

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103116023 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 22

(21) 申请号 201310032294. 1

G01N 21/76(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 01. 25

(71) 申请人 宁波大学

地址 315211 浙江省宁波市江北区风华路
818 号

(72) 发明人 杜书平 郭智勇 郝婷婷 陈贝贝
王泽波

(74) 专利代理机构 宁波奥圣专利代理事务所
(普通合伙) 33226

代理人 程晓明

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

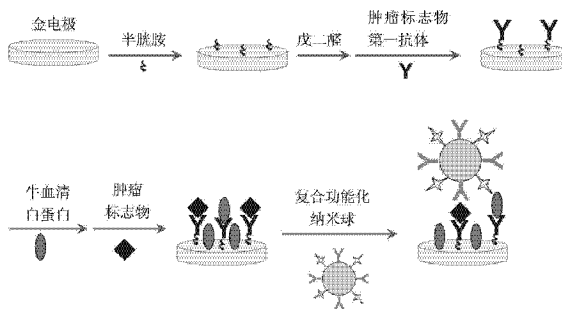
权利要求书3页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

用于检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了用于检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器及其制备方法和应用,该免疫传感器,包括工作电极、参比电极和对电极,所述的工作电极为表面依次修饰有半胱胺、戊二醛、肿瘤标志物第一抗体、肿瘤标志物、以及肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球的金电极,以牛血清蛋白封闭非特异性活性位点;其制备方法包括固载有肿瘤标志物第一抗体的金电极的制备步骤;肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球的合成步骤;最后将得到的金电极和复合功能化纳米球组装成电化学发光免疫传感器的步骤,优点是灵敏度高、分析速度快、稳定、选择性强、重现性好、易于操作、方法灵活。



1. 一种用于检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器,包括工作电极、参比电极和对电极,其特征在于:所述的工作电极为表面依次修饰有半胱胺、戊二醛、肿瘤标志物第一抗体、肿瘤标志物、以及肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球的金电极,以牛血清白蛋白封闭非特异性活性位点。

2. 根据权利要求1所述的用于检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器,其特征在于:所述的参比电极为Ag/AgCl电极或者甘汞电极,所述的对电极是铂电极。

3. 根据权利要求1所述的用于检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器,其特征在于:所述的电化学发光标记物为含氨基官能团的鲁米诺及其衍生物或含氨基官能团的三联吡啶衍生物。

4. 一种制备权利要求1所述的用于检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器的方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 固载有肿瘤标志物第一抗体的金电极的制备

a. 将直径为3~5 mm的金电极依次用1.0 μm 、0.3 μm 、0.05 μm 的三氧化二铝抛光处理,超声2 min,超纯水冲洗干净后,置于0.5 M的 H_2SO_4 中,在0~1.6 V的电位范围内进行循环伏安扫描,扫速为100 mV/s,直至循环伏安曲线稳定;

b. 将步骤(a)所得电极用超纯水冲洗干净后,浸泡在0.1 mol/L的半胱胺溶液中,4 $^\circ\text{C}$ 下反应10 h;

c. 将步骤(b)所得电极用超纯水冲洗干净后,浸泡在2.5%戊二醛水溶液中,4 $^\circ\text{C}$ 下反应1 h;

d. 将步骤(c)所得电极用超纯水冲洗干净后,浸泡在50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的肿瘤标志物第一抗体中,4 $^\circ\text{C}$ 下反应12~18 h;

e. 将步骤(d)所得电极用超纯水冲洗干净后,浸泡在质量百分浓度为2%的牛血清白蛋白中,4 $^\circ\text{C}$ 下封闭1~2 h,即得固载有肿瘤标志物第一抗体的金电极;

(2) 肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球的合成

a. 导电纳米球的合成:在干净的烧杯中加入90~100 mL的由乙醇、水及浓氨水组成的混合液,磁力搅拌30 min;待溶液混合均匀后,磁力搅拌的同时,缓慢滴加5 mL正硅酸四乙酯;滴加完毕后,用封口膜密封烧杯口,反应10 h;4000 rpm离心洗涤,然后将沉淀物分散在超纯水中形成10 mg/mL的第一悬浮液;取2 mL第一悬浮液至离心管中,加入0.18 mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷后,室温下混匀搅拌7 h;4000 rpm离心洗涤,然后将沉淀物分散在乙醇中形成0.5 mg/mL的第二悬浮液;取20 mL第二悬浮液至干净的烧杯中,然后加入10 mL质量分数为1%的 HAuCl_4 溶液超声混匀;然后缓慢滴加3 mL的20 mM的柠檬酸三钠溶液,磁力搅拌1 h,4000 rpm离心洗涤,沉淀物即粒径约为80~100 nm的导电纳米球,4 $^\circ\text{C}$ 储存备用;

b. 取1~2 mg导电纳米球,加水0.5 mL超声分散,再加入90~100 μL 戊二醛,室温下旋转温育反应1 h,4000 rpm离心洗涤;

c. 取步骤(b)所得的沉淀物,加入0.5~1 mL的0.001 M的电化学发光标记物溶液,室温下旋转温育反应1 h,4000 rpm离心洗涤;

d. 取步骤(c)所得的沉淀物,加水0.5 mL超声分散,再加入90~100 μL 戊二醛,室温下旋转温育反应1 h;

e. 取 3 ~ 5 μg 肿瘤标记物第二抗体加入到步骤(d) 所得的悬浮液, 室温下旋转温育反应 1 h, 4000 rpm 离心洗涤, 即可得到肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存备用;

