



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101251535 B

(45) 授权公告日 2012.05.30

(21) 申请号 200810024506.0

报》.2007, 第 20 卷 (第 1 期), 第 18-21 页.

(22) 申请日 2008.03.25

审查员 姚进孝

(73) 专利权人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市汉口路 22 号南  
京大学科技处

(72) 发明人 朱俊杰 接贵芬

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 黄嘉栋

(51) Int. Cl.

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2007003516 A2, 2007.01.11, 全文.

US 20070114138 A1, 2007.05.24, 全文.

王存嫦等. 一种新的多层碳纳米管复合膜  
修饰的葡萄糖生物传感器制备. 《传感技术学

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免疫传  
感器及其制法和用途

(57) 摘要

一种基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免  
疫传感器,其特征是:它是在金电极表面上覆盖  
有 CdSe 纳晶-碳纳米管-壳聚糖复合物膜,并用  
硅烷偶联剂处理后固定抗体的电化学发光免疫  
传感器。将本发明的传感器完全清洗后再浸入  
40 μL 不同浓度的待测样品 (HIgG) 中,在 37℃ 下  
温育 50 分钟,然后进行电化学发光的测试,发光  
强度与待测样品 (HIgG) 的浓度成线性关系。本发  
明公开了基于纳晶复合物的电化学发光免疫传  
感器的制法。

1. 一种基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免疫传感器,其特征是:它是在金电极表面上覆盖有 CdSe 纳晶-碳纳米管-壳聚糖复合物膜,并用硅烷偶联剂处理后固定抗体的电化学发光免疫传感器。

2. 一种制备权利要求 1 所述的基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免疫传感器的方法,其特征是它由下列步骤组成:

步骤 1. 将一定量壳聚糖溶于含有 0.05M HCl 的 80-90°C 的热水中,得到 0.50% 的壳聚糖溶液,然后过滤得到无色的滤液,多壁碳纳米管在 3 份硫酸与 1 份硝酸组成的混酸中超声氧化 4 小时,离心后用二次水洗涤,直至 pH 值为 ~ 7,然后将纯化处理后的多壁碳纳米管分散于 0.50mg/mL 的壳聚糖溶液超声 15 分钟,得到一均匀的黑色碳纳米管-壳聚糖复合溶液,

步骤 2. 将 0.05mM 的 CdSe 纳晶溶液用盐酸调至 pH 5.5,然后与上述步骤 1 得到的碳纳米管-壳聚糖复合溶液以 1 : 3 的体积比超声混合 0.5 小时,得到 CdSe NCs/CNT-CHIT 复合溶液,备用,

步骤 3. 将 4mm 直径金电极依次用 1.0,0.3 和 0.05  $\mu\text{m}$  的三氧化二铝抛光粉抛光处理,再用二次水冲洗干净,然后将电极置于 0.5M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液中,在 -0.2 ~ 1.6V 下扫描至循环伏安曲线稳定,

步骤 4. 将步骤 3 的金电极冲洗干净,待电极干燥后取 10  $\mu\text{L}$  步骤 2 的 CdSe NCs/CNT-CHIT 混合溶液滴在电极表面于空气中凉干,然后浸在质量百分比浓度为 1-3% 的硅烷偶联剂 KH550 的水溶液中 0.5-2 小时,二次水冲干净后浸入 2.5-5% 的戊二醛溶液中 10-20min,

步骤 5. 将步骤 4 的电极冲洗干净后浸入到 0.5-1mg/mL 的羊抗人 IgG 的、pH = 7.4 的 50mM 磷酸缓冲溶液中反应 12-20 小时,然后用 50mM 的磷酸缓冲液冲洗干净,浸入质量百分比浓度为 2-3% 的牛血清蛋白 (BSA) 中封闭 1-2 小时,即制得基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免疫传感器。

3. 一种采用权利要求 1 所述的基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免疫传感器作为电化学发光分析探针的免疫检测方法,其特征是它由下列步骤组成:

步骤 1. 将上述方法制得的基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免疫传感器清洗后再浸入 40  $\mu\text{L}$  要检测的样品人的 IgG,在 37°C 下温育 50 分钟,

步骤 2. 电化学发光 (ECL) 免疫检测:将步骤 1 处理后的基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免疫传感器清洗,在含有 0.1M  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  和 0.1M KCl 的 0.1M 磷酸缓冲液中,pH 7.4,进行电化学发光的测试,发光强度与待测样品 HIgG 的浓度成线性关系。

4. 根据权利要求 3 所述的免疫检测方法,其特征是:所述的电化学发光测试是以基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免疫传感器为工作电极、Pt 电极为对电极、甘汞电极为参比电极的三电极体系,用 MPI-A 型电致化学发光仪,在 0 到 -1.5V 进行循环伏安扫描,光电倍增管高压设为 500 ~ 700V。

## 基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免疫传感器及其制法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种新型的基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免疫传感器,以及用该传感器作为电化学发光分析探针的免疫检测方法。

### 背景技术

[0002] 半导体纳米晶体 (NCs) 由于其独特的荧光特性而广泛应用于生物标记与免疫分析中。近几年来,半导体纳晶的电致化学发光 (ECL) 研究引起了人们极大的兴趣。较之荧光分析,半导体纳晶的 ECL 通过电化学控制,不需激发光源,背景小,灵敏度高,线性范围宽,在 ECL 生物传感器和免疫分析中具有潜在的应用价值。但是到目前为止,基于半导体纳晶的 ECL 进行生物分子的检测还很少有报道,可能是由于半导体纳晶的 ECL 强度不如传统的发光试剂如鲁米诺和  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 。因此,发展新的半导体纳晶材料以及提高半导体纳晶的 ECL 强度成为研制 ECL 生物传感器的当务之急。[参见:(a)Constantine, C. A.; Gattas-Asfura, K. M.; Mello, S. V.; Crespo, G.; Rastogi, V.; Cheng, T. C.; DeFrank, J. J.; Leblanc, R. M. *J. Phys. Chem. B* 2003, 107, 13762-13764. (b)Constantine, C. A.; Gattas-Asfura, K. M.; Mello, S. V.; Crespo, G.; Rastogi, V.; Cheng, T. C.; DeFrank, J. J.; Leblanc, R. M. *Langmuir* 2003, 19, 9863-9867. (c)Goldman, E. R.; Balighian, E. D.; Mattoussi, H.; Kenneth Kuno, M.; Mauro, J. M.; Tran, P. T.; Anderson, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 6378-6382. (d)Goldman, E. R.; Clapp, A. R.; Anderson, G. P.; Uyeda, H. T.; Mauro, J. M.; Medintz, I. L.; Mattoussi, H. *Anal. Chem.* 2004, 76, 684-688.]

[0003] 最近的研究表明,纳晶薄膜技术为研制 ECL 传感器提供了一种有效的方法,向 CdSe 或 CdSe/CdS 纳晶膜施加负电位能极大地提高发光强度。CdSe NCs 因其具有优良的光学特性而成为 ECL 研究的热门材料。碳纳米管 (CNTs) 由于具有良好的导电性能够极大地提高半导体纳米晶体的 ECL 强度。此外,壳聚糖 (CHIT) 具有极好的成膜能力和生物相容性,碳纳米管溶于壳聚糖已广泛用于生物传感器中。CdSe NCs/CNT-CHIT 纳米复合物具有很强的 ECL,良好的生物相容性,极好的稳定性,是用于研制 ECL 生物传感器的良好的纳米材料,在免疫生物学和临床检验学等研究中将会有广阔的应用前景。[参见:(e)Jie, G.; Liu, B.; Pan, H.; Zhu, J. J.; Chen, H. Y. *Anal. Chem.* 2007, 79, 5574-5581. (f)Poznyak, S. K.; Talapin, D. V.; Shevchenko, E. V.; Weller, H. *Nano Lett.* 2004, 4, 693-698. (g)Weller, H. *Angew. Chem. Int. Edit.* 1993, 32, 41-53. (h)Murray, C. B.; Norris, D. J.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 8706-8715. 目前,基于纳晶复合物的电化学发光免疫传感器用作免疫分析探针还未见报道。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种新型的基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免疫传感器,以及用该传感器作为电化学发光分析探针的免疫检测方法。

