



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110514730 A

(43)申请公布日 2019. 11. 29

(21)申请号 201910772227.0

(22)申请日 2019.08.21

(71)申请人 南通大学

地址 226019 江苏省南通市崇川区啬园路9号

(72)发明人 刘扬 朱晨晨 邓安平 鲍宁
周亭含 缪胡颢 许琴

(74)专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 钱超

(51)Int.Cl.

G01N 27/49(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

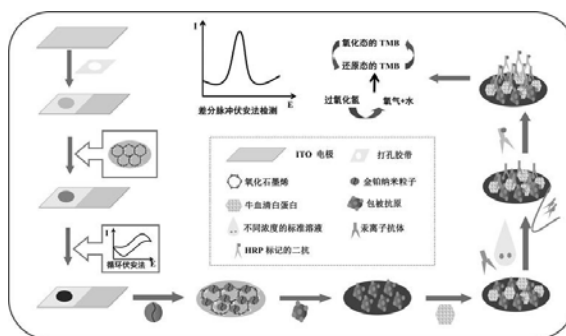
权利要求书2页 说明书8页 附图7页

(54)发明名称

一种可抛型汞离子传感器的制备方法及使用
方法

(57)摘要

本发明公开了一种可抛型汞离子免疫传感器的制备方法和使用方法,合成石墨烯-金-铂纳米复合物,应用氧化铟锡玻璃作为工作电极,利用石墨烯-金-铂优异的电子传导能力和固定抗原的能力,结合电化学检测技术,制备一种新的对汞离子特异性检测的免疫传感器,并应用于汞离子的检测。所制备的传感器可产生电流信号,信号值与汞离子浓度呈现良好的线性范围和较
低的检测限。



1. 一种可抛型汞离子传感器的制备方法,其特征在于,步骤为:

第一步:氧化铟锡玻璃ITO电极的切割和清洗:将ITO导电玻璃用玻璃刀裁剪成 12×20 mm的薄片,接着对ITO进行清洗,用丙酮、乙醇和双蒸水分别进行超声水浴10分钟,洗好后放进烘箱进行烘干备用;

第二步:用打孔器在透明胶带上打出直径为4mm的孔,然后贴到烘好的ITO玻璃上,用来固定电极反应面积,制备得到ITO工作电极;

第三步:滴加 $5.0 \mu\text{L}$ 的 0.5 mg/mL 的氧化石墨烯GO溶液在ITO工作电极表面孔内,红外灯下烘干,形成GO/ITO电极;

第四步:用银/氯化银电极做参比电极、饱和甘汞电极作为对电极,将GO/ITO电极作为工作电极,在含有 1.0 mg/mL 氯金酸和 1.0 mg/mL 氯铂酸的溶液里,进行循环伏安法电化学沉积金-铂合金,制备成氧化石墨烯-金-铂GO-Au-Pt纳米复合物,形成GO-Au-Pt/ITO电极;

第五步:将 0.05 mmol 氯化甲基汞溶解于 $200.0 \mu\text{L}$ 含有浓度为 1.0 mol/L NaOH的甲醇溶液中,加入 0.01 mmol/L 的6-巯基烟酸 5.0 mL ,再与 $200.0 \mu\text{L}$ 浓度为 1.0 mg/mL 卵白蛋白OVA混合后发生耦合,所得 Hg^{2+} -OVA作为包被抗原,用磷酸盐吐温缓冲液PBST清洗GO-Au-Pt/ITO电极,每次使用PBST $20.0 \mu\text{L}$,清洗三次,

滴加 $10.0 \mu\text{L}$ 的浓度为 $20.0 \mu\text{g/mL}$ Hg^{2+} -OVA于GO-Au-Pt/ITO电极,在 4°C 的环境下进行孵育过夜,形成 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极;

第六步:滴加 $10.0 \mu\text{L}$ 浓度为 $20.0 \mu\text{g/mL}$ 的牛血清白蛋白BSA在 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面,在 4°C 的环境下培养30 min,封闭 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面非特异性的活性位点;

第七步:用PBST清洗第六步封闭后的 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极,每次使用PBST $20.0 \mu\text{L}$,清洗三次,

滴加 $5.0 \mu\text{L}$ 的不同浓度 Hg^{2+} 标准溶液和 $5.0 \mu\text{L}$ 浓度为 $20.0 \mu\text{g/mL}$ 的抗 Hg^{2+} 的多克隆抗体mAb在清洗后的 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面,并在 4°C 的环境下孵育30 min,再用PBST溶液清洗三次,每次使用PBST $20.0 \mu\text{L}$,形成mAb/ Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极;所述不同浓度 Hg^{2+} 标准溶液浓度分别为 1800.0 、 1500 、 1200.0 、 1000.0 、 500.0 、 100.0 、 10.0 、 5.0 、 0.5 和 0.1 ng/mL ;

第八步:将 $10.0 \mu\text{L}$ 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG即HRP-GaR IgG加入到 1.0 mL PBS 7.0 中摇匀后滴加 $10.0 \mu\text{L}$ 在mAb/ Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面,并在 4°C 的环境下培养30 min,然后用PBST溶液清洗三次,每次使用PBST $20.0 \mu\text{L}$,制得HRP-GaR IgG/mAb/ Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO可抛型汞离子传感器。

2. 根据权利要求1所述的一种可抛型汞离子传感器的制备方法,其特征在于:所述第四步中循环伏安法电化学沉积金-铂合金的具体的参数,电位范围: $-0.35 \sim 0.7 \text{ V}$,扫描速度 50 mV/s ,扫描段数:10段,采样间隔: 0.001 V ,静止时间: 0 s ,灵敏度: 1×10^{-4} ,然后室温下自然晾干。

3. 根据权利要求1所述的一种可抛型汞离子传感器的制备方法,其特征在于:所述第七步中在竞争阶段,标准 Hg^{2+} 溶液和包被抗原(Hg^{2+} -OVA)争夺有限且固定量的mAb,随着 Hg^{2+} 浓度的升高,结合在工作电极上的mAb抗体的量逐渐减少,最后检测的电信号和表面的免疫复合物量呈正比。

4. 根据权利要求1所述的一种可抛型汞离子传感器的制备方法,其特征在于,所述第四步得到的GO-Au-Pt/ITO固定免疫物的能力通过以下测试可以得到:

第一步:将荧光标记抗体即DyLight 549标记了的的山羊抗兔IgG(DL549-GaR IgG)用PBS 7.0溶液稀释成5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0和35.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度备用;

第二步:将裸ITO电极、GO/ITO电极和GO-Au-Pt/ITO电极分为3组,每组8个,分别加入如下8个浓度的DL549-GaR IgG:0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0和35.0 $\mu\text{g/mL}$,孵育8个小时,然后用PBST溶液清洗三次,每次使用PBST 20.0 μL ,用荧光扫描仪记录荧光图像;

第三步:将第二步得到的荧光图像用Image Pro-Plus 6.0用来计算荧光强度IOD和面积AREA的数值,荧光密度的平均值则是通过IOD/AREA计算得到,使用SPSS 16.0软件通过单因素方差分析进行显著性检验。

5. 一种权利要求1-4任一所述制备方法制得的可抛型汞离子传感器的使用方法,其特征在于,步骤为:

第一步:使用电化学工作站以三电极体系进行测定,以HRP-GaR IgG/mAb/Hg²⁺-OVA/GO-Au-Pt/ITO为工作电极,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为对电极,组建三电极系统;

第二步:配制5.0 mL含有1% H₂O₂和5% 3,3',5,5'-四甲基联苯胺TMB的磷酸-氯化钠缓冲液PBS,用1.0 mol/L NaOH调节其pH为7.0,作为缓冲液备用;

第三步:采用差分脉冲伏安法DPV在缓冲液中进行测试,测试参数有:扫描电压范围为-0.03~ 0.3 V,振幅为0.05 V,脉冲宽度为0.06 s,采样宽度为0.02 s,脉冲间隔为0.5 s,静止时间为0.0 s,灵敏度为 1×10^{-4} ,按照不同浓度的汞离子标准溶液浓度得到DPV数据图,再根据DPV数据图测得的峰电流 μA 为纵坐标,以不同浓度的汞离子标准溶液浓度 ng/mL 为横坐标,通过电流信号与汞离子标准溶液浓度之间的关系,绘制工作曲线;

