



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105784992 A

(43)申请公布日 2016.07.20

(21)申请号 201610315599.7

(22)申请日 2016.05.13

(71)申请人 河南大学

地址 475001 河南省开封市明伦街85号

(72)发明人 刘小强 刘培培 霍小鹤 朱杰

(74)专利代理机构 郑州联科专利事务所(普通合伙) 41104

代理人 刘建芳 杨海霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

以TNS-MWCNT复合材料为抗体和示踪标记物载体的电化学免疫传感器构建方法

(57)摘要

本发明公开了一种以TiO<sub>2</sub>纳米片(TNS)-多壁碳纳米管(MWCNT)复合材料为抗体和示踪标记物载体的电化学免疫传感器构建方法,首先通过水热法制备出TNS-MWCNT复合材料并氨基化,然后将其分散于Nafion溶液中并滴加在电极表面。以氨基交联剂BS<sup>3</sup>为双氨基交联剂将捕获抗体(Ab1)共价结合在NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT表面,用于三明治型夹心测定。同时,BS<sup>3</sup>还被用于将辣根过氧化物酶(HRP)和信号抗体(Ab2)固定在NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT表面以制备示踪标记物。采用本发明方法制备所得的电化学免疫传感器能够快速地测定α-甲胎蛋白,且灵敏度较高、线性范围较大、检测限较低。

1. 一种以TNS-MWCNT复合材料为抗体和示踪标记物载体的电化学免疫传感器构建方法,其特征在于,包括如下步骤:

①NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT复合材料的制备:

TNS-MWCNT的制备:称取50 mg的MWCNTs分散在40 mL的异丙醇中超声20 min,随后加入50 μL二亚乙基三胺,搅拌均匀后,加入3.6 mL异丙醇钛,再次搅拌均匀后将混合液转移至反应釜中,于180—220℃反应18—28 h;反应结束后,取出,冷却至室温,黑色沉淀物经过离心分离、洗涤、干燥,即得到复合纳米材料TNS-MWCNT;

氨基化TNS-MWCNT的制备:将120 mg TNS-MWCNT与20 mL乙醇、1 mL 28%氨水和5 mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷混合后,机械搅拌12h,离心分离,弃去上清液,所得固体残留物洗涤、干燥后,室温下储存备用,记为NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT;

②示踪标记物的制备:

HRP|NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT|Ab2示踪标记物的制备:将2 mg BS<sup>3</sup>溶解在0.5 mL 0.02 M 的PBS缓冲液中获得溶液A,然后将3 mg NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT分散于溶液A中,搅拌下加入400 μL 2.5 mg·mL<sup>-1</sup>的辣根过氧化物酶水溶液并在室温下孵育30 min,然后加入20 μL 含1.0 mg·mL<sup>-1</sup>信号抗体Ab2的PBS缓冲液,4℃下搅拌4 h,离心分离,所得沉淀物用洗涤缓冲液洗涤并用封闭缓冲液在室温下封闭30 min,最后用洗涤缓冲液洗涤后,分散于含0.1% 牛血清蛋白的1.0 mL PBS缓冲液中,备用,记为HRP|NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT|Ab2;

③免疫传感器的构建:

将6 mg 步骤①所得NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT分散于1 mL 含1% Nafion溶液中,超声20 min以得到均匀的分散液,取5 μL分散液滴加在预处理好的玻碳电极表面,室温下自然晾干;然后在玻碳电极表面滴加10 μL 含2 mg·mL<sup>-1</sup> BS<sup>3</sup>的PBS缓冲液并在室温下孵育1 h,随后滴加5 μL 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> 的捕获抗体Ab1,室温下孵育60 min,浸入PBS缓冲液中洗涤3 min,然后将该玻碳电极用5 μL封闭缓冲液孵育30 min,再分别用洗涤缓冲液和PBS缓冲液洗涤3 min,即得电化学免疫传感器。

2. 如权利要求1所述以TNS-MWCNT复合材料为抗体和示踪标记物载体的电化学免疫传感器构建方法,其特征在于,在步骤②和③中,所述洗涤缓冲液为:含0.05 % Tween 20的PBS缓冲液;所述封闭缓冲液为:含2 %牛血清蛋白的PBS缓冲液。

## 以TNS-MWCNT复合材料为抗体和示踪标记物载体的电化学免疫传感器构建方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于电化学免疫传感器构建技术领域,具体涉及一种以TiO<sub>2</sub>纳米片(TNS)-多壁碳纳米管(MWCNT)复合材料为抗体和示踪标记物载体的电化学免疫传感器的构建方法,该电化学免疫传感器可用于检测甲胎蛋白( $\alpha$ -fetoprotein,AFP)。

### 背景技术

[0002] 化学发光免疫测定、酶联免疫吸附测试(ELISA)、荧光免疫测定和放射免疫测定法等各种免疫测定技术已被广泛应用于癌症筛查、早期疾病诊断、疾病治疗疗效等医疗领域。然而,这些常规免疫测定方法过程比较复杂,检测时间较长,往往还涉及多步培育和清洗过程,而且通常这些免疫测定方法必须使用实验室精细的设备和工具。相反地,近年来,由于电化学免疫传感器在分析测试中表现出操作方便、制备简单、分析速度快、灵敏度高、性能优异等显著优势从而引起了相关学者极大的研究兴趣。而且,电化学免疫传感器被广泛视为比分光光度法和光学分析法更灵敏的分析方法,这是因为分光光度法或光学分析法对光源要求较苛刻且需要单色仪和光学探测器;同时,当用分光光度法或光学分析法对浑浊的或带颜色的样品进行测试时有时会获得错误的信息。

