



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116338180 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 27

(21) 申请号 202310246823.1

(22) 申请日 2023.03.14

(71) 申请人 重庆医科大学

地址 400016 重庆市渝中区医学院路1号

(72) 发明人 陈婷梅 李鑫 程伟 申波

刘长金

(74) 专利代理机构 重庆渝之知识产权代理有限公司

公司 50249

专利代理师 彭周

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

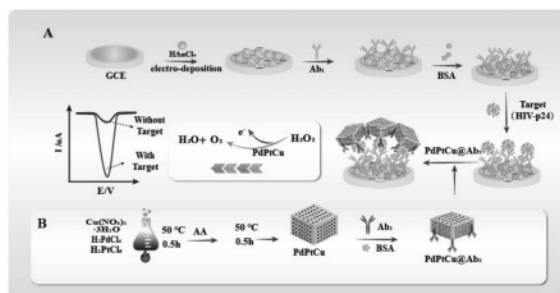
权利要求书1页 说明书9页
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

基于金属纳米酶的电化学生物免疫传感器及其制备与在艾滋病检测中的应用

(57) 摘要

本发明属于医学与生物化学技术领域,具体公开了一种基于金属纳米酶的电化学生物免疫传感器及其制备与在艾滋病检测中的应用。所述电化学生物免疫传感器包括工作电极和生物共轭物,所述工作电极包括基底电极与固定在基底电极上的捕获抗体Ab1,所述捕获抗体Ab1用于捕获待测艾滋病抗原;所述生物共轭物包括能与所述待测艾滋病抗原相结合的标记抗体Ab2和与所述标记抗体Ab2交联的金属纳米酶,所述金属纳米酶具有类过氧化物酶活性。本发明利用金属纳米酶类过氧化物酶催化活性的特性,结合电化学免疫传感技术,实现对待测艾滋病抗原(如HIV-p24抗原)的高灵敏度检测,能有效缩短检测窗口期,为艾滋病的检测和研究提供新的思路。



1. 一种基于金属纳米酶的电化学生物免疫传感器,其特征在于,包括工作电极和生物共轭物,所述工作电极包括基底电极与固定在基底电极上的捕获抗体Ab1,所述捕获抗体Ab1用于捕获待测艾滋病抗原;所述生物共轭物包括能与所述待测艾滋病抗原相结合的标记抗体Ab2和与所述标记抗体Ab2交联的金属纳米酶,所述金属纳米酶具有类过氧化物酶活性。

2. 根据权利要求1所述的电化学生物免疫传感器,其特征在于:所述待测艾滋病抗原为HIV-p24抗原,所述捕获抗体Ab1为HIV-p24兔抗体,所述标记抗体Ab2为HIV-p24单克隆抗体;

和/或,所述金属纳米酶为三元素金属立方体介孔纳米复合材料PdPtCu NPs;

和/或,所述基底电极为氧化石墨烯/玻碳电极。

3. 根据权利要求2所述的电化学生物免疫传感器,其特征在于:所述基底电极为表面修饰有纳米金的氧化石墨烯/玻碳电极。

4. 根据权利要求1所述的电化学生物免疫传感器,其特征在于:所述生物共轭物的用量为5~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

和/或,所述工作电极与所述生物共轭物之间通过双抗体夹心免疫反应相结合,所述双抗体夹心免疫反应时间为30~75min。

5. 根据权利要求1所述的电化学生物免疫传感器,其特征在于:所述电化学生物免疫传感器还包括电解质溶液,所述电解质溶液为含 H_2O_2 的缓冲液。

6. 根据权利要求5所述的电化学生物免疫传感器,其特征在于:所述缓冲液中 H_2O_2 的浓度为5.0~15.0mM。

7. 一种根据权利要求1~6任一项所述的电化学生物免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

将所述捕获抗体Ab1固定在基底电极上,制得工作电极;

将待测液滴加在所述工作电极上,进行第一次孵育;

第一次孵育结束后,清洗工作电极,加入所述生物共轭物,进行第二次孵育。

8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于:第一次孵育和第二次孵育的反应温度均为37 $^{\circ}\text{C}$;

和/或,第一次孵育反应时间为30~75min;

和/或,第二次孵育反应时间为30~75min;

和/或,将所述捕获抗体Ab1固定在基底电极上,制得工作电极的方法包括如下步骤:将所述捕获抗体Ab1滴加到基底电极上,进行孵育,然后用牛血清白蛋白溶液阻断非特异性结合位点,再进行清洗,得到所述工作电极。

9. 根据权利要求1~6任一项所述的电化学生物免疫传感器和/或根据权利要求7~8任一项所述的方法在制备艾滋病抗原检测试剂中的应用,所述应用非疾病诊断或治疗目的。

10. 一种非疾病诊断或治疗目的的待测艾滋病抗原检测方法,其特征在于:采用权利要求1~6任一项所述的电化学生物免疫传感器和/或根据权利要求7~8任一项所述的方法制备得到的电化学生物免疫传感器对待测液中待测艾滋病抗原进行定性和/或定量分析。

基于金属纳米酶的电化学生物免疫传感器及其制备与在艾滋病检测中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医学与生物化学技术领域,特别是涉及一种基于金属纳米酶的电化学生物免疫传感器及其制备与在艾滋病检测中的应用。

背景技术

[0002] 艾滋病是影响公众健康的重要公共卫生问题之一。纵观HIV/AIDS患者的实验室检测技术发展历程,HIV的诊断技术有抗体检测、抗原抗体联合检测和核酸检测。随着科技革新,技术发展,HIV抗体和HIV-p24抗原同时检测提高了检测灵敏度,检测结果能够区分HIV抗体和HIV-p24抗原,更有利于判断HIV感染的阶段,助力精准临床诊疗。查阅文献我们发现有这样两个概念:核酸检测收益,即血液筛查得到的血清学指标阴性而相应核酸指标检出阳性的结果。精英控制者,即一类感染HIV后不服药也不会发病的病人,其外周血中抗-HIV阳性,但HIV RNA常因病毒载量低而无法检出(HIV核酸检测阴性)。该类病人占HIV感染者总数的比例小于1%。由此可知,不同方法学检测也有各自检测限。尽管,HIV核酸检测最为敏感,优于酶联免疫检测,可有效缩短窗口期。同时也有研究显示,核酸检测可将HIV感染窗口期缩短至2.93天。但它距离广泛运用于HIV初筛还有一定距离。这是因为,这种检测出报告较慢,实验室环境,场地布局要求较高,且价格过于昂贵。对成年人来说,除可能暴露HIV后处在严重恐艾情绪中的人,一般还是推荐在2-3周后进行抗原抗体联合实验或在4到6周后进行抗体筛查。因此,对HIV-p24抗原检测更实用可行,对HIV-p24抗原检测的方法学研究和拓展很有必要。