第四步:待测样品溶液代替汞离子标准溶液进行检测,检测的结果通过工作曲线查得。

一种可抛型汞离子传感器的制备方法和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及汞离子检测的应用技术领域,尤其涉及一种可抛型汞离子传感器的制备方法和使用方法。

背景技术

[0002] 汞是环境中毒性最强的重金属元素之一。在我国经济快速发展的现状下,燃料和矿物的燃烧挥发、电池等工业生产排放的废水、含汞废弃物的排放等都使得环境中汞的含量聚集增加。而排放在环境中的汞以固体废物、废水、废气的形式进入自然界,引起环境中长期和反复的汞污染。环境中的汞污染可以通过食物链等形式进入生物反复累积,且自身代谢难以排出。汞中毒轻则造成口腔炎症、手颤、神经系统紊乱,慢性汞中毒不仅会造成四肢发麻,运动失调、视野变窄、听力困难等症状,严重者更会发生心力衰竭而死亡。因此,发展一种快速、简便、灵敏、准确、低成本的检测汞装置在环境保护、健康促进等方面都有着非常重要的意义和迫切的需求。

[0003] 目前,关于汞的检测已经有报道的方法有:原子发射光谱法AES、电感耦合等离子体质谱ICP-MS、冷蒸气或者氢化物原子荧光光谱法CV-AAS、高效液相色谱法HPLC、分光光度法、酶联免疫吸附法ELISA,生物传感器ESN等。上述方法都存在一定的缺陷:借助昂贵和笨重的仪器、成本高、制备样品过程复杂、检测时间长、需要专业的检测人员操作、不符合一次性的要求等缺陷。因此,我们迫切需要建立一种简单,快速、经济的方法检测汞的含量。其中免疫方法与其他快速检测方法的结合如化学发光免疫传感器、表面拉曼光谱免疫传感器等均可以利用抗原与抗体之间的特异性结合,同时还可以解决传统方法的缺陷。尤其是电化学免疫传感器,因为具有灵敏度高、选择性好、操作简便、成本低廉、易于小型化、可连续快速、自动化检测分析等优点,在汞离子检测中具有良好的应用前景。

发明内容

[0004] 本发明提供一种可抛型汞离子传感器的制备方法和使用方法,解决现有技术中的应用阳极溶出伏安法检测的灵敏度和重现性都不高,而且抗干扰能力不够,会有其他重金属如铅等同时溶出而被检测的缺陷;而关于汞离子检测的可抛型免疫传感器很少有报道,或者集中在固体大电极上的实施,固体大电极需要专人清洗、抛光,只局限于实验室检测,不能做到一次性可抛型,而且成本很高等技术问题。

[0005] 本发明采用以下技术方案:一种可抛型汞离子传感器的制备方法,步骤为:

第一步:氧化铟锡玻璃ITO电极的切割和清洗:将ITO导电玻璃用玻璃刀裁剪成 12×20 mm的薄片,接着对ITO进行清洗,用丙酮、乙醇和双蒸水分别进行超声水浴10分钟,洗好后放进烘箱进行烘干备用;

第二步:用打孔器在透明胶带上打出直径为4mm的孔,然后贴到烘好的ITO玻璃上,用来固定电极反应面积,制备得到ITO工作电极;

第三步:滴加 $5.0 \mu\text{L}$ 的 0.5 mg/mL 的氧化石墨烯GO溶液在ITO工作电极表面孔内,红外

灯下烘干,形成GO/ITO电极;

第四步:用银/氯化银电极做参比电极、饱和甘汞电极作为对电极,将GO/ITO电极作为工作电极,在含有1.0 mg/mL氯金酸和1.0 mg/mL氯铂酸的溶液里,进行循环伏安法电化学沉积金-铂合金,制备成氧化石墨烯-金-铂GO-Au-Pt纳米复合物,形成GO-Au-Pt/ITO电极;

第五步:将0.05 mmol 氯化甲基汞溶解于200.0 μ L含有浓度为1.0 mol/L NaOH的甲醇溶液中,加入0.01 mmol/L的6-巯基烟酸5.0 mL,再与200.0 μ L浓度为1.0 mg/mL卵白蛋白OVA混合后发生耦合,所得 Hg^{2+} -OVA作为包被抗原,用磷酸盐吐温缓冲液PBST清洗GO-Au-Pt/ITO电极,每次使用PBST 20.0 μ L,清洗三次,滴加10.0 μ L的浓度为20.0 μ g/mL Hg^{2+} -OVA于GO-Au-Pt/ITO电极,在4℃的环境下进行孵育过夜,形成 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极;

第六步:滴加10.0 μ L浓度为20.0 μ g/mL的牛血清白蛋白BSA在 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面,在4℃的环境下培养30 min,封闭 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面非特异性的活性位点;

第七步:用PBST清洗第六步封闭后的 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极,每次使用PBST 20.0 μ L,清洗三次,滴加5.0 μ L的不同浓度 Hg^{2+} 标准溶液和5.0 μ L浓度为20.0 μ g/mL的抗 Hg^{2+} 的多克隆抗体mAb在清洗后的 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面,并在4℃的环境下孵育30 min,再用PBST溶液清洗三次,每次使用PBST 20.0 μ L,形成mAb/ Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极;所述不同浓度 Hg^{2+} 标准溶液浓度分别为1800.0、1500.0、1200.0、1000.0、500.0、100.0、10.0、5.0、0.5和0.1 ng/mL;

第八步:将10.0 μ L辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG即HRP-GaR IgG加入到1.0 mL PBS 7.0中摇匀后滴加10.0 μ L在mAb/ Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面,并在4℃的环境下培养30 min,然后用PBST溶液清洗三次,每次使用PBST 20.0 μ L,制得HRP-GaR IgG/mAb/ Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO可抛型汞离子传感器。

[0006] 作为本发明的一种优选技术方案:所述第四步中循环伏安法电化学沉积金-铂合金的具体的参数,电位范围:-0.35~0.7 V,扫描速度50 mV/s,扫描段数:10段,采样间隔:0.001 V,静止时间:0 s,灵敏度: 1×10^{-4} ,然后室温下自然晾干。

[0007] 作为本发明的一种优选技术方案:所述第七步中在竞争阶段,标准 Hg^{2+} 溶液和包被抗原(Hg^{2+} -OVA)争夺有限且固定量的mAb,随着 Hg^{2+} 浓度的升高,结合在工作电极上的mAb抗体的量逐渐减少,最后检测的电信号和表面的免疫复合物量呈正比。

[0008] 作为本发明的一种优选技术方案:所述的GO-Au-Pt/ITO固定免疫物的能力通过以下测试可以得到:

第一步:将荧光标记抗体即DyLight 549标记了的山羊抗兔IgG(DL549-GaR IgG)用PBS 7.0溶液稀释成5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0和35.0 μ g/mL浓度备用;

第二步:将裸ITO电极、GO/ITO电极和GO-Au-Pt/ITO电极分为3组,每组8个,分别加入如下8个浓度的DL549-GaR IgG:0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0和35.0 μ g/mL,孵育8个小时,然后用PBST溶液清洗三次,每次使用PBST 20.0 μ L,用荧光扫描仪记录荧光图像;

第三步:将第二步得到的荧光图像用Image Pro-Plus 6.0用来计算荧光强度IOD和面积AREA的数值,荧光密度的平均值则是通过IOD/AREA计算得到,使用SPSS 16.0软件通过单因素方差分析进行显著性检验。

[0009] 另外,本发明还提供了所述制备方法制得的可抛型汞离子传感器的使用方法,包

括如下步骤:

第一步:使用电化学工作站以三电极体系进行测定,以HRP-GaR IgG/mAb/Hg²⁺-OVA/GO-Au-Pt/ITO为工作电极,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为对电极,组建三电极系统;

第二步:配制5.0 mL含有1% H₂O₂和5% 3,3',5,5'-四甲基联苯胺TMB的磷酸-氯化钠缓冲液PBS,用1.0 mol/L NaOH调节其pH为7.0,作为缓冲液备用;

第三步:采用差分脉冲伏安法DPV在缓冲液中进行测试,测试参数有:扫描电压范围为-0.03~ 0.3 V,振幅为0.05 V,脉冲宽度为0.06 s,采样宽度为0.02 s,脉冲间隔为0.5 s,静止时间为0.0 s,灵敏度为 1×10^{-4} ,按照不同浓度的汞离子标准溶液浓度得到DPV数据图,按照DPV数据图以不同浓度的汞离子标准溶液浓度为横坐标,测得的峰电流 μ A为纵坐标,通过所得的氧化峰电流信号与汞离子标准溶液浓度之间的关系,绘制工作曲线;

