



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103868971 A

(43) 申请公布日 2014.06.18

(21) 申请号 201410036028.0

(22) 申请日 2014.01.26

(71) 申请人 济南大学

地址 250022 山东省济南市济微路 106 号

(72) 发明人 魏琴 李月云 闫涛 胡丽华

张勇 吴丹 李贺 魏东

(51) Int. Cl.

G01N 27/48 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种谷胱甘肽转移酶抗原生物传感器的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及一种谷胱甘肽转移酶抗原生物传感器的制备方法及应用,属于新型纳米功能材料与生物传感技术领域。具体是基于磺酸化石墨烯($\text{HSO}_3\text{-GS}$)和双金属纳米多孔合金材料铂铁(PtFe),制备的检测谷胱甘肽转移酶的夹心型电化学免疫传感器,用于检测血清中的谷胱甘肽转移酶。其特征在于:(1)磺酸化石墨烯的制备;(2)双金属多孔材料铂铁-辣根过氧化物酶-谷胱甘肽转移酶二抗复合物的制备;(3)电化学免疫传感器的制备。 PtFe 对 H_2O_2 具有很强的催化能力,同时利于固定更多的二抗、保持物质生物活性;将电子媒介体天青A加入底液中,避免了修饰到电极上后的泄漏问题,制备的传感器灵敏度高、特异性好、易于操作、检测限低。

1. 一种谷胱甘肽转移酶抗原生物传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 双金属纳米多孔材料铂铁(PtFe)的制备

将 PtFeAl 合金片放到装有 $0.5 \sim 1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液的小烧杯中,置于恒温水浴中, $40 \sim 50^\circ\text{C}$ 条件下,放置 $24 \sim 48 \text{ h}$,将得到的产物用二次水反复洗涤,室温下晾干,即制备出所需的 PtFe;

(2) PtFe/辣根过氧化物酶/谷胱甘肽转移酶二抗复合物(PtFe/HRP/Ab₂)制备

将 PtFe 悬浮液超声,移取悬浮液、HRP 溶液和 Ab₂ 溶液于一离心管中,体积比为 PtFe:HRP : Ab₂ = $1 : 0.5 \sim 2 : 0.5 \sim 2$ 进行混合, 4°C 条件下,进行振荡孵化,孵化 $12 \sim 24 \text{ h}$ 后,置于 4°C 冰箱中保存待用;

(3) 电化学免疫传感器的制备。

2. 如权利要求 1 所述的一种谷胱甘肽转移酶抗原生物传感器的制备方法,其特征在于,所述的电化学免疫传感器的制备,步骤如下:

(1) 将直径 4 mm 的玻碳电极依次用 1.0 、 0.3 和 0.05 mm 的三氧化二铝抛光粉抛光处理,乙醇超声清洗,再用超纯水冲洗干净,然后将电极置于 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 铁氰化钾溶液中,在 $-0.2 \sim 0.6 \text{ V}$ 电位下扫描,使峰电位差小于 80 mV ;

(2) 将壳聚糖分散的 HSO₃-GS 修饰于玻碳电极表面,室温干燥;

(3) 将谷胱甘肽转移酶一抗(Ab₁)滴涂到步骤(2)HSO₃-GS 修饰的电极表面,置于 4°C 湿润条件下晾干;

(4) 将浓度为 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 牛血清白蛋白滴涂到步骤(3)Ab₁ 修饰的电极表面, 4°C 下湿润条件下晾干;

(5) 将谷胱甘肽转移酶抗原(GST)滴涂在步骤(4)牛血清白蛋白修饰的电极表面, 4°C 下湿润条件下晾干;

(6) 将 PtFe/HRP/Ab₂ 滴涂在步骤(5)GST 修饰的电极表面, 4°C 下湿润条件下晾干,电化学免疫传感器制备完成。

3. 如权利要求 1 所述的一种谷胱甘肽转移酶抗原生物传感器的制备方法,其特征在于,所述 HSO₃-GS 的浓度为 $0.5 \sim 2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,所述 PtFe 悬浮液的浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,所述 HRP 的浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,所述 Ab₂ 的浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

