



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103913565 B

(45) 授权公告日 2015.05.06

(21) 申请号 201410171321.8

25-26 页.

(22) 申请日 2014.04.26

郑先君 等. 铜掺杂TiO₂的制备、表征及光催化产氢性能.《桂林理工大学学报》.2012,第32卷(第4期),第575页.

(73) 专利权人 济南大学

地址 250022 山东省济南市济微路106号

Alexandra Teleki et al..Flame-made Nb- and Cu-doped TiO₂ sensors for CO and ethanol.《SENSORS ACTUATORS B》.2008,第130卷(第1期),第449-457页.

(72) 发明人 魏琴 张森 杜斌 庞雪辉

马洪敏 吴丹

审查员 王晓媛

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 27/30(2006.01)

G01N 27/48(2006.01)

(56) 对比文件

CN 102735728 A, 2012.10.17, 说明书第0053段.

CN 103235145 A, 2013.08.07, 1-2, 4.

CN 102836715 A, 2012.12.26, 全文.

CN 101890338 A, 2010.11.24, 全文.

余珊珊. 纳米二氧化钛的化学改性及其光催化性能的研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技 I 辑》.2012,(第12期),第13-14、

权利要求书2页 说明书8页

(54) 发明名称

一种双功能标记物构建的免疫传感器用于分析物检测的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种双功能标记物构建的免疫传感器的制备方法及其应用,属于新型纳米功能材料与生物传感器技术领域。其特征在于:(1)铜掺杂二氧化钛 Cu@TiO₂的制备;(2)双功能标记物-二抗孵化物 Cu@TiO₂-Ab₂的制备;(3)双功能标记物构建的免疫传感器的制备及分析应用。本发明双功能标记物构建的免疫传感器优点在于识别快速、灵敏度高、检测限低、成本低、便于操作,能实现多种肿瘤标志物的高灵敏、特异性、快速准确检测。

1. 一种双功能标记物构建的免疫传感器用于分析物检测的方法,包括以下步骤:

(1) 用方波伏安法对分析物进行检测

1) 使用电化学工作站对三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,免疫传感器为工作电极,在 10 mL、pH 4.0~6.0 的 PBS 缓冲溶液中进行测试;

2) 扫描电压范围从 -0.4~0.4 V,电势阶跃为 5 mV,频率 25 Hz,振幅 25 mV;

3) 二氧化钛上的铜离子发生氧化还原反应在 0.0 V 附近产生信号,根据所得电流强度与分析物浓度之间的线性关系,绘制工作曲线;

(2) 用计时电流法对分析物进行检测

1) 使用电化学工作站对三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,免疫传感器为工作电极,在 10 mL、pH 4.0~6.0 的 PBS 缓冲溶液中进行测试;

2) 在 0.0~-0.5 V 的检测电压下,每隔 40 秒加入 10 μL 5.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 ,记录电流变化;

3) 二氧化钛上的铜离子对 H_2O_2 具有催化作用,能将 H_2O_2 催化转变为 H_2O ,同时产生电流变化,根据所得电流强度与分析物浓度之间的线性关系,绘制工作曲线;

其中,所述双功能标记物构建的免疫传感器的制备步骤如下:

a、将 3~5 μL 、1.5~2.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 超声处理分散均匀的石墨烯,滴涂在玻碳工作电极表面,自然晾干;

b、分别将 3~5 μL 的 8~12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 分析物的一抗 Ab_1 滴涂在 a 步骤中得到的工作电极表面,4℃冰箱中干燥;

c、滴涂 2~4 μL 、80~120 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的牛血清白蛋白于 b 步骤中得到的工作电极表面,置于 4℃冰箱中直至干燥,超纯水清洗后,置于 4℃冰箱中晾干;

d、取 3~5 μL 权利要求 1 制备的双功能标记物 - 二抗孵化物 $\text{Cu@TiO}_2\text{-Ab}_2$,滴涂于电极表面上,置于 4℃冰箱中晾干,制得一种双功能标记物构建的免疫传感器;其中所述双功能标记物 - 二抗孵化物 $\text{Cu@TiO}_2\text{-Ab}_2$ 的制备步骤如下:

