



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109507174 A

(43)申请公布日 2019.03.22

(21)申请号 201910038073.2

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2019.01.16

(71)申请人 济南大学

地址 250022 山东省济南市市中区南辛庄西路336号

(72)发明人 魏琴 李小建 马洪敏 吴丹 匡轩 王欢 庞雪辉 张勇 胡丽华 范大伟

(74)专利代理机构 济南誉丰专利代理事务所 (普通合伙) 37240

代理人 李茜

(51)Int.Cl.

G01N 21/76(2006.01)

G01N 27/30(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

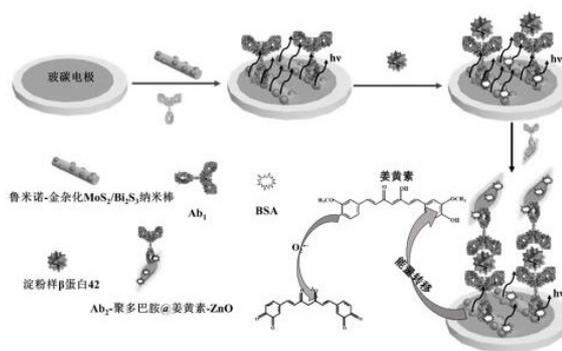
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

基于姜黄素复合ZnO纳米粒子猝灭鲁米诺电化学发光传感器的制备

(57)摘要

本发明涉及一种金杂化MoS2/Bi2S3纳米棒固载鲁米诺检测淀粉样β蛋白42的电化学发光传感器。在本发明中,MoS2/Bi2S3纳米棒不仅具有优良的电催化性能,而且可以通过金-硫键固载大量的发光材料鲁米诺,增强发光材料的电化学发光强度。为了灵敏地检测淀粉样β蛋白42,本发明设计了一种夹心型的猝灭型电化学发光免疫传感器,采用姜黄素-ZnO纳米材料基于消耗超氧根自由基和电化学发光-共振能量转移猝灭鲁米诺的电化学发光信号。根据不同浓度的淀粉样β蛋白42可以结合不同量的二抗标记物聚多巴胺@姜黄素-ZnO,使得该传感器电化学发光强度变化不同。本发明对淀粉样β蛋白42检测的线性范围为0.05 pg/mL-10 ng/mL,检测限为21 fg/mL。



1. 一种金杂化 $\text{MoS}_2/\text{Bi}_2\text{S}_3$ 纳米棒固载鲁米诺检测淀粉样 $\beta$ 蛋白42的电化学发光传感器, 制备步骤如下:

(1) 使用抛光粉预处理直径4 mm的玻碳电极, 超纯水冲洗干净;

(2) 将7  $\mu\text{L}$  10 mg/mL鲁米诺-金杂化 $\text{MoS}_2/\text{Bi}_2\text{S}_3$ 纳米棒溶液滴涂到电极表面, 室温保存至干燥;

(3) 滴涂6  $\mu\text{L}$  500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 一抗 $\text{Ab}_1$ 溶液于玻碳电极表面, 4  $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存至干燥, 超纯水清洗;

(4) 滴涂3  $\mu\text{L}$ 质量分数为1%的牛血清白蛋白, 封闭非特异性活性位点, 4  $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存至干燥, 超纯水清洗;

(5) 将6  $\mu\text{L}$ 不同浓度的淀粉样 $\beta$ 蛋白42滴涂在电极表面, 4  $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存至干燥, 超纯水清洗;

(6) 将6  $\mu\text{L}$  1~7 mg/mL  $\text{Ab}_2$ -聚多巴胺@姜黄素-ZnO溶液滴涂在电极表面, 4  $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存至干燥, 超纯水清洗, 即制得检测淀粉样 $\beta$ 蛋白42的电化学发光生物传感器。

2. 本发明所述的一种金杂化 $\text{MoS}_2/\text{Bi}_2\text{S}_3$ 纳米棒固载鲁米诺检测淀粉样 $\beta$ 蛋白42的电化学发光传感器, 所述鲁米诺-金杂化的 $\text{MoS}_2/\text{Bi}_2\text{S}_3$ 纳米棒溶液, 制备步骤如下:

