



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110531061 A

(43)申请公布日 2019.12.03

(21)申请号 201910623848.2

C01G 49/08(2006.01)

(22)申请日 2019.07.11

C01G 23/053(2006.01)

(71)申请人 宁波大学

地址 315211 浙江省宁波市江北区风华路
818号

(72)发明人 姜涛 周骏 姜勇 杜远远
顾辰杰 王福艳

(74)专利代理机构 宁波奥圣专利代理事务所
(普通合伙) 33226

代理人 何仲

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/537(2006.01)

G01N 21/65(2006.01)

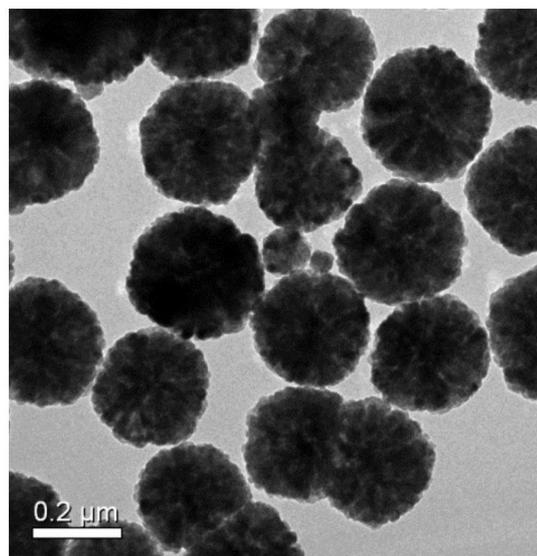
权利要求书2页 说明书7页 附图6页

(54)发明名称

一种四氧化三铁/二氧化钛/银核壳纳米材料的制备方法及其可循环免疫检测应用

(57)摘要

本发明公开了一种四氧化三铁/二氧化钛/银核壳纳米材料的制备方法及其直接可循环免疫检测应用,特点是活化三重核壳纳米材料使其与待测抗原相结合,利用表面增强拉曼散射效应实现待测抗原的直接拉曼检测,在拉曼检测完成后,对上述免疫结合的纳米材料进行紫外光照降解抗原,磁力回收表面已无抗原存在的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料,并将其用于下一次对待测抗原的检测中,重复这一拉曼检测-催化降解-拉曼检测过程,实现肿瘤标志物直接可循环免疫检测,优点是三层核壳结构既具有磁性分离和拉曼增强的作用,又具有催化降解肿瘤标志物的作用,同时检测限低且可检测大分子肿瘤标志物。



1. 一种四氧化三铁/二氧化钛/银核壳纳米材料的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 将1.35-6.75克六水合三氯化铁、3.6-18.0克醋酸钠和1.0-5.0克聚乙二醇溶于40-200毫升乙二醇中,超声直至完全溶解后,转移到水热反应釜中,于200℃下反应10小时,离心并用乙醇清洗后收集沉淀,即得到 Fe_3O_4 纳米颗粒;

(2) 称取50毫克步骤(1)得到的 Fe_3O_4 纳米颗粒溶于浓度为0.1毫摩尔每毫升盐酸水溶液中超声15分钟,磁性分离并用去离子水清洗三次;再次磁性分离后,将 Fe_3O_4 纳米颗粒溶于120毫升由乙醇和乙腈按体积比3:1混合而成的混合溶液中,超声使其完全溶解后,向其加入500微升氨水,超声5分钟使其混合均匀;然后在搅拌条件下逐滴加入1-6毫升钛酸四丁酯,反应1.5小时后,磁性分离并用乙醇洗涤三次后,即得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒;

(3) 取81毫克步骤(2)得到的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒和75.4毫克氟化铵溶于20.45毫升由乙醇和水按体积比13.5:6.95混合而成的混合溶液中,超声使其充分溶解后,将反应溶液放置于室温下持续搅拌1小时,搅拌速度为180-200转每分钟,搅拌完成后,将反应溶液转移至反应釜中,在180℃下反应24小时,待反应釜自然冷却至室温后,磁性分离并用去离子水洗涤3次,即得到结晶化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒;

(4) 取81毫克步骤(3)得到的结晶化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒溶于33.4毫升乙醇中,持续搅拌下逐滴加入25微升3-氨丙基三甲氧基硅氧烷,将反应溶液置于80℃下冷凝回流4小时,待其自然冷却至室温后,磁性分离并用乙醇洗涤三次,即得到氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒;

(5) 将1克聚乙烯吡咯烷酮和28毫克步骤(4)得到的氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒溶于10毫升去离子水中混合均匀后,在机械搅拌下逐滴加入银氨溶液并转移至水热反应釜中,密封后置于120℃下反应11小时,待反应釜自然冷却至室温后,磁性分离并依次用四氢呋喃、乙醇和去离子水洗涤,即得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料,并置于去离子水中储存待用,

根据权利要求1所述的一种四氧化三铁/二氧化钛/银核壳纳米材料的制备方法,其特征在于步骤(5)中所述的银氨溶液制备方法为:取2毫升浓度为0.01-0.08毫克每毫升的硝酸银水溶液,加入过量的氨水直至反应溶液变澄清得到银氨溶液。

2. 一种基于权利要求1或2制备方法所得的四氧化三铁/二氧化钛/银核壳纳米材料的肿瘤标志物可循环免疫检测方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 将15毫克 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料溶于2毫升二甲基甲酰胺溶液中,然后加入1毫升丁二酸酐的DMF溶液,于70℃下缓慢摇动孵化24小时后,磁性分离并用去离子水洗涤2次,即得到羧基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料,并溶于1毫升水中,然后加入1毫升EDC/NHS的PBS溶液,于30℃下缓慢摇动孵化1小时后,用去离子水洗涤1次,再将洗涤后的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料溶于1毫升由PBS缓冲液和水按等体积比混合而成的混合溶液中,向其中加入100微克每毫升的肿瘤标志物溶液,于30℃缓慢摇动孵化3.5小时后,用去离子水洗涤一次,磁性分离得到标记有肿瘤标志物的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料,利用拉曼光谱仪对其进行光谱测量可检测待测肿瘤标志物的含量;

