



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110243895 A

(43)申请公布日 2019.09.17

(21)申请号 201910589727.0

(22)申请日 2019.07.02

(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号济南大学

(72)发明人 曹伟 李璇 魏琴 苗俊聪
许晓婷

(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 赵凤

(51) Int. Cl.

G01N 27/30(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页

(54)发明名称

一种基于 $Mn_xCo_{1-x}Se_2-Pd$ 的夹心型电化学免疫传感器的制备方法及应用

(57)摘要

本发明涉及一种夹心型电化学免疫传感器的制备与应用,具体说是一种以 $UiO-67$,金纳米粒子($UiO-67/Au$)的复合材料为传感平台,以 $Mn_xCo_{1-x}Se_2-Pd$ 为二抗标记物的夹心型免疫传感器,本发明属于新型功能材料、生物传感技术领域。 $UiO-67/Au$ 具有大的比表面积,良好的生物相容性等优点,可以有效促进电子传递过程,是一种优良的传感材料。 $Mn_xCo_{1-x}Se_2-Pd$ 对 H_2O_2 具有良好的催化作用,能够显著提高免疫传感器的灵敏度,扩大检出范围,降低检出限。

1. 一种基于 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd的夹心型电化学免疫传感器的制备方法及应用,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将玻碳电极用抛光粉打磨,再使用超纯水清洗,将电极置于5 mmol/L 铁氰化钾溶液中,并在 $-0.2\sim 0.6$ V 电位下进行扫描,使峰电位的差值小于110 mV;

(2) 将10 μ L,1~2 mg/mL UiO-67/Au溶液滴加在电极上,室温下干燥;

(3) 将10 μ L,10~20 μ g/mL胰岛素一抗滴加在电极上,室温下干燥之后,用PBS清洗,除去多余抗体;

(4) 将5 μ L,质量分数为1~2% BSA溶液滴加于电极上,用以封闭非特异性结合位点,干燥之后使用PBS洗去多余BSA;

(5) 将10 μ L不同浓度的胰岛素抗原滴加到电极上,室温下干燥并用PBS洗涤;

(6) 将10 μ L,3~4 mg/mL $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd-Ab₂溶液滴加于电极上,室温下干燥后用PBS洗涤,夹心型电化学免疫传感器的制备完成。

2. 如权利1所述的一种基于 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd的夹心型电化学免疫传感器的制备方法及应用,其所述的UiO-67/Au复合材料的制备步骤如下:

(1) UiO-67的制备

将45~55 mg 2,2-联吡啶-5,5-二羧酸溶于含有350~400 μ L三乙胺的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,同时,将45~50 mg四氯化锆分散在15~20 mL的DMF中,得到白色溶液,将以上两种溶液混合,然后再加入2~3 ml醋酸,将其倒入高压反应釜中,在85 $^{\circ}$ C下反应24 h,反应结束后,将所得到的沉淀离心收集,用DMF、甲醇和乙醇分别洗涤三次,弃去上清液,将沉淀放入60 $^{\circ}$ C真空干燥箱干燥,最后经过研磨,得到白色粉末UiO-67;

(2) UiO-67/Au的制备

称取0.1~0.2 g UiO-67在室温下超声分散于10~20 mL甲醇中,得到白色均匀乳浊液,加入0.3~0.4 mL氯金酸混合,在室温下搅拌5 h得到黄色乳浊液,称取0.06~0.07 g硼氢化钠超声溶解于10~20 mL甲醇后,逐滴加入到上述黄色乳浊液中,溶液迅速变为红棕色,继续搅拌2 h,将所得到的混合物离心5 min并用乙醇洗涤三次,将沉淀放入60 $^{\circ}$ C真空干燥箱干燥12 h,最后经过研磨得到UiO-67/Au。

3. 如权利1所述的一种基于 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd的夹心型电化学免疫传感器的制备方法及应用,其所述的 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd-Ab₂制备步骤如下:

(1) $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ 的制备

称取4~6 mmol的 $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 、1~3 mmol的 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 和6~8 mmol尿素溶解于40~50 mL超纯水中,形成透明粉红色溶液,转移至高压反应釜,并在120 $^{\circ}$ C下反应6 h,反应结束后,除去上清液,收集沉淀,并将沉淀用超纯水和乙醇分别离心洗涤三次,放入真空干燥箱中干燥6 h,最后得到紫红色粉末,

