



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113267632 B

(45) 授权公告日 2023.06.23

(21) 申请号 202110571488.3

审查员 苗君叶

(22) 申请日 2021.05.25

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113267632 A

(43) 申请公布日 2021.08.17

(73) 专利权人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区颐和园路5号

(72) 发明人 邵元华 梁旭 米兰 胡悦聪

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

专利代理师 赵静

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

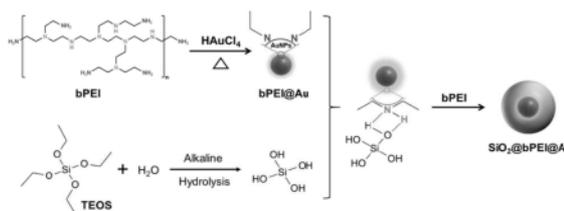
权利要求书2页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

一种基于多功能聚乙烯亚胺介导的检测心肌梗死标志物的无标记电化学发光免疫阵列传感器

(57) 摘要

本发明公开了利用“一锅法”制备多功能聚乙烯亚胺介导的二氧化硅@金核壳纳米结构,并将其用于构建同时检测三种急性心肌梗死标志物的无标记电化学发光免疫阵列传感器。具体步骤如下:将氯金酸加入热的聚乙烯亚胺溶液中生成金纳米,冷却后再加入聚乙烯亚胺和正硅酸四乙酯形成二氧化硅壳层。反应所得沉淀与壳聚糖溶液混合后修饰电极可用于无标记电化学发光免疫分析,检测限均低至fg/mL。此外,该材料还可用于修饰阵列电极,三种目标物在10pg/mL~100ng/mL范围内有良好的线性响应,实现了样品中多种目标分析物的同时定量分析。与现有技术相比,本发明技术简单、稳定、价格低廉,灵敏度高,可广泛应用于基于生物亲和反应的多通道定量检测中,极大地缩短分析时间,提高分析通量,在电化学发光分析领域具有广阔的应用前景。



1. 一种多功能聚乙烯亚胺介导的二氧化硅@金核壳纳米结构的制备方法,包括下述步骤:

1) 将氯金酸加入热的还原剂溶液中进行还原反应,生成金纳米粒子;

2) 冷却后向步骤1)的体系中加入碱源和硅酸酯进行反应,在所述金纳米粒子的表面形成二氧化硅壳层,即得;其中,所述还原剂和碱源均为聚乙烯亚胺;

所述聚乙烯亚胺为分枝状聚乙烯亚胺,其重均分子量为1800g/mol。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于:

所述硅酸酯为正硅酸四乙酯;

所述还原剂、氯金酸、正硅酸四乙酯、碱源的摩尔比为0.2:18:81:10~2:18:810:50。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于:

所述还原剂、氯金酸、正硅酸四乙酯、碱源的摩尔比为1:18:405:30。

4. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于:所述步骤1)中,所述还原剂与氯金酸的摩尔比为0.2:18~2:18;

所述还原反应的反应温度在30~100℃;所述还原反应的反应时间在2~20min;

所述还原反应在溶剂中进行,所述溶剂为水;

所述步骤2)中,所述冷却在冰水浴中进行,所述冷却的时间为3~10min;

所述反应在15~25℃条件下,反应时间为25~40min。

5. 权利要求1-4中任一项所述方法制备得到的多功能聚乙烯亚胺介导的二氧化硅@金核壳纳米结构。

6. 一种无标记免疫传感器或无标记免疫阵列传感器的制备方法,包括下述步骤:

a1) 将权利要求5所述的多功能聚乙烯亚胺介导的二氧化硅@金核壳纳米结构与壳聚糖溶液混合后滴涂于电极或阵列电极表面,自然干燥,得到修饰电极或修饰阵列电极;

a2) 将所述修饰电极或修饰阵列电极表面先用柠檬酸钠@金修饰的抗体的溶液进行修饰,再用BSA溶液封闭非特异性结合位点,即得。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:所述步骤a1)中,所述壳聚糖溶液浓度为0.1~5mg/mL;

所述多功能聚乙烯亚胺介导的二氧化硅@金核壳纳米结构与壳聚糖的质量比为2~20:1;

所述电极为玻璃碳电极,电极直径3mm;所述阵列电极为三玻璃碳电极阵列,阵列中各电极直径2mm,间距2mm;

所述步骤a2)中,对于所述修饰电极,其选择的抗体选自下述任意一种:抗cTnI抗体、抗hFABP抗体、抗coopeptin抗体;

对于所述修饰阵列电极,所述抗体选自下述任意一种:抗cTnI抗体、抗hFABP抗体、抗coopeptin抗体;且所述阵列电极中不同电极上的抗体不同;

或,所述步骤a2)的具体制备方法如下:在所述修饰的电极或修饰的阵列电极表面滴加柠檬酸钠@金修饰的抗体的溶液,4℃孵育过夜;用PBS溶液清洗后,滴加BSA的PBS溶液,4℃保持1h以封闭非特异性结合位点,最后用PBS清洗电极表面。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:所述步骤a1)中,所述壳聚糖溶液浓度为0.5mg/mL;

所述多功能聚乙烯亚胺介导的二氧化硅@金核壳纳米结构与壳聚糖的质量比为14:1。

9. 权利要求7或8所述方法制备得到的无标记免疫传感器或无标记电化学发光免疫阵列传感器。

一种基于多功能聚乙烯亚胺介导的检测心肌梗死标志物的无标记电化学发光免疫阵列传感器

技术领域

[0001] 本发明属于纳米合成、免疫反应、电化学发光分析、成像分析等领域,具体涉及一种由多功能聚乙烯亚胺介导的合成二氧化硅@金核壳纳米结构的新方法,发展了一种新型无标记电化学发光免疫传感器阵列用于同时检测三种急性心肌梗死标志物。

