



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109799229 A

(43)申请公布日 2019.05.24

(21)申请号 201811578269.2

(22)申请日 2018.12.24

(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 赵冠辉 曹伟 王耀光 李小建  
东雪 苗俊聪 魏琴

(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 高强

(51)Int.Cl.

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 27/30(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

一种基于[Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs的免  
疫传感器的制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种基于新型纳米多孔材料Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs的竞争型电致化学发光免疫传感器的制备方法及应用,属于电化学发光传感器领域,首次以纳米复合材料Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs为电化学发光信号源,利用氨基功能化的介孔二氧化硅MSN优良的生物兼容性和大的比表面积增加抗体的固载量,根据不同浓度抗原引起的电化学发光信号强度的不同,实现对β-淀粉样蛋白的检测。

1. 一种基于Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs的竞争型电致化学发光免疫传感器的制备方法及应用,其特征在于,步骤如下:

(1) 介孔二氧化硅MSN的制备

将0.5 mL ~ 1.5 mL、1 mol/L的氢氧化钠溶液加入30 mL超纯水80 °C搅拌20 min,加入3 mg ~ 5 mg十六烷基三甲基溴化铵,继续搅拌30 min,降至室温,加入2 mL ~ 3 mL硅酸四乙酯,搅拌4 h,继续加入500 μL ~ 1 mL硅酸四乙酯和乙醇1:10的混合溶液搅拌4 h,离心分离悬浮物,使用盐酸和甲醇1:1混合液洗涤3次,乙醇洗涤2次,35 °C真空干燥,得到白色固体介孔二氧化硅;将30 mg ~ 50 mg介孔二氧化硅分散在50 mL无水乙醇,加入200 μL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷,70 °C ~ 90 °C回流12 h,超纯水洗涤,35 °C真空干燥,得到氨基功能化的介孔二氧化硅MSN;

(2) Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs的制备

将140 mg ~ 160 mg六水合氯化镍和260 mg ~ 280 mg二水合柠檬酸三钠分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min,同样将130 mg ~ 150 mg的铁氰化钾分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min,然后将两种溶液混合继续在室温下搅拌8 h ~ 12 h,离心分离悬浮物,使用超纯水和乙醇分别洗涤2次,35 °C真空干燥,得到土黄色纳米多孔NiFe MOFs;

将30 mg ~ 50 mg纳米多孔NiFe MOFs分散在50 mL超纯水中,加入1 mL ~ 3 mL、1% ~ 3%的氯金酸溶液,室温下搅拌5 min,加入4 mg ~ 6 mg聚乙烯吡咯烷酮抑制金纳米粒子的团聚,然后加入70 mg ~ 90 mg还原剂柠檬酸三钠,0.5 mg ~ 1 mg硼氢化钠室温下搅拌8 h ~ 12 h,溶液慢慢变成紫黑色,离心分离悬浮物,超纯水洗涤至上清液无色,35 °C真空干燥12 h,得到紫黑色固体Au@NiFe MOFs;

将40 mg ~ 60 mg纳米多孔Au@NiFe MOFs分散在30 mL超纯水中,加入6 mg ~ 10 mg三联吡啶氯化钌六水合物,室温下搅拌8 h ~ 12 h,由于Au纳米粒子和NiFe MOFs表面都带有大量负电荷可以和发光体Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>阳离子通过静电吸附结合而形成稳定的Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs复合物,离心分离悬浮物,超纯水洗涤至上清液无色,35 °C真空干燥12 h,得到红棕色固体Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs;

(3) Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs标记β-淀粉样蛋白孵化物溶液的制备

将6 mg ~ 10 mg的Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs分散于1 mL pH = 7.5的PBS中,加入4 μL ~ 6 μL、6 mg/mL的Aβ,4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h ~ 24 h,4 °C离心分离洗去未结合Aβ,然后加入1 mL 0.1%的牛血清白蛋白溶液4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化2 h ~ 4 h封闭Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs表面的非特异性活性位点,4 °C离心分离洗去未结合的牛血清白蛋白,最后分散于pH 7.5的PBS缓冲溶液中,制得0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL的Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs标记β-淀粉样蛋白溶液,储存于4 °C中备用;

(4) 分别用1.0 mm、0.3 mm、0.05 mm的氧化铝抛光粉对直径4 mm的玻碳电极做抛光处理,用超纯水冲洗干净;

