



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110716040 A

(43)申请公布日 2020.01.21

(21)申请号 201911051390.4

G01N 27/30(2006.01)

(22)申请日 2019.10.31

C07K 16/38(2006.01)

(71)申请人 福建师范大学

地址 350108 福建省福州市闽侯县上街镇
 学园路福建师大旗山校区福建师大科
 研处

(72)发明人 戴宏 皇怡甜 任卉竹 高利红
 张书培

(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 33/531(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

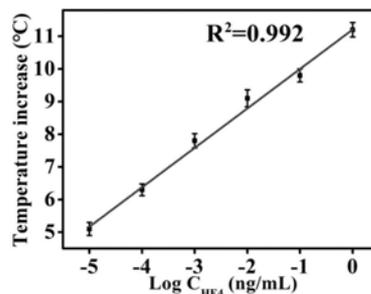
权利要求书3页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种基于MXene纳米片光热放大的邻近杂交双模式免疫传感器的制备及应用

(57)摘要

本发明公开一种基于MXene纳米片光热放大的邻近杂交双模式免疫传感器的制备及应用。将聚乙烯亚胺(PEI)改性的TiO₂盘状纳米粒子作为基底,通过电沉积金将大量的捕获底物脱氧核糖核酸固定在传感界面上。两种脱氧核糖核酸探针均以目标物人附睾蛋白4抗体标记,作为HE4的识别部分被DNA₃捕获后,HE4通过免疫识别诱导一次抗体标记的DNA₁和二次抗体标记的DNA₂之间的邻近杂交。Mxene纳米片负载大量的硫堇可以有效地嵌插到杂交形成的双链DNA沟槽中,不仅可用作电化学-温度双模式的信号探针,而且由于光热效应产生的升温实现了电化学信号放大。在808nm红外激光器的照射下,实现对HE4的高灵敏检测。



1. 一种基于MXene纳米片光热放大的邻近杂交双模式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(GCE)的预处理: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;

(3) TiO_2 NDs-PEI/DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4-DNA₂-Ab₂/MXene@Thi修饰电极的制备:将3 mg的 TiO_2 盘状纳米粒子(TiO_2 NDs)粉末溶于1 mL超纯水中,得到3 mg/mL TiO_2 NDs的水分散 液,取10 μL 聚乙烯亚胺(PEI)加超纯水稀释至1 mL得到1 wt.% PEI的水溶液,向1 mL上述 TiO_2 NDs分散液中加入1 mL的1 wt.% PEI水溶液,室温下连续搅拌6 h,10000 rpm离心10 min后,用超纯水冲洗3次,去除多余的PEI,经干燥后得到的 TiO_2 NDs-PEI重新分散在1 mL 的超纯水中,取5 μL TiO_2 NDs-PEI分散液滴涂于干净的GCE表面,在烘箱中烘干并冷却至 室温得到PEI- TiO_2 NDs修饰电极;将PEI- TiO_2 NDs修饰电极浸入含有体积比为1:1的0.01 M H_2SO_4 和0.01 M Na_2SO_4 的0.1 wt.% HAuCl_4 溶液中进行恒电位沉积,电压0.2 V,沉积时间30 s得到Au/PEI- TiO_2 NDs修饰电极;将5 μL 10 μM 捕获脱氧核糖核酸(DNA₃)滴涂在上述修 饰电极表面,并在室温下通过Au-S键结合孵育3小时,用pH 7.4的磷酸缓冲溶液冲洗后,将 所得电极放在100 μL 1 mM 巯基己醇(MCH)溶液中浸泡30 min,滴加5 μL 含10 μM DNA₁- Ab₁、10 μM DNA₂-Ab₂和不同浓度的HE4标准溶液的混合液在4 $^\circ\text{C}$ 下孵育60 min,用pH 7.4的 磷酸缓冲溶液冲洗电极表面并在室温条件下自然晾干,得到 TiO_2 NDs-PEI/DNA₃/DNA₁-Ab₁- HE4-DNA₂-Ab₂修饰电极;最后,取5 μL MXene@Thi复合物溶液滴涂在电极表面于室温下孵育 50 min,用pH 7.4的磷酸缓冲溶液洗去残余液并在室温条件下自然晾干,即得到 TiO_2 NDs- PEI /DNA₃/ DNA₁-Ab₁-HE4 -DNA₂-Ab₂/MXene@Thi修饰电极;

