



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110530949 A

(43)申请公布日 2019.12.03

(21)申请号 201910861104.4

(22)申请日 2019.09.12

(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 薛经纬
马洪敏 赵磊

(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 27/327(2006.01)

G01N 27/30(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种基于铜纳米簇-共振能量转移体系构建
的免疫传感器的制备方法及应用

(57)摘要

一种基于铜纳米簇-共振能量转移体系构建的免疫传感器的制备方法及应用,该发明属于纳米材料与共振能量转移FRET领域;本发明以牛血清蛋白BSA包裹的铜纳米团簇Cu NCs作为能量供体,并在其表面利用L-抗坏血酸原位生长金纳米粒子Au NPs作为能量受体,得到Cu NCs-Au NPs三维共振结构,供受体对之间通过偶极-偶极的非辐射作用方式传递能量,其传递速率与距离的六次方呈反比,二者之间光谱的高比率重叠以及超近的配对距离,显著猝灭了Cu NCs的ECL发射并控制发光强度在合理范围内,为生物标志物的痕量检测提供了一种新的ECL-FRET能量转移新模型,为猝灭型ECL传感体系的机理探究提供了一种全新的思路。

1. 一种基于铜纳米簇-共振能量转移体系构建的免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将玻碳电极分别在乙醇和去离子水中超声清洗30 s,依次用1.0 μm , 0.3 μm 和0.05 μm 的 Al_2O_3 抛光粉对其抛光使之类似镜面般光滑,用氮气吹干;

(2) 将6 μL 分散均匀、浓度为1 ~ 3 mg/mL的Cu NCs-Au NPs溶液滴涂至玻碳电极表面,室温下自然晾干;

(3) 将上述晾干的玻碳电极插入5 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$ 的重组蛋白A溶液中,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化30 min,超纯水洗净,室温下自然晾干;

(4) 滴加6 μL 质量分数为0.1%的牛血清蛋白溶液,使之封闭非特异性活性位点,用pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,室温下自然晾干;

(5) 滴加6 μL 浓度为1 ~ 2 $\mu\text{g/mL}$ 的抗体标准溶液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化1 h,用pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干;

(6) 滴加6 μL 未知浓度的对应于抗体的抗原溶液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化1 h,用pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干,传感器构建完毕。

2. 如权利要求1所述的一种基于铜纳米簇-共振能量转移体系构建的免疫传感器的制备方法,所述Cu NCs-Au NPs溶液,按以下步骤制备:

室温下,将1 mL、浓度为5 ~ 10 mmol/L 的硫酸铜溶液与1 mL、浓度为1 ~ 2 mg/mL 的牛血清蛋白溶液充分混合,剧烈搅拌2 ~ 5 min后,加入0.1 ~ 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65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中12 h,直至溶液颜色由淡蓝色变为棕色,此时,铜离子已被BSA成功还原,得到BSA包覆的铜纳米簇Cu NCs;

将制备的Cu NCs与浓度为10 mmol/L的L-抗坏血酸溶液混合,随后加入5 mL去离子水进行稀释,然后,向上述溶液中加入50 ~ 150 μL 、质量分数2%的氯金酸溶液,持续搅拌2 h后得到紫黑色的Cu NCs-Au NPs三维共振纳米结构。

3. 如权利要求1所述的一种基于铜纳米簇-共振能量转移体系构建的免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述抗原为人体急性细菌感染以及脓毒症的标志物降钙素原。

4. 如权利要求1所述的一种基于铜纳米簇-共振能量转移体系构建的免疫传感器的制备方法制备的传感器用于检测降钙素原的浓度。

5. 如权利要求4所述的检测降钙素原的浓度,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作为激发源,Ag/AgCl电极作为参比电极,铂电极作为对电极,所制备的电致发光传感器作为工作电极,将电化学工作站和超微弱光检测仪联用,光电倍增管高压设置为800 V,循环伏安扫描电位为0 ~ 1.5 V,扫速为200 mV/s;

(2) 在10 mL、pH 7.4的含浓度为50 ~ 80 mmol/L三乙胺磷酸缓冲液中,通过电致发光系统,检测在一系列不同浓度的待测物抗原修饰状态下传感器的电致发光信号强度,绘制工作曲线;

(3) 将实际血清样品代替待测抗原进行检测。

一种基于铜纳米簇-共振能量转移体系构建的免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于纳米科学与免疫分析领域。

