



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 109521006 B

(45) 授权公告日 2021.03.19

(21) 申请号 201811578328.6

(22) 申请日 2018.12.24

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109521006 A

(43) 申请公布日 2019.03.26

(73) 专利权人 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 赵冠辉 曹伟 王耀光 李新建
东雪 李璇 魏琴

(74) 专利代理机构 济南誉丰专利代理事务所
(普通合伙) 37240

代理人 高强

(51) Int. Cl.

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 27/30 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 108918627 A, 2018.11.30

WO 2016161255 A1, 2016.10.06

WO 2017015669 A1, 2017.01.26

CN 102262125 A, 2011.11.30

CN 106404756 A, 2017.02.15

CN 104865242 A, 2015.08.26

CN 106248657 A, 2016.12.21

CN 105837610 A, 2016.08.10

Xue Dong 等. Ultrasensitive competitive method-based electrochemiluminescence immunosensor for diethylstilbestrol detection based on Ru (bpy)₃²⁺ as luminophor encapsulated in metal-organic frameworks UiO-67. 《Biosensors and Bioelectronics》. 2018, 第 201-206 页.

Guanhui Zhao 等. Quenching Electrochemiluminescence Immunosensor Based on Resonance Energy Transfer between Ruthenium (II) Complex Incorporated in the UiO-67 Metal-Organic Framework and Gold Nanoparticles for Insulin Detection. 《ACS Appl. Mater. Interfaces》. 2018, 第22932-22938页.

审查员 张馨丹

权利要求书2页 说明书7页

(54) 发明名称

一种基于Au@NiFe MOFs的双猝灭竞争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新型纳米材料Au@NiFe MOFs的双重猝灭竞争型电致化学发光免疫传感器的制备方法及应用,属于电化学发光传感器领域,首次以纳米多孔Au@NiFe MOFs作为双重猝灭标记物标记抗原,利用Ru (bpy)₃²⁺/Zr-MOFs作为发光体构建双重猝灭竞争型传感器。鉴于纳米多孔Au@NiFe MOFs材料的双重猝灭效果,传感器的灵敏度将被大大提升。根据不同浓度标准溶液引起的电化学发光信号强度的不同,实现对雌激素己烯雌酚的超灵敏检测。

1. 一种基于Au@NiFe MOFs的双重猝灭型电致化学发光免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤如下:

(1) Ru (bpy) $_3^{2+}$ /Zr-MOFs的制备

将30 mg ~ 45 mg 2, 2-联吡啶-5, 5-二羧酸溶于12 mL N, N-二甲基甲酰胺中,加入120 μ L ~ 360 μ L三乙胺,然后加入1 mL ~ 5 mL醋酸,搅拌10 min ~ 15 min得到有机前驱体溶液,将30 mg ~ 50 mg ZrCl $_4$ 分散于16 mL N, N-二甲基甲酰胺中,搅拌10 min ~ 15 min得到金属溶液前驱体,将两种前驱体溶液混合于50 mL聚四氟乙烯高压反应釜中,70 $^{\circ}$ C ~ 90 $^{\circ}$ C反应24 h,离心分离,用N, N-二甲基甲酰胺、甲醇、乙醇分别洗涤数次,35 $^{\circ}$ C真空干燥12 h,得到白色固体Zr-MOFs;将18 mg ~ 24 mg Zr-MOFs分散于10 mL乙醇溶液中,搅拌5 min后和10 mL含有1 mg ~ 3 mg的Ru (bpy) $_3$ Cl $_2$ $\cdot$ 6H $_2$ O的N, N-二甲基甲酰胺溶液混合,80 $^{\circ}$ C ~ 100 $^{\circ}$ C搅拌12 h,N, N-二甲基甲酰胺、乙醇分别洗涤数次,35 $^{\circ}$ C真空干燥12 h,得到橙黄色固体Ru (bpy) $_3^{2+}$ /Zr-MOFs;

