



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103575874 B

(45) 授权公告日 2015.01.21

(21) 申请号 201310508295.9

(22) 申请日 2013.10.25

(73) 专利权人 济南大学

地址 250022 山东省济南市济微路 106 号

(72) 发明人 马洪敏 魏琴 杨焱明 高丕成

张勇 吴丹 范大伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 27/416 (2006.01)

构建及应用.《中国优秀硕士学位论文全文数据库》.2013,第2013年卷(第2期),1-52.

Guangfeng Wang et al..Dual amplification strategy for the fabrication of highly sensitive interleukin-6 amperometric immunosensor based on poly-dopamine.《Langmuir》.2011,第27卷(第3期),1224-1231.

审查员 胡晓佳

(56) 对比文件

CN 103196967 A, 2013.07.10, 摘要, 说明书第 4-21 段, 实施例 1-2, 图 1, 权利要求 1-7.

US 2013221346 A1, 2013.08.29, 全文.

WO 2012021887 A2, 2012.02.16, 全文.

KR 20120118536 A, 2012.10.29, 全文.

焦颖芝. 基于钯金属纳米材料无酶传感器

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种基于多巴胺仿生修饰的免疫传感器的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种基于多巴胺仿生修饰的无酶电化学免疫传感器电极的制备方法及应用,涉及纳米科学、生物免疫技术、电化学传感等领域。本发明利用多巴胺仿生修饰对电极进行功能化,利用聚多巴胺修饰层的还原特性原位合成具有酶催化活性的铂、银、钯等金属纳米颗粒。通过与金属纳米颗粒及聚多巴胺修饰层的相互作用将抗体固定在电极表面。基于金属纳米颗粒对 H₂O₂ 还原反应的电催化作用及抗体分子对抗原的识别作用,实现对肿瘤标志物的电化学免疫分析。该方法不仅步骤简单,操作容易,成本低廉,而且具有较高的电化学活性及良好的响应性能,解决了常规方法纳米材料合成困难、缺乏简单而有效的固定方法等问题。该方法可以适用于多种肿瘤标志物免疫传感器电极的制备,在科研和临床中具有广泛的应用前景。

1. 一种基于多巴胺仿生修饰的免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 多巴胺仿生修饰:用移液枪将 3 ~ 10 μL 新配制的浓度为 0.1 ~ 2.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的盐酸多巴胺溶液滴涂在处理、活化好的电极表面,室温晾干;

(2) 纳米颗粒原位制备:用超纯水多次冲洗步骤(1)制得的电极,然后用移液枪将 3 ~ 10 μL 浓度为 0.5 ~ 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的金属纳米颗粒的前躯体溶液滴涂在步骤(1)制得的电极表面,室温晾干;所述的金属纳米颗粒为铂纳米颗粒、银纳米颗粒、钯纳米颗粒、铂银纳米颗粒、铂钯纳米颗粒、银钯纳米颗粒中的一种;所述的前躯体溶液为氯铂酸溶液、硝酸银溶液、氯化钯溶液、氯铂酸硝酸银混合溶液、氯铂酸氯化钯混合溶液、硝酸银氯化钯混合溶液;

(3) 抗体固定:用超纯水多次冲洗步骤(2)制得的电极,用移液枪将肿瘤标志物抗体溶液滴涂在步骤(2)制得的电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下晾干;

(4) 非特异性位点封闭:用超纯水多次冲洗步骤(3)制得的电极,用移液枪将质量分数为 1% 的牛血清白蛋白(BSA)溶液滴涂在步骤(3)制得的电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下晾干;

(5) 抗原识别:用超纯水多次冲洗步骤(4)制得的电极,用移液枪将肿瘤标志物标准溶液或未知样品溶液滴涂在步骤(4)制得的电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下晾干,即制得一种多巴胺仿生修饰的免疫传感器。

2. 根据权利要求 1 所述的一种基于多巴胺仿生修饰的免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,所述的盐酸多巴胺溶液, pH 为 8.5, 溶剂为 10 $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸(Tris-HCl)缓冲溶液。

