



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106770215 B

(45)授权公告日 2019.04.30

(21)申请号 201611117355.4

审查员 李占

(22)申请日 2016.12.07

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106770215 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(73)专利权人 西南大学

地址 400715 重庆市北碚区天生路2号

(72)发明人 卓颖 梁文斌 雷燕梅 柴雅琴

袁若

(74)专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有

限公司 11275

代理人 赵荣之

(51)Int.Cl.

G01N 21/76(2006.01)

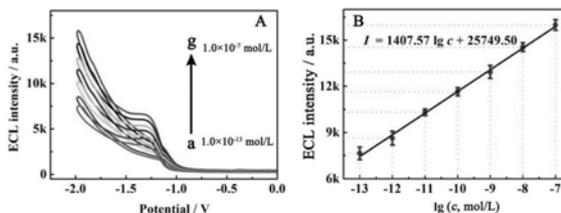
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种多功能化的铁钴磁性纳米传感器的制备方法及其产品和应用

(57)摘要

本发明公开了一种多功能化的铁钴磁性纳米传感器的制备方法及其产品和应用,所述方法包括1)CoFe₂O₄磁性纳米颗粒的制备;2)多巴胺功能化CoFe₂O₄磁性纳米颗粒的制备;3)nano-Au@CoFe₂O₄磁性纳米颗粒的制备;4)多功能化的CoFe₂O₄磁性纳米传感器的制备。然后将所制备的多功能化的铁钴磁性纳米传感器应用于检测离子、蛋白和DNA。通过实施例的进一步验证发现本发明所制备的多功能化的CoFe₂O₄磁性纳米传感器应用于Cu²⁺的检测,显示出较高的灵敏度、优异的选择性和良好的重现性。



1. 一种多功能化的铁钴磁性纳米传感器的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒的制备:将 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 与 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于乙二醇中得到澄清的溶液,然后向溶液中依次加入醋酸钠、尿素和聚乙二醇搅拌得到红棕色混合物,将红棕色混合物转入聚四氟乙烯内衬不锈钢反应釜中在温度为 $150 \sim 200 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 $8 \sim 12$ 小时,最后,进一步离心得到黑色沉淀物,将黑色沉淀物在磁场下交替用去离子水和乙醇洗涤,进一步干燥得到 CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒;

2) 多巴胺功能化 CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒的制备:将步骤1)得到的 CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒超声溶解于四氢呋喃溶液中,进一步加入多巴胺水溶液并超声混合,进一步使用醋酸溶液调节混合溶液pH值为 $4.0 \sim 5.0$,然后放在摇床上混合过夜离心得固体产品,将固体产品在磁场下交替用去离子水和乙醇洗涤后,进一步干燥获得多巴胺功能化 CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒,将所述颗粒与去离子水混合,将混合液备用;

3) $\text{nano-Au@CoFe}_2\text{O}_4$ 磁性纳米颗粒的制备:将纳米金胶体溶液加入步骤2)得到的混合液中,继续在在摇床上混合,进一步离心得固体纳米颗粒,在磁场下交替用去离子水和乙醇洗涤后,获得 $\text{nano-Au@CoFe}_2\text{O}_4$ 磁性纳米颗粒,并溶解于Tris-HCl缓冲溶液中,在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下存储备用;

4) 多功能化的 CoFe_2O_4 磁性纳米传感器的制备:将5'和3'分别修饰叠氮基和巯基的DNA1链与步骤3)得到的溶液混合并保持至 4°C ,然后加入正己硫醇溶液并保持至 4°C ,进一步离心得固体,在磁场下交替用去离子水和乙醇洗涤后,获得多功能化的 CoFe_2O_4 磁性纳米传感器,并分散于Tris-HCl缓冲溶液中,在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件存储。

2. 根据权利要求1所述一种多功能化的铁钴磁性纳米传感器的制备方法,其特征在于,步骤1)所述 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 与 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 摩尔比为 $1:2$,所述 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、醋酸钠、尿素和聚乙二醇加入摩尔量的比例为 $0.05:1:1:0.03$ 。

