



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109187379 B

(45) 授权公告日 2021.03.16

(21) 申请号 201811245395.6

G01N 27/26 (2006.01)

(22) 申请日 2018.10.25

G01N 33/53 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

(56) 对比文件

申请公布号 CN 109187379 A

CN 105241937 A, 2016.01.13

CN 107064509 A, 2017.08.18

(43) 申请公布日 2019.01.11

(73) 专利权人 福建医科大学

罗敏等. 基于Au-ZnO花-棒复合材料对甲胎蛋白光电化学免疫传感器的研究.《中国化学会第30届学术年会摘要集-第四分会:生物分析和生物传感》.2016,

地址 350004 福建省福州市台江区交通路88号

屠闻文等. 卟啉纳米组装与生物传感.《化学进展》.2011,第23卷(第10期),

(72) 发明人 韩志钟 翁清花 张思颖 朱莉莉
郑小娜 李小芬 黄起杰 刘鹏辉

审查员 李帅

(74) 专利代理机构 福州智理专利代理有限公司
35208

代理人 王义星

(51) Int. Cl.

G01N 21/27 (2006.01)

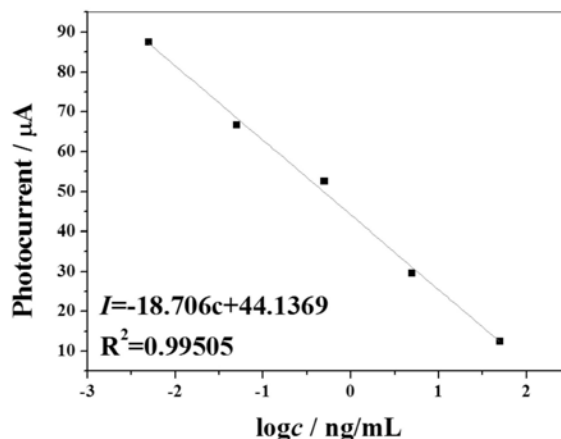
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

一种天然叶绿素敏化氧化锌基光电化学免疫传感器的构建和应用

(57) 摘要

本发明公开一种天然叶绿素敏化氧化锌基光电化学免疫传感器的构建和应用,包括如下步骤:将制好的氧化锌阵列置于提取的天然叶绿素溶液中浸泡,天然叶绿素与ZnO表面共价结合;加入甲胎蛋白抗体(Ab)并固定至电极表面,用牛血清蛋白(BSA)封闭;最后,引入不同浓度的甲胎蛋白,通过检测抗原抗体特异性反应引起的光电流信号变化,以实现测定甲胎蛋白的目的。本发明所得到的天然叶绿素敏化剂制备方法绿色环保,操作简便快捷,制备的天然叶绿素敏化氧化锌基光电化学免疫传感器生物相容性好,成本低,节能环保。因此,在光电生物传感技术和生物医学领域具有较好的应用前景。



1. 一种天然叶绿素敏化氧化锌基光电化学免疫传感器的构建方法,包括如下步骤:

1) 对ITO玻璃进行清洗,然后采用旋涂法,将乙酸锌溶于乙醇形成溶液,将乙酸锌乙醇溶液平铺在干燥的ITO玻璃上,煅烧后在ITO表面形成种子层;2) 配制由六水合硝酸锌,六次甲基四胺,聚乙烯亚胺组成的水溶液,然后加入氨水,并用纯净水制成ZnO纳米阵列结构生长液;3) 将步骤1)制得的表面负载有种子层的ITO玻璃浸入到步骤2)制得的ZnO纳米阵列结构生长液中,在85 °C下反应4 h,并在450 °C下煅烧后制得ZnO纳米材料,将ZnO纳米材料上的多余ZnO刮去后即得ZnO电极;4) 采摘并清洗绿黄葛树叶,除去叶脉,风干,将其剪碎后加入二氧化硅研磨以防止叶绿素被破坏,加入乙醇浸泡,过滤即得叶绿素提取液,浓缩叶绿素获得叶绿素浓缩液,将步骤3)制备好的ZnO电极放入装有叶绿素浓缩液的烧杯中浸泡,浸泡后取出并用乙醇清洗以去除黏附物,干燥后得到天然叶绿素增敏ZnO纳米材料CHL-ZnO,将天然叶绿素增敏ZnO纳米材料上的多余ZnO刮掉后,即得CHL-ZnO电极;5) 将甲胎蛋白抗体Ab引入到步骤4)获得的CHL-ZnO电极上:取10 μ L 100 μ g/mL 甲胎蛋白抗体Ab滴加到CHL-ZnO电极上,并于37 °C 孵化,用纯净水漂洗数次后获得Ab/CHL-ZnO电极;6) 取15 μ L 1 wt % 牛血清蛋白BSA封闭液滴加至步骤5)制得的Ab/CHL-ZnO电极上,并于37 °C 孵化以封闭非特异性结合位点,纯净水漂洗后,得到的电极BSA/Ab/CHL-ZnO作为光电化学免疫传感器。

