



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111198222 B

(45) 授权公告日 2021.09.07

(21) 申请号 202010033287.3

(22) 申请日 2020.01.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111198222 A

(43) 申请公布日 2020.05.26

(73) 专利权人 云南大学
地址 650000 云南省昆明市翠湖北路2号

(72) 发明人 李灿鹏

(74) 专利代理机构 成都市鼎宏恒业知识产权代
理事务所(特殊普通合伙)
51248

代理人 富丽娟

(51) Int.Cl.
G01N 27/327(2006.01) (续)

(56) 对比文件
Zhang, Si et al..A double signal electrochemical human immunoglobulin G immunosensor based on gold nanoparticles-polydopamine functionalized reduced graphene oxide as a sensor platform and

AgNPs/carbon nanocomposite as signal probe and catalytic substrate.《Biosensors and Bioelectronics》.2015,第77卷1078-1085.

Khan, M. Z. H. et al..Au-PDA@SiO₂ core-shell nanospheres decorated rGO modified electrode for electrochemical sensing of cefotaxime.《Scientific Reports》.2019,第9卷(第1期),19041.

Li, Xiaxia et al..One step synthesis of boron-doped carbon nitride derived from 4-pyridylboronic acid as biosensing platforms for assessment of food safety.《Chemical Communications》.2019,第55卷(第62期),9160-9163.

Tang, Zhongxue et al..Triple sensitivity amplification for ultrasensitive electrochemical detection of prostate specific antigen.《Biosensors and Bioelectronics》.2016,第92卷577-582.

(续)

审查员 张楠喆

权利要求书2页 说明书6页 附图4页

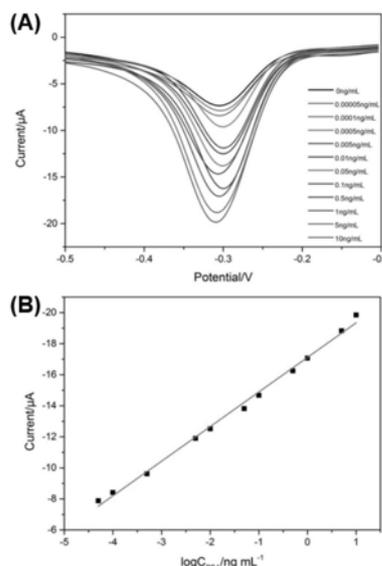
(54) 发明名称

一种检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器的制备及使用方法

(57) 摘要

本发明涉及生物领域,具体涉及一种检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器的制备及使用方法。本发明通过在电极表面依次修饰上金纳米粒子负载的具有较好导电性的聚多巴胺和氮化硼复合物(Au@PDA@BCN)和对信号分子亚甲基蓝(MB)具有优良富集作用的金铂纳米粒子修饰的二氧化锰共价有机框架复合材料(AuPt@MnO₂@TFPB-COF);通过两种材料实现对电化学信号的放大效果,所构建的使用肽和抗体的夹心型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器实现了精确定量检测前列腺特异性抗原的目的。

CN 111198222 B



[接上页]

(51) Int.Cl.

G01N 27/30 (2006.01)

G01N 27/48 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(56) 对比文件

Zhang, Yimeng et al..Multivalency Interface and g-C₃N₄ Coated Liquid Metal Nanoprobe Signal Amplification for Sensitive Electrogenerated Chemiluminescence Detection of Exosomes and Their Surface Proteins.《Analytical Chemistry》.2019,第91卷(第18期),12100-12107.

Chen, Xiudong et al..High-Lithium-Affinity Chemically Exfoliated 2D Covalent Organic Frameworks.《Advanced Materials》.2019,第31卷(第29期),1901640.

Liang, Huan et al..Ultrasensitive electrochemical sensor for prostate

specific antigen detection with a phosphorene platform and magnetic covalent organic framework signal amplifier.《Biosensors and Bioelectronics》.2019,第144卷111691.

Miao, Luyang et al..Amperometric sandwich immunoassay for the carcinoembryonic antigen using a glassy carbon electrode modified with iridium nanoparticles, polydopamine and reduced graphene oxide.《Microchimica Acta》.2016,第184卷(第1期),169-175.

Chen, Zongbao et al..Thionine-coordinated BCN nanosheets for electrochemical enzyme immunoassay of lipocalin-2 on biofunctionalized carbon-fiber microelectrode.《Sensors and Actuators B: Chemical》.2018,第273卷253-259.

1. 一种检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器的制备方法:其特征在於:包括以下步骤:

(1) 玻碳电极的处理:将玻碳电极清洗干净;

(2) 将金纳米粒子负载聚多巴胺和氮化硼复合物的纳米材料分散液滴加至步骤(1)中清洗干净的玻碳电极表面,晾干;

(3) 将前列腺特异性抗体滴加到步骤(2)处理好的玻碳电极表面,进行孵育,孵育完成后用磷酸盐缓冲液清洗电极表面,晾干;

(4) 将牛血清蛋白溶液滴加到步骤(3)处理好的玻碳电极表面,进行孵育,孵育完成后用磷酸盐缓冲液清洗电极表面,晾干;

(5) 将前列腺特异性抗原溶液滴加到步骤(4)处理好的电极表面,进行孵育,孵育完成后用磷酸盐缓冲液清洗电极表面,晾干;