(2) 检测结束后,将标记有肿瘤标志物的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料溶于去离子水中,并将其转移到透明玻璃瓶中,采用小磁铁吸引的方式聚集 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米粒子,采

用波长为265纳米的紫外灯进行照射,在光催化作用下直至肿瘤标志物降解完全,然后将催化后的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料重复步骤(1)方法链接新的肿瘤标志物,即可实现对肿瘤标志物的直接可循环免疫检测。

3. 根据权利要求3所述的基于四氧化三铁/二氧化钛/银核壳纳米材料的肿瘤标志物可循环免疫检测方法,其特征在于:步骤(1)中所述的丁二酸酐的DMF溶液中丁二酸酐的浓度为10.3毫克每毫升;所述的EDC/NHS的PBS溶液中EDC的浓度为10毫克每毫升,NHS的浓度为10毫克每毫升。

4. 根据权利要求3所述的基于四氧化三铁/二氧化钛/银核壳纳米材料的肿瘤标志物可循环免疫检测方法,其特征在于:所述的肿瘤标志物包括前列腺特异性抗原PSA、甲胎蛋白AFP、免疫球蛋白IgG、糖类抗原CA199和癌胚抗原CEA。

一种四氧化三铁/二氧化钛/银核壳纳米材料的制备方法及其可循环免疫检测应用

技术领域

[0001] 本发明涉及材料工程及纳米技术领域,尤其是涉及一种四氧化三铁/二氧化钛/银($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$)核壳纳米材料的制备方法及其可循环免疫检测应用。

背景技术

[0002] 近年来,随着环境污染的加剧,全球气候的持续改变,粮食危机的产生以及人们生活压力的加大,癌症频发,其高死亡率已经成为人类健康的严重威胁。因此,人们开发了一系列先进的免疫技术,如化学发光法和酶联免疫分析法等生化检测技术对癌症病患进行探测和治疗。但是,对于处于癌症早期的患者,其血液中癌症标志物含量较低,很难及早被发现并进行治疗。近年来发展起来的表面增强拉曼散射免疫技术充分利用表面增强拉曼散射具有的较高电磁场增强程度和可达单分子级别的高灵敏度的优势,可实现肿瘤标志物的痕量检测。但是,表面增强拉曼散射技术基于的材料多为贵金属纳米材料制备成本较高,不利于其在临床免疫检测中的实际应用。因此,有必要开发一种循环免疫检测技术。二氧化钛纳米材料具有优良的光催化活性,是实现这种可循环免疫检测技术的一种潜在关键材料。同时,如何利用具有优良的光电磁等性能的多样化纳米材料进一步提高复合纳米材料的光催化活性,促进可循环免疫检测技术在原场快速免疫检测中的应用仍是科研工作者努力的方向。

发明内容

[0003] 本发明所要解决的技术问题是提供一种既具有磁性分离和拉曼增强的作用,又具有催化降解癌症标志物的检测限低的四氧化三铁/二氧化钛/银核壳纳米材料的制备方法及其可循环免疫检测应用。

[0004] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为:一种四氧化三铁/二氧化钛/银核壳纳米材料的制备方法,包括以下步骤:

(1) 将1.35-6.75克六水合三氯化铁、3.6-18.0克醋酸钠和1.0-5.0克聚乙二醇溶于40-200毫升乙二醇中,超声直至完全溶解后,转移到水热反应釜中,于 200°C 下反应10小时,离心并用乙醇清洗后收集沉淀,即得到 Fe_3O_4 纳米颗粒;

(2) 称取50毫克步骤(1)得到的 Fe_3O_4 纳米颗粒溶于浓度为0.1毫摩尔每毫升盐酸水溶液中超声15分钟,磁性分离并用去离子水清洗三次;再次磁性分离后,将 Fe_3O_4 纳米颗粒溶于120毫升由乙醇和乙腈按体积比3:1混合而成的混合溶液中,超声使其完全溶解后,向其加入500微升氨水,超声5分钟使其混合均匀;然后在搅拌条件下逐滴加入1-6毫升钛酸四丁酯,反应1.5小时后,磁性分离并用乙醇洗涤三次后,即得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒;

(3) 取81毫克步骤(2)得到的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒和75.4毫克氟化铵溶于20.45毫升由乙醇和水按体积比13.5:6.95混合而成的混合溶液中,超声使其充分溶解后,将反应溶液放置于室温下持续搅拌1小时,搅拌速度为180-200转每分钟,搅拌完成后,将反应溶液转移至

反应釜中,在180℃下反应24小时,待反应釜自然冷却至室温后,磁性分离并用去离子水洗涤3次,即得到结晶化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒;

(4)取81毫克步骤(3)得到的结晶化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒溶于33.4毫升乙醇中,持续搅拌下逐滴加入25微升3-氨丙基三甲氧基硅氧烷,将反应溶液置于80℃下冷凝回流4小时,待其自然冷却至室温后,磁性分离并用乙醇洗涤三次,即得到氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒;

(5)将1克聚乙烯吡咯烷酮(分子量5800克每摩尔)和28毫克步骤(4)得到的氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒溶于10毫升去离子水中混合均匀后,在机械搅拌下逐滴加入银氨溶液并转移至水热反应釜中,密封后置于120℃下反应11小时,待反应釜自然冷却至室温后,磁性分离并依次用四氢呋喃、乙醇和去离子水洗涤,即得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料,并置于去离子水中储存待用,其中银氨溶液制备方法为:取2毫升浓度为0.01-0.08毫克每毫升的硝酸银水溶液,加入过量的氨水直至反应溶液变澄清得到银氨溶液。

[0005] 基于上述制备方法所得的四氧化三铁/二氧化钛/银核壳纳米材料的肿瘤标志物的可循环免疫检测方法,包括以下步骤:

(1)将15毫克 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ /Ag核壳纳米材料溶于2毫升二甲基甲酰胺(DMF)溶液中,然后加入1毫升丁二酸酐的DMF溶液,于70℃下缓慢摇动孵化24小时后,磁性分离并用去离子水洗涤2次,即得到羧基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料,并溶于1毫升水中,然后加入1毫升EDC/NHS的PBS溶液,于30℃下缓慢摇动孵化1小时后,用去离子水洗涤1次,再将洗涤后的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料溶于1毫升由PBS缓冲液和水按等体积比混合而成的混合溶液中,向其中加入100微克每毫升的肿瘤标志物溶液,于30℃缓慢摇动孵化3.5小时后,用去离子水洗涤一次,磁性分离得到标记有肿瘤标志物的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料,利用拉曼光谱仪对其进行光谱测量可检测待测肿瘤标志物的含量;

(2)检测结束后,将标记有肿瘤标志物的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料溶于去离子水中,并将其转移到透明玻璃瓶中,采用小磁铁吸引的方式聚集 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米粒子,采用波长为265纳米的紫外灯进行照射,在光催化作用下直至肿瘤标志物降解完全,然后将催化后的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料重复步骤(1)方法链接新的肿瘤标志物,即可实现对肿瘤标志物的直接可循环免疫检测。

[0006] 步骤(1)中所述的丁二酸酐的DMF溶液中丁二酸酐的浓度为10.3毫克每毫升;所述的EDC/NHS的PBS溶液中EDC的浓度为10毫克每毫升,NHS的浓度为10毫克每毫升。

[0007] 所述的肿瘤标志物包括前列腺特异性抗原PSA、甲胎蛋白AFP、免疫球蛋白IgG、糖类抗原CA199和癌胚抗原CEA。

[0008] 与现有技术相比,本发明的优点在于:本发明首次公开了四氧化三铁/二氧化钛/银核壳纳米材料的制备方法及对肿瘤标志物的可循环免疫检测方法,三层核壳结构中的 Fe_3O_4 内核使得三重核壳结构具有磁性分离的作用,可以使得样品清洗分离更为简单快速。同时,由于 Fe_3O_4 内核的存在,当对核壳纳米材料表面结合的肿瘤标志物进行光催化降解的时候,可以通过外加磁场使得核壳纳米材料一定程度上发生团聚富集,增强催化的效率。 TiO_2 中间壳层具有良好的光催化活性,其机理为在紫外光照下,由于光子的能量大于 TiO_2 禁带宽度,其价带上的电子(e^-)吸收光子能量被激发到导带上,同时在价带上留下空穴(h^+)。当 TiO_2 存在表面缺陷或者合适的俘获剂时,电子和空穴的复合得到抑制,就会在 TiO_2 表面发

生氧化-还原反应。价带空穴是良好的氧化剂,能够与 TiO_2 表面吸附的 H_2O 分子或反应溶液中溶解的 OH^- 结合形成氧化性很活泼的羟基自由基($\cdot\text{OH}$)。而导带电子是良好的还原剂,通过与 TiO_2 表面吸附的或反应溶液中溶解的 O_2 进行一系列中间反应,最终也可以形成氧化性很活泼的羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)。羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)能够把各种有机物(包括前列腺特异性抗原PSA这种单链糖蛋白)氧化成 CO_2 、 H_2O 等无机小分子,而且因为他们的氧化能力强,能够确保氧化反应一般不停留在中间步骤,不产生中间产物。 Ag 壳层由大量密布的 Ag 纳米颗粒组成,当有外界光照时,其表面电子会被激发形成局域表面等离子共振,当 Ag 纳米颗粒周围有 TiO_2 存在时,这些激发的电子一部分可以通过电荷传递过程到达 TiO_2 导带之中,导带之中增多的电子会显著促进 TiO_2 对肿瘤标志物的催化降解能力。在催化降解后,通过适当清洗, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料还能被回收利用,重新与新的待测抗原结合进行检测,实现一种循环免疫检测。同时,通过水热法一步包覆的 Ag 壳层相比于其他方法如静电吸附法合成的 Ag 颗粒,在氨基化的 TiO_2 表面吸附更为紧密而均匀。有利于对 Ag 和 TiO_2 之间的电荷传递过程的促进效果,进而显著增强 TiO_2 的光催化活性,实现肿瘤标志物这类大分子的催化降解。并且,其表面电子在激发光作用下共振引起的局域电磁场可以显著增强肿瘤标志物的特异性拉曼信号。 Ag 拉曼散射截面较大,增强拉曼散射效率较高,有利于实现肿瘤标志物的高灵敏度高特异性的表面增强拉曼散射基直接免疫检测,避免了间接探测需要引入额外的拉曼分子,操作步骤较繁琐的缺点。总之, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料,既具有磁性分离的功能、催化降解肿瘤标志物的作用、又具有增强肿瘤标志物拉曼信号的作用,是一种新颖的多功能纳米材料。通过设计合成这种新颖的三重核壳结构,特别是在反应过程中通过系统地调节反应条件,控制 Fe_3O_4 的直径、 TiO_2 的中间层厚度和 Ag 壳层的密集度,我们能够综合利用上述三种材料各自的优势,实现肿瘤标志物的高灵敏度高特异性直接可循环免疫检测。

附图说明

[0009] 图1为本发明实施例1中制备的 Fe_3O_4 纳米材料的透射电子显微镜照片;

图2为本发明实施例1中制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 核壳纳米材料的透射电子显微镜照片;

图3为本发明实施例1中制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料的扫描电子显微镜照片;

图4为采用静电吸附法将 Ag 颗粒包于本实施例1制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 核壳纳米材料外表面形成的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 三重核壳纳米材料的扫描电子显微镜照片;

图5为分别采用本发明实施例1中制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料和静电吸附法制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 三重核壳纳米材料对小分子4-巯基苯甲酸(0.01毫摩尔每毫升)进行催化的结果;

图6为本发明实施例1中制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料对前列腺特异性抗原PSA(10微克每毫升)的进行免疫检测并催化的结果;

图7为采用静电吸附法制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料对前列腺特异性抗原PSA(10微克每毫升)的进行免疫检测并催化的结果;

图8为本发明实施例1中制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料对前列腺特异性抗原PSA的直接可循环免疫检测结果;