将1~2 mmol的Se加入到40~50 mL乙二醇中,超声溶解2 h后加入上述紫红色粉末,再将混合液转移到的高压釜中,在180 $^{\circ}$ C下反应12 h,反应之后冷却至室温,将所得到的沉淀离心收集用乙醇和超纯水分别洗涤三次,将产品放入60 $^{\circ}$ C真空干燥箱干燥,

最后把样品放在400 $^{\circ}$ C的氮气中退火1 h;

(2) $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd的制备

将60~70 mg的 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ 分散在80~90 mL乙醇水(50%)中,然后加入13~14 mL Na_2PdCl_4

(10 mmol/L) 溶液, 超声混合, 在搅拌下将 NaBH_4 溶液逐滴加入用以还原金属离子, 反应 2 h 后, 将所得到的混合物离心收集, 用超纯水洗涤三次, 将产品放入 60°C 真空干燥箱干燥;

(3) $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Se}_2\text{-Pd-Ab}_2$ 的制备

用量筒量取 2~3 mL 的 PBS 溶液, 加入 4~6 mg 的 $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Se}_2\text{-Pd}$ 标记物、1~2 mL 的 NHS、1~2 mL 的 EDC 和 100~200 μL 的 Ab_2 , 将溶液混合后放置在 4°C 的冷冻振荡器中, 振荡 24 h, 然后用冷冻离心机将所得到的混合物在 4°C 下用 4000 r/min 离心分离, 用 PBS 溶液洗涤三次, 加入 1 mL 的 $\text{pH}=7.38$ 的 PBS 溶液配成 $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Se}_2\text{-Pd-Ab}_2$ 溶液。

4. 如权利 1 所述一种基于 $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Se}_2\text{-Pd}$ 的夹心型电化学免疫传感器的制备方法及应用, 其特征在于, 用于胰岛素的检验, 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, 所制备的电化学免疫传感器为工作电极;

(2) 使用计时电流法, 在 10~20 mL、 pH 为 6.0~8.0 并含有 5 mmol/L H_2O_2 的 PBS 溶液中进行检测, 起始电压为 $-0.2\sim 0.6$ V, 灵敏度为 10^{-4} , 记录电流变化, 绘制工作曲线;

(3) 将待测样品溶液代替胰岛素的标准溶液进行检测。

一种基于 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd的夹心型电化学免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种电化学免疫传感器的制备与应用,具体说是一种以UiO-67/Au为传感平台,以 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd为二抗标记物的夹心型免疫传感器,本发明属于新型功能材料、生物传感技术领域。

背景技术

[0002] 胰岛素是一种由胰脏内的胰岛B细胞分泌的蛋白质激素。胰岛素的主要功能是促进人体中组织细胞对葡萄糖的摄取和利用,促进葡萄糖转化成糖原并储藏在人体内。胰岛素可以促进人体内的葡萄糖释放能量,以用于机体的生命活动,而且它可以参与调节新陈代谢,控制血糖平衡。当人体的胰岛素分泌不足时,人体的血糖浓度就失去平衡,从而导致糖尿病的出现。因此,通过检测胰岛素的含量来监测糖尿病病情,这在医学治疗方面尤为重要。

[0003] 电化学免疫传感器是指将生物活性物质如酶、抗原、抗体、DNA等生物体成分作为敏感元件,电极作为转换元件,以电势或电流为特征检测信号的传感器。此类传感器具有高灵敏性、高选择性、高专一性和低检出限等优点。

[0004] UiO系列材料是Zr基通过与有机配体连接而呈现立方体结构的,同时具有12配位的金属有机框架材料,其中UiO-67由于具有比表面积和孔道结构大,化学稳定性和热稳定高等优点,被广泛应用在电化学免疫传感器中。Au纳米粒子具有优异的导电性,可以与抗体通过Au-NH₂结合;因此将Au纳米粒子通过原位还原的方法负载在UiO-67上(UiO-67/Au),以此提高复合材料的导电性和生物相容性。

[0005] 在催化领域,双金属催化剂一直以来都是研究的热点。两种金属的协同作用能够改变单金属催化剂的活性,提高自身的稳定性,表现出优异的选择性。将Mn掺杂进CoSe₂中大大增加了催化剂的活性位点,提高了对H₂O₂的催化能力。另外,将Pd纳米粒子负载在 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ 上,不仅可以提高标记物材料对H₂O₂的电催化活性,而且Pd纳米粒子可以通过Pd-NH₂连接抗体提高材料的生物相容性,从而提高传感器的灵敏度,降低检出限,扩大检测范围。

