(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104133059 A
(43)申请公布日 2014.11.05

(21)申请号 201410411598.3

(22)申请日 2014.08.20

(71)申请人 济南大学
地址 250022 山东省济南市济微路106号济南大学化学化工学院

(72)发明人 魏琴 郭占魁 庞雪辉 朱宝存 闫涛 马洪敏

(51)Int.Cl.
G01N 33/531(2006.01)
G01N 27/48(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

(54)发明名称

一种合金负载分子筛电化学免疫传感器的制备方法及应用

(57)摘要

本发明涉及一种合金负载分子筛电化学免疫传感器的制备方法及应用，属于新型功能材料、生物传感检测技术领域。哌嗪修饰的氨基化石墨烯的引入显著改善了电极的性能，增强了电极的电子传输能力；合金负载分子筛SAPO-34-Pd/Co比表面积大，生物相容性好，催化效率高等特点，显著提高了免疫传感器的灵敏度和稳定性，对肿瘤的早期诊断具有重要的意义。

CN 104133059 A

1. 一种合金负载分子筛电化学免疫传感器的制备，其特征在于，包括以下步骤：

(1)将直径为 4 mm 的玻碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨，超纯水清洗干净；取 6 μL、0.5 ~ 2 mg/mL 的哌嗪修饰的氨基化石墨烯的壳聚糖溶液滴加到电极表面，室温下晾干，用超纯水冲洗电极表面，晾干；滴加 3 μL、质量分数为 1.0~2.5% 的戊二醛溶液连接抗体和哌嗪修饰的氨基化石墨烯；

(2)在步骤(1)修饰的工作电极表面滴加 6 μL、5~10 μg/mL 的肿瘤标志物一抗，超纯水冲洗电极表面，4 ℃冰箱中晾干；

(3) 在步骤(2) 修饰的工作电极表面滴加 6 μL、质量分数为 1~2% 的 BSA 溶液，封闭电极表面上非特异性活性位点，超纯水冲洗电极表面，4 ℃冰箱中晾干；

(4) 在步骤(3) 修饰的工作电极表面滴加 6 μL、0.001~20 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原溶液，超纯水冲洗电极表面，4 ℃冰箱中干燥；

(5) 在步骤(4) 修饰的工作电极表面滴加 6 μL SAPO-34-Pd/Co-Ab_2 二抗孵化物溶液，置于 4 ℃冰箱中晾干，制得一种合金负载分子筛电化学免疫传感器。

2. 如权利要求 1 所述的一种合金负载分子筛电化学免疫传感器的制备方法，所述 SAPO-34-Pd/Co-Ab_2 二抗孵化物溶液的制备，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 哌嗪修饰的氨基化石墨烯的壳聚糖溶液的制备

将 0.5 ~ 2.0 mg 哌嗪修饰的氨基化石墨烯加入到 1 mL、0.1% 的壳聚糖溶液中，超声分散 10 ~ 20 min，将溶液保存在 4 ℃下备用；

所述 0.1% 的壳聚糖溶液，是将 1 g 的壳聚糖溶于 10mL、0.02mol/L 的稀盐酸溶液中；

(2) SAPO-34-Pd/Co-Ab_2 二抗孵化物的制备

1) 氨基化分子筛的制备

称取 0.05~1.5 g SAPO-34 于三口烧瓶中，加入 0.1~3 mL 的 3- 氨丙基三乙氧基硅烷和 10 mL 的无水乙醇，将混合物加热到 70 ℃并保持 1.0~2.0 h，然后冷却到室温，混合物经 7000 rpm 下离心分离 5 min，制得氨基化的分子筛 NH_2-SAPO-34，用水洗涤并离心分离三次，最后将氨基化的分子筛在 35~45℃下真空干燥；

2) SAPO-34-Pd/Co 的制备

在氮气保护和冰浴冷却下，将 3~6 mL、0.2 mol/L 的硝酸钴，2.5 mL、64 mmol/L 的柠檬酸钠，20 ~40 mg NH_2-SAPO-34 和 25 mL 超纯水混合超声 20 min；

