

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510088898.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 27/30 (2006.01)

H01L 49/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 2 月 7 日

[11] 公开号 CN 1908665A

[22] 申请日 2005.8.2

[21] 申请号 200510088898.3

[71] 申请人 中国科学院电子学研究所

地址 100080 北京市海淀区北四环西路 19 号

[72] 发明人 夏善红 许媛媛 边超 陈绍凤

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 周国城

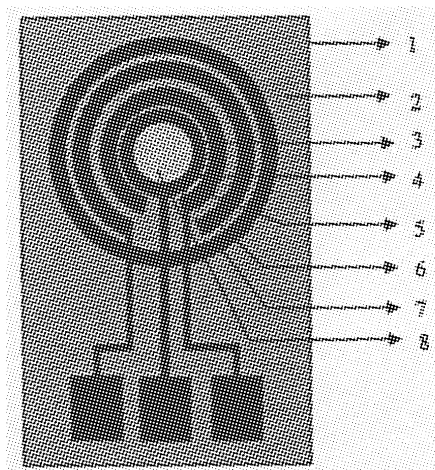
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 3 页

[54] 发明名称

基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器及其制备方法

[57] 摘要

基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器及制备方法，该传感器包括硅基底，氧化硅和氮化硅绝缘层，及在绝缘层上由内而外同心分布的圆形金薄膜工作电极、SU-8 光刻胶围成的环形敏感膜池、环形铂薄膜对电极、环形铂薄膜参比电极、SU-8 光刻胶围成的环形反应池、以及在工作电极上固定的生物分子敏感膜。本发明用微纳米加工技术和混合自组装膜等技术，制备的免疫传感器一致性好、相关性高、易于微型化、与集成电路工艺相兼容、批量生产成本低，基于混合自组装膜制备的“混合自组装膜-纳米金-蛋白质-抗体”生物分子敏感膜有友好的仿生界面，能够最大限度地保持抗体的免疫活性，提高传感器的检测灵敏度，为免疫分析、疾病检测等提供了新的途径。



1、一种基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器，包括基底，绝缘层，电极、反应池，是采用微纳米加工技术制备的，其特征在于，在硅基底上表面，固接有氧化硅层和氮化硅层组成的绝缘层，在绝缘层上表面固接有圆形工作电极、环形对电极和环形参比电极，三电极顺次由内而外同心分布，各接有接线板；在圆形工作电极和环形对电极之间，在绝缘层上表面设有一环形敏感膜池；在环形参比电极外周，于绝缘层上表面设有一环形反应池；

在圆形工作电极上表面固接有一层基于混合自组装膜制备的生物分子敏感膜。

2、根据权利要求1所述的基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器，其特征在于，所述圆形工作电极，为圆形金薄膜工作电极；环形对电极和环形参比电极，为铂薄膜制作；环形敏感膜池和环形反应池，都是由SU-8光刻胶围成的。

3、根据权利要求1所述的基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 用微纳米加工技术制备传感器结构层：首先制作上述传感器的掩模板；其次按照微电子工艺清洗步骤清洗硅片并烘干，依次采用热氧化方法和低压化学气相沉积法在硅片上生长氧化硅和沉积氮化硅以形成绝缘层；然后在绝缘层上旋涂光刻胶，利用工作电极掩模板进行曝光、显影，并在显影后的绝缘层上溅射金，脱胶后清洗即可以制备圆形金薄膜工作电极，再次旋涂光刻胶，利用对电极与参比电极掩模板进行曝光、显影，并在显影后的绝缘层上溅射铂，脱胶后清洗即可以制备环形铂薄膜对电极、环形铂薄膜参比电极；最后在已经形成电极的绝缘层上旋涂SU-8光刻胶，依次利用敏感膜池掩模板和反应池掩模板进行两次曝光，通过一次显影，即可以制备环形敏感膜池和环形反应池；

(2) 基于混合自组装膜制备生物分子敏感膜：首先在工作电极表面滴涂体积比为3:7的 H_2O_2 和 H_2SO_4 的混合溶液，浸泡处理30秒~60秒得到洁净的工作电极表面；其次将两种巯基化合物分别溶解在去离子水

