



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110470718 B

(45) 授权公告日 2021.04.13

(21) 申请号 201910884366.2

G01N 27/30 (2006.01)

(22) 申请日 2019.09.19

G01N 33/531 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

审查员 刘畅

申请公布号 CN 110470718 A

(43) 申请公布日 2019.11.19

(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 魏琴 徐芮 范大伟 吴丹 曹伟
马洪敏

(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)

权利要求书2页 说明书10页

(54) 发明名称

一种用于检测心肌肌钙蛋白I的光电化学免疫传感器的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于检测心肌肌钙蛋白I的光电化学免疫传感器的制备方法。本发明以构建拼合式光电化学传感器的方式,免疫分析与光电测试分开,实现光电测试与生物分子的免疫识别过程互不干扰的目的。以硫化铋纳米棒修饰的三氧化钨作为基底材料提供基础的光电响应,二者带隙结构匹配,能够很好的利用可见光。其次在96微孔板中进行抗原与抗体的特性免疫识别,利用硫化镉封装包覆有抗坏血酸的介孔二氧化硅标记心肌肌钙蛋白I第二抗体,硫化镉通过二硫键与介孔二氧化硅进行牢固的结合,当滴入二硫苏糖醇之后,断开硫化镉与二氧化硅之间的二硫键,抗坏血酸得以释放,依此在不同程度上提高光电流,实现对心肌肌钙蛋白I的灵敏检测。其检测限为0.17 pg/mL。

1. 一种用于检测心肌肌钙蛋白I的光电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 三氧化钨材料的制备

取1.0 ~ 2.0 g氯化钨溶于35 ~ 50 mL无水乙醇中,在室温下搅拌1 ~ 2 h后,将混合溶液转移至高压反应釜中于120 ~ 180 °C下反应4 ~ 8 h,反应结束后自然冷却至室温,之后产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,洗涤结束后,产品于40 ~ 60 °C下干燥10 ~ 12 h,制得海胆状的三氧化钨材料;

(2) 硫化铋纳米棒材料的制备

取1.5 ~ 2.0 g五水合硝酸铋溶于20 ~ 30 mL乙二醇中,于室温下搅拌20 ~ 30 min,此溶液作为溶液A;取1.2 ~ 1.5 g九水合硫化钠溶于20 ~ 50 mL超纯水中,于室温下搅拌10 ~ 20 min,此溶液作为溶液B;取1.8 ~ 2.0 g尿素溶于10 ~ 40 mL超纯水中,于室温下搅拌均匀,此溶液作为溶液C;将溶液B加入溶液A中,得到黑色混合溶液,搅拌5 min后,将溶液C逐渐加入上述黑色混合溶液中,于室温下搅拌均匀后,转入高压反应釜中,于150 ~ 200 °C下水热反应20 ~ 28 h,反应结束后自然冷却至室温,之后产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,最后产品于40 ~ 60 °C下干燥过夜,得到硫化铋纳米棒材料;

(3) 介孔二氧化硅纳米材料的制备

取0.1 ~ 0.5 g十六烷基三甲基溴化铵溶于200 ~ 250 mL超纯水中,之后向溶液中加入1.0 ~ 2.0 mL浓度为0.5 ~ 3 mol/L的氢氧化钠水溶液,混合溶液于70 ~ 100 °C下搅拌均匀后,向溶液中逐滴加入1 ~ 3 mL的正硅酸四乙酯溶液,继续搅拌1 ~ 5 h,搅拌结束后自然冷却至室温,产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,之后产品于50 °C下真空干燥过夜,所得到的固体粉末材料继续在400 ~ 600 °C下高温煅烧4 ~ 7 h,以除去多余的表面活性剂,得到介孔二氧化硅纳米材料;

(4) 巯基乙酸功能化的硫化镉量子点的制备

取0.08 ~ 0.10 g四水合硝酸镉溶于200 ~ 300 mL超纯水中,搅拌均匀后,加入100 ~ 200 μ L的巯基乙酸溶液,得到浑浊的淡蓝色溶液后,用0.01 ~ 0.02 mol/L的氢氧化钠水溶液调节pH至9 ~ 11,之后加入5 ~ 20 mL溶有0.03 ~ 0.05 g的九水合硫化钠水溶液,遮光搅拌10 ~ 30 min后,混合溶液用无水甲醇和超纯水洗涤得到淡黄色产品,之后于40 ~ 70 °C下真空干燥过夜,得到巯基乙酸功能化的硫化镉量子点材料;

(5) PBS缓冲溶液的配置

取11.94 g十二水合磷酸氢二钠定容于500 mL的容量瓶中配置成浓度为1/15 mol/L的水溶液,作为甲液;取4.54 g磷酸二氢钾定容于500 mL的容量瓶中配置成浓度为1/15 mol/L的水溶液,作为乙液;将甲液和乙液按比例混合,配置成一系列pH在5.0 ~ 8.0的PBS缓冲溶液;

(6) 硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅复合材料的制备

取0.5 ~ 1 g介孔二氧化硅材料溶于40 ~ 70 mL无水甲醇溶液中,之后向溶液中加入0.1 ~ 0.3 g的2-(吡啶基二硫烷基)乙胺,于室温下搅拌12 ~ 24 h,以实现在介孔二氧化硅表面二硫键的连接,之后产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,于35 °C下真空干燥;干燥后的材料溶于含有0.1 ~ 0.3 g的抗坏血酸的10 mL的PBS缓冲溶液中,于室温下震荡12 ~ 24 h后,向溶液中加入0.01 ~ 0.03 g所合成的巯基乙酸功能化的硫化镉量子点和0.03 ~

