

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 5 月 31 日 (31.05.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/095246 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 27/26 (2006.01) **G01N 27/327** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/110984

(22) 国际申请日: 2017 年 11 月 15 日 (15.11.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201611054808.3 2016 年 11 月 25 日 (25.11.2016) CN

(71) 申请人: 深圳大学 (SHENZHEN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。

(72) 发明人: 宋家俊 (SONG, Jiajun); 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。林鹏 (LIN, Peng); 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。刘丹 (LIU, Dan); 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。柯善明 (KE, Shanming); 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。曾燮榕

(ZENG, Xierong); 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。

(74) 代理人: 深圳市君胜知识产权代理事务所 (普通合伙) (JOHNSON INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY (SHENZHEN)); 中国广东省深圳市南山区麒麟路 1 号南山知识服务大楼 308-309 号, Guangdong 518052 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,

(54) Title: SALMONELLA SENSOR, PREPARATION METHOD, AND SALMONELLA CONCENTRATION DETECTION METHOD

(54) 发明名称: 沙门氏菌传感器、制备方法及沙门氏菌浓度的检测方法

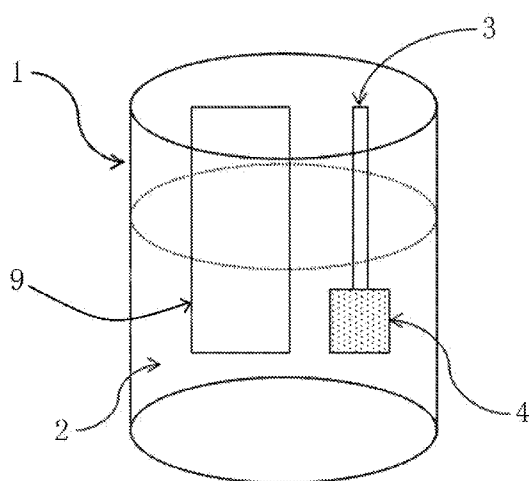


图 1

(57) Abstract: A salmonella sensor, a preparation method, and a salmonella concentration detection method. The salmonella sensor comprises an electrolytic tank (1), an electrolyte (2) disposed in the electrolytic tank (1), an organic electrochemical transistor (9) disposed in the electrolytic tank (1), and a gate electrode (3) disposed in the electrolytic tank (1). The organic electrochemical transistor (9) comprises a substrate (5), a source electrode (7) and a drain electrode (8) that are disposed on the substrate (5), and an organic semiconductor film layer (6) that is coated on the substrate (5) and that connects the source electrode (7) and the drain electrode (8). A photoelectric active semiconductor material (4) serving as a sensitive function layer of the sensor modifies the gate electrode (3), and an antibody used for being combined with salmonella is fixed on the gate electrode (3) modified by the photoelectric active semiconductor material (4). The salmonella sensor has an extremely-high sensitivity and an extremely-low detection limit, and the device is simple and is easy to microminaturize. By means of the salmonella concentration detection method based on the salmonella sensor, fast and simple high-sensitivity salmonella concentration detection can be implemented.



CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要：沙门氏菌传感器、制备方法及沙门氏菌浓度的检测方法，沙门氏菌传感器包括：电解池(1)，设置在电解池(1)内的电解液(2)，设置在电解池(1)内的有机电化学晶体管(9)，及设置在电解池(1)内的栅电极(3)；有机电化学晶体管(9)包括：衬底(5)，设置在衬底(5)之上的源电极(7)和漏电极(8)，及涂覆在衬底(5)之上连接源电极(7)和漏电极(8)的有机半导体薄膜层(6)；栅电极(3)上修饰有光电活性半导体材料(4)作为传感器的敏感功能层；修饰有光电活性半导体材料(4)的栅电极(3)上固定有用于与沙门氏菌结合的抗体。沙门氏菌传感器具有极高的灵敏度和极低的检测极限，且设备简单，易微型化。基于沙门氏菌传感器的沙门氏菌浓度的检测方法，可以实现快速、简便的高灵敏沙门氏菌浓度检测。

沙门氏菌传感器、制备方法及沙门氏菌浓度的检测方法

技术领域

本发明涉及生物传感技术领域，尤其涉及一种沙门氏菌传感器、制备方法及沙门氏菌浓度的检测方法。

背景技术

沙门氏菌属于革兰氏阴性菌，为一种肠道杆菌致病菌，是引起食物中毒的重要病原菌，其分布广泛，极易污染水源及各类食物，尤其是禽蛋肉类产品。在各类细菌性的食物中毒中，沙门氏菌引起的食物中毒的案例常年位居前列，近年来，我国沙门氏菌感染事件不断增加，一半以上的细菌性食物中毒是由沙门氏菌引起的，可见沙门氏菌污染已经严重威胁到了人类健康，制约了经济发展，因此，开发简便、准确、快速、灵敏的沙门氏菌检测技术对于保障食品安全和人类健康具有重大意义。

目前，检测沙门氏菌的方法主要有传统标准检测方法、分子生物学方法、免疫学方法、电阻抗法、沙门氏菌显色培养基法等，其中传统标准检测方法、分子生物学方法、免疫学方法为应用最为广泛的三种方法。传统标准检测方法需要预增菌，选择性增菌以及分离等许多复杂繁琐的步骤，全过程至少需要 4~7 天。显然，传统标准检测方法已无法满足快速检测沙门氏菌的要求。以分子生物学为基础的方法主要有扩增片段长度多态性技术(AFLP)、聚合酶链反应技术(PCR)核酸探针、基因芯片技术等，分子生物学方法检测快速且灵敏度高，但需要昂贵的仪器和熟练的技术人员，且样品的前处理较复杂，因此不适合现场实地的检测和监控。免疫方法包括酶联免疫吸附法(ELISA)、斑点酶联免疫吸附法(Dot-ELISA)、免疫磁性分离技术、免疫荧光标记法等，免疫学方法简便、快速、且灵敏度高，但检测低浓度目标物时易出现假阴性或假阳性的结果，且其结果解读需要一定的专业知识，不便于基层检测。

因此，现有技术还有待于改进和发展。

发明内容

鉴于上述现有技术的不足，本发明的目的在于提供一种沙门氏菌传感器、制

备方法及沙门氏菌浓度的检测方法,从而解决现有的沙门氏菌检测技术灵敏度低,设备昂贵,样品处理过程繁琐的问题。

本发明的技术方案如下:

一种沙门氏菌传感器,用于检测沙门氏菌的浓度,所述沙门氏菌传感器包括:电解池,设置在所述电解池内的电解液,设置在所述电解池内的有机电化学晶体管,及设置在所述电解池内的栅电极;所述有机电化学晶体管包括:衬底,设置在所述衬底之上的源电极和漏电极,及涂覆在衬底之上连接源电极和漏电极的有机半导体薄膜层;所述栅电极上修饰有光电活性半导体材料作为传感器的敏感功能层;修饰有光电活性半导体材料的栅电极上固定有用于与沙门氏菌结合的抗体。

