



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114441615 B

(45) 授权公告日 2022. 12. 02

(21) 申请号 202111680376.8

G01N 27/06 (2006.01)

(22) 申请日 2021.12.30

G01N 27/07 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114441615 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2022.05.06

CN 113447467 A, 2021.09.28

(73) 专利权人 广州市赛特检测有限公司
地址 510520 广东省广州市天河区高科路
37号自编C栋418

CN 104034881 A, 2014.09.10

CN 111965231 A, 2020.11.20

CN 111562368 A, 2020.08.21

CN 113049637 A, 2021.06.29

CN 215297225 U, 2021.12.24

US 2011053139 A1, 2011.03.03

(72) 发明人 张秀娟 夏铭辰 曹健 郑永旭
林炳然

Suzanne Witt 等. Boron doped diamond thin films for the electrochemical detection of SARS-CoV-2 S1 protein. 《Diamond and Related Materials》. 2021, 第118卷

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202
专利代理师 颜希文 郝传鑫

审查员 佟莹

(51) Int. Cl.

G01N 27/327 (2006.01)

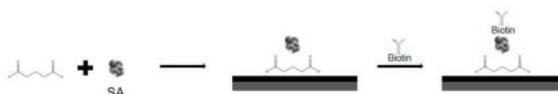
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

一种检测新冠病毒的电阻抗生物传感器电极的修饰方法

(57) 摘要

本发明提供一种检测新冠病毒的电阻抗生物传感器电极的修饰方法,该方法采用戊二醛作为基底连接层材料,将链酶亲和素固定在两电极之间,戊二醛干燥后具有较强的结合力,并且链酶亲和素与生物素之间是通过共价键的形式结合,这种组合式的化学修饰方法具有较高的稳定性,不易脱落。本发明生物探针中的生物活性物质能特异性识别目标物质的结合位点,并与结合位点发生特异性结合。与现有电化学生物传感器相比,具有操作简单,方便使用的优点。



1. 一种检测新冠病毒的电阻抗生物传感器电极的修饰方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将NHS、生物素加入到水中,配制生物素活化液;将生物素活化液加入到抗体溶液中,在室温下搅拌,保温2~4h;

(2) 向步骤(1)所得溶液中加入氯化铵溶液,在室温下搅拌10~30min;

(3) 用PBS缓冲液对步骤(2)所得溶液进行透析;将透析液上1mL分子筛柱进行柱层析,以PBS为洗脱液,收集1mL/管,带生物素标记的抗体溶液在1~3mL之间洗下;

(4) 将戊二醛和链酶亲和素混合,在4℃静置8~10h,配制生物探针基底溶液;

(5) 传感器表面用氧气或空气等离子体处理30~60s,去掉传感器修饰区域表面细小颗粒;

(6) 将生物探针基底溶液均匀喷涂于两个电极之间,自然干燥至形成半透明的薄膜;

(7) 将步骤(3)得到的带生物素标记的抗体溶液均匀滴涂到步骤(6)所形成的半透明薄膜上,孵育5~30min;

所述步骤(4)中,选用质量分数为2.5%的戊二醛溶液和浓度为100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链酶亲和素按体积比为1:1混合;

所述步骤(1)中,生物素在生物素活化液中的浓度为1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,NHS在生物素活化液中的浓度为2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,对生物素进行活化的时间为1~2h;

所述步骤(1)中,每1mL抗体溶液中加入120 μL 生物素活化液;所述抗体在抗体溶液中的浓度为1mg/mL;

所述步骤(2)中所加入的氯化铵溶液的浓度为1mol/L;每1mL步骤(1)所制溶液中加入8~9 μL 氯化铵溶液;

所述步骤(7)中,带生物素标记的抗体溶液的滴涂量为40~50mL,带生物素标记的抗体溶液中抗体的浓度为0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

电极选自以下材料中的任意一种:金、铂金、铜、玻碳、FTO、ITO。

2. 根据权利要求1所述电阻抗生物传感器电极的修饰方法,其特征在于,所述步骤(1)中,抗体为单克隆抗体,抗体溶液的溶剂为水。

3. 根据权利要求1所述电阻抗生物传感器电极的修饰方法,其特征在于,所述步骤(3)中,选用0.01M的pH为7~8的PBS缓冲液,在4℃下对步骤(2)所得溶液透析2h。

4. 根据权利要求1所述电阻抗生物传感器电极的修饰方法,其特征在于,所述步骤(6)中,生物探针基底溶液的喷涂量为40~50 μL 。

一种检测新冠病毒的电阻抗生物传感器电极的修饰方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物传感器技术领域,具体涉及一种检测新冠病毒的电阻抗生物传感器电极的修饰方法。

