



(21)申请号 201911187316.5

(22)申请日 2019.11.28

(71)申请人 北京乐普医疗科技有限责任公司

地址 102200 北京市昌平区超前路37号7-1
号楼

(72)发明人 范运 邱笑违 黄莎 董飒英

(74)专利代理机构 北京中创博腾知识产权代理
事务所(普通合伙) 11636

代理人 孙福岭

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 27/48(2006.01)

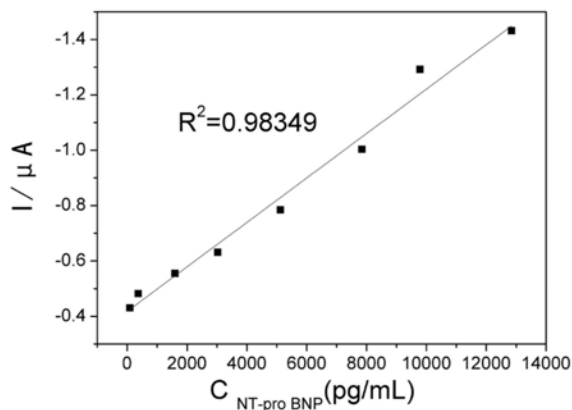
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学
免疫传感器的制备方法及应用

(57)摘要

基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法及应用,主要解决电化学法检测心肌标记物测试问题,以氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金为基底,通过结和抗原和抗体,制备电化学免疫传感器,通过结合标记抗体上的辣根过氧化物酶对过氧化氢的电化学检测,实现了对不同浓度的抗原进行检测。本发明可以快速,准确的检测不同浓度的心肌标记物,制备的电化学免疫传感器简单有效,不仅有效实现了检测不同浓度的心肌标记物,而且由于基底材料简单,为后续构建其他标记物电化学免疫传感器研究提供了模型。



1. 基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

(1) 配制1.0~5.0mg/mL的氧化石墨烯的固体颗粒分散液和质量分数为0.25%~2%的壳聚糖溶液;

(2) 取所述固体颗粒分散液和所述壳聚糖溶液进行混合, 混合液经超声分散均匀形成滴涂液, 所述滴涂液中的氧化石墨烯的固体颗粒分散液浓度为0.9~4.5mg/mL, 滴涂液中的壳聚糖溶液的质量分数为0.23%~1.8%;

(3) 将所述滴涂液超声分散并取5~8μL滴涂液于金电极上, 隔夜干燥;

(4) 将滴涂有滴涂液的所述金电极放入20~40nm的胶体金溶液中并吸附至饱和, 制得氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金修饰电极, 氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金修饰电极记为G0-Chits/AuNPs修饰电极, 隔夜干燥;

(5) 配制pH为7.0~9.0的磷酸盐缓冲溶液, 用配置好的磷酸盐缓冲溶液稀释心肌标记物的包被抗体Ab1, 稀释后包被抗体Ab1浓度为0.2~1.0mg/ml;

(6) 取5~8μL配置好的所述包被抗体Ab1滴涂于G0-Chits/AuNPs修饰电极表面上, 孵育6~12h, 制得G0-Chits/AuNPs/Ab1修饰电极;

(7) 取所述磷酸盐缓冲溶液配制质量分数为0.5%~5.0%的牛血清白蛋白BSA溶液, 取配制好的所述牛血清白蛋白BSA溶液5~8μL滴涂于G0-Chits/AuNPs/Ab1修饰电极表面上, 孵育6~12h, 制得G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA修饰电极干燥储存备用;

(8) 在G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA修饰电极表面上滴涂5~8μL心肌标记物抗原Ag, 孵育0.5~1h, 制备成G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag修饰电极;

(9) 取所述配置好的磷酸盐缓冲溶液稀释心肌标记物的酶标抗体Ab2, 稀释后酶标抗体Ab2浓度为0.1~0.3mg/ml;

(10) 在G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag电极表面滴涂5~8μL对应的酶标抗体Ab2, 孵育0.5~1h, 构成心肌标记物免疫传感器, 心肌标记物免疫传感器记为G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2。

2. 根据权利要求1所述的基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法, 其特征在于, 所述壳聚糖溶液的溶剂为0.5%~8%的冰醋酸水溶液, 水浴加热至40℃, 转速2000r~5000r/min下溶解时间为4~6h。

3. 根据权利要求1所述的基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法, 其特征在于, 所述氧化石墨烯的固体颗粒分散液溶剂为超纯水或者乙醇。

4. 根据权利要求1所述的基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法, 其特征在于, 所述步骤(9)中酶标抗体Ab2的酶为辣根过氧化物酶。

5. 根据权利要求1所述的基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法, 其特征在于, 所述步骤(6)和步骤(7)中的孵育温度为4℃, 所述步骤(8)和步骤(10)中的孵育温度为37℃, 所述步骤(7)中G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA修饰电极的干燥储存环境温度为4℃。

6. 根据权利要求1所述的基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法, 其特征在于, 所述步骤(8)中心肌标记物抗原Ag为: NT-pro-BNP、BNP、cTnI、cTnT抗原。