(3) 电化学发光免疫传感器的组装

a. 将固载有肿瘤标志物第一抗体的金电极, 浸泡在含肿瘤标志物的溶液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 50 min;

b. 将步骤(a) 所得的电极用超纯水冲洗干净后, 浸泡在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球的水悬浮液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 h;

c. 将步骤(b) 所得的电极用超纯水冲洗干净后, 作为工作电极, 采用铂电极作为对电极, Ag/AgCl 电极或者饱和甘汞电极作为参比电极, 构成三电极体系的电化学发光免疫传感器。

5. 根据权利要求 4 所述的用于检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器的制备方法, 其特征在于: 所述的电化学发光标记物为含氨基官能团的鲁米诺及其衍生物或含氨基官能团的三联吡啶衍生物。

6. 根据权利要求 4 所述的用于检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器的制备方法, 其特征在于: 步骤(2) 的(a) 步骤中所述的乙醇、水和浓氨水的混合体积比为 87:7:1。

7. 一种利用权利要求 4 ~ 6 中任一项所述的用于检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器检测肿瘤标志物的方法, 其特征在于具体步骤如下:

(1) 电化学发光免疫传感器的组装

a. 配制一系列不同浓度的肿瘤标志物溶液, 将权利要求 2 中制备得到的固载有肿瘤标志物第一抗体的金电极, 分别浸泡在不同浓度的肿瘤标志物的溶液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 50 min;

b. 将步骤(a) 所得的电极用超纯水冲洗干净后, 浸泡在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的权利要求 2 中制备得到的肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球的水悬浮液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 h;

c. 将步骤(b) 所得的电极用超纯水冲洗干净后, 作为工作电极, 采用铂电极作为对电极, Ag/AgCl 电极或者饱和甘汞电极作为参比电极, 构成三电极体系的电化学发光免疫传感器;

(2) 标准曲线建立

将电化学发光免疫传感器放入含共反应试剂的缓冲溶液, 启动电化学反应, 测量电化学发光强度, 获得一系列不同浓度的肿瘤标志物溶液对应的电化学发光强度值, 建立电化学发光强度值与肿瘤标志物溶液浓度之间的定量关系;

(3) 样品测定

根据上述步骤获得待测样品溶液的电化学发光强度值, 根据电化学发光强度值与肿瘤标志物溶液浓度之间的定量关系, 计算得到待测样品溶液中肿瘤标志物的准确浓度。

8. 根据权利要求 7 所述的利用电化学发光免疫传感器检测肿瘤标志物的方法, 其特征在于: 所述的电化学发光标记物为含氨基官能团的鲁米诺及其衍生物, 所述的含共反应试剂的缓冲溶液相应为含 1 ~ 3 mM 的 H_2O_2 的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 体系缓冲溶液, 所述的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 体系缓冲溶液的浓度为 0.05 M, pH 为 9 ~ 11。

9. 根据权利要求 7 所述的利用电化学发光免疫传感器检测肿瘤标志物的方法,其特征
在于:所述的电化学发光标记物为含氨基官能团的三联吡啶钌衍生物,所述的含共反应试剂
的缓冲溶液相应为含 0.03 ~ 2 mM 的 2-(二丁基胺)乙醇的 Na_2CO_3 - NaHCO_3 体系缓冲溶
液,所述的 Na_2CO_3 - NaHCO_3 体系缓冲溶液的浓度为 0.05 M, pH 为 7 ~ 9。

10. 根据权利要求 7 所述的利用电化学发光免疫传感器检测肿瘤标志物的方法,其特
征在于:所述的肿瘤标志物为甲胎蛋白、癌胚抗原、癌胚铁蛋白、胰癌胚抗原、细胞角蛋白、
鳞癌相关抗原、前列腺特异性抗原、碱性磷酸酶、神经元特异性烯醇化酶、人绒毛膜促性腺
激素和儿茶酚胺类物质。

用于检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种电化学发光免疫传感器及其检测方法,尤其是涉及一种基于生物条形码模式构建的用于检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器及其制备方法和应用方法。

背景技术

[0002] 癌症是严重威胁人类健康的疾病之一,具有高发病率和高死亡率,随着人们生活水平日渐提高,癌症早期发现、早期诊断已成关注焦点和研究热点。肿瘤标志物是这样一类物质,在肿瘤细胞的发生和增殖过程中,由肿瘤细胞本身所产生,或者由机体对肿瘤细胞的反应而产生,分泌并释放到血液、细胞、体液中,可直接、有效反应肿瘤细胞在体内的产生、发展和治疗效果等情况。显然,检测肿瘤标志物是实现癌症早期发现、早期诊断的重要手段。目前,国内外也已对此做了大量的研究工作,已有少量肿瘤标志物被应用于临床检测。但总体而言,现有方法灵敏度有限,难以实现对癌前病变、早期患者体内极低浓度肿瘤标志物的检测。因此,开发高灵敏度的肿瘤标志物检测方法仍是迫切需求。

[0003] 免疫传感器是利用抗体与抗原之间的特异性识别与结合而研制成的一类生物传感器,响应速度快、特异性强、选择性好、重现性好。电化学发光免疫分析是电化学发光和免疫测定相结合的产物,具有快速、稳定、选择性强、重现性好、易于操作、方法灵活多样的优点。

