



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102967706 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 03

(21) 申请号 201210472350. 9

(22) 申请日 2012. 11. 21

(73) 专利权人 济南大学

地址 250022 山东省济南市市中区济微路 106 号

(72) 发明人 颜梅 楚成超 葛慎光 葛磊 张彦 王盼盼 李伟平 李龙 李蒙 刘芳 刘伟艳 王衍虎 于京华

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006. 01)

G01N 21/76 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

- CN 1595160 A, 2005. 03. 16, CN 101358977 A, 2009. 02. 04, CN 101441212 A, 2009. 05. 27, CN 102707049 A, 2012. 10. 03, US 2011/0237862 A1, 2011. 09. 29, WO 2005/094231 A2, 2005. 10. 13, WO 2009/154425 A2, 2009. 12. 23,

Lingling Wang et al. Sandwich-type amperometric immunosensor for human immunoglobulin G using antibody-adsorbed Au/SiO2 nanoparticles. 《Microchim Acta》. 2010,

王群. Fe3O4/ZnSe/SiO2 复合纳米微球的制备与表征. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库》. 2011,

Hengguo Wang et al. Layer-by-Layer Assembled Fe3O4@CdTe Core/Shell Microspheres as Separable Luminescent Probe for Sensitive Sensing of Cu2+ Ions. 《Langmuir》. 2011, 第 27 卷 (第 18 期),

周魁等. 表面改性磁性 Fe3O4/SiO2 复合微球的制备与表征. 《有机硅材料》. 2011, 第 25 卷 (第 3 期),

审查员 舒霏霏

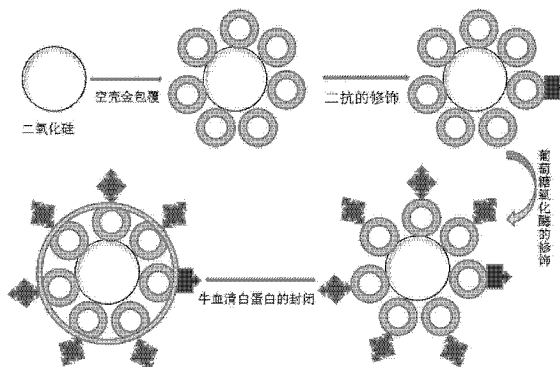
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

检测肿瘤标志物流动注射化学发光免疫传感器的制备及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种肿瘤标志物流动注射化学发光检测的传感器。该传感器的制备，包括以下步骤：利用聚甲基丙烯酸甲酯制备流动注射化学发光流通池；按照现有方法制备出碳量子点，碳包覆的四氧化三铁，二氧化硅和空壳金纳米粒子；将碳量子点包覆在磁性粒子表面；将一抗修饰在包覆碳量子点的磁性粒子上；将空壳金纳米粒子修饰在二氧化硅上；将二抗修饰在包覆在二氧化硅表面的空壳金粒子上；利用流动注射进行化学发光检测。本发明的传感器特异性强，灵敏度高，操作简单，检测线低。



