



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101706498 B

(45) 授权公告日 2013.01.02

(21) 申请号 200910212772.0

(22) 申请日 2009.11.09

(73) 专利权人 东南大学

地址 210096 江苏省南京市四牌楼2号

(72) 发明人 周镇先 钱静 刘松琴

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 李纪昌

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

(56) 对比文件

钱静等. 基于 SiO₂@Ru 标记的甲胎蛋白电致化学发光传感器. 《分析化学》. 2009, 第 37 卷

Qian Lei 等. One-Step Synthesis of Ru(2,2'-Bipyridine)₃Cl₂-Immobilized Silica Nanoparticles for Use in Electrogenerated Chemiluminescence Detection. 《ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS》. 2007, 第 17 卷 (第 8 期), 第 1353-1358 页.

Chiu Mei-Hsin 等. Disposable

Screen-Printed Carbon Electrodes for Dual Electrochemiluminescence/Amperometric Detection: Sequential Injection Analysis of Oxalate. 《Electroanalysis》. 2007, 第 19 卷 (第 22 期), 第 2301-2306 页.

蒋荣等. 3-氨基丙基三乙氧基硅烷改性凹凸棒土固定化菠萝蛋白酶工艺研究. 《安徽农业科学》. 2008, 第 36 卷 (第 25 期), 第 10739-10741 页.

Guo Zhihui 等. Electrochemistry and Electrogenerated Chemiluminescence of SiO₂ Nanoparticles/Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)

Multilayer Films on Indium Tin Oxide Electrodes. 《Analytical Chemistry》. 2003, 第 76 卷 (第 1 期), 第 184-191 页.

于萍等. 几种醇类的固态电致化学发光-高效液相色谱检测. 《中国科学 B 辑:化学》. 2009, 第 39 卷 (第 8 期), 第 825-831 页.

审查员 张锦广

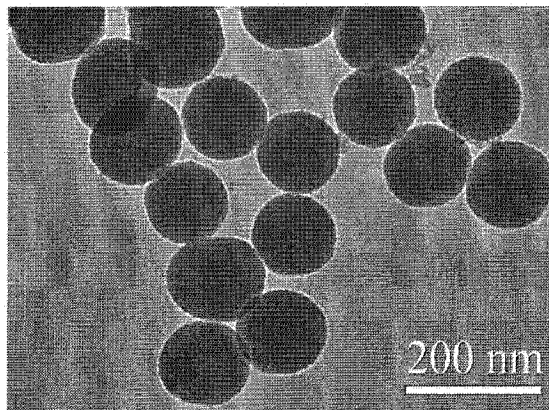
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种电致化学发光免疫传感器的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种纳米免疫标记物的制备技术, 涉及了具有信号放大功能的由 SiO₂ 包裹发光物质 (Ru(bpy)₃²⁺) 和第二抗体 (Ab₂) 共修饰的用于低浓度抗原检测的电致化学发光免疫传感器的制备方法. SiO₂ 核壳式的纳米结构, 不仅可以很好的保持内容物的化学性质, 还可以有效的阻止内容物的泄露. 而且由于一个 SiO₂ 小球中可以包裹多个标记物分子, 从而使检测的灵敏度得到较大的提高. 所合成的 SiO₂@Ru 粒径均一且具有良好的单分散性, 从而使得每个 SiO₂@Ru 纳米小球固定相同量的甲胎蛋白抗体, 提高了检测的重复性. 在 0.01-20ng mL⁻¹ 范围, ECL 信号值与 AFP 浓度呈现良好的线性关系, 检测下限达到 35pg mL⁻¹.



