



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115266853 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 01

(21) 申请号 202210920591.9

(22) 申请日 2022.08.02

(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 于凯 朱乾龙 姜杰 左壮

赵博毅 鄢川博

(74) 专利代理机构 威海恒誉润达专利代理事务

所(普通合伙) 37260

专利代理师 郭莹

(51) Int. Cl.

G01N 27/26 (2006.01)

G01N 27/30 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

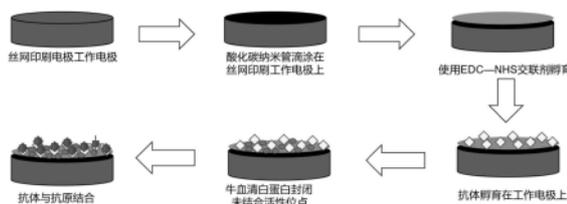
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种电化学生物传感器及其制备方法与应用

(57) 摘要

一种电化学生物传感器及其制备方法与应用,电化学生物传感器包括丝网印刷工作电极,丝网印刷工作电极表面依次修饰有酸性碳纳米管、交联剂及稳定剂;本申使用酸化碳纳米管修饰丝网印刷工作电极,通过对碳纳米管进行酸化,可以增强其活性并去除杂质,使其含有大量羧基,采用交联剂对酸化碳纳米管中羧基进行活化,以交联抗体,可广泛应用于电化学分析检测领域。



1. 一种电化学生物传感器,包括丝网印刷工作电极,其特征在于,所述丝网印刷工作电极表面依次修饰有酸性碳纳米管、交联剂及稳定剂。

2. 一种电化学生物传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将碳纳米管放入浓硫酸和浓硝酸混合溶液中,油浴后,用水进行抽滤,加入乙醇后进行旋蒸,得到酸化碳纳米管;

(2) 对酸化碳纳米管进行稀释,滴涂在丝网印刷工作电极表面上,干燥处理;

(3) 使用交联剂孵育步骤(2)制备的丝网印刷工作电极,对酸化碳纳米管进行活化,以交联抗体;

(4) 将抗体滴涂在步骤(3)制备的丝网印刷工作电极上,进行孵育;

(5) 在步骤(4)制备的丝网印刷工作电极上,滴加稳定剂孵育,封闭所述丝网印刷工作电极上未反应的活性位点,得到电化学生物传感器。

3. 根据权利要求2所述的一种电化学生物传感器的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,浓硫酸和浓硝酸的摩尔比为3:1;油浴温度为120℃,油浴时间为2h;旋蒸时间为15分钟。

4. 根据权利要求2所述的一种电化学生物传感器的制备方法,其特征在于,步骤(2)中,采用乙醇对酸性碳纳米管进行稀释,乙醇浓度为25ug/ml;采用红外灯进行干燥处理。

5. 根据权利要求2所述的一种电化学生物传感器的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中的交联剂为1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)。

6. 根据权利要求2所述的一种电化学生物传感器的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中交联剂的孵育时间为30min。

7. 根据权利要求2所述的一种电化学生物传感器的制备方法,其特征在于,步骤(4)中,抗体的孵育时间为1h。

8. 根据权利要求2所述的一种电化学生物传感器的制备方法,其特征在于,所述稳定剂为牛血清白蛋白溶液。

9. 根据权利要求8所述的一种电化学生物传感器的制备方法,其特征在于,所述牛血清白蛋白溶液的质量分数1%牛血清白蛋白溶液,孵育时间为30min。

10. 如权利要求1所述的电化学生物传感器在新型冠状病毒检测中的应用。

一种电化学生物传感器及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及电化学分析检测领域,尤其是涉及一种电化学生物传感器及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 新冠病毒又称之为新型冠状病毒,传染性非常强,为遏制新型冠状病毒传染,新型冠状病毒抗原的检测尤为重要,现有技术中主要采用以下技术进行新型冠状病毒抗原的检测:

[0003] 基于高通量测序平台的SARS-CoV-2核酸检测技术:高通量测序平台的最大优点是可以发现未知病原体并获得完整的基因序列,因此,它非常适合在疫情爆发的早期识别病原体,并为病原体核酸检测技术的进一步发展提供序列信息,然而,当高通量测序平台用于病原体检测时,由于测序仪器昂贵、检测周期长和检测成本高,往往难以普及。