背景技术

[0002] 急性心肌梗死(AMI)是一种由冠状动脉急性、持续性缺血缺氧引起的心肌疾病,是近年来世界上致死率最高的疾病之一。大量的研究数据表明,AMI发作后的3小时内是拯救患者生命的黄金时期,因此快速、准确的诊断对于及时治疗和挽救濒死心肌具有重要意义。近年来,常以定量检测血清中AMI生物标志物的含量作为AMI临床诊断的有力依据。然而,目前检测AMI生物标志物的方法通常局限于单标志物检测,容易造成检测的假阳性。因此,开发一种新型免疫传感平台用于同时检测多种AMI标志物(心肌肌钙蛋白I(cTnI)、心型脂肪酸结合蛋白(hFABP)、和肽素(copeptin)等)对于提高诊断准确率至关重要。

[0003] 实际上,已有空间分辨的电化学发光传感平台用于多AMI标志物同时检测的报道。例如,Zhang等(Sens.Actuators,B:Chem.,2018,257,60-67)以钌复合物标记的链霉亲和素-生物素抗体复合物为电化学发光探针,在金电极上构建了夹心型的适配体免疫传感阵列,实现了三种AMI标志物(cTnI、cTcT、Myo)的同时检测。然而,这种基于标记方法的组装策略不仅需要另外合成发光功能化探针,引入第二种识别分子,而且操作繁琐耗时,不利于AMI快速诊断的目标。因此急需开发一种无标记的电化学发光传感器阵列用于多种AMI标志物的快速、同时检测。

[0004] 纳米材料由于其具有较大的比表面积,较好的导电性,优异的催化性能和良好的生物兼容性等性质被广泛用于分析探针的构建及分析界面的组装等领域。但是,多数纳米材料的制备困难,步骤繁琐,稳定性差,不利于进一步的分析应用,因此需要简化其制备过程,提高稳定性和实用性。分枝状聚乙烯亚胺(bPEI)是一种胺类高聚物,具有特殊的网状限域结构,其分子中含有伯胺、仲胺、叔胺三种类型的胺基,因此具有强还原性和强碱性,且在水溶液中具有较高的阳离子电荷密度,通常作为联吡啶钌高效的共反应剂参与电化学发光免疫分析过程。例如,Yuan等(Anal.Chim.Acta,2018,1001,112-118)将bPEI与联吡啶钌的衍生物偶联,形成自增强的联吡啶钌-PEI复合物,通过分子内电子转移来显著提高发光效率,用于癌胚抗原的超灵敏检测。然而,bPEI的其他性质在电化学发光免疫分析领域的应用较少。实际上,bPEI的多功能特性为简单、温和、迅速地合成稳定的纳米材料,提高其实用价值方面提供了一种全新的思路,因此在构建超灵敏的无标记电化学发光免疫分析界面上具有突出的优势。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种基于多功能聚乙烯亚胺介导的同时检测三种急性心肌

梗死标志物的无标记电化学发光免疫阵列传感器。

[0006] 本发明包括“一锅法”制备多功能聚乙烯亚胺介导的二氧化硅@金核壳纳米结构的新方法,用于构建同时检测三种AMI标志物的无标记电化学发光免疫阵列传感器。

[0007] 本发明所提供的多功能聚乙烯亚胺介导的二氧化硅@金核壳纳米结构的制备方法,包括下述步骤:

[0008] 1) 将氯金酸加入热的还原剂溶液中进行还原反应,生成金纳米粒子;

[0009] 2) 冷却后向步骤1)的体系中加入碱源和硅酸酯进行反应,在所述金纳米粒子的表面形成二氧化硅壳层,得到所述多功能聚乙烯亚胺介导的二氧化硅@金核壳纳米结构。

[0010] 上述方法中,所述还原剂和碱源均为聚乙烯亚胺,进一步可为分枝状聚乙烯亚胺,其重均分子量可为1500~2000g/mol,优选1800g/mol。

[0011] 上述方法步骤1)中,所述还原剂与氯金酸的摩尔比为0.2:18~2:18。

[0012] 上述方法步骤1)中,所述还原反应的反应温度在30~100℃,优选80℃;所述还原反应的反应时间在2~20min,优选15min。

[0013] 上述方法步骤1)中,所述还原反应在溶剂中进行,所述溶剂为水。

[0014] 上述方法步骤2)中,所述冷却在冰水浴中进行,所述冷却的时间可为3~10min,优选5min。

[0015] 上述方法步骤2)中,所述反应在常温(15~25℃)条件下,反应时间可为25~40min,优选30min。

[0016] 上述方法步骤2)中,所述硅酸酯为正硅酸酯,进一步可为正硅酸四乙酯。

[0017] 上述方法中,当所述还原剂和碱源均为聚乙烯亚胺,所述硅酸酯为正硅酸四乙酯,所述反应中一次聚乙烯亚胺(还原剂)、氯金酸、正硅酸四乙酯、二次聚乙烯亚胺(碱源)的摩尔比为0.2:18:81:10~2:18:810:50,优选1:18:405:30;

[0018] 具体的,当所述还原剂和碱源均为聚乙烯亚胺时,所述硅酸酯为正硅酸四乙酯时,所述方法具体步骤及原理如下:将一定量的聚乙烯亚胺溶于超纯水中,加热搅拌并迅速加入氯金酸水溶液。聚乙烯亚胺中丰富的胺基能够直接还原氯金酸生成金纳米粒子,同时,金-氮键的存在可以使聚乙烯亚胺的伯胺基牢固地结合在金纳米表面。反应一段时间后置于冰水浴中冷却,常温搅拌下加入正硅酸四乙酯,水解生成的带有负点的硅羟基被吸附到带有正电荷的聚乙烯亚胺修饰的金纳米表面,并通过氢键与仲胺基交联。此时再加入聚乙烯亚胺水溶液,聚乙烯亚胺的强碱性可以催化正硅酸四乙酯的水解缩合反应,使其逐层沉积在金纳米表面,形成致密的二氧化硅壳层,并将二次加入的聚乙烯亚胺同步包裹在硅壳层中。

[0019] 由于聚乙烯亚胺含有丰富的叔胺基,是联吡啶钉有效的共反应剂,所以该材料能够有效地放大联吡啶钉的电化学发光信号。该材料还具有极高的稳定性和良好的生物兼容性,将其与壳聚糖溶液混合后滴涂于电极表面,自然干燥得到的修饰电极能够作为电化学发光传感界面分别检测三种AMI标志物。用同样的方法将该材料修饰在阵列电极表面,构建基于空间分辨的无标记电化学发光分析界面用于同时检测三种AMI标志物。

