



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108845121 A

(43)申请公布日 2018. 11. 20

(21)申请号 201810649493.X

(22)申请日 2018.06.22

(71)申请人 哈尔滨工业大学(威海)

地址 264209 山东省威海市文化西路2号

(72)发明人 曹立新 梁晨希 孙帅 刘海萍  
毕四富

(51)Int.Cl.

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

一种冈田酸三维金纳米柱阵列免疫电极的  
制备方法

### (57)摘要

本发明涉及一种冈田酸三维金纳米柱阵列免疫电极的制备方法,其采用化学沉积-电沉积方法在孔径为80~200 nm的聚碳酸酯滤膜上沉积金,得到三维金纳米柱阵列电极;在三维金纳米柱阵列电极表面通过循环伏安法电聚合修饰聚硫堇,形成聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极;在聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极上结合戊二醛,再将冈田酸抗体固定到戊二醛上,形成冈田酸抗体/戊二醛/聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极;最后用牛血清蛋白封闭电极,制得冈田酸三维金纳米柱阵列免疫电极。本发明电极具有三维结构,表面积大,制备简单,稳定性好,抗体固定牢固,操作简便,检测限低,灵敏度高,可实现快速检测。

1. 一种冈田酸三维金纳米柱阵列免疫电极的制备方法,其特征在于:其包括以下步骤:

(1) 三维金纳米柱阵列电极的制备:首先采用化学沉积法在孔径为80~200 nm的聚碳酸酯滤膜模板上沉积金,通过控制沉积时间,使膜孔内充满实心的金纳米柱,而后去除表面金膜,通过导电胶带固定在集流体上,边缘用绝缘胶带密封,制得二维金纳米盘阵列电极;之后采用恒电位电沉积法在制得的二维金纳米盘阵列电极表面继续电沉积金,通过控制沉积电位和沉积时间,使二维金纳米盘阵列电极表面的金纳米盘生长为金纳米柱,得到三维金纳米柱阵列电极;

(2) 电聚合修饰聚硫堇:将5 mmol/L硫堇溶于pH=2.5的醋酸溶液中,以三维金纳米柱阵列电极为工作电极,铂电极为辅助电极,Ag/AgCl电极为参比电极,采用循环伏安法制备聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极;

(3) 戊二醛的结合:将聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极浸入2.5%戊二醛的磷酸缓冲溶液中,恒温28~32 °C,反应时间为50~60 min,得到戊二醛/聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极;

(4) 冈田酸抗体的固定:将0.02 mg/mL的无标记冈田酸抗体溶液滴加到戊二醛/聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极表面,在室温下反应60~70 min,形成冈田酸抗体/戊二醛/聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极;

(5) 封闭:将步骤(4)得到的电极浸入3%牛血清蛋白溶液中,恒温28~32 °C,反应时间为50~60 min,制得冈田酸三维金纳米柱阵列免疫电极。

## 一种冈田酸三维金纳米柱阵列免疫电极的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫电极的制备方法,具体地说是一种冈田酸三维金纳米柱阵列免疫电极的制备方法。

### 背景技术

[0002] 冈田酸(Okadaic Acid, OA)属于海洋毒素中腹泻性贝类毒素的一种。人体内食入的冈田酸达到一定含量后,会引起腹泻、恶心、呕吐和腹痛等症状,同时,冈田酸在体内长期积累还会诱发肿瘤和致癌,对人类健康安全具有较大危害。欧盟规定的冈田酸最高允许量为160 ng/g。快速、简便、准确检测冈田酸含量对人类的生命安全具有重要意义。传统的冈田酸检测方法主要有:小鼠试验法、高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、酶联免疫法等。虽然这些方法应用广泛,但仍然存在个体差异性大、无法定量检测、成本昂贵、步骤繁琐、操作要求高等一些缺陷。

