



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110095596 A

(43)申请公布日 2019.08.06

(21)申请号 201910451497.1

(22)申请日 2019.05.28

(71)申请人 陕西师范大学

地址 710062 陕西省西安市长安南路199号

(72)发明人 刘伟 郭小艳 陈莹 张柳

(74)专利代理机构 西安永生专利代理有限责任  
公司 61201

代理人 高雪霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

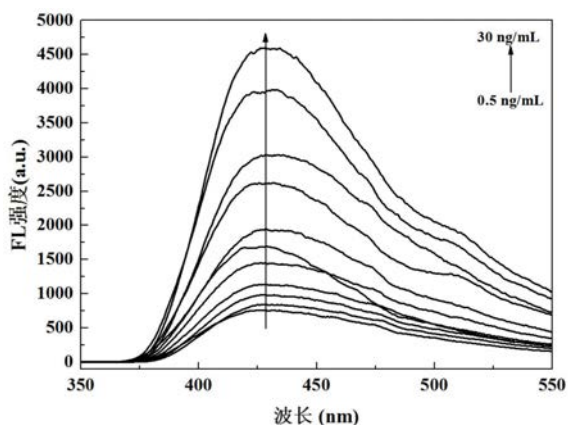
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

## (54)发明名称

基于Fe-MOFs的化学发光-荧光双响应免疫传感器

## (57)摘要

本发明公开了一种基于Fe-MOFs的化学发光-荧光双响应免疫传感器,该免疫传感器包含Fe-MOFs标记的检测抗体和检测区连接捕获抗体并用封闭剂封闭非特异性位点的纸芯片;其中所述的Fe-MOFs是Fe<sup>3+</sup>与2-氨基苯-1,4-二羧酸形成的金属有机框架材料;本发明免疫传感器以Fe-MOFs作为一种信号分子,其稳定性较好,且具有较好的水溶性,此外该材料既具有荧光性能,而且还能够催化鲁米诺-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>化学发光体系产生化学发光。本发明免疫传感器用于免疫反应时,其检测结果的信号输出有两种模式:既可以采用荧光方法检测,又可以采用化学发光方法检测,两种检测方式可以灵活选择。这不仅有助于丰富检测方式,而且两种方式的使用还可以进一步提高检测结果的准确性。



1. 一种基于Fe-MOFs的化学发光-荧光双响应免疫传感器,其特征在于:所述的免疫传感器包含Fe-MOFs标记的检测抗体和检测区连接捕获抗体并用封闭剂封闭非特异性位点的纸芯片;其中所述的Fe-MOFs是 $\text{Fe}^{3+}$ 与2-氨基苯-1,4-二羧酸形成的金属有机框架材料,其结构式为 $\text{Fe}(\text{OH})[(\text{OOC})_2\text{NH}_2-\text{C}_6\text{H}_3] \cdot 0.3(\text{HOO})_2\text{NH}_2-\text{C}_6\text{H}_3$ ,属于斜方晶系,Imma空间群,晶胞参数为: $a=6.9177(14)\text{\AA}$ 、 $b=17.668(3)\text{\AA}$ 、 $c=12.120(3)\text{\AA}$ ,晶胞体积 $Z=4$ 。

2. 根据权利要求1所述的双响应免疫传感器,其特征在于:所述的Fe-MOFs标记的检测抗体的制备方法为:将Fe-MOFs均匀分散于pH为7.4的PBS缓冲溶液中,加入质量浓度为20%~40%的戊二醛水溶液,两者混合均匀,在室温下孵育20~40分钟,离心分离,所得下层物质分散于pH为7.4的PBS缓冲溶液中,加入检测抗体,在5~15℃条件下反应10~12小时,离心分离。

3. 根据权利要求2所述的双响应免疫传感器,其特征在于:所述Fe-MOFs与戊二醛、检测抗体的摩尔比为 $1:5.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \times 10^{-2}:1.5 \times 10^{-3} \sim 3.0 \times 10^{-3}$ 。

