



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106568936 A

(43)申请公布日 2017.04.19

(21)申请号 201610888938.0

(22)申请日 2016.10.12

(71)申请人 宁波大学

地址 315211 浙江省宁波市江北区风华路
818号

(72)发明人 卢静 郭智勇 胡宇芳 沙玉红
武琳 俞欣辰 郭富米

(74)专利代理机构 宁波奥圣专利代理事务所
(普通合伙) 33226

代理人 何仲

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

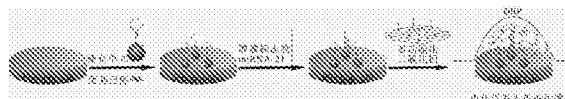
权利要求书2页 说明书9页
序列表3页 附图1页

(54)发明名称

基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学
发光免疫传感器的制备方法及其应用

(57)摘要

本发明公开了基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器的制备方法及其应用,特点是包括将制备的Fe₃O₄磁性纳米颗粒进行氨基化,然后与氯金酸反应制备Fe₃O₄@Au磁性纳米颗粒的步骤;将制备的单片层MoS₂进行羧基化,后依次与偶联试剂、信号DNA溶液和鲁米诺溶液反应,最后加入巯基乙醇溶液震荡清洗得到信号单元溶液的步骤;将Fe₃O₄@Au与捕获DNA溶液反应得到捕获单元溶液的步骤;最后将捕获单元溶液滴涂于磁性玻碳电极表面,然后依次将miRNA-21、信号单元溶液滴涂于磁性玻碳电极表面即可,优点是灵敏度高,特异性强、准确性高以及操作步骤简单,实验成本低。



1. 一种基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) Fe₃O₄@Au磁性纳米颗粒的制备

a. 制备Fe₃O₄磁性纳米颗粒:将0.7~1.0 g FeCl₃·6H₂O和0.2~0.5 g FeCl₂·4H₂O溶于50~100 mL的二次水后加入到三口烧瓶中,通氮气,磁力搅拌混合均匀,温度升高到80~100℃,向三口烧瓶中缓慢滴加20~25wt%的氨水,调节pH=9~10,继续加热搅拌1~2 h后,停止加热,在氮气的保护下,搅拌回流,冷却至室温,制备得到的黑色沉淀物即为Fe₃O₄磁性纳米颗粒,用二次水清洗至中性,乙醇中定容至50 mL;

b. 制备氨基化的Fe₃O₄磁性纳米颗粒:将步骤a所制备的Fe₃O₄磁性纳米颗粒溶液超声0.5~1 h,加入0.2~0.3 mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷,搅拌4~5 h,加入1~2 mL 0.1~0.5 mol/L硝酸溶液,继续搅拌3~4 h后,得到氨基化的Fe₃O₄磁性纳米颗粒,清洗3~5次,乙醇中定容至100 mL;

c. 制备Fe₃O₄@Au磁性纳米颗粒:将5~10 mL步骤b所制备的氨基化的Fe₃O₄磁性纳米颗粒溶液和10~20 mL 1wt%HAuCl₄在60~100 kHz的超声频率下混合,搅拌1 h后,缓慢加入30~50 mL 20~30 mmol/L柠檬酸三钠溶液,超声2~3 h,得到Fe₃O₄@Au磁性纳米颗粒,二次水清洗,定容至20 mL;

(2) 信号单元的合成

a. 制备单片层MoS₂:称取0.8~1 g MoS₂粉末加入高压釜,随后加入30~35 mL 0.4~0.5 mol/L的正丁基锂正己烷溶液,将高压釜密封后放在100℃真空干燥箱中反应4~5 h,获得的产物过滤洗涤,在60℃真空烘箱中干燥得到锂离子插层的二硫化钼;取0.1~0.2 g锂离子插层的二硫化钼分散在200~300 mL水中,室温下超声4~5 h,得到单分子层的MoS₂水溶液,冷冻干燥后得到MoS₂粉末;

b. 制备羧基化MoS₂:将0.04~0.05 g步骤a所制备的MoS₂粉末加入到40~50 mL 30~40 mmol/L的半胱氨酸溶液中,在超声仪中超声2~3 h,低速离心除去未完全剥离的MoS₂,最终获得羧基化的MoS₂纳米片层;

c. 合成信号单元:取100~200 μL 1~2 mg/mL羧基化的MoS₂纳米片层溶液超声1 h,加入200~400 μL偶联试剂,混合均匀,用0.5~1.0 mol/L盐酸调节溶液pH为4~6,常温震荡30~40 min,离心洗涤去除上清液,取沉淀定容至200~300 μL;加入20~30 μL 1~5 μmol/L信号DNA溶液和20~30 μL 0.05~0.1 mol/L鲁米诺溶液,用1~2 mol/L氢氧化钠调节溶液pH为9~10,混合均匀,常温震荡3~4 h;最后加入10~20 μL 10~20 mmol/L巯基乙醇溶液封闭非特异性吸附位点,继续震荡1~2 h,用二次水清洗离心去除上清液,最后将沉淀分散在杂交缓冲液中定容至30~50 μL,即得到信号单元溶液;

(3) 捕获单元的合成

取50~100 μL Fe₃O₄@Au溶液超声5~10 min,加入20~50 μL 1~5 μmol/L捕获DNA溶液,用DNA固定缓冲液定容至200 μL,混合均匀,37℃下震荡3~4 h,暗处放置24 h;然后滴加10~20 μL 10~20 mmol/L 巯基乙醇溶液封闭非特异性吸附位点,用水清洗离心去上清以去除多余的MCH,取沉淀用水定容至100 μL,即得到捕获单元溶液,4℃下保存备用;

