



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104880456 B

(45)授权公告日 2016.10.12

(21)申请号 201510262821.7

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2015.05.22

审查员 王树玲

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104880456 A

(43)申请公布日 2015.09.02

(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 李建修 魏琴 马洪敏 庞雪辉

王晓东 杜斌 范大伟 曹伟

胡丽华 吴丹 闫涛 李月云

(51)Int.Cl.

G01N 21/76(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页

(54)发明名称

一种基于GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂构建的
电化学发光免疫传感器的制备方法及应用

(57)摘要

本发明属于纳米功能材料,免疫分析以及生物传感技术领域,提供了一种氧化石墨烯/羧基化碳纳米管负载金掺杂二氧化铈纳米粒子的构建的电化学发光免疫传感器的制备方法及其应用。采用氧化石墨烯/羧基化碳纳米管负载金作为基底材料,二氧化铈作为发光材料的电化学发光免疫传感器。对肿瘤的早期诊断以及临床应用方面具有重要的实用性。

1. 一种基于GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂构建的电化学发光免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下几个步骤:

(1)氧化石墨烯的制备

将36 mL,98%的硫酸和4 mL,85%的磷酸加入500 mL的三口烧瓶中,用磁力搅拌器搅拌均匀,加入300 mg石墨粉,搅拌;缓慢加入1.8 g的高锰酸钾粉末;50 °C油浴下,磁力搅拌12 h,冷却至室温;在搅拌条件下,倒入40 mL冰中;加入300 μ L、质量分数为30%的过氧化氢溶液,并持续搅拌1 h;以转速9000 r/min,离心分离10 min,去除上清液;用0.2 mol/L的盐酸溶液洗涤沉淀两遍,无水乙醇洗涤沉淀两遍,最后用无水乙醚洗涤沉淀一遍;在35 °C下真空干燥12 h;因乙醚的挥发性较强、容易喷溅,在真空干燥时要将其置于大离心管内,用滤纸包裹好,以防喷溅;最终得到黄色固体粉末,用玛瑙研钵将其研磨、称重,制得氧化石墨烯;

(2)GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂的制备

将100 mg氧化石墨烯粉末溶于100 mL超纯水中,超声2 h;加入100 mg羧基化碳纳米管,超声1 h;加入2.17 g 的Ce(NO₃)₃·6H₂O,持续搅拌30 min;加入10 mg的NaOH,使溶液pH为10,不断搅拌情况下加入NH₃·H₂O,使溶液pH为11;加入5mL,质量分数为1%的HAuCl₄·4H₂O溶液,所得悬浮液加热至80 °C并维持6 h,离心处理,将得到的沉淀物用超纯水和无水乙醇清洗3次,产物在40 °C真空干燥箱中干燥12 h,于300 °C管式炉中煅烧1 h;

(3)电化学发光免疫传感器的制备方法

1)将直径为4 mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨,超纯水清洗干净;

2)取6 μ L、2.0 ~ 14.0 mg/mL的GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂壳聚糖溶液滴加到电极表面,室温下晾干;

3)滴加6 μ L、6 ~ 12 μ g/mL的肿瘤标志物抗体,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中干燥;

4)滴加3 μ L、质量分数为1 ~ 2%的BSA溶液用以封闭电极表面上非特异性活性位点,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;

5)滴加6 μ L、0.05 ~ 100 ng/mL的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原溶液,4 °C冰箱中干燥,制得一种基于GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂构建的电化学发光免疫传感器。

2. 根据权利要求1所述的一种基于GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂构建的电化学发光免疫传感器的制备方法,所述肿瘤标志物选自下列之一:癌胚抗原CEA、甲胎蛋白AFP、甲状旁腺激素PTH鳞状细胞相关抗原SCCA、人核基质蛋白NMP-22、前列腺特异性抗原PSA、人绒毛膜促性腺激素HCG、酸性磷酸酶ACP、人胎盘催乳素HPL、卵巢癌糖类抗原CA125、乳腺癌易感基因CA15-3、糖蛋白抗原CA50、CA19-9、CA549、CA72-4、细胞角蛋白、磷化蛋白p53、碱性磷酸酶ALP、神经原特异性烯醇化酶NSE、促肾上腺皮质激素ACTH、生长激素GH。

