



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110133075 B

(45) 授权公告日 2021.07.16

(21) 申请号 201910458908.X

(22) 申请日 2019.05.29

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110133075 A

(43) 申请公布日 2019.08.16

(73) 专利权人 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 任卉竹 高利红 衣欢
张书培 宋建榕 郑祥钦(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 27/30 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 27/48 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102476046 A, 2012.05.30

CN 109813773 A, 2019.05.28

Lingshan Gong 等. Silver Iodide-
Chitosan Nanotag Induced Biocatalytic
Precipitation for Self-Enhanced
Ultrasensitive Photocathodic
Immunosensor.《Analytical Chemistry》.2016,
第88卷T. Somanathan 等. Helical multiwalled
carbon nanotubes (h-MWCNTs) synthesized
by catalytic chemical vapor deposition.
《NEW CARBON MATERIALS》.2010, 第25卷 (第3
期),Hongchun Luo 等. Carbon fibers
surface-grown with helical carbon
nanotubes and polyaniline for high-
performance electrode materials and
flexible supercapacitors.《Journal of
Electroanalytical Chemistry》.2018, 第828卷

审查员 佟莹

权利要求书2页 说明书5页 附图2页

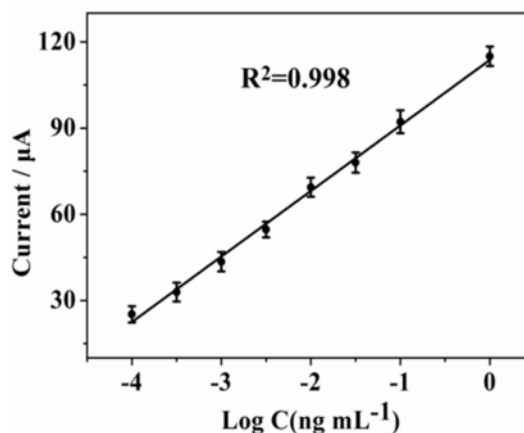
(54) 发明名称

一种基于碘化银纳米粒子光热效应诱导原
位信号放大的唾液酸免疫传感器

(57) 摘要

本发明公开一种基于碘化银纳米粒子光热效应诱导原位信号放大的唾液酸免疫传感器的制备及应用。将聚苯胺与螺旋碳纳米管复合作为基底固定唾液酸抗体，壳聚糖修饰的碘化银纳米粒子为探针标记唾液酸二抗，在唾液酸存在的情况下，通过抗原与抗体之间特异性识别构建出一种夹心型免疫传感器。由于碘化银自身发生氧化还原反应能产生一定强度的电化学信号，在808nm红外激光器的照射下，基于碘化银纳米粒子的光热效应，传感界面迅速升温，电化学信号随温度升高显著增强，从而实现了传感界面的原位信号放大。在光热条件下，随着唾液酸浓度的

不断升高，通过免疫反应结合的碘化银信号探针增多，电化学信号随之增强，从而实现对唾液酸的高灵敏检测。



1. 一种基于碘化银纳米粒子光热效应诱导原位信号放大的唾液酸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;

(2) PANI-HCNT/ Ab_1 /SA/ Ab_2 @SICNPs修饰电极的制备:将5 mg的聚苯胺PANI粉末溶于1 mL N,N-二甲基甲酰胺DMF,将5 mg螺旋碳纳米管HCNT粉末溶于1 mL N,N-二甲基甲酰胺DMF,将5 mg/mL PANI溶液和5 mg/mL HCNT溶液按体积比为5:1混合,然后,取3 μ L PANI-HCNT混合溶液滴涂于干净的玻碳电极表面,在烘箱中烘干,冷却至室温,再取3 μ L 2.5 wt.%戊二醛水溶液滴涂在电极上,4 $^{\circ}$ C下活化40 min,将获得的修饰电极浸泡在10 ng/mL 唾液酸一抗 Ab_1 溶液中,在4 $^{\circ}$ C下孵育50 min,随后用pH 7.4的磷酸缓冲溶液去除多余的 Ab_1 ,最后将电极浸入浓度为1.0 wt.%的BSA水溶液反应1 h,封闭电极表面上非特异性活性位点,冲去表面残余液后,即得到PANI-HCNT/ Ab_1 修饰电极;将此电极浸入5 μ L不同浓度的唾液酸SA标准溶液中于冰箱中孵育40 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PANI-HCNT/ Ab_1 /SA修饰电极;最后,取3 μ L壳聚糖修饰的碘化银纳米粒子标记二抗 Ab_2 @SICNPs溶液滴涂在PANI-HCNT/ Ab_1 /SA修饰电极表面,于4 $^{\circ}$ C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PANI-HCNT/ Ab_1 /SA/ Ab_2 @SICNPs修饰电极;

