



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104297478 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 30

(21) 申请号 201410457671. 0

(22) 申请日 2014. 09. 09

(73) 专利权人 济南大学

地址 250022 山东省济南市济微路 106 号

(72) 发明人 任祥 杜斌 闫涛 魏琴 马洪敏
吴丹

Co304 and Ag/Co304 nanosheets and their electrocatalytic properties. 《J Sol-Gel Sci Technol》. 2013, 第 67 卷摘要, 574 页左栏第 2 段至 575 页左栏第 1 段, Conclusions 部分, 图 4-5.

审查员 胡晓佳

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 27/26(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102854235 A, 2013. 01. 02, 权利要求 1-6, 说明书第 22-28 段.

CN 102658176 A, 2012. 09. 12, 全文.

US 2012034711 A1, 2012. 02. 09, 全文.

KR 20130127998 A, 2013. 11. 25, 全文.

胡自强 等. 聚苯胺二茂铁甲酸修饰的酶传感器的研究. 《杭州师范学院学报(自然科学版)》. 2001, 第 18 卷(第 1 期), 摘要, 第 41 页, 第 42 页 2.1 节.

Lu Pan et al.. Facile synthesis of

权利要求书 2 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

一种基于酸中心复合物的免疫传感器的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及一种酸中心复合物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。基于酸中心复合物比表面积大, 导电性优异, 生物相容性好, 氧化还原性能好等特点, 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。

1. 一种基于酸中心复合物的免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 酸中心复合物的制备

将 0.4~2.0 mg 的二茂铁甲酸 FA 与 0.4~2.0 mg 的盐酸掺杂的聚苯胺 PANI 混合,分散于 1 mL、0.5~10 mg/mL 的壳聚糖盐酸盐 CS-HCl 水溶液中,震荡超声 24 h,混合均匀;

(2) Ab-Ag@Co₃O₄抗体孵化物溶液的制备

a Co₃O₄纳米片的制备

在磁力搅拌下,将 2.0~3.0 g 的 CoCl₂·6H₂O 溶于 50~70 mL 超纯水中,制得 CoCl₂水溶液;将 20 mL、0.1~1.0 mol/L NaOH 水溶液逐滴加入到 CoCl₂水溶液中,继续搅拌 5 min,得到棕色沉淀,离心,用超纯水和无水乙醇分别洗涤 3 次,在 60 °C 真空干燥箱中干燥 12 h,制得固体沉淀物,将其在 300~500 °C 下煅烧 1 h,逐渐降到室温,制得 Co₃O₄纳米片;

b 氨基化 Co₃O₄的制备

将 0.1 g 的 Co₃O₄纳米片加入到 10 mL 的无水甲苯中,加入 0.1~1 mL 的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷,60~80 °C 回流 1.5 h,离心,于 110 °C 下干燥 1 h,制得氨基化的 Co₃O₄;

c Ab-Ag@Co₃O₄抗体孵化物溶液的制备

将 50 mg 的硝酸银溶于 50 mL、质量分数为 3~8 % 的柠檬酸钠水溶液中,搅拌 1 h;逐滴加入 1~5 mL、0.1 mmol/L 的硼氢化钠水溶液,搅拌 20~30 min,直至变为棕黄色,制得 Ag 纳米粒子溶液;

d 将 1 mg 氨基化的 Co₃O₄和 30~70 mL 的 Ag 纳米粒子溶液,充分混合,震荡离心,得到 Ag@Co₃O₄;将 1 mg 的 Ag@Co₃O₄加入到 1 mL、0.1~5 μg/mL 的抗体 Ab 溶液中,充分混匀,震荡 24 h,制得 Ab-Ag@Co₃O₄抗体孵化物溶液;

