



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104459132 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 25

(21) 申请号 201410763882. 7

(22) 申请日 2014. 12. 12

(71) 申请人 济南大学

地址 250022 山东省济南市济微路 106 号

(72) 发明人 吴丹 闫涛 李月云 孙培晓
王晓东 庞雪辉 马洪敏 张勇
范大伟 杜斌 胡丽华 魏琴

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 27/416(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页

(54) 发明名称

一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器的制备方法及应用。具体是采用 Au@Ag/CuO-GS 作为检测抗体标记物,制备一种检测胰腺癌肿瘤标志物的夹心型电化学免疫传感器,利用 Au@Ag/CuO-GS 其优异的生物相容性和高的催化性能,使所制作的传感器具有更高的灵敏度和更宽的检测范围,检测限可达 1.5fg/mL。

1. 一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤如下:

(1) 将直径为 3~5 mm 的玻碳电极用 Al₂O₃ 抛光粉打磨,超纯水清洗干净;

(2) 以质量浓度为 0.8~1.5% 的 HAuCl₄ 溶液为底液,在 -0.2 V 电压下扫描 30 s,将金电沉积到电极表面,用超纯水冲洗,晾干;

(3) 继续将 4~6 μL、8~12 μg/mL 的胰腺癌标志物捕获抗体 Ab₁ 溶液滴加到电极表面,超纯水冲洗,4 °C 冰箱中干燥;

(4) 继续将 3 μL、质量分数为 0.5~2.0% 的牛血清白蛋白 BSA 溶液滴加到电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,超纯水冲洗,4 °C 冰箱中晾干;

(5) 滴加 4~6 μL、0.01 pg/mL~100 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原标准溶液到电极表面,超纯水冲洗,4 °C 冰箱中干燥;

(6) 将 4~6 μL、1~3 mg/mL 的检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab₂ 溶液滴涂于电极表面上,置于 4 °C 冰箱中晾干,制得一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器。

2. 如权利要求 1 所述的一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器的制备方法,所述检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab₂ 溶液,其特征在于,制备步骤如下:

(1) 花状纳米 CuO-GS 的制备

将 10.0 mL、8~10.0 mol/L 的 NaOH,以每分钟 0.5 mL 的速度加入 1.0 mL、0.4~0.6 mol/L 的硝酸铜溶液中,加入 0.05~0.07 g 的氧化石墨烯,放入反应釜中,100 °C 下反应 24 h,反应完全后进行离心分离,得到黑色固体沉淀物,将其放入鼓风干燥箱中干燥 8~12 h,制得花状纳米 CuO-GS;

(2) 氨基化的花状纳米 CuO-GS 的制备

称取 0.08~0.12 g 的花状纳米 CuO-GS,依次加入 8~12 mL 无水乙醇,0.08~0.12 mL 的 3-氨基三乙氧基硅烷于三口烧瓶中,60~80 °C 下油浴回流加热、搅拌 1.0~2.0 h;取出,放在离心管中进行离心,用无水乙醇清洗,离心去除上清液,干燥后,制得黑色固体氨基化的花状纳米 CuO-GS;

(3) Au@Ag 溶液的制备

称量 99 mL 超纯水,加入 1 mL、质量分数为 0.8~1.2% 的 HAuCl₄ 水溶液,油浴回流加热,沸腾后加入 2.5 mL、质量分数为 0.8~1.2% 的柠檬酸钠水溶液,继续沸腾 13~18 min,取出后冷却到室温,制得纳米金溶液,遮光保存;

配制 100 mL、50 mmol/L 的十六烷基三甲基溴化铵 CTAB 水溶液,加入 5 mL、0.1 mol/L 的抗坏血酸 VC,2.5 mL、8~12 mmol/L 的硝酸银溶液,5 mL 纳米金溶液,滴加 1 mol/L 的 NaOH 溶液至颜色由红色变为金黄色,制得金黄色的 Au@Ag 溶液;

(4) 检测抗体标记物 Au@Ag/CuO-GS 的制备

取 20 mL Au@Ag 溶液,以 10000~12000 rpm 的转速进行离心 15~20 min,去除上清液,加入 20 mL 水,超声使其均匀,加入 1 mL、8~12 mg/mL 氨基化的花状纳米 CuO-GS 的水溶液,震荡 24 h 后,以 8000 rpm 的转速离心 5 min,用水清洗沉淀两次,放入鼓风干燥箱中进行干燥 8~12 h,制得黑色固体检测抗体标记物 Au@Ag/CuO-GS;

