



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108918855 A

(43)申请公布日 2018.11.30

(21)申请号 201810856758.3

(22)申请日 2018.07.31

(71)申请人 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 曹伟 东雪 李璇 赵冠辉

房靖龙 苗俊聪 魏琴

(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 高强

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页

(54)发明名称

一种基于AgNCs为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的制备方法及应用

(57)摘要

本发明涉及一种基于AgNCs为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的制备方法及应用,本发明属于新型功能材料与生物传感技术领域。具体是一种以银纳米团(AgNCs)为电致化学发光传感平台,将硫脲(Sem)作为共反应剂促进剂包裹于AgNCs表面,且负载上金纳米粒子(AuNPs),以此复合物AgNCs-Sem-AuNPs增大电致化学发光信号,形成信号“开”的模式;此外,金属-有机骨架复合物(MOF)材料NH<sub>2</sub>-MIL-125作为二抗标记物与AgNCs产生共振能量转移,造成信号“关闭”,以此构建的夹心型电致化学发光传感器,用于灵敏准确检测N端前脑钠肽(NT-Pro-BNP)。

1. 一种基于AgNCs为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的制备方法及应用,其特征在於,包括以下步骤:

(1) 将玻碳电极用抛光粉打磨,再使用去离子水清洗,将电极置于5 mmol/L铁氰化钾溶液中,并在-0.2 ~ 0.6 V电位下进行扫描,使峰电位的差值小于110 mV;

(2) 将8  $\mu\text{L}$ , 5 ~ 8 mg/mL AgNCs-Sem-AuNPs复合物溶液滴加在电极上,室温下干燥;

(3) 将8  $\mu\text{L}$ , 1 ~ 2  $\mu\text{g/mL}$  NT-Pro-BNP抗体滴加在电极上,室温下干燥之后,用PBS清洗,除去多余抗体,室温下干燥;

(4) 将3  $\mu\text{L}$ , 质量分数为1 ~ 2% BSA溶液滴加于电极上,用以封闭非特异性结合位点,干燥之后使用PBS洗去多余BSA,室温下干燥;

(5) 将8  $\mu\text{L}$ , 0.00001 ~ 100 ng mL<sup>-1</sup>一系列不同浓度的NT-Pro-BNP抗原标准溶液滴加于电极上,室温下干燥之后,用PBS清洗,除去多余抗原,室温下干燥;

(6) 将8  $\mu\text{L}$ , 5 ~ 8 mg/mL被NH<sub>2</sub>-MIL-125标记的二抗滴加于电极上,室温下干燥之后,用PBS清洗,除去多余二抗,室温下干燥;

如权利1所述的一种基于AgNCs为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的制备方法及应用,其所述的AgNCs-Sem-AuNPs材料的制备步骤如下:

(1) AgNCs的制备

将0.15 ~ 0.18 g聚乙烯吡咯烷酮(PVP)用20 ~ 25 mL乙二醇(EG)溶解,然后将3 ~ 5 mL的AgNO<sub>3</sub>(1 mM,溶解于EG中),和2 ~ 5 mL的FeCl<sub>3</sub>(0.6 mM,溶解于EG中)依次加入PVP溶液中,然后将混合物倒入50 mL的高压釜中,140 °C反应1 h,离心洗涤数次,放置于60 °C真空干燥箱中干燥12 h,得到AgNCs;

(2) AuNPs的制备

首先将100 mL质量分数为0.01 ~ 0.03%的氯金酸(HAuCl<sub>4</sub>) 130 °C油浴加热至沸腾,然后将2 ~ 3 mL质量分数为1 ~ 3%的柠檬酸钠在搅拌条件下逐滴加入到上述溶液中,溶液颜色由淡黄色变为红棕色,即为AuNPs,冷却至室温后避光保存以备使用;

(3) AgNCs-Sem-AuNPs的制备

在搅拌下将200 ~ 300  $\mu\text{L}$ 氨基脲(Sem, 10 mM)溶液加入到上述合成的300 ~ 500  $\mu\text{L}$  AuNCs溶液(1 mg/mL)中,搅拌12小时以获得AgNCs-Sem,用去离子水洗涤两次后,收集沉淀并分散在去离子水中,然后,将200 ~ 400  $\mu\text{L}$ 制备的AuNPs溶液(1 mg/mL)加入AgNCs-Sem溶液中,搅拌12小时,然后离心洗涤数次,放置于60 °C真空干燥箱中干燥12 h,获得AgNCs-Sem-AuNPs。