4. 根据权利要求1所述的双响应免疫传感器,其特征在于:所述的检测抗体为前列腺特异性抗原的检测抗体、捕获抗体为前列腺特异性抗原的捕获抗体;或者所述的检测抗体为癌胚抗原的检测抗体、捕获抗体为癌胚抗原的捕获抗体;或者所述的检测抗体为糖类抗原125的检测抗体、捕获抗体为糖类抗原125的捕获抗体;或者所述的检测抗体为糖类抗原199的检测抗体、捕获抗体为糖类抗原199的捕获抗体;或者所述的检测抗体为免疫球蛋白的检测抗体、捕获抗体为免疫球蛋白的捕获抗体。

5. 根据权利要求1所述的双响应免疫传感器,其特征在于:所述的封闭剂为牛血清蛋白。

6. 根据权利要求1所述的双响应免疫传感器,其特征在于:所述的检测区连接捕获抗体的方法为:将纸芯片用氧等离子体处理,使其表面生成醛基,然后利用醛基和捕获抗体的氨基连接。

7. 根据权利要求1所述的双响应免疫传感器,其特征在于:所述的纸芯片是用Whatman 1号滤纸或Whatman3号滤纸制作的包含进样区、检测区、废液区、通道的纸芯片。

## 基于Fe-MOFs的化学发光-荧光双响应免疫传感器

### 技术领域

[0001] 本发明属于新兴功能金属有机框架材料与生物传感检测技术领域,具体涉及一种以具有荧光性能的Fe-MOFs为信号标记物的化学发光和荧光双响应免疫传感器。

### 背景技术

[0002] 多维传感检测手段可以实现针对一种分析物质的多种信号输出方式,相较于常见的单一检测模式,多维传感检测由于其检测方式多样化以及检测结果准确度高而得到广泛应用。传统的多维传感器的构建是基于有意将多种不同的信号输出物质整合到单一检测体系,或者是将多个信号分子单元结合到一个信号物质中,以此作为一个整体用于实现检测。在过去的几年里,例如量子点,有机染料,纳米材料等物质被用来构建多维传感检测模型。然而,由于这些物质自身的一些不足使得这一检测的发展受到限制,因此,有待开发新的信号物质来构建和丰富多维传感检测器。

[0003] 自从Whiteside小组于2007年首次提出微流体模式的纸质平台以来,作为微流控芯片中的一种的纸芯片在及时检测方面得到了快速的发展与应用。纸芯片由于其具有可用性,可处理性,良好的物理化学特性等独特的优势被认为是一种新兴的,极具发展前景的反应载体,其在免疫疾病诊断方面的应用也备受关注。据报道纸芯片上的检测手段也非常多样,有化学发光检测法、比色法、电化学法、荧光法等。然而,针对一种待测物质,这些检测手段往往独立进行单一使用的。到目前为止,还没有文献报道,针对一种待测物质,针对同一反应,其最终的信号输出,检测手段有两种的。而两种检测手段的灵活应用可以方便我们的检测。

[0004] 近年来,金属有机框架材料(MOFs)作为一种新兴的材料,在检测领域可以作为一种信号物质。MOFs是一种由金属离子和有机配体通过化学键的连接作用而形成的一种复合材料。MOFs由于其大的比表面积,多孔隙,易于修饰,合成条件温和,有高的活性位点以及所含金属离子密度高等特点,在设计新材料及检测方面得到了极大的关注与探究。最近有将MOFs应用到免疫检测方面的报道,但大多文献中报道的方法是在MOFs的合成过程中,直接加入检测抗体,利用MOFs的孔隙结构,实现检测抗体与MOFs的连接。但这种合成方法会影响检测抗体的结合效率,且由于MOFs的孔隙结构可能会导致检测抗体的泄露,还可能会引起检测抗体的变性,进而影响其性能的发挥。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种以Fe-MOFs作为信号物质,通过共价键和待测物质的检测抗体相连,在纸芯片上构建一种化学发光和荧光双响应的免疫传感器。

