



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109142331 A

(43)申请公布日 2019.01.04

(21)申请号 201810893750.4

(22)申请日 2018.08.08

(71)申请人 福建医科大学

地址 350004 福建省福州市台江区交通路  
88号

(72)发明人 彭花萍 黄种南 陈伟 吴伟华  
庄琼琼

(74)专利代理机构 福州智理专利代理有限公司  
35208

代理人 王义星

(51)Int.Cl.

G01N 21/76(2006.01)

G01N 27/416(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

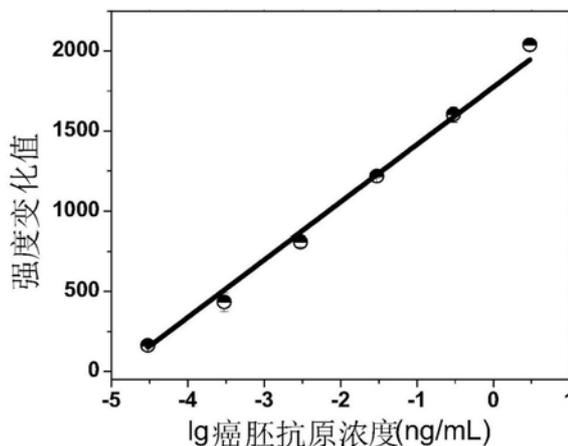
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种用于癌胚抗原检测的电致化学发光方法及其试剂盒

(57)摘要

本发明公开一种用于癌胚抗原检测的电致化学发光方法及其试剂盒。本发明以癌胚抗原为检测对象,将高量子产率金纳米团簇电致化学发光技术和免疫分析技术有机结合,采用还原法制备高量子产率金纳米团簇电致化学发光探针,以二氧化锰纳米材料作为电致化学发光猝灭剂,利用酶联免疫反应产生的抗坏血酸与二氧化锰的氧化还原反应恢复电致化学发光信号,由此发展一种基于高量子产率金纳米团簇探针的高性能电致化学发光癌胚抗原检测新方法及其检测试剂盒。本发明对癌胚抗原检测线性范围为 $3 \times 10^{-5}$  ng/mL~3 ng/mL,检测限为27 fg/mL。具有快速、准确、灵敏度高、选择性和稳定性好、样品用量少等特点,具有较好的临床应用前景。



1. 一种基于高量子产率金纳米团簇探针的电致化学发光癌胚抗原检测方法,其特征在于:首先在电极表面修饰金纳米团簇,通过还原法制备高量子产率金纳米团簇电致化学发光探针,并进一步在电极表面修饰二氧化锰纳米材料,将其作为电致化学发光信号猝灭剂;在空白酶标板固定癌胚抗原抗体,加入癌胚抗原,再加入生物素标记的癌胚抗原抗体,形成夹心免疫复合物;加入链霉亲和素-碱性磷酸酶,再加入2-磷酸-L-抗坏血酸三钠盐,通过碱性磷酸酶选择性水解2-磷酸-L-抗坏血酸三钠盐产生抗坏血酸;取出反应液,将电极浸入反应液中,电极表面的二氧化锰与反应液中的抗坏血酸发生氧化还原反应;采集修饰电极的电致化学发光信号,根据电致化学发光信号的改变实现癌胚抗原的检测。

2. 根据权利要求1所述的一种基于高量子产率金纳米团簇探针的电致化学发光癌胚抗原检测方法,其特征是所述还原法制备高量子产率金纳米团簇电致化学发光探针采用下述的电化学还原法或化学还原法制备:

(1) 电化学还原法:采用三电极体系进行还原,以金纳米团簇修饰玻碳电极为工作电极,铂丝电极为对电极,Ag/AgCl为参比电极,将上述电极插入0.1 mol/L、pH 7.4磷酸盐缓冲溶液中,施加-1.4 V~-2 V范围内负电位电压,进行恒电位还原处理5 min~1 h,得到电致化学发光金纳米团簇探针;

(2) 化学还原法:将金纳米团簇修饰玻碳电极浸泡在0.1~1 mol/L硼氢化钠溶液反应5 min~30 min,得到化学还原法制备的金纳米团簇探针修饰电极。

3. 根据权利要求1所述的一种基于高量子产率金纳米团簇探针的电致化学发光癌胚抗原检测方法,其特征是所述电极表面修饰二氧化锰纳米材料采用下述的电化学沉积法或滴涂法制备:

(1) 电化学沉积法:采用三电极体系,以还原法处理金纳米团簇修饰电极为工作电极,铂丝电极为对电极,Ag/AgCl为参比电极,采用I-t法,在1:1 V/V的KMnO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液中,电沉积二氧化锰,沉积电位为-0.1 V~-0.5 V,时间为100 s~600 s,清洗,氮气吹干;

(2) 滴涂法:首先制备二氧化锰纳米片,取500 μL 10 mmol/L的KMnO<sub>4</sub>溶液加入到1.25 mL、0.1 mol/L、pH 6.0的缓冲溶液中,加入去离子水使溶液最后的体积成5 mL后超声30 min,结束后12000 r.p.m离心10 min,用水洗3次,重新分散于2.5 mL去离子水中,得到二氧化锰纳米片溶液;取5 μL滴涂于金纳米团簇修饰电极表面,自然晾干。

4. 根据权利要求1所述的一种基于高量子产率金纳米团簇探针的电致化学发光癌胚抗原检测方法,其特征是所述在空白酶标板固定癌胚抗原抗体的方法为自组装法:取空白酶标板,在空白酶标板样品孔中加入1~5 mg/mL pH 8.5的多巴胺溶液50~100 μL,于4 °C反应1~5 h,反应结束后用水轻轻漂洗,拍干;再滴加0.1~0.5 mg/mL癌胚抗原抗体溶液,4 °C孵育8~12 h,漂洗;加入50~100 μL 1wt%~5wt%的牛血清白蛋白溶液,于4 °C反应0.5~2 h,洗涤,拍干。