发明内容

[0006] 本发明的目的之一是制备一种以UiO-67/Au为传感平台,以 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd为二抗标记物的夹心型电化学免疫传感器。

[0007] 本发明的目的之二是将该传感器用于胰岛素的高灵敏、特异性检测。

[0008] 本发明的技术方案如下:

1. 一种基于 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd的夹心型电化学免疫传感器的制备方法如下:

(1) 将玻碳电极用抛光粉打磨,再使用超纯水清洗,将电极置于5 mmol/L 铁氰化钾溶液中,并在-0.2~0.6 V 电位下进行扫描,使峰电位的差值小于110 mV;

(2) 将10 μL , 1~2 mg/mL UiO-67/Au溶液滴加在电极上, 室温下干燥;

(3) 将10 μL , 10~20 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素一抗滴加在电极上, 室温下干燥之后, 用PBS清洗, 除去多余抗体;

(4) 将5 μL , 质量分数为1~2% BSA溶液滴加于电极上, 用以封闭非特异性结合位点, 干燥之后使用PBS洗去多余BSA;

(5) 将10 μL 不同浓度的胰岛素抗原滴加到电极上, 室温下干燥并用PBS洗涤;

(6) 将10 μL , 3~4 mg/mL $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Se}_2\text{-Pd}$ 溶液滴加于电极上, 室温下干燥后用PBS洗涤, 夹心型电化学免疫传感器的制备完成。

[0009] 2. 一种基于 $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Se}_2\text{-Pd}$ 的夹心型电化学免疫传感器的UiO-67/Au复合材料的制备步骤如下:

(1) UiO-67的制备

将45~55 mg 2,2-联吡啶-5,5-二羧酸溶于含有350~400 μL 三乙胺的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中, 同时, 将45~50 mg四氯化锆分散在15~20 mL的DMF中, 得到白色溶液, 将以上两种溶液混合, 然后再加入2~3 ml醋酸, 将其倒入高压反应釜中, 在85 $^{\circ}\text{C}$ 下反应24 h, 反应结束后, 将所得到的沉淀离心收集, 用DMF、甲醇和乙醇分别洗涤三次, 弃去上清液, 将沉淀放入60 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥箱干燥, 最后经过研磨, 得到白色粉末UiO-67;

(2) UiO-67/Au的制备

称取0.1~0.2 g UiO-67在室温下超声分散于10~20 mL甲醇中, 得到白色均匀乳浊液, 加入0.3~0.4 mL氯金酸混合, 在室温下搅拌5 h得到黄色乳浊液, 称取0.06~0.07 g硼氢化钠超声溶解于10~20 mL甲醇后, 逐滴加入到上述黄色乳浊液中, 溶液迅速变为红棕色, 继续搅拌2 h, 将所得到的混合物离心5 min并用乙醇洗涤三次, 将沉淀放入60 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥箱干燥12 h, 最后经过研磨得到UiO-67/Au。

[0010] 3. 一种基于 $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Se}_2\text{-Pd}$ 的夹心型电化学免疫传感器的 $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Se}_2\text{-Pd-Ab}_2$ 制备步骤如下:

(1) $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Se}_2$ 的制备

称取4~6 mmol的 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1~3 mmol的 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和6~8 mmol尿素溶解于40~50 mL超纯水中, 形成透明粉红色溶液, 转移至高压反应釜, 并在120 $^{\circ}\text{C}$ 下反应6 h, 反应结束后, 除去上清液, 收集沉淀, 并将沉淀用超纯水和乙醇分别离心洗涤三次, 放入真空干燥箱中干燥6 h, 最后得到紫红色粉末。将1~2 mmol的Se加入到40~50 mL乙二醇中, 超声溶解2 h后加入上述紫红色粉末, 再将混合液转移到的高压釜中, 在180 $^{\circ}\text{C}$ 下反应12 h, 反应之后冷却至室温, 将所得到的沉淀离心收集用乙醇和超纯水分别洗涤三次, 将产品放入60 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥箱干燥。最后把样品放在400 $^{\circ}\text{C}$ 的氮气中退火1 h;

