



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109738496 B

(45) 授权公告日 2021.06.08

(21) 申请号 201910060618.X

CN 107621493 A, 2018.01.23

(22) 申请日 2019.01.22

CN 108693231 A, 2018.10.23

CN 103908963 A, 2014.07.09

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109738496 A

Jingman Han等.One-

stepsynthesisofgrapheneoxide-thionine-

Aunanocomposites and

itsapplicationforelectrochemicalimmunosensing.《Biosensors andBioelectronics》.2013,第47卷

(43) 申请公布日 2019.05.10

(73) 专利权人 重庆医科大学

地址 400016 重庆市渝中区医学院路1号

Shuang Zhao等.A highly sensitive label-free electrochemical immunosensor based on AuNPs-PtNPs-MOFs for nuclear matrix protein 22 analysis in urine sample.《Journal of Electroanalytical Chemistry》.2018,第834卷

(72) 发明人 于超 何俊琳 毛巍然

(51) Int.Cl.

G01N 27/26 (2006.01)

G01N 27/30 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 107677716 A, 2018.02.09

CN 107505466 A, 2017.12.22

审查员 汪李

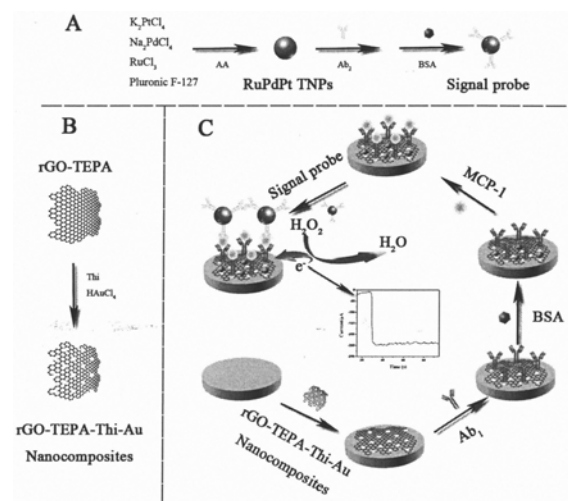
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种用于检测单核细胞趋化蛋白-1新型电化学生物传感器制备方法

(57) 摘要

本发明成功开发了基于新型还原性氧化石墨四乙烯五胺-硫堇-金纳米粒子 (rGO-TEPA-Thi-Au) 复合材料和钌钯铂三金属纳米粒子 (RuPdPt TNPs) 的超敏夹心电化学免疫传感器,用于检测人血清中的单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)。还原性氧化石墨四乙烯五胺 (rGO-TEPA) 含有大量氨基并显著加速电子转移,硫堇 (Thi) 分子增加了对带负电荷的 AuCl_4^- 离子的吸附能力,纳米复合材料中的金纳米颗粒 (AuNPs) 可以提供用于固定生物材料的活性位点。此外, RuPdPt TNPs 对 H_2O_2 的还原具有优异的催化性能,并且 Pt-NH₂ 可有效捕获抗体。本发明的优点在于线性范围宽。灵敏度高,特异性强,检测迅速,以及良好的可重复使用性,并且该发明可用于测量人血清中 MCP-1 含量,有在临床检测中有着巨大潜力。



1. 一种基于还原性氧化石墨烯四乙烯五胺-硫堇-金纳米粒子复合材料和钉钨铂三金属纳米粒子信号探针所构建的新型电化学生物传感器的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 还原性氧化石墨烯四乙烯五胺-硫堇-金纳米粒子复合材料的制备:

首先将3mL 1mg mL^{-1} 的还原性氧化石墨烯四乙烯五胺溶液超声处理至少30分钟;然后,将3mL 0.5mM的硫堇和25 μL 1%HAuCl₄溶液加入到上述还原性氧化石墨烯四乙烯五胺溶液中并在室温中剧烈搅拌12小时;随后在9000rpm下离心15分钟收集所得物并用超纯水离心洗涤三次;将离心收集的产物溶入到1mL超纯水中并在4℃冰箱储存;