(3) 唾液酸的检测:采用三电极体系进行测定,以PANI-HCNT/ Ab_1 /SA/ Ab_2 @SICNPs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唾液酸进行检测,设置初始电位为-0.5 V,终止电位为0.6 V,在pH 7.4的磷酸缓冲溶液中,用差分脉冲伏安法对 1×10^{-4} ng/mL~1 ng/mL一系列不同浓度的唾液酸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;待测样品溶液代替唾液酸标准溶液进行检测,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,所述的螺旋碳纳米管HCNT由下述方法制备:以石英片50 mm $\times$ 30 mm $\times$ 2 mm为衬底,将其置入乙醇中超声清洗30 min,并用二次水冲洗,经过0.1M硝酸铁 $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 水溶液处理后,在室温下干燥;然后将上述石英片放置在水平石英管式炉内,升温至800 $^{\circ}$ C在 H_2 气氛中反应90 min后,所得样品在 N_2 气氛中缓慢冷却至室温,即得到螺旋碳纳米管。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的 Ab_2 @SICNPs溶液由下述方法制备:1) 壳聚糖修饰的碘化银纳米粒子SICNPs的制备:黑暗条件下,在10 mL的0.5 wt.% 壳聚糖CS溶液中加入10 mL的0.1M $AgNO_3$ 溶液,搅拌30 min得混合溶液;再将10 mL的0.15M KI溶液缓慢加入到上述混合溶液中,搅拌3h,得到的SICNPs复合物在6000 rpm的转速下离心20min,并用二次水和乙醇洗涤,然后在60 $^{\circ}$ C下干燥12h,所得产物用50 mL二次水分散,即得到2 mM的SICNPs原液;2) 壳聚糖修饰的碘化银纳米粒子标记二抗 Ab_2 @SICNPs溶液的制备:将50 μ L 1 ng/mL唾液酸二抗 Ab_2 溶液与50 μ L 2.5 wt.%戊二醛水溶液混合40 min,再加入300 μ L 2 mM的SICNPs原液,在4 $^{\circ}$ C的温和搅拌条件下孵育2h,并加入50 μ L 1.0 wt.%的BSA水溶液反应1 h,封闭 Ab_2 表面非特异性活性位点,混合溶液经过6000 rpm的转速下离心20min,并用二次水和乙醇洗涤后弃去上清液,即得到 Ab_2 @SICNPs复合物,用pH 7.4的磷酸缓冲溶液分散,再加入20 μ L BSA水溶液,放置4 $^{\circ}$ C条件下备用。

4. 一种基于碘化银纳米粒子光热效应诱导原位信号放大检测唾液酸的传感器,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PANI-HCNT/Ab₁/SA/Ab₂@SICNPs修饰电极,所述的PANI-HCNT/Ab₁/SA/Ab₂@SICNPs修饰电极由下述方法制备而成的:1) 玻碳电极的抛光: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) PANI-HCNT/Ab₁/SA/Ab₂@SICNPs修饰电极的制备:将5 mg的聚苯胺PANI粉末溶于1 mL N,N-二甲基甲酰胺DMF,将5 mg螺旋碳纳米管HCNT粉末溶于1 mL N,N-二甲基甲酰胺DMF,将5 mg/mL PANI溶液和5 mg/mL HCNT溶液按体积比为5:1混合,然后,取3 μ L PANI-HCNT混合溶液滴涂于干净的玻碳电极表面,在烘箱中烘干,冷却至室温,再取3 μ L 2.5 wt.%戊二醛水溶液滴涂在电极上,4 $^{\circ}$ C下活化40 min,将获得的修饰电极浸泡在10 ng/mL唾液酸一抗Ab₁溶液中,在4 $^{\circ}$ C下孵育50 min,随后用pH 7.4的磷酸缓冲溶液去除多余的Ab₁,最后将电极浸入浓度为1.0 wt.%的BSA水溶液反应1 h,封闭电极表面上非特异性活性位点,冲去表面残余液后,即得到PANI-HCNT/Ab₁修饰电极;将电极浸入5 μ L不同浓度的唾液酸SA标准溶液中于冰箱中孵育40 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PANI-HCNT/Ab₁/SA修饰电极;最后,取3 μ L 壳聚糖修饰的碘化银纳米粒子标记二抗Ab₂@SICNPs溶液滴涂在PANI-HCNT/Ab₁/SA修饰电极表面,于4 $^{\circ}$ C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PANI-HCNT/Ab₁/SA/Ab₂@SICNPs修饰电极。

