



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109709189 A

(43)申请公布日 2019.05.03

(21)申请号 201910144068.X

(22)申请日 2019.02.27

(71)申请人 山东理工大学

地址 255086 山东省淄博市高新技术开发
区高创园A座313室

(72)发明人 李月云 吕慧 李新进 徐振

(51)Int.Cl.

G01N 27/327(2006.01)

G01N 27/30(2006.01)

G01N 27/48(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

一种心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传
感器的制备方法

(57)摘要

本发明属于免疫分析和生物传感技术领域，提供了一种心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器的制备方法。本发明利用金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯作为催化材料，与检测抗体孵化后作为标记物，同时利用金纳米立方功能化的氧化石墨烯作为电极修饰材料，从而实现了心肌肌钙蛋白cTnI的检测，具备灵敏度高，特异性强，检测限低，对心肌肌钙蛋白的早期检测具有重要的科学意义和应用价值。

1. 一种心肌肌钙蛋白的夹心型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) 制备金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液;
- (2) 制备金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液;
- (3) 制备检测心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器;
- (4) 制作检测心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器的工作曲线。

2. 如权利要求1所述的一种心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器的制备方法, 其特征在于, 所述步骤(1)制备金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液, 步骤如下:

(1) 金纳米立方分散液的制备

配制10 mL含0.25 mM氯金酸和75 mM十六烷基三甲基溴化铵的混合液于50 mL的圆底烧瓶中, 在磁力搅拌下迅速加入0.5 ~ 0.7 mL、10 mM新配制的冰硼氢化钠溶液, 于27 °C水浴中搅拌3小时, 制得金纳米粒子水溶胶;

量取1.0 mL上述制备的金纳米粒子水溶胶用超纯水稀释至100 mL作为金晶种分散液;

在50 mL离心管中依次加入0.1 mL、10 mM氯金酸溶液, 2.0 mL、0.2 M十六烷基三甲基溴化铵溶液, 1.5 mL、0.1 M抗坏血酸, 0.3 ~ 0.5 mL上述制备的金晶种分散液, 超纯水稀释至25 mL, 在恒温振荡培养箱中于27 °C振荡8小时, 得到金纳米立方混合液; 离心, 超纯水洗涤3次, 沉淀物重新分散于25 mL超纯水中, 制得金纳米立方分散液;

(2) 氧化石墨烯的制备

称取1.5 ~ 2.5 g石墨粉, 在搅拌下加入96 mL浓硫酸, 反应20分钟后加入10 ~ 14 g高锰酸钾, 在冰水浴下搅拌1.5小时, 加热至55 °C反应5小时, 依次缓慢加入100 mL超纯水和10 mL双氧水, 搅拌30分钟后离心分离, 在冷冻干燥机中于-50 °C冻干12小时, 制得氧化石墨烯;

(3) 金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液的制备

称取10 ~ 20 mg氧化石墨烯加入20 mL上述制备的金纳米立方分散液中, 在室温下超声2小时, 离心分离, 制得金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液。

3. 如权利要求1所述的一种心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器的制备方法, 其特征在于, 所述步骤(2)制备金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液, 步骤如下:

(1) 金银核壳纳米立方分散液的制备

根据权利要求2(1)的步骤制备25 mL金纳米立方分散液, 后依次加入1.0 ~ 3.0 mL、0.1 M新配制的抗坏血酸和1.0 mL、10 mM硝酸银, 于60 °C的水浴中反应12小时; 用体积比为3:1的超纯水与丙酮的混合液离心洗涤3次, 所得沉淀物重新分散在20 mL超纯水中, 制得金银核壳纳米立方分散液;

(2) 氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取15 ~ 25 mg氧化石墨烯加入20 mL超纯水中, 超声分散, 加入20 ~ 40 mg硫脲, 超声5分钟, 转移到高压反应釜中, 于180 °C反应12小时; 自然冷却至室温, 超纯水洗涤至中性, 在冷冻干燥机中于-50 °C冻干8小时, 制得氮硫双掺杂氧化石墨烯;

(3) 金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取10 ~ 20 mg上述制备的氮硫双掺杂氧化石墨烯, 分散在20 mL金银核壳纳米立方