2. 如权利1所述的一种基于AgNCs为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的制备方法及应用,其所述的NH<sub>2</sub>-MIL-125材料的制备步骤如下:

将550 ~ 600 mg 2-氨基对苯二甲酸(NH<sub>2</sub>-BDC)及3.0 ~ 4.0 mL的冰醋酸溶解于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)和甲醇的体积比为9:1的混合溶液中,DMF和甲醇总体积为20 ~ 40 mL,随后加入0.5 ~ 0.7 mL钛酸四丁酯(TBOT),然后将混合物倒入反应釜中,150 °C热处理24 h,再分别用DMF和甲醇离心洗涤数次,最后得到黄色粉末,即为NH<sub>2</sub>-MIL-125。

3. 如权利1所述的一种基于AgNCs为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的制备方法及应用,其特征在於,用于NT-Pro-BNP的检验,检测步骤如下:

(1) 使用电化学工作站的三电极体系进行测试,Ag/AgCl电极作为参比电极,铂丝电极

为对电极,所制备的电致化学发光免疫传感器为工作电极,将电化学工作站和化学发光检测仪连接在一起将光电倍增管的高压设置为700 V,循环伏安扫描电位范围为0 ~ 1.3 V,扫描速率为0.1 V/s;

(2)在10 mL、pH 6.0 ~ 8.5的含浓度为1 mmol/L ~ 12 mmol/L三丙胺的PBS缓冲溶液中,通过电化学发光方法,检测对不同浓度的NT-Pro-BNP标准溶液产生的电化学发光信号强度,绘制工作曲线;

(3)将待测NT-Pro-BNP样品溶液代替NT-Pro-BNP标准溶液进行测定。

## 一种基于AgNCs为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种电致化学发光免疫传感器的制备与应用,具体说是一种以AgNCs-Sem-AuNPs为传感平台,以NH<sub>2</sub>-MIL-125为二抗标记物的信号“开-关”型免疫传感器,本发明属于新型功能材料、生物传感技术领域。

### 背景技术

[0002] N端前脑钠肽(NT-Pro-BNP)是由心肌细胞合成的具有生物学活性的天然激素,主要在心室表达,同时也存在于脑组织中。NT-Pro-BNP作为心衰定量标志物,不仅反映左室收缩功能障碍,也反映左室舒张功能障碍、瓣膜功能障碍和右室功能障碍情况。临床表明,NT-Pro-BNP对于诊断心力衰竭是高度准确的,通过监测NT-Pro-BNP含量以及观察患者症状是确定临床失代偿的最好方法,此外,NT-Pro-BNP也是急性冠脉综合征病人死亡的最强大的预测物。因此,监测NT-Pro-BNP的含量可有效预测、诊断心力衰竭、急性冠脉综合征等疾病。

[0003] 电致化学发光(ECL)是将电化学手段与化学发光技术相结合的一种研究方法,近几年在免疫分析等方面受到的广泛地关注。ECL传感器具有高灵敏性、高选择性、高专一性和检出限低等优点,可快速准确的检测待测物的含量。

[0004] 近几年,金属纳米簇由于其光学/电化学性质而得到了很多关注,其特征与半导体量子点类似。由于它们优异的光稳定性,良好的生物相容性和水溶性,它们已经越来越广泛的应用在细胞成像及生物分子检测等领域。本发明中AgNCs作为电致化学发光体被应用于NT-Pro-BNP的检测中,通过与共反应剂促进剂Sem及AuNPs复合在一起,产生高强度、高稳定性的电致化学发光信号,提高检测的灵敏度和准确性。