(1) 二氧化钛纳米材料的制备

将 2 mL 钛酸丁酯加入 40~50 mL 乙二醇中,室温搅拌 6~8 h 制成混合物,将混合物加入 150~170 mL 的丙酮中,加 2~3 mL 水,剧烈搅拌 1~2 h,离心分离,用乙醇清洗 2~4 次,50℃干燥,制得二氧化钛前驱体;将 0.1 g 二氧化钛前驱体分散到 20 mL 水中,搅拌条件下加热回流 1~2 h;再经过离心分离,乙醇清洗 2~4 次,50℃干燥,制得二氧化钛纳米材料,备用;

(2) 铜掺杂二氧化钛 Cu@TiO_2 的制备

将 1 g 二氧化钛纳米材料加到 40 mL、10 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液中,搅拌 2~3 h,装入聚四氟乙烯的反应釜中,120~140℃加热 18~24 h,取出、冷却至室温,用 8~12 mL、0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液搅拌处理,超纯水洗涤至中性,60℃下干燥,得到处理过的二氧化钛纳米材料;

将乙二胺(en)和 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 以化学计量比 2:1 的比例混合制得 $\text{Cu}(\text{en})_2(\text{OH})_2$ 溶液,将 0.8 g 上述处理过的二氧化钛纳米材料加到 50 mL 制得的 $\text{Cu}(\text{en})_2(\text{OH})_2$ 溶液中,搅拌 1~2 h,得到蓝色物质,离心分离,用水清洗数次后,在 400~500℃下煅烧得到黄色粉末铜掺杂二氧化钛 Cu@TiO_2 ;

(3) 双功能标记物的制备

将 0.25 g Cu@TiO_2 、0.5 mL 3-氨基三乙氧基硅烷、80 mL 甲苯,在氮气保护下,120℃

搅拌回流 4~6 h,用甲苯和超纯水各清洗 2~4 次,50~60°C 下干燥,制得氨基功能化铜掺杂二氧化钛 Cu@TiO₂,即双功能标记物;所述的双功能标记物,其功能一是利用二氧化钛上的铜离子发生氧化还原反应产生的信号用方波伏安法对分析物进行检测;二是利用二氧化钛上的铜离子催化 H₂O₂ 产生的信号,采用计时电流法对分析物进行检测;

(4) 双功能标记物 - 二抗孵化物 Cu@TiO₂-Ab₂ 的制备

将 1 mg 双功能标记物和 0.5 mL、质量分数为 2.5% 的戊二醛混合,振荡 1~2 h,离心,倾倒入上层溶液,加入 0.4~0.6 mL、pH 7.0~7.8 的 PBS 溶液,超声使其分散均匀;加入 3~5 μL 分析物的二抗(Ab₂),振荡 10~12 h 后离心分离,用 pH 7.0~7.8 的 PBS 溶液定容至 1 mL,制得双功能标记物 - 二抗孵化物 Cu@TiO₂-Ab₂,置于 4°C 冰箱中备用。

2. 根据权利要求 1 所述的分析物检测的方法,其特征在于,所述分析物选自以下之一:癌胚抗原 CEA,甲胎蛋白 AFP, IgE, IgG, α-L-岩藻糖苷酶 AFU,前列腺特异性抗原 PSA, CA15-3, CA125, CA19-9, CA724, CA242,人绒毛膜促性腺激素 HCG,乳腺癌易感基因 BRCA1,鳞状细胞癌抗原 SCC、细胞角蛋白 19 片断 Cyfra21-1,组织多肽抗原 TPA,神经元特异性烯醇化酶 NSE。

一种双功能标记物构建的免疫传感器用于分析物检测的方法

技术领域

[0001] 本发明属于功能化纳米材料、免疫分析及生物传感技术领域,具体涉及一种双功能标记物构建的免疫传感器的制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 自上世纪 80 年代,电化学传感器的研究与开发呈现出突飞猛进的局面。近年来,随着纳米材料科学和微电子技术的快速发展,纳米技术、生命科学、生物技术、电分析技术和表面科学等领域的交叉融合,各种新原理、新材料和新工艺的广泛采用,电化学传感器不断涌现并进入实际应用。

[0003] 免疫传感器是将免疫学方法和分析化学相结合的生物传感器,通过抗原与抗体的特异性结合,使得它具有灵敏度高、选择性好、快速及操作简便等优点。

[0004] 标记物是电化学免疫传感器的重要结构组成部分。由于免疫反应中的抗原抗体本身不具有氧化还原特性,因此不能在电化学检测中产生信号实现定量和定性分析。研制性能优异的标记物,用以标记抗原或抗体,成为实现高灵敏检测的关键所在。

