



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110231489 A

(43)申请公布日 2019.09.13

(21)申请号 201910415524.X

(22)申请日 2019.05.18

(71)申请人 安徽科技学院

地址 233100 安徽省滁州市凤阳县东华路

(72)发明人 刘国东 范川 邱万伟 钱立生  
李坤

(74)专利代理机构 合肥广源知识产权代理事务  
所(普通合伙) 34129

代理人 徐国法

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

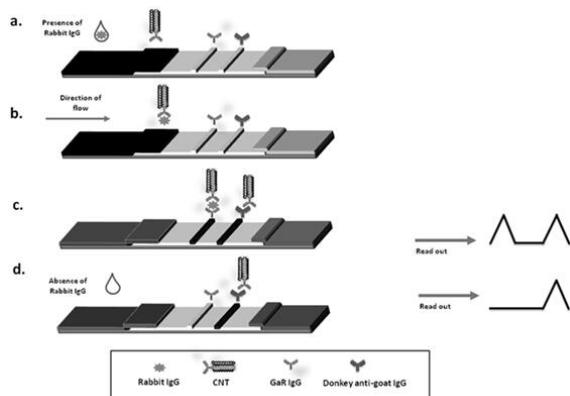
权利要求书2页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种提高碳纳米管标记的试纸条生物传感  
器检测灵敏度的方法

(57)摘要

本发明属于免疫检测传感器的检测技术领  
域,具体涉及一种提高碳纳米管标记的试纸条生物  
传感器检测灵敏度的方法,由羧基修饰多壁碳  
纳米管为原料制备标记抗体复合物,依次调整制  
备试纸条生物传感器以及检测过程中条件,在兔  
子IgG在浓度为5ng/ml的条件下,得到各条件的  
改变对检测线对应相应信号,并进行分析;得到  
影响碳纳米管标记的试纸条生物传感器检测灵  
敏度的主要条件包括制备标记抗体复合物时抗  
体的添加量、检测线上多克隆羊抗兔IgG的浓度、  
结合垫上标记抗体复合物的量以及检测缓冲液  
中BSA的浓度。本发明相比现有技术具有以下优  
点:在最优条件下,检测极限为0.1ng/ml,实现简  
便、快捷的对蛋白进行超灵敏检测。



1. 一种提高碳纳米管标记的试纸条生物传感器检测灵敏度的方法,包括利用标记抗体复合物制备试纸条生物传感器,所述试纸条生物传感器包括固定底板,固定底板上粘设硝酸纤维素膜作为底膜,在底膜上从左到右依次粘设样品垫、结合垫和吸收垫,样品垫和结合垫部分重叠,结合垫和吸收垫之间存在间隔形成间隔区,所述间隔区上设有检测线和控制线;

所述样品垫在使用前用sample pad缓冲液浸泡30分钟,然后在37℃的干燥箱中干燥4h,然后在干燥器中保存备用;所述结合垫上喷设标记抗体复合物,然后在室温条件下干燥;所述检测线由多克隆羊抗兔IgG喷在硝酸纤维素膜上得到,所述控制线由小鼠抗羊IgG喷在硝酸纤维素膜上得到;

试纸条生物传感器的检测方法为,将100μL一定浓度的兔子IgG的检测缓冲液滴加10分钟后,然后用检测缓冲液清洗,在试纸条生物传感器上得到肉眼可观察到的黑色的检测线和控制线,5分钟后,拍照,然后将照片导入电脑,用ImageJ软件对试纸条生物传感器的检测线进行信号转化处理,记录相应的响应信息,从而对数据进行分析处理;

其特征在于,由羧基修饰多壁碳纳米管为原料制备标记抗体复合物,所述检测缓冲液由PBST和BSA组成;

依次调整制备试纸条生物传感器以及检测过程中各条件,按照上述检测方法在兔子IgG在浓度为5ng/ml的条件下,得到各条件的改变对检测线对应相应信号,并进行分析;得到影响碳纳米管标记的试纸条生物传感器检测灵敏度的主要条件包括制备标记抗体复合物时抗体的添加量、检测线上多克隆羊抗兔IgG的浓度、结合垫上标记抗体复合物的量以及检测缓冲液中BSA的浓度。