5. 根据权利要求1所述的一种基于高量子产率金纳米团簇探针的电致化学发光癌胚抗原检测方法,其特征是所述加入癌胚抗原,再加入生物素标记的癌胚抗原抗体,形成夹心免疫复合物的方法为:在固定有癌胚抗原抗体酶标板的样品反应孔中加入样本,盖上封板膜,轻轻振荡混匀,37 °C温育30 min~60 min,洗涤,拍干;加入0.1~10 μg/mL生物素标记的癌胚抗原抗体50 μL,37 °C温育30 min~60 min,洗涤,拍干。

6. 根据权利要求1所述的一种基于高量子产率金纳米团簇探针的电致化学发光癌胚抗

原检测方法,其特征是所述加入链霉亲和素-碱性磷酸酶,再加入2-磷酸-L-抗坏血酸三钠盐的方法为:在形成夹心免疫复合物的酶标板孔中每孔分别加入50  $\mu\text{L}$ 的0.1~1 U/mL链霉亲和素-碱性磷酸酶和5~10 mmol/L 2-磷酸-L-抗坏血酸三钠盐溶液,轻轻振荡混匀,避光反应,37  $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min~60 min。

7. 根据权利要求1所述的一种基于高量子产率金纳米团簇探针的电致化学发光癌胚抗原检测方法,其特征是所述采集修饰电极的电致化学发光信号方法如下:采用三电极体系进行测试,以修饰电极为工作电极,铂丝电极为对电极,Ag/AgCl为参比电极,缓冲溶液为磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲溶液,所用电解质为KCl或 $\text{KNO}_3$ ;将上述电极插入含有过硫酸根离子共反应剂的缓冲溶液中,施加一定的扫描电压,工作电极表面产生电致化学发光辐射,光电倍增管高压设置为600~800 V,检测电致化学发光辐射信号。

8. 根据权利要求1~7任一所述的一种基于高量子产率金纳米团簇探针的电致化学发光癌胚抗原检测方法,其特征是所述根据电致化学发光信号的改变实现癌胚抗原的检测为:电极表面所采集的电致化学发光信号的电致化学发光强度值与癌胚抗原浓度的对数值在 $3 \times 10^{-5}$  ng/mL~3 ng/mL的范围内呈线性关系,检测限为27 fg/mL。

9. 一种权利要求1~8任一所述的基于高量子产率金纳米团簇探针的电致化学发光癌胚抗原检测方法的检测试剂盒,其特征是,包括金纳米团簇溶液、二氧化锰纳米材料、癌胚抗原抗体固定酶标板、癌胚抗原标准品、生物素标记的癌胚抗原抗体、链霉亲和素-碱性磷酸酶、2-磷酸-L-抗坏血酸三钠盐、洗涤液、电致化学发光测试电解质溶液。

10. 根据权利要求9所述的基于高量子产率金纳米团簇探针的电致化学发光癌胚抗原检测方法的检测试剂盒,其特征是所述的癌胚抗原抗体固定酶标板为:取空白酶标板,在空白酶标板样品孔中加入1~5 mg/mL pH 8.5的多巴胺溶液50~100  $\mu\text{L}$ ,于4  $^{\circ}\text{C}$ 反应1~5 h,反应结束后用水轻轻漂洗,拍干;再滴加0.1~0.5 mg/mL癌胚抗原抗体溶液,4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育8~12 h,漂洗;加入50~100  $\mu\text{L}$  1wt%~5wt% 的牛血清白蛋白溶液,于4  $^{\circ}\text{C}$ 反应0.5~2 h,洗涤,拍干;所述洗涤液为磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲溶液;所述的电致化学发光测试电解质溶液为含有过硫酸钾的缓冲溶液。

## 一种用于癌胚抗原检测的电致化学发光方法及其试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于高量子产率金纳米团簇探针的电致化学发光癌胚抗原检测方法及其检测试剂盒,属于分析化学及纳米技术领域。

### 背景技术

[0002] 恶性肿瘤是影响人民生命健康的一类重要疾病,成为全球最大的公共卫生问题。肿瘤标志物的确认及其灵敏检测已被广泛用于恶性肿瘤的诊断及对疗效、复发、预后的判断。癌胚抗原是国际上公认的一种肿瘤标志物,临床上癌胚抗原的检测对肺癌、胃癌、结肠癌、胰腺癌及其它腺上皮性恶性肿瘤等的诊断具有很大意义。目前用于检测血清中癌胚抗原含量的免疫分析方法已发展出很多种,如酶联免疫分析法、放射免疫分析法、化学发光免疫分析法、电致化学发光免疫分析和荧光免疫分析法等。其中,电致化学发光免疫分析是近几年发展迅速的一种新型免疫检测方法,已在临床分析及医药、免疫等领域广泛应用,该技术具有操作简单、快速、选择性好、线性范围宽,及易控制等诸多优良的性能特点,并且电致化学发光技术无需激发光源、背景信号底,不但可以有效避免常规荧光分析中的光漂白和背景干扰问题,而且比常规荧光分析法更为灵敏。

[0003] 寻找新型发光体,发展性能优良的电致化学发光体系是电致化学发光分析的重要研究方向。量子点或纳米团簇,因具有良好的光学和电学特性,在发光材料的研发、光敏传感器的构建等方面引起了越来越多的关注。在众多发光体中,金纳米团簇由于其特有的生物相容性好、量子尺寸效、特殊光电性质等特性,在生物标记、医学成像、生物传感器、催化和光电子学等领域被广泛应用。但是由于其电致化学发光强度小、量子产率低、发光机制不清楚等问题的限制,金纳米团簇在电致化学发光领域的研究还非常少。针对上述问题,本课题组通过纳米尺度调控制得了高量子产率的金纳米团簇探针新方法,并将其应用于细胞释放多巴胺的检测及小分子生物硫醇等生物分子的高灵敏、快速检测。针对临床肿瘤诊断和治疗的迫切需求,设计和制备基于新型功能化金纳米团簇的高量子产率电致化学发光免疫传感器并将其用于肿瘤标志物的检测具有较重要的学术创新性和临床应用价值。

