



(21) 申请号 201410411550. 2

(22) 申请日 2014. 08. 20

(71) 申请人 济南大学

地址 250022 山东省济南市济微路 106 号

(72) 发明人 魏琴 高丕成 张勇 马洪敏

庞雪辉 胡丽华

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 27/327 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书8页

(54) 发明名称

一种双功能标记光电化学传感器的制备方法
及应用

(57) 摘要

本发明提供了一种双功能标记光电化学传感器的制备方法及应用,属于纳米功能材料、临床分析、生物传感技术和电化学技术领域。本发明基于 TiO_2 与羧基间的配位原理制备了 $\text{TiO}_2\text{-CdSe}$ 半导体复合物;所制备的 $\text{TiO}_2\text{-CdSe}$ 半导体复合物在可见光区显示了显著增强的光电转换效果,其光电流值是单独 TiO_2 光电流值的 10 倍,并且 $\text{TiO}_2\text{-CdSe}$ 半导体复合物比表面积大、生物相容性好,用于标记 CA125 的二抗 (Ab_2),从而制得 $\text{TiO}_2\text{-CdSe-Ab}_2$ 孵化物。与其它电化学或者光致电化学传感器不同的是,由于 $\text{TiO}_2\text{-CdSe}$ 半导体复合物既能进行光电转换,又能产生 Cd^{2+} ,因此, $\text{TiO}_2\text{-CdSe}$ 半导体复合物作为二抗标记物的免疫传感器可以采用电化学与光致电化学两种分析技术实现对 CA125 的快速、灵敏、准确检测。该方法对癌症的早期诊断具有一定的指导意义和应用价值。

1. 一种双功能标记光电化学传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)ITO 电极的预处理:将 ITO 玻璃切割至 $3\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 大小,依次用洗洁精、丙酮、乙醇以及超纯水超声清洗 30 min ,最后用氮气吹干玻璃,用绝缘胶带在 ITO 电极的一端留出 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 大小的面积用以修饰生物分子;

(2)将处理后的 ITO 电极在浸泡在体积分数为 $1\% \sim 3\%$ 的 3- 氨丙基三乙氧基硅烷 APTES 的甲醇溶液中,避光浸泡 $10 \sim 14\text{ h}$,用水冲洗电极,以除去未结合的 APTES 分子;

(3)取新鲜制备的 $10\text{ }\mu\text{L}$ 金纳米溶胶滴加到电极表面,用于结合 CA125 一抗分子;

(4)将 $6\text{ }\mu\text{L}$ 、 $8 \sim 12\text{ }\mu\text{g/mL}$ CA125 一抗溶液滴加到电极上,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温冰箱中孵化 2 h ,冲洗电极表面以除去未结合的一抗分子;

(5)滴涂 $2\text{ }\mu\text{L}$ 、质量分数为 $0.5\% \sim 1.5\%$ 的 BSA 溶液于电极上,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存、晾干;

(6)用超纯水清洗,晾至湿润状态,将 $6\text{ }\mu\text{L}$ 、 $0.05\text{ pg/mL} \sim 100\text{ ng/mL}$ 不同浓度的 CA125 抗原溶液滴涂于电极表面,使其与 CA125 一抗之间发生特异性免疫反应并继续孵化 2 h ,用超纯水冲洗以除去未结合的 CA125,晾干;

(7)取 $6\text{ }\mu\text{L}$ $\text{TiO}_2\text{-CdSe-Ab}_2$ 二抗孵化物溶液滴涂于电极表面,孵化 2 h 后冲洗电极表面,晾干,制得双功能标记光电化学传感器。

2. 如权利要求 1 所述的一种双功能标记光电化学传感器的制备方法,其特征在于,所述的 $\text{TiO}_2\text{-CdSe-Ab}_2$ 二抗孵化物溶液,制备步骤如下:

(1) TiO_2 纳米颗粒的制备

取 $6 \sim 8\text{ mL}$ 钛酸丁酯溶于 30 mL 乙醇中,充分搅拌均匀,取 10 mL 超纯水在搅拌下缓慢加入溶液中,室温磁力搅拌反应 120 min ,将该混合液转移至高压釜中, $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水热反应 $10 \sim 12\text{ h}$,制得白色固体,离心分离,并用二次水和乙醇分别清洗 5 次 ,在 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下真空干燥 $10 \sim 14\text{ h}$,研磨制得 TiO_2 纳米颗粒;

(2) 羧基功能化 CdSe 量子点的制备

将 $1.0 \sim 1.3\text{ g}$ $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 溶于 40 mL 水中,加入巯基乙酸的混合液,用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 $9 \sim 11$,搅拌下加入 12 mL 、 0.2 mol/L 的 NaSeSO_3 溶液,将反应物油浴加热至沸腾,回流 4 h ,最终得到羧基化 CdSe 量子点溶液;

