



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105044083 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201510479538. X

(22) 申请日 2015. 08. 03

(71) 申请人 济南大学

地址 250022 山东省济南市南辛庄西路 336
号济南大学科技处

(72) 发明人 郑香丽 周长利 夏方诤 田栋
花小霞

(51) Int. Cl.

G01N 21/76(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

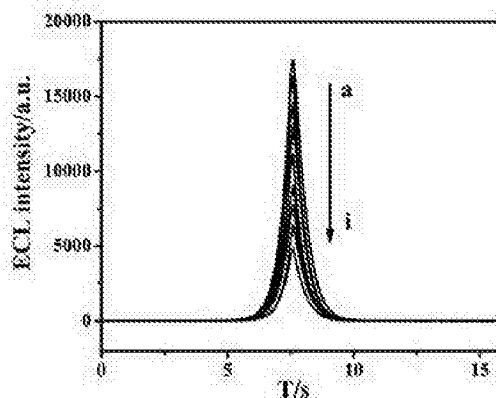
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种基于 Au-g-C₃N₄ 纳米复合材料的甲胎蛋白的电致化学发光免疫传感器的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及电致化学发光免疫传感器技术领域,特别是涉及一种基于 Au-g-C₃N₄ 纳米复合材料的甲胎蛋白的电致化学发光免疫传感器的制备方法及应用。采用滴涂法将 Au-g-C₃N₄ 纳米复合材料修饰到电极表面作为发光材料和抗体捕获基底,金纳米粒子优良的导电性和催化性能可以有效提高传感器的发光信号。基于抗原抗体之间良好的特异性,该传感器用于检测甲胎蛋白,根据对不同浓度的甲胎蛋白的电致化学发光强度的不同,实现对甲胎蛋白的检测。



1. 一种基于 Au-g-C₃N₄ 纳米复合材料的甲胎蛋白的电致化学发光免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 用 1.0 μm、0.3 μm、0.05 μm 的 Al₂O₃ 抛光粉依次打磨直径为 4 mm 的玻璃碳电极 (GCE),分别在乙醇和超纯水中超声清洗 3 min,氮气吹干,取 6~10 μL Au-g-C₃N₄ 纳米复合材料 (Au-g-C₃N₄ NHs) 分散液滴涂到电极表面,室温下晾干成膜,用 PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗以除去未键合的 Au-g-C₃N₄ NHs 得到 Au-g-C₃N₄ NHs/GCE;

(2) 取 50 μL 1~2.5 μg/mL 的甲胎蛋白抗体 (anti-AFP) 标准溶液滴涂到电极表面,在 4 °C 冰箱中孵育 12 h,用 PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗除去物理吸附得到 anti-AFP/Au-g-C₃N₄ NHs/GCE;

(3) 取 50 μL 质量分数为 1~3% 的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液滴涂到电极表面,在 37 °C 下孵育 1 h,以封闭非特异性结合位点,用 PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗电极表面得到 BSA/anti-AFP/Au-g-C₃N₄ NHs/GCE;

(4) 滴加 50 μL 浓度为 0.001~5 ng/mL 的一系列不同浓度的甲胎蛋白抗原标准溶液用于与抗体特异性识别,在 37 °C 下孵育 60 min,用 PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗电极表面,制得一种基于 Au-g-C₃N₄ NHs 的甲胎蛋白的电致化学发光免疫传感器 (AFP/BSA/anti-AFP/Au-g-C₃N₄ NHs/GCE)。

2. 根据权利要求 1 所述的一种基于 Au-g-C₃N₄ NHs 的甲胎蛋白的电致化学发光免疫传感器的制备方法,所述的 Au-g-C₃N₄ NHs 分散液,其特征在于,制作步骤如下:

(1) g-C₃N₄ 纳米片 (g-C₃N₄ NSs) 的制备

称取 10 g 尿素于坩埚中在马弗炉中以 50 °C/min 程序升温至 550 °C,恒温煅烧 2.5 h 得淡黄色粉末 g-C₃N₄;

称取制得的 g-C₃N₄ 100 mg 于锥形瓶中,加入 100 mL 超纯水,然后超声 16 h,所得溶液在 6000 r/s 下离心,除去未分散的 g-C₃N₄,收取上清液,在 60 °C 下旋蒸得到乳白色的 g-C₃N₄ NSs 分散液;

