



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109632920 A

(43)申请公布日 2019.04.16

(21)申请号 201811380480.3

(22)申请日 2018.11.20

(71)申请人 武汉市农业科学院

地址 430076 湖北省武汉市洪山区白沙洲  
大道青菱乡张家湾特1号

(72)发明人 胡姣 刘萌萌 夏定 王利华  
肖康飞 战艺芳 韩艳云

(74)专利代理机构 武汉河山金堂专利事务所  
(普通合伙) 42212

代理人 胡清堂

(51)Int.Cl.

G01N 27/42(2006.01)

G01N 33/539(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

一种电化学信号标记材料的制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种电化学信号标记材料的制备方法，具体包括以下步骤：将金属离子负载到表面含有丰富氨基官能团的聚合物微球表面，再通过硅烷化试剂水解在所述微球表面包裹一层硅壳，最后利用氨基硅烷化试剂水解在所述硅壳表面修饰上氨基，即可得到电化学信号标记材料。采用该方法制备的电化学信号标记材料无需消解即可提供强且稳定的电化学信号，而且一颗载体球表面可以结合多个金属离子，实现了金属离子信号的集成和放大。还可以在制备的电化学信号标记材料表面进一步修饰上羧基或者巯基，也可以直接利用材料表面的氨基共价偶联探针分子，得到稳定的靶标探针，进一步可建立稳定的电化学免疫传感器，具有重大的实用价值。

1. 一种电化学信号标记材料的制备方法,其特征在于:将金属离子负载到表面含有丰富氨基官能团的聚合物微球表面,再通过硅烷化试剂水解在所述微球表面包裹一层硅壳,最后利用氨基硅烷化试剂水解在所述硅壳表面修饰上氨基,即形成电化学信号标记材料。

2. 根据权利要求1所述的一种电化学信号标记材料的制备方法,其特征在于:所述的聚合物微球的粒径为 $0.1\text{--}1\mu\text{m}$ 。

3. 根据权利要求1或2所述的一种电化学信号标记材料的制备方法,其特征在于:所述的聚合物微球为苯乙烯-丙烯酰胺微球。

4. 根据权利要求1所述的一种电化学信号标记材料的制备方法,其特征在于:所述的金属离子为 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 或 $\text{Cd}^{2+}$ 。

5. 根据权利要求1所述的一种电化学信号标记材料的制备方法,其特征在于:所述硅烷化试剂为正硅酸乙酯,所述氨基硅烷化试剂为3-氨基三乙氧基硅烷。

6. 根据权利要求1所述的一种电化学信号标记材料的制备方法,其特征在于:具体包括以下步骤:

a) 将聚合物微球加入金属离子的无机盐溶液中,室温下反应0.5-2h后离心洗涤,再用无水乙醇溶液重新分散负载有金属离子的微球;

b) 采用聚乙烯吡咯烷酮重新分散步骤a)得到的负载有金属离子的微球,离心洗涤;用无水乙醇分散,加入氨水和硅烷化试剂,每隔18-24h补加一次硅烷化试剂,补加3-5次后离心洗涤;再用无水乙醇分散,加入氨水和氨基硅烷化试剂,置于摇床上反应24-48h,离心洗涤;最后用超纯水分散。

7. 根据权利要求1所述的一种电化学信号标记材料在生物探针中的应用。

## 一种电化学信号标记材料的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及电化学信号标记领域,具体涉及一种电化学信号标记材料的制备方法。

### 背景技术

[0002] 电化学分析法是一种通过检测目标分析物的电化学性质,从而实现对目标物进行定性或定量检测的电化学方法。由于并非所有的待检物均具备或者具备较强的电化学信号,因此需要通过给予待检物一个具有电化学信号的标签来实现此类物质的电化学检测。在实际应用中,常规的电化学分析手段难以满足低浓度目标分析物的检测需求,因此,发展灵敏度更高的电化学检测方法一直是研究的热点以及难点。为了提高分析方法的灵敏度,一般采取某些纳米材料作为电化学信号标记材料。不仅可以提高抗原/抗体的固载量,还可以提高电极表面电子的传递,从而达到增强检测信号和灵敏度的目的。为了建立高灵敏的电化学免疫方法,电化学信号标记材料的设计和合成一直是研究的关键技术之一。

