



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106323952 B

(45)授权公告日 2019.04.02

(21)申请号 201610935907.6

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2016.11.01

审查员 彭倩筠

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106323952 A

(43)申请公布日 2017.01.11

(73)专利权人 济南大学

地址 250022 山东省济南市辛庄西路336号

济南大学科技处

(72)发明人 花小霞 周长利 王月娇

(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 李茜

(51)Int.Cl.

G01N 21/76(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

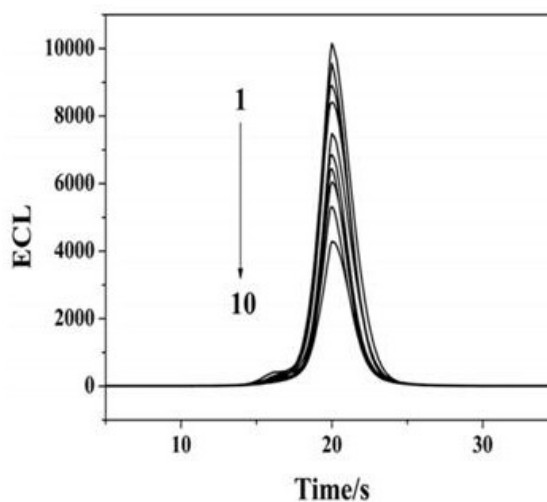
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种基于双共反应剂放大信号的电致发光免疫传感器的制备方法及应用

(57)摘要

本发明涉及电致化学发光免疫传感器技术领域,特别是涉及一种以硫化镉和二硫化钼纳米复合物(CdS/MoS₂)为发光材料和基底材料,以过硫酸钾和过氧化氢为双共反应剂增强发光强度的免疫传感器的制备方法及应用。将CdS和MoS₂两种带隙相近的半导体纳米材料复合,可以提高导电效率和电子-空穴分离效率;K₂S₂O₈和H₂O₂作为双共反应剂可以发挥协同效应,提高传感器的发光强度、增强稳定性。基于抗原抗体之间的特异性结合,该传感器用于检测原降钙素(PCT),根据不同浓度的PCT对电子传递阻碍程度不同,从而使得传感器电致化学发光强度不同,实现PCT的检测。



1. 一种基于双共反应剂放大信号的电致化学发光免疫传感器的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 用 $1.0\mu\text{m}$ 、 $0.3\mu\text{m}$ 、 $0.05\mu\text{m}$ 的 Al_2O_3 抛光粉依次打磨直径为 4mm 的玻璃碳电极GCE, 分别在乙醇和超纯水中超声清洗 5min , 氮气吹干, 取 $6\sim 10\mu\text{L}$ CdS/MoS_2 纳米复合材料分散液滴涂到电极表面, 室温下晾干成膜, 用PBS pH 7.4缓冲溶液冲洗以除去未键合的 CdS/MoS_2 得到 $\text{CdS}/\text{MoS}_2/\text{GCE}$;

(2) 取 $10\mu\text{L}$ $8\sim 10\mu\text{g}/\text{mL}$ 的原降钙素抗体anti-PCT标准溶液滴涂到电极表面, 4°C 下孵化过夜, 用PBS pH 7.4缓冲溶液冲洗得anti-PCT/ $\text{CdS}/\text{MoS}_2/\text{GCE}$;

(3) 取 $10\mu\text{L}$ 质量分数为 $1\sim 3\%$ 的牛血清白蛋白BSA溶液滴涂到电极表面, 在 37°C 下孵化 1h , 封闭非特异性结合的位点, 用PBS pH 7.4缓冲溶液冲洗电极表面得到BSA/anti-PCT/ $\text{CdS}/\text{MoS}_2/\text{GCE}$;