所述的沙门氏菌传感器,其中,所述光电活性半导体材料为有机半导体材料、无机半导体材料或二者的组合。

所述的沙门氏菌传感器,其中,所述衬底是由玻璃、聚合物柔性材料或硅片制成。

所述的沙门氏菌传感器,其中,所述源电极、漏电极及栅电极是由金属材料、金属氧化物半导体材料、合金材料构成。

所述的沙门氏菌传感器,其中,所述有机半导体薄膜层由聚(3,4-乙烯二氧噻吩)-聚苯乙烯磺酸、聚吡咯、聚噻吩、聚苯胺、聚吡唑或者聚(3,4-乙烯二氧噻吩)-聚苯乙烯磺酸、聚吡咯、聚噻吩、聚苯胺、聚吡唑的两种或两种以上的共聚物中的至少一种构成。

所述的沙门氏菌传感器,其中,所述源电极和漏电极的厚度为 50-500nm;所述有机半导体薄膜层的厚度为 10-300nm。

一种如以上任一项所述的沙门氏菌传感器的制备方法,包括步骤:

A、彻底清洗衬底并干燥,在衬底上制备源电极和漏电极,在源电极和漏电极之间制备有机半导体薄膜层,得到有机电化学晶体管;

B、彻底清洗栅电极并干燥,在栅电极上修饰光电活性半导体材料作为传感器的敏感功能层,在修饰有光电活性半导体材料的栅电极上固定用于与沙门氏菌结合的抗体,得到固定有抗体的修饰后的栅电极;

C、将有机电化学晶体管和固定有抗体的修饰后的栅电极放置于装有电解液的电解池中,制得所述沙门氏菌传感器。

所述的沙门氏菌传感器的制备方法，其中，所述步骤 A 中，所述的源电极和漏电极是通过真空热蒸镀、磁控溅射或气相沉积中的一种方法制备；制备有机半导体薄膜层的方法为旋涂或喷墨印刷。

一种基于以上所述的沙门氏菌传感器的沙门氏菌浓度的检测方法，所述沙门氏菌浓度的检测方法包括：

在光照条件下，通过栅电极上的抗体与沙门氏菌的结合，使栅电极上的光电流变化，引起有机电化学晶体管的沟道电流的变化，通过测量有机电化学晶体管沟道电流的变化来实现对不同浓度沙门氏菌的检测。

所述的沙门氏菌浓度的检测方法，其中，所述沙门氏菌浓度的检测方法还包括：在沙门氏菌上修饰金纳米颗粒。

有益效果：本发明沙门氏菌传感器具有极高的灵敏度和极低的检测极限，且设备简单，易微型化。本发明基于所述沙门氏菌传感器的沙门氏菌浓度的检测方法，可以实现快速、简便的高灵敏沙门氏菌浓度检测。

附图说明

图 1 是本发明沙门氏菌传感器的整体结构示意图。

图 2 是本发明所述有机电化学晶体管的结构示意图。

图 3 为光照“关-开”下栅电极修饰有 CdS QDs 的器件的 I_{ds} -T 曲线。

图 4 为沙门氏菌（沙门氏菌浓度为 10^8 cells/ml）与抗体结合前后所测的 I_{ds} -T 曲线（a 为 CdS QDs 修饰的栅电极的 I_{ds} -T 曲线，b 为固定抗体在 CdS QDs 修饰的栅电极上的 I_{ds} -T 曲线，c 为沙门氏菌与抗体结合后的 I_{ds} -T 曲线）。

图 5 为采用光电化学分析方法测试不同浓度沙门氏菌的结果。

图 6 为基于位阻效应的沙门氏菌传感器测试不同浓度沙门氏菌的结果。

图 7 为基于激子—等离子体效应的沙门氏菌传感器测试不同浓度沙门氏菌的结果。

具体实施方式

本发明提供一种沙门氏菌传感器、制备方法及沙门氏菌浓度的检测方法，为使本发明的目的、技术方案及效果更加清楚、明确，以下对本发明进一步详细说明。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。

本发明提供一种用于检测沙门氏菌的浓度的沙门氏菌传感器，如图 1、图 2 所示，包括：电解池 1，设置在所述电解池 1 内的电解液 2，设置在所述电解池 1 内的有机电化学晶体管 9，及设置在所述电解池内的栅电极 3；所述有机电化学晶体管 9 包括：衬底 5，设置在所述衬底 5 之上的源电极 7 和漏电极 8，及涂覆在衬底 5 之上连接源电极 7 和漏电极 8 的有机半导体薄膜层 6；所述栅电极 3 上修饰有光电活性半导体材料 4 作为传感器的敏感功能层；修饰有光电活性半导体材料的栅电极 3 上固定有用于与沙门氏菌结合的抗体。

进一步的，本发明实施例中，所述光电活性半导体材料为有机半导体材料、无机半导体材料或二者的组合；例如 CdS、TiO₂。

进一步的，本发明实施例中，所述衬底是由玻璃、聚合物柔性材料（例如 PET）或硅片制成。

进一步的，本发明实施例中，所述源电极、漏电极及栅电极是由金属材料、金属氧化物半导体材料、合金材料构成；例如 Au、Ag、Pt、Cu、ITO 等。

进一步的，本发明实施例中，所述有机半导体薄膜层由聚(3,4-乙烯二氧噻吩)-聚苯乙烯磺酸（(PEDOT:PSS)、聚吡咯、聚噻吩、聚苯胺、聚吡唑或者聚(3,4-乙烯二氧噻吩)-聚苯乙烯磺酸、聚吡咯、聚噻吩、聚苯胺、聚吡唑的两种或两种以上的共聚物中的至少一种构成。

进一步的，本发明实施例中，所述源电极和漏电极的厚度为 50-500nm。

进一步的，本发明实施例中，所述有机半导体薄膜层的厚度为 10-300nm。

进一步的，本发明实施例中，将源电极、漏电极和栅电极放置于装有电解液的电解池中进行检测，所述电解液用于作为电子给体。

本发明所述有机电化学晶体管（OECT）为有机薄膜晶体管（OTFT）中的其中重要一类，其具有成本低、容易制备、工作电压低（<1V）、生物兼容性好、易微型化、可制成柔性器件等诸多优点。由于 OECT 同时具有传感和信号放大的功能，因此在生物分子检测中具有非常高的灵敏度和低的检测极限。与此同时，OECT 可制备成小尺寸器件，有利于传感器的微型化和可集成性。

本发明将光电化学（PEC）生物传感技术和有机电化学晶体管（OECT）完美结合，并应用于沙门氏菌的检测，开发出一种沙门氏菌传感器，具有简便、准确、高灵敏、易微型化等优异性能，所需设备简单，应用范围广。

本发明实施例还提供了一种如以上所述的沙门氏菌传感器的制备方法,包括步骤:

S100、彻底清洗衬底并干燥,在衬底上制备源电极和漏电极,在源电极和漏电极之间制备有机半导体薄膜层,得到有机电化学晶体管;

S200、彻底清洗栅电极并干燥,在栅电极上修饰光电活性半导体材料作为传感器的敏感功能层,在修饰有光电活性半导体材料的栅电极上固定用于与沙门氏菌结合的抗体,得到固定有抗体的修饰后的栅电极;