3. 根据权利要求 1 所述的一种基于多巴胺仿生修饰的免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,所述的电极选自下列一种:3 mm 玻碳电极、4 mm 玻碳电极、5 mm 玻碳电极、3 mm 金电极、4 mm 金电极、5 mm 金电极。

4. 根据权利要求 1 所述的一种基于多巴胺仿生修饰的免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤(3)中,所述的肿瘤标志物为癌胚抗原 CEA、前列腺特异性抗原 PSA、糖蛋白抗原 CA125、甲胎蛋白 AFP、乳腺癌易感基因 BRCA1 中的一种。

5. 根据权利要求 1 所述的一种基于多巴胺仿生修饰的免疫传感器的制备方法,制备的免疫传感器用于检测,其特征在于,步骤如下:用超纯水多次冲洗步骤(5)制得的电极并作为工作电极,Ag/AgCl 电极作为参比电极,Pt 电极作为对电极,在 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液中加入 10 μL 浓度为 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 H_2O_2 溶液作为底液,在电化学工作站上以即时电流模式测定 -0.4 v 电势下的电流,实现对肿瘤标志物的检测。

一种基于多巴胺仿生修饰的免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米科学、生物免疫技术、电化学传感等领域,具体涉及一种基于多巴胺仿生修饰的无酶电化学免疫传感器电极的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 肿瘤标志物检测是目前唯一无创的早期预警癌症的方法,在临床中对肿瘤的普查、诊断及判断预后等具有十分重要的意义。在众多的肿瘤标志物检测方法中,电化学免疫分析具有操作简便、样品量少、快速灵敏、成本低廉且易于实现微型化等优点,在临床和科研中得到了广泛应用。

[0003] 早期的电化学免疫传感器通常通过对抗原或抗体进行酶标记来检测信号,但酶标操作费时,并且酶对环境要求较高,特别是当酶结合到固体载体表面后容易失活。因此基于具有酶催化活性的纳米材料构建的无酶电化学免疫传感器引起了人们极大的研究兴趣。而其中无标记型电化学免疫传感器又具有步骤简单、方便快捷、重现性好等优点,具有良好的应用前景。但依然存在纳米材料合成困难、缺乏简单而有效的固定方法等问题。

[0004] 对工作电极的修饰及纳米材料的制备是构建无酶电化学免疫传感器的关键。多巴胺仿生修饰是一种非常简单易行的表面功能化方法,可以对几乎任何有机和无机材料表面进行功能化。通过在弱碱性条件下的氧化聚合反应,在材料表面形成的聚多巴胺修饰层具有儿茶酚的反应特性,可以通过 Michael 加成或希夫碱反应与含有巯基或氨基的生物分子反应,将生物分子固定在材料表面上。同时聚多巴胺修饰层还具有还原特性,可以将金属离子还原成纳米颗粒,纳米颗粒的形貌可以通过改变实验条件来控制。

[0005] 本发明首先利用多巴胺仿生修饰对电极进行功能化,然后利用聚多巴胺修饰层的还原特性原位合成具有酶催化活性的铂、银、钯等金属纳米颗粒。抗体可以通过与金属纳米颗粒及聚多巴胺修饰层的相互作用很好地固定在电极表面。基于金属纳米颗粒对 H_2O_2 还原反应的电催化作用及抗体分子对抗原的识别作用,实现对肿瘤标志物的电化学免疫分析。

[0006] 经对现有技术文献的检索发现,CN101975807A 公开了一种三维 Pt-Pb 纳米花针式无酶葡萄糖传感器电极及制备和应用。CN102435649A 公开了一种 Pt-Ag 合金纳米颗粒无酶葡萄糖传感器电极的制备及应用。CN102636536A 公开了一种 Pt-Cu 合金中空纳米颗粒无酶葡萄糖传感器电极的制备和应用。CN103257166A 公开了一种 Pt 纳米花微型针式无酶葡萄糖传感器电极及其制备方法。以上技术文献均为葡萄糖传感器,均未涉及免疫反应,且均未涉及多巴胺仿生修饰。