[0003] 近些年,贵金属纳米材料,纳米酶检测技术,表面等离子共振成像(SPRI)技术,生物传感技术的研究发展迅速,在上述方法的基础上大大提高了检测的灵敏度,扩大临床检测范围,对疾病的早期诊断和干预有一定的指导意义。电化学免疫传感技术是一种基于生物传感技术相关测定原理的、将免疫测定和传感技术进行结合而设计制造的一类新型的电化学传感器,它不仅能将免疫分子固定到电极表面,同时通过高灵敏传感技术捕捉电极表面产生电化学信号变化,还能将捕捉到的电化学信号转化成可检测的电学信号,从而将待测分子的浓度进行准确的定量检测。电化学免疫传感技术具有便携、响应快、高灵敏和低成本等优点,因此其最常被应用于抗原的测定。

[0004] 然而,先前报道的大多数抗原电化学免疫传感器一般是在传感电极界面直接构筑的,这在应对复杂生物样品检测时常常会面临如下一些问题:冗长繁琐的检测步骤、检测灵敏度低和电极界面易于被蛋白质钝化等。近年来,随着纳米技术的发展,研究者们合成了许多具有特定结构和功能的纳米材料。具有成本低、稳定性强而且可回收再利用等优点的纳米酶越来越多的出现在人们的面前。纳米酶通过与传统的比色法、荧光法及电化学检测法结合,通过反应系统的颜色、荧光和电流信号的变化实现对被测成分定量地检测,已在检测生物分子的领域发挥重要作用。根据纳米酶模拟天然酶的功能,可把纳米酶简单地分为类过氧化物酶、类氧化酶、类过氧化氢酶和类超氧化物歧化酶等几类。如今,许多种类纳米材

料:金属氧化物纳米材料、碳纳米材料、金属纳米材料、金属硫化物纳米材料和纳米复合材料已经被证实具有过氧化物酶催化活性。

[0005] 基于此,若将具有过氧化物酶催化活性的金属纳米酶应用到电化学免疫传感技术中,或许能解决目前抗原电化学免疫传感器存在的问题,为临床传染病学和感染性疾病、临床经血传播疾病领域对HIV-p24抗原检测的方法学研究和拓展提供新思路。

发明内容

[0006] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的目的在于提供一种基于金属纳米酶的电化学免疫传感器及其制备与在艾滋病检测中的应用,用于解决现有技术中抗原电化学免疫传感器存在的冗长繁琐的检测步骤、检测灵敏度低和电极界面易于被蛋白质钝化,为艾滋病检测特别是HIV-p24抗原的检测提供一种新的技术手段。

[0007] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明第一方面提供一种基于金属纳米酶的电化学免疫传感器,包括工作电极和生物共轭物,所述工作电极包括基底电极与固定在基底电极上的捕获抗体Ab1,所述捕获抗体Ab1用于捕获待测艾滋病抗原;所述生物共轭物包括能与所述待测艾滋病抗原相结合的标记抗体Ab2和与所述标记抗体Ab2交联的金属纳米酶,所述金属纳米酶具有类过氧化物酶活性。

[0008] 进一步,所述待测艾滋病抗原为HIV-p24抗原,所述捕获抗体Ab1为HIV-p24兔抗体,所述标记抗体Ab2为HIV-P24单克隆抗体。

[0009] 进一步,所述金属纳米酶为三元素金属立方体介孔纳米复合材料PdPtCu NPs。

[0010] 进一步,所述三元素金属立方体介孔纳米复合材料PdPtCu NPs的制备方法包括如下步骤:

[0011] 在表面活性剂的水溶液中加入钯的水溶性盐、铂的水溶性盐、铜的水溶性盐、抗坏血酸,通过水热和溶剂热法制备得到三元素金属立方体介孔纳米复合材料PdPtCu NPs。

[0012] 进一步,所述三元素金属立方体介孔纳米复合材料PdPtCu NPs的制备方法包括如下步骤:

[0013] 在表面活性剂的水溶液中加入氯化钾、钯的水溶性盐、铂的水溶性盐、铜的水溶性盐,于45~55℃孵育20~40分钟,然后加入抗坏血酸,反应20~40分钟,再离心收集产物,洗涤,得到三元素金属立方体介孔纳米复合材料PdPtCu NPs。

[0014] 进一步,所述表面活性剂选自十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)中的任意一种。

[0015] 进一步,所述钯的水溶性盐选自 H_2PdCl_4 ,铂的水溶性盐选自 H_2PtCl_6 ,铜的水溶性盐 $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ 。

[0016] 进一步,表面活性剂、氯化钾、 Pd^{2+} 、 Pt^{2+} 、 Cu^{2+} 、抗坏血酸的摩尔比为1:0.15~0.3:0.02~0.03:0.05~0.08:0.01~0.02:1~2。

[0017] 进一步,所述基底电极为氧化石墨烯/玻碳电极。

[0018] 进一步,所述基底电极为表面修饰有纳米金的氧化石墨烯/玻碳电极。

[0019] 进一步,所述生物共轭物的用量为5~20 $\mu g/mL$,优选为5~15 $\mu g/mL$,更优选为8~12 $\mu g/mL$,最优选为10 $\mu g/mL$ 。

[0020] 进一步,所述工作电极与所述生物共轭物之间通过双抗体夹心免疫反应相结合,

所述双抗体夹心免疫反应时间为30~75min,优选为45~75min,更优选为50~70min,最优选为60min。

[0021] 进一步,所述电化学生物免疫传感器还包括电解质溶液,所述电解质溶液为含 H_2O_2 的缓冲液。

[0022] 进一步,所述缓冲液中 H_2O_2 的浓度为5.0~15.0mM,优选为7.5~12.5mM,更优选为9~11mM,最优选为10mM。

[0023] 进一步,所述缓冲液为PBS缓冲液,优选为0.01M,pH=7.4的PBS缓冲液。

[0024] 进一步,所述电化学生物免疫传感器的标准曲线为 $Y = -8.58321gC - 116.94$,线性范围为 $0.00004 \sim 100.0ng\ ml^{-1}$,检出限为 $20fg\ ml^{-1}$ 。

