



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109709188 A

(43)申请公布日 2019.05.03

(21)申请号 201910144057.1

(22)申请日 2019.02.27

(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 吕慧 李新进 徐振
陈磊

(51)Int.Cl.

G01N 27/327(2006.01)

G01N 27/30(2006.01)

G01N 27/48(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型
免疫传感器的制备方法及应用

(57)摘要

本发明属于免疫分析和生物传感技术领域，提供了一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器的制备方法及应用。本发明利用硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯作为催化材料，与检测抗体孵化后作为标记物，同时利用金纳米棒功能化的聚多巴胺作为电极修饰材料。所构建的夹心型电化学免疫传感器通过差分脉冲伏安法，实现了对心肌肌钙蛋白cTnI、cTnT的定量检测，具备灵敏度高，特异性强，检测限低，对心肌肌钙蛋白的早期检测具有重要的科学意义和应用价值。

1. 一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)将直径为3.0 ~ 5.0 mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨,超纯水清洗干净;

(2)取6.0 μL、1.0 ~ 3.0 mg/mL的金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液滴涂到电极表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;

(3)将6.0 μL、8.0 ~ 12 μg/mL的标志物捕获抗体Ab₁滴加到电极表面,超纯水冲洗,4 °C冰箱中晾干;

(4)继续将3.0 μL、0.8 ~ 1.2 mg/mL的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;

(5)滴加6.0 μL、0.00005 ~ 200 ng/mL的一系列不同浓度的标志物抗原Ag溶液,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;

(6)将6.0 μL、2.5 ~ 3.5 mg/mL硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液滴至电极表面,置于4 °C冰箱中孵化40min,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干,制得一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器。

2. 如权利要求1所述的一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液的制备,包括以下步骤:

(1)金纳米棒分散液的制备

取0.1 mL、25 mM氯金酸溶液,加入4.9 mL超纯水,与5.0 mL、0.2 M十六烷基三甲基溴化铵的水溶液混合;随后,在磁力搅拌下迅速加入1.0 mL、6.0 mM新配制的冰硼氢化钠溶液,室温下静置30min,制得金晶种分散液;

称取7.0 g十六烷基三甲基溴化铵和1.234 g油酸钠溶解在250 mL超纯水中,超声至完全溶解后,30 °C下反应15min;在磁力搅拌下加入250 mL、1.0 mM 氯金酸溶液,反应90min,依次加入1.0 ~ 1.5 mL抗坏血酸和0.3 ~ 0.5 mL上述制备的金晶种分散液,反应1min,在30 °C下静置12h,得到金纳米棒混合液,超纯水离心洗涤3次,重新分散于10 mL超纯水中,制得金纳米棒分散液;

(2)金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液的制备

在50 mL离心管中依次加入10 ~ 20 mg多巴胺,10 mL、10 mM、pH为8.5的Tris-HCl缓冲液,5.0 mL上述制备的金纳米棒分散液,室温下振荡8h,超纯水离心洗涤3次,制得金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液。

3. 如权利要求1所述的一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液的制备,包括以下步骤:

(1)氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取15 ~ 25 mg 氧化石墨烯加入20 mL超纯水中,超声分散,加入20 ~ 40 mg硫脲,超声5min,转移到聚四氟乙烯高压反应釜中,于180 °C反应12h;自然冷却至室温,超纯水洗涤至中性,在冷冻干燥机中于-50 °C冻干8h,制得氮硫双掺杂氧化石墨烯;

所述氧化石墨烯制备方法如下:称取2.0 g石墨粉,在搅拌条件下加入96 mL浓硫酸,反应20min后加入12 g高锰酸钾,在冰水浴条件下搅拌1.5h,加热至55 °C反应5h,依次缓慢加入100 mL超纯水和10 mL、浓度为30%双氧水,搅拌30min后离心分离,在冷冻干燥机中于-50

°C冻干12h,制得氧化石墨烯;

(2) 金铂核壳枝晶状纳米粒子分散液的制备

根据权利要求2(1)的步骤制备25 mL金纳米立方分散液,后依次加入1.0 ~ 3.0 mL、0.1 M新配制的抗坏血酸和1.0 mL、10 mM氯亚铂酸钾,于60 °C的水浴中反应12h,自然冷却至室温,用体积比为3:1的超纯水与丙酮得混合液离心洗涤3次,所得沉淀物重新分散在10 mL超纯水中,制得金铂核壳枝晶状纳米粒子分散液;

