



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105424921 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 23

(21) 申请号 201510750069. 0

(22) 申请日 2015. 11. 06

(71) 申请人 上海师范大学

地址 200234 上海市徐汇区桂林路 100 号

(72) 发明人 贾能勤 张鑫 郭薇薇 章阿敏  
黄楚森

(74) 专利代理机构 上海科盛知识产权代理有限公司 31225

代理人 赵志远

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 27/327(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

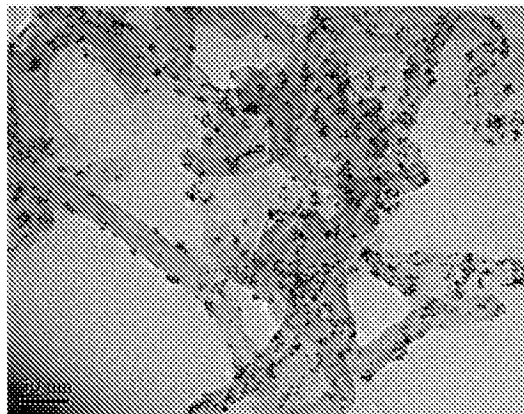
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料  
及制备与应用

(57) 摘要

本发明涉及一种功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料及其制备方法与应用。首先合成碳纳米管-铂复合材料,并酸化处理,再将酸化处理过的碳纳米管-铂复合材料超声分散于二次蒸馏水中,之后加入聚乙烯亚胺,进行缩合反应,并对反应产物离心分离,并洗涤,得到碳纳米管-铂纳米复合材料,最后利用戊二醛的交联作用,将发光物质鲁米诺化学交联到碳纳米管-铂纳米复合材料表面,将最终产物离心分离,得到碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料;此外,本发明公开了功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料在电化学发光免疫传感器中的应用。与现有技术相比,本发明的纳米复合材料提高了电化学发光免疫传感器的电化学响应信号强度和检测灵敏度。



1. 一种功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 合成碳纳米管-铂复合材料,并酸化处理;

(2) 将酸化处理过的碳纳米管-铂复合材料超声分散于二次蒸馏水中,之后加入聚乙烯亚胺,进行缩合反应,并对反应产物离心分离,并洗涤,得到碳纳米管-铂纳米复合材料;

(3) 利用戊二醛的交联作用,将发光物质鲁米诺化学交联到碳纳米管-铂纳米复合材料表面,将最终产物离心分离,得到碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料。

2. 根据权利要求1所述的一种功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料的制备方法,其特征在于,步骤(1)中合成碳纳米管-铂复合材料的方法如下:

将 $H_2PtCl_6$ 和KOH加入到乙二醇溶液中,再加入经纯化和羟基化后的碳纳米管,在超声波的作用下混合均匀,放入微波炉中加热后,过滤,用超纯水洗涤,干燥,得到载铂量为10~20wt%的碳纳米管负载铂纳米粒子,即碳纳米管-铂复合材料。

3. 根据权利要求1所述的一种功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,酸化处理是指:将碳纳米管分散在3:1(V/V) $H_2SO_4/HNO_3$ 中,超声小时,然后离心分离并用蒸馏水和乙醇反复洗涤直至离心液pH接近于7.0,使得碳纳米管羟基化,并打断碳纳米管,然后干燥处理。

4. 根据权利要求1所述的一种功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料的制备方法,其特征在于,步骤(2)具体为,将酸化处理过碳纳米管-铂复合材料分散到蒸馏水中,加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺和聚乙烯亚胺,并超声分散均匀,摇床反应后离心分离,将氨基引入到碳纳米管-铂复合材料的表面,得到碳纳米管-铂纳米复合材料;

其中,酸化处理过碳纳米管-铂复合材料与1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺的重量比为1:1:1,所述的聚乙烯亚胺与酸化处理过碳纳米管-铂复合材料的重量比为5:1。

