



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107860923 B

(45)授权公告日 2020.05.22

(21)申请号 201711054579.X

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2017.11.01

G01N 33/543(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 27/327(2006.01)

申请公布号 CN 107860923 A

C01G 23/053(2006.01)

C01G 23/00(2006.01)

(43)申请公布日 2018.03.30

B82Y 15/00(2011.01)

(73)专利权人 济南大学

审查员 王丽华

地址 250022 山东省济南市市中区南辛庄
西路336号

(72)发明人 于京华 薛洁 高超民 葛慎光
颜梅

(74)专利代理机构 济南誉丰专利代理事务所
(普通合伙企业) 37240

代理人 高强

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种检测双肿瘤标志物光致电化学免疫传
感器的构建方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于枝状二氧化钛纳米棒-钛酸锶(B-TiO₂ NRs-SrTiO₃)异质结双组份光致电化学免疫传感器的构建方法,可以实现同时检测甲胎蛋白和糖类抗原153。利用水热法合成B-TiO₂ NRs-SrTiO₃异质结,有效地促进载流子分离与空穴传输,产生的光电流密度与B-TiO₂ NRs相比有显著增加。在B-TiO₂ NRs-SrTiO₃异质结的基础上,利用β-半乳糖苷酶和乙酰胆碱酯酶作为信号标记物,特异性的催化对氨基苯基吡喃半乳糖苷和乙酰胆碱水解,原位生成对氨基苯酚和胆碱,分别作为牺牲电子供体,用于区分光电流信号。由于合适的信号差异,该传感器可以实现对甲胎蛋白和糖类抗原153的高灵敏检测。

1. 基于枝状二氧化钛纳米棒-钛酸锶(B-TiO₂ NRs-SrTiO₃) 异质结同时特异性检测双肿瘤标志物的光致电化学(PEC) 免疫传感器的制备方法,其特征包括以下步骤:

(1) 5~20mL 盐酸加入5~20mL超纯水中,室温搅拌10min,加入0.2~10mL钛酸四正丁酯溶液,继续搅拌30min得到混合溶液;掺杂氟的SnO₂透明导电玻璃依次在丙酮、乙醇、超纯水中各清洗10min,干燥后以导电面向下的方式放入高压反应釜的聚四氟乙烯内衬中,将混合溶液转移至内衬中,封闭拧紧反应釜,于预热的150℃烘箱内恒温反应30~300min;反应完毕后,将高压釜自然冷却至室温,取出样品,用超纯水彻底清洗3次,放入真空干燥箱中60℃干燥8h,制备二氧化钛纳米棒;

(2) 量取0~10mL 盐酸加入盛有10~50mL超纯水的烧杯中,室温搅拌10min,加入0~10mL三氯化钛溶液,继续搅拌10min得到混合溶液;将二氧化钛纳米棒以导电面向上的方式放入混合溶液中,用保鲜膜封口烧杯,置于90℃烘箱中反应10~120min,反应完毕后,取出样品,用超纯水彻底冲洗3次,放入真空干燥箱中60℃干燥8h;最后,将样品放入500℃马弗炉中煅烧2h以提高制备的枝状二氧化钛纳米棒结晶度;

(3) 称取0.05~0.5g钛酸锶加入盛有1~20mL超纯水的烧杯中,室温搅拌30min后,依次加入1~20mL一缩二乙二醇,1~20mL无水乙醇,1~20mL异丙醇,1~20mL氢氧化四丁铵水溶液,继续搅拌30min得到混合溶液并转移至高压反应釜的聚四氟乙烯内衬中,将B-TiO₂ NRs以导电面向上的方式放入内衬中,封闭拧紧反应釜,于预热的160℃烘箱内恒温反应30~240min;反应完毕后,将高压釜自然冷却至室温,取出样品,用超纯水和乙醇分别清洗3次,最后将B-TiO₂ NRs-SrTiO₃异质结样品放入60℃真空干燥箱中干燥8h;

