



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106483281 A  
(43)申请公布日 2017.03.08

(21)申请号 201610852039.5

(22)申请日 2016.09.26

(71)申请人 重庆医科大学

地址 400016 重庆市渝中区医学院路1号

(72)发明人 于超 吴静 赵一璘 牛亚珍

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 27/48(2006.01)

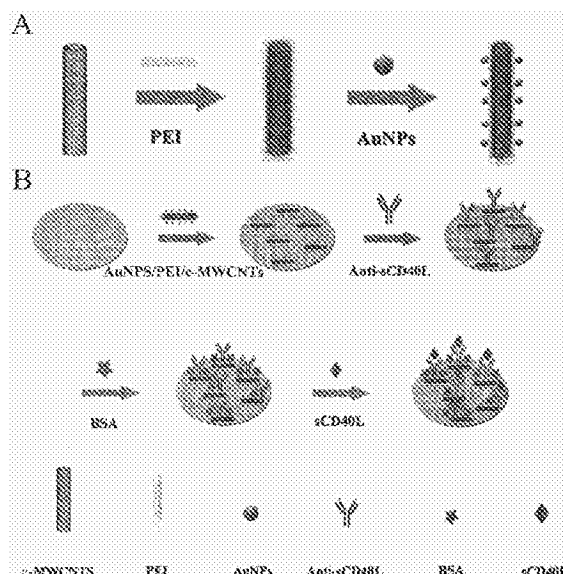
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

用于sCD40L检测的可再生电化学免疫传感器制备方法

(57)摘要

本发明涉及可用于预测和诊断急性冠状动脉综合征的生物标志物即可溶性CD40配体(sCD40L)检测的可再生电化学免疫传感器的制备方法,属于电化学检测技术领域。其特征在于:首先采用羧基功能化的多壁碳纳米管-聚乙烯亚胺-金纳米粒子纳米复合物(c-MWCNTs-PEI-AuNPs)作为基底材料用于固载sCD40L抗体,实现对sCD40L的捕获,进而对sCD40L进行定量检测。由于c-MWCNTs-PEI-AuNPs纳米复合物制备简单,导电性良好,具有较好的稳定性和较大的比表面积,因此能牢固地固载大量的抗体,并且利用抗体和抗原的特异性识别,使构建的电化学免疫传感器具有较强的特异性。本发明具有灵敏度高,特异性强,方便快捷和可重复多次使用的优点,并为sCD40L的检测提供了新的方法,为临床预测和诊断急性冠脉综合症提供有用的信息。



1. 一种用于可溶性CD40配体 (sCD40L) 检测的可再生电化学免疫传感器制备方法, 其特征在于包括以下步骤:

(1) 羧基功能化多壁碳纳米管 (c-MWCNTs)-聚乙烯亚胺 (PEI)-金纳米粒子 (AuNPs) 基底材料的制备;

(2) 建立可再生电化学免疫传感器, 测定sCD40L, 绘制标准曲线。

2. 根据权利要求1所述c-MWCNTs-PEI-AuNPs纳米复合物的制备过程, 其特征在于包括以下步骤:

称取2mg的c-MWCNTs到2mL的超纯水中, 超声1-3h, 使其分散均匀。在不断搅拌下加入N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 溶液活化其羧基, 搅拌30min之后加入100 $\mu$ L PEI溶液继续搅拌2-5h。将上述材料洗涤多次之后, 分散在2mL超纯水中, 先后分别加入100 $\mu$ L  $\text{HAuCl}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1%) 和900 $\mu$ L (30mM) 的 $\text{NaBH}_4$ 溶液搅拌过夜, 洗涤多次后分散在2mL超纯水中, 即可得到c-MWCNTs-PEI-AuNPs纳米复合物, 将其分散在2mL超纯水中储存于4 $^{\circ}$ C冰箱中备用。

3. 根据权利要求1所述的建立可再生电化学免疫传感器, 测定sCD40L, 绘制标准曲线, 其特征在于包括以下步骤:

(1) 分别用0.3 $\mu$ m和0.05 $\mu$ m的 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 粉末将电极抛光至镜面, 然后分别用适量超纯水、无水乙醇、超纯水按上述顺序将电极各超声清洗5min, 室温干燥备用;