0.06 g的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC),在室温下继续震荡12 ~ 24 h,反应结束后,产品用PBS缓冲溶液洗涤3次,冷冻干燥,得到硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅复合材料;

(7) 硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅标记心肌肌钙蛋白I二抗的制备

取1 ~ 5 mg所制备的硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅溶于1 ~ 3 mL、pH为7.0的PBS缓冲溶液后,加入100 ~ 300 μL 浓度为5 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的心肌肌钙蛋白I二抗,于10 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 下震荡2 ~ 5 h后,离心,用PBS缓冲溶液洗涤3次,产物溶于2mL的PBS缓冲溶液中于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存备用;

(8) 光电化学免疫传感器的制备

1) 将导电玻璃依次用洗洁精、丙酮、乙醇和超纯水超声清洗,氮气吹干;

2) 取6 μL 、2 ~ 6 mg/mL的三氧化钨的水溶液滴加到ITO导电玻璃的导电面,红外灯下晾干;

3) 在修饰的电极表面继续滴加6 μL 、2 ~ 6 mg/mL的硫化铋的水溶液,电极于室温下自然晾干;

4) 取200 μL 浓度为5 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的心肌肌钙蛋白I捕获抗体滴入96微孔板中,于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置10 ~ 14 h以保证抗体与96微孔板牢固结合,抗体孵化结束后,吸出未结合的心肌肌钙蛋白I抗体,用PBS缓冲溶液小心清洗96微孔板;

5) 取100 μL 用PBS配制的质量分数在1 ~ 3 %的牛血清白蛋白滴于96微孔板中,于室温下孵化1小时,之后吸出未结合的牛血清白蛋白,用PBS清洗96微孔板;

6) 取200 μL 浓度为0.0005 ~ 200 ng/mL的心肌肌钙蛋白I抗原滴于96微孔板中,在室温下孵化1 h,之后用PBS缓冲溶液清洗96微孔板;

7) 取200 μL 浓度为5 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 带有硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅标记的心肌肌钙蛋白I二抗滴于96微孔板中,室温下孵化1 h后,用PBS缓冲溶液冲洗96微孔板;

8) 取50 μL 用PBS缓冲溶液配制的浓度为10 ~ 20 mmol/L的二硫苏糖醇滴入96微孔板中,作用10 ~ 30 min;

9) 将96微孔板中的溶液吸出,注入5 mL的PBS缓冲溶液中作为光电测试的电解质溶液,将修饰的硫化铋/三氧化钨/导电玻璃电极浸入该电解质溶液中,制得一种检测心肌肌钙蛋白I抗原的光电化学免疫传感器。

一种用于检测心肌肌钙蛋白I的光电化学免疫传感器的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于检测心肌肌钙蛋白I的光电化学免疫传感器的制备方法,具体是以硫化铋敏化的三氧化钨作为基底材料,以硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅作为标记物标记心肌肌钙蛋白I二抗,制备一种检测心肌肌钙蛋白I的拼合式光电化学传感器,属于新型功能材料与生物传感检测技术领域。

背景技术

[0002] 心肌肌钙蛋白I(cTnI)作为心肌损伤标志物,在临床上已应用了多年。由于其高度的心肌特异性,对于心肌损伤的高度敏感性及较长的窗口期,cTnI已被临床医生及检验人员广泛接受,不仅成为判断心肌损伤,特别是诊断急性心梗的“金标准”,而且已成为判断冠脉综合征病人处于心肌损伤风险的最合适的标志物。肌钙蛋白的升高还作为有力的证据支持临床医生及早做出抗血栓、抗血小板凝集及介入性治疗的决定。心肌梗死是冠状动脉闭塞,血流中断,部分心肌因严重的持续性缺血而发生局部坏死,由于cTnI的心脏特异性,及其在心脏受损后的快速及长时期升高,可作为一种诊断心肌损伤性疾病,特别是诊断心肌梗死的首选标志物。此外,cTnI还可以作为不稳定性心绞痛最佳血液指标以及作为急性冠脉综合征病人的预后标志物。同时,cTnI也可以作为疾病治疗的监测指标,如可以判断溶栓,低分子量肝素等的治疗效果。因此,构建一种快速、灵敏的检测cTnI的分析方法十分重要。目前已有的cTnI检测方法有很多,如化学发光法(心肌肌钙蛋白鲁米诺化学发光免疫分析检测方法,031317979),电化学免疫传感器方法(一种氮硫双掺杂氧化石墨烯标记的夹心型免疫传感器的制备方法及应用,201910144057.1),荧光比色法(一种定量检测肌钙蛋白I/肌酸激酶同工酶/肌红蛋白的荧光免疫层析试剂盒,201110451642.X),酶联免疫方法(人心肌肌钙蛋白I的双抗夹心ELISA检测试剂盒,201710797247.4)等,但酶联免疫分析操作复杂繁琐;荧光分析可控性差,毒性大;化学发光免疫分析检测时间长。本发明设计了一种拼合式光电化学传感器,拼合式传感器检测灵敏,干扰少,稳定性好,本发明设计的拼合式光电化学传感器检测简单快速,稳定无毒,对cTnI的检测限达到0.17 pg/mL。