(1)  $\text{MoS}_2/\text{Bi}_2\text{S}_3$ 纳米棒的制备

将0.242 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和0.765 g  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 分散在60 mL超纯水中, 加入0.76 g硫脲, 磁力搅拌1 h; 将上述溶液转移至100 mL反应釜中, 220  $^\circ\text{C}$ 反应24 h, 离心、洗涤、干燥得到 $\text{MoS}_2/\text{Bi}_2\text{S}_3$ 纳米棒;

(2) 鲁米诺-金杂化的 $\text{MoS}_2/\text{Bi}_2\text{S}_3$ 纳米棒的制备

将制备的 $\text{MoS}_2/\text{Bi}_2\text{S}_3$ 纳米棒分散在50 mL超纯水中, 超声1 h; 然后, 将2 mL 1%  $\text{HAuCl}_4$ 和5 mg PVP加入到上述溶液中, 搅拌6 h之后, 逐滴加入2 mL 50 mmol/L柠檬酸钠溶液和少量的 $\text{NaBH}_4$ 溶液还原 $\text{HAuCl}_4$ ; 搅拌6 h之后, 离心去除未结合的金纳米粒子, 得到金杂化的 $\text{MoS}_2/\text{Bi}_2\text{S}_3$ 纳米棒; 然后将纳米棒分散在5 mL超纯水中, 加入1~5 mL 5 mmol/L鲁米诺过夜搅拌, 通过金-NH<sub>2</sub>键将鲁米诺结合在纳米棒材料表面, 离心分离去除未结合的鲁米诺, 得到鲁米诺-金杂化的 $\text{MoS}_2/\text{Bi}_2\text{S}_3$ 纳米棒。

3. 本发明所述的一种金杂化 $\text{MoS}_2/\text{Bi}_2\text{S}_3$ 纳米棒固载鲁米诺检测淀粉样 $\beta$ 蛋白42的电化学发光传感器, 所述 $\text{Ab}_2$ -聚多巴胺@姜黄素-ZnO, 制备步骤如下:

(1) 姜黄素-ZnO的制备

将5 mg姜黄素分散在50 mL超纯水中, 90  $^\circ\text{C}$ 回流至姜黄素完全溶解; 然后, 加入50 mL 0.1 mol/L硝酸锌溶液, 90  $^\circ\text{C}$ 回流1 h; 当上述溶液冷却至室温, 冰水浴中加入5 mL 0.2 mol/L KOH, 搅拌1 h, 形成橙黄色的胶状悬浮液, 用超纯水和丙酮洗涤去除未结合的姜黄素, 真空干燥得到姜黄素-ZnO;

(2)  $\text{Ab}_2$ -聚多巴胺@姜黄素-ZnO

将20 mg制备的姜黄素-ZnO和1~5 mg多巴胺分散在30 mL超纯水中, 搅拌6 h, 离心去除未结合的多巴胺; 将上述混合物分散在10 mL 10 mmol/L Tris-HCl (pH=8.5) 溶液中, 搅拌6 h, 离心去除未结合的聚多巴胺; 然后, 将1~10 mg聚多巴胺@姜黄素-ZnO分散在5 mL磷酸盐缓冲溶液 (pH=7.4) 中, 加入500  $\mu\text{L}$  500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 二抗 $\text{Ab}_2$ , 4  $^\circ\text{C}$ 下搅拌6 h; 之后, 加入100  $\mu\text{L}$  1%牛血清白蛋白, 封闭非特异性位点, 离心得到 $\text{Ab}_2$ -聚多巴胺@姜黄素-ZnO, 将其分散1

mL在磷酸盐缓冲溶液(pH=7.4)中,保存在4 °C冰箱中待用。

4.本发明所述的制备方法制备的基于鲁米诺-金杂化的MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒构建电化学发光传感器,用于淀粉样β蛋白42的检测,步骤如下:

(1)将参比电极-Ag/AgCl电极、对电极-铂丝电极、所制得的电化学发光传感器作为工作电极,连接在化学发光检测仪的暗盒中,将电化学工作站和化学发光检测仪连接在一起,光电倍增管的高压设置为600 V,扫描电压设置为-0.2~0.6 V;

