



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106526159 A

(43)申请公布日 2017. 03. 22

(21)申请号 201610985908.1

(22)申请日 2016.11.09

(71)申请人 福建师范大学

地址 350108 福建省福州市闽侯上街镇大学城福建师范大学科技处

(72)发明人 林燕语 戴宏 高利红

(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 33/53(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

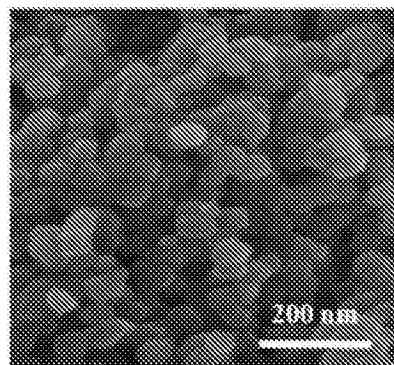
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种基于TiO₂介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器的制备方法及应用

(57)摘要

本发明公开一种基于TiO₂介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器的制备方法及应用,特点是基于两种TiO₂介晶纳米材料,结合电化学及电化学发光方法,制备一种新的双响应夹心型免疫传感器,并用于白介素6的检测。锐钛矿型TiO₂介晶材料和离子液体,分别用于固定Ru(bpy)₃²⁺和IL-6抗体,作为信号探针和分子识别探针;八面体锐钛矿型TiO₂介晶材料用于固定辣根过氧化物酶标记的IL-6二抗和酸性磷酸酶,其将通过典型的夹心型免疫反应自组装到电极表面,制得IL-6夹心型免疫传感器。所制备的传感器可产生电化学信号及电化学发光信号,信号值与IL-6浓度分别在10⁻⁶-90 pg/mL范围内及10⁻⁸-90 pg/mL范围内成线性。



1. 一种基于 TiO_2 介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

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,最后依序用乙醇,稀酸和水彻底洗涤;

滴加4 μL 锐钛矿型 TiO_2 介晶(AMCs)/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶液于干净的玻碳电极表面,60 $^\circ\text{C}$ 下干燥20min,制得AMCs/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /GCE修饰电极;

滴加4 μL 羧基化离子液体(CTIL)溶液于AMCs/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /GCE修饰电极表面,60 $^\circ\text{C}$ 下干燥20min,制得CTIL/AMCs/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /GCE修饰电极;

将CTIL/AMCs/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /GCE修饰电极浸入浓度比为1:2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)混合液中50min,再浸入5 μL 浓度为2 mg/mL白介素6抗体(Ab_1)溶液中并在4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中孵育45min,用去离子水洗去物理吸附的 Ab_1 ,制得 Ab_1 /CTIL/AMCs/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /GCE修饰电极;

将 Ab_1 /CTIL/AMCs/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /GCE修饰电极浸入0.5 wt.%的BSA溶液中并在4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中孵育1 h,以封闭电极表面上非特异性活性位点,用去离子水冲洗电极表面洗去物理吸附,并保存在4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中;

将步骤(5)获得的电极浸入不同浓度的白介素6(IL-6)标准溶液中并在4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中孵育30 min,用pH7.5的PBS缓冲溶液冲洗电极表面,制得IL-6/ Ab_1 /CTIL/AMCs/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /GCE修饰电极;

