



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107422008 B

(45)授权公告日 2019.06.21

(21)申请号 201710513678.3

(22)申请日 2017.06.29

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107422008 A

(43)申请公布日 2017.12.01

(73)专利权人 东南大学
地址 210096 江苏省南京市四牌楼2号

(72)发明人 沈艳飞 潘登 张明明 陈慧琴
张袁健

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

代理人 肖明芳

(51)Int.Cl.

G01N 27/30(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

(56)对比文件

CN 101526523 A,2009.09.09,

CN 102507953 A,2012.06.20,

CN 102749452 A,2012.10.24,

CN 106383159 A,2017.02.08,

Dexiang Feng,et al..Simultaneous electrochemical detection of multiple tumor markers using functionalized graphene nanocomposites as non-enzymatic labels.《Sensors and Actuators B》.2014,第201卷

Jing Qian,et al..Versatile Immunosensor Using a Quantum Dot Coated Silica Nanosphere as a Label for Signal Amplification.《Anal.Chem.》.2010,第82卷(第15期),

审查员 徐妍妍

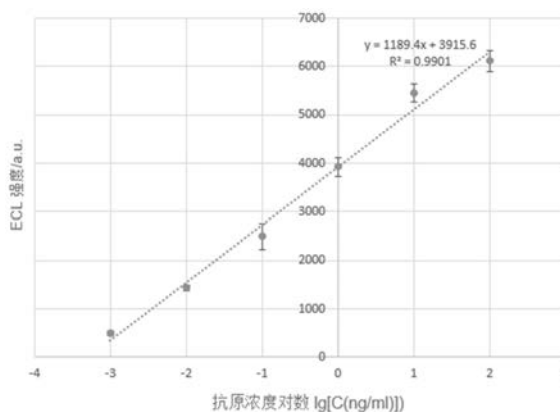
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

一种测定甲胎蛋白的电化学免疫传感器及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种测定甲胎蛋白的电化学免疫传感器及其制备方法与应用,基底电极由MWNTs-CS溶液修饰,甲胎蛋白第一抗体溶液共价结合到修饰后的基底电极上,甲胎蛋白抗原溶液特异性结合到甲胎蛋白第一抗体上,CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体溶液特异性结合到甲胎蛋白抗原上,所述基底电极为玻碳电极。本发明还提供了一种基于CdTe QDs信号放大的电化学免疫传感器的人血清中甲胎蛋白的检测方法,所述检测方法灵敏度高、特异性好、具有很宽的线性范围和较低的检测限且成本低廉。



1. 一种测定甲胎蛋白的电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,基底电极由MWNTs-CS溶液修饰,戊二醛溶液结合到经MWNTs-CS修饰的电极上,甲胎蛋白第一抗体溶液通过酰胺键共价结合到结合戊二醛的基底电极上,甲胎蛋白抗原溶液特异性结合到甲胎蛋白第一抗体上,CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体溶液特异性结合到甲胎蛋白抗原上。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述基底电极为玻碳电极。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述MWNTs-CS溶液按如下步骤制备:将CS分散在乙酸水溶液中并搅拌0.2~3h,得到CS溶液;将MWNTs分散在CS溶液中并超声处理10~60min以获得MWNTs-CS的均匀混合物;离心得到MWNTs-CS沉淀,并重悬于水中制成MWNTs-CS溶液。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体溶液按如下方法制备:

(1) 量取环己烷、Triton X-100、正己醇,混合均匀后加入CdTe水溶液,混合均匀后加入TEOS和APTES,混合均匀后加入氨水,1~10℃搅拌反应12~36h,反应结束后离心,用乙醇和水清洗沉淀,最后重悬于水中得到CdTe@SiO₂溶液;

(2) 用EDC溶液和NHS溶液将GO悬浮液室温活化1~5h,离心获得沉淀;将沉淀加入步骤(1)得到的CdTe@SiO₂溶液中,室温搅拌反应1~5h,离心清洗沉淀,最后重悬于水中得到CdTe@SiO₂-GO溶液;

(3) 将甲胎蛋白第二抗体溶液加入步骤(2)得到的CdTe@SiO₂-GO溶液中,黑暗条件下1~10℃搅拌反应6~18h,然后加入BSA溶液室温搅拌反应1~5h,离心并重悬于PBS溶液中得到CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体溶液。

5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(1) CdTe、TEOS和APTES的比例为50mg:1mL:1mL~70mg:1mL:1mL,TEOS和氨水的体积比为1:1~1:3。

6. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中EDC、NHS和GO的质量比为4:2:1~2:1:2。

7. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中CdTe和步骤(2)中GO的质量比为3:1~3:5。

8. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将基底电极进行打磨、抛光和超声清洗;

(2) 取MWNTs-CS溶液,滴加到步骤(1)预处理过的电极表面,室温放置2h,用PBS溶液清洗,晾干;

(3) 向步骤(2)得到的电极表面滴加戊二醛溶液,室温放置1~5h,然后用PBS溶液清洗,晾干;将甲胎蛋白第一抗体溶液滴加到电极表面,1~10℃放置12h,然后用PBS溶液清洗,晾干;

(4) 向步骤(3)得到的电极表面滴加BSA溶液,室温放置1~5h,然后用PBS溶液清洗,晾干;

(5) 向步骤(4)得到的电极表面滴加甲胎蛋白抗原溶液进行特异性反应,20~50℃反应10~60min,然后用PBS溶液清洗,晾干;