2. 如权利要求1所述一种提高碳纳米管标记的试纸条生物传感器检测灵敏度的方法,其特征在于,所述羧基修饰多壁碳纳米管在使用前用浓硫酸和浓硝酸的混合液超声处理,超声处理6小时后,在10000转/分钟的转速下离心10分钟,然后用超纯水洗涤三次,最后溶于超纯水备用;其中浓硫酸和浓硝酸的体积比为3:1。

3. 如权利要求2所述一种提高碳纳米管标记的试纸条生物传感器检测灵敏度的方法,其特征在于,所述标记抗体复合物的制备方法为,取9.6mgEDC和5.43mg sulfo-NHS溶于1ml MES缓冲液中,加入0.5mg处理过的碳纳米管使其终浓度在0.5mg/ml;在室温下反应15分钟,在10000转/分钟的转速下离心10min,弃去上清液,用PBS缓冲液重复洗涤2次,最后溶于PBS中,超声3-5秒使溶液分散均匀;然后加入20ug羊抗兔IgG溶液,室温下反应过夜;在5000转/分钟的转速下离心分5分钟,弃去上清液,加入PBS缓冲液;在10000转速下离心10分钟,重复洗涤2次已去掉未结合的抗体,最后溶于1ml Eluent 缓冲液中,置于4℃下保存备用。

4. 如权利要求3所述一种提高碳纳米管标记的试纸条生物传感器检测灵敏度的方法,其特征在于,在制备标记抗体复合物时,用于制备标记抗体复合物的抗体原料羊抗兔IgG溶液的浓度为20μg/ml。

5. 如权利要求1所述一种提高碳纳米管标记的试纸条生物传感器检测灵敏度的方法,其特征在于,在制备检测线时,在制备检测线的位置用Biojet BJQ3000把多克隆羊抗兔IgG喷2遍。

6. 如权利要求1所述一种提高碳纳米管标记的试纸条生物传感器检测灵敏度的方法,其特征在于,在加工结合垫时,用Airjet AJQ 3000把标记抗体复合物喷3遍。

7. 如权利要求1所述一种提高碳纳米管标记的试纸条生物传感器检测灵敏度的方法，其特征在于，所述检测缓冲液中BSA的浓度为1%。

## 一种提高碳纳米管标记的试纸条生物传感器检测灵敏度的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测传感器的检测技术领域,具体涉及一种提高碳纳米管标记的试纸条生物传感器检测灵敏度的方法。

### 背景技术

[0002] 侧向流动免疫分析法是一种实时监控的纸基生物传感器,由于其成本低,操作简单等优点而备受关注。侧向流动免疫分析的另一个主要优点是它可以在各种生物样本上进行,包括血浆、汗、唾液、血清、尿和全血。此外,用于检测所需的样本量比常规检测中所需的检测要小得多。因此,侧向流动免疫分析作为一种非常实用的便携式分析工具已被广泛用于蛋白质的快速检测。目前,包含金纳米颗粒、量子点、磁性纳米颗粒、上转换发光纳米颗粒和活性拉曼纳米材料在内的各种纳米颗粒都已被用作侧向流动免疫分析的标记。在这些材料中,金纳米颗粒是应用最广泛的标签,因为它们具有独特的光学性质和容易表面修饰。随着研究的进一步深入,发现碳纳米管作为一种新型标记物,比传统的纳米金标记具有更好的信号效果,为实现对蛋白的超灵敏检测提供了一个简便、快捷的检测手段,但是在实际检测时发现,对于碳纳米管标记的试纸条生物传感器,虽然相比纳米金标记对蛋白检测灵敏度有所提高,但需要对其制备方法进行优化改进,才能实现较好的技术效果。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是针对现有碳纳米管标记的试纸条生物传感器检测灵敏度不够高的问题,提供了一种提高碳纳米管标记的试纸条生物传感器检测灵敏度的方法。

[0004] 本发明是通过以下技术方案实现的:包括利用标记抗体复合物制备试纸条生物传感器,所述试纸条生物传感器包括固定底板,固定底板上粘设硝酸纤维素膜作为底膜,在底膜上从左到右依次粘设样品垫、结合垫和吸收垫,样品垫和结合垫部分重叠,结合垫和吸收垫之间存在间隔形成间隔区,所述间隔区上设有检测线和控制线;

所述样品垫在使用前用sample pad缓冲液浸泡30分钟,然后在37℃的干燥箱中干燥4h,然后在干燥器中保存备用;所述结合垫上喷设标记抗体复合物,然后在室温条件下干燥;所述检测线由多克隆羊抗兔IgG喷在硝酸纤维素膜上得到,所述控制线由小鼠抗羊IgG喷在硝酸纤维素膜上得到;