或无水乙醇溶液中，按 1:1~1:10 比例混合，滴涂于工作电极表面，并将此体系在避光、密闭、室温件下静置 2~6 小时，在工作电极表面形成混合自组装膜；然后在工作电极表面滴涂纳米金溶胶，在室温条件下静置 5~10 小时，纳米金结合于混合自组装膜表面，形成“混合自组装膜-纳米金”膜；再在工作电极表面滴涂蛋白质溶液，在 4℃条件下静置 8~16 小时，蛋白质被吸附于纳米金膜表面，形成“混合自组装膜-纳米金-蛋白质”膜；最后在工作电极表面滴涂待测抗原对应的抗体溶液，于 37℃条件下温浴 30~60 分钟，抗体被定向地固定在蛋白质上，获得基于混合自组装膜的“混合自组装膜-纳米金-蛋白质-抗体”新型生物分子敏感膜。

4、根据权利要求 3 所述的基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器的制备方法，其特征在于，所述（2）中的巯基化合物，是指一端为巯基，另一端为巯基或氨基的双官能团或多官能团化合物。

5、根据权利要求 3 所述的基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器的制备方法，其特征在于，所述（2）中的蛋白质，是指蛋白质 A 或蛋白质 G 中的任何一种。

基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种免疫传感器及其制备，特别涉及一种基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器及其制备和在免疫分析、疾病检测等领域的应用。

背景技术

免疫分析是利用抗原/抗体反应来测定痕量物质的一种高灵敏度、高选择性的方法，它为免疫生物分子以及肿瘤标志物的临床免疫测定提供了有力手段。常规的临床免疫分析方法主要有：放射免疫分析法、酶联免疫分析法、荧光免疫分析法、化学发光免疫分析法等。其中，放射免疫分析法灵敏度高，干扰少，应用范围宽，但试剂寿命有限，并且其放射性标记物对人体有害；酶联免疫分析法、荧光和化学发光免疫分析法在很大程度上促进了临床免疫分析手段的自动化、智能化和网络化，但这些方法需要价格昂贵的专用仪器设备，操作复杂，成本高，难以推广使用。因而研制微型便携式检测仪器以适应免疫生物分子检测或对恶性肿瘤的大规模筛查、早期诊断和预后监测的需要是亟待解决的问题。

免疫传感器结合了免疫分析和电化学或光谱学等诸多特点，已经成为免疫分析领域中的主要研究和发展对象。然而，尽管在相关领域中有大量的研究和报道，免疫传感器在临床诊断中的商业化应用却非常少，其原因主要来源于目前尚未很好解决的几个基本问题：免疫生物分子（抗原/抗体）在电极上的负载率低、难以控制固定化抗体的取向和保持固定化抗体的免疫活性。近年来，安培型免疫传感器受到人们的极大关注。这种电化学器件与传统的免疫化学分析方法相结合，既有很好的特异性，又有较低的检测限，且其检测信号强度与待测物的浓度成线性关系，因而可直接将检测信号转换为直观易读的待测物浓度值，与其它技术相比，这种传感器对仪器设备的要求低，操作简单。

目前, 安培免疫传感器制备技术主要还处于实验室研究阶段, 使用的电极主要是碳棒、金属丝、金属板、金属薄片等, 或者是采用丝网印刷工艺制备的厚膜玻碳, 这些电极的制备工艺与集成电路工艺不兼容, 不易于微型化和大批量生产, 并且制备的电极一致性差、相关性低, 大大限制了其在临床的应用和发展。采用微纳米加工技术制备微型安培免疫传感器电极具有微型化、与集成电路工艺兼容、批量生产成本低、易于实现传感器的阵列化和现场实时多样品多组分检测等优点。