[0004] 本发明提供了一种基于高量子产率金纳米团簇探针的电致化学发光癌胚抗原检测方法,及基于该方法制备的检测试剂盒。

### 发明内容

[0005] 本发明的一个目的在于提供一种基于高量子产率金纳米团簇探针的电致化学发光癌胚抗原检测方法。

[0006] 本发明的另一个目的在于提供一种基于高量子产率金纳米团簇探针的电致化学发光癌胚抗原检测试剂盒。

[0007] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案:一种基于高量子产率金纳米团簇探针的电致化学发光癌胚抗原检测方法,其特征在于:首先在电极表面修饰金纳米团簇,通过还原法制备高量子产率金纳米团簇电致化学发光探针,并进一步在电极表面修饰二氧化

锰纳米材料,将其作为电致化学发光信号猝灭剂;在空白酶标板固定癌胚抗原抗体,加入癌胚抗原,再加入生物素标记的癌胚抗原抗体,形成夹心免疫复合物;加入链霉亲和素-碱性磷酸酶,再加入2-磷酸-L-抗坏血酸三钠盐,通过碱性磷酸酶选择性水解2-磷酸-L-抗坏血酸三钠盐产生抗坏血酸;取出反应液,将电极浸入反应液中,电极表面的二氧化锰与反应液中的抗坏血酸发生氧化还原反应;采集修饰电极的电致化学发光信号,根据电致化学发光信号的改变实现癌胚抗原的检测。

[0008] 所述还原法制备高量子产率金纳米团簇电致化学发光探针采用下述的电化学还原法或化学还原法制备:

(1) 电化学还原法:采用三电极体系进行还原,以金纳米团簇修饰玻碳电极为工作电极,铂丝电极为对电极,Ag/AgCl为参比电极,将上述电极插入0.1 mol/L、pH 7.4磷酸盐缓冲溶液中,施加-1.4 V~-2 V范围内负电位电压,进行恒电位还原处理5 min~1 h,得到电致化学发光金纳米团簇探针;

(2) 化学还原法:将金纳米团簇修饰玻碳电极浸泡在0.1~1 mol/L硼氢化钠溶液反应5 min~30 min,得到化学还原法制备的金纳米团簇探针修饰电极。

[0009] 所述电极表面修饰二氧化锰纳米材料采用下述的电化学沉积法或滴涂法制备:

(1) 电化学沉积法:采用三电极体系,以还原法处理金纳米团簇修饰电极为工作电极,铂丝电极为对电极,Ag/AgCl为参比电极,采用I-t法,在1:1 V/V的KMnO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液中,电沉积二氧化锰,沉积电位为-0.1 V~-0.5 V,时间为100 s~600 s,清洗,氮气吹干;

(2) 滴涂法:首先制备二氧化锰纳米片,取500 μL 10 mmol/L的KMnO<sub>4</sub>溶液加入到1.25 mL、0.1 mol/L、pH 6.0的缓冲溶液中,加入去离子水使溶液最后的体积成5 mL后超声30 min,结束后12000 r.p.m离心10 min,用水洗3次,重新分散于2.5 mL去离子水中,得到二氧化锰纳米片溶液;取5 μL滴涂于金纳米团簇修饰电极表面,自然晾干。

[0010] 所述在空白酶标板固定癌胚抗原抗体的方法为自组装法:取空白酶标板,在空白酶标板样品孔中加入1~5 mg/mL pH 8.5的多巴胺溶液50~100 μL,于4 °C反应1~5 h,反应结束后用水轻轻漂洗,拍干;再滴加0.1~0.5 mg/mL癌胚抗原抗体溶液,4 °C孵育8~12 h,漂洗;加入50~100 μL 1wt%~5wt%的牛血清白蛋白溶液,于4 °C反应0.5~2 h,洗涤,拍干。

[0011] 所述加入癌胚抗原,再加入生物素标记的癌胚抗原抗体,形成夹心免疫复合物的方法为:在固定有癌胚抗原抗体酶标板的样品反应孔中加入样本,盖上封板膜,轻轻振荡混匀,37 °C温育30 min~60 min,洗涤,拍干;加入0.1~10 μg/mL生物素标记的癌胚抗原抗体50 μL,37 °C温育30 min~60 min,洗涤,拍干。

[0012] 所述加入链霉亲和素-碱性磷酸酶,再加入2-磷酸-L-抗坏血酸三钠盐的方法为:在形成夹心免疫复合物的酶标板孔中每孔分别加入50 μL的0.1~1 U/mL链霉亲和素-碱性磷酸酶和5~10 mmol/L 2-磷酸-L-抗坏血酸三钠盐溶液,轻轻振荡混匀,避光反应,37 °C温育30 min~60 min。

[0013] 所述采集修饰电极的电致化学发光信号方法如下:采用三电极体系进行测试,以修饰电极为工作电极,铂丝电极为对电极,Ag/AgCl为参比电极,缓冲溶液为磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲溶液,所用电解质为KCl或KNO<sub>3</sub>;将上述电极插入含有过硫酸根离子共反应剂的缓冲溶液中,施加一定的扫描电压,工作电极表面产生电致化学发光辐射,光电倍增管高压设置为600~800 V,检测电致化学发光辐射信号。

[0014] 所述根据电致化学发光信号的改变实现癌胚抗原的检测为:电极表面所采集的电致化学发光信号的电致化学发光强度值与癌胚抗原浓度的对数值在 $3 \times 10^{-5}$  ng/mL~3 ng/mL的范围内呈线性关系,检测限为27 fg/mL。