(5) 检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab₂ 溶液的制备

取 2 mL、2 mg/mL 的检测抗体标记物 Au@Ag/CuO-GS 水溶液,加入 2 mL、10 μg/mL 抗体溶液,4 °C 震荡 12h,去除上清液,加入 2 mL、pH 7.4 的 PBS,制得检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab₂ 溶液,4 °C 条件下备用。

3. 如权利要求 1 所述的制备方法制备的一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器,用于胰腺癌肿瘤标志物的检测,检测步骤如下:

(1) 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,铂丝电极为辅助电极,所制备的传感器为工作电极,在 10 mL、40~60 mmol/L 的 pH 5.6 ~ 8.0 磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2) 用计时电流法对胰腺癌肿瘤标志物进行检测,输入电压为 -0.4 V,取样间隔 0.1 s,运行时间 400 s;

(3) 当背景电流趋于稳定后,每隔 50 s 向 10 mL、50 mmol/L 的 pH=7.4 磷酸盐缓冲溶液中注入 10 μL、5~10 mol/L 的双氧水溶液,记录电流变化。

4. 如权利要求 1~3 所述的一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述胰腺癌肿瘤标志物选自下列之一:癌胚抗原 CEA、糖类抗原 19-9、糖类抗原 242、铁蛋白 Ferritin。

一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器的制备方法及应用。具体是采用 Au@Ag/CuO-GS 作为检测抗体标记物,制备一种检测胰腺癌肿瘤标志物的夹心型电化学免疫传感器,属于新型功能材料与生物传感检测技术领域。

背景技术

[0002] 胰腺癌是一种恶性程度很高,诊断和治疗都很困难的消化道恶性肿瘤。其发病率和死亡率近年来明显上升。5 年生存率 <1%,是预后最差的恶性肿瘤之一。胰腺癌早期的确诊率不高,手术死亡率较高,而治愈率很低。在临床研究上,发展一种快速、简便、灵敏的检测肿瘤标志物方法是十分重要的。

[0003] 目前已有的癌症标志物的临床检测方法很多,如放射免疫分析法、免疫放射分析法、酶标记免疫分析法、化学免疫发光分析法、时间分辨荧光免疫分析法等。免疫传感器是将免疫学方法与分析化学方法相结合的一种生物传感器,通过抗原与抗体之间的特性性结合,使得它具有高灵敏性、高选择性、分析快速和操作简便等优点。

[0004] 电化学免疫传感器具有灵敏度高、选择性好、结构简单、操作简便、易于小型化、可连续、快速自动化检测分析等优点,因此本发明制备了一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器,实现了对肿瘤标志物的检测。

[0005] 申请号为 201310249684 的专利发明了一种用于无标记癌胚抗原检测的电化学免疫传感器的制备方法,在电化学传感器中,夹心型的电化学免疫传感器应用更为广泛,本发明制备了一种 Au@Ag/CuO-GS 作为标记物的胰腺癌夹心型免疫传感器。纳米材料凭借其特殊的物理和化学性质得到了广泛应用,纳米材料能够提供大的比表面积,提高传感器的实用性和稳定性,申请号为 201410012160 的专利中介绍了一种用纳米氧化铜催化过氧化氢氧化对苯二甲酸增强荧光的方法,纳米氧化铜的信号增强效果明显。石墨烯纳米层(GS)具有大的比表面积,催化性能好,生物相容性好,能有效地吸附固载抗原,增强电子传递等优点,申请号为 201310600457 的专利依据这些优点发明了一种黑色素纳米微球-石墨烯电化学传感器,效果较好,因此本发明将哌嗪修饰的氨基化石墨烯引入到电化学免疫传感器的制备中。核壳结构具有良好的光学和催化性能,金银核壳亦被用于传感器的制备。在此电化学免疫传感器中,将纳米 CuO、石墨烯、金银核壳掺杂在一起,制得 Au@Ag/CuO-GS,作为检测抗体标记物。纳米金即具有高电子密度、介电特性和催化作用,能与多种生物大分子结合,且不影响其生物活性,本研究中将纳米金作为捕获抗体标记物。该方法具有成本低、灵敏度高、特异性好、检测快速等优点,而且制备过程较为简单,有效克服了目前肿瘤标志物检测方法的不足。