在安培免疫传感器的制备过程中, 抗体的固定是至关重要的步骤。传统的固定方法有物理吸附、化学交联以及溶胶-凝胶包埋等。其中, 采用物理吸附法固定抗体重复性差, 传感器灵敏度低; 采用化学交联和溶胶-凝胶包埋法不能控制抗体的取向, 并且容易造成抗体失去活性。利用自组装技术构建有序、超薄、重复性好且具有良好生物相容性的自组装单分子层, 将其用于生物分子的固定有利于提高传感器的灵敏度、响应速度和重复性, 能设计和控制生物分子的取向。然而, 在单一成分的自组装单分子层上固定抗体容易在抗体之间形成较大的空间位阻, 阻碍抗体的免疫活性部位对分析样品中抗原的特异识别和结合, 降低了抗体在电极表面的有效负载率, 进而降低了免疫传感器的检测灵敏度。

发明内容

本发明的目的在于提出一种基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器, 该免疫传感器采用微纳米加工技术制备, 集工作电极、对电极、参比电极、敏感膜池和反应池于一片硅基芯片上, 具有结构紧凑、微型化、易于集成、批量生产成本低等优点, 并且电极在结构上具有电场分布均匀, 呈环形对称, 与电化学反应体系中电子媒介体的扩散方向一致的优点, 可以较好地抑制电流噪声、消除干扰。同时, 基于混合自组装膜制备生物分子敏感膜, 使得固定的抗体具有良好的空间分布和定向性, 最大限度地保持抗体的免疫活性, 有利于提高传感器的检测灵敏度。

为达到上述目的, 本发明的技术方案是提供一种基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器, 包括基底, 绝缘层, 电极、反应池, 是采用微纳米加工技术制备的, 其在硅基底上表面, 固接有氧化硅层和氮化硅

层组成的绝缘层，在绝缘层上表面固接有圆形工作电极、环形对电极和环形参比电极，三电极顺次由内而外同心分布，各接有接线板；在圆形工作电极和环形对电极之间，在绝缘层上表面设有一环形敏感膜池；在环形参比电极外周，于绝缘层上表面设有一环形反应池；

在圆形工作电极上表面固接有一层基于混合自组装膜制备的生物分子敏感膜。

所述的基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器，其所述圆形工作电极，为圆形金薄膜工作电极；环形对电极和环形参比电极，为铂薄膜制作；环形敏感膜池和环形反应池，都是由 SU-8 光刻胶围成的。

所述的基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器的制备方法，包括以下步骤：

(1) 用微纳米加工技术制备传感器结构层：首先制作上述传感器的掩模板；其次按照微电子工艺清洗步骤清洗硅片并烘干，依次采用热氧化方法和低压化学气相沉积法在硅片上生长氧化硅和沉积氮化硅以形成绝缘层；然后在绝缘层上旋涂光刻胶，利用工作电极掩模板进行曝光、显影，并在显影后的绝缘层上溅射金，脱胶后清洗即可以制备圆形金薄膜工作电极，再次旋涂光刻胶，利用对电极与参比电极掩模板进行曝光、显影，并在显影后的绝缘层上溅射铂，脱胶后清洗即可以制备环形铂薄膜对电极、环形铂薄膜参比电极；最后在已经形成电极的绝缘层上旋涂 SU-8 光刻胶，依次利用敏感膜池掩模板和反应池掩模板进行两次曝光，通过一次显影，即可以制备环形敏感膜池和环形反应池；

(2) 基于混合自组装膜制备生物分子敏感膜：首先在工作电极表面滴涂体积比为 3:7 的 H_2O_2 和 H_2SO_4 的混合溶液，浸泡处理 30 秒~60 秒得到洁净的工作电极表面；其次将两种巯基化合物分别溶解在去离子水或无水乙醇溶液中，按 1:1~1:10 比例混合，滴涂于工作电极表面，并将此体系在避光、密闭、室温件下静置 2~6 小时，在工作电极表面形成混合自组装膜；然后在工作电极表面滴涂纳米金溶胶，在室温条件下静置 5~10 小时，纳米金结合于混合自组装膜表面，形成“混合自组装膜-纳米金”膜；再在工作电极表面滴涂蛋白质溶液，在 4℃ 条件下静置 8~16 小时，蛋白质被吸附于纳米金膜表面，形成“混合自组装膜-纳米金-蛋白

