



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 107727858 B

(45)授权公告日 2019.06.25

(21)申请号 201710924116.8

(22)申请日 2017.09.30

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107727858 A

(43)申请公布日 2018.02.23

(73)专利权人 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 王平 裴福彬 李明党 马恩慧
余昊轩 董云会 李月云

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

G01N 27/416(2006.01)

B82Y 5/00(2011.01)

B82Y 30/00(2011.01)

B82Y 40/00(2011.01)

(56)对比文件

Qinfeng Rong等.Network nanostructured polypyrrole hydrogel/Au composites as enhanced electrochemical biosensing platform.《Scientific reports》.2015,第5卷文献号11440第1-8页.

Mingdang Li等.An ultrasensitive sandwich-type electrochemical immunosensor based on the signal amplification strategy of mesoporous core-shell Pd@Pt nanoparticles/amino group functionalized grapheme nanocomposite.《Biosensors & Bioelectronics》.2017,

Lakshinandan Goswami等.Determining the Ionic and Electronic Contribution in Conductivity.《The journal of physical chemistry》.2011,第115卷第19668-19675页.

审查员 陈伟潘

权利要求书2页 说明书7页

(54)发明名称

一种基于Rh@Pt纳米枝晶复合材料免疫传感器的制备方法及应用

(57)摘要

本发明属于新型功能材料与生物传感检测技术领域,提供了一种基于Rh@Pt纳米枝晶复合材料免疫传感器的制备方法及应用。具体是采用Rh@Pt纳米枝晶复合材料作为标记物,聚吡咯-金纳米粒子作为基底,制备了一种电化学免疫传感器并应用于肿瘤标志物抗原的检测。

1. 一种基于负载Rh@Pt纳米枝晶的氨基化石墨烯的免疫传感器的制备方法,其特征在于,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、乙醇清洗干净;

(2) 取6 μ L、1 ~ 3 mg/mL的聚吡咯-金纳米粒子修饰到电极表面,室温下晾干,用超纯水冲洗电极表面,晾干;

(3) 继续将6 μ L、8 ~ 12 μ g/mL的肿瘤标志物捕获抗体Ab₁滴加到电极表面,4 °C冰箱中干燥;

(4) 继续将3 μ L、0.5 ~ 1 wt%的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;

(5) 滴加6 μ L、0.0001 ~ 5 ng/mL的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原Ag溶液,用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4 °C冰箱中干燥;

(6) 将6 μ L、1 ~ 3 mg/mL的负载Rh@Pt纳米枝晶的氨基化石墨烯的肿瘤标志物检测抗体Rh@Pt/NH₂-GS/Ab₂溶液,滴涂于电极表面上,置于4 °C冰箱中孵化40 min后用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液清洗电极,4 °C冰箱中干燥,制得一种基于负载Rh@Pt纳米枝晶的氨基化石墨烯的免疫传感器;

所述聚吡咯-金纳米粒子的制备,步骤如下:

(1) 聚吡咯的合成

取0.5 ~ 1.5 mL吡咯分散在25 mL、0.5 ~ 1.5 mol/L的盐酸里,得吡咯和盐酸的混合液;取10 mL吡咯和盐酸的混合液,搅拌条件下加入2 mL、1 mol/L的过硫酸铵溶液,冰浴反应4 ~ 6 h,离心分离,室温干燥得到聚吡咯;

(2) 金纳米粒子分散液的制备

取1 mL、0.8 ~ 1.2 wt%的氯金酸溶液加入到99 mL超纯水中,加热至微沸,加入2.5 mL、0.5 ~ 1.5 wt%的柠檬酸钠溶液,保持微沸状态15 min后,冷却至室温,得到金纳米粒子分散液,将其转移到4 °C下保存备用;

(3) 聚吡咯-金纳米粒子的合成

将20 ~ 30 mL上述制备的金纳米粒子分散液离心分离,重新分散在10 mL的超纯水中,加入10 mg聚吡咯,在振荡培养箱中振荡12 h,离心分离,室温干燥,得聚吡咯-金纳米粒子;

所述负载Rh@Pt纳米枝晶的氨基化石墨烯的制备方法及其应用的肿瘤标志物检测抗体Rh@Pt/NH₂-GS/Ab₂溶液的制备,步骤如下:

(1) Rh@Pt纳米枝晶的合成

取0.21 g柠檬酸钠和0.2 ~ 0.3 g十六烷基三甲基氯化铵加入到9 mL超纯水中,搅拌5 min,依次加入0.1 mL、0.1 mol/L的三氯化铑,0.9 mL、0.08 ~ 0.12 mol/L的氯铂酸,搅拌15 min后,加入1 mL甲醛,将混合液转入高压反应釜中,在180 °C的条件之下反应40 ~ 60 min,冷却至室温,离心分离,冷冻干燥,得Rh@Pt纳米枝晶;

(2) 氨基化石墨烯的合成

取0.8 g石墨粉加90 ~ 98 mL、98 wt%的浓硫酸和10 mL浓磷酸,搅拌25 min后,加入4 ~ 5 g高锰酸钾,搅拌15 min后,加热至45 ~ 60 °C,反应12 h后,加40 mL超纯水冻成的冰,再加0.5 mL、20 ~ 30 wt%的双氧水,搅拌20 min后离心洗涤,加30 mL超纯水,超声40 min,离心分离,将上清液冷冻干燥得到氧化石墨烯;取0.1 g氧化石墨烯放入小烧杯中,加40 mL

乙二醇,超声30 min,加0.8 ~ 1 mL浓氨水,将混合物转入高压反应釜,180 °C下反应5 h,冷却到室温,离心分离,室温下干燥得氨基化石墨烯;

(3) 负载Rh@Pt纳米枝晶的氨基化石墨烯的合成

取15 mg氨基化石墨烯和5 ~ 10 mg的Rh@Pt纳米枝晶分散在10 mL超纯水中,超声1 h,离心分离得负载Rh@Pt纳米枝晶的氨基化石墨烯;

(4) 负载Rh@Pt纳米枝晶的氨基化石墨烯的肿瘤标志物检测抗体Rh@Pt/NH₂-GS/Ab₂溶液的制备

将1 ~ 4 mg的负载Rh@Pt纳米枝晶的氨基化石墨烯分散到1 mL超纯水中,加入100 μL、80 ~ 120 μg/mL的肿瘤标志物检测抗体Ab₂溶液和900 μL、50 mmol/L的pH为7.4磷酸盐缓冲溶液,4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h;在4 °C下,6000 rpm转速下离心10 min,得下层沉淀,加入1 mL、50 mmol/L的pH为7.4磷酸盐缓冲溶液离心洗涤,得下层沉淀,最后加入1 mL、50 mmol/L的pH为7.4磷酸盐缓冲溶液,制得负载Rh@Pt纳米枝晶的氨基化石墨烯的肿瘤标志物检测抗体Rh@Pt/NH₂-GS/Ab₂溶液,4 °C下保存备用。

2. 如权利要求1所述的一种基于负载Rh@Pt纳米枝晶的氨基化石墨烯的免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述肿瘤标志物选自下列之一:AFP、CEA、PSA。

3. 如权利要求1所述的制备方法制备的一种基于负载Rh@Pt纳米枝晶的氨基化石墨烯的免疫传感器,用于肿瘤标志物的检测,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为5.3 ~ 8.0磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2) 用时间-电流法对分析物进行检测,输入电压为-0.4 V,取样间隔0.1 s,运行时间400 s;

(3) 当背景电流趋于稳定后,每隔50 s向10 mL、50 mmol/L的pH为7.4的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. 如权利要求3所述的一种基于负载Rh@Pt纳米枝晶的氨基化石墨烯的免疫传感器,其特征在于,所述肿瘤标志物选自下列之一:AFP、CEA、PSA。

一种基于Rh@Pt纳米枝晶复合材料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,提供了一种基于Rh@Pt纳米枝晶复合材料免疫传感器的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 肿瘤的发病率高,且不易察觉,我国病例数相当庞大,占全世界病例数的55%,且肿瘤的生长和转移的速度快,对人类的健康产生极大危害,然而肿瘤若在早期能够确诊治愈率还是很高的。肿瘤标志物与肿瘤有着密切的关系,通过检测人体血清中肿瘤标志物的含量来推测是否患有肿瘤已经成为一种人们广泛认可的方法。

[0003] 目前电化学免疫传感器已经广泛用于肿瘤标志物的检测,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、制备简单、检测快速、成本低廉等优点,在临床检验、环境监测、食品安全控制、生物检测等领域都有重要的应用价值。