[0025] 本发明第二方面提供一种如第一方面所述的电化学生物免疫传感器的制备方法,包括如下步骤:

[0026] 将所述捕获抗体Ab1固定在基底电极上,制得工作电极;

[0027] 将待测液滴加在所述工作电极上,进行第一次孵育;

[0028] 第一次孵育结束后,清洗工作电极,加入所述生物共轭物,进行第二次孵育。

[0029] 进一步,第一次孵育和第二次孵育的反应温度均为 $37^\circ C$ 。

[0030] 进一步,第一次孵育反应时间为30~75min,优选为45~75min,更优选为50~70min,最优选为60min。

[0031] 进一步,第二次孵育反应时间为30~75min,优选为45~75min,更优选为50~70min,最优选为60min。

[0032] 进一步,将玻碳电极置于氧化石墨烯分散液中,孵化烘干,制得氧化石墨烯/玻碳电极,作为基底电极;优选地,所述氧化石墨烯分散液的浓度为 $1.0 \sim 2.0mg/mL$ 。

[0033] 进一步,将玻碳电极置于氧化石墨烯分散液中,孵化烘干,制得氧化石墨烯/玻碳电极;再在所述氧化石墨烯/玻碳电极上修饰纳米金,制得所述基底电极。

[0034] 进一步,孵化温度为 $37^\circ C$ 。

[0035] 进一步,将所述氧化石墨烯/玻碳电极置于金前驱体盐溶液中,通过电沉积方式在所述氧化石墨烯/玻碳电极修饰纳米金,制得所述基底电极;所述金前驱体盐选自氯金酸,所述金前驱体盐溶液的浓度为 $25 \sim 35mM$ 。

[0036] 进一步,在制备氧化石墨烯/玻碳电极之前,所述玻碳电极经过抛光、清洗和干燥处理。

[0037] 进一步,将所述捕获抗体Ab1固定在基底电极上,制得工作电极的方法包括如下步骤:将所述捕获抗体Ab1滴加到基底电极上,进行孵育,然后用牛血清白蛋白溶液阻断非特异性结合位点,再进行清洗,得到所述工作电极。优选地,孵育和/或用牛血清白蛋白溶液阻断非特异性结合位点的反应温度为 $37^\circ C$,时间为30~75min,优选为45~75min,更优选为50~70min,最优选为60min。

[0038] 进一步,所述制备方法中,用缓冲液对电极进行清洗,所述缓冲液为PBS缓冲液,优选为0.01M,pH=7.4的PBS缓冲液。

[0039] 本发明第三方面提供根据第一方面所述的电化学生物免疫传感器或根据第二方面所述的制备方法在制备艾滋病抗原检测试剂中的应用,所述应用非疾病诊断或治疗目的。

[0040] 本发明第四方面提供一种非疾病诊断或治疗目的的待测艾滋病抗原检测方法,采用第一方面所述的电化学生物免疫传感器或根据第二方面所述的方法制备得到的电化学生物免疫传感器对待测液中待测艾滋病抗原进行定性和/或定量分析。

[0041] 进一步,所述检测方法包括如下步骤:

[0042] 第二次孵育结束后,清洗工作电极,再将工作电极置于电解质溶液中,测量电化学信号。

[0043] 进一步,在-0.1至-0.5V的电位扫描下用差分脉冲伏安法(DPV)测量电化学信号,振幅为70mV,脉冲宽度为50ms,脉冲周期为200ms。

[0044] 如上所述,本发明的基于金属纳米酶的电化学生物免疫传感器及其制备与在艾滋病检测中的应用,具有以下有益效果:

[0045] 1、本发明利用金属纳米酶类过氧化物酶催化活性的特性,结合电化学免疫传感技术,实现对待测艾滋病抗原(如HIV-p24抗原)的高灵敏度检测,能有效缩短检测窗口期,为临床传染病学和感染性疾病、临床经血传播疾病领域对艾滋病检测的方法学研究和拓展提供新思路。

[0046] 2、本发明解决了现有技术(固定化的电极传感界面)存在的冗长繁琐的检测步骤、检测灵敏度低和电极界面易于被蛋白质钝化等问题。本发明所提出的基于金属纳米酶的电化学生物免疫传感器的线性范围可达到 $0.00004\sim 100.0\text{ng ml}^{-1}$,检出限可达到 20fg ml^{-1} (S/N=3),与现有的电化学免疫检测方法对比,本发明方法具有更低的检出限和更高的灵敏度。

[0047] 3、本发明将氧化石墨烯(GO)引入到电化学生物免疫传感器体系中,利用GO含有众多亲水官能团,易于被修饰,比表面积大,分散性好,具有良好的湿敏特性等特点,可以有效避免电极界面的钝化,并且也可以简化免疫检测流程。

[0048] 5、本发明合成的三元金属立方体介孔纳米复合材料PdPtCu NPs具有生物酶辣根过氧化物酶(HRP)催化过氧化氢(H_2O_2)的活性,催化机理简单易得。

[0049] 6、本发明合成的三元素金属立方体介孔纳米复合材料PdPtCu NPs作为信号探针,合成步骤简单,操作简便,环境要求不高,同时因其具有立方体介孔的特性,易与标记抗体高度结合,可以实现其与检测抗原进行高效结合,起到信号放大作用。