(6) 将肽的生物共轭探针滴加到步骤(5)处理好的电极表面,进行孵育,孵育完成后用磷酸盐缓冲液清洗电极表面,晾干,得到检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器;

所述的步骤(2)金纳米粒子负载聚多巴胺和氮化硼复合物的纳米材料分散液的制备方法具体包括以下步骤:

S1:在去离子水中加入HAuCl₄溶液,在110℃条件下加热,然后加入柠檬酸钠溶液,在110℃条件下沸腾回流直至溶液变为酒红色,冷却后得到金纳米粒子分散液;

S2:取4-吡啶基硼酸置于管式炉中,在氮气流的保护下将管式炉加热至800℃煅烧得到黑色的氮化硼;

S3:按照质量份数比为1:2的比例分别称取步骤S2制备好的氮化硼和多巴胺,将两者分散在pH=8.5的Tris盐酸缓冲液中,超声处理;然后在搅拌条件下缓慢加入步骤S1制备好的金纳米粒子分散液,搅拌至溶液变为黑色,经离心处理并洗涤,最终分散在去离子水中得到金纳米粒子负载聚多巴胺和氮化硼复合物的纳米材料分散液。

2. 根据权利要求1所述的一种检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器的制备方法,其特征在於:所述的步骤(1)中,玻碳电极的处理具体为:将玻碳电极用的Al₂O₃抛光粉抛光,然后分别用硝酸溶液、乙醇溶液、超纯水超声清洗。

3. 根据权利要求1所述的一种检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器的制备方法,其特征在於:所述的步骤(3)中,孵育条件为4℃条件下孵育12h。

4. 根据权利要求1所述的一种检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器的制备方法,其特征在於:所述的步骤(5)中,前列腺特异性抗原溶液的浓度为0.00005-10ng/mL。

5. 根据权利要求1所述的一种检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器的制备方法,其特征在於:所述的步骤(6)中,肽的生物共轭探针的制备方法具体包括以下步骤:

N1:在烧瓶中加入1,2,4,5-四(4-甲酰基苯基)苯、对苯二胺,然后再加入体积比为1:1的均三甲苯和环氧己烷的混合溶剂,密封烧瓶并在超声处理,然后加入乙酸溶液,该混合物通过三次冷冻-融化循环脱气后加入氩气密封,并将烧瓶进行油浴,之后冷却过滤,用四氢呋喃和丙酮洗涤之后真空冷冻干燥得到浅黄色的粉末TFPB-COF;

N2:取步骤N1制备好的TFPB-COF于烧杯中,再加入HClO₄溶液,加入去离子水超声混合,

然后在30℃水浴中将KMnO₄加入溶液中,搅拌后再超声处理,最后滤出悬浮液并在60℃条件下干燥得到黑色粉末MnO₂@TFPB-COF;

N3:取步骤N2制备好的MnO₂@TFPB-COF于烧瓶中,加入无水乙醇超声处理,再缓慢加入HAuCl₄乙醇溶液和H₂PtCl₆乙醇溶液并超声处理,然后在冰浴中加入NaBH₄乙醇溶液并超声处理,然后离心处理并用去离子水洗涤,最后重悬于pH=7.0的PBS中得到AuPt@MnO₂@TFPB-COF分散液;

N4:将亚甲基蓝溶液滴加到步骤N3制备好的AuPt@MnO₂@TFPB-COF分散液中并搅拌,然后离心处理并用pH=7.0的PBS洗涤,最后分散在pH=7.0的PBS中得到MB@MnO₂@TFPB-COF分散液;

N5:将前列腺特异性抗原亲和肽加入步骤N4制备的MB@MnO₂@TFPB-COF分散液中,经搅拌后,离心处理并用pH=7.0的PBS洗涤,得到肽的生物共轭探针。

6.根据权利要求1至5任意一项所述的检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器的使用方法,其特征在于:包括以下步骤:

T1:使用电化学工作站,在三电极体系中,以所制备的前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器为工作电极,铂丝电极为对电极,饱和甘汞电极为参比电极,在pH=7.0的磷酸盐缓冲液中进行测试;

T2:利用差分脉冲伏安法对目标物进行检测,记录电流峰值;

T3:记录不同浓度下的前列腺特异性抗原对应的电流峰值;

T4:利用工作曲线法,得到待测样品中前列腺特异性抗原的浓度。

7.根据权利要求6所述的检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器的使用方法,其特征在于:所述的步骤T1中,具体是在10mL浓度为0.1mol/L的pH=7.0的磷酸盐缓冲液中进行测试。

8.根据权利要求7所述的检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器的使用方法,其特征在于:所述的步骤T2中,扫描电压为-0.1~-0.6V,脉冲振幅为0.05V,脉冲宽度为0.05s。

一种检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器的制备及使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物领域,具体涉及一种检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器的制备及使用方法。

背景技术

[0002] 前列腺癌是男性癌症的主要组成之一,在美国,也有成千上万的男性死于前列腺癌,因此前列腺癌也受到了各界的广泛关注。到目前为止,前列腺癌并没有彻底根治的方法,而解决这一问题的最佳方法就是先前的诊断。前列腺特异性抗原,是一种与血清中的前列腺癌相关的重要蛋白质,也已经被证实是前列腺癌的最有效的标志物。当前列腺特异性抗原的浓度高于4.0ng/mL时(人体中前列腺特异性抗原的国际认可水平),患前列腺癌的风险将会大大增加。而且,前列腺特异性抗原的值还显示了患者对前列腺切除手术的反应。术后患者的前列腺特异性抗原的浓度超过0.5ng/mL时也会增大患癌风险。因此,前列腺特异性抗原的超灵敏检测对于前列腺癌的早期诊断和检测治疗至关重要。