所述巯基乙酸的混合液是由 $50 \sim 60\text{ mL}$ 高纯水和 0.84 mL 巯基乙酸共混制得;所述 0.2 mol/L 的 NaSeSO_3 溶液,取 10 mmol Se 和 12 mmol Na_2SO_3 加入 50 mL 水中,反应 3 h ,过滤制得;

(3) $\text{TiO}_2\text{-CdSe-Ab}_2$ 二抗孵化物溶液的制备

称取 $3 \sim 5\text{ mg}$ TiO_2 分散于 4 mL 羧基化 CdSe 量子点溶液中,超声并搅拌反应 $10 \sim 14\text{ h}$,待反应完成后,用超纯水离心洗涤 3 次 ,制得 $\text{TiO}_2\text{-CdSe}$ 半导体复合物;将 $\text{TiO}_2\text{-CdSe}$ 半导体复合物分散于 1 mL 水中,用 1- 乙基 -3-(3- 二甲氨基丙基) - 碳化二亚胺 EDC/N- 羟基琥珀酰亚胺 NHS 交联剂活化复合物表面的羧基,将 1 mL 、 $8 \sim 12\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的 CA125 二抗 Ab_2 加入混匀,并于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温震荡器中震荡 12 h ,用超纯水离心洗涤去掉未结合的 Ab_2 分子,制得 $\text{TiO}_2\text{-CdSe-Ab}_2$ 二抗孵化物溶液。

3. 如权利要求 1 所述的制备方法制备的双功能标记光电化学传感器,其特征在于,使用电化学和光致电化学的方法实现对人体 CA125 的定量检测,步骤如下:

(1) 双功能标记光电化学传感器置于 $0.3 \sim 0.5$ mL、 0.1 mol/L 的硝酸溶液中浸泡 4 h, 使 CdSe 量子点分解成为 Cd^{2+} , 将其加入到 3.6 mL、 $30 \sim 50$ mg/mL Hg^{2+} 的 pH 4.6 醋酸-醋酸钠缓冲溶液中, 使用三电极体系, 进行电化学检测;

所述三电极饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 玻碳电极为工作电极;

(2) 扫描电压范围从 $-0.9 \sim -0.6$ V, 电势跃阶为 4 mV, 频率 25 Hz, 振幅 25 mV;

(3) Cd^{2+} 发生氧化还原反应在 -0.7 V 附近产生信号, 根据所得电流强度与分析物之间的线性关系, 绘制工作曲线;

(4) 光电检测采用 $i-t$ 测试手段, 偏压设置为 0 V; 每隔 20 s 进行开关灯, 记录开关灯前后电流的变化值, 根据不同浓度的抗原产生不同大小的光电流值, 绘制工作曲线;

(5) 将待测样品溶液代替 CA125 的标准溶液, 按照所述 CA125 的工作曲线的绘制方法进行检测。

一种双功能标记光电化学传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于功能化纳米材料、免疫分析及生物传感技术领域,具体涉及基于一种双功能 TiO_2/CdSe 半导体标记物构建的夹心型免疫传感器的制备及应用。

背景技术

[0002] 半导体材料因其能带与价带之间存在能级差,使得其在光等能量的激发下会产生电子的跃迁,从而呈现出介于导体与绝缘体之间的半导电状态。

[0003] TiO_2 是一种经常在光催化、太阳能电池以及燃料电池等方面应用的半导体材料。 TiO_2 具有易批量合成以及对环境无污染的特点。相比于块状 TiO_2 来讲,纳米形态的 TiO_2 具有比表面积大、生物亲和性好以及便于官能团化等优点。但是不足的是, TiO_2 能带宽度较宽 (3.2 eV),从而使其只能在紫外光区被有效激发,在可见光区的光电转换效率极低。为了使其能够在可见光范围内表现出好的光电转换特性,对 TiO_2 敏化一直是科研工作者研究的热点内容。

[0004] 硒化镉量子点(CdSe QDs)是一种窄能带的半导体纳米材料,其能带宽度约为 1.7 eV,几乎接近 TiO_2 能带宽度的 50% 大小。窄的禁带宽度使得 CdSe QDs 在可见光区范围内就能表现出良好的光催化与光电转换性质。此外,根据相关研究表明,当宽能带半导体与窄能带半导体相互复合后,所得到的复合物能够表现出优于这两者本身的光电转换效果。因此说,CdSe 除了本身就是一种良好的光电转换原件以外,其还可作为 TiO_2 的敏化剂用以提高 TiO_2 在可见光区的光电转换效率。