(2)使用含1 mmol/L~8 mmol/L过氧化氢的PBS缓冲溶液,通过电化学发光法检测不同浓度的淀粉样β蛋白42产生的电化学发光信号强度;

所述PBS缓冲溶液,其pH=6.5~8.5,是用1/15 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和1/15 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>配制;

(3)根据所得的电化学发光强度值与淀粉样β蛋白42浓度对数的线性关系,绘制工作曲线。

## 基于姜黄素复合ZnO纳米粒子猝灭鲁米诺电化学发光传感器的制备

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种金杂化 $\text{MoS}_2/\text{Bi}_2\text{S}_3$ 纳米棒固载鲁米诺检测淀粉样 $\beta$ 蛋白42的电化学发光传感器。具体是采用金杂化 $\text{MoS}_2/\text{Bi}_2\text{S}_3$ 纳米棒固载鲁米诺作为发光材料,姜黄素复合ZnO纳米粒子作为猝灭剂,制备一种检测淀粉样 $\beta$ 蛋白42猝灭型电化学发光传感器,属于电化学发光检测技术领域。

### 背景技术

[0002] 阿尔茨海默病是一种发生于老年和老年前期的神经系统退行性疾病,临床表现为记忆障碍、失语、执行功能障碍以及人格和行为改变等。因此,阿尔茨海默病严重威胁着人类的健康,并且降低人类的生活质量。淀粉样 $\beta$ 蛋白的沉积与阿尔茨海默病的发病机理具有一定的关系。淀粉样 $\beta$ 蛋白42和淀粉样 $\beta$ 蛋白40是淀粉样 $\beta$ 蛋白的两种主要成分,其中,淀粉样 $\beta$ 蛋白42阿尔茨海默病病人斑块中的主要成分,比淀粉样 $\beta$ 蛋白40更容易聚集。早期发现、早期治疗将会改善病人的生存质量。因此,在本发明中,以淀粉样 $\beta$ 蛋白42为检测对象,开发一种新颖的、灵敏的免疫测定方法,是非常有意义的。

[0003] 电化学发光(ECL)分析具有灵敏度高,线性范围宽;反应可控性、时空可控性好;仪器简单,分析速度快;节约试剂;分析的应用范围广;可以同时获得多种信息,有利于研究快速发光反应和发光反应机理等优势,已经发展成为分析化学的一门分支学科。鲁米诺作为传统的电化学发光试剂,具有高效的发光效率,然而,如何将鲁米诺稳定地固载在电极表面构建固态ECL传感器,对于解决ECL传感器的稳定性及灵敏度至关重要。众所周知,无标记型传感器依据生物分子对修饰电极的阻抗作用引起ECL信号的变化实现目标物的检测。因此,发现新型的猝灭剂通过能量转移引起发光材料ECL信号的变化,对于实现目标物的痕量检测具有重要的意义。

### 发明内容

[0004] 本发明设计了一种猝灭型的电化学发光免疫传感器用于检测淀粉样 $\beta$ 蛋白。

[0005] 在本发明中,采用金杂化 $\text{MoS}_2/\text{Bi}_2\text{S}_3$ 纳米棒固载发光材料鲁米诺,极大地增强了鲁米诺的ECL强度。 $\text{MoS}_2/\text{Bi}_2\text{S}_3$ 纳米棒不仅对过氧化氢的分解具有一定的催化作用,而且可以通过Au-S键结合更多的金纳米粒子,从而通过金-NH<sub>2</sub>键固载更多的鲁米诺和淀粉样 $\beta$ 蛋白42抗体。本发明使用 $\text{MoS}_2/\text{Bi}_2\text{S}_3$ 纳米棒作为基底材料,利用 $\text{MoS}_2$ 和 $\text{Bi}_2\text{S}_3$ 之间形成的异质结改善了其电化学特性,与单纯的 $\text{MoS}_2$ 和 $\text{Bi}_2\text{S}_3$ 纳米材料相比,复合纳米材料固载鲁米诺具有稳定且强的电化学发光信号,改善了传感器的稳定性和灵敏度。为了灵敏地检测淀粉样 $\beta$ 蛋白42,姜黄素复合ZnO纳米粒子作为猝灭剂,降低鲁米诺的电化学发光强度。抗氧化剂姜黄素可以与超氧根自由基( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )反应,而鲁米诺的电化学发光强度与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的含量成正比,因为 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 是生成鲁米诺自由基和激发态3-氨基邻苯二甲酸盐必不可少的物质之一。并且,姜黄素的紫外-可见吸收峰与鲁米诺的荧光发射峰具有一定的波谱重叠,即二者之间也存在一定的

