(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103235115 A
(43)申请公布日 2013.08.07

(21)申请号 201310111897.0

(22)申请日 2013.04.01

(71)申请人 上海师范大学
地址 200234 上海市徐汇区桂林路100号

(72)发明人 贾能勤 吴贝娜 胡宸溢

(74)专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有限公司 31227
代理人 吴泽群

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)

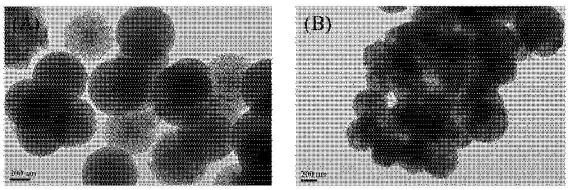
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

快速高灵敏检测视黄醇结合蛋白的新型电化学发光免疫传感器及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种快速高灵敏检测视黄醇结合蛋白的新型电化学发光免疫传感器，采用双抗夹心法，利用多壁碳纳米管大的比表面积和良好的导电性以及SiO_2良好的生物相容性和表面规则的孔状结构、大的吸附容量等优点，在玻碳电极表面构建一个双重信号放大的电化学发光免疫传感器，并对人体液中RBP进行电化学发光检测。结果表明，采用电化学发光免疫传感方法，检测RBP的浓度范围宽，检测限低，并且具有良好的稳定性、重现性等传感特性。



CN 103235115 A

1. 一种快速高灵敏检测视黄醇结合蛋白的新型电化学发光免疫传感器，其特征在于，包括玻碳电极，玻碳电极表面修饰有一层多壁碳纳米管膜，多壁碳纳米管膜上依次修饰有RBP一抗、BSTA、RBP抗原和RBP二抗标记的Ru-Nafion@SiO_2复合纳米粒子。

2. 根据权利要求1所述的快速高灵敏检测视黄醇结合蛋白的新型电化学发光免疫传感器，其特征在于，所述RBP二抗标记的Ru-Nafion@SiO_2复合纳米粒子是以SiO_2纳米粒子为核心，表面包覆Nafion膜，Nafion膜上吸附有Ru（bpy）$_3^{2+}$，最外层标记RBP二抗的复合纳米粒子。

3. 权利要求1或2所述的快速高灵敏检测视黄醇结合蛋白的新型电化学发光免疫传感器的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

1)将SiO_2纳米粒子分散于Nafion-乙醇溶液中，冰浴中搅拌3-4小时，4℃下离心分离，获得Nafion包覆的SiO_2，记为Nafion@SiO_2；

2）将步骤1）获得的Nafion@SiO_2分散于pH=7.0～7.5的0.005～0.015M的PBS缓冲液中，加入RBP二抗，冰浴中搅拌5-6小时，离心分离，重悬于上述PBS缓冲液中，超声分散；

3）向步骤2）所得悬浮液中加入Ru(bpy)$_3$Cl$_2$，冰浴中搅拌50-60min，离心分离，得RBP二抗标记的Ru-Nafion@SiO_2复合纳米粒子；

4)将RBP二抗标记的Ru-Nafion@SiO_2复合纳米粒子分散于pH=7.0～7.5的0.005～0.015M的PBS缓冲液中，加入牛血清蛋白，4℃下保藏；

5）将酸化的碳纳米管分散在二甲亚砜中，加入EDC和NHS，室温下震荡3-4小时，离心分离；

6）将已活化的多壁碳纳米管分散到二甲亚砜溶液中，将上述分散液滴加到经预处理的玻碳电极表面，待电极表面晾干后，将RBP一抗滴加到多壁碳纳米管膜表面，35℃-40℃条件孵育1.5-2.5小时；

7）将BSAT溶液滴加到修饰有抗体的电极上，35℃-40℃条件孵育30-50分钟；

8)将该电极浸泡在RBP抗原中，35℃-40℃条件孵育0.5-1.5小时，得到固定的免疫交联层，记为RBP/BSAT/anti-RBP/MWCNTs/GCE；

9)将二抗标记的Ru-Nafion@SiO_2复合纳米粒子滴加到修饰好的电极表面，35℃-40℃条件孵育0.5～1.5小时。

4. 权利要求3所述快速高灵敏检测视黄醇结合蛋白的新型电化学发光免疫传感器的制备方法，其特征在于，步骤1）中SiO_2纳米粒子与Nafion的质量比为1:20-25。