[0005] 光致电化学免疫传感器是一种以光能作为激发能量,电信号作为检测信号的传感器。在此类传感器中,光电转换元件—半导体材料扮演着不可替代的作用。正是由于检测信号与激发能量方式的不同,使得光致电化学传感器有着高的灵敏度。将免疫分析技术与光电检测技术结合,能够大大提高被测物检测的灵敏度,并且能够降低检测限。通过被测物质对半导体所产生的光电信号的影响,实现对被测物质的定量检测。半导体纳米材料具有高的比表面积和良好的生物亲和性,因此能够负载更多的抗原、抗体等生物分子,从而进一步提高检测的灵敏度。

[0006] 与光致电化学不同,电化学分析是一种以不同方式的电信号作为激发与检测信号的分析检测技术。电化学传感器是一种将电化学分析与传感技术结合所产生的一种传感器件。其检测原理是基于被测物质影响电极体系的电化学信号,从而实现对被测物质的定量与定性分析。电化学传感器也是近年来新兴的灵敏分析检测技术,并且已经在生命科学、生物科学以及表面科学等领域得到了广泛的研究与应用。纳米材料因其优良的物理、化学性能经常被用于电化学传感器的构建过程中。

[0007] 肿瘤标志物是指肿瘤细胞在生长过程中产生分泌的一种物质,其含量与肿瘤细胞的存在密切相关。通过检测肿瘤标志物,在临床上可以实现对肿瘤的监测,实现对肿瘤疾病的早期诊断与预防等,对临床检测有重要的指导意义。CA125 是卵巢癌的一种特异性标志物。卵巢癌病人血清中,CA125 水平会明显高于正常值,化疗和手术有效者 CA125 水平很快

下降,若有复发时,CA125 升高可先于临床症状之前。因此实现 CA125 的快速准确测定,及时发现并了解病情,对临床检测具有重要的指导意义。

[0008] 本发明基于 TiO_2 与羧基间的配位作用,通过简单的震荡方法制备了 TiO_2 -CdSe 半导体复合物。所制备的 TiO_2 -CdSe 半导体复合物在可见光区显示了 10 倍于 TiO_2 的光电流强度。首次将所制备的 TiO_2 -CdSe 半导体复合物作为肿瘤标志物 CA125 的二抗标记物,成功构建了用于灵敏检测 CA125 的夹心型免疫传感器。

[0009] 以 TiO_2 -CdSe 为二抗标记物,使得该夹心型免疫传感器可以用光致电化学与电化学两种分析检测技术实现对 CA125 的定量检测。检测结果表明,无论是电化学方法还是光致电化学方法,该传感器都对 CA125 的检测有高的灵敏度、低的检出限与宽的线性范围。以所制备 TiO_2 -CdSe 半导体复合物为 CA125 二抗标记物所构建的夹心型免疫传感器,可以扩展到其他肿瘤标志物比如 CA153、CA199 的分析检测。

发明内容

[0010] 本发明的目的之一是提供制备具有高光电转换效率的 TiO_2 -CdSe 异质结复合半导体的简便方法。

[0011] 本发明的目的之二是将所制备 TiO_2 -CdSe 半导体复合物作为 CA125 二抗标记物用于构建夹心型免疫传感器。

[0012] 本发明的目的之三是使用电化学与光致电化学两种方法实现对 CA125 的快速灵敏检测。

[0013] 本发明的技术方案,包括以下步骤。

[0014] 1. 一种双功能标记光电化学传感器的制备方法

(1)ITO 电极的预处理:将 ITO 玻璃切割至 $3\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 大小,依次用洗洁精、丙酮、乙醇以及超纯水超声清洗 30 min,最后用氮气吹干玻璃,用绝缘胶带在 ITO 电极的一端留出 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 大小的面积用以修饰生物分子;

(2) 将处理后的 ITO 电极在浸泡在体积分数为 1% ~ 3% 的 3- 氨丙基三乙氧基硅烷 APTES 的甲醇溶液中,避光浸泡 10 ~ 14 h,用水冲洗电极,以除去未结合的 APTES 分子;

(3) 取新鲜制备的 10 μL 金纳米溶胶滴加到电极表面,用于结合 CA125 一抗分子;

(4) 将 6 μL 、8~12 $\mu\text{g/mL}$ CA125 一抗溶液滴加到电极上,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 恒温冰箱中孵化 2 h,冲洗电极表面以除去未结合的一抗分子;

(5) 滴涂 2 μL 、质量分数为 0.5% ~ 1.5% 的 BSA 溶液于电极上,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存、晾干;

(6) 用超纯水清洗,晾至湿润状态,将 6 μL 、0.05 $\mu\text{g/mL}$ ~ 100 ng/mL 不同浓度的 CA125 抗原溶液滴涂于电极表面,使其与 CA125 一抗之间发生特异性免疫反应并继续孵化 2 h,用超纯水冲洗以除去未结合的 CA125,晾干;