[0006] 针对上述目的,本发明所采用的免疫传感器包含Fe-MOFs标记的检测抗体和检测区连接捕获抗体并用封闭剂封闭非特异性位点的纸芯片;其中所述的Fe-MOFs是 $\text{Fe}^{3+}$ 与2-氨基苯-1,4-二羧酸形成的金属有机框架材料 $\text{NH}_2\text{-MIL-53(Fe)}$ ,根据文献“High-Throughput Assisted Rationalization of the Formation of Metal Organic Frameworks in the

Iron(III)Aminoterephthalate Solvothermal System. Inorganic Chemistry, 2008, 47, 17, 7568-7576”中的方法合成,其结构式为 $\text{Fe}(\text{OH})[(\text{OOC})_2\text{NH}_2-\text{C}_6\text{H}_3] \cdot 0.3(\text{HOOC})_2\text{NH}_2-\text{C}_6\text{H}_3$ ,属于斜方晶系,Imma空间群,晶胞参数为: $a=6.9177(14)\text{\AA}$ 、 $b=17.668(3)\text{\AA}$ 、 $c=12.120(3)\text{\AA}$ ,晶胞体积 $Z=4$ 。

[0007] 上述Fe-MOFs标记的检测抗体的制备方法为:将Fe-MOFs均匀分散于pH为7.4的PBS缓冲溶液中,加入质量浓度为20%~40%的戊二醛水溶液,两者混合均匀,在室温下孵育20~40分钟,离心分离,所得下层物质分散于pH为7.4的PBS缓冲溶液中,加入检测抗体,在5~15℃条件下反应10~12小时,离心分离。

[0008] 上述Fe-MOFs标记的检测抗体的制备方法中,优选Fe-MOFs与戊二醛、检测抗体的摩尔比为 $1:5.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \times 10^{-2}:1.5 \times 10^{-3} \sim 3.0 \times 10^{-3}$ 。

[0009] 本发明免疫传感器中,所述的检测抗体为前列腺特异性抗原的检测抗体、癌胚抗原的检测抗体、糖类抗原125的检测抗体、糖类抗原199的检测抗体、免疫球蛋白的检测抗体等,依次对应的捕获抗体为前列腺特异性抗原的捕获抗体、癌胚抗原的捕获抗体、糖类抗原125的捕获抗体、糖类抗原199的捕获抗体、免疫球蛋白的捕获抗体等。

[0010] 本发明免疫传感器中,所述的封闭剂为牛血清蛋白。

[0011] 本发明免疫传感器中,所述的检测区连接捕获抗体的方法为:将纸芯片用氧等离子体处理,使其表面生成醛基,然后利用醛基和捕获抗体的氨基连接。

[0012] 本发明免疫传感器中,所述的纸芯片是用Whatman 1号滤纸或Whatman 3号滤纸制作的包含进样区、检测区、废液区、通道的纸芯片。

[0013] 本发明免疫传感器的制作方法如下:

[0014] 1、在Fe-MOFs上通过共价键连接待测物质的检测抗体,得到Fe-MOFs标记的检测抗体。

[0015] 2、将纸芯片用氧等离子体处理,使其表面生成醛基,然后在纸芯片的检测区连接捕获抗体并用封闭剂封闭非特异性位点。

[0016] 采用本发明免疫传感器检测待测物质时,先在检测区连接捕获抗体并用封闭剂封闭非特异性位点的纸芯片的各个检测区分别加入不同浓度抗原标准品溶液,使其与固定在纸芯片上的PSA捕获抗体结合15分钟后,用pH为7.4的PBS缓冲溶液经环炉洗涤5分钟,自然晾干。然后在纸芯片的各个检测区分别加入Fe-MOFs标记的检测抗体,室温反应15分钟后,用pH为7.4的PBS缓冲溶液经环炉洗涤5分钟,自然晾干。再采用化学发光法或荧光法检测不同浓度抗原标准品溶液对应的化学发光强度或荧光强度,绘制化学发光强度或荧光强度随抗原标准品浓度变化的标准曲线,然后采用该方法检测实际样品,结合标准曲线即可实现实际样品的定性和定量检测。