[0004] 基于纳米粒子的生物条形码技术是一种有效的信号放大和检测技术,该方法通过目标蛋白第一抗体标记的磁性微球、目标蛋白、目标蛋白的第二抗体和条形码 DNA 同时标记的纳米金颗粒形成夹心式免疫复合物,磁场分离后,经去杂交将条形码 DNA 释放,再通过下游检测方法如 PCR 扩增、生物芯片法等检测条形码 DNA 数量以检测目标蛋白浓度。该方法灵敏度超高,比常规 ELISA 高 10^6 倍,是目前报道的唯一一种具有聚合酶链扩增反应灵敏度而又不需要酶放大的检测体系。因具有超高灵敏度,生物条形码技术自 2003 年问世以来,越来越受到科学家关注,但至今未见生物条形码技术在免疫传感器构建方面的研究报道。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种基于生物条形码模式的检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器,其兼具生物条形码技术的超高灵敏度和电化学发光免疫分析快速、稳定、选择性强、重现性好、易于操作、方法灵活多样的优点,可以实现对超低浓度肿瘤标志物的检测,达到对肿瘤疾病早期发现、早期诊断的目的,本发明还提供了上述检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器的制备方法和应用方法。

[0006] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为:一种用于检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器,包括工作电极、参比电极和对电极,所述的工作电极为表面依次修饰有半胱胺、戊二醛、肿瘤标志物第一抗体、肿瘤标志物、以及肿瘤标志物第二抗体和电化学

发光标记物同时标记的复合功能化纳米球的金电极,以牛血清白蛋白封闭非特异性活性位点。

[0007] 所述的参比电极为 Ag/AgCl 电极或者饱和甘汞电极,所述的对电极是铂电极。

[0008] 所述的电化学发光标记物为含氨基官能团的鲁米诺及其衍生物或含氨基官能团的三联吡啶衍生物。

[0009] 一种制备用于检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器的方法,包括以下步骤:

(1) 固载有肿瘤标志物第一抗体的金电极的制备

a. 将直径为 3 ~ 5 mm 的金电极依次用 1.0 μm 、0.3 μm 、0.05 μm 的三氧化二铝抛光处理,超声 2 min,超纯水冲洗干净后,置于 0.5 M 的 H_2SO_4 中,在 0 ~ 1.6 V 的电位范围内进行循环伏安扫描,扫速为 100 mV/s,直至循环伏安曲线稳定;

b. 将步骤(a)所得电极用超纯水冲洗干净后,浸泡在 0.1 mol/L 的半胱胺溶液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 10 h;

c. 将步骤(b)所得电极用超纯水冲洗干净后,浸泡在 2.5% 戊二醛水溶液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 h;

d. 将步骤(c)所得电极用超纯水冲洗干净后,浸泡在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的肿瘤标志物第一抗体中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 12 ~ 18 h;

e. 将步骤(d)所得电极用超纯水冲洗干净后,浸泡在质量百分浓度为 2% 的牛血清白蛋白中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下封闭 1 ~ 2 h,即得固载有肿瘤标志物第一抗体的金电极;

(2) 肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球的合成

a. 导电纳米球的合成:在干净的烧杯中加入 90 ~ 100 mL 的由乙醇、水及浓氨水组成的混合液,磁力搅拌 30 min;待溶液混合均匀后,磁力搅拌的同时,缓慢滴加 5 mL 正硅酸四乙酯 (TEOS);滴加完毕后,用封口膜密封烧杯口,反应 10 h;4000 rpm 离心洗涤,然后将沉淀物分散在超纯水中形成 10 mg/mL 的第一悬浮液;取 2 mL 第一悬浮液至离心管中,加入 0.18 mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 后,室温下混匀搅拌 7 h;4000 rpm 离心洗涤,然后将沉淀物分散在乙醇中形成 0.5 mg/mL 的第二悬浮液;取 20 mL 第二悬浮液至干净的烧杯中,然后加入 10 mL 质量分数为 1% 的 HAuCl_4 溶液超声混匀;然后缓慢滴加 3 mL 的 20 mM 的柠檬酸三钠溶液,磁力搅拌 1 h,4000 rpm 离心洗涤,沉淀物即粒径约为 80 ~ 100 nm 的导电纳米球,4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用;

b. 取 1 ~ 2 mg 导电纳米球,加水 0.5 mL 超声分散,再加入 90 ~ 100 μL 戊二醛,室温下旋转温育反应 1 h,4000 rpm 离心洗涤;

c. 取步骤(b)所得的沉淀物,加入 0.5 ~ 1 mL 的 0.001 M 的电化学发光标记物溶液,室温下旋转温育反应 1 h,4000 rpm 离心洗涤;

d. 取步骤(c)所得的沉淀物,加水 0.5 mL 超声分散,再加入 90 ~ 100 μL 戊二醛,室温下旋转温育反应 1 h;

e. 取 3 ~ 5 μg 肿瘤标志物第二抗体加入到步骤(d)所得的悬浮液,室温下旋转温育反应 1 h,4000 rpm 离心洗涤,即可得到肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球,4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存备用;

(3) 电化学发光免疫传感器的组装

a. 将固载有肿瘤标志物第一抗体的金电极,浸泡在含肿瘤标志物的溶液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下温

育 50 min ;

b. 将步骤(a)所得的电极用超纯水冲洗干净后,浸泡在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球的水悬浮液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 h ;

c. 将步骤(b)所得的电极用超纯水冲洗干净后,作为工作电极,采用铂电极作为对电极,Ag/AgCl 电极或者饱和甘汞电极作为参比电极,构成三电极体系的电化学发光免疫传感器。

