



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110470659 A

(43)申请公布日 2019.11.19

(21)申请号 201910793150.5

(22)申请日 2019.08.27

(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 曹伟 东雪 李璇 赵冠辉 赵磊
苗俊聪 房靖龙 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 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4页

(54)发明名称

一种基于ZnO@AgNCs信号放大的无标型电致
化学发光传感器的制备方法

(57)摘要

本发明为一种基于ZnO@AgNCs信号放大的无
标型电致化学发光传感器的制备方法,涉及一种
基于发光材料ZnO@AgNCs为基底,构建用于检测
降钙素原(PCT)的无标型免疫传感器的制备方
法,本发明属于新型功能材料与生物传感技术领
域。具体是以ZnO纳米块为模板,原位生长AgNCs
合成复合材料ZnO@AgNCs作为传感器ECL发光基
底,ZnO@AgNCs复合材料结合了ZnO及AgNCs各自
的发光性能,当PBS缓冲溶液中存在K₂S₂O₈时,
ZnO@AgNCs复合材料能发射出高效稳定的ECL信
号,实现了ECL信号的放大,以此构建的无标型电
致化学发光免疫传感器灵敏特异检测PCT。

1. 一种基于ZnO@AgNCs信号放大的无标型电致化学发光传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将玻碳电极用抛光粉打磨,再使用去离子水清洗,将电极置于5 mmol/L铁氰化钾溶液中,并在-0.2 ~ 0.6 V电位下进行扫描,使峰电位的差值小于110 mV;

(2) 将8 μ L, 1 ~ 5 mg/mL ZnO@AgNCs复合物溶液滴加在电极上,室温下干燥;

(3) 将8 μ L, 1 ~ 2 μ g/mL PCT抗体滴加在电极上,室温下干燥之后,用PBS清洗,除去多余抗体,室温下干燥;

(4) 将3 μ L, 质量分数为1 ~ 2% BSA溶液滴加于电极上,用以封闭非特异性结合位点,干燥之后使用PBS洗去多余BSA,室温下干燥;

(5) 将8 μ L, 0.0001 ~ 200 ng/mL一系列不同浓度的PCT抗原标准溶液滴加于电极上,室温下干燥之后,用PBS清洗,除去多余抗原,室温下干燥。

2. 如权利1所述的一种基于ZnO@AgNCs信号放大的无标型电致化学发光传感器的制备方法,其所述的ZnO@AgNCs材料的制备步骤如下:

(1) ZnO的制备

在搅拌下将10 ~ 30 mL浓度为1~3 mol/L 的KOH与20 ~ 40 mL乙二醇混合,加入10 ~ 30 mL 0.4 ~ 0.6 M Zn(NO₃)₂·6H₂O和100 ~ 300 mg十六烷基三甲基溴化铵,搅拌20 min后放置在高压反应釜中,在120 °C条件下反应5 h,溶液在8000转速下离心8分钟,分离出上清液倾倒,再用水和乙醇将沉淀洗涤数次,产物在60 °C下真空干燥后,研磨保存在4 °C下以备使用;

(2) ZnO@AgNCs的合成

取100 ~ 300 mg ZnO溶于30 mL 水中,再取40 ~ 60 mg AgNO₃溶于1 mL水中,将两溶液混合并搅拌,加1~2滴NaBH₄至变色,过夜搅拌6 h后离心洗涤数次,产物在60 °C下真空干燥后,研磨保存在4 °C下以备使用。

3. 如权利1所述的一种基于ZnO@AgNCs信号放大的无标型电致化学发光传感器的制备方法,其特征在于,用于PCT的检测,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800 V,循环伏安扫描电位范围为-1.5 ~ 0 V,扫描速率为0.1 V/s;

(2) 在10 mL、pH 6.0 ~ 8.5的含浓度为50 mmol/L ~ 100 mmol/L K₂S₂O₈的PBS缓冲溶液中通过电化学发光方法,检测对不同浓度的PCT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PCT样品溶液代替PCT标准溶液进行测定。

一种基于ZnO@AgNCs信号放大的无标型电致化学发光传感器的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种电致化学发光免疫传感器的制备与应用,具体说是一种以ZnO@AgNCs作为信号放大传感平台灵敏检测PCT的无标型免疫传感器,本发明属于新型功能材料、生物传感技术领域。

