



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109490285 B

(45) 授权公告日 2021.04.09

(21) 申请号 201910005928.1

US 2015369806 A1, 2015.12.24

(22) 申请日 2019.01.04

CN 109115751 A, 2019.01.01

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 106526159 A, 2017.03.22

申请公布号 CN 109490285 A

CN 108548854 A, 2018.09.18

(43) 申请公布日 2019.03.19

(73) 专利权人 福建师范大学

Hongli Zheng等. A dual-amplified electrochemiluminescence immunosensor constructed on dual-roles of rutile TiO₂ mesocrystals for ultrasensitive zearalenone detection. 《Electrochimica Acta》. 2018, 第260卷第847-854页.

地址 350108 福建省福州市闽侯县上街镇
 学园路福建师大旗山校区福建师大科研处

(72) 发明人 戴宏 房丹丹 张书培 高利红
 郑祥钦 衣欢

Li, PL等. Combined detection of sialic acid and hydroxyproline in diagnosis of ovarian cancer and its comparison with human epididymis protein 4 and carbohydrate antigen 125. 《CLINICA CHIMICA ACTA》. 2015, 第439卷第148-153页.

(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

王岩等. 巯基苯硼酸和巯基丙酸共修饰的碳纳米管量子点电化学发光选择性检测多巴胺. 《第十三届全国电分析化学学术会议会议论文集摘要集中国化学会会议论文集》. 2017, 全文.

(51) Int. Cl.

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 27/30 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

审查员 顾竹君

(56) 对比文件

CN 108802391 A, 2018.11.13

权利要求书2页 说明书5页 附图2页

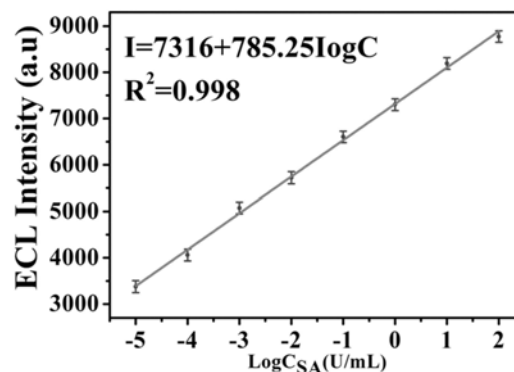
(54) 发明名称

基于Ru(bpy)₃²⁺和Bi纳米棒自增强体系的唾液酸可再生电致化学发光传感器

(57) 摘要

本发明公开一种基于Ru(bpy)₃²⁺和Bi纳米棒自增强体系的唾液酸可再生电致化学发光传感器,其特点为可大量合成的Bi NRs作为Ru(bpy)₃²⁺的共反应试剂,构成自增强Ru(bpy)₃²⁺-Bi纳米棒体系,将其固定在金红石二氧化钛介晶表面,成功制备一种高效的ECL探针用于SA检测。以C₆₀和二氧化钛类八面体作为传感平台,进一步增强ECL信号,提高检测灵敏度。利用4-巯基苯硼酸作为分子识别元件捕获目标物SA,在碱性条件下形成稳定的环酯,该结构在酸性条件发生解离,迫使SA与ECL探针脱离电极界面,但保留下来

的薄膜仍可再次孵育SA和ECL探针,恢复ECL信号。该传感器表现出高的灵敏性、稳定性和宽的线性范围。



1. 一种基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和Bi纳米棒自增强体系构建的唾液酸可再生电致化学发光免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 玻碳电极(GCE)首先在铺有氧化铝粉末的麂皮上机械打磨抛光,用二次水洗去表面残留粉末,再移入超声水浴中清洗,直至清洗干净,再依序用乙醇,稀酸和水彻底洗涤,得到表面洁净的玻碳电极;

(2) 取3 μL 浓度为5 mg/mL的 C_{60} 溶液于处理过的玻碳电极表面,红外灯下烘干,冷却至室温,得到 C_{60} 修饰电极;随后,向修饰电极上滴涂3 μL 5 mg/mL TiO_2 类八面体(TiO_2MCs),在红外灯下烘干,待冷却至室温后,得到 $\text{TiO}_2\text{MCs}/\text{C}_{60}$ 修饰电极;

(3) 滴加3 μL 4-MPBA于步骤(2)所制得的修饰电极界面,并在室温下孵育40 分钟,4-MPBA通过Ti-S键自组装到 $\text{TiO}_2\text{MCs}/\text{C}_{60}$ 修饰电极表面,得到4-MPBA/ $\text{TiO}_2\text{MCs}/\text{C}_{60}$ 修饰电极;