(2) 将6 $\mu$ L制备好的c-MWCNTs-PEI-AuNPs纳米复合物滴加在电极表面, 室温干燥;

(3) 将6 $\mu$ L的sCD40L抗体滴加在修饰后的电极表面后, 置于4 $^{\circ}$ C冰箱中孵育10h;

(4) 用超纯水将孵育后的电极表面的未结合的sCD40L抗体冲去后, 滴加6 $\mu$ L牛血清白蛋白 (BSA, 0.25%) 溶液室温孵育30min;

(5) 用超纯水将孵育后的电极表面多余的BSA冲去后, 将6 $\mu$ L不同浓度的sCD40L分别滴加在电极表面孵育45min;

(6) 用超纯水将未与sCD40L抗体结合的sCD40L冲去之后, 置于5mM的铁氰化钾溶液 (5mM  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、5mM  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、0.1M KCl) 中进行表征, 用差分脉冲伏安法 (DPV) 测量其电流响应值;

(7) 根据所得峰电流差值与sCD40L浓度的对数呈线性关系, 绘制工作曲线;

(8) 将检测过sCD40L的电极放入解离液 (30mM NaOH) 中润洗60s后取出, 用超纯水小心冲洗, 置于4 $^{\circ}$ C冰箱中储存备用。

## 用于sCD40L检测的可再生电化学免疫传感器制备方法

### 技术领域：

[0001] 本发明涉及一种用于可作为预测和诊断急性冠状动脉综合征良好而可靠的生化标志物即可溶性CD40配体 (sCD40L) 检测的电化学免疫传感器的制备方法, 基于羧基功能化的多壁碳纳米管 (c-MWCNTs)、聚乙烯亚胺 (PEI) 和金纳米粒子 (AuNPs) 纳米复合材料的直接型可再生的免疫传感器, 用于sCD40L的检测, 属于电化学检测领域。

### 背景技术：

[0002] 目前, 心血管疾病因其发病率、致残率和致死率较高, 威胁人类的健康, 已经成为导致人类死亡的主要原因, 其中急性冠状动脉综合征是临床上常见的、严重的心血管疾病。sCD40L是肿瘤坏死因子超家族中的一员, 属于I型跨膜糖蛋白, 能够促进细胞的扩增和迁移。有研究表明, 人血清中的sCD40L可用于急性冠状动脉综合征早期诊断与预测其发病风险的一个可靠而良好的生化标志物。因此, 定量检测人血清中的sCD40L对预测和诊断急性冠状动脉综合征有十分重要的意义。

[0003] 蛋白质的传统检测方法有免疫细胞化学法 (ICC)、免疫组化法 (IHC)、蛋白质免疫印迹杂交法 (WB) 等方法, 但这些方法存在许多不足, 如样品处理过程繁琐、分析时间较长、仪器或者试剂昂贵、灵敏度较低等, 不适用于常规的临床检测。近年来, 电化学免疫传感器因其方便快捷、灵敏等特点而备受关注, 并且已广泛应用于生化分析、环境监测、临床研究和食品质量检测等领域。

[0004] 在电化学免疫传感器的应用中, 为了达到简便、快速地实现对目标物质进行检测的目的, 应选择合适的电极修饰材料。近年来, 多壁碳纳米管碳纳米管 (MWCNTs) 因其优良的导电性、较强的吸附能力、良好的电化学稳定性和较大的比表面积等特点, 广泛应用于电化学免疫传感器中。但由于其 $\pi$ - $\pi$ 电子的存在, 形成范德华力的相互作用, 具有较强的疏水性, 导致其在许多溶剂中分散不均匀、易团聚, 从而使其在电化学免疫传感器的应用受到了许多限制。为了提高MWCNTs的分散性, 降低其团聚作用, 一方面选用c-MWCNTs因其带有羧基, 增加了其分散性; 另一方面采用支化的PEI (分支中含有很多氨基的一类聚合物), 具有良好的水溶性, 与c-MWCNTs相结合, 不仅进一步提高了MWCNTs在溶剂中的分散性, 而且它所提供的大量氨基为材料的进一步修饰奠定了基础。金纳米粒子 (AuNPs) 具有良好的导电性、较大的比表面积、较强的吸附能力、良好的生物相容性等特点, 具有放大电化学免疫传感器电信号的功能, 能够进一步提高电化学免疫传感器的灵敏性, 在电化学免疫传感器中得到广泛应用。本发明利用上述材料的性质, 不仅使电信号进一步放大, 而且通过AuNPs与sCD40L抗体形成Au-NH<sub>2</sub>键, 从而固定sCD40L抗体, 并且能保持此抗体的活性, 从而实现对sCD40L的定量检测。由于基底材料c-MWCNTs-PEI-AuNPs纳米复合材料电化学性质稳定, 其与sCD40L抗体结合牢固, 在碱性溶液中, 抗体抗原解离, 而抗体与电极表面的连接不受影响, 使电化学免疫传感器具有再生性可多次重复使用。

