



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110308188 A

(43)申请公布日 2019.10.08

(21)申请号 201910028254.7

(22)申请日 2019.01.11

(71)申请人 天津理工大学

地址 300384 天津市西青区宾水西道391号

(72)发明人 李明吉 郑思雨 李红姬 李翠平

钱莉荣 杨保和

(74)专利代理机构 天津创智天诚知识产权代理  
事务所(普通合伙) 12214

代理人 李蕊

(51) Int. Cl.

G01N 27/327(2006.01)

G01N 27/48(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

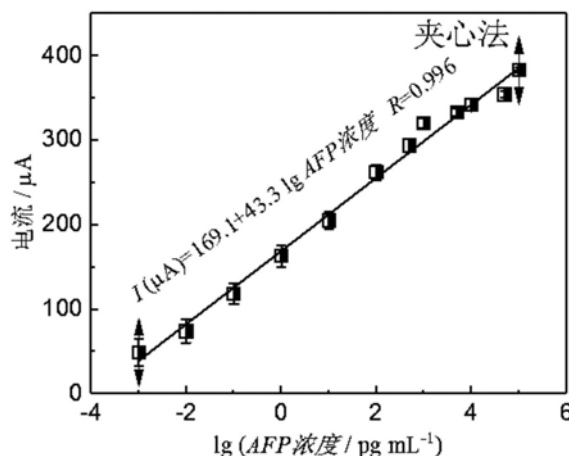
权利要求书3页 说明书8页 附图2页

## (54)发明名称

金铂共修饰石墨烯电极及其制备方法和应用

## (57)摘要

本发明公开了一种金铂共修饰石墨烯电极及其制备方法和应用,金铂共修饰石墨烯电极的制备方法包括以下步骤:清洗玻碳片,将玻碳片放入直流等离子体化学气相沉积设备的样品腔内,抽真空,向所述样品腔内充入惰性气体和氢气,升温后向所述样品腔内喷射甲烷,结束直流等离子体化学气相沉积,将石墨烯玻碳片作为工作电极,将工作电极、对电极和参比电极所构成的三电极系统插入到电解液中,连接电化学工作站,采用多电位阶跃方法在所述石墨烯玻碳片的表面电化学还原沉积金铂纳米粒子,沉积时间为1~5min,清洗后得到金铂共修饰石墨烯电极。用本发明的金铂共修饰石墨烯电极定量检测肿瘤标志物具有微型化、半自动、准确率较高等特点。



1. 一种金铂共修饰石墨烯电极的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤1,清洗玻碳片;

步骤2,进行直流等离子体化学气相沉积

将步骤1所得玻碳片放入直流等离子体化学气相沉积设备的样品腔内,抽真空,向所述样品腔内充入惰性气体和氢气,使所述样品腔内的压强为3000~3500Pa,升温至900~1100℃后向所述样品腔内喷射甲烷3~5min,结束直流等离子体化学气相沉积,其中,甲烷的喷射流速为0.15~0.25L/min;

步骤3,将步骤2所得石墨烯玻碳片作为工作电极,将工作电极、对电极和参比电极所构成的三电极系统插入到电解液中,连接电化学工作站,采用多电位阶跃方法在所述石墨烯玻碳片的表面电化学还原沉积金铂纳米粒子,沉积时间为1~5min,清洗后得到金铂共修饰石墨烯电极,其中,所述电解液为四氯金酸和氯铂酸的混合溶液。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,在所述步骤1中,清洗玻碳片用于去除所述玻碳片的表面的有机物和无机物,具体步骤为:用超纯水、无水乙醇和超纯水先后依次超声清洗至少10min,干燥;

在所述步骤1中,所述玻碳片的厚度为1~1.5mm;

在所述步骤2中,按体积份数计,所述惰性气体与氢气的比为(1.3~1.7):(1.8~2.2);

在所述步骤3中,所述电解液中的所述四氯金酸的浓度为0.05~0.2mmol/L,所述氯铂酸的浓度为0.01~0.05mmol/L,电解液的溶剂为超纯水;

在所述步骤3中,所述对电极为铂片,所述参比电极为饱和甘汞电极或银/氯化银电极。

3. 如权利要求1或2所述制备方法获得的金铂共修饰石墨烯电极。

4. 如权利要求3所述金铂共修饰石墨烯电极作为免疫传感器的应用。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述金铂共修饰石墨烯电极作为免疫传感器的使用方法,包括以下步骤:

a) 将所述金铂共修饰石墨烯电极放入特异性的抗体Ab1溶液中,于37℃恒定温度条件下孵育2~3h,得到孵育有抗体Ab1的免疫电极,用磷酸缓冲溶液冲洗免疫电极的表面,再将该免疫电极放入浓度为1~2wt%的牛血清白蛋白溶液中,在37℃恒定温度条件下孵育20~30min,取出所述免疫电极用磷酸缓冲溶液冲洗其表面;

b) 将步骤a) 所得免疫电极浸入不同浓度的特定抗原溶液中,其中,每次将免疫电极浸入特定抗原溶液中后进行如下操作:

在37℃恒定温度条件下孵育30~90min,取出该免疫电极用磷酸缓冲溶液冲洗其表面,得到孵育有特定抗原的免疫电极,取0.1~0.150体积份数的标签溶液滴加到所述免疫电极的表面,在37℃恒定温度条件下孵育20~30min,取出免疫电极,用磷酸缓冲溶液冲洗所述免疫电极的表面,得到标签修饰的免疫电极;以所述标签修饰的免疫电极作为工作电极,将参比电极、对电极和所述标签修饰的免疫电极浸入除氧后的磷酸缓冲溶液中,测试标签修饰的免疫电极的差分脉冲伏安曲线,以差分脉冲伏安曲线-1~1V处波峰所对应的电位作为定性指标,所述定性指标所对应的电流作为定量指标,获得特定抗原溶液在该特定抗原浓度下的定量指标;

c) 绘制坐标系,所述坐标系的横、纵坐标分别为特定抗原浓度和定量指标,针对步骤b) 所得不同浓度的特定抗原溶液,将每一特定抗原溶液的特定抗原浓度以及在该特定抗原浓

度下的定量指标绘入所述坐标系,得到工作曲线,拟合所述工作曲线得到线性回归方程;

d) 准备待测溶液,所述待测溶液含有特定抗原,获得所述待测溶液的差分脉冲伏安曲线(DPV),以待测溶液的差分脉冲伏安曲线 $-1\sim 1V$ 处波峰所对应的电位作为定性指标,所述定性指标所对应的电流作为定量指标,将所述待测溶液的定量指标代入线性回归方程,得到该待测溶液中特定抗原的浓度。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,标签溶液的制备方法如下:

1) 将柠檬酸和 $H AuCl_4$ 加入水中,得到 $H AuCl_4$ /柠檬酸混合液,其中,在所述 $H AuCl_4$ /柠檬酸混合液中,所述柠檬酸的浓度为 $50\sim 200mmol/L$ , $H AuCl_4$ 的浓度为 $1\sim 6mmol/L$ ;

2) 将 $100\sim 500$ 质量份数的纳米粉分散到 $10$ 体积份数的 $H AuCl_4$ /柠檬酸混合液中,得到悬浮液,其中,所述纳米粉为二氧化硅纳米粉或氨基化碳纳米管粉末;

3) 保持所述悬浮液搅拌状态,用紫外灯照射该悬浮液 $3\sim 5h$ 后抽滤,烘干,得到载体粉末;

4) 将所述载体粉末、用作探针标记的抗体 $Ab_2$ 溶液和有机染料均匀混合,在室温 $20\sim 25^\circ C$ 下搅拌 $1\sim 2h$ ,抽滤,用磷酸缓冲溶液冲洗,过滤,用 $10$ 体积份数的磷酸缓冲溶液均匀分散过滤所得固体,得到标签溶液,其中,所述载体粉末的质量份数为 $10\sim 50$ ,所述有机染料的体积份数为 $10\sim 50$ ,所述用作探针标记的抗体 $Ab_2$ 溶液中抗体 $Ab_2$ 的质量份数为 $0.005\sim 0.025$ 。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,在所述步骤d)中,获得所述待测溶液的差分脉冲伏安曲线的步骤为:

(a) 将所述金铂共修饰石墨烯电极放入特异性的抗体 $Ab_1$ 溶液中,于 $37^\circ C$ 恒定温度条件下孵育 $2\sim 3h$ ,得到孵育有抗体 $Ab_1$ 的免疫电极,用磷酸缓冲溶液冲洗免疫电极的表面,再将该免疫电极放入浓度为 $1\sim 2wt\%$ 的牛血清白蛋白溶液中,在 $37^\circ C$ 恒定温度条件下孵育 $20\sim 30min$ ,取出所述免疫电极用磷酸缓冲溶液冲洗其表面;

(b) 将步骤(a)所得免疫电极浸入待测溶液中,在 $37^\circ C$ 恒定温度条件下孵育 $30\sim 90min$ ,取出该免疫电极用磷酸缓冲溶液冲洗其表面,得到孵育有特定抗原的免疫电极,取 $0.1\sim 0.150$ 体积份数的标签溶液滴加到所述免疫电极的表面,在 $37^\circ C$ 恒定温度条件下孵育 $20\sim 30min$ ,取出免疫电极,用磷酸缓冲溶液冲洗所述免疫电极的表面,得到标签修饰的免疫电极;以所述标签修饰的免疫电极作为工作电极,将参比电极、对电极和所述标签修饰的免疫电极浸入除氧后的磷酸缓冲溶液中,获得标签修饰的免疫电极的差分脉冲伏安曲线。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,在所述步骤a)中,特异性的抗体 $Ab_1$ 溶液的体积份数为 $10$ 体积份数,特异性的抗体 $Ab_1$ 溶液中特异性的抗体 $Ab_1$ 的浓度为 $0.1\sim 5\mu g/mL$ ;

在所述步骤a)中,所述牛血清白蛋白溶液的体积份数为 $20$ 体积份数;

在所述步骤b)中,差分脉冲伏安曲线的电压范围设置为 $-1\sim 1V$ ;

在所述步骤b)中,所述磷酸缓冲溶液的 $pH=7.4$ ,浓度为 $0.1\sim 0.2mol/L$ ,所述除氧后的磷酸缓冲溶液的制备方法为:将氮气发生器的出气管浸入待除氧的磷酸缓冲溶液中后通入氮气 $5\sim 30min$ ;

在所述步骤b)中,每次测得差分脉冲伏安曲线后,将所述免疫电极浸入至 $0.1\sim 0.2mol/L$ 的甘氨酸溶液中 $3\sim 10min$ ,取出免疫电极,用磷酸缓冲溶液冲洗其表面;

在所述步骤b)中,将所述标签修饰的免疫电极浸入 $20\sim 25$ 体积份数除氧后的磷酸缓冲

溶液中。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,在所述步骤(a)中,特异性的抗体Ab1溶液的体积份数为10体积份数,特异性的抗体Ab1溶液中特异性的抗体Ab1的浓度为 $0.1\sim 5\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

10. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,在所述步骤3)中,当所述纳米粉为二氧化硅纳米粉时,所述载体粉末为Au/SiO<sub>2</sub>;当所述纳米粉为氨基化碳纳米管粉末时,所述载体粉末为Au/CNT;

在所述步骤4)中,所述有机染料为甲苯胺蓝、二茂铁甲酸、亚甲基蓝或甲基橙;

在所述步骤4)中,所述有机染料通过有机染料溶液加入,所述有机染料溶液中有机染料的浓度为 $1\times 10^{-3}\sim 2\times 10^{-3}\text{mol}/\text{L}$ ;

在所述步骤4)中,在室温 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 $1\sim 2\text{h}$ 时的搅拌速度为 $240\sim 300\text{r}/\text{min}$ ;

在所述步骤4)中,所述磷酸缓冲溶液的 $\text{pH}=7.4$ ,浓度为 $0.1\sim 0.2\text{mol}/\text{L}$ ;

在所述步骤4)中,所述用作探针标记的抗体Ab2溶液中抗体Ab2的浓度为 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ;

所述质量份数的单位为mg,所述体积份数的单位为mL;

抗体Ab1为Anti-AFP McAb,抗体Ab2为Anti-AFP McAb,所述特定抗原为AFP Antigen。

## 金铂共修饰石墨烯电极及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于电化学生物传感器技术领域,具体来说涉及一种金铂共修饰石墨烯电极及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 癌症(cancer)是一大类恶性肿瘤的统称,是目前威胁人类健康的重大疾病之一。肿瘤标志物(Tumor Marker)作为反应肿瘤存在的一类分子,存在于人类的血液和组织当中,他们的确定识别对于癌症的早期预防具有十分重要的意义。

