



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110133266 A

(43)申请公布日 2019.08.16

(21)申请号 201910427228.1

(22)申请日 2019.05.22

(71)申请人 太原理工大学

地址 030024 山西省太原市万柏林区迎泽
西大街79号

(72)发明人 张冰 丁传敏 贾晔婧

(74)专利代理机构 太原市科瑞达专利代理有限
公司 14101

代理人 李富元

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

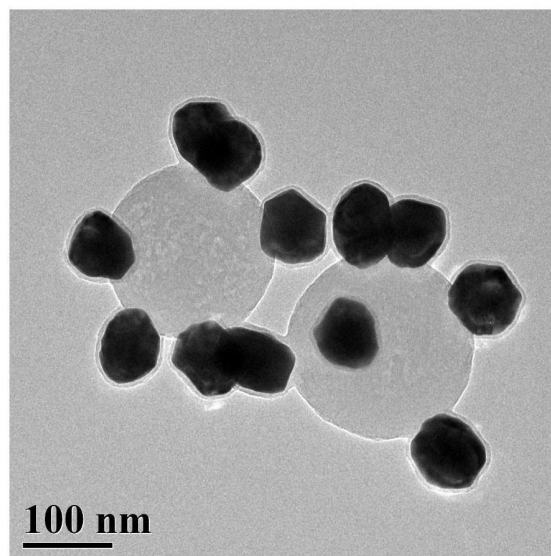
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

癌胚抗体和聚苯胺@金的结合物制备及其构建光热免疫传感器检测癌胚抗原的方法

(57)摘要

本发明涉及肿瘤标志物癌胚抗原检测领域。癌胚抗体和聚苯胺@金的结合物制备方法,将氯金酸水溶液置于45℃水浴中预热10 min,之后在氯金酸水溶液上缓慢地加入溶于己烷的苯胺溶液,将以上混合物在45℃孵育过夜,当聚苯胺@金纳米颗粒生长完成后,水相表面的己烷被丢弃,离心收集聚苯胺@金纳米颗粒,用水冲洗几次,即得聚苯胺@金复合物,记为PANi@Au;取上述制备好的聚苯胺@金复合物,然后加入癌胚抗体anti-CEA,震荡过夜,最后离心清洗得到癌胚抗体和聚苯胺@金的结合物,记为anti-CEA-PANi@Au。本发明还涉及聚苯胺@金复合物构建光热免疫传感器检测癌胚抗原的方法。



1. 癌胚抗体和聚苯胺@金的结合物制备方法,其特征在于:按照如下的步骤进行

步骤一、将氯金酸水溶液置于45℃水浴中预热10 min,之后在氯金酸水溶液上缓慢地加入溶于己烷的苯胺溶液,将以上混合物在45℃孵育过夜,当聚苯胺@金纳米颗粒生长完成后,水相表面的己烷被丢弃,离心收集聚苯胺@金纳米颗粒,用水冲洗几次,即得聚苯胺@金复合物,记为PANi@Au;

步骤二、取上述制备好的聚苯胺@金复合物,然后加入癌胚抗体anti-CEA,震荡过夜,最后离心清洗得到癌胚抗体和聚苯胺@金的结合物,记为anti-CEA-PANi@Au。

2. 根据权利要求1所述的癌胚抗体和聚苯胺@金的结合物制备方法,其特征在于:步骤一中氯金酸的量5-9a毫升,浓度为0.55毫克/毫升;正己烷的量为0.5-0.9a毫升,质量分数为99.5 %;苯胺的量为9.2-16.6a微升,质量分数为99.5 %;步骤二中聚苯胺@金复合物的量为1-1.8a毫升;癌胚抗体的量为100-180a微升,浓度为0.01毫克/毫升;a为正整数。

3. 利用权利要求1制备的聚苯胺@金复合物构建光热免疫传感器检测癌胚抗原的方法,其特征在于:使用癌胚抗体包被板同时孵育不同浓度的癌胚抗原CEA和anti-CEA-PANi@Au,然后用蒸馏水清洗3-5次,构建成光热免疫传感器,加入定量的蒸馏水,在波长为808 nm的近红外激光下照射5 min,通过温度计检测温度变化定量分析癌胚抗原的浓度。