[0003] 目前为止,尽管大量的电化学免疫传感器已被研制出来,但仍需对它们的分析性能进行大幅改进来满足人类日益增长的需求。为了实现这一目标,不同的纳米材料如磁性粒子、贵金属纳米材料、量子点、碳纳米材料和氧化物纳米材料被用于电化学免疫传感器的研制中。由于这些材料展现出显著的电学、化学、几何和电子传递等特殊性能,它们通常被用作载体平台来固定捕获抗体。例如:MaIhotra等人制备出一种电化学免疫传感器实现了对头、颈部细胞中的鳞状癌细胞中白细胞介素-6的测定。该免疫传感器以高导电、高比表面积和浓密竖立的单壁碳纳米管(SWCNT)束为基体负载捕获抗体,分析物抗原与捕获抗体相结合,然后跟一个辣根过氧化物酶(HRP)标记的信号抗体作用构成三明治型传感器。免疫传感器的高灵敏度是通过SWCNT束载体平台上的酶催化放大信号来实现的,可使人类白细胞介素-6在牛血清白中的检出限低至30 pg mL<sup>-1</sup>。纳米材料除了作为基底负载生物分子外,还可以作为载体负载信号抗体和酶,以达到信号放大的目的。例如: Xu等人构造了一个以金纳米棒作为抗体和葡萄糖氧化酶载体的鲁米诺阴极电致化学发光免疫传感器。由于其良好的生物相容性、高效的电催化活性和大的比表面积,金纳米棒能够负载大量的电致发光标记物和生物分子,放大电致发光信号,从而提高生物传感器的性能。电致发光信号与前列腺特异性抗原呈线性关系,检测的浓度范围为10 pg mL<sup>-1</sup> - 8 ng mL<sup>-1</sup>,检出限低达8 pg mL<sup>-1</sup>。

[0004] 二氧化钛纳米材料由于其大表面积和孔隙分布均匀的特征而在生物电子传感器研发领域引起了越来越多的关注。二氧化钛纳米材料能够增加传感器表面上的生物分子负载,并为生物分子提供了生物相容的载体微环境。例如:金纳米颗粒(GNP)修饰钛酸纳米管(TNT)复合材料被用来制备一种葡萄糖氧化酶(GOD)生物传感器,该复合纳米材料直接促进

了GOD电子转移速率(在180 mV s<sup>-1</sup>扫速下电子转移速率常数为7.1 s<sup>-1</sup>)及其对葡萄糖的电催化活性。结果显示,该传感器对葡萄糖表现出低检出限(5.1 mA mM<sup>-1</sup>)和宽线性范围(0.01-1.2 mM)。但是,二氧化钛纳米材料由于其导电性较差而在生物电子学中的应用一直受到抑制,因而需要改善材料的性能。据报道,碳纳米管以其快速的电子转移能力、高灵敏度和生物电催化能力被广泛应用于生物电子学。因此,TiO<sub>2</sub>-CNT复合材料在电化学生物传感器和免疫传感器的应用有着极大的潜在价值。

[0005] 本发明通过水热法制备了氨基化的二氧化钛纳米片(TNS)-多壁碳纳米管(MWCNT)复合物。这个复合材料可同时被用做载体平台负载捕获抗体和作为载体负载HRP和信号抗体。氨基化的TNS-MWCNT复合物与生物分子通过氨基交联剂(双(硫代琥珀酰亚胺基)辛二酸酯钠盐)(BS<sup>3</sup>)结合在一起。通过夹心免疫反应后,可以利用微分脉冲伏安法(DPV)技术来检测肿瘤标志物甲胎蛋白。

## 发明内容

[0006] 本发明目的在于克服现有技术缺陷,提供一种以TiO<sub>2</sub>纳米片(TNS)-多壁碳纳米管(MWCNT)复合材料为抗体和示踪标记物载体的电化学免疫传感器的构建方法,该电化学免疫传感器能够快速测定甲胎蛋白,且灵敏度较高、线性范围较大、检测限较低。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

一种以TNS-MWCNT复合材料为抗体和示踪标记物载体的电化学免疫传感器构建方法,其包括如下步骤:

### ①NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT复合材料的制备:

TNS-MWCNT的制备(二亚乙基三胺催化作用下通过水解异丙醇钛在MWCNT表面制备TiO<sub>2</sub>纳米片):称取50 mg的MWCNTs分散在40 mL的异丙醇中,超声20 min,随后加入50 μL二亚乙基三胺(DETA),搅拌均匀后,加入3.6 mL 异丙醇钛(TIP),再次搅拌均匀后将混合液转移至聚四氟乙烯反应釜中,于180-220℃反应18-28 h;反应结束后,取出,冷却至室温,黑色沉淀物经过离心分离、乙醇洗涤、70℃干燥,即得到复合纳米材料TNS-MWCNT;

氨基化TNS-MWCNT的制备:将120 mg TNS-MWCNT与20 mL乙醇、1 mL 28%氨水和5 mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷混合后,机械搅拌过夜(12h)以防止TNS-MWCNT沉淀,离心分离,弃去上清液,所得固体残留物洗涤、干燥后,室温下储存备用,记为NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT;

### ②示踪标记物的制备:

HRP|NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT|Ab2示踪标记物的制备:将2 mg BS<sup>3</sup>(双(硫代琥珀酰亚胺基)辛二酸酯钠盐)溶解在0.5 mL 0.02 M的PBS缓冲液中获得溶液A,然后将3 mg NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT分散于溶液A中,搅拌下加入400 μL 2.5 mg·mL<sup>-1</sup>的辣根过氧化物酶水溶液并在室温下孵育30 min,然后加入20 μL 含1.0 mg·mL<sup>-1</sup>信号抗体Ab2的PBS缓冲液,4℃下搅拌4 h,离心分离,所得沉淀物用洗涤缓冲液洗涤并用封闭缓冲液在室温下封闭30 min,最后用洗涤缓冲液洗涤后,分散于含0.1%牛血清蛋白的1.0 mL PBS缓冲液中,备用,记为HRP|NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT|Ab2;

### ③免疫传感器的构建:

将6 mg 步骤①所得NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT分散于1 mL 1% Nafion溶液中,超声20 min以得到均匀的分散液,取5 μL分散液滴加在预处理好的玻碳电极表面,室温下自然晾干;然后在玻

碳电极表面滴加10  $\mu\text{L}$  含2  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$   $\text{BS}^3$ 的PBS缓冲液并在室温下孵育1 h,随后滴加5  $\mu\text{L}$  0.5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的捕获抗体Ab1,室温下孵育60 min,浸入PBS缓冲液中洗涤3 min,然后将该玻碳电极用5  $\mu\text{L}$ 封闭缓冲液孵育30 min,再分别用洗涤缓冲液和PBS缓冲液洗涤3 min,即得电化学免疫传感器。所得电化学免疫传感器在4 $^{\circ}\text{C}$ 和100%湿度饱和环境下备用。