所述sample pad缓冲液按重量百分比计包括以下溶质:0.05M Tris-HCl、0.15mM NaCl、0.25% Triton X-100和2.5%Tween-20;

试纸条生物传感器的检测方法为,将100μL一定浓度的兔子IgG的检测缓冲液滴加10分钟后,然后用检测缓冲液清洗,在试纸条生物传感器上得到肉眼可观察到的黑色的检测线和控制线,5分钟后,拍照,然后将照片导入电脑,用ImageJ软件对试纸条生物传感器的检测线进行信号转化处理,记录相应的响应信息,从而对数据进行分析处理;

特别的,由羧基修饰多壁碳纳米管为原料制备标记抗体复合物,所述检测缓冲液由

PBST和BSA组成；

依次调整制备试纸条生物传感器以及检测过程中各条件,按照上述检测方法在兔子IgG在浓度为5ng/ml的条件下,得到各条件的改变对检测线对应相应信号,并进行分析;得到影响碳纳米管标记的试纸条生物传感器检测灵敏度的主要条件包括制备标记抗体复合物时抗体的添加量、检测线上多克隆羊抗兔IgG的浓度、结合垫上标记抗体复合物的量以及检测缓冲液中BSA的浓度。

[0005] 作为对上述方案的进一步改进,所述羧基修饰多壁碳纳米管在使用前用浓硫酸和浓硝酸的混合液超声处理,超声处理6小时后,在10000转/分钟的转速下离心10分钟,然后用超纯水洗涤三次,最后溶于超纯水备用;其中浓硫酸和浓硝酸的体积比为3:1。

[0006] 作为对上述方案的进一步改进,所述标记抗体复合物的制备方法为,取9.6mgEDC和5.43mg sulfo-NHS溶于1ml MES缓冲液中,加入0.5mg处理过的碳纳米管使其终浓度在0.5mg/ml;在室温下反应15分钟,在10000转/分钟的转速下离心10min,弃去上清液,用PBS缓冲液重复洗涤2次,最后溶于PBS中,超声3-5秒使溶液分散均匀;然后加入20ug羊抗兔IgG溶液,室温下反应过夜;在5000转/分钟的转速下离心分5钟,弃去上清液,加入PBS缓冲液;在10000转速下离心10分钟,重复洗涤2次已去掉未结合的抗体,最后溶于1ml Eluent 缓冲液中,置于4℃下保存备用;

所述MES缓冲液中溶质浓度为0.1M,其pH值为6.0;

所述Eluent缓冲液包括以下重量百分比的溶质:20mM Na<sub>3</sub>P0<sub>4</sub> • 12H<sub>2</sub>O,10%蔗糖,5% BSA,0.25% Tween-20。

[0007] 作为对上述方案的进一步改进,在制备标记抗体复合物时,设置用于制备标记抗体复合物的抗体原料羊抗兔IgG溶液的浓度为5μg/ml、10μg/ml、20μg/ml、50μg/ml,根据检测结果,优选羊抗兔IgG溶液的浓度为20μg/ml。

[0008] 作为对上述方案的进一步改进,在制备检测线时,设置在制备检测线的位置分别用Biojet BJQ3000对多克隆羊抗兔IgG喷1遍、2遍、3遍,根据检测结果,优选喷2遍效果最佳。

[0009] 作为对上述方案的进一步改进,在加工结合垫时,设置用Airjet AJQ 3000把标记抗体复合物分别喷2遍、3遍、4遍、5遍,根据检测结果,优选喷3遍最佳。

[0010] 作为对上述方案的进一步改进,所述检测缓冲液中BSA的浓度分别设置为0%、1%、2%、3%,根据检测结果,优选测缓冲液中BSA的浓度为1%。

[0011] 所述样品垫的原料为硝酸纤维素膜,固定底板的材质为惰性塑料,具体优选为聚酯纤维。

[0012] 所述样品垫与结合垫的重叠部分为2-3mm,且重叠部分样品垫在上,在检测过程中,加入样品兔子IgG,兔子IgG与结合垫上的标记抗体复合物发生特异性结合,然后兔子IgG与标记抗体复合物即MWCNTs-antibody-IgG免疫复合物,此免疫复合物继续向前移动,到达检测线时,该免疫复合物与固定在检测线上的多克隆羊抗兔IgG抗体发生免疫结合,形成MWCNTs-antibody-IgG-antibody双抗夹心结构,同时羧基修饰多壁碳纳米管也停留在此区域,从而出现一条黑色的检测线;剩余未结合的MWCNTs-antibody继续移动,到达控制线时被固定在此的小鼠抗羊IgG (secondary antibody) 捕获,形成第二条黑线;