[0005] 纳米材料在光电方面的特殊性质,使其被广泛用于传感器件的制作。某些纳米材料具有大的比表面积,常被用作载体来固定抗原或抗体。其中,自身具有良好氧化还原能力的材料,可以用来作为电化学反应的信号源;而具有催化能力的材料,可以用其催化过氧化氢实现间接定量。因此在制备标记物的过程中利用纳米材料的特性能够达到良好的效果。

[0006] 石墨烯具有比表面积大,催化性能好,能高效吸附固载生物分子及增强电子传递等优点。二氧化钛(TiO_2) 纳米材料具有不同的形貌和晶型结构,在光催化、传感器、电池及其他领域具有广泛的应用。它具有比表面积大、成本低廉、生物相容性好、制备简单等优点,能够稳定的固载抗体。已有研究结果显示金属离子掺杂的二氧化钛在光催化降解环境污染物质方面具有良好的效果,而在传感器的制备中还未曾出现过。

[0007] 本发明利用石墨烯增强电极的电子传递能力并将铜掺杂二氧化钛作为一种新型标记物,提供了一种双功能标记物构建的免疫传感器的制备方法,实现了在两种电化学检测技术下对一种分析物的灵敏分析。

发明内容

[0008] 本发明的目的之一是提供一种双功能标记物的制备方法。

[0009] 本发明的目的之二是将所制备的双功能标记物应用于免疫传感器的制备。

[0010] 本发明的目的之三是利用所制备的免疫传感器,通过两种电化学技术对分析物进行检测。

[0011] 本发明的技术方案,包括以下步骤。

[0012] 1. 一种双功能标记物-二抗孵化物的制备方法,包括以下步骤:

[0013] (1) 二氧化钛纳米材料的制备

[0014] 将 2 mL 钛酸丁酯加入 40~50 mL 乙二醇中, 室温搅拌 6~8 h 制成混合物, 将该混合物加入 150~170 mL 的丙酮中, 加 2~3 mL 水, 剧烈搅拌 1~2 h, 离心分离, 用乙醇清洗 2~4 次, 50℃干燥, 制得二氧化钛前驱体; 将 0.1 g 二氧化钛前驱体分散到 20 mL 水中, 搅拌条件下加热回流 1~2 h; 再经过离心分离, 乙醇清洗 2~4 次, 50℃干燥, 制得二氧化钛纳米材料, 备用。

[0015] (2) 铜掺杂二氧化钛 Cu@TiO_2 的制备

[0016] 将 1 g 二氧化钛纳米材料加到 40 mL、10 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液中, 搅拌 2~3 h, 装入聚四氟乙烯的反应釜中, 120~140℃加热 18~24 h, 取出并冷却至室温, 用 8~12 mL、0.1 mol·L⁻¹ HCl 溶液搅拌处理, 超纯水洗涤至中性, 60℃下干燥, 得到处理过的二氧化钛纳米材料;

[0017] 将乙二胺(en) 和 Cu(OH)_2 以化学计量比 2:1 的比例混合制得 $\text{Cu(en)}_2(\text{OH})_2$ 溶液, 将 0.8 g 上述处理过的二氧化钛纳米材料加到 50 mL 制得的 $\text{Cu(en)}_2(\text{OH})_2$ 溶液中, 搅拌 1~2 h, 得到蓝色物质, 离心分离, 用水清洗数次后, 在 400~500℃下煅烧得到黄色粉末铜掺杂二氧化钛 Cu@TiO_2 。

[0018] (3) 双功能标记物的制备

[0019] 将 0.25 g Cu@TiO_2 、0.5 mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷、80 mL 甲苯, 在氮气保护下, 120℃搅拌回流 4~6 h, 用甲苯和超纯水各清洗 2~4 次, 50~60℃下干燥, 制得氨基功能化铜掺杂二氧化钛 Cu@TiO_2 , 即双功能标记物;

[0020] 所述的双功能标记物, 其功能一是利用二氧化钛上的铜离子发生氧化还原反应产生的信号用方波伏安法对分析物进行检测; 二是利用二氧化钛上的铜离子对催化 H_2O_2 产生的信号, 采用计时电流法对分析物进行检测。