第四步:待测样品溶液代替汞离子标准溶液进行检测,检测的结果通过工作曲线查得。
[0010] 本发明所述一种可抛型汞离子传感器的制备方法和使用方法采用以上技术方案与现有技术相比,具有以下技术效果:

1、对汞离子显示出良好的线性范围和较低检测限低至0.03 ng/mL,所制得的该汞离子免疫传感器具有特异性强、灵敏度高、稳定性好、检测限低等优点,且成本低廉,一次性可抛,便于应用于环境中实时对汞离子的检测;

2、所制备的石墨烯-金-铂纳米复合物应用的电沉积方法环保、高效、简单迅速,条件控制稳定且易于批量生产和商品化,重现性和稳定性优异;

3、在氧化石墨烯这个二维的材料表面修饰金铂合金,一方面利用了氧化石墨烯较好的电化学生活性和更大的表面区域含有电活性位置,另一方面金铂合金的催化性能也有助于提高传感器的灵敏度,线性范围更宽,检测限更低,同时在固定免疫复合物上面体现了优良性质。这比纯粹的GO的性能优越;

5、利用ITO电极作为工作电极,摒弃了传统免疫传感器工作电极需要专人清洗、时间和人力成本都很高,而该发明的传感器一次性可抛,在实际环境中和床旁检测中应用更广泛;

6、利用竞争性免疫反应机制作为传感器的制备机理,准确性高,干扰小,避免其他常见汞离子检测常见的干扰,选择性得到了很大的提高。

[0011] 7、该汞离子免疫传感器具有特异性强、灵敏度高、稳定性好、检测限低等优点,且成本低廉,一次性可抛,便于应用于环境中实时对汞离子的检测。

附图说明

[0012] 图1是本申请可抛型汞离子传感器的制备过程图。

[0013] 图2是本申请ITO电极表面滴加氧化石墨烯以后形成GO/ITO电极的扫描电镜图。

[0014] 图3是本申请GO-Pt-Au/ITO在10K放大倍数下的扫描电镜图。

[0015] 图4是本申请GO-Pt-Au/ITO在20K放大倍数下的扫描电镜图。

[0016] 图5是本申请ITO电极表面滴加氧化石墨烯以后形成GO/ITO电极点扫下的能谱分析图。

[0017] 图6是本申请GO-Pt-Au/ITO即GO-Pt-Au纳米复合物修饰的ITO电极点扫下的能谱分析图。

[0018] 图7是本申请荧光标记GO-Au-Pt/ITO电极固定免疫复合物的能力分析图。

[0019] 图8是本申请不同浓度的汞离子溶液的电化学竞争免疫法得到的差分脉冲伏安DPV图。

[0020] 图9是本申请中通过差分脉冲伏安DPV法得到电流(μA)与汞离子的浓度(ng/mL)所做的工作曲线图。

[0021]

具体实施方式

[0022] 以下结合实例对本发明作进一步的描述,实施例仅用于对本发明进行说明,并不构成对权利要求范围的限制,本领域技术人员可以想到的其他替代手段,均在本发明权利要求范围内。

[0023] 荧光标记抗体标记DyLight 549的山羊抗兔IgG,购买于美国Abbkine试剂有限公司,牛血清蛋白(BSA)、卵白蛋白(OVA)和吐温-20购买于Sigma(圣路易斯,密苏里州,美国);3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB):阿拉丁中国有限公司(上海,中国);硝酸汞离子购买于多伦多化学品研究公司(多伦多,安森美,加拿大);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG结合物(HRP-GaR IgG)购买于中山金桥生物技术有限公司(北京,中国);包被抗原 Hg^{2+} -OVA和汞离子抗体的制备方法如下:0.05mmol 氯化甲基汞溶解于200.0 μL 含有1 mol/L NaOH的甲醇中,通过加入6-巯基烟酸,与卵白蛋白(OVA)混合后发生耦合反应,所得 Hg^{2+} -OVA作为免疫抗原,进行小鼠免疫和杂交瘤技术,制备得到汞离子的多克隆抗体,保存在 -40°C 中备用。

[0024] 实施例1:

如图1所示,一种可抛型汞离子传感器的制备方法,步骤为:

第一步:氧化铟锡玻璃ITO电极的切割和清洗:将ITO导电玻璃用玻璃刀裁剪成 $12\times 20\text{ mm}$ 的薄片,接着对ITO进行清洗,用丙酮、乙醇和双蒸水分别进行超声水浴10分钟,洗好后放进烘箱进行烘干备用;

第二步:用打孔器在透明胶带上打出直径为4mm的孔,然后贴到烘好的ITO玻璃上,用来固定电极反应面积,制备得到ITO工作电极;

第三步:滴加5.0 μL 的0.5 mg/mL的氧化石墨烯GO溶液在ITO工作电极表面孔内,红外灯下烘干,形成GO/ITO电极;

第四步:用银/氯化银电极做参比电极、饱和甘汞电极作为对电极,将GO/ITO电极作为工作电极,在含有1.0 mg/mL氯金酸和1.0 mg/mL氯铂酸的溶液里,进行循环伏安电化学沉积金-铂合金,制备成氧化石墨烯-金-铂GO-Au-Pt纳米复合物,形成GO-Au-Pt/ITO电极;

第五步:将0.05 mmol 氯化甲基汞溶解于200.0 μL 含有浓度为1.0 mol/L NaOH的甲醇溶液中,加入0.01 mmol/L的6-巯基烟酸5.0 mL,再与200.0 μL 浓度为1.0 mg/mL卵白蛋白OVA混合后发生耦合,所得 Hg^{2+} -OVA作为包被抗原,用磷酸盐吐温缓冲液PBST清洗GO-Au-Pt/ITO电极,每次使用PBST 20.0 μL ,清洗三次。滴加10.0 μL 的浓度为20.0 $\mu\text{g/mL}$ Hg^{2+} -OVA于GO-Au-Pt/ITO电极,在 4°C 的环境下进行孵育过夜,形成 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极;

第六步:滴加10.0 μL 浓度为20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的牛血清白蛋白BSA在 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面,在 4°C 的环境下培养30 min,封闭 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面非特异性的活性位点;

第七步：用PBST清洗第六步封闭后的 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极，每次使用PBST 20.0 μL ，清洗三次。滴加5.0 μL 的不同浓度 Hg^{2+} 标准溶液和5.0 μL 浓度为20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的抗 Hg^{2+} 的多克隆抗体mAb在清洗后的 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面，并在4℃的环境下孵育30 min，再用PBST溶液清洗三次，每次使用PBST 20.0 μL ，形成mAb/ Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极；所述不同浓度 Hg^{2+} 标准溶液浓度分别为1800.0、1500、1200.0、1000.0、500.0、100.0、10.0、5.0、0.5和0.1 ng/mL；

第八步：将10.0 μL 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG即HRP-GaR IgG加入到1.0 mL PBS 7.0中摇匀后滴加10.0 μL 在mAb/ Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面，并在4℃的环境下培养30 min，然后用PBST溶液清洗三次，每次使用PBST 20.0 μL ，制得HRP-GaR IgG/mAb/ Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO可抛型汞离子传感器。

[0025] 本发明制备了一种基于石墨烯-金-铂纳米复合物的竞争型免疫传感器，并实现对汞离子的高灵敏检测。将纳米金和铂粒子通过循环伏法电化学方法共沉积在石墨烯涂层表面，通过金-铂-氮键合方法将包被抗原 Hg^{2+} -OVA固定在氧化铟锡导电玻璃ITO电极表面，然后应用牛血清白蛋白BSA封闭非特异性的活性位点，制得汞离子的竞争型免疫传感器。在传感界面原位上，免疫复合物的中辣根过氧化物酶HRP标记的二抗可以催化过氧化氢 H_2O_2 和3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺TMB产生电流信号。电流信号增强与汞离子浓度的增加呈反比，应用差分脉冲伏安法DPV催化电流的大小，在对汞离子在0.1~1800.0 ng/mL显示出良好的线性范围，检测限低至0.03 ng/mL。本发明利用了石墨烯-金-铂纳米复合物优异的电催化性能和强大的电荷载体移动能力，同时电沉积的金铂可以增加电极表面活性面积并且与牢固的固定免疫复合物，这些都可以在一定程度上提高传感器的灵敏度及电化学催化活性，所制得的该汞离子免疫传感器具有特异性强、灵敏度高、稳定性好、检测限低等优点，且成本低廉，一次性可抛，便于应用于环境中实时对汞离子的检测。

