



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105929153 A

(43)申请公布日 2016.09.07

(21)申请号 201610263224.0

(22)申请日 2016.04.26

(71)申请人 哈尔滨工业大学(威海)

地址 264200 山东省威海市高区文化西路2号

(72)发明人 曹立新 李小龙 梁晨希 王凯
刘海萍

(74)专利代理机构 威海科星专利事务所 37202
代理人 王元生

(51)Int.Cl.

G01N 33/553(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种黄曲霉毒素B1金纳米井阵列免疫电极的制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种黄曲霉毒素B1金纳米井阵列免疫电极的制备方法,其采用化学沉积法在模孔直径为400-800nm的聚碳酸酯滤膜上沉积金,得到金纳米管阵列主体,在模孔直径为80-200nm的聚碳酸酯滤膜上沉积金,得到金纳米柱阵列底片,组装制成金纳米井阵列电极;在金纳米管阵列电极表面滴加蛋白A溶液形成蛋白A/金纳米井阵列电极;而后放入无标记AFB1抗体溶液中,制成AFB1抗体/蛋白A/金纳米井阵列电极;进而封闭得到AFB1免疫反应电极。本发明制作简单,具有三维结构,表面积大,有效避免不同材质导致的电化学响应信号的干扰;抗体固定牢固有效,性能稳定可靠,可实现AFB1的灵敏快速测定。

1. 一种黄曲霉毒素B1金纳米井阵列免疫电极的制备方法,其特征在于:其包括以下步骤:

(1)金纳米管阵列主体的制备:首先采用化学沉积法在模孔直径为400-800nm的聚碳酸酯滤膜模板上沉积金,模孔中沉积有金纳米管,通过控制沉积时间,使模孔中沉积金纳米管的壁厚为50-200nm;而后去除该聚碳酸酯滤膜上表面的镀金层,得到金纳米管阵列主体;

(2)金纳米柱阵列底片的制备:采用化学沉积法在模孔直径为80-200nm的聚碳酸酯滤膜模板上沉积金,通过控制沉积时间,使模孔中充满实心的金纳米柱,得到金纳米柱阵列底片;

(3)金纳米井阵列阵列电极的组装:而后将得到的金纳米柱阵列底片下表面通过导电胶粘结固定在集电体上,金纳米管阵列主体平铺覆盖在金纳米柱阵列底片上,周边用绝缘胶带密封固定在集电体上,制成金纳米井阵列电极;

(4)定向蛋白A自组装修饰金纳米井阵列电极的制备:在金纳米管阵列电极表面滴加50 μ L 0.2mg/mL的蛋白A溶液,恒温25-30 $^{\circ}$ C,反应时间为50-60min,得到蛋白A/金纳米井阵列电极;

(5)抗体的固定:将步骤(4)得到的蛋白A/金纳米井阵列电极放入1.2 mg/mL的无标记AFB1抗体溶液中,恒温25-30 $^{\circ}$ C,反应时间为50-60min,制成AFB1抗体/蛋白A/金纳米井阵列电极;

(6)封闭:将步骤(5)得到的电极浸入到3% 小牛血清溶液中,封闭非活性位点,恒温25-30 $^{\circ}$ C,时间为50-60min,得到AFB1免疫反应电极。

一种黄曲霉毒素B1金纳米井阵列免疫电极的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种电极的制备方法,具体地说是一种黄曲霉毒素B1金纳米井阵列免疫电极的制备方法。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素B1(AFB1)是迄今发现的毒性最强的一类生物毒素,具有诱导突变、抑制免疫和致癌作用。快速、灵敏、准确分析是避免和减小AFB1危害的有效手段。目前AFB1分析检测方法如高效液相色谱法、酶联免疫测定法、放射免疫测定法、金标法,免疫亲和柱净化-荧光快速检测技术等,虽然取得了较大进展,但仍然存在操作要求高、步骤过于繁琐、灵敏度较差、误检率高、仪器昂贵等不同缺陷。