[0003] 电化学免疫传感器在肿瘤标志物检测的应用中一直备受关注,而纳米材料极大地拓展了电化学免疫传感器的检测灵敏度,对实现肿瘤早期诊断具有重要意义。当前电化学免疫传感器的研究绝大多数还处于基础实验阶段,尚无法满足临床检测中对灵敏度、稳定性和检测范围的要求;再者,在微型化和纳米材料中生物传感应用方面仍然缺乏系统的研究,不能完全实现复杂的生物样品的实时、快速、超灵敏检测。

[0004] 在肿瘤的发生发展过程中,往往伴随着血液中肿瘤标志物含量的升高,定量检测肿瘤标志物的方法通常是免疫测定,然而传统的免疫测定技术具有耗费时间、准确度不高、难以实现自动化等缺点。

### 发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种金铂共修饰石墨烯电极。

[0006] 本发明的另一目的是提供上述金铂共修饰石墨烯电极的制备方法。

[0007] 本发明的另一目的是提供上述金铂共修饰石墨烯电极作为免疫传感器的应用。

[0008] 本发明的目的是通过下述技术方案予以实现的。

[0009] 一种金铂共修饰石墨烯电极的制备方法,包括以下步骤:

[0010] 步骤1,清洗玻碳片;

[0011] 在所述步骤1中,清洗玻碳片用于去除所述玻碳片的表面的有机物和无机物,具体步骤为:用超纯水、无水乙醇和超纯水先后依次超声清洗至少10min,干燥。

[0012] 在所述步骤1中,所述玻碳片的厚度为1~1.5mm。

[0013] 步骤2,进行直流等离子体化学气相沉积(DC plasma chemical vapor deposition)

[0014] 将步骤1所得玻碳片放入直流等离子体化学气相沉积设备的样品腔内,抽真空,向所述样品腔内充入惰性气体和氢气,使所述样品腔内的压强为3000~3500Pa,升温至900~1100℃后向所述样品腔内喷射甲烷3~5min,结束直流等离子体化学气相沉积,其中,甲烷的喷射流速为0.15~0.25L/min;

[0015] 在所述步骤2中,按体积份数计,所述惰性气体与氢气的比为(1.3~1.7):(1.8~2.2)。

[0016] 步骤3,将步骤2所得石墨烯玻碳片作为工作电极,将工作电极、对电极和参比电极

所构成的三电极系统插入到电解液中,连接电化学工作站,采用多电位阶跃方法在所述石墨烯玻碳片的表面电化学还原沉积金铂纳米粒子,沉积时间为1~5min,清洗后得到金铂共修饰石墨烯电极,其中,所述电解液为四氯金酸( $\text{HAuCl}_4$ )和氯铂酸( $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ )的混合溶液;

[0017] 在所述步骤3中,所述电解液中的所述四氯金酸的浓度为0.05~0.2mmol/L,所述氯铂酸的浓度为0.01~0.05mmol/L,电解液的溶剂为超纯水。

[0018] 在所述步骤3中,所述对电极为铂片,所述参比电极为饱和甘汞电极或银/氯化银电极。

[0019] 上述制备方法所得金铂共修饰石墨烯电极。

[0020] 上述金铂共修饰石墨烯电极作为免疫传感器的应用。

[0021] 在上述技术方案中,所述金铂共修饰石墨烯电极作为免疫传感器的使用方法,包括以下步骤:

[0022] a) 将所述金铂共修饰石墨烯电极放入特异性的抗体Ab1溶液中,于37℃恒定温度条件下孵育2~3h,得到孵育有抗体Ab1的免疫电极,用磷酸缓冲溶液冲洗免疫电极的表面,再将该免疫电极放入浓度为1~2wt%的牛血清白蛋白(BSA)溶液中,在37℃恒定温度条件下孵育20~30min,取出所述免疫电极用磷酸缓冲溶液冲洗其表面;

[0023] 在所述步骤a)中,特异性的抗体Ab1溶液的体积份数为10体积份数,特异性的抗体Ab1溶液中特异性的抗体Ab1的浓度为0.1~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0024] 在所述步骤a)中,所述牛血清白蛋白溶液的体积份数为20体积份数。

[0025] b) 将步骤a)所得免疫电极浸入不同浓度的特定抗原溶液中,其中,每次将免疫电极浸入特定抗原溶液中后进行如下操作:

[0026] 在37℃恒定温度条件下孵育30~90min,取出该免疫电极用磷酸缓冲溶液冲洗其表面,得到孵育有特定抗原的免疫电极,取0.1~0.150体积份数的标签溶液滴加到所述免疫电极的表面,在37℃恒定温度条件下孵育20~30min,取出免疫电极,用磷酸缓冲溶液冲洗所述免疫电极的表面,得到标签修饰的免疫电极;以所述标签修饰的免疫电极作为工作电极,将参比电极、对电极和所述标签修饰的免疫电极浸入除氧后的磷酸缓冲溶液中,测试标签修饰的免疫电极的差分脉冲伏安曲线(DPV),以差分脉冲伏安曲线-1~1V处波峰所对应的电位作为定性指标,所述定性指标所对应的电流作为定量指标,获得特定抗原溶液在该特定抗原浓度下的定量指标;

[0027] 在所述步骤b)中,差分脉冲伏安曲线的电压范围设置为-1~1V。

[0028] 在所述步骤b)中,所述磷酸缓冲溶液的pH=7.4,浓度为0.1~0.2mol/L,所述除氧后的磷酸缓冲溶液的制备方法为:将氮气发生器的出气管浸入待除氧的磷酸缓冲溶液中后通入氮气5~30min。

[0029] 在所述步骤b)中,每次测得差分脉冲伏安曲线(响应电流)后,将所述免疫电极浸入至0.1~0.2mol/L的甘氨酸溶液(pH=2.4)中3~10min,取出免疫电极,用磷酸缓冲溶液冲洗其表面。

[0030] 在所述步骤b)中,将所述标签修饰的免疫电极浸入20~25体积份数除氧后的磷酸缓冲溶液中。

[0031] c) 绘制坐标系,所述坐标系的横、纵坐标分别为特定抗原浓度和定量指标,针对步骤b)所得不同浓度的特定抗原溶液,将每一特定抗原溶液的特定抗原浓度以及在该特定抗

原浓度下的定量指标绘入所述坐标系,得到工作曲线,拟合所述工作曲线得到线性回归方程;