(4) 10~40μL 0.5mg/mL壳聚糖滴加到B-TiO₂ NRs-SrTiO₃电极表面,室温孵育2h,用1M NaOH和超纯水分别清洗3次,10~40μL戊二醛滴加至电极表面,室温孵育30min,用超纯水彻底清洗3次,0~40μL含0.5mg/mL AFP Ab₁与0.5mg/mL CA 153 Ab₁混合溶液滴加到电极表面,在4℃下孵育16h,用pH 7.4 PBS彻底冲洗3次,继续滴涂10mL3%的牛血清白蛋白封堵非特异性结合位点,用pH 7.4 PBS彻底冲洗3次,10~40μL不同浓度AFP和CA 153混合抗原滴加至电极表面,37℃孵育30min,用pH 7.4 PBS洗涤3次,滴加10~40μL 0.25mg/mL生物素-AFP Ab₂,37℃孵育30min,用pH 7.4 PBS洗涤3次;然后,滴加10~40μL含0.2mg/mL链霉亲和素的0.01M pH 7.4 PBS溶液,37℃孵育60min,用pH 7.4 PBS洗涤3次,滴加10~40μL 0.5mg/mL生物素-β-Gal,37℃孵育60min,用pH 7.4 PBS洗涤3次;滴加10~40μL 0.25mg/mL生物素-CA 153 Ab₂,37℃孵育60min,用pH 7.4 PBS洗涤3次,最后,滴加10~40μL 0.25mg/mL链霉亲和素-AChE,37℃孵育60min,用pH 7.4 PBS洗涤液彻底冲洗3次,PEC免疫传感器成功构建。

一种检测双肿瘤标志物光致电化学免疫传感器的构建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及双肿瘤标志物的定量检测领域,更具体的说是基于枝状二氧化钛纳米棒-钛酸锶异质结同时特异性检测两种肿瘤标志物的光致电化学免疫传感器的构建。本发明还涉及无机纳米复合材料的合成领域。

背景技术

[0002] 肿瘤标志物是肿瘤细胞通过基因表达而合成、分泌,或是机体因对肿瘤产生反应而异常产生的一类物质,在肿瘤早期诊断中有重要作用。及时检测肿瘤标志物的含量对于临床肿瘤筛查和早期诊断有重要意义,因此需要构建高灵敏度的免疫传感器用于检测肿瘤标志物。目前已报道的免疫传感器大多数用于检测单一肿瘤标志物,只有极少数的免疫传感器用于检测双肿瘤标志物。与检测单一肿瘤标志物相比,同时检测双肿瘤标志物策略具有检测量大、成本低、分析速度快等优点。并且在临床诊断中,由于单一肿瘤标志物对于肿瘤细胞异常表现的敏感性或特异性偏低,导致检测灵敏度低,同时检测双肿瘤标志物则可以显著提高检测的灵敏度、特异性和准确度。

[0003] 现如今,电化学法、化学发光法、电化学发光法和光致电化学(PEC)等方法已用于肿瘤标志物的检测。其中PEC法由于激发光源和检测信号完全分离,在检测过程中背景信号被极大的削弱,使得传感器具有背景信号低、响应速度快、灵敏度高等优势。目前,已经构建的用于检测双肿瘤标志物的PEC免疫传感器中,大部分的工作都是通过将工作区域进行空间分离,从而区分不同肿瘤标志物产生的信号,导致制作步骤繁琐、操作复杂、检测过程耗时等问题。鉴于这些情况,迫切需要设计一种操作简单、灵敏度高、在单工作区同时检测双肿瘤标志物的PEC免疫传感器。

[0004] 众所周知,PEC免疫传感器的灵敏度与光敏材料的光电转换效率密切相关。枝状二氧化钛纳米棒(B-TiO₂ NRs)作为本发明的光敏材料,具有大比表面积,良好化学稳定性和优良光电效应等优势。但B-TiO₂ NRs的光生电子-空穴对复合速率过快,导致光电转换效率较差。为了解决这一问题,与金属离子掺杂、与其他半导体复合等方法已经用于提高B-TiO₂ NRs的光电转换效率。其中,钛酸锶(SrTiO₃)作为n型半导体材料,其导带位置比B-TiO₂ NRs导带位置低,使得SrTiO₃可与B-TiO₂ NRs配对产生能带电势差,且由于SrTiO₃与B-TiO₂ NRs不同的能带结构会产生耦合作用,因而SrTiO₃与B-TiO₂ NRs复合形成B-TiO₂ NRs-SrTiO₃异质结,可以促进光生载流子的转移和分离,进而抑制电子-空穴对的复合,提高传感器的灵敏度。

