



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111965231 B

(45) 授权公告日 2022. 08. 02

(21) 申请号 202010762909.6

(22) 申请日 2020.07.31

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111965231 A

(43) 申请公布日 2020.11.20

(73) 专利权人 华中科技大学
地址 430074 湖北省武汉市洪山区珞喻路
1037号
专利权人 华中科技大学同济医学院附属协和
医院

(72) 发明人 刘欢 陈建军 李华曜 胡志响
赵雨农 李龙 苏虎音 刘竞尧
龙文博

(74) 专利代理机构 华中科技大学专利中心
42201
专利代理师 许恒恒 李智

(51) Int.Cl.

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 27/48 (2006.01)

G01N 27/27 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 109906375 A, 2019.06.18

CN 104897906 A, 2015.09.09

CN 105044346 A, 2015.11.11

CN 109932507 A, 2019.06.25

CN 111273014 A, 2020.06.12

Jiubiao Guo 等. A photoelectrochemical biosensor for rapid and ultrasensitive norovirus detection.

《Bioelectrochemistry》. 2020, 第136卷第107591页.

审查员 马慧媛

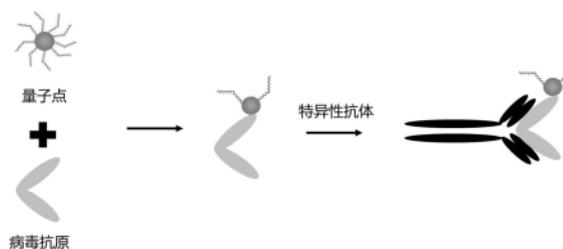
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于病毒检测的半导体传感器及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明属于生化传感技术领域,公开了一种用于病毒检测的半导体传感器及其制备方法与应用,其中制备方法包括以下步骤:(1)准备氧化物或硫族化合物胶体半导体纳米材料;(2)在胶体半导体纳米材料表面包被病毒特异性抗原或抗体,得到敏感材料;(3)基于所述敏感材料,采用化学修饰电极或场效应晶体管等器件结构制备病毒检测传感器。本发明通过在胶体半导体纳米材料表面引入病毒特异性抗原或抗体,将病毒抗原抗体之间的特异性结合反应引起的电荷转移通过半导体敏感效应转换为传感器电信号输出,提高病毒检测技术的实时性与便捷性。



1. 一种用于病毒检测的半导体传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 准备胶体半导体纳米材料;所述胶体半导体纳米材料的某一个维度尺寸为1~100 nm,表面有亲水或疏水配体,能够稳定分散在水或有机溶剂中;

(2) 在所述胶体半导体纳米材料表面包被病毒特异性抗原或抗体,这些病毒抗原或抗体能够对目标种类的病毒标志物产生特异性结合反应,从而得到对目标种类的病毒标志物具有特异性结合反应的敏感材料;

(3) 采用滴涂、旋涂、或喷涂打印成膜工艺将所述敏感材料涂覆在化学修饰电极、叉指电极、悬臂梁、声表面波器件、或场效应晶体管栅极上以构建病毒检测传感器;

并且,所述步骤(2)中,在所述胶体半导体纳米材料的表面包被病毒抗原或抗体,具体是采用交联法或配体交换法,该步骤是在所述胶体半导体纳米材料形成的水基溶液中完成的;

其中,所述交联法具体为先在胶体半导体纳米材料表面修饰巯基丙酸、巯基乙胺、或半胱氨酸形成羧基或氨基封端的亲水配体,然后使用戊二醛、琥珀酰亚胺-4-环己烷-1-碳酸酯或1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐作为交联剂将病毒抗原或抗体包被在半导体纳米材料表面;所述配体交换法是将病毒抗原或抗体溶液直接与胶体半导体纳米材料在溶液中混合进行置换反应,使病毒抗原或抗体直接取代胶体半导体纳米材料表面的有机配体从而包被在半导体纳米材料表面。

