



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116285957 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 23

(21) 申请号 202211504820.5

G01N 21/76 (2006.01)

(22) 申请日 2022.11.28

G01N 27/26 (2006.01)

(71) 申请人 南京理工大学

地址 210094 江苏省南京市玄武区孝陵卫
200号

(72) 发明人 邓盛元 陈雯 杨文博 于叶舟
刘政 朴禹滢 万莹

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公
司 33200

专利代理师 邱启旺

(51) Int. Cl.

C09K 11/06 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 27/30 (2006.01)

G01N 27/48 (2006.01)

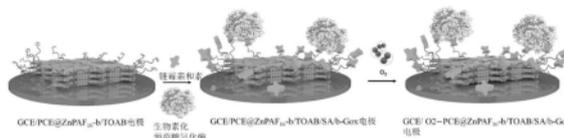
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

一种自增强型电化学发光复合物及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种基于自增强型电化学发光复合物及应用,该复合物是先通过将四羟基苯基锌卟啉、氟化碳链以及羧基-聚乙二醇-生物素构建多孔结构框架,然后在多孔中嵌入具有高携氧能力的全氟-15冠-5醚制备得到。氟化碳链可为全氟丁二酸、全氟戊二酸、全氟己二酸、全氟辛二酸、全氟壬二酸或全氟癸二酸,从而构建不同孔径大小的复合物。对比这六种物质的电化学发光信号,发现全氟癸二酸制备的复合物的电化学发光强度最大。因此,利用链霉亲和素和生物素之间的亲和力,将生物素化葡萄糖氧化酶固定在全氟癸二酸制备的复合物表面上,形成自增强型电化学发光生物传感器,且该传感器可定量检测葡萄糖,表现出宽的检测线性范围和高灵敏度。



1. 一种自增强型电化学发光复合物,其特征在于,通过以下制备方法得到:

(1) 先称取四羟基苯基卟啉、乙酸锌溶解在二甲基甲酰胺中,振荡至混合均匀,所述四羟基苯基卟啉和乙酸锌摩尔比为1:5~9;之后油浴加热至110~120℃,回流45~60分钟;冷却至室温,倒入去离子水静置,离心得到沉淀物,将沉淀物烘干得到四羟基苯基锌卟啉;

(2) 将步骤(1)得到的四羟基苯基锌卟啉、氟化碳链、N,N'-二环己基碳二亚胺和4-二甲基氨基吡啶溶解于四氢呋喃中,所述四羟基苯基锌卟啉、氟化碳链、N,N'-二环己基碳二亚胺和4-二甲基氨基吡啶摩尔比为1:1.5:20:20,在黑暗条件下加热至40~50℃并搅拌至混合均匀,反应时间为12~18小时;之后加入羧基-聚乙二醇-生物素、N,N'-二环己基碳二亚胺和4-二甲基氨基吡啶,所述四羟基苯基锌卟啉、羧基-聚乙二醇-生物素、N,N'-二环己基碳二亚胺和4-二甲基氨基吡啶摩尔比为1:4:10:10,在40~50℃黑暗条件下反应18~20小时;接着蒸发浓缩得到固体物质后,先用甲醇溶解,再用冰乙醚沉淀,反复溶解沉淀直至上清液无色;然后将沉淀物透析,去除杂质,最后进行冻干获得生物素化锌全氟芳香框架并避光保存于2~8℃备用;所述生物素化锌全氟芳香框架标记为ZnPAFn-b;

(3) 将步骤(2)得到的ZnPAFn-b溶解于去离子水中,加入全氟-15冠-5醚,所述ZnPAFn-b与全氟-15冠-5醚摩尔比为1:64;之后在水浴锅中超声,离心,收集上层液,得到自增强型电化学发光复合物,标记为PCE@ZnPAFn-b。

2. 根据权利要求1所述的一种自增强型电化学发光复合物,其特征在于,所述氟化碳链为全氟丁二酸、全氟戊二酸、全氟己二酸、全氟辛二酸、全氟壬二酸或全氟癸二酸。

3. 根据权利要求2所述的一种自增强型电化学发光复合物,其特征在于,所述氟化碳链为全氟癸二酸。

4. 根据权利要求1所述的一种自增强型电化学发光复合物,其特征在于,ZnPAFn-b和PCE@ZnPAFn-b中的n为4、6、8、12、14或16;n为氟原子的个数。

5. 根据权利要求1所述的一种自增强型电化学发光复合物,其特征在于,所述透析的截留分子量大于等于2000Da。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的一种自增强型电化学发光复合物在制备定量检测葡萄糖的电极的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述应用具体为:

(1) 打磨电极至表面光滑;

(2) 将步骤(1)中打磨好的电极在无水乙醇和去离子水中先后超声处理后,用氮气吹干;

(3) 将PCE@ZnPAF₁₆-b滴在电极表面,待电极干燥后重复以上步骤,得到GCE/PCE@ZnPAF₁₆-b电极;

(4) 将TOAB滴在步骤(3)中的电极表面,晾干后得到GCE/PCE@ZnPAF₁₆-b/TOAB修饰电极;

(5) 将步骤(4)中修饰电极浸泡在链霉亲和素溶液;室温孵育1小时后,再用磷酸盐缓冲液冲洗,得到GCE/PCE@ZnPAF₁₆-b/TOAB/SA修饰电极;

(6) 将步骤(5)中修饰电极浸泡在生物素化葡萄糖氧化酶溶液中孵育1小时,然后用磷酸盐缓冲液再次淋洗得到GCE/PCE@ZnPAF₁₆-b/TOAB/SA/b-Gox修饰电极;