5. 权利要求4所述的传感器在检测唾液酸中的应用,其特征在于,步骤如下:1) 采用三电极体系进行测定,以PANI-HCNT/Ab₁/SA/Ab₂@SICNPs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SA进行检测,设置初始电位为-0.5 V,终止电位为0.6 V;2) 在pH 7.4的磷酸缓冲溶液中,用差分脉冲伏安法对 1×10^{-4} ng/mL ~ 1 ng/mL一系列不同浓度的唾液酸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;待测样品溶液代替唾液酸标准溶液进行检测,检测的结果通过工作曲线查得。

一种基于碘化银纳米粒子光热效应诱导原位信号放大的唾液酸免疫传感器

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,具体涉及一种基于碘化银纳米粒子光热效应诱导原位信号放大的唾液酸免疫传感器的制备及应用。

背景技术

[0002] 电化学检测方法,是将目标物与分子识别元件结合前后产生的各种物理、化学等信号转换为电化学信号的方法,具有构造简单、成本低廉、响应速度快、稳定性高等优点,被广泛地应用于分析化学领域。将电化学分析方法与光热效应结合,能够显著提高电化学免疫传感器的分析性能,实现信号放大。光热效应是指光作用于材料并将一部分能量转变为热能的现象,相比于传统升温方法,808 nm近红外激光照射可对传感界面进行局部加热,在传感器周围建立起一个具有温度梯度的非等温体系,而溶液整体温度基本不受影响,具有设备简单、操作方便、控温精准等优势。以具有光热效应的材料作为光热剂,采用能产生较强穿透力的808 nm近红外光作为光源,将光热剂引入传感器界面,近红外光经过光热效应迅速产生热能,使传感器界面的局部温度迅速升高,加快了本体溶液的对流传质,从而加速传感器界面的电子传递,实现了电化学信号放大。

[0003] 唾液酸(SA)是一种9-碳单糖的衍生物,在人体内浓度的升高与各种疾病密切相关,例如糖尿病,心血管和神经疾病。此外,SA在某些恶性肿瘤的血清中存在过度表达,因而被认为是高灵敏度肿瘤标志物辅助诊断的指标,测定血清唾液酸的含量对恶性肿瘤的早期诊断、疗效观察及预后判断均有重要的临床意义。免疫分析是基于抗原和抗体特异性反应进行检测的一种技术手段,具有高选择性和低检出限。电化学免疫分析法是将免疫分析与电化学分析技术相结合的一种免疫分析方法,能够显著提高分析灵敏度,因此开发新的信号放大策略对构建电化学免疫传感器至关重要。该方法的核心是采用光热材料碘化银纳米粒子标记抗体作为信号探针,既可以作为电化学信号源,又可利用自身光热效应实现信号放大。通过施加808 nm近红外光源照射,可在传感器界面的原位实现对目标物的快速灵敏检测。因此,与传统的电化学免疫传感器相比,该传感器采用具有信号源和光热效应双重作用的信号探针,其优异的亲和性避免了电极污染,在检测过程中不存在因信号源泄露造成的信号不稳定现象,显著提高了传感器的分析性能。

[0004] 以聚苯胺-螺旋碳纳米管复合物作为传感器基底,螺旋碳纳米管表现出的良好导电性有利于电子传输,此外,其独特的螺旋状立体结构具有较大的比表面积,提高了聚苯胺在传感器界面的负载量,因而可为抗体的固定提供更多的活性位点。壳聚糖修饰的碘化银纳米粒子具有更好的成膜性,有利于信号探针的固定化,具有信号源不易泄露,生物相容性良好等优点。通过抗原与抗体之间的特异性识别构建出一种夹心型免疫传感器,在808 nm近红外光源照射下,基于碘化银纳米粒子的光热效应对电化学信号进行原位放大。随着唾液酸浓度的升高,电化学信号不断增强且一定范围内呈线性关系,从而实现了唾液酸的高灵敏检测。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种基于碘化银纳米粒子光热效应诱导原位信号放大的唾液酸免疫传感器及其制备和应用。