[0032] d) 准备待测溶液,所述待测溶液含有特定抗原,获得所述待测溶液的差分脉冲伏安曲线(DPV),以待测溶液的差分脉冲伏安曲线-1~1V处波峰所对应的电位作为定性指标,所述定性指标所对应的电流作为定量指标,将所述待测溶液的定量指标代入线性回归方程,得到该待测溶液中特定抗原的浓度。

[0033] 在所述步骤d)中,获得所述待测溶液的差分脉冲伏安曲线(DPV)的步骤为:

[0034] (a) 将所述金铂共修饰石墨烯电极放入特异性的抗体Ab1溶液中,于37℃恒定温度条件下孵育2~3h,得到孵育有抗体Ab1的免疫电极,用磷酸缓冲溶液冲洗免疫电极的表面,再将该免疫电极放入浓度为1~2wt%的牛血清白蛋白(BSA)溶液中,在37℃恒定温度条件下孵育20~30min,取出所述免疫电极用磷酸缓冲溶液冲洗其表面;

[0035] 在所述步骤(a)中,特异性的抗体Ab1溶液的体积份数为10体积份数,特异性的抗体Ab1溶液中特异性的抗体Ab1的浓度为0.1~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0036] (b) 将步骤(a)所得免疫电极浸入待测溶液中,在37℃恒定温度条件下孵育30~90min,取出该免疫电极用磷酸缓冲溶液冲洗其表面,得到孵育有特定抗原的免疫电极,取0.1~0.150体积份数的标签溶液滴加到所述免疫电极的表面,在37℃恒定温度条件下孵育20~30min,取出免疫电极,用磷酸缓冲溶液冲洗所述免疫电极的表面,得到标签修饰的免疫电极;以所述标签修饰的免疫电极作为工作电极,将参比电极、对电极和所述标签修饰的免疫电极浸入除氧后的磷酸缓冲溶液中,获得标签修饰的免疫电极的差分脉冲伏安曲线(DPV)。

[0037] 标签溶液的制备方法如下:

[0038] 1) 将柠檬酸和 $\text{HAuCl}_4$ 加入水中,得到 $\text{HAuCl}_4$ /柠檬酸混合液,其中,在所述 $\text{HAuCl}_4$ /柠檬酸混合液中,所述柠檬酸的浓度为50~200 $\text{mmol}/\text{L}$ , $\text{HAuCl}_4$ 的浓度为1~6 $\text{mmol}/\text{L}$ 。

[0039] 2) 将100~500质量份数的纳米粉分散到10体积份数的 $\text{HAuCl}_4$ /柠檬酸混合液中,得到悬浮液,其中,所述纳米粉为二氧化硅( $\text{SiO}_2$ )纳米粉或氨基化碳纳米管(CNT)粉末;

[0040] 3) 保持所述悬浮液搅拌状态,用紫外灯照射该悬浮液3~5h后抽滤,烘干,得到载体粉末;

[0041] 在所述步骤3)中,当所述纳米粉为二氧化硅( $\text{SiO}_2$ )纳米粉时,所述载体粉末为 $\text{Au}/\text{SiO}_2$ ;当所述纳米粉为氨基化碳纳米管(CNT)粉末时,所述载体粉末为 $\text{Au}/\text{CNT}$ 。

[0042] 4) 将所述载体粉末、用作探针标记的抗体Ab2溶液和有机染料均匀混合,在室温20~25℃下搅拌1~2h,抽滤,用磷酸缓冲溶液冲洗,过滤,用10体积份数的磷酸缓冲溶液均匀分散过滤所得固体,得到标签溶液,其中,所述载体粉末的质量份数为10~50,所述有机染料的体积份数为10~50,所述用作探针标记的抗体Ab2溶液中抗体Ab2的质量份数为0.005~0.025;

[0043] 在所述步骤4)中,所述有机染料为甲苯胺蓝(TB)、二茂铁甲酸(FA)、亚甲基蓝(MB)或甲基橙(MO)。

[0044] 在所述步骤4)中,所述有机染料通过有机染料溶液加入,所述有机染料溶液中有机染料的浓度为 $1 \times 10^{-3} \sim 2 \times 10^{-3} \text{mol}/\text{L}$ 。

[0045] 在所述步骤4)中,在室温20~25℃下搅拌1~2h时的搅拌速度为240~300 $\text{r}/\text{min}$ 。

- [0046] 在所述步骤4)中,所述磷酸缓冲溶液的pH=7.4,浓度为0.1~0.2mol/L。
- [0047] 在所述步骤4)中,所述用作探针标记的抗体Ab2溶液中抗体Ab2的浓度为1 $\mu$ g/mL。
- [0048] 在上述技术方案中,所述质量份数的单位为mg,所述体积份数的单位为mL。
- [0049] 在上述技术方案中,抗体Ab1为Anti-AFP McAb(coating),抗体Ab2为Anti-AFP McAb(labeling),所述特定抗原为AFP Antigen(Purified)。
- [0050] 本发明的有益效果如下:
- [0051] 本发明中的金铂共修饰石墨烯电极属于纳米复合材料领域,以石墨烯作为基底,将金铂纳米粒子通过多电位阶跃方法共沉积在石墨烯表面,由于石墨烯是垂直生长于基底表面的,因此具有较大的比表面积,有助于固定金铂纳米粒子等其它敏感成分,金铂纳米粒子具有电子转移速度快且稳定性高的优点,有助于增大信号,且该金铂共修饰石墨烯电极的制备方法简单,能够通过电化学的方式对电极进行多次修饰和对待测物抗原的检测。用本发明的金铂共修饰石墨烯电极定量检测肿瘤标志物具有微型化、半自动、准确率较高等特点。

### 附图说明

- [0052] 图1(a)为本发明金铂共修饰石墨烯电极的扫描电子显微镜(SEM)照片;
- [0053] 图1(b)为本发明金铂共修饰石墨烯电极的扫描电子显微镜(SEM)照片;
- [0054] 图2为实施例1中不同浓度特定抗原溶液的差分脉冲伏安曲线;
- [0055] 图3为实施例1所得工作曲线。