[0004] 本发明中使用的Rh@Pt纳米枝晶不仅具有核壳状双金属的协同作用,还具有丰富的边缘和拐角处的原子,这使得Rh@Pt纳米枝晶具有优良的催化性。氨基化石墨烯纳米片具有较大的比表面积,能够负载大量的Rh@Pt纳米枝晶,同时氨基化石墨烯还具有优良的导电性,能够分散Rh@Pt纳米枝晶催化还原过氧化氢所产生的电子,以防止由于电子聚集而引起催化反应减缓。此外,Rh@Pt纳米枝晶的引入不仅使复合材料的导电性得到了明显的提高,还能有效防止了石墨烯的堆叠。因此,Rh@Pt纳米枝晶复合材料作为信号放大器能够提高传感器的灵敏度。聚吡咯作为导电聚合物,能加速电子传导,在形成聚吡咯-金纳米粒子后不仅具有聚吡咯的高导电性,还具有良好的生物相容性,能够很好的固载捕获抗体,同时金纳米粒子的加入进一步提高了聚吡咯的导电性。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种基于Rh@Pt纳米枝晶复合材料免疫传感器的制备方法及应用,实现了对肿瘤标志物的定量检测。

[0006] 本发明的目的之一是提供一种基于Rh@Pt纳米枝晶复合材料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Rh@Pt纳米枝晶复合材料免疫传感器应用于肿瘤标志物的特异性、定量检测。

[0008] 本发明的技术方案,包括以下步骤。

[0009] 1. 一种基于Rh@Pt纳米枝晶复合材料免疫传感器的制备方法,步骤如下:

[0010] (1)将直径为3 ~ 5 mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨,超纯水、乙醇清洗干净;

[0011] (2)取6 μ L、1 ~ 3 mg/mL的聚吡咯-金纳米粒子修饰到电极表面,室温下晾干,用超纯水冲洗电极表面,晾干;

[0012] (3)继续将6 μL 、8 ~ 12 $\mu\text{g/mL}$ 的肿瘤标志物捕获抗体Ab₁滴加到电极表面,4℃冰箱中干燥;

[0013] (4)继续将3 μL 、0.5 ~ 1 wt%的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4℃冰箱中晾干;

[0014] (5)滴加6 μL 、0.0001 ~ 5 ng/mL的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原Ag溶液,用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4℃冰箱中干燥;

[0015] (6)将6 μL 、1 ~ 3 mg/mL的Rh@Pt纳米枝晶复合材料肿瘤标志物检测抗体Rh@Pt/NH₂-GS/Ab₂溶液,滴涂于电极表面上,置于4℃冰箱中孵化40 min后用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液清洗电极,4℃冰箱中干燥,制得一种基于Rh@Pt纳米枝晶复合材料的免疫传感器。

[0016] 2. 所用聚吡咯-金纳米粒子、Rh@Pt纳米枝晶复合材料肿瘤标志物检测抗体Rh@Pt/NH₂-GS/Ab₂溶液的制备

[0017] (1)聚吡咯-金纳米粒子的制备

[0018] ①聚吡咯的合成

[0019] 取0.5 ~ 1.5 mL吡咯分散在25 mL、0.5 ~ 1.5 mol/L的盐酸里,得吡咯和盐酸的混合液;取10 mL吡咯和盐酸的混合液,搅拌条件下加入2 mL、1 mol/L的过硫酸铵,冰浴反应4 ~ 6 h,离心分离,室温干燥得到聚吡咯;

[0020] ②聚吡咯-金纳米粒子的合成

[0021] 取1 mL、0.8 ~ 1.2 wt%的氯金酸溶液加入到99 mL超纯水中,加热至微沸,加入2.5 mL、0.5 ~ 1.5 wt%的柠檬酸钠溶液,保持微沸状态15 min后,冷却至室温,得到金纳米粒子分散液,将其转移到4℃下保存备用;将20 ~ 30 mL上述制备的金纳米粒子分散液离心分离,重新分散在10 mL的超纯水中,加入10 mg聚吡咯,在振荡培养箱中振荡12 h,离心分离,室温干燥,得聚吡咯-金纳米粒子;