[0005] 本发明的技术方案如下：

[0006] 一种基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免疫传感器，它是在金电极表面上覆盖有 CdSe 纳晶-碳纳米管-壳聚糖复合物膜，并用硅烷偶联剂处理后固定抗体的电化学发光免疫传感器。

[0007] 一种制备上述基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免疫传感器的方法，它由下列步骤组成：

[0008] 步骤 1. 将一定量壳聚糖溶于含有 0.05M HCl 的热水 (80-90℃) 中，得到 0.50% 的壳聚糖溶液，然后过滤得到无色的滤液，多壁碳纳米管在混酸 (硫酸与硝酸的体积比为 3 : 1) 中超声氧化 4 小时，离心后用二次水洗涤，直至 pH 值为 ~ 7，然后将纯化处理后的多壁碳纳米管分散于壳聚糖溶液 (0.50mg mL<sup>-1</sup>) 超声 15 分钟，得到一均匀的黑色 CNT-CHIT 复合溶液，

[0009] 步骤 2. 将 0.05mM 的 CdSe 纳晶溶液用盐酸调至 pH 5.5，然后与上述步骤 1 得到的 CNT-CHIT 复合溶液以 1 : 3 的体积比超声混合 0.5 小时，得到 CdSe NCs/CNT-CHIT 复合溶液，备用，

[0010] 步骤 3. 将 4mm 直径金电极依次用 1.0, 0.3 和 0.05 μm 的三氧化二铝抛光粉抛光处理，再用二次水冲洗干净，然后将电极置于在 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液中，在 -0.2 ~ 1.6V 下扫描至循环伏安曲线稳定，

[0011] 步骤 4. 将步骤 3 的金电极冲洗干净，待电极干燥后取 10 μL 步骤 2 的 CdSeNCs/CNT-CHIT 混合溶液滴在电极表面于空气中凉干，然后浸在质量百分比浓度为 1-3% 的硅烷偶联剂 KH550 的水溶液中 0.5-2 小时，二次水冲干净后浸入 2.5-5% 的戊二醛 (GLD) 溶液中 10-20min，

[0012] 步骤 5. 将步骤 4 的电极冲洗干净后浸入到 0.5-1mg/mL 的羊抗人 IgG 的 50mM 磷酸缓冲溶液 (pH 7.4) 中反应 12-20 小时，然后用 50mM 的磷酸缓冲液冲洗干净，浸入质量百分比浓度为 2-3% 的牛血清蛋白 (BSA) 中封闭 1-2 小时，即制得基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免疫传感器。

[0013] 一种采用基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免疫传感器作为电化学发光分析探针的免疫检测方法，它由下列步骤组成：

[0014] 步骤 1. 将上述方法制得的基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免疫传感器清洗后再浸入 40 μL 要检测的样品 (人的 IgG)，在 37℃ 下温育 50 分钟，

[0015] 步骤 2. 电化学发光 (ECL) 免疫检测：将步骤 1 处理后的基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免疫传感器清洗，在含有 0.1M K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 和 0.1M KCl 的 0.1M PBS (pH 7.4) 缓冲液中，进行电化学发光的测试，发光强度与待测样品 (HIgG) 的浓度成线性关系。

