



(21)申请号 201710513898.6

(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 107422018 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 胡慧祯 潘登 张明明
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 27/403(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件

CN 105424776 A, 2016.03.23,

CN 105158479 A, 2015.12.16,

CN 102749442 A, 2012.10.24,

Huizhen Hu, et al..A

photoelectrochemical immunoassay for

tumor necrosis factor- α using a GO-PTCNH₂ nanohybrid as a probe.《Journal of Electroanalytical Chemistry》.2018,第824卷

Zhongyuan Liu, et al..Highly sensitive, reagentless amperometric immunosensor based on a novel redox-active organic-inorganic composite film.《Sensors and Actuators B》.2008,第134卷

Liuliu Gao, et al..Ultrasensitive electrochemical biosensor based on graphite oxide, Prussian blue, and PTC-NH₂ for the detection of α 2,6-sialylated glycans in human serum.《Biosensors and Bioelectronics》.2014,第62卷

Jing Zhang, et al..A novel immunosensor for detection of beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase in serum based on gold nanoparticles loaded on Prussian blue-based hybrid nanocomposite film.《Electrochimica Acta》.2015,第156卷

审查员 徐妍妍

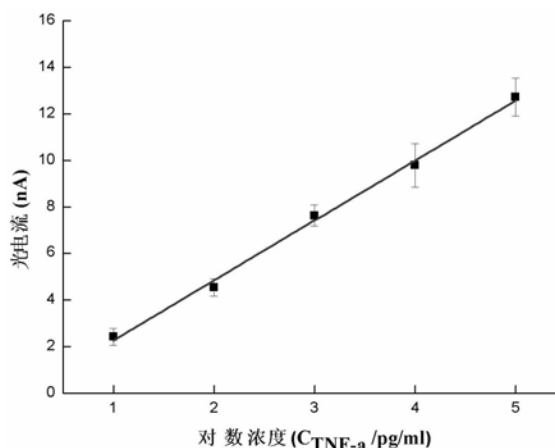
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种检测TNF- α 的光电免疫传感器及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种检测TNF- α 的光电免疫传感器及其制备方法和应用,光基底电极表面依次经GO-PTC-NH₂溶液、anti-TNF- α 溶液修饰,所述基底电极为玻碳电极或氧化铟锡半导体电极。本发明利用GO-PTC-NH₂纳米复合物制备光电免疫生物传感器用于肿瘤标志物检测的方法,与传统的酶联免疫吸附以及PCR等方法相比具有操作简便、技术要求低、反应迅速的特点,所使用的光电探针摒弃了传统金属材料等的光腐蚀等弊端,稳定性较好且负载量大,功能化基团多,便于修饰。



1. 一种检测TNF- α 的光电免疫传感器的制备方法,其特征在于,基底电极表面依次经GO-PTC-NH₂溶液、anti-TNF- α 溶液修饰;具体包括以下步骤:

(1) 基底电极预处理;

(2) 将GO-PTC-NH₂溶液滴加到步骤(1)得到的电极表面,室温放置20~24h,用去离子水清洗,晾干;

(3) 向步骤(2)得到的电极表面滴加戊二醛溶液,然后用去离子水清洗,清洗后将Anti-TNF- α 溶液滴加到电极表面进行孵育,然后用体积分数为0.05%PBST溶液清洗,晾干;

(4) 向步骤(3)得到的电极表面滴加BSA溶液和PEG 20000溶液,室温封闭30min,用体积分数为0.05%PBST溶液清洗,晾干。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中孵育温度为4℃,孵育时间为12h。

一种检测TNF- α 的光电免疫传感器及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学检测领域,具体涉及一种检测TNF- α 的光电免疫传感器及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 肿瘤标志物是在癌症患者的肿瘤或血液、尿液等其他体液中可以检测到的分子变化,检测其含量变化可以作为对疾病的诊断和预后指标,用于疗效观察及监测有无复发。现在的酶联免疫法等临床分析技术大都只能检测到较明显的变化导致疾病很少能够在早期发现并且进行干预治疗,因此找到更为灵敏与特异的检测微量抗原的方法与平台就显得尤为重要。光电化学传感器依据光被半导体电极、金属材料或电极周围溶液中的反应剂吸收后体现出的光能与电能和化学能的转换,在生命分析领域具有强大的应用前景,并且其灵敏度高、检测限低、成本低、反应快、特异性强,有望实现肿瘤等疾病早期检测与诊断。