[0007] CN103116023A 公开了一种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。CN102262118A 公开了一种检测肿瘤标志物的生物电化学传感器及其制备方法。CN1614405A 公开了一种肿瘤标志物的电化学免疫测定方法及微体积免疫测定芯片。以上技术文献均未涉及多巴胺仿生修饰。

发明内容

[0008] 本发明的目的之一是提供简单易行的无酶电化学免疫传感器电极的制备方法,解决电极修饰步骤复杂、重现性差等问题。

[0009] 本发明的目的之二是提供快速、低成本、通用的肿瘤标志物检测方法,为电化学免疫传感器在临床中的应用提供技术基础。

[0010] 一种基于多巴胺仿生修饰的无酶电化学免疫传感器电极的制备方法及应用,包括以下步骤:

[0011] (1)多巴胺仿生修饰:用移液枪将 3 ~ 10 μL 新配制的浓度为 0.1 ~ 2.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的盐酸多巴胺溶液滴涂在处理、活化好的电极表面,室温晾干;所述的盐酸多巴胺溶液, pH 为 8.5,溶剂为 10 $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸(Tris-HCl)缓冲溶液;所述的电极选自下列一种:3 mm 玻碳电极、4 mm 玻碳电极、5 mm 玻碳电极、3 mm 金电极、4 mm 金电极、5 mm 金电极;

[0012] (2) 纳米颗粒原位制备:用超纯水多次冲洗步骤(1)制得的电极,然后用移液枪将 3 ~ 10 μL 浓度为 0.5 ~ 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的金属纳米颗粒的前躯体溶液滴涂在步骤(1)制得的电极表面,室温晾干;所述的金属纳米颗粒为铂纳米颗粒、银纳米颗粒、钯纳米颗粒、铂银纳米颗粒、铂钯纳米颗粒、银钯纳米颗粒中的一种;所述的前躯体溶液为氯铂酸溶液、硝酸银溶液、氯化钯溶液、氯铂酸硝酸银混合溶液、氯铂酸氯化钯混合溶液、硝酸银氯化钯混合溶液;

[0013] (3) 抗体固定:用超纯水多次冲洗步骤(2)制得的电极,用移液枪将肿瘤标志物抗体溶液滴涂在步骤(2)制得的电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下晾干;所述的肿瘤标志物为癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原(PSA)、糖蛋白抗原(CA125)、甲胎蛋白(AFP) 乳腺癌易感基因(BRCA1)中的一种;

[0014] (4) 非特异性位点封闭:用超纯水多次冲洗步骤(3)制得的电极,用移液枪将质量分数为 1% 的牛血清白蛋白(BSA)溶液滴涂在步骤(3)制得的电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下晾干;

[0015] (5) 抗原识别:用超纯水多次冲洗步骤(4)制得的电极,用移液枪将肿瘤标志物标准溶液或未知样品溶液滴涂在步骤(4)制得的电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下晾干;

[0016] (6) 电化学检测:用超纯水多次冲洗步骤(5)制得的电极并作为工作电极, Ag/AgCl 电极作为参比电极, Pt 电极作为对电极,在 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液中加入 10 μL 浓度为 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 H_2O_2 溶液作为底液,在电化学工作站上以即时电流模式测定 -0.4 V 电势下的电流,实现对肿瘤标志物的检测。

[0017] 与现有技术相比,本发明具有如下优点:

[0018] (1) 该电极制备方法不仅步骤简单,操作容易,成本低廉,而且具有较高的电化学生活性及良好的响应性能,解决了常规方法纳米材料合成困难、缺乏简单而有效的固定方法等问题;

[0019] (2) 多巴胺仿生修饰及原位制备的金属纳米颗粒便于进行抗体的固定,避免了复杂的抗体固定过程及由此引起的失活问题;

[0020] (3) 该方法可以适用于多种肿瘤标志物免疫传感器电极的制备,在科研和临床中具有广泛的应用前景。

具体实施方式

[0021] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

[0022] 实施例 1

[0023] (1) 多巴胺仿生修饰:用移液枪将 3 μL 新配制的浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、pH 为 8.5 的盐酸多巴胺溶液滴涂在处理、活化好的 3 mm 玻碳电极表面,室温晾干;