(2) 钉钨铂三金属纳米粒子信号探针的制备:

将17.5mM K₂PtCl₄, 2.5mM Na₂PdCl₄, 1.25mM RuCl₃和20mg Pluronic F-127分散在2mL的水溶液中,然后在搅拌的条件下快速加入2mL 0.1M抗坏血酸;将溶液混合后,在室温下搅拌120分钟后用超纯水离心清洗循环三次,将离心收集的钉钨铂三金属纳米粒子冷冻干燥后在4℃冰箱储存;然后,将单核趋化蛋白-1第二抗体溶解于pH=7.4, 10mL的PBS中,得到10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的单核趋化蛋白-1第二抗体原液;取50 μL 单核趋化蛋白-1第二抗体原液溶液加入到4.0mg mL^{-1} , 1.0mL的钉钨铂三金属纳米粒子溶液中,溶解并在4℃下振荡12小时;接下来,将100 μL 0.25wt%BSA加入上述溶液中以封闭活性位点,随后,将所得溶液离心,彻底洗涤以除去未结合的抗体,再分散于1mL超纯水中得到信号探针,然后在4℃下储存以供进一步使用;

(3) 采用上述复合材料和信号探针构筑所述的电化学生物传感器。

2. 根据权利要求1所述的制备方法得到的电化学生物传感器,用于单核细胞趋化蛋白-1的检测,其特征在于所述检测步骤如下:

(1) 分别用0.3和0.05 μm 的Al₂O₃粉末将电极抛光成镜面,然后分别按超纯水、无水乙醇、超纯水的顺序超声电极各5min,室温干燥备用;

(2) 将10 μL 电极修饰材料还原性氧化石墨烯四乙烯五胺-硫堇-金纳米粒子复合材料滴加在电极表面,在室温条件下干燥;

(3) 在37℃下,将10 μL 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的单核趋化蛋白-1第一抗体溶液结合到干燥的电极表面,结合时间为2.5h;

(4) 用超纯水将孵育后的电极冲洗干净后滴加10 μL , 0.25%的BSA溶液37℃下孵育30min;

(5) 用超纯水将电极冲洗干净后将不同浓度的单核趋化蛋白-1抗原滴加在电极上并置于37℃孵育2h;

(6) 在干燥后的电极上滴加10 μL 信号探针混合液置于37℃孵育1h;

(7) 将孵育后的电极用超纯水冲洗干净后置于室温条件干燥;

(8) 将电极置于5mL, 用0.1M Na₂HPO₄, 0.1M KH₂PO₄, 0.1M KCl配置而成的0.1M PBS中进行表征,每隔20s加入20 μL , 2.4mM H₂O₂, 测量其计时电流变化电流值;

(9) 根据所得电流变化值与单核趋化蛋白-1抗原浓度呈线性关系,绘制工作曲线。

一种用于检测单核细胞趋化蛋白-1新型电化学生物传感器制备方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种在临床上定量检测单核细胞趋化蛋白-1的电化学免疫传感器的制备方法及应用,尤其是基于还原性氧化石墨烯四乙烯五胺-硫堇-金纳米粒子复合材料及三金属钨钼铂纳米复合材料作为信号探针制备的生物传感器,用于检测单核细胞趋化蛋白-1,属于电化学检测领域。

背景技术：

[0002] 心血管疾病是发达国家最常见的死亡原因而其中动脉粥样硬化又是心血管疾病的主要原因。单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 是半胱氨酸-半胱氨酸家族的成员,也称为半胱氨酸-半胱氨酸趋化因子配体2,其与心血管疾病的发病机理密切相关。人血清中MCP-1水平升高可导致一些动脉粥样硬化疾病的产生,如不稳定性心绞痛,心肌梗塞和支架内再狭窄等。因此,测定血清中的MCP-1对于动脉粥样硬化疾病的诊断和预测具有重要意义。