[0003] 由于金属离子的信号强且易于判读,因此可以采用量子点或者金属纳米颗粒作为信号标记材料,通过测量其溶出伏安信号进行定量检测目标分析物。该方法具有较高的灵敏度,但是该方法一般需要对信号标记材料进行消解,将量子点或者金属纳米颗粒转换为离子形态才可进行检测。这就导致操作步骤繁琐、耗时,影响到实际应用。

### 发明内容

[0004] 针对现有的信号标记材料在实际应用中存在的问题,本发明构建了一种新型的金属离子微球,其作为电化学信号标记材料无需消解即可提供强且稳定的电化学信号。

[0005] 本发明的目的是通过以下的技术方案实现的:

[0006] 一种电化学信号标记材料的制备方法具体包括以下步骤:

[0007] (1) 将金属离子负载到表面含有丰富氨基官能团的聚合物微球表面,具体方法为:将表面含有丰富氨基官能团的聚合物微球加入金属离子的无机盐溶液中,室温下反应0.5-2h,使金属离子以静电引力和配位键的形式与微球表面的氨基结合。反应结束后依次采用超纯水和无水乙醇多次离心洗涤。最后用无水乙醇溶液重新分散负载有金属离子的微球。

[0008] (2) 利用硅烷化试剂水解依次在微球表面修饰硅壳和氨基。具体方法为:采用聚乙烯吡咯烷酮的乙醇溶液重新分散步骤1)得到的负载有金属离子的微球,然后用无水乙醇多次离心洗涤;再用无水乙醇分散,加入氨水和硅烷化试剂的乙醇溶液,每隔18-24h补加一次硅烷化试剂的乙醇溶液,补加3-5次后用无水乙醇多次离心洗涤;再用无水乙醇分散,加入氨水和氨基硅烷化试剂的乙醇溶液,置于摇床上反应24-48h,离心,沉淀依次用无水乙醇和超纯水多次离心洗涤;最后用超纯水重新分散,得到表面富含氨基的金属离子微球,即电化学信号标记材料。

[0009] 优选地,步骤(1)所述聚合物微球的粒径为0.1-1μm。

[0010] 更加优选地,步骤(1)所述聚合物微球为苯乙烯-丙烯酰胺微球。

[0011] 优选地,步骤(1)所述金属离子为Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>或Cd<sup>2+</sup>。

[0012] 优选地,步骤(2)所述硅烷化试剂为正硅酸乙酯,所述氨基硅烷化试剂为3-氨丙基三乙氧基硅烷。

[0013] 本发明的有益效果为:(1)制备的电化学信号标记材料无需消解即可提供强且稳定的电化学信号。(2)充分利用金属离子电化学信号强且稳定的特性,将其与载体材料结合起来,得到具备金属离子电化学信号的信标材料;同时,一颗载体球表面可以结合多个金属离子,实现了金属离子信号的集成和放大。(3)本发明中只需改变金属离子的种类,即可得到具有不同电信号的微球,可通过不同金属离子特殊的电流位置实现多组分的定量检测,方法简单快速,灵敏度高。(4)可以在制备的电化学信号标记材料表面进一步修饰上羧基或者巯基,然后与探针分子(抗原、抗体等)共价偶联,也可以直接利用材料表面的氨基共价偶联探针分子,得到稳定的靶标探针,进一步可建立稳定的电化学免疫传感器。