发明内容

[0006] 本发明的目的之一是基于 Au@Ag/CuO-GS 作为检测抗体标记物,构建了一种快速

超灵敏的夹心型电化学免疫传感器。

[0007] 本发明的目的之二是将该夹心型电化学免疫传感器应用于多种肿瘤标志物的检测。

[0008] 本发明的技术方案如下：

1. 一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤如下：

(1) 将直径为 3~5 mm 的玻碳电极用 Al₂O₃ 抛光粉打磨,超纯水清洗干净；

(2) 以质量浓度为 0.8~1.5% 的 HAuCl₄ 溶液为底液,在 -0.2 V 电压下扫描 30 s,将金电沉积到电极表面,用超纯水冲洗,晾干；

(3) 继续将 4~6 μL、8 ~ 12 μg/mL 的肿瘤标志物捕获抗体 Ab₁ 溶液滴加到电极表面,超纯水冲洗,4 °C 冰箱中干燥；

(4) 继续将 3 μL、质量分数为 0.5 ~ 2.0 % 的牛血清白蛋白 BSA 溶液滴加到电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,超纯水冲洗,4 °C 冰箱中晾干；

(5) 滴加 4~6 μL、0.01 pg/mL ~ 100 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原标准溶液到电极表面,超纯水冲洗,4 °C 冰箱中干燥；

(6) 将 4~6 μL、1 ~ 3 mg/mL 的检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab₂ 溶液滴涂于电极表面上,置于 4 °C 冰箱中晾干,制得一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器。

[0009] 2. 检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab₂ 溶液的制备

(1) 花状纳米 CuO-GS 的制备

将 10.0 mL、8~10.0 mol/L 的 NaOH,以每分钟 0.5 mL 的速度加入 1.0 mL、0.4~0.6 mol/L 的硝酸铜溶液中,加入 0.05~0.07 g 的氧化石墨烯,放入反应釜中,100 °C 下反应 24 h,反应完全后进行离心分离,得到黑色固体沉淀物,将其放入鼓风干燥箱中干燥 8~12 h,制得花状纳米 CuO-GS；

(2) 氨基化的花状纳米 CuO-GS 的制备

称取 0.08~0.12 g 的花状纳米 CuO-GS,依次加入 8~12 mL 无水乙醇,0.08~0.12 mL 的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷于三口烧瓶中,60~80 °C 下油浴回流加热、搅拌 1.0~2.0 h；取出,放在离心管中进行离心,用无水乙醇清洗,离心去除上清液,干燥后,制得黑色固体氨基化的花状纳米 CuO-GS；

(3) Au@Ag 溶液的制备

称量 99 mL 超纯水,加入 1 mL、质量分数为 0.8~1.2% 的 HAuCl₄ 水溶液,油浴回流加热,沸腾后加入 2.5 mL、质量分数为 0.8~1.2% 的柠檬酸钠水溶液,继续沸腾 13 ~18 min,取出后冷却到室温,制得纳米金溶液,遮光保存；

配制 100 mL、50 mmol/L 的十六烷基三甲基溴化铵 CTAB 水溶液,加入 5 mL、0.1 mol/L 的抗坏血酸 VC,2.5 mL、8~12 mmol/L 的硝酸银溶液,5 mL 纳米金溶液,滴加 1 mol/L 的 NaOH 溶液至颜色由红色变为金黄色,制得金黄色的 Au@Ag 溶液；

(4) 检测抗体标记物 Au@Ag/CuO-GS 的制备

取 20 mL Au@Ag 溶液,以 10000 ~12000 rpm 的转速进行离心 15~20min,去除上清液,加入 20 mL 水,超声使其均匀,加入 1 mL、8~12 mg/mL 氨基化的花状纳米 CuO-GS 的水溶液,震

荡 24 h 后,以 8000 rpm 的转速离心 5 min,用水清洗沉淀两次,放入鼓风干燥箱中进行干燥 8~12 h,制得黑色固体检测抗体标记物 Au@Ag/CuO-GS;