(4) 滴加 $10\mu\text{L}$ 浓度为 $0.0001\sim 10\text{ng}/\text{mL}$ 的一系列不同浓度的原降钙素标准溶液用于与抗体特异性识别, 在 37°C 下孵育 60min , 用PBS pH 7.4缓冲溶液冲洗电极表面, 制得一种基于 CdS/MoS_2 的电致化学发光免疫传感器PCT/BSA/anti-PCT/ $\text{CdS}/\text{MoS}_2/\text{GCE}$;

所述的 CdS/MoS_2 纳米复合材料分散液, 其特征在于, 制作步骤如下:

称取一定量摩尔比例为 $1:1$ 的 CdCl_2 和 NaMoO_4 加入到 100mL 水中, 超声至完全溶解, 加入 2.66g 硫脲和 1.0g PVP, 搅拌得乳白色分散液, 将分散液转移到 100mL 高压釜中, 180°C 反应 48h , 自然冷却, 用 $1:1$ 的水和乙醇洗涤三次, 干燥过夜, 得 CdS/MoS_2 粉末; 称取 10mg CdS/MoS_2 粉末超声分散到 10mL 超纯水中, 即得 CdS/MoS_2 纳米复合材料分散液。

2. 权利要求1所述方法制备的电致化学发光免疫传感器在检测原降钙素中的应用。

3. 根据权利要求2所述的应用, 其特征在于, 用于PCT检测的检测步骤如下:

(1) PCT/BSA/anti-PCT/ $\text{CdS}/\text{MoS}_2/\text{GCE}$ 为工作电极, Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂电极为对电极; 使用MPI-B型多参数化学发光分析测试系统进行测试, 将光电倍增管的高压设置为 800V , 扫描区间为 $-1.8\sim 0\text{V}$, 扫描速度为 $100\text{mV}/\text{s}$;

(2) 在 10mL 含有 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 过硫酸钾和 $8\sim 12\text{mmol}/\text{L}$ 过氧化氢的PBS pH 7.4缓冲溶液的电解池中, 通过MPI-B型多参数化学发光分析测试系统检测 $0.0001\sim 10\text{ng}/\text{mL}$ 一系列不同浓度PCT标准溶液的电极的电致化学发光强度, 绘制工作曲线;

(3) 将待测样品溶液代替PCT标准溶液进行检测。

一种基于双共反应剂放大信号的电致发光免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及电致化学发光免疫传感器技术领域,特别是涉及一种以硫化镉和二硫化钼纳米复合物(CdS/MoS₂)为发光材料和基底材料,以过硫酸钾和过氧化氢为双共反应剂的免疫传感器的制备方法及应用。将CdS和MoS₂两种带隙相近的半导体纳米材料复合可以有效提高传感器的发光强度、并且增强稳定性。过硫酸钾和过氧化氢同时做共反应剂,可以发挥协同作用,提高传感器的发光强度。基于抗原抗体之间的特异性结合,该传感器用于检测原降钙素(PCT),根据不同浓度的PCT对电子传递阻碍程度不同,继而使得传感器电致化学发光强度不同,实现PCT的检测。

背景技术

[0002] PCT属于一种降钙素前肽物质,无激素活性,在血清中的水平升高是由于严重的细菌、真菌、寄生虫的感染破坏以及脓毒症和多脏器功能衰竭而致,PCT在自身免疫、过敏和病毒感染时,含量不会升高。因此PCT可以对细菌、真菌引起的系统性感染作出诊断,PCT将会被视为全身性细菌感染和脓毒症辅助以及鉴别诊断的常规指标。目前对PCT抗原的检测手段主要有放射免疫学分析法、双抗夹心免疫化学发光法(ILMA)、胶体金比色法、透射免疫浊度法。这些方法具有较高的灵敏度和选择性,但检测过程需要昂贵的专用仪器,需要复杂的前处理且操作繁琐、样品消耗量较大,不适宜快速检测。电致化学发光免疫传感器具有设备简单,操作方便,灵敏度高,选择性好,检测速度快等优点。本发明基于电致化学发光免疫传感器的优点制备了一种基于双共反应剂放大信号的PCT电致化学发光免疫传感器,将免疫学方法与电致化学发光技术相结合,通过抗原抗体之间的特异性结合实现PCT的灵敏检测。