[0008] 步骤②和③中,所述封闭缓冲液为:含2 % (w/v)牛血清蛋白(BSA)的PBS缓冲液(0.05 M, pH 7.4);所述洗涤缓冲液为:含0.05 % (w/v)Tween 20的PBS缓冲液(0.05 M, pH 7.4)。

[0009] 和现有技术相比,本发明方法发明的有益效果:

在电极表面引入 $\text{NH}_2\text{-TNS-MWCNT}$ 复合材料,增加了该免疫传感器的导电性和生物相容性,大大增加了捕获抗体Ab1的负载量,提高抗体与抗原的结合效率。同时利用 $\text{NH}_2\text{-TNS-MWCNT}$ 复合材料比表面积大、生物相容性好的优点,借助 $\text{BS}^3$ 将酶HRP和信号抗体Ab2固定在 $\text{NH}_2\text{-TNS-MWCNT}$ 表面用作免疫示踪标记物,可提高酶和抗体的负载量,从而提高该传感器的灵敏度和检测限。

## 附图说明

[0010] 图1为不同材料的高倍电镜图谱:其中,A为MWCNT的透射电镜图(TEM),B为TNS-MWCNT复合材料透射电镜图,C为TNS-MWCNT复合材料的局部放大的透射电镜图,D为TNS-MWCNT复合材料扫描电镜图(SEM);

图2 为不同材料的X射线衍射(XRD)图谱,其中,a为MWCNTs,b为 $\text{TiO}_2$ 纳米粒子,c为TNS-MWCNT 复合材料。

[0011] 图3 为不同材料的傅里叶红外(FT-IR)图谱,红外光谱图其中,a为MWCNTs,b为 $\text{TiO}_2$ 纳米粒子,c为TNS-MWCNT 复合材料;

图4 为TNS-MWCNT复合材料的X射线光电子能谱(XPS)分析:A为XPS 全谱扫描;B、C和D分别为C1s,01s 和Ti2p高分辨率的XPS光谱;

图5 为奈奎斯特图,其中,a为裸GCE,b为TNS-MWCNT|GCE,c为 $\text{TiO}_2$ |GCE,d为Ab1|TNS-MWCNT|GCE,e为BSA|Ab1|TNS-MWCNT|GCE,f为Ab2|AFP|BSA|Ab1|TNS-MWCNT|GCE;

图6中,A为Ab1浓度值对本发明免疫传感器电流响应的影响;B为示踪标记物上的HRP与Ab2的浓度比对本发明免疫传感器电流响应的影响;C为本发明免疫传感器电流响应随AFP浓度增加的变化曲线;D为本发明免疫传感器电流响应与AFP浓度的对数的线性关系图。

## 具体实施方式

[0012] 以下结合实施例对本发明的技术方案作进一步地详细介绍,但本发明的保护范围并不局限于此。

[0013] 下述实施例中,所用到的 $\text{BS}^3$ 、5% Nafion溶液购自西格玛奥德里奇有限公司,MWCNTs购自中国科学院成都有机化学有限公司,捕获抗体Ab1、信号抗体Ab2均购自成都双流正龙生化制品研究室。

[0014] 实施例1

一种以TNS-MWCNT复合材料为抗体和示踪标记物载体的电化学免疫传感器构建方法,其包括如下步骤:

### ①NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT复合材料的制备:

TNS-MWCNT的制备:称取50 mg的MWCNTs分散在40 mL的异丙醇中,超声20 min,随后加入50 μL二亚乙基三胺(DETA),搅拌均匀后,加入3.6 mL 异丙醇钛(TIP,纯度97%),再次搅拌均匀后将混合液转移至聚四氟乙烯反应釜中,于200℃反应24h;反应结束后,取出,冷却至室温,黑色沉淀物经过离心分离、乙醇洗涤、70℃干燥,即得到复合纳米材料TNS-MWCNT;

氨基化TNS-MWCNT的制备:将120 mg TNS-MWCNT与20 mL乙醇、1 mL 28%氨水和5 mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷混合后,机械搅拌过夜(12h)以防止TNS-MWCNT沉淀,离心分离,弃去上清液,所得固体残留物洗涤、干燥后,室温下储存备用,记为NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT;

### ②示踪标记物的制备:

HRP|NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT|Ab2示踪标记物的制备:将2 mg BS<sup>3</sup>溶解在0.5 mL 0.02 M 的PBS缓冲液中获得溶液A,然后将3 mg NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT分散于溶液A中,搅拌下加入400 μL 2.5 mg·mL<sup>-1</sup>的辣根过氧化物酶水溶液并在室温下孵育30 min,然后加入20 μL 含1.0 mg·mL<sup>-1</sup>信号抗体Ab2的PBS缓冲液,4℃下搅拌4 h,离心分离,所得沉淀物用洗涤缓冲液洗涤并用封闭缓冲液在室温下封闭30 min,最后用洗涤缓冲液洗涤后,分散于含0.1% 牛血清蛋白的1.0 mL PBS缓冲液中,备用,记为HRP|NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT|Ab2;

### ③免疫传感器的构建:

将6 mg 步骤①所得NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT分散于1 mL 1% Nafion溶液中,超声20 min以得到均匀的分散液,取5 μL分散液滴加在预处理好的玻碳电极表面,室温下自然晾干;然后在玻碳电极表面滴加10 μL 含2 mg·mL<sup>-1</sup> BS<sup>3</sup>的PBS缓冲液并在室温下孵育1 h,随后滴加5 μL 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> 的捕获抗体Ab1,室温下孵育60 min,浸入PBS缓冲液中洗涤3 min,然后将该玻碳电极用5 μL封闭缓冲液孵育30 min,再分别用洗涤缓冲液和PBS缓冲液洗涤3 min,即得电化学免疫传感器。所得电化学免疫传感器在4℃和100%湿度饱和环境下备用。