### 具体实施方式

- [0056] 下述实施例中,肿瘤标志物抗原Anti-AFP与特异性的抗体Ab1及探针标记的抗体Ab2之间发生特异性免疫反应,本专利采用双抗体夹心法,使三者作用后形成Ab1/Anti-AFP/Ab2免疫复合物,用探针标签标记的抗体Ab2来放大免疫反应信号的同时获得电化学响应信号。
- [0057] 在下述实施例中,所涉及的药品如下:
- [0058] 1) 无水乙醇:天津市汇杭化工科技有限公司
- [0059] 2) 柠檬酸:天津市科威有限公司
- [0060] 3) 甘氨酸:天津市奥滨医科医药销售有限公司
- [0061] 4) H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>:Thermo Fisher Scientific Inc(USA)的Alfa Aesar
- [0062] 5) H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>:沈阳市金科试剂厂
- [0063] 6) SiO<sub>2</sub>:四平市高斯达纳米材料设备有限公司
- [0064] 7) TB:Aladdin Reagent Co.,Ltd.(中国上海)
- [0065] 8) CNT:深圳市图灵进化科技有限公司
- [0066] 9) BSA:北京Solarbio科技有限公司(中国北京)
- [0067] 10) 抗体Ab2:Anti-AFP McAb(labeling)、抗体Ab1:Anti-AFP McAb(coating)和AFP Antigen(Purified)均购买自上海领潮生物科技有限公司
- [0068] 用作探针标记的抗体Ab2溶液的溶剂:磷酸缓冲溶液
- [0069] 特异性的抗体Ab1溶液的溶剂:磷酸缓冲溶液

- [0070] 牛血清白蛋白溶液的溶剂:磷酸缓冲溶液
- [0071] 有机染料的溶剂:磷酸缓冲溶液
- [0072] 11) 无水磷酸二氢钠、无水磷酸氢二钠:天津市光复精细化工研究所(由此两种溶液配制磷酸缓冲溶液(PBS))
- [0073] 磷酸缓冲溶液浓度为0.1mol/L (pH=7.4),配置方法为:分别配置0.1mol/L的无水磷酸二氢钠和无水磷酸氢二钠溶液,按体积份数计,无水磷酸二氢钠与无水磷酸氢二钠的比为19:81,将二者均匀混合即可;
- [0074] 磷酸缓冲溶液的除氧的方法为:将氮气发生器的出气管浸入待除氧的溶液中10min。
- [0075] 12) 玻碳片:TOKAI ENGINEERING日本东海模具工程株式会社
- [0076] 13) 铂片电极:天津艾利安电子科技有限公司
- [0077] 14) 饱和甘汞电极:天津艾利安电子科技有限公司
- [0078] 15) 甘氨酸溶液的制备方法:在磷酸缓冲溶液中滴加磷酸使磷酸缓冲溶液的PH为2.4,用此磷酸缓冲溶液配置0.1~0.2mol/L甘氨酸溶液即可。
- [0079] 上述所有试剂均为分析级。
- [0080] 下述实施例中,所涉及的仪器和型号如下:
- [0081] 1. 电化学工作站(CHI660E):上海辰华仪器有限公司
- [0082] 2. 紫外灯(305nm):上海华伦灯泡厂
- [0083] 3. 磁力搅拌器(BII-2):上海司乐仪器有限公司
- [0084] 4. SHZ-D(III)循环水式真空泵:河北省予华仪器有限公司(抽滤用)
- [0085] 5. 恒温培育箱(DH3600B II):天津市泰斯特仪器有限公司
- [0086] 6. 氮气发生器(SPN-500A):北京中惠普分析技术研究所
- [0087] 7. 优普系列超纯水器(UPHW-III-90T):四川优普超纯科技有限公司
- [0088] 8. 直流等离子体化学气相沉积(CVD)设备:河北省激光所
- [0089] 在所有实验中使用超纯水(比电阻为18MΩ cm<sup>-1</sup>)。
- [0090] 下面结合具体实施例进一步说明本发明的技术方案。
- [0091] 实施例1
- [0092] 一种金铂共修饰石墨烯电极的制备方法,包括以下步骤:
- [0093] 步骤1,准备2cm×1cm且厚度为1mm的玻碳片,打磨干净,清洗玻碳片,清洗玻碳片用于去除玻碳片表面的有机物和无机物(污垢),具体步骤为:用超纯水、无水乙醇和超纯水先后依次超声清洗10min,于室温25℃干燥10分钟。
- [0094] 步骤2,进行直流等离子体化学气相沉积:将步骤1所得玻碳片放入直流等离子体化学气相沉积设备样品腔内样品台的中央,关闭样品腔(室)后抽真空至1Pa以下,向样品腔内同时充入氩气和氢气,充入时氢气流量为2L/min,氩气的流量为1.5L/min,使样品腔内的压强为3300Pa,升温至900℃后向样品腔内喷射甲烷5min,喷射完毕后关闭所有阀门与电源,结束直流等离子体化学气相沉积,待直流等离子体化学气相沉积设备降至室温20~25℃取出石墨烯玻碳片(沉积着石墨烯的玻碳片),其中,甲烷的喷射流速为0.2L/min,存储待喷射甲烷的腔体内的压强为13300Pa(泵压)。步骤2所得石墨烯玻碳片SEM如图1(a)和1(b)所示,由图可知,石墨烯是垂直生长于石墨烯玻碳片表面的,而且经电沉积法沉积的金铂纳

米粒子均匀的分布在石墨烯玻碳片表面。

[0095] 步骤3,将步骤2所得石墨烯玻碳片作为工作电极,将工作电极、铂片(对电极)和参比电极所构成的三电极系统插入到电解液中,参比电极为饱和甘汞电极。连接电化学工作站,采用多电位阶跃方法在石墨烯玻碳片的石墨烯表面电化学还原沉积金铂纳米粒子,清洗后得到金铂共修饰石墨烯电极,其中,电解液为四氯金酸( $\text{HAuCl}_4$ )和氯铂酸( $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ )的混合溶液,电解液的溶剂为超纯水,电解液中的四氯金酸的浓度为 $0.1\text{mmol/L}$ ,氯铂酸的浓度为 $0.04\text{mmol/L}$ ,多电位阶跃方法(STEP)的具体参数为:第一阶跃电位 $4\text{V}$ ,阶跃时间为 $1\text{s}$ ;第二阶跃电位为 $4\text{V}$ ,阶跃时间为 $1\text{s}$ ;初始电位 $0.2\text{V}$ ,循环次数为30圈。

[0096] 上述金铂共修饰石墨烯电极作为免疫传感器的应用,金铂共修饰石墨烯电极作为免疫传感器的使用方法包括以下步骤:

[0097] a) 将金铂共修饰石墨烯电极放入 $10\text{mL}$ 浓度为 $1\mu\text{g/mL}$ 的特异性的抗体Ab1溶液中,放入恒温培育箱中于 $37^\circ\text{C}$ 恒定温度条件下孵育 $2\text{h}$ ,得到孵育有抗体Ab1的免疫电极,用磷酸缓冲溶液冲洗免疫电极的表面,再将该免疫电极放入 $20\text{mL}$ 浓度为 $1\text{wt}\%$ 的牛血清白蛋白(BSA)溶液中,在 $37^\circ\text{C}$ 恒定温度条件下孵育 $20\text{min}$ ,取出免疫电极用磷酸缓冲溶液冲洗其表面(不使用时低温 $0\sim 4^\circ\text{C}$ 保存)。

[0098] b) 将步骤a)所得免疫电极浸入不同浓度的特定抗原溶液中,其中,每次将免疫电极浸入特定抗原溶液中后进行如下操作:

[0099] 在 $37^\circ\text{C}$ 恒定温度条件下孵育 $30\text{min}$ ,取出该免疫电极用磷酸缓冲溶液冲洗其表面,得到孵育有特定抗原的免疫电极,取 $100\mu\text{L}$ 标签溶液滴加到免疫电极的表面,在 $37^\circ\text{C}$ 恒定温度条件下孵育 $30\text{min}$ ,取出免疫电极,用磷酸缓冲溶液冲洗免疫电极的表面,得到标签修饰的免疫电极;以标签修饰的免疫电极作为工作电极,将标签修饰的免疫电极浸入 $25\text{mL}$ 除氧后的磷酸缓冲溶液( $\text{pH}=7.4$ )中,测试标签修饰的免疫电极的差分脉冲伏安曲线(DPV),差分脉冲伏安曲线的电压范围设置为 $-1\sim 1\text{V}$ ,以差分脉冲伏安曲线 $-0.125\text{V}$ 处波峰所对应的电位作为定性指标,定性指标所对应的电流作为定量指标,获得特定抗原溶液在该特定抗原浓度下的定量指标;

[0100] 免疫电极分别浸入多个特定抗原溶液中后的差分脉冲伏安曲线如图2所示,浸入到电解液三电极系统协同工作发生氧化还原反应,采用夹心法构造的Ab1/Anti-AFP/Ab2免疫复合物产生氧化峰,且AFP抗原浓度与氧化峰电流呈现正比关系,由图可知不同浓度的AFP抗原标准品与不同的响应电流值一一对应。

[0101] 每次测得差分脉冲伏安曲线(响应电流)后:将免疫电极浸入至 $0.1\text{mol/L}$ 的甘氨酸溶液( $\text{pH}=2.4$ )中 $3\text{min}$ ,清洗表面附着的免疫复合物,取出免疫电极,用磷酸缓冲溶液冲洗其表面。

[0102] 标签溶液的制备方法如下:

[0103] 1) 将柠檬酸和 $\text{HAuCl}_4$ 加入超纯水中,得到 $\text{HAuCl}_4$ /柠檬酸混合液,其中,在 $\text{HAuCl}_4$ /柠檬酸混合液中,柠檬酸的浓度为 $80\text{mmol/L}$ , $\text{HAuCl}_4$ 的浓度为 $1\text{mmol/L}$ 。

[0104] 2) 将 $100\text{mg}$ 的纳米粉分散到 $10\text{mL}$ 的 $\text{HAuCl}_4$ /柠檬酸混合液中,得到悬浮液,其中,纳米粉为氨基化碳纳米管(CNT)粉末;

[0105] 3) 在磁力搅拌条件下,用 $305\text{nm}$ 波长的紫外灯照射该悬浮液 $3\text{h}$ 后抽滤,于 $100^\circ\text{C}$ 烘干 $5\text{min}$ ,得到载体粉末,室温保存;

[0106] 4) 将25mg载体粉末、25mL用作探针标记的抗体Ab2溶液和25mL有机染料均匀混合,在室温20~25℃下搅拌2h(速度为250r/min),抽滤,用磷酸缓冲溶液冲洗,过滤,用10mL磷酸缓冲溶液均匀分散过滤所得固体,得到标签溶液(低温0~4℃保存),其中,用作探针标记的抗体Ab2溶液中的抗体Ab2的浓度为1 $\mu$ g/mL。有机染料通过有机染料溶液加入,有机染料溶液中有有机染料的浓度为1 $\times 10^{-3}$ mol/L,有机染料为甲苯胺蓝(TB)。

[0107] c) 绘制坐标系,坐标系的横、纵坐标分别为特定抗原浓度和定量指标,针对步骤b)所得不同浓度的特定抗原溶液,将每一特定抗原溶液的特定抗原浓度以及在该特定抗原浓度下的定量指标绘入坐标系,得到工作曲线,工作曲线如图3所示,由图可知横坐标为AFP抗原浓度(pg/mL)的对数,纵坐标为AFP抗原的氧化峰电流( $\mu$ A),并且AFP抗原的氧化峰电流与AFP抗原浓度的对数呈现出相应的线性关系,拟合工作曲线得到线性回归方程为 $I(\mu A) = 169.1 + 43.31g(\text{AFP浓度}/\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$ , $R = 0.996$ ,获得AFP浓度范围为1fg/mL到100ng/mL;

[0108] d) 准备待测溶液,待测溶液含有特定抗原,获得待测溶液的差分脉冲伏安曲线(DPV),以待测溶液的差分脉冲伏安曲线-0.125V处波峰所对应的电位作为定性指标,定性指标所对应的电流作为定量指标,将待测溶液的定量指标代入线性回归方程,得到该待测溶液中特定抗原的浓度。

[0109] 为了验证本发明金铂共修饰石墨烯电极作为免疫传感器的应用效果,进行下述实验:

[0110] 配制待测溶液:取三个10mL的容量瓶,各加入2mL正常人血清(购买自北京Solarbio科技有限公司(中国北京)),向其中分别添加0.1mL、0.5mL和5mL的特定抗原溶液,特定抗原溶液中特定抗原为AFP Antigen,特定抗原溶液中特定抗原的浓度为100ng/mL,用磷酸缓冲溶液将上述三瓶溶液分别定容至10mL,得到AFP抗原(特定抗原)浓度依次为1、5和50ng/mL的三瓶待测溶液。(此时,容量瓶中血清浓度均稀释为最开始正常人血清的20%,稀释后血清中AFP的含量为232.92pg/ml)。

[0111] 检测过程:

[0112] (a) 将金铂共修饰石墨烯电极放入10mL浓度为1 $\mu$ g/mL的特异性的抗体Ab1溶液中,放入恒温培育箱中于37℃恒定温度条件下孵育2h,得到孵育有抗体Ab1的免疫电极,用磷酸缓冲溶液冲洗免疫电极的表面,再将该免疫电极放入20mL浓度为1wt%的牛血清白蛋白(BSA)溶液中,在37℃恒定温度条件下孵育20min,取出免疫电极用磷酸缓冲溶液冲洗其表面(不使用时低温0~4℃保存)。

[0113] (b) 将步骤(a)所得免疫电极浸入待测溶液中,在37℃恒定温度条件下孵育30min,取出该免疫电极用磷酸缓冲溶液冲洗其表面,得到孵育有特定抗原及血清的免疫电极,取100 $\mu$ L上述制备方法所得的标签溶液滴加到免疫电极的表面,在37℃恒定温度条件下孵育30min,取出免疫电极,用磷酸缓冲溶液冲洗免疫电极的表面,得到标签修饰的免疫电极;以标签修饰的免疫电极作为工作电极,对电极为铂片电极,参比电极为饱和甘汞电极,此三电极系统浸入25mL除氧后的磷酸缓冲溶液(pH=7.4)中并连接电化学工作站,采用差分脉冲伏安法测试DPV曲线,浸入到电解液的三电极系统协同工作发生氧化还原反应产生氧化峰,而DPV测得的氧化峰与相应的响应电流值对应(即 $I(\mu A)$ ),差分脉冲伏安曲线的电压范围设置为-1~1V,以差分脉冲伏安曲线-0.125V处波峰所对应的电位作为定性指标,定性指标所对应的电流作为定量指标,获得特定抗原溶液在该特定抗原浓度下的定量指标;将定量指

标带入线性回归方程 $I(\mu A) = 169.1 + 43.31g(\text{AFP浓度}/\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1})$ 中,计算得到待测溶液中特定抗原的浓度。

[0114] 每次测得差分脉冲伏安曲线(响应电流)后:将免疫电极浸入至0.1mol/L的甘氨酸溶液(pH=2.4)中3min,清洗表面附着的免疫复合物,取出免疫电极,用磷酸缓冲溶液冲洗其表面。

[0115] 按照上述检测过程分别测试特定抗原浓度为1ng/mL、5ng/mL和50ng/mL的待测溶液,测试结果详见表1。

[0116] 计算过程:

[0117] 将表1中待测溶液中血清中AFP的含量定义为C1,将待测溶液中AFP抗原添加含量定义为C2,将检测过程测试AFP结果定义为C3,加入AFP抗原的回收率计算公式为 $(C3-C1) * 100\%/C2$ 。

[0118] 实验结果如下:使用夹心型方法检测人血清样品中的AFP

[0119] 表1

[0120]

待测溶液中血清中 AFP 的含量 (pg mL <sup>-1</sup> )	待测溶液中 AFP 抗原添加含量 (ng mL <sup>-1</sup> )	检测过程测试 AFP 结果 (ng mL <sup>-1</sup> )	回收率 (%)
232.92	1	1.24	101.1%

[0121]

	5	5.14	98.2%
	50	50.63	100.8%

[0122] 结论:回收率范围为98.2%~101.1%,满足90%~110%的合格范围,可见该传感器在血清检测中具有高的准确度,对临床应用上具有可行性。虽然添加含量与检测含量之间有误差,但是该误差较小且很有可能是由于血清中原始存在的特定抗原导致的。

[0123] 以上对本发明做了示例性的描述,应该说明的是,在不脱离本发明的核心的情况下,任何简单的变形、修改或者其他本领域技术人员能够不花费创造性劳动的等同替换均落入本发明的保护范围。

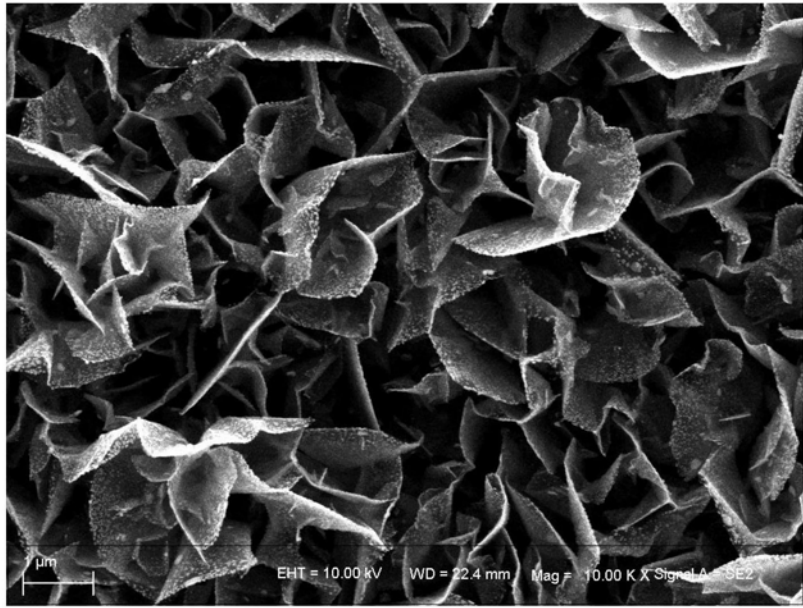


图1 (a)

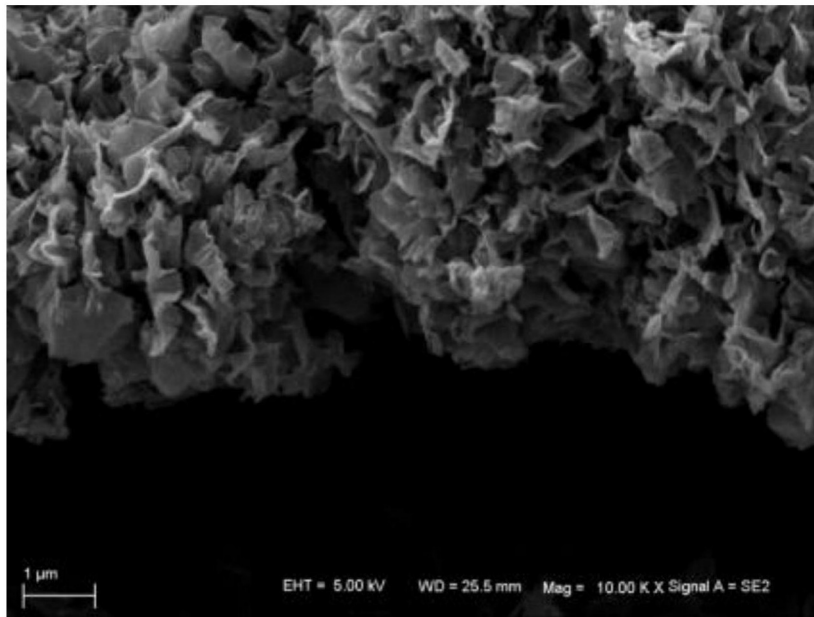


图1 (b)

