



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105699464 B

(45)授权公告日 2018.04.13

(21)申请号 201610125971.8

(22)申请日 2016.03.05

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105699464 A

(43)申请公布日 2016.06.22

(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 褚衍广 魏琴 马洪敏 吴丹

张勇 庞雪辉

(51)Int.Cl.

G01N 27/416(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

审查员 陈洋

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种基于氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的免疫传感器的制备方法及应用

(57)摘要

本发明涉及一种基于氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的免疫传感器的制备方法及应用。属于新型功能材料与生物传感检测技术领域。本发明具体是采用在制备氧化亚铜纳米粒子的基础上，原位还原氯化钡形成氧化亚铜掺杂钡纳米粒子的复合物，并研究了最佳掺杂量，实现了对前列腺抗原的高灵敏检测，对前列腺的早期诊断具有重要的意义。

1. 一种基于氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 依次用1.0、0.3、0.05 μm 的氧化铝粉末对直径为4mm的玻碳电极抛光,分别在超纯水和无水乙醇中超声清洗,氮气吹干;

(2) 将5~15 μL 、金纳米粒子溶液滴到电极表面,室温下晾干;

(3) 待电极近干时,将6 μL 、浓度为1 ~ 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的前列腺特异捕获抗体滴加至修饰电极表面,于4 °C冰箱中孵化1小时,用超纯水清洗干净;

(4) 滴加6 μL 、质量分数为1.0 ~ 3.0%的牛血清白蛋白溶液于电极表面,封闭非特异性活性位点,于4 °C冰箱中晾干,用超纯水清洗干净;

(5) 滴加6 μL 、 10^{-5} ng/mL ~ 100 ng/mL 的一系列不同浓度的前列腺特异性抗原标准溶液,于4 °C冰箱中晾干,用超纯水清洗干净;

(6) 滴加6 μL 、1 ~ 3 mg/mL 的氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体溶液,置于4 °C冰箱中晾干,即制得一种基于氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的免疫传感器。

2. 如权利要求1所述的一种基于氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的免疫传感器的制备方法,所述氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体溶液的制备,其特征在于,步骤如下:

(1) 氧化亚铜掺杂钡纳米粒子的制备

在烧杯中,将0.100 ~ 0.300 g乙酸铜溶于20 ~ 60 mL超纯水中,磁力搅拌,得到澄清的溶液;4.0 ~ 12.0 mL、0.1 mol/L的 $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶液快速加入到剧烈搅拌下的上述澄清溶液,颜色立即从蓝色变到亮黄色;所得混合物继续搅拌30分钟,离心,分别用超纯水和无水乙醇洗几次,并在60 °C烘箱中干燥4小时;加入0.5 ~ 4.0 mL、0.05 mol/L的氯化钡溶液,磁力搅拌30分钟,离心洗涤;

(2) 氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记检测抗体溶液的制备

将制备的1 mL、浓度为1 ~ 3 mg/mL 氧化亚铜/钡纳米粒子溶液与1 mL、浓度为0.5 ~ 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的检测抗体混合,震荡12小时,滴加0.5 ~ 1.5 mL质量分数为1.0 ~ 3.0%的牛血清白蛋白溶液,继续震荡12小时,离心,用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液洗涤,得到氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体孵化物,将其分散于1 mL、pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液中,制得氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体溶液,于4 °C冰箱中储存备用。

3. 如权利要求1所述的制备方法制备的免疫传感器的检测方法,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,铂丝电极为辅助电极,饱和甘汞电极为参比电极,所制备的修饰电极为工作电极,在10 mL、pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2) 选择计时电流法对前列腺抗原进行检测,将输入电压设置为-0.4 V,取样间隔设置为0.1秒,运行时间设置为200秒;

(3) 当背景电流趋于稳定后,每隔50秒向磷酸盐缓冲溶液中注入10 μL 、浓度为5 mol/L的过氧化氢溶液,然后记录电流随时间的变化,绘制工作曲线;

