



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109444403 B

(45) 授权公告日 2021.07.06

(21) 申请号 201811578268.8

(22) 申请日 2018.12.24

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109444403 A

(43) 申请公布日 2019.03.08

(73) 专利权人 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 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 高强

(51) Int. Cl.
G01N 33/531 (2006.01) (续)

(56) 对比文件
US 2014072963 A1, 2014.03.13
US 2006035248 A1, 2006.02.16
CN 104865242 A, 2015.08.26
CN 108918617 A, 2018.11.30
CN 108918856 A, 2018.11.30
CN 107543852 A, 2018.01.05
CN 107290412 A, 2017.10.24
CN 106053823 A, 2016.10.26
Guanhui Zhao等. Quenching

Electrochemiluminescence Immunosensor
Based on Resonance Energy Transfer
between Ruthenium (II) Complex

Incorporated in the UiO-67 Metal-Organic
Framework and Gold Nanoparticles for
Insulin Detection.《ACS Appl. Mater.
Interfaces》.2018,第10卷第22932-22938页.

Bingxin Wang等. An ECL biosensor for
sensitive detection of concanavalin A
based on the ECL quenching of Ru complex
by MoS₂nanoflower.《Sensors and Actuators
B: Chemical》.2017,第245卷第247-255页.

Zhou Jingrong等. A chemiluminescence
metalloimmunoassay for sensitive
detection of alpha-fetoprotein in human
serum using Fe-MIL-88B-NH₂ as a label.
《APPLIED SPECTROSCOPY REVIEWS》.2016,第51
卷(第7-9期),第517-526页.

Xu Zhao et.al. Electrical and
structural engineering of cobalt selenide
nanosheets by Mn modulation for efficient
oxygen evolution.《Applied Catalysis B:
Environmental》.2018,第236卷第569-575页.

(续)

审查员 毛景秀

权利要求书2页 说明书8页

(54) 发明名称
一种基于Ru (bpy)₃²⁺/Zn-oxalate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)₃²⁺/Zn-oxalate MOFs的双猝灭型电致化学
发光免疫传感器的制备方法,属于电致化学发
光传感器领域,首次以纳米复合材料Ru (bpy)₃²⁺/Zn-

oxalate MOFs为电致化学发光信号源,利用另一种
纳米多孔材料Au@NiFe MOFs作为双重猝灭剂构
建夹心型免疫传感器,根据不同浓度β-淀粉样
蛋白引起的电致化学发光信号强度的不同,实现
对β-淀粉样蛋白的检测。

CN 109444403 B

[转续页]

[接上页]

(51) Int.Cl.

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 27/30 (2006.01)

(56) 对比文件

Wu Tingting等.A competitive photoelectrochemical immunosensor for the detection of diethylstilbestrol based on an Au/UiO-66 (NH₂)/CdS matrix and a direct Z-scheme Melem/CdTe heterojunction as

labels.《BIOSENSORS & BIOELECTRONICS》.2018,第117卷第575-582页.

Meng-Nan Ma等.New Signal Amplification Strategy Using Semicarbazide as Coreaction Accelerator for Highly Sensitive Electrochemiluminescent Aptasensor Construction.《Analytical chemistry》.2015,第87卷第11389-11397页.

1. 一种基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 的双猝灭夹心型电致化学发光免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤如下:

(1) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 的制备

将10 mg ~ 20 mg三联吡啶氯化钌六水合物和80 mg ~ 120 mg硝酸锌同时加入到45 mL N, N-二甲基甲酰胺和超纯水1 ~ 3:1的混合液中,继续加入200 μL ~ 400 μL 、0.75 mol L^{-1} 草酸,2 mL ~ 4 mL、3 mol L^{-1} 盐酸,室温超声5 min,将混合物转移至圆底烧瓶中,60 $^{\circ}\text{C}$ 回流12 h ~ 36 h,离心分离悬浮物,分别用N, N-二甲基甲酰胺和超纯水各洗涤三次得到橙红色沉淀,35 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥,得到 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 复合物;

