



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104132981 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 05

(21) 申请号 201410344064. 3

(22) 申请日 2014. 07. 20

(71) 申请人 济南大学

地址 250022 山东省济南市济微路 106 号

(72) 发明人 张森 任祥 杜斌 魏琴 庞雪辉

张勇 马洪敏 吴丹

(51) Int. Cl.

G01N 27/327(2006. 01)

G01N 33/74(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

C01G 3/12(2006. 01)

B82Y 30/00(2011. 01)

权利要求书2页 说明书6页

(54) 发明名称

一种 Cu₂S 标记的雌激素免疫传感器的制备方法及应用

(57) 摘要

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 Cu₂S 标记的雌激素免疫传感器的制备方法及应用。其特征在于:本发明采用简单易行的腐蚀法,制备了成本低、导电性好、催化性能高和电活性强的 Cu₂S 纳米材料;制备 Cu₂S-BSA- 雌激素标记物,将所制得 Cu₂S-BSA- 雌激素标记物用作制备雌激素的竞争型免疫传感器。其优点在于识别快速、灵敏度高、检测限低、能实现多种雌激素的高灵敏、特异性、快速准确检测。

1. 一种 Cu_2S 标记的雌激素免疫传感器的制备方法及应用

一种 Cu_2S 标记的雌激素免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 裸金电极的预处理,将金电极用 $0.05\ \mu\text{m}$ 氧化铝粉末打磨抛光以去除表面的杂质,然后用超纯水进行冲洗;以 $0.1\ \text{mol/L}$ 的 H_2SO_4 作为底液,用循环伏安法进行预处理;

(2) 将处理后的金电极浸泡在用乙醇溶解的 $5\sim 15\ \text{mmol/L}$ 的巯基乙酸当中,避光浸泡 $12\ \text{h}$,利用金-硫键使巯基乙酸固定在金电极表面;

(3) 取 $3\ \mu\text{L}$ 含 $0.1\sim 0.4\ \text{mol/L}$ 的 EDC 与 $0.1\ \text{mol/L}$ 的 NHS 滴加到电极上用于活化羧基,在室温下晾干;

(4) 将 $4\ \mu\text{L}$, $50\sim 200\ \text{ng/mL}$ 雌激素抗体滴到电极上,置于 $4\ ^\circ\text{C}$ 保存晾干;

(5) 滴涂 $2\ \mu\text{L}$ 、质量分数为 $0.5\sim 2.0\%$ 的 BSA 溶液于电极上,置于 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存、晾干;

(6) 用超纯水进行清洗,晾干后,将 $6\ \mu\text{L}$ 雌激素混合溶液滴涂于电极表面,使其竞争结合电极表面的抗体, $4\ ^\circ\text{C}$ 保存晾干,用超纯水进行清洗,晾干,即制得雌激素免疫传感器;

所述雌激素混合溶液是由等体积的 Cu_2S -BSA-雌激素标记物溶液分别与不同浓度的雌激素溶液混合制得;所述不同浓度的雌激素溶液的浓度为 $10\ \text{pg/mL}\sim 10\ \text{ng/mL}$ 。

2. 如权利要求 1 所述的一种 Cu_2S 标记的雌激素免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述 Cu_2S -BSA-雌激素标记物溶液,制备步骤如下:

(1) 制备 Cu_2S 纳米材料

将 $3\sim 4$ 片、 $1\ \text{cm}^2$ 的高纯铜片用细砂纸打磨干净,先用超纯水进行冲洗,再用无水乙醇超声清洗,最后用超纯水超声除去残留的乙醇,分别加入 $600\sim 1000\ \mu\text{L}$ $0.16\ \text{mol/L}$ 的硫脲、 $50\sim 150\ \mu\text{L}$ 的乙二胺,放置 $2\sim 4$ 天,铜片表面形成一层 Cu_2S 纳米材料,超声,将其从铜片上分离,分别用无水乙醇和超纯水清洗数次,置于 $30\ ^\circ\text{C}$ 的真空干燥箱中干燥,制得 Cu_2S 纳米材料;

