



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102680683 B

(45) 授权公告日 2014.07.02

(21) 申请号 201210173858.9

(22) 申请日 2012.05.30

(73) 专利权人 中国人民解放军第306医院
地址 100101 北京市朝阳区安翔北里9号

(72) 发明人 裴振华 全保刚 牛忠英 施生根
汤楚华 史亮

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 关畅

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 27/02 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101517403 A, 2009.08.26, 说明书第1页

CN 101400993 A, 2009.04.01, 全文.

WO 2011156088 A1, 2011.12.15, 全文.

US 2012009665 A1, 2012.01.12, 全文.

EP 2423162 A1, 2012.02.29, 全文.

审查员 胡晓佳

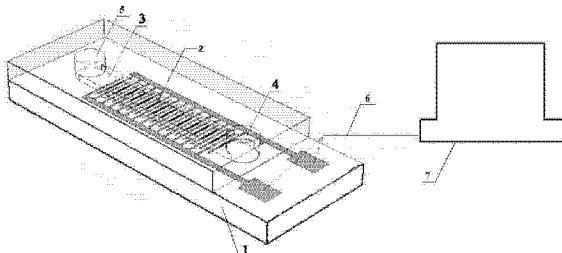
(54) 发明名称

一种基于导电聚合物的牙周细菌阻抗免疫传感器

(57) 摘要

本发明公开了一种基于导电聚合物修饰电极的牙周细菌阻抗免疫传感器。所述免疫传感器包括设于固相基底上的工作微电极与所述固相基底共价键合在一起的微流芯片通道，所述微流芯片通道设于所述工作微电极上；所述微流芯片通道的两端分别设有进样口和出样口；所述工作微电极通过导线与电化学工作站相连接；所述工作微电极的表面上沉积有聚吡咯，所述聚吡咯上修饰有特异性抗体。本发明提供的牙周细菌阻抗免疫传感器的优点在于：1、样本检测在微纳米空间中进行，消耗微量试剂和样品，降低了成本；2、工作微电极表面修饰导电聚合物膜或者纳米线阵列，增加单位面积抗体固定数量和检测比表面积，从而大大提高传感器的灵敏度、抗干扰性以及响应时间。

B
CN 102680683 B
CN



1. 一种基于导电聚合物的牙周细菌阻抗免疫传感器，其特征在于：所述免疫传感器包括设于固相基底上的工作微电极，与所述固相基底共价键合在一起的微流芯片通道，所述微流芯片通道设于所述工作微电极上；所述微流芯片通道的两端分别设有进样口和出样口；所述工作微电极通过导线与电化学工作站相连接；

所述工作微电极的表面上沉积有聚吡咯，所述聚吡咯上修饰有特异性抗体；

所述工作微电极为叉指电极；

所述叉指电极包括 10 对～15 对分支电极，所述分支电极之间的间隔为 20 μm～50 μm；所述分支电极的宽度为 50 μm～100 μm。

2. 根据权利要求 1 所述的免疫传感器，其特征在于：所述固相基底为氧化硅基片、玻璃或柔性基底。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的免疫传感器，其特征在于：所述工作微电极为金电极或铂电极。

4. 根据权利要求 1 所述的免疫传感器，其特征在于：所述微流芯片通道的材质为聚二甲基硅氧烷。

5. 根据权利要求 1 所述的免疫传感器，其特征在于：所述特异性抗体为牙周细菌菌体表面蛋白抗体。

一种基于导电聚合物的牙周细菌阻抗免疫传感器

技术领域

[0001] 本发明涉及一种牙周细菌的定量检测装置，具体涉及一种灵敏度高、检测范围广、响应时间短、抗干扰性强，且工艺简单、成本低的，具有导电聚合物修饰电极的牙周细菌阻抗免疫传感器。

背景技术

[0002] 牙周炎是世界范围内的多发病、常见病，被世界卫生组织列为危害人类健康的第三大类慢性非传染性疾病，严重危害口腔和全身健康，是心血管疾病、糖尿病等全身性疾病的重要危险因素，近来研究更是发现牙周炎可显著增加某些癌症的发病率。目前，我国成人组牙周病的发病率高达 80% 以上，中年以上为好发人群，人口老龄化的增加更进一步加重了患者和卫生系统的医疗负担，因此及时监控和防治牙周炎已成为公共卫生系统和人民大众及其关注和急需解决的健康问题。