(2) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 标记 β -淀粉样蛋白第一抗体孵化物溶液的制备

将10 mmol ~ 30 mmol EDC和5 mmol ~ 15 mmol NHS加入到1 mL ~ 3 mL、1 mg mL^{-1} 的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 溶液4 $^{\circ}\text{C}$ 震荡反应2 h以活化 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 表面的羧基基团,洗去未反应交联剂后加入400 μL ~ 600 μL 、1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的 β -淀粉样蛋白第一抗体溶液继续4 $^{\circ}\text{C}$ 震荡反应10 h ~ 14 h使得第一抗体通过酰胺反应结合到 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 的表面,离心分离 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 标记 β -淀粉样蛋白第一抗体孵化物,用pH 7.5的PBS溶液洗去未反应的第一抗体后分散于pH = 7.5的PBS缓冲溶液中,制得0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 标记 β -淀粉样蛋白第一抗体溶液,储存于4 $^{\circ}\text{C}$ 中备用;

(3) 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 $^{\circ}\text{C}$ 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二水合柠檬酸三钠,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 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥12 h,得到紫黑色固体 Au@NiFe MOFs ;

(4) Au@NiFe MOFs 标记 β -淀粉样蛋白第二抗体孵化物溶液的制备

将6 mg ~ 10 mg的 Au@NiFe MOFs 分散于1 mL pH = 7.5的PBS中,加入4 μL ~ 6 μL 、6 mg/mL的第二抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h ~ 24 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心分离洗去未结合第二抗体,然后加入1 mL 0.1%的牛血清白蛋白溶液4 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养箱中振荡孵化2 h ~ 4 h封闭 Au@NiFe MOFs 表面的非特异性活性位点,4 $^{\circ}\text{C}$ 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 Au@NiFe MOFs 标记 β -淀粉样蛋白第二抗体溶液,储存于4 $^{\circ}\text{C}$ 中备用;

(5) 分别用1.0 μm 、0.3 μm 、0.05 μm 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;

(6) 将6 μL 、0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 标记 β -淀粉样蛋白第一抗体溶液滴涂至电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干;

(7) 将2 μL ~ 4 μL 体积分数为0.5%的牛血清白蛋白溶液于电极表面,以封闭非特异性

活性位点,用pH = 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 °C晾干;

(8)将6 μL 、一定浓度的 β -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;

(9)将6 μL 、0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL的Au@NiFe MOFs标记 β -淀粉样蛋白第二抗体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 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 的双猝灭夹心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 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 的双猝灭夹心型电致化学发光免疫传感器用于 β -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 β -淀粉样蛋白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 β -淀粉样蛋白溶液进行测定。

一种基于Ru (bpy)₃²⁺/Zn-oxalate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Ru (bpy)₃²⁺/Zn-oxalate MOFs的双猝灭夹心型电致化学发光免疫传感器的制备方法。具体涉及发光材料Ru (bpy)₃²⁺/Zn-oxalate MOFs和纳米多孔材料Au@NiFeMOFs的制备及其在电致化学发光传感器中的应用。Au@NiFeMOFs具有高的孔隙率、大的比表面积和良好的导电性被用来作为双重猝灭剂标记抗体从而达到对化学发光信号双重猝灭的作用。本发明属于电致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β-淀粉样蛋白(AB)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患者大量的科学研究,AB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AB检测方法有着重要意义。电致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双猝灭夹心型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AB的检测。

[0003] 在本发明中,首次使用一种新型多孔材料Ru (bpy)₃²⁺/Zn-oxalate MOFs作为电致化学发光材料并引入到电致化学发光领域。Zn-oxalate 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Ru (bpy)₃²⁺阳离子,进而增强传感器的发光强度来提高其灵敏度。且使用一种新型纳米多孔材料Au@NiFe MOFs作为猝灭剂并引入到电致化学发光领域。其中Au纳米粒子和NiFe MOFs都可以猝灭Ru (bpy)₃²⁺/Zn-oxalate MOFs的发光效应,达到双重猝灭的效果。且Au@NiFe MOFs因为其多孔性具有较大的比表面积可以负载更多的AB。如上所述都可以大大增强传感器的灵敏度。