(4) HE4的检测:采用三电极体系进行测定,以 TiO_2 NDs-PEI/DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4-DNA₂- Ab₂/MXene@Thi修饰电极为工作电极,Ag/AgCl为参比电极,铂丝电极为辅助电极,在电化学 工作站上对HE4进行检测,设置初始电位为0 V,终止电位为-0.5 V,在pH 7.4的磷酸缓冲溶 液中,用方波伏安法(SWV)对 1×10^{-6} ng/mL~10 ng/mL一系列不同浓度的HE4标准溶液在修 饰电极上的电化学行为进行测定,通过记录808 nm激光照射后产生的电化学信号,绘制工 作曲线;用普通温度计采集照射后电极表面的温度,绘制工作曲线;待测样品溶液代替HE4 标准溶液进行检测,检测的结果通过工作曲线查得。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征 在于,所述的 TiO_2 盘状纳米粒子(TiO_2 NDs)由下 述方法制备的:将4.5 g对苯二甲酸,2.34 mL钛酸丁酯(IV),9 mL无水甲醇和81 mL N,N-二 甲基甲酰胺(DMF)混合,然后将混合物转移到100 mL高压反应釜中,在150 $^\circ\text{C}$ 下加热48 h, 冷却后过滤并用甲醇多次洗涤得到白色悬浮液,随后,上述白色悬浮液产物在400 $^\circ\text{C}$ 空气 中煅烧5 h,自然冷却后,收集得到的白色粉末即为 TiO_2 盘状纳米粒子(TiO_2 NDs)。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征 在于,所述的DNA₁-Ab₁或DNA₂-Ab₂由下述方法制 备:1) 抗体(Ab₁或Ab₂)的活化:取0.2 mg 抗体(Ab₁或Ab₂)固体用1 mL浓度为55 mM、pH 7.4 磷酸缓冲溶液稀释至0.2 mg/mL,取10 μL 浓度为0.4 mM (N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧 酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)的二甲基亚砷溶液,与100 μL 浓度为0.2 mg/mL 抗体溶液(Ab₁或 Ab₂)在室温下孵育2 h,转速为10000 rpm的离心过滤纯化10 min即得到活化的Ab₁-SMCC或 Ab₂-SMCC,并在100 μL 浓度为55 mM、pH 7.4磷酸缓冲溶液中重新溶解; 2) DNA₁或DNA₂的还

原:取40 μL 100 mM二硫苏糖醇(DTT)的水溶液与30 μL 浓度为100 μM 的DNA₁或DNA₂的Tris-HCl缓冲溶液混合1 h,得到的DNA₁或DNA₂溶液经过转速为10000 rpm的离心过滤纯化10 min即得到还原的DNA₁或DNA₂,并在100 μL 浓度为55 mM、pH 7.4磷酸缓冲溶液中重新溶解;3) DNA₁-Ab₁或DNA₂-Ab₂溶液的制备:将上述所得活化的Ab₁-SMCC或Ab₂-SMCC溶液与还原的DNA₁或DNA₂溶液混合,在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,随后经过多次转速为10000 rpm的离心过滤10 min除去未反应的DNA₁或DNA₂,将得到的DNA₁-Ab₁或DNA₂-Ab₂溶于200 μL 浓度为55 mM、pH 7.4磷酸缓冲溶液中,放置4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下备用。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的MXene@Thi复合物由下述方法制备的:取5 mg MXene纳米片分散在1 mL乙醇中,然后与20 μL 的3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)均匀混合,并在室温下持续搅拌过夜,经过转速为10000 rpm的离心过滤10 min,用超纯水多次洗涤得到改性MXene纳米片,加入1 mL超纯水中超声得到MXene纳米片分散液,再加入200 μL 的2.5 wt.%戊二醛的水溶液搅拌40 min,通过转速为10000 rpm的离心收集沉淀,并用超纯水洗涤3次得到黑色固体,将1 mL的5 mg/mL硫堇水溶液与黑色固体混合,在黑暗条件下搅拌5h,经过离心洗涤得到的固体分散在1 mL超纯水中,得到5 mg/mL的MXene@Thi复合物溶液。