(7) 将步骤(6)中的修饰电极置于充满氧气的小型气体罩内,获得GCE/O₂-PCE@ZnPAF₁₆-b/TOAB/SA/b-Gox修饰电极,又称为自增强型电化学发光生物传感器。

一种自增强型电化学发光复合物及应用

技术领域

[0001] 本发明属于物化分析技术领域,尤其涉及一种自增强型电化学发光复合物及应用。

背景技术

[0002] 作为一种强大的敏感分析技术,电化学发光(Electrochemiluminescence,ECL)是一个在电极表面产生高活性物质,经高能电子转移反应生成激发态进行光发射的过程。它有效结合了电化学和化学发光两者独特的优势,表现出高灵敏度、低背景、宽动态范围、易于控制和设备简单。因此,ECL已被广泛用于有机分析、免疫传感器、DNA探针检测和酶生物传感器。在这些应用中,如何实现信号的放大是关键的一环。可固定于电极表面的自增强型ECL复合物作为发光体,具有明显的优点,包括缩短了两者的电子传输距离,减少了能量损失,实现发光稳定和增强发光效率,减少试剂消耗,简化了分析过程,扩展了其应用范围。目前,还没有关于将气体固定于电极表面的自增强型ECL发光体。因此,必须探索一个合适的纳米载体,以实现气体自增强型电化学发光复合物。

[0003] 众所周知,多孔材料因具有高表面积、高孔隙率和表面易于修饰,引起了人们的极大兴趣。在各种多孔材料家族中,共价有机聚合物(Covalent organic framework,COP)近年来受到广泛的研究关注。COP是一种新兴的多维和多功能材料,通过稳定的共价键连接有机单体构成,具有许多独特的性质,包括优良的热稳定性和化学稳定性、可调节和可设计的结构和功能。特别是发光功能化的COP。通过将电化学发光体整合到COP的骨架或空腔中,提供了一个新的构建自增强型ECL平台。

[0004] 全氟碳化物(Perfluorocarbon,PFC)是一类由碳和氟原子组成的化学惰性分子。根据结构分脂肪族和芳香族两类。在相同气压下,溶解在PFC中的氧气(Oxygen, O_2)量大大高于水中的量,甚至可达到1000倍。从PFC作为人工血液替代品的成功制造中吸取经验,具有很好的生物相容性和高氧溶解的PFC的纳米液滴作为氧气输送载体非常有用,广泛应用于光动力治疗(PDT)。

[0005] 葡萄糖测试在临床诊断、生物技术和食品工业中至关重要。葡萄糖不仅是人体的主要能量来源,而且与糖尿病密切相关。数百万的糖尿病患者需要每天检测他们的血糖水平。糖尿病引起的血糖异常可导致严重的并发症,包括失明、心血管疾病和肾衰竭。此外,为了控制葡萄糖水平,正常人(血液中正常的葡萄糖水平在 4.4 至 $6.6\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间)和非糖尿病急症患者也应进行葡萄糖监测。因此,监测众多样本对糖尿病的早期检测、预防、诊断和管理是很有利。开发一种简单、快速、灵敏的方法来监测葡萄糖的水平,在临床上是很重要的。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于针对现有技术的不足,提供一种自增强型电化学发光复合物作为ECL发光体,该发光体可以实现将气体固定于电极表面,并应用于电化学发光检测葡萄

糖,具有良好的检测性能。

[0007] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:一种自增强型电化学发光复合物,通过以下制备方法得到:

[0008] (1) 先称取四羟基苯基卟啉、乙酸锌溶解在二甲基甲酰胺中,振荡至混合均匀,所述四羟基苯基卟啉和乙酸锌摩尔比为1:5~9;之后油浴加热至110~120℃,回流45~60分钟;冷却至室温,倒入去离子水静置,离心得到沉淀物,将沉淀物烘干得到四羟基苯基锌卟啉;

[0009] (2) 将步骤(1)得到的四羟基苯基锌卟啉、氟化碳链、N,N'-二环己基碳二亚胺和4-二甲基氨基吡啶溶解于四氢呋喃中,所述四羟基苯基锌卟啉、氟化碳链、N,N'-二环己基碳二亚胺和4-二甲基氨基吡啶摩尔比为1:1.5:20:20,在黑暗条件下加热至40~50℃并搅拌至混合均匀,反应时间为12~18小时;之后加入羧基-聚乙二醇-生物素、N,N'-二环己基碳二亚胺和4-二甲基氨基吡啶,所述四羟基苯基锌卟啉、羧基-聚乙二醇-生物素、N,N'-二环己基碳二亚胺和4-二甲基氨基吡啶摩尔比为1:4:10:10,在40~50℃黑暗条件下反应18~20小时;接着蒸发浓缩得到固体物质后,先用甲醇溶解,再用冰乙醚沉淀,反复溶解沉淀直至上清液无色;然后将沉淀物透析,去除杂质,最后进行冻干获得生物素化锌全氟芳香框架并避光保存于2~8℃备用;所述生物素化锌全氟芳香框架标记为ZnPAFn-b;

[0010] (3) 将步骤(2)得到的ZnPAFn-b溶解于去离子水中,加入全氟-15冠-5醚,所述ZnPAFn-b与全氟-15冠-5醚摩尔比为1:64;之后在水浴锅中超声,离心,收集上层液,得到自增强型电化学发光复合物,标记为PCE@ZnPAFn-b。