将 5 mL、1.6 mol/L 的硼氢化钠溶液以 20 mL/h 的速率加到上述混合液中并强力搅拌，制得 Co 纳米粒子溶液；

将 10 mL、30~60 mmol/L 四氯钯酸钠 Na_2PdCl_4 和 10 mL、0.16 mol/L 的 $NaBH_4$ 溶液同时以 20 mL/h 的速率加到 Co 纳米粒子溶液中，混合物再搅拌 1 h，然后分离洗涤，并在 35 ℃下真空干燥，制得 SAPO-34-Pd/Co；

3) SAPO-34-Pd/Co-Ab_2 二抗孵化物溶液的制备

将 1~3 mg 的 SAPO-34-Pd/Co 分散到 1 mL 超纯水中，加入 100 μL、80~120 μg/mL 的二抗 Ab_2 和 900 μL、40~60 mmol/L 的 pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液，4℃恒温振荡培养箱中振荡孵化 12 h，在 4 ℃下、6000 rpm 转速下离心 15 min，得到下层沉淀；再加入 1 mL、50 mmol/L 的 pH=7.4 磷酸盐缓冲溶液离心洗涤 1 次，得下层沉淀；最后加入 1 mL、50 mmol/L 的 pH=7.4 磷酸盐缓冲溶液，制得 SAPO-34-Pd/Co-Ab_2 二抗孵化物溶液，4 ℃下保存备用。

3. 如权利要求 1 所述的制备方法制备的一种合金负载分子筛电化学免疫传感器，其特征在于，用于多种肿瘤标志物的检测，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，所制备的免疫传感器为工作电极，在 10 mL、50 mmol·L-1、pH 5.80 ~ 7.90 的 PBS 缓冲溶液中进行测试 ；

（2）用时间－电流法对多种肿瘤标志物抗原标准溶液进行检测，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 的 50 mmol·L-1、pH=7.0 的 PBS 中注入 10 μL、5 mol/L 的双氧水溶液，然后记录电流变化，绘制工作曲线 ；

（4）将待测样品溶液代替多种肿瘤标志物抗原的标准溶液进行检测。

4. 如权利要求 1 所述的一种合金负载分子筛电化学免疫传感器的制备方法，其特征在于，所述肿瘤标志物选自下列之一 ：人核基质蛋白 (NMP-22)，甲胎蛋白 (AFP)，癌胚抗原 (CEA)，乳腺癌易感基因 (CA15-3)，糖蛋白抗原 CA125， CA19-9，CA72-4，CA242，鳞状细胞相关抗原 (SCC)，细胞角蛋白 19(CYFRA21-1)，β2- 微球蛋白，铁蛋白，前列腺特异性抗原 (PSA)，神经原特异性烯醇化酶 (NSE)，绒毛膜促性腺激素 (HCG)。

一种合金负载分子筛电化学免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种合金负载分子筛电化学免疫传感器的制备方法及应用。具体是采用合金负载分子筛 SAPO-34-Pd/Co，制备一种检测肿瘤标志物的夹心型电化学免疫传感器，属于新型功能材料与生物传感检测技术领域。

背景技术

[0002] 癌症是一大类恶性肿瘤的统称。肿瘤在发生发展过程中，肿瘤细胞异常表达或宿主细胞对肿瘤反应后产生的某些物质，如肿瘤特异性抗原、胚胎抗原、某些分化抗原、激素和同工酶等，可作为肿瘤标志物，用于临床某些肿瘤的诊断和辅助诊断。因此，在临床研究上，发展一种快速、简便、灵敏的检测肿瘤标志物方法是十分重要的。

[0003] 目前已有的肿瘤标志物的临床检测方法很多，如放射免疫分析、酶联免疫分析、化学发光免疫分析等。免疫传感器是将免疫学方法与分析化学方法相结合的一种生物传感器，通过抗原与抗体之间的特性性结合，使得它具有高灵敏性、高选择性、分析快速和操作简便等优点。