(3) 硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取10 ~ 20 mg上述制备的氮硫双掺杂氧化石墨烯超声分散在20 mL超纯水中,加入30 ~ 50 μ L、0.3 M L-赖氨酸持续超声2h,后加入200 μ L上述制备的金铂核壳枝晶状纳米粒子分散液,在室温下搅拌2h;加入10 mg硫堇,在室温下振荡8h,离心洗涤3次,在鼓风干燥箱中于40 °C烘干12h,制得硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯;

(4) 硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液的制备

取5.0 ~ 7.0 mg上述制备的硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯分散到1.0 mL超纯水中,加入100 μ L、80 ~ 120 μ g/mL标志物检测抗体溶液和900 μ L、50 mM、pH为7.0的磷酸盐缓冲溶液,于恒温振荡培养箱中4 °C条件下振荡孵化8h,离心分离,沉淀再分散到2.0 mL、50 mM、pH为7.0的磷酸盐缓冲溶液中,制得硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液,4 °C下保存备用。

4. 如权利要求1所述的一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器的制备方法,制备的传感器用于标志物的检测,其特征在于,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,上述制备的传感器为工作电极,在pH为5.5 ~ 8.5的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2) 采用差分脉冲伏安法对分析物进行检测,初始电位为-0.40 V,终止电位为0 V,脉冲振幅为50 mV,脉冲宽度为50 ms,脉冲周期为500 ms,记录不同浓度标志物抗原所对应的电流峰值,绘制工作曲线,记录电流变化;

(3) 利用工作曲线法,得到待测样品中标志物抗原的浓度。

5. 如权利要求1、3、4任一项所述的标志物,其特征在于,所述标志物选自下列之一:
cTnI、cTnT。

一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析和生物传感技术领域,涉及一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器的制备方法及应用。具体是采用硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯作为催化材料标记检测抗体,同时利用金纳米棒功能化的聚多巴胺作为电极修饰材料,通过差分脉冲伏安法实现了对心肌肌钙蛋白的灵敏检测。

背景技术

[0002] 急性心肌梗塞(AMI)作为危害人类生命和健康的第一杀手,具有发病急,死亡率高的特点。心肌肌钙蛋白是目前认为较好的心肌损害标志物,对于AMI的早期诊断和治疗具有重要作用。因此,研制出一种灵敏度高,特异性好,临床诊断符合率高,检测快捷方便的方法,可以实现心肌肌钙蛋白的灵敏检测。目前,对于心肌肌钙蛋白的检测方法有很多,如酶联免疫吸附法,免疫荧光法等,但这些方法在检测过程中需要大型仪器设备,操作复杂,检测耗时长,以及存在放射性污染等问题,因此,发明一种特异性强,灵敏度高,检测速度快,操作简便的心肌肌钙蛋白免疫传感器十分重要。

[0003] 电化学免疫传感器依靠抗原与其相应抗体的特异性结合,已经广泛应用于各种生物标志物的检测,一般可分为夹心型免疫传感器和无标记型免疫传感器两种。夹心型电化学免疫传感器结合了高特异性的免疫分析技术和高灵敏的电化学分析技术,具有灵敏度高、检测范围宽、检测下限低、检测快速等优点,已广泛应用于环境监测、食品安全控制、生物监测、临床检验等领域。

[0004] 核壳结构的双金属纳米复合材料因其独特的光学、电学以及化学性质,目前已在生产、生活及科研中得到了广泛应用。硫堇作为电子媒介体不仅可以加速电子转移,而且自身可以作为电活性物质提供电流响应信号。氮硫双掺杂氧化石墨烯具有增大的表面积、良好的导电性和生物相容性,被广泛用于电池、传感器等领域。本发明采用金纳米棒功能化的聚多巴胺作为基底材料,硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯作为催化材料,并与检测抗体进行孵化作为标记物,构建了夹心型电化学免疫传感器。通过差分脉冲伏安法进行检测,有利于实现对心肌肌钙蛋白cTnI、cTnT的定量灵敏检测。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器的制备方法及应用,实现了对心肌肌钙蛋白cTnI、cTnT的定量灵敏检测。

[0006] 本发明的目的之一是提供一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器的制备方法。

[0007] 本发明的目的之二是将所制备的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器应用于心肌肌钙蛋白cTnI、cTnT的检测。