[0004] 在此夹心型免疫传感器中,随着AB浓度的增大,结合到电极传感界面的双重猝灭剂增多,对Ru (bpy)₃²⁺/Zn-oxalate MOFs发光效率的猝灭强度增大,导致化学发光信号减小。此外,本发明设计的双猝灭夹心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Ru (bpy)₃²⁺/Zn-oxalate MOFs构建双猝灭型免疫传感器来检测AB的方法还未见报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种更简单可靠的基于Ru (bpy)₃²⁺/Zn-oxalate 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AB的快速、灵敏、特异、高效检测。

[0006] 本发明的技术方案如下:

[0007] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

[0008] 1. Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs标记β-淀粉样蛋白第一抗体孵化物溶液、Au@NiFe MOFs标记β-淀粉样蛋白第二抗体孵化物溶液的制备

[0009] (1) Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs的制备

[0010] 将10 mg ~ 20 mg三联吡啶氯化钌六水合物和80 mg ~ 120 mg硝酸锌同时加入到45 mL N, N-二甲基甲酰胺和超纯水1 ~ 3:1的混合液中,继续加入200 μL ~ 400 μL、0.75 mol L⁻¹草酸,2 mL ~ 4 mL、3 mol L⁻¹盐酸,室温超声5 min,将混合物转移至圆底烧瓶中,60 °C回流12 h ~ 36 h,离心分离悬浮物,分别用N, N-二甲基甲酰胺和超纯水各洗涤三次得到橙红色沉淀,35 °C真空干燥,得到Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs复合物;

[0011] (2) Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs标记β-淀粉样蛋白第一抗体孵化物溶液的制备

[0012] 将10 mmol ~ 30 mmol EDC和5 mmol ~ 15 mmol NHS加入到1 mL ~ 3 mL、1 mg mL⁻¹的Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs溶液4 °C震荡反应2 h以活化Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs表面的羧基基团,洗去未反应交联剂后加入400 μL ~ 600 μL、1 μg mL⁻¹的β-淀粉样蛋白第一抗体溶液继续4 °C震荡反应10 h ~ 14 h使得第一抗体通过酰胺反应结合到Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs的表面,离心分离Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs标记β-淀粉样蛋白第一抗体孵化物,用pH 7.5的PBS溶液洗去未反应的第一抗体后分散于pH = 7.5的PBS缓冲溶液中,制得0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL的Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs标记β-淀粉样蛋白第一抗体溶液,储存于4 °C中备用;

[0013] (3) Au@NiFe MOFs的制备

[0014] 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;

[0015] 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二水合柠檬酸三钠,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;

[0016] (4) Au@NiFe MOFs标记β-淀粉样蛋白第二抗体孵化物溶液的制备

[0017] 将6 mg ~ 10 mg的Au@NiFe MOFs分散于1 mL pH = 7.5的PBS中,加入4 μL ~ 6 μL、6 mg/mL的第二抗体,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第二抗体,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Au@NiFe MOFs标记β-淀粉样蛋白第二抗体溶液,储存于4 °C中备用。

[0018] 2. 一种Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs的双猝灭夹心型电致化学发光传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0019] (1) 分别用1.0 μm、0.3 μm、0.05 μm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;

[0020] (2)将6 μL 、0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 标记 β -淀粉样蛋白第一抗体溶液滴涂至电极表面,4 $^\circ\text{C}$ 晾干;

[0021] (3)将2 μL ~ 4 μL 体积分数为0.5%的牛血清白蛋白溶液于电极表面,以封闭非特异性活性位点,用 $\text{pH} = 7.5$ 的PBS缓冲溶液冲洗,4 $^\circ\text{C}$ 晾干;

[0022] (4)将6 μL 、一定浓度的 β -淀粉样蛋白溶液滴加到电极表面,用 $\text{pH} = 7.5$ 的PBS缓冲溶液冲洗,4 $^\circ\text{C}$ 晾干

[0023] (5)将6 μL 、0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL的 Au@NiFe MOFs 标记 β -淀粉样蛋白第二抗体溶液滴加到电极表面,4 $^\circ\text{C}$ 晾干,用 $\text{pH} = 7.5$ 的PBS缓冲溶液冲洗,制得一种基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 的双猝灭夹心型电致化学发光免疫传感器。