将IL-6/ Ab_1 /CTIL/AMCs/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /GCE修饰电极浸入辣根过氧化物酶(HRP)标记的IL-6二抗(Ab_2)和酸性磷酸酶(ACP)及八面体锐钛矿型 TiO_2 介晶(OAMs)(Ab_2 -HRP/ACP/OAMs)复合物溶液并在4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中孵育40 min,用pH7.5的PBS缓冲溶液冲洗电极表面,制得 Ab_2 -HRP/ACP/OAMs/IL-6/ Ab_1 /CTIL/AMCs/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /GCE,并保存在4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的锐钛矿型 TiO_2 介晶(AMCs)/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶液由下述方法制备:500 μL 浓度为10mg/mL的AMCs溶液与500 μL 浓度为0.01mol/L的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶液混合2 h,在10000 rpm转速下离心10 min,收集AMCs/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 沉淀物,在去离子水中重新分散以备使用。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述的锐钛矿型 TiO_2 介晶(AMCs)材料由下述方法制备的:4.5g的十二烷基硫酸钠(SDS)溶解在150mL浓度为2 mol/L的盐酸溶液中,搅拌5分钟;加入4.5mL异丙醇(TIP)钛(IV),在80 $^\circ\text{C}$ 下搅拌48 h,离心收集沉淀物并用蒸馏水彻底清洗;在60 $^\circ\text{C}$ 下烘干12 h,然后在空气中400 $^\circ\text{C}$ 下煅烧30min,以除去残余的有机物,制得AMCs。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的辣根过氧化物酶(HRP)标记的IL-6二抗(Ab_2)和酸性磷酸酶(ACP)及八面体锐钛矿型 TiO_2 介晶(OAMs)(Ab_2 -HRP/ACP/OAMs)复合物溶液由下述方法制备:1 mL OAMs 悬浮液与40 μL (3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(APTES)在室温下搅拌12 h,离心收集氨基化的OAMs沉淀物并用蒸馏水彻底清洗去掉多余的APTES;将20 μL 浓度为10mg/mL HRP标记的 Ab_2 溶液及浓度为1mg/mL的ACP与10 μL 浓度为10 mM的(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)(EDC)及10 μL 浓度为20 mM的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)混合50 min,加入氨基功能化的OAMs溶液4 $^\circ\text{C}$ 放置12 h,在10000 rpm转速下离心10 min获得 Ab_2 -HRP/ACP/OAMs复合物并分散在pH 7.4 PBS溶液中保存。

5. 根据权利要求4所述的方法, 其特征在于, 所述的八面体锐钛矿型 TiO_2 介晶(OAMs)材料由下述方法制备的: 1.2克的锐钛矿型 TiO_2 粉末溶解于60mL浓度为18mol/L的KOH溶液中, 搅拌20分钟后, 将悬浮液移入一个100mL聚四氟乙烯内衬不锈钢高压釜内; 密封反应器, 170°C 下反应72小时, 冷却到室温; 然后, 用稀醋酸溶液洗涤沉淀至沉淀pH值为3.5, 沉淀离心后在 65°C 下干燥12小时得到产物钛酸纳米线; 取400mg前驱体钛酸纳米线分散在70mL稀醋酸中, 于100聚四氟乙烯高压反应釜中 200°C 条件下反应48h, 所得到的产物用蒸馏水和无水乙醇离心洗涤, 60°C 条件下烘干12h并 400°C 下煅烧30分钟, 以除去残余的有机物, 制得OAMs。

6. 权利要求1-5任一所述的方法制备的一种基于 TiO_2 介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器。

7. 权利要求6所述的一种基于 TiO_2 介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器, 其特征在于, 用于白介素6(IL-6)的检测, 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6所述的一种基于 TiO_2 介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器为工作电极, Ag/AgCl为参比电极, 铂丝电极为对电极, 在含有浓度为 5×10^{-3} mol/L 1-萘磷酸(NPP)和浓度为 15×10^{-3} mol/L H_2O_2 的pH7.5的PBS缓冲溶液中进行测试, 采用差示脉冲伏安法(DPV), 扫描电压范围为0.2V-0.6V, 扫描速率为100 mV/s, 通过所得的氧化峰电流信号与IL-6标准溶液浓度之间的关系, 绘制电化学工作曲线;

(2) 使用电化学工作站采用三电极体系进行测定, 以权利要求6所述的一种基于 TiO_2 介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器为工作电极, Ag/AgCl为参比电极, 铂丝电极为对电极, 在含有浓度为 5×10^{-3} mol/L 1-萘磷酸(NPP)和浓度为 15×10^{-3} mol/L H_2O_2 的pH7.5的PBS缓冲溶液中进行测试, 采用循环伏安电压, 扫描电压范围为0V-1.3V, 扫描速率为100 mV/s, 通过电致化学发光设备采集电致化学发光信号, 光电倍增管电压为900V, 通过所得的电致化学发光强度与IL-6标准溶液浓度之间的关系, 绘制电致化学发光工作曲线;

(3) 待测样品溶液代替IL-6标准溶液进行检测, 检测的结果通过工作曲线查得。

一种基于TiO₂介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器的制备方法及应用

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TiO₂介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 白细胞介素6(IL-6),简称白介素6,参与了大量的生物活性过程,如杂交瘤细胞的生长和免疫系统的调节等。此外,IL-6是诊断疾病,包括糖尿病、动脉粥样硬化、抑郁症,阿尔茨海默病、癌症等的潜在因素。各种分析方法已经应用于各种疾病中IL-6的检测分析,包括酶联免疫吸附测定,表面等离子体共振,荧光芯片,化学发光免疫分析法,电化学免疫和电化学发光免疫分析。尽管这些分析方法具有许多优点,寻找一种新的方法提高准确性、选择性和IL-6的检测灵敏度,仍然是一个挑战。因此在临床研究上,发展一种快速、简便、灵敏和低成本的IL-6的检测方法有着巨大的需求及重要的意义。