附图说明

[0050] 图1显示为本发明实施例中电化学生物免疫传感器的构建过程及检测原理示意图。

[0051] 图2显示本发明一实施例中三元素PdPtCuNPs的TEM表征结果图。

[0052] 图3显示本发明一实施例中所构建的生物传感器的可行性验证结果图。

[0053] 图4显示本发明一实施例中生物传感器的修饰步骤电化学阻抗表征结果图。

[0054] 图5显示本发明一实施例中生物传感器的修饰步骤循环伏安表征结果图。

[0055] 图6显示本发明一实施例中 H_2O_2 的浓度优化结果图。

[0056] 图7显示本发明一实施例中Ab2-PdPtCu NPs的浓度优化结果图。

[0057] 图8显示本发明一实施例中孵育时间优化结果图。

[0058] 图9显示本发明一实施例中检测不同浓度HIV-p24抗原的DPV微分脉冲响应曲线

图。

[0059] 图10显示本发明一实施例中靶标HIV-p24抗原浓度和DPV响应信号的线性回归关系曲线图。

[0060] 图11显示本发明一实施例中检测HIV-p24抗原的选择性考察结果图。

具体实施方式

[0061] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0062] 本发明一实施例提供了一种基于金属纳米酶的电化学生物免疫传感器,包括工作电极和生物共轭物,所述工作电极包括基底电极与固定在基底电极上的捕获抗体Ab1,所述捕获抗体Ab1用于捕获待测艾滋病抗原;所述生物共轭物包括能与所述待测艾滋病抗原相结合的标记抗体Ab2和与所述标记抗体Ab2交联的金属纳米酶,所述金属纳米酶具有类过氧化物酶活性。

[0063] 在本申请的一具体实施方式中,所述待测艾滋病抗原为HIV-p24抗原,其蛋白序列为:

[0064] AVGIGALFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQAR
ILAVERYLKDQQLGIWGCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNHTTWMEWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEK
NEQELLELDKWASLWNWFNITNLWYIKLFIWVGGVGLRIVFAVLSIVNRVRQGYSPFSFQTHLPTPRGPDRPE
GIEEEGGERDRDRSIRLVNGSLALIWDRLSLCLFSYHRLRDLILLIVTRIVELLGRRGWELKYWNLLQYWSQEL
KNSAVSLLNATAIAVAEGTDRVIEVVQGACRAIRHPRRIRQGLERILL;

[0065] 所述捕获抗体Ab1为HIV-p24兔抗体,所述标记抗体Ab2为HIV-p24单克隆抗体。上述抗原、抗体购买于上海领潮生物科技有限公司。

[0066] 在本申请的一具体实施方式中,所述金属纳米酶为三元素金属立方体介孔纳米复合材料PdPtCu NPs。

[0067] 在本申请的一具体实施方式中,所述三元素金属立方体介孔纳米复合材料PdPtCu NPs的制备方法包括如下步骤:

[0068] 在表面活性剂的水溶液中加入钯的水溶性盐、铂的水溶性盐、铜的水溶性盐、抗环血酸,通过水热和溶剂热法制备得到三元素金属立方体介孔纳米复合材料PdPtCu NPs。

[0069] 进一步地,所述三元素金属立方体介孔纳米复合材料PdPtCu NPs的制备方法包括如下步骤:

[0070] 在表面活性剂的水溶液中加入氯化钾、钯的水溶性盐、铂的水溶性盐、铜的水溶性盐,于45~55℃孵育20~40分钟,然后加入抗环血酸,反应20~40分钟,再离心收集产物,洗涤,得到三元素金属立方体介孔纳米复合材料PdPtCu NPs。

[0071] 上述实施例中,所述表面活性剂选自十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)中的任意一种,所述钯的水溶性盐选自PdCl₂,铂的水溶性盐选自H₂PtCl₆,铜的水溶性盐Cu(NO₃)₂·3H₂O;表面活性剂、氯化钾、Pd²⁺、Pt²⁺、Cu²⁺、抗环血酸的摩尔比为1:0.15~0.3:0.02~0.03:0.05~0.08:0.01~0.02:1~2。

[0072] 贵金属钯(Pd)基纳米材料是一类具有优异催化活性的电催化材料,本发明上述实施例以Pd作为主要合金,通过水热和溶剂热法,添加铂(Pt)、铜(Cu)元素,探索具有结构优势以及组分优势的多元三维PdPtCuNPs纳米材料。其中,铜(Cu)的引入可以降低Pd的用量,还可以带来诸如配体效应、应力效应、聚集体效应等协同作用,优化材料的电催化性能;铂(Pt)的引入能够进一步提高催化剂的活性。通过实验验证可以知晓,本发明方法制得PdPtCuNPs具有类过氧化物酶催化活性,基于此,本发明实施例利用该材料类过氧化物酶催化活性,更高的催化活性与稳定性等特性,再结合电化学免疫传感技术,以求对HIV-p24抗原实现高灵敏度检测,有效缩短检测窗口期,为临床传染病学和感染性疾病、临床经血传播疾病领域对HIV-p24抗原检测的方法学研究和拓展提供新思路。

[0073] 在本申请的一具体实施方式中,所述基底电极为氧化石墨烯/玻碳电极,优选为表面修饰有纳米金的氧化石墨烯/玻碳电极。本实施例将氧化石墨烯(GO)引入到电化学生物免疫传感器体系中,利用GO含有众多亲水官能团,易于被修饰,比表面积大,分散性好,具有良好的湿敏特性等特点,可以有效避免电极界面的钝化,并且也可以简化免疫检测流程。

[0074] 在本申请的一具体实施方式中,所述生物共轭物的用量为5~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,优选为5~15 $\mu\text{g}/\text{mL}$,更优选为8~12 $\mu\text{g}/\text{mL}$,最优选为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0075] 在本申请的一具体实施方式中,所述工作电极与所述生物共轭物之间通过双抗体夹心免疫反应相结合,所述双抗体夹心免疫反应时间为30~75min,优选为45~75min,更优选为50~70min,最优选为60min。

[0076] 在本申请的一具体实施方式中,所述电化学生物免疫传感器还包括电解质溶液,所述电解质溶液为含 H_2O_2 的缓冲液进一步地,所述缓冲液中 H_2O_2 的浓度为5.0~15.0mM,优选为7.5~12.5mM,更优选为9~11mM,最优选为10mM;所述缓冲液为PBS缓冲液,优选为0.01M,pH=7.4的PBS缓冲液。

[0077] 本发明另一实施例提供了一种如上所述的电化学生物免疫传感器的制备方法,包括如下步骤:

[0078] 将所述捕获抗体Ab1固定在基底电极上,制得工作电极;

[0079] 将待测液滴加在所述工作电极上,进行第一次孵育;