一种天然叶绿素敏化氧化锌基光电化学免疫传感器的构建和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种天然叶绿素敏化氧化锌基光电化学免疫传感器,将含有甲胎蛋白抗原的样品固定至制备好的BSA/Ab/CHL-ZnO电极上,检测其光电流变化值,带入所得方程,从而达到检测甲胎蛋白浓度的目的,属于分析化学和纳米材料领域。

背景技术

[0002] 光电化学型免疫传感器是一种利用光生电流或光生电压相关的待测物质浓度变化进行分析的新技术。其中,氧化锌作为一种非常重要的无机功能材料,具有良好的光电性能,以及无毒、化学稳定、生物相容性好等优点,可以广泛应用于光电化学生物传感技术。纯的氧化锌由于本身禁带宽度大,只能吸收紫外光,而天然色素对可见光具有良好的吸收,且生物相容性好,容易提取。

[0003] 近年来,纳米材料在光电化学生物传感器领域的研究也越来越多。纳米材料具备优异的物理、化学、电催化等性能,基于纳米材料的光电化学生物传感器体现出体积更小、速度更快、检测灵敏度更高等优异性能。而氧化锌作为一个重要的半导体陶瓷材料,具有许多有用的特性,如压电性、光吸收和发射、高电压-电流的非线性、对气体和化学制剂敏感和良好的催化活性。纯的氧化锌只能吸收紫外线,对可见光不灵敏,需使用增敏剂增敏。目前主要采用无机物(如贵金属、量子点)和有机物(大环化合物)对ZnO表面进行修饰,增强对可见光的吸收。但存在成本高、工艺复杂、生物相容性差等缺点,特别是有机物的合成过程往往会造成环境污染。而天然色素来源丰富,生物相容性好,容易提取,绿色环保。利用天然色素敏化作用不但可使ZnO受可见光照射而产生光电流,而且可使半导体电极自身不受激发,因而可避免因腐蚀、溶解而引起的消耗。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种基于天然叶绿素敏化氧化锌基光电化学免疫传感器,以及用于甲胎蛋白检测的方法。

[0005] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案:一种天然叶绿素敏化氧化锌基光电化学免疫传感器的构建方法,包括如下步骤:

[0006] 1)对ITO玻璃进行清洗,然后采用旋涂法,将乙酸锌溶于乙醇形成溶液,将乙酸锌乙醇溶液平铺在干燥的ITO玻璃上,煅烧后在ITO表面形成种子层;2)配制由六水合硝酸锌,六次甲基四胺,聚乙烯亚胺组成的水溶液,然后加入氨水,并用纯净水制成ZnO纳米阵列结构生长液;3)将上述步骤1)制得的表面负载有ZnO种子层的ITO玻璃浸入到步骤2)制得的ZnO纳米阵列生长液中,在85℃下反应4h,并在450℃下煅烧后制得ZnO纳米材料,将ZnO纳米材料上的多余ZnO刮去后即得ZnO电极;4)采摘并清洗绿黄葛树叶,除去叶脉,风干,将其剪碎后加入二氧化硅研磨以防止叶绿素被破坏,加入乙醇浸泡,过滤即得叶绿素提取液,浓缩叶绿素获得叶绿素浓缩液,将步骤3)制备好的ZnO电极放入装有叶绿素浓缩液的烧杯