(4) 电化学发光免疫传感器组装

a. 将直径为3~5 mm磁性玻碳电极依次用0.1、0.3、0.05 μmol/L Al₂O₃浆抛光成镜面,

依次用无水乙醇、蒸馏水超声波清洗, N₂吹干;

b. 取5~10 μL捕获单元溶液滴涂于上述预处理过的磁性玻碳电极表面, 通过磁性作用, 捕获单元即被牢固地吸附在电极表面, 然后将5~10 μL miRNA-21溶液滴涂在电化学发光免疫传感器上, 置于37℃中孵育1~2 h, 清洗; 再取5~10 μL步骤(2)所得的信号单元溶液, 置于37℃中孵育1~2 h后, 清洗得到基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器。

2. 根据权利要求1所述的基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器的制备方法, 其特征在于: 步骤(2)c中所述的杂交缓冲液的配方组成为10 mmol/L Tris-HCl, 1.0 mmol/L EDTA, 0.3 mol/L NaCl和1 mmol/L MgCl₂, pH为7.6~8.0; 步骤(3)所述的DNA固定缓冲液的配方组成为10 mmol/L Tris-HCl, 1.0 mmol/L EDTA, 10 mmol/L TCEP和0.1 mol/L NaCl, pH为7.6~8.0。

3. 根据权利要求1所述的基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器的制备方法, 其特征在于: 步骤(2)c中所述的偶联试剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与N-羟基琥珀酰亚胺溶于水得到, 所述的偶联试剂中1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的摩尔浓度为10~100 mmol/L, 所述的N-羟基琥珀酰亚胺的摩尔浓度为1~10 mmol/L。

4. 根据权利要求1所述的基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器的制备方法, 其特征在于: 所述的信号DNA的核苷酸序列为: 5'-NH₂-(CH₂)₆-CCG GCT CAT CAT GTT-3'; 所述的捕获DNA的核苷酸序列为5'-SH-(CH₂)₆-CCG GCT CAA CAT CAG TCT GAT AAG CTA AAC ATG ATG AGC CCG-3'; 所述的miRNA-21的核苷酸序列为: 5'-UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A-3'。

5. 一种权利要求1-4中任一项所述的基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器的应用, 其特征在于所述的基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器用于检测miRNA-21的方法, 具体步骤如下:

采用基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器作为工作电极, 采用铂电极作为对电极, Ag/AgCl电极作为参比电极, 构成三电极体系; 将三电极体系放入测试缓冲液, 启动电化学反应, 测量电化学发光强度, 获得待测miRNA-21溶液对应的电化学发光强度值, 根据电化学发光强度值与miRNA-21溶液浓度之间的定量关系; 计算得到待测样品中miRNA-21的准确浓度。

6. 根据权利要求5所述的基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器的应用, 其特征在于: 所述的测试缓冲液的配方组成为50 mmol/L Tris-HCl和1~5 mmol/L H₂O₂, pH为8.4~8.8。

7. 根据权利要求6所述的基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器的应用, 其特征在于所述的电化学反应的条件如下: 电位阶跃计时电流法, 脉冲宽度: 0.25 s; 脉冲间隔: 30 s; 初始电压: 0 V; 脉冲电压: 1.0 V。

基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器的制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种电化学发光免疫传感器及其检测方法,尤其是涉及一种基于多功能化二硫化钼材料的miRNA-21电化学发光免疫传感器的制备方法及其应用,属于功能材料和生物传感技术领域。

背景技术

[0002] 癌症,也称恶性肿瘤,本质上是一种多基因疾病,是由细胞生长增殖机制失常引起的疾病,严重危害人类的健康。据WHO报告与预测,全球癌症病例将呈现迅猛增长态势,由2012年的1400万人,逐年递增至2025年的1900万人,到2035年将达到2400万人。肿瘤专家认为,实现对肿瘤的早期发现、早期诊断、早期治疗,可以有效地预防癌症,其中早期诊断是关键。肿瘤标志物的发现使得早期诊断成为可能。肿瘤标志物是在肿瘤的发生和增殖过程中产生、反映肿瘤存在和生长的一类物质,因此,检测肿瘤标志物对癌症患者有极其重要的意义。研究发现,人体的很多肿瘤中都存在miRNA的差异表达,在这些差异表达中miRNA-21较为特殊,高表达的miRNA-21发挥着原癌基因的作用,一旦被激活,就会诱导或促进肿瘤的发生发展,因此,miRNA-21可作为有效的肿瘤标志物。

[0003] 目前miRNA-21的检测方法主要有Northern印迹分析、微阵列芯片法、实时荧光定量PCR法和原位杂交法等。Northern印记分析操作繁琐、耗时长、灵敏度低,检测时需要大量样品,并且对RNase污染非常敏感,实验中每一步操作不当都会影响实验结果;实时荧光定量PCR的低选择性和非线性目标的放大可能会导致基因表达的失真,只能用来量化miRNA前体的表达,而不能量化成熟的miRNA表达;微阵列芯片制作和检测费用很高,芯片上可利用体积很小,导致灵敏度不高。因此,建立一种灵敏、准确、快速、简便的miRNA-21检测方法是迫切需求。

[0004] 电化学发光免疫分析方法是电化学发光和免疫分析相结合的产物,它具有灵敏度高、响应快速、选择性强、重现性好、易于操作、步骤简单等优点,具有良好的应用前景。二硫化钼(MoS_2)是一类与石墨烯有着类似结构的层状无机化合物,具有较大的比表面积、良好的导电性以及较好的化学稳定性,其在电化学发光免疫传感器方面受到关注。目前,国内外还没有关于基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器的制备方法及其应用的相关研究报道。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种灵敏度高,特异性强、准确性高以及操作步骤简单,实验成本低的基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器的制备方法及其应用。