背景技术

[0002] 铜纳米团簇是纳米科学发展所兴起的一种新型纳米材料,其良好的光学稳定性,大的斯托克位移,高的量子产率以及良好的生物相容性为其在生物传感领域的应用奠定了坚实的基础。铜纳米团簇能够在碱性环境中被核酸、配基、蛋白质等多种微还原剂合成,其中以牛血清蛋白为模板的铜纳米团簇在低电势下表现出了较短波长的电致光信号,同时,其表面包覆的牛血清蛋白暴露出大量的官能团活性位点,为生物分子的修饰提供了极大的便利,相较于半导体量子点等电致发光体在免疫分析中有着得天独厚的优势。然而,其较高的电致发光效率也让传感平台的信号难以控制,基于此我们提出利用共振能量转移体系来控制其发光强度使其能够满足目标物痕量分析的需要,旨在为猝灭型ECL传感体系的机理探究提供了一种全新的思路。

发明内容

[0003] 本发明的技术任务之一是为了弥补现阶段ECL-FRET模型证据的不足,提供一种Cu NCs-Au NPs三维共振结构的制备方法。该方法以实现共振能量转移要满足的三个条件为抓手,摆脱了传统ECL-FRET传感模型单纯强调光谱重叠的片面行为,重点探究验证猝灭效率与共受体之间距离的关系,为猝灭型ECL传感体系的机理探究提供了一种全新的思路。

[0004] 本发明的技术任务二是提供所述ECL-FRET模型在生物传感领域的用途,基于该模型研发的生物传感器能够快速检测降钙素原,灵敏度高,检出限低,重现性好,在临床检测中有着广阔的应用前景。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

1. 一种基于铜纳米簇-共振能量转移体系构建的免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将玻碳电极分别在乙醇和去离子水中超声清洗30 s,依次用1.0 μm , 0.3 μm 和0.05 μm 的 Al_2O_3 抛光粉对其抛光使之类似镜面般光滑,用氮气吹干;

(2) 将6 μL 分散均匀、浓度为1 ~ 3 mg/mL的Cu NCs-Au NPs溶液滴涂至玻碳电极表面,室温下自然晾干;

(3) 将上述晾干的玻碳电极插入5 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$ 的重组蛋白A溶液中,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化30 min,超纯水洗净,室温下自然晾干;

(4) 滴加6 μL 质量分数为0.1%的牛血清蛋白溶液,使之封闭非特异性活性位点,用pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,室温下自然晾干;

(5) 滴加6 μL 浓度为1 ~ 2 $\mu\text{g/mL}$ 的抗体标准溶液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化1 h,用pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干;

(6) 滴加6 μL 未知浓度的对应于抗体的抗原溶液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化1 h,用pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干,传感器构建完毕。

[0006] 2.所述的一种基于铜纳米簇-共振能量转移体系构建的免疫传感器的制备方法,所述Cu NCs-Au NPs溶液,按以下步骤制备:

室温下,将1 mL、浓度为5 ~ 10 mmol/L 的硫酸铜溶液与1 mL、浓度为1 ~ 2 mg/mL 的牛血清蛋白溶液充分混合,剧烈搅拌2 ~ 5 min后,加入0.1 ~ 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65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中12 h,直至溶液颜色由淡蓝色变为棕色,此时,铜离子已被BSA成功还原,得到BSA包覆的铜纳米簇Cu NCs。将制备的Cu NCs与浓度为10 mmol/L的L-抗坏血酸溶液混合,随后加入5 mL去离子水进行稀释,然后,向上述溶液中加入50 ~ 150 μL 、质量分数2%的氯金酸溶液,持续搅拌2 h后得到紫黑色的Cu NCs-Au NPs三维共振纳米结构。

[0007] 3.所述的一种基于铜纳米簇-共振能量转移体系构建的免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述抗原为人体急性细菌感染以及脓毒症的标志物降钙素原。

[0008] 4.所述的一种基于铜纳米簇-共振能量转移体系构建的免疫传感器的制备方法制备的传感器用于检测降钙素原的浓度。

[0009] 5.所述的检测降钙素原的浓度,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作为激发源,Ag/AgCl电极作为参比电极,铂电极作为对电极,所制备的电致发光传感器作为工作电极,将电化学工作站和超微弱光检测仪联用,光电倍增管高压设置为800 V,循环伏安扫描电位为0 ~ 1.5 V,扫速为200 mV/s;

(2) 在10 mL、pH 7.4的含浓度为50 ~ 80 mmol/L三乙胺磷酸缓冲液中,通过电致发光系统,检测在一系列不同浓度的待测物抗原修饰状态下传感器的电致发光信号强度,绘制工作曲线;

(3) 将实际血清样品代替待测抗原进行检测。

[0010] 本发明的有益成果

(1) 首次基于铜纳米团簇制备了三维共振ECL传感模型Cu NCs-Au NPs,该结构通过供受体对之间偶极-偶极的非辐射作用方式传递能量能够有效控制铜纳米簇的ECL强度;

(2) 本发明首次基于三维共振结构Cu NCs-Au NPs,构建了一种ECL传感平台用于降钙素原的实际样品检测,该传感器灵敏度高,检测范围宽,检出限低至2.9 fg/mL。