(4) 取体积比为1:1的5 mg/mL金红石 TiO_2 介晶(N-TiO_2)溶液与 1.0×10^{-2} M钌联吡啶($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)在室温下混合振荡6 小时,使 N-TiO_2 表面吸附足够的发光试剂 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$,离心、洗涤、再分散得到 $\text{N-TiO}_2@\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 复合物;向上述 $\text{N-TiO}_2@\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 复合物溶液中滴加100 μL 10 mM 的4-巯基苯甲酸(4-MBA)并在室温下搅拌1小时,接着,再向所获得的混合溶液中加入200 μL 5 mg/mL 的铋纳米棒Bi NRs,室温振荡40 分钟,离心、洗涤、再分散得到 $\text{N-TiO}_2@\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}@\text{Bi NRs}$ 复合物;随后,将浓度比为2:1的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)加入到上述获得的 $\text{N-TiO}_2@\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}@\text{Bi NRs}$ 复合物溶液中,室温孵育50分钟后,滴加100 μL 40 ng/mL 的唾液酸抗体(Ab)于所获得的混合溶液中,室温振荡40分钟 离心,洗涤,再分散制得 $\text{N-TiO}_2@\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}@\text{Bi NRs-Ab}$ 复合物;最后,向上述 $\text{N-TiO}_2@\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}@\text{Bi NRs-Ab}$ 复合物溶液中滴加50 μL 1 wt% BSA 封闭非特异性吸附位点,离心,洗涤,再分散,最终制得 $\text{N-TiO}_2@\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}@\text{Bi NRs-Ab-BSA}$ 复合物溶液作为电致化学发光探针,储存在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用;

(5) 将步骤(3)制得的4-MPBA/ $\text{TiO}_2\text{MCs}/\text{C}_{60}$ 修饰玻碳电极浸入到不同浓度的唾液酸(SA)标准溶液中并在室温下孵育40 分钟,随后,用去离子水冲洗电极表面,制得SA/4-MPBA/ $\text{TiO}_2\text{MCs}/\text{C}_{60}$ 修饰玻碳电极,然后滴加3 μL 步骤(4)制备的电致化学发光探针 $\text{N-TiO}_2@\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}@\text{Bi NRs-Ab-BSA}$ 复合物溶液于SA/4-MPBA/ $\text{TiO}_2\text{MCs}/\text{C}_{60}$ 修饰玻碳电极,室温下反应40 分钟,用去离子水冲洗电极表面,制得 $\text{N-TiO}_2@\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}@\text{Bi NRs-Ab-BSA}/\text{SA}/4\text{-MPBA}/\text{TiO}_2\text{MCs}/\text{C}_{60}$ 修饰玻碳电极;

(6) 将步骤(5)制得的 $\text{N-TiO}_2@\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}@\text{Bi NRs-Ab-BSA}/\text{SA}/4\text{-MPBA}/\text{TiO}_2\text{MCs}/\text{C}_{60}$ 修饰玻碳电极浸入到pH为6的PBS溶液中一段时间,SA与4-MPBA形成的硼酸酯键解离,致使SA及与SA连接的ECL探针脱离电极界面,得到pH 诱导的自清洁电极。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的金红石 TiO_2 介晶(N-TiO_2)由下述方法制备的:将4 g十二烷基苯磺酸钠(SDBS)溶解在200 mL 2.2 mol/L HNO_3 溶液中并在室温下搅拌几分钟,使溶液分散均匀;然后,向上述溶液中加入1 mL的异丙氧钛(TIP),在80 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌192 小时,所得混合溶液离心、洗涤后,在60 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥一夜;接着,再在400 $^{\circ}\text{C}$ 下煅烧60分钟,去除残留有机物,得到最终产物;

所述的 TiO_2 类八面体(TiO_2MCs)由下述方法制备的:首先,将200 mg锐钛矿型 TiO_2 超声分散在35 mL醋酸溶液中,其次,将所得均相溶液转移到100 mL四氟乙烯内衬不锈钢高压釜中,在200 $^{\circ}\text{C}$ 下反应48小时,所得产物经离心、洗涤后,在60 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥12小时,最后,再在

400 °C下煅烧30分钟,除去残余有机物,得到最终产物。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的铋纳米棒Bi NRs由下述方法制备的:将750 mg 的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和250 mg 的 $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ 通过温和加热溶解在25 mL甘油和12.5 mL乙醇的混合物中;然后,将125 mg 的硼氢化钠(NaBH_4)快速加入到上述混合物中,搅拌1分钟,得到黑色溶液,离心,分别用无水乙醇和去离子水冲洗三次后,将所得产物置于真空干燥箱中干燥4小时,得到最终产物。