图9为本发明实施例1中制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料对前列腺特异性抗原PSA的

直接可循环免疫中拉曼谱中频移为 1264 cm^{-1} 的特征峰强度随待测抗原浓度的变化图；

图10为本发明实施例2中制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料对前列腺特异性抗原PSA的直接可循环免疫中拉曼谱中频移为 1264 cm^{-1} 的特征峰强度随待测抗原浓度的变化图；

图11为本发明实施例3中制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料对前列腺特异性抗原PSA的直接可循环免疫中拉曼谱中频移为 1264 cm^{-1} 的特征峰强度随待测抗原浓度的变化图。

具体实施方式

[0010] 以下结合附图实施例对本发明作进一步详细描述。

[0011] 以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。若未特别指明，实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段，所用原料均为市售商品。实施例中使用的拉曼光谱检测仪BWS415购自美国必达泰克公司(B&W Tek Inc.)。

[0012] 实施例1

一种 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 三重核壳纳米材料及其对前列腺特异性抗原PSA的直接可循环免疫检测方法，包括以下步骤：

1、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 三重核壳纳米材料的制备

(1) 将3.5克六水合三氯化铁、10.8克醋酸钠和3克聚乙二醇溶于120毫升乙二醇中，超声直至完全溶解后，转移到水热反应釜中，于 200°C 下反应10小时，离心并用乙醇清洗后收集沉淀，即得到 Fe_3O_4 纳米颗粒；

(2) 称取50毫克步骤(1)得到的 Fe_3O_4 纳米颗粒溶于浓度为0.1毫摩尔每毫升盐酸水溶液中超声15分钟，磁性分离并用去离子水清洗三次；再次磁性分离后，将 Fe_3O_4 纳米颗粒溶于120毫升由乙醇和乙腈按体积比3:1混合而成的混合溶液中，超声使其完全溶解后，向其加入500微升氨水，超声5分钟使其混合均匀；然后在搅拌条件下逐滴加入3毫升钛酸四丁酯并反应1.5小时，反应结束后，磁性分离并用乙醇洗涤三次后，即得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒；

(3) 取81毫克步骤(2)得到的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒和75.4毫克氟化铵溶于20.45毫升由乙醇和水按体积比13.5:6.95混合而成的混合溶液中，超声使其充分溶解后，将反应溶液放置于室温下持续搅拌1小时，搅拌速度为180-200转每分钟，搅拌完成后，将反应溶液转移至反应釜中，在 180°C 下反应24小时，待反应釜自然冷却至室温后，磁性分离并用去离子水洗涤3次，即得到结晶化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒；

(4) 取81毫克步骤(3)得到的结晶化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒溶于33.4毫升乙醇中，持续搅拌下逐滴加入25微升3-氨基三甲氧基硅氧烷，将反应溶液置于 80°C 下冷凝回流4小时，待其自然冷却至室温后，磁性分离并用乙醇洗涤三次，即得到氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒；

(5) 将1克聚乙烯吡咯烷酮(分子量5800克每摩尔)和28毫克步骤(4)得到的氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 纳米颗粒溶于10毫升去离子水中混合均匀后，在机械搅拌下逐滴加入银氨溶液并转移至水热反应釜中，密封后置于 120°C 下反应11小时，待反应釜自然冷却至室温后，磁性分离并依次用四氢呋喃、乙醇和去离子水洗涤，即得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料，并置于去离子水中储存待用，其中银氨溶液制备方法为：取2毫升浓度为0.01-0.08毫克每毫升的硝酸银水溶液，加入过量的氨水直至反应溶液变澄清得到银氨溶液。

[0013] 2、基于 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料的前列腺特性抗原PSA的直接可循环免疫检测

(1) 将15毫克 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 三重核壳纳米材料溶于2毫升二甲基甲酰胺(DMF)溶液中,然后加入1毫升浓度为10.3毫克每毫升的丁二酸酐的DMF溶液,于70℃下缓慢摇动孵化24小时后,磁性分离并用去离子水洗涤2次,即得到羧基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料,并溶于1毫升水中,然后加入1毫升EDC/NHS的PBS溶液,于30℃下缓慢摇动孵化1小时后,用去离子水洗涤1次,再将上述洗涤后的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料溶于1毫升由PBS缓冲液和水按等体积比混合而成的混合溶液中,向其中加入100微克每毫升的前列腺特异性抗原PSA溶液,于30℃缓慢摇动孵化3.5小时后,用去离子水洗涤一次,磁性分离得到标记有PSA的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料,利用拉曼光谱仪对其进行光谱测量可检测待测抗原PSA的含量;

(2) 检测结束后,将标记有PSA的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料溶于去离子水中,并将其转移到透明玻璃瓶中,采用小磁铁吸引的方式聚集纳米粒子,采用波长为265纳米的紫外灯进行照射,并每隔20分钟检测一次拉曼信号,直至PSA的拉曼特征峰消失,证明PSA已被催化降解完全;然后将上述催化后的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料,再链接新的PSA,进行拉曼检测后再进行紫外光照进行催化,循环重复这一免疫链接、拉曼检测和光催化降解的过程即可实现直接可循环免疫检测。

[0014] 图1显示出本实施例中制备的 Fe_3O_4 纳米材料的透射电子显微镜照片。从图1中可以看出,所制备的 Fe_3O_4 纳米材料直径为240-280纳米。

[0015] 图2显示出本实施例中制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 核壳纳米材料的透射电子显微镜照片,从图2可以看出,所制备的材料为核壳结构, TiO_2 壳层厚度为20纳米。

[0016] 图3显示出本实施例中制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料的扫描电子显微镜照片,从图3可以看出,所制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料表面为大量的银纳米颗粒,排列紧密。

[0017] 图4显示出采用静电吸附法将Ag颗粒包于本实施例制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 核壳纳米材料外表面形成的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料的扫描电子显微镜照片,从图4可以看出,所制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料表面为少量稀疏的银纳米颗粒,银纳米颗粒和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 外表面结合的较为松散且并不均匀。