[0020] 上述方法制备的多功能聚乙烯亚胺介导的二氧化硅@金核壳纳米结构也属于本发明的保护范围。

[0021] 本发明的另一个目的是提供一种无标记免疫传感器。

[0022] 本发明所提供的无标记免疫传感器是按照包括下述步骤的方法制备得到的：

[0023] a1) 将本发明制备的多功能聚乙烯亚胺介导的二氧化硅@金核壳纳米结构与壳聚糖溶液混合后滴涂于电极表面，自然干燥，得到修饰电极；

[0024] a2) 在所述修饰电极表面先用柠檬酸钠@金修饰的抗体 (Ab-GNP) 溶液进行修饰，再用BSA溶液封闭非特异性结合位点，即得。

[0025] 上述步骤a1) 中，所述壳聚糖溶液浓度在0.1~5mg/mL，优选0.5mg/mL；

[0026] 上述步骤a1) 中，所述多功能聚乙烯亚胺介导的二氧化硅@金核壳纳米结构与壳聚糖的质量比为2~20:1，优选14:1。

[0027] 上述步骤a1) 中，所述电极为玻璃碳电极，电极直径3mm。

[0028] 所述玻璃碳电极使用前还需进行前处理，以清除电极表面玷污或吸附杂质造成的污染。具体方法如下：首先将玻璃碳电极 (GCE) 依次在0.5 μ m和0.05 μ m的氧化铝悬浊液中抛光打磨，更换悬浊液及超声处理前需用超纯水冲洗电极表面；将电极依次置于超纯水、乙醇、超纯水中各超声处理5min以除去电极表面残留的氧化铝粉末；随后在电极表面滴加浓硫酸并保持15s以活化表面羧基，超纯水冲洗后将其置于0.50mol/L硫酸中进行电化学清洗，扫描范围从-1.0V到1.0V，以0.1V/s的扫速进行循环伏安扫描至稳定。将该电极用超纯水冲洗，并用氮气吹干备用。

[0029] 上述步骤a2) 中，所述抗体具体可选自下述任意一种：抗cTnI抗体、抗hFABP抗体、抗copeptin抗体。

[0030] 上述步骤a2) 中，所述柠檬酸钠@金修饰的抗体 (Ab-GNPs) 是按照文献方法制备得到的 (Anal. Chem., 2018, 90, 6064-6070)。

[0031] 上述步骤a1) 得到的修饰电极可作为电化学发光传感界面分别检测三种AMI标志物 (心肌肌钙蛋白I (cTnI)、心型脂肪酸结合蛋白 (hFABP) 和肽素 (copeptin))。

[0032] 本发明的再一个目的是提供一种无标记电化学发光免疫阵列传感器。

[0033] 本发明所提供的无标记电化学发光免疫阵列传感器是按照包括下述步骤的方法制备得到的：

[0034] b1) 将本发明制备的多功能聚乙烯亚胺介导的二氧化硅@金核壳纳米结构与壳聚糖溶液混合后滴涂于电极阵列表面，自然干燥，得到修饰的电极阵列；

[0035] b2) 在所述修饰的阵列电极表面先用柠檬酸钠@金修饰的抗体 (Ab-GNP) 溶液进行修饰，再用BSA溶液封闭非特异性结合位点，即得。

[0036] 上述步骤b1) 中，所述壳聚糖溶液浓度在0.1~5mg/mL，优选0.5mg/mL；

[0037] 上述步骤b1) 中，所述多功能聚乙烯亚胺介导的二氧化硅@金核壳纳米结构与壳聚糖的质量比为2~20:1，优选14:1。

[0038] 上述步骤b1) 中，所述阵列电极为三玻璃碳电极阵列，阵列中各电极直径2mm，间距2mm。

[0039] 上述步骤b2) 中，所述抗体具体可选自下述任意一种：抗cTnI抗体、抗hFABP抗体、抗copeptin抗体；且所述电极阵列中不同电极上的抗体不同。

[0040] 上述步骤b2) 中，所述柠檬酸钠@金修饰的抗体 (Ab-GNPs) 是按照下述方法制备得到的 (Anal. Chem., 2018, 90, 6064-6070)：将4mL柠檬酸钠溶液 (1%, w/w) 迅速加入到100mL 0.3mmol/L沸腾的氯金酸溶液中，并剧烈搅拌。回流30min后自然冷却至室温。在6000r/min

下离心10min,取上清液用0.1M氢氧化钠溶液将pH调至8,得到柠檬酸钠@金(GNPs)。将25 μ L 1.0mg/mL抗体加入到1mL GNPs溶液中,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。加入250 μ L BSA溶液(5%,w/w),搅拌5min。在12500r/min离心40min,沉积物分散在250 μ L含有BSA(1%,w/w)的PBS缓冲液(0.01mol/L,pH 7.4)中。获得的柠檬酸钠@金修饰的抗体(Ab-GNPs)存储在4 $^{\circ}$ C。

[0041] 上述步骤b2)的具体制备方法如下:在所述修饰的电极阵列表面滴加柠檬酸钠@金修饰的抗体溶液,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;用PBS溶液清洗后,滴加BSA的PBS溶液,4 $^{\circ}$ C保持1h以封闭非特异性结合位点,最后用PBS清洗电极表面,即得。

[0042] 所述柠檬酸钠@金修饰的抗体溶液的浓度为0.1mg/mL;所述PBS为0.01M磷酸缓冲液,pH=7.4;所述BSA的PBS溶液中BSA的质量浓度为3%。

[0043] 所述阵列电极的电化学发光免疫分析图像由EMCCD精确采集;

[0044] 采用该无标记免疫阵列传感器进行电化学发光成像免疫分析,可以实现样品中多种目标分析物的同时定量分析。

[0045] 本发明还提供了上述无标记电化学发光免疫阵列传感器的应用。

[0046] 本发明所提供无标记电化学发光免疫阵列传感器的应用是其在检测心肌梗死标志物中的应用;尤其是可实现对三种AMI目标物(心肌肌钙蛋白I(cTnI)、心型脂肪酸结合蛋白(hFABP)、和肽素(copeptin))的快速、同时检测。

