



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101285774 B

(45) 授权公告日 2010.06.09

(21) 申请号 200810071137.0

(22) 申请日 2008.05.27

(73) 专利权人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明南路 422 号

(72) 发明人 陈曦 王旭东 陈海旭 王小茹

(74) 专利代理机构 厦门南强之路专利事务所

35200

代理人 马应森

for multi-sample determination

of biochemical oxygen demand (BOD). Sensors and Actuators B110 2. 2005, 110(2), 289-298.

戴媛静等. 基于氧猝灭的有机改性溶胶-凝胶微生物传感器测定 BOD 的研究. 环境科学学报 23 5. 2003, 23(5), 683-688.

审查员 姚正阳

(51) Int. Cl.

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/48(2006.01)

C12Q 1/00(2006.01)

(56) 对比文件

JP 特开平 10-318965 A, 1998.12.04, 全文.

CN 1584554 A, 2005.02.23, 全文.

Nga-Yan Kwok 等. An optical biosensor

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

一类可视化氧传感检测的生物传感器的制备方法

(57) 摘要

一类可视化氧传感检测的生物传感器的制备方法,涉及一种生物传感器。提供一种具有成本低、灵敏度高、分辨率好、准确度高等特点的可视化氧传感检测的生物传感器的制备方法。将四乙氧基硅烷、3-氨基丙基-三甲氧基硅烷、超纯水和甲醇混匀,加入绿色量子点溶液和 Cd 前驱体溶液,于玻璃片上涂膜得发光稳定的量子点层。将四甲氧基硅烷和二甲基二甲氧基硅烷加入 HCl 加热,取下层凝胶液与 PtF20TPP 的四氢呋喃溶液混合,涂布于量子点层上成膜。将 TMOS 与 DiMe-DMOS 混匀,加入 HCl 水溶液,水解留下层凝胶液;将聚乙烯醇水溶液和凝胶液混合,取上层液体与溶解有微生物或酶的磷酸盐缓冲液混合,于氧传感层表面均匀涂膜成型。

1. 一类可视化氧传感检测的生物传感器的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 制备发光稳定的量子点层:

将四乙氧基硅烷、3-氨基丙基-三甲氧基硅烷、超纯水和甲醇按体积比 1 : 8.8 : 20 : 101.3 的比例混匀,取 13.10mL 于容器中,搅拌;将容器封口,在封口上穿孔,将该容器置于恒温箱中,然后加入绿色量子点溶液和镉前驱体溶液,得混合液,将混合液置于恒温箱中保存,于玻璃片上均匀涂膜,再置于恒温箱中干燥,得发光稳定的量子点层;

2) 量子点层表面氧传感敏感层的铺设:

将四甲氧基硅烷和二甲基二甲氧基硅烷按体积比 1 : 1.8 的比例量取,振荡加入与 TMOS 同体积的 0.01mol/LHCl,密封,再置于 55 ~ 65°C 磁搅拌水浴加热,反应后溶液下层呈乳白胶状;静置,取下层凝胶液与浓度为 2.0g/L 的发红色荧光的 PtF₂₀TPP 的四氢呋喃溶液按体积比 4 : 1 混合,均匀涂布于上述制备的量子点层上成膜,干燥备用;

3) 固定微生物或者酶构筑微生物传感器:

将 TMOS 与 DiMe-DMOS 按体积比 1 : 1.2 混匀,再加入与 TMOS 同体积的 0.01mol/L 的 HCl 水溶液,将混合液置于 55 ~ 65°C 水浴中搅拌水解,反应后溶液下层呈乳白胶状;静置,留下层凝胶液备用;将 5% (W/V) 的聚乙烯醇水溶液和凝胶液按体积比 1 : 1 混合,静置后,取上层液体与溶解有微生物或酶的磷酸盐缓冲液按体积比 1 : 1 混合,于氧传感层表面均匀涂膜,干燥成型,得基于氧传感检测的可视化微生物传感器。