分散液中,在室温下振荡6小时,离心分离,在高温鼓风干燥箱中于40 °C烘干12小时,制得金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯;

(4) 金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液的制备

称取3.0 ~ 7.0 mg金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯分散到1.0 mL超纯水中,加入100 μ L、80 ~ 120 μ g/mL心肌肌钙蛋白检测抗体溶液和900 μ L、50 mM、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液,于恒温振荡培养箱中4 °C下振荡孵化12小时,离心分离,将下层沉淀再分散到2.0 mL、50 mM、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液中,制得金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液,4 °C下保存备用。

4. 如权利要求1所述的一种心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述步骤(3)制备检测心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器,步骤如下:

(1) 将直径为3.0 ~ 5.0 mm的玻璃碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨,超纯水清洗干净;

(2) 取6.0 μ L、1.0 ~ 3.0 mg/mL的金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液滴涂到电极表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;

(3) 将6.0 μ L、8.0 ~ 12 μ g/mL的心肌肌钙蛋白捕获抗体 Ab_1 滴加到电极表面,超纯水冲洗,4 °C冰箱中晾干;

(4) 继续将3.0 μ L、0.8 ~ 1.2 mg/mL的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;

(5) 滴加6.0 μ L、0.0001 ~ 200 ng/mL的一系列不同浓度的心肌肌钙蛋白抗原Ag溶液,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;

(6) 将6.0 μ L、1.5 ~ 3.5 mg/mL金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液滴至电极表面,置于4 °C冰箱中孵化40分钟,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干,制得检测心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器。

5. 如权利要求1所述的一种心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述步骤(4)制作检测心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器的工作曲线,步骤如下:

(1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,所制备的传感器为工作电极,在10 mL包含5.0 mM过氧化氢溶液、2.0 mM邻苯二胺溶液、pH为5.5 ~ 8.5的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2) 采用差分脉冲伏安法对分析物进行检测,初始电位为0.15 V,终止电位为0.50 V,脉冲振幅为50 mV,脉冲宽度为50 ms,脉冲周期为500 ms,记录电流变化;

(3) 记录不同浓度下心肌肌钙蛋白所对应的电流峰值,绘制工作曲线;

(4) 利用工作曲线法,得到待测样品中心肌肌钙蛋白抗原的浓度。

6. 如权利要求1、3、4和5所述的心肌肌钙蛋白,其特征在于,所述心肌肌钙蛋白为cTnI。

一种心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析和生物传感技术领域,涉及一种心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器的制备方法。具体是采用金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯作为催化材料标记检测抗体,同时利用金纳米立方功能化的氧化石墨烯作为电极修饰材料,从而实现了心肌肌钙蛋白的灵敏检测。

背景技术

[0002] 心肌肌钙蛋白是目前认为较好的心肌损害标志物,可用于诊断心肌梗塞,正常人血液中的心肌肌钙蛋白水平在0.5 ng/mL以下,在发生心肌梗塞后6-9小时,血液中心肌肌钙蛋白的含量出现增高并持续数天。因此,实现心肌肌钙蛋白的灵敏检测,可以使病患得到及时诊断和救治,大大加快了病患接受进一步治疗的进程,对心肌梗塞的临床诊断具有重要意义。目前,对于心肌肌钙蛋白的检测方法有很多,如酶联免疫吸附法,免疫荧光法等,但这些方法在检测过程中需要大型仪器设备,操作复杂,检测耗时长,以及存在放射性污染等问题,因此,发明一种特异性强,灵敏度高,检测速度快,操作简便的心肌肌钙蛋白免疫传感器十分重要。

[0003] 电化学免疫传感器依靠抗原与其相应抗体的特异性结合,已经广泛应用于各类生物标志物的检测,一般可分为夹心型免疫传感器和无标记型免疫传感器两种。夹心型电化学免疫传感器结合了高特异性的免疫分析技术和高灵敏的电化学分析技术,具有灵敏度高、检测范围宽、检测下限低、检测快速等优点,已广泛应用于环境监测、食品安全控制、生物监测、临床检验等领域。

