



(21)申请号 201610702017.0

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2016.08.22

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106248656 A

US 6586738 B2,2003.07.01,

CN 102259936 A,2011.11.30,

CN 105562035 A,2016.05.11,

(43)申请公布日 2016.12.21

Lingshan Gong 等.Highly sensitive and stabilized sensing of 6-

(73)专利权人 福建师范大学

地址 350108 福建省福州市闽侯大学城科技路1号福建师范大学旗山校区

benzylaminopurine based on NiCo₂O₄

nanosuperstructures.《RSC Advances》.2016,第6卷第4758-4763页.

(72)发明人 林燕语 戴宏 郑红利

审查员 唐海银

(74)专利代理机构 福州智理专利代理有限公司
35208

代理人 王义星

(51)Int.Cl.

G01N 21/76(2006.01)

G01N 27/48(2006.01)

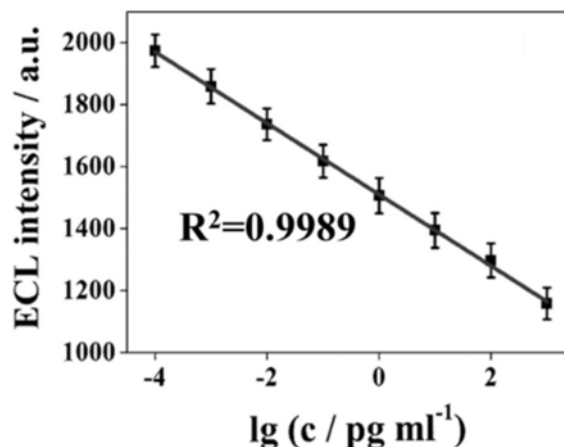
权利要求书2页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种基于纳米NiCo₂O₄@AD双功能催化剂的电化学发光免疫传感器的制备及应用

(57)摘要

本发明公开一种基于纳米NiCo₂O₄@AD双功能催化剂的电化学发光免疫传感器的制备及应用,特点是通过将金刚烷修饰到NiCo₂O₄纳米片表面进而制得双功能催化剂NiCo₂O₄@AD,由于具有大比表面积及优异的电子传导能力的NiCo₂O₄纳米片与具有良好供电能力的金刚烷之间的协同效应,该复合材料修饰的电极显著提高了S₂O₈²⁻电化学发光体系的灵敏度及稳定性。基于NiCo₂O₄@AD良好的生物兼容性,将前列腺素E1抗体及前列腺素E1固定到修饰电极表面,制得前列腺素E1电化学发光免疫传感器,用于前列腺素E1的检测,检测范围0.1 fg/ml-1.0 ng/ml。具有特异性强、灵敏度高、稳定性好等优点。



1. 一种基于金刚烷修饰的纳米 NiCo_2O_4 双功能催化剂的电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) 玻碳电极首先在铺有氧化铝粉末的麂皮上机械打磨抛光,用二次水洗去表面残留粉末,再移入超声水浴中清洗,直至清洗干净,最后依序用乙醇,稀酸和水彻底洗涤;

(2) 滴加 $3\mu\text{L}$ 浓度为 0.5 mg/mL 的金刚烷修饰的纳米 NiCo_2O_4 悬浮液于干净的玻碳电极表面,红外灯下烘干,冷却至室温;

(3) 滴加 $30\mu\text{L}$ 浓度为 $2.0\text{ wt\%}$ 的戊二醛溶液于步骤(2)制得的修饰电极表面活化 1 h ;

(4) 滴加 $30\mu\text{L}$ 前列腺素E1抗体溶液于步骤(3)制得的修饰电极表面并在 4°C 冰箱中孵育 40 min ,用去离子水洗去物理吸附的前列腺素E1抗体;

(5) 取 $40\mu\text{L}$ 浓度为 $1.0\text{ wt.}\%$ 的BSA 滴加到步骤(4)制得的修饰电极表面 4°C 冰箱中孵育 1 h ,以封闭电极表面上非特异性活性位点,用去离子水冲洗电极表面洗去物理吸附,并保存在 4°C 冰箱中;

