



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110554027 A

(43)申请公布日 2019.12.10

(21)申请号 201910884354.X

(22)申请日 2019.09.19

(71)申请人 济南大学

地址 250022 山东省济南市市中区南辛庄
西路336号

(72)发明人 魏琴 贾越 杨磊 赵磊 张诺
马洪敏

(74)专利代理机构 济南誉丰专利代理事务所
(普通合伙企业) 37240

代理人 赵凤

(51)Int.Cl.

G01N 21/76(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种基于氧化铁阵列共反应促进金纳米簇
电致发光响应的免疫传感器的制备方法及应用

(57)摘要

本发明涉及一种基于氧化铁 Fe_2O_3 阵列共反应促进金纳米簇电致发光响应的免疫传感器的制备方法及应用,属于电化学与免疫分析领域;本发明基于电致发光ECL技术,以C-反应蛋白CRP为目标分析物,以金纳米团簇AuNCs为ECL发射体,在共反应促进剂氧化铁纳米阵列 Fe_2O_3 的催化下,由于电子沿有序阵列结构运输的改善,所有暴露的活性位点都能有效地增强AuNCs的ECL发射,因此,本发明以 Fe_2O_3 /AuNCs作为传感平台,构建了一种夹心型ECL免疫传感器,该传感器对目标物CRP表现出了高的灵敏度,宽的检测范围以及低的检出限,能够实现人体血清中CRP的快速灵敏测定,对临床上患者感染类型的判断有着较大的应用价值。

1. 一种基于氧化铁阵列共反应促进金纳米簇电致发光响应的免疫传感器的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 将尺寸为 1×2 cm的ITO玻璃在丙酮中超声清洗1 h, 依次用清水和无水乙醇清洗干净, 氮气吹干;

(2) 将处理好的ITO玻璃放入反应釜中, 加入30 ~ 50 mL的原料混合液, 在 $120 \sim 150^{\circ}\text{C}$ 反应6 ~ 8 h;

(3) 冷却后, 取出ITO玻璃, 用超纯水和无水乙醇冲洗干净, 晾干后放入管式炉中, 氮气环境下 $200 \sim 300^{\circ}\text{C}$ 煅烧3h, 得到 Fe_2O_3 阵列, 作为传感器基底材料;

(4) 在 Fe_2O_3 表面滴涂6 μL 、浓度为2 ~ 5 mg/mL的 Ab_1 溶液, 4°C 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面;

(5) 滴加3 μL 、质量分数为0.1%的牛血清白蛋白溶液, 以封闭电极表面的非特异性活性位点, 4°C 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面;

(6) 滴加6 μL PCT的标准溶液或未知浓度的PCT溶液, 37°C 下孵化2 h, 4°C 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面;

(7) 滴加6 μL AuNCs-PA-Ab_2 溶液, 4°C 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面, 传感器构建完毕。

2. 如权利要求1所述的一种基于氧化铁阵列共反应促进金纳米簇电致发光响应的免疫传感器的制备方法, 其特征在于, 所述原料混合液, 按以下步骤制备:

室温下, 将5~ 15 mL、浓度为0.5 ~ 1 M的三氯化铁溶液与1~ 5 mL、浓度为0.1 ~ 0.6 M的尿素水溶液混合, 强力搅拌10 ~ 30 min后, 常温放置备用。

3. 如权利要求1所述的一种基于氧化铁 Fe_2O_3 阵列共反应促进金纳米簇电致发光响应的免疫传感器的制备方法, 其特征在于, 所述 AuNCs-Ab_2 溶液, 按以下步骤制备:

室温下, 将5 mL、浓度为5 ~ 10 mmol/L 的氯金酸溶液与5 mL、浓度为50 ~ 100 mg/mL的牛血清蛋白溶液充分混合, 剧烈搅拌2 ~ 5 min后, 加入0.5 ~ 1 mL、浓度为1 ~ 2 mol/L的氢氧化钠溶液, 然后将该混合液置于 37°C 水浴中12 h, 直至溶液颜色由淡黄色变为棕黄色, 此时, 氯金酸根离子已被BSA成功还原, 随后, 将上述溶液倒入透析袋, 透析48 h, 得到中性的 AuNCs ;

在上述溶液中, 加入1 ~ 5 μL 、浓度为1 ~ 10 mg/mL的EDC/NHS混合液, 震荡5min, 倒入100 ~ 300 μL 、浓度为10 mg/mL的 Ab_2 溶液, 在 4°C 下振荡孵化12 h, 离心后分散到1 mL pH 7.4的PBS缓冲溶液中得到 AuNCs-Ab_2 溶液, 置于 4°C 下储存备用。