[0024] 3. 电致化学发光传感器用于待测样品的电化学发光检测:

[0025] (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;

[0026] (2)在10 mL、 $\text{pH} 6.0 \sim 8.5$ 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AB标准溶液产生的电化学发光信号强度,绘制工作曲线;

[0027] (3)将待测样品溶液代替标准溶液进行测定。

[0028] 本发明的有益成果

[0029] (1)首次以纳米材料 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 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 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 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;

[0030] (2)采用纳米多孔材料 Au@NiFe MOFs 作为猝灭剂对发光体的发光效应进行双重猝灭,其具有优良的生物相容性、较大的比表面积等优势,有效增加抗原的固载量,从而大大提高传感器的灵敏度

[0031] (3)本发明首次将 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 和 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AB的临床检测,具有操作简单,检测快速,信号线性范围宽(50 fg/mL ~ 50 ng/mL)和检出限低(10 fg/mL)的优点。

[0032] 实施例1

[0033] $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 标记 β -淀粉样蛋白第一抗体孵化物溶液、 Au@NiFe MOFs 标记 β -淀粉样蛋白第二抗体孵化物溶液的制备

[0034] (1) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 的制备

[0035] 将10 mg三联吡啶氯化钌六水合物和80 mg硝酸锌同时加入到45 mL N, N-二甲基甲酰胺和超纯水1:1的混合液中,继续加入200 μL 、0.75 mol L^{-1} 草酸(,2 mL、3 mol L^{-1} 盐酸,室温超声5 min,将混合物转移至圆底烧瓶中,60 $^\circ\text{C}$ 回流12 h,离心分离悬浮物,分别用N, N-二甲基甲酰胺和超纯水各洗涤三次得到橙红色沉淀,35 $^\circ\text{C}$ 真空干燥,得到 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 复合物;

[0036] (2) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 标记 β -淀粉样蛋白第一抗体孵化物溶液的制备

[0037] 将10 mmol EDC和5 mmol NHS加入到1 mL、 1 mg mL^{-1} 的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 溶液4 °C震荡反应2 h以活化 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 表面的羧基基团,洗去未反应交联剂后加入400 μL 、 $1 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ 的 β -淀粉样蛋白第一抗体溶液继续4 °C震荡反应10 h使得第一抗体通过酰胺反应结合到 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 的表面,离心分离 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 标记 β -淀粉样蛋白第一抗体孵化物,用pH 7.5的PBS溶液洗去未反应的第一抗体后分散于pH = 7.5的PBS缓冲溶液中,制得0.5 mg/mL的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 标记 β -淀粉样蛋白第一抗体溶液,储存于4 °C中备用;

[0038] (3) Au@NiFe MOFs的制备

[0039] 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;

[0040] 将30 mg纳米多孔NiFe MOFs分散在50 mL超纯水中,加入1 mL、1%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二水合柠檬酸三钠,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;

[0041] (4) Au@NiFe MOFs标记 β -淀粉样蛋白第二抗体孵化物溶液的制备

[0042] 将6 mg的Au@NiFe MOFs分散于1 mL pH = 7.5的PBS中,加入4 μL 、6 mg/mL的第二抗体,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第二抗体,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Au@NiFe MOFs标记 β -淀粉样蛋白第二抗体溶液,储存于4 °C中备用。

[0043] 实施例2

[0044] $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 标记 β -淀粉样蛋白第一抗体孵化物溶液、Au@NiFe MOFs标记 β -淀粉样蛋白第二抗体孵化物溶液的制备

[0045] (1) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 的制备

[0046] 将15 mg三联吡啶氯化钌六水合物和100 mg硝酸锌同时加入到45 mL N, N-二甲基甲酰胺和超纯水2:1的混合液中,继续加入300 μL 、 0.75 mol L^{-1} 草酸,3 mL、 3 mol L^{-1} 盐酸,室温超声5 min,将混合物转移至圆底烧瓶中,60 °C回流24 h,离心分离悬浮物,分别用N, N-二甲基甲酰胺和超纯水各洗涤三次得到橙红色沉淀,35 °C真空干燥,得到 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 复合物;