背景技术

[0002] 新型冠状病毒的检测方法主要包含核酸检测、抗体检测、抗原检测几种方法。由于抗原检测检出率较低,目前新冠检测主要集中在抗体和核酸检测。核酸检测目前是新型冠状病毒检测的“金标准”,具有早期诊断、灵敏度和特异性高等特点,但这种方法需要相应的实时荧光定量PCR仪和专业技术人员等特定条件才能实现;抗体检测操作便捷、检测迅速,可作为核酸诊断的补充手段,但抗体检测容易出现“假阳性”和“假阴性”的情况,因此,发展更为简便和易于推广的检测方法迫在眉睫。

[0003] 生物传感器主要包括的结构有:受体层,其可以具有固定在表面上的大量受体,例如抗体、半抗原、DNA、细胞或酶;信号转换器,其输出与结合在受体层上的被分析物的量相关的测量信号;以及信号处理系统,其用于放大和/或进一步处理有信号转换器输出的测量信号。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术存在的不足之处而提供一种检测新冠病毒的电阻抗生物传感器的修饰方法。

[0005] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案为:

[0006] 一种检测新冠病毒的电阻抗生物传感器的修饰方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 将NHS、生物素加入到水中,配制生物素活化液;将生物素活化液加入到抗体溶液中,在室温下搅拌,保温2~4h;

[0008] (2) 向步骤(1)所得溶液中加入氯化铵溶液,在室温下搅拌10~30min;

[0009] (3) 用PBS缓冲液对步骤(2)所得溶液进行透析;将透析液上1mL分子筛柱进行柱层析,以PBS为洗脱液,收集1mL/管,带生物素标记的抗体溶液在1~3mL之间洗下;

[0010] (4) 将戊二醛和链酶亲和素混合,在4℃静置8~10h,配制生物探针基底溶液;

[0011] (5) 传感器表面用氧气或空气等离子体处理30~60s,去掉传感器修饰区域表面细小颗粒;表面等离子体处理是为了清除掉传感器基层、两电极表面上的一些微小颗粒,让修饰物质结合的更加牢固。

[0012] (6) 将生物探针基底溶液均匀喷涂于两个电极之间,自然干燥至形成半透明的薄膜;

[0013] (7) 将步骤(3)得到的带生物素标记的抗体溶液均匀滴涂到步骤(6)所形成的半透明薄膜上,孵育5~30min。

[0014] 本发明技术方案采用戊二醛作为基底连接层材料,将链酶亲和素固定在两电极之间,戊二醛干燥后具有较强的结合力,并且链酶亲和素与生物素之间是通过共价键的形式

结合,这种组合式的化学修饰方法具有较高的稳定性,不易脱落。

[0015] 本发明技术方案所制备的电阻抗生物传感器的工作原理为:待检测的样本接触传感器后,样本中的目标物质被生物探针捕获并特异性结合,结合后传感器表面的电阻抗上升;通过给予特定的电压,检测前后电流的大小,来反应电阻抗的变化。若阻抗值上升,则表明样本中有目标物质,若无变化则表明样本中没有目标物质。

[0016] 作为本发明的优选技术方案,所述步骤(1)中,生物素在生物素活化液中的浓度为 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$,NHS在生物素活化液中的浓度为 $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$,对生物素进行活化的时间为 $1\sim 2\text{h}$ 。

[0017] 作为本发明的优选技术方案,所述步骤(1)中,每 1mL 抗体溶液中加入 $120\mu\text{L}$ 生物素活化液;所述抗体在抗体溶液中的浓度为 $1\text{mg}/\text{mL}$ 。

[0018] 作为本发明的优选技术方案,所述步骤(1)中,抗体为单克隆抗体,所述单克隆抗体为抗S蛋白单克隆抗体(SARS-CoV-2(2019-nCoV) Spike Neutralizing Antibody,Rabbit Mab),购自义翘神州科技股份有限公司(货号:40592-R117)。抗体溶液的溶剂为水。

[0019] 作为本发明的优选技术方案,所述步骤(2)中所加入的氯化铵溶液的浓度为 $1\text{mol}/\text{L}$;每 1mL 步骤(1)所制溶液中加入 $8\sim 9\mu\text{L}$ 氯化铵溶液。

[0020] 作为本发明的优选技术方案,所述步骤(3)中,选用 0.01M 的 pH 为 $7\sim 8$ 的PBS缓冲液,在 4°C 下对步骤(2)所得溶液透析 2h 。