(7) 取 6 μL TiO_2 -CdSe- Ab_2 二抗孵化物溶液滴涂于电极表面,孵化 2 h 后冲洗电极表面,晾干,制得双功能标记光电化学传感器。

[0015] 2. TiO_2 -CdSe- Ab_2 二抗孵化物溶液的制备方法

(1) TiO_2 纳米颗粒的制备

取 6~8 mL 钛酸丁酯溶于 30 mL 乙醇中,充分搅拌均匀,取 10 mL 超纯水在搅拌下缓慢加

入溶液中,室温磁力搅拌反应 120 min,将该混合液转移至高压釜中,200 °C 水热反应 10~12 h,制得白色固体,离心分离,并用二次水和乙醇分别清洗 5 次,在 80 °C 下真空干燥 10~14 h,研磨制得 TiO_2 纳米颗粒。

[0016] (2) 羧基功能化 CdSe 量子点的制备

将 1.0 ~ 1.3 g $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 溶于 40 mL 水中,加入巯基乙酸的混合液,用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 9 ~ 11,搅拌下加入 12 mL、0.2 mol/L 的 NaSeSO_3 溶液,将反应物油浴加热至沸腾,回流 4 h,最终得到羧基化 CdSe 量子点溶液;

所述巯基乙酸的混合液是由 50 ~ 60 mL 高纯水和 0.84 mL 巯基乙酸共混制得;所述 0.2 mol/L 的 NaSeSO_3 溶液,取 10 mmol Se 和 12 mmol Na_2SO_3 加入 50 mL 水中,反应 3 h,过滤制得。

[0017] (3) TiO_2 -CdSe- Ab_2 二抗孵化物溶液的制备

称取 3~5 mg TiO_2 分散于 4 mL 羧基化 CdSe 量子点溶液中,超声并搅拌反应 10~14 h,待反应完成后,用超纯水离心洗涤 3 次,制得 TiO_2 -CdSe 半导体复合物;将 TiO_2 -CdSe 半导体复合物分散于 1 mL 水中,用 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺 EDC/N-羟基琥珀酰亚胺 NHS 交联剂活化复合物表面的羧基,将 1 mL、8 ~ 12 $\mu\text{g/mL}$ 的 CA125 二抗 Ab_2 加入混匀,并于 4 °C 恒温振荡器中震荡 12 h,用超纯水离心洗涤去掉未结合的 Ab_2 分子,制得 TiO_2 -CdSe- Ab_2 二抗孵化物溶液。

[0018] 3. 电化学和光致电化学的方法实现对人体 CA125 的定量检测

(1) 双功能标记光电化学传感器置于 0.3 ~ 0.5 mL、0.1 mol/L 的硝酸溶液中浸泡 4 h,使 CdSe 量子点分解成为 Cd^{2+} ,将其加入到 3.6 mL、30 ~ 50 mg/mL Hg^{2+} 的 pH 4.6 醋酸-醋酸钠缓冲溶液中,使用三电极体系,进行电化学检测;

所述三电极饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,玻碳电极为工作电极;

(2) 扫描电压范围从 -0.9~-0.6 V,电势跃阶为 4 mV,频率 25 Hz,振幅 25 mV;

(3) Cd^{2+} 发生氧化还原反应在 -0.7 V 附近产生信号,根据所得电流强度与分析物之间的线性关系,绘制工作曲线;

(4) 光电检测采用 i-t 测试手段,偏压设置为 0 V;每隔 20 s 进行开关灯,记录开关灯前后电流的变化值,根据不同浓度的抗原产生不同大小的光电流值,绘制工作曲线;

(5) 将待测样品溶液代替 CA125 的标准溶液,按照所述 CA125 的工作曲线的绘制方法进行检测。

[0019] 本发明的有益成果

(1) 基于配位原理制备光电效果明显高于 TiO_2 的 TiO_2 -CdSe 半导体复合纳米材料。所制备的 TiO_2 -CdSe 半导体复合物在可见光区显示了 10 倍于 TiO_2 的光电流强度,从而显著提高了传感体系检测的灵敏度,使体系检测限降低。

[0020] (2) 制备 TiO_2 -CdSe 复合物标记的 CA125 二抗,构建夹心型免疫传感器实现对 CA125 的灵敏、准确检测。

[0021] (3) 与其它电化学或者光致电化学传感器不同的是,由于 TiO_2 -CdSe 半导体复合物既能进行光电转换,又能产生 Cd^{2+} 。因此, TiO_2 -CdSe 半导体复合物作为二抗标记物的免疫传感器可以采用电化学与光致电化学两种分析技术实现对 CA125 的快速、灵敏、准确检测,并可互相验证结果的准确性。