背景技术

[0002] PCT是一种能反映全身炎症反应活跃程度的蛋白质。影响PCT水平的因素包括被感染器官的大小和类型、细菌的种类、炎症的程度和免疫反应的状况。PCT在健康个体中的浓度非常低,约为0.1 ng/ml,当严重细菌、真菌、寄生虫感染以及脓毒症和多脏器功能衰竭时它在血浆中的水平升高。血浆中的PCT含量是鉴别诊断细菌性和非细菌性感染和炎症的有效参数。

[0003] 电致化学发光(ECL)是将电化学手段与化学发光技术相结合的一种研究方法,近几年在免疫分析等方面受到的广泛地关注。ECL传感器具有高灵敏性、高选择性、高专一性和检出限低等优点,可快速准确的检测待测物的含量。

[0004] 本发明中采用的ZnO纳米块及AgNCs各自均具有ECL发射信号,但信号较低,将ZnO纳米块作为基底,原位生长AgNCs以合成ZnO@AgNCs纳米复合材料,可显著放大ECL信号。当共反应剂 $K_2S_2O_8$ 存在时,传感器基底材料ZnO@AgNCs发射出高效稳定的ECL信号,以此构建的电致化学发光免疫传感器能特异灵敏的检测PCT含量。

发明内容

[0005] 本发明的目的之一是制备一种基于ZnO@AgNCs信号放大的无标型电致化学发光传感器。

[0006] 本发明的目的之二是将该传感器用于PCT的高灵敏、特异性检测。

[0007] 本发明的技术方案如下:

1. 一种基于ZnO@AgNCs信号放大的无标型电致化学发光传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将玻碳电极用抛光粉打磨,再使用去离子水清洗,将电极置于5 mmol/L铁氰化钾溶液中,并在-0.2 ~ 0.6 V电位下进行扫描,使峰电位的差值小于110 mV;

(2) 将8 μ L, 1 ~ 5 mg/mL ZnO@AgNCs复合物溶液滴加在电极上,室温下干燥;

(3) 将8 μ L, 1 ~ 2 μ g/mL PCT抗体滴加在电极上,室温下干燥之后,用PBS清洗,除去多余抗体,室温下干燥;

(4) 将3 μ L, 质量分数为1 ~ 2% BSA溶液滴加于电极上,用以封闭非特异性结合位点,干燥之后使用PBS洗去多余BSA,室温下干燥;

(5) 将8 μ L, 0.0001 ~ 200 ng/mL一系列不同浓度的PCT抗原标准溶液滴加于电极上,室温下干燥之后,用PBS清洗,除去多余抗原,室温下干燥。

[0008] 2. 如权利1所述的一种基于ZnO@AgNCs信号放大的无标型电致化学发光传感器的制备方法,其所述的ZnO@AgNCs材料的制备步骤如下:

(1) ZnO的制备

在搅拌下将10 ~ 30 mL浓度为1~3 mol/L 的KOH与20 ~ 40 mL乙二醇混合,加入10 ~ 30 mL 0.4 ~ 0.6 M $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 和100 ~ 300 mg十六烷基三甲基溴化铵,搅拌20 min后放置在高压反应釜中,在120 °C条件下反应5 h,溶液在8000转速下离心8分钟,分离出上清液倾倒,再用水和乙醇将沉淀洗涤数次,产物在60 °C下真空干燥后,研磨保存在4 °C下以备使用;

(2) ZnO@AgNCs的合成

取100 ~ 300 mg ZnO溶于30 mL 水中,再取40 ~60 mg $AgNO_3$ 溶于1 mL水中,将两溶液混合并搅拌,加1~2滴 $NaBH_4$ 至变色,过夜搅拌6 h后离心洗涤数次,产物在60 °C下真空干燥后,研磨保存在4 °C下以备使用。

[0009] 3.PCT的检验,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800 V,循环伏安扫描电位范围为-1.5 ~ 0 V,扫描速率为0.1 V/s;

(2)在10 mL、pH 6.0 ~ 8.5的含浓度为50 mmol/L ~ 100 mmol/L $K_2S_2O_8$ 的PBS缓冲溶液中通过电化学发光方法,检测对不同浓度的PCT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PCT样品溶液代替PCT标准溶液进行测定。

[0010] 本发明的有益成果

(1)本发明采用ZnO纳米块作为基底,原位生长AgNCs以合成ZnO@AgNCs纳米复合材料,可显著放大两种材料自身的ECL信号,有效提高传感器的灵敏度;