3. 如权利要求1所述的制备方法制备的传感器用于多种肿瘤标志物的检测方法,其特征在于,步骤如下:

(1)使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和Ag/AgCl电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,所制备的传感器为工作电极;在10 mL、50 mmol/L的pH 7.5 ~ 8.5包含有0.1 mol/L KCl和20 ~ 140 mmol/L K₂S₂O₈的PBS缓冲溶液中进行测试;

(2)用MP1-F流动注射化学发光分析仪对分析物进行检测,在底液为10 mL,pH 8.0的含

有0.1 mol/L KCl和120 mmol/L K₂S₂O₈的PBS缓冲溶液中进行扫描,扫描电压范围为-2 ~ 0 V,光电倍增管高压为750 V,扫描速率为0.1 V s⁻¹;

(3)当峰值趋于稳定后,记录电化学发光光谱。

一种基于GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂构建的电化学发光免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂构建的电化学发光免疫传感器的制备方法及应用。具体是采用GO/MWCNTs-COOH/Au作为基底材料和CeO₂作为发光材料,制备一种检测肿瘤标志物的无标记型电化学发光免疫传感器,属于新型功能材料与生物传感检测技术领域。

背景技术

[0002] 癌症是一大类恶性肿瘤的统称。肿瘤的发病率高,生长和转移速度快,对人类的健康有极大的危害。肿瘤标记物是肿瘤细胞产生和释放的以抗原、酶、激素等形式的代谢产物,并可用于临床某些肿瘤的诊断和辅助诊断。因此,在临床研究上,发展一种快速、简便、灵敏的检测肿瘤标志物方法引起人们的广泛关注。

[0003] 目前已有的肿瘤标志物的临床检测方法很多,如放射免疫分析、酶联免疫分析、化学发光免疫分析,时间分辨荧光免疫分析法等。免疫传感器是将免疫学方法与分析化学方法相结合的一种生物传感器,通过抗原与抗体之间的特性相结合,使其具有高灵敏性、高选择性、分析快速和操作简便等优点。

[0004] 电化学发光免疫传感器具有灵敏度高、选择性好、操作简便、易于小型化、可连续、快速自动化检测分析等优点,因此本发明制备了一种基于GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂电化学发光免疫传感器,实现了对肿瘤标志物的检测。

[0005] 氧化石墨烯和羧基化碳纳米管具有比表面积大、导电性能优良等优点,羧基化碳纳米管的水溶性较好,其可提高该电化学发光免疫传感器的稳定性。Au NPs能够提高复合材料的导电性,从而提高电子传输能力。因此本发明将金纳米粒子修饰的氧化石墨烯和羧基化碳纳米管引入到免疫传感器的制备中,利用其比表面积大,电子传递能力优异等特点,从而起到增强电化学发光信号的作用。CeO₂具有低毒,生物相容性好,化学稳定性好等特点。因此,本发明利用Au原子的较好的生物相容性,实现了抗体在电极表面的固定;将复合材料GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂引入传感器的制备中,构建了一种超灵敏的无标记型电化学发光免疫传感器。CeO₂作为电化学发光材料第一次在免疫传感器中应用。复合材料GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂在检测过程中可产生良好的电化学发光信号,有效地降低了传感器的检出限,可用于多种肿瘤标志物的分析。该方法具有成本低、灵敏度高、特异性好、检测快速等优点,而且制备过程较为简单,有效克服了目前肿瘤标志物检测方法的不足。

发明内容

[0006] (1)基于复合材料GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂,构建了一种无酶、快速且灵敏的无标记型电化学发光免疫传感器。

[0007] (2)将该无标记型电化学发光免疫传感器应用于多种肿瘤标志物的检测。

[0008] 本发明的技术方案如下:

[0009] 1.一种基于GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂构建的电化学发光免疫传感器的制备方法

[0010] (1)将直径为4 mm的玻璃碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨,超纯水清洗干净;

[0011] (2)取6 μ L、2.0 ~ 14.0 mg/mL的GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂壳聚糖溶液滴加到电极表面,室温下晾干;

