



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105158469 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 16

(21) 申请号 201510598028. 4

(22) 申请日 2015. 09. 18

(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 姜丽萍 王平 刘青
董云会

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书2页 说明书6页

(54) 发明名称

一种基于生物素化氨基化 Fe_3O_4 与链霉亲和素的免疫传感器的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明属于新型功能材料与生物传感检测技术领域,提供了一种基于生物素化氨基化 Fe_3O_4 与链霉亲和素的免疫传感器的制备方法及应用。具体是采用生物素化 Fe_3O_4 作为标记物,制备了一种检测肿瘤标志物抗原的电化学免疫传感器。

1. 一种基于生物素化氨基化 Fe_3O_4 与链霉亲和素的免疫传感器的制备方法, 其特征在于, 步骤如下:

(1) 将直径为 3 ~ 5 mm 的玻碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨, 超纯水清洗干净;

(2) 取 6 μL 、0.5 ~ 1.5 mg/mL 的 SnO_2 负载石墨烯聚苯胺滴涂到电极表面, 室温下晾干, 用超纯水冲洗电极表面, 晾干;

(3) 继续将 6 μL 、8 ~ 12 $\mu\text{g/mL}$ 的肿瘤标志物捕获抗体 Ab_1 滴加到电极表面, 超纯水冲洗, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中干燥;

(4) 继续将 3 μL 、0.5 ~ 1.5 mg/mL 的牛血清白蛋白 BSA 溶液滴加到电极表面, 超纯水冲洗电极表面, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干;

(5) 滴加 6 μL 、0.0005 ~ 10 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原 Ag 溶液, 超纯水冲洗电极表面, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中干燥;

(6) 将 6 μL 、1 ~ 3 mg/mL 的生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B- Ab_2 溶液, 滴涂于电极表面上, 置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干;

(7) 将 6 μL 、0.1 ~ 0.3 mg/mL 的链霉亲和素溶液, 滴涂于电极表面上, 置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干;

(8) 将 6 μL 、1 ~ 3 mg/mL 的生物素化氨基化 Fe_3O_4 溶液, 滴涂于电极表面上, 置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干, 制得一种基于生物素化氨基化 Fe_3O_4 与链霉亲和素的免疫传感器。

2. 如权利要求 1 所述的一种基于生物素化氨基化 Fe_3O_4 与链霉亲和素的免疫传感器的制备方法, 所述 SnO_2 负载石墨烯聚苯胺、生物素化氨基化 Fe_3O_4 、生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B- Ab_2 溶液的制备, 步骤如下:

(1) SnO_2 负载石墨烯聚苯胺的制备

称取 40 ~ 60 mg 的 SnO_2 负载石墨烯, 量取 10 mL N, N- 二甲基甲酰胺, 混合于 50 mL 烧杯中, 继续加入 0.04 ~ 0.06 mL 苯胺, 1 ~ 2 mL, 质量分数为 37% 的盐酸 HCl 溶液, 磁力搅拌 1 h, 后称取 0.05 ~ 0.15 g 过硫酸铵加入上述烧杯中, 室温下超声反应 12 h; 离心分离得到 SnO_2 负载石墨烯聚苯胺;

(2) 生物素化氨基化 Fe_3O_4 的制备

①氨基化 Fe_3O_4 的合成

称取 0.5 ~ 1.5 g Fe_3O_4 溶解于 50 ml 无水乙醇中, 超声时间 1 h, 在恒温 40 $^\circ\text{C}$ 、搅拌条件下加入 2 ~ 6 g 的 3- 氨基丙基三乙氧基硅烷, 搅拌时间 8 h; 后磁分离, 水洗三次, 乙醇洗涤三次, 室温干燥, 制得氨基化 Fe_3O_4 ;

②生物素化氨基化 Fe_3O_4 的合成

将 1.5 ~ 2.5 mg 生物素氨基乙酸 n- 羟基琥珀酰亚胺溶于 1 ml 的 N, N- 二甲基甲酰胺中, 然后加入 10 ~ 30 mg 氨基化磁性 Fe_3O_4 和 30 mL pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液, 37 $^\circ\text{C}$ 下搅拌 12 h, 分别用 N, N- 二甲基甲酰胺和水进行三次洗涤, 室温干燥, 制得生物素化氨基化 Fe_3O_4 ;

(3) 生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B- Ab_2 溶液的制备

将 1 ~ 3 mg 生物素氨基乙酸 n- 羟基琥珀酰亚胺溶于 1 mL 的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中, 震荡溶解, 再加入 100 μL 、80~120 $\mu\text{g/mL}$ 的肿瘤标志物检测抗体溶液和 900 μL 、50 mmol/L 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液, 4 $^\circ\text{C}$ 恒温振荡培养箱中振荡, 孵化 12 h, 制得生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B- Ab_2 溶液, 4 $^\circ\text{C}$ 下保存备用。