[0047] 本发明还提供了一种利用上述无标记电化学发光免疫阵列传感器同时检测三种AMI目标物的方法。

[0048] 本发明所提供的同时检测三种AMI目标物的方法,包括下述步骤:

[0049] (c1)以所述无标记电化学发光免疫阵列传感器作为工作电极,与参比电极、对电极组成三电极系统,在检测液中采用电化学发光法对一系列浓度的三种AMI目标物溶液进行电化学检测,根据电化学发光强度与对应的抗原cTnI、抗原hFABP或抗原copeptin浓度的对数值绘制标准曲线;

[0050] 所述检测液为:含有0.1mmol/L联吡啶钉的0.1mol/L的磷酸缓冲液,pH在6.0~9.0,优选7.0;

[0051] (c2)用待测样品溶液替代(c1)中所述的一系列浓度的三种AMI目标物溶液,按照所述(c1)中方法对待测样品进行检测,根据所述标准曲线,计算得到所述待测样品中的抗原cTnI、抗原hFABP和抗原copeptin的浓度。

[0052] 上述方法(c1)中,所述对电极为铂丝,参比电极为银/氯化银(Ag/AgCl)。

[0053] 上述方法(c1)中,抗原cTnI溶液的浓度范围为100fg/mL~10ng/mL;抗原hFABP溶液的浓度范围为10fg/mL~10ng/mL;抗原copeptin溶液的浓度范围为10fg/mL~100pg/mL。

[0054] 上述方法(c1)中,所述电化学发光检测包括下述步骤:将一系列浓度的三种AMI目标物溶液分别滴加在所述工作电极表面,37 $^{\circ}$ C下温育1h,用PBS溶液清洗电极表面,进行电化学发光检测;其中,所述三种AMI目标物分别与所述工作电极中具有抗体相匹配;

[0055] 上述方法(c1)中,所述电化学发光检测的检测条件为:施加恒电位1.35V(vs.Ag/AgCl),EMCCD的曝光时间设置为2s。

[0056] 本发明利用“一锅法”制备聚乙烯亚胺介导的二氧化硅@金核壳纳米结构,将其修饰在电极表面构建无标记电化学发光分析界面,用于定量测定实际样品中的目标物。该分析方法可以检测低至fg/mL水平的目标物(心肌肌钙蛋白I(cTnI)、心型脂肪酸结合蛋白

(hFABP)、和肽素(copeptin)),因此可以用于构建无标记免疫阵列传感器实现对三种AMI目标物的快速、同时检测。与现有技术相比,本发明技术简单、稳定、价格低廉,灵敏度高,可广泛应用于基于生物亲和反应的多通道定量检测中,极大地缩短分析时间,提高分析通量,在电化学发光分析领域具有广阔的应用前景。

附图说明

[0057] 图1为实施例1中制备的聚乙烯亚胺介导的二氧化硅@金核壳纳米结构的原理示意图。

[0058] 图2为实施例1(3)中的免疫反应示意图。研究体系分别为心肌肌钙蛋白I、心型脂肪酸结合蛋白、和肽素在修饰电极上的免疫反应。

[0059] 图3(A)为实施例1(3)中心肌肌钙蛋白I体系的电化学发光信号图。

[0060] 图3(B)为实施例1(3)中心肌肌钙蛋白I体系的标准曲线图。

[0061] 图3(C)为实施例1(3)中心型脂肪酸结合蛋白体系的电化学发光信号图。

[0062] 图3(D)为实施例1(3)中心型脂肪酸结合蛋白体系的标准曲线图。

[0063] 图3(E)为实施例1(3)中和肽素体系的电化学发光信号图。

[0064] 图3(F)为实施例1(3)中和肽素体系的标准曲线图。

[0065] 图4为实施例1(5)中的免疫反应示意图。研究体系为心肌肌钙蛋白I、心型脂肪酸结合蛋白及和肽素在修饰阵列电极上的免疫反应。

[0066] 图5为实施例1(6)中的阵列电极免疫反应检测装置图。

[0067] 图6(A)为实施例1(5)中阵列免疫电极的电化学发光成像图。

[0068] 图6(B)为实施例1(5)中阵列电极的示意图。

[0069] 图6(C)为实施例1(5)中阵列免疫电极1号位(cTnI)的标准曲线图。

[0070] 图6(D)为实施例1(5)中阵列免疫电极2号位(hFABP)的标准曲线图。

[0071] 图6(E)为实施例1(5)中阵列免疫电极3号位(copeptin)的标准曲线图。

具体实施方式

[0072] 下面结合具体实施例对本发明作进一步阐述,但本发明并不限于以下实施例。所述方法如无特别说明均为常规方法。所述原材料如无特别说明均能从公开商业途径获得。

[0073] 下述实施例中所使用的聚乙烯亚胺为分枝状聚乙烯亚胺,其重均分子量为1800g/mol,购自Aladdin。

[0074] 实施例1

[0075] (1)制备聚乙烯亚胺介导的二氧化硅@金核壳纳米结构($\text{SiO}_2@\text{bPEI@Au}$):

[0076] 将1mg聚乙烯亚胺溶于30mL水中,剧烈搅拌下升温至80℃,迅速加入100μL 0.1M氯金酸水溶液,反应15min。置于冰水浴中冷却5min后,常温搅拌下加入50μL正硅酸四乙酯,再迅速加入30mg聚乙烯亚胺,继续反应30min。将反应液在6000rpm下离心分离5min,沉淀物用分别用水、乙醇清洗3次。将最终得到的沉淀物30mg $\text{SiO}_2@\text{bPEI@Au}$ 均匀分散到超纯水中,并定容至10mL,存于4℃待用。

[0077] (2)玻碳电极的处理:首先将玻碳电极(GCE)依次在0.5μm和0.05μm的氧化铝悬浊液中抛光打磨,更换悬浊液及超声处理前需用超纯水冲洗电极表面;将电极依次置于超纯