(2) 金纳米溶液 Au 的制备

量取 97 mL 的超纯水于锥形瓶,在搅拌下加入 1 mL 0.01 mol/L 的 HAuCl₄ 和 1 mL 的 0.03 mol/L 柠檬酸二钠,之后逐滴滴加 1 mL 0.047 mol/L 的硼氢化钠至溶液变为亮酒红色,再搅拌 15 min 的金纳米溶液 Au;

(3) Au-g-C₃N₄ NHs 分散液的制备

移取 5 mL 的金纳米溶液 Au 在搅拌条件加入到 5 mL 得 g-C₃N₄ NSs 分散液中,强力搅拌 60 min,离心洗涤后再用 1 mL 超纯水稀释即得 Au-g-C₃N₄ NHs 分散液。

3. 根据权利要求 1 所述的制备方法制备的一种基于 Au-g-C₃N₄ NHs 的甲胎蛋白的电致化学发光免疫传感器,其特征在于,用于 AFP 的检测,检测步骤如下:

(1) 以所制备的免疫传感器为工作电极,Ag/AgCl 电极为参比电极,铂电极为对电极;使用 MPI-B 型多参数化学发光分析测试系统进行测试,将光电倍增管的高压设置为 600 V,扫描区间为 -1.1~0 V,扫描速度为 100 mV/s;

(2) 在含有 0.1 mol/L 过硫酸钾的 10 mL PBS (pH 7.4) 缓冲溶液的电解池中,通过 MPI-B 型多参数化学发光分析测试系统检测 0.001~5 ng/mL 一系列不同浓度 AFP 标准溶液及未特异性结合 AFP 的电极的电致化学发光强度,绘制工作曲线;

(3) 将待测样品溶液代替 AFP 标准溶液进行检测。

一种基于 Au-g-C₃N₄ 纳米复合材料的甲胎蛋白的电致化学发光免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及电致化学发光免疫传感器技术领域,特别是涉及一种基于 Au-g-C₃N₄ 纳米复合材料的甲胎蛋白的电致化学发光免疫传感器的制备方法及应用。具体涉及一种 g-C₃N₄ 纳米片 (g-C₃N₄ NSs) 作为发光材料,以 Au 作为抗体捕获基底同时兼具导电和催化作用的电致化学发光免疫传感器的制备及应用。

背景技术

[0002] 甲胎蛋白 (AFP) 是一种肝癌标志物,在正常人血清中 AFP 的含量不高于 20 μg/L,然而当肝细胞发生癌变时,其在血清中的含量就会急剧增加,因此发展一种简便、快速、高灵敏的检测 AFP 的方法对肝癌的早期诊断和鉴别具有重要意义。

[0003] 目前测定 AFP 的免疫方法有很多,如酶联免疫分析,荧光免疫分析,放射免疫分析等。其中酶联免疫分析和荧光免疫分析成本较高,并且存在试剂盒难以保存的问题,而放射性免疫分析的重现性较差。电致化学发光免疫传感器具有设备简单,操作简便,灵敏度高,选择性好,抗干扰能力强,成本低等优点。因此本发明制备了一种基于 (Au-g-C₃N₄ 纳米复合材料) Au-g-C₃N₄ NHs 的甲胎蛋白的电致化学发光免疫传感器,将免疫学方法与电致化学发光检测方法相结合,通过抗原抗体之间高度的特异性结合实现对 AFP 的检测。

[0004] 本发明利用滴涂法将 Au-g-C₃N₄ NHs 修饰到玻碳电极表面,由于 g-C₃N₄ NSs 良好的成膜性,因此无需对电极及修饰材料进行其他处理。在此,复合物中的 g-C₃N₄ NSs 作为发光材料,Au 作为抗体捕获基底,同时还起到促进电子传递和催化作用有效的增强了电致化学发光强度。该方法在检测过程中产生了良好的电致化学发光强度,可以用于 AFP 的分析。在本发明中构建的电致化学发光免疫传感器具有成本低,稳定性好,制备过程简单,灵敏度高等优点,有效克服了目前 AFP 检测方法的不足。