(5) 将6 μL 0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL介孔硅MSN纳米材料水溶液滴涂至电极表面,室温下晾干;

(6) 将3 μL、0.5% ~ 1.5%戊二醛溶液滴于电极表面连接介孔硅MSN和抗体,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗电极表面,晾干;

(7) 将6 μL、8 μg/mL ~ 12 μg/mL的β-淀粉样蛋白抗体溶液孵化滴涂到电极表面,用pH

7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 °C晾干;

(8) 将2  $\mu$ L ~ 4  $\mu$ L体积分数为0.5%的牛血清白蛋白溶液滴涂到电极表面,以封闭电极表面上的非特异性活性位点,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 °C晾干;

(9) 将6  $\mu$ L、一定浓度的 $\beta$ -淀粉样蛋白溶液滴加到电极表面,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 °C晾干;

(10) 将6  $\mu$ L、0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL的Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs标记 $\beta$ -淀粉样蛋白溶液滴加到电极表面,4 °C晾干,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,制得一种基于Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs的竞争型电致化学发光免疫传感器。

2. 如权利要求1所述制备方法制得的一种基于Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs的竞争型电致化学发光免疫传感器用于 $\beta$ -淀粉样蛋白的检测,其特征在于,检测步骤如下:

(1) 使用电化学工作站的三电极体系进行测试,Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝电极为对电极,所制备的电致化学发光免疫传感器修饰的玻碳电极为工作电极,将电化学工作站和化学发光检测仪连接在一起将光电倍增管的高压设置为500 V,循环伏安扫描电位范围为0 ~ 1.4 V,扫描速率为0.1 V/s;

(2) 在10 mL、pH 6.0 ~ 8.5的含浓度为1 mmol/L ~ 12 mmol/L三丙胺的PBS缓冲溶液中,通过电化学发光方法,检测对不同浓度的AB溶液产生的电化学发光信号强度,绘制工作曲线;

(3) 将待测样品溶液代替 $\beta$ -淀粉样蛋白溶液进行测定。

# 一种基于 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{Au@NiFe MOFs}$ 的免疫传感器的制备方法

## 技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{Au@NiFe MOFs}$ 的竞争型电致化学发光免疫传感器的制备方法及应用。具体涉及纳米材料 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{Au@NiFe MOFs}$ 和氨基功能化的介孔二氧化硅MSN的制备及其在电致化学发光传感器中的应用。利用MSN优良的生物兼容性、大的比表面积、高的孔隙率作为基底材料增加抗体和发光材料 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{Au@NiFe MOFs}$ 的固载量来达到增强传感器光信号输出的目的。本发明属于电化学发光检测技术领域。

## 背景技术

[0002] 从阿尔茨海默症(AD)患者脑内的细胞质基质中分离出来的 $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )可溶性寡聚物已经被证明可以损害海马突出可塑性、减少突触、诱导tau蛋白过度磷酸化,还会引起神经性营养不良、激活小胶质细胞炎症、损害记忆等症状(在不存在淀粉样斑块的情况下)。AD作为一种进行性不可逆神经系统疾病,严重威胁着人类的健康,大大降低了许多中老年人的生活质量。经过对AD患者大量的科学的研究,A $\beta$ 由于其具有非常强的神经毒性被认为是AD发病机制的关键,因此被选作诊断AD的生物标志物和治疗靶点。然而寻找一种可以简便快捷灵敏的A $\beta$ 检测方法有着重要意义。电化学发光方法消耗低、容易控制、灵敏度高且检测限低,具有电化学和化学发光两种方法的优势,是一种环境友好型方法。因此本发明设计了一种竞争型的电致化学发光免疫分析方法用于早期AD患者脑内细胞质基质A $\beta$ 的检测。

[0003] 在本发明中,首次使用一种新型纳米多孔材料 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{Au@NiFe MOFs}$ 作为电化学发光材料并引入到电化学发光领域。 $\text{Au@NiFe MOFs}$ 表面带有许多负电荷又因其多孔性具有较大的比表面积可以负载更多的 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ 阳离子,进而增强传感器的发光强度来提高其灵敏度。氨基功能化的介孔二氧化硅MSN由于其较大的比表面积被作为传感器基底材料,可以捕获更多的A $\beta$ 抗体增加传感器的灵敏度。本发明的原理是基于单独A $\beta$ 和其抗体的结合能力大大强于 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{Au@NiFe MOFs}$ 标记的A $\beta$ ,随着单独A $\beta$ 溶液浓度的变大,和抗体结合的 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{Au@NiFe MOFs}$ 标记A $\beta$ 就越少,发光强度减弱。此外,本发明设计的竞争型免疫传感器也为其它蛋白质毒素的检测提供了一种新方法。目前基于 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{Au@NiFe MOFs}$ 构建竞争型免疫传感器来检测A $\beta$ 的方法还未见报道。