(6) 取 $30\mu\text{L}$ 浓度为 0.1 fg/mL - 1.0 ng/mL 的前列腺素E1标准溶液滴于步骤(5)制得的修饰电极表面并在 4°C 冰箱中孵育 40 min ,用 $\text{pH}7.5$ 的 PBS缓冲溶液冲洗电极表面,制得一种基于金刚烷修饰的纳米 NiCo_2O_4 双功能催化剂的前列腺素E1的电化学发光免疫传感器;

所述的金刚烷修饰的纳米 NiCo_2O_4 悬浮液由下述方法制备的: 1.0 mL 浓度为 1.0 mg/mL 的纳米 NiCo_2O_4 与 1.0 mL 浓度为 $1.0\text{ wt\%}$ 的3-氨基三乙氧基硅烷混合振荡 12 h ,离心收集氨基功能化的纳米 NiCo_2O_4 产物并重新分散在 2.0 mL 的去离子水中;然后将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐及N-羟基琥珀酰亚胺活化的1-金刚烷甲酸与氨基功能化的纳米 NiCo_2O_4 产物混合振荡 2 h ,制得金刚烷修饰的纳米 NiCo_2O_4 , 离心收集金刚烷修饰的纳米 NiCo_2O_4 产物并重新分散在 2.0 mL 的去离子水中。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的纳米 NiCo_2O_4 材料的由下述方法制备的:用 20 mL 乙醇及 40 mL 去离子水配制浓度为 1 mmol 的 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液,浓度为 2 mmol 的 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液及浓度为 4.5 mmol 的六亚甲基四胺的混合溶液,将混合溶液转移到 100 mL 聚四氟乙烯反应釜内衬中, 90°C 下磁力搅拌 24 h 后冷却至室温,通过离心收集沉淀物并用去离子水及乙醇洗涤数次,在烘箱中 60°C 下烘干 12 h ,最后,在空气中 350°C 煅烧 2 h 获得介孔 NiCo_2O_4 纳米片。

3. 权利要求1-2任一所述的方法制备的一种基于金刚烷修饰的纳米 NiCo_2O_4 双功能催化剂的电化学发光免疫传感器。

4. 权利要求3所述的一种基于金刚烷修饰的纳米 NiCo_2O_4 双功能催化剂的电化学发光免疫传感器,其特征在于,用于前列腺素E1的检测,检测步骤如下:

(1) 使用电化学工作站采用三电极体系进行测定,以权利要求3所述的一种基于金刚烷修饰的纳米 NiCo_2O_4 双功能催化剂的电化学发光免疫传感器为工作电极, Ag/AgCl 为参比电极,铂丝电极为对电极,在 0.1 mol/L 的 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 的 $\text{pH } 8.0$ 的 PBS缓冲溶液中进行测试;

(2) 采用循环伏安电压对不同浓度的前列腺素E1标准溶液进行检测,扫描电压范围为 0.8 V - -1.8 V ,扫描速率为 100 mV/s ,通过电致化学发光设备采集电致化学发光信号,光电倍增管电压为 900 V ,通过所得的电致化学发光强度与前列腺素E1标准溶液浓度之间的关系,绘制工作曲线;

