



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104634973 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 20

(21) 申请号 201510071326. 8

(22) 申请日 2015. 02. 11

(71) 申请人 曲阜师范大学

地址 273165 山东省济宁市曲阜市静轩西路
57 号

(72) 发明人 渠凤丽 赵岩

(74) 专利代理机构 济南泉城专利商标事务所
37218

代理人 李桂存

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

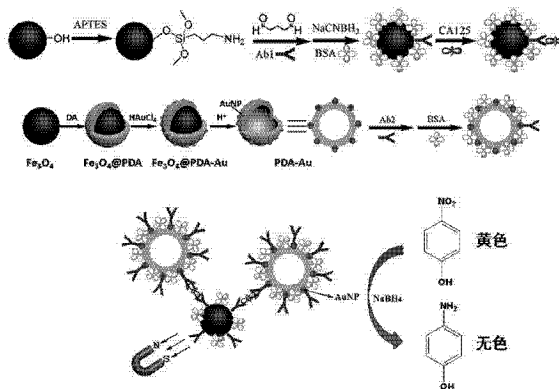
权利要求书2页 说明书8页 附图9页

(54) 发明名称

一种纳米金复合材料免疫传感器的制备方法
及应用

(57) 摘要

本发明提供一种纳米金复合材料免疫传感器的制备方法及应用,将氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠分散到 Tris 缓冲溶液中与癌症标志物抗体 (Ab1) 相连后作为易分离的免疫探针;中空聚多巴胺-金纳米材料 (PDA-Au) 分散到 Tris 缓冲溶液中与癌症标志物抗体 (Ab2) 相连作为免疫识别物质。Ab1 与 Ab2 与对应癌症标志抗原特异性结合构成三明治夹心免疫体系。通过磁性将该免疫体系分离出来,随后加入到对硝基苯酚与硼氢化钠的混合水溶液中,通过紫外可见仪进行测定。本发明制备得到的纳米金复合材料免疫传感器免疫检测线性范围为 $0 \sim 100U/mL$, 检测下限达 $0.05U/mL$, 相关系数达 0.998。



1. 一种纳米金复合材料免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 制备氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠

将直径为 200 ~ 250nm 的 Fe_3O_4 纳米磁珠分散到水中, Fe_3O_4 纳米磁珠浓度为 0.2 ~ 0.8mg/mL 水,然后按浓度为 0.1 ~ 0.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 水加入 3- 氨丙基三乙氧基硅烷,混合均匀,于 15 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 3 ~ 12h,得到氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠;

(2) 制备中空聚多巴胺 - 金纳米材料

a) 将直径为 200 ~ 250nm 的 Fe_3O_4 纳米磁珠加入到 pH 为 8.5 的 Tris 缓冲溶液中,配制成 1.0 ~ 2.0mg/mL Fe_3O_4 纳米磁珠的 Tris 分散液,然后加入多巴胺盐酸盐, Fe_3O_4 纳米磁珠与多巴胺盐酸盐的质量比为 1:0.8 ~ 1.2,混合均匀,于 15 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应 3 ~ 24h,磁分离,得 Fe_3O_4 - 聚多巴胺纳米颗粒;

b) 将 Fe_3O_4 - 聚多巴胺纳米颗粒配制成浓度为 0.05 ~ 0.1mg/mL 的溶液,然后加入质量分数为 1% 的 HAuCl_4 水溶液, Fe_3O_4 - 聚多巴胺与 HAuCl_4 水溶液的体积比为 150 ~ 250 :1,混合均匀,于 80 ~ 100 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应 20 ~ 40 min,磁分离,得 Fe_3O_4 - 聚多巴胺 -Au 纳米材料;

c) 将 Fe_3O_4 - 聚多巴胺 -Au 纳米材料配制成浓度为 1.5 ~ 2.5mg/mL 的溶液,加入浓度为 5.5 ~ 6.5mol/L 的盐酸水溶液 1.5 ~ 2.5mL,于 15 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应 5 ~ 8h,得中空聚多巴胺 - 纳米金材料;

(3) 制备免疫传感器

a) 将步骤(1)制备的氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠分散到 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中,配制成浓度为 0.5 ~ 2.0mg/mL 的分散液,按分散液与戊二醛水溶液的体积比 0.5 ~ 2.0 :1 加入浓度为 2.5wt% 的戊二醛水溶液,于 15 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应 3 ~ 12h,得到功能化 Fe_3O_4 纳米磁珠,将功能化 Fe_3O_4 纳米磁珠磁分离后重新分散到 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中,配制成浓度为 0.5 ~ 1.5mg/mL 的分散液,加入浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的癌症标志物抗体,即一抗 /Ab1,功能化 Fe_3O_4 纳米磁珠分散液与一抗 /Ab1 的体积比为 5 ~ 20 :1,37 $^{\circ}\text{C}$ 下震荡 0.5 ~ 2h,随后加入浓度为 1wt% 的 BSA 用以封闭非特异性结合位点,功能化 Fe_3O_4 纳米磁珠分散液与加入的 BSA 的体积比为 0.5 ~ 2 :1,37 $^{\circ}\text{C}$ 下震荡 10 ~ 60min 后磁分离,随后加入 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液混合均匀,再次磁分离,将其重新分散到 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中,配制成质量浓度为 0.5 ~ 2.0mg/mL 的分散液,然后向上述分散液中加入质量浓度为 1mg/mL 的 NaBH_3CN 水溶液,加入的 NaBH_3CN 水溶液与上述分散液的体积比为 0.5 ~ 2 :1,然后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡 10 ~ 60min,得到 Fe_3O_4 -Ab1;

b) 将上步得到的 Fe_3O_4 -Ab1 分散到 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中配制成浓度为 0.5 ~ 1.5mg/mL 的分散液,加入到从 0 U/mL 到 100 U/mL 的不同浓度的癌症标志物的抗原中,其中 Fe_3O_4 -Ab1 分散液与相对应的癌症标志物的抗原的体积比为 0.5 ~ 2 :1,37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡 10 ~ 60min,得到 Fe_3O_4 -Ab1- 癌标;

c) 将步骤(2)制得的中空聚多巴胺 - 纳米金材料分散到 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中配制成浓度为 0.5 ~ 2.0mg/mL 的中空聚多巴胺 - 纳米金分散液,然后加入浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的癌症标志物抗体,即二抗 /Ab2, 中空聚多巴胺 - 纳米金分散液与二抗 /Ab2 的体积比为 5 ~ 20 :1,37 $^{\circ}\text{C}$ 下震荡 0.5 ~ 2h,随后按中空聚多巴胺 - 纳米金分散液与 BSA 的体积比为 0.5 ~ 2 :1 加入浓度为 1wt% 的 BSA 用以封闭非特异性结合位点,37 $^{\circ}\text{C}$ 下震荡 10 ~ 60min,离心分离,将分离出的固体重新分散到 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中,配制成浓度为 0.5 ~ 2.0mg/

mL 的中空聚多巴胺 - 纳米金溶液, 然后按中空聚多巴胺 - 纳米金分散液与 Fe_3O_4 -Ab1- 癌标的体积比为 0.5 ~ 2 : 1 加入浓度为 0.5 ~ 2.0mg/mL 的 Fe_3O_4 -Ab1- 癌标, 于 37°C 下震荡 10 ~ 60min 后磁分离, 随后加入 10 ~ 20mL pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液混合均匀, 再次磁分离, 然后加入到对硝基苯酚和硼氢化钠混合水溶液中, 得混合溶液, 通过对溶液中对硝基苯酚紫外 - 可见光谱吸收的变化, 即可实现癌症标志物抗原的检测。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法, 其特征在于: 步骤(3) 的 c) 中所述的对硝基苯酚和硼氢化钠混合水溶液中, 对硝基苯酚水溶液的摩尔浓度范围为 0.05 ~ 0.2mmol/L, 硼氢化钠水溶液浓度为 0.1 mol/L, 对硝基苯酚水溶液与硼氢化钠水溶液的体积比为 0.5 ~ 2 : 1。

3. 根据权利要求 1 所述的制备方法, 其特征在于: 所述的 Tris 缓冲溶液的浓度为 8 ~ 12mmol/L。

4. 根据权利要求 1 所述的制备方法, 其特征在于: 本发明制备得到的纳米金复合材料免疫传感器免疫检测线性范围为 0 ~ 100U/mL, 检测下限达 0.05U/mL, 相关系数达 0.998。

5. 上述权利要求 1 所述制备方法得到的纳米金复合材料免疫传感器的应用, 其特征在于: 用于检测癌症标志物抗原或者具有特异性结合特点的特征蛋白质。

一种纳米金复合材料免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于传感器领域,具体涉及一种纳米金复合材料免疫传感器的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 纳米金由于具有小尺寸效应、表面效应、粒度可控,在生物医学工程、电子学、催化工程等方面一直被广泛应用。将纳米金负载在不同的载体上可形成一系列新型的纳米金催化剂,从而可用于不同的催化体系。同时,纳米金由于其生物相容性,已广泛应用到生物传感器的研究开发中,而在生物传感器的发展改进过程中,主要工作集中在提高信号灵敏度,降低检测下限方面上。目前,纳米金作为催化剂应用到生物传感器上使用效率仍然较低。