(6) 向步骤(5)得到的电极表面滴加CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体溶液进行特异性反应,20~50℃反应10~60min,然后用PBS溶液清洗,晾干。

9. 权利要求1-8任意一项所述的制备方法制备得到的电化学免疫传感器。

一种测定甲胎蛋白的电化学免疫传感器及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学检测,具体涉及一种测定甲胎蛋白的电化学免疫传感器及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 作为世界上严重危害人类生命的重大疾病之一,癌症已经成为发达国家的第一致死因素和发展中国家的第二致死因素。目前对于晚期癌症的治疗仍存在很多技术难题,“早发现,早诊断,早治疗”仍然是目前世界上公认治疗癌症最有效的手段,因此癌症的早期检测对于提高癌症患者生存率具有重大意义。

[0003] 甲胎蛋白(AFP)主要是在胎儿肝脏卵黄囊合成的一种分子量为69 000的胎儿血清蛋白。胎儿出生后约两周甲胎蛋白从血液中消失,在正常成年人血清中AFP含量一般低于20ng/mL。当肝细胞发生癌变时,恢复了产生这种蛋白质的功能,而且随着病情恶化它在血清中的含量会急剧增加。AFP可以在约80%的肝细胞癌患者中出现升高,其血清水平一般与原发肝癌的发生、发展、消退、复发等具有密切相关,检测血清中AFP的浓度可获相关肿瘤的组织生长、细胞分化和功能的相关信息。

[0004] 现阶段已经开发了多种方法用于检测AFP的含量,例如酶联免疫测定、电化学免疫测定、表面等离子体共振、原子吸收光谱法、化学发光荧光法和电化学发光免疫测定。上述检测方法具有准确、高效等优点,但步骤繁琐耗时、样品量大、设备庞大、成本高,无法满足AFP现场快速检测的要求。因此,为了满足对早期恶性肿瘤病变快速便捷的临床筛查需求,迫切需要开发一种快速,高灵敏度的微器械。

[0005] 电致化学发光(ECL)免疫传感器是电化学传感器中重要组成部分,它以荧光探针标记抗体或者抗原,通过传感元件将荧光探针的光信号转换为电信号,从而对待检物进行定量。ECL免疫传感器具有选择性好、灵敏度高、成本低,所需设备相对简单,适合联机化,容易微型化等优点,成功应用在医学、环境和食品安全检测等多领域,已成为各种生物活性物质快速检测的研究热点和发展前沿,具有广阔而良好的应用前景。与传统检测技术不同,电极表面发生ECL发光反应,因此降低电极表面活性物质的消耗是非常重要的。在所有ECL系统中,在水溶液中具有优异的发光效果和生物相容性的CdTe量子点系统已成为最广泛使用和活跃的ECL系统之一。

发明内容

[0006] 发明目的:为解决现有技术存在的缺陷,本发明提供了一种基于CdTe QDs信号放大的电化学免疫传感器及其制备方法。本发明还提供了一种基于CdTe QDs信号放大的电化学免疫传感器的人血清中甲胎蛋白的检测方法,所述检测方法灵敏度高、特异性好、具有很宽的线性范围和较低的检测限且成本低廉。

[0007] 本发明中技术术语的缩写如下:

[0008] 甲胎蛋白:AFP;多壁碳纳米管:MWNTs;壳聚糖:CS;Si(OC₂H₅)₄:TEOS;

$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$: APTES; 氧化石墨烯: GO; 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺盐酸盐: EDC; N-羟基琥珀酰亚胺: NHS;

[0009] 技术方案: 本发明所述的一种测定甲胎蛋白的电化学免疫传感器的制备方法, 基底电极由 MWNTs-CS 溶液修饰, 甲胎蛋白第一抗体溶液共价结合到修饰后的基底电极上, 甲胎蛋白抗原溶液特异性结合到甲胎蛋白第一抗体上, CdTe@SiO_2 -GO-甲胎蛋白第二抗体溶液特异性结合到甲胎蛋白抗原上。

[0010] 优选地, 所述基底电极为玻碳电极。

[0011] 所述 MWNTs-CS 按如下步骤制备:

[0012] 将 CS 分散在乙酸水溶液中并搅拌 0.2~3h, 得到 CS 溶液。将 MWNTs 分散在 CS 溶液中并超声处理 10~60min 以获得 MWNTs-CS 的均匀混合物。离心得到 MWNTs-CS 沉淀, 并重新悬浮于水中制成 MWNTs-CS 溶液。

[0013] 优选地, 将 0.2~3mg CS 分散在 0.2~3mL 体积分数为 0.2~5% 乙酸水溶液中并搅拌 0.2~3h, 得到 CS 水溶液。将 1~5mg MWNTs 分散在 CS 水溶液中并超声处理 10~60min 以获得 MWNTs-CS 的均匀混合物。离心得到 MWNTs-CS 沉淀, 并重新悬浮于水中以制成 1~5mg/mL MWNTs-CS 水溶液。

[0014] 所述 CdTe@SiO_2 -GO-甲胎蛋白第二抗体按如下方法制备:

[0015] (1) 量取环己烷、Triton X-100、正己醇, 混合均匀后加入 CdTe 水溶液, 混合均匀后加入 TEOS 和 APTES, 混合均匀后加入氨水进行反应, 1~10℃ 搅拌反应 12~36h, 反应结束后离心, 用乙醇和水清洗沉淀, 最后重悬于水中得到 CdTe@SiO_2 溶液;