[0004] 电化学免疫传感器具有灵敏度高、选择性好、结构简单、操作简便、易于小型化、可连续、快速自动化检测分析等优点，因此本发明制备了一种合金负载分子筛电化学免疫传感器，实现了对肿瘤标志物的检测。

[0005] 石墨烯纳米层(GS)具有大的比表面积，催化性能好，生物相容性好，能有效地吸附固载抗原，增强电子传递等优点，因此本发明将哌嗪修饰的氨基化石墨烯引入到电化学免疫传感器的制备中，利用其生物相容性及大的比表面积，实现抗体在电极表面的固定；利用其优异的电子传递能力，起到增强电化学信号的作用。

[0006] 本发明采用原位化学还原的方法，制备了合金负载分子筛 SAPO-34-Pd/Co；通过戊二醛的交联作用，实现了抗体在电极表面的固定；将合金负载分子筛 SAPO-34-Pd/Co 引入传感器的制备中，构建了一种超灵敏的夹心型电化学免疫传感器。在不使用酶的情况下，合金负载分子筛 SAPO-34-Pd/Co 对双氧水 H_2O_2 有良好的催化能力，并在检测过程中产生良好的电化学信号，有效地降低了传感器的检出限，可用于多种肿瘤标志物的分析。该方法具有成本低、灵敏度高、特异性好、检测快速等优点，而且制备过程较为简单，有效克服了目前肿瘤标志物检测方法的不足。

发明内容

[0007] 本发明的目的之一是基于合金负载分子筛 SAPO-34-Pd/Co，构建了一种无酶、快速且超灵敏的夹心型电化学免疫传感器。

[0008] 本发明的目的之二是将该夹心型电化学免疫传感器应用于多种肿瘤标志物的检测。

[0009] 本发明的技术方案如下：

1. 一种合金负载分子筛电化学免疫传感器的制备，其特征在于，包括以下步骤：

(1)将直径为 4 mm 的玻碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨，超纯水清洗干净；取 6 μL、0.5 ~ 2 mg/mL 的哌嗪修饰的氨基化石墨烯的壳聚糖溶液滴加到电极表面，室温下晾干，用超纯水冲洗电极表面，晾干；滴加 3 μL、质量分数为 1.0~2.5% 的戊二醛溶液连接抗体和哌嗪修饰的氨基化石墨烯；

(2)在步骤(1)修饰的工作电极表面滴加 6 μL、5~10 μg/mL 的肿瘤标志物一抗，超纯水冲洗电极表面，4 ℃冰箱中晾干；

(3)在步骤(2)修饰的工作电极表面滴加 6 μL、质量分数为 1~2% 的 BSA 溶液，封闭电极表面上非特异性活性位点，超纯水冲洗电极表面，4 ℃冰箱中晾干；

(4)在步骤(3)修饰的工作电极表面滴加 6 μL、0.001~20 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原溶液，超纯水冲洗电极表面，4 ℃冰箱中干燥；

(5)在步骤(4)修饰的工作电极表面滴加 6 μL SAPO-34-Pd/Co-Ab_2 二抗孵化物溶液，置于 4 ℃冰箱中晾干，制得一种合金负载分子筛电化学免疫传感器。

[0010] 2. 上述所述的 SAPO-34-Pd/Co-Ab_2 二抗孵化物溶液的制备，步骤如下：

(1)哌嗪修饰的氨基化石墨烯的壳聚糖溶液的制备

将 0.5 ~ 2.0 mg 哌嗪修饰的氨基化石墨烯加入到 1 mL、0.1% 的壳聚糖溶液中，超声分散 10 ~ 20 min，将溶液保存在 4 ℃下备用；所述 0.1% 的壳聚糖溶液，是将 1 g 的壳聚糖溶于 10mL、0.02mol/L 的稀盐酸溶液中；