[0016] 所述的电化学发光测试是以修饰好的金电极 (基于 CdSe 纳晶复合物的电化学发光免疫传感器) 为工作电极、Pt 电极为对电极、甘汞电极为参比电极的三电极体系，用 MPI-A 型电致化学发光仪，在 0 到 -1.5V 进行循环伏安扫描，光电倍增管高压设为 500 ~ 700V。

[0017] 本发明中 CNT-CHIT 比 CNTs 具有更开放的多空结构 (扫描电子显微镜图 1A, 1B)，使复合的 CdSeNCs ECL 不仅能在修饰电极和溶液界面产生，而且能在膜的内部产生，极大的提高了发光强度。而且，CdSe NCs/CNT-CHIT 具有极好的生物相容性和稳定性，是组装 ECL

免疫传感器的良好材料。KH550 不仅用作 ECL 传感器组装过程中固定抗体的偶联剂,而且因氨基功能团的催化效应能够极大的增强 ECL(见图 2)。ECL 检测表明抗原浓度在 0.02 到 200ng/mL 范围内,ECL 强度随着浓度的增大而降低,与浓度的对数成线性关系(见图 2 中的插图),检测限达到 0.001ng/mL。

[0018] 本发明的电化学发光传感器表现出了优良的准确性、高灵敏性,稳定性与重现性,免疫分析检测迅速、方便,可用于实际样品的检测。

#### 附图说明

[0019] 图 1 为本发明中 CNTs(A) 与 CNT-CHIT(B) 的扫描电子显微镜 (SEM) 表征结果。

[0020] 图 2 采用电化学发光技术,在检测范围内,一系列不同浓度的人的 IgG(0,0.02,0.1,0.5,2,10,50,100,200ng mL<sup>-1</sup>) 的光学免疫分析结果,及标准曲线。

#### 具体实施方式

[0021] 实施例 1. 电化学发光免疫传感器的制备及免疫检测

[0022] 首先将直径 4mm 金电极依次用 1.0,0.3 和 0.05 μm 的三氧化二铝抛光粉抛光处理,二次水冲净后置于在 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液中,在 -0.2 ~ 1.6V 下扫描至循环伏安曲线稳定。取 10 μL CdSe NCs/CNT-CHIT 混合溶液滴在电极表面于空气中凉干,然后浸在质量百分比浓度为 3% 的硅烷偶联剂 KH550 的水溶液中 0.5 小时。二次水冲干净后浸入 2.5% 的戊二醛 (GLD) 中 15min。

[0023] 将上述电极洗净后浸入到 0.5mg/mL 的羊抗人 IgG(50mM PBS, pH 7.4) 反应 12 小时,然后用 50mM 的 PBS 缓冲液冲洗干净,浸入质量百分浓度为 2% 的牛血清蛋白 (BSA) 中封闭 1 小时。清洗后再浸入 40 μL 要检测的样品 (人的 IgG),在 37°C 下温育 50 分钟,抗体与抗原反应,完全清洗后的电极可用于电化学发光检测。

[0024] 实施例 2. 电化学发光免疫传感器的制备及免疫检测

[0025] 将硅烷偶联剂 KH550 的浓度改为 1%,制备的其他条件同实施例 1,得到形貌与性质类似于实施例 1 的免疫传感器。免疫检测结果同实施例 1。

[0026] 实施例 3. 电化学发光免疫传感器的制备及免疫检测

[0027] 将“浸在质量百分比浓度为 3% 的硅烷偶联剂 KH550 的水溶液中 0.5 小时”改为“浸在质量百分比浓度为 3% 的硅烷偶联剂 KH550 的水溶液中 2 小时”,制备的其他条件同实施例 1,得到形貌与性质类似于实施例 1 的免疫传感器。免疫检测结果同实施例 1。

[0028] 实施例 4. 电化学发光免疫传感器的制备及免疫检测

[0029] 将“浸入 2.5% 的戊二醛 (GLD) 中 15min。”改为“浸入 2.5% 的戊二醛 (GLD) 中 20min。”,制备的其他条件同实施例 1,得到形貌与性质类似于实施例 1 的免疫传感器。免疫检测结果同实施例 1。