当样品中不含有目标IgG时,检测线没有颜色而控制线会形成一条黑线,以此说明试纸

条的有效性。

[0013] 本发明相比现有技术具有以下优点:本发明中通过对制备过程以及检测过程中各条件调整后,分别分析其对检测结果的影响,得出对试纸条生物传感器检测灵敏度影响较大的多个条件,然后分别设置多组数据对相应的响应信号进行比较,选择响应信号最大时对应的条件,得到最优条件:在制备标记抗体复合物时,用于制备标记抗体复合物的抗体原料羊抗兔IgG溶液的浓度为20ng/m;在制备检测线时,在制备检测线的位置用Biojet BJQ3000把多克隆羊抗兔IgG喷2遍;在加工结合垫时,用Airjet AJQ 3000把标记抗体复合物喷3遍;所述检测缓冲液中BSA的浓度为1%;

在最优条件下,响应信号与兔子IgG在0.1-2ng/ml范围内有良好的线性关系,检测极限为0.1ng/ml,具有较好的重现性和特异性,相比传统的纳米金标记具有更好的信号效果,为实现对蛋白的超灵敏检测提供了一个简便、快捷的检测手段,该免疫试纸条生物传感器在现场检测蛋白质方面具有巨大潜力。

## 附图说明

[0014] 图1是检测原理示意图;

(a) 样品加入;(b) 目标物IgG与碳纳米管-羊抗兔抗体偶合物发生免疫结合反应;(c) 检测线上形成兔IgG-羊抗兔抗体-碳纳米管复合物以及控制线上过量的羊抗兔抗体被捕获;(d) 无目标物。

[0015] 图2羊抗兔IgG溶液的浓度对响应信号的影响。

[0016] 图3检测线上多克隆羊抗兔IgG的浓度对响应信号的影响。

[0017] 图4结合垫上标记抗体复合物的量对响应信号的影响。

[0018] 图5检测缓冲液中BSA的浓度对响应信号的影响。

[0019] 图6不同浓度样品的试纸条检测结果图片。

## 具体实施方式

[0020] 为了详细说明本发明的技术内容、所实现的目的及效果,以下结合实施方式予以说明。

[0021] 本发明最关键的构思在于:以羧基修饰多壁碳纳米管作为标记物制备试纸条生物传感器的制备原料,采用双抗夹心方法对目标蛋白进行检测,通过对制备过程以及检测过程中各条件调整后,分别分析其对检测结果的影响,得出对试纸条生物传感器检测灵敏度影响较大的多个条件,然后分别设置多组数据对相应的响应信号进行比较,选择响应信号最大时对应的条件,得到最优条件;

在最优的实验条件下,响应信号与兔子IgG在0.1-2ng/ml范围内有良好的线性关系,检测极限为0.1ng/ml,具有较好的重现性和特异性,相比传统的纳米金标记具有更好的信号效果,为实现对蛋白的超灵敏检测提供了一个简便、快捷的检测手段。

[0022] 本发明中所用部分原料来源如下:羧基修饰多壁碳纳米管(MWCNTs),十二水合磷酸钠(Na3P04 • 12H2O),牛血清白蛋白(BSA),蔗糖(sucrose),吐温-20(Tween 20),氯化钠(NaCl),EDC, sulfo-NHS,曲拉通X-100(TritonX-100),Tris-HCl,磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.4,0.01M), MES缓冲液均购于Sigma-Aldrich公司;兔子免疫球蛋白G(rabbit IgG),多克

隆羊抗兔IgG(anti-rabbit IgG),小鼠抗羊IgG(secondary antibody)购于Thermo Scientific;人癌胚抗原(CEA),Thrombin, PDGF-BB, H-IgG购于Fitzgerald Industries International公司;纤维素纤维膜(CFSP001700),玻璃纤维膜(GFCP000800),硝酸纤维素膜(HFB24004)和层压板(HF000MC100)均购自于Millipore公司;