[0004] 核壳结构的双金属纳米复合材料因其独特的光学、电学以及化学性质,目前已在生产、生活及科研中得到了广泛应用。氮硫双掺杂氧化石墨烯具有增大的表面积、良好的导电性和生物相容性,被广泛用于电池、传感器等领域。本发明采用金纳米立方功能化的氧化石墨烯作为基底材料,金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯作为催化材料,并与检测抗体进行孵化作为标记物,构建了用于测定心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器的制备方法,实现了对心肌肌钙蛋白的超灵敏检测。

[0006] 本发明的目的之一是提供一种心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器的制备方法。

[0007] 本发明的目的之二是将所制备的金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器应用于心肌肌钙蛋白的高灵敏、特异性检测。

[0008] 本发明的技术方案,包括以下步骤:

1. 一种心肌肌钙蛋白的夹心型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) 制备金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液;
- (2) 制备金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液;
- (3) 制备检测心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器;
- (4) 制作检测心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器的工作曲线。

[0009] 2. 制备金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液,步骤如下:

(1) 金纳米立方分散液的制备

配制10 mL含0.25 mM氯金酸和75 mM十六烷基三甲基溴化铵的混合液于50 mL的圆底烧瓶中,在磁力搅拌下迅速加入0.5 ~ 0.7 mL、10 mM新配制的冰硼氢化钠溶液,于27 °C水浴中搅拌3小时,制得金纳米粒子水溶胶;

量取1.0 mL上述制备的金纳米粒子水溶胶用超纯水稀释至100 mL作为金晶种分散液;

在50 mL离心管中依次加入0.1 mL、10 mM氯金酸溶液,2.0 mL、0.2 M十六烷基三甲基溴化铵溶液,1.5 mL、0.1 M抗坏血酸,0.3 ~ 0.5 mL上述制备的金晶种分散液,超纯水稀释至25 mL,在恒温振荡培养箱中于27 °C振荡8小时,得到金纳米立方混合液;离心,超纯水洗涤3次,沉淀物重新分散于25 mL超纯水中,制得金纳米立方分散液;

(2) 氧化石墨烯的制备

称取1.5 ~ 2.5 g石墨粉,在搅拌下加入96 mL浓硫酸,反应20分钟后加入10 ~ 14 g高锰酸钾,在冰水浴下搅拌1.5小时,加热至55 °C反应5小时,依次缓慢加入100 mL超纯水和10 mL双氧水,搅拌30分钟后离心分离,在冷冻干燥机中于-50 °C冻干12小时,制得氧化石墨烯;

(3) 金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液的制备

称取10 ~ 20 mg氧化石墨烯加入20 mL上述制备的金纳米立方分散液中,在室温下超声2小时,离心分离,制得金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液。

[0010] 3. 制备金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液,步骤如下:

(1) 金银核壳纳米立方分散液的制备

根据权利要求2(1)的步骤制备25 mL金纳米立方分散液,后依次加入1.0 ~ 3.0 mL、0.1 M新配制的抗坏血酸和1.0 mL、10 mM硝酸银,于60 °C的水浴中反应12小时;用体积比为3:1的超纯水与丙酮的混合液离心洗涤3次,所得沉淀物重新分散在20 mL超纯水中,制得金银核壳纳米立方分散液;

(2) 氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取15 ~ 25 mg氧化石墨烯加入20 mL超纯水中,超声分散,加入20 ~ 40 mg硫脲,超声5分钟,转移到高压反应釜中,于180 °C反应12小时;自然冷却至室温,超纯水洗涤至中性,在冷冻干燥机中于-50 °C冻干8小时,制得氮硫双掺杂氧化石墨烯;

(3) 金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取10 ~ 20 mg上述制备的氮硫双掺杂氧化石墨烯,分散在20 mL金银核壳纳米立方分散液中,在室温下振荡6小时,离心分离,在高温鼓风干燥箱中于40 °C烘干12小时,制得金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯;

(4) 金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液的制备

称取3.0 ~ 7.0 mg金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯分散到1.0 mL超纯水中,加入100 μL 、80 ~ 120 $\mu\text{g/mL}$ 心肌肌钙蛋白检测抗体溶液和900 μL 、50 mM、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液,于恒温振荡培养箱中4 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡孵化12小时,离心分离,将下层沉淀再分散到2.0 mL、50 mM、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液中,制得金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液,4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

[0011] 4. 制备检测心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器,步骤如下:

- (1)将直径为3.0 ~ 5.0 mm的玻璃碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨,超纯水清洗干净;
- (2)取6.0 μL 、1.0 ~ 3.0 mg/mL的金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液滴涂到电极表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;
- (3)将6.0 μL 、8.0 ~ 12 $\mu\text{g/mL}$ 的心肌肌钙蛋白捕获抗体 Ab_1 滴加到电极表面,超纯水冲洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;
- (4)继续将3.0 μL 、0.8 ~ 1.2 mg/mL的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,超纯水冲洗电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;
- (5)滴加6.0 μL 、0.0001 ~ 200 ng/mL的一系列不同浓度的心肌肌钙蛋白抗原Ag溶液,超纯水冲洗电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;
- (6)将6.0 μL 、1.5 ~ 3.5 mg/mL金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液滴至电极表面,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化40分钟,超纯水冲洗电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,制得检测心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器。

[0012] 5. 制作检测心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器的工作曲线,步骤如下:

- (1)使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,所制备的传感器为工作电极,在10 mL包含5.0 mM过氧化氢溶液、2.0 mM邻苯二胺溶液、pH为5.5 ~ 8.5的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;
- (2)采用差分脉冲伏安法对分析物进行检测,初始电位为0.15 V,终止电位为0.50 V,脉冲振幅为50 mV,脉冲宽度为50 ms,脉冲周期为500 ms,记录电流变化;
- (3)记录不同浓度下心肌肌钙蛋白所对应的电流峰值,绘制工作曲线;
- (4)利用工作曲线法,得到待测样品中心肌肌钙蛋白抗原的浓度。

[0013] 所述心肌肌钙蛋白为:cTnI。

[0014] 本发明所用原材料均可在化学试剂公司或生物制药公司购买。

[0015] 本发明的有益成果

(1)采用金纳米立方功能化的氧化石墨烯作为基底材料,具有独特的导电性和粘附性,可以结合更多抗体,提高传感器的分析性能。金银核壳纳米立方,具有良好的水溶性和催化性能,且表面存在更多的结合位点,能有效吸附并固载抗体。氮硫双掺杂氧化石墨烯具有优异的导电性,增大的比表面积,可以结合更多金银核壳纳米立方,通过两者的协同效应可以进一步提高材料的催化性能,实现对检测信号的放大,从而提高了免疫传感器检测心肌肌钙蛋白的灵敏度,降低了检测限;

(2)一种心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器的制备方法,实现了对心肌肌钙蛋白cTnI的灵敏测定,其线性范围为0.0001 ~ 200 ng/mL,最低检测限为0.033 pg/mL,表明一种心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器可以达到准确测定的目的。

具体实施方式

[0016] 现将本发明通过具体实施方式进一步说明,但不限于此。

[0017] 实施例1制备金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液,步骤如下:

(1) 金纳米立方分散液的制备

配制10 mL含0.25 mM氯金酸和75 mM十六烷基三甲基溴化铵的混合液于50 mL的圆底烧瓶中,在磁力搅拌下迅速加入0.5 mL、10 mM新配制的冰硼氢化钠溶液,于27 °C水浴中搅拌3小时,制得金纳米粒子水溶胶;

量取1.0 mL上述制备的金纳米粒子水溶胶用超纯水稀释至100 mL作为金晶种分散液;

在50 mL离心管中依次加入0.1 mL、10 mM氯金酸溶液,2.0 mL、0.2 M十六烷基三甲基溴化铵溶液,1.5 mL、0.1 M抗坏血酸,0.3 mL上述制备的金晶种分散液,超纯水稀释至25 mL,在恒温振荡培养箱中于27 °C振荡8小时,得到金纳米立方混合液;离心,超纯水洗涤3次,沉淀物重新分散于25 mL超纯水中,制得金纳米立方分散液;

(2) 氧化石墨烯的制备

称取1.5 g石墨粉,在搅拌下加入96 mL浓硫酸,反应20分钟后加入10 g高锰酸钾,在冰水浴下搅拌1.5小时,加热至55 °C反应5小时,依次缓慢加入100 mL超纯水和10 mL双氧水,搅拌30分钟后离心分离,在冷冻干燥机中于-50 °C冻干12小时,制得氧化石墨烯;

