



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104374908 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 21

(21) 申请号 201410619102. 1

(22) 申请日 2014. 11. 07

(73) 专利权人 济南大学

地址 250022 山东省济南市济微路 106 号

(72) 发明人 王欢 魏琴 张以河 庞雪辉  
吴丹 马洪敏 范大伟 胡丽华

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 103472123 A, 2013. 12. 25,

张学记 等主编. 基于纳米粒子的电化学免疫传感器和免疫分析. 《电化学与生物传感器—原理、设计及其在生物医学中的应用》. 2009,

Joseph Wang 等. Thick-film electrochemical immunosensor based on stripping potentiometric detection of a metal ion label.. 《Anal. Chem. 》. 1998, 第 70 卷

Xia Chu 等. An electrochemical stripping metalloimmunoassay based on silver-enhanced gold nanoparticle label.. 《Biosens. Bioelectron. 》. 2005, 第 20 卷

Yuxue Dai 等. Sensitive sandwich electrochemical immunosensor for alpha fetoprotein based on Prussian blue modified hydroxyapatite.. 《Biosens. Bioelectron. 》. 2011, 第 28 卷

王丽娟, 贾翠娟. 基于银沉积电化学溶出分析的超灵敏甲胎蛋白传感器. 《分析测试学报》. 2012, 第 31 卷 (第 7 期),

审查员 毕秀华

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种银离子取代羟基磷灰石中钙的免疫传感器的制备及应用

(57) 摘要

本发明属于免疫分析和生物传感技术领域, 其公开了一种银离子取代羟基磷灰石中钙的免疫传感器的制备及应用, 用于快速检测前列腺特异性抗原 PSA。其制作方案是: 以丝网印刷电极为工作电极, 将金纳米溶胶对其进行修饰, 然后依次加入 PSA 抗体、牛血清白蛋白、PSA 以及银离子取代羟基磷灰石标记的抗体溶液。金纳米溶胶有利于抗体的固定和火星保持, 银离子取代羟基磷灰石具有羟基磷灰石的生物相容性, 可以吸附抗体等蛋白质, 同时其内部的银离子可在酸性条件下释放出来, 使 PSA 的检测转化为银离子的检测, 实现了较高的灵敏度, 检测限可低至 0. 01pg/mL。

CN 104374908 B

1. 一种银离子取代羟基磷灰石中钙的免疫传感器的制备方法,包括以下步骤:

(1) 银离子取代的羟基磷灰石标记抗体的制备

将粒径 20~60nm 的纳米羟基磷灰石和硝酸银以质量比为 1 : 1 ~ 3 的比例混合,溶于 5~10mL 水中,震荡 10~24 小时,离心分离;

取 1~2mg 获得的银离子取代的纳米羟基磷灰石,溶于 5mL 磷酸盐缓冲溶液,加入 0.05~0.1ml 浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PSA 抗体溶液,孵化震荡 5~12 小时,离心分离;

将获得的银离子取代的羟基磷灰石标记抗体重新加入 5mL 磷酸盐缓冲溶液,并加入 1mg 的牛血清白蛋白,孵化震荡 5~12 小时,离心分离;

将沉淀重新分散到 2~4mL 磷酸盐缓冲溶液中,即获得银离子取代的羟基磷灰石标记抗体的储备液;

(2) 银离子取代羟基磷灰石中钙的免疫传感器制备

取 5~20 $\mu\text{L}$  金纳米溶胶滴加到丝网印刷电极上,晾干;

依次在丝网印刷电极上滴加 5~10 $\mu\text{L}$  浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PSA 抗体、浓度为 1% 牛血清白蛋白、PSA、银离子取代的羟基磷灰石标记抗体溶液,孵化 1~4 小时,并用磷酸盐缓冲溶液清洗干净,即制得一种银离子取代羟基磷灰石中钙的免疫传感器。

## 一种银离子取代羟基磷灰石中钙的免疫传感器的制备及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析与生物传感技术领域,具体涉及一种银离子取代羟基磷灰石中钙的免疫传感器的制备及应用,研制一种快速检测前列腺肿瘤标志物的丝网印刷电极免疫传感器。