7. 一种基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器, 其特征在于, 采用如权

利要求1至6任一项所述的基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法获得。

8. 根据权利要求7所述的基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器, 其特征在于, 用于心肌标记物的检测性能测试。

9. 根据权利要求8所述的基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器, 其特征在于, 所述心肌标记物的检测性能测试中: 将心肌标记物免疫传感器GO-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2修饰电极作为工作电极, 饱和Ag/AgCl电极作为参比电极, 铂丝作为对电极, 以pH为8的磷酸盐缓冲溶液为电解液, 采用循环伏安法对过氧化氢进行测试。

10. 根据权利要求9所述的基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器, 其特征在于, 随着心肌标记物抗原浓度的增加循环伏安曲线中还原电流呈线性增加。

基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法及应用,特别涉及一种以氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金为基底接枝抗体的修饰电极的制备方法及应用,属于电化学传感器领域。

背景技术

[0002] 电化学免疫传感器具有电化学生物传感器的稳定、高效、灵敏特点,同时又具有抗原抗体的高特异性结合的特点。电化学免疫传感器相对于酶联免疫、化学发光和荧光免疫分析法具有简便、快速和成本低等特点。

[0003] 构建免疫传感器的关键在于修饰材料基底固载抗体的量,传统修饰电极的材料有壳聚糖等天然大分子和纳米碳基材料,具有比表面积大、特定的官能团多等特点,适用于固载抗体等蛋白质,有利于构建稳定、高效、灵敏的电化学免疫传感器。

[0004] 急性心肌梗死是一种常见的心血管系统疾病,急性心肌梗死发病急促和病情发展迅速,有较高的临床病死率。研究发现,心肌标记物在急性心肌梗死临床诊断中具有较高的特异性和灵敏度,在急性心肌梗死的早期诊断中具有极大的应用价值。其中NT-pro BNP和cTnI为心肌标记物中常见的标记物,NT-pro BNP和cTnI已成为疾病早期诊断、监测的常用指标。

发明内容

[0005] 本发明针对现有技术存在的不足,提供一种基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法及应用,以氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金为基底,通过结和抗原和抗体,制备电化学免疫传感器,通过结合酶标记抗体上的酶对过氧化氢的电化学检测,实现对不同浓度的抗原进行检测。此外,通过对本电化学免疫传感器的电化学性质,以及对过氧化氢的催化性能的研究,能够为后续其他电化学免疫传感器的构筑奠定基础。

[0006] 本发明解决上述技术问题的技术方案如下:基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法,包括如下步骤:

[0007] (1) 配制1.0~5.0mg/mL的氧化石墨烯的固体颗粒分散液和质量分数为0.25%~2%的壳聚糖溶液;

[0008] (2) 取所述固体颗粒分散液和所述壳聚糖溶液进行混合,混合液经超声分散均匀形成滴涂液,所述滴涂液中的氧化石墨烯的固体颗粒分散液浓度为0.9~4.5mg/mL,滴涂液中的壳聚糖溶液的质量分数为0.23%~1.8%;

[0009] (3) 将所述滴涂液超声分散并取5~8μL滴涂液于金电极上,隔夜干燥;

[0010] (4) 将滴涂有滴涂液的所述金电极放入20~40nm的胶体金溶液中并吸附至饱和,制得氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金修饰电极,氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金修饰电极记为GO-Chits/AuNPs修饰电极,隔夜干燥;

[0011] (5) 配制pH为7.0~9.0的磷酸盐缓冲溶液,用配置好的磷酸盐缓冲溶液稀释心肌标记物的包被抗体Ab1,稀释后包被抗体Ab1浓度为0.2~1.0mg/ml;

[0012] (6) 取5~8 μ L配置好的所述包被抗体Ab1滴涂于G0-Chits/AuNPs修饰电极表面上,孵育6~12h,制得G0-Chits/AuNPs/Ab1修饰电极;

[0013] (7) 取所述磷酸盐缓冲溶液配制质量分数为0.5%~5.0%的牛血清白蛋白BSA溶液,取配制好的所述牛血清白蛋白BSA溶液5~8 μ L滴涂于G0-Chits/AuNPs/Ab1修饰电极表面上,孵育6~12h,制得G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA修饰电极干燥储存备用;

[0014] (8) 在G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA修饰电极表面上滴涂5~8 μ L心肌标记物抗原Ag,孵育0.5~1h,制备成G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag修饰电极;

[0015] (9) 取所述配置好的磷酸盐缓冲溶液稀释心肌标记物的酶标抗体Ab2,稀释后酶标抗体Ab2浓度为0.1~0.3mg/ml;

[0016] (10) 在G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag电极表面滴涂5~8 μ L对应的酶标抗体Ab2,孵育0.5~1h,构成心肌标记物免疫传感器,心肌标记物免疫传感器记为G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2。

[0017] 作为基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法的优选方案,所述壳聚糖溶液的溶剂为0.5%~8%的冰醋酸水溶液,水浴加热至40℃,转速2000r~5000r/min下溶解时间为4~6h。

[0018] 作为基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法的优选方案,所述氧化石墨烯的固体颗粒分散液溶剂为超纯水或者乙醇。