[0012] (3)滴加6 μ L、6 ~ 12 μ g/mL的肿瘤标志物抗体,超纯水冲洗电极表面,4 $^{\circ}$ C冰箱中干燥;

[0013] (4)滴加3 μ L、质量分数为1 ~ 2%的BSA溶液用以封闭电极表面上非特异性活性位点,超纯水冲洗电极表面,4 $^{\circ}$ C冰箱中晾干;

[0014] (5)滴加6 μ L、0.05 ~ 100 ng/mL的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原溶液,4 $^{\circ}$ C冰箱中干燥,制得一种基于GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂构建的电化学发光免疫传感器。

[0015] 2. 氧化石墨烯的制备

[0016] 将36 mL、98%的硫酸和4 mL、85%的磷酸加入500 mL的三口烧瓶中,用磁力搅拌器搅拌均匀,加入300 mg石墨粉,搅拌;缓慢加入1.8 g的高锰酸钾粉末;50 $^{\circ}$ C油浴下,磁力搅拌12 h,冷却至室温;在搅拌条件下,倒入40 mL冰中;加入300 μ L、质量分数为30%的过氧化氢溶液,并持续搅拌1 h;以转速9000 r/min,离心分离10 min,去除上清液;用0.2 mol/L的盐酸溶液洗涤沉淀两遍,无水乙醇洗涤沉淀两遍,最后用无水乙醚洗涤沉淀一遍;在35 $^{\circ}$ C下真空干燥12 h;因乙醚的挥发性较强、容易喷溅,在真空干燥时要将其置于大离心管内,用滤纸包裹好,以防喷溅;最终得到黄色固体粉末,用玛瑙研钵将其研磨、称重,制得氧化石墨烯。

[0017] 3. GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂的制备

[0018] 将100 mg氧化石墨烯粉末溶于100 mL超纯水中,超声2 h;加入100 mg羧基化碳纳米管,超声1 h;加入2.17 g 的Ce(NO₃)₃·6H₂O,持续搅拌30 min;加入10 mg的NaOH,使溶液pH为10,不断搅拌情况下加入NH₃·H₂O,使溶液pH为11;加入5mL,质量分数为1%的HAuCl₄·4H₂O溶液,所得悬浮液加热至80 $^{\circ}$ C并维持6 h,离心处理,将得到的沉淀物用超纯水和无水乙醇清洗3次,产物在40 $^{\circ}$ C真空干燥箱中干燥12 h,于300 $^{\circ}$ C管式炉中煅烧1 h。

[0019] 4. 多种肿瘤标志物的检测方法

[0020] (1)使用电化学工作站以三电极体系,饱和Ag/AgCl电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,所制备的传感器为工作电极,在10 mL、50 mmol/L的pH 7.5 ~ 8.5包含有0.1 mol/L KCl和20 ~ 140 mmol/L K₂S₂O₈的PBS缓冲溶液中进行测试;

[0021] (2)用MP1-F流动注射化学发光分析仪对分析物进行检测,在底液为10 mL,pH 8.0的含有0.1 mol/L KCl和120 mmol/L K₂S₂O₈的PBS缓冲溶液中进行扫描,扫描电压范围为-2 ~ 0 V,光电倍增管高压为750 V,扫描速率为0.1 V s⁻¹;

[0022] (3)当峰值趋于稳定后,记录电化学发光光谱。

[0023] 5. 上述肿瘤标志物选自下列之一:癌胚抗原CEA、甲胎蛋白AFP、甲状旁腺激素PTH、鳞状细胞相关抗原SCCA、人核基质蛋白NMP-22、前列腺特异性抗原PSA、人绒毛膜促性腺激素HCG、酸性磷酸酶ACP、人胎盘催乳素HPL、卵巢癌糖类抗原CA125、乳腺癌易感基因CA15-3、糖蛋白抗原CA50、CA19-9、CA549、CA72-4、细胞角蛋白、磷化蛋白p53、碱性磷酸酶ALP、神经原特异性烯醇化酶NSE、促肾上腺皮质激素ACTH、生长激素GH。

