



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110412259 A

(43)申请公布日 2019.11.05

(21)申请号 201910804968.2

(22)申请日 2019.08.28

(71)申请人 浙江理工大学

地址 310018 浙江省杭州市钱塘新区下沙  
高教西区2号大街928号浙江理工大学

(72)发明人 彭志勤 何宇杰 刘珉琦 黄诗莹  
万军民

(74)专利代理机构 杭州永航联科专利代理有限  
公司 33304

代理人 侯兰玉

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 27/327(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页

(54)发明名称

一种基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免  
疫传感器的构建方法

(57)摘要

本发明涉及电化学免疫传感器领域,公开了一种基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器的构建方法,包括:1)2-硝基对苯二甲酸的制备;2)2-氨基对苯二甲酸的制备;3)Co-MOFs材料的制备;4)Au@Co-MOFs复合材料的制备;5)基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器的构建。通过本发明可以构建出一种基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器,可以用于超灵敏检测,具有更好的准确性,更高的灵敏度,对我国电化学免疫传感器领域具有十分重要的现实意义。

1. 一种基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器的构建方法,以g、mmol和μL、mL计,其特征在于包括以下步骤:

1) 在反应容器中加入由浓硫酸和发烟硝酸混合而成的混酸,在室温及搅拌条件下加入对苯二甲酸,加料时间为20-40min;在55-75min内加热至60-70℃,保温60-80min,继续升温至77-82℃,然后控制温度超过85℃,保温2.5-4h,将所得反应物冷却后,倒入碎冰水中,过滤沉淀,水洗至中性,在水中重结晶,得到2-硝基对苯二甲酸,备用;

2) 在反应容器中加入28-35mL浓盐酸,搅拌条件下加入13-15g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,待全部溶解后,加入7-8g 2-硝基对苯二甲酸;在30-40min内加热97-103℃,反应2-3h,冷却至室温,过滤,用稀盐酸洗涤滤饼,用氢氧化钠溶液将滤饼溶解,再调至酸性,过滤沉淀,干燥得5.5-6.7g 2-氨基对苯二甲酸,备用;

3) 取2.1-4.2mmol 2-氨基对苯二甲酸溶于33-47mL的N,N-二甲基甲酰胺中,另将1.1-2.1mmol醋酸钴溶于37-45mL的N,N-二甲基甲酰胺中,搅拌;待两种溶液混合搅拌1-1.5h后,转移到反应釜,120-140℃下反应44-52h,所得产物依次用无水乙醇和N,N-二甲基甲酰胺洗涤,真空干燥,得到Co-MOFs材料;

4) 在75-85℃搅拌下将Co-MOFs材料和氯金酸溶液混合,超声分散,干燥后在管式炉中以4-6℃/min的速度升温至480-520℃,焙烧1.5-2.5h,得到的Au@Co-MOFs,备用;

5) 将玻碳电极在microcloth垫上用20-25nm氧化铝抛光浆打磨后在无水乙醇中超声清洗,后在去离子水中超声清洗,接然后用稀硫酸对电极循环活化40-50圈,彻底洗涤;

6) 在玻碳电极表面滴加10-15μL的Au@Co-MOFs溶液,室温干燥后在电极表面滴加10-15μL 0.04-0.06M的MPA水溶液,孵育成饱和MPA单层,然后用PBS清洗,得到修饰有MPA的电极;将修饰有MPA的电极在0.04-0.06M EDC/0.02-0.04M NHS的MES缓冲液中孵育,将MPA的末端羧基转化为活性NHS酯;然后滴加5-10μL特异性一抗,使其端氨基与活化后的羧基结合,用PBS清洗去除未结合的抗体后,再用10-15μL的BSA溶液在36-38℃下将电极封闭25-30min以减少分析物或杂质的非特异性结合,即完成电化学免疫传感器的组装,得到基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤1)中,所述发烟硝酸和浓硫酸的体积比为1:(1.2-1.5)。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤2)中,所述浓盐酸的浓度是36-38wt%,所述稀盐酸的浓度为8-12wt%;所述氢氧化钠溶液的浓度为8-12wt%。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤3)中,真空干燥温度为65-75℃,真空干燥时间为10-15h。

5. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤4)中,所述Co-MOFs材料和氯金酸摩尔比为1:2-2.5;所述氯金酸溶液的浓度为0.8-1.2mmol/L。

6. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤5)中,两次超声时间为10-15min,所述稀硫酸的浓度范围是2-3mol/L。

7. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤6)中,所述Au@Co-MOFs溶液的浓度范围为0.1-0.5mol/L。

8. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤6)中,所述PBS的pH=7.4。

9. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤6)中,两次孵育的温度为36-38℃,时间

为50-70min。

10. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤6) 中,所述BSA溶液的浓度为0.5-1.5wt%。

# 一种基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器的构建方法

## 技术领域

[0001] 本发明涉及电化学免疫传感器领域,尤其涉及一种基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器的构建方法。

## 背景技术

[0002] MOFs是金属有机骨架化合物的简称。是由无机金属中心(金属离子或金属簇)与桥连的有机配体通过自组装相互连接,形成的一类具有周期性网络结构的晶态多孔材料。MOFs是一种有机-无机杂化材料,也称配位聚合物,它既不同于无机多孔材料,也不同于一般的有机配合物。这种兼有无机材料的刚性和有机材料的柔性特征,使其在现代材料研究方面呈现出巨大的发展潜力和诱人的发展前景。

[0003] 电化学免疫传感器具有灵敏度高、仪器设备简单、操作方便、易于实现自动化等特点,广泛地应用于生物、医学、药学、临床、环境、食品、免疫和核酸杂交分析和工业分析等领域。在21世纪中必将继续为解决人类面临的各种重大问题发挥更加显著的作用。但是,在进行超灵敏检测时,它的精确性达不到要求。因此,有必要开发出新的电化学免疫传感器来应对这些具有高要求的使用情况。

## 发明内容

[0004] 为了解决上述技术问题,本发明提供了一种基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器的构建方法,本发明创造性地将MOFs材料应用于电化学免疫传感器的构建,本发明构建的电化学免疫传感器具有直观、更加准确、灵敏度更高的特点。

[0005] 本发明的具体技术方案为:一种基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器的构建方法,包括以下步骤:

[0006] 1)在反应容器中加入由浓硫酸和发烟硝酸混合而成的混酸,在室温及搅拌条件下加入对苯二甲酸,加料时间为20-40min;在55-75min内加热至60-70℃,保温60-80min,继续升温至77-82℃,然后控制温度超过85℃,保温2.5-4h,将所得反应物冷却后,倒入碎冰水中,过滤沉淀,水洗至中性,在水中重结晶,得到2-硝基对苯二甲酸,备用。

[0007] 本发明在步骤1)中制备的2-硝基对苯二甲酸,是通过硝化反应制备得到的,经过重结晶操作,具有较好的纯净度。

[0008] 2)在反应容器中加入28-35ml浓盐酸,搅拌条件下加入13-15g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,待全部溶解后,加入7-8g 2-硝基对苯二甲酸;在30-40min内加热97-103℃,反应2-3h,冷却至室温,过滤,用稀盐酸洗涤滤饼,用氢氧化钠溶液将滤饼溶解,再调至酸性,过滤沉淀,干燥得5.5-6.7g 2-氨基对苯二甲酸,备用;

[0009] 3)取2.1-4.2mmol 2-氨基对苯二甲酸溶于33-47mL的N,N-二甲基甲酰胺中,另将1.1-2.1mmol醋酸钴溶于37-45ml的N,N-二甲基甲酰胺中,搅拌;待两种溶液混合搅拌1-1.5h后,转移到反应釜,120-140℃下反应44-52h,所得产物依次用无水乙醇和N,N-二甲基

甲酰胺洗涤,真空干燥,得到Co-MOFs材料;

[0010] 本发明在步骤3)通过2-氨基对苯二甲酸和醋酸钴制备得到了Co-MOFs材料,具有较好的多孔性以及大的比表面积,有利于在接下去的步骤中合成复合材料。

[0011] 4)在75-85℃搅拌下将Co-MOFs材料和氯金酸溶液混合,超声分散,干燥后在管式炉中以4-6℃/min的速度升温至480-520℃,焙烧1.5-2.5h,得到的Au@Co-MOFs,备用。

[0012] 5)将玻碳电极在microcloth垫上用20-25nm氧化铝抛光浆打磨后在无水乙醇中超声清洗,后在去离子水中超声清洗,接然后用稀硫酸对电极循环活化40-50圈,彻底洗涤。

