



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107085024 A

(43)申请公布日 2017.08.22

(21)申请号 201710341224.2

(22)申请日 2017.05.16

(71)申请人 山东理工大学

地址 255086 山东省淄博市高新技术开发
区高创园A座313室

(72)发明人 李月云 李法瀛 高增强 苏晓楠
张晓波 吕慧 王平 陈志伟
董云会

(51)Int.Cl.

G01N 27/327(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页

(54)发明名称

一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的
制备方法及应用

(57)摘要

本发明属于纳米功能材料、免疫分析以及生物传感技术领域,提供了一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法及应用。采用 $\text{MoS}_2@ \text{Cu}_2\text{O}/\text{Pt}$ 作为检测抗体标记物制备的免疫传感器具有特异性强,灵敏度高和检出限低等优点,对乙肝病毒标志物的检测具有重要的科学意义和应用价值。

1. 一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述免疫传感器包括固定有乙肝病毒标志物抗体Ab₁的多孔石墨烯负载金纳米粒子修饰的电极和MoS₂@Cu₂O/Pt-Ab₂检测抗体孵化物溶液的制备,其中固定有乙肝病毒标志物抗体Ab₁的多孔石墨烯负载金纳米粒子修饰的电极的制备步骤如下:

(1) 将直径为3 ~ 5 mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨,超纯水清洗干净;

(2) 将6 μL、0.5 ~ 2.0 mg/mL的多孔石墨烯负载金纳米粒子溶液滴涂在电极表面,晾干,用超纯水冲洗,晾干;

(3) 继续将6 μL、8 ~ 12 μg/mL的乙肝病毒标志物抗体Ab₁溶液滴涂到电极表面,4℃冰箱中晾干;

(4) 超纯水冲洗掉未结合的Ab₁后,继续将3 ~ 5 μL、质量分数为0.1 ~ 1.0 %的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,4℃冰箱中晾干。

2. 如权利要求1所述的一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法,所述多孔石墨烯负载金纳米粒子,制备步骤如下:

将8 ~ 12 mL、0.5 mg/mL氧化石墨烯与200 μL、质量分数为1%的HAuCl₄·4H₂O和20 μL、质量分数为1%聚乙二醇溶液混合,超声1 h,使混合液均匀分散;将混合液转移到聚四氟乙烯反应釜中,加热至160~200℃,反应10~14 h;冷却至室温,超纯水离心洗涤3次;冻干机干燥,制得多孔石墨烯负载金纳米粒子。

3. 如权利要求1所述的一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法,所述MoS₂@Cu₂O/Pt-Ab₂检测抗体孵化物溶液,制备步骤如下:

(1) MoS₂@Cu₂O的制备

将8 ~ 10 mL、1.0 ~ 1.5 mg/mL的(NH₄)₂MoS₄溶液和10 mL、4 mg/mL的Cu(NO₃)₂·3H₂O溶液分别超声10 min;将两种溶液混合并加入100 μL水合肼,超声30 min;混合液转移到聚四氟乙烯反应釜中,加热至150 ~ 250℃,维持8 ~ 12 h;冷却至室温,所得沉淀分别用超纯水和无水乙醇洗涤三次,分散在3 mL超纯水中,冻干机中干燥24 h,得到MoS₂@Cu₂O;

(2) 氨基化MoS₂@Cu₂O的制备

将30 ~ 70 mg的MoS₂@Cu₂O加入到10 mL的无水甲苯中,加入0.2 ~ 0.4 mL的3-氨基丙基三乙氧基硅烷,70℃回流1.5 ~ 2.5 h,超纯水离心洗涤三次;80℃干燥12 h,得到氨基化MoS₂@Cu₂O;

(3) MoS₂@Cu₂O/Pt的制备

将8 ~ 12 mg的氨基化MoS₂@Cu₂O加入到25 ~ 35 mL的Pt纳米粒子溶液中,振荡24 h,离心分离,得到MoS₂@Cu₂O/Pt,超纯水离心洗涤三次,干燥;