4. 权利要求1-3任一所述的方法制备的一种基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和Bi纳米棒自增强体系构建的唾液酸可再生电致化学发光免疫传感器,其特征在于,包括 $\text{N-TiO}_2/\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Bi NRs-Ab-BSA/SA/4-MPBA/TiO}_2 \text{ MCs/C}_{60}$ 修饰玻碳电极。

5. 权利要求4所述的一种基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和Bi纳米棒自增强体系构建的唾液酸可再生电致化学发光免疫传感器,其特征在于,用于唾液酸SA检测,检测步骤如下:

(1) 使用电化学工作站采用三电极体系进行测定,以权利要求4所述的一种基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和Bi纳米棒自增强体系构建的唾液酸可再生电致化学发光免疫传感器为工作电极,Ag/AgCl为参比电极,铂丝电极为辅助电极,在0.1 mol/mL pH 8.0的 PBS缓冲溶液中进行测试;

(2) 采用电位范围0 -1.6 V,扫描速率0.15 V/s电位窗口,电致化学发光设备光电倍增管800 V对不同浓度的唾液酸SA标准溶液进行检测,通过电致化学发光设备采集1.1V的ECL信号强度,通过ECL信号强度与唾液酸SA标准溶液浓度之间的关系,绘制工作曲线;

(3) 待测样品溶液代替唾液酸SA标准溶液进行检测,检测的结果可通过工作曲线查得。

基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和Bi纳米棒自增强体系的唾液酸可再生电致化学发光传感器

技术领域

[0001] 本发明属于新型功能材料与生物传感检测技术领域,具体涉及一种基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和Bi纳米棒自增强体系构建的唾液酸可再生电致化学发光免疫传感器及其分析方法的制备和应用。

背景技术

[0002] 细胞表面唾液酸(SA)是临床公认的肿瘤标记物,研究表明SA的过表达与多种疾病有关,比如:心血管疾病、肺癌、白血病和结肠癌。目前,用于检测SA的分析方法有很多,例如,非酶电化学传感器、安培酶传感器、比色传感器等,但这些检测方法有一个共同的缺点,即免疫传感器在每次检测后难以实现再生,需要重新修饰免疫传感层才能进行测量,这使得检测过程变得繁琐、耗时长。因此,开发一种可再生的传感器来检测SA具有重要的意义。

[0003] 电致化学发光免疫传感器,凭借其优异的特性(灵敏度高、特异性好、操作简便、背景低),已经被广泛地应用于临床诊断、药物分析和环境监测等领域。本发明构建了一种硼酸亲和型可再生电致化学发光(ECL)免疫传感器检测SA。铋纳米棒(Bi NRs)首次作为钌联吡啶($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)的共反应试剂,构成自增强 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -Bi NRs体系,并以金红石 TiO_2 介晶(N- TiO_2)为载体,其大的比表面积和优异的介孔结构为 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和Bi NRs的负载提供大量的活性位点,最终制备出高效的ECL探针,实现对SA的高灵敏检测。4-巯基苯硼酸(4-MPBA)作为仿生识别分子,在碱性条件下与目标物SA通过共价作用形成稳定的环酯,将SA固定在修饰电极表面,修饰电极与标记有SA抗体的探针连接,可产生强烈的ECL信号。将孵育有ECL探针的修饰电极浸泡在PBS(pH 6)溶液中一段时间,硼酸酯解离,迫使SA与ECL探针脱离电极界面,ECL信号大幅度减低,而保留下的传感层仍可继续使用,再次与SA和ECL探针孵育,ECL信号恢复,得到一种可再生的ECL免疫传感器检测SA。基于N- TiO_2 和Bi NRs的信号放大作用,所构建的可再生ECL传感器表现出优异的ECL性能,包括良好的灵敏性、高的稳定性和宽的线性范围。

发明内容

[0004] 本发明的目的之一是提供一种以4-MPBA作为分子识别元件,构建硼酸亲和型可再生ECL传感器,并以金红石 TiO_2 介晶(N- TiO_2)为载体,负载自增强 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -Bi NRs体系,提供一种高效的ECL探针及其制备方法。

[0005] 本发明的目的之二是将该可再生电致化学发光免疫传感器应用于唾液酸(SA)的高灵敏检测。

[0006] 为实现发明目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 1. 基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和Bi纳米棒自增强体系构建的唾液酸可再生电致化学发光免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0008] (1) 玻碳电极(GCE)首先在铺有氧化铝粉末的麂皮上机械打磨抛光,用二次水洗去