(2) 制备 Cu_2S -BSA-雌激素标记物溶液

称取 Cu_2S 纳米材料 $2.0\sim 3.0\ \text{mg}$ 于 $1\ \text{mL}$ 离心管中,超声分散均匀;加入 $500\ \mu\text{L}$ 质量分数为 $1.0\%\sim 3.0\%$ 的戊二醛溶液,室温下搅拌 $1\sim 3\ \text{h}$,在 $7000\ \text{rpm}$ 、 $20\ ^\circ\text{C}$ 下离心 $3\ \text{min}$,制得处理后的 Cu_2S 纳米材料;将处理后的 Cu_2S 纳米材料分散在 $0.5\ \text{mL}$ 、 $\text{pH}=7.4$ 的 PBS 中,加入 $3\sim 5\ \mu\text{g}$ 的雌激素-BSA 偶联物, $4\ ^\circ\text{C}$ 下孵化 $12\ \text{h}$,制得 Cu_2S 标记的雌激素-BSA 孵化物,即 Cu_2S -BSA-雌激素标记物溶液,通过离心分离未结合上的雌激素-BSA 偶联物后,将其分散在 $1\ \text{mL}$ 、质量分数为 $0.1\sim 0.3\%$ BSA 的 PBS 中,置于 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

3. 如权利要求 1 所述的一种 Cu_2S 标记的雌激素免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述的制备方法制备的免疫传感器用于雌激素的检测,检测步骤如下:

(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 $10\ \text{mL}$ 、 $\text{pH}\ 6.0\sim 7.0$ 的 PBS 缓冲溶液中进行测试;

(2) 用方波伏安法对分析物进行检测,扫描电压范围从 $-0.3\sim 0.6\ \text{V}$,电势跃阶为 $5\ \text{mV}$,频率 $25\ \text{Hz}$,振幅 $25\ \text{mV}$;

(3) Cu_2S 标记物发生氧化还原反应在 $0.17\ \text{V}$ 附近产生信号,根据所得电流强度与雌激素之间的线性关系,绘制工作曲线。

4. 根据权利要求 1 ~ 3 所述的雌激素,其特征在于,所述雌激素选自以下之一:雌二醇、雌三醇、己烯雌酚、双酚 A、炔诺酮、炔雌醇、左炔诺孕酮。

一种 Cu_2S 标记的雌激素免疫传感器的制备方法及应用

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 Cu_2S 标记的雌激素免疫传感器的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 环境中的痕量雌激素通过食物链进入人体，会形成假性激素，传递假性化学讯号，干扰体内正常内分泌物质的合成、释放、运输、结合、代谢等过程，激活或抑制内分泌系统的功能，从而破坏机体稳定性和调控作用，损害生物体生殖机能或引发恶性肿瘤。

[0003] 环境雌激素种类繁多，一些雌激素，如雌二醇、雌三醇等，虽是一类生物体自身可以合成的激素，但也常在人兽药物中使用；还有一些在药品、生活用品中有广泛应用，如己烯雌酚、双酚 A 等。随着药物滥用、生活垃圾遗弃、生物代谢等原因，在自然水体中也能检测到痕量雌激素。

[0004] 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、生物技术和电分析技术等领域的交叉融合，电化学传感器不断涌现并进入实际应用。电化学免疫传感器是将免疫学方法和电化学分析相结合的生物传感器，通过抗原与抗体的特异性结合，使其具有灵敏度高、选择性好、快速、操作简便等优点。

[0005] 纳米材料，因在光学、热学、电学、磁学、力学以及化学方面的特殊性能，使其在生产、生活、科研等各方面都有很广泛的应用。在制备过程中，具有大的比表面积、优良的导电能力、良好的生物相容性和稳定性的纳米材料常被用作基底材料以增大传感信号、提高灵敏度。具有大的比表面积、高的表面自由能及富含表面功能基团等特性的纳米材料，因其能固定大量生物分子至电极表面，并保持生物构型及活性，常作为载体固定抗原或抗体。自身具有良好的氧化还原能力的纳米材料，可以用来作为电化学反应的信号源；具有催化能力的纳米材料，可用其催化过氧化氢来间接的定量被测物质。由此可以看出，纳米材料在电化学免疫传感器制备中起到了重要的作用。