2. 如权利要求1所述制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中,所述胶体半导体纳米材料中的基体半导体纳米材料,具体为氧化物或硫族化合物的胶体量子点、纳米线、纳米片、纳米带或它们的复合结构。

3. 如权利要求2所述制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中,所述胶体半导体纳米材料中的基体半导体纳米材料,具体为硫化铅量子点、硫化亚锡量子点、硫化锌量子点、氧化锡量子点、氧化钨量子点、氧化锌量子点、氧化锡纳米线、硫化铅纳米线、硫化铋纳米带、硫化钼纳米片或硫化锡纳米片。

4. 如权利要求1所述制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中,包被病毒抗原或抗体后还需进行表面封闭,并进一步纯化;

其中,所述表面封闭步骤是采用牛血清白蛋白将半导体纳米材料表面以及交联剂表面的非特异性蛋白质结合位点进行封闭;

所述纯化处理步骤用超滤离心管将样品浓缩纯化3~5次,经离心洗涤后将终产物复溶于磷酸盐缓冲液中。

5. 一种用于病毒检测的半导体传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 准备胶体半导体纳米材料;所述胶体半导体纳米材料的某一个维度尺寸为1~100 nm,表面有亲水或疏水配体,能够稳定分散在水或有机溶剂中;

(2) 采用滴涂、旋涂、或喷涂打印成膜工艺将所述胶体半导体材料涂覆在化学修饰电极、叉指电极、悬臂梁、声表面波器件、或场效应晶体管栅极上形成半导体纳米薄膜;

(3) 在所述半导体纳米薄膜表面包被病毒特异性抗原或抗体,这些病毒抗原或抗体能够对目标种类的病毒标志物产生特异性结合反应,从而获得对目标种类的病毒标志物具有特异性识别的半导体传感器;

所述步骤(3)中,在半导体纳米材料的表面包被病毒抗原或抗体具体是采用交联法或

配体交换法；

其中,所述交联法具体为先在半导体纳米薄膜表面修饰巯基丙酸、巯基乙胺、或半胱氨酸形成羧基或氨基封端的亲水配体,然后使用戊二醛、琥珀酰亚胺-4-环己烷-1-碳酸酯或1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐作为交联剂将病毒抗原或抗体包被在半导体纳米薄膜表面;所述配体交换法是将病毒抗原或抗体溶液滴加在薄膜表面进行置换反应,使病毒抗原或抗体直接取代胶体半导体纳米材料表面的有机物配体从而包被在半导体纳米薄膜表面。

6.如权利要求5所述制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中,包被病毒抗原或抗体后还需进行表面封闭;

其中,所述表面封闭步骤是采用牛血清白蛋白将半导体纳米薄膜表面以及交联剂表面的非特异性蛋白质结合位点进行封闭。

7.利用如权利要求1—6任意一项所述制备方法制备得到的病毒检测传感器。

8.如权利要求7所述病毒检测传感器在制备手持式病毒检测仪或集成于智能终端中的应用。

9.如权利要求8所述应用,其特征在于,所述智能终端为智能手机。

10.如权利要求8所述应用,其特征在于,所述手持式病毒检测仪或智能终端能够用于SARS-CoV-2新型冠状病毒检测。

一种用于病毒检测的半导体传感器及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生化传感技术领域,更具体地,涉及一种用于病毒检测的半导体传感器及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 快速、准确、易于普及的病毒检测技术对于实现病毒感染人群的早发现、早隔离、早诊断、早治疗具有重要意义。以SARS-CoV-2新型冠状病毒为例,因其传染性强,引起大规模人群感染事件。目前,新型冠状病毒检测方法主要分为针对病毒核酸的直接检测方法与针对人体血清抗体的间接检测方法。核酸检测作为病毒感染确诊标准方法之一,主要通过鼻咽或口咽拭子方法取得患者上呼吸道分泌物样本,利用实时荧光定量PCR(聚合酶链式反应)技术实现对样本中的病毒核糖核酸(RNA)的检测。核酸检测操作复杂,检测时间长,对采样和检测人员技能以及实验室生物安全资质有特殊要求。