5. 一种双模式基于MXene纳米片光热放大的电化学邻近杂交免疫传感器,包括工作电极、铂丝电极为对电极和Ag/AgCl为参比电极,其特征在于,所述的工作电极采用TiO₂ NDs-PEI/DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4-DNA₂-Ab₂/MXene@Thi修饰电极,所述的TiO₂ NDs-PEI/DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4-DNA₂-Ab₂/MXene@Thi修饰电极由下述方法制备而成的:1) 玻碳电极的预处理: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) TiO₂ NDs-PEI/DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4-DNA₂-Ab₂/MXene@Thi修饰电极的制备:将3 mg的TiO₂盘状纳米粒子(TiO₂ NDs)粉末溶于1 mL超纯水中,得到3 mg/mL TiO₂ NDs的水分散液,取10 μL 聚乙烯亚胺(PEI)加超纯水稀释至1 mL得到1 wt.% PEI的水溶液,向1 mL上述TiO₂ NDs分散液中加入1 mL的1 wt.% PEI水溶液,室温下连续搅拌6 h,10000 rpm离心10 min后,用超纯水冲洗3次,去除多余的PEI,经干燥后得到的TiO₂ NDs-PEI重新分散在1 mL的超纯水中,取5 μL TiO₂ NDs-PEI分散液滴涂于干净的GCE表面,在烘箱中烘干并冷却至室温得到PEI-TiO₂ NDs修饰电极;将PEI-TiO₂ NDs修饰电极浸入含有体积比为1:1的0.01 M H₂SO₄和0.01 M Na₂SO₄的0.1 wt.% HAuCl₄溶液中进行恒电位沉积,电压0.2 V,沉积时间30 s得到Au/PEI-TiO₂ NDs修饰电极;将5 μL 10 μM 捕获脱氧核糖核酸(DNA₃)滴涂在上述修饰电极表面,并在室温下通过Au-S键结合孵育3小时,用pH 7.4的磷酸缓冲溶液冲洗后,将所得电极放在100 μL 1 mM 巯基己醇(MCH)溶液中浸泡30 min,滴加5 μL 含10 μM DNA₁-Ab₁、10 μM DNA₂-Ab₂和不同浓度的HE4标准溶液的混合液在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育60 min,用pH 7.4的磷酸缓冲溶液冲洗电极表面并在室温条件下自然晾干,得到TiO₂ NDs-PEI/DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4-DNA₂-Ab₂修饰电极;最后,取5 μL MXene@Thi复合物溶液滴涂在电极表面于室温下孵育50 min,用pH 7.4的磷酸缓冲溶液洗去残余液并在室温条件下自然晾干,即得到TiO₂ NDs-PEI/DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4-DNA₂-Ab₂/MXene@Thi修饰电极。

6. 权利要求4所述的一种双模式基于MXene纳米片光热放大的电化学邻近杂交免疫传感器的应用,其特征在于,步骤如下:1) 采用三电极体系进行测定,以TiO₂ NDs-PEI/DNA₃/

DNA₁-Ab₁-HE4-DNA₂-Ab₂/MXene@Thi 修饰电极为工作电极, Ag/AgCl 为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 在电化学工作站上对 HE4 进行检测, 设置初始电位为 0 V, 终止电位为 -0.5 V; 2) 在 pH 7.4 的磷酸缓冲溶液中, 用方波伏安法 (SWV) 对 1×10^{-6} ng/mL~10 ng/mL 一系列不同浓度的 HE4 标准溶液在修饰电极上的电化学行为进行测定, 通过记录 808 nm 激光照射后产生的电化学信号, 绘制工作曲线; 用普通温度计采集照射后电极表面的温度, 绘制工作曲线; 待测样品溶液代替 HE4 标准溶液进行检测, 检测的结果通过工作曲线查得。

一种基于MXene纳米片光热放大的邻近杂交双模式免疫传感器的制备及应用

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MXene纳米片光热放大的邻近杂交双模式免疫传感器的制备及应用。

背景技术

[0002] 蛋白质结合脱氧核糖核酸(DNA)介导的邻近杂交反应作为一种特殊的分析策略,在蛋白质的识别和检测中得到了极大的关注。通过一对DNA标记的亲亲和探针经过免疫反应和DNA杂交过程之后,同时识别靶蛋白,极大增强了对靶蛋白的选择性和敏感性,这归因于蛋白质和标记探针的DNA的双重识别。因此,这种方法将传统的蛋白质免疫识别转化为简单的DNA识别,明显简化了操作过程,防止样品污染,在蛋白质检测中具有巨大的应用潜力。迄今为止,在肿瘤标志物的临床诊断中,已经开发了基于邻近杂交策略的多种方法,传统的仪器分析技术在一些资源受限区域的应用是有限的。因此,需要直观和简单的信号输出方法例如温度,将复杂的生物分析信号用普通温度计读出,即使是肉眼也可以很容易地检测到,在保证灵敏度和准确度的前提下可进行样品分析。在温度作为辅助读出模式的探索中,光热效应介导的温度升高同时会导致电化学信号的增强,这归因于热电化学理论中温度对电化学反应参数的影响。通过引入性能优良的光热试剂,如层状Mxene纳米片可在808 nm的激光照射下将光能迅速转化为热能。它还表现出过渡金属碳化物的良好导电性和表面羟基的亲水性,以及大的比表面积有利于纳米片表面功能改性作为电化学信号的负载基质。因此,利用光热效应产生的热实现了电化学信号放大。为简化操作,研制出一种基于MXene纳米片光热放大的电化学—温度读出双模式的邻近杂交免疫传感器,实现了对卵巢癌标记物——人附睾蛋白4(HE4)的灵敏检测,显著提高了分析结果的灵敏度和准确性

