



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108226461 B

(45)授权公告日 2020.05.19

(21)申请号 201810066547.X

(22)申请日 2018.01.23

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108226461 A

(43)申请公布日 2018.06.29

(73)专利权人 东南大学

地址 211189 江苏省南京市江宁区东南大学路2号

(72)发明人 丁收年 梁秀丽 韩亭亭 朱红允

武锡锦 左家莹 刘金霞 闫其报 温雪飞

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

代理人 王艳

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 27/48(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

(56)对比文件

CN 107353903 A,2017.11.17,

Xin Zhang and Shou-Nian Ding.General

Strategy to Fabricate

Electrochemiluminescence Sandwich-Type Nanoimmunosensors Using CdTe@ZnS Quantum Dots as Luminescent Labels and Fe₃O₄@SiO₂ Nanoparticles as Magnetic Separable Scaffolds.《Xin Zhang and Shou-Nian Ding》.2016,第1卷

Oluwasesan Adegoke & Enoch Y.

Park.Size-confined fixed-composition and composition-dependent engineered band gap alloying induces different internal structures in L-cysteine-capped alloyed quaternary CdZnTeS quantum dots.

《Scientific Reports》.2016,第6卷

Zhuo Li,et al.Fluorescence analysis

of 6-mercaptopurine with the use of a nano-composite consisting of BSA-capped Au nano-clusters and core-shell Fe₃O₄-SiO₂ nanoparticles.《Biosensors and Bioelectronics》.2015,第70卷

Haiping Huang,et

al.Electrochemiluminescence based on quantum dots and their analytical.《Anal. Methods》.2011,第3卷

审查员 许珊萍

权利要求书2页 说明书13页 附图3页

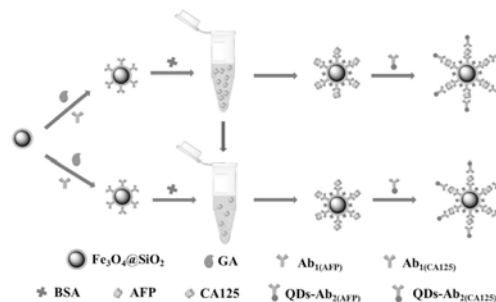
(54)发明名称

基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开一种基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器,包括CdZnTeS-Ab₂、非特异性结合位点被封闭的Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁以及分别与CdZnTeS-Ab₂和Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁通过抗原-抗体间的相互作用连接的抗原;CdZnTeS-Ab₂为CdZnTeS量子点标记的二抗;Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁为表面修饰有一抗的Fe₃O₄@SiO₂。本发明还提供上述电化学发光免疫传感器的制备方法和应用。本发明基于抗原与抗体之间的相互作用构建电化学发光免

疫传感器,大大提高了检测的特异性,检测速度快、灵敏度高、特异性好、检测限低、可检测的线性范围宽、操作简单,并且能够实现可视化检测。



CN 108226461 B

1. 一种基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器,其特征在于,所述电化学发光免疫传感器包括CdZnTeS-Ab₂、非特异性结合位点被封闭的Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁以及分别与CdZnTeS-Ab₂和Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁通过抗原-抗体间的相互作用连接的抗原;所述CdZnTeS-Ab₂为CdZnTeS量子点标记的所述抗原对应的第二抗体;所述Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁为表面化学修饰有所述抗原对应的第一抗体的Fe₃O₄@SiO₂,所述Fe₃O₄@SiO₂为SiO₂包覆的Fe₃O₄;

所述CdZnTeS量子点合成步骤为:

(a) 将0.6g CdCl₂·2.5 H₂O和0.8g L-半胱氨酸溶解在100mL超纯水中并用NaOH调节pH至10来制备Cd前驱体溶液;

(b) 在25mL超纯水中加入0.1g碲粉,通N₂ 10min,迅速加入0.08g NaHB₄,于80℃回流30min,制得NaHTe前驱体溶液;

(c) 将0.08g的ZnCl₂和0.144g的L-半胱氨酸溶解在30mL的去离子水中制备ZnS前驱体溶液;

(d) 将15mL新制NaHTe前驱体溶液加入到N₂饱和的Cd前驱体溶液中,随后加入ZnS前驱体溶液,将得到的混合溶液加热至约100℃,得CdZnTeS量子点溶液。

2. 根据权利要求1所述的基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器,其特征在于,所述CdZnTeS-Ab₂的制备方法包括以下步骤:

1) 活化CdZnTeS量子点表面的羧酸基团;

2) 使所述第二抗体与经过步骤1)处理的CdZnTeS量子点表面的羧酸基团反应,获得CdZnTeS量子点标记的所述抗原对应的第二抗体。

3. 根据权利要求1或2所述的基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器,其特征在于,所述CdZnTeS量子点的粒径为6.79nm。

4. 根据权利要求1所述的基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器,其特征在于,所述非特异性结合位点被封闭的Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁的制备方法包括以下步骤:

1) 使戊二醛与表面氨基化的Fe₃O₄@SiO₂反应,获得戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂;

2) 使所述第一抗体与所述戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂反应,通过戊二醛的交联反应将所述第一抗体连接到Fe₃O₄@SiO₂上,获得表面修饰有所述第一抗体的Fe₃O₄@SiO₂;

3) 使用牛血清白蛋白封闭步骤2)获得的表面修饰有所述第一抗体的Fe₃O₄@SiO₂的非特异性结合位点,获得所述非特异性结合位点被封闭的Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁。

5. 根据权利要求4所述的基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器,其特征在于,所述Fe₃O₄@SiO₂的粒径为200~300nm。

6. 一种权利要求1~5中任意一项所述的基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器的制备方法,其特征在于,该制备方法包括以下步骤:

1) 将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的水溶液加入到CdZnTeS量子点的分散液中,活化CdZnTeS量子点表面的羧酸基团,获得活化的CdZnTeS量子点分散液;

2) 向步骤1)获得的活化的CdZnTeS量子点分散液中加入所述第二抗体,振荡反应2~3小时,除去未连接的量子点和副产物,即得所述CdZnTeS-Ab₂;

3) 将氨基化的Fe₃O₄@SiO₂与戊二醛在水中混合均匀,搅拌反应6~7小时后,分离产物中的磁性物质,洗涤除去过量的戊二醛,获得戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂;

4) 使所述第一抗体与步骤3)获得的戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂在PBS缓冲液中混合均

匀,振荡反应1 ~ 2小时,分离产物中的磁性物质,洗涤除去未反应的所述第一抗体,获得表面修饰有所述第一抗体的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$;

5) 将步骤4) 获得的表面修饰有所述第一抗体的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 在含有牛血清白蛋白的PBS缓冲液中温育以封闭非特异性结合位点,分离产物中的磁性物质,获得所述非特异性结合位点被封闭的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1$;

6) 将步骤5) 获得的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1$ 与所述抗原在PBS缓冲液中混合均匀,35~37°C振荡反应1~2小时,分离产物中的磁性物质,洗涤除去未与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1$ 特异性结合的抗原,将获得的产物与步骤2) 获得的 CdZnTeS-Ab_2 混合均匀并于35~37°C孵育1 ~ 2小时,分离反应混合物中的固体物质,洗涤,即得所述基于 CdZnTeS 量子点的电化学发光免疫传感器。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,步骤2) 中,所述振荡反应在35~37°C下进行;使用50KD超滤管超滤所述振荡反应的产物,以除去未连接的量子点和副产物。

8. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,步骤3) 中,所述氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 的制备方法包括:将 Fe_3O_4 分散于乙醇和水的混合溶剂中,用稀氨水将pH调至9.0~9.5,搅拌下加入原硅酸四乙酯,反应3~4小时后,加入(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷,搅拌8~10h后,将产物洗涤并干燥,得氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$;所述搅拌反应6~7小时在室温下进行,所述洗涤除去过量的戊二醛中洗涤液为PBS缓冲液;步骤4) 中,所述振荡反应在35~37°C下进行;步骤5) 中,所述温育的温度为35~37°C,时间为30~60min。

9. 使用权利要求1~5中任意一项所述的基于 CdZnTeS 量子点的电化学发光免疫传感器进行抗原检测的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤1) 或步骤2) 中任意一种:

1) 构建包含已知浓度的所述抗原的电化学发光免疫传感器,以 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 作为共反应试剂,在三电极体系中,使用电化学发光分析仪采集电化学发光信号,建立电化学发光强度与抗原浓度的线性关系;构建包含待测浓度的所述抗原的电化学发光免疫传感器,以 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 作为共反应试剂,在三电极体系中,使用电化学发光分析仪采集电化学发光信号,根据所述电化学发光强度与抗原浓度的线性关系,获得所述待测抗原的浓度;

2) 构建包含已知浓度的所述抗原的电化学发光免疫传感器,以 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 作为共反应试剂,在三电极体系中,在电化学工作站上进行循环伏安扫描,电位窗口设置在-1.6 ~ 0V,直接用普通拍照设备获得电化学发光成像,建立电化学发光强度与抗原浓度的对应关系;构建包含待测浓度的所述抗原的电化学发光免疫传感器,以 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 作为共反应试剂,在三电极体系中,在电化学工作站上进行循环伏安扫描,直接用普通拍照设备获得电化学发光成像,根据所述电化学发光强度与抗原浓度的对应关系,获得所述待测抗原的浓度。

