



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102778571 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 29

(21) 申请号 201210287253. 2

G01N 27/48 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 08. 13

审查员 舒霏霏

(73) 专利权人 中国人民解放军第三军医大学第
三附属医院

地址 400038 重庆市渝中区大坪长江支路
10 号

(72) 发明人 仲召阳 王东 关伟 梁伟 戴楠
卿毅

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限
公司 11227

代理人 赵青朵 冯琼

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

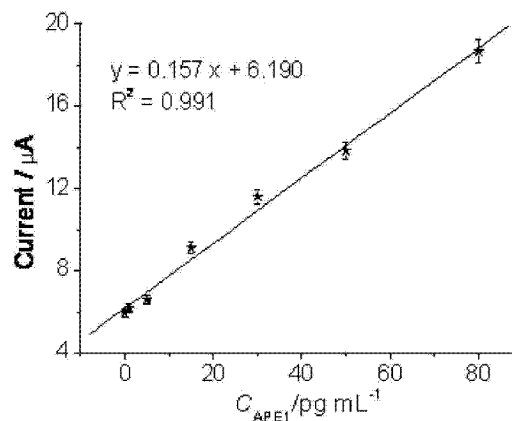
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种离子液体-石墨烯纳米复合物、其制备
方法及电化学免疫检测方法

(57) 摘要

本发明涉及电化学免疫检测领域,特别涉及一种离子液体-石墨烯纳米复合物、其制备方法
及电化学免疫检测方法。该检测方法采用双抗体
夹心法,使固载在电极表面的脱嘌呤脱嘧啶核酸
内切酶/氧化还原因子抗体(anti-APE1)与样品
溶液中的脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因
子(APE1)发生免疫反应,再和室温离子液体-石
墨烯纳米复合物与碱性磷酸酯酶(ALP)及二茂
铁(Fc)标记的 anti-APE1 共耦合物结合。基于
ALP-Fc-anti-APE 与室温离子液体-石墨烯纳米
复合物的电化学活性,测得循环伏安催化电流值
进而检测检测样品中 APE1 的浓度。本发明提供
的电化学免疫检测方法线性响应范围为 0.1-80pg/
mL,检测下限为 0.04pg/mL,特异性好,灵敏度高。



1. 一种离子液体-石墨烯纳米复合物的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤1:取石墨烯用第一阳离子表面活性剂的水溶液分散、超声处理后制得第一阳离子表面活性剂-石墨烯复合物;

步骤2:取所述第一阳离子表面活性剂-石墨烯复合物与第二阳离子表面活性剂的水溶液混合制得石墨烯纳米片;

步骤3:取所述石墨烯纳米片经超声分散后与离子液体混合,即得;

所述第一阳离子表面活性剂选自十六烷基三甲基溴化铵、十二烷基三甲基氯化铵、十二烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基氯化铵或季胺盐型 gemini 表面活性剂 $C_{12}C_6C_{12}Br_2$;

所述第二阳离子表面活性剂选自聚对苯乙烯磺酸钠、聚丙烯酸钠或对甲基苯乙烯磺酸钠。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤3中所述离子液体为1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐。

3. 根据权利要求1或2所述的制备方法制得的离子液体-石墨烯纳米复合物在电化学免疫检测中的应用。

4. 一种电化学免疫检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤1:获得二茂铁标记的待测蛋白抗体;

步骤2:取石墨烯用第一阳离子表面活性剂的水溶液分散、超声处理后制得第一阳离子表面活性剂-石墨烯复合物,再与第二阳离子表面活性剂的水溶液混合制得石墨烯纳米片,经超声分散后与离子液体经第一混合,制得离子液体-石墨烯纳米复合物;

步骤3:取所述二茂铁标记的待测蛋白抗体与所述离子液体-石墨烯纳米复合物经第二混合后,再加入碱性磷酸酯酶经第三混合,制得离子液体-石墨烯纳米复合物-碱性磷酸酯酶及二茂铁标记的待测蛋白抗体共耦合物;

步骤4:将玻碳电极表面修饰处理后置于待测蛋白抗体溶液中充分结合,封闭以去掉非特异性结合位点,制得免疫电极;

步骤5:取所述免疫电极与不同浓度梯度的待测蛋白标准品溶液混合后,与所述离子液体-石墨烯纳米复合物-碱性磷酸酯酶及二茂铁标记的待测蛋白抗体共耦合物混合后制得工作电极;

步骤6:在缓冲溶液中,在底物抗坏血酸磷酸酯盐存在的条件下,取所述工作电极、免疫电极分别与待测蛋白温育,以铂丝电极作为对电极,饱和甘汞电极(SCE)作为参比电极,采用循环伏安法进行电化学检测,以工作电极和免疫电极的响应电流之差和所述待测蛋白标准品溶液的浓度绘制标准曲线;