CN 102967706 B

1. 一种检测肿瘤标志物的流动注射化学发光传感器的制备方法,其包括以下步骤:
 - (1) 利用聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)制备流动注射化学发光流通池;
 - (2) 按照现有方法制备出碳量子点,碳包覆的四氧化三铁,二氧化硅和空壳金纳米粒子;
 - (3) 将发光碳量子点修饰在碳包覆的四氧化三铁上,然后将一抗修饰在表面;
 - (4) 将空壳金纳米粒子修饰在二氧化硅粒子上,然后将二抗和葡萄糖氧化酶修饰在空壳金粒子上;
 - (5) 将制作好的化学发光传感器结合流动注射化学发光仪对免疫标记物进行检测。
2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:所述的发光碳量子点修饰碳包覆四氧化三铁及空壳金包覆二氧化硅的制备包括以下步骤:
 - (1) 碳包覆四氧化三铁的制备:将四氧化三铁浸入到硝酸溶液中超声 10 min,后通过磁铁的作用进行分离,二次水冲洗,然后在 5% 的葡萄糖溶液中超声 10 min,二次水冲洗,最后四氧化三铁的水溶液在高压釜中以 180 °C 中反应 10 h;
 - (2) 碳量子点的制备:在 pH 7.0 的磷酸缓冲溶液(PBS)中,以石墨电极为工作电极,银/氯化银电极为参考电极,铂电极为对电极,在 $-3.0 \text{ V} \sim 3.0 \text{ V}$ 电压范围以 0.1 V/s 的扫速反应 24 h,离心分离,二次水冲洗;
 - (3) 将(1)制备的碳包覆四氧化三铁浸入到 0.20% 邻苯二甲酸二乙二醇二丙烯酸酯(PDDA)中搅拌 20 min 使其表面带上正电,然后通过磁铁的作用进行分离,二次水冲洗;
 - (4) 将(3)得到的碳包覆四氧化三铁浸入到(2)得到的碳量子点溶液中并搅拌 20 min 形成一碳量子点层;
 - (5) 重复以上(3)(4)过程可以得到需要的量子点层数;
 - (6) (5)中制得碳量子点包覆磁性粒子浸入到 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)溶液中 20 min,然后通过磁铁的作用进行分离,PBS 冲洗后将一抗加入,反应 20 min,最后加入牛血清白蛋白(BSA)封闭活性位点,制备好的溶液保存在 4 °C 的冰箱中待用;
 - (7) 二氧化硅的制备:将 3 mL 的正硅酸四乙酯(TEOS)加入到 40 mL 的乙醇中搅拌 10 min 得到 TEOS 的均匀溶液 B,将 4 mL 的氨水加入到 40 mL 的乙醇中搅拌 10 min 得到氨水的均匀溶液 A,将 B 液缓慢加入到 A 液中,搅拌 12 h,离心分离,二次水冲洗;
 - (8) 空壳金粒子的制备:在 2.5 mL 4.8 mM 的氯金酸中加入 25 mL 10 mM 四甲基溴化磷搅拌 5 min,然后再加入 0.2 mL 0.5 M 的硼氢化钾搅拌 10 min,离心分离,二次水冲洗;
 - (9) 将(7)制得的二氧化硅纳米粒子浸入 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)中并搅拌 1 h,离心分离,二次水冲洗;
 - (10) 将(9)离心的二氧化硅浸入到(8)制得空壳金粒子中并搅拌 1h,离心分离,二次水冲洗;
 - (11) 将(10)制备粒子中加入二抗和葡萄糖氧化酶中 30 min,最后用 BSA 封闭活性位点,制备好的溶液保存在 4 °C 的冰箱中待用;
 - (12) 利用流动注射在磁铁的作用下依次注入修饰一抗的磁性粒子,抗原,修饰二抗的复合粒子,最后通入葡萄糖溶液和硝酸的混合溶液进行化学发光的测定。

检测肿瘤标志物流动注射化学发光免疫传感器的制备及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫标记物检测技术领域,更具体的说是一种流动注射化学发光免疫传感器的制备本发明还涉及采用所述的流动注射化学发光传感器测免疫标记物的方法。

背景技术

[0002] 近年来,免疫分析是临床检验中一项重要的肿瘤疾病的诊治手段。一直以来,恶性肿瘤也就是癌症都是人类健康和生命安全的一个严重威胁。癌症细胞,是指一些拥有分裂潜能的细胞在致癌因素的作用下发生了恶性转化和克隆性增生而产生的一种新生物。并且癌细胞除了自身的生长失控外,还会侵入周遭正常组织甚至可以经由体内的循环系统或者淋巴系统转移到身体的其他部分,从而引起身体病变甚至死亡。所以,癌症早期的诊断和及早的治疗具有重要的意义。但是癌症早期的抗原含量较低很难被发现,低含量的抗原的测定成为了分析人员的重要追求。

[0003] 免疫分析法是利用抗体与抗原特异性结合反应检测各种物质(药物、激素、蛋白质、微生物等)的高选择性生物化学方法。近年来,随着现代生物传感器技术的不断发展,免疫分析在食品安全、临床诊断、微生物检验、药物分析与环境监测等领域得到了广泛的应用。免疫分析包括非标记性免疫分析和标记性免疫分析。非标记免疫包括免疫扩散和免疫电泳,是可溶性的抗原和相对应的抗体在溶液或凝胶中进行接触,从而形成一种不溶性抗原-抗体复合物进行分离的技术。标记性免疫分析技术是采用光电物质、同位素或酶等示踪物质来标记抗体(或抗原)进行抗原-抗体反应,通过对免疫复合物中的标记物信号的测定,从而达到对免疫反应进行监测的目的。标记性免疫分析技术放射免疫分析、酶联免疫吸收分析、毛细管电泳化学发光免疫分析、高效液相色谱化学发光免疫分析、微流控芯片化学发光免疫分析、电化学免疫分析、电致发光免疫分析、荧光免疫技术、胶体金免疫技术和铁蛋白免疫技术等。但是这些免疫分析方法一般耗时较长并且拥有繁琐的加样、温育、洗涤等操作过程,而且操作人员和免疫物质的接触较多,可能对操作的人员的身体健康造成危害。而且有些测定速度快、灵敏度高、检测性低的检测手段需要仪器昂贵,不能在发展中国家普及。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是提供了一种灵敏度高、检测速度快、试剂用量少,检测肿瘤标志物的流动注射化学发光传感器。