其它试剂均为分析纯;实验所有用水均为超纯水(>18 MΩ cm)。

[0023] 其中,标记物制备试纸条生物传感器的制备方法包括以下内容:

包括利用标记抗体复合物制备试纸条生物传感器,所述试纸条生物传感器包括固定底板,固定底板上粘设硝酸纤维素膜作为底膜,在底膜上从左到右依次粘设样品垫、结合垫和吸收垫,样品垫和结合垫部分重叠,结合垫和吸收垫之间存在间隔形成间隔区,所述间隔区上设有检测线和控制线;

所述样品垫在使用前用sample pad缓冲液浸泡30分钟,然后在37℃的干燥箱中干燥4h,然后在干燥器中保存备用;所述结合垫上喷设标记抗体复合物,然后在室温条件下干燥;所述检测线由多克隆羊抗兔IgG喷在硝酸纤维素膜上得到,所述控制线由小鼠抗羊IgG喷在硝酸纤维素膜上得到;

所述sample pad缓冲液按重量百分比计包括以下溶质:0.05M Tris-HCl、0.15mM NaCl、0.25% Triton X-100和2.5%Tween-20;

将20mg羧基修饰多壁碳纳米管在使用前用加入4.8ml浓硫酸和1.6ml浓硝酸的混合液超声处理6小时后,在10000转/分钟的转速下离心10分钟,然后用超纯水洗涤三次,最后溶于超纯水备用;其中浓硫酸和浓硝酸的体积比为3:1;

所述标记抗体复合物的制备方法为,取9.6mgEDC和5.43mg sulfo-NHS溶于1ml MES缓冲液中,加入0.5mg处理过的碳纳米管使其终浓度在0.5mg/ml;在室温下反应15分钟,在10000转/分钟的转速下离心10min,弃去上清液,用PBS缓冲液重复洗涤2次,最后溶于PBS中,超声3-5秒使溶液分散均匀;然后加入20ug羊抗兔IgG溶液,室温下反应过夜;在5000转/分钟的转速下离心分5钟,弃去上清液,加入PBS缓冲液;在10000转速下离心10分钟,重复洗涤2次已去掉未结合的抗体,最后溶于1ml Eluent 缓冲液中,置于4℃下保存备用;

所述MES缓冲液中溶质浓度为0.1M,其pH值为6.0;

所述Eluent缓冲液包括以下重量百分比的溶质:20mM Na<sub>3</sub>P0<sub>4</sub> • 12H<sub>2</sub>O,10%蔗糖,5% BSA,0.25%Tween-20。

[0024] 试纸条生物传感器的检测方法为,将100μL一定浓度的兔子IgG的检测缓冲液滴加10分钟后,然后用检测缓冲液清洗,在试纸条生物传感器上得到肉眼可观察到的黑色的检测线和控制线,5分钟后,拍照,然后将照片导入电脑,用ImageJ软件对试纸条生物传感器的检测线进行信号转化处理,记录相应的响应信息,从而对数据进行分析处理;

特别的,由羧基修饰多壁碳纳米管为原料制备标记抗体复合物,所述检测缓冲液由PBST和BSA组成。

[0025] 如图1中所示,在检测过程中,加入样品兔子IgG,兔子IgG与结合垫上的标记抗体复合物发生特异性结合,然后兔子IgG与标记抗体复合物即MWCNTs-antibody-IgG免疫复合物,此免疫复合物继续向前移动,到达检测线时,该免疫复合物与固定在检测线上的多克隆羊抗兔IgG抗体发生免疫结合,形成MWCNTs-antibody-IgG-antibody双抗夹心结构,同时羧基修饰多壁碳纳米管也停留在此区域,从而出现一条黑色的检测线;剩余未结合的MWCNTs-

antibody继续移动,到达控制线时被固定在此的小鼠抗羊IgG (secondary antibody) 捕获,形成第二条黑线;

当样品中不含有目标IgG时,检测线没有颜色而控制线会形成一条黑线,以此说明试纸条的有效性。

[0026] 依次调整制备试纸条生物传感器以及检测过程中各条件,按照上述检测方法在兔子IgG在浓度为5ng/ml的条件下,得到各条件的改变对检测线对应相应信号,并进行分析;得到影响碳纳米管标记的试纸条生物传感器检测灵敏度的主要条件包括制备标记抗体复合物时抗体的添加量、检测线上多克隆羊抗兔IgG的浓度、结合垫上标记抗体复合物的量以及检测缓冲液中BSA的浓度。