[0006] 硫化亚铜 (Cu_2S) 在防污涂料、固体润滑剂、催化剂、太阳电池及其他领域具有广泛的应用。它具有原料低廉、制备简单、导电性好、催化性能高等优点。本发明首次采用 Cu_2S 作为标记材料用于电化学免疫传感器的研制。

[0007] 本发明使用一种简单的腐蚀方法来制备 Cu_2S 纳米材料，利用 Cu_2S 共价偶联牛血清白蛋白 BSA-雌激素制备标记物 (Cu_2S -BSA-雌激素标记物) 研制了一种灵敏的测定微量雌激素的竞争型免疫传感器。在不使用酶标记和酸溶出的情况下， Cu_2S 也能产生良好的电化学信号。该检测是基于 Cu_2S -BSA-雌激素标记物与雌激素之间竞争性的结合雌激素抗体。随着雌激素浓度增加，在免疫传感器上的 Cu_2S -BSA-雌激素标记物竞争结合抗体的数量减少，因此氧化还原信号下降，依此来检测雌激素的含量。

发明内容

[0008] 本发明的目的之一是提供一种 Cu_2S -BSA-雌激素标记物的制备方法。

[0009] 本发明的目的之二是将所制得 Cu_2S -BSA- 雌激素标记物用作制备雌激素的竞争型免疫传感器。

[0010] 本发明的技术方案,包括以下步骤。

[0011] 一种 Cu_2S 标记的雌激素免疫传感器的制备方法, 本发明所述的雌激素免疫传感器的制备方法,步骤如下:

(1) 裸金电极的预处理,将金电极用 $0.05 \mu\text{m}$ 氧化铝粉末打磨抛光以去除表面的杂质,然后用超纯水进行冲洗;以 0.1 mol/L 的 H_2SO_4 作为底液,用循环伏安法进行预处理;

(2) 将处理后的金电极浸泡在用乙醇溶解的 $5 \sim 15 \text{ mmol/L}$ 的巯基乙酸当中,避光浸泡 12 h ,利用金-硫键使巯基乙酸固定在金电极表面;

(3) 取 $3 \mu\text{L}$ 含 $0.1 \sim 0.4 \text{ mol/L}$ 的 EDC 与 0.1 mol/L 的 NHS 滴加到电极上用于活化羧基,在室温下晾干;

(4) 将 $4 \mu\text{L}$, $50 \sim 200 \text{ ng/mL}$ 雌激素抗体滴到电极上,置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存晾干;

(5) 滴涂 $2 \mu\text{L}$ 、质量分数为 $0.5 \sim 2.0 \%$ 的 BSA 溶液于电极上,置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存、晾干;

(6) 用超纯水进行清洗,晾干后,将 $6 \mu\text{L}$ 雌激素混合溶液滴涂于电极表面,使其竞争结合电极表面的抗体, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存晾干,用超纯水进行清洗,晾干,即制得雌激素免疫传感器;

(7) 所述雌激素混合溶液是由等体积的 Cu_2S -BSA- 雌激素标记物溶液分别与不同浓度的雌激素溶液混合制得;所述不同浓度的雌激素溶液的浓度为 $10 \text{ pg/mL} \sim 10 \text{ ng/mL}$ 。

[0012] 所述的 Cu_2S -BSA- 雌激素标记物溶液的制备,步骤如下:

(1) Cu_2S 纳米材料的制备

将 $3 \sim 4$ 片、 1 cm^2 的高纯铜片用细砂纸打磨干净,先用超纯水进行冲洗,再用无水乙醇超声清洗,最后用超纯水超声除去残留的乙醇,分别加入 $600 \sim 1000 \mu\text{L}$ 0.16 mol/L 的硫脲、 $50 \sim 150 \mu\text{L}$ 的乙二胺,放置 $2 \sim 4$ 天,铜片表面形成一层 Cu_2S 纳米材料,超声,将其从铜片上分离,分别用无水乙醇和超纯水清洗数次,置于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 的真空干燥箱中干燥,制得 Cu_2S 纳米材料;