4. 如权利要求1所述的一种基于氧化铁阵列共反应促进金纳米簇电致发光响应的免疫传感器的制备方法, 其特征在于, 所述CRP为人体细菌感染标志物C-反应蛋白。

5. 如权利要求4所述的检测CRP的浓度, 其特征在于, 步骤如下:

(1) 超微弱发光检测仪参数设置: 光电倍增管高压设置为600 V, 放大级数IV;

(2) 电化学工作站参数设置: 循环伏安法扫描电位范围 $-1.2 \sim 0$ V, 扫描速率为0.15 V/s;

(3) 测试: 以 Ag/AgCl 电极作为参比电极, 铂丝电极为对电极, 以传感器为工作电极, 在10 ~ 15 mL含80 ~ 100 mM过硫酸钾的PBS溶液中进行ECL测试, 根据孵化不同浓度CRP时产生的ECL信号强度绘制工作曲线。

一种基于氧化铁阵列共反应促进金纳米簇电致发光响应的免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于电化学与免疫分析领域。

背景技术

[0002] 金纳米团簇是一种传统的荧光探针,由于其高的量子产率和大的斯托克位移成为了很有前途的电致化学发光体。特别地,以牛血清蛋白为模板的金纳米团簇因为其良好的生物相同性不仅可以作为ECL信号标签用于疾病标志物的低浓度检测,还能够通过牛血清蛋白表面大量的氨基、羧基等官能团链接免疫分子;然而,由于牛血清蛋白较差的电导率和低的ECL效率,寻找一种策略放大其ECL响应来满足痕量标志物的检测显得尤为重要。

[0003] 迄今为止,利用 $S_2O_8^{2-}$ 作为半导体量子点ECL发射的共反应剂的研究不在少数,原因在于 $S_2O_8^{2-}$ 可以通过电化学还原生成氧化中间体 $SO_4^{\cdot-}$,然后与带负电荷的金纳米团簇的阴离子自由基 $Au NCs^{\cdot-}$ 反应,方法是在最高占据的分子轨道上注入电子,诱导金纳米簇形成激发态,从而释放光信号;因此,金纳米簇的ECL取决于 $SO_4^{\cdot-}$ 中间体的含量,而将共反加速策略推广到ECL系统中,可以有效地解决 $Au NCs$ 发光效率低的问题;铁基化合物具备良好的氧化还原性能,可以与共反应剂相互作用,促进中间自由基的形成,加速ECL的激发。

发明内容

[0004] 本发明的技术任务之一是寻找一种能够使电子沿有序阵列结构运输的铁基ECL共反应加速剂,在微观结构上尽可能多地暴露材料的活性位点,从而有效增强 $AuNCs$ 的ECL发射。所提出的氧化铁阵列所用原料成本低,制备工艺简单,反应耗能低,有着广阔的应用价值与前景。

[0005] 本发明的技术任务之二是提供所述免疫传感器的用途,该传感器快速检测CRP灵敏度高、特异性强、重现性好,在CRP的临床检测中有着较大的潜在应用价值。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

1. 一种基于氧化铁阵列共反应促进金纳米簇电致发光响应的免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将尺寸为 1×2 cm的ITO玻璃在丙酮中超声清洗1 h,依次用清水和无水乙醇清洗干净,氮气吹干;

(2) 将处理好的ITO玻璃放入反应釜中,加入30 ~ 50 mL的原料混合液,在 $120 \sim 150^\circ\text{C}$ 反应 6 ~ 8h;

(3) 冷却后,取出ITO玻璃,用超纯水和无水乙醇冲洗干净,晾干后放入管式炉中,氮气环境下 $200 \sim 300^\circ\text{C}$ 煅烧3h,得到 Fe_2O_3 阵列,作为传感器基底材料;

(4) 在 Fe_2O_3 表面滴涂6 μL 、浓度为2 ~ 5 mg/mL的 Ab_1 溶液,4 $^\circ\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面;

(5) 滴加3 μL 、质量分数为0.1%的牛血清白蛋白溶液,以封闭电极表面的非特异性活性

位点,4 °C晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面;

(6)滴加6 μ L PCT的标准溶液或未知浓度的PCT溶液,37 °C下孵化2 h,4 °C晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面;