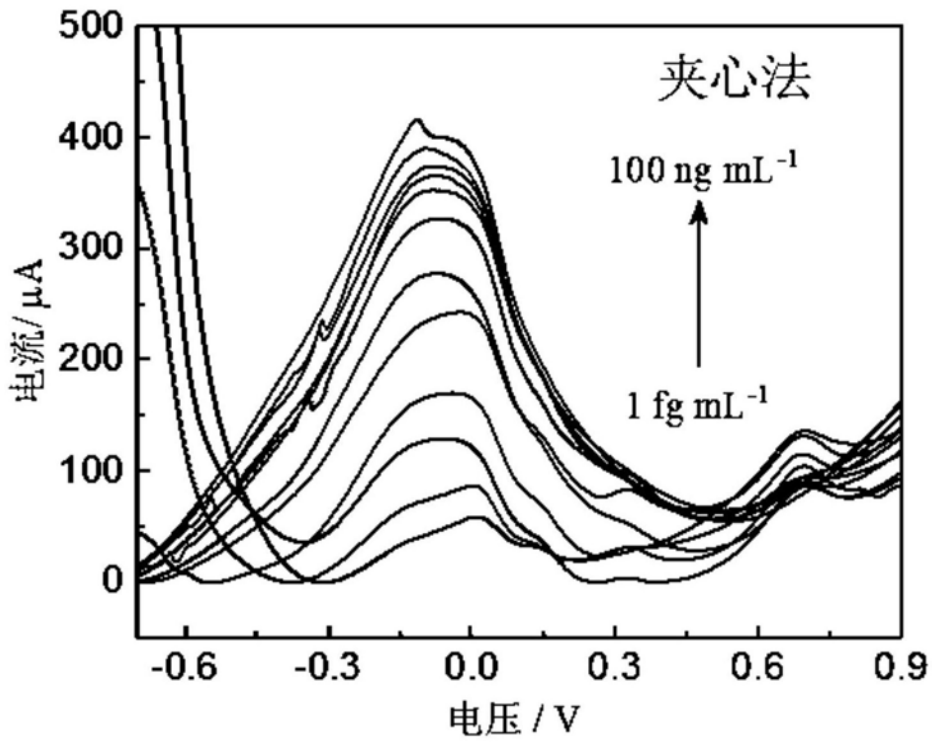


图2

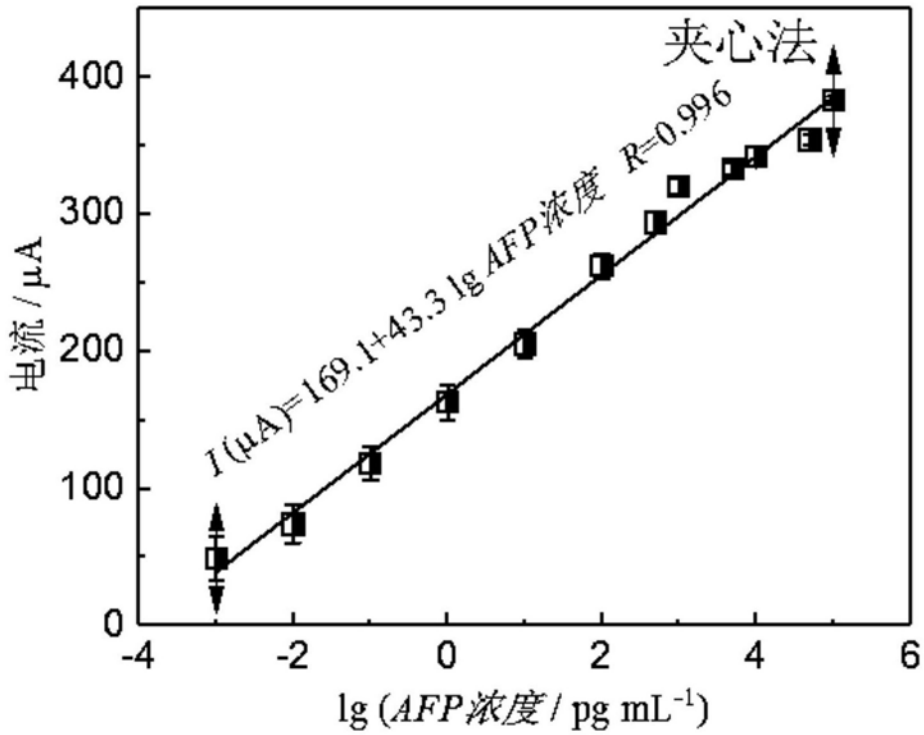


图3

专利名称(译)	金铂共修饰石墨烯电极及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110308188A</a>	公开(公告)日	2019-10-08
申请号	CN201910028254.7	申请日	2019-01-11
[标]申请(专利权)人(译)	天津理工大学		
申请(专利权)人(译)	天津理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津理工大学		
[标]发明人	李明吉 李红姬 李翠平 钱莉荣 杨保和		
发明人	李明吉 郑思雨 李红姬 李翠平 钱莉荣 杨保和		
IPC分类号	G01N27/327 G01N27/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N27/3277 G01N27/3278 G01N27/48 G01N33/53		
代理人(译)	李蕊		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种金铂共修饰石墨烯电极及其制备方法和应用，金铂共修饰石墨烯电极的制备方法包括以下步骤：清洗玻碳片，将玻碳片放入直流等离子体化学气相沉积设备的样品腔内，抽真空，向所述样品腔内充入惰性气体和氢气，升温后向所述样品腔内喷射甲烷，结束直流等离子体化学气相沉积，将石墨烯玻碳片作为工作电极，将工作电极、对电极和参比电极所构成的三电极系统插入到电解液中，连接电化学工作站，采用多电位阶跃方法在所述石墨烯玻碳片的表面电化学还原沉积金铂纳米粒子，沉积时间为1~5min，清洗后得到金铂共修饰石墨烯电极。用本发明的金铂共修饰石墨烯电极定量检测肿瘤标志物具有微型化、半自动、准确率较高等特点。

