



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106018806 A

(43)申请公布日 2016.10.12

(21)申请号 201610301770.9

(22)申请日 2016.05.09

(71)申请人 山东理工大学

地址 255086 山东省淄博市高新技术开发
区高创园A座313室

(72)发明人 李月云 王平 董云会 冯金慧
刘会 刘青 陈磊

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

(54)发明名称

一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型
免疫传感器的制备方法及应用

(57)摘要

本发明属于纳米功能材料、免疫分析以及生物传感技术领域,提供了一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器的制备方法及应用。采用Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8作为检测抗体标记物制备的电化学免疫传感器具有特异性强,灵敏度高和检出限低等优点,对肿瘤标志物CEA、CA125的检测具有重要的科学意义和应用价值。

1. 一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤如下:

(1)将6 μL、1 ~ 3 mg/mL的Au@GO-Th滴涂到用Al₂O₃抛光粉打磨成镜面的直径为4 mm的玻璃碳电极的表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;

(2)继续将6 μL、8 ~ 12 μg/mL的肿瘤标志物捕获抗体Ab₁溶液孵化到电极表面,超纯水冲洗,4℃冰箱中晾干;

(4)继续将3 μL、质量分数为0.5 ~ 2.5%的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,超纯水冲洗,4℃冰箱中晾干;

(5)滴加6 μL、0.1pg/mL~ 50 ng/mL的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原Ag溶液到电极表面,超纯水冲洗,4℃冰箱中干燥;

(6)继续将6 μL、1 ~ 5 mg/mL的Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液滴加到电极表面,置于4℃冰箱中晾干,制得一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器。

2. 如权利要求1所述的一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器的制备方法,所述Au@GO-Th、Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液,制备步骤如下:

(1)Au@GO-Th的制备

1)Au纳米粒子的制备

在99 mL超纯水中加入1 mL、质量分数为1%的HAuCl₄,加热至沸腾,然后加入2.5 ~ 3.5 mL、质量分数为1%的柠檬酸三钠,加热至溶液颜色变成深红色,继续加热15 ~ 25 min,冷却至室温得到Au纳米粒子溶液;

2)GO-Th纳米复合物的制备

将0.8 ~ 1.2 mg的氧化石墨烯加入1mL超纯水中,充分搅拌,加入1mL、1mmol/L的硫堇,室温下搅拌36 ~ 48 h,离心分离,超纯水洗涤三次,得到GO-Th纳米复合物,35℃真空干燥12h,备用;

3)Au@GO-Th的制备

将10 ~ 15 mg GO-Th溶解到上述制备的20mL的Au纳米粒子溶液中,室温下搅拌12 h,离心分离,超纯水洗涤三次,35℃真空干燥12 h,制得Au@GO-Th;

(2)Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液的制备

1)PdNPs的制备

将65 ~ 70 g聚乙烯吡咯烷酮,20 mL无水乙醇,50 mL超纯水,30 mL、2 ~ 3 mmol/L的H₂PdCl₆在烧瓶中混合,室温下反应3 h;利用旋转蒸发除去乙醇和水,所得Pd纳米粒子溶解于40 ~ 60mL丙酮溶液中,离心分离,分别用氯仿和己烷洗涤三次除去剩余的聚乙烯吡咯烷酮,60℃真空干燥12 h得到PdNPs;以甲醇为溶剂,制成0.25 mg/mL的PdNPs甲醇溶液备用;

2)Pd-ZIF-8的制备

将10 mL、0.25 mg/mL的PdNPs甲醇溶液,130 ~ 170 mL、25 mmol/L的2-甲基咪唑甲醇溶液,140 ~ 160 mL、25 mmol/L的Zn(NO₃)₂·6H₂O甲醇溶液混合,室温反应24 h,离心分离,用甲醇洗涤三次,35℃真空干燥12 h,制得Pd-ZIF-8;

3)磁性Fe₃O₄@Pd-ZIF-8的制备及氨基化

称取2.5 ~ 2.9 g的FeCl₃·6H₂O加到70mL乙二醇中,再加入7.0 g NaAc,25 mL三乙胺和2.5 g Pd-ZIF-8,室温下磁力搅拌30 ~ 40 min,后转移至不锈钢高压反应釜中,加热到

200°C保持8 ~ 10 h,冷却至室温,离心分离,超纯水洗涤三次,35°C真空干燥12 h,制得磁性的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Pd-ZIF-8}$;

称取0.1 ~ 0.2 g的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Pd-ZIF-8}$ 溶解到含有1mL氨丙基三乙氧基硅烷的10mL乙醇溶液中,油浴加热至65 ~ 75°C,磁力搅拌1.5 h,磁分离,超纯水洗涤三次,制得氨基化 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Pd-ZIF-8}$;

4) $\text{Au-Fe}_3\text{O}_4@\text{Pd-ZIF-8}$.

