



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106370858 A

(43)申请公布日 2017.02.01

(21)申请号 201610696325.7

(22)申请日 2016.08.20

(71)申请人 福建师范大学

地址 350108 福建省福州市闽侯大学城科技路1号福建师范大学旗山校区

(72)发明人 戴宏 高利红 林燕语 张书培

(74)专利代理机构 福州智理专利代理有限公司
35208

代理人 王义星

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 27/30(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

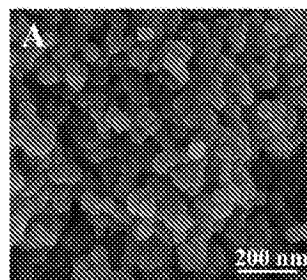
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种基于电位寻址模式的双肿瘤标志物的光电检测方法

(57)摘要

本发明公开一种基于电位寻址模式的双肿瘤标志物的光电检测方法。该方法利用在光电检测过程中,调制传感界面上的应用电位,即可实现对白细胞介素-6和前列腺特异抗原等两种肿瘤标志物的高灵敏检测。通过将聚酰胺胺和TiO₂介观晶体相复合,分别修饰于双圆盘电极界面上,形成基质层,然后分别修饰上白细胞介素-6和前列腺特异抗原。分别在纳米石墨相氮化碳及壳聚糖-碘化银纳米粒子上功能化白细胞介素-6抗体和前列腺特异抗原抗体,进而制备了针对白细胞介素-6和前列腺特异抗原的纳米光电化学探针。结合竞争免疫分析策略,所制备的光电化学探针能与目标物竞争结合于电极基质上。可实现对于同种测试样品中的两种肿瘤标志物的电位寻址型光电化学检测。



1. 一种基于电位寻址模式的双肿瘤标志物的光电检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

双圆盘玻碳电极(DDCE)的预处理:DDCE首先在铺有氧化铝粉末的麂皮上机械打磨抛光,用二次水洗去表面残留粉末,再移入超声水浴中清洗,直至清洗干净,最后依序用乙醇,稀酸和水彻底洗涤;

PAAD@CAM/DDCE修饰电极的制备:将100 μ L浓度为3mg/ml的二氧化钛介观晶体(CAM)溶液与100 μ L浓度为0.5wt%的聚酰胺胺溶液相混合,超声3个小时;在3000转/分钟的转速下将该溶液离心,去除上清液,随后加入200 μ L超纯水,摇匀,获得均一的修饰溶液;分别滴加4 μ L该修饰溶液于双圆盘玻碳电极上,红外灯下烘干,冷却至室温,即得到PAAD@CAM/DDCE修饰电极;通过将该PAAD@CAM/DDCE修饰电极浸泡于浓度为5.0 wt. %的戊二醛溶液中50分钟,然后分别在两个PAAD@CAM/DDCE修饰电极滴涂20 μ L 浓度为1 ng mL⁻¹前列腺特异抗原和20 μ L of 1 ng mL⁻¹白细胞介素-6,作用45分钟后,依次用清水清洗,随后,将该修饰电极浸入浓度为1.0 wt.%的牛血清白蛋白 1 h,封闭电极表面上非特异性活性位点;用pH 7.4的磷酸缓冲溶液冲洗电极表面并在室温条件下自然晾干,制得修饰电极;

前列腺特异抗原的抗体功能化的光电化学探针(Ab₁@g-C₃N₄):混合100 μ L 浓度为0.5wt%的壳聚糖溶液与1 mL浓度为3 mg mL⁻¹的石墨相氮化碳(g-C₃N₄)溶液,超声48 小时,将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟,移除上清液,获得沉淀,烘干;将3mg该沉淀物分散于1mL二次水溶液,即得到浓度为3 mg mL⁻¹的壳聚糖-石墨相氮化碳光电化学探针,移取120 μ L浓度为0.3 mg mL⁻¹的壳聚糖-石墨相氮化碳溶液与20 μ L 前列腺特异抗原的抗体相混合,然后滴加30 μ L浓度为0.5wt%的戊二醛溶液,室温下反应3小时,随后将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟,移除上清液,获得沉淀;然后再加入1mL磷酸盐缓冲溶液,超声分散,即获得前列腺特异抗原的抗体功能化的光电化学探针(Ab₁@g-C₃N₄);

白细胞介素-6抗体功能化的光电化学探针(Ab₂@CS-AgI):混合100 μ L 浓度为0.5wt%的壳聚糖溶液与1 mL浓度为3 mg mL⁻¹的纳米碘化银(AgI)溶液,超声48 小时,将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟,移除上清液,获得沉淀,烘干,将3mg该沉淀物分散于1mL二次水溶液,即得到浓度为3 mg mL⁻¹的壳聚糖-纳米碘化银光电化学探针;移取120 μ L浓度为0.3 mg mL⁻¹的壳聚糖-纳米碘化银溶液与20 μ L 白细胞介素-6抗体相混合,然后滴加30 μ L浓度为0.5wt%的戊二醛溶液,室温下反应3小时,随后将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟,移除上清液,获得沉淀,然后再加入1mL磷酸盐缓冲溶液,超声分散,即获得前列腺特异抗原的抗体功能化的光电化学探针(Ab₂@CS-AgI);