发明内容

[0005] 本发明的目的之一是以 Au-g-C₃N₄ NHs 为基底材料,构建了一种简单快速,稳定性好,灵敏度高的电致化学发光免疫传感器。

[0006] 本发明的目的之二是将该电致化学发光免疫传感器用于 AFP 的检测。

[0007] 本发明的技术方案为:

1. 一种基于 Au-g-C₃N₄ 纳米复合材料的甲胎蛋白的电致化学发光免疫传感器的制备方法

(1) 用 1.0 μm、0.3 μm、0.05 μm 的 Al₂O₃ 抛光粉依次打磨直径为 4 mm 的玻碳电极 (GCE),分别在乙醇和超纯水中超声清洗 3 min,氮气吹干,取 6~10 μL Au-g-C₃N₄ NHs 分散液滴涂到电极表面,室温下晾干成膜,用 PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗以除去未键合的 Au-g-C₃N₄ NHs 得到 Au-g-C₃N₄ NHs/GCE;

(2) 取 50 μL 1.0~2.5 μg/mL 的甲胎蛋白抗体 (anti-AFP) 标准溶液滴涂到电极表

面,在 4 °C 冰箱中孵育 12 h,用 PBS(pH 7.4) 缓冲溶液冲洗除去物理吸附得到 anti-AFP/Au-g-C₃N₄ NHs/GCE ;

(3) 取 50 μL 质量分数为 1~3% 的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液滴涂到电极表面,在 37 °C 下孵育 1 h,以封闭非特异性结合位点,用 PBS(pH 7.4) 缓冲溶液冲洗电极表面得到 BSA/anti-AFP/Au-g-C₃N₄ NHs/GCE ;

(4) 滴加 50 μL 浓度为 0.001~5 ng/mL 的一系列不同浓度的甲胎蛋白抗原标准溶液用于与抗体特异性识别,在 37 °C 下孵育 60 min,用 PBS(pH 7.4) 缓冲溶液冲洗电极表面,制得一种基于 Au-g-C₃N₄ NHs 的甲胎蛋白的电致化学发光免疫传感器 (AFP/BSA/anti-AFP/Au-g-C₃N₄ NHs/GCE)。

[0008] 2. 上述的 Au-g-C₃N₄ NHs 分散液的制备

(1) g-C₃N₄ NSs 的制备

称取 10 g 尿素于坩埚中在马弗炉中以 50 °C /min 程序升温至 550 °C,恒温煅烧 2.5 h 得淡黄色粉末 g-C₃N₄。称取制得的 g-C₃N₄ 100 mg 于锥形瓶中,加入 100 mL 超纯水,然后超声 16 h,所得溶液在 6000 r/s 下离心,除去未分散的 g-C₃N₄,收取上清液,在 60 °C 下旋蒸得到乳白色的 g-C₃N₄ NSs 分散液 ;

(2) 金纳米溶液 Au 的制备

量取 97 mL 的超纯水于锥形瓶,在搅拌下加入 1 mL 0.01 mol/L 的 H₂AuCl₄和 1 mL 的 0.03 mol/L 柠檬酸二钠,之后逐滴滴加 1 mL 0.047 mol/L 的硼氢化钠至溶液变为亮酒红色,再搅拌 15 min 的金纳米溶液 Au ;

(3) Au-g-C₃N₄ NHs 分散液的制备

移取 5 mL 的金纳米溶液 Au 在搅拌条件加入到 5 mL 得 g-C₃N₄ NSs 分散液中,强力搅拌 60 min,离心洗涤后再用 1 mL 超纯水稀释即得 Au-g-C₃N₄ NHs 分散液。

[0009] 3. AFP 的检测

(1) 以所制备的免疫传感器为工作电极,Ag/AgCl 电极为参比电极,铂电极为对电极 ;使用 MPI-B 型多参数化学发光分析测试系统进行测试,将光电倍增管的高压设置为 600 V,扫描区间为 -1.1~0 V,扫描速度为 100 mV/s ;

(2) 在含有 0.1 mol/L 过硫酸钾的 10 mL PBS(pH 7.4) 缓冲溶液的电解池中,通过 MPI-B 型多参数化学发光分析测试系统检测 0.001~5 ng/mL 一系列不同浓度 AFP 标准溶液及未特异性结合 AFP 的电极的电致化学发光强度,绘制工作曲线 ;