步骤7:取所述免疫电极与待测蛋白样品溶液温育,采用循环伏安法进行电化学检测,测得待测蛋白样品溶液的电化学峰峰电流强度,与标准曲线比对,获得所述待测蛋白样品溶液的浓度;

所述第一阳离子表面活性剂选自十六烷基三甲基溴化铵、十二烷基三甲基氯化铵、十二烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基氯化铵或季胺盐型 gemini 表面活性剂 $C_{12}C_6C_{12}Br_2$;

所述第二阳离子表面活性剂选自聚对苯乙烯磺酸钠、聚丙烯酸钠或对甲基苯乙烯磺酸

钠；

步骤4中所述表面修饰处理为：取所述玻碳电极抛光成镜面，超声处理晾干后，表面修饰所述离子液体-石墨烯纳米复合物后吸附金纳米链。

5. 根据权利要求4所述的电化学免疫检测方法，其特征在于，步骤6中所述缓冲溶液为 Tris-HCl 缓冲溶液。

6. 根据权利要求4所述的电化学免疫检测方法，其特征在于，步骤6中所述缓冲溶液为 pH 值为 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液。

7. 一种电化学免疫检测脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子的方法，其特征在于，包括如下步骤：

步骤1：获得二茂铁标记的脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子抗体；

步骤2：取石墨烯用第一阳离子表面活性剂的水溶液分散、超声处理后制得第一阳离子表面活性剂-石墨烯复合物，再与第二阳离子表面活性剂的水溶液混合制得石墨烯纳米片，经超声分散后与离子液体经第一混合，制得离子液体-石墨烯纳米复合物；

步骤3：取所述二茂铁标记的脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子抗体与所述离子液体-石墨烯纳米复合物经第二混合后，再加入碱性磷酸酯酶经第三混合，制得离子液体-石墨烯纳米复合物-碱性磷酸酯酶及二茂铁标记的脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子抗体共耦合物；

步骤4：将玻碳电极表面修饰处理后置于脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子抗体溶液中充分结合，封闭以去掉非特异性结合位点，制得免疫电极；

步骤5：取所述免疫电极与不同浓度梯度的脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子标准品溶液混合后，与所述离子液体-石墨烯纳米复合物-碱性磷酸酯酶及二茂铁标记的脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子抗体共耦合物混合后制得工作电极；

步骤6：在缓冲溶液中，在底物抗坏血酸磷酸酯盐存在的条件下，取所述工作电极、免疫电极分别与脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子温育，以铂丝电极作为对电极，饱和甘汞电极 (SCE) 作为参比电极，采用循环伏安法进行电化学检测，以工作电极和免疫电极的响应电流之差和所述脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子标准品溶液的浓度绘制标准曲线；

步骤7：取所述免疫电极与脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子样品溶液温育，采用循环伏安法进行电化学检测，测得脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子样品溶液的电化学峰峰电流强度，与标准曲线比对，获得所述脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子样品溶液的浓度；

所述第一阳离子表面活性剂选自十六烷基三甲基溴化铵、十二烷基三甲基氯化铵、十二烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基氯化铵或季胺盐型 gemini 表面活性剂 $C_{12}C_6C_{12}Br_2$ ；

所述第二阳离子表面活性剂选自聚对苯乙烯磺酸钠、聚丙烯酸钠或对甲基苯乙烯磺酸钠。

一种离子液体-石墨烯纳米复合物、其制备方法及电化学 免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及电化学免疫检测领域,特别涉及一种离子液体-石墨烯纳米复合物、其制备方法及电化学免疫检测方法。

背景技术

[0002] 骨肉瘤是一种常见于儿童和青少年的恶性骨肿瘤,化疗是目前提高骨肉瘤患者生存率的主要手段,然而目前仍有 10%~25% 的骨肉瘤患者对现行化疗方案反应差,根本原因是肿瘤细胞对化疗药物有抗药性。脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子抗体(anti-APE1)是生物大分子中极具结构和功能特点的典范分子,它由 DNA 修复和氧化还原两个相对独立的功能区构成,是 DNA 碱基切除修复(base excision repair, BER)途径的关键限速酶,不但能修复辐射、烷化和氧化引起的 DNA 损伤,而且能通过氧化还原机制调节多种转录因子(如 NF- κ B, AP-1, Egr-1, p53, 及 HIF-1 α 等)的 DNA 结合活性及下游靶基因的表达,参与氧化应激、细胞周期调控及凋亡等多种关键的细胞反应。目前多种证据提示 APE1 蛋白的不正常表达与代谢异常、分化性疾病、肿瘤等病理过程密切相关,而 APE1 表达水平及其分布失调则与肿瘤放化疗抵抗、肿瘤诊断和预后息息相关。目前 APE1 的检测方法多为免疫组化方法、血清学方法。但是免疫组化方法对检验仪器要求较高,只能定性检测 APE1,无法对 APE1 的含量进行准确测定,血清学方法准确性、特异性不高。