[0021] 作为本发明的优选技术方案,所述步骤(4)中,选用质量分数为 2.5% 的戊二醛溶液和浓度为 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉亲和素按体积比为 $1:1$ 混合。本发明生物探针固定层中的戊二醛可在传感器表面形成一层稳定的膜作为生物探针的基底,其中混的链霉亲和素可以与生物活性物质上标记的生物素通过共价键进行特异性结合,从而将生物探针固定在传感器表面。

[0022] 作为本发明的优选技术方案,所述步骤(6)中,生物探针基底溶液的喷涂量为 $40\sim 50\mu\text{L}$ 。

[0023] 作为本发明的优选技术方案,所述步骤(7)中,带生物素标记的抗体溶液的滴涂量为 $40\sim 50\mu\text{L}$,带生物素标记的抗体溶液中抗体的浓度为 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0024] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于,生物探针固定层中的戊二醛可在传感器表面形成一层稳定的膜作为生物探针的基底,其中混的链霉亲和素可以与生物活性物质上标记的生物素通过共价键进行特异性结合,从而将生物探针固定在传感器表面。生物探针中的生物活性物质能特异性识别目标物质的结合位点,并与结合位点发生特异性结合。与现有电化学生物传感器相比,具有操作简单,方便使用的优点。

附图说明

[0025] 图1为本发明电阻抗生物传感器电极的修饰方法示意图;

[0026] 图2为本发明电阻抗生物传感器电极的修饰流程图;

[0027] 图3为不同浓度新冠病毒S蛋白低频交流电阻抗测试曲线图;

[0028] 图4为不同浓度新冠病毒S蛋白与波峰电阻抗值的线性关系图;

[0029] 图5为本发明实施例1用于新冠病毒检测的电阻抗生物传感器对新冠病毒的特异性响应图。

具体实施方式

[0030] 为更好的说明本发明的目的、技术方案和优点,下面将结合具体实施例对本发明作进一步说明。

[0031] 实施例1

[0032] 一种用于新冠病毒检测的电阻抗生物传感器,包括在所述用于新冠病毒检测的电阻抗生物传感器的工作电极上修饰生物探针固定层和电化学生物探针。所述工作电极选自以下材料中的任意一种:金、铂金、铜、玻碳、FTO、ITO。

[0033] 实施例2

[0034] 一种电阻抗生物传感器电极的修饰方法,包括以下步骤:

[0035] (1) 向1mL 1mg/mL抗体溶液加入120 μ L 1 μ g/ μ L NHS活化的生物素溶液(EZ-LinkTM NHS-SS-生物素,购自Thermofisher,货号:21441),在室温下持续搅拌,保温2-4小时。

[0036] (2) 加入9.6 μ L 1 mol/L NH_4Cl ,在室温下搅拌10分钟。

[0037] (3) 在4 $^{\circ}\text{C}$,使用100ml PBS (0.01M pH=7.4)充分透析混合溶液2h,以除去游离的生物素。将透析液上1ml的分子筛柱,以PBS缓慢洗脱,收集1ml/管,带生物素标记的抗体溶液在1~3ml之间洗下。

[0038] (4) 将浓度为2.5%的戊二醛和浓度为100 μ g/mL的链酶亲和素按体积比为1:1混合,在4 $^{\circ}\text{C}$ 静置8-10h,配制生物探针基底溶液。

[0039] (5) 传感器表面用氧气或空气等离子体处理30s-60s,去掉传感器修饰区域表面细小颗粒。

[0040] (6) 将40 μ L生物探针基底溶液均匀喷涂于两个电极之间,自然干燥至形成半透明的薄膜。

[0041] (7) 将40 μ L 0.1 μ g/mL的带生物素标记的抗体溶液(pH=7-8)均匀的滴涂到生物探针基底层上,孵育5mins-30mins后,生物素与链酶亲和素特异性结合,抗体探针固定在传感器上。

[0042] 实施例3

[0043] 采用实施例1的电阻抗生物传感器用于检测新冠病毒,检测方法包括如下步骤:

[0044] (1) 使用阻抗分析仪测量干燥情况下实施例2中的电阻抗生物传感器空白基础阻抗值 R_b ;

[0045] (2) 将40 μ L检测样本溶液均匀滴加到电阻抗生物传感器进行室温孵育5-30mins,再使用去离子水冲洗未结合样本溶液,静置干燥。

[0046] (3) 使用阻抗分析仪测量孵育样本后的电阻抗生物传感器阻抗值 R_{ct} ,计算 R_{ct} 与 R_b 变化量 $\Delta R = R_{ct} - R_b$ 判断是否检出新冠病毒。