[0003] 三氧化钨,一种典型的半导体纳米光敏材料,制备简单,成本低,在可见光下具有良好的光电响应,经过硫化铋敏化之后,可大幅度提高对可见光的吸收效率,获得优异的光电流,为后续的检测提供光电响应基础。介孔二氧化硅具有良好的生物相容性,二氧化硅内部的孔可以很好的包覆目标分子—抗坏血酸,抗坏血酸作为一种电子供体,可以促使光生电子快速传递,采用无机半导体量子点作为介孔二氧化硅的“帽子”,可以很好的将抗坏血酸封装在介孔二氧化硅中,此复合材料作为二抗标记物,在检测目标物的时候,不同浓度的抗原可以实现不同浓度的抗坏血酸的释放,从而引起光电流的变化,以实现目标物的定量检测。同时,采用拼合式的构建方式,免疫识别分析和光电测试分开,降低了对光敏材料光电响应的要求,同时避免了由于免疫反应对电信号的影响,构建操作简单。提高了传感器的稳定性和灵敏度。

[0004] 光电化学传感器是基于物质的光电转换特性来确定待测物浓度的一类检测装置。光电化学检测方法具有设备简单、灵敏度高、易于微型化的特点,已经发展成为一种极具应用潜力的分析方法,在食品、环境、医药等领域具有广阔的应用前景。本发明基于三氧化钨/硫化铋复合材料作为基底材料,以硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅作为标记物,根据不同浓度的待测物对光信号强度的影响不同,实现了对心肌肌钙蛋白I的检测。本发明制备的光电化学传感器具有制作简单、成本低、检测快速和灵敏度高等特点,实现了在可见光范围内对心肌肌钙蛋白I的稳定、灵敏检测,有效克服了目前对心肌肌钙蛋白I检测方法的不足。

发明内容

[0005] 本发明目的之一是采用硫化铋纳米棒敏化三氧化钨半导体光敏材料作为基底材料产生光电响应。硫化铋作为一种良好的敏化剂与三氧化钨具有匹配的能级,可以提高单纯光敏材料的光电性能,为后续测试提供光电流基础。

[0006] 本发明目的之二是采用硫化镉量子点封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅,二氧化硅具有良好的生物相容性,介孔二氧化硅可以包覆大量的抗坏血酸,而硫化镉通过二硫键的形成可以作为介孔二氧化硅的“帽子”将抗坏血酸封装在二氧化硅的孔内,当存在二硫苏糖醇时,可以将二硫键断开,使得抗坏血酸释放出来,抗坏血酸作为电子供体,可以提高光电响应。

[0007] 本发明目的之三是构建一种拼合式的光电化学传感器,拼合式的传感器将无机半导体材料的光电测试与生物分子之间的特异性识别免疫反应分开,这样电化学测试不会对免疫反应产生干扰,且省去了生物分子对电子传递的阻碍作用,对基底材料光电响应要求较低,无其他干扰。

[0008] 本发明目的之四是以硫化铋/三氧化钨作为基底,以硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅标记二抗,制备了一种灵敏度高、选择性好、检测速度快的拼合式光电化学传感器,实现了在可见光下对心肌肌钙蛋白I的灵敏检测。

[0009] 本发明技术方案如下:

[0010] 1、基于一种用于检测心肌肌钙蛋白I的光电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0011] (1)三氧化钨材料的制备

[0012] 取1.0 ~ 2.0 g氯化钨溶于35 ~ 50 mL无水乙醇中,在室温下搅拌1 ~ 2 h后,将混合溶液转移至高压反应釜中于120 ~ 180 °C下反应4 ~ 8 h,反应结束后自然冷却至室温,之后产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,洗涤结束后,产品于40 ~ 60 °C下干燥10 ~ 12 h,制得海胆状的三氧化钨材料;

[0013] (2)硫化铋纳米棒材料的制备

[0014] 取1.5 ~ 2.0 g五水合硝酸铋溶于20 ~ 30 mL乙二醇中,于室温下搅拌20 ~ 30 min,此溶液作为溶液A;取1.2 ~ 1.5 g九水合硫化钠溶于20 ~ 50 mL超纯水中,于室温下搅拌10 ~ 20 min,此溶液作为溶液B;取1.8 ~ 2.0 g尿素溶于10 ~ 40 mL超纯水中,于室温下搅拌均匀,此溶液作为溶液C;将溶液B加入溶液A中,得到黑色混合溶液,搅拌5 min后,将溶液C逐渐加入上述混合溶液中,于室温下搅拌均匀后,转入高压反应釜中,于150 ~ 200

°C下水热反应20 ~ 28 h,反应结束后自然冷却至室温,之后产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,最后产品于40 ~ 60 °C下干燥过夜,得到棒状的硫化铋纳米材料;

[0015] (3)介孔二氧化硅纳米材料的制备

[0016] 取0.1 ~ 0.5 g十六烷基三甲基溴化铵溶于200 ~ 250 mL超纯水中,之后向溶液中加入1.0 ~ 2.0 mL浓度为0.5 ~ 3 mol/L的氢氧化钠水溶液,该混合溶液于70 ~ 100 °C下搅拌均匀后,向溶液中逐滴加入1 ~ 3 mL的正硅酸四乙酯溶液,继续搅拌1 ~ 5 h,搅拌结束后自然冷却至室温,产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,之后产品于50 °C下真空干燥过夜,所得到的固体粉末材料继续在400 ~ 600 °C下高温煅烧4 ~ 7 h,以除去多余的表面活性剂,得到介孔二氧化硅纳米材料;