[0015] 本发明所述的基于高量子产率金纳米团簇探针的电致化学发光癌胚抗原检测方法的检测试剂盒,其特征在于,包括金纳米团簇溶液、二氧化锰纳米材料、癌胚抗原抗体固定酶标板、癌胚抗原标准品、生物素标记的癌胚抗原抗体、链霉亲和素-碱性磷酸酶、2-磷酸-L-抗坏血酸三钠盐、洗涤液、电致化学发光测试电解质溶液。

[0016] 所述的癌胚抗原抗体固定酶标板为:取空白酶标板,在空白酶标板样品孔中加入1~5 mg/mL pH 8.5的多巴胺溶液50~100  $\mu$ L,于4  $^{\circ}$ C反应1~5 h,反应结束后用水轻轻漂洗,拍干;再滴加0.1~0.5 mg/mL癌胚抗原抗体溶液,4  $^{\circ}$ C孵育8~12 h,漂洗;加入50~100  $\mu$ L 1wt%~5wt%的牛血清白蛋白溶液,于4  $^{\circ}$ C反应0.5~2 h,洗涤,拍干;所述洗涤液为磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲溶液;所述的电致化学发光测试电解质溶液为含有过硫酸钾的缓冲溶液。

[0017] 具体地说,为了实现上述目的,本发明采用以下具体技术方案:首先制备高量子产率金纳米团簇电致化学发光探针,以二氧化锰为电致化学发光猝灭剂,进而利用酶联免疫反应,在夹心免疫反应的基础上,基于链霉亲和素-碱性磷酸酶溶液和2-磷酸-L-抗坏血酸三钠盐反应产生的抗坏血酸与二氧化锰的氧化学原反应恢复电致化学发光信号,由此发展一种基于高量子产率金纳米团簇探针的电致化学发光免疫分析方法,用于肿瘤标志物癌胚抗原的高效检测。本发明包括以下步骤:

(一)高量子产率金纳米团簇探针制备

高量子产率金纳米团簇探针制备方法如下:

(1)电化学还原法:采用三电极体系进行还原,以金纳米团簇修饰玻碳电极为工作电极,铂丝电极为对电极,Ag/AgCl为参比电极,将上述电极插入缓冲溶液中,施加负电位电压(-1.4 V~-2 V范围内),进行恒电位还原处理5 min~1 h,得到电化学发光金纳米团簇探针。

[0018] (2)化学还原法:将金纳米团簇修饰玻碳电极浸泡在0.1~1 mol/L硼氢化钠溶液反应5~30 min(优选0.1 mol/L硼氢化钠溶液反应5 min),得到化学还原法制备的金纳米团簇探针修饰电极。

[0019] 所述的金纳米团簇材料为功能化修饰金纳米团簇,如:N-乙酰化-L-半胱氨酸-金纳米团簇,牛血清白蛋白-金纳米团簇等。

[0020] (二)电致化学发光信号采集方法

将电极抛光,再依次放入HNO<sub>3</sub>溶液、无水乙醇和去离子水中超声清洗,N<sub>2</sub>吹干。采用三电极体系进行测试,以修饰玻碳电极为工作电极,铂丝电极为对电极,Ag/AgCl为参比电极,将上述电极插入含有共反应剂的缓冲溶液中。采用阶跃脉冲法,初始电位为0 V,脉冲时间为10 s,终止电位为-2 V,脉冲时间为1 s。光电倍增管高压设置为600 V ~ 800 V,检测工作电极表面产生的电致化学发光信号。

[0021] 所述电极为玻碳电极、丝网印刷电极或ITO电极等。上述共反应剂为过硫酸根离子,浓度范围为0.01~1 mol/L,优选0.1 mol/L。所述缓冲溶液为磷酸盐缓冲液或Tris-HCl缓冲溶液,在缓冲溶液中所添加电解质为KCl或KNO<sub>3</sub>,浓度为0.01~1 mol/L,优选0.1 mol/L。

### [0022] (三) 二氧化锰纳米材料修饰方法

(1) 电化学沉积法: 采用三电极体系, 以还原法处理金纳米团簇修饰电极为工作电极, 铂丝电极为对电极, Ag/AgCl 为参比电极, 采用 I-t 法, 在  $\text{KMnO}_4\text{-H}_2\text{SO}_4$  (1:1 V/V) 溶液中, 电化学沉积二氧化锰, 沉积电位为  $-0.1\text{ V}\sim-0.5\text{ V}$ , 时间为  $100\text{ s}\sim 600\text{ s}$ , 优选  $-0.2\text{ V}$ ,  $300\text{ s}$ , 之后用双蒸水冲洗干净, 氮气吹干备用。

[0023] (2) 滴涂法: 首先制备二氧化锰纳米片, 取  $500\text{ }\mu\text{L}$   $10\text{ mmol/L}$  的  $\text{KMnO}_4$  溶液加入到  $1.25\text{ mL}$   $0.1\text{ mol/L}$  pH 6.0 的缓冲溶液中, 加入去离子水使溶液最后的体积成  $5\text{ mL}$  后超声  $30\text{ min}$ , 结束后  $12000\text{ r.p.m}$  离心  $10\text{ min}$ , 用水洗 3 次, 重新分散于  $2.5\text{ mL}$  去离子水中, 得到二氧化锰纳米片溶液。取  $5\text{ }\mu\text{L}$  滴涂于金纳米团簇修饰电极表面, 自然晾干。