质”膜；最后在工作电极表面滴涂待测抗原对应的抗体溶液，于 37℃ 条件下温浴 30~60 分钟，抗体被定向地固定在蛋白质上，获得基于混合自组装膜的“混合自组装膜-纳米金-蛋白质-抗体”新型生物分子敏感膜。

所述的基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器的制备方法，其所述（2）中的巯基化合物，是指一端为巯基，另一端为巯基或氨基的双官能团或多官能团化合物。

所述的基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器的制备方法，其所述（2）中的蛋白质，是指蛋白质 A 或蛋白质 G 中的任何一种。

本发明的特点是：

首先，采用微纳米加工技术制备免疫传感器同心式三电极、敏感膜池和反应池，整合工作电极、对电极、参比电极、敏感膜池和反应池于一硅基芯片上。与丝网厚膜印刷技术制备的电极相比，该电极具有体积小，灵敏度高，一致性好，相关性高，工艺简单，与集成电路工艺兼容，大批量生产成本低等优点。

其次，基于混合自组装膜制备生物分子敏感膜，其优点在于，使得固定的抗体具有良好的空间分布，有效地减小了在单一成分的自组装单分子层上固定抗体形成的抗体之间较大的空间位阻；纳米颗粒良好的生物亲和性和高的反应活性有利于提高工作电极表面的反应活性和对抗体的亲和性；蛋白质 A 或蛋白质 G 对抗体 Fc 片段的特异识别和结合性能够有效地控制固定抗体的取向，最大限度地保持了抗体的免疫活性，从而有利于提高传感器的检测灵敏度。

本发明结合微纳米加工技术、混合自组装膜等技术可批量制备安培免疫传感器。该传感器具有生物兼容性良好的生物分子敏感膜，并且具有微型化、与集成电路工艺相兼容、批量生产成本低等优点。用于免疫球蛋白、临床肿瘤标志物等的测定，将推进免疫检测技术、疾病检测和癌症早期诊断普及化和室外化以及在大规模筛查和预后检测方面具有广阔的应用前景，对免疫科学、临床医学、分析化学和材料科学的发展具有重要的意义。

附图说明

图 1 是本发明微型安培免疫传感器结构示意图；其中

图 1A 是微型安培免疫传感器结构俯视图；

图 1B 是微型安培免疫传感器结构剖面图；

图 2 是本发明实施例生物分子敏感膜的制备方法流程图；其中

图 2 (a) 是清洗后洁净的工作电极；

图 2 (b) 是工作电极及在工作电极表面形成的混合自组装膜；

图 2 (c) 是工作电极及在工作电极表面形成的“混合自组装膜-纳米金”膜；

图 2 (d) 是工作电极及在工作电极表面形成的“混合自组装膜-纳米金-蛋白质”膜；

图 2 (e) 是工作电极及在工作电极表面形成的“混合自组装膜-纳米金-蛋白质-抗体”生物分子敏感膜；

图 3 是本发明实施例检测免疫球蛋白 G (IgG) 抗原的标定曲线。

具体实施方式

本发明提出的基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器及其制备方法，现结合附图及实施例进一步说明如下：

本发明的基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器，如图 1 所示，其中，图 1A 是本发明的微型安培免疫传感器结构俯视图；图 1B 是本发明的微型安培免疫传感器结构剖面图。

本发明传感器采用微纳米加工技术制备，其结构是：包括硅基底 1，氧化硅和氮化硅绝缘层 2，及在氧化硅和氮化硅绝缘层上由内而外同心分布的圆形金薄膜工作电极 3、SU-8 光刻胶围成的环形敏感膜池 4、环形铂薄膜对电极 5、环形铂薄膜参比电极 6、SU-8 光刻胶围成的环形反应池 7、以及在圆形金薄膜工作电极 3 上固定的基于混合自组装膜制备的生物分子敏感膜 8。其制备方法如下：