4. 如权利要求 1 ~ 3 之一所述的制备方法制备的传感器的检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 采用 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{pH} = 7.4$ 的磷酸盐缓冲溶液,配制在 $0.01 \sim 12 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内不同浓度的 GST 溶液,将 $6 \text{ } \mu\text{L}$ 不同浓度的 GST 溶液分别滴涂至权利要求 2 中步骤(4)牛血清白蛋白修饰的电极表面,晾干后,按照权利要求 2 中步骤(6)修饰电极,连接至电化学工作站中,分别将电极置于含有 $2.0 \sim 3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 天青 A 和 $1.0 \sim 5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 的 $\text{pH}=7.4$ 的 PBS 缓冲溶液中测定其电流变化;

(2) 根据所得电流差值与 GST 浓度呈线性关系,绘制工作曲线;

(3) 依据工作曲线的绘制方法进行样品中 GST 的检测,检测结果从工作曲线中查得。

一种谷胱甘肽转移酶抗原生物传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种谷胱甘肽转移酶抗原生物传感器的制备方法及应用。具体是基于磺酸化石墨烯($\text{HSO}_3\text{-GS}$)和双金属纳米多孔合金材料铂铁(PtFe),制备谷胱甘肽转移酶的夹心型电化学免疫传感器,用于检测血清中的谷胱甘肽转移酶。属于新型纳米功能材料与生物传感技术领域。

背景技术

[0002] 谷胱甘肽转移酶(GST)主要是在肝脏中参与生物转化第二相反应的一种生物酶,它既能在组织中又可在血清中检测到,而其它许多肿瘤标志物只能在组织中检测到,而且检测血清中的GST对机体无侵袭性,可以大大方便临床的应用,因此谷胱甘肽转移酶免疫传感器的研制具有重要的意义。

[0003] 本发明基于合成纳米材料磺酸化石墨烯($\text{HSO}_3\text{-GS}$)以及双金属纳米多孔材料铂铁(PtFe)制备谷胱甘肽转移酶夹心型免疫传感器的研究,突出了电极修饰材料对生物传感器增大响应、提高检测灵敏度、增大线性范围等作用。 $\text{HSO}_3\text{-GS}$ 具有比表面积大、能加强电子传导等优势,利用化学键合作用可直接与谷胱甘肽转移酶一抗联接,无需采用传统交联剂戊二醛固定化。采用 PtFe 有利于固定更多的二抗、保持物质生物活性,并且对 H_2O_2 具有很强的催化能力。两者利用简单滴涂法修饰于玻碳电极上可增强电极在反应过程中的电化学响应。将电子媒介体天青A加入底液中,避免了修饰到电极上后的泄漏问题。

[0004] 本发明制得的生物传感器的响应电流与GST浓度在 $0.01 \sim 12 \text{ ng/mL}$ 范围内保持良好的线性关系,检测限为 2.1 pg/mL 。

[0005] 本发明利用免疫反应的高特异性,结合 $\text{HSO}_3\text{-GS}$ 和 PtFe ,制备了一种谷胱甘肽转移酶夹心型免疫传感器。

[0006] 本发明具有灵敏度高、特异性好、检测成本低、能快速检测谷胱甘肽转移酶等优势,且本发明制备过程简单,操作过程简便,有效克服了目前谷胱甘肽转移酶检测方法的不足。

发明内容

[0007] 本发明的目的之一在于避免传统检测方法的仪器设备复杂、操作过程繁琐、检测人员要求高等缺点,提供了一种灵敏度高、特异性强、重现性好、操作简便的快速检测谷胱甘肽转移酶的电化学免疫传感器的制备方法。

[0008] 本发明的目的之二是将该电化学免疫传感器应用于谷胱甘肽转移酶的检测。

[0009] 为了实现上述目的,本发明是通过以下措施来实现的。

[0010] 一种谷胱甘肽转移酶抗原生物传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) PtFe 的制备