[0006] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为:一种基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 磁性纳米颗粒的制备

a. 制备 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒:将0.7~1.0 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和0.2~0.5 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于50~100 mL的二次水后加入到三口烧瓶中,通氮气,磁力搅拌混合均匀,温度升高到80~100℃,向三口烧瓶中缓慢滴加20~25wt%的氨水,调节pH=9~10,继续加热搅拌1~2 h后,停止加热,在氮气的保护下,搅拌回流,冷却至室温,制备得到的黑色沉淀物即为 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒,用二次水清洗至中性,乙醇中定容至50 mL;

b. 制备氨基化的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒:将步骤a所制备的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒溶液超声0.5~1 h,加入0.2~0.3 mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES),搅拌4~5 h,加入1~2 mL 0.1~0.5 mol/L硝酸溶液,继续搅拌3~4 h后,得到氨基化的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒,清洗3~5次,乙醇中定容至100 mL;

c. 制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 磁性纳米颗粒:将5~10 mL步骤b所制备的氨基化的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒溶液和10~20 mL 1wt%HAuCl₄在60~100 kHz的超声频率下混合,搅拌1 h后,缓慢加入30~50 mL 20~30 mmol/L柠檬酸三钠溶液,超声2~3 h,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 磁性纳米颗粒,二次水清洗,定容至20 mL;

(2) 信号单元((signal DNA & luminol)@ MoS_2)的合成

a. 制备单片层 MoS_2 :称取0.8~1 g MoS_2 粉末加入高压釜,随后加入30~35 mL 0.4~0.5 mol/L的正丁基锂正己烷溶液,将高压釜密封后放在100℃真空干燥箱中反应4~5 h,获得的产物过滤洗涤,在60℃真空烘箱中干燥得到锂离子插层的二硫化钼;取0.1~0.2 g 锂离子插层的二硫化钼分散在200~300 mL水中,室温下超声4~5 h,得到单分子层的 MoS_2 水溶液,冷冻干燥后得到 MoS_2 粉末;

b. 制备羧基化 MoS_2 :将0.04~0.05 g步骤a所制备的 MoS_2 粉末加入到40~50 mL 30~40 mmol/L的半胱氨酸溶液中,在超声仪中超声2~3 h,低速离心除去未完全剥离的 MoS_2 ,最终获得羧基化的 MoS_2 纳米片层;

c. 合成信号单元((signal DNA & luminol)@ MoS_2):取100~200 μL 1~2 mg/mL羧基化的 MoS_2 纳米片层溶液超声1 h,加入200~400 μL 偶联试剂,混合均匀,用0.5~1.0 mol/L盐酸调节溶液pH为4~6,常温震荡30~40 min,离心洗涤去除上清液以去除多余的偶联试剂,取沉淀定容至200~300 μL ;加入20~30 μL 1~5 $\mu\text{mol/L}$ 信号DNA(signal DNA)溶液和20~30 μL 0.05~0.1 mol/L鲁米诺(luminol)溶液,用1~2 mol/L氢氧化钠调节溶液pH为9~10,混合均匀,常温震荡3~4 h;最后加入10~20 μL 10~20 mmol/L巯基己醇(MCH)溶液封闭非特异性吸附位点,继续震荡1~2 h,用二次水清洗离心去除上清液以去除剩余的MCH、未结合的signal DNA和luminol,最后将沉淀分散在杂交缓冲液中定容至30~50 μL ,即得到信号单元((signal DNA & luminol)@ MoS_2)溶液;

(3) 捕获单元($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ -capture DNA)的合成

取50~100 μL $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 溶液超声5~10 min,加入20~50 μL 1~5 $\mu\text{mol/L}$ 捕获DNA(capture DNA)溶液,用DNA固定缓冲液定容至200 μL ,混合均匀,37℃下震荡3~4 h,暗处放置24 h,利用Au-S键合作用,capture DNA自组装在 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 的表面,清洗去掉未结合的capture DNA;滴加10~20 μL 10~20 mmol/L 巯基己醇溶液封闭非特异性吸附位点,用水清洗离心去上清以去除多余的MCH,取沉淀用水定容至100 μL ,即得到捕获单元($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ -capture DNA)溶液,4℃下保存备用;

(4) 电化学发光免疫传感器组装

a. 将直径为3~5 mm磁性玻碳电极依次用0.1、0.3、0.05 $\mu\text{mol/L}$ Al_2O_3 浆抛光成镜面,依次用无水乙醇、蒸馏水超声波清洗, N_2 吹干;

b. 取5~10 μL 捕获单元($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ -capture DNA)溶液滴涂于上述预处理过的磁性玻碳电极表面,通过磁性作用,捕获单元即被牢固地吸附在电极表面,然后将5~10 μL miRNA-21溶液滴涂在电化学发光免疫传感器上,置于37 $^\circ\text{C}$ 中孵育1~2 h,清洗;再取5~10 μL 步骤(2)所得的信号单元((signal DNA & luminol)@ MoS_2)溶液,置于37 $^\circ\text{C}$ 中孵育1~2 h后,清洗得到基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器。

[0007] 步骤(2)c中所述的杂交缓冲液的配方组成为10 mmol/L Tris-HCl,1.0 mmol/L EDTA,0.3 mol/L NaCl和1 mmol/L MgCl_2 ,pH为7.6~8.0;步骤(3)所述的DNA固定缓冲液的配方组成为10 mmol/L Tris-HCl,1.0 mmol/L EDTA,10 mmol/L TCEP和0.1 mol/L NaCl , pH为7.6~8.0。