(1) 用微纳米加工技术制备传感器结构层：首先制作上述传感器的掩模板：工作电极掩模板、对电极掩模板、参比电极掩模板、敏感膜池掩模板和反应池掩模板；其次按照微电子工艺清洗步骤清洗硅片（硅基底）1 并烘干，依次采用热氧化方法和低压化学气相沉积法在硅片 1 上生

长氧化硅和沉积氮化硅以形成绝缘层 2；然后在绝缘层 2 上旋涂光刻胶，利用工作电极掩模板进行曝光、显影，并在显影后的绝缘层上溅射金，脱胶后清洗即可以制备圆形金薄膜工作电极 3；再次旋涂光刻胶，利用对电极与参比电极掩模板进行曝光、显影，并在显影后的绝缘层上溅射铂，脱胶后清洗即可以制备环形铂薄膜对电极 5、环形铂薄膜参比电极 6；最后在已经形成电极的绝缘层 2 上旋涂 SU-8 光刻胶，依次利用敏感膜池掩模板和反应池掩模板进行两次曝光，通过一次显影，即可以制备环形敏感膜池 4 和环形反应池 7。

(2) 基于混合自组装膜制备生物分子敏感膜 8 的流程图，如图 2 所示：首先在工作电极 3 表面滴涂体积比为 3:7 的 H_2O_2 和 H_2SO_4 的混合溶液，浸泡处理 30 秒~60 秒得到洁净的工作电极 3（图 2 (a)）；其次将两种一端为巯基，另一端为巯基或氨基的双官能团或多官能团化合物分别溶解在去离子水或无水乙醇溶液中，按 1:1~1:10 比例混合，滴涂于工作电极 3 表面，并将此体系在避光、密闭、室温条件下静置 2~6 小时，在工作电极 3 表面形成混合自组装膜（图 2 (b)）；然后在工作电极 3 表面滴涂纳米金溶胶，在室温条件下静置 5~10 小时，纳米金结合于混合自组装膜表面，形成“混合自组装膜-纳米金”膜（图 2 (c)）；再在工作电极 3 表面滴涂蛋白质 A 或蛋白质 G 溶液，在 4℃条件下静置 8~16 小时，蛋白质 A 或蛋白质 G 被吸附于纳米金表面，形成“混合自组装膜-纳米金-蛋白质”膜（图 2 (d)）；最后在工作电极 3 表面滴涂待测抗原对应的抗体溶液，于 37℃条件下温浴 30~60 分钟，抗体被定向地固定在蛋白质 A 或蛋白质 G 上，获得基于混合自组装膜的“混合自组装膜-纳米金-蛋白质-抗体”新型生物分子敏感膜（图 2 (e)）。

实施例：

下面以免疫球蛋白 G (IgG) 的测定为例说明基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器及其制备方法。IgG 的临床意义是与多种先天性和自身免疫系统疾病相关。

1、基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器，如图 1 所示：

该传感器采用微纳米加工技术制备，包括硅基底 1，氧化硅和氮化硅

绝缘层 2, 及在氧化硅和氮化硅绝缘层 2 上由内而外同心分布的圆形金薄膜工作电极 3、SU-8 光刻胶围成的环形敏感膜池 4、环形铂薄膜对电极 5、环形铂薄膜参比电极 6、SU-8 光刻胶围成的环形反应池 7、以及在圆形金薄膜工作电极 3 上固定的基于混合自组装膜制备的生物分子敏感膜 8。

本发明实施例的金薄膜工作电极 3 半径为 0.5mm, 铂薄膜对电极 5 的内径为 1mm、外径为 1.3mm, 铂薄膜参比电极 6 的内径为 1.5mm、外径为 1.8mm, 敏感膜池 4 高度为 50 μ m, 反应池 7 高度为 100 μ m。