能量转移,进一步猝灭了鲁米诺的电化学发光强度。姜黄素的疏水性限制了其在生物分析领域的应用,将姜黄素固定在纳米材料上改善了其在水中的分散性,拓宽其在生物传感器领域的应用。在本发明中,将姜黄素与ZnO纳米粒子复合,为了稳定简单地结合二抗,聚多巴胺自聚合在复合材料表面,通过Michael反应聚多巴胺上的苯醌官能团可以和生物分子上的氨基形成共价键。不同浓度的淀粉样β蛋白42可以结合不同量的二抗-聚多巴胺@姜黄素-ZnO,从而引起鲁米诺-金杂化的MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒发光强度的变化,实现淀粉样β蛋白42的检测。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

1. 一种金杂化MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒固载鲁米诺检测淀粉样β蛋白42的电化学发光传感器,制备步骤如下:

(1) 使用抛光粉预处理直径4 mm的玻碳电极,超纯水冲洗干净;

(2) 将7 μL 10 mg/mL鲁米诺-金杂化MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒溶液滴涂到电极表面,室温保存至干燥;

(3) 滴涂6 μL 500 μg/mL一抗Ab<sub>1</sub>溶液于玻碳电极表面,4 °C冰箱中保存至干燥,超纯水清洗;

(4) 滴涂3 μL质量分数为1%的牛血清白蛋白BSA,封闭非特异性活性位点,4 °C冰箱中保存至干燥,超纯水清洗;

(5) 将6 μL不同浓度的淀粉样β蛋白42滴涂在电极表面,4 °C冰箱中保存至干燥,超纯水清洗;

(6) 将6 μL 1~7 mg/mL Ab<sub>2</sub>-聚多巴胺@姜黄素-ZnO溶液滴涂在电极表面,4 °C冰箱中保存至干燥,超纯水清洗,即制得检测淀粉样β蛋白42的电化学发光生物传感器。

[0007] 2. 本发明所述的一种金杂化MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒固载鲁米诺检测淀粉样β蛋白42的电化学发光传感器,所述鲁米诺-金杂化的MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒溶液,制备步骤如下:

(1) MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒的制备

将0.242 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O和0.765 g Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O分散在60 mL超纯水中,加入0.76 g硫脲,磁力搅拌1 h。将上述溶液转移至100 mL反应釜中,220 °C反应24 h,离心、洗涤、干燥得到MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒;

(2) 鲁米诺-金杂化的MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒的制备

将制备的MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒分散在50 mL超纯水中,超声1 h。然后,将2 mL 1% HAuCl<sub>4</sub>和5 mg PVP加入到上述溶液中,搅拌6 h之后,逐滴加入2 mL 50 mmol/L柠檬酸钠溶液和少量的NaBH<sub>4</sub>溶液还原HAuCl<sub>4</sub>。搅拌6 h之后,离心去除未结合的金纳米粒子,得到金杂化的MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒。然后将纳米棒分散在5 mL超纯水中,加入1~5 mL 5 mmol/L鲁米诺过夜搅拌,通过金-NH<sub>2</sub>键将鲁米诺结合在纳米棒材料表面,离心分离去除未结合的鲁米诺,得到鲁米诺-金杂化的MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒。

[0008] 3. 本发明所述的一种金杂化MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒固载鲁米诺检测淀粉样β蛋白42的电化学发光传感器,所述Ab<sub>2</sub>-聚多巴胺@姜黄素-ZnO,制备步骤如下:

(1) 姜黄素-ZnO的制备

将5 mg姜黄素分散在50 mL超纯水中,90 °C回流至姜黄素完全溶解。加入50 mL 0.1 mol/L硝酸锌溶液,90 °C回流1 h。当上述溶液冷却至室温,冰水浴中加入5 mL 0.2 mol/L