3. 根据权利要求1所述一种多功能化的铁钴磁性纳米传感器的制备方法,其特征在于,步骤2)所述多巴胺水溶液的质量分数为 $1.0 \% \sim 2.0 \%$,所述 CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒与多巴胺水溶液的质量比为 $1:100$ 。

4. 根据权利要求1所述一种多功能化的铁钴磁性纳米传感器的制备方法,其特征在于,步骤3)所述纳米金胶体溶液与多巴胺功能化 CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒的质量比为 $800:1$ 。

5. 根据权利要求1所述一种多功能化的铁钴磁性纳米传感器的制备方法,其特征在于,步骤4)所述正己硫醇溶液的浓度为 1.0 mM ,所述DNA1链、 $\text{nano-Au@CoFe}_2\text{O}_4$ 磁性纳米颗粒与正己硫醇溶液的质量比为 $1 \times 10^{-4}:1:0.2$ 。

6. 根据权利要求1所述一种多功能化的铁钴磁性纳米传感器的制备方法,其特征在于,步骤3)与步骤4)所述Tris-HCl缓冲溶液的pH值为 7.4 。

7. 权利要求1~6任一项所述方法制备而成的多功能化的铁钴磁性纳米传感器。

8. 权利要求7所述多功能化的铁钴磁性纳米传感器定量检测离子、蛋白和DNA的应用。

一种多功能化的铁钴磁性纳米传感器的制备方法及其产品和应用

技术领域

[0001] 本发明属于纳米传感器领域,具体涉及一种多功能化的铁钴磁性纳米传感器的制备方法及其产品和应用。

背景技术

[0002] 构建一个高灵敏的传感平台,并用于定量检测离子、蛋白和DNA,一直以来是环境检测,临床实验和基础研究领域的焦点。近年来,电致化学发光(ECL)作为一个强有力的分析技术,在生物分析拥有较大的潜力,原因在于其简化了光学设置,拥有较低的背景信号和高的灵敏度。然而,几乎所有的ECL生物传感器都是异相分析模式(比如,金电极和玻璃碳电极表面的分析),其通常伴随着一些固有缺点:(1)有限的反应区域和本身存在的位阻导致识别探针具有相对较慢的结合动力学和较低的识别效率,从而导致低的灵敏度和选择性;(2)电极的污染会导致相对较低的再现性;(3)发光体具有较低的ECL效率,导致相对较低的灵敏度。因此,构建一个高灵敏和选择性的传感平台用于目标物的检测是具有非常重要的意义。

[0003] 目前,磁性传感器作为纳米平台,已经广泛应用在均相的体系中,因为其磁性纳米载体具有以下特点:(1)在准均相体系中,磁性纳米载体在水相和固相之间作为一个“桥梁”,可以扩大反应面积和改善空间位阻;(2)磁性纳米载体具有较大的比表面积和优异的磁特性,可允许多个生物分子识别,且从混合溶液中快速、方便地分离出来。常见的是 Fe_3O_4 磁性纳米粒子(MNPs)作为磁性纳米传感器的纳米载体。

[0004] 虽然 Fe_3O_4 MNPs构建的磁性纳米传感器拥有上述的优点,然而为了改善磁性纳米传感器的灵敏度和选择性,进一步去探索多功能化磁性纳米载体具有更重要的意义。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的之一在于提供一种多功能化的铁钴磁性纳米传感器的制备方法及产品,通过水热法简单地合成了一种分散良好的、小尺寸的铁钴磁性纳米颗粒,简称“ CoFe_2O_4 MNPs”,所制备的 CoFe_2O_4 MNPs可以作为一种新的共反应促进剂,能够显著提高混合氨基化茈萘衍生物(PTC-NH₂)的发光效率;本发明的目的之二在于提供所述铁钴磁性纳米传感器的应用。

[0006] 为实现上述发明目的,具体提供了如下的技术方案:

[0007] 1、一种多功能化的铁钴磁性纳米传感器的制备方法,包括如下步骤:

[0008] 1) CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒的制备:将 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 与 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于乙二醇中得到澄清的溶液,然后向溶液中依次加入醋酸钠、尿素和聚乙二醇搅拌得到红棕色混合物,将红棕色混合物转入聚四氟乙烯内衬不锈钢反应釜中在温度为150~200℃反应大约8~12小时。最后,进一步离心得到黑色沉淀物,将黑色沉淀物在磁场下交替用去离子水和乙醇洗涤,进一步干燥得到 CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒;

[0009] 2) 多巴胺功能化 CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒的制备:将步骤1)得到的 CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒超声溶解于四氢呋喃溶液中,进一步加入多巴胺水溶液并超声,进一步使用醋酸溶液调节混合溶液(不能使用其它酸性物质替代)调节混合溶液pH值为4.0~5.0,然后放在摇床上混合过夜离心得固体产品,将固体在磁场下交替用去离子水和乙醇洗涤后,进一步干燥获得多巴胺功能化 CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒,将所述颗粒与去离子水混合,将混合液备用;

[0010] 3) nano-Au@ CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒的制备:将纳米金胶体溶液加入步骤2)得到的混合液中,继续在在摇床上混合,进一步离心得固体纳米颗粒,在磁场下交替用去离子水和乙醇洗涤后,获得nano-Au@ CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒,并溶解于Tris-HCl缓冲溶液中,在4℃条件下存储备用;

[0011] 4) 多功能化的 CoFe_2O_4 磁性纳米传感器的制备:将5'和3'分别修饰叠氮基和巯基的DNA1链与步骤3)得到的溶液混合并保持至4℃,然后加入正己硫醇溶液并保持至4℃,进一步离心得固体,在磁场下交替用去离子水和乙醇洗涤后,获得多功能化的 CoFe_2O_4 磁性纳米传感器,并分散于Tris-HCl缓冲溶液中,在4℃条件存储。

[0012] 优选的,步骤1)所述 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 与 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 摩尔比为1:2,所述 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、醋酸钠、尿素和聚乙二醇加入比例范范围为0.05:1:1:0.03。

[0013] 优选的,步骤2)所述多巴胺水溶液的质量分数为1.0%~2.0%,所述 CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒与多巴胺水溶液的质量比为1:100。

[0014] 优选的,步骤3)所述纳米金胶体溶液与多巴胺功能化 CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒的质量比为800:1。

[0015] 优选的,步骤4)所述正己硫醇溶液的浓度为1.0mM,所述DNA1链、nano-Au@ CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒与正己硫醇溶液的质量比为 1×10^{-4} :1:0.2。

[0016] 优选的,步骤3)与步骤4)所述Tris-HCl缓冲溶液的pH值为7.4。

[0017] 2、所述方法制备而成的多功能化的铁钴磁性纳米传感器。

[0018] 3、所述多功能化的铁钴磁性纳米传感器定量检测离子、蛋白和DNA的应用。

[0019] 本发明的有益效果在于:本发明基于双重放大策略“共反应促进剂放大策略和杂交链式反应放大策略”,多功能化 CoFe_2O_4 磁性纳米传感器成功的构建并成功的应用于 Cu^{2+} 的检测。本发明的检测体系具有以下几个显著的优点:(1)本发明所制备的 CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒作为一种新的ECL共反应促进剂系统,可显著提高PTC-NH₂的ECL发光效率;(2)所制备的 CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒作为纳米载体,具有优异的磁性性能可允许快速的分离和大的比表面积允许多个生物分子识别事件的发生;在准均相体系中,所制备的 CoFe_2O_4 磁性纳米载体在水相和固相之间作为一个“桥梁”,可以扩大反应面积和改善空间位阻。因此,本发明所制备的多功能化的 CoFe_2O_4 磁性纳米传感器应用于 Cu^{2+} 的检测,显示出较高的灵敏度、优异的选择性和良好的重现性。另外,多功能化的 CoFe_2O_4 磁性纳米颗粒,也能成为其他分析物检测的一个可靠的和灵敏的平台。

附图说明

[0020] 为了使本发明的目的、技术方案和有益效果更加清楚,本发明提供如下附图:

[0021] 图1中A表示多功能化的 CoFe_2O_4 磁性纳米传感器对不同浓度的 Cu^{2+} 标准溶液的ECL响应曲线,B表示ECL信号强度值与 Cu^{2+} 浓度的对数的标准曲线;