[0018] 图5为分别采用本发明实施例1中制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料和静电吸附法制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料对小分子4-巯基苯甲酸(0.01毫摩尔每毫升)进行催化的结果,从图5中可以看出,当催化时间延长至70分钟时,4-巯基苯甲酸已经被本发明实施例1中制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料催化降解完全,而静电吸附法制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料对4-巯基苯甲酸分子并没有催化降解完全。因此,本发明实施例1中制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料具有更高的催化活性。

[0019] 图6为本发明实施例1中制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料对前列腺特异性抗原PSA(10微克每毫升)的进行免疫检测并催化结果,从图6中可以看出,免疫结合后出现了较为明显的拉曼谱,证明抗原PSA已经与核壳纳米材料结合被探测到。进行紫外光照催化后,特征拉曼谱强度几乎降低为零,证明本发明实施例1中制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料已经将待测抗原PSA完全催化分解掉。这主要是由于采用水热法包覆的Ag颗粒在 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 核壳纳米材料外表面包覆的较为紧密且分布均匀,有利于对Ag和 TiO_2 之间的电荷传递过程的促进效果,进而显著增强 TiO_2 的光催化活性,实现肿瘤标志物这类大分子的催化降解。

[0020] 图7为采用静电吸附法制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料对前列腺特异性抗原PSA(10微克每毫升)的进行免疫检测并催化结果,从图7中可以看出,免疫结合后同样出现了较为明显的拉曼谱,证明静电吸附法制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料也有较为良好的SERS增强效果,可以实现抗原PSA的免疫探测。但是,进行紫外光照催化后,可以发现上述特征拉曼谱强度仅有微弱降低,证明采用静电吸附法制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料并不能将待测抗原PSA进行催化分解掉。这主要是由于采用静电吸附法包覆的Ag颗粒在 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ 核壳纳米材料外表面包覆的较为松散且分布不均匀,不利于实现对Ag和 TiO_2 之间的电荷传递过程的促进,无法增强 TiO_2 的光催化活性,也就不能实现肿瘤标志物这类大分子的催化降解。因而,通过采用水热合成方法包覆银纳米颗粒可以获得结构良好的三重核壳纳米材料,获得较为优良的催化活性和循环免疫催化效果。

[0021] 图8为本发明实施例1中制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料对前列腺特异性抗原PSA的直接可循环免疫检测结果。从图8中可以看出,每经过一次光催化降解过程,拉曼标记分子的拉曼光谱就会消失,表明抗原抗体已经被催化完全。经过八次免疫链接、拉曼检测和光催化降解的循环过程,前列腺特异抗原(PSA)的检测极限可达到100皮克每毫升。

[0022] 图9为拉曼谱中频移为 1264 cm^{-1} 的特征峰强度随待测抗原浓度的变化图,通过拟合可见,当待测抗原的浓度从100皮克每毫升变化到0.1毫克每毫升时,拉曼特征峰强度随浓度为线性变化。拟合结果显示,这一变化趋势符合 $Y = 8750 + 792X$ 这一线性方程式,拟合度为0.985。

[0023] 实施例2

同上述实施例1,其区别在于: $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料的制备中:步骤(1)中将1.35克六水合三氯化铁、3.6克醋酸钠和1.0克聚乙二醇溶于40毫升乙二醇中,超声直至完全溶解后,转移到水热反应釜中,于 200°C 下反应10小时,离心并用乙醇清洗后收集沉淀,即得到 Fe_3O_4 纳米颗粒;步骤(2)中加入钛酸四丁酯的体积为1毫升。

[0024] 图10为拉曼谱中频移为 1264 cm^{-1} 的特征峰强度随待测抗原浓度的变化图,通过拟合可见,当待测抗原的浓度从100皮克每毫升变化到0.1毫克每毫升时,拉曼特征峰强度随浓度为线性变化。拟合结果显示,这一变化趋势符合 $Y = 8734 + 806X$ 这一线性方程式,拟合度为0.972。

[0025] 实施例3

同上述实施例1,其区别在于: $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2/\text{Ag}$ 核壳纳米材料的制备中:步骤(1)中将6.75克六水合三氯化铁、18.0克醋酸钠和5.0克聚乙二醇溶于200毫升乙二醇中,超声直至完全溶解后,转移到水热反应釜中,于 200°C 下反应10小时,离心并用乙醇清洗后收集沉淀,即得到 Fe_3O_4 纳米颗粒;步骤(2)中加入钛酸四丁酯的体积为6毫升。

[0026] 图11为拉曼谱中频移为 1264 cm^{-1} 的特征峰强度随待测抗原浓度的变化图,通过拟合可见,当待测抗原的浓度从100皮克每毫升变化到0.1毫克每毫升时,拉曼特征峰强度随浓度为线性变化。拟合结果显示,这一变化趋势符合 $Y = 8930 + 840X$ 这一线性方程式,拟合度为0.981。