[0016] (2) 用 EDC 溶液和 NHS 溶液将 GO 悬浮液室温活化 1~5h, 离心获得沉淀; 将沉淀加入步骤 (1) 得到的 CdTe@SiO_2 溶液中, 室温搅拌反应 1~5h, 离心清洗沉淀, 最后重悬于水中得到 CdTe@SiO_2 -GO 溶液;

[0017] (3) 将甲胎蛋白第二抗体溶液加入步骤 (2) 得到的 CdTe@SiO_2 -GO 溶液中, 黑暗条件下 1~10℃ 搅拌反应 6~18h, 然后加入 BSA 溶液室温搅拌反应 1~5h, 离心并重悬于 PBS 溶液中得到 CdTe@SiO_2 -GO-甲胎蛋白第二抗体溶液。

[0018] 所述步骤 (1) 环己烷、Triton X-100、正己醇和 CdTe 水溶液的体积比为 0.75:0.177:0.18: (0.6~1.8)。

[0019] 所述步骤 (1) CdTe、TEOS 和 APTES 的比例为 50mg:1mL:1mL~70mg:1mL:1mL。TEOS 和氨水的体积比为 1:1~1:3

[0020] 所述步骤 (1) 中 CdTe 水溶液的浓度为 0.5~2mg/mL。

[0021] 所述步骤 (2) 中 EDC 溶液和 NHS 溶液的溶剂为 0.1M PBS, EDC 溶液的浓度为 10~30mg/mL, NHS 溶液的浓度为 5~15mg/mL。GO 悬浮液溶剂为超纯水, 浓度为 0.5~2mg/mL。所述 EDC、NHS 和 GO 的质量比为 4:2:1~2:1:2。

[0022] 所述步骤 (1) 中 CdTe 和步骤 (2) 中 GO 的质量比为 3:1~3:5。

[0023] 所述步骤 (3) 中甲胎蛋白第二抗体溶液的溶剂为超纯水, 浓度为 50~150 $\mu\text{g/mL}$ 。BSA 溶液的溶剂为 0.1M PBS, BSA 的质量分数为 0.2~2wt.%。甲胎蛋白第二抗体溶液和 BSA 溶液都是过量的。

[0024] 一种测定甲胎蛋白的电化学免疫传感器的制备方法, 按如下步骤制备

[0025] (1) 基底电极预处理: 将基底电极进行打磨、抛光和超声清洗;

[0026] (2) 基底电极修饰:取MWNTs-CS溶液,滴加到步骤(1)预处理过的电极表面,室温放置2h,用PBS溶液清洗,晾干;

[0027] (3) 共价连接甲胎蛋白第一抗体:向步骤(2)得到的电极表面滴加戊二醛溶液,室温放置1~5h,用PBS溶液清洗,晾干;将甲胎蛋白第一抗体溶液滴加到电极表面,1~10℃放置12h,用PBS溶液清洗,晾干;

[0028] (4) 封闭非特异性位点:向步骤(3)得到的电极表面滴加BSA溶液,室温放置1~5h,用PBS溶液清洗,晾干;

[0029] (5) 结合甲胎蛋白抗原:向步骤(4)得到的电极表面滴加甲胎蛋白抗原溶液进行特异性反应,20~50℃反应10~60min,用PBS溶液清洗,晾干;

[0030] (6) CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体特异性结合:向步骤(5)得到的电极表面滴加CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体溶液进行特异性反应,20~50℃反应10~60min,用PBS溶液清洗,晾干。

[0031] 所述步骤(1)中基底电极分别用0.05和0.03μm Al₂O₃粉末抛光,然后分别用无水乙醇和超纯水超声清洗5min。

[0032] 所述步骤(2)中MWNTs-CS溶液的浓度为1~5mg/mL, MWNTs-CS溶液是过量的,用PBS溶液清洗未结合的MWNTs-CS。

[0033] 所述步骤(3)中戊二醛溶液的溶剂为超纯水,戊二醛的质量分数为0.2~2wt. %。甲胎蛋白第一抗体溶液的溶剂为0.1M PBS,浓度为10~30μg/mL。戊二醛溶液和甲胎蛋白第一抗体溶液是过量的。

[0034] 所述步骤(4)中BSA溶液的溶剂为0.1M PBS,BSA的质量分数为0.2~2wt. %,BSA溶液是过量的,用PBS溶液清洗未结合的BSA。

[0035] 所述步骤(6)中CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体溶液浓度为10~30μg/mL, CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体溶液是过量的,用PBS溶液清洗未结合的CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体。其中,CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体浓度是以CdTe的浓度来计算。

[0036] 上述制备方法制备得到的电化学免疫传感器。

[0037] 上述制备方法制备得到的电化学免疫传感器在定量检测甲胎蛋白中的应用。

[0038] 有益效果:与现有技术相比,本发明具有如下优点:

[0039] (1) 本发明的免疫传感器用于检测血清中甲胎蛋白,既不需要常规检测方法中对样品进行复杂处理,也避免了使用HPLC等常规检测方法费用高、操作繁琐等问题。

[0040] (2) 本发明的免疫传感器具有优异的抗干扰性能,对甲胎蛋白的测定具有很高的选择性。

[0041] (3) 选择绿色化学试剂壳聚糖和多壁碳纳米管复合材料作为甲胎蛋白检测时玻碳电极的修饰材料,健康安全。同时,利用其高导电性提高了电化学免疫传感器的灵敏度。