(7)滴加6 μ L AuNCs-PA-Ab₂溶液,4 °C晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面,传感器构建完毕。

[0007] 2. 所述的一种基于氧化铁阵列共反应促进金纳米簇电致发光响应的免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述原料混合液,按以下步骤制备:

室温下,将5~15 mL、浓度为0.5~1 M的三氯化铁溶液与1~5 mL、浓度为0.1~0.6 M的尿素水溶液混合,强力搅拌10~30 min后,常温放置备用。

[0008] 3. 所述的一种基于氧化铁阵列共反应促进金纳米簇电致发光响应的免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述AuNCs-Ab₂溶液,按以下步骤制备:

室温下,将5 mL、浓度为5~10 mmol/L 的氯金酸溶液与5 mL、浓度为50~100 mg/mL 的牛血清蛋白溶液充分混合,剧烈搅拌2~5 min后,加入0.5~1 mL、浓度为1~2 mol/L 的氢氧化钠溶液,然后将该混合液置于37 °C 水浴中12 h,直至溶液颜色由淡黄色变为棕黄色,此时,氯金酸根离子已被BSA成功还原,随后,将上述溶液倒入透析袋,透析48 h,得到中性的AuNCs;

在上述溶液中,加入1~5 μ L、浓度为1~10 mg/mL的EDC/NHS混合液,震荡5min,倒入100~300 μ L、浓度为10 mg/mL的Ab₂溶液,在4 °C下振荡孵化12 h,离心后分散到1 mL pH 7.4的PBS缓冲溶液中得到AuNCs-Ab₂溶液,置于4 °C下储存备用。

[0009] 4. 所述的一种基于氧化铁阵列共反应促进金纳米簇电致发光响应的免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述CRP为人体细菌感染标志物C-反应蛋白。

[0010] 5. 所述的检测CRP的浓度,其特征在于,步骤如下:

(1)超微弱发光检测仪参数设置:光电倍增管高压设置为600 V,放大级数IV;

(2)电化学工作站参数设置:循环伏安法扫描电位范围-1.2~0 V,扫描速率为0.15 V/s;

(3)测试:以Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝电极为对电极,以传感器为工作电极,在10~15 mL含80~100 mM过硫酸钾的PBS溶液中进行ECL测试,根据孵化不同浓度CRP时产生的ECL信号强度绘制工作曲线。

[0011] 本发明的有益成果

(1)本发明首次基于氧化铁纳米阵列构建了一种有序的ECL传感模型,该模型能够使电子沿有序阵列结构输运,在微观结构上暴露出更多的活性位点,从而有效增强AuNCs的ECL发射。并且所提出的氧化铁阵列所用原料成本低,制备工艺简单,反应耗能低。

[0012] (2)本发明首次基于该传感模型构建了一种夹心型免疫传感器用于CRP的灵敏检测,该传感器具有高的灵敏度、宽的检测范围与低的检出限,为CRP的早期临床检测提供了一种全新的分析方法。

具体实施方式

[0013] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明,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。

[0014] 实施例1. 一种基于氧化铁阵列共反应促进金纳米簇电致发光响应的免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)将尺寸为 1×2 cm的ITO玻璃在丙酮中超声清洗1 h,依次用清水和无水乙醇清洗干净,氮气吹干;

(2)将处理好的ITO玻璃放入反应釜中,加入30 mL的原料混合液,在 120°C 反应 6 h;

(3)冷却后,取出ITO玻璃,用超纯水和无水乙醇冲洗干净,晾干后放入管式炉中,氮气环境下 200°C 煅烧3h,得到 Fe_2O_3 阵列,作为传感器基底材料;

(4)在 Fe_2O_3 表面滴涂6 μL 、浓度为2 mg/mL的 Ab_1 溶液, 4°C 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面;

(5)滴加3 μL 、质量分数为0.1%的牛血清白蛋白溶液,以封闭电极表面的非特异性活性位点, 4°C 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面;

(6)滴加6 μL PCT的标准溶液或未知浓度的PCT溶液, 37°C 下孵化2 h, 4°C 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面;

(7)滴加6 μL AuNCs-PA-Ab_2 溶液, 4°C 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面,传感器构建完毕。

[0015] 实施例2. 一种基于氧化铁阵列共反应促进金纳米簇电致发光响应的免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)将尺寸为 1×2 cm的ITO玻璃在丙酮中超声清洗1 h,依次用清水和无水乙醇清洗干净,氮气吹干;