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明是通过以下措施来实现的:一种检测检测肿瘤标志物的流动注射化学发光传感器的制备方法,其包括以下步骤:

[0006] (1) 利用聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)制备流动注射化学发光流通池;

[0007] (2) 按照现有方法制备出碳量子点,碳包覆的四氧化三铁,二氧化硅和空壳金纳米粒子;

[0008] (3) 将发光碳量子点修饰在碳包覆的四氧化三铁上,然后将一抗修饰在表面;

[0009] (4) 将空壳金纳米粒子修饰在二氧化硅粒子上,然后将二抗和葡萄糖氧化酶修饰在空壳金粒子上;

[0010] (5) 将制作好的化学发光传感器结合流动注射化学发光仪对免疫标记物进行检测。

[0011] 本发明所述发光碳量子点修饰碳包覆四氧化三铁及空壳金包覆二氧化硅的制备包括以下步骤:

[0012] (1) 碳包覆四氧化三铁的制备:将四氧化三铁浸入到硝酸溶液中超声 10 min,后通过磁铁的作用进行分离,二次水冲洗,然后在 5% 的葡萄糖溶液中超声 10 min,二次水冲洗,最后四氧化三铁的水溶液在高压釜中以 180 °C 中反应 10 h;

[0013] (2) 碳量子点的制备:在 pH 7.0 的磷酸缓冲溶液(PBS)中,以石墨电极为工作电极,银/氯化银电极为参考电极,铂电极为对电极,在 -3.0 V~3.0 V 电压范围以 0.1 V/s 的扫速反应 24 h,离心分离,二次水冲洗;

[0014] (3) 将(1)制备的碳包覆四氧化三铁浸入到 0.20% 邻苯二甲酸二乙二醇二丙烯酸酯(PDDA)中搅拌 20 min 使其表面带上正电,然后通过磁铁的作用进行分离,二次水冲洗;

[0015] (4) 将(3)得到的碳包覆四氧化三铁浸入到(2)得到的碳量子点溶液中并搅拌 20 min 形成一碳量子点层;

[0016] (5) 重复以上(3)(4)过程可以得到需要的量子点层数;

[0017] (6) (5)中制得碳量子点包覆磁性粒子浸入到 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)溶液中 20 min,然后通过磁铁的作用进行分离,PBS 冲洗后将一抗加入,反应 20 min,最后加入牛血清白蛋白(BSA)封闭活性位点,制备好的溶液保存在 4 °C 的冰箱中待用;

[0018] (7) 二氧化硅的制备:将 3 mL 的正硅酸四乙酸(TEOS)加入到 40 mL 的乙醇中搅拌 10 min 得到 TEOS 的均匀溶液 B,将 4 mL 的氨水加入到 40 mL 的乙醇中搅拌 10 min 得到氨水的均匀溶液 A,将 B 液缓慢加入到 A 液中,搅拌 12 h,离心分离,二次水冲洗;

[0019] (8) 空壳金粒子的制备:在 2.5 mL 4.8 mM 的氯金酸中加入 25 mL 10 mM 四甲基溴化磷搅拌 5 min,然后再加入 0.2 mL 0.5 M 的硼氢化钾搅拌 10 min,离心分离,二次水冲洗;

[0020] (9) 将(7)制得的二氧化硅纳米粒子浸入 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)中并搅拌 1 h,离心分离,二次水冲洗;

[0021] (10) 将(9)离心的二氧化硅浸入到(8)制得空壳金粒子中并搅拌 1h,离心分离,二次水冲洗;

[0022] (11) 将(10)制备粒子中加入二抗和葡萄糖氧化酶中 30 min,最后用 BSA 封闭活性位点,制备好的溶液保存在 4 °C 的冰箱中待用;

[0023] (12) 利用流动注射在磁铁的作用下依次注入修饰一抗的磁性粒子,抗原,修饰二抗的复合粒子,最后通入葡萄糖溶液和硝酸的混合溶液进行化学发光的测定。

[0024] 本发明中使用的洗涤溶液为 pH 7.0 PBS。

[0025] 本发明所述肿瘤标志物为甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原、CA19-9、人绒毛膜促性腺激素(HCG)。