[0003] 现在常用的检测前列腺特异性抗原的方法,例如化学发光法,荧光法和质谱免疫测定法,通常都需要配备精密分析仪器的大型实验室,需要复杂的操作和大量的等待时间。尽管酶联免疫吸附测定能够在2小时内同时检测96个样品,但基于酶的生物传感器很容易受到环境、生物酶固定和纯化程序复杂以及成本高等因素的限制,因此,开发出一种具有简单,快速,便宜和超灵敏性的卓越传感器就显得尤其重要。

[0004] 而现在常用的夹心型电化学免疫传感器都是基于抗体和抗原的特异性结合,但是抗体的生产周期长,价格昂贵。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器的制备及使用方法,以解决现有的对于前列腺特异性抗原的检测成本高、灵敏度低、稳定性差等问题。

[0006] 为解决上述的技术问题,本发明采用以下技术方案:

[0007] 一种检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器的制备方法:包括以下步骤:

[0008] (1) 玻碳电极的处理:将玻碳电极清洗干净;

[0009] (2) 将金纳米粒子负载聚多巴胺和氮化硼复合物的纳米材料分散液滴加至步骤(1)中清洗干净的玻碳电极表面,晾干;

[0010] (3) 将前列腺特异性抗体滴加到步骤(2)处理好的玻碳电极表面,进行孵育,孵育完成后用磷酸盐缓冲液清洗电极表面,晾干;

[0011] (4) 将牛血清蛋白溶液滴加到步骤(3)处理好的玻碳电极表面,进行孵育,孵育完成后用磷酸盐缓冲液清洗电极表面,晾干;

[0012] (5) 将前列腺特异性抗原溶液滴加到步骤(4)处理好的电极表面,进行孵育,孵育完成后用磷酸盐缓冲液清洗电极表面,晾干;

[0013] (6) 将肽的生物共轭探针滴加到步骤(5)处理好的电极表面,进行孵育,孵育完成后用磷酸盐缓冲液清洗电极表面,晾干,得到检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器。

[0014] 作为优选,所述的步骤(1)中,玻碳电极的处理具体为:将玻碳电极用的 Al_2O_3 抛光粉抛光,然后分别用硝酸溶液、乙醇溶液、超纯水超声清洗。

[0015] 作为优选,所述的步骤(2)金纳米粒子负载聚多巴胺和氮化硼复合物的纳米材料分散液的制备方法具体包括以下步骤:

[0016] S1:在去离子水中加入 HAuCl_4 溶液,在 110°C 条件下加热,然后加入柠檬酸钠溶液,在 110°C 条件下沸腾回流直至溶液变为酒红色,冷却后得到金纳米粒子分散液;

[0017] S2:取4-吡啶基硼酸置于管式炉中,在氮气流的保护下将管式炉加热至 800°C 煅烧得到黑色的氮化硼;

[0018] S3:按照质量份数比为1:2的比例分别称取步骤S2制备好的氮化硼和多巴胺,将两者分散在 $\text{pH}=8.5$ 的Tris盐酸缓冲液中,超声处理;然后在搅拌条件下缓慢加入步骤S1制备好的金纳米粒子分散液,搅拌至溶液变为黑色,经离心处理并洗涤,最终分散在去离子水中得到金纳米粒子负载聚多巴胺和氮化硼复合物的纳米材料分散液。

[0019] 作为优选,所述的步骤(3)中,孵育条件为 4°C 条件下孵育12h。

[0020] 作为优选,所述的步骤(5)中,前列腺特异性抗原溶液的浓度为 $0.00005-10\text{ng/mL}$ 。

[0021] 作为优选,所述的步骤(6)中,肽的生物共轭探针的制备方法具体包括以下步骤:

[0022] N1:在烧瓶中加入1,2,4,5-四(4-甲酰基苯基)苯、对苯二胺,然后再加入体积比为1:1的均三甲苯和环氧己烷的混合溶剂,密封烧瓶并在超声处理,然后加入乙酸溶液,该混合物通过三次冷冻-融化循环脱气后加入氩气密封,并将烧瓶进行油浴,之后冷却过滤,用四氢呋喃和丙酮洗涤之后真空冷冻干燥得到浅黄色的粉末TFPB-COF;

[0023] N2:取步骤N1制备好的TFPB-COF于烧杯中,再加入 HClO_4 溶液,加入去离子水超声混合,然后在 30°C 水浴中将 KMnO_4 加入溶液中,搅拌后再超声处理,最后滤出悬浮液并在 60°C 条件下干燥得到黑色粉末 $\text{MnO}_2@\text{TFPB-COF}$;

[0024] N3:取步骤N2制备好的 $\text{MnO}_2@\text{TFPB-COF}$ 于烧瓶中,加入无水乙醇超声处理,再缓慢加入 HAuCl_4 乙醇溶液和 H_2PtCl_6 乙醇溶液并超声处理,然后在冰浴中加入 NaBH_4 乙醇溶液并超声处理,然后离心处理并用去离子水洗涤,最后重悬于 $\text{pH}=7.0$ 的PBS中得到 $\text{AuPt}@\text{MnO}_2@\text{TFPB-COF}$ 分散液;