[0006] 为实现发明目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] (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;

[0008] (2) PANI-HCNT/ Ab_1 /SA/ Ab_2 @SICNPs修饰电极的制备: 将5 mg的聚苯胺(PANI)粉末溶于1 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF),将5 mg螺旋碳纳米管(HCNT)粉末溶于1 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF),将5 mg/mL PANI溶液和5 mg/mL HCNT溶液按体积比为5:1混合,然后,取3 μ L PANI-HCNT混合溶液滴涂于干净的玻碳电极表面,在烘箱中烘干,冷却至室温,再取3 μ L 2.5 wt.%戊二醛水溶液滴涂在电极上,4 $^{\circ}$ C下活化40 min,将获得的修饰电极浸泡在10 ng/mL唾液酸一抗(Ab_1) (购自武汉纯度生物科技有限公司)溶液中,在4 $^{\circ}$ C下孵育50 min,随后用pH 7.4的磷酸缓冲溶液去除多余的 Ab_1 ,最后将电极浸入浓度为1.0 wt.%的BSA水溶液反应1 h,封闭 Ab_2 表面非特异性活性位点,冲去表面残余液后,即得到PANI-HCNT/ Ab_1 修饰电极;将电极浸入5 μ L不同浓度的唾液酸(SA) (购自武汉纯度生物科技有限公司)标准溶液中于冰箱中孵育40 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PANI-HCNT/ Ab_1 /SA修饰电极;最后,取3 μ L Ab_2 @SICNPs溶液滴涂在PANI-HCNT/ Ab_1 /SA修饰电极表面,于4 $^{\circ}$ C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PANI-HCNT/ Ab_1 /SA/ Ab_2 @SICNPs修饰电极;

[0009] (3) 唾液酸的检测: 采用三电极体系进行测定,以PANI-HCNT/ Ab_1 /SA/ Ab_2 @SICNPs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唾液酸进行检测,设置初始电位为-0.5 V,终止电位为0.6 V,在pH 7.4的磷酸缓冲溶液中,用差分脉冲伏安法(DPV)对 1×10^{-4} ng/mL~1 ng/mL一系列不同浓度的唾液酸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;待测样品溶液代替唾液酸标准溶液进行检测,检测的结果通过工作曲线查得。

[0010] 上述螺旋碳纳米管(HCNT)的制备

[0011] 以石英片(50 mm $\times$ 30 mm $\times$ 2 mm)为衬底,将其置入乙醇中超声清洗30 min,并用二次水冲洗,经过0.1M硝酸铁($Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$)水溶液处理后,在室温下干燥;然后将上述石英板放置在水平石英管式炉内,升温至800 $^{\circ}$ C在 H_2 气氛中反应90 min后,所得样品在 N_2 气氛中缓慢冷却至室温,即得到螺旋碳纳米管;

[0012] 上述壳聚糖修饰的碘化银纳米粒子(SICNPs)的制备:

[0013] 黑暗条件下,在10 mL的0.5 wt.%壳聚糖(CS)溶液中加入10 mL的0.1M $AgNO_3$ 溶液,搅拌30 min得混合溶液;再将10 mL的0.15M KI溶液缓慢加入到上述混合溶液中,搅拌3h,得到的SICNPs复合物在6000 rpm的转速下离心20min,并用二次水和乙醇洗涤,然后在60 $^{\circ}$ C下干燥12h,所得产物用50 mL二次水分散,即得到2 mM的SICNPs原液;

[0014] 壳聚糖修饰的碘化银纳米粒子(SICNPs)标记二抗(Ab_2 @SICNPs)溶液的制备:

[0015] 将50 μ L 1 ng/mL唾液酸二抗(Ab_2) (购自武汉纯度生物科技有限公司)溶液与50 μ L 2.5 wt.%戊二醛水溶液混合40 min,再加入300 μ L 2 mM的SICNPs原液,在4 $^{\circ}$ C的温和