[0027] 设置实验分别根据以上主要条件对各组进行调整,具体内容如下:

1. 制备标记抗体复合物时抗体的添加量

设置用于制备标记抗体复合物的抗体原料羊抗兔IgG溶液的浓度为5μg/ml、10μg/ml、20μg/ml、50μg/ml,根据图2中检测结果,优选羊抗兔IgG溶液的浓度为20μg/ml;

2. 检测线上多克隆羊抗兔IgG的浓度

在制备检测线时,设置在制备检测线的位置分别用Bio jet BJQ3000对多克隆羊抗兔IgG喷1遍、2遍、3遍,根据图3中检测结果,优选喷2遍效果最佳;

3. 结合垫上标记抗体复合物的量

在加工结合垫时,设置用Air jet AJQ 3000把标记抗体复合物分别喷2遍、3遍、4遍、5遍,根据图4中检测结果,优选喷3遍最佳;

4. 检测缓冲液中BSA的浓度

在检测过程中,检测缓冲液中BSA的浓度分别设置为0%、1%、2%、3%,根据图5中检测结果,优选测缓冲液中BSA的浓度为1%。

[0028] 设置实验

然后分别设置样品浓度为0、0.1、0.2、0.5、0.7、1.0、2.0、5.0、7.0、10、20、50、100ng/ml,使用以上方法制备所得试纸条生物传感器进行检测,检测结果如图6中所示,样品浓度为0.1ng/ml的检测线有一定颜色,经ImageJ软件对试纸条生物传感器的检测线进行信号转化处理后有一定波动

因此,本发明在最优的实验条件下,羧基修饰多壁碳纳米管标记的试纸条生物传感器的检测极限为0.1ng/ml,具有较好的重现性和特异性,相比传统的纳米金标记具有更好的信号效果,为实现对蛋白的超灵敏检测提供了一个简便、快捷的检测手段。

