



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113008971 A

(43)申请公布日 2021.06.22

(21)申请号 201911321158.8

(22)申请日 2019.12.19

(71)申请人 重庆医科大学

地址 400016 重庆市渝中区医学院路1号

(72)发明人 冯文莉 谢国明 彭杨

(51)Int.Cl.

G01N 27/48(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

B82Y 15/00(2011.01)

B82Y 40/00(2011.01)

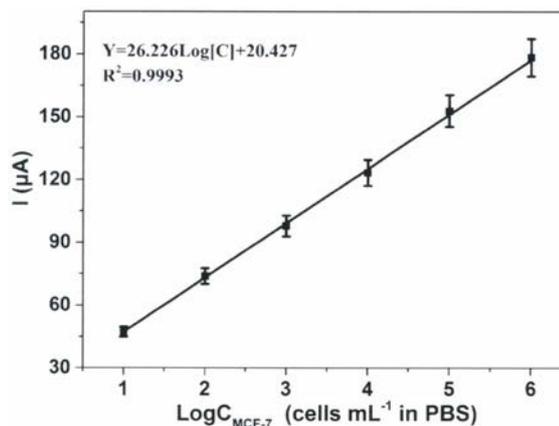
权利要求书2页 说明书6页 附图7页

(54)发明名称

一种基于PdIrBP介孔纳米球与科琴黑的循环肿瘤细胞生物传感器

(57)摘要

循环肿瘤细胞的检测和回收对监测转移和治疗效果具有重要的临床意义。在这项工作中，我们开发了一种基于纳米材料的集成电化学传感模型，以实现循环肿瘤细胞的高灵敏检测和无损收集。首次将科琴黑与金纳米颗粒结合在一起，并用于修饰金电极的表面，从而提高了电导率并增加了电极的比表面积。PdIrBP介孔纳米球和抗体结合在一起形成信号探针，用作探测标签以放大电流信号。此外，将甘氨酸盐酸用作抗体洗脱液，可从电极释放并收集捕获的循环肿瘤细胞，以用于进一步的临床研究。在 10^1 /mL到 1×10^6 /mL范围内获得的电化学信号和靶细胞浓度之间有良好的线性关系，检出限低至2/mL。因此，这种新型的细胞传感器模型具有潜在的临床应用价值，可用于癌症患者的早期诊断和预后监测。



1. 一种基于PdIrBP介孔纳米球与科琴黑的循环肿瘤细胞生物传感器,其制备方法包括以下步骤:

(1) 科琴黑的准备借助于超声搅拌将2.0mg的科琴黑分散在4.0mL的0.5wt.%的壳聚糖溶液中以获得均匀的悬浮液。

(2) 金纳米颗粒的制备将100mL的0.01%氯金酸水溶液煮沸10-15分钟,然后在剧烈搅拌和连续加热的情况下逐滴加入1mL的2.0wt.%柠檬酸钠溶液。然后将该混合溶液连续搅拌直至颜色从黄色变为深粉红色,加热停止。待冷却至室温后,以11000r/min的转速离心10分钟,洗涤收集金纳米颗粒,并在4℃下保存。

(3) PdIrBP介孔纳米球的合成将30mg双十八烷基二甲基氯化铵添加到10.0mL去离子水中,并搅拌以获得均匀的溶液。随后,将1.0mL的0.337mol/L氟化铵,1.0mL的0.101mol/L硼酸添加到之前的溶液中,然后添加金属前体0.8mL的10mmol/L氯钼酸和0.8mL的10mmol/L氯铱酸。温育5分钟后,注入0.8mL的氨水(10wt.%)以调节溶液的pH。当混合溶液的颜色从棕黄色变为无色后,将1.0mL的0.034mol/L次磷酸二氢钠混合到上述溶液中,并在95℃下磁力搅拌20分钟。最后,注入1.0mL新鲜制备的0.1mol/L二甲胺硼烷以引发还原反应,溶液的颜色逐渐演变为深棕色。在95℃下反应30分钟后,通过以8000r/min离心5分钟收集产物,并用乙醇和去离子水洗涤几次。

(4) 信号探针的制备将0.5mg聚乙二醇添加到1.0mL的PdIrBP介孔纳米球(1.0mg/mL)中。将混合物在室温下搅拌孵育3小时,然后用去离子水离心洗涤3次,最后将沉淀物分散在500μL去离子水中以备将来使用。抗体和经聚乙二醇修饰的PdIrBP纳米球通过使用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺作为偶联剂连接。将50μL上述制备的修饰过的PdIrBP介孔纳米球在室温下添加至450μL的10mmol/L PBS中,并充分搅拌。随后加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(5μL,25mM)水溶液和N-羟基琥珀酰亚胺(5μL,50mM)水溶液。20分钟后,将纳米材料用去离子水洗涤两次,然后重新分散在50μL的PBS中。随后,将50μL抗体(20mg/mL)添加到纳米球悬液中。在室温下孵育1小时后,将反应溶液储存在4℃的冰箱中以备将来使用。

(5) 生物传感器的构建将金电极(直径3mm)用0.3μm和0.05μm的氧化铝抛光至镜面状。随后分别在双蒸水,乙醇和双蒸水中交替超声处理10分钟。在室温下干燥后,将电极在新鲜制备的食人鱼液(98%硫酸:30%过氧化氢,体积比为3:1)中活化5分钟,并用超纯水彻底冲洗,在空气中干燥。将10μL步骤(1)准备好的科琴黑溶液加到电极上,并在37℃下进行干燥。用同样的方法将步骤(2)富集的金纳米颗粒滴加在已修饰了科琴黑的电极上。10μL抗体混合物(80μg/mL)滴加在修饰电极上,在37℃下加盖放置1h。用0.01mol/L的PBS缓冲液冲洗后,再加入10μL的0.3%BSA在37℃孵育1h,以封闭非特异性结合位点。所得的电极用PBS洗涤,并保存在4℃备用。