[0008] 步骤(2)c中所述的偶联试剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶于水中得到,所述的偶联试剂中1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的摩尔浓度为10~100 mmol/L,所述的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的摩尔浓度为1~10 mmol/L。

[0009] 所述的信号DNA的核苷酸序列为:5' - NH_2 -(CH_2)₆-CCG GCT CAT CAT GTT-3';所述的捕获DNA的核苷酸序列为5' -SH-(CH_2)₆-CCG GCT CAA CAT CAG TCT GAT AAG CTA AAC ATG ATG AGC CGG-3';所述的miRNA-21的核苷酸序列为:5' -UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A-3'。

[0010] 上述基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器的应用,该基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器用于检测miRNA-21的方法具体步骤如下:采用基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器作为工作电极,采用铂电极作为对电极,Ag/AgCl电极作为参比电极,构成三电极体系;将三电极体系放入测试缓冲液,启动电化学反应,测量电化学发光强度,获得待测miRNA-21溶液对应的电化学发光强度值,根据电化学发光强度值与miRNA-21溶液浓度之间的定量关系;计算得到待测样品中miRNA-21的准确浓度。

[0011] 所述的测试缓冲液的配方组成为50 mmol/L Tris-HCl和1~5 mmol/L H_2O_2 ,pH为8.4~8.8。

[0012] 所述的电化学反应的条件如下:电位阶跃计时电流法,脉冲宽度:0.25 s;脉冲间隔:30 s;初始电压:0 V;脉冲电压:1.0 V。

[0013] 发明原理:本发明利用DNA的碱基互补配对,结合多功能化的二硫化钼和核壳结构的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$,构建了一种新型检测miRNA-21电化学发光免疫传感器。 MoS_2 本身化学性质稳定且表面不存在活性基团,但是经过锂离子插层剥离后其片层表面出现缺陷位点,反应活性较高,易与巯基发生化学配位络合作用,故可以通过半胱氨酸引入羧基基团用于固载其他物质。 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ -capture DNA作为传感器的捕获单元,具有以下功能:(1)capture DNA捕获miRNA-21;(2) $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 生物相容性好,比表面积大,有利于大量capture DNA被固定在电极表面。多功能化二硫化钼是将luminol和signal DNA同时修饰在二硫化钼的表面。作为传感器的信号单元,具有以下多种功能:(1)luminol作为电化学发光体;(2)miRNA打开茎环结构

的capture DNA, signal DNA即可与打开茎环结构的capture DNA形成双链, 结合到电极表面形成信号; (3) 半胱氨酸改性后的二硫化钼具有较大的表面积、丰富的羧基基团和良好的生物相容性, 可以负载大量的带有氨基的luminol和signal DNA, 大大增加了luminol和signal DNA的数量, 灵敏度得到了较大提高; (4) 使用二维片状结构的二硫化钼, 当其通过DNA杂交反应结合到在电极表面, 就如同在电极外部覆盖了一层网, 该结构可有效地保护内部杂交的双链结构, 同时多功能化二硫化钼可有效地延展电极的OHP(赫姆霍兹面), 使所有标记在二硫化钼上的luminol都可参与电化学反应, 从而产生有效的电化学发光信号。

[0014] 本发明利用碱基的互补配对原理, capture DNA通过Au-S键固定在电极表面, 此时, 茎环结构的capture DNA处于“闭合”状态, 当miRNA-21不存在时, capture DNA和signal DNA无法形成双链, 信号单元也无法连接到电极表面; 当miRNA-21存在时, 捕获单元中的capture DNA的茎环打开, 和miRNA-21进行杂交, 随后, 和信号单元中的signal DNA进一步杂交, 多功能化二硫化钼通过这种碱基互补配对被结合到电极表面之后, 在电化学反应的激发下, luminol即产生稳定的发光信号。肿瘤标志物miRNA-21的浓度越大, 结合的luminol越多, 电化学发光强度越高, 电化学发光强度与miRNA-21浓度的对数之间呈线性关系。据此可以实现样品中miRNA-21的未知浓度的检测。

[0015] 与现有技术相比, 本发明的优点在于:

(1) 高灵敏度, 首先, 传统电化学发光免疫分析方法, 是将电化学发光物质标记在肿瘤标志物抗体或者纳米材料上, 可以标记的数量很有限, 本发明使用的二硫化钼, 表面积大, 可以大幅度提高电化学发光体的标记数量, 同时, 二维结构的二硫化钼可有效延展电极表面的OHP, 使所有标记在信号单元中的电化学发光体都是有效的, 就如同直接结合在电极表面。

[0016] (2) 高特异性, 常见其他肿瘤标志物对本检测体系均无干扰。原因在于: 本发明是基于核酸分子之间碱基互补配对原则而构建的电化学发光免疫传感器, 干扰物质不是特定capture DNA的目标物, 因此待测液中的干扰物质并不能与特定capture DNA结合, capture DNA的茎环结构不能被打开, 无法和信号单元中的signal DNA杂交, 不能产生ECL信号, 故对本检测体系无干扰。

[0017] (3) 结果准确, 回收率均在90%~110%之间。

[0018] (4) 制备与检测方法试剂用量少、检测速度快。将捕获单元($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ -capture DNA)滴涂于磁性玻碳电极表面之后, 即可一步构建成电化学发光免疫传感器, 制备方法极其简单; 孵育完成后, 即可检测得到即时的电化学发光信号, 实现定量检测。

[0019] 综上所述, 本发明制备一种基于多功能化二硫化钼的miRNA-21的电化学发光免疫传感器, 消除了传统“夹心式”电化学发光免疫传感器灵敏度提升的瓶颈, 具有高灵敏度、高特异性、简单、快速、易于操作等优点, 可以实现对超低浓度miRNA-21的检测, 具有良好的应用前景。