[0003] 本发明中CdS/MoS₂作为基底材料,一方面由于其比表面积大、成膜能力强,可以固定大量抗体;另一方面由于MoS₂和CdS具有相近的带隙结构,两者复合可以有效增强光电转换效率,提高电致化学发光的强度和稳定性,进而提高灵敏度。而过硫酸钾和过氧化氢做双共反应剂,可以发挥协同作用,进一步提高传感器的灵敏度。本发明中构建的电致化学发光免疫传感器具有制备过程简单,成本低,稳定性好,灵敏度高等优点,为PCT检测提供了一种可行的方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的是以CdS/MoS₂为基底和发光材料,以过硫酸钾和过氧化氢做双共反应剂增强电致发光强度,构建一种简单快速,稳定性好,灵敏度高的电致化学发光免疫传感器,并且将该电致化学发光免疫传感器用于PCT的灵敏检测。

[0005] 本发明的技术方案为:

[0006] 1.一种基于双共反应剂放大信号的电致化学发光免疫传感器的制备方法:

[0007] (1)用1.0 μ m、0.3 μ m、0.05 μ m的Al₂O₃抛光粉依次打磨直径为4mm的玻璃碳电极(GCE),分别在乙醇和超纯水中超声清洗5min,氮气吹干,取6~10 μ L CdS/MoS₂纳米复合材料分散

液滴涂到电极表面,室温下晾干成膜,用PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗以除去未键合的CdS/MoS₂得到CdS/MoS₂/GCE;

[0008] (2) 取10 μ L 8~10 μ g/mL的原降钙素抗体 (anti-PCT) 标准溶液滴涂到电极表面,4 $^{\circ}$ C下孵化过夜,用PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗得anti-PCT/CdS/MoS₂/GCE;

[0009] (3) 取10 μ L质量分数为1~3%的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液滴涂到电极表面,在37 $^{\circ}$ C下孵化1h,封闭非特异性结合的位点,用PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗电极表面得到BSA/anti-PCT/CdS/MoS₂/GCE;

[0010] (4) 滴加10 μ L浓度为0.0001~10ng/mL的一系列不同浓度的原降钙素标准溶液用于与抗体特异性识别,在37 $^{\circ}$ C下孵育60min,用PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗电极表面,制得一种基于CdS/MoS₂的电致化学发光免疫传感器 (PCT/BSA/anti-PCT/CdS/MoS₂/GCE)。

[0011] 上述的CdS/MoS₂分散液的制备:

[0012] 称取一定量摩尔比例为1:1的CdCl₂和NaMoO₄加入到100mL水中,超声至完全溶解,加入2.66g硫脲和1.0g PVP,搅拌得乳白色分散液,将分散液转移到100mL高压釜中,180 $^{\circ}$ C反应48h,自然冷却。用水和乙醇 (1:1) 洗涤三次,干燥过夜,得CdS/MoS₂粉末。称取10mg CdS/MoS₂粉末超声分散到10mL超纯水中,即得CdS/MoS₂粉末分散液。

[0013] 的检测:

[0014] (1) PCT/BSA/anti-PCT/CdS/MoS₂/GCE为工作电极,Ag/AgCl电极为参比电极,铂电极为对电极;使用MPI-B型多参数化学发光分析测试系统进行测试,将光电倍增管的高压设置为800V,扫描区间为-1.8~0V,扫描速度为100mV/s;

[0015] (2) 在10mL含有0.1mol/L过硫酸钾和8~12mmol/L过氧化氢的PBS (pH 7.4) 缓冲溶液的电解池中,通过MPI-B型多参数化学发光分析测试系统检测0.0001~10ng/mL一系列不同浓度PCT标准溶液的电极的电致化学发光强度,绘制工作曲线;