[0022] 图2中A、B分别表示多功能化的CoFe₂O₄磁性纳米传感器的选择性和稳定性。

具体实施方式

[0023] 下面对本发明的优选实施例进行详细的描述。实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。

[0024] 实施例1

[0025] 多功能化的铁钴磁性纳米传感器的制备方法如下:

[0026] 1) CoFe₂O₄磁性纳米颗粒的制备:将Co(NO₃)₂·6H₂O与FeCl₃·6H₂O溶解于乙二醇中得到澄清的溶液,然后向溶液中依次加入醋酸钠、尿素和聚乙二醇搅拌得到红棕色混合物,将红棕色混合物转入聚四氟乙烯内衬不锈钢反应釜中在150~200℃反应大约8~12小时。最后,进一步离心得到黑色沉淀物,将黑色沉淀物在磁场下交替用去离子水和乙醇洗涤,进一步干燥得到CoFe₂O₄磁性纳米颗粒;

[0027] 2) 多巴胺功能化CoFe₂O₄磁性纳米颗粒的制备:将步骤1)得到的CoFe₂O₄磁性纳米颗粒超声溶解于四氢呋喃溶液中,进一步加入多巴胺水溶液并超声混合,进一步使用醋酸溶液(不

[0028] 能使用其它酸性物质替代)调节混合溶液pH值为4.0~5.0,然后放在摇床上混合过夜离心得固体产品,将固体在磁场下交替用去离子水和乙醇洗涤后,进一步干燥获得多巴胺功能化CoFe₂O₄磁性纳米颗粒,将所述颗粒与去离子水混合,将混合液备用;

[0029] 3) nano-Au@CoFe₂O₄磁性纳米颗粒的制备:将纳米金胶体溶液加入步骤2)得到的混合液中,继续在在摇床上混合,进一步离心得固体纳米颗粒,在磁场下交替用去离子水和乙醇洗涤后,获得nano-Au@CoFe₂O₄磁性纳米颗粒,并溶解于Tris-HCl缓冲溶液中,在4℃条件下存储备用;

[0030] 4) 多功能化的CoFe₂O₄磁性纳米传感器的制备:将5'和3'分别修饰叠氮基和巯基的DNA1链与步骤3)得到的溶液混合并保持至4℃,然后加入正己硫醇溶液并保持至4℃,进一步离心得固体,在磁场下交替用去离子水和乙醇洗涤后,获得多功能化的CoFe₂O₄磁性纳米传感器,并分散于Tris-HCl缓冲溶液中,在4℃条件存储。

[0031] 本实施例中,步骤1)所述Co(NO₃)₂·6H₂O与FeCl₃·6H₂O摩尔比为1:2,所述Co(NO₃)₂·6H₂O、醋酸钠、尿素和聚乙二醇加入比例范围为0.05:1:1:0.03。

[0032] 本实施例中,步骤2)所述多巴胺水溶液的质量分数为1.0%~2.0%,所述CoFe₂O₄磁性纳米颗粒与多巴胺水溶液的质量比为1:100。

[0033] 本实施例中,步骤3)所述纳米金胶体溶液与多巴胺功能化CoFe₂O₄磁性纳米颗粒的质量比为800:1。

[0034] 本实施例中,步骤4)所述正己硫醇溶液的浓度为1.0mM,所述DNA1链、nano-Au@CoFe₂O₄磁性纳米颗粒与正己硫醇溶液的质量比为1×10⁻⁴:1:0.2。本实施例中,步骤3)与步骤4)所述Tris-HCl缓冲溶液的pH值为7.4。

[0035] 应用实施例1

[0036] 采用该多功能化的CoFe₂O₄磁性纳米传感器的对Cu²⁺的标准溶液进行了检测,具体方法如下:

[0037] 1) 将制备好的多功能化的CoFe₂O₄磁性纳米传感器与3'修饰炔基的DNA2链DNA2(作

为引发链)溶液混合后。然后,加入不同浓度 Cu^{2+} 溶液(含抗坏血酸溶液)于上述溶液中,混合之后,可以通过Click反应使引发链DNA2与DNA1链接在一起。

