



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110794014 A

(43)申请公布日 2020.02.14

(21)申请号 201911136254.5

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2019.11.19

(71)申请人 山西大学

地址 030006 山西省太原市小店区坞城路
92号

(72)发明人 周影 双少敏

(74)专利代理机构 太原智慧管家知识产权代理
事务所(特殊普通合伙)
14114

代理人 马俊平

(51)Int.Cl.

G01N 27/30(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

G01N 27/48(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

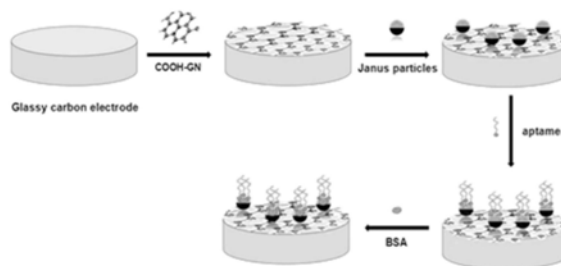
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54)发明名称

一种电化学免疫传感器及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供了一种电化学免疫传感器及其制备方法和应用,一种电化学免疫传感器,是以适配体/氨基作为功能化基团制备的Janus粒子,并用其修饰玻碳电极,制备得到的电化学免疫传感器。该方法制备的电化学免疫传感器可用于 β -受体激动剂莱克多巴胺的检测。该方法提高了电化学免疫传感器电极的灵敏度和选择性,使电极修饰过程更加简便,具有良好的稳定性和重现性,并且可以应用于人体尿液中莱克多巴胺的检测。



1. 一种电化学免疫传感器,其特征在于:是以适配体/氨基作为功能化基团制备具有特异性识别功能的Janus粒子,并用其修饰玻碳电极表面制得到。

2. 如权利要求1所述的一种电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 在480mL超纯水中加入1.00g十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 和3.5mL2.00mol/L的氢氧化钠溶液,在80℃下剧烈搅拌30分钟;

(2) 边剧烈搅拌边缓慢滴加5.00mL四乙基原硅酸盐 (TEOS),混合反应2小时得到产物A,将产物A用乙醇洗涤备用;

(3) 将步骤(2)中洗涤后的产物A分散在70mL甲醇和3.0mL 37.2%盐酸的混合液中,回流两次,每次十分钟,离心得到产物MSN并用甲醇洗涤,将洗涤后的产物MSN在60℃真空干燥后备用;

(4) 将步骤(3)中真空干燥后的产物MSN超声分散在1.0mL3-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 和50.0mL甲醇的混合液中,在80℃下回流8小时,离心得到产物B并用甲醇洗涤,将洗涤后的产物B在60℃干燥,制得MSN-NH₂粒子,保存备用;

(5) 将步骤(4)制得的MSN-NH₂粒子超声均匀分散在10mLSDS溶液中,控制加热温度为80℃,加入1.0g石蜡中,融化后形成混合物,磁力搅拌下乳化1小时;

(6) 将步骤(5)中乳化后的混合物分散在20mL超纯水中,加入0.5mL1%氯金酸,连续搅拌30分钟后形成胶体,对胶体进行过滤,过滤后胶体颜色由白色变成淡黄色;

(7) 将步骤(6)中过滤后的胶体分散在20mL超纯水中,加入1.0mL 1.0mol/L的NaBH₄溶液,搅拌10分钟,过滤洗涤,然后分散在氯仿中,加热溶解石蜡,并用氯仿洗涤,真空干燥12小时后,得到两面分别是纳米金和氨基的Janus粒子,保存备用;

(8) 将步骤(7)得到的Janus粒子与1mg二环己基碳二亚胺 (DCC)、1mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶于1mL二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液中,超声30秒,使Janus粒子分散均匀;

(9) 将10μL羧基化石墨烯缓慢滴加在玻碳电极表面,用红外灯烤干,用超纯水轻轻冲洗,得到羧基化石墨烯修饰的电极;

(10) 将步骤(9)处理的羧基化电极浸泡在步骤(8)所得溶液24小时,红外灯烤干,然后用超纯水轻冲电极表面除去吸附松散的Janus颗粒,烤干后,得到Janus粒子修饰电极;

(11) 将步骤(10)中得到的Janus粒子修饰电极浸泡在莱克多巴胺适配体溶液中,2-10℃下过夜,吹干备用;

(12) 将步骤(11)中处理的Janus粒子修饰电极浸泡在BSA溶液中2-4小时,用超纯水冲洗,除去表面吸附松散的BSA,吹干,浸入pH 6-8的缓冲液中,备用。

3. 如权利要求2所述的一种电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述的步骤(8)中,二环己基碳二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺的浓度均为1mg/mL。

4. 如权利要求2所述的一种电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述的步骤(11)中浸泡时间为12小时。