(4) 将待测样品溶液代替前列腺特异性抗原标准溶液进行检测。

一种基于氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的免疫传感器的制备方法及应用。具体是采用在氧化亚铜母液中原位还原氯化钡,合成氧化亚铜掺杂钡的纳米复合物,制备一种检测前列腺抗原的电化学免疫传感器,属于新型功能材料与生物传感检测技术领域。

背景技术

[0002] 目前ELISA、RIA、荧光偏振免疫测定、免疫发光技术、自动化免疫分析等多种方法应用于检测PSA。其中,电化学免疫检测具有高灵敏性、高选择性、分析快速和操作简便等优点,它利用抗原与抗体之间特异性结合的免疫学方法与电化学技术检测相结合。在电化学检测中,标记物起着关键作用,因此各种各样的标记物应运而生。寻找一种步骤简单、条件温和,产物易得,电化学响应信号强的标记物尤为重要,本发明合成了一种氧化亚铜掺杂钡纳米粒子复合物,制备了一种氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记抗体的电化学免疫传感器,实现了对前列腺抗原的检测。

[0003] 本发明利用氧化亚铜和钡纳米粒子对过氧化氢进行电化学催化的性能,将氧化亚铜与钡纳米粒子相结合,得到氧化亚铜掺杂钡的纳米复合物,并且制备了氧化亚铜掺杂不同量的钡纳米复合物,并寻找最佳掺杂量,合成步骤是在制备氧化亚铜纳米粒子的基础之上,原位一步还原氯化钡,得到了氧化亚铜掺杂钡的纳米复合物,该方法步骤简单、条件温和,产物易得。该方法解决了单独使用氧化亚铜和钡纳米粒子催化过氧化氢电信号小的问题。使用氧化亚铜掺杂钡的纳米复合物标记前列腺抗体,利用氧化亚铜和钡纳米粒子的协同作用,增强了催化过氧化氢还原的电化学催化性能。在检测前列腺过程中产生了逐步放大的电化学信号,有效地增强了电化学免疫传感器的灵敏度。该方法成本低、灵敏度高、特异性好、检测速度快等优点,而且制备过程简单易得,克服了目前前列腺抗原检测方法的不足。

发明内容

[0004] 本发明的目的之一是基于氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的免疫传感器,构建了一种无酶、快速且超灵敏的夹心型电化学免疫传感器。

[0005] 本发明的目的之二是将该夹心型电化学免疫传感器应用于前列腺抗原的检测。

[0006] 本发明的技术方案如下:

[0007] 1.氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的免疫传感器的制备方法:

[0008] (1)依次用1.0、0.3、0.05 μm 的氧化铝粉末对直径为4 mm的玻碳电极抛光,分别在超纯水和无水乙醇中超声清洗,氮气吹干;

[0009] (2)将5 ~ 15 μL 、金纳米粒子溶液滴到电极表面,室温下晾干;

[0010] (3)待电极近干时,将6 μL 、浓度为1 ~ 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的前列腺特异捕获抗体滴加至修饰电极表面,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化1小时,用超纯水清洗干净;

[0011] (4)滴加6 μL 、质量分数为1.0 ~ 3.0%的牛血清白蛋白溶液于电极表面,封闭非特异性活性位点,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,用超纯水清洗干净;

[0012] (5)滴加6 μL 、 10^{-5} ng/mL ~ 100 ng/mL的一系列不同浓度的前列腺特异性抗原标准溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,用超纯水清洗干净;

[0013] (6)滴加6 μL 、1 ~ 3 mg/mL的氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体溶液,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,即制得一种基于氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的免疫传感器。

[0014] 2.氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体溶液的制备方法

[0015] (1)氧化亚铜掺杂钡纳米粒子的制备

[0016] 在烧杯中,将0.100 ~ 0.300 g乙酸铜溶于20 ~ 60 mL超纯水中,磁力搅拌,得到澄清的溶液;4.0 ~ 12.0 mL、0.1 mol/L的 $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶液快速加入到剧烈搅拌下的上述混合物,颜色立即从蓝色变到亮黄色;所得混合物继续搅拌30分钟,离心,分别用超纯水和无水乙醇洗几次,并在60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥4小时;加入0.5 ~ 4.0 mL、0.05 mol/L的氯化钡溶液,磁力搅拌30分钟,离心洗涤;