[0011] 进一步地,所述氟化碳链为全氟丁二酸、全氟戊二酸、全氟己二酸、全氟辛二酸、全氟壬二酸或全氟癸二酸。

[0012] 进一步地,所述氟化碳链为全氟癸二酸。

[0013] 进一步地,ZnPAFn-b和PCE@ZnPAFn-b中的n为4、6、8、12、14或16;n为氟原子的个数。

[0014] 进一步地,所述透析的截留分子量大于等于2000Da。

[0015] 上述的一种自增强型电化学发光复合物在制备定量检测葡萄糖的电极的应用。

[0016] 进一步地,所述应用具体为:

[0017] (1) 打磨电极至表面光滑;

[0018] (2) 将步骤(1)中打磨好的电极在无水乙醇和去离子水中先后超声处理后,用氮气吹干;

[0019] (3) 将PCE@ZnPAF₁₆-b在滴在电极表面,待电极干燥后重复以上步骤,得到GCE/PCE@ZnPAF₁₆-b电极;

[0020] (4) 将TOAB滴在步骤(3)中的电极表面,晾干后得到GCE/PCE@ZnPAF₁₆-b/TOAB修饰电极;

[0021] (5) 将步骤(4)中修饰电极浸泡在链霉亲和素溶液;室温孵育1小时后,再用磷酸盐缓冲液冲洗,得到GCE/PCE@ZnPAF₁₆-b/TOAB/SA修饰电极。

[0022] (6) 将步骤(5)中修饰电极浸泡在生物素化葡萄糖氧化酶溶液中孵育1小时,然后用磷酸盐缓冲液再次淋洗得到GCE/PCE@ZnPAF₁₆-b/TOAB/SA/b-Gox修饰电极。

[0023] (7) 将步骤(6)中的修饰电极置于充满氧气的小型气体罩内,获得GCE/O₂-PCE@

ZnPAF₁₆-b/TOAB/SA/b-Gox修饰电极,又称为自增强型电化学发光生物传感器。

[0024] 本发明的有益效果如下:

[0025] (1) 本发明将四羟基苯基锌卟啉、氟化碳链以及羧基-聚乙二醇-生物素构建多孔结构框架,然后在多孔中嵌入具有高携氧能力的全氟-15冠-5醚,根据选择不同长度的氟化碳链从而制备了一系列孔径大小不同的自增强型电化学发光复合物,该复合物可以使气体固定于电极表面,且具有富氧、催化和功能可调节的特点;

[0026] (2) 对比一系列孔径大小不同的自增强型电化学发光复合物后,选出ECL信号最强的自增强型电化学发光复合物以链霉亲和素为中间体,通过链霉亲和素和生物素之间的亲和力,将生物素化葡萄糖氧化酶固定在自增强型电化学发光复合物表面,得到自增强型电化学发光生物传感器;

[0027] (3) 自增强型电化学发光生物传感器对葡萄糖进行检测,构建的传感器对葡萄糖的线性检测范围宽,为0.1mM~10mM,高灵敏度,其最低检测限为62μM。

附图说明

[0028] 图1为GCE/O₂-PCE@ZnPAFn-b/TOAB电极的ECL信号强度对比图和ECL-时间曲线图,其中,图(a)是GCE/O₂-PCE@ZnPAFn-b/TOAB电极的ECL信号强度对比图、图(b)是GCE/O₂-PCE@ZnPAFn-b/TOAB电极的ECL-时间曲线;

[0029] 图2为自增强型电化学发光生物传感器制备的具体过程;

[0030] 图3为自增强型电化学发光生物传感器组装过程的电化学交流阻抗变化图;

[0031] 图4为自增强型电化学发光生物传感器检测不同浓度的葡萄糖获得的ECL-浓度图和线性曲线,其中,图(a)是ECL-浓度图、(b)是线性曲线;

[0032] 图5为自增强型电化学发光生物传感器对抗坏血酸、尿酸、半胱氨酸、果糖、蔗糖和柠檬酸干扰性实验性结果图;

[0033] 图6为血清样品中的葡萄糖的检测表。

具体实施方式

[0034] 这里将详细地对示例性实施例进行说明,其示例表示在附图中。下面的描述涉及附图时,除非另有表示,不同附图中的相同数字表示相同或相似的要素。以下示例性实施中所描述的实施方式并不代表与本发明相一致的所有实施方式。相反,它们仅是与如所附权利要求书中所详述的、本发明的一些方面相一致的装置和方法的例子。

[0035] 下面结合附图,对本发明进行详细说明。在不冲突的情况下,下述的实施例及实施方式中的特征可以相互组合。

[0036] 在本发明的一种自增强型电化学发光复合物,通过以下制备方法得到:

[0037] (1) 先称取四羟基苯基卟啉、乙酸锌溶解在二甲基甲酰胺中,振荡至混合均匀,所述四羟基苯基卟啉和乙酸锌摩尔比为1:5~9;之后油浴加热至110~120℃,回流45~60分钟;冷却至室温,倒入去离子水静置,离心得到沉淀物,将沉淀物烘干得到四羟基苯基锌卟啉;

[0038] (2) 将步骤(1)得到的四羟基苯基锌卟啉、氟化碳链、N,N'-二环己基碳二亚胺和4-二甲基氨基吡啶溶解于四氢呋喃中,所述四羟基苯基锌卟啉、氟化碳链、N,N'-二环己基碳

二亚胺和4-二甲基氨基吡啶摩尔比为1:1.5:20:20,在黑暗条件下加热至40~50℃并搅拌至混合均匀,反应时间为12~18小时;之后加入羧基-聚乙二醇-生物素、N,N'-二环己基碳二亚胺和4-二甲基氨基吡啶,所述四羟基苯基锌卟啉、羧基-聚乙二醇-生物素、N,N'-二环己基碳二亚胺和4-二甲基氨基吡啶摩尔比为1:4:10:10,在40~50℃黑暗条件下反应18~20小时;接着蒸发浓缩得到固体物质后,先用甲醇溶解,再用冰乙醚沉淀,反复溶解沉淀直至上清液无色;然后将沉淀物透析,去除杂质,最后进行冻干获得生物素化锌全氟芳香框架并避光保存于2~8℃备用;所述生物素化锌全氟芳香框架标记为ZnPAFn-b;

