(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108845119 A
(43)申请公布日 2018.11.20

(21)申请号 201810328983.X

(22)申请日 2018.04.13

(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 高超民 薛洁 于海瀚 葛慎光 于京华

(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 33/53(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)
G01N 27/327(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页

(54)发明名称

一种基于载流子双向调控策略的光致电化学免疫传感器的构建方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于电子空穴双向调控策略构建的超灵敏光致电化学免疫传感器的构建方法。钙钛矿材料Bi_4NbO_8Cl，作为高效的可见光光活性材料，同时引入了电子传输层和空穴传输层的概念。构建了三维枝状TiO_2/Bi_4NbO_8Cl/Co-Pi光电极，在光照下，Bi_4NbO_8Cl光生电子被TiO_2快速抽取，空穴被Co-Pi有效富集，实现载流子的彻底分离，从而光电流得到极大的提高，最终实现传感器灵敏度提高的目的。

CN 108845119 A

1.一种基于光生载流子双向调控策略的超灵敏光致电化学免疫传感器的构建方法，其特征在于该方法包括以下步骤：

(1)制备枝状二氧化钛纳米棒(Branched TiO_2 nanorods)：第一步：将10 mL盐酸加入到10 mL超纯水中，室温下磁力搅拌10 min，并将适量的钛酸四正丁酯溶液加入至上述溶液中，磁力搅拌30 min；将得到的混合溶液转移至高压反应釜的聚四氟乙烯内衬中，并将清洗好的掺杂氟的SnO_2透明导电玻璃，简写为FTO，以导电面向下的方式放入聚四氟乙烯内衬中，最后将反应釜放入预热的150 ℃烘箱内恒温反应；反应完毕后，将高压釜自然冷却至室温，取出样品，用超纯水和乙醇彻底清洗，然后放入真空干燥箱中60 ℃干燥8 h得到二氧化钛纳米棒样品。

第二步：量取适量盐酸加入到盛有20 mL超纯水的烧杯中并且在室温下磁力搅拌10 min，量取适量三氯化钛溶液加入到上述溶液中，室温下磁力搅拌10 min，将上述生长有二氧化钛纳米棒的FTO以导电面向上的方式放入所得的混合溶液中，并用保鲜膜封口烧杯，置于80 ℃烘箱中反应一定时间，最终得到Branched TiO_2 nanorods (B-TiO_2 NRs)，反应完毕后将FTO取出，用超纯水和乙醇彻底清洗，然后放入真空干燥箱中60 ℃干燥8 h；最后，将样品放入500 ℃马弗炉中煅烧2 h以提高其结晶度。

(2)制备Bi_4NbO_8Cl钙钛矿材料：称取适量的Bi_2O_3, BiOCl和Nb_2O_5放于清洗干净的坩埚中，将其混合均匀，放入管式炉中，700 ℃煅烧24 h以固态反应得到Bi_4NbO_8Cl材料。

(3)制备B-TiO_2/Bi_4NbO_8Cl/Co-Pi光电极：称取适量的步骤(2)中得到的Bi_4NbO_8Cl材料，加入到盛有超纯水的烧杯中，得到悬浊液；滴管量取一定量悬浊液以步骤(1)中得到的B-TiO_2为基底，通过旋涂的方法得到B-TiO_2/Bi_4NbO_8Cl复合材料；以30mL 0.1摩尔磷酸钾和硝酸钴溶液为电解液，通过光致电沉积技术修饰实现在B-TiO_2/Bi_4NbO_8Cl复合材料表面修饰Co-Pi。

(4)构建光致电化学免疫传感器：将10~50 μL 0.5 mg/mL壳聚糖滴加到B-TiO_2/Bi_4NbO_8Cl/Co-Pi光电极表面，室温孵育4 h，用1 M NaOH和超纯水分别清洗3次，将10~40 μL戊二醛滴加至电极表面，室温孵育1 h，用超纯水彻底清洗3次。0~50 μL 0.5 mg/mL β-human chorionic gonadotrophin (β-HCG)抗体溶液滴加到活化的电极表面，在4 ℃下孵育6 h，用pH 7.4 PBS彻底清洗，继续滴加20 mL 3%的牛血清白蛋白封堵非特异性结合位点，用pH 7.4 PBS彻底冲洗3次，最后，0~50 μL不同浓度的β-HCG抗原溶液滴加到电极表面，37 ℃孵育2 h，并用pH 7.4 PBS溶液清洗。