[0047] 由图3可知,该电阻抗生物传感器可检测SARS-CoV-2 (2019-nCoV),在加入SARS-CoV-2 (2019-nCoV) S蛋白溶液后,计时电流数值上升,并且与0pg/mL数值变化有显著性差异。

[0048] 由图4可知,该电阻抗生物传感器可检测SARS-CoV-2 (2019-nCoV),在加入SARS-CoV-2 (2019-nCoV) S蛋白溶液后,计时电流数值上升,电流数值与浓度呈线性关系。

[0049] 实施例4特异性试验

[0050] (1) 使用阻抗分析仪测量干燥情况下实施例2中的电阻抗生物传感器空白基础阻

抗值 R_b ;

[0051] (2) 将40 μ L检测阴性对照溶液(MERS-CoV Spike Protein、HCoV-NL63Spike Protein、ddH₂O)均匀滴加到电阻抗生物传感器进行室温孵育5-30mins,再使用去离子水冲洗未结合样本溶液,静置干燥。

[0052] (3) 使用阻抗分析仪测量孵育样本后的电阻抗生物传感器阻抗值 R_{ct} ,计算 R_{ct} 与 R_b 变化量 $\Delta R=R_{ct}-R_b$ 判断是否检出。

[0053] 由图5可知,该电阻抗生物传感器可检测SARS-CoV-2(2019-nCoV),并且对MERS-Cov、HCoV-NL63、ddH₂O无响应。在加入阴性对照溶液后,计时电流数值上升,但数值变化与阳性样本存在显著性差异。