(3) 将待测样品溶液代替 AFP 标准溶液进行检测。

[0010] 本发明的有益成果

(1) 本发明以 g-C₃N₄ NSs 为发光材料,利用其优异的光学性质构建的电致化学发光免疫传感器具有更高的发光信号 ;

(2) 本发明不需要引入任何链接剂,以 Au 作为抗体捕获基底,一方面可以与抗体结合,将抗体固定在电极表面,另一方促进电子传递和催化过硫酸钾产生更多的电子空穴,有效的增强了电致化学发光强度 ;

(3) 本发明所用基底材料 Au-g-C₃N₄ NHs 具有良好的成膜性,无需做特殊处理,极大的简化了电极制备过程 ;

(4) 本发明制备的电致化学发光免疫传感器用于 AFP 的检测,操作简单,线性范围宽,

检出限低,可以实现对 AFP 的简单、快速、高灵敏检测。线性范围为 0.001~5 ng/mL,检出限为 0.0005 ng/mL。

[0011] 附图说明:

图 1 为不同浓度 AFP 的电致化学发光强度图;

图 2 为不同浓度 AFP 的相对电致化学发光强度与 $\lg c$ 的线性拟合图。

[0012] 其中,图 1 中由 a 到 i 的电致化学发光强度图分别代表 AFP 的浓度为 0,0.001,0.005,0.01,0.05,0.1,0.5,1,5 ng/mL。

[0013] 具体实施方式:

为了更好地理解本发明,下面用具体实例来详细说明本发明的技术方案,但是本发明并不局限于此。

[0014] 实施例 1 一种基于 Au-g-C₃N₄ NHs 的甲胎蛋白的电致化学发光免疫传感器的制备方法

(1) 用 1.0 μm 、0.3 μm 、0.05 μm 的 Al₂O₃ 抛光粉依次打磨直径为 4 mm 的 GCE,分别在乙醇和超纯水中超声清洗 3 min,氮气吹干,取 6 μL Au-g-C₃N₄ NHs 分散液滴涂到电极表面,室温下晾干成膜,用 PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗以除去未键合的 Au-g-C₃N₄ NHs 得到 Au-g-C₃N₄ NHs/GCE;

(2) 取 50 μL 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 anti-AFP 标准溶液滴涂到电极表面,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵育 12 h,用 PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗除去物理吸附得到 anti-AFP/Au-g-C₃N₄ NHs/GCE;

(3) 取 50 μL 质量分数为 1% 的 BSA 溶液滴涂到电极表面,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h,以封闭非特异性结合位点,用 PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗电极表面得到 BSA/anti-AFP/Au-g-C₃N₄ NHs/GCE;

(4) 滴加 50 μL 浓度为 0.001~5 ng/mL 的一系列不同浓度的甲胎蛋白抗原标准溶液用于与抗体特异性识别,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 60 min,用 PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗电极表面,制得一种基于 Au-g-C₃N₄ NHs 的 AFP 的电致化学发光免疫传感器 (AFP/BSA/anti-AFP/Au-g-C₃N₄ NHs/GCE)。

[0015] 实施例 2 一种基于 Au-g-C₃N₄ NHs 的甲胎蛋白的电致化学发光免疫传感器的制备方法

(1) 用 1.0 μm 、0.3 μm 、0.05 μm 的 Al₂O₃ 抛光粉依次打磨直径为 4 mm 的 GCE 极,分别在乙醇和超纯水中超声清洗 3 min,氮气吹干,取 8 μL Au-g-C₃N₄ NHs 分散液滴涂到电极表面,室温下晾干成膜,用 PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗以除去未键合的 Au-g-C₃N₄ NHs 得到 Au-g-C₃N₄ NHs/GCE;

(2) 取 50 μL 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 anti-AFP 标准溶液滴涂到电极表面,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵育 12 h,用 PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗除去物理吸附得到 anti-AFP/Au-g-C₃N₄ NHs/GCE;

(3) 取 50 μL 质量分数为 2% 的 BSA 溶液滴涂到电极表面,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h,以封闭非特异性结合位点,用 PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗电极表面得到 BSA/anti-AFP/Au-g-C₃N₄ NHs/GCE;

(4) 滴加 50 μL 浓度为 0.001~5 ng/mL 的一系列不同浓度的甲胎蛋白抗原标准溶液用于与抗体特异性识别,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 50 min,用 PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗电极表面,制得一种基于 Au-g-C₃N₄ NHs 的 AFP 的电致化学发光免疫传感器 (AFP/BSA/anti-AFP/