### 背景技术

[0002] 前列腺癌是指发生在前列腺的上皮性恶性肿瘤。2004年WHO《泌尿系统及男性生殖器官肿瘤病理学和遗传学》中前列腺癌病理类型上包括腺癌(腺泡腺癌)、导管腺癌、尿路上皮癌、鳞状细胞癌、腺鳞癌。其中前列腺腺癌占95%以上,因此,通常我们所说的前列腺癌就是指前列腺腺癌。根据世界卫生组织国际癌症研究机构最新统计,2012年新诊断的前列腺癌患者为110万,约占新增癌症病例总数的15%,是全球范围内男性第二位最常见的癌症。

[0003] 临床诊断前列腺癌主要依靠直肠指诊、血清PSA、经直肠前列腺超声和盆腔MRI检查,CT对诊断早期前列腺癌的敏感性低于MRI。因前列腺癌骨转移率较高,在决定治疗方案前通常还要进行核素骨扫描检查。确诊前列腺癌需要通过前列腺穿刺活检进行病理检查。尽管有一些不可逆的因素,但前列腺癌只要能早期发现、早期诊断,治愈率相当高。因此,前列腺癌的早期发现具有重要意义和科学价值。

[0004] PSA是前列腺特异抗原,作为前列腺癌的特异性标志物,PSA对前列腺癌的诊断特异性达90%~97%,被认为是最有价值的前列腺癌的肿瘤标志物,被广泛应用于前列腺癌的筛选、诊断及治疗后的监测。PSA是代表前列腺特异性抗原小于4ng/mL正常,大于4ng/mL要考虑到前列腺是否有问题。它具有组织特异性,但不是肿瘤所特有的。

[0005] 目前国内绝大多数检测机构都在使用酶联免疫法进行PSA的检测。由于其检测周期长,程序复杂所需试剂繁多等缺点已远远不能满足现代检测要求。随着现代科学技术的不断发展,特别是免疫学生物化学,分子生物学的不断发展,电化学免疫传感器已经引起广泛的研究兴趣。

[0006] 本发明采用丝网印刷电极,价格低廉,结合电化学技术和免疫技术,提高了传感器的选择性和灵敏度,不需要对样品进行预处理,节省了检测时间,降低了检测成本,因此是一种快速、廉价且灵敏度高的检测方法。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的在于避免传统检测方法的仪器设备复杂、操作过程繁琐、检测人员要求高、检测成本高等缺点,提供了一种灵敏度高、特异性强、重现性好、操作简便且价廉易得的检测PSA的丝网印刷电极免疫传感器的制备方法。

[0008] 为了实现上述目的,本发明是通过以下措施来实现的。本发明的技术方案,包括以下步骤。

[0009] 1. 一种银离子取代羟基磷灰石中钙的免疫传感器的制备方法

[0010] (1) 银离子取代的羟基磷灰石标记抗体的制备

[0011] 将粒径 20~60nm 的纳米羟基磷灰石和硝酸银以质量比为 1 : 1 ~ 3 的比例混合, 溶于 5~10mL 水中, 震荡 10~24 小时, 离心分离;

[0012] 取 1~2mg 获得的银离子取代的纳米羟基磷灰石, 溶于 5mL 磷酸盐缓冲溶液, 加入 0.05~0.1ml 浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PSA 抗体溶液, 孵化震荡 5~12 小时, 离心分离;

[0013] 将获得的银离子取代的羟基磷灰石标记抗体重新加入 5mL 磷酸盐缓冲溶液, 并加入 1mg 的牛血清白蛋白, 孵化震荡 5~12 小时, 离心分离;

[0014] 将沉淀重新分散到 2~4mL 磷酸盐缓冲溶液中, 即获得银离子取代的羟基磷灰石标记抗体的储备液;

[0015] (2) 银离子取代羟基磷灰石中钙的免疫传感器制备

[0016] 取 5~20 $\mu\text{L}$  金纳米溶胶滴加到丝网印刷电极上, 晾干;

[0017] 依次在丝网印刷电极上滴加 5~10 $\mu\text{L}$  的 PSA 抗体、牛血清白蛋白、PSA、银离子取代的羟基磷灰石标记抗体溶液, 孵化 1~4 小时, 并用磷酸盐缓冲溶液清洗干净, 即制得一种银离子取代羟基磷灰石中钙的免疫传感器;