5. 根据权利要求1所述的一种功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料的制备方法,其特征在于,步骤(3)具体为:将戊二醛和鲁米诺与碳纳米管-铂纳米复合材料混合,分散到蒸馏水中,摇床反应后离心分离,用蒸馏水和乙醇分别洗涤三次去除未反应的试剂,即制备得到碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料;

其中,戊二醛、鲁米诺及碳纳米管-铂纳米复合材料的加入量重量比为6:9:1。

6. 一种采用权利要求1~5中任一项所述的制备方法制得的功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料。

7. 一种如权利要求6所述的功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料在电化学发光免疫传感器中的应用。

8. 根据权利要求7所述的功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料的应用,其特征在于,将所述的功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料修饰到电极表面,利用戊二醛的交联作用,将抗体共价连接到碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料修饰电极表面,得到对所述抗体对应抗原具有靶向特异性检测的电化学发光免疫传感器。

9. 根据权利要求7所述的功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料的应用,其特征在于,所述的抗体为CA19-9抗体,所述抗体对应抗原为CA19-9抗原。

## 功能化碳纳米管 - 铂 - 鲁米诺纳米复合材料及制备与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种鲁米诺纳米复合材料,尤其是涉及一种功能化碳纳米管 - 铂 - 鲁米诺纳米复合材料及制备与应用。

### 背景技术

[0002] 在过去几十年里,肿瘤治疗取得了迅猛发展。传统的治疗方法如手术、放疗、化疗有较好的疗效,但同时也给患者带来了极大的痛苦和毒副作用。因此,实现早期精确诊断、提高药物的靶向性、降低治疗的毒副作用成为目前癌症诊治的关键。现阶段检测肿瘤标志物是癌症早期诊断的主要手段,主要方法有:酶联免疫分析法、荧光免疫分析法、放射免疫分析法、化学发光免疫分析法等等。这些传统的分析方法虽然特异性强、灵敏度高,但也存在一些不足之处,如:操作流程复杂、耗时较长、后续数据处理复杂和仪器设备昂贵等等。与上述方法相比,电化学发光(ECL)技术是一种灵敏度高,仪器简单,反应可控性好,成本低的电化学分析技术。电化学发光免疫传感器是将高灵敏的电化学发光传感技术与特异性免疫反应结合起来,通过抗原 - 抗体免疫反应前后电化学发光信号的变化,来监测免疫反应过程。将电化学发光和免疫传感器结合构建电化学发光免疫传感器具有广阔的应用前景。在电化学发光体系中,鲁米诺(luminol)因其氧化电位低、成本低廉、高的发光效率等优点而引起人们的关注。然而,相比较把鲁米诺溶解在溶液里,将鲁米诺固定在电极上具有更多的优势,如:节约试剂,提高电化学发光效率等。并且,过氧化氢( $H_2O_2$ )作为鲁米诺高效共反应试剂可有效放大鲁米诺的电化学发光信号,可提高免疫传感器的灵敏度。

[0003] 近年来,纳米技术为攻克临床上癌症诊治的难题带来了新机遇,新型功能性纳米材料由于其特殊的纳米结构、较强的吸附能力、大的比表面积从而可以大大提高生物分子(如酶、DNA等)的固载量、标记生物分子、催化反应、加快电子传递及增大电流信号,为生物电化学传感器的研究和应用提供新途径。将纳米技术用于电化学发光生物分析中,两者相结合可开发出性能优良的生物分析方法。自从纳米碳管(CNT)被发现以来,其特有的力学、电学和化学性质引起了物理、化学、材料科学和纳米科技领域学者的极大兴趣。碳纳米管以其大比表面积、良好的机械性质以及快速的电子传递能力被广泛应用于电分析化学研究领域,以碳纳米管作为载体负载金属纳米粒子获得功能化的碳纳米管可以带来更多理想效果。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的就是提供了一种功能化碳纳米管 - 铂 - 鲁米诺纳米复合材料及制备与应用。