(3) 酸中心复合物的免疫传感器的制备

a 将直径为 4 mm 的玻璃碳电极用 Al₂O₃抛光粉打磨,超纯水清洗干净;将 6 μL、0.5 ~ 2 mg/mL 酸中心复合物 FA@PANI@CS-HCl 分散液滴加到电极表面,室温下晾干成膜;

b 依次滴加 6 μL 的 EDC/NHS 溶液、6 μL 的 Ab-Ag@Co₃O₄抗体孵化物溶液于电极表面,超纯水冲洗,4 °C 冰箱中晾干;所述 EDC/NHS 溶液是由 0.1 mol/L 的 EDC 和 0.1 mol/L 的 NHS 按照 1 ~ 4 : 1 的体积比混合制得;

c 滴加 6 μL、质量分数为 0.5% ~ 2% 的 BSA 溶液于电极表面,封闭电极表面上非特异性活性位点,超纯水冲洗,4 °C 冰箱中晾干;

d 滴加 6 μL、0.0001~2 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原标准溶液至电极表面,超纯水冲洗,4 °C 冰箱中晾干,制得一种基于酸中心复合物的免疫传感器。

2. 如权利要求 1 所述的制备方法制备的一种基于酸中心复合物的免疫传感器,其特征在于,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,所制备的免疫传感器为工作电极,在 10 mL、50 mmol/L、pH 6.00 ~8.10 的 PBS 缓冲溶液中进行测试;

(2) 用方波伏安法对肿瘤标志物抗原标准溶液进行检测,其电压测试范围为 -0.2V ~ 0.6V;

(3) 当背景电流趋于稳定后,测量抗原加入前后的传感器的峰电流值,然后记录电流变化,绘制工作曲线;

(4) 将待测样品溶液代替肿瘤标志物抗原标准溶液进行检测。

3. 根据权利要求 2 所述的基于酸中心复合物的免疫传感器,所述的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 和 CA242,鳞状细胞相关抗原(SCC),细胞角蛋白 19(CYFRA21-1), β 2-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)。

一种基于酸中心复合物的免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种酸中心复合物电化学免疫传感器的制备方法及应用。具体是采用 FA@PANI@CS-HCl 制备一种检测肿瘤标志物的电化学免疫传感器,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] 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。

[0004] 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、化学发光免疫分析、酶联免疫分析等。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。

[0005] 本发明采用 FA@PANI@CS-HCl 为基底材料,FA 产生电化学信号,PANI 提高电极表面的导电性和比表面积,从而利用 CS-HCl 良好的成膜性,实现了基底材料 FA@PANI@CS-HCl 对电极的良好修饰,实现了其对免疫分子的成功固定,增强了传感器的灵敏度,拓宽了线性范围,有效地降低了传感器的检出限,并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

[0006] 本发明的目的之一是基于酸中心复合物 FA@PANI@CS-HCl 为基底材料,构建了一种无酶,无标记的快速超灵敏的电化学免疫传感器。

[0007] 本发明的目的之二就是将 Ag@Co₃O₄用于孵化抗体,实现了对肿瘤标志物的高灵敏检测。

[0008] 本发明的目的之三就是将该无标记电化学免疫传感器用于多种肿瘤标志物的检测。

[0009] 本发明的技术方案如下:

[0010] 1. 一种基于酸中心复合物的免疫传感器的制备方法

[0011] (1)将直径为 4 mm 的玻碳电极用 Al₂O₃抛光粉打磨,超纯水清洗干净;将 6 μL、0.5 ~ 2 mg/mL 酸中心复合物 FA@PANI@CS-HCl 分散液滴加到电极表面,室温下晾干成膜;

[0012] (2)依次滴加 6 μL 的 EDC/NHS 溶液、6 μL 的 Ab-Ag@Co₃O₄抗体孵化物溶液于电极

表面,超纯水冲洗,4℃冰箱中晾干;所述 EDC/NHS 溶液是由 0.1 mol/L 的 EDC 和 0.1 mol/L 的 NHS 按照 1 ~ 4 : 1 的体积比混合制得;

[0013] (3)滴加 6 μ L、质量分数为 0.5% ~ 2% 的 BSA 溶液于电极表面,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;

[0014] (4)滴加 6 μ L、0.0001~2 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原标准溶液至电极表面,超纯水冲洗,4℃冰箱中晾干,制得一种基于酸中心复合物的免疫传感器。