[0021] (4) 双功能标记物 - 二抗孵化物 $\text{Cu@TiO}_2\text{-Ab}_2$ 的制备

[0022] 将 1 mg 双功能标记物和 0.5 mL、质量分数为 2.5% 的戊二醛混合, 振荡 1~2 h, 离心, 倾倒上层溶液, 加入 0.4~0.6 mL、pH 7.0~7.8 的 PBS 溶液, 超声使其分散均匀; 加入 3~5 μL 分析物的二抗 Ab_2 , 振荡 10~12 h 后离心分离, 用 pH 7.0~7.8 的 PBS 溶液定容至 1 mL, 制得双功能标记物 - 二抗孵化物 $\text{Cu@TiO}_2\text{-Ab}_2$, 置于 4℃冰箱中备用。

[0023] 2. 一种双功能标记物构建的免疫传感器的制备方法, 包括如下步骤:

[0024] (1) 将 3~5 μL 、1.5~2.5 mg·mL⁻¹ 超声处理分散均匀的石墨烯, 滴涂在玻碳工作电极表面, 自然晾干;

[0025] (2) 分别将 3~5 μL 的 8~12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 分析物的一抗 (Ab_1) 滴涂在 (1) 中得到的工作电极表面, 4℃冰箱中干燥;

[0026] (3) 滴涂 2~4 μL 、80~120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的牛血清白蛋白于 (2) 中得到的工作电极表面, 置于 4℃冰箱中直至干燥, 超纯水清洗后, 置于 4℃冰箱中晾干;

[0027] (4) 取 3~5 μL 上述制备的双功能标记物 - 二抗孵化物 $\text{Cu@TiO}_2\text{-Ab}_2$, 滴涂于电极表面上, 置于 4℃冰箱中晾干, 制得一种双功能标记物构建的免疫传感器。

[0028] 上述制备方法制备的免疫传感器, 用于分析物的检测, 包括如下步骤:

[0029] (1) 用方波伏安法对分析物进行检测

[0030] 1) 使用电化学工作站对三电极体系进行测试, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 所制备的免疫传感器为工作电极, 在 10 mL、pH 4.0~6.0 的 PBS 缓冲溶液中

进行测试；

[0031] 2) 扫描电压范围从 $-0.4 \sim 0.4$ V, 电势阶跃为 5 mV, 频率 25 Hz, 振幅 25 mV；

[0032] 3) 二氧化钛上的铜离子发生氧化还原反应在 0.0 V 附近产生信号, 根据所得电流强度与分析物浓度之间的线性关系, 绘制工作曲线；

[0033] (2) 用计时电流法对分析物进行检测

[0034] 1) 使用电化学工作站对三电极体系进行测试, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 所制备的免疫传感器为工作电极, 在 10 mL、pH 4.0~6.0 的 PBS 缓冲溶液中进行测试；

[0035] 2) 在 $0.0 \sim -0.5$ V 的检测电压下, 每隔 40 秒加入 $10 \mu\text{L}$ $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 , 记录电流变化；

[0036] 3) 二氧化钛上的铜离子对 H_2O_2 具有催化作用, 能将 H_2O_2 催化转变为 H_2O , 同时产生电流变化, 根据所得电流强度与分析物浓度之间的线性关系, 绘制工作曲线；

[0037] 4. 上述所述分析物选自以下之一: 癌胚抗原 CEA, 甲胎蛋白 AFP, IgE, IgG、 α -L-岩藻糖苷酶 AFU, 前列腺特异性抗原 PSA, CA15-3, CA125, CA19-9, CA724, CA242, 人绒毛膜促性腺激素 HCG, 乳腺癌易感基因 BRCA1, 鳞状细胞癌抗原 SCC、细胞角蛋白 19 片断 Cyfra21-1, 组织多肽抗原 TPA, 神经元特异性烯醇化酶 NSE。

[0038] 本发明的有益成果

[0039] (1) 制备 $\text{Cu}@\text{TiO}_2$ 标记抗体的孵化物, 铜掺杂二氧化钛作为一种新型标记物, 利用二氧化钛大的比表面积和良好的生物相容性可以负载更多的抗体, 增大了传感器电流响应；

[0040] (2) 使用了 $\text{Cu}@\text{TiO}_2$ 制备标记物, 可用两种电化学方法检测。二氧化钛上掺杂的铜离子可以通过自身氧化还原反应, 在方波伏安法下产生电信号实现检测, 另外铜离子可以催化过氧化氢产生信号, 用计时电流法记录下信号改变, 以此实现两种方法的检测。