[0003] 电化学生物免疫电极基于抗原和抗体的识别与结合,具有快速、灵敏、仪器设备简单等特殊优势。金电极具有导电性好、化学性质稳定高、与生物大分子兼容性好等特点,因此是生物电化学中最常使用的电极材料之一。金纳米材料比表面积大,可负载更多抗体及标记物,可对信号进行有效放大,且具有良好的生物相容性,因而可有效提高电化学免疫传感器的灵敏度。Liu等[Liu Y, Qin Z, Wu X, Jiang H. Biochem. Eng. J., 2006, 32: 211-217]在以2-氨基乙硫醇修饰的二维金叉指电极上自组装一层纳米金胶粒,将AFB1抗体直接固定在金胶粒上,构建了电导型免疫传感器,检测下限达到0.1 ng/mL。Zhou等[Zhou L T, Li R Y, Li Z J, Xia Q F, Fang Y J, Liu J K. Sensor. Actuat. B-Chem., 2012, 174: 359-365]将纳米金颗粒嵌入到导电聚合物中,提高了修饰电极的机械性能。Sharma等[Sharma A, Matharu Z, Sumana G, Solanki P R, Kim C G, Malhotra B D. Thin Solid Films, 2010, 519: 1213-1218]利用N-羟基琥珀酰亚胺与乙基二甲基胺丙基碳化二亚胺(EDC)活化AFB1抗体(anti-AFB1)上的羧基并与半胱胺修饰的金纳米颗粒共价连接,随后将金纳米颗粒共价固定到巯基苯甲酸(MBA)自组装膜(SAM)修饰的金电极上,构建了电流型免疫传感器,检测下限达0.179 ng/mL。cao等[Hu H F, Cao L X, Li Q C, et al. RSC Advances. 2015, 5: 55209-55217.]人在金三维柱状纳米阵列电极表面修饰聚邻苯二胺,通过戊二醛交联固定AFB1抗体,构建了阻抗型免疫传感器,检测下线为0.019 ng/mL。

[0004] 然而,目前已有的AFB1金纳米免疫传感器还存在一定缺陷,限制了其在实际检测中的应用。如制备过程复杂,成本高;纳米金粒在电极上的分布和尺寸难以控制;抗体固定效果差,抗体与抗原结合的空间阻力高;检测限高,定量测定线性范围窄,稳定性差等。提高AFB1免疫传感器性能最有效的二个途径是:(1)改善基体电极的性能;(2)保证抗原或抗体在电极上有效固定,构建性能优越的分子识别膜。

[0005] 纳米阵列电极是多个纳米电极的集合体。其不仅具有单个电极高传质速率、低双电层充电电流、小时间常数、小IR降及高信噪比等优,而且由于成千上万个单个纳米电极集中在一个基体上,克服了单个纳米电极响应信号过小、易受干扰和难以操作等缺点,能极大地提高测量的灵敏度和可靠性,降低操作难度和测量成本。目前人们制备出多种形式的金纳米阵列电极。如一维粒状金纳米阵列电极、二维带状盘状金纳米阵列电极、三维柱状纳

米阵列电极及金纳米管阵列电极。其中纳米管阵列电极与其他阵列电极相比具有更大的活性面积,更优异的电催化性能,近年来,引起了研究者的特殊关注。

[0006] 目前金纳米管阵列电极(或修饰电极)制备方法的报道主要有以下二类:一类是在聚碳酸酯滤膜模孔中化学沉积金管或者在背面喷金的氧化铝模板(聚碳酸酯滤膜模板)孔中电沉积金管,再用胶黏剂将其固定在基体电极上,然后溶去模板,制成纳米管阵列(修饰)电极。另一类是采用纳米金对碳纳米管进行修饰,再将其用胶黏剂固定在基体电极上。然而,以上方法制备出的免疫电极存在不同程度上的不足。(1)电沉积法制备的电极,制备过程复杂,难以保证纳米管长度、管壁厚度和均匀性;(2)由于是纳米尺寸,裸露出来的纳米管容易折断;(3)无论电沉积法还是化学沉积法制备的金纳米管阵列电极,其纳米管的底部是敞口的,与基体电极表面连接部位是基体电极表面,或者是胶黏剂,其材质与金纳米管壁是不同的(即使基体电极表面材料是金,由于制备工艺与金管壁不同,二者的表面状态也是不同的)。因而电极放入溶液中,溶液不仅会与金纳米管壁接触还会与基体电极表面或者胶黏剂接触,电极功能化和免疫修饰表面状态不一致,会导致电化学响应信号受到一定干扰,因而影响到AFB1免疫检测的准确性。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是克服上述现有技术的不足,提供一种制作简捷、成本低,具有三维结构,表面积大,抗体固定牢固有效,性能稳定可靠,能有效避免不同材质导致的电化学响应信号干扰的AFB1金纳米井阵列免疫电极的制备方法。

[0008] 本发明解决上述技术问题采用的技术方案是:一种AFB1金纳米井阵列免疫电极的制备方法,其特征在于:其包括以下步骤:

(1)金纳米管阵列主体的制备:首先采用化学沉积法在模孔直径为400-800nm的聚碳酸酯滤膜模板上沉积金,模孔中沉积有金纳米管,通过控制沉积时间,使模孔中沉积金纳米管的壁厚为50-200nm;而后去除该聚碳酸酯滤膜上表面的镀金层,得到金纳米管阵列主体;

(2)金纳米柱阵列底片的制备:采用化学沉积法在模孔直径为80-200nm的聚碳酸酯滤膜模板上沉积金,通过控制沉积时间,使模孔中充满实心的金纳米柱,得到金纳米柱阵列底片;

(3)金纳米井阵列电极的组装:而后将得到的金纳米柱阵列底片下表面通过导电胶粘结固定在集电体上,金纳米管阵列主体平铺覆盖在金纳米柱阵列底片上,周边用绝缘胶带密封固定在集电体上,制成金纳米井阵列电极;

(4)定向蛋白A自组装修饰金纳米井阵列电极的制备:在金纳米管阵列电极表面滴加50 μ L 0.2mg/mL的蛋白A溶液,恒温25-30 $^{\circ}$ C,反应时间为50-60min,得到蛋白A/金纳米井阵列电极;

(5)抗体的固定:将步骤(4)得到的蛋白A/金纳米井阵列电极放入1.2 mg/mL的无标记AFB1抗体溶液中,恒温25-30 $^{\circ}$ C,反应时间为50-60min,制成AFB1抗体/蛋白A/金纳米井阵列电极;

(6)封闭:将步骤(5)得到的电极浸入到3% 小牛血清溶液中,封闭非活性位点,恒温25-30 $^{\circ}$ C,时间为50-60min,得到AFB1免疫电极。

[0009] 本发明制备的基础电极--金纳米井阵列电极具有三维纳米结构,表面积大。由于

管壁包埋在聚碳酸酯滤膜中,结构稳定,强度好;井壁和井底材质相同,能有效避免不同材质所导致的电化学响应信号的干扰。直接在其井壁和井底表面通过自组装固定蛋白A,使抗体的抗原结合位点Fab段得到充分的暴露,并有效降低抗体与抗原结合的空间阻力,较好地保持其空间构象,提高固相抗体的特异性和利用率,提高了传感器的灵敏度。制备的无标记免疫反应电极不需要对抗原或抗体进行标记,简化了制备和操作过程,有效地提高了分析速度,降低了分析成本。进行测量时,将免疫电极放至一系列不同浓度的得出抗原的定量关系溶液中,在25℃下进行免疫反应60 min后,在2 mmol/L $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ +PBS(pH=7.00)中进行电化学阻抗谱测量,采用阻抗谱拟合软件ZsimpWin对传感器与不同浓度抗原免疫反应后的阻抗谱进行拟合计算,得到在一定浓度下的工作曲线。该方法的检测限可达到 1.0×10^{-10} g/mL。远低于欧盟的检出限量2ng/g。本发明制作简单、成本低,具有三维结构,表面积大,抗体固定牢固有效,性能稳定可靠,抗体的特异性和利用率大大提高,能够实现检测体系的微型化和集成化,有效避免不同材质导致的电化学响应信号的干扰,可实现AFB1的快速灵敏检测。

具体实施方式

[0010] 下面结合对本发明进行具体描述。

[0011] 一种黄曲霉毒素B1金纳米井阵列免疫电极的制备方法,其包括以下步骤:

(1)金纳米管阵列主体的制备:首先采用化学沉积法在模孔直径为400–800nm的聚碳酸酯滤膜模板上沉积金,模孔中沉积有金纳米管,通过控制沉积时间,使模孔中沉积金纳米管的壁厚为50–200nm;而后去除该聚碳酸酯滤膜上表面的镀金层,得到金纳米管阵列主体;

(2)金纳米柱阵列底片的制备:采用化学沉积法在模孔直径为80–200nm的聚碳酸酯滤膜模板上沉积金,通过控制沉积时间,使模孔中充满实心的金纳米柱,得到金纳米柱阵列底片;

(3)金纳米井阵列阵列电极的组装:而后将得到的金纳米柱阵列底片下表面通过导电胶粘结固定在集电体上,金纳米管阵列主体平铺覆盖在金纳米柱阵列底片上,周边用绝缘胶带密封固定在集电体上,制成金纳米井阵列电极;

(4)定向蛋白A自组装修饰金纳米井阵列电极的制备:在金纳米管阵列电极表面滴加50 μ L 0.2mg/mL的蛋白A溶液,恒温25–30℃,反应时间为50–60min,得到蛋白A/金纳米井阵列电极;