5. 权利要求3所述快速高灵敏检测视黄醇结合蛋白的新型电化学发光免疫传感器的制备方法，其特征在于，步骤2）中SiO_2与鼠抗RBP的质量比为1000:2.0-4.0。

6. 权利要求3所述快速高灵敏检测视黄醇结合蛋白的新型电化学发光免疫传感器的制备方法，其特征在于，步骤3)中Ru(bpy)$_3$Cl$_2$与RBP二抗标记的Nafion@SiO_2中SiO_2的质量比4:1.0-2.0。

7. 权利要求3所述快速高灵敏检测视黄醇结合蛋白的新型电化学发光免疫传感器的制备方法，其特征在于，步骤4）中牛血清白蛋白与RBP二抗标记的Ru-Nafion@SiO_2复合纳米粒子的质量比是1:2。

8. 权利要求3所述快速高灵敏检测视黄醇结合蛋白的新型电化学发光免疫传感器的

制备方法，其特征在于，步骤5）中EDC和NHS与酸化的碳纳米管的质量比为：25:25:1。

9. 权利要求3所述快速高灵敏检测视黄醇结合蛋白的新型电化学发光免疫传感器的制备方法，其特征在于，步骤6)中所述预处理的方法为：用2#、5#金相砂纸抛光打磨玻碳电极，再用0.3和0.05μm的Al_2O_3抛光粉抛光，冲洗去表面污物，然后依次在体积比为1:1的HNO_3、无水乙醇、二次蒸馏水中分别超声1-2分钟，用高纯N_2吹干。

10. 权利要求3所述快速高灵敏检测视黄醇结合蛋白的新型电化学发光免疫传感器的制备方法，其特征在于，步骤7)中BSAT溶液为BSA与吐温20的混合溶液，其中BSA的浓度为3wt%-5wt%，吐温20的浓度为0.5wt%-1.5wt%。

快速高灵敏检测视黄醇结合蛋白的新型电化学发光免疫传感器及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物传感器技术，具体涉及一种快速高灵敏检测视黄醇结合蛋白的新型电化学发光免疫传感器及其制备方法。

背景技术

[0002] 临床上疾病的早期诊断对提高疾病治愈的可能性具有至关重要的作用，这给各种疾病标记物的分析方法带来一定的挑战，同时也促进了检测疾病标志物传感器研究的快速发展。电化学发光是指物质在电极上经历了高能量的电子转移反应从而形成激发态来发射出光的一种电化学反应，其综合了电化学与光学的双重优点，近年来已逐渐发展为一种应用于生物医学检测等诸多领域的新型分析测试方法。电化学发光免疫传感器也因其操作简单、灵敏度高、检测迅速和背景噪音低等优点而成为近几年的研究热点。特别在检测 DNA 杂交物、基因点突变、端粒酶活性、蛋白质等物质上取得了显著效果。双抗夹心型的电化学发光免疫传感器是基于抗原抗体特异性免疫反应的一种生物传感器，指某种蛋白有选择性的被其对应的抗体捕获后又与其二抗结合，之后将这个夹心体系与分子探针结合修饰到电极上，通过一定的电化学发光表征手段来间接检测蛋白的量。常用来标记二抗的探针有酶、荧光染料、电化学发光试剂(三联吡啶钌)、电活性物质， 纳米粒子等。目前，很多研究都尝试直接用三联吡啶钌($Ru(bpy)_3^{2+}$)类的化合物标记 DNA 和蛋白质，主要源于钌类化合物卓越的发光性能、良好的水溶性和生物相容性。但这种方法存在一定的局限性，因钌类化合物与蛋白质或 DNA 等的结合率不高，导致大多数这类免疫传感器的信号不够强，故其检测的线性范围较窄，且检测限低，因而难以应用于实际样品的检测中。本发明成功地构建了一种双重信号放大型蛋白质的电化学发光免疫分析方法，首先利用 SiO_2 大的比表面积和表面多而规则的孔结构，再结合 Nafion 膜较好的阳离子交换性能来吸附大量的 $Ru(bpy)_3^{2+}$，合成钌参杂的 SiO_2 纳米粒子，由视黄醇结合蛋白(RBP)单抗分子标记的此复合纳米粒子探针构建的电化学发光免疫传感器与三丙胺(TPA)溶液可产生强烈的光强。另外，通过多壁碳纳米管(MWCNTs)与玻碳电极(GCE)间稳定的 $\pi-\pi$ 键结合，将兼具导电性能佳、比表面积大的多壁碳纳米管固定到玻碳电极表面，一方面可以通过活化的多壁碳纳米管的羧基与抗体氨基间的酰胺反应将大量的 RBP 一抗固定于电极表面，另一方面多壁碳纳米管可作为再次信号放大的基质材料，极大地提高了免疫传感器的灵敏度和检测的线性范围。