(2)本发明构建的无标型电致化学发光免疫传感器,应用于PCT的检测,具有操作简单,检测快速,信号线性范围宽(0.0001 ng/mL ~ 200 ng/mL)和检出限低(0.03 pg/mL)的优点。

具体实施方式

[0011] 实施例1 一种基于ZnO@AgNCs信号放大的无标型电致化学发光传感器的ZnO@AgNCs材料的制备步骤如下:

((1) ZnO的制备

在搅拌下将10 mL浓度为2 mol/L 的KOH与20 mL乙二醇混合,加入10 mL 0.5 M $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 和200 mg十六烷基三甲基溴化铵,搅拌20 min后放置在高压反应釜中,在120 °C条件下反应5 h,溶液在8000转速下离心8分钟,分离出上清液倾倒,再用水和乙醇将沉淀洗涤数次,产物在60 °C下真空干燥后,研磨保存在4 °C下以备使用;

(2) ZnO@AgNCs的合成

取100 mg ZnO溶于30 mL 水中,再取40 mg $AgNO_3$ 溶于1 mL水中,将两溶液混合并搅拌,加1~2滴 $NaBH_4$ 至变色,过夜搅拌6 h后离心洗涤数次,产物在60 °C下真空干燥后,研磨

保存在4 °C下以备使用。

[0012] 实施例2 一种基于ZnO@AgNCs信号放大的无标型电致化学发光传感器的ZnO@AgNCs材料的制备步骤如下：

(1) ZnO的制备

在搅拌下将20 mL浓度为1 mol/L 的KOH与30 mL乙二醇混合,加入20 mL 0.4 M Zn(NO₃)₂·6H₂O和100 mg十六烷基三甲基溴化铵,搅拌20 min后放置在高压反应釜中,在120 °C条件下反应5 h,溶液在8000转速下离心8分钟,分离出上清液倾倒,再用水和乙醇将沉淀洗涤数次,产物在60 °C下真空干燥后,研磨保存在4 °C下以备使用;

(2) ZnO@AgNCs的合成

取200 mg ZnO溶于30 mL 水中,再取50 mg AgNO₃溶于1 mL水中,将两溶液混合并搅拌,加1~2滴NaBH₄至变色,过夜搅拌6 h后离心洗涤数次,产物在60 °C下真空干燥后,研磨保存在4 °C下以备使用。

[0013] 实施例3 一种基于ZnO@AgNCs信号放大的无标型电致化学发光传感器的ZnO@AgNCs材料的制备步骤如下：

(1) ZnO的制备

在搅拌下将30 mL浓度为3 mol/L 的KOH与40 mL乙二醇混合,加入30 mL 0.6 M Zn(NO₃)₂·6H₂O和300 mg十六烷基三甲基溴化铵,搅拌20 min后放置在高压反应釜中,在120 °C条件下反应5 h,溶液在8000转速下离心8分钟,分离出上清液倾倒,再用水和乙醇将沉淀洗涤数次,产物在60 °C下真空干燥后,研磨保存在4 °C下以备使用;

(2) ZnO@AgNCs的合成

取300 mg ZnO溶于30 mL 水中,再取60 mg AgNO₃溶于1 mL水中,将两溶液混合并搅拌,加1~2滴NaBH₄至变色,过夜搅拌6 h后离心洗涤数次,产物在60 °C下真空干燥后,研磨保存在4 °C下以备使用。

[0014] 实施例4一种基于ZnO@AgNCs信号放大的无标型电致化学发光传感器的制备方法：

(1)将玻碳电极用抛光粉打磨,再使用去离子水清洗,将电极置于5 mmol/L铁氰化钾溶液中,并在-0.2 ~ 0.6 V电位下进行扫描,使峰电位的差值小于110 mV;

(2)将8 μL,1 mg/mL ZnO@AgNCs复合物溶液滴加在电极上,室温下干燥;

(3)将8 μL,1.5 μg/mL PCT抗体滴加在电极上,室温下干燥之后,用PBS清洗,除去多余抗体,室温下干燥;

(4)将3 μL,质量分数为1.5% BSA溶液滴加于电极上,用以封闭非特异性结合位点,干燥之后使用PBS洗去多余BSA,室温下干燥;