[0026] 本发明的有益效果:

[0027] (1) 本发明利用流动注射化学发光的方法进行测定操作快速简单, 反应及结果均由仪器自动完成和记录, 避免了主观因素的影响, 并保证有很好的重复性, 便于现场检测;

[0028] (2) 利用磁性四氧化三铁作为开关进行流动注射的固定, 并且四氧化三铁被碳包覆, 使得四氧化三铁磁性不受外界的影响以及表面带上大量羧基;

[0029] (3) 利用碳量子点作为发光物质, 具有较好的生物相容性, 降低了发光物质对生物分析的影响;

[0030] (4) 利用空壳金包二氧化硅来修饰二抗, 可以使得相应的葡萄糖氧化酶的含量较高, 起到放大信号的作用。

附图说明

[0031] 下面结合附图和具体实施例对本发明做进一步详细描述。

[0032] 图 1 是一抗的修饰流程图。

[0033] 图 2 是二抗的修饰流程图。

具体实施方式

[0034] 一种检测检测免疫标记物的流动注射化学发光传感器的制备方法, 其包括以下步骤:

[0035] (1) 利用 PMMA 制备流动注射化学发光流通池;

[0036] (2) 按照现有方法制备出碳量子点, 碳包覆的四氧化三铁, 二氧化硅和空壳金纳米粒子;

[0037] (3) 将发光碳量子点修饰在碳包覆的四氧化三铁上, 然后将一抗修饰在表面;

[0038] (4) 将空壳金纳米粒子修饰在二氧化硅粒子上, 然后将二抗和葡萄糖氧化酶修饰在空壳金粒子上;

[0039] (5) 将制作好的化学发光传感器结合流动注射化学发光仪对免疫标记物进行检测。

[0040] 本发明所述发光碳量子点修饰碳包覆四氧化三铁及的制备包括以下步骤:

[0041] (1) 碳包覆四氧化三铁的制备: 将四氧化三铁浸入到硝酸溶液中超声 10 min, 后通过磁铁的作用进行分离, 二次水冲洗, 然后在 5% 的葡萄糖溶液中超声 10 min, 二次水冲洗, 最后四氧化三铁的水溶液在高压釜中以 180 °C 中反应 10 h;

[0042] (2) 碳量子点的制备: 在 Ph 7.0 PBS 中, 以石墨电极为工作电极, 银 / 氯化银电极为参考电极, 铂电极为对电极, 从 -3.0 V 到 3.0 V 电压范围以 0.1 V/s 的扫速反应 24 h, 离心分离, 二次水冲洗;

[0043] (3) 将(1)制备的碳包覆四氧化三铁浸入到 0.2% PDDA 中搅拌 20 min 使表面带上正电, 然后通过磁铁的作用进行分离, 二次水冲洗;

[0044] (4) 将(3)得到的碳包覆四氧化三铁浸入到(2)得到的碳量子点溶液中并搅拌 20 min 形成一碳量子点层;

[0045] (5) 重复以上(3)(4)过程可以得到需要的量子点层数;

[0046] (6) (5)中制得碳量子点包覆磁性粒子浸入到 EDC 溶液中 20 min, 然后通过磁铁的作用进行分离, PBS 冲洗然后将一抗加入, 最后加入 BSA 封闭活性位点, 制备好的溶液保存

在 4℃ 的冰箱中待用；

[0047] (7) 二氧化硅的制备：将 3 mL 的 TEOS 加入到 40 mL 的乙醇中搅拌 10 min 得到 TEOS 的均匀溶液 B，将 4 mL 的氨水加入到 40 mL 的乙醇中搅拌 10 min 得到氨水的均匀溶液 A，将 B 液缓慢加入到 A 液中，搅拌 12 h，离心分离，二次水冲洗；

[0048] (8) 空壳金粒子的制备：在 2.5 mL 4.8 mM 的氯金酸中加入 25 mL 10 mM 四甲基溴化磷搅拌 5 min，然后再加入 0.2 mL 0.5 M 的硼氢化钾搅拌 10 min，离心分离，二次水冲洗；