2、基于混合自组装膜的微型安培免疫传感器的制备。

(1) 用微纳米加工技术制备传感器结构层: 首先制作上述传感器的掩模板: 工作电极掩模板、对电极掩模板、参比电极掩模板、敏感膜池掩模板和反应池掩模板; 其次按照微电子工艺清洗步骤清洗硅片 1 并烘干, 依次采用热氧化方法和低压化学气相沉积法在硅片 1 上生长氧化硅 (厚度为 1 μ m) 和沉积氮化硅 (厚度为 300nm) 以形成绝缘层 2; 然后在绝缘层 2 上旋涂光刻胶, 利用工作电极掩模板进行曝光、显影, 并在显影后的绝缘层 2 上溅射金 (厚度为 300nm), 脱胶后清洗即可以制备圆形金薄膜工作电极 3, 再次旋涂光刻胶, 利用对电极与参比电极掩模板进行曝光、显影, 并在显影后的绝缘层上溅射铂 (厚度为 300nm), 脱胶后清洗即可以制备环形铂薄膜对电极 5 和环形铂薄膜参比电极 6; 最后在已经形成电极的绝缘层 2 上旋涂 SU-8 光刻胶, 依次利用敏感膜池掩模板和反应池掩模板进行两次曝光, 一次显影, 即可以制备上述环形敏感膜池 4 和环形反应池 7。

(2) 基于混合自组装膜制备生物分子敏感膜 8 的流程图, 如图 2 所示: 首先在工作电极 3 表面滴涂溶液的体积比为 3:7 的 H_2O_2 和 H_2SO_4 的混合溶液, 浸泡处理 30 秒得到洁净的工作电极 3 表面 (图 2 (a)); 其次将配置好的 10mM 1,6-己二硫醇和 10mM 巯基乙胺混合溶液按 1:1 比例混合滴涂于工作电极表面, 并将此体系在避光、密闭、室温条件下静置 2 小时, 之后用去离子水清洗, 氮气吹干, 在工作电极 3 表面形成 1,6-己二硫醇和巯基乙胺混合自组装膜 (图 2 (b)); 然后在工作电极 3 表面滴涂纳米金溶胶, 在室温条件下静置 5 小时, 纳米金结合于混合自组装膜

表面，之后用去离子水清洗，干燥，形成“1,6-己二硫醇和巯基乙胺混合自组装膜-纳米金”膜（图2（c））；再在工作电极3表面滴涂蛋白质A溶液，在4℃条件下静置10小时，蛋白质A被吸附于纳米颗粒金膜表面，之后用磷酸盐缓冲液（pH6.0）清洗，干燥，形成“1,6-己二硫醇和巯基乙胺混合自组装膜-纳米金-蛋白质A”膜（图2（d））；最后在工作电极3表面滴涂IgG抗体溶液，于37℃条件下温浴60分钟，IgG抗体被定向地固定在蛋白质A上，之后用磷酸盐缓冲液（pH7.4）清洗，干燥，获得基于混合自组装膜的“1,6-己二硫醇和巯基乙胺混合自组装膜-纳米金-蛋白质A-IgG抗体”新型生物分子敏感膜（图2（e））。为减少非特异性反应，再向工作电极3表面滴涂1%的牛血清蛋白，4℃静置1小时，以封闭电极表面的非特异性活性位点，再用磷酸盐缓冲液（pH7.4）清洗，干燥备用。

3、IgG的测定。

（1）测定时直接在上述免疫传感器工作电极3上滴加2μl待测IgG抗原样品溶液与工作电极表面IgG抗体发生免疫反应，37℃温育30分钟，洗涤，吹干；再加入2μl过量辣根过氧化物酶标IgG抗体溶液与被结合在工作电极3上的IgG抗原发生免疫反应，37℃温育30分钟，洗涤，吹干。

（2）电流测定：底物溶液为H₂O₂与KI，浓度分别为1mM，3mM，由磷酸盐缓冲液（pH7.4）稀释而成。当向传感器反应池7滴加20μl底物溶液后，使用电化学分析仪检测恒电位150mV下的时间-电流曲线；从电流-浓度标准曲线（图3）可查得待测IgG抗原的浓度。

（3）电流-浓度标准曲线的制作：采用上述免疫传感器和测定方法，将待测IgG抗原溶解在磷酸盐缓冲液（pH7.4）中配成溶液，并稀释成一系列不同浓度的IgG抗原溶液，分别测定其标准曲线。结果如图3所示：检测下限：10ng/ml；线性范围：30ng/ml~1100ng/ml。