[0019] 作为基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法的优选方案,所述步骤(9)中酶标抗体Ab2的酶为辣根过氧化物酶。

[0020] 作为基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法的优选方案,所述步骤(6)和步骤(7)中的孵育温度为4℃,所述步骤(8)和步骤(10)中的孵育温度为37℃,所述步骤(7)中G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA修饰电极的干燥储存环境温度为4℃。

[0021] 作为基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法的优选方案,所述步骤(8)中心肌标记物抗原Ag为:NT-pro-BNP、BNP、cTnI、cTnT抗原。

[0022] 本发明提供一种基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器,采用上述的基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法获得。

[0023] 作为基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的优选方案,用于心肌标记物的检测性能测试。所述心肌标记物的检测性能测试中:将心肌标记物免疫传感器G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2修饰电极作为工作电极,饱和Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝作为对电极,以pH为8的磷酸盐缓冲溶液为电解液,采用循环伏安法对过氧化氢进行测试。随着心肌标记物抗原浓度的增加循环伏安曲线中还原电流呈线性增加。

[0024] 本发明以氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金为基底,通过结和抗原和抗体,制备电化学免疫传感器,通过结合酶标记抗体上的酶对过氧化氢的电化学检测,实现了对不同浓度的抗原进行检测。本发明可以快速,准确的检测不同浓度的心肌标记物,制备的电化学免疫传感器简单有效,不仅有效实现了检测不同浓度的心肌标记物,而且由于基底材料简单,为后续构建其他标记物电化学免疫传感器研究提供了模型。

附图说明

[0025] 为了更清楚地说明本发明的实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。显而易见地,下面描述中的附图仅仅是示例性的,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图引伸获得其它的实施附图。

[0026] 图1为实施例1中G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2免疫传感器电极还原电流随滴涂NT-pro-BNP浓度之间的变化关系曲线;

[0027] 图2为实施例2中G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2免疫传感器电极还原电流随滴涂NT-pro-BNP浓度之间的变化关系曲线;

[0028] 图3为实施例3中G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2免疫传感器电极还原电流随滴涂cTnI浓度之间的变化关系曲线;

[0029] 图4为实施例4中G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2免疫传感器电极还原电流随滴涂cTnI浓度之间的变化关系曲线。

具体实施方式

[0030] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合附图对本发明的具体实施方式做详细的说明。在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明。但是本发明能够以很多不同于在此描述的其它方式来实施,本领域技术人员可以在不违背本发明内涵的情况下做类似改进,因此本发明不受下面公开的具体实施例的限制。

[0031] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施方式的目的,不是旨在于限制本发明。本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0032] 实施例1

[0033] 基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法,包括如下步骤:

[0034] (1) 配制1.0mg/mL的氧化石墨烯的固体颗粒分散液和质量分数为0.25%的壳聚糖溶液;

[0035] (2) 取所述固体颗粒分散液和所述壳聚糖溶液进行混合,混合液经超声分散均匀形成滴涂液,所述滴涂液中的氧化石墨烯的固体颗粒分散液浓度为0.9mg/mL,滴涂液中的壳聚糖溶液的质量分数为0.23%;

[0036] (3) 将所述滴涂液超声分散并取5 μ L滴涂液于金电极上,隔夜干燥;

[0037] (4) 将滴涂有滴涂液的所述金电极放入20nm的胶体金溶液中并吸附至饱和,制得氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金修饰电极,氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金修饰电极记为G0-Chits/AuNPs修饰电极,隔夜干燥;

[0038] (5) 配制pH为7.0的磷酸盐缓冲溶液,用配置好的磷酸盐缓冲溶液稀释心肌标记物的包被抗体Ab1,稀释后包被抗体Ab1浓度为0.2mg/ml;

[0039] (6) 取5 μ L配置好的所述包被抗体Ab1滴涂于G0-Chits/AuNPs修饰电极表面上,孵育6h,制得G0-Chits/AuNPs/Ab1修饰电极;

[0040] (7) 取所述磷酸盐缓冲溶液配制质量分数为0.5%的牛血清白蛋白BSA溶液,取配制好的所述牛血清白蛋白BSA溶液5 μ L滴涂于G0-Chits/AuNPs/Ab1修饰电极表面上,孵育6h,制得G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA修饰电极干燥储存备用;

[0041] (8) 在G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA修饰电极表面上滴涂5 μ L心肌标记物抗原Ag,孵育0.5h,制备成G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag修饰电极;

[0042] (9) 取所述配置好的磷酸盐缓冲溶液稀释心肌标记物的酶标抗体Ab2,稀释后酶标抗体Ab2浓度为0.1mg/ml;

[0043] (10) 在G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag电极表面滴涂5 μ L对应的酶标抗体Ab2,孵育0.5h,构成心肌标记物免疫传感器,心肌标记物免疫传感器记为G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2。