[0080] 第一次孵育结束后,清洗工作电极,加入所述生物共轭物,进行第二次孵育。

[0081] 在本申请的一具体实施方式中,第一次孵育和第二次孵育的反应温度均为37 $^{\circ}\text{C}$;第一次孵育和第二次孵育的反应时间为30~75min,优选为45~75min,更优选为50~70min,最优选为60min。

[0082] 在本申请的一具体实施方式中,将玻碳电极置于氧化石墨烯分散液中,孵化烘干,制得氧化石墨烯/玻碳电极,作为基底电极;优选地,所述氧化石墨烯分散液的浓度为1.0~2.0mg/mL。其中,孵化温度优选为37 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0083] 在本申请的一具体实施方式中,将玻碳电极置于氧化石墨烯分散液中,孵化烘干,制得氧化石墨烯/玻碳电极;再在所述氧化石墨烯/玻碳电极上修饰纳米金,制得所述基底电极。其中,孵化温度优选为37 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0084] 上述实施例中,孵化温度为37 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0085] 进一步地,将所述氧化石墨烯/玻碳电极置于金前驱体盐溶液中,通过电沉积方式在所述氧化石墨烯/玻碳电极修饰纳米金,制得所述基底电极;所述金前驱体盐选自氯金

酸,所述金前驱体盐溶液的浓度为25~35mM。

[0086] 在本申请的另一实施方式中,在制备氧化石墨烯/玻碳电极之前,所述玻碳电极经过抛光、清洗和干燥处理。

[0087] 在本申请的另一实施方式中,将所述捕获抗体Ab1固定在基底电极上,制得工作电极的方法包括如下步骤:将所述捕获抗体Ab1滴加到基底电极上,进行孵育,然后用牛血清白蛋白溶液阻断非特异性结合位点,再进行清洗,得到所述工作电极。优选地,孵育和/或用牛血清白蛋白溶液阻断非特异性结合位点的反应温度为37℃,时间为30~75min,优选为45~75min,更优选为50~70min,最优选为60min。

[0088] 在本申请的一具体实施方式中,所述制备方法中,用缓冲液对电极进行清洗,所述缓冲液为PBS缓冲液,优选为0.01M,pH=7.4的PBS缓冲液。

[0089] 本发明另一实施例提供了根据如上所述的电化学生物免疫传感器或根据如上所述的制备方法在制备艾滋病抗原检测试剂中的应用,所述应用非疾病诊断或治疗目的。

[0090] 本发明另一实施例提供了一种非疾病诊断或治疗目的的待测艾滋病抗原检测方法,采用如上所述的电化学生物免疫传感器或根据如上所述的方法制备得到的电化学生物免疫传感器对待测液中待测艾滋病抗原进行定性和/或定量分析。

[0091] 在本申请的另一实施方式中,所述检测方法包括如下步骤:

[0092] 第二次孵育结束后,清洗工作电极,再将工作电极置于电解质溶液中,测量电化学信号。将构筑的电化学生物免疫传感器电极放置在含有电解质溶液中进行类过氧化物酶氧化还原反应,用微分脉冲伏安法(DPV)记录其反应过程中的电化学信号,其信号大小即可间接反映出待测艾滋病抗原的含量。

[0093] 进一步地,在-0.1至-0.5V的电位扫描下用差分脉冲伏安法(DPV)测量电化学信号,振幅为70mV,脉冲宽度为50ms,脉冲周期为200ms。

[0094] 本发明另一实施方式中制备了一种基于金属纳米酶的电化学生物免疫传感器,并用于检测p24抗原,具体实施过程如下:

[0095] 一、制备电化学生物免疫传感器并检测p24抗原

[0096] 1、材料

[0097] 氯铂酸(H_2PtCl_6 ,8wt%)是从Sigma-Aldrich(St Louis,USA)订购的。氯化钯($PdCl_2$)、十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)、硝酸铜($Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)购自Adamas-beta(上海,中国)。盐酸(HCl)、氢氧化钠(NaOH)和无水乙醇由Greagent(上海,中国)提供。抗坏血酸(AA)和牛血清白蛋白(BSA)购自Sigma-Aldrich(StLouis,USA)。抗原(HIV p-24,Ag)及对应的捕获抗体Ab1和标记抗体Ab2购自领潮生物(上海,中国)。实验中使用的所有化学品都是分析级参考品。所有实验中的水都是在Millipore Mill-Q净化系统中制备的,电阻率为 $18M\Omega\ cm^{-1}$ 。

[0098] 2、检测仪器

[0099] 电化学实验由DONGHUA DH7000电化学工作系统(中国江苏)测量,使用常规的三电极系统,包括工作电极(玻璃碳电极,GCE),对电极(铂丝)和参比电极(浸泡在饱和KCl溶液中)。透射电子显微镜(TEM)和高分辨率透射电子显微镜(HRTEM)使用日本东京的JEM-2100F(加速电压为200kV)进行。

[0100] 3、PdPtCu纳米立方体的合成

[0101] 在典型的合成中,首先将0.0355g PdCl₂超声溶于0.2mLHCl溶液中,用去离子水稀释至20mL,制备10mM H₂PdCl₄溶液待用。然后,将0.325mg CTAC溶解在5.0mL去离子H₂O中,然后加入0.24mL KCl (80mM)、0.25mL H₂PdCl₄ (10mM)、0.0625mL H₂PtCl₆ (10mM)和0.125mL Cu(NO₃)₂·3H₂O (10mM)。在50℃下孵育30分钟后,将0.50mL的0.30M新鲜制备的AA快速注射到上述溶液中,同时轻轻摇动。再过30分钟后,通过离心收集产物,并用乙醇和H₂O洗涤3次,最后用H₂O定容至3mL,4℃保存待用。

[0102] 4、Ab2-PdPtCu NPs的合成

[0103] 将0.5mL合成的PdPtCu NPs均匀溶液与0.5mL Ab2(终浓度10μg/mL)混合,并在4℃搅拌过夜(8-12h)。通过PdPtCu NPs和Ab2上的氨基基团,抗体和纳米材料之间发生有效的交联,形成稳定的Pd-NH₂和Pt-NH₂键,离心(6000r/min)3min弃上清,除去未结合的Ab2后。然后将离心混合物,分散在1mL PBS(0.01M,pH 7.4)中4℃保存,用于进一步的电化学检测。