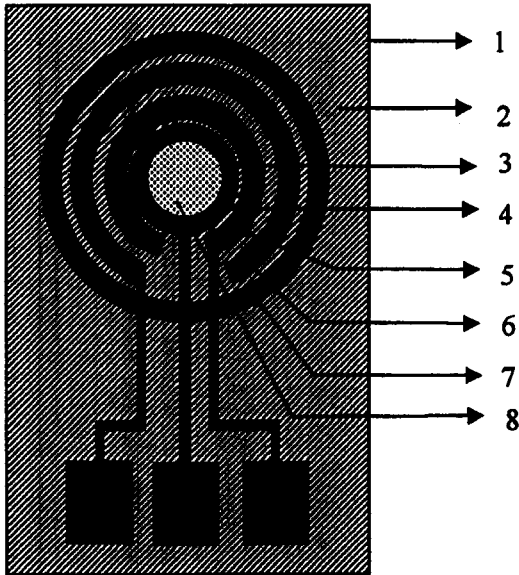


图 1A

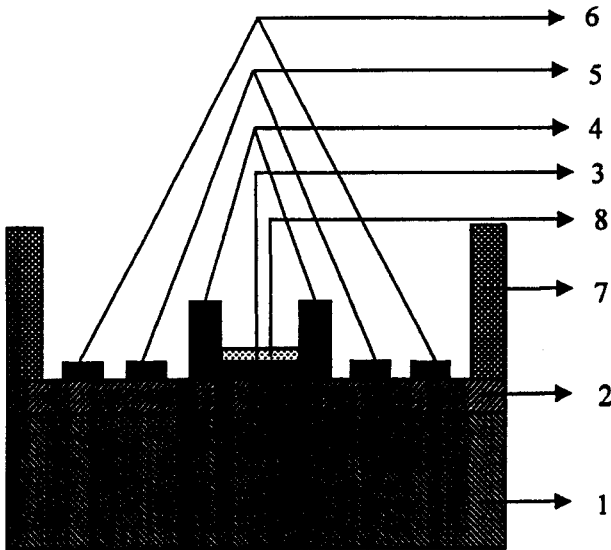
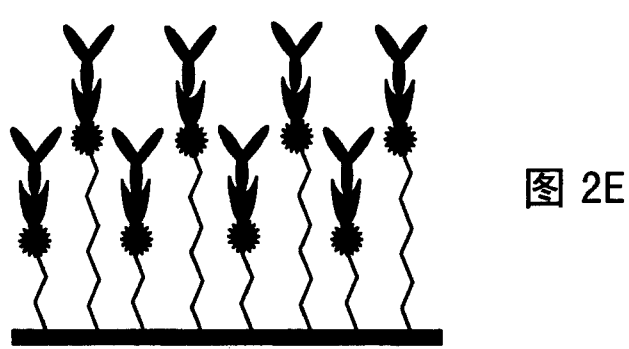
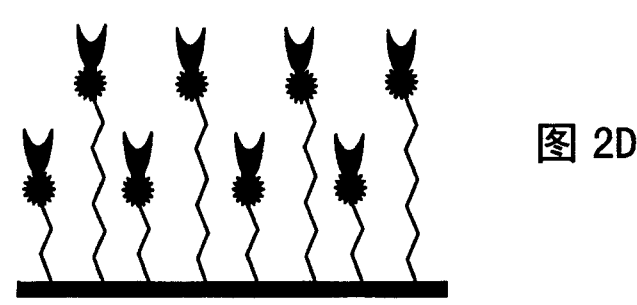
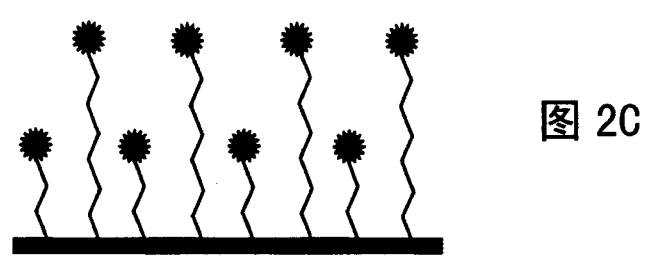
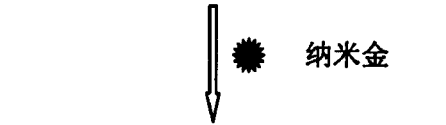
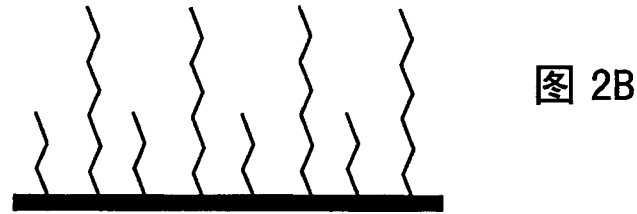
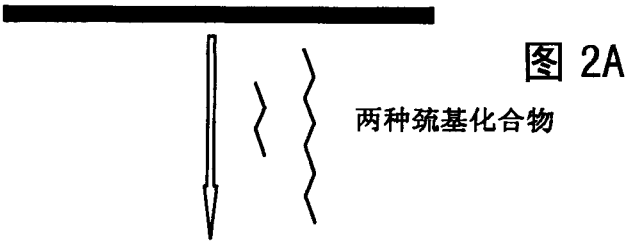