[0017] 本发明的有益效果如下:

[0018] 1、本发明免疫传感器以Fe-MOFs作为一种信号分子,其稳定性较好,且具有较好的水溶性,此外该材料既具有荧光性能,而且还能够催化鲁米诺- $\text{H}_2\text{O}_2$ 化学发光体系产生化学发光。同时其表面含有较为活泼、易于修饰的活性官能团 $-\text{NH}_2$ ,可通过交联剂戊二醛与检测抗体上的 $-\text{NH}_2$ 共价键结合,相较于文献报道的一锅法合成法相比,具有结合较为牢固,结合方式较为温和,不会出现抗体在MOFs材料中的泄露,不会破坏抗体的活性等优势。

[0019] 2、本发明免疫传感器用于免疫反应时,其检测结果的信号输出有两种模式:既可

以采用荧光方法检测,又可以采用化学发光方法检测,两种检测方式可以灵活选择。这不仅有助于丰富检测方式,而且两种方式的使用还可以进一步提高检测结果的准确性。

### 附图说明

- [0020] 图1是实施例1中的免疫传感器用于PSA检测时的荧光分析特性曲线。  
[0021] 图2是实施例1中的免疫传感器用于PSA检测时的荧光分析标准曲线。  
[0022] 图3是实施例1中的免疫传感器用于PSA检测时的化学发光分析特性曲线。  
[0023] 图4是实施例1中的免疫传感器用于PSA检测时的化学发光分析标准曲线。  
[0024] 图5是实施例1中的免疫传感器与QDs作为信号分子的免疫传感器用于PSA荧光检测时的稳定性比较。

### 具体实施方式

[0025] 下面结合附图和实施例对本发明进一步详细说明,但本发明的保护范围不仅限于这些实施例。

#### [0026] 实施例1

[0027] 本实施例以前列腺特异性抗原(PSA)免疫传感器为例,其由Fe-MOFs标记的PSA检测抗体和检测区连接PSA捕获抗体并用牛血清蛋白(BSA)封闭非特异性位点的纸芯片组成,其制作方法以及采用该传感器检测PSA的方法如下:

[0028] 1、按照Fe-MOFs与戊二醛、PSA检测抗体的摩尔比为 $1:6.25 \times 10^{-3}:2.8 \times 10^{-3}$ ,将30mg Fe-MOFs均匀分散到10mL pH为7.4的PBS缓冲溶液中,加入2.5mL质量浓度为25%的戊二醛水溶液,两者混合均匀,在室温下孵育30分钟,然后离心分离,所得下层物质溶解在pH为7.4的PBS缓冲溶液中,配制成5mg/mL的溶液,再加入100 $\mu$ L 60 $\mu$ g/mL PSA检测抗体溶液(由pH为7.4的PBS缓冲溶液配制),在10 $^{\circ}$ C条件下反应12小时,离心分离以除去未反应的PSA检测抗体,并用pH为7.4的PBS缓冲溶液洗涤,自然晾干,得到Fe-MOFs标记的PSA检测抗体。