### [0024] (四) 夹心免疫反应体系构建

夹心免疫反应体系构建具体步骤如下: (1) 将空白酶标板设空白孔 (空白对照孔不加样品, 其余各步骤操作相同)、标准品孔、待测样品孔。取空白酶标板, 在空白酶标板样品孔中加入  $50\text{ }\mu\text{L}$   $1\sim 5\text{ mg/mL}$  的多巴胺溶液 (pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液溶解), 于  $4\text{ }^\circ\text{C}$  反应  $1\sim 5\text{ h}$ , 反应结束后用水轻轻漂洗, 拍干。再滴加  $0.01\sim 0.5\text{ mg/mL}$  癌胚抗原抗体溶液,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  孵育  $8\sim 12\text{ h}$ , 漂洗。加入  $50\sim 200\text{ }\mu\text{L}$   $1\%\sim 5\%$  的牛血清白蛋白溶液, 于  $4\text{ }^\circ\text{C}$  反应  $0.5\sim 2\text{ h}$ , 反应完成后洗涤 (小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 秒后弃去, 如此重复 4 次, 拍干)。然后在标准品孔中加入癌胚抗原标准溶液  $50\text{ }\mu\text{L}$ , 在样品反应孔中加入  $50\text{ }\mu\text{L}$  样本, 盖上封板膜, 轻轻振荡混匀,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  温育  $30\sim 60\text{ min}$ , 洗涤, 拍干, 再加入  $0.1\sim 10\text{ }\mu\text{g/mL}$  生物素标记的癌胚抗原抗体  $50\text{ }\mu\text{L}$ ,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  温育  $30\sim 60\text{ min}$ , 洗涤, 拍干。每孔加入  $0.1\sim 1\text{ U/mL}$  链霉亲和素-碱性磷酸酶溶液  $50\text{ }\mu\text{L}$ , 轻轻振荡混匀,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  温育  $30\sim 60\text{ min}$ , 用  $10\text{ mM}$  pH=7.3 Tris-HCl 缓冲液洗涤, 拍干。

### [0025] (五) 癌胚抗原的测定

癌胚抗原检测步骤如下: 往上述构建的所述的夹心免疫反应体系的酶标板中加入  $5\sim 10\text{ mmol/L}$  2-磷酸-L-抗坏血酸三钠盐溶液  $50\text{ }\mu\text{L}$ , 再加入  $10\text{ mM}$  pH=8.0 Tris-HCl 缓冲溶液  $50\text{ }\mu\text{L}$ , 轻轻振荡混匀,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  避光反应  $25\sim 30\text{ min}$ 。将上述二氧化锰/金纳米团簇修饰电极浸入上述反应液中浸泡  $4\sim 10\text{ min}$ , 取出后用双蒸水冲洗干净,  $\text{N}_2$  吹干。采集工作电极表面产生的电致化学发光信号, 以电致化学发光信号对癌胚抗原浓度作图绘制标准曲线。

### [0026] (六) 试剂盒

一种基于高量子产率金纳米团簇探针的电致化学发光癌胚抗原检测试剂盒, 其中包括金纳米团簇溶液、二氧化锰纳米材料、癌胚抗原抗体固定酶标板、癌胚抗原标准品、生物素标记的癌胚抗原抗体、链霉亲和素-碱性磷酸酶、2-磷酸-L-抗坏血酸三钠盐、洗涤液、电致化学发光测试电解质溶液。

[0027] 与现有技术相比, 本发明的有益效果为:

本发明以高量子产率金纳米团簇探针为电致化学发光材料, 以纳米二氧化锰为电致化学发光猝灭剂, 利用酶联免疫反应产生抗坏血酸恢复其电致化学发光信号实现癌胚抗原的检测。本发明对癌胚抗原的检测灵敏度高、操作简单, 可有效避免检测过程中实际样品复杂成份的干扰, 因而特异性好、准确度高。并且, 本发明成本低、制作简单、稳定性好、灵敏度高, 线性范围宽 ( $3\times 10^{-5}\text{ ng/mL}\sim 3\text{ ng/mL}$ ), 检测限低 ( $27\text{ fg/mL}$ ), 具有很好的市场价值。

## 附图说明

- [0028] 图1为金纳米团簇探针修饰玻碳电极的电致化学发光-时间曲线图。
- [0029] 图2为二氧化锰/金纳米团簇探针修饰玻碳电极的电致化学发光-时间曲线图。
- [0030] 图3为本发明检测癌胚抗原的电致化学发光-时间曲线图(癌胚抗原浓度为1 ng/mL)。
- [0031] 图4为电致化学发光强度变化与癌胚抗原浓度对数值之间的线性关系图。

## 具体实施方式

- [0032] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步阐述,本发明并不限于此。
- [0033] 本发明所用的癌胚抗原抗体(CEA抗体,武汉默沙克生物科技有限公司),癌胚抗原(CEA标准品,武汉默沙克生物科技有限公司),生物素标记的癌胚抗原抗体(生物素标记的CEA抗IgG抗体,武汉默沙克生物科技有限公司),链霉亲和素-碱性磷酸酶(ExtrAvidin Alkaline Phosphatase conjugate,武汉博士德生物工程有限公司),2-磷酸-L-抗坏血酸三钠盐(2-Phospho-L-ascorbic acid trisodium salt,Sigma-Aldrich公司)为现有技术产品。

### [0034] 实施例1

取0.6 mL 0.5 mol/L的NaOH与0.4 mL 20 mg/mL氯金酸溶液加入到4 mL 0.08 mol/L的N-乙酰-L-半胱氨酸溶液中,混匀后置于37 °C恒温水槽中孵育3小时。待反应结束后,用分子量为3000的透析袋对反应液透析纯化24 h,得到纯化后的N-乙酰-L-半胱氨酸保护的金纳米团簇溶液,于4 °C冰箱避光保存。