所述Pt纳米粒子溶液是用100 mL、质量分数为0.01%的H₂PtCl₆·6H₂O溶液加热至沸腾,逐滴加入10 mL、38.8 mmol/L的柠檬酸钠溶液,回流反应45 ~ 55 min,停止加热,继续搅拌10 min,冷却至室温制得;

④ MoS₂@Cu₂O/Pt-Ab₂检测抗体孵化物溶液的制备

在2 mL、2.0 ~ 3.0 mg/mL的MoS₂@Cu₂O/Pt加入2 mL、8 ~ 12 μg/mL的乙肝病毒标志物检测抗体Ab₂溶液,4℃恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h;超纯水离心洗涤三次,重新分散到2 mL、pH=6.98磷酸盐缓冲溶液,得到MoS₂@Cu₂O/Pt-Ab₂检测抗体孵化物溶液,4℃下保存备用。

4. 如权利要求1所述一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法制备的传感器,用于乙肝病毒标志物的检测,检测步骤如下:

(1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,所制备的传感器为工作电极,在10 mL、50 mmol/L的pH 5.1 ~ 8.6磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2) 用计时电流法对乙肝病毒标志物进行检测,输入电压为-0.4 V,取样间隔0.1 s,运行时间300 s;

(3) 当背景电流趋于稳定后,每隔50 s向10 mL、50 mmol/L的pH=6.98磷酸盐缓冲溶液中注入10 μ L、5 mol/L的双氧水溶液,记录电流变化。

5. 如权利要求1~3所述的乙肝病毒标志物,其特征在于,所述乙肝病毒标志物选自HBc、HBe、HBs。

一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于纳米功能材料、免疫分析以及生物传感技术领域,提供了一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 乙肝是一类遭遇乙肝病毒而导致肝脏损伤的有着传染性的疾病,生长和转移速度快,对人类的健康有极大的危害。鉴于乙肝具有耐药性和对体内免疫力都会造成巨大伤害等很多乙肝的病因。现阶段世界上还没有治愈乙肝的特效药,因此早期诊断对乙肝的预防和治疗具有重要的临床意义。

[0003] HBc、HBe、HBs等常见的乙肝病毒标志物,对乙肝的早期诊断具有重要意义。目前,对于病毒标志物的检测方法很多,如放射免疫分析法、免疫放射分析法、化学免疫发光分析法、时间分辨荧光免疫分析法等,但多数检测方法繁琐,操作复杂,费用昂贵,检出限高,因此,建立一种快速、简便、灵敏的检测方法有重要意义。

[0004] 夹心型免疫传感器将高特异性的免疫分析技术和高灵敏的电化学分析技术相结合,具有灵敏度高、制备简单、检测快速、成本低等优点,在临床检验、环境监测、食品安全控制、生物监测等领域都有重要的应用价值。而构建电化学免疫传感器的关键有两点:其一是采用简单、快速、有效的方法将标志物抗原、抗体等固定在电极表面;其二是开发传感器的信号放大技术。

[0005] 多孔石墨烯负载金纳米粒子具有大的比表面积和生物相容性,可以显著提高捕获抗体Ab₁的固载量;良好的导电性可以加速电子传递,提高反应速率;新颖复合纳米材料MoS₂@Cu₂O/Pt具有良好的电催化性能,并且各组分协同作用,可以实现多重信号放大。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法及应用,实现了不同乙肝病毒标志物的高灵敏检测。

[0007] 本发明的目的之一是以MoS₂@Cu₂O/Pt作为检测抗体标记物,构建一种超灵敏的夹心型免疫传感器。

[0008] 本发明的目的之二是将所制备的夹心型免疫传感器用于乙肝病毒标志物的检测。

[0009] 本发明的技术方案,包括以下步骤。

[0010] 1. 一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法,所述免疫传感器包括固定有乙肝病毒标志物抗体Ab₁的多孔石墨烯负载金纳米粒子修饰的电极和MoS₂@Cu₂O/Pt-Ab₂检测抗体孵化物溶液的制备,其中固定有乙肝病毒标志物抗体Ab₁的多孔石墨烯负载金纳米粒子修饰的电极的制备步骤如下:

- (1) 将直径为3 ~ 5 mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨,超纯水清洗干净;
- (2) 将6 μL、0.5 ~ 2.0 mg/mL的多孔石墨烯负载金纳米粒子溶液滴涂在电极表面,晾干,用超纯水冲洗,晾干;

(3) 继续将6 μL 、8 ~ 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乙肝病毒标志物抗体 Ab_1 溶液滴涂到电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;

(4) 超纯水冲洗掉未结合的 Ab_1 后,继续将3 ~ 5 μL 、质量分数为0.1 ~ 1.0 %的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干。

[0011] 2.如权利要求1所述的一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法,所述多孔石墨烯负载金纳米粒子,制备步骤如下:

将8 ~ 12 mL、0.5 mg/mL氧化石墨烯与200 μL 、质量分数为1%的 $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和20 μL 、质量分数为1%聚乙二醇溶液混合,超声1 h,使混合液均匀分散;将混合液转移到聚四氟乙烯反应釜中,加热至160~200 $^{\circ}\text{C}$,反应10~14 h;冷却至室温,超纯水离心洗涤3次;冻干机干燥,制得多孔石墨烯负载金纳米粒子。

[0012] 3.如权利要求1所述的一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法,所述 $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}/\text{Pt}-\text{Ab}_2$ 检测抗体孵化物溶液,制备步骤如下:

(1) $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}$ 的制备

将8 ~ 10 mL、1.0 ~ 1.5 mg/mL的 $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$ 溶液和10 mL、4 mg/mL的 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 溶液分别超声10min;将两种溶液混合并加入100 μL 水合肼,超声30 min;混合液转移到聚四氟乙烯反应釜中,加热至150 ~ 250 $^{\circ}\text{C}$,维持8 ~ 12 h;冷却至室温,所得沉淀分别用超纯水和无水乙醇洗涤三次,分散在3 mL超纯水中,冻干机中干燥24 h,得到 $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}$;

(2) 氨基化 $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}$ 的制备

将30 ~ 70 mg的 $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}$ 加入到10 mL的无水甲苯中,加入0.2 ~ 0.4 mL的3-氨基丙基三乙氧基硅烷,70 $^{\circ}\text{C}$ 回流1.5 ~ 2.5 h,超纯水离心洗涤三次;80 $^{\circ}\text{C}$ 干燥12 h,得到氨基化 $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}$;

(3) $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}/\text{Pt}$ 的制备

将8 ~ 12 mg的氨基化 $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}$ 加入到25 ~ 35 mL的Pt纳米粒子溶液中,振荡24 h,离心分离,得到 $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}/\text{Pt}$,超纯水离心洗涤三次,干燥;

所述Pt纳米粒子溶液是用100 mL、质量分数为0.01%的 $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液加热至沸腾,逐滴加入10 mL、38.8 mmol/L的柠檬酸钠溶液,回流反应45 ~ 55 min,停止加热,继续搅拌10 min,冷却至室温制得;

④ $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}/\text{Pt}-\text{Ab}_2$ 检测抗体孵化物溶液的制备

在2 mL、2.0 ~ 3.0 mg/mL的 $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}/\text{Pt}$ 加入2 mL、8 ~ 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乙肝病毒标志物检测抗体 Ab_2 溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h;超纯水离心洗涤三次,重新分散到2 mL、pH=6.98磷酸盐缓冲溶液,得到 $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}/\text{Pt}-\text{Ab}_2$ 检测抗体孵化物溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

[0013] 4.如权利要求1所述一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法制备的传感器,用于乙肝病毒标志物的检测,检测步骤如下:

(1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,所制备的传感器为工作电极,在10 mL、50 mmol/L的pH 5.1 ~ 8.6磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2) 用计时电流法对乙肝病毒标志物进行检测,输入电压为-0.4 V,取样间隔0.1 s,

运行时间300 s；

(3) 当背景电流趋于稳定后,每隔50 s向10 mL、50 mmol/L的pH=6.98磷酸盐缓冲溶液中注入10 μ L、5 mol/L的双氧水溶液,记录电流变化。

[0014]

所述肿瘤标志物选自下列之一: HBc、HBe或HBs。

[0015] 本发明所用原材料均可在化学试剂公司或生物制药公司购买。

[0016] 本发明的有益成果

(1) 本发明使用多孔石墨烯负载金纳米粒子作为基底材料,具有大的比表面积和生物相容性,可以显著提高捕获抗体Ab₁的固载量,其良好的导电性可以加速电子传递,对于实现传感器的高灵敏度以及低检测限具有重要意义;(2) 首次采用MoS₂@Cu₂O/Pt作为检测抗体标记物构建夹心型电化学免疫传感器,利用复合材料中各组分的化学性能以及对过氧化氢的良好电催化优势,通过各组分协同作用,实现多重信号放大;提高了传感器的灵敏度,降低了检测限;

(3) 将新颖MoS₂@Cu₂O/Pt纳米粒子直接与乙肝病毒标志物检测抗体结合,构建无酶免疫传感器,避免因酶的失活或泄露引起检测误差;同时简化了检测抗体标志物的制备,降低了成本,并显著提高所设计的电化学免疫传感器的重现性和稳定性;

(4) 一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器对HBs的检测,其线性范围10 pg/mL~200 ng/mL,检测限最低3.3 pg/mL;对HBe进行检测,其线性范围为5.0 pg/mL~100 ng/mL,检测限为1.7 pg/mL;对HBc进行检测,其线性范围为5.0 pg/mL~100 ng/mL,检测限为1.7 pg/mL;表明一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器可以达到灵敏定量检测的目的。

具体实施方式

[0017] 现将本发明通过具体实施方式进一步说明,但不限于此。

[0018] 实施例1 一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法,所述免疫传感器包括固定有乙肝病毒标志物抗体Ab₁的多孔石墨烯负载金纳米粒子修饰的电极和MoS₂@Cu₂O/Pt-Ab₂检测抗体孵化物溶液的制备,其中固定有乙肝病毒标志物抗体Ab₁的多孔石墨烯负载金纳米粒子修饰的电极的制备步骤如下:

(1) 将直径为3 mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨,超纯水清洗干净;

(2) 将6 μ L、0.5 mg/mL的多孔石墨烯负载金纳米粒子溶液滴涂在电极表面,晾干,用超纯水冲洗,晾干;

(3) 继续将6 μ L、8 μ g/mL的乙肝病毒标志物抗体Ab₁溶液滴涂到电极表面,4℃冰箱中晾干;

(4) 超纯水冲洗掉未结合的Ab₁后,继续将3 μ L、质量分数为1.0 %的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,4℃冰箱中晾干。

[0019] 实施例2 一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法,所述免疫传感器包括固定有乙肝病毒标志物抗体Ab₁的多孔石墨烯负载金纳米粒子修饰的电极和MoS₂@Cu₂O/Pt-Ab₂检测抗体孵化物溶液的制备,其中固定有乙肝病毒标志物抗体Ab₁的多孔石墨烯负载金纳米粒子修饰的电极的制备步骤如下:

(1) 将直径为4 mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨,超纯水清洗干净;

(2) 将6 μL 、1.0 mg/mL的多孔石墨烯负载金纳米粒子溶液滴涂在电极表面,晾干,用超纯水冲洗,晾干;

(3) 继续将6 μL 、10 $\mu\text{g/mL}$ 的乙肝病毒标志物抗体Ab₁溶液滴涂到电极表面,4℃冰箱中晾干;