白细胞介素-6和前列腺特异抗原的检测:采用三电极体系进行测定,以所构建步骤(2)所获得的白细胞介素-6和前列腺特异抗原的PAAD@CAM/DDCE修饰电极为工作电极,Ag/AgCl为参比电极,铂丝电极为对电极,利用光电化学工作站进行检测,结合竞争免疫分析策略,固载于PAAD@CAM/DDCE修饰电极上的白细胞介素-6和前列腺特异抗原,分别与待测溶液中的白细胞介素-6和前列腺特异抗原竞争结合,放入待测溶液中的步骤(3)所制得的前列腺特异抗原的抗体功能化的光电化学探针(Ab₁@g-C₃N₄)用于结合固载于PAAD@CAM/DDCE修饰电极上的前列腺特异抗原和待测溶液中游离的前列腺特异抗原,放入待测溶液中的步骤(4)制得的白细胞介素-6抗体功能化的光电化学探针(Ab₂@CS-AgI)用于结合固载于PAAD@CAM/DDCE修饰电极上的白细胞介素-6和待测溶液中游离的白细胞介素-6;分别设置电压为

+0.12V和-0.135V,每隔10s进行开关灯,氙灯发射的单色光激发光源使用前由单色仪过滤;在pH 7.4的 PBS缓冲溶液中,通过记录开关灯前后产生的不同电流信号,在+0.12V电压下,可绘制针对前列腺特异抗原的工作曲线;在-0.135V电压下,可绘制针对白细胞介素-6的工作曲线,检测的结果可通过工作曲线查得。

一种基于电位寻址模式的双肿瘤标志物的光电检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于新型功能材料与生物传感检测技术领域,具体涉及一种针对两种肿瘤标志物的新型电位寻址模式的光电化学传感方法。

背景技术

[0002] 近年来,在医疗诊断和病原体识别中利用高效的生物传感器的构建实现简单的蛋白质检测得到越来越广泛的关注。预测及诊断癌症以能够早期干预和更好的管理疾病,作为诊断工具,肿瘤标志物发挥了重要的作用。针对肿瘤早期诊断中的假阳性与假阴性的问题,开发针对多种肿瘤标志物的快速灵敏检测方法,就成为了目前亟待解决的问题。

[0003] 光电化学(PEC)检测,是基于光电化学过程和化学/生物识别过程建立起来的一种新的分析方法。该方法以光作为激发信号,以光电流作为检测信号,具有灵敏度高、响应快速、设备简单和易微型化等优点,为临床诊断、环境监测与食品安全等领域提供了一种强有力手段。光电化学分析使用光作为激发信号,检测的是电信号,通过采用不同形式的能量作为激发信号和检测信号,使激发和检测信号互不干扰,因而背景信号较低,可获得较高的灵敏度。但目前的光电检测方法多仅能针对单一目标物而开展检测。目前尚无研究是利用不同光电活性材料的临界电压,运用电位调制技术,借助电位寻址技术,实现对于以两种肿瘤标志物为代表的两种目标物的检测。

发明内容

[0004] 本发明的目的之一是针对两种目标物的电位寻址模式光电化学传感器的制备。

[0005] 本发明的目的之二是将该光电化学传感器可实现对于白细胞介素-6和前列腺特异抗原为代表的两种肿瘤标志物的高灵敏检测。

[0006] 为实现发明目的,本发明采用如下技术方案:一种基于电位寻址模式的双肿瘤标志物的光电检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 双圆盘玻碳电极(DDCE)的预处理:DDCE首先在铺有氧化铝粉末的麂皮上机械打磨抛光,用二次水洗去表面残留粉末,再移入超声水浴中清洗,直至清洗干净,最后依序用乙醇,稀酸和水彻底洗涤;

(2) PAAD@CAM/DDCE修饰电极的制备:将100 μ L浓度为3mg/ml的二氧化钛介观晶体(CAM)溶液与100 μ L浓度为0.5wt%的聚酰胺胺溶液相混合,超声3个小时;在3000转/分钟的转速下将该溶液离心,去除上清液,随后加入200 μ L超纯水,摇匀,获得均一的修饰溶液;分别滴加4 μ L该修饰溶液于双圆盘玻碳电极上,红外灯下烘干,冷却至室温,即得到PAAD@CAM/DDCE修饰电极;通过将该PAAD@CAM/DDCE修饰电极浸泡于浓度为5.0 wt. %的戊二醛溶液中50分钟,然后分别在两个PAAD@CAM/DDCE修饰电极滴涂20 μ L 浓度为1 ng mL⁻¹前列腺特异抗原和 20 μ L of 1 ng mL⁻¹白细胞介素-6,作用45分钟后,依次用清水清洗,随后,将该修饰电极浸入浓度为1.0 wt.%的牛血清白蛋白 1 h,封闭电极表面上非特异性活性位点;用pH 7.4的磷酸缓冲溶液冲洗电极表面并在室温条件下自然晾干,制得修饰电极;