[0026] 实施例2：

如图1所示，一种可抛型汞离子传感器的制备方法，步骤为：

第一步：氧化铟锡玻璃ITO电极的切割和清洗：将ITO导电玻璃用玻璃刀裁剪成12×20 mm的薄片，接着对ITO进行清洗，用丙酮、乙醇和双蒸水分别进行超声水浴10分钟，洗好后放进烘箱进行烘干备用；

第二步：用打孔器在透明胶带上打出直径为4mm的孔，然后贴到烘好的ITO玻璃上，用来固定电极反应面积，制备得到ITO工作电极；

第三步：滴加5.0 μL 的0.5 mg/mL的氧化石墨烯GO溶液在ITO工作电极表面孔内，红外灯下烘干，形成GO/ITO电极；

第四步：用银/氯化银电极做参比电极、饱和甘汞电极作为对电极，将GO/ITO电极作为工作电极，在含有1.0 mg/mL氯金酸和1.0 mg/mL氯铂酸的溶液里，进行循环伏安法电化学沉积金-铂合金，制备成氧化石墨烯-金-铂GO-Au-Pt纳米复合物，形成GO-Au-Pt/ITO电极；

第五步：将0.05 mmol 氯化甲基汞溶解于200.0 μL 含有浓度为1.0 mol/L NaOH的甲醇溶液中，加入0.01 mmol/L的6-巯基烟酸5.0 mL，再与200.0 μL 浓度为1.0 mg/mL卵白蛋白OVA混合后发生耦合，所得 Hg^{2+} -OVA作为包被抗原，用磷酸盐吐温缓冲液PBST清洗GO-Au-Pt/ITO电极，每次使用PBST 20.0 μL ，清洗三次。滴加10.0 μL 的浓度为20.0 $\mu\text{g/mL}$ Hg^{2+} -OVA于GO-Au-Pt/ITO电极，在4℃的环境下进行孵育过夜，形成 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极；

第六步:滴加10.0 μL 浓度为20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的牛血清白蛋白BSA在 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面,在4℃的环境下培养30 min,封闭 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面非特异性的活性位点;

第七步:用PBST清洗第六步封闭后的 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极,每次使用PBST 20.0 μL ,清洗三次。滴加5.0 μL 的不同浓度 Hg^{2+} 标准溶液和5.0 μL 浓度为20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的抗 Hg^{2+} 的多克隆抗体mAb在清洗后的 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面,并在4℃的环境下孵育30 min,再用PBST溶液清洗三次,每次使用PBST 20.0 μL ,形成mAb/ Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极;所述不同浓度 Hg^{2+} 标准溶液浓度分别为1800.0、1500、1200.0、1000.0、500.0、100.0、10.0、5.0、0.5和0.1 ng/mL;

第八步:将10.0 μL 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG即HRP-GaR IgG加入到1.0 mL PBS 7.0中摇匀后滴加10.0 μL 在mAb/ Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面,并在4℃的环境下培养30 min,然后用PBST溶液清洗三次,每次使用PBST 20.0 μL ,制得HRP-GaR IgG/mAb/ Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO可抛型汞离子传感器。

[0027] 图2 为ITO电极表面滴加氧化石墨烯以后形成GO/ITO电极的在10K放大倍数下的扫描电镜图,显示了固定于在ITO电极表面的氧化石墨烯GO的二维结构,可以看出该方法保留了石墨烯典型的褶皱状和薄如纱的形貌。图3显示的是基于GO-Au-Pt/ITO电极表面在放大10K倍之后的扫描电镜SEM图像,证明了大量的金铂纳米粒子均一地分散在基于石墨烯的工作电极表面。金铂纳米粒子的直径可从图4中观察到,大约在120~300nm之间。图5和图6对应的能谱分析(EDS)也证实了GO/ITO电极表面只有碳元素的存在,而GO-Au-Pt/ITO电极表面可以检测出金、铂、碳元素。

[0028] 实施例3:

如图1所示,一种可抛型汞离子传感器的制备方法,步骤为:

第一步:氧化铟锡玻璃ITO电极的切割和清洗:将ITO导电玻璃用玻璃刀裁剪成12×20 mm的薄片,接着对ITO进行清洗,用丙酮、乙醇和双蒸水分别进行超声水浴10分钟,洗好后放进烘箱进行烘干备用;

第二步:用打孔器在透明胶带上打出直径为4mm的孔,然后贴到烘好的ITO玻璃上,用来固定电极反应面积,制备得到ITO工作电极;

第三步:滴加5.0 μL 的0.5 mg/mL的氧化石墨烯GO溶液在ITO工作电极表面孔内,红外灯下烘干,形成GO/ITO电极;

第四步:用银/氯化银电极做参比电极、饱和甘汞电极作为对电极,将GO/ITO电极作为工作电极,在含有1.0 mg/mL氯金酸和1.0 mg/mL氯铂酸的溶液里,进行循环伏安法电化学沉积金-铂合金,制备成氧化石墨烯-金-铂GO-Au-Pt纳米复合物,形成GO-Au-Pt/ITO电极;

第五步:将0.05 mmol 氯化甲基汞溶解于200.0 μL 含有浓度为1.0 mol/L NaOH的甲醇溶液中,加入0.01 mmol/L的6-巯基烟酸5.0 mL,再与200.0 μL 浓度为1.0 mg/mL卵白蛋白OVA混合后发生耦合,所得 Hg^{2+} -OVA作为包被抗原,用磷酸盐吐温缓冲液PBST清洗GO-Au-Pt/ITO电极,每次使用PBST 20.0 μL ,清洗三次。滴加10.0 μL 的浓度为20.0 $\mu\text{g/mL}$ Hg^{2+} -OVA于GO-Au-Pt/ITO电极,在4℃的环境下进行孵育过夜,形成 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极;

第六步:滴加10.0 μL 浓度为20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的牛血清白蛋白BSA在 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面,在4℃的环境下培养30 min,封闭 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面非特异性

的活性位点;

第七步:用PBST清洗第六步封闭后的 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极,每次使用PBST 20.0 μL ,清洗三次。滴加5.0 μL 的不同浓度 Hg^{2+} 标准溶液和5.0 μL 浓度为20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的抗 Hg^{2+} 的多克隆抗体mAb在清洗后的 Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面,并在4℃的环境下孵育30 min,再用PBST溶液清洗三次,每次使用PBST 20.0 μL ,形成mAb/ Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极;所述不同浓度 Hg^{2+} 标准溶液浓度分别为1800.0、1500、1200.0、1000.0、500.0、100.0、10.0、5.0、0.5和0.1 ng/mL;

第八步:将10.0 μL 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG即HRP-GaR IgG加入到1.0 mL PBS 7.0中摇匀后滴加10.0 μL 在mAb/ Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO电极表面,并在4℃的环境下培养30 min,然后用PBST溶液清洗三次,每次使用PBST 20.0 μL ,制得HRP-GaR IgG/mAb/ Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO可抛型汞离子传感器。

[0029] 在竞争阶段,标准 Hg^{2+} 溶液和包被抗原(Hg^{2+} -OVA)争夺有限且固定量的mAb,随着 Hg^{2+} 浓度的升高,结合在工作电极上的mAb抗体的量逐渐减少,最后检测的电信号和表面的免疫复合物量呈正比。

[0030] 所述的GO-Au-Pt/ITO电极固定免疫物的能力通过以下测试可以得到:

第一步:将荧光标记抗体即DyLight 549标记了的山羊抗兔IgG(DL549-GaR IgG)用PBS 7.0溶液稀释成5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0和35.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度备用;

第二步:将裸ITO电极、GO/ITO电极和GO-Au-Pt/ITO电极分为3组,每组8个,分别加入如下8个浓度的DL549-GaR IgG:0.5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0和35.0 $\mu\text{g/mL}$,孵育8个小时,然后用PBST溶液清洗三次,每次使用PBST 20.0 μL ,用荧光扫描仪记录荧光图像;

第三步:将第二步得到的荧光图像用Image Pro-Plus 6.0用来计算荧光强度IOD和面积AREA的数值,荧光密度的平均值则是通过IOD/AREA计算得到,使用SPSS 16.0软件通过单因素方差分析进行显著性检验。