搅拌条件下孵育2h,并加入50 μL 1.0 wt.%的BSA水溶液反应1 h,封闭 Ab_2 表面非特异性活性位点,混合溶液经过6000 rpm的转速下离心20min,并用二次水和乙醇洗涤后弃去上清液,即得到 Ab_2 @SICNPs复合物,用pH 7.4的磷酸缓冲溶液分散,再加入20 μL BSA水溶液,放置4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下备用。

[0016] 本发明所述的一种基于碘化银纳米粒子光热效应诱导原位信号放大检测唾液酸的传感器,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 $\text{PANI-HCNT}/\text{Ab}_1/\text{SA}/\text{Ab}_2$ @SICNPs修饰电极,所述的 $\text{PANI-HCNT}/\text{Ab}_1/\text{SA}/\text{Ab}_2$ @SICNPs修饰电极由下述方法制备而成的:1)玻碳电极的抛光: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) $\text{PANI-HCNT}/\text{Ab}_1/\text{SA}/\text{Ab}_2$ @SICNPs修饰电极的制备:将5 mg的聚苯胺(PANI)粉末溶于1 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF),将5 mg螺旋碳纳米管(HCNT)粉末溶于1 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF),将5 mg/mL PANI溶液和5 mg/mL HCNT溶液按体积比为5:1混合,然后,取3 μL PANI-HCNT混合溶液滴涂于干净的玻碳电极表面,在烘箱中烘干,冷却至室温,再取3 μL 2.5 wt.%戊二醛水溶液滴涂在电极上,4 $^{\circ}\text{C}$ 下活化40 min,将获得的修饰电极浸泡在10 ng/mL唾液酸一抗(Ab_1)溶液中,在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育50 min,随后用pH 7.4的磷酸缓冲溶液去除多余的 Ab_1 ,最后将电极浸入浓度为1.0 wt.%的BSA水溶液反应1 h,封闭电极表面上非特异性活性位点,冲去表面残余液后,即得到 $\text{PANI-HCNT}/\text{Ab}_1$ 修饰电极;将电极浸入5 μL 不同浓度的唾液酸(SA)标准溶液中于冰箱中孵育40 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 $\text{PANI-HCNT}/\text{Ab}_1/\text{SA}$ 修饰电极;最后,取3 μL Ab_2 @SICNPs溶液滴涂在 $\text{PANI-HCNT}/\text{Ab}_1/\text{SA}$ 修饰电极表面,于4 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\text{PANI-HCNT}/\text{Ab}_1/\text{SA}/\text{Ab}_2$ @SICNPs修饰电极。

[0017] 本发明所述的一种基于碘化银纳米粒子光热效应诱导原位信号放大的唾液酸免疫传感器的制备及应用,其特征在于,步骤如下:1)采用三电极体系进行测定,以 $\text{PANI-HCNT}/\text{Ab}_1/\text{SA}/\text{Ab}_2$ @SICNPs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唾液酸进行检测,设置初始电位为-0.5 V,终止电位为0.6 V;2)在pH7.4的磷酸缓冲溶液中,用差分脉冲伏安法(DPV)对 1×10^{-4} ng/mL~1 ng/mL一系列不同浓度的唾液酸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;待测样品溶液代替唾液酸标准溶液进行检测,检测的结果通过工作曲线查得。

[0018] 本发明的显著优点为:

[0019] (1) 光热材料碘化银纳米粒子标记抗体作为信号探针,既可以作为电化学信号源,又可利用自身光热效应实现信号放大。与传统的电化学免疫传感器相比,该传感器采用具有信号源和光热效应双重作用的信号探针,其优异的亲和性避免了电极污染,在检测过程中不存在因信号源泄露造成的信号不稳定现象,显著提高了传感器的分析性能。

[0020] (2) 壳聚糖修饰的碘化银纳米粒子具有更好的成膜性,有利于信号探针的固定化,具有信号源不易泄露,生物相容性良好等优点。

[0021] (3) 以聚苯胺-螺旋碳纳米管复合物作为传感器基底,螺旋碳纳米管表现出的良好导电性有利于电子传输,此外,其独特的螺旋状立体结构具有较大的比表面积,提高了聚苯