[0008] 本发明的技术方案,包括以下步骤。

[0009] 1. 一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器的制备方法,包括以下步骤:

- (1) 将直径为3.0 ~ 5.0 mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨,超纯水清洗干净;
- (2) 取6.0 μL、1.0 ~ 3.0 mg/mL的金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液滴涂到电极表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;
- (3) 将6.0 μL、8.0 ~ 12 μg/mL的标志物捕获抗体Ab₁滴加到电极表面,超纯水冲洗,4 °C冰箱中晾干;
- (4) 继续将3.0 μL、0.8 ~ 1.2 mg/mL的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;
- (5) 滴加6.0 μL、0.00005 ~ 200 ng/mL的一系列不同浓度的标志物抗原Ag溶液,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;
- (6) 将6.0 μL、2.5 ~ 3.5 mg/mL硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液滴至电极表面,置于4 °C冰箱中孵化40min,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干,制得一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器。

[0010] 2. 所述金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液的制备,包括以下步骤:

(1) 金纳米棒分散液的制备

取0.1 mL、25 mM氯金酸溶液,加入4.9 mL超纯水,与5.0 mL、0.2 M十六烷基三甲基溴化铵的水溶液混合;随后,在磁力搅拌下迅速加入1.0 mL、6.0 mM新配制的冰硼氢化钠溶液,室温下静置30min,制得金晶种分散液;

称取7.0 g十六烷基三甲基溴化铵和1.234 g油酸钠溶解在250 mL超纯水中,超声至完全溶解后,30 °C下反应15min;在磁力搅拌下加入250 mL、1.0 mM 氯金酸溶液,反应90min,依次加入1.0 ~ 1.5 mL抗坏血酸和0.3 ~ 0.5 mL上述制备的金晶种分散液,反应1min,在30 °C下静置12h,得到金纳米棒混合液,超纯水离心洗涤3次,重新分散于10 mL超纯水中,制得金纳米棒分散液;

(2) 金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液的制备

在50 mL离心管中依次加入10 ~ 20 mg多巴胺,10 mL、10 mM、pH为8.5的Tris-HCl缓冲液,5.0 mL上述制备的金纳米棒分散液,室温下振荡8h,超纯水离心洗涤3次,制得金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液。

[0011] 3. 所述硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液的制备,包括以下步骤:

(1) 氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取15 ~ 25 mg 氧化石墨烯加入20 mL超纯水中,超声分散,加入20 ~ 40 mg硫脲,超声5min,转移到聚四氟乙烯高压反应釜中,于180 °C反应12h;自然冷却至室温,超纯水洗涤至中性,在冷冻干燥机中于-50 °C冻干8h,制得氮硫双掺杂氧化石墨烯;

所述氧化石墨烯制备方法如下:称取2.0 g石墨粉,在搅拌条件下加入96 mL浓硫酸,反应20min后加入12 g高锰酸钾,在冰水浴条件下搅拌1.5h,加热至55 °C反应5h,依次缓慢加入100 mL超纯水和10 mL、浓度为30%双氧水,搅拌30min后离心分离,在冷冻干燥机中于-50 °C冻干12h,制得氧化石墨烯;

(2) 金铂核壳枝晶状纳米粒子分散液的制备

根据权利要求2(1)的步骤制备25 mL金纳米立方分散液,后依次加入1.0 ~ 3.0 mL、0.1 M新配制的抗坏血酸和1.0 mL、10 mM氯亚铂酸钾,于60 °C的水浴中反应12h,自然冷却至室温,用体积比为3:1的超纯水与丙酮得混合液离心洗涤3次,所得沉淀物重新分散在10 mL超纯水中,制得金铂核壳枝晶状纳米粒子分散液;

(3) 硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取10 ~ 20 mg上述制备的氮硫双掺杂氧化石墨烯超声分散在20 mL超纯水中,加入30 ~ 50 μ L、0.3 M L-赖氨酸持续超声2h,后加入200 μ L上述制备的金铂核壳枝晶状纳米粒子分散液,在室温下搅拌2h;加入10 mg硫堇,在室温下振荡8h,离心洗涤3次,在鼓风干燥箱中于40 °C烘干12h,制得硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯;