附图说明

[0020] 图1 基于多功能化二硫化钼检测miRNA-21的电化学发光免疫传感器的制备流程和检测原理图;

图2 多功能化二硫化钼的制备流程图;

图3 不同浓度miRNA-21的ECL信号(y)—浓度(x)对数线性图;

图4 本发明制备的miRNA-21传感器分别对空白(blank)、500 pmol/L单碱基错配miRNA-21(1MT)、500 pmol/L三碱基错配miRNA-21(3MT)、500 pmol/L非互补序列(NC)和1 fmol/L miRNA-21(target)测得的电化学发光信号图。

具体实施方式

[0021] 以下结合附图实施例对本发明作进一步详细描述。

[0022] 具体实施例一

实施例1

一种基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器的制备方法,如图1所示,包括以下步骤:

(1) $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 磁性纳米颗粒的制备方法

a. 制备 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒:将0.85 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和0.35 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于80 mL的二次水后加入到三口烧瓶中,通氮气,磁力搅拌混合均匀,温度升高到 90°C ,向三口烧瓶中缓慢滴加22wt%的氨水,调节 $\text{pH}=9\sim 10$,继续加热搅拌1.5 h后,停止加热,在氮气的保护下,搅拌回流,冷却至室温,制备得到的黑色沉淀物即为 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒,用二次水清洗至中性,乙醇中定容至50 mL;

b. 制备氨基化的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒:将步骤a所制备的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒溶液超声0.8 h,加入0.25 mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES),搅拌4.5 h,加入1.5 mL 0.3 mol/L硝酸溶液,继续搅拌3.5 h后,得到氨基化的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒,清洗3~5次,乙醇中定容至100 mL;

c. 制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 磁性纳米颗粒:将8 mL步骤b所制备的氨基化的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒溶液和15 mL 1wt% HAuCl_4 在80 kHz的超声频率下混合,搅拌1 h后,缓慢加入40 mL 25 mmol/L柠檬酸三钠溶液,超声2.5 h,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 磁性纳米颗粒,二次水清洗,定容至20 mL;

(2) 信号单元((signal DNA & luminol)@ MoS_2)的合成方法

a. 制备单片层 MoS_2 :称取0.9 g MoS_2 粉末加入高压釜,随后加入32 mL 0.45 mol/L的正丁基锂正己烷溶液,将高压釜密封后放在 100°C 真空干燥箱中反应4.5 h,获得的产物过滤洗涤,在 60°C 真空烘箱中干燥得到锂离子插层的二硫化钼;取0.15 g 锂离子插层的二硫化钼分散在250 mL水中,室温下超声4.5 h,得到单分子层的 MoS_2 水溶液,冷冻干燥后得到 MoS_2 粉末;

b. 制备羧基化 MoS_2 :将0.045 g步骤a所制备的 MoS_2 粉末加入到45 mL 35 mmol/L的半胱氨酸溶液中,在超声仪中超声2.5 h,低速离心除去未完全剥离的 MoS_2 ,最终获得羧基化的 MoS_2 纳米片层;

c. 合成信号单元((signal DNA & luminol)@ MoS_2):多功能化二硫化钼的制备流程图如图2所示,取150 μL 1.5 mg/mL羧基化的 MoS_2 纳米片层溶液超声1 h,加入300 μL 偶联试剂,混合均匀,用0.8 mol/L盐酸调节溶液 pH 为4~6,常温震荡35 min,离心洗涤去除上清液以去除多余的偶联试剂,取沉淀定容至250 μL ;加入25 μL 3 $\mu\text{mol/L}$ 信号DNA(signal DNA)溶液和25 μL 0.08 mol/L鲁米诺(luminol)溶液,用1.5 mol/L氢氧化钠调节溶液 pH 为9~10,混合均匀,常温震荡3.5 h;最后加入15 μL 15 mmol/L巯基己醇(MCH)溶液封闭非特异

性吸附位点,继续震荡1.5 h,用二次水清洗离心去除上清液以去除剩余的MCH、未结合的signal DNA和luminol,最后将沉淀分散在杂交缓冲液中定容至40 μL ,即得到信号单元((signal DNA & luminol)@MoS₂)溶液;其中信号DNA的核苷酸序列为:5'-NH₂-(CH₂)₆-CCG GCT CAT CAT GTT-3';其中偶联试剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶于水中得到,偶联试剂中1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的摩尔浓度为50 mmol/L, N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的摩尔浓度为5 mmol/L;杂交缓冲液的配方组成为10 mmol/L Tris-HCl,1.0 mmol/L EDTA,0.3 mol/L NaCl和1 mmol/L MgCl₂,pH为7.6~8.0;

(3) 捕获单元(Fe₃O₄@Au-capture DNA)的合成方法

取80 μL Fe₃O₄@Au溶液超声80 min,加入35 μL 3 $\mu\text{mol/L}$ 捕获DNA(capture DNA)溶液,用DNA固定缓冲液定容至200 μL ,混合均匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 下震荡3.5 h,暗处放置24 h,利用Au-S键合作用,capture DNA自组装在Fe₃O₄@Au的表面,清洗去掉未结合的capture DNA;滴加15 μL 15 mmol/L 巯基己醇溶液封闭非特异性吸附位点,用水清洗离心去上清以去除多余的MCH,取沉淀用水定容至100 μL ,即得到捕获单元(Fe₃O₄@Au-capture DNA)溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用;其中DNA固定缓冲液的配方组成为10 mmol/L Tris-HCl,1.0 mmol/L EDTA,10 mmol/L TCEP和0.1 mol/L NaCl ,pH为7.6~8.0;捕获DNA的核苷酸序列为5'-SH-(CH₂)₆-CCG GCT CAA CAT CAG TCT GAT AAG CTA AAC ATG ATG AGC CGG-3' ;

