



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110618180 A

(43)申请公布日 2019.12.27

(21)申请号 201910915916.2

(22)申请日 2019.09.25

(71)申请人 江西科技师范大学

地址 330000 江西省南昌市经济技术开发区枫林大街605号

(72)发明人 段学民 胥荃 卢丽敏 徐景坤
蒋丰兴 卢欣宇 蔡悦

(74)专利代理机构 北京轻创知识产权代理有限公司 11212

代理人 刘红阳

(51)Int.Cl.

G01N 27/327(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

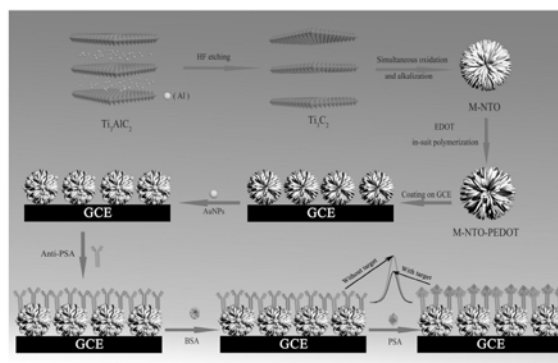
权利要求书2页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种非标记型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器的制备方法及应用

(57)摘要

本发明公开了一种非标记型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器的制备方法及应用,属于电化学传感器技术领域,利用钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)/金纳米粒子的复合材料作为信号放大材料,前列腺特异性抗体作为分子识别原件,构建出一种新型非标记型免疫传感器,实现对前列腺特异性抗原的快速、灵敏检测。本发明所构建的非标记型前列腺特异性抗原免疫传感器具有检测范围广、检测下限低、灵敏度高、操作简单、检测速度快等优点,为的早期诊断提供了一种可靠的检测手段,其线性检测范围是0.0001ng/mL-20ng/mL,最低检测下限为40fg/mL。



1. 一种非标记型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器的制备方法,包括工作电极,参比电极和对电极,其特征在于,所述工作电极为玻碳电极其表面依次修饰钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)/金纳米粒子的复合材料、前列腺特异性抗体、牛血清蛋白,所述参比电极为饱和甘汞电极,所述对电极为铂片电极;制备方法包括以下步骤:

- (1) 制备钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)复合材料,即M-NTO-PEDOT复合材料;
- (2) 制备非标记型检测前列腺特异性抗原电化学免疫传感器的工作电极;
- (3) 制备非标记型检测前列腺特异性抗原电化学免疫传感器的工作曲线。

2. 根据权利要求1所述的一种非标记型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)具体包括以下步骤:

①制备钛酸盐

将1g LiF,加入20mL浓度为9mol L⁻¹的盐酸中,待LiF溶解后,将1g Ti₃AlC₂慢慢加入该溶液中,在40℃下磁力搅拌24小时,离心,去上清液,用去离子水洗涤至中性,60℃下真空干燥6小时,得到Ti₃C₂粉末;将100mg的Ti₃C₂粉末,30mL浓度为1mol L⁻¹的氢氧化钠溶液和0.68mL质量分数为30%的过氧化氢溶液混合,然后将混合悬浮液在140℃下加热12小时,洗涤并烘干,得到钛酸盐,即M-NTO;

②制备钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)复合材料

称取90mg上述钛酸盐溶于10mL的水中,同时取200mg的3,4-乙撑二氧噻吩溶于2mL的乙醇中,混合上述溶液磁力搅拌5分钟;配置4mL浓度为1mol L⁻¹的FeCl₃·6H₂O溶液,慢慢滴加入上述混合悬浮液中,在磁力搅拌条件下,常温反应24小时,反应完毕后离心,去上清,乙醇洗涤后离心,去上清,将沉淀在真空干燥箱中60℃干燥,得到钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)复合材料,即M-NTO-PEDOT复合材料。

3. 根据权利要求1所述的一种非标记型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)具体包括以下步骤:

①将直径为3.0mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉抛光成镜面,分别依次在超纯水、无水乙醇、超纯水中超声清洗;将5.0μL、1mg/mL上述M-NTO-PEDOT复合材料分散液滴加到电极表面上,在红外线烘箱中37℃烘干,作为工作电极;使用电化学工作站以三电极体系沉积金纳米粒子,以饱和甘汞电极为参比电极,铂片电极为对电极,在5.0mL、5mmol L⁻¹的氯金酸溶液中,用时间-电流方法进行沉积,输入电压为-0.2V,运行时间为120s,得到钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)/金纳米粒子的复合材料(即M-NTO-PEDOT-AuNPs复合材料)修饰的工作电极;

②继续将5.0μL、100μg/mL的前列腺特异性抗体滴加到上述电极表面,在37℃水浴槽中孵育1.5小时;然后将5.0μL、0.1wt%的牛血清白蛋白溶液滴加到电极表面,在37℃水浴槽中固定0.5小时,用以封闭非特异性活性位点,用pH为7.0的磷酸盐缓冲液冲洗电极表面,自然晾干,得到非标记型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器的工作电极。

4. 根据权利要求1所述的一种非标记型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)具体包括以下步骤:

将一系列不同浓度的前列腺特异性抗原溶液滴加在所述步骤(2)制备的工作电极表面,在37℃水浴槽中孵育2小时,用pH为7.0的磷酸盐缓冲液冲洗电极表面,自然晾干,使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂片电极为对电极,在含

有0.1M KCl和5mM[Fe(CN)₆]^{3-/4-}且pH为7.0的磷酸缓冲液中,用差分脉冲阳极伏安法测固定抗原前后的工作电极的响应电流,得到二者电流差(Δ I)与初始电流(I₀)的关系,既抑制率,为Δ I/I₀,记录不同浓度下的抑制率与抗原浓度(C_{PSA}),得到工作曲线,利用工作曲线法,得到待测样品中前列腺特异性抗原的浓度。

一种非标记型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于电化学传感器技术领域,具体涉及一种非标记型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 近年来,前列腺癌(PCa)的发病人数和死亡人数一直呈增长趋势,是男性中第二常见的非皮肤癌。另外,美国食品与药物管理局指出,前列腺特异性抗原是唯一可接受的用于诊断前列腺癌的肿瘤标志物,因此,对前列腺特异性抗原的测定,对于减少前列腺癌死亡风险有积极的作用。

[0003] 近年来,电化学免疫传感器备受关注,被广泛应用于肿瘤标志物的检测。而非标记型电化学免疫传感器是基于抗原和抗体特异性结合的一种分析方法,具有检测迅速、检出限低、灵敏度高、操作简单和制备成本低的优点。

发明内容

[0004] 本发明提供一种非标记型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器的制备方法及应用,利用钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)/金纳米粒子的复合材料作为信号放大材料,前列腺特异性抗体作为分子识别原件,构建出一种新型非标记型免疫传感器,实现对前列腺特异性抗原的快速、灵敏检测。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0006] 一种非标记型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器的制备方法,包括工作电极,参比电极和对电极,所述工作电极为玻碳电极表面依次修饰钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)/金纳米粒子的复合材料、前列腺特异性抗体、牛血清蛋白,所述参比电极为饱和甘汞电极,所述对电极为铂片电极;制备方法包括以下步骤:

[0007] (1) 制备钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)复合材料,即M-NTO-PEDOT复合材料;

[0008] (2) 制备非标记型检测前列腺特异性抗原电化学免疫传感器的工作电极;

[0009] (3) 制备非标记型检测前列腺特异性抗原电化学免疫传感器的工作曲线。

[0010] 优选的,所述步骤(1)具体包括以下步骤:

[0011] ①制备钛酸盐

[0012] 将1g LiF,加入20mL浓度为9mol L⁻¹的盐酸中,待LiF溶解后,将1g Ti₃AlC₂慢慢加入该溶液中,在40℃下磁力搅拌24小时,离心,去上清液,用去离子水洗涤至中性,60℃下真空干燥6小时,得到Ti₃C₂粉末;将100mg的Ti₃C₂粉末,30mL浓度为1mol L⁻¹的氢氧化钠溶液和0.68mL质量分数为30%的过氧化氢溶液混合,然后将混合悬浮液在140℃下加热12小时,洗涤并烘干,得到钛酸盐,即M-NTO;