## 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种更简单可靠的基于 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{Au@NiFe MOFs}$ 的电致化学发光免疫传感器的制备方法和应用,实现对蛋白质毒素A $\beta$ 的快速、灵敏、特异、高效检测。

[0005] 本发明的技术方案如下:

为了实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

1. 介孔二氧化硅MSN、纳米多孔材料 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}/\text{Au@NiFe MOFs}$ 标记A $\beta$ 抗原孵化物溶液的制备

### (1) 介孔二氧化硅MSN的制备

将0.5 mL ~ 1.5 mL、1 mol/L的氢氧化钠溶液加入30 mL超纯水80 °C搅拌20 min, 加入3 mg ~ 5 mg十六烷基三甲基溴化铵, 继续搅拌30 min, 降至室温, 加入2 mL ~ 3 mL硅酸四乙酯, 搅拌4 h, 继续加入500 μL ~ 1 mL硅酸四乙酯和乙醇1:10的混合溶液搅拌4 h, 离心分离悬浮物, 使用盐酸和甲醇1:1混合液洗涤3次, 乙醇洗涤2次, 35 °C真空干燥, 得到白色固体介孔二氧化硅; 将30 mg ~ 50 mg介孔二氧化硅分散在50 mL无水乙醇, 加入200 μL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷, 70 °C ~ 90 °C回流12 h, 超纯水洗涤, 35 °C真空干燥, 得到氨基功能化的介孔二氧化硅MSN;

### (2) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Au@NiFe MOFs}$ 的制备

将140 mg ~ 160 mg六水合氯化镍和260 mg ~ 280 mg二水合柠檬酸三钠分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min, 同样将130 mg ~ 150 mg的铁氰化钾分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min, 然后将两种溶液混合继续在室温下搅拌8 h ~ 12 h, 离心分离悬浮物, 使用超纯水和乙醇分别洗涤2次, 35 °C真空干燥, 得到土黄色纳米多孔NiFe MOFs;

将30 mg ~ 50 mg纳米多孔NiFe MOFs分散在50 mL超纯水中, 加入1 mL ~ 3 mL、1% ~ 3%的氯金酸溶液, 室温下搅拌5 min, 加入4 mg ~ 6 mg聚乙烯吡咯烷酮抑制金纳米粒子的团聚, 然后加入70 mg ~ 90 mg还原剂柠檬酸三钠, 0.5 mg ~ 1 mg硼氢化钠, 室温下搅拌8 h ~ 12 h, 溶液慢慢变成紫黑色, 离心分离悬浮物, 超纯水洗涤至上清液无色, 35 °C真空干燥12 h, 得到紫黑色固体Au@NiFe MOFs;

将40 mg ~ 60 mg纳米多孔Au@NiFe MOFs分散在30 mL超纯水中, 加入6 mg ~ 10 mg三联吡啶氯化钌六水合物, 室温下搅拌8 h ~ 12 h, 由于Au纳米粒子和NiFe MOFs表面都带有大量负电荷可以和发光体 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 阳离子通过静电吸附结合而形成稳定的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Au@NiFe MOFs}$ 复合物, 离心分离悬浮物, 超纯水洗涤至上清液无色, 35 °C真空干燥12 h, 得到红棕色固体 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Au@NiFe MOFs}$ ;

### (3) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Au@NiFe MOFs}$ 标记Aβ孵化物溶液的制备

将6 mg ~ 10 mg的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Au@NiFe MOFs}$ 分散于1 mL pH 7.5的PBS中, 加入4 μL ~ 6 μL、6 mg/mL的Aβ, 4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h ~ 24 h, 4 °C离心分离洗去未结合的Aβ, 然后加入1 mL 0.1%的牛血清白蛋白溶液4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化2 h ~ 4 h封闭 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Au@NiFe MOFs}$ 表面的非特异性活性位点, 4 °C离心分离洗去未结合的牛血清白蛋白, 最后分散于pH 7.5的PBS缓冲溶液中, 制得0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Au@NiFe MOFs}$ 标记Aβ溶液, 储存于4 °C中备用。