[0047] (2) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 标记 β -淀粉样蛋白第一抗体孵化物溶液的制备

[0048] 将20 mmol EDC和10 mmol NHS加入到2 mL、 1 mg mL^{-1} 的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 溶液4 °C震荡反应2 h以活化 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 表面的羧基基团,洗去未反应交联剂后加入500 μL 、 $1 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ 的 β -淀粉样蛋白第一抗体溶液继续4 °C震荡反应12 h使得第一抗体通过酰胺反应结合到 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 的表面,离心分离 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 标记 β -淀粉样蛋白第一抗体孵化物,用pH 7.5的PBS溶液洗去未反应的第一抗体后分散于pH = 7.5的PBS缓冲溶液中,制得2.5 mg/mL的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 标记 β -淀粉样蛋白第一抗体溶液,储存于4 °C中备用。

oxalated MOFs标记 β -淀粉样蛋白第一抗体溶液,储存于4 °C中备用;

[0049] (3) Au@NiFe MOFs的制备

[0050] 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;

[0051] 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二水合柠檬酸三钠,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;

[0052] (4) Au@NiFe MOFs标记 β -淀粉样蛋白第二抗体孵化物溶液的制备

[0053] 将8 mg的Au@NiFe MOFs分散于1 mL pH = 7.5的PBS中,加入5 μ L、6 mg/mL的第二抗体,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第二抗体,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Au@NiFe MOFs标记 β -淀粉样蛋白第二抗体溶液,储存于4 °C中备用。

[0054] 实施例3

[0055] Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs标记 β -淀粉样蛋白第一抗体孵化物溶液、Au@NiFe MOFs标记 β -淀粉样蛋白第二抗体孵化物溶液的制备

[0056] (1) Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs的制备

[0057] 将20 mg三联吡啶氯化钌六水合物和120 mg硝酸锌同时加入到45 mL N, N-二甲基甲酰胺和超纯水3:1的混合液中,继续加入400 μ L、0.75 mol L⁻¹草酸,4 mL、3 mol L⁻¹盐酸,室温超声5 min,将混合物转移至圆底烧瓶中,60 °C回流36 h,离心分离悬浮物,分别用N, N-二甲基甲酰胺和超纯水各洗涤三次得到橙红色沉淀,35 °C真空干燥,得到Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs复合物。

[0058] (2) Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs标记 β -淀粉样蛋白第一抗体孵化物溶液的制备

[0059] 将30 mmol EDC和15 mmol NHS加入到3 mL、1 mg mL⁻¹的Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs溶液4 °C震荡反应2 h以活化Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs表面的羧基基团,洗去未反应交联剂后加入600 μ L、1 μ g mL⁻¹的 β -淀粉样蛋白第一抗体溶液继续4 °C震荡反应14 h使得第一抗体通过酰胺反应结合到Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs的表面,离心分离Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs标记 β -淀粉样蛋白第一抗体孵化物,用pH 7.5的PBS溶液洗去未反应的第一抗体后分散于pH = 7.5的PBS缓冲溶液中,制得5 mg/mL的Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs标记 β -淀粉样蛋白第一抗体溶液,储存于4 °C中备用;

[0060] (3) Au@NiFe MOFs的制备

[0061] 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;

[0062] 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二水合柠檬酸三钠,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;

[0063] (4) Au@NiFe MOFs标记 β -淀粉样蛋白第二抗体孵化物溶液的制备

[0064] 将10 mg的Au@NiFe MOFs分散于1 mL pH = 7.5的PBS中,加入6 μ L、6 mg/mL的第二抗体,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第二抗体,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Au@NiFe MOFs表面的得非特异性活性位点,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Au@NiFe MOFs标记 β -淀粉样蛋白第二抗体溶液,储存于4 °C中备用。

[0065] 实施例4

[0066] 一种Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs的双猝灭夹心型电致化学发光传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0067] (1) 分别用1.0 μ m、0.3 μ m、0.05 μ m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;

[0068] (2) 将6 μ L、0.5 mg/mL Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs标记 β -淀粉样蛋白第一抗体溶液滴涂至电极表面,4 °C晾干;