Au-g-C₃N₄ NHs/GCE)。

[0016] 实施例 3 一种基于 Au-g-C₃N₄ NHs 的甲胎蛋白的电致化学发光免疫传感器的制备方法

(1) 用 1.0 μm、0.3 μm、0.05 μm 的 Al₂O₃ 抛光粉依次打磨直径为 4 mm 的 GCE, 分别在乙醇和超纯水中超声清洗 3 min, 氮气吹干, 取 10 μL Au-g-C₃N₄ NHs 分散液滴涂到电极表面, 室温下晾干成膜, 用 PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗以除去未键合的 Au-g-C₃N₄ NHs 得到 Au-g-C₃N₄ NHs/GCE ;

(2) 取 50 μL 2.5 μg/mL 的 anti-AFP 标准溶液滴涂到电极表面, 在 4 °C 冰箱中孵育 12 h, 用 PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗除去物理吸附得到 anti-AFP/Au-g-C₃N₄ NHs/GCE ;

(3) 取 50 μL 质量分数为 3% 的 BSA 溶液滴涂到电极表面, 在 37 °C 下孵育 1 h, 以封闭非特异性结合位点, 用 PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗电极表面得到 BSA/anti-AFP/Au-g-C₃N₄ NHs/GCE ;

(4) 滴加 50 μL 浓度为 0.001~5 ng/mL 的一系列不同浓度的甲胎蛋白抗原标准溶液用于与抗体特异性识别, 在 37 °C 下孵育 60 min, 用 PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗电极表面, 制得一种基于 Au-g-C₃N₄ NHs 的甲胎蛋白的电致化学发光免疫传感器 (AFP/BSA/anti-AFP/Au-g-C₃N₄ NHs/GCE)。

[0017] 实施例 4 上述 Au-g-C₃N₄ NHs 分散液的制备

(1) g-C₃N₄ NSs 的制备

称取 10 g 尿素于坩埚中在马弗炉中以 50 °C/min 程序升温至 550 °C, 恒温煅烧 2.5 h 得淡黄色粉末 g-C₃N₄。称取制得的 g-C₃N₄ 100 mg 于锥形瓶中, 加入 100 mL 超纯水, 然后超声 16 h, 所得溶液在 6000 r/s 下离心, 除去未分散的 g-C₃N₄, 收取上清液, 在 60 °C 下旋蒸得到乳白色的 g-C₃N₄ NSs 分散液 ;

(2) 金纳米溶液 Au 的制备

量取 97 mL 的超纯水于锥形瓶, 在搅拌下加入 1 mL 0.01 mol/L 的 HAuCl₄ 和 1 mL 的 0.03 mol/L 柠檬酸二钠, 之后逐滴滴加 1 mL 0.047 mol/L 的硼氢化钠至溶液变为亮酒红色, 再搅拌 15 min 的金纳米溶液 Au ;

(3) Au-g-C₃N₄ NHs 分散液的制备

移取 5 mL 的金纳米溶液 Au 在搅拌条件加入到 5 mL 得 g-C₃N₄ NSs 分散液中, 强力搅拌 60 min, 离心洗涤后再用 1 mL 超纯水稀释即得 Au-g-C₃N₄ NHs 分散液。

[0018] 实施例 5 AFP 的检测

(1) 以所制备的免疫传感器为工作电极, Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂电极为对电极 ; 使用 MPI-B 型多参数化学发光分析测试系统进行测试, 将光电倍增管的高压设置为 600 V, 扫描区间为 -1.1~0 V, 扫描速度为 100 mV/s ;

(2) 在含有 0.1 mol/L 过硫酸钾的 10 mL PBS (pH 7.4) 缓冲溶液的电解池中, 通过 MPI-B 型多参数化学发光分析测试系统检测 0.001~5 ng/mL 一系列不同浓度 AFP 标准溶液的电极的电致化学发光强度 (I) 及未特异性结合 AFP 的电极的电致化学发光强度 (I_0), 结果见图 1, 根据所得的电致化学发光强度和 AFP 浓度的关系, 绘制工作曲线 ;