[0003] 与核酸检测相比,基于病毒抗原抗体特异性结合反应的病毒检测技术更加快速、便捷,适用于多种样本,如血清、唾液等,可降低对检测人员和实验室的要求,显著提高检测效率。以新冠病毒抗体检测为例,目前应用最为广泛现场检测手段是胶体金免疫层析试剂盒,主要针对血清和尿液样本中的IgM(免疫球蛋白M)和IgG(免疫球蛋白G)抗体以及在呼吸道唾液粘膜分泌物中的IgA(免疫球蛋白A)抗体检测。中国发明专利申请公开了基于尿液检测的新冠病毒抗体(IgG/IgM)胶体金免疫层析快速检测试纸条。在检测试纸上直接滴加2滴待测尿液,15分钟内通过肉眼即可判定结果。

[0004] 目前胶体金抗体检测技术主要利用胶体金显色并通过肉眼判断结果,不具有定量检测的能力,容易漏诊或误判。

[0005] 利用半导体传感器检测各种化学、生物分子的技术具有高灵敏、低成本、方便、快捷的优点,可以提高检测的实时性与便捷性。同时电学信号可采用数值显示,具有定量检测的功能。中国发明专利CN103675034A公开了一种以量子点作为气体敏感材料的半导体电阻式气体传感器及其制备方法,通过亚硝酸钠短链配体置换量子点表面长链有机配体,实现对低浓度NO₂气体分子的室温高灵敏检测。胶体量子点表面的短链配体对气体分子无特异性,不参与气体分子与量子点的反应,其作用主要是减少表面长链有机配体,暴露出更多气体分子吸附活性位点,同时缩短量子点间距提高载流子输运特性,传感器性能取决于气体分子直接在量子点表面原子发生吸附反应而引起传感器电阻值变化。

[0006] 上述胶体半导体纳米材料及其传感器主要用于气体小分子的检测,而目前用于生物大分子检测的胶体半导体纳米材料主要基于胶体量子点的荧光特性。胶体半导体纳米材料表面具有丰富的活性位点,物化特性易受到其表面原子组成和化学反应的影响,结合病毒特异性抗原或抗体的修饰,在病毒检测中具有潜在优势。

发明内容

[0007] 针对现有的病毒检测方法存在的检测时间长、便捷性不高、难以普及的问题,本发

明目的在于提供一种用于病毒检测的半导体传感器及其制备方法与应用,通过在胶体半导体纳米材料表面引入病毒特异性抗原或抗体,设计制备出基于电化学电极、场效应晶体管等结构的病毒检测传感器,将病毒抗原抗体之间的结合反应引起的电荷转移通过半导体敏感效应转换为传感器电信号输出,可同时现场检测抗原与抗体,提高病毒检测的实时性与便捷性,尤其适于无临床症状病毒感染者的现场快速筛查与大规模人群动态监测。

[0008] 为实现上述目的,按照本发明的一个方面,提供了一种用于病毒检测的半导体传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0009] (1) 准备胶体半导体纳米材料;

[0010] (2) 在所述胶体半导体纳米材料表面包被病毒特异性抗原或抗体,这些病毒抗原或抗体能够对目标种类的病毒标志物产生特异性结合反应,从而得到对目标种类的病毒标志物具有特异性结合反应的敏感材料;

[0011] (3) 采用滴涂、旋涂、或喷涂打印成膜工艺将所述敏感材料涂覆在化学修饰电极、叉指电极、悬臂梁、声表面波器件、或场效应晶体管电极上构建病毒检测传感器。