[0005] 本发明的目的可以通过以下技术方案来实现:

[0006] 一种功能化碳纳米管 - 铂 - 鲁米诺纳米复合材料的制备方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 合成碳纳米管 - 铂复合材料,并酸化处理;

[0008] (2) 将酸化处理过的碳纳米管 - 铂复合材料超声分散于二次蒸馏水中,之后加入

聚乙烯亚胺,进行缩合反应,并对反应产物离心分离,并洗涤,得到碳纳米管-铂纳米复合材料;

[0009] (3) 利用戊二醛的交联作用,将发光物质鲁米诺化学交联到碳纳米管-铂纳米复合材料表面,将最终产物离心分离,得到碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料。

[0010] 步骤(1)中合成碳纳米管-铂复合材料的方法如下:将 $H_2PtCl_6$ 和KOH加入到乙二醇溶液中,再加入经纯化和羟基化后的碳纳米管,在超声波的作用下混合均匀,放入微波炉中加热后,过滤,用超纯水洗涤,干燥,得到载铂量为10~20wt%的碳纳米管负载铂纳米粒子,即碳纳米管-铂复合材料。

[0011] 步骤(1)中,酸化处理是指:将一定量的碳纳米管分散在3:1(V/V) $H_2SO_4/HNO_3$ 中,超声16小时,然后离心分离并用蒸馏水和乙醇反复洗涤直至离心液pH接近于7.0。将羟基化和已经打断的碳纳米管至于真空干燥箱60℃干燥。

[0012] 步骤(2)具体为,将酸化处理过碳纳米管-铂复合材料分散到蒸馏水中,加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺和聚乙烯亚胺,并超声分散均匀,摇床反应后离心分离,将氨基引入到碳纳米管-铂复合材料的表面,得到碳纳米管-铂纳米复合材料;其中,酸化处理过碳纳米管-铂复合材料与1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺的重量比为1:1:1,所述的聚乙烯亚胺与酸化处理过碳纳米管-铂复合材料的重量比为5:1。

[0013] 步骤(3)具体为:将戊二醛和鲁米诺与碳纳米管-铂纳米复合材料混合,分散到蒸馏水中,摇床反应后离心分离,用蒸馏水和乙醇分别洗涤三次去除未反应的试剂,即制备得到碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料;其中,戊二醛、鲁米诺及碳纳米管-铂纳米复合材料的加入量重量比为6:9:1。

[0014] 采用上述制备方法制得的功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料。

[0015] 所述的功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料在电化学发光免疫传感器中的应用,具体为:将所述的功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料修饰到玻碳电极表面,用壳聚糖固定,利用戊二醛的交联作用,将抗体共价连接到碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料修饰电极表面,得到对所述抗体对应抗原具有靶向特异性检测的电化学发光免疫传感器。

[0016] 所述的抗体为CA19-9抗体,所述抗体对应抗原为糖抗原19-9(Carbohydrate antigen 19-9,CA19-9)。通过电化学发光的测定,大大提高了对肿瘤标志物CA19-9检测灵敏度,为肿瘤早期检测提供了一种新方法。

[0017] 本发明利用戊二醛将聚乙烯亚胺(PEI)功能化的碳纳米管-铂(CNTs-Pt)复合材料与鲁米诺共价相连,制备成一种功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料(CNTs-Pt-luminol),该纳米复合材料既可作为免疫传感器的平台,还固定了发光试剂。本发明利用酸化处理过的碳纳米管-铂为基底材料,在水相体系中合成碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料,其大比表面积可增加抗体生物分子负载量。此外,将鲁米诺固定在电极表面可以节约试剂,提高电化学发光效率。不仅如此,铂纳米粒子在该纳米复合材料中可以有效增强免疫传感器的导电性,加快了电子传递速率,同时,铂纳米粒子可以催化过氧化氢,进而提高了该免疫传感器的电化学发光效率。

