



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104407138 B

(45) 授权公告日 2015.08.19

(21) 申请号 201410635022.5

(22) 申请日 2014.11.12

(73) 专利权人 济南大学

地址 250022 山东省济南市济微路 106 号

(72) 发明人 王玉兰 闫涛 李月云 庞雪辉

吴丹 马洪敏 范大伟 魏琴

with Pt: Electrocatalytic Properties.

《Langmuir》. 2012, 第 28 卷摘要, 3307 页末段至 3308 页首段, 图 1-2.

审查员 胡晓佳

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 27/48(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

(56) 对比文件

CN 102854235 A, 2013.01.02, 权利要求 1-6, 说明书第 22-28 段.

CN 102658176 A, 2012.09.12, 全文.

US 2012034711 A1, 2012.02.09, 全文.

KR 20130127998 A, 2013.11.25, 全文.

Serhiy Cherevko et al.. Nanoporous Pt@ AuxCu100−

x by Hydrogen Evolution Assisted Electrodeposition of AuxCu100−

x and Galvanic Replacement of Cu

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

一种基于松枝状纳米金铜的生物传感器的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明一种基于松枝状纳米金铜的生物传感器的制备方法及应用。具体是采用电沉积方法得到松枝状纳米金铜合金, 制备一种检测肿瘤标志物抗原的电化学免疫传感器, 属于新型功能材料与生物传感检测技术领域, 检测线性范围为 0.0005~500ng/mL, 检测限 0.15pg/mL。

1. 一种基于松枝状纳米金铜的生物传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 生物传感器的制备

1) 依次用 1.0、0.3、0.05 μm 的氧化铝粉末对玻碳电极进行抛光,分别在超纯水和乙醇中超声清洗,氮气吹干;

2) 以 10 mL 含有浓度为 10 mmol/L 的硫酸钠、5 mmol/L 的氯金酸、10 mmol/L 的硫酸和 10 mmol/L 的硫酸铜溶液为底液,在 -0.8 V 电压下扫描 400 ~ 600 s,得到电沉积松枝状纳米金铜修饰的电极;

3) 继续将 6 μL 浓度为 8 ~ 12 $\mu\text{g/mL}$ 的肿瘤标志物抗体溶液滴加到修饰电极表面,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化 1 h,清洗干净;

4) 用 3 μL 浓度为 5~15 mg/mL 的牛血清白蛋白溶液封闭非特异性活性位点,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化 1 h,清洗干净;

5) 将 6 μL 浓度为 0.0005 ~ 500 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原用于和抗体的特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存备用;

(2) 肿瘤标志物的检测

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,所制备的免疫传感器为工作电极,在 10 mL 的 pH 值为 6.8 的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

2) 选择循环伏安法对肿瘤标志物抗原进行检测,将电压设置为 -0.8 ~ 0.8 V,记录电流的变化,绘制工作曲线;

3) 将待测样品溶液代替肿瘤标志物抗原标准溶液进行检测。

2. 如权利要求 1 所述的一种基于松枝状纳米金铜的生物传感器的制备方法,其特征在于,所述肿瘤标志物选自下列之一:TPA、CEA、SCCA、CD146、AFP、CA724。

一种基于松枝状纳米金铜的生物传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明一种基于松枝状纳米金铜的生物传感器的制备方法及应用。具体是采用电沉积方法得到松枝状纳米金铜合金,制备一种检测肿瘤标志物抗原的电化学免疫传感器,属于新型功能材料与生物传感检测技术领域。

背景技术

[0002] 目前电化学免疫传感器已经广泛用于肿瘤标志物的检测,因为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一系列优点。其中,由于无标记电化学免疫传感器可以直接用于检测抗原抗体的识别过程并且避免了标记物带来的干扰,得到了更加广泛的关注。

[0003] 本发明利用简单的电沉积方法,得到了松枝状的纳米金铜合金。首先,不需要引入其他电子媒介体,合金中的铜可以直接产生电化学信号;其次,不需要引入任何连接剂,合金中的金可以用于抗体的固定和促进电子的传递;最后,松枝状的形貌增加了与蛋白质的接触面积,进一步促进了蛋白质和电极之间的电子传递。该方法在检测过程中产生了良好的电化学信号,可用于多种肿瘤标志物抗原的分析。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抗原检测方法的不足。

发明内容

[0004] 本发明的目的之一是基于松枝状纳米金铜合金,构建了一种无电子媒介体、无标记的电化学免疫传感器。

[0005] 本发明的目的之二是将该无标记电化学传感器应用于肿瘤标志物的高灵敏、特异性检测。

[0006] 本发明的技术方案如下:

[0007] 1. 基于松枝状纳米金铜的生物传感器的制备方法:

[0008] (1)依次用 1.0、0.3、0.05 μm 的氧化铝粉末对玻碳电极进行抛光,分别在超纯水和乙醇中超声清洗,氮气吹干;

[0009] (2)以 10 mL 含有浓度为 10 mmol/L 的硫酸钠、5 mmol/L 的氯金酸、10 mmol/L 的硫酸和 10 mmol/L 的硫酸铜溶液为底液,在 -0.8 V 电压下扫描 400 ~ 600 s,得到电沉积松枝状纳米金铜修饰的电极;

[0010] (3)继续将 6 μL 浓度为 8 ~ 12 $\mu\text{g/mL}$ 的肿瘤标志物抗体溶液滴加到修饰电极表面,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化 1 h,清洗干净;

[0011] (4)用 3 μL 浓度为 5~15 mg/mL 的牛血清白蛋白溶液封闭非特异性活性位点,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化 1 h,清洗干净;

[0012] (5)将 6 μL 浓度为 0.0005 ~ 500 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原用于和抗体的特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存备用。