(6) 循环肿瘤细胞的检测及释放将10μL循环肿瘤细胞加到步骤(5)制备好的电极上,在37℃温育40分钟。然后将10μL步骤(4)合成的信号探针滴到电极上进行免疫反应,形成双抗夹心免疫复合物。用PBS洗净未结合在电极上的物质,检测出电极的DPV信号。

在细胞检测完成后,将电极浸入1mL甘氨酸-盐酸洗脱液(0.1mol/L)中10s,然后快速加入几滴0.4mol/L的NaOH溶液以调节pH值。在500r/min下离心5分钟后,将所得沉淀物用PBS(0.01mol/L)洗涤2-3次获得循环肿瘤细胞。

2. 如权利要求1所述的基于PdIrBP介孔纳米球与科琴黑的循环肿瘤细胞生物传感器, 其制备方法步骤(1)中所用科琴黑的浓度最好是0.5mg/mL。

3. 如权利要求1所述的基于PdIrBP介孔纳米球与科琴黑的循环肿瘤细胞生物传感器, 其制备方法步骤(2)中氯金酸水溶液的浓度最好是0.01%。

4. 如权利要求1所述的基于PdIrBP介孔纳米球与科琴黑的循环肿瘤细胞生物传感器, 其制备方法步骤(2)中柠檬酸钠溶液的浓度最好是2.0wt.%。

5. 如权利要求1所述的基于PdIrBP介孔纳米球与科琴黑的循环肿瘤细胞生物传感器, 其制备方法步骤(3)中氨水的体积最好是0.8mL。

6. 如权利要求1所述的基于PdIrBP介孔纳米球与科琴黑的循环肿瘤细胞生物传感器, 其制备方法步骤(3)中二甲胺硼烷的浓度最好是0.1mol/L。

7. 如权利要求1所述的基于PdIrBP介孔纳米球与科琴黑的循环肿瘤细胞生物传感器, 其制备方法步骤(4)中所用PdIrBP介孔纳米球的浓度最好是1.0mg/mL。

8. 如权利要求1所述的基于PdIrBP介孔纳米球与科琴黑的循环肿瘤细胞生物传感器, 其制备方法步骤(4)中抗体的浓度最好是20mg/mL。

9. 如权利要求1所述的基于PdIrBP介孔纳米球与科琴黑的循环肿瘤细胞生物传感器, 其制备方法步骤(5)中抗体混合物的浓度最好是80 μ g/mL。

10. 如权利要求1所述的基于PdIrBP介孔纳米球与科琴黑的循环肿瘤细胞生物传感器, 其制备方法步骤(6)中细胞孵育的时间最好是40分钟。

一种基于PdIrBP介孔纳米球与科琴黑的循环肿瘤细胞生物传感器

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物传感器,特别涉及一种基于新型纳米颗粒复合物和高导电炭黑材料的超灵敏检测及无损收集循环肿瘤细胞的生物传感器。

背景技术

[0002] 循环肿瘤细胞与肿瘤的转移和复发有着密切的联系,因此循环肿瘤细胞的检测对癌症患者的诊断和治疗具有重要意义,同时对循环肿瘤细胞进行收集可以用于进一步的研究从而判断患者的用药疗效、预后情况以及复发几率等。目前检测循环肿瘤细胞的方法主要包括基于细胞生物学性质的方法、直接镜检的方法以及基于细胞物理学性质的方法,在这些方法中,基于细胞生物学性质的方法最为常见,其中利用抗体捕获携带了相应抗原的循环肿瘤细胞是目前应用得最广泛的检测方法。利用该技术可以实现高效的检测,但由于使用的抗体单一,无法将发生了上皮细胞-间充质转化的循环肿瘤细胞检测出来,容易产生假阴性的结果,且该方法也无法实现对循环肿瘤细胞的无损收集,因此,该方法在临床上面的推广使用收到了限制。

[0003] 为了解决这一难题,本发明引入电化学传感器检测循环肿瘤细胞,电化学生物传感器具有较高的灵敏度、良好的选择性且检测迅速便捷,致使其在各种遗传性疾病筛查、流行病学调查和肿瘤的早期诊断方面都具有极大的应用价值,同时利用混合抗体捕获不同时期的循环肿瘤细胞,减少了假阴性的产生,并引入甘氨酸-盐酸这一温和的抗原抗体洗脱剂破坏抗体与细胞表面抗原的结合,实现了对细胞的无损释放和收集。

[0004] 随着纳米技术的飞速发展,多种多样的纳米材料被用于电化学传感器的构建。科琴黑是一种高导电的炭黑材料,由于其具有独特的支链结构,所以与其他导电炭黑相比,它具有更多的导电接触点,能更大地增加电极的导电性能。金纳米颗粒具有高稳定性及与生物相容性,利用其修饰电极表面可以使得有效表面积更大,且能与更多的生物分子相结合。PdIrBP介孔纳米球具有类酶活性,能高效地催化过氧化氢从而产生电化学信号,将其作为信号分子与抗体组成信号探针,可以有效增加检测灵敏度。

发明内容

[0005] 本发明的目的是开发一种超灵敏、高特异检测循环肿瘤细胞并对其进行无损收集的生物传感器。

[0006] 具体技术方案如下:

[0007] 一种基于PdIrBP介孔纳米球与科琴黑的循环肿瘤细胞生物传感器,其制备方法包括以下步骤:

[0008] (1) 科琴黑的准备 借助于超声搅拌将2.0mg的科琴黑分散在4.0mL的0.5wt.%的壳聚糖溶液中获得均匀的悬浮液。

[0009] (2) 金纳米颗粒的制备 将100mL的0.01%氯金酸水溶液煮沸10-15分钟,然后在刷

烈搅拌和连续加热的情况下逐滴加入1mL的2.0wt.%柠檬酸钠溶液。然后将该混合溶液连续搅拌直至颜色从黄色变为深粉红色,加热停止。待冷却至室温后,以11000r/min的转速离心10分钟,洗涤收集金纳米颗粒,并在4℃下保存。