[0003] 电化学免疫分析法(Electrochemical Immunoassay, ECIA)是将免疫技术与电化学检测结合的一种免疫分析新方法,基于抗原和抗体的特异性反应,将一些既易测定又具有高度敏感性的物质标记到特异性抗原或抗体分子上,通过这些标记物的增强放大效应来显示反应系统中抗原或抗体的性质与含量。电化学免疫分析的标记物主要有两类:生物酶及电化学活性物质。用作标记物的电化学活性物质为具有电化学氧化还原性质的金属离子和电活性的有机功能基团。

[0004] 纳米材料是指在三维空间中至少有一维处于纳米尺度范围(1~100nm)或由它们作为基本单元构成的材料,这大约相当于 10~100 个原子紧密排列在一起的尺度。由于纳米材料具有的高比表面积、高活性、特殊物理性质及小尺寸,使得纳米材料从一个惰性体转变为一个活泼的能提供电子和获取电子的物体,将其引入传感器的构建中可明显增强传感器的响应速度、灵敏度、选择性等。

[0005] 因此,提供一种灵敏度高、特异性好的基于复合纳米颗粒的电化学免疫检测方法用来检测脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子抗体(anti-APE1),对癌症的早期诊断、病情监测、判断预后及其制定合理的治疗方案和评估疗效具有重要意义。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明提供一种离子液体-石墨烯纳米复合物、其制备方法及电化学免疫检测方法。该电化学免疫检测方法线性响应范围为 0.1-80pg/mL,检测下限为 0.04pg/

mL, 特异性好, 灵敏度高。

[0007] 为了实现上述发明目的, 本发明提供以下技术方案:

[0008] 本发明提供了一种离子液体-石墨烯纳米复合物的制备方法, 包括如下步骤:

[0009] 步骤 1: 取石墨烯用第一阳离子表面活性剂的水溶液分散、超声处理后制得第一阳离子表面活性剂-石墨烯复合物;

[0010] 步骤 2: 取所述第一阳离子表面活性剂-石墨烯复合物与第二阳离子表面活性剂的水溶液混合制得石墨烯纳米片;

[0011] 步骤 3: 取所述石墨烯纳米片经超声分散后与离子液体混合, 即得。

[0012] 所述第一阳离子表面活性剂选自十六烷基三甲基溴化铵、十二烷基三甲基氯化铵、十二烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基氯化铵或季胺盐型 gemini 表面活性剂 $C_{12}C_6C_{12}Br_2$;

[0013] 所述第二阳离子表面活性剂选自聚对苯乙烯磺酸钠、聚丙烯酸钠或对甲基苯乙烯磺酸钠。

[0014] 作为优选, 步骤 3 中离子液体为 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐。

[0015] 本发明还提供了上述制备方法制得的离子液体-石墨烯纳米复合物在电化学免疫检测中的应用。

[0016] 本发明提供了一种电化学免疫检测方法, 包括如下步骤:

[0017] 步骤 1: 获得二茂铁标记的待测蛋白抗体;

[0018] 步骤 2: 取石墨烯用第一阳离子表面活性剂的水溶液分散、超声处理后制得第一阳离子表面活性剂-石墨烯复合物, 再与第二阳离子表面活性剂的水溶液混合制得石墨烯纳米片, 经超声分散后与离子液体经第一混合, 制得离子液体-石墨烯纳米复合物;

[0019] 步骤 3: 取所述二茂铁标记的待测蛋白抗体与所述离子液体-石墨烯纳米复合物经第二混合后, 再加入碱性磷酸酯酶经第三混合, 制得离子液体-石墨烯纳米复合物-碱性磷酸酯酶及二茂铁标记的待测蛋白抗体共耦合物;

[0020] 步骤 4: 将玻碳电极表面修饰处理置于待测蛋白抗体溶液中充分结合, 封闭以去掉非特异性结合位点, 制得免疫电极;

[0021] 步骤 5: 取所述免疫电极与不同浓度梯度的待测蛋白标准品溶液混合后, 与所述离子液体-石墨烯纳米复合物-碱性磷酸酯酶及二茂铁标记的待测蛋白抗体共耦合物混合后制得工作电极;

[0022] 步骤 6: 在缓冲溶液中, 在底物抗坏血酸磷酸酯盐存在的条件下, 取所述工作电极、免疫电极分别与待测蛋白温育, 以铂丝电极作为对电极, 饱和甘汞电极 (SCE) 作为参比电极, 采用循环伏安法进行电化学检测, 以工作电极和免疫电极的响应电流之差和所述待测蛋白标准品溶液的浓度绘制标准曲线;