表面残留粉末,再移入超声水浴中清洗,直至清洗干净,再依序用乙醇,稀酸和水彻底洗涤,得到表面洁净的玻璃碳电极;

[0009] (2)取3 μL 5 mg/ml 的 C_{60} 溶液于处理过的玻璃碳电极表面,红外灯下烘干,冷却至室温,得到 C_{60} 修饰电极;随后,向修饰电极上滴涂3 μL 5 mg/ml TiO_2 类八面体(TiO_2 MCs),在红外灯下烘干,待冷却至室温后,得到 TiO_2 MCs/ C_{60} 修饰电极;

[0010] (3)滴加3 μL 4-MPBA于步骤(2)所制得的修饰电极界面,并在室温下孵育40 分钟,4-MPBA通过Ti-S键自组装到 TiO_2 MCs/ C_{60} 修饰电极表面,得到4-MPBA/ TiO_2 MCs/ C_{60} 修饰电极;

[0011] (4)取体积比为1:1的5 mg/mL金红石 TiO_2 介晶(N-TiO_2)溶液与 1.0×10^{-2} M钌联吡啶($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)在室温下混合振荡6 小时,使 N-TiO_2 表面吸附足够的发光试剂 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$,离心、洗涤、再分散得到 $\text{N-TiO}_2@(\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+})$ 复合物;向上述复合物溶液中滴加100 μL 10 mM的4-巯基苯甲酸(4-MBA)并在室温下搅拌1 小时,接着,再向所获得的混合溶液中加入200 μL 5 mg/mL 的Bi NRs,室温振荡40 分钟,离心、洗涤、再分散得到 $\text{N-TiO}_2@(\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+})@(\text{Bi NRs})$ 复合物;随后,将浓度比为2:1的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)加入到上述获得的复合溶液中,室温孵育50 分钟后,滴加100 μL 40 ng/mL 的唾液酸抗体(Ab)于所获得的混合溶液中,室温振荡40 分钟,离心,洗涤,再分散制得 $\text{N-TiO}_2@(\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+})@(\text{Bi NRs-Ab})$ 复合物;最后,向上述复合溶液中滴加50 μL 1 wt% BSA 封闭非特异性吸附位点,离心,洗涤,再分散,最终制得 $\text{N-TiO}_2@(\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+})@(\text{Bi NRs-Ab-BSA})$ 复合物溶液作为电致化学发光探针,储存在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用;

[0012] (5)将步骤(3)制得的4-MPBA/ TiO_2 MCs/ C_{60} 修饰玻璃碳电极浸入到不同浓度的唾液酸(SA)标准溶液中并在室温下孵育40 分钟,随后,用去离子水冲洗电极表面,制得SA/4-MPBA/ TiO_2 MCs/ C_{60} 修饰玻璃碳电极,然后滴加3 μL 步骤(4)制备的电致化学发光探针($\text{N-TiO}_2@(\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+})@(\text{Bi NRs-Ab-BSA})$)复合物溶液于SA/4-MPBA/ TiO_2 MCs/ C_{60} 修饰玻璃碳电极,室温下反应40 分钟,用去离子水冲洗电极表面,制得 $\text{N-TiO}_2@(\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+})@(\text{Bi NRs-Ab-BSA/SA/4-MPBA/} \text{TiO}_2 \text{ MCs/} \text{C}_{60})$ 修饰玻璃碳电极;

[0013] (6)将步骤(5)制得的 $\text{N-TiO}_2@(\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+})@(\text{Bi NRs-Ab-BSA/SA/4-MPBA/} \text{TiO}_2 \text{ MCs/} \text{C}_{60})$ 修饰玻璃碳电极浸入到pH为6 PBS溶液中一段时间,SA与4-MPBA形成的硼酸酯键解离,致使SA及与SA连接的ECL探针脱离电极界面,得到pH 诱导的自清洁电极。