取1 ~ 2 mL上述制备的Au纳米粒子溶液与2 mL、2 mg/mL的氨基化 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Pd-ZIF-8}$ 溶液混合,室温下振荡24 h,磁分离,超纯水洗涤三次,制得 $\text{Au-Fe}_3\text{O}_4@\text{Pd-ZIF-8}$;

5) $\text{Au-Fe}_3\text{O}_4@\text{Pd-ZIF-8-Ab}_2$ 捕获抗体孵化物溶液的制备

将6 ~ 10 mg的 $\text{Au-Fe}_3\text{O}_4@\text{Pd-ZIF-8}$ 分散到1 mL超纯水中,加入1 mL、20 $\mu\text{g/mL}$ 的肿瘤标志物检测抗体 Ab_2 溶液,4°C恒温振荡培养箱中振荡孵化12 ~ 24 h,离心分离,所得固体分散于PBS溶液中,制成1 ~ 5 mg/mL的 $\text{Au-Fe}_3\text{O}_4@\text{Pd-ZIF-8-Ab}_2$ 捕获抗体孵化物溶液,储存于4 °C冰箱中备用。

3. 如权利要求1所述的一种基于 $\text{Au-Fe}_3\text{O}_4@\text{Pd-ZIF-8}$ 标记的夹心型免疫传感器的制备方法制备的免疫传感器,用于肿瘤标志物的检测,检测步骤如下:

(1)使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,所制备的传感器为工作电极,在10 mL、50 mmol/L的pH 5.0 ~ 9.0磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2)用计时电流法对肿瘤标志物进行检测,输入电压为-0.4 V,取样间隔0.1 s,运行时间400 s;

(3)当背景电流趋于稳定后,每隔50 s向10 mL、50 mmol/L的pH=7.4磷酸盐缓冲溶液中注入10 μL 、5 mmol/L的双氧水溶液,记录电流变化。

4. 如权利要求 1、2、3所述的肿瘤标志物,选自CEA或CA125。

一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于纳米功能材料、免疫分析以及生物传感技术领域,提供了一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 肿瘤的发病率高,生长和转移速度快,对人类的健康有极大的危害。肿瘤标记物是肿瘤细胞产生和释放的以抗原、酶、激素等形式的代谢产物存在于肿瘤细胞内或宿主体液中,其在临床上对于随原发肿瘤的发现,肿瘤高危人群的筛选、良性和恶性肿瘤的鉴别诊断、肿瘤发展程度的判断,肿瘤的治疗效果的观察和评价及肿瘤复发和预后的预测产生极大的影响,引起人们的广泛关注。

[0003] CA125、CEA等常见的肿瘤标志物,对于肝癌的诊断都能起到一定的作用。对于肿瘤标记物的检测方法很多,但多数检测方法繁琐,操作复杂,费用昂贵,检出限高,因此,建立一种快速、简便、灵敏的检测方法有重要意义。

[0004] 夹心型电化学免疫传感器结合了高特异性的免疫分析技术和高灵敏的电化学分析技术,具有灵敏度高、制备简单、检测快速、成本低、等优点,在临床检验、环境监测、食品安全控制、生物监测等领域都有重要的应用价值。而构建电化学免疫传感器的关键有两点:其一是采用简单、快速、有效的方法将抗原抗体等生物分子固定在电极表面;其二是开发传感器的信号放大技术。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器的制备方法及应用,实现了对肝癌肿瘤标志物CEA、CA125的高灵敏检测。

[0006] 本发明的目的之一是提供一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器的制备方法。

[0007] 本发明的目的之二是将所制备的Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器,用于肿瘤标志物的灵敏检测。

[0008] 本发明的技术方案,包括以下步骤。

[0009] 1. 一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤如下:

(1)将6 μ L、1 ~ 3 mg/mL的Au@GO-Th滴涂到用Al₂O₃抛光粉打磨成镜面的直径为4 mm的玻碳电极的表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;