(4) 电化学发光免疫传感器组装

a. 将直径为3~5 mm磁性玻碳电极依次用0.1、0.3、0.05 $\mu\text{mol/L}$ Al₂O₃浆抛光成镜面,依次用无水乙醇、蒸馏水超声波清洗,N₂吹干;

b. 取8 μL 捕获单元(Fe₃O₄@Au-capture DNA)溶液滴涂于上述预处理过的磁性玻碳电极表面,通过磁性作用,捕获单元即被牢固地吸附在电极表面,然后将8 μL miRNA-21溶液滴涂在电化学发光免疫传感器上,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 中孵育1.5 h,清洗;再取8 μL 步骤(2)所得的信号单元((signal DNA & luminol)@MoS₂)溶液,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 中孵育1.5 h后,清洗得到基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器。其中miRNA-21的核苷酸序列为:5'-UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A-3' 。

[0023] 实施例2

同上述实施例1,其区别在于:

步骤(1)Fe₃O₄@Au磁性纳米颗粒的制备方法中:将0.7 g FeCl₃·6H₂O和0.2 g FeCl₂·4H₂O溶于50 mL的二次水后加入到三口烧瓶中,通氮气,磁力搅拌混合均匀,温度升高到80 $^{\circ}\text{C}$,向三口烧瓶中缓慢滴加20wt%的氨水,调节pH=9~10,继续加热搅拌1.5 h;将Fe₃O₄磁性纳米颗粒溶液超声0.5 h,加入0.2 mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷,搅拌4 h,加入1 mL 0.5 mol/L硝酸溶液,继续搅拌3 h;将5 mL氨基化的Fe₃O₄磁性纳米颗粒溶液和10 mL 1wt% HAuCl₄在60 kHz的超声频率下混合,搅拌1 h后,缓慢加入30 mL 30 mmol/L柠檬酸三钠溶液,超声2 h。

[0024] 步骤(2)信号单元的合成方法中:称取0.8 g MoS₂粉末加入高压釜,随后加入30 mL 0.5 mol/L的正丁基锂正己烷溶液,将高压釜密封后放在100 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥箱中反应4 h;取0.1 g 锂离子插层的二硫化钼分散在200 mL水中,室温下超声4 h;将0.04 g MoS₂粉末加入到40 mL 40 mmol/L的半胱氨酸溶液中,在超声仪中超声2 h;取100 μL 2 mg/mL羧基

化的 MoS_2 纳米片层溶液超声1 h,加入200 μL 偶联试剂,混合均匀,用0.5 mol/L盐酸调节溶液pH为4~6,常温震荡30 min,离心洗涤去除上清液,取沉淀定容至200 μL ;加入20 μL 5 $\mu\text{mol/L}$ 信号DNA溶液和20 μL 0.1 mol/L鲁米诺溶液,用1 mol/L氢氧化钠调节溶液pH为9~10,混合均匀,常温震荡3 h;最后加入20 μL 10 mmol/L巯基乙醇溶液,继续震荡1 h,用二次水清洗离心去除上清液,最后将沉淀分散在杂交缓冲液中定容至30 μL ;偶联试剂中1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的摩尔浓度为10 mmol/L,所述的N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)的摩尔浓度为10 mmol/L。

[0025] 步骤(3)捕获单元的合成方法中:取50 μL $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 溶液超声5 min,加入20 μL 5 $\mu\text{mol/L}$ 捕获DNA溶液,用DNA固定缓冲液定容至200 μL ,混合均匀,37 $^\circ\text{C}$ 下震荡4 h,暗处放置24 h,滴加10 μL 20 mmol/L 巯基乙醇溶液封闭非特异性吸附位点,用水清洗离心去上清以去除多余的捕获DNA和MCH,取沉淀用水定容至100 μL 。

[0026] 步骤(4)电化学发光免疫传感器组装中:取5 μL 捕获单元溶液滴涂于预处理过的磁性玻碳电极表面,然后将5 μL miRNA-21溶液滴涂在电化学发光免疫传感器上,置于37 $^\circ\text{C}$ 中孵育1 h,清洗;再取5 μL 信号单元溶液,置于37 $^\circ\text{C}$ 中孵育1 h后,清洗即可。

[0027] 实施例3

同上述实施例1,其区别在于:

步骤(1) $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 磁性纳米颗粒的制备方法中:将1.0 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和0.5 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于100 mL的二次水后加入到三口烧瓶中,通氮气,磁力搅拌混合均匀,温度升高到100 $^\circ\text{C}$,向三口烧瓶中缓慢滴加25wt%的氨水,调节pH=9~10,继续加热搅拌2 h;将 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒溶液超声1 h,加入0.3 mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷,搅拌5 h,加入2 mL 0.1 mol/L硝酸溶液,继续搅拌4 h;将10 mL氨基化的 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒溶液和20 mL 1wt% HAuCl_4 在100 kHz的超声频率下混合,搅拌1 h后,缓慢加入50 mL 20 mmol/L柠檬酸三钠溶液,超声3 h。