[0049] (9) 将(7)制得的二氧化硅纳米粒子浸入 APTES 中并搅拌 1 h，离心分离，二次水冲洗；

[0050] (10) 将(9)离心的二氧化硅浸入到(8)制得空壳金粒子中并搅拌 1h，离心分离，二次水冲洗；

[0051] (11) 将(10)制备粒子中加入二抗和葡萄糖氧化酶中 30 min，最后用 BSA 封闭活性位点，制备好的溶液保存在 4℃ 的冰箱中待用；

[0052] (12) 利用流动注射在磁铁的作用下依次注入修饰一抗的磁性粒子，抗原，修饰二抗的复合粒子，最后通入葡萄糖溶液和硝酸的混合溶液进行化学发光的测定。

[0053] 实施例 1 (胚胎抗原类, 如 AFP)

[0054] (1) 选择临床发病较高的 AFP 进行测定；

[0055] (2) 碳包覆四氧化三铁的制备：将四氧化三铁浸入到硝酸溶液中超声 10 min，后通过磁铁的作用进行分离，二次水冲洗，然后在 5% 的葡萄糖溶液中超声 10 min，二次水冲洗，最后四氧化三铁的水溶液在高压釜中以 180 °C 中反应 10 h；

[0056] (3) 碳量子点的制备：在 7.0 的磷酸缓冲溶液中，以石墨电极为工作电极，银 / 氯化银电极为参考电极，铂电极为对电极，在 -3.0 V~3.0 V 电压范围以 0.1 V/s 的扫速反应 24 h，离心分离，二次水冲洗；

[0057] (4) 将(2)制备的碳包覆四氧化三铁浸入到 0.2% PDDA 中搅拌 20 min 使表面带上正电，然后通过磁铁的作用进行分离，二次水冲洗；

[0058] (5) 将(4)得到的碳包覆四氧化三铁浸入到(3)得到的碳量子点溶液中并搅拌 20 min 形成一碳量子点层；

[0059] (6) 重复以上(4)(5)过程可以得到需要的量子点层数；

[0060] (7) (6)中制得碳量子点包覆磁性粒子浸入到 EDC 溶液中 20 min，然后通过磁铁的作用进行分离，PBS 冲洗然后将 AFP 一抗加入，最后加入 BSA 封闭活性位点，制备好的溶液保存在 4℃ 的冰箱中待用；

[0061] (8) 二氧化硅的制备：将 3 mL 的 TEOS 加入到 40 mL 的乙醇中搅拌 10 min 得到 TEOS 的均匀溶液 B，将 4 mL 的氨水加入到 40 mL 的乙醇中搅拌 10 min 得到氨水的均匀溶液 A，将 B 液缓慢加入到 A 液中，搅拌 12 h，离心分离，二次水冲洗；

[0062] (9) 空壳金粒子的制备：在 2.5 mL 4.8 mM 的氯金酸中加入 25 mL 10 mM 四甲基溴化磷搅拌 5 min，然后再加入 0.2 mL 0.5 M 的硼氢化钾搅拌 10 min，离心分离，二次水冲洗；

[0063] (10) 将(8)制得的二氧化硅纳米粒子浸入 APTES 中并搅拌 1 h，离心分离，二次水冲洗；

[0064] (11) 将(10)离心的二氧化硅浸入到(9)制得空壳金粒子中并搅拌 1h，离心分离，二次水冲洗；

[0065] (12)将(11)制备粒子中加入 AFP 二抗和葡萄糖氧化酶中 30 min,最后用 BSA 封闭活性位点,制备好的溶液保存在 4℃的冰箱中待用;

[0066] (12)根据流动注射在磁铁的作用下注入修饰 AFP 一抗的磁性粒子,接着注入 AFP 抗原并且反应 5 min,然后注入修饰 AFP 二抗的复合粒子,最后通入葡萄糖溶液和硝酸的混合溶液进行化学发光的测定。

[0067] AFP 流动注射化学发光传感器对人体、动物血清样品中的 AFP 进行检测,结果见表 1。利用现有的方法,制备 AFP 电化学免疫传感器,连接电化学工作站,对人体、动物血清样品提取液中的 AFP 进行实际检测,结果见表 1。

[0068] 表 1 本发明 AFP 流动注射化学发光免疫传感器与 AFP 电化学免疫传感器检测效果对比

[0069]

肿瘤标志物	传感器类型	实际样品检测	
		线性范围(mol/L)	最低检测限(mol/L)
AFP	流动注射化学发光免疫传感器	$0.1 \times 10^{-11} \sim 1.7 \times 10^{-10}$	0.4×10^{-12}
	电化学免疫传感器	$0.1 \times 10^{-10} \sim 2.3 \times 10^{-10}$	0.2×10^{-11}

[0070] 从表 1 中结果可以看出 AFP 流动注射化学发光免疫传感器比 AFP 电化学免疫传感器具有更宽的线性范围、更高的灵敏度和更低的检测限。

[0071] 实施例 2 (糖类标志物,如 CA19-9)