具体实施方式

[0041] 实施例 1

[0042] 1. 一种双功能标记物 - 二抗孵化物的制备方法, 包括以下步骤：

[0043] (1) 二氧化钛纳米材料的制备

[0044] 将 2 mL 钛酸丁酯加入 40 mL 乙二醇中, 室温搅拌 6 h 制成混合物, 将该混合物加入 150 mL 的丙酮中, 加 2 mL 水, 剧烈搅拌 1 h, 离心分离, 用乙醇清洗 2 次, 50°C 干燥, 制得二氧化钛前驱体; 将 0.1 g 二氧化钛前驱体分散到 20 mL 水中, 搅拌条件下加热回流 1 h; 再经过离心分离, 乙醇清洗 2 次, 50°C 干燥, 制得二氧化钛纳米材料, 备用；

[0045] (2) 铜掺杂二氧化钛 $\text{Cu}@\text{TiO}_2$ 的制备

[0046] 将 1 g 二氧化钛纳米材料加到 40 mL、 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液中, 搅拌 2 h, 装入聚四氟乙烯的反应釜中, 120°C 加热 18 h, 取出、冷却至室温, 用 8 mL、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液搅拌处理, 超纯水洗涤至中性, 60°C 下干燥, 得到处理过的二氧化钛纳米材料；

[0047] 将乙二胺(en)和 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 以化学计量比 2:1 的比例混合制得 $\text{Cu}(\text{en})_2(\text{OH})_2$ 溶液, 将 0.8 g 上述处理过的二氧化钛纳米材料加到 50 mL 制得的 $\text{Cu}(\text{en})_2(\text{OH})_2$ 溶液中, 搅拌 1 h, 得到蓝色物质, 离心分离, 用水清洗数次后, 在 400°C 下煅烧得到黄色粉末铜掺杂二氧化

钛 Cu@TiO_2 ;

[0048] (3) 双功能标记物的制备

[0049] 将 0.25 g Cu@TiO_2 、0.5 mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷、80 mL 甲苯,在氮气保护下,120℃搅拌回流 4 h,用甲苯和超纯水各清洗 2 次,50℃下干燥,制得氨基功能化铜掺杂二氧化钛 Cu@TiO_2 ,即双功能标记物;

[0050] 所述的双功能标记物,其功能一是利用二氧化钛上的铜离子发生氧化还原反应产生的信号用方波伏安法对分析物进行检测;二是利用二氧化钛上的铜离子对催化 H_2O_2 产生的信号,采用计时电流法对分析物进行检测。

[0051] 实施例 2

[0052] 1. 一种双功能标记物 - 二抗孵化物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0053] (1) 二氧化钛纳米材料的制备

[0054] 将 2 mL 钛酸丁酯加入 50 mL 乙二醇中,室温搅拌 8 h 制成混合物,将混合物加入 170 mL 的丙酮中,加 3 mL 水,剧烈搅拌 2 h,离心分离,用乙醇清洗 4 次,50℃干燥,制得二氧化钛前驱体;将 0.1 g 二氧化钛前驱体分散到 20 mL 水中,搅拌条件下加热回流 2 h;再经过离心分离,乙醇清洗 4 次,50℃干燥,制得二氧化钛纳米材料,备用;

[0055] (2) 铜掺杂二氧化钛 Cu@TiO_2 的制备

[0056] 将 1 g 二氧化钛纳米材料加到 40 mL、10 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液中,搅拌 3 h,装入聚四氟乙烯的反应釜中,140℃加热 24 h,取出、冷却至室温,用 12 mL、0.1 mol·L⁻¹ HCl 溶液搅拌处理,超纯水洗涤至中性,60℃下干燥,得到处理过的二氧化钛纳米材料;

[0057] 将乙二胺(en)和 Cu(OH)_2 以化学计量比 2:1 的比例混合制得 $\text{Cu(en)}_2(\text{OH})_2$ 溶液,将 0.8 g 上述处理过的二氧化钛纳米材料加到 50 mL 制得的 $\text{Cu(en)}_2(\text{OH})_2$ 溶液中,搅拌 2 h,得到蓝色物质,离心分离,用水清洗数次后,在 500℃下煅烧得到黄色粉末铜掺杂二氧化钛 Cu@TiO_2 ;