[0015] 步骤②和③中,所述封闭缓冲液为:含2 %(w/v)牛血清蛋白(BSA)的PBS缓冲液(0.05 M, pH 7.4);所述洗涤缓冲液为:含0.05 %(w/v)Tween 20的PBS缓冲液(0.05 M, pH 7.4)。

### [0016] ④ 测试过程:

为进行免疫反应和电化学测试,上述制备所得的电化学免疫传感器先用5 μL不同浓度的AFP稀释液或血清样品在室温下孵育50 min,然后分别用洗涤缓冲液和PBS缓冲液洗涤1.5 min。再用5 μL步骤②所得产物HRP|NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT|Ab2在室温下孵育50 min,并分别用洗涤缓冲液和PBS缓冲液洗涤3 min。随后,将该电化学免疫传感器、参比电极、对电极置于含10 mL PBS缓冲液的电化学电池中,接着将氢醌(最终浓度2 mM)和过氧化氢(最终浓度1 mM)注入此电池中,在脉冲振幅50 mV、脉冲宽度50 ms、0.2 ~ -0.2 V范围内进行差分脉冲伏安(DPV)扫描,以定量测定AFP。

### [0017] 复合材料的表征:

图1为不同材料的高倍电镜图谱:其中,A为MWCNT的透射电镜图,B为TNS-MWCNT复合材料透射电镜图,C为TNS-MWCNT复合材料的局部放大的透射电镜图,D为TNS-MWCNT复合材料扫描电镜图。从图1的A中可以看出MWCNT呈中空且略显弯曲的管状结构,它的外直径大约为20-30nm,长大约为0.5-1μm。图1的B是TNS-MWCNT二元复合物的TEM图,从图中可以看出,中空管状结构的MWCNT完全被浓密半透明的TiO<sub>2</sub>纳米片所覆盖,这种半透明的TiO<sub>2</sub>纳米片是在

二亚乙基三胺催化剂的作用下通过水解异丙醇钛合成出来的;DETA同时也能有效将TiO<sub>2</sub>纳米片组装在羧基修饰MWCNTs表面以形成一维多孔复合结构。图1中C的TEM图更是证实了TNS-MWCNT复合材料中MWCNTs被浓密的TiO<sub>2</sub>纳米片包围着,但是仅从TEM图很难确定TiO<sub>2</sub>的片状纳米结构,于是,TiO<sub>2</sub>的SEM图被用来准确确定TiO<sub>2</sub>的纳米结构。从图1的D中可以看出:TiO<sub>2</sub>呈略显弯曲的薄片状,与其TEM图完全一致。从TEM和SEM图中均可以看出,TNSs和MWCNTs表面的接触非常密切,这说明TNSs已成功沉积在MWCNTs上。

[0018] 图2为MWCNTs、TiO<sub>2</sub>纳米粒子和TNS-MWCNT 复合材料的XRD谱图,分别用曲线a、b和c表示。从曲线a看出MWCNTs在25.9° 和 43.6°有两个明显的特征衍射峰,分别对应MWCNT的(002)和(100)晶面;TiO<sub>2</sub>纳米粒子的XRD谱图(曲线b)在25.3°、37.9°、48.0°、54.1°、54.9°、62.7°、68.8°、70.2°、75.0° 和 82.8°处均有衍射峰,分别对应锐钛矿TiO<sub>2</sub>的(1 0 1)、(0 0 4)、(2 0 0)、(1 0 5)、(2 1 1)、(2 0 4)、(1 1 6)、(2 2 0)、(2 1 5) 和 (2 2 4)晶面;而在图2的曲线c中则包含了TiO<sub>2</sub>纳米粒子和MWCNTs 所有的衍射峰,说明TNS-MWCNT 复合物已被成功合成。然而,复合材料的峰值强度与单独组分相比大大降低了,这意味着两种组分之间的相互作用轻微地损坏了它们的晶体结构。

[0019] 图3 给出了MWCNTs(曲线a)、TiO<sub>2</sub>纳米粒子(曲线b)和TNS-MWCNT 复合材料(曲线c)的红外光谱图,从红外光谱图可以得出相应纳米材料的结构信息。图3的曲线a在3440 cm<sup>-1</sup>和1630 cm<sup>-1</sup>附近出现两个明显的吸收峰,分别对应于MWCNTs表面上-OH的拉伸振动和弯曲振动。且这两个吸收峰在曲线b和c均可被观察到,说明在TiO<sub>2</sub>纳米粒子和TNS-MWCNT复合物中都含有-OH官能团。图3的曲线b中,TiO<sub>2</sub>纳米粒子在400 和 800 cm<sup>-1</sup>的强吸收峰分别归属于Ti-O键的拉伸振动和Ti-O-Ti键的桥梁振动,这两个吸收峰在TNS-MWCNT复合材料的红外光谱图(图3曲线c)中也可以被发现。因此,图3可以证明TNS-MWCNT复合纳米材料已被成功合成。

[0020] 通过X射线光电子能谱(XPS)可以得知样品的表面元素组成及化学键合状态。图4中A给出了TNS-MWCNT复合材料的XPS全谱图,从谱图可以看出,样品主要含有C1s、O1s、Ti2p三种峰,说明样品主要由C、O和Ti元素组成。TNS-MWCNT复合材料中C1s的XPS谱图如图4中B所示,位于284.1,285.2,286.4 和 288.8 eV处的峰分别对应于四种不同化学态的C原子。例如,在284.1eV附近的峰对应石墨烯型C=C/C-C 结构;在285.2eV附近的峰则属于碳纳米管中有缺陷的C原子;此外,在286.4eV和288.8eV的峰分别对应于C-O 和C=O化学键。由图4中的C可以看出:O1s的XPS谱图在532.4和530.7eV出现两个明显的峰,这两个峰分别对应于O原子的C=O 结构和TNS中晶格氧[Ti-O<sub>6</sub>]的结构。另外,Ti2p的XPS谱图因其自旋分裂而呈现出两个能级峰(见图4中D),位于459.1eV和464.6 eV的能级峰分别对应TNS-MWCNT复合物中Ti2p<sub>3/2</sub> 和Ti2p<sub>1/2</sub>的结合能。以上的XPS谱图清楚地表明TNS 已完全沉积在MWCNT 表面上形成二元复合物。