发明内容

[0003] 本发明所要解决的技术问题在于克服现有技术的缺陷,提供一种纳米金复合材料免疫传感器的制备方法,本发明方法制备的免疫传感器是利用纳米金颗粒在对硝基苯酚还原成为对氨基苯酚的过程中具有良好的催化还原能力,还原过程中会产生颜色的变化,通过对硝基苯酚的紫外/可见吸收变化进行测定。

[0004] 本发明还提供了上述免疫传感器应用。

[0005] 本发明纳米金复合材料免疫传感器的制备方法,包括以下步骤:

(1) 制备氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠

将直径为 200 ~ 250nm 的 Fe_3O_4 纳米磁珠分散到水中, Fe_3O_4 纳米磁珠浓度为 0.2 ~ 0.8mg/mL 水,然后按浓度为 0.1 ~ 0.4 $\mu\text{L/mL}$ 水加入 3-氨基丙基三乙氧基硅烷,混合均匀,于 15 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 3 ~ 12h,得到氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠;

(2) 制备中空聚多巴胺-金纳米材料(PDA-Au)

a) 将直径为 200 ~ 250nm 的 Fe_3O_4 纳米磁珠加入到 pH 为 8.5 的三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲溶液中,配制成 1.0 ~ 2.0mg/mL Fe_3O_4 纳米磁珠的 Tris 分散液,然后加入多巴胺盐酸盐, Fe_3O_4 纳米磁珠与多巴胺盐酸盐的质量比为 1:0.8 ~ 1.2,混合均匀,于 15 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应 3 ~ 24h,磁分离,得 Fe_3O_4 -聚多巴胺纳米颗粒;

b) 将 Fe_3O_4 -聚多巴胺纳米颗粒配制成浓度为 0.05 ~ 0.1mg/mL 的溶液,然后加入质量分数为 1% 的氯金酸(HAuCl_4)水溶液, Fe_3O_4 -聚多巴胺与氯金酸(HAuCl_4)水溶液的体积比为 150 ~ 250 :1,混合均匀,于 80 ~ 100 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应 20 ~ 40 min,磁分离,得 Fe_3O_4 -聚多巴胺-Au 纳米材料;

c) 将 Fe_3O_4 -聚多巴胺-Au 纳米材料配制成浓度为 1.5 ~ 2.5mg/mL 的溶液,加入浓度为 5.5 ~ 6.5mol/L 的盐酸水溶液 1.5 ~ 2.5mL,于 15 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应 5 ~ 8h,得中空聚多巴胺-纳米金材料;

(3) 制备免疫传感器

a) 将步骤(1)制备的氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠分散到 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中,配

制成浓度为 0.5 ~ 2.0mg/mL 的分散液,按分散液与戊二醛水溶液的体积比 0.5 ~ 2.0 :1 加入浓度为 2.5wt% 的戊二醛水溶液,于 15 ~ 25°C 搅拌反应 3 ~ 12h,得到功能化 Fe_3O_4 纳米磁珠,将功能化 Fe_3O_4 纳米磁珠磁分离后重新分散到 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中,配制成浓度为 0.5 ~ 1.5mg/mL 的分散液,加入浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的癌症标志物抗体,即一抗 /Ab1,功能化 Fe_3O_4 纳米磁珠分散液与一抗 /Ab1 的体积比为 5 ~ 20 :1,37°C 下震荡 0.5 ~ 2h,随后加入浓度为 1wt% 的牛血清蛋白(BSA)用以封闭非特异性结合位点,功能化 Fe_3O_4 纳米磁珠分散液与加入的 BSA 的体积比为 0.5 ~ 2 :1,37°C 下震荡 10 ~ 60min 后磁分离,随后加入 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液混合均匀,再次磁分离,将其重新分散到 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中,配制成质量浓度为 0.5 ~ 2.0mg/mL 的分散液,然后向上述分散液中加入质量浓度为 1mg/mL 的 NaBH_3CN 水溶液,加入的 NaBH_3CN 水溶液与上述分散液的体积比为 0.5 ~ 2 :1,然后于 37°C 震荡 10 ~ 60min,得到 Fe_3O_4 -Ab1 ;

b) 将上步得到的 Fe_3O_4 -Ab1 分散到 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中配制成浓度为 0.5 ~ 1.5mg/mL 的分散液,加入到从 0 U/mL 到 100 U/mL 的不同浓度的癌症标志物的抗原(癌标)中,其中 Fe_3O_4 -Ab1 分散液与相对应的癌症标志物的抗原的体积比为 0.5 ~ 2 :1,37°C 震荡 10 ~ 60min,得到 Fe_3O_4 -Ab1- 癌标 ;

c) 将步骤(2)制得的中空聚多巴胺-纳米金材料分散到 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中配制成浓度为 0.5 ~ 2.0mg/mL 的中空聚多巴胺-纳米金分散液,然后加入浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的癌症标志物抗体,即二抗 /Ab2, 中空聚多巴胺-纳米金分散液与二抗 /Ab2 的体积比为 5 ~ 20 :1,37°C 下震荡 0.5 ~ 2h,随后按中空聚多巴胺-纳米金分散液与 BSA 的体积比为 0.5 ~ 2 :1 加入浓度为 1wt% 的 BSA 用以封闭非特异性结合位点,37°C 下震荡 10 ~ 60min,离心分离,将分离出的固体重新分散到 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中,配制成浓度为 0.5 ~ 2.0mg/mL 的中空聚多巴胺-纳米金溶液,然后按中空聚多巴胺-纳米金分散液与 Fe_3O_4 -Ab1- 癌标的体积比为 0.5 ~ 2 :1 加入浓度为 0.5 ~ 2.0mg/mL 的 Fe_3O_4 -Ab1- 癌标,于 37°C 下震荡 10 ~ 60min 后磁分离,随后加入 10 ~ 20mL pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液混合均匀,再次磁分离,然后加入到对硝基苯酚和硼氢化钠混合水溶液中,得混合溶液,通过对溶液中对硝基苯酚紫外-可见光谱吸收的变化,即可实现癌症标志物抗原的检测。

[0006] 所述的对硝基苯酚和硼氢化钠混合水溶液中,对硝基苯酚水溶液的摩尔浓度范围为 0.05 ~ 0.2mmol/L,硼氢化钠水溶液浓度为 0.1 mol/L,对硝基苯酚水溶液与硼氢化钠水溶液的体积比为 0.5 ~ 2 :1。

[0007] 本发明方法所述 Tris 缓冲溶液的浓度为 8 ~ 12mmol/L。

[0008] 本发明制备得到的纳米金复合材料免疫传感器免疫检测线性范围为 0 ~ 100U/mL,检测下限达 0.05U/mL,相关系数达 0.998。

[0009] 本发明制备方法中,中空型聚多巴胺-纳米金复合材料的催化活性组分 Au 具有纳米尺度,并且高度、均匀分散于中空聚多巴胺球表面,使该材料作为催化剂时具有良好的活性;中空聚多巴胺球表层具有还原性,将 HAuCl_4 还原为金纳米颗粒均匀分布在材料表面,提高了金纳米催化剂的利用率。进一步的,材料在除去内核模板 Fe_3O_4 后,重量降低,材料整体上水溶性较好,不易沉淀。

[0010] 本发明制备得到的纳米金复合材料免疫传感器应用原理为:金纳米颗粒在对硝基苯酚还原成对氨基苯酚过程中具有良好的催化还原能力,还原过程中产生颜色的变化和对

硝基苯酚的紫外 / 可见吸收变化跟待检测物质的浓度线性相关。随着待检测物质加入量的增加, 进入免疫体系的与二抗相连的 PDA-Au 的量也随之增加。在硼氢化钠的存在下, 实验测定不同时间点下, 不同浓度待检测物质所对应的对硝基苯酚紫外 / 可见吸收的变化。

[0011] 本发明上述纳米金复合材料免疫传感器应用, 主要用于检测癌症标志物抗原或者具有特异性结合特点的特征蛋白质。

[0012] 检测时, 将氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠分散到 Tris 缓冲溶液中与癌症标志物抗体 (Ab1) 相连后作为易分离的免疫探针; 中空聚多巴胺 - 金纳米材料 (PDA-Au) 分散到 Tris 缓冲溶液中与癌症标志物抗体 (Ab2) 相连作为免疫识别物质。Ab1 与 Ab2 与对应癌症标志抗原特异性结合构成三明治夹心免疫体系。通过磁性将该免疫体系分离出来, 随后加入到对硝基苯酚与硼氢化钠的混合水溶液中, PDA-Au 中的金纳米可以催化还原对硝基苯酚为对氨基苯酚, 在催化还原过程中产生紫外的变化可以通过紫外可见仪进行测定。随着癌症标志物抗原的量的增大, 最终构成三明治夹心免疫体系的 PDA-Au 的量也随之增大, 在进行紫外测定时, 金纳米还原对硝基苯酚为对氨基苯酚的能力增大, 测定结果中对硝基苯酚的信号减弱。在本发明中癌症标志物抗原的检测范围为 0-100 U/mL, 通过上述方法可得到良好的线性结果, 线性方程为 $y = -0.01432 + 1.3745 C_{[\text{癌标}]} \text{ (U/mL)}$, 检测下限达 0.05 U/mL, 相关系数为 0.998。