[0010] (3) PdIrBP介孔纳米球的合成 将30mg双十八烷基二甲基氯化铵添加到10.0mL去离子水中,并搅拌以获得均匀的溶液。随后,将1.0mL的0.337mol/L氟化铵,1.0mL的0.101mol/L硼酸添加到之前的溶液中,然后添加金属前体0.8mL的10mmol/L氯钯酸和0.8mL的10mmol/L氯铱酸。温育5分钟后,注入0.8mL的氨水(10wt.%)以调节溶液的pH。当混合溶液的颜色从棕黄色变为无色后,将1.0mL 0.034mol/L次磷酸二氢钠混合到上述溶液中,并在95℃下磁力搅拌20分钟。最后,注入1.0mL新鲜制备的0.1mol/L二甲胺硼烷以引发还原反应,溶液的颜色逐渐演变为深棕色。在95℃下反应30分钟后,通过以8000r/min离心5分钟收集产物,并用乙醇和去离子水洗涤几次。

[0011] (4) 信号探针的制备 将0.5mg聚乙二醇添加到1.0mL的PdIrBP介孔纳米球(1.0mg/mL)中。将混合物在室温下搅拌孵育3小时,然后用去离子水离心洗涤3次,最后将沉淀物分散在500μL去离子水中以备将来使用。抗体和经聚乙二醇修饰的PdIrBP纳米球通过使用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺作为偶联剂连接。将50μL上述制备的修饰过的PdIrBP介孔纳米球在室温下添加至450μL的10mmol/L PBS中,并充分搅拌。随后加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(5μL,25mM)水溶液和N-羟基琥珀酰亚胺(5μL,50mM)水溶液。20分钟后,将纳米材料用去离子水洗涤两次,然后重新分散在50μL的PBS中。随后,将50μL抗体(20mg/mL)添加到纳米球悬液中。在室温下孵育1小时后,将反应溶液储存在4℃的冰箱中以备将来使用。

[0012] (5) 生物传感器的构建 将金电极(直径3mm)用0.3μm和0.05μm的氧化铝抛光至镜面状。随后分别在双蒸水,乙醇和双蒸水中交替超声处理10分钟。在室温下干燥后,将电极在新鲜制备的食人鱼液(98%硫酸:30%过氧化氢,体积比为3:1)中活化5分钟,并用超纯水彻底冲洗,在空气中干燥。将10μL步骤(1)准备好的科琴黑溶液加到电极上,并在37℃下进行干燥。用同样的方法将步骤(2)富集的金纳米颗粒滴加在已修饰了科琴黑的电极上。10μL抗体混合物(80μg/mL)滴加在修饰电极上,在37℃下加盖放置1h。用0.01mol/L的PBS缓冲液冲洗后,再加入10μL的0.3%BSA在37℃孵育1h,以封闭非特异性结合位点。所得的电极用PBS洗涤,并保存在4℃备用。

[0013] (6) 循环肿瘤细胞的检测及释放 将10μL循环肿瘤细胞加到步骤(5)制备好的电极上,在37℃温育40分钟。然后将10μL步骤(4)合成的信号探针滴到电极上进行免疫反应,形成双抗夹心免疫复合物。用PBS洗净未结合在电极上的物质,检测出电极的DPV信号。

[0014] 在细胞检测完成后,将电极浸入1mL甘氨酸-盐酸洗脱液(0.1mol/L)中10s,然后快速加入几滴0.4mol/L的NaOH溶液以调节pH值。在500r/min下离心5分钟后,将所得沉淀物用PBS(0.01mol/L)洗涤2-3次获得循环肿瘤细胞。

[0015] 所述步骤(1)中所用科琴黑的浓度最好是0.5mg/mL。

[0016] 所述步骤(2)中氯金酸水溶液的浓度最好是0.01%。

[0017] 所述步骤(2)中柠檬酸钠溶液的浓度最好是2.0wt%。

[0018] 所述步骤(3)中氨水的体积最好是0.8mL。

[0019] 所述步骤(3)中二甲胺硼烷的浓度最好是0.1mol/L。

[0020] 所述步骤(4)中PdIrBP介孔纳米球的浓度最好是1.0mg/mL。

[0021] 所述步骤(4)中抗体的浓度最好是20mg/mL。

[0022] 所述步骤(5)中抗体混合物的浓度最好是80 μ g/mL。

[0023] 所述步骤(6)中细胞孵育的时间最好是40分钟。

[0024] 本发明构建了一个基于PdIrBP介孔纳米球与科琴黑的生物传感器用于循环肿瘤细胞的超灵敏检测及无损收集,其检测原理是利用科琴黑修饰金电极以提高电导率。然后在电极表面添加金纳米颗粒进行修饰,从而可以改善电极的有效表面积,并通过金-NH₂键与更多的捕获抗体结合。抗体将循环肿瘤细胞捕获到电极表面上,再添加信号探针以形成双抗夹心结构。通过差异脉冲伏安法定量检测循环肿瘤细胞。最后,甘氨酸盐酸缓冲液的引入可以破坏细胞表面的抗原与抗体的结合,从而实现循环肿瘤细胞的收集。

[0025] 各种纳米材料的成功合成对此传感器的制备起着至关重要的作用,本发明采用场发射扫描电镜、透射电镜、原子力显微镜对其进行了形态学表征。如附图1所示,科琴黑的场发射扫描电镜结果显示,科琴黑分布均匀,且可以观察到科琴黑具有的分支结构,这种独特的结构提供了更多的导电接触点,因此与其他炭黑材料相比,科琴黑的导电性更好。金纳米颗粒的透射电镜结果(附图2)显示金纳米颗粒大小一致且分布均匀,直径为20nm左右,为抗体的结合奠定了良好基础。附图3显示了PdIrBP介孔纳米球的透射电镜图像,该纳米材料为球形,且具有高度分支的结构,这些分支形成了类似于有机树枝状聚合物的网络,其大小一致,直径约100nm,均匀的分散在水中。利用能量色散光谱仪来分析PdIrBP介孔纳米球的元素组成。如附图4所示,该纳米立方体中含有Pd、Ir、B、P这四种元素,进一步表明了该纳米材料的成功合成。