(2) Cu_2S -BSA- 雌激素标记物溶液的制备

称取 Cu_2S 纳米材料 $2.0 \sim 3.0 \text{ mg}$ 于 1 mL 离心管中,超声分散均匀;加入 $500 \mu\text{L}$ 质量分数为 $1.0\% \sim 3.0\%$ 的戊二醛溶液,室温下搅拌 $1 \sim 3 \text{ h}$,在 7000 rpm 、 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 下离心 3 min ,制得处理后的 Cu_2S 纳米材料;将处理后的 Cu_2S 纳米材料分散在 0.5 mL 、 $\text{pH}=7.4$ 的 PBS 中,加入 $3 \sim 5 \mu\text{g}$ 的雌激素-BSA 偶联物, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下孵化 12 h ,制得 Cu_2S 标记的雌激素-BSA 孵化物,即 Cu_2S -BSA- 雌激素标记物溶液,通过离心分离未结合上的雌激素-BSA 偶联物后,将其分散在 1 mL 、质量分数为 $0.1 \sim 0.3 \%$ BSA 的 PBS 中,置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

[0013] 本发明所述制备的免疫传感器用于雌激素的检测,步骤如下:

(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 、 $\text{pH} 6.0 \sim 7.0$ 的 PBS 缓冲溶液中进行测试;

(2) 用方波伏安法对分析物进行检测,扫描电压范围从 $-0.3 \sim 0.6 \text{ V}$,电势跃阶为 5 mV ,频率 25 Hz ,振幅 25 mV ;

(3) Cu_2S 标记物发生氧化还原反应在 0.17 V 附近产生信号,根据所得电流强度与雌激

素之间的线性关系,绘制工作曲线。

[0014] 4. 本发明所述的雌激素选自下列之一:雌二醇、雌三醇、己烯雌酚、双酚 A、炔诺酮、炔雌醇、左炔诺孕酮。

[0015] 本发明的有益成果

(1) 使用巯基乙酸连接金电极和雌激素抗体,不仅简化了传感器制备过程,而且化学键合更为牢固,传感器更稳定;

(2) 采用非常简单的腐蚀法制备 Cu_2S 纳米材料,原料低廉、制备方便,材料导电性好、催化性能高,电活性强;

(3) 本发明首次将 Cu_2S 纳米材料应用于电化学免疫传感器的制备中;

(4) 制备 Cu_2S 标记 BSA- 雌激素的孵化物,构建竞争型免疫传感器实现对雌激素的灵敏检测;

(5) 本发明制备的传感器可用于多种雌激素的检测,检测范围宽,检出限可以低至 3 pg/mL。

具体实施方式

[0016] 实施例 1 一种 Cu_2S 标记的雌激素免疫传感器的制备方法

(1) 裸金电极的预处理,将金电极用 0.05 μm 氧化铝粉末打磨抛光以去除表面的杂质,然后用超纯水进行冲洗;以 0.1 mol/L 的 H_2SO_4 作为底液,用循环伏安法进行预处理;

(2) 将处理后的金电极浸泡在用乙醇溶解的 5 mmol/L 的巯基乙酸当中,避光浸泡 12 h,利用金-硫键使巯基乙酸固定在金电极表面;

(3) 取 3 μL 含 0.1 mol/L 的 EDC 与 0.1 mol/L 的 NHS 滴加到电极上用于活化羧基,在室温下晾干;

(4) 将 4 μL , 50 ng/mL 雌激素抗体滴到电极上,置于 4 $^\circ\text{C}$ 保存晾干;

(5) 滴涂 2 μL 、质量分数为 0.5 % 的 BSA 溶液于电极上,置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱保存、晾干;

(6) 用超纯水进行清洗,晾干后,将 6 μL 雌激素混合溶液滴涂于电极表面,使其竞争结合电极表面的抗体,4 $^\circ\text{C}$ 保存晾干,用超纯水进行清洗,晾干,即制得雌激素免疫传感器;