[0024] (2) 纳米颗粒原位制备:用超纯水多次冲洗步骤(1)制得的电极,然后用移液枪将 3 μL 浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的硝酸银溶液滴涂在步骤(1)制得的电极表面,室温晾干;

[0025] (3) 抗体固定:用超纯水多次冲洗步骤(2)制得的电极,用移液枪将癌胚抗原(CEA)抗体溶液滴涂在步骤(2)制得的电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下晾干;

[0026] (4) 非特异性位点封闭:用超纯水多次冲洗步骤(3)制得的电极,用移液枪将质量分数为 1% 的牛血清白蛋白(BSA)溶液滴涂在步骤(3)制得的电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下晾干;

[0027] (5) 抗原识别:用超纯水多次冲洗步骤(4)制得的电极,用移液枪将癌胚抗原(CEA)标准溶液或未知样品溶液滴涂在步骤(4)制得的电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下晾干;

[0028] (6) 电化学检测:用超纯水多次冲洗步骤(5)制得的电极并作为工作电极,Ag/AgCl 电极作为参比电极,Pt 电极作为对电极,在 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液中加入 10 μL 浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 H_2O_2 溶液作为底液,在电化学工作站上以即时电流模式测定 -0.4 V 电势下的电流,实现对癌胚抗原(CEA)的检测。

[0029] 实施例 2

[0030] (1) 多巴胺仿生修饰:用移液枪将 5 μL 新配制的 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、pH 为 8.5 的盐酸多巴胺溶液滴涂在处理、活化好的 4 mm 玻碳电极表面,室温晾干;

[0031] (2) 纳米颗粒原位制备:用超纯水多次冲洗步骤(1)制得的电极,然后用移液枪将 5 μL 浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的氯铂酸溶液滴涂在步骤(1)制得的电极表面,室温晾干;

[0032] (3) 抗体固定:用超纯水多次冲洗步骤(2)制得的电极,用移液枪将前列腺特异性抗原(PSA)抗体溶液滴涂在步骤(2)制得的电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下晾干;

[0033] (4) 非特异性位点封闭:用超纯水多次冲洗步骤(3)制得的电极,用移液枪将质量分数为 1% 的牛血清白蛋白(BSA)溶液滴涂在步骤(3)制得的电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下晾干;

[0034] (5) 抗原识别:用超纯水多次冲洗步骤(4)制得的电极,用移液枪将前列腺特异性抗原(PSA)标准溶液或未知样品溶液滴涂在步骤(4)制得的电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下晾干;

[0035] (6) 电化学检测:用超纯水多次冲洗步骤(5)制得的电极并作为工作电极,Ag/AgCl 电极作为参比电极,Pt 电极作为对电极,在 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液中加入 10 μL 浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 H_2O_2 溶液作为底液,在电化学工作站上以即时电流模式测定 -0.4 V 电势下的电流,实现对前列腺特异性抗原(PSA)的检测。

[0036] 实施例 3

[0037] (1) 多巴胺仿生修饰:用移液枪将 10 μL 新配制的浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、pH 为 8.5 的盐酸多巴胺溶液滴涂在处理、活化好的 5 mm 金电极表面,室温晾干;

[0038] (2) 纳米颗粒原位制备:用超纯水多次冲洗步骤(1)制得的电极,然后用移液枪将 10 μL 浓度为 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的氯化钯溶液滴涂在步骤(1)制得的电极表面,室温晾干;

[0039] (3) 抗体固定:用超纯水多次冲洗步骤(2)制得的电极,用移液枪将甲胎蛋白(AFP)抗体溶液滴涂在步骤(2)制得的电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下晾干;

[0040] (4) 非特异性位点封闭 :用超纯水多次冲洗步骤(3) 制得的电极,用移液枪将质量分数为 1% 的牛血清白蛋白(BSA) 溶液滴涂在步骤(3) 制得的电极表面,4℃ 条件下晾干;