10. 根据权利要求9所述的抗原检测的方法,其特征在于,所述三电极体系中,工作电极为所述电化学发光免疫传感器修饰的玻碳电极为工作电极,对电极为铂丝电极,参比电极为饱和甘汞电极;所述电化学发光分析仪的光电倍增管的高压设为600V,施加电位为-1.6 ~ 0 V,扫速为100 mV s^{-1} ;所述以 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 作为共反应试剂,在三电极体系中,使用电化学发光分析仪采集电化学发光信号的具体方法为:在pH 7 ~ 8.4的含50 ~ 100 $\text{mmol/L K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 的PBS溶液中,通过电化学发光分析仪,检测所述抗原的电化学发光响应;所述普通拍照设备为普通相机。

基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于电化学发光分析领域,具体涉及基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 癌症被视为导致人类死亡的第二大威胁因素。目前,癌症的治疗手段依旧是很难攻克的一项挑战。生物标志物被认为是人体内癌症发生的一个指示信号,生物标志物的检测可以为早期癌症诊断和有效的监测治疗效果提供有价值的信息,显著提高了常规癌症诊断的性能。迄今为止,已有多种基于抗原与抗体相互作用的免疫分析方法用于生物标志物的检测,如比色免疫分析法,荧光免疫分析法,电化学免疫分析法,电化学发光免疫分析法等。与其他分析方法相比,电化学发光技术由于具有小型化、简单化、快速响应、多功能性和高灵敏度等优点而受到越来越多的关注。

发明内容

[0003] 发明目的:本发明的目的之一是针对于现有的生物标志物检测方法存在的问题,提供一种灵敏度高、检测限低、检测范围宽的基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器,实现对抗原,例如AFP和CA125的快速、灵敏、高效检测。

[0004] 本发明的目的之二是提供上述基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器的制备方法。

[0005] 本发明的目的之三是提供上述基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器进行抗原检测的方法,基于CdZnTeS量子点构建CdZnTeS量子点/ $K_2S_2O_8$ 体系,可采集到CdZnTeS量子点强而稳定的阴极电化学发光信号。

[0006] 技术方案:本发明提供一种基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器,该电化学发光免疫传感器包括CdZnTeS- Ab_2 、非特异性结合位点被封闭的 $Fe_3O_4@SiO_2-Ab_1$ 以及分别与CdZnTeS- Ab_2 和 $Fe_3O_4@SiO_2-Ab_1$ 通过抗原-抗体间的相互作用连接的待测抗原;CdZnTeS- Ab_2 为CdZnTeS量子点标记的待测抗原对应的二抗(第二抗体); $Fe_3O_4@SiO_2-Ab_1$ 为表面化学修饰有待测抗原对应的一抗(第一抗体)的 $Fe_3O_4@SiO_2$, $Fe_3O_4@SiO_2$ 为 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 。

[0007] 上述CdZnTeS- Ab_2 的制备方法包括以下步骤:

[0008] 1) 活化CdZnTeS量子点表面的羧酸基团;

[0009] 2) 使二抗与经过步骤1)处理的CdZnTeS量子点表面的羧酸基团反应,获得CdZnTeS量子点标记的待测抗原对应的二抗。

[0010] 为了获得较高的电化学发光强度,使上述CdZnTeS量子点的粒径为5.90~6.85nm。上述CdZnTeS量子点可采用现有方法获得;优选地,上述CdZnTeS量子点的制备方法为:首先制备Cd、Te和ZnS前驱体:通过将0.6~1.0g $CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$ 和0.8~1.0g L-半胱氨酸溶解在100~120mL超纯水中并用NaOH调节pH至10~10.5来制备Cd前驱体溶液。在25~30mL超纯水

中加入0.1~0.12g碲粉,通N₂10~20min后,迅速加入0.08~0.12g NaHB₄,于80℃加热25~30min,制得NaHTe前驱体溶液。将0.08~0.15g的ZnCl₂和0.144~0.2g的L-半胱氨酸溶解在30~35mL的去离子水中制备ZnS前驱体溶液。然后,将15~20mL新制的NaHTe前驱体溶液加入到N₂饱和的Cd前驱体溶液中,随后加入ZnS前驱体溶液,最后,将得到的混合物加热至约100~110℃,通过在不同的时间段取样可获得不同粒径的CdZnTeS量子点。CdZnTeS量子点合成过程中需要惰性氛围,本发明中采取通N₂的方式,pH控制在10~10.5范围内。

[0011] 上述非特异性结合位点被封闭的Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁的制备方法包括以下步骤:

[0012] 1) 使戊二醛与表面氨基化的Fe₃O₄@SiO₂反应,获得戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂;

[0013] 2) 使所述一抗与所述戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂反应,通过戊二醛的交联反应将所述一抗连接到Fe₃O₄@SiO₂上,获得表面修饰有所述一抗的Fe₃O₄@SiO₂;

[0014] 3) 使用牛血清白蛋白(BSA)封闭步骤2)获得的表面修饰有所述一抗的Fe₃O₄@SiO₂的非特异性结合位点,获得非特异性结合位点被封闭的Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁。

[0015] 为了获得优良的电化学发光性能,使上述Fe₃O₄@SiO₂的粒径为200~300nm。上述表面氨基化的Fe₃O₄@SiO₂可通过现有方法获得;优选地,上述表面氨基化的Fe₃O₄@SiO₂的制备方法为:

[0016] 1) Fe₃O₄合成:

[0017] 将0.6~0.7g FeCl₃和0.2~0.25g柠檬酸三钠先溶解在20~25mL乙二醇中,之后在搅拌下加入1.2~1.5g醋酸钠(NaAC)。将混合物剧烈搅拌30min,然后密封在高压釜中,将高压釜在200℃下加热并保持10h,冷却至室温,黑色产品用乙醇和去离子水洗涤数次,60℃下干燥6h,获得Fe₃O₄。

[0018] 2) 氨基化的Fe₃O₄@SiO₂合成:

[0019] 将0.04~0.06g Fe₃O₄超声分散在35~40mL乙醇和5~8mL水中,用稀氨水将pH调至9.0,然后在搅拌下加入0.2~0.3mL原硅酸四乙酯(TEOS),使反应持续3h。其次加入0.1~0.15mL(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(APTES),室温下搅拌8h,最后将产物洗涤并真空干燥,即得表面氨基化的Fe₃O₄@SiO₂。

[0020] 本发明另一方面提供上述基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0021] 1) 将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的水溶液加入到CdZnTeS量子点的分散液中,活化CdZnTeS量子点表面的羧酸基团,获得活化的CdZnTeS量子点分散液;

[0022] 2) 向步骤1)获得的活化的CdZnTeS量子点分散液中加入所述二抗,避光振荡反应2~3小时,除去未连接的量子点和副产物,即得所述CdZnTeS-Ab₂;

[0023] 3) 将氨基化的Fe₃O₄@SiO₂与戊二醛在水中混合均匀,搅拌反应6~7小时后,分离产物中的磁性物质,洗涤除去过量的戊二醛,获得戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂;

[0024] 4) 使所述一抗与步骤3)获得的戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂在PBS缓冲液中混合均匀,震荡反应1~2小时,分离产物中的磁性物质,洗涤除去未反应的所述一抗,获得表面修饰有所述一抗的Fe₃O₄@SiO₂;

[0025] 5) 将步骤4)获得的表面修饰有所述一抗的Fe₃O₄@SiO₂在含有BSA的PBS缓冲液中温育以封闭非特异性结合位点,分离产物中的磁性物质,获得非特异性结合位点被封闭的

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1$;

[0026] 6) 将步骤5) 获得的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1$ 与所述抗原在PBS缓冲液中混合均匀, 35~37°C 振荡反应1~2小时, 分离产物中的磁性物质, 洗涤除去未与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1$ 特异性结合的抗原, 将获得的产物与步骤2) 获得的 CdZnTeS-Ab_2 混合均匀并于35~37°C 孵育1~2小时, 分离反应混合物中的磁性物质, 洗涤, 即得所述基于 CdZnTeS 量子点的电化学发光免疫传感器。

[0027] 上述步骤1) 和步骤2) 获得 CdZnTeS-Ab_2 的方法具体为: 首先将75~100 μL 新鲜制备的EDC水溶液(EDC浓度为4.2~5mg/mL) 加入到500~600 μL 浓度为1~2mg/mL的 CdZnTeS 量子点分散液中以活化 CdZnTeS 量子点表面的羧酸基团; 然后, 向得到的溶液中加入0.8~1.2mL的待测抗原对应的二抗溶液(溶液中二抗的浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 于暗处轻轻振荡, 在35~37°C 下反应2~3小时。最后, 使用50KD超滤管(离心转速为3000g, 时间为10~20min) 超滤获得的反应产物以除去未连接的量子点和副产物。所得混合物于4°C 下储存, 备用。