5. 如权利要求2所述的一种电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述的步骤(12)中BSA溶液浓度为0.25%,浸泡2小时,缓冲溶液pH为7.4。

6. 如权利要求1所述的电化学免疫传感器在莱克多巴胺检测中的应用。

一种电化学免疫传感器及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及电化学电极材料制备技术领域,具体涉及一种电化学免疫传感器的制备方法,以及所制备的传感器在检测人体尿液中莱克多巴胺的应用。

背景技术

[0002] 电化学免疫传感器将免疫反应的高特异性与电化学分析的高灵敏度相结合,因其样品消耗量小、灵敏度高及仪器廉价等优点,成为临床、生物医药、环境化学以及食品安全分析中一种有力的分析手段。其中,电极修饰是制备免疫电化学传感器的关键所在。传统的电极修饰方法需要对电极表面进行层层修饰,过程繁琐,灵敏度低,新型的修饰方法有待开发。

[0003] Janus是古罗马神话中具有前后两张脸的神,分别代表过去和将来。1991年De Genne在诺贝尔获奖致辞中首次应用它来表示微粒同时具有两种不同特性。这一术语后用来表示具有各向异性的非中心对称的颗粒,即Janus Particles。Janus粒子不仅在形状和外观上呈现各向异性,在化学组成及性能方面也呈现非对称性。如Janus粒子的两个半球面可以同时携带适配体/氨基等不同的化学物质,利用Janus粒子的这种特性可以用来对玻碳电极表面进行修饰,从而开发一种新型的电极修饰方法,制备一种新型电化学免疫传感器。

发明内容

[0004] 本发明目的在于提供一种电化学免疫传感器及其制备方法和应用,该传感器应具有高的灵敏度和选择性,电极修饰过程更加简便,且具有良好的稳定性和重现性,该传感器可以应用于人体尿液中莱克多巴胺的检测。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供的一种电化学免疫传感器,是以适配体/氨基作为功能化基团制备具有独特结合与识别功能的Janus粒子,并用其修饰玻碳电极表面制得到。

[0006] 本发明提供的一种电化学免疫传感器的制备方法,步骤包括:

[0007] 一种电化学免疫传感器,是以适配体/氨基作为功能化基团制备具有特异性识别功能的Janus粒子,并用其修饰玻碳电极表面制得到。

[0008] 一种电化学免疫传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0009] (1) 在480mL超纯水中加入1.00g十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)和3.5mL2.00mol/L的氢氧化钠溶液,在80℃下剧烈搅拌30分钟;

[0010] (2) 边剧烈搅拌边缓慢滴加5.00mL四乙基原硅酸盐(TEOS),混合反应2小时得到产物A,将产物A用乙醇洗涤备用;

[0011] (3) 将步骤(2)中洗涤后的产物A分散在70mL甲醇和3.0mL 37.2%盐酸的混合液中,回流两次,每次十分钟,离心得到产物MSN并用甲醇洗涤,将洗涤后的产物MSN在60℃真空干燥后备用;

[0012] (4) 将步骤(3)中真空干燥后的产物MSN超声分散在1.0mL3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)和50.0mL甲醇的混合液中,在80℃下回流8小时,离心得到产物B并用甲醇洗涤,将

洗涤后的产物B在60℃干燥,制得MSN-NH₂粒子,保存备用;

[0013] (5) 将步骤(4)制得的MSN-NH₂粒子超声均匀分散在10mLSDS溶液中,控制加热温度为80℃,加入1.0g石蜡中,融化后形成混合物,磁力搅拌下乳化1小时;

[0014] (6) 将步骤(5)中乳化后的混合物分散在20mL超纯水中,加入0.5mL1%氯金酸,连续搅拌30分钟后形成胶体,对胶体进行过滤,过滤后胶体颜色由白色变成淡黄色;

[0015] (7) 将步骤(6)中过滤后的胶体分散在20mL超纯水中,加入1.0mL1.0mol/L的NaBH₄溶液,搅拌10分钟,过滤洗涤,然后分散在氯仿中,加热溶解石蜡,并用氯仿洗涤,真空干燥12小时后,得到两面分别是纳米金和氨基的Janus粒子,保存备用;

[0016] (8) 将步骤(7)得到的Janus粒子与1mg二环己基碳二亚胺(DCC)、1mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶于1mL二甲基甲酰胺(DMF)溶液中,超声30秒,使Janus粒子分散均匀;

[0017] (9) 将10μL羧基化石墨烯缓慢滴加在玻碳电极表面,用红外灯烤干,用超纯水轻轻冲洗,得到羧基化石墨烯修饰的电极;