[0044] 具体的,所述壳聚糖溶液的溶剂为0.5%的冰醋酸水溶液,水浴加热至40 $^{\circ}$ C,转速2000r $\sim$ 5000r/min下溶解时间为4h。所述氧化石墨烯的固体颗粒分散液溶剂为超纯水或者乙醇。所述步骤(9)中酶标抗体Ab2的酶为辣根过氧化物酶。所述步骤(6)和步骤(7)中的孵育温度为4 $^{\circ}$ C,所述步骤(8)和步骤(10)中的孵育温度为37 $^{\circ}$ C,所述步骤(7)中G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA修饰电极的干燥储存环境温度为4 $^{\circ}$ C。所述步骤(8)中心肌标记物抗原Ag为NT-pro-BNP。

[0045] 基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器,采用上述的基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法获得。将基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器用于心肌标记物的检测性能测试。所述心肌标记物的检测性能测试中:将心肌标记物免疫传感器G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2修饰电极作为工作电极,饱和Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝作为对电极,以pH为8的磷酸盐缓冲溶液为电解液,采用循环伏安法对过氧化氢进行测试。随着心肌标记物抗原浓度的增加循环伏安曲线中还原电流呈线性增加。

[0046] 具体的,测试体系为三电极体系,即G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2的修饰电极作为工作电极,饱和Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝为对电极,以pH为8的磷酸盐缓冲溶液为电解液,采用循环伏安法对过氧化氢进行测试,设定动态扫描电压范围为-0.2-0.7V,扫速为50mV/s,测得背景后加入10 μ L过氧化氢,溶液中过氧化氢的浓度为13.85mmol/L,观察随着NT-pro-BNP抗原的浓度增加循环伏安曲线中还原电流的也呈线性增加,从而实现NT-pro-BNP浓度的测定。由图1可知,线性范围为387pg/ml $\sim$ 10098pg/ml,G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2的修饰电极电流随着抗原的浓度增加而增加。

[0047] 实施例2

[0048] 基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法,包括如下步骤:

[0049] (1) 配制5.0mg/mL的氧化石墨烯的固体颗粒分散液和质量分数为2%的壳聚糖溶液;

[0050] (2) 取所述固体颗粒分散液和所述壳聚糖溶液进行混合,混合液经超声分散均匀形成滴涂液,所述滴涂液中的氧化石墨烯的固体颗粒分散液浓度为4.5mg/mL,滴涂液中的壳聚糖溶液的质量分数为1.8%;

[0051] (3) 将所述滴涂液超声分散并取8 μ L滴涂液于金电极上,隔夜干燥;

[0052] (4) 将滴涂有滴涂液的所述金电极放入40nm的胶体金溶液中并吸附至饱和,制得氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金修饰电极,氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金修饰电极记为G0-Chits/AuNPs修饰电极,隔夜干燥;

[0053] (5) 配制pH为9.0的磷酸盐缓冲溶液,用配置好的磷酸盐缓冲溶液稀释心肌标记物的包被抗体Ab1,稀释后包被抗体Ab1浓度为1.0mg/ml;

[0054] (6) 取8 μ L配置好的所述包被抗体Ab1滴涂于G0-Chits/AuNPs修饰电极表面上,孵育12h,制得G0-Chits/AuNPs/Ab1修饰电极;

[0055] (7) 取所述磷酸盐缓冲溶液配制质量分数为5.0%的牛血清白蛋白BSA溶液,取配制好的所述牛血清白蛋白BSA溶液8 μ L滴涂于G0-Chits/AuNPs/Ab1修饰电极表面上,孵育12h,制得G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA修饰电极干燥储存备用;

[0056] (8) 在G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA修饰电极表面上滴涂8 μ L心肌标记物抗原Ag,孵育1h,制备成G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag修饰电极;

[0057] (9) 取所述配置好的磷酸盐缓冲溶液稀释心肌标记物的酶标抗体Ab2,稀释后酶标抗体Ab2浓度为0.3mg/ml;

[0058] (10) 在G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag电极表面滴涂5~8 μ L对应的酶标抗体Ab2,孵育1h,构成心肌标记物免疫传感器,心肌标记物免疫传感器记为G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2。

[0059] 具体的,所述壳聚糖溶液的溶剂为8%的冰醋酸水溶液,水浴加热至40℃,转速2000r~5000r/min下溶解时间为6h。所述氧化石墨烯的固体颗粒分散液溶剂为超纯水或者乙醇。所述步骤(9)中酶标抗体Ab2的酶为辣根过氧化物酶。所述步骤(6)和步骤(7)中的孵育温度为4℃,所述步骤(8)和步骤(10)中的孵育温度为37℃,所述步骤(7)中G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA修饰电极的干燥储存环境温度为4℃。所述步骤(8)中心肌标记物抗原Ag为NT-pro-BNP。

[0060] 基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器,采用上述的基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法获得。将基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器用于心肌标记物的检测性能测试。所述心肌标记物的检测性能测试中:将心肌标记物免疫传感器G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2修饰电极作为工作电极,饱和Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝作为对电极,以pH为8的磷酸盐缓冲溶液为电解液,采用循环伏安法对过氧化氢进行测试。随着心肌标记物抗原浓度的增加循环伏安曲线中还原电流呈线性增加。