[0029] 2、将Whatman 1号滤纸粘到塑料垫纸板上,按照在CorelDraw X6软件中设计好的纸芯片形状,用切割机剪切,得到纸芯片,所述纸芯片由11个检测区、一个进样区、11个通道以及周围的环圈废液区组成。将得到的纸芯片用氧等离子体清洗机处理4分钟,使其表面生成功能性基团醛基,以用于捕获抗体的固定。然后将得到的纸芯片的各个检测区加入2.5 $\mu$ L 60 $\mu$ g/mL PSA捕获抗体溶液(由pH为7.4的PBS缓冲溶液配制),室温孵育30分钟,然后用pH为7.4的PBS缓冲溶液经环炉(Wei Liu, Yumei Guo, Mei Zhao, Ring-Oven Washing Technique Integrated Paper-based Immunodevice for Sensitive Detection of Cancer Biomarker, Anal. Chem, 2015, 87, 7951-7957)洗涤5分钟,以洗去未反应的捕获抗体,自然晾干。再在各个检测区加入2.5 $\mu$ L质量浓度为0.06%的BSA溶液(由pH为7.4的PBS缓冲溶液配制),反应15分钟,以封闭非特异性位点,再用pH为7.4的PBS缓冲溶液经环炉洗涤5分钟,以洗去未反应的BSA,自然晾干,得到检测区连接PSA捕获抗体并用BSA封闭非特异性位点的纸芯片。

[0030] 3、在步骤2得到的纸芯片的各个检测区分别加入2.5 $\mu$ L不同浓度(0.5、1、2、4、6、8、10、15、20、25、30ng/mL,由pH为7.4的PBS缓冲溶液配制)的PSA抗原标准品溶液,使其与固定在纸芯片上的PSA捕获抗体结合15分钟后,用pH为7.4的PBS缓冲溶液经环炉洗涤5分钟,自

然晾干。然后在纸芯片的各个检测区分别加入2.5 $\mu$ L步骤1得到的Fe-MOFs标记的PSA检测抗体,室温反应15分钟后,用pH为7.4的PBS缓冲溶液经环炉洗涤5分钟,自然晾干。

[0031] 4、将步骤3得到的纸芯片上的各个检测区剪下来,分别用化学发光法和荧光法进行检测。对于荧光检测法,将剪下来的检测区置于固体支架上,用300nm的激发光激发,检测428nm处的荧光强度并记录下来,结果如图1和2所示。对于化学发光检测法,将剪下来的检测区置于化学发光仪的检测暗盒中,用流动注射泵注入20 $\mu$ L pH为11的鲁米诺-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>混合液,用化学发光仪将化学发光信号记录下来,结果见图3和4。

[0032] 由图1和图2可见,当PSA浓度在0.5~30ng/mL范围内变化时,荧光强度与其浓度有较好的线性关系。线性方程为 $Y=126C+707$ , $R^2=0.9974$ ,其中,Y表示荧光强度,C表示PSA浓度。检出限为0.2ng/mL。

[0033] 由图3和图4可见,当PSA浓度在1.0~30.0ng/mL范围内变化时,化学发光强度与其浓度呈现较好的线性关系。线性方程为 $Y=115C+255$ , $R^2=0.9949$ ,其中Y表示化学发光强度,C代表PSA浓度。检出限为0.3ng/mL。

[0034] 为了证明本发明免疫传感器的稳定性,将实施例1构建的免疫传感器与量子点CdTe-QDs作为信号标记物时构建的免疫传感器的稳定性进行比较,结果见图5。由图5可见,实施例1构建的免疫传感器在免疫检测中,前3天其荧光信号比较稳定,随着时间的延长,其荧光信号逐渐降低。而当量子点作为信号标记物时,刚合成出来的荧光信号与放置一天、两天、三天后的荧光信号相差较大,衰减较多,其稳定性要差一些。说明本发明以Fe-MOFs为信号标记物所构建的免疫传感器的稳定性良好。

[0035] 为了验证本发明免疫传感器的可行性,发明人采集了志愿者的血清进行实际样品中PSA含量的测定,并将检测结果与ELISA标准方法的检测结果进行了对比,此外还进行了加标回收实验,实验结果如表1所示。

[0036] 表1本发明免疫传感器与标准方法检测实际样品的分析结果

[0037]