[0042] (4) 制备高效纳米荧光探针材料,并用标记抗体,探讨对其电致发光和电子转移的原理的研究,对功能纳米材料的组成和成分进行系统的研究,对标记探针方面的研究有重要的理论价值。

附图说明

[0043] 图1为本发明的制备示意图;

- [0044] 图2为本发明的循环伏安图；
[0045] 图3为本发明的抗原抗体孵育时间与ECL强度之间的关系；
[0046] 图4为本发明的ECL强度与抗原浓度的对数之间的线性关系图；
[0047] 图5为本发明的选择性考察图。

具体实施方式

[0048] 根据下述实施例,可以更好地理解本发明。然而,本领域的技术人员容易理解,实施例所描述的内容仅用于说明本发明,而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

[0049] 甲胎蛋白第一抗体和第二抗体购买自北京科跃中楷生物技术有限公司。甲胎蛋白第一抗体编号Z111N001,甲胎蛋白第二抗体编号Z111N002,两种抗体均为固体粉末,溶剂为0.1M PBS。

[0050] 实施例1 CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体的制备

[0051] (1) CdTe@SiO₂的制备

[0052] 用移液枪将0.75mL环己烷,0.177mL Triton X-100和0.18mL正己醇加入到2mL离心管中,超声均匀,向其中加入600μL 1mg/mL CdTe水溶液,超声均匀后再向其中加入10μL TEOS和10μL APTES,超声均匀后再加入20μL氨水,4℃搅拌反应24h,离心后用乙醇和水各清洗三次,最后重悬于500μL水中得到CdTe@SiO₂溶液。

[0053] (2) CdTe@SiO₂-GO的制备

[0054] 用50μL 20mg/mL EDC溶液和50μL 10mg/mL NHS溶液将1mL 1mg/mL GO溶液室温活化2h,然后通过离心收集活化GO。将步骤(1)得到的500μL含有氨基的CdTe@SiO₂溶液加入到上述沉淀中,室温反应2h,离心清洗,最后重悬于水中得到CdTe@SiO₂-GO溶液。

[0055] (3) CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体的制备

[0056] 100μL 100μg/mL甲胎蛋白第二抗体溶液共价偶联到步骤(2)得到的CdTe@SiO₂-GO的GO上,并在黑暗条件下4℃反应12h,然后加入500μL 1wt.%BSA溶液,室温搅拌2h封闭GO上剩余的活性位点,离心除去上清液中未结合的抗体或BSA,最后得到CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体,重悬于PBS溶液中得到CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体溶液。

[0057] 实施例2 CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体的制备

[0058] (1) CdTe@SiO₂的制备

[0059] 用移液枪将0.75mL环己烷,0.177mL Triton X-100和0.18mL正己醇加入到2mL离心管中,超声均匀,向其中加入1.8mL 0.5mg/mL CdTe水溶液,超声均匀后再向其中加入18μL TEOS和18μL APTES,超声均匀后再加入54μL氨水,10℃搅拌反应12h,离心后用乙醇和水各清洗三次,最后重悬于500μL水中得到CdTe@SiO₂溶液。

[0060] (2) CdTe@SiO₂-GO的制备

[0061] 用120μL 10mg/mL EDC溶液和120μL 5mg/mL NHS溶液将600μL 0.5mg/mL GO溶液室温活化5h,然后通过离心收集活化GO。将步骤(1)得到的500μL含有氨基的CdTe@SiO₂溶液加入到上述沉淀中,室温反应5h,离心清洗,最后重悬于水中得到CdTe@SiO₂-GO溶液。

[0062] (3) CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体的制备

[0063] 200μL 50μg/mL甲胎蛋白第二抗体溶液共价偶联到步骤(2)得到的CdTe@SiO₂-GO

的G0上,并在黑暗条件下4℃反应18h,然后加入2.5mL 0.2wt.%BSA溶液,室温搅拌5h封闭G0上剩余的活性位点,离心除去上清液中未结合的抗体或BSA,最后得到CdTe@SiO₂-G0-甲胎蛋白第二抗体,重悬于PBS溶液中得到CdTe@SiO₂-G0-甲胎蛋白第二抗体溶液。

[0064] 实施例3 CdTe@SiO₂-G0-甲胎蛋白第二抗体的制备

[0065] (1) CdTe@SiO₂的制备

[0066] 用移液枪将0.75mL环己烷,0.177mL Triton X-100和0.18mL正己醇加入到2mL离心管中,超声均匀,向其中加入600μL 2mg/mL CdTe水溶液,超声均匀后再向其中加入8.5μL TEOS和8.5μL APTES,超声均匀后再加入8.5μL氨水,4℃搅拌反应36h,离心后用乙醇和水各清洗三次,最后重悬于500μL水中得到CdTe@SiO₂溶液。

[0067] (2) CdTe@SiO₂-G0的制备

[0068] 用50μL 30mg/mL EDC溶液和50μL 15mg/mL NHS溶液将750μL 2mg/mL G0溶液室温活化2h,然后通过离心收集活化G0。将步骤(1)得到的500μL含有氨基的CdTe@SiO₂溶液加入到上述沉淀中,室温反应2h,离心清洗,最后重悬于水中得到CdTe@SiO₂-G0溶液。