(2) Ru (bpy) $_3^{2+}$ /Zr-MOFs标记抗体孵化物溶液的制备

将10 mg的Ru (bpy) $_3^{2+}$ /Zr-MOFs分散于1 mL EDC/NHS溶液中室温震荡反应4 h ~ 8 h,超纯水洗去多余EDC/NHS,然后分散到1 mL pH = 7.5的PBS中,加入4 μ L ~ 6 μ L、6 mg/mL的抗体,4 $^{\circ}$ C恒温振荡培养箱中振荡孵化12h ~ 24 h,4 $^{\circ}$ C离心分离,最后分散于pH = 7.5的PBS缓冲溶液中,制得0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL的Ru (bpy) $_3^{2+}$ /Zr-MOFs标记偶联抗体,储存于4 $^{\circ}$ C中备用;

(3) 纳米多孔材料Au@NiFe MOFs的制备

将140 mg ~ 160 mg六水合氯化镍和260 mg ~ 280 mg二水合柠檬酸三钠分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min,同样将130 mg ~ 150 mg的铁氰化钾分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min,然后将两种溶液混合继续在室温下搅拌8 h ~ 12 h,离心分离悬浮物,使用超纯水和乙醇分别洗涤2次,35 $^{\circ}$ C真空干燥,得到土黄色纳米多孔NiFe MOFs;

将30 mg ~ 50 mg纳米多孔NiFe MOFs分散在50 mL超纯水中,加入1 mL ~ 3 mL 1% ~ 3%的氯金酸溶液,室温下搅拌5 min,加入4 mg ~ 6 mg聚乙烯吡咯烷酮抑制金纳米粒子的团聚,然后加入70 mg ~ 90 mg还原剂柠檬酸三钠,0.5 mg ~ 1 mg硼氢化钠,室温下搅拌8 h ~ 12 h,溶液慢慢变成紫黑色,离心分离悬浮物,超纯水洗涤至上清液无色,35 $^{\circ}$ C真空干燥12 h,得到紫黑色固体Au@NiFe MOFs;

(4) Au@NiFe MOFs标记抗原孵化物溶液的制备

将8 mg ~ 12 mg的Au@NiFe MOFs分散到1 mL pH = 7.5的PBS中,加入4 μ L ~ 6 μ L、6 mg/mL的抗原,4 $^{\circ}$ C恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h ~ 24 h,4 $^{\circ}$ C离心分离,加入1 mL 0.5% ~ 0.9%的牛血清白蛋白溶液,4 $^{\circ}$ C恒温振荡培养箱中振荡孵化2 h封闭Au@NiFe MOFs上面的非特异性活性位点,4 $^{\circ}$ C离心分离,最后分散于pH = 7.5的PBS缓冲溶液中,制得0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL的Au@NiFe MOFs标记抗原,储存于4 $^{\circ}$ C中备用;

(5) 分别用1.0 mm、0.3 mm、0.05 mm的氧化铝抛光粉对直径4 mm的玻璃碳电极做抛光处理,用超纯水冲洗干净;

(6) 将6 μ L 0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL Ru (bpy) $_3^{2+}$ /Zr-MOFs标记偶联抗体滴涂至电极表面,4 $^{\circ}$ C晾干;

(7) 将3 μ L体积分数为1%的牛血清白蛋白BSA溶液于电极表面,以封闭电极表面上非特

异性活性位点,用pH = 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 °C晾干;

(8)将6 μ L、一定浓度的待测物标准溶液滴加到电极表面,用pH = 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 °C晾干

(9)将6 μ L、0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL的Au@NiFe MOFs标记待测物抗原孵化溶液滴加到电极表面,4 °C晾干,用pH = 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,制得一种基于Au@NiFe MOFs的双猝灭竞争型电致化学发光免疫传感器。

2.如权利要求1所述制备方法制得的一种基于Au@NiFe MOFs的双猝灭竞争型电致化学发光免疫传感器用于己烯雌酚的检测,其特征在于,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修饰的玻碳电极为工作电极,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500 V,循环伏安扫描电位范围为0 ~ 1.4 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,检测对不同浓度的己烯雌酚标准溶液产生的电化学发光信号强度,绘制工作曲线;