[0003] 电化学发光免疫传感器,利用抗原与抗体之间的特异性结合的一类生物传感器,具有灵敏度高、选择性好、操作简便、易于小型化、可连续快速、自动化检测分析等优点,具有良好的应用前景。本发明制备了一种基于TiO₂介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器,并实现对白介素6的高灵敏检测。锐钛矿型TiO₂介晶材料(AMCs)和离子液体(CTIL),分别用于固定Ru(bpy)₃²⁺和IL-6抗体(Ab₁),作为信号探针和分子识别探针;八面体锐钛矿型TiO₂介晶(OAMs)材料用于固定辣根过氧化物酶(HRP)标记的IL-6二抗(Ab₂)和酸性磷酸酶(ACP),其将通过典型的夹心型免疫反应自组装到电极表面,制得IL-6夹心型免疫传感器。1-萘酚,传感界面原位上催化水解1-萘磷酸(NPP)的产物,可被HRP及H₂O₂氧化,产生EC信号,EC信号与IL-6浓度在一定范围内显示很宽的动态线性范围;另一方面,1-萘酚氧化产物可以猝灭Ru(bpy)₃²⁺的ECL,导致发光强度的下降,ECL强度与IL-6浓度在一定范围内显示了一个宽的动态线性范围。基于TiO₂介晶纳米材料优异的生物相容性及离子液体的良好的电子传导性,所制得的免疫传感器具有特异性强、灵敏度高、稳定性好、检测限低等优点。

发明内容

[0004] 本发明的目的之一是TiO₂介晶纳米材料,构建一种稳定性好,灵敏度高的双响应夹心型免疫传感器的制备。

[0005] 本发明的目的之二是将该双响应夹心型免疫传感器应用于白介素6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:

1.一种基于TiO₂介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器的制备方法:

(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,最后依序用乙醇,稀酸和水彻底洗涤;

(2) 滴加4μL锐钛矿型TiO₂介晶(AMCs)/Ru(bpy)₃²⁺溶液于干净的玻碳电极表面,60°

C下干燥20min,制得AMCs/Ru(bpy) $_3^{2+}$ /GCE电极;

(3) 滴加4 μ L 羧基化离子液体(CTIL)溶液于AMCs/Ru(bpy) $_3^{2+}$ /GCE修饰电极表面,60°C下干燥20min,制得CTIL/AMCs/Ru(bpy) $_3^{2+}$ /GCE电极;

(4) 将CTIL/AMCs/Ru(bpy) $_3^{2+}$ /GCE修饰电极浸入浓度比为1:2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)混合液中50min,再浸入5 μ L浓度为2 mg/mL白介素6抗体(Ab $_1$)溶液中并在4°C冰箱中孵育45min,用去离子水洗去物理吸附的Ab $_1$,制得Ab $_1$ /CTIL/AMCs/Ru(bpy) $_3^{2+}$ /GCE电极;

(5) 将Ab $_1$ /CTIL/AMCs/Ru(bpy) $_3^{2+}$ /GCE修饰电极浸入0.5 wt.%的BSA溶液中并在4°C冰箱中孵育1 h,以封闭电极表面上非特异性活性位点,用去离子水冲洗电极表面洗去物理吸附,并保存在4°C冰箱中;

(6) 将步骤(5)得到的电极浸入不同浓度的白介素6(IL-6)标准溶液中并在4°C冰箱中孵育30 min,用pH7.5的 PBS缓冲溶液冲洗电极表面,制得IL-6/Ab $_1$ /CTIL/AMCs/Ru(bpy) $_3^{2+}$ /GCE电极;

(7) 将电IL-6/Ab $_1$ /CTIL/AMCs/Ru(bpy) $_3^{2+}$ /GCE极浸入辣根过氧化物酶(HRP)标记的IL-6二抗(Ab $_2$)和酸性磷酸酶(ACP)及八面体锐钛矿型TiO $_2$ 介晶(OAMs)(Ab $_2$ -HRP/ACP/OAMs)复合物溶液并在4°C冰箱中孵育40 min,用pH7.5的 PBS缓冲溶液冲洗电极表面,制得Ab $_2$ -HRP/ACP/OAMs/IL-6/Ab $_1$ /CTIL/AMCs/Ru(bpy) $_3^{2+}$ /GCE电极,并保存在4°C冰箱中。