[0069] (3) 将2 μ L体积分数为0.5%的牛血清白蛋白溶液于电极表面,以封闭非特异性活性位点,用pH = 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 °C晾干;

[0070] (4) 将6 μ L、一定浓度的 β -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

[0071] (5) 将6 μ L、0.5 mg/mL的Au@NiFe MOFs标记 β -淀粉样蛋白第二抗体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)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs的双猝灭夹心型电致化学发光免疫传感器。

[0072] 实施例5

[0073] 一种Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs的双猝灭夹心型电致化学发光传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0074] (1) 分别用1.0 μ m、0.3 μ m、0.05 μ m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;

[0075] (2) 将6 μ L、2.5 mg/mL Ru(bpy)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs标记 β -淀粉样蛋白第一抗体溶液滴涂至电极表面,4 °C晾干;

[0076] (3) 将3 μ L体积分数为0.5%的牛血清白蛋白溶液于电极表面,以封闭非特异性活性位点,用pH = 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 °C晾干;

[0077] (4) 将6 μ L、一定浓度的 β -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

[0078] (5) 将6 μ L、2.5 mg/mL的Au@NiFe MOFs标记 β -淀粉样蛋白第二抗体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)₃²⁺/Zn-oxalated MOFs的双猝灭夹心型电致化学发光免疫传感器。

[0079] 实施例6

[0080] 一种 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 的双猝灭夹心型电致化学发光传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0081] (1)分别用 $1.0\ \mu\text{m}$ 、 $0.3\ \mu\text{m}$ 、 $0.05\ \mu\text{m}$ 的氧化铝抛光粉对直径 $4\ \text{mm}$ 的玻碳电极做抛光处理,用超纯水冲洗干净;

[0082] (2)将 $6\ \mu\text{L}$ 、 $5\ \text{mg/mL}$ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 标记 β -淀粉样蛋白第一抗体溶液滴涂至电极表面, $4\ ^\circ\text{C}$ 晾干;

[0083] (3)将 $4\ \mu\text{L}$ 体积分数为 0.5% 的牛血清白蛋白溶液于电极表面,以封闭非特异性活性位点,用 $\text{pH} = 7.5$ 的PBS缓冲溶液冲洗, $4\ ^\circ\text{C}$ 晾干;

[0084] (4)将 $6\ \mu\text{L}$ 、一定浓度的 β -淀粉样蛋白溶液滴加到电极表面,用 $\text{pH} = 7.5$ 的PBS缓冲溶液冲洗, $4\ ^\circ\text{C}$ 晾干

[0085] (5)将 $6\ \mu\text{L}$ 、 $5\ \text{mg/mL}$ 的 Au@NiFe MOFs 标记 β -淀粉样蛋白第二抗体溶液滴加到电极表面, $4\ ^\circ\text{C}$ 晾干,用 $\text{pH} = 7.5$ 的PBS缓冲溶液冲洗,制得一种基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zn-oxalated MOFs}$ 的双猝灭夹心型电致化学发光免疫传感器。

[0086] 实施例7

[0087] 电致化学发光传感器用于 $\text{A}\beta$ 的电化学发光检测:

[0088] (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 $500\ \text{V}$,循环伏安扫描电位范围为 $0 \sim 1.4\ \text{V}$,扫描速率为 $0.1\ \text{V/s}$;

[0089] (2)在 $10\ \text{mL}$ 、 $\text{pH} 7.5$ 的含浓度为 $10\ \text{mmol/L}$ 三丙胺的PBS缓冲溶液中,通过电致化学发光系统,检测对不同浓度的 $\text{A}\beta$ 产生的电化学发光信号强度,绘制工作曲线;

[0090] (3)将待测样品溶液代替标准溶液进行测定。

[0091] 实施例8

[0092] 人体血清样品中 $\text{A}\beta$ 的检测

[0093] 人体血清样品 $1\ \text{mL}$,向其中加入不同浓度的 $\text{A}\beta$ 溶液,采用标准加入法测定样品中 $\text{A}\beta$ 的平均回收率,结果见表1.

[0094] 表1 样品中 $\text{A}\beta$ 的检测结果

[0095]

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

[0096] 表1检测结果可以看出,人体血清样品中AB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。