## 附图说明

[0014] 图1是Cu金属离子微球制备及与抗体共价偶联的示意图。

[0015] 图2是Cu金属离子微球的透射电镜和电化学信号分析,其中A为透射电镜图,B为电化学信号分析图。

[0016] 图3是Cu金属离子微球的电化学信号稳定性分析;A为每次超滤洗涤后的上清的电化学信号检测,B为超滤十次后的上清和沉淀的电化学信号检测。

[0017] 图4是Cu金属离子微球的电化学信号强度与其浓度的关系图。

[0018] 图5是Cu金属离子微球偶联抗体的验证分析。

[0019] 图6是Cd金属离子微球的透射电镜和电化学信号分析,其中A为透射电镜图,B为电化学信号分析图。

[0020] 图7是Cd金属离子微球的电化学信号与其浓度的关系图。

[0021] 图8是Cd金属离子微球偶联抗体的验证分析。

## 具体实施方式

[0022] 下面将结合实施例对本发明做进一步的描述,但并不是限制本发明的范围,仅作示例说明。

[0023] 实施例1:Cu金属离子微球

[0024] 下面以Cu离子微球的制备及与抗体的共价偶联为例(图1),对金属离子微球的制备及应用方法进行详细的说明。

[0025] 1、Cu金属离子与微球的反应

[0026] 具体步骤如下:取40mg表面富含氨基的苯乙烯-丙烯酰胺微球(粒径为300nm),加入500μL硫酸铜的溶液(0.5M),用超纯水稀释至4mL。室温下置于摇床上反应30min后离心,离心条件为15000r×15min。去掉上清后,用超纯水离心洗涤5次,离心条件为15000r×15min。去掉上清后,加入无水乙醇离心洗涤6次,离心条件为15000r×10min。最后用4mL无水乙醇溶液重新分散负载有金属离子的微球。

[0027] 2、硅烷化试剂修饰

[0028] 取4mL上述含有微球的无水乙醇溶液离心,离心条件为15000r×10min,去掉上清

后,用4mL聚乙烯吡咯烷酮的乙醇溶液(质量浓度为20mg/mL)重新分散,室温下置于摇床上反应24h。离心,并用无水乙醇洗涤5次,离心条件15000r×10min。然后用4mL无水乙醇溶液分散,并加入100μL氨水(质量分数为25.8%)和200μL正硅酸乙酯的乙醇溶液(体积分数为10%),继续置于摇床上反应。然后每隔24h补加一次正硅酸乙酯的乙醇溶液(体积分数为10%),补加三次正硅酸乙酯溶液以后,离心,并用无水乙醇洗涤5次,离心条件15000r×10min。然后用4mL无水乙醇溶液分散,并加入100μL氨水(质量分数为25.8%)和200μL3-氨基丙基三乙氧基硅烷的乙醇溶液(体积分数为10%),继续置于摇床上反应。48h后离心,沉淀先用无水乙醇洗涤5次,离心条件15000r×10min;然后用超纯水洗涤5次,离心条件15000r×15min。最后用2mL超纯水重新分散,得到表面富含氨基的金属离子微球。

[0029] 3、Cu金属离子微球的性能表征

[0030] (1) 结构表征:采用透射电镜确定微球形貌(图2A),由图2A可以看到Cu金属离子微球表面有一层薄薄的硅壳。

[0031] (2) 电化学信号检测:取1mL缓冲溶液加入到检测池中,并加入40μL修饰液,取1μL金属离子微球加入到检测池中,选择方波伏安法检测。电化学信号表征可以看到该金属离子微球具有明显的Cu离子的电化学信号(图2B)。

[0032] 由图3可以看到经过十次超滤洗涤,Cu金属离子微球的电化学信号非常稳定,说明通过该方法制备的金属离子微球非常稳定。

[0033] 由图4可以看出,在一定范围内Cu金属离子微球的电化学信号随着微球的浓度的增加而增加。

[0034] 4、Cu金属离子微球修饰抗体

[0035] 取2mg(约100μL)金属离子微球,用0.01M,pH为7.2的磷酸缓冲溶液置换后,加入100μL1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的溶液(20mg/mL)和10mg鼠源单克隆抗体,室温下反应4h后离心洗涤三次,洗涤条件为:0.01M,pH为7.2的磷酸缓冲溶液,离心条件为15000r×10min。洗涤后用200μL 0.01M,pH为7.2的磷酸缓冲溶液重新分散,得到标记了抗体的金属离子微球。