[0010] 所述的电化学发光标记物为含氨基官能团的鲁米诺及其衍生物或含氨基官能团的三联吡啶衍生物。

[0011] 步骤(2)的(a)步骤中所述的乙醇、所述的水和所述的浓氨水的混合体积比为 87:7:1。

[0012] 一种用于检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器检测肿瘤标志物的方法,具体步骤如下:

(1) 电化学发光免疫传感器的组装

a. 配制一系列不同浓度的肿瘤标志物溶液,将权利要求 2 中制备得到的固载有肿瘤标志物第一抗体的金电极,分别浸泡在不同浓度的肿瘤标志物的溶液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 50 min ;

b. 将步骤(a)所得的电极用超纯水冲洗干净后,浸泡在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的权利要求 2 中制备得到的肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球的水悬浮液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 h ;

c. 将步骤(b)所得的电极用超纯水冲洗干净后,作为工作电极,采用铂电极作为对电极,Ag/AgCl 电极或者饱和甘汞电极作为参比电极,构成三电极体系的电化学发光免疫传感器;

(2) 标准曲线建立

将电化学发光免疫传感器放入含共反应试剂的缓冲溶液,启动电化学反应,测量电化学发光强度,获得一系列不同浓度的肿瘤标志物溶液对应的电化学发光强度值,建立电化学发光强度值与肿瘤标志物溶液浓度之间的定量关系;

(3) 样品测定

根据上述步骤获得待测样品溶液的电化学发光强度值,根据电化学发光强度值与肿瘤标志物溶液浓度之间的定量关系,计算得到待测样品溶液中肿瘤标志物的准确浓度。

[0013] 所述的电化学发光标记物为含氨基官能团的鲁米诺及其衍生物,所述的含共反应试剂的缓冲溶液相应为含 1 ~ 3 mM 的 H_2O_2 的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 体系缓冲溶液,所述的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 体系缓冲溶液的浓度为 0.05 M, pH 为 9 ~ 11。

[0014] 所述的电化学发光标记物为含氨基官能团的三联吡啶衍生物,所述的含共反应试剂的缓冲溶液相应为含 0.03 ~ 2 mM 的 2-(二丁基胺)乙醇(DBAE)的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 体系缓冲溶液,所述的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 体系缓冲溶液的浓度为 0.05 M, pH 为 7 ~ 9。

[0015] 所述的肿瘤标志物为甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、癌胚铁蛋白、胰癌胚抗原、细胞角蛋白、鳞癌相关抗原、前列腺特异性抗原(PSA)、碱性磷酸酶(ALP)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)和儿茶酚胺类物质。

[0016] 发明原理:现行电化学发光免疫分析方法中,电化学发光标记物直接标记在第二

抗体上,一个肿瘤标志物抗原一般对应于一个第二抗体,而一个第二抗体至多可以标记 20 个左右的电化学发光标记物,否则失去免疫活性,这就意味着一个肿瘤标志物抗原至多对应于 20 个左右电化学发光标记物;本发明创新标记手段,采用生物条形码模式,将电化学发光标记物不直接标记于第二抗体,而是和第二抗体一起固载到导电纳米球之上,这样,一个肿瘤标志物抗原对应于一个导电纳米球,而一个导电纳米球表面可以标记数万个电化学发光标记物,这就意味着,一个肿瘤标志物抗原可以对应于数万个电化学发光标记物,灵敏度大幅提高是必然的。总而言之,该导电纳米球比表面积大,且具有导电表面,既不影响电化学发光标记物与电极之间的能量、电子传递,大幅度提高有效的电化学发光探针数目至传统标记方法的千倍以上,又不会影响第二抗体活性,最终实现大幅度提高检测灵敏度的目的。

[0017] 与现有技术相比,本发明的优点在于:

(1) 高灵敏度,本发明的检测限达到 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ pg/mL,而目前传统的检测方法检测限最高也只有 $0.1 \sim 1$ pg/mL。

[0018] (2) 高选择性,常见其他蛋白对本检测体系均无干扰。原因在于:本发明构建的电化学发光免疫传感器,是基于抗体与抗原之间的特异性识别与结合构建的,干扰蛋白不是肿瘤标志物第一抗体和第二抗体的目标物,因此待测液中的干扰蛋白并不能与肿瘤标志物第一抗体和第二抗体结合,故对本检测体系无干扰。

[0019] (3) 结果准确,回收率达到 91% ~ 110%。

[0020] (4) 操作简单。

[0021] 综上所述,本发明拟制备一种基于生物条形码模式的检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器,兼具生物条形码技术的超高灵敏度和电化学发光免疫分析快速、稳定、选择性强、重现性好、易于操作、方法灵活多样的优点,可以实现对超低浓度肿瘤标志物的检测,达到对肿瘤疾病早期发现、早期诊断的目的。

附图说明

[0022] 图 1 为肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球的制备过程流程图;

图 2 为基于生物条形码模式构建的检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器的制备过程流程图;

图 3 为一系列的电化学阻抗图,阻抗的变化表明了电化学发光免疫传感器的层层组装制备过程(电化学发光免疫传感器的层层组装制备过程中的阻抗变化图)。a:裸电极;b:组装半胱胺后的金电极;c:组装肿瘤标志物第一抗体后的金电极;d:组装牛血清白蛋白后的金电极;e:组装肿瘤标志物后的金电极;f:组装复合功能化纳米球后的金电极。实验条件:50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS),含 5 mmol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 溶液;