[0004] 基于实时PCR平台的新型冠状病毒核酸检测技术:实时荧光定量PCR平台可以通过一个紧凑的实时荧光定量PCR仪器实现对已知序列的靶核酸的灵敏和定量检测。实时PCR平台因其稳定性、可靠性和易操作性,已成为应用最广泛的核酸检测平台。由于实时PCR平台具有灵敏度高、特异性好、操作简单等优点,且大型医疗机构普遍配备相关仪器,是目前用于新型冠状病毒核酸检测的主要技术平台。然而,核酸提取和扩增检测通常在传统实时PCR平台中单独进行,需要高度专业化的实验室和训练有素的操作员。此外,实时PCR平台依赖荧光定量PCR仪器,检测时间为2-4小时,不适合在资源有限的地区进行现场筛查和检测。由于检测灵敏度不足以检测病毒载量低的样本,且受荧光标记种类的限制,单个拷贝的tar数量较多,因此经常出现假阴性结果。

[0005] 专利申请号为202110888055.0的发明专利公开了一种电化学生物传感器及其制备方法和检测新型冠状病毒的方法:其公开的电化学生物传感器包括丝网印刷电极和修饰在丝网印刷电极表面的功能层,功能层含有聚丙烯胺盐酸盐(PAH)、二氧化铈(CeO₂)以及二茂铁标记的非特异性单链DNA(Fc-ssDNA),其以丝网印刷电极作为基体,以二茂铁标记的非特异性单链DNA(Fc-ssDNA)作为电化学探针,然而其在检测时,需要对相应的DNA进行标记,操作繁琐且成本较高。

发明内容

[0006] 为解决上述技术问题,本发明提供一种电化学生物传感器及其制备方法与应用。

[0007] 本申请实施例的第一方面提供了一种电化学生物传感器,包括丝网印刷工作电极,所述丝网印刷工作电极表面依次修饰有酸性碳纳米管、交联剂及稳定剂。

[0008] 本申请的第二方面提供了一种电化学生物传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0009] (1) 将碳纳米管放入浓硫酸和浓硝酸混合溶液中,油浴后,用水进行抽滤,加入乙醇后进行旋蒸,得到酸化碳纳米管;

[0010] (2) 对酸化碳纳米管进行稀释,滴涂在丝网印刷工作电极表面上,干燥处理;

[0011] (3) 使用交联剂孵育步骤(2) 制备的丝网印刷工作电极,对酸化碳纳米管进行活化,以交联抗体;

[0012] (4) 将抗体滴涂在步骤(3) 制备的丝网印刷工作电极上,进行孵育;

[0013] (5) 在步骤(4) 制备的丝网印刷工作电极上,滴加稳定剂孵育,封闭所述丝网印刷工作电极上未反应的活性位点,得到电化学传感器。

[0014] 在其中一实施例中,步骤(1) 中,浓硫酸和浓硝酸的摩尔比为3:1;油浴温度为120℃,油浴时间为2h;旋蒸时间为15分钟。

[0015] 在其中一实施例中,步骤(2) 中,采用乙醇对酸性碳纳米管进行稀释,乙醇浓度为25ug/ml;采用红外灯进行干燥处理。

[0016] 在其中一实施例中,所述步骤(3) 中的交联剂为1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺(EDC) 和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)。

[0017] 在其中一实施例中,所述步骤(3) 中交联剂的孵育时间为30min。

[0018] 在其中一实施例中,步骤(4) 中,抗体的孵育时间为1h。

[0019] 在其中一实施例中,所述稳定剂为牛血清白蛋白溶液。

[0020] 在其中一实施例中,所述牛血清白蛋白溶液的质量分数1%牛血清白蛋白溶液,孵育时间为30min。

[0021] 本申请的第三方面提供了一种电化学传感器在新型冠状病毒检测中的应用。

[0022] 本发明使用酸化碳纳米管修饰丝网印刷工作电极,通过对碳纳米管进行酸化,可以增强其活性并去除杂质,使其含有大量羧基,采用交联剂对酸化碳纳米管中羧基进行活化,以交联抗体。本申请提出的电化学传感器制作方法有便携、灵敏、稳定性高、小型化、成本低、无需前处理、检测快速等优点,可实现对新型冠状病毒肺炎患者的早发现、早隔离及早治疗,同时为设计现场快速诊断新型冠状病毒检测设备提供有力支撑。

附图说明

[0023] 图1为本申请一实施例提供的一种电化学传感器的制备流程示意图;

[0024] 图2为本申请一实施例提供的电化学工作站的结构示意图;

[0025] 图3为本申请一实施例提供的抗原浓度与交流阻抗的关系图。

具体实施方式

[0026] 为了使本申请所要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本申请进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本申请,并不用于限定本申请。

[0027] 除非另有定义,本发明所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的人员通常理解的含义相同。本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不用于限制本发明。

