



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107941712 A

(43)申请公布日 2018.04.20

(21)申请号 201711204561.3

(22)申请日 2017.11.27

(71)申请人 陕西科技大学

地址 710021 陕西省西安市未央区大学园
区陕西科技大学

(72)发明人 苏秀霞 徐佳 张婧 张姣
霍文静 胡金龙 晏春苗 张海宁

(74)专利代理机构 西安西达专利代理有限责任
公司 61202

代理人 刘华

(51)Int.Cl.

G01N 21/21(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

一种基于液晶生物传感器检测天蚕素B的方法

(57)摘要

本发明提供了一种基于液晶生物传感器检测天蚕素B的方法,将N,N-二甲基-N-十八烷基(3-[三甲氧基硅烷]丙基)氯化铵/三乙氧基丁醛硅烷(DMOAP/TEA)混合自组装修饰玻片表面,诱导液晶分子取向;采用TEA中的醛基将天蚕素B固定于自组装膜修饰的基底表面,天蚕素B抗体与固定于玻片表面的天蚕素B特异性结合后,会扰乱液晶分子的取向,导致光学信号的颜色和亮度发生变化,以此实现对天蚕素B的检测。本发明在检测天蚕素B时,结合液晶生物传感器的优点,从而具有灵敏度高、特异性好、非标记和操作简单等特点。

1. 一种基于液晶生物传感器检测天蚕素B的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 玻片的预处理

将玻片切割成所需大小,用新配制的Piranha溶液于80℃充分浸泡,再分别用乙醇和去离子水清洗干净,经N₂吹干,干燥,防尘备用;

2) 玻片的组装

2-1) 上玻片的DMOAP溶液组装:将经过步骤1) 预处理的玻片浸入DMOAP水溶液中,充分浸泡后,用超纯水冲洗干净,N₂吹干,干燥,防尘备用;

2-2) 下玻片的TEA和DMOAP混合溶液组装:将经过步骤1) 预处理的玻片浸入50℃的TEA:DMOAP体积比为1-5:1的醋酸-醋酸钠溶液中,充分浸泡后,用超纯水冲洗干净,N₂吹干,干燥,防尘备用;

3) 天蚕素B的固定

取适量的CB溶液滴加至下玻片表面,于37℃温育2.5h,取出后分别用PBS缓冲液和超纯水冲洗,除去未固定的CB分子,N₂吹干,冷冻保存;

4) 天蚕素B抗原抗体竞争免疫反应

将一定浓度的天蚕素B抗体溶液与不同浓度的天蚕素B溶液37℃恒温混匀10min后滴加至固定有抗原的玻片上,于37℃温育1.5h,抗原抗体即可实现免疫竞争反应;分别用PBS缓冲液和超纯水冲洗,N₂吹干备用;

5) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用Mylar聚酯片隔开,Mylar聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定;先将液晶5CB加热到40℃左右使其呈各向同性的液态,然后将其从Mylar聚酯片开孔处注入并通过毛细管作用力布满整个空腔,自然冷却到28℃左右观察。

2. 根据权利要求1所述的一种基于液晶生物传感器检测天蚕素B的方法,其特征在于:所述的步骤1) 中对玻片表面进行酸处理,使玻片表面产生大量羟基。

3. 根据权利要求1所述的一种基于液晶生物传感器检测天蚕素B的方法,其特征在于:所述的步骤2) 中对酸处理过后的上玻片用体积分数0.2%的DMOAP水溶液浸泡30min。

4. 根据权利要求1所述的一种基于液晶生物传感器检测天蚕素B的方法,其特征在于:所述的步骤2) 中对酸处理过后的下玻片用含体积分数1%-5%TEA且含体积分数1%DMOAP的溶液在50℃下恒温2h,使基底表面存在功能化的自组装膜。

5. 根据权利要求1所述的一种基于液晶生物传感器检测天蚕素B的方法,其特征在于:所述的步骤3) 中将一定量的天蚕素B溶液加在经功能化修饰的基底上,用洗耳球吹开,于37℃温育2.5h,使天蚕素B固定在下玻片上。

6. 根据权利要求1所述的一种基于液晶生物传感器检测天蚕素B的方法,其特征在于:所述的步骤4) 中将一定量的天蚕素B和天蚕素B抗体混合均匀后,加在固定有天蚕素B的下玻片上,用洗耳球吹开,与37℃温育1.5h,即可进行抗原抗体的竞争免疫反应。

7. 根据权利要求1所述的一种基于液晶生物传感器检测天蚕素B的方法,其特征在于:所述的步骤5) 中将上玻片和下玻片面对面组装成液晶盒,玻片之间用Mylar聚酯片隔开。

8. 根据权利要求1所述的一种基于液晶生物传感器检测天蚕素B的方法,其特征在于:所述的步骤5) 中先将液晶5CB加热到40℃左右使其呈各向同性的液态,然后将其从中间开

凸型空腔的Mylar 聚酯片开孔处注入,液晶由于毛细管作用力而布满整个空腔。

9.根据权利要求1所述的一种基于液晶生物传感器检测天蚕素B的方法,其特征在于:所述的步骤5)中将制作好的液晶池自然冷却到室温用偏光显微镜观察其光学现象。

一种基于液晶生物传感器检测天蚕素B的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及化学检测技术领域,具体涉及一种基于液晶生物传感器检测天蚕素B的方法。