4. 根据权利要求3所述的聚苯胺@金复合物构建光热传感器检测癌胚抗原的方法,其特征在于:anti-CEA-PANi@Au的量为100-180b微升;癌胚抗原的量为100-180b微升;b为正整数。

5. 根据权利要求3所述的聚苯胺@金复合物构建光热免疫传感器检测癌胚抗原的方法,其特征在于:依次孵育不同浓度的癌胚抗原和anti-CEA-PANi@Au是指将依次在浓度为0纳克/毫升、0.1纳克/毫升、0.5纳克/毫升、1纳克/毫升、3纳克/毫升、5纳克/毫升、10纳克/毫升、25纳克/毫升的癌胚抗原和anti-CEA-PANi@Au的混合液中保持在室温孵育40 分钟。

6. 根据权利要求3所述的聚苯胺@金复合物构建光热免疫传感器检测癌胚抗原的方法,其特征在于:通过温度计检测温度变化来定量癌胚抗原的浓度是指癌胚抗原浓度与温度变化成线性相关性,对应的线性方程为 $y = 6.2895 \log(x) + 15.6468$,其中,x是癌胚抗原的浓度,单位是纳克/毫升,y是检测的温度变化。

癌胚抗体和聚苯胺@金的结合物制备及其构建光热免疫传感器检测癌胚抗原的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及肿瘤标志物癌胚抗原检测领域,具体是制备聚苯胺@金复合物,利用其光热性能构建光热免疫传感器,实现对癌胚抗原的检测。

背景技术

[0002] 癌症是一种以细胞增殖为特征的复杂疾病,已成为世界范围内死亡的主要原因(Siegel, R., Miller, K., Jemal, A., 2016. *Ca. Cancer J. Clin.* 66, 7-30.)。早期诊断和治疗是预防癌症和降低死亡率的最有效方法之一。癌胚抗原(CEA),一种200 kDa的糖蛋白,作为临床诊断的广谱肿瘤标志物已被广泛研究(Laboria, N., Frago, A., Kemmer, W., 2010. *Anal. Chem.* 82, 1712-1719.)。同时,癌胚抗原在鉴别诊断、疾病监测、疗效评价等方面具有重要的临床价值。免疫学方法以抗原和抗体的特异性识别为基础,已成为癌胚抗原定量检测的主要分析方法(Tang, D., Su, B., Tang, J., Ren, J., Chen, G., 2010. *Anal. Chem.* 82, 1527-1534.)。现已开发了电化学免疫分析(Luong, J., Vashist, S., 2017. *Biosens. Bioelectron.* 89, 293-304.)、荧光免疫分析(Pang, X., Li, J., Zhao, Y., 2015. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 7, 19260-19267.)、光电化学免疫分析(Hu, C., Zheng, J., Su, X., 2014. *Anal. Chem.* 86, 4188-4195.)、ELISA(Wang, L., Zhang, Y., Gao, X., Duan, Z., Wang, S., 2010. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3265-3270.)、比色免疫分析(Liang, K., Zhai, S., Zhang, Z., 2014. *Analyst.* 139, 4330-4334.)等多种分析方法。但是,要实现检测读数,大多数免疫检测技术必须依赖昂贵、复杂的分析设备。