[0013] ②制备钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)复合材料

[0014] 称取90mg上述钛酸盐溶于10mL的水中,同时取200mg的3,4-乙撑二氧噻吩溶于2mL

的乙醇中,混合上述溶液磁力搅拌5分钟;配置4mL浓度为 1mol L^{-1} 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液,慢慢滴加入上述混合悬浮液中,在磁力搅拌条件下,常温反应24小时,反应完毕后离心,去上清,乙醇洗涤后离心,去上清,将沉淀在真空干燥箱中 60°C 干燥,得到钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)复合材料,即M-NTO-PEDOT复合材料。

[0015] 优选的,所述步骤(2)具体包括以下步骤:

[0016] ①将直径为3.0mm的玻璃碳电极用 Al_2O_3 抛光粉抛光成镜面,分别依次在超纯水、无水乙醇、超纯水中超声清洗;将5.0 μL 、1mg/mL上述M-NTO-PEDOT复合材料分散液滴加到电极表面上,在红外线烘箱中 37°C 烘干,作为工作电极;使用电化学工作站以三电极体系沉积金纳米粒子,以饱和甘汞电极为参比电极,铂片电极为对电极,在5.0mL、5mmol L^{-1} 的氯金酸溶液中,用时间-电流方法进行沉积,输入电压为-0.2V,运行时间为120s,得到钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)/金纳米粒子的复合材料(即M-NTO-PEDOT-AuNPs复合材料)修饰的工作电极;

[0017] ②继续将5.0 μL 、100 $\mu\text{g/mL}$ 的前列腺特异性抗体滴加到上述电极表面,在 37°C 水浴槽中孵育1.5小时;然后将5.0 μL 、0.1wt%的牛血清白蛋白溶液滴加到电极表面,在 37°C 水浴槽中固定0.5小时,用以封闭非特异性活性位点,用pH为7.0的磷酸盐缓冲液冲洗电极表面,自然晾干,得到非标记型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器的工作电极。

[0018] 优选的,所述步骤(3)具体包括以下步骤:

[0019] 将一系列不同浓度的前列腺特异性抗原溶液滴加在所述步骤(2)制备的工作电极表面,在 37°C 水浴槽中孵育2小时,用pH为7.0的磷酸盐缓冲液冲洗电极表面,自然晾干,使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂片电极为对电极,在含有0.1M KCl和5mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 且pH为7.0的磷酸缓冲液中,用差分脉冲阳极伏安法测固定抗原前后的工作电极的响应电流,得到二者电流差(ΔI)与初始电流(I_0)的关系,抑制率,为 $\Delta I/I_0$,记录不同浓度下的抑制率与抗原浓度(C_{PSA}),得到工作曲线,利用工作曲线法,得到待测样品中前列腺特异性抗原的浓度。

[0020] 本发明的有益技术效果为:

[0021] (1)本发明通过新型钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)/金纳米粒子复合材料作为信号放大器,其中,钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)比表面积大,能大大提高检测分子在电极上的负载量,金纳米粒子可用于与抗体通过S-Au键结合,而将抗体固定在电极表面。钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)/金纳米粒子复合材料具有独特的结构,拥有大的比表面积,从而提高的前列腺特异性抗体的固定位点,为前列腺特异性抗原提供大量特异性结合位点,这种纳米复合材料充分发挥钛酸盐比表面积大的特性,以及有效的利用聚(3,4-乙撑二氧噻吩)卓越的导电性能和良好的生物相容性,和金纳米粒子结合特异性抗原体的能力,能够充分发挥三者的协同效应,展现出优异的导电性能和生物相容性,从而有效地提高传感器的灵敏度,所构建的非标记型免疫传感器实现了对前列腺特异性抗原的定量检测,具有检测范围广、检测下限低、灵敏度高、操作简单、检测速度快等优点,为的早期诊断提供了一种可靠的检测手段;