中浸泡,浸泡后取出并用乙醇清洗以去除黏附物,干燥后得到天然叶绿素增敏ZnO纳米材料(CHL-ZnO),将天然叶绿素增敏ZnO纳米材料上的多余ZnO刮掉后,即得CHL-ZnO电极;5)将甲胎蛋白抗体(Ab)引入到步骤4)获得的CHL-ZnO电极上:取10 μL 100 $\mu\text{g/mL}$ 甲胎蛋白抗体(Ab)滴加到CHL-ZnO电极上,并于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵化,用纯净水漂洗数次后获得Ab/CHL-ZnO电极;6)取15 μL 1 wt % 牛血清蛋白(BSA)封闭液滴加至步骤5)制得的Ab/CHL-ZnO电极上,并于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵化以封闭非特异性结合位点,纯净水漂洗后,得到的电极(BSA/Ab/CHL-ZnO)作为光电化学免疫传感器。

[0007] 本发明一种天然叶绿素敏化氧化锌基光电化学免疫传感器的应用,包括如下步骤:1)将制好的氧化锌阵列置于提取的天然叶绿素溶液中浸泡,天然叶绿素与ZnO表面共价结合;2)加入甲胎蛋白抗体(Ab)并固定至电极表面,用牛血清蛋白(BSA)封闭;最后,引入不同浓度的甲胎蛋白,通过检测抗原抗体特异性反应引起的光电流信号变化,以实现测定甲胎蛋白的目的。

[0008] 本发明所述的天然叶绿素敏化氧化锌基光电化学免疫传感器的检测甲胎蛋白抗原的方法,包括如下步骤:将0.005 ng/mL ~ 50 ng/mL 不同浓度的甲胎蛋白抗原(Ag)固定至BSA/Ab/CHL-ZnO电极上,检测其光电流变化值,随着甲胎蛋白抗原浓度增加,光电流信号越弱,在0.005 ng/mL ~ 50 ng/mL 浓度范围内,光电流信号与甲胎蛋白抗原(Ag)浓度对数呈线性关系。

[0009] 具体地说,本发明采用以下技术方案:所述的一种天然叶绿素敏化氧化锌基光电化学免疫传感器,其特征是以天然叶绿素作为敏化剂,增强氧化锌在可见光照射下的光电流响应,以引入甲胎蛋白抗原抗体的天然叶绿素敏化氧化锌(CHL-ZnO)电极作为工作电极进行光电流检测。

[0010] 上述CHL-ZnO 材料由以下方法制备获得:清洗导电玻璃(ITO)电极,并在导电面旋涂5 mM乙酸锌生长溶液,300 $^{\circ}\text{C}$ 煅烧20 min,置于含有15 mM六亚甲基四胺、30 mM六水合硝酸锌、10 mM聚乙烯亚胺和0.5 M氨水的水溶液85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴4 h,取出干燥后450 $^{\circ}\text{C}$ 煅烧 30 min,得到ZnO纳米材料;将氧化锌纳米材料上的ZnO刮去1*0.5cm,即得ZnO电极。用200 mL乙醇浸泡绿黄葛树叶4 h,得到天然色素提取液,过滤后浓缩4倍,并将干燥好的ZnO纳米材料置于提取液中浸泡16 h,用乙醇洗去表面未附上的色素,取出干燥后得到天然叶绿素敏化ZnO纳米材料;将天然叶绿素增敏ZnO纳米材料上的ZnO刮去1*0.5cm,即得CHL-ZnO电极。

[0011] 一种基于天然叶绿素敏化氧化锌基光电化学免疫传感器检测甲胎蛋白的方法,包括如下步骤:1) ITO电极放入清洁剂、去离子水、丙酮、乙醇等超声清洗后,将乙酸锌生长液平铺于ITO电极上,经过煅烧和水浴得到ZnO纳米材料;将ZnO纳米材料上的ZnO刮去1*0.5cm,即得ZnO电极。2)提取绿黄葛树叶的天然叶绿素(CHL),将ZnO纳米材料放入天然叶绿素溶液中浸泡,得到天然叶绿素敏化ZnO纳米材料(CHL-ZnO);将天然叶绿素增敏ZnO纳米材料上的ZnO刮去1*0.5cm,即得CHL-ZnO电极。并在上面引入甲胎蛋白抗体,构建成氧化锌基光电化学生物传感器;3)采用三电极体系进行测试,以CHL-ZnO电极为工作电极,铂丝电极为对电极,饱和Ag/AgCl为参比电极,将上述电极插入0.1M 磷酸盐缓冲溶液中,以氙灯光源模拟可见光照射,检测光致电流信号;4)以光致电流信号对甲胎蛋白浓度作图得到标准曲线,光电流信号与甲胎蛋白抗原浓度对数在0.005 ng/mL ~ 50 ng/mL 范围内呈线性关系。

