

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01138830.7

[43] 公开日 2002 年 6 月 5 日

[11] 公开号 CN 1352388A

[22] 申请日 2001.12.12 [21] 申请号 01138830.7

[74] 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公司

[71] 申请人 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所

代理人 梁爱荣

地址 130022 吉林省长春市人民大街 140 号

[72] 发明人 马保亮 范 翊 李亚军

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图页数 1 页

[54] 发明名称 一种检测细菌的电化学生物传感器电极的制备

## [57] 摘要

本发明属于检测细菌的电化学生物传感器电极的制备其步骤如下:a、硅基底的处理;b、金膜的制备;c、硫醇自组装膜的制备;d、聚双炔单分子层的制备。采用自组装技术,实现了用硫醇和聚双炔及带有受体的聚双炔双分子层仿生膜对金电极表面的修饰,并用循环伏安法检测了该电极与细菌培养后电流的响应值,制备了检测细菌的电化学生物传感器,其原理是双层仿生膜中的聚双炔单分子层的结构受生物分子识别的影响,这阻碍了探测分子与金电极表面的运输,从而产生了非常明显的电流响应。这种生物传感器与以前的相比具有制备简单,特异性强等优点。本发明快速地对细菌进行检测,在医疗诊断、食品工业和环境保护领域均具有十分重要的意义。

## 权 利 要 求 书

1、一种检测细菌的电化学生物传感器电极的制备其步骤如下：

(1) 金电极的制备

a、 硅基底的处理

首先，把硅片放入丙酮溶液中做超声处理；然后，再把硅片放入乙醇溶液中同样做超声处理；最后，把硅片放入浓硫酸中加热，直到冒出蒸汽为止，取出硅片并分别用热和冷的去离子水将其冲净待用；

b、 金膜的制备

用蒸发镀膜法在待用硅片的表面镀制一层金膜，则形成金电极；

(2) 对金电极进行修饰：

c、 硫醇自组装膜的制备：把制备好的金电极在硫酸和过氧化氢的混合溶液中浸泡一定的时间取出，用去离子水和乙醇将其表面冲净后，将其放入具有一定温度的十八烷基硫醇的溶液中进行自组装，形成带有硫醇薄膜的金电极；

d、 聚双炔朗缪单分子层的制备

将带有受体的聚双炔类脂衍生物溶于氯仿与甲醇混合的溶剂中形成溶液，将 10,12 二十五碳双炔酸（PDA）溶于氯仿与甲醇混合的溶剂中形成溶液；再将上述两种溶液以一定比例形成带有受体的聚双炔类脂衍生物和 PDA 混合液铺展在 KSV-5000 双区域拉膜仪上，混合液挥发一定时间后，拉膜仪以一定的速度压膜形成聚双炔朗缪单分子层，当单分子层的目标压力达到 20mN/m 后稳定一定时间，再用紫外灯照射后，用水平接触法将单分子层转移到修饰有硫醇薄膜的金电极上，形成了带有双分子层的电化学生物传感器的电极。

# 说 明 书

## 一种检测细菌的电化学生物传感器电极的制备

**技术领域：**本发明属于生物传感器制备领域，涉及利用电化学的方法检测细菌的生物传感器电极的制备。

**背景技术：**众所周知，微生物与人类的生活息息相关，且它们对人类的生活有着十分重要的影响。例如，许多细菌能够通过释放毒素使人致病；同时也有许多细菌能够被我们所利用为人类服务。目前，一般检测细菌的方法是通过测定细菌的生理、形态特征或通过测定细菌的基因组成来鉴定细菌。这些方法的操作复杂，且需要花费很长的时间，它们已远远不能满足当前对微生物检测的要求。在这种情况下，许多研究人员努力地探索新的方法，以便对细菌进行快速地检测。1993年Charach等人在科学上首次报导了利用带有细胞表面受体的聚双炔薄膜在与对应的配体分子结合时，薄膜的颜色可以由蓝变红这种现象对流感病毒进行了直接的比色检测。这种亲合变色现象引起了人们的广泛兴趣。国内有不少单位对此进行了研究，如北京感光所的江龙等人利用带有受体的聚双炔脂质体对细菌进行了检测。这些研究都集中于利用聚双炔的光学性质对细菌进行检测，而利用电化学的方法检测细菌的报道还很少。

**详细内容：**本发明的目的是为了解决上述对细菌检测操作复杂，且需要花费时间长的问题，本发明出一种生物传感器电极的制备其步骤如下：

(1) 金电极的制备

### a、硅基底的处理

首先，把硅片放入丙酮溶液中做超声处理；然后，再把硅片放入乙醇溶液中同样做超声处理；最后，把硅片放入浓硫酸中加热，直到冒出蒸汽为止，取出硅片并分别用热和冷的去离子水将其冲净待用；

### b、金膜的制备

用蒸发镀膜法在待用硅片的表面镀制一层金膜，则形成金电极；

#### (2) 对金电极进行修饰：

c、硫醇自组装膜的制备：把制备好的金电极在硫酸和过氧化氢的混合溶液中浸泡一定的时间取出，用去离子水和乙醇将其表面冲净后，将其放入具有一定温度的十八烷基硫醇的溶液中进行自组装，形成带有硫醇薄膜的金电极；