(3) 待测样品溶液代替前列腺素E1标准溶液进行检测,检测的结果可通过工作曲线查得。

一种基于纳米 NiCo_2O_4 @AD双功能催化剂的电化学发光免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于新型功能材料与生物传感检测技术领域,具体涉及一种基于纳米 NiCo_2O_4 @AD双功能催化剂的电化学发光免疫传感器的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 前列腺素E1 (PGE1),广泛存在于体内的生物活性物质,是前列腺素家族中的重要成员,其对多器官系统中细胞功能有着多样化及强大的作用。作为一种环氧合酶的花生四烯酸代谢产物,PGE1与炎前和抗炎作用及骨质疏松症相关,一些研究发现PGE1能减少脊髓损伤引起的压迫损伤并且其对骨质疏松症治疗有一定的有益效果。PGE1,作为一种有效的血管扩张剂,具有扩张血管、改善末梢循环和抑制血小板聚集、防止血栓形成作用,其通过增加心输出量和降低充盈压和肺血管阻力对严重心脏衰竭患者具有有益的血流动力学效应。PGE1与血管疾病和肺部疾病密切相关,它在监测和量化人体前列腺素水平中有着关键的作用,因此在临床研究上,发展一种快速、简便、灵敏和低成本的PGE1的检测方法有着巨大的需求及重要的意义。

[0003] 电化学发光免疫传感器,利用抗原与抗体之间的特异性结合的一类生物传感器,具有灵敏度高、选择性好、操作简便、易于小型化、可连续快速、自动化检测分析等优点,具有良好的应用前景。本发明制备了一种基于 NiCo_2O_4 @AD双功能催化剂的电化学发光免疫传感器,并实现对前列腺素E1的高灵敏检测。已有文献报道有着多种价态的过渡金属的氢氧化物或氧化物,如 Co_3O_4 , NiO , $\text{Ni}(\text{OH})_2$ and NiCo_2O_4 ,对析氧反应过程有一定的催化作用。其中,由于 $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$ 及 $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{3+}$ 氧化还原电对的贡献, NiCo_2O_4 具有更好的电子传导能力及电化学活性。本发明通过将金刚烷修饰到 NiCo_2O_4 纳米片表面进而制得双功能催化剂 NiCo_2O_4 @AD,由于该复合物具有大比表面积及良好的生物相容性,可提供更多电活性位点及生物分子固定位点,其修饰电极对析氧反应过程展示了优异的催化性能并能显著提高 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 电化学发光体系的灵敏度及稳定性。基于 NiCo_2O_4 @AD优异的生物相容性及高催化性能,所制得的免疫传感器具有特异性强、灵敏度高、稳定性好、检测限低等优点。

发明内容

[0004] 本发明的目的之一是基于纳米 NiCo_2O_4 @AD材料,构建一种无标记,稳定性好,灵敏度高的电化学发光免疫传感器的制备。

[0005] 本发明的目的之二是将该电化学发光免疫传感器应用于前列腺素E1的高灵敏检测。

[0006] 为实现发明目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 1.一种基于 NiCo_2O_4 @AD双功能催化剂的电化学发光免疫传感器的制备方法:

[0008] (1)玻碳电极(GCE)首先在铺有氧化铝粉末的麂皮上机械打磨抛光,用二次水洗去表面残留粉末,再移入超声水浴中清洗,直至清洗干净,最后依序用乙醇,稀酸和水彻底洗

涤；

[0009] (2)滴加3 μ L 浓度为 0.5 mg/mL 的NiCo₂O₄@AD悬浮液于干净的玻碳电极表面,红外灯下烘干,冷却至室温,制得NiCo₂O₄@AD修饰玻碳电极;

[0010] (3)滴加30 μ L 浓度为 2.0 wt%的戊二醛溶液于NiCo₂O₄@AD修饰电极表面活化1 h;

[0011] (4)滴加30 μ L前列腺素E1抗体(anti-PGE1)溶液于修饰电极表面并在4 $^{\circ}$ C冰箱中孵育40 min,用去离子水洗去物理吸附的anti-PGE1,制得NiCo₂O₄@AD/ anti-PGE1修饰玻碳电极;

[0012] (5)取40 μ L 浓度为1.0 wt.%的BSA 滴加到修饰电极表面4 $^{\circ}$ C冰箱中孵育1 h,以封闭电极表面上非特异性活性位点,用去离子水冲洗电极表面洗去物理吸附,并保存在4 $^{\circ}$ C冰箱中;

