



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112763553 B

(45) 授权公告日 2023. 02. 28

(21) 申请号 202011567659.7

CN 110575846 A, 2019.12.17

(22) 申请日 2020.12.25

CN 104132934 A, 2014.11.05

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 105085843 A, 2015.11.25

申请公布号 CN 112763553 A

CN 103913499 A, 2014.07.09

(43) 申请公布日 2021.05.07

CN 103926294 A, 2014.07.16

(73) 专利权人 中北大学

US 2013306485 A1, 2013.11.21

地址 030051 山西省太原市学院路3号

US 2008226503 A1, 2008.09.18

(72) 发明人 史楠 王海宾 向林慧子 高莉

李艳霞等. 识别牛血红蛋白的分子印迹电化学传感器的制备与研究.《理化检验(化学分册)》.2015, (第12期),

梁栋 王蓉珍 成琛 郭建峰

王芳

Chen Sihua 等. Molecularly imprinted ultrathin graphitic carbon nitride nanosheets-Based electrochemiluminescence sensing probe for sensitive detection of perfluorooctanoic acid.《Analytica Chimica Acta》.2015, 第896卷第68-77页. (续)

(74) 专利代理机构 西安瀚汇专利代理事务所

(普通合伙) 61279

专利代理师 汪重庆

审查员 李妍

(51) Int. Cl.

G01N 27/26 (2006.01)

G01N 27/30 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104142361 A, 2014.11.12

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

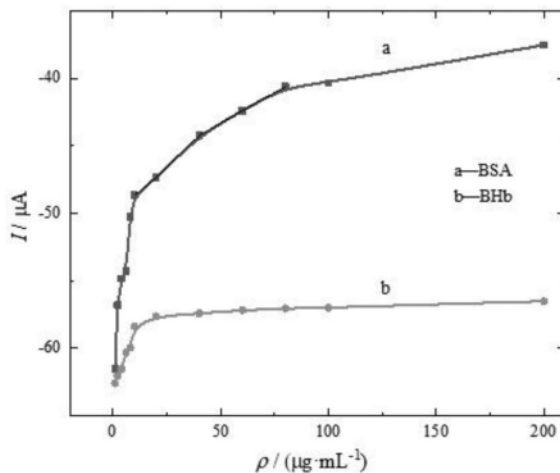
(54) 发明名称

一种基于分子印迹技术对蛋白质的电化学检测方法

是一种具有生物兼容的分子印迹电化学传感器制备方法,用以简便快速,低成本的识别蛋白质。

(57) 摘要

本发明提供了一种基于分子印迹技术对蛋白质的电化学检测方法;包括:步骤1,配置所需要溶液;步骤2,制备UT-g-C₃N₄;步骤3,用UT-g-C₃N₄修饰GCE电极;步骤4,制备MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE;步骤5,将所有电极放在相同浓度电解质溶液和相同扫描条件下,获得循环伏安曲线,对比分析。本发明以二维纳米材料g-C₃N₄为基质负载于玻碳电极上,以牛血清白蛋白(BSA)为模板分子,以丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵(DAC)为功能单体,N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(MBA)为交联剂,采用新型表面分子印迹技术,在水溶液中制备专一性识别BSA分子的分子印迹电化学传感器,并通过循环伏安法对目标蛋白质进行检测。本发明



CN 112763553 B

[接上页]

(56) 对比文件

Feng Shasha 等. A Novel Molecularly Imprinted Photoelectrochemical Sensor Based on g-C₃N₄-AuNPs for the Highly Sensitive and Selective Detection of Triclosan.《Electroanalysis》.2017,第30卷第320-327页.

Yola Mehmet Lu'tfi 等. Electrochemical detection of atrazine by platinum nanoparticles/carbon nitride nanotubes with molecularly imprinted polymer.

《Industrial & Engineering Chemistry Research》.2017,第56卷第7631-7639页.

Yuan Qingbin 等. Selective Adsorption and Photocatalytic Degradation of Extracellular Antibiotic Resistance Genes by Molecularly-Imprinted Graphitic Carbon Nitride.《Environmental Science & Technology》.2020,第54卷第4621-4630页.

史楠 等. 牛血清白蛋白分子表面印迹材料的制备及其大分子识别特性研究.《高分子学报》.2014,(第12期),第1678-1686页.