将 PtFeAl 合金片放到装有 $0.5 \sim 1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$ 溶液的小烧杯中,置于恒温水浴中, $40 \sim 50^\circ\text{C}$ 条件下,放置 $24 \sim 48 \text{ h}$,将得到的产物用二次水反复洗,室温下晾干,即制备

出所需的 PtFe。

[0011] (2) PtFe/辣根过氧化物酶/谷胱甘肽转移酶二抗复合物(PtFe/HRP/Ab₂) 制备

将装有 PtFe 悬浮液超声,移取 PtFe 悬浮液、HRP 溶液和 Ab₂ 溶液于一离心管中,体积比为 PtFe : HRP : Ab₂ = 1 : 0.5 ~ 2 : 0.5 ~ 2 进行混合,4℃条件下,进行振荡孵化,孵化 12 ~ 24 h 后,置于 4℃冰箱中保存待用。

[0012] (3) 电化学免疫传感器的制备

1) 将直径 4 mm 的玻碳电极依次用 1.0、0.3 和 0.05 mm 的三氧化二铝抛光粉抛光处理,乙醇超声清洗,再用超纯水冲洗干净,然后将电极置于 5 mmol · L⁻¹ 铁氰化钾溶液中,在 -0.2 ~ 0.6 V 电位下扫描,使峰电位差小于 90 mV;

2) 将壳聚糖分散的 HSO₃-GS 修饰于玻碳电极表面,室温干燥;

3) 将谷胱甘肽转移酶一抗(Ab₁)滴涂到步骤 2) HSO₃-GS 修饰的电极表面,置于 4℃湿润条件下晾干;

4) 将浓度为 100 μg · mL⁻¹ 牛血清白蛋白滴涂到步骤 3) Ab₁ 修饰的电极表面,4℃下湿润条件下晾干;

5) 将 GST 滴涂在步骤 4) 牛血清白蛋白修饰的电极表面,4℃下湿润条件下晾干;

6) 将 PtFe/HRP/Ab₂ 滴涂在步骤 5) GST 修饰的电极表面,4℃下湿润条件下晾干,电化学免疫传感器制备完成。

[0013] 所述 HSO₃-GS 的浓度为 0.5 ~ 2.5 mg · mL⁻¹, 所述 PtFe 悬浮液的浓度为 10 mg · mL⁻¹, 所述 HRP 的浓度为 1.0 mg · mL⁻¹, 所述 Ab₂ 的浓度为 1.0 mg · mL⁻¹。

[0014] (4) 电化学免疫传感器的应用

用于谷胱甘肽转移酶的检测,步骤如下:

1) 采用 0.10 mol · mL⁻¹, pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液,配制在 0.01 ~ 12 ng · mL⁻¹ 范围内不同浓度的 GST 溶液,将 6 μL 不同浓度的 GST 溶液分别滴涂至上述步骤 4) 牛血清白蛋白修饰的电极表面,晾干后,按照上述步骤 6) 修饰电极,连接至电化学工作站中,分别将电极置于含有 2.0 ~ 3.0 mmol · L⁻¹ 天青 A 和 1.0 ~ 5.0 mmol · L⁻¹ H₂O₂ 的 pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液中测定其电流变化;

2) 根据所得电流差值与 GST 浓度呈线性关系,绘制工作曲线;

3) 依据工作曲线的绘制方法进行样品中 GST 的检测,检测结果从工作曲线中查得。

[0015] 本发明的有益成果

(1) 谷胱甘肽转移酶抗原生物传感器,HSO₃-GS 引入到谷胱甘肽转移酶抗原电化学免疫传感器的制备当中,利用 HSO₃-GS 良好的电子传递能力,显著改善了电极的性能。