水、乙醇、超纯水中各超声处理5min以除去电极表面残留的氧化铝粉末;随后在电极表面滴加浓硫酸并保持15s以活化表面羧基,超纯水冲洗后将其置于0.50mol/L硫酸中进行电化学清洗,扫描范围从-1.0V到1.0V,以0.1V/s的扫速进行循环伏安扫描至稳定。将该电极用超纯水冲洗,并用氮气吹干备用。

[0078] (3) 制备无标记免疫电极:取上述(1)制备的 $\text{SiO}_2@\text{bPEI}@Au$,将其与0.5mg/mL的壳聚糖(CS)以7:3的体积比混合,并超声分散($\text{CS}-\text{SiO}_2@\text{bPEI}@Au$)。取10 μL 滴涂于玻璃碳电极上,自然干燥,得到 $\text{CS}-\text{SiO}_2@\text{bPEI}@Au/\text{GCE}$ 修饰电极。迅速滴加6 μL 0.1mg/mL柠檬酸钠@金修饰的抗体($\text{Ab}-\text{GNP}$)溶液(Anal.Chem., 2018, 90, 6064-6070)于 $\text{CS}-\text{SiO}_2@\text{bPEI}@Au/\text{GCE}$ 电极上,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,得到 $\text{Ab}-\text{GNP}/\text{CS}-\text{SiO}_2@\text{bPEI}@Au/\text{GCE}$ 。用PBS(0.01M磷酸缓冲液, $\text{pH}=7.4$)溶液清洗后,滴加6 μL BSA(3%, w/w)的PBS溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保持1h以封闭非特异性结合位点,得到 $\text{BSA}/\text{Ab}-\text{GNP}/\text{CS}-\text{SiO}_2@\text{bPEI}@Au/\text{GCE}$ 修饰电极,PBS清洗电极表面。未使用时,电极保存在4 $^{\circ}\text{C}$ 的PBS中。

[0079] 在制备好的 $\text{BSA}/\text{Ab}-\text{GNP}/\text{CS}-\text{SiO}_2@\text{bPEI}@Au/\text{GCE}$ 修饰电极表面滴加3 μL 含有10fg/mL、100fg/mL、1pg/mL、10pg/mL、100pg/mL、1ng/mL或10ng/mL不同浓度抗原(Ag)的PBS溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育1h,然后用PBS溶液清洗电极表面,得到 $\text{Ag}/\text{BSA}/\text{Ab}-\text{GNP}/\text{CS}-\text{SiO}_2@\text{bPEI}@Au/\text{GCE}$ 免疫修饰电极。(Ag分别为cTnI、hFABP、copeptin, Ab分别为抗cTnI、抗hFABP、抗copeptin)。

[0080] (4) 电化学发光检测:采用三电极系统(工作电极为上述(3)中制备好的免疫修饰电极,对电极为铂丝,参比电极为银/氯化银(Ag/AgCl)),检测液为:含有0.1mmol/L联吡啶钌的0.1mol/L的磷酸缓冲液($\text{pH}=7.0$)。检测条件为:扫描区间为0V~1.35V(vs. Ag/AgCl),扫描速率为0.1V/s,光电倍增管PMT设置为700V。

[0081] 上述制备 $\text{SiO}_2@\text{bPEI}@Au$ 材料的原理如图1所示,免疫反应过程如图2所示。所得电化学发光信号及标准曲线如图3所示,由图可知,随着抗原浓度增加,电化学发光响应随之降低;电化学发光强度与抗原cTnI、hFABP、copeptin浓度的线性范围分别为100fg/mL~10ng/mL,10fg/mL~10ng/mL,10fg/mL~100pg/mL,检测限分别为0.56fg/mL,0.9fg/mL,0.40fg/mL(信噪比为3)。

[0082] (5) 制备无标记免疫阵列电极:设计三玻璃碳电极阵列(GCE array)并分别标记为1号(cTnI)、2号(hFABP)、3号(copeptin)位置。取4.5 μL 上述(3)中的 $\text{CS}-\text{SiO}_2@\text{bPEI}@Au$ 分别滴涂于玻璃碳电极阵列上,自然干燥,得到 $\text{CS}-\text{SiO}_2@\text{bPEI}@Au/\text{GCE array}$ 修饰电极。分别滴加3 μL 0.1mg/mL柠檬酸钠@金修饰的抗体(Ab_1-GNP 、 Ab_2-GNP 、 Ab_3-GNP)溶液(Anal.Chem., 2018, 90, 6064-6070),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,得到 $\text{Ab}-\text{GNP}/\text{CS}-\text{SiO}_2@\text{bPEI}@Au/\text{GCE array}$ 。用PBS(0.01M磷酸缓冲液, $\text{pH}=7.4$)溶液清洗后,分别滴加3 μL BSA(3%, w/w)的PBS溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保持1h以封闭非特异性结合位点,得到 $\text{BSA}/\text{Ab}-\text{GNP}/\text{CS}-\text{SiO}_2@\text{bPEI}@Au/\text{GCE array}$ 修饰电极,PBS清洗电极表面。未使用时,电极保存在4 $^{\circ}\text{C}$ 的PBS中。

[0083] 在制备好的 $\text{BSA}/\text{Ab}-\text{GNP}/\text{CS}-\text{SiO}_2@\text{bPEI}@Au/\text{GCE array}$ 修饰电极表面分别滴加3 μL 含有不同种类抗原(Ag_1 、 Ag_2 、 Ag_3)的PBS溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育1h,然后用PBS溶液清洗电极表面,得到 $\text{Ag}/\text{BSA}/\text{Ab}-\text{GNP}/\text{CS}-\text{SiO}_2@\text{bPEI}@Au/\text{GCE}$ 免疫修饰电极。(Ag分别为cTnI、hFABP、copeptin, Ab分别为抗cTnI、抗hFABP、抗copeptin)。

[0084] (6) 阵列电极的电化学发光检测:采用三电极系统(工作电极为上述(5)中制备好的免疫阵列电极,对电极为铂丝,参比电极为银/氯化银(Ag/AgCl)),检测液为:含有