[0036] 5、抗体偶联验证

[0037] 取100μL标记了抗体的金属离子微球,加入100μL HRP标记的羊抗鼠IgG,室温下摇床上反应30min后,离心洗涤10次。洗涤条件为:0.01M,pH为7.2的磷酸缓冲溶液,离心条件为15000r×10min。然后收集第十次洗涤液的上清,沉淀用100μL 0.01M,pH为7.2的磷酸缓冲溶液重新分散。对照组用未标记抗体的金属离子微球与HRP标记的羊抗鼠抗体反应。实验组和对照组的上清液和沉淀重悬液分别与TMB显色剂反应(图5)。由图5可以看到,仅标记的抗体的Cu金属离子微球可以结合HRP标记的羊抗鼠IgG,并进一步使TMB试剂显色。

[0038] 实施例2:Cd金属离子微球

[0039] 下面以Cd金属离子微球的制备及应用为例,对金属离子微球进行详细的说明。

[0040] 1、Cd金属离子与微球的反应

[0041] 具体步骤如下:取40mg表面富含氨基的苯乙烯-丙烯酰胺微球(粒径为300nm),加入500μL硝酸镉的溶液(0.5M),用超纯水稀释至4mL。室温下置于摇床上反应30min后离心,离心条件为15000r×15min。去掉上清后,用超纯水离心洗涤5次,离心条件为15000r×15min。去掉上清后,加入无水乙醇离心洗涤6次,离心条件为15000r×10min。最后用4mL无

水乙醇溶液重新分散负载有金属离子的微球。

[0042] 2、硅烷化试剂修饰

[0043] 取4mL上述含有微球的无水乙醇溶液离心,离心条件为 $15000r \times 10min$ ,去掉上清后,用4mL聚乙烯吡咯烷酮的乙醇溶液(质量浓度为20mg/mL)重新分散,室温下置于摇床上反应24h。离心,并用无水乙醇洗涤5次,离心条件 $15000r \times 10min$ 。然后用4mL无水乙醇溶液分散,并加入100 $\mu L$ 氨水(质量分数为25.8%)和200 $\mu L$ 正硅酸乙酯的乙醇溶液(体积分数为10%),继续置于摇床上反应。然后每隔24h补加一次正硅酸乙酯的乙醇溶液(体积分数为10%),补加3次正硅酸乙酯溶液以后,离心,并用无水乙醇洗涤5次,离心条件 $15000r \times 10min$ 。然后用4mL无水乙醇溶液分散,并加入100 $\mu L$ 氨水(质量分数为25.8%)和200 $\mu L$ 3-氨基丙基三乙氧基硅烷的乙醇溶液(体积分数为10%),继续置于摇床上反应。48h后离心,沉淀先用无水乙醇洗涤5次,离心条件 $15000r \times 10min$ ;然后用超纯水洗涤5次,离心条件 $15000r \times 15min$ 。最后用2mL超纯水重新分散,得到表面富含氨基的金属离子微球。

[0044] 3、Cd金属离子微球的表征

[0045] (1)结构表征:采用透射电镜确定微球形貌(图6A),由图6A可以看到Cd金属离子微球表面有一层薄薄的硅壳。

[0046] (2)电化学信号检测:取1mL缓冲溶液加入到检测池中,并加入40 $\mu L$ 修饰液,取1 $\mu L$ 金属离子微球加入到检测池中,选择方波伏安法检测。电化学信号表征可以看到该金属离子微球具有明显的Cd离子的电化学信号(图6B)。由图7可以看出,在一定范围内Cd金属离子微球的电化学信号随着微球的浓度的增加而增加。