[0003] 视黄醇结合蛋白(RBP)是一种广泛存在于人体血液、尿液、脑脊液和其他体液内的低分子量蛋白质，其具有从肝细胞中转运视黄醇至周围组织的功能。现认为血液中 RBP 主要以视黄醇、前白蛋白结合的复合物形式存在，当复合物中视黄醇与靶细胞结合后，RBP 便与前白蛋白分离，自肾小球滤出，由近端肾小管上皮细胞吸收、降解。近年来的深入研究表明 RBP 含量改变能够敏感地反映近端肾小管功能、肝功能损害程度，是反映肾脏、 肝脏及营养性疾病发展、转归的敏感指标。尿液中 RBP 的检测可作为肝功能早期损害和监护治疗的重要指标，从而有效地防止由肝功能的损坏引起的糖尿病和高血压等疾病的发生率。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种快速高灵敏检测视黄醇结合蛋白的新型电化学发光免疫传感器，探索一种简便、快捷、灵敏的检测体液中 RBP 含量的新方法，为基于双抗夹心法的电化学发光免疫传感器在疾病标志物的检测方面的应用提供依据。

[0005] 本发明的技术方案如下：

[0006] 一种快速高灵敏检测视黄醇结合蛋白的新型电化学发光免疫传感器，其特征在于，包括玻碳电极，玻碳电极表面修饰有一层多壁碳纳米管膜，多壁碳纳米管膜上依次修饰有 RBP 一抗、BSTA、RBP 抗原和 RBP 二抗标记的 Ru－Nafion@SiO_2 复合纳米粒子。

[0007] 所述 RBP 二抗标记的 Ru－Nafion@SiO_2 复合纳米粒子是以 SiO_2 纳米粒子为核心，表面包覆 Nafion 膜，Nafion 膜上吸附有 Ru（bpy）$_3^{2+}$，最外层标记 RBP 二抗的复合纳米粒子。

[0008] 其制备方法包括以下步骤：

[0009] 1)将 SiO_2 纳米粒子分散于 Nafion- 乙醇溶液中，冰浴中搅拌 3-4 小时，4℃下离心分离，获得 Nafion 包覆的 SiO_2，记为 Nafion@SiO_2；SiO_2 纳米粒子与 Nafion 的质量比优选为 1:20-25；

[0010] 2)将步骤 1)获得的 Nafion@SiO_2 分散于 pH=7.0 ～ 7.5 的 0.005 ～ 0.015M 的 PBS 缓冲液中，加入 RBP 二抗，冰浴中搅拌 5-6 小时，离心分离，重悬于上述 PBS 缓冲液中，超声分散；SiO_2 与 RBP 二抗的质量比优选为 1000:2.0-4.0；

[0011] 3）向步骤 2）所得悬浮液中加入 Ru(bpy)$_3$$Cl_2$，冰浴中搅拌 50-60min，离心分离，得 RBP 二抗标记的 Ru－Nafion@SiO_2 复合纳米粒子；Ru(bpy)$_3$$Cl_2$ 与 RBP 二抗标记的 Nafion@SiO_2 中 SiO_2 的质量比为 4:1.0-2.0；

[0012] 4）将 RBP 二抗标记的 Ru－Nafion@SiO_2 复合纳米粒子分散于 pH=7.0 ～ 7.5 的 0.005 ～ 0.015M 的 PBS 缓冲液中，加入牛血清蛋白，4℃下保藏；牛血清白蛋白与 RBP 二抗标记的 Ru－Nafion@SiO_2 复合纳米粒子的质量比是 1:2；