发明内容

[0005] 在本发明中,我们构建了基于高性能B-TiO₂ NRs-SrTiO₃异质结的PEC免疫传感器,用于同时检测双肿瘤标志物甲胎蛋白(AFP)和糖类抗原153(CA 153)。利用水热法制备B-TiO₂ NRs-SrTiO₃电极,有效的促进载流子分离和空穴传输,产生的光电流密度与B-TiO₂ NRs相比有较大增加。在B-TiO₂ NRs-SrTiO₃结构的基础上,利用β-半乳糖苷酶(β-Gal)和乙

酰胆碱酯酶(AChE)作为信号标记物,特异的催化对氨基苯基吡喃半乳糖苷(PAPG)和乙酰胆碱(ATC)水解,原位生成对氨基苯酚(PAP)和胆碱(TC),分别产生相应牺牲电子供体,用于区分光电流信号。由于合适的信号差异,该策略可以实现高灵敏度和特异性检测AFP和CA153。

[0006] 本发明通过以下实验方案实现:

[0007] (1)制备二氧化钛纳米棒。5~20 mL盐酸(12 M)加入5~20 mL超纯水中,室温搅拌10 min,加入0.2~10 mL钛酸四正丁酯溶液,继续搅拌30 min得到混合溶液;掺杂氟的SnO₂透明导电玻璃(FTO)依次在丙酮、乙醇、超纯水中各清洗10 min,干燥后以导电面向下的方式放入高压反应釜的聚四氟乙烯内衬中,将混合溶液转移至内衬中,封闭拧紧反应釜,于预热的150 °C烘箱内恒温反应30~300 min;反应完毕后,将高压釜自然冷却至室温,取出样品,用超纯水彻底清洗3次,放入真空干燥箱中60 °C干燥8 h。

[0008] (2)制备三维B-TiO₂ NRs。量取0~10 mL盐酸加入盛有10~50 mL超纯水的烧杯中,室温搅拌10 min,加入0~10 mL三氯化钛溶液,继续搅拌10 min得到混合溶液;将步骤(1)制备的二氧化钛纳米棒以导电面向上的方式放入混合溶液中,用保鲜膜封口烧杯,置于90 °C烘箱中反应10~120 min,反应完毕后,取出样品,用超纯水彻底冲洗3次,放入真空干燥箱中60 °C干燥8 h;最后,将样品放入500 °C马弗炉中煅烧2 h以提高结晶度。

[0009] (3)制备B-TiO₂ NRs-SrTiO₃异质结。称取0.05~0.5 g钛酸锶加入盛有1~20 mL超纯水的烧杯中,室温搅拌30 min后,依次加入1~20 mL一缩二乙二醇,1~20 mL无水乙醇,1~20 mL异丙醇,1~20 mL氢氧化四丁铵(40wt%)水溶液,继续搅拌30 min得到混合溶液并转移至高压反应釜的聚四氟乙烯内衬中,将步骤(2)得到的B-TiO₂ NRs以导电面向上的方式放入内衬中,封闭拧紧反应釜,于预热的160 °C烘箱内恒温反应30~240 min;反应完毕后,将高压釜自然冷却至室温,取出样品,用超纯水和乙醇分别清洗3次,最后将样品放入60 °C真空干燥箱中干燥8 h。

[0010] (4)构建PEC免疫传感器。10~40 μL 0.5 mg/mL壳聚糖滴加到B-TiO₂ NRs-SrTiO₃电极表面,室温孵育2 h,用1 M NaOH和超纯水分别清洗3次,10~40 μL戊二醛滴加至电极表面,室温孵育30 min,用超纯水彻底清洗3次。0~40 μL含0.5 mg/mL AFP Ab₁与0.5 mg/mL CA 153 Ab₁混合溶液滴加到电极表面,在4 °C下孵育16 h,用pH 7.4 PBS彻底冲洗3次,继续滴涂10 mL 3%的牛血清白蛋白封堵非特异性结合位点,用pH 7.4 PBS彻底冲洗3次,10~40 μL不同浓度AFP和CA 153混合抗原滴加至电极表面,37 °C孵育30 min,用pH 7.4 PBS洗涤3次,滴加10~40 μL 0.25 mg/mL生物素-AFP Ab₂,37 °C孵育30 min,用pH 7.4 PBS洗涤3次;然后,滴加10~40 μL含0.2 mg/mL链霉亲和素的0.01 M PBS (pH 7.4) 溶液,37 °C孵育60 min,用pH 7.4 PBS洗涤3次,滴加10~40 μL 0.5 mg/mL生物素-β-Gal,37 °C孵育60 min,用pH 7.4 PBS洗涤3次;滴加10~40 μL 0.25 mg/mL生物素-CA 153 Ab₂,37 °C孵育60 min,用pH 7.4 PBS洗涤3次,最后,滴加10~40 μL 0.25 mg/mL链霉亲和素-AChE,37 °C孵育60 min,用pH 7.4 PBS洗涤液彻底冲洗3次,PEC免疫传感器成功构建。