[0028] 步骤(2)信号单元的合成方法中:称取1 g MoS_2 粉末加入高压釜,随后加入35 mL 0.4 mol/L的正丁基锂正己烷溶液,将高压釜密封后放在100 $^\circ\text{C}$ 真空干燥箱中反应5 h;取0.2 g 锂离子插层的二硫化钼分散在300 mL水中,室温下超声5 h;将0.05 g MoS_2 粉末加入到50 mL 30 mmol/L的半胱氨酸溶液中,在超声仪中超声3 h;取200 μL 1 mg/mL羧基化的 MoS_2 纳米片层溶液超声1 h,加入400 μL 偶联试剂,混合均匀,用1.0 mol/L盐酸调节溶液pH为4~6,常温震荡40 min,离心洗涤去除上清液,取沉淀定容至300 μL ;加入30 μL 1 $\mu\text{mol/L}$ 信号DNA溶液和30 μL 0.05 mol/L鲁米诺溶液,用2 mol/L氢氧化钠调节溶液pH为9~10,混合均匀,常温震荡4 h;最后加入10 μL 20 mmol/L巯基乙醇溶液,继续震荡2 h,用二次水清洗离心去除上清液,最后将沉淀分散在杂交缓冲液中定容至50 μL ;其中偶联试剂中1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的摩尔浓度为100mmol/L,所述的N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)的摩尔浓度为1 mmol/L。

[0029] 步骤(3)捕获单元的合成方法中:取100 μL $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 溶液超声10 min,加入50 μL 1 $\mu\text{mol/L}$ 捕获DNA溶液,用DNA固定缓冲液定容至200 μL ,混合均匀,37 $^\circ\text{C}$ 下震荡4 h,暗处放置24 h,滴加20 μL 10 mmol/L 巯基乙醇溶液封闭非特异性吸附位点,用水清洗离心去上清以去除多余的捕获DNA和MCH,取沉淀用水定容至100 μL 。

[0030] 步骤(4)电化学发光免疫传感器组装中:取10 μL 捕获单元溶液滴涂于预处理过的

磁性玻碳电极表面,然后将10 μL miRNA-21溶液滴涂在电化学发光免疫传感器上,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 中孵育2 h,清洗;再取10 μL 信号单元溶液,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 中孵育2 h后,清洗即可。

[0031] 具体实施例二

一种利用具体实施例一制备的基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器检测miRNA-21的方法,具体步骤如下:

取5~10 μL 具体实施例一步骤(3)制备的捕获单元溶液滴涂于预处理过的磁性玻碳电极表面,然后分别将一系列不同浓度的5~10 μL miRNA-21溶液滴涂在电化学发光免疫传感器上,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 中孵育1~2 h,清洗;再取5~10 μL 信号单元溶液,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 中孵育1~2 h后,清洗;以此作为工作电极,采用铂电极作为对电极,Ag/AgCl电极作为参比电极,构成三电极体系;将三电极体系放入测试缓冲液,启动电化学反应,测量电化学发光强度;获得一系列不同浓度的miRNA-21溶液对应的电化学发光强度值,建立电化学发光强度值与miRNA-21溶液浓度之间的定量关系;根据这个定量关系可以检测样品中miRNA-21的未知浓度。上述测试缓冲液的配方组成为50 mmol/L Tris-HCl和1~5 mmol/L H_2O_2 ,pH为8.4~8.8。电化学反应的条件如下:电位阶跃计时电流法,脉冲宽度:0.25 s;脉冲间隔:30 s;初始电压:0 V;脉冲电压:1.0 V。

[0032] 不同浓度miRNA-21的ECL信号(y)一浓度(x)对数线性图如图3所示,线性方程为: $y = 1531.65 * \log x + 6125.30$,相关系数 $R^2 = 0.9965$,由图3表明,该传感器的线性范围为1 fmol/L~10 pmol/L,检测限为0.3 fmol/L,线性良好,可以用于未知样品中miRNA-21浓度的检测。

[0033] 具体实施例三

特异性试验设计及结果分析

将上述具体实施例一制备的基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器,分别对空白(blank)、500 pmol/L单碱基错配miRNA-21(1MT)、500 pmol/L三碱基错配miRNA-21(3MT)、500 pmol/L非互补序列(NC)和1 fmol/L miRNA-21(target)进行检测。结果如图4所示,在500 pmol/L单碱基错配miRNA-21存在的情况下,该传感器的电化学发光强度在800左右,小于1 fmol/L miRNA-21的电化学发光强度1600左右,这表明碱基错配miRNA-21对miRNA-21无显著干扰,所以此传感器有较好的选择性。其中单碱基错配(1MT)miRNA-21的核苷酸序列为:5'-UAG CUU AUC AGA CUG AUG CUG A-3';三碱基错配(3MT)miRNA-21的核苷酸序列为:5'-UAG CAU AUC ACA CUG AUG CUG A-3';非互补序列(NC)的核苷酸序列为:5'-ACC GAA CAG GAG GAA UCU CAC G-3'。

[0034] 具体实施例四

为验证本方法在临床应用的价值,在空白人血清中加入miRNA-21标准溶液作为实际样品,采用加标回收的方法对人体血清样品中不同浓度的miRNA-21进行了检测,检测方法如上述具体实施例二所述,结果如表1所示。

[0035] 表1 人体血清中miRNA-21的检测(n=5)

血清样品	加标量	检出量	RSD (%)	回收率 (%)
1	10 (pmol/L)	10.63 ± 0.52 (pmol/L)	4.9	106.3
2	1 (pmol/L)	0.942 ± 0.069 (pmol/L)	7.3	94.2
3	100 (fmol/L)	91.5 ± 4.5 (fmol/L)	4.9	91.5
4	10 (fmol/L)	10.75 ± 0.56 (fmol/L)	5.2	107.5
5	1 (fmol/L)	0.927 ± 0.059 (fmol/L)	6.4	92.7

由表1检测结果可知,结果的相对标准偏差(RSD)小于7.3%,回收率为91.5~107.5%,表明本发明对于血清中不同浓度miRNA-21的检测精密度高,结果准确可靠。