[0003] 牙周炎病因复杂，文献报道遗传因素、免疫因素等均与牙周炎发病关系密切，但是细菌因素始终是引起牙周炎的始动因素，是造成牙周破坏的必需因素。患牙局部牙周优势菌的数量变化是评价病情的重要指标。另外，目前临床在牙周炎的药物辅助治疗过程中，不同个体的常规用药基本相同，而患者对药物治疗的疗效不同则从一定程度上侧面反映了针对性用药的临床价值，及时了解牙周患部的优势菌定植情况，对临床药物辅助治疗牙周炎也具有重要指导意义。

[0004] 但目前牙周细菌检测并没有成为牙周常规检查的一部分，很大原因是因为目前适于临床椅旁细菌检测的技术和手段发展相对滞后。传统用于牙周细菌定量检测的手段主要是细菌培养和定量 PCR 技术，存在检测条件苛刻、检测周期长、成本高、临床椅旁检测使用不便等缺陷。尽管我们近期基于细菌细胞的电学性质，结合免疫磁分离技术，建立了基于液体电极微流芯片的牙周细菌电化学测菌法，实现了牙周主要致病菌牙龈卟啉单胞菌的快速无标记电阻抗定量分析，但是检测系统的灵敏度、稳定性、便携性、抗干扰性、可抛性仍需要进一步改进。

[0005] 随着微纳米加工、新材料和新器件技术的发展进步，基于导电聚合物微纳米结构的高性能生物传感器的研发为实现椅旁牙周多菌种同步快速检测提供了新的机遇和途径。目前国内尚未见利用牙周细菌细胞的电学性质，基于导电聚合物的用于牙周细菌直接量化的生物传感器报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的是针对目前牙周细菌椅旁检测技术上的局限，提供一种灵敏度高、检测范围广、响应时间短、抗干扰性强，且工艺简单、成本低的，易于批量制备和向可抛弃型终端产品转化的，具有导电聚合物修饰电极的牙周细菌阻抗免疫传感器。

[0007] 本发明提供的一种牙周细菌阻抗免疫传感器，包括设于固相基底上的工作微电极，与所述固相基底共价键合在一起的微流芯片通道，所述微流芯片通道设于所述工作微

电极上;所述微流芯片通道的两端分别设有进样口和出样口;所述工作微电极通过导线与电化学工作站相连接;

[0008] 所述工作微电极的表面上沉积有导电聚合物,所述导电聚合物上修饰有牙周细菌特异性抗体。

[0009] 上述的阻抗免疫传感器中,所述固相基底可为氧化硅基片、玻璃或柔性基底。

[0010] 上述的阻抗免疫传感器中,所述工作微电极可为金电极或铂电极。

[0011] 上述的阻抗免疫传感器中,所述工作微电极可为叉指电极,所述叉指电极可包括10对~15对分支电极,所述分支电极之间的间隔可为 $20\text{ }\mu\text{m}$ ~ $50\text{ }\mu\text{m}$;所述分支电极的宽度可为 $50\text{ }\mu\text{m}$ ~ $100\text{ }\mu\text{m}$ 。

[0012] 上述的阻抗免疫传感器中,所述微流芯片通道的材质可为聚二甲基硅氧烷(polydimethylsilicone, PDMS)。

[0013] 上述的阻抗免疫传感器中,所述特异性抗体为牙周细菌菌体表面蛋白抗体,本发明可通过更换所述导电聚合物层上的生物分子识别元件—特异性抗体,即可用于多种生物分子的检测。

[0014] 本发明提供的工作微电极表面上沉积的导电聚合物层,可通过无模板电化学法在所述工作微电极上得到;导电聚合物层上的牙周细菌特异抗体,可通过化学交联法在所述导电聚合物层上固定。

[0015] 本发明还提供上述的牙周细菌阻抗免疫传感器在牙周细菌量化中的应用。

[0016] 本发明由于采取以上技术方案,具有以下优点:1、样本检测在微纳米空间中进行,消耗微量试剂和样品,降低了成本;2、工作微电极表面修饰导电聚合物膜或者纳米线阵列,增加单位面积抗体固定数量和检测比表面积,从而大大提高传感器的灵敏度、抗干扰性以及响应时间;3、工艺简单,通过更换所述导电聚合物层上的生物分子识别元件—特异性抗体,即可用于多种生物分子的检测;4、所需微纳米加工技术和生物技术成熟,易于批量制备和向可抛弃型终端产品转化。