[0005] 金属-有机骨架复合物(MOF)是近十年来发展迅速的一种配位聚合物,具有三维的孔结构,一般以金属离子为连接点,有机配体位支撑构成空间3D延伸,系沸石和碳纳米管之外的又一类重要的新型多孔材料,在催化,传感,储能和分离中都有广泛应用。本发明中将NH<sub>2</sub>-MIL-125作为二抗标记物与AgNCs形成共振能量转移,造成信号“关闭”,以此构建的电致化学发光传感器能有效检测NT-Pro-BNP的含量。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的之一是制备一种以AgNCs-Sem-AuNPs为传感平台,以NH<sub>2</sub>-MIL-125为二抗标记物的信号“开-关”型电致化学发光免疫传感器。

[0007] 本发明的目的之二是将该传感器用于NT-Pro-BNP的高灵敏、特异性检测。

[0008] 本发明的技术方案如下:

1. 一种基于AgNCs为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的制备方法如下:

(1) 将玻碳电极用抛光粉打磨,再使用去离子水清洗,将电极置于5 mmol/L铁氰化钾溶液中,并在-0.2 ~ 0.6 V电位下进行扫描,使峰电位的差值小于110 mV;

(2) 将8  $\mu$ L, 5 ~ 8 mg/mL AgNCs-Sem-AuNPs复合物溶液滴加在电极上,室温下干燥;

(3) 将8  $\mu\text{L}$ , 1 ~ 2  $\mu\text{g/mL}$  NT-Pro-BNP抗体滴加在电极上, 室温下干燥之后, 用PBS清洗, 除去多余抗体, 室温下干燥;

(4) 将3  $\mu\text{L}$ , 质量分数为1 ~ 2 % BSA溶液滴加于电极上, 用以封闭非特异性结合位点, 干燥之后使用PBS洗去多余BSA, 室温下干燥;

(5) 将8  $\mu\text{L}$ , 0.00001 ~ 100  $\text{ng mL}^{-1}$  一系列不同浓度的NT-Pro-BNP抗原标准溶液滴加于电极上, 室温下干燥之后, 用PBS清洗, 除去多余抗原, 室温下干燥;

(6) 将8  $\mu\text{L}$ , 5 ~ 8  $\text{mg/mL}$ 被 $\text{NH}_2\text{-MIL-125}$ 标记的二抗滴加于电极上, 室温下干燥之后, 用PBS清洗, 除去多余二抗, 室温下干燥。

[0009] 2. 一种基于AgNCs为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的AgNCs-Sem-AuNPs材料的制备步骤如下:

(1) AgNCs的制备

将0.15 ~ 0.18 g聚乙烯吡咯烷酮(PVP)用20 ~ 25 mL乙二醇(EG)溶解, 然后将3 ~ 5 mL的 $\text{AgNO}_3$  (1 mM, 溶解于EG中), 和2 ~ 5 mL的 $\text{FeCl}_3$  (0.6 mM, 溶解于EG中)依次加入PVP溶液中, 然后将混合物倒入50 mL的高压釜中, 140  $^\circ\text{C}$ 反应1 h, 离心洗涤数次, 放置于60  $^\circ\text{C}$ 真空干燥箱中干燥12 h, 得到AgNCs;

(2) AuNPs的制备

首先将100 mL质量分数为0.01 ~ 0.03%的氯金酸( $\text{HAuCl}_4$ ) 130  $^\circ\text{C}$ 油浴加热至沸腾, 然后将2 ~ 3 mL质量分数为1 ~ 3%的柠檬酸钠在搅拌条件下逐滴加入到上述溶液中, 溶液颜色由淡黄色变为红棕色, 即为AuNPs, 冷却至室温后避光保存以备使用;

(3) AgNCs-Sem-AuNPs的制备

在搅拌下将200 ~ 300  $\mu\text{L}$ 氨基脲(Sem, 10 mM)溶液加入到上述合成的300 ~ 500  $\mu\text{L}$  AuNCs溶液(1  $\text{mg/mL}$ )中, 搅拌12小时以获得AgNCs-Sem, 用去离子水洗涤两次后, 收集沉淀并分散在去离子水中, 然后, 将200 ~ 400  $\mu\text{L}$ 制备的AuNPs溶液(1  $\text{mg/mL}$ )加入AgNCs-Sem溶液中, 搅拌12小时, 然后离心洗涤数次, 放置于60  $^\circ\text{C}$ 真空干燥箱中干燥12 h, 获得AgNCs-Sem-AuNPs。