[0005] 本发明基于c-MWCNTs-PEI-AuNPs纳米复合物为基底材料, 建立一种用于生物样品中sCD40L检测的直接型可再生电化学免疫传感器的制备方法, 为生物体样品中的sCD40L的

方便、快速定量检测提供一种新方法,为临床上急性冠脉综合症的预测和诊断提供参考。

#### 发明内容:

[0006] 本发明的目的是提供一种用于生物样品中的sCD40L定量检测的可再生电化学免疫传感器的制备方法,其特征包括以下步骤:

[0007] (1) 羧基功能化多壁碳纳米管(c-MWCNTs)-聚乙烯亚胺(PEI)-金纳米粒子(AuNPs)基底材料的制备;

[0008] (2) 建立可再生电化学免疫生物传感器,测定sCD40L,绘制标准曲线。

[0009] 本发明所述c-MWCNTs-PEI-AuNPs纳米复合物的制备过程,其特征包括以下步骤:

[0010] 称取2mg c-MWCNTs到2mL的超纯水中,超声1-3h,使其分散均匀。在不断搅拌下加入适量的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液活化其羧基,搅拌30min后加入100 $\mu$ L PEI溶液继续搅拌2-5h。将上述材料洗涤多次之后,分散在2mL超纯水中,先后分别加入100 $\mu$ L  $\text{HAuCl}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1%) 和900 $\mu$ L (30mM)的 $\text{NaBH}_4$ 溶液搅拌过夜,洗涤多次后分散在2mL超纯水中,即可得到c-MWCNTs-PEI-AuNPs纳米复合物,将其分散在2mL超纯水中储存于4 $^{\circ}$ C冰箱中备用。

[0011] 本发明中所述的建立可再生电化学免疫传感器,测定生物样品中的sCD40L浓度,绘制标准曲线,其特征在于包括以下步骤:

[0012] (1) 分别用0.3 $\mu$ m和0.05 $\mu$ m的 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 粉末将电极抛光至镜面,然后分别用适量超纯水、无水乙醇、超纯水按上述顺序将电极超声清洗各5min,室温干燥备用;

[0013] (2) 将6 $\mu$ L制备好的c-MWCNTs-PEI-AuNPs纳米复合物滴加在电极表面,室温干燥;

[0014] (3) 将6 $\mu$ L的sCD40L抗体滴加在修饰后的电极表面置于4 $^{\circ}$ C冰箱中孵育10h;

[0015] (4) 用超纯水将孵育后的电极表面的未结合的sCD40L抗体冲去后,滴加6 $\mu$ L牛血清白蛋白(BSA,0.25%)溶液室温孵育30min;

[0016] (5) 用超纯水将电极表面多余的BSA冲去后,将6 $\mu$ L不同浓度的sCD40L分别滴加在电极表面孵育45min;

[0017] (6) 用超纯水将未与sCD40L抗体结合的sCD40L冲去之后,将电极置于5mM的铁氰化钾溶液(5mM  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、5mM  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、0.1M KCl)中进行表征,用差分脉冲伏安法(DPV)测量其电流响应值;

[0018] (7) 根据所得峰电流差值与sCD40L浓度的对数呈线性关系,绘制工作曲线;

[0019] (8) 将检测过sCD40L的电极放入解离液(30mM NaOH)中润洗60s后取出,用超纯水小心冲洗,置于4 $^{\circ}$ C冰箱中储存备用。