(3)将待测己烯雌酚样品溶液代替己烯雌酚标准溶液进行测定。

一种基于Au@NiFe MOFs的双猝灭竞争型电致化学发光传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于Au@NiFe MOFs的双重猝灭竞争型电致化学发光免疫传感器的制备方法及应用。具体涉及纳米材料Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs和双猝灭剂Au@NiFe MOFs的制备及其在电致化学发光传感器中的应用。利用Au@NiFe MOFs其优良的生物兼容性、大的比表面积、高的孔隙率来增加抗原固载量,且其可以双重猝灭Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs的发光效应,进而达到了增强传感器灵敏度的目的。本发明属于电化学发光检测技术领域。

背景技术

[0002] 己烯雌酚(DES)是一种人工合成的非甾体雌激素物质,能产生与天然雌二醇相同的所有药理与治疗作用。1971年Herbst等人在《新英格兰医学杂志》上正式提出DES与青年女性罕见的阴道腺癌(CCA)之间的关系,因此DES对人体的危害极大。若母体孕期服用过DES,女性胎儿发育至成年怀孕时易于流产,主要因为DES致使子宫畸形;对于男性胎儿来说,由DES引起的症状主要包括:隐睾、睾丸癌、附睾囊肿、不育等。DES作为一种可以促进动物蛋白质合成的雌激素主要存在于猪羊鱼肉等动物性食品中,因此,中华人民共和国农业部第235号公告在修订的《动物性食品中兽药最高残留量》中规定所有食品动物和所有可食组织中DES的最高含量为未检出。故寻找一种可以简便快捷灵敏的DES检测方法有着重要意义。本发明中所用的电化学发光方法消耗低、易控制、灵敏度高且检测限低,具有电化学和化学发光两种方法的优势,是一种环境友好型方法。因此本发明设计了一种竞争型的电致化学发光免疫分析方法用于己烯雌酚的检测。

[0003] 在本发明中,使用一种新型纳米材料Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs作为电化学发光材料。Zr-MOFs因其多孔性具有较大的比表面积可以负载更多的Ru(bpy)₃²⁺,进而增强传感器的发光强度。且首次使用一种新型纳米多孔材料Au@NiFe MOFs作为猝灭剂并引入到电化学发光领域。其中Au纳米粒子和NiFe MOFs都可以猝灭Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs的发光效应,达到双重猝灭的效果。且Au@NiFe MOFs因为其多孔性具有较大的比表面积可以负载更多的己烯雌酚抗原。如上所述都可以大大增强传感器的灵敏度。本发明的原理是基于己烯雌酚标准溶液和己烯雌酚抗体的结合能力大大强于Au@NiFe MOFs标记的己烯雌酚-BSA偶联抗原,随着己烯雌酚标准溶液浓度的变大,和己烯雌酚抗体结合的Au@NiFe MOFs标记偶联抗原就越少,双重猝灭效果减弱,发光强度增强。此外,本发明设计的竞争型免疫传感器也为其它雌激素分析物的检测提供了一种新方法。目前基于Au@NiFe MOFs构建双重猝灭竞争型免疫传感器来检测己烯雌酚的方法还未见报道。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种更简单可靠的基于Au@NiFe MOFs的双重猝灭竞争型电致化学发光免疫传感器的制备方法和应用,实现对雌激素的快速、灵敏、特异、高效检测。

[0005] 本发明的技术方案如下:

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

[0007] 1. 纳米材料 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zr-MOFs}$ 标记抗体、 Au@NiFe MOFs 标记己烯雌酚-BSA偶联抗原孵化物溶液的制备

[0008] (1) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zr-MOFs}$ 的制备

[0009] 将30 mg ~ 45 mg 2, 2-联吡啶-5, 5-二羧酸(BPDC)溶于12 mL N, N-二甲基甲酰胺(DMF)中,加入120 μL ~ 360 μL 三乙胺,然后加入1 mL ~ 5 mL醋酸,搅拌10 min ~ 15 min得到有机前驱体溶液,将30 mg ~ 50 mg ZrCl_4 分散于16 mL N, N-二甲基甲酰胺中,搅拌10 min ~ 15 min得到金属溶液前驱体,将两种前驱体溶液混合于50 mL聚四氟乙烯高压反应釜中,70 $^{\circ}\text{C}$ ~ 90 $^{\circ}\text{C}$ 反应24 h,离心分离,用N, N-二甲基甲酰胺、甲醇、乙醇分别洗涤数次,35 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥12 h,得到白色固体Zr-MOFs;将18 mg ~ 24 mg Zr-MOFs分散于10 mL乙醇溶液中,搅拌5 min后和10 mL含有 $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mg ~ 3 mg)的N, N-二甲基甲酰胺溶液混合,80 $^{\circ}\text{C}$ ~ 100 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌12 h, N, N-二甲基甲酰胺、乙醇分别洗涤数次,35 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥12 h,得到橙黄色固体 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zr-MOFs}$;