0.1mmol/L联吡啶钉的0.1mol/L的磷酸缓冲液(pH=7.0)。检测条件为:恒电位1.35V(vs.Ag/AgCl),EMCCD的曝光时间设置为2s。

[0085] 上述阵列电极免疫反应过程如图4所示,电化学发光检测装置如图5所示,所得电化学发光图像及相应的标准曲线如图6所示。由图可知,随着抗原浓度增加,电化学发光图像亮度也随之降低,电化学发光强度与抗原cTnI、hFABP、copeptin的对数浓度在10pg/mL~100ng/mL范围内呈线性关系。本发明方法线性范围宽,操作简单,能够快速、同时检测三种急性心肌梗死标志物。

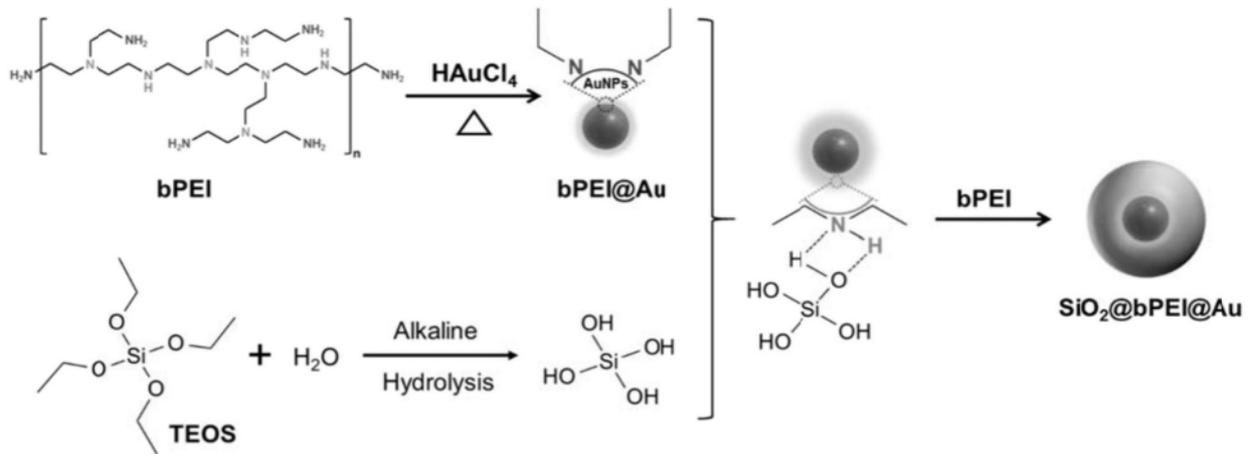


图1

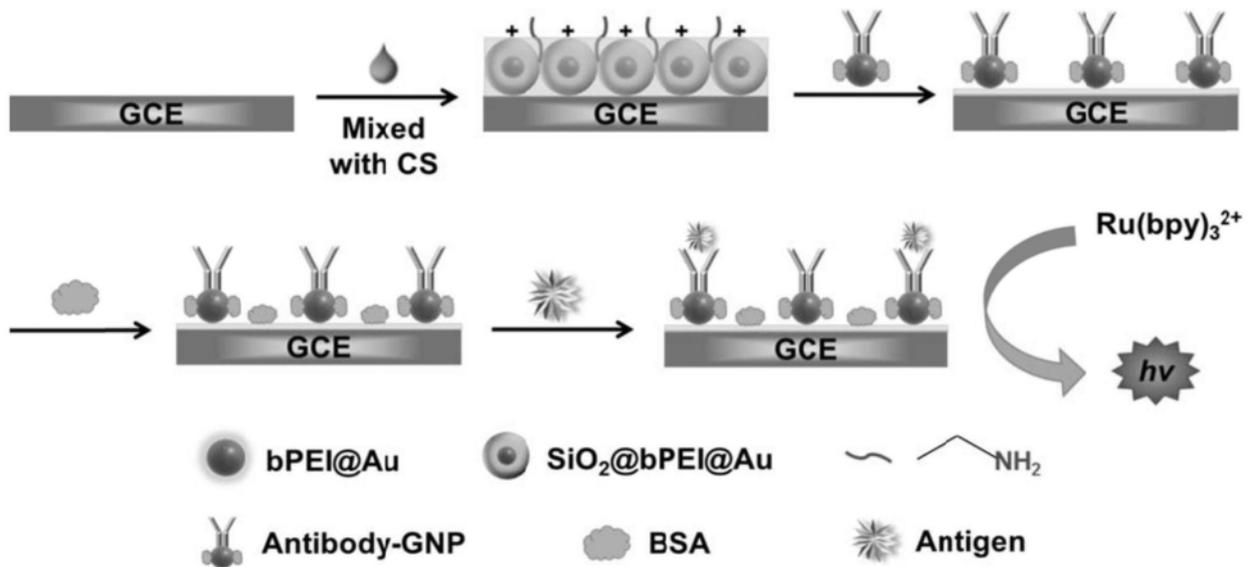


图2