[0003] 传统确定MCP-1浓度的方法包括有酶联免疫吸附测定 (ELISA),免疫组织化学,蛋白质印迹和免疫细胞化学。尽管这些方法比较有效,但它们仍然存在着价格昂贵,耗时且操作复杂的缺点。因此,迫切需要一种用于敏感检测MCP-1的替代方法。MCP-1定量分析的替代方案是电化学免疫传感器,其具有优于传统检测方法的许多优点,包括操作简单,检测快速和检测成本低。然而,电化学免疫传感器仍存在缺点:电流信号太小不满足所需的灵敏度,而更高的灵敏度允许我们用更少的生物样品获得准确的结果。因此,我们倾向于建立夹心免疫传感器以提高检测灵敏度,信号放大策略是我们新的电化学免疫传感器要解决的关键问题。

[0004] 纳米复合材料由于其潜在的生物测定应用而在过去几十年中被大量研究。一种新型材料,还原性氧化石墨烯-四亚乙基五胺 (rGO-TEPA),不仅具有rGO的整体性能,而且与其他碳材料相比具有许多优点,例如显著的溶解性和较大的表面积。最重要的是,rGO-TEPA含有大量氨基,可以很容易地与金属或生物材料结合形成多功能纳米复合材料。为了将抗体固定在基于rGO-TEPA的电活性纳米复合材料上,我们直接一步通过硫堇 (Thi) 和rGO-TEPA的协同作用与 HAuCl_4 结合,在室温下合成rGO-TEPA-Thi-Au纳米复合材料。其中带正电荷的Thi分子增加了带负电荷的 AuCl_4^- 离子的吸附能力,吸附在纳米复合材料上的Thi分子仍然保持其电活性氧化还原性质。此外,纳米复合材料中的AuNPs可以提供活性位点以固定生物分子以制备免疫传感器。最后,该纳米复合材料可以容易地在玻碳电极 (GCE) 上形成具有优异导电性的稳定膜。用这种纳米复合材料改性的电极具有更好的导电性,从而实现初步的信号放大。

[0005] 新信号材料的开发是电化学免疫传感器信号放大的核心组成部分。最近,三金属纳米催化材料比单金属和双金属对应材料引起了更多的关注。与双金属和单金属催化材料相比,三金属纳米材料具有更好的性能,如化学稳定性,高表面积和快速电子转移。这些特性是由于复合材料的几何和电子效应的结合而产生的。这两种效应同时存在并对三金属催

化剂中的催化活性产生协同效应,这对于电分析应用是重要的。这里,我们首次合成的钌钯铂三金属纳米粒子(RuPdPt TNPs)是用于检测MCP-1的理想信号放大标记。主要原因如下:首先,RuPdPt TNPs具有表面积大,粒径均匀,导电性好的特点。其次,在该课题的研究中,与传统纳米材料如Pt纳米粒子和PdPt双金属纳米粒子相比,RuPdPt TNPs具有很强的催化活性。最后,该材料能够通过Pt-NH₂键大量固定生物分子。总之,通过RuPdPt TNP催化H₂O₂可以极大地放大信号。

[0006] 该项目建立了一个简单、快速的检测方法实现了对MCP-1的特异、超灵敏检测。为心血管疾病患者早期检测和风险预测提供依据。

发明内容:

[0007] 1.本发明的目的是用于检测核细胞趋化蛋白-1的电化学免疫传感器的制备方法与应用,为临床上心血管疾病患者早期检测和风险预测提供依据,其特征包括以下步骤:

[0008] (1) 还原性氧化石墨烯四乙烯五胺-硫堇-金纳米粒子(rGO-TEPA-Thi-Au)复合材料的制备和信号探针的制备;

[0009] (2) 建立电化学免疫传感器,检测单核细胞趋化蛋白-1,绘制标准曲线。

[0010] 2.本发明所述还原性氧化石墨烯四乙烯五胺-硫堇-金纳米粒子(rGO-TEPA-Thi-Au)复合材料的制备和信号探针的制备过程具体包括以下步骤,其特征包括以下步骤:

[0011] (1) rGO-TEPA-Thi-Au复合材料的制备:

[0012] 首先将3mL rGO-TEPA溶液(1mg mL⁻¹)超声处理至少30分钟。然后,将3mL Thi(0.5mM)和25μL 1%HAuCl₄溶液加入到上述rGO-TEPA溶液中并在室温中剧烈搅拌12小时。随后在9000rpm下离心15分钟收集所得物并用超纯水离心洗涤三次。将离心收集的产物溶入到1mL超纯水中并在4℃冰箱储存。

[0013] (2) 钌钯铂三金属纳米粒子(RuPdPt TNPs)的制备:

[0014] 将含有17.5mM K₂PtCl₄,2.5mM Na₂PdCl₄,1.25mM RuCl₃和20mg Pluronic F-127的分散在2mL的水溶液中,然后在搅拌的条件下快速加入2mL 0.1M AA。将混合溶液后在室温下搅拌120分钟后用超纯水离心清洗循环三次。将离心收集的产物冷冻干燥后在4℃冰箱储存。

[0015] (3) 信号探针的制备:

[0016] 将单核趋化蛋白-1第二抗体溶解于PBS(pH=7.4,10mL)中,得到单核趋化蛋白-1第二抗体原液(10μg mL⁻¹)。取50μL单核趋化蛋白-1第二抗体原液溶液加入到RuPdPt TNP(4.0mg mL⁻¹,1.0mL)中,溶解并在4℃下振荡12小时。接下来,将100μL BSA(0.25%,w/v)加入上述溶液中以封闭活性位点。随后,将所得溶液离心,彻底洗涤以除去未结合的抗体,再分散于1mL超纯水中得到信号探针,然后在4℃下储存以供进一步使用。

[0017] 3.根据权利要求1所述的建立电化学免疫传感器,检测单核细胞趋化蛋白-1,绘制标准曲线,其特征在于包括以下步骤:

[0018] (1) 分别用0.3和0.05μm的Al₂O₃粉末将电极抛光成镜面,然后分别按超纯水、无水乙醇、超纯水的顺序超声电极各5min,室温干燥备用;

[0019] (2) 将10μL电极修饰材料还原性氧化石墨烯四乙烯五胺-硫堇-金纳米粒子(rGO-TEPA-Thi-Au)复合材料滴加在电极表面,在室温条件下干燥。

[0020] (3) 将10 μ L的单核趋化蛋白-1第一抗体溶液(10 μ g mL⁻¹)结合到干燥的电极表面(37 $^{\circ}$ C, 2.5h)

[0021] (4) 用超纯水将孵育后的电极冲洗干净后滴加10 μ L, 0.25%的BSA溶液37 $^{\circ}$ C下孵育30min。

[0022] (5) 用超纯水将电极冲洗干净后将不同浓度的单核趋化蛋白-1抗原滴加在电极上并置于37 $^{\circ}$ C孵育2h。

[0023] (6) 在干燥后的电极上滴加10 μ L信号探针混合液置于37 $^{\circ}$ C孵育1h。

[0024] (7) 将孵育后的电极用超纯水冲洗干净后置于室温条件干燥。

[0025] (8) 将电极置于5mL, 0.1M PBS (0.1M Na₂HPO₄, 0.1M KH₂PO₄, 0.1M KCl) 中进行表征, 每隔20s加入20 μ L, 2.4mM H₂O₂, 测量其计时电流变化电流值。

[0026] (9) 根据所得电流变化值与单核趋化蛋白-1抗原浓度呈线性关系, 绘制工作曲线。

[0027] 与现有技术相比, 本发明的一种定量检测MCP-1的电化学免疫传感器的制备方法与应用, 其突出的特点是:

[0028] (1) 将基于还原性氧化石墨烯四乙烯五胺-硫堇-金纳米粒子复合材料作为电极修饰材料, 将基于钌钨铂三金属纳米粒子作为信号探针, 不仅有效的提高了材料的催化性能, 而且提高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和检测范围;