(4) 硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液的制备

取5.0 ~ 7.0 mg上述制备的硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯分散到1.0 mL超纯水中,加入100 μ L、80 ~ 120 μ g/mL标志物检测抗体溶液和900 μ L、50 mM、pH为7.0的磷酸盐缓冲溶液,于恒温振荡培养箱中4 °C条件下振荡孵化8h,离心分离,沉淀再分散到2.0 mL、50 mM、pH为7.0的磷酸盐缓冲溶液中,制得硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液,4 °C下保存备用。

[0012] 4. 标志物检测步骤如下:

(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,上述制备的传感器为工作电极,在pH为5.5 ~ 8.5的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2) 采用差分脉冲伏安法对分析物进行检测,初始电位为-0.40 V,终止电位为0 V,脉冲振幅为50 mV,脉冲宽度为50 ms,脉冲周期为500 ms,记录不同浓度标志物抗原所对应的电流峰值,绘制工作曲线,记录电流变化;

(3) 利用工作曲线法,得到待测样品中标志物抗原的浓度。

[0013] 所述标志物选自下列之一:cTnI、cTnT。

[0014] 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。

[0015] 本发明的有益成果

(1) 采用金纳米棒功能化的聚多巴胺作为基底材料,具有独特的导电性和粘附性,可以结合更多抗体。金铂核壳枝晶状纳米粒子具有良好的水溶性和催化性能,且存在更多的结合位点,能有效吸附并固载抗体。硫堇具有独特的电子转移能力,同时本身可作为电活性物质提供电信号。氮硫双掺杂氧化石墨烯具有优异的导电性和增大的比表面积,可以结合更多金铂核壳枝晶状纳米粒子和硫堇。通过不同材料间的协同效应可以进一步提高复合纳米材料的催化性能,实现对检测信号放大,提高了检测心肌钙蛋白的灵敏度;

(2) 一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器,通过差分脉冲伏安法对心肌钙蛋白cTnI、cTnT进行检测。其中对cTnI的线性范围为0.0001 ~ 100 ng/mL,检测限为0.033 pg/mL;对cTnT的线性范围为0.0005 ~ 100 ng/mL,检测限为0.167 pg/mL;表明一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器可以达到定量测定的目的。

具体实施方式

[0016] 现将本发明通过具体实施方式进一步说明,但不限于此。

[0017] 实施例1一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器的制备方法,包括以下步骤:

- (1) 将直径为3.0mm的玻碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨,超纯水清洗干净;
- (2) 取6.0 μL 、1.0 mg/mL的金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液滴涂到电极表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;
- (3) 将6.0 μL 、8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标志物捕获抗体 Ab_1 滴加到电极表面,超纯水冲洗,4 °C冰箱中晾干;
- (4) 继续将3.0 μL 、0.8 mg/mL的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;
- (5) 滴加6.0 μL 、0.00005 ~ 200 ng/mL的一系列不同浓度的标志物抗原Ag溶液,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;
- (6) 将6.0 μL 、2.5 mg/mL硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液滴至电极表面,置于4 °C冰箱中孵化40min,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干,制得一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器。

[0018] 实施例2一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器的制备方法,包括以下步骤:

- (1) 将直径为4.0 mm的玻碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨,超纯水清洗干净;
- (2) 取6.0 μL 、2.0 mg/mL的金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液滴涂到电极表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;
- (3) 将6.0 μL 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标志物捕获抗体 Ab_1 滴加到电极表面,超纯水冲洗,4 °C冰箱中晾干;
- (4) 继续将3.0 μL 、1.0 mg/mL的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;
- (5) 滴加6.0 μL 、0.00005 ~ 200 ng/mL的一系列不同浓度的标志物抗原Ag溶液,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;
- (6) 将6.0 μL 、3.0 mg/mL硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液滴至电极表面,置于4 °C冰箱中孵化40min,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干,制得一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器。

[0019] 实施例3一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器的制备方法,包括以下步骤:

- (1) 将直径为5.0 mm的玻碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨,超纯水清洗干净;
- (2) 取6.0 μL 、3.0 mg/mL的金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液滴涂到电极表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;
- (3) 将6.0 μL 、12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标志物捕获抗体 Ab_1 滴加到电极表面,超纯水冲洗,4 °C冰箱中晾干;
- (4) 继续将3.0 μL 、1.2 mg/mL的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;

(5)滴加6.0 μL 、0.00005 ~ 200 ng/mL的一系列不同浓度的标志物抗原Ag溶液,超纯水冲洗电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;