[0016] (3) 将待测样品溶液代替PCT标准溶液进行检测。

[0017] 本发明的有益效果为:

[0018] (1) 本发明以CdS/MoS₂二维半导体纳米材料做基底,比表面积大、成膜能力强,可固定大量抗体;

[0019] (2) 本发明把CdS/MoS₂发光材料滴涂到电极表面,通过蛋白质阻碍电子传递从而改变发光强度的机理检测PCT,无酶、无标记,极大的简化了电极制备过程;

[0020] (3) 本发明用CdS和MoS₂两种带隙相近的半导体材料复合,提高了光电转换效率和稳定性,有效的增强了电致化学发光强度;

[0021] (4) 本发明以过硫酸钾和过氧化氢做双共反应剂,可发挥协同作用,有效的增强了电致化学发光强度;

[0022] (5) 本发明制备的电致化学发光免疫传感器用于PCT的检测,操作简单,线性范围宽,检出限低,可以实现对PCT的简单、快速、高灵敏检测。线性范围为0.0001~10ng/mL,检出限为0.05pg/mL。

附图说明:

[0023] 图1为不同浓度PCT的电致化学发光强度图;

[0024] 图2为不同浓度PCT的相对电致化学发光强度与lgc的线性拟合图。

[0025] 其中,图1中由1到10的电致化学发光强度图分别代表PCT的浓度为0,0.0001,0.001,0.005,0.01,0.05,0.1,0.5,1,10ng/mL。

具体实施方式:

[0026] 为了更好地理解本发明,下面用具体实例来详细说明本发明的技术方案,但是本发明并不局限于此。

[0027] 实施例1一种基于双共反应剂放大信号的电致化学发光免疫传感器的制备方法:

[0028] (1) 用1.0 μm 、0.3 μm 、0.05 μm 的 Al_2O_3 抛光粉依次打磨直径为4mm的玻碳电极(GCE),分别在乙醇和超纯水中超声清洗5min,氮气吹干,取6 μL CdS/MoS₂纳米复合材料分散液滴涂到电极表面,室温下晾干成膜,用PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗以除去未键合的CdS/MoS₂得到CdS/MoS₂/GCE;

[0029] (2) 取10 μL 10 $\mu\text{g/mL}$ 的原降钙素抗体(anti-PCT)标准溶液滴涂到电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化过夜,用PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗得anti-PCT/CdS/MoS₂/GCE;

[0030] (3) 取10 μL 质量分数为1%的牛血清白蛋白(BSA)溶液滴涂到电极表面,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化1h,封闭非特异性结合的位点,用PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗电极表面得到BSA/anti-PCT/CdS/MoS₂/GCE;

[0031] (4) 滴加10 μL 浓度为0.0001~10ng/mL的一系列不同浓度的原降钙素标准溶液用于与抗体特异性识别,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育60min,用PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗电极表面,制得一种基于CdS/MoS₂的电致化学发光免疫传感器(PCT/BSA/anti-PCT/CdS/MoS₂/GCE)。

[0032] 实施例2一种基于双共反应剂增强半导体纳米复合材料光强的电致化学发光免疫传感器的制备方法:

[0033] (1) 用1.0 μm 、0.3 μm 、0.05 μm 的 Al_2O_3 抛光粉依次打磨直径为4mm的玻碳电极(GCE),分别在乙醇和超纯水中超声清洗5min,氮气吹干,取8 μL CdS/MoS₂纳米复合材料分散液滴涂到电极表面,室温下晾干成膜,用PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗以除去未键合的CdS/MoS₂得到CdS/MoS₂/GCE;

[0034] (2) 取10 μL 10 $\mu\text{g/mL}$ 的原降钙素抗体(anti-PCT)标准溶液滴涂到电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化过夜,用PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗得anti-PCT/CdS/MoS₂/GCE;