S300、将有机电化学晶体管和固定有抗体的修饰后的栅电极放置于装有电解液的电解池中,制得所述沙门氏菌传感器。

优选地,所述步骤 S100 中,所述的源电极和漏电极是通过真空热蒸镀、磁控溅射或气相沉积中的一种方法制备。

优选地,所述步骤 S100 中,制备有机半导体薄膜层的方法为旋涂或喷墨印刷;退火温度为 100-250℃,退火氛围为氮气,时间为 20-60min。

本发明实施例提供的沙门氏菌传感器,将有机电化学晶体管(OECT)和光电化学(PEC)分析方法相结合,用光电活性物质修饰 OECT 的栅电极,并将抗体固定在栅电极上,在光照的作用下,沙门氏菌与栅电极上的抗体发生特异性结合之后会导致栅电极上光电流发生改变,进一步引起有机电化学晶体管中相关电学参数(沟道电流、转移曲线等)的变化,通过测量有机电化学晶体管相关电学参数(沟道电流、转移曲线等)的变化可达到检测不同浓度沙门氏菌的目的。

由于有机电化学晶体管兼具传感和信号放大的作用,所以本发明沙门氏菌传感器传感器具有极高的灵敏度和极低的检测极限,且设备简单,易微型化,能够解决现有沙门氏菌检测技术中灵敏度低,设备昂贵,样品处理过程繁琐等缺点。

本发明实施例还提供了一种基于以上所述的沙门氏菌传感器的沙门氏菌浓度的检测方法,所述沙门氏菌浓度的检测方法包括:

在光照条件下,通过栅电极上的抗体与沙门氏菌的结合,使栅电极上的光电流变化,引起有机电化学晶体管的沟道电流的变化,通过测量有机电化学晶体管沟道电流的变化来实现对不同浓度沙门氏菌的检测。

具体实施时,用光电活性物质修饰 OECT 的栅电极,并将抗体固定在栅电极上,在光照的作用下,通过测量器件的 I_{ds} -T (沟道电流-时间) 曲线来反应栅

电极上光电流的变化, 由于栅电极上连接有抗体, 当抗体与沙门氏菌发生特异性结合时, 沙门氏菌的位阻效应会使得栅电极光电流下降, 并且不同浓度沙门氏菌引起光电流的下降值不同, 据此可以对不同浓度的沙门氏菌进行检测。

优选地, 所述沙门氏菌浓度的检测方法还包括: 在沙门氏菌上修饰(固定)金纳米颗粒。

下面以具体实施例对本发明作详细说明:

实施例 1 基于位阻效应的沙门氏菌传感器

原理: 栅电极选用组装有硫化镉量子点(CdS QDs)的 ITO 电极, 在光照条件下, 当光的能量大于 CdS 中电子跃迁所需的能量时, CdS 中价带的电子会跃迁至导带, 形成电子-空穴对。当导带中的电子注入电极, 溶液中电子给体提供电子给价带中的空穴, 会形成光电流, 该电流的产生会降低电解质/栅电极界面的电位, 从而增加施加在 OEET 器件上的有效栅电压。OEET 的沟道电流如下方程所示:

$$I_{DS} = \frac{q\mu p_0 t W}{L V_P} (V_P - V_G^{eff} + \frac{V_{DS}}{2}) V_{DS} \quad (|V_{DS}| \ll |V_P - V_G^{eff}|)$$

$$V_P = q p_0 t / C_i$$

$$V_G^{eff} = V_G + V_{offset}$$

其中 q 代表电子电量, μ 代表空穴迁移率, p_0 代表有机半导体层中的初始空穴密度, W 和 L 分别代表器件沟道的宽度和长度, t 代表有机半导体膜的厚度, C_i 代表 OEET 器件的有效栅电容, V_P 代表夹断电压, V_G^{eff} 代表有效栅电压, V_{offset} 代表补偿电压, 补偿电压与栅极-电解液、电解液-沟道这两个界面的电压降有关系。

由于有机电化学晶体管的沟道电流 I_{ds} 受到栅电压 V_G 的调控, 由以上方程可以看出, 当有效栅电压增大时沟道电流 I_{ds} 会减小。图 3 中光照“关-开”(off-on)形成的台阶大小间接反映了栅电极上产生光电流的大小, 并且对该信号进行了放大, 因此当栅电极上产生的光电流大小改变时, I_{ds} - T 曲线中光照“关-开”所形成的台阶大小也会随之改变, 在栅电极上连接抗体, 当抗体与沙门氏菌发生特异性结合时, 由于沙门氏菌的位阻效应会使得栅电极光电流下降, 并且不同浓度沙门氏菌引起光电流的下降值不同, 据此可以对不同浓度的沙门氏菌进行检测。

图 4 为浓度为 10^8 cells/ml 沙门氏菌与抗体结合前后的电学信号变化图。图 5 为采用传统的光电化学分析方法测试不同浓度沙门氏菌的结果，检测极限为 10^3 cells/ml。图 6 为基于有机电化学晶体管的光电化学传感器测试不同浓度沙门氏菌的结果，检测极限为 10^2 cells/ml。由此可见，该新型传感技术的灵敏度要高于传统的光电化学传感技术。

基于位阻效应的沙门氏菌传感器的制备过程

1. 制作有机电化学晶体管(OECT)的源电极、漏电极及有机半导体薄膜层：将清洗好的玻璃贴紧在设计好图案的掩模板上，通过热蒸镀沉积金属电极，分别沉积 10nm 的 Cr 和 100nm 的 Au 以得到 Au/Cr/玻璃电极，在该电极上旋涂一层掺有二甲基亚砜(DMSO)的聚(3,4-乙烯二氧噻吩)-聚苯乙烯磺酸(PEDOT:PSS)，将不需要覆盖 PEDOT:PSS 膜的地方擦除干净；在氮气氛围 180°C 退火 1h，使 PEDOT:PSS 膜更加牢固的附着在电极表面并最终得到了 OECT 器件。

2. TGA（巯基乙酸）修饰的 CdS QDs 的合成：在三口烧瓶中加入 50 mL 0.01 M CdCl_2 溶液，搅拌，通入氮气，升温至 40°C 后加入 250 μL TGA，反应 30 min；在此期间，使用 1 M 的 NaOH 溶液调节混合液的 pH 到 11；然后，加入 5.0 mL 0.1 M Na_2S 溶液，氮气氛围下 110°C 加热，回流 4h，用水(体积比 1:1)稀释后，保存于 4°C 冰箱待用。

3. CdS QDs 修饰的栅电极的制备：将洗净干燥后的 ITO 电极依次浸入 2% PDDA(聚合物电解质，0.5 M NaCl 溶液配制)和 CdS QDs 溶液中各 10 min，每次浸泡完用水清洗，该过程重复 3 次，得到所需的多层膜修饰电极，在光照下，测量 $I_{\text{ds}}-T$ 曲线。