(5) 检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab₂ 溶液的制备

取 2 mL、2 mg/mL 的检测抗体标记物 Au@Ag/CuO-GS 水溶液,加入 2 mL、10 μg/mL 抗体溶液,4 °C 震荡 12h,去除上清液,加入 2 mL、pH 7.4 的 PBS,制得检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab₂ 溶液,4 °C 条件下备用。

[0010] 3. 胰腺癌肿瘤标志物的检测方法

(1) 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,铂丝电极为辅助电极,所制备的传感器为工作电极,在 10 mL、40~60 mmol/L 的 pH 5.6 ~ 8.0 磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2) 用计时电流法对胰腺癌肿瘤标志物进行检测,输入电压为 -0.4 V,取样间隔 0.1 s,运行时间 400 s;

(3) 当背景电流趋于稳定后,每隔 50 s 向 10 mL、50 mmol/L 的 pH=7.4 磷酸盐缓冲溶液中注入 10 μL、5~10 mol/L 的双氧水溶液,记录电流变化。

[0011] 上述所述胰腺癌肿瘤标志物选自下列之一:癌胚抗原 CEA、糖类抗原 19-9、糖类抗原 242、铁蛋白 Ferritin。

[0012] 本发明的有益成果

(1) 本发明的发明人首次将 Au@Ag/CuO-GS 纳米粒子作为检测抗体标记物引入到胰腺癌肿瘤标志物的电化学免疫传感器的制备当中,利用 Au@Ag/CuO-GS 其优异的生物相容性和高的催化性能,使所制作的传感器具有更高的灵敏度和更宽的检测范围。

[0013] (2) 利用具有良好催化效果的金银双金属和氧化铜,实现信号的双重放大;同时引入石墨烯,提高比表面积和电子转移速率,进一步提高了传感器的灵敏度,实现了电化学信号的多重放大。

[0014] (3) 使用完全相同的纳米材料和修饰方法,利用抗原与抗体的特异性结合,只需改变胰腺癌肿瘤标志物种类即可实现多种肿瘤标志物的高灵敏、特异性检测,此方法操作简单,检测速度快,可在短时间内实现大量样品的测定,有利于肿瘤标志物传感器的商品化。

[0015] (4) 将 Au@Ag/CuO-GS 纳米粒子与胰腺癌肿瘤标志物检测抗体直接孵化,在检测抗体的标记物中不必使用酶,避免了因酶的失活和泄漏造成的检测误差,简化了检测抗体标记物的制作步骤,显著提高了电化学免疫传感器的重现性和稳定性。

具体实施方式

[0016] 实施例 1 一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器的制备方法及应用

1. 一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤如下:

(1) 将直径为 3 mm 的玻碳电极用 Al₂O₃ 抛光粉打磨,超纯水清洗干净;

(2) 以质量浓度为 0.8% 的 H₂AuCl₄ 溶液为底液,在 -0.2 V 电压下扫描 30 s,将金电沉积到电极表面,用超纯水冲洗,晾干;

(3) 继续将 4 μL、8 μg/mL 的肿瘤标志物捕获抗体 Ab₁ 溶液滴加到电极表面,超纯水冲

洗,4 °C冰箱中干燥;

(4)继续将 3 μL 、质量分数为 0.5 % 的牛血清白蛋白 BSA 溶液滴加到电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,超纯水冲洗,4 °C冰箱中晾干;

(5)滴加 4 μL 、0.01 pg/mL ~ 100 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原标准溶液到电极表面,超纯水冲洗,4 °C冰箱中干燥;

(6)将 4 μL 、1 mg/mL 的检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab_2 溶液滴涂于电极表面上,置于 4 °C冰箱中晾干,制得一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器。

[0017] 实施例 2 一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器的制备方法及应用

(1)将直径为 3~5 mm 的玻碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨,超纯水清洗干净;

(2)以质量浓度为 1.2% 的 HAuCl_4 溶液为底液,在 -0.2 V 电压下扫描 30 s,将金电沉积到电极表面,用超纯水冲洗,晾干;

(3)继续将 5 μL 、10 $\mu\text{g/mL}$ 的肿瘤标志物捕获抗体 Ab_1 溶液滴加到电极表面,超纯水冲洗,4 °C冰箱中干燥;

(4)继续将 3 μL 、质量分数为 1.2 % 的牛血清白蛋白 BSA 溶液滴加到电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,超纯水冲洗,4 °C冰箱中晾干;