[0022] (4)采用电化学方法对CA125的检测范围为0.1 pg/mL ~ 20 ng/mL,检出限为0.02 pg/mL;采用光致电化学方法对CA125的检测范围为0.05 pg/mL ~ 100 ng/mL,检出限为0.01 pg/mL。

具体实施方式

[0023] 实施例1 双功能标记光电化学传感器的制备方法

(1)ITO 电极的预处理:将 ITO 玻璃切割至 3 cm × 0.5 cm 大小,依次用洗洁精、丙酮、乙醇以及超纯水超声清洗 30 min,最后用氮气吹干玻璃,用绝缘胶带在 ITO 电极的一端留出 0.5 cm × 0.5 cm 大小的面积用以修饰生物分子;

(2)将处理后的 ITO 电极在浸泡在体积分数为 1% 的 3- 氨丙基三乙氧基硅烷 APTES 的甲醇溶液中,避光浸泡 10h,用水冲洗电极,以除去未结合的 APTES 分子;

(3)取新鲜制备的 10 μL 金纳米溶胶滴加到电极表面,用于结合 CA125 一抗分子;

(4)将 6 μL、8 μg/mL CA125 一抗溶液滴加到电极上,置于 4 °C 恒温冰箱中孵化 2 h,冲洗电极表面以除去未结合的一抗分子;

(5)滴涂 2 μL、质量分数为 0.5% 的 BSA 溶液于电极上,置于 4 °C 冰箱保存、晾干;

(6)用超纯水清洗,晾至湿润状态,将 6 μL、0.05 pg/mL ~ 100 ng/mL 不同浓度的 CA125 抗原溶液滴涂于电极表面,使其与 CA125 一抗之间发生特异性免疫反应并继续孵化 2 h,用超纯水冲洗以除去未结合的 CA125,晾干;

(7)取 6 μL TiO₂-CdSe-Ab₂ 二抗孵化物溶液滴涂于电极表面,孵化 2 h 后冲洗电极表面,晾干,制得双功能标记光电化学传感器。

[0024] 实施例2 双功能标记光电化学传感器的制备方法

(1)ITO 电极的预处理:将 ITO 玻璃切割至 3 cm × 0.5 cm 大小,依次用洗洁精、丙酮、乙醇以及超纯水超声清洗 30 min,最后用氮气吹干玻璃,用绝缘胶带在 ITO 电极的一端留出 0.5 cm × 0.5 cm 大小的面积用以修饰生物分子;

(2)将处理后的 ITO 电极在浸泡在体积分数为 2% 的 3- 氨丙基三乙氧基硅烷 APTES 的甲醇溶液中,避光浸泡 12 h,用水冲洗电极,以除去未结合的 APTES 分子;

(3)取新鲜制备的 10 μL 金纳米溶胶滴加到电极表面,用于结合 CA125 一抗分子;

(4)将 6 μL、10 μg/mL CA125 一抗溶液滴加到电极上,置于 4 °C 恒温冰箱中孵化 2 h,冲洗电极表面以除去未结合的一抗分子;

(5)滴涂 2 μL、质量分数为 1.0% 的 BSA 溶液于电极上,置于 4 °C 冰箱保存、晾干;

(6)用超纯水清洗,晾至湿润状态,将 6 μL、0.05 pg/mL ~ 100 ng/mL 不同浓度的 CA125 抗原溶液滴涂于电极表面,使其与 CA125 一抗之间发生特异性免疫反应并继续孵化 2 h,用超纯水冲洗以除去未结合的 CA125,晾干;

(7)取 6 μL TiO₂-CdSe-Ab₂ 二抗孵化物溶液滴涂于电极表面,孵化 2 h 后冲洗电极表面,晾干,制得双功能标记光电化学传感器。

[0025] 实施例3 双功能标记光电化学传感器的制备方法

(1)ITO 电极的预处理:将 ITO 玻璃切割至 3 cm × 0.5 cm 大小,依次用洗洁精、丙酮、乙醇以及超纯水超声清洗 30 min,最后用氮气吹干玻璃,用绝缘胶带在 ITO 电极的一端留出 0.5 cm × 0.5 cm 大小的面积用以修饰生物分子;

(2) 将处理后的 ITO 电极在浸泡在体积分数为 3% 的 3- 氨丙基三乙氧基硅烷 APTES 的甲醇溶液中, 避光浸泡 14 h, 用水冲洗电极, 以除去未结合的 APTES 分子;

(3) 取新鲜制备的 10 μ L 金纳米溶胶滴加到电极表面, 用于结合 CA125 一抗分子;

(4) 将 6 μ L、12 μ g/mL CA125 一抗溶液滴加到电极上, 置于 4 $^{\circ}$ C 恒温冰箱中孵化 2 h, 冲洗电极表面以除去未结合的一抗分子;