[0011] (5)光致电化学免疫检测。PEC检测在自制的配备500 W氙灯和单色仪的PEC系统进行。首先将步骤(4)构建的PEC免疫传感器浸入含0.01 M Mg²⁺和10 mM PAPG的0.1 M PBS (pH 7.4) 溶液,室温孵育15 min,用PEC法测定AFP的浓度;超纯水彻底冲洗免疫传感器后,浸入到含2 mM ATC的0.1 M PBS (pH 7.4) 中,室温孵育10 min,用PEC法测定CA 153的浓度。

[0012] 本发明的有益效果:

[0013] (1) 利用水热法制备的B-TiO₂ NRs-SrTiO₃, 显著促进光生载流子分离和空穴传输, 抑制电子-空穴对的复合, 进一步提高传感器的灵敏度。

[0014] (2) 本发明构建的免疫传感器使用特异性水解酶 β -Gal和AChE作为信号标志物, 特异性水解PAPG和ATC分别产生相应牺牲电子供体, 用于区分光电流信号, 实现了单工作区对AFP和CA153特异性检测。

具体实施方式

[0015] 为了进一步理解本发明, 按照本发明技术方案结合实施例进行实施, 给出具体的实施方式:

[0016] (1) 制备二氧化钛纳米棒。5~20 mL盐酸(12 M)加入5~20 mL超纯水中, 室温搅拌10 min, 加入0.2~10 mL钛酸四正丁酯溶液, 继续搅拌30 min得到混合溶液; 掺杂氟的SnO₂透明导电玻璃(FTO)依次在丙酮、乙醇、超纯水中各清洗10 min, 干燥后以导电面向下的方式放入高压反应釜的聚四氟乙烯内衬中, 将混合溶液转移至内衬中, 封闭拧紧反应釜, 于预热的150 °C烘箱内恒温反应30~300 min; 反应完毕后, 将高压釜自然冷却至室温, 取出样品, 用超纯水彻底清洗3次, 放入真空干燥箱中60 °C干燥8 h。

[0017] (2) 制备三维B-TiO₂ NRs。量取0~10 mL盐酸加入盛有10~50 mL超纯水的烧杯中, 室温搅拌10 min, 加入0~10 mL三氯化钛溶液, 继续搅拌10 min得到混合溶液; 将步骤(1)制备的二氧化钛纳米棒以导电面向上的方式放入混合溶液中, 用保鲜膜封口烧杯, 置于90 °C烘箱中反应10~120 min, 反应完毕后, 取出样品, 用超纯水彻底冲洗3次, 放入真空干燥箱中60 °C干燥8 h; 最后, 将样品放入500 °C马弗炉中煅烧2 h以提高结晶度。

[0018] (3) 制备B-TiO₂ NRs-SrTiO₃异质结。称取0.05~0.5 g钛酸锶加入盛有1~20 mL超纯水的烧杯中, 室温搅拌30 min后, 依次加入1~20 mL一缩二乙二醇, 1~20 mL无水乙醇, 1~20 mL异丙醇, 1~20 mL氢氧化四丁铵(40wt%)水溶液, 继续搅拌30 min得到混合溶液并转移至高压反应釜的聚四氟乙烯内衬中, 将步骤(2)得到的B-TiO₂ NRs以导电面向上的方式放入内衬中, 封闭拧紧反应釜, 于预热的160 °C烘箱内恒温反应30~240 min; 反应完毕后, 将高压釜自然冷却至室温, 取出样品, 用超纯水和乙醇分别清洗3次, 最后将样品放入60 °C真空干燥箱中干燥8 h。