[0012] 作为本发明的进一步优选,所述步骤(1)中,所述胶体半导体纳米材料具体为氧化物或硫族化合物的胶体量子点、纳米线、纳米片、纳米带或它们的复合结构,优选为硫化铅量子点、硫化亚锡量子点、硫化锌量子点、氧化锡量子点、氧化钨量子点、氧化锌量子点、氧化锡纳米线、硫化铅纳米线、硫化铋纳米带、硫化钼纳米片或硫化锡纳米片。

[0013] 作为本发明的进一步优选,所述步骤(1)中,所述胶体半导体纳米材料的某一个维度尺寸为1~100nm,表面有亲水或疏水配体,能够稳定分散在水或有机溶剂中。

[0014] 作为本发明的进一步优选,所述步骤(2)中,在所述胶体半导体纳米材料的表面包被病毒抗原或抗体,具体是采用交联法或配体交换法,该步骤是在所述胶体半导体纳米材料形成的水基溶液中完成的;

[0015] 优选的,所述交联法具体为先在胶体半导体纳米材料表面修饰巯基丙酸、巯基乙胺、或半胱氨酸形成羧基或氨基封端的亲水配体,然后使用戊二醛、琥珀酰亚胺-4-环己烷-1-碳酸酯(SMCC)或1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)作为交联剂将病毒抗原或抗体包被在半导体纳米材料表面;所述配体交换法是将病毒抗原或抗体溶液直接与胶体半导体纳米材料在溶液中混合进行置换反应,使病毒抗原或抗体直接取代胶体半导体纳米材料表面的有机配体从而包被在半导体纳米材料表面。

[0016] 作为本发明的进一步优选,所述步骤(2)中,包被病毒抗原或抗体后还需进行表面封闭,并进一步纯化;

[0017] 优选的,所述表面封闭步骤是采用牛血清白蛋白(BSA)将半导体纳米材料表面以及交联剂表面的非特异性蛋白质结合位点进行封闭;

[0018] 优选的,所述纯化处理步骤用超滤离心管将样品浓缩纯化3~5次,经离心洗涤后,将终产物复溶于磷酸盐缓冲液中。

[0019] 按照本发明的再一方面,本发明提供了一种用于病毒检测的半导体传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0020] (1) 准备胶体半导体纳米材料;

[0021] (2) 采用滴涂、旋涂、或喷涂打印成膜工艺将所述胶体半导体材料涂覆在化学修饰电极、叉指电极、悬臂梁、声表面波器件、或场效应晶体管电极上形成半导体纳米薄膜;

[0022] (3) 在所述半导体纳米薄膜表面包被病毒特异性抗原或抗体, 这些病毒抗原或抗体能够对目标种类的病毒标志物产生特异性结合反应, 从而获得对目标种类的病毒标志物具有特异性识别的半导体传感器。

[0023] 作为本发明的进一步优选, 所述步骤 (3) 中, 在半导体纳米材料的表面包被病毒抗原或抗体具体是采用交联法或配体交换法;

[0024] 优选的, 所述交联法具体为先在半导体纳米薄膜表面修饰巯基丙酸、巯基乙胺、或半胱氨酸形成羧基或氨基封端的亲水配体, 然后使用戊二醛、琥珀酰亚胺-4-环己烷-1-碳酸酯 (SMCC) 或 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 作为交联剂将病毒抗原或抗体包被在半导体纳米薄膜表面; 所述配体交换法是将病毒抗原或抗体溶液滴加在薄膜表面进行置换反应, 使病毒抗原或抗体直接取代胶体半导体纳米薄膜表面的有机物配体从而包被在半导体纳米薄膜表面。

[0025] 优选的, 所述步骤 (3) 中, 包被病毒抗原或抗体后还需进行表面封闭; 所述表面封闭步骤是采用牛血清白蛋白 (BSA) 将半导体纳米薄膜表面以及交联剂表面的非特异性蛋白质结合位点进行封闭。