1. 一种电致化学发光免疫传感器的制备方法,其特征在于包括如下制备步骤:

(1) $\text{SiO}_2\text{@Ru}$ 微球的制备:将 7.5mL 环己烷,1.8mL 正己醇和 1.77mLTween-80 混合均匀,然后加入 $340\ \mu\text{L}$ 5mg/mL $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的水溶液,室温下均匀搅拌反应 30min,形成稳定的油包水体系,再向该体系中加入 $100\ \mu\text{L}$ TEOS 和 $60\ \mu\text{L}$ $\text{LNH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 来引发聚合反应,室温下继续搅拌反应 20h,反应完成后,向体系中加入 5mL 丙酮使纳米颗粒从油包水的体系中分离沉淀出来,然后以 8000r/min 离心 10min,在离心管底部可以看到有橙黄色的沉淀形成,弃去上清液,用无水乙醇和水分别洗涤沉淀数次,充分除去表面活性剂 TEOS 和纳米颗粒表面吸附的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$,得 $\text{SiO}_2\text{@Ru}$ 微球;

(2) 纳米免疫标记物的制备:AFP 抗体修饰 $\text{SiO}_2\text{@Ru}$ 微球:2mL $\text{SiO}_2\text{@Ru}$ 用乙醇稀释至 6mL,加入 $400\ \mu\text{L}$ APTS 搅拌反应 30min,离心,用水和乙醇洗涤数次以除去多余的 APTS,得到 APTS 修饰的 $\text{SiO}_2\text{@Ru}$;将 APTS 修饰的 $\text{SiO}_2\text{@Ru}$ 纳米粒子与 5mL 5wt% 的戊二醛溶液在 37°C 水浴中搅拌反应 2h,离心并分散于 3mL 双蒸水中,并加入 2mL anti-AFP 的抗体,再次在 37°C 水浴中搅拌反应 2h,离心得到 Ab2- $\text{SiO}_2\text{@Ru}$;最后,将 Ab2- $\text{SiO}_2\text{@Ru}$ 分散于 5mL 1wt% BSA 溶液并搅拌 30min,封闭多余氨基,离心,并将 Ab2- $\text{SiO}_2\text{@Ru}$ 分散至 2mL 0.02M pH 7.0PBS, 4°C 保存备用,由此可得到电致化学发光免疫传感器。

一种电致化学发光免疫传感器的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种纳米免疫标记物的制备技术,涉及了具有信号放大功能的由 SiO_2 包裹发光物质 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) 和第二抗体 (Ab2) 共修饰的用于低浓度抗原检测的电致化学发光免疫传感器的制备方法。

背景技术

[0002] 原发性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 近年的发病率呈逐渐上升趋势。HCC 预后差,5 年生存率小于 5%,全球每年约有 5918 万人死于 HCC。从 20 世纪 90 年代起,因 HCC 死亡人数在世界恶性肿瘤死亡人数中位列第三,我国 HCC 是位列第二的癌症“杀手”,每年死亡人数占世界 HCC 死亡人数的一半以上。肝癌预后差的原因之一是多数患者未能早期发现和早期诊断,不同阶段的 HCC 治疗效果和预后有明显差异。因此,早期发现、早期诊断和早期治疗是提高 HCC 患者生存和预后的重要因素。

[0003] 在癌症患者的治疗过程中,血清中肿瘤相关的抗原可用于非侵入性试验来检测癌症的复发情况,在病人接受治疗后,其检测含量对患者的监测起着重要的作用。甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP) 是目前临床唯一广泛使用的 HCC 诊断血清标记物,AFP 用于肝癌高危人群的普查和筛查,使部分患者的术后生存期和预后有了显著的提高。 α -甲胎蛋白 (AFP) 是一种分子量约为 70kDa 的癌蛋白。通常在胎儿和新生儿的生长过程中由肝脏、卵黄囊和消化道排泄。AFP 在健康的成人體內,其值低于 25ng/mL。血清中 AFP 水平的增加被视为一些癌变的早期迹象,其中包括肝癌,卵黄囊肿瘤,由肝组织转移的胃癌,睾丸癌和鼻咽癌。目前,通过酶联免疫吸附检测 (ELISA),表面等离子体共振,荧光免疫,化学发光,原子吸收光谱等检测手段在 AFP 抗原的检测中已有了一定的发展。