[0026] 在含有0.1M KCl的[Fe(CN)₆]^{3-/4-}(5mM)溶液中,以100mV/s的扫描速率进行循环伏安法(CV)检测,以证明修饰工作电极的每个步骤来验证实验的可行性。如附图5所示,用KB(曲线b)和AuNPs(曲线c)修饰后,电极的电流信号比裸电极(曲线a)大大增加。这归因于KB和AuNPs的高比表面积和出色的电导率。电流的变化证明这两种纳米材料成功地结合到电极表面。由于抗体的位阻效应和BSA的阻断作用,在固定Ab₁(曲线d)和BSA(曲线e)后,电流响应持续下降,表明Ab₁和BSA也如预期一样成功固定在电极表面。当捕获了MCF-7细胞后,电流信号进一步降低(曲线f),这主要是由于细胞的电阻降低了电极界面的电转移效率。

[0027] PdIrBP介孔纳米球催化过氧化氢产生的电化学信号会在一定时间内达到峰值,探索这个合适的时间有助于捕获到最大的信号。我们检测了不同反应时间的DPV信号,如附图6所示,当催化反应时间达到40s时,可获得最高电流。因此,对于本研究,PdIrBP介孔纳米球催化过氧化氢的最佳反应时间为40s。

[0028] 工作溶液的pH值对细胞和抗体的结合强度以及纳米材料的催化效率有很大的影响。当pH值从3调整到6时,相应的DPV信号迅速增加,而当pH值超过6时,DPV信号开始急剧下降(附图7)。这可能是由于PdIrBP介孔纳米球和肿瘤细胞在弱酸性环境中都更加稳定。因此,最佳的pH值为6。

[0029] Ab₁的浓度直接影响细胞的捕获效率,因此该实验参数在本次传感器的构建中起着非常重要的作用。如附图8所示,差异脉冲伏安法检测信号随着Ab₁浓度的增加而增加,并且在80 μ g/mL处最大,之后电流响应信号逐渐降低,导致这个现象的原因可能是由于更多的抗体固定在电极界面上可能产生更大的空间位阻,从而阻碍了靶细胞的识别。因此,Ab₁的

最佳浓度是80 μ g/mL。

[0030] MCF-7细胞和抗体的孵育时间在细胞捕获效率中也起着决定性的作用。附图9显示了孵育时间对生物传感器电化学响应的影响。在40min内,随着孵育时间的增加,更多的MCF-7细胞会被捕获在电极表面,从而导致电流响应增强。然而,随着孵育时间的进一步增加,电流信号没有明显变化。这些结果表明最佳孵育时间为40分钟。

[0031] 本发明对该传感策略的重复性进行了试验。方法如下:通过使用五个新鲜制备的修饰好的电极,以相同浓度(10^4 /mL和 10^5 /mL)检测靶细胞五次,相对标准偏差(RSD)分别为1.06%和1.21%(附图10)。此数据表明该免疫传感器具有出色的可重复性。

[0032] 此外,还研究了该免疫传感器的稳定性。将制备好的电极在4 $^{\circ}$ C的冰箱中放置7天和15天后,与新鲜制备的电极相比,其初始电流响应的95.92%和90.3%得以保留,表明所建立的免疫传感器具较好的稳定性。

[0033] 为了评估该传感策略对靶细胞的分析性能,我们用一系列不同浓度的MCF-7细胞对本策略进行了研究。当靶细胞的浓度增加时,电流响应相应地增加。校正曲线显示MCF-7细胞浓度介于 10^4 /mL到 10^6 /mL之间的DPV值与对数值之间有良好的线性。线性回归方程为 $Y = 26.226 \text{ Log}[C] + 20.427$,相关系数(R^2)为0.9993(附图11),其中Y为免疫传感器的峰值电流,C为MCF-7细胞的浓度。在信噪比为3的情况下,最低检测限估计为2/mL。

[0034] 为了评估电化学免疫测定的特异性,选择了HeLa细胞和K562这两种非特异性细胞系,在优化条件下以相同浓度评估该传感器的特异性。附图12证明了在任何浓度下非特异性细胞的电流响应都没有显著变化,而对MCF-7细胞的电化学信号非常高,并且该信号随着MCF-7细胞浓度的增加而增加。当这些干扰细胞分别与MCF-7细胞混合时,相应的电流响应与相同浓度下纯MCF-7细胞的电化学信号相近。这些结果表明该生物传感器对MCF-7细胞表现出极好的特异性。

[0035] 为了验证本策略能高效释放及回收循环肿瘤细胞,我们对比了洗脱前后的电极所产生的电化学信号。如附图13所示,与抗体捕获靶细胞后(曲线b)相比,在用抗体洗脱液处理后,电极的电流信号(曲线a)显著增加。由此可以证明利用该方法能将电极上的细胞洗脱下来。将洗脱下来的细胞培养12小时之后观察细胞形态,如附图14所示,细胞已经开始贴壁生长并增殖,证明该洗脱方法并不会对细胞的活性造成影响。