2. 如权利要求 1 所述的一类可视化氧传感检测的生物传感器的制备方法,其特征在于在步骤 1) 中,所述绿色量子点溶液的浓度按摩尔比为 $10^{-5} \sim 10^{-3}$ mol/L。

3. 如权利要求 1 所述的一类可视化氧传感检测的生物传感器的制备方法,其特征在于在步骤 1) 中,所述镉前驱体溶液为 0.3mL 与量子点溶液浓度相同的镉前驱体溶液。

4. 如权利要求 3 所述的一类可视化氧传感检测的生物传感器的制备方法,其特征在于在步骤 1) 中,镉前驱体溶液的制备方法为将 CdCl₂ 和巯基乙酸按摩尔比为 1 : 2.4 混匀,使用 1.0mol/LNaOH 调节溶液 pH 为 9 ~ 11,即得镉前驱体溶液。

5. 如权利要求 1 所述的一类可视化氧传感检测的生物传感器的制备方法,其特征在于在步骤 1) 中,所述混合液置于 28 ~ 35°C 恒温箱中避光保存 3 ~ 5h 后,于玻璃片上均匀涂膜,置于 28 ~ 35°C 恒温箱中避光干燥,得发光稳定的量子点层。

6. 如权利要求 1 所述的一类可视化氧传感检测的生物传感器的制备方法,其特征在于在步骤 2) 中,所述振荡采用超声振荡 1 ~ 3min 后,再逐滴振荡加入与 TMOS 同体积的 0.01mol/LHCl。

7. 如权利要求 1 所述的一类可视化氧传感检测的生物传感器的制备方法,其特征在于在步骤 2) 中,磁搅拌水浴加热的时间为 2 ~ 3h,静置的时间为 3 ~ 5min,干燥的温度为 55 ~ 65°C,干燥的时间 24h。

8. 如权利要求 1 所述的一类可视化氧传感检测的生物传感器的制备方法,其特征在于在步骤 3) 中,所述的微生物为耗氧微生物,所述的酶为氧化酶。

一类可视化氧传感检测的生物传感器的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物传感器,尤其是涉及一种可视化氧传感检测的生物传感器的制备方法。

背景技术

[0002] 氧传感器在海洋学、气象学、生物学、环境科学和生命科学等领域有着广泛的应用。目前大多数的氧传感器都是基于压力、电化学和光化学等实现定量的氧含量测定,测定过程需要大型的科学仪器辅助、繁琐复杂的数据采集和处理过程,不仅检测成本较高,而且需要专业的技术人员,限制了此类传感器在实时在线检测和日常生活中的应用。Evans 等人 (AnalChem. 2006, 78, 5645-5652 ;Journal of Fluorescence. 2006, 16, 201-206) 报道了使用比色法进行氧含量检测的研究工作,第一次实现了不需要任何科学仪器的快速可视化的氧含量测定。由于所研制的传感器呈现出的颜色和氧浓度的对应关系复杂,仍需要复杂的数据处理过程。Kato 等人 (Chemistry Letters. 2007, 36, 1310-1311) 利用具有特殊荧光特性的卟啉衍生物 TPPS (5, 10, 15, 20-tetraphenyl-21H, 23H-porphinetetrasulfonic acid) 一定程度上解决了上述问题,但所制备的传感器的灵敏度和检测范围有较大的局限性。同时,两个研究小组所研制的传感器的分辨率较低,所使用的有机染料无法被单一波长的光源同时激发,较难根据不同的需求实现可视化的多色氧传感检测。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于针对现有的比色氧传感器存在灵敏度较低,检测范围存在较大局限性等问题,提供一种具有成本低、灵敏度高、分辨率好、准确度高等特点,可实现对待测物的可视化快速测定的可视化氧传感检测的生物传感器的制备方法。

[0004] 本发明包括以下步骤:

[0005] 1) 制备发光稳定的量子点层:

[0006] 将四乙氧基硅烷 (TEOS)、3-氨基丙基-三甲氧基硅烷 (APTMS)、超纯水 (电阻 18.2M Ω) 和甲醇按体积比 1 : 8.8 : 20 : 101.3 的比例混匀,取 13.10mL 于容器中,搅拌;将容器封口,在封口上穿几个小孔,将该容器置于恒温箱中,然后加入绿色量子点溶液和 Cd 前驱体溶液,得混合液,将混合液置于恒温箱中保存,于玻璃片上均匀涂膜,再置于恒温箱中干燥,得发光稳定的量子点层。

[0007] 2) 量子点层表面氧传感敏感层的铺设:

[0008] 将四甲氧基硅烷 (TMOS) 和二甲基二甲氧基硅烷 (DiMe-DMOS) 按体积比 1 : 1.8 的比例量取,振荡加入与 TMOS 同体积的 0.01mol/L HCl,密封,再置于 55 ~ 65 $^{\circ}$ C 磁搅拌水浴加热,反应后溶液下层呈乳白胶状;静置,取下层凝胶液与浓度为 2.0g/L 的发红色荧光的 PtF₂₀TPP ($\lambda_{em, max} = 648nm$) 的四氢呋喃溶液按体积比 4 : 1 混合,均匀涂布于上述制备的量子点层上成膜,干燥备用;

[0009] 3) 固定微生物或者酶等构筑微生物传感器:

[0010] 将 TMOS 与 DiMe-DMOS 按体积比 1 : 1.2 混匀,再加入与 TMOS 同体积的 0.01mol/L 的 HCl 水溶液,将混合液置于 55 ~ 65°C 水浴中搅拌水解,反应后溶液下层呈乳白胶状;静置,留下层凝胶液备用;将 5% (W/V) 的聚乙烯醇水溶液和上述凝胶液按体积比 1 : 1 混合,静置后,取上层液体与溶解有微生物或酶的磷酸盐缓冲液按体积比 1 : 1 混合,于上述制备的氧传感层表面均匀涂膜,干燥成型,得基于氧传感检测的可视化微生物传感器。

[0011] 在步骤 1) 中,所述搅拌的时间最好为 1 ~ 2h,容器封口可采用封口膜,恒温箱的温度最好为 28 ~ 35°C,恒温的时间最好为 45 ~ 55h,所述绿色量子点溶液最好为按摩尔比 1mL 浓度为 10^{-5} ~ 10^{-3} mol/L 的绿色量子点溶液,所述镉 (Cd) 前驱体溶液最好为 0.3mL 与量子点溶液浓度相同的镉 (Cd) 前驱体溶液,镉 (Cd) 前驱体溶液的制备方法可将 CdCl₂ 和巯基乙酸按摩尔比为 1 : 2.4 混匀,使用 1.0mol/L NaOH 调节溶液 pH 为 9 ~ 11,即得镉 (Cd) 前驱体溶液。所述混合液置于 28 ~ 35°C 恒温箱中避光保存 3 ~ 5h 后,于玻璃片上均匀涂膜,置于 28 ~ 35°C 恒温箱中避光干燥,得发光稳定的量子点层。

[0012] 在步骤 2) 中,所述振荡可采用超声振荡 1 ~ 3min 后,再逐滴振荡加入与 TMOS 同体积的 0.01mol/L HCl。磁搅拌水浴加热的时间最好为 2 ~ 3h。静置的时间最好为 3 ~ 5min,干燥的温度最好为 55 ~ 65°C,干燥的时间最好 24h。