(2)SAPO-34-Pd/Co-Ab_2 二抗孵化物的制备

1)氨基化分子筛的制备

称取 0.05~1.5 g SAPO-34 于三口烧瓶中，加入 0.1~3 mL 的 3- 氨丙基三乙氧基硅烷和 10 mL 的无水乙醇，将混合物加热到 70 ℃并保持 1.0~2.0 h，然后冷却到室温，混合物经 7000 rpm 下离心分离 5 min，制得氨基化的分子筛 NH_2-SAPO-34，用水洗涤并离心分离三次，最后将氨基化的分子筛在 35~45℃下真空干燥；

2)SAPO-34-Pd/Co 的制备

在氮气保护和冰浴冷却下，将 3~6 mL、0.2 mol/L 的硝酸钴，2.5 mL、64 mmol/L 的柠檬酸钠，20 ~40 mg NH_2-SAPO-34 和 25 mL 超纯水混合超声 20 min；

将 5 mL、1.6 mol/L 的硼氢化钠溶液以 20 mL/h 的速率加到上述混合液中并强力搅拌，制得 Co 纳米粒子溶液；

将 10 mL、30~60 mmol/L 四氯钯酸钠 Na_2PdCl_4 和 10 mL、0.16 mol/L 的 $NaBH_4$ 溶液同时以 20 mL/h 的速率加到 Co 纳米粒子溶液中，混合物再搅拌 1 h，然后分离洗涤，并在 35 ℃下真空干燥，制得 SAPO-34-Pd/Co。

[0011] 3)SAPO-34-Pd/Co-Ab_2 二抗孵化物溶液的制备

将 1~3 mg 的 SAPO-34-Pd/Co 分散到 1 mL 超纯水中，加入 100 μL、80~120 μg/mL 的二抗 Ab_2 和 900 μL、40~60 mmol/L 的 pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液，4℃恒温振荡培养箱中振荡孵化 12 h，在 4 ℃下、6000 rpm 转速下离心 15 min，得到下层沉淀；再加入 1 mL、50 mmol/L 的 pH=7.4 磷酸盐缓冲溶液离心洗涤 1 次，得下层沉淀；最后加入 1 mL、50 mmol/L 的 pH=7.4 磷酸盐缓冲溶液，制得 SAPO-34-Pd/Co-Ab_2 二抗孵化物溶液，4 ℃下保存备用。

[0012] 3. 多种肿瘤标志物的检测，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，所制备的免疫传感器为工作电极，在 10 mL、50 mmol·L^{-1}、pH 5.80 ~ 7.90 的 PBS 缓冲溶液中进行测试；

（2）用时间－电流法对多种肿瘤标志物抗原标准溶液进行检测，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 的 50 mmol·L^{-1}、pH=7.0 的 PBS 中注入 10 μL、5 mol/L 的双氧水溶液，然后记录电流变化，绘制工作曲线；

（4）将待测样品溶液代替多种肿瘤标志物抗原的标准溶液进行检测。

[0013]　4. 上述所述肿瘤标志物选自下列之一：人核基质蛋白（NMP-22），甲胎蛋白（AFP），癌胚抗原（CEA），乳腺癌易感基因（CA15-3），糖蛋白抗原 CA125，CA19-9，CA72-4，CA242，鳞状细胞相关抗原（SCC），细胞角蛋白 19（CYFRA21-1），β2- 微球蛋白，铁蛋白，前列腺特异性抗原（PSA），神经原特异性烯醇化酶（NSE），绒毛膜促性腺激素（HCG）。

[0014]　本发明的有益成果

（1）哌嗪修饰的氨基化石墨烯与普通石墨烯相比较，其保留了石墨烯较大的表面积和较好的导电性，以及良好的生物相容性和稳定性，另外，其表面还有大量的亚氨基官能团，能够增加抗体在其表面的负载量和在水中的分散性，增加了传感器灵敏度和稳定性。

[0015]　（2）将壳聚糖应用到电化学免疫传感器的制备当中，利用其优异的成膜性能，防止了哌嗪修饰的氨基化石墨烯从电极表面上脱落，同时利用壳聚糖具有很好的生物相容性和低毒性，有利于抗体在电极表面的固定。

[0016]　（3）sapo34 为立方体结构，具有微孔尺寸，其大的表面积能够增加合金在其表面的负载量，进而增加二抗的负载量，使传感器实现了对肿瘤标志物的超灵敏检测。