[0015] 2. 酸中心复合物 FA@PANI@CS-HCl 分散液的制备

[0016] 将 0.4~2.0 mg 的二茂铁甲酸 FA 与 0.4~2.0 mg 的盐酸掺杂的聚苯胺 PANI 混合,分散于 1 mL、0.5~10 mg/mL 的壳聚糖盐酸盐 CS-HCl 水溶液中,震荡超声 24 h,混合均匀。

[0017] 3. Ab-Ag@Co₃O₄抗体孵化物溶液的制备

[0018] (1) Co₃O₄纳米片的制备

[0019] 在磁力搅拌下,将 2.0~3.0 g 的 CoCl₂·6H₂O 溶于 50~70 mL 超纯水中,制得 CoCl₂水溶液;将 20 mL、0.1~1.0 mol/L NaOH 水溶液逐滴加入到 CoCl₂水溶液中,继续搅拌 5 min,得到棕色沉淀,离心,用超纯水和无水乙醇分别洗涤 3 次,在 60 °C 真空干燥箱中干燥 12 h,制得固体沉淀物,将其在 300~500 °C 下煅烧 1 h,逐渐降到室温,制得 Co₃O₄纳米片;

[0020] (2) 氨基化 Co₃O₄的制备

[0021] 将 0.1 g 的 Co₃O₄纳米片加入到 10 mL 的无水甲苯中,加入 0.1~1 mL 的 3-氨基三乙氧基硅烷,60~80 °C 回流 1.5 h,离心,于 110 °C 下干燥 1 h,制得氨基化的 Co₃O₄;

[0022] (3) Ab-Ag@Co₃O₄抗体孵化物溶液的制备

[0023] 将 50 mg 的硝酸银溶于 50 mL、质量分数为 3~8 % 的柠檬酸钠水溶液中,搅拌 1 h;逐滴加入 1~5 mL、0.1 mmol/L 的硼氢化钠水溶液,搅拌 20~30 min,直至变为棕黄色,制得 Ag 纳米粒子溶液;将 1 mg 氨基化的 Co₃O₄和 30~70 mL 的 Ag 纳米粒子溶液,充分混合,震荡离心,得到 Ag@Co₃O₄;将 1 mg 的 Ag@Co₃O₄加入到 1 mL、0.1~5 μ g/mL 的抗体 Ab 溶液中,充分混匀,震荡 24 h,制得 Ab-Ag@Co₃O₄抗体孵化物溶液。

[0024] 4. 肿瘤标志物的检测

[0025] (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、pH 6.00 ~8.10 的 PBS 缓冲溶液中进行测试;

[0026] (2)用方波伏安法对肿瘤标志物抗原标准溶液进行检测,其电压测试范围为 -0.2V ~ 0.6V;

[0027] (3)当背景电流趋于稳定后,测量抗原加入前后的传感器的峰电流值,然后记录电流变化,绘制工作曲线;

[0028] (4)将待测样品溶液代替肿瘤标志物抗原标准溶液进行检测。

[0029] 上述所述的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 和 CA242,鳞状细胞相关抗原 SCC,细胞角蛋白 19(CYFRA21-1), β 2-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] 本发明的有益成果

[0031] (1)二茂铁甲酸 FA 良好的电子媒介体,能够充分反映电化学反应的进程,但是

其水溶性较差,故将 FA 与可溶性强的壳聚糖盐酸盐进行复合,形成酸中心复合物,增强 FA 的水溶性。壳聚糖盐酸盐的使用,能够防止传感器上的基底材料脱落,同时增强其成膜性。

[0032] (2) 盐酸掺杂的聚苯胺应用到电化学免疫传感器中,能够增强电极表面的导电性,同时增大传感器的比表面积来负载更多的抗体,从而实现了对肿瘤标志物的高灵敏检测。

[0033] (3) Co_3O_4 纳米片,是介孔纳米材料,其大的比表面积能够增强贵金属 Ag 在其表面的负载量,进而促进抗体的负载量,增大传感信号,使传感器实现了对肿瘤标志物的超灵敏检测。

[0034] (4) 本传感器采用无标记的方法,避免了传统标记型传感器的构建过程复杂,标记物质容易泄露,从而导致其重现性差的特点,简化了传感器的构建步骤,显著提高了电化学免疫传感器的重现性和稳定性。