图 4 为一系列的电化学发光行为图,表明电化学发光免疫传感器层层组装制备过程中电化学发光行为的变化。(电化学发光免疫传感器层层组装制备过程中的电化学发光行为图)a:裸电极;b:组装半胱胺后的金电极;c:组装肿瘤标志物第一抗体后的金电极;d:组装牛血清白蛋白后的金电极;e:组装肿瘤标志物后的金电极;f:组装复合功能化纳米球后的金电极。实验条件:0.05 M 碳酸盐缓冲液(含 1 mM 的 H_2O_2),电位范围 0 ~ 1.0 V,扫速

0.1 V/s;

图 5 中 A 为检测一系列不同浓度(a ~ g, $4 \times 10^{-8} \sim 4 \times 10^{-6}$ ng/mL)肿瘤标志物前列腺特异性抗原(PSA)的电化学发光行为图。B 为不同浓度肿瘤标志物前列腺特异性抗原(PSA)的 ECL 信号—浓度线性图。实验条件:0.05 M 碳酸盐缓冲液(含 1mM 的 H_2O_2), 电位范围 0 ~ 1.0 V, 扫速 0.1 V/s。

具体实施方式

[0023] 以下结合附图实施例对本发明作进一步详细描述。

[0024] 具体实施例一

肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球的合成,其具体步骤如下:

(a) 导电纳米球的合成:在干净的烧杯中加入 90 ~ 100 mL 的由乙醇、水及浓氨水组成的混合液($V_{乙醇}:V_{水}:V_{浓氨水} = 87:7:1$ 为宜),磁力搅拌 30 min;待溶液混合均匀后,磁力搅拌的同时,缓慢滴加 5 mL 正硅酸四乙酯(TEOS);滴加完毕后,用封口膜密封烧杯口,反应 10 h;4000 rpm 离心洗涤,然后将沉淀物分散在超纯水中形成 10 mg/mL 的第一悬浮液;取 2 mL 第一悬浮液至离心管中,加入 0.18 mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)后,室温下混匀搅拌 7 h;4000 rpm 离心洗涤,然后将沉淀物分散在乙醇中形成 0.5 mg/mL 的第二悬浮液;取 20 mL 第二悬浮液至干净的烧杯中,然后加入 10 mL 质量分数为 1% 的 $H AuCl_4$ 溶液超声混匀;然后缓慢滴加 3 mL 20 mM 的柠檬酸三钠溶液,磁力搅拌 1 h,4000 rpm 离心洗涤,所得沉淀物即粒径约为 80 ~ 100 nm 的导电纳米球,4℃ 储存备用。

[0025] (b)取 1 ~ 2 mg 导电纳米球,加水 0.5 mL 超声分散,再加入 90 ~ 100 μ L 戊二醛,室温下旋转温育反应 1 h,4000 rpm 离心洗涤;

(c)取步骤(b)所得的沉淀物,加入 0.5 ~ 1 mL 的 0.001 M 的电化学发光标记物(含氨基官能团的鲁米诺及其衍生物或含氨基官能团的三联吡啶钌衍生物)溶液,室温下旋转温育反应 1 h,4000 rpm 离心洗涤;

(d)取步骤(c)所得的沉淀物,加水 0.5 mL 超声分散,再加入 90 ~ 100 μ L 戊二醛,室温下旋转温育反应 1 h;

(e)取 3 ~ 5 μ g 肿瘤标记物第二抗体加入到步骤(d)所得的溶液,室温下旋转温育反应 1 h,即可得到肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球,4℃ 下储存备用。

[0026] 具体实施例二

半胱胺组装的金电极的制备,其具体步骤如下:

将直径为 3 ~ 5 mm 的金电极依次用 1.0 μ m、0.3 μ m、0.05 μ m 的三氧化二铝抛光粉抛光处理,将金电极用超纯水冲洗干净,在超纯水中超声 2 min,然后置于 0.5 M 的 H_2SO_4 中,在 0 ~ 1.6 V 的电位范围内进行循环伏安扫描,扫速为 100 mV/s,直至循环伏安曲线稳定;将该金电极用超纯水冲洗干净后,浸泡在 0.1 mol/L 的半胱胺溶液中 4℃ 下反应 10 h,用超纯水冲洗干净,即可得到半胱胺修饰的金电极。这一过程可用交流阻抗法进行监测。如图 3 所示,未修饰半胱胺之前的裸电极阻抗很小(曲线 a),修饰了半胱胺之后的金电极阻抗大大增加(曲线 b),表明半胱胺成功地组装到金电极上。

[0027] 具体实施例三

戊二醛、肿瘤标志物第一抗体组装的金电极的制备,其具体步骤如下:

将实施例二中的金电极用超纯水冲洗干净后,浸泡在含有 2.5% 的戊二醛水溶液中 4℃ 下反应 1 h;将该金电极用超纯水冲洗干净后,浸泡在 50 μg/mL 的肿瘤标志物第一抗体中 4℃ 下反应 12 ~ 18 h,用超纯水冲洗干净,即可得到戊二醛、肿瘤标志物第一抗体修饰的金电极。这一过程可用交流阻抗法进行监测。如图 3 所示,修饰了戊二醛、肿瘤标志物第一抗体之后的金电极阻抗大大增加(曲线 c),表明戊二醛、肿瘤标志物第一抗体成功地组装到金电极上。