[0017]　（4）将合金负载分子筛 SAPO-34-Pd/Co 与肿瘤标志物二抗直接孵化，利用贵金属优异的生物相容性和较高的催化性能，在二抗的标记中不必使用酶，避免了因酶的失活和泄漏造成的检测误差，简化了二抗标记物的制作步骤，显著提高了电化学免疫传感器的重现性和稳定性。

[0018]　（5）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。

[0019]　（6）本发明制备的电化学免疫传感器用于多种肿瘤标志物的检测，响应时间短，检测限低，线性范围宽，可以实现简单、快速、高灵敏和特异性检测，对常见肿瘤标志物检测限可达 0.12pg/mL。

具体实施方式

[0020]　实施例 1 一种合金负载分子筛电化学免疫传感器的制备

1. 一种合金负载分子筛电化学免疫传感器的制备，其特征在于，包括以下步骤：

（1）将直径为 4 mm 的玻碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨，超纯水清洗干净；取 6 μL、0.5 mg/mL 的哌嗪修饰的氨基化石墨烯的壳聚糖溶液滴加到电极表面，室温下晾干，用超纯水冲洗电极表面，晾干；滴加 3 μL、质量分数为 1.0% 的戊二醛溶液连接抗体和哌嗪修饰的氨基化石墨烯；

（2）在步骤（1）修饰的工作电极表面滴加 6 μL、5 μg/mL 的肿瘤标志物一抗，超纯水冲洗电极表面，4 ℃冰箱中晾干；

（3）在步骤（2）修饰的工作电极表面滴加 6 μL、质量分数为 1% 的 BSA 溶液，封闭电极

表面上非特异性活性位点，超纯水冲洗电极表面，4 ℃冰箱中晾干；

（4）在步骤（3）修饰的工作电极表面滴加6 μL、0.001~20 ng/mL的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原溶液，超纯水冲洗电极表面，4 ℃冰箱中干燥；

（5）在步骤（4）修饰的工作电极表面滴加6 μL SAPO-34-Pd/Co-Ab_2二抗孵化物溶液，置于4 ℃冰箱中晾干，制得一种合金负载分子筛电化学免疫传感器。

[0021] 实施例2 一种合金负载分子筛电化学免疫传感器的制备

1. 一种合金负载分子筛电化学免疫传感器的制备，其特征在于，包括以下步骤：

（1）将直径为4 mm的玻碳电极用Al_2O_3抛光粉打磨，超纯水清洗干净；取6 μL、1mg/mL的哌嗪修饰的氨基化石墨烯的壳聚糖溶液滴加到电极表面，室温下晾干，用超纯水冲洗电极表面，晾干；滴加3 μL、质量分数为1.5 %的戊二醛溶液连接抗体和哌嗪修饰的氨基化石墨烯；

（2）在步骤（1）修饰的工作电极表面滴加6 μL、8 μg/mL的肿瘤标志物一抗，超纯水冲洗电极表面，4 ℃冰箱中晾干；

（3）在步骤（2）修饰的工作电极表面滴加6 μL、质量分数为1.5 %的BSA溶液，封闭电极表面上非特异性活性位点，超纯水冲洗电极表面，4 ℃冰箱中晾干；

（4）在步骤（3）修饰的工作电极表面滴加6 μL、0.001~20 ng/mL的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原溶液，超纯水冲洗电极表面，4 ℃冰箱中干燥；

（5）在步骤（4）修饰的工作电极表面滴加6 μL SAPO-34-Pd/Co-Ab_2二抗孵化物溶液，置于4 ℃冰箱中晾干，制得一种合金负载分子筛电化学免疫传感器。

[0022] 实施例3 一种合金负载分子筛电化学免疫传感器的制备

1. 一种合金负载分子筛电化学免疫传感器的制备，其特征在于，包括以下步骤：

（1）将直径为4 mm的玻碳电极用Al_2O_3抛光粉打磨，超纯水清洗干净；取6 μL、2 mg/mL的哌嗪修饰的氨基化石墨烯的壳聚糖溶液滴加到电极表面，室温下晾干，用超纯水冲洗电极表面，晾干；滴加3 μL、质量分数为2.5%的戊二醛溶液连接抗体和哌嗪修饰的氨基化石墨烯；