背景技术

[0002] 天蚕素作为一种最早被发现并且被研究的动物抗菌肽,属于阳离子抗菌肽。天蚕素B含有35个氨基酸残基,不含半胱氨酸,结构中不含二硫键。其N端区域具有强碱性,而在C端区域可形成疏水螺旋,N末端区域富含亲水碱性氨基酸残基,这种结构有利于天蚕素吸附到带负电荷的细胞膜上,C末端含较多的疏水性氨基酸残基,疏水性的尾部有利于抗菌肽插入细胞膜的双层脂质膜中,分子两端各形成一个两亲性 α -螺旋,这种结构是破坏、裂解细菌的主要结构。天蚕素B对革兰氏阳性菌、部分革兰氏阴性菌均具有很强的杀伤力,而对真菌和真核细胞没有毒,而在动植物抗病基因工程、植物育种、生物饲料添加剂等领域有着巨大的潜在应用价值。

[0003] 然而,现有的检测手段,现有多肽检测方法有电位滴定法、高效液相色谱法、免疫分析法等,电位滴定法滴定终点难以判定,且受客观环境影响大;高效液相色谱法的分析成本高,耗时长;免疫分析法对抗原抗体标记要求高。而本发明使用的方法具有灵敏度高、特异性好、非标记和操作简单等优点。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术的上述不足,本发明的目的是提供一种基于液晶生物传感器检测天蚕素B的方法。本发明为快速检测天蚕素B(CB)存在提供了一种新的方法,具有灵敏度高、特异性好、非标记和操作简单等优点。

[0005] 为了达到上述目的,本发明采用的技术方案为:

一种基于液晶生物传感器检测天蚕素B的方法,将N,N-二甲基-N-十八烷基(3-[三甲氧基硅烷]丙基)氯化铵/三乙氧基丁醛硅烷(DMOAP/TEA)混合自组装修饰玻片表面,诱导液晶分子取向;采用TEA中的醛基将天蚕素B固定于自组装膜修饰的基底表面,天蚕素B抗体与固定于玻片表面的天蚕素B特异性结合后,会扰乱液晶分子的取向,导致光学信号的颜色和亮度发生变化,以此实现对天蚕素B的检测。本发明包括以下步骤:

1) 将玻片切割成 $2\text{cm} \times 2\text{cm}$,用新配制的Piranha溶液 $[V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{H}_2\text{O}_2) = 7 : 3]$ 于 80°C 浸泡1h,再分别用乙醇和去离子水清洗干净,经 N_2 吹干,于 110°C 干燥3h,防尘备用。

[0006] 2) 玻片的组装

上玻片的DMOAP溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸0.2%(体积分数)的DMOAP水溶液中,常温下静置30min,超纯水冲洗干净, N_2 吹干,于 110°C 干燥,备用。

[0007] 下玻片的TEA和DMOAP混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入(1%-5%)(体积分数)的TEA和1%(体积分数)DMOAP的 10mmol/L 醋酸-醋酸钠($\text{PH}=5.0$)溶液中,于 50°C 恒温2h,超纯水冲洗干净, N_2 吹干,于 110°C 干燥1h,备用。

[0008] 3) 天蚕素B的固定

取适量的CB溶液滴加至下玻片表面,于37℃温浴2.5h,取出后分别用PBS缓冲液(PH=7.4)和超纯水冲洗,除去未固定的CB分子,N₂吹干,置于-20℃下冷冻保存。

[0009] 4) 天蚕素B抗原抗体竞争免疫反应

将一定浓度的天蚕素B抗体溶液与不同浓度的天蚕素B溶液37℃恒温混匀10 min后滴加至固定有抗原的玻片上,于37℃温育1.5h,抗原抗体即可实现免疫竞争反应。分别用PBS缓冲液(PH=7.4)和超纯水冲洗,N₂吹干备用。

[0010] 5) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用Mylar聚酯片隔开,Mylar聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶5CB加热到40℃左右使其呈各向同性的液态,然后将其从Mylar聚酯片开孔处注入并通过毛细管作用力布满整个空腔,自然冷却到28℃左右观察;

所述的步骤1)中酸处理玻片并用无水乙醇浸泡10min,使基底表面固定足够的羟基。

[0011] 所述的步骤2)中上玻片在0.2%(体积分数)的DMOAP水溶液中常温下浸泡30 min。

[0012] 所述的步骤2)中下玻片在(1%-5%)(体积分数)TEA和1%(体积分数)DMOAP的乙醇溶液在80℃浸泡2h。

[0013] 所述的步骤3)中将(50-100 ng/L)的CB溶液加在经自组装修饰的下玻片上,用洗耳球吹开,于37℃温育2.5h,使基底表面固定CB。

[0014] 所述的步骤4)中将一定浓度的anti-CB和不同浓度的CB溶液加在固定有CB的玻片上,洗耳球吹开,于37℃温育1.5h,抗原抗体即可实现免疫竞争反应。

[0015] 所述的步骤5)中将上玻片和下玻片面对面组装成液晶盒,玻片之间用Mylar聚酯片隔开。

[0016] 所述的步骤5)中先将液晶5CB加热到40℃左右使其呈各向同性的液态,然后将其从中间开凸型空腔的Mylar聚酯片开孔处注入,液晶由于毛细管作用力而布满整个空腔。