[0028] 上述步骤3) 至步骤5) 获得非特异性结合位点被封闭的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1$ 的方法具体为: 通过戊二醛的交联反应将待测抗原对应的一抗连接到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 上。简言之, 将10~15mg氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 充分溶于7.5~10mL超纯水中, 然后将2.5~2.8mL 2.5wt%的戊二醛溶液加入到氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 的水溶液中并在室温下搅拌6~7小时, 之后, 磁性分离产物中的磁性物质, 用10mM PBS (pH 7.4) 洗涤分离得到的磁性物质以除去过量的戊二醛, 获得戊二醛(GA) 功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 。将得到的产物再分散在5~5.5mL的PBS (10mM, pH 7.4) 中。随后, 将450~500 μL 浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的待测抗原对应的一抗溶液加入到450~500 μL 戊二醛功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 中, 使混合物在室温下轻微震荡反应1~2小时。磁性分离产物中的磁性物质, 然后用10mM PBS (pH 7.4) 洗涤以除去未结合的一抗, 获得 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1$ 。最后, 将 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1$ 在含有BSA的PBS溶液中(100~120 μL , 1.0wt%) 于35~37°C 下温育30~60min以封闭非特异性结合位点, 磁性分离产物中的磁性物质, PBS洗涤, 获得非特异性结合位点被封闭的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1$, 即 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{Ab}_1/\text{BSA}$ 。将得到的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{Ab}_1/\text{BSA}$ 重新分散于500 μL PBS中, 得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{Ab}_1/\text{BSA}$ 溶液, 4°C 保存, 备用。

[0029] 上述步骤6) 获得基于 CdZnTeS 量子点的电化学发光免疫传感器的方法具体为: 将50~70 μL 以上制得的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{Ab}_1/\text{BSA}$ 溶液加入到含有抗原的PBS溶液中, 并在35~37°C 振荡1~2小时。用1~2mL 10mM的PBS (pH 7.4) 小心洗涤所获得的抗原-抗体复合物以除去物理吸附的抗原。然后, 将 CdZnTeS-Ab_2 与抗原-抗体复合物混合并于35~37°C 下孵育1~2小时以构建夹心型免疫传感器。最后, 用PBS洗涤得到的免疫传感器以去除未结合的 CdZnTeS-Ab_2 , 然后再分散在90~100 μL PBS溶液中, 并在4°C 下储存备用。

[0030] 本发明另一方面提供使用上述基于 CdZnTeS 量子点的电化学发光免疫传感器进行抗原浓度检测的方法, 包括以下步骤1) 或步骤2) 中任意一种:

[0031] 1) 构建包含不同已知浓度的抗原的所述电化学发光免疫传感器, 以 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 作为共反应试剂, 在三电极体系中, 使用电化学发光分析仪采集电化学发光信号, 建立电化学发光强度与抗原浓度的线性关系; 构建包含待测浓度的抗原的所述电化学发光免疫传感器, 以 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 作为共反应试剂, 在三电极体系中, 使用电化学发光分析仪采集电化学发光信号, 根据所述电化学发光强度与抗原浓度的线性关系, 获得所述抗原的待测浓度;

[0032] 2) 构建包含不同已知浓度的所述抗原的电化学发光免疫传感器, 以 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 作为共反应试剂, 在三电极体系中, 在电化学工作站上进行循环伏安扫描, 电位窗口设置在-1.6~

0V,肉眼观察或直接用普通拍照设备拍摄电化学发光成像图片,通过Image-Pro Plus软件获得电化学发光强度,建立电化学发光强度与抗原浓度的对应关系;构建包含待测浓度的所述抗原的电化学发光免疫传感器,以 $K_2S_2O_8$ 作为共反应试剂,在三电极体系中,在电化学工作站上进行循环伏安扫描,肉眼观察或直接用普通拍照设备获得电化学发光信号,通过Image-Pro Plus软件获得电化学发光强度,根据所述电化学发光强度与抗原浓度的对应关系,获得所述抗原的待测浓度。

[0033] 优选地,上述三电极体系中,电化学发光免疫传感器修饰的玻碳电极为工作电极,对电极为铂丝电极,参比电极为饱和甘汞电极;电化学发光分析仪的光电倍增管的高压设为600V,施加电位为 $-1.6\sim 0V$,扫速为 $100mV\ s^{-1}$;以 $K_2S_2O_8$ 作为共反应试剂,在三电极体系中,使用电化学发光分析仪采集电化学发光信号的具体方法为:在pH 7~8.4的含50~100mmol/L $K_2S_2O_8$ 的PBS溶液中,通过电化学发光分析仪,检测所述抗原的电化学发光响应;普通拍照设备为普通相机或手机相机。

[0034] 上述抗原可以为甲胎蛋白(AFP)抗原或癌抗原125(CA125)。以AFP为例,构建包含不同已知浓度的抗原的电化学发光免疫传感器的方法为:

[0035] 将50~70 μL 以上制备的 $Fe_3O_4@SiO_2/Ab_1(AFP)/BSA$ 溶液加入到溶液A(含有不同抗原的4~5mL PBS溶液)中,并在37 $^{\circ}C$ 振荡1~2小时。用PBS小心洗涤所获得的抗原-抗体复合物以除去物理吸附的抗原。然后,将 $CdZnTeS-Ab_2(AFP)$ 与抗原-抗体复合物混合并于35~37 $^{\circ}C$ 孵育1~2小时以构建夹心型免疫传感器。最后,用PBS洗涤得到的免疫传感器以去除未结合的 $CdZnTeS-Ab_2(AFP)$,然后再分散在90~100 μL PBS溶液中,并在4 $^{\circ}C$ 下储存备用。CA125免疫传感器的构建过程中,将50~70 μL 非特异性结合位点被封闭的 $Fe_3O_4@SiO_2-Ab_1(CA125)$ 溶液置于上述溶液A中,其他步骤与AFP免疫传感器的构建过程类似。

[0036] 有益效果:本发明合成了一种水溶性 $CdZnTeS$ 量子点,其具有优良的电化学发光性质,制备了一种基于 $CdZnTeS$ 量子点的电化学发光生物传感器。本发明的电化学发光免疫传感器采用了 $CdZnTeS$ 量子点作为发光材料,其具有较强的电化学发光性质,可以提高生物传感器的灵敏度。同时,本发明制备了磁性 $Fe_3O_4@SiO_2$ 纳米材料,并使用该磁性 $Fe_3O_4@SiO_2$ 纳米材料作为电化学发光免疫传感器的载体,磁性 $Fe_3O_4@SiO_2$ 纳米材料具有大的比表面积、超顺磁性和良好的生物相容性等优点,有利于将大量发光材料固定在其表面,放大电化学发光信号。同时,借助于外部磁体能够实现简单、快速的分离,避免非特异性吸附,也简化了实验步骤。本发明的电化学发光免疫传感器基于抗原与抗体之间的相互作用构建电化学发光免疫传感器,大大提高了检测的特异性,其检测速度快、灵敏度高、特异性好、检测限低、可检测的线性范围宽、制备和操作简单,并且能够实现可视化检测。本发明所制备的电化学发光免疫传感器对AFP的检测范围为0.5fg/mL~20ng/mL,检测限为0.1fg/mL,对CA125的检测范围为0.1mU/mL~500U/mL,检测限为0.03mU/mL。同时,在相对较低浓度的抗原范围内,可以用手机拍摄到电化学发光成像图片和视频。该方法可以推广到其他肿瘤标志物的检测,可开发出多组分同时检测的电化学发光免疫传感器。

附图说明

[0037] 图1为电化学发光免疫传感器的构建过程机理图;

[0038] 图2为不同浓度AFP和CA125制得的电化学发光免疫传感器在含50mM $K_2S_2O_8$ 的0.1M

PBS中的电化学发光响应,其中图2A为不同浓度的AFP电化学发光免疫传感器在含有50mM $K_2S_2O_8$ 的0.1M PBS (pH 7.4) 中的ECL响应,图2B为不同浓度的CA125电化学发光免疫传感器在含有50mM $K_2S_2O_8$ 的0.1M PBS (pH 7.4) 中的ECL响应;a-o浓度分别为:AFP (0.5fg/mL, 1fg/mL, 5fg/mL, 10fg/mL, 50fg/mL, 0.1pg/mL, 0.5pg/mL, 1pg/mL, 5pg/mL, 10pg/mL, 50pg/mL, 0.1ng/mL, 1ng/mL, 5ng/mL, 20ng/mL), CA125 (0.1mU/mL, 0.5mU/mL, 1mU/mL, 5mU/mL, 10mU/mL, 50mU/mL, 0.1U/mL, 0.5U/mL, 1U/mL, 5U/mL, 10U/mL, 50U/mL, 100U/mL, 200U/mL, 500U/mL), 插图分别为相应的线性关系图。可以看出,AFP和CA125的电化学发光强度分别与AFP和CA125的浓度对数值之间存在良好的线性关系,相关系数分别为0.9959和0.9964;