[0025] N4:将亚甲基蓝溶液滴加到步骤N3制备好的 $\text{AuPt}@\text{MnO}_2@\text{TFPB-COF}$ 分散液中并搅拌,然后离心处理并用 $\text{pH}=7.0$ 的PBS洗涤,最后分散在 $\text{pH}=7.0$ 的PBS中得到 $\text{MB}@\text{MnO}_2@\text{TFPB-COF}$ 分散液;

[0026] N5:将前列腺特异性抗原亲和肽加入步骤N4制备的 $\text{MB}@\text{MnO}_2@\text{TFPB-COF}$ 分散液中,经搅拌后,离心处理并用 $\text{pH}=7.0$ 的PBS洗涤,得到肽的生物共轭探针。

[0027] 一种检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器的使用方法,包括以下步骤:

[0028] T1:使用电化学工作站,在三电极体系中,以所制备的前列腺特异性抗原的夹心型

电化学免疫传感器为工作电极,铂丝电极为对电极,饱和甘汞电极为参比电极,在 $\text{pH}=7.0$ 的磷酸盐缓冲液中进行测试;

[0029] T2:利用差分脉冲伏安法对目标物进行检测,记录电流峰值;

[0030] T3:记录不同浓度下的前列腺特异性抗原对应的电流峰值;

[0031] T4:利用工作曲线法,得到待测样品中前列腺特异性抗原的浓度。

[0032] 作为优选,所述的步骤T1中,具体是在10mL浓度为 0.1mol/L 的 $\text{pH}=7.0$ 的磷酸盐缓冲液中进行测试。

[0033] 作为优选,所述的步骤T2中,扫描电压为 $-0.1\sim-0.6\text{V}$,脉冲振幅为 0.05V ,脉冲宽度为 0.05s 。

[0034] 与现有技术相比,本发明至少能达到以下有益效果之一:

[0035] 本发明通过在电极表面依次修饰上金纳米粒子负载的具有较好导电性的聚多巴胺和氮化硼复合物(Au@PDA@BCN)和对信号分子亚甲基蓝(MB)具有优良富集作用的金铂纳米粒子修饰的二氧化锰共价有机框架复合材料($\text{AuPt@MnO}_2\text{@TFPB-COF}$);通过两种材料实现对电化学信号的放大效果,所构建的使用肽和抗体的夹心型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器实现了精确定量检测前列腺特异性抗原的目的,具有优越的稳定性和良好的再现性,利用 $\text{AuPt@MnO}_2\text{@TFPB-COF}$ 纳米复合材料来标记肽作为传感器的探针,对客体分子具有较好的富集作用,并且拥有大量的催化活性位点,表现出了优异的催化性能;

[0036] 本发明将常用的抗2换为前列腺特异性抗原的亲性和肽,相比抗体,肽具有更短的生产周期、更低的成本等优点;

[0037] 本发明基底材料 Au@PDA@BCN 具有优越的导电性能及稳定性,能够有效地提高免疫传感器的灵敏度;

[0038] 本发明具有操作简单,成本低,检测迅速,高灵敏度等优点,可以用于实际样品的快速检测;

[0039] 本发明使用了对信号分子具有优良富集作用并且具有较高稳定性的共价有机框架材料来构建电化学信号放大的传感器,能够催化电化学反应从而来提高电信号;

[0040] 本发明使用了导电性优良的 Au@PDA@BCN 纳米复合材料作为使用肽和抗体的夹心型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器的基底材料,对电信号的放大也具有促进作用;

[0041] 本发明把电化学法和免疫法相结合,用来检测前列腺抗原方法。该方法具有较高的灵敏度、较宽的检测范围,较快的检测速度及较低的检测限,较高的选择性和操作方便等优点,有望成为检测标记物的重要方法。

附图说明

[0042] 图1为本发明实施例1TFPB-COF、 $\text{MnO}_2\text{@TFPB-COF}$ 的拉曼光谱图;

[0043] 图2为本发明实施例1TFPB-COF、 $\text{MnO}_2\text{@TFPB-COF}$ 的红外光谱图;

[0044] 图3为本发明实施例1 $\text{MnO}_2\text{@TFPB-COF}$ 和 $\text{AuPt@MnO}_2\text{@TFPB-COF}$ 、 Au@PDA@BCN 的透射电镜图;

[0045] 图4为本发明实施例1不同修饰电极的CV图(A)和阻抗图(B);

[0046] 图5为本发明实施例1不同浓度PSA修饰电极的DPV图(A)和标准曲线(B)。

具体实施方式

[0047] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0048] 实施例1:

[0049] 一种检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器的制备方法:包括以下步骤:

[0050] (1) 金纳米粒子 (AuNPs) 的制备:在50mL去离子水中加入500 μ L浓度为23.46mol/L的HAuCl₄溶液,在110 $^{\circ}$ C条件下加热5min,然后迅速加入5mL浓度为14.55mol/L的新鲜制备的柠檬酸钠溶液,在110 $^{\circ}$ C条件下沸腾回30min直至溶液变为酒红色,冷却至室温后得到金纳米粒子分散液,在4 $^{\circ}$ C下储存备用。