[0031] 如图7a线所示,固定了荧光抗体的工作电极的平均荧光强度的增加较为明显,证实了荧光抗体会吸附在工作电极表面上。随着抗体浓度为5.0 $\mu\text{g/mL}$ 增加到20.0 $\mu\text{g/mL}$,固定有DL549-GAR免疫球蛋白的电极的平均荧光强度增加,这表明蛋白质在电极表面固定化的情况得到了提升,同时也发现在高浓度25.0和25 $\mu\text{g/mL}$ 时,DL549-GaR 免疫球蛋白被固定在工作电极上,荧光强度保持不变,这表明工作电极表面的蛋白结合位点在抗体浓度为20 $\mu\text{g/mL}$ 达到饱和。

[0032] 该免疫传感器滴加10.0 μL 1% BSA到上述图4所描述的电极表面,之后再测定电极上的荧光强度。如图7b线所示,由于工作电极已预先用1% 牛血清白蛋白BSA预先封闭30分钟,可以发现,图7b中的线条几乎与空白组相同,该传感器的可以适用于常见的免疫分析。

[0033] 实施例4

可抛型汞离子传感器的使用方法,汞离子检测的步骤:

第一步:使用电化学工作站以三电极体系进行测定,以HRP-GaR IgG/mAb/ Hg^{2+} -OVA/GO-Au-Pt/ITO为工作电极,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为对电极,组建三电极系统;

第二步:配制5.0 mL含有1% H_2O_2 和5% 3,3',5,5'-四甲基联苯胺TMB的磷酸-氯化钠缓

冲液PBS,用1.0 mol/L NaOH调节其pH为7.0,作为缓冲液备用;

第三步:采用差分脉冲伏安法DPV在缓冲液中进行测试,测试参数有:扫描电压范围为-0.03~ 0.3 V,振幅为0.05 V,脉冲宽度为0.06 s,采样宽度为0.02 s,脉冲间隔为0.5 s,静止时间为0.0 s,灵敏度为 1×10^{-4} ,按照不同浓度的汞离子标准溶液浓度得到DPV数据图,按照DPV数据图以不同浓度的汞离子标准溶液浓度为横坐标,测得的峰电流 μA 为纵坐标,通过所得的氧化峰电流信号与汞离子标准溶液浓度之间的关系,绘制工作曲线,如图8所示,按照不同浓度的汞离子标准溶液浓度得到DPV测试数据,从a到J代表的汞离子浓度分别是1800.0、1500、1200.0、1000.0、500.0、100.0、10.0、5.0、0.5和0.1 ng/mL的电化学竞争免疫法得到的差分脉冲伏安DPV图,即电压-电流图;以不同浓度的汞离子标准溶液浓度 (ng/mL) 为横坐标,DPV测得的氧化峰电流值 (μA) 为纵坐标,通过所得的氧化峰电流信号与汞离子标准溶液浓度之间的关系,绘制工作曲线,如图9所示。工作曲线为的线性关系式为: $I(\mu\text{A}) = -1.1703 \lg[\text{Hg}^{2+}] - 1.601 \times 10^{-4}$, $R=0.9990$,其中 $[\text{Hg}^{2+}]$ 代表汞离子的浓度,单位为ng/mL

