



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110542711 A

(43)申请公布日 2019.12.06

(21)申请号 201910639756.3

(22)申请日 2019.07.16

(71)申请人 杭州育源生命科技有限公司

地址 310018 浙江省杭州市经济技术开发区
杭州东部国际商务中心2幢808室

(72)发明人 王志江

(74)专利代理机构 北京博维知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 11486

代理人 王艺

(51)Int.Cl.

G01N 27/26(2006.01)

G01N 27/30(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页

(54)发明名称

一种免疫传感器的制备及用于FSH抗体检测
的方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于AgNPs/CQDs-PEI-GO材料,构建一种稳定性好,灵敏度高的电化学发光免疫传感器,以及用于检测FSH抗体的方法。AgNPs/CQDs-PEI-GO电化学发光免疫传感器解决了市面上销售的抗体检测试剂盒无法用于FSH抗体检测的缺陷,为辅助生殖提供了技术支持,提高了检测方法的特异性。本发所用材料CQDs具有毒性低和生物兼容性好的优点,其次,PEI-GO和AgNPs由于其具有高的导电性,大的比表面积和好的生物兼容性等优点,因此该传感器应用于样品的检测中,具有良好的稳定性、重现性和特异性。

1. 一种基于碳量子点的电化学发光免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

将直径为5mm的玻碳电极(GCE)在铺有0.5 μ m的氧化铝粉末的抛光布上机械打磨抛光,先用二次水洗去表面残留粉末,再用乙醇清洗,再移入超声水浴中清洗,氮气吹干;

在玻碳电极上滴涂10 μ L浓度为1.5mg /mL的AgNPs/CQDs-PEI-GO的溶液,室温下晾干,得到AgNPs/CQDs-PEI-GO修饰的玻碳电极;

用PBS冲洗AgNPs/CQDs-PEI-GO修饰的玻碳电极,滴涂20 μ LFSH抗体(anti-FSH)在修饰的玻碳电极表面并在4 $^{\circ}$ C冰箱中孵育10h,用去离子水洗去物理吸附的anti-FSH,制得AgNPs/CQDs-PEI-GO/anti-FSH修饰的玻碳电极;

在AgNPs/CQDs-PEI-GO/anti-FSH修饰的玻碳电极上滴涂30 μ L 浓度为1.0 wt.%的BSA,以封闭电极表面上非特异性活性位点,并保存在4 $^{\circ}$ C冰箱中;

取20 μ L浓度为10 ng/mL~100 ng/mL的anti-FSH标准溶液滴于AgNPs/CQDs-PEI-GO/anti-FSH修饰电极表面并在4 $^{\circ}$ C冰箱中孵育10h,用PBS缓冲溶液冲洗电极表面,制得一种基于AgNPs/CQDs-PEI-GO电化学发光免疫传感器。

2. 根据权利要求1所述的基于碳量子点的电化学发光免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述AgNPs/CQDs-PEI-GO材料由以下方法制备:

CQDs的制备

称取 100~200g橘子经榨汁机搅拌后得到悬浮液,取 30mL橘子汁和 40mL 乙醇于200mL 水热反应釜中,置于烘箱中 200 $^{\circ}$ C加热 6h,反应完全后冷却至室温,过滤残渣,将滤液离心后再用微孔滤膜过滤,再用冷冻干燥机对溶液进行冷冻干燥约72h,得到微黄色粉末,储存于4 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用;

PEI-GO 的制备

称量 0.2 g GO 溶于 300 mL 二次水中,超声 30 min;加入 0.1 g PEI,50 $^{\circ}$ C 加热回流10 h,冷却至室温,所得产物离心、洗涤,最终溶于水中备用;

AgNPs/CQDs-PEI-GO的制备

取20 mL CQDs 加入到 PEI-GO 溶液中,100 $^{\circ}$ C 加热回流 2 h,所得溶液离心洗涤后,然后加入0.1 mL和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二酰亚胺和N-羟基丁二酰亚胺(5:1)的混合溶液,搅拌 5 min;加入5 mL AgNPs 后继续搅10h;得到的产物为AgNPs/CQDs-PEI-GO,离心、洗涤后溶于 PBS中。

3. 根据权利要求1所述的一种电化学发光免疫传感器使用方法,所述电化学发光免疫传感器采用权利要求1所述的制备方法制备,其特征在与,包括如下步骤:

使用电化学工作站用三电极体系,Ag/AgCl 做参比电极,铂丝做对电极,AgNPs/CQDs-PEI-GO/anti-FSH 做工作电极,检测工作在5 mL 含有 0.1 mol /L K₂S₂O₈ 和 0.1 mol /L KCl 的PBS溶液中进行,光电倍增管设置 800 V,扫描电压-1.8 V ~ -0.2 V,扫速 200 mV s。

4. 一种采用电化学发光免疫传感器检测FSH抗体的方法,所述电化学发光免疫传感器为采用权利要求1所述的电化学发光免疫传感器,其特征在于,所述检测方法包括:

FSH抗体的检测由三部分分析组成:筛选实验、确证实验和滴定实验;

筛选实验是检测样本中是否为 FSH 抗体潜在阳性,用AgNPs/CQDs-PEI-GO电化学发光

免疫传感器得到FSH抗体的最低检出限,如浓度大于最低检出限,需要进一步通过确证实验验证;

对不同浓度的anti-FSH标准溶液进行检测,通过所得的电致化学发光强度与anti-FSH标准溶液浓度之间的关系,绘制工作曲线;

待测样品溶液代替anti-FSH标准溶液进行检测,检测的结果可通过工作曲线查得。

一种免疫传感器的制备及用于FSH抗体检测的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物传感检测技术领域,具体涉及一种基于AgNPs/CQDs-PEI-GO电化学发光免疫传感器的制备方法及用于检测FSH抗体的方法。

背景技术

[0002] 卵泡刺激素又称促卵泡激素(Folicle Stimulating Hormone,FSH),是一种糖蛋白激素,分子量约为30KD,属于糖蛋白激素家族。它能促进颗粒细胞增生,刺激类固醇生成,调节配子细胞的发育和成熟,是下丘脑-垂体-性腺轴中的主要激素之一。利用FSH激素诱导卵泡细胞发育成熟和体外受精,进行完全体外化培养技术生产的胚胎,移植给受体,用于完成试管婴儿等辅助生育。

[0003] 生殖辅助药物用于诱导重组促卵泡生长激素,能够维持窦前卵泡的存活,并且促进原始卵泡的发展。但药物长期使用可能产生抗体,影响效果,目前市场上销售的用于检测抗体的试剂盒无法有效检测到FSH抗体,为了高效地使用生殖药物,需要及时检测是否产生FSH抗体。

发明内容

[0004] 本发明公开了一种基于AgNPs/CQDs-PEI-GO材料,构建一种稳定性好,灵敏度高的电化学发光免疫传感器,以及用于检测FSH抗体的方法。

[0005] 为实现发明目的,本发明采用如下技术方案:

一种基于碳量子点的电化学发光免疫传感器的制备方法,包括以下步骤:

(1) 将直径为5mm的玻碳电极(GCE)在铺有0.5 μ m的氧化铝粉末的抛光布上机械打磨抛光,先用二次水洗去表面残留粉末,再用乙醇清洗,再移入超声水浴中清洗,氮气吹干;

(2) 在玻碳电极上滴涂10 μ L浓度为1.5mg/mL的AgNPs/CQDs-PEI-GO的溶液,室温下晾干,得到AgNPs/CQDs-PEI-GO修饰的玻碳电极;

(3) 用PBS冲洗AgNPs/CQDs-PEI-GO修饰的玻碳电极,滴涂20 μ LFSH抗体(anti-FSH)在修饰的玻碳电极表面并在4 $^{\circ}$ C冰箱中孵育10h,用去离子水洗去物理吸附的anti-FSH,制得AgNPs/CQDs-PEI-GO/anti-FSH修饰的玻碳电极;

(4) 在AgNPs/CQDs-PEI-GO/anti-FSH修饰的玻碳电极上滴涂30 μ L浓度为1.0 wt.%的BSA,以封闭电极表面上非特异性活性位点,并保存在4 $^{\circ}$ C冰箱中;

(5) 取20 μ L浓度为10 ng/mL~100 ng/mL的anti-FSH标准溶液滴于AgNPs/CQDs-PEI-GO/anti-FSH修饰电极表面并在4 $^{\circ}$ C冰箱中孵育10h,用PBS缓冲溶液冲洗电极表面,制得一种基于AgNPs/CQDs-PEI-GO电化学发光免疫传感器。

[0006] 其中AgNPs/CQDs-PEI-GO材料由以下方法制备:

(1) CQDs的制备

称取100~200g橘子经榨汁机搅拌后得到悬浮液,取 30mL橘子汁和 40mL 乙醇于200mL 水热反应釜中,置于烘箱中 200 $^{\circ}$ C加热 6h,反应完全后冷却至室温,过滤残渣,将滤