[0069] (3) CdTe@SiO₂-G0-甲胎蛋白第二抗体的制备

[0070] 200μL 150μg/mL甲胎蛋白第二抗体溶液共价偶联到步骤(2)得到的CdTe@SiO₂-G0的G0上,并在黑暗条件下10℃反应6h,然后加入500μL 2wt.%BSA溶液,室温搅拌2h封闭G0上剩余的活性位点,离心除去上清液中未结合的抗体或BSA,最后得到CdTe@SiO₂-G0-甲胎蛋白第二抗体,重悬于PBS溶液中得到CdTe@SiO₂-G0-甲胎蛋白第二抗体溶液。

[0071] 实施例4测定甲胎蛋白的电化学免疫传感器的制备方法

[0072] 电化学免疫传感器的制备方法如图1所示,包括以下步骤:

[0073] (1) 电极预处理:将玻碳电极分别用0.05和0.03μm Al₂O₃粉末处理,然后分别用无水乙醇和超纯水超声清洗5min;

[0074] (2) 滴加MWNTs-CS:用移液枪取5μL 1mg/mL MWNTs-CS溶液滴加在预处理后的玻碳电极表面,室温放置2h干燥,PBS溶液清洗未结合的复合材料,晾干,利用其较大的比表面积优势使抗体更多的富集在电极表面;

[0075] (3) 共价连接捕捉抗体甲胎蛋白第一抗体:在步骤(2)得到的玻碳电极表面滴加2wt.%戊二醛溶液,室温下2h,用PBS清洗,将10μL 20μg/mL捕捉抗体滴加在电极表面,在4℃冰箱中放置12h,利用酰胺键将捕捉抗体固定在电极表面,用PBS溶液清洗未结合的抗体,晾干;

[0076] (4) 封闭非特异性位点:滴加10μL 1wt.%BSA溶液到步骤(3)得到的电极表面,室温放置2h,封闭未被抗体结合的位点,防止待测样品中某些物质与之发生非特异性结合,提高背景信号,然后用PBS溶液清洗未结合的BSA,晾干;

[0077] (5) 结合抗原:滴加10μL待测抗原溶液到步骤(4)得到的电极表面,37℃孵育40min,使甲胎蛋白抗原和甲胎蛋白第一抗体充分发生特异性反应,用PBS溶液清洗除去未结合的甲胎蛋白抗原。

[0078] (6) 标记抗体CdTe@SiO₂-G0-甲胎蛋白第二抗体固定:向步骤(5)得到的电极表面滴加10μL 20μg/mL标记抗体溶液,37℃下孵育40min,使甲胎蛋白抗原和甲胎蛋白第二抗体充分发生特异性反应,用PBS溶液清洗除去未结合的标记抗体;

[0079] (7) 信号检测:将步骤(6)得到的电极放在含有0.1M K₂S₂O₈和0.1mM KCl的PBS溶液

中进行ECL测定,光电倍增高压(PMT)为800V,记录ECL信号强度,分析结果。

[0080] 实施例5测定甲胎蛋白的电化学免疫传感器的制备方法

[0081] 电化学免疫传感器的制备方法如图1所示,包括以下步骤:

[0082] (1) 电极预处理:将玻碳电极分别用0.05和0.03 μm Al_2O_3 粉末处理,然后分别用无水乙醇和超纯水超声清洗5min;

[0083] (2) 滴加MWNTs-CS:用移液枪取1 μL 5mg/mL MWNTs-CS溶液滴加在预处理后的玻碳电极表面,室温放置2h干燥,PBS溶液清洗未结合的复合材料,晾干,利用其较大的比表面积优势使抗体更多的富集在电极表面;

[0084] (3) 共价连接捕捉抗体甲胎蛋白第一抗体:在步骤(2)得到的玻碳电极表面滴加0.2wt.%戊二醛溶液,室温下5h,用PBS清洗,将20 μL 10 $\mu\text{g/mL}$ 捕捉抗体滴加在电极表面,在10 $^{\circ}\text{C}$ 放置12h,利用酰胺键将捕捉抗体固定在电极表面,用PBS溶液清洗未结合的抗体,晾干;

[0085] (4) 封闭非特异性位点:滴加50 μL 0.2wt.%BSA溶液到步骤(3)得到的电极表面,室温放置1h,封闭未被抗体结合的位点,防止待测样品中某些物质与之发生非特异性结合,提高背景信号,然后用PBS溶液清洗未结合的BSA,晾干;

[0086] (5) 结合抗原:滴加10 μL 待测抗原溶液到步骤(4)得到的电极表面,20 $^{\circ}\text{C}$ 孵育60min,使甲胎蛋白抗原和甲胎蛋白第一抗体充分发生特异性反应,用PBS溶液清洗除去未结合的甲胎蛋白抗原。

[0087] (6) 标记抗体CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体固定:向步骤(5)得到的电极表面滴加20 μL 10 $\mu\text{g/mL}$ 标记抗体溶液,20 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育60min,使甲胎蛋白抗原和甲胎蛋白第二抗体充分发生特异性反应,用PBS溶液清洗除去未结合的标记抗体;

[0088] (7) 信号检测:将步骤(6)得到的电极放在含有0.1M $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 和0.1mM KCl的PBS溶液中进行ECL测定,光电倍增高压(PMT)为800V,记录ECL信号强度,分析结果。