用聚乙烯亚胺(PEI)改性的TiO₂纳米盘(TiO₂ NDs)作为基底,表现出优异的生物相容性,并且由于TiO₂ NDs的大比表面积,将大量的捕获脱氧核糖核酸(DNA₃)底物固定到传感界面上。两种DNA探针(DNA₁和DNA₂)标记的抗体作为HE4的识别元件,被底物DNA₃捕获后,结合HE4通过免疫识别诱导DNA₁和DNA₂之间的邻近杂交反应。Mxene纳米片负载大量的硫堇(Mxene@Thi)嵌入形成的双链DNA沟槽中,不仅作为双读出的信号探针,而且由于温度的升高而达到信号放大的目的。在808 nm近红外光源照射下,随着HE4浓度的升高,电化学信号和温度不断增强且一定范围内呈线性关系,从而实现了对HE4的高灵敏检测。与传统的电化学免疫分析方法相比,这种双读出模式可灵活用于日常检测,并扩大了光热效应在临床诊断中的应用范围。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种基于MXene纳米片光热放大的邻近杂交双模式免疫传感器的制备及应用。

[0004] 为实现发明目的,本发明采用如下技术方案:

(1) GCE的预处理: 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;

(2) TiO_2 NDs-PEI/DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4-DNA₂-Ab₂/MXene@Thi修饰电极的制备: 将3 mg的 TiO_2 盘状纳米粒子(TiO_2 NDs)粉末溶于1 mL超纯水中, 得到3 mg/mL TiO_2 NDs的水分散液, 取10 μL 聚乙烯亚胺(PEI)加超纯水稀释至1 mL得到1 wt.% PEI的水溶液, 向1 mL上述 TiO_2 NDs分散液中加入1 mL的1 wt.% PEI水溶液, 室温下连续搅拌6 h, 10000 rpm离心10 min后, 用超纯水冲洗3次, 去除多余的PEI, 经干燥后得到的 TiO_2 NDs-PEI重新分散在1 mL的超纯水中, 取5 μL TiO_2 NDs-PEI分散液滴涂于干净的GCE表面, 在烘箱中烘干并冷却至室温得到PEI- TiO_2 NDs修饰电极; 将PEI- TiO_2 NDs修饰电极浸入含有体积比为1:1的0.01 M H_2SO_4 和0.01 M Na_2SO_4 的0.1 wt.% HAuCl_4 溶液中进行恒电位沉积, 电压0.2 V, 沉积时间30 s得到Au/PEI- TiO_2 NDs修饰电极; 将5 μL 10 μM 捕获DNA₃滴涂在上述修饰电极表面, 并在室温下通过Au-S键结合孵育3小时, 用pH 7.4的磷酸缓冲溶液冲洗后, 将所得电极放在100 μL 1 mM 巯基己醇(MCH)溶液中浸泡30 min, 滴加5 μL 含10 μM DNA₁-Ab₁、10 μM DNA₂-Ab₂和不同浓度的HE4标准溶液的混合液在4 °C下孵育60 min, 用pH 7.4的磷酸缓冲溶液冲洗电极表面并在室温条件下自然晾干, 得到 TiO_2 NDs-PEI/DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4-DNA₂-Ab₂修饰电极; 最后, 取5 μL MXene@Thi复合物溶液滴涂在电极表面于室温下孵育50 min, 用pH 7.4的磷酸缓冲溶液洗去残余液并在室温条件下自然晾干, 即得到 TiO_2 NDs-PEI /DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4 -DNA₂-Ab₂/MXene@Thi修饰电极;

(3) HE4的检测: 采用三电极体系进行测定, 以 TiO_2 NDs-PEI/DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4-DNA₂-Ab₂/MXene@Thi修饰电极为工作电极, Ag/AgCl为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 在电化学工作站上对HE4进行检测, 设置初始电位为0 V, 终止电位为-0.5 V, 在pH 7.4的磷酸缓冲溶液中, 用方波伏安法(SWV)对 1×10^{-6} ng/mL~10 ng/mL一系列不同浓度的HE4标准溶液在修饰电极上的电化学行为进行测定, 通过记录808 nm激光照射后产生的电化学信号, 绘制工作曲线; 用普通温度计采集照射后电极表面的温度, 绘制工作曲线; 待测样品溶液代替HE4标准溶液进行检测, 检测的结果通过工作曲线查得。

[0005] 所述的 TiO_2 盘状纳米粒子(TiO_2 NDs)由下述方法制备的: 将4.5 g对苯二甲酸, 2.34 mL钛酸丁酯(IV), 9 mL无水甲醇和81 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)混合, 然后将混合物转移到100 mL高压反应釜中, 在150 °C下加热48 h, 冷却后过滤并用甲醇多次洗涤得到白色悬浮液, 随后, 上述白色悬浮液产物在400 °C空气中煅烧5 h, 自然冷却后, 收集得到的白色粉末即为 TiO_2 盘状纳米粒子(TiO_2 NDs)。

[0006] 上述的DNA₁-Ab₁或DNA₂-Ab₂的制备:

抗体(Ab₁或Ab₂)的活化: 取0.2 mg 抗体(Ab₁或Ab₂)固体用1 mL浓度为55 mM、pH 7.4磷酸缓冲溶液稀释至0.2 mg/mL, 取10 μL 浓度为0.4 mM (N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)的二甲基亚砷溶液, 与100 μL 浓度为0.2 mg/mL 抗体溶液(Ab₁或Ab₂) 在室温下孵育2 h, 转速为10000 rpm的离心过滤纯化10 min即得到活化的Ab₁-SMCC或Ab₂-SMCC, 并在100 μL 浓度为55 mM、pH 7.4磷酸缓冲溶液中重新溶解; DNA₁或DNA₂的还原: 取40 μL 100 mM二硫苏糖醇(DTT)的水溶液与30 μL 浓度为100 μM 的DNA₁或DNA₂的Tris-HCl缓冲溶液混合1 h, 得到的DNA₁或DNA₂溶液经过转速为10000 rpm的离心过滤纯化10 min即得到还原的DNA₁或DNA₂, 并在100 μL 浓度为55 mM、pH 7.4磷酸缓冲溶液中重新溶解; DNA₁-Ab₁或

DNA₂-Ab₂溶液的制备:将上述所得活化的Ab₁-SMCC或Ab₂-SMCC溶液与还原的DNA₁或DNA₂溶液混合,在4 °C下孵育过夜,随后经过多次转速为10000 rpm的离心过滤10 min除去未反应的DNA₁或DNA₂,将得到的DNA₁-Ab₁或DNA₂-Ab₂溶于200 μL浓度为55 mM、pH 7.4磷酸缓冲溶液中,放置4 °C条件下备用。

[0007] 上述的MXene@Thi复合物的制备:

取5 mg MXene纳米片分散在1 mL乙醇中,然后与20 μL的3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)均匀混合,并在室温下持续搅拌过夜,经过转速为10000 rpm的离心过滤10 min,用超纯水多次洗涤得到改性MXene纳米片,加入1 mL超纯水中超声得到MXene纳米片分散液,再加入200 μL的2.5 wt.%戊二醛的水溶液搅拌40 min,通过转速为10000 rpm的离心收集沉淀,并用超纯水洗涤3次得到黑色固体,将1 mL的5 mg/mL硫堇水溶液与黑色固体混合,在黑暗条件下搅拌5h,经过离心洗涤得到的固体分散在1 mL超纯水中,得到5 mg/mL的MXene@Thi复合物溶液。

[0008] 本发明所述的一种双模式基于MXene纳米片光热放大的电化学邻近杂交免疫传感器的应用,包括工作电极、铂丝电极为对电极和Ag/AgCl为参比电极,其特征在于,所述的工作电极采用TiO₂ NDs-PEI/DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4-DNA₂-Ab₂/MXene@Thi修饰电极,所述的TiO₂ NDs-PEI/DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4-DNA₂-Ab₂/MXene@Thi修饰电极由下述方法制备而成的:1) 玻碳电极的预处理: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) TiO₂ NDs-PEI/DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4-DNA₂-Ab₂/MXene@Thi修饰电极的制备:将3 mg的TiO₂盘状纳米粒子(TiO₂ NDs)粉末溶于1 mL超纯水中,得到3 mg/mL TiO₂ NDs的水分散液,取10 μL聚乙烯亚胺(PEI)加超纯水稀释至1 mL得到1 wt.% PEI的水溶液,向1 mL上述TiO₂ NDs分散液中加入1 mL的1 wt.% PEI水溶液,室温下连续搅拌6 h,10000 rpm离心10 min后,用超纯水冲洗3次,去除多余的PEI,经干燥后得到的TiO₂ NDs-PEI重新分散在1 mL的超纯水中,取5 μL TiO₂ NDs-PEI分散液滴涂于干净的GCE表面,在烘箱中烘干并冷却至室温得到PEI-TiO₂ NDs修饰电极;将PEI-TiO₂ NDs修饰电极浸入含有体积比为1:1的0.01 M H₂SO₄和0.01 M Na₂SO₄的0.1 wt.% HAuCl₄溶液中进行恒电位沉积,电压0.2 V,沉积时间30 s得到Au/PEI-TiO₂ NDs修饰电极;将5 μL 10 μM捕获DNA₃滴涂在上述修饰电极表面,并在室温下通过Au-S键结合孵育3小时,用pH 7.4的磷酸缓冲溶液冲洗后,将所得电极放在100 μL 1 mM 巯基己醇(MCH)溶液中浸泡30 min,滴加5 μL含10 μM DNA₁-Ab₁、10 μM DNA₂-Ab₂和不同浓度的HE4标准溶液的混合液在4 °C下孵育60 min,用pH 7.4的磷酸缓冲溶液冲洗电极表面并在室温条件下自然晾干,得到TiO₂ NDs-PEI/DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4-DNA₂-Ab₂修饰电极;最后,取5 μL MXene@Thi复合物溶液滴涂在电极表面于室温下孵育50 min,用pH 7.4的磷酸缓冲溶液洗去残余液并在室温条件下自然晾干,即得到TiO₂ NDs-PEI /DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4 -DNA₂-Ab₂/MXene@Thi修饰电极。