[0104] 5、工作电极GCE/GO-AuNPs的修饰与制备;

[0105] 为使GCE(直径4mm)工作电极表面在改性前具有镜面光泽,用0.05μm氧化铝粉对GCE工作电极表面进行抛光。GCE在超纯水中超声清洗三次后,用去离子水清洗,氮气干燥。将5mL氧化石墨烯(1.5mg/mL)超声震荡1h,得到均匀溶液,随后,用移液器移取10μL GO分散液于已处理好的GCE表面,37℃孵化烘干。以GO/GCE电极为工作电极构建三电极系统,置于29.4mM氯金酸溶液中,-0.2V恒电位沉积250s,得到AuNPs-rGO薄膜。去离子水清洗,室温干燥后,4℃保存待用。

[0106] 6、夹心式电化学生物免疫传感器的构建

[0107] 修饰好的电极表面加入10μL(10μg/mL)的Ab1,37℃孵育1h。然后,用10μL BSA溶液(2.5wt.%)在37℃阻断非特异性结合位点1h。最后,用PBS(0.01M,pH 7.4)冲洗构建的电化学生物免疫传感器(BSA/Ab1/AuNPs/GO/GCE),并在4℃保存备用。

[0108] 7、HIV-p24抗原的电化学检测

[0109] 将10μL不同浓度p24抗原标准液或者待测液滴加在BSA/Ab1/AuNPs-GO/GCE表面上,并在37℃下孵育1小时。随后,将Ab2/PdPtCu NPs在37℃下孵育45min。在每个步骤后,用PBS(0.01M,pH 7.4)彻底冲洗制备的电极表面,以去除未结合的蛋白质。最后在含有10mM H₂O₂的PBS(0.01M,pH 7.4)中,在-0.1至-0.5V的电位扫描下用差分脉冲伏安法(DPV)测量电化学信号,振幅为70mV,脉冲宽度为50ms,脉冲周期为200ms。

[0110] 二、三元素介孔纳米酶PdPtCuNPs的表征

[0111] 取实施例1所制得的三元素介孔纳米酶PdPtCu NPs,使用透射电子显微镜(TEM)表征,判断空间结构及形态,验证纳米酶的合成是否成功。由图2可知,合成的纳米酶PdPtCu NPs为单分散立方体,在100nm可以看到介孔形貌,进一步放大,在50nm介孔形貌清晰可见。为了进一步验证纳米酶PdPtCuNPs的化学组成,进行了STEM-EDS元素Mapping分析,从EDS元素分析中可以明显观察到Pd、Pt和Cu三个元素,提示三元素金属纳米酶PdPtCu NPs合成成功。

[0112] 三、验证检测HIV-p24抗原电化学生物免疫传感器的可行性及性能

[0113] 1、为了证实构建的电化学生物免疫传感器的可行性,本实施例分别检测了含p24抗原和不含p24抗原的两组上述方法所构建传感器的DPV微分脉冲信号。结果如图3所示,含p24抗原这一组传感器产生了相对较高的DPV信号,而不含p24抗原这一组传感器产生了相

对较低或没有DPV信号,证明了该传感器可以选择性的和HIV-P24抗原进行结合,同时新型三元素纳米酶PdPtCu对 H_2O_2 具有生物催化活性,该生物免疫传感器具有信号放大能力,能如预期那样成功进行HIV-p24抗原检测。

[0114] 2、为了验证不同修饰步骤是否成功,按步骤一所提的操作,对传感器的修饰步骤进行了电化学阻抗表征(EIS)和循环伏安表征(CV)。结果如图4和图5所示,由图4和图5可知,GCE经过GCE/GO-AuNPs的修饰后(图4曲线a、图5曲线a),其电化学阻抗,氧化还原峰电流和峰电位差都有明显地改善,说明GCE/GO-AuNPs有更好的电子转移能力;经过Ab1修饰后(图4曲线b、图5曲线b),其氧化还原峰电流发生显著下降现象,电化学阻抗增大。随后,加入待检测HIV-p24抗原(图4曲线c、图5曲线c),其氧化还原峰电流呈现进一步下降现象,电化学阻抗呈现进一步增大。最后PdPtCuNPs/Ab2/HIV-p24/BSA/Ab1/AuNPs/GO/GCE修饰后下降最为严重(图4曲线d、图5曲线d),这说明各种免疫生物探针的成功构建和待检测HIV-p24抗原、Ab1/AuNPs/GO与PdPtCu NPs/Ab2之间发生了有效的双抗体夹心免疫反应。

[0115] 3、为了获得最优的分析性能,按步骤一所提的操作,依次对所开发的免疫传感器进行了 H_2O_2 的浓度、Ab2-PdPtCu NPs的浓度、Ab2-PdPtCu NPs的孵育时间这三个实验参数进行优化。从该免疫传感器检测HIV-p24的优化条件图6-8可知;Ab2-PdPtCu NPs的用量为 $10\mu\text{g/mL}$,免疫反应时间为60min,电解质溶液 H_2O_2 的终浓度为10mM。

[0116] 4、在优化的实验条件下,利用所制备的免疫传感器检测不同浓度的HIV-p24抗原,以探索该传感器的线性范围。图9a-e依次显示了所制备的免疫传感器在不同浓度的HIV-p24抗原(a-e: 0.00004 、 0.002 、 0.2 、 20 、 100ng mL^{-1})时的DPV值,从图10可知,该传感器检测p24抗原线性关系良好,标准曲线为: $Y = -8.58321\text{gC} - 116.94$, $R^2 = 0.9949$,线性范围为: $0.00004 \sim 100.0\text{ng mL}^{-1}$,检出限为: 20fg mL^{-1} ($S/N=3$);与现有的电化学免疫检测方法对比,该方法具有较低的检出限和较高的灵敏度。此外,该传感电极通过简单的抛光处理即可实现传感界面更新再生,再按步骤一所提的操作,即可对大量HIV-p24抗原样品实现快速和低成本测定。

[0117] 5、为了评估特异性,本实施例选择了人体血清中潜在的干扰物(HBsAg、HCV-Ab),进行了工程免疫传感器的交叉反应性实验。实验所用的潜在干扰物是由厦门万泰凯瑞生物技术有限公司所生产的HBsAg、HCV-Ab、HIV-p24相应试剂盒的标准品。结果如图11所示,由图11可知,HIV-p24抗原存在时,电流值明显增大。同时,与空白组相比,其他干扰蛋白的存在没有明显的信号变化。即使在较高浓度干扰物存在的条件下,该传感器对HIV-p24的响应信号基本不受影响,表明其具有很好的选择性。