### [0035] 实施例2

将直径3 mm的玻碳电极用1.0 μm、0.3 μm、0.05 μm的Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>粉末依次抛光,打磨,至光滑镜面,再依次放入HNO<sub>3</sub>溶液,无水乙醇,去离子水中超声清洗3分钟,N<sub>2</sub>吹干。取5 μL实施例1制备的N-乙酰-L-半胱氨酸保护的金纳米团簇溶液滴加在处理好的玻碳电极表面,室温干燥,并进一步将该电极浸泡在0.1 mol/L硼氢化钠溶液中反应5分钟,得到金纳米团簇探针修饰电极。将上述电极插入含有0.1 mol/L过硫酸钾和0.1 mol/L KCl的0.1 mol/L pH 7.4磷酸盐缓冲溶液中。采用阶跃脉冲法,初始电位为0 V,脉冲时间为10 s,终止电位为-2 V,脉冲时间为1 s。光电倍增管高压设置为750 V,检测工作电极表面产生的电致化学发光信号,得到电致化学发光信号(见图1)。

### [0036] 实施例3

将直径3 mm的玻碳电极用1.0 μm、0.3 μm、0.05 μm的Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>粉末依次抛光,打磨,至光滑镜面,再依次放入HNO<sub>3</sub>溶液,无水乙醇,去离子水中超声清洗3分钟,N<sub>2</sub>吹干。取5 μL实施例1制备的N-乙酰-L-半胱氨酸保护的金纳米团簇溶液滴加在处理好的玻碳电极表面,室温干燥,并进一步将该电极浸泡在0.1 mol/L硼氢化钠溶液中反应5分钟,得到金纳米团簇探针修饰玻碳电极。采用三电极体系,以金纳米团簇探针修饰玻碳电极为工作电极,铂丝电极为对电极,Ag/AgCl为参比电极,采用计时电流法,在KMnO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(1:1 V/V)溶液中,电沉积二氧化锰,沉积电位为-0.2 V,沉积时间为300 s,所得到的电极为二氧化锰/金纳米团簇修饰玻碳电极,之后用双蒸水冲洗干净,N<sub>2</sub>气轻轻吹干备用。将上述电极插入含有0.1 mol/L过硫酸钾和0.1 mol/L KCl的0.1 mol/L pH 7.4磷酸盐缓冲溶液中。采用阶跃脉冲法,初始

电位为0 V,脉冲时间为10 s,终止电位为-2 V,脉冲时间为1 s。光电倍增管高压设置为750 V,检测工作电极表面产生的电致化学发光信号,得到电致化学发光信号(见图2)。

#### [0037] 实施例4

取空白酶标板,在空白酶标板样品孔中加入50  $\mu\text{L}$  5 mg/mL的多巴胺溶液(pH 8.5的Tris-HCl缓冲溶液溶解),于4  $^{\circ}\text{C}$ 反应2 h,反应结束后用水轻轻漂洗,拍干。再滴加100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 癌胚抗原抗体溶液,4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育12 h。孵育结束后用水轻轻漂洗,以便除去电极表面非特异性吸附的抗体。接着加入1%的牛血清白蛋白溶液50  $\mu\text{L}$ ,于4  $^{\circ}\text{C}$ 反应1 h,反应完成后洗涤(小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置30秒后弃去,如此重复4次,拍干),得到癌胚抗原抗体固定酶标板。

#### [0038] 实施例5

在实施例4制备的癌胚抗原抗体固定酶标板的标准品孔中加入1 ng/mL的癌胚抗原标准溶液50  $\mu\text{L}$ ,盖上封板膜,轻轻振荡混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min,洗涤,拍干,再加入0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 生物素标记的癌胚抗原抗体50  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min,洗涤,拍干。每孔加入0.2 U/mL链霉亲和素-碱性磷酸酶溶液50  $\mu\text{L}$ (37  $^{\circ}\text{C}$ 预热30 min),轻轻振荡混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 温育45 min,洗涤,拍干。再往上述酶标板中加入8 mmol/L的2-磷酸-L-抗坏血酸三钠盐溶液50  $\mu\text{L}$ (37  $^{\circ}\text{C}$ 预热30 min),再加入pH=8.0 Tri-Hcl 50  $\mu\text{L}$ ,轻轻振荡混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 避光反应25 min。将各个孔中的液体取出,加入2 mL的EP管当中,将处理好的电极放入各个对应浓度EP管中浸泡10 min,取出后用双蒸水冲洗干净, $\text{N}_2$ 吹干。将上述电极插入含有0.1 mol/L过硫酸钾和0.1 mol/L KCl的0.1 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液中。采用阶跃脉冲法,初始电位为0 V,脉冲时间为10 s,终止电位为-2 V,脉冲时间为1 s。光电倍增管高压设置为750 V,检测工作电极表面产生的电致化学发光信号,得到的电致化学发光信号比未加癌胚抗原的溶液明显增大(图3)。

#### [0039] 实施例6

取空白酶标板,将空白酶标板设空白孔(空白对照孔不加样品,其余各步骤操作相同)、标准品孔、待测样品孔。在空白酶标板各孔中加入50  $\mu\text{L}$  5 mg/mL的多巴胺溶液(pH 8.5的Tris-HCl缓冲溶液溶解),于4  $^{\circ}\text{C}$ 反应2 h,反应结束后用水轻轻漂洗,拍干。再滴加200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 癌胚抗原抗体溶液,4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育12 h。孵育结束后用水轻轻漂洗,以便除去电极表面非特异性吸附的抗体。接着加入1%的牛血清白蛋白溶液50  $\mu\text{L}$ ,于4  $^{\circ}\text{C}$ 反应1 h,反应完成后洗涤(小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置30秒后弃去,如此重复4次,拍干)。然后在标准品孔中加入不同浓度的癌胚抗原标准溶液50  $\mu\text{L}$ ,盖上封板膜,轻轻振荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min,洗涤,拍干,再加入0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 生物素标记的癌胚抗原抗体50  $\mu\text{L}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min,洗涤,拍干。每孔加入0.2 U/mL 链霉亲和素-碱性磷酸酶溶液50  $\mu\text{L}$ (37 $^{\circ}\text{C}$ 预热30 min),轻轻振荡混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 温育45 min,洗涤,拍干。再往上述酶标板中加入8 mmol/L的2-磷酸-L-抗坏血酸三钠盐溶液50  $\mu\text{L}$ (37  $^{\circ}\text{C}$ 预热30 min),再加入pH=8.0 Tri-Hcl 50  $\mu\text{L}$ ,轻轻振荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应25 min。将各个孔中的液体取出,加入2 mL的EP管当中,将处理好的电极放入各个对应浓度EP管中浸泡10 min。取出后用双蒸水冲洗干净, $\text{N}_2$ 吹干。将上述电极插入含有0.1 mol/L过硫酸钾和0.1 mol/L KCl的0.1 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液中。采用阶跃脉冲法,初始电位为0 V,脉冲时间为10 s,终止电位为-2 V,脉冲时间为1 s。光电倍增管高压设置为750 V,检测工作电极表面产生的电致化学发光信号,在癌胚抗原