[0003] 随着新型智能光热纳米材料的迅速发展及其在生物学中的应用,纳米材料介导的光热效应受到广泛关注。纳米材料包括金纳米结构(Ma, H., Ma, W., Chen, J., Liu, X., Peng, Y., Yang, Z., Tian, H., Long, Y., 2018. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 5272-5279.)、无机纳米结构(Crane, M., Zhou, X., Davis, E., P.金z金skie, P., 2018. *J. Chem. -Asian J.* 13, 2575-2586.)、近红外染料(Zhang, J., Xing, H., Lu, Y., 2018. *Chem. Sci.* 9, 3906-3910.)和碳纳米材料(Smith, B., Roder, P., Zhou, X., P.金z金skie, P., 2015. *Nanoscale.* 7, 7115-7126.),均被探讨作为光热剂。这些光热剂可以吸收近红外(NIR)光并产生热量,从而导致温度升高。而光热剂在医学上已被广泛研究用于光热治疗肿瘤(Xu, Z., Zhu, S., Wang, M., Li, Y., Shi P., Huang, X., 2015. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 7, 1355-1363.)。光热疗法因其为抗癌治疗、药物释放和成像等非侵入性技术提供了平台而受到越来越多的关注和发展(Shu, Y., Song, R., Zheng, A., Huang, J., Chen, M., 2018. *Talanta.* 181, 278-285.)。同时,分子分析也通过光热剂转化为温度信号。例如, Li等人将等离子体 Cu_{2-x}Se 纳米晶加载到脂质体中制成光热软纳米包体,用于黄曲霉毒素B1的光热免疫检测(Li, X., Yang, L., Men, C., Xie, Y., Liu, J., Zou, H., Li, Y., Zhan, L., Huang, C., 2019. *Anal. Chem.* 91,

4444-4450.);Fu等研制了四氧化三铁纳米材料介导的TMB-H₂O₂光热免疫检测平台,并利用温度计检测前列腺特异性抗原(PSA)生物标志物(Fu, G., Sanjay, S., Zhou, W., Brekken, R., Kirken, R., Li, X., 2018. Anal. Chem. 90, 5930-5937.)。

[0004] 本文采用界面合成法制备聚苯胺@金复合纳米材料,并用其作为标记物构建光热免疫传感器,用于癌胚抗原的检测。纳米材料的制备方法简单、快速、成本低。同时,可以用普通温度计实现癌胚抗原的定量检测。在实际应用中,与传统的免疫测定方法相比,该读出法在无仪器免疫测定中具有突出的优点。免疫分析法重复性和稳定性好,并且选择性高。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是:如何提供一种快速简单检测癌胚抗原的光热免疫传感器,以聚苯胺@金复合纳米材料作为标记物在常规条件下实现对癌胚抗原的定量检测,具有良好的特异性和稳定性,并且能用于实际样品的检测。

[0006] 本发明所采用的技术方案是:基于聚苯胺@金复合物的制备光热免疫传感器方法,按照如下的步骤进行

癌胚抗体和聚苯胺@金的结合物制备方法,按照如下的步骤进行

步骤一、将氯金酸水溶液置于45℃水浴中预热10 min,之后在氯金酸水溶液上缓慢地加入溶于己烷的苯胺溶液,将以上混合物在45℃孵育过夜,当聚苯胺@金纳米颗粒生长完成后,水相表面的己烷被丢弃,离心收集聚苯胺@金纳米颗粒,用水冲洗几次,即得聚苯胺@金复合物,记为PANi@Au;

步骤二、取上述制备好的聚苯胺@金复合物,然后加入癌胚抗体anti-CEA,震荡过夜,最后离心清洗得到癌胚抗体和聚苯胺@金的结合物,记为anti-CEA-PANi@Au。

[0007] 作为一种优选方式:步骤一中氯金酸的量5-9a毫升,浓度为0.55毫克/毫升;正己烷的量为0.5-0.9a毫升,质量分数为99.5%;苯胺的量为9.2-16.6a微升,质量分数为99.5%;步骤二中聚苯胺@金复合物的量为1-1.8a毫升;癌胚抗体的量为100-180a微升,浓度为0.01毫克/毫升;a为正整数。

[0008] 聚苯胺@金复合物构建光热免疫传感器检测癌胚抗原的方法,使用癌胚抗体包被板同时孵育不同浓度的癌胚抗原CEA和anti-CEA-PANi@Au,然后用蒸馏水清洗3-5次,构建光热免疫传感器,加入定量的蒸馏水,在波长为808 nm的近红外激光下照射5 min,通过温度计检测温度变化定量分析癌胚抗原的浓度。

[0009] 作为一种优选方式:anti-CEA-PANi@Au的量为100-180b微升;癌胚抗原的量为100-180b微升;b为正整数。

[0010] 聚苯胺@金复合物构建光热免疫传感器检测癌胚抗原的方法,依次孵育不同浓度的癌胚抗原和anti-CEA-PANi@Au是指将依次在浓度为0纳克/毫升、0.1纳克/毫升、0.5纳克/毫升、1纳克/毫升、3纳克/毫升、5纳克/毫升、10纳克/毫升、25纳克/毫升的癌胚抗原和anti-CEA-PANi@Au的混合液中保持在室温孵育40 分钟。