[0013] (6)取30 μ L浓度为0.1 fg/ml-1.0 ng/ml的前列腺素E1标准溶液滴于NiCo₂O₄@AD/anti-PGE1修饰电极表面并在4 $^{\circ}$ C冰箱中孵育40 min,用pH7.5的 PBS缓冲溶液冲洗电极表面,制得一种基于纳米NiCo₂O₄@AD双催化剂的PGE1电化学发光免疫传感器。

[0014] 2.上述NiCo₂O₄@AD材料的制备:1.0mL浓度为1.0mg/mL的NiCo₂O₄与1.0mL浓度为1.0wt %的3-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 混合振荡12h,离心收集氨基功能化的NiCo₂O₄产物并重新分散在2.0 mL的去离子水中;然后将(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐) (EDC) 及N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化的1-金刚烷甲酸与氨基功能化的NiCo₂O₄产物混合振荡2h,制得金刚烷修饰的NiCo₂O₄ (NiCo₂O₄@AD), 离心收集NiCo₂O₄@AD产物并重新分散在2.0 mL的去离子水中。

[0015] 3.上述NiCo₂O₄材料的制备:用20mL乙醇及40mL去离子水配制浓度为1mmol 的 Ni(NO₃)₂·6H₂O溶液,浓度为2 mmol的Co(NO₃)₂·6H₂O 溶液及浓度为4.5 mmol 的六亚甲基四胺的混合溶液,将混合溶液转移到 100 mL 聚四氟乙烯反应釜内衬中,90 $^{\circ}$ C下磁力搅拌24 h后冷却至室温,通过离心收集沉淀物并用去离子水及乙醇洗涤数次,在烘箱中60 $^{\circ}$ C下烘干12 h,最后,在空气中350 $^{\circ}$ C 煅烧2 h 获得介孔NiCo₂O₄纳米片。

[0016] 4.本发明上述方法制备的一种基于纳米NiCo₂O₄@AD双功能催化剂的电化学发光免疫传感器。

[0017] 5.前列腺素E1的检测步骤:

[0018] (1)使用电化学工作站采用三电极体系进行测定,以上述制备的一种基于纳米NiCo₂O₄@AD双催化剂的电化学发光免疫传感器为工作电极,Ag/AgCl为参比电极,铂丝电极为对电极,在0.1mol/ml K₂S₂O₈的pH 8.0的 PBS缓冲溶液中进行测试;

[0019] (2)采用循环伏安电压对不同浓度的前列腺素E1标准溶液进行检测,扫描电压范围为0.8V--1.8 V,扫描速率为100 mV/s,通过电致化学发光设备采集电致化学发光信号,光电倍增管电压为900V,通过所得的电致化学发光强度与前列腺素E1标准溶液浓度之间的关系,绘制工作曲线;

[0020] (3)待测样品溶液代替前列腺素E1标准溶液进行检测,检测的结果可通过工作曲线查得。

[0021] 本发明的显著优点为:

[0022] (1)由于Ni²⁺/Ni³⁺及Co²⁺/Co³⁺氧化还原电对的贡献,NiCo₂O₄具有优异的电子传导

性及电化学活性,同时具有大比表面积及介孔结构的 NiCo_2O_4 纳米片可提供更多电活性位点及生物分子固定位点。金刚烷具有大比表面积及较好的供电子能力。本发明通过将金刚烷修饰到 NiCo_2O_4 纳米片表面制得双功能催化剂 $\text{NiCo}_2\text{O}_4@\text{AD}$,该复合物修饰电极对析氧反应过程展示了优异的催化性能并能显著提高 $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 电化学发光体系的灵敏度及稳定性,本发明制备的免疫传感器具有较高的灵敏度。

[0023] (2) $\text{NiCo}_2\text{O}_4@\text{AD}$ 具有大比表面积及良好的生物兼容性有利于抗体在电极表面的固定,本发明制备的免疫传感器具有较好的稳定性。