[0018] 上述抗体浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 牛血清白蛋白浓度为 1%。

[0019] 2. PSA 的检测步骤

[0020] (1) 工作曲线的绘制

[0021] 采用不同浓度的 PSA 按照权利要求 1 中所述的方法制备一系列银离子取代羟基磷灰石中钙的免疫传感器;

[0022] 将参比电极、对电极和工作电极连接在电化学工作站上, 在电解槽中加入 50 $\mu\text{L}$  的磷酸盐缓冲溶液溶液, 再加入 5~10 $\mu\text{L}$  的 10% 的盐酸溶液, 将银离子取代的羟基磷灰石溶解, 释放出银离子;

[0023] 设定电位范围为 -0.2~0.4V, 沉积电位为 -0.2V, 沉积时间为 30~300s, 通过阳极溶出伏安法检测修饰好的工作电极的电流响应;

[0024] 根据所得电流响应与 PSA 浓度的关系, 绘制工作曲线;

[0025] (2) PSA 的检测

[0026] 采用 5~10 $\mu\text{L}$  待测血清样品取代步骤(1)中的 PSA, 其它与步骤(1)相同;

[0027] 根据所测得的数值, 对照 PSA 的工作曲线, 计算出样品中 PSA 的含量。

[0028] 本发明具备以下优势:

[0029] (1) 本发明快速、准确, 不需前处理, 可用于复杂的血清样品中的 PSA 的检测。

[0030] (2) 本发明采用的银离子取代羟基磷灰石中的钙离子, 使银离子负载于羟基磷灰石的纳米结构中, 具有良好的生物相容性, 利于抗体等蛋白质分子的固定。

[0031] (3) 羟基磷灰石可溶于酸性溶液, 易于将携带的银离子释放出来, 实现了由测定 PSA 到测定银离子的转化, 从而提高了本发明传感器的灵敏度, 使 PSA 的检测限可低至 0.01pg/mL。

[0032] (4) 本发明印刷电极制备简单、成本低、便于携带、试剂消耗少, 易于微型化和集成化, 应用范围广。

## 具体实施方式

[0033] 实施例一 银离子取代的羟基磷灰石标记抗体的制备

[0034] (1)将粒径 20nm 的纳米羟基磷灰石和硝酸银以质量比为 1:1 的比例混合,溶于 5mL 水中,震荡 10 小时,离心分离;

[0035] (2)取 1mg 获得的银离子取代的纳米羟基磷灰石,溶于 5mL 磷酸盐缓冲溶液,加入 0.05ml 浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PSA 抗体溶液,孵化震荡 5 小时,离心分离;

[0036] (3)将获得的银离子取代的羟基磷灰石标记抗体重新加入 5mL 磷酸盐缓冲溶液,并加入 1mg 的牛血清白蛋白,孵化震荡 5 小时,离心分离;

[0037] (4)将沉淀重新分散到 2mL 磷酸盐缓冲溶液中,即获得银离子取代的羟基磷灰石标记抗体的储备液。

[0038] 实施例二 银离子取代的羟基磷灰石标记抗体的制备

[0039] (1)将粒径 60nm 的纳米羟基磷灰石和硝酸银以质量比为 1:3 的比例混合,溶于 10mL 水中,震荡 24 小时,离心分离;

[0040] (2)取 2mg 获得的银离子取代的纳米羟基磷灰石,溶于 5mL 磷酸盐缓冲溶液,加入 0.1ml 浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PSA 抗体溶液,孵化震荡 12 小时,离心分离;

[0041] (3)将获得的银离子取代的羟基磷灰石标记抗体重新加入 5mL 磷酸盐缓冲溶液,并加入 1mg 的牛血清白蛋白,孵化震荡 12 小时,离心分离;

[0042] (4)将沉淀重新分散到 4mL 磷酸盐缓冲溶液中,即获得银离子取代的羟基磷灰石标记抗体的储备液。

[0043] 实施例三 银离子取代羟基磷灰石中钙的免疫传感器制备

[0044] (1)取 5 $\mu\text{L}$  金纳米溶胶滴加到丝网印刷电极上,晾干;

[0045] (2)在丝网印刷电极上滴加 5 $\mu\text{L}$  的浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  PSA 抗体溶液,孵化 1 小时,并用磷酸盐缓冲溶液清洗干净;

[0046] (3)在丝网印刷电极上滴加 5 $\mu\text{L}$  的浓度为 1% 牛血清白蛋白溶液,孵化 1 小时,并用磷酸盐缓冲溶液清洗干净;