(2)在步骤(1)修饰的工作电极表面滴加6 μL、10 μg/mL的肿瘤标志物一抗，超纯水冲洗电极表面，4 ℃冰箱中晾干；

（3）在步骤（2）修饰的工作电极表面滴加6 μL、质量分数为2%的BSA溶液，封闭电极表面上非特异性活性位点，超纯水冲洗电极表面，4 ℃冰箱中晾干；

（4）在步骤（3）修饰的工作电极表面滴加6 μL、0.001~20 ng/mL的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原溶液，超纯水冲洗电极表面，4 ℃冰箱中干燥；

（5）在步骤（4）修饰的工作电极表面滴加6 μL SAPO-34-Pd/Co-Ab_2二抗孵化物溶液，置于4 ℃冰箱中晾干，制得一种合金负载分子筛电化学免疫传感器。

[0023] 实施例4 SAPO-34-Pd/Co-Ab_2二抗孵化物溶液的制备

（1）哌嗪修饰的氨基化石墨烯的壳聚糖溶液的制备

将0.5 mg哌嗪修饰的氨基化石墨烯加入到1 mL、0.1%的壳聚糖溶液中，超声分散10 min，将溶液保存在4 ℃下备用；

所述0.1%的壳聚糖溶液，是将1 g的壳聚糖溶于10mL、0.02mol/L的稀盐酸溶液中；

（2）SAPO-34-Pd/Co-Ab_2二抗孵化物的制备

1）氨基化分子筛的制备

称取 0.05 g SAPO-34 于三口烧瓶中，加入 0.1mL 的 3- 氨丙基三乙氧基硅烷和 10 mL 的无水乙醇，将混合物加热到 70 ℃并保持 1.0 h，然后冷却到室温，混合物经 7000 rpm 下离心分离 5 min，制得氨基化的分子筛 NH_2-SAPO-34，用水洗涤并离心分离三次，最后将氨基化的分子筛在 35℃下真空干燥；

2）SAPO-34-Pd/Co 的制备

在氮气保护和冰浴冷却下，将 3 mL、0.2 mol/L 的硝酸钴，2.5 mL、64 mmol/L 的柠檬酸钠，20 mg NH_2-SAPO-34 和 25 mL 超纯水混合超声 20 min；

将 5 mL、1.6 mol/L 的硼氢化钠溶液以 20 mL/h 的速率加到上述混合液中并强力搅拌，制得 Co 纳米粒子溶液；

将 10 mL、30 mmol/L 四氯钯酸钠 Na_2PdCl_4 和 10 mL、0.16 mol/L 的 $NaBH_4$ 溶液同时以 20 mL/h 的速率加到 Co 纳米粒子溶液中，混合物再搅拌 1 h，然后分离洗涤，并在 35 ℃下真空干燥，制得 SAPO-34-Pd/Co。

[0024] 3）SAPO-34-Pd/Co-Ab_2 二抗孵化物溶液的制备

将 1 mg 的 SAPO-34-Pd/Co 分散到 1 mL 超纯水中，加入 100 μL、80 μg/mL 的二抗 Ab_2 和 900 μL、40 mmol/L 的 pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液，4℃恒温振荡培养箱中振荡孵化 12 h，在 4 ℃下、6000 rpm 转速下离心 15 min，得到下层沉淀；再加入 1 mL、50 mmol/L 的 pH=7.4 磷酸盐缓冲溶液离心洗涤 1 次，得下层沉淀；最后加入 1 mL、50 mmol/L 的 pH=7.4 磷酸盐缓冲溶液，制得 SAPO-34-Pd/Co-Ab_2 二抗孵化物溶液，4 ℃下保存备用。