[0026] 按照本发明的另一方面, 本发明提供了利用上述制备方法制备得到的病毒检测传感器。

[0027] 按照本发明的又一方面, 本发明提供了上述病毒检测传感器在手持式病毒检测仪或集成于智能终端中的应用; 优选的, 所述智能终端为智能手机;

[0028] 更优选的, 所述病毒检测仪或智能终端用于 SARS-CoV-2 新型冠状病毒检测。

[0029] 通过本发明所构思的以上技术方案, 与现有技术相比, 现在的胶体金试纸条技术依赖双抗夹心方法, 两个抗体或者两个抗原的配对设计是一个难点, 需针对目标蛋白不同的表位设计抗原和筛选抗体, 而半导体传感器检测方案只需一种抗原或抗体, 从而可以简化技术工艺, 削减生产成本。本发明利用胶体半导体纳米材料表面抗原或抗体与病毒标志物的结合实现对病毒的检测, 胶体半导体纳米材料比表面积大、表面活性位点丰富, 物化特性易受到其表面原子组成和化学反应的影响, 病毒抗体与抗原的特异性结合反应会引起半导体纳米材料电学信号显著变化, 有利于提高检测结果的特异性与灵敏度, 同时采用化学修饰电极叉指电极、悬臂梁、声表面波器件、场效应晶体管结构, 实现信号转换与放大, 由于半导体传感器采用电信号进行读出, 相较于现有免疫层析技术依靠肉眼判断, 检测速度更快, 检测灵敏度和可靠性更高, 能够在同一时间、同一地点实现对新冠病毒抗原与抗体的原位协同检测, 具有更加准确、快速、高效且易于普及的特点。此外由于传感器体积小, 电学信号易于与信号传输装置集成, 同时基于悬臂梁、声表面波器件的传感器具有无线无源的优势, 可以远程读取检测信号, 提高病毒检测的可靠性与便捷性。病毒检测过程中可以实现医务人员与感染者非接触测试, 极大保障了检测的安全性, 可推广应用于社区、医院、公共场所的新冠病毒携带者快速筛查和大规模排查、临床诊断以及流行病学调查、疫苗开发等场景。

[0030] 本发明中的病毒传感器装置, 在应用时, 可以取血清、唾液或尿液样本加入磷酸盐缓冲液中, 随即滴加混合溶液于上述传感器上, 1~5 分钟内测试传感器的信号响应, 通过信号响应大小得到检测结果。本发明中目标种类的病毒标志物可以为 SARS-CoV-2 新型冠状病毒特异性抗体或抗原, 或者为流感病毒抗体或抗原; 本发明适用的目标种类的病毒尤其可以为 SARS-CoV-2 新型冠状病毒。本发明中涉及的抗原、抗体等生物材料均可以采用市售商

品,如普健生物(武汉)科技有限公司生产的新冠病毒抗原(ATMP02479COV(RBD))和新冠病毒抗体(ATMA10176Mo)等。

附图说明

[0031] 图1是胶体量子点表面修饰特定的病毒抗原检测病毒抗体示意图。

[0032] 图2是实施例1中的平面三电极采用积分脉冲伏安(DPV)模式检测新冠病毒抗体的结果。其中,△PBS标记的曲线为硫化铅修饰电化学传感器在磷酸盐(PBS)缓冲液中的DPV曲线,○抗体标记的曲线为在上述磷酸盐缓冲液中加入1μL新冠病毒标准抗体电化学传感器的DPV曲线,由图可知,加入抗体后,电流显著增加,表明新冠病毒抗原抗体特异性结合反应引起了电流峰值的增加。

具体实施方式

[0033] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。此外,下面所描述的本发明各个实施方式中所涉及到的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以相互组合。