[0003] 电化学免疫传感器将抗原-抗体免疫反应的特异性和电化学检测技术的高灵敏性结合,具有很好的检测效果,受到了国内外研究者的广泛关注。金电极具有性质稳定、导电性好、生物相容性良好等优点,是生物传感器中最常见的电极材料之一。金纳米材料具有大的比表面积,可提供更多的生物活性分子吸附位点,同时具有放大信号的作用,可以有效提高电化学免疫传感器的灵敏度。郭萌萌等人在分析测试学报, 2014, 33(2): 161-166中报道说在金电极上电聚合修饰聚硫堇-亚甲基蓝复合聚合膜,然后固定纳米金颗粒和冈田酸抗体,用牛血清蛋白封闭电极,制备了电流型免疫传感器,检测限为 $1 \times 10^{-10}$  g/mL。

[0004] 然而,目前已有的冈田酸金纳米免疫传感器研究还很少,且存在一定缺陷,如制备过程复杂,纳米金颗粒尺寸难以控制,抗体固定效果差,检测限高,稳定性差等,这些缺陷导致其在实际检测中的应用受限。提高冈田酸免疫传感器性能的有效途径有:(1)改善基底电极性能;(2)选择合适的修饰膜层,提高抗体或抗原在电极表面的固定效果。

[0005] 纳米阵列电极是多个纳米电极的集合体,它不仅具有单个纳米电极高传质速率、低双电层充电电流、小时间常数和信噪比等优点,而且可以克服单个纳米电极响应信号小、易干扰和难操作等缺点,能极大地提高检测的灵敏度和可靠性。同时,纳米阵列电极具有大的比表面积,可提供更多的生物活性物质的吸附位点,在生物传感器应用中有巨大发展潜力。纳米阵列电极的制备方法中,模板法因具有适用范围广、制备材料的形状和尺寸可控以及良好的单分散性等优点,得到了广泛应用。模板法是以具有纳米孔径的多孔材料为模板,结合化学沉积、电化学沉积等技术,在膜孔内填充金属,制备所需的纳米阵列电极。常用的模板有聚碳酸酯滤膜和多孔氧化铝膜。

[0006] 目前,三维金纳米柱阵列电极主要的制备方法是通过模板法制备二维金纳米盘阵列,然后采用刻蚀的方法溶去模板,形成三维金纳米柱阵列电极。Martin等人在Nano Letters, 2003, 3: 815中首次报道了采用 $O_2$ 等离子体进行刻蚀,去除聚碳酸酯滤膜,制备三维金纳米柱阵列电极。Krishnamoorthy等人在 Analytical Chemistry, 2005, 77(15): 5068-5071中报道了采用二氯甲烷和乙醇混合溶液进行化学刻蚀,制备了长度约为200 nm

的三维金纳米柱阵列电极。De Leo等人在Electroanalysis, 2007, 19(2-3): 227-236中报道说分别用O<sub>2</sub>/Ar等离子体和二氯甲烷-乙醇溶液进行刻蚀,制备了三维金纳米柱阵列电极。但是,刻蚀方法存在一定缺陷,人为操作的误差影响大,刻蚀效果差异性较大,进而导致制备的三维金纳米柱阵列电极稳定性差,影响免疫传感器检测的准确性。

## 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,提供一种制作简便,成本低,具有三维结构,表面积大,抗体固定牢固,性能稳定,灵敏度高的冈田酸三维金纳米柱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:一种冈田酸三维金纳米柱阵列免疫电极的制备方法,其特征在于:其包括以下步骤:

(1) 三维金纳米柱阵列电极的制备:首先采用化学沉积法在孔径为80~200 nm的聚碳酸酯滤膜模板上沉积金,通过控制沉积时间,使膜孔内充满实心的金纳米柱,而后去除表面金膜,通过导电胶带固定在集流体上,边缘用绝缘胶带密封,制得二维金纳米盘阵列电极;之后采用恒电位电沉积法在制得的二维金纳米盘阵列电极表面继续电沉积金,通过控制沉积电位和沉积时间,使二维金纳米盘阵列电极表面的金纳米盘生长为金纳米柱,得到三维金纳米柱阵列电极;

(2) 电聚合修饰聚硫堇:将5 mmol/L硫堇溶于pH=2.5的醋酸溶液中,以三维金纳米柱阵列电极为工作电极,铂电极为辅助电极,Ag/AgCl电极为参比电极,采用循环伏安法制备聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极;