(3) 金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液的制备

称取10 mg氧化石墨烯加入20 mL上述制备的金纳米立方分散液中,在室温下超声2小时,离心分离,制得金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液。

[0018] 实施例2制备金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液,步骤如下:

(1) 金纳米立方分散液的制备

配制10 mL含0.25 mM氯金酸和75 mM十六烷基三甲基溴化铵的混合液于50 mL的圆底烧瓶中,在磁力搅拌下迅速加入0.6 mL、10 mM新配制的冰硼氢化钠溶液,于27 °C水浴中搅拌3小时,制得金纳米粒子水溶胶;

量取1.0 mL上述制备的金纳米粒子水溶胶用超纯水稀释至100 mL作为金晶种分散液;

在50 mL离心管中依次加入0.1 mL、10 mM氯金酸溶液,2.0 mL、0.2 M十六烷基三甲基溴化铵溶液,1.5 mL、0.1 M抗坏血酸,0.4 mL上述制备的金晶种分散液,超纯水稀释至25 mL,在恒温振荡培养箱中于27 °C振荡8小时,得到金纳米立方混合液;离心,超纯水洗涤3次,沉淀物重新分散于25 mL超纯水中,制得金纳米立方分散液;

(2) 氧化石墨烯的制备

称取2.0 g石墨粉,在搅拌下加入96 mL浓硫酸,反应20分钟后加入12 g高锰酸钾,在冰水浴下搅拌1.5小时,加热至55 °C反应5小时,依次缓慢加入100 mL超纯水和10 mL双氧水,搅拌30分钟后离心分离,在冷冻干燥机中于-50 °C冻干12小时,制得氧化石墨烯;

(3) 金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液的制备

称取15 mg氧化石墨烯加入20 mL上述制备的金纳米立方分散液中,在室温下超声2小时,离心分离,制得金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液。

[0019] 实施例3制备金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液,步骤如下:

(1) 金纳米立方分散液的制备

配制10 mL含0.25 mM氯金酸和75 mM十六烷基三甲基溴化铵的混合液于50 mL的圆底

烧瓶中,在磁力搅拌下迅速加入0.7 mL、10 mM新配制的冰硼氢化钠溶液,于27 °C水浴中搅拌3小时,制得金纳米粒子水溶胶;

量取1.0 mL上述制备的金纳米粒子水溶胶用超纯水稀释至100 mL作为金晶种分散液;

在50 mL离心管中依次加入0.1 mL、10 mM氯金酸溶液,2.0 mL、0.2 M十六烷基三甲基溴化铵溶液,1.5 mL、0.1 M抗坏血酸,0.5 mL上述制备的金晶种分散液,超纯水稀释至25 mL,在恒温振荡培养箱中于27 °C振荡8小时,得到金纳米立方混合液;离心,超纯水洗涤3次,沉淀物重新分散于25 mL超纯水中,制得金纳米立方分散液;

(2) 氧化石墨烯的制备

称取2.5 g石墨粉,在搅拌下加入96 mL浓硫酸,反应20分钟后加入14 g高锰酸钾,在冰水浴下搅拌1.5小时,加热至55 °C反应5小时,依次缓慢加入100 mL超纯水和10 mL双氧水,搅拌30分钟后离心分离,在冷冻干燥机中于-50 °C冻干12小时,制得氧化石墨烯;

(3) 金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液的制备

称取20 mg氧化石墨烯加入20 mL上述制备的金纳米立方分散液中,在室温下超声2小时,离心分离,制得金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液。

[0020] 实施例4制备金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液,步骤如下:

(1) 金银核壳纳米立方分散液的制备

根据权利要求2(1)的步骤制备25 mL金纳米立方分散液,后依次加入1.0 mL、0.1 M新配制的抗坏血酸和1.0 mL、10 mM硝酸银,于60 °C的水浴中反应12小时;用体积比为3:1的超纯水与丙酮的混合液离心洗涤3次,所得沉淀物重新分散在20 mL超纯水中,制得金银核壳纳米立方分散液;

(2) 氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取15 mg氧化石墨烯加入20 mL超纯水中,超声分散,加入20 mg硫脲,超声5分钟,转移到高压反应釜中,于180 °C反应12小时;自然冷却至室温,超纯水洗涤至中性,在冷冻干燥机中于-50 °C冻干8小时,制得氮硫双掺杂氧化石墨烯;