(5)光致电化学免疫检测：在由步骤(5)中得到的B-TiO_2/Bi_4NbO_8Cl/Co-Pi光电极、铂对电极和Ag/AgCl参比电极组成的三电极体系中进行光电流信号检测，检测方法为时间-电流曲线法，外加电压为0.0 V，激发波长范围为100-800 nm，激发光源开关的间隔为20 s，检测溶液为经过通氮气除氧的10 mL含有0.01 M 过氧化氢的pH 7.4 PBS溶液，随着β-HCG抗原浓度的增加，光电流信号逐渐降低，通过β-HCG抗原浓度与光电流信号之间的定量关系可以实现对β-HCG抗原的检测。

2.根据权利要求1所述的一种基于光生载流子双向调控策略的超灵敏光致电化学免疫传感器的构建方法，其特征在于步骤(1)中钛酸四正丁酯溶液的体积为0.1~10 mL；第二步中盐酸的体积为0.1~20 mL，三氯化钛溶液的体积为0.1~20 mL，第二步的反应时间为30~180 min。

3.根据权利要求1所述的一种基于光生载流子双向调控策略的超灵敏光致电化学免疫传感器的构建方法，其特征在于步骤(2)中Bi_2O_3，BiOCl和Nb_2O_5的质量分别为1~30 g，1~20 g，和1~20 g。

4.根据权利要求1所述的一种基于光生载流子双向调控策略的超灵敏光致电化学免疫传感器的构建方法，其特征在于步骤(3)中Bi_4NbO_8Cl的质量为1~10 g，量取的悬浊液的体积为0.1~10 mL。

一种基于载流子双向调控策略的光致电化学免疫传感器的构建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及光致电化学免疫传感器中的载流子分离新机理，更具体地说是基于光生载流子定向调控策略构建的超灵敏光致电化学免疫传感器。

背景技术

[0002] 光致电化学分析(PEC)是一种新发展的用于生物检测的分析技术，具有良好的应用前景。在PEC检测中，光被用于激发电极上的活性物质，光电流被用作检测信号而收集，PEC传感器结合了光激发与电化学检测，具有光学方法和电化学传感器的优点。由于激发与检测是彼此分离的资源，PEC分析方法的灵敏性可以与低背景信号的电化学发光相媲美。众所周知，PEC传感器的光电流密度大小直接决定了传感器的灵敏度，亦即，光活性材料的载流子分离效率对PEC传感器的灵敏度有直接关系。光活性材料的电子空穴分离过程为：当光活性材料吸收比其禁带宽度能量大的光时会被激发产生电子-空穴对，产生的电子空穴更倾向于复合，降低光电流密度，从而影响传感器的灵敏度。因此，促进光生电子空穴有效分离阻止其复合对提高传感器灵敏度来说具有重要意义。

[0003] 目前，促进载流子有效分离的策略主要为采用具有异质结构的复合材料代替单一光活性材料作为光电极，异质结构的存在可以促进光生电子的有效分离，在一定程度上可以提高光电流密度。但是，由于缺乏用于传输光生空穴的空穴传输材料的存在，空穴会在光活性材料的价带积累，不利于电子空穴的有效分离。基于此，我们提出了电子空穴双向调控策略，即引入电子传输层和空穴传输层，形成电子传输层/光活性吸光层/空穴传输层的光电极，当吸光层吸收能量比其禁带宽度大的能量时，激发产生电子空穴，由于电子传输层和吸光层的导带位置相匹配，以及其良好的亲电子能力，电子会被电子传输层快速抽取；空穴会被空穴传输层富集，从而实现光生电子空穴流向不同方向的彻底有效分离，最终实现光电流密度的极大提高和传感器灵敏度提高的目的。

[0004] 光活性材料，作为PEC免疫传感器中很重要的组成部分，其种类对电流密度以及传感器灵敏度有很大影响。截至目前，许多光活性材料被合成并应用于传感器中，例如，TiO_2，ZnO，CdS等半导体。有机无机卤化钙钛矿材料，具有强的光吸收，带隙可调，长的扩散长度，高的载流子迁移率等特性，在太阳能电池领域得到广泛应用。但是有机无机卤化钙钛矿材料由于其在水相中快速分解而无法在分析检测中应用。Bi_4NbO_8Cl (Eg=2.39 eV)，作为一种Sillen-Aurivillius晶型的钙钛矿材料，广泛用在光催化裂解水方面，可以在水中稳定存在。然而，Bi_4NbO_8Cl很少用于分析检测领域，我们将其用于PEC检测体系中作为可见光吸光材料。

[0005] TiO_2，作为一种n型半导体材料，在钙钛矿太阳能电池领域中被广泛用作电子传输层材料，同时，其具有与Bi_4NbO_8Cl相匹配的导带位置和优异的亲电子能力。因此，三维枝状TiO_2纳米阵列材料(B-TiO_2 NRs)被制备用作电子传输层。磷酸钴(Co-Pi)，具有优异的空穴传输能力，因此选择其为空穴传递材料。因此，我们首次构建了电子传输层/吸光层/空穴传