[0013] 6)在玻碳电极表面滴加10-15μL的Au@Co-MOFs溶液,室温干燥后在电极表面滴加10-15μL 0.04-0.06M的MPA水溶液,孵育成饱和MPA单层,然后用PBS清洗,得到修饰有MPA的电极;将修饰有MPA的电极在0.04-0.06M EDC/0.02-0.04M NHS的MES缓冲液中孵育,将MPA的末端羧基转化为活性NHS酯;然后滴加5-10μL特异性一抗,使其端氨基与活化后的羧基结合,用PBS清洗去除未结合的抗体后,再用10-15μL的BSA溶液在36-38℃下将电极封闭25-30min以减少分析物或杂质的非特异性结合,即完成电化学免疫传感器的组装,得到基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器。

[0014] 本发明在步骤6)中构建出的基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器可以通过将含有某一类蛋白质的溶液滴加到玻碳电极的表面,利用电化学工作站进行相关的检测,进行超灵敏检测。

[0015] 作为优选,步骤1)中,所述发烟硝酸和浓硫酸的体积比为1:(1.2-1.5)。

[0016] 作为优选,步骤2)中,所述浓盐酸的浓度是36-38wt %,所述稀盐酸的浓度是8-12wt %;所述氢氧化钠溶液的浓度为8-12wt %。

[0017] 作为优选,步骤3)中,真空干燥温度为65-75℃,真空干燥时间为10-15h。

[0018] 作为优选,步骤4)中,所述Co-MOFs材料和氯金酸的摩尔比为1:(2-2.5);所述氯金酸溶液的浓度0.8-1.2mmol/L。

[0019] 作为优选,步骤5)中,两次超声时间为10-15min,所述稀硫酸的浓度范围是2-3mol/L。

[0020] 作为优选,步骤6)中,所述Au@Co-MOFs溶液的浓度范围为0.1-0.5mol/L。

[0021] 作为优选,步骤6)中,所述PBS的pH=7.4。

[0022] 作为优选,步骤6)中,两次孵育的温度为36-39℃,时间为50-70min。

[0023] 作为优选,步骤6)中,所述BSA溶液的浓度为0.5-1.5wt %。

[0024] 与现有技术对比,本发明的有益效果是:

[0025] 1、本发明制备的Co-MOFs材料具有多孔性以及大的比表面积,能够更好的与纳米金结合形成复合材料,具有较好的结构与功能性,使其具有更好的信号放大效果。

[0026] 2、本发明制备的MOFs材料具有较小的空间位阻,能够很好的连接所需的纳米金材料,并且在检测过程中可以与抗体进行更好的特异性反应。

[0027] 3、本发明制备的Au@Co-MOFs复合材料具有更加优越的导电性,是一种理想的放大电信号的载体,能够在构建出的电化学免疫传感器中更好的增强测得的电信号,提高检测的灵敏度。

[0028] 4、本发明构建的电化学免疫传感器用Au@Co-MOFs复合材料修饰电极,在超灵敏检测过程对拥有比常规电化学免疫传感器更好的准确性,更高的精确度,更强的专一性。

## 具体实施方式

[0029] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述。

### [0030] 实施例1

[0031] 1) 在反应容器中加入由浓硫酸和发烟硝酸混合而成的混酸(发烟硝酸:硫酸=1:1.2体积比),在室温及搅拌条件下加入12g的对苯二甲酸(混酸:对苯二甲酸=1.01:1摩尔比),加料时间为27min;在60min内加热至66℃,保温75min,继续升温至80℃,然后控制温度超过85℃,保温3.5h,将所得反应物冷却后,倒入碎冰水中,过滤沉淀,水洗至中性,在水中重结晶,得到9.3g 2-硝基对苯二甲酸,备用;

[0032] 2) 在反应容器中加入28ml浓盐酸,搅拌条件下加入13g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,待全部溶解后,加入7g 2-硝基对苯二甲酸;在35min内加热98℃,反应2h,冷却至室温,过滤,用稀盐酸洗涤滤饼,用氢氧化钠溶液将滤饼溶解,再调至酸性,过滤沉淀,干燥得5.7g 2-氨基对苯二甲酸,备用;