[0034] 实施例1

[0035] (1) 制备硫化铅(PbS)量子点材料。具体地,取1.8g氧化铅,6mL OA,20mL十八烯(ODE)于三口烧瓶中高速搅拌,抽真空后将该前驱物温度升至120℃。在手套箱中用移液枪取280μL双(三甲基硅基)硫醚溶解到抽过真空的10ml ODE中,制备硫的前驱物。在氮气环境下将硫的前驱物快速注入到铅的前驱物中,反应30s后放入冷水浴中快速冷却。收集沉淀,用甲苯丙酮洗涤数次,离心收集沉淀,真空烘干得到PbS量子点。

[0036] (2) 将PbS量子点分散在正辛烷中得到浓度为10-50mg/mL的PbS胶体量子点溶液,用移液器取0.5μL上述PbS量子点滴到平面三电极的工作电极上,采用旋涂成膜的方式以260rpm的转速涂覆100s,重复上述步骤4次,室温下干燥10分钟后得到硫化铅量子点修饰的平面三电极。

[0037] (3) 将1μL商用标准抗原滴加并包覆在上述硫化铅量子点薄膜表面,在37℃环境下进行1小时抗原孵育处理。处理后,采用磷酸盐缓冲液对薄膜表面进行冲洗,移除表面剩余物质,得到抗原包被的硫化铅量子点薄膜。取200μL牛血清白蛋白溶液(10mg/mL的)滴加并包裹在抗原包被的硫化铅量子点薄膜表面,室温下浸润2小时对量子点表面进行封闭,然后采用磷酸盐缓冲液对薄膜表面进行冲洗,移除表面剩余物质,得到牛血清白蛋白封闭的硫化铅量子点薄膜。

[0038] (4) 在平面三电极表面滴加200μL磷酸盐缓冲液,1~5分钟内采用电化学工作站测试工作电极表面循环伏安特性、积分脉冲伏安特性和电化学阻抗谱。接着在上述200μL磷酸盐缓冲液中注入不同浓度的抗体溶液,分别进行循环伏安特性、积分脉冲伏安特性和电化学阻抗谱特性测试,通过记录电化学测试氧化还原峰值电流大小及阻抗大小判断抗体浓度。

[0039] 实施例2

[0040] (1) 制备硫化亚锡(SnS)量子点材料。具体地,取1mM氯化亚锡(SnCl_2),5mL油酸,

5mL十八烯于三口烧瓶中高速搅拌,并加热至120摄氏度抽真空30分钟,将该前驱物在氮气氛围以 $6^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 的升温速率将温度升至 150°C ,注入0.5mL 1-十二烷硫醇(DDT),继续加热到 180°C ,取1mM硫代乙酰胺溶解到2mL油胺制备硫的前驱物。在氮气环境下于 180°C 将硫的前驱物快速注入到锡的前驱物中,反应30min后冷却至室温。用乙醇洗涤数次,离心收集沉淀,真空烘干得到SnS量子点。

[0041] (2) 选用磷酸盐缓冲液,加入SnS量子点,加入3-巯基丙酸(3-MPA)置换掉量子点表面有机配体,然后使用EDC作为交联剂将可特异性检测病毒抗体的抗原包被在量子点表面,经离心洗涤后将终产物溶于磷酸盐缓冲液中。

[0042] (3) 选择电流体喷印成膜工艺将修饰有特定抗原的SnS量子点溶液涂覆在高电子迁移率晶体管(HEMT)的栅极上,室温下干燥得到量子点敏化的晶体管器件,采用半导体参数测试仪记录晶体管的输出特性。

[0043] (4) 取20 μL 血清样本加入100 μL 磷酸盐缓冲液中,随即滴加50 μL 磷酸盐缓冲液于量子点敏化场效应管传感器上,1~5分钟内测试晶体管输出特性,通过比较晶体管漏电流(I_D)变化大小判断病毒抗体的浓度。