附图说明

[0017] 图1是根据本发明的免疫传感器结构示意图。

[0018] 图2是根据本发明循环伏安法制备聚吡咯的循环伏安曲线。

[0019] 图3是根据本发明循环伏安法聚合的聚吡咯的扫描电镜照片。

[0020] 图中各标记如下:1 氧化硅基片、2 叉指电极、3 微流芯片通道、4 进样口、5 出样口、6 导线、7 电化学工作站。

具体实施方式

[0021] 下面结合附图对本发明做进一步说明,但本发明并不局限于以下实施例。

[0022] 本发明提供的牙周细菌阻抗免疫传感器包括设于氧化硅基片1上的叉指电极2和与该氧化硅基片1共价键合在一起的微流芯片通道3,且该微流芯片通道3设于叉指电极2之上,该叉指电极2为由厚度为10nm的钛金属层和厚度为80nm金层沉积为一体的电极(可使该电极更牢固地固定在氧化硅基片1上),其包括15对分支电极,分支电极之间的间隔为 $50\text{ }\mu\text{m}$,其宽度为 $100\text{ }\mu\text{m}$,该叉指电极2可采用标准的光刻技术进行制备:首先通过在氧化

硅基片 1 上甩胶、前烘、曝光和显影的步骤得到做好电极图形的硅片 ; 接着在做好图形的硅片上先后通过热蒸镀法制备钛和金的薄层 ; 最后用丙酮溶液将光刻胶去除后即可 ; 该微流芯片通道 3 的材质为聚二甲基硅氧烷, 其高度为 $50 \mu\text{m}$; 该微流芯片通道 3 的两端分别设有进样口 4 和出样口 5 ; 叉指电极 2 通过导线 6 与电化学工作站 7 相连接 ; 叉指电极 2 的表面上沉积有聚吡咯层, 该聚吡咯层上修饰有特异性抗体。

[0023] 上述的免疫传感器中, 组成叉指电极 2 的分支电极可为 10 对 ~ 15 对, 分支电极之间的间距可在 $20 \mu\text{m} \sim 50 \mu\text{m}$ 之间的范围内进行调整, 其宽度可在 $50 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$ 之间的范围内进行调整。

[0024] 上述免疫传感器中的聚吡咯层可通过循环伏安法 (Cyclic Voltammetry, CV) 进行制备, 实验采取三电极体系, 工作电极为叉指电极 2 中的一侧叉指, 以另一侧叉指作为对电极, 参比电极可为自制的 Ag/AgCl 准参比电极 (制作方法如下 : 取一段粗银丝, 经过物理打磨去除表面的氧化层, 然后分别放置于丙酮、乙醇和去离子水中超声清洗各 5 分钟, 氮气吹干后备用 ; 用浓盐酸与去离子水按 1 : 1 的体积比混合配置电解液, 将清洗干净的银丝作为工作电极, 铂片或不锈钢片为对电极, 在 1.4V 的恒定电压下反应 10 分钟, 最后获得表面均匀、褐红色的 Ag/AgCl 准参比电极), 实验中使用的电解液成分是 0.04M 的樟脑磺酸, 0.2M 的吡咯, 2.0M 的 pH=6.86 的磷酸盐缓冲溶液 ; 实验中设定循环伏安的扫描范围为 -0.1V ~ 1.2V (vs. Ag/AgCl), 扫描速率为 20mA/s, 循环次数为 5 次 ; 从图 3 所示的循环伏安图中可以得到这个体系的聚合参数如下 : 吡咯单体的氧化峰出现在 0.9V, 吡咯的聚合电流密度为 $1\text{mA}/\text{cm}^2$; 吡咯单体的氧化进行得很快, 基本上第一圈循环就可以在电极表面看到黑色的聚吡咯 ; 由于已经有聚吡咯覆盖了工作电极导致电极表面电导率下降, 所以在扫描第二个循环时氧化电位处的电流要远小于第一个循环的电流。