[0003] 羧基化石墨烯(GO)是将氧化石墨烯分子环氧基活化成羧基加以利用的碳功能化材料,通过引入更多极性基团羧基解决了石墨烯本身由于高表面积而容易团聚的问题,同时也增强了该材料的可修饰性,使其不仅可以凭借强大的 π - π 共轭与材料复合同样也可以依靠羧基化基团与其他生物分子共价结合,并且具有良好的生物相容性,成为传感器构建中候选材料之一。氨基化茚四羧酸PTC-NH₂作为3,4,9,10-茚四羧酸二酐(PTCDA)的氨基化产物,具有氨基和共轭芳烃结构,同时也有优异的电子传输与光电响应特性,可以作为增强光电信号的核心材料。基于多羧基化氧化石墨烯GO与氨基化茚四羧酸PTC-NH₂复合物为光电探针(GO-PTC-NH₂),利用了碳纳米材料氧化石墨烯GO的高比表面积和羧基化官能团以及PTC-NH₂材料的优异光电转化性质、氨基化官能团的优势,形成一个具有较强光电转化效率的光电探针。两者之间通过强烈的 π - π 共轭以及静电相互作用紧密嵌合,使得GO片层负载大量的PTC-NH₂分子,其中前者提供羧基以及作为载体负载更多的信号材料和识别分子,后者提供氨基且嵌入氧化石墨烯片层中增强导电性及提供光电活性。凭借该纳米信号复合物自然光下的优异光电活性进行光电信号转导,用作传感器基底材料实现对后续分子的检测。

[0004] 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)能杀伤和抑制肿瘤细胞,抗感染,并参与某些自身免疫病的病理损伤。该痕量物质含量的细微变化对于疾病的早期诊断、药物疗效评定或者健康状况评估都有一定的指导作用。因此本体系所构建传感器被首先用于TNF- α 光电化学检测,该过程中通过光电流变化评价靶标物浓度的依据主要是空间位阻与绝缘大分子对于电解液与电极表面进行电子传递能力的削弱影响。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种利用羧基化氧化石墨烯(GO)以及氨基化茚四羧酸

[0006] (PTC-NH₂)复合物制备光电免疫生物传感器用于肿瘤标志物检测的方法。即首先通过强烈的 π - π 共轭以及静电相互作用使得大量PTC-NH₂分子紧密嵌合负载在GO片层表面,形成一个导电性良好且具有优异光电活性的纳米信号复合物;之后将该光电探针用作传感

器基底材料进而负载锚定大量的anti-TNF- α 识别分子构成捕获层;最后凭借抗原抗体之间特异的识别,检测待测液中靶标物TNF- α 的含量。

[0007] 此方法的优点在于采用光电化学免疫传感增强了灵敏度,同时使用无机碳纳米材料与有机分子结合构成的探针,增强了生物相容性,性质稳定且反应位点充足。利用该方式制备的光电免疫传感器操作简便,反应迅速,灵敏度高,能够实现对于痕量抗原的检测,为开发出性能更优异的光电探针以及平台用于临床诊断提供思路。

[0008] 本发明中技术术语的缩写如下:

[0009] 羧基化氧化石墨烯:GO;氨基化花四羧酸:PTC-NH₂;TNF- α 抗体:anti-TNF- α ;氧化铟锡半导体电极:ITO;玻碳电极:GCE;花四羧酸二酐:PTCDA。

[0010] 为实现上述目的,本发明的技术方案如下:

[0011] 一种检测TNF- α 的光电免疫传感器的制备方法,基底电极表面依次经GO-PTC-NH₂溶液、anti-TNF- α 溶液修饰。

[0012] 优选地,所述基底电极为玻碳电极或氧化铟锡半导体电极。

[0013] 所述GO-PTC-NH₂溶液按如下步骤制备:

[0014] 称取GO和PTC-NH₂在1×PBS溶液中溶解,超声分散后将混合溶液在室温反应20~24h,得到GO-PTC-NH₂溶液。

[0015] 优选地,GO和PTC-NH₂研磨成细粉状,所述GO和PTC-NH₂的质量比为1:1。GO和PTC-NH₂在PBS溶液中的浓度为0.25mg/ml。

[0016] 所述PTC-NH₂按如下步骤制备:将PTCDA溶解于乙醇中,混合均匀,逐滴加入乙二胺,室温搅拌反应24h,离心,将沉淀分别用无水乙醇、超纯水清洗至滤液无色,烘干后得到PTC-NH₂。

[0017] 所述PTCDA和乙二胺的比例为1g:10ml;PTCDA和乙醇的比例为1g:5ml。

[0018] 更优选地,所述PTC-NH₂按如下步骤制备:

[0019] 称取0.5g PTCDA溶解于2.5ml乙醇,此时红色溶液,室温600rpm磁力搅拌1h后向其缓慢逐滴加入乙二胺试剂5ml,可观察到溶液变成紫色,继续搅拌反应24h。将所得溶液离心之后取沉淀,分别用无水乙醇、超纯水清洗三次至滤液基本无色,期间以超声方式溶解沉淀。清洗完成后将沉淀置于烘箱37℃干燥2天,所得紫黑色固体即为PTC-NH₂,将其转移至试剂瓶遮光保存于干燥器中待用。

[0020] 一种检测TNF- α 的光电免疫传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0021] (1) 基底电极预处理;

[0022] (2) 将GO-PTC-NH₂溶液滴加到步骤(1)得到的电极表面,室温放置20~24h,用去离子水清洗,晾干;

[0023] (3) 向步骤(2)得到的电极表面滴加戊二醛溶液,然后用去离子水清洗,清洗后将Anti-TNF- α 溶液滴加到基底电极上进行孵育,然后用体积分数为0.05%PBST溶液清洗,晾干;

[0024] (4) 向步骤(3)得到的电极表面滴加BSA溶液和PEG 20000溶液,室温封闭30min,用体积分数为0.05%PBST溶液清洗,晾干。

[0025] 所述步骤(1)中ITO电极置于无水乙醇以及50%异丙醇分别超声清洗两次,每次15min。超声过程中保证整个电极每个面自始至终都处于处理液中,防止电极之间吸附。

[0026] 所述步骤(1)中GCE电极用 $0.3\mu\text{m}$ 的 Al_2O_3 浆抛光,依次置于无水乙醇、去离子水中超声清洗最后用去离子水冲洗。

[0027] 所述步骤(2)中GO-PTC- NH_2 溶液的浓度为 0.25mg/ml ,是以溶液中GO的浓度计算。GO-PTC- NH_2 溶液是过量的,未结合的用去离子水清洗。

[0028] 所述步骤(3)中戊二醛溶液中溶剂为去离子水,戊二醛浓度为 25mg/ml ;Anti-TNF- α 溶液中溶剂为 $1\times\text{PBS}$ 缓冲液,Anti-TNF- α 的浓度为 $1\mu\text{g/ml}$;PBST溶液的溶剂为 $1\times\text{PBS}$ 缓冲液。戊二醛溶液和Anti-TNF- α 溶液是过量的。

[0029] 优选地,所述步骤(3)中孵育温度为 4°C ,孵育时间为 12h 。

[0030] 所述步骤(4)中BSA溶液的溶剂为 $1\times\text{PBS}$ 缓冲液,BSA浓度为 10mg/ml ;PEG 20000溶液的溶剂为去离子水,PEG 20000的浓度为 50mg/ml 。BSA溶液和PEG 20000溶液是过量的。