1. 一种基于分子印迹技术对蛋白质的电化学检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤1,制备UT-g-C₃N₄;

步骤2,用UT-g-C₃N₄修饰GCE电极;

步骤3,制备MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE;

步骤4,利用制备成功的MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE对牛血清白蛋白进行电化学检测;

步骤1中,所述制备UT-g-C₃N₄具体步骤为:采用三聚氰胺高温聚合法制备块状g-C₃N₄;在室温下,将块状的g-C₃N₄用5-10mol/l盐酸搅拌,并用去离子水反复冲洗以除去余酸,得到质子化的g-C₃N₄;将质子化g-C₃N₄分散于去离子水中,用超声波细胞破碎仪超声2-4h、离心除去未脱落的团聚体,最后得到UT-g-C₃N₄分散液;

步骤2中,所述GCE电极的玻碳电极直径为3mm-9mm,用抛光粉末 α -Al₂O₃粉末打磨抛光,并用无水乙醇、去离子水交替冲洗;用循环伏安法扫描至稳定后,将其取出晾干备用;量取5-20 μ L已处理好的UT-g-C₃N₄分散液滴涂在已处理好的GCE表面,室温干燥后即可得到UT-g-C₃N₄/GCE;

步骤3中,在UT-g-C₃N₄/GCE表面负载分子印迹聚合膜,向容器中加入中性PBS缓冲溶液,再加入150:1-250:1的丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵和BSA相互反应,在35-55 $^{\circ}$ C水浴锅中恒温反应10-30min;加入交联剂20%-30%的N,N-亚甲基双丙烯酰胺MBA,通入N₂排尽装置中的空气,再加入1%的引发剂过硫酸铵和亚硫酸氢钠,把修饰氮化碳的玻碳电极悬空浸入溶液中,过夜反应后取出电极,在1-3mol/L氢氧化钠中浸电极浸泡30-60min,并用去离子水清洗,制得MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE;

步骤4中,将所制备MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE电极作为工作电极、参比电极和辅助电极,采用电化学工作站三电极体系进行循环伏安法扫描检测不同浓度梯度的待测溶液。

一种基于分子印迹技术对蛋白质的电化学检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于应用新型材料用于分析检测技术领域；尤其涉及一种基于分子印迹技术对蛋白质的电化学检测方法。

背景技术

[0002] 目标蛋白质是人体所有细胞和组织的重要组成部分，在基因表达、信息复制和催化代谢等方面发挥着重要作用。它们的应用极其广泛，最主要的方面应该是蛋白质组学和生物医学两大领域。例如癌症病人血清中低丰度的肿瘤蛋白标志物的水平可以提供有关疾病状态的有用信息，可用于癌症诊断、预后和流行病学研究。因此，高选择性、高特异性的肿瘤蛋白标志物的检测不仅可以提高早期诊断的可靠性，而且可以大大提高治疗的疗效。因此，在复杂的生物样本中准确、选择性地检测具有重要生物学功能的低丰度蛋白是蛋白质组学研究、生物医学应用和临床诊断的重要课题。

[0003] 目前常用的蛋白质专一性检测方法仍然是免疫检测分析法，如酶联免疫吸附法(ELISA)，依赖于抗体和抗原之间的特异性识别检测目标分析物，即将已知的抗原或抗体包被于固相支持物上，加入酶标记抗体与吸附在固相载体上的抗原或抗体特异性结合，通过底物使酶显色来判断免疫发生的程度达到检测的目的。然而依赖于单克隆抗体的酶免疫检测技术，存在抗体制备困难、生产成本低、稳定性差、环境要求苛刻、使用寿命短等问题。因此，建立一个快速、简单、特异、高通量的蛋白质等生物大分子的检测方法已成为分析检测科学的研究热点之一。

[0004] 分子印迹聚合物(Molecular imprinted polymers, MIPs)被认为是一种很有前途的抗体替代品，MIPs与目标分子结合的过程类似于抗原和抗体的结合，与生物抗体相比，MIPs具有稳定性好、成本低、开发时间短、生产方便等优点。得益于纳米新材料的应用，新型纳米材料是合成生物大分子印迹聚合物薄层的优良载体材料，克服了生物大分子分子印迹的局限性。将分子印迹的专一识别性能与新型导电纳米材料结合在一起所制备的分子印迹电化学传感器，即可以绑定目标分子并进行特异性识别，又可以将生物信号实时转换为电信号，从而实现目标蛋白分子定性定量的精准检测。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供了一种基于分子印迹技术对蛋白质的电化学检测方法。

[0006] 本发明是通过以下技术方案实现的：

[0007] 步骤1，制备UT-g-C₃N₄；

[0008] 步骤2，用UT-g-C₃N₄修饰GCE电极；

[0009] 步骤3，制备MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE；

[0010] 步骤4，利用制备成功的MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE对牛血清白蛋白(BSA)进行电化学检测。

[0011] 优选地，步骤1中，所述制备UT-g-C₃N₄具体步骤为：采用三聚氰胺高温聚合法制备

块状 $g-C_3N_4$ ；在室温下，将块状的 $g-C_3N_4$ 用5-10mol/l盐酸搅拌，并用去离子水反复冲洗以除去余酸，得到质子化的 $g-C_3N_4$ ；将质子化 $g-C_3N_4$ 散于去离子水中，用超声波细胞破碎仪超声2-4h、离心除去未脱落的团聚体，最后得到UT- $g-C_3N_4$ 分散液。