[0025] 上述免疫传感器中的抗体固定采用 EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐) -NHS(N-羟基琥珀酰亚胺) 化学交联法固定抗体。首先抗体固定液 (包括 2 毫克 / 毫升抗体, 60 毫摩尔 EDC、2 毫克 / 毫升 NHS) 经进样口 4 注入微流芯片通道 3 内, 和聚吡咯室温共孵育 3 个小时, 然后用磷酸缓冲液 (pH 7.2) 冲洗去除多余抗体固定液 ; 然后用牛血清白蛋白溶液 (1M, pH 7.2) 封闭非特异性位点 ; 最后用磷酸缓冲液 (pH 7.2) 冲洗去除多余牛血清白蛋白。

[0026] 下面以牙周致病菌牙龈卟啉单胞菌检测为例, 利用上述阻抗免疫传感器进行细菌检测包括以下步骤 :

[0027] ① 在微流芯片通道 3 中注入待检测的样本, 样本溶液经进样口 4 注入微流芯片通道 3 内, 室温孵育 30 分钟, 使得样本中的靶细菌充分被叉指电极 2 表面修饰的特异性抗体捕获 ;

[0028] ② 将去离子水注入微流芯片通道 3 内, 目的为冲洗去除未与抗体结合的多余样本 ;

[0029] ③ 通过导线 6 连接叉指电极 2 与电化学工作站 7, 通过给叉指电极 2 施加一个特定频率的交流电压并记录系统反馈回的交流电流以及相位差, 从而获得系统的阻抗值, 读取电化学工作站 7 中显示的阻抗数据, 记录测量出的牙龈卟啉单胞菌溶液的阻抗值 ;