第四步:待测样品溶液代替汞离子标准溶液进行检测,检测的结果通过工作曲线查得。

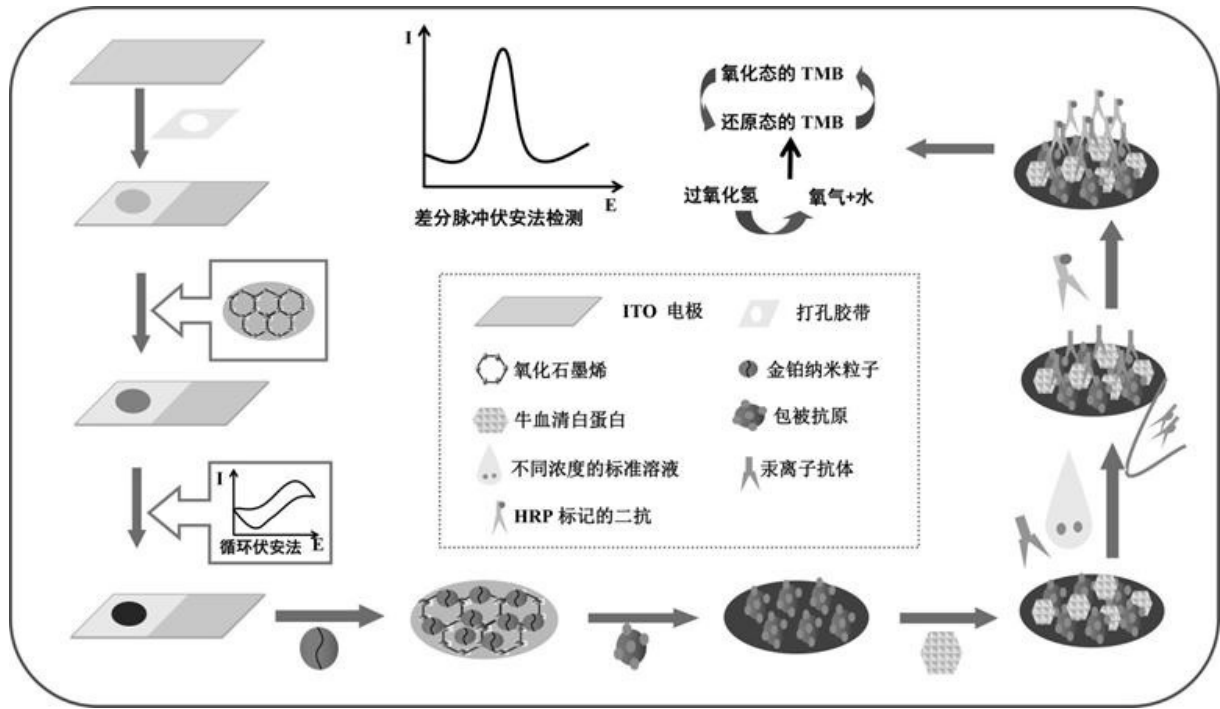


图1

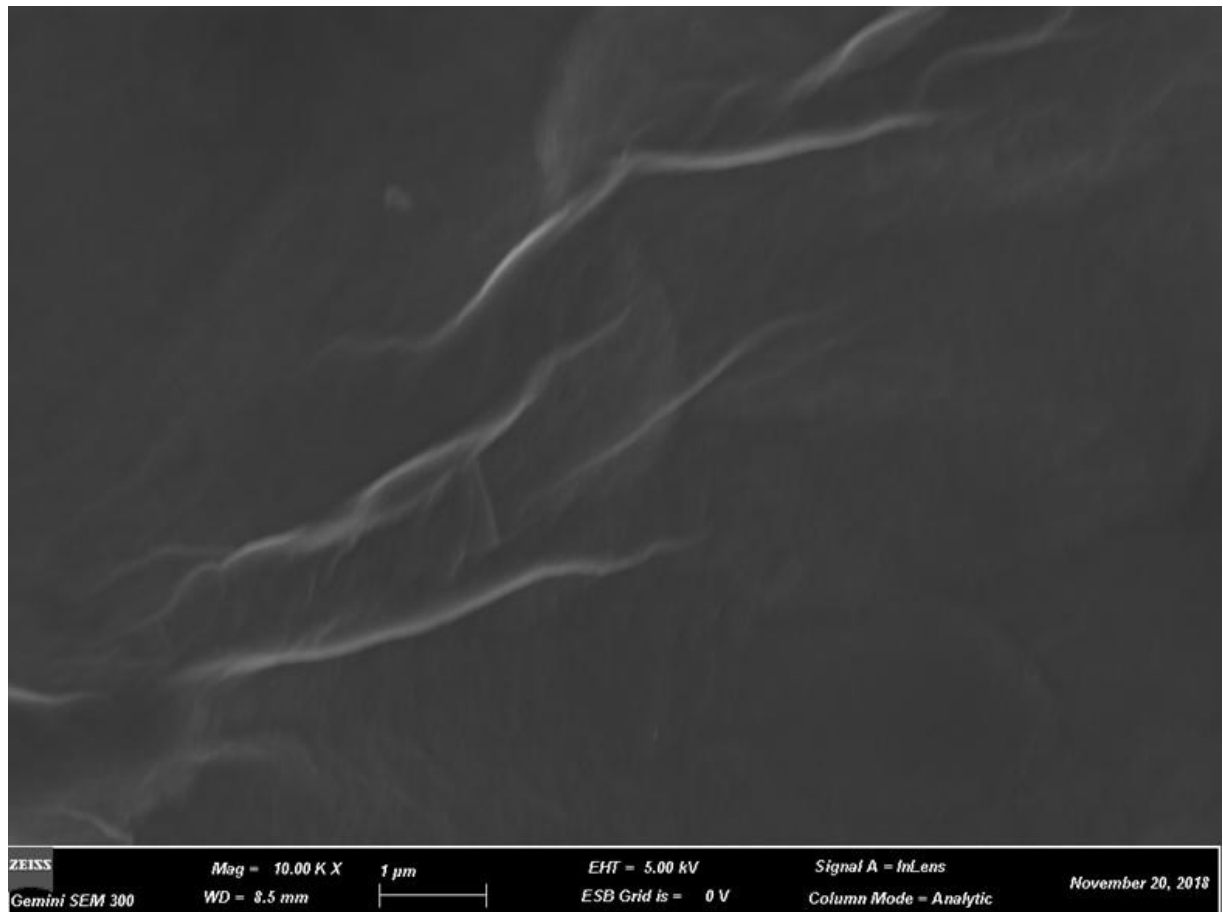


图2

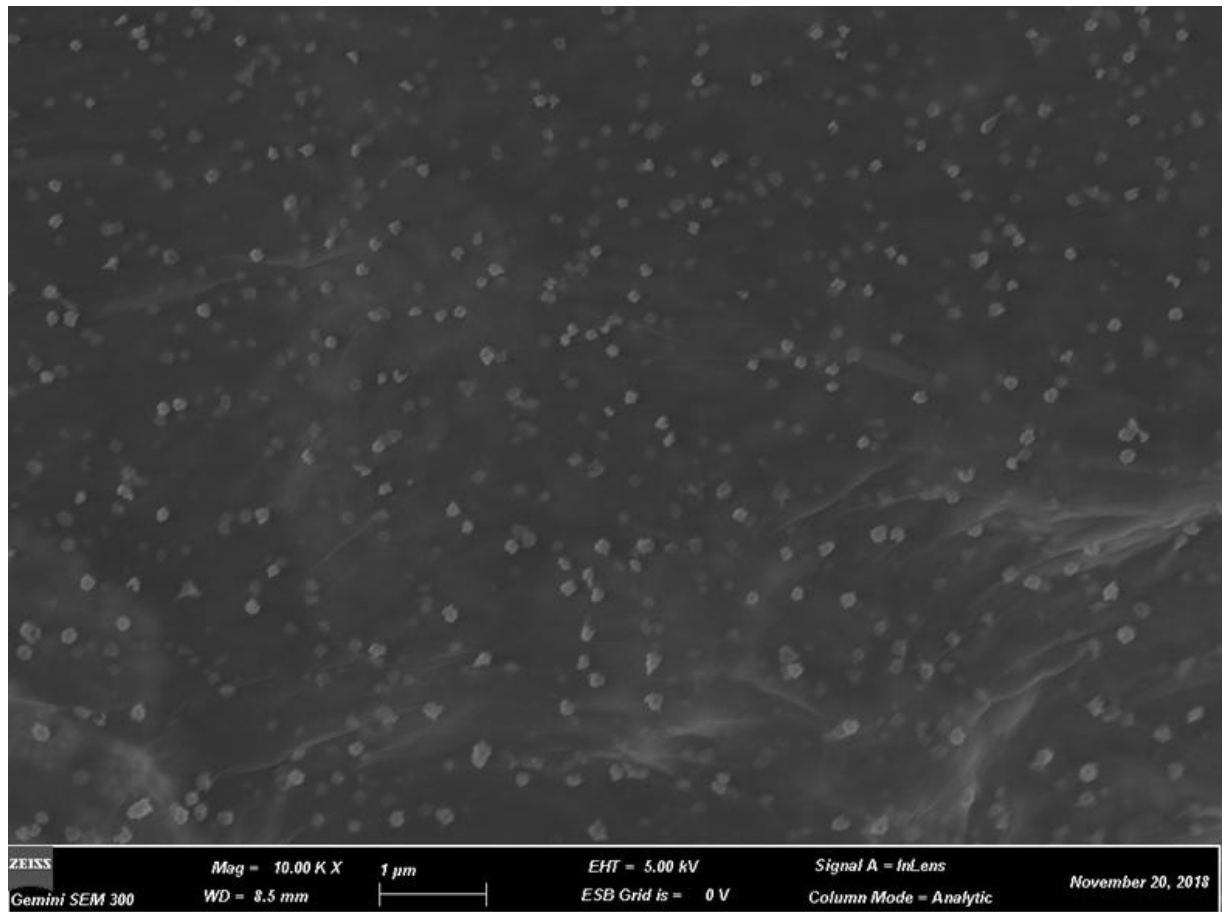


图3

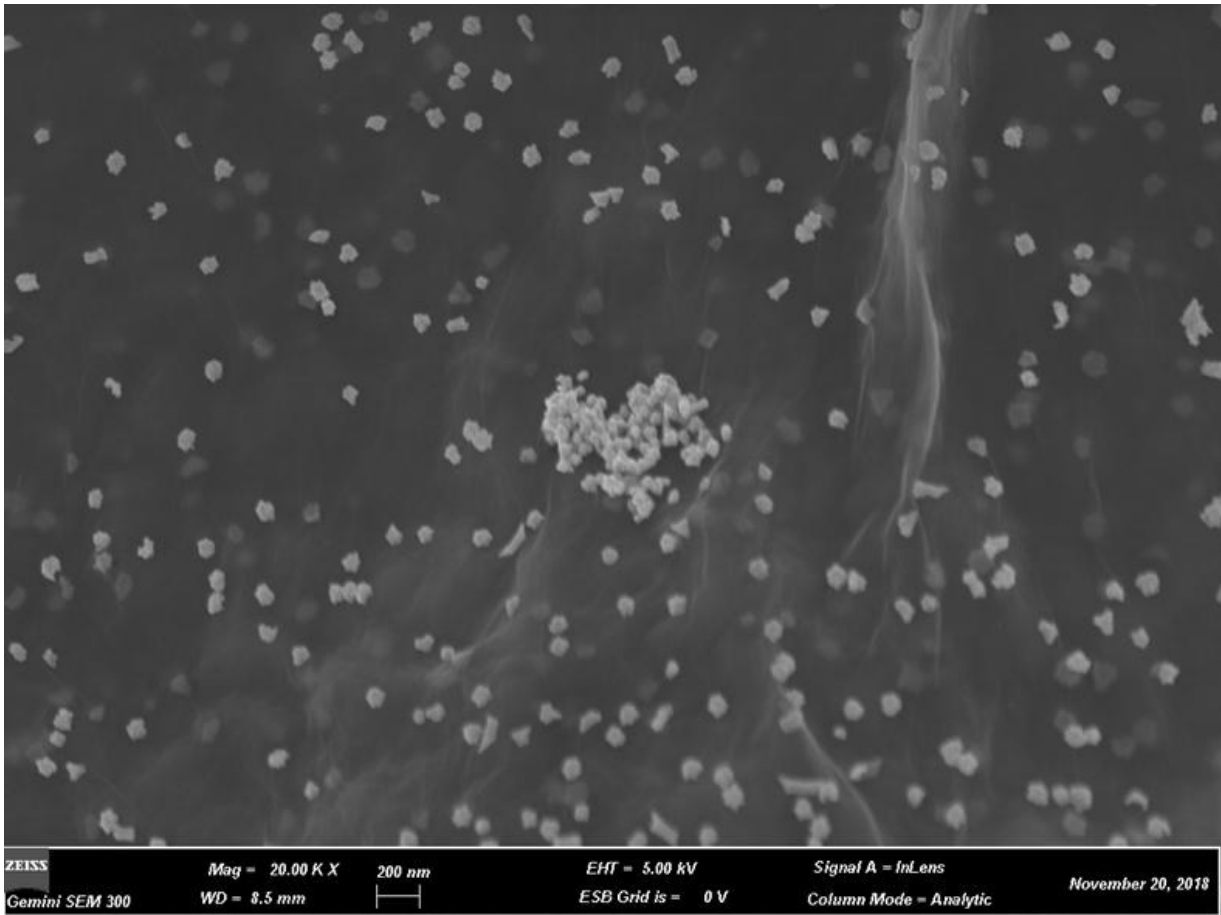


图4

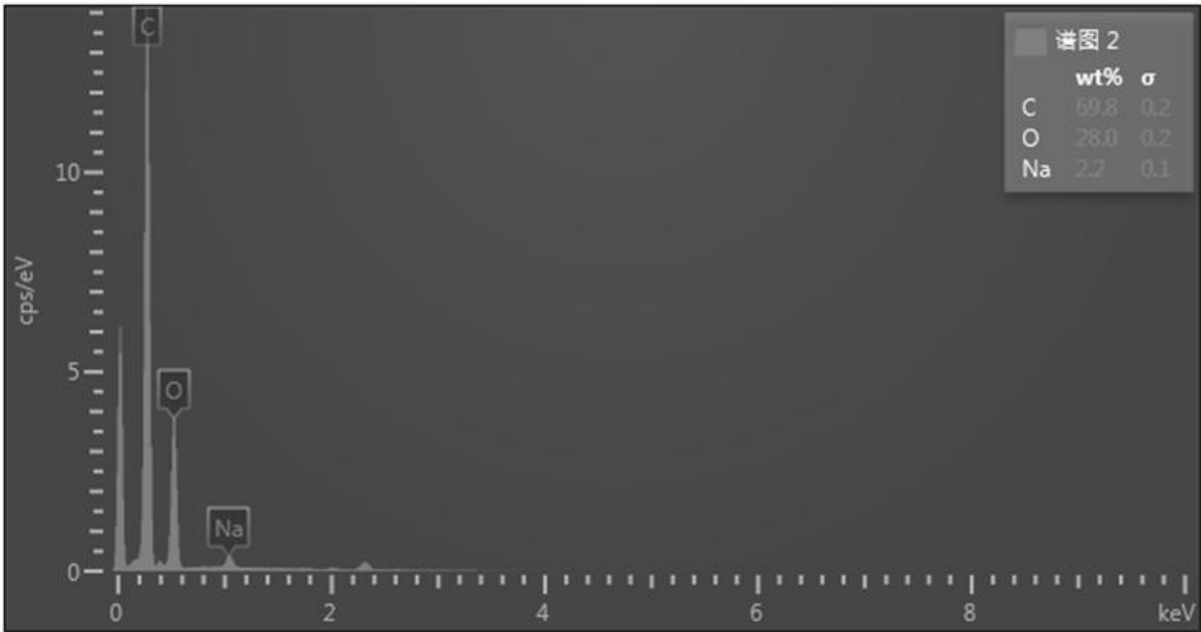


图5

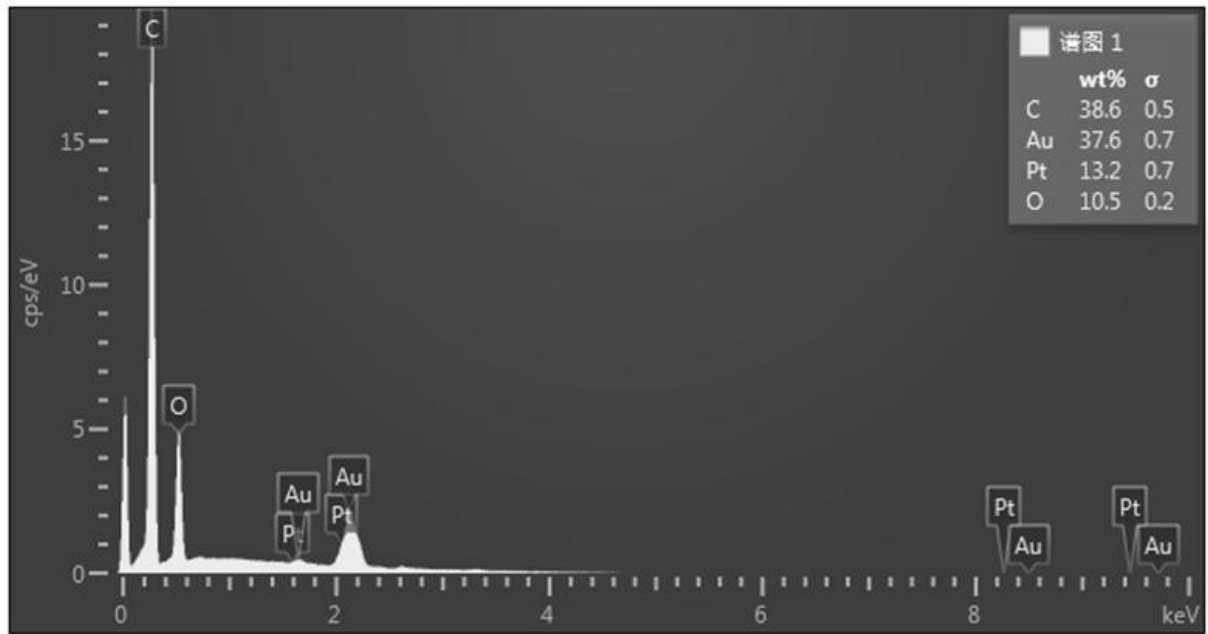


图6

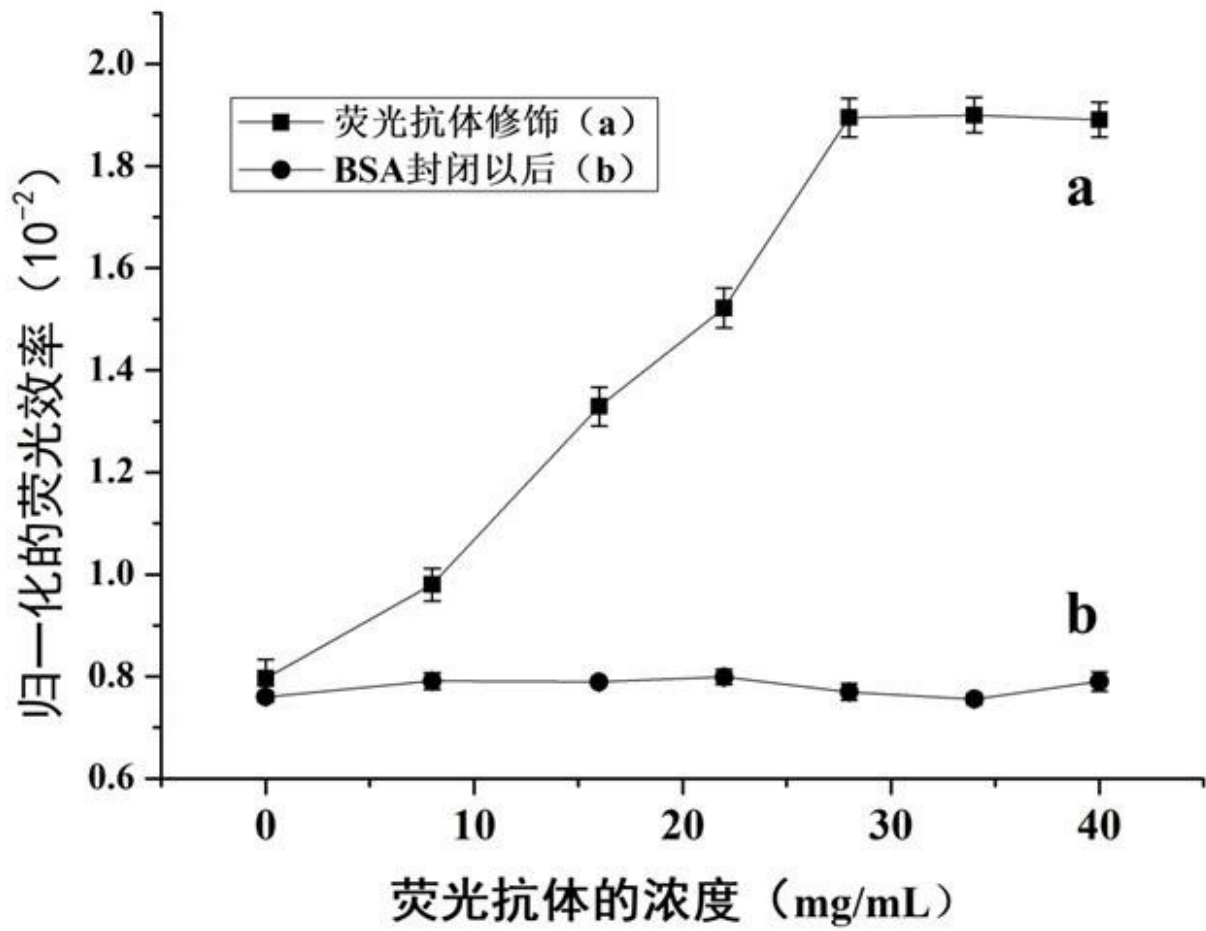