[0029] (2) 本方法制备的电化学免疫传感器可为临床早期诊断心血管疾病患者提供依据, 并且也可以用于预测心血管事件发生的风险。另外, 此方法简便, 快速, 便于实现商品化, 从而推进精准医学的发展。

[0030] (3) 使用完全相同的纳米材料和修饰方法, 可以在电极表面固载不同的抗体, 从而实现对多种生物分子的同时检测, 为疾病的诊断提供更加全面的依据。

附图说明:

[0031] 图1为本发明的电化学免疫传感器的构建示意图。

[0032] 图2为本发明的还原性氧化石墨烯四乙烯五胺-硫堇-金纳米粒子复合材料的电镜图和钌钨铂三金属纳米粒子电镜图, XPS图和EDS图。

[0033] 图3为本发明的电化学免疫传感器在检测MCP-1时得到的计时电流变化电流与浓度的线性关系, 以及传感器的特异性和稳定性。

具体实施方式:

[0034] 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。

[0035] 实施例1

[0036] 步骤1. 首先将3mL rGO-TEPA溶液(1mg mL⁻¹)超声处理至少30分钟。然后, 将3mL Thi (0.5mM) 和25 μ L 1%HAuCl₄溶液加入到上述rGO-TEPA溶液中并在室温中剧烈搅拌12小时。随后在9000rpm下离心15分钟收集所得物并用超纯水离心洗涤三次。将离心收集的产物溶入到1mL超纯水中并在4 $^{\circ}$ C冰箱储存。

[0037] 步骤2. 分别用0.3和0.05 μ m的Al₂O₃粉末将电极抛光成镜面, 然后分别按超纯水、无水乙醇、超纯水的顺序超声电极各5min, 室温干燥备用;

[0038] 步骤3.将10 μ L电极修饰材料还原性氧化石墨烯四乙烯五胺-硫堇-金纳米粒子(rGO-TEPA-Thi-Au)复合材料滴加在电极表面,在室温条件下干燥。

[0039] 步骤4.将10 μ L的单核趋化蛋白-1第一抗体溶液(10 μ g mL⁻¹)结合到干燥的电极表面(37 $^{\circ}$ C,2.5h)

[0040] 步骤5.用超纯水将孵育后的电极冲洗干净后滴加10 μ L,0.25%的BSA溶液37 $^{\circ}$ C下孵育30min。

[0041] 步骤6.用超纯水将电极冲洗干净后将不同浓度的单核趋化蛋白-1抗原滴加在电极上并置于37 $^{\circ}$ C孵育2h。

[0042] 步骤7.在干燥后的电极上滴加10 μ L信号探针混合液置于37 $^{\circ}$ C孵育1h。

[0043] 步骤8.将孵育后的电极用超纯水冲洗干净后置于室温条件干燥。

[0044] 步骤9.将电极置于5mL,0.1M PBS(0.1M Na₂HPO₄,0.1M KH₂PO₄,0.1M KCl)中进行表征,每隔50s加入20 μ L,1.4mM H₂O₂,测量其计时电流变化电流值;

[0045] 步骤10.根据所得电流变化值与单核趋化蛋白-1抗原浓度呈线性关系,绘制工作曲线;测定结果表明MCP-1浓度在20fg mL⁻¹-1000pg mL⁻¹范围内成线性关系,线性相关系数为0.99673,检测限为8.9fg mL⁻¹。

[0046] 步骤11.将本发明上述传感器于4 $^{\circ}$ C保存,间断检测传感器电流响应,储存21天后电流响应仍为初始电流的85.2%,表示传感器具有良好的稳定性;

[0047] 步骤12.本发明取同一批次制备的免疫传感器5支,在相同条件下对20pg mL⁻¹的MCP-1分别进行测定,每一支电极测定3次,传感器重现性良好。

[0048] 步骤13.将本发明上述传感器在血液中其他生物分子存在的条件下检测MCP-1,结果其他生物分子的存在不影响MCP-1电流的改变,说明传感器的特异性好,可以很好区分目标检测物。

[0049] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出的是,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提条件下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