[0044] 上述实施例仅以平面三电极、场效应晶体管为例,本发明还可以采用声表面波器件、共振悬臂梁、叉指电极等传感器结构实现信号转换与放大。胶体半导体纳米材料除了上述合成过程介绍外,可以采用现有技术中已知的其他合成方法进行合成,当然也可以直接采用市售的胶体半导体纳米材料。本专利中涉及的抗原、抗体等生物材料均可以采用市售商品,如普健生物(武汉)科技有限公司生产的新冠病毒抗原(ATMP02479COV(RBD))和新冠病毒抗体(ATMA10176Mo)等。

[0045] 本领域的技术人员容易理解,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作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

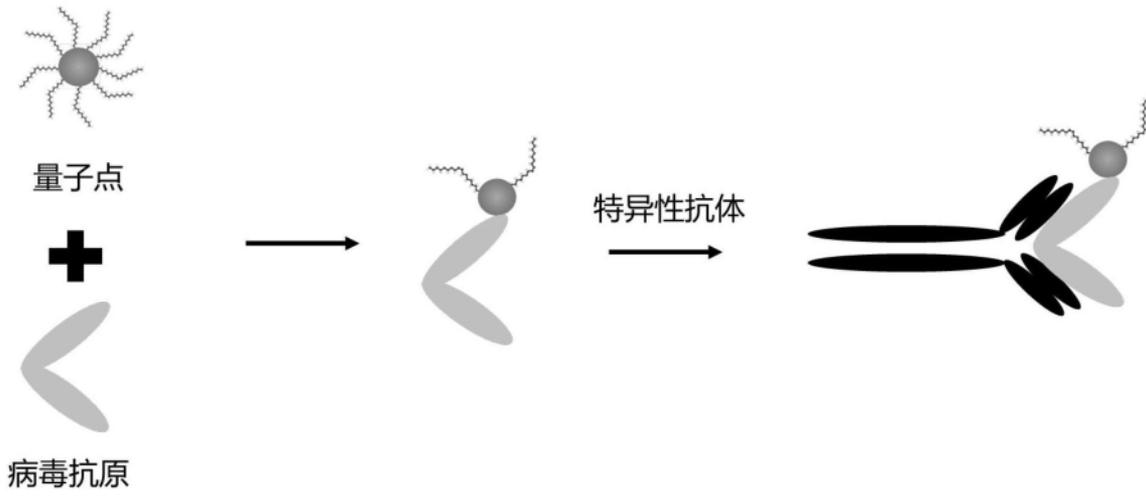


图1

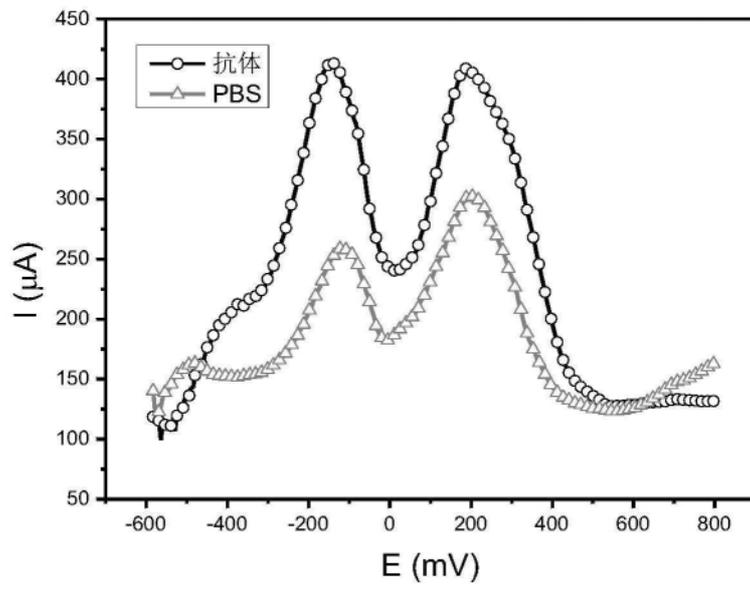


图2