[0013] 与现有技术相比, 本发明纳米金复合材料免疫传感器的制备方法及应用优点在于:

1) 中空型聚多巴胺 - 纳米金复合材料, 利用了 Fe_3O_4 - 聚多巴胺纳米颗粒形成的基质使纳米金吸附在壳核结构表面。多巴胺可在纳米磁珠表面自聚成膜, 利用本身的还原性还原 HAuCl_4 以形成金纳米颗粒, 纳米金分布在 Fe_3O_4 - 聚多巴胺纳米颗粒复合材料表层, 酸洗去除 Fe_3O_4 纳米磁珠后, 催化性能保持不变, 并且材料的水溶性得到提高, 更有利于实际应用。

[0014] 2) 采用夹心三明治免疫法设计了一种新型灵敏免疫传感器用以检测癌症标志物抗原 (癌标)。其中氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠作为易分离的免疫探针用于标记一抗 (Ab1), 中空聚多巴胺 - 金纳米材料 (PDA-Au) 作为标记物并用以固定二抗 (Ab2), 纳米金颗粒在对硝基苯酚还原成对氨基苯酚过程中具有良好的催化还原能力, 还原过程中产生颜色的变化和对硝基苯酚的紫外 / 可见吸收变化跟癌标的浓度线性相关, 随着癌标加入量的增加, 进入免疫体系的与二抗相连的 PDA-Au 的量也随之增加, 在硼氢化钠的存在下, 实验测定了不同时间点下, 不同浓度癌标所对应的对硝基苯酚紫外 / 可见吸收的变化。

附图说明

[0015] 图 1 是本发明实施例的中空型聚多巴胺 - 纳米金复合材料制备方法及其免疫传感器的示意图;

图 2 是本发明实施例 1 的 Fe_3O_4 - 聚多巴胺 - Au 复合材料的透射电镜图;

图 3 是本发明实施例 1 的中空型聚多巴胺 - 纳米金复合材料的透射电镜图;

图 4 是本发明实施例 1 中 50U/mL CA125 所对应的对硝基苯酚随时间变化的紫外吸收变化图;

图 5 是本发明实施例 1 中 50U/mL CA125 所对应的不同浓度的对硝基苯酚随时间变化的紫外吸收变化图, a 到 c 分别对应 0.05mmol/L, 0.1mmol/L, 0.2 mmol/L 对硝基苯酚;

图 6 是本发明实施例 1 中不同的反应时间对应的 50 U/mL CA125 在 0.5min 是引起的对硝基苯酚紫外吸收(400nm)变化；

图 7 是本发明实施例 1 的在 5min 时间点上不同浓度的 CA125 引起的对硝基苯酚的紫外吸收变化曲线图,内插图是相对应的紫外吸收(400nm)校正曲线；

图 8 是本发明实施例 1 的不同浓度的 CA125 引起的对硝基苯酚的紫外吸收(400nm)校正曲线, a 为中空型聚多巴胺-纳米金作为免疫标记物的对应曲线, b 为纳米金作为免疫标记物的对应曲线；

图 9 是本发明实施例制备的免疫传感器的选择性对照。

具体实施方式

[0016] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0017] 本发明纳米金复合材料免疫传感器的制备方法。

[0018] 实施例 1

(1) 制备氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠

将 0.325g 无水 FeCl_3 和 0.2g 柠檬酸钠分散到 20mL 乙二醇中,搅拌 1h 使固体完全溶解,随后加入 1.2g 乙酸钠搅拌 30min,将混合物加入到容积为 50 mL 的水热反应釜中,放入烘箱中,200℃下保持 12h,待反应釜冷却至室温时,取出,反应釜底的黑色沉淀即为 Fe_3O_4 纳米磁珠,利用磁铁进行磁分离,将得到的 Fe_3O_4 用水和乙醇分别洗涤 3 次,50℃真空干燥 12h,取 4mg Fe_3O_4 分散在 10mL 水中,加入 20 μL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷,室温下搅拌 6h,即得到氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠；

(2) 制备中空聚多巴胺-金纳米材料(PDA-Au)

称取 40mg Fe_3O_4 纳米磁珠,分散到 pH 为 8.5 浓度为 10 mmol/L 的 Tris 缓冲溶液中,在快速搅拌下加入 40mg 多巴胺,多巴胺可在 Fe_3O_4 纳米磁珠表面自主形成薄膜,室温下快速搅拌 8h,利用磁铁进行分离,水洗 3 次,50℃真空干燥 12h,即得到 Fe_3O_4 -PDA 纳米颗粒；

称取 2mg Fe_3O_4 -PDA 纳米颗粒分散到 25 mL 去离子水中,超声 5min 使其形成均匀分散液,在快速搅拌下加入 75 μL 质量分数为 1% 的 HAuCl_4 水溶液,90℃反应 30min 后, HAuCl_4 可在多巴胺的还原作用下形成金纳米颗粒,然后利用磁铁进行分离,水洗 3 次,50℃真空干燥 12h,即得到 Fe_3O_4 -聚多巴胺-Au 纳米材料；

取 2mg Fe_3O_4 -聚多巴胺-Au 纳米材料分散到 1mL 水中,加入 2 mL 6 mol/L 的盐酸水溶液,充分混匀,室温下反应 6h,盐酸将 Fe_3O_4 纳米磁珠酸化为铁离子脱离材料,离心后所得沉淀无磁性,重新分散至 1mL 水中,即得到中空聚多巴胺-纳米金材料；

(3) 制备免疫传感器

氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠作为易分离的免疫探针用于标记一抗(Ab1)；中空聚多巴胺-金纳米材料(PDA-Au) 作为标记物并用以固定二抗(Ab2)；

a)取 1mg 的氨基化的 Fe_3O_4 分散到 1mL 的 pH 为 7.2 的 10mmol/L 的 Tris 缓冲溶液中,与 1 mL 2.5wt% 的戊二醛溶液 20℃下混合搅拌 6h 后磁分离,重新分散至 1mL pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中,得到功能化 Fe_3O_4 纳米磁珠,然后取 100 μL 功能化的四氧化三铁加入到含

有 $10\ \mu\text{L}$ $2\ \mu\text{g/mL}$ 的 anti-CA125 一抗 (Ab1) 的 $200\ \mu\text{L}$ Tris 缓冲溶液中, 37°C 震荡 1h, 随后加入质量浓度为 1% 的牛血清蛋白 (BSA) $100\ \mu\text{L}$, 用以封闭非特异性结合位点, 37°C 下震荡 30min, 磁分离, 将其重新分散到 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中, 配制成质量浓度为 1mg/mL 的分散液。为了去除多余未反应的基团, 质量浓度为 1mg/mL 的 NaBH_3CN 水溶液 $100\ \mu\text{L}$ 加入到上述分散液中, 37°C 震荡 30min, 得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ab1}$;

b) 取步骤 a) 中的 1mg/mL 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ab1}$ 分散液 1mL , 分散介质为 pH7.2 的 Tris 缓冲溶液, 分别加入到浓度从 0 U/mL 到 100 U/mL 的 $100\ \mu\text{L}$ 不同浓度的 CA125 的抗原中, 37°C 震荡 10min, 得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ab1-CA125}$;

c) 取 $100\ \mu\text{L}$ 浓度为 2mg/mL 的中空型聚多巴胺 - 金纳米材料与 $10\ \mu\text{L}$ 浓度为 $2\ \mu\text{g/mL}$ 的 anti-CA125 二抗 (Ab2) 混合, 37°C 下震荡 1h。随后加入 $100\ \mu\text{L}$ 质量分数为 1% 的牛血清蛋白 (BSA) 用以封闭非特异性结合位点, 37°C 下震荡 30min, 离心分离, 将分离出的固体重新分散到 1mL 的 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中, 随后加入到 $100\ \mu\text{L}$ 质量浓度为 1mg/mL 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ab1-CA125}$ 中, 37°C 下震荡 30min, 磁分离, 其中, 所述 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液的浓度为 10mmol/L ;

d) 磁分离后加入到 2mL 0.1mmol/L 的对硝基苯酚和 2mL 0.1mol/L 硼氢化钠混合水溶液中, 在硼氢化钠的还原作用下, 金纳米颗粒可以催化对硝基苯酚为对氨基苯酚, 对硝基苯酚浓度的变化可以通过紫外 - 可见光谱体现, 通过对溶液中对硝基苯酚紫外 - 可见光谱吸收的变化, 即可实现癌症标志物抗原的检测。