[0021] 电化学阻抗(EIS)法监测免疫传感器的组装过程:

电化学阻抗图谱是用来评估动力学过程和修饰电极界面性能的有效工具。因此,电化学阻抗被用来研究本发明实施例1所制备的电化学免疫传感器的组装过程。

[0022] 阻抗实验在含0.1 M KCl电解质的5 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] | K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]中进行,并在0.209 V的直流电压上叠加5 mV的交流电压作为激发信号。在100 KHz~100 mHz频率范围内记录奈奎斯特图,如图5所示。图5中的所有奈奎斯特图在高频区呈现一个半圆,它对应电

子转移电阻( $R_{et}$ );在低频区包含一个直线部分,它对应扩散控制过程。半圆直径与修饰电极表面的铁氰化钾的电子传递阻力成正比。如预期那样,裸GCE电极(曲线a)在高频区的半圆直径很小,代表表面电阻很小,证明完全受扩散过程控制。在曲线b、d、e和f中,裸GCE电极依次被修饰上TNS-MWCNT|Nafion分散体系、捕获抗体Ab1、BSA、和标记信号抗体Ab2,从图中可以看出,伴随着逐步修饰过程,半圆直径逐渐增加,表明各种材料被层层组装于电极表面。纳米材料和生物分子的在电极表面的附着形成了一个电子和传质阻挡层,它阻碍铁氰化钾向电极表面的扩散,因而减小了电子传递系数。

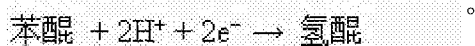
#### [0023] 电化学免疫传感器检测条件的优化:

由于捕获抗体的浓度和示踪标记物中标记抗体与HRP的浓度比都会影响检测信号的强度,因此在性能评估之前,应对反应条件加以优化以达到最佳测定效果。如图6中A所示,在Ab1的浓度达到 $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ 之前,本专利免疫传感器的DPV电流呈显著增加趋势,随后略降低。随着Ab1浓度的增加,越来越多的AFP被捕获抗体结合,因而越来越多的示踪标记物被固定在电极表面,从而产生较强的检测信号。但是,过多的Ab1集中在电极表面将会产生空间位阻效应,阻碍了标记物的绑定,会导致DPV电流的降低。因此Ab1的浓度设定为 $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ 。

[0024] 此外,由于加入HRP的量对检测信号有着显著影响,因此在示踪标记物上的HRP与Ab2的浓度比也需要优化。从图6的B中可以看出,开始时电流随着HRP/Ab2比例的增加而增加,在比例为50:1时,电流达到最大值,紧接着电流有所下降,这可能因为较高比例的HRP/Ab2阻碍了抗原与Ab2的结合。也就是说,过量的HRP会阻碍Ab2与抗原的结合。因此HRP/Ab2比例设定为50:1。

#### [0025] 分析性能评估:

HRP由于其稳定性、高催化性能以及超高灵敏度,成为电化学免疫分析中广泛应用的示踪标记酶。本发明通过双氨基化试剂BS<sup>3</sup>将HRP和Ab2负载于NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT表面形成了免疫分析的示踪标记物。该示踪标记物与抗原结合后形成三层夹心结构用于分析检测。测试前,检测液用高纯氮气除氧15 min,在检测过程中保持氮气环境。在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的帮助下,HRP催化氢醌转化为苯醌,随后苯醌被电化学还原为氢醌来提供检测信号,如下两反应式所示:



[0026] 在最优条件下,差分脉冲伏安(DPV)被用来评估免疫传感器的分析性能。如图6中C所示,还原峰电流随AFP浓度的增加而增加,校准曲线(图6中D)显示峰电流与分析物浓度的对数之间有良好的线性关系,线性范围为 $0.005 \text{ ng/mL}$ 至 $320 \text{ ng/mL}$ ,相关系数为0.994 ( $n=4$ )。在信噪比为3的条件下,AFP的检测限低至 $2.0 \text{ pg/mL}$ ,本发明传感器的性能优于之前报道的多种免疫分析方法和免疫传感器。

#### [0027] 免疫传感器的重现性、特异性、稳定性和在血清样品中的应用

本发明进一步研究了实施例1制备所得电化学免疫传感器的特异性、重现性和稳定性。为评估该免疫传感器的特异性,本发明引入了几种可能的干扰物,包括癌胚抗原(CEA),前列腺癌蛋白抗原(PSA),肿瘤抗原125(CA125),免疫球蛋白G(IgG)和牛血清蛋白(BSA)。此免疫传感器分别用含有上述其中一种干扰物( $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  AFP孵育。与没有干扰物相比,由干扰物引起的电流变化小于5.4%,表明此免疫传感器具有良好的选择性。

[0028] 为了探究此免疫传感器的准确度和重现性,本发明使用相同方法和步骤分别制备六根电极,在相同实验条件下进行研究测试,所得相对标准偏差(RSD)为4.9%。表明此免疫传感器准确度和重现性良好。

[0029] 此外,此免疫传感器的稳定性也通过测量它们在4℃条件下储存两周前后的电流响应进行了评估。结果表明,两周后92.7%的电流响应得以保留,这表明此免疫传感器具有良好的稳定性。

[0030] 该免疫传感器对实际血清样品分析的适用性通过标准加入法进行了评估。实验结果显示在表1中。回收率/检测率为96.2% - 104.8%,这表明本发明的电化学免疫传感器可被用于日常临床诊断中人体血清中AFP的检测。

[0031] 表 1用本发明免疫传感器检测加入人体血清中的AFP

样品	加入浓度( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	检测浓度( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	相对标准偏差(%)	检测率%
1	0.2	0.204	3.9	102.0
2	5.0	5.24	4.5	104.8
3	50	48.1	3.7	96.2