[0018] (10) 将步骤(9)处理的羧基化电极浸泡在步骤(8)所得溶液24小时,红外灯烤干,然后用超纯水轻冲电极表面除去吸附松散的Janus颗粒,烤干后,得到Janus粒子修饰电极;

[0019] (11) 将步骤(10)中得到的Janus粒子修饰电极浸泡在莱克多巴胺适配体溶液中,2-10℃下过夜,吹干备用;

[0020] (12) 将步骤(11)中处理的Janus粒子修饰电极浸泡在BSA溶液中2-4小时,用超纯水冲洗,除去表面吸附松散的BSA,吹干,浸入pH 6-8的缓冲液中,备用。

[0021] 所述的步骤(8)中,二环己基碳二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺的浓度均优选为1mg/mL。

[0022] 所述的步骤(11)中浸泡时间优选为12小时。

[0023] 所述的步骤(12)中BSA溶液浓度优选为0.25%,浸泡时间优选为2小时,缓冲溶液pH优选为7.4。

[0024] 本发明方法制备的电化学免疫传感器在莱克多巴胺检测中的应用。

[0025] 本发明的有益效果是:

[0026] (1) 以适配体/氨基制备Janus粒子,将其修饰在玻碳电极表面,提高了电极的灵敏度且使电极修饰过程更加简单。

[0027] (2) 制得的电化学免疫传感器,将其用于构建实际人体尿液中检测莱克多巴胺的传感体系,可以显著提高免疫电极的选择性。本发明制备得到的电化学免疫传感器可检测实际人体尿液中的莱克多巴胺。

[0028] (3) 制得的电化学免疫传感器,具有良好的稳定性和重现性,是对Janus粒子独特性质的开发和应用,也为未来莱克多巴胺的检测提供了新的思路。

附图说明

[0029] 构成本申请的一部分的附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0030] 图1为本发明制备电化学免疫传感器的修饰过程;

[0031] 图2为本发明制备电化学免疫传感器用扫描电镜表征羧基化石墨烯修饰的玻碳电极;

- [0032] 图3为本发明制备电化学免疫传感器用循环伏安法表征电极修饰过程；
- [0033] 图4为本发明制备电化学免疫传感器免疫电极在不同扫描速度下的循环伏安图；
- [0034] 图5为本发明制备电化学免疫传感器免疫电极随在莱克多巴胺溶液中孵育时间的变化其阳极峰电流的变化；
- [0035] 图6为本发明制备电化学免疫传感器免疫电极不同pH下其阳极峰电流的变化；
- [0036] 图7为本发明制备电化学免疫传感器用差分脉冲法表征免疫电极在不同浓度莱克多巴胺溶液中的检测；
- [0037] 图8为本发明制备电化学免疫传感器莱克多巴胺浓度与峰电流的线性关系；
- [0038] 图9为本发明制备电化学免疫传感器用差分脉冲法峰电流表征免疫电极选择性。

具体实施方式

[0039] 需要说明的是，在不冲突的情况下，本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明。

[0040] 为了使本技术领域的人员更好地理解本申请方案，下面将结合本申请实施例中的附图，对本申请实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本申请一部分的实施例，而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都应当属于本申请保护的范围。

[0041] 实施例1

[0042] 一种电化学免疫传感器的制备方法，包括以下步骤：

[0043] (1) 在480mL超纯水中加入1.00g十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 和3.5mL2.00mol/L的氢氧化钠溶液，在80℃下剧烈搅拌30分钟；

[0044] (2) 边剧烈搅拌边缓慢滴加5.00mL四乙基原硅酸盐 (TEOS)，混合反应2小时得到产物A，将产物A用乙醇洗涤备用；

[0045] (3) 将步骤(2)中洗涤后的产物A分散在70mL甲醇和3.0mL 37.2%盐酸的混合液中，回流两次，每次十分钟，离心得到产物MSN并用甲醇洗涤，将洗涤后的产物MSN在60℃真空干燥后备用；

[0046] (4) 将步骤(3)中真空干燥后的产物MSN超声分散在1.0mL3-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 和50.0mL甲醇的混合液中，在80℃下回流8小时，离心得到产物B并用甲醇洗涤，将洗涤后的产物B在60℃干燥，制得MSN-NH₂粒子，保存备用；

[0047] (5) 将步骤(4)制得的MSN-NH₂粒子超声均匀分散在10mLSDS溶液中，控制加热温度为80℃，加入1.0g石蜡中，融化后形成混合物，磁力搅拌下乳化1小时；

[0048] (6) 将步骤(5)中乳化后的混合物分散在20mL超纯水中，加入0.5mL1%氯金酸，连续搅拌30分钟后形成胶体，对胶体进行过滤，过滤后胶体颜色由白色变成淡黄色；