[0009] 本发明所述的一种双模式基于MXene纳米片光热放大的电化学邻近杂交免疫传感器的应用,其特征在于,步骤如下:采用三电极体系进行测定,以TiO₂ NDs-PEI/DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4-DNA₂-Ab₂/MXene@Thi修饰电极为工作电极,Ag/AgCl为参比电极,铂丝电极为辅助电极,在电化学工作站上对HE4进行检测,设置初始电位为0 V,终止电位为-0.5 V,在pH 7.4的磷酸缓冲溶液中,用方波伏安法(SWV)对1×10⁻⁶ ng/mL~10 ng/mL一系列不同浓度的

HE4标准溶液在修饰电极上的电化学行为进行测定,通过记录808 nm激光照射后产生的电化学信号,绘制工作曲线;用普通温度计采集照射后电极表面的温度,绘制工作曲线;待测样品溶液代替HE4标准溶液进行检测,检测的结果通过工作曲线查得。

[0010] 本发明的显著优点为:

(1) 采用聚乙烯亚胺改性的TiO₂纳米盘作为基底,表现出优异的生物相容性,并且由于TiO₂ NDs的大比表面积,将大量的捕获DNA底物固定到传感界面上,提高了传感器的分析容量。

[0011] (2) 邻近杂交方法将传统的蛋白质免疫识别转化为简单的DNA识别,提高了检测的准确性和灵敏度,在蛋白质临床检测中具有较大的应用前景。

[0012] (3) 光热材料Mxene纳米片负载硫堇作为信号探针,在808 nm激光照射下,将复杂的生物分析信号用普通温度计读出,这种温度读出模式可灵活用于日常检测,具有很大的商业应用潜力。

[0013] (4) 光热效应介导的温度升高同时会导致电化学信号的增强,显著提高了传感器的灵敏度和准确性,提供了光热效应用于传感器信号放大的新思路。

附图说明

[0014] 图1为本发明所述的HE4的邻近杂交免疫传感器的制备过程示意图。

[0015] 图2 A为传感电极的电化学响应与HE4标准溶液浓度 1×10^{-6} ng/mL ~ 10 ng/mL (a-h)的线性关系图。

[0016] 图2 B为传感电极的温度响应与HE4标准溶液浓度 1×10^{-5} ng/mL ~ 1 ng/mL (a-f)的线性关系图。

具体实施方式

[0017] 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。

[0018] 实施例1

一种基于MXene纳米片光热放大的邻近杂交双模式免疫传感器的制备 (如图1所示):

(1) 玻碳电极的预处理: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) 将3 mg的TiO₂盘状纳米粒子(TiO₂ NDs)粉末溶于1 mL 超纯水中,得到3 mg/mL TiO₂ NDs的水分散液,取10 μL聚乙烯亚胺(PEI)加超纯水稀释至1 mL 得到1 wt.% PEI的水溶液,向1 mL上述TiO₂ NDs分散液中加入1 mL的1 wt.% PEI水溶液,室温下连续搅拌6 h,10000 rpm离心10 min后,用超纯水冲洗3次,去除多余的PEI,经干燥后得到的TiO₂ NDs-PEI重新分散在1 mL的超纯水中,取5 μL TiO₂ NDs-PEI分散液滴涂于干净的GCE表面,在烘箱中烘干并冷却至室温得到PEI-TiO₂ NDs修饰电极;

(3) 将PEI-TiO₂ NDs修饰电极浸入含有体积比为1:1的0.01 M H₂SO₄和0.01 M Na₂SO₄的0.1 wt.% HAuCl₄溶液中进行恒电位沉积,电压0.2 V,沉积时间30 s得到Au/ PEI-TiO₂ NDs修饰电极;

(4) 将5 μL 10 μM 捕获脱氧核糖核酸(DNA₃)溶液滴涂在上述修饰电极表面,并在室温下通过Au-S键结合孵育3小时,用pH 7.4的磷酸缓冲溶液冲洗后,将所得电极放在100 μL 1 mM 巯基己醇(MCH)溶液中浸泡30 min,滴加5 μL 含10 μM DNA₁-Ab₁、10 μM DNA₂-Ab₂和不同浓度的HE4标准溶液的混合液在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育60 min,用pH 7.4的磷酸缓冲溶液冲洗电极表面并在室温条件下自然晾干,得到TiO₂ NDs-PEI/DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4-DNA₂-Ab₂修饰电极;

(5) 取5 μL MXene@Thi复合物溶液滴涂在电极表面于室温下孵育50 min,用pH 7.4的磷酸缓冲溶液洗去残余液并在室温条件下自然晾干,即得到TiO₂ NDs-PEI /DNA₃/ DNA₁-Ab₁-HE4 -DNA₂-Ab₂/MXene@Thi修饰电极。