(2) $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Se}_2\text{-Pd}$ 的制备

将60~70 mg的 $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Se}_2$ 分散在80~90 mL乙醇水(50%)中, 然后加入13~14 mL Na_2PdCl_4 (10 mmol/L)溶液, 超声混合, 在搅拌下将 NaBH_4 溶液逐滴加入用以还原金属离子, 反应2 h后, 将所得到的混合物离心收集, 用超纯水洗涤三次, 将产品放入60 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥箱干燥;

(3) $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Se}_2\text{-Pd-Ab}_2$ 的制备

用量筒量取2~3 mL的PBS溶液, 加入4~6 mg的 $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Se}_2\text{-Pd}$ 标记物、1~2 mL的NHS、1~2

mL的EDC和100~200 μ L的Ab₂,将溶液混合后放置在4℃的冷冻震荡器中,振荡24 h,然后用冷冻离心机将所得到的混合物在4℃下用4000 r/min离心分离,用PBS溶液洗涤三次,加入1 mL的pH=7.38的PBS溶液配成Mn_xCo_{1-x}Se₂-Pd-Ab₂溶液。

[0011] 4胰岛素的检验,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,所制备的电化学免疫传感器为工作电极;

(2)使用计时电流法,在10~20 mL、pH为6.0~8.0并含有5 mmol/L H₂O₂的PBS溶液中进行检测,起始电压为-0.2~0.6 V,灵敏度为10⁻⁴,记录电流变化,绘制工作曲线;

(3)将待测样品溶液代替胰岛素的标准溶液进行检测。

[0012] 本发明的有益成果

1.本发明将Au负载在UiO-67上,提高了传感器的导电性,而且Au与抗体通过Au-NH₂键将抗体固定在电极表面,提高了抗体的结合率。

[0013] 2.本发明以Mn_xCo_{1-x}Se₂-Pd为标记物,促进电子传递,显现出对H₂O₂优异的催化性能,增大电流信号值,显著地提高了传感器的灵敏度,降低了传感器的检出限。

[0014] 3.本发明利用抗原、抗体的免疫反应,提高了检测方法的特异性。

[0015] 4.本发明制备的夹心型电化学免疫传感器利用UiO-67/Au传感平台的导电性和Mn_xCo_{1-x}Se₂-Pd高电催化性进行胰岛素的检测,具有检测线低、线性范围宽、灵敏度高、操作简单、响应时间短,特异性检验等特点,对胰岛素的检测限可达0.34 μ g/mL。

具体实施方式

[0016] 实施例1 一种基于Mn_xCo_{1-x}Se₂-Pd的夹心型电化学免疫传感器的UiO-67/Au复合材料的制备步骤如下:

将45 mg 2,2-联吡啶-5,5-二羧酸溶于含有360 μ L三乙胺的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,同时,将45 mg四氯化锆分散在16 mL的DMF中,得到白色溶液,将以上两种溶液混合,然后再加入2.25 mL醋酸,将其倒入高压反应釜中,在85℃下反应24 h,反应结束后,将所得到的沉淀离心收集,用DMF、甲醇和乙醇分别洗涤三次,弃去上清液,将沉淀放入60℃真空干燥箱干燥,最后经过研磨,得到白色粉末UiO-67;

(2)UiO-67/Au的制备

称取0.1 g UiO-67在室温下超声分散于10 mL甲醇中,得到白色均匀乳浊液,加入0.3 mL氯金酸混合,在室温下搅拌5 h得到黄色乳浊液,称取0.06 g硼氢化钠超声溶解于10 mL甲醇后,逐滴加入到上述黄色乳浊液中,溶液迅速变为红棕色,继续搅拌2 h,将所得到的混合物离心5 min并用乙醇洗涤三次,将沉淀放入60℃真空干燥箱干燥12 h,最后经过研磨得到UiO-67/Au。

[0017] 实施例2 一种基于Mn_xCo_{1-x}Se₂-Pd的夹心型电化学免疫传感器的UiO-67/Au复合材料的制备步骤如下:

将50 mg 2,2-联吡啶-5,5-二羧酸溶于含有350 μ L三乙胺的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,同时,将47 mg四氯化锆分散在18 mL的DMF中,得到白色溶液,将以上两种溶液混合,然后再加入2.5 mL醋酸,将其倒入高压反应釜中,在85℃下反应24 h,反应结束后,将所得到的沉淀离心收集,用DMF、甲醇和乙醇分别洗涤三次,弃去上清液,将沉淀放入60℃真空干燥