[0023] 步骤 7: 取所述免疫电极与待测蛋白样品溶液温育, 采用循环伏安法进行电化学检测, 测得待测蛋白样品溶液的电化学峰峰电流强度, 与标准曲线比对, 获得所述待测蛋白样品溶液的浓度;

[0024] 所述第一阳离子表面活性剂选自十六烷基三甲基溴化铵、十二烷基三甲基氯化铵、十二烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基氯化铵或季胺盐型 gemini 表面活性剂 $C_{12}C_6C_{12}Br_2$;

[0025] 所述第二阳离子表面活性剂选自聚对苯乙烯磺酸钠、聚丙烯酸钠或对甲基苯乙烯磺酸钠。作为优选,步骤4中预处理为取所述玻碳电极抛光成镜面,超声处理晾干后,表面修饰所述离子液体-石墨烯纳米复合物后吸附金纳米链。

[0026] 作为优选,步骤6中缓冲溶液为 Tris-HCl 缓冲溶液。

[0027] 作为优选,步骤6中缓冲溶液为 pH 值为 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液。

[0028] 本发明还提供了一种电化学免疫检测脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子的方法,包括如下步骤:

[0029] 步骤1:获得二茂铁标记的脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子抗体;

[0030] 步骤2:取石墨烯用第一阳离子表面活性剂的水溶液分散、超声处理后制得第一阳离子表面活性剂-石墨烯复合物,再与第二阳离子表面活性剂的水溶液混合制得石墨烯纳米片,经超声分散后与离子液体经第一混合,制得离子液体-石墨烯纳米复合物;

[0031] 步骤3:取所述二茂铁标记的脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子抗体与所述离子液体-石墨烯纳米复合物经第二混合后,再加入碱性磷酸酯酶经第三混合,制得离子液体-石墨烯纳米复合物-碱性磷酸酯酶及二茂铁标记的脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子抗体共耦合物;

[0032] 步骤4:将玻碳电极表面修饰处理后置于脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子抗体溶液中充分结合,封闭以去掉非特异性结合位点,制得免疫电极;

[0033] 步骤5:取所述免疫电极与不同浓度梯度的脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子标准品溶液混合后,与所述离子液体-石墨烯纳米复合物-碱性磷酸酯酶及二茂铁标记的脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子抗体共耦合物混合后制得工作电极;

[0034] 步骤6:在缓冲溶液中,在底物抗坏血酸磷酸酯盐存在的条件下,取所述工作电极、免疫电极分别与脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子温育,以铂丝电极作为对电极,饱和甘汞电极(SCE)作为参比电极,采用循环伏安法进行电化学检测,以工作电极和免疫电极的响应电流之差和所述脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子标准品溶液的浓度绘制标准曲线;

[0035] 步骤7:取所述免疫电极与脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子样品溶液温育,采用循环伏安法进行电化学检测,测得脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子样品溶液的电化学峰峰电流强度,与标准曲线比对,获得所述脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子样品溶液的浓度;

[0036] 所述第一阳离子表面活性剂选自十六烷基三甲基溴化铵、十二烷基三甲基氯化铵、十二烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基氯化铵或季胺盐型 gemini 表面活性剂 $C_{12}C_6C_{12}Br_2$;

[0037] 所述第二阳离子表面活性剂选自聚对苯乙烯磺酸钠、聚丙烯酸钠或对甲基苯乙烯磺酸钠。在本发明提供的实施例中,一种电化学免疫检测脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子的方法,包括如下步骤:

[0038] 室温离子液体-石墨烯纳米复合物与碱性磷酸酯酶(ALP)及二茂铁(Fe)标记的 anti-APE1 共耦合物的制备:

[0039] 将 5mg 石墨烯纳米片用 5mL 1wt% 的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB, cetyltrimethylammonium bromide)溶液均匀分散,超声处理制得 CTAB-石墨烯复合物;将

所述 1mL CTAB- 石墨烯复合物 (1mg/mL) 加入到 0.5mL, 5wt% 的聚对苯乙烯磺酸钠 (PSS, Polysodium4-styrenesulfonate) 溶液中, 制得表面带负电荷的石墨烯纳米片; 将所述表面带负电荷的石墨烯纳米片超声分散, 并与 0.5mL 1mM 的离子液体 [bmim]BF₄ 混合, 逐制得室温离子液体-石墨烯纳米复合物。

[0040] 将 100 μ L Fc 标记的 anti-APE1 抗体蛋白与 0.5mL 室温离子液体-石墨烯纳米复合物在 4℃ 下搅拌混合 4 小时, 然后再将 100 μ L, 10mg/mL ALP 加入到上述混合溶液中并在 4℃ 下搅拌混合 4 小时。制得室温离子液体-石墨烯纳米复合物与碱性磷酸酯酶 (ALP) 及二茂铁 (Fc) 标记的 anti-APE1 共耦合物, 所得产物保存于 4℃。

[0041] 免疫电极的制备:

[0042] 玻碳电极 ($\Phi = 4\text{mm}$) 依次经 1.0, 0.3 和 0.05 μm 的 Al₂O₃ 糊抛光后用蒸馏水冲洗干净, 再分别在蒸馏水、丙酮、蒸馏水中超声洗涤, 清洗后的电极置于室温下晾干, 备用。将 10 μ L 1- 丁基-3- 甲基咪唑四氟硼酸盐分散石墨烯纳米复合物 (1mg/mL) 滴加到电极表面并在室温下晾干, 然后将该电极浸入金纳米链溶胶中自组装 8 小时。清洗后将修饰电极置于 anti-APE1 抗体溶液中, 于 4℃ 的冰箱中浸泡吸附 8h, 得到免疫电极。最后将免疫电极置于 0.25% BSA 溶液中在 37℃ 条件下温育 1h, 取出, 水洗, 于室温下放置晾干, 置于 4℃ 的冰箱中保存待用。

[0043] 本发明提供一种离子液体-石墨烯纳米复合物、其制备方法及电化学免疫检测方法。该检测方法采用双抗体夹心法, 使固载在电极表面的脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶 / 氧化还原因子抗体 (anti-APE1) 与样品溶液中的脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶 / 氧化还原因子 (APE1) 发生免疫反应, 再和室温离子液体-石墨烯纳米复合物与碱性磷酸酯酶 (ALP) 及二茂铁 (Fc) 标记的 anti-APE1 共耦合物结合。基于 ALP-Fc-anti-APE 与室温离子液体-石墨烯纳米复合物的电化学活性, 测得循环伏安催化电流值进而检测检测样品中 APE1 的浓度。本发明提供的电化学免疫检测方法线性响应范围为 0.1-80pg/mL, 检测下限为 0.04pg/mL, 特异性好, 灵敏度高, 对待测蛋白尤其是 APE1 的测定具有重要意义。

附图说明

[0044] 图 1 示实施例 1 中本发明提供的电化学免疫检测方法测得的响应电流值与 APE1 浓度的标准曲线; 其中, 横坐标为 APE1 浓度, 纵坐标为电流值; 线性方程为 $y = 0.157x + 6.190$, $R^2 = 0.991$;

[0045] 图 2 示本发明提供的电化学免疫检测法与 CLIA 法对同一人体血清样品的测定结果比较图; 其中, 横坐标为本发明提供的电化学免疫检测方法测得的电流值对应的 APE1 的浓度, 纵坐标为 CLIA 法对应的 APE1 的浓度; 线性方程为 $y = 0.977x + 1.198$, $R^2 = 0.998$ 。

具体实施方式

[0046] 本发明公开了一种离子液体-石墨烯纳米复合物、其制备方法及电化学免疫检测方法, 本领域技术人员可以借鉴本文内容, 适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是, 所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的, 它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述, 相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合, 来实现和应用本

发明技术。

[0047] 本发明提供的一种离子液体-石墨烯纳米复合物、其制备方法及电化学免疫检测方法中所用原料均可由市场购得。

[0048] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0049] 实施例 1 离子液体-石墨烯纳米复合物的制备

[0050] 将 5mg 石墨烯用 5mL1wt% 的十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB, cetyltrimethylammonium bromide) 溶液均匀分散,超声处理制得 CTAB-石墨烯复合物;将所述 1mL CTAB-石墨烯复合物 (1mg/mL) 加入到 0.5mL,5wt% 的聚对苯乙烯磺酸钠 (PSS, Polysodium4-styrenesulfonate) 溶液中,制得表面带负电荷的石墨烯纳米片;将所述表面带负电荷的石墨烯纳米片超声分散,并与 0.5mL1mM 的离子液体 [bmim]BF₄ 混合,制得室温离子液体-石墨烯纳米复合物。

[0051] 实施例 2 离子液体-石墨烯纳米复合物的制备

[0052] 将 5mg 石墨烯用 5mL1wt% 的十二烷基三甲基氯化铵溶液均匀分散,超声处理制得 CTAB-石墨烯复合物;将所述 1mL CTAB-石墨烯复合物 (1mg/mL) 加入到 0.5mL,5wt% 的聚丙烯酸钠溶液中,制得表面带负电荷的石墨烯纳米片;将所述表面带负电荷的石墨烯纳米片超声分散,并与 0.5mL1mM 的离子液体 [bmim]BF₄ 混合,制得室温离子液体-石墨烯纳米复合物。

[0053] 实施例 3 离子液体-石墨烯纳米复合物的制备

[0054] 将 5mg 石墨烯用 5mL1wt% 的十二烷基三甲基溴化铵溶液均匀分散,超声处理制得 CTAB-石墨烯复合物;将所述 1mL CTAB-石墨烯复合物 (1mg/mL) 加入到 0.5mL,5wt% 的对甲基苯乙烯磺酸钠溶液中,制得表面带负电荷的石墨烯纳米片;将所述表面带负电荷的石墨烯纳米片超声分散,并与 0.5mL1mM 的离子液体 [bmim]BF₄ 混合,制得室温离子液体-石墨烯纳米复合物。