(3) 戊二醛的结合:将聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极浸入2.5%戊二醛的磷酸缓冲溶液中,恒温28~32 °C,反应时间为50~60 min,得到戊二醛/聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极;

(4) 冈田酸抗体的固定:将0.02 mg/mL的无标记冈田酸抗体溶液滴加到戊二醛/聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极表面,在室温下反应60~70 min,形成冈田酸抗体/戊二醛/聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极;

(5) 封闭:将步骤(4)得到的电极浸入3%牛血清蛋白溶液中,恒温28~32 °C,反应时间为50~60 min,制得冈田酸三维金纳米柱阵列免疫电极。

[0009] 进行检测时,将免疫电极浸入一系列不同浓度的冈田酸抗原溶液中,在32 °C下免疫反应40 min后取出,放入5 mmol/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>+0.2 mol/L PBS溶液中进行电化学阻抗谱测试,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,得到在一定浓度范围内的工作曲线,该方法的检测限为 $2.65 \times 10^{-12}$  g/mL,远低于欧盟规定的最高允许量160 ng/g。本发明制备的三维金纳米柱阵列电极具有微观三维纳米结构,表面积大,可以提供更多的生物活性分子吸附位点;同时,经化学沉积-电沉积得到的三维金纳米柱阵列电极受人为误差因素影响较小,电极稳定性好。在电极表面电聚合修饰聚硫堇,膜层性质稳定,提供了丰富的氨基基团,有利于电极表面通过戊二醛交联作用固定更多冈田酸抗体。戊二醛两端的醛基分别与聚硫堇和冈田酸抗体上的氨基发生席夫碱反应,可以将抗体牢固结合在电极表面,提高传感器的稳定性。制备的免疫反应电极无需进行标记,简化了制备过程,缩短了分析时间,降低了检测成本。本发明电极制备简单,具有三维结构,表面积大,稳定性好,抗体固定牢固,操作简便,检测限低,灵敏度高,可实现

冈田酸的快速检测。

## 具体实施方式

[0010] 下面对本发明进行具体描述。

[0011] 实施例1:一种冈田酸三维金纳米柱阵列免疫电极的制备方法,其包括以下步骤:

(1) 三维金纳米柱阵列电极的制备:

a) 首先将孔径为80~200 nm的聚碳酸酯滤膜固定后放入甲醇中清洗5 min,再放入甲醇-水溶液(甲醇:水体积比=1:1)中清洗;

b) 将清洗后的聚碳酸酯滤膜放入敏化液中进行敏化处理,所用敏化液组分为:0.025~0.028 mol/L  $\text{SnCl}_2$ , 0.05~0.08 mol/L  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , 溶剂为体积比=1:1的甲醇-水溶液,敏化时间为40~50 min;

c) 将敏化清洗后的聚碳酸酯滤膜放入0.03 mol/L的银氨溶液进行活化预镀银,活化时间为5 min;

d) 将活化清洗后的聚碳酸酯滤膜放入镀金液中进行化学镀金,镀金液的组分和工艺条件为: $\text{Na}_3\text{Au}(\text{SO}_3)_2$  0.005~0.008 mol/L,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.13 mol/L, 甲醛0.6~0.7 mol/L, pH值10~11, 温度2~6 °C, 时间24~26 h;

e) 将化学镀后的聚碳酸酯滤膜放入25%  $\text{HNO}_3$ 溶液中浸泡纯化,时间为12 h;

f) 将纯化后的聚碳酸酯滤膜清洗晾干,用3M透明胶带去除表面金膜,得到二维金纳米盘阵列;

g) 将得到的金纳米盘阵列通过铝导电胶带粘到铜集流体上,根据需要控制二维金纳米盘阵列留出一定面积,其余部分用绝缘胶带密封固定,制成二维金纳米盘阵列电极;

h) 将二维金纳米盘阵列电极作为工作电极在上述镀金液体系中进行恒电位电沉积,制成三维金纳米柱阵列电极,铂电极作为辅助电极,饱和硫酸亚汞电极作为参比电极,沉积电位为-1.0 V(vs. SSE),沉积时间为200~300 s;