(3) 前列腺特异抗原的抗体功能化的光电化学探针 ($Ab_1@g-C_3N_4$): 混合100 μL 浓度为0.5wt% 的壳聚糖溶液与1 mL浓度为3 mg mL^{-1} 的石墨相氮化碳 ($g-C_3N_4$) 溶液, 超声48 小时, 将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟, 移除上清液, 获得沉淀, 烘干; 将3mg该沉淀物分散于1mL二次水溶液, 即得到浓度为3 mg mL^{-1} 的壳聚糖-石墨相氮化碳光电化学探针, 移取120 μL 浓度为0.3 mg mL^{-1} 的壳聚糖-石墨相氮化碳溶液与20 μL 前列腺特异抗原的抗体相混合, 然后滴加30 μL 浓度为0.5wt% 的戊二醛溶液, 室温下反应3小时, 随后将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟, 移除上清液, 获得沉淀; 然后再加入1mL磷酸盐缓冲溶液, 超声分散, 即获得前列腺特异抗原的抗体功能化的光电化学探针 ($Ab_1@g-C_3N_4$);

(4) 白细胞介素-6抗体功能化的光电化学探针 ($Ab_2@CS-AgI$): 混合100 μL 浓度为0.5wt% 的壳聚糖溶液与1 mL浓度为3 mg mL^{-1} 的纳米碘化银 (AgI) 溶液, 超声48 小时, 将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟, 移除上清液, 获得沉淀, 烘干, 将3mg该沉淀物分散于1mL二次水溶液, 即得到浓度为3 mg mL^{-1} 的壳聚糖-纳米碘化银光电化学探针; 移取120 μL 浓度为0.3 mg mL^{-1} 的壳聚糖-纳米碘化银溶液与20 μL 白细胞介素-6抗体相混合, 然后滴加30 μL 浓度为0.5wt% 的戊二醛溶液, 室温下反应3小时, 随后将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟, 移除上清液, 获得沉淀, 然后再加入1mL磷酸盐缓冲溶液, 超声分散, 即获得前列腺特异抗原的抗体功能化的光电化学探针 ($Ab_2@CS-AgI$);

(5) 白细胞介素-6和前列腺特异抗原的检测: 采用三电极体系进行测定, 以所构建步骤(2)所获得的白细胞介素-6和前列腺特异抗原的PAAD@CAM/DDCE修饰电极为工作电极, $Ag/AgCl$ 为参比电极, 铂丝电极为对电极, 利用光电化学工作站进行检测, 结合竞争免疫分析策略, 固载于PAAD@CAM/DDCE修饰电极上的白细胞介素-6和前列腺特异抗原, 分别与待测溶液中的白细胞介素-6和前列腺特异抗原竞争结合, 放入待测溶液中的步骤(3)所制得的前列腺特异抗原的抗体功能化的光电化学探针 ($Ab_1@g-C_3N_4$) 用于结合固载于PAAD@CAM/DDCE修饰电极上的前列腺特异抗原和待测溶液中游离的前列腺特异抗原, 放入待测溶液中的步骤(4)制得的白细胞介素-6抗体功能化的光电化学探针 ($Ab_2@CS-AgI$) 用于结合固载于PAAD@CAM/DDCE修饰电极上的白细胞介素-6和待测溶液中游离的白细胞介素-6; 分别设置电压为+0.12V和-0.135V, 每隔10s进行开关灯, 氙灯发射的单色光激发光源使用前由单色仪过滤; 在pH 7.4的 PBS缓冲溶液中, 通过记录开关灯前后产生的不同电流信号, 在+0.12V电压下, 可绘制针对前列腺特异抗原的工作曲线; 在-0.135V电压下, 可绘制针对白细胞介素-6的工作曲线, 检测的结果可通过工作曲线查得。

[0007] 具体地说, 本发明采用如下技术方案: 本发明所述的一种基于电位寻址模式的双肿瘤标志物的光电检测方法, 包括如下步骤:

(1) 双圆盘玻碳电极 (DDCE) 的预处理: DDCE首先在铺有氧化铝粉末的麂皮上机械打磨抛光, 用二次水洗去表面残留粉末, 再移入超声水浴中清洗, 直至清洗干净, 最后依序用乙醇, 稀酸和水彻底洗涤;

(2) PAAD@CAM/DDCE修饰电极的制备: 将100 μL 浓度为3mg/ml的二氧化钛介观晶体 (CAM) 溶液与100 μL 浓度为0.5%的聚酰胺胺溶液相混合, 超声3个小时。在3000转/分钟的转速下将该溶液离心, 去除上清液, 随后加入200 μL 超纯水, 摇匀, 获得均一的修饰溶液。分别滴加4 μL 该修饰溶液于双圆盘玻碳电极上, 红外灯下烘干, 冷却至室温, 即得到PAAD@CAM/DDCE修饰电极; 通过将该双圆盘玻碳电极浸泡于浓度为5.0 wt. %的戊二醛溶液中50分钟, 然后分别