(7) 所述雌激素混合溶液是由等体积的 Cu_2S -BSA- 雌激素标记物溶液分别与不同浓度的雌激素溶液混合制得;所述不同浓度的雌激素溶液的浓度为 10 pg/mL \sim 10 ng/mL。

[0017] 实施例 2 一种 Cu_2S 标记的雌激素免疫传感器的制备方法

(1) 裸金电极的预处理,将金电极用 0.05 μm 氧化铝粉末打磨抛光以去除表面的杂质,然后用超纯水进行冲洗;以 0.1 mol/L 的 H_2SO_4 作为底液,用循环伏安法进行预处理;

(2) 将处理后的金电极浸泡在用乙醇溶解的 10 mmol/L 的巯基乙酸当中,避光浸泡 12 h,利用金-硫键使巯基乙酸固定在金电极表面;

(3) 取 3 μL 含 0.3 mol/L 的 EDC 与 0.1 mol/L 的 NHS 滴加到电极上用于活化羧基,在室温下晾干;

(4) 将 4 μL , 100 ng/mL 雌激素抗体滴到电极上,置于 4 $^\circ\text{C}$ 保存晾干;

(5) 滴涂 2 μL 、质量分数为 1.0% 的 BSA 溶液于电极上,置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱保存、晾干;

(6) 用超纯水进行清洗,晾干后,将 6 μL 雌激素混合溶液滴涂于电极表面,使其竞争结合电极表面的抗体,4 $^\circ\text{C}$ 保存晾干,用超纯水进行清洗,晾干,即制得雌激素免疫传感器;

(7) 所述雌激素混合溶液是由等体积的 Cu_2S -BSA- 雌激素标记物溶液分别与不同浓度的雌激素溶液混合制得；所述不同浓度的雌激素溶液的浓度为 $10 \text{ pg/mL} \sim 10 \text{ ng/mL}$ 。

[0018] 实施例 3 一种 Cu_2S 标记的雌激素免疫传感器的制备方法

(1) 裸金电极的预处理, 将金电极用 $0.05 \mu\text{m}$ 氧化铝粉末打磨抛光以去除表面的杂质, 然后用超纯水进行冲洗; 以 0.1 mol/L 的 H_2SO_4 作为底液, 用循环伏安法进行预处理;

(2) 将处理后的金电极浸泡在用乙醇溶解的 15 mmol/L 的巯基乙酸当中, 避光浸泡 12 h , 利用金-硫键使巯基乙酸固定在金电极表面;

(3) 取 $3 \mu\text{L}$ 含 0.4 mol/L 的 EDC 与 0.1 mol/L 的 NHS 滴加到电极上用于活化羧基, 在室温下晾干;

(4) 将 $4 \mu\text{L}$, 200 ng/mL 雌激素抗体滴到电极上, 置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存晾干;

(5) 滴涂 $2 \mu\text{L}$ 、质量分数为 2.0% 的 BSA 溶液于电极上, 置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存、晾干;

(6) 用超纯水进行清洗, 晾干后, 将 $6 \mu\text{L}$ 雌激素混合溶液滴涂于电极表面, 使其竞争结合电极表面的抗体, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存晾干, 用超纯水进行清洗, 晾干, 即制得雌激素免疫传感器;

(7) 所述雌激素混合溶液是由等体积的 Cu_2S -BSA- 雌激素标记物溶液分别与不同浓度的雌激素溶液混合制得；所述不同浓度的雌激素溶液的浓度为 $10 \text{ pg/mL} \sim 10 \text{ ng/mL}$ 。

[0019] 实施例 4 Cu_2S -BSA- 雌激素标记物溶液

(1) 制备 Cu_2S 纳米材料

将 3 片、 1 cm^2 的高纯铜片用细砂纸打磨干净, 先用超纯水进行冲洗, 再用无水乙醇超声清洗, 最后用超纯水超声除去残留的乙醇, 分别加入 $600 \mu\text{L}$ 0.16 mol/L 的硫脲、 $50 \mu\text{L}$ 的乙二胺, 放置 2 天, 铜片表面形成一层 Cu_2S 纳米材料, 超声, 将其从铜片上分离, 分别用无水乙醇和超纯水清洗数次, 置于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 的真空干燥箱中干燥, 制得 Cu_2S 纳米材料。