[0118] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

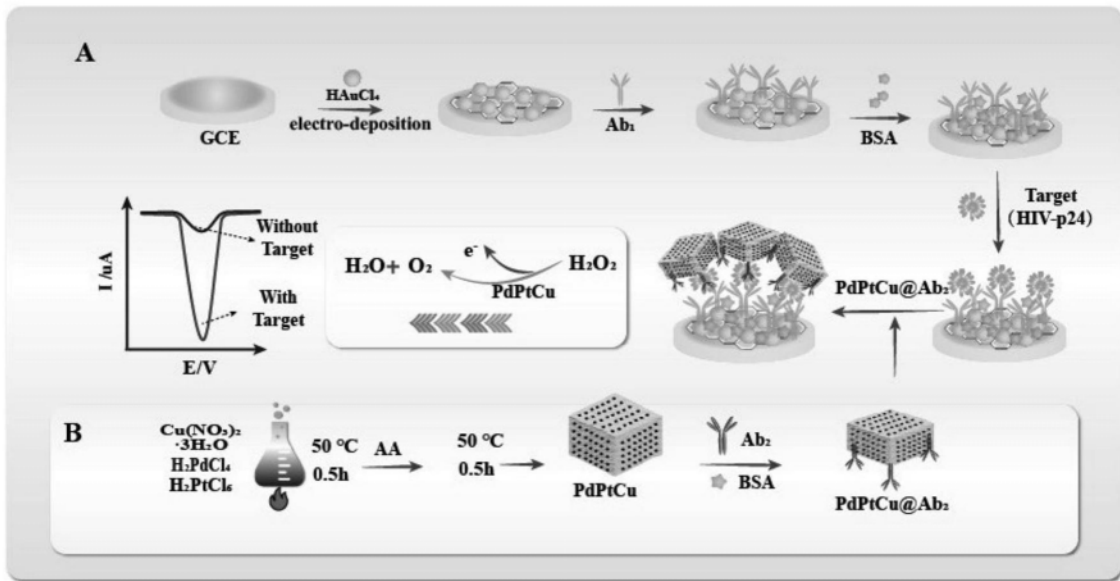


图1

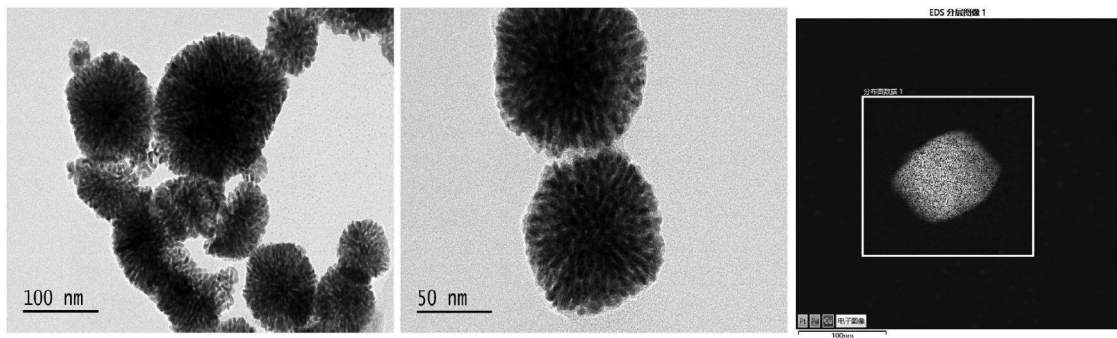


图2

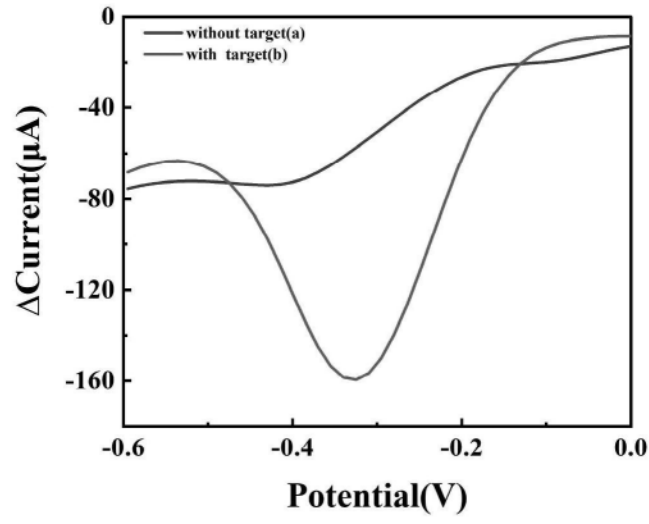


图3

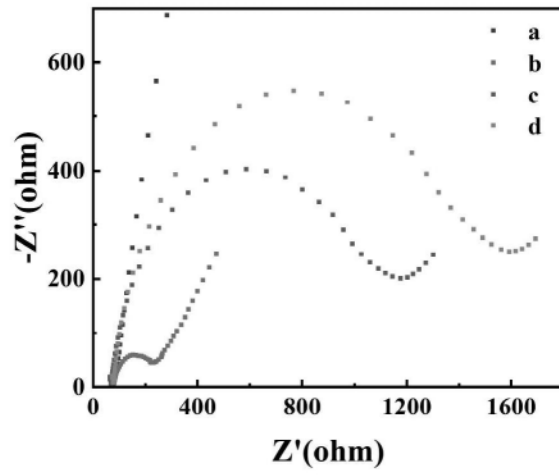


图4

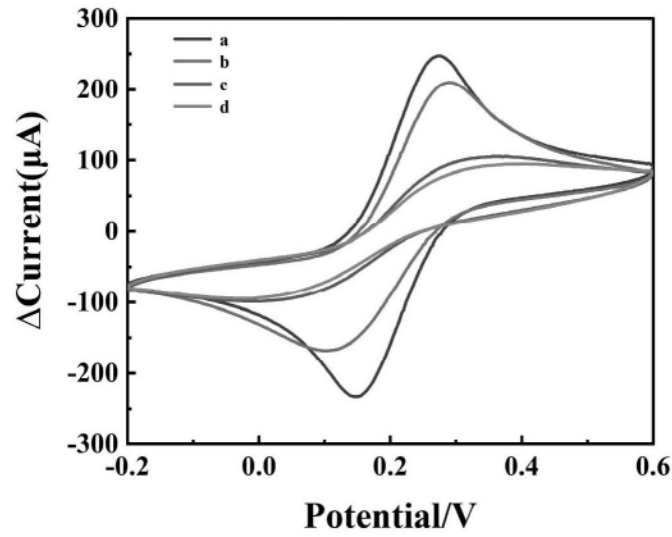