[0013] 5)将酸化的碳纳米管分散在二甲亚砜中，加入 EDC 和 NHS，室温下震荡 3-4 小时，离心分离，分散到二甲亚砜溶液中；EDC 和 NHS 与酸化的碳纳米管的质量比优选为 :25:25:1；

[0014] 6）将已活化的多壁碳纳米管溶液滴加到经预处理的玻碳电极表面，待电极表面晾干后，将 RBP 一抗滴加到多壁碳纳米管膜表面，35℃ -40℃条件孵育 1.5 ～ 2.5 小时；所述预处理的方法为：用 2#、5# 金相砂纸抛光打磨玻碳电极，再用 0.3 和 0.05μm 的 Al_2O_3 抛光粉抛光，冲洗去表面污物，然后依次在体积比 1:1 的 HNO_3、无水乙醇、二次蒸馏水中分别超声 1-2 分钟，用高纯 N_2 吹干；

[0015] 7）将 BSAT 溶液滴加到修饰有抗体的电极上，35℃ -40℃条件孵育 30 ～ 50 分钟；BSAT 溶液浓度为 4wt%-6wt%；

[0016] 8)将该电极浸泡在 RBP 抗原中，35℃ -40℃条件孵育 0.5 ～ 1.5 小时，得到固定的免疫交联层，记为 RBP/BSTA/anti-RBP/MWCNTs/GCE；

[0017] 9）将二抗标记的 Ru－Nafion@SiO_2 复合纳米粒子滴加到修饰好的电极表面，35℃ -40℃条件孵育 0.5 ～ 1.5 小时。

[0018] 本发明采用双抗夹心法，利用多壁碳纳米管大的比表面积和良好的导电性以及

SiO_2 良好的生物相容性和表面规则的孔状结构、大的吸附容量等优点，在玻碳电极表面构建一个双重信号放大的电化学发光免疫传感器，并对人体液中 RBP 进行电化学发光检测。本发明中，RBP 二抗标记的 Ru－Nafion@SiO_2 复合纳米粒子合成方法简单单，采用生物相容性好、比表面积大的纳米材料 SiO_2 作为复合体基质，在吸附大量发光试剂 $Ru(bpy)_3^{2+}$ 的同时连接足量的抗体 RBP，极大提高了分子探针的信号；同时，双抗夹心型免疫传感器的构建方法简单易行，无需昂贵仪器，具有灵敏度高、线性范围宽、检测限低、稳定性、重现性好等优点，对病人体液中 RBP 的检测回收率合理，取得了较理想的结果。

附图说明

[0019] 图 1 是 SiO_2 纳米粒子 (A) 和 Ru－Nafion@SiO_2-Ab_2(B) 的透射电图。

[0020] 图 2 是不同修饰电极 (a)Ab_2/MWCNTs/GCE 和

[0021] (b)Ru－Nafion@SiO_2-Ab_2/MWCNTs/GCE 在 0.1M PBS(pH8.0) 中的循环伏安图。

[0022] 图 3 是构建的免疫传感器 (A) 对不同浓度 RBP 的电化学发光电压响应图和 (B) 电化学发光强度与浓度的线性关系。

具体实施方式

[0023] 以下实施例中所采用的试剂包括：六水合三联吡啶钌 ($Ru(bpy)_3^{2+}$)、三丙胺 (TPA)、有机硅烷 (3- 氨丙基三甲氧基硅烷，APTMS，25K)、牛血清白蛋白 (BSA)、N. 羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、(3. 二甲氨基丙基)-3. 乙基碳二亚胺 (EDC) 购自 Sigma-Aldrich。多壁碳纳米管 (MWCNTs)、吐温 20 购自上海生工生物公司，Nafion 购自 Fluka Ltd.，RBP 抗原标准液和 RBP 单克隆抗体 S-113-7 由艾普力公司提供，患者尿液样品由上海市第六人民医院提供。此样品均保存在 -20℃备用。不同 pH 的磷酸缓冲溶液由 Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 按不同比例配制而成。所用试剂均为分析纯试剂，所有免疫分析物都用 PBS(pH7.4) 配制，其他所有溶液均用二次蒸馏水配制。