### d、聚双炔朗缪单分子层的制备

将带有受体的聚双炔类脂衍生物溶于氯仿与甲醇混合的溶剂中形成溶液，将 10,12 二十五碳双炔酸（PDA）溶于氯仿与甲醇混合的溶剂中形成溶液；再将上述两种溶液以一定比例形成带有受体的聚双炔类脂衍生物和 PDA 混合液铺展在 KSV-5000 双区域拉膜仪上，混合液挥发一定时间后，拉膜仪以一定的速度压膜形成聚双炔朗缪单分子层，当单分子层的目标压力达到  $20\text{mN/m}$  后稳定一定时间，再用紫外灯照射后，用水平接触法将单分子层转移到修饰有硫醇薄膜的金电极上，形成了带有双分子层的电化学生物传感器的电极。

本发明采用上述超分子自组装技术，实现了用硫醇和聚双炔及

带有受体的聚双炔类脂衍生物的聚双炔双分子层仿生膜对金电极表面的修饰，再利用循环伏安法测量本发明电极与细菌培养后电流响应值的变化，则制成了检测细菌的电化学生物传感器。本发明传感器的原理是双层仿生膜中的聚双炔单分子层的结构受生物分子识别的影响：即当双层仿生膜表面的受体带有受体的聚双炔类脂衍生物与细菌表面的配体识别后，聚双炔薄膜的结构变得更加有序，使膜中缺陷的数量减少，这影响了探测分子与金电极表面的运输，从而产生了非常明显的电流响应。同时，所测数据可直接用计算机进行处理，这也使得数据处理的速度大大加快，有利于细菌的定量检测。

本发明的优点是：采用本发明的技术方案解决了对细菌检测操作复杂，且需要花费时间长的问题，提供了一种容易制备且测试操作简单方便、灵敏度高、特异性强、响应时间短、可定量检测细菌浓度的生物传感器的电极。实现了对大肠杆菌 K12 的直接检测。本发明快速地对细菌进行检测，在医疗诊断、食品工业和环境保护领域均具有十分重要的意义。本发明还可用硫醇和聚双炔及带有其它受体的聚双炔双分子层仿生膜对不同的细菌和病毒进行检测。

#### 附图说明：图 1 是本发明电极结构示意图

**具体实施方式：**如图 1 所示包括有：硅片（1）、金膜（2）、硫醇薄膜（3）、单分子层（4）、受体（5）。受体（5）可选用甘露糖或唾液酸。硅片（1）先在丙酮溶液中做超声处理 15 分钟左右然后再放入乙醇溶液中做超声处理 15 分钟左右；硅片（1）的表面镀制金膜（2）的厚度可为 70 nm 或 100nm 或 150 nm。金电极在硫酸和过氧化氢的混合溶液中可浸入 5 分钟左右并放入 0.5 mM 或 1mM 或

1.5 mM 的十八烷基硫醇的溶液中进行自组装。在 KSV-5000 双区域拉膜仪上铺 1mmolMPDA/PDA 体积比 1: 20 的氯仿/甲醇体积比 5: 1 溶液，挥发 30 分钟左右，以 4mm/分的速度压膜，目标压力为 20mN/m 后稳定 15 分钟左右，用 254nm 的紫外灯照射 10 秒后用水平接触法将其转移到修饰有硫醇薄膜（3）的金电极上。PDA/MPDA 混合单分子膜（4）的制备条件为 PH=6.5 或 7、温度为 20℃或 25℃、目标压为 20mN/m。

将本发明制备好的双分子层的电极作为工作电极，及选用本发明之外的 Ag/AgCl 作为参比电极，用铂丝作为对极组成三电极系统，选用 0.1M KCl, 5mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 和 5mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 作为电解液，对三电极系统进行循环伏安扫描，记录此时的峰电流为 I<sub>0</sub>；然后把双分子层的电极置于浓度为 9×10<sup>8</sup>Cell/ml 的大肠杆菌 K12 中培养 1 分钟后，再对其进行循环伏安扫描，记录此时的峰电流为 I<sub>x</sub>；并由此计算出电流的响应值 (I<sub>x</sub>/I<sub>0</sub>) ×100%。按照这种方法，分别测出双分子层电极与大肠杆菌 K12 培养 2、3、5 和 8 分钟后的电流 I<sub>x</sub> 的响应值。在此基础上，作出双分子层电极对大肠杆菌 K12 不同时间的响应曲线。由该响应曲线获得检测的最佳时间后，又在此最佳时间下，测量了双分子层电极对不同浓度细菌的响应曲线。同时，我们又测试了双分子层电极放在生理盐水中和单分子层表面无受体时，双分子层电极对大肠杆菌的响应曲线，结果表明：这种电化学传感器对大肠杆菌的检测是特异性的，且其检测的灵敏度非常高。

## 说 明 书 附 图

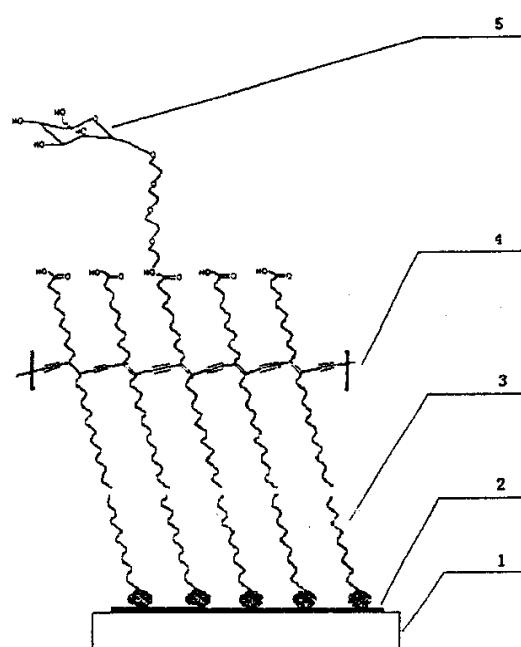


图. 1