[0054] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

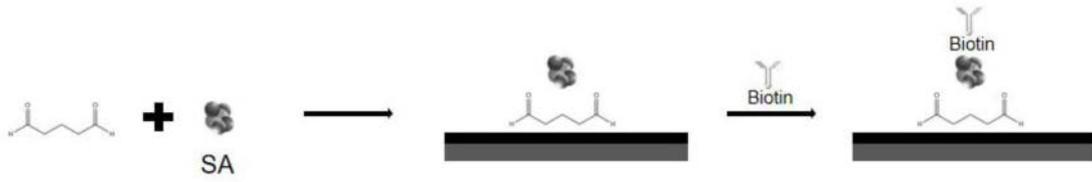


图1



图2

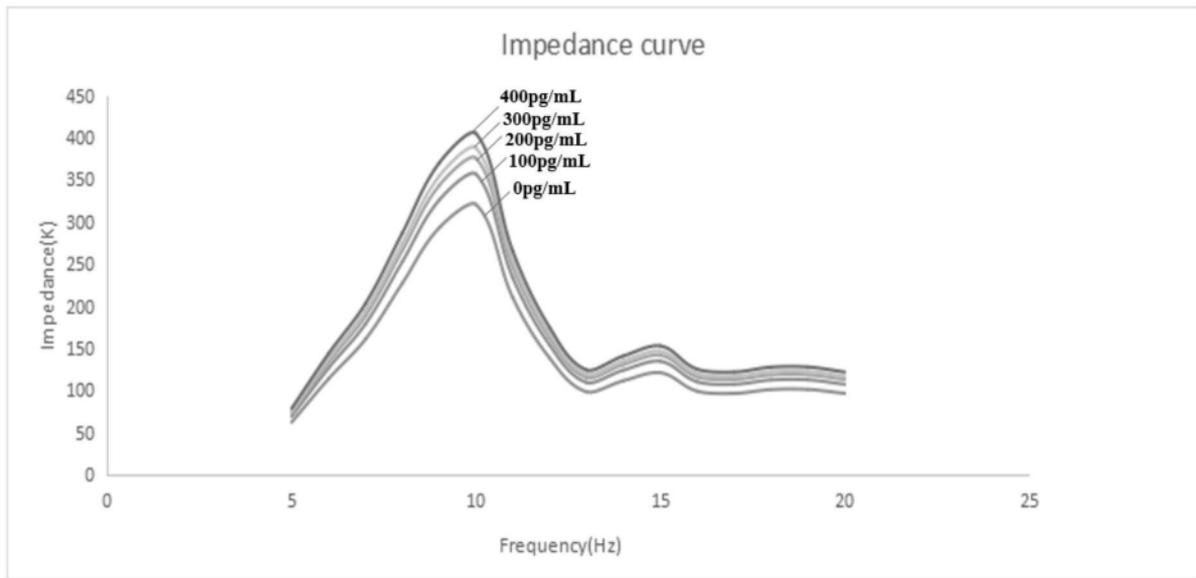


图3

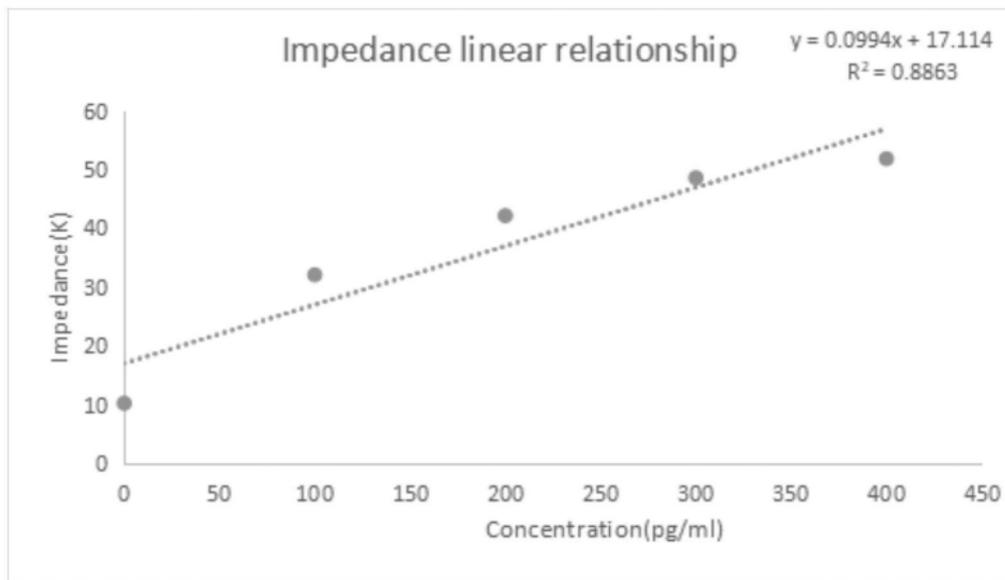


图4

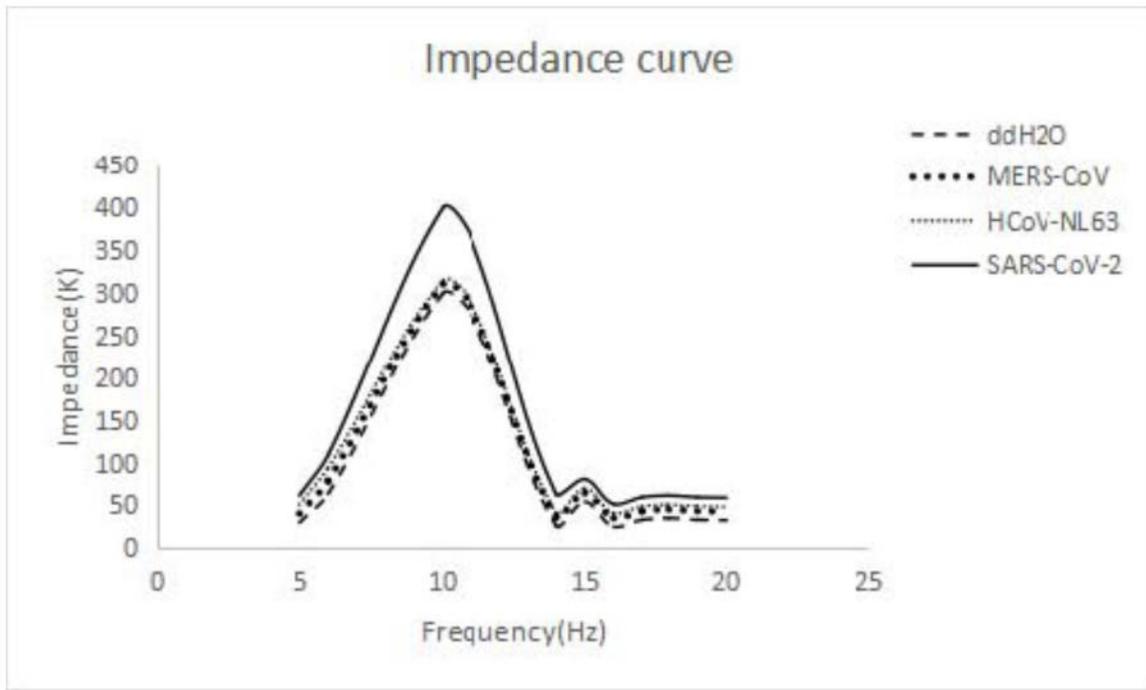


图5