[0051] (2) 氮化硼 (BCN) 的制备:取5g 4-吡啶基硼酸置于管式炉中,在氮气流的保护下将管式炉加热至800 $^{\circ}$ C煅烧3h,得到黑色的粉末氮化硼。

[0052] (3) Au@PDA@BCN分散液的制备:分别称取1mg步骤(2)制备好的氮化硼和2mg多巴胺,并将两者分散在pH=8.5的Tris盐酸缓冲液中,超声30min;然后在搅拌条件下缓慢加入5mL步骤(1)制备好的金纳米粒子分散液,在室温下搅拌5h至溶液变为黑色,以10000rpm离心15min并洗涤三次,最终分散在1mL去离子水中得到2mg/mL的金纳米粒子负载聚多巴胺和氮化硼复合物的纳米材料分散液。

[0053] (4) TFPB-COF的制备:在10mL高压烧瓶中加入25mg1,2,4,5-四(4-甲酰基苯基)苯,10.8mg对苯二胺,然后再加入1.0mL体积比为1:1的均三甲苯和环氧己烷的混合溶剂,密封烧瓶并在室温下超声处理10min,然后加入0.1mL浓度为6M的乙酸溶液,其混合物通过三次冷冻-融化循环脱气后加入氩气密封,并将烧瓶置于120 $^{\circ}$ C油浴三天,之后冷却过滤,用四氢呋喃和丙酮洗涤之后真空冷冻干燥得到浅黄色的粉末TFPB-COF。

[0054] (5) MnO₂@TFPB-COF的制备:取20mg步骤(4)制备好的TFPB-COF于烧杯中,再加入60mg质量分数为70%的HClO₄溶液,加入40mL去离子水超声混合10min,然后在30 $^{\circ}$ C水浴中将30mg KMnO₄加入溶液中,磁力搅拌30min后再超声2h,最后滤出悬浮液并在60 $^{\circ}$ C条件下干燥12h得到黑色粉末MnO₂@TFPB-COF。

[0055] (6) AuPt@MnO₂@TFPB-COF的制备:取2mg步骤(5)制备好的MnO₂@TFPB-COF于烧瓶中,加入1mL无水乙醇超声处理30min,再缓慢地连续加入500 μ L质量分数为1%的HAuCl₄乙醇溶液和500 μ L质量分数为1%的H₂PtCl₆乙醇溶液并超声处理30min,然后在冰浴中加入2mL浓度为1.2mM的NaBH₄乙醇溶液并超声处理1h,然后用8000rpm离心10min并用去离子水洗涤三次,最后重悬于1mL pH=7.0的PBS中得到AuPt@MnO₂@TFPB-COF分散液。

[0056] (7) 将1mL浓度为2.5mg/mL的亚甲基蓝溶液滴加到步骤(6)制备的AuPt@MnO₂@TFPB-COF分散液中,并在常温下搅拌12h,然后10000rpm离心并用PH=7.2的PBS洗涤三次,最后分散在1mL pH=7.0的PBS中得到MB@MnO₂@TFPB-COF分散液;

[0057] (8) 将100 μ L浓度为1.0mg/mL的前列腺特异性抗原亲和肽加入步骤(7)制备的MB@MnO₂@TFPB-COF分散液中,在4 $^{\circ}$ C条件下搅拌12h,然后8000rpm离心15min并用pH=7.0的PBS洗涤三次,得到肽的生物共轭探针。

[0058] (9) 将直径为3-5mm的玻碳电极用0.05mm的Al₂O₃抛光粉抛光,然后分别用质量分数

为50%的硝酸溶液、乙醇溶液、超纯水超声清洗三分钟得到裸玻碳电极GCE,其中乙醇水溶液为无水乙醇和超纯水体积比为1:1的混合液。

[0059] (10) 将10 μ L浓度为2mg/mL的金纳米粒子负载聚多巴胺和氮化硼复合物的纳米材料(Au@PDA@BCN)分散液滴加至步骤(9)中处理好的玻碳电极表面,在室温下晾干,制得GCE/Au@PDA@BCN。

[0060] (11) 将浓度为10 μ g/mL的前列腺特异性抗体(Ab1)滴加到步骤(10)处理好的电极表面,在4 $^{\circ}$ C条件下孵育12h,孵育完成后用pH=7.0的磷酸盐缓冲液清洗电极表面,晾干,制得GCE/Au@PDA@BCN/Ab1。

[0061] (12) 将质量分数为2.5%的牛血清蛋白溶液(BSA)滴加到步骤(11)处理好的电极表面,在室温下孵育45min,孵育完成后用pH=7.0的磷酸盐缓冲液清洗电极表面,晾干,制得GCE/Au@PDA@BCN/Ab1/BSA。

[0062] (13) 将浓度分别为0、0.00005、0.0001、0.0005、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10ng/mL的前列腺特异性抗原溶液(PSA)滴加到步骤(12)处理好的电极表面,在室温下孵育1h,孵育完成后用pH=7.0的磷酸盐缓冲液清洗电极表面,晾干,制得GCE/Au@PDA@BCN/Ab1/BSA/PSA。