[0035] (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。

[0036] (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 0.21 pg/mL。

具体实施方式

[0037] 实施例 1 一种基于酸中心复合物的免疫传感器的制备

[0038] (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;将 6 μL 、0.5 mg/mL 酸中心复合物 FA@PANI@CS-HCl 分散液滴加到电极表面,室温下晾干成膜;

[0039] (2) 依次滴加 6 μL 的 EDC/NHS 溶液、6 μL 的 Ab-Ag@ Co_3O_4 抗体孵化物溶液于电极表面,超纯水冲洗,4℃冰箱中晾干;所述 EDC/NHS 溶液是由 0.1 mol/L 的 EDC 和 0.1 mol/L 的 NHS 按照 1 : 1 的体积比混合制得;

[0040] (3) 滴加 6 μL 、质量分数为 0.5% 的 BSA 溶液于电极表面,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;

[0041] (4) 滴加 6 μL 、0.0001~2 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原标准溶液至电极表面,超纯水冲洗,4℃冰箱中晾干,制得一种基于酸中心复合物的免疫传感器。

[0042] 实施例 2 一种基于酸中心复合物的免疫传感器的制备

[0043] (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;将 6 μL 、1 mg/mL 酸中心复合物 FA@PANI@CS-HCl 分散液滴加到电极表面,室温下晾干成膜;

[0044] (2) 依次滴加 6 μL 的 EDC/NHS 溶液、6 μL 的 Ab-Ag@ Co_3O_4 抗体孵化物溶液于电极表面,超纯水冲洗,4℃冰箱中晾干;所述 EDC/NHS 溶液是由 0.1 mol/L 的 EDC 和 0.1 mol/L 的 NHS 按照 2 : 1 的体积比混合制得;

[0045] (3) 滴加 6 μL 、质量分数为 1% 的 BSA 溶液于电极表面,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;

[0046] (4) 滴加 6 μL 、0.0001~2 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原标准溶液至电极表面,超纯水冲洗,4℃冰箱中晾干,制得一种基于酸中心复合物的免疫传感器。

[0047] 实施例 3 一种基于酸中心复合物的免疫传感器的制备

[0048] (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;将 6 μL 、2 mg/mL 酸中心复合物 FA@PANI@CS-HCl 分散液滴加到电极表面,室温下晾干成膜;

[0049] (2) 依次滴加 6 μL 的 EDC/NHS 溶液、6 μL 的 Ab-Ag@Co₃O₄ 抗体孵化物溶液于电极表面,超纯水冲洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;所述 EDC/NHS 溶液是由 0.1 mol/L 的 EDC 和 0.1 mol/L 的 NHS 按照 4:1 的体积比混合制得;

[0050] (3) 滴加 6 μL 、质量分数为 2% 的 BSA 溶液于电极表面,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;

[0051] (4) 滴加 6 μL 、0.0001~2 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原标准溶液至电极表面,超纯水冲洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,制得一种基于酸中心复合物的免疫传感器。

[0052] 实施例 4 酸中心复合物 FA@PANI@CS-HCl 分散液的制备

[0053] 将 0.4mg 的二茂铁甲酸 FA 与 0.4 mg 的盐酸掺杂的聚苯胺 PANI 混合,分散于 1 mL、0.5 mg/mL 的壳聚糖盐酸盐 CS-HCl 水溶液中,震荡超声 24 h,混合均匀。

[0054] 实施例 5 酸中心复合物 FA@PANI@CS-HCl 分散液的制备

[0055] 将 1.0mg 的二茂铁甲酸 FA 与 1.2 mg 的盐酸掺杂的聚苯胺 PANI 混合,分散于 1 mL、5.0 mg/mL 的壳聚糖盐酸盐 CS-HCl 水溶液中,震荡超声 24 h,混合均匀。

[0056] 实施例 6 酸中心复合物 FA@PANI@CS-HCl 分散液的制备

[0057] 将 2.0 mg 的二茂铁甲酸 FA 与 2.0 mg 的盐酸掺杂的聚苯胺 PANI 混合,分散于 1 mL、10 mg/mL 的壳聚糖盐酸盐 CS-HCl 水溶液中,震荡超声 24 h,混合均匀。