[0089] 实施例6测定甲胎蛋白的电化学免疫传感器的制备方法

[0090] 电化学免疫传感器的制备方法如图1所示,包括以下步骤:

[0091] (1) 电极预处理:将玻碳电极分别用0.05和0.03 μm Al_2O_3 粉末处理,然后分别用无水乙醇和超纯水超声清洗5min;

[0092] (2) 滴加MWNTs-CS:用移液枪取5 μL 1mg/mL MWNTs-CS溶液滴加在预处理后的玻碳电极表面,室温放置2h干燥,PBS溶液清洗未结合的复合材料,晾干,利用其较大的比表面积优势使抗体更多的富集在电极表面;

[0093] (3) 共价连接捕捉抗体甲胎蛋白第一抗体:在步骤(2)得到的玻碳电极表面滴加2wt.%戊二醛溶液,室温下2h,用PBS清洗,将10 μL 30 $\mu\text{g/mL}$ 捕捉抗体滴加在电极表面,在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置12h,利用酰胺键将捕捉抗体固定在电极表面,用PBS溶液清洗未结合的抗体,晾干;

[0094] (4) 封闭非特异性位点:滴加5 μL 2wt.%BSA溶液到步骤(3)得到的电极表面,室温放置5h,封闭未被抗体结合的位点,防止待测样品中某些物质与之发生非特异性结合,提高背景信号,然后用PBS溶液清洗未结合的BSA,晾干;

[0095] (5) 结合抗原:滴加10 μL 待测抗原溶液到步骤(4)得到的电极表面,50 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10min,使甲胎蛋白抗原和甲胎蛋白第一抗体充分发生特异性反应,用PBS溶液清洗除去未

结合的甲胎蛋白抗原。

[0096] (6) 标记抗体CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体固定:向步骤(5)得到的电极表面滴加10μL 30μg/mL标记抗体溶液,50℃下孵育10min,使甲胎蛋白抗原和甲胎蛋白第二抗体充分发生特异性反应,用PBS溶液清洗除去未结合的标记抗体;

[0097] (7) 信号检测:将步骤(6)得到的电极放在含有0.1M K₂S₂O₈和0.1mM KCl的PBS溶液中进行ECL测定,光电倍增高压(PMT)为800V,记录ECL信号强度,分析结果。

[0098] 实施例7测定甲胎蛋白的电化学免疫传感器循环伏安图

[0099] 为探究甲胎蛋白的电化学免疫传感器各修饰阶段传感器的信号响应,将实施例4中每个步骤得到的玻碳电极置于含有2mM K₃[Fe(CN)₆]的0.01M PBS溶液中以0.1V/s的速度进行循环伏安扫描,结果见图2所示。随着MWNTs-CS修饰在玻碳电极表面,与裸电极相比较获得了一个增大的峰电流信号,因为复合材料增强了电子传递,提高了传感器的灵敏度。随后将甲胎蛋白第一抗体、BSA、甲胎蛋白修饰在电极表面,传感器的响应信号逐渐降低,其原因是蛋白增大了电极表面的阻抗值,使电流降低。

[0100] 实施例8测定甲胎蛋白的电化学免疫传感器免疫反应孵育时间与ECL强度关系的研究

[0101] 探究捕捉抗体与甲胎蛋白的孵育时间对传感器ECL信号强度的影响。电化学免疫传感器的制备方法同实施例4,不同的是步骤(5)中选用10min、15min、20min、25min、30min、35min、40min和45min 8个不同的孵育时间进行本次实验。结果如图3,在10~35min时,ECL信号随时间的延长而急剧增加,在40min时达到最大值,故本次实验选用40min作为孵育时间。

[0102] 实施例9测定甲胎蛋白的电化学免疫传感器ECL强度与抗原浓度之间的线性关系

[0103] 电化学免疫传感器的制备方法同实施例4,不同的是步骤(5)中甲胎蛋白抗原的浓度不同。配制不同浓度的甲胎蛋白标准溶液,分别为0.001ng/mL,0.01ng/mL,0.1ng/mL,1ng/mL,10ng/mL和100ng/mL,使用的溶剂为0.1M PBS,每个浓度平行对照三次。通过对数据分析,得到ECL强度与抗原浓度的对数之间的线性关系,结果见图4。随着甲胎蛋白浓度的不断增大,ECL传感器的信号强度也随之不断增大。与现有商品化甲胎蛋白(AFP)检测试剂盒(胶体金法)最低检测线为20ng/mL相比,该传感器最低检测限为1pg/mL,本发明具有更高的灵敏度。

[0104] 实施例10测定甲胎蛋白的电化学免疫传感器的选择性性能

[0105] 考察AFP的结构类似物TNF-α和CEA对甲胎蛋白检测的影响,电化学免疫传感器的制备方法同实施例4,不同的是步骤(5)中所使用的的抗原不同,结果见图5。相同浓度即10ng/mL下(使用的溶剂为0.1M PBS),甲胎蛋白的ECL强度分别是TNF-α和CEA ECL强度的10倍和8倍,并且混合溶液对甲胎蛋白的检测不造成影响,说明本发明的免疫传感器具有较高的特异性,对甲胎蛋白的测定具有很高的选择性。