[0010] (2) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zr-MOFs}$ 标记抗体孵化物溶液的制备

[0011] 将10 mg的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zr-MOFs}$ 分散于1 mL EDC/NHS溶液中室温震荡反应4 h ~ 8 h,超纯水洗去多余EDC/NHS,然后分散到1 mL pH = 7.5的PBS中,加入4 μL ~ 6 μL 、6 mg/mL的抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h ~ 24 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心分离,最后分散于pH = 7.5的PBS缓冲溶液中,制得0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zr-MOFs}$ 标记偶联抗体,储存于4 $^{\circ}\text{C}$ 中备用;

[0012] (3) 纳米多孔材料 Au@NiFe MOFs 的制备

[0013] 将140 mg ~ 160 mg六水合氯化镍和260 mg ~ 280 mg二水合柠檬酸三钠分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min,同样将130 mg ~ 150 mg的铁氰化钾分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min,然后将两种溶液混合继续在室温下搅拌8 h ~ 12 h,离心分离悬浮物,使用超纯水和乙醇分别洗涤2次,35 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥,得到土黄色纳米多孔NiFe MOFs;

[0014] 将30 mg ~ 50 mg纳米多孔NiFe MOFs分散在50 mL超纯水中,加入1 mL ~ 3 mL 1% ~ 3%的氯金酸溶液,室温下搅拌5 min,加入4 mg ~ 6 mg聚乙烯吡咯烷酮(PVP)抑制金纳米粒子的团聚,然后加入还原剂柠檬酸三钠(70 mg ~ 90 mg),硼氢化钠(0.5 mg ~ 1 mg)室温下搅拌8 h ~ 12 h,溶液慢慢变成紫黑色,离心分离悬浮物,超纯水洗涤至上清液无色,35 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥12 h,得到紫黑色固体 Au@NiFe MOFs ;

[0015] (4) Au@NiFe MOFs 标记抗原孵化物溶液的制备

[0016] 将8 mg ~ 12 mg的 Au@NiFe MOFs 分散到1 mL pH = 7.5的PBS中,加入4 μL ~ 6 μL 、6 mg/mL的抗原,4 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h ~ 24 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心分离,加入1 mL 0.5% ~ 0.9%的牛血清白蛋白溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养箱中振荡孵化2 h封闭 Au@NiFe MOFs 上面的非特异性活性位点,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心分离,最后分散于pH = 7.5的PBS缓冲溶液中,制得0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL的 Au@NiFe MOFs 标记抗原,储存于4 $^{\circ}\text{C}$ 中备用。

[0017] 2. 一种 Au@NiFe MOFs 的双重猝灭竞争型电致化学发光传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0018] (1) 分别用1.0 mm、0.3 mm、0.05 mm的氧化铝抛光粉对直径4 mm的玻碳电极做抛光处理,用超纯水冲洗干净;

[0019] (2)将6 μL 0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL Ru(bpy) $_3^{2+}$ /Zr-MOFs标记偶联抗体滴涂至电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干;

[0020] (3)将3 μL 体积分数为1%的牛血清白蛋白BSA溶液于电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,用pH = 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干;

[0021] (4)将6 μL 、一定浓度的待测物标准溶液滴加到电极表面,用pH = 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干

[0022] (5)将6 μL 、0.5 mg/mL ~ 5 mg/mL的Au@NiFe MOFs标记待测物抗原孵化溶液滴加到电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干,用pH = 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,制得一种基于Au@NiFe MOFs的双猝灭竞争型电致化学发光免疫传感器。

[0023] 3.电致化学发光传感器用于待测样品的电化学发光检测:

[0024] (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传感器修饰的玻碳电极为工作电极,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500 V,循环伏安扫描电位范围为0 ~ 1.4 V,扫描速率为0.1 V/s;

[0025] (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,通过电化学发光系统,检测对不同浓度的己烯雌酚标准溶液产生的电化学发光信号强度,绘制工作曲线;

[0026] (3)将待测样品溶液代替标准溶液进行测定。

[0027] 本发明的有益成果

[0028] (1)首次采用纳米多孔材料Au@NiFe MOFs作为猝灭剂标记抗原对发光体的发光效应进行双重猝灭,且其具有优良的生物相容性、较大的比表面积等优势,有效增加抗原的固载量,从而大大提高传感器的灵敏度;

[0029] (2)以纳米材料Ru(bpy) $_3^{2+}$ /Zr-MOFs为发光材料用于电致化学发光传感器的构建中,利用Ru(bpy) $_3^{2+}$ /Zr-MOFs高且稳定的发光效率来提高传感器光信号的输出,从而获得更高的灵敏度;

[0030] (3)本发明首次将纳米多孔Au@NiFe MOFs和Ru(bpy) $_3^{2+}$ /Zr-MOFs相结合用于电致化学发光传感器的构建,基于此构建的传感器可应用于雌激素的临床检测,具有操作简单,检测快速,信号线性范围宽(0.1 pg/mL ~ 50 ng/mL)和检出限低(0.039 pg/mL)的优点。

[0031] 实施例1

[0032] 纳米材料Ru(bpy) $_3^{2+}$ /Zr-MOFs标记抗体、Au@NiFe MOFs标记己烯雌酚-BSA偶联抗原孵化物溶液的制备

[0033] (1)Ru(bpy) $_3^{2+}$ /Zr-MOFs的制备

[0034] 将30 mg 2, 2-联吡啶-5, 5-二羧酸(BPDC)溶于12 mL N, N-二甲基甲酰胺(DMF)中,加入120 μL 三乙胺,然后加入1 mL ~ 5 mL醋酸,搅拌10 min得到有机前驱体溶液,将30 mg ZrCl $_4$ 分散于16 mL N, N-二甲基甲酰胺中,搅拌10 min得到金属溶液前驱体,将两种前驱体溶液混合于50 mL聚四氟乙烯高压反应釜中,70 $^{\circ}\text{C}$ 反应24 h,离心分离,用N, N-二甲基甲酰胺、甲醇、乙醇分别洗涤数次,35 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥12 h,得到白色固体Zr-MOFs;将18 mg Zr-MOFs分散于10 mL乙醇溶液中,搅拌5 min后和10 mL含有Ru(bpy) $_3\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mg)的N, N-二甲基甲酰胺溶液混合,80 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌12 h,N, N-二甲基甲酰胺、乙醇分别洗涤数次,35 $^{\circ}\text{C}$

真空干燥12 h,得到橙黄色固体Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs;

[0035] (2) Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs标记抗体孵化物溶液的制备

[0036] 将10 mg的Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs分散于1 mL EDC/NHS溶液中室温震荡反应4 h,超纯水洗去多余EDC/NHS,然后分散到1 mL pH = 7.5的PBS中,加入4 μL、6 mg/mL的抗体,4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化12h,4 °C离心分离,最后分散于pH = 7.5的PBS缓冲溶液中,制得0.5 mg/mL的Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs标记偶联抗体,储存于4 °C中备用;

[0037] (3) 纳米多孔材料Au@NiFe MOFs的制备

[0038] 将140 mg六水合氯化镍和260 mg二水合柠檬酸三钠分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min,同样将130 mg的铁氰化钾分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min,然后将两种溶液混合继续在室温下搅拌8 h,离心分离悬浮物,使用超纯水和乙醇分别洗涤2次,35 °C真空干燥,得到土黄色纳米多孔NiFe MOFs;

[0039] 将30 mg纳米多孔NiFe MOFs分散在50 mL超纯水中,加入1 mL 1%的氯金酸溶液,室温下搅拌5 min,加入4 mg聚乙烯吡咯烷酮(PVP)抑制金纳米粒子的团聚,然后加入还原剂柠檬酸三钠(70 mg),硼氢化钠(0.5 mg)室温下搅拌8 h,溶液慢慢变成紫黑色,离心分离悬浮物,超纯水洗涤至上清液无色,35 °C真空干燥12 h,得到紫黑色固体Au@NiFe MOFs;