[0039] 图3为电化学发光免疫传感器的稳定性(图3A)、重现性(图3B)及特异性(图3C)表征;图3A中将免疫传感器在PBS缓冲液(pH7.4)中于4℃保存1周,仍能检测到初始响应的91%,表明所制备的免疫传感器稳定性良好;图3B中五组独立的对照实验用于检测传感器的重现性,相对标准偏差(RSD)分别为1.27%和2.35%;图3C中加入干扰物质,与无干扰物组对比显示,本发明中所构建的免疫传感器特异性良好;

[0040] 图4为不同浓度AFP(图4A)和CA125(图4B)制得的电化学发光免疫传感器的可视化电化学发光成像及其线性关系图;其中,图4A为不同浓度AFP制得的电化学发光免疫传感器的可视化电化学发光成像,图4A中从左至右发光成像对应的浓度分别为:AFP (20ng/mL, 15ng/mL, 10ng/mL, 8ng/mL, 5ng/mL, 3ng/mL, 1ng/mL, 0.5ng/mL);图4B为不同浓度CA125制得的电化学发光免疫传感器的可视化电化学发光成像,图4B中从左至右发光成像对应的浓度分别为:CA125 (500U/mL, 400U/mL, 300U/mL, 200U/mL, 100U/mL, 50U/mL, 30U/mL and 20U/mL);图4C是由图4A中的电化学发光图片通过Image-Pro Plus软件分析所得的线性关系,其横坐标为AFP浓度的对数值,单位为ng/mL,纵坐标为电化学发光强度,单位为a.u.;图4D是由图4B中的电化学发光图片通过Image-Pro Plus软件分析所得的线性关系,其横坐标为CA125浓度的对数值,单位为U/mL,纵坐标为电化学发光强度,单位为a.u.;由此可见,电化学发光免疫传感器通过电化学发光成像图片仍旧能够获得良好的线性关系,线性拟合方程为: $I=22.071gC_{AFP}+21.71$ 和 $I=24.231gC_{CA125}-16.58$,相关系数分别为0.9875和0.9900;

[0041] 图5A为CdZnTeS量子点的TEM表征图,图5B为CdZnTeS量子点的粒径分布图;

[0042] 图6为 $Fe_3O_4@SiO_2$ 的TEM表征图。

具体实施方式

[0043] 以下实施例中用到的试剂和仪器: $CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$, $NaBH_4$, Te粉, 柠檬酸三钠, 乙二醇, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 和醋酸钠(NaAC)购自于国药集团化学试剂有限公司, L-半胱氨酸, 戊二醛(GA), (3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(APTES)和原硅酸四乙酯(TEOS)购买于上海阿拉丁生化科技股份有限公司, $ZnCl_2$ 购自于西龙化工有限公司, 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)购买于萨恩化学技术有限公司, 牛血清白蛋白(BSA)购自于生工生物工程股份有限公司, 人血清样由南京中大医院提供, AFP及其一抗二抗, CA125及其一抗二抗, AFP ELISA试剂盒和CA125 ELISA试剂盒购自于上海酶联生物科技有限公司, MPI-M型电化学发光分析仪购买于西安瑞迈分析仪器有限公司。

[0044] 实施例1

[0045] 基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器的制备方法及其对不同浓度AFP和

CA125的检测,包括以下步骤:

[0046] (1) 制备CdZnTeS量子点:

[0047] (a) 将0.6g $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 和0.8g L-半胱氨酸溶解在100mL超纯水中并用NaOH调节pH至10来制备Cd前驱体溶液;

[0048] (b) 在25mL超纯水中加入0.1g碲粉,通 N_2 10min,迅速加入0.08g NaHB_4 ,于80℃回流30min,制得NaHTe前驱体溶液;

[0049] (c) 将0.08g的 ZnCl_2 和0.144g的L-半胱氨酸溶解在30mL的去离子水中制备ZnS前驱体溶液;

[0050] (d) 将15mL新制NaHTe前驱体溶液加入到 N_2 饱和的Cd前驱体溶液中,随后加入ZnS前驱体溶液。将得到的混合溶液加热至约100℃,得CdZnTeS量子点溶液,所得量子点粒径为6.79nm。CdZnTeS量子点的TEM表征图和粒径分布图如图5所示。

[0051] (2) 基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器的制备方法:

[0052] (a) CdZnTeS-Ab₂溶液的制备

[0053] 以CdZnTeS-Ab₂(AFP)为例,首先将75μL新鲜制备的EDC水溶液(EDC浓度为4.2mg/mL)加入到500μL的步骤(1)制得的CdZnTeS量子点溶液中以活化CdZnTeS量子点表面的羧基团,然后,加入0.8mL的AFP抗原对应的二抗(Ab₂(AFP))溶液(Ab₂(AFP)浓度为10μg/mL),于暗处轻轻振荡,在室温下反应2小时。最后,使用50KD超滤管(离心转速为3000g,时间为10min)超滤获得的产物以除去未连接的量子点和副产物。所得混合物于4℃下储存,备用。

[0054] CdZnTeS-Ab₂(CA125)的制备过程中,所用的二抗为CA125抗原所对应的二抗,其余步骤均与CdZnTeS-Ab₂(AFP)相同。

[0055] (b) Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁溶液的制备

[0056] Fe₃O₄合成:

[0057] 将0.6g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和0.2g柠檬酸三钠先溶解在20mL乙二醇中,之后在搅拌下加入1.2g NaAC。将混合物剧烈搅拌30min,然后密封在高压釜中,将高压釜在200℃下加热并保持10h,冷却至室温,黑色产品用乙醇和去离子水洗涤数次,60℃下干燥6h,获得Fe₃O₄。

[0058] 氨基化的Fe₃O₄@SiO₂合成:

[0059] 将0.05g Fe₃O₄超声分散在35mL乙醇和5mL水中,用稀氨水将pH调至9.0,然后在搅拌下加入0.2mL TEOS,使反应持续3h,然后加入0.1mL APTES,室温下搅拌8h,最后将产物洗涤并真空干燥,即得氨基化的Fe₃O₄@SiO₂。氨基化的Fe₃O₄@SiO₂的TEM表征如图6所示。

[0060] 通过戊二醛的交联反应将AFP一抗连接到氨基化的Fe₃O₄@SiO₂上,简言之,将10mg氨基化的Fe₃O₄@SiO₂充分溶于7.5mL超纯水中,然后加入2.5mL 2.5wt%的戊二醛溶液并在室温下搅拌6小时,之后,通过磁性分离产物中的磁性物质,用10mM PBS (pH 7.4)洗涤分离得到的磁性物质以除去过量的戊二醛,得到戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂。将得到的戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂再分散在5mL的PBS (10mM, pH 7.4)中,得到戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂在PBS中的分散液。随后,将450μL含有10μg/mL AFP抗原对应的一抗(Ab₁(AFP))溶液加入到450μL以上制得的戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂在PBS的分散液中,使混合物在室温下轻微震荡反应1小时,然后磁性分离产物中的磁性物质,用10mM PBS (pH 7.4)洗涤以除去未结合的Ab₁(AFP)。最后,将Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁(AFP)在含有BSA的PBS溶液(100μL, BSA浓度为1.0wt%)中于37℃温育30min以封闭非特异性结合位点,磁性分离产物中的磁性物质,洗涤,即得到非特

异性结合位点被封闭的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1(\text{AFP})$,即 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{Ab}_1(\text{AFP})/\text{BSA}$ 。将非特异性结合位点被封闭的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1(\text{AFP})$ 重新分散于500 μL PBS中,得到非特异性结合位点被封闭的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1(\text{AFP})$ 溶液,4 $^\circ\text{C}$ 保存,备用。

[0061] $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1(\text{CA125})$ 的制备过程中,所用的一抗为CA125抗原所对应的一抗,其余步骤均与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1(\text{AFP})$ 相同。

[0062] (c) 电化学发光免疫传感器的构建

[0063] AFP电化学发光免疫传感器的构建:

[0064] 将50 μL 步骤(b)制得的非特异性结合位点被封闭的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1(\text{AFP})$ 溶液分别加入到溶液A(含有不同浓度的AFP抗原的4mL PBS溶液,AFP抗原浓度为0.5fg/mL,1fg/mL,5fg/mL,10fg/mL,50fg/mL,0.1pg/mL,0.5pg/mL,1pg/mL,5pg/mL,10pg/mL,50pg/mL,0.1ng/mL,1ng/mL,5ng/mL,20ng/mL)中,并在37 $^\circ\text{C}$ 振荡1小时。用PBS小心洗涤所获得的抗原-抗体复合物以除去物理吸附的抗原。然后,将步骤(a)制得的 $\text{CdZnTeS-Ab}_2(\text{AFP})$ 与抗原-抗体复合物混合并在37 $^\circ\text{C}$ 孵育1小时以构建夹心型电化学发光免疫传感器。最后,用PBS洗涤得到的电化学发光免疫传感器以去除未结合的 $\text{CdZnTeS-Ab}_2(\text{AFP})$,然后再分散在100 μL PBS溶液中,并在4 $^\circ\text{C}$ 下储存备用。