[0028] 本发明的术语“包括”和“具有”以及它们任何变形,意图在于覆盖不排他的包含。例如包含了一系列步骤的过程、方法、装置、产品或设备没有限定于已列出的步骤或模块,而是可选地还包括没有列出的步骤,或可选地还包括对于这些过程、方法、产品或设备固有的其它步骤。

[0029] 本实施例的第一方面提供了一种电化学生物传感器,包括丝网印刷工作电极,丝网印刷工作电极表面依次修饰有酸化碳纳米管、交联剂及稳定剂。

[0030] 具体地,丝网印刷工作电极采用碳电极,碳电极具有宽电位窗口、低背景和易于表面修饰等特点广泛应用于电化学传感器,在碳电极表面进行电化学预处理,提供了一种低成本和简易的方法来改善传感器的电化学行为。

[0031] 酸化碳纳米管由碳纳米管制备而成,碳纳米管是生物传感器中高度优选的材料,其具有高灵敏度、低噪声和宽吸收光谱,操作简单等特点,是实时监测中最理想的;且碳纳米管是碳的重要多晶型形式,因其具有优异的电子转移性能、机械性能和优异的生物相容性,使其成为制造传感器电极的优良碳基材料。

[0032] 此外,碳纳米管可以提供很大的电活性区域,可以帮助同时感应许多分子,碳纳米管的独特性质使其成为适用于电化学生物传感器转导机制的出色导电纳米级电极材料,与其他也用作电化学生物传感器表面修饰剂的材料(如金和银)相比,快速、绿色的获得方式,这种材料的大比表面积允许感兴趣的生物分子耦合,并且可以增强其导电性,用固定剂将其功能化,并且这种类型的表面修饰可以很容易地转移到丝网印刷碳电极上,使得这种免疫传感器能够集成在编写检测设备中。本实施例将碳纳米管进行酸化,可以增强其活性及去除杂质,使其含有大量羧基,便于通过交联剂偶联抗体。

[0033] 交联剂为1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),EDC—NHS联用可以对酸化碳纳米管羧基进行活化,以交联抗体。

[0034] 稳定剂为牛血清白蛋白溶液,通过牛血清白蛋白溶液封闭丝网印刷工作电极上未反应的活性位点,以得到电化学生物传感器。

[0035] 如图1所示,本实施例的第二方面提供了一种电化学生物传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0036] 步骤(1):将500mg碳纳米管放入90ml浓硫酸和30ml浓硝酸混合溶液中,在120℃的温度下油浴,油浴时间为2h;油浴后,用水进行抽滤,加入乙醇后旋蒸15分钟,将水和乙醇混合物溶剂全部蒸干,得到酸化碳纳米管,以在碳纳米管的壁上引入羧基;

[0037] 步骤(2):将酸化碳纳米管用乙醇进行稀释,乙醇浓度为25ug/ml,滴涂10u1在丝网印刷工作电极表面上,用红外灯烘干20分钟;

[0038] 步骤(3):滴加5u1 100mM的1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)在步骤(2)制备的丝网印刷工作电极上孵育15min,然后滴加5u1 25mM的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)继续孵育15min,1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)使羟基和氨基间脱水形成酰胺键,酸化碳纳米管上的羧基先与EDC反应生成一个中间物,然后再与抗体上的氨基反应,形成酸化碳纳米管与抗体蛋白质的结合物,N-羟基琥珀酰亚胺NHS与EDC交联使用,可以起到增大活化羧基性能和增强稳定性的作用,EDC—NHS联用对酸化碳纳米管进行活化,以交联抗体;

[0039] 步骤(4):将10u1抗体滴涂在步骤(3)制备的丝网印刷工作电极上,孵育1h;

[0040] 步骤(5):在步骤(4)制备的丝网印刷工作电极上,滴加10u1质量分数1%牛血清白蛋白溶液,孵育30min,封闭电极上未反应的活性位点,得到制备好的电化学生物传感器,将电化学生物传感器浸泡在PH为7.4的磷酸盐缓冲液中储存备用。

[0041] 本申请的第三方面提供了一种电化学生物传感器在新型冠状病毒检测中的应用。

[0042] 将上述实施例制备得到的电化学传感器孵育新型冠状病毒抗原,孵育30min,利用电化学工作站测量交流阻抗(EIS)的变化。

[0043] 具体地,如图2所示,将上述实施例制备得到的电化学传感器作为工作电极,银/氯化银作为参比电极,碳作为辅助电极,建立电化学工作站。

[0044] 本实施例中所用抗体名称:2019-nCoV NP Antibody (5A6)、抗体原液浓度:6.48mg/ml、分子质量:150KD;所用抗原名称:2019-nCoV Antigen (NCPN2)、抗原原液浓度:0.27mg/ml、分子质量:62KD。