[0017] (4)巯基乙酸功能化的硫化镉量子点的制备

[0018] 取0.08 ~ 0.10 g四水合硝酸镉溶于200 ~ 300 mL超纯水中,搅拌均匀后,加入100 ~ 200 μ L的巯基乙酸溶液,得到浑浊的淡蓝色溶液后,用0.01 ~ 0.02 mol/L的氢氧化钠水溶液调节pH至9 ~ 11,之后加入5 ~ 20 mL溶有0.03 ~ 0.05 g的九水合硫化钠水溶液,遮光搅拌10 ~ 30 min后,混合溶液用无水甲醇和超纯水洗涤得到淡黄色产品,之后于40 ~ 70 °C下真空干燥过夜,得到巯基乙酸功能化的硫化镉量子点材料;

[0019] (5)PBS缓冲溶液的配制

[0020] 取11.94 g十二水合磷酸氢二钠定容于500 mL的容量瓶中配置成浓度为1/15 mol/L的水溶液,作为甲液;取4.54 g磷酸二氢钾定容于500 mL的容量瓶中配置成浓度为1/15 mol/L的水溶液,作为乙液;将甲液和乙液按比例混合,配置成一系列pH在5.0 ~ 8.0的PBS缓冲溶液;

[0021] (6)硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅复合材料的制备

[0022] 取0.5 ~ 1 g介孔二氧化硅材料溶于40 ~ 70 mL无水甲醇溶液中,之后向溶液中加入0.1 ~ 0.3 g的2-(吡啶基二硫烷基)乙胺,于室温下搅拌12 ~ 24 h,以实现在介孔二氧化硅表面二硫键的连接,之后产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,于35 °C下真空干燥;干燥后的材料溶于含有0.1 ~ 0.3 g的抗坏血酸的10 mL的PBS缓冲溶液中,于室温下震荡12 ~ 24 h后,向溶液中加入0.01 ~ 0.03 g所合成的巯基乙酸功能化的硫化镉量子点和0.03 ~ 0.06 g的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC),在室温下继续震荡12 ~ 24 h,反应结束后,产品用PBS缓冲溶液洗涤3次,冷冻干燥,得到硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅复合材料;

[0023] (7)硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅标记心肌肌钙蛋白I二抗的制备

[0024] 取1 ~ 5 mg所制备的硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅溶于1 ~ 3 mL、pH为7.0的PBS缓冲溶液后,加入100 ~ 300 μ L浓度为5 ~ 20 μ g/mL的心肌肌钙蛋白I二抗,于10 ~ 40 °C下震荡2 ~ 5 h后,离心,用PBS缓冲溶液洗涤3次,产物溶于2 mL的PBS缓冲溶液在4 °C冰箱中储存备用;

[0025] (8)光电化学传感器的制备

[0026] 1)将导电玻璃依次用洗洁精、丙酮、乙醇和超纯水超声清洗,氮气吹干;

[0027] 2)取6 μ L、2 ~ 6 mg/mL的三氧化钨的水溶液滴加到ITO导电玻璃的导电面,红外灯下晾干;

[0028] 3)在修饰的电极表面继续滴加6 μ L、2 ~ 6 mg/mL的硫化铋的水溶液,电极于室温

下自然晾干；

[0029] 4) 取200 μL 浓度为5 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的心肌肌钙蛋白I捕获抗体滴入96微孔板中,于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置10 ~ 14 h以保证抗体与96微孔板牢固结合,抗体孵化结束后,吸出未连接的心肌肌钙蛋白I抗体,用PBS缓冲溶液小心清洗96微孔板后;

[0030] 5) 取100 μL 用PBS配制的质量分数在1 ~ 3 %的牛血清白蛋白滴于96微孔板中,于室温下孵化1小时,之后吸出未结合的牛血清白蛋白,用PBS清洗96微孔板;

[0031] 6) 取200 μL 浓度为0.0005 ~ 200 ng/mL 的心肌肌钙蛋白I抗原滴于96微孔板中,在室温下孵化1 h,之后用PBS缓冲溶液清洗96微孔板;

[0032] 7) 取200 μL 浓度为5 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 带有硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅标记的心肌肌钙蛋白I二抗滴于96微孔板中,室温下孵化1 h后,用PBS缓冲溶液冲洗96微孔板;

[0033] 8) 取50 μL 用PBS缓冲溶液配制的浓度为10 ~ 20 mmol/L 的二硫苏糖醇滴入96微孔板中,作用10 ~ 30 min;

[0034] 9) 将96微孔板中的溶液吸出,注入5 mL的PBS缓冲溶液中作为光电测试的电解质溶液,将修饰的硫化铋/三氧化钨/导电玻璃电极浸入该电解质溶液中,制得一种检测心肌肌钙蛋白I抗原的光电化学传感器。

[0035] 2. 如权利要求1所述制备的光电化学传感器的检测方法,其特征在于,步骤如下:

[0036] (1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,制备的ITO修饰电极为工作电极,在含有从96微孔板吸出的溶液的pH为5.0 ~ 8.0的PBS缓冲溶液中进行测试;

[0037] (2) 将所修饰的电极浸入含有从96微孔板中吸出不同的溶液的PBS缓冲溶液中,利用时间-电流法进行测试,设置电压为-0.1 ~ 0.1 V,运行时间120 s,光源波长为400 ~ 450 nm;

[0038] (3) 电极放置好之后,每隔20 s开灯持续照射20 s,记录光电流,绘制工作曲线;