KOH, 搅拌1 h, 形成橙黄色的胶状悬浮液, 用超纯水和丙酮洗涤去除未结合的姜黄素, 真空干燥得到姜黄素-ZnO;

(2) Ab<sub>2</sub>-聚多巴胺@姜黄素-ZnO

将20 mg制备的姜黄素-ZnO和1~5 mg多巴胺分散在30 mL超纯水中, 搅拌6 h, 离心去除未结合的多巴胺。将上述混合物分散在10 mL 10 mmol/L Tris-HCl (pH=8.5) 溶液中, 搅拌6 h, 离心去除未结合的聚多巴胺。然后, 将1~10 mg聚多巴胺@姜黄素-ZnO分散在5 mL磷酸盐缓冲溶液 (pH=7.4) 中, 加入500 μL 500 μg/mL二抗Ab<sub>2</sub>, 4 °C下搅拌6 h。之后, 加入100 μL 1%牛血清白蛋白, 封闭非特异性位点, 离心得到Ab<sub>2</sub>-聚多巴胺@姜黄素-ZnO, 将其分散1 mL在磷酸盐缓冲溶液 (pH=7.4) 中, 保存在4 °C冰箱中待用。

[0009] 4. 本发明所述的制备方法制备的基于鲁米诺-金杂化的MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒构建电化学发光传感器, 用于淀粉样β蛋白42的检测, 步骤如下:

(1) 将参比电极-Ag/AgCl电极、对电极-铂丝电极、所制得的电化学发光传感器作为工作电极, 连接在化学发光检测仪的暗盒中, 将电化学工作站和化学发光检测仪连接在一起, 光电倍增管的高压设置为600 V, 扫描电压设置为-0.2~0.6 V;

(2) 使用含1 mmol/L~8 mmol/L过氧化氢的PBS缓冲溶液, 通过电化学发光法检测不同浓度的淀粉样β蛋白42产生的电化学发光信号强度;

所述PBS缓冲溶液, 其pH=6.5~8.5, 是用1/15 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和1/15 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>配制;

(3) 根据所得的电化学发光强度值与淀粉样β蛋白42浓度对数的线性关系, 绘制工作曲线。

## 附图说明

图1为本发明设计的传感器的流程设计图。

## 具体实施方式

[0010] 下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。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。

[0011] 实施例1制备鲁米诺-金杂化的MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒溶液

(1) MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒的制备

将0.242 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O和0.765 g Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O分散在60 mL超纯水中, 加入0.76 g硫脲, 磁力搅拌1 h。将上述溶液转移至100 mL反应釜中, 220 °C反应24 h, 离心、洗涤、干燥得到MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒;

(2) 鲁米诺-金杂化的MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒的制备

将制备的MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒分散在50 mL超纯水中, 超声1 h。将2 mL 1% HAuCl<sub>4</sub>和5 mg PVP加入到上述溶液中, 搅拌6 h之后, 逐滴加入2 mL 50 mmol/L柠檬酸钠溶液和少量的NaBH<sub>4</sub>溶液还原HAuCl<sub>4</sub>。搅拌6 h之后, 离心去除未结合的金纳米粒子, 得到金杂化的MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒。然后将纳米棒分散在5 mL超纯水中, 加入5 mL 5mmol/L鲁米诺过夜搅拌, 通过金-NH<sub>2</sub>键将鲁米诺结合在纳米棒材料表面, 离心分离去除未结合的鲁米诺, 得到鲁米诺-金杂化的MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒。

**[0012] 实施例2制备Ab<sub>2</sub>-聚多巴胺@姜黄素-ZnO****(1) 姜黄素-ZnO的制备**

将5 mg姜黄素分散在50 mL超纯水中,90 °C回流至姜黄素完全溶解。加入50 mL 0.1 mol/L硝酸锌溶液,90 °C回流1 h。当上述溶液冷却至室温,冰水浴中加入5 mL 0.2 mol/L KOH,搅拌1 h,形成橙黄色的胶状悬浮液,用超纯水和丙酮洗涤去除未结合的姜黄素,真空干燥得到姜黄素-ZnO;