[0019] 实施例 2

(1) 制备氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠

将 0.325g 无水 FeCl_3 和 0.2g 柠檬酸钠分散到 20mL 乙二醇中, 搅拌 1h 使固体完全溶解; 随后加入 1.2g 乙酸钠搅拌 30min。将混合物加入到容积为 $50\ \text{mL}$ 的水热反应釜中, 放入烘箱中, 200°C 下保持 12h, 待反应釜冷却至室温时, 取出。反应釜底的黑色沉淀即为 Fe_3O_4 纳米磁珠, 利用磁铁进行磁分离, 将得到的 Fe_3O_4 用水和乙醇分别洗涤 3 次, 50°C 真空干燥 12h。取 4mg Fe_3O_4 分散在 $10\ \text{mL}$ 水中, 加入 $20\ \mu\text{L}$ 3- 氨基丙基三乙氧基硅烷, 室温下搅拌 6h, 即得到的氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠;

(2) 制备中空聚多巴胺 - 金纳米材料 (PDA-Au)

称取 $40\ \text{mg}$ Fe_3O_4 纳米磁珠, 分散到 pH 为 8.5 的 Tris ($10\ \text{mmol/L}$) 缓冲溶液中, 在快速搅拌下加入 $40\ \text{mg}$ 多巴胺, 多巴胺可在 Fe_3O_4 纳米磁珠表面自主形成薄膜, 室温下快速搅拌 24 h, 利用磁铁进行分离, 水洗 3 次, 50°C 真空干燥 12h。即得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PDA}$ 纳米颗粒;

称取 2mg $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PDA}$ 纳米颗粒分散到 $25\ \text{mL}$ 去离子水中, 超声 5min 使其形成均匀分散液, 在快速搅拌下加入 $100\ \mu\text{L}$ 质量分数为 1% 的 HAuCl_4 水溶液, 90°C 反应 30min 后, HAuCl_4 可在多巴胺的还原作用下形成金纳米颗粒。然后利用磁铁进行分离, 水洗 3 次, 50°C 真空干燥 12h, 即得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-聚多巴胺-Au}$ 纳米材料;

取 $2\ \text{mg}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-聚多巴胺-Au}$ 纳米复合材料分散到 $1\ \text{mL}$ 水中, 加入 $2\ \text{mL}$ $6\ \text{mol/L}$ 的盐酸水溶液, 充分混匀, 室温下反应 6 h, 盐酸将 Fe_3O_4 纳米磁珠酸化为铁离子脱离材料, 离心后所得沉淀无磁性, 重新分散至 $1\ \text{mL}$ 水中, 即得到中空聚多巴胺 - 纳米金材料;

(3) 制备免疫传感器

氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠作为易分离的免疫探针用于标记一抗 (Ab1); 中空聚多巴

胺-金纳米材料(PDA-Au)作为标记物并用以固定二抗(Ab2)；

a)取 1 mg 的氨基化的 Fe_3O_4 分散到 1 mL 的 pH 为 7.2 的 Tris (10 mmol/L) 缓冲溶液中, 与 1 mL 2.5 wt% 的戊二醛溶液 20°C 下混合搅拌 6h 后磁分离, 重新分散至 1 mL pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中, 得到功能化 Fe_3O_4 纳米磁珠, 然后取 100 μL 功能化的四氧化三铁加入到含有 10 μL 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 anti-CA125 一抗(Ab1)的 200 μL Tris 缓冲溶液中, 37°C 震荡 1h, 随后加入质量浓度为 1% 的牛血清蛋白(BSA) 50 μL , 用以封闭非特异性结合位点, 37°C 下震荡 30min, 磁分离洗除多余物质, 将其重新分散到 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中, 配制成质量浓度为 1 mg/mL 的分散液, 为了去除多余未反应的基团, 质量浓度为 1 mg/mL 的 NaBH_3CN 水溶液 100 μL 加入到上述分散液中, 37°C 震荡 30min, 得到 Fe_3O_4 -Ab1；

b)取步骤 a)中的 1mg/mL 的 Fe_3O_4 -Ab1 分散液 1 mL, 分散介质为 pH7.2 的 Tris 缓冲溶液, 分别加入到浓度从 0 U/mL 到 100 U/mL 的 100 μL 不同浓度的 CA125 的抗原中, 37°C 震荡 10min, 得到 Fe_3O_4 -Ab1-CA125；

c)取 100 μL 质量浓度为 2 mg/mL 的中空型聚多巴胺-金纳米材料与 8 μL 浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 anti-CA125 二抗(Ab2)混合, 37°C 下震荡 1h。随后加入 50 μL 质量分数为 1% 的牛血清蛋白(BSA)用以封闭非特异性结合位点, 37°C 下震荡 30min, 离心分离, 将分离出的固体重新分散到 1 mL 的 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中, 随后加入到 100 μL 质量浓度为 1mg/mL 的 Fe_3O_4 -Ab1-CA125 中, 37°C 下震荡 30min, 磁分离。其中, 所述 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液的浓度为 10 mmol/L；

d)磁分离后加入到 2 mL 0.05 mmol/L 的对硝基苯酚和 2 mL 0.1 mol/L 硼氢化钠混合水溶液中, 在硼氢化钠的还原作用下, 金纳米颗粒可以催化对硝基苯酚为对氨基苯酚, 对硝基苯酚浓度的变化可以通过紫外-可见光谱体现, 通过对溶液中对硝基苯酚紫外-可见光谱吸收的变化, 即可实现癌症标志物抗原的检测。

[0020] 实施例 3

(1) 制备氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠

将 0.325g 无水 FeCl_3 和 0.2g 柠檬酸钠分散到 20 mL 乙二醇中, 搅拌 1h 使固体完全溶解, 随后加入 1.2 g 乙酸钠搅拌 30min, 将混合物加入到容积为 50 mL 的水热反应釜中, 放入烘箱中, 200°C 下保持 12h, 待反应釜冷却至室温时, 取出。反应釜底的黑色沉淀即为 Fe_3O_4 纳米磁珠, 利用磁铁进行磁分离, 将得到的 Fe_3O_4 用水和乙醇分别洗涤 3 次, 50°C 真空干燥 12h。取 4mg Fe_3O_4 分散在 10mL 水中, 加入 20 μL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷, 室温下搅拌 6h, 即得到的氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠；

(2) 制备中空聚多巴胺-金纳米材料(PDA-Au)

称取 40 mg Fe_3O_4 纳米磁珠, 分散到 pH 为 8.5 的 Tris (10 mmol/L) 缓冲溶液中, 在快速搅拌下加入 40 mg 多巴胺, 多巴胺可在 Fe_3O_4 纳米磁珠表面自主形成薄膜, 室温下快速搅拌 8h, 利用磁铁进行分离, 水洗 3 次, 50°C 真空干燥 12h, 即得到 Fe_3O_4 -PDA 纳米颗粒；

称取 2 mg Fe_3O_4 -PDA 纳米颗粒分散到 25 mL 去离子水中, 超声 5min 使其形成均匀分散液, 在快速搅拌下加入 75 μL 质量分数为 1% 的 HAuCl_4 水溶液, 90°C 反应 30min 后, HAuCl_4 可在多巴胺的还原作用下形成金纳米颗粒。然后利用磁铁进行分离, 水洗 3 次, 50°C 真空干燥 12h。即得到 Fe_3O_4 -聚多巴胺-Au 纳米材料；

取 2 mg Fe_3O_4 -聚多巴胺-Au 纳米复合材料分散到 1 mL 水中, 加入 1 mL 6 mol/L 的盐

酸水溶液,充分混匀,室温下反应 6h,盐酸将 Fe_3O_4 纳米磁珠酸化为铁离子脱离材料。离心后所得沉淀无磁性,重新分散至 1 mL 水中,即得到中空聚多巴胺-纳米金材料;