[0049] (7) 将步骤(6)中过滤后的胶体分散在20mL超纯水中，加入1.0mL1.0mol/L的NaBH₄溶液，搅拌10分钟，过滤洗涤，然后分散在氯仿中，加热溶解石蜡，并用氯仿洗涤，真空干燥12小时后，得到两面分别是纳米金和氨基的Janus粒子，保存备用；

[0050] (8) 将步骤(7)得到的Janus粒子与1mg 1mg/mL二环己基碳二亚胺 (DCC)、1mg 1mg/mL-N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶于1mL二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液中，超声30秒，使Janus粒子分

散均匀；

[0051] (9) 将10 μ L羧基化石墨烯缓慢滴加在玻碳电极表面,用红外灯烤干,用超纯水轻轻冲洗,得到羧基化石墨烯修饰的电极；

[0052] (10) 将步骤(9)处理的羧基化电极浸泡在步骤(8)所得溶液24小时,红外灯烤干,然后用超纯水轻冲电极表面除去吸附松散的Janus颗粒,烤干后,得到Janus粒子修饰电极；

[0053] (11) 将步骤(10)中得到的Janus粒子修饰电极浸泡在莱克多巴胺适配体溶液中12小时,6 $^{\circ}$ C下过夜,吹干备用；

[0054] (12) 将步骤(11)中处理的Janus粒子修饰电极浸泡在0.25%BSA溶液中2小时,用超纯水冲洗,除去表面吸附松散的BSA,吹干,浸入pH7.4的缓冲液中,备用。

[0055] 制备的免疫电化学传感器修饰过程示意图见图1。

[0056] 实施例2

[0057] 对实施例1修饰好的玻碳电极表面进行扫描电镜表征。如图2所示,从图中可以看到,羧基化石墨烯附着在玻碳电极表面,羧基化石墨烯可通过氨基连接Janus,Janus的纳米金表面可以固定大量的莱克多巴胺适配体,可以使免疫电极的灵敏度有很大的提高。说明本发明制备的适配体/氨基Janus粒子免疫电极修饰成功。

[0058] 实施例3

[0059] 实施例1制备的免疫电化学传感器修饰过程表征：

[0060] 取实施例1制备的Janus粒子修饰电极,在0.1mM pH 7的磷酸缓冲液中以10mM[Fe(CN) $_6$] $^{3-/4-}$ 作为探针利用循环伏安法表征电极的修饰过程。如图3所示：修饰了Janus粒子后电极产生的峰电流减小,这是因为Janus粒子与羧基化石墨烯连接附着在电极表面,在铁氰化钾溶液中暴露的是聚苯乙烯,所以其导电性能会减小。在莱克多巴胺适配体中浸泡后检测到的峰电流减小,说明莱克多巴胺抗体很好地附着在了纳米金颗粒表面。在牛血清白蛋白溶液中浸泡后,电流又有一定程度的降低,证明了牛血清白蛋白完成了在纳米金粒子表面的封闭活性位点的作用。该图说明了实施例1中制备的电极每一步的修饰过程都是成功的。

[0061] 利用循环伏安法通过峰电流和扫描速率之间的关系来研究实施例1制备的免疫电化学传感器的电化学过程机理。见图4：在10mmol/L[Fe(CN) $_6$] $^{3-/4-}$ 中,扫描速度在20-200mV/s的范围内,峰电流与扫描速率成正相关。峰电流与扫描速率的平方根成良好的线性关系,线性回归方程为： $i_{pa}(\mu A) = 4.3855v^{1/2}(mV s^{-1})^{1/2} + 11.911, R^2 = 0.9976$ ； $i_{pc}(\mu A) = -4.3319v^{1/2}(mV s^{-1})^{1/2} - 2.8084, R^2 = 0.9917$ 。这说明电极反应是受扩散控制的。

[0062] 实施例4

[0063] 实施例1制备的电化学免疫传感器在莱克多巴胺溶液中阳极峰电流随孵育时间的影响：

[0064] 将实施例1中制备的免疫器电极插入 1×10^{-7} mol/L的莱克多巴胺溶液中,每五分钟用差分脉冲法测定检测一次电流值。阳极峰电流随浸泡时间的影响见图5：浸泡时间越长,免疫电极表面附着的莱克多巴胺越多,峰电流相应变小。起初变化明显,最后变化缓慢,在60分钟时电流值不变。说明免疫电极上的适配体已经被莱克多巴胺全部作用。因此选用60分钟为孵育时间。

[0065] 实施例5

[0066] 实施例1制备的电化学免疫传感器在不同pH溶液中免疫电极对莱克多巴胺检测的影响：

[0067] 取实施例1制备的电化学免疫传感器与 1×10^{-7} mol/L莱克多巴胺作用60分钟，将其放入10 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 探针的不同pH磷酸缓冲溶液中用循环伏安法表征，见图6，pH 5-7范围内，电流信号一直在减弱，而pH 7、8和9时电流信号比较接近。可能原因是在碱性环境下，电极表面带负电荷，与 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 发生电荷相互排斥作用，使探针分子不易接触到电极表面。由于免疫电极中适配体对pH的特殊要求，最终选择在生理条件pH 7的环境中进行莱克多巴胺的测定。