液离心后再用微孔滤膜过滤,再用冷冻干燥机对溶液进行冷冻干燥约72h,得到微黄色粉末,储存于4℃冰箱中保存备用;

(2) PEI-GO 的制备

称量 0.2 g GO 溶于 300 mL 二次水中,超声 30 min;加入 0.1 g PEI,50℃ 加热回流 10 h,冷却至室温,所得产物离心、洗涤,最终溶于水中备用;

(3) AgNPs/CQDs-PEI-GO的制备

取 20 mL CQDs 加入到 PEI-GO 溶液中,100 °C 加热回流 2 h,所得溶液离心洗涤后,然后加入 0.1 mL 和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二酰亚胺和N-羟基丁二酰亚胺(5:1)的混合溶液,搅拌 5 min;加入 5 mL AgNPs 后继续搅拌 10h;得到的产物为AgNPs/CQDs-PEI-GO,离心、洗涤后溶于 PBS中。

[0007] 基于AgNPs/CQDs-PEI-GO电化学发光免疫传感器,其特征在于,使用方法如下:使用电化学工作站用三电极体系,Ag/AgCl 做参比电极,铂丝做对电极,AgNPs/CQDs-PEI-GO/anti-FSH 做工作电极,检测工作在5 mL 含有 0.1 mol /L K₂S₂O₈ 和 0.1 mol /L KCl 的PBS溶液中进行,光电倍增管设置 800 V,扫描电压-1.8 V ~ -0.2 V,扫速 200 mV s。

[0008] 一种基于AgNPs/CQDs-PEI-GO电化学发光免疫传感器,用于FSH抗体的检测方法如下:FSH抗体的检测由三部分分析组成:筛选实验、确证实验和滴定实验;

(1)筛选实验是检测样本中是否为 FSH 抗体潜在阳性,用AgNPs/CQDs-PEI-GO电化学发光免疫传感器得到FSH抗体的最低检出限,如浓度大于最低检出限,需要进一步通过确证实验验证;

(2)对不同浓度的anti-FSH标准溶液进行检测,通过所得的电致化学发光强度与anti-FSH标准溶液浓度之间的关系,绘制工作曲线;

(3)待测样品溶液代替anti-FSH标准溶液进行检测,检测的结果可通过工作曲线查得。

[0009] 本发明的有益效果为:

(1) CQDs具有毒性低和生物兼容性好的优点,其次,PEI-GO 和 AgNPs 由于其具有高的导电性,大的比表面积和好的生物兼容性等优点,因此该传感器应用于样品的检测中,具有良好的稳定性、重现性和特异性。

[0010] (2) AgNPs/CQDs-PEI-GO电化学发光免疫传感器解决了市面上销售的抗体检测试剂盒无法用于FSH抗体检测的缺陷,为辅助生殖提供了技术支持,提高了检测方法的特异性。

[0011] (3) 本发明用橘子作为原料制备CQDs,具有原料来源简单,绿色无毒的优点。

具体实施方式

[0012] 实施例1

一种基于碳量子点的电化学发光免疫传感器的制备方法,

(1)将直径为5mm的玻碳电极(GCE)在铺有0.5μm的氧化铝粉末的抛光布上机械打磨抛光,先用30ml二次水洗去表面残留粉末,再用乙醇清洗2次,再移入超声水浴中清洗2分钟,氮气吹干;

(2)在玻碳电极上滴涂10 μL浓度为1.5mg /mL的AgNPs/CQDs-PEI-GO的溶液,室温放置5小时后晾干,得到AgNPs/CQDs-PEI-GO修饰的玻碳电极;

(3) 用30mL PBS溶液 (pH7.4) 冲洗AgNPs/CQDs-PEI-GO修饰的玻碳电极, 滴涂20 μ L FSH抗体 (anti-FSH) 在修饰的玻碳电极表面并在4 $^{\circ}$ C冰箱中孵育10h, 用去离子水冲洗3次, 除去物理吸附的anti-FSH, 制得AgNPs/CQDs-PEI-GO/anti-FSH修饰的玻碳电极;

(4) 在AgNPs/CQDs-PEI-GO/anti-FSH修饰的玻碳电极上滴涂30 μ L 浓度为1.0 wt.%的BSA, 以封闭电极表面上非特异性活性位点, 并保存在4 $^{\circ}$ C冰箱中;