[0028] 具体实施例四

牛血清白蛋白组装的金电极的制备,其具体步骤如下:

将实施例三中的金电极用超纯水冲洗干净后,浸泡在质量百分浓度为 2% 的牛血清白蛋白中 4℃ 下封闭 1 ~ 2 h,用超纯水冲洗干净,即可得到牛血清白蛋白固载的金电极。这一过程可用交流阻抗法进行监测。如图 3 所示,组装了牛血清白蛋白之后的金电极阻抗大大增加(曲线 d),表明牛血清白蛋白成功地组装到金电极上。

[0029] 具体实施例五

肿瘤标志物组装的金电极的制备,其具体步骤如下:

将该实施例四中的金电极用超纯水冲洗干净后,浸泡在含肿瘤标志物的溶液中 4℃ 下温育 50 min;用超纯水冲洗干净,即可得到肿瘤标志物组装的金电极。这一过程可用交流阻抗法进行监测。如图 3 所示,组装了肿瘤标志物之后的金电极阻抗大大增加(曲线 e),表明肿瘤标志物成功地组装到金电极上。

[0030] 具体实施例六

肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球组装的金电极的制备,其具体步骤如下:

将实施例五中的金电极用超纯水冲洗干净后,浸泡在 50 μg/mL 肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球溶液中 4℃ 下反应 1 h;用超纯水冲洗干净,即可得到肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球组装的金电极。这一过程可用交流阻抗法进行监测。如图 3 所示,修饰了肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球之后的金电极阻抗大大减小(曲线 f),因为制备肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球中用的新型吸附载体是导电纳米球,所以组装上肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球后阻抗大大减小,表明肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球成功地组装到金电极上。

[0031] 具体实施例七

构建电化学发光免疫传感器及肿瘤标志物的检测,其具体步骤如下:

将实施例六中的金电极用超纯水冲洗干净后,作为工作电极,采用铂电极作为对电极,Ag/AgCl 电极或者饱和甘汞电极作为参比电极,构成三电极体系的电化学发光免疫传感器,根据电化学发光标记物,选择合适的含共反应试剂的缓冲溶液。将上述的三支电极,放入合适的含共反应试剂的缓冲溶液,启动电化学反应,测量电化学发光强度。配制一系列不同浓度的肿瘤标志物溶液,按照前述步骤获得一系列的对应的电化学发光强度值,建立电化学

发光强度值与肿瘤标志物溶液浓度之间的定量关系;根据上述步骤获得待测样品溶液的电化学发光强度值,根据电化学发光强度值与肿瘤标志物溶液浓度之间的定量关系,计算得到待测样品溶液中肿瘤标志物的准确浓度。

[0032] 具体实施例八

以前列腺特异性抗原(PSA)为例检测电化学发光免疫传感器组装过程的电化学发光行为

按照实施例一的操作步骤完成导电纳米球、复合功能化纳米球的制备。然后按照实施例二至六层层组装金电极,在 0.05 M 碳酸盐缓冲液(含 1 mM 的 H_2O_2)、电位范围 0 ~ 1.0 V、扫速 0.1 V/s 的实验条件下,测试并记录如下电极的电化学发光行为:a:裸电极(图 4. a);b:组装半胱胺后的金电极(图 4. b);c:组装肿瘤标志物第一抗体后的金电极(图 4. c);d:组装牛血清白蛋白后的金电极(图 4. d);e:组装肿瘤标志物后的金电极(图 4. e);f:组装复合功能化纳米球后的金电极(图 4. f)。由图 4 可以得出,a ~ e 均无发光信号,只有 f 有显著的发光信号,是因为裸电极、半胱胺、肿瘤标志物第一抗体、牛血清白蛋白、肿瘤标志物均无标记电化学发光标记物,而复合功能化纳米球标记有电化学发光标记物,所以只有在组装上复合功能化纳米球后,本发明的传感器才会有电化学发光行为。本发明建立电化学发光强度值与肿瘤标志物溶液浓度之间的定量关系后,可以由待测物的电化学发光信号强度直接得出肿瘤标志物的浓度。

[0033] 具体实施例九

本发明的灵敏度及线性范围

以检测肿瘤标志物前列腺特异性抗原(PSA)为例,按照发明内容中的具体实验步骤构建电化学发光免疫传感器,在实验条件:0.05 M 碳酸盐缓冲液(含 1 mM 的 H_2O_2),电位范围 0 ~ 1.0 V,扫速 0.1 V/s 下测试电化学发光。如图 5 所示,电化学发光信号随着肿瘤标志物前列腺特异性抗原(PSA)浓度($4 \times 10^{-8} \sim 4 \times 10^{-6}$ ng/mL)的增加而增加,肿瘤标志物前列腺特异性抗原(PSA)浓度的对数与电化学发光强度呈现良好的线性关系,线性方程为: $I = 4004.59 + 416.46 \cdot \log C$,线性相关系数为 0.9986。该公式中 I 是电化学发光强度,C 是肿瘤标志物前列腺特异性抗原(PSA)的浓度。