[0065] CA125电化学发光免疫传感器的构建:

[0066] CA125电化学发光免疫传感器的构建过程中,将50 μL $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1(\text{CA125})$ 分别置于溶液B(含有不同浓度的CA125抗原的4mL PBS溶液,CA125抗原浓度为0.1mU/mL,0.5mU/mL,1mU/mL,5mU/mL,10mU/mL,50mU/mL,0.1U/mL,0.5U/mL,1U/mL,5U/mL,10U/mL,50U/mL,100U/mL,200U/mL,500U/mL)中,其他步骤与AFP电化学发光免疫传感器的构建过程相同。

[0067] (3) 不同浓度的AFP和CA125抗原的检测

[0068] 将10 μL 步骤(2)中步骤(c)制得的不同AFP和CA125抗原浓度的电化学发光免疫传感器滴至玻碳电极表面,在三电极体系中,以50mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 作为共反应试剂,电化学发光分析仪的光电倍增管的高压设为600V,施加电位为-1.6~0V,扫速为100mV s^{-1} ,通过电化学发光分析仪采集电化学发光信号。如图2所示,图2A为不同浓度的AFP电化学发光免疫传感器在含有50mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 的0.1M PBS (pH 7.4)中的ECL响应,图2B为不同CA125浓度的电化学发光免疫传感器在含有50mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 的0.1M PBS (pH 7.4)中的ECL响应,a-o浓度分别为:AFP (0.5fg/mL,1fg/mL,5fg/mL,10fg/mL,50fg/mL,0.1pg/mL,0.5pg/mL,1pg/mL,5pg/mL,10pg/mL,50pg/mL,0.1ng/mL,1ng/mL,5ng/mL,20ng/mL),CA125 (0.1mU/mL,0.5mU/mL,1mU/mL,5mU/mL,10mU/mL,50mU/mL,0.1U/mL,0.5U/mL,1U/mL,5U/mL,10U/mL,50U/mL,100U/mL,200U/mL,500U/mL)。由图2可知,电化学发光强度与抗原浓度的对数值存在良好的线性关系,相关系数分别为0.9959和0.9964。由此,可以采集未知浓度抗原的电化学发光信号通过此线性关系分析得出抗原的浓度,从而实现抗原的检测。本发明的检测中,可检测的AFP线性范围为0.5fg/mL~20ng/mL,CA125的线性范围为0.1mU/mL~500U/mL,检测限分别为0.1fg/mL和0.03mU/mL。

[0069] (4) 电化学发光免疫传感器的稳定性、重现性、特异性评估

[0070] 稳定性是免疫传感器在实际应用中的关键因素。当免疫传感器在PBS (pH 7.4)中于4 $^\circ\text{C}$ 下存储一周时,其仍能够检测到91%的初始响应(图3A)。结果表明免疫传感器具有优异的稳定性。进行了五组独立对照试验以研究免疫传感器的重现性,如图3B,横坐标为样品

序号,纵坐标为电化学发光强度,由电化学发光强度变化计算可得,AFP和CA125的相对标准偏差分别为1.27%和2.35%,表明免疫传感器可以重复使用。为了测试免疫传感器的特异性,以10pg/mL AFP和1U/mL CA125为例,将10pg/mL AFP和1U/mL CA125分别与10ng/mL的BSA、葡萄糖(Glu)、人免疫球蛋白G(IgG)和尿酸(UA)混合。图3C展示了单独纯ODs的AFP和CA125的电化学发光响应及含有干扰物质(BSA、葡萄糖(Glu)、人免疫球蛋白G(IgG)和尿酸(UA))的AFP和CA125的电化学发光响应,横坐标为含不同干扰物质的AFP和CA125电化学发光免疫传感器,纵坐标为电化学发光强度。由电化学发光强度变化计算可得,检测到的AFP的相对标准偏差为3.69%,CA125为2.35%。结果表明免疫传感器具有良好的特异性。

[0071] 实施例2

[0072] 基于CdZnTeS量子点的可视化电化学发光免疫传感器的制备方法及其对不同浓度AFP和CA125的检测,包括以下步骤:

[0073] (1) 制备CdZnTeS量子点:

[0074] (a) 将0.8g $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 和0.8g L-半胱氨酸溶解在100mL超纯水中并用NaOH调节pH至10.5来制备Cd前驱体溶液;

[0075] (b) 在30mL超纯水中加入0.12g碲粉,通 N_2 20min,迅速加入0.12g NaHB_4 ,于80°C回流30min,制得NaHTe前驱体溶液;

[0076] (c) 将0.15g的 ZnCl_2 和0.2g的L-半胱氨酸溶解在30mL的去离子水中制备ZnS前驱体溶液;

[0077] (d) 将18mL新制NaHTe溶液加入到 N_2 饱和的Cd前驱体溶液中,随后加入ZnS前驱体溶液,将得到的溶液混合物加热至约110°C,得CdZnTeS量子点溶液。

[0078] (2) 基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器的制备方法:

[0079] (a) CdZnTeS-Ab₂溶液的制备

[0080] 以CdZnTeS-Ab₂(AFP)为例,首先将80 μL 新鲜制备的EDC溶液(EDC浓度为5mg/mL)加入到550 μL 步骤(1)制得的CdZnTeS量子点溶液中以活化CdZnTeS量子点表面的羧酸基团,然后,加入1mL的Ab₂(AFP)溶液(Ab₂(AFP)浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$),于暗处轻轻振荡,在室温下反应2小时。最后,使用50KD超滤管(离心转速为3000g,时间为20min)超滤获得的产物以除去未连接的量子点和副产物。所得混合物于4°C下储存,备用。

[0081] CdZnTeS-Ab₂(CA125)的制备过程中,所用的二抗为CA125抗原所对应的二抗,其余步骤均与CdZnTeS-Ab₂(AFP)相同。

[0082] (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ -Ab₁溶液的制备

[0083] 通过戊二醛的交联反应将AFP一抗连接到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 上,简言之,将15mg氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 充分溶于10mL超纯水中,然后加入2.7mL 2.5wt%的戊二醛溶液并在室温下搅拌7小时,之后,磁性分离产物中的磁性物质,用10mM PBS(pH 7.4)洗涤分离得到的磁性物质以除去过量的戊二醛,得到戊二醛功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 。将得到的戊二醛功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 再分散在5mL的PBS(10mM,pH 7.4)中。随后,将500 μL 含有10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ab₁(AFP)溶液加入到500 μL 以上制得的戊二醛功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 在PBS的分散液中,使混合物在室温下轻微震荡反应1小时,磁性分离产物中的磁性物质,然后用10mM PBS(pH 7.4)洗涤以除去未结合的Ab₁(AFP),制得 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ -Ab₁(AFP)。最后,将 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ -Ab₁(AFP)在含有BSA的PBS溶液(120 μL ,1.0wt%)中于37°C下温育30min以封闭非特异性结合位点,得到非特异性结合位点被封闭

的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1(\text{AFP})$,即 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{Ab}_1(\text{AFP})/\text{BSA}$ 。将得到的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{Ab}_1(\text{AFP})/\text{BSA}$ 生物复合物洗涤后重新分散于500 μL PBS中,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{Ab}_1(\text{AFP})/\text{BSA}$ 溶液,4 $^\circ\text{C}$ 保存,备用。

[0084] $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1(\text{CA125})$ 除使用的一抗为CA125抗原所对应的一抗外,其余步骤均与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1(\text{AFP})$ 相同。

[0085] (c) 电化学发光免疫传感器的构建

[0086] AFP电化学发光免疫传感器的构建:

[0087] 将70 μL 步骤(b)制得的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{Ab}_1(\text{AFP})/\text{BSA}$ 溶液加入到溶液C(含有不同浓度的AFP抗原的5mL PBS溶液,AFP抗原的浓度分别为20ng/mL,15ng/mL,10ng/mL,8ng/mL,5ng/mL,3ng/mL,1ng/mL和0.5ng/mL)中,并在37 $^\circ\text{C}$ 振荡2小时,用PBS小心洗涤所获得的抗原-抗体复合物以除去物理吸附的抗原。然后,将步骤(a)制得的 $\text{CdZnTeS-Ab}_2(\text{AFP})$ 与上述抗原-抗体复合物溶液混合并在35 $^\circ\text{C}$ 孵育2小时以构建夹心型电化学发光免疫传感器。最后,用PBS洗涤得到的电化学发光免疫传感器以去除未结合的 $\text{CdZnTeS-Ab}_2(\text{AFP})$,然后再分散在100 μL PBS溶液中,并在4 $^\circ\text{C}$ 下储存备用。

[0088] CA125电化学发光免疫传感器的构建:

[0089] CA125电化学发光免疫传感器的构建过程中,70 μL $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-Ab}_1(\text{CA125})$ 置于溶液D(含有不同浓度的CA125抗原的5mL PBS溶液,CA125抗原的浓度分别为500U/mL,400U/mL,300U/mL,200U/mL,100U/mL,50U/mL,30U/mL和20U/mL)中,其他步骤与AFP电化学发光免疫传感器的构建过程相同。

[0090] (3) 不同浓度的AFP和CA125抗原的可视化检测

[0091] 将10 μL 不同AFP和CA125浓度的免疫传感器滴至玻碳电极表面,在三电极体系中,以50mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 作为共反应试剂,在电化学工作站上进行循环伏安扫描,施加电位为-1.6~0V,使用手机拍摄到电化学发光成像图片。如图4所示,图4A为不同浓度的AFP免疫传感器的可视化电化学发光成像,从左至右,浓度分别为20ng/mL,15ng/mL,10ng/mL,8ng/mL,5ng/mL,3ng/mL,1ng/mL和0.5ng/mL;图4B为不同浓度的CA125免疫传感器的可视化电化学发光成像,从左至右,浓度分别为500U/mL,400U/mL,300U/mL,200U/mL,100U/mL,50U/mL,30U/mL和20U/mL。显然,随着AFP浓度从20ng/mL减少至0.5ng/mL、CA125浓度从500U/mL减少至20U/mL时,电化学发光发射逐渐变弱。可以通过Image-Pro Plus软件来分析可视化图片的电化学发光强度,如图4C、4D所示,电化学发光强度与抗原浓度的对数值成正比。线性拟合方程为 $I=22.071\lg C_{\text{AFP}}+21.71$,相关系数为0.9875, $I=24.231\lg C_{\text{CA125}}-16.58$,相关系数为0.9900。使用手机能够拍摄到相对较低浓度抗原所构建的免疫传感器的电化学发光成像图片,表明构建的电化学发光免疫传感器灵敏度很高,具有很大的实际应用潜力。

[0092] 实施例3

[0093] 基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器的制备方法及其对AFP和CA125的检测结果与ELISA结果对比,包括以下步骤:

[0094] (1) 制备CdZnTeS量子点:

[0095] (a) 将0.75g $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 和0.8g L-半胱氨酸溶解在110mL超纯水中并用NaOH调节pH至10来制备Cd前驱体溶液;

[0096] (b) 在25mL超纯水中加入0.1g碲粉,通 N_2 10min,迅速加入0.1g NaHB_4 ,于80 $^\circ\text{C}$ 回流30min,制得NaHTe前驱体溶液;

[0097] (c) 将0.12g的ZnCl₂和0.18g的L-半胱氨酸溶解在35mL的去离子水中制备ZnS前驱体溶液；

[0098] (d) 将20mL新制NaHTe溶液加入到N₂饱和的Cd前驱体溶液中,随后加入ZnS前驱体溶液,将得到的混合溶液加热至约110℃,得CdZnTeS量子点溶液。

[0099] (2) 基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器的制备方法:

[0100] (a) CdZnTeS-Ab₂溶液的制备

[0101] 以CdZnTeS-Ab₂(AFP)为例,首先将80μL新鲜制备的EDC溶液(EDC浓度为4.5mg/mL)加入到550μL步骤(1)制得的CdZnTeS量子点溶液中以活化CdZnTeS量子点表面的羧酸基团,然后,加入1mL的Ab₂(AFP)溶液(Ab₂(AFP)浓度为10μg/mL),于暗处轻轻振荡,在室温下反应2小时。最后,使用50KD超滤管(离心转速为3000g,时间为10min)超滤获得的产物以除去未连接的量子点和副产物。所得混合物于4℃下储存,备用。

[0102] CdZnTeS-Ab₂(CA125)的制备过程中,所用的二抗为CA125抗原所对应的二抗,其余步骤均与CdZnTeS-Ab₂(AFP)相同。

[0103] (b) Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁溶液的制备

[0104] 通过戊二醛的交联反应将AFP一抗连接到Fe₃O₄@SiO₂上,简言之,将12mg氨基化的Fe₃O₄@SiO₂充分溶于8mL超纯水中,然后加入2.7mL 2.5wt%的戊二醛溶液并在室温下搅拌6小时,之后,磁性分离产物中的磁性物质,用10mM PBS(pH 7.4)洗涤分离得到的磁性物质以除去过量的戊二醛,得到戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂。将得到的戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂再分散在5mL的PBS(10mM,pH 7.4)中。随后,将460μL含有10μg/mL Ab₁(AFP)溶液加入到450μL以上制得的戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂在PBS的分散液中,使混合物在室温下轻微震荡反应2小时,然后磁性分离产物中的磁性物质,用10mM PBS(pH 7.4)洗涤以除去未结合的Ab₁(AFP)。最后,将Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁(AFP)在含有BSA的PBS溶液(100μL,BSA浓度为1.0wt%)中于37℃下温育30min以封闭非特异性结合位点,磁性分离产物中的磁性物质,洗涤,即得到非特异性结合位点被封闭的Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁(AFP),即Fe₃O₄@SiO₂/Ab₁(AFP)/BSA。将得到的Fe₃O₄@SiO₂/Ab₁(AFP)/BSA生物复合物重新分散于500μL PBS中,得到Fe₃O₄@SiO₂/Ab₁(AFP)/BSA溶液,4℃保存,备用。

[0105] Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁(CA125)除使用的一抗为CA125抗原对应的一抗外,其余步骤均与Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁(AFP)相同。

[0106] (c) 电化学发光免疫传感器的构建

[0107] AFP电化学发光免疫传感器的构建:

[0108] 将60μL步骤(b)制得的Fe₃O₄@SiO₂/Ab₁(AFP)/BSA溶液加入到稀释的血清中,并在37℃振荡2小时。用PBS小心洗涤所获得的抗原-抗体复合物以除去物理吸附的抗原。然后,将步骤(a)制得的CdZnTeS-Ab₂(AFP)与本步骤制得的抗原-抗体复合物混合并于37℃孵育2小时以构建夹心型免疫传感器。最后,用PBS洗涤得到的免疫传感器以去除未结合的CdZnTeS-Ab₂(AFP),然后再分散在100μL PBS溶液中,并在4℃下储存备用。

[0109] CA125电化学发光免疫传感器的构建:

[0110] CA125电化学发光免疫传感器的构建过程中,将60μL Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁(CA125)置于本步骤中与Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁(AFP)溶液孵育后剩余的血清中,其他步骤与AFP免疫传感器的构建过程相同。

[0111] (3) 本发明的电化学发光免疫传感器对AFP和CA125检测结果与ELISA结果对比：

[0112] (a) 将由稀释所得的不同浓度血清构建的电化学发光免疫传感器滴至玻碳电极上，以50mM $K_2S_2O_8$ 作为共反应试剂，电化学发光分析仪的光电倍增管的高压设为600V，施加电位为-1.6~0V，扫速为100mV s^{-1} ，采集电化学发光信号。通过电化学发光强度(y)与抗原浓度(x)的线性关系 $y=1976.2x+12533.5$ (AFP电化学发光免疫传感器) 和 $y=2080.6x+8521.2$ (CA125电化学发光免疫传感器) 得血清中AFP和CA125的浓度；

[0113] (b) 使用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测同一批血清中AFP和CA125的浓度；

[0114] (c) 将(a)和(b)中的检测结果进行对比，列于表1A和1B中。结果表明免疫传感器测定值与ELISA结果一致，说明该方法对于AFP和CA125测定的准确度和精度都很高。

[0115] 表1A

样品序号	商用 ELISA 方法(ng/mL)	本发明电化学发光免疫传感器检测(ng/mL)	相对标准偏差 (%)
1	4.18	4.06	-2.87
2	3.22	3.41	5.90
3	1.89	1.92	1.59

[0117] 表1B

样品序号	商用 ELISA 方法(U/mL)	本发明电化学发光免疫传感器检测(U/mL)	相对标准偏差 (%)
1	6.50	6.68	2.77%
2	4.75	4.61	-2.95%
3	3.06	3.22	5.23%

[0119] 实施例4

[0120] 基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器的制备方法及其可靠性评估，包括以下步骤：

[0121] (1) 制备CdZnTeS量子点：

[0122] (a) 将0.7g $CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$ 和0.9g L-半胱氨酸溶解在100mL超纯水中并用NaOH调节pH至10来制备Cd前驱体溶液；

[0123] (b) 在30mL超纯水中加入0.1g碲粉，通 N_2 10min，迅速加入0.08g $NaHB_4$ ，于80℃回流30min，制得NaHTe前驱体溶液；

[0124] (c) 将0.09g的 $ZnCl_2$ 和0.16g的L-半胱氨酸溶解在30mL的去离子水中制备ZnS前驱体溶液；

[0125] (d) 将15mL新制NaHTe溶液加入到 N_2 饱和的Cd前驱体溶液中，随后加入ZnS前驱体溶液，将得到的混合溶液混合加热至约100℃，得CdZnTeS量子点溶液。