[0055] 实施例 4 离子液体-石墨烯纳米复合物的制备

[0056] 将 5mg 石墨烯用 5mL1wt% 的十六烷基三甲基氯化铵溶液均匀分散,超声处理制得 CTAB-石墨烯复合物;将所述 1mL CTAB-石墨烯复合物 (1mg/mL) 加入到 0.25mL,10wt% 的聚对苯乙烯磺酸钠 (PSS, Polysodium4-styrenesulfonate) 溶液中,制得表面带负电荷的石墨烯纳米片;将所述表面带负电荷的石墨烯纳米片超声分散,并与 0.5mL1mM 的离子液体 [bmim]BF₄ 混合,制得室温离子液体-石墨烯纳米复合物。

[0057] 实施例 5 离子液体-石墨烯纳米复合物的制备

[0058] 将 5mg 石墨烯用 5mL1wt% 的季胺盐型 gemini 表面活性剂 C₁₂C₆C₁₂Br₂ 溶液均匀分散,超声处理制得 CTAB-石墨烯复合物;将所述 1mLCTAB-石墨烯复合物 (1mg/mL) 加入到 0.5mL,5wt% 的聚丙烯酸钠溶液中,制得表面带负电荷的石墨烯纳米片;将所述表面带负电荷的石墨烯纳米片超声分散,并与 0.5mL1mM 的离子液体 [bmim]BF₄ 混合,制得室温离子液体-石墨烯纳米复合物。

[0059] 实施例 6 采用本发明提供的电化学免疫检测法对 APE1 的标准溶液进行检测

[0060] 取本发明实施例 1 至 5 提供的离子液体-石墨烯纳米复合物。

[0061] 将 100 μ L Fc 标记的 anti-APE1 抗体蛋白与 0.5mL 本发明实施例 1 提供的离子液体-石墨烯纳米复合物在 4℃ 下搅拌混合 4 小时,然后再将 100 μ L,10mg/mL ALP 加入到上

述混合溶液中并在 4℃ 下搅拌混合 4 小时。制得室温离子液体-石墨烯纳米复合物与碱性磷酸酯酶 (ALP) 及二茂铁 (Fc) 标记的 anti-APE1 共耦合物, 所得产物保存于 4℃。

[0062] 免疫电极的制备:

[0063] 玻碳电极 ($\Phi = 4\text{mm}$) 依次经 1.0, 0.3 和 0.05 μm 的 Al_2O_3 糊抛光后用蒸馏水冲洗干净, 再分别在蒸馏水、丙酮、蒸馏水中超声洗涤, 清洗后的电极置于室温下晾干, 备用。将 10 μL 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐分散石墨烯纳米复合物 (1mg/mL) 滴加到电极表面并在室温下晾干, 然后将该电极浸入金纳米链溶胶中自组装 8 小时。清洗后将修饰电极置于 anti-APE1 抗体溶液中, 于 4℃ 的冰箱中浸泡吸附 8h, 得到免疫电极。最后将免疫电极置于 0.25% BSA 溶液中在 37℃ 条件下温育 1h, 取出, 水洗, 于室温下放置晾干, 置于 4℃ 的冰箱中保存待用。

[0064] 将制备好的免疫电极分别与 80-120 μL 不同浓度的 APE1 标准溶液, 于 37℃ 反应 30min。反应完成后用 PBS 冲洗去掉未结合的蛋白样品。

[0065] 将与 NSE 标准溶液反应后的电极置于 80-120 μL 室温离子液体-石墨烯纳米复合物与碱性磷酸酯酶 (ALP) 及二茂铁 (Fc) 标记的 anti-APE1 共耦合物溶液中, 在 37℃ 下反应 30min。用 PBS 溶液洗 3 次, 以除去非特异性吸附的共耦合物。

[0066] 电化学检测采用三电极体系, 免疫电极为工作电极, 铂丝电极作为对电极, 饱和甘汞电极 (SCE) 作为参比电极。在含有 5mM AA-P 的 0.1mol/L Tris-HCl (pH = 8.5) 缓冲溶液中进行, 采用循环伏安电化学对免疫电极进行三次循环伏安扫描, 并记录下三次扫描得到的氧化峰电流值。电位扫描速度为 50mV/s, 扫描范围为 -0.2 ~ 0.6V (vs. SCE)。