[0013] 在步骤 3) 中,聚乙烯醇水溶液的分子量最好为 124000。所述的微生物或酶为耗氧微生物或各种氧化酶(如葡萄糖氧化酶,乙醇氧化酶等)。

[0014] 本发明制备的可视化生物传感器具有成本低、稳定性好、灵敏度高、分辨率高、准确度高等特点,在不借助任何科学仪器的情况下可实现待测物快速准确、实时在线的可视化检测,极大地方便了此类传感器在日常生活和科学研究中的应用。其原理是发绿光的量子点层在不同氧浓度下具有非常好的稳定性,其荧光强度不随氧浓度的变化而变化,而发红色荧光的氧传感层对氧浓度变化非常敏感,其荧光强度可通过不同的氧浓度进行可逆地调节,通过两种不同强度的光混合出不同颜色的复合光,在此基础上,在氧传感层上再铺设包埋有耗氧菌或氧化酶的膜,从而实现对不同待测物的可视化检测。

具体实施方式

[0015] 以下实施例将对本发明作进一步的说明。

[0016] 实施例 1

[0017] 将 TEOS、APTMS、超纯水和甲醇按体积比 1 : 8.8 : 20 : 101.3 的比例混匀,取 13.10mL 于聚四氟乙烯烧杯中,室温搅拌 1h;使用封口膜将聚四氟乙烯烧杯封口,在封口膜上穿几个小孔,以利于甲醇挥发,将该聚四氟乙烯烧杯置于 30°C 恒温箱中 48h;然后加入 1mL 浓度为 2×10^{-3} mol/L 的绿色量子点溶液和 0.3mL Cd 前驱体溶液(将 CdCl₂ 和巯基乙酸按摩尔比为 1 : 2.4 混匀,超纯水稀释到浓度为 2×10^{-3} mol/L,使用 1.0mol/L NaOH 调节溶液 pH 为 9,得 Cd 前驱体溶液),将混合液置于 30°C 恒温箱中避光保存 4h 后,取 40 μ L 于玻璃片(48 × 12.4 × 0.9, mm) 上均匀涂膜,置于 30°C 恒温箱中避光干燥,得发光稳定的量子点层。

[0018] 将 TMOS 和 DiMe-DMOS 按体积比 1 : 1.8 的比例量取于小瓶中,超声振荡 1min 后,再逐滴振荡加入与 TMOS 同体积的 0.01mol/L HCl,密封,将小瓶置于 60°C 磁搅拌水浴加热 3h。反应后溶液下层呈乳白胶状;静置 3min,取下层凝胶液与浓度为 2.0g/L 的发红色荧光

的 $\text{PtF}_{20}\text{TPP}$ 的四氢呋喃溶液按体积比 4 : 1 混合,取 $50\ \mu\text{L}$ 均匀涂布于上述制备的量子点层上成膜,于 60°C 烘箱中干燥 24h 后备用。得可视化光学氧传感器。

[0019] 实施例 2

[0020] 将 TEOS、APTMS、超纯水和甲醇按体积比 1 : 8.8 : 20 : 101.3 的比例混匀,取 13.10mL 于聚四氟乙烯烧杯中,室温搅拌 1h;使用封口膜将聚四氟乙烯烧杯封口,在封口膜上穿几个小孔,以利于甲醇挥发,将该聚四氟乙烯烧杯置于 30°C 恒温箱中 48h;然后加入 1mL 浓度为 $2 \times 10^{-5}\text{mol/L}$ 的绿色量子点溶液和 0.3mL Cd 前驱体溶液(将 CdCl_2 和巯基乙酸按摩尔比为 1 : 2.4 混匀,超纯水稀释到浓度为 $2 \times 10^{-5}\text{mol/L}$,使用 1.0mol/L NaOH 调节溶液 pH 为 10,得 Cd 前驱体溶液),将混合液置于 30°C 恒温箱中避光保存 4h 后,取 $60\ \mu\text{L}$ 于玻璃片 ($48 \times 12.4 \times 0.9, \text{mm}$) 上均匀涂膜,置于 30°C 恒温箱中避光干燥,得发光稳定的量子点层。