[0034] 具体实施例十

其他蛋白对本发明构建的传感器的影响

本发明具有高选择性,常见的牛血清白蛋白、小鸡白蛋白、血浆蛋白、免疫球蛋白或者非目标肿瘤标志物等蛋白质,对本发明的检测应用无干扰。为了确定本发明构建的传感器的特异性,以肿瘤标志物前列腺特异性抗原(PSA)作为目标肿瘤标志物,选择小鸡白蛋白、牛血清白蛋白、血浆蛋白、CEA、AFP、癌胚铁蛋白、胰癌胚抗原、细胞角蛋白、鳞癌相关抗原作为对照蛋白进行测定。按照发明内容中传感器制备步骤构建对照蛋白的电化学发光免疫传感器,然后进行电化学发光行为测试,测试结果显示,本电化学发光免疫传感器只对肿瘤标志物前列腺特异性抗原(PSA)有强的响应,其他蛋白的电化学发光信号可以忽略,进一步验证了本发明的高选择性。

[0035] 具体实施例十一

人唾液中肿瘤标志物的检测

准确移取人唾液空白样品,进行加标回收检测,按照发明内容中实施例一至实施例八

的具体实验步骤构建传感器并进行检测,检测结果见表 1。

[0036] 表 1 人唾液中多种肿瘤标志物的检测结果

肿瘤标志物	加入量 ng/mL	唾液样品		
		检出值($n=5$, $\bar{x} \pm s$) ng/mL	RSD (%)	回收率 (%)
甲胎蛋白 (AFP)	4×10^{-7}	$(3.85 \pm 0.10) \times 10^{-7}$	2.6	96.3%
癌胚抗原 (CEA)	4×10^{-7}	$(3.90 \pm 0.07) \times 10^{-7}$	1.8	97.5%
前列腺特异性抗 (PSA)	4×10^{-7}	$(4.39 \pm 0.09) \times 10^{-7}$	2.1	109.8%
碱性磷酸酶 (ALP)	4×10^{-7}	$(3.65 \pm 0.09) \times 10^{-7}$	2.5	91.3%
人绒毛膜促性腺激素 (HCG)	4×10^{-7}	$(3.92 \pm 0.08) \times 10^{-7}$	2.0	98.0%

由表 1 检测结果可知,结果的相对标准偏差(RSD)小于 2.6%,平均回收率为 91 ~ 110%,表明本发明对于人唾液中多种肿瘤标志物的检测精密度高,结果准确可靠。

[0037] 以上结果说明,基于生物条形码模式构建的检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器灵敏度高、检测限低、选择性高、操作简单、结果准确可靠、重现性好。只需改变本电化学发光免疫传感器中的抗体,即可实现对不同目标肿瘤标志物的高灵敏度、特异性检测。

[0038] 当然,上述说明并非对本发明的限制,本发明也并不限于上述举例。本技术领域的普通技术人员在本发明的实质范围内,作出的变化、改型、添加或替换,也应属于本发明的保护范围。