[0019] 上述所用的Mxene纳米片,购买自北京福斯曼科技有限公司,人附睾蛋白4抗体(即本说明书中所述的抗体Ab₁或Ab₂)和人附睾蛋白4 (HE4)均购买自武汉纯度生物科技有限公司,脱氧核糖核酸DNA₁(序列为5' -GCT GAG GTT ATC AAG ACT TTT TTT ATC ACA TCA GGC TCT AGC GTA TGC TAT TG-SH-3') 脱氧核糖核酸DNA₂(序列为5' -SH-TAC GTC CAG AAC TTT ACC AAA CCA CAC CCT TTT TTT GTC TTG GCT GAG GAT-3)和脱氧核糖核酸DNA₃(序列为5' -ATC CTC AGC AAC CTC AGC AGC G-SH-3')由上海生工生物工程股份有限公司合成及纯化。

[0020] 实施例2

实施例1所用的TiO₂盘状纳米粒子(TiO₂ NDs)的制备:

将4.5 g对苯二甲酸,2.34 mL钛酸丁酯(IV),9 mL无水甲醇和81 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)混合,然后将混合物转移到100 mL高压反应釜中,在150 $^{\circ}\text{C}$ 下加热48 h,冷却后过滤并用甲醇多次洗涤得到白色悬浮液,随后,上述白色悬浮液产物在400 $^{\circ}\text{C}$ 空气中煅烧5 h,自然冷却后,收集得到的白色粉末即为TiO₂盘状纳米粒子(TiO₂ NDs);

实施例1所用的DNA₁-Ab₁或DNA₂-Ab₂的制备:

抗体(Ab₁或Ab₂)的活化:取0.2 mg 抗体(Ab₁或Ab₂)固体用1 mL 浓度为55 mM、pH 7.4磷酸缓冲溶液稀释至0.2 mg/mL,取10 μL 浓度为0.4 mM (N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)的二甲基亚砜溶液,与100 μL 浓度为0.2 mg/mL 抗体溶液(Ab₁或Ab₂)在室温下孵育2 h,转速为10000 rpm的离心过滤纯化10 min即得到活化的Ab₁-SMCC或Ab₂-SMCC,并在100 μL 浓度为55 mM、pH 7.4磷酸缓冲溶液中重新溶解;DNA₁或DNA₂的还原:取40 μL 100 mM二硫苏糖醇(DTT)的水溶液与30 μL 浓度为100 μM 的DNA₁或DNA₂的Tris-HCl缓冲溶液混合1 h,得到的DNA₁或DNA₂溶液经过转速为10000 rpm的离心过滤纯化10 min即得到还原的DNA₁或DNA₂,并在100 μL 浓度为55 mM、pH 7.4磷酸缓冲溶液中重新溶解;DNA₁-Ab₁或DNA₂-Ab₂溶液的制备:将上述所得活化的Ab₁-SMCC或Ab₂-SMCC溶液与还原的DNA₁或DNA₂溶液混合,在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,随后经过多次多次转速为10000 rpm的离心过滤10 min除去未反应的DNA₁或DNA₂,将得到的DNA₁-Ab₁或DNA₂-Ab₂溶于200 μL 浓度为55 mM、pH 7.4磷酸缓冲溶液中,放置4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下备用。

[0021] 实施例1所用的MXene@Thi复合物的制备:

取5 mg MXene纳米片分散在1 mL乙醇中,然后与20 μL 的3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)均匀混合,并在室温下持续搅拌过夜,经过转速为10000 rpm的离心过滤10 min,用超纯水多次洗涤得到改性MXene纳米片,加入1 mL超纯水中超声得到MXene纳米片分散液,再加入200 μL 的2.5 wt.%戊二醛的水溶液搅拌40 min,通过转速为10000 rpm的离心收集

沉淀,并用超纯水洗涤3次得到黑色固体,将1 mL的5 mg/mL硫堇水溶液与黑色固体混合,在黑暗条件下搅拌5h,经过离心洗涤得到的固体分散在1 mL超纯水中,得到5 mg/mL的MXene@Thi复合物溶液。

[0022] 实施例3

一种基于MXene纳米片光热放大的邻近杂交双模式免疫传感器的应用,步骤如下:

(1) 采用三电极体系进行测定,以TiO₂ NDs-PEI/DNA₃/DNA₁-Ab₁-HE4-DNA₂-Ab₂/MXene@Thi修饰电极为工作电极,Ag/AgCl为参比电极,铂丝电极为辅助电极,在电化学工作站上对HE4进行检测,设置初始电位为0 V,终止电位为-0.5 V;

(2) 在pH 7.4的磷酸缓冲溶液中,用方波伏安法(SWV)对 1×10^{-6} ng/mL~10 ng/mL一系列不同浓度的HE4标准溶液在修饰电极上的电化学行为进行测定,通过记录808 nm激光照射后产生的电化学信号,绘制工作曲线,见图2A;用普通温度计采集照射后电极表面的温度,绘制工作曲线,见图2B;