(2)继续将6 μ L、8 ~ 12 μ g/mL的肿瘤标志物捕获抗体Ab₁溶液孵化到电极表面,超纯水冲洗,4℃冰箱中晾干;

(4)继续将3 μ L、质量分数为0.5 ~ 2.5%的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,超纯水冲洗,4℃冰箱中晾干;

(5)滴加6 μL 、0.1pg/mL~ 50 ng/mL的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原Ag溶液到电极表面,超纯水冲洗,4℃冰箱中干燥;

(6)继续将6 μL 、1 ~ 5 mg/mL的Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液滴加到电极表面,置于4℃冰箱中晾干,制得一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器。

[0010] 2.所述的Au@GO-Th、Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液,制备步骤如下:

(1)Au@GO-Th的制备

1)Au纳米粒子的制备

在99 mL超纯水中加入1 mL、质量分数为1%的HAuCl₄,加热至沸腾,然后加入2.5 ~ 3.5 mL、质量分数为1%的柠檬酸三钠,加热至溶液颜色变成深红色,继续加热15 ~ 25 min,冷却至室温得到Au纳米粒子溶液;

2)GO-Th纳米复合物的制备

将0.8 ~ 1.2 mg的氧化石墨烯加入1mL超纯水中,充分搅拌,加入1mL、1mmol/L的巯基,室温下搅拌36 ~ 48 h,离心分离,超纯水洗涤三次,得到GO-Th纳米复合物,35℃真空干燥12h,备用;

3)Au@GO-Th的制备

将10 ~ 15 mg GO-Th溶解到上述制备的20mL的Au纳米粒子溶液中,室温下搅拌12 h,离心分离,超纯水洗涤三次,35℃真空干燥12 h,制得Au@GO-Th;

(2)Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液的制备

1)PdNPs的制备

将65 ~ 70 g聚乙烯吡咯烷酮,20 mL无水乙醇,50 mL超纯水,30 mL、2 ~ 3 mmol/L的H₂PdCl₆在烧瓶中混合,室温下反应3 h;利用旋转蒸发除去乙醇和水,所得Pd纳米粒子溶解于40 ~ 60mL丙酮溶液中,离心分离,分别用氯仿和己烷洗涤三次除去剩余的聚乙烯吡咯烷酮,60℃真空干燥12 h得到PdNPs;以甲醇为溶剂,制成0.25 mg/mL的PdNPs甲醇溶液备用;

2)Pd-ZIF-8的制备

将10 mL、0.25 mg/mL的PdNPs甲醇溶液,130 ~ 170 mL、25 mmol/L的2-甲基咪唑甲醇溶液,140 ~ 160 mL、25 mmol/L的Zn(NO₃)₂·6H₂O甲醇溶液混合,室温反应24 h,离心分离,用甲醇洗涤三次,35℃真空干燥12 h,制得Pd-ZIF-8;

3)磁性Fe₃O₄@Pd-ZIF-8的制备及氨基化

称取2.5 ~ 2.9 g的FeCl₃·6H₂O加到70mL乙二醇中,再加入7.0 g NaAc,25 mL三乙胺和2.5 g Pd-ZIF-8,室温下磁力搅拌30 ~ 40 min,后转移至不锈钢高压反应釜中,加热到200℃保持8 ~ 10 h,冷却至室温,离心分离,超纯水洗涤三次,35℃真空干燥12 h,制得磁性的Fe₃O₄@Pd-ZIF-8;

称取0.1 ~ 0.2 g的Fe₃O₄@Pd-ZIF-8溶解到含有1mL氨丙基三乙氧基硅烷的10mL乙醇溶液中,油浴加热至65 ~ 75℃,磁力搅拌1.5 h,磁分离,超纯水洗涤三次,制得氨基化Fe₃O₄@Pd-ZIF-8;

4)Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8.