[0016] (2) 将 PtFe 与肿瘤标志物二抗直接孵化,利用铂铁优异的生物相容性和高的催化性能,显著提高了电化学免疫传感器的重现性和稳定性。

[0017] (3) PtFe 与辣根过氧化物酶复合标记二抗,具有对信号的协同增敏作用。

[0018] (4) 本发明所制备的电化学免疫传感器,操作简单,检测速度快,可在短时间内实现批量样品的测定。

具体实施方式

[0019] 实施例 1 PtFe 的制备

将 PtFeAl 合金片放到装有 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液的小烧杯中,置于恒温水浴中, 40°C 条件下,放置 24 h,将得到的产物用二次水反复洗涤,室温下晾干,即制备出所需的 PtFe。

[0020] 实施例 2 PtFe 的制备

将 PtFeAl 合金片放到装有 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液的小烧杯中,置于恒温水浴中, 50°C 条件下,放置 48 h,将得到的产物用二次水反复洗涤,室温下晾干,即制备出所需的 PtFe。

[0021] 实施例 3 PtFe 的制备

将 PtFeAl 合金片放到装有 $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液的小烧杯中,置于恒温水浴中, 45°C 条件下,放置 35 h,将得到的产物用二次水反复洗涤,室温下晾干,即制备出所需的 PtFe。

[0022] 实施例 4 PtFe/HRP/Ab₂ 制备

将装有 PtFe 悬浮液超声,移取 PtFe 悬浮液、HRP 溶液和 Ab₂ 溶液于一离心管中,体积比为 PtFe : HRP : Ab₂ = 1 : 0.5 : 0.5 进行混合, 4°C 条件下,进行振荡孵化,孵化 12 h 后,置于 4°C 冰箱中保存待用。

[0023] 实施例 5 PtFe/HRP/Ab₂ 制备

将装有 PtFe 悬浮液超声,移取 PtFe 悬浮液、HRP 溶液和 Ab₂ 溶液于一离心管中,体积比为 PtFe : HRP : Ab₂ = 1 : 1 : 1 进行混合, 4°C 条件下,进行振荡孵化,孵化 24h 后,置于 4°C 冰箱中保存待用。

[0024] 实施例 6 PtFe/HRP/Ab₂ 制备

将装有 PtFe 悬浮液超声,移取 PtFe 悬浮液、HRP 溶液和 Ab₂ 溶液于一离心管中,体积比为 PtFe : HRP : Ab₂ = 1 : 2 : 2 进行混合, 4°C 条件下,进行振荡孵化,孵化 18h 后,置于 4°C 冰箱中保存待用。

[0025] 实施例 7 电化学免疫传感器的制备

(1) 将直径 4 mm 的玻碳电极依次用 1.0、0.3 和 0.05 mm 的三氧化二铝抛光粉抛光处理,乙醇超声清洗,再用超纯水冲洗干净,然后将电极置于 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 铁氰化钾溶液中,在 $-0.2 \sim 0.6 \text{ V}$ 电位下扫描,使峰电位差小于 90 mV;

(2) 将壳聚糖分散的 HSO₃-GS 修饰于玻碳电极表面,室温干燥;

(3) 将谷胱甘肽转移酶一抗 (Ab₁) 滴涂到步骤 (2) HSO₃-GS 修饰的电极表面,置于 4°C 湿润条件下晾干;

(4) 将浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 牛血清白蛋白滴涂到步骤 (3) Ab₁ 修饰的电极表面, 4°C 下湿润条件下晾干;

(5) 将 GST 滴涂在步骤 (4) 牛血清白蛋白修饰的电极表面, 4°C 下湿润条件下晾干;

(6) 将 PtFe/HRP/Ab₂ 滴涂在步骤 (5) GST 修饰的电极表面, 4°C 下湿润条件下晾干,电化学免疫传感器制备完成。

[0026] 实施例 8 电化学免疫传感器的应用

用于谷胱甘肽转移酶的检测,步骤如下:

(1) 采用 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液,配制在 $0.01 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内不同浓度的 GST 溶液,将 6 μL 不同浓度的 GST 溶液分别滴涂至实施例 7 中步骤 (4) 牛血清白蛋白修饰的电极表面,晾干后,按照实施例 7 中步骤 (6) 修饰电极,连接至电化学工作站中,分别将电极置于含有 $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 天青 A 和 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 的 pH=7.4 的 PBS 缓冲溶液中测定其电流变化;

(2) 根据所得电流差值与 GST 浓度呈线性关系, 绘制工作曲线;

(3) 依据工作曲线的绘制方法进行样品中 GST 的检测, 检测结果从工作曲线中查得。

[0027] 实施例 9 电化学免疫传感器的应用

用于谷胱甘肽转移酶的检测, 步骤如下:

(1) 采用 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{pH} = 7.4$ 的磷酸盐缓冲溶液, 配制在 $12 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内不同浓度的 GST 溶液, 将 $6 \mu\text{L}$ 不同浓度的 GST 溶液分别滴涂至实施例 7 中步骤(4)牛血清白蛋白修饰的电极表面, 晾干后, 按照实施例 7 中步骤(6)修饰电极, 连接至电化学工作站中, 分别将电极置于含有 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 天青 A 和 $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 的 $\text{pH}=7.4$ 的 PBS 缓冲溶液中测定其电流变化;

(2) 根据所得电流差值与 GST 浓度呈线性关系, 绘制工作曲线;

(3) 依据工作曲线的绘制方法进行样品中 GST 的检测, 检测结果从工作曲线中查得。

[0028] 实施例 10 电化学免疫传感器的应用

用于谷胱甘肽转移酶的检测, 步骤如下:

(1) 采用 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{pH} = 7.4$ 的磷酸盐缓冲溶液, 配制在 $5.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内不同浓度的 GST 溶液, 将 $6 \mu\text{L}$ 不同浓度的 GST 溶液分别滴涂至实施例 7 中步骤(4)牛血清白蛋白修饰的电极表面, 晾干后, 按照实施例 7 中步骤(6)修饰电极, 连接至电化学工作站中, 分别将电极置于含有 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 天青 A 和 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 的 $\text{pH}=7.4$ 的 PBS 缓冲溶液中测定其电流变化;

(2) 根据所得电流差值与 GST 浓度呈线性关系, 绘制工作曲线;

(3) 依据工作曲线的绘制方法进行样品中 GST 的检测, 检测结果从工作曲线中查得。

专利名称(译)	一种谷胱甘肽转移酶抗原生物传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN103868971A	公开(公告)日	2014-06-18
申请号	CN201410036028.0	申请日	2014-01-26
[标]申请(专利权)人(译)	济南大学		
申请(专利权)人(译)	济南大学		
当前申请(专利权)人(译)	济南大学		
[标]发明人	魏琴 李月云 闫涛 胡丽华 张勇 吴丹 李贺 魏东		
发明人	魏琴 李月云 闫涛 胡丽华 张勇 吴丹 李贺 魏东		
IPC分类号	G01N27/48 G01N33/53		
其他公开文献	CN103868971B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种谷胱甘肽转移酶抗原生物传感器的制备方法及应用，属于新型纳米功能材料与生物传感技术领域。具体是基于磺酸化石墨烯（HSO₃-GS）和双金属纳米多孔合金材料铂铁（PtFe），制备的检测谷胱甘肽转移酶的夹心型电化学免疫传感器，用于检测血清中的谷胱甘肽转移酶。其特征在于：（1）磺酸化石墨烯的制备；（2）双金属多孔材料铂铁—辣根过氧化物酶—谷胱甘肽转移酶二抗复合物的制备；（3）电化学免疫传感器的制备。PtFe对H₂O₂具有很强的催化能力，同时利于固定更多的二抗、保持物质生物活性；将电子媒介体天青A加入底液中，避免了修饰到电极上后的泄漏问题，制备的传感器灵敏度高、特异性好、易于操作、检测限低。