[0004] 电致化学发光 (Electrochemiluminescence, 简称 ECL) 检测方法因其灵敏度高、选择性好已在分析科学领域受到人们广泛的关注。电化学发光是在电极上施加一定的电压,利用电化学反应来直接或间接地引发的化学发光现象,它实际上是化学发光的一个分支。电化学发光的发现可以追溯到上世纪初,但在分析化学领域的应用和研究始于 20 世纪 70 年代,特别是 20 世纪 80 年代以后,电化学发光得到了蓬勃发展。目前相关研究已引起人们极大的兴趣联吡啶钌 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) 由于具有水溶性好,化学性能稳定,氧化还原可逆,发光效率高,应用的 pH 范围宽,可电化学再生和激发态寿命长等特点而广泛应用于 ECL 的研究。

[0005] 在电化学发光的研究中,通过化学修饰的方法将直接或间接参与化学发光反应的试剂固定在电极上而构建的一类实验装置泛称为电化学发光传感器。在某些情况下,高度集成化和微型化的电化学发光装置有时也称为传感器。由于电化学发光传感器在一定程度上减少了贵重试剂的使用,并使实验装置简单化或微型化,近几年来日益受到重视。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的固定化方法大致可以分为 Nafion 膜法, LB 膜法,分子自组装膜法和溶胶-凝胶法。现有的固定联吡啶钌的方法普遍存在稳定性差,使用寿命短,修饰物易泄漏等问题。研究和开发新的固定化材料必将是今后发展的重点。

发明内容

[0006] 技术问题:本发明的目的是针对以上技术问题,提供一种制备工艺简单,降低检测成本的固态 ECL 免疫传感器,通过对制得的 SiO_2 包裹的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 纳米小球 ($\text{SiO}_2@\text{Ru}$) 表面功能化,得到由 AFP 抗体修饰的可用于低浓度生物分子检测并具有信号放大作用的复合纳米粒子标记物;用电致化学发光方法检测血清中的抗原。

[0007] 技术方案:一种电致化学发光免疫传感器的制备方法,制备步骤为: $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 微球的制备:将 7.5mL 环己烷,1.8mL 正己醇和 1.77mL Tween-80 混合均匀,然后加入 340 μL 5mg/mL $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的水溶液,室温下均匀搅拌反应 30min,形成稳定的油包水体系,再向该体系中加入 100 μL TEOS 和 60 μL $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 来引发聚合反应,室温下继续搅拌反应 20h,反应完成后,向体系中加入 5mL 丙酮使纳米颗粒从油包水的体系中分离沉淀出来,然后以 8000r/min 离心 10min,在离心管底部可以看到有橙黄色的沉淀形成,弃去上清液,用无水乙醇和水分别洗涤沉淀数次,充分除去表面活性剂 TEOS 和纳米颗粒表面吸附的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$,得 $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 微球;纳米免疫标记物的制备:AFP 抗体修饰 $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 微球:2mL $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 用乙醇稀释至 6mL,加入 400 μL APTS 搅拌反应 30min,离心,用水和乙醇洗涤数次以除去多余的 APTS,得到 APTS 修饰的 $\text{SiO}_2@\text{Ru}$;将 APTS 修饰的 $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 纳米粒子与 5mL 5wt% 的戊二醛溶液在 37 $^\circ\text{C}$ 水浴中搅拌反应 2h,离心并分散于 3mL 双蒸水中,并加入 2mL anti-AFP (Ab2),再次在 37 $^\circ\text{C}$ 水浴中搅拌反应 2h,离心得到 Ab2- $\text{SiO}_2@\text{Ru}$;最后,将 Ab2- $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 分散于 5mL 1wt% BSA 溶液并搅拌 30min,封闭多余氨基,离心,并将 Ab2- $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 分散至 2mL 0.02M pH 7.0PBS,4 $^\circ\text{C}$ 保存备用,由此可得到电致化学发光免疫传感器。