[0014] 2. 上述的金红石 TiO_2 介晶(N-TiO_2)由下述方法制备的:将4 g十二烷基苯磺酸钠(SDBS)溶解在200 mL 2.2 mol/L HNO_3 溶液中并在室温下搅拌几分钟,使溶液分散均匀;然后,向上述溶液中加入1 mL的异丙氧钛(TIP),在80 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌192 小时,所得混合溶液离心、洗涤后,在60 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥一夜;接着,再在400 $^{\circ}\text{C}$ 下煅烧60 分钟,去除残留有机物,得到最终产物;所述的 TiO_2 类八面体(TiO_2 MCs)由下述方法制备的:首先,将200 mg锐钛矿型 TiO_2 超声分散在35 mL醋酸溶液中,其次,将所得均相溶液转移到100 mL四氟乙烯内衬不锈钢高压釜中,在200 $^{\circ}\text{C}$ 下反应48 小时,所得产物经离心、洗涤后,在60 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥12 小时,最后,再在400 $^{\circ}\text{C}$ 下煅烧30 分钟,除去残余有机物,得到最终产物;上述的 C_{60} 溶液由下述步骤配置的,取5 mg 的 C_{60} (足球烯)溶解于1 mL 的甲苯溶液中获得 C_{60} 溶液。

[0015] 3. 所述的铋纳米棒(Bi NRs)由下述方法制备的:将750 mg 的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和250 mg 的 $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ 通过温和加热溶解在25 mL甘油和12.5 mL乙醇的混合物中;然

后,将125 mg 的硼氢化钠(NaBH_4)快速加入到上述混合物中,搅拌1 分钟,得到黑色溶液,离心,分别用无水乙醇和去离子水冲洗三次后,将所得产物置于真空干燥箱中干燥4 小时,得到最终产物。

[0016] 4. 本发明上述的方法制备一种基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和Bi纳米棒自增强体系构建的唾液酸可再生电致化学发光免疫传感器($\text{N-TiO}_2\text{@Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{@Bi NRs-Ab-BSA/SA/4-MPBA/TiO}_2\text{MCs/C}_{60}$ 修饰玻碳电极)。

[0017] 5. 本发明上述的方法制备的一种基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和Bi纳米棒自增强体系构建的唾液酸可再生电致化学发光免疫传感器,用于唾液酸(SA)检测步骤如下:

[0018] (1) 使用电化学工作站采用三电极体系进行测定,以上述的一种基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和Bi纳米棒自增强体系构建的唾液酸可再生电致化学发光免疫传感器为工作电极, Ag/AgCl 为参比电极,铂丝电极为辅助电极,在0.1 mol/mL pH 8.0的 PBS缓冲溶液中进行测试;

[0019] (2) 采用电位范围0 -1.6 V,扫描速率0.15 V/s电位窗口,电致化学发光设备光电倍增管800 V对不同浓度的唾液酸(SA)标准溶液进行检测,通过电致化学发光设备采集1.1V的ECL信号强度,通过ECL信号强度与唾液酸(SA)标准溶液浓度之间的关系,绘制工作曲线;

[0020] (3) 待测样品溶液代替唾液酸(SA)标准溶液进行检测,检测的结果可通过工作曲线查得。

[0021] 本发明的显著优点为:

[0022] (1) 以4-巯基苯硼酸(4-NPBA)作为分子识别元件捕获目标物唾液酸(SA),成功构建一种硼酸亲和型可再生电致化学发光免疫传感器检测唾液酸。

[0023] (2) 铋纳米棒(Bi NRs)被首次用作钌联吡啶($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)的共反应试剂,其与 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 连接构成自增强的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -Bi NRs体系,并将其负载到具有大的比表面积和优异介孔结构的金红石 TiO_2 介晶(N-TiO_2)的表面,制备出高效的ECL探针用于SA检测。

[0024] (3) 以 C_{60} 和 TiO_2 类八面体(TiO_2 MCs)作为传感器的基底,借助 C_{60} 优异的导电性和 TiO_2 MCs大的比表面积,进一步提高检测灵敏度。

[0025] (4) 本发明构建的可再生免疫传感器具有良好的重复性、高的灵敏性和稳定性、宽的线性范围等。

附图说明

[0026] 图1的A、B分别为金红石 TiO_2 介晶(N-TiO_2)的扫描电镜图(SEM),X射线衍射(XRD)图,C、D分别为铋纳米棒(Bi NRs)的透射电镜(TEM),高倍透射电镜(HRTEM)。

[0027] 图2为免疫传感电极的电致化学发光响应信号与唾液酸(SA)标准溶液浓度的线性关系图。

具体实施方式

[0028] 本发明用下列实施例来进一步说明本发明,但本发明的保护范围并不限于下列实施例。

[0029] 实施例1

[0030] 1. 基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和Bi纳米棒自增强体系构建的唾液酸可再生电致化学发光免

疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0031] (1)玻碳电极(GCE)首先在铺有氧化铝粉末的麂皮上机械打磨抛光,用二次水洗去表面残留粉末,再移入超声水浴中清洗,直至清洗干净,再依序用乙醇,稀酸和水彻底洗涤,得到表面洁净的玻碳电极;