[0024] 实施例 1：双抗夹心型免疫传感器的制备

[0025] 1) 将 10mg 合成的 SiO_2 纳米粒子分散在 5mL Nafion (5wt%)－乙醇溶液中，冰浴中搅拌 4 小时，得到 Nafion 包覆的 SiO_2(Nafion@SiO_2) 溶液，将该溶液离心分离 (转速为 10000rpm，温度为 4℃)；

[0026] 2) 将所得固体颗粒分散在 2mL PBS (0.01M) 中 (pH7.4)，注入 600mL 鼠抗 RBP (39μg/mL)，冰浴中不断搅拌 6 小时，离心分离后溶于 1mL 的 pH=7.4 的 PBS (0.01M) 中；

[0027] 3) 将 1mL30mM 的 $Ru(bpy)_3Cl_2$ 加入到 1mL 的上述连有二抗的 Nafion@SiO_2 的悬浮液中，冰浴中持续搅拌 1 小时，通过阳离子交换作用使 $Ru(bpy)_3Cl_2$ 吸附到连有二抗的 Nafion@SiO_2 复合体表面，离心分离，得到 RBP 二抗标记的 Ru－Nafion@SiO_2 复合纳米粒子；

[0028] 4) 将所得复合纳米粒子分散在 1mL PBS(pH7.4，0.01M) 中，在上述复合体溶液中加入牛血清白蛋白 (5wt%BSA) 以防止复合物表面的非特异性结合，合成的该分子探针放在 4° C 下备用；(牛血清白蛋白与复合体溶液中纳米粒子的质量比是 1:2)

[0029] 5) 多壁碳纳米管的功能化：首先将多壁碳纳米管在 3:1 的硫酸和硝酸中回流 16 个小时，用去离子水多次过滤、冲洗至滤液为中性，真空条件下烘干，将 2mg 酸化的碳纳米管分散在 2mL 二甲亚砜 (DMSO) 中，向溶液中加入 50mg EDC 和 50mg NHS 室温下震荡 4 小时，

将混合液离心分离(10000rpm)10 分钟以除去多余的 EDC 和 NHS;

[0030] 6)用 2#、5# 金相砂纸抛光打磨玻碳电极,再用 0.3 和 0.05μm 的 Al_2O_3 抛光粉抛光,冲洗去表面污物,然后依次在 1:1 的 HNO_3、无水乙醇、二次蒸馏水中分别超声 1-2 分钟,用高纯 N_2 吹干;将 8μL 已活化的多壁碳纳米管溶液(1mg/mL)滴加到处理好的玻碳电极表面,待电极表面晾干后,将 10μL38μg/mL RBP 一抗(作为捕获探针)滴加到多壁碳纳米管膜表面,37℃恒温孵育 2 小时;

[0031] 7)将 10μL BSAT 溶液(5wt%BSA+1wt% 吐温 20)滴加到修饰有抗体的电极上,37℃恒温孵育 40 分钟;

[0032] 8)将该电极浸泡在 100μL RBP 抗原中,37℃恒温孵育 1 小时,得到固定的免疫交联层简称为 RBP/BSAT/anti-RBP/MWCNTs/GCE;

[0033] 9)将 10μL 制备好的二抗标记的 Ru-Nafion@SiO_2 复合纳米粒子滴加到修饰好的电极表面,37℃孵育 1 小时。

[0034] 过程中,步骤 5)到步骤 9)每一步都用 0.1M PBS(pH7.4)冲洗修饰好的电极,将该构建好的免疫传感器置于 4℃备用。

[0035] 实施例 2:RBP 单抗标记的 Ru-Nafion@SiO_2 复合纳米粒子与多壁碳纳米管修饰的玻碳电极的电化学行为研究

[0036] 在修饰有多壁碳纳米管的玻碳电极上分别修饰 10μL RBP 二抗和 10μL RBP 二抗标记的 Ru-Nafion@SiO_2 复合纳米粒子溶液,在 4mL 含有 0.25mM TPA 的 PBS(pH8.0)检测池中进行电化学行为检测,单独的 RBP 抗体与多壁碳纳米管修饰的电极基本没有电信号,但 RBP 二抗标记的 Ru-Nafion@SiO_2 复合纳米粒子与多壁碳纳米管修饰的电极的峰电流明显增加,且有一对 $Ru(bpy)_3^{2+}$ 的特征氧化还原峰(图 2),表明 RBP 二抗标记的 Ru-Nafion@SiO_2 复合纳米粒子探针中 $Ru(bpy)_3^{2+}$ 自身的电化学性质未受影响。