[0018] 与现有技术相比,本发明具有以下优点及有益效果:

[0019] 1、本发明的纳米复合材料中铂纳米粒子可催化过氧化氢产生氧化性物质，促进鲁米诺发光，该材料可作为自增强型的电化学发光纳米复合材料，可进一步提高了电化学发光免疫传感器的电化学响应信号强度和检测灵敏度。

[0020] 2、本发明将功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料用在电化学发光免疫传感器中，该电化学发光免疫传感器具有构建方法简便，对肿瘤标志物（如 CA19-9 等）检测具有快速、灵敏度高、特异性强和检测范围宽等优点。该电化学发光免疫传感器的应用为肿瘤早期诊断及检测其他肿瘤标志物的检测提供了新方法。

[0021] 3、基于碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料的电化学发光免疫传感器，基于抗原抗体之间的特异性结合和电化学发光的方法，采用碳纳米管-铂-鲁米诺修饰电极实现了对不同浓度的抗原 CA19-9 进行定量高灵敏检测。

### 附图说明

[0022] 图 1 为功能化碳纳米管-铂纳米复合材料的透射电镜图；

[0023] 图 2 为不同纳米材料的紫外-可见吸收光谱图；

[0024] 图 3 为构建的传感器对不同浓度 CA19-9 的电化学发光检测强度图；

[0025] 图 4 为构建的传感器对不同浓度 CA19-9 的电化学发光检测强度校准曲线。

### 具体实施方式

[0026] 下面结合附图和具体实施例对本发明进行详细说明。

[0027] 鲁米诺（含量 >98%）购买自上海生物工程股份有限公司。1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、聚乙烯亚胺 (PEI) 和壳聚糖 (Chitosan) 购于 Sigma-Aldrich。无水乙醇 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , AR)、戊二醛 (25%, GA) 购买自上海化学试剂有限公司。牛血清白蛋白 (BSA, 纯度 >99.8%, 分子量 68000) 购买自厦门星隆达化学试剂有限公司。糖抗原 (Carbohydrate Antigen 19-9, CA19-9) 和 CA19-9 抗体 (anti-CA19-9) 购买自上海领潮生物有限公司。实验所用水为去离子水 (18.2M $\Omega$ )。

[0028] 实施例 1

[0029] 碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料的制备：

[0030] 首先合成碳纳米管-铂复合材料，其过程如下：将 1.2mL 19.3mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  和 0.2mL 0.4mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> KOH 加入到 12.5mL 乙二醇溶液中，再加入 20mg 经纯化和羟基化后的碳纳米管，在超声波的作用下混合均匀，放入微波炉中加热后，过滤，用超纯水洗涤，在红外灯下干燥，得到载铂量约为 14% 的碳纳米管负载铂纳米粒子 (CNTs-Pt)。图 1 为功能化碳纳米管-铂纳米复合材料的透射电镜图。

[0031] 对碳纳米管进行酸化处理：将一定量的碳纳米管分散在 3:1 (V/V)  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$  中，超声 16 小时，然后离心分离并用蒸馏水和乙醇反复洗涤直至离心液 pH 接近于 7.0。将羟基化和已经打断的碳纳米管至于真空干燥箱 60 $^\circ\text{C}$  干燥。

[0032] 然后，将 2mg 上述酸化处理过碳纳米管-铂复合材料在室温条件下分散到 1mL 蒸馏水中，加入 2mg EDC、2mg NHS 和 10mg PEI 于上述分散液中超声分散均匀，摇床反应 4h 后离心分离，将氨基引入到碳纳米管-铂的表面。接着，将 250  $\mu\text{L}$  25% 戊二醛和 17.7mg 鲁米诺与碳纳米管-铂复合材料混合，分散到 1mL 蒸馏水中，摇床反应 6h 后离心分离，用蒸馏水和