[0012] 所述缓冲溶液为磷酸盐缓冲液,在缓冲溶液所添加的电解质为NaCl,电解质浓度

为0.1 M。

[0013] 本发明采用的具体技术方案如下：

[0014] (一)天然叶绿素敏化ZnO的制备

[0015] 依次采用清洁剂、去离子水、丙酮、乙醇等对ITO玻璃进行超声清洗,然后采用旋涂法,将5 nM 乙酸锌溶液平铺在干燥的ITO上,300 °C煅烧20 min,在ITO表面形成种子层。再配制含有30 mM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 、15 mM 六亚甲基四胺、10 mM聚乙烯亚胺以及0.5 M $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 的ZnO生长液。将上述负载有ZnO种子层的ITO浸入到生长液中,在85 °C下反应4 h,并在450 °C下煅烧30 min,制得ZnO纳米材料;将ZnO纳米材料上的ZnO刮去1*0.5cm,即得ZnO电极。

[0016] 采摘并清洗绿黄葛树叶,除去叶脉,风干,称取11 g剪碎后加入二氧化硅研磨以防止叶绿素被破坏,加入乙醇200 mL浸泡4 h,过滤提纯即得叶绿素提取液,将制备好的ZnO放入烧杯浸泡16 h,用乙醇清洗去除物理黏附,取出干燥后得到天然叶绿素增敏ZnO电极(CHL-ZnO电极);将天然叶绿素增敏ZnO纳米材料上的ZnO刮去1*0.5cm,即得CHL-ZnO电极。

[0017] (二)免疫传感器的制备

[0018] 首先,将甲胎蛋白抗体引入到获得的CHL-ZnO电极上。取10 μL 100 $\mu\text{g/mL}$ 甲胎蛋白抗体滴加到CHL-ZnO复合物上,并于37 °C 孵化2 h,用纯净水漂洗数次后获得Ab/CHL-ZnO电极。接着,取15 μL 1 wt % BSA封闭液滴加至Ab/CHL-ZnO电极上,并于37 °C 孵化30 min以封闭非特异性结合位点。纯净水漂洗后,得到的电极(记作BSA/Ab/CHL-ZnO)作为光电化学免疫传感器。取10 μL 一定浓度(0.005 ng/mL ~ 50 ng/mL)的甲胎蛋白抗原溶液滴加至所制得的光电化学免疫传感器,37 °C 孵化1 h。光电流检测前,将最后得到的电极(记作Ag/BSA/Ab/CHL-ZnO)用纯净水漂洗数遍。

[0019] (三)天然叶绿素增敏传感器光电流信号的产生和检测

[0020] 采用传统的三电极系统,室温条件下进行实验,其中铂丝是作为对电极,饱和的氯化银电极作为参比电极,CHL-ZnO作为工作电极。将修饰的电极置于0.1 M 磷酸盐缓冲溶液中,外加电压0 V,在模拟自然光下进行光电化学检测。

[0021] (四)甲胎蛋白的测定

[0022] 将甲胎蛋白抗体和不同浓度的抗原引入CHL-ZnO电极上,孵化完成后按照步骤(三)所述方法获得与浓度相应的光电流强度,绘制工作曲线。

[0023] 本发明的有益效果

[0024] (1)本发明以天然叶绿素作为敏化剂,利用其良好的光电响应性能,所构建的氧化锌基光电化学免疫传感灵敏度高,重现性好;