(2) 电聚合修饰聚硫堇:将5 mmol/L硫堇溶于pH=2.5的醋酸溶液中,以三维金纳米柱阵列电极为工作电极,铂电极为辅助电极,Ag/AgCl电极为参比电极,采用循环伏安法进行电聚合,电聚合电位范围为-0.4~1.2 V(vs. Ag/AgCl),扫描速率为80 mV/s,聚合圈数为15圈,制得聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极。在电极表面电聚合修饰聚硫堇,制备的膜层性质稳定,提供了丰富的氨基基团,有利于电极表面通过戊二醛交联作用固定更多冈田酸抗体;

(3) 戊二醛的交联:将聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极浸入含2.5%戊二醛的磷酸缓冲溶液中,恒温28 °C,反应时间为60 min,得到戊二醛/聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极;戊二醛两端的醛基分别与聚硫堇和冈田酸抗体上的氨基发生席夫碱反应,可以将抗体牢固结合在电极表面,提高传感器的稳定性;

(4) 冈田酸抗体的固定:将0.02 mg/mL的无标记冈田酸抗体溶液滴加到戊二醛/聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极表面,在室温下反应70 min,形成冈田酸抗体/戊二醛/聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极;

(5) 封闭:将步骤(4)得到的电极浸入3%牛血清蛋白溶液中,恒温28 °C,反应时间为60 min,制得冈田酸三维金纳米柱阵列免疫电极。

[0012] 实施例2:一种冈田酸三维金纳米柱阵列免疫电极的制备方法,其包括以下步骤:

(1) 三维金纳米柱阵列电极的制备:

a) 首先将孔径为80~200 nm的聚碳酸酯滤膜固定后放入甲醇中清洗5 min,再放入甲醇-水溶液(甲醇:水体积比=1:1)中清洗;

b) 将清洗后的聚碳酸酯滤膜放入敏化液中进行敏化处理,所用敏化液组分为:0.025~0.028 mol/L  $\text{SnCl}_2$ , 0.05~0.08 mol/L  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , 溶剂为体积比=1:1的甲醇-水溶液,敏化时间为40~50 min;

c) 将敏化清洗后的聚碳酸酯滤膜放入0.03 mol/L的银氨溶液进行活化预镀银,活化时间为5 min;

d) 将活化清洗后的聚碳酸酯滤膜放入镀金液中进行化学镀金,镀金液的组分和工艺条件为: $\text{Na}_3\text{Au}(\text{SO}_3)_2$  0.005~0.008 mol/L,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.13 mol/L, 甲醛0.6~0.7 mol/L, pH值10~11, 温度2~6 °C, 时间24~26 h;

e) 将化学镀后的聚碳酸酯滤膜放入25%  $\text{HNO}_3$ 溶液中浸泡纯化,时间为12 h;

f) 将纯化后的聚碳酸酯滤膜清洗晾干,用3M透明胶带去除表面金膜,得到二维金纳米盘阵列;

g) 将得到的金纳米盘阵列通过铝导电胶带粘到铜集流体上,根据需要控制二维金纳米盘阵列留出一定面积,其余部分用绝缘胶带密封固定,制成二维金纳米盘阵列电极;

h) 将二维金纳米盘阵列电极作为工作电极在上述镀金液体系中进行恒电位电沉积,制成三维金纳米柱阵列电极,铂电极作为辅助电极,饱和硫酸亚汞电极作为参比电极,沉积电位为-1.0 V(vs. SSE),沉积时间为200~300 s;

(2) 电聚合修饰聚硫堇:将5 mmol/L硫堇溶于pH=2.5的醋酸溶液中,以三维金纳米柱阵列电极作为工作电极,铂电极作为辅助电极,Ag/AgCl电极为参比电极,采用循环伏安法进行电聚合,电聚合电位范围为-0.4~1.2 V(vs. Ag/AgCl),扫描速率为80 mV/s,聚合圈数为15圈,制得聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极。在电极表面电聚合修饰聚硫堇,制备的膜层性质稳定,提供了丰富的氨基基团,有利于电极表面通过戊二醛交联作用固定更多冈田酸抗体;