(3) 得到相对电致化学发光强度 $(I_0 - I) / I_0$ 和 AFP 浓度的对数 ($\lg c$) 的线性关系见图 2, 由图 2 可知, AFP 在 0.001~5 ng/mL 的浓度范围内, $(I_0 - I) / I_0$ 与 $\lg c$ 呈现良好的线性相关,

线性方程为 $(I_0 - D) / I_0 = 0.18579 \lg c + 2.29231$, 线性相关系数为 0.9936, 检出限为 0.0005 ng/mL;

(4) 将待测样品溶液代替 AFP 标准溶液进行检测。

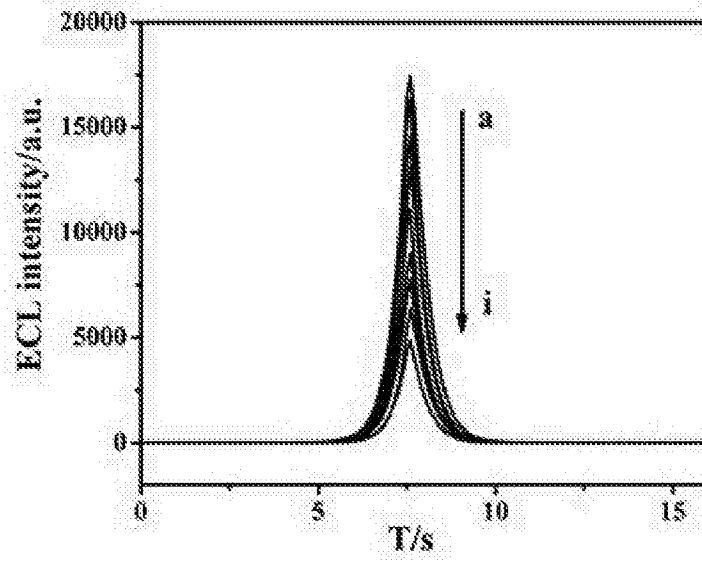


图 1

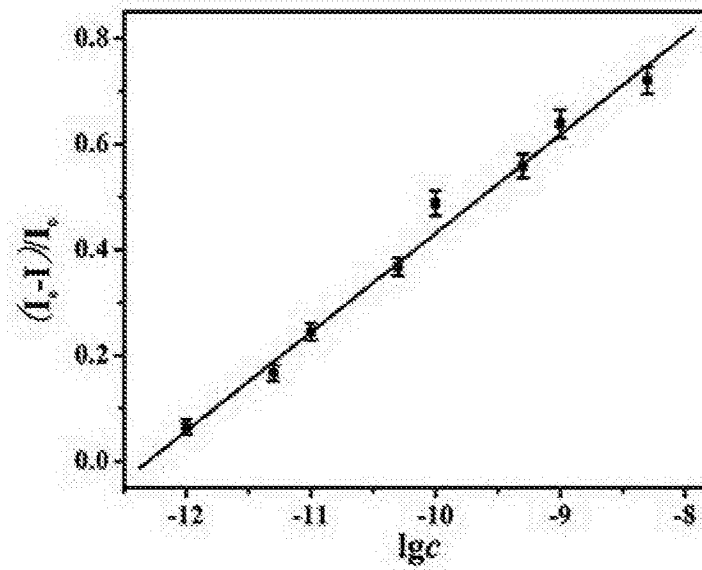


图 2

专利名称(译)	一种基于Au-g-C3N4纳米复合材料的甲胎蛋白的电致化学发光免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN105044083A	公开(公告)日	2015-11-11
申请号	CN201510479538.X	申请日	2015-08-03
[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	郑香丽 周长利 夏方詮 田栋 花小霞		
发明人	郑香丽 周长利 夏方詮 田栋 花小霞		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/68 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及电致化学发光免疫传感器技术领域，特别是涉及一种基于Au-g-C3N4 ？纳米复合材料的甲胎蛋白的电致化学发光免疫传感器的制备方法及应用。采用滴涂法将Au-g-C3N4 ？纳米复合材料修饰到电极表面作为发光材料和抗体捕获基底，金纳米粒子优良的导电性和催化性能可以有效提高传感器的发光信号。基于抗原抗体之间良好的特异性，该传感器用于检测甲胎蛋白，根据对不同浓度的甲胎蛋白的电致化学发光强度的不同，实现对甲胎蛋白的检测。