[0061] 具体的,测试体系为三电极体系,即G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2的修饰电极作为工作电极,饱和Ag/AgCl电极为参比电极,铂丝为对电极,以pH为8的磷酸盐缓冲溶液为电解液,采用循环伏安法对过氧化氢进行测试,设定动态扫描电压范围为-0.2~0.5V,扫速为50mV/s,测得背景后加入10 μ L过氧化氢,溶液中过氧化氢的浓度为13.85mmol/L,观察随着NT-pro-BNP抗原的浓度增加循环伏安曲线中还原电流的也呈线性增加,从而实现对NT-pro-BNP浓度的测定。由图2可知,线性范围为89.94pg/ml~12846pg/ml,G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2的修饰电极随着抗原的浓度增加而增加。

[0062] 实施例3

[0063] 基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法,包括如下步

骤:

[0064] (1) 配制1.0mg/mL的氧化石墨烯的固体颗粒分散液和质量分数为0.25%的壳聚糖溶液;

[0065] (2) 取所述固体颗粒分散液和所述壳聚糖溶液进行混合,混合液经超声分散均匀形成滴涂液,所述滴涂液中的氧化石墨烯的固体颗粒分散液浓度为0.9mg/mL,滴涂液中的壳聚糖溶液的质量分数为0.23%;

[0066] (3) 将所述滴涂液超声分散并取5 μ L滴涂液于金电极上,隔夜干燥;

[0067] (4) 将滴涂有滴涂液的所述金电极放入20nm的胶体金溶液中并吸附至饱和,制得氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金修饰电极,氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金修饰电极记为G0-Chits/AuNPs修饰电极,隔夜干燥;

[0068] (5) 配制pH为7.0的磷酸盐缓冲溶液,用配置好的磷酸盐缓冲溶液稀释心肌标记物的包被抗体Ab1,稀释后包被抗体Ab1浓度为0.2mg/ml;

[0069] (6) 取5 μ L配置好的所述包被抗体Ab1滴涂于G0-Chits/AuNPs修饰电极表面上,孵育6h,制得G0-Chits/AuNPs/Ab1修饰电极;

[0070] (7) 取所述磷酸盐缓冲溶液配制质量分数为0.5%的牛血清白蛋白BSA溶液,取配制好的所述牛血清白蛋白BSA溶液5 μ L滴涂于G0-Chits/AuNPs/Ab1修饰电极表面上,孵育6h,制得G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA修饰电极干燥储存备用;

[0071] (8) 在G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA修饰电极表面上滴涂5 μ L心肌标记物抗原Ag,孵育0.5h,制备成G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag修饰电极;

[0072] (9) 取所述配置好的磷酸盐缓冲溶液稀释心肌标记物的酶标抗体Ab2,稀释后酶标抗体Ab2浓度为0.1mg/ml;

[0073] (10) 在G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag电极表面滴涂5 μ L对应的酶标抗体Ab2,孵育0.5h,构成心肌标记物免疫传感器,心肌标记物免疫传感器记为G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2。

[0074] 具体的,所述壳聚糖溶液的溶剂为0.5%的冰醋酸水溶液,水浴加热至40 $^{\circ}$ C,转速2000r~5000r/min下溶解时间为4h。所述氧化石墨烯的固体颗粒分散液溶剂为超纯水或者乙醇。所述步骤(9)中酶标抗体Ab2的酶为辣根过氧化物酶。所述步骤(6)和步骤(7)中的孵育温度为4 $^{\circ}$ C,所述步骤(8)和步骤(10)中的孵育温度为37 $^{\circ}$ C,所述步骤(7)中G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA修饰电极的干燥储存环境温度为4 $^{\circ}$ C。所述步骤(8)中心肌标记物抗原Ag为cTnI。

[0075] 基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器,采用上述的基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法获得。将基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器用于心肌标记物的检测性能测试。所述心肌标记物的检测性能测试中:将心肌标记物免疫传感器G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2修饰电极作为工作电极,饱和Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝作为对电极,以pH为8的磷酸盐缓冲溶液为电解液,采用循环伏安法对过氧化氢进行测试。随着心肌标记物抗原浓度的增加循环伏安曲线中还原电流呈线性增加。

[0076] 具体的,测试体系为三电极体系,即G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2的修饰电极为工作电极,饱和Ag/AgCl电极为参比电极,铂丝为对电极,以pH为8的磷酸盐缓冲溶液为电

解液,采用循环伏安法对过氧化氢进行测试,设定动态扫描电压范围为-0.2-0.7V,扫速为50mV/s,测得背景后加入10 μ L过氧化氢,溶液中过氧化氢的浓度为13.85mmol/L,观察随着cTnI的浓度增加循环伏安曲线中还原电流的也呈线性增加,从而实现cTnI浓度的测定。由图3可知,G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2的修饰电极随着抗原的浓度增加而增加,线性范围为0.3ng/ml~53ng/ml。

[0077] 实施例4

[0078] 基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法,包括如下步骤:

[0079] (1) 配制5.0mg/mL的氧化石墨烯的固体颗粒分散液和质量分数为2%的壳聚糖溶液;

[0080] (2) 取所述固体颗粒分散液和所述壳聚糖溶液进行混合,混合液经超声分散均匀形成滴涂液,所述滴涂液中的氧化石墨烯的固体颗粒分散液浓度为4.5mg/mL,滴涂液中的壳聚糖溶液的质量分数为1.8%;