[0017] (2)氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记检测抗体溶液的制备

[0018] 将制备的1 mL、浓度为1 ~ 3 mg/mL氧化亚铜/钡纳米粒子溶液与1 mL、浓度为0.5 ~ 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的检测抗体混合,震荡12小时,滴加0.5 ~ 1.5 mL质量分数为1.0 ~ 3.0%的牛血清白蛋白溶液,继续震荡12小时,离心,用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液洗涤,得到氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体孵化物,将其分散于1 mL、pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液中,制得氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体溶液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存备用。

[0019] 3.前列腺抗原的检测步骤

[0020] (1)使用电化学工作站以三电极体系进行测试,铂丝电极为辅助电极,饱和甘汞电极为参比电极,所制备的修饰电极为工作电极,在10 mL、pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

[0021] (2)选择计时电流法对前列腺抗原进行检测,将输入电压设置为-0.4 V,取样间隔设置为0.1秒,运行时间设置为200秒;

[0022] (3)当背景电流趋于稳定后,每隔50秒向磷酸盐缓冲溶液中注入10 μL 浓度为5 mol/L的过氧化氢溶液,然后记录电流随时间的变化,绘制工作曲线;

[0023] (4)将待测样品溶液代替前列腺抗原标准溶液进行检测。

[0024] 本发明的有益成果

[0025] (1)氧化亚铜掺杂钡纳米粒子合成步骤建立在制备氧化亚铜纳米粒子的基础上,原位一步还原氯化钡,得到了氧化亚铜掺杂钡的纳米复合物,并探究最佳掺杂量,该方法步骤简单、条件温和,产物易得。

[0026] (2)本发明利用氧化亚铜和钡纳米粒子对过氧化氢进行电化学催化的性能,将氧化亚铜与钡纳米粒子相结合,得到氧化亚铜掺杂钡的纳米复合物,该方法解决了单独使用氧化亚铜和钡纳米粒子催化过氧化氢电信号小的问题。使用氧化亚铜掺杂钡的纳米粒子复合物标记前列腺抗体,利用氧化亚铜和钡纳米粒子的协同作用,增强了催化过氧化氢还原的电化学催化性能。

[0027] (3)本发明将制备的夹心型电化学免疫传感器用于前列腺抗原的检测,检测限低,线性范围宽,可以实现简单、快速、灵敏和特异性检测。本发明对前列腺抗原检测线性范围

为 $10^{-5} \sim 100$ ng/mL,检测限达到2 fg/mL。

具体实施方式

[0028] 实施例1一种氧化亚铜掺杂钡纳米粒子作为标记物的免疫传感器的制备方法

[0029] (1)依次用1.0、0.3、0.05 μm 的氧化铝粉末对直径为4 mm的玻碳电极抛光,分别在超纯水和无水乙醇中超声清洗,氮气吹干;

[0030] (2)将5 μL 、金纳米粒子溶液滴到电极表面,室温下晾干;

[0031] (3)待电极近干时,将6 μL 、浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的前列腺特异抗体滴加至修饰电极表面,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化1小时,用超纯水清洗干净;

[0032] (4)滴加6 μL 、质量分数为1.0%的牛血清白蛋白溶液于电极表面,封闭非特异性活性位点,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,用超纯水清洗干净;

[0033] (5)滴加6 μL 、 10^{-5} ng/mL \sim 100 ng/mL的一系列不同浓度的前列腺特异性抗原标准溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,用超纯水清洗干净;

[0034] (6)滴加6 μL 、1 mg/mL的氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体溶液,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,储存备用。

[0035] 实施例2一种氧化亚铜掺杂钡纳米粒子作为标记物的免疫传感器的制备方法

[0036] (1)依次用1.0、0.3、0.05 μm 的氧化铝粉末对直径为4 mm的玻碳电极抛光,分别在超纯水和无水乙醇中超声清洗,氮气吹干;