取1 ~ 2 mL上述制备的Au纳米粒子溶液与2 mL、2 mg/mL的氨基化Fe₃O₄@Pd-ZIF-8溶液混合,室温下振荡24 h,磁分离,超纯水洗涤三次,制得Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8;

5) Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液的制备

将6 ~ 10 mg的Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8分散到1 mL超纯水中,加入1 mL、20 μg/mL的肿瘤标志物检测抗体Ab₂溶液,4℃恒温振荡培养箱中振荡孵化12 ~ 24 h,离心分离,所得固体分散于PBS溶液中,制成1 ~ 5 mg/mL的Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液,储存于4℃冰箱中备用。

[0011] 3. 肿瘤标志物的检测,步骤如下:

(1)使用电化学工作站以三电极体系进行测试,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝电极为辅助电极,所制备的传感器为工作电极,在10 mL、50 mmol/L的pH 5.0 ~ 9.0磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2)用计时电流法对肿瘤标志物进行检测,输入电压为-0.4 V,取样间隔0.1 s,运行时间400 s;

(3)当背景电流趋于稳定后,每隔50 s向10 mL、50 mmol/L的pH=7.4磷酸盐缓冲溶液中注入10 μL、5 mmol/L的双氧水溶液,记录电流变化。

[0012] 所述肿瘤标志物选自下列之一: CA125、CEA。

[0013] 本发明所用原材料均可在化学试剂公司或生物制药公司购买。

[0014] 本发明的有益成果

(1)本发明使用金杂化的硫堇石墨烯作为基底材料,硫堇的存在大大提高了石墨烯的分散性,金纳米粒子具有良好的催化性能及生物相容性,以及良好的导电能力,与石墨烯结合能够很好的固载捕获抗体,并能加速电子的传递,对于实现传感器的高灵敏度以及低检测限具有重要意义。

[0015] (2)采用Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8作为检测抗体标记物,Pd、Fe₃O₄、Au具有良好的导电能力以及对过氧化氢有催化作用,ZIF-8是典型的沸石咪唑酯骨架结构材料,与Pd结合,形成以Pd为中心的MOFs材料,具有表面积大催化性好等特点,材料表面负载Fe₃O₄纳米粒子,增加了催化性能,从而可以实现电化学信号的多重协同放大,因此提高了传感器的灵敏度,降低了检测限;

(3)一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器对CA125的检测,其线性范围0.1 pg/mL ~ 50 ng/mL,检测限最低0.03 pg/mL;对CEA进行检测,其线性范围为0.1 pg/mL ~ 45 ng/mL,检测限为0.03 pg/mL。表明基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器可以达到准确测定肿瘤标志物的目的。

具体实施方式

[0016] 现将本发明通过具体实施方式进一步说明,但不限于此。

[0017] 实施例1一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤如下:

(1)将6 μL、1 mg/mL的Au@GO-Th滴涂到用Al₂O₃抛光粉打磨成镜面的直径为4 mm的玻璃碳电极的表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;

(2)继续将6 μL、8 μg/mL的肿瘤标志物捕获抗体Ab₁溶液孵化到电极表面,超纯水冲洗,4℃冰箱中晾干;

(4)继续将3 μL、质量分数为0.5%的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,超纯水冲洗,4℃冰箱中晾干;

(5)滴加6 μL 、0.1pg/mL ~ 50 ng/mL的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原Ag溶液到电极表面,超纯水冲洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中干燥;

(6)继续将6 μL 、1 mg/mL的Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液滴加到电极表面,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,制得一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器。

[0018] 实施例2一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤如下:

(1)将6 μL 、2 mg/mL的Au@GO-Th滴涂到用Al₂O₃抛光粉打磨成镜面的直径为4 mm的玻碳电极的表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;

(2)继续将6 μL 、10 μg /mL的肿瘤标志物捕获抗体Ab₁溶液孵化到电极表面,超纯水冲洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;

(4)继续将3 μL 、质量分数为1.5%的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,超纯水冲洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;

(5)滴加6 μL 、0.1pg/mL ~ 50 ng/mL的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原Ag溶液到电极表面,超纯水冲洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中干燥;

(6)继续将6 μL 、3 mg/mL的Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液滴加到电极表面,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,制得一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器。

[0019] 实施例3一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤如下:

(1)将6 μL 、3 mg/mL的Au@GO-Th滴涂到用Al₂O₃抛光粉打磨成镜面的直径为4 mm的玻碳电极的表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;

(2)继续将6 μL 、12 μg /mL的肿瘤标志物捕获抗体Ab₁溶液孵化到电极表面,超纯水冲洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;

(4)继续将3 μL 、质量分数为2.5%的牛血清白蛋白BSA溶液滴加到电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,超纯水冲洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;

(5)滴加6 μL 、0.1pg/mL ~ 50 ng/mL的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原Ag溶液到电极表面,超纯水冲洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中干燥;