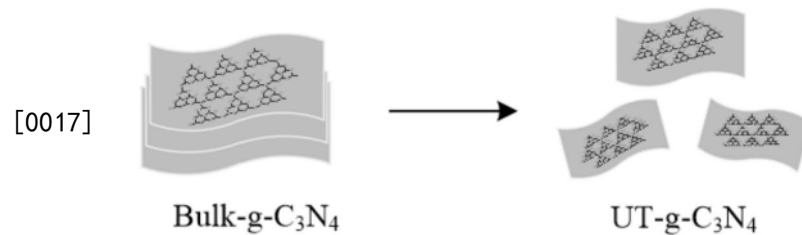
[0012] 优选地，步骤2中，所述GCE电极的玻璃碳电极直径为3mm-9mm，用抛光粉末 α -Al₂O₃粉末打磨抛光，并用无水乙醇、去离子水交替冲洗；用循环伏安法扫描至稳定后，将其取出晾干备用；量取5-20 μ L已处理好的UT- $g-C_3N_4$ 分散液滴涂在已处理好的GCE表面，室温干燥后即可得到UT- $g-C_3N_4$ /GCE。

[0013] 优选地，步骤3中，在UT- $g-C_3N_4$ /GCE表面负载分子印迹聚合膜，向容器中加入中性PBS缓冲溶液，再加入150:1-250:1的丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵 (DAC) 和BSA相互反应，在35-55 $^{\circ}$ C水浴锅中恒温反应10-30min；加入交联剂20%-30%的N,N-亚甲基双丙烯酰胺MBA，通入N₂排尽装置中的空气，再加入1%的引发剂过硫酸铵和亚硫酸氢钠，把修饰氮化碳的玻璃碳电极悬空浸入溶液中，过夜反应后取出电极，在1-3mol/L氢氧化钠中浸电极浸泡30-60min，并用去离子水清洗，制得可供使用的MIPs/UT- $g-C_3N_4$ /GCE。

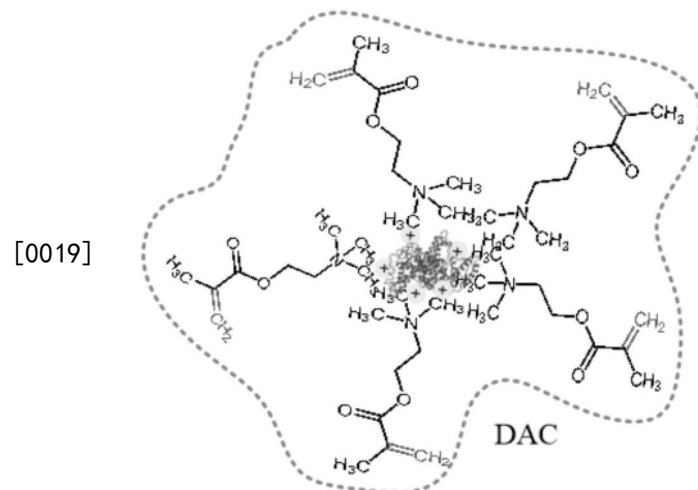
[0014] 优选地，步骤4中，应用所制备MIPs/UT- $g-C_3N_4$ /GCE电极作为工作电极，参比电极(Ag/AgCl电极)和辅助电极(铂丝电极)，采用电化学工作站三电极体系进行循环伏安法(Cyclic Voltammetry, CV)扫描检测不同浓度梯度的待测溶液。

[0015] 本发明的制备原理为：

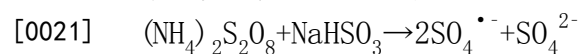
[0016] 第一步：块状 $g-C_3N_4$ 质子化后超声形成UT- $g-C_3N_4$ ；



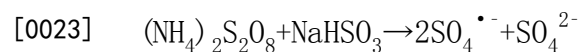
[0018] 第二步：单体DAC与模板BSA通过强静电相互作用结合到一起；



[0020] 第三步：氧化还原引发体系在溶液中生成自由基；



[0022] 第四步：同时进行DAC接枝聚合和BSA印迹。



[0024] 本发明具有以下优点：

[0025] (1) 本发明以超薄二维纳米材料 $g-C_3N_4$ 为基质负载于玻碳电极上,以牛血清白蛋白(BSA)为模板分子,以丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵(DAC)为功能单体, N,N' -亚甲基双丙烯酰胺(MBA)为交联剂,采用新型表面分子印迹技术,在水溶液中制备专一性识别BSA分子的分子印迹电化学传感器,并通过循环伏安法对目标蛋白质进行检测。

[0026] (2) 本发明旨在建立具有高选择性和高灵敏度的快速检测目标蛋白质的分析方法,即寻求一种具有生物兼容的分子印迹电化学传感器制备方法,用以简便快速,低成本的识别蛋白质。