[0031] 上述任一种制备方法制备得到的光电免疫传感器。

[0032] 上述光电免疫传感器在定量检测TNF- α 中的应用。

[0033] 有益效果:本发明利用氧化石墨烯以及氨基化花四羧酸纳米复合物制备光电免疫生物传感器用于肿瘤标志物检测的方法,与传统的酶联免疫吸附以及PCR等方法相比具有操作简便、技术要求低、反应迅速的特点,所使用的光电探针摒弃了传统金属材料等的光腐蚀等弊端,稳定性较好且负载量大,功能化基团多,便于修饰。反映了GO-PTC- NH_2 在光电化学领域应用的广阔前景以及该传感器用于痕量标志物检测的可行性,为开发出性能更优异的光电探针以及平台用于临床诊断提供了思路。

附图说明

[0034] 图1为信号复合物的光电活性检测电流-时间图;

[0035] 图2为光电极免疫传感器组装过程中电极表面阻抗监测图;

[0036] 图3为抗原浓度与光电流强度之间的线性关系图。

具体实施方式

[0037] 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,而不应也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

[0038] 实施例1 GO-PTC- NH_2 的制备

[0039] 用分析天平称取GO以及PTC- NH_2 各 0.5mg ,于精密研钵中将其仔细研磨充分混合成为细粉状,转移至 $2\text{ml } 1\times\text{PBS}$ 缓冲液中溶解。经过 30min 超声分散后,将混合溶液在室温下连续搅拌反应 $20\sim 24\text{h}$,得到 0.25mg/ml GO-PTC- NH_2 溶液,溶液呈紫红色,避光放置于 4°C 冰箱中待用。

[0040] 实施例2信号复合物的光电活性检测

[0041] (1) 仪器:上海辰华电化学工作站(chi660e软件),氙灯光源,万用电表

[0042] (2) 材料及试剂:

[0043] 电极:ITO,规格为 $5\text{cm}\times 1\text{cm}$

[0044] 电解液: 50mM 抗坏血酸的磷酸盐缓冲液

[0045] 试剂: 0.25mg/ml GO溶液(溶剂 $1\times\text{PBS}$ 缓冲液)、 0.25mg/ml PTC- NH_2 溶液(溶剂 $1\times$

PBS缓冲液)、0.25mg/ml GO-PTC-NH₂溶液(溶剂1×PBS缓冲液)

[0046] (3) 方法:

[0047] 电极处理:ITO电极置于无水乙醇以及50%异丙醇水溶液中分别超声清洗两次,每次15min。超声过程中保证整个电极每个面自始至终都处于处理液中,防止电极之间吸附。完全处理之后取出电极于烘箱中37℃干燥之后用万用电表测试正反并做标记待用,清除其表面残余的玻璃碎屑以及其他油脂等杂质同时提高电极表面亲水性能便于其之后的修饰。

[0048] 滴样:分别滴加10μl 0.25mg/ml GO溶液、0.25mg/ml PTC-NH₂溶液、0.25mg/ml GO-PTC-NH₂于电极正面固定区域,室温避光静置24h后检测电极的光电流强度。

[0049] 测试:氙灯光源系统提供光照,利用电化学工作站三电极体系,观察电极表面电流在光照下的强度与其无光照时的差异,比较几种试剂光电活性。

[0050] (4) 结果:

[0051] 信号复合物的光电活性检测结果如图1所示,a为ITO电极的光电流强度,b为经GO修饰的ITO电极的光电流强度,c为经GO-PTC-NH₂修饰的ITO电极的光电流强度,d为经PTC-NH₂修饰的ITO电极的光电流强度。c曲线所对应的GO-PTC-NH₂的电流信号是最优异的,充分证明了PTC-NH₂分子本身能够产生较强的光电流,而GO的大表面积以及两者之间的共轭结合使得该光电活性得到了明显的增强。

[0052] 该实验的主要目的是为了证明所选取纳米复合物优异的光电活性,证实其在形成复合物过程中光电性质得到了增强。可用做传感器组装的基底材料,进行信号变化的指示。

[0053] 实施例3光电免疫传感器的制备方法

[0054] (1) 信号层固定

[0055] 将GO-PTC-NH₂复合物在室温下超声30min使其成为均匀分散液,GO-PTC-NH₂的浓度为0.25mg/mL。取10μL小心滴加于处理好的ITO电极正面,室温放置24h使其固定,此时可以观察到电极表面形成的一层薄且均匀的浅红棕色膜。反应完成后用去离子水清洗除去电极表面杂质。