[0081] (3) 将所述滴涂液超声分散并取8 μ L滴涂液于金电极上,隔夜干燥;

[0082] (4) 将滴涂有滴涂液的所述金电极放入40nm的胶体金溶液中并吸附至饱和,制得氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金修饰电极,氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金修饰电极记为G0-Chits/AuNPs修饰电极,隔夜干燥;

[0083] (5) 配制pH为7.0的磷酸盐缓冲溶液,用配置好的磷酸盐缓冲溶液稀释心肌标记物的包被抗体Ab1,稀释后包被抗体Ab1浓度为1.0mg/ml;

[0084] (6) 取5 μ L配置好的所述包被抗体Ab1滴涂于G0-Chits/AuNPs修饰电极表面上,孵育6h,制得G0-Chits/AuNPs/Ab1修饰电极;

[0085] (7) 取所述磷酸盐缓冲溶液配制质量分数为0.5%的牛血清白蛋白BSA溶液,取配制好的所述牛血清白蛋白BSA溶液5 μ L滴涂于G0-Chits/AuNPs/Ab1修饰电极表面上,孵育6h,制得G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA修饰电极干燥储存备用;

[0086] (8) 在G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA修饰电极表面上滴涂5 μ L心肌标记物抗原Ag,孵育0.5h,制备成G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag修饰电极;

[0087] (9) 取所述配置好的磷酸盐缓冲溶液稀释心肌标记物的酶标抗体Ab2,稀释后酶标抗体Ab2浓度为0.3mg/ml;

[0088] (10) 在G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag电极表面滴涂5 μ L对应的酶标抗体Ab2,孵育0.5h,构成心肌标记物免疫传感器,心肌标记物免疫传感器记为G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2。

[0089] 具体的,所述壳聚糖溶液的溶剂为0.5%的冰醋酸水溶液,水浴加热至40 $^{\circ}$ C,转速2000r~5000r/min下溶解时间为4h。所述氧化石墨烯的固体颗粒分散液溶剂为超纯水或者乙醇。所述步骤(9)中酶标抗体Ab2的酶为辣根过氧化物酶。所述步骤(6)和步骤(7)中的孵育温度为4 $^{\circ}$ C,所述步骤(8)和步骤(10)中的孵育温度为37 $^{\circ}$ C,所述步骤(7)中G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA修饰电极的干燥储存环境温度为4 $^{\circ}$ C。所述步骤(8)中心肌标记物抗原Ag为cTnI。

[0090] 基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器,采用上述的基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法获得。将基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米

金的电化学免疫传感器用于心肌标记物的检测性能测试。所述心肌标记物的检测性能测试中:将心肌标记物免疫传感器G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2修饰电极作为工作电极,饱和Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝作为对电极,以pH为8的磷酸盐缓冲溶液为电解液,采用循环伏安法对过氧化氢进行测试。随着心肌标记物抗原浓度的增加循环伏安曲线中还原电流呈线性增加。

[0091] 具体的,测试体系为三电极体系,即G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2的修饰电极作为工作电极,饱和Ag/AgCl电极为参比电极,铂丝为对电极,以pH为8的磷酸盐缓冲溶液为电解液,采用循环伏安法对过氧化氢进行测试,设定动态扫描电压范围为-0.2-0.7V,扫速为50mV/s,测得背景后加入10 μ L过氧化氢,溶液中过氧化氢的浓度为13.85mmol/L,观察随着cTnI抗原的浓度增加循环伏安曲线中还原电流的也呈线性增加,从而实现cTnI浓度的测定。由图4可知,G0-Chits/AuNPs/Ab1/BSA/Ag/Ab2的修饰电极随着抗原的浓度增加而增加,线性范围为0.2ng/ml~55ng/ml。

[0092] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0093] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