图1

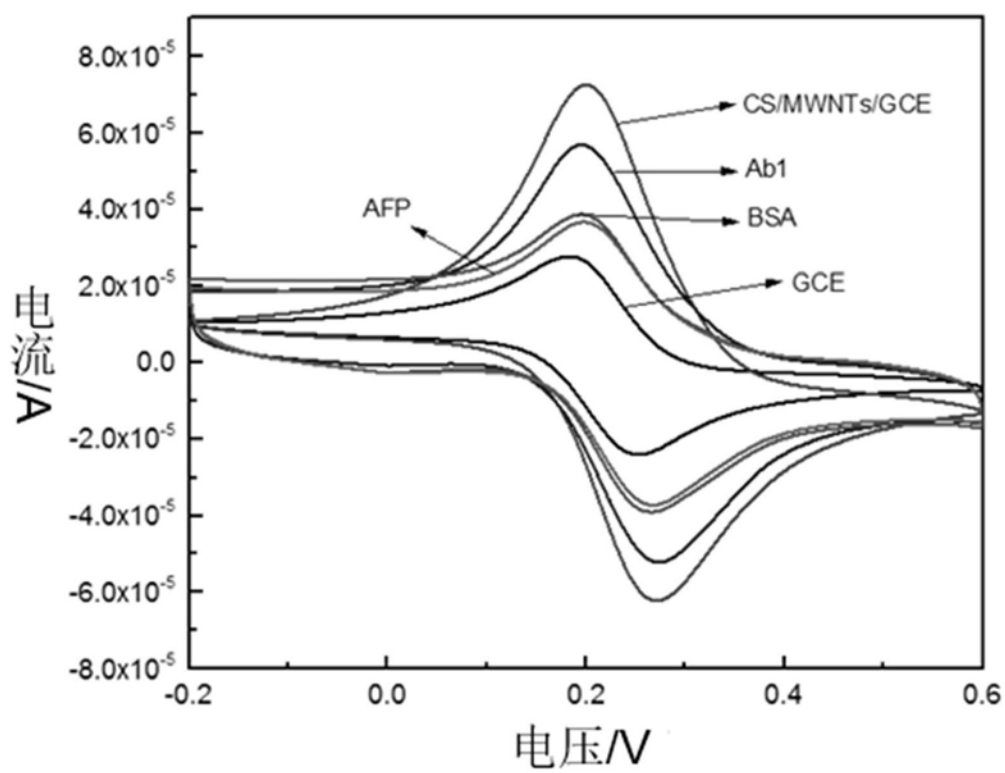


图2

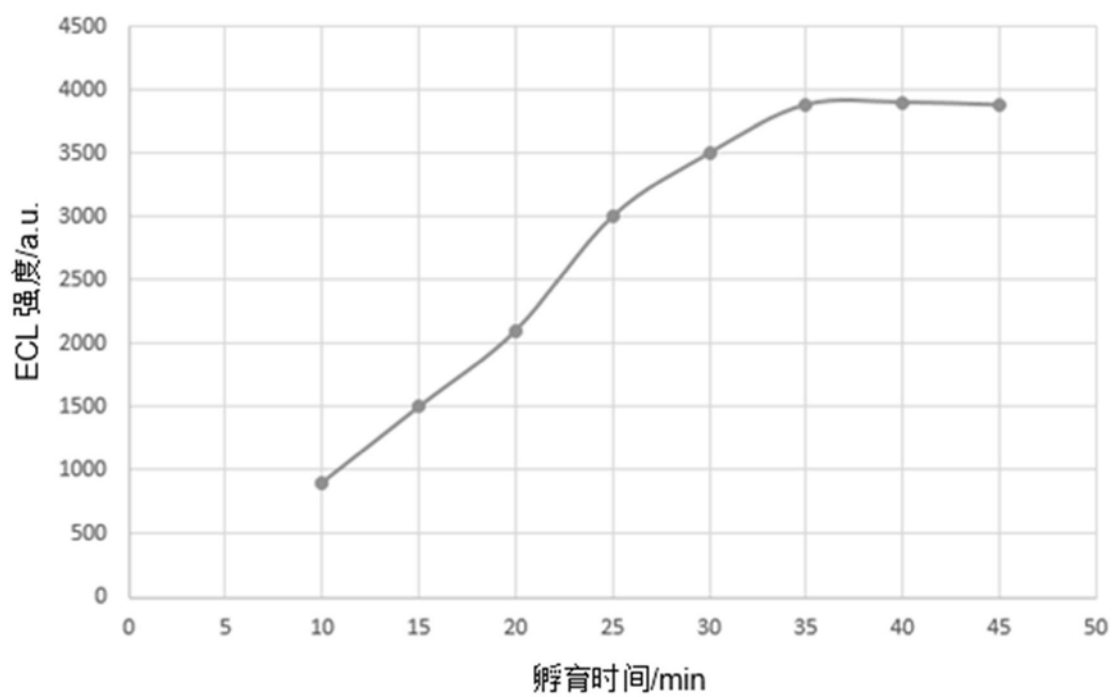


图3

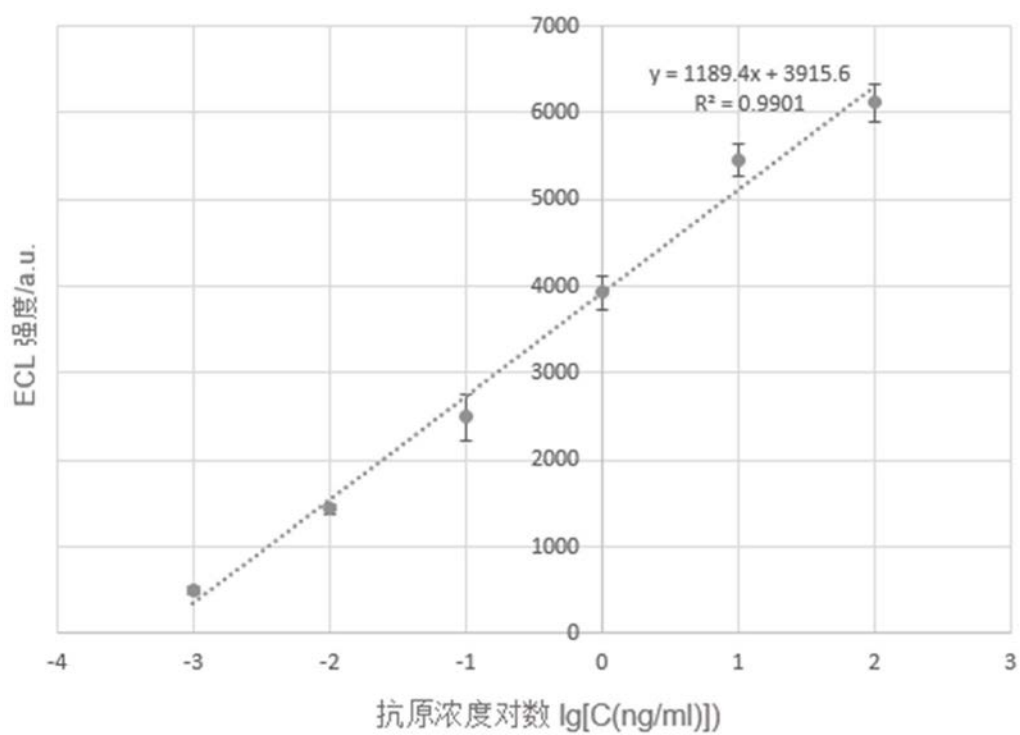


图4

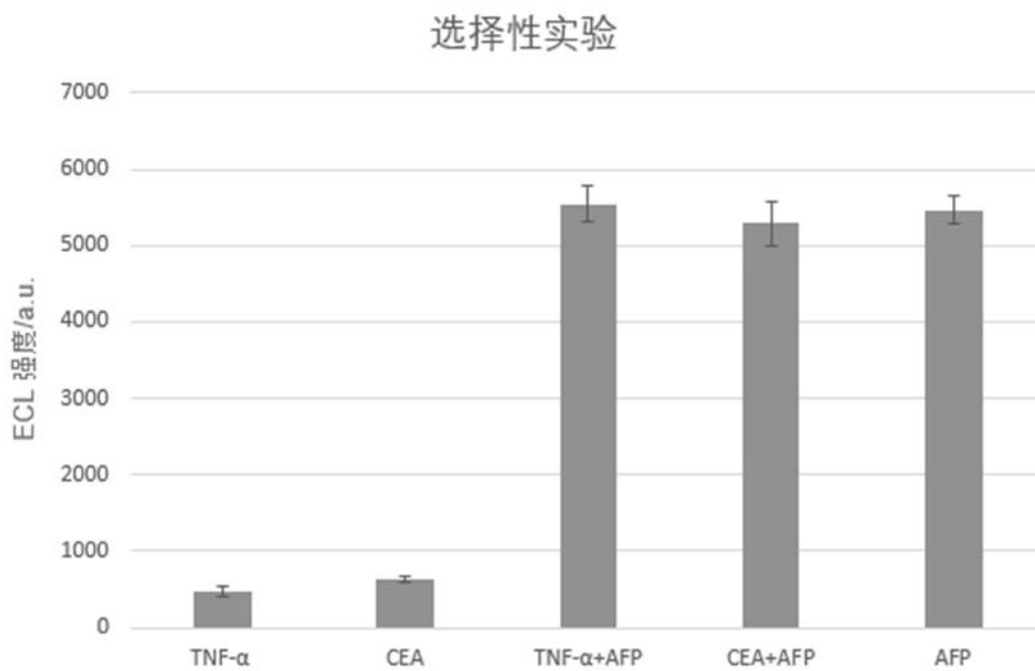


图5

专利名称(译)	一种测定甲胎蛋白的电化学免疫传感器及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN107422008B	公开(公告)日	2019-06-21
申请号	CN2017110513678.3	申请日	2017-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	东南大学		
[标]发明人	沈艳飞 潘登 张明明 陈慧琴 张袁健		
发明人	沈艳飞 潘登 张明明 陈慧琴 张袁健		
IPC分类号	G01N27/30 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N27/308 G01N33/53 G01N33/68		
审查员(译)	徐妍妍		
其他公开文献	CN107422008A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种测定甲胎蛋白的电化学免疫传感器及其制备方法与应用，基底电极由MWNTs-CS溶液修饰，甲胎蛋白第一抗体溶液共价结合到修饰后的基底电极上，甲胎蛋白抗原溶液特异性结合到甲胎蛋白第一抗体上，CdTe@SiO₂-GO-甲胎蛋白第二抗体溶液特异性结合到甲胎蛋白抗原上，所述基底电极为玻碳电极。本发明还提供了一种基于CdTe QDs信号放大的电化学免疫传感器的人血清中甲胎蛋白的检测方法，所述检测方法灵敏度高、特异性好、具有很宽的线性范围和较低的检测限且成本低廉。