(6)继续将6 μL 、5 mg/mL的Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液滴加到电极表面,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,制得一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器。

[0020] 实施例4所述的Au@GO-Th、Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液,制备步骤如下:

(1)Au@GO-Th的制备

1)Au纳米粒子的制备

在99 mL超纯水中加入1 mL、质量分数为1%的HAuCl₄,加热至沸腾,然后加入2.5 mL、质量分数为1%的柠檬酸三钠,加热至溶液颜色变成深红色,继续加热15 min,冷却至室温得到Au纳米粒子溶液;

2)GO-Th纳米复合物的制备

将0.8 mg的氧化石墨烯加入1 mL超纯水中,充分搅拌,加入1 mL、1 mmol/L的硫堇,室温下搅拌36 h,离心分离,超纯水洗涤三次,得到GO-Th纳米复合物,35 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥12 h,备用;

3)Au@GO-Th的制备

将10 mg GO-Th溶解到上述制备的20mL的Au纳米粒子溶液中,室温下搅拌12 h,离心分离,超纯水洗涤三次, 35°C真空干燥12 h,制得Au@GO-Th;

(2) Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液的制备

1) PdNPs的制备

将65g聚乙烯吡咯烷酮, 20 mL无水乙醇, 50 mL超纯水, 30 mL、2 mmol/L的H₂PdCl₆在烧瓶中混合,室温下反应3 h;利用旋转蒸发除去乙醇和水,所得Pd纳米粒子溶解于40 mL丙酮溶液中,离心分离,分别用氯仿和己烷洗涤三次除去剩余的聚乙烯吡咯烷酮,60°C真空干燥12 h得到PdNPs;以甲醇为溶剂,制成0.25 mg/mL的PdNPs甲醇溶液备用;

2) Pd-ZIF-8的制备

将10 mL、0.25 mg/mL的PdNPs甲醇溶液,130 mL、25 mmol/L的2-甲基咪唑甲醇溶液,140 mL、25 mmol/L的Zn(NO₃)₂·6H₂O甲醇溶液混合,室温反应24 h,离心分离,用甲醇洗涤三次,35°C真空干燥12 h,制得Pd-ZIF-8;

3) 磁性Fe₃O₄@Pd-ZIF-8的制备及氨基化

称取2.5 g的FeCl₃·6H₂O加到70mL乙二醇中,再加入7.0 g NaAc,25 mL三乙胺和2.5 g Pd-ZIF-8,室温下磁力搅拌30 min,后转移至不锈钢高压反应釜中,加热到200°C保持8 h,冷却至室温,离心分离,超纯水洗涤三次, 35°C真空干燥12 h,制得磁性的Fe₃O₄@Pd-ZIF-8;

称取0.1 g的Fe₃O₄@Pd-ZIF-8溶解到含有1mL氨丙基三乙氧基硅烷的10mL乙醇溶液中,油浴加热至65°C,磁力搅拌1.5 h,磁分离,超纯水洗涤三次,制得氨基化Fe₃O₄@Pd-ZIF-8;

4) Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8.

取1 mL上述制备的Au纳米粒子溶液与2 mL、2 mg/mL的氨基化Fe₃O₄@Pd-ZIF-8溶液混合,室温下振荡24 h,磁分离,超纯水洗涤三次,制得Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8;

5) Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液的制备

将6 mg的Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8分散到1 mL超纯水中,加入1 mL、20 μg/mL的肿瘤标志物检测抗体Ab₂溶液,4°C恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h,离心分离,所得固体分散于PBS溶液中,制成1 ~ 5 mg/mL的Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液,储存于4 °C冰箱中备用。

[0021] 实施例5所述的Au@GO-Th、Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液,制备步骤如下:

(1) Au@GO-Th的制备

1) Au纳米粒子的制备

在99 mL超纯水中加入1 mL、质量分数为1%的HAuCl₄,加热至沸腾,然后加入3.0 mL、质量分数为1%的柠檬酸三钠,加热至溶液颜色变成深红色,继续加热20 min,冷却至室温得到Au纳米粒子溶液;

2) GO-Th纳米复合物的制备

将1.0 mg的氧化石墨烯加入1mL超纯水中,充分搅拌,加入1mL、1mmol/L硫堇,室温下搅拌40 h,离心分离,超纯水洗涤三次,得到GO-Th纳米复合物,35°C真空干燥12 h,备用;