3. 如权利要求 1 所述的制备方法制备的一种基于生物素化氨基化 Fe_3O_4 与链霉亲和素的免疫传感器,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 ~ 8.0 磷酸盐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、50 mmol/L 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液中注入 10 μL 、5 mol/L 的双氧水溶液,记录电流变化。

4. 根据权利要求 1、2、3 所述的肿瘤标志物,其特征在於,所述肿瘤标志物选自下列之一: AFP、CEA、PSA。

一种基于生物素化氨基化 Fe_3O_4 与链霉亲和素的免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析和生物传感技术领域,提供了一种生物素化氨基化 Fe_3O_4 与链霉亲和素多重放大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,不易察觉,我国病例数相当庞大,占全世界病例数的 55%,且肿瘤的生长和转移的速度快,对人类的健康产生极大危害。肿瘤标志物的灵敏检测,在临床上对于肿瘤的早期发现,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] 目前电化学免疫传感器已经广泛用于肿瘤标志物的检测,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。

[0004] 本发明中使用的石墨烯是褶皱的二维平面薄膜,具有大的比表面积,良好的电子传递能力和催化性能,能有效吸附固载抗体。 SnO_2 纳米粒子原位吸附在石墨烯表面,有效地避免了石墨烯片层的堆叠,而聚苯胺加入后可以大大的提高 SnO_2 的电化学性质,并且聚苯胺的存在可以使 SnO_2 负载石墨与抗体通过氨基更牢固的键合在一起。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种生物素化氨基化 Fe_3O_4 与链霉亲和素多重放大免疫传感器的制备方法及应用,实现了对肿瘤标志物的超灵敏检测。

[0006] 本发明的目的之一是提供一种生物素化氨基化 Fe_3O_4 与链霉亲和素的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生物素化氨基化 Fe_3O_4 与链霉亲和素的免疫传感器应用于肿瘤标志物的高灵敏、特异性检测。

[0008] 本发明的技术方案,包括以下步骤。

[0009] 1. 一种基于生物素化氨基化 Fe_3O_4 与链霉亲和素的免疫传感器的制备方法,步骤如下:

- (1) 将直径为 3 ~ 5 mm 的玻碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨,超纯水清洗干净;
- (2) 取 6 μL 、0.5 ~ 1.5 mg/mL 的 SnO_2 负载石墨烯聚苯胺滴涂到电极表面,室温下晾干,用超纯水冲洗电极表面,晾干;
- (3) 继续将 6 μL 、8 ~ 12 $\mu\text{g/mL}$ 的肿瘤标志物捕获抗体 Ab_1 滴加到电极表面,超纯水冲洗,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中干燥;
- (4) 继续将 3 μL 、0.5 ~ 1.5 mg/mL 的牛血清白蛋白 BSA 溶液滴加到电极表面,超纯水

冲洗电极表面,4℃冰箱中晾干;

(5)滴加6 μL 、0.0005 ~ 10 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原 Ag 溶液,超纯水冲洗电极表面,4℃冰箱中干燥;

(6)将6 μL 、1 ~ 3 mg/mL 的生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B-Ab₂溶液,滴涂于电极表面上,置于4℃冰箱中晾干;

(7)将6 μL 、0.1 ~ 0.3 mg/mL 的链霉亲和素溶液,滴涂于电极表面上,置于4℃冰箱中晾干;

(8)将6 μL 、1 ~ 3 mg/mL 的生物素化氨基化 Fe₃O₄溶液,滴涂于电极表面上,置于4℃冰箱中晾干,制得一种基于生物素化氨基化 Fe₃O₄与链霉亲和素的免疫传感器。

[0010] 2. 所用 SnO₂负载石墨烯聚苯胺、生物素化氨基化 Fe₃O₄、生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B-Ab₂溶液的制备

(1) SnO₂负载石墨烯聚苯胺的制备

称取40 ~ 60 mg 的 SnO₂负载石墨烯,量取10 mL N,N-二甲基甲酰胺,混合于50 mL 烧杯中,继续加入0.04 ~ 0.06 mL 苯胺,1 ~ 2 mL,质量分数为37%的盐酸 HCl 溶液,磁力搅拌1 h,后称取0.05 ~ 0.15 g 过硫酸铵加入上述烧杯中,室温下超声反应12 h;离心分离得到 SnO₂负载石墨烯聚苯胺;

(2) 生物素化氨基化 Fe₃O₄的制备

①氨基化 Fe₃O₄的合成

称取0.5 ~ 1.5 g Fe₃O₄溶解于50 ml 无水乙醇中,超声时间1 h,在恒温40℃、搅拌条件下加入2 ~ 6 g 的3-氨丙基三乙氧基硅烷,搅拌时间8 h;后磁分离,水洗三次,乙醇洗涤三次,室温干燥,制得氨基化 Fe₃O₄;