[0025] 实施例 5 SAPO-34-Pd/Co-Ab_2 二抗孵化物溶液的制备

（1）哌嗪修饰的氨基化石墨烯的壳聚糖溶液的制备

将 1.0 mg 哌嗪修饰的氨基化石墨烯加入到 1 mL、0.1% 的壳聚糖溶液中，超声分散 15 min，将溶液保存在 4 ℃下备用；

所述 0.1% 的壳聚糖溶液，是将 1 g 的壳聚糖溶于 10mL、0.02mol/L 的稀盐酸溶液中；

（2）SAPO-34-Pd/Co-Ab_2 二抗孵化物的制备

1）氨基化分子筛的制备

称取 1.0 g SAPO-34 于三口烧瓶中，加入 2 mL 的 3- 氨丙基三乙氧基硅烷和 10 mL 的无水乙醇，将混合物加热到 70 ℃并保持 1.5 h，然后冷却到室温，混合物经 7000 rpm 下离心分离 5 min，制得氨基化的分子筛 NH_2-SAPO-34，用水洗涤并离心分离三次，最后将氨基化的分子筛在 40℃下真空干燥；

2）SAPO-34-Pd/Co 的制备

在氮气保护和冰浴冷却下，将 4 mL、0.2 mol/L 的硝酸钴，2.5 mL、64 mmol/L 的柠檬酸钠，30 mg NH_2-SAPO-34 和 25 mL 超纯水混合超声 20 min；

将 5 mL、1.6 mol/L 的硼氢化钠溶液以 20 mL/h 的速率加到上述混合液中并强力搅拌，制得 Co 纳米粒子溶液；

将 10 mL、40 mmol/L 四氯钯酸钠 Na_2PdCl_4 和 10 mL、0.16 mol/L 的 $NaBH_4$ 溶液同时以 20 mL/h 的速率加到 Co 纳米粒子溶液中，混合物再搅拌 1 h，然后分离洗涤，并在 35 ℃下真空干燥，制得 SAPO-34-Pd/Co。

[0026] 3）SAPO-34-Pd/Co-Ab_2 二抗孵化物溶液的制备

将2 mg的SAPO-34-Pd/Co分散到1 mL超纯水中，加入100 μL、100 μg/mL的二抗Ab_2和900 μL、50 mmol/L的pH 7.4磷酸盐缓冲溶液，4℃恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h，在4 ℃下、6000 rpm转速下离心15 min，得到下层沉淀；再加入1 mL、50 mmol/L 的pH=7.4磷酸盐缓冲溶液离心洗涤1次，得下层沉淀；最后加入1 mL、50 mmol/L的pH=7.4磷酸盐缓冲溶液，制得SAPO-34-Pd/Co-Ab_2二抗孵化物溶液，4 ℃下保存备用。

[0027] 实施例6 SAPO-34-Pd/Co-Ab_2二抗孵化物溶液的制备

（1）哌嗪修饰的氨基化石墨烯的壳聚糖溶液的制备

将2.0 mg哌嗪修饰的氨基化石墨烯加入到1 mL、0.1%的壳聚糖溶液中，超声分散20 min，将溶液保存在4 ℃下备用；

所述0.1%的壳聚糖溶液，是将1 g的壳聚糖溶于10mL、0.02mol/L的稀盐酸溶液中；

（2）SAPO-34-Pd/Co-Ab_2二抗孵化物的制备

1）氨基化分子筛的制备

称取1.5 g SAPO-34于三口烧瓶中，加入3 mL的3-氨丙基三乙氧基硅烷和10 mL的无水乙醇，将混合物加热到70 ℃并保持2.0 h，然后冷却到室温，混合物经7000 rpm下离心分离5 min，制得氨基化的分子筛NH_2-SAPO-34，用水洗涤并离心分离三次，最后将氨基化的分子筛在45℃下真空干燥；

2）SAPO-34-Pd/Co的制备

在氮气保护和冰浴冷却下，将6 mL、0.2 mol/L的硝酸钴，2.5 mL、64 mmol/L的柠檬酸钠，40 mg NH_2-SAPO-34和25 mL超纯水混合超声20 min；