(2)将处理好的ITO玻璃放入反应釜中,加入40 mL的原料混合液,在 135°C 反应 7 h;

(3)冷却后,取出ITO玻璃,用超纯水和无水乙醇冲洗干净,晾干后放入管式炉中,氮气环境下 250°C 煅烧3h,得到 Fe_2O_3 阵列,作为传感器基底材料;

(4)在 Fe_2O_3 表面滴涂6 μL 、浓度为3.5 mg/mL的 Ab_1 溶液, 4°C 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面;

(5)滴加3 μL 、质量分数为0.1%的牛血清白蛋白溶液,以封闭电极表面的非特异性活性位点, 4°C 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面;

(6)滴加6 μL PCT的标准溶液或未知浓度的PCT溶液, 37°C 下孵化2 h, 4°C 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面;

(7)滴加6 μL AuNCs-PA-Ab_2 溶液, 4°C 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面,传感器构建完毕。

[0016] 实施例3. 一种基于氧化铁阵列共反应促进金纳米簇电致发光响应的免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)将尺寸为 1×2 cm的ITO玻璃在丙酮中超声清洗1 h,依次用清水和无水乙醇清洗干净,氮气吹干;

(2)将处理好的ITO玻璃放入反应釜中,加入50 mL的原料混合液,在 150°C 反应8h;

(3)冷却后,取出ITO玻璃,用超纯水和无水乙醇冲洗干净,晾干后放入管式炉中,氮气环境下 300°C 煅烧3h,得到 Fe_2O_3 阵列,作为传感器基底材料;

(4)在 Fe_2O_3 表面滴涂6 μL 、浓度为5 mg/mL的 Ab_1 溶液, 4°C 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面;

(5) 滴加3 μL 、质量分数为0.1%的牛血清白蛋白溶液,以封闭电极表面的非特异性活性位点,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面;

(6) 滴加6 μL PCT的标准溶液或未知浓度的PCT溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化2 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面;

(7) 滴加6 μL AuNCs-PA-Ab₂溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干后用pH 7.4的PBS冲洗ITO表面,传感器构建完毕。

[0017] 实施例4.原料混合液,按以下步骤制备:

室温下,将5 mL、浓度为0.5 M的三氯化铁溶液与1 mL、浓度为0.1 M的尿素水溶液混合,强力搅拌10 min后,常温放置备用。

[0018] 实施例5.原料混合液,按以下步骤制备:

室温下,将10 mL、浓度为0.75 M的三氯化铁溶液与3 mL、浓度为0.35 M的尿素水溶液混合,强力搅拌20 min后,常温放置备用。

[0019] 实施例6.原料混合液,按以下步骤制备:

室温下,将15 mL、浓度为1 M的三氯化铁溶液与5 mL、浓度为0.6 M的尿素水溶液混合,强力搅拌30 min后,常温放置备用。

[0020] 实施例7. AuNCs-Ab₂溶液,按以下步骤制备:

室温下,将5 mL、浓度为5 mmol/L 的氯金酸溶液与5 mL、浓度为50 mg/mL 的牛血清蛋白溶液充分混合,剧烈搅拌2 min后,加入0.5 mL、浓度为1 mol/L的氢氧化钠溶液,然后将该混合液置于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中12 h,直至溶液颜色由淡黄色变为棕黄色,此时,氯金酸根离子已被BSA成功还原,随后,将上述溶液倒入透析袋,透析48 h,得到中性的AuNCs;

在上述溶液中,加入1 μL 、浓度为 1 mg/mL的EDC/NHS混合液,震荡5min,倒入100 μL 、浓度为10 mg/mL的Ab₂溶液,在4 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡孵化12 h,离心后分散到1 mL pH 7.4的PBS缓冲溶液中得到AuNCs-Ab₂溶液,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存备用。

[0021] 实施例8. AuNCs-Ab₂溶液,按以下步骤制备:

室温下,将5 mL、浓度为7.5 mmol/L 的氯金酸溶液与5 mL、浓度为75 mg/mL 的牛血清蛋白溶液充分混合,剧烈搅拌3.5 min后,加入0.75 mL、浓度为1.5 mol/L的氢氧化钠溶液,然后将该混合液置于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中12 h,直至溶液颜色由淡黄色变为棕黄色,此时,氯金酸根离子已被BSA成功还原,随后,将上述溶液倒入透析袋,透析48 h,得到中性的AuNCs;