[0027] 除上述实施例外,肿瘤标志物还可以为甲胎蛋白AFP、免疫球蛋白IgG、糖类抗原CA199和癌胚抗原CEA等。

[0028] 上述说明并非对本发明的限制,本发明也并不限于上述举例。本技术领域的普通

技术人员在本发明的实质范围内,做出的变化、改型、添加或替换,也应属于本发明的保护范围。

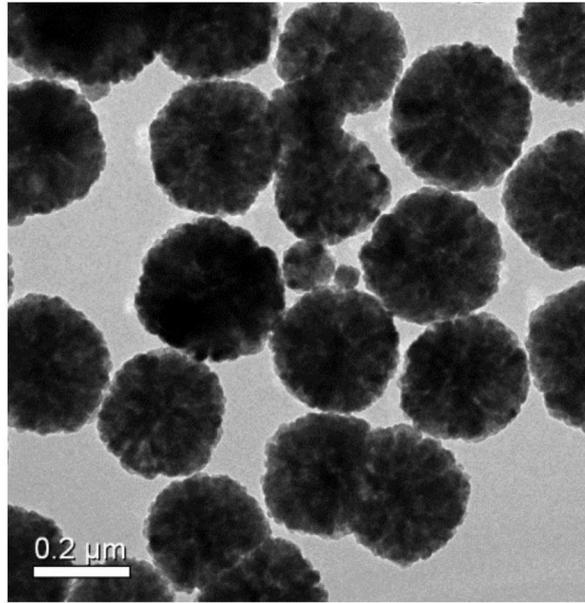


图1

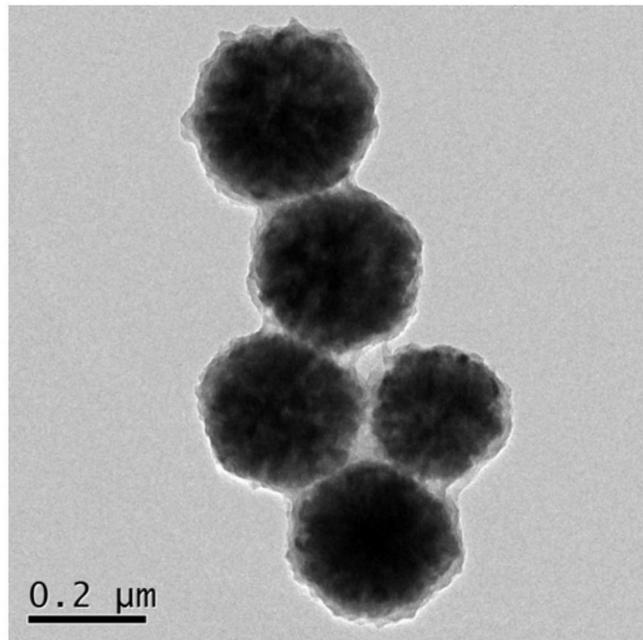


图2

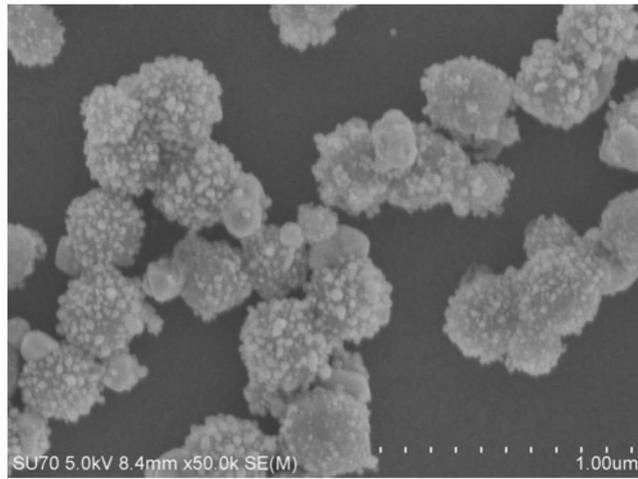


图3

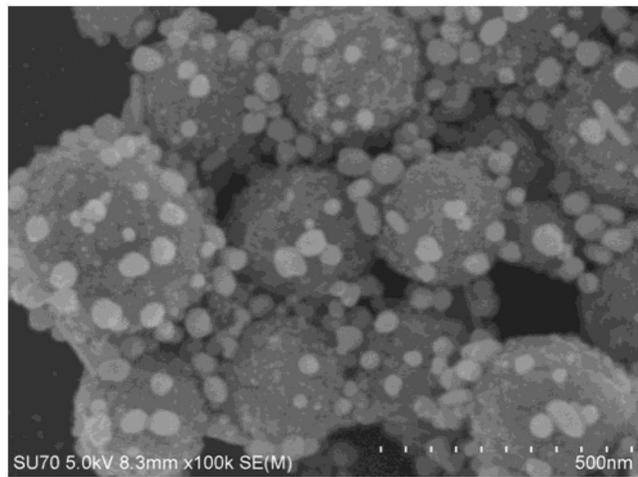


图4

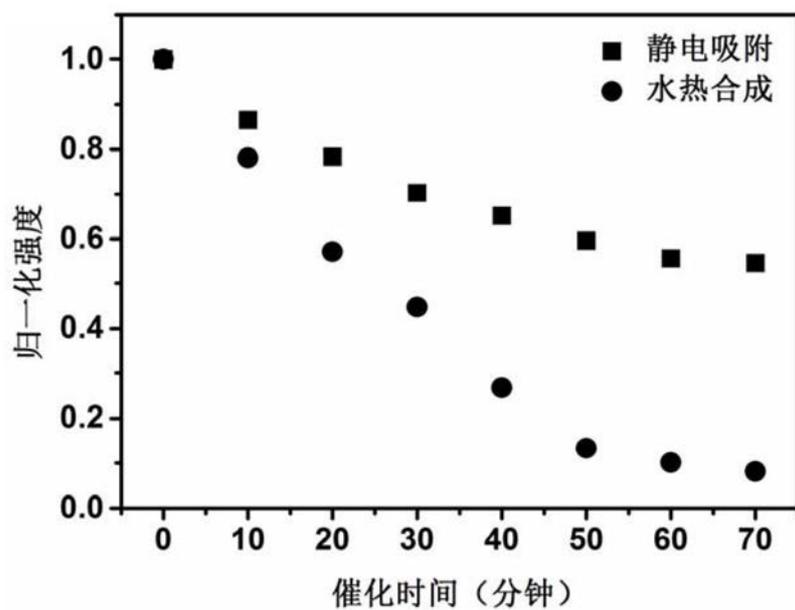


图5

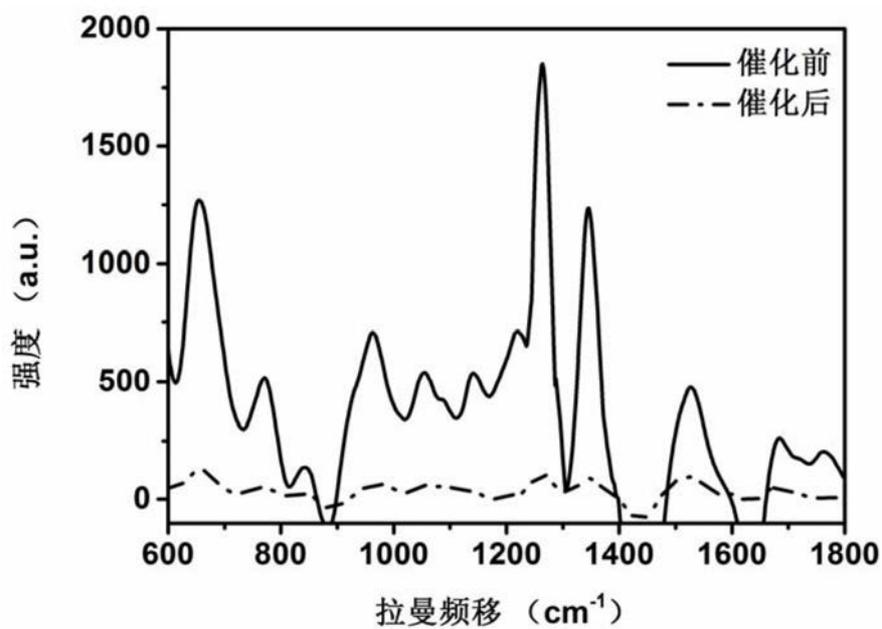


图6

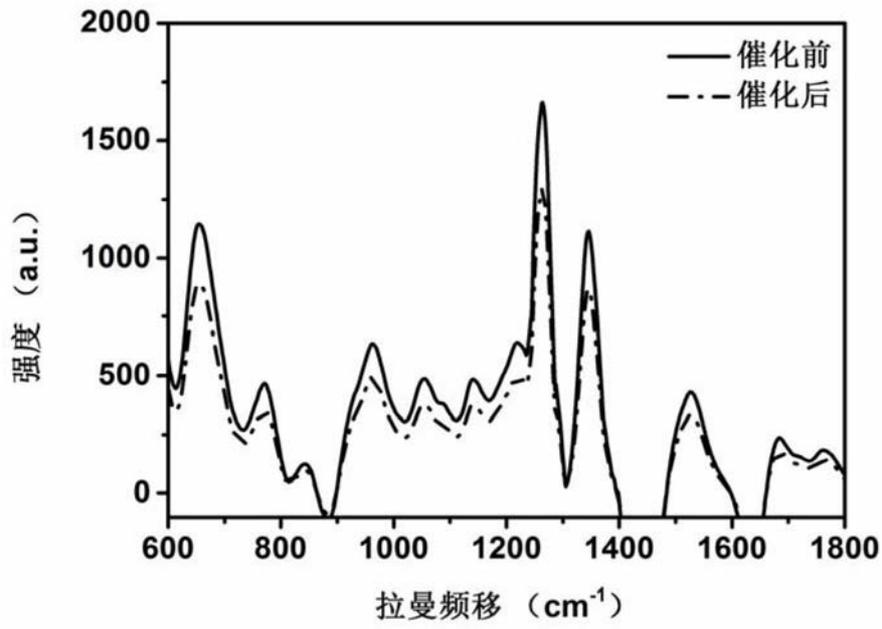


图7