[0039] (4) 将待测的心肌肌钙蛋白I抗原样品溶液代替心肌肌钙蛋白I抗原标准溶液进行检测。

[0040] 本传感器对心肌肌钙蛋白抗原的检测线性范围为0.5 pg/mL ~ 200 ng/mL ,检测限为0.17 pg/mL 。

[0041] 合成材料所需要的化学试剂均为当地试剂店购得,没有经过再处理。

[0042] 本发明的有益成果

[0043] (1) 本发明采用硫化铋敏化的三氧化钨作为光敏基底材料,解决了单纯硫化铋和单纯三氧化钨的光电转换效率低的问题。

[0044] (2) 本发明采用硫化镉封装包覆有抗坏血酸的介孔二氧化硅作为二抗标记物,介孔二氧化硅具有良好的生物相容性,易于与生物分子结合,采用无机半导体材料硫化镉通过二硫键的形成将抗坏血酸包覆在介孔硅内部,当溶液中存在二硫苏糖醇时,二硫键会断开,使得抗坏血酸释放出来,抗坏血酸作为电子供体,可以促进电子的传递,提高传感器的灵敏度。

[0045] (3) 本发明采用拼合式的光电化学传感器的方式,将半导体材料的光电测试过程与生物分子之间的特异性免疫识别反应过程分开,一方面降低了对基底材料光电响应的要

求,另一方面生物分子识别过程单独进行,不会被光电测试过程破坏活性,并且减小了传感器层层修饰过程中的其他干扰作用。

[0046] (4)本发明制备的光电化学传感器,用于心肌肌钙蛋白抗原I的检测,响应时间短,检测限低,线性范围宽,稳定性好,可以实现简便快捷、高灵敏和高稳定性检测。

具体实施方案

[0047] 实施例1 光电化学传感器的制备

[0048] (1)三氧化钨材料的制备

[0049] 取1.0 g氯化钨溶于35 mL无水乙醇中,在室温下搅拌1 h后,将混合溶液转移至高压反应釜中于120 °C下反应4 h,反应结束后自然冷却至室温,之后产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,洗涤结束后,产品于40 °C下干燥10 h,制得海胆状的三氧化钨材料;

[0050] (2)硫化铋纳米棒材料的制备

[0051] 取1.5 g五水合硝酸铋溶于20 mL乙二醇中,于室温下搅拌20 min,此溶液作为溶液A;取1.2 g九水合硫化钠溶于20 mL超纯水中,于室温下搅拌10 min,此溶液作为溶液B;取1.8 g尿素溶于10 mL超纯水中,于室温下搅拌均匀,此溶液作为溶液C;将溶液B加入溶液A中,得到黑色混合溶液,搅拌5 min后,将溶液C逐渐加入上述混合溶液中,于室温下搅拌均匀后,转入高压反应釜中,于150 °C下水热反应20 h,反应结束后自然冷却至室温,之后产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,最后产品于40 °C下干燥过夜,得到棒状的硫化铋纳米材料;

[0052] (3)介孔二氧化硅纳米材料的制备

[0053] 取0.1 g十六烷基三甲基溴化铵溶于200 mL超纯水中,之后向溶液中加入1.0 mL浓度为0.5 mol/L的氢氧化钠水溶液,该混合溶液于70 °C下搅拌均匀后,向溶液中逐滴加入1 mL的正硅酸四乙酯溶液,继续搅拌1 h,搅拌结束后自然冷却至室温,产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,之后产品于50 °C下真空干燥过夜,所得到的固体粉末材料继续在400 °C下高温煅烧4 h,以除去多余的表面活性剂,得到介孔二氧化硅纳米材料;

[0054] (4)巯基乙酸功能化的硫化镉量子点的制备

[0055] 取0.08 g四水合硝酸镉溶于200 mL超纯水中,搅拌均匀后,加入100 μ L的巯基乙酸溶液,得到浑浊的淡蓝色溶液后,用0.01 mol/L的氢氧化钠水溶液调节pH至9,之后加入5 mL溶有0.03 g的九水合硫化钠水溶液,遮光搅拌10 min后,混合溶液用无水甲醇和超纯水洗涤得到淡黄色产品,之后于40 °C下真空干燥过夜,得到巯基乙酸功能化的硫化镉量子点材料;

[0056] (5)PBS缓冲溶液的配制

[0057] 取11.94 g十二水合磷酸氢二钠定容于500 mL的容量瓶中配置成浓度为1/15 mol/L的水溶液,作为甲液;取4.54 g磷酸二氢钾定容于500 mL的容量瓶中配置成浓度为1/15 mol/L的水溶液,作为乙液;将甲液和乙液按比例混合,配置成一系列pH在5.0 ~ 8.0的PBS缓冲溶液;

[0058] (6)硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅复合材料的制备

[0059] 取0.5 g介孔二氧化硅材料溶于40 mL无水甲醇溶液中,之后向溶液中加入0.1 g的2-(吡啶基二硫烷基)乙胺,于室温下搅拌12 h,以实现在介孔二氧化硅表面二硫键的连

接,之后产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,于35 °C下真空干燥;干燥后的材料溶于含有0.1 g的抗坏血酸的10 mL的PBS缓冲溶液中,于室温下震荡12 h后,向溶液中加入0.01 g所合成的巯基乙酸功能化的硫化镉量子点和0.03 g的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC),在室温下继续震荡12 h,反应结束后,产品用PBS缓冲溶液洗涤3次,冷冻干燥,得到硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅复合材料;

[0060] (7) 硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅标记心肌肌钙蛋白I二抗的制备

[0061] 取1 mg所制备的硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅溶于1 mL、pH为7.0的PBS缓冲溶液后,加入100 μ L浓度为5 μ g/mL的心肌肌钙蛋白二抗,于10 °C下震荡2 h后,离心,用PBS缓冲溶液洗涤3次,产物溶于2 mL的PBS缓冲溶液中在4 °C冰箱中储存备用;

[0062] (8) 光电化学传感器的制备

[0063] 1) 将导电玻璃依次用洗洁精、丙酮、乙醇和超纯水超声清洗,氮气吹干;