[0006] 2. 一种 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Au@NiFe MOFs}$ 的竞争型电致化学发光传感器的制备方法, 包括以下步骤:

(1) 分别用1.0 mm、0.3 mm、0.05 mm的氧化铝抛光粉对直径4 mm的玻碳电极做抛光处理, 用超纯水冲洗干净;

(2) 将6 μL、0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL介孔硅MSN纳米材料水溶液滴涂至电极表面, 室温下晾干;

(3) 将3 μL、0.5% ~ 1.5%戊二醛溶液滴于电极表面连接介孔硅MSN和抗体, 用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗电极表面, 晾干;

(4) 将6 μL、8 μg/mL ~ 12 μg/mL的Aβ抗体溶液孵化滴涂到电极表面, 用pH 7.5的PBS

缓冲溶液冲洗,4 ℃晾干;

(5) 将2  $\mu$ L ~ 4  $\mu$ L体积分数为0.5%的牛血清白蛋白溶液滴涂到电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 ℃晾干;

(6) 将6  $\mu$ L、一定浓度的A $\beta$ 溶液滴加到电极表面,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 ℃晾干;

(7) 将6  $\mu$ L、0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL的Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs标记A $\beta$ 溶液滴加到电极表面,4 ℃晾干,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,制得一种基于Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs的竞争型电致化学发光免疫传感器。

[0007] 3. 电致化学发光传感器用于待测样品的电化学发光检测:

(1) 使用电化学工作站的三电极体系进行测试,Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝电极为对电极,所制备的电致化学发光传感器修饰的玻碳电极为工作电极,将电化学工作站和化学发光检测仪连接在一起将光电信增管的高压设置为500 V,循环伏安扫描电位范围为0 ~ 1.4 V,扫描速率为0.1 V/s;

(2) 在10 mL、pH 6.0 ~ 8.5的含浓度为1 mmol/L ~ 12 mmol/L三丙胺的PBS缓冲溶液中,通过电化学发光系统,检测对不同浓度的A $\beta$ 标准溶液产生的电化学发光信号强度,绘制工作曲线;

(3) 将待测样品溶液代替标准溶液进行测定。

[0008] 本发明的有益成果

(1) 首次以纳米材料Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs为发光材料并将其用于电致化学发光传感器的构建中,利用Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs高且稳定的发光效率来提高传感器光信号的输出,从而获得更高的灵敏度;

(2) 采用氨基功能化的介孔二氧化硅MSN作为基底材料,其具有优良的生物相容性、较大的比表面积等优势,有效增加抗体的固载量,从而进一步提高传感器的灵敏度;

(3) 本发明首次将介孔硅MSN和Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs相结合用于电致化学发光传感器的构建,基于此构建的传感器可应用于蛋白质毒素A $\beta$ 的临床检测,具有操作简单,检测快速,信号线性范围宽(0.1 pg/mL ~ 50 ng/mL)和检出限低(0.013 pg/mL)的优点。

[0009] 实施例1

介孔二氧化硅MSN、纳米多孔材料Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs标记A $\beta$ 抗原孵化物溶液的制备

(1) 介孔二氧化硅MSN的制备

将0.5 mL、1 mol/L的氢氧化钠溶液加入30 mL超纯水80 ℃搅拌20 min,加入3 mg十六烷基三甲基溴化铵,继续搅拌30 min,降至室温,加入2 mL硅酸四乙酯,搅拌4 h,继续加入500  $\mu$ L硅酸四乙酯和乙醇1:10的混合溶液搅拌4 h,离心分离悬浮物,使用盐酸和甲醇1:1混合液洗涤3次,乙醇洗涤2次,35 ℃真空干燥,得到白色固体介孔二氧化硅;将30 mg介孔二氧化硅分散在50 mL无水乙醇,加入200  $\mu$ L 3-氨基三乙氧基硅烷,70 ℃回流12 h,超纯水洗涤,35 ℃真空干燥,得到氨基功能化的介孔二氧化硅MSN;

(2) Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs的制备

将140 mg六水合氯化镍和260 mg二水合柠檬酸三钠分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min,同样将130 mg的铁氰化钾分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min,然后将两种溶液混合