浓度为 $3 \times 10^{-5}$  ng/mL~3 ng/mL的范围内癌胚抗原浓度的对数值与电致化学发光强度值呈良好的线性关系,检测限为27 fg/mL(见图4)。

#### [0040] 实施例7

取500  $\mu$ L 10 mmol/L 的 $\text{KMnO}_4$ 溶液加入到1.25 mL 0.1 mol/L pH 6.0的2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)缓冲溶液中,加入去离子水使溶液最后的体积成5 mL后超声30 min,结束后12000 r.p.m离心10 min,用水洗3次,重新分散于2.5 mL去离子水中,得到二氧化锰纳米片溶液。

#### [0041] 实施例8

试剂盒使用方法:(1)取5  $\mu$ L实施例1制备的N-乙酰-L-半胱氨酸保护的金纳米团簇滴加在处理好的玻碳电极表面,室温干燥。并进一步将该电极浸泡在0.1 mol/L硼氢化钠溶液中反应5分钟,得到金纳米团簇探针修饰玻碳电极。取6  $\mu$ L实施例7制备的 $\text{MnO}_2$ 纳米片溶液滴加在上述金纳米团簇探针修饰玻碳电极表面,室温干燥,得到二氧化锰/金纳米团簇修饰玻碳电极。(2)取实施例4制备的癌胚抗原抗体固定酶标板,将其设为空白孔(空白对照孔不加样品,其余各步骤操作相同)、标准品孔、待测样品孔。在空白酶标板各孔中加入50  $\mu$ L 5 mg/mL的多巴胺溶液(pH 8.5的Tris-HCl缓冲溶液溶解),于4  $^{\circ}\text{C}$ 反应2 h,反应结束后用水轻轻漂洗,拍干。再滴加200 ng/mL癌胚抗原抗体溶液,4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育12 h。孵育结束后用水轻轻漂洗,以便除去电极表面非特异性吸附的抗体。接着加入50  $\mu$ L 1%的BSA溶液,于4  $^{\circ}\text{C}$ 反应1 h,反应完成后洗涤(小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置30秒后弃去,如此重复4次,拍干)。然后在标准品孔中加入不同浓度的癌胚抗原标准溶液50  $\mu$ L,盖上封板膜,轻轻振荡混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min,洗涤,拍干,再加入0.5  $\mu\text{g/mL}$ 生物素标记的癌胚抗原抗体50  $\mu$ L,37  $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min,洗涤,拍干。每孔加入0.2 U/mL的链霉亲和素-碱性磷酸酶溶液50  $\mu$ L(37  $^{\circ}\text{C}$ 预热30 min),轻轻振荡混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 温育45 min,洗涤,拍干。再往上述酶标板中加入8 mmol/L的2-酸磷-L-抗坏血酸三钠盐溶液50  $\mu$ L(37  $^{\circ}\text{C}$ 预热30 min),再加入pH=8.0 Tri-HCl 50  $\mu$ L,轻轻振荡混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 避光反应25 min。(3)将各个孔中的液体取出,加入2 mL的EP管当中,将处理好的电极放入各个对应浓度EP管中浸泡10 min。取出后用双蒸水冲洗干净, $\text{N}_2$ 吹干。将上述电极插入含有0.1 mol/L过硫酸钾和0.1 mol/L KCl的0.1 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液中。采用阶跃脉冲法,初始电位为0 V,脉冲时间为10 s,终止电位为-2 V,脉冲时间为1 s。光电倍增管高压设置为750 V,检测工作电极表面产生的电致化学发光信号,在癌胚抗原浓度为 $3 \times 10^{-5}$  ng/mL~3 ng/mL的范围内癌胚抗原浓度的对数值与电致化学发光强度变化值呈良好的线性关系,检测限为27 fg/mL。

[0042] 以上所述仅为本发明的典型实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改,等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