[0068] 实施例6

[0069] 实施例1制备的电化学免疫传感器对莱克多巴胺检测的实验：

[0070] 采用差分脉冲法用于实施例1制备的电化学免疫传感器对莱克多巴胺检测的实验。如图7所示，实施例1制备的免疫电极在一系列浓度从低到高的标准浓度的莱克多巴胺pH 7的磷酸缓冲液中孵育60分钟，其中a-j莱克多巴胺浓度分别为 0.1×10^{-13} , 0.5×10^{-12} , 1×10^{-12} , 0.5×10^{-11} , 1×10^{-11} , 1×10^{-10} , 1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 1×10^{-7} mol/L。用其进行差分脉冲法测定，免疫电极对于莱克多巴胺的检测限可以达到 3×10^{-14} mol/L。此外，本发明制备的电化学免疫传感器的电流变化与莱克多巴胺浓度的对数呈良好的线性关系，如图8所示，在 1×10^{-7} – 1×10^{-13} mol/L的浓度范围内，RAC浓度与峰值电流有良好的线性关系，其线性回归方程为： $i_p (\mu\text{A}) = -2.4686 \log C (\text{mol/L}) + 5.7214$, $R^2 = 0.9782$ 。

[0071] 实施例7

[0072] 实施例1制备的电化学免疫传感器对莱克多巴胺选择性的实验：

[0073] 通过对一些常见的干扰物质的测试研究，来分析实施例1制备的免疫传感器的选择性。如图9所示，选择尿素、甘油、葡萄糖、L-谷氨酸、L-色氨酸、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 作为干扰物质进行研究。以 1×10^{-7} mol/L莱克多巴胺溶液为基准，以相同莱克多巴胺浓度的干扰物溶液为实验对象，分别对二者进行电化学检测分析。结果表明，二者测定的电流信号没有明显差别。说明本发明制备的检测莱克多巴胺的电化学免疫传感器选择性良好。

[0074] 实施例8

[0075] 实施例1制备的电化学免疫传感器的稳定性和重现性实验：

[0076] 将实施例1制备好的免疫电极在4℃下保存两周后，该电极在相同的实验条件下检测浓度为 1×10^{-7} mol/L的莱克多巴胺溶，发现峰电流没有明显的差别（低于6%）。免疫电极具有良好的稳定性可能是由于Janus粒子和纳米金颗粒在保存的过程中可以保持数量不变，而莱克多巴胺抗体则可以牢固地吸附在纳米金粒子上面，不易从电极表面脱落。另外，利用差分脉冲法进行了重复性实验，在同样 1×10^{-6} mol/L莱克多巴胺中分别测定了10次。结果表明，这10次测定结果的标准偏差为0.33，说明实施例1制备的免疫电极重复性良好。

[0077] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，对于本领域的技术人员来说，本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进或组合等，均应包含在本发明的保护范围之内。