[0017] 所述的步骤5)中将制作好的液晶池自然冷却到28℃左右用偏光显微镜观察其光学现象。

[0018] 优选的,本发明基于液晶生物传感器检测CB的方法包括以下几个步骤:

为了达到上述目的,本发明采用的技术方案包括以下步骤:

1) 将玻片切割成2cm×2cm,用新配制的Piranha溶液[V(H₂SO₄):V(H₂O₂)=7:3]于80℃浸泡1h,再分别用乙醇和去离子水清洗干净,经N₂吹干,于110℃干燥3h,防尘备用。

[0019] 2) 玻片的组装

上玻片的DMOAP溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸0.2%(体积分数)的DMOAP水溶液中,常温下静置30min,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥,备用。

[0020] 下玻片的TEA和DMOAP混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入(1%-5%)(体积分数)的TEA和1%(体积分数)DMOAP的10mmol/L醋酸-醋酸钠(PH=5.0)溶液中,于50℃恒温2h,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥1h,备用。

[0021] 3) 天蚕素B的固定

取适量的CB溶液滴加至下玻片表面,于37℃温浴2.5h,取出后分别用PBS缓冲液(PH=7.4)和超纯水冲洗,除去未固定的CB分子,N₂吹干,置于-20℃下冷冻保存。

[0022] 4) 天蚕素B抗原抗体竞争免疫反应

将一定浓度的anti-CB溶液与不同浓度的CB溶液37℃恒温混匀10min后滴加至固定有抗原的玻璃片上,于37℃温育1.5h,抗原抗体即可实现免疫竞争反应。分别用PBS缓冲液(PH=7.4)和超纯水冲洗,N₂吹干备用。

[0023] 5) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用Mylar聚酯片隔开,Mylar聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶5CB加热到40℃左右使其呈各向同性的液态,然后将其从Mylar聚酯片开孔处注入并通过毛细管作用力布满整个空腔,自然冷却到28℃左右观察;

优选的,所述的步骤2)中上玻片用0.2%(体积分数)的DMOAP水溶液浸泡30min。

[0024] 优选的,所述的步骤2)中下玻片用(1%-5%)(质量分数)TEA和1%(质量分数)DMOAP的乙醇溶液中于80℃浸泡2h,使基底表面功能化。

[0025] 优选的,所述的步骤3)中通过TEA中的醛基与CB的羧基作用将浓度为(50-120nmol/L)CB固定在玻片上。

[0026] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

本发明可以快速,微量地检测CB的含量,并且无需标记,不会造成任何污染。

附图说明

[0027] 图1为不同体积比的TEA/DMOAP基底自组装膜制备的液晶池光学成像;

图2为固定化CB浓度对液晶池光学成像的影响对比照片;

图3为不同浓度天蚕素B制备的液晶池光学成像。

具体实施方式

[0028] 下面结合实施例对本发明作进一步阐述,但是本发明不局限于以下实施例。

[0029] 一、实施例1~5 对TEA/DMOAP比例的确定

实施例1

1) 将玻片切割成2cm×2cm,用新配制的Piranha溶液[V(H₂SO₄):V(H₂O₂)=7:3]于80℃浸泡1h,再分别用乙醇和去离子水清洗干净,经N₂吹干,干燥3h,防尘备用。

[0030] 2) 玻片的组装

上玻片的DMOAP溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸0.2%(体积分数)的DMOAP水溶液中,常温下静置30min,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥,备用。

[0031] 下玻片的TEA和DMOAP混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入5%(体积分数)的TEA和1%(体积分数)DMOAP的10mmol/L醋酸-醋酸钠(PH=5.0)溶液中,于50℃恒温2h,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥1h,备用。

[0032] 3) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用Mylar聚酯片隔开,Mylar聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶5CB加热到40℃左右使其呈各向同性的液态,然后将其从Mylar聚酯片开孔处注入并通过毛细管作用力布满整个空腔,自然冷却到28℃左右观察;

实施例2

1) 将玻片切割成 $2\text{cm} \times 2\text{cm}$,用新配制的Piranha溶液 $[V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{H}_2\text{O}_2) = 7 : 3]$ 于 80°C 浸泡1h,再分别用乙醇和去离子水清洗干净,经 N_2 吹干,于 110°C 干燥3h,防尘备用。

[0033] 2) 玻片的组装

上玻片的DMOAP溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸0.2%(体积分数)的DMOAP水溶液中,常温下静置30min,超纯水冲洗干净, N_2 吹干,于 110°C 干燥,防尘备用。

[0034] 下玻片的TEA和DMOAP混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入4%(体积分数)的TEA和1%(体积分数)DMOAP的 10mmol/L 醋酸-醋酸钠($\text{PH}=5.0$)溶液中,于 50°C 恒温2h,超纯水冲洗干净, N_2 吹干,于 110°C 干燥1h,备用。

[0035] 3) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用Mylar聚酯片隔开,Mylar聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶5CB加热到 40°C 左右使其呈各向同性的液态,然后将其从Mylar聚酯片开孔处注入并通过毛细管作用力布满整个空腔,自然冷却到 28°C 左右观察。

[0036] 实施例3

1) 将玻片切割成 $2\text{cm} \times 2\text{cm}$,用新配制的Piranha溶液 $[V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{H}_2\text{O}_2) = 7 : 3]$ 于 80°C 浸泡1h,再分别用乙醇和去离子水清洗干净,经 N_2 吹干,于 110°C 干燥3h,防尘备用。