(5)抗体的固定:将步骤(4)得到的蛋白A/金纳米井阵列电极放入1.2 mg/mL的无标记AFB1抗体溶液中,恒温25–30℃,反应时间为50–60min,制成AFB1抗体/蛋白A/金纳米井阵列电极;

(6)封闭:将步骤(5)得到的电极浸入到3% 小牛血清溶液中,封闭非活性位点,恒温25–30℃,时间为50–60min,得到AFB1免疫反应电极。

[0012] 本发明上述黄曲霉毒素B1金纳米井阵列免疫电极的制备方法,具体步骤是:

(1)纳米管阵列主体的制备:

a. 首先将模孔直径为400–800nm的聚碳酸酯滤膜固定在非金属片或非金属夹板上,放入甲醇中浸泡清洗5分钟,辅以超声波处理;

b. 将甲醇浸泡清洗后的聚碳酸酯滤膜放入含有 $SnCl_2$ 、 CF_3COOH 的甲醇和水混合液中进行

行敏化前处理,所述敏化混合液为 SnCl_2 0.026M, CF_3COOH 0.05M,体积比1:1 (v/v)的甲醇和水混合液,温度为常温,时间为40-60 min;

c.将敏化并清洗后的聚碳酸酯滤膜放入银的含量为0.04 M的银氨溶液中进行预镀银;

d.将预镀银并清洗后的聚碳酸酯滤膜放入镀金溶液中进行化学镀,所述镀金溶液的主要组成和镀金工艺为: $\text{Na}_3\text{Au}(\text{SO}_3)_2$ 0.006M ; Na_2SO_3 0.08M;甲醛 0.04M;pH值 9.50~10.50;温度:2-5℃;时间:16-26 h;

e.将化学镀后的聚碳酸酯滤膜在20-25% HNO_3 水溶液中浸泡12小时,再用水清洗;

f.去除上述处理后的聚碳酸酯滤膜一面的镀金膜,露出金纳米管端口,在150℃的烘箱中加热20分钟,消除滤孔模孔中金纳米管和聚碳酸酯滤膜之间的空隙,金纳米管的壁厚为50-200nm;得到金纳米管阵列。

[0013] (2) 金纳米柱阵列底片的制备:

a.将模孔直径为80-200nm的聚碳酸酯滤膜固定在非金属片或非金属夹板上,放入甲醇中浸泡清洗5分钟,辅以超声波处理;

b.将甲醇浸泡清洗后的聚碳酸酯滤膜放入含有 SnCl_2 、 CF_3COOH 的甲醇和水混合液中进行敏化前处理,所述敏化混合液为 SnCl_2 0.026M, CF_3COOH 0.05M,体积比1:1 (v/v)的甲醇和水混合液,温度为常温,时间为40-60 min;

c.将敏化并清洗后的聚碳酸酯滤膜放入银的含量为0.04 M的银氨溶液中进行预镀银;

d.将预镀银并清洗后的聚碳酸酯滤膜放入镀金溶液中进行化学镀,所述镀金溶液的主要组成和镀金工艺为: $\text{Na}_3\text{Au}(\text{SO}_3)_2$ 0.005-0.05M; Na_2SO_3 0.01-0.1M;甲醛 0.3-0.8M;pH值 9.50~10.50;温度:2-8 ℃;时间:12-24 h;

e.将化学镀后的聚碳酸酯滤膜在20-25% HNO_3 水溶液中浸泡12小时,再用水清洗;

f. 在150℃的烘箱中加热20分钟,消除滤孔中金纳米线和聚碳酸酯滤膜之间的空隙,得到金纳米柱阵列。

[0014] (3)电极的组装:

将上述制备得到的金纳米柱阵列底片下表面粘在导电铝双面胶带上,导电铝双面胶带的另一面粘在作集电体的金属铜片上,金纳米管阵列主体平铺覆盖在金纳米柱阵列底片上,可根据测量需要,金纳米管阵列主体的上表面留出一定的面积后,其余部分用绝缘胶带密封并固定在集电体上,制成金纳米井阵列电极。这样可以保证将电极放入溶液中时,只有未密封的那部分金纳米管阵列产生电化学响应信号。

[0015] (4)定向蛋白A自组装修饰金纳米井阵列电极的制备:在金纳米管阵列电极表面滴加50 μL 0.2mg/mL的蛋白A溶液,恒温25-30 ℃,反应时间为50-60min,得到蛋白A/金纳米井阵列电极。