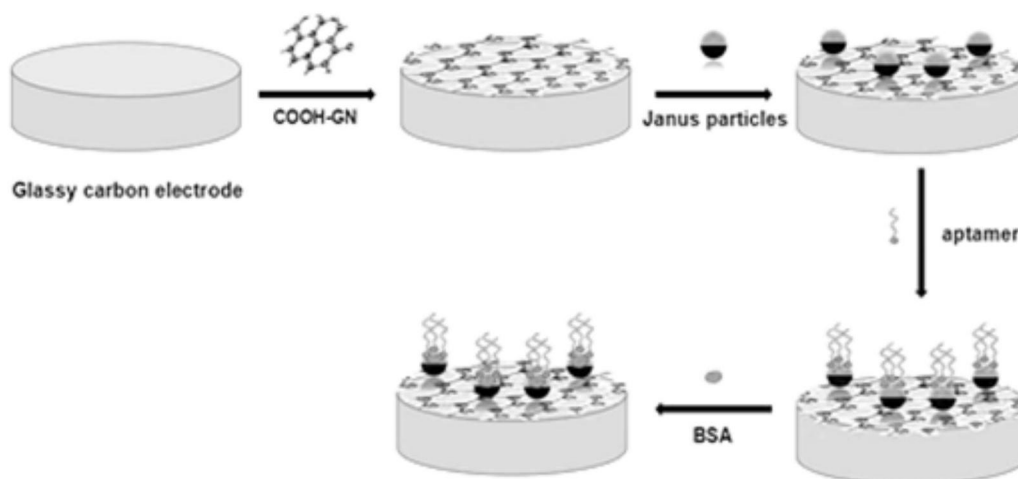


图1

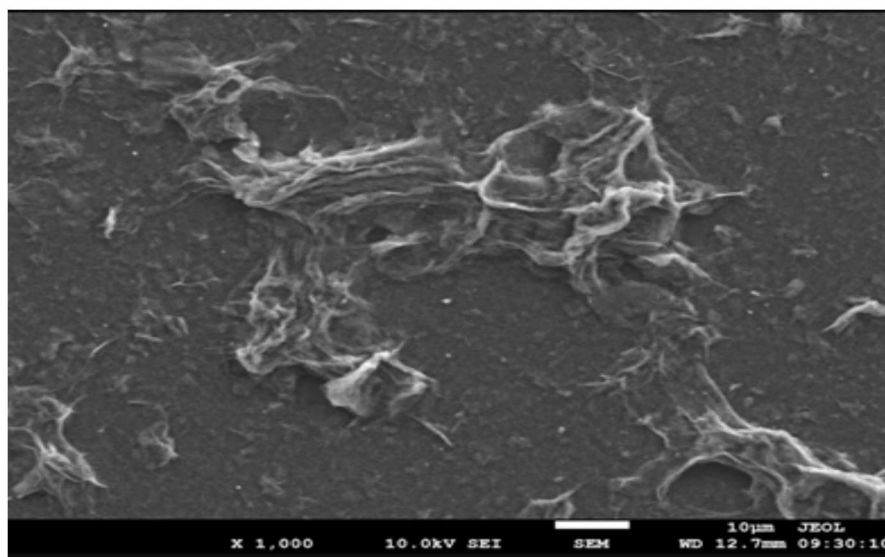


图2

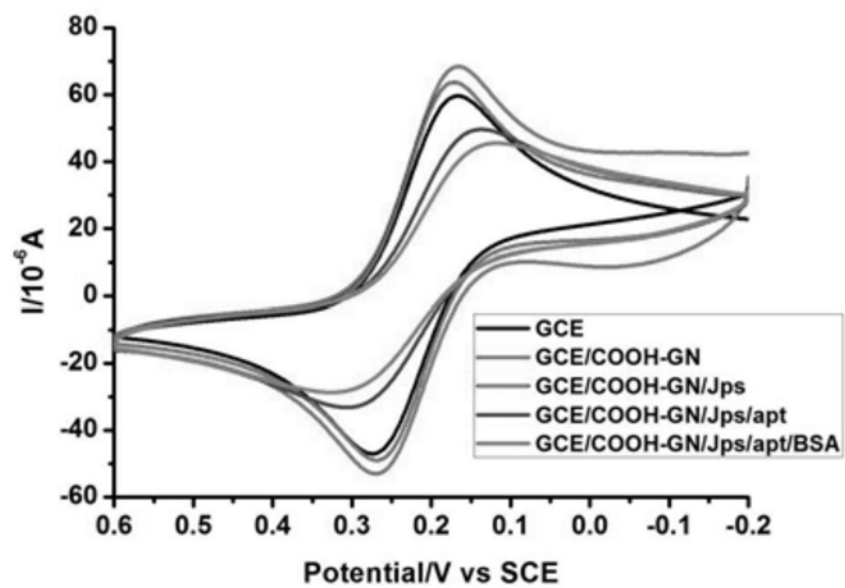


图3

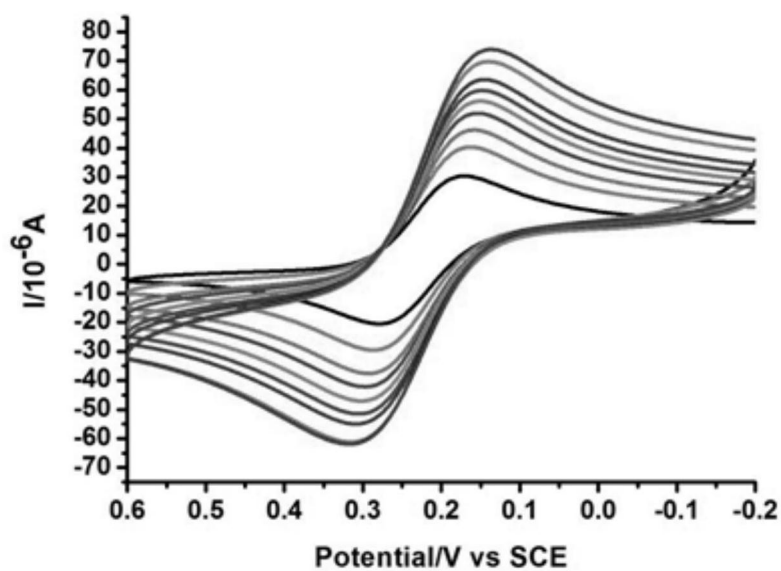


图4

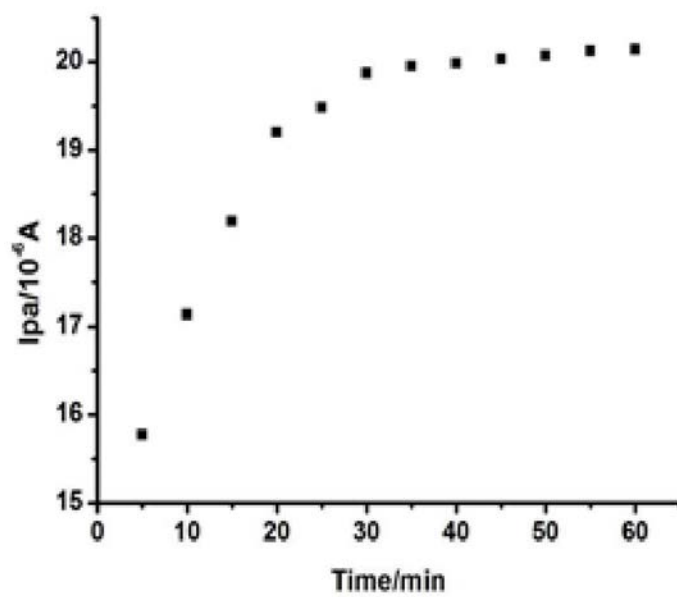


图5

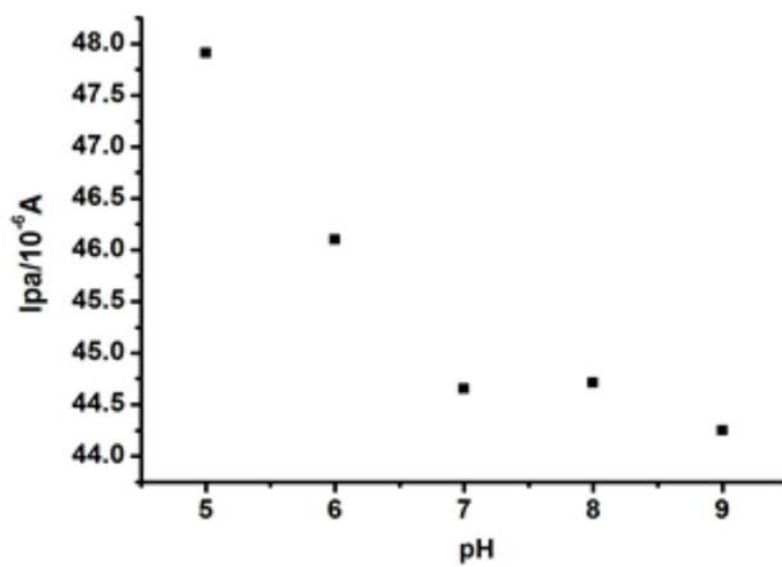


图6

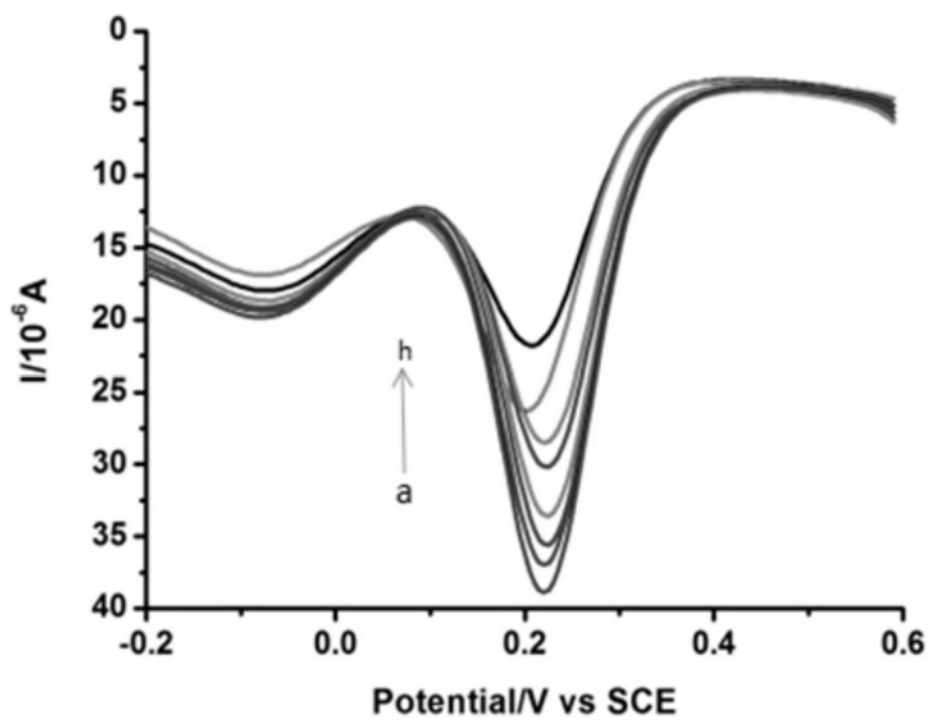


图7

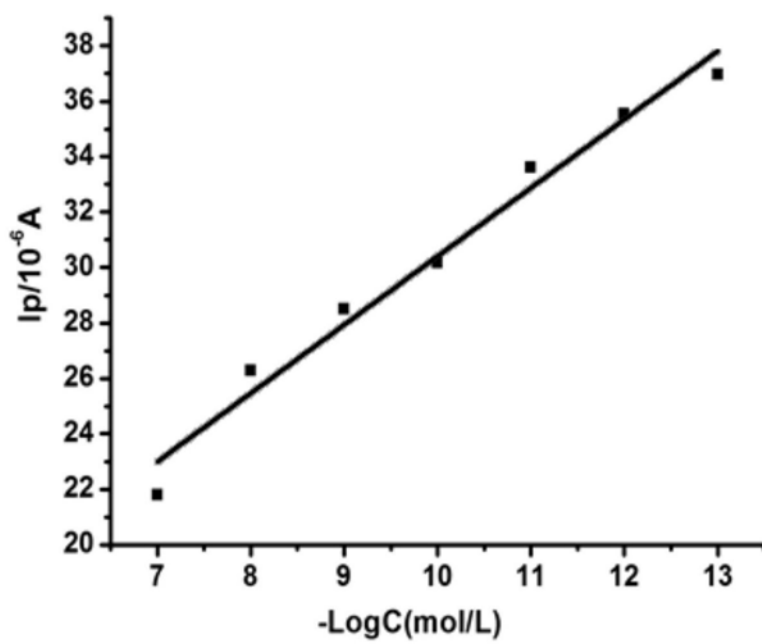