[0024] (3) 本发明利用抗原、抗体的免疫反应,提高了检测方法的特异性。

附图说明

[0025] 图1A为 NiCo_2O_4 纳米片的电子发射扫描电子显微镜(SEM)图。

[0026] 图1B为 NiCo_2O_4 纳米片的透射电子显微镜(TEM)图。

[0027] 图1B插图图1B为 NiCo_2O_4 纳米片的高分辨透射电子显微镜(HRTEM)图。

[0028] 图2为 $\text{NiCo}_2\text{O}_4@\text{AD}$ 的红外光谱(IR)图。

[0029] 图3为免疫传感电极的电化学发光响应信号与前列腺素E1标准溶液浓度的线性关系图。

具体实施方式

[0030] 本发明用下列实施例来进一步说明本发明,但本发明的保护范围并不限于下列实施例。

[0031] 实施例1

[0032] 1.一种基于纳米 $\text{NiCo}_2\text{O}_4@\text{AD}$ 双功能催化剂的电化学发光免疫传感器的制备:

[0033] (1)玻碳电极(GCE)首先在铺有氧化铝粉末的麂皮上机械打磨抛光,用二次水洗去表面残留粉末,再移入超声水浴中清洗,直至清洗干净,最后依序用乙醇,稀酸和水彻底洗涤;

[0034] (2)滴加 $3\mu\text{L}$ 浓度为 0.5 mg/mL 的 $\text{NiCo}_2\text{O}_4@\text{AD}$ 悬浮液于干净的玻碳电极表面,红外灯下烘干,冷却至室温,制得 $\text{NiCo}_2\text{O}_4@\text{AD}$ 修饰玻碳电极;

[0035] (3)滴加 $30\mu\text{L}$ 浓度为 $2.0\text{wt}\%$ 的戊二醛溶液于 $\text{NiCo}_2\text{O}_4@\text{AD}$ 修饰电极表面活化1 h;

[0036] (4)滴加 $30\mu\text{L}$ 前列腺素E1抗体(anti-PGE1)溶液于修饰电极表面并在 4°C 冰箱中孵育40 min,用去离子水洗去物理吸附的anti-PGE1,制得 $\text{NiCo}_2\text{O}_4@\text{AD}/\text{anti-PGE1}$ 修饰玻碳电极;

[0037] (5)取 $40\mu\text{L}$ 浓度为 $1.0\text{ wt}\%$ 的BSA 滴加到修饰电极表面 4°C 冰箱中孵育1 h,以封闭电极表面上非特异性活性位点,用去离子水冲洗电极表面洗去物理吸附,并保存在 4°C 冰箱中;

[0038] (6)取 $30\mu\text{L}$ 浓度为 0.1 fg/mL - 1.0 ng/mL 的PGE1标准溶液滴于 $\text{NiCo}_2\text{O}_4@\text{AD}/\text{anti-PGE1}$ 修饰电极表面并在 4°C 冰箱中孵育40 min,用 $\text{pH}7.5$ 的 PBS缓冲溶液冲洗电极表面,制得一种基于纳米 $\text{NiCo}_2\text{O}_4@\text{AD}$ 双催化剂的PGE1电化学发光免疫传感器。

[0039] 实施例2

[0040] NiCo_2O_4 材料的制备:

[0041] 用20 mL 乙醇及40 mL 去离子水配制浓度为1 mmol 的 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液, 浓度为2 mmol 的 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶液及浓度为4.5 mmol 的六亚甲基四胺的混合溶液, 将混合溶液转移到 100 mL 聚四氟乙烯反应釜内衬中, 90 °C下磁力搅拌24 h后冷却至室温, 通过离心收集沉淀物并用去离子水及乙醇洗涤数次, 在烘箱中60 °C下烘干12 h, 最后, 在空气中350 °C 煅烧2 h 获得介孔 NiCo_2O_4 纳米片。 NiCo_2O_4 纳米片的电子发射扫描电子显微镜(SEM)图及透射电子显微镜(TEM)图, 如图1A及图1B所示, 表明 NiCo_2O_4 纳米片是由 NiCo_2O_4 纳米粒子单元相互连接构成, 形成大量的粒间孔隙, 这样的多孔结构将极大地增加电活性位点。高分辨透射电子显微镜(HRTEM)图, 如图1B中插图所示, 可见清晰的约0.25 nm的晶格条纹, 与尖晶石 NiCo_2O_4 (311)晶面一致。