[0032] (2)取5 mg 的 C_{60} (足球烯)溶解于1 mL 的甲苯溶液中,取3 μ L C_{60} 溶液于处理过的玻碳电极表面,红外灯下烘干,冷却至室温,得到 C_{60} 修饰电极;随后,向修饰电极上滴涂3 μ L 5 mg/ml TiO_2 类八面体(TiO_2 MCs)水溶液,在红外灯下烘干,待冷却至室温后,得到 TiO_2 MCs/ C_{60} 修饰电极;

[0033] (3)滴加3 μ L 4-巯基苯硼酸(4-MPBA)于步骤(2)所制得的修饰电极界面,并在室温下孵育40 分钟,4-MPBA通过Ti-S键自组装到 TiO_2 MCs/ C_{60} 修饰电极表面,得到4-MPBA/ TiO_2 MCs/ C_{60} 修饰电极;

[0034] (4)取体积比为1:1的5 mg/mL金红石 TiO_2 介晶(N- TiO_2)溶液与 1.0×10^{-2} M钌联吡啶($Ru(bpy)_3^{2+}$)在室温下混合振荡6 小时,使N- TiO_2 表面吸附足够的发光试剂 $Ru(bpy)_3^{2+}$,离心、洗涤、再分散得到N- $TiO_2@Ru(bpy)_3^{2+}$ 复合物;向上述复合物溶液中滴加100 μ L 10 mM的4-巯基苯甲酸(4-MBA)并在室温下搅拌1 小时,接着,再向所获得的混合溶液中加入200 μ L 5 mg/mL 的铋纳米棒(Bi NRs),室温振荡40 分钟,离心、洗涤、再分散得到N- $TiO_2@Ru(bpy)_3^{2+}@Bi$ NRs复合物;随后,将浓度比为2:1的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)加入到上述获得的复合溶液中,室温孵育50 分钟后,滴加100 μ L 40 ng/mL 的唾液酸抗体(Ab)于所获得的混合溶液中,室温振荡40 分钟,离心,洗涤,再分散制得N- $TiO_2@Ru(bpy)_3^{2+}@Bi$ NRs-Ab复合物;最后,向上述复合溶液中滴加50 μ L 1 wt% BSA 封闭非特异性吸附位点,离心,洗涤,再分散,最终制得N- $TiO_2@Ru(bpy)_3^{2+}@Bi$ NRs-Ab-BSA复合物溶液作为电致化学发光探针,储存在4 $^{\circ}$ C冰箱中备用;

[0035] (5)将步骤(3)制得的4-MPBA/ TiO_2 MCs/ C_{60} 修饰玻碳电极浸入到不同浓度的唾液酸(SA)标准溶液中并在室温下孵育40 分钟,随后,用去离子水冲洗电极表面,制得SA/4-MPBA/ TiO_2 MCs/ C_{60} 修饰玻碳电极,然后滴加3 μ L步骤(4)制备的电致化学发光探针(N- $TiO_2@Ru(bpy)_3^{2+}@Bi$ NRs-Ab-BSA)复合物溶液于SA/4-MPBA/ TiO_2 MCs/ C_{60} 修饰玻碳电极,室温下反应40 分钟,用去离子水冲洗电极表面,制得N- $TiO_2@Ru(bpy)_3^{2+}@Bi$ NRs-Ab-BSA/SA/4-MPBA/ TiO_2 MCs/ C_{60} 修饰玻碳电极;

[0036] (6)将步骤(5)制得的N- $TiO_2@Ru(bpy)_3^{2+}@Bi$ NRs-Ab-BSA/SA/4-MPBA/ TiO_2 MCs/ C_{60} 修饰玻碳电极浸入到pH为 6 的PBS溶液中一段时间,唾液酸(SA)与4-MPBA形成的硼酸酯键解离,致使SA及与SA连接的ECL探针脱离电极界面,得到pH 诱导的自清洁电极。

[0037] 实施例2

[0038] 上述实施例1所述的金红石 TiO_2 介晶(N- TiO_2)由下述方法制备的:将4 g十二烷基苯磺酸钠(SDBS)溶解在200 mL 2.2 mol/L HNO_3 溶液中并在室温下搅拌几分钟,使溶液分散均匀;然后,向上述溶液中加入1 mL的异丙氧钛(TIP),在80 $^{\circ}$ C下搅拌192 小时,所得混合溶液离心、洗涤后,在60 $^{\circ}$ C下干燥一夜;接着,再在400 $^{\circ}$ C下煅烧60 分钟,去除残留有机物,得到最终产物;