[0033] 3) 称取步骤2)中2.1mmol 2-氨基对苯二甲酸溶解于45ml的N,N-二甲基甲酰胺溶剂中,再分别加入1.1mmol醋酸钴溶解于40ml的DMF溶剂中,磁力搅拌。待两种溶液溶解后,将其分别混合,搅拌1.5h后,转移到反应釜,130℃条件下,反应45h。所得产物依次用无水乙醇和DMF洗3次,70℃真空干燥12h,得到Zn-MOFs材料;

[0034] 4) 在80℃搅拌下,将Co-MOFs材料和氯金酸溶液混合,将该混合溶液超声分散,干燥后在管式炉中以5℃/min的速度升温至500℃,焙烧2h,得到的粉末即为Au@Co-MOFs,备用;

[0035] 5) 将玻碳电极在microcloth垫上用20nm氧化铝抛光浆打磨后在无水乙醇中超声清洗,后在去离子水中超声清洗,接然后用稀硫酸对电极循环活化40圈,彻底洗涤;

[0036] 6) 在玻碳电极表面滴加15μL的Au@Co-MOFs溶液,室温干燥后在电极表面滴加15μL 0.04M的MPA水溶液,孵育成饱和MPA单层,然后用PBS清洗,得到修饰有MPA的电极;将修饰有MPA的电极在0.06M EDC/0.04M NHS的MES缓冲液中孵育,将MPA的末端羧基转化为活性NHS酯;然后滴加10μL特异性一抗,使其端氨基与活化后的羧基结合,用PBS清洗去除未结合的抗体后,再用15μL的BSA溶液在37℃下将电极封闭30min以减少分析物或杂质的非特异性结合,即完成电化学免疫传感器的组装,得到基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器。

### [0037] 实施例2

[0038] 1) 在反应容器中加入由浓硫酸和发烟硝酸混合而成的混酸(发烟硝酸:硫酸=1:1.2体积比),在室温及搅拌条件下加入15g的对苯二甲酸(混酸:对苯二甲酸=1.01:1摩尔比),加料时间为35min;在65min内加热至70℃,保温60min,继续升温至81℃,然后控制温度超过85℃,保温3h,将所得反应物冷却后,倒入碎冰水中,过滤沉淀,水洗至中性,在水中重结晶,得到10.8g 2-硝基对苯二甲酸,备用;

[0039] 2) 在反应容器中加入35ml浓盐酸,搅拌条件下加入15g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,待全部溶解后,加入8g 2-硝基对苯二甲酸;在40min内加热100℃,反应2h,冷却至室温,过滤,用稀盐酸洗涤滤饼,用氢氧化钠溶液将滤饼溶解,再调至酸性,过滤沉淀,干燥得6.4g 2-氨基对苯二甲酸,备用;

[0040] 3) 称取步骤2)中2.8mmol 2-氨基对苯二甲酸溶解于45ml的N,N-二甲基甲酰胺溶剂中,再分别加入1.4mmol醋酸钴溶解于40ml的DMF溶剂中,磁力搅拌。待两种溶液溶解后,

将其分别混合,搅拌1h后,转移到反应釜,120℃条件下,反应48h。所得产物依次用无水乙醇和DMF洗3次,70℃真空干燥12h,得到Co-MOFs材料;

[0041] 4) 在80℃搅拌下,将Co-MOFs材料和氯金酸溶液混合,将该混合溶液超声分散,干燥后在管式炉中以4℃/min的速度升温至480℃,焙烧2h,得到的粉末即为Au@Co-MOFs,备用;

[0042] 5) 将玻碳电极在microcloth垫上用20nm氧化铝抛光浆打磨后在无水乙醇中超声清洗,后在去离子水中超声清洗,接然后用稀硫酸对电极循环活化45圈,彻底洗涤;

[0043] 6) 在玻碳电极表面滴加15μL的Au@Co-MOFs溶液,室温干燥后在电极表面滴加15μL 0.04M的MPA水溶液,孵育成饱和MPA单层,然后用PBS清洗,得到修饰有MPA的电极;将修饰有MPA的电极在0.06M EDC/0.04M NHS的MES缓冲液中孵育,将MPA的末端羧基转化为活性NHS酯;然后滴加10μL特异性一抗,使其端氨基与活化后的羧基结合,用PBS清洗去除未结合的抗体后,再用15μL的BSA溶液在37℃下将电极封闭30min以减少分析物或杂质的非特异性结合,即完成电化学免疫传感器的组装,得到基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器。