[0011] 作为一种优选方式:通过温度计检测温度变化来定量癌胚抗原的浓度是指癌胚抗原浓度与温度变化成线性相关性,对应的线性方程为 $y = 6.2895 \log(x) + 15.6468$,其中,x是癌胚抗原的浓度,单位是纳克/毫升,y是检测的温度变化。

[0012] 本发明的有益效果是:本发明方法制备聚苯胺@金复合物,利用其光热能构建光热

免疫传感器对癌胚抗原进行检测。此光热免疫传感器使用温度计进行检测,操作简单方便,并且检测速度快,准确率高,检测癌胚抗原有较好的专一性。

附图说明

[0013] 图1是聚苯胺@金复合物扫描电子显微镜(TEM)图;

图2是聚苯胺@金复合物扫描电子显微镜(SEM)图;

图3是聚苯胺@金复合物X-射线衍射(XRD)图;

图4是聚苯胺@金复合物光热免疫传感器的构建示意图;

图5是癌胚抗原的浓度与温度变化的线性图。

具体实施方式

[0014] 癌胚抗体和聚苯胺@金的结合物制备方法,按照如下的步骤进行

步骤一、将5-9a毫升,浓度为0.55毫克/毫升的氯金酸水溶液置于45℃水浴中预热10 min,之后在氯金酸水溶液上缓慢地加入溶于0.5-0.9a毫升己烷的9.2-16.6a微升苯胺溶液,将以上混合物在45℃孵育过夜。当聚苯胺@金纳米颗粒生长完成后,水相表面的己烷被丢弃,离心收集聚苯胺@金纳米颗粒,用水冲洗几次,即得聚苯胺@金复合物(记为PANi@Au);

步骤二、取上述制备好的1-1.8a毫升聚苯胺@金复合物,然后加入100-180a微升,浓度为0.01毫克/毫升的癌胚抗体(anti-CEA),震荡过夜,最后离心清洗得到癌胚抗体和聚苯胺@金的结合物(记为anti-CEA-PANi@Au)。

[0015] 利用制备的聚苯胺@金复合物构建光热免疫传感器检测癌胚抗原的方法,示意图如图4所示,使用CEA包被板同时孵育0纳克/毫升、0.1纳克/毫升、0.5纳克/毫升、1纳克/毫升、3纳克/毫升、5纳克/毫升、10纳克/毫升、25纳克/毫升的癌胚抗原(CEA)和100-180a微升anti-CEA-PANi@Au混合液,然后用蒸馏水清洗3-5次,构建成光热免疫传感器,随后加入200-360a微升的蒸馏水,在波长为808 nm的近红外激光下照射5 min,通过温度计检测温度变化定量分析癌胚抗原的浓度。

[0016] 通过温度计检测温度变化定量分析癌胚抗原的浓度是指,将免疫传感器在近红外激光下照射5分钟后,使用温度计检测温度变化,当癌胚抗原的浓度在0纳克/毫升时,检测到溶液的温度变化为10.2℃,当癌胚抗原的浓度在0.1纳克/毫升时,得到的温度变化开始大于10.2℃,癌胚抗原的浓度检测范围是0.1纳克/毫升到25纳克/毫升,如图5,在此范围内,癌胚抗原的浓度与温度变化成线性相关,其线性相关系数平方是0.98,对应的线性方程为 $y=6.2895 \log(x) + 15.6468$ ($R^2=0.98$, $n=21$) 其中,x是癌胚抗原的浓度,单位是纳克/毫升,y是温度变化。其最低检测限为0.07纳克/毫升(信噪比为3),与其它检测方法相比,构建的光热免疫传感器具有较低的检测限和较宽的检测范围(R是线性相关系数, R^2 是线性相关系数的平方,n代表的是实验次数)。