4. 抗体在 CdS QDs 修饰的栅电极表面的固定：通过抗体上的 NH_2 基团和 CdS QDs 上的 COOH 基团之间的偶联反应进行；将 CdS QDs 修饰的电极浸入 20mg/ml EDC（1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐）和 10mg/ml NHS（N-羟基琥珀酰亚胺）的溶液中 1h，随后用水小心冲洗，将 25 μL 抗体（2mg/ml）滴在电极表面并 4°C 孵化过夜后，使用 10 mM PBS 小心冲洗，以便去除未固定的抗体。然后，使用 1 mM MEA（乙醇胺）于 4°C 封闭电极 2 小时，再用 10 mM PBS（磷酸盐缓冲液）小心冲洗后，在光照下，测量 $I_{\text{ds}}-T$ 曲线。

5. 沙门氏菌与抗体的结合：固定有抗体的栅电极在 1ml 不同浓度的沙门氏

菌溶液中 (10mM PBS 溶液配制) 室温下浸泡 1h 以便其充分结合, 然后用 10mM PBS 小心冲洗, 除去未结合的沙门氏菌, 在光照下, 测量 I_{ds} -T 曲线。

在该实例中, CdS QDs 修饰、连接抗体以及和沙门氏菌结合后的栅电极的 I_{ds} -T 曲线在 0.1M 抗坏血酸 (AA) 溶液 (0.1M PBS 溶液配制) 中测量, $V_G=0V$, $V_{DS}=0.1V$, 激发波长为 420nm。

实施例 2 基于激子-等离子体效应的沙门氏菌免疫传感器

原理: 在位阻效应的基础上, 设计了基于硫化镉量子点 (CdS QDs) 和金纳米颗粒 (Au NPs) 之间的激子-等离子体效应的体系来进一步提升传感器的灵敏度, 由于 CdS QDs 的荧光光谱和 Au NPs 的紫外吸收光谱重叠, 光照条件下 CdS QDs 的荧光可以激发 Au NPs 发生表面等离子体共振, 它们间的相互作用会改变 CdS QDs 内的激子状态, 引起光电流的降低。因此, 在沙门氏菌上修饰 Au NPs, 在栅电极上连接抗体, 其发生特异性结合之后会激发激子-等离子体效应, 导致光电流的降低, 在 I_{ds} -T 曲线上表现为光照“关-开”台阶的减小, 根据不同浓度沙门氏菌引起光电流猝灭的效果不同达到检测不同浓度沙门氏菌的效果, 图 7 为基于激子-等离子体效应的沙门氏菌传感器测试不同浓度沙门氏菌的结果, 检测极限为 10cells/ml, 由此可见, 该新型传感技术的灵敏度要高于基于位阻效应的沙门氏菌传感器。

基于激子-等离子体效应的沙门氏菌传感器的制备过程

1. 制作有机电化学晶体管 (OECT) 的源电极、漏电极及有机半导体薄膜层: 将清洗好的玻璃贴紧在设计好图案的掩模板上, 通过热蒸镀沉积金属电极, 分别沉积 10nm 的 Cr 和 100nm 的 Au 以得到 Au/Cr/玻璃电极, 在该电极上旋涂一层掺有二甲基亚砜 (DMSO) 的聚(3,4-乙烯二氧噻吩)-聚苯乙烯磺酸 (PEDOT:PSS), 将不需要覆盖 PEDOT:PSS 膜的地方擦除干净; 在氮气氛围 180℃ 退火 30min, 使 PEDOT:PSS 膜更加牢固的附着在电极表面并最终得到了 OECT 器件。

2. TGA (巯基乙酸) 修饰的 CdS QDs 的合成: 在三口烧瓶中加入 50 mL 0.01 M $CdCl_2$ 溶液, 搅拌, 通入氮气, 升温至 40℃ 后加入 250 μ L TGA, 反应 30 min。在此期间, 使用 1 M 的 NaOH 溶液调节混合液的 pH 到 11。然后, 加入 5.0mL 0.1M Na_2S 溶液, 氮氛下 110° C 加热, 回流 4h, 用水(体积比 1:1)稀释后, 保存于 4 °C 冰箱待用。

3. Au NPs 的合成: Au NPs 通过常见的 NaBH_4 还原 HAuCl_4 的方法来进行; 0.6mL 0.1M 冰水配制的 NaBH_4 加入到不停搅拌的 20mL 2.5×10^{-4} M HAuCl_4 溶液中; 溶液迅速变为橘红色代表 Au NPs 的形成, 该溶液继续在冰水浴中搅拌 10 min, 随后在常温条件下搅拌 3h, 在此过程中, 溶液颜色会逐渐变为酒红色; 搅拌结束后, 金胶溶液保存于 4 °C 冰箱待用。

4. CdS QDs 修饰的栅电极的制备: 将洗净干燥后的 ITO 电极依次浸入 2% PDDA(聚合物电解质, 0.5 M NaCl 溶液配制)和 CdS QDs 溶液中各 10 min, 每次浸泡完用水清洗, 该过程重复 3 次, 得到所需的多层膜修饰电极, CdS QDs 干燥稳定后在光照下测量 I_{ds} -T 曲线。

5. 抗体在 CdS QDs 修饰的栅电极表面的固定: 通过抗体上的 NH_2 基团和 CdS QDs 上的 COOH 基团之间的偶联反应进行; 将 CdS QDs 修饰的电极浸入 20mg/ml EDC 和 10mg/ml NHS 的溶液中 1h, 随后用水小心冲洗, 将 25 μL 抗体(2mg/ml)滴在电极表面并 4°C 孵化过夜后, 使用 10 mM PBS 小心冲洗, 以便去除未固定的抗体。然后, 使用 1 mM MEA (乙醇胺) 于 4 °C 封闭电极 2 小时, 再用 10 mM PBS (磷酸盐缓冲液) 小心冲洗后, 在光照下, 测量 I_{ds} -T 曲线。

6. Au NPs (金纳米颗粒) 对沙门氏菌的标记: 将 10^9 cells 沙门氏菌与 2ml 所合成的 Au NPs 直接混合, 震荡过夜之后离心, 收集细菌, 加入 1ml 10mM PBS 混合均匀之后继续离心收集, 重复该过程 2 遍, 起到清洗作用, 除去未结合的 Au NPs, 最后用 10mM PBS 稀释 Au NPs 修饰的沙门氏菌成一系列浓度, 待测。

7. 沙门氏菌与抗体的结合: 固定有抗体的栅电极在 1ml 在不同浓度的沙门氏菌溶液中 (10mM PBS 溶液配制) 室温下浸泡一小时以便其充分结合, 然后用 10mM PBS 小心冲洗, 除去未结合的沙门氏菌, 在光照下, 测量 I_{ds} -T 曲线。

在该实例中, CdS QDs 修饰、连接抗体以及和沙门氏菌结合后的栅电极的 I_{ds} -T 曲线在 0.1M 抗坏血酸 (AA) 溶液 (0.1M PBS 溶液配制) 中测量, $V_G=0\text{V}$, $V_{DS}=0.1\text{V}$, 激发波长为 420nm。