[0047] 4、Cd金属离子微球修饰抗体

[0048] 取2mg(约100 $\mu L$ )Cd金属离子微球,用0.01M,pH为7.2的磷酸缓冲溶液置换后,加入100 $\mu L$ 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的溶液(20mg/mL)和10mg鼠源单克隆抗体,室温下反应4h后离心洗涤三次,洗涤条件为:0.01M,pH为7.2的磷酸缓冲溶液,离心条件为 $15000r \times 10min$ 。洗涤后用200 $\mu L$ 0.01M,pH为7.2的磷酸缓冲溶液重新分散,得到标记了抗体的Cd金属离子微球。

[0049] 5、抗体偶联验证

[0050] 取100 $\mu L$ 标记了抗体的Cd金属离子微球,加入100 $\mu L$ HRP标记的羊抗鼠IgG,室温下摇床上反应30min后,离心洗涤10次。洗涤条件为:0.01M,pH为7.2的磷酸缓冲溶液,离心条件为 $15000r \times 10min$ 。然后收集第十次洗涤液的上清,沉淀用100 $\mu L$ 0.01M,pH为7.2的磷酸缓冲溶液重新分散。对照组用未标记抗体的金属离子微球与HRP标记的羊抗鼠抗体反应。实验组和对照组的上清液和沉淀重悬液分别与TMB显色剂反应(图8)。由图8可以看到,仅标记的抗体的Cd金属离子微球可以结合HRP标记的羊抗鼠IgG,并进一步使TMB试剂显色。

[0051] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制。对于本领域的技术人员来说,可根据以上描述的技术方案以及构思,做出其它各种相应的改变以及变形,而所有的这些改变以及变形都应该属于本发明权利要求的保护范围之内。