[0056] (2) 锚定识别分子

[0057] 取10μl新制的25mg/ml戊二醛(GA)溶液作为交联剂,凭借其两端的醛基分别与步骤(1)得到的电极表面材料GO-PTC-NH₂的氨基以及待锚定的抗体的氨基形成shiff碱基团实现锚定步骤,该反应在室温下持续2h,戊二醛还可以加固之前形成的膜。去离子水清洗除去多余戊二醛溶液后,在电极上共价结合10μl 1μg/ml Anti-TNF-α溶液,作为识别并且捕获富集待测液中抗原的分子,共价结合的温度为4℃,孵育时间12h使其充分锚定负载在电极材料表面,便于捕获待测液中抗原,锚定步骤完成后以体积分数为0.05%PBST溶液清洗除去未结合的Anti-TNF-α。

[0058] (3) 非特异性位点封闭

[0059] 为了覆盖电极表面除抗体以外还可能与抗原结合的非特异性位点,分别量取10μl 110mg/ml BSA溶液以及50mg/ml聚乙二醇20000(PEG 20000)溶液滴加于步骤(2)得到的电极表面,室温封闭30min,防止非特异性位点结合靶标物所带来的阳性干扰,用体积分数为0.05%PBST溶液清洗除去多余试剂。

[0060] (4) 目标分子TNF-α的检测

[0061] 将待测抗原溶液10μl与步骤(3)得到的电极在室温下孵育2h,放在50mM抗坏血酸

的磷酸盐缓冲液中检测电极在孵育抗原前后的光电流变化,分析结果。

[0062] 实施例4光电免疫传感器的制备方法

[0063] 同实施例3的方法,所不同的是,基底电极为玻碳电极。

[0064] 实施例5光电免疫传感器组装过程中电极表面交流阻抗监测

[0065] (1) 仪器:上海辰华电化学工作站(chi660e软件)

[0066] (2) 材料及试剂:

[0067] 电极:GCE ($\Phi = 3\text{mm}$)

[0068] 电解液:5mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 的磷酸盐缓冲液做电解液

[0069] 试剂:0.25mg/ml GO-PTC-NH₂溶液、2.5%戊二醛溶液、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-TNF- α 溶液、10mg/ml BSA溶液、50mg/ml PEG 20000溶液、100ng/ml TNF- α 溶液。

[0070] (3) 方法:

[0071] 电极处理:GCE电极用0.3 μm 的Al₂O₃浆抛光,依次置于无水乙醇、去离子水中超声清洗,然后用去离子水冲洗,测试其氧化还原电位,控制其峰电位在80mV以下。

[0072] 传感器组装:按照实施例4进行光电免疫传感器的组装。

[0073] 测试:将每个步骤得到的电极依次于5mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 的磷酸盐缓冲液中检测其阻抗图(Electrochemical impedance spectroscopy, EIS),比较各步骤电极表面与溶液界面阻抗变化,监测传感器组装的正常进行。

[0074] (4) 结果:

[0075] 传感器组装过程中电极表面交流阻抗监测见图2, a至g曲线为电极层层组装过程中的电极表面交流阻抗曲线。其中

[0076] a为GCE的交流阻抗强度,

[0077] b为GO-PTC-NH₂/GCE交流阻抗的强度,

[0078] c代表GA/GO-PTC-NH₂/GCE的交流阻抗强度,

[0079] d代表anti-TNF- α /GA/GO-PTC-NH₂/GCE的交流阻抗强度,

[0080] e代表BSA/anti-TNF- α /GA/GO-PTC-NH₂/GCE的交流阻抗强度,

[0081] f代表PEG 20000/BSA/anti-TNF- α /GA/GO-PTC-NH₂/GCE的交流阻抗强度,

[0082] g代表TNF- α /PEG 20000/BSA/anti-TNF- α /GA/GO-PTC-NH₂/GCE的交流阻抗强度。

[0083] 由图2可知,随着电极表面材料的增多,导电性减弱,阻抗增强,反映为阻抗图中曲线半径的增大。

[0084] 该实验的主要目的是为了监测传感器组装过程的正常进行,初步证明传感器设计合理。

[0085] 实施例6抗原浓度与光电流强度之间的线性关系

[0086] (1) 仪器:上海辰华电化学工作站(chi660e软件),氙灯光源,万用电表

[0087] (2) 材料及试剂:

[0088] ITO:氧化铟锡半导体电极,规格为5cm $\times$ 1cm

[0089] 电解液:50mM抗坏血酸的磷酸盐缓冲液

[0090] 试剂:0.25mg/ml GO-PTC-NH₂溶液、25mg/ml戊二醛溶液、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-TNF- α 溶液、10mg/ml BSA溶液、50mg/ml PEG 20000溶液、0.01ng/ml $\sim$ 100ng/ml TNF- α 溶液(溶剂1 $\times$ PBS缓冲液)。

[0091] (3) 方法:

[0092] 电极处理:ITO电极处理同实施例2。

[0093] 传感器组装:按照实施例3进行光电免疫传感器的组装。不同的是步骤(4)配制不同浓度的TNF- α 标准溶液进行测定,TNF- α 标准溶液的浓度分别为0.01ng/ml、0.1ng/ml、1ng/ml、10ng/ml、100ng/ml。

[0094] 测试:氙灯光源系统提供光照,利用电化学工作站三电极体系,观察电极表面电流在光照下的强度,比较加抗原前后光电流强度变化,分析光电流强度变化与抗原浓度关系。

[0095] (4) 结果:

[0096] 抗原浓度与光电流强度之间的线性关系图如图3所示,传感器组装完成后对从0.01ng/ml~100ng/ml不同浓度的待测抗原标准液进行了检测,抗原出现前后传感器界面光电流强度都得到了记录,通过分析发现随着抗原浓度的增强,光电流变化也随之增强,且增强的幅度与抗原对数浓度呈现较好的线性关系,抗原的线性范围为0.01ng/ml~100ng/ml,最低检测限为3.3pg/ml,可以实现痕量抗原的检测且灵敏度高。