本发明所提供的沙门氏菌传感器是一种新型的生物传感技术, 通过沙门氏菌引起栅电极上光电流的变化, 进一步引起 OECT 相关电学参数 (界面电势、有效栅电压、沟道电流等) 的变化, 最终通过测量 OECT 沟道电流的变化来实现对不同浓度沙门氏菌的检测。本发明利用位阻效应的沙门氏菌传感器的最低检测

极限为 10^2 cells/ml, 利用激子-等离子体效应的沙门氏菌传感器的最低检测极限可达 10 cells/ml, 可以实现快速简便的高灵敏沙门氏菌实际检测。

本发明将光电化学生物传感技术与有机电化学晶体管相结合, 开发出一种新型的沙门氏菌传感技术, 由于 OEECT 兼具传感和信号放大的作用, 可对栅电极上微弱的电流信号变化进行放大, 因此该传感器具有极高的灵敏度, 本发明传感器结构简单、器件尺寸小, 所有部件都可以集成到一个微小衬底上, 易集成化、微型化、阵列化, 适合大规模生产; 该传感器工作电压低 ($<1V$), 有机半导体薄膜层和组装于栅电极上的半导体材料都可选用生物兼容性好的材料, 为传感器提供良好的稳定性; 并且检测所需设备价格低, 操作简单, 检测人员无需具备太多专业知识, 该发明在一定程度上解决了当前某些沙门氏菌检测技术中灵敏度低, 设备昂贵, 样品处理过程繁琐, 检测人员专业知识要求高等缺点。

本发明首次将基于有机电化学晶体管的光电化学生物传感技术应用于沙门氏菌的检测中, 也是首次设计基于激子-等离子体效应的沙门氏菌传感器, 除沙门氏菌以外, 该传感技术在其他致病细菌的检测和监控中也有很大的应用前景。

另外需要说明的是, 本发明有机电化学晶体管中的有机半导体薄膜层也可换成其他无机半导体薄膜材料如石墨烯。本发明是在 OEECT 栅电极上修饰光电活性材料, 光照下引起电解质/栅电极界面电位变化来达到生物分子检测目的, 而在有机电化学晶体管中的有机半导体薄膜层上修饰光电活性材料, 光照下引起电解质/沟道界面电位变化亦可同样达到传感检测目的。

综上所述, 本发明沙门氏菌传感器具有极高的灵敏度和极低的检测极限, 且设备简单, 易微型化。本发明基于所述沙门氏菌传感器的沙门氏菌浓度的检测方法, 可以实现快速、简便的高灵敏沙门氏菌浓度检测。

应当理解的是, 本发明的应用不限于上述的举例, 对本领域普通技术人员来说, 可以根据上述说明加以改进或变换, 所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

权 利 要 求 书

1. 一种沙门氏菌传感器,用于检测沙门氏菌的浓度,其特征在于,所述沙门氏菌传感器包括:电解池,设置在所述电解池内的电解液,设置在所述电解池内的有机电化学晶体管,及设置在所述电解池内的栅电极;
所述有机电化学晶体管包括:衬底,设置在所述衬底之上的源电极和漏电极,及涂覆在衬底之上连接源电极和漏电极的有机半导体薄膜层;
所述栅电极上修饰有光电活性半导体材料作为传感器的敏感功能层;
修饰有光电活性半导体材料的栅电极上固定有用于与沙门氏菌结合的抗体。
2. 根据权利要求1所述的沙门氏菌传感器,其特征在于,所述光电活性半导体材料为有机半导体材料、无机半导体材料或二者的组合。
3. 根据权利要求1所述的沙门氏菌传感器,其特征在于,所述衬底是由玻璃、聚合物柔性材料或硅片制成。
4. 根据权利要求1所述的沙门氏菌传感器,其特征在于,所述源电极、漏电极及栅电极是由金属材料、金属氧化物半导体材料、合金材料构成。
5. 根据权利要求1所述的沙门氏菌传感器,其特征在于,所述有机半导体薄膜层由聚(3,4-乙烯二氧噻吩)-聚苯乙烯磺酸、聚吡咯、聚噻吩、聚苯胺、聚吡唑或者聚(3,4-乙烯二氧噻吩)-聚苯乙烯磺酸、聚吡咯、聚噻吩、聚苯胺、聚吡唑的两种或两种以上的共聚物中的至少一种构成。
6. 根据权利要求1所述的沙门氏菌传感器,其特征在于,所述源电极和漏电极的厚度为50-500nm;所述有机半导体薄膜层的厚度为10-300nm。
7. 一种如权利要求1-6任一项所述的沙门氏菌传感器的制备方法,其特征在于,包括步骤:
A、彻底清洗衬底并干燥,在衬底上制备源电极和漏电极,在源电极和漏电极之间制备有机半导体薄膜层,得到有机电化学晶体管;
B、彻底清洗栅电极并干燥,在栅电极上修饰光电活性半导体材料作为传感器的敏感功能层,在修饰有光电活性半导体材料的栅电极上固定用于与沙门氏菌结合的抗体,得到固定有抗体的修饰后的栅电极;
C、将有机电化学晶体管和固定有抗体的修饰后的栅电极放置于装有电解液的电解池中,制得所述沙门氏菌传感器。
8. 根据权利要求7所述的沙门氏菌传感器的制备方法,其特征在于,所述步骤A中,所述的源电极和漏电极是通过真空热蒸镀、磁控溅射或气相沉积中的一种方法制备;制备有机半导体薄膜层的方法为旋涂或喷墨印刷。

9. 一种基于权利要求 1 所述的沙门氏菌传感器的沙门氏菌浓度的检测方法，其特征在于，所述沙门氏菌浓度的检测方法包括：

在光照条件下，通过栅电极上的抗体与沙门氏菌的结合，使栅电极上的光电流变化，引起有机电化学晶体管的沟道电流的变化，通过测量有机电化学晶体管沟道电流的变化来实现对不同浓度沙门氏菌的检测。