[0045] 如图3所示,测量上述实施例制备得到的电化学传感器交流阻抗的变化,可以根据半圆直径大小判断交流阻抗大小,直径越大,交流阻抗越大;曲线A的电化学传感器未滴加抗原,曲线B的电化学传感器滴加10uL浓度为0.1ug/mL抗原;曲线C的电化学传感器滴加10uL浓度为1ug/mL抗原;曲线D的电化学传感器10uL浓度为10ug/mL抗原,由图可知,随抗原浓度的增加,电化学传感器所测得的交流阻抗逐渐增大。

[0046] 综上所述,本申请实施例提供的电化学传感器,是一种无需对样品进行预处理或标记的高灵敏免疫学诊断方法,该传感器可由平板计算机或智能手机中的软件连接便携式恒电位仪,不需要大型检测设备,在试剂成本及检测成本、操作人员专业技能要求、检测时间等方面仍具有相当优势,且检测时间短,不需要专业人员进行帮助测定,便于普及。本申请提出的电化学传感器制作方法有便携、灵敏、稳定性高、小型化、成本低、无需前处理、检测快速等优点,可实现对新型冠状病毒肺炎患者的早发现、早隔离及早治疗,同时为设计现场快速诊断新型冠状病毒检测设备提供有力支撑。

[0047] 本领域普通技术人员可以意识到,结合本文中所公开的实施例描述的各示例的单元及算法步骤,能够以电子硬件、或者计算机软件和电子硬件的结合来实现。这些功能究竟以硬件还是软件方式来执行,取决于技术方案的特定应用和设计约束条件。专业技术人员可以对每个特定的应用来使用不同方法来实现所描述的功能,但是这种实现不应认为超出本申请的范围。

[0048] 以上所述实施例仅用以说明本申请的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本申请进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本申请各实施例技术方案的精神和范围,均应包含在本申请的保护范围之内。