[0039] (3) 将步骤(2)得到的ZnPAFn-b溶解于去离子水中,加入全氟-15冠-5醚,所述ZnPAFn-b与全氟-15冠-5醚摩尔比为1:64;之后在水浴锅中超声,离心,收集上层液,得到自增强型电化学发光复合物,标记为PCE@ZnPAFn-b。

[0040] 在一些实施例中,氟化碳链为全氟丁二酸、全氟戊二酸、全氟己二酸、全氟辛二酸、全氟壬二酸或全氟癸二酸;优选全氟癸二酸。

[0041] 其中ZnPAFn-b和PCE@ZnPAFn-b中的n为氟原子的个数;

[0042] 若氟化碳链为全氟丁二酸,则n=4,则制备得到PCE@ZnPAF₄-b;

[0043] 若氟化碳链为全氟戊二酸,则n=6,则制备得到PCE@ZnPAF₆-b;

[0044] 若氟化碳链为全氟己二酸,则n=8,则制备得到PCE@ZnPAF₈-b;

[0045] 若氟化碳链为全氟辛二酸,则n=12,则制备得到PCE@ZnPAF₁₂-b;

[0046] 若氟化碳链为全氟壬二酸,则n=14,则制备得到PCE@ZnPAF₁₄-b;

[0047] 若氟化碳链为全氟癸二酸,则n=16,则制备得到PCE@ZnPAF₁₆-b。

[0048] 实施例1:GCE/O₂-PCE@ZnPAFn-b/TOAB电极的制备

[0049] (1) 用0.05μm氧化铝悬浊液抛光打磨玻碳电极(Glassy carbon electrode,GCE)以拥有光洁的镜面,然后电极在无水乙醇和去离子水中先后超声处理后,氮气吹干;

[0050] (2) 取20μL 1mg/mL PCE@ZnPAFn-b(n=4、6、8、12、14、16)溶液滴在预处理的玻碳电极表面,待电极干燥后重复以上步骤,得到修饰电极称为GCE/PCE@ZnPAFn-b电极;

[0051] (3) 将10μL 25mM四辛基溴化铵(TOAB)滴在步骤(2)中获得的电极表面,晾干后得到的修饰电极称为GCE/PCE@ZnPAFn-b/TOAB电极;

[0052] (4) 将GCE/PCE@ZnPAFn/TOAB电极置于自制的小型气体罩里。小型气体罩的进口连接氧气罐,出口将电极罩住提供氧气(O₂)环境,使电极充氧后得到氧气固定于电极表面,标记为GCE/O₂-PCE@ZnPAFn-b/TOAB电极。

[0053] 采用实施例1的制备方法,分别得到GCE/O₂-PCE@ZnPAF₄-b/TOAB电极、GCE/O₂-PCE@ZnPAF₆-b/TOAB电极、GCE/O₂-PCE@ZnPAF₈-b/TOAB电极、GCE/O₂-PCE@ZnPAF₁₂-b/TOAB电极、GCE/O₂-PCE@ZnPAF₁₄-b/TOAB电极、GCE/O₂-PCE@ZnPAF₁₆-b/TOAB电极。

[0054] 实施例2:ECL信号检测

[0055] 将获得的GCE/O₂-PCE@ZnPAFn-b/TOAB(n=4、6、8、12、14、16)电极作为工作电极,铂丝电极为辅助电极,Ag/AgCl(饱和KCl)电极作为参比电极;设置电化学发光分析系统的参数为放大级数为3、在工作电极上施加-2到0V的电位、光电倍增管偏置电压为-600V、扫描速率为0.3V/s;实验中所用的ECL缓冲液为空气饱和的pH 7.4,10mM三羟甲基氨基甲烷(Tris(hydroxymethyl)aminomethane,Tris)缓冲液(含有0.3M氯化钾);在室温下分别记录GCE/O₂-PCE@ZnPAFn-b/TOAB(n=4、6、8、12、14、16)电极的ECL信号对比图和ECL-时间图。

[0056] 如图1所示,其中,图1中的(a)是GCE/O₂-PCE@ZnPAFn-b/TOAB (n=4、6、8、12、14、16) 电极的ECL信号对比图,具体测试结果可知,GCE/O₂-PCE@ZnPAFn-b/TOAB电极的ECL强度随着n增加而增强,即 $I_{ECL}(\text{ZnPAF}_4\text{-b}) < I_{ECL}(\text{ZnPAF}_6\text{-b}) < I_{ECL}(\text{ZnPAF}_8\text{-b}) < I_{ECL}(\text{ZnPAF}_{12}\text{-b}) < I_{ECL}(\text{ZnPAF}_{14}\text{-b}) < I_{ECL}(\text{ZnPAF}_{16}\text{-b})$,其中, $I_{ECL}(\text{ZnPAF}_4\text{-b})$ 表示ZnPAF₄-b的电化学发光强度, $I_{ECL}(\text{ZnPAF}_6\text{-b})$ 表示ZnPAF₆-b的电化学发光强度, $I_{ECL}(\text{ZnPAF}_8\text{-b})$ 表示ZnPAF₈-b的电化学发光强度, $I_{ECL}(\text{ZnPAF}_{12}\text{-b})$ 表示ZnPAF₁₂-b的电化学发光强度, $I_{ECL}(\text{ZnPAF}_{14}\text{-b})$ 表示ZnPAF₁₄-b的电化学发光强度, $I_{ECL}(\text{ZnPAF}_{16}\text{-b})$ 表示ZnPAF₁₆-b的电化学发光强度;图1中的(b)是GCE/O₂-PCE@ZnPAFn-b/TOAB (n=4、6、8、12、14、16) 电极的ECL-时间图,具体测试结果可知,在连续的10圈循环扫描过程中,其ECL发光强度均表现出优异的稳定性。