[0072] (1)选择临床发病较高的 CA19-9 进行测定;

[0073] (2)碳包覆四氧化三铁的制备:将四氧化三铁浸入到硝酸溶液中超声 10 min,后通过磁铁的作用进行分离,二次水冲洗,然后在 5% 的葡萄糖溶液中超声 10 min,二次水冲洗,最后四氧化三铁的水溶液在高压釜中以 180℃中反应 10 h;

[0074] (3)碳量子点的制备:在 pH 7.0 的 PBS 中,以石墨电极为工作电极,银/氯化银电极为参考电极,铂电极为对电极,从 -3.0 V~3.0 V 电压范围以 0.1 V/s 的扫速反应 24 h,离心分离,二次水冲洗;

[0075] (4)将(2)制备的碳包覆四氧化三铁浸入到 0.2% PDDA 中搅拌 20 min 使表面带上正电,然后通过磁铁的作用进行分离,二次水冲洗;

[0076] (5)将(4)得到的碳包覆四氧化三铁浸入到(3)得到的碳量子点溶液中并搅拌 20 min 形成一碳量子点层;

[0077] (6)重复以上(4)(5)过程可以得到需要的量子点层数;

[0078] (7)(6)中制得碳量子点包覆磁性粒子浸入到 EDC 溶液中 20 min,然后通过磁铁的作用进行分离,PBS 冲洗然后将 CA19-9 一抗加入,最后加入 BSA 封闭活性位点,制备好的溶液保存在 4℃的冰箱中待用;

[0079] (8)二氧化硅的制备:将 3 mL 的 TEOS 加入到 40 mL 的乙醇中搅拌 10 min 得到 TEOS 的均匀溶液 B,将 4 mL 的氨水加入到 40 mL 的乙醇中搅拌 10 min 得到氨水的均匀溶液 A,将 B 液缓慢加入到 A 液中,搅拌 12 h,离心分离,二次水冲洗;

[0080] (9)空壳金粒子的制备:在 2.5mL 4.8mM 的氯金酸中加入 25 mL 10 mM 四甲基溴化磷搅拌 5 min,然后再加入 0.2 mL 0.5 M 的硼氢化钾搅拌 10 min,离心分离,二次水冲洗;

[0081] (10)将(8)制得的二氧化硅纳米粒子浸入 APTES 中并搅拌 1 h,离心分离,二次水冲洗;

[0082] (11)将(10)离心的二氧化硅浸入到(9)制得空壳金粒子中并搅拌 1h,离心分离,二次水冲洗;

[0083] (12)将(11)制备粒子中加入 CA19-9 二抗和葡萄糖氧化酶中 30 min,最后用 BSA 封闭活性位点,制备好的溶液保存在 4℃ 的冰箱中待用;

[0084] (12)根据流动注射在磁铁的作用下注入修饰 CA19-9 一抗的磁性粒子,接着注入 CA19-9 抗原并且反应 5 min,然后注入修饰 CA19-9 二抗的复合粒子,最后通入葡萄糖溶液和硝酸的混合溶液进行化学发光的测定。

[0085] CA19-9 流动注射化学发光传感器对人体、动物血清样品中的 CA19-9 进行检测,结果见表 1。利用现有的方法,制备 CA19-9 电化学免疫传感器,连接电化学工作站,对人体、动物血清样品提取液中的 CA19-9 进行实际检测,结果见表 2。

[0086] 表 2 本发明 CA19-9 流动注射化学发光免疫传感器与 CA19-9 电化学免疫传感器检测效果对比

[0087]

肿瘤标志物	传感器类型	实际样品检测	
		线性范围(mol/L)	最低检测限(mol/L)
甲胎蛋白	电致化学发光免疫传感器	$0.5 \times 10^{-12} \sim 1.9 \times 10^{-10}$	0.1×10^{-12}
	电化学免疫传感器	$0.8 \times 10^{-10} \sim 2.6 \times 10^{-10}$	0.3×10^{-10}

[0088] 从表 2 中结果可以看出 CA19-9 流动注射化学发光免疫传感器比 CA19-9 电化学免疫传感器具有更宽的线性范围、更高的灵敏度和更低的检测限。

[0089] 实施例 3 (激素类,如 HCG)

[0090] (1)选择临床发病较高的 HCG 进行测定;