10. 根据权利要求 9 所述的沙门氏菌浓度的检测方法，其特征在于，所述沙门氏菌浓度的检测方法还包括：在沙门氏菌上修饰金纳米颗粒。

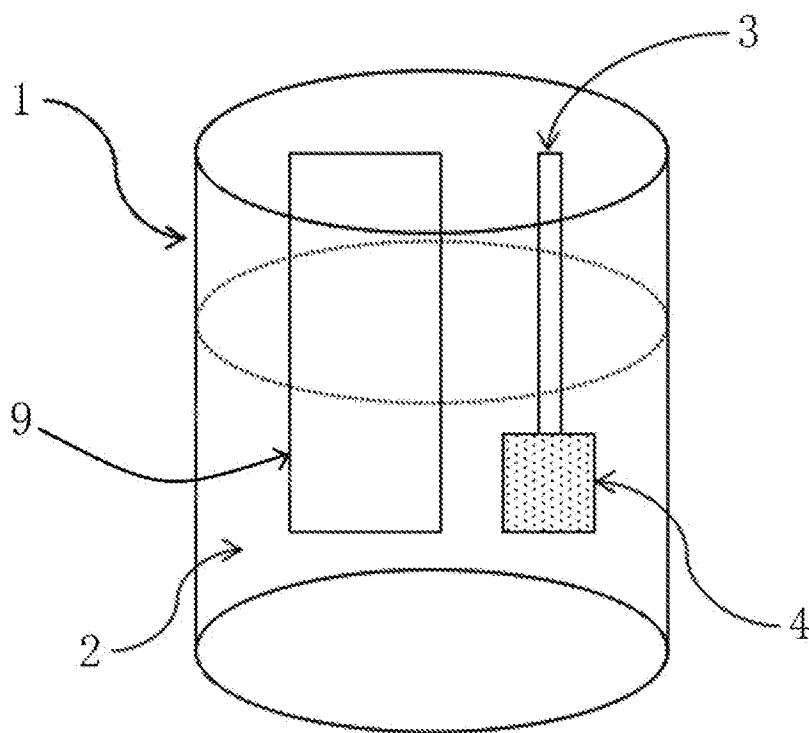


图 1

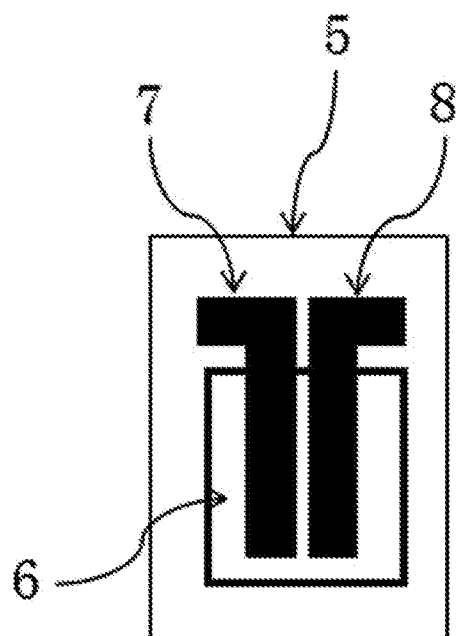


图 2

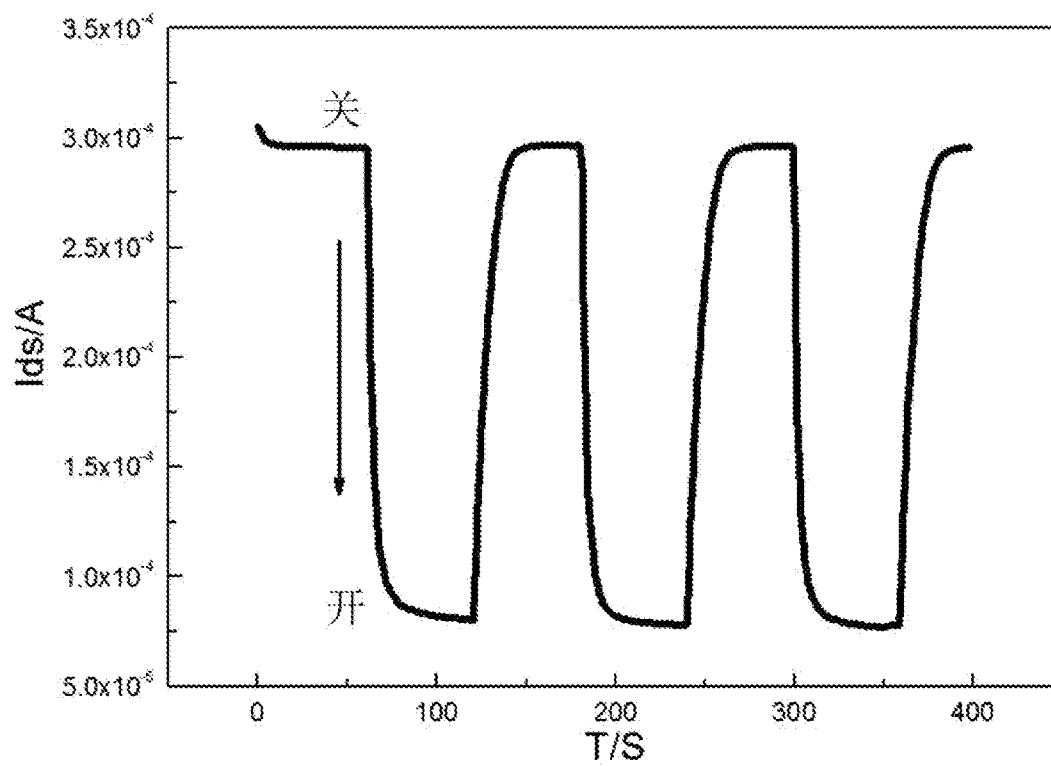


图 3

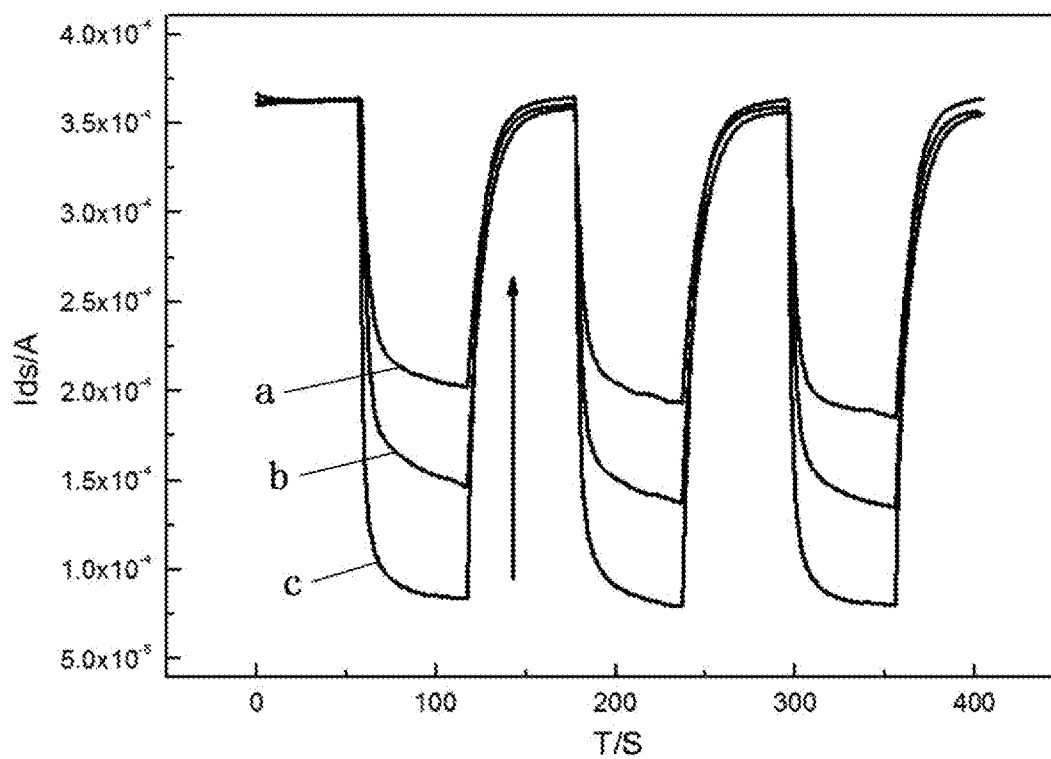


图 4

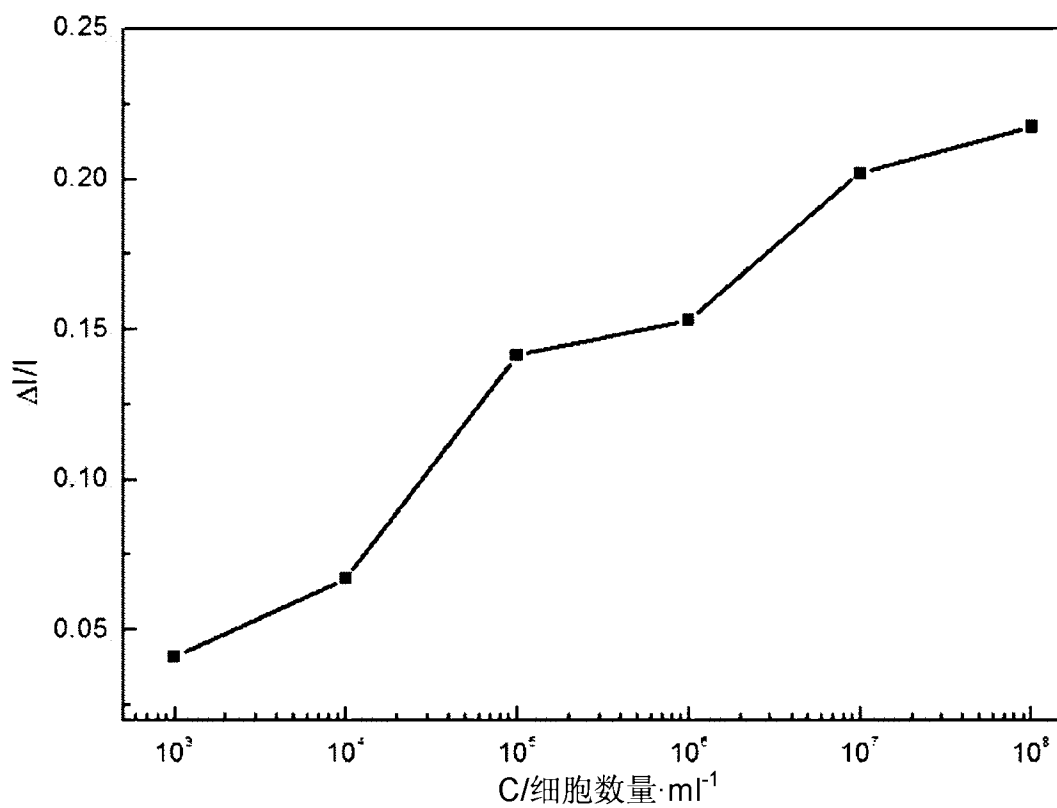


图 5

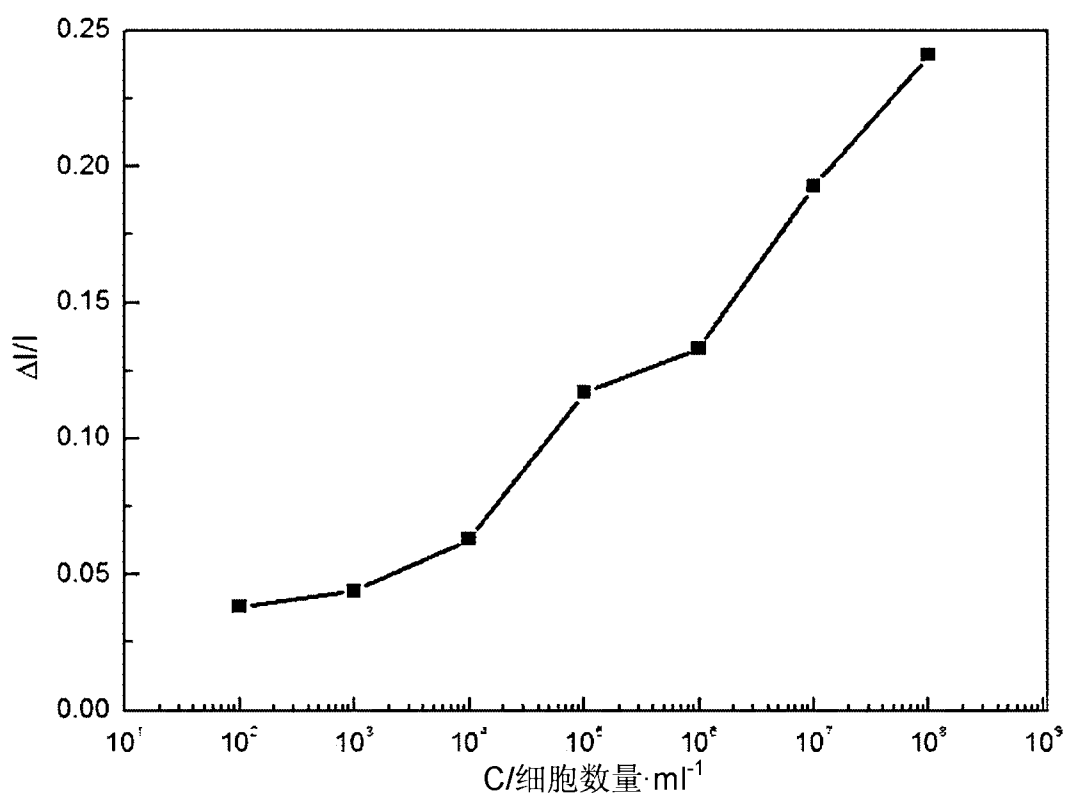


图 6

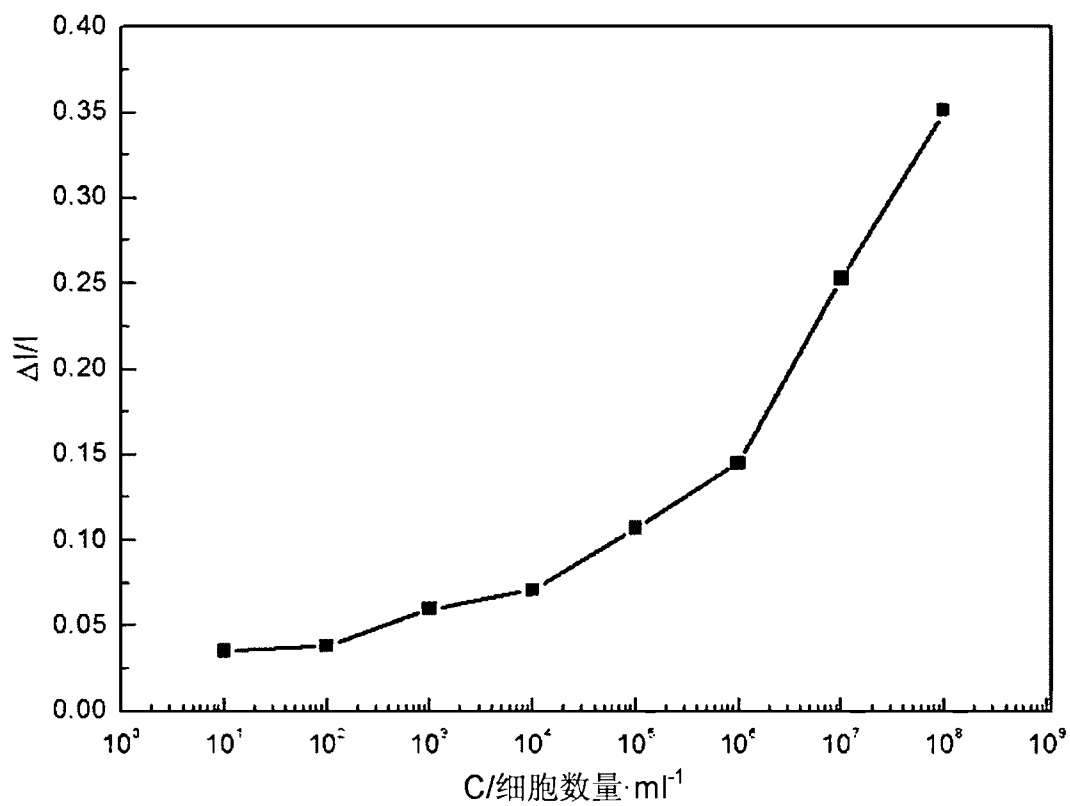


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/110984

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 27/26 (2006.01) i; G01N 27/327 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 27/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC: 深圳大学, 电化学, OECT, 传感器, 检测, 菌, 沙门氏菌, 激子, 有机电化学晶体管, 有机, 电解池, 门电极, 有机电化学, 光电活性, 林鹏, 位阻效应, 抗体, 栅极, 宋家俊, 刘丹, 曾燮榕, 电极, 食物中毒, 柯善明, 等离子, antibody, transistor, grid, salmonella, audion, triode, dynatron, bacteria, sensor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 106770566 A (SHENZHEN UNIVERSITY) 31 May 2017 (31.05.2017), claims 1-10	1-10
PX	CN 106770587 A (SHENZHEN UNIVERSITY) 31 May 2017 (31.05.2017), claims 1-10, description, paragraphs [0034], and [0041]-[0056], and figures 1-7	1-10
X	王静静. 基于有机电化学晶体管的癌胚抗原, 鸟嘌呤及酚类传感研究. 湖南师范大学硕士学位论文. 15 April 2016 (15.04.2016), text, pp. 5-7, 10 and 11. (Studies on the Carcinoembryonic Antigen, Guanine and Phenols Sensors Based on Organic Electrochemical Transistors), non-official translation (WANG, Jingjing. Hunan Normal University Master's Dissertation.)	1-10