[0063] (14) 将10 μ L肽的生物共轭探针滴加到步骤(13)处理好的电极表面,在室温下孵育1h,孵育完成后用pH=7.0的磷酸盐缓冲液清洗电极表面,晾干,得到检测不同浓度的前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器GCE/Au@PDA@BCN/Ab1/BSA/PSA/Pep-bioconjugates。

[0064] 一种检测前列腺特异性抗原的夹心型电化学免疫传感器的使用方法,包括以下步骤:

[0065] (1) 使用电化学工作站,在三电极体系中,以所制备的肽和抗体的夹心型检测前列腺特异性抗原的电化学免疫传感器为工作电极,铂丝电极为对电极,饱和甘汞电极为参比电极,在10mL浓度为0.1mol/L的pH=7.0的磷酸盐缓冲液中进行测试;

[0066] (2) 利用差分脉冲伏安法(DPV)对目标物进行检测,扫描电压为-0.1~-0.6V,脉冲振幅为0.05V,脉冲宽度为0.05s,记录电流峰值;

[0067] (3) 记录不同浓度下的前列腺特异性抗原对应的电流峰值;

[0068] (4) 利用工作曲线法,得到待测样品中前列腺特异性抗原的浓度,结果表明检测范围为0.0005-10ng/mL,检测下限(LOD)达到了17fg/mL(S/N=3)。

[0069] 图1为实施例1中步骤(4)中TFPB-COF及步骤(5)中MnO₂@TFPB-COF的拉曼光谱图;其中1633,1587,1412,1200和659cm⁻¹几个波段可以被分配给C=N基团,苯环芳香族基团(C₆)环的C=C,C的变形振动,C₆环的C-H基团和Mn-O伸缩振动;1318cm⁻¹处的峰代表无序碳或有缺陷的石墨结构的特征,MnO₂@TFPB-COF的峰相比TFPB-COF都发生了一定的位移,说明了MnO₂@TFPB-COF的制备成功。

[0070] 图2为实施例1中步骤(4)中TFPB-COF及步骤(5)中MnO₂@TFPB-COF的红外光谱图;其中1615cm⁻¹处的峰可归因于来自TFPB的醛基和来自PPDA的氨基反应得到的-C=N基团;1500、837cm⁻¹处的峰归因于芳环的拉伸/弯曲振动和芳香族C-H的平面外振动;在MnO₂@TFPB-COF中可观察到约1650cm⁻¹处的新峰,表明TFPB-COF中的C=N键被部分氧化。在负载上MnO₂之后其峰形没有发生太大的变化,也说明了MnO₂@TFPB-COF的制备成功。

[0071] 图3为实例1中 MnO_2 @TFPB-COF、 AuPt@MnO_2 @TFPB-COF、PDA@BCN和 Au@PDA@BCN 的透射电镜图;图中A为 MnO_2 @TFPB-COF;B为 AuPt@MnO_2 @TFPB-COF;C为PDA@BCN;D为 Au@PDA@BCN ;如图3A所示, MnO_2 颗粒均匀的分布在TFPB-COF的表面,这可以防止脱落的多层纳米片的重新堆积;如图3B所示,可以看出 MnO_2 @TFPB-COF的表面附着有AuNPs和PtNPs颗粒,说明 AuPt@MnO_2 @TFPB-COF复合成功;如图3C所示,BCN纳米片的外部均匀地包裹着一层PDA;如图3D所示,在PDA@BCN的表面附着着约有5nm大小的AuNPs,说明 Au@PDA@BCN 复合成功。

[0072] 将实施例1中步骤(9)-步骤(14)中制备的GCE、GCE/ Au@PDA@BCN 、GCE/ $\text{Au@PDA@BCN}/\text{Ab1}$ 、GCE/ $\text{Au@PDA@BCN}/\text{Ab1}/\text{BSA}$ 、GCE/ $\text{Au@PDA@BCN}/\text{Ab1}/\text{BSA}/\text{PSA}$ 和GCE/ $\text{Au@PDA@BCN}/\text{Ab1}/\text{BSA}/\text{PSA}/\text{Pep-bioconjugates}$ 分别进行CV(电位范围0.5~-0.3V)和阻抗(频率范围为 10^{-1} ~ 10^5 Hz)测试,因为可以通过测量修饰电极电流强度和阻抗变化来揭示传感器的电化学反应。图4A所示为CV曲线,图4B所示为阻抗谱图,从图4A中可知,在裸GCE上修饰 Au@PDA@BCN 之后,电信号相应明显改善,因为 Au@PDA@BCN 可促进电子转移,修饰电极分别在Ab1、BSA、PSA溶液中孵育过后,峰值电流依次下降,原因是蛋白质生物大分子会抑制电荷转移,当滴加上肽的生物共轭物后,峰值电流显著增加,其原因可能是由于肽的生物共轭物中 MnO_2 @TFPB-COF的高比表面积可吸收大量的铁氰化钾离子,从而提高电子转移效率;图4B中的阻抗谱图与图4A的CV图是相一致的;半圆直径和电荷转移电阻(R_{ct})密切相关,半圆直径对应电子转移阻力,而直线表示电荷扩散,其结果表明,与裸GCE相比, Au@PDA@BCN 的 R_{ct} 显著降低,这是因为AuNPs能促进电子转移;当修饰电极分别在Ab1、BSA、PSA溶液中孵育时,由于蛋白质生物大分子阻碍电荷转移, R_{ct} 依次增加;当修饰电极与肽的生物共轭物孵育后,由于高比表面积 MnO_2 @COF对铁氰化物离子的吸附能力较强,AuNPs和PtNPs在肽的生物共轭物中的电子转移能力好, R_{ct} 值明显降低。

