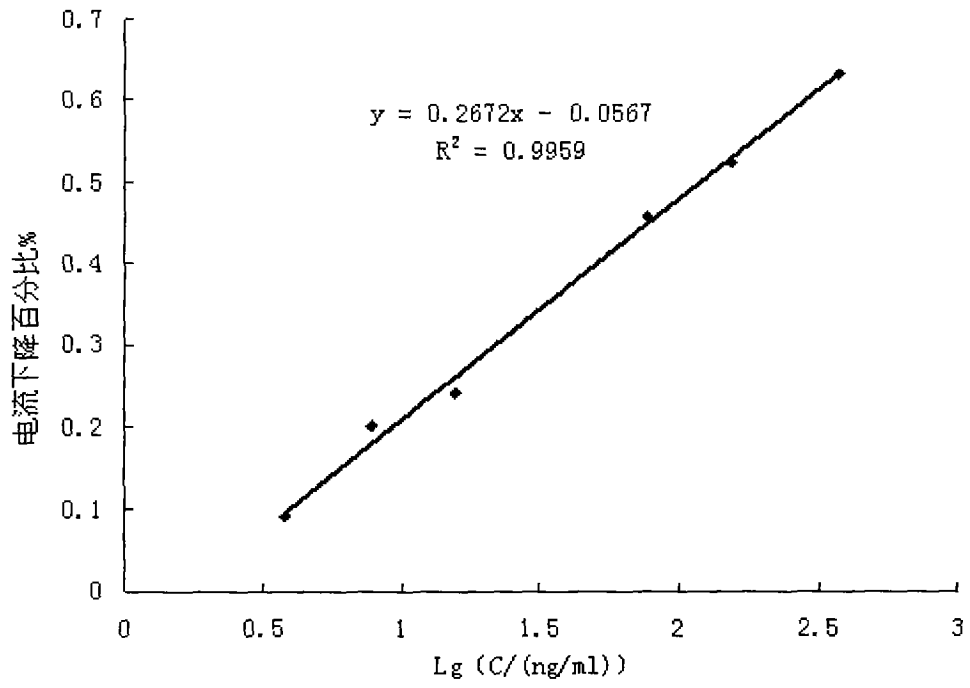


图 1

专利名称(译)	纳米金免疫电极的制备方法		
公开(公告)号	CN101655473B	公开(公告)日	2012-12-05
申请号	CN200910153183.X	申请日	2009-09-24
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	谭勋 丁守强 潘韬		
发明人	谭勋 丁守强 潘韬		
IPC分类号	G01N27/327 G01N33/531		
审查员(译)	刘畅		
其他公开文献	CN101655473A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种纳米金免疫电极的制备方法，包括步骤：将圆盘金电极用氧化铝粉末抛光、用浓硫酸、过氧化氢混合液浸泡、超声波清洗、在0.5M硫酸溶液中用循环伏安法抛光、以氯金酸电解液为底液，用线性循环伏安扫描法在圆盘金电极上沉积纳米金颗粒、连接特异性抗体、封闭。本发明融合了电沉积技术和纳米金技术，直接运用电沉积方法将氯金酸钠溶液中的金离子用过电化学工艺控制直接氧化形成纳米金颗粒组装在金电极表面，制备出的免疫电极与参比电极和辅助电极一起形成的传感器不但保留了传感器的灵敏度高、特异性强、重复性好、稳定性强的优点，而且大幅缩短了工作电极的制备时间。