[0024] 本发明的有益成果

[0025] (1)GO/MWCNTs-COOH具有较大的表面积能够增加Au NPs在其表面的负载量,进而增加抗体的负载量,此外,其电子传导能力优异,引入到电化学发光免疫传感器中,使传感器实现了对肿瘤标志物的灵敏检测。

[0026] (2)CeO₂一步还原到基底材料GO/MWCNTs-COOH上,复合材料GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂制备较为简单。CeO₂具有强而稳定的电化学发光信号,在免疫传感器中第一次作为电化学发光材料得以应用。

[0027] (3)MWCNTs-COOH的使用,既利用其较大比表面积和良好的电子传导能力,又可增大基底材料的水溶性,使其具有更为稳定的电化学发光信号,从而较好的提高传感器的稳定性。

[0028] (4)将壳聚糖应用到电化学免疫传感器的制备当中,利用其优异的成膜性能,防止了复合材料GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂从电极表面上脱落,同时利用壳聚糖具有很好的生物相容性和低毒性,有利于抗体在电极表面的固定。

[0029] (5)本发明利用抗原、抗体的免疫反应,提高了检测方法的特异性。

[0030] (6)本发明制备的电化学发光免疫传感器用于多种肿瘤标志物的检测,响应时间短,检测限低,线性范围宽,可以实现简单、快速、高灵敏和特异性检测,对常见肿瘤标志物检测限可达0.02 ng/mL。

具体实施方式

[0031] 实施例1 一种基于GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂电化学发光免疫传感器的制备

[0032] (1)将直径为4 mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨,超纯水清洗干净;

[0033] (2)取6 μL、2.0 mg/mL的GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂壳聚糖溶液滴加到电极表面,室温下晾干;

[0034] (3)滴加6 μL、6μg/mL的肿瘤标志物抗体,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中干燥;

[0035] (4)滴加3 μL、质量分数为1 %的BSA溶液用以封闭电极表面上非特异性活性位点,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;

[0036] (5)滴加6 μL、0.05 ~ 100 ng/mL的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原溶液, 4 °C冰箱中干燥,制得一种基于GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂构建的电化学发光免疫传感器。

[0037] 实施例2 一种基于GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂电化学发光免疫传感器的制备

[0038] (1)将直径为4 mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨,超纯水清洗干净;

[0039] (2)取6 μL、8.0 mg/mL的GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂壳聚糖溶液滴加到电极表面,室温下晾干;

[0040] (3)滴加6 μL、10 μg/mL的肿瘤标志物抗体,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中干燥;

[0041] (4)滴加3 μL、质量分数为1.5%的BSA溶液用以封闭电极表面上非特异性活性位点,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;

[0042] (5)滴加6 μL、0.05 ~ 100 ng/mL的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原溶液, 4 °C冰箱中干燥,制得一种基于GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂构建的电化学发光免疫传感器。

[0043] 实施例3 一种基于GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂电化学发光免疫传感器的制备

[0044] (1)将直径为4 mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨,超纯水清洗干净;

[0045] (2)取6 μL 、14.0 mg/mL 的GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂壳聚糖溶液滴加到电极表面,室温下晾干;

[0046] (3)滴加6 μL 、12 $\mu\text{g/mL}$ 的肿瘤标志物抗体,超纯水冲洗电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中干燥;

[0047] (4)滴加3 μL 、质量分数为2%的BSA溶液用以封闭电极表面上非特异性活性位点,超纯水冲洗电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;

[0048] (5)滴加6 μL 、0.05 ~ 100 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中干燥,制得一种基于GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO₂构建的电化学发光免疫传感器。

[0049] 实施例4 电化学发光免疫传感器用于癌胚抗原CEA的检测

[0050] (1)使用电化学工作站以三电极体系,饱和Ag/AgCl电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,所制备的传感器为工作电极,在10 mL ,pH 7.5 ~ 8.5的含有0.1 mol/L KCl和20 ~ 140 mmol/L K₂S₂O₈的PBS缓冲溶液中进行测试;

[0051] (2)用MP1-F流动注射化学发光分析仪对分析物进行检测,在底液为10 mL ,pH 8.0的含有0.1 mol/L KCl和120 mmol/L K₂S₂O₈的PBS缓冲溶液中进行扫描,扫描电压范围为-2 ~ 0 V ,光电倍增管高压为750 V ,扫描速率为0.1 V s^{-1} ;