**(2) Ab<sub>2</sub>-聚多巴胺@姜黄素-ZnO**

将20 mg制备的姜黄素-ZnO和1 mg多巴胺分散在30 mL超纯水中,搅拌6 h,离心去除未结合的多巴胺。将上述混合物分散在10 mL 10 mmol/L Tris-HCl (pH=8.5) 溶液中,搅拌6 h,离心去除未结合的聚多巴胺。然后,将1 mg聚多巴胺@姜黄素-ZnO分散在5 mL磷酸盐缓冲溶液 (pH=7.4) 中,加入500 μL 500 μg/mL二抗Ab<sub>2</sub>,4 °C下搅拌6 h。之后,加入100 μL 1%牛血清白蛋白,封闭非特异性位点,离心得到Ab<sub>2</sub>-聚多巴胺@姜黄素-ZnO,将其分散在1 mL磷酸盐缓冲溶液 (pH=7.4) 中,保存在4 °C冰箱中待用。

**[0013] 实施例3制备Ab<sub>2</sub>-聚多巴胺@姜黄素-ZnO****(1) 姜黄素-ZnO的制备**

将5 mg姜黄素分散在50 mL超纯水中,90 °C回流至姜黄素完全溶解。然后,加入50 mL 0.1 mol/L硝酸锌溶液,90 °C回流1 h。当上述溶液冷却至室温,冰水浴中加入5 mL 0.2 mol/L KOH,搅拌1 h,形成橙黄色的胶状悬浮液,用超纯水和丙酮洗涤去除未结合的姜黄素,真空干燥得到姜黄素-ZnO;

**(2) Ab<sub>2</sub>-聚多巴胺@姜黄素-ZnO**

将20 mg制备的姜黄素-ZnO和5 mg多巴胺分散在30 mL超纯水中,搅拌6 h,离心去除未结合的多巴胺。将上述混合物分散在10 mL 10 mmol/L Tris-HCl (pH=8.5) 溶液中,搅拌6 h,离心去除未结合的聚多巴胺。然后,将5 mg聚多巴胺@姜黄素-ZnO分散在5 mL磷酸盐缓冲溶液 (pH=7.4) 中,加入500 μL 500 μg/mL二抗Ab<sub>2</sub>,4 °C下搅拌6 h。之后,加入100 μL 1%牛血清白蛋白,封闭非特异性位点,离心得到Ab<sub>2</sub>-聚多巴胺@姜黄素-ZnO,将其分散在1 mL磷酸盐缓冲溶液 (pH=7.4) 中,保存在4 °C冰箱中待用。

**[0014] 实施例4制备Ab<sub>2</sub>-聚多巴胺@姜黄素-ZnO****(1) 姜黄素-ZnO的制备**

将5 mg姜黄素分散在50 mL超纯水中,90 °C回流至姜黄素完全溶解。然后,加入50 mL 0.1 mol/L硝酸锌溶液,90 °C回流1 h。当上述溶液冷却至室温,冰水浴中加入5 mL 0.2 mol/L KOH,搅拌1 h,形成橙黄色的胶状悬浮液,用超纯水和丙酮洗涤去除未结合的姜黄素,真空干燥得到姜黄素-ZnO;

**(2) Ab<sub>2</sub>-聚多巴胺@姜黄素-ZnO**

将20 mg制备的姜黄素-ZnO和10 mg多巴胺分散在30 mL超纯水中,搅拌6 h,离心去除未结合的多巴胺。将上述混合物分散在10 mL 10 mmol/L Tris-HCl (pH=8.5) 溶液中,搅拌6 h,离心去除未结合的聚多巴胺。然后,将10 mg聚多巴胺@姜黄素-ZnO分散在5 mL磷酸盐缓冲溶液 (pH=7.4) 中,加入500 μL 500 μg/mL二抗Ab<sub>2</sub>,4 °C下搅拌6 h。之后,加入100 μL 1%牛血清白蛋白,封闭非特异性位点,离心得到Ab<sub>2</sub>-聚多巴胺@姜黄素-ZnO,将其分散在1 mL磷酸盐缓冲溶液 (pH=7.4) 中,保存在4 °C冰箱中待用。