继续在室温下搅拌8 h, 离心分离悬浮物, 使用超纯水和乙醇分别洗涤2次, 35 °C真空干燥, 得到土黄色纳米多孔NiFe MOFs;

将30 mg纳米多孔NiFe MOFs分散在50 mL超纯水中, 加入1 mL、1% ~ 3%的氯金酸溶液, 室温下搅拌5 min, 加入4 mg聚乙烯吡咯烷酮抑制金纳米粒子的团聚, 然后加入70 mg还原剂柠檬酸三钠, 0.5 mg硼氢化钠室温下搅拌8 h, 溶液慢慢变成紫黑色, 离心分离悬浮物, 超纯水洗涤至上清液无色, 35 °C真空干燥12 h, 得到紫黑色固体Au@NiFe MOFs;

将40 mg纳米多孔Au@NiFe MOFs分散在30 mL超纯水中, 加入6 mg三联吡啶氯化钌六水合物, 室温下搅拌8 h, 由于Au纳米粒子和NiFe MOFs表面都带有大量负电荷可以和发光体Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>阳离子通过静电吸附结合而形成稳定的Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs复合物, 离心分离悬浮物, 超纯水洗涤至上清液无色, 35 °C真空干燥12 h, 得到红棕色固体Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs;

### (3) Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs标记Aβ孵化物溶液的制备

将6 mg的Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs分散于1 mL pH 7.5的PBS中, 加入4 μL、6 mg/mL的Aβ, 4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h, 4 °C离心分离洗去未结合Aβ, 然后加入1 mL 0.1%的牛血清白蛋白溶液4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化2 h封闭Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs表面的非特异性活性位点, 4 °C离心分离洗去未结合的牛血清白蛋白, 最后分散于pH 7.5的PBS缓冲溶液中, 制得0.5 mg/mL的Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs标记Aβ溶液, 储存于4 °C中备用。

## [0010] 实施例2

介孔二氧化硅MSN、纳米多孔材料Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs标记Aβ抗原孵化物溶液的制备

### (1) 介孔二氧化硅MSN的制备

将1 mL、1 mol/L的氢氧化钠溶液加入30 mL超纯水80 °C搅拌20 min, 加入4 mg十六烷基三甲基溴化铵, 继续搅拌30 min, 降至室温, 加入2.5 mL硅酸四乙酯, 搅拌4 h, 继续加入750 μL硅酸四乙酯和乙醇1:10的混合溶液搅拌4 h, 离心分离悬浮物, 使用盐酸和甲醇1:1混合液洗涤3次, 乙醇洗涤2次, 35 °C真空干燥, 得到白色固体介孔二氧化硅; 将40 mg介孔二氧化硅分散在50 mL无水乙醇, 加入200 μL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷, 80 °C回流12 h, 超纯水洗涤, 35 °C真空干燥, 得到氨基功能化的介孔二氧化硅MSN;

### (2) Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs的制备

将150 mg六水合氯化镍和270 mg二水合柠檬酸三钠分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min, 同样将140 mg的铁氰化钾分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min, 然后将两种溶液混合继续在室温下搅拌10 h, 离心分离悬浮物, 使用超纯水和乙醇分别洗涤2次, 35 °C真空干燥, 得到土黄色纳米多孔NiFe MOFs;

将40 mg纳米多孔NiFe MOFs分散在50 mL超纯水中, 加入2 mL、2%的氯金酸溶液, 室温下搅拌5 min, 加入5 mg聚乙烯吡咯烷酮抑制金纳米粒子的团聚, 然后加入80 mg还原剂柠檬酸三钠, 0.75 mg硼氢化钠室温下搅拌10 h, 溶液慢慢变成紫黑色, 离心分离悬浮物, 超纯水洗涤至上清液无色, 35 °C真空干燥12 h, 得到紫黑色固体Au@NiFe MOFs;

将50 mg纳米多孔Au@NiFe MOFs分散在30 mL超纯水中, 加入8 mg三联吡啶氯化钌六水合物, 室温下搅拌10 h, 由于Au纳米粒子和NiFe MOFs表面都带有大量负电荷可以和发光体

Ru (bpy)  $3^{2+}$ 阳离子通过静电吸附结合而形成稳定的Ru (bpy)  $3^{2+}$ /Au@NiFe MOFs复合物,离心分离悬浮物,超纯水洗涤至上清液无色,35 °C真空干燥12 h,得到红棕色固体Ru (bpy)  $3^{2+}$ /Au@NiFe MOFs;