[0036] 在本次策略中,我们开发了一种以科琴黑/金纳米颗粒为平台,以PdIrBP介孔纳米球为信号标签,用于超灵敏检测循环肿瘤细胞的整合的电化学免疫传感器。本发明的优越之处在于①科琴黑和金纳米颗粒的独特功能使它们的结合能极大地增加该传感器的灵敏度;②由于高催化活性和强稳定性,PdIrBP介孔纳米球被认为是优异的信号标签,这些纳米材料的组合使得能够构建一个具有较宽线性范围和较低检测限的免疫传感器;③该发明传感器还具有足够的特异性,可以从实际血液样本中将目标细胞区分出来,能有效地抵抗实际血液样本复杂环境的干扰;④通过抗体洗脱液Gly-HCl,可以实现对靶细胞的高效和无损收集,且释放的靶细胞的生物活性没有收到任何影响,可为确定治疗方案或监测预后提供准确的信息。因此,该免疫传感器代表着为实现精准检测循环肿瘤细胞更进一步,也为真正实现液体活检奠定了基础。

附图说明

- [0037] 图1是科琴黑的场发射扫描电镜图
[0038] 图2是金纳米颗粒的透射电镜图
[0039] 图3是PdIrBP介孔纳米球的透射电镜图
[0040] 图4是PdIrBP介孔纳米球的EDS元素分析结果
[0041] 图5是可行性分析
[0042] 图6是反应时间的优化
[0043] 图7是工作液pH值的优化
[0044] 图8是捕获抗体浓度的优化
[0045] 图9是细胞孵育时间的优化
[0046] 图10是重复性分析
[0047] 图11是细胞浓度与电化学信号的关系
[0048] 图12是传感策略的特异性试验
[0049] 图13是细胞释放的效果分析
[0050] 图14是回收细胞的形态图

具体实施方式

[0051] 一种基于PdIrBP介孔纳米球与科琴黑的循环肿瘤细胞生物传感器,其制备方法包括以下步骤:

[0052] (1) 科琴黑的准备 借助于超声搅拌将2.0mg的科琴黑分散在4.0mL的0.5wt%的壳聚糖溶液中以获得均匀的悬浮液。

[0053] (2) 金纳米颗粒的制备 将100mL的0.01%氯金酸水溶液煮沸10-15分钟,然后在剧烈搅拌和连续加热的情况下逐滴加入1mL的2.0wt%柠檬酸钠溶液。然后将该混合溶液连续搅拌直至颜色从黄色变为深粉红色,加热停止。待冷却至室温后,以11000r/min的转速离心10分钟,洗涤收集金纳米颗粒,并在4℃下保存。

[0054] (3) PdIrBP介孔纳米球的合成 将30mg双十八烷基二甲基氯化铵添加到10mL去离子水中,并搅拌以获得均匀的溶液。随后,将1.0mL的0.337mol/L氟化铵,1.0mL的0.101mol/L硼酸添加到之前的溶液中,然后添加金属前体0.8mL的10mmol/L氯钨酸和0.8mL的10mmol/L氯铱酸。温育5分钟后,注入0.8mL的氨水(10wt.%)以调节溶液的pH。当混合溶液的颜色从棕黄色变为无色后,将1.0mL 0.034mol/L次磷酸二氢钠混合到上述溶液中,并在95℃下磁力搅拌20分钟。最后,注入1.0mL新鲜制备的0.1mol/L二甲胺硼烷以引发还原反应,溶液的颜色逐渐演变为深棕色。在95℃下反应30分钟后,通过以8000r/min离心5分钟收集产物,并用乙醇和去离子水洗涤几次。

[0055] (4) 信号探针的制备 将0.5mg聚乙二醇添加到1.0mL的PdIrBP介孔纳米球(1.0mg/mL)中。将混合物在室温下搅拌孵育3小时,然后用去离子水离心洗涤3次,最后将沉淀物分散在500μL去离子水中以备将来使用。抗体和经聚乙二醇修饰的PdIrBP纳米球通过使用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺作为偶联剂连接。将50μL上述制备的修饰过的PdIrBP介孔纳米球在室温下添加至450μL的10mmol/L PBS中,并充分搅拌。随后加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(5μL, 25mM)水溶液和N-羟基琥珀酰亚胺(5μ

L, 50mM) 水溶液。20分钟后,将纳米材料用去离子水洗涤两次,然后重新分散在50 μ L的PBS中。随后,将50 μ L抗体 (20mg/mL) 添加到纳米球悬液中。在室温下孵育1小时后,将反应溶液储存在4 $^{\circ}$ C的冰箱中以备将来使用。

[0056] (5) 生物传感器的构建 将金电极(直径3mm)用0.3和0.05 μ m的氧化铝抛光至镜面状。随后分别在双蒸水,乙醇和双蒸水中交替超声处理10分钟。在室温下干燥后,将电极在新鲜制备的食人鱼液(98%硫酸:30%过氧化氢,体积比为3:1)中活化5分钟,并用超纯水彻底冲洗,在空气中干燥。将10 μ L步骤(1)准备好的科琴黑溶液加到电极上,并在37 $^{\circ}$ C下进行干燥。用同样的方法将步骤(2)富集的金纳米颗粒滴加在已修饰了科琴黑的电极上。10 μ L抗体混合物(80 μ g/mL)滴加在修饰电极上,在37 $^{\circ}$ C下加盖放置1h。用0.01mol/L的PBS缓冲液冲洗后,再加入10 μ L的0.3%BSA在37 $^{\circ}$ C孵育1h,以封闭非特异性结合位点。所得的电极用PBS洗涤,并保存在4 $^{\circ}$ C备用。

[0057] (6) 循环肿瘤细胞的检测及释放 将10 μ L循环肿瘤细胞加到步骤(5)制备好的电极上,在37 $^{\circ}$ C温育40分钟。然后将10 μ L步骤(4)合成的信号探针滴到电极上进行免疫反应,形成双抗夹心免疫复合物。用PBS洗净未结合在电极上的物质,检测出电极的DPV信号。

[0058] 在细胞检测完成后,将电极浸入1mL甘氨酸-盐酸洗脱液(0.1mol/L)中10s,然后快速加入几滴0.4mol/L的NaOH溶液以调节pH值。在500r/min下离心5分钟后,将所得沉淀物用PBS(0.01mol/L)洗涤2-3次获得循环肿瘤细胞。