(3) 金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取10 mg上述制备的氮硫双掺杂氧化石墨烯,分散在20 mL金银核壳纳米立方分散液中,在室温下振荡6小时,离心分离,在高温鼓风干燥箱中于40 °C烘干12小时,制得金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯;

(4) 金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液的制备

称取3.0 mg金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯分散到1.0 mL超纯水中,加入100 μ L、80 μ g/mL心肌肌钙蛋白检测抗体溶液和900 μ L、50 mM、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液,于恒温振荡培养箱中4 °C下振荡孵化12小时,离心分离,将下层沉淀再分散到2.0 mL、50 mM、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液中,制得金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液,4 °C下保存备用。

[0021] 实施例5制备金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液,步骤如下:

(1) 金银核壳纳米立方分散液的制备

根据权利要求2(1)的步骤制备25 mL金纳米立方分散液,后依次加入2.0 mL、0.1 M新

配制的抗坏血酸和1.0 mL、10 mM硝酸银,于60 °C的水浴中反应12小时;用体积比为3:1的超纯水与丙酮的混合液离心洗涤3次,所得沉淀物重新分散在20 mL超纯水中,制得金银核壳纳米立方分散液;

(2) 氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取20 mg氧化石墨烯加入20 mL超纯水中,超声分散,加入30 mg硫脲,超声5分钟,转移到高压反应釜中,于180 °C反应12小时;自然冷却至室温,超纯水洗涤至中性,在冷冻干燥机中于-50 °C冻干8小时,制得氮硫双掺杂氧化石墨烯;

(3) 金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取15 mg上述制备的氮硫双掺杂氧化石墨烯,分散在20 mL金银核壳纳米立方分散液中,在室温下振荡6小时,离心分离,在高温鼓风干燥箱中于40 °C烘干12小时,制得金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯;

(4) 金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液的制备

称取5.0 mg金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯分散到1.0 mL超纯水中,加入100 μ L、100 μ g/mL心肌肌钙蛋白检测抗体溶液和900 μ L、50 mM、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液,于恒温振荡培养箱中4 °C下振荡孵化12小时,离心分离,将下层沉淀再分散到2.0 mL、50 mM、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液中,制得金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液,4 °C下保存备用。

[0022] 实施例6制备金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液,步骤如下:

(1) 金银核壳纳米立方分散液的制备

根据权利要求2(1)的步骤制备25 mL金纳米立方分散液,后依次加入3.0 mL、0.1 M新配制的抗坏血酸和1.0 mL、10 mM硝酸银,于60 °C的水浴中反应12小时;用体积比为3:1的超纯水与丙酮的混合液离心洗涤3次,所得沉淀物重新分散在20 mL超纯水中,制得金银核壳纳米立方分散液;

(2) 氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取25 mg氧化石墨烯加入20 mL超纯水中,超声分散,加入40 mg硫脲,超声5分钟,转移到高压反应釜中,于180 °C反应12小时;自然冷却至室温,超纯水洗涤至中性,在冷冻干燥机中于-50 °C冻干8小时,制得氮硫双掺杂氧化石墨烯;

(3) 金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯的制备

称取20 mg上述制备的氮硫双掺杂氧化石墨烯,分散在20 mL金银核壳纳米立方分散液中,在室温下振荡6小时,离心分离,在高温鼓风干燥箱中于40 °C烘干12小时,制得金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯;

(4) 金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液的制备

称取7.0 mg金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯分散到1.0 mL超纯水中,加入100 μ L、120 μ g/mL心肌肌钙蛋白检测抗体溶液和900 μ L、50 mM、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液,于恒温振荡培养箱中4 °C下振荡孵化12小时,离心分离,将下层沉淀再分散到2.0 mL、50 mM、pH为7.2的磷酸盐缓冲溶液中,制得金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液,4 °C下保存备用。

[0023] 实施例7制备检测心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器,步骤如下:

- (1) 将直径为3.0 mm的玻碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨,超纯水清洗干净;
- (2) 取6.0 μL 、1.0 mg/mL的金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液滴涂到电极表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;
- (3) 将6.0 μL 、8.0 $\mu\text{g/mL}$ 的心肌肌钙蛋白捕获抗体 Ab_1 滴加到电极表面,超纯水冲洗,4 °C冰箱中晾干;
- (4) 继续将3.0 μL 、0.8 mg/mL的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;
- (5) 滴加6.0 μL 、0.0001 ~ 200 ng/mL的一系列不同浓度的心肌肌钙蛋白抗原Ag溶液,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;
- (6) 将6.0 μL 、1.5mg/mL金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液滴至电极表面,置于4 °C冰箱中孵化40分钟,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干,制得检测心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器。

[0024] 实施例8制备检测心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器,步骤如下:

- (1) 将直径为4.0 mm的玻碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨,超纯水清洗干净;
- (2) 取6.0 μL 、2.0 mg/mL的金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液滴涂到电极表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;
- (3) 将6.0 μL 、10 $\mu\text{g/mL}$ 的心肌肌钙蛋白捕获抗体 Ab_1 滴加到电极表面,超纯水冲洗,4 °C冰箱中晾干;
- (4) 继续将3.0 μL 、1.0 mg/mL的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;
- (5) 滴加6.0 μL 、0.0001 ~ 200 ng/mL的一系列不同浓度的心肌肌钙蛋白抗原Ag溶液,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;
- (6) 将6.0 μL 、2.5 mg/mL金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液滴至电极表面,置于4 °C冰箱中孵化40分钟,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干,制得检测心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器。

[0025] 实施例9制备检测心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器,步骤如下:

- (1) 将直径为5.0 mm的玻碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨,超纯水清洗干净;
- (2) 取6.0 μL 、3.0 mg/mL的金纳米立方功能化的氧化石墨烯分散液滴涂到电极表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;
- (3) 将6.0 μL 、12 $\mu\text{g/mL}$ 的心肌肌钙蛋白捕获抗体 Ab_1 滴加到电极表面,超纯水冲洗,4 °C冰箱中晾干;
- (4) 继续将3.0 μL 、1.2 mg/mL的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;
- (5) 滴加6.0 μL 、0.0001 ~ 200 ng/mL的一系列不同浓度的心肌肌钙蛋白抗原Ag溶液,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;
- (6) 将6.0 μL 、3.5 mg/mL金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯标记检测抗体分散液滴至电极表面,置于4 °C冰箱中孵化40分钟,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干,制得检测心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器。

[0026] 实施例10心肌肌钙蛋白cTnI的检测,步骤如下:

(1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,所制备的传感器为工作电极,在10 mL包含5.0 mM过氧化氢溶液、2.0 mM邻苯二胺溶液、pH为5.5 ~ 8.5的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2) 采用差分脉冲伏安法对分析物进行检测,初始电位为0.15 V,终止电位为0.50 V,脉冲振幅为50 mV,脉冲宽度为50 ms,脉冲周期为500 ms,记录电流变化;

(3) 记录不同浓度下心肌肌钙蛋白所对应的电流峰值,绘制工作曲线;

(4) 利用工作曲线法,得到待测样品中心肌肌钙蛋白抗原的浓度;

(5) 根据所得电流峰值与cTnI浓度之间的线性关系,测得线性范围为0.0001 ~ 200 ng/mL,检测限为0.033 pg/mL。

专利名称(译)	一种心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器的制备方法		
公开(公告)号	CN109709189A	公开(公告)日	2019-05-03
申请号	CN201910144068.X	申请日	2019-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	山东理工大学		
申请(专利权)人(译)	山东理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东理工大学		
[标]发明人	李月云 吕慧 李新进 徐振		
发明人	李月云 吕慧 李新进 徐振		
IPC分类号	G01N27/327 G01N27/30 G01N27/48 G01N33/68 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫分析和生物传感技术领域，提供了一种心肌肌钙蛋白的夹心型电化学免疫传感器的制备方法。本发明利用金银核壳纳米立方功能化的氮硫双掺杂氧化石墨烯作为催化材料，与检测抗体孵化后作为标记物，同时利用金纳米立方功能化的氧化石墨烯作为电极修饰材料，从而实现了心肌肌钙蛋白cTnI的检测，具备灵敏度高，特异性强，检测限低，对心肌肌钙蛋白的早期检测具有重要的科学意义和应用价值。