[0057] 由实施例2可知,GCE/O₂-PCE@ZnPAF₁₆-b/TOAB电极的ECL强度最大,所以实施例3采用PCE@ZnPAF₁₆-b制备自增强型电化学发光生物传感器。

[0058] 实施例3:自增强型电化学发光生物传感器的制备

[0059] (1)用0.05μm氧化铝悬浊液抛光打磨玻碳电极(GCE)以拥有光洁的镜面,然后电极在无水乙醇和去离子水中先后超声处理后,氮气吹干;

[0060] (2)将20uL 1mg/mL PCE@ZnPAF₁₆-b溶液滴在预处理的玻碳电极表面,待电极干燥后重复以上步骤,得到的修饰电极称为GCE/PCE@ZnPAF₁₆-b电极;

[0061] (3)将10μL 25mM四辛基溴化铵(TOAB)滴加在步骤(2)的电极表面,晾干后得到的修饰电极称为GCE/PCE@ZnPAF₁₆-b/TOAB修饰电极;

[0062] (4)将步骤(3)中的电极浸泡在1mg/mL链霉亲和素(SA)溶液。室温孵育1小时后,再用pH=7.4,10mM磷酸盐缓冲液冲洗以除去未结合的SA,得到的修饰电极称为GCE/PCE@ZnPAF₁₆-b/TOAB/SA电极;

[0063] (5)将步骤(4)中的电极浸泡在4mg/mL生物素化葡萄糖氧化酶(b-GOx)溶液中孵育1小时,然后用pH=7.4,10mM磷酸盐缓冲液再次淋洗得到的修饰电极称为GCE/PCE@ZnPAF₁₆-b/TOAB/SA/b-Gox电极;

[0064] (6)将步骤(5)中的电极置于充满氧气的小型气体罩内,使电极充氧后得到氧气(O₂)固定于电极表面,获得的修饰电极称为GCE/O₂-PCE@ZnPAF₁₆-b/TOAB/SA/b-Gox电极,又可以称为自增强型电化学发光生物传感器。

[0065] 所述生物素化葡萄糖氧化酶(b-GOx)是通过生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯连接在葡萄糖氧化酶上形成的。

[0066] 自增强型电化学发光生物传感器制备的具体过程如图2所示。

[0067] 电化学交流阻抗(Electrochemiluminescent electrical impedance,EIS)常被用于电极修饰过程界面变化的表征,图3表示电极修饰过程中阻抗变化情况。从图3中可知,与裸电极相比,PCE@ZnPAF₁₆-b修饰电极表现出一个大的阻抗,表明PCE@ZnPAF₁₆-b的覆盖阻碍了电极/电解质界面处的电子转移。为了使电极更稳定,而后,修饰上TOAB后,阻抗值急剧增大,说明TOAB阻碍电子从铁氰化钾和亚铁氰化钾的氧化还原探针转移到电极表面。随后,SA和b-GOx层层修饰在电极上,阻抗图上半圆弧直径逐层增大,即表明阻抗值也逐渐变大,这是归因于蛋白质分子的绝缘特性。最后,将修饰电极充氧后,阻抗值明显变小。表明葡萄糖生物传感器携带氧后能够有效地改善修饰电极的电子传输能力。从阻抗变化情况可以看出,自增强型电化学发光生物传感器的组装过程是成功的。

[0068] 实施例4:葡萄糖检测

[0069] (1) 将自增强型电化学发光生物传感器作为工作电极,铂丝电极为辅助电极,Ag/AgCl(饱和KCl)电极作为参比电极;

[0070] (2) 设置电化学发光分析系统的参数为为放大级数为3、在工作电极上施加-2到0V的电位、光电倍增管偏置电压为-800V、扫描速率为0.3V/s;

[0071] (3) 实验中所用的ECL缓冲液为空气饱和的pH 7.4,10Mm Tris缓冲液(含有0.3M氯化钾);

[0072] (4) 在ECL缓冲液中加入不同浓度的葡萄糖,使得物质的浓度梯度为0~12mM,然后在室温下进行测量。

[0073] 如图4所示,图4中的(a)为检测葡萄糖获得的ECL-浓度图,自增强型电化学发光生物传感器的ECL信号强度随着葡萄糖浓度的增加而减少,这是由于固定化葡萄糖氧化酶在催化葡萄糖的过程竞争性消耗氧气,导致产生的单线态氧减少,从而使ECL光强减弱。图4中的(b)为检测葡萄糖获得的线性曲线图,在0.1mM-10mM范围内,自增强型电化学发光生物传感器的ECL信号的减少与葡萄糖的浓度呈现较好的线性关系,可以定量检测葡萄糖的浓度,线性方程为 $I_{ECL} = -626.06C_{glu} + 9223.52$,相关系数为 $R^2 = 0.991$,其线性检测范围为0.1mM-10mM,检测下限达到62 μ M,说明该ECL电化学生物传感器可以实现对葡萄糖的宽线性和高灵敏度检测。