(3) 制备免疫传感器

氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠作为易分离的免疫探针用于标记一抗(Ab1);中空聚多巴胺-金纳米材料(PDA-Au)作为标记物并用以固定二抗(Ab2);

a)取 1 mg 的氨基化的 Fe_3O_4 分散到 1mL 的 pH 为 7.2 的 Tris (10mmol/L)缓冲溶液中,与 1 mL 2.5wt% 的戊二醛溶液 20℃下混合搅拌 6h 后磁分离,重新分散至 1 mL pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中,得到功能化 Fe_3O_4 纳米磁珠。然后取 100 μL 功能化的四氧化三铁加入到含有 10 μL 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 anti-CA125 一抗(Ab1)的 200 μL Tris 缓冲溶液中,37℃震荡 1h,随后加入质量浓度为 1% 的牛血清蛋白(BSA)80 μL ,用以封闭非特异性结合位点,37℃下震荡 30min,磁分离洗除多余物质。将其重新分散到 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中,配制成浓度为 1mg/mL 的分散液,为了去除多余未反应的基团,浓度为 1mg/mL 的 NaBH_3CN 水溶液 100 μL 加入到上述分散液中,37℃震荡 30min,得到 Fe_3O_4 -Ab1;

b)取步骤 a)中的 1mg/mL 的 Fe_3O_4 -Ab1 分散液 1 mL,分散介质为 pH7.2 的 Tris 缓冲溶液,分别加入到浓度从 0 U/mL 到 100 U/mL 的 100 μL 不同浓度的 CA125 的抗原中,37℃震荡 10min,得到 Fe_3O_4 -Ab1-CA125;

c)取 100 μL 质量浓度为 2mg/mL 的中空型聚多巴胺-金纳米材料与 12 μL 质量浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 anti-CA125 二抗(Ab2)混合,37℃下震荡 1h。随后加入 80 μL 质量分数为 1% 的牛血清蛋白(BSA)用以封闭非特异性结合位点,37℃下震荡 30min,离心分离,将分离出的固体重新分散到 1mL 的 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液中,随后加入到 100 μL 质量浓度为 1mg/mL 的 Fe_3O_4 -Ab1-CA125 中,37℃下震荡 30min,磁分离洗涤,其中,所述 pH 为 7.2 的 Tris 缓冲溶液的浓度为 10 mmol/L;

d)磁分离后加入到 2mL 0.2mmol/L 的对硝基苯酚和 2mL 0.1mol/L 硼氢化钠混合水溶液中,在硼氢化钠的还原作用下,金纳米颗粒可以催化对硝基苯酚为对氨基苯酚,对硝基苯酚浓度的变化可以通过紫外-可见光谱体现,通过对溶液中对硝基苯酚紫外-可见光谱吸收的变化,即可实现癌症标志物抗原的检测。

[0021] 图 2 和图 3 为 Fe_3O_4 -聚多巴胺-Au 和中空型多巴胺-纳米金的透射电镜图,从图 2 可以看出 Fe_3O_4 本身为球形,粒径约为 240 nm;在 Tris 溶液存在下加入多巴胺,在 Fe_3O_4 表面包覆一层聚多巴胺膜,膜的厚度约为 40 nm(图 2);聚多巴胺壳膜作为还原剂和支撑物,还原 HAuCl_4 为金纳米颗粒沉积在聚多巴胺膜层表面,金纳米颗粒的直径大约为 15nm(图 2)。将 Fe_3O_4 磁珠酸洗之后,聚多巴胺膜保持形状不变,为空心球。吸附的纳米金粒径也保持不变(图 3)。

[0022] 本发明制备的纳米金复合材料免疫传感器的应用,以用于检测卵巢癌 CA125 标志物为例,方法为:

氨基化的 Fe_3O_4 纳米磁珠作为易分离的免疫探针用于标记一抗。中空聚多巴胺-金纳米材料(PDA-Au)作为标记物并用以固定二抗。金纳米颗粒在对硝基苯酚还原成对氨基苯酚过程中具有良好的催化还原能力。还原过程中产生颜色的变化和对硝基苯酚的紫外/可见吸收变化跟 CA125 的浓度线性相关。随着 CA125 加入量的增加,进入免疫体系的与二抗相连的 PDA-Au 的量也随之增加。在硼氢化钠的存在下,实验测定了不同时间点下,不同浓

度 CA125 所对应的对硝基苯酚紫外 / 可见吸收的变化。

[0023] 该免疫检测线性范围为 0-100U/mL, 检测下限达 0.05U/mL, 相关系数为 0.998。

[0024] 图 4 是本发明实施例 1 中 50U/mL CA125 所对应的对硝基苯酚随时间变化的紫外吸收变化图, 其中 400 nm 的吸收峰为对硝基苯酚的吸收。曲线 a 到 b 分别是 0 min 和 0.5 min 的吸收曲线, 曲线 b 到 i, 每条吸收曲线时间相差为 1.5min。可以看出在 NaBH_4 作为还原剂的存在下, 随时间增加对硝基苯酚的吸收逐渐减小, 反应大约进行了 11 min, 反应体系中的对硝基苯酚基本还原为对氨基苯酚。同时对硝基苯酚的颜色也由黄色基本变为无色。

[0025] 图 5 是本发明实施例 1 中 50 U/mL CA125 所对应的不同浓度的对硝基苯酚随时间变化的紫外吸收变化图, a 到 c 分别对应 0.05 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.2 mmol/L 对硝基苯酚。与 0.05 mmol/L 和 0.2 mmol/L 对硝基苯酚相比, 0.1 mmol/L 对硝基苯酚表现出更好的转化率。过高或者过低的浓度都会影响 CA125 检测的线性范围。

[0026] 图 6 是本发明实施例 1 中不同的反应时间对应的 50 U/mL CA125 在 0.5min 时引起的对硝基苯酚紫外吸收 (400 nm) 变化。温度和培养时间是影响免疫传感器灵敏度检测的重要因素, 考虑到绝大多数实际生物检测都在 37°C, 本实施例中所有检测均在 37°C 中进行。随着培养时间的增加, 对硝基苯酚的紫外吸收 (400 nm) 逐渐降低, 当时间增加到约 30min 时, 对硝基苯酚的紫外吸收趋于平稳。因此, 在本实施例中, 选择 30min 的培养时间作为对 CA125 的免疫检测。

[0027] 图 7 是本发明实施例 1 的在 5min 时间点上不同浓度的 CA125 引起的对硝基苯酚的紫外吸收变化曲线图, 曲线 a 到 k 分别是 0 U/mL 和 100 U/mL CA125 对应的吸收曲线, 随着 CA125 浓度的增大, 引入反应体系中的聚多巴胺 - 金纳米数量增加, 对硝基苯酚的紫外吸收随之减小。内插图是对应的紫外吸收 (400 nm) 校正曲线, 说明在 CA125 浓度在 0.1 至 100 U/mL 范围内, 该发明实施例展现的免疫检测有良好的线性范围。线性结果 $y = -0.01432 + 1.3745 C_{[\text{CA125}]}$ (U/mL), $R^2 = 0.978$, 最低检测下限为 0.1U/mL。

[0028] 图 8 是本发明实施例 1 的不同浓度的 CA125 引起的对硝基苯酚的紫外吸收 (400 nm) 校正曲线, a 为中空型聚多巴胺 - 纳米金作为免疫标记物的对应曲线, b 为纳米金作为免疫标记物的对应曲线。为了证明实施例 4 设计的免疫传感检测灵敏度高于已有的免疫传感检测, 选择了两种不同的免疫标记物作为对比。其中中空型聚多巴胺 - 纳米金作为免疫标记物所展现出的线性范围是纳米金作为免疫标记物线性范围的 2 倍, 极大的提高了金纳米颗粒还原对硝基苯酚为对氨基苯酚的速率。进一步证明该实施例有较高的免疫传感检测的灵敏度。

[0029] 图 9 是本发明实施例制备的免疫传感器的选择性对照, 为了证明本发明实施例设计的免疫传感器对 CA125 的选择性, 设计了 2 种对照组, 50 U/mL 的 CA125 和 500 ng/mL 的干扰物质 (空白对照 blank), 人免疫球蛋白 G (HIgG), 前列腺癌的特异性标志物 (PSA), 人血清白蛋白 (HSA) 存在的情况下测定对硝基苯酚的紫外吸收变化。结果表明, 对硝基苯酚的紫外吸收只有在 CA125 存在下才会降低, 其他各种干扰物质不会影响吸收峰的变化。证明本发明实施例对 CA125 的选择性。

[0030] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已, 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。