[0058] (3) 双功能标记物的制备

[0059] 将 0.25 g Cu@TiO_2 、0.5 mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷、80 mL 甲苯,在氮气保护下,120℃搅拌回流 6 h,用甲苯和超纯水各清洗 4 次,60℃下干燥,制得氨基功能化铜掺杂二氧化钛 Cu@TiO_2 ,即双功能标记物;

[0060] 所述的双功能标记物,其功能一是利用二氧化钛上的铜离子发生氧化还原反应产生的信号用方波伏安法对分析物进行检测;二是利用二氧化钛上的铜离子对催化 H_2O_2 产生的信号,采用计时电流法对分析物进行检测。

[0061] 实施例 3

[0062] 1. 一种双功能标记物 - 二抗孵化物的制备方法,包括以下步骤:

[0063] (1) 二氧化钛纳米材料的制备

[0064] 将 2 mL 钛酸丁酯加入 45 mL 乙二醇中,室温搅拌 7 h 成为混合物,将混合物加入 160 mL 的丙酮中,加 2.5 mL 水,剧烈搅拌 1.5 h,离心分离,用乙醇清洗 3 次,50℃干燥,制得二氧化钛前驱体;将 0.1 g 二氧化钛前驱体分散到 20 mL 水中,搅拌条件下加热回流 1.5 h;再经过离心分离,乙醇清洗 3 次,50℃干燥,制得二氧化钛纳米材料,备用;

[0065] (2) 铜掺杂二氧化钛 Cu@TiO_2 的制备

[0066] 将 1 g 二氧化钛纳米材料加到 40 mL、10 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液中,搅拌 2.5 h,装

入聚四氟乙烯的反应釜中,130℃加热 20 h,取出、冷却至室温,用 10 mL、0.1 mol·L⁻¹ HCl 溶液搅拌处理,超纯水洗涤至中性,60℃下干燥,得到处理过的二氧化钛纳米材料;

[0067] 将乙二胺(en)和 Cu(OH)₂ 以化学计量比 2:1 的比例混合制得 Cu(en)₂(OH)₂ 溶液,将 0.8 g 上述处理过的二氧化钛纳米材料加到 50 mL 制得的 Cu(en)₂(OH)₂ 溶液中,搅拌 1h,得到蓝色物质,离心分离,用水清洗数次后,在 450℃下煅烧得到黄色粉末铜掺杂二氧化钛 Cu@TiO₂;

[0068] (3) 双功能标记物的制备

[0069] 将 0.25 g Cu@TiO₂、0.5 mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷、80 mL 甲苯,在氮气保护下,120℃搅拌回流 5 h,用甲苯和超纯水各清洗 3 次,55℃下干燥,制得氨基功能化铜掺杂二氧化钛 Cu@TiO₂,即双功能标记物;

[0070] 所述的双功能标记物,其功能一是利用二氧化钛上的铜离子发生氧化还原反应产生的信号用方波伏安法对分析物进行检测;二是利用二氧化钛上的铜离子对催化 H₂O₂ 产生的信号,采用计时电流法对分析物进行检测。

[0071] 实施例 4

[0072] 双功能标记物-二抗孵化物 Cu@TiO₂-Ab₂ 的制备

[0073] 将 1 mg 双功能标记物和 0.5 mL、质量分数为 2.5% 的戊二醛混合,振荡 1 h,离心,倾倒入上层溶液,加入 0.4 mL、pH 7.0 的 PBS 溶液,超声使其分散均匀;加入 3 μL 分析物的二抗 Ab₂,振荡 10 h 后离心分离,用 pH 7.0 的 PBS 溶液定容至 1 mL,制得双功能标记物-二抗孵化物 Cu@TiO₂-Ab₂,置于 4℃冰箱中备用。

[0074] 实施例 5

[0075] 双功能标记物-二抗孵化物 Cu@TiO₂-Ab₂ 的制备

[0076] 将 1 mg 双功能标记物和 0.5 mL、质量分数为 2.5% 的戊二醛混合,振荡 2 h,离心,倾倒入上层溶液,加入 0.6 mL、pH 7.8 的 PBS 溶液,超声使其分散均匀;加入 5 μL 分析物的二抗 Ab₂,振荡 12 h 后离心分离,用 pH 7.8 的 PBS 溶液定容至 1 mL,制得双功能标记物-二抗孵化物 Cu@TiO₂-Ab₂,置于 4℃冰箱中备用。