[0037] 2) 玻片的组装

上玻片的DMOAP溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸0.2%(体积分数)的DMOAP水溶液中,常温下静置30min,超纯水冲洗干净, N_2 吹干,于 110°C 干燥,防尘备用。

[0038] 下玻片的TEA和DMOAP混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入3%(体积分数)的TEA和1%(体积分数)DMOAP的 10mmol/L 醋酸-醋酸钠($\text{PH}=5.0$)溶液中,于 50°C 恒温2h,超纯水冲洗干净, N_2 吹干,于 110°C 干燥1h,防尘备用。

[0039] 3) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用Mylar聚酯片隔开,Mylar聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶5CB加热到 40°C 左右使其呈各向同性的液态,然后将其从Mylar聚酯片开孔处注入并通过毛细管作用力布满整个空腔,自然冷却到 28°C 左右观察。

[0040] 实施例4

1) 将玻片切割成 $2\text{cm} \times 2\text{cm}$,用新配制的Piranha溶液 $[V(\text{H}_2\text{SO}_4) : V(\text{H}_2\text{O}_2) = 7 : 3]$ 于 80°C 浸泡1h,再分别用乙醇和去离子水清洗干净,经 N_2 吹干,于 110°C 干燥3h,防尘备用。

[0041] 2) 玻片的组装

上玻片的DMOAP溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸0.2%(体积分数)的DMOAP水溶液中,常温下静置30min,超纯水冲洗干净, N_2 吹干,于 110°C 干燥,防尘备用。

[0042] 下玻片的TEA和DMOAP混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入2%(体积分数)的TEA和1%(体积分数)DMOAP的 10mmol/L 醋酸-醋酸钠($\text{PH}=5.0$)溶液中,于 50°C 恒温2h,超纯水冲洗干净, N_2 吹干,于 110°C 干燥1h,防尘备用。

[0043] 3) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用Mylar聚酯片隔开,Mylar聚酯

片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶5CB加热到40℃左右使其呈各向同性的液态,然后将其从Mylar聚酯片开孔处注入并通过毛细管作用力布满整个空腔,自然冷却到28℃左右观察。

[0044] 实施例5

1) 将玻片切割成2cm×2cm,用新配制的Piranha溶液[V(H₂SO₄):V(H₂O₂)=7:3]于80℃浸泡1h,再分别用乙醇和去离子水清洗干净,经N₂吹干,于110℃干燥3h,防尘备用。

[0045] 2) 玻片的组装

上玻片的DMOAP溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸0.2%(体积分数)的DMOAP水溶液中,常温下静置30min,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥,防尘备用。

[0046] 下玻片的TEA和DMOAP混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入1%(体积分数)的TEA和1%(体积分数)DMOAP的10mmol/L醋酸-醋酸钠(PH=5.0)溶液中,于50℃恒温2h,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥1h,防尘备用。

[0047] 3) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用Mylar聚酯片隔开,Mylar聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶5CB加热到40℃左右使其呈各向同性的液态,然后将其从Mylar聚酯片开孔处注入并通过毛细管作用力布满整个空腔,自然冷却到28℃左右观察。

[0048] 将实施例1~5制备的液晶池在偏光显微镜下进行观察,得到图1结果,图中TEA/DMOAP体积比为:(a)5:1;(b)4:1;(c)3:1;(d)2:1;(e)1:1。如图1所示,当TEA/DMOAP比例较高时(图a),光学成像中亮斑大且多,随着TEA/DMOAP比例减小,光学成像中亮斑逐渐减少,当两者比等于或小于2:1时,光学成像均为均一黑色图案。为了使基底固定有既能诱导液晶垂直排列又能提供足够的醛基固定CB,因此选择TEA/DMOAP比例为2:1。

[0049] 二、实施例6~9 对固定化CB含量的确定

实施例6

1) 将玻片切割成2cm×2cm,用新配制的Piranha溶液[V(H₂SO₄):V(H₂O₂)=7:3]于80℃浸泡1h,再分别用乙醇和去离子水清洗干净,经N₂吹干,于110℃干燥3h,防尘备用。

[0050] 2) 玻片的组装

上玻片的DMOAP溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸0.2%(体积分数)的DMOAP水溶液中,常温下静置30min,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥,防尘备用。

[0051] 下玻片的TEA和DMOAP混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入2%(体积分数)的TEA和1%(体积分数)DMOAP的10mmol/L醋酸-醋酸钠(PH=5.0)溶液中,于50℃恒温2h,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥1h,防尘备用。

[0052] 3) 天蚕素B的固定

取500ng/ml的CB溶液滴加至下玻片表面,于37℃温浴2.5h,取出后分别用PBS缓冲液(PH=7.4)和超纯水冲洗,除去未固定的CB分子,N₂吹干,置于-20℃下冷冻保存。

[0053] 4) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用Mylar聚酯片隔开,Mylar聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶5CB加热到40℃左右使其呈各向同性的液态,然后将其从Mylar聚酯片开孔处注入并通过毛细管作用力布

满整个空腔,自然冷却到28℃左右观察。

[0054] 实施例7

1) 将玻片切割成2cm×2cm,用新配制的Piranha溶液[V(H₂SO₄):V(H₂O₂)=7:3]于80℃浸泡1h,再分别用乙醇和去离子水清洗干净,经N₂吹干,于110℃干燥3h,防尘备用。