(5)滴加 4~6 μL 、0.01 pg/mL ~ 100 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原标准溶液到电极表面,超纯水冲洗,4 °C冰箱中干燥;

(6)将 5 μL 、2 mg/mL 的检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab_2 溶液滴涂于电极表面上,置于 4 °C冰箱中晾干,制得一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器。

[0018] 实施例 3 一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器的制备方法及应用

(1)将直径为 3~5 mm 的玻碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨,超纯水清洗干净;

(2)以质量浓度为 1.5% 的 HAuCl_4 溶液为底液,在 -0.2 V 电压下扫描 30 s,将金电沉积到电极表面,用超纯水冲洗,晾干;

(3)继续将 6 μL 、12 $\mu\text{g/mL}$ 的肿瘤标志物捕获抗体 Ab_1 溶液滴加到电极表面,超纯水冲洗,4 °C冰箱中干燥;

(4)继续将 3 μL 、质量分数为 2.0 % 的牛血清白蛋白 BSA 溶液滴加到电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,超纯水冲洗,4 °C冰箱中晾干;

(5)滴加 6 μL 、0.01 pg/mL ~ 100 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原标准溶液到电极表面,超纯水冲洗,4 °C冰箱中干燥;

(6)将 6 μL 、3 mg/mL 的检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab_2 溶液滴涂于电极表面上,置于 4 °C冰箱中晾干,制得一种基于金电沉积和 Au@Ag/CuO-GS 为标记物的胰腺癌免疫传感器。

[0019] 实施例 4 检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab_2 溶液的制备

(1)花状纳米 CuO-GS 的制备

将 10.0 mL、8 mol/L 的 NaOH ,以每分钟 0.5 mL 的速度加入 1.0 mL、0.4 mol/L 的硝酸

铜溶液中,加入 0.05 g 的氧化石墨烯,放入反应釜中,100 °C 下反应 24 h,反应完全后进行离心分离,得到黑色固体沉淀物,将其放入鼓风干燥箱中干燥 8 h,制得花状纳米 CuO-GS;

(2) 氨基化的花状纳米 CuO-GS 的制备

称取 0.08 g 的花状纳米 CuO-GS,依次加入 8 mL 无水乙醇,0.08 mL 的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷于三口烧瓶中,60 °C 下油浴回流加热、搅拌 1.0 h;取出,放在离心管中进行离心,用无水乙醇清洗,离心去除上清液,干燥后,制得黑色固体氨基化的花状纳米 CuO-GS;

(3) Au@Ag 溶液的制备

称量 99 mL 超纯水,加入 1 mL、质量分数为 0.8% 的 HAuCl_4 水溶液,油浴回流加热,沸腾后加入 2.5 mL、质量分数为 0.8% 的柠檬酸钠水溶液,继续沸腾 13 min,取出后冷却到室温,制得纳米金溶液,遮光保存;

配制 100 mL,50 mmol/L 的十六烷基三甲基溴化铵 CTAB 水溶液,加入 5 mL、0.1 mol/L 的抗坏血酸 VC,2.5 mL,8 mmol/L 的硝酸银溶液,5 mL 纳米金溶液,滴加 1 mol/L 的 NaOH 溶液至颜色由红色变为金黄色,制得金黄色的 Au@Ag 溶液;

(4) 检测抗体标记物 Au@Ag/CuO-GS 的制备

取 20 mL Au@Ag 溶液,以 10000 的转速进行离心 15 min,去除上清液,加入 20 mL 水,超声使其均匀,加入 1 mL、8 mg/mL 氨基化的花状纳米 CuO-GS 的水溶液,震荡 24 h 后,以 8000 rpm 的转速离心 5 min,用水清洗沉淀两次,放入鼓风干燥箱中进行干燥 8 h,制得黑色固体检测抗体标记物 Au@Ag/CuO-GS;

(5) 检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab₂ 溶液的制备

取 2 mL、2 mg/mL 的检测抗体标记物 Au@Ag/CuO-GS 水溶液,加入 2 mL、10 μg/mL 抗体溶液,4 °C 震荡 12h,去除上清液,加入 2 mL、pH 7.4 的 PBS,制得检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab₂ 溶液,4 °C 条件下备用。