[0039] 上述实施例1所述的 TiO_2 类八面体(TiO_2 MCs)由下述方法制备的:首先,将200 mg锐钛矿型 TiO_2 超声分散在35 mL醋酸溶液中,其次,将所得均相溶液转移到100 mL四氟乙烯

内衬不锈钢高压釜中,在200 °C下反应48 小时,所得产物经离心、洗涤后,在60 °C下干燥12 小时,最后,再在400 °C下煅烧30 分钟,除去残余有机物,得到最终产物。

[0040] 实施例3

[0041] 上述实施例1所述的铋纳米棒(Bi NRs)由下述方法制备的:将750 mg 的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和250 mg 的 $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ 通过温和加热溶解在25 mL甘油和12.5 mL乙醇的混合物中;然后,将125 mg 的硼氢化钠(NaBH_4)快速加入到上述混合物中,搅拌1 分钟,得到黑色溶液,离心,分别用无水乙醇和去离子水冲洗三次后,将所得产物置于真空干燥箱中干燥4 小时,得到最终产物。

[0042] 实施例4

[0043] 唾液酸(SA)的检测步骤:

[0044] (1)使用电化学工作站采用三电极体系进行测定,以实施例1制备的一种基于 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和Bi纳米棒自增强体系构建的唾液酸可再生电致化学发光免疫传感器($\text{N-TiO}_2/\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Bi NRs-Ab-BSA/SA/4-MPBA/TiO}_2$ MCs/ C_{60} 修饰玻碳电极)为工作电极, Ag/AgCl 为参比电极,铂丝电极为辅助电极,在0.1 mol/mL pH 8.0的 PBS缓冲溶液中进行测试;

[0045] (2)采用电位范围0 -1.6 V,扫描速率0.15 V/s电位窗口,电致化学发光设备光电倍增管800 V对不同浓度的唾液酸(SA)标准溶液进行检测,通过电致化学发光设备采集1.1V的ECL信号强度,通过ECL信号强度与唾液酸(SA)标准溶液浓度之间的关系,绘制工作曲线;