[0025] (2)本发明所得到的天然叶绿素敏化剂制备方法绿色环保,操作简便快捷,制备的天然叶绿素敏化氧化锌基光电化学免疫传感器生物相容性好,成本低,节能环保。因此,在光电生物传感技术和生物医学领域具有较好的应用前景。

附图说明

[0026] 图1是本发明的光电化学免疫传感器的原理示意图。

[0027] 图2 是ZnO和CHL -ZnO的紫外可见吸收图谱。

[0028] 图3是 ZnO和CHL -ZnO的红外图谱。

[0029] 图4是 不同电极的电化学阻抗谱图,其中a为ZnO电极,b为CHL-ZnO电极,c为Ab/

CHL-ZnO电极,d为BSA/Ab/CHL-ZnO电极,e为5 ng/mL Ag/BSA/Ab/CHL-ZnO电极。

[0030] 图5是甲胎蛋白抗原浓度(a~e = 0.005 ng/mL ~ 50 ng/mL)的光电流变化图。

[0031] 图6是甲胎蛋白抗原光电流信号与浓度的线性图。

具体实施方式

[0032] 下面结合附图和实施例对本发明进行详细描述:

[0033] 发明原理介绍:

[0034] 天然叶绿素敏化氧化锌基光电化学免疫传感器的原理如图1所示,图中表明ZnO电极的修饰过程(图1中的a)和光电化学检测基本原理(图1中的b)。如图1中的a所示,首先,将制好的氧化锌阵列置于提取的天然叶绿素溶液中浸泡16 h,天然叶绿素与ZnO表面共价结合。其次,加入甲胎蛋白抗体(Ab)并固定至电极表面,用牛血清蛋白(BSA)封闭;最后,引入不同浓度的甲胎蛋白,通过检测抗原抗体特异性反应引起的光电流信号变化,以实现测定甲胎蛋白的目的。在图1中的b中,天然叶绿素不仅作为载体在免疫分析中为甲胎蛋白抗体提供生物相容性环境,而且在可见光照射条件下作为光敏物质提升光电化学性能,增强光电流。具体而言,在模拟太阳光照射下,天然叶绿素吸收太阳能,产生光生电子,并且由天然叶绿素直接传递到ZnO的导带,从而增强光电流。更重要的是,天然叶绿素出色的传导性使界面电子转移得到改善,光电流效能更是显著提高。

[0035] 本发明中的方法,具体包括以下步骤:

[0036] (一)天然叶绿素敏化ZnO复合物的制备

[0037] 1)依次采用清洁剂、去离子水、丙酮、乙醇等对ITO玻璃(购自广东佛山美晶源责任有限公司)进行超声清洗,然后采用旋涂法,将0.0278 g乙酸锌溶于25 mL乙醇(购自国药集团化学试剂有限公司)溶液平铺在干燥的ITO上,300 °C煅烧20 min,在ITO表面形成种子层。2)再配制由0.9177 g六水合硝酸锌(购自国药集团化学试剂有限公司),0.1774 g 六次甲基四胺(HMTA,购自国药集团化学试剂有限公司),0.3001 g 聚乙烯亚胺(PEI,购自国药集团化学试剂有限公司)溶于50 mL纯净水,加入2.548 mL氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$,购自国药集团化学试剂有限公司)后,再加入50 mL纯净水制成的ZnO纳米阵列结构生长液。3)将上述步骤1)制得的表面负载有ZnO种子层的ITO浸入到步骤2)制得的ZnO纳米阵列生长液中,在85 °C下反应4 h,并在450 °C下煅烧30 min,制得ZnO纳米材料。将ZnO纳米材料上的ZnO刮去1*0.5cm,即得ZnO电极。

[0038] 4)采摘并清洗绿黄葛树叶,除去叶脉,风干,称取11 g剪碎后加入二氧化硅(购自国药集团化学试剂有限公司)研磨以防止叶绿素被破坏,加入乙醇200 mL浸泡4 h,过滤即得叶绿素提取液,浓缩叶绿素4倍,将步骤3)制备好的ZnO电极放入烧杯浸泡16 h,用乙醇清洗去除物理黏附,取出干燥后得到天然叶绿素增敏ZnO纳米材料(CHL-ZnO)。将天然叶绿素增敏ZnO纳米材料上的ZnO刮去1*0.5cm,即得CHL-ZnO电极。