(3) Ru (bpy)  $3^{2+}$ /Au@NiFe MOFs标记A $\beta$ 孵化物溶液的制备

将8 mg的Ru (bpy)  $3^{2+}$ /Au@NiFe MOFs分散于1 mL pH 7.5的PBS中,加入5  $\mu$ L、6 mg/mL的A $\beta$ 溶液,4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化18 h,4 °C离心分离洗去未结合A $\beta$ ,然后加入1 mL、0.1%的牛血清白蛋白溶液4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化3 h封闭Ru (bpy)  $3^{2+}$ /Au@NiFe MOFs表面的非特异性活性位点,4 °C离心分离洗去未结合的牛血清白蛋白,最后分散于pH 7.5的PBS缓冲溶液中,制得2.5 mg/mL的Ru (bpy)  $3^{2+}$ /Au@NiFe MOFs标记A $\beta$ 溶液,储存于4 °C中备用。

[0011] 实施例3

介孔二氧化硅MSN、纳米多孔材料Ru (bpy)  $3^{2+}$ /Au@NiFe MOFs标记A $\beta$ 抗原孵化物溶液的制备

(1) 介孔二氧化硅MSN的制备

将1.5 mL、1 mol/L的氢氧化钠溶液加入30 mL超纯水80 °C搅拌20 min,加入5 mg十六烷基三甲基溴化铵,继续搅拌30 min,降至室温,加入3 mL硅酸四乙酯,搅拌4 h,继续加入1 mL硅酸四乙酯和乙醇1:10的混合溶液搅拌4 h,离心分离悬浮物,使用盐酸和甲醇1:1混合液洗涤3次,乙醇洗涤2次,35 °C真空干燥,得到白色固体介孔二氧化硅;将50 mg介孔二氧化硅分散在50 mL无水乙醇,加入200  $\mu$ L 3-氨基丙基三乙氧基硅烷,90 °C回流12 h,超纯水洗涤,35 °C真空干燥,得到氨基功能化的介孔二氧化硅MSN;

(2) Ru (bpy)  $3^{2+}$ /Au@NiFe MOFs的制备

将160 mg六水合氯化镍和280 mg二水合柠檬酸三钠分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min,同样将150 mg的铁氰化钾分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min,然后将两种溶液混合继续在室温下搅拌12 h,离心分离悬浮物,使用超纯水和乙醇分别洗涤2次,35 °C真空干燥,得到土黄色纳米多孔NiFe MOFs;

将50 mg纳米多孔NiFe MOFs分散在50 mL超纯水中,加入3 mL、3%的氯金酸溶液,室温下搅拌5 min,加入6 mg聚乙烯吡咯烷酮抑制金纳米粒子的团聚,然后加入90 mg还原剂柠檬酸三钠,1 mg硼氢化钠室温下搅拌12 h,溶液慢慢变成紫黑色,离心分离悬浮物,超纯水洗涤至上清液无色,35 °C真空干燥12 h,得到紫黑色固体Au@NiFe MOFs;

将60 mg纳米多孔Au@NiFe MOFs分散在30 mL超纯水中,加入10 mg三联吡啶氯化钌六水合物,室温下搅拌12 h,由于Au纳米粒子和NiFe MOFs表面都带有大量负电荷可以和发光体Ru (bpy)  $3^{2+}$ 阳离子通过静电吸附结合而形成稳定的Ru (bpy)  $3^{2+}$ /Au@NiFe MOFs复合物,离心分离悬浮物,超纯水洗涤至上清液无色,35 °C真空干燥12 h,得到红棕色固体Ru (bpy)  $3^{2+}$ /Au@NiFe MOFs;

(3) Ru (bpy)  $3^{2+}$ /Au@NiFe MOFs标记A $\beta$ 孵化物溶液的制备

将10 mg的Ru (bpy)  $3^{2+}$ /Au@NiFe MOFs分散于1 mL pH 7.5的PBS中,加入6  $\mu$ L、6 mg/mL的A $\beta$ 溶液,4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化24 h,4 °C离心分离洗去未结合A $\beta$ ,然后加入1 mL 0.1%的牛血清白蛋白溶液4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化4 h封闭Ru (bpy)  $3^{2+}$ /Au@NiFe MOFs表面的非特异性活性位点,4 °C离心分离洗去未结合的牛血清白蛋白,最后分散于pH