[0022] (2)Rh@Pt纳米枝晶复合材料制备

[0023] ①Rh@Pt纳米枝晶的合成

[0024] 取0.21 g柠檬酸钠和0.2 ~ 0.3 g十六烷基三甲基氯化铵加入到9 mL超纯水中,搅拌5 min,依次加入0.1 mL、0.1 mol/L的三氯化铑,0.9 mL、0.08 ~ 0.12 mol/L的氯铂酸,搅拌15 min后,加入1 mL甲醛,将混合液转入高压反应釜中,在180℃的条件之下反应40 ~ 60 min,冷却至室温,离心分离,冷冻干燥,得Rh@Pt纳米枝晶;

[0025] ②Rh@Pt纳米枝晶复合材料合成

[0026] 取0.8 g石墨粉加90 ~ 98 mL、质量分数为98 wt%的浓硫酸和10 mL浓磷酸,搅拌25 min后,加入4 ~ 5 g高锰酸钾,搅拌15 min后,加热至45 ~ 60℃,反应12 h后,加40 mL超纯水冻成的冰,再加0.5 mL、20 ~ 30 wt%的双氧水,搅拌20 min后离心洗涤,加30 mL超纯水,超声40 min,离心分离,将上清液冷冻干燥得到氧化石墨烯;取0.1 g氧化石墨烯放入小烧杯中,加40 mL乙二醇,超声30 min,加0.8 ~ 1 mL浓氨水,将混合物转入高压反应釜,180℃下反应5 h,冷却到室温,离心分离,室温下干燥得氨基化石墨烯;取15 mg氨基化石墨烯和5 ~ 10 mg的Rh@Pt纳米枝晶分散在10 mL超纯水中,超声1 h,离心分离得Rh@Pt纳米枝晶复合材料;

[0027] (3)Rh@Pt纳米枝晶复合材料肿瘤标志物检测抗体Rh@Pt/NH₂-GS/Ab₂溶液的制备

[0028] 将1 ~ 4 mg的负载Rh@Pt纳米枝晶的氨基化石墨烯分散到1 mL超纯水中,加入100

μL 、80 ~ 120 $\mu\text{g/mL}$ 的肿瘤标志物检测抗体 Ab_2 溶液和900 μL 、50 mmol/L的pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液,4℃恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h;在4℃下,6000 rpm转速下离心10 min,得下层沉淀,加入1 mL、50 mmol/L的pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液离心洗涤,得下层沉淀,最后加入1 mL、50 mmol/L的pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液,制得Rh@Pt纳米枝晶复合材料肿瘤标志物检测抗体Rh@Pt/ $\text{NH}_2\text{-GS}$ / Ab_2 溶液,4℃下保存备用。

[0029] 3. 肿瘤标志物的检测

[0030] (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为5.3 ~ 8.0的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

[0031] (2)用时间-电流法对分析物进行检测,输入电压为-0.4 V,取样间隔0.1 s,运行时间400 s;

[0032] (3)当背景电流趋于稳定后,每隔50 s向10 mL、50 mmol/L的pH为7.4的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。

[0033] 上述所述肿瘤标志物选自下列之一:AFP、CEA、PSA。

[0034] 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。

[0035] 本发明的有益成果

[0036] (1)本发明使用了聚吡咯-金纳米粒子,聚吡咯造价低廉,具有优良的导电性,能够加速电子转移,金纳米粒子能够进一步提高聚吡咯的导电性,同时聚吡咯呈现薄片状,具有较大的比表面积,能够负载较多的金纳米粒子,这使得聚吡咯-金纳米粒子不仅具有优良的导电性,还具有良好的生物相容性,同时金纳米粒子的加入也增加了聚吡咯在水中的分散性;

[0037] (2)采用Rh@Pt纳米枝晶复合材料作为检测抗体标记物,Rh@Pt纳米枝晶能够防止石墨烯的堆叠,提高石墨烯在水中的分散性,此外Rh@Pt纳米枝晶具有较多的边缘和拐角,增大了比表面积,具有较多的活性位点,能够更好地催化过氧化氢的还原,同时基于铂-氨之间的作用Rh@Pt纳米枝晶能够很好的固载抗体,实现了放大电化学信号的作用,从而提高了传感器的灵敏度,降低了检测限;

[0038] (3)一种基于Rh@Pt纳米枝晶复合材料免疫传感器对肿瘤标志物的检测,其线性范围0.0001~ 5 ng/mL,检测限最低0.033 pg/mL,表明一种基于Rh@Pt纳米枝晶复合材料免疫传感器可以达到定量检测的目的。