[0010] 3. 一种基于AgNCs为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的二抗标记物 $\text{NH}_2\text{-MIL-125}$ 的制备步骤如下:

将550 ~ 600 mg 2-氨基对苯二甲酸( $\text{NH}_2\text{-BDC}$ )及3.0 ~ 4.0 mL的冰醋酸溶解于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)和甲醇的体积比为9:1的混合溶液中, DMF和甲醇总体积为20 ~ 40 mL, 随后加入0.5 ~ 0.7 mL钛酸四丁酯(TBOT), 然后将混合物倒入反应釜中, 150  $^\circ\text{C}$ 热处理24 h, 再分别用DMF和甲醇离心洗涤数次, 最后得到黄色粉末, 即为 $\text{NH}_2\text{-MIL-125}$ 。

[0011] 4. NT-Pro-BNP的检验, 步骤如下:

(1) 使用电化学工作站的三电极体系进行测试, Ag/AgCl电极作为参比电极, 铂丝电极为对电极, 所制备的电致化学发光免疫传感器为工作电极, 将电化学工作站和化学发光检测仪连接在一起将光电倍增管的高压设置为700 V, 循环伏安扫描电位范围为0 ~ 1.3 V, 扫描速率为0.1 V/s;

(2) 在10 mL、pH 6.0 ~ 8.5的含浓度为1 mmol/L ~ 12 mmol/L三丙胺的PBS缓冲溶液中, 通过电化学发光方法, 检测对不同浓度的NT-Pro-BNP标准溶液产生的电化学发光信号强度, 绘制工作曲线;

(3) 将待测NT-Pro-BNP样品溶液代替NT-Pro-BNP标准溶液进行测定。

[0012] 本发明的有益成果

(1) 本发明采用AgNCs作为发光材料,将Sem作为共反应剂促进剂包裹于AgNCs,有效的增大及稳定了发光信号,同时,负载于Sem表面的AuNPs亦进一步提高了信号,此外,AgNCs-Sem-AuNPs复合材料产生的高且稳定的发光信号,有效提高了检测NT-Pro-BNP的灵敏度。

[0013] (2) MOF材料NH<sub>2</sub>-MIL-125作为二抗标记物与AgNCs产生共振能量转移,有效猝灭了发光信号,造成信号“关闭”,在传感器工作曲线绘制中,随着NT-Pro-BNP抗原标准溶液浓度增加,NH<sub>2</sub>-MIL-125的猝灭效果越明显,从而能准确、特异的检测NT-Pro-BNP的含量。

[0014] (3) 本发明采用AgNCs-Sem-AuNPs作为传感平台实现信号开启与放大,NH<sub>2</sub>-MIL-125作为二抗标记物实现信号“关闭”,以此构建的超灵敏电致化学发光免疫传感器应用于NT-Pro-BNP的临床检测,具有操作简单,检测快速,信号线性范围宽(0.01 pg/mL ~ 100 ng/mL)和检出限低(3.23 fg/mL)的优点。

### 具体实施方式

[0015] 实施例1 一种基于AgNCs为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的AgNCs-Sem-AuNPs材料的制备步骤如下:

(1) AgNCs的制备

将0.15 g聚乙烯吡咯烷酮(PVP)用20 mL乙二醇(EG)溶解,然后将4 mL的AgNO<sub>3</sub>(1 mM,溶解于EG中),和2 mL的FeCl<sub>3</sub>(0.6 mM,溶解于EG中)依次加入PVP溶液中,然后将混合物倒入50 mL的高压釜中,140 °C 反应1 h,离心洗涤数次,放置于60 °C真空干燥箱中干燥12 h,得到AgNCs;

(2) AuNPs的制备

首先将100 mL质量分数为0.02%的氯金酸(HAuCl<sub>4</sub>) 130 °C油浴加热至沸腾,然后将2 mL质量分数为1.5%的柠檬酸钠在搅拌条件下逐滴加入到上述溶液中,溶液颜色由淡黄色变为红棕色,即为AuNPs,冷却至室温后避光保存以备使用;