(3) 戊二醛的交联:将聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极浸入含2.5%戊二醛的磷酸缓冲溶液中,恒温32 °C,反应时间为50 min,得到戊二醛/聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极;戊二醛两端的醛基分别与聚硫堇和冈田酸抗体上的氨基发生席夫碱反应,可以将抗体牢固结合在电极表面,提高传感器的稳定性;

(4) 冈田酸抗体的固定:将0.02 mg/mL的无标记冈田酸抗体溶液滴加到戊二醛/聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极表面,在室温下反应70 min,形成冈田酸抗体/戊二醛/聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极;

(5) 封闭:将步骤(4)得到的电极浸入3%牛血清蛋白溶液中,恒温32 °C,反应时间为50 min,制得冈田酸三维金纳米柱阵列免疫电极。

[0013] 相比实施例1,实施例2中反应温度较高,该温度有利于交联和封闭步骤反应的进行,所需反应时间较少;同时,又不会因温度过高而对生物分子活性和反应造成影响。实施例2可以使电极表面固定更多的戊二醛,继而固定更多的抗体,制备的免疫电极性能更好。使用本发明制备的免疫电极进行检测时,将免疫电极浸入一系列不同浓度的冈田酸抗原溶液中,在32 °C下免疫反应40 min后取出,放入5 mmol/L  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6+0.2$  mol/L PBS溶液中进行电化学阻抗谱测试,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,得到在一定浓度范围内的工作曲线,该方法的检测限为 $2.65 \times 10^{-12}$  g/mL,远低于欧盟规定的最高允许量160 ng/g。

[0014] 本发明制备的三维金纳米柱阵列电极具有微观三维纳米结构,表面积大,可以提供更多的生物活性分子吸附位点,同时,通过化学沉积-电化学沉积得到的三维金纳米柱阵列电极受人为误差因素影响较小,电极稳定性好。

[0015] 本发明在电极表面电聚合修饰聚硫堇,膜层性质稳定,提供了丰富的氨基基团,有利于电极表面通过戊二醛交联作用固定更多冈田酸抗体,提高了免疫电极的灵敏度。戊二醛两端的醛基分别与聚硫堇和冈田酸抗体上的氨基发生席夫碱反应,可以将抗体牢固结合在电极表面,提高传感器的稳定性。制备的免疫电极无需进行标记,简化了制备过程,缩短了分析时间,降低了检测成本。

[0016] 本发明电极制备简单,具有三维结构,表面积大,稳定性好,抗体固定牢固,操作简便,检测限低,灵敏度高,可实现冈田酸的快速检测。

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种冈田酸三维金纳米柱阵列免疫电极的制备方法                         |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN108845121A</a>                   | 公开(公告)日 | 2018-11-20 |
| 申请号            | CN201810649493.X                               | 申请日     | 2018-06-22 |
| [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<br>梁晨希<br>孙帅<br>刘海萍<br>毕四富                 |         |            |
| 发明人            | 曹立新<br>梁晨希<br>孙帅<br>刘海萍<br>毕四富                 |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/531 G01N27/327                          |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/531 G01N27/327                          |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及一种冈田酸三维金纳米柱阵列免疫电极的制备方法，其采用化学沉积-电沉积方法在孔径为80~200 nm的聚碳酸酯滤膜上沉积金，得到三维金纳米柱阵列电极；在三维金纳米柱阵列电极表面通过循环伏安法电聚合修饰聚硫堇，形成聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极；在聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极上结合戊二醛，再将冈田酸抗体固定到戊二醛上，形成冈田酸抗体/戊二醛/聚硫堇/三维金纳米柱阵列电极；最后用牛血清蛋白封闭电极，制得冈田酸三维金纳米柱阵列免疫电极。本发明电极具有三维结构，表面积大，制备简单，稳定性好，抗体固定牢固，操作简便，检测限低，灵敏度高，可实现快速检测。