[0007] 2.上述锐钛矿型TiO $_2$ 介晶(AMCs)/Ru(bpy) $_3^{2+}$ 溶液由下述方法制备:500 μ L浓度为10mg/mL的AMCs溶液与500 μ L浓度为0.01mol/L的Ru(bpy) $_3^{2+}$ 溶液混合2 h,在10000 rpm转速下离心10 min,收集AMCs/Ru(bpy) $_3^{2+}$ 沉淀物,在去离子水中重新分散以备使用。

[0008] 3.上述锐钛矿型TiO $_2$ 介晶(AMCs)材料由下述方法制备的:4.5g的十二烷基硫酸钠(SDS)溶解在150mL浓度为2 mol/L的盐酸溶液中,搅拌5分钟;加入4.5mL异丙醇(TIP)钛(IV),在80°C下搅拌48 h,离心收集沉淀物并用蒸馏水彻底清洗;在60°C下烘干12 h,然后在空气中400°C下煅烧30min,,以除去残余的有机物,制得AMCs。

[0009] 4.上述辣根过氧化物酶(HRP)标记的IL-6二抗(Ab $_2$)和酸性磷酸酶(ACP)及八面体锐钛矿型TiO $_2$ 介晶(OAMs)(Ab $_2$ -HRP/ACP/OAMs)复合物溶液由下述方法制备:1 mL OAMs 悬浮液与40 μ L(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(APTES)试剂在室温下搅拌12 h,离心收集氨基化的OAMs沉淀物并用蒸馏水彻底清洗去掉多余的APTES;将20 μ L浓度为10mg/mL HRP标记的Ab $_2$ 溶液及浓度为1mg/mL ACP与10 μ L浓度为10 mM的(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)(EDC)及10 μ L浓度为20 mM的 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)混合50 min,加入氨基功能化的 OAMs 溶液4°C放置12 h,在10000 rpm 转速下离心10 min 获得Ab $_2$ -HRP/ACP/OAMs复合物并分散在pH 7.4 PBS溶液中保存。

[0010] 5.上述八面体锐钛矿型TiO $_2$ 介晶(OAMs)材料由下述方法制备的:1.2克的锐钛矿型TiO $_2$ 粉末溶解于60mL浓度为18mol/L的 KOH溶液中,搅拌20分钟后,将悬浮液移入一个100mL聚四氟乙烯内衬不锈钢高压釜内;密封反应器,170°C 下反应72小时,冷却到室温;然后,用稀醋酸溶液洗涤沉淀至沉淀pH值为3.5,沉淀离心后在65°C下干燥12 小时得到产物钛酸纳米线.;取400mg前驱体钛酸纳米线分散在70mL稀醋酸中,于100聚四氟乙烯高压反应釜中200°C条件下反应 48h,所得到的产物用蒸馏水和无水乙醇离心洗涤,60°C条件下烘

干12 h并400°C下煅烧 30分钟,以除去残余的有机物,制得OAMs。

[0011] 6.白介素6(IL-6)的检测步骤如下:

(1)使用电化学工作站采用三电极体系进行测定,以上述一种基于TiO₂介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器为工作电极,Ag/AgCl为参比电极,铂丝电极为对电极,在含有浓度为 5×10^{-3} mol/L 1-萘磷酸(NPP)和浓度为 15×10^{-3} mol/L H₂O₂的pH7.5的 PBS缓冲溶液中进行测试,采用差示脉冲伏安法(DPV),扫描电压范围为0.2V-0.6 V,扫描速率为100 mV/s,通过所得的氧化峰电流信号与IL-6标准溶液浓度之间的关系,绘制电化学工作曲线;

(2)使用电化学工作站采用三电极体系进行测定,以上述一种基于TiO₂介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器为工作电极,Ag/AgCl为参比电极,铂丝电极为对电极,在含有浓度为 5×10^{-3} mol/L 1-萘磷酸(NPP)和浓度为 15×10^{-3} mol/L H₂O₂的pH7.5的 PBS缓冲溶液中进行测试,采用循环伏安电压,扫描电压范围为0V-1.3 V,扫描速率为100 mV/s,通过电致化学发光设备采集电致化学发光信号,光电倍增管电压为900V,通过所得的电致化学发光强度与IL-6标准溶液浓度之间的关系,绘制电化学发光工作曲线;