(3) AgNCs-Sem-AuNPs的制备

在搅拌下将250 μL氨基脒(Sem, 10 mM)溶液加入到上述合成的300 μL AuNCs溶液(1 mg/mL)中,搅拌12小时以获得AgNCs-Sem,用去离子水洗涤两次后,收集沉淀并分散在去离子水中,然后,将250 μL制备的AuNPs溶液(1 mg/mL)加入AgNCs-Sem溶液中,搅拌12小时,然后离心洗涤数次,放置于60 °C真空干燥箱中干燥12 h,获得AgNCs-Sem-AuNPs。

[0016] 实施例2 一种基于AgNCs为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的AgNCs-Sem-AuNPs材料的制备步骤如下:

(1) AgNCs的制备

将0.16 g聚乙烯吡咯烷酮(PVP)用22 mL乙二醇(EG)溶解,然后将3 mL的AgNO<sub>3</sub>(1 mM,溶解于EG中),和2.5 mL的FeCl<sub>3</sub>(0.6 mM,溶解于EG中)依次加入PVP溶液中,然后将混合物倒入50 mL的高压釜中,140 °C 反应1 h,离心洗涤数次,放置于60 °C真空干燥箱中干燥12 h,得到AgNCs;

(2) AuNPs的制备

首先将100 mL质量分数为0.01%的氯金酸(HAuCl<sub>4</sub>) 130 °C油浴加热至沸腾,然后将

2.5 mL质量分数为1%的柠檬酸钠在搅拌条件下逐滴加入到上述溶液中,溶液颜色由淡黄色变为红棕色,即为AuNPs,冷却至室温后避光保存以备使用;

### (3) AgNCs-Sem-AuNPs的制备

在搅拌下将200  $\mu$ L氨基脲 (Sem, 10 mM) 溶液加入到上述合成的500  $\mu$ L AuNCs溶液 (1 mg/mL) 中,搅拌12小时以获得AgNCs-Sem,用去离子水洗涤两次后,收集沉淀并分散在去离子水中,然后,将200  $\mu$ L制备的AuNPs溶液 (1 mg/mL) 加入AgNCs-Sem溶液中,搅拌12小时,然后离心洗涤数次,放置于60  $^{\circ}$ C真空干燥箱中干燥12 h,获得AgNCs-Sem-AuNPs。

[0017] 实施例3 一种基于AgNCs为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的AgNCs-Sem-AuNPs材料的制备步骤如下:

#### (1) AgNCs的制备

将0.18 g聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 用25 mL乙二醇 (EG) 溶解,然后将5 mL的AgNO<sub>3</sub> (1 mM, 溶解于EG中),和5 mL的FeCl<sub>3</sub> (0.6 mM, 溶解于EG中) 依次加入PVP溶液中,然后将混合物倒入50 mL的高压釜中,140  $^{\circ}$ C 反应1 h,离心洗涤数次,放置于60  $^{\circ}$ C真空干燥箱中干燥12 h,得到AgNCs;

#### (2) AuNPs的制备

首先将100 mL质量分数为0.03%的氯金酸 (HAuCl<sub>4</sub>) 130  $^{\circ}$ C油浴加热至沸腾,然后将3 mL质量分数为3%的柠檬酸钠在搅拌条件下逐滴加入到上述溶液中,溶液颜色由淡黄色变为红棕色,即为AuNPs,冷却至室温后避光保存以备使用;

### (3) AgNCs-Sem-AuNPs的制备

在搅拌下将300  $\mu$ L氨基脲 (Sem, 10 mM) 溶液加入到上述合成的400  $\mu$ L AuNCs溶液 (1 mg/mL) 中,搅拌12小时以获得AgNCs-Sem,用去离子水洗涤两次后,收集沉淀并分散在去离子水中,然后,将400  $\mu$ L制备的AuNPs溶液 (1 mg/mL) 加入AgNCs-Sem溶液中,搅拌12小时,然后离心洗涤数次,放置于60  $^{\circ}$ C真空干燥箱中干燥12 h,获得AgNCs-Sem-AuNPs。

[0018] 实施例4 一种基于AgNCs为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的二抗标记物NH<sub>2</sub>-MIL-125的制备步骤如下:

将550 mg 2-氨基对苯二甲酸 (NH<sub>2</sub>-BDC) 及3.0 mL的冰醋酸溶解于N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 和甲醇的体积比为9:1的混合溶液中,DMF和甲醇总体积为20 mL,随后加入0.5 mL钛酸四丁酯 (TBOT),然后将混合物倒入反应釜中,150  $^{\circ}$ C热处理24 h,再分别用DMF和甲醇离心洗涤数次,最后得到黄色粉末,即为NH<sub>2</sub>-MIL-125。

[0019] 实施例5 一种基于AgNCs为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的二抗标记物NH<sub>2</sub>-MIL-125的制备步骤如下:

将560 mg 2-氨基对苯二甲酸 (NH<sub>2</sub>-BDC) 及3.2 mL的冰醋酸溶解于N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 和甲醇的体积比为9:1的混合溶液中,DMF和甲醇总体积为40 mL,随后加入0.68 mL钛酸四丁酯 (TBOT),然后将混合物倒入反应釜中,150  $^{\circ}$ C热处理24 h,再分别用DMF和甲醇离心洗涤数次,最后得到黄色粉末,即为NH<sub>2</sub>-MIL-125。

[0020] 实施例6 一种基于AgNCs为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的二抗标记物NH<sub>2</sub>-MIL-125的制备步骤如下:

将600 mg 2-氨基对苯二甲酸 (NH<sub>2</sub>-BDC) 及4.0 mL的冰醋酸溶解于N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 和甲醇的体积比为9:1的混合溶液中,DMF和甲醇总体积为30 mL,随后加入0.7 mL钛

酸四丁酯 (TBOT), 然后将混合物倒入反应釜中, 150 °C 热处理 24 h, 再分别用 DMF 和甲醇离心洗涤数次, 最后得到黄色粉末, 即为 NH<sub>2</sub>-MIL-125。

[0021] 实施例7 一种基于 AgNCs 为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的制备方法:

(1) 将玻碳电极用抛光粉打磨, 再使用去离子水清洗, 将电极置于 5 mmol/L 铁氰化钾溶液中, 并在 -0.2 ~ 0.6 V 电位下进行扫描, 使峰电位的差值小于 110 mV;

(2) 将 8 μL, 5 mg/mL AgNCs-Sem-AuNPs 复合物溶液滴加在电极上, 室温下干燥;

(3) 将 8 μL, 1 μg/mL NT-Pro-BNP 抗体滴加在电极上, 室温下干燥之后, 用 PBS 清洗, 除去多余抗体, 室温下干燥;

(4) 将 3 μL, 质量分数为 1% BSA 溶液滴加于电极上, 用以封闭非特异性结合位点, 干燥之后使用 PBS 洗去多余 BSA, 室温下干燥;

(5) 将 8 μL, 0.00001 ~ 50 ng mL<sup>-1</sup> 一系列不同浓度的 NT-Pro-BNP 抗原标准溶液滴加于电极上, 室温下干燥之后, 用 PBS 清洗, 除去多余抗原, 室温下干燥;

(6) 将 8 μL, 5 mg/mL 被 NH<sub>2</sub>-MIL-125 标记的二抗滴加于电极上, 室温下干燥之后, 用 PBS 清洗, 除去多余二抗, 室温下干燥。

[0022] 实施例8 一种基于 AgNCs 为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的制备方法:

(1) 将玻碳电极用抛光粉打磨, 再使用去离子水清洗, 将电极置于 5 mmol/L 铁氰化钾溶液中, 并在 -0.2 ~ 0.6 V 电位下进行扫描, 使峰电位的差值小于 110 mV;

(2) 将 8 μL, 6 mg/mL AgNCs-Sem-AuNPs 复合物溶液滴加在电极上, 室温下干燥;

(3) 将 8 μL, 1.5 μg/mL NT-Pro-BNP 抗体滴加在电极上, 室温下干燥之后, 用 PBS 清洗, 除去多余抗体, 室温下干燥;

(4) 将 3 μL, 质量分数为 1.5% BSA 溶液滴加于电极上, 用以封闭非特异性结合位点, 干燥之后使用 PBS 洗去多余 BSA, 室温下干燥;