[0064] 2) 取6 μ L、2 mg/mL的三氧化钨的水溶液滴加到ITO导电玻璃的导电面,红外灯下晾干;

[0065] 3) 在修饰的电极表面继续滴加6 μ L、2 mg/mL的硫化铋的水溶液,电极于室温下自然晾干;

[0066] 4) 取200 μ L浓度为5 μ g/mL的心肌肌钙蛋白I捕获抗体滴入96微孔板中,于4 °C条件下放置10 h以保证抗体与96微孔板牢固结合,抗体孵化结束后,吸出未连接的心肌肌钙蛋白I抗体,用PBS缓冲溶液清洗96微孔板后;

[0067] 5) 取100 μ L用PBS配制的质量分数在1 %的牛血清白蛋白滴于96微孔板中,于室温下孵化1小时,之后吸出未结合的牛血清白蛋白,用PBS清洗96微孔板;

[0068] 6) 取200 μ L浓度为0.0005 ~ 200 ng/mL的心肌肌钙蛋白I抗原滴于96微孔板中,在室温下孵化1 h,之后用PBS缓冲溶液清洗96微孔板;

[0069] 7) 取200 μ L浓度为5 μ g/mL带有硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅标记的心肌肌钙蛋白I二抗滴于96微孔板中,室温下孵化1 h后,用PBS缓冲溶液冲洗96微孔板;

[0070] 8) 取50 μ L用PBS缓冲溶液配制的浓度为10 mmol/L的二硫苏糖醇滴入96微孔板中,作用10 min;

[0071] 9) 将96微孔板中的溶液吸出,注入5 mL的PBS缓冲溶液中作为光电测试的电解质溶液,将修饰的硫化铋/三氧化钨/导电玻璃电极浸入该电解质溶液中,制得一种检测心肌肌钙蛋白I抗原的光电化学传感器。

[0072] 实施例2 光电化学传感器的构架

[0073] (1) 三氧化钨材料的制备

[0074] 取1.5 g氯化钨溶于40 mL无水乙醇中,在室温下搅拌1.5 h后,将混合溶液转移至高压反应釜中于160 °C下反应5 h,反应结束后自然冷却至室温,之后产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,洗涤结束后,产品于50 °C下干燥11 h,制得海胆状的三氧化钨材料;

[0075] (2) 硫化铋纳米棒材料的制备

[0076] 取1.8 g五水合硝酸铋溶于25 mL乙二醇中,于室温下搅拌25 min,此溶液作为溶液A;取1.3 g九水合硫化钠溶于30 mL超纯水中,于室温下搅拌15 min,此溶液作为溶液B;取1.8 g尿素溶于30 mL超纯水中,于室温下搅拌均匀,此溶液作为溶液C;将溶液B加入溶液A中,得到黑色混合溶液,搅拌5 min后,将溶液C逐渐加入上述混合溶液中,于室温下搅拌均

匀后,转入高压反应釜中,于160 °C下水热反应24 h,反应结束后自然冷却至室温,之后产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,最后产品于50 °C下干燥过夜,得到棒状的硫化铋纳米材料;

[0077] (3)介孔二氧化硅纳米材料的制备

[0078] 取0.4 g十六烷基三甲基溴化铵溶于240 mL超纯水中,之后向溶液中加入1.5 mL浓度为1 mol/L的氢氧化钠水溶液,该混合溶液于80 °C下搅拌均匀后,向溶液中逐滴加入2 mL的正硅酸四乙酯溶液,继续搅拌3 h,搅拌结束后自然冷却至室温,产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,之后产品于50 °C下真空干燥过夜,所得到的固体粉末材料继续在450 °C下高温煅烧6 h,以除去多余的表面活性剂,得到介孔二氧化硅纳米材料;

[0079] (4)巯基乙酸功能化的硫化镉量子点的制备

[0080] 取0.09 g四水合硝酸镉溶于250 mL超纯水中,搅拌均匀后,加入180 μL的巯基乙酸溶液,得到浑浊的淡蓝色溶液后,用0.01 mol/L的氢氧化钠水溶液调节pH至10,之后加入10 mL溶有0.04 g的九水合硫化钠水溶液,遮光搅拌20 min后,混合溶液用无水甲醇和超纯水洗涤得到淡黄色产品,之后于50 °C下真空干燥过夜,得到巯基乙酸功能化的硫化镉量子点材料;

[0081] (5)PBS缓冲溶液的配制

[0082] 取11.94 g十二水合磷酸氢二钠定容于500 mL的容量瓶中配置成浓度为1/15 mol/L的水溶液,作为甲液;取4.54 g磷酸二氢钾定容于500 mL的容量瓶中配置成浓度为1/15 mol/L的水溶液,作为乙液;将甲液和乙液按比例混合,配置成一系列pH在5.0 ~ 8.0的PBS缓冲溶液;

[0083] (6)硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅复合材料的制备

[0084] 取0.7 g介孔二氧化硅材料溶于50 mL无水甲醇溶液中,之后向溶液中加入0.2 g的2-(吡啶基二硫烷基)乙胺,于室温下搅拌18 h,以实现在介孔二氧化硅表面二硫键的连接,之后产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,于35 °C下真空干燥;干燥后的材料溶于含有0.2 g的抗坏血酸的10 mL的PBS缓冲溶液中,于室温下震荡18 h后,向溶液中加入0.02 g所合成的巯基乙酸功能化的硫化镉量子点和0.05 g的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC),在室温下继续震荡19 h,反应结束后,产品用PBS缓冲溶液洗涤3次,冷冻干燥,得到硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅复合材料;