(6)将6.0 μL 、3.5 mg/mL巯基与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液滴至电极表面,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化40min,超纯水冲洗电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,制得一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器。

[0020] 实施例4所述金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液的制备,包括以下步骤:

(1)金纳米棒分散液的制备

取0.1 mL、25 mM氯金酸溶液,加入4.9 mL超纯水,与5.0 mL、0.2 M十六烷基三甲基溴化铵的水溶液混合;随后,在磁力搅拌下迅速加入1.0 mL、6.0 mM新配制的冰硼氢化钠溶液,室温下静置30min,制得金晶种分散液;

称取7.0 g十六烷基三甲基溴化铵和1.234 g油酸钠溶解在250 mL超纯水中,超声至完全溶解后,30 $^{\circ}\text{C}$ 下反应15min;在磁力搅拌下加入250 mL、1.0 mM 氯金酸溶液,反应90min,依次加入1.0 mL抗坏血酸和0.3 mL上述制备的金晶种分散液,反应1min,在30 $^{\circ}\text{C}$ 下静置12h,得到金纳米棒混合液,超纯水离心洗涤3次,重新分散于10 mL超纯水中,制得金纳米棒分散液;

(2)金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液的制备

在50 mL离心管中依次加入10 mg多巴胺,10 mL、10 mM、pH为8.5的Tris-HCl缓冲液,5.0 mL上述制备的金纳米棒分散液,室温下振荡8h,超纯水离心洗涤3次,制得金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液。

[0021] 实施例5所述金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液的制备,包括以下步骤:

(1)金纳米棒分散液的制备

取0.1 mL、25 mM氯金酸溶液,加入4.9 mL超纯水,与5.0 mL、0.2 M十六烷基三甲基溴化铵的水溶液混合;随后,在磁力搅拌下迅速加入1.0 mL、6.0 mM新配制的冰硼氢化钠溶液,室温下静置30min,制得金晶种分散液;

称取7.0 g十六烷基三甲基溴化铵和1.234 g油酸钠溶解在250 mL超纯水中,超声至完全溶解后,30 $^{\circ}\text{C}$ 下反应15min;在磁力搅拌下加入250 mL、1.0 mM 氯金酸溶液,反应90min,依次加入1.0 ~ 1.5 mL抗坏血酸和0.4 mL上述制备的金晶种分散液,反应1min,在30 $^{\circ}\text{C}$ 下静置12h,得到金纳米棒混合液,超纯水离心洗涤3次,重新分散于10 mL超纯水中,制得金纳米棒分散液;

(2)金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液的制备

在50 mL离心管中依次加入15mg多巴胺,10 mL、10 mM、pH为8.5的Tris-HCl缓冲液,5.0 mL上述制备的金纳米棒分散液,室温下振荡8h,超纯水离心洗涤3次,制得金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液。

[0022] 实施例6所述金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液的制备,包括以下步骤:

(1)金纳米棒分散液的制备

取0.1 mL、25 mM氯金酸溶液,加入4.9 mL超纯水,与5.0 mL、0.2 M十六烷基三甲基溴化铵的水溶液混合;随后,在磁力搅拌下迅速加入1.0 mL、6.0 mM新配制的冰硼氢化钠溶液,室温下静置30min,制得金晶种分散液;

称取7.0 g十六烷基三甲基溴化铵和1.234 g油酸钠溶解在250 mL超纯水中,超声至完

全溶解后, 30 °C下反应15min;在磁力搅拌下加入250 mL、1.0 mM 氯金酸溶液,反应90min,依次加入1.5 mL抗坏血酸和0.5 mL上述制备的金晶种分散液,反应1min,在30 °C下静置12h,得到金纳米棒混合液,超纯水离心洗涤3次,重新分散于10 mL超纯水中,制得金纳米棒分散液;

(2) 金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液的制备

在50 mL离心管中依次加入20 mg多巴胺,10 mL、10 mM、pH为8.5的Tris-HCl缓冲液,5.0 mL上述制备的金纳米棒分散液,室温下振荡8h,超纯水离心洗涤3次,制得金纳米棒功能化的聚多巴胺分散液。

[0023] 实施例7所述硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液的制备,包括以下步骤:

(1) 氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取15 mg 氧化石墨烯加入20 mL超纯水中,超声分散,加入20 mg硫脲,超声5min,转移到聚四氟乙烯高压反应釜中,于180 °C反应12h;自然冷却至室温,超纯水洗涤至中性,在冷冻干燥机中于-50 °C冻干8h,制得氮硫双掺杂氧化石墨烯;

所述氧化石墨烯制备方法如下:称取2.0 g石墨粉,在搅拌条件下加入96 mL浓硫酸,反应20min后加入12 g高锰酸钾,在冰水浴条件下搅拌1.5h,加热至55 °C反应5h,依次缓慢加入100 mL超纯水和10 mL、浓度为30%双氧水,搅拌30min后离心分离,在冷冻干燥机中于-50 °C冻干12h,制得氧化石墨烯;

(2) 金铂核壳枝晶状纳米粒子分散液的制备

根据权利要求2(1)的步骤制备25 mL金纳米立方分散液,后依次加入1.0 mL、0.1 M新配制的抗坏血酸和1.0 mL、10 mM氯亚铂酸钾,于60 °C的水浴中反应12h,自然冷却至室温,用体积比为3:1的超纯水与丙酮得混合液离心洗涤3次,所得沉淀物重新分散在10 mL超纯水中,制得金铂核壳枝晶状纳米粒子分散液;

(3) 硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取10 mg上述制备的氮硫双掺杂氧化石墨烯超声分散在20 mL超纯水中,加入30 μ L、0.3 M L-赖氨酸持续超声2h,后加入200 μ L上述制备的金铂核壳枝晶状纳米粒子分散液,在室温下搅拌2h;加入10 mg硫堇,在室温下振荡8h,离心洗涤3次,在鼓风干燥箱中于40 °C烘干12h,制得硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯;

(4) 硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液的制备

取5.0 mg上述制备的硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯分散到1.0 mL超纯水中,加入100 μ L、80 μ g/mL标志物检测抗体溶液和900 μ L、50 mM、pH为7.0的磷酸盐缓冲溶液,于恒温振荡培养箱中4 °C条件下振荡孵化8h,离心分离,沉淀再分散到2.0 mL、50 mM、pH为7.0的磷酸盐缓冲溶液中,制得硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液,4 °C下保存备用。

[0024] 实施例8所述硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液的制备,包括以下步骤:

(1) 氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取20 mg 氧化石墨烯加入20 mL超纯水中,超声分散,加入30 mg硫脲,超声5min,转

移到聚四氟乙烯高压反应釜中,于180 °C反应12h;自然冷却至室温,超纯水洗涤至中性,在冷冻干燥机中于-50 °C冻干8h,制得氮硫双掺杂氧化石墨烯;

所述氧化石墨烯制备方法如下:称取2.0 g石墨粉,在搅拌条件下加入96 mL浓硫酸,反应20min后加入12 g高锰酸钾,在冰水浴条件下搅拌1.5h,加热至55 °C反应5h,依次缓慢加入100 mL超纯水和10 mL、浓度为30%双氧水,搅拌30min后离心分离,在冷冻干燥机中于-50 °C冻干12h,制得氧化石墨烯;

(2) 金铂核壳枝晶状纳米粒子分散液的制备

根据权利要求2(1)的步骤制备25 mL金纳米立方分散液,后依次加入2.0 mL、0.1 M新配制的抗坏血酸和1.0 mL、10 mM氯亚铂酸钾,于60 °C的水浴中反应12h,自然冷却至室温,用体积比为3:1的超纯水与丙酮得混合液离心洗涤3次,所得沉淀物重新分散在10 mL超纯水中,制得金铂核壳枝晶状纳米粒子分散液;

(3) 硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取15 mg上述制备的氮硫双掺杂氧化石墨烯超声分散在20 mL超纯水中,加入40 μ L、0.3 M L-赖氨酸持续超声2h,后加入200 μ L上述制备的金铂核壳枝晶状纳米粒子分散液,在室温下搅拌2h;加入10 mg硫堇,在室温下振荡8h,离心洗涤3次,在鼓风干燥箱中于40 °C烘干12h,制得硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯;

(4) 硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液的制备

取6.0 mg上述制备的硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯分散到1.0 mL超纯水中,加入100 μ L、100 μ g/mL标志物检测抗体溶液和900 μ L、50 mM、pH为7.0的磷酸盐缓冲溶液,于恒温振荡培养箱中4 °C条件下振荡孵化8h,离心分离,沉淀再分散到2.0 mL、50 mM、pH为7.0的磷酸盐缓冲溶液中,制得硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液,4 °C下保存备用。