图5

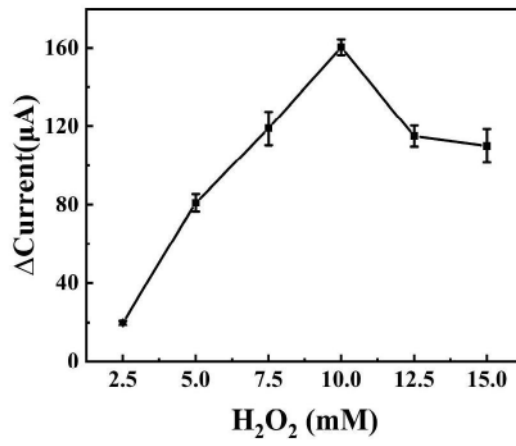


图6

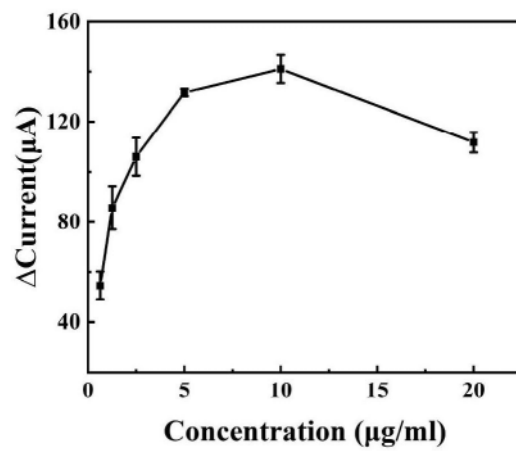


图7

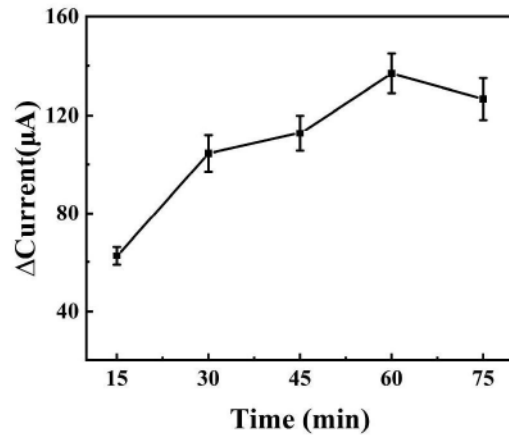


图8

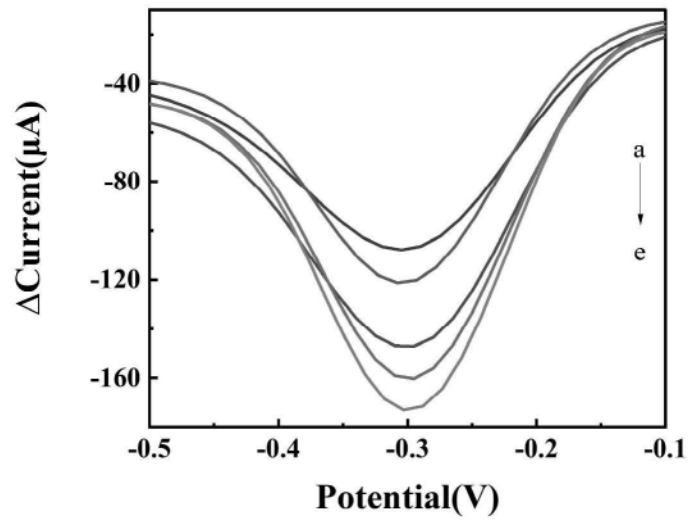


图9

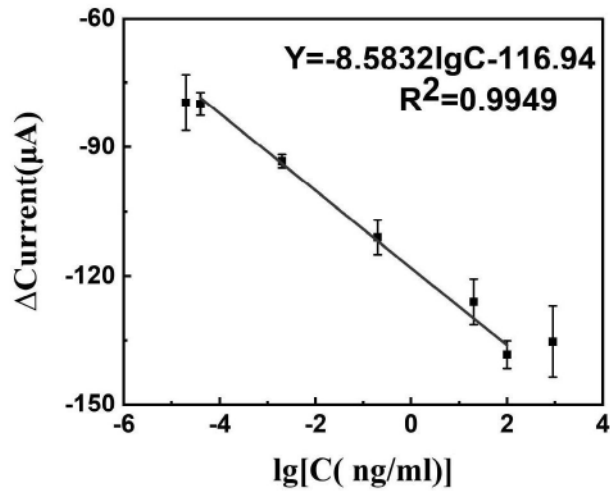


图10

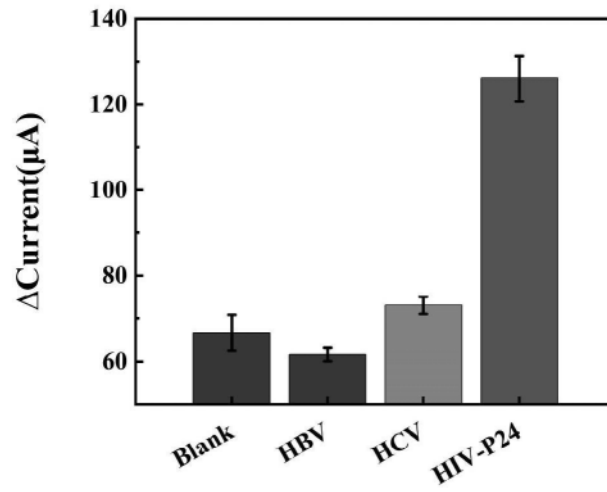


图11