②生物素化氨基化 Fe₃O₄的合成

将1.5 ~ 2.5 mg 生物素氨基乙酸 n-羟基琥珀酰亚胺溶于1 ml 的 N,N-二甲基甲酰胺中,然后加入10 ~ 30 mg 氨基化磁性 Fe₃O₄和30 mL pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液,37℃下搅拌12 h,分别用 N,N-二甲基甲酰胺和水进行三次洗涤,室温干燥,制得生物素化氨基化 Fe₃O₄;

(3) 生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B-Ab₂溶液的制备

将1 ~ 3 mg 生物素氨基乙酸 n-羟基琥珀酰亚胺溶于1 mL 的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中,震荡溶解,再加入100 μL 、80~120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的肿瘤标志物检测抗体溶液和900 μL 、50 mmol/L 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液,4℃恒温振荡培养箱中振荡,孵化12 h,制得生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B-Ab₂溶液,4℃下保存备用。

[0011] 3. 肿瘤标志物的检测

(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,所制备的传感器为工作电极,在10 mL、50 mmol/L 的 pH 5.0 ~ 8.0 磷酸盐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、50 mmol/L 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液中注入10 μL 、5 mol/L 的双氧水溶液,记录电流变化。

[0012] 上述所述肿瘤标志物选自下列之一:AFP、CEA、PSA

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。

[0013] 本发明的有益成果

(1) 本发明使用了 SnO_2 负载石墨烯聚苯胺, 石墨烯有大的比表面积, 可增加抗体的结合位点, 石墨烯氧化得还原石墨烯, 是亲水性物质, 在水中有优越的分散性, 且羧基能与抗体上的氨基有效结合, SnO_2 纳米颗粒在石墨烯片层上原位还原能有效避免石墨烯片层的堆叠, 聚苯胺加入后可以大大的提高 SnO_2 的电化学性质, 并且聚苯胺的存在可以增加了抗体结合率, 使得结合更加牢固;

(2) 采用生物素化氨基化 Fe_3O_4 作为捕获抗体标记物, Fe_3O_4 纳米颗粒有极高的强度和良好的导电性, 且对过氧化氢有催化作用, 将 Fe_3O_4 氨基化后可以有效的结合生物素。十字型的链霉亲和素有四个结合位点, 可以同时与四个生物素结合, 其中一个位点上结合生物素化的二抗, 另外三个位点结合生物素化的捕获抗体标记物, 实现了三重放大电化学信号的作用, 从而提高了传感器的灵敏度, 降低了检测限;

(3) 一种基于生物素化氨基化 Fe_3O_4 与链霉亲和素的免疫传感器对肿瘤标志物的检测, 其线性范围 $0.0005 \sim 10 \text{ ng/mL}$, 检测限最低 0.1 pg/mL , 表明一种基于生物素化氨基化 Fe_3O_4 与链霉亲和素的免疫传感器可以达到准确测定的目的。

具体实施方式

[0014] 实施例 1 一种基于生物素化氨基化 Fe_3O_4 与链霉亲和素的免疫传感器的制备

(1) 将直径为 3 mm 的玻碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨, 超纯水清洗干净;

(2) 取 $6 \mu\text{L}$ 、 0.5 mg/mL 的 SnO_2 负载石墨烯聚苯胺滴涂到电极表面, 室温下晾干, 用超纯水冲洗电极表面, 晾干;

(3) 继续将 $6 \mu\text{L}$ 、 $8 \mu\text{g/mL}$ 的肿瘤标志物捕获抗体 Ab_1 滴加到电极表面, 超纯水冲洗, 4°C 冰箱中干燥;

(4) 继续将 $3 \mu\text{L}$ 、 0.5 mg/mL 的牛血清白蛋白 BSA 溶液滴加到电极表面, 超纯水冲洗电极表面, 4°C 冰箱中晾干;

(5) 滴加 $6 \mu\text{L}$ 、 $0.0005 \sim 10 \text{ ng/mL}$ 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原 Ag 溶液, 超纯水冲洗电极表面, 4°C 冰箱中干燥;

(6) 将 $6 \mu\text{L}$ 、 1 mg/mL 的生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B- Ab_2 溶液, 滴涂于电极表面上, 置于 4°C 冰箱中晾干;

(7) 将 $6 \mu\text{L}$ 、 0.1 mg/mL 的链霉亲和素溶液, 滴涂于电极表面上, 置于 4°C 冰箱中晾干;