[0038] 2) 发夹探针1(H1)和发夹探针2(H2)溶液(使用前,所有的发夹探针被加热到 95°C 约5分钟,然后在室温下冷却约1小时)加入上述溶液中后,继续混合,进而DNA2可以引发杂交链式反应,从而生成很长的双链DNA聚合物。

[0039] 3) 加入ECL信号探针PTC- NH_2 溶液,继续在室温下混合,进而使PTC- NH_2 分子通过静电吸附、分子间的疏水性和 π - π 堆积作用嵌入到双链DNA槽中。值得注意的是,在实验中的每一步的产物,都是在磁场条件下,用去离子水冲洗除去物理吸附物种。

[0040] 4) 电化学发光检测采用自制的三电极体系,即是Ag/AgCl(饱和KCl)作为参比电极,铂丝电极作为对电极,金片(GCP,直径为1.45厘米)在有/无磁场作用下作为工作电极。在准均相体系中,所得到的磁性产品中加入检测底液中,用自制的三电极系统检测(在磁场作用下)中检测。在工作电压范围是 -2.0 至 0V (vs. Ag/AgCl),扫描速率为 0.3V/S 和电压为 800V 的光电倍增管中检测。

[0041] 5) 其多功能化的 CoFe_2O_4 磁性纳米传感器对不同浓度的 Cu^{2+} 标准溶液的ECL响应曲线,具体结果见图1(A)。将三次测的ECL信号强度求平均值,与 Cu^{2+} 浓度的对数作图,图1(B)为标准曲线,其线性响应范围为 $1.0 \times 10^{-13}\text{mol/L} \sim 1.0 \times 10^{-7}\text{mol/L}$ 。

[0042] 由图1A可反映出该多功能化的 CoFe_2O_4 磁性纳米传感器的对 Cu^{2+} 的标准溶液的浓度效应很灵敏,由图1B可反映出ECL信号强度值与 Cu^{2+} 浓度的对数的标准曲线其线性关系非常好。

[0043] 应用实施例2该多功能化的 CoFe_2O_4 磁性纳米传感器的选择性和稳定性检测

[0044] 为了进一步研究该多功能化的 CoFe_2O_4 磁性纳米传感器的实用价值。我们使用该传感器检测方法对于干扰离子的样品进行了检测,其结果和标准的 Cu^{2+} 方法检测的结果进行了对照。具体步骤如下:

[0045] 1) 将制备好的多功能化的 CoFe_2O_4 磁性纳米传感器分别与 $1.0 \times 10^{-5}\text{mol/L}$ 干扰离子和 $1.0 \times 10^{-7}\text{mol/L}$ Cu^{2+} 的样品溶液反应。反应完成后用去离子水冲洗去掉未结合的物质。

[0046] 2) 电化学发光检测采用自制的三电极体系,即是Ag/AgCl(饱和KCl)作为参比电极,铂丝电极作为对电极,金片(GCP,直径为1.45厘米)在有/无磁场作用下作为工作电极。在准均相体系中,所得到的磁性产品中加入检测底液中,用自制的三电极系统检测(在磁场作用下)中检测。在工作电压范围是 -2.0 至 0V (vs. Ag/AgCl),扫描速率为 0.3V/S 和电压为 800V 的光电倍增管中检测。

[0047] 3) 其ECL信号与干扰离子浓度的紧密相关被测定,将三次ECL信号强度求平均值,对照 $1.0 \times 10^{-7}\text{mol/L}$ Cu^{2+} 的ECL强度,具体结果见图2(A)。

[0048] 4) 在 $1.0 \times 10^{-7}\text{mol/L}$ 的 Cu^{2+} 孵育之后,多功能化的 CoFe_2O_4 磁性纳米传感器的ECL强度稳定性,具体结果见图2(B)。

[0049] 由以上应用实施例可反映出本发明所制备的多功能化的 CoFe_2O_4 磁性纳米传感器应用于 Cu^{2+} 的检测,显示出较高的灵敏度、优异的选择性和良好的重现性。