[0058] 实施例 7 Ab-Ag@Co₃O₄ 抗体孵化物溶液的制备

[0059] (1) Co₃O₄ 纳米片的制备

[0060] 在磁力搅拌下,将 2.0 g 的 CoCl₂·6H₂O 溶于 50 mL 超纯水中,制得 CoCl₂ 水溶液;将 20 mL、0.1 mol/L NaOH 水溶液逐滴加入到 CoCl₂ 水溶液中,继续搅拌 5 min,得到棕色沉淀,离心,用超纯水和无水乙醇分别洗涤 3 次,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥箱中干燥 12 h,制得固体沉淀物,将其在 300 $^{\circ}\text{C}$ 下煅烧 1 h,逐渐降到室温,制得 Co₃O₄ 纳米片;

[0061] (2) 氨基化 Co₃O₄ 的制备

[0062] 将 0.1 g 的 Co₃O₄ 纳米片加入到 10 mL 的无水甲苯中,加入 0.1 mL 的 3-氨基三乙氧基硅烷,60 $^{\circ}\text{C}$ 回流 1.5 h,离心,于 110 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥 1 h,制得氨基化的 Co₃O₄;

[0063] (3) Ab-Ag@Co₃O₄ 抗体孵化物溶液的制备

[0064] 将 50 mg 的硝酸银溶于 50 mL、质量分数为 3% 的柠檬酸钠水溶液中,搅拌 1 h;逐滴加入 1 mL、0.1 mmol/L 的硼氢化钠水溶液,搅拌 20 min,直至变为棕黄色,制得 Ag 纳米粒子溶液;将 1 mg 氨基化的 Co₃O₄ 和 30 mL 的 Ag 纳米粒子溶液,充分混合,震荡离心,得到 Ag@Co₃O₄;将 1 mg 的 Ag@Co₃O₄ 加入到 1 mL、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗体 Ab 溶液中,充分混匀,震荡 24 h,制得 Ab-Ag@Co₃O₄ 抗体孵化物溶液。

[0065] 实施例 8 Ab-Ag@Co₃O₄ 抗体孵化物溶液的制备

[0066] (1) Co₃O₄ 纳米片的制备

[0067] 在磁力搅拌下,将 2.5 g 的 CoCl₂·6H₂O 溶于 60 mL 超纯水中,制得 CoCl₂ 水溶液;将 20 mL、0.5 mol/L NaOH 水溶液逐滴加入到 CoCl₂ 水溶液中,继续搅拌 5 min,得到棕色沉淀,离心,用超纯水和无水乙醇分别洗涤 3 次,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥箱中干燥 12 h,制得固体沉淀物,将其在 400 $^{\circ}\text{C}$ 下煅烧 1 h,逐渐降到室温,制得 Co₃O₄ 纳米片;

[0068] (2) 氨基化 Co₃O₄ 的制备

[0069] 将 0.1 g 的 Co₃O₄ 纳米片加入到 10 mL 的无水甲苯中,加入 0.5 mL 的 3-氨基

三乙氧基硅烷, 70℃回流 1.5 h, 离心, 于 110℃下干燥 1 h, 制得氨基化的 Co_3O_4 ;

[0070] (3) Ab-Ag@ Co_3O_4 抗体孵化物溶液的制备

[0071] 将 50 mg 的硝酸银溶于 50 mL、质量分数为 6 % 的柠檬酸钠水溶液中, 搅拌 1 h; 逐滴加入 3 mL、0.1 mmol/L 的硼氢化钠水溶液, 搅拌 25 min, 直至变为棕黄色, 制得 Ag 纳米粒子溶液; 将 1 mg 氨基化的 Co_3O_4 和 50 mL 的 Ag 纳米粒子溶液, 充分混合, 震荡离心, 得到 Ag@ Co_3O_4 ; 将 1 mg 的 Ag@ Co_3O_4 加入到 1 mL、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗体 Ab 溶液中, 充分混匀, 震荡 24 h, 制得 Ab-Ag@ Co_3O_4 抗体孵化物溶液。