输层结构的$TiO_2/Bi_4NbO_8Cl/Co-Pi$光电极，在该电极中，TiO_2作为电子的高速传输媒介可以实现快速运输电子，Bi_4NbO_8Cl作为可见光吸光层吸收光能，Co-Pi作为空穴传输材料可以快速抽取Bi_4NbO_8Cl产生的空穴，避免空穴的积累。当Bi_4NbO_8Cl被光激发产生电子空穴时，产生的电子会途径TiO_2电子传输层迅速传至外电路，空穴被Co-Pi富集，最终被消耗，该电极可以实现电子空穴的有效分离，从而实现提高电流密度及PEC传感器灵敏度的目的，并且首次用于PEC分析检测体系实现对β-人绒毛促性腺激素(β-human chorionic gonadotrophin)的超灵敏检测。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种基于光生载流子双向调控策略的超灵敏光致电化学免疫传感器的构建方法，其特征在于该方法包括以下步骤：

(1)制备枝状二氧化钛纳米棒(Branched TiO_2 nanorods)：第一步：将10 mL盐酸加入到10 mL超纯水中，室温下磁力搅拌10 min，并将适量的钛酸四正丁酯溶液加入至上述溶液中，磁力搅拌30 min；将得到的混合溶液转移至高压反应釜的聚四氟乙烯内衬中，并将清洗好的掺杂氟的SnO_2透明导电玻璃，简写为FTO，以导电面向下的方式放入聚四氟乙烯内衬中，最后将反应釜放入预热的150 ℃烘箱内恒温反应；反应完毕后，将高压釜自然冷却至室温，取出样品，用超纯水和乙醇彻底清洗，然后放入真空干燥箱中60 ℃干燥8 h得到二氧化钛纳米棒样品。

[0007] 第二步：量取适量盐酸加入到盛有20 mL超纯水的烧杯中并且在室温下磁力搅拌10 min，量取适量三氯化钛溶液加入到上述溶液中，室温下磁力搅拌10 min，将上述生长有二氧化钛纳米棒的FTO以导电面向上的方式放入所得的混合溶液中，并用保鲜膜封口烧杯，置于80 ℃烘箱中反应一定时间，最终得到Branched TiO_2 nanorods (B-TiO_2 NRs)，反应完毕后将FTO取出，用超纯水和乙醇彻底清洗，然后放入真空干燥箱中60 ℃干燥8 h；最后，将样品放入500 ℃马弗炉中煅烧2 h以提高其结晶度。

[0008] (2)制备Bi_4NbO_8Cl钙钛矿材料：称取适量的Bi_2O_3, BiOCl和Nb_2O_5放于清洗干净的坩埚中，将其混合均匀，放入管式炉中，700 ℃煅烧24 h以固态反应得到Bi_4NbO_8Cl材料。

[0009] (3)制备B-$TiO_2/Bi_4NbO_8Cl/Co-Pi$光电极：称取适量的步骤(2)中得到的Bi_4NbO_8Cl材料，加入到盛有超纯水的烧杯中，得到悬浊液；滴管量取一定量悬浊液以步骤(1)中得到的B-TiO_2为基底，通过旋涂的方法得到B-TiO_2/Bi_4NbO_8Cl复合材料；以30mL 0.1摩尔磷酸钾和硝酸钴溶液为电解液，通过光致电沉积技术修饰实现在B-TiO_2/Bi_4NbO_8Cl复合材料表面修饰Co-Pi。

[0010] (4)构建光致电化学免疫传感器：将10~50 μL 0.5 mg/mL壳聚糖滴加到B-$TiO_2/Bi_4NbO_8Cl/Co-Pi$光电极表面，室温孵育4 h，用1 M NaOH和超纯水分别清洗3次，将10~40 μL戊二醛滴加至电极表面，室温孵育1 h，用超纯水彻底清洗3次。0~50 μL 0.5 mg/mL β-human chorionic gonadotrophin (β-HCG)抗体溶液滴加到活化的电极表面，在4 ℃下孵育6 h，用pH 7.4 PBS彻底清洗，继续滴加20 mL 3%的牛血清白蛋白封堵非特异性结合位点，用pH 7.4 PBS彻底冲洗3次，最后，0~50 μL不同浓度的β-HCG抗原溶液滴加到电极表面，37 ℃孵育2 h，并用pH 7.4 PBS溶液清洗。

[0011] (5)光致电化学免疫检测：在由步骤(5)中得到的B-$TiO_2/Bi_4NbO_8Cl/Co-Pi$光电极、

铂对电极和Ag/AgCl参比电极组成的三电极体系中进行光电流信号检测，检测方法为时间-电流曲线法，外加电压为0.0 V，激发波长范围为100-800 nm，激发光源开关的间隔为20 s，检测溶液为经过通氮气除氧的10 mL含有0.01 M 过氧化氢的pH 7.4 PBS溶液，随着β-HCG抗原浓度的增加，光电流信号逐渐降低，通过β-HCG抗原浓度与光电流信号之间的定量关系可以实现对β-HCG抗原的检测。