[0074] 上述得到的线性方程是通过拟合出来的,即在软件在输入数据点后,选择线性拟合曲线,得到线性方程;相关系数 R^2 是各个原始数据点偏离拟合曲线相对偏差,也表示该拟合曲线的可信度; I_{ECL} 为自增强型电化学发光生物传感器在不同浓度的葡萄糖溶液的ECL信号; C_{glu} 为葡萄糖的浓度。

[0075] 0.1mM-10mM的检测范围,在工业和生活中有很多的实际应用。例如,正常人血液中的葡萄糖水平在4.4至6.6mmol \cdot L⁻¹之间,在0.1mM-10mM的检测范围内,即可以检测人血液中的葡萄糖水平。

[0076] 实施例5:抗干扰性

[0077] 配置浓度为4.5mM的葡萄糖标准溶液,分别加入0.1mM的抗坏血酸、尿酸、半胱氨酸、果糖、蔗糖和柠檬酸作为葡萄糖的干扰物质,本实施例与实施例4不同的是步骤(4)中选择4.5mM的葡萄糖标准溶液进行干扰性检测。检测结果如图5所示,干扰物质对传感器检测葡萄糖的ECL信号基本无影响,表明该传感器对葡萄糖具有良好的抗干扰性。

[0078] 该传感器对葡萄糖具有良好的抗干扰性,可以应用于临床诊断、生物技术和食品工业。

[0079] 实施例6:血清样品中的葡萄糖的测定

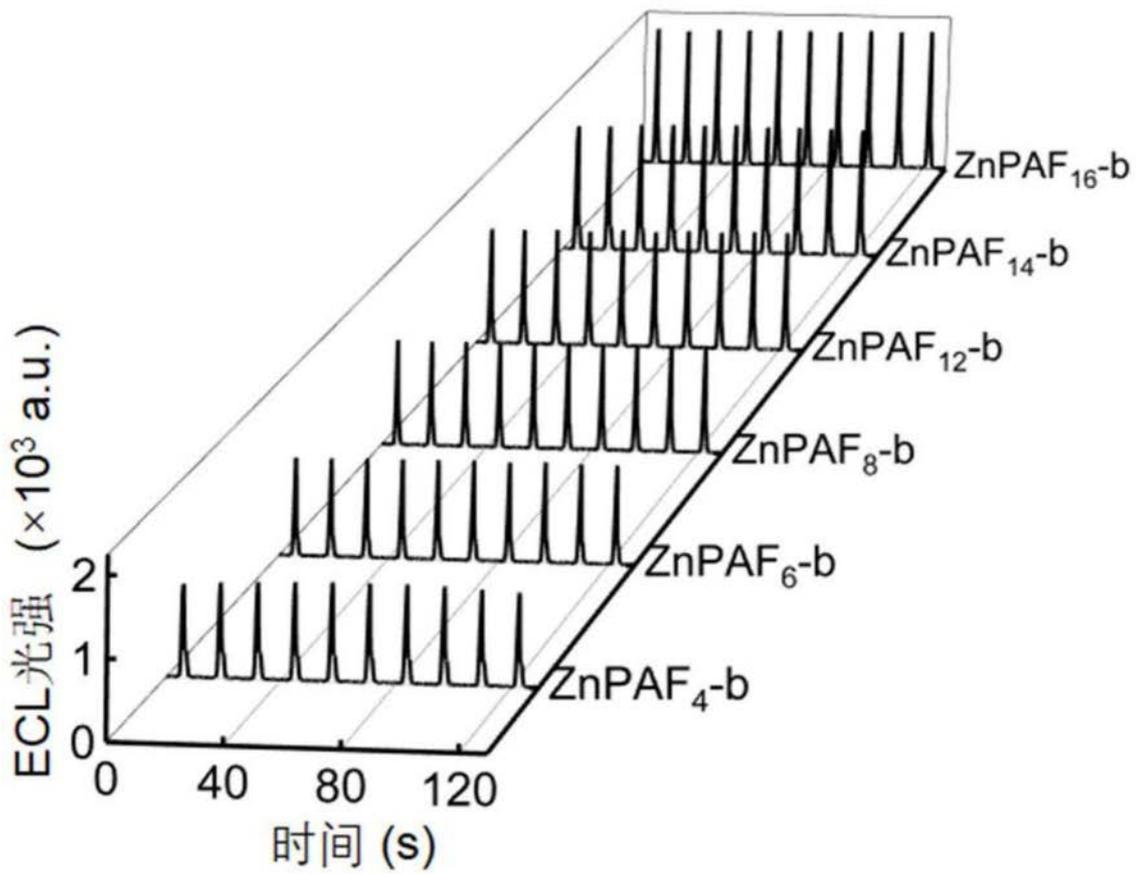
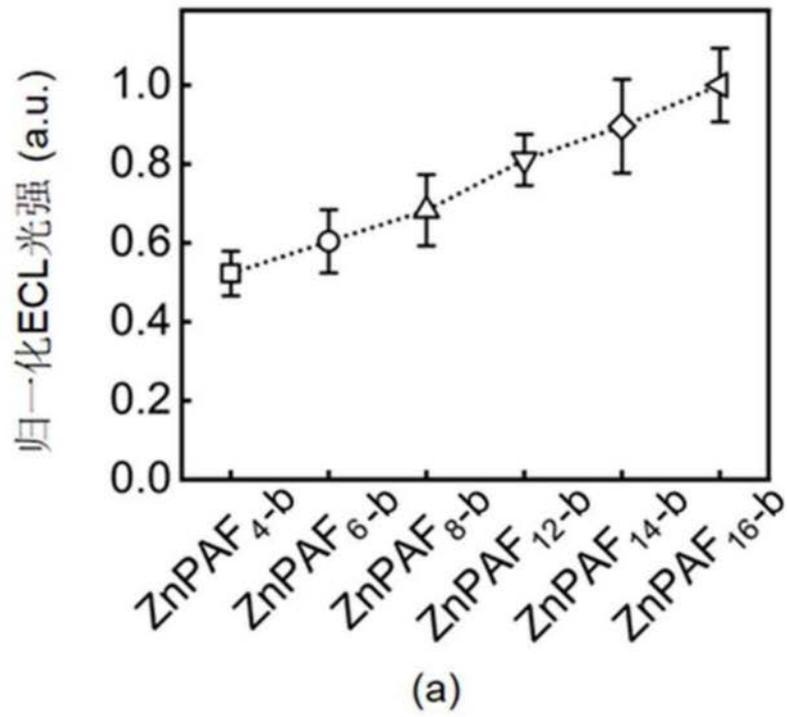
[0080] 为了确定所制备的自增强型电化学发光生物传感器的实用性,利用所开发的生物传感器和标准添加法测定了几种不同浓度的葡萄糖溶液。本实施例与实施例4不同的是步骤(4)中选择不同浓度的葡萄糖作为待测样品。具体检测结果见图6,回收率为94.04%至102.97%,表明所提出的生物传感器具有良好的回收率。这些结果证实,该自增强型电化学发光生物传感器具有实际应用的价值。