7.5的PBS缓冲溶液中,制得5 mg/mL的Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs标记Aβ溶液,储存于4 °C中备用。

#### [0012] 实施例4

一种Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs的竞争型电致化学发光传感器的制备方法,包括以下步骤:

(1) 分别用1.0 mm、0.3 mm、0.05 mm的氧化铝抛光粉对直径4 mm的玻碳电极做抛光处理,用超纯水冲洗干净;

(2) 将6 μL、0.5 mg/mL介孔硅MSN纳米材料水溶液滴涂至电极表面,室温下晾干;

(3) 将3 μL、0.5%戊二醛溶液滴于电极表面连接介孔硅MSN和抗体,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗电极表面,晾干;

(4) 将6 μL、8 μg/mL的Aβ抗体溶液孵化滴涂到电极表面,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 °C晾干;

(5) 将2 μL体积分数为0.5%的牛血清白蛋白溶液滴于电极表面,以封闭电极表面上的非特异性活性位点,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 °C晾干;

(6) 将6 μL、一定浓度的Aβ溶液滴加到电极表面,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 °C晾干;

(7) 将6 μL、0.5 mg/mL的Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs标记Aβ溶液滴加到电极表面,4 °C晾干,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,制得一种基于Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs的竞争型电致化学发光免疫传感器。

#### [0013] 实施例5

一种Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs的竞争型电致化学发光传感器的制备方法,包括以下步骤:

(1) 分别用1.0 mm、0.3 mm、0.05 mm的氧化铝抛光粉对直径4 mm的玻碳电极做抛光处理,用超纯水冲洗干净;

(2) 将6 μL、2.5 mg/mL介孔硅MSN纳米材料水溶液滴涂至电极表面,室温下晾干;

(3) 将3 μL、1%戊二醛溶液滴于电极表面连接介孔硅MSN和抗体,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗电极表面,晾干;

(4) 将6 μL、10 μg/mL的Aβ抗体溶液孵化滴涂到电极表面,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 °C晾干;

(5) 将3 μL体积分数为0.5%的牛血清白蛋白溶液滴于电极表面,以封闭电极表面上的非特异性活性位点,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 °C晾干;

(6) 将6 μL、一定浓度的Aβ溶液滴加到电极表面,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 °C晾干;

(7) 将6 μL、2.5 mg/mL的Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs标记Aβ溶液滴加到电极表面,4 °C晾干,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,制得一种基于Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs的竞争型电致化学发光免疫传感器。

#### [0014] 实施例6

一种Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs的竞争型电致化学发光传感器的制备方法,包括以下步骤:

- (1) 分别用1.0 mm、0.3 mm、0.05 mm的氧化铝抛光粉对直径4 mm的玻碳电极做抛光处理,用超纯水冲洗干净;
- (2) 将6  $\mu$ L、5 mg/mL介孔硅MSN纳米材料水溶液滴涂至电极表面,室温下晾干;
- (3) 将3  $\mu$ L、1.5%戊二醛溶液滴于电极表面连接介孔硅MSN和抗体,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗电极表面,晾干;
- (4) 将6  $\mu$ L、12  $\mu$ g/mL的A $\beta$ 抗体溶液孵化滴涂到电极表面,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4  $^{\circ}$ C晾干;
- (5) 将4  $\mu$ L体积分数为0.5%的牛血清白蛋白溶液滴于电极表面,以封闭电极表面上的非特异性活性位点,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4  $^{\circ}$ C晾干;
- (6) 将6  $\mu$ L、一定浓度的A $\beta$ 溶液滴加到电极表面,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4  $^{\circ}$ C晾干;
- (7) 将6  $\mu$ L、5 mg/mL的Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs标记A $\beta$ 溶液滴加到电极表面,4  $^{\circ}$ C晾干,用pH 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,制得一种基于Ru (bpy) <sub>3</sub><sup>2+</sup>/Au@NiFe MOFs的竞争型电致化学发光免疫传感器。

#### [0015] 实施例7

电致化学发光传感器用于A $\beta$ 的电化学发光检测:

- 1) 使用电化学工作站的三电极体系进行测试,Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝电极为对电极,所制备的电致化学发光传感器修饰的玻碳电极为工作电极,将电化学工作站和化学发光检测仪连接在一起将光电倍增管的高压设置为500 V,循环伏安扫描电位范围为0 ~ 1.4 V,扫描速率为0.1 V/s;
- (2) 在10 mL、pH 7.5的含浓度为10 mmol/L三丙胺的PBS缓冲溶液中,通过电化学发光系统,检测对不同浓度的A $\beta$ 产生的电化学发光信号强度,绘制工作曲线;
- (3) 将待测样品溶液代替标准溶液进行测定。

#### [0016] 实施例8

人体血清样品中A $\beta$ 的检测

人体血清样品1 mL,向其中加入不同浓度的A $\beta$ 溶液,采用标准加入法测定样品中A $\beta$ 的平均回收率,结果见表1.

表1 样品中A $\beta$ 的检测结果

样品	样品含量 (ng/mL)	加入浓度 (ng/mL)	检测浓度 (n = 5, ng/mL)	相对标准偏差 (%)	回收率 (%)
人体血清	0.59	0.005	0.59504, 0.59507, 0.59460, 0.59500, 0.59510	3.7	99.24
		0.1	0.690, 0.687, 0.688, 0.687, 0.693	2.3	99
		5	5.68, 5.70, 5.54, 5.62, 5.60	1.1	100.76

表1检测结果可以看出,人体血清样品中A<sub>β</sub>检测结果的回收率在95.0 ~ 105%范围内,表明本发明可以用于临床生物样品的检测,方法的精密度高,结果准确可靠。

专利名称(译)	一种基于[Ru(bpy)3]2+/Au@NiFe MOFs的免疫传感器的制备方法																							
公开(公告)号	<a href="#">CN109799229A</a>		公开(公告)日	2019-05-24																				
申请号	CN201811578269.2		申请日	2018-12-24																				
[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	赵冠辉 曹伟 王耀光 李小建 东雪 苗俊聪 魏琴																							
发明人	赵冠辉 曹伟 王耀光 李小建 东雪 苗俊聪 魏琴																							
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/531 G01N27/30 G01N27/327																							
代理人(译)	高强																							
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>																							
摘要(译)	<p>本发明涉及一种基于新型纳米多孔材料Ru(bpy)32+/Au@NiFe MOFs的竞争型电致化学发光免疫传感器的制备方法及应用，属于电化学发光传感器领域，首次以纳米复合材料Ru(bpy)32+/Au@NiFe MOFs为电化学发光信号源，利用氨基功能化的介孔二氧化硅MSN优良的生物兼容性和大的比表面积增加抗体的固载量，根据不同浓度抗原引起的电化学发光信号强度的不同，实现对β-淀粉样蛋白的检测。</p>																							
<table border="1"> <thead> <tr> <th>样品</th> <th>样品含量 (ng/mL)</th> <th>加入浓度 (ng/mL)</th> <th>检测浓度 (n=5, ng/mL)</th> <th>相对标准偏差 (%)</th> <th>回收率 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="3">人体血清</td> <td rowspan="3">0.59</td> <td>0.005</td> <td>0.59504, 0.59507, 0.59460, 0.59500, 0.59510</td> <td>3.7</td> <td>99.24</td> </tr> <tr> <td>0.1</td> <td>0.690, 0.687, 0.688, 0.687, 0.693</td> <td>2.3</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>5.68, 5.70, 5.54, 5.62, 5.60</td> <td>1.1</td> <td>100.76</td> </tr> </tbody> </table>					样品	样品含量 (ng/mL)	加入浓度 (ng/mL)	检测浓度 (n=5, ng/mL)	相对标准偏差 (%)	回收率 (%)	人体血清	0.59	0.005	0.59504, 0.59507, 0.59460, 0.59500, 0.59510	3.7	99.24	0.1	0.690, 0.687, 0.688, 0.687, 0.693	2.3	99	5	5.68, 5.70, 5.54, 5.62, 5.60	1.1	100.76
样品	样品含量 (ng/mL)	加入浓度 (ng/mL)	检测浓度 (n=5, ng/mL)	相对标准偏差 (%)	回收率 (%)																			
人体血清	0.59	0.005	0.59504, 0.59507, 0.59460, 0.59500, 0.59510	3.7	99.24																			
		0.1	0.690, 0.687, 0.688, 0.687, 0.693	2.3	99																			
		5	5.68, 5.70, 5.54, 5.62, 5.60	1.1	100.76																			