[0091] (2)碳包覆四氧化三铁的制备:将四氧化三铁浸入到硝酸溶液中超声 10 min,后通过磁铁的作用进行分离,二次水冲洗,然后在 5% 的葡萄糖溶液中超声 10 min,二次水冲洗,最后四氧化三铁的水溶液在高压釜中以 180 °C 中反应 10 h;

[0092] (3)碳量子点的制备:在 Ph 7.0 的 PBS 中,以石墨电极为工作电极,银 / 氯化银电极为参考电极,铂电极为对电极,在 $-3.0 \text{ V} \sim 3.0 \text{ V}$ 电压范围以 0.1 V/s 的扫速氧化 24 h,离心分离,二次水冲洗;

[0093] (4) 将(2)制备的碳包覆三氧化二铁浸入到 0.2% PDDA 中搅拌 20 min 使表面带上正电, 然后通过磁铁的作用进行分离, 二次水冲洗;

[0094] (5) 将(4)得到的碳包覆三氧化二铁浸入到(3)得到的碳量子点溶液中并搅拌 20 min 形成一碳量子点层;

[0095] (6) 重复以上(4)(5)过程可以得到需要的量子点层数;

[0096] (7)(6)中制得碳量子点包覆磁性粒子浸入到 EDC 溶液中 20 min, 然后通过磁铁的作用进行分离, PBS 冲洗然后将 HCG 一抗加入, 最后加入 BSA 封闭活性位点, 制备好的溶液保存在 4℃ 的冰箱中待用;

[0097] (8) 二氧化硅的制备: 将 3 mL 的 TEOS 加入到 40 mL 的乙醇中搅拌 10 min 得到 TEOS 的均匀溶液 B, 将 4 mL 的氨水加入到 40 mL 的乙醇中搅拌 10 min 得到氨水的均匀溶液 A, 将 B 液缓慢加入到 A 液中, 搅拌 12 h, 离心分离, 二次水冲洗;

[0098] (9) 空壳金粒子的制备: 在 2.5 mL 4.8 mM 的氯金酸中加入 25 mL 10 mM 四甲基溴化磷搅拌 5 min, 然后再加入 0.2 mL 0.5 M 的硼氢化钾搅拌 10 min, 离心分离, 二次水冲洗;

[0099] (10) 将(8)制得的二氧化硅纳米粒子浸入 APTES 中并搅拌 1 h, 离心分离, 二次水冲洗;

[0100] (11) 将(10)离心的二氧化硅浸入到(9)制得空壳金粒子中并搅拌 1h, 离心分离, 二次水冲洗;

[0101] (12) 将(11)制备粒子中加入 HCG 二抗和葡萄糖氧化酶中 30 min, 最后用 BSA 封闭活性位点, 制备好的溶液保存在 4℃ 的冰箱中待用;

[0102] (12) 根据流动注射在磁铁的作用下注入修饰 HCG 一抗的磁性粒子, 接着注入 HCG 抗原并且反应 5 min, 然后注入修饰 HCG 二抗的复合粒子, 最后通入葡萄糖溶液和硝酸的混合溶液进行化学发光的测定。

[0103] HCG 流动注射化学发光传感器对人体、动物血清样品中的 HCG 进行检测, 结果见表 3。利用现有的方法, 制备 HCG 电化学免疫传感器, 连接电化学工作站, 对人体、动物血清样品提取液中的 HCG 进行实际检测, 结果见表 1。

[0104] 表 3 本发明 HCG 流动注射化学发光免疫传感器与 HCG 电化学免疫传感器检测效果对比

[0105]

肿瘤标志物	传感器类型	实际样品检测	
		线性范围(mol/L)	最低检测限(mol/L)
甲胎蛋白	电致化学发光免疫传感器	$0.1 \times 10^{-11} \sim 2.2 \times 10^{-10}$	0.4×10^{-12}
	电化学免疫传感器	$0.5 \times 10^{-10} \sim 2.7 \times 10^{-10}$	0.2×10^{-10}