[0037] (2)将10 μL 、金纳米粒子溶液滴到电极表面,室温下晾干;

[0038] (3)待电极近干时,将6 μL 、浓度为2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的前列腺特异抗体滴加至修饰电极表面,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化1小时,用超纯水清洗干净;

[0039] (4)滴加6 μL 、质量分数为2.0%的牛血清白蛋白溶液于电极表面,封闭非特异性活性位点,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,用超纯水清洗干净;

[0040] (5)滴加6 μL 、 10^{-5} ng/mL \sim 100 ng/mL的一系列不同浓度的前列腺特异性抗原标准溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,用超纯水清洗干净;

[0041] (6)滴加6 μL 、2 mg/mL的氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体溶液,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,储存备用。

[0042] 实施例3一种氧化亚铜掺杂钡纳米粒子作为标记物的免疫传感器的制备方法

[0043] (1)依次用1.0、0.3、0.05 μm 氧化铝粉末对直径为4 mm的玻碳电极抛光,分别在超纯水和无水乙醇中超声清洗,氮气吹干;

[0044] (2)将15 μL 、金纳米粒子溶液滴到电极表面,室温下晾干;

[0045] (3)待电极近干时,将6 μL 、浓度为3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的前列腺特异抗体滴加至修饰电极表面,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化1小时,用超纯水清洗干净;

[0046] (4)滴加6 μL 、质量分数为3.0%的牛血清白蛋白溶液于电极表面,封闭非特异性活性位点,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,用超纯水清洗干净;

[0047] (5)滴加6 μL 、 10^{-5} ng/mL \sim 100 ng/mL的一系列不同浓度的前列腺特异性抗原标准溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,用超纯水清洗干净;

[0048] (6)滴加6 μL 、3 mg/mL的氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体溶液,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,储存备用。

[0049] 实施例4氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体溶液的制备方法

[0050] (1)氧化亚铜掺杂钡纳米粒子的制备

[0051] 在烧杯中,将0.100 ~ 0.300 g乙酸铜溶于20 ~ 60 mL超纯水中,磁力搅拌,得到澄清的溶液;4.0 ~ 12.0 mL、0.1 mol/L的 $N_2H_4 \cdot H_2O$ 溶液快速加入到剧烈搅拌下的上述混合物,颜色立即从蓝色变到亮黄色;所得混合物继续搅拌30分钟,离心,分别用超纯水和无水乙醇洗几次,并在60 °C烘箱中干燥4小时;加入0.5 ~ 4.0 mL、0.05 mol/L的氯化钡溶液,磁力搅拌30分钟,离心洗涤;

[0052] (2)氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记检测抗体溶液的制备

[0053] 将制备的1 mL、浓度为1 ~ 3 mg/mL氧化亚铜/钡纳米粒子溶液与1 mL、浓度为0.5 ~ 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 的检测抗体混合,震荡12小时,滴加0.5 ~ 1.5 mL质量分数为1.0 ~ 3.0%的牛血清白蛋白溶液,继续震荡12小时,离心,用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液洗涤,得到氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体孵化物,将其分散于1 mL、pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液中,制得氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体溶液,于4 °C冰箱中储存备用。

[0054] 将1 mL浓度为1 mg/mL氧化亚铜/钡纳米粒子溶液与1 mL浓度为0.5 $\mu\text{g/mL}$ 检测抗体混合,震荡12小时,滴加0.5 mL、质量分数为1.0%的牛血清白蛋白溶液,继续震荡12小时,离心,用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液洗涤,得到氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体孵化物,将其分散于1 mL、pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液中,制得氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体溶液,于4 °C冰箱中储存备用。

[0055] 实施例5氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体溶液的制备方法

[0056] (1)氧化亚铜掺杂钡纳米粒子的制备

[0057] 在烧杯中,将0.100 ~ 0.300 g乙酸铜溶于20 ~ 60 mL超纯水中,磁力搅拌,得到澄清的溶液;4.0 ~ 12.0 mL、0.1 mol/L的 $N_2H_4 \cdot H_2O$ 溶液快速加入到剧烈搅拌下的上述混合物,颜色立即从蓝色变到亮黄色;所得混合物继续搅拌30分钟,离心,分别用超纯水和无水乙醇洗几次,并在60 °C烘箱中干燥4小时;加入0.5 ~ 4.0 mL、0.05 mol/L的氯化钡溶液,磁力搅拌30分钟,离心洗涤;