[0055] 2) 玻片的组装

上玻片的DMOAP溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸0.2%(体积分数)的DMOAP水溶液中,常温下静置30min,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥,防尘备用。

[0056] 下玻片的TEA和DMOAP混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入4%(体积分数)的TEA和1%(体积分数)DMOAP的10mmol/L醋酸-醋酸钠(PH=5.0)溶液中,于50℃恒温2h,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥1h,防尘备用。

[0057] 3) 天蚕素B的固定

取250ng/ml的CB溶液滴加至下玻片表面,用洗耳球吹开,于37℃温浴2.5h,取出后分别用PBS缓冲液(PH=7.4)和超纯水冲洗,除去未固定的CB分子,N₂吹干,置于-20℃下冷冻保存。

[0058] 4) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用Mylar聚酯片隔开,Mylar聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶5CB加热到40℃左右使其呈各向同性的液态,然后将其从Mylar聚酯片开孔处注入并通过毛细管作用力布满整个空腔,自然冷却到28℃左右观察。

[0059] 实施例8

1) 将玻片切割成2cm×2cm,用新配制的Piranha溶液[V(H₂SO₄):V(H₂O₂)=7:3]于80℃浸泡1h,再分别用乙醇和去离子水清洗干净,经N₂吹干,于110℃干燥3h,防尘备用。

[0060] 2) 玻片的组装

上玻片的DMOAP溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸0.2%(体积分数)的DMOAP水溶液中,常温下静置30min,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥,防尘备用。

[0061] 下玻片的TEA和DMOAP混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入4%(体积分数)的TEA和1%(体积分数)DMOAP的10mmol/L醋酸-醋酸钠(PH=5.0)溶液中,于50℃恒温2h,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥1h,防尘备用。

[0062] 3) 天蚕素B的固定

取100ng/ml的CB溶液滴加至下玻片表面,用洗耳球吹开,于37℃温浴2.5h,取出后分别用PBS缓冲液(PH=7.4)和超纯水冲洗,除去未固定的CB分子,N₂吹干,置于-20℃下冷冻保存。

[0063] 4) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用Mylar聚酯片隔开,Mylar聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶5CB加热到40℃左右使其呈各向同性的液态,然后将其从Mylar聚酯片开孔处注入并通过毛细管作用力布满整个空腔,自然冷却到28℃左右观察。

[0064] 实施例9

1) 将玻片切割成2cm×2cm,用新配制的Piranha溶液[V(H₂SO₄):V(H₂O₂)=7:3]于80℃浸

泡1h,再分别用乙醇和去离子水清洗干净,经N₂吹干,于110℃干燥3h,防尘备用。

[0065] 2) 玻片的组装

上玻片的DMOAP溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸0.2%(体积分数)的DMOAP水溶液中,常温下静置30min,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥,防尘备用。

[0066] 下玻片的TEA和DMOAP混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入4%(体积分数)的TEA和1%(体积分数)DMOAP的10mmol/L醋酸-醋酸钠(PH=5.0)溶液中,于50℃恒温2h,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥1h,防尘备用。

[0067] 3) 天蚕素B的固定

取80ng/ml的CB溶液滴加至下玻片表面,用洗耳球吹开,于37℃温浴2.5h,取出后分别用PBS缓冲液(PH=7.4)和超纯水冲洗,除去未固定的CB分子,N₂吹干,置于-20℃下冷冻保存。

[0068] 4) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用Mylar聚酯片隔开,Mylar聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶5CB加热到40℃左右使其呈各向同性的液态,然后将其从Mylar聚酯片开孔处注入并通过毛细管作用力布满整个空腔,自然冷却到28℃左右观察。

[0069] 将实施例6~9制备的液晶池置于偏光显微镜下观察,得到图2照片,图中,固定化CB浓度分别为:(a) 500 ng/ml; (b) 250 ng/ml; (c) 100 ng/ml; (d) 80 ng/ml。如图2所示,当CB浓度较高时(500 ng/ml),对液晶分子取向扰乱程度较大,光学成像中有较大的彩色亮斑出现(图a),背景值较高,干扰后续检测。随着固定化CB浓度的减小,对液晶分子取向扰乱减小,液晶池光学成像逐渐变暗,当固定化抗原浓度为100、80 ng/ml时,光学成像中只有少数星点亮斑,由于需要足够的抗原与抗体反应,因此选择固定化CB浓度为100ng/ml固定于基底表面,进行后续检测。

[0070] 三、实施例10~14 CB的检测

实施例10

1) 将玻片切割成2cm×2cm,用新配制的Piranha溶液[V(H₂SO₄):V(H₂O₂)=7:3]于80℃浸泡1h,再分别用乙醇和去离子水清洗干净,经N₂吹干,于110℃干燥3h,防尘备用。

[0071] 2) 玻片的组装

上玻片的DMOAP溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸0.2%(体积分数)的DMOAP水溶液中,常温下静置30min,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥,防尘备用。

[0072] 下玻片的TEA和DMOAP混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入4%(体积分数)的TEA和1%(体积分数)DMOAP的10mmol/L醋酸-醋酸钠(PH=5.0)溶液中,于50℃恒温2h,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥1h,防尘备用。