具体实施方式

[0039] 现将本发明通过具体实施方式进一步说明,但不限于此。

[0040] 实施例1一种基于Rh@Pt纳米枝晶复合材料免疫传感器的制备

[0041] (1)将直径为3 mm的玻璃碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨,超纯水、乙醇清洗干净;

[0042] (2)取6 μL 、1 mg/mL的聚吡咯-金纳米粒子修饰到电极表面,室温下晾干,用超纯水冲洗电极表面,晾干;

[0043] (3)继续将6 μL 、8 $\mu\text{g/mL}$ 的肿瘤标志物捕获抗体 Ab_1 滴加到电极表面,4℃冰箱中干燥;

[0044] (4)继续将3 μL 、0.5 wt%的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,用pH为7.4的

磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4℃冰箱中晾干;

[0045] (5)滴加6 μL 、0.0001 ~ 5 ng/mL的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原Ag溶液,用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4℃冰箱中干燥;

[0046] (6)将6 μL 、1 mg/mL的Rh@Pt纳米枝晶复合材料肿瘤标志物检测抗体Rh@Pt/ NH_2 -GS/ Ab_2 溶液,滴涂于电极表面上,置于4℃冰箱中孵化40 min后用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液清洗电极,4℃冰箱中干燥,制得一种基于Rh@Pt纳米枝晶复合材料免疫传感器。

[0047] 实施例2一种基于Rh@Pt纳米枝晶复合材料免疫传感器的制备

[0048] (1)将直径为4 mm的玻碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨,超纯水、乙醇清洗干净;

[0049] (2)取6 μL 、2 mg/mL的聚吡咯-金纳米粒子修饰到电极表面,室温下晾干,用超纯水冲洗电极表面,晾干;

[0050] (3)继续将6 μL 、10 $\mu\text{g/mL}$ 的肿瘤标志物捕获抗体 Ab_1 滴加到电极表面,4℃冰箱中干燥;

[0051] (4)继续将3 μL 、0.8 wt%的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4℃冰箱中晾干;

[0052] (5)滴加6 μL 、0.0001 ~ 5 ng/mL的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原Ag溶液,用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4℃冰箱中干燥;

[0053] (6)将6 μL 、2 mg/mL的Rh@Pt纳米枝晶复合材料肿瘤标志物检测抗体Rh@Pt/ NH_2 -GS/ Ab_2 溶液,滴涂于电极表面上,置于4℃冰箱中孵化40 min后用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液清洗电极,4℃冰箱中干燥,制得一种基于Rh@Pt纳米枝晶复合材料免疫传感器。

[0054] 实施例3一种基于Rh@Pt纳米枝晶复合材料免疫传感器的制备

[0055] (1)将直径为5 mm的玻碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨,超纯水、乙醇清洗干净;

[0056] (2)取6 μL 、3 mg/mL的聚吡咯-金纳米粒子修饰到电极表面,室温下晾干,用超纯水冲洗电极表面,晾干;

[0057] (3)继续将6 μL 、12 $\mu\text{g/mL}$ 的肿瘤标志物捕获抗体 Ab_1 滴加到电极表面,4℃冰箱中干燥;

[0058] (4)继续将3 μL 、1 wt%的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4℃冰箱中晾干;

[0059] (5)滴加6 μL 、0.0001 ~ 5 ng/mL的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原Ag溶液,用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4℃冰箱中干燥;

[0060] (6)将6 μL 、3 mg/mL的Rh@Pt纳米枝晶复合材料肿瘤标志物检测抗体Rh@Pt/ NH_2 -GS/ Ab_2 溶液,滴涂于电极表面上,置于4℃冰箱中孵化40 min后用pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液清洗电极,4℃冰箱中干燥,制得一种基于Rh@Pt纳米枝晶复合材料免疫传感器。

[0061] 实施例4聚吡咯-金纳米粒子的制备

[0062] (1)聚吡咯的合成

[0063] 取0.5 mL吡咯分散在25 mL、0.5 mol/L的盐酸里,得吡咯和盐酸的混合液;取10 mL吡咯和盐酸的混合液,搅拌条件下加入2 mL、1 mol/L的过硫酸铵溶液,冰浴反应4 h,离心分离,室温干燥得到聚吡咯;

[0064] (2)金纳米粒子分散液的制备

[0065] 取1 mL、0.8 wt%的氯金酸溶液加入到99 mL超纯水中,加热至微沸,加入2.5 mL、

0.5 wt%的柠檬酸钠溶液,保持微沸状态15 min后,冷却至室温,得到金纳米粒子分散液,将其转移到4℃下保存备用;