[0041] (5) 抗原识别 :用超纯水多次冲洗步骤(4) 制得的电极,用移液枪将甲胎蛋白(AFP) 标准溶液或未知样品溶液滴涂在步骤(4) 制得的电极表面,4℃ 条件下晾干;

[0042] (6) 电化学检测 :用超纯水多次冲洗步骤(5) 制得的电极并作为工作电极,Ag/AgCl 电极作为参比电极,Pt 电极作为对电极,在 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液中加入 10 μL 浓度为 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 H_2O_2 溶液作为底液,在电化学工作站上以即时电流模式测定 -0.4 v 电势下的电流,实现对甲胎蛋白(AFP) 的检测。

[0043] 实施例 4

[0044] (1) 多巴胺仿生修饰 :用移液枪将 6 μL 新配制的浓度为 2.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、pH 为 8.5 的盐酸多巴胺溶液滴涂在处理、活化好的 4 mm 玻碳电极表面,室温晾干;

[0045] (2) 纳米颗粒原位制备 :用超纯水多次冲洗步骤(1) 制得的电极,然后用移液枪将 5 μL 浓度为 2.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的硝酸银溶液滴涂在步骤(1) 制得的电极表面,室温晾干;

[0046] (3) 抗体固定 :用超纯水多次冲洗步骤(2) 制得的电极,用移液枪将乳腺癌易感基因(BRCA1) 抗体溶液滴涂在步骤(2) 制得的电极表面,4℃ 条件下晾干;

[0047] (4) 非特异性位点封闭 :用超纯水多次冲洗步骤(3) 制得的电极,用移液枪将质量分数为 1% 的牛血清白蛋白(BSA) 溶液滴涂在步骤(3) 制得的电极表面,4℃ 条件下晾干;

[0048] (5) 抗原识别 :用超纯水多次冲洗步骤(4) 制得的电极,用移液枪将乳腺癌易感基因(BRCA1) 标准溶液或未知样品溶液滴涂在步骤(4) 制得的电极表面,4℃ 条件下晾干;

[0049] (6) 电化学检测 :用超纯水多次冲洗步骤(5) 制得的电极并作为工作电极,Ag/AgCl 电极作为参比电极,Pt 电极作为对电极,在 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液中加入 10 μL 浓度为 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 H_2O_2 溶液作为底液,在电化学工作站上以即时电流模式测定 -0.4 v 电势下的电流,实现对乳腺癌易感基因(BRCA1) 的检测。

专利名称(译)	一种基于多巴胺仿生修饰的免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN103575874B	公开(公告)日	2015-01-21
申请号	CN201310508295.9	申请日	2013-10-25
[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	马洪敏 魏琴 杨焱明 高丕成 张勇 吴丹 范大伟		
发明人	马洪敏 魏琴 杨焱明 高丕成 张勇 吴丹 范大伟		
IPC分类号	G01N33/531 G01N27/416		
CPC分类号	G01N33/5438 G01N33/57407 G01N33/9413 G01N2800/7028		
审查员(译)	胡晓佳		
其他公开文献	CN103575874A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于多巴胺仿生修饰的无酶电化学免疫传感器电极的制备方法及应用，涉及纳米科学、生物免疫技术、电化学传感等领域。本发明利用多巴胺仿生修饰对电极进行功能化，利用聚多巴胺修饰层的还原特性原位合成具有酶催化活性的铂、银、钯等金属纳米颗粒。通过与金属纳米颗粒及聚多巴胺修饰层的相互作用将抗体固定在电极表面。基于金属纳米颗粒对H₂O₂还原反应的电催化作用及抗体分子对抗原的识别作用，实现对肿瘤标志物的电化学免疫分析。该方法不仅步骤简单，操作容易，成本低廉，而且具有较高的电化学活性及良好的响应性能，解决了常规方法纳米材料合成困难、缺乏简单而有效的固定方法等问题。该方法可以适用于多种肿瘤标志物免疫传感器电极的制备，在科研和临床中具有广泛的应用前景。