X	CN 103558270 A (UNIVERSITY OF HAINAN) 05 February 2014 (05.02.2014), description, paragraphs [0003], [0004] and [0027]-[0037], and figure 1	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 09 January 2018	Date of mailing of the international search report 29 January 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer CHEN, Fei Telephone No. (86-10) 53962394

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/110984

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105190310 A (UNIVERSITY OF TOLEDO) 23 December 2015 (23.12.2015), entire document	1-10
A	CN 102735734 A (HONG KONG POLYTECHNIC UNIVERSITY) 17 October 2012 (17.10.2012), entire document	1-10
A	US 2006057707 A1 (SRU BIOSYSTEMS, INC.) 16 March 2006 (16.03.2006), entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/110984

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 106770566 A	31 May 2017	None	
CN 106770587 A	31 May 2017	None	
CN 103558270 A	05 February 2014	None	
CN 105190310 A	23 December 2015	HK 1213325 A1	30 June 2016
		US 2016022185 A1	28 January 2016
		EP 2972333 A1	20 January 2016
		WO 2014164654 A1	09 October 2014
CN 102735734 A	17 October 2012	US 9632058 B2	25 April 2017
		CN 102735734 B	18 May 2016
		US 2012247976 A1	04 October 2012
US 2006057707 A1	16 March 2006	US 8580578 B2	12 November 2013
		US 2009264314 A1	22 October 2009
		US 2011201132 A1	18 August 2011
		US 7575939 B2	18 August 2009
		US 7935520 B2	03 May 2011

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/110984

A. 主题的分类

G01N 27/26(2006.01)i; G01N 27/327(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

G01N 27/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC: 深圳大学, 电化学, OECT, 传感器, 检测, 菌, 沙门氏菌, 激子, 有机电化学晶体管, 有机, 电解池, 门电极, 有机电化学, 光电活性, 林鹏, 位阻效应, 抗体, 栅极, 宋家俊, 刘丹, 曾燮榕, 电极, 食物中毒, 柯善明, 等离子, antibody, transistor, grid, salmonella, audion, triode, dynatron, bacteria, sensor