[0016] (5)抗体的固定:将步骤(4)得到的蛋白A/金纳米井阵列电极放入1.2 mg/mL的无标记AFB1抗体溶液中,恒温25-30 ℃,反应时间为50-60min,制成AFB1抗体/蛋白A/金纳米井阵列电极。

[0017] (6)封闭:将步骤(5)得到的电极浸入到3% 小牛血清溶液中,封闭非活性位点,恒温25-30 ℃,时间为50-60min,得到AFB1免疫反应电极。

[0018] 本发明所述金纳米管阵列主体通过金纳米柱阵列底片连接固定在集电体上,在金纳米管阵列主体底部形成同材质的井底。本发明基础电极金纳米井阵列电极的优点和效果

是：(1) 具有三维结构，表面积更大，其中金纳米管内表面不仅具有纳米材料的表面效应、体积效应、量子尺寸效应等纳米材料的特质，还可以通过自组装及化学等修饰方法进行功能化设计，构建纳米组装电极体系，实现检测体系的微型化和集成化。该电极在电化学生物传感器领域具有特殊的优势。(2) 制作简单，稳定性高，成本低。金纳米管阵列的管壁厚度和内径大小可通过化学沉积时间控制，而且，由于管壁包埋在聚碳酸酯滤膜中，结构稳定，强度好，有效地保证了产品的稳定性。(3) 金纳米柱阵列底片形成的井底与金纳米管阵列形成的井壁为同材质，金纳米管阵列主体和金纳米柱阵列底片二者之间可以无缝叠加，接触面都为金，接触良好。能有效避免不同材质所导致的电化学响应信号的干扰。

[0019] 本发明直接在其井壁和井底表面通过自组装固定蛋白A，使抗体的抗原结合位点Fab段得到充分的暴露，并有效降低抗体与抗原结合的空间阻力，较好地保持其空间构象，提高固相抗体的特异性和利用率，提高了传感器的灵敏度。制备的无标记免疫反应电极不需要对抗原或抗体进行标记，能直接测定抗原抗体复合物形成时氧化还原化学反应的变化，简化制备和操作过程，有效地提高分析速度，降低分析成本。进行测量时，将免疫电极放至一系列不同浓度的得出抗原的定量关系溶液中，在25℃下进行免疫反应60 min后，在2 mmol/L $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ +PBS(pH=7.00)中进行电化学阻抗谱测量，采用阻抗谱拟合软件ZsimpWin对传感器与不同浓度抗原免疫反应后的阻抗谱进行拟合计算，得到在一定浓度下的工作曲线。该方法的检测限可达到 1.0×10^{-10} g/mL。远低于欧盟的检出限量2ng/g。

[0020] 本发明制作简单、成本低，具有三维结构，表面积大，抗体固定牢固有效，抗体的特异性和利用率大大提高，性能稳定可靠，有效避免不同材质导致的电化学响应信号的干扰，可实现AFB1的快速灵敏检测。

专利名称(译)	一种黄曲霉毒素B1金纳米井阵列免疫电极的制备方法		
公开(公告)号	CN105929153A	公开(公告)日	2016-09-07
申请号	CN201610263224.0	申请日	2016-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	哈尔滨工业大学(威海)		
申请(专利权)人(译)	哈尔滨工业大学(威海)		
当前申请(专利权)人(译)	哈尔滨工业大学(威海)		
[标]发明人	曹立新 李小龙 梁晨希 王凯 刘海萍		
发明人	曹立新 李小龙 梁晨希 王凯 刘海萍		
IPC分类号	G01N33/553 G01N33/531 G01N27/327		
CPC分类号	G01N27/3278 G01N33/531 G01N33/5438 G01N33/553 G01N2333/38		
代理人(译)	王元生		
其他公开文献	CN105929153B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种黄曲霉毒素B1金纳米井阵列免疫电极的制备方法，其采用化学沉积法在模孔直径为400-800nm的聚碳酸酯滤膜上沉积金，得到金纳米管阵列主体，在模孔直径为80-200nm的聚碳酸酯滤膜上沉积金，得到金纳米柱阵列底片，组装制成金纳米井阵列电极；在金纳米管阵列电极表面滴加蛋白A溶液形成蛋白A/金纳米井阵列电极；而后放入无标记AFB1抗体溶液中，制成AFB1抗体/蛋白A/金纳米井阵列电极；进而封闭得到AFB1免疫反应电极。本发明制作简单，具有三维结构，表面积大，有效避免不同材质导致的电化学响应信号的干扰；抗体固定牢固有效，性能稳定可靠，可实现AFB1的灵敏快速测定。