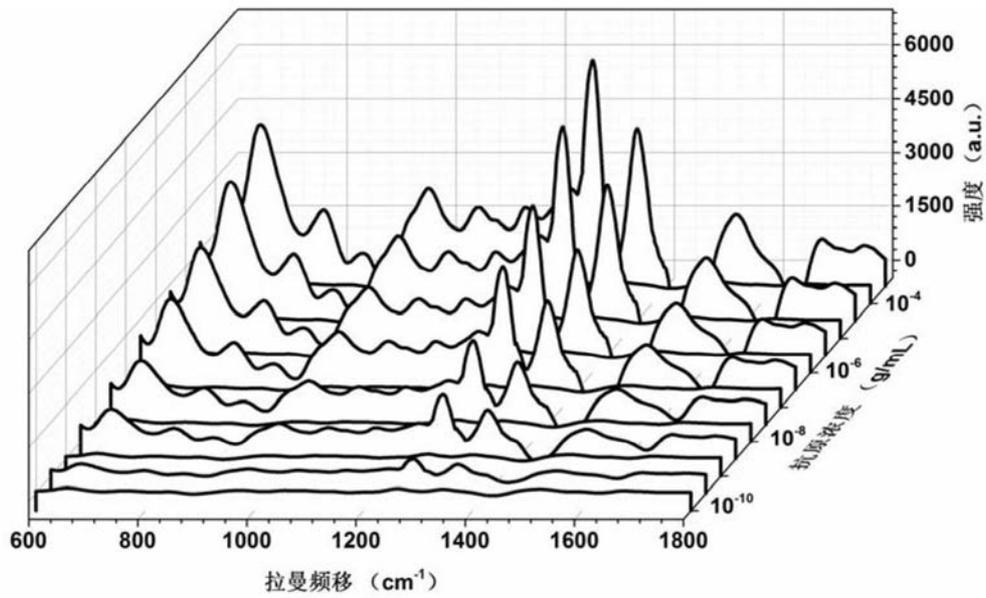


图8

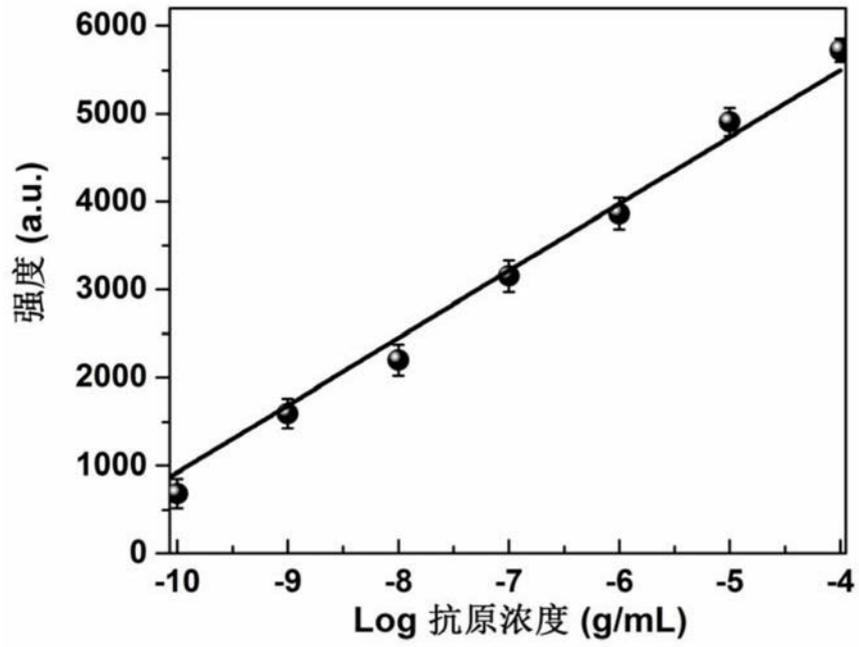


图9

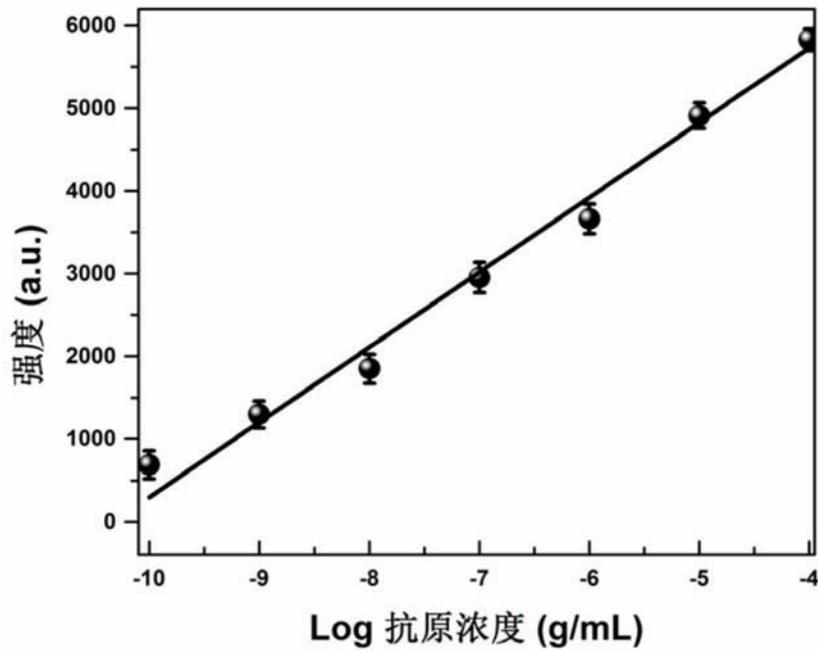


图10

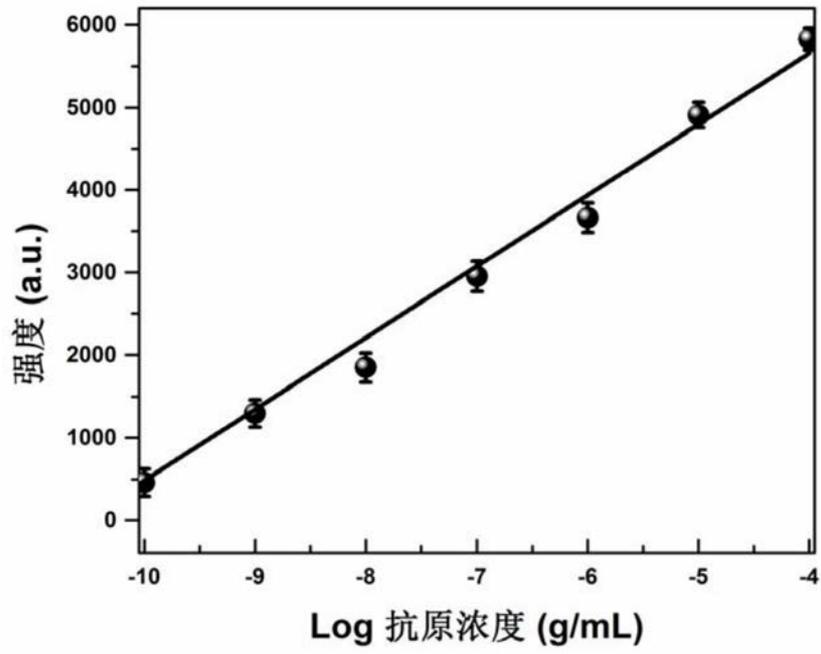


图11

专利名称(译)	一种四氧化三铁/二氧化钛/银核壳纳米材料的制备方法及其可循环免疫检测应用		
公开(公告)号	CN110531061A	公开(公告)日	2019-12-03
申请号	CN201910623848.2	申请日	2019-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	宁波大学		
申请(专利权)人(译)	宁波大学		
当前申请(专利权)人(译)	宁波大学		
[标]发明人	姜涛 周骏 姜勇 杜远远 顾辰杰 王福艳		
发明人	姜涛 周骏 姜勇 杜远远 顾辰杰 王福艳		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/543 G01N33/537 G01N21/65 C01G49/08 C01G23/053		
CPC分类号	C01G23/053 C01G49/08 C01P2004/03 C01P2004/04 G01N21/65 G01N33/532 G01N33/537 G01N33/54326		
代理人(译)	何仲		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种四氧化三铁/二氧化钛/银核壳纳米材料的制备方法及其直接可循环免疫检测应用，特点是活化三重核壳纳米材料使其与待测抗原相结合，利用表面增强拉曼散射效应实现待测抗原的直接拉曼检测，在拉曼检测完成后，对上述免疫结合的纳米材料进行紫外光照降解抗原，磁力回收表面已无抗原存在的Fe₃O₄/TiO₂/Ag核壳纳米材料，并将其用于下一次对待测抗原的检测中，重复这一拉曼检测-催化降解-拉曼检测过程，实现肿瘤标志物直接可循环免疫检测，优点是三层核壳结构既具有磁性分离和拉曼增强的作用，又具有催化降解肿瘤标志物的作用，同时检测限低且可检测大分子肿瘤标志物。