[0073] 3) 天蚕素B的固定

取100ng/ml的CB溶液滴加至下玻片表面,用洗耳球吹开,于37℃温浴2.5h,取出后分别用PBS缓冲液(PH=7.4)和超纯水冲洗,除去未固定的CB分子,N₂吹干,置于-20℃下冷冻保存。

[0074] 4) 天蚕素B抗体竞争免疫反应

将一定浓度的anti-CB溶液与0ng/ml的CB溶液37℃恒温混匀10min后滴加至固定有抗

原的玻璃片上,于37℃温育1.5h,抗原抗体即可实现免疫竞争反应。分别用PBS缓冲液(PH=7.4)和超纯水冲洗,N₂吹干备用。

[0075] 5) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用Mylar聚酯片隔开,Mylar聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶5CB加热到40℃左右使其呈各向同性的液态,然后将其从Mylar聚酯片开孔处注入并通过毛细管作用力布满整个空腔,自然冷却到28℃左右观察。

[0076] 实施例11

1) 将玻片切割成2cm×2cm,用新配制的Piranha溶液[V(H₂SO₄):V(H₂O₂)=7:3]于80℃浸泡1h,再分别用乙醇和去离子水清洗干净,经N₂吹干,于110℃干燥3h,防尘备用。

[0077] 2) 玻片的组装

上玻片的DMOAP溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸0.2%(体积分数)的DMOAP水溶液中,常温下静置30min,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥,防尘备用。

[0078] 下玻片的TEA和DMOAP混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入4%(体积分数)的TEA和1%(体积分数)DMOAP的10mmol/L醋酸-醋酸钠(PH=5.0)溶液中,于50℃恒温2h,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥1h,防尘备用。

[0079] 3) 天蚕素B的固定

取100ng/ml的CB溶液滴加至下玻片表面,用洗耳球吹开,于37℃温浴2.5h,取出后分别用PBS缓冲液(PH=7.4)和超纯水冲洗,除去未固定的CB分子,N₂吹干,置于-20℃下冷冻保存。

[0080] 4) 天蚕素B抗原抗体竞争免疫反应

将一定浓度的anti-CB溶液与1.0ng/ml的CB溶液37℃恒温混匀10min后滴加至固定有抗原的玻片上,于37℃温育1.5h,抗原抗体即可实现免疫竞争反应。分别用PBS缓冲液(PH=7.4)和超纯水冲洗,N₂吹干备用。

[0081] 5) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用Mylar聚酯片隔开,Mylar聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶5CB加热到40℃左右使其呈各向同性的液态,然后将其从Mylar聚酯片开孔处注入并通过毛细管作用力布满整个空腔,自然冷却到28℃左右观察。

[0082] 实施例12

1) 将玻片切割成2cm×2cm,用新配制的Piranha溶液[V(H₂SO₄):V(H₂O₂)=7:3]于80℃浸泡1h,再分别用乙醇和去离子水清洗干净,经N₂吹干,于110℃干燥3h,防尘备用。

[0083] 2) 玻片的组装

上玻片的DMOAP溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸0.2%(体积分数)的DMOAP水溶液中,常温下静置30min,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥,防尘备用。

[0084] 下玻片的TEA和DMOAP混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入4%(体积分数)的TEA和1%(体积分数)DMOAP的10mmol/L醋酸-醋酸钠(PH=5.0)溶液中,于50℃恒温2h,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥1h,防尘备用。

[0085] 3) 天蚕素B的固定

取100ng/ml的CB溶液滴加至下玻片表面,用洗耳球吹开,于37℃温浴2.5h,取出后分别用PBS缓冲液(PH=7.4)和超纯水冲洗,除去未固定的CB分子,N₂吹干,置于-20℃下冷冻保存。

[0086] 4) 天蚕素B抗原抗体竞争免疫反应

将一定浓度的anti-CB溶液与10 ng/ml的CB溶液37℃恒温混匀10min后滴加至固定有抗原的玻片上,于37℃温育1.5h,抗原抗体即可实现免疫竞争反应。分别用PBS缓冲液(PH=7.4)和超纯水冲洗,N₂吹干备用。

[0087] 5) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用Mylar聚酯片隔开,Mylar聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶5CB加热到40℃左右使其呈各向同性的液态,然后将其从Mylar聚酯片开孔处注入并通过毛细管作用力布满整个空腔,自然冷却到28℃左右观察。

[0088] 实施例13

1) 将玻片切割成2cm×2cm,用新配制的Piranha溶液[V(H₂SO₄):V(H₂O₂)=7:3]于80℃浸泡1h,再分别用乙醇和去离子水清洗干净,经N₂吹干,于110℃干燥3h,防尘备用。

[0089] 2) 玻片的组装

上玻片的DMOAP溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸0.2%(体积分数)的DMOAP水溶液中,常温下静置30min,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥,防尘备用。

[0090] 下玻片的TEA和DMOAP混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入4%(体积分数)的TEA和1%(体积分数)DMOAP的10mmol/L醋酸-醋酸钠(PH=5.0)溶液中,于50℃恒温2h,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥1h,防尘备用。

[0091] 3) 天蚕素B的固定

取100ng/ml的CB溶液滴加至下玻片表面,用洗耳球吹开,于37℃温浴2.5h,取出后分别用PBS缓冲液(PH=7.4)和超纯水冲洗,除去未固定的CB分子,N₂吹干,置于-20℃下冷冻保存。