(4) 超纯水冲洗掉未结合的Ab₁后,继续将4 μL 、质量分数为0.5 %的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,4℃冰箱中晾干。

[0020] 实施例3 一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法,所述免疫传感器包括固定有乙肝病毒标志物抗体Ab₁的多孔石墨烯负载金纳米粒子修饰的电极和MoS₂@Cu₂O/Pt-Ab₂检测抗体孵化物溶液的制备,其中固定有乙肝病毒标志物抗体Ab₁的多孔石墨烯负载金纳米粒子修饰的电极的制备步骤如下:

(1) 将直径为5 mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨,超纯水清洗干净;

(2) 将6 μL 、2.0 mg/mL的多孔石墨烯负载金纳米粒子溶液滴涂在电极表面,晾干,用超纯水冲洗,晾干;

(3) 继续将6 μL 、12 $\mu\text{g/mL}$ 的乙肝病毒标志物抗体Ab₁溶液滴涂到电极表面,4℃冰箱中晾干;

(4) 超纯水冲洗掉未结合的Ab₁后,继续将5 μL 、质量分数为0.1 %的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,4℃冰箱中晾干。

[0021] 实施例4 一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法,所述多孔石墨烯负载金纳米粒子,制备步骤如下:

将8 mL、0.5 mg/mL氧化石墨烯与200 μL 、质量分数为1%的HAuCl₄·4H₂O和20 μL 、质量分数为1%聚乙二醇溶液混合,超声1h,使混合液均匀分散;将混合液转移到聚四氟乙烯反应釜中,加热至160℃,反应14 h;冷却至室温,超纯水离心洗涤3次;冻干机干燥,制得多孔石墨烯负载金纳米粒子。

[0022] 实施例5 一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法,所述多孔石墨烯负载金纳米粒子,制备步骤如下:

将10 mL、0.5 mg/mL氧化石墨烯与200 μL 、质量分数为1%的HAuCl₄·4H₂O和20 μL 、质量分数为1%聚乙二醇溶液混合,超声1h,使混合液均匀分散;将混合液转移到聚四氟乙烯反应釜中,加热至180℃,反应12 h;冷却至室温,超纯水离心洗涤3次;冻干机干燥,制得多孔石墨烯负载金纳米粒子。

[0023] 实施例6 一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法,所述多孔石墨烯负载金纳米粒子,制备步骤如下:

将12 mL、0.5 mg/mL氧化石墨烯与200 μL 、质量分数为1%的HAuCl₄·4H₂O和20 μL 、质量分数为1%聚乙二醇溶液混合,超声1h,使混合液均匀分散;将混合液转移到聚四氟乙烯反应釜中,加热至200℃,反应14 h;冷却至室温,超纯水离心洗涤3次;冻干机干燥,制得多孔石墨烯负载金纳米粒子。

[0024] 实施例7 一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法,所述MoS₂@Cu₂O/Pt-Ab₂检测抗体孵化物溶液,制备步骤如下:

(1) MoS₂@Cu₂O的制备

将8 mL、1.0 mg/mL的(NH₄)₂MoS₄溶液和10 mL、4 mg/mL的Cu(NO₃)₂·3H₂O溶液分别超声

10min;将两种溶液混合并加入100 μ L水合肼,超声30 min;混合液转移到聚四氟乙烯反应釜中,加热至150 $^{\circ}$ C,维持12 h;冷却至室温,所得沉淀分别用超纯水和无水乙醇洗涤三次,分散在3 mL超纯水中,冻干机中干燥24 h,得到MoS₂@Cu₂O;

(2) 氨基化MoS₂@Cu₂O的制备

将30 mg的MoS₂@Cu₂O加入到10 mL的无水甲苯中,加入0.2 mL的3-氨丙基三乙氧基硅烷,70 $^{\circ}$ C回流1.5 h,超纯水离心洗涤三次;80 $^{\circ}$ C干燥12 h,得到氨基化MoS₂@Cu₂O;