[0008] 反相微乳法合成的 SiO_2 包裹的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 纳米小球 ($\text{SiO}_2@\text{Ru}$),可以作为模型蛋白质甲胎蛋白抗体 (anti-AFP) 的标记物,用 ECL 方法实现了对甲胎蛋白 (AFP) 的灵敏测定。 SiO_2 核壳式的纳米结构,不仅可以很好的保持内容物的化学性质,还可以有效的阻止内容物的泄露。而且由于一个 SiO_2 小球中可以包裹多个标记物分子,从而使检测的灵敏度得到较大的提高。

[0009] 纳米二氧化硅粒子的比表面大,而且表面有着丰富的羟基。因此,通过与 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTS) 反应,室温下就可在其表面修饰上氨基基团。端基为 $-\text{NH}_2$ 二氧化硅粒子以戊二醛 (glutaraldehyde) 为交联剂,将二抗 (Ab2) 固定在 $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 微球表面。此种标记物可用作血清抗原夹心免疫检测过程中的电致化学发光信号标记物,利用电致化学发光方法进行免疫检测,由于一个 SiO_2 小球中可以包裹多个标记物分子,极大的提高了检测的灵敏度。

[0010] 有益效果:(1) 本发明用反相微乳法合成的 SiO_2 包裹的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 纳米小球 ($\text{SiO}_2@\text{Ru}$),粒径均一,具有良好的分散性。 SiO_2 核壳式的纳米结构,不仅可以很好的保持内容物的化学性质,还可以有效的阻止内容物的泄露。纳米颗粒的粒径与水和 TEOS 的比例以及水与表面活性剂 Tween-80 的比例有很大关系,以 TEOS : $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ = 10 : 6 (体积比), H_2O : Tween-80 = 10 : 52 (体积比),用反相微乳法制备的 $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 纳米颗粒的尺寸均一,通过 TEM 测定其平均粒径为 $140 \pm 5\text{nm}$ 。

[0011] (2) $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 可以作为模型蛋白质甲胎蛋白抗体 (anti-AFP) 的标记物,用 ECL 方法实现了对甲胎蛋白 (AFP) 的灵敏测定。而且由于一个 SiO_2 小球中可以包裹多个标记物分

子,从而使检测的灵敏度得到较大的提高。

[0012] (3) 以粒径均一的 $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 微球作为修饰抗体和载体,在提高了检测的灵敏度的基础上,使得制得的免疫传感器有很好的重复性和稳定性。

[0013] (4) 纳米免疫标记物的制备技术,将 $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 微球与 APTS 反应,从而在微球表面上嫁接氨基基团,利用微球覆盖的氨基基团与抗体中的氨基在戊二醛的交联反应实现抗体在 $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 微球表面的固定,然后用 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 处理修饰后的 $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 微球,封闭微球表面残留的活性环氧基团和非特异性的结合位置,得到多个 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 分子标记的第二抗体纳米免疫标志物。

[0014] (5) 通过应用此项标记物,并结合夹心免疫法的低浓度生物分子检测可检测抗原最小浓度可达 0.035ng mL^{-1} ,线性范围为 $0.05 \sim 20\text{ng mL}^{-1}$,通过测定一系列不同浓度的抗原可以验证此项检测方法线性相关系数达到 0.9986。

[0015] (6) SiO_2 核壳式的纳米结构,不仅可以很好的保持内容物的化学性质,还可以有效的阻止内容物的泄露。而且由于一个 SiO_2 小球中可以包裹多个标记物分子,从而使检测的灵敏度得到较大的提高。

附图说明

[0016] 图 1 为粒径在 $140 \pm 5\text{nm}$ 的 $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 小球;

[0017] 图 2 为 SiO_2 (a), $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ (b), 游离态 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (c) 的 PL 光谱图;

[0018] 图 3 为纳米免疫标志物的合成示意图;

[0019] 图 4 为夹心免疫过程示意图;

[0020] 图 5 为不同 AFP 浓度所得到的 ECL 信号;(a)0.01, (b)0.1, (c)3, (d)5, (e)10, (f) 20ng mL^{-1} ;