(5) 滴涂 2 μ L、质量分数为 1.5% 的 BSA 溶液于电极上, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存、晾干;

(6) 用超纯水清洗, 晾至湿润状态, 将 6 μ L、0.05 μ g/mL ~ 100 μ g/mL 不同浓度的 CA125 抗原溶液滴涂于电极表面, 使其与 CA125 一抗之间发生特异性免疫反应并继续孵化 2 h, 用超纯水冲洗以除去未结合的 CA125, 晾干;

(7) 取 6 μ L TiO₂-CdSe-Ab₂ 二抗孵化物溶液滴涂于电极表面, 孵化 2 h 后冲洗电极表面, 晾干, 制得双功能标记光电化学传感器。

[0026] 实施例 4 TiO₂ 纳米颗粒的制备

取 6 mL 钛酸丁酯溶于 30 mL 乙醇中, 充分搅拌均匀, 取 10 mL 超纯水在搅拌下缓慢加入溶液中, 室温磁力搅拌反应 120 min, 将该混合液转移至高压釜中, 200 $^{\circ}$ C 水热反应 10 h, 制得白色固体, 离心分离, 并用二次水和乙醇分别清洗 5 次, 在 80 $^{\circ}$ C 下真空干燥 10 h, 研磨制得 TiO₂ 纳米颗粒。

[0027] 实施例 5 TiO₂ 纳米颗粒的制备

取 7 mL 钛酸丁酯溶于 30 mL 乙醇中, 充分搅拌均匀, 取 10 mL 超纯水在搅拌下缓慢加入溶液中, 室温磁力搅拌反应 120 min, 将该混合液转移至高压釜中, 200 $^{\circ}$ C 水热反应 11 h, 制得白色固体, 离心分离, 并用二次水和乙醇分别清洗 5 次, 在 80 $^{\circ}$ C 下真空干燥 12 h, 研磨制得 TiO₂ 纳米颗粒。

[0028] 实施例 6 TiO₂ 纳米颗粒的制备

取 8 mL 钛酸丁酯溶于 30 mL 乙醇中, 充分搅拌均匀, 取 10 mL 超纯水在搅拌下缓慢加入溶液中, 室温磁力搅拌反应 120 min, 将该混合液转移至高压釜中, 200 $^{\circ}$ C 水热反应 12 h, 制得白色固体, 离心分离, 并用二次水和乙醇分别清洗 5 次, 在 80 $^{\circ}$ C 下真空干燥 14 h, 研磨制得 TiO₂ 纳米颗粒。

[0029] 实施例 7 羧基功能化 CdSe 量子点的制备

将 1.0 g CdCl₂ · 2.5H₂O 溶于 40 mL 水中, 加入巯基乙酸的混合液, 用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 9, 搅拌下加入 12 mL、0.2 mol/L 的 NaSeSO₃ 溶液, 将反应物油浴加热至沸腾, 回流 4h, 最终得到羧基化 CdSe 量子点溶液;

所述巯基乙酸的混合液是由 50 mL 高纯水和 0.84 mL 巯基乙酸共混制得; 所述 0.2 mol/L 的 NaSeSO₃ 溶液, 取 10 mmol Se 和 12 mmol Na₂SO₃ 加入 50 mL 水中, 反应 3h, 过滤制得。

[0030] 实施例 8 羧基功能化 CdSe 量子点的制备

将 1.2 g CdCl₂ · 2.5H₂O 溶于 40 mL 水中, 加入巯基乙酸的混合液, 用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 10, 搅拌下加入 12 mL、0.2 mol/L 的 NaSeSO₃ 溶液, 将反应物油浴加热至沸腾, 回流 4h, 最终得到羧基化 CdSe 量子点溶液;

所述巯基乙酸的混合液是由 55 mL 高纯水和 0.84 mL 巯基乙酸共混制得; 所述 0.2 mol/L 的 NaSeSO₃ 溶液, 取 10 mmol Se 和 12 mmol Na₂SO₃ 加入 50 mL 水中, 反应 3h, 过滤制得。

[0031] 实施例 9 羧基功能化 CdSe 量子点的制备

将 1.3 g $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 溶于 40 mL 水中,加入巯基乙酸的混合液,用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 11,搅拌下加入 12 mL、0.2 mol/L 的 NaSeSO_3 溶液,将反应物油浴加热至沸腾,回流 4 h,最终得到羧基化 CdSe 量子点溶液;

所述巯基乙酸的混合液是由 60 mL 高纯水和 0.84 mL 巯基乙酸共混制得;所述 0.2 mol/L 的 NaSeSO_3 溶液,取 10 mmol Se 和 12 mmol Na_2SO_3 加入 50 mL 水中,反应 3 h,过滤制得。