[0037] 实施例 3:双抗夹心型免疫传感器构建过程的电化学阻抗表征

[0038] 在电极的修饰过程中,采用电化学阻抗法对其进行表征。首先将处理好的裸玻碳电极置于 4mL $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 阻抗液(5mM)中,其阻抗值非常小,随着电极表面逐层修饰 RBP 一抗、BSAT、抗原、RBP 二抗标记的 Ru-Nafion@SiO_2 复合纳米粒子,其阻抗值也随之增大,表明各项修饰物很好地固定于电极表面。

[0039] 实施例 4:双抗夹心型免疫传感器对抗原 RBP 的电化学发光定量检测

[0040] 将构建好的免疫传感器置于 4mL 含有 0.25mM TPA 的 PBS(pH8.0)缓冲溶液中,随着抗原 RBP 的浓度不断增加电化学发光强度也不断增强,当 RBP 达到一定的浓度时,光强不再有明显的增幅。以电化学发光强度的对数对不同浓度的 RBP 对数作图得到该传感器检测 RBP 的线性范围为 78～5000ng/mL,检测限为 26ng/mL(S/N=3)(图 3)。所构建的电化学发光免疫传感器 RSD 值为 5.68%,显示了良好的稳定性和重现性。实验结果表明所制备的免疫传感器具有检测限低,灵敏度高,线性范围宽,稳定性、重现性好等优点。

[0041] 实施例 5:双抗夹心型免疫传感器对人体尿液中 RBP 的电化学发光检测

[0042] 构建的免疫传感器用来检测肾小球损坏患者体液中 RBP 的含量,对不同浓度的患者体液 RBP(浓度由传统的酶连接免疫吸附测定得出)进行回收率试验,得到的回收率在 98.01%～112.98% 范围内。