[0021] 图 6 为 AFP 浓度与 ECL 信号的线性关系。

具体实施方式

[0022] 实施例 1:

[0023] 一种电致化学发光免疫传感器的制备方法,制备步骤为:
1. $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 微球的制备:将 7.5mL 环己烷,1.8mL 正己醇和 1.77mL Tween-80 混合均匀,然后加入 $340 \mu\text{L}$ 5mg/mL $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的水溶液,室温下均匀搅拌反应 30min,形成稳定的油包水体系,再向该体系中加入 $100 \mu\text{L}$ TEOS 和 $60 \mu\text{L}$ $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 来引发聚合反应,室温下继续搅拌反应 20h,反应完成后,向体系中加入 5mL 丙酮使纳米颗粒从油包水的体系中分离沉淀出来,然后以 8000r/min 离心 10min,在离心管底部可以看到有橙黄色的沉淀形成,弃去上清液,用无水乙醇和水分别洗涤沉淀数次,充分除去表面活性剂 TEOS 和纳米颗粒表面吸附的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$,得 $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 微球;
2. 纳米免疫标记物的制备:AFP 抗体修饰 $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 微球:2mL $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 用乙醇稀释至 6mL,加入 $400 \mu\text{L}$ APTS 搅拌反应 30min,离心,用水和乙醇洗涤数次以除去多余的 APTS,得到 APTS 修饰的 $\text{SiO}_2@\text{Ru}$;
3. 将 APTS 修饰的 $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 纳米粒子与 5mL 5wt% 的戊二醛溶液在 37°C 水浴中搅拌反应 2h,离心并分散于 3mL 双蒸水中,并加入 2mL anti-AFP (Ab2),再次在 37°C 水浴中搅拌反应 2h,离心得到 Ab2- $\text{SiO}_2@\text{Ru}$;
4. 最后,将 Ab2- $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 分散于 5mL 1wt% BSA 溶液并搅拌 30min,封闭多余氨基,离心,并将 Ab2- $\text{SiO}_2@\text{Ru}$ 分散至 2mL 0.02M pH 7.0 PBS, 4°C 保存

备用,由此可得到电致化学发光免疫传感器。

[0024] 实施例 2:

[0025] Ab1-MUA/MU-Au 修饰电极的制备

[0026] 金丝电极于 2M KOH 中煮沸 2h,洗净。将其放入 30 μ L 2.5mM MUA 和 30 μ L 7.5mM MU ($V_{\text{MUA}}/V_{\text{MU}} = 1 : 3$) 的混合溶液中 10h. 得到 MUA/MU 修饰的金丝电极并浸入 TNTU(o-(5-norbornene-2,3-dicarboximido)-N, N, N', N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate) 活化溶液中活化 15min,淋洗,放入 100 μ L anti-AFP 溶液中 1h. 淋洗后放入 100 μ L BSA(1wt%) 溶液中 30min 以封闭非特异性结合位点,得到 anti-AFP(Ab1) 修饰的金丝电极 (Ab1-MUA/MU-Au)。

[0027] AFP 抗体修饰 SiO₂@Ru 微球

[0028] 2mL SiO₂@Ru 用乙醇稀释至 6mL,加入 400 μ L APTS 搅拌反应 30min,离心,用水和乙醇洗涤数次以除去剩余的 APTS,得到 APTS 修饰的 SiO₂@Ru。将上述纳米粒子与 5mL 戊二醛溶液 (5wt%) 在 37 $^{\circ}$ C 水浴中搅拌反应 2h。离心并分散于 3mL 二次水中,并加入 2mL anti-AFP(Ab2),再次在 37 $^{\circ}$ C 水浴中搅拌反应 2h,离心得到 Ab2 修饰的 SiO₂@Ru (Ab2-SiO₂@Ru)。最后,将 Ab2-SiO₂@Ru 分散于 5mL 1wt% BSA 溶液并搅拌 30min,封闭多余氨基。离心,并将 Ab2-SiO₂@Ru 分散至 2mL 0.02M pH 7.0PBS,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0029] 电致化学发光夹心免疫检测