[0030] 实施例 5. 电化学发光免疫传感器的制备及免疫检测

[0031] 将“浸入 2.5% 的戊二醛 (GLD) 中 15min。”改为“浸入 5% 的戊二醛 (GLD) 中 10min。”,制备的其他条件同实施例 1,得到形貌与性质类似于实施例 1 的免疫传感器。免疫检测结果同实施例 1。

[0032] 实施例 6. 电化学发光免疫传感器的制备及免疫检测

[0033] 将“0.5mg/mL 的羊抗人 IgG (50mM PBS, pH 7.4)”改为“1mg/mL 的羊抗人 IgG (50mM PBS, pH 7.4)”,制备的其他条件同实施例 1,得到形貌与性质类似于实施例 1 的免疫传感器。免疫检测结果同实施例 1。

[0034] 实施例 7. 电化学发光免疫传感器的制备及免疫检测

[0035] 将“浸入到 0.5mg/mL 的羊抗人 IgG (50mM PBS, pH 7.4) 反应 12 小时”改为“浸入到 0.5mg/mL 的羊抗人 IgG (50mM PBS, pH 7.4) 反应 16 小时”,制备的其他条件同实施例 1,得到形貌与性质类似于实施例 1 的免疫传感器。免疫检测结果同实施例 1。

[0036] 实施例 8. 电化学发光免疫传感器的制备及免疫检测

[0037] 将“浸入到 0.5mg/mL 的羊抗人 IgG (50mM PBS, pH 7.4) 反应 12 小时”改为“浸入到 0.5mg/mL 的羊抗人 IgG (50mM PBS, pH 7.4) 反应 20 小时”,制备的其他条件同实施例 1,得到形貌与性质类似于实施例 1 的免疫传感器。免疫检测结果同实施例 1。

[0038] 实施例 9. 电化学发光免疫传感器的制备及免疫检测

[0039] 将封闭 1 小时改为封闭 2 小时,制备的其他条件同实施例 1,得到形貌与性质类似于实施例 1 的免疫传感器。免疫检测结果同实施例 1。

[0040] 实施例 10. 电化学发光免疫传感器的制备及免疫检测

[0041] 将“2%的牛血清蛋白 (BSA)”改为“3%的牛血清蛋白 (BSA)”,制备的其他条件同实施例 1,得到形貌与性质类似于实施例 1 的免疫传感器。免疫检测结果同实施例 1。