(3)待测样品溶液代替IL-6标准溶液进行检测,检测的结果通过工作曲线查得。

[0012] 本发明的显著优点为:

(1)所制备的锐钛矿型TiO₂ 介晶材料(AMCs)和八面体锐钛矿型TiO₂介晶(OAMs)具有大比表面积及良好的生物相容性有利于发光试剂、酶和抗体本在电极表面的固定,可提高传感器的灵敏度及稳定性;

(2)通过酶催化反应在传感器界面原位生成电活性物质,所制备的免疫传感器具有较高的灵敏度;

(3)所制备的双响应夹心型免疫传感器可产生电化学发光及电化学信号,具有较高的选择性及灵敏度;

(4)本发明利用抗原、抗体的免疫反应,提高了检测方法的特异性。

附图说明

[0013] 图1为一种基于TiO₂介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器的制备过程示意图。

[0014] 图2A为AMCs材料的电子发射扫描电子显微镜(SEM)图。

[0015] 图2B及图2C为AMCs材料的透射电子显微镜(TEM)图。

[0016] 图2C插图 of AMCs 纳米片的高分辨透射电子显微镜(HRTEM)及选区电子衍射(SAED)图。

[0017] 图2D为OAMs材料的电子发射扫描电子显微镜(SEM)图。

[0018] 图2E及图2F为OAMs材料的透射电子显微镜(TEM)图。

[0019] 图2F插图 of OAMs 纳米片的高分辨透射电子显微镜(HRTEM)及选区电子衍射(SAED)图。

[0020] 图3为双响应夹心型免疫传感电极的电化学信号及电化学发光响应信号与白介素6标准溶液浓度的线性关系图。

具体实施方式

[0021] 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。

[0022] 实施例1

一种基于TiO₂介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器的制备(如图1所示):

(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,最后依序用乙醇,稀酸和水彻底洗涤;

(2) 滴加4μL锐钛矿型TiO₂ 介晶(AMCs)/Ru(bpy)₃²⁺溶液于干净的玻碳电极表面,60°C下干燥20min,制得AMCs/Ru(bpy)₃²⁺/GCE电极;

(3) 滴加4μL 羧基化离子液体(CTIL)溶液于AMCs/Ru(bpy)₃²⁺/GCE修饰电极表面,60°C下干燥20min,制得CTIL/AMCs/Ru(bpy)₃²⁺/GCE电极;

(4) 将CTIL/AMCs/Ru(bpy)₃²⁺/GCE修饰电极浸入浓度比为1:2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)混合液中50min,再浸入5 μL浓度为2 mg/mL白介素6抗体(Ab₁)溶液中并在4°C冰箱中孵育45min,用去离子水洗去物理吸附的Ab₁,制得Ab₁/CTIL/AMCs/Ru(bpy)₃²⁺/GCE电极;

(5) 将Ab₁/CTIL/AMCs/Ru(bpy)₃²⁺/GCE修饰电极浸入0.5 wt.%的BSA溶液中并在4°C冰箱中孵育1 h,以封闭电极表面上非特异性活性位点,用去离子水冲洗电极表面洗去物理吸附,并保存在4°C冰箱中;

(6) 将步骤(5)得到的电极浸入不同浓度的白细胞介素6(IL-6)标准溶液中并在4°C冰箱中孵育30 min,用pH7.5的 PBS缓冲溶液冲洗电极表面,制得IL-6/Ab₁/CTIL/AMCs/Ru(bpy)₃²⁺/GCE电极;

(7) 将IL-6/Ab₁/CTIL/AMCs/Ru(bpy)₃²⁺/GCE修饰电极浸入固定化辣根过氧化物酶(HRP)标记的IL-6二抗(Ab₂)和酸性磷酸酶(ACP)及八面体锐钛矿型TiO₂介晶(OAMs)(Ab₂-HRP/ACP/OAMs)复合物溶液并在4°C冰箱中孵育40 min,用pH7.5的 PBS缓冲溶液冲洗电极表面,制得Ab₂-HRP/ACP/OAMs/IL-6/Ab₁/CTIL/AMCs/Ru(bpy)₃²⁺/GCE,并保存在4°C冰箱中。辣根过氧化物酶(HRP)标记的IL-6二抗(Ab₂)和酸性磷酸酶(ACP)购于上海领潮生物科技有限公司。

[0023] 实施例2

上述实施例1的羧基化离子液体(CTIL)的制备:

3.3g甲基咪唑与5.7g 氯乙酸在20mL的甲苯中回流24h,重结晶纯化得到羧基化离子液体。

[0024] 实施例3

上述实施例1的锐钛矿型TiO₂ 介晶(AMCs)/Ru(bpy)₃²⁺溶液的制备:

4.5g十二烷基硫酸钠(SDS)溶解在150mL浓度为2 mol/L的盐酸溶液中,搅拌5分钟;加入4.5mL四异丙醇钛(IV),在80°C下搅拌48 h,离心收集沉淀物并用蒸馏水彻底清洗;在60°C下烘干12 h,然后在空气中400°C下煅烧30min,以除去残余的有机物,制得锐钛矿型TiO₂介晶(AMCs)。AMCs的电子发射扫描电子显微镜(SEM)图、透射电子显微镜(TEM)图、高分辨透射电子显微镜(HRTEM)及选区电子衍射(SAED)图,如图2A、图2B、图2C及图2C插图所示,表明AMCs的形成。

[0025] 500 μL 浓度为10mg/mL 的AMCs溶液 与 500 μL 浓度为 0.01mol/L的 Ru

(bpy) $_3^{2+}$ 溶液混合 2 h, 在 10000 rpm 转速下离心 10 min, 收集 AMCs/Ru(bpy) $_3^{2+}$ 沉淀物, 在去离子水中重新分散以备使用。

[0026] 实施例4

上述实施例1的辣根过氧化物酶(HRP)标记的IL-6二抗(Ab $_2$)酸性磷酸酶(ACP)及八面体锐钛矿型TiO $_2$ 介晶(OAMs)(Ab $_2$ -HRP/ACP/OAMs)复合物溶液的制备:

1 mL OAMs 悬浮液与40 μ L (3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(APTES)试剂在室温下搅拌12 h, 离心收集氨基化的OAMs沉淀物并用蒸馏水彻底清洗去掉多余的APTES; 将20 uI 浓度为10 mg/mL HRP标记的Ab $_2$ 溶液及浓度为1 mg/mL ACP与10 μ L 浓度为10 mM的(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)(EDC)及10 μ L 浓度为20 mM的 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)混合50 min, 加入氨基功能化的 OAMs 溶液4 $^{\circ}$ C放置12 h, 在 10000 rpm 转速下离心 10 min 获得Ab $_2$ -HRP/ACP/OAMs复合物并分散在pH 7.4 PBS溶液中保存。

[0027] 实施例5

上述实施例4的八面体锐钛矿型TiO $_2$ 介晶(OAMs)材料的制备:

1.2克的锐钛矿型TiO $_2$ 粉末溶解于60 mL浓度为18 mol/L的KOH溶液中, 搅拌20分钟后, 将悬浮液移入一个100 mL聚四氟乙烯内衬不锈钢高压釜内; 密封反应器, 170 $^{\circ}$ C 下反应72 小时, 冷却到室温; 然后, 用稀醋酸溶液洗涤沉淀至沉淀pH值为3.5, 沉淀离心后在65 $^{\circ}$ C下干燥12 小时得到产物钛酸纳米线; 取400 mg前驱体钛酸纳米线分散在70 mL稀醋酸中, 于100 聚四氟乙烯高压反应釜中200 $^{\circ}$ C条件下反应 48 h, 所得到的产物用蒸馏水和无水乙醇离心洗涤, 60 $^{\circ}$ C条件下烘干12 h并400 $^{\circ}$ C下煅烧 30 分钟, 以除去残余的有机物, 制得OAMs。其中锐钛矿型TiO $_2$ 粉末购于青岛德固赛化学有限公司。OAMs的电子发射扫描电子显微镜(SEM)图、透射电子显微镜(TEM)图、高分辨透射电子显微镜(HRTEM)及选区电子衍射(SAED)图, 如图2D、图2E、图2F及图2F插图所示, 表明OAMs的形成。

[0028] 实施例6

白介素6(IL-6)的检测步骤:

(1) 使用电化学工作站采用三电极体系进行测定, 以上述实施例制备的基于TiO $_2$ 介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器为工作电极, Ag/AgCl为参比电极, 铂丝电极为对电极, 在含有浓度为 5×10^{-3} mol/L 1-萘磷酸(NPP) 和浓度为 15×10^{-3} mol/L H $_2$ O $_2$ 的pH 7.5的 PBS缓冲溶液中进行测试, 采用差示脉冲伏安法(DPV), 扫描电压范围为0.2 V-0.6 V, 扫描速率为100 mV/s, 通过所得的氧化峰电流信号与IL-6标准溶液浓度之间的关系, 绘制电化学工作曲线, 如图3所示;