在两个圆盘电极分别滴涂上20 μL 浓度为1 ng mL^{-1} 前列腺特异抗原和 20 μL of 1 ng mL^{-1} 白细胞介素-6,作用45分钟后,依次用清水清洗。随后,将该修饰电极浸入浓度为1.0 wt.%的牛血清白蛋白 1 h,封闭电极表面上非特异性活性位点;用pH 7.4的磷酸缓冲溶液冲洗电极表面并在室温条件下自然晾干,制得修饰电极;

(3) 前列腺特异抗原的抗体功能化的光电化学探针($\text{Ab}_1\text{@g-C}_3\text{N}_4$):混合100 μL 浓度为0.5%的壳聚糖溶液与1 mL浓度为3 mg mL^{-1} 的石墨相氮化碳($\text{g-C}_3\text{N}_4$)溶液,超声48小时。将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟,移除上清液,获得沉淀,烘干。将3mg该沉淀物分散于1mL二次水溶液,即得到浓度为3 mg mL^{-1} 的壳聚糖-石墨相氮化碳光电化学探针。移取120 μL 浓度为0.3 mg mL^{-1} 的壳聚糖-石墨相氮化碳溶液与20 μL 前列腺特异抗原的抗体相混合,然后滴加30 μL 浓度为0.5%的戊二醛溶液,室温下反应3小时。随后将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟,移除上清液,获得沉淀。然后再加入1mL磷酸盐缓冲溶液,超声分散,即获得前列腺特异抗原的抗体功能化的光电化学探针($\text{Ab}_1\text{@g-C}_3\text{N}_4$)。

[0008] (4) 白细胞介素-6抗体功能化的光电化学探针($\text{Ab}_2\text{@CS-AgI}$):混合100 μL 浓度为0.5%的壳聚糖溶液与1 mL浓度为3 mg mL^{-1} 的纳米碘化银(AgI)溶液,超声48小时。将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟,移除上清液,获得沉淀,烘干。将3mg该沉淀物分散于1mL二次水溶液,即得到浓度为3 mg mL^{-1} 的壳聚糖-纳米碘化银光电化学探针。移取120 μL 浓度为0.3 mg mL^{-1} 的壳聚糖-纳米碘化银溶液与20 μL 白细胞介素-6抗体相混合,然后滴加30 μL 浓度为0.5%的戊二醛溶液,室温下反应3小时。随后将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟,移除上清液,获得沉淀。然后再加入1mL磷酸盐缓冲溶液,超声分散,即获得前列腺特异抗原的抗体功能化的光电化学探针($\text{Ab}_2\text{@CS-AgI}$)。

[0009] 上述二氧化钛介观晶体、石墨相氮化碳、壳聚糖-碘化银购自宏泰纳米材料有限公司。

[0010] (5) 白细胞介素-6和前列腺特异抗原的检测:采用三电极体系进行测定,以所构建的白细胞介素-6和前列腺特异抗原的PAAD@CAM/DDCE修饰电极为工作电极, Ag/AgCl 为参比电极,铂丝电极为对电极,利用光电化学工作站进行检测,结合竞争免疫分析策略,固载于的PAAD@CAM/DDCE修饰电极上的白细胞介素-6和前列腺特异抗原,分别与待测溶液中的白细胞介素-6和前列腺特异抗原竞争结合。分别设置电压为+0.12V和-0.135V,每隔10s进行开关灯,氙灯发射的单色光激发光源使用前由单色仪过滤;在pH 7.4的PBS缓冲溶液中,通过记录开关灯前后产生的不同电流信号,在+0.12V电压下,可绘制针对前列腺特异抗原的工作曲线;在-0.135V电压下,可绘制针对白细胞介素-6的工作曲线。检测的结果可通过工作曲线查得。

[0011] 本发明所述的一种基于电位寻址模式的双肿瘤标志物的光电检测方法,其特征在于,所使用的检测系统包括双圆盘玻碳电极为工作电极、铂丝电极为对电极和 Ag/AgCl 为参比电极,其特征在于,所述的工作电极采用同时修饰前列腺特异抗原和白细胞介素-6的双圆盘玻碳电极,其由下述步骤的方法制备而成:1) 双圆盘玻碳电极的抛光:电极首先在铺有氧化铝粉末的麂皮上机械打磨抛光,用二次水洗去表面残留粉末,再移入超声水浴中清洗,直至清洗干净,最后依序用乙醇,稀酸和水彻底洗涤;2) PAAD@CAM/DDCE修饰电极的制备:将100 μL 浓度为3mg/ml的二氧化钛介观晶体(CAM)溶液与100 μL 浓度为0.5%的聚酰胺胺(PAAD)溶液相混合,超声3个小时。在3000转/分钟的转速下将该溶液离心,去除上清液,随