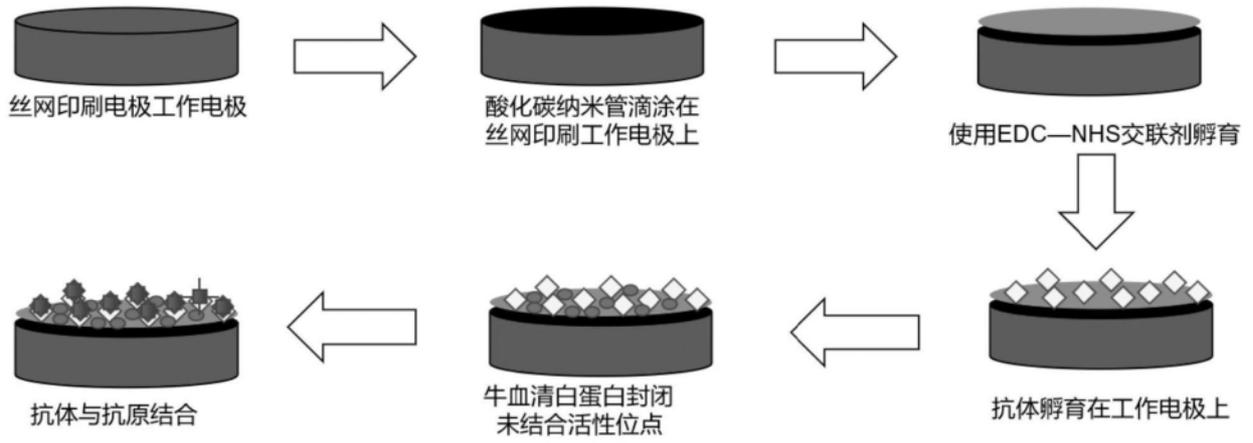


图1

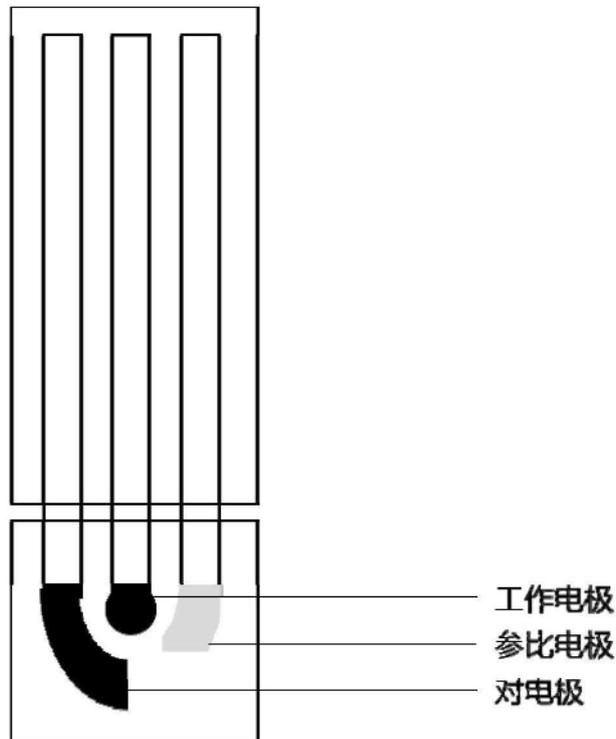


图2

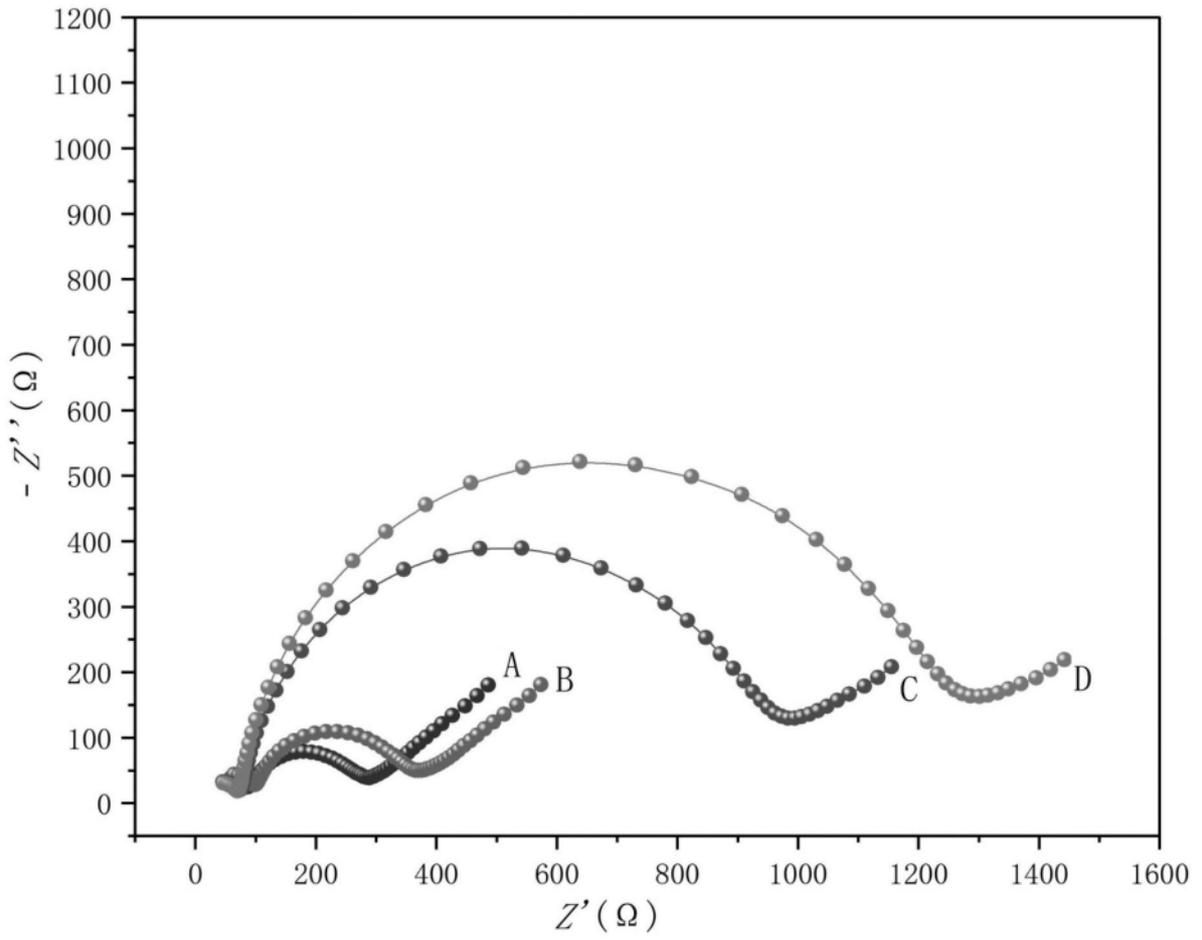


图3