[0017] 癌胚抗原浓度与温度变化的对应关系如下表所示:

x(纳克/毫升)	0	0.1	0.5	1	3	5	10	25
y($\Delta T/^\circ\text{C}$)	10.2	10.3	13.6	16.4	18.1	20.0	22.3	24.8

实际样品分析

用构建的光热免疫传感器检测胎牛血清中的癌胚抗原,添加的癌胚抗原浓度分别为

0.1纳克/毫升、1纳克/毫升、5纳克/毫升、10纳克/毫升、15纳克/毫升、20纳克/毫升,由线性相关方程 $y=6.2895 \log(x) + 15.6468$ 计算得到癌胚抗原的浓度分别为0.10纳克/毫升、0.98纳克/毫升、4.7纳克/毫升、9.2纳克/毫升、15.9纳克/毫升、19.1纳克/毫升,回收率为101.6%、98.3%、94.9%、91.7%、105.9%、95.4%,证明该传感器可以用来检测实际食品样品中的癌胚抗原浓度。

[0018] 专一性分析

将制得的光热免疫传感器分别在空白缓冲溶液、不同干扰物质(K^+ , Ca^{2+} , AMH抗原, 葡萄糖)的缓冲溶液中孵育40分钟后,用蒸馏水充分洗涤,然后检测,构建的光热传感器与上述四种干扰物质作用后,测得的温度变化与空白组比较($10.2^{\circ}C$)相差不大。相反,当构建的光热免疫传感器与1纳克/毫升的癌胚抗原作用时,温度变化明显,为 $16.5^{\circ}C$ 。说明由聚苯胺@金复合物构建的光热免疫传感器对检测癌胚抗原具有较好的专一性。