后加入200 μ L超纯水,摇匀,获得均一的修饰溶液。分别滴加4 μ L该修饰溶液于双圆盘玻碳电极上,红外灯下烘干,冷却至室温,即得到PAAD@CAM/DDCE修饰电极;通过将该双圆盘玻碳电极浸泡于浓度为5.0 wt. %的戊二醛溶液中50分钟,然后分别在两个圆盘电极分别滴涂上20 μ L 浓度为1 ng mL⁻¹前列腺特异抗原和 20 μ L of 1 ng mL⁻¹白细胞介素-6,作用45分钟后,依次用清水清洗。随后,将该修饰电极浸入浓度为1.0 wt.%的牛血清白蛋白 1 h,封闭电极表面上非特异性活性位点;用pH 7.4的磷酸缓冲溶液冲洗电极表面并在室温条件下自然晾干,制得同时修饰前列腺特异抗原和白细胞介素-6的双圆盘玻碳修饰电极;

本发明所述的前列腺特异抗原的抗体功能化的光电化学探针(Ab₁@g-C₃N₄)的制备,其特征在于,混合100 μ L 浓度为0.5% 的壳聚糖溶液与1 mL浓度为3 mg mL⁻¹ 的石墨相氮化碳(g-C₃N₄)溶液,超声48 小时。将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟,移除上清液,获得沉淀,烘干。将3mg该沉淀物分散于1mL二次水溶液,即得到浓度为3 mg mL⁻¹的壳聚糖-石墨相氮化碳光电化学探针。移取120 μ L浓度为0.3 mg mL⁻¹ 的壳聚糖-石墨相氮化碳溶液与20 μ L 前列腺特异抗原的抗体相混合,然后滴加30 μ L浓度为 0.5% 的戊二醛溶液,室温下反应3小时。随后将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟,移除上清液,获得沉淀。然后再加入1mL磷酸盐缓冲溶液,超声分散,即获得前列腺特异抗原的抗体功能化的光电化学探针(Ab₁@g-C₃N₄)。该探针用于结合固载的前列腺特异抗原和溶液中游离的前列腺特异抗原。

[0012] 本发明所述的白细胞介素-6抗体功能化的光电化学探针(Ab₂@CS-AgI)的制备,其特征在于,混合100 μ L 浓度为0.5% 的壳聚糖溶液与1 mL浓度为3 mg mL⁻¹ 的纳米碘化银(AgI)溶液,超声48 小时。将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟,移除上清液,获得沉淀,烘干。将3mg该沉淀物分散于1mL二次水溶液,即得到浓度为3 mg mL⁻¹的壳聚糖-纳米碘化银光电化学探针。移取120 μ L浓度为0.3 mg mL⁻¹ 的壳聚糖-纳米碘化银溶液与20 μ L 白细胞介素-6抗体相混合,然后滴加30 μ L浓度为 0.5% 的戊二醛溶液,室温下反应3小时。随后将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟,移除上清液,获得沉淀。然后再加入1mL磷酸盐缓冲溶液,超声分散,即获得前列腺特异抗原的抗体功能化的光电化学探针(Ab₂@CS-AgI)。该探针用于结合固载的白细胞介素-6和溶液中游离的白细胞介素-6。

[0013] 本发明所述的一种基于电位寻址模式的双肿瘤标志物的光电检测方法,其特征在于,白细胞介素-6和前列腺特异抗原的检测:采用三电极体系进行测定,以所构建的白细胞介素-6和前列腺特异抗原的PAAD@CAM/DDCE修饰电极为工作电极,Ag/AgCl为参比电极,铂丝电极为对电极,利用光电化学工作站进行检测,结合竞争免疫分析策略,固载于的PAAD@CAM/DDCE修饰电极上的白细胞介素-6和前列腺特异抗原,分别与待测溶液中的白细胞介素-6和前列腺特异抗原竞争结合。分别设置电压为+0.12V和-0.135V,每隔10s进行开关灯,氙灯发射的单色光激发光源使用前由单色仪过滤;在pH 7.4的 PBS缓冲溶液中,通过记录开关灯前后产生的不同电流信号,在+0.12V电压下,可绘制针对前列腺特异抗原的工作曲线;在-0.135V电压下,可绘制针对白细胞介素-6的工作曲线。检测的结果可通过工作曲线查得。在pH 7.4的 PBS缓冲溶液中,通过记录开关灯前后产生的不同电流信号,在+0.12V电压下,可在10⁻⁶到90 ng mL⁻¹浓度范围内,实现对前列腺特异抗原的定量检测;在-0.135V电压下,可在10⁻⁵ to 90 pg mL⁻¹浓度范围内,实现对白细胞介素-6的定量检测。

[0014] 本发明涉及的一种针对白细胞介素-6和前列腺特异抗原为代表的肿瘤标志物的

电位寻址型光电传感方法。该方法利用在光电检测过程中,调制传感界面上的应用电位,即可实现对白细胞介素-6和前列腺特异抗原等两种肿瘤标志物的高灵敏检测。通过将聚酰胺胺和TiO₂介观晶体相复合,分别修饰于双圆盘电极界面上,形成基质层,然后分别修饰上白细胞介素-6和前列腺特异抗原。分别在纳米石墨相氮化碳及壳聚糖-碘化银纳米粒子上功能化白细胞介素-6抗体和前列腺特异抗原抗体,进而制备了针对白细胞介素-6和前列腺特异抗原的纳米光电化学探针。结合竞争免疫分析策略,所制备的光电化学探针能与目标物竞争结合于电极基质上。在光照情况下,通过调制双圆盘电极上的应用电压,可以使双圆盘电极中的其中一个界面达到临界状态,此时该界面上电流为零,而另一个电极界面上的依然有电流,进而可实现对目标的选择性检测。通过该发现,可实现对于同种测试样品中的两种肿瘤标志物的电位寻址型光电化学检测。