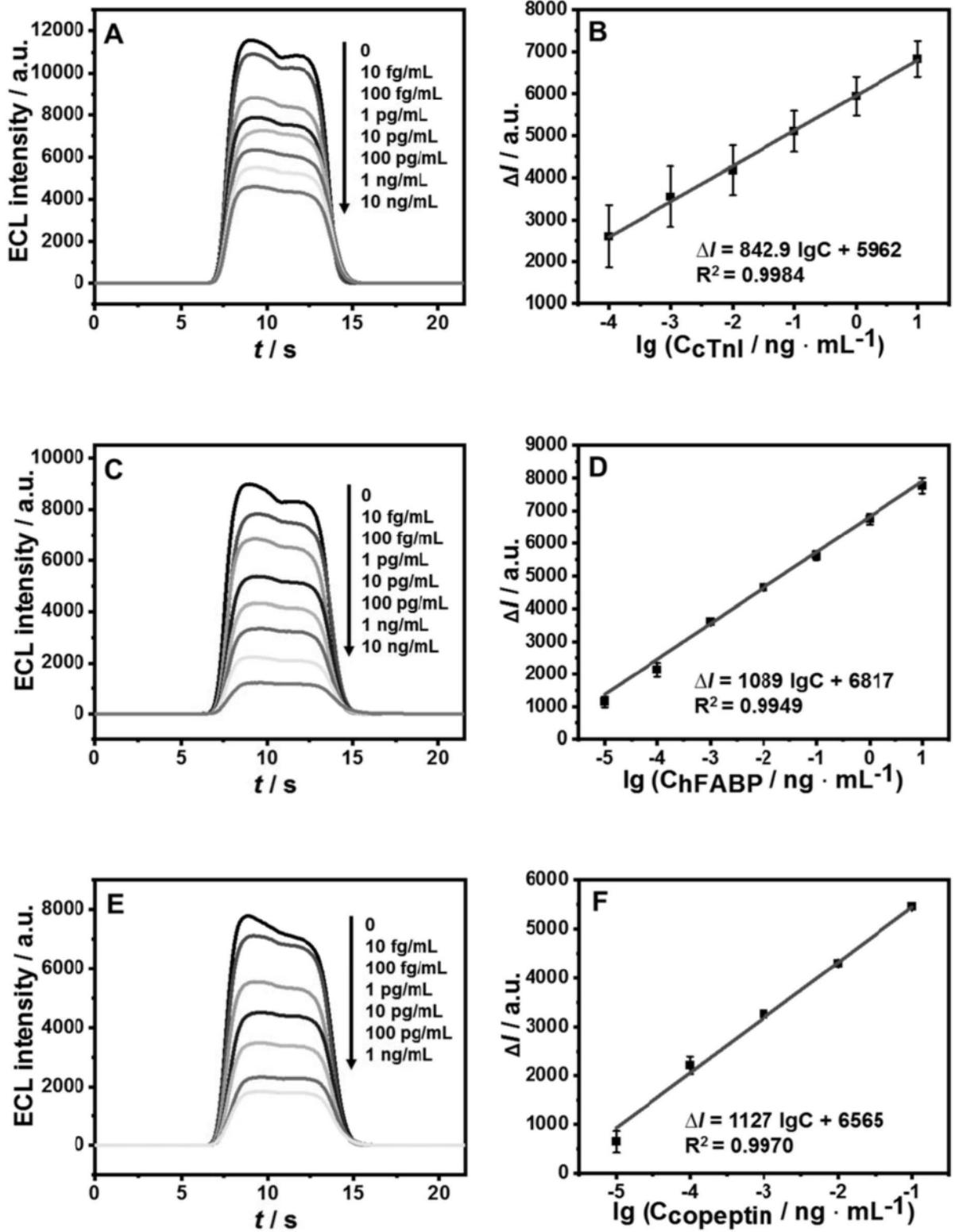


图3

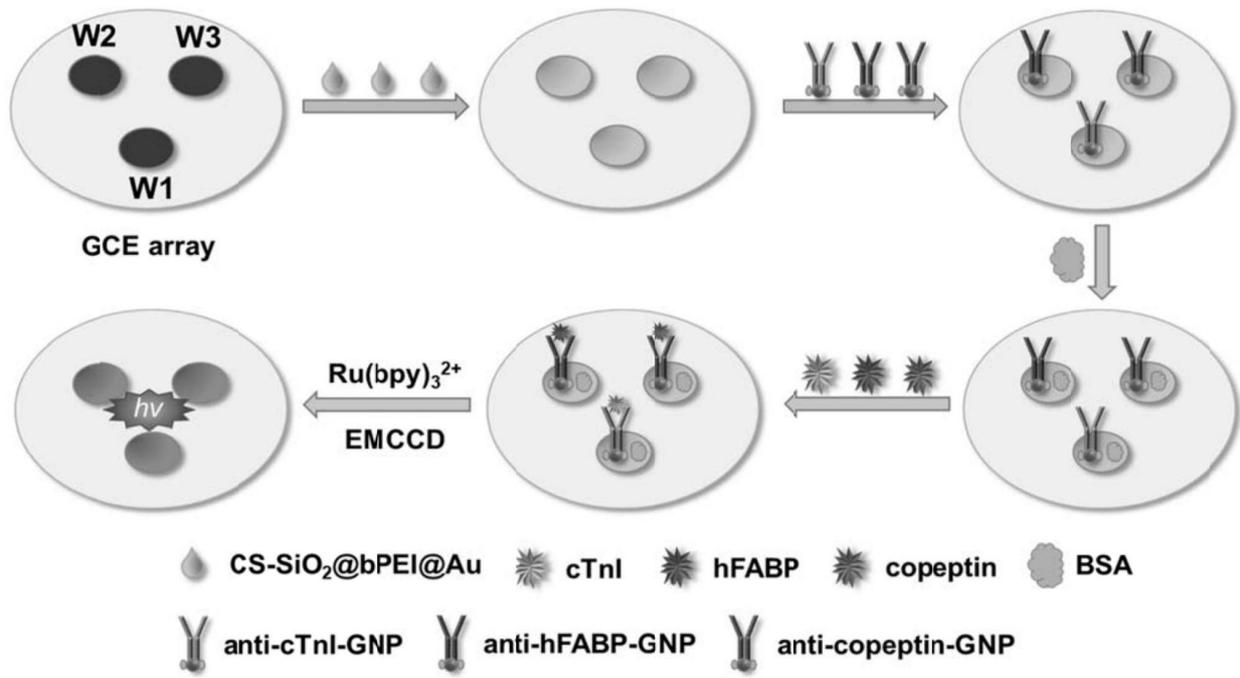


图4

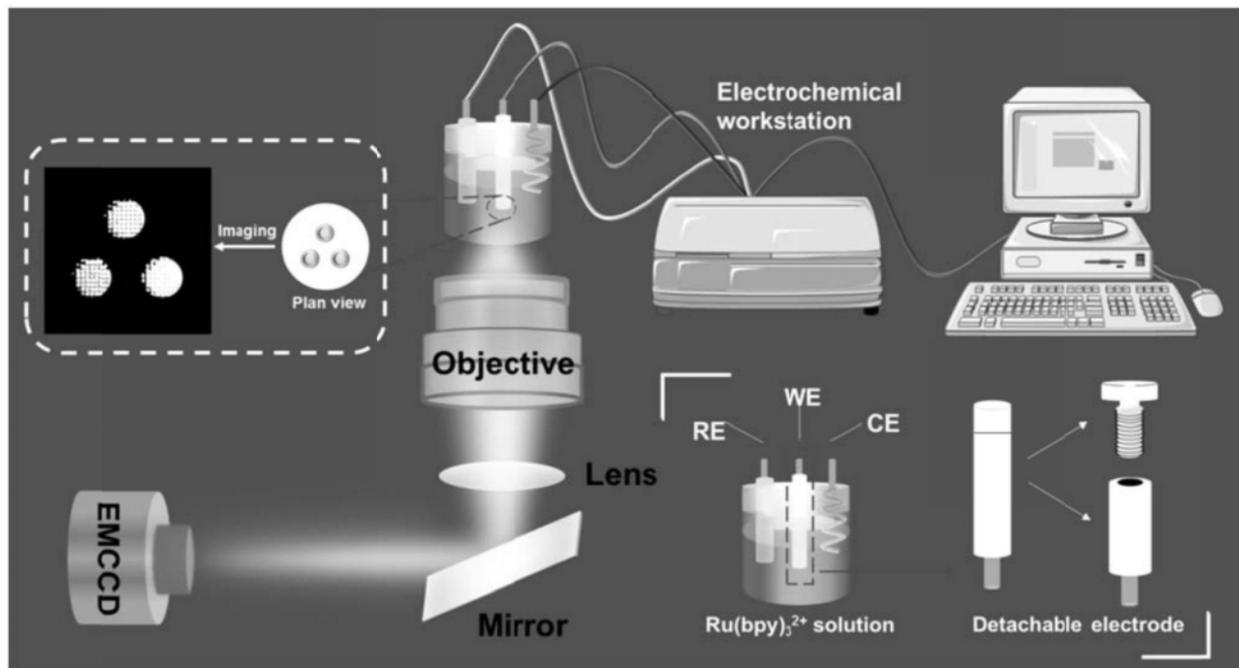


图5

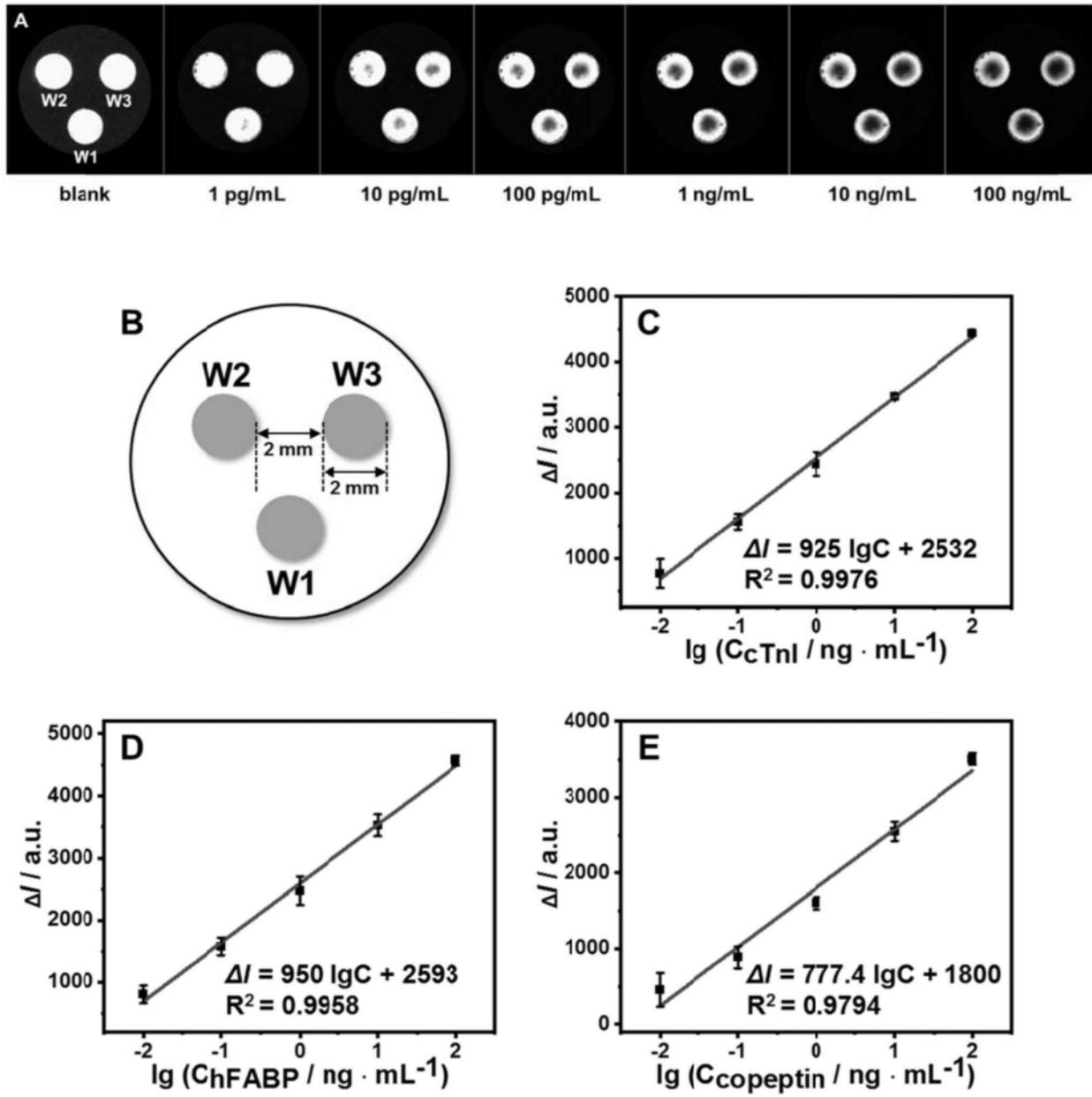


图6