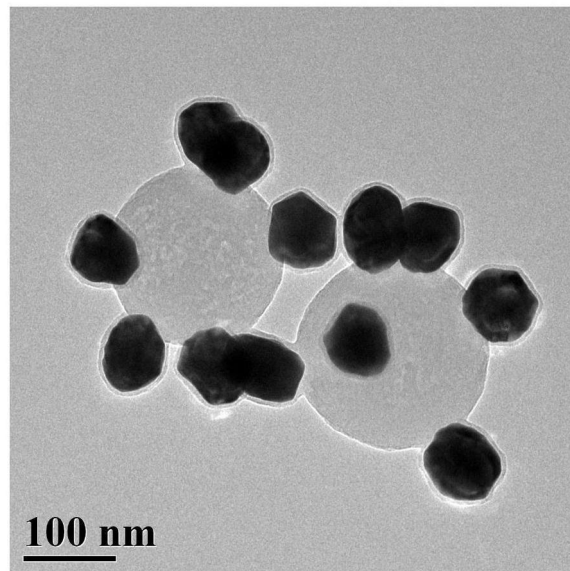


图1

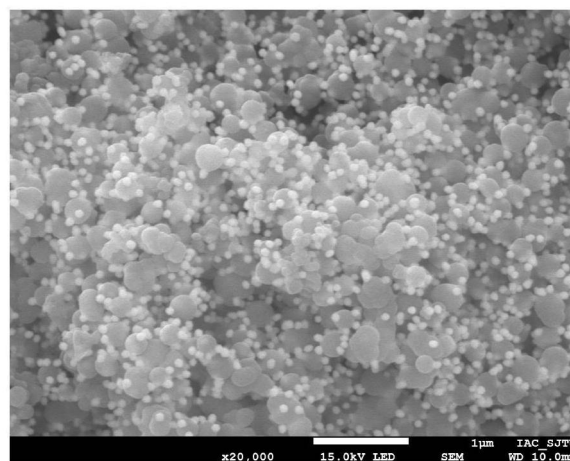


图2

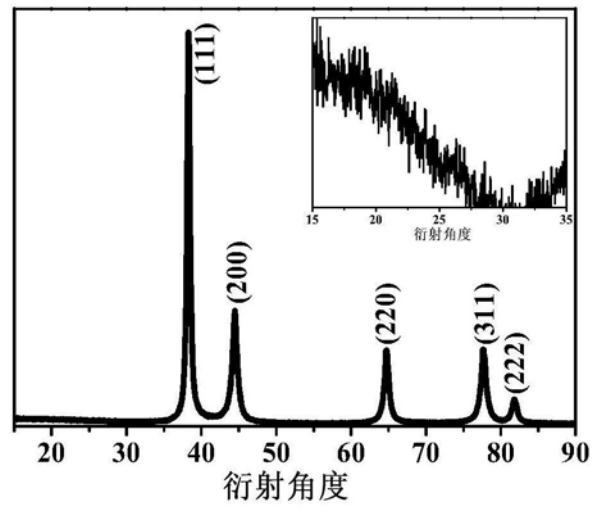


图3

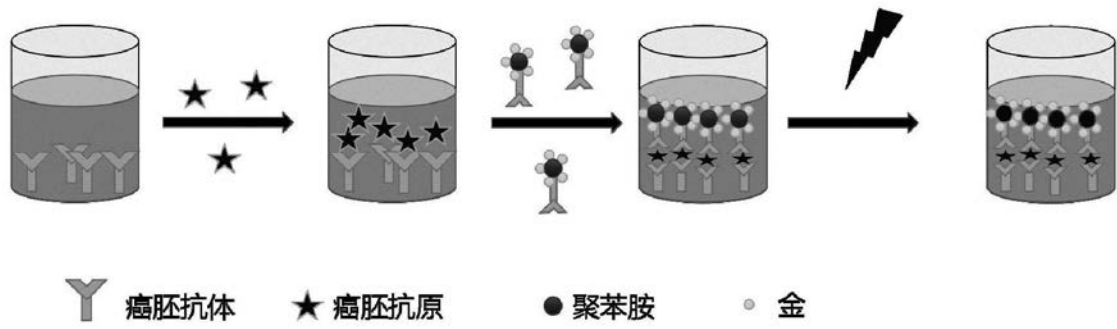


图4

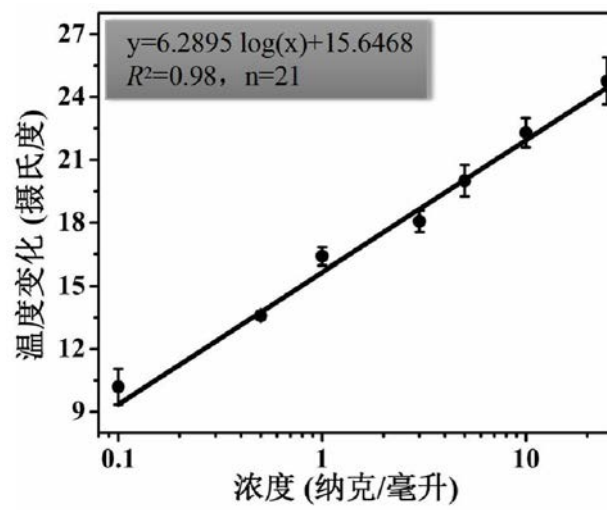


图5

专利名称(译)	癌胚抗体和聚苯胺@金的结合物制备及其构建光热免疫传感器检测癌胚抗原的方法		
公开(公告)号	CN110133266A	公开(公告)日	2019-08-16
申请号	CN201910427228.1	申请日	2019-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	太原理工大学		
申请(专利权)人(译)	太原理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	太原理工大学		
[标]发明人	张冰 丁传敏		
发明人	张冰 丁传敏 贾晔婧		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/57473		
代理人(译)	李富元		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及肿瘤标志物癌胚抗原检测领域。癌胚抗体和聚苯胺@金的结合物制备方法，将氯金酸水溶液置于45℃水浴中预热10 min，之后在氯金酸水溶液上缓慢地加入溶于己烷的苯胺溶液，将以上混合物在45℃孵育过夜，当聚苯胺@金纳米颗粒生长完成后，水相表面的己烷被丢弃，离心收集聚苯胺@金纳米颗粒，用水冲洗几次，即得聚苯胺@金复合物，记为PANi@Au；取上述制备好的聚苯胺@金复合物，然后加入癌胚抗体anti-CEA，震荡过夜，最后离心清洗得到癌胚抗体和聚苯胺@金的结合物，记为anti-CEA-PANi@Au。本发明还涉及聚苯胺@金复合物构建光热免疫传感器检测癌胚抗原的方法。