[0030] ④ 根据获得的牙龈卟啉单胞菌标准菌株浓度 - 阻抗标准曲线, 推算出实际临床样本中牙龈卟啉单胞菌的浓度。

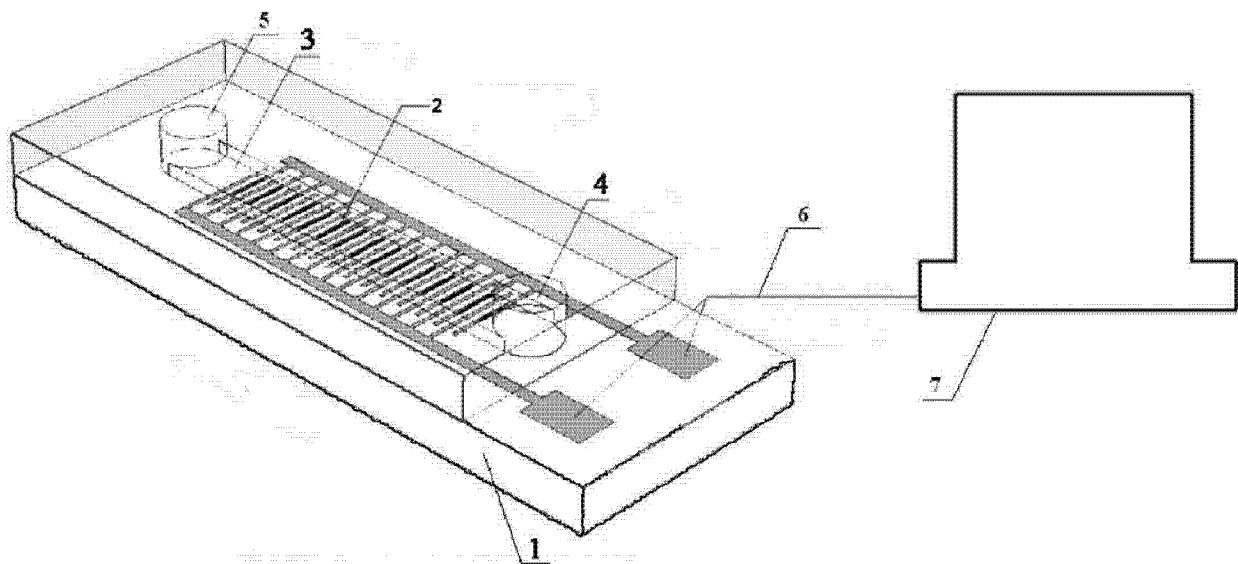


图 1

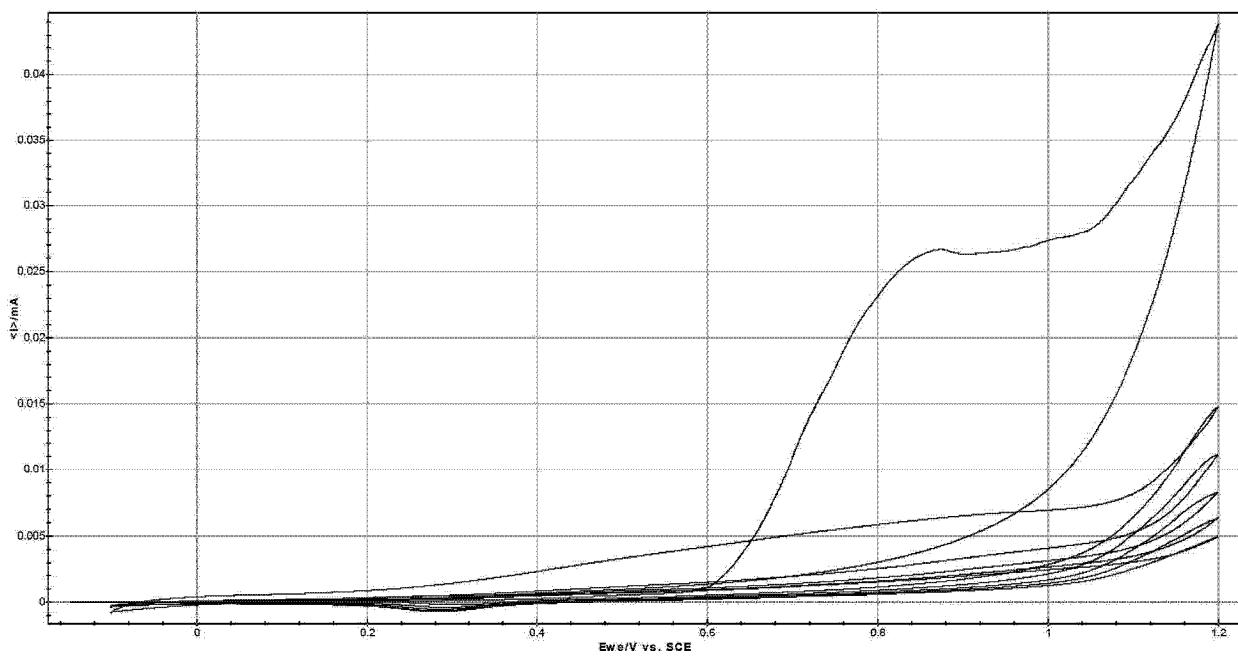


图 2

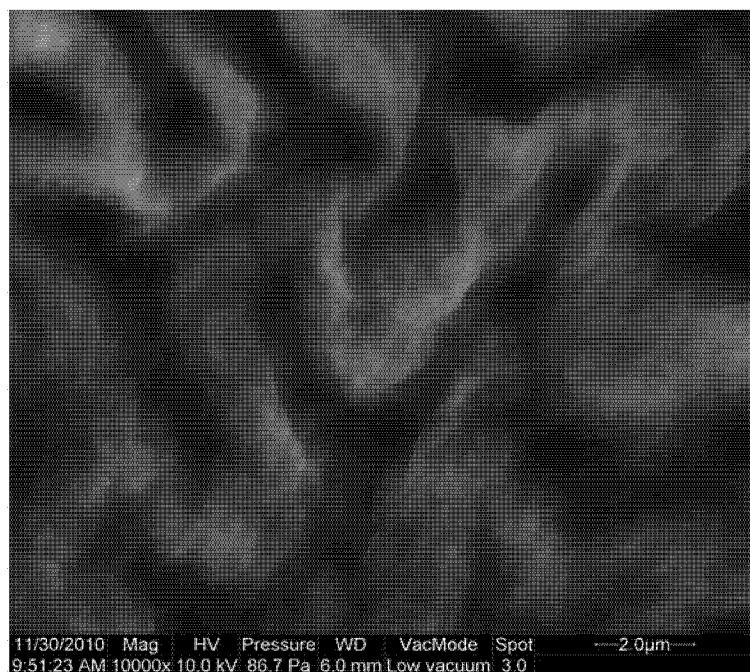


图 3