将5 mL、1.6 mol/L的硼氢化钠溶液以20 mL/h的速率加到上述混合液中并强力搅拌，制得Co纳米粒子溶液；

将10 mL、60 mmol/L四氯钯酸钠Na_2PdCl_4和10 mL、0.16 mol/L的$NaBH_4$溶液同时以20 mL/h的速率加到Co纳米粒子溶液中，混合物再搅拌1 h，然后分离洗涤，并在35 ℃下真空干燥，制得SAPO-34-Pd/Co。

[0028] 3）SAPO-34-Pd/Co-Ab_2二抗孵化物溶液的制备

将3 mg的SAPO-34-Pd/Co分散到1 mL超纯水中，加入100 μL、120 μg/mL的二抗Ab_2和900 μL、60 mmol/L的pH 7.4磷酸盐缓冲溶液，4℃恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h，在4 ℃下、6000 rpm转速下离心15 min，得到下层沉淀；再加入1 mL、50 mmol/L 的pH=7.4磷酸盐缓冲溶液离心洗涤1次，得下层沉淀；最后加入1 mL、50 mmol/L的pH=7.4磷酸盐缓冲溶液，制得SAPO-34-Pd/Co-Ab_2二抗孵化物溶液，4 ℃下保存备用。

[0029] 人核基质蛋白(NMP-22)，甲胎蛋白(AFP)，癌胚抗原(CEA)，乳腺癌易感基因(CA15-3)，糖蛋白抗原CA125，CA19-9，CA72-4，CA242，鳞状细胞相关抗原(SCC)，细胞角蛋白19(CYFRA21-1)，β2-微球蛋白，铁蛋白，前列腺特异性抗原(PSA)，神经原特异性烯醇化酶(NSE)，绒毛膜促性腺激素(HCG)。

[0030] 实施例7 电化学免疫传感器用于人核基质蛋白NMP-22的检测

（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，所制备的免疫传感器为工作电极，在10 mL、pH 5.8 ~ 7.9的PBS缓冲溶液中进行测试；

（2）用时间-电流法对分析物进行检测，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 的 50 mmol/L、pH=7.0 的 PBS 中注入 10 μL、5 mol/L 的双氧水溶液，然后记录电流变化。

[0031] （4）根据所得电流强度与人核基质蛋白 NMP-22 抗原浓度之间的线性关系，绘制工作曲线，测得线性范围为 1 .0pg/mL ~ 20 ng/mL，检测限为 0.21 pg/mL。

[0032] 实施例 8 甲胎蛋白的检测

绘制工作曲线步骤同实施例 7，按照绘制工作曲线的方法进行甲胎蛋白样品分析，测得线性范围为 1.0 pg/mL ~ 20 ng/mL，检测限为 0.33 pg/mL。

[0033] 实施例 9 乳腺癌易感基因的检测

绘制工作曲线步骤同实施例 7，按照绘制工作曲线的方法进行乳腺癌易感基因样品分析，测得线性范围为 0.5 pg/mL ~ 18 ng/mL，检测限为 0.12pg/mL。

patsnap

专利名称(译)	一种合金负载分子筛电化学免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN104133059A	公开(公告)日	2014-11-05
申请号	CN201410411598.3	申请日	2014-08-20
[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	魏琴 郭占魁 庞雪辉 朱宝存 闫涛 马洪敏		
发明人	魏琴 郭占魁 庞雪辉 朱宝存 闫涛 马洪敏		
IPC分类号	G01N33/531 G01N27/48 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/54366 G01N33/54393 G01N33/57484		
其他公开文献	CN104133059B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种合金负载分子筛电化学免疫传感器的制备方法及应用，属于新型功能材料、生物传感检测技术领域。哌嗪修饰的氨基化石墨烯的引入显著改善了电极的性能，增强了电极的电子传输能力；合金负载分子筛SAPO-34-Pd/Co比表面积大，生物相容性好，催化效率高等特点，显著提高了免疫传感器的灵敏度和稳定性，对肿瘤的早期诊断具有重要的意义。