[0012] 步骤(1)中钛酸四正丁酯溶液的体积为0.1~10 mL；第二步中盐酸的体积为0.1~20 mL，三氯化钛溶液的体积为0.1~20 mL，第二步的反应时间为30~180 min。

[0013] 步骤(2)中Bi_2O_3, BiOCl和Nb_2O_5的质量分别为1~30 g, 1~20 g，和1~20 g。

[0014] 步骤(3)中Bi_4NbO_8Cl的质量为1~10 g，量取的悬浊液的体积为0.1~10 mL。

具体实施方式

[0015] 为了进一步说明构建一种基于光生载流子双向调控策略的超灵敏光致电化学免疫传感器的方法，本实施例按照本发明技术方案进行实施，给出具体的实施方式：将10 mL盐酸加入到10 mL超纯水中，室温下磁力搅拌10 min，并将适量的钛酸四正丁酯溶液加入该混合溶液中并且磁力搅拌30 min；将得到的混合溶液转移至高压反应釜的聚四氟乙烯内衬中，并将清洗好的掺杂氟的SnO_2透明导电玻璃，简写为FTO，以导电面向下的方式放入聚四氟乙烯内衬中，最后将反应釜放入预热的150 ℃烘箱内恒温反应；反应完毕后，将高压釜自然冷却至室温，取出样品，用超纯水和乙醇彻底清洗，然后放入真空干燥箱中60 ℃干燥8 h得到二氧化钛纳米棒样品；量取适量盐酸加入到盛有20 mL超纯水的烧杯中并且在室温下磁力搅拌10 min，量取适量三氯化钛溶液加入到上述溶液中，室温下磁力搅拌10 min，将生长有二氧化钛纳米棒的FTO以导电面向上的方式放入所得的混合溶液中，并用保鲜膜封口烧杯，置于80 ℃烘箱中反应30~180 min，最终得到B-TiO_2纳米材料，反应完毕后将FTO取出，用超纯水和乙醇彻底清洗，然后放入真空干燥箱中60 ℃干燥8 h，最后，将样品放入500 ℃马弗炉中煅烧2 h以提高其结晶度；称取Bi_2O_3, BiOCl和Nb_2O_5的质量分别为1~30 g, 1~20 g，和1~20 g，放于清洗干净的坩埚中，将其混合均匀，放入管式炉中，700 ℃煅烧24 h以得到Bi_4NbO_8Cl材料。称取1~10 g合成的Bi_4NbO_8Cl材料，加入到盛有超纯水的烧杯中，得到悬浊液；滴管量取0.1~10 mL悬浊液溶液，以B-TiO_2为基底，通过旋涂的方法得到B-TiO_2/Bi_4NbO_8Cl复合材料，以30mL 0.1摩尔磷酸钾和硝酸钴溶液为电解液，通过光致电沉积技术修饰实现在B-TiO_2/Bi_4NbO_8Cl复合材料表面修饰Co-Pi。

[0016] (5)构建光致电免疫传感器：将10~50 μL 0.5 mg/mL壳聚糖滴加到B-TiO_2/Bi_4NbO_8Cl/Co-Pi光电极表面，室温孵育4 h，用1 M NaOH和超纯水分别清洗3次，10~40 μL戊二醛滴加至电极表面，室温孵育1 h，用超纯水彻底清洗3次。0~50 μL 0.5 mg/mL β-HCG 抗体溶液滴加到活化的电极表面，在4 ℃下孵育6 h，用pH 7.4 PBS彻底清洗，继续滴加20 mL 3%的牛血清白蛋白封堵非特异性结合位点，用pH 7.4 PBS彻底冲洗3次，最后，0~50 μL不同浓度的β-HCG抗原溶液滴加到电极表面，37 ℃孵育2 h，并用pH 7.4 PBS溶液清洗。

[0017] (6)光致电化学免疫检测：在由步骤(5)中得到的B-TiO_2/Bi_4NbO_8Cl/Co-Pi光电极、铂对电极和Ag/AgCl参比电极组成的三电极体系中进行光电流信号检测，检测方法为时间-电流曲线法，外加电压为0.0 V，激发波长范围为100-800 nm，激发光源开关的间隔为20 s，检测溶液为经过通氮气除氧的10 mL含有0.01 M 过氧化氢的pH 7.4 PBS溶液，随着β-HCG

抗原浓度的增加，光电流信号逐渐降低，通过β-HCG抗原浓度与光电流信号之间的定量关系可以实现对β-HCG抗原的检测。