[0020] 实施例 5 检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab₂ 溶液的制备

(1) 花状纳米 CuO-GS 的制备

将 10.0 mL、9 mol/L 的 NaOH,以每分钟 0.5 mL 的速度加入 1.0 mL、0.5 mol/L 的硝酸铜溶液中,加入 0.06 g 的氧化石墨烯,放入反应釜中,100 °C 下反应 24 h,反应完全后进行离心分离,得到黑色固体沉淀物,将其放入鼓风干燥箱中干燥 10 h,制得花状纳米 CuO-GS;

(2) 氨基化的花状纳米 CuO-GS 的制备

称取 0.10 g 的花状纳米 CuO-GS,依次加入 10 mL 无水乙醇,0.10 mL 的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷于三口烧瓶中,70 °C 下油浴回流加热、搅拌 1.5 h;取出,放在离心管中进行离心,用无水乙醇清洗,离心去除上清液,干燥后,制得黑色固体氨基化的花状纳米 CuO-GS;

(3) Au@Ag 溶液的制备

称量 99 mL 超纯水,加入 1 mL、质量分数为 1.0% 的 HAuCl_4 水溶液,油浴回流加热,沸腾后加入 2.5 mL、质量分数为 1.0% 的柠檬酸钠水溶液,继续沸腾 15 min,取出后冷却到室温,制得纳米金溶液,遮光保存;

配制 100 mL,50 mmol/L 的十六烷基三甲基溴化铵 CTAB 水溶液,加入 5 mL、0.1 mol/L 的抗坏血酸 VC,2.5 mL,10 mmol/L 的硝酸银溶液,5 mL 纳米金溶液,滴加 1 mol/L 的 NaOH 溶液至颜色由红色变为金黄色,制得金黄色的 Au@Ag 溶液;

(4) 检测抗体标记物 Au@Ag/CuO-GS 的制备

取 20 mL Au@Ag 溶液,以 110000 rpm 的转速进行离心 17 min,去除上清液,加入 20 mL 水,超声使其均匀,加入 1 mL、10 mg/mL 氨基化的花状纳米 CuO-GS 的水溶液,震荡 24 h 后,以 8000 rpm 的转速离心 5 min,用水清洗沉淀两次,放入鼓风干燥箱中进行干燥 8~12 h,制得黑色固体检测抗体标记物 Au@Ag/CuO-GS;

(5) 检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab₂ 溶液的制备

取 2 mL、2 mg/mL 的检测抗体标记物 Au@Ag/CuO-GS 水溶液,加入 2 mL、10 μg/mL 抗体溶液,4 °C 震荡 12h,去除上清液,加入 2 mL、pH 7.4 的 PBS,制得检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab₂ 溶液,4 °C 条件下备用。

[0021] 实施例 6 检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab₂ 溶液的制备

(1) 花状纳米 CuO-GS 的制备

将 10.0 mL、10.0 mol/L 的 NaOH,以每分钟 0.5 mL 的速度加入 1.0 mL、0.6 mol/L 的硝酸铜溶液中,加入 0.07 g 的氧化石墨烯,放入反应釜中,100 °C 下反应 24 h,反应完全后进行离心分离,得到黑色固体沉淀物,将其放入鼓风干燥箱中干燥 12 h,制得花状纳米 CuO-GS;

(2) 氨基化的花状纳米 CuO-GS 的制备

称取 0.12 g 的花状纳米 CuO-GS,依次加入 12 mL 无水乙醇,0.12 mL 的 3-氨丙基三乙氧基硅烷于三口烧瓶中,80 °C 下油浴回流加热、搅拌 2.0 h;取出,放在离心管中进行离心,用无水乙醇清洗,离心去除上清液,干燥后,制得黑色固体氨基化的花状纳米 CuO-GS;

(3) Au@Ag 溶液的制备

称量 99 mL 超纯水,加入 1 mL、质量分数为 1.2% 的 HAuCl₄ 水溶液,油浴回流加热,沸腾后加入 2.5 mL、质量分数为 1.2% 的柠檬酸钠水溶液,继续沸腾 18 min,取出后冷却到室温,制得纳米金溶液,遮光保存;