3) Au@GO-Th的制备

将12.5 mg GO-Th溶解到上述制备的20mL的Au纳米粒子溶液中,室温下搅拌12 h,离心分离,超纯水洗涤三次, 35°C真空干燥12 h,制得Au@GO-Th;

(2) Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液的制备

1) PdNPs的制备

将67.5 g聚乙烯吡咯烷酮, 20 mL无水乙醇, 50 mL超纯水, 30 mL、2.5 mmol/L的H₂PdCl₆在烧瓶中混合, 室温下反应3 h; 利用旋转蒸发除去乙醇和水, 所得Pd纳米粒子溶解于50 mL丙酮溶液中, 离心分离, 分别用氯仿和己烷洗涤三次除去剩余的聚乙烯吡咯烷酮, 60°C真空干燥12 h得到PdNPs; 以甲醇为溶剂, 制成0.25 mg/mL的PdNPs甲醇溶液备用;

2) Pd-ZIF-8的制备

将10 mL、0.25 mg/mL的PdNPs甲醇溶液, 150 mL、25 mmol/L的2-甲基咪唑甲醇溶液, 150 mL、25 mmol/L的Zn(NO₃)₂·6H₂O甲醇溶液混合, 室温反应24 h, 离心分离, 用甲醇洗涤三次, 35°C真空干燥12 h, 制得Pd-ZIF-8;

3) 磁性Fe₃O₄@Pd-ZIF-8的制备及氨基化

称取2.7 g的FeCl₃·6H₂O加到70 mL乙二醇中, 再加入7.0 g NaAc, 25 mL三乙胺和2.5 g Pd-ZIF-8, 室温下磁力搅拌35 min, 后转移至不锈钢高压反应釜中, 加热到200°C保持9 h, 冷却至室温, 离心分离, 超纯水洗涤三次, 35°C真空干燥12 h, 制得磁性的Fe₃O₄@Pd-ZIF-8;

称取0.15 g的Fe₃O₄@Pd-ZIF-8溶解到含有1 mL氨丙基三乙氧基硅烷的10 mL乙醇溶液中, 油浴加热至70°C, 磁力搅拌1.5 h, 磁分离, 超纯水洗涤三次, 制得氨基化Fe₃O₄@Pd-ZIF-8;

4) Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8.

取1.5 mL上述制备的Au纳米粒子溶液与2 mL、2 mg/mL的氨基化Fe₃O₄@Pd-ZIF-8溶液混合, 室温下振荡24 h, 磁分离, 超纯水洗涤三次, 制得Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8;

5) Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液的制备

将8 mg的Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8分散到1 mL超纯水中, 加入1 mL、20 μg/mL的肿瘤标志物检测抗体Ab₂溶液, 4°C恒温振荡培养箱中振荡孵化18 h, 离心分离, 所得固体分散于PBS溶液中, 制成1 ~ 5 mg/mL的Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液, 储存于4°C冰箱中备用。

[0022] 实施例6所述的Au@GO-Th、Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液, 制备步骤如下:

(1) Au@GO-Th的制备

1) Au纳米粒子的制备

在99 mL超纯水中加入1 mL、质量分数为1%的HAuCl₄, 加热至沸腾, 然后加入3.5 mL、质量分数为1%的柠檬酸三钠, 加热至溶液颜色变成深红色, 继续加热25 min, 冷却至室温得到Au纳米粒子溶液;

2) GO-Th纳米复合物的制备

将1.2 mg的氧化石墨烯加入1 mL超纯水中, 充分搅拌, 加入1 mL、1 mmol/L硫堇, 室温下搅拌48 h, 离心分离, 超纯水洗涤三次, 得到GO-Th纳米复合物, 35°C真空干燥12 h, 备用;

3) Au@GO-Th的制备

将15 mg GO-Th溶解到上述制备的20 mL的Au纳米粒子溶液中, 室温下搅拌12 h, 离心分离, 超纯水洗涤三次, 35°C真空干燥12 h, 制得Au@GO-Th;

(2) Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液的制备

1) PdNPs的制备

将70 g聚乙烯吡咯烷酮, 20 mL无水乙醇, 50 mL超纯水, 30 mL、3 mmol/L的 H_2PdCl_6 在烧瓶中混合, 室温下反应3 h; 利用旋转蒸发除去乙醇和水, 所得Pd纳米粒子溶解于60 mL丙酮溶液中, 离心分离, 分别用氯仿和己烷洗涤三次除去剩余的聚乙烯吡咯烷酮, 60°C真空干燥12 h得到PdNPs; 以甲醇为溶剂, 制成0.25 mg/mL的PdNPs甲醇溶液备用;