[0046] (3)待测样品溶液代替唾液酸(SA)标准溶液进行检测,检测的结果可通过工作曲线查得。

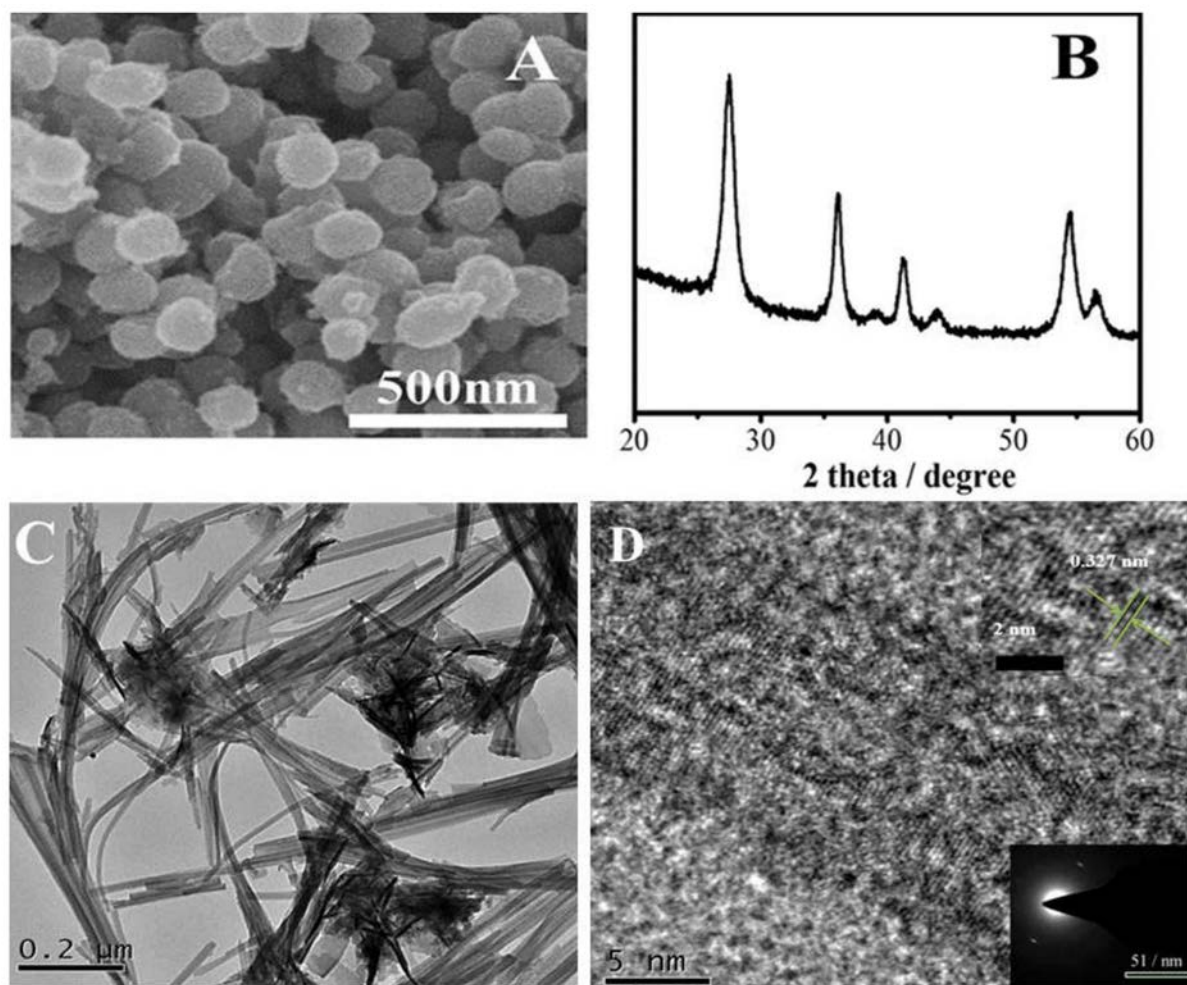


图1

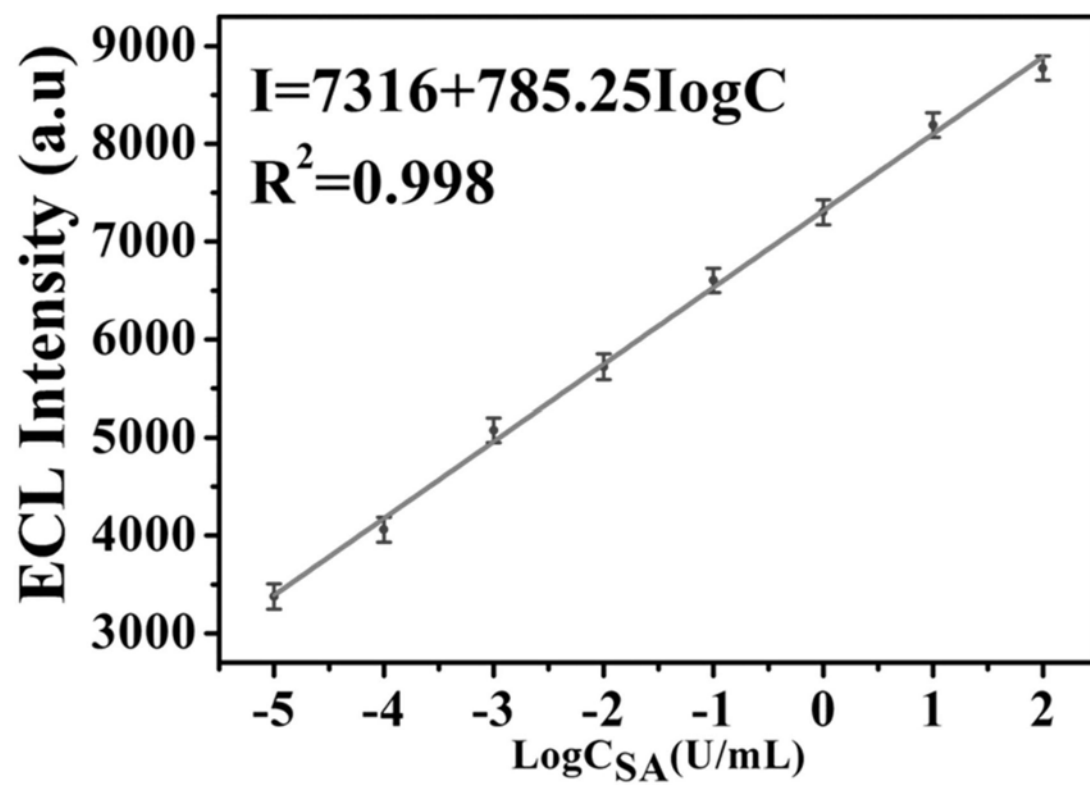


图2