附图说明

[0027] 图1是本发明实施例1中BSA@MIP/UT- $g-C_3N_4$ /GCE制备过程图；

[0028] 图2是本发明实施例1中MIP/UT- $g-C_3N_4$ /GCE的红外表征图；

[0029] 图3是本发明实施例2修饰电极的循环伏安图；

[0030] 图4是本发明实施例2MIPs/UT- $g-C_3N_4$ /GCE的响应时间；

[0031] 图5是本发明MIPs/UT- $g-C_3N_4$ /GCE进行选择性的评估图；

[0032] 图6是本发明MIPs/UT- $g-C_3N_4$ /GCE进行稳定性评估图。

具体实施方式

[0033] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明。应当指出的是,以下的实施实例只是对本发明的进一步说明,但本发明的保护范围并不限于以下实施例。

[0034] 实施例1

[0035] 本实施例涉及一种基于分子印迹技术对蛋白质的电化学检测方法,见图1所示:包括以下步骤:

[0036] 步骤1,采用三聚氰胺高温聚合法制备块状 $g-C_3N_4$ 。三聚氰胺在氮气条件下加热5min,升温5h,温度为550℃。将得到的产物冷却至室温,得到黄色块状 $g-C_3N_4$ 。取1g上述块状 $g-C_3N_4$ 溶于25mL盐酸中,盐酸浓度为10M,在室温下搅拌1h。然后过滤溶液,并用去离子水反复冲洗以除去余酸,室温条件下干燥,最后得到质子化的 $g-C_3N_4$ 。取50mg质子化 $g-C_3N_4$ 分散在100mL去离子水中,用超声波细胞破碎仪超声2h,然后以4000rpm/min转速离心10min除去未脱落的团聚体,最后获得超薄氮化碳(Ultrathin- $g-C_3N_4$, UT- $g-C_3N_4$)分散液。

[0037] 步骤2,将直径为3mm的玻碳电极(Glassy carbon electrode, GCE)依次用1 μ m, 0.3 μ m, 0.05 μ m颗粒度的 $\alpha-Al_2O_3$ 粉末抛光,“8”字型打磨5min,并将完成打磨的电极用无水乙醇、去离子水交替冲洗2~3min,后将电极置于铁氰化钾和氯化钾的混合溶液中进行循环伏安法测试。将循环伏安法扫描电位范围、扫描速率分别设置为-0.2~+0.6V、50mV/s,当伏安图稳定后,将其取出晾干备用。使用移液枪量取5 μ L已处理好的UT- $g-C_3N_4$ 分散液滴涂在已处理好的GCE表面,室温干燥6h后即可得到UT- $g-C_3N_4$ /GCE。

[0038] 步骤3,在修饰了UT- $g-C_3N_4$ 的GCE表面负载分子印迹聚合膜。先准备好水浴锅、三口烧瓶、冷凝管、充 N_2 管、磁转子、瓶塞等并安装好装置;向25mL三口烧瓶中加入950 μ L的PBS溶液;加入50 μ L的DAC和30mg的BSA相互反应,放置在35℃水浴锅中恒温反应10min;称取1.6mg MBA并加入到溶液中;向三口烧瓶中通入 N_2 ,排尽装置中的空气,反应10min;把0.0058g过硫

酸铵溶于2.5ml PBS溶液中,把0.0029g亚硫酸氢钠溶于2.5ml PBS溶液中,各取250 μ L两种溶液加入三口烧瓶中;把修饰氮化碳的玻璃碳电极悬空浸入溶液中,过夜反应后取出电极,室温下干燥,所得电极为印迹有BSA的MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE (BSA@MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE),其见图2所示。为了得到可以利用的MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE,将BSA@MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE置于PBS缓冲液中,利用CV在电位范围-0.2~0.6V和扫描速率50mV/s的条件下循环扫描20圈,并用去离子水淋洗,然后在1mol/L氢氧化钠中浸电极泡60min,达到除去模板蛋白的效果,并用去离子水清洗,制得可供使用的MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE。

[0039] 步骤4,采用电化学工作站三电极体系进行循环伏安法(Cyclic Voltammetry,CV)扫描检测,即工作电极(玻璃碳电极)、参比电极(Ag/AgCl电极)和辅助电极(铂丝电极)。将所有电极(GCE、UT-g-C₃N₄/GCE、MIPs-UT-g-C₃N₄/GCE以BSA@MIPs-UT-g-C₃N₄/GCE)放在相同浓度电解质溶液、相同扫描条件下获得循环伏安曲线,然后对比分析,说明纳米材料氮化碳以及分子印迹的修饰效果。

[0040] 实施例2

[0041] 本实施例涉及一种基于分子印迹技术对蛋白质的电化学检测方法,包括以下步骤:

[0042] 步骤1,采用三聚氰胺高温聚合法制备块状g-C₃N₄。三聚氰胺在氮气条件下加热5min,升温5h,温度为650 $^{\circ}$ C。将得到的产物冷却至室温,得到黄色块状g-C₃N₄。取1g上述块状g-C₃N₄溶于25mL盐酸中,盐酸浓度为5M,在室温下搅拌1h。然后过滤溶液,并用去离子水反复冲洗以除去余酸,室温条件下干燥,最后得到质子化的g-C₃N₄。取50mg质子化g-C₃N₄分散在100mL去离子水中,用超声波细胞破碎仪超声1h,然后以8000rpm/min转速离心除去未脱落的团聚体,最后获得超薄氮化碳(Ultrathin-g-C₃N₄,UT-g-C₃N₄)分散液。

[0043] 步骤2,将直径为6mm的玻璃碳电极(Glassy carbon electrode,GCE)依次用1 μ m,0.3 μ m,0.05 μ m颗粒度的 α -Al₂O₃粉末抛光,“8”字型打磨5min,并将完成打磨的电极用无水乙醇、去离子水交替冲洗2~3min,后将电极置于铁氰化钾和氯化钾的混合溶液中进行循环伏安法测试。将循环伏安法扫描电位范围、扫描速率分别设置为-0.1~+0.8V、100mV/s,当伏安图稳定后,将其取出晾干备用。使用移液枪量取10 μ L已处理好的UT-g-C₃N₄分散液滴涂在已处理好的GCE表面,室温干燥后即可得到UT-g-C₃N₄/GCE。

[0044] 步骤3,在修饰了UT-g-C₃N₄的GCE表面负载分子印迹聚合膜。向10mL三口烧瓶中加入1000 μ L的PBS溶液;加入100 μ L的DAC和50mg的BSA相互反应,放置在45 $^{\circ}$ C水浴锅中恒温反应30min;称取3mg MBA并加入到溶液中;向三口烧瓶中通入N₂,排尽装置中的空气;把0.007g过硫酸铵和0.003g亚硫酸氢钠溶于5mL PBS溶液中,各取250 μ L两种溶液加入三口烧瓶中;把修饰氮化碳的玻璃碳电极悬空浸入溶液中,过夜反应后取出电极,室温下干燥,所得电极为印迹有BSA的MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE (BSA@MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE)。为了得到可以利用的MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE,将BSA@MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE置于PBS缓冲液中,利用CV在电位范围-0.1~0.7V和扫描速率100mV/s的条件下循环扫描20圈,并用去离子水淋洗,然后在2mol/L氢氧化钠中浸电极泡30min,达到除去模板蛋白的效果,并用去离子水清洗,制得可供使用的MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE。

[0045] 步骤4,采用电化学工作站三电极体系进行循环伏安法(Cyclic Voltammetry,CV)扫描检测,即工作电极(玻璃碳电极)、参比电极(Ag/AgCl电极)和辅助电极(铂丝电极)。见附

图3所示。将所有电极 (GCE、UT-g-C₃N₄/GCE、MIPs-UT-g-C₃N₄/GCE以BSA@MIPs-UT-g-C₃N₄/GCE) 放在相同浓度电解质溶液、相同扫描条件下获得循环伏安曲线,然后对比分析,说明纳米材料氮化碳以及分子印迹的修饰效果。见附图4所示。

[0046] MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE的选择性评估:

[0047] 将BHb溶液配制成和BSA溶液相同的浓度阶梯,用MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE进行选择性的评估,记录CV曲线的氧化峰电流,结果见图5。显然,分子印迹上的空穴对BSA的结构识别能力更强,即相对于BHb,电极仍然对BSA的选择性更好。为了更好地证明所制备的传感器对BSA分子有更高的选择性,用配制好的PBS溶液配制浓度均为0.1mg/mL的BSA和BHb溶液进行1:1混合,得到BSA/BHb二元溶液。为考察MIPs-g-C₃N₄电化学传感器对BSA分子的选择性,测定CV曲线峰电流变化值 ΔI 。由表1MIP-g-C₃N₄竞争实验相关系数表可知,BSA印迹的MIPs-g-C₃N₄对BSA表现出优异的选择性。

[0048] 表1

Protein	g-C ₃ N ₄ /GCE		MIP/g-C ₃ N ₄ /GCE	
	BSA	BHb	BSA	BHb
$\Delta I/\mu A$	10.57	9.98	23.69	4.02
k	1.06		5.89	
k'	5.56			

[0050] MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE的稳定性评估

[0051] 为了实现制备的电化学传感器在检测实际样品时保持良好的性能,将使用过的UT-g-C₃N₄/GCE和MIPs-UT-g-C₃N₄/GCE放在4℃环境下保存5天,并进行CV扫描示意图不管是UT-g-C₃N₄/GCE还是MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE的CV测试,五条曲线的电流、电位变化不大且基本吻合,证明在较短的时间内所制备的修饰电极稳定性较高。见图6所示。UT-g-C₃N₄/GCE的电流响应在第一天略有波动,随后保持稳定;MIPs/UT-g-C₃N₄/GCE的电流响应出现较图3和图4中明显的氧化还原峰,证明此时电极表面的修饰材料稳定性不如只有纳米材料UT-g-C₃N₄的稳定性高,可能是因为电极负载材料太多,出现黏合不紧密的问题,使得电子有更多机会穿过材料到达电极表面,使得电流响应更高。