[0020] (2) 制备 Cu_2S -BSA- 雌激素标记物溶液

称取 Cu_2S 纳米材料 2.0 mg 于 1 mL 离心管中, 超声分散均匀; 加入 $500 \mu\text{L}$ 质量分数为 1.0% 的戊二醛溶液, 室温下搅拌 1 h , 在 7000 rpm 、 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 下离心 3 min , 制得处理后的 Cu_2S 纳米材料; 将处理后的 Cu_2S 纳米材料分散在 0.5 mL 、 $\text{pH}=7.4$ 的 PBS 中, 加入 $3 \mu\text{g}$ 的雌激素-BSA 偶联物, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下孵化 12 h , 制得 Cu_2S 标记的雌激素-BSA 孵化物, 即 Cu_2S -BSA- 雌激素标记物溶液, 通过离心分离未结合上的雌激素-BSA 偶联物后, 将其分散在 1 mL 、质量分数为 0.1% BSA 的 PBS 中, 置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

[0021] 实施例 5 Cu_2S -BSA- 雌激素标记物溶液

(1) 制备 Cu_2S 纳米材料

将 3 片、 1 cm^2 的高纯铜片用细砂纸打磨干净, 先用超纯水进行冲洗, 再用无水乙醇超声清洗, 最后用超纯水超声除去残留的乙醇, 分别加入 $800 \mu\text{L}$ 0.16 mol/L 的硫脲、 $100 \mu\text{L}$ 的乙二胺, 放置 3 天, 铜片表面形成一层 Cu_2S 纳米材料, 超声, 将其从铜片上分离, 分别用无水乙醇和超纯水清洗数次, 置于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 的真空干燥箱中干燥, 制得 Cu_2S 纳米材料。

[0022] (2) 制备 Cu_2S -BSA- 雌激素标记物溶液

称取 Cu_2S 纳米材料 2.5 mg 于 1 mL 离心管中, 超声分散均匀; 加入 $500 \mu\text{L}$ 质量分数为 2.0% 的戊二醛溶液, 室温下搅拌 2 h , 在 7000 rpm 、 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 下离心 3 min , 制得处理后的 Cu_2S 纳米材料; 将处理后的 Cu_2S 纳米材料分散在 0.5 mL 、 $\text{pH}=7.4$ 的 PBS 中, 加入 $4 \mu\text{g}$ 的雌激素-BSA 偶联物, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下孵化 12 h , 制得 Cu_2S 标记的雌激素-BSA 孵化物, 即 Cu_2S -BSA- 雌激

素标记物溶液,通过离心分离未结合上的雌激素-BSA 偶联物后,将其分散在 1mL、质量分数为 0.2 % BSA 的 PBS 中,置于 4℃冰箱备用。

[0023] 实施例 6 Cu₂S-BSA- 雌激素标记物溶液

(1) 制备 Cu₂S 纳米材料

将 4 片、1 cm² 的高纯铜片用细砂纸打磨干净,先用超纯水进行冲洗,再用无水乙醇超声清洗,最后用超纯水超声除去残留的乙醇,分别加入 1000 μL 0.16 mol/L 的硫脲、150 μL 的乙二胺,放置 4 天,铜片表面形成一层 Cu₂S 纳米材料,超声,将其从铜片上分离,分别用无水乙醇和超纯水清洗数次,置于 30 °C 的真空干燥箱中干燥,制得 Cu₂S 纳米材料。