[0030] Ab1-MUA/MU-Au 置入 100 μ L 含有不同 AFP 浓度的溶液中,在 37 $^{\circ}$ C 水浴中温育 30min。通过第一步免疫反应得到 Ag-Ab1-MUA/MU-Au。再与 100 μ L 1wt% 的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液温浴 30 分钟,淋洗后置入 0.5mL Ab2-SiO₂@Ru 搅拌 30min 以捕获 Ab2-SiO₂@Ru,由于标志物表面含有 AFP 第二抗体,因此,可再次通过抗原抗体的结合,可将该标志物修饰到电极表面。充分淋洗得到 Ab2-SiO₂@Ru-Ag-Ab1-MUA/MU-Au。

[0031] 三电极工作体系:金丝电极为工作电极,铂丝电极为对电极,参比电极为 Ag/AgCl 电极 (饱和 KCl)。检测池要正对光电倍增管 (PMT),缓冲溶液为 2mL 含 3mmol/L C₂O₄²⁻ 的 0.1mol/L PBS(pH7.0)。光电倍增管高压 1000V,静止下在 0.6-1.25V 电位区间内进行循环伏安 (CV) 扫描,同步记录 ECL 信号。

[0032] 实施例 3:

[0033] 电致化学发光检测:

[0034] 1) 测试条件的优化:

[0035] a) C₂O₄²⁻ 作为重要的反应物,其浓度大小对 ECL 的影响很大。在其他条件不变的情况下,ECL 信号值随着 C₂O₄²⁻ 浓度的增大,先是逐渐升高,后达到一个平台。在 C₂O₄²⁻ 浓度较小的时候,ECL 信号大小主要受控于 C₂O₄²⁻ 浓度,因此随着 C₂O₄²⁻ 浓度的增大而成比例增大;当 C₂O₄²⁻ 浓度增大到一定程度时,ECL 信号大小主要受控于优化体系中不变的 SiO₂@Ru 浓度,因而出现平台。最终优化 C₂O₄²⁻ 浓度为 3mmol/L。

[0036] b) 抗原温育时间:随着温育时间的增长,ECL 信号增强,并在温育时间为 30min 后达到平台,最终优化温育时间为 30min。

[0037] 2) 标准曲线绘制:

[0038] a) 用同一金丝电极温育不同浓度 AFP 标准溶液,测定 ECL 信号,绘制标准曲线,确定最优的线性范围;