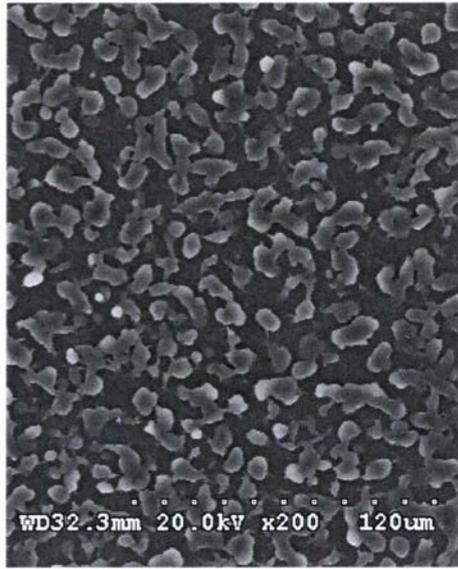


图1

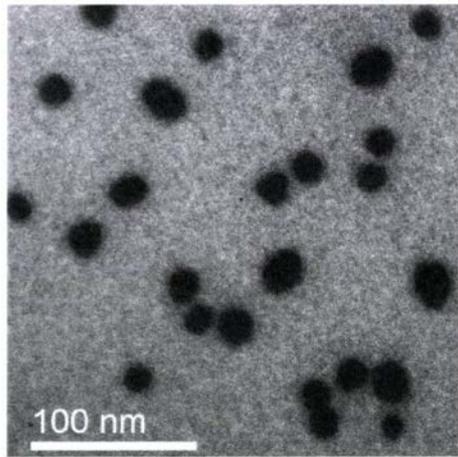


图2

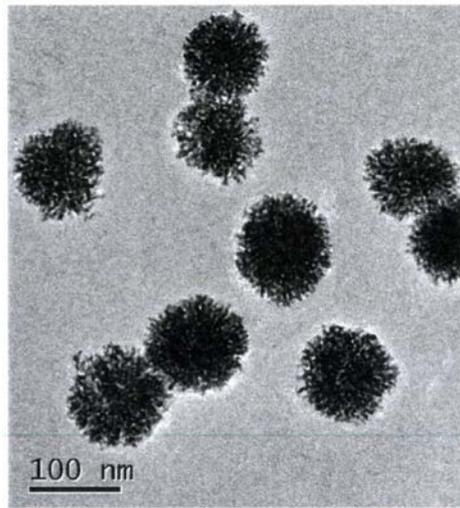


图3

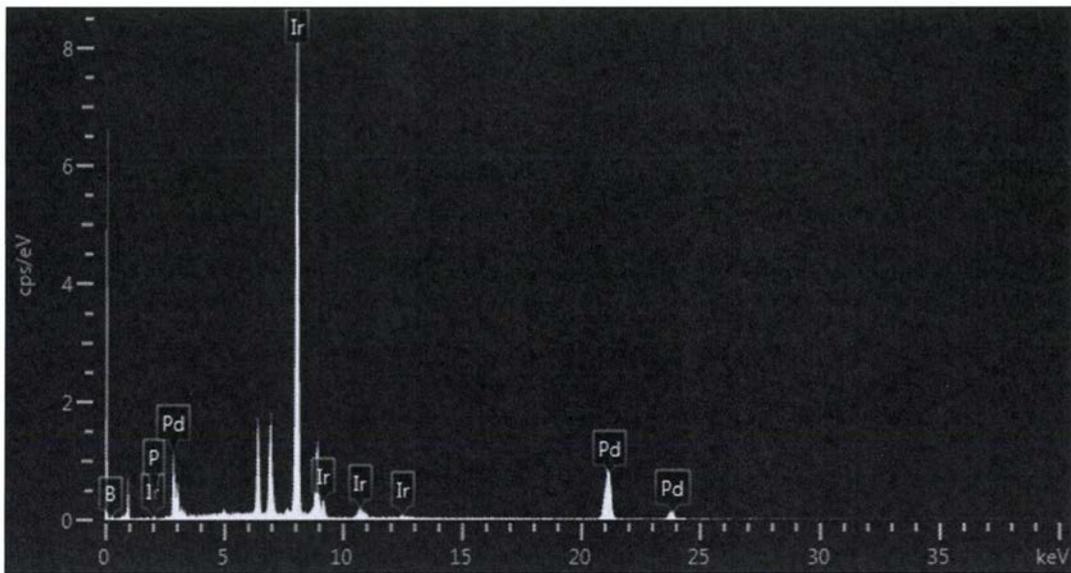


图4

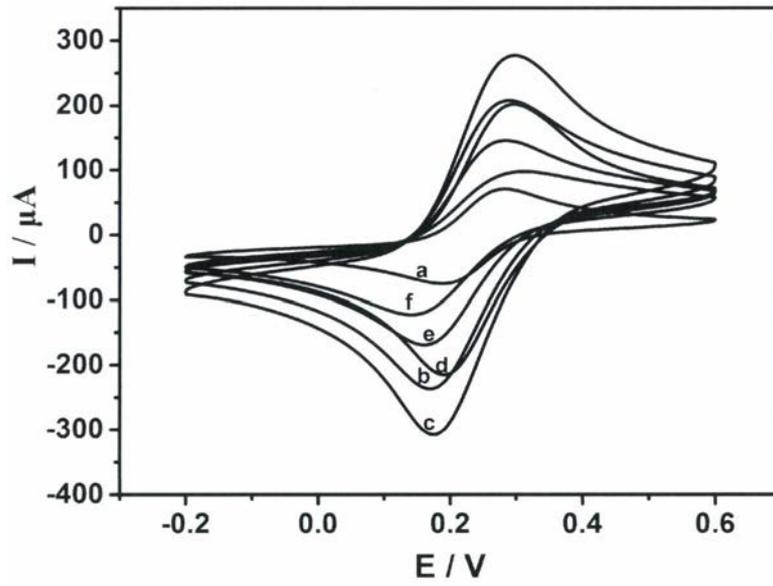