[0067] 免疫传感器电流响应信号的检测基于夹心反应模式, 固载在电极表面的抗体分子与样品溶液中的抗原分子发生免疫反应后, 再与室温离子液体-石墨烯纳米复合物与碱性磷酸酯酶 (ALP) 及二茂铁 (Fc) 标记的 anti-APE1 共耦合物结合。基于室温离子液体-石墨烯纳米复合物与碱性磷酸酯酶 (ALP) 及二茂铁 (Fc) 标记的 anti-APE1 共耦合物的电化学特性, 测得的循环伏安氧化峰峰电流值随抗原浓度的增加而增强, 其变化与结合的抗原蛋白的浓度的对数成正比例关系。将三次循环伏安扫描得到的还原峰电流绝对值求平均值, 与 APE1 标准溶液的浓度作图, 图 1 为标准曲线, 其线性响应范围为 0.1-80pg/mL。

[0068] 结果表明, 本发明提供的检测方法获得的还原峰电流值与 APE1 标准溶液的浓度具有很好的相关性, 线性方程为 $y = 0.157x + 6.190$, $R^2 = 0.991$ 。

[0069] 采用本发明实施例 2 至 5 提供的离子液体-石墨烯纳米复合物, 按照上述方法对 APE1 的标准溶液进行检测, 结果同上, 三次循环伏安扫描得到的还原峰电流绝对值求平均值, 与 APE1 标准溶液的浓度具有很好的相关性。

[0070] 实施例 7 人体血清样品的检测

[0071] 为了进一步研究该免疫传感器的临床实用价值, 使用本发明提供的电化学免疫检测方法对人体血清样品进行检测, 其结果和标准的 CLIA 方法检测的结果进行对照。

[0072] 取本发明实施例 1 至 5 提供的离子液体-石墨烯纳米复合物。

[0073] 将 100 μL Fc 标记的 anti-APE1 抗体蛋白与 0.5mL 实施例 1 提供的离子液体-石墨烯纳米复合物在 4℃ 下搅拌混合 4 小时, 然后再将 100 μL , 10mg/mL ALP 加入到上述混合溶液中并在 4℃ 下搅拌混合 4 小时。制得室温离子液体-石墨烯纳米复合物与碱性磷酸酯酶 (ALP) 及二茂铁 (Fc) 标记的 anti-APE1 共耦合物, 所得产物保存于 4℃。

[0074] 免疫电极的制备：

[0075] 玻碳电极 ($\Phi = 4\text{mm}$) 依次经 1.0, 0.3 和 0.05 μm 的 Al_2O_3 糊抛光后用蒸馏水冲洗干净, 再分别在蒸馏水、丙酮、蒸馏水中超声洗涤, 清洗后的电极置于室温下晾干, 备用。将 10 μL 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐分散石墨烯纳米复合物 (1mg/mL) 滴加到电极表面并在室温下晾干, 然后将该电极浸入金纳米链溶胶中自组装 8 小时。清洗后将修饰电极置于 anti-APE1 抗体溶液中, 于 4℃ 的冰箱中浸泡吸附 8h, 得到免疫电极。最后将免疫电极置于 0.25% BSA 溶液中在 37℃ 条件下温育 1h, 取出, 水洗, 于室温下放置晾干, 置于 4℃ 的冰箱中保存待用。

[0076] 将制备好的免疫电极分别与 80-120 μL 血清样品溶液, 于 37℃ 反应 30min。反应完成后用 PBS 冲洗去掉未结合的蛋白样品。

[0077] 将与样品溶液反应后的电极置于 80-120 μL 室温离子液体-石墨烯纳米复合物与碱性磷酸酯酶 (ALP) 及二茂铁 (Fc) 标记的 anti-APE1 共耦合物溶液中, 在 37℃ 下反应 30min。用 PBS 溶液洗 3 次, 以除去非特异性吸附的共耦合物。

[0078] 电化学检测采用三电极体系, 免疫电极为工作电极, 铂丝电极作为对电极, 饱和甘汞电极 (SCE) 作为参比电极。在含有 5mM AA-P 的 0.1mol/L Tris-HCl (pH = 8.5) 缓冲溶液中进行, 采用循环伏安电化学对免疫电极进行三次循环伏安扫描, 并记录下三次扫描得到的氧化峰电流值。电位扫描速度为 50mV/s, 扫描范围为 -0.2 ~ 0.6V (vs. SCE)。

[0079] 将三次循环伏安扫描得到的还原峰电流绝对值求平均值, 对照 APE1 标准曲线 (图 1) 得到测得的每个样品的 APE1 含量。采用标准的 CLIA 方法对同一血清样品进行检测, 得到 APE1 的浓度。将两种方法测得的结果进行比较, 具体结果见图 2。

[0080] 结果表明, 本发明提供的电化学免疫检测方法与 CLIA 检测方法, 两种检测方法的相关性良好, 线性方程为 $y = 0.977x + 1.198$, $R^2 = 0.998$ 。