(3) MoS₂@Cu₂O/Pt的制备

将8 mg的氨基化MoS₂@Cu₂O加入到25 mL的Pt纳米粒子溶液中,振荡24 h,离心分离,得到MoS₂@Cu₂O/Pt,超纯水离心洗涤三次,干燥;

所述Pt纳米粒子溶液是用100 mL、质量分数为0.01%的H₂PtCl₆·6H₂O溶液加热至沸腾,逐滴加入10 mL、38.8 mmol/L的柠檬酸钠溶液,回流反应45 min,停止加热,继续搅拌10 min,冷却至室温制得;

④ MoS₂@Cu₂O/Pt-Ab₂检测抗体孵化物溶液的制备

在2 mL、2.0 mg/mL的MoS₂@Cu₂O/Pt加入2 mL、8 μ g/mL的乙肝病毒标志物检测抗体Ab₂溶液,4 $^{\circ}$ C恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h;超纯水离心洗涤三次,重新分散到2 mL、pH=6.98磷酸盐缓冲溶液,得到MoS₂@Cu₂O/Pt-Ab₂检测抗体孵化物溶液,4 $^{\circ}$ C下保存备用。

[0025] 实施例8一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法,所述MoS₂@Cu₂O/Pt-Ab₂检测抗体孵化物溶液,制备步骤如下:

(1) MoS₂@Cu₂O的制备

将9 mL、1.2 mg/mL的(NH₄)₂MoS₄溶液和10 mL、4 mg/mL的Cu(NO₃)₂·3H₂O溶液分别超声10 min;将两种溶液混合并加入100 μ L水合肼,超声30 min;混合液转移到聚四氟乙烯反应釜中,加热至200 $^{\circ}$ C,维持10 h;冷却至室温,所得沉淀分别用超纯水和无水乙醇洗涤三次,分散在3 mL超纯水中,冻干机中干燥24 h,得到MoS₂@Cu₂O;

(2) 氨基化MoS₂@Cu₂O的制备

将50 mg的MoS₂@Cu₂O加入到10 mL的无水甲苯中,加入0.3 mL的3-氨丙基三乙氧基硅烷,70 $^{\circ}$ C回流2.0 h,超纯水离心洗涤三次;80 $^{\circ}$ C干燥12 h,得到氨基化MoS₂@Cu₂O;

(3) MoS₂@Cu₂O/Pt的制备

将10 mg的氨基化MoS₂@Cu₂O加入到30 mL的Pt纳米粒子溶液中,振荡24 h,离心分离,得到MoS₂@Cu₂O/Pt,超纯水离心洗涤三次,干燥;

所述Pt纳米粒子溶液是用100 mL、质量分数为0.01%的H₂PtCl₆·6H₂O溶液加热至沸腾,逐滴加入10 mL、38.8 mmol/L的柠檬酸钠溶液,回流反应50 min,停止加热,继续搅拌10 min,冷却至室温制得;

④ MoS₂@Cu₂O/Pt-Ab₂检测抗体孵化物溶液的制备

在2 mL、2.5 mg/mL的MoS₂@Cu₂O/Pt加入2 mL、10 μ g/mL的乙肝病毒标志物检测抗体Ab₂溶液,4 $^{\circ}$ C恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h;超纯水离心洗涤三次,重新分散到2 mL、pH=6.98磷酸盐缓冲溶液,得到MoS₂@Cu₂O/Pt-Ab₂检测抗体孵化物溶液,4 $^{\circ}$ C下保存备用。

[0026] 实施例9一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法,所述MoS₂@Cu₂O/Pt-Ab₂检测抗体孵化物溶液,制备步骤如下:

(1) MoS₂@Cu₂O的制备

将10 mL、1.5 mg/mL的 $(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4$ 溶液和10 mL、4 mg/mL的 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 溶液分别超声10min;将两种溶液混合并加入100 μL 水合肼,超声30 min;混合液转移到聚四氟乙烯反应釜中,加热至250 $^\circ\text{C}$,维持8 h;冷却至室温,所得沉淀分别用超纯水和无水乙醇洗涤三次,分散在3 mL超纯水中,冻干机中干燥24 h,得到 $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}$;

(2) 氨基化 $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}$ 的制备

将70 mg的 $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}$ 加入到10 mL的无水甲苯中,加入0.4 mL的3-氨丙基三乙氧基硅烷,70 $^\circ\text{C}$ 回流2.5 h,超纯水离心洗涤三次;80 $^\circ\text{C}$ 干燥12 h,得到氨基化 $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}$;

(3) $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}/\text{Pt}$ 的制备

将12 mg的氨基化 $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}$ 加入到35 mL的Pt纳米粒子溶液中,振荡24 h,离心分离,得到 $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}/\text{Pt}$,超纯水离心洗涤三次,干燥;

所述Pt纳米粒子溶液是用100 mL、质量分数为0.01%的 $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液加热至沸腾,逐滴加入10 mL、38.8 mmol/L的柠檬酸钠溶液,回流反应55 min,停止加热,继续搅拌10 min,冷却至室温制得;

④ $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}/\text{Pt}-\text{Ab}_2$ 检测抗体孵化物溶液的制备

在2 mL、3.0 mg/mL的 $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}/\text{Pt}$ 加入2 mL、12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乙肝病毒标志物检测抗体 Ab_2 溶液,4 $^\circ\text{C}$ 恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h;超纯水离心洗涤三次,重新分散到2 mL、pH=6.98磷酸盐缓冲溶液,得到 $\text{MoS}_2@\text{Cu}_2\text{O}/\text{Pt}-\text{Ab}_2$ 检测抗体孵化物溶液,4 $^\circ\text{C}$ 下保存备用。

[0027] 实施例10 HBs的检测

(1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,所制备的传感器为工作电极,在10 mL、50 mmol/L的pH 5.1 ~ 8.6磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2) 用计时电流法对乙肝病毒标志物进行检测,输入电压为-0.4 V,取样间隔0.1 s,运行时间300 s;

(3) 当背景电流趋于稳定后,每隔50 s向10 mL、50 mmol/L的pH=6.98磷酸盐缓冲溶液中注入10 μL 、5 mol/L的双氧水溶液,记录电流变化;

(4) 绘制标准曲线,测定样品中HBs的线性范围为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~200 ng/mL,检测限为3.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0028] 实施例11 HBe的检测

按照实施例10的方法对样品中HBe进行检测,其线性范围为5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100ng/mL,检测限为1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0029] 实施例12 HBc的检测

按照实施例10的方法对样品中HBc进行检测,其线性范围为5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100ng/mL,检测限为1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

专利名称(译)	一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN107085024A	公开(公告)日	2017-08-22
申请号	CN201710341224.2	申请日	2017-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	山东理工大学		
申请(专利权)人(译)	山东理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东理工大学		
[标]发明人	李月云 李法瀛 高增强 苏晓楠 张晓波 吕慧 王平 陈志伟 董云会		
发明人	李月云 李法瀛 高增强 苏晓楠 张晓波 吕慧 王平 陈志伟 董云会		
IPC分类号	G01N27/327 G01N33/532 G01N33/569		
CPC分类号	G01N27/3278 G01N33/532 G01N33/56983 G01N2333/005		
其他公开文献	CN107085024B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于纳米功能材料、免疫分析以及生物传感技术领域，提供了一种检测乙肝病毒标志物的免疫传感器的制备方法及应用。采用 MoS₂@Cu₂O/Pt 作为检测抗体标记物制备的免疫传感器具有特异性强，灵敏度高和检出限低等优点，对乙肝病毒标志物的检测具有重要的科学意义和应用价值。