在上述溶液中,加入3 μL 、浓度为 5 mg/mL的EDC/NHS混合液,震荡5min,倒入200 μL 、浓度为10 mg/mL的Ab₂溶液,在4 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡孵化12 h,离心后分散到1 mL pH 7.4的PBS缓冲溶液中得到AuNCs-Ab₂溶液,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存备用。

[0022] 实施例9. AuNCs-Ab₂溶液,按以下步骤制备:

室温下,将5 mL、浓度为10 mmol/L 的氯金酸溶液与5 mL、浓度为100 mg/mL 的牛血清蛋白溶液充分混合,剧烈搅拌5 min后,加入1 mL、浓度为2 mol/L的氢氧化钠溶液,然后将该混合液置于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中12 h,直至溶液颜色由淡黄色变为棕黄色,此时,氯金酸根离子已被BSA成功还原,随后,将上述溶液倒入透析袋,透析48 h,得到中性的AuNCs;

在上述溶液中,加入5 μL 、浓度为 10 mg/mL的EDC/NHS混合液,震荡5min,倒入300 μL 、浓度为10 mg/mL的Ab₂溶液,在4 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡孵化12 h,离心后分散到1 mL pH 7.4的PBS缓冲溶液中得到AuNCs-Ab₂溶液,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存备用。

[0023] 实施例10. 检测CRP浓度:

- (1) 超微弱发光检测仪参数设置:光电倍增管高压设置为600 V,放大级数IV;
- (2) 电化学工作站参数设置:循环伏安法扫描电位范围-1.2 ~ 0 V,扫描速率为0.15 V/s;
- (3) 测试:以Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝电极为对电极,以传感器为工作电极,在10 mL含80 mM过硫酸钾的PBS溶液中进行ECL测试,根据孵化不同浓度CRP时产生的ECL信号强度绘制工作曲线。

[0024] 实施例11. 检测CRP浓度:

- (1) 超微弱发光检测仪参数设置:光电倍增管高压设置为600 V,放大级数IV;
- (2) 电化学工作站参数设置:循环伏安法扫描电位范围-1.2 ~ 0 V,扫描速率为0.15 V/s;
- (3) 测试:以Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝电极为对电极,以传感器为工作电极,在12.5 mL含90 mM过硫酸钾的PBS溶液中进行ECL测试,根据孵化不同浓度CRP时产生的ECL信号强度绘制工作曲线。

[0025] 实施例12. 检测CRP浓度:

- (1) 超微弱发光检测仪参数设置:光电倍增管高压设置为600 V,放大级数IV;
- (2) 电化学工作站参数设置:循环伏安法扫描电位范围-1.2 ~ 0 V,扫描速率为0.15 V/s;
- (3) 测试:以Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝电极为对电极,以传感器为工作电极,在15 mL含100 mM过硫酸钾的PBS溶液中进行ECL测试,根据孵化不同浓度CRP时产生的ECL信号强度绘制工作曲线。

专利名称(译)	一种基于氧化铁阵列共反应促进金纳米簇电致发光响应的免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN110554027A	公开(公告)日	2019-12-10
申请号	CN201910884354.X	申请日	2019-09-19
[标]申请(专利权)人(译)	济南大学		
申请(专利权)人(译)	济南大学		
当前申请(专利权)人(译)	济南大学		
[标]发明人	魏琴 贾越 杨磊 赵磊 张诺 马洪敏		
发明人	魏琴 贾越 杨磊 赵磊 张诺 马洪敏		
IPC分类号	G01N21/76 G01N27/327 G01N33/531		
CPC分类号	G01N21/76 G01N27/3275 G01N27/3278 G01N33/531		
代理人(译)	赵凤		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于氧化铁Fe₂O₃阵列共反应促进金纳米簇电致发光响应的免疫传感器的制备方法及应用，属于电化学与免疫分析领域；本发明基于电致发光ECL技术，以C-反应蛋白CRP为目标分析物，以金纳米团簇AuNCs为ECL发射体，在共反应促进剂氧化铁纳米阵列Fe₂O₃的催化下，由于电子沿有序阵列结构输运的改善，所有暴露的活性位点都能有效地增强AuNCs的ECL发射，因此，本发明以Fe₂O₃/AuNCs作为传感平台，构建了一种夹心型ECL免疫传感器，该传感器对目标物CRP表现出了高的灵敏度，宽的检测范围以及低的检出限，能够实现人体血清中CRP的快速灵敏测定，对临床上患者感染类型的判断有着较大的应用价值。