[0050] 最后说明的是,以上优选实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管通过上述优选实施例已经对本发明进行了详细的描述,但本领域技术人员应当理解,可以在

形式上和细节上对其作出各种各样的改变,而不偏离本发明权利要求书所限定的范围。

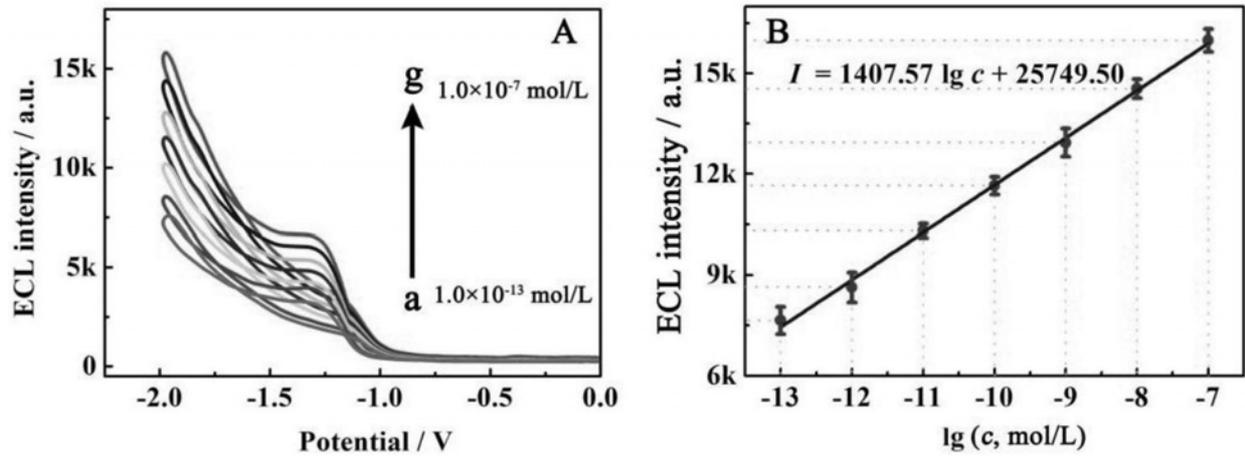


图1

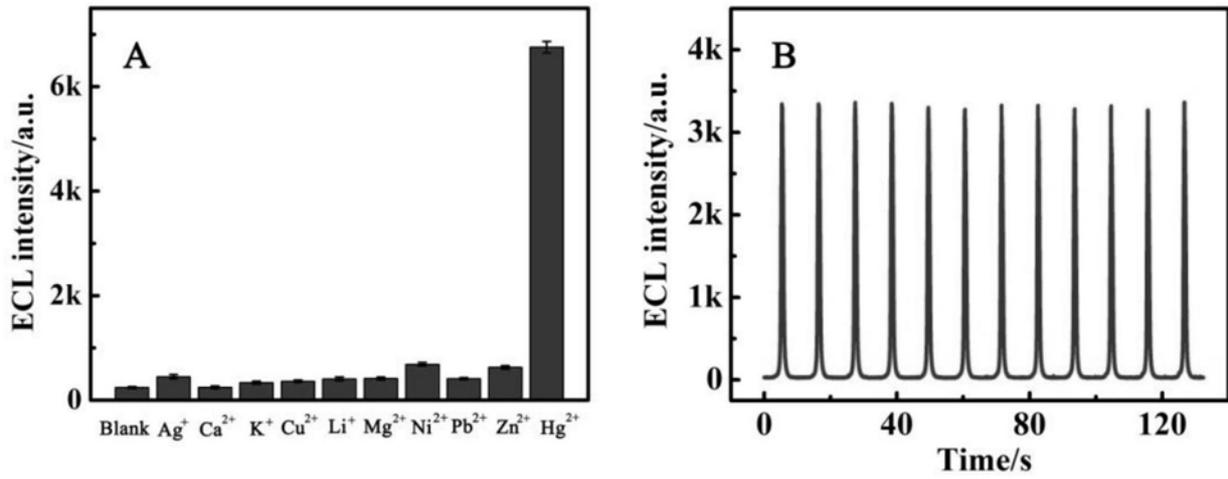


图2