[0015] 本发明的显著优点为:

(1) 以纳米光电材料的临界电压为依据,通过调制应用电位,实现了对于两种肿瘤标志物的同时检测。与传统方法相比,该方法具有快速、灵敏、准确的优点。

[0016] (2) 通过在传感界面引入聚酰胺胺-TiO₂介观晶体材料的复合物,能有效提高生物分子的负载量,从而提高所制备的传感器的分析测试性能。

[0017] (3) 通过利用石墨相氮化碳和壳聚糖-碘化银的光生临界电压的不同,为构建该型传感器提供了必要的检测基础。

附图说明

[0018] 图1为本发明所述的一种基于电位寻址模式的双肿瘤标志物的光电检测方法过程示意图。

[0019] 图2A为二氧化钛介观晶体的SEM图。

[0020] 图2B为二氧化钛介观晶体的SEM图。

[0021] 图3A为不同浓度 10^{-5} to 90 pg mL^{-1} 白细胞介素-6标准溶液,传感电极的光电流响应图。

图3B为传感电极的光电流响应与白细胞介素-6标准溶液浓度的线性关系图。

[0022] 图3C为不同浓度 10^{-6} 到 90 ng mL^{-1} 前列腺特异抗原标准溶液,传感电极的光电流响应图。

图3D为传感电极的光电流响应前列腺特异抗原标准溶液浓度的线性关系图。

具体实施方式

[0023] 本发明用下列实施例来进一步说明本发明,但本发明的保护范围并不限于下列实施例。

[0024] 实施例1

一种基于电位寻址模式的双肿瘤标志物的光电化学传感器的制备方法(如图1所示):

(1) 双圆盘玻碳电极(DDCE)的预处理:DDCE首先在铺有氧化铝粉末的麂皮上机械打磨抛光,用二次水洗去表面残留粉末,再移入超声水浴中清洗,直至清洗干净,最后依序用乙醇,稀酸和水彻底洗涤;

(2) 将 $100 \mu\text{L}$ 浓度为 3 mg/ml 的二氧化钛介观晶体(CAM)溶液与 $100 \mu\text{L}$ 浓度为 0.5% 的聚酰

胺胺溶液相混合,超声3个小时。在3000转/分钟的转速下将该溶液离心,去除上清液,随后加入200 μ L超纯水,摇匀,获得均一的修饰溶液。

[0025] (3) 分别滴加4 μ L该修饰溶液于双圆盘玻碳电极上,红外灯下烘干,冷却至室温,即得到PAAD@CAM/DDCE修饰电极;通过将该双圆盘玻碳电极浸泡于浓度为5.0 wt. %的戊二醛溶液中50分钟,然后分别在两个圆盘电极分别滴涂上20 μ L 浓度为1 ng mL⁻¹前列腺特异抗原和 20 μ L of 1 ng mL⁻¹白细胞介素-6,作用45分钟后,依次用清水清洗。

[0026] (4) 将该修饰电极浸入浓度为1.0 wt.%的牛血清白蛋白 1 h,封闭电极表面上非特异性活性位点;用pH 7.4的磷酸缓冲溶液冲洗电极表面并在室温条件下自然晾干,制得修饰电极。

[0027] 实施例2

前列腺特异抗原的抗体功能化的光电化学探针(Ab₁@g-C₃N₄)的制备

(1) 混合100 μ L 浓度为0.5% 的壳聚糖溶液与1 mL浓度为3 mg mL⁻¹ 的石墨相氮化碳(g-C₃N₄) 溶液,超声48 小时。将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟,移除上清液,获得沉淀,烘干。

[0028] (2) 将3mg该沉淀物分散于1mL二次水溶液,即得到浓度为3 mg mL⁻¹的壳聚糖-石墨相氮化碳光电化学探针。移取120 μ L浓度为0.3 mg mL⁻¹ 的壳聚糖-石墨相氮化碳溶液与20 μ L 前列腺特异抗原的抗体相混合,然后滴加30 μ L浓度为 0.5% 的戊二醛溶液,室温下反应3小时。

[0029] (3) 随后将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟,移除上清液,获得沉淀。然后再加入1mL磷酸盐缓冲溶液,超声分散,即获得前列腺特异抗原的抗体功能化的光电化学探针(Ab₁@g-C₃N₄)。

[0030] 实施例3

白细胞介素-6抗体功能化的光电化学探针(Ab₂@CS-AgI)的制备

(1) 混合100 μ L 浓度为0.5% 的壳聚糖溶液与1 mL浓度为3 mg mL⁻¹ 的纳米碘化银(AgI)溶液,超声48 小时。

[0031] (2) 将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟,移除上清液,获得沉淀,烘干。将3mg该沉淀物分散于1mL二次水溶液,即得到浓度为3 mg mL⁻¹的壳聚糖-纳米碘化银光电化学探针。