(5) 将 8 μL, 0.00001 ~ 50 ng mL<sup>-1</sup> 一系列不同浓度的 NT-Pro-BNP 抗原标准溶液滴加于电极上, 室温下干燥之后, 用 PBS 清洗, 除去多余抗原, 室温下干燥;

(6) 将 8 μL, 6 mg/mL 被 NH<sub>2</sub>-MIL-125 标记的二抗滴加于电极上, 室温下干燥之后, 用 PBS 清洗, 除去多余二抗, 室温下干燥。

[0023] 实施例9 一种基于 AgNCs 为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的制备方法:

(1) 将玻碳电极用抛光粉打磨, 再使用去离子水清洗, 将电极置于 5 mmol/L 铁氰化钾溶液中, 并在 -0.2 ~ 0.6 V 电位下进行扫描, 使峰电位的差值小于 110 mV;

(2) 将 8 μL, 8 mg/mL AgNCs-Sem-AuNPs 复合物溶液滴加在电极上, 室温下干燥;

(3) 将 8 μL, 2 μg/mL NT-Pro-BNP 抗体滴加在电极上, 室温下干燥之后, 用 PBS 清洗, 除去多余抗体, 室温下干燥;

(4) 将 3 μL, 质量分数为 2% BSA 溶液滴加于电极上, 用以封闭非特异性结合位点, 干燥之后使用 PBS 洗去多余 BSA, 室温下干燥;

(5) 将 8 μL, 0.00001 ~ 50 ng mL<sup>-1</sup> 一系列不同浓度的 NT-Pro-BNP 抗原标准溶液滴加于电极上, 室温下干燥之后, 用 PBS 清洗, 除去多余抗原, 室温下干燥;

(6) 将8  $\mu\text{L}$ , 8 mg/mL被NH<sub>2</sub>-MIL-125标记的二抗滴加于电极上, 室温下干燥之后, 用PBS清洗, 除去多余二抗, 室温下干燥。

[0024] 实施例10 NT-Pro-BNP的检验, 步骤如下:

(1) 使用电化学工作站的三电极体系进行测试, Ag/AgCl电极作为参比电极, 铂丝电极为对电极, 所制备的电致化学发光免疫传感器为工作电极, 将电化学工作站和化学发光检测仪连接在一起将光电倍增管的高压设置为700 V, 循环伏安扫描电位范围为0 ~ 1.3 V, 扫描速率为0.1 V/s;

(2) 在10 mL、pH 6.0 ~ 8.5的含浓度为1 mmol/L ~ 12 mmol/L三丙胺的PBS缓冲溶液中, 通过电化学发光方法, 检测对不同浓度的NT-Pro-BNP标准溶液产生的电化学发光信号强度, 绘制工作曲线;

(3) 将待测NT-Pro-BNP样品溶液代替NT-Pro-BNP标准溶液进行测定;

(4) NT-Pro-BNP检测的线性范围是0.01 pg/mL ~ 100 ng/mL, 检测限是3.23 fg/mL。

专利名称(译)	一种基于AgNCs为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN108918855A</a>	公开(公告)日	2018-11-30
申请号	CN201810856758.3	申请日	2018-07-31
[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	曹伟 东雪 李璇 赵冠辉 房靖龙 苗俊聪 魏琴		
发明人	曹伟 东雪 李璇 赵冠辉 房靖龙 苗俊聪 魏琴		
IPC分类号	G01N33/531 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/531 G01N21/76		
代理人(译)	高强		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种基于AgNCs为发光体的信号“开-关”型电致化学发光传感器的制备方法及应用，本发明属于新型功能材料与生物传感技术领域。具体是一种以银纳米团(AgNCs)为电致化学发光传感平台，将硫脲(Sem)作为共反应剂促进剂包裹于AgNCs表面，且负载上金纳米粒子(AuNPs)，以此复合物AgNCs-Sem-AuNPs增大电致化学发光信号，形成信号“开”的模式；此外，金属-有机骨架复合物(MOF)材料NH<sub>2</sub>-MIL-125作为二抗标记物与AgNCs产生共振能量转移，造成信号“关闭”，以此构建的夹心型电致化学发光传感器，用于灵敏准确检测N端前脑钠肽(NT-Pro-BNP)。