图5

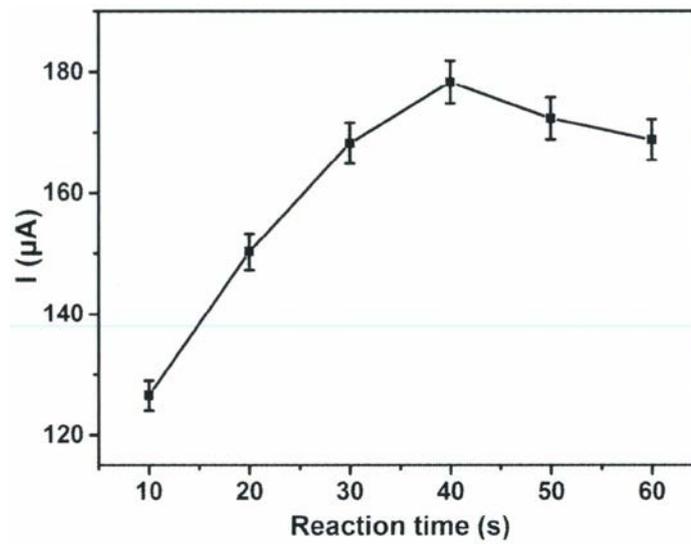


图6

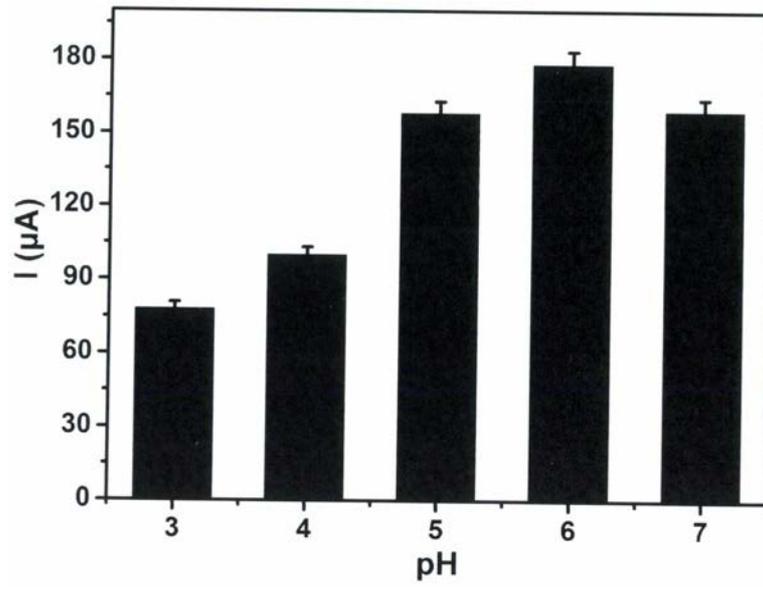


图7

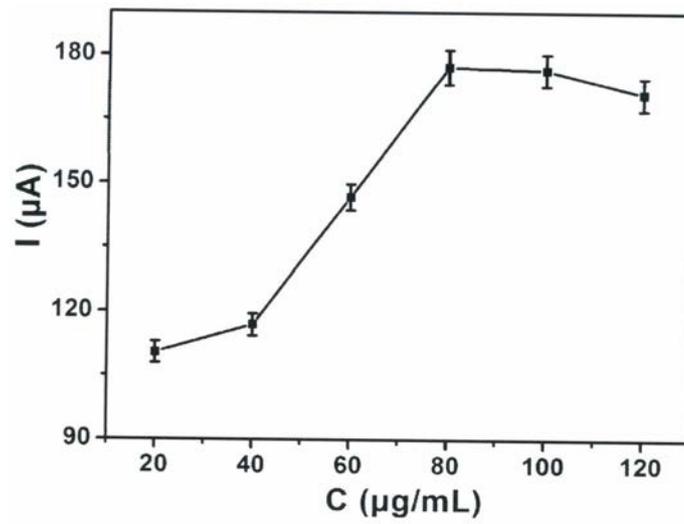


图8

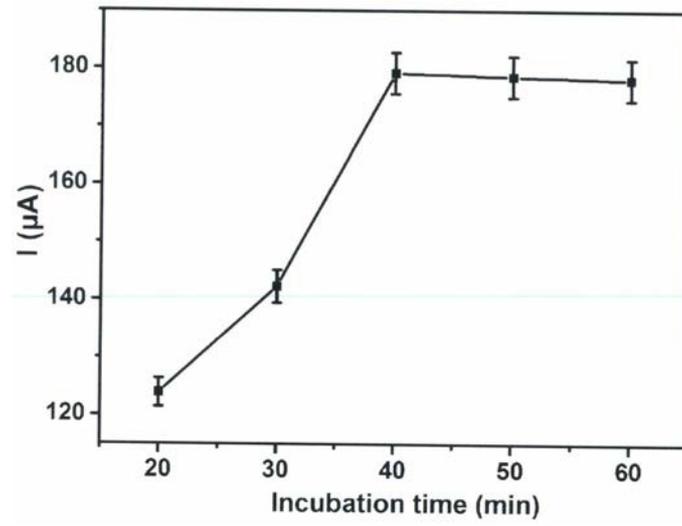


图9