[0066] (3) 聚吡咯-金纳米粒子的合成

[0067] 将20 mL上述制备的金纳米粒子分散液离心分离,重新分散在10 mL的超纯水中,加入10 mg聚吡咯,在振荡培养箱中振荡12 h,离心分离,室温干燥,得聚吡咯-金纳米粒子。

[0068] 实施例5聚吡咯-金纳米粒子的制备

[0069] (1) 聚吡咯的合成

[0070] 取1 mL吡咯分散在25 mL、1 mol/L的盐酸里,得吡咯和盐酸的混合液;取10 mL吡咯和盐酸的混合液,搅拌条件下加入2 mL、1 mol/L的过硫酸铵溶液,冰浴反应5 h,离心分离,室温干燥得到聚吡咯;

[0071] (2) 金纳米粒子分散液的制备

[0072] 取1 mL、1 wt%的氯金酸溶液加入到99 mL超纯水中,加热至微沸,加入2.5 mL、1 wt%的柠檬酸钠溶液,保持微沸状态15 min后,冷却至室温,得到金纳米粒子分散液,将其转移到4℃下保存备用;

[0073] (3) 聚吡咯-金纳米粒子的合成

[0074] 将25 mL上述制备的金纳米粒子分散液离心分离,重新分散在10 mL的超纯水中,加入10 mg聚吡咯,在振荡培养箱中振荡12 h,离心分离,室温干燥,得聚吡咯-金纳米粒子。

[0075] 实施例6聚吡咯-金纳米粒子的制备

[0076] (1) 聚吡咯的合成

[0077] 取1.5 mL吡咯分散在25 mL、1.5 mol/L的盐酸里,得吡咯和盐酸的混合液;取10 mL吡咯和盐酸的混合液,搅拌条件下加入2 mL、1 mol/L的过硫酸铵溶液,冰浴反应6 h,离心分离,室温干燥得到聚吡咯;

[0078] (2) 金纳米粒子分散液的制备

[0079] 取1 mL、1.2 wt%的氯金酸溶液加入到99 mL超纯水中,加热至微沸,加入2.5 mL、1.5 wt%的柠檬酸钠溶液,保持微沸状态15 min后,冷却至室温,得到金纳米粒子分散液,将其转移到4℃下保存备用;

[0080] (3) 聚吡咯-金纳米粒子的合成

[0081] 将30 mL上述制备的金纳米粒子分散液离心分离,重新分散在10 mL的超纯水中,加入10 mg聚吡咯,在振荡培养箱中振荡12 h,离心分离,室温干燥,得聚吡咯-金纳米粒子。

[0082] 实施例7Rh@Pt纳米枝晶复合材料肿瘤标志物检测抗体Rh@Pt/NH₂-GS/Ab₂溶液的制备

[0083] (1) Rh@Pt纳米枝晶的合成

[0084] 取0.21 g柠檬酸钠和0.2 g十六烷基三甲基氯化铵加入到9 mL超纯水中,搅拌5 min,依次加入0.1 mL、0.1 mol/L的三氯化铈,0.9 mL、0.08 mol/L的氯铂酸,搅拌15 min后,加入1 mL甲醛,将混合液转入高压反应釜中,在180℃的条件之下反应40 min,冷却至室温,离心分离,冷冻干燥,得Rh@Pt纳米枝晶;

[0085] (2) 氨基化石墨烯的合成

[0086] 取0.8 g石墨粉加90 mL、98 wt%的浓硫酸和10 mL浓磷酸,搅拌25 min后,加入4 g高锰酸钾,搅拌15 min后,加热至45℃,反应12 h后,加40 mL超纯水冻成的冰,再加0.5 mL,

20 wt%的双氧水,搅拌20 min后离心洗涤,加30 mL超纯水,超声40 min,离心分离,将上清液冷冻干燥得到氧化石墨烯;取0.1 g氧化石墨烯放入小烧杯中,加40 mL乙二醇,超声30 min,加0.8 mL浓氨水,将混合物转入高压反应釜,180℃下反应5 h,冷却到室温,离心分离,室温下干燥得氨基化石墨烯;

[0087] (3) Rh@Pt纳米枝晶复合材料合成

[0088] 取15 mg氨基化石墨烯和5 mg的Rh@Pt纳米枝晶分散在10 mL超纯水中,超声1 h,离心分离得Rh@Pt纳米枝晶复合材料;