[0077] 实施例 6

[0078] 双功能标记物-二抗孵化物 Cu@TiO₂-Ab₂ 的制备

[0079] 将 1 mg 双功能标记物和 0.5 mL、质量分数为 2.5% 的戊二醛混合,振荡 1.5 h,离心,倾倒入上层溶液,加入 0.5 mL、pH 7.5 的 PBS 溶液,超声使其分散均匀;加入 4 μL 分析物的二抗 Ab₂,振荡 11 h 后离心分离,用 pH 7.5 的 PBS 溶液定容至 1 mL,制得双功能标记物-二抗孵化物 Cu@TiO₂-Ab₂,置于 4℃冰箱中备用。

[0080] 实施例 7

[0081] 一种双功能标记物构建的免疫传感器的制备方法

[0082] (1) 将 3 μL、1.5 mg·mL⁻¹ 超声处理分散均匀的石墨烯,滴涂在玻碳工作电极表面,自然晾干;

[0083] (2) 分别将 3 μL 的 8 μg·mL⁻¹ 分析物的一抗 Ab₁ 滴涂在(1)中得到的工作电极表面,4℃冰箱中干燥;

[0084] (3) 滴涂 2 μL、80 μg·mL⁻¹ 的牛血清白蛋白于(2)中得到的工作电极表面,置于 4℃冰箱中直至干燥,超纯水清洗后,置于 4℃冰箱中晾干;

[0085] (4)取 3 μL 上述制备的双功能标记物 - 二抗孵化物 $\text{Cu@TiO}_2\text{-Ab}_2$, 滴涂于电极表面上, 置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干, 制得一种双功能标记物构建的免疫传感器。

[0086] 实施例 8

[0087] 一种双功能标记物构建的免疫传感器的制备方法

[0088] (1) 将 5 μL 、2.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 超声处理分散均匀的石墨烯, 滴涂在玻碳工作电极表面, 自然晾干;

[0089] (2) 分别将 5 μL 的 12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 分析物的一抗 Ab_1 滴涂在(1)中得到的工作电极表面, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中干燥;

[0090] (3) 滴涂 4 μL 、120 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的牛血清白蛋白于(2)中得到的工作电极表面, 置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中直至干燥, 超纯水清洗后, 置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干;

[0091] (4)取 5 μL 上述制备的双功能标记物 - 二抗孵化物 $\text{Cu@TiO}_2\text{-Ab}_2$, 滴涂于电极表面上, 置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干, 制得一种双功能标记物构建的免疫传感器。

[0092] 实施例 9

[0093] 一种双功能标记物构建的免疫传感器的制备方法

[0094] (1) 将 4 μL 、2.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 超声处理分散均匀的石墨烯, 滴涂在玻碳工作电极表面, 自然晾干;

[0095] (2) 分别将 4 μL 的 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 分析物的一抗 Ab_1 滴涂在(1)中得到的工作电极表面, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中干燥;

[0096] (3) 滴涂 3 μL 、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的牛血清白蛋白于(2)中得到的工作电极表面, 置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中直至干燥, 超纯水清洗后, 置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干;

[0097] (4)取 4 μL 上述制备的双功能标记物 - 二抗孵化物 $\text{Cu@TiO}_2\text{-Ab}_2$, 滴涂于电极表面上, 置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干, 制得一种双功能标记物构建的免疫传感器。

[0098] 实施例 10

[0099] 用方波伏安法对分析物进行检测

[0100] (1) 使用电化学工作站对三电极体系进行测试, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 所制备的免疫传感器为工作电极, 在 10 mL、pH 4.0~6.0 的 PBS 缓冲溶液中进行测试;

[0101] (2) 扫描电压范围从 -0.4~0.4 V, 电势阶跃为 5 mV, 频率 25 Hz, 振幅 25 mV;

[0102] (3) 二氧化钛上的铜离子发生氧化还原反应在 0.0 V 附近产生信号, 根据所得电流强度与分析物浓度之间的线性关系, 绘制工作曲线。

[0103] 实施例 11

[0104] 用计时电流法对分析物进行检测

[0105] (1) 使用电化学工作站对三电极体系进行测试, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 所制备的免疫传感器为工作电极, 在 10 mL、pH 4.0~6.0 的 PBS 缓冲溶液中进行测试;

[0106] (2) 在 0.0~-0.5 V 的检测电压下, 每隔 40 秒加入 10 μL 5.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 , 记录电流变化;