[0032] 实施例 10 TiO_2 -CdSe- Ab_2 二抗孵化物的制备

称取 3 mg TiO_2 分散于 4 mL 羧基化 CdSe 量子点溶液中,超声并搅拌反应 10~14 h,待反应完成后,用超纯水离心洗涤 3 次,制得 TiO_2 -CdSe 半导体复合物;将 TiO_2 -CdSe 半导体复合物分散于 1 mL 水中,用 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺 EDC/N-羟基琥珀酰亚胺 NHS 交联剂活化复合物表面的羧基,将 1 mL、8 $\mu\text{g/mL}$ 的 CA125 二抗 Ab_2 加入混匀,并于 4 $^\circ\text{C}$ 恒温振荡器中振荡 12 h,用超纯水离心洗涤去掉未结合的 Ab_2 分子;

所述 TiO_2 ,为实施例 4、实施例 5 或实施例 6 制备的 TiO_2 纳米颗粒。

[0033] 所述羧基化 CdSe 量子点溶液,为实施例 7、实施例 8 或实施例 9 制备的羧基化 CdSe 量子点溶液。

[0034] 实施例 11 TiO_2 -CdSe- Ab_2 二抗孵化物的制备

称取 4 mg TiO_2 分散于 4 mL 羧基化 CdSe 量子点溶液中,超声并搅拌反应 10~14 h,待反应完成后,用超纯水离心洗涤 3 次,制得 TiO_2 -CdSe 半导体复合物;将 TiO_2 -CdSe 半导体复合物分散于 1 mL 水中,用 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺 EDC/N-羟基琥珀酰亚胺 NHS 交联剂活化复合物表面的羧基,将 1 mL、10 $\mu\text{g/mL}$ 的 CA125 二抗 Ab_2 加入混匀,并于 4 $^\circ\text{C}$ 恒温振荡器中振荡 12 h,用超纯水离心洗涤去掉未结合的 Ab_2 分子;

所述 TiO_2 为实施例 5、实施例 6 或实施例 7 制备的 TiO_2 纳米颗粒。

[0035] 所述羧基化 CdSe 量子点溶液,为实施例 7、实施例 8 或实施例 9 制备的羧基化 CdSe 量子点溶液。

[0036] 实施例 12 TiO_2 -CdSe- Ab_2 二抗孵化物的制备

称取 5 mg TiO_2 分散于 4 mL 羧基化 CdSe 量子点溶液中,超声并搅拌反应 10~14 h,待反应完成后,用超纯水离心洗涤 3 次,制得 TiO_2 -CdSe 半导体复合物;将 TiO_2 -CdSe 半导体复合物分散于 1 mL 水中,用 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺 EDC/N-羟基琥珀酰亚胺 NHS 交联剂活化复合物表面的羧基,将 1 mL、12 $\mu\text{g/mL}$ 的 CA125 二抗 Ab_2 加入混匀,并于 4 $^\circ\text{C}$ 恒温振荡器中振荡 12 h,用超纯水离心洗涤去掉未结合的 Ab_2 分子;

所述 TiO_2 为实施例 5、实施例 6 或实施例 7 制备的 TiO_2 纳米颗粒。

[0037] 所述羧基化 CdSe 量子点溶液,为实施例 7、实施例 8 或实施例 9 制备的羧基化 CdSe 量子点溶液。

[0038] 实施例 13 电化学和光致电化学两种方法检测 CA125

(1) 双功能标记光电化学传感器置于 0.3 mL、0.1 mol/L 的硝酸溶液中浸泡 4 h,使 CdSe 量子点分解成为 Cd^{2+} ,将其加入到 3.6 mL、30 mg/mL Hg^{2+} 的 pH 4.6 醋酸-醋酸钠缓冲溶液中,使用三电极体系,进行电化学检测;

所述三电极饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,玻碳电极为工作电极;

(2) 扫描电压范围从 -0.9~-0.6 V,电势跃阶为 4 mV,频率 25 Hz,振幅 25 mV;

(3) Cd^{2+} 发生氧化还原反应在 -0.7 V 附近产生信号,根据所得电流强度与分析物之间

的线性关系,绘制工作曲线;

(4) 光电检测采用 $i-t$ 测试手段,偏压设置为 0 V;每隔 20 s 进行开关灯,记录开关灯前后电流的变化值,根据不同浓度的抗原产生不同大小的光电流值,绘制工作曲线;

(5) 将待测样品溶液代替 CA125 的标准溶液,按照所述 CA125 的工作曲线的绘制方法进行检测;

(6) 用于 1# 血清样品中 CA125 的检测,采用加标回收法,每种样品平行检测 7 次,其相对标准偏差低于 3.2%,回收率为 90.9%~105%,本发明的检测方法的精密度和准确度均令人满意。