[0021] 将 TMOS 和 DiMe-DMOS 按体积比 1 : 1.8 的比例量取于小瓶中,超声振荡 1min 后,再逐滴振荡加入与 TMOS 同体积的 0.01mol/L HCl,密封,将小瓶置于 60°C 磁搅拌水浴加热 3h。反应后溶液下层呈乳白胶状;静置 3min,取下层凝胶液与浓度为 2.0g/L 的发红色荧光的 $\text{PtF}_{20}\text{TPP}$ 的四氢呋喃溶液按体积比 4 : 1 混合,取 $40\ \mu\text{L}$ 均匀涂布于上述制备的量子点层上成膜,于 60°C 烘箱中干燥 24h 后备用。

[0022] 将 TMOS 与 DiMe-DMOS 按体积比 1 : 1.2 混匀;再加入与 TMOS 同体积的 0.01mol/L 的 HCl 水溶液;将混合液置于小瓶中,加带小孔的盖子,于 60°C 水浴中搅拌水解;反应后溶液下层呈乳白胶状;静置 3min,留下层凝胶液备用;将 5% (W/V) 的 PVA 水溶液和上述凝胶液按体积比 1 : 1 混合,静置 3min 后,取上层液体 $500\ \mu\text{L}$ 与 $500\ \mu\text{L}$ 耗氧微生物的磷酸盐缓冲液混合,于上述制备的氧传感层表面均匀涂膜,干燥成型,得基于氧传感检测的可视化 BOD 微生物传感器。

[0023] 实施例 3

[0024] 将 TEOS、APTMS、超纯水和甲醇按体积比 1 : 8.8 : 20 : 101.3 的比例混匀,取 13.10mL 于聚四氟乙烯烧杯中,室温搅拌 1h;使用封口膜将聚四氟乙烯烧杯封口,在封口膜上穿几个小孔,以利于甲醇挥发,将该聚四氟乙烯烧杯置于 30°C 恒温箱中 48h;然后加入 1mL 浓度为 $5 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 的绿色量子点溶液和 0.3mL Cd 前驱体溶液(将 CdCl_2 和巯基乙酸按摩尔比为 1 : 2.4 混匀,超纯水稀释到浓度为 $5 \times 10^{-4}\text{mol/L}$,使用 1.0mol/L NaOH 调节溶液 pH 为 11,得 Cd 前驱体溶液),将混合液置于 30°C 恒温箱中避光保存 4h 后,取 $50\ \mu\text{L}$ 于玻璃片 ($48 \times 12.4 \times 0.9, \text{mm}$) 上均匀涂膜,置于 30°C 恒温箱中避光干燥,得发光稳定的量子点层。

[0025] 将 TMOS 和 DiMe-DMOS 按体积比 1 : 1.8 的比例量取于小瓶中,超声振荡 1min 后,再逐滴振荡加入与 TMOS 同体积的 0.01mol/L HCl,密封,将小瓶置于 60°C 磁搅拌水浴加热 3h。反应后溶液下层呈乳白胶状;静置 3min,取下层凝胶液与浓度为 2.0g/L 的发红色荧光的 $\text{PtF}_{20}\text{TPP}$ 的四氢呋喃溶液按体积比 4 : 1 混合,取 $40\ \mu\text{L}$ 均匀涂布于上述制备的量子点层上成膜,于 60°C 烘箱中干燥 24h 后备用。

[0026] 将 TMOS 与 DiMe-DMOS 按体积比 1 : 1.2 混匀;再加入与 TMOS 同体积的 0.01mol/L 的 HCl 水溶液;将混合液置于小瓶中,加带小孔的盖子,于 60°C 水浴中搅拌水解;反应后溶液下层呈乳白胶状;静置 3min,留下层凝胶液备用;将 5% (W/V) 的 PVA 水溶液和上述凝

胶液按体积比 1 : 1 混合,静置 3min 后,取上层液体 500 μ L 与 500 μ L 溶解有葡萄糖氧化酶的磷酸盐缓冲液混合,于上述制备的氧传感层表面均匀涂膜,干燥成型,得基于氧传感检测的可视化葡萄糖传感器。