**[0015] 实施例5制备检测淀粉样β蛋白42的电化学发光传感器**

- (1) 使用抛光粉预处理直径4 mm的玻碳电极,超纯水冲洗干净;
- (2) 将7 μL 10 mg/mL鲁米诺-金杂化MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒溶液滴涂到电极表面,室温保存至干燥;
- (3) 滴涂6 μL 500 μg/mL一抗Ab<sub>1</sub>溶液于玻碳电极表面,4 °C冰箱中保存至干燥,超纯水清洗;
- (4) 滴涂3 μL质量分数为1%的牛血清白蛋白,封闭非特异性活性位点,4 °C冰箱中保存至干燥,超纯水清洗;
- (5) 将6 μL不同浓度的淀粉样β蛋白42滴涂在电极表面,4 °C冰箱中保存至干燥,超纯水清洗;
- (6) 将6 μL 3 mg/mL Ab<sub>2</sub>-聚多巴胺@姜黄素-ZnO溶液滴涂在电极表面,4 °C冰箱中保存至干燥,超纯水清洗,即制得检测淀粉样β蛋白42的电化学发光生物传感器。

**[0016] 实施例6制备检测淀粉样β蛋白42的电化学发光传感器**

- (1) 使用抛光粉预处理直径4 mm的玻碳电极,超纯水冲洗干净;
- (2) 将7 μL 10 mg/mL鲁米诺-金杂化MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒溶液滴涂到电极表面,室温保存至干燥;
- (3) 滴涂6 μL 500 μg/mL一抗Ab<sub>1</sub>溶液于玻碳电极表面,4 °C冰箱中保存至干燥,超纯水清洗;
- (4) 滴涂3 μL质量分数为1%的牛血清白蛋白,封闭非特异性活性位点,4 °C冰箱中保存至干燥,超纯水清洗;
- (5) 将6 μL不同浓度的淀粉样β蛋白42滴涂在电极表面,4 °C冰箱中保存至干燥,超纯水清洗;
- (6) 将6 μL 7 mg/mL Ab<sub>2</sub>-聚多巴胺@姜黄素-ZnO溶液滴涂在电极表面,4 °C冰箱中保存至干燥,超纯水清洗,即制得检测淀粉样β蛋白42的电化学发光生物传感器。

**[0017] 实施例7淀粉样β蛋白42的检测方法**

(1) 将参比电极-Ag/AgCl电极、对电极-铂丝电极、所制得的电化学发光传感器作为工作电极,连接在化学发光检测仪的暗盒中,将电化学工作站和化学发光检测仪连接在一起,光电倍增管的高压设置为600 V,扫描电压设置为-0.2~0.6 V;

(2) 使用含3 mmol/L过氧化氢的PBS缓冲溶液,通过电化学发光法检测不同浓度的淀粉样β蛋白42产生的电化学发光信号强度;

所述PBS缓冲溶液,其pH=6.5,是用1/15 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和1/15 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>配制;

(3) 根据所得的电化学发光强度值与淀粉样β蛋白42浓度对数的线性关系,绘制工作曲线。

**[0018] 实施例8淀粉样β蛋白42的检测方法**

(1) 将参比电极-Ag/AgCl电极、对电极-铂丝电极、所制得的电化学发光传感器作为工作电极,连接在化学发光检测仪的暗盒中,将电化学工作站和化学发光检测仪连接在一起,光电倍增管的高压设置为600 V,扫描电压设置为-0.2~0.6 V;

(2) 使用含5 mmol/L过氧化氢的PBS缓冲溶液,通过电化学发光法检测不同浓度的淀粉样β蛋白42产生的电化学发光信号强度;

所述PBS缓冲溶液,其pH=8.0,是用1/15 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 和1/15 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 配制;

(3) 根据所得的电化学发光强度值与淀粉样 $\beta$ 蛋白42浓度对数的线性关系,绘制工作曲线。

[0019] 实施例9人造脑脊液淀粉样 $\beta$ 蛋白42的检测

(1) 向稀释的人造脑脊液中加入不同浓度的淀粉样 $\beta$ 蛋白42,采用标准加入法测定样品中淀粉样 $\beta$ 蛋白42的平均回收率,结果见表1。

[0020] 表1 样品中淀粉样 $\beta$ 蛋白42的检测结果

样品	加入浓度 ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	检测浓度 ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	回收率(%)
1	1	1.12	112
2	0.1	0.109	109
3	0.05	0.047	94
4	0.001	0.00104	104