[0035] (3) 取10 μL 质量分数为2%的牛血清白蛋白(BSA)溶液滴涂到电极表面,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化1h,封闭非特异性结合的位点,用PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗电极表面得到BSA/anti-PCT/CdS/MoS₂/GCE;

[0036] (4) 滴加10 μL 浓度为0.0001~10ng/mL的一系列不同浓度的原降钙素标准溶液用于与抗体特异性识别,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育60min,用PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗电极表面,制得一种基于CdS/MoS₂的电致化学发光免疫传感器(PCT/BSA/anti-PCT/CdS/MoS₂/GCE)。

[0037] 实施例3一种基于双共反应剂增强半导体纳米复合材料光强的电致化学发光免疫传感器的制备方法:

[0038] (1) 用1.0 μm 、0.3 μm 、0.05 μm 的 Al_2O_3 抛光粉依次打磨直径为4mm的玻碳电极(GCE),分别在乙醇和超纯水中超声清洗5min,氮气吹干,取10 μL CdS/MoS₂纳米复合材料分散液滴涂到电极表面,室温下晾干成膜,用PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗以除去未键合的CdS/MoS₂得到CdS/MoS₂/GCE;

[0039] (2) 取10 μ L 10 μ g/mL的原降钙素抗体 (anti-PCT) 标准溶液滴涂到电极表面,4 $^{\circ}$ C下孵化过夜,用PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗得anti-PCT/CdS/MoS₂/GCE;

[0040] (3) 取10 μ L质量分数为3%的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液滴涂到电极表面,在37 $^{\circ}$ C下孵化1h,封闭非特异性结合的位点,用PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗电极表面得到BSA/anti-PCT/CdS/MoS₂/GCE;

[0041] (4) 滴加10 μ L浓度为0.0001~10ng/mL的一系列不同浓度的原降钙素标准溶液用于与抗体特异性识别,在37 $^{\circ}$ C下孵育60min,用PBS (pH 7.4) 缓冲溶液冲洗电极表面,制得一种基于CdS/MoS₂的电致化学发光免疫传感器 (PCT/BSA/anti-PCT/CdS/MoS₂/GCE)。

[0042] 实施例4上述的CdS/MoS₂分散液的制备称取一定量摩尔比例为1:1的CdCl₂和NaMoO₄加入到100mL水中,超声至完全溶解,加入2.66g硫脲和1.0g PVP,搅拌得乳白色分散液,将分散液转移到100mL高压釜中,180 $^{\circ}$ C反应48h,自然冷却。用水和乙醇(1:1)洗涤三次,干燥过夜,得CdS/MoS₂粉末。称取10mg CdS/MoS₂粉末超声分散到10mL超纯水中,即得CdS/MoS₂粉末分散液。

[0043] 实施例5PCT的检测

[0044] (1) PCT/BSA/anti-PCT/CdS/MoS₂/GCE为工作电极,Ag/AgCl电极为参比电极,铂电极为对电极;使用MPI-B型多参数化学发光分析测试系统进行测试,将光电倍增管的高压设置为800V,扫描区间为-1.8~0V,扫描速度为100mV/s;

[0045] (2) 在10mL含有0.1mol/L过硫酸钾和8mmol/L过氧化氢的PBS (pH 7.4) 缓冲溶液的电解池中,通过MPI-B型多参数化学发光分析测试系统检测0.0001~10ng/mL一系列不同浓度PCT标准溶液及未特异性结合PCT的电极的电致化学发光强度,所得结果见图1,根据所得的峰值(不同浓度PCT标准溶液的电极的峰值为I,未特异性结合PCT的电极的峰值为I₀)和PCT浓度的关系,绘制工作曲线;