配制 100 mL、50 mmol/L 的十六烷基三甲基溴化铵 CTAB 水溶液,加入 5 mL、0.1 mol/L 的抗坏血酸 VC,2.5 mL、12 mmol/L 的硝酸银溶液,5 mL 纳米金溶液,滴加 1 mol/L 的 NaOH 溶液至颜色由红色变为金黄色,制得金黄色的 Au@Ag 溶液;

(4) 检测抗体标记物 Au@Ag/CuO-GS 的制备

取 20 mL Au@Ag 溶液,以 12000 rpm 的转速进行离心 20min,去除上清液,加入 20 mL 水,超声使其均匀,加入 1 mL、12 mg/mL 氨基化的花状纳米 CuO-GS 的水溶液,震荡 24 h 后,以 8000 rpm 的转速离心 5 min,用水清洗沉淀两次,放入鼓风干燥箱中进行干燥 12 h,制得黑色固体检测抗体标记物 Au@Ag/CuO-GS;

(5) 检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab₂ 溶液的制备

取 2 mL、2 mg/mL 的检测抗体标记物 Au@Ag/CuO-GS 水溶液,加入 2 mL、10 μg/mL 抗体溶液,4 °C 震荡 12h,去除上清液,加入 2 mL、pH 7.4 的 PBS,制得检测抗体孵化物 Au@Ag/CuO-GS/Ab₂ 溶液,4 °C 条件下备用。

[0022] 实施例 7 电化学免疫传感器用于癌胚抗原 CEA 的检测

(1) 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,铂丝电极为辅助电极,所制备的传感器为工作电极,在 10 mL、40~60 mmol/L 的 pH 5.6 ~ 8.0 磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2) 用计时电流法对胰腺癌肿瘤标志物进行检测,输入电压为 -0.4 V,取样间隔 0.1 s,

运行时间 400 s；

(3)当背景电流趋于稳定后,每隔 50 s 向 10 mL、50 mmol/L 的 pH=7.4 磷酸盐缓冲溶液中注入 10 μ L、5~10 mol/L 的双氧水溶液,记录电流变化。

[0023] (4) 根据所得电流强度与癌胚抗原 CEA 浓度之间的线性关系,绘制工作曲线,测得线性范围为 10 fg/mL ~ 100 ng/mL,检测限为 3.35 fg/mL。

[0024] 实施例 8 糖类抗原 19-9 的检测

绘制工作曲线步骤同实施例 7,按照绘制工作曲线的方法进行糖类抗原 19-9 样品分析,测得线性范围为 10fg/mL ~ 100 ng/mL,检测限为 2.80 fg/mL。

[0025] 实施例 9 糖类抗原 242 的检测

绘制工作曲线步骤同实施例 7,按照绘制工作曲线的方法进行糖类抗原 242 分析,测得线性范围为 6.0 fg/mL ~ 90 ng/mL,检测限为 1.5 fg/mL。

[0026] 实施例 10 铁蛋白 Ferritin 的检测

绘制工作曲线步骤同实施例 7,按照绘制工作曲线的方法进行铁蛋白 Ferritin 分析,测得线性范围为 6.6 fg/mL ~ 90 ng/mL,检测限为 1.8 fg/mL。

专利名称(译)	一种基于金电沉积和AuAg/CuO-GS为标记物的胰腺癌免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN104459132A	公开(公告)日	2015-03-25
申请号	CN201410763882.7	申请日	2014-12-12
[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	吴丹 闫涛 李月云 孙培晓 王晓东 庞雪辉 马洪敏 张勇 范大伟 杜斌 胡丽华 魏琴		
发明人	吴丹 闫涛 李月云 孙培晓 王晓东 庞雪辉 马洪敏 张勇 范大伟 杜斌 胡丽华 魏琴		
IPC分类号	G01N33/574 G01N27/416 G01N33/532		
CPC分类号	G01N27/416 G01N33/532 G01N33/57438		
其他公开文献	CN104459132B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于金电沉积和AuAg/CuO-GS为标记物的胰腺癌免疫传感器的制备方法及应用。具体是采用AuAg/CuO-GS作为检测抗体标记物，制备一种检测胰腺癌肿瘤标志物的夹心型电化学免疫传感器，利用AuAg/CuO-GS其优异的生物相容性和高的催化性能，使所制作的传感器具有更高的灵敏度和更宽的检测范围，检测限可达1.5fg/mL。