样品	原始浓度 (ng/mL)	加标量 (ng/mL)	测定值 $\pm$ SD(ng/mL)		
			FL	CL	ELISA
1	1.2	2.0	3.4 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.2
		4.0	5.1 $\pm$ 0.1	5.2 $\pm$ 0.2	5.1 $\pm$ 0.1
		6.0	7.2 $\pm$ 0.1	7.1 $\pm$ 0.3	7.2 $\pm$ 0.1
2	1.7	2.0	3.7 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.1	3.7 $\pm$ 0.1
		4.0	5.8 $\pm$ 0.3	5.9 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 0.3
		6.0	7.8 $\pm$ 0.1	7.8 $\pm$ 0.1	7.8 $\pm$ 0.1
3	2.3	2.0	4.2 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.3
		4.0	6.3 $\pm$ 0.1	6.1 $\pm$ 0.3	6.3 $\pm$ 0.1
		6.0	8.2 $\pm$ 0.2	8.1 $\pm$ 0.1	8.2 $\pm$ 0.2

[0038] 由表1可见,ELISA标准方法的检测结果与采用本发明免疫传感器检测的结果不存在显著性差异,且加标回收的RSD值均在 $\pm 5\%$ 以内,说明本发明免疫传感器用于实际样品的检测是准确可行的。