箱干燥,最后经过研磨,得到白色粉末UiO-67;

(2)UiO-67/Au的制备

称取0.15 g UiO-67在室温下超声分散于15 mL甲醇中,得到白色均匀乳浊液,加入0.35 mL氯金酸混合,在室温下搅拌5 h得到黄色乳浊液,称取0.065 g硼氢化钠超声溶解于15 mL甲醇后,逐滴加入到上述黄色乳浊液中,溶液迅速变为红棕色,继续搅拌2 h,将所得到的混合物离心5 min并用乙醇洗涤三次,将沉淀放入60°C真空干燥箱干燥12 h,最后经过研磨得到UiO-67/Au。

[0018] 实施例3 一种基于 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd的夹心型电化学免疫传感器的UiO-67/Au复合材料的制备步骤如下:

将55 mg 2,2-联吡啶-5,5-二羧酸溶于含有400 μ L三乙胺的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,同时,将50 mg四氯化锆分散在20 mL的DMF中,得到白色溶液,将以上两种溶液混合,然后再加入3 mL醋酸,将其倒入高压反应釜中,在85°C下反应24 h,反应结束后,将所得到的沉淀离心收集,用DMF、甲醇和乙醇分别洗涤三次,弃去上清液,将沉淀放入60°C真空干燥箱干燥,最后经过研磨,得到白色粉末UiO-67;

(2)UiO-67/Au的制备

称取0.2 g UiO-67在室温下超声分散于20 mL甲醇中,得到白色均匀乳浊液,加入0.4 mL氯金酸混合,在室温下搅拌5 h得到黄色乳浊液,称取0.07 g硼氢化钠超声溶解于20 mL甲醇后,逐滴加入到上述黄色乳浊液中,溶液迅速变为红棕色,继续搅拌2 h,将所得到的混合物离心5 min并用乙醇洗涤三次,将沉淀放入60°C真空干燥箱干燥12 h,最后经过研磨得到UiO-67/Au。

[0019] 实施例4 一种基于 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd的夹心型电化学免疫传感器的 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd-Ab₂制备步骤如下:

(1) $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ 的制备

称取4 mmol的 $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 、1 mmol的 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 和7.5 mmol尿素溶解于40 mL超纯水中,形成透明粉红色溶液,转移至高压反应釜,并在120°C下反应6 h,反应结束后,除去上清液,收集沉淀,并将沉淀用超纯水和乙醇分别离心洗涤三次,放入真空干燥箱中干燥6 h,最后得到紫红色粉末。将1 mmol的Se加入到40 mL乙二胺中,超声溶解2 h后加入上述紫红色粉末,再将混合液转移到的高压釜中,在180 °C下反应12 h,反应之后冷却至室温,将所得到的沉淀离心收集用乙醇和超纯水分别洗涤三次,将产品放入60°C真空干燥箱干燥。最后把样品放在400 °C的氮气中退火1 h;

(2) $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd的制备

将60 mg的 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ 分散在80 mL乙醇水(50%)中,然后加入13 mL Na_2PdCl_4 (10 mmol/L)溶液,超声混合,在搅拌下将 $NaBH_4$ 溶液逐滴加入用以还原金属离子,反应2 h后,将所得到的混合物离心收集,用超纯水洗涤三次,将产品放入60°C真空干燥箱干燥;

(3) $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd-Ab₂的制备

用量筒量取2 mL的PBS溶液,加入4 mg的 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd标记物、1 mL的NHS、1 mL的EDC和100 μ L的Ab₂,将溶液混合后放置在4°C的冷冻振荡器中,振荡24 h,然后用冷冻离心机将所得到的混合物在4°C下用4000 r/min离心分离,用PBS溶液洗涤三次,加入1 mL的pH=7.38的PBS溶液配成 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd-Ab₂溶液。

[0020] 实施例5 一种基于 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd的夹心型电化学免疫传感器的 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd- Ab_2 制备步骤如下:

(1) $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ 的制备

称取5 mmol的 $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 、2 mmol的 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 和7 mmol尿素溶解于45 mL超纯水中,形成透明粉红色溶液,转移至高压反应釜,并在120℃下反应6 h,反应结束后,除去上清液,收集沉淀,并将沉淀用超纯水和乙醇分别离心洗涤三次,放入真空干燥箱中干燥6 h,最后得到紫红色粉末。将1.5 mmol的Se加入到45 mL乙二醇中,超声溶解2 h后加入上述紫红色粉末,再将混合液转移到的高压釜中,在180℃下反应12 h,反应之后冷却至室温,将所得到的沉淀离心收集用乙醇和超纯水分别洗涤三次,将产品放入60℃真空干燥箱干燥。最后把样品放在400℃的氮气中退火1 h;

(2) $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd的制备

将65 mg的 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ 分散在85 mL乙醇水(50%)中,然后加入13 mL Na_2PdCl_4 (10 mmol/L)溶液,超声混合,在搅拌下将 $NaBH_4$ 溶液逐滴加入用以还原金属离子,反应2 h后,将所得到的混合物离心收集,用超纯水洗涤三次,将产品放入60℃真空干燥箱干燥;

(3) $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd- Ab_2 的制备

用量筒量取2.5 mL的PBS溶液,加入5 mg的 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd标记物、1.5 mL的NHS、1.5 mL的EDC和150 μ L的 Ab_2 ,将溶液混合后放置在4℃的冷冻震荡器中,振荡24 h,然后用冷冻离心机将所得到的混合物在4℃下用4000 r/min离心分离,用PBS溶液洗涤三次,加入1 mL的pH=7.38的PBS溶液配成 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd- Ab_2 溶液。

[0021] 实施例6 一种基于 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd的夹心型电化学免疫传感器的 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd- Ab_2 制备步骤如下:

(1) $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ 的制备

称取6 mmol的 $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 、3 mmol的 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 和8 mmol尿素溶解于50 mL超纯水中,形成透明粉红色溶液,转移至高压反应釜,并在120℃下反应6 h,反应结束后,除去上清液,收集沉淀,并将沉淀用超纯水和乙醇分别离心洗涤三次,放入真空干燥箱中干燥6 h,最后得到紫红色粉末。将2 mmol的Se加入到50 mL乙二醇中,超声溶解2 h后加入上述紫红色粉末,再将混合液转移到的高压釜中,在180℃下反应12 h,反应之后冷却至室温,将所得到的沉淀离心收集用乙醇和超纯水分别洗涤三次,将产品放入60℃真空干燥箱干燥。最后把样品放在400℃的氮气中退火1 h;

(2) $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd的制备

将70 mg的 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ 分散在90 mL乙醇水(50%)中,然后加入14 mL Na_2PdCl_4 (10 mmol/L)溶液,超声混合,在搅拌下将 $NaBH_4$ 溶液逐滴加入用以还原金属离子,反应2 h后,将所得到的混合物离心收集,用超纯水洗涤三次,将产品放入60℃真空干燥箱干燥;

(3) $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd- Ab_2 的制备

用量筒量取3 mL的PBS溶液,加入6 mg的 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd标记物、2 mL的NHS、2 mL的EDC和200 μ L的 Ab_2 ,将溶液混合后放置在4℃的冷冻震荡器中,振荡24 h,然后用冷冻离心机将所得到的混合物在4℃下用4000 r/min离心分离,用PBS溶液洗涤三次,加入1 mL的pH=7.38的PBS溶液配成 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd- Ab_2 溶液。

[0022] 实施例7 一种基于 $Mn_xCo_{1-x}Se_2$ -Pd的夹心型电化学免疫传感器的制备方法:

(1) 将玻碳电极用抛光粉打磨,再使用超纯水清洗,将电极置于5 mmol/L 铁氰化钾溶液中,并在 -0.2~0.6 V 电位下进行扫描,使峰电位的差值小于110 mV;

(2) 将10 μL ,1.5 mg/mL UiO-67/Au溶液滴加在电极上,室温下干燥;

(3) 将10 μL ,10 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素一抗滴加在电极上,室温下干燥之后,用PBS清洗,除去多余抗体;

(4) 将5 μL ,质量分数为1% BSA溶液滴加于电极上,用以封闭非特异性结合位点,干燥之后使用PBS洗去多余BSA;

(5) 将10 μL 不同浓度的胰岛素抗原滴加到电极上,室温下干燥并用PBS洗涤;