[0052] 本发明以二维纳米材料g-C₃N₄为基质负载于玻碳电极上,以牛血清白蛋白 (BSA) 为模板分子,以丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵 (DAC) 为功能单体,N,N'-亚甲基双丙烯酰胺 (MBA) 为交联剂,采用新型表面分子印迹技术,在水溶液中制备专一性识别BSA分子的分子印迹电化学传感器,并通过循环伏安法对目标蛋白质进行检测。

[0053] 本发明旨在建立具有高选择性和高灵敏度的快速检测目标蛋白质的分析方法,即寻求一种具有生物兼容的分子印迹电化学传感器制备方法,用以简便快速,低成本的识别蛋白质。

[0054] 以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是,本发明并不局限于上述特定实施方式,本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变形或修改,这并不影响本发明的实质。

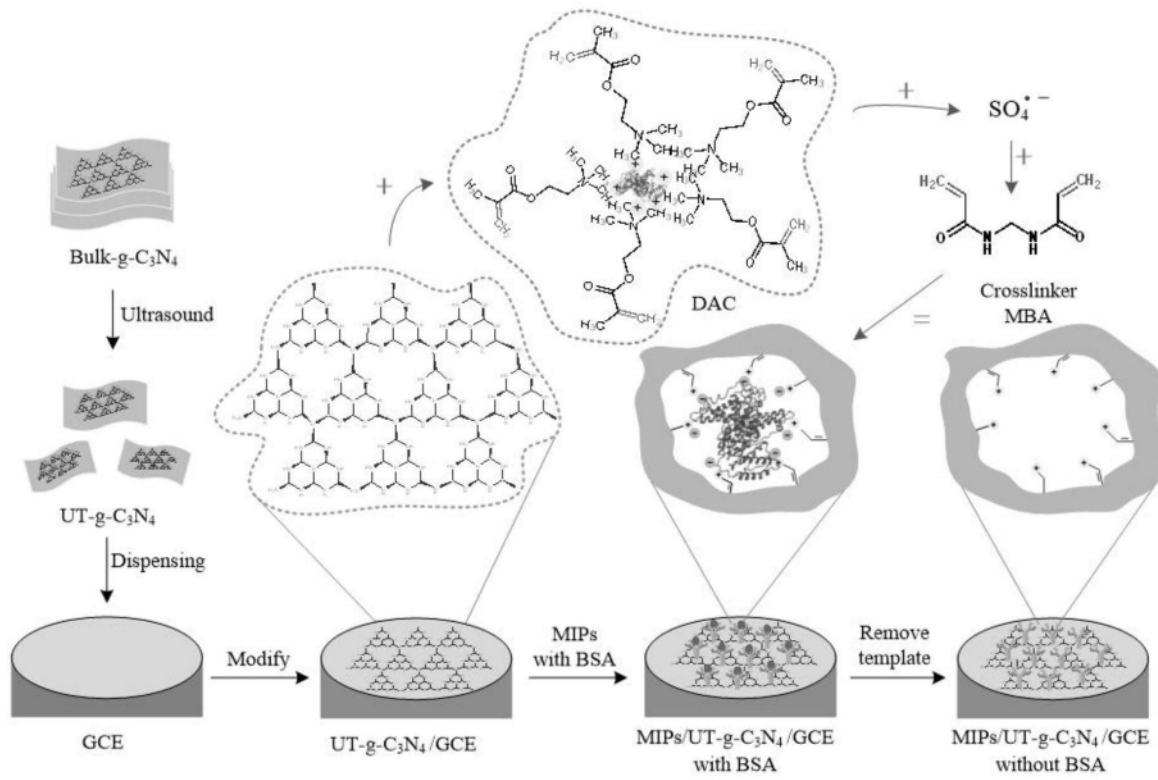