[0013] 肿瘤标志物的检测步骤：

[0014] (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,所制备的免疫传感器为工作电极,在 10 mL 的 pH 值为 6.8 的磷酸盐缓冲溶液中进行测试；

[0015] (2) 选择循环伏安法对肿瘤标志物抗原进行检测,将电压设置为 $-0.8 \sim 0.8$ V,记录电流的变化,绘制工作曲线；

[0016] (3) 将待测样品溶液代替肿瘤标志物抗原标准溶液进行检测。

[0017] 3. 上述肿瘤标志物选自下列之一:TPA、CEA、SCCA、CD146、AFP、CA724。

[0018] 本发明的有益成果

[0019] (1) 本发明首次利用新方法电沉积得到松枝状纳米金铜合金,在构建电化学免疫传感器的过程中,即作为信号生成器有作为信号放大器。

[0020] (2) 本发明不需要引入其他电子媒介体,合金中的铜可以直接产生电化学信号。

[0021] (3) 本发明不需要引入任何连接剂,合金中的金可用于抗体的固定和促进电子的传递。

[0022] (4) 松枝状的形貌增加了与蛋白质的接触面积,显著促进了蛋白质和电极之间的电子传递。

[0023] (5) 本发明将制备的无标记电化学免疫传感器用于肿瘤标志物抗原的检测,检测限低,线性范围宽,可以实现简单、快速、灵敏和特异性检测。线性范围为 $0.0005 \sim 500$ ng/mL,检测限可达到 0.15 pg/mL。

具体实施方式

[0024] 实施例 1 基于松枝状纳米金铜的生物传感器的制备方法：

[0025] (1) 依次用 1.0 、 0.3 、 0.05 μm 的氧化铝粉末对玻碳电极进行抛光,分别在超纯水和乙醇中超声清洗,氮气吹干；

[0026] (2) 以 10 mL 含有浓度为 10 mmol/L 的硫酸钠、 5 mmol/L 的氯金酸、 10 mmol/L 的硫酸和 10 mmol/L 的硫酸铜溶液为底液,在 -0.8 V 电压下扫描 400 s,得到电沉积松枝状纳米金铜修饰的电极；

[0027] (3) 继续将 6 μL 浓度为 8 $\mu\text{g/mL}$ 的肿瘤标志物抗体溶液滴加到修饰电极表面,于 4°C 冰箱中孵化 1 h,清洗干净；

[0028] (4) 用 3 μL 浓度为 5 mg/mL 的牛血清白蛋白溶液封闭非特异性活性位点,于 4°C 冰箱中孵化 1 h,清洗干净；

[0029] (5) 将 6 μL 浓度为 $0.0005 \sim 500$ ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原用于和抗体的特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净,于 4°C 冰箱中储存备用。

[0030] 实施例 2 基于松枝状纳米金铜的生物传感器的制备方法：

[0031] (1) 依次用 1.0 、 0.3 、 0.05 μm 的氧化铝粉末对玻碳电极进行抛光,分别在超纯水和乙醇中超声清洗,氮气吹干；

[0032] (2) 以 10 mL 含有浓度为 10 mmol/L 的硫酸钠、 5 mmol/L 的氯金酸、 10 mmol/L 的硫酸和 10 mmol/L 的硫酸铜溶液为底液,在 -0.8 V 电压下扫描 500 s,得到电沉积松枝状纳米金铜修饰的电极；

[0033] (3)继续将6 μL 浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的肿瘤标志物抗体溶液滴加到修饰电极表面,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化1 h,清洗干净;

[0034] (4)用3 μL 浓度为10 mg/mL 的牛血清白蛋白溶液封闭非特异性活性位点,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化1 h,清洗干净;

[0035] (5)将6 μL 浓度为0.0005 ~ 500 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原用于和抗体的特异性识别,室温下孵化1 h,清洗干净,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存备用。

[0036] 实施例3基于松枝状纳米金铜的生物传感器的制备方法:

[0037] (1)依次用1.0、0.3、0.05 μm 的氧化铝粉末对玻碳电极进行抛光,分别在超纯水和乙醇中超声清洗,氮气吹干;

[0038] (2)以10 mL含有浓度为10 mmol/L 的硫酸钠、5 mmol/L 的氯金酸、10 mmol/L 的硫酸和10 mmol/L 的硫酸铜溶液为底液,在-0.8 V电压下扫描600 s,得到电沉积松枝状纳米金铜修饰的电极;

[0039] (3)继续将6 μL 浓度为12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的肿瘤标志物抗体溶液滴加到修饰电极表面,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化1 h,清洗干净;

[0040] (4)用3 μL 浓度为15 mg/mL 的牛血清白蛋白溶液封闭非特异性活性位点,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化1 h,清洗干净;

[0041] (5)将6 μL 浓度为0.0005 ~ 500 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原用于和抗体的特异性识别,室温下孵化1 h,清洗干净,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存备用。

[0042] 实施例4肿瘤标志物CA724的检测步骤:

[0043] (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,所制备的免疫传感器为工作电极,在10 mL的pH值为6.8的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

[0044] (2)选择循环伏安法对肿瘤标志物CA724进行检测,将电压设置为-0.8 ~ 0.8 V,记录电流的变化,绘制工作曲线;

[0045] (3)将待测样品溶液代替肿瘤标志物CA724标准溶液进行检测。

[0046] (4)该电化学免疫传感器对肿瘤标志物CA724检测线性范围为0.0005~ 500 ng/mL ,检测限0.15 pg/mL 。

[0047] 实施例5按照实施例4的方法对TPA、CEA、SCCA、CD146、AFP进行检测,测得线性范围为0.0005~ 500 ng/mL ,检测限0.18 pg/mL 。