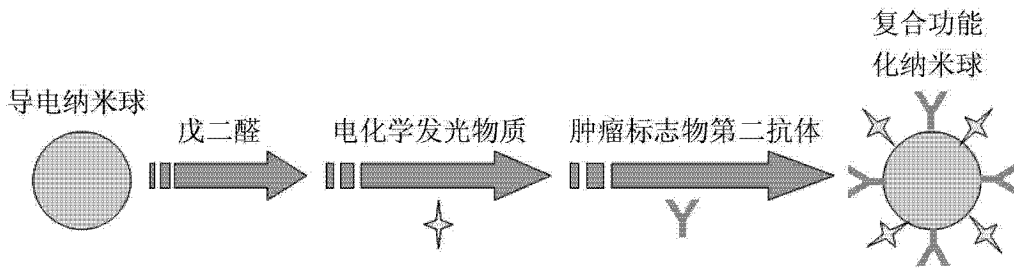


图 1

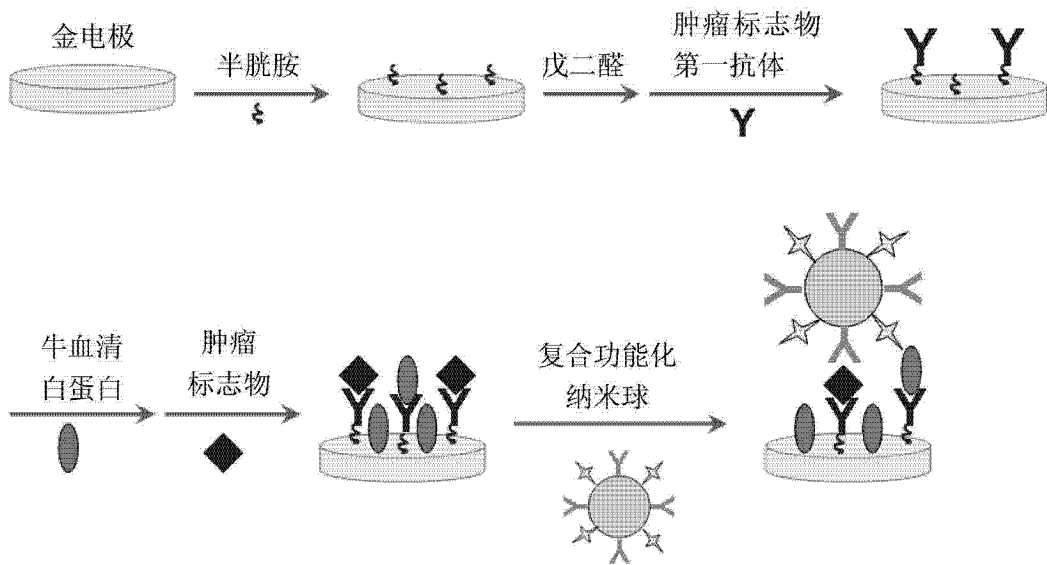


图 2

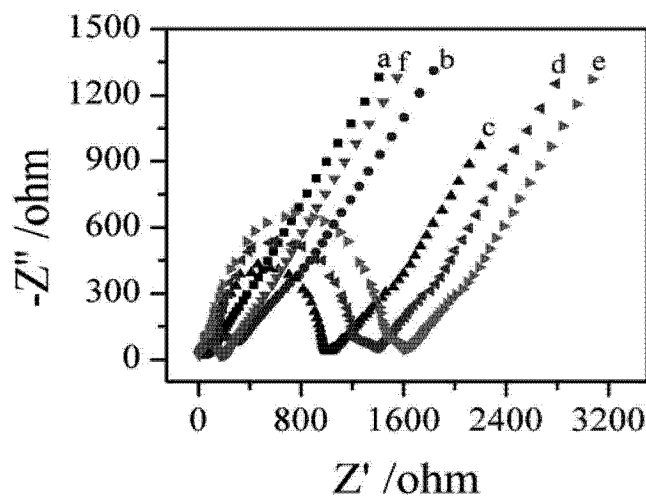


图 3

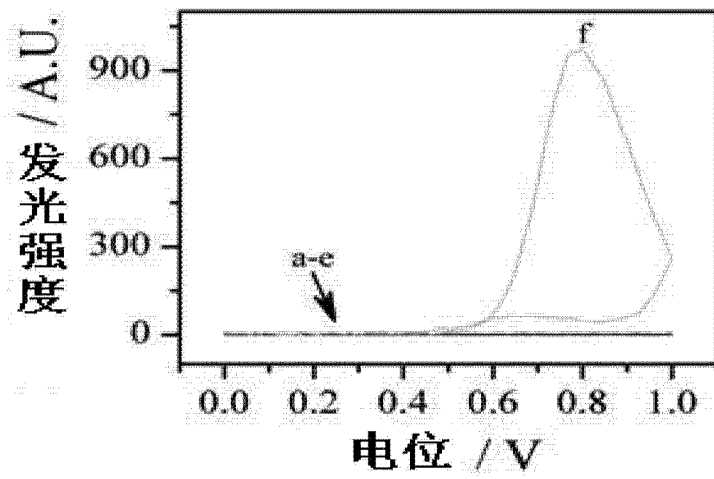


图 4

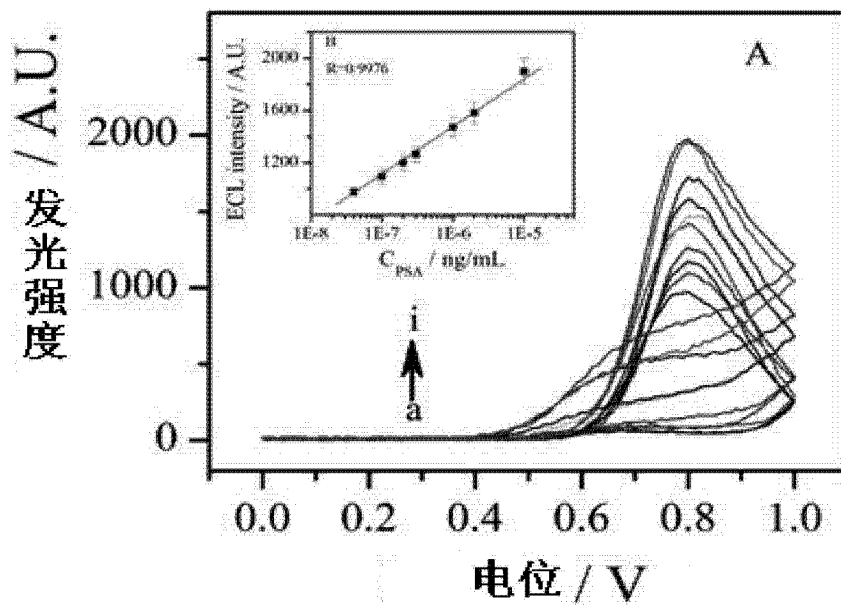


图 5

专利名称(译)	用于检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN103116023A	公开(公告)日	2013-05-22
申请号	CN201310032294.1	申请日	2013-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	宁波大学		
申请(专利权)人(译)	宁波大学		
当前申请(专利权)人(译)	宁波大学		
[标]发明人	杜书平 郭智勇 郝婷婷 陈贝贝 王泽波		
发明人	杜书平 郭智勇 郝婷婷 陈贝贝 王泽波		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/532 G01N21/76		
代理人(译)	程晓明		
其他公开文献	CN103116023B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了用于检测肿瘤标志物的电化学发光免疫传感器及其制备方法和应用，该免疫传感器，包括工作电极、参比电极和对电极，所述的工作电极为表面依次修饰有半胱胺、戊二醛、肿瘤标志物第一抗体、肿瘤标志物、以及肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球的金电极，以牛血清蛋白封闭非特异性活性位点；其制备方法包括固载有肿瘤标志物第一抗体的金电极的制备步骤；肿瘤标志物第二抗体和电化学发光标记物同时标记的复合功能化纳米球的合成步骤；最后将得到的金电极和复合功能化纳米球组装成电化学发光免疫传感器的步骤，优点是灵敏度高、分析速度快、稳定、选择性强、重现性好、易于操作、方法灵活。