乙醇分别洗涤三次去除未反应的试剂,即制备得到的碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料。图 2 紫外可见光谱证实鲁米诺成功地连接到碳纳米管-铂纳米材料表面。

[0033] 实施例 2

[0034] 电化学发光免疫传感器的组装

[0035] 首先将玻碳电极 (GCE, 直径 3.0mm) 分别用 0.3  $\mu\text{m}$ 、0.05  $\mu\text{m}$   $\text{Al}_2\text{O}_3$  进行抛光,依次在二次蒸馏水和乙醇中各超声 2min,以除去残留在电极表面的  $\text{Al}_2\text{O}_3$  颗粒,用  $\text{N}_2$  吹干。将 4  $\mu\text{L}$  实施例 1 所得碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料滴加到预先处理的玻碳电极表面,避光室温下干燥。随后,将 2  $\mu\text{L}$  壳聚糖 (Chitosan、0.1wt%) 溶液固定在电极上,并滴加戊二醛溶液 (12.5wt%) 交联抗体 CA19-9 (anti-CA19-9) 1h,再滴加 2  $\mu\text{L}$  BSAT 溶液 (0.5wt% BSA 包含 1wt% Tween-20) 孵育 1h,以封闭修饰电极表面非特异性位点。最后用 PBS 溶液轻轻冲洗多次,即构建成 GCE/CNTs-Pt-luminol/Chi/anti-CA19-9/BSAT 免疫传感器,放置于 4 $^\circ\text{C}$  冰箱中备用。

[0036] 实施例 3

[0037] 电化学发光免疫传感器对 CA19-9 抗原定量检测

[0038] 首先分别将 4  $\mu\text{L}$  不同浓度抗原 CA19-9 滴加于组装好的电化学发光免疫传感器 (GCE/CNTs-Pt-luminol/Chi/anti-CA19-9/BSAT 修饰电极) 表面,并置于恒温培育箱中孵育 2h,利用抗原抗体的特异性识别,将抗原 CA19-9 结合固载到修饰电极表面。然后用 PBS 溶液轻轻冲洗,以去除未吸附的 CA19-9 抗原。在最佳条件下,将构建好的免疫传感器用于电化学发光定量检测。

[0039] 如图 3、图 4 所示,图 3 中从 a-j 分别对应的是 CA19-9 抗原浓度:(a)0.0001U/L, (b)0.0005U/L, (c)0.001U/L, (d)0.005U/L, (e)0.01U/L, (f)0.05U/L, (g)0.1U/L, (h)0.5U/L (i)1U/L, (j)10U/L。经电化学发光测定,随着 CA19-9 抗原浓度的增加,电化学发光强度不断减小。电化学发光强度与 CA19-9 抗原浓度的对数值呈线性关系,检测范围为 0.0001 ~ 10U/mL,线性相关系数为 0.998,检测限为 0.00003U/mL,表明该传感器适用于对肿瘤标志物的定量灵敏检测。与传统的免疫传感检测相比,构建的新型电化学发光传感器具有制备简单、灵敏度高、稳定性良好和特异性强等特点。

[0040] 上述的对实施例的描述是为便于该技术领域的普通技术人员能理解和使用发明。熟悉本领域技术的人员显然可以容易地对这些实施例做出各种修改,并把在此说明的一般原理应用到其他实施例中而不必经过创造性的劳动。因此,本发明不限于上述实施例,本领域技术人员根据本发明的揭示,不脱离本发明范畴所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。