[0089] (4) Rh@Pt纳米枝晶复合材料肿瘤标志物检测抗体Rh@Pt/NH₂-GS/Ab₂溶液的制备

[0090] 将1 mg的Rh@Pt纳米枝晶复合材料分散到1 mL超纯水中,加入100 μL、80 μg/mL的肿瘤标志物检测抗体Ab₂溶液和900 μL、50 mmol/L的pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液,4℃恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h;在4℃下,6000 rpm转速下离心10 min,得下层沉淀,加入1 mL、50 mmol/L的pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液离心洗涤,得下层沉淀,最后加入1 mL、50 mmol/L的pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液,制得Rh@Pt纳米枝晶复合材料肿瘤标志物检测抗体Rh@Pt/NH₂-GS/Ab₂溶液,4℃下保存备用。

[0091] 实施例8 Rh@Pt纳米枝晶复合材料肿瘤标志物检测抗体Rh@Pt/NH₂-GS/Ab₂溶液的制备

[0092] (1) Rh@Pt纳米枝晶的合成

[0093] 取0.21 g柠檬酸钠和0.25 g十六烷基三甲基氯化铵加入到9 mL超纯水中,搅拌5 min,依次加入0.1 mL、0.1 mol/L的三氯化铑,0.9 mL、0.1 mol/L的氯铂酸,搅拌15 min后,加入1 mL甲醛,将混合液转入高压反应釜中,在180℃的条件之下反应50 min,冷却至室温,离心分离,冷冻干燥,得Rh@Pt纳米枝晶;

[0094] (2) 氨基化石墨烯的合成

[0095] 取0.8 g石墨粉加90 ~ 98 mL、98 wt%的浓硫酸和10 mL浓磷酸,搅拌25 min后,加入4.5 g高锰酸钾,搅拌15 min后,加热至50℃,反应12 h后,加40 mL超纯水冻成的冰,再加0.5 mL、25 wt%的双氧水,搅拌20 min后离心洗涤,加30 mL超纯水,超声40 min,离心分离,将上清液冷冻干燥得到氧化石墨烯;取0.1 g氧化石墨烯放入小烧杯中,加40 mL乙二醇,超声30 min,加0.9 mL浓氨水,将混合物转入高压反应釜,180℃下反应5 h,冷却到室温,离心分离,室温下干燥得氨基化石墨烯;

[0096] (3) Rh@Pt纳米枝晶复合材料合成

[0097] 取15 mg氨基化石墨烯和8 mg的Rh@Pt纳米枝晶分散在10 mL超纯水中,超声1 h,离心分离得Rh@Pt纳米枝晶复合材料;

[0098] (4) Rh@Pt纳米枝晶复合材料肿瘤标志物检测抗体Rh@Pt/NH₂-GS/Ab₂溶液的制备

[0099] 将2 mg的Rh@Pt纳米枝晶复合材料分散到1 mL超纯水中,加入100 μL、100 μg/mL的肿瘤标志物检测抗体Ab₂溶液和900 μL、50 mmol/L的pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液,4℃恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h;在4℃下,6000 rpm转速下离心10 min,得下层沉淀,加入1 mL、50 mmol/L的pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液离心洗涤,得下层沉淀,最后加入1 mL、50 mmol/L的pH为7.4的磷酸盐缓冲溶液,制得Rh@Pt纳米枝晶复合材料肿瘤标志物检测抗体Rh@Pt/NH₂-GS/Ab₂溶液,4℃下保存备用。

[0100] 实施例9 Rh@Pt纳米枝晶复合材料肿瘤标志物检测抗体Rh@Pt/NH₂-GS/Ab₂溶液的制

备

[0101] (1) Rh@Pt 纳米枝晶的合成

[0102] 取 0.21 g 柠檬酸钠和 0.3 g 十六烷基三甲基氯化铵加入到 9 mL 超纯水中, 搅拌 5 min, 依次加入 0.1 mL、0.1 mol/L 的三氯化铑, 0.9 mL、0.12 mol/L 的氯铂酸, 搅拌 15 min 后, 加入 1 mL 甲醛, 将混合液转入高压反应釜中, 在 180℃ 的条件之下反应 60 min, 冷却至室温, 离心分离, 冷冻干燥, 得 Rh@Pt 纳米枝晶;