[0039] 实施例 14 电化学和光致电化学两种方法检测 CA125

(1) 双功能标记光电化学传感器置于 0.4 mL、0.1 mol/L 的硝酸溶液中浸泡 4 h,使 CdSe 量子点分解成为 Cd^{2+} ,将其加入到 3.6 mL、40 mg/mL Hg^{2+} 的 pH 4.6 醋酸-醋酸钠缓冲溶液中,使用三电极体系,进行电化学检测;

所述三电极饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,玻碳电极为工作电极;

(2) 扫描电压范围从 -0.9~-0.6 V,电势跃阶为 4 mV,频率 25 Hz,振幅 25 mV;

(3) Cd^{2+} 发生氧化还原反应在 -0.7 V 附近产生信号,根据所得电流强度与分析物之间的线性关系,绘制工作曲线;

(4) 光电检测采用 $i-t$ 测试手段,偏压设置为 0 V;每隔 20 s 进行开关灯,记录开关灯前后电流的变化值,根据不同浓度的抗原产生不同大小的光电流值,绘制工作曲线;

(5) 采用电化学方法对 CA125 的检测范围为 0.1 pg/mL ~ 20 ng/mL,检出限为 0.02 pg/mL;

(6) 采用光电化学方法对 CA125 的检测范围为 0.05 pg/mL ~ 100 ng/mL,检出限为 0.01 pg/mL;

(7) 将待测样品溶液代替 CA125 的标准溶液,按照所述 CA125 的工作曲线的绘制方法进行检测;

(8) 用于 2# 血清样品中 CA125 的检测,采用加标回收法,每种样品平行检测 7 次,其相对标准偏差低于 1.9%,回收率为 95.6%~97.6%,本发明的检测方法的精密度和准确度均令人满意。

[0040] 实施例 15 电化学和光致电化学两种方法检测 CA125

(1) 双功能标记光电化学传感器置于 0.5 mL、0.1 mol/L 的硝酸溶液中浸泡 4 h,使 CdSe 量子点分解成为 Cd^{2+} ,将其加入到 3.6 mL、50 mg/mL Hg^{2+} 的 pH 4.6 醋酸-醋酸钠缓冲溶液中,使用三电极体系,进行电化学检测;

所述三电极饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,玻碳电极为工作电极;

(2) 扫描电压范围从 -0.9~-0.6 V,电势跃阶为 4 mV,频率 25 Hz,振幅 25 mV;

(3) Cd^{2+} 发生氧化还原反应在 -0.7 V 附近产生信号,根据所得电流强度与分析物之间的线性关系,绘制工作曲线;

(4) 光电检测采用 $i-t$ 测试手段,偏压设置为 0 V;每隔 20 s 进行开关灯,记录开关灯前后电流的变化值,根据不同浓度的抗原产生不同大小的光电流值,绘制工作曲线;

(5) 用于 3# 血清样品中 CA125 的检测,采用加标回收法,每种样品平行检测 7 次,其相对标准偏差低于 1.8%,回收率为 95.8%~98.0%,本发明的检测方法的精密度和准确度均令

人满意。

专利名称(译)	一种双功能标记光电化学传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN104133069A	公开(公告)日	2014-11-05
申请号	CN201410411550.2	申请日	2014-08-20
[标]申请(专利权)人(译)	济南大学		
申请(专利权)人(译)	济南大学		
当前申请(专利权)人(译)	济南大学		
[标]发明人	魏琴 高丕成 张勇 马洪敏 庞雪辉 胡丽华		
发明人	魏琴 高丕成 张勇 马洪敏 庞雪辉 胡丽华		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N27/327		
CPC分类号	G01N33/54366 G01N33/57488		
其他公开文献	CN104133069B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种双功能标记光电化学传感器的制备方法及应用，属于纳米功能材料、临床分析、生物传感技术和电化学技术领域。本发明基于TiO₂与羧基间的配位原理制备了TiO₂-CdSe半导体复合物；所制备的TiO₂-CdSe半导体复合物在可见光区显示了显著增强的光电转换效果，其光电流值是单独TiO₂光电流值的10倍，并且TiO₂-CdSe半导体复合物比表面积大、生物相容性好，用于标记CA125的二抗（Ab₂），从而制得TiO₂-CdSe-Ab₂孵化物。与其它电化学或者光致电化学传感器不同的是，由于TiO₂-CdSe半导体复合物既能进行光电转换，又能产生Cd²⁺，因此，TiO₂-CdSe半导体复合物作为二抗标记物的免疫传感器可以采用电化学与光致电化学两种分析技术实现对CA125的快速、灵敏、准确检测。该方法对癌症的早期诊断具有一定的指导意义和应用价值。