(2) 使用电化学工作站采用三电极体系进行测定, 以上述实施例制备的一种基于TiO $_2$ 介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器为工作电极, Ag/AgCl为参比电极, 铂丝电极为对电极, 在含有浓度为 5×10^{-3} mol/L 1-萘磷酸(NPP) 和浓度为 15×10^{-3} mol/L H $_2$ O $_2$ 的pH 7.5的 PBS缓冲溶液中进行测试, 采用循环伏安电压, 扫描电压范围为0 V-1.3 V, 扫描速率为100 mV/s, 通过电致化学发光设备采集电致化学发光信号, 光电倍增管电压为900 V, 通过所得的电致化学发光强度与IL-6标准溶液浓度之间的关系, 绘制电化学发光工作曲线, 如图3所示;

(3) 待测样品溶液代替IL-6标准溶液进行检测, 检测的结果通过工作曲线查得。

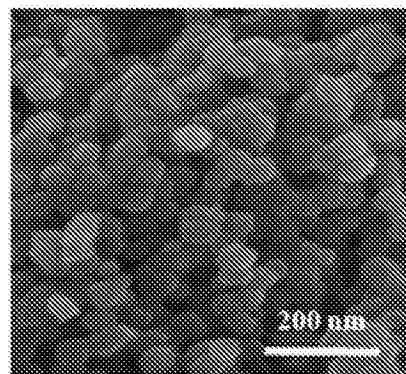
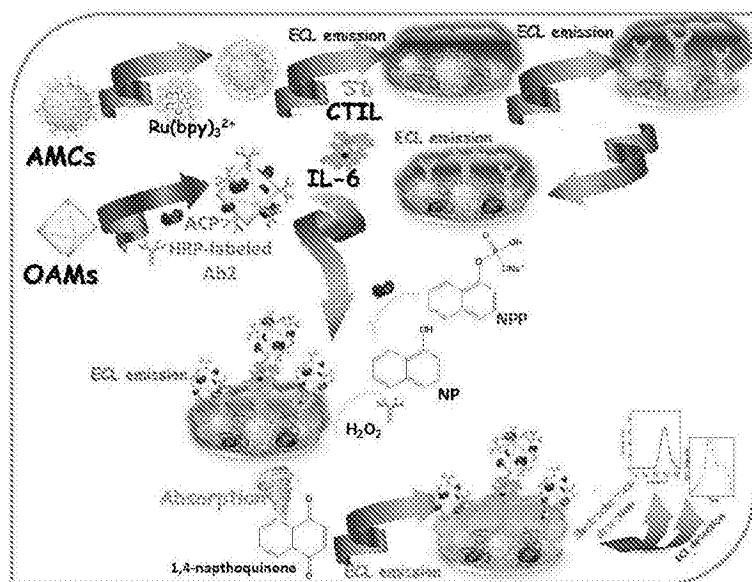