[0092] 4) 天蚕素B抗原抗体竞争免疫反应

将一定浓度的anti-CB溶液与50ng/ml的CB溶液37℃恒温混匀10min后滴加至固定有抗原的玻片上,于37℃温育1.5h,抗原抗体即可实现免疫竞争反应。分别用PBS缓冲液(PH=7.4)和超纯水冲洗,N₂吹干备用。

[0093] 5) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用Mylar聚酯片隔开,Mylar聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶5CB加热到40℃左右使其呈各向同性的液态,然后将其从Mylar聚酯片开孔处注入并通过毛细管作用力布满整个空腔,自然冷却到28℃左右观察。

[0094] 实施例14

1) 将玻片切割成2cm×2cm,用新配制的Piranha溶液[V(H₂SO₄):V(H₂O₂)=7:3]于80℃浸泡1h,再分别用乙醇和去离子水清洗干净,经N₂吹干,于110℃干燥3h,防尘备用。

[0095] 2) 玻片的组装

上玻片的DMOAP溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸0.2%(体积分数)的DMOAP水溶液中,

常温下静置30min,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥,防尘备用。

[0096] 下玻片的TEA和DMOAP混合溶液组装:将清洗烘烤后的玻片浸入4%(体积分数)的TEA和1%(体积分数)DMOAP的10mmol/L醋酸-醋酸钠(PH=5.0)溶液中,于50℃恒温2h,超纯水冲洗干净,N₂吹干,于110℃干燥1h,防尘备用。

[0097] 3) 天蚕素B的固定

取100ng/ml的CB溶液滴加至下玻片表面,用洗耳球吹开,于37℃温浴2.5h,取出后分别用PBS缓冲液(PH=7.4)和超纯水冲洗,除去未固定的CB分子,N₂吹干,置于-20℃下冷冻保存。

[0098] 4) 天蚕素B抗原抗体竞争免疫反应

将一定浓度的anti-CB溶液与100ng/ml的CB溶液37℃恒温混匀10min后滴加至固定有抗原的玻片上,于37℃温育1.5h,抗原抗体即可实现免疫竞争反应。分别用PBS缓冲液(PH=7.4)和超纯水冲洗,N₂吹干备用。

[0099] 5) 液晶池的制作

液晶池由上玻片和下玻片面对面组装而成,玻片之间用Mylar聚酯片隔开,Mylar聚酯片中间开凸型空腔,除开孔方向外,其它三边边缘用小夹子固定。先将液晶5CB加热到40℃左右使其呈各向同性的液态,然后将其从Mylar聚酯片开孔处注入并通过毛细管作用力布满整个空腔,自然冷却到28℃左右观察。

[0100] 将实施例10~14制备的液晶池分别置于偏光显微镜下进行观察,得到图3结果,图中天蚕素B的浓度分别为:(a) 0 ng/ml; (b) 1.0ng/ml; (c) 10 ng/ml; (d) 50ng/ml; (e) 100ng/ml。如图3所示,在一定浓度范围内,待测天蚕素B的浓度越低,结合到基底玻片表面的天蚕素B抗体分子越多,图像越亮;反之,待测天蚕素B浓度越高,结合到基底玻片表面的天蚕素B抗体分子越少,图像趋于全黑。因此,天蚕素B含量超过10ng/ml时,光学信号出现明显变化。