[0052] (3)当峰值趋于稳定后,记录电化学发光光谱。

[0053] (4)根据所得电化学发光强度与癌胚抗原CEA浓度之间的线性关系,绘制工作曲线,测得线性范围为0.05 ~ 100 ng/mL ,检测限为0.02 ng/mL 。

[0054] 实施例5 电化学发光免疫传感器用于甲胎蛋白AFP的检测

[0055] 按照实施例4进行操作,根据所得电化学发光强度与甲胎蛋白AFP浓度之间的线性关系,绘制工作曲线,测得线性范围为0.04 ~ 110 ng/mL ,检测限为0.02 ng/mL 。

[0056] 实施例6 电化学发光免疫传感器用于卵巢癌糖类抗原CA125的检测

[0057] 按照实施例4进行操作,根据所得电化学发光强度与卵巢癌糖类抗原CA125浓度之间的线性关系,绘制工作曲线,测得线性范围为0.04 ~ 100 ng/mL ,检测限为0.02 ng/mL 。

[0058] 实施例7 电化学发光免疫传感器用于鳞状细胞相关抗原SCCA的检测

[0059] 按照实施例4进行操作,根据所得电化学发光强度与鳞状细胞相关抗原SCCA浓度之间的线性关系,绘制工作曲线,测得线性范围为0.06 ~ 100 ng/mL ,检测限为0.03 ng/mL 。

[0060] 实施例8 电化学发光免疫传感器用于前列腺特异性抗原PSA的检测

[0061] 按照实施例4进行操作,根据所得电化学发光强度与前列腺特异性抗原PSA浓度之间的线性关系,绘制工作曲线,测得线性范围为0.05 ~ 110 ng/mL ,检测限为0.02 ng/mL 。

[0062] 实施例9 电化学发光免疫传感器用于人核基质蛋白NMP-22的检测

[0063] 按照实施例4进行操作,根据所得电化学发光强度与人核基质蛋白NMP-22浓度之间的线性关系,绘制工作曲线,测得线性范围为0.04 ~ 120 ng/mL ,检测限为0.02 ng/mL 。

[0064] 实施例10 电化学发光免疫传感器用于乳腺癌易感基因CA15-3的检测

[0065] 按照实施例4进行操作,根据所得电化学发光强度与乳腺癌易感基因CA15-3浓度之间的线性关系,绘制工作曲线,测得线性范围为0.03 ~ 100 ng/mL ,检测限为0.01 ng/mL 。

[0066] 实施例11 电化学发光免疫传感器用于糖蛋白抗原CA50的检测

[0067] 按照实施例4进行操作,根据所得电化学发光强度与糖蛋白抗原CA50浓度之间的线性关系,绘制工作曲线,测得线性范围为0.05 ~ 100 ng/mL,检测限为0.02 ng/mL。

专利名称(译)	一种基于GO/MWCNTs-COOH/Au@CeO ₂ 构建的电化学发光免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN104880456B	公开(公告)日	2016-10-12
申请号	CN201510262821.7	申请日	2015-05-22
[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	李建修 魏琴 马洪敏 庞雪辉 王晓东 杜斌 范大伟 曹伟 胡丽华 吴丹 闫涛 李月云		
发明人	李建修 魏琴 马洪敏 庞雪辉 王晓东 杜斌 范大伟 曹伟 胡丽华 吴丹 闫涛 李月云		
IPC分类号	G01N21/76 G01N27/327 G01N33/74 G01N33/573 G01N33/53		
其他公开文献	CN104880456A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于纳米功能材料，免疫分析以及生物传感技术领域，提供了一种氧化石墨烯/羧基化碳纳米管负载金掺杂二氧化铈纳米粒子的构建的电化学发光免疫传感器的制备方法及其应用。采用氧化石墨烯/羧基化碳纳米管负载金作为基底材料，二氧化铈作为发光材料的电化学发光免疫传感器。对肿瘤的早期诊断以及临床应用方面具有重要的实用性。