[0039] (二)免疫传感器的制备

[0040] 1)首先,将甲胎蛋白抗体(Ab,购自南京三辰生物科技责任有限公司)引入到步骤(一)获得的CHL-ZnO电极上:取10 μL 100 $\mu\text{g/mL}$ 甲胎蛋白抗体(Ab)滴加到CHL-ZnO电极上,并于37 °C 孵化2 h,用纯净水漂洗数次后获得Ab/CHL-ZnO电极。2)接着,取15 μL 1 wt % 牛血清蛋白(BSA,购自生工生物工程(上海)股份有限公司)封闭液滴加至步骤1)制得的

Ab/CHL-ZnO电极上,并于37 °C 孵化30 min以封闭非特异性结合位点。纯净水漂洗后,得到的电极(记作BSA/Ab/CHL-ZnO)作为光电化学免疫传感器。3)取10 μ L一定浓度(0.005 ng/mL ~ 50 ng/mL)的甲胎蛋白抗原(Ag,购自南京三辰生物科技责任有限公司)溶液加入步骤2)制得的光电化学免疫传感器(BSA/Ab/CHL-ZnO),37 °C 孵化1 h,获得电极(Ag/BSA/Ab/CHL-ZnO),将最后得到的电极(Ag/BSA/Ab/CHL-ZnO)用纯净水漂洗数遍,待用。

[0041] (三)天然叶绿素增敏传感器光电流信号的产生和检测

[0042] 采用传统的三电极系统,室温条件下进行实验,其中铂丝作为对电极,饱和的氯化银电极作为参比电极,步骤(一)获得的CHL-ZnO电极作为工作电极。将此CHL-ZnO电极置于0.1 M 磷酸盐缓冲溶液中,外加电压0 V,在模拟自然光下进行光电化学检测。

[0043] (四)甲胎蛋白的测定

[0044] 将甲胎蛋白抗体(Ab)和不同浓度的甲胎蛋白抗原(Ag)引入CHL-ZnO电极上,孵化完成后按照步骤(三)所述方法获得与浓度相应的光电流强度,绘制工作曲线。

[0045] 上述基于天然叶绿素敏化氧化锌基光电化学免疫传感器测定甲胎蛋白的技术,具体检测方法为:将含有甲胎蛋白抗原的样品滴加到免疫传感器上,检测光电流信号变化值。

[0046] (五)测定紫外可见吸收光谱

[0047] 将步骤(一)所得ZnO电极上的ZnO(ZnO)和天然叶绿素增敏ZnO电极上的ZnO(CHL-ZnO)从导电玻璃上刮下来,分散到1 mL水中,混合均匀后,迅速测其紫外可见吸收光谱图,见图2,图谱表明天然叶绿素可以有效的增强ZnO对可见光的吸收。

[0048] (六)测定红外图谱

[0049] 将步骤(一)所得ZnO电极上的ZnO(ZnO)和天然叶绿素增敏ZnO电极上的ZnO(CHL-ZnO)从导电玻璃上刮下来,取适量样加上研细的KBr研磨压片,进行分析。图3的红外图谱可以明显地表征,叶绿素与氧化锌表面形成共价结合,天然叶绿素增敏传感器的构建成功。

[0050] (七)测定电化学交流阻抗图谱

[0051] 在CHI660D电化学工作站上采用交流阻抗法进行样品阻抗的测量,采用饱和Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝电极作为对电极,步骤(一)所得的ZnO电极、CHL-ZnO电极、步骤(二)所得的Ab/CHL-ZnO电极、BSA/Ab/CHL-ZnO电极以及5 ng/mL Ag/BSA/Ab/CHL-ZnO电极分别作为工作电极,5mM的 $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 溶液作为电解池溶液,测量样品的阻抗。图4的电化学阻抗谱是说明修饰过程中阻抗变化信息以及电极特点的有效手段,随着叶绿素、抗体、牛血清蛋白、抗原的加入,阻抗值逐渐增加,也可以表明天然叶绿素增敏传感器的传导界面已构建完成。