[0029] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

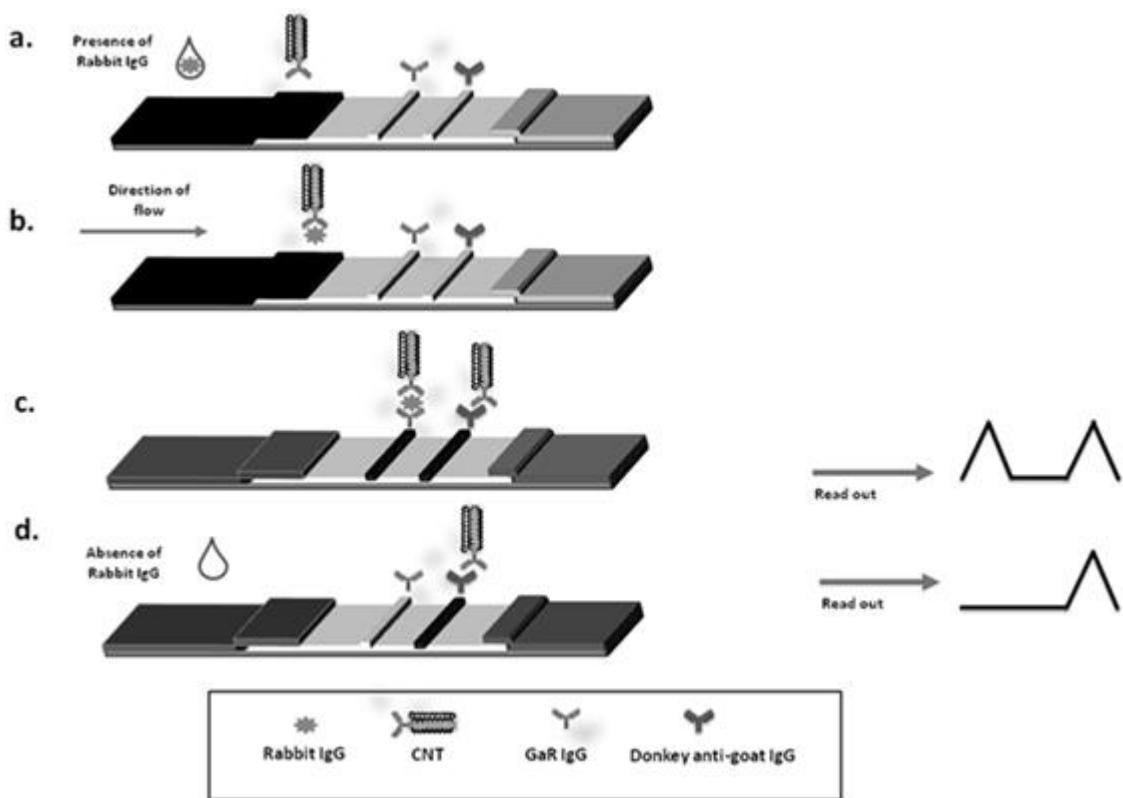


图1

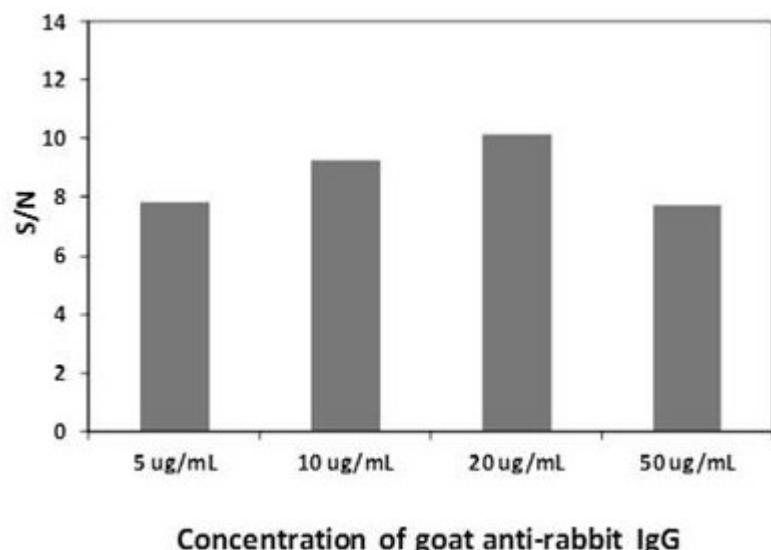


图2

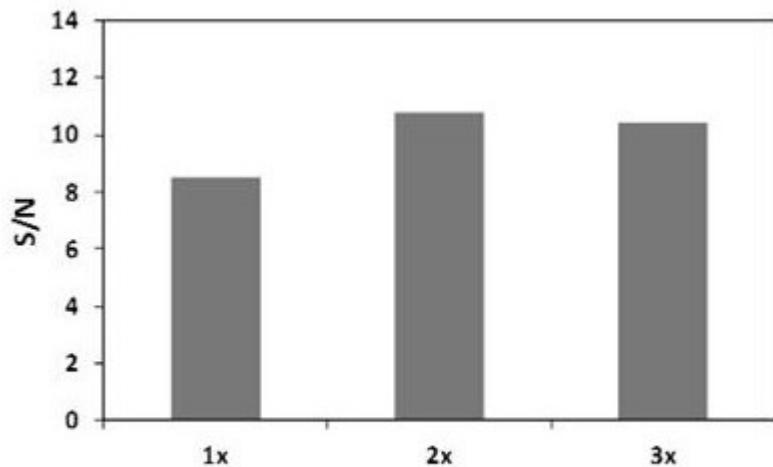


图3

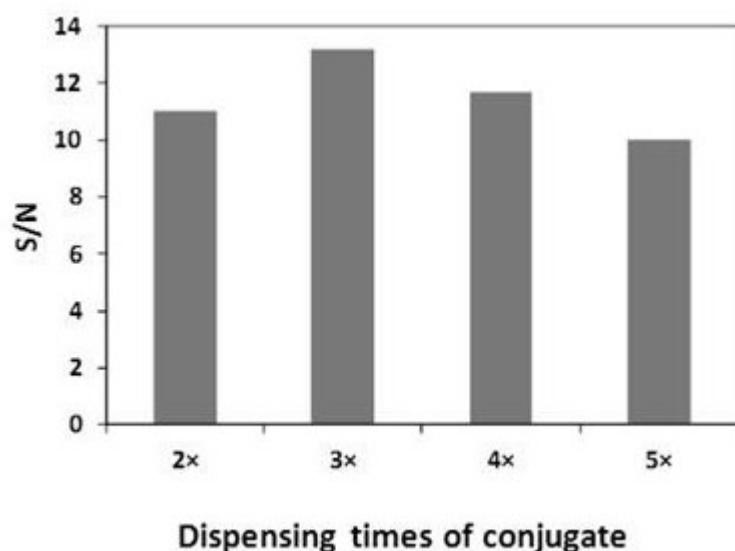


图4

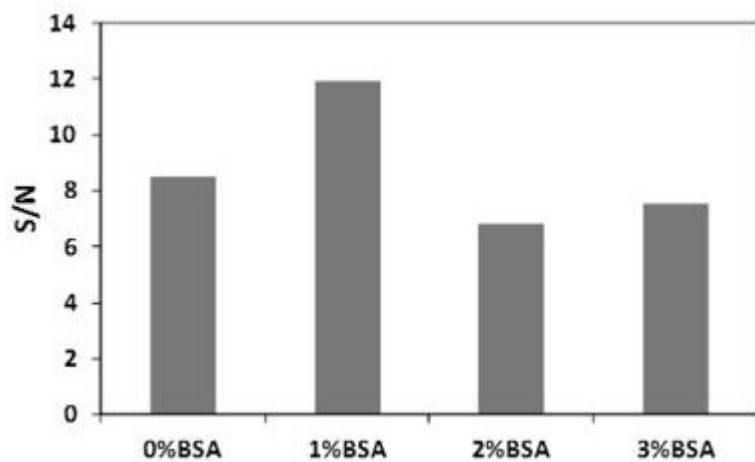


图5

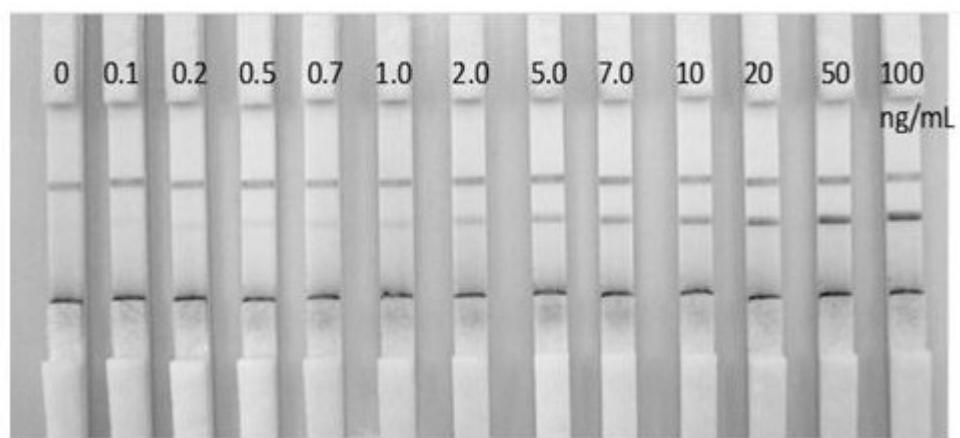


图6

专利名称(译)	一种提高碳纳米管标记的试纸条生物传感器检测灵敏度的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110231489A</a>	公开(公告)日	2019-09-13
申请号	CN201910415524.X	申请日	2019-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	安徽科技学院		
申请(专利权)人(译)	安徽科技学院		
当前申请(专利权)人(译)	安徽科技学院		
[标]发明人	刘国东 范川 邱万伟 钱立生 李坤		
发明人	刘国东 范川 邱万伟 钱立生 李坤		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/6854		
代理人(译)	徐国法		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

### 摘要(译)

本发明属于免疫检测传感器的检测技术领域，具体涉及一种提高碳纳米管标记的试纸条生物传感器检测灵敏度的方法，由羧基修饰多壁碳纳米管为原料制备标记抗体复合物，依次调整制备试纸条生物传感器以及检测过程中条件，在兔子IgG在浓度为5ng/ml的条件下，得到各条件的改变对检测线对应相应信号，并进行分析；得到影响碳纳米管标记的试纸条生物传感器检测灵敏度的主要条件包括制备标记抗体复合物时抗体的添加量、检测线上多克隆羊抗兔IgG的浓度、结合垫上标记抗体复合物的量以及检测缓冲液中BSA的浓度。本发明相比现有技术具有以下优点：在最优条件下，检测极限为0.1ng/ml，实现简便、快捷的对蛋白进行超灵敏检测。