[0042] 实施例3

[0043] NiCo_2O_4 @AD材料的制备:

[0044] 1.0 mL 浓度为1.0 mg/mL 的 NiCo_2O_4 与1.0 mL 浓度为1.0 wt%的3-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 混合振荡12h, 离心收集氨基功能化的 NiCo_2O_4 产物并重新分散在2.0 mL的去离子水中; 然后将(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐) (EDC) 及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化的1-金刚烷甲酸与氨基功能化的 NiCo_2O_4 产物混合振荡2h, 制得金刚烷修饰的 NiCo_2O_4 (NiCo_2O_4 @AD), 离心收集 NiCo_2O_4 @AD产物并重新分散在2.0 mL的去离子水中。 NiCo_2O_4 @AD的红外光谱(IR)图, 如图2所示, 在1666 cm^{-1} 和3185 cm^{-1} 处有吸收峰出现, 这是典型的酰胺基团中C = O及N-H基团的伸缩振动吸收峰, 表明了 NiCo_2O_4 @AD的成功制备。

[0045] 实施例4

[0046] 前列腺素E1的检测步骤:

[0047] (1) 使用电化学工作站采用三电极体系进行测定, 以所制备的一种基于纳米 NiCo_2O_4 @AD双催化剂的电化学发光免疫传感器为工作电极, Ag/AgCl为参比电极, 铂丝电极作为对电极, 在0.1mol/ml $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 的pH 8.0的 PBS缓冲溶液中进行测试;

[0048] (2) 采用循环伏安电压对不同浓度的前列腺素E1标准溶液进行检测, 扫描电压范围为0.8V--1.8 V, 扫描速率为100 mV/s, 通过电致化学发光设备采集电致化学发光信号, 光电倍增管电压为900V, 通过所得的电致化学发光强度与前列腺素E1标准溶液浓度之间的关系, 绘制工作曲线, 图3为免疫传感电极的电化学发光响应信号与前列腺素E1标准溶液浓度的线性关系图;