[0106] 从表 3 中结果可以看出: HCG 流动注射化学发光免疫传感器比 HCG 电化学免疫传感器具有更宽的线性范围、更高的灵敏度和更低的检测限。

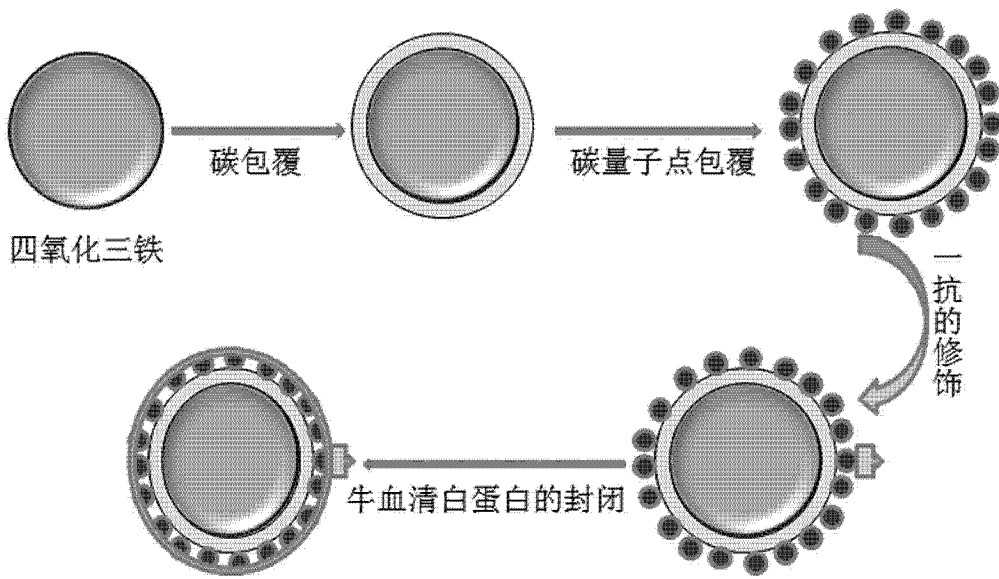


图 1

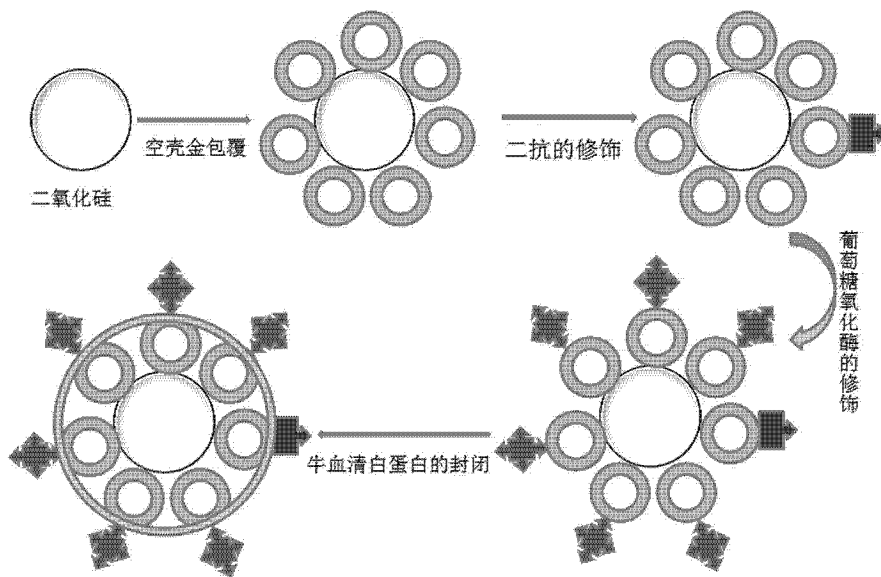


图 2

专利名称(译)	检测肿瘤标志物流动注射化学发光免疫传感器的制备及应用		
公开(公告)号	CN102967706B	公开(公告)日	2014-09-03
申请号	CN201210472350.9	申请日	2012-11-21
[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	颜梅 楚成超 葛慎光 葛磊 张彦 王盼盼 李伟平 李龙 李蒙 刘芳 刘伟艳 王衍虎 于京华		
发明人	颜梅 楚成超 葛慎光 葛磊 张彦 王盼盼 李伟平 李龙 李蒙 刘芳 刘伟艳 王衍虎 于京华		
IPC分类号	G01N33/574 G01N21/76 G01N33/531		
其他公开文献	CN102967706A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种肿瘤标志物流动注射化学发光检测的传感器。该传感器的制备,包括以下步骤:利用聚甲基丙烯酸甲酯制备流动注射化学发光流通池;按照现有方法制备出碳量子点,碳包覆的四氧化三铁,二氧化硅和空壳金纳米粒子;将碳量子点包覆在磁性粒子表面;将一抗修饰在包覆碳量子点的磁性粒子上;将空壳金纳米粒子修饰在二氧化硅上;将二抗修饰在包覆在二氧化硅表面的空壳金粒子上;利用流动注射进行化学发光检测。本发明的传感器特异性强,灵敏度高,操作简单,检测线低。