[0052] 本发明运用光电流检测技术,将不同浓度(0.005 ng/mL ~ 50 ng/mL)的甲胎蛋白抗原(Ag)固定至BSA/Ab/CHL-ZnO电极上,检测其光电流变化值。实验结果见附图5和图6,由图可知,一定范围内,随着甲胎蛋白抗原浓度增加,光电流信号越弱。在0.005 ng/mL ~ 50 ng/mL浓度(a~e)范围内,光电流信号与甲胎蛋白抗原(Ag)浓度对数呈线性关系。

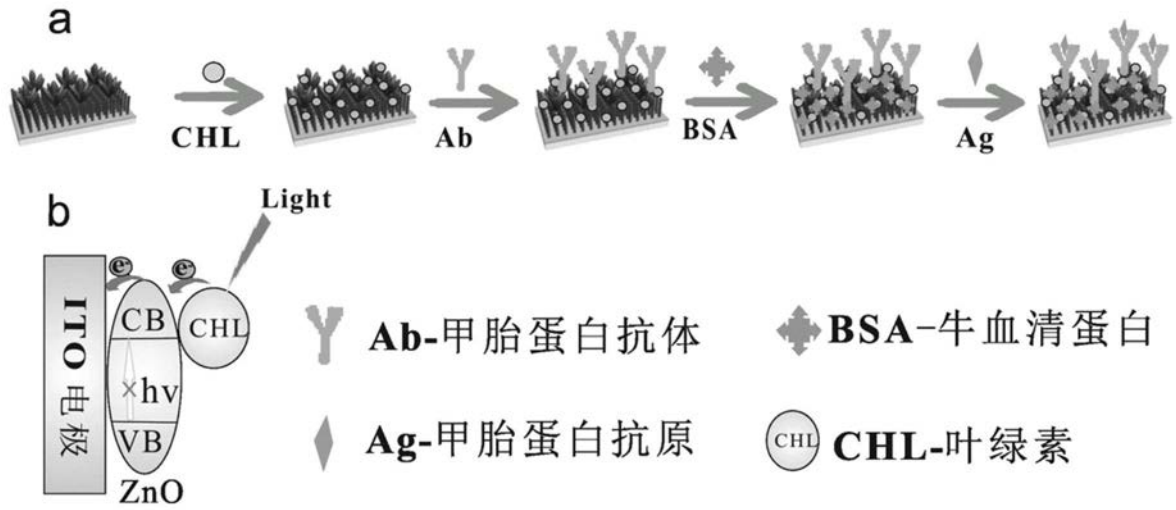


图1

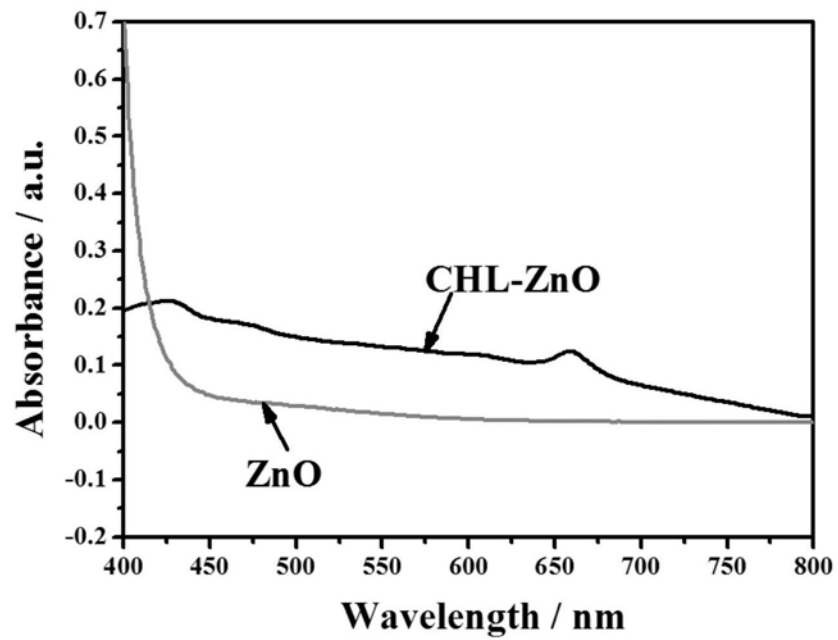


图2

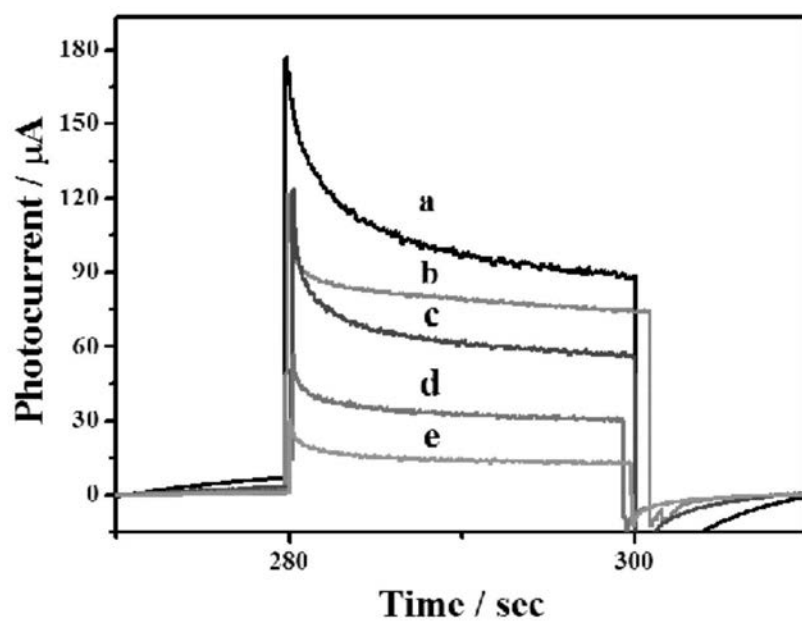


图5

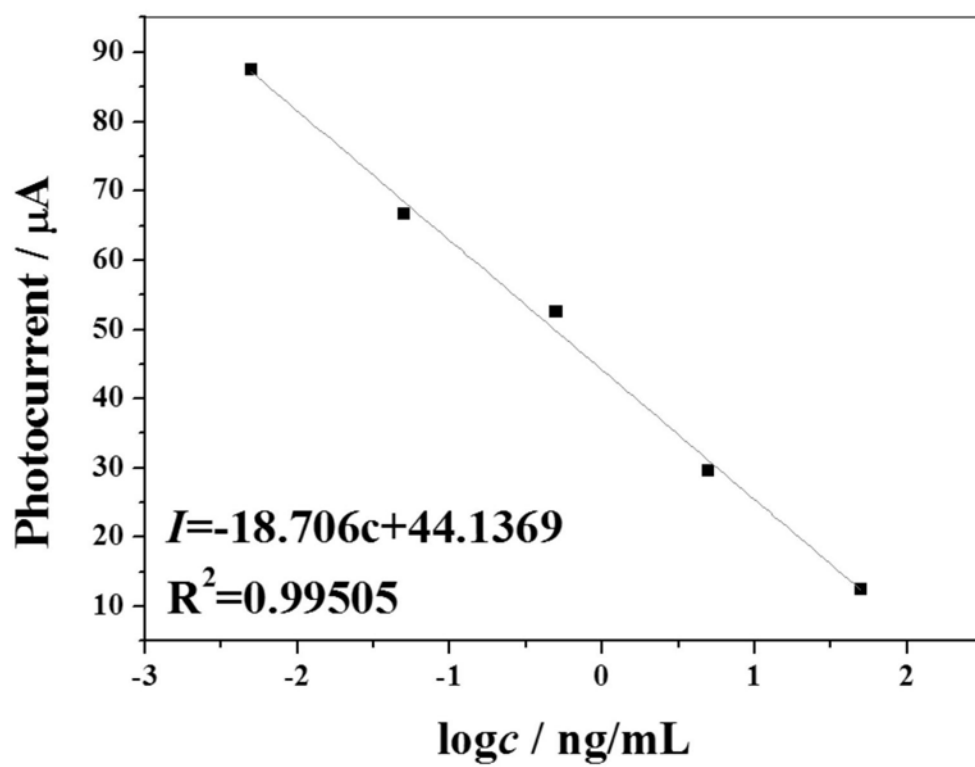


图6