[0040] (4) Au@NiFe MOFs标记抗原孵化物溶液的制备

[0041] 将8 mg的Au@NiFe MOFs分散到1 mL pH = 7.5的PBS中,加入4 μL、6 mg/mL的抗原,4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h,4 °C离心分离,加入1 mL 0.5%的牛血清白蛋白溶液,4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化2 h封闭Au@NiFe MOFs上面的非特异性活性位点,4 °C离心分离,最后分散于pH = 7.5的PBS缓冲溶液中,制得0.5 mg/mL的Au@NiFe MOFs标记抗原,储存于4 °C中备用。

[0042] 实施例2

[0043] 纳米材料Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs标记抗体、Au@NiFe MOFs标记己烯雌酚-BSA偶联抗原孵化物溶液的制备

[0044] (1) Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs的制备

[0045] 将37.5 mg 2, 2'-联吡啶-5, 5'-二羧酸(BPDC)溶于12 mL N, N-二甲基甲酰胺(DMF)中,加入240 μL三乙胺,然后加入3 mL醋酸,搅拌12.5 min得到有机前驱体溶液,将40 mg ZrCl₄分散于16 mL N, N-二甲基甲酰胺中,搅拌12.5 min得到金属溶液前驱体,将两种前驱体溶液混合于50 mL聚四氟乙烯高压反应釜中,80 °C反应24 h,离心分离,用N, N-二甲基甲酰胺、甲醇、乙醇分别洗涤数次,35 °C真空干燥12 h,得到白色固体Zr-MOFs;将21 mg Zr-MOFs分散于10 mL乙醇溶液中,搅拌5 min后和10 mL含有Ru(bpy)₃Cl₂·6H₂O(2 mg)的N, N-二甲基甲酰胺溶液混合,90 °C搅拌12 h,用N, N-二甲基甲酰胺、乙醇分别洗涤数次,35 °C真空干燥12 h,得到橙黄色固体Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs;

[0046] (2) Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs标记抗体孵化物溶液的制备

[0047] 将10 mg的Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs分散于1 mL EDC/NHS溶液中室温震荡反应6 h,超纯水洗去多余EDC/NHS,然后分散到1 mL pH = 7.5的PBS中,加入5 μL、6 mg/mL的抗体,4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化18 h,4 °C离心分离,最后分散于pH = 7.5的PBS缓冲溶液中,制得2.5 mg/mL的Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs标记偶联抗体,储存于4 °C中备用;

[0048] (3) 纳米多孔材料Au@NiFe MOFs的制备

[0049] 将150 mg六水合氯化镍和170 mg二水合柠檬酸三钠分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min,同样将140 mg的铁氰化钾分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min,然后将两种溶液混合继续在室温下搅拌10 h,离心分离悬浮物,使用超纯水和乙醇分别洗涤2次,35 °C真空干燥,得到土黄色纳米多孔NiFe MOFs;

[0050] 将40 mg纳米多孔NiFe MOFs分散在50 mL超纯水中,加入2 mL 2%的氯金酸溶液,室温下搅拌5 min,加入5 mg聚乙烯吡咯烷酮(PVP)抑制金纳米粒子的团聚,然后加入还原剂柠檬酸三钠(80 mg),硼氢化钠(0.75 mg)室温下搅拌10 h,溶液慢慢变成紫黑色,离心分离悬浮物,超纯水洗涤至上清液无色,35 °C真空干燥12 h,得到紫黑色固体Au@NiFe MOFs;

[0051] (4) Au@NiFe MOFs标记抗原孵化物溶液的制备

[0052] 将10 mg的Au@NiFe MOFs分散到1 mL pH = 7.5的PBS中,加入5 μ L、6 mg/mL的抗原,4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化18 h,4 °C离心分离,加入1 mL 0.7%的牛血清白蛋白溶液,4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化2 h封闭Au@NiFe MOFs上面的非特异性活性位点,4 °C离心分离,最后分散于pH = 7.5的PBS缓冲溶液中,制得2.5 mg/mL的Au@NiFe MOFs标记抗原,储存于4 °C中备用。