[0032] (3) 移取120 μ L浓度为0.3 mg mL⁻¹ 的壳聚糖-纳米碘化银溶液与20 μ L 白细胞介素-6抗体相混合,然后滴加30 μ L浓度为 0.5% 的戊二醛溶液,室温下反应3小时。随后将该溶液在6000转/分钟的转速下离心20分钟,移除上清液,获得沉淀。然后再加入1mL磷酸盐缓冲溶液,超声分散,即获得前列腺特异抗原的抗体功能化的光电化学探针(Ab₂@CS-AgI)。

[0033] 实施例4

针对前列腺特异抗原和白细胞介素-6的基于电位寻址模式的双肿瘤标志物的光电检测方法,步骤如下:

(1) 采用三电极体系进行测定,以所构建实施例1制得的白细胞介素-6和前列腺特异抗原的PAAD@CAM/DDCE修饰电极为工作电极,Ag/AgCl为参比电极,铂丝电极为对电极,利用光电化学工作站进行检测,结合竞争免疫分析策略,固载于的修饰电极上的白细胞介素-6和前列腺特异抗原,分别与待测溶液中的白细胞介素-6和前列腺特异抗原竞争结合,实施例2

和实施例3所制备的光电化学探针。分别设置电压为+0.12V和-0.135V,每隔10s进行开关灯,氙灯发射的单色光激发光源使用前由单色仪过滤;

(2) 在pH 7.4的 PBS缓冲溶液中,通过记录开关灯前后产生的不同电流信号,在-0.135V电压下,检测 10^{-5} to 90 pg mL^{-1} 浓度范围内,一系列不同溶度的白细胞介素-6标准溶液,通过记录开关灯前后产生的不同电流信号,绘制工作曲线。图3C为不同浓度 1×10^{-7} mg/mL-1.0 mg/mL (a-h) 白细胞介素-6标准溶液,传感电极的光电流响应。图3D为传感电极的光电流响应与白细胞介素-6标准溶液浓度的线性关系图。在+0.12V电压下,检测 10^{-6} 到 90 ng mL^{-1} 浓度范围内,一系列不同溶度的前列腺特异抗原标准溶液,通过记录开关灯前后产生的不同电流信号,绘制工作曲线。图3C为不同浓度 1×10^{-7} mg/mL-1.0 mg/mL (a-h) 前列腺特异抗原标准溶液,传感电极的光电流响应。图3D为传感电极的光电流响应与前列腺特异抗原标准溶液浓度的线性关系图。将待测样品溶液代替所测试的标准溶液进行检测,通过调制检测电压,可实现对特定目标物的检测,其结果可通过工作曲线查得。