[0047] (4)在丝网印刷电极上滴加 5 $\mu\text{L}$  的 PSA 溶液,孵化 1 小时,并用磷酸盐缓冲溶液清洗干净,即制得 PSA 免疫传感器;

[0048] (5)依次在丝网印刷电极上滴加 5 $\mu\text{L}$  的银离子取代的羟基磷灰石标记抗体溶液,孵化 1 小时,并用磷酸盐缓冲溶液清洗干净,即制得银离子取代羟基磷灰石中钙的免疫传感器制备。

[0049] 实施例四 银离子取代羟基磷灰石中钙的免疫传感器制备

[0050] (1)取 20 $\mu\text{L}$  金纳米溶胶滴加到丝网印刷电极上,晾干;

[0051] (2)在丝网印刷电极上滴加 10 $\mu\text{L}$  的浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  PSA 抗体溶液,孵化 4 小时,并用磷酸盐缓冲溶液清洗干净;

[0052] (3)在丝网印刷电极上滴加 10 $\mu\text{L}$  的浓度为 1% 牛血清白蛋白溶液,孵化 4 小时,并用磷酸盐缓冲溶液清洗干净;

[0053] (4)在丝网印刷电极上滴加 10 $\mu\text{L}$  的 PSA 溶液,孵化 4 小时,并用磷酸盐缓冲溶液清洗干净,即制得 PSA 免疫传感器;

[0054] (5)依次在丝网印刷电极上滴加 10 $\mu\text{L}$  的银离子取代的羟基磷灰石标记抗体溶液,

孵化 4 小时,并用磷酸盐缓冲溶液清洗干净,即制得银离子取代羟基磷灰石中钙的免疫传感器制备。

[0055] 实施例五 PSA 的检测方法

[0056] 实施例 1~4 中任一所述的一种高灵敏前列腺肿瘤标志物免疫传感器,用于 PSA 的检测,包括以下步骤:

[0057] (1) 工作曲线的绘制

[0058] 采用不同浓度的 PSA 按照实施例 1~4 中任一所述的方法制备一系列丝网印刷电极免疫传感器;

[0059] 将参比电极、对电极和工作电极连接在电化学工作站上,在电解槽中加入 50 $\mu$ L 的磷酸盐缓冲溶液溶液,再加入 10 $\mu$ L 的 1+10 的盐酸溶液,将银离子取代的羟基磷灰石溶解,释放出银离子;

[0060] 设定电位范围为 -0.2~0.4V,沉积电位为 -0.2V,沉积时间为 30~300s,通过阳极溶出伏安法检测修饰好的工作电极的电流响应;

[0061] 根据所得电流响应与 PSA 浓度的关系,绘制工作曲线;

[0062] (2) PSA 的检测

[0063] 采用 10 $\mu$ L 待测血清样品取代步骤(1)中的 PSA,其它与步骤(1)相同;

[0064] 根据所测得的数值,对照 PSA 的工作曲线,计算出样品中 PSA 的含量。

专利名称(译)	一种银离子取代羟基磷灰石中钙的免疫传感器的制备及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN104374908B</a>	公开(公告)日	2015-10-21
申请号	CN201410619102.1	申请日	2014-11-07
[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	王欢 魏琴 张以河 庞雪辉 吴丹 马洪敏 范大伟 胡丽华		
发明人	王欢 魏琴 张以河 庞雪辉 吴丹 马洪敏 范大伟 胡丽华		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54313		
其他公开文献	CN104374908A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明属于免疫分析和生物传感技术领域，其公开了一种银离子取代羟基磷灰石中钙的免疫传感器的制备及应用，用于快速检测前列腺特异性抗原PSA。其制作方案是：以丝网印刷电极为工作电极，将金纳米溶胶对其进行修饰，然后依次加入PSA抗体、牛血清白蛋白、PSA以及银离子取代羟基磷灰石标记的抗体溶液。金纳米溶胶有利于抗体的固定和火星保持，银离子取代羟基磷灰石具有羟基磷灰石的生物相容性，可以吸附抗体等蛋白质，同时其内部的银离子可在酸性条件下释放出来，使PSA的检测转化为银离子的检测，实现了较高的灵敏度，检测限可低至0.01pg/mL。