

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl<sup>6</sup>



[12] 发明专利申请公开说明书

G01D 5/00

G01N 27/26

[21] 申请号 96114794.6

[43]公开日 1998年7月1日

[11] 公开号 CN 1186225A

[22]申请日 96.12.26

[71]申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022吉林省长春市人民大街159号

[72]发明人 董绍俊 李景虹 丁林 汪尔康

权利要求书 1 页 说明书 3.0 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 涂抹-冷冻法制备生物传感器

[57]摘要

本发明属于使用涂抹-冷冻法制备生物传感器的方法。

本发明的目的是使用硫醇在基底电极上形成稳定的单分子膜，利用受体对配体的生物识别作用制备磷脂膜型生物传感器。首先将磷脂单层涂抹在烷基硫醇自组装膜上，接着将受体嵌入磷脂膜，并在低温下冷冻，将有机溶剂冻出和磷脂膜进行重组，制备成无溶剂的磷脂膜生物传感器。它与以往生物传感器相比，制备简便、易重现、稳定性好、寿命长、检测线性范围宽、检测下限低、易嵌入受体和相容性好等特点。

(BJ)第 1456 号

## 权利要求书

---

1. 一种涂抹-冷冻法制备生物传感器, 其特征在于将金电极放入含7:3的浓硫酸: 30%过氧化氢的混和溶液中进行化学氧化处理, 并在高纯氮气氛下干燥, 再浸入1 mM ~ 10 mM的链长为10 ~ 20的烷基硫醇的乙醇或己烷溶液中形成疏水性的硫醇自组膜修饰金电极, 将10~30 mg/ml 磷脂酰肌醇和胆碱的葵烷溶液涂抹在烷基硫醇单分子膜修饰金电极上, 将此磷脂膜电极放入缬氨霉素和莫能菌素的溶液中培养6 ~ 24小时, 再在低温-5~-20℃下将有机溶剂冷冻, 清洗后即获得功能化的支撑磷脂膜生物传感器。

## 说明书

---

### 涂抹 - 冷冻法制备生物传感器

本发明属于使用涂抹 - 冷冻法制备生物传感器的方法。

生物膜本质上是一种天然的生物传感器,它的基本结构已被普遍认为是双层磷脂膜,主要以平板双层磷脂膜和球形磷脂体为代表,是发展电子器件的基本母板结构。通过在双层磷脂膜中选择性地嵌入具有生物识别性的受体而获得接近生物膜的敏感元件,以识别和检测配体的底物,它将在生命科学、医药分析、生物工程和环境监测等领域中有广泛的应用前景。

传统双层磷脂膜传感器的制备方法复杂、寿命短,约1小时。1993年和1994年D.P.Nikolelis和U.Krull在*Electroanalysis*,1993,5,539和*Anal.Chim. Acta*, 1994,288, 187中公开了固体支撑自组装双层磷脂膜技术,这种双层磷脂膜的一侧与固体基底直接接触,强烈地改变了生物膜的结构和性质,因此寿命仍然很短,一般只在24小时至36小时之间。而且它的制备繁琐、寿命短、稳定性差等缺点使之与实用型生物传感器的要求还相差很远。

本发明的目的是使用硫醇在基底电极上形成稳定的单分子膜,利用受体对配体的生物识别作用制备磷脂膜型生物传感器。首先将磷脂单层涂抹在烷基硫醇自组装膜上,接着将受体嵌入磷脂膜,并在低温下冷冻,将有机溶剂冻出和磷脂膜进行重组,制备成无溶剂的磷脂膜生物传感器。

本发明将金电极放入含7:3的浓硫酸:30%过氧化氢的混和溶液中进行化学氧化处理,并在高纯氮气氛下干燥,再浸入1 mM ~ 10 mM的链长为

油、心磷脂、鞘磷脂和胆碱的癸烷溶液涂抹在烷基硫醇单分子膜修饰金电极上，再将此磷脂膜电极放入天然或人工合成的菌素，包括缬氨霉素和莫能菌素，及酶，包括过氧化物酶、氧化酶，蛋白质复合物或生物媒介体，包括铁氰化钾、二茂铁、醌类、吡啶氧化还原体系的溶液中培养6~24小时后，再放在低温-5~-20℃下将有机溶剂冷冻出并使生物膜进行重组，清洗后即获得功能化的支撑磷脂膜生物传感器。它可以用来检测底物、激素、离子、电子受体或给体，具有很好的生物识别功能。

由于本发明使用的硫醇单分子膜具有结构完美、空间结构有序和热力学稳定的特点，和磷脂的仿生性及嵌入受体的分子识别性，因此本发明制备的支撑磷脂膜生物传感器与以往生物传感器相比，制备简便、易重现、稳定性好、寿命长、检测线性范围宽、检测下限低、易嵌入受体和相容性好等特点。

本发明提供的实施例如下：

实施例1. 涂抹法 - 冷冻制备含有缬氨霉素的 $K^+$ 生物传感器。

将金电极放入含7:3的浓硫酸: 30%过氧化氢的混和溶液中进行化学氧化处理，并在高纯氮气氛下干燥，再浸入1 mM十二烷基硫醇的己烷溶液中24 小时，用无水乙醇和高纯水反复清洗和高纯氮气干燥，将20 mg/ml胆碱的癸烷溶液直接涂抹到上述烷基化的金电极表面上，将其放在-15℃的低温冷冻室10分钟，将修饰好的胆碱膜电极放入含 $10^{-3}$  M NaCl和 $2 \times 10^{-6}$  M缬氨霉素的溶液中培养8小时后，即制备成 $K^+$ 生物传感器。 $K^+$ 的能斯特响应斜率接近于60 mV,  $K^+$ 检测线性范围从 $10^{-5}$ M到  $10^{-1}$ M, 检测下限为 $10^{-7}$ M。在-10℃下寿命为2个月左右。

实施例2. 涂抹-冷冻法制备含有莫能菌素的Na<sup>+</sup>生物传感器.

将金电极放入含7:3的浓硫酸:30%过氧化氢的混和溶液中进行化学氧化处理,并在高纯氮气氛下干燥,再浸入3 mM十四烷基硫醇的乙醇溶液中16 小时后用无水乙醇和高纯水反复清洗和高纯氮气干燥,将18 mg/ml 磷脂酰肌醇的癸烷溶液直接涂抹到十四烷基硫醇修饰金电极表面上,将其放在-10℃的低温冷冻室15分钟,使有机溶液冻出而获得不含有有机溶剂的支撑双层磷脂酰肌醇膜,最后将其放入含 10<sup>-2</sup> M NaCl和 2 × 10<sup>-6</sup> M莫能菌素的溶液中培养10小时,即制备成涂抹-冷冻法的支撑磷脂酰肌醇膜生物传感器.该生物传感器对Na<sup>+</sup>的能斯特响应斜率为60 mV,检测线性范围从10<sup>-1</sup> M到10<sup>-5</sup> M,检测下限为10<sup>-6</sup> M. Na<sup>+</sup>对K<sup>+</sup>、Rb<sup>+</sup>和Ag<sup>+</sup>的选择系数分别为6 × 10<sup>-2</sup>、7.2 × 10<sup>-3</sup>和30.此传感器寿命长于2个月.