[0046] (3) $\Delta I/I_0$ 与PCT浓度的对数(lgc)的线性关系见图2($\Delta I = I - I_0$),由图2可知,PCT在0.1pg/mL~10ng/mL浓度范围内, $\Delta I/I_0$ 与PCT浓度的对数呈良好的线性相关,线性方程为 $\Delta I/I_0 = 0.1071 \lg c + 0.461$,c是浓度,单位是g/mL,线性相关系数为0.981,检出限为0.05pg/mL;

[0047] (4) 将待测样品溶液代替PCT标准溶液进行检测。

[0048] 实施例6PCT的检测

[0049] (1) PCT/BSA/anti-PCT/CdS/MoS₂/GCE为工作电极,Ag/AgCl电极为参比电极,铂电极为对电极;使用MPI-B型多参数化学发光分析测试系统进行测试,将光电倍增管的高压设置为800V,扫描区间为-1.8~0V,扫描速度为100mV/s;

[0050] (2) 在10mL含有0.1mol/L过硫酸钾和10mmol/L过氧化氢的PBS (pH 7.4) 缓冲溶液的电解池中,通过MPI-B型多参数化学发光分析测试系统检测0.0001~10ng/mL一系列不同浓度PCT标准溶液及未特异性结合PCT的电极的电致化学发光强度,所得结果见图1,根据所得的峰值(不同浓度PCT标准溶液的电极的峰值记为I,未特异性结合PCT的电极的峰值为I₀)和PCT浓度的关系,绘制工作曲线;

[0051] (3) $\Delta I/I_0$ 与PCT浓度的对数(lgc)的线性关系见图2($\Delta I = I - I_0$),由图2可知,PCT在0.1pg/mL~10ng/mL浓度范围内, $\Delta I/I_0$ 与PCT浓度的对数呈良好的线性相关,线性方程为 $\Delta I/I_0 = 0.1071 \lg c + 0.461$,c是浓度,单位是g/mL,线性相关系数为0.981,检出限为

0.05pg/mL;

[0052] (4) 将待测样品溶液代替PCT标准溶液进行检测。

[0053] 实施例7PCT的检测

[0054] (1) PCT/BSA/anti-PCT/CdS/MoS₂/GCE为工作电极,Ag/AgCl电极为参比电极,铂电极为对电极;使用MPI-B型多参数化学发光分析测试系统进行测试,将光电倍增管的高压设置为800V,扫描区间为-1.8~0V,扫描速度为100mV/s;

[0055] (2) 在10mL含有0.1mol/L过硫酸钾和12mmol/L过氧化氢的PBS (pH 7.4) 缓冲溶液的电解池中,通过MPI-B型多参数化学发光分析测试系统检测0.0001~10ng/mL一系列不同浓度PCT标准溶液及未特异性结合PCT的电极的电致化学发光强度,所得结果见图1,根据所得的峰值(不同浓度PCT标准溶液的电极的峰值记为I,未特异性结合PCT的电极的峰值记为I₀)和PCT浓度的关系,绘制工作曲线;

[0056] (3) $\Delta I/I_0$ 与PCT浓度的对数(lgc)的线性关系见图2($\Delta I = I - I_0$),由图2可知,PCT在0.1pg/mL~10ng/mL浓度范围内, $\Delta I/I_0$ 与PCT浓度的对数呈良好的线性相关,线性方程为 $\Delta I/I_0 = 0.1071gc + 0.461$,c是浓度,单位是g/mL,线性相关系数为0.981,检出限为0.05pg/mL;