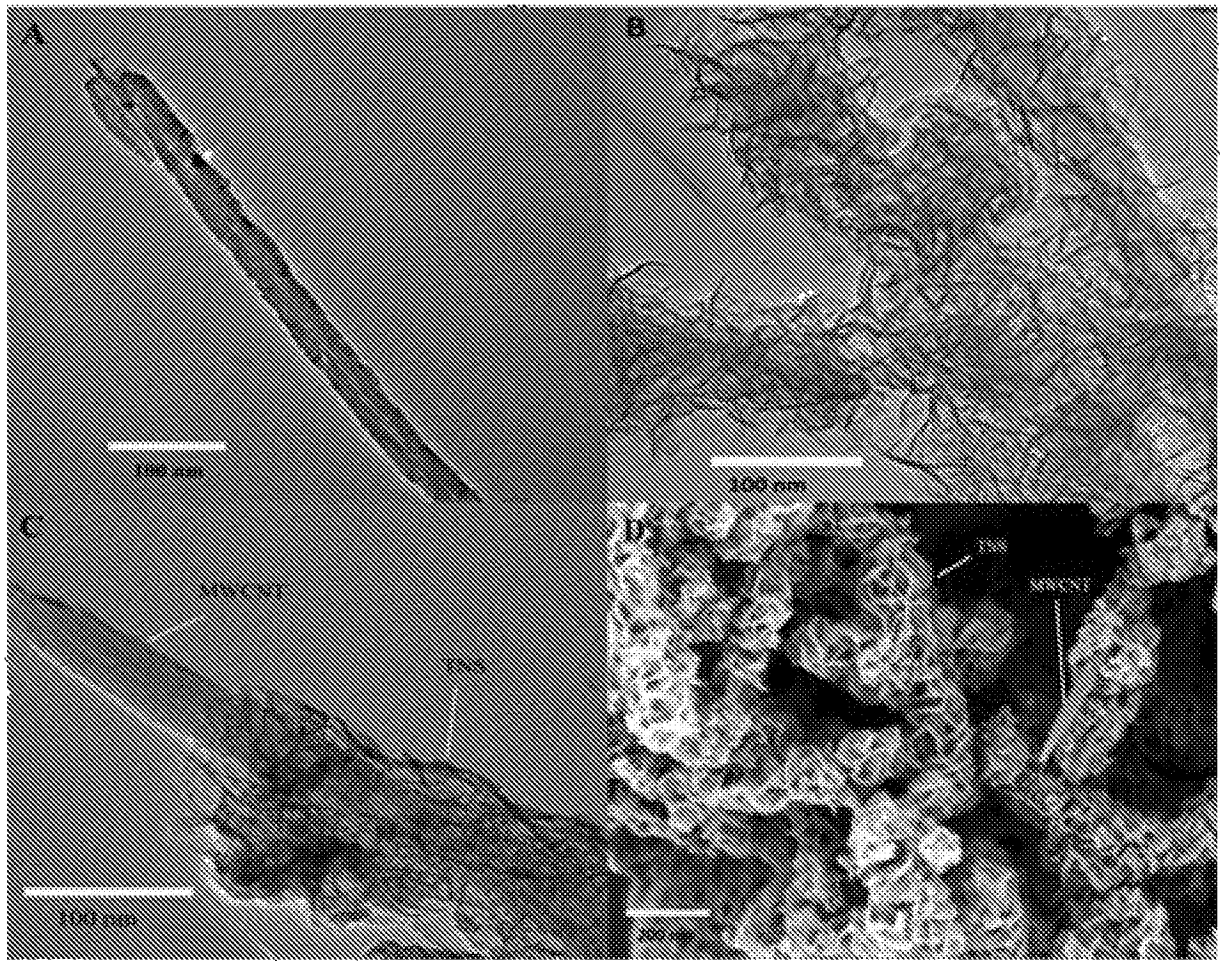


图1

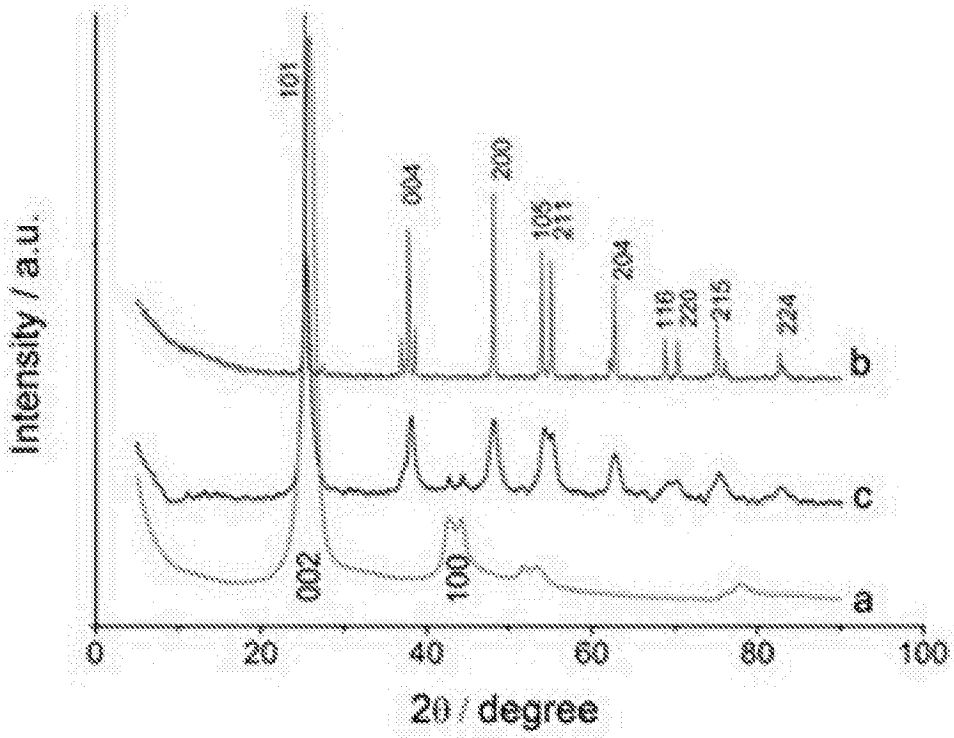


图2

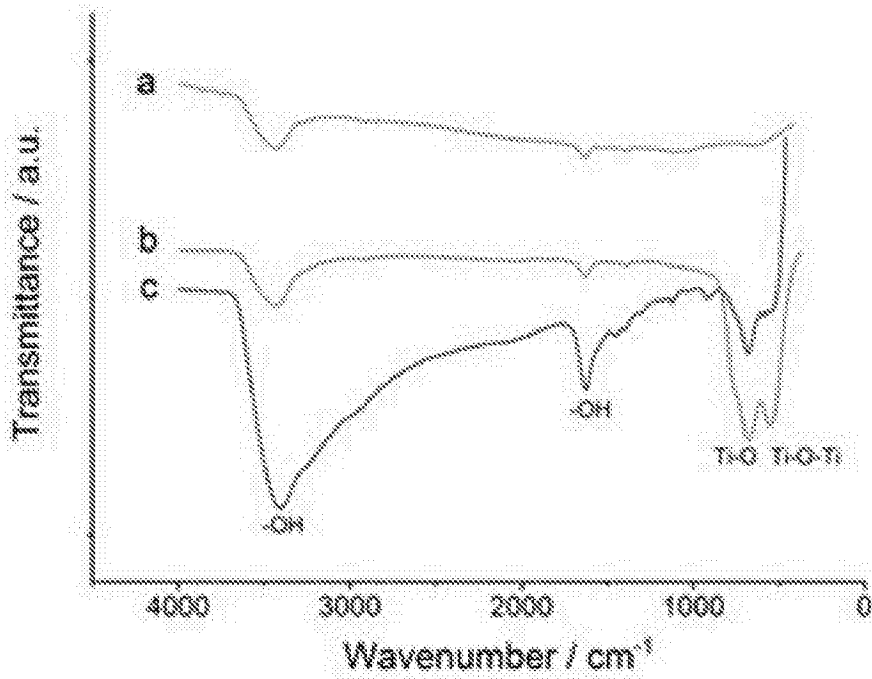


图3

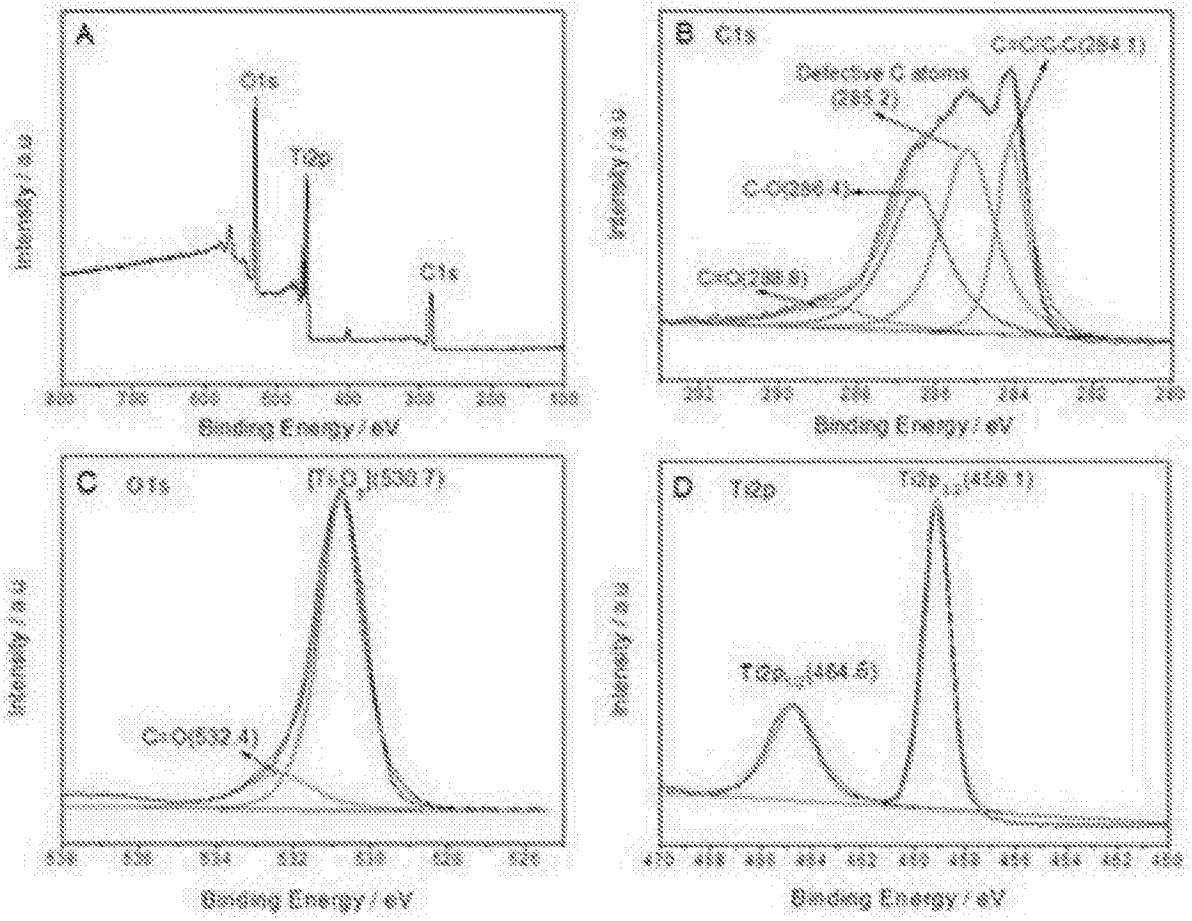


图4

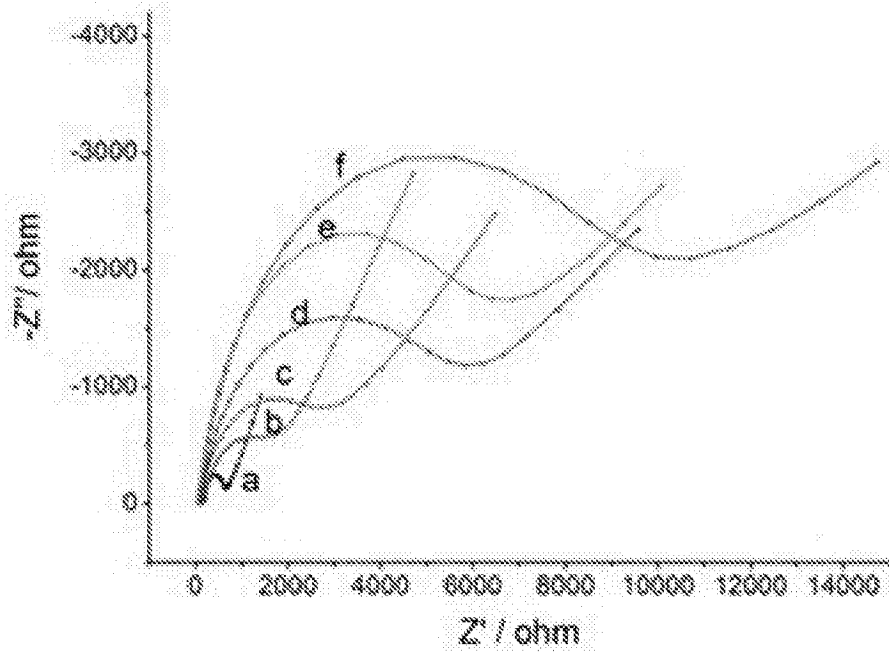


图5

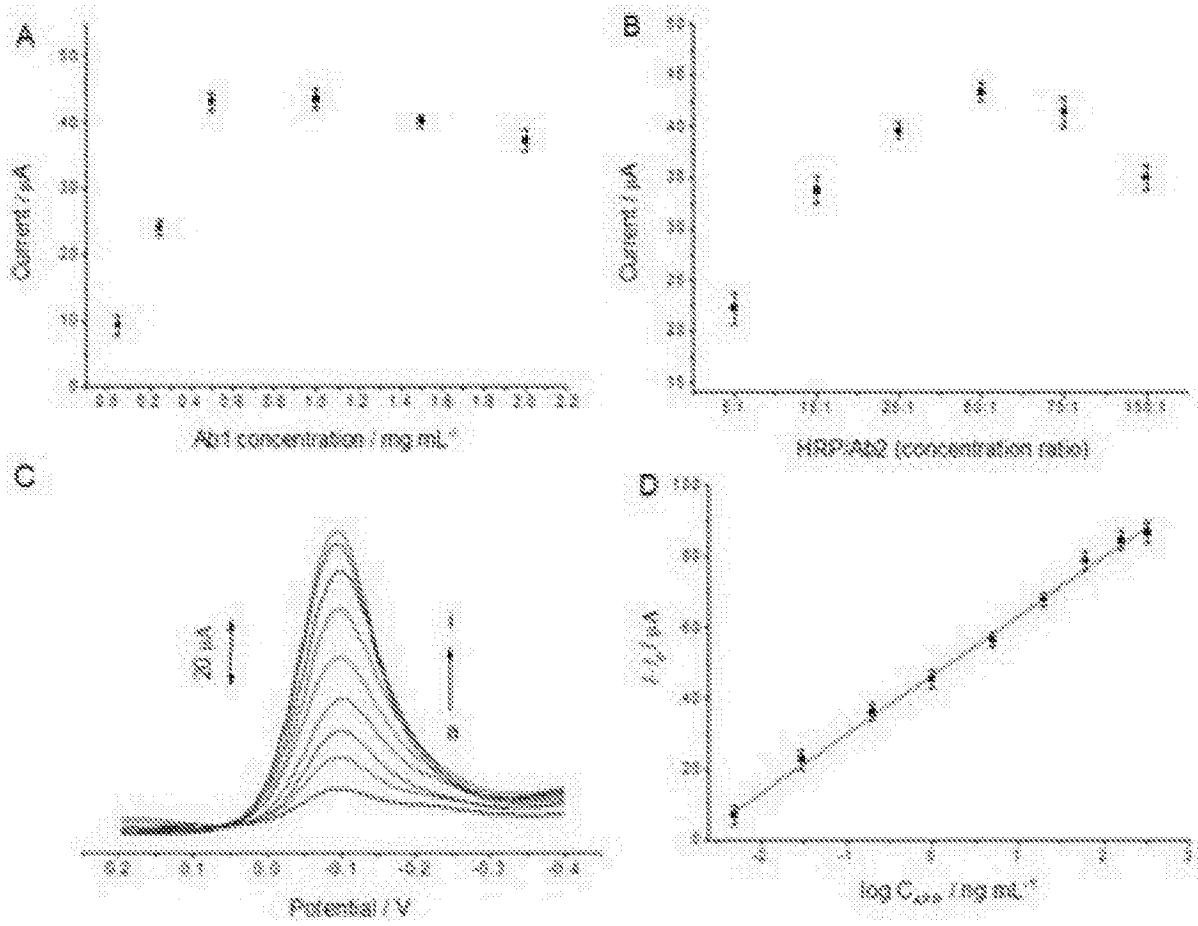


图6

专利名称(译)	以TNS-MWCNT复合材料为抗体和示踪标记物载体的电化学免疫传感器构建方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105784992A</a>	公开(公告)日	2016-07-20
申请号	CN201610315599.7	申请日	2016-05-13
[标]申请(专利权)人(译)	河南大学		
申请(专利权)人(译)	河南大学		
当前申请(专利权)人(译)	河南大学		
[标]发明人	刘小强 刘培培 霍小鹤 朱杰		
发明人	刘小强 刘培培 霍小鹤 朱杰		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54313		
代理人(译)	刘建芳 杨海霞		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种以TiO<sub>2</sub>纳米片(TNS)-多壁碳纳米管(MWCNT)复合材料为抗体和示踪标记物载体的电化学免疫传感器构建方法，首先通过水热法制备出TNS-MWCNT复合材料并氨基化，然后将其分散于Nafion溶液中并滴加在电极表面。以氨基交联剂BS3为双氨基交联剂将捕获抗体(Ab1)共价结合在NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT表面，用于三明治型夹心测定。同时，BS3还被用于将辣根过氧化物酶(HRP)和信号抗体(Ab2)固定在NH<sub>2</sub>-TNS-MWCNT表面以制备示踪标记物。采用本发明方法制备所得的电化学免疫传感器能够快速测定α-甲胎蛋白，且灵敏度较高、线性范围较大、检测限较低。