[0025] 实施例9所述硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液的制备,包括以下步骤:

(1) 氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取25 mg 氧化石墨烯加入20 mL超纯水中,超声分散,加入40 mg硫脲,超声5min,转移到聚四氟乙烯高压反应釜中,于180 °C反应12h;自然冷却至室温,超纯水洗涤至中性,在冷冻干燥机中于-50 °C冻干8h,制得氮硫双掺杂氧化石墨烯;

所述氧化石墨烯制备方法如下:称取2.0 g石墨粉,在搅拌条件下加入96 mL浓硫酸,反应20min后加入12 g高锰酸钾,在冰水浴条件下搅拌1.5h,加热至55 °C反应5h,依次缓慢加入100 mL超纯水和10 mL、浓度为30%双氧水,搅拌30min后离心分离,在冷冻干燥机中于-50 °C冻干12h,制得氧化石墨烯;

(2) 金铂核壳枝晶状纳米粒子分散液的制备

根据权利要求2(1)的步骤制备25 mL金纳米立方分散液,后依次加入3.0 mL、0.1 M新配制的抗坏血酸和1.0 mL、10 mM氯亚铂酸钾,于60 °C的水浴中反应12h,自然冷却至室温,用体积比为3:1的超纯水与丙酮得混合液离心洗涤3次,所得沉淀物重新分散在10 mL超纯水中,制得金铂核壳枝晶状纳米粒子分散液;

(3) 硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取20 mg上述制备的氮硫双掺杂氧化石墨烯超声分散在20 mL超纯水中,加入50 μL 、0.3 M L-赖氨酸持续超声2h,后加入200 μL 上述制备的金铂核壳枝晶状纳米粒子分散液,在室温下搅拌2h;加入10 mg硫堇,在室温下振荡8h,离心洗涤3次,在鼓风干燥箱中于40 $^{\circ}\text{C}$ 烘干12h,制得硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯;

(4) 硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液的制备

取7.0 mg上述制备的硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯分散到1.0 mL超纯水中,加入100 μL 、120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标志物检测抗体溶液和900 μL 、50 mM、pH为7.0的磷酸盐缓冲溶液,于恒温振荡培养箱中4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下振荡孵化8h,离心分离,沉淀再分散到2.0 mL、50 mM、pH为7.0的磷酸盐缓冲溶液中,制得硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液,4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

[0026] 实施例10心肌肌钙蛋白cTnI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,上述制备的传感器为工作电极,在pH为5.5 ~ 8.5的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2) 采用差分脉冲伏安法对分析物进行检测,初始电位为-0.40 V,终止电位为0 V,脉冲振幅为50 mV,脉冲宽度为50 ms,脉冲周期为500 ms,记录不同浓度标志物抗原所对应的电流峰值,绘制工作曲线,记录电流变化;

(3) 根据所得电流峰值与心肌肌钙蛋白cTnI浓度之间的线性关系,绘制工作曲线,线性范围为0.0001 ~ 100 ng/mL,检测限为0.033 pg/mL。

[0027] 实施例11心肌肌钙蛋白cTnT的检测

按照实施例10的方法对样品中cTnT进行检测,线性范围为0.0005 ~ 100 ng/mL,检测限为0.167 pg/mL。

专利名称(译)	一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN109709188A	公开(公告)日	2019-05-03
申请号	CN201910144057.1	申请日	2019-02-27
[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 吕慧 李新进 徐振 陈磊		
发明人	李月云 吕慧 李新进 徐振 陈磊		
IPC分类号	G01N27/327 G01N27/30 G01N27/48 G01N33/68 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫分析和生物传感技术领域，提供了一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器的制备方法及应用。本发明利用硫堇与金铂核壳枝晶状纳米粒子功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯作为催化材料，与检测抗体孵化后作为标记物，同时利用金纳米棒功能化的聚多巴胺作为电极修饰材料。所构建的夹心型电化学免疫传感器通过差分脉冲伏安法，实现了对心肌肌钙蛋白cTnI、cTnT的定量检测，具备灵敏度高，特异性强，检测限低，对心肌肌钙蛋白的早期检测具有重要的科学意义和应用价值。