图8

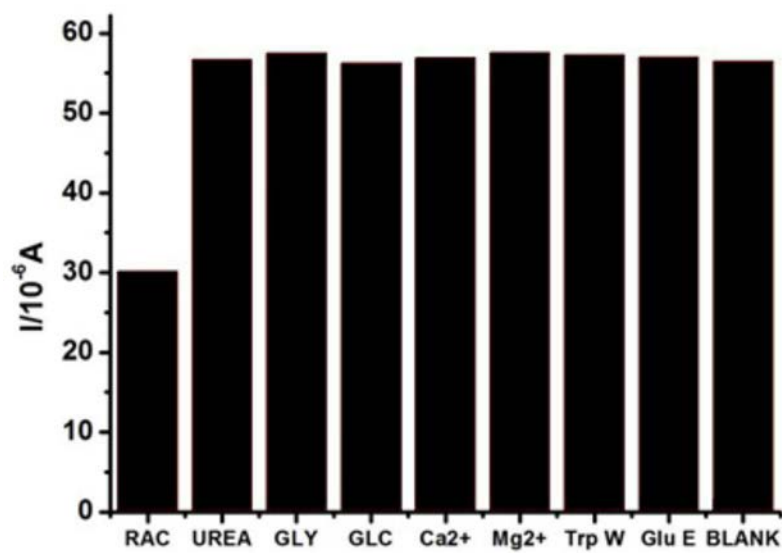


图9

专利名称(译)	一种电化学免疫传感器及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN110794014A	公开(公告)日	2020-02-14
申请号	CN201911136254.5	申请日	2019-11-19
[标]申请(专利权)人(译)	山西大学		
申请(专利权)人(译)	山西大学		
当前申请(专利权)人(译)	山西大学		
[标]发明人	周影 双少敏		
发明人	周影 双少敏		
IPC分类号	G01N27/30 G01N27/327 G01N27/48 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N27/308 G01N27/3277 G01N27/3278 G01N27/48 G01N33/531 G01N33/54346 G01N33/5438 G01N33/54393		
代理人(译)	马俊平		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种电化学免疫传感器及其制备方法和应用，一种电化学免疫传感器，是以适配体/氨基作为功能化基团制备的Janus粒子，并用其修饰玻碳电极，制备得到的电化学免疫传感器。该方法制备的电化学免疫传感器可用于 β -受体激动剂莱克多巴胺的检测。该方法提高了电化学免疫传感器电极的灵敏度和选择性，使电极修饰过程更加简便，具有良好的稳定性和重现性，并且可以应用于人体尿液中莱克多巴胺的检测。