[0073] 实施例1制备得到的12个电化学免疫传感器进行DPV(电位范围-0.1~-0.5V)测试,如图5A所示,在0.00005-10ng/mL的浓度范围内,随着PSA浓度的增加,电流响应的值也增加,这归因于在更高浓度的PSA溶液下,在电极上固定的肽的生物共轭物也越多,具有越多的MB信号分子;如图5B所示,电流强度(I)与 $\log C_{\text{PSA}}$ 之间有良好的线性关系,根据 3σ 准则,检测下限(LOD)为17fg/mL($S/N=3$);相关系数(R^2)为0.995,基于 AuPt@MnO_2 @COF纳米材料具有较大的孔径和良好的生物相容性,制备的免疫传感器具有更强的分析性能、更低的检出限、更高的灵敏度和更宽的线性范围,有助于免疫传感器捕获更多的信号分子,进一步提高检测灵敏度。

[0074] 在本说明书中所谈到多个解释性实施例,指的是结合该实施例描述的具体方法包括在本申请概括性描述的至少一个实施例中。在说明书中多个地方出现同种表述不是一定指的是同一个实施例。进一步来说,结合任意一实施例描述一个方法时,所要主张的是结合其他实施例来实现这种方法落在本发明的范围内。

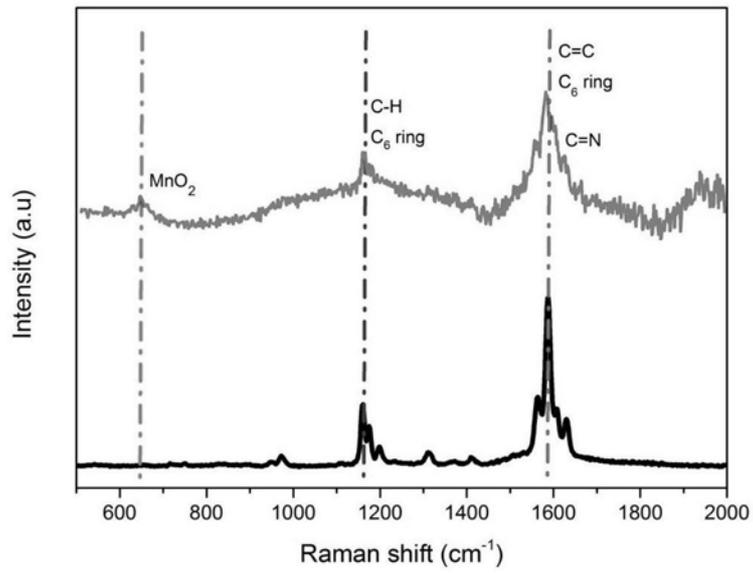


图1

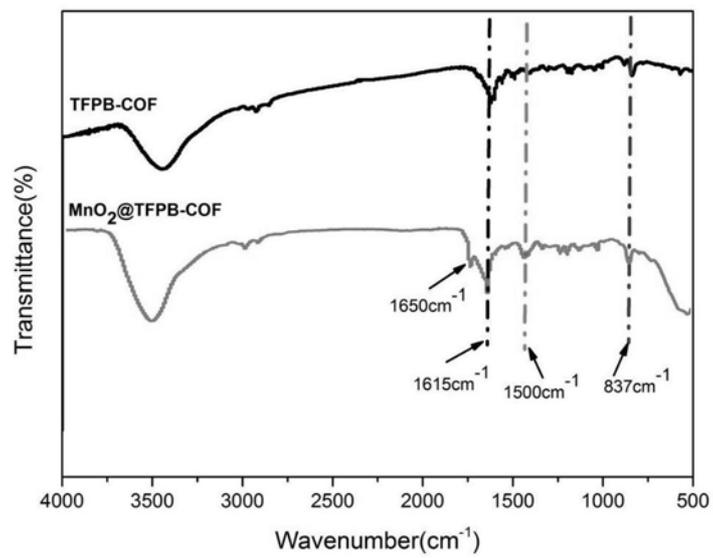


图2

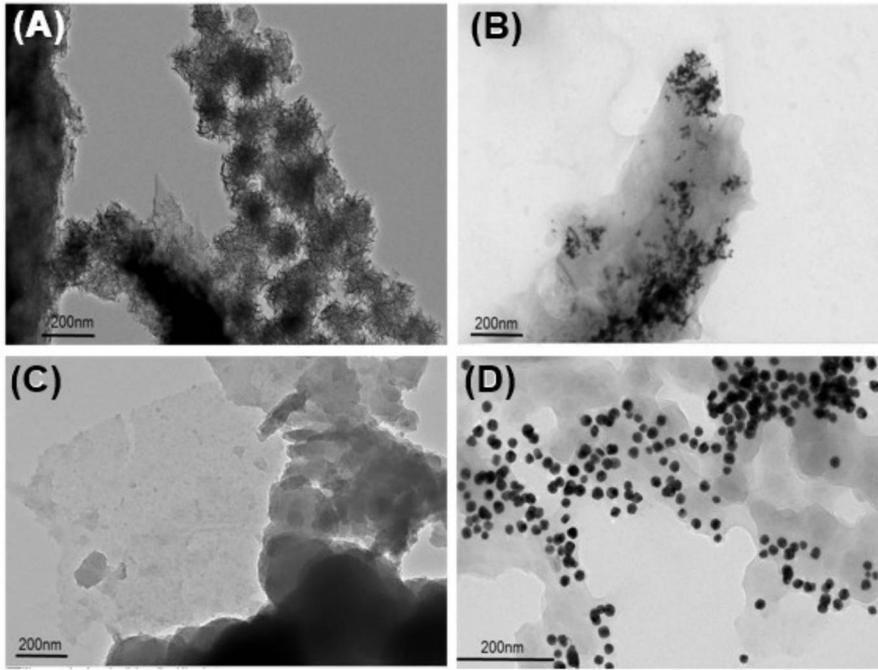


图3

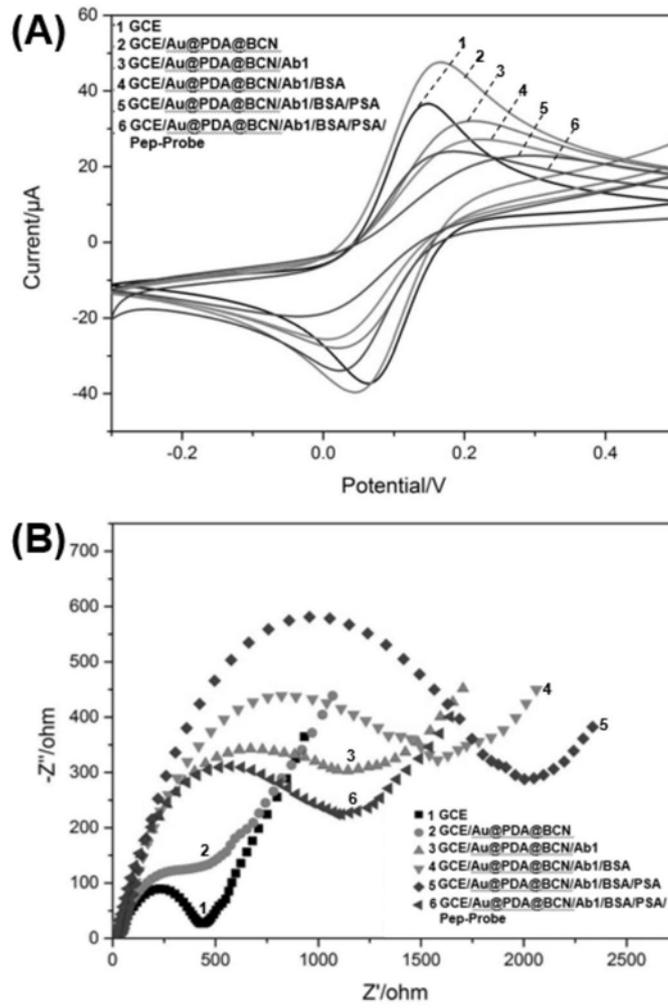


图4

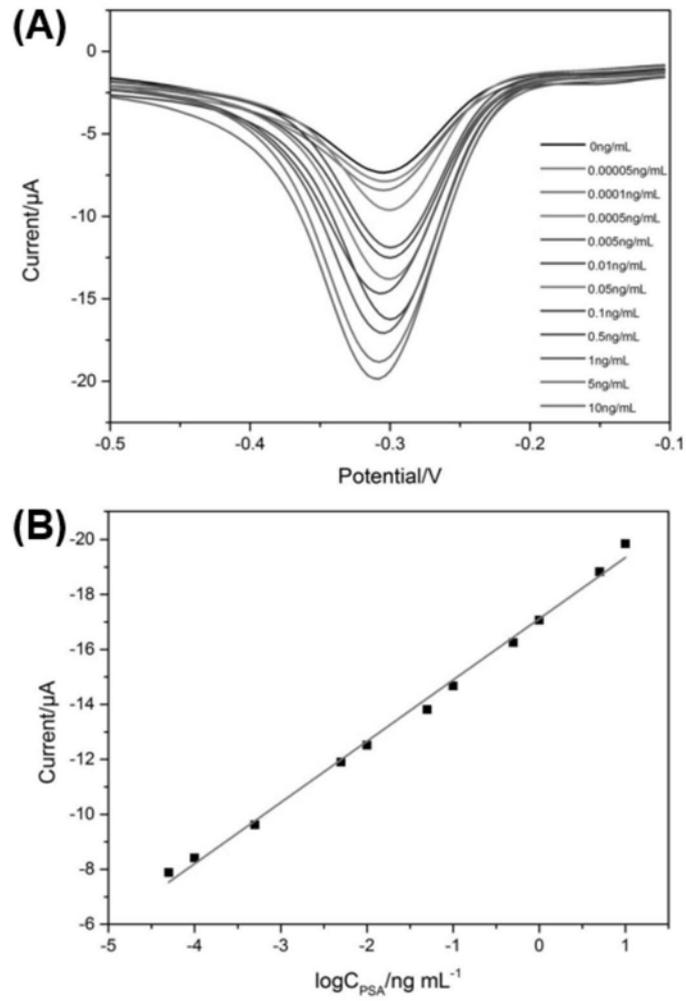


图5