[0053] 实施例3

[0054] 纳米材料Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs标记抗体、Au@NiFe MOFs标记己烯雌酚-BSA偶联抗原孵化物溶液的制备

[0055] (1) Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs的制备

[0056] 将45 mg 2, 2'-联吡啶-5, 5'-二羧酸(BPDC)溶于12 mL N, N-二甲基甲酰胺(DMF)中,加入360 μ L三乙胺,然后加入5 mL醋酸,搅拌15 min得到有机前驱体溶液,将50 mg ZrCl₄分散于16 mL N, N-二甲基甲酰胺中,搅拌15 min得到金属溶液前驱体,将两种前驱体溶液混合于50 mL聚四氟乙烯高压反应釜中,90 °C反应24 h,离心分离,用N, N-二甲基甲酰胺、甲醇、乙醇分别洗涤数次,35 °C真空干燥12 h,得到白色固体Zr-MOFs;将24 mg Zr-MOFs分散于10 mL乙醇溶液中,搅拌5 min后和10 mL含有(Ru(bpy)₃²⁺)Cl₂·6H₂O(3 mg)的N, N-二甲基甲酰胺溶液混合,100 °C搅拌12 h,用N, N-二甲基甲酰胺、乙醇分别洗涤数次,35 °C真空干燥12 h,得到橙黄色固体Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs;

[0057] (2) Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs标记抗体孵化物溶液的制备

[0058] 将10 mg的Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs分散于1 mL EDC/NHS溶液中室温震荡反应8 h,超纯水洗去多余EDC/NHS,然后分散到1 mL pH = 7.5的PBS中,加入6 μ L、6 mg/mL的抗体,4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化24 h,4 °C离心分离,最后分散于pH = 7.5的PBS缓冲溶液中,制得5 mg/mL的Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs标记偶联抗体,储存于4 °C中备用;

[0059] (3) 纳米多孔材料Au@NiFe MOFs的制备

[0060] 将160 mg六水合氯化镍和280 mg二水合柠檬酸三钠分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min,同样将150 mg的铁氰化钾分散于20 mL超纯水中磁力搅拌5 min,然后将两种溶液混合继续在室温下搅拌12 h,离心分离悬浮物,使用超纯水和乙醇分别洗涤2次,35 °C真空干燥,得到土黄色纳米多孔NiFe MOFs;

[0061] 将50 mg纳米多孔NiFe MOFs分散在50 mL超纯水中,加入3 mL 3%的氯金酸溶液,室温下搅拌5 min,加入6 mg聚乙烯吡咯烷酮(PVP)抑制金纳米粒子的团聚,然后加入还原剂柠檬酸三钠(90 mg),硼氢化钠(1 mg)室温下搅拌12 h,溶液慢慢变成紫黑色,离心分离

悬浮物,超纯水洗涤至上清液无色,35 °C真空干燥12 h,得到紫黑色固体Au@NiFe MOFs;

[0062] (4) Au@NiFe MOFs标记抗原孵化物溶液的制备

[0063] 将12 mg的Au@NiFe MOFs分散到1 mL pH = 7.5的PBS中,加入6 µL、6 mg/mL的抗原,4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化24 h,4 °C离心分离,加入1 mL 0.9%的牛血清白蛋白溶液,4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化2 h封闭Au@NiFe MOFs上面的非特异性活性位点,4 °C离心分离,最后分散于pH = 7.5的PBS缓冲溶液中,制得5 mg/mL的标记抗原,储存于4 °C中备用。

[0064] 实施例4

[0065] 一种基于Au@NiFe MOFs的双猝灭竞争型电致化学发光传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0066] (1) 分别用1.0 mm、0.3 mm、0.05 mm的氧化铝抛光粉对直径4 mm的玻碳电极做抛光处理,用超纯水冲洗干净;

[0067] (2) 将6 µL 0.5 mg/mL Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs标记偶联抗体滴涂至电极表面,4 °C晾干;

[0068] (3) 将3 µL体积分数为1%的牛血清白蛋白BSA溶液于电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,用pH = 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 °C晾干;