[0043] 以上所述为本发明的较佳实施例而已,但本发明不应该局限于该实施例所公开的

内容。所以凡是不脱离本发明所公开的原理下完成的等效或修改，都落入本发明保护的范围。

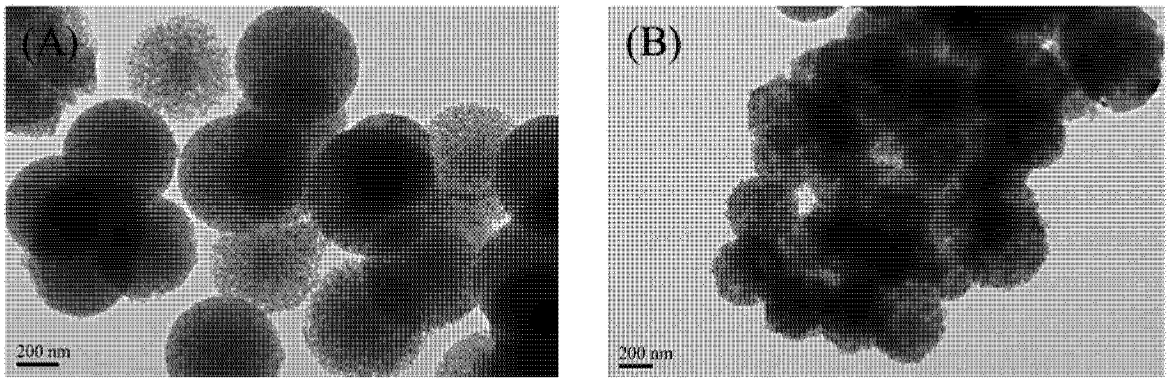

(A)
200 nm
(B)
200 nm

图 1

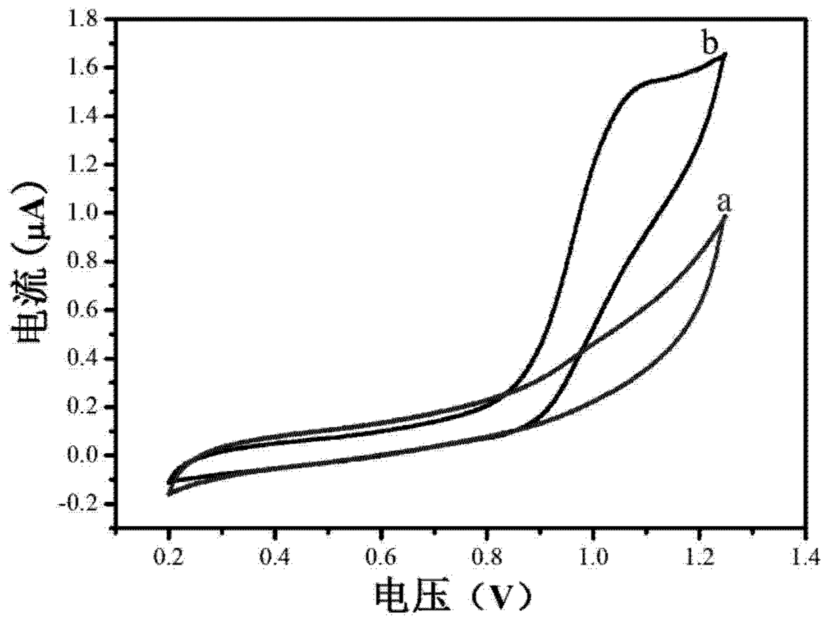

电流（μA）
电压（V）
a
b
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4

图 2

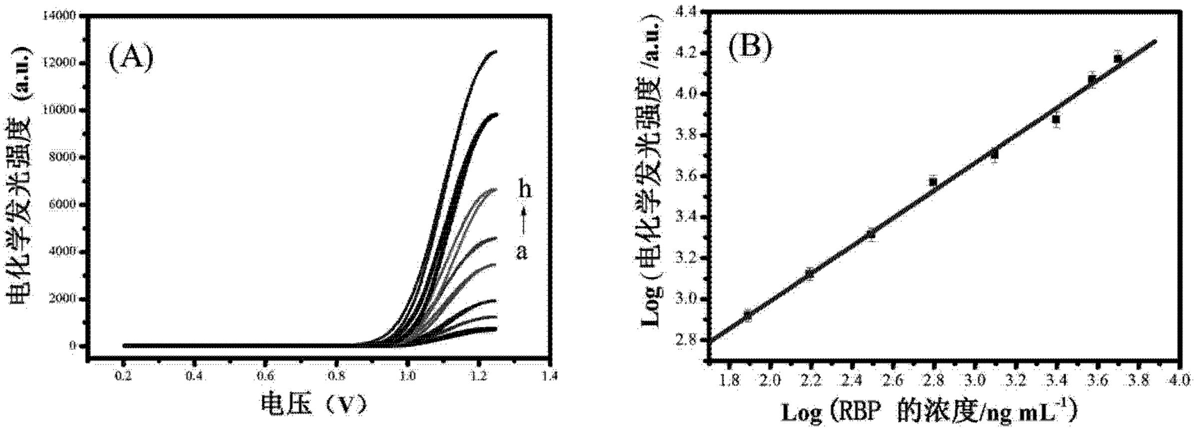


图 3

专利名称(译)	快速高灵敏检测视黄醇结合蛋白的新型电化学发光免疫传感器及其制备方法		
公开(公告)号	CN103235115A	公开(公告)日	2013-08-07
申请号	CN201310111897.0	申请日	2013-04-01
[标]申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
[标]发明人	贾能勤 吴贝娜 胡宸溢		
发明人	贾能勤 吴贝娜 胡宸溢		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
其他公开文献	CN103235115B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种快速高灵敏检测视黄醇结合蛋白的新型电化学发光免疫传感器，采用双抗夹心法，利用多壁碳纳米管大的比表面积和良好的导电性以及SiO2良好的生物相容性和表面规则的孔状结构、大的吸附容量等优点，在玻碳电极表面构建一个双重信号放大的电化学发光免疫传感器，并对人体液中RBP进行电化学发光检测。结果表明，采用电化学发光免疫传感方法，检测RBP的浓度范围宽，检测限低，并且具有良好的稳定性、重现性等传感特性。