表1检测结果可以看出,样品中淀粉样 $\beta$ 蛋白42检测结果的回收率为94~112 %,表明本发明可以应用于实际生物样品的检测,结果准确可靠。

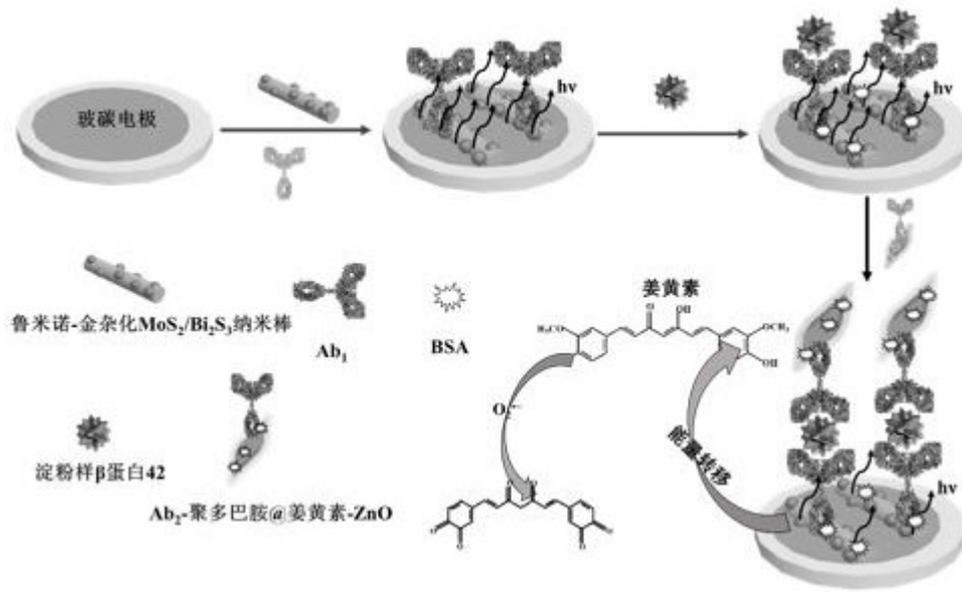


图1

专利名称(译)	基于姜黄素复合ZnO纳米粒子猝灭鲁米诺电化学发光传感器的制备		
公开(公告)号	<a href="#">CN109507174A</a>	公开(公告)日	2019-03-22
申请号	CN201910038073.2	申请日	2019-01-16
[标]申请(专利权)人(译)	济南大学		
申请(专利权)人(译)	济南大学		
当前申请(专利权)人(译)	济南大学		
[标]发明人	魏琴 李小建 马洪敏 吴丹 匡轩 王欢 庞雪辉 张勇 胡丽华 范大伟		
发明人	魏琴 李小建 马洪敏 吴丹 匡轩 王欢 庞雪辉 张勇 胡丽华 范大伟		
IPC分类号	G01N21/76 G01N27/30 G01N27/327 G01N33/531		
CPC分类号	G01N21/76 G01N27/30 G01N27/3278 G01N33/531		
代理人(译)	李茜		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种金杂化MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒固载鲁米诺检测淀粉样β蛋白42的电化学发光传感器。在本发明中，MoS<sub>2</sub>/Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub>纳米棒不仅具有优良的电催化性能，而且可以通过金-硫键固载大量的发光材料鲁米诺，增强发光材料的电化学发光强度。为了灵敏地检测淀粉样β蛋白42，本发明设计了一种夹心型的猝灭型电化学发光免疫传感器，采用姜黄素-ZnO纳米材料基于消耗超氧根自由基和电化学发光-共振能量转移猝灭鲁米诺的电化学发光信号。根据不同浓度的淀粉样β蛋白42可以结合不同量的二抗标记物聚多巴胺@姜黄素-ZnO，使得该传感器电化学发光强度变化不同。本发明对淀粉样β蛋白42检测的线性范围为0.05 pg/mL-10 ng/mL，检测限为21 fg/mL。