[0072] 实施例 9 Ab-Ag@ Co_3O_4 抗体孵化物溶液的制备

[0073] (1) Co_3O_4 纳米片的制备

[0074] 在磁力搅拌下, 将 3.0 g 的 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于 70 mL 超纯水中, 制得 CoCl_2 水溶液; 将 20 mL、1.0 mol/L NaOH 水溶液逐滴加入到 CoCl_2 水溶液中, 继续搅拌 5 min, 得到棕色沉淀, 离心, 用超纯水和无水乙醇分别洗涤 3 次, 在 60 °C 真空干燥箱中干燥 12 h, 制得固体沉淀物, 将其在 500℃ 下煅烧 1 h, 逐渐降到室温, 制得 Co_3O_4 纳米片;

[0075] (2) 氨基化 Co_3O_4 的制备

[0076] 将 0.1 g 的 Co_3O_4 纳米片加入到 10 mL 的无水甲苯中, 加入 1 mL 的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷, 80℃回流 1.5 h, 离心, 于 110℃下干燥 1 h, 制得氨基化的 Co_3O_4 ;

[0077] (3) Ab-Ag@ Co_3O_4 抗体孵化物溶液的制备

[0078] 将 50 mg 的硝酸银溶于 50 mL、质量分数为 8 % 的柠檬酸钠水溶液中, 搅拌 1 h; 逐滴加入 5 mL、0.1 mmol/L 的硼氢化钠水溶液, 搅拌 30 min, 直至变为棕黄色, 制得 Ag 纳米粒子溶液; 将 1 mg 氨基化的 Co_3O_4 和 70 mL 的 Ag 纳米粒子溶液, 充分混合, 震荡离心, 得到 Ag@ Co_3O_4 ; 将 1 mg 的 Ag@ Co_3O_4 加入到 1 mL、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗体 Ab 溶液中, 充分混匀, 震荡 24 h, 制得 Ab-Ag@ Co_3O_4 抗体孵化物溶液。

[0079] 实施例 10 人核基质蛋白 NMP-22 肿瘤标志物的检测

[0080] (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、pH 6.00 ~ 8.10 的 PBS 缓冲溶液中进行测试;

[0081] (2) 用方波伏安法对肿瘤标志物抗原标准溶液进行检测, 其电压测试范围为 -0.2V ~ 0.6V;

[0082] (3) 当背景电流趋于稳定后, 测量抗原加入前后的传感器的峰电流值, 然后记录电流变化, 绘制工作曲线;

[0083] (4) 将待测样品溶液代替肿瘤标志物抗原标准溶液进行检测。

[0084] (5) 测得线性范围为 1.0 pg/mL ~ 25 ng/mL, 检测限为 0.21 pg/mL。

[0085] 实施例 11 甲胎蛋白的检测

[0086] 绘制工作曲线步骤同实施例 9, 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 0.80 pg/mL ~ 25 ng/mL, 检测限为 0.18 pg/mL。

[0087] 实施例 12 乳腺癌易感基因的检测

[0088] 绘制工作曲线步骤同实施例 9, 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 ~ 20 ng/mL, 检测限为 0.12 pg/mL。

[0089] 实施例 13 鳞状细胞相关抗原 SCC 的检测

[0090] 绘制工作曲线步骤同实施例 9,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 1.2 pg/mL ~ 25ng/mL,检测限为 0.24 pg/mL。

[0091] 实施例 14细胞角蛋白 19(CYFRA21-1) 的检测

[0092] 绘制工作曲线步骤同实施例 9,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 ~ 20 ng/mL,检测限为 0.12pg/mL。

专利名称(译)	一种基于酸中心复合物的免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN104297478B	公开(公告)日	2015-12-30
申请号	CN201410457671.0	申请日	2014-09-09
[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	任祥 杜斌 闫涛 魏琴 马洪敏 吴丹		
发明人	任祥 杜斌 闫涛 魏琴 马洪敏 吴丹		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/532 G01N27/26		
CPC分类号	G01N27/48 G01N33/531 G01N33/574 G01N2800/7028		
审查员(译)	胡晓佳		
其他公开文献	CN104297478A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种酸中心复合物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。基于酸中心复合物比表面积大，导电性优异，生物相容性好，氧化还原性能好等特点，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。