胺在传感器界面的负载量,因而可为抗体的固定提供更多的活性位点。

附图说明

[0022] 图1为本发明所述的唾液酸的夹心型电化学免疫传感器的制备过程示意图。

[0023] 图2 A为不同浓度 1×10^{-4} ng/mL ~ 1 ng/mL (a-h) 唾液酸标准溶液传感电极的电化学响应图。

[0024] 图2 B为传感电极的电化学响应与唾液酸标准溶液浓度的线性关系图。

具体实施方式

[0025] 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。

[0026] 实施例1

[0027] 一种基于碘化银纳米粒子光热效应诱导原位信号放大的唾液酸免疫传感器的制备(如图1所示):

[0028] (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;

[0029] (2) 黑暗条件下,在10 mL的0.5 wt. % 壳聚糖(CS)溶液中加入10 mL的0.1M AgNO_3 溶液,搅拌30 min得混合溶液;再将10 mL的0.15M KI溶液缓慢加入到上述混合溶液中,搅拌3 h,得到的SICNPs复合物在6000 rpm的转速下离心20 min,并用二次水和乙醇洗涤,然后在60 °C下干燥12 h,所得产物用50 mL二次水分散,即得到2 mM的SICNPs原液;

[0030] (3) 将50 μL 唾液酸二抗(Ab_2)溶液与50 μL 2.5 wt. %戊二醛水溶液混合40 min,再加入300 μL 2 mM的SICNPs原液,在4 °C的温和搅拌条件下孵育2h,并加入50 μL 1.0 wt. %的BSA水溶液反应1 h,封闭 Ab_2 表面非特异性活性位点,混合溶液经过6000 rpm的转速下离心20min,并用二次水和乙醇洗涤后弃去上清液,即得到 Ab_2 @SICNPs复合物,用pH 7.4的磷酸缓冲溶液分散,再加入20 μL BSA水溶液,放置4 °C条件下备用。

[0031] (4) 取3 μL PANI-HCNT混合溶液滴涂于干净的玻碳电极表面,在烘箱中烘干,冷却至室温,再取3 μL 2.5 wt. %戊二醛水溶液滴涂在电极上,4 °C下活化40 min,将获得的修饰电极浸泡在10 ng/mL唾液酸一抗(Ab_1)溶液中,在4 °C下孵育50 min,随后用pH 7.4的磷酸缓冲溶液去除多余的 Ab_1 ,最后将电极浸入浓度为1.0 wt. %的BSA水溶液反应1 h,封闭电极表面上非特异性活性位点,冲去表面残余液后,即得到PANI-HCNT/ Ab_1 修饰电极;

[0032] (5) 取3 μL Ab_2 @SICNPs溶液滴涂在步骤(4)制得的PANI-HCNT/ Ab_1 修饰电极表面,于4 °C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PANI-HCNT/ Ab_1 /SA/ Ab_2 @SICNPs修饰电极。

[0033] 实施例2

[0034] 实施例1所用的螺旋碳纳米管(HCNT)的制备:

[0035] 以石英片(50 mm $\times$ 30 mm $\times$ 2 mm)为衬底,将其置入乙醇中超声清洗30 min,并用二次水冲洗,经过0.1M硝酸铁($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)水溶液处理后,在室温下干燥;然后将上述石英板放置在水平石英管式炉内,升温至800 °C在 H_2 气氛中反应90 min后,所得样品在 N_2

气氛中缓慢冷却至室温,即得到螺旋碳纳米管。

[0036] 实施例1所用的壳聚糖修饰的碘化银纳米粒子(SICNPs)的制备:

[0037] 黑暗条件下,在10 mL的0.5 wt. % 壳聚糖(CS)溶液中加入10 mL的0.1M AgNO_3 溶液,搅拌30 min得混合溶液;再将10 mL的0.15M KI溶液缓慢加入到上述混合溶液中,搅拌3h,得到的SICNPs复合物在6000 rpm的转速下离心20min,并用二次水和乙醇洗涤,然后在60 °C下干燥12h,所得产物用50 mL二次水分散,即得到2 mM的SICNPs原液。

[0038] 实施例1所用的壳聚糖修饰的碘化银纳米粒子(SICNPs)标记二抗(Ab_2 @SICNPs)溶液的制备:

[0039] 将50 μL 1 ng/mL唾液酸二抗(Ab_2)溶液与50 μL 2.5 wt. %戊二醛水溶液混合40 min,再加入300 μL 2 mM的SICNPs原液,在4 °C的温和搅拌条件下孵育2h,并加入50 μL 1.0 wt. %的BSA水溶液反应1 h,封闭 Ab_2 表面非特异性活性位点,混合溶液经过6000 rpm的转速下离心20min,并用二次水和乙醇洗涤后弃去上清液,即得到 Ab_2 @SICNPs复合物,用pH 7.4的磷酸缓冲溶液分散,再加入20 μL BSA水溶液,放置4 °C条件下备用。

[0040] 实施例3

[0041] 一种基于碘化银纳米粒子光热效应诱导原位信号放大的唾液酸免疫传感器的应用,步骤如下:

[0042] (1)采用三电极体系进行测定,以实施例1制得的PANI-HCNT/ Ab_1 /SA/ Ab_2 @SICNPs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SA进行检测,设置初始电位为-0.5 V,终止电位为0.6 V;

[0043] (2)在pH 7.4的磷酸缓冲溶液中,用差分脉冲伏安法(DPV)对 1×10^{-4} ng/mL~1 ng/mL一系列不同浓度的唾液酸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;