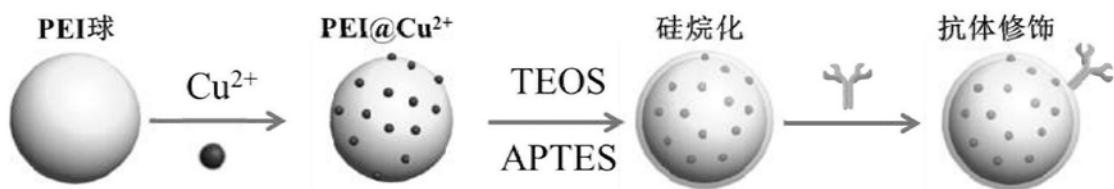


图1

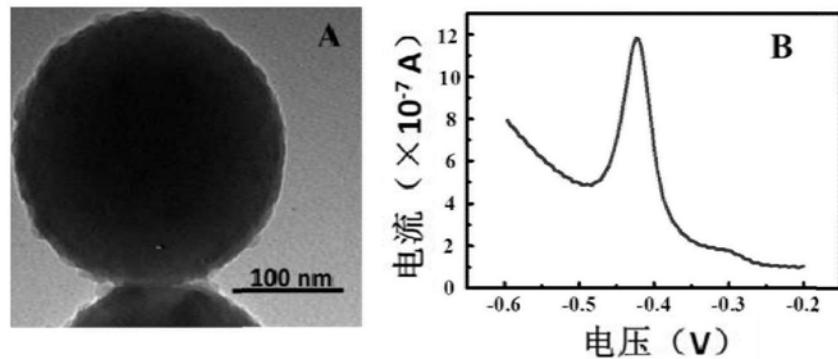


图2

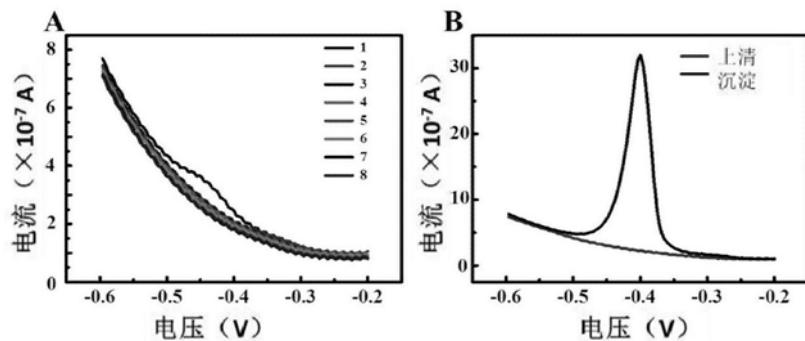


图3

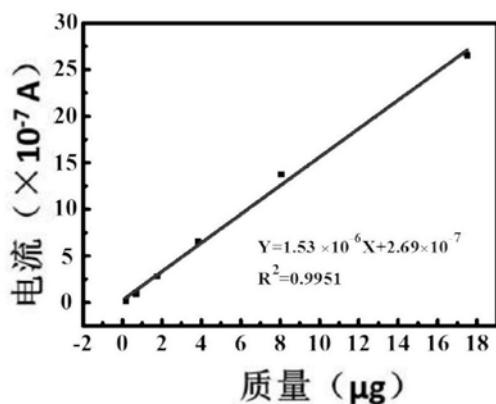


图4

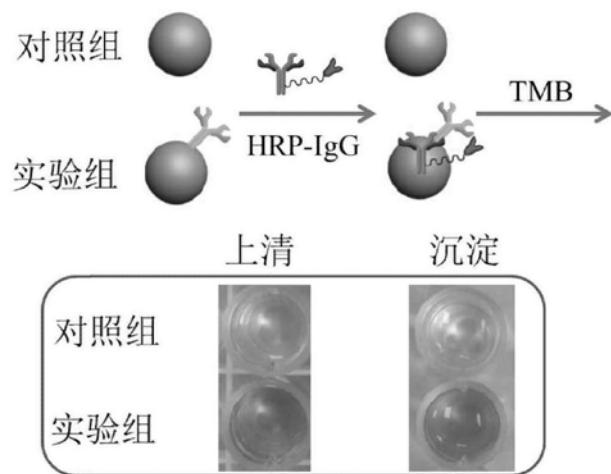


图5

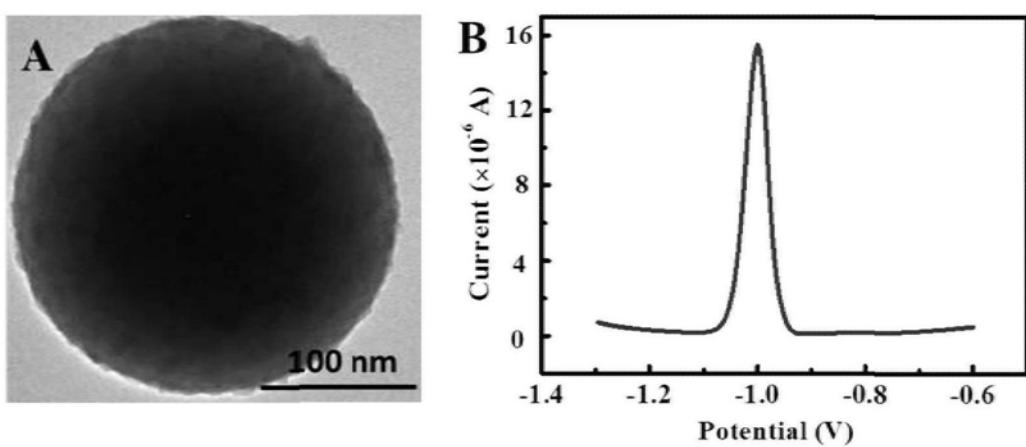


图6

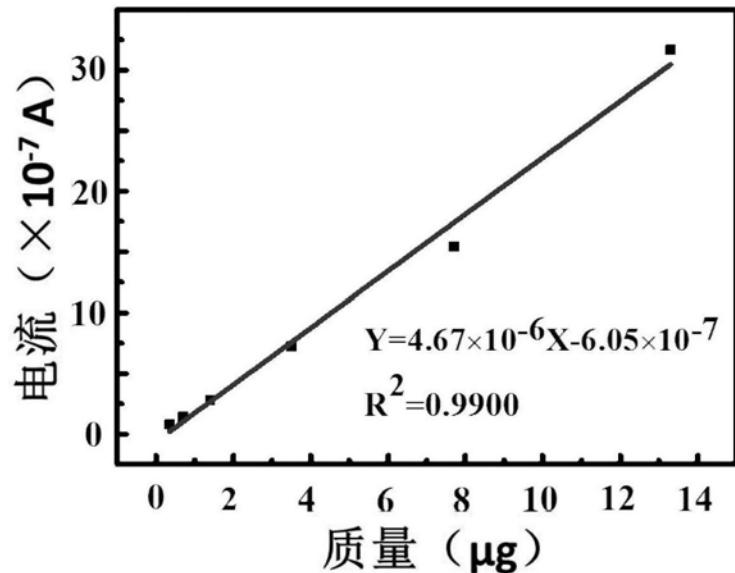


图7

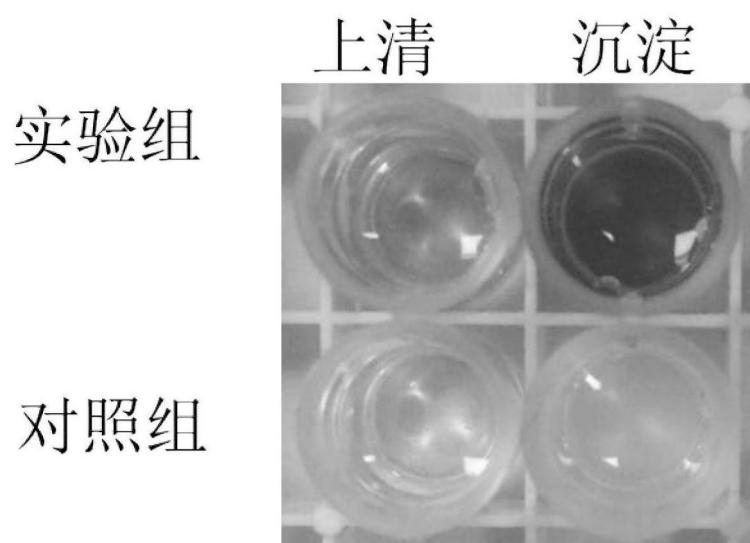


图8

专利名称(译)	一种电化学信号标记材料的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109632920A</a>	公开(公告)日	2019-04-16
申请号	CN201811380480.3	申请日	2018-11-20
[标]发明人	胡姣 刘萌萌 夏定 王利华 肖康飞 韩艳云		
发明人	胡姣 刘萌萌 夏定 王利华 肖康飞 战艺芳 韩艳云		
IPC分类号	G01N27/42 G01N33/539 G01N33/543		
CPC分类号	G01N27/423 G01N33/539 G01N33/54346		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>	<a href="#">Sipo</a>	

**摘要(译)**

本发明提供了一种电化学信号标记材料的制备方法，具体包括以下步骤：将金属离子负载到表面含有丰富氨基官能团的聚合物微球表面，再通过硅烷化试剂水解在所述微球表面包裹一层硅壳，最后利用氨基硅烷化试剂水解在所述硅壳表面修饰上氨基，即可得到电化学信号标记材料。采用该方法制备的电化学信号标记材料无需消解即可提供强且稳定的电化学信号，而且一颗载体球表面可以结合多个金属离子，实现了金属离子信号的集成和放大。还可以在制备的电化学信号标记材料表面进一步修饰上羧基或者巯基，也可以直接利用材料表面的氨基共价偶联探针分子，得到稳定的靶标探针，进一步可建立稳定的电化学免疫传感器，具有重大的实用价值。