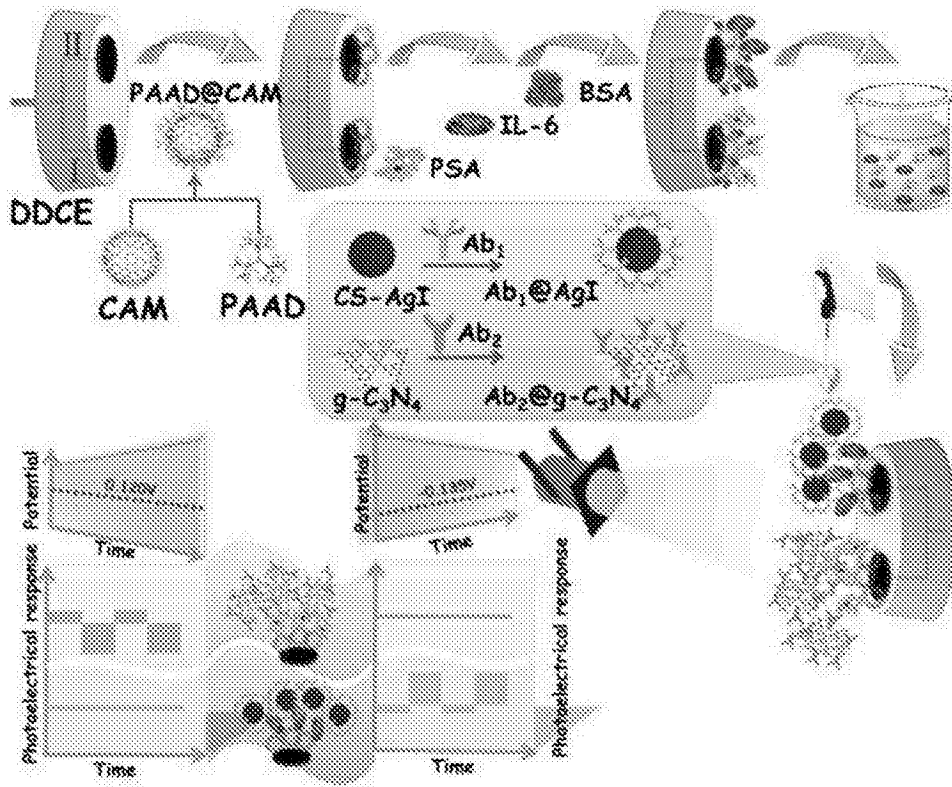


图1

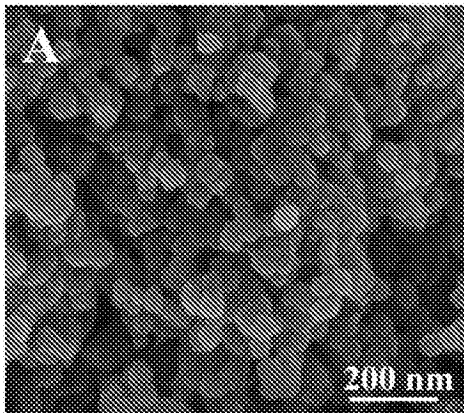


图2A

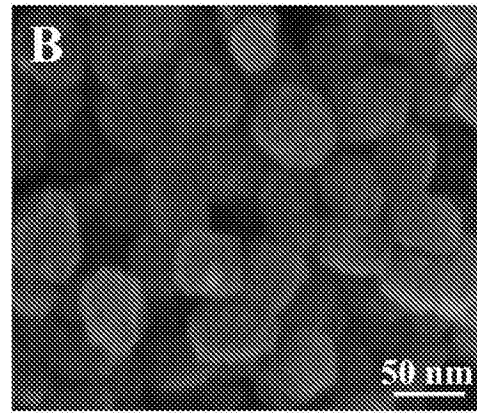


图2B

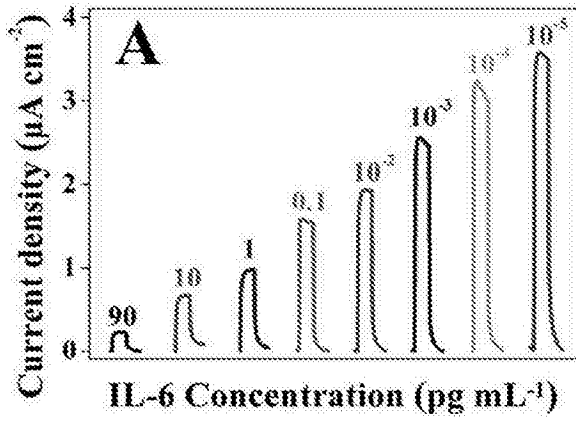


图3A

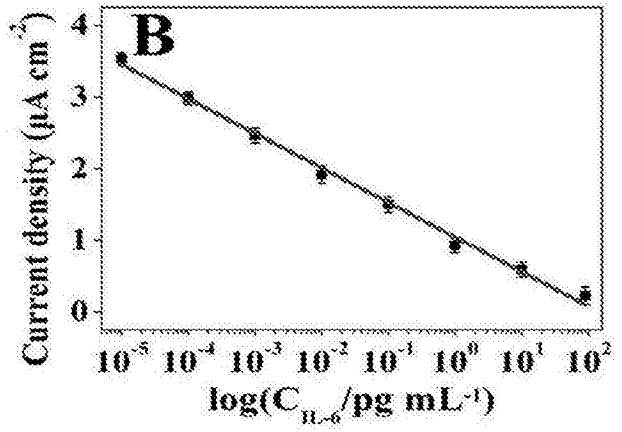


图3B

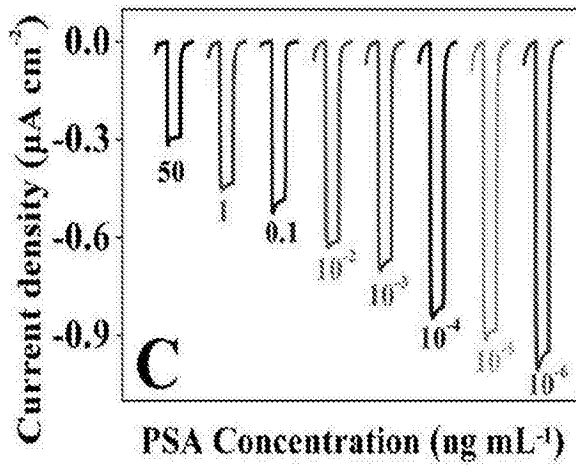


图3C

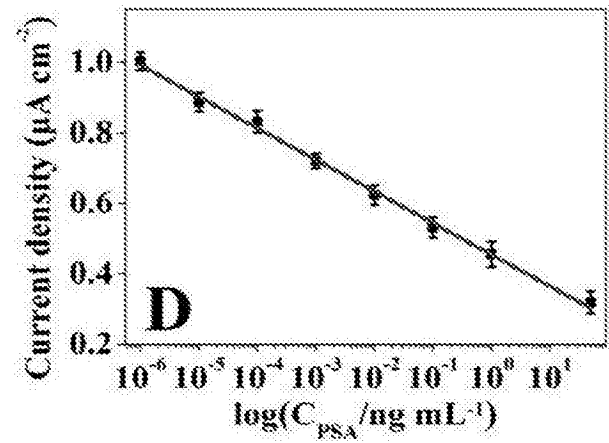


图3D