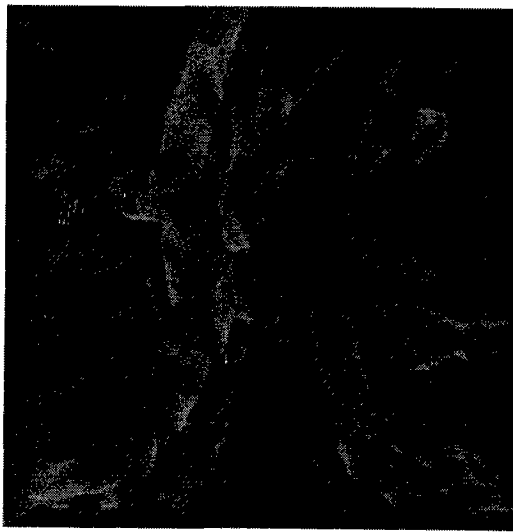


图 1A

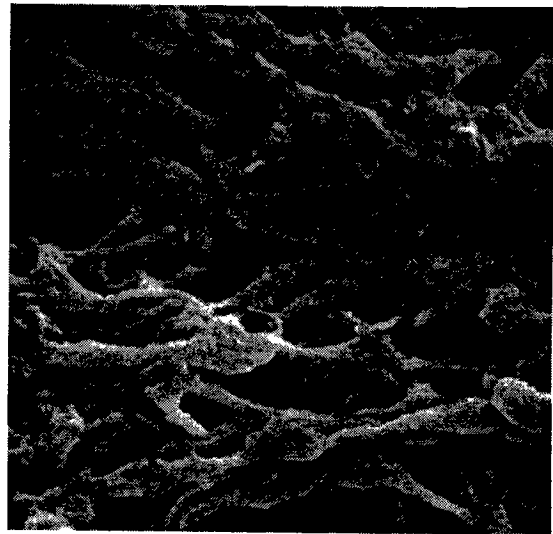


图 1B

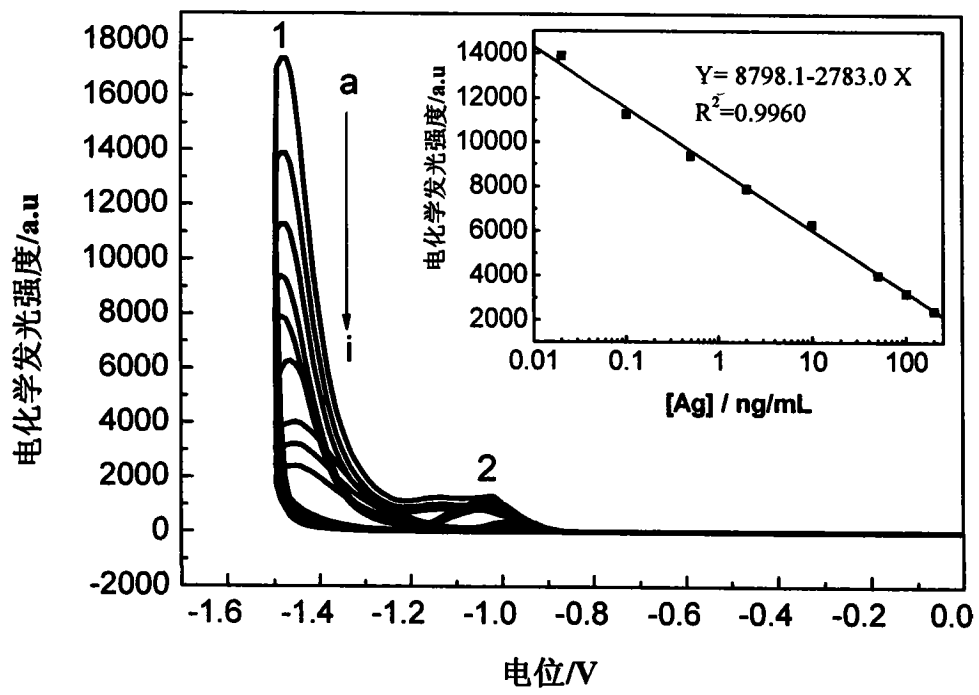


图 2

专利名称(译)	基于CdSe纳晶复合物的电化学发光免疫传感器及其制法和用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN101251535B</a>	公开(公告)日	2012-05-30
申请号	CN200810024506.0	申请日	2008-03-25
[标]申请(专利权)人(译)	南京大学		
申请(专利权)人(译)	南京大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京大学		
[标]发明人	朱俊杰 接贵芬		
发明人	朱俊杰 接贵芬		
IPC分类号	G01N33/52 G01N33/53 G01N21/76		
其他公开文献	CN101251535A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种基于CdSe纳晶复合物的电化学发光免疫传感器，其特征是：它是在金电极表面上覆盖有CdSe纳晶-碳纳米管-壳聚糖复合物膜，并用硅烷偶联剂处理后固定抗体的电化学发光免疫传感器。将本发明的传感器完全清洗后再浸入40 $\mu$ L不同浓度的待测样品(HIgG)中，在37 $^{\circ}$ C下温育50分钟，然后进行电化学发光的测试，发光强度与待测样品(HIgG)的浓度成线性关系。本发明公开了基于纳晶复合物的电化学发光免疫传感器的制法。