[0036] 以上结果说明,本发明基于一种多功能化二硫化钼的miRNA-21的电化学发光免疫传感器,灵敏度高,检测限低,选择性好,操作简单,检测结果准确可靠。实验过程中只需要将捕获单元($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ -capture DNA)滴涂到磁性电极表面即可实现电化学发光免疫传感器的一步制备,进而实现miRNA-21高灵敏度、强特异性、简单、快速检测。

[0037] 当然,上述说明并非对本发明的限制,本发明也并不限于上述举例。本技术领域的普通技术人员在本发明的实质范围内,做出的变化、改型、添加或替换,也应属于本发明的保护范围。

[0001]

序 列 表

<110> 宁波大学

<120> 基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器的制备方法及其应用

<130>

<160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 信号DNA

<400> 1

5' -NH₂- (CH₂)₆-CCG GCT CAT CAT GTT-3' 15

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 捕获DNA

<400> 2

5' -SH- (CH₂)₆-CCG GCT CAA CAT CAG TCT GAT AAG CTA AAC ATG ATG AGC CCG-3'

42

<210> 3

	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	miRNA-21	
	<400>	3	
	5'	-UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A-3'	22
	<210>	4	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	单碱基错配 miRNA-21	
[0002]	<400>	4	
	5'	-UAG CUU AUC AGA CUG AUG CUG A-3'	22
	<210>	5	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	三碱基错配 miRNA-21	
	<400>	5	
	5'	-UAG CAU AUC ACA CUG AUG CUG A-3'	22
	<210>	6	
	<211>	22	
	<212>	DNA	

-
- <213> 人工序列
- <220>
- [0003] <223> 非互补序列
- <400> 6
- 5' -ACC GAA CAG GAG GAA UCU CAC G-3' 22

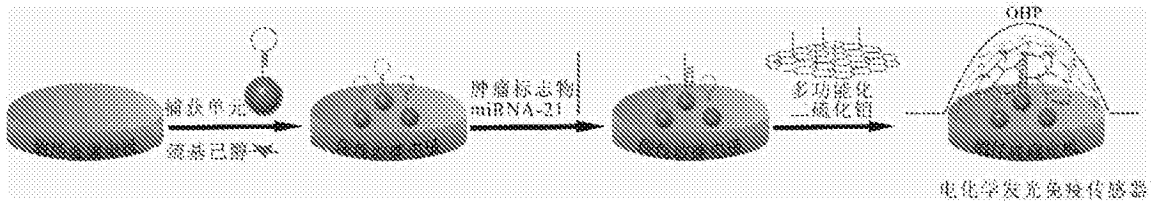


图1



图2

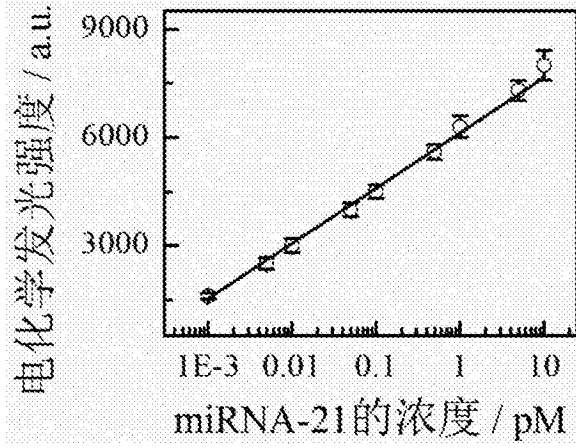


图3

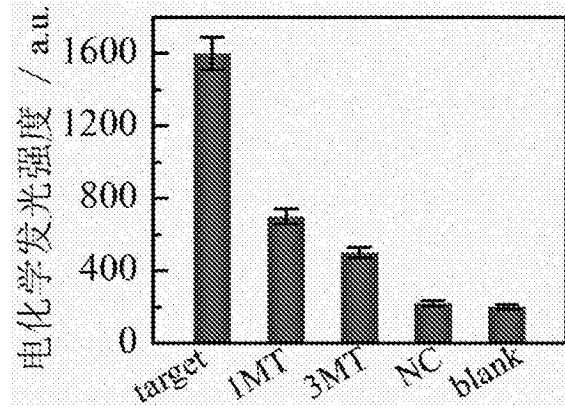


图4

专利名称(译)	基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器的制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN106568936A	公开(公告)日	2017-04-19
申请号	CN201610888938.0	申请日	2016-10-12
[标]申请(专利权)人(译)	宁波大学		
申请(专利权)人(译)	宁波大学		
当前申请(专利权)人(译)	宁波大学		
[标]发明人	卢静 郭智勇 胡宇芳 沙玉红 武琳 俞欣辰 郭富米		
发明人	卢静 郭智勇 胡宇芳 沙玉红 武琳 俞欣辰 郭富米		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/53 G01N33/54326 G01N33/54346		
代理人(译)	何仲		
其他公开文献	CN106568936B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了基于多功能化二硫化钼的miRNA-21电化学发光免疫传感器的制备方法及其应用，特点是包括将制备的Fe₃O₄磁性纳米颗粒进行氨基化，然后与氯金酸反应制备Fe₃O₄@Au磁性纳米颗粒的步骤；将制备的单片层MoS₂进行羧基化，后依次与偶联试剂、信号DNA溶液和鲁米诺溶液反应，最后加入巯基乙醇溶液震荡清洗得到信号单元溶液的步骤；将Fe₃O₄@Au与捕获DNA溶液反应得到捕获单元溶液的步骤；最后将捕获单元溶液滴涂于磁性玻碳电极表面，然后依次将miRNA-21、信号单元溶液滴涂于磁性玻碳电极表面即可，优点是灵敏度高，特异性强、准确性高以及操作步骤简单，实验成本低。