[0058] (2)氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记检测抗体溶液的制备

[0059] 将1 mL浓度为2 mg/mL氧化亚铜/钡纳米粒子的溶液与1 mL浓度为1.0 $\mu\text{g/mL}$ 检测抗体混合,震荡12小时,滴加1.0 mL、质量分数为2.0%的牛血清白蛋白溶液,继续震荡12小时,离心,用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液洗涤,得到氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体孵化物,将其分散于1 mL、pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液中,制得氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体溶液,于4 °C冰箱中储存备用。

[0060] 实施例6氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体溶液的制备方法

[0061] (1)氧化亚铜掺杂钡纳米粒子的制备

[0062] 在烧杯中,将0.100 ~ 0.300 g乙酸铜溶于20 ~ 60 mL超纯水中,磁力搅拌,得到澄清的溶液;4.0 ~ 12.0 mL、0.1 mol/L的 $N_2H_4 \cdot H_2O$ 溶液快速加入到剧烈搅拌下的上述混合物,颜色立即从蓝色变到亮黄色;所得混合物继续搅拌30分钟,离心,分别用超纯水和无水乙醇洗几次,并在60 °C烘箱中干燥4小时;加入0.5 ~ 4.0 mL、0.05 mol/L的氯化钡溶液,磁力搅拌30分钟,离心洗涤;

[0063] (2)氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记检测抗体溶液的制备

[0064] 将加入氯化钡制备的1 mL浓度为3 mg/mL氧化亚铜/钡纳米粒子的溶液与1 mL浓度为1.5 μg/mL检测抗体混合,震荡12小时,滴加1.5 mL、质量分数为3.0%的牛血清白蛋白溶液,继续震荡12小时,离心,用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液洗涤,得到氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体孵化物,将其分散于1 mL、pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液中,制得氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的检测抗体溶液,于4 °C冰箱中储存备用。

[0065] 实施例7前列腺抗原的检测步骤

[0066] (1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试,铂丝电极为辅助电极,饱和甘汞电极为参比电极,所制备的修饰电极为工作电极,在10 mL、pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

[0067] (2) 选择计时电流法对前列腺抗原进行检测,将输入电压设置为-0.4 V,取样间隔设置为0.1秒,运行时间设置为200秒;

[0068] (3) 背景电流趋于稳定后,每隔50秒向磷酸盐缓冲溶液中注入10 μL浓度为5 mol/L的过氧化氢溶液,然后记录电流随时间的变化,绘制工作曲线;

[0069] (4) 将待测样品溶液代替前列腺抗原标准溶液进行检测。

[0070] (5) 该电化学免疫传感器对前列腺抗原检测线性范围为 $10^{-5} \sim 100$ ng/mL,检测限2 fg/mL。

专利名称(译)	一种基于氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN105699464B	公开(公告)日	2018-04-13
申请号	CN201610125971.8	申请日	2016-03-05
[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	褚衍广 魏琴 马洪敏 吴丹 张勇 庞雪辉		
发明人	褚衍广 魏琴 马洪敏 吴丹 张勇 庞雪辉		
IPC分类号	G01N27/416 G01N33/53		
CPC分类号	G01N27/416 G01N33/53		
审查员(译)	陈洋		
其他公开文献	CN105699464A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于氧化亚铜掺杂钡纳米粒子标记的免疫传感器的制备方法及应用。属于新型功能材料与生物传感检测技术领域。本发明具体是采用在制备氧化亚铜纳米粒子的基础上，原位还原氧化钡形成氧化亚铜掺杂钡纳米粒子的复合物，并研究了最佳掺杂量，实现了对前列腺抗原的高灵敏检测，对前列腺的早期诊断具有重要的意义。