(5) 取20 μ L浓度分别为10 ng/mL、20ng/mL、30ng/mL、40ng/mL、50ng/mL、60ng/mL、70ng/mL、80ng/mL、90ng/mL、100 ng/mL的anti-FSH标准溶液分别滴于AgNPs/CQDs-PEI-GO/anti-FSH修饰电极表面并在4 $^{\circ}$ C冰箱中孵育10h, 用PBS缓冲溶液冲洗电极表面, 制得一种基于AgNPs/CQDs-PEI-GO电化学发光免疫传感器。

[0013] 实施例2

AgNPs/CQDs-PEI-GO材料由以下方法制备:

(1) CQDs的制备

称取200g橘子经榨汁机搅拌后得到悬浮液, 取 30mL橘子汁和 40mL 乙醇于 200mL 水热反应釜中, 置于烘箱中 200 $^{\circ}$ C加热 6h, 反应完全后冷却至室温, 过滤残渣, 将滤液在10000 r/min 转速下离心 40min, 除去大颗粒杂质, 再用微孔滤膜过滤, 除去反应中生成的大分子和不溶于水的杂质, 便制得纯净的 CQDs 溶液。最后用分子量为 1000Da 的透析袋透析24h, 以去除未参加反应的原料或反应中生成的小分子, 收集透析内的产物再用冷冻干燥机对溶液进行冷冻干燥约72h, 得到微黄色粉末, 储存于4 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用;

(2) PEI-GO 的制备

称量 0.2 g GO 溶于 300 mL 二次水中, 超声 30 min; 加入 0.1 g PEI, 50 $^{\circ}$ C 加热回流 10 h, 冷却至室温, 所得产物离心、用二次水洗涤3次, 最终溶于水中备用;

(3) AgNPs/CQDs-PEI-GO的制备

取 20 mL CQDs 加入到 PEI-GO 溶液中, 100 $^{\circ}$ C 加热回流 2 h, 所得溶液离心, 用二次水洗涤后, 然后加入 0.1 mL 和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二酰亚胺和N-羟基丁二酰亚胺(5:1)的混合溶液, 搅拌 5 min; 加入 5 mL AgNPs 后继续搅拌 10h; 得到的产物为AgNPs/CQDs-PEI-GO, 离心、洗涤后溶于 PBS中。

[0014] 实施例3

基于AgNPs/CQDs-PEI-GO电化学发光免疫传感器用于FSH抗体的检测:

使用电化学工作站用三电极体系, Ag/AgCl 做参比电极, 铂丝做对电极, AgNPs/CQDs-PEI-GO/anti-FSH 做工作电极, 检测工作在5 mL 含有 0.1 mol/L $K_2S_2O_8$ 和 0.1 mol/L KCl 的PBS溶液中进行, 光电倍增管设置 800 V, 扫描电压-1.8 V ~ -0.2 V, 扫速 200 mV/s。

[0015] 一种基于AgNPs/CQDs-PEI-GO电化学发光免疫传感器, 用于FSH抗体的检测方法如下: FSH抗体的检测由三部分分析组成: 筛选实验、确证实验和滴定实验;

(1) 筛选实验是检测样本中是否为 FSH 抗体潜在阳性, 用AgNPs/CQDs-PEI-GO电化学发光免疫传感器得到FSH抗体的最低检出限, 如浓度大于最低检出限, 需要进一步通过确证实验验证;

(2) 对不同浓度的anti-FSH标准溶液进行检测, 通过所得的电致化学发光强度与anti-FSH标准溶液浓度之间的关系, 绘制工作曲线;

(3) 待测样品溶液代替anti-FSH标准溶液进行检测,检测的结果可通过工作曲线查得。

专利名称(译)	一种免疫传感器的制备及用于FSH抗体检测的方法		
公开(公告)号	CN110542711A	公开(公告)日	2019-12-06
申请号	CN201910639756.3	申请日	2019-07-16
[标]发明人	王志江		
发明人	王志江		
IPC分类号	G01N27/26 G01N27/30 G01N27/327 G01N33/531		
CPC分类号	G01N27/26 G01N27/30 G01N27/327 G01N33/531		
代理人(译)	王艺		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于AgNPs/CQDs-PEI-GO材料，构建一种稳定性好，灵敏度高的电化学发光免疫传感器，以及用于检测FSH抗体的方法。AgNPs/CQDs-PEI-GO电化学发光免疫传感器解决了市面上销售的抗体检测试剂盒无法用于FSH抗体检测的缺陷，为辅助生殖提供了技术支持，提高了检测方法的特异性。本发所用材料CQDs具有毒性低和生物兼容性好的优点，其次，PEI-GO和AgNPs由于其具有高的导电性，大的比表面积和好的生物兼容性等优点，因此该传感器应用于样品的检测中，具有良好的稳定性、重现性和特异性。