图2A

图1

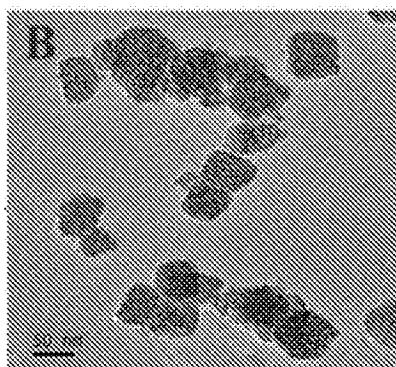


图2B

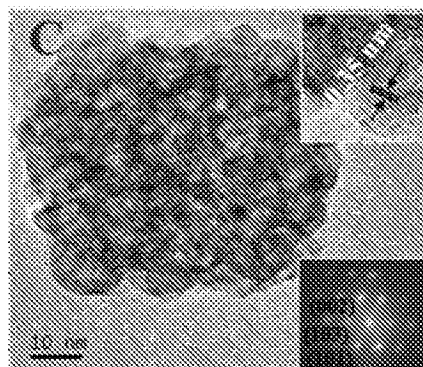


图2C

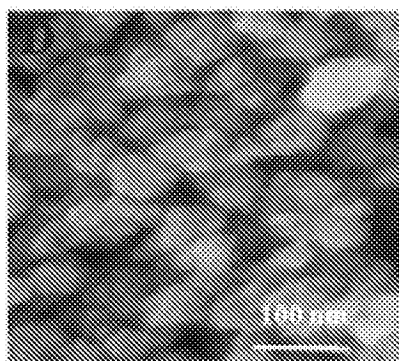


图2D

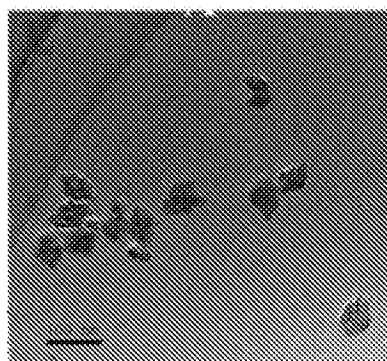


图2E

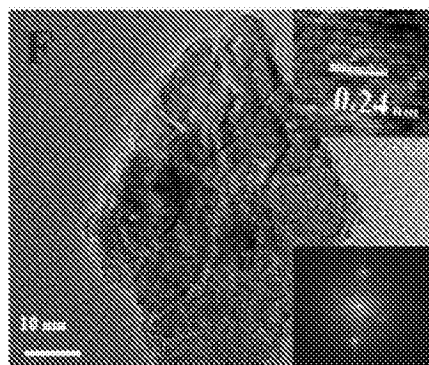


图2F

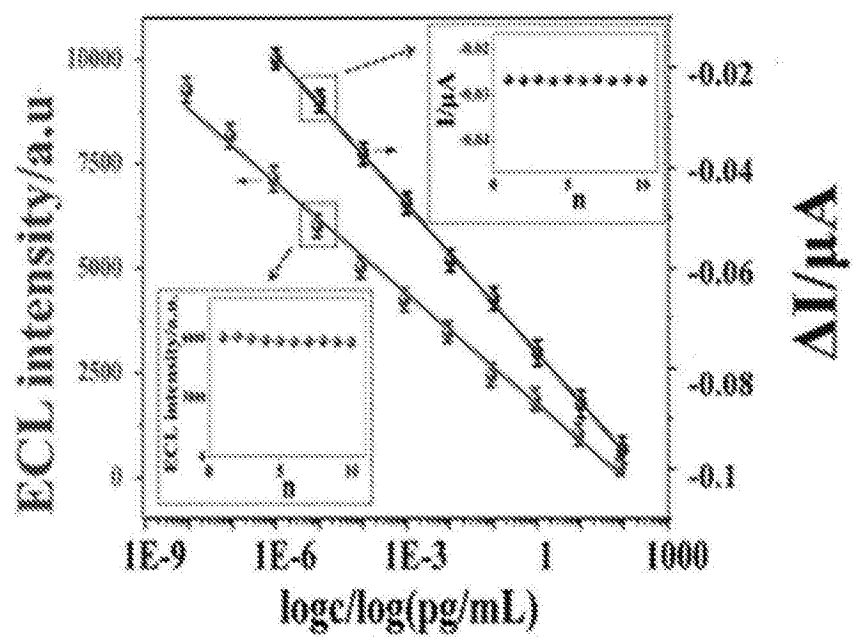


图3

专利名称(译)	一种基于TiO ₂ 介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN106526159A	公开(公告)日	2017-03-22
申请号	CN201610985908.1	申请日	2016-11-09
[标]申请(专利权)人(译)	福建师范大学		
申请(专利权)人(译)	福建师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	福建师范大学		
发明人	林燕语 戴宏 高利红		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/5302 G01N33/535		
其他公开文献	CN106526159B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种基于TiO₂介晶纳米材料的双响应夹心型免疫传感器的制备方法及应用，特点是基于两种TiO₂介晶纳米材料，结合电化学及电化学发光方法，制备一种新的双响应夹心型免疫传感器，并用于白介素6的检测。锐钛矿型TiO₂介晶材料和离子液体，分别用于固定Ru(bpy)₃²⁺和IL-6抗体，作为信号探针和分子识别探针；八面体锐钛矿型TiO₂介晶材料用于固定辣根过氧化物酶标记的IL-6二抗和酸性磷酸酶，其将通过典型的夹心型免疫反应自组装到电极表面，制得IL-6夹心型免疫传感器。所制备的传感器可产生电化学信号及电化学发光信号，信号值与IL-6浓度分别在10⁻⁶-90 pg/mL范围内及10⁻⁸-90 pg/mL范围内成线性。