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 106770566 A (深圳大学) 2017年 5月 31日 (2017 - 05 - 31) 权利要求1-10	1-10
PX	CN 106770587 A (深圳大学) 2017年 5月 31日 (2017 - 05 - 31) 权利要求1-10、说明书第[0034], [0041]-[0056]段、图1-7	1-10
X	王静静. “基于有机电化学晶体管的癌胚抗原、鸟嘌呤及酚类传感研究” 湖南师范大学硕士学位论文, 2016年 4月 15日 (2016 - 04 - 15), 正文第5-7, 10-11页	1-10
X	CN 103558270 A (海南大学) 2014年 2月 5日 (2014 - 02 - 05) 说明书第[0003]-[0004], [0027]-[0037]段、图1	1-10
A	CN 105190310 A (托莱多大学) 2015年 12月 23日 (2015 - 12 - 23) 全文	1-10
A	CN 102735734 A (香港理工大学) 2012年 10月 17日 (2012 - 10 - 17) 全文	1-10
A	US 2006057707 A1 (SRU BIOSYSTEMS, INC.) 2006年 3月 16日 (2006 - 03 - 16) 全文	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2018年 1月 9日

国际检索报告邮寄日期

2018年 1月 29日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

陈飞

电话号码 (86-10)53962394

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/110984

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	106770566	A	2017年 5月 31日	无			
CN	106770587	A	2017年 5月 31日	无			
CN	103558270	A	2014年 2月 5日	无			
CN	105190310	A	2015年 12月 23日	HK	1213325	A1	2016年 6月 30日
				US	2016022185	A1	2016年 1月 28日
				EP	2972333	A1	2016年 1月 20日
				WO	2014164654	A1	2014年 10月 9日
CN	102735734	A	2012年 10月 17日	US	9632058	B2	2017年 4月 25日
				CN	102735734	B	2016年 5月 18日
				US	2012247976	A1	2012年 10月 4日
US	2006057707	A1	2006年 3月 16日	US	8580578	B2	2013年 11月 12日
				US	2009264314	A1	2009年 10月 22日
				US	2011201132	A1	2011年 8月 18日
				US	7575939	B2	2009年 8月 18日
				US	7935520	B2	2011年 5月 3日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)