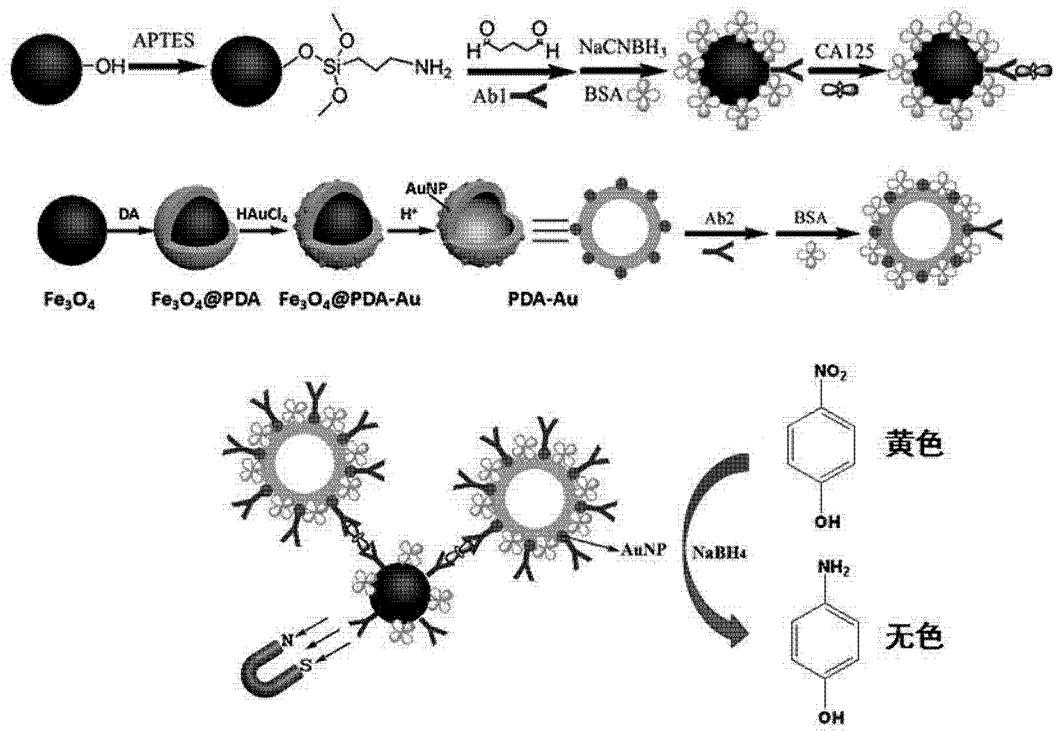


图 1

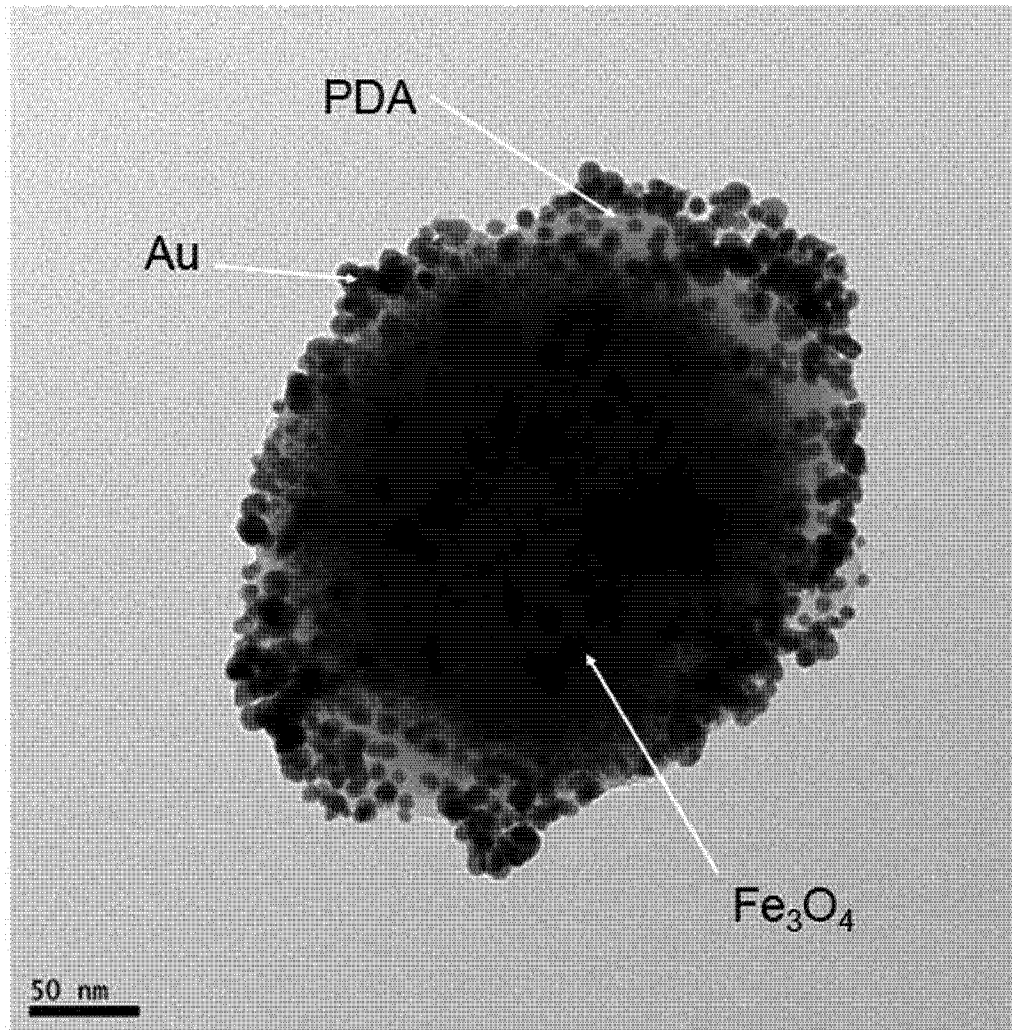


图 2

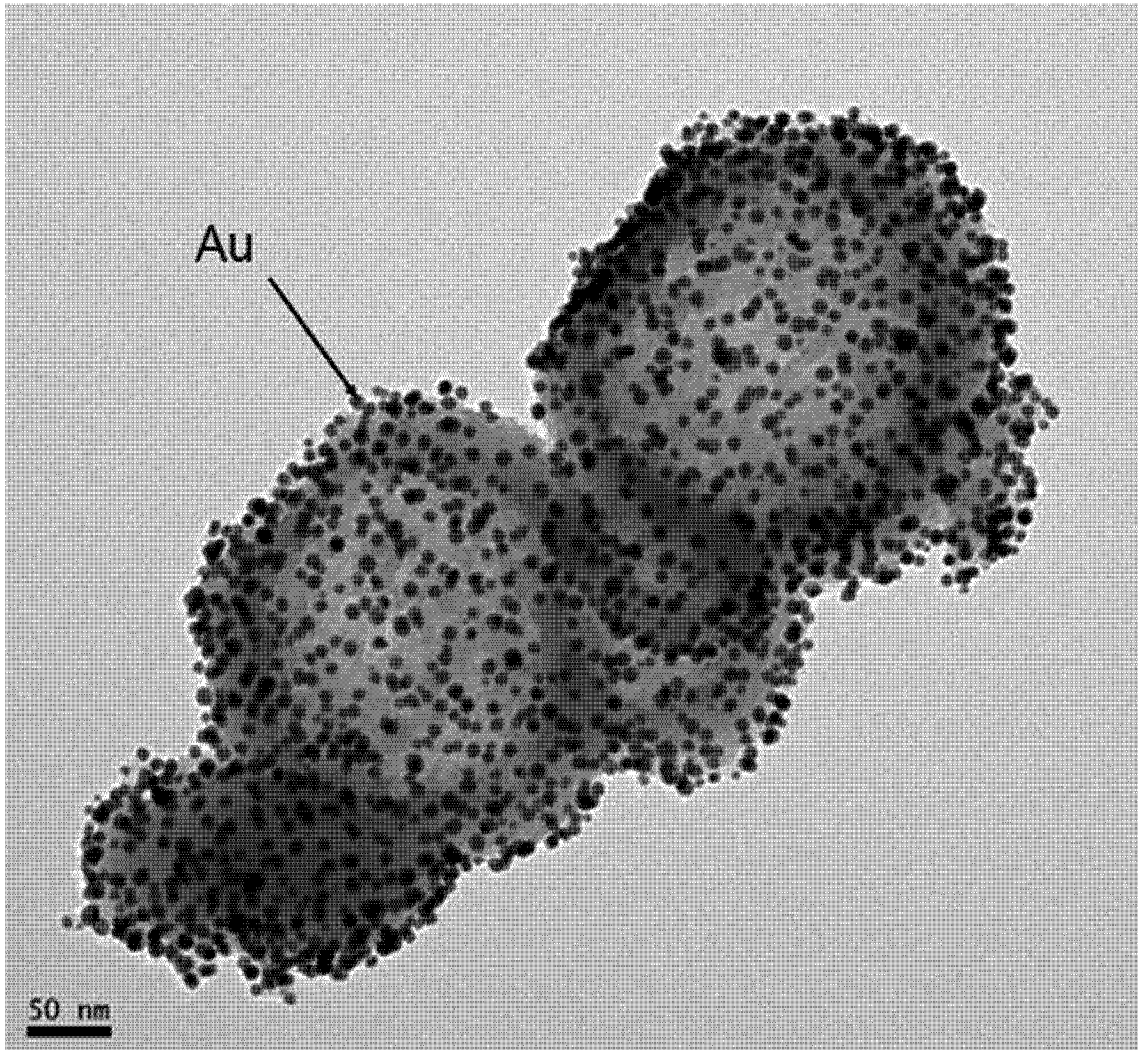


图 3

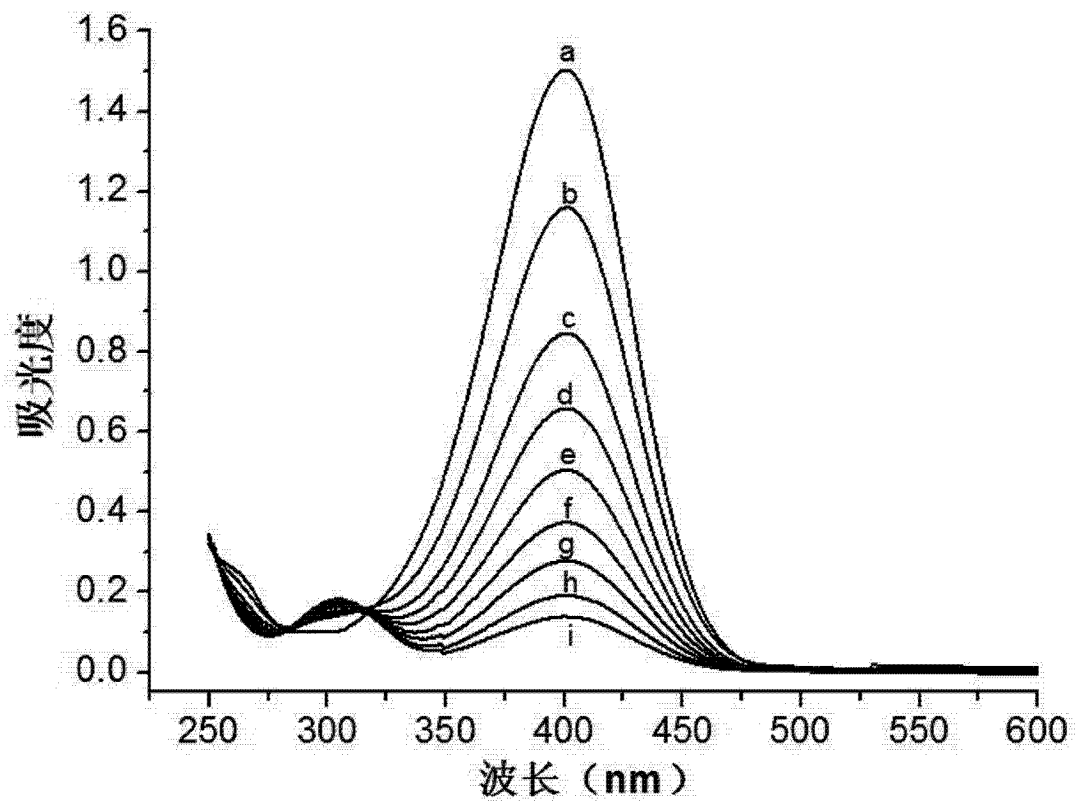


图 4

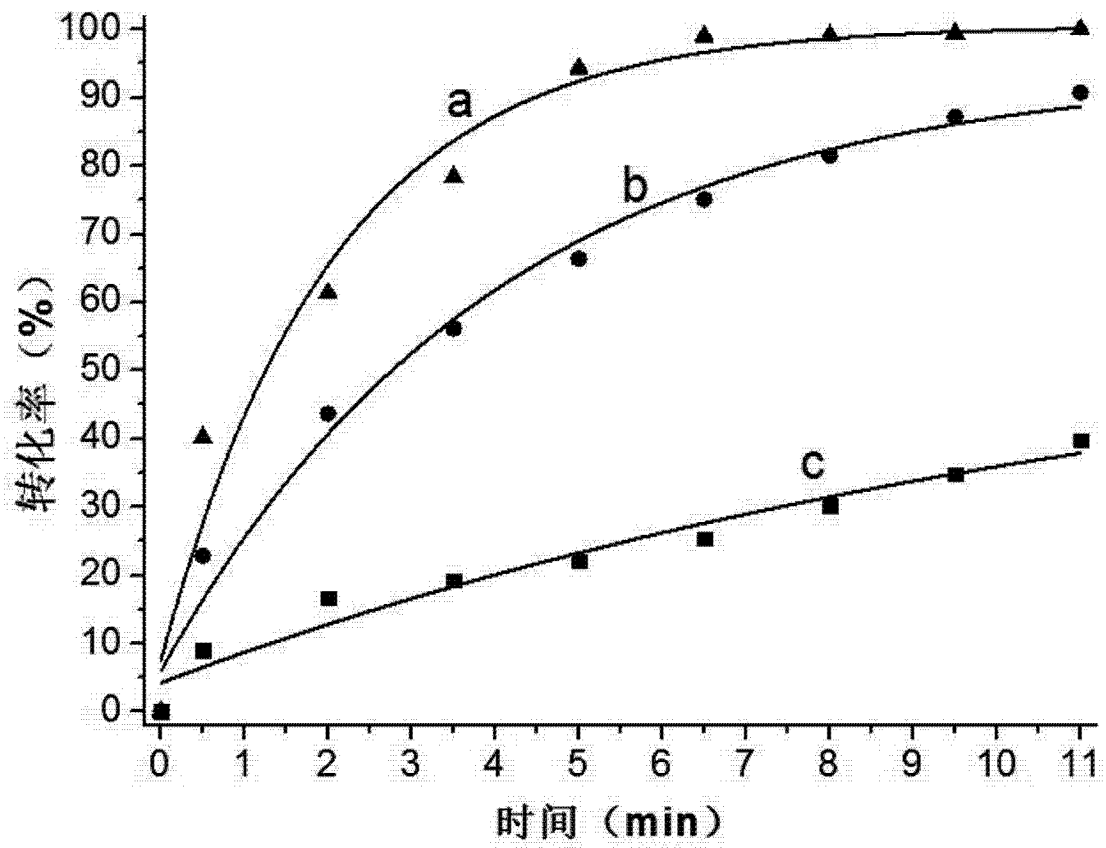


图 5

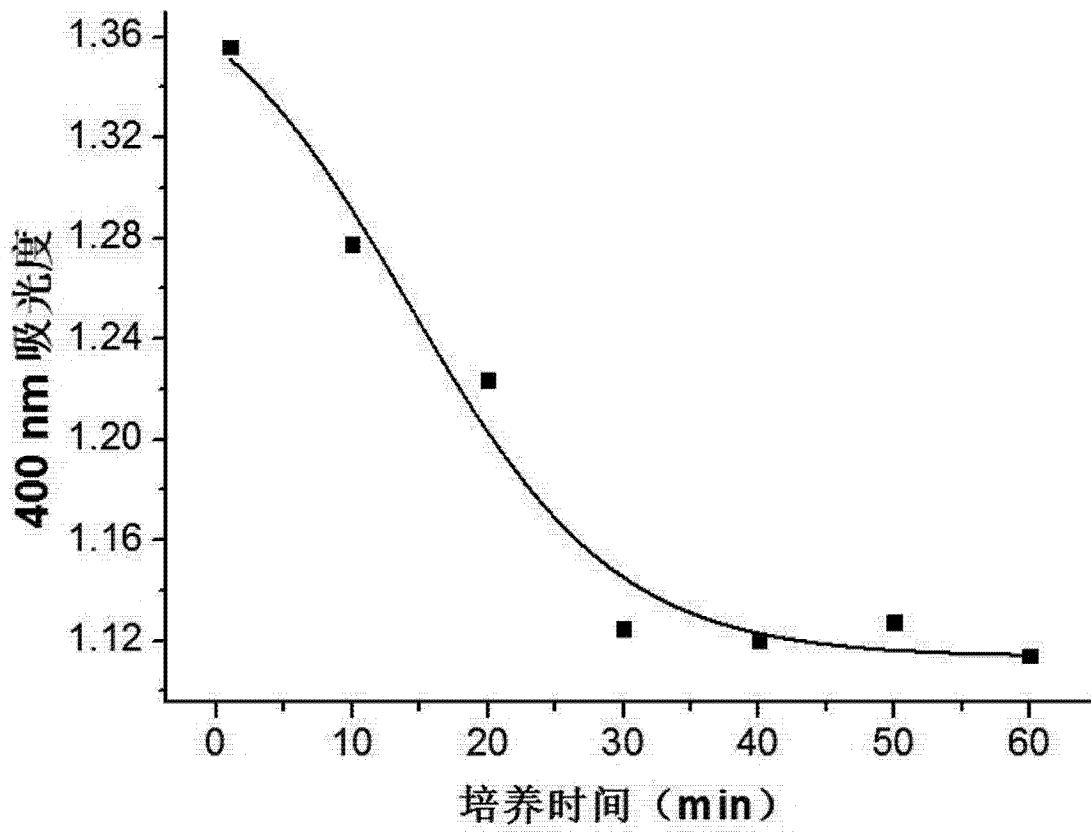


图 6

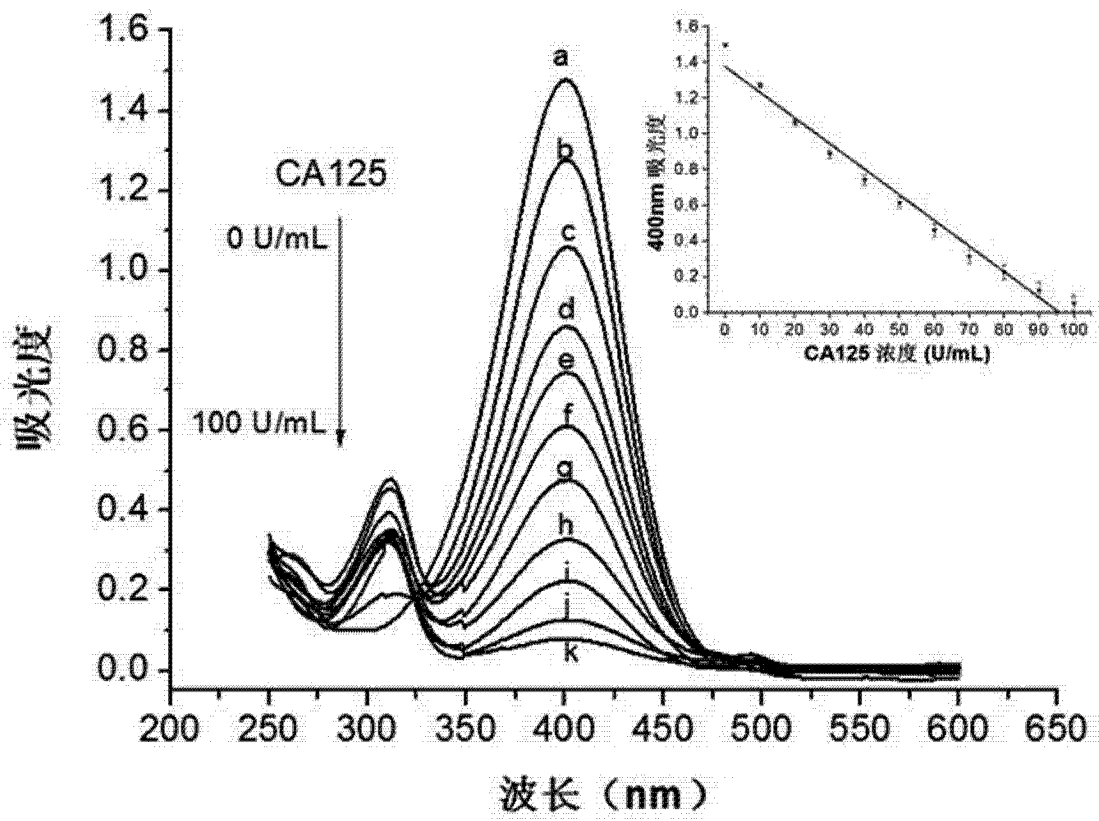


图 7

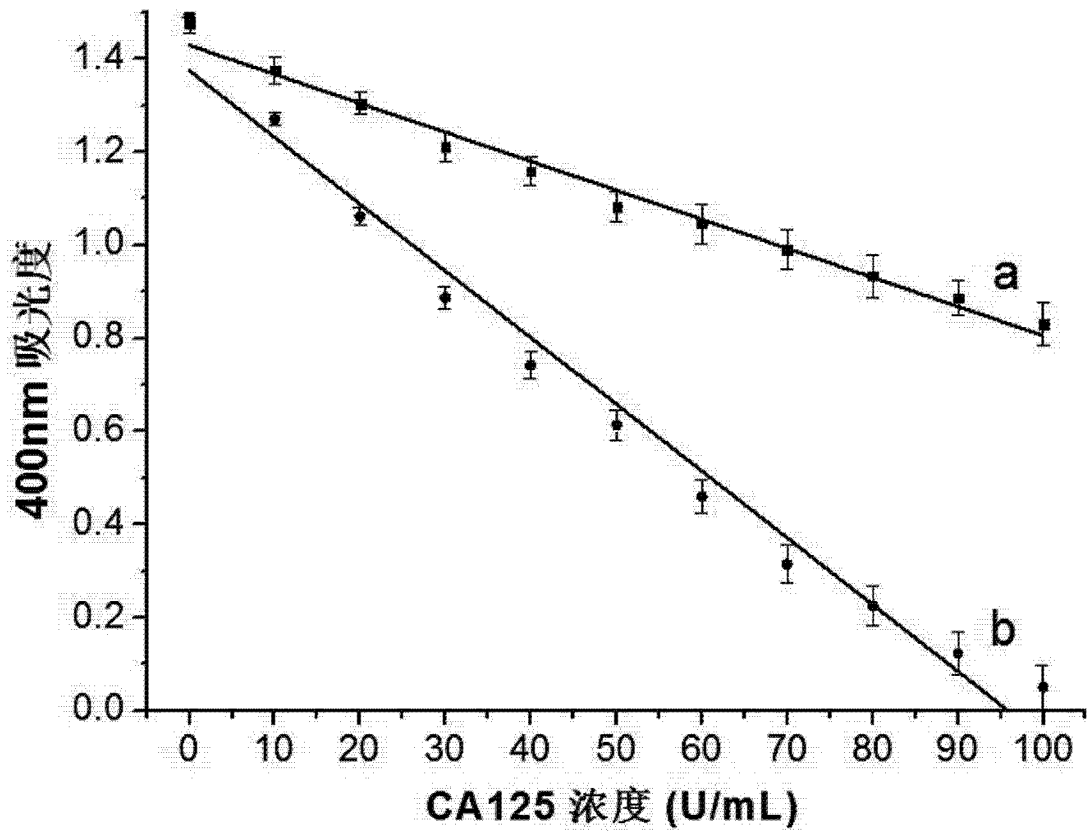