[0101] 以上结果显示,利用竞争免疫法检测CB,在CB的含量超过10ng/ml时,光学信号出现明显变化。因此,可以实现对CB的快速高效地检测。

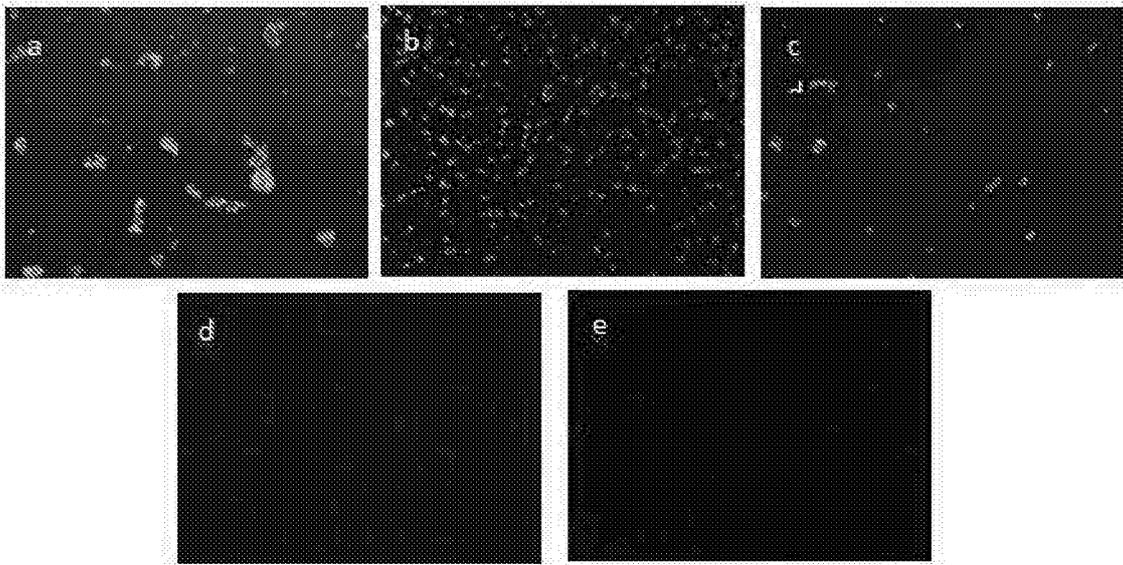


图1

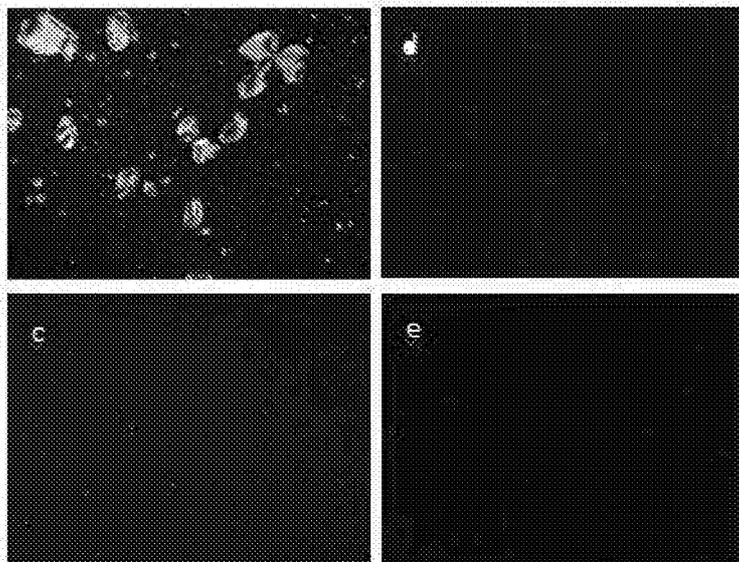


图2

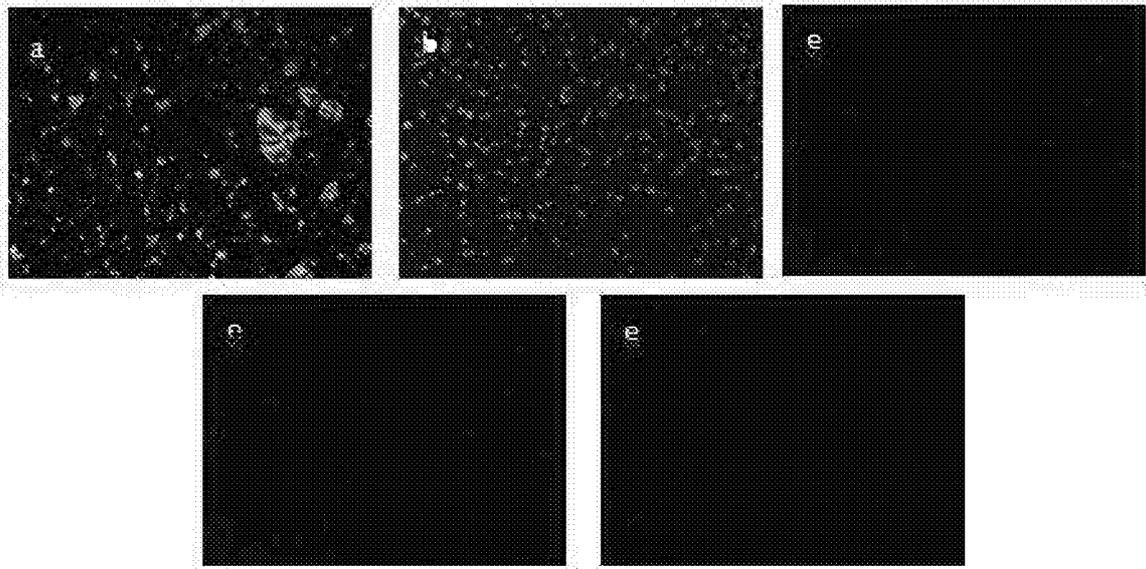


图3

专利名称(译)	一种基于液晶生物传感器检测天蚕素B的方法		
公开(公告)号	CN107941712A	公开(公告)日	2018-04-20
申请号	CN201711204561.3	申请日	2017-11-27
[标]申请(专利权)人(译)	陕西科技大学		
申请(专利权)人(译)	陕西科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	陕西科技大学		
[标]发明人	苏秀霞 徐佳 张婧 张姣 霍文静 胡金龙 晏春苗 张海宁		
发明人	苏秀霞 徐佳 张婧 张姣 霍文静 胡金龙 晏春苗 张海宁		
IPC分类号	G01N21/21 G01N33/531		
CPC分类号	G01N21/21 G01N33/531		
代理人(译)	刘华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种基于液晶生物传感器检测天蚕素B的方法，将N,N-二甲基-N-十八烷基(3-[三甲氧基硅烷]丙基)氯化铵/三乙氧基丁醛硅烷(DMOAP/TEA)混合自组装修饰玻片表面，诱导液晶分子取向；采用TEA中的醛基将天蚕素B固定于自组装修饰的基底表面，天蚕素B抗体与固定于玻片表面的天蚕素B特异性结合后，会扰乱液晶分子的取向，导致光学信号的颜色和亮度发生变化，以此实现对天蚕素B的检测。本发明在检测天蚕素B时，结合液晶生物传感器的优点，从而具有灵敏度高、特异性好、非标记和操作简单等特点。