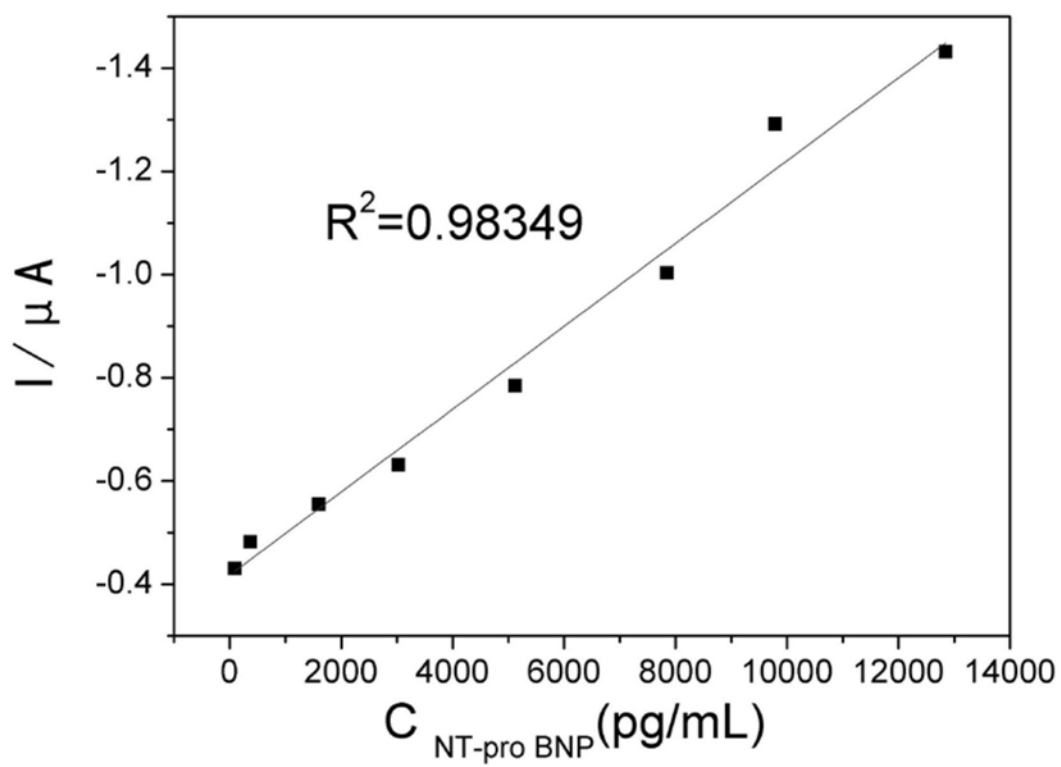


图1

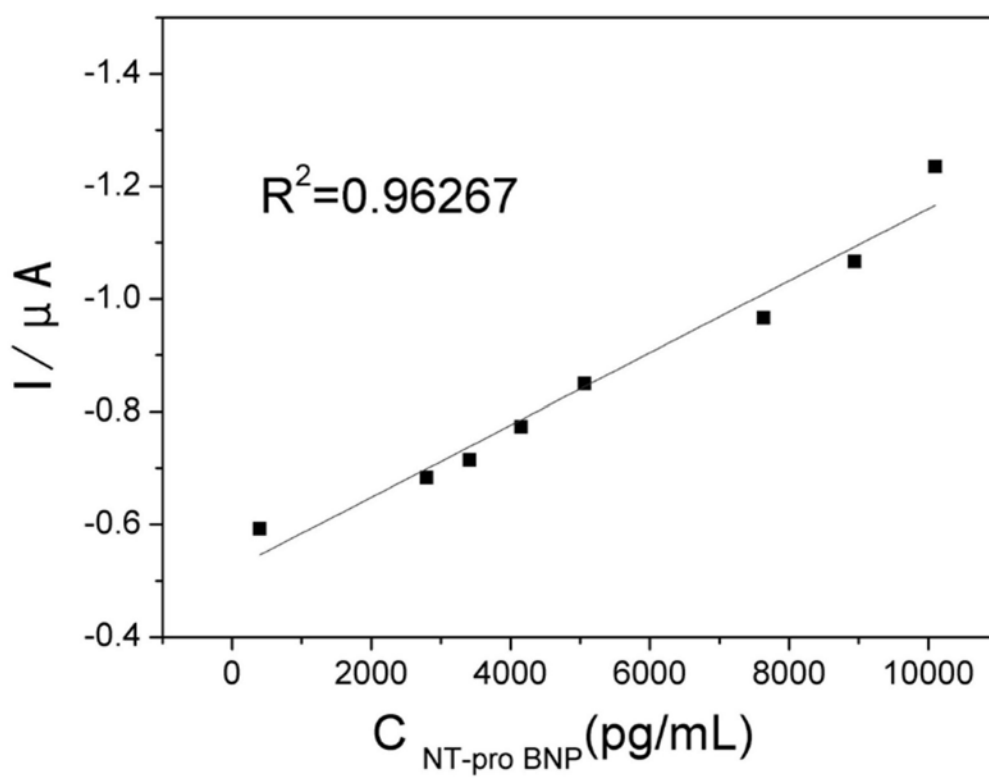


图2

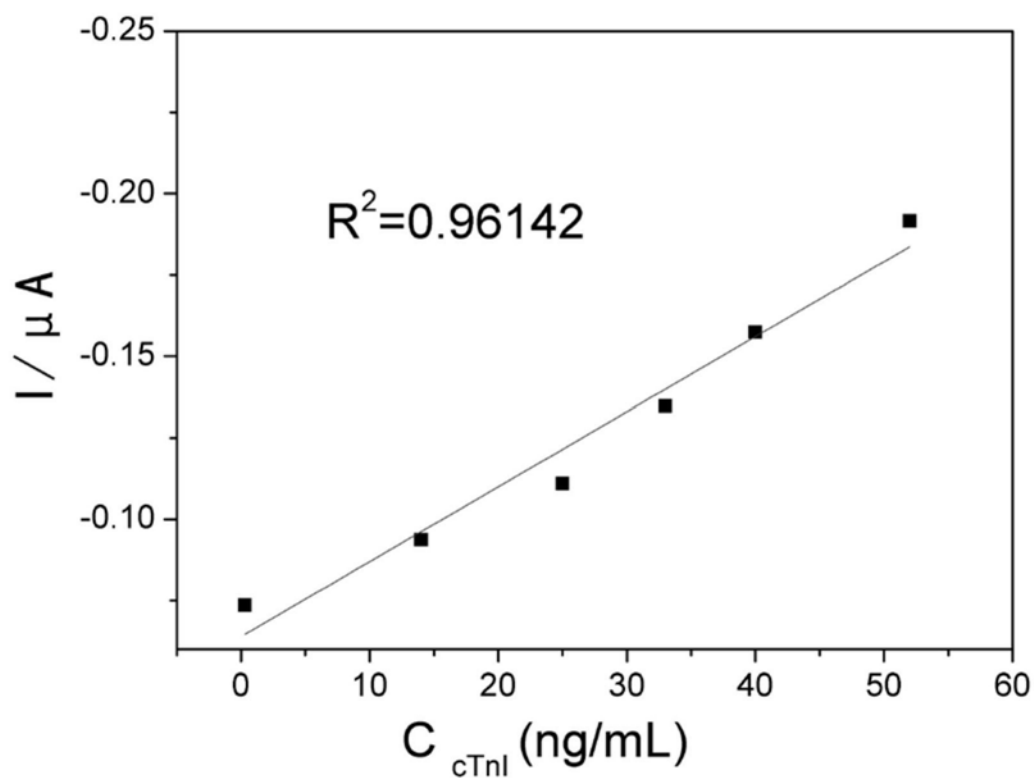


图3

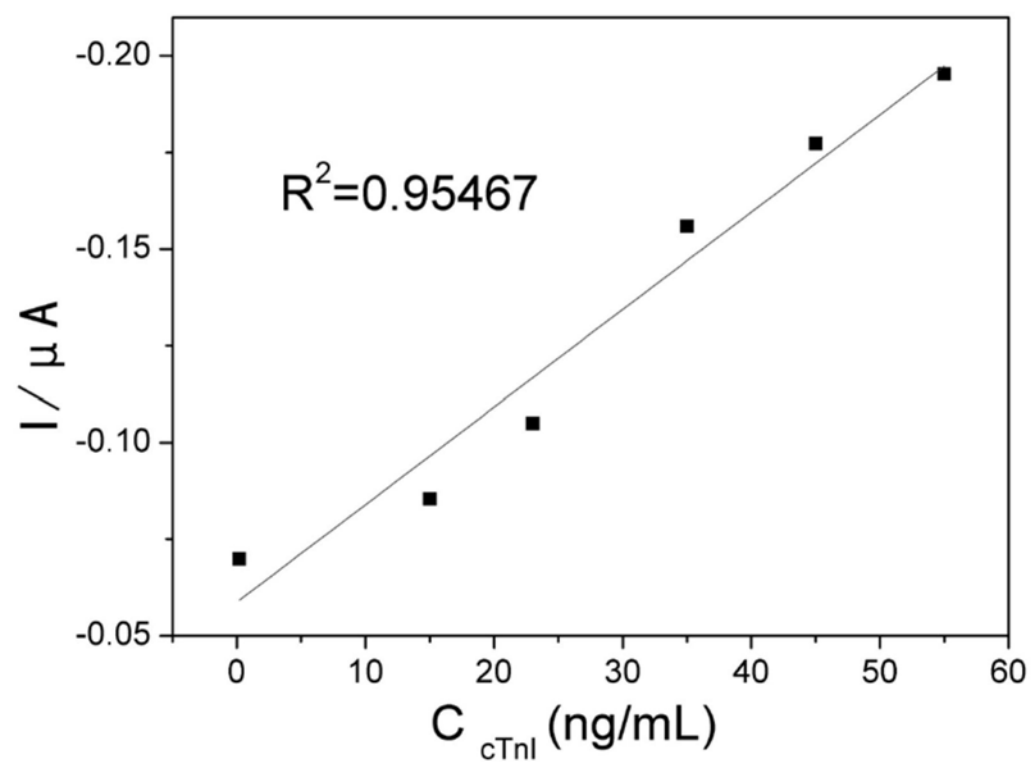


图4

专利名称(译)	基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN110895278A	公开(公告)日	2020-03-20
申请号	CN201911187316.5	申请日	2019-11-28
[标]申请(专利权)人(译)	北京乐普医疗科技有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	北京乐普医疗科技有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京乐普医疗科技有限责任公司		
[标]发明人	范运 邱笑违 黄莎 董飒英		
发明人	范运 邱笑违 黄莎 董飒英		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/48		
CPC分类号	G01N27/48 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

基于氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金的电化学免疫传感器的制备方法及应用，主要解决电化学法检测心肌标记物测试问题，以氧化石墨烯-壳聚糖/纳米金为基底，通过结和抗原和抗体，制备电化学免疫传感器，通过结合标记抗体上的辣根过氧化物酶对过氧化氢的电化学检测，实现了对不同浓度的抗原进行检测。本发明可以快速、准确的检测不同浓度的心肌标记物，制备的电化学免疫传感器简单有效，不仅有效实现了检测不同浓度的心肌标记物，而且由于基底材料简单，为后续构建其他标记物电化学免疫传感器研究提供了模型。