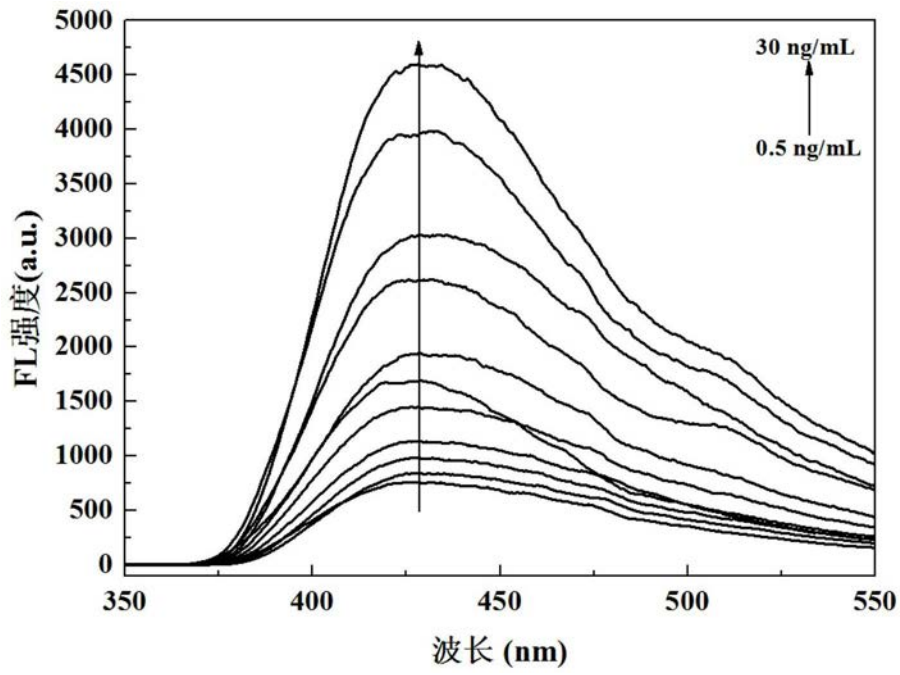


图1

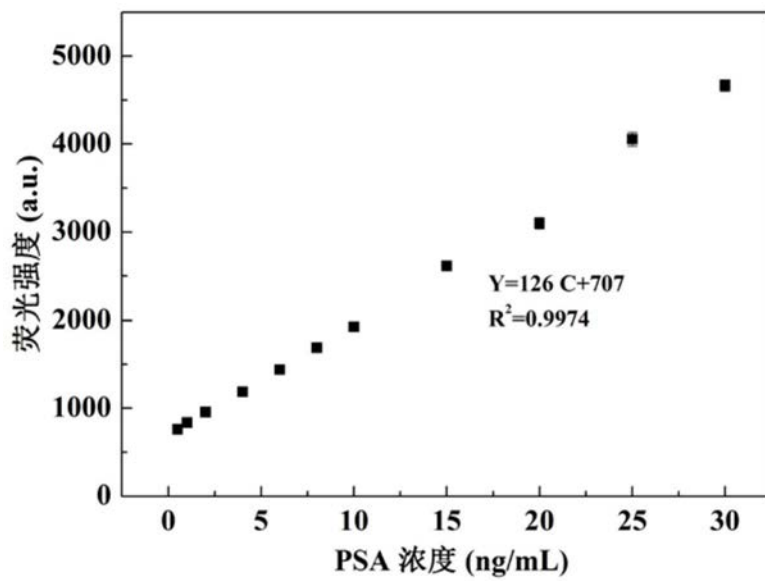


图2

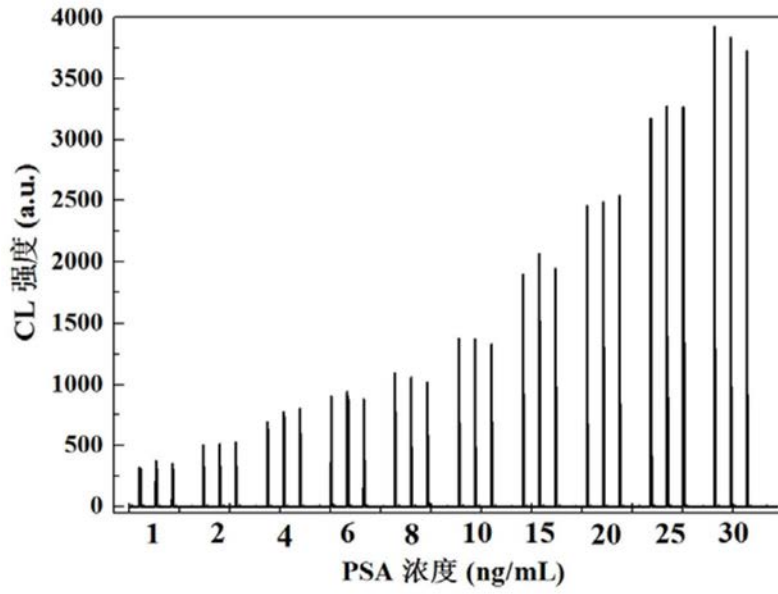


图3

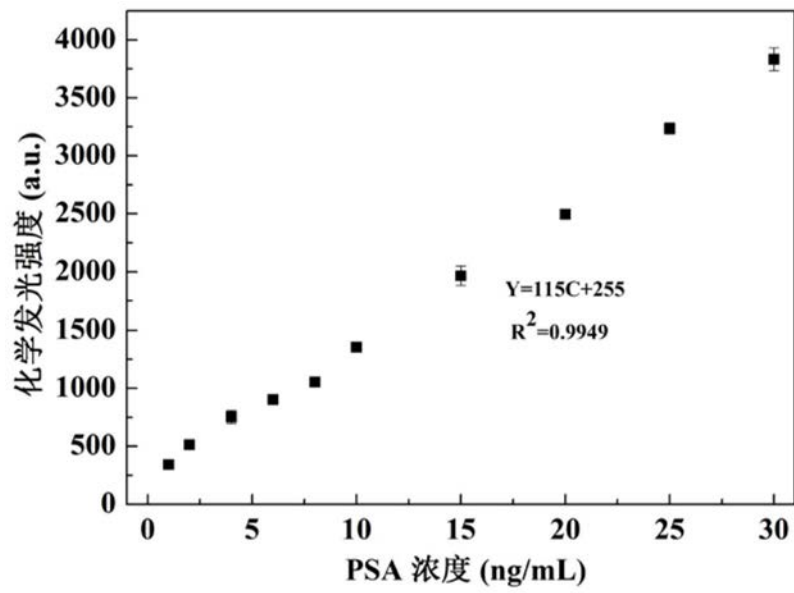


图4

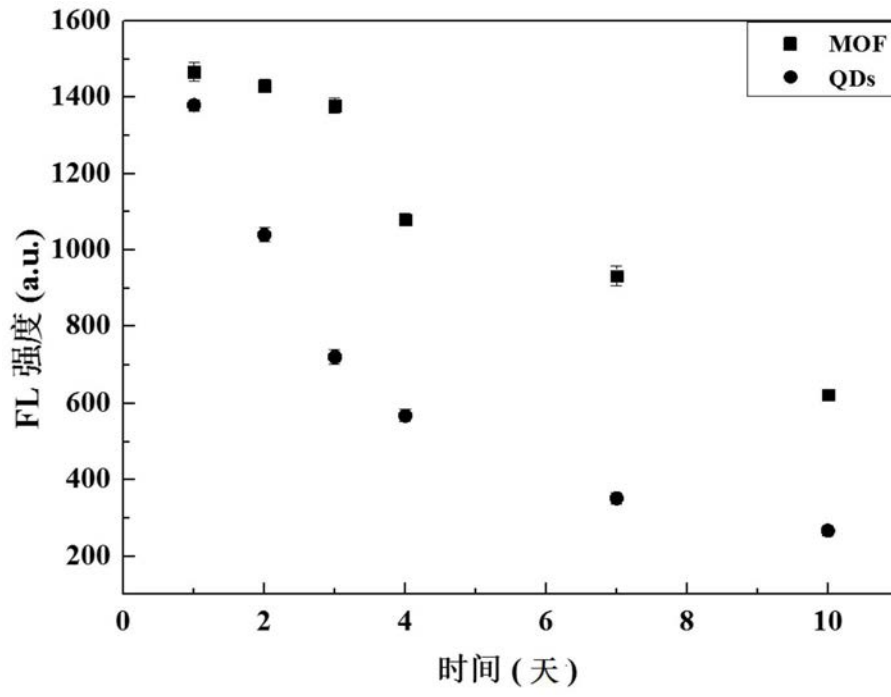


图5

专利名称(译)	基于Fe-MOFs的化学发光-荧光双响应免疫传感器		
公开(公告)号	<a href="#">CN110095596A</a>	公开(公告)日	2019-08-06
申请号	CN201910451497.1	申请日	2019-05-28
[标]申请(专利权)人(译)	陕西师范大学		
申请(专利权)人(译)	陕西师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	陕西师范大学		
[标]发明人	刘伟 郭小艳 陈莹 张柳		
发明人	刘伟 郭小艳 陈莹 张柳		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/6402 G01N21/6486 G01N21/76 G01N33/533		
代理人(译)	高雪霞		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种基于Fe-MOFs的化学发光-荧光双响应免疫传感器，该免疫传感器包含Fe-MOFs标记的检测抗体和检测区连接捕获抗体并用封闭剂封闭非特异性位点的纸芯片；其中所述的Fe-MOFs是Fe<sup>3+</sup>与2-氨基苯-1,4-二羧酸形成的金属有机框架材料；本发明免疫传感器以Fe-MOFs作为一种信号分子，其稳定性较好，且具有较好的水溶性，此外该材料既具有荧光性能，而且还能够催化鲁米诺-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>化学发光体系产生化学发光。本发明免疫传感器用于免疫反应时，其检测结果的信号输出有两种模式：既可以采用荧光方法检测，又可以采用化学发光方法检测，两种检测方式可以灵活选择。这不仅有助于丰富检测方式，而且两种方式的使用还可以进一步提高检测结果的准确性。