[0069] (4) 将6 µL、一定浓度的待测物标准溶液滴加到电极表面,用pH = 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 °C晾干

[0070] (5) 将6 µL、0.5 mg/mL的Au@NiFe MOFs标记待测物抗原孵化物溶液滴加到电极表面,4 °C晾干,用pH = 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,制得一种基于Au@NiFe MOFs的双猝灭竞争型电致化学发光免疫传感器。

[0071] 实施例5

[0072] 一种基于Au@NiFe MOFs的双猝灭竞争型电致化学发光传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0073] (1) 分别用1.0 mm、0.3 mm、0.05 mm的氧化铝抛光粉对直径4 mm的玻碳电极做抛光处理,用超纯水冲洗干净;

[0074] (2) 将6 µL 2.5 mg/mL Ru(bpy)₃²⁺/Zr-MOFs标记偶联抗体滴涂至电极表面,4 °C晾干;

[0075] (3) 将3 µL体积分数为1%的牛血清白蛋白BSA溶液于电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,用pH = 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 °C晾干;

[0076] (4) 将6 µL、一定浓度的待测物标准溶液滴加到电极表面,用pH = 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,4 °C晾干

[0077] (5) 将6 µL、2.5 mg/mL的Au@NiFe MOFs标记待测物抗原孵化物溶液滴加到电极表面,4 °C晾干,用pH = 7.5的PBS缓冲溶液冲洗,制得一种基于Au@NiFe MOFs的双猝灭竞争型电致化学发光免疫传感器。

[0078] 实施例6

[0079] 一种基于Au@NiFe MOFs的双猝灭竞争型电致化学发光传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0080] (1) 分别用1.0 mm、0.3 mm、0.05 mm的氧化铝抛光粉对直径4 mm的玻碳电极做抛

光处理,用超纯水冲洗干净;

[0081] (2)将6 μL 5 mg/mL $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{Zr-MOFs}$ 标记偶联抗体滴涂至电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干;

[0082] (3)将3 μL 体积分数为1%的牛血清白蛋白BSA溶液于电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,用 $\text{pH} = 7.5$ 的PBS缓冲溶液冲洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干;

[0083] (4)将6 μL 、一定浓度的待测物标准溶液滴加到电极表面,用 $\text{pH} = 7.5$ 的PBS缓冲溶液冲洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干

[0084] (5)将6 μL 、5 mg/mL的 Au@NiFe MOFs 标记待测物抗原孵化溶液滴加到电极表面,4 $^{\circ}\text{C}$ 晾干,用 $\text{pH} = 7.5$ 的PBS缓冲溶液冲洗,制得一种基于 Au@NiFe MOFs 的双猝灭竞争型电致化学发光免疫传感器。

[0085] 实施例7

[0086] 电致化学发光传感器用于己烯雌酚的电化学发光检测:

[0087] (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传感器修饰的玻碳电极为工作电极,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500 V,循环伏安扫描电位范围为0 ~ 1.4 V,扫描速率为0.1 V/s;

[0088] (2)在10 mL、 $\text{pH} 7.5$ 的含浓度为10 mmol/L三丙胺的PBS缓冲溶液中,通过电化学发光系统,检测对不同浓度的己烯雌酚抗原产生的电化学发光信号强度,绘制工作曲线;

[0089] (3)将待测样品溶液代替标准溶液进行测定。

[0090] 实施例8

[0091] 鱼肉提取液中雌激素己烯雌酚的检测

[0092] 鱼肉提取液1 mL,向其中加入不同浓度的己烯雌酚标准溶液,采用标准加入法测定样品中己烯雌酚的平均回收率,结果见表1.

[0093] 表1 样品中己烯雌酚的检测结果

样品	样品含量 (ng/mL)	加入浓度 (ng/mL)	检测浓度 ($n = 5$, ng/mL)	相对标准偏差 (%)	回收率 (%)
提取液	0.0	0.01	0.0096	4.6	96
		0.5	0.502	3.0	100.1
		5.00	4.94	2.4	98.8

[0095] 表1检测结果可以看出,鱼肉提取液中己烯雌酚检测结果的回收率在95.0 ~ 105%范围内,表明本发明可以用于实际生物样品的检测,方法的精密度高,结果准确可靠。