[0044] 实施例3

[0045] 1) 在反应容器中加入由浓硫酸和发烟硝酸混合而成的混酸(发烟硝酸:硫酸=1:1.2体积比),在室温及搅拌条件下加入13g的对苯二甲酸(混酸:对苯二甲酸=1.01:1摩尔比),加料时间为35min;在65min内加热至70℃,保温60min,继续升温至81℃,然后控制温度超过85℃,保温3h,将所得反应物冷却后,倒入碎冰水中,过滤沉淀,水洗至中性,在水中重结晶,得到10.2g 2-硝基对苯二甲酸,备用;

[0046] 2) 在反应容器中加入35ml浓盐酸,搅拌条件下加入14g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,待全部溶解后,加入8g 2-硝基对苯二甲酸;在40min内加热100℃,反应2h,冷却至室温,过滤,用稀盐酸洗涤滤饼,用氢氧化钠溶液将滤饼溶解,再调至酸性,过滤沉淀,干燥得6.1g 2-氨基对苯二甲酸,备用;

[0047] 3) 称取步骤2)中4.2mmol 2-氨基对苯二甲酸溶解于45ml的N,N-二甲基甲酰胺溶剂中,再分别加入2.1mmol醋酸锌溶解于40ml的DMF溶剂中,磁力搅拌。待两种溶液溶解后,将其分别混合,搅拌1h后,转移到反应釜,125℃条件下,反应50h。所得产物依次用无水乙醇和DMF洗3次,70℃真空干燥12h,得到Co-MOFs材料;

[0048] 4) 在85℃搅拌下,将Zn-MOFs材料和氯金酸溶液混合,将该混合溶液超声分散,干燥后在管式炉中以6℃/min的速度升温至520℃,焙烧3h,得到的粉末即为Au@Co-MOFs,备用;

[0049] 5) 将玻碳电极在microcloth垫上用20nm氧化铝抛光浆打磨后在无水乙醇中超声清洗,后在去离子水中超声清洗,接然后用稀硫酸对电极循环活化50圈,彻底洗涤;

[0050] 6) 在玻碳电极表面滴加15μL的Au@Co-MOFs溶液,室温干燥后在电极表面滴加15μL 0.06M的MPA水溶液,孵育成饱和MPA单层,然后用PBS清洗,得到修饰有MPA的电极;将修饰有MPA的电极在0.06M EDC/0.04M NHS的MES缓冲液中孵育,将MPA的末端羧基转化为活性NHS酯;然后滴加10μL特异性一抗,使其端氨基与活化后的羧基结合,用PBS清洗去除未结合的抗体后,再用15μL的BSA溶液在37℃下将电极封闭30min以减少分析物或杂质的非特异性结合,即完成电化学免疫传感器的组装,得到基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器。

[0051] 在实施例1-3中,构建出的基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器的检测

下限为60-70pg,这比常规的电化学免疫传感器的检测下限要高1-2个等级,具有更好的灵敏性和更加优秀的准确度。

[0052] 本发明中所用原料、设备,若无特别说明,均为本领域的常用原料、设备;本发明中所用方法,若无特别说明,均为本领域的常规方法。

[0053] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例,并非对本发明作任何限制,凡是根据本发明技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、变更以及等效变换,均仍属于本发明技术方案的保护范围。

专利名称(译)	一种基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器的构建方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110412259A</a>	公开(公告)日	2019-11-05
申请号	CN201910804968.2	申请日	2019-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	浙江理工大学		
申请(专利权)人(译)	浙江理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江理工大学		
[标]发明人	彭志勤 何宇杰 黄诗莹 万军民		
发明人	彭志勤 何宇杰 刘珉琦 黄诗莹 万军民		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/327		
CPC分类号	G01N27/308 G01N27/3278 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及电化学免疫传感器领域，公开了一种基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器的构建方法，包括：1)2-硝基对苯二甲酸的制备；2)2-氨基对苯二甲酸的制备；3)Co-MOFs材料的制备；4)Au@Co-MOFs复合材料的制备；5)基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器的构建。通过本发明可以构建出一种基于Au@Co-MOFs复合材料的电化学免疫传感器，可以用于超灵敏检测，具有更好的准确性，更高的灵敏度，对我国电化学免疫传感器领域具有十分重要的现实意义。