[0019] (4) 构建PEC免疫传感器。10~40 μ L 0.5 mg/mL壳聚糖滴加到B-TiO₂ NRs-SrTiO₃电极表面, 室温孵育2 h, 用1 M NaOH和超纯水分别清洗3次, 10~40 μ L戊二醛滴加至电极表面, 室温孵育30 min, 用超纯水彻底清洗3次。0~40 μ L含0.5 mg/mL AFP Ab₁与0.5 mg/mL CA 153 Ab₁混合溶液滴加到电极表面, 在4 °C下孵育16 h, 用pH 7.4 PBS彻底冲洗3次, 继续滴涂10 mL 3%的牛血清白蛋白封堵非特异性结合位点, 用pH 7.4 PBS彻底冲洗3次, 10~40 μ L不同浓度AFP和CA 153混合抗原滴加至电极表面, 37 °C孵育30 min, 用pH 7.4 PBS洗涤3次, 滴加10~40 μ L 0.25 mg/mL生物素-AFP Ab₂, 37 °C孵育30 min, 用pH 7.4 PBS洗涤3次; 然后, 滴加10~40 μ L含0.2 mg/mL链霉亲和素的0.01 M PBS (pH 7.4) 溶液, 37 °C孵育60 min, 用pH 7.4 PBS洗涤3次, 滴加10~40 μ L 0.5 mg/mL生物素- β -Gal, 37 °C孵育60 min, 用pH 7.4 PBS洗涤3次; 滴加10~40 μ L 0.25 mg/mL生物素-CA 153 Ab₂, 37 °C孵育60 min, 用pH 7.4 PBS洗涤3次, 最后, 滴加10~40 μ L 0.25 mg/mL链霉亲和素-AChE, 37 °C孵育

60 min, 用 pH 7.4 PBS 洗涤液彻底冲洗 3 次, PEC 免疫传感器成功构建。

[0020] (5) 光致电化学免疫检测。PEC 检测在自制的配备 500 W 氙灯和单色仪的 PEC 系统进行。首先将步骤 (4) 构建的 PEC 免疫传感器浸入含 0.01 M Mg^{2+} 和 10 mM PAPG 的 0.1 M PBS (pH 7.4) 溶液, 室温孵育 15 min, 用 PEC 法测定 AFP 的浓度; 超纯水彻底冲洗免疫传感器后, 浸入到含 2 mM ATC 的 0.1 M PBS (pH 7.4) 中, 室温孵育 10 min, 用 PEC 法测定 CA 153 的浓度。

专利名称(译)	一种检测双肿瘤标志物光致电化学免疫传感器的构建方法		
公开(公告)号	CN107860923B	公开(公告)日	2020-05-22
申请号	CN2017111054579.X	申请日	2017-11-01
[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	于京华 薛洁 高超民 葛慎光 颜梅		
发明人	于京华 薛洁 高超民 葛慎光 颜梅		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531 G01N33/543 G01N27/327 C01G23/053 C01G23/00 B82Y15/00		
CPC分类号	B82Y15/00 C01G23/006 C01G23/053 C01P2004/16 G01N27/3275 G01N33/531 G01N33/54386 G01N33/57484		
代理人(译)	高强		
审查员(译)	王丽华		
其他公开文献	CN107860923A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于枝状二氧化钛纳米棒-钛酸锶 (B-TiO₂ NRs-SrTiO₃) 异质结双组份光致电化学免疫传感器的构建方法，可以实现同时检测甲胎蛋白和糖类抗原153。利用水热法合成B-TiO₂ NRs-SrTiO₃异质结，有效地促进载流子分离与空穴传输，产生的光电流密度与B-TiO₂ NRs相比有显著增加。在B-TiO₂ NRs-SrTiO₃异质结的基础上，利用β-半乳糖苷酶和乙酰胆碱酯酶作为信号标记物，特异性的催化对氨基苯基吡喃半乳糖苷和乙酰胆碱水解，原位生成对氨基苯酚和胆碱，分别作为牺牲电子供体，用于区分光电流信号。由于合适的信号差异，该传感器可以实现对甲胎蛋白和糖类抗原153的高灵敏检测。