图1

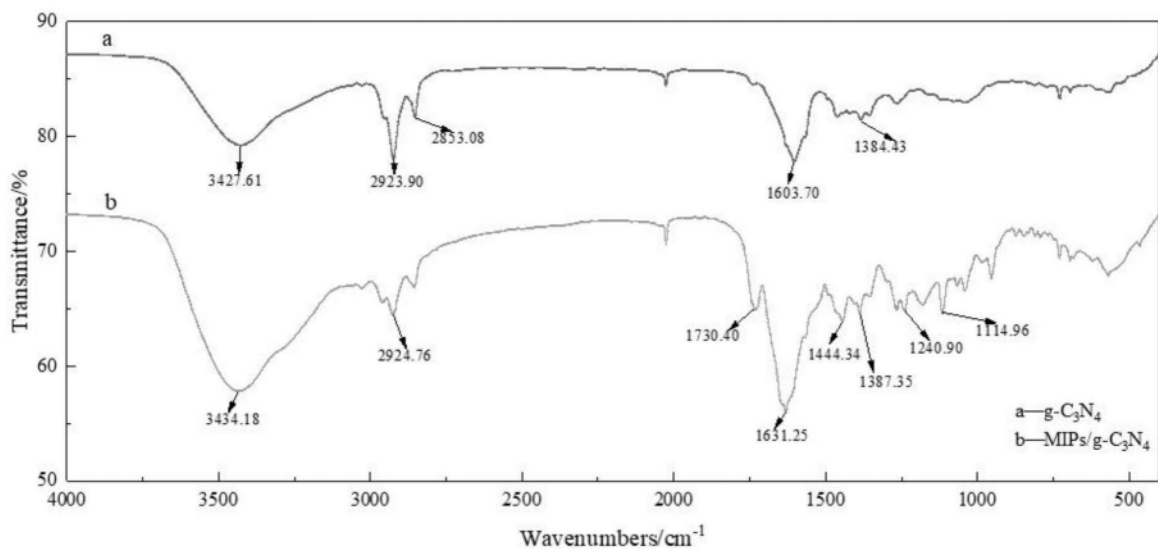


图2

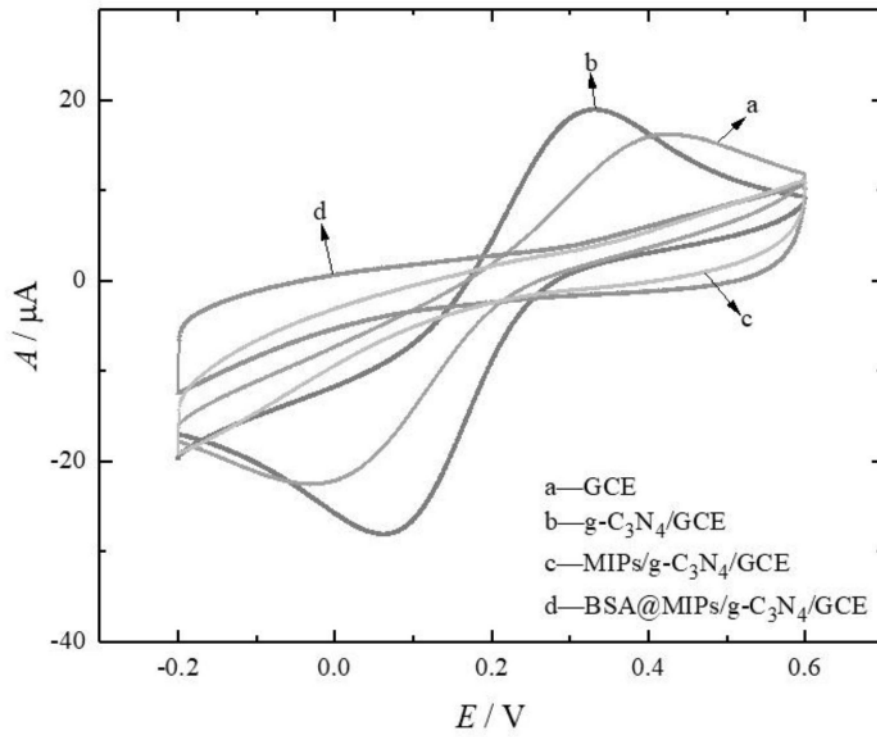


图3

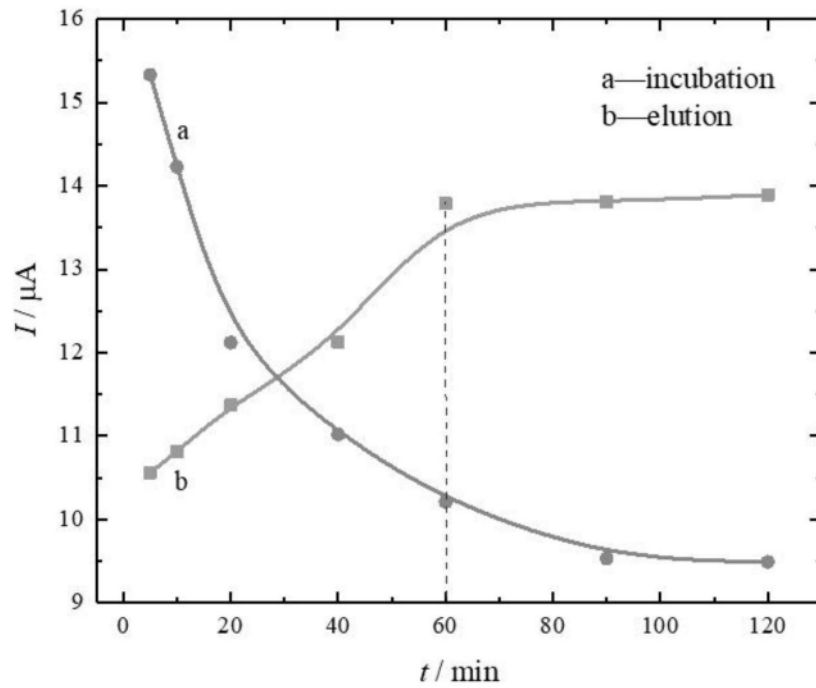


图4

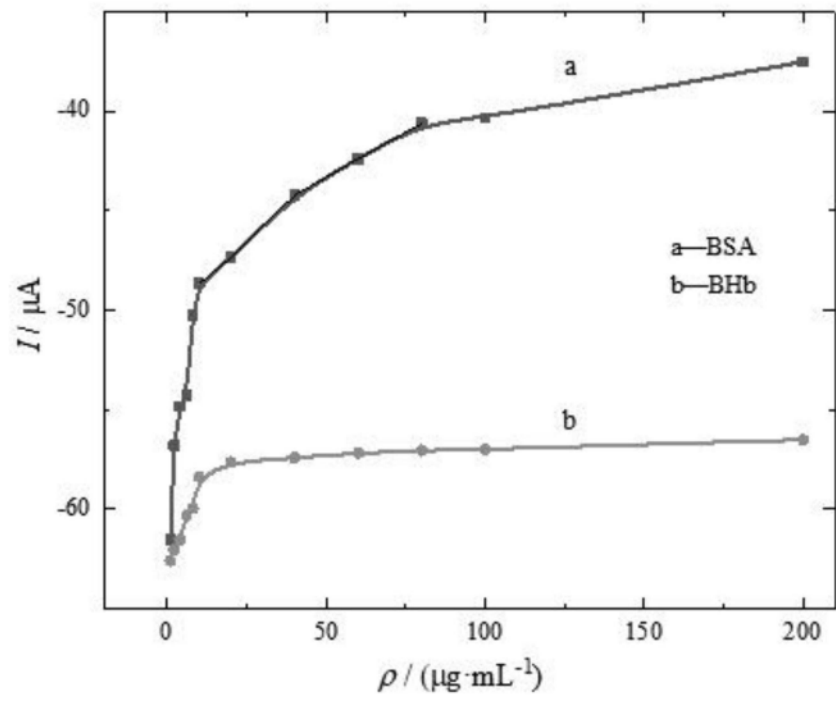


图5

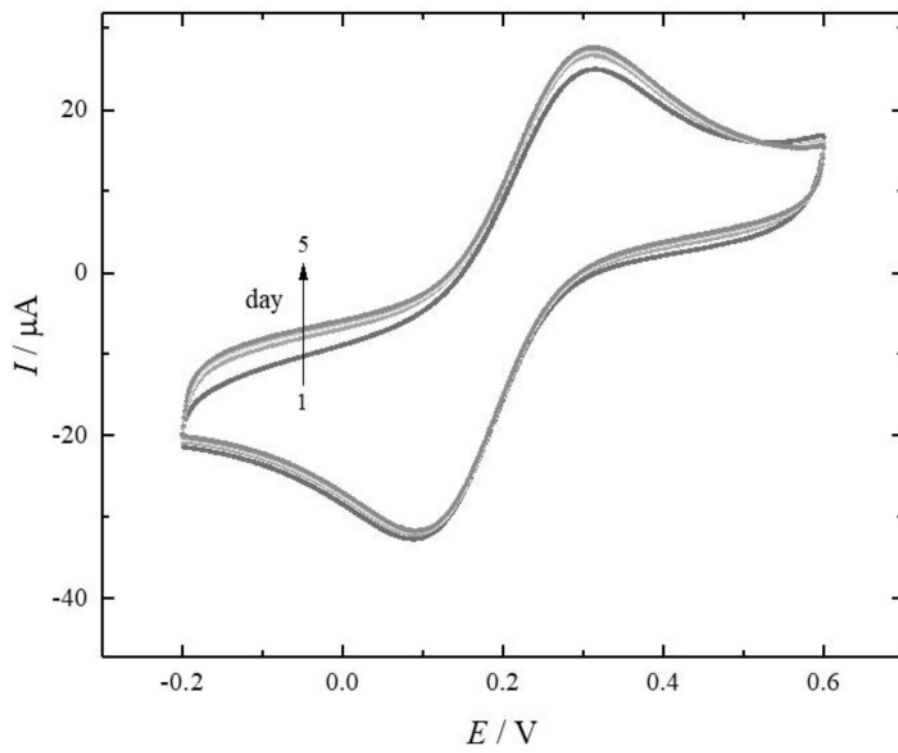


图6