[0057] (4) 将待测样品溶液代替PCT标准溶液进行检测。

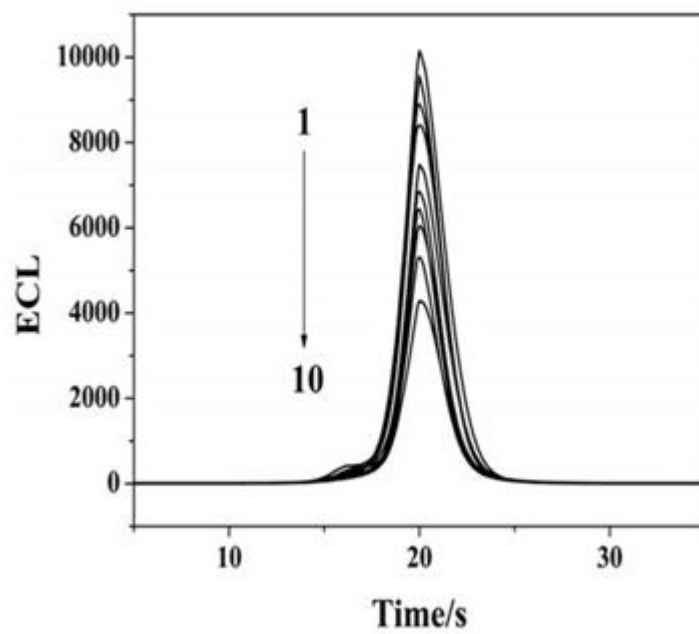


图1

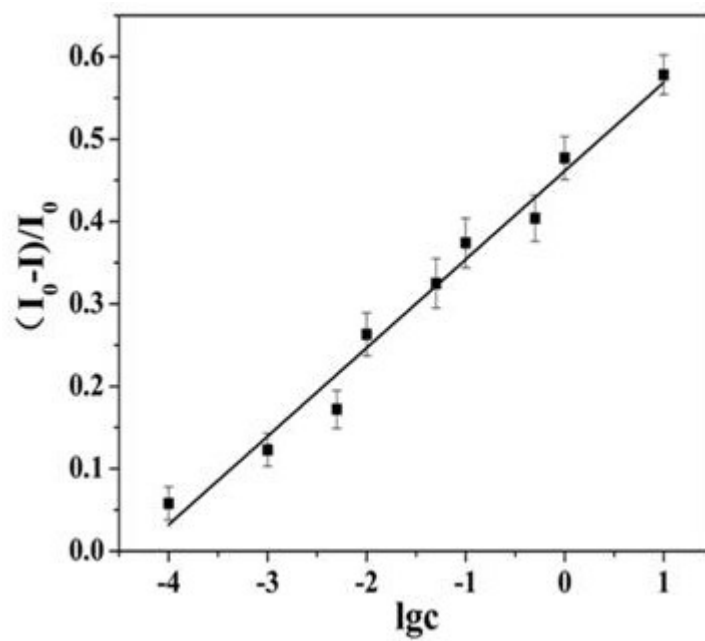


图2

专利名称(译)	一种基于双共反应剂放大信号的电致发光免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN106323952B	公开(公告)日	2019-04-02
申请号	CN201610935907.6	申请日	2016-11-01
[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	花小霞 周长利 王月娇		
发明人	花小霞 周长利 王月娇		
IPC分类号	G01N21/76 G01N27/327 G01N33/53		
CPC分类号	G01N21/76 G01N27/3278 G01N33/53		
代理人(译)	李茜		
其他公开文献	CN106323952A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及电致化学发光免疫传感器技术领域，特别是涉及一种以硫化镉和二硫化钼纳米复合物 (CdS/MoS₂) 为发光材料和基底材料，以过硫酸钾和过氧化氢为双共反应剂增强发光强度的免疫传感器的制备方法及应用。将CdS和MoS₂两种带隙相近的半导体纳米材料复合，可以提高导电效率和电子-空穴分离效率；K₂S₂O₈和H₂O₂作为双共反应剂可以发挥协同效应，提高传感器的发光强度、增强稳定性。基于抗原抗体之间的特异性结合，该传感器用于检测原降钙素 (PCT)，根据不同浓度的PCT对电子传递阻碍程度不同，从而使得传感器电致化学发光强度不同，实现PCT的检测。