(3) 待测样品溶液代替HE4标准溶液进行检测,检测的结果通过工作曲线查得。

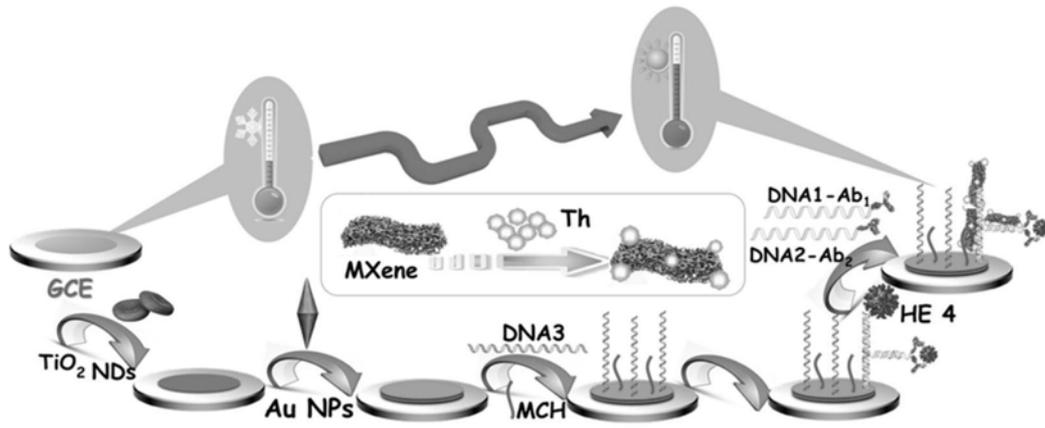


图1

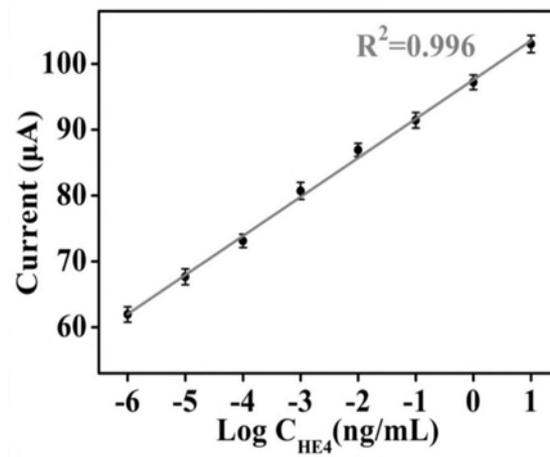


图2A

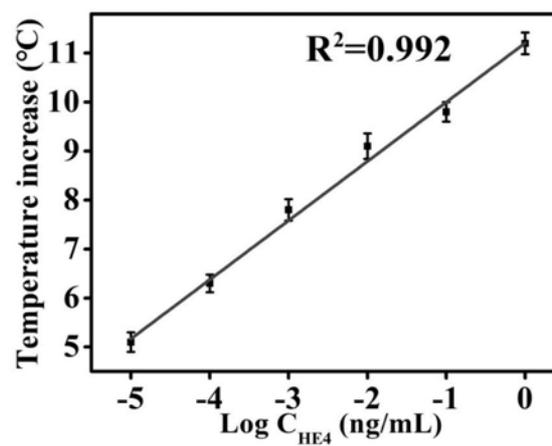


图2B

专利名称(译)	一种基于MXene纳米片光热放大的邻近杂交双模式免疫传感器的制备及应用		
公开(公告)号	CN110716040A	公开(公告)日	2020-01-21
申请号	CN201911051390.4	申请日	2019-10-31
[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	戴宏 任卉竹 高利红 张书培		
发明人	戴宏 皇怡甜 任卉竹 高利红 张书培		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/68 G01N33/574 G01N27/30 C07K16/38		
CPC分类号	C07K16/38 G01N27/30 G01N33/531 G01N33/57449 G01N33/68 G01N2333/81		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种基于MXene纳米片光热放大的邻近杂交双模式免疫传感器的制备及应用。将聚乙烯亚胺(PEI)改性的TiO₂盘状纳米粒子作为基底,通过电沉积金将大量的捕获底物脱氧核糖核酸固定在传感界面上。两种脱氧核糖核酸探针均以目标物人附睾蛋白4抗体标记,作为HE4的识别部分被DNA3捕获后,HE4通过免疫识别诱导一次抗体标记的DNA1和二次抗体标记的DNA2之间的邻近杂交。Mxene纳米片负载大量的硫堇可以有效地嵌插到杂交形成的双链DNA沟槽中,不仅可用作电化学—温度双模式的信号探针,而且由于光热效应产生的升温实现了电化学信号放大。在808nm红外激光器的照射下,实现对HE4的高灵敏检测。