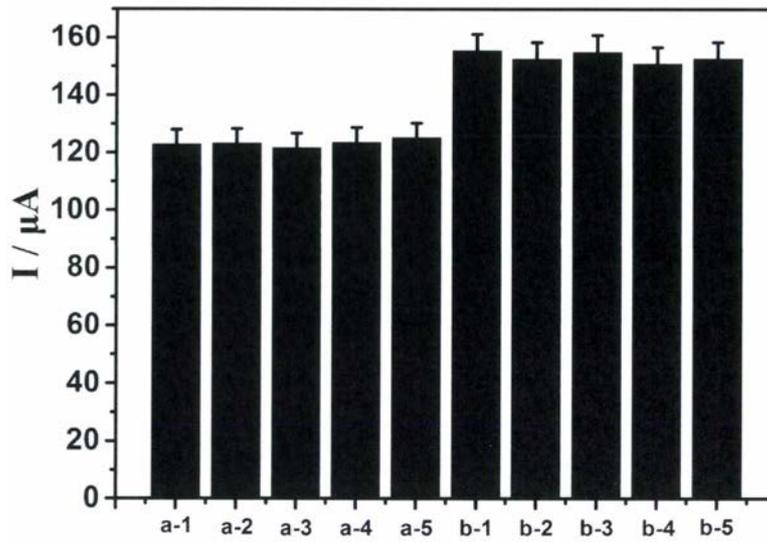


图10

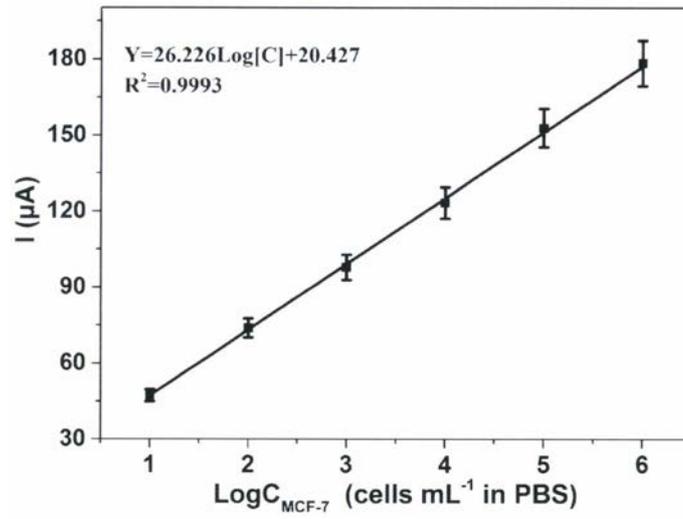


图11

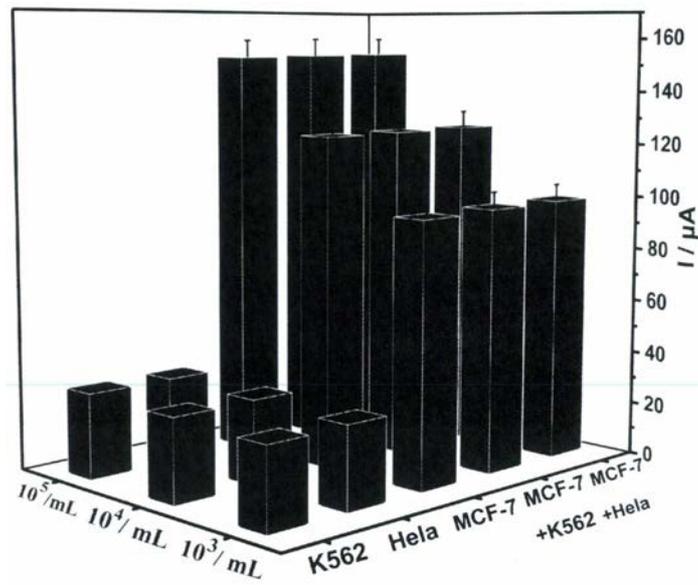


图12

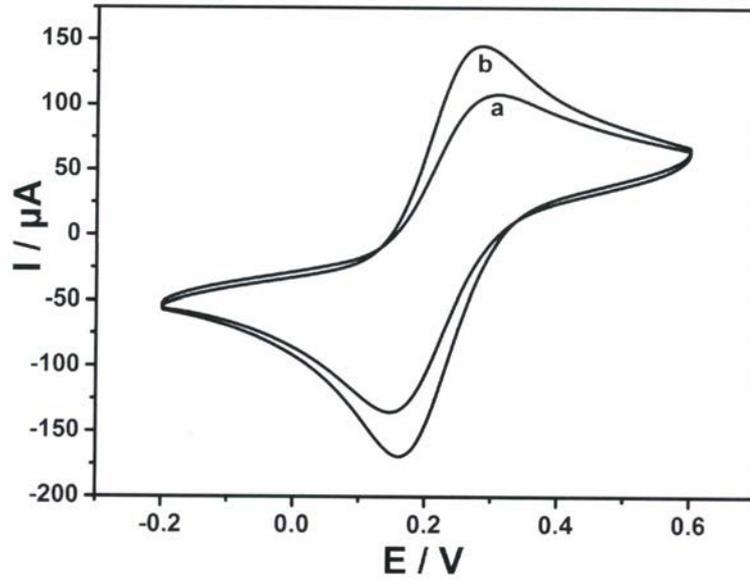


图13

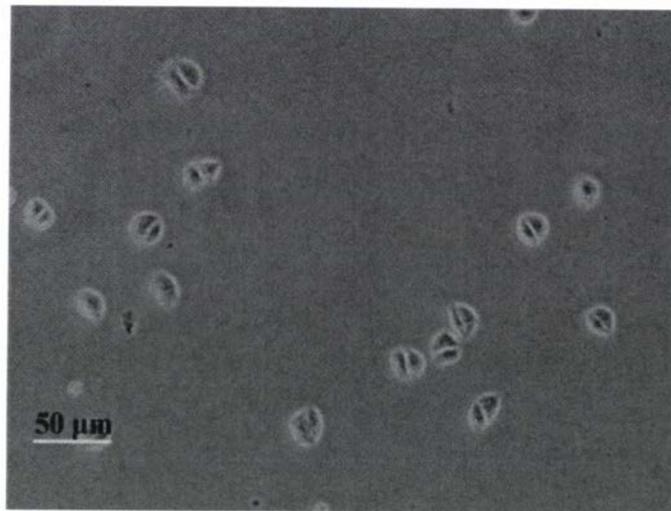


图14