图 1B



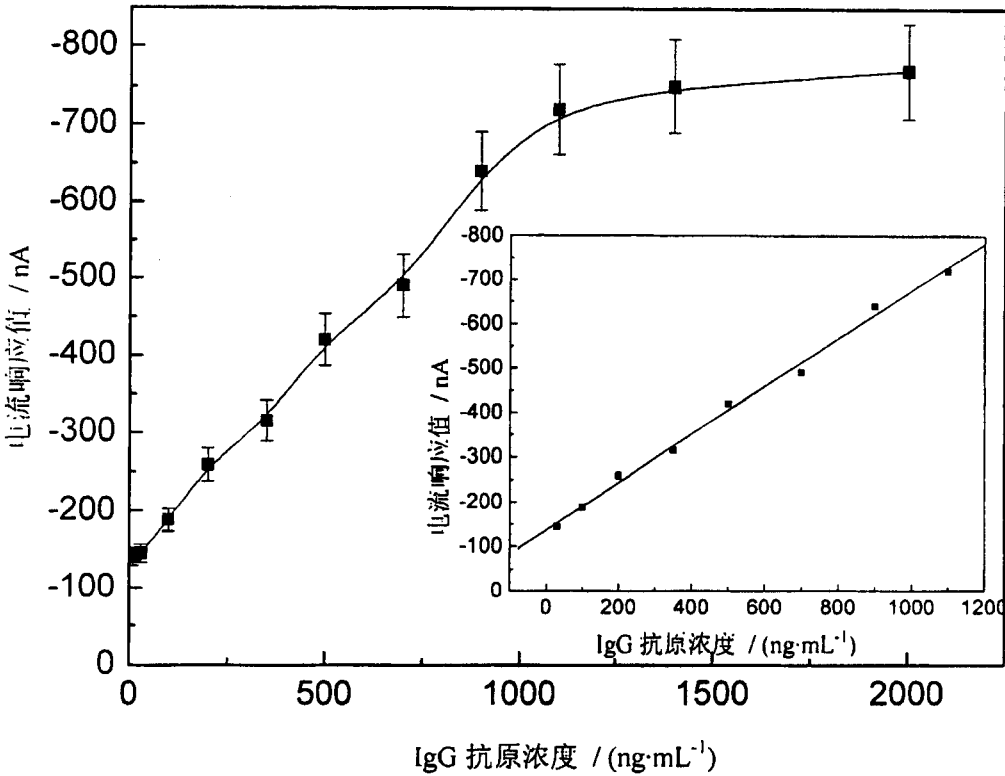


图 3