[0107] (3) 二氧化钛上的铜离子对 H_2O_2 具有催化作用, 能将 H_2O_2 催化转变为 H_2O , 同时产生电流变化, 根据所得电流强度与分析物浓度之间的线性关系, 绘制工作曲线。

[0108] 实施例 12

[0109] 按照实施例 1~9 进行操作,分析物选癌胚抗原 CEA,用方波伏安法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $3 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 80 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $1.46 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$;用计时电流法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $0.6 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 80 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $0.24 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。分析物选甲胎蛋白 AFP 时,用方波伏安法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $5 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $1.3 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$;用计时电流法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $2 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $0.54 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0110] 实施例 13

[0111] 按照实施例 1~9 进行操作,分析物选 IgG 时,用方波伏安法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $0.1 \text{ pg/mL} \sim 100 \text{ ng/mL}$,检测限为 $0.052 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$;用计时电流法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $0.01 \text{ pg/mL} \sim 100 \text{ ng/mL}$,检测限为 $0.0043 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。分析物选 IgE 时,用方波伏安法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $0.5 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $0.18 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$;用计时电流法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $0.1 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $0.048 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0112] 实施例 14

[0113] 按照实施例 1~9 进行操作,分析物选 α -L-岩藻糖苷酶 AFU,时,用方波伏安法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $15 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 10.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $4.5 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$;用计时电流法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $5.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 10.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $1.6 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0114] 实施例 15

[0115] 按照实施例 1~9 进行操作,分析物选前列腺特异性抗原 PSA,时,用方波伏安法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $20 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 40.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $6.1 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$;用计时电流法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $5.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 40.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $1.4 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0116] 实施例 16

[0117] 按照实施例 1~9 进行操作,分析物选 CA15-3, CA125, CA19-9, CA724, CA242 时,用方波伏安法对分析物进行检测,体系的线性范围分别为 $10 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限可达到 $3.1 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$;用计时电流法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $5 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限可达到 $1.2 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0118] 实施例 17

[0119] 按照实施例 1~9 进行操作,分析物选乳腺癌易感基因 BRCA1 时,用方波伏安法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $10 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $2.5 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$;用计时电流法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $4.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $1.3 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。分析物选鳞状细胞癌抗原 SCCA 时,用方波伏安法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $20 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $6.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$;用计时电流法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $8.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $2.1 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0120] 实施例 18

[0121] 按照实施例 1~9 进行操作,分析物选人绒毛膜促性腺激素 HCG 时,用方波伏安法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $40 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $8.2 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$;用

计时电流法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $10 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $2.6 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0122] 实施例 19

[0123] 按照实施例 1~9 进行操作,分析物选细胞角蛋白 19 片断 Cyfra21-1 时,用方波伏安法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $0.12 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$;用计时电流法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $0.032 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0124] 实施例 20

[0125] 按照实施例 1~9 进行操作,分析物选神经元特异性烯醇化酶 NSE 时,用方波伏安法对分析物进行检测,体系的线性范围为 $5.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 80 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $1.3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$;用计时电流法对分析物进行检测,体系线性范围为 $1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 80 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $0.24 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种双功能标记物构建的免疫传感器用于分析物检测的方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN103913565B | 公开(公告)日 | 2015-05-06 |
| 申请号 | CN201410171321.8 | 申请日 | 2014-04-26 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 济南大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 济南大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 济南大学 | | |
| [标]发明人 | 魏琴 张森 杜斌 庞雪辉 马洪敏 吴丹 | | |
| 发明人 | 魏琴 张森 杜斌 庞雪辉 马洪敏 吴丹 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N27/30 G01N27/48 | | |
| CPC分类号 | G01N33/532 G01N33/54393 | | |
| 审查员(译) | 王晓媛 | | |
| 其他公开文献 | CN103913565A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种双功能标记物构建的免疫传感器的制备方法及其应用，属于新型纳米功能材料与生物传感器技术领域。其特征在于：(1)铜掺杂二氧化钛CuTiO₂的制备；(2)双功能标记物-二抗孵化物CuTiO₂-Ab₂的制备；(3)双功能标记物构建的免疫传感器的制备及分析应用。本发明双功能标记物构建的免疫传感器优点在于识别快速、灵敏度高、检测限低、成本低、便于操作，能实现多种肿瘤标志物的高灵敏、特异性、快速准确检测。