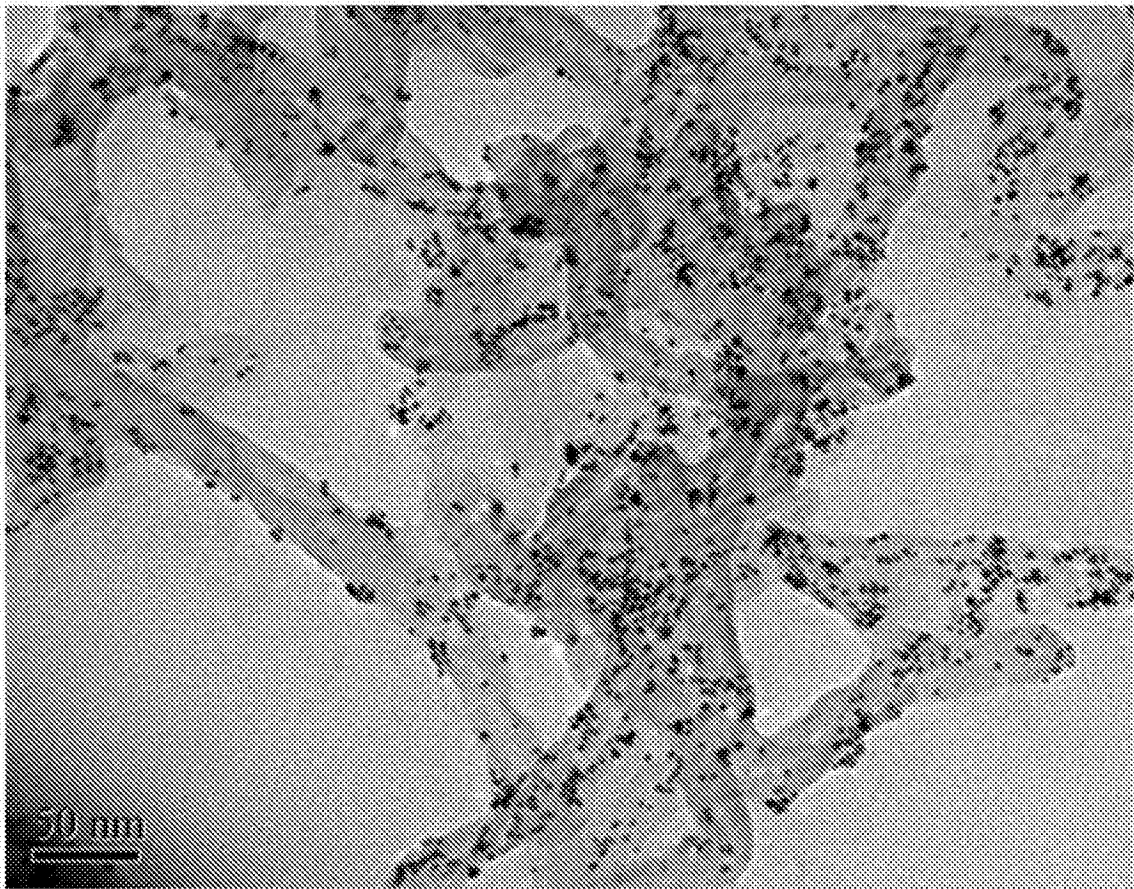


图 1

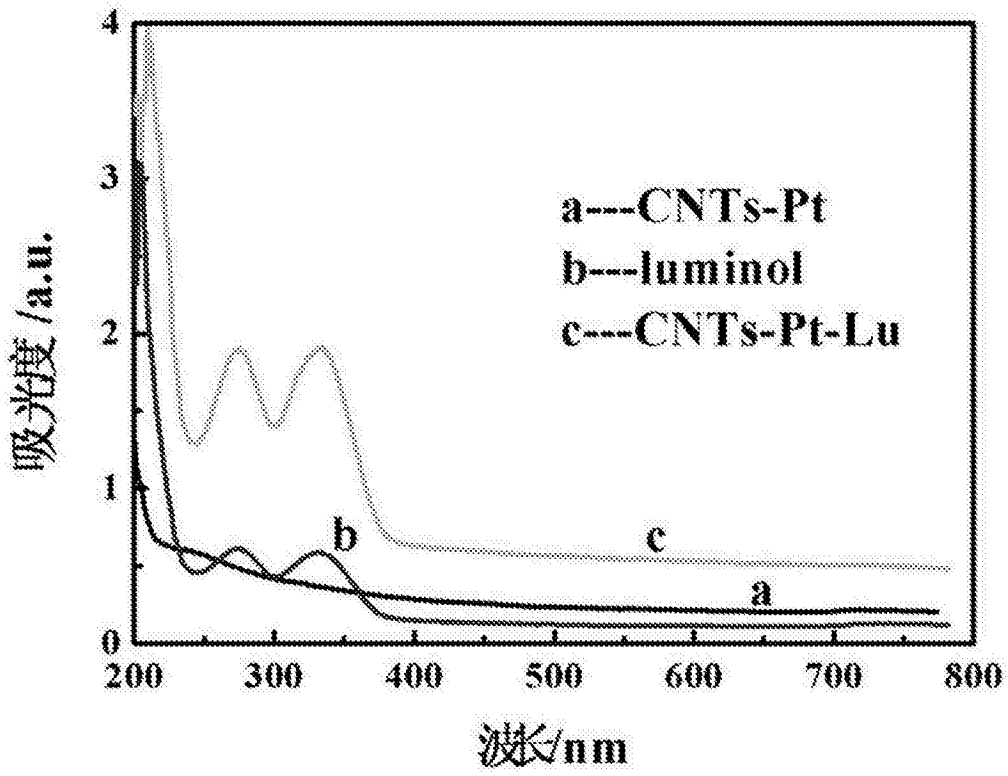


图 2

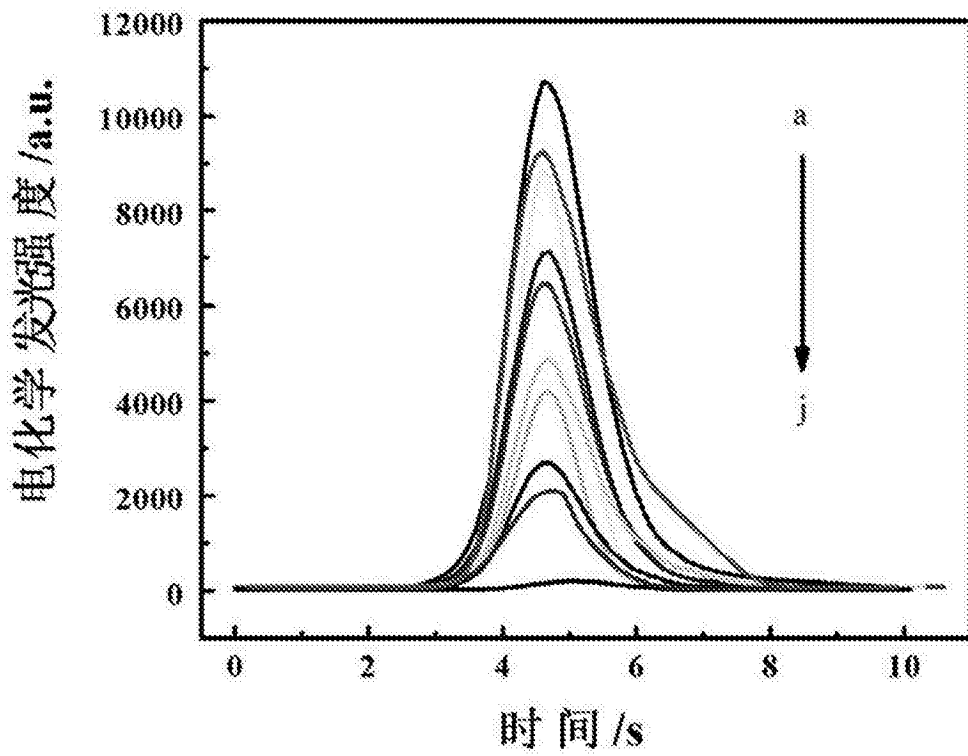


图 3

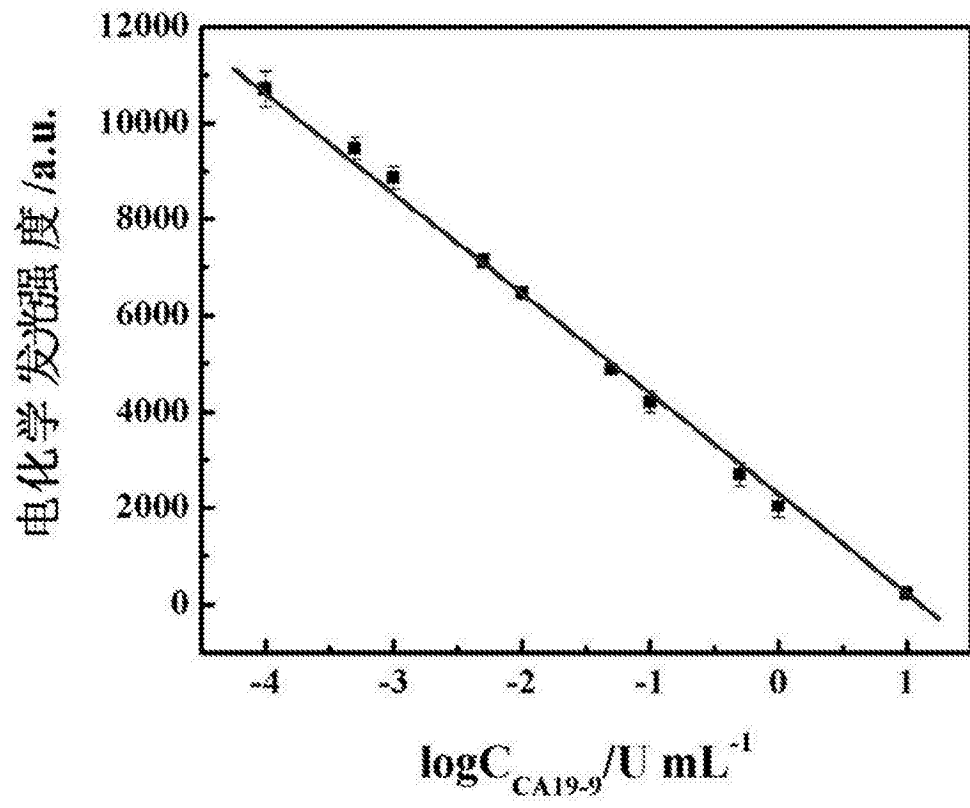


图 4

专利名称(译)	功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料及制备与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN105424921A</a>	公开(公告)日	2016-03-23
申请号	CN201510750069.0	申请日	2015-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
[标]发明人	贾能勤 张鑫 郭薇薇 章阿敏 黄楚森		
发明人	贾能勤 张鑫 郭薇薇 章阿敏 黄楚森		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543 G01N27/327 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N27/3278 G01N33/531 G01N33/54393		
代理人(译)	赵志远		
其他公开文献	CN105424921B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料及其制备方法与应用。首先合成碳纳米管-铂复合材料，并酸化处理，再将酸化处理过的碳纳米管-铂复合材料超声分散于二次蒸馏水中，之后加入聚乙烯亚胺，进行缩合反应，并对反应产物离心分离，并洗涤，得到碳纳米管-铂纳米复合材料，最后利用戊二醛的交联作用，将发光物质鲁米诺化学交联到碳纳米管-铂纳米复合材料表面，将最终产物离心分离，得到碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料；此外，本发明公开了功能化碳纳米管-铂-鲁米诺纳米复合材料在电化学发光免疫传感器中的应用。与现有技术相比，本发明的纳米复合材料提高了电化学发光免疫传感器的电化学响应信号强度和检测灵敏度。