[0081] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明保护的范围之内。

[0082] 以上实施例仅用于说明本发明的设计思想和特点,其目的在于使本领域内的技术人员能够了解本发明的内容并据以实施,本发明的保护范围不限于上述实施例。所以,凡依据本发明所揭示的原理、设计思路所作的等同变化或修饰,均在本发明的保护范围之内。

[0083] 本领域技术人员在考虑说明书及实践这里公开的内容后,将容易想到本申请的其它实施方案。本申请旨在涵盖本申请的任何变型、用途或者适应性变化,这些变型、用途或者适应性变化遵循本申请的一般性原理并包括本申请未公开的本技术领域中的公知常识或惯用技术手段。说明书和实施例仅被视为示例性的。

[0084] 应当理解的是,本申请并不局限于上面已经描述并在附图中示出的精确结构,并且可以在不脱离其范围进行各种修改和改变。



(b)

图1

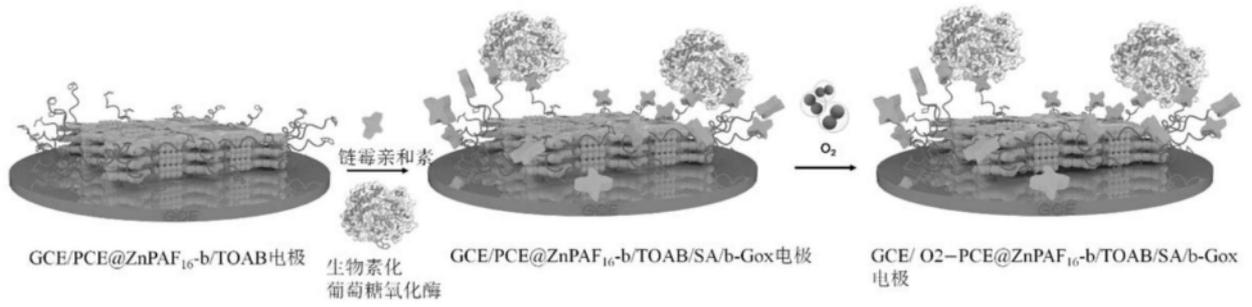
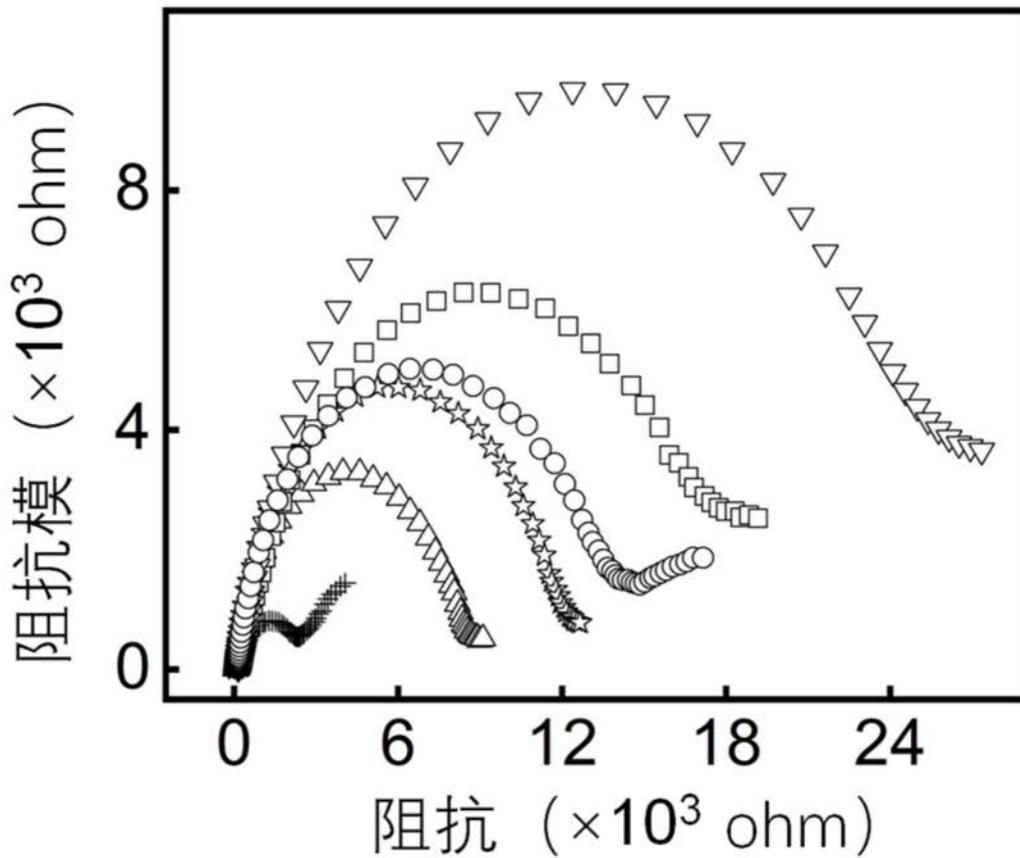