[0081] 采用本发明实施例 2 至 5 提供的离子液体-石墨烯纳米复合物, 按照上述方法对同一血清样品进行检测, 结果同上, 见表 1。

[0082] 表 1 本发明提供的电化学免疫检测方法与 CLIA 检测结果比较

[0083]

血清样品编号	电化学免疫 (pg/mL)	CLIA 方法 (pg/mL)
1	-1.0	0.2
2	3.2	4.4
3	7.5	8.5
4	11.7	12.6
5	15.9	16.7
6	20.1	20.9
7	24.3	25.0

8	28.6	29.1
9	32.8	33.2
10	37.0	37.3
11	41.2	41.5
12	45.4	45.6
13	49.6	49.7
14	53.9	53.8
15	58.1	57.9
16	62.3	62.1
17	66.5	66.2
18	70.7	70.3
19	75.0	74.4
20	79.2	78.6

[0084] 结果表明,本发明提供的电化学免疫检测方法与 CLIA 法检测结果具有很好的相关性。

[0085] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

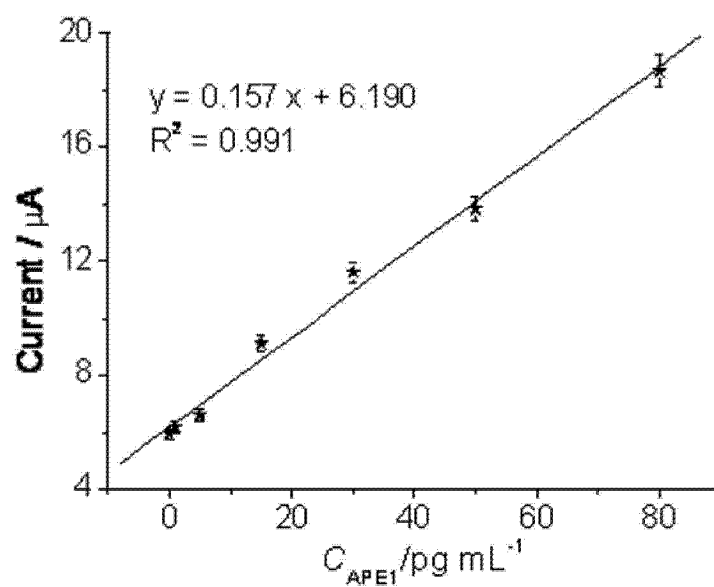


图 1

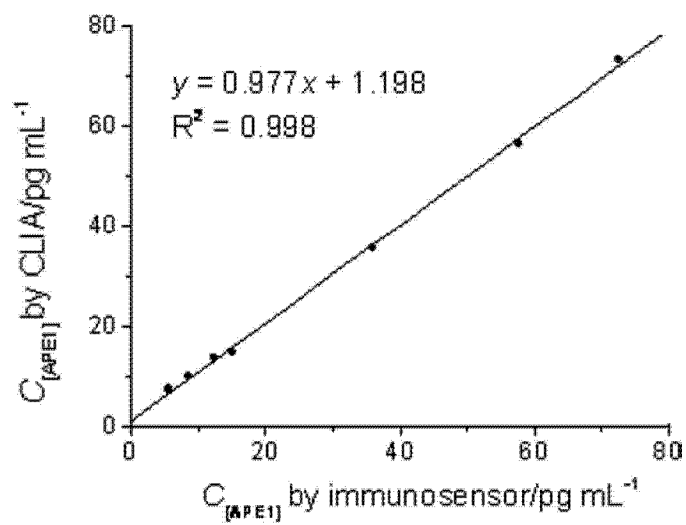


图 2

专利名称(译)	一种离子液体-石墨烯纳米复合物、其制备方法及其电化学免疫检测方法		
公开(公告)号	CN102778571B	公开(公告)日	2014-10-29
申请号	CN201210287253.2	申请日	2012-08-13
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学第三附属医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学第三附属医院		
[标]发明人	仲召阳 王东 关伟 梁伟 戴楠 卿毅		
发明人	仲召阳 王东 关伟 梁伟 戴楠 卿毅		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N27/48		
代理人(译)	冯琼		
其他公开文献	CN102778571A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及电化学免疫检测领域，特别涉及一种离子液体-石墨烯纳米复合物、其制备方法及其电化学免疫检测方法。该检测方法采用双抗体夹心法，使固载在电极表面的脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子抗体（anti-APE1）与样品溶液中的脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子（APE1）发生免疫反应，再和室温离子液体-石墨烯纳米复合物与碱性磷酸酯酶（ALP）及二茂铁（Fc）标记的anti-APE1共轭物结合。基于ALP-Fc-anti-APE1与室温离子液体-石墨烯纳米复合物的电化学活性，测得循环伏安催化电流值进而检测检测样品中APE1的浓度。本发明提供的电化学免疫检测方法线性响应范围为0.1-80pg/mL，检测下限为0.04pg/mL，特异性好，灵敏度高。