[0022] (2)本发明所构建的非标记型电化学免疫传感器实现了精确定量检测前列腺特异性抗原的目的,其线性检测范围是0.0001ng/mL-20ng/mL,最低检测下限为40fg/mL。

附图说明

[0023] 图1为本发明电化学免疫传感器的工作电极的制备原理流程图；

[0024] 图2为本发明制备的M-NTO (A) 和M-NTO-PEDOT (B) 材料的扫描电镜 (SEM) 图；

[0025] 图3为本发明M-NTO-PEDOT-AuNPs修饰电极检测前列腺特异性抗原的线性图。

具体实施方式

[0026] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明。

[0027] 实施例1

[0028] 如图1所示为本发明一种非标记型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器的工作电极制备原理流程图,包括工作电极,参比电极和对电极,所述工作电极为玻碳电极其表面依次修饰钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)/金纳米粒子的复合材料、前列腺特异性抗体、牛血清蛋白,所述参比电极为饱和甘汞电极,所述对电极为铂片电极;制备方法包括以下步骤:

[0029] (1) 制备钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)复合材料,即M-NTO-PEDOT复合材料,具体包括以下步骤:

[0030] ①制备钛酸盐

[0031] 将1g LiF,加入20mL浓度为9mol L⁻¹的盐酸中,待LiF溶解后,将1g Ti₃AlC₂慢慢加入该溶液中,在40℃下磁力搅拌24小时,离心,去上清液,用去离子水洗涤至中性,60℃下真空干燥6小时,得到Ti₃C₂粉末;将100mg的Ti₃C₂粉末,30mL浓度为1mol L⁻¹的氢氧化钠溶液和0.68mL质量分数为30%的过氧化氢溶液混合,然后将混合悬浮液在140℃下加热12小时,洗涤并烘干,得到钛酸盐,即M-NTO;

[0032] ②制备钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)复合材料

[0033] 称取90mg上述钛酸盐溶于10mL的水中,同时取200mg的3,4-乙撑二氧噻吩溶于2mL的乙醇中,混合上述溶液磁力搅拌5分钟;配置4mL浓度为1mol L⁻¹的FeCl₃·6H₂O溶液,慢慢滴加入上述混合悬浮液中,在磁力搅拌条件下,常温反应24小时,反应完毕后离心,去上清,乙醇洗涤后离心,去上清,将沉淀在真空干燥箱中60℃干燥,得到钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)复合材料,即M-NTO-PEDOT复合材料。

[0034] 如图2所示为制备的M-NTO (A) 和M-NTO-PEDOT (B) 材料的扫描电镜 (SEM) 图,PEODT附着在花球状的钛酸盐表面,表明M-NTO与PEODT的成功复合。

[0035] (2) 制备非标记型检测前列腺特异性抗原电化学免疫传感器的工作电极,具体包括以下步骤:

[0036] ①将直径为3.0mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉抛光成镜面,分别依次在超纯水、无水乙醇、超纯水中超声清洗;将5.0μL、1mg/mL上述M-NTO-PEDOT复合材料分散液滴加到电极表面上,在红外线烘箱中37℃烘干,作为工作电极;使用电化学工作站以三电极体系沉积金纳米粒子,以饱和甘汞电极为参比电极,铂片电极为对电极,在5.0mL、5mmol L⁻¹的氯金酸溶液中,用时间-电流方法进行沉积,输入电压为-0.2V,运行时间为120s,得到钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)/金纳米粒子的复合材料(即M-NTO-PEDOT-AuNPs复合材料)修饰的工作电极;

[0037] ②继续将5.0μL、100μg/mL的前列腺特异性抗体滴加到上述电极表面,在37℃水浴

槽中孵育1.5小时;然后将5.0 μ L、0.1wt%的牛血清白蛋白溶液滴加到电极表面,在37 $^{\circ}$ C水浴槽中固定0.5小时,用以封闭非特异性活性位点,用pH为7.0的磷酸盐缓冲液冲洗电极表面,自然晾干,得到非标记型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器的工作电极。

[0038] (3) 制备非标记型检测前列腺特异性抗原电化学免疫传感器的工作曲线,具体包括以下步骤:

[0039] 将一系列不同浓度的前列腺特异性抗原溶液滴加在所述步骤(2)制备的工作电极表面,在37 $^{\circ}$ C水浴槽中孵育2小时,用pH为7.0的磷酸盐缓冲液冲洗电极表面,自然晾干,使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂片电极为对电极,在含有0.1M KCl和5mM[Fe(CN) $_6$] $^{3-/4-}$ 且pH为7.0的磷酸缓冲液中,用差分脉冲阳极伏安法测固定抗原前后的工作电极的响应电流,得到二者电流差(ΔI)与初始电流(I_0)的关系,抑制率,为 $\Delta I/I_0$,记录不同浓度下的抑制率与抗原浓度(C_{PSA}),得到图3所示的线性关系,抑制率与 $\log C_{PSA}$ 呈现良好的线形关系($R^2=0.997$),且具有较宽的线性范围(0.0001–20.0 ng/mL)和较高的灵敏度和低检测限(40pg/mL),充分表明该传感电极能够成功检测未知浓度的前列腺特异性抗原。利用工作曲线法,可以得到待测样品中前列腺特异性抗原的浓度。

[0040] 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,凡在本发明的技术方案的基础上,本领域技术人员不需要付出创造性劳动即可做出的各种修改或变形仍在本发明的保护范围内。

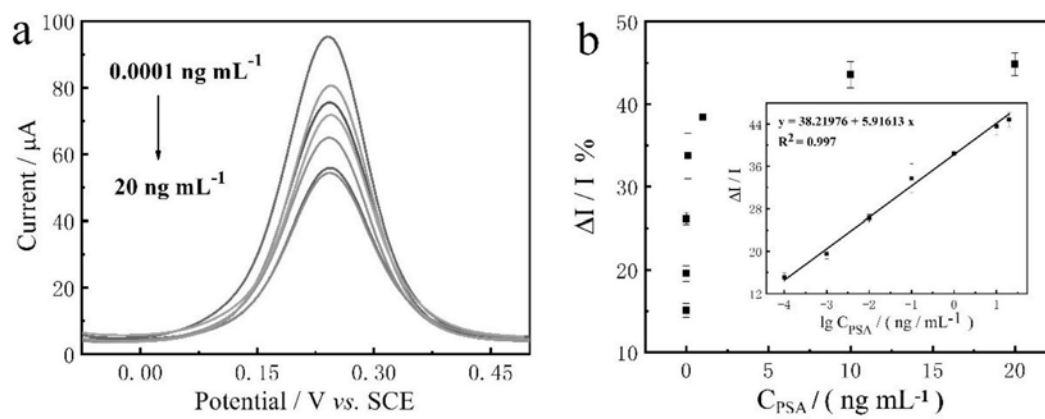


图3

专利名称(译)	一种非标记型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN110618180A	公开(公告)日	2019-12-27
申请号	CN201910915916.2	申请日	2019-09-25
[标]申请(专利权)人(译)	江西科技师范大学		
申请(专利权)人(译)	江西科技师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	江西科技师范大学		
[标]发明人	段学民 胥荃 卢丽敏 徐景坤 蒋丰兴 蔡悦		
发明人	段学民 胥荃 卢丽敏 徐景坤 蒋丰兴 卢欣宇 蔡悦		
IPC分类号	G01N27/327 G01N33/53		
CPC分类号	G01N27/3276 G01N27/3277 G01N27/3278 G01N33/5302		
代理人(译)	刘红阳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种非标记型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器的制备方法及应用，属于电化学传感器技术领域，利用钛酸盐-聚(3,4-乙撑二氧噻吩)/金纳米粒子的复合材料作为信号放大材料，前列腺特异性抗体作为分子识别原件，构建出一种新型非标记型免疫传感器，实现对前列腺特异性抗原的快速、灵敏检测。本发明所构建的非标记型前列腺特异性抗原免疫传感器具有检测范围广、检测下限低、灵敏度高、操作简单、检测速度快等优点，为的早期诊断提供了一种可靠的检测手段，其线性检测范围是0.0001ng/mL-20ng/mL，最低检测下限为40fg/mL。