[0126] (2) 基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器的制备方法：

[0127] (a) CdZnTeS-Ab₂溶液的制备

[0128] 以CdZnTeS-Ab₂(AFP)为例，首先将80μL新鲜制备的EDC溶液(EDC浓度为4.5mg/mL)加入到500μL步骤(1)制得的CdZnTeS量子点溶液中以活化CdZnTeS量子点表面的羧酸基团，然

后,加入1mL的Ab₂(AFP)溶液(溶液中Ab₂(AFP)浓度为10μg/mL),于暗处轻轻振荡,在室温下反应2小时。最后,使用50KD超滤管(离心转速为3000g,时间为20min)超滤获得的产物以除去未连接的量子点和副产物。所得混合物于4℃下储存,备用。

[0129] CdZnTeS-Ab₂(CA125)的制备过程中,所用的二抗为CA125抗原所对应的二抗,其余步骤均与CdZnTeS-Ab₂(AFP)相同。

[0130] (b) Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁溶液的制备

[0131] 通过戊二醛的交联反应将AFP一抗连接到Fe₃O₄@SiO₂上,简言之,将11mg氨基化的Fe₃O₄@SiO₂充分溶于7.5mL超纯水中,然后加入2.5mL 2.5wt%的戊二醛溶液并在室温下搅拌6小时,之后,磁性分离产物中的磁性物质,用10mM PBS (pH 7.4)洗涤分离得到的磁性物质以除去过量的戊二醛,得到戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂。将得到的戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂再分散在5mL的PBS缓冲液(10mM, pH 7.4)中,得到戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂在PBS缓冲液中的分散液。随后,将500μL含有10μg/mL Ab₁(AFP)溶液加入到500μL以上制得的戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂在PBS缓冲液中的分散液中,使混合物在室温下轻微震荡反应1.5小时,磁性分离产物中的磁性物质,然后用10mM PBS (pH 7.4)洗涤分离出的磁性物质以除去未结合的Ab₁(AFP)。最后,将Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁(AFP)在含有BSA的PBS溶液(100μL, BSA的浓度为1.0wt%)中于37℃下温育60min以封闭非特异性结合位点,磁性分离产物中的磁性物质,洗涤,即得到非特异性结合位点被封闭的Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁(AFP),即Fe₃O₄@SiO₂/Ab₁(AFP)/BSA。将得到的Fe₃O₄@SiO₂/Ab₁(AFP)/BSA生物复合物重新分散于500μL PBS中,得到Fe₃O₄@SiO₂/Ab₁(AFP)/BSA溶液,4℃保存,备用。

[0132] Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁(CA125)通过相同的方法制备。

[0133] (c) 免疫传感器的构建

[0134] AFP电化学发光免疫传感器的构建:

[0135] 将50μL步骤(b)制得的Fe₃O₄@SiO₂/Ab₁(AFP)/BSA溶液加入到稀释的已知浓度的血清中,并在37℃振荡1小时。用PBS小心洗涤所获得的抗原-抗体复合物以除去物理吸附的抗原。然后,将步骤(a)制得的CdZnTeS-Ab₂(AFP)溶液与本步骤中所述的抗原-抗体复合物混合并于37℃孵育1小时以构建夹心型免疫传感器。最后,用PBS洗涤得到的免疫传感器以去除未结合的CdZnTeS-Ab₂(AFP),然后再分散在100μL PBS溶液中,并在4℃下储存备用。

[0136] CA125电化学发光免疫传感器的构建:

[0137] CA125免疫传感器的构建过程中,50μL Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁(CA125)置于本步骤中所述剩余的血清中,其他步骤与AFP免疫传感器的构建过程相同。

[0138] (3) 采用标准加入法评估电化学发光免疫传感器的可靠性:

[0139] (a) 向已知浓度的血清中加入一定浓度的AFP和CA125抗原,所得血清样记为B,将50μL的Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁(AFP)溶液加入到血清样B中,并在37℃振荡1小时。用PBS小心洗涤所获得的抗原-抗体复合物以除去物理吸附的抗原。然后,将CdZnTeS-Ab₂(AFP)与本步骤中所述的抗原-抗体复合物混合并孵育1小时以构建夹心型免疫传感器。最后,用PBS洗涤得到的免疫传感器以去除未结合的CdZnTeS-Ab₂(AFP),然后再分散在100μL PBS溶液中,并在4℃下储存备用。

[0140] CA125免疫传感器的构建过程中,50μL Fe₃O₄@SiO₂-Ab₁(CA125)置于上述剩余的血清样B中,其他步骤与AFP免疫传感器的构建过程相同;

[0141] (b) 以50mM $K_2S_2O_8$ 作为共反应试剂,通过电化学发光分析仪分别采集添加抗原前后的电化学发光信号,由电化学发光强度(y)与抗原浓度(x)的线性关系 $y=1976.2x+12533.5$ (AFP电化学发光免疫传感器)和 $y=2080.6x+8521.2$ (CA125电化学发光免疫传感器)分别计算AFP和CA125抗原的浓度;

[0142] (c) 表2为通过标准加入法向稀释的血清中加入AFP和CA125的分析检测结果,由表2A和表2B,回收率范围从96.94%到104.77%,RSD范围从1.38%到3.69%。结果表明本发明中所提出的免疫测定法较为可靠。

[0143] 表2A

	血清中初始 AFP 浓度 (ng/mL)	添加的 AFP 浓度 (ng/mL)	实际检测到的 AFP 浓度 (ng/mL)	平均值 (ng/mL)	RSD (%)	回收率 (%)
[0144]	1.5	1.2	2.81,2.76,2.64,2.87,2.75	2.77	3.07	102.59
		1.5	2.97,3.09,3.16,3.04,2.91	3.03	3.23	101.00
		1.8	3.15,3.24,3.32,3.11,3.27	3.22	2.69	97.58
	3	2.4	5.28,5.16,5.43,5.32,5.01	5.24	3.07	97.04
		3	5.94,6.35,6.21,6.19,6.06	6.15	2.54	102.50
		3.6	6.65,6.28,6.16,6.72,6.42	6.45	3.69	97.73

[0145] 表2B

	血清中初始 CA125 浓度 (U/mL)	添加的 CA125 浓度 (U/mL)	实际检测到的 CA125 浓度 (U/mL)	平均值 (U/mL)	RSD (%)	回收率 (%)
[0146]	2	1.6	3.39,3.46,3.63,3.53,3.42	3.49	2.76	96.94
		2	4.08,4.29,3.95,4.19,4.21	4.14	3.18	103.50
		2.4	4.55,4.62,4.76,4.46,4.68	4.61	2.51	104.77
	5	4	8.95,8.86,8.78,9.12,9.05	8.95	1.54	99.44
		5	9.83,10.02,9.75,10.08,9.97	9.93	1.38	99.30
		6	10.88,11.39,10.91,11.32,11.47	11.19	2.49	101.73