[0044] (3)待测样品溶液代替唾液酸标准溶液进行检测,检测的结果通过工作曲线查得。

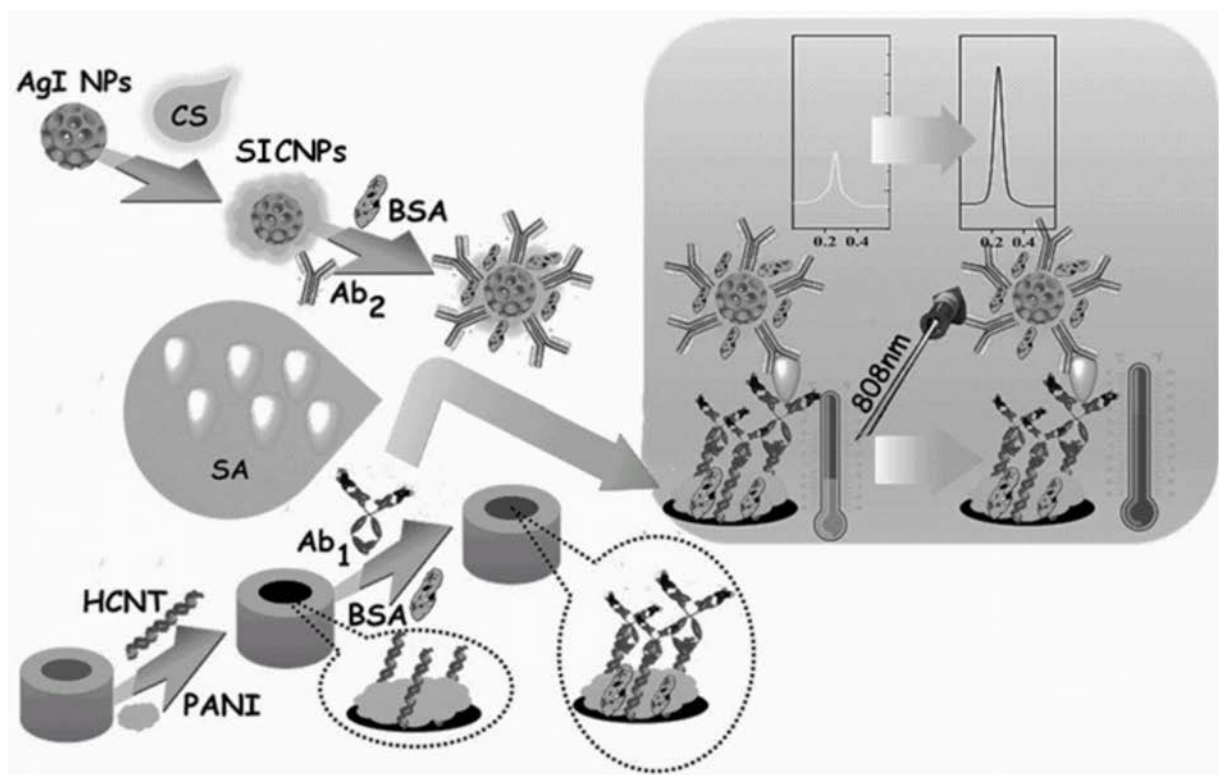


图1

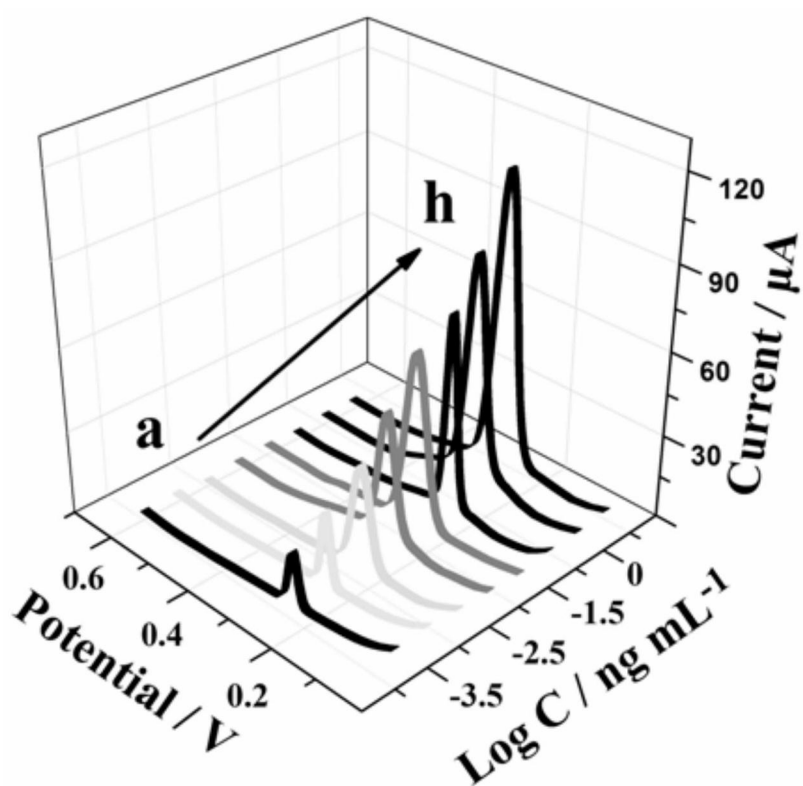


图2A

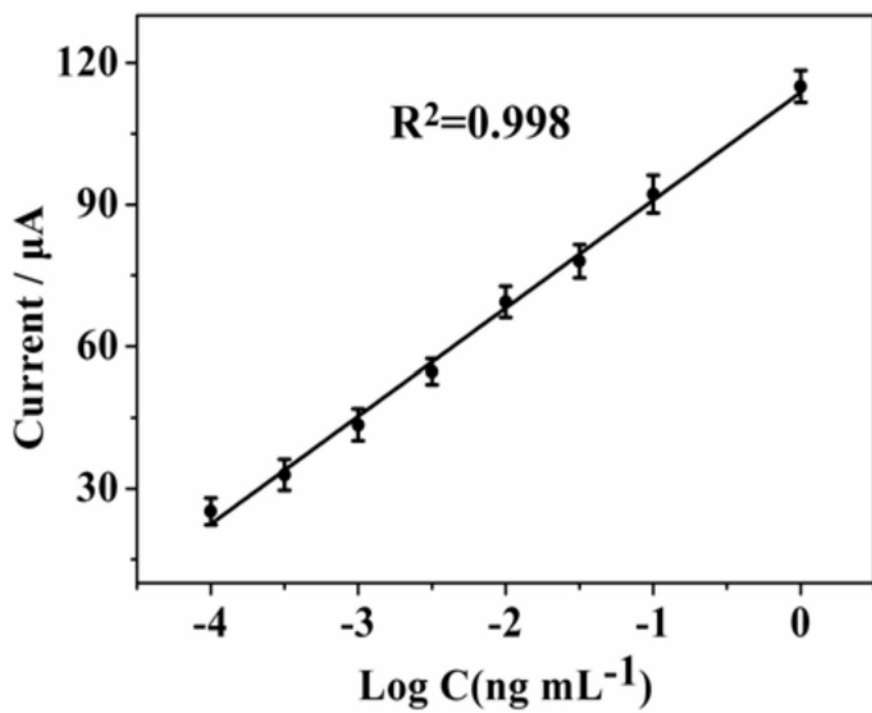


图2B