[0085] (7)硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅标记心肌肌钙蛋白I二抗的制备

[0086] 取2 mg所制备的硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅溶于2 mL、pH为7.0的PBS缓冲溶液后,加入200 μL浓度为10 μg/mL的心肌肌钙蛋白I二抗,于30 °C下震荡4 h后,离心,用PBS缓冲溶液洗涤3次,产物溶于2 mL的PBS缓冲溶液中在4 °C冰箱中储存备用;

[0087] (8)光电化学传感器的制备

[0088] 1)将导电玻璃依次用洗洁精、丙酮、乙醇和超纯水超声清洗,氮气吹干;

[0089] 2)取6 μL、4 mg/mL的三氧化钨的水溶液滴加到ITO导电玻璃的导电面,红外灯下晾干;

[0090] 3)在修饰的电极表面继续滴加6 μL、4 mg/mL的硫化铋的水溶液,电极于室温下自然晾干;

[0091] 4)取200 μL浓度为10 μg/mL的心肌肌钙蛋白I捕获抗体滴入96微孔板中,于4 °C

条件下放置12 h以保证抗体与96微孔板牢固结合,抗体孵化结束后,吸出未连接的心肌肌钙蛋白I抗体,用PBS缓冲溶液清洗96微孔板后;

[0092] 5)取100 μL 用PBS配制的质量分数在2 %的牛血清白蛋白滴于96微孔板中,于室温下孵化1小时,之后吸出未结合的牛血清白蛋白,用PBS清洗96微孔板;

[0093] 6)取200 μL 浓度为0.0005 ~ 200 ng/mL 的心肌肌钙蛋白I抗原滴于96微孔板中,在室温下孵化1 h,之后用PBS缓冲溶液清洗96微孔板;

[0094] 7)取200 μL 浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 带有硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅标记的心肌肌钙蛋白I二抗滴于96微孔板中,室温下孵化1 h后,用PBS缓冲溶液冲洗96微孔板;

[0095] 8)取50 μL 用PBS缓冲溶液配制的浓度为15 mmol/L 的二硫苏糖醇滴入96微孔板中,作用20 min;

[0096] 9)将96微孔板中的溶液吸出,注入5 mL的PBS缓冲溶液中作为光电测试的电解质溶液,将修饰的硫化铋/三氧化钨/导电玻璃电极浸入该电解质溶液中,制得一种检测心肌肌钙蛋白抗原I的光电化学传感器。

[0097] 实施例3 光电化学免疫传感器的构建

[0098] (1)三氧化钨材料的制备

[0099] 取2.0 g氯化钨溶于50 mL无水乙醇中,在室温下搅拌2 h后,将混合溶液转移至高压反应釜中于180 $^{\circ}\text{C}$ 下反应8 h,反应结束后自然冷却至室温,之后产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,洗涤结束后,产品于60 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥12 h,制得海胆状的三氧化钨材料;

[0100] (2)硫化铋纳米棒材料的制备

[0101] 取2.0 g五水合硝酸铋溶于30 mL乙二醇中,于室温下搅拌30 min,此溶液作为溶液A;取1.5 g九水合硫化钠溶于50 mL超纯水中,于室温下搅拌20 min,此溶液作为溶液B;取2.0 g尿素溶于40 mL超纯水中,于室温下搅拌均匀,此溶液作为溶液C;将溶液B加入溶液A中,得到黑色混合溶液,搅拌5 min后,将溶液C逐渐加入上述混合溶液中,于室温下搅拌均匀后,转入高压反应釜中,于200 $^{\circ}\text{C}$ 下水热反应28 h,反应结束后自然冷却至室温,之后产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,最后产品于60 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥过夜,得到棒状的硫化铋纳米材料;

[0102] (3)介孔二氧化硅纳米材料的制备

[0103] 取0.5 g十六烷基三甲基溴化铵溶于250 mL超纯水中,之后向溶液中加入2.0 mL浓度为3 mol/L 的氢氧化钠水溶液,该混合溶液于100 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌均匀后,向溶液中逐滴加入3 mL的正硅酸四乙酯溶液,继续搅拌5 h,搅拌结束后自然冷却至室温,产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,之后产品于50 $^{\circ}\text{C}$ 下真空干燥过夜,所得到的固体粉末材料继续在600 $^{\circ}\text{C}$ 下高温煅烧7 h,以除去多余的表面活性剂,得到介孔二氧化硅纳米材料;

[0104] (4)巯基乙酸功能化的硫化镉量子点的制备

[0105] 取0.10 g四水合硝酸镉溶于300 mL超纯水中,搅拌均匀后,加入200 μL 的巯基乙酸溶液,得到浑浊的淡蓝色溶液后,用0.02 mol/L 的氢氧化钠水溶液调节pH至11,之后加入20 mL溶有0.05 g的九水合硫化钠水溶液,遮光搅拌30 min后,混合溶液用无水甲醇和超纯水洗涤得到淡黄色产品,之后于70 $^{\circ}\text{C}$ 下真空干燥过夜,得到巯基乙酸功能化的硫化镉量子点材料;

[0106] (5)PBS缓冲溶液的配置

[0107] 取11.94 g十二水合磷酸氢二钠定容于500 mL的容量瓶中配置成浓度为1/15 mol/L的水溶液,作为甲液;取4.54 g磷酸二氢钾定容于500 mL的容量瓶中配置成浓度为1/15 mol/L的水溶液,作为乙液;将甲液和乙液按比例混合,配置成一系列pH在5.0 ~ 8.0的PBS缓冲溶液;