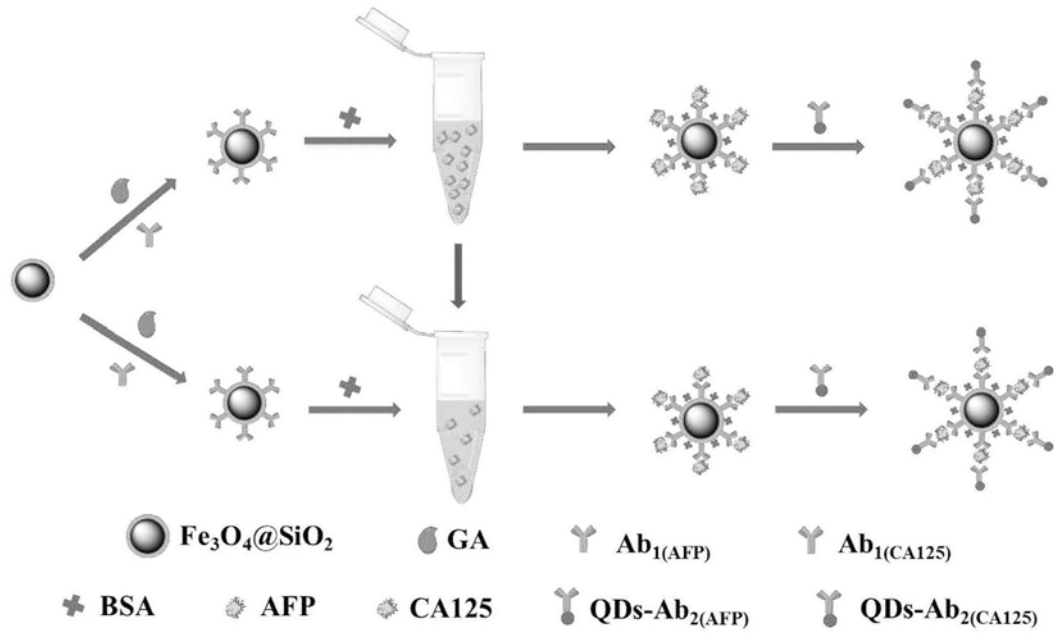


图1

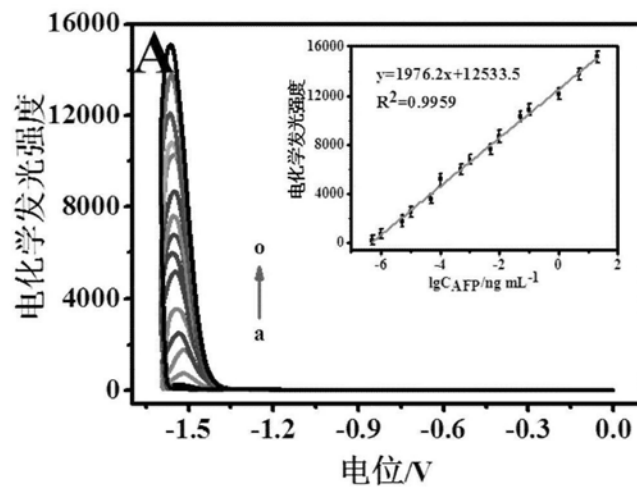


图2A

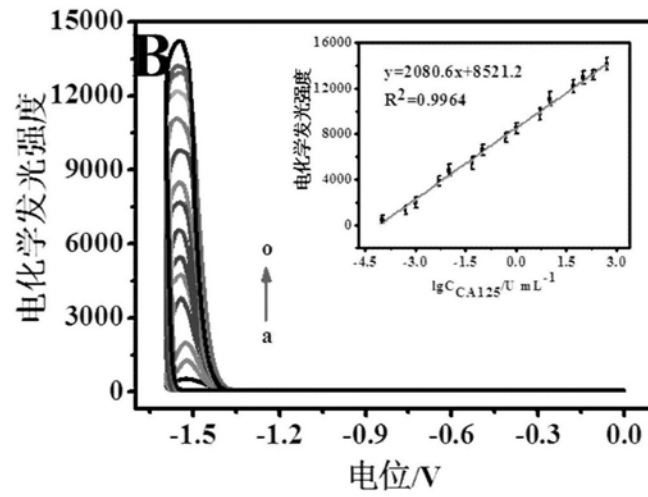


图2B

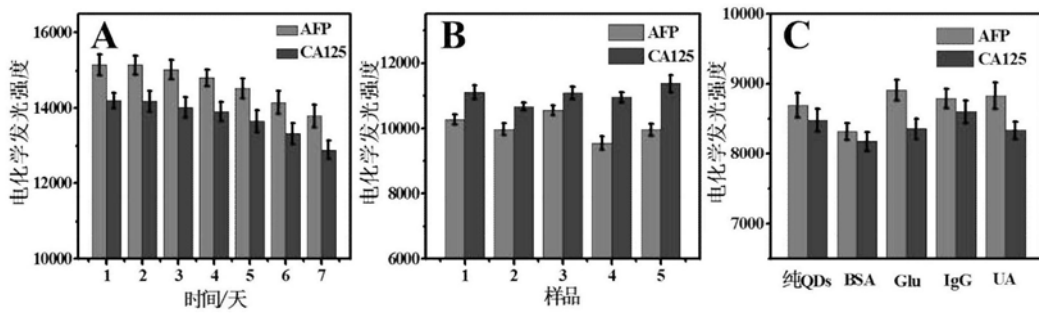


图3

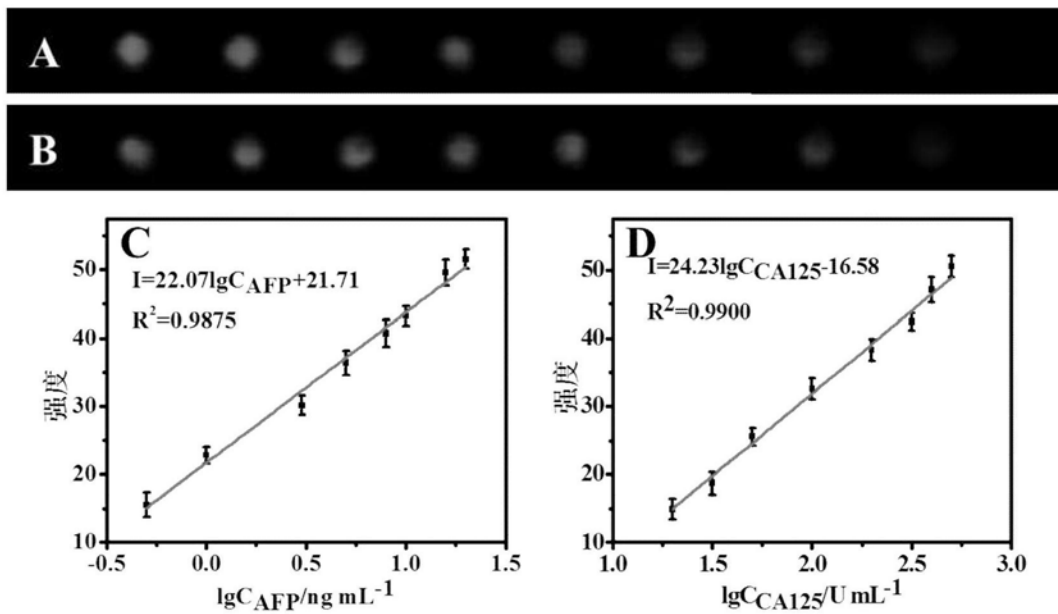


图4

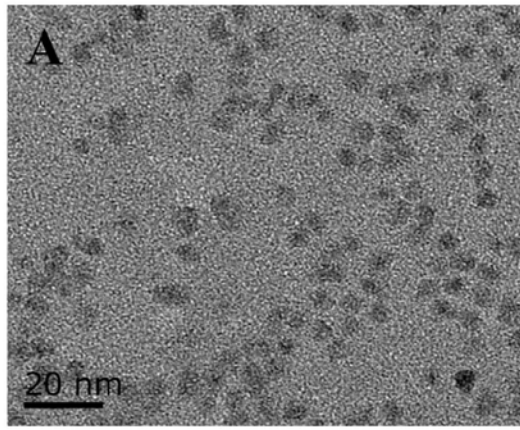


图5A

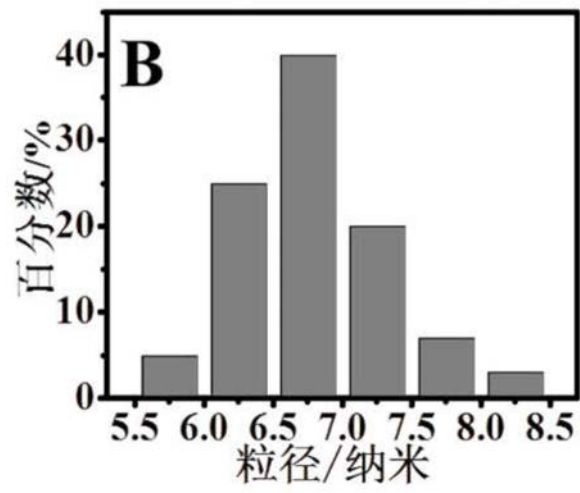


图5B

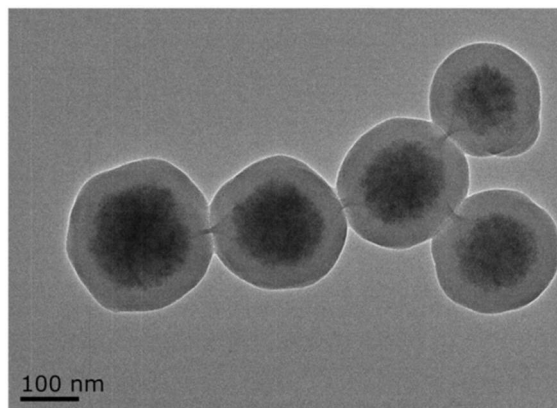


图6

专利名称(译)	基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN108226461B	公开(公告)日	2020-05-19
申请号	CN201810066547.X	申请日	2018-01-23
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	东南大学		
[标]发明人	丁收年 梁秀丽 韩亭亭 朱红允 武锡锦 左家莹 刘金霞 闫其报 温雪飞		
发明人	丁收年 梁秀丽 韩亭亭 朱红允 武锡锦 左家莹 刘金霞 闫其报 温雪飞		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/48 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N27/48 G01N33/53		
代理人(译)	王艳		
其他公开文献	CN108226461A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器，包括CdZnTeS-Ab2、非特异性结合位点被封闭的Fe₃O₄@SiO₂-Ab1以及分别与CdZnTeS-Ab2和Fe₃O₄@SiO₂-Ab1通过抗原-抗体间的相互作用连接的抗原；CdZnTeS-Ab2为CdZnTeS量子点标记的二抗；Fe₃O₄@SiO₂-Ab1为表面修饰有一抗的Fe₃O₄@SiO₂。本发明还提供上述电化学发光免疫传感器的制备方法和应用。本发明基于抗原与抗体之间的相互作用构建电化学发光免疫传感器，大大提高了检测的特异性，检测速度快、灵敏度高、特异性好、检测限低、可检测的线性范围宽、操作简单，并且能够实现可视化检测。