(6) 将10 μL ,3 mg/mL $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Se}_2\text{-Pd-Ab}_2$ 溶液滴加于电极上,室温下干燥后用PBS洗涤,夹心型电化学免疫传感器的制备完成。

[0023] 实施例8一种基于 $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Se}_2\text{-Pd}$ 的夹心型电化学免疫传感器的制备方法:

(1) 将玻碳电极用抛光粉打磨,再使用超纯水清洗,将电极置于5 mmol/L 铁氰化钾溶液中,并在-0.2~0.6 V 电位下进行扫描,使峰电位的差值小于110 mV;

(2) 将10 μL ,1 mg/mL UiO-67/Au溶液滴加在电极上,室温下干燥;

(3) 将10 μL ,15 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素一抗滴加在电极上,室温下干燥之后,用PBS清洗,除去多余抗体;

(4) 将5 μL ,质量分数为1% BSA溶液滴加于电极上,用以封闭非特异性结合位点,干燥之后使用PBS洗去多余BSA;

(5) 将10 μL 不同浓度的胰岛素抗原滴加到电极上,室温下干燥并用PBS洗涤;

(6) 将10 μL ,3.5 mg/mL $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Se}_2\text{-Pd-Ab}_2$ 溶液滴加于电极上,室温下干燥后用PBS洗涤,夹心型电化学免疫传感器的制备完成。

[0024] 实施例9 一种基于 $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Se}_2\text{-Pd}$ 的夹心型电化学免疫传感器的制备方法:

(1) 将玻碳电极用抛光粉打磨,再使用超纯水清洗,将电极置于5 mmol/L 铁氰化钾溶液中,并在-0.2~0.6 V 电位下进行扫描,使峰电位的差值小于110 mV;

(2) 将10 μL ,2 mg/mL UiO-67/Au溶液滴加在电极上,室温下干燥;

(3) 将10 μL ,20 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素一抗滴加在电极上,室温下干燥之后,用PBS清洗,除去多余抗体;

(4) 将5 μL ,质量分数为2% BSA溶液滴加于电极上,用以封闭非特异性结合位点,干燥之后使用PBS洗去多余BSA;

(5) 将10 μL 不同浓度的胰岛素抗原滴加到电极上,室温下干燥并用PBS洗涤;

(6) 将10 μL ,4 mg/mL $\text{Mn}_x\text{Co}_{1-x}\text{Se}_2\text{-Pd-Ab}_2$ 溶液滴加于电极上,室温下干燥后用PBS洗涤,夹心型电化学免疫传感器的制备完成。

[0025] 实施例10 胰岛素的检验,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,所制备的电化学免疫传感器为工作电极;

(2) 使用计时电流法,在10 mL、pH为7.4并含有5 mmol/L H_2O_2 的PBS溶液中进行检测,起始电压为-0.2~0.6 V,灵敏度为 10^{-4} ,记录电流变化,绘制工作曲线;

(3) 将待测样品溶液代替胰岛素的标准溶液进行检测;

(4) 胰岛素检测的线性范围是 10^{-3} ~100ng/mL,检测限是0.34 pg/mL。

专利名称(译)	一种基于MnxCo1-xSe2-Pd的夹心型电化学免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN110243895A	公开(公告)日	2019-09-17
申请号	CN201910589727.0	申请日	2019-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	济南大学		
申请(专利权)人(译)	济南大学		
当前申请(专利权)人(译)	济南大学		
[标]发明人	曹伟 李璇 魏琴 苗俊聪 许晓婷		
发明人	曹伟 李璇 魏琴 苗俊聪 许晓婷		
IPC分类号	G01N27/30 G01N27/327 G01N21/78 G01N33/532		
CPC分类号	G01N21/78 G01N27/308 G01N27/3278 G01N33/532		
代理人(译)	赵凤		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种夹心型电化学免疫传感器的制备与应用，具体说是一种以UiO-67，金纳米粒子 (UiO-67/Au) 的复合材料为传感平台，以MnxCo1-xSe2-Pd为二抗标记物的夹心型免疫传感器，本发明属于新型功能材料、生物传感技术领域。UiO-67/Au具有大的比表面积，良好的生物相容性等优点，可以有效促进电子传递过程，是一种优良的传感材料。MnxCo1-xSe2-Pd对H2O2具有良好的催化作用，能够显著提高免疫传感器的灵敏度，扩大检出范围，降低检出限。