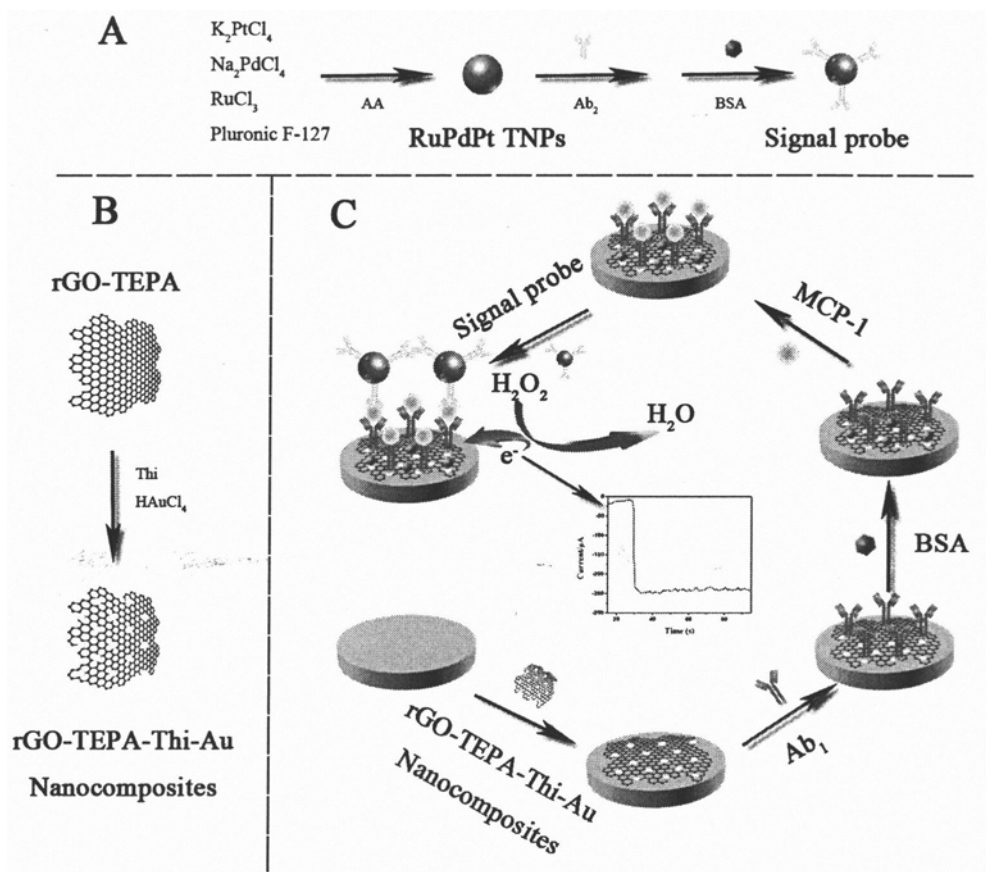


图1

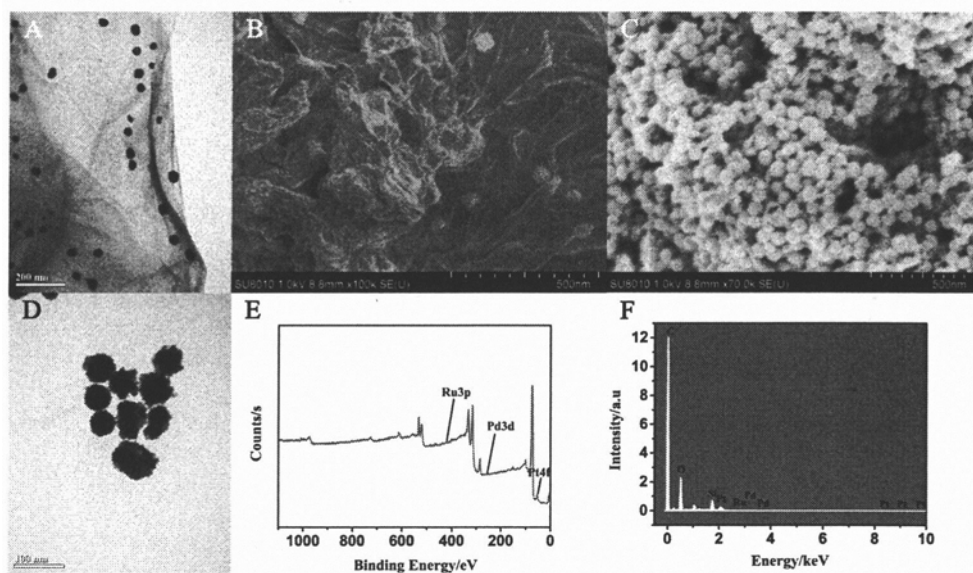