图 8

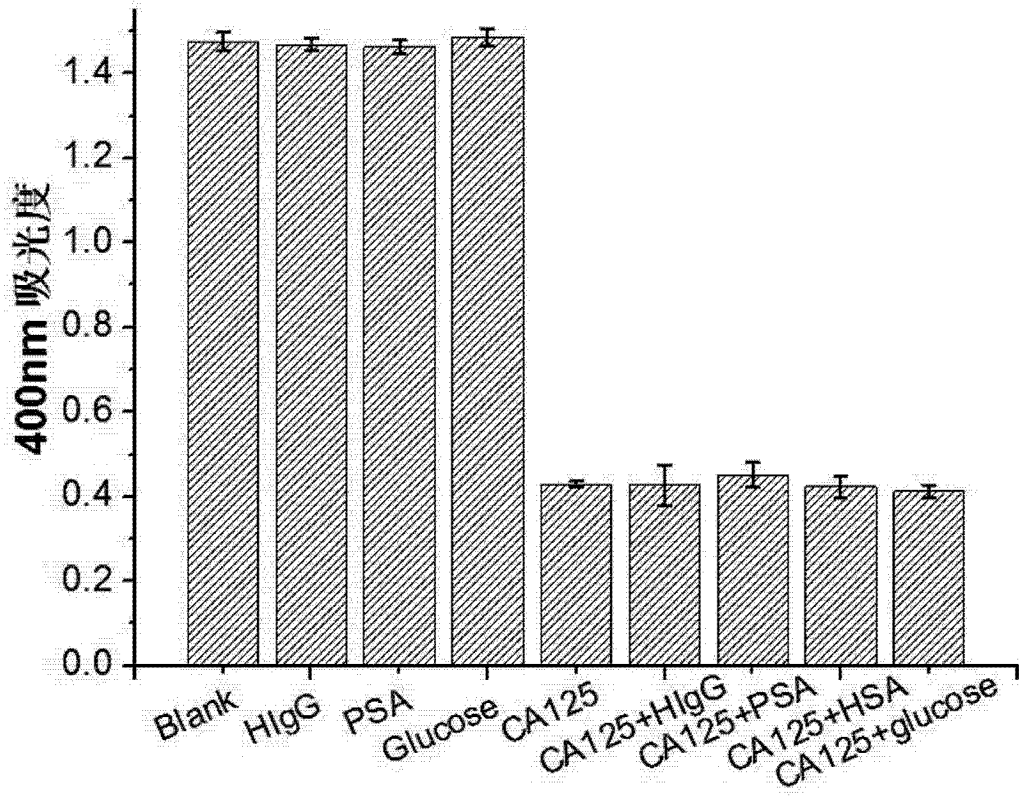


图 9

专利名称(译)	一种纳米金复合材料免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN104634973A	公开(公告)日	2015-05-20
申请号	CN201510071326.8	申请日	2015-02-11
[标]申请(专利权)人(译)	曲阜师范大学		
申请(专利权)人(译)	曲阜师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	曲阜师范大学		
[标]发明人	渠凤丽 赵岩		
发明人	渠凤丽 赵岩		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/54346 G01N33/574 G01N2800/7028		
其他公开文献	CN104634973B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种纳米金复合材料免疫传感器的制备方法及应用，将氨基化的Fe₃O₄纳米磁珠分散到Tris缓冲溶液中与癌症标志物抗体（Ab1）相连后作为易分离的免疫探针；中空聚多巴胺-金纳米材料（PDA-Au）分散到Tris缓冲溶液中与癌症标志物抗体（Ab2）相连作为免疫识别物质。Ab1与Ab2与对应癌症标志抗原特异性结合构成三明治夹心免疫体系。通过磁性将该免疫体系分离出来，随后加入到对硝基苯酚与硼氢化钠的混合水溶液中，通过紫外可见仪进行测定。本发明制备得到的纳米金复合材料免疫传感器免疫检测线性范围为0~100U/mL，检测下限达0.05U/mL，相关系数达0.998。