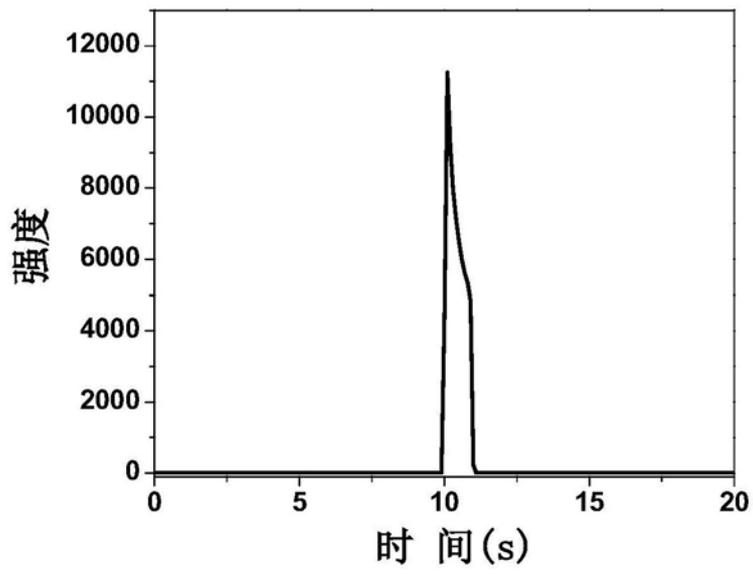


图1

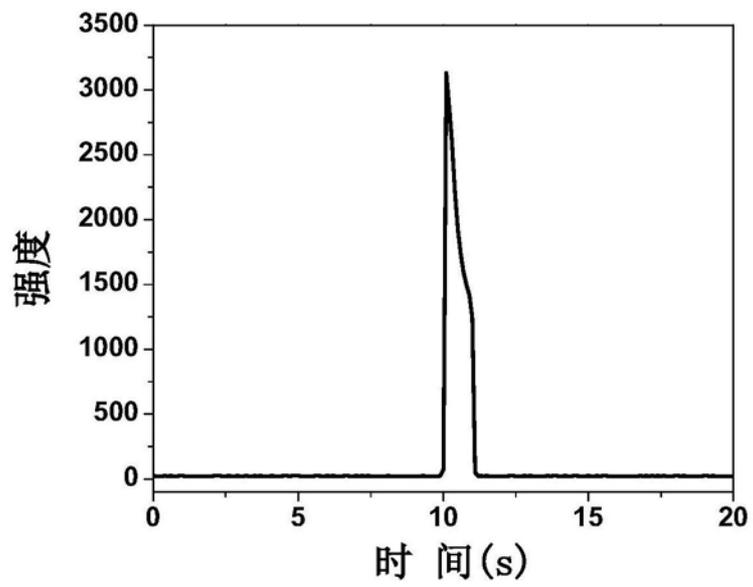


图2

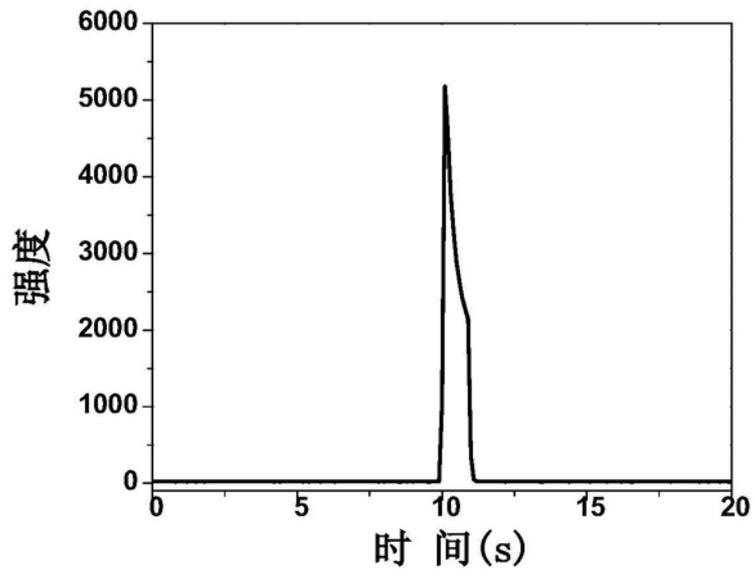


图3

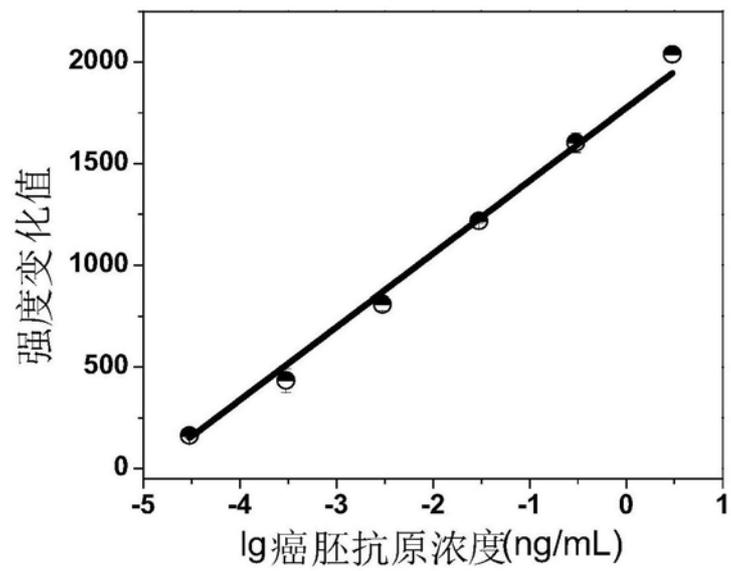


图4

专利名称(译)	一种用于癌胚抗原检测的电致化学发光方法及其试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN109142331A</a>	公开(公告)日	2019-01-04
申请号	CN201810893750.4	申请日	2018-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	福建医科大学		
申请(专利权)人(译)	福建医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	福建医科大学		
[标]发明人	彭花萍 黄种南 陈伟 吴伟华 庄琼琼		
发明人	彭花萍 黄种南 陈伟 吴伟华 庄琼琼		
IPC分类号	G01N21/76 G01N27/416 G01N33/53		
CPC分类号	G01N21/76 G01N27/416 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开一种用于癌胚抗原检测的电致化学发光方法及其试剂盒。本发明以癌胚抗原为检测对象，将高量子产率金纳米团簇电致化学发光技术和免疫分析技术有机结合，采用还原法制备高量子产率金纳米团簇电致化学发光探针，以二氧化锰纳米材料作为电致化学发光猝灭剂，利用酶联免疫反应产生的抗坏血酸与二氧化锰的氧化还原反应恢复电致化学发光信号，由此发展一种基于高量子产率金纳米团簇探针的高性能电致化学发光癌胚抗原检测新方法及其检测试剂盒。本发明对癌胚抗原检测线性范围为 $3 \times 10^{-5}$  ng/mL~3 ng/mL，检测限为27 fg/mL。具有快速、准确、灵敏度高、选择性和稳定性好、样品用量少等特点，具有较好的临床应用前景。