图2



- + 裸电极
- △ GCE/PCE@ZnPAF₁₆-b
- ☆ GCE/PCE@ZnPAF₁₆-b/TOAB
- GCE/PCE@ZnPAF₁₆-b/TOAB/SA
- ▽ GCE/PCE@ZnPAF₁₆-b/TOAB/SA/b-Gox
- GCE/O₂-PCE@ZnPAF₁₆-b/TOAB/SA/b-Gox

图3

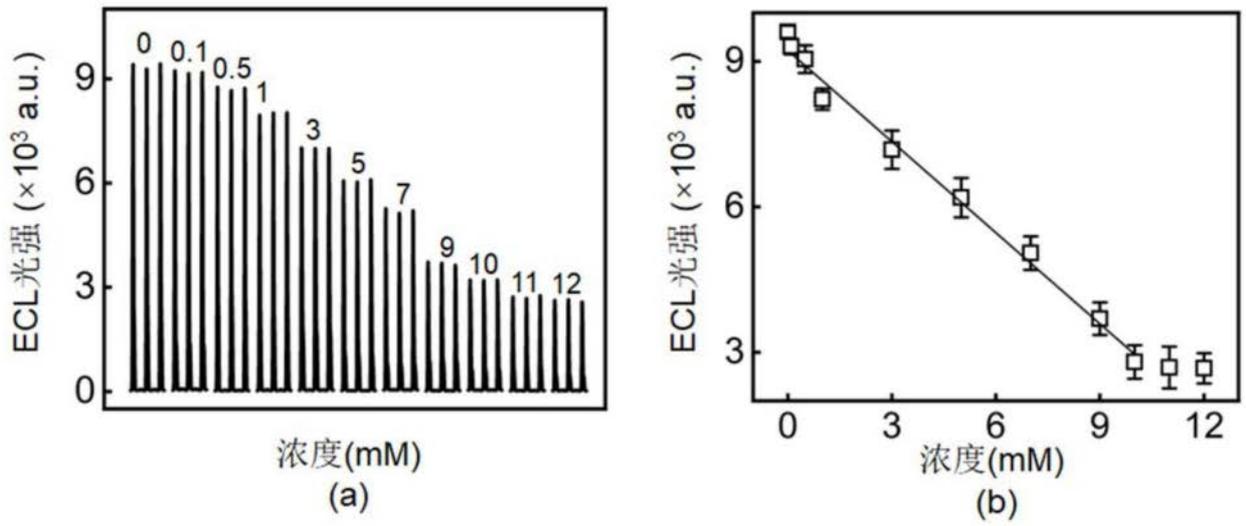


图4

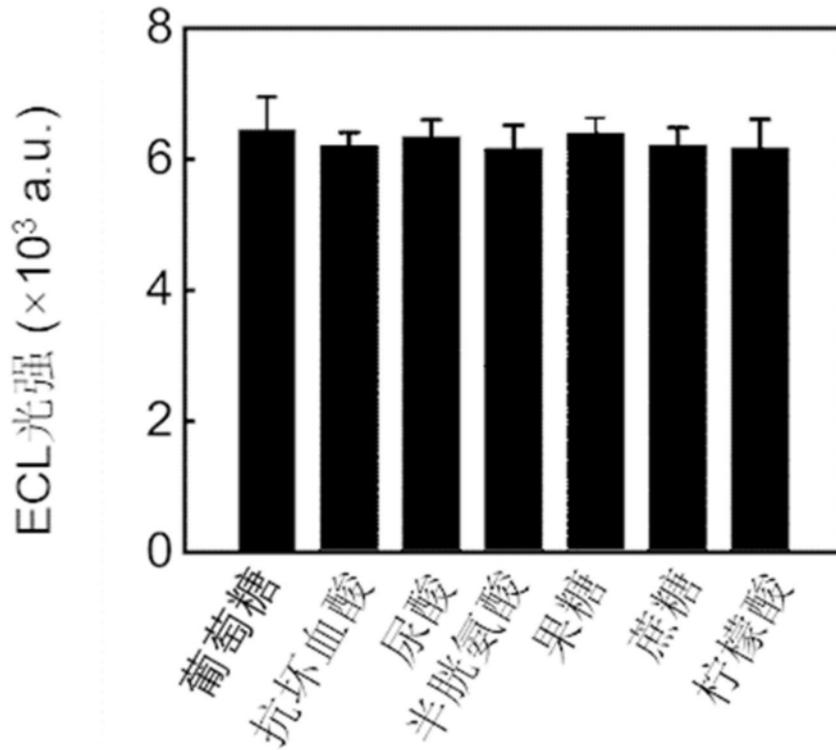


图5

样本	添加量(mM)	检测值(mM)	回收率(%)	相对标准偏差(%)
1	3.00	3.19	94.04	3.15
2	5.00	5.10	98.04	1.86
3	9.00	8.74	102.97	4.37

图6