图7

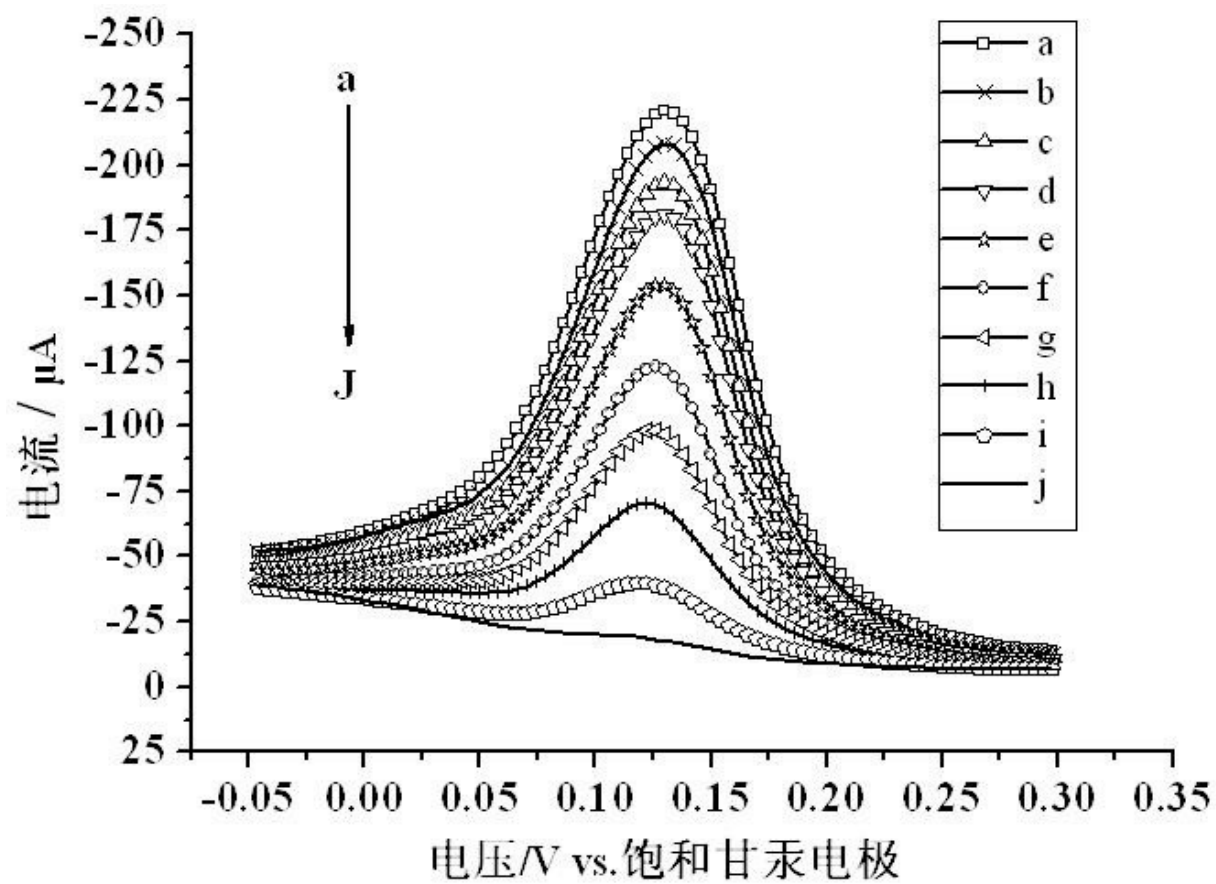


图8

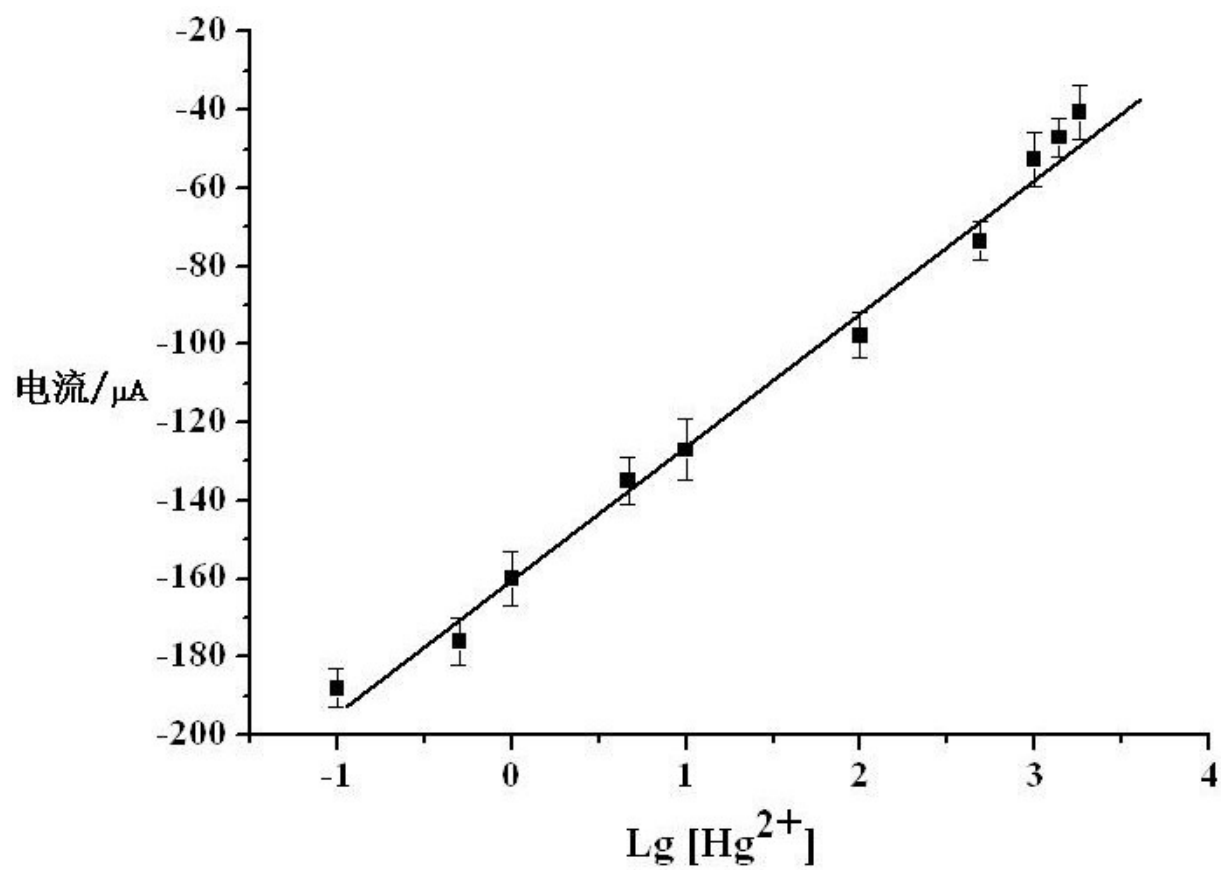


图9

专利名称(译)	一种可抛型汞离子传感器的制备方法和使用方法		
公开(公告)号	CN110514730A	公开(公告)日	2019-11-29
申请号	CN201910772227.0	申请日	2019-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	南通大学		
申请(专利权)人(译)	南通大学		
当前申请(专利权)人(译)	南通大学		
[标]发明人	刘扬 朱晨晨 邓安平 鲍宁 许琴		
发明人	刘扬 朱晨晨 邓安平 鲍宁 周亭含 缪胡颢 许琴		
IPC分类号	G01N27/49 G01N33/535 G01N33/533		
CPC分类号	G01N27/49 G01N33/533 G01N33/535		
代理人(译)	钱超		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种可抛型汞离子免疫传感器的制备方法和使用方法，合成石墨烯-金-铂纳米复合物，应用氧化铟锡玻璃作为工作电极，利用石墨烯-金-铂优异的电子传导能力和固定抗原的能力，结合电化学检测技术，制备一种新的对汞离子特异性检测的免疫传感器，并应用于汞离子的检测。所制备的传感器可产生电流信号，信号值与汞离子浓度呈现良好的线性范围和较低的检测限。