[0020] 与现有技术相比,本发明是一种用于生物样品中sCD40L定量检测的可再生电化学免疫传感器的制备方法,其突出的特点是:

[0021] (1) 将c-MWCNTs-PEI-AuNPs纳米复合材料作为基底引入到电化学免疫传感器的制备中,不仅增强了导电性,加快了电子传递,而且增加了生物分子的固载量,进而提高了电化学免疫传感器的灵敏度。

[0022] (2) 本方法制备的可再生电化学免疫传感器由于其基底材料(c-MWCNTs-PEI-AuNPs)的制备过程简单、方便和电化学性质稳定,抗体与基底材料结合牢固。在碱性条件下,抗体与抗原解离,而抗体与基底材料的结合不受太大影响,因此具有优良的稳定性、重

现性和再生性,可重复多次使用。

[0023] (3) 本方法制备的可再生电化学免疫传感器可为临床对急性冠状动脉综合症的预防和诊断提供有效信息,有助于急性冠状动脉综合症的诊断和预防。

[0024] (4) 本方法制备的可再生电化学免疫传感器由于利用抗体抗原之间的特异性结合,具有良好的特异性,其制备过程简单、检测步骤较少,检测速度较快,便于实现商品化,从而推进转化医学的发展。

#### 附图说明:

[0025] 图1为本发明中可再生电化学免疫传感器的构建示意图。

[0026] 图2为本发明中基底材料的不同合成步骤的透射电子显微镜图、能谱图和紫外-可见吸收光谱图。

[0027] 图3为本发明的可再生电化学免疫传感器在检测可溶性CD40配体时得到的DPV曲线及其峰电流差值与浓度对数的线性关系。

#### 具体实施方式:

[0028] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步阐述,应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。

[0029] 实施例1

[0030] 步骤1.称取2mg c-MWCNTs到2mL的超纯水中,超声1-3h,使其分散均匀。在不断搅拌下加入适量的EDC和NHS溶液活化其羧基,磁力搅拌30min之后加入100 $\mu$ L PEI溶液继续搅拌2-5h。将上述材料洗涤多次之后,分散在2mL超纯水中,先后分别加入100 $\mu$ L  $\text{HAuCl}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1%) 和900 $\mu$ L的 $\text{NaBH}_4$  (30mM) 搅拌过夜,洗涤多次后分散在2mL超纯水中,即可得到c-MWCNTs-PEI-AuNPs纳米复合物,将其分散在2mL超纯水中储存于4 $^{\circ}$ C冰箱中备用;

[0031] 步骤2.分别用0.3 $\mu$ m和0.05 $\mu$ m的 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 粉末将电极抛光至镜面,然后分别用适量超纯水、无水乙醇、超纯水按以上顺序将电极各超声清洗5min,室温干燥备用;

[0032] 步骤3.取上述制备好的6 $\mu$ L的c-MWCNTs-PEI-AuNPs纳米复合物滴加在电极表面,室温干燥;

[0033] 步骤4.将6 $\mu$ L的sCD40L抗体滴加在修饰后的电极表面后,置于4 $^{\circ}$ C冰箱中孵育10h;

[0034] 步骤5.用超纯水将孵育后的电极表面的未结合的sCD40L抗体冲去后,滴加6 $\mu$ L BSA (0.25%) 溶液室温孵育30min;

[0035] 步骤6.用超纯水将孵育后的电极表面多余的BSA冲去后,在电极上分别滴加6 $\mu$ L不同浓度的sCD40L置于37 $^{\circ}$ C孵育45min;

[0036] 步骤7.用超纯水将未与sCD40L抗体结合的sCD40L冲去之后,将其置于铁氰化钾溶液 (5mM  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、5mM  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、0.1M KCl) 中进行表征,用DPV测量其电流响应值;

[0037] 步骤8.根据所得峰电流值求得其差值与sCD40L浓度的对数呈线性关系,绘制工作曲线;测定结果表明sCD40L浓度在10fg  $\text{mL}^{-1}$ -100pg  $\text{mL}^{-1}$ 范围内成线性关系,线性相关系数平方 ( $R^2$ ) 为0.99,检测限为3fg  $\text{mL}^{-1}$  ( $S/N=3$ );