(5)将8 μL,0.0001 ~ 200 ng/mL一系列不同浓度的PCT抗原标准溶液滴加于电极上,室温下干燥之后,用PBS清洗,除去多余抗原,室温下干燥。

[0015] 实施例5一种基于ZnO@AgNCs信号放大的无标型电致化学发光传感器的制备方法：

(1)将玻碳电极用抛光粉打磨,再使用去离子水清洗,将电极置于5 mmol/L铁氰化钾溶液中,并在-0.2 ~ 0.6 V电位下进行扫描,使峰电位的差值小于110 mV;

(2)将8 μL,5 mg/mL ZnO@AgNCs复合物溶液滴加在电极上,室温下干燥;

(3)将8 μL,2 μg/mL PCT抗体滴加在电极上,室温下干燥之后,用PBS清洗,除去多余抗体,室温下干燥;

(4) 将3 μL , 质量分数为2% BSA溶液滴加于电极上, 用以封闭非特异性结合位点, 干燥之后使用PBS洗去多余BSA, 室温下干燥;

(5) 将8 μL , 0.0001 ~ 200 ng/mL一系列不同浓度的PCT抗原标准溶液滴加于电极上, 室温下干燥之后, 用PBS清洗, 除去多余抗原, 室温下干燥。

[0016] 实施例6一种基于ZnO@AgNCs信号放大的无标型电致化学发光传感器的制备方法:

(1) 将玻碳电极用抛光粉打磨, 再使用去离子水清洗, 将电极置于5 mmol/L铁氰化钾溶液中, 并在-0.2 ~ 0.6 V电位下进行扫描, 使峰电位的差值小于110 mV;

(2) 将8 μL , 5 mg/mL ZnO@AgNCs复合物溶液滴加在电极上, 室温下干燥;

(3) 将8 μL , 2 $\mu\text{g/mL}$ PCT抗体滴加在电极上, 室温下干燥之后, 用PBS清洗, 除去多余抗体, 室温下干燥;

(4) 将3 μL , 质量分数为2% BSA溶液滴加于电极上, 用以封闭非特异性结合位点, 干燥之后使用PBS洗去多余BSA, 室温下干燥;

(5) 将8 μL , 0.0001 ~ 200 ng/mL一系列不同浓度的PCT抗原标准溶液滴加于电极上, 室温下干燥之后, 用PBS清洗, 除去多余抗原, 室温下干燥。

[0017] 实施例7 PCT的检验, 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800 V, 循环伏安扫描电位范围为-1.5 ~ 0 V, 扫描速率为0.1 V/s;

(2) 在10 mL、pH 6.0 ~ 8.5的含浓度为50 mmol/L ~ 100 mmol/L $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 的PBS缓冲溶液中通过电化学发光方法, 检测对不同浓度的PCT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PCT样品溶液代替PCT标准溶液进行测定;

(4) PCT检测的线性范围是0.0001 ng/mL ~ 200 ng/mL, 检测限是0.03 pg/mL。

专利名称(译)	一种基于ZnO@AgNCs信号放大的无标型电致化学发光传感器的制备方法		
公开(公告)号	CN110470659A	公开(公告)日	2019-11-19
申请号	CN201910793150.5	申请日	2019-08-27
[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	曹伟 东雪 李璇 赵冠辉 赵磊 苗俊聪 房靖龙 魏琴		
发明人	曹伟 东雪 李璇 赵冠辉 赵磊 苗俊聪 房靖龙 魏琴		
IPC分类号	G01N21/76 G01N27/327 G01N33/531		
CPC分类号	G01N21/76 G01N27/3278 G01N33/531		
代理人(译)	赵凤		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明为一种基于ZnO@AgNCs信号放大的无标型电致化学发光传感器的制备方法，涉及一种基于发光材料ZnO@AgNCs为基底，构建用于检测降钙素原(PCT)的无标型免疫传感器的制备方法，本发明属于新型功能材料与生物传感技术领域。具体是以ZnO纳米块为模板，原位生长AgNCs合成复合材料ZnO@AgNCs作为传感器ECL发光基底，ZnO@AgNCs复合材料结合了ZnO及AgNCs各自的发光性能，当PBS缓冲溶液中存在K₂S₂O₈时，ZnO@AgNCs复合材料能发射出高效稳定的ECL信号，实现了ECL信号的放大，以此构建的无标型电致化学发光免疫传感器灵敏特异检测PCT。