2) Pd-ZIF-8的制备

将10 mL、0.25 mg/mL的PdNPs甲醇溶液, 170 mL、25 mmol/L的2-甲基咪唑甲醇溶液, 160 mL、25 mmol/L的 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 甲醇溶液混合, 室温反应24 h, 离心分离, 用甲醇洗涤三次, 35°C真空干燥12 h, 制得Pd-ZIF-8;

3) 磁性 Fe_3O_4 @Pd-ZIF-8的制备及氨基化

称取2.9 g的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 加到70 mL乙二醇中, 再加入7.0 g NaAc, 25 mL三乙胺和2.5 g Pd-ZIF-8, 室温下磁力搅拌40 min, 后转移至不锈钢高压反应釜中, 加热到200°C保持10 h, 冷却至室温, 离心分离, 超纯水洗涤三次, 35°C真空干燥12 h, 制得磁性的 Fe_3O_4 @Pd-ZIF-8;

称取0.2 g的 Fe_3O_4 @Pd-ZIF-8溶解到含有1 mL氨丙基三乙氧基硅烷的10 mL乙醇溶液中, 油浴加热至75°C, 磁力搅拌1.5 h, 磁分离, 超纯水洗涤三次, 制得氨基化 Fe_3O_4 @Pd-ZIF-8;

4) Au- Fe_3O_4 @Pd-ZIF-8.

取2 mL上述制备的Au纳米粒子溶液与2 mL、2 mg/mL的氨基化 Fe_3O_4 @Pd-ZIF-8溶液混合, 室温下振荡24 h, 磁分离, 超纯水洗涤三次, 制得Au- Fe_3O_4 @Pd-ZIF-8;

5) Au- Fe_3O_4 @Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液的制备

将10 mg的Au- Fe_3O_4 @Pd-ZIF-8分散到1 mL超纯水中, 加入1 mL、20 μg/mL的肿瘤标志物检测抗体Ab₂溶液, 4°C恒温振荡培养箱中振荡孵化24 h, 离心分离, 所得固体分散于PBS溶液中, 制成1 ~ 5 mg/mL的Au- Fe_3O_4 @Pd-ZIF-8-Ab₂捕获抗体孵化物溶液, 储存于4°C冰箱中备用。

[0023] 实施例7肿瘤标志物CA125的检测, 步骤如下:

(1) 使用电化学工作站以三电极体系进行测试, 饱和甘汞电极为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 所制备的传感器为工作电极, 在10 mL、50 mmol/L的pH 5.0 ~ 9.0磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2) 用计时电流法对肿瘤标志物CA125进行检测, 输入电压为-0.4 V, 取样间隔0.1 s, 运行时间400 s;

(3) 当背景电流趋于稳定后, 每隔50 s向10 mL、50 mmol/L的pH=7.4磷酸盐缓冲溶液中注入10 μL、5 mmol/L的双氧水溶液, 记录电流变化;

(4) 采用标准曲线法, 测定样品中CA125的线性范围为0.1 pg/mL ~ 50 ng/mL, 检测限为0.03 pg/mL。

[0024] 实施例8肿瘤标志物CEA的检测

按照实施例7的方法对样品中CEA进行检测, 其线性范围为0.1 pg/mL ~ 45 ng/mL, 检测限为0.03 pg/mL。

专利名称(译)	一种基于Au-Fe ₃ O ₄ @Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN106018806A	公开(公告)日	2016-10-12
申请号	CN201610301770.9	申请日	2016-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	山东理工大学		
申请(专利权)人(译)	山东理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东理工大学		
[标]发明人	李月云 王平 董云会 冯金慧 刘会 刘青 陈磊		
发明人	李月云 王平 董云会 冯金慧 刘会 刘青 陈磊		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/57484		
其他公开文献	CN106018806B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于纳米功能材料、免疫分析以及生物传感技术领域，提供了一种基于Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8标记的夹心型免疫传感器的制备方法及应用。采用Au-Fe₃O₄@Pd-ZIF-8作为检测抗体标记物制备的电化学免疫传感器具有特异性强，灵敏度高和检出限低等优点，对肿瘤标志物CEA、CA125的检测具有重要的科学意义和应用价值。