[0038] 步骤9.将本发明用于检测sCD40L以及血浆中的干扰物质,结果表明血浆中的干扰物质的电流响应值远远低于sCD40L的电流相应值,说明传感器的特异性好,抗干扰能力强,

能够排除其他物质的干扰；

[0039] 步骤10. 将本发明中上述传感器置于于冰箱中4℃保存, 间断检测传感器电流响应, 储存28天后电流响应仍为初始电流的89.53%, 表明传感器具有良好的稳定性;

[0040] 步骤11. 将本发明的5个电化学免疫传感器用于检测同一浓度( $1\text{pg mL}^{-1}$ )的sCD40L, 其相对标准偏差为1.38%, 表明此传感器有良好的重现性;

[0041] 步骤12. 将本发明用于检测同一浓度( $1\text{pg mL}^{-1}$ )的sCD40L后, 放入解离液(30mM NaOH)中润洗60s后取出, 用超纯水小心冲洗之后重复上述步骤, 结果表明其重复5次电流值仍为初始电流的95.79%, 表明此传感器由于材料的稳定、抗体与材料的牢固结合具有良好的再生性, 可多次循环使用。

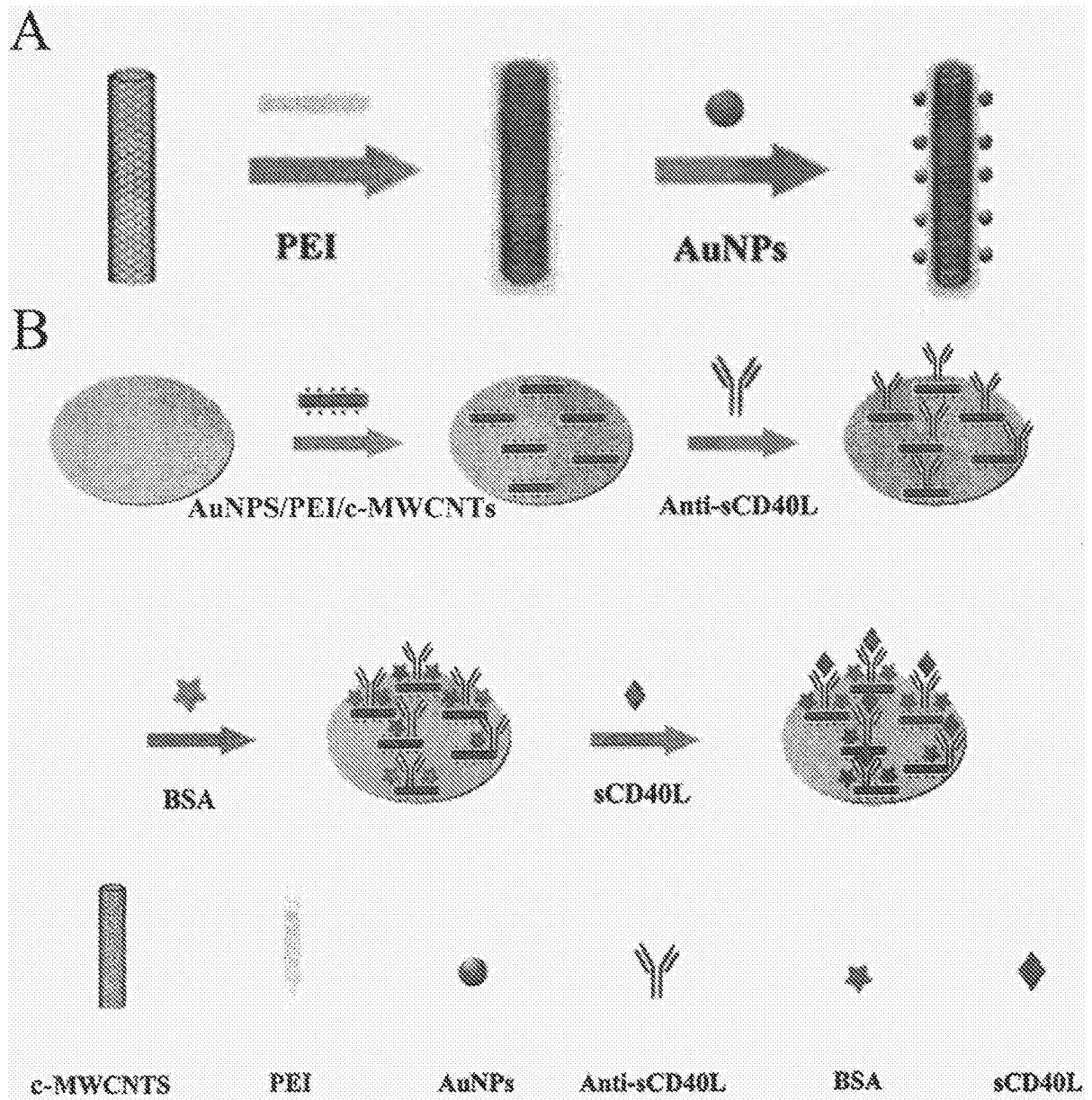