图2

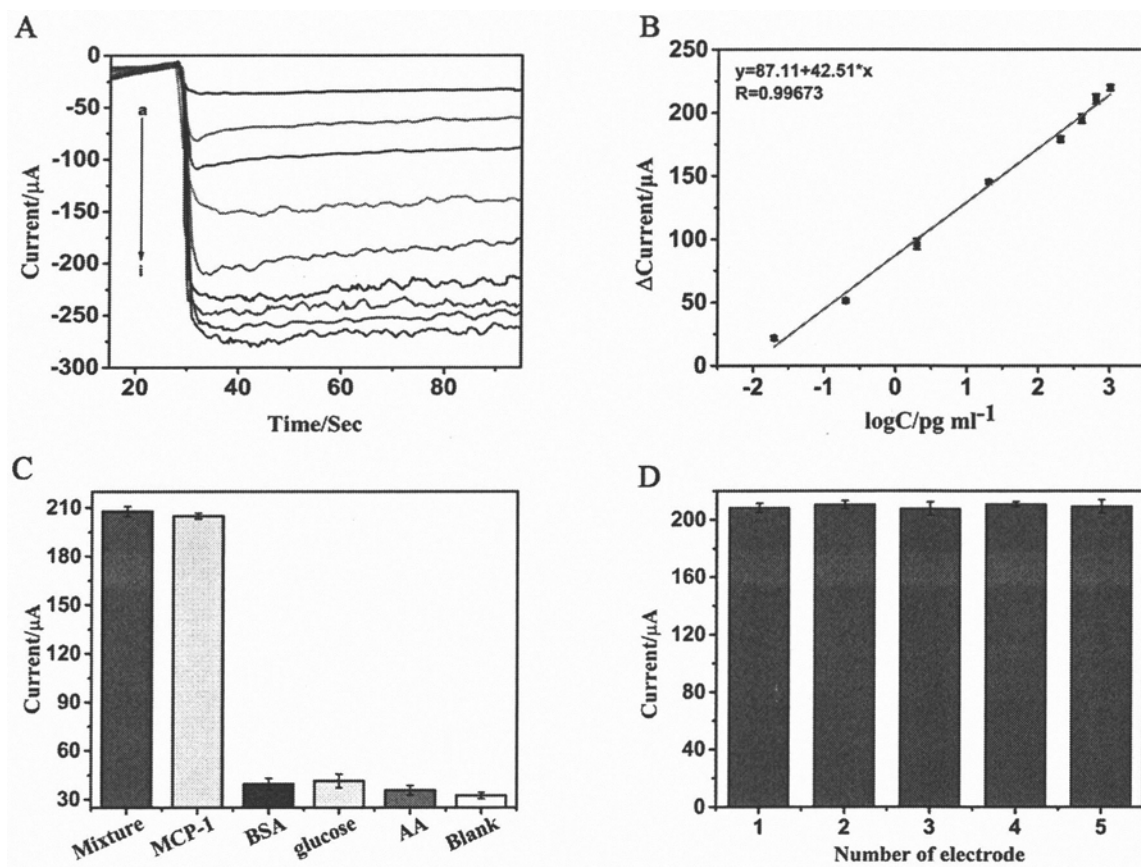


图3