[0024] (2) 制备 Cu₂S-BSA- 雌激素标记物溶液

称取 Cu₂S 纳米材料 3.0 mg 于 1 mL 离心管中,超声分散均匀;加入 500 μL 质量分数为 3.0% 的戊二醛溶液,室温下搅拌 3 h,在 7000 rpm、20 °C 下离心 3 min,制得处理后的 Cu₂S 纳米材料;将处理后的 Cu₂S 纳米材料分散在 0.5 mL、pH=7.4 的 PBS 中,加入 5μg 的雌激素-BSA 偶联物,4 °C 下孵化 12 h,制得 Cu₂S 标记的雌激素-BSA 孵化物,即 Cu₂S-BSA- 雌激素标记物溶液,通过离心分离未结合上的雌激素-BSA 偶联物后,将其分散在 1mL、质量分数为 0.3 % BSA 的 PBS 中,置于 4℃冰箱备用。

[0025] 实施例 7 雌激素—雌二醇的检测

(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,所制备的免疫传感器为工作电极,在 10 mL、pH 6.0 ~ 7.0 的 PBS 缓冲溶液中进行测试;

(2) 用方波伏安法对分析物进行检测,扫描电压范围从 -0.3 ~ 0.6 V,电势跃阶为 5 mV,频率 25 Hz,振幅 25 mV;

(3) Cu₂S 标记物发生氧化还原反应在 0.17 V 附近产生信号,根据所得电流强度与雌二醇之间的线性关系,绘制工作曲线。

[0026] (4) 按照绘制工作曲线的方法进行雌二醇样品分析,测得线性范围为 25 pg/mL ~ 7.5 ng/mL,检测限为 5 pg/mL。

[0027] 实施例 8 雌激素—雌三醇的检测

绘制工作曲线步骤同实施例 7,按照绘制工作曲线的方法进行雌三醇样品分析,测得线性范围为 25 pg/mL ~ 5 ng/mL,检测限为 5pg/mL。

[0028] 实施例 9 雌激素—己烯雌酚的检测

绘制工作曲线步骤同实施例 7,按照绘制工作曲线的方法进行己烯雌酚样品分析,测得线性范围为 10 pg/mL ~ 2.5 ng/mL,检测限为 3 pg/mL。

[0029] 实施例 10 雌激素—双酚 A 的检测

绘制工作曲线步骤同实施例 7,按照绘制工作曲线的方法进行双酚 A 样品分析,测得线性范围为 20 pg/mL ~ 4 ng/mL,检测限为 4.5 pg/mL。

[0030] 实施例 11 雌激素—炔诺酮的检测

绘制工作曲线步骤同实施例 7,按照绘制工作曲线的方法进行炔诺酮样品分析,测得线性范围为 40 pg/mL ~ 2 ng/mL,检测限为 6.3 pg/mL。

[0031] 实施例 12 雌激素—炔雌醇的检测

绘制工作曲线步骤同实施例 7,按照绘制工作曲线的方法进行炔雌醇样品分析,测得线

性范围为 15 pg/mL ~ 4 ng/mL, 检测限为 3.8 pg/mL。

[0032] 实施例 13 雌激素—左炔诺孕酮的检测

绘制工作曲线步骤同实施例 7, 按照绘制工作曲线的方法进行左炔诺孕酮样品分析, 测得线性范围为 25 pg/mL ~ 5 ng/mL, 检测限为 5 pg/mL。

专利名称(译)	一种Cu ₂ S标记的雌激素免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN104132981A	公开(公告)日	2014-11-05
申请号	CN201410344064.3	申请日	2014-07-20
[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	张森 任祥 杜斌 魏琴 庞雪辉 张勇 马洪敏 吴丹		
发明人	张森 任祥 杜斌 魏琴 庞雪辉 张勇 马洪敏 吴丹		
IPC分类号	G01N27/327 G01N33/74 G01N33/532 C01G3/12 B82Y30/00		
其他公开文献	CN104132981B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

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Cu₂S标记的雌激素免疫传感器的制备方法及应用。其特征在于：本发明采用简单易行的腐蚀法，制备了成本低、导电性好、催化性能高和电活性强的Cu₂S纳米材料；制备Cu₂S-BSA-雌激素标记物，将所制得Cu₂S-BSA-雌激素标记物用作制备雌激素的竞争型免疫传感器。其优点在于识别快速、灵敏度高、检测限低、能实现多种雌激素的高灵敏、特异性、快速准确检测。