[0039] b) 用不同金丝电极, 温育不同浓度血 AFP 标准溶液, 测定 ECL 信号, 绘制标准曲线。

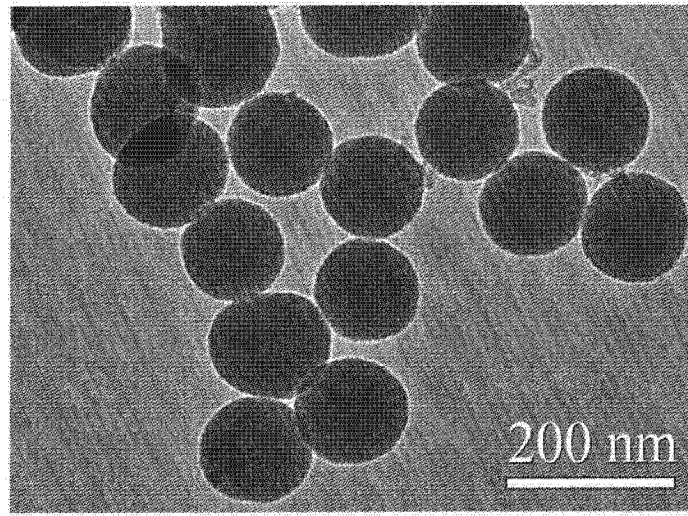


图 1

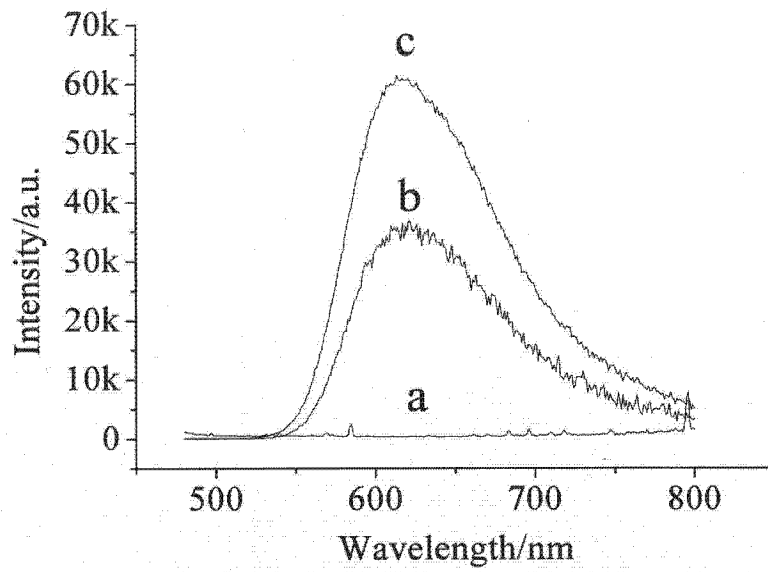


图 2

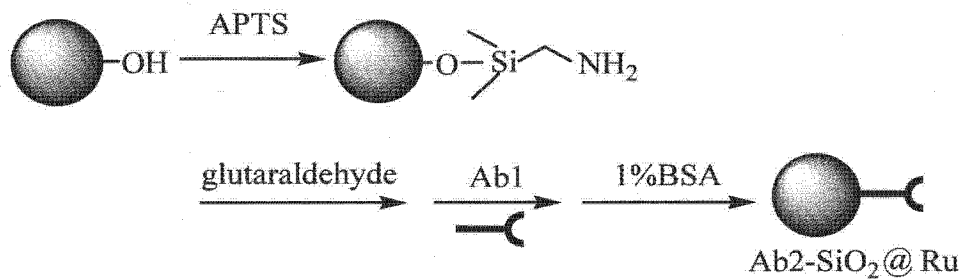


图 3

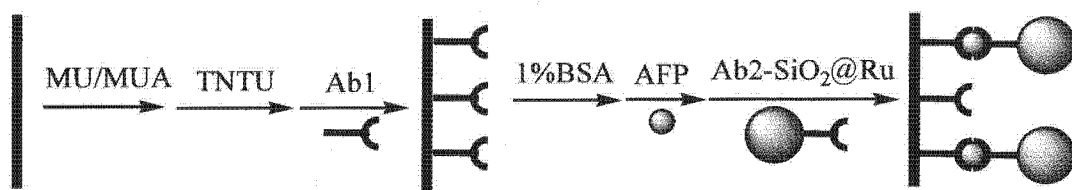


图 4

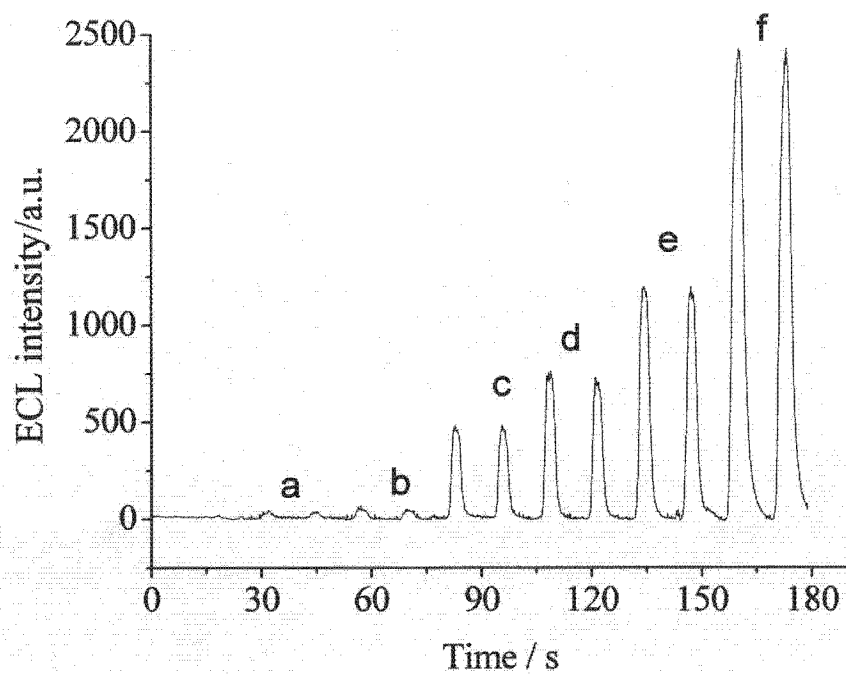


图 5

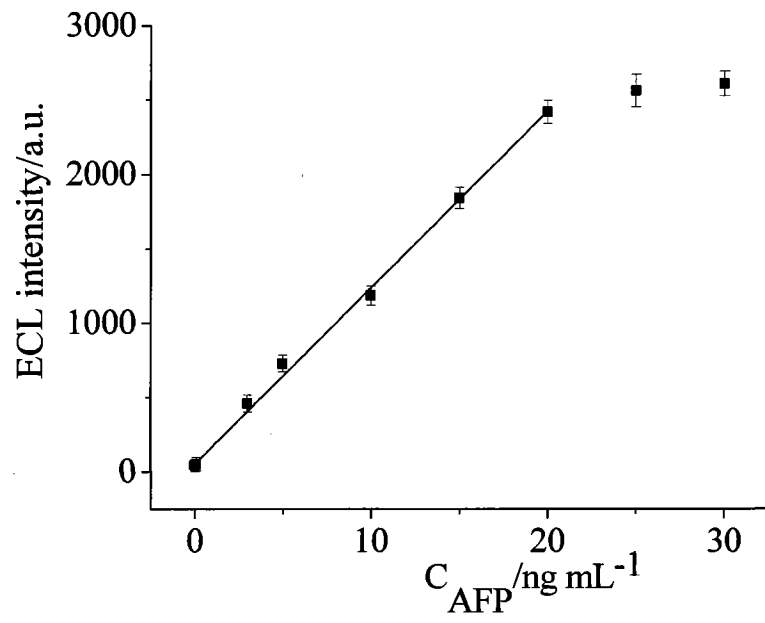


图 6

专利名称(译)	一种电致化学发光免疫传感器的制备方法		
公开(公告)号	CN101706498B	公开(公告)日	2013-01-02
申请号	CN200910212772.0	申请日	2009-11-09
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	东南大学		
[标]发明人	周镇先 钱静 刘松琴		
发明人	周镇先 钱静 刘松琴		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53 G01N21/76		
其他公开文献	CN101706498A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种纳米免疫标记物的制备技术，涉及了具有信号放大功能的由SiO₂包裹发光物质(Ru(bpy)₃²⁺)和第二抗体(Ab₂)共修饰的用于低浓度抗原检测的电致化学发光免疫传感器的制备方法。SiO₂核壳式的纳米结构，不仅可以很好的保持内容物的化学性质，还可以有效的阻止内容物的泄露。而且由于一个SiO₂小球中可以包裹多个标记物分子，从而使检测的灵敏度得到较大的提高。所合成的SiO₂Ru粒径均一且具有良好的单分散性，从而使得每个SiO₂Ru纳米小球固定相同量的甲胎蛋白抗体，提高了检测的重复性。在0.01-20ng mL⁻¹范围，ECL信号值与AFP浓度呈现良好的线性关系，检测下限达到35pg mL⁻¹。