[0108] (6) 硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅复合材料的制备

[0109] 取1.0 g介孔二氧化硅材料溶于70 mL无水甲醇溶液中,之后向溶液中加入0.3 g的2-(吡啶基二硫烷基)乙胺,于室温下搅拌24 h,以实现在介孔二氧化硅表面二硫键的连接,之后产品用无水乙醇和超纯水各洗涤3次,于35 °C下真空干燥;干燥后的材料溶于含有0.3 g的抗坏血酸的10 mL的PBS缓冲溶液中,于室温下震荡24 h后,向溶液中加入0.03 g所合成的巯基乙酸功能化的硫化镉量子点和0.06 g的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC),在室温下继续震荡24 h,反应结束后,产品用PBS缓冲溶液洗涤3次,冷冻干燥,得到硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅复合材料;

[0110] (7) 硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅标记心肌肌钙蛋白I二抗的制备

[0111] 取5 mg所制备的硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅溶于3 mL、pH为7.0的PBS缓冲溶液后,加入300 μ L浓度为20 μ g/mL的心肌肌钙蛋白I二抗,于40 °C下震荡5 h后,离心,用PBS缓冲溶液洗涤3次,产物溶于2 mL的PBS缓冲溶液中在4 °C冰箱中储存备用;

[0112] (8) 光电化学传感器的制备

[0113] 1) 将导电玻璃依次用洗洁精、丙酮、乙醇和超纯水超声清洗,氮气吹干;

[0114] 2) 取6 μ L、6 mg/mL的三氧化钨的水溶液滴加到ITO导电玻璃的导电面,红外灯下晾干;

[0115] 3) 在修饰的电极表面继续滴加6 μ L、6 mg/mL的硫化铋的水溶液,电极于室温下自然晾干;

[0116] 4) 取200 μ L浓度为20 μ g/mL的心肌肌钙蛋白I捕获抗体滴入96微孔板中,于4 °C条件下放置14 h以保证抗体与96微孔板牢固结合,抗体孵化结束后,吸出未固定的心肌肌钙蛋白I抗体,用PBS缓冲溶液清洗96微孔板后;

[0117] 5) 取100 μ L用PBS配制的质量分数在3%的牛血清白蛋白滴于96微孔板中,于室温下孵化1小时,之后吸出未结合的牛血清白蛋白,用PBS清洗96微孔板;

[0118] 6) 取200 μ L浓度为0.0005 ~ 200 ng/mL的心肌肌钙蛋白I抗原滴于96微孔板中,在室温下孵化1 h,之后用PBS缓冲溶液清洗96微孔板;

[0119] 7) 取200 μ L浓度为20 μ g/mL带有硫化镉封装包覆抗坏血酸的介孔二氧化硅标记的心肌肌钙蛋白I检测抗体滴于96微孔板中,室温下孵化1 h后,用PBS缓冲溶液冲洗96微孔板;

[0120] 8) 取50 μ L用PBS缓冲溶液配制的浓度为20 mmol/L的二硫苏糖醇滴入96微孔板中,作用30 min;

[0121] 9) 将96微孔板中的溶液吸出,注入5 mL的PBS缓冲溶液中作为光电测试的电解质溶液,将修饰的硫化铋/三氧化钨/导电玻璃电极浸入该电解质溶液中,制得一种检测心肌肌钙蛋白I抗原的光电化学传感器。

[0122] 实施例4 心肌肌钙蛋白I的检测

[0123] (1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电

极为辅助电极,制备的ITO修饰电极为工作电极,在含有从96微孔板吸出的溶液的pH为5.0的PBS缓冲溶液中进行测试;

[0124] (2)将所修饰的电极浸入含有从96微孔板中吸出不同的溶液的PBS缓冲溶液中,利用时间-电流法进行测试,设置电压为-0.1 V,运行时间120 s,光源波长为400 nm;

[0125] (3)电极放置好之后,每隔20 s开灯持续照射20 s,记录光电流,绘制工作曲线;

[0126] (4)将待测的心肌肌钙蛋白I抗原样品溶液代替心肌肌钙蛋白I抗原标准溶液进行检测。

[0127] 实施例5 心肌肌钙蛋白I的检测

[0128] (1)使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,制备的ITO修饰电极为工作电极,在含有从96微孔板吸出的溶液的pH为7.0的PBS缓冲溶液中进行测试;

[0129] (2)将所修饰的电极浸入含有从96微孔板中吸出不同的溶液的PBS缓冲溶液中,利用时间-电流法进行测试,设置电压为0 V,运行时间120 s,光源波长为430 nm;

[0130] (3)电极放置好之后,每隔20 s开灯持续照射20 s,记录光电流,绘制工作曲线;

[0131] (4)将待测的心肌肌钙蛋白I抗原样品溶液代替心肌肌钙蛋白I抗原标准溶液进行检测。

[0132] 实施例6 心肌肌钙蛋白I的检测

[0133] (1)使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,制备的ITO修饰电极为工作电极,在含有从96微孔板吸出的溶液的pH为8.0的PBS缓冲溶液中进行测试;

[0134] (2)将所修饰的电极浸入含有从96微孔板中吸出不同的溶液的PBS缓冲溶液中,利用时间-电流法进行测试,设置电压为0.1 V,运行时间120 s,光源波长为450 nm;

[0135] (3)电极放置好之后,每隔20 s开灯持续照射20 s,记录光电流,绘制工作曲线;

[0136] (4)将待测的心肌肌钙蛋白I抗原样品溶液代替心肌肌钙蛋白I抗原标准溶液进行检测。