[0049] (3) 待测样品溶液代替前列腺素E1标准溶液进行检测, 检测的结果可通过工作曲线查得。

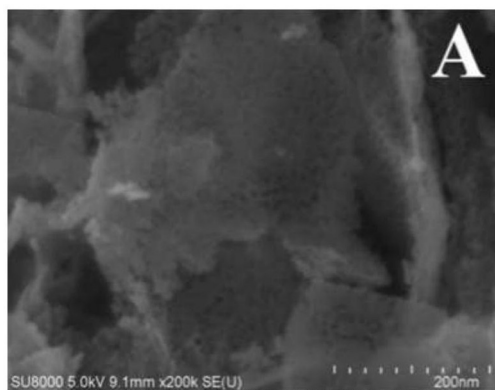


图1A

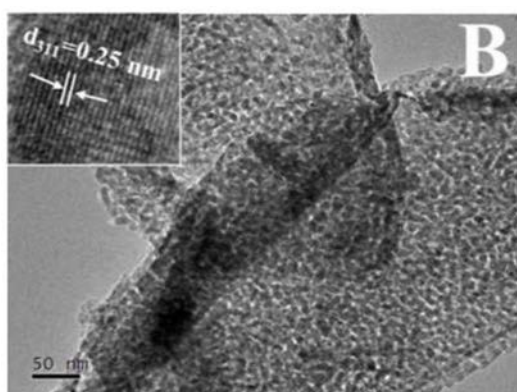


图1B

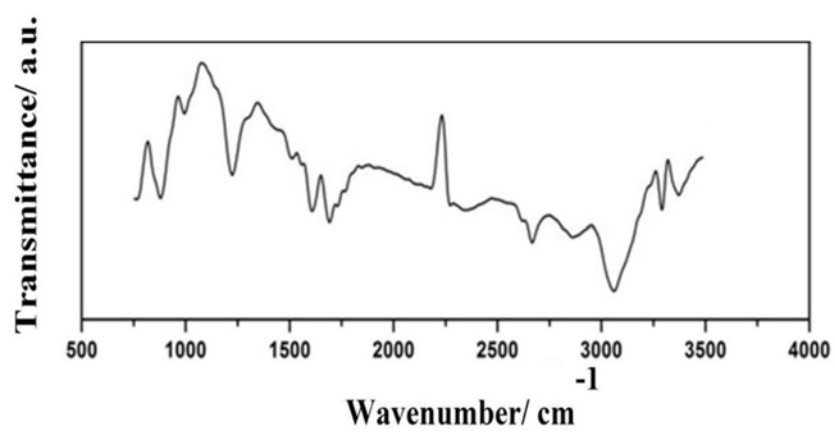


图2

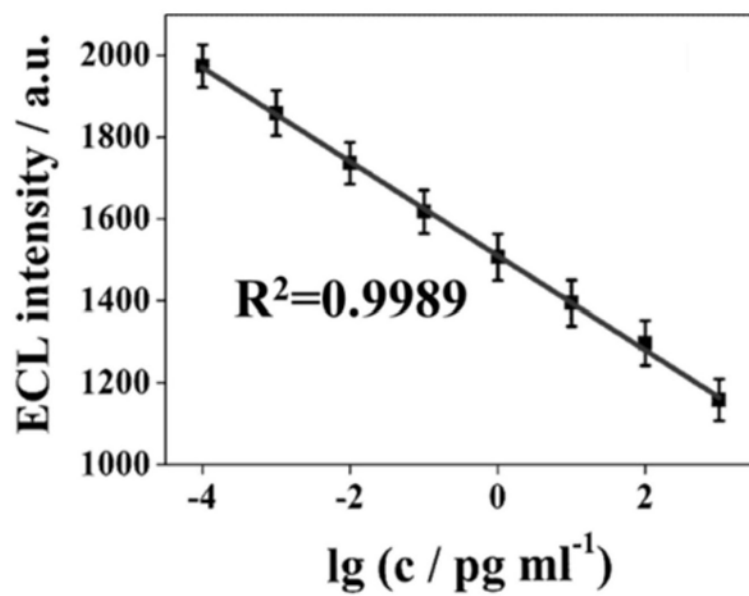


图3

专利名称(译)	一种基于纳米NiCo ₂ O ₄ @AD双功能催化剂的电化学发光免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN106248656B	公开(公告)日	2018-11-23
申请号	CN201610702017.0	申请日	2016-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	福建师范大学		
申请(专利权)人(译)	福建师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	福建师范大学		
[标]发明人	林燕语 戴宏 郑红利		
发明人	林燕语 戴宏 郑红利		
IPC分类号	G01N21/76 G01N27/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N21/76 G01N27/48 G01N33/53		
审查员(译)	唐海银		
其他公开文献	CN106248656A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种基于纳米NiCo₂O₄@AD双功能催化剂的电化学发光免疫传感器的制备方法及应用, 特点是通过将金刚烷修饰到NiCo₂O₄纳米片表面进而制得双功能催化剂NiCo₂O₄@AD, 由于具有大比表面积及优异的电子传导能力的NiCo₂O₄纳米片与具有良好供电能力的金刚烷之间的协同效应, 该复合材料修饰的电极显著提高了S₂O₈²⁻-电化学发光体系的灵敏度及稳定性。基于NiCo₂O₄@AD良好的生物兼容性, 将前列腺素E₁抗体及前列腺素E₁固定到修饰电极表面, 制得前列腺素E₁电化学发光免疫传感器, 用于前列腺素E₁的检测, 检测范围0.1 fg/ml-1.0 ng/ml。具有特异性强、灵敏度高、稳定性好等优点。