图1

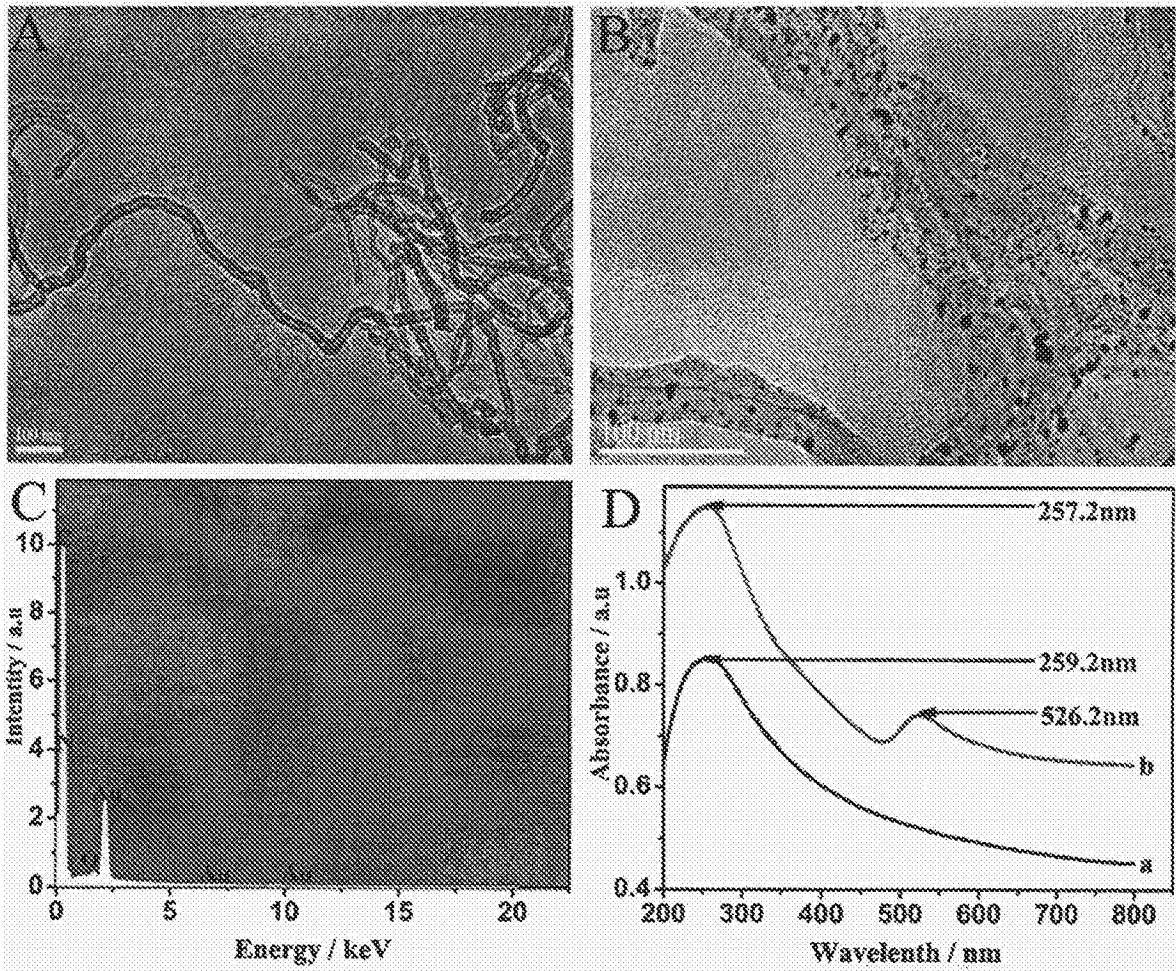


图2

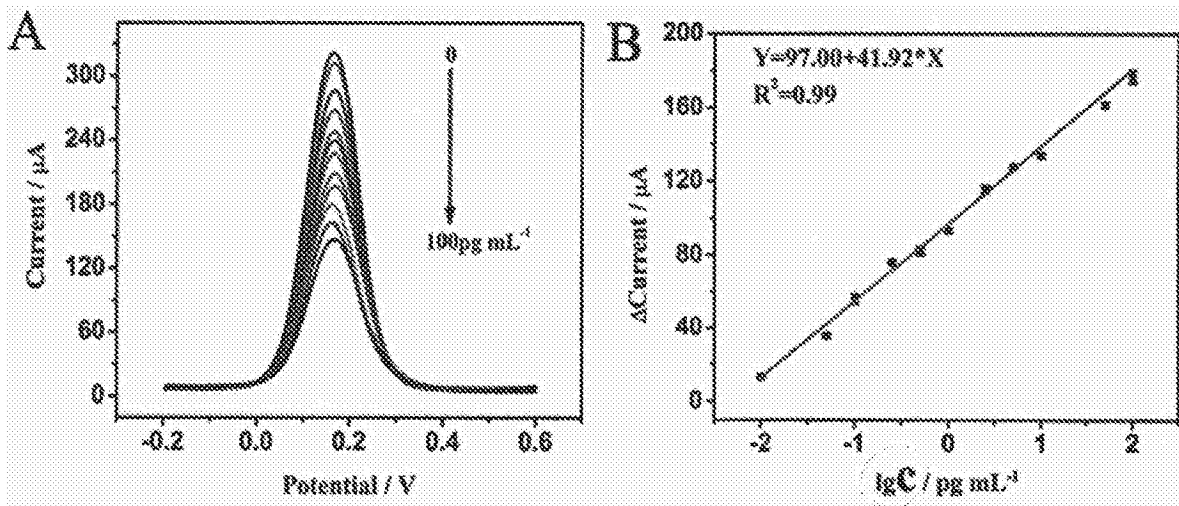


图3

专利名称(译)	用于sCD40L检测的可再生电化学免疫传感器制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106483281A</a>	公开(公告)日	2017-03-08
申请号	CN201610852039.5	申请日	2016-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	重庆医科大学		
申请(专利权)人(译)	重庆医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	重庆医科大学		
[标]发明人	于超 吴静 赵一璘 牛亚珍		
发明人	于超 吴静 赵一璘 牛亚珍		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N27/48		
CPC分类号	G01N33/5302 G01N27/48 G01N33/54346 G01N2800/324		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及可用于预测和诊断急性冠状动脉综合征的生物标志物即可溶性CD40配体(sCD40L)检测的可再生电化学免疫传感器的制备方法,属于电化学检测技术领域。其特征在于:首先采用羧基功能化的多壁碳纳米管-聚乙烯亚胺-金纳米粒子纳米复合物(c-MWCNTs-PEI-AuNPs)作为基底材料用于固载sCD40L抗体,实现对sCD40L的捕获,进而对sCD40L进行定量检测。由于c-MWCNTs-PEI-AuNPs纳米复合物制备简单,导电性良好,具有较好的稳定性和较大的比表面积,因此能牢固地固载大量的抗体,并且利用抗体和抗原的特异性识别,使构建的电化学免疫传感器具有较强的特异性。本发明具有灵敏度高,特异性强,方便快捷和可重复多次使用的优点,并为sCD40L的检测提供了新的方法,为临床预测和诊断急性冠脉综合症提供有用的信息。