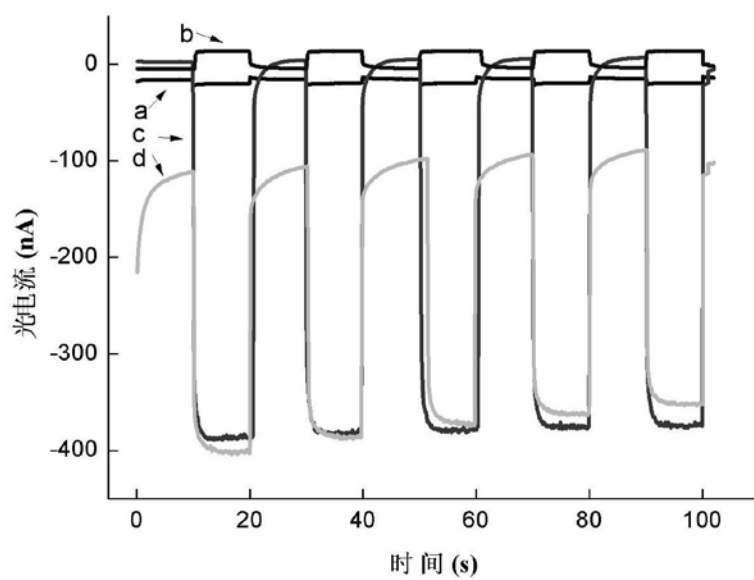


图1

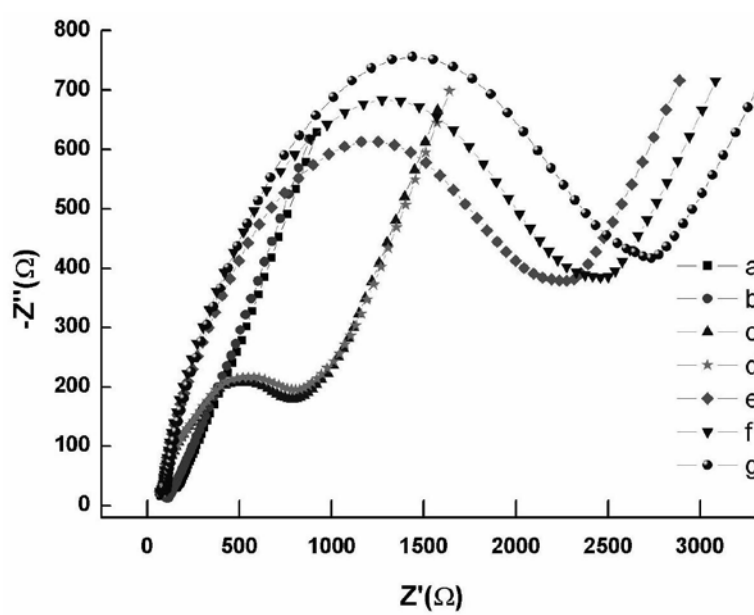


图2

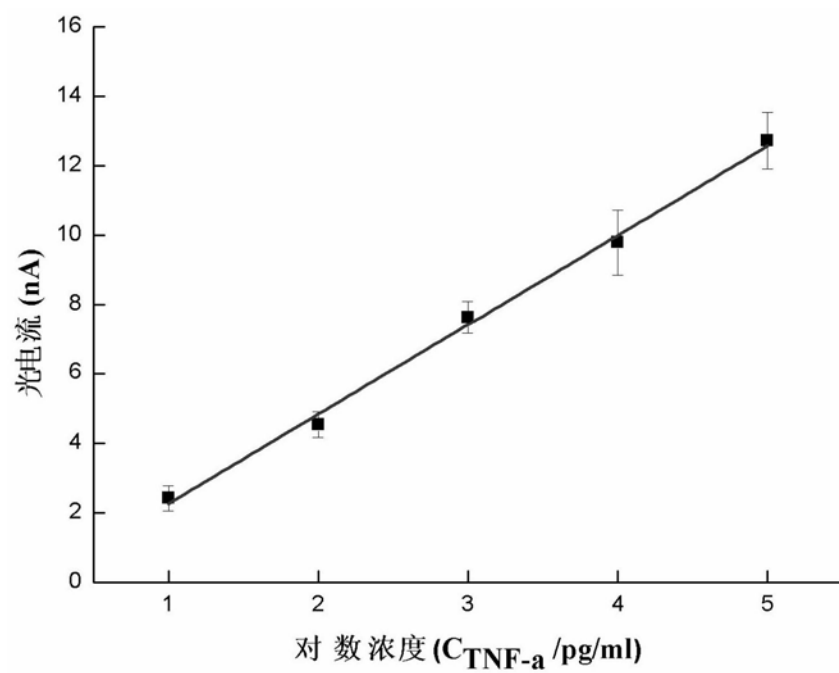


图3

专利名称(译)	一种检测TNF- α 的光电免疫传感器及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN107422018B	公开(公告)日	2019-06-18
申请号	CN2017110513898.6	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 胡慧祯 潘登 张明明 张袁健		
发明人	沈艳飞 胡慧祯 潘登 张明明 张袁健		
IPC分类号	G01N27/403 G01N33/53		
CPC分类号	G01N27/403 G01N33/53		
审查员(译)	徐妍妍		
其他公开文献	CN107422018A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测TNF- α 的光电免疫传感器及其制备方法和应用，光基底电极表面依次经GO-PTC-NH₂溶液、anti-TNF- α 溶液修饰，所述基底电极为玻碳电极或氧化铟锡半导体电极。本发明利用GO-PTC-NH₂纳米复合物制备光电免疫生物传感器用于肿瘤标志物检测的方法，与传统的酶联免疫吸附以及PCR等方法相比具有操作简便、技术要求低、反应迅速的特点，所使用的光电探针摒弃了传统金属材料等的光腐蚀等弊端，稳定性较好且负载量大，功能化基团多，便于修饰。