[0103] (2) 氨基化石墨烯的合成

[0104] 取 0.8 g 石墨粉加 98 mL、98 wt% 的浓硫酸和 10 mL 浓磷酸, 搅拌 25 min 后, 加入 5 g 高锰酸钾, 搅拌 15 min 后, 加热至 60℃, 反应 12 h 后, 加 40 mL 超纯水冻成的冰, 再加 0.5 mL、30 wt% 的双氧水, 搅拌 20 min 后离心洗涤, 加 30 mL 超纯水, 超声 40 min, 离心分离, 将上清液冷冻干燥得到氧化石墨烯; 取 0.1 g 氧化石墨烯放入小烧杯中, 加 40 mL 乙二醇, 超声 30 min, 加 1 mL 浓氨水, 将混合物转入高压反应釜, 180℃ 下反应 5 h, 冷却到室温, 离心分离, 室温下干燥得氨基化石墨烯;

[0105] (3) Rh@Pt 纳米枝晶复合材料合成

[0106] 取 15 mg 氨基化石墨烯和 10 mg 的 Rh@Pt 纳米枝晶分散在 10 mL 超纯水中, 超声 1 h, 离心分离得 Rh@Pt 纳米枝晶复合材料;

[0107] (4) Rh@Pt 纳米枝晶复合材料肿瘤标志物检测抗体 Rh@Pt/NH₂-GS/Ab₂ 溶液的制备

[0108] 将 4 mg 的 Rh@Pt 纳米枝晶复合材料分散到 1 mL 超纯水中, 加入 100 μ L、120 μ g/mL 的肿瘤标志物检测抗体 Ab₂ 溶液和 900 μ L、50 mmol/L 的 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液, 4℃ 恒温振荡培养箱中振荡孵化 12 h; 在 4℃ 下, 6000 rpm 转速下离心 10 min, 得下层沉淀, 加入 1 mL、50 mmol/L 的 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液离心洗涤, 得下层沉淀, 最后加入 1 mL、50 mmol/L 的 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液, 制得 Rh@Pt 纳米枝晶复合材料肿瘤标志物检测抗体 Rh@Pt/NH₂-GS/Ab₂ 溶液, 4℃ 下保存备用。

[0109] 实施例 10 肿瘤标志物 AFP 的检测

[0110] (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 为 5.3 的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

[0111] (2) 用时间-电流法对分析物进行检测, 输入电压为 -0.4 V, 取样间隔 0.1 s, 运行时间 400 s;

[0112] (3) 当背景电流趋于稳定后, 每隔 50 s 向 10 mL、50 mmol/L 的 pH 为 7.4 的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;

[0113] (4) 根据所得电流强度与 AFP 浓度之间的线性关系, 绘制工作曲线, 测得线性范围为 0.0001 ~ 5 ng/mL, 检测限为 0.033 pg/mL。

[0114] 实施例 11 肿瘤标志物 CEA 的检测

[0115] 按照实施例 10 的方法对样品中 CEA 进行检测, 其线性范围为 0.001 ~ 5 ng/mL, 检测限为 0.3 pg/mL。

[0116] 实施例 12 肿瘤标志物 PSA 的检测

[0117] 按照实施例 10 的方法对样品中 PSA 进行检测, 其线性范围为 0.0005 ~ 5 ng/mL, 检测限为 0.1 pg/mL。

专利名称(译)	一种基于Rh@Pt纳米枝晶复合材料免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN107727858B	公开(公告)日	2019-06-25
申请号	CN2017110924116.8	申请日	2017-09-30
[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	王平 裴福彬 李明党 马恩慧 余昊轩 董云会 李月云		
发明人	王平 裴福彬 李明党 马恩慧 余昊轩 董云会 李月云		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531 G01N27/327 G01N27/416 B82Y5/00 B82Y30/00 B82Y40/00		
CPC分类号	B82Y5/00 B82Y30/00 B82Y40/00 G01N27/3277 G01N27/3278 G01N27/416 G01N33/531 G01N33/57484		
其他公开文献	CN107727858A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于新型功能材料与生物传感检测技术领域，提供了一种基于Rh@Pt纳米枝晶复合材料免疫传感器的制备方法及应用。具体是采用Rh@Pt纳米枝晶复合材料作为标记物，聚吡咯-金纳米粒子作为基底，制备了一种电化学免疫传感器并应用于肿瘤标志物抗原的检测。