[0011] 具体实施方式:

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。

[0012] 实施例1. 一种基于铜纳米簇-共振能量转移体系构建的免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将玻碳电极分别在乙醇和去离子水中超声清洗30 s,依次用1.0 μm , 0.3 μm 和0.05 μm 的 Al_2O_3 抛光粉对其抛光使之类似镜面般光滑,用氮气吹干;

(2) 将6 μL 分散均匀、浓度为1 mg/mL的Cu NCs-Au NPs溶液滴涂至玻碳电极表面,室温下自然晾干;

(3) 将上述晾干的玻碳电极插入5 $\mu\text{g/mL}$ 的重组蛋白A溶液中,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化30 min,超纯水洗净,室温下自然晾干;

(4) 滴加6 μL 质量分数为0.1%的牛血清蛋白溶液,使之封闭非特异性活性位点,用pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,室温下自然晾干;

(5) 滴加6 μL 浓度为1 $\mu\text{g/mL}$ 的抗体标准溶液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化1 h,用pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干;

(6) 滴加6 μL 未知浓度的对应于抗体的抗原溶液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化1 h,用pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干,传感器构建完毕。

[0013] 实施例2. 一种基于铜纳米簇-共振能量转移体系构建的免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将玻碳电极分别在乙醇和去离子水中超声清洗30 s,依次用1.0 μm , 0.3 μm 和0.05 μm 的 Al_2O_3 抛光粉对其抛光使之类似镜面般光滑,用氮气吹干;

(2) 将6 μL 分散均匀、浓度为2 mg/mL 的 Cu NCs-Au NPs 溶液滴涂至玻碳电极表面,室温下自然晾干;

(3) 将上述晾干的玻碳电极插入7.5 $\mu\text{g/mL}$ 的重组蛋白A溶液中,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化30 min,超纯水洗净,室温下自然晾干;

(4) 滴加6 μL 质量分数为0.1%的牛血清蛋白溶液,使之封闭非特异性活性位点,用pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,室温下自然晾干;

(5) 滴加6 μL 浓度为1.5 $\mu\text{g/mL}$ 的抗体标准溶液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化1 h,用pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干;

(6) 滴加6 μL 未知浓度的对应于抗体的抗原溶液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化1 h,用pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干,传感器构建完毕。

[0014] 实施例3. 一种基于铜纳米簇-共振能量转移体系构建的免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将玻碳电极分别在乙醇和去离子水中超声清洗30 s,依次用1.0 μm , 0.3 μm 和0.05 μm 的 Al_2O_3 抛光粉对其抛光使之类似镜面般光滑,用氮气吹干;

(2) 将6 μL 分散均匀、浓度为3 mg/mL 的 Cu NCs-Au NPs 溶液滴涂至玻碳电极表面,室温下自然晾干;

(3) 将上述晾干的玻碳电极插入10 $\mu\text{g/mL}$ 的重组蛋白A溶液中,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化30 min,超纯水洗净,室温下自然晾干;

(4) 滴加6 μL 质量分数为0.1%的牛血清蛋白溶液,使之封闭非特异性活性位点,用pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,室温下自然晾干;

(5) 滴加6 μL 浓度为2 $\mu\text{g/mL}$ 的抗体标准溶液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化1 h,用pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干;

(6) 滴加6 μL 未知浓度的对应于抗体的抗原溶液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化1 h,用pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液冲洗电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干,传感器构建完毕。

[0015] 实施例4. Cu NCs-Au NPs 溶液,按以下步骤制备:

室温下,将1 mL、浓度为5 mmol/L 的硫酸铜溶液与1 mL、浓度为1 mg/mL 的牛血清蛋白溶液充分混合,剧烈搅拌2 min后,加入0.1 mL、浓度为1 mol/L 的氢氧化钠溶液,然后将该混合液置于65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中12 h,直至溶液颜色由淡蓝色变为棕色,此时,铜离子已被BSA成功还原,得到BSA包覆的铜纳米簇 Cu NCs 。将制备的 Cu NCs 与浓度为10 mmol/L 的L-抗坏

血酸溶液混合,随后加入5 mL去离子水进行稀释,然后,向上述溶液中加入50 μ L、质量分数2%的氯金酸溶液,持续搅拌2 h后得到紫黑色的Cu NCs-Au NPs三维共振纳米结构。

[0016] 实施例5. Cu NCs-Au NPs溶液,按以下步骤制备:

室温下,将1 mL、浓度为7.5 mmol/L 的硫酸铜溶液与1 mL、浓度为1.5 mg/mL 的牛血清蛋白溶液充分混合,剧烈搅拌3.5 min后,加入0.5 mL、浓度为1.5 mol/L的氢氧化钠溶液,然后将该混合液置于65 $^{\circ}$ C 水浴中12 h,直至溶液颜色由淡蓝色变为棕色,此时,铜离子已被BSA成功还原,得到BSA包覆的铜纳米簇Cu NCs。将制备的Cu NCs与浓度为10 mmol/L的L-抗坏血酸溶液混合,随后加入5 mL去离子水进行稀释,然后,向上述溶液中加入100 μ L、质量分数2%的氯金酸溶液,持续搅拌2 h后得到紫黑色的Cu NCs-Au NPs三维共振纳米结构。

[0017] 实施例6. Cu NCs-Au NPs溶液,按以下步骤制备:

室温下,将1 mL、浓度为10 mmol/L 的硫酸铜溶液与1 mL、浓度为2 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65 $^{\circ}$ C 水浴中12 h,直至溶液颜色由淡蓝色变为棕色,此时,铜离子已被BSA成功还原,得到BSA包覆的铜纳米簇Cu NCs。将制备的Cu NCs与浓度为10 mmol/L的L-抗坏血酸溶液混合,随后加入5 mL去离子水进行稀释,然后,向上述溶液中加入150 μ L、质量分数2%的氯金酸溶液,持续搅拌2 h后得到紫黑色的Cu NCs-Au NPs三维共振纳米结构。

[0018] 实施例7. 检测降钙素原浓度

(1) 使用电化学工作站的三电极体系作为激发源,Ag/AgCl电极作为参比电极,铂电极作为对电极,所制备的电致发光传感器作为工作电极,将电化学工作站和超微弱光检测仪联用,光电倍增管高压设置为800 V,循环伏安扫描电位为0 ~ 1.5 V,扫速为200 mV/s;

(2) 在10 mL、pH 7.4的含浓度为50 mmol/L三乙胺磷酸缓冲液中,通过电致发光系统,检测在一系列不同浓度的待测物抗原修饰状态下传感器的电致发光信号强度,绘制工作曲线;

(3) 将实际血清样品代替待测抗原进行检测。

[0019] 实施例8. 检测降钙素原浓度

(1) 使用电化学工作站的三电极体系作为激发源,Ag/AgCl电极作为参比电极,铂电极作为对电极,所制备的电致发光传感器作为工作电极,将电化学工作站和超微弱光检测仪联用,光电倍增管高压设置为800 V,循环伏安扫描电位为0 ~ 1.5 V,扫速为200 mV/s;

(2) 在10 mL、pH 7.4的含浓度为65 mmol/L三乙胺磷酸缓冲液中,通过电致发光系统,检测在一系列不同浓度的待测物抗原修饰状态下传感器的电致发光信号强度,绘制工作曲线;

(3) 将实际血清样品代替待测抗原进行检测。

[0020] 实施例9 检测降钙素原浓度

(1) 使用电化学工作站的三电极体系作为激发源,Ag/AgCl电极作为参比电极,铂电极作为对电极,所制备的电致发光传感器作为工作电极,将电化学工作站和超微弱光检测仪联用,光电倍增管高压设置为800 V,循环伏安扫描电位为0 ~ 1.5 V,扫速为200 mV/s;

(2) 在10 mL、pH 7.4的含浓度为80 mmol/L三乙胺磷酸缓冲液中,通过电致发光系统,检测在一系列不同浓度的待测物抗原修饰状态下传感器的电致发光信号强度,绘制工作曲

线；

- (3) 将实际血清样品代替待测抗原进行检测。

专利名称(译)	一种基于铜纳米簇-共振能量转移体系构建的免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN110530949A	公开(公告)日	2019-12-03
申请号	CN201910861104.4	申请日	2019-09-12
[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 薛经纬 马洪敏 赵磊		
发明人	魏琴 贾越 杨磊 薛经纬 马洪敏 赵磊		
IPC分类号	G01N27/327 G01N27/30 G01N33/53		
CPC分类号	G01N27/308 G01N27/3278 G01N33/53		
代理人(译)	赵凤		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种基于铜纳米簇-共振能量转移体系构建的免疫传感器的制备方法及应用，该发明属于纳米材料与共振能量转移FRET领域；本发明以牛血清蛋白BSA包裹的铜纳米团簇Cu NCs作为能量供体，并在其表面利用L-抗坏血酸原位生长金纳米粒子Au NPs作为能量受体，得到Cu NCs-Au NPs三维共振结构，供受体对之间通过偶极-偶极的非辐射作用方式传递能量，其传递速率与距离的六次方呈反比，二者之间光谱的高比率重叠以及超近的配对距离，显著猝灭了Cu NCs的ECL发射并控制发光强度在合理范围内，为生物标志物的痕量检测提供了一种新的ECL-FRET能量转移新模型，为猝灭型ECL传感体系的机理探究提供了一种全新的思路。