(8) 将 $6 \mu\text{L}$ 、 1 mg/mL 的生物素化氨基化 Fe_3O_4 溶液, 滴涂于电极表面上, 置于 4°C 冰箱中晾干, 制得一种基于生物素化氨基化 Fe_3O_4 与链霉亲和素的免疫传感器。

[0015] 实施例 2 一种基于生物素化氨基化 Fe_3O_4 与链霉亲和素的免疫传感器的制备

(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;

(2) 取 $6 \mu\text{L}$ 、 1.0 mg/mL 的 SnO_2 负载石墨烯聚苯胺滴涂到电极表面, 室温下晾干, 用超纯水冲洗电极表面, 晾干;

(3) 继续将 $6 \mu\text{L}$ 、 $10 \mu\text{g/mL}$ 的肿瘤标志物捕获抗体 Ab_1 滴加到电极表面, 超纯水冲洗, 4°C 冰箱中干燥;

(4) 继续将 $3 \mu\text{L}$ 、 1.0 mg/mL 的牛血清白蛋白 BSA 溶液滴加到电极表面, 超纯水冲洗电

极表面,4 °C冰箱中晾干;

(5) 滴加 6 μL 、0.0005 ~ 10 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原 Ag 溶液,超纯水冲洗电极表面,4°C冰箱中干燥;

(6) 将 6 μL 、2 mg/mL 的生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B-Ab₂溶液,滴涂于电极表面上,置于 4°C冰箱中晾干;

(7) 将 6 μL 、0.2 mg/mL 的链霉亲和素溶液,滴涂于电极表面上,置于 4°C冰箱中晾干;

(8) 将 6 μL 、2 mg/mL 的生物素化氨基化 Fe₃O₄溶液,滴涂于电极表面上,置于 4°C冰箱中晾干,制得一种基于生物素化氨基化 Fe₃O₄与链霉亲和素的免疫传感器。

[0016] 实施例 3 一种基于生物素化氨基化 Fe₃O₄与链霉亲和素的免疫传感器的制备

(1) 将直径为 5 mm 的玻碳电极用 Al₂O₃抛光粉打磨,超纯水清洗干净;

(2) 取 6 μL 、1.5 mg/mL 的 SnO₂负载石墨烯聚苯胺滴涂到电极表面,室温下晾干,用超纯水冲洗电极表面,晾干;

(3) 继续将 6 μL 、12 $\mu\text{g/mL}$ 的肿瘤标志物捕获抗体 Ab₁滴加到电极表面,超纯水冲洗,4°C冰箱中干燥;

(4) 继续将 3 μL 、1.5 mg/mL 的牛血清白蛋白 BSA 溶液滴加到电极表面,超纯水冲洗电极表面,4°C冰箱中晾干;

(5) 滴加 6 μL 、0.0005 ~ 10 ng/mL 的一系列不同浓度的肿瘤标志物抗原 Ag 溶液,超纯水冲洗电极表面,4°C冰箱中干燥;

(6) 将 6 μL 、3 mg/mL 的生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B-Ab₂溶液,滴涂于电极表面上,置于 4°C冰箱中晾干;

(7) 将 6 μL 、0.3 mg/mL 的链霉亲和素溶液,滴涂于电极表面上,置于 4°C冰箱中晾干;

(8) 将 6 μL 、3 mg/mL 的生物素化氨基化 Fe₃O₄溶液,滴涂于电极表面上,置于 4°C冰箱中晾干,制得一种基于生物素化氨基化 Fe₃O₄与链霉亲和素的免疫传感器。

[0017] 实施例 4 SnO₂负载石墨烯聚苯胺、生物素化氨基化 Fe₃O₄、生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B-Ab₂溶液的制备

(1) SnO₂负载石墨烯聚苯胺的制备

称取 40mg 的 SnO₂负载石墨烯,量取 10 mL N,N-二甲基甲酰胺,混合于 50 mL 烧杯中,继续加入 0.04mL 苯胺,1 mL,质量分数为 37% 的盐酸 HCl 溶液,磁力搅拌 1 h,后称取 0.05 g 过硫酸铵加入上述烧杯中,室温下超声反应 12 h;离心分离得到 SnO₂负载石墨烯聚苯胺;

(2) 生物素化氨基化 Fe₃O₄的制备

①氨基化 Fe₃O₄的合成

称取 0.5 g Fe₃O₄溶解于 50 ml 无水乙醇中,超声时间 1 h,在恒温 40°C、搅拌条件下加入 2 g 的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷,搅拌时间 8 h;后磁分离,水洗三次,乙醇洗涤三次,室温干燥,制得氨基化 Fe₃O₄;

②生物素化氨基化 Fe₃O₄的合成

将 1.5 mg 生物素氨基乙酸 n-羟基琥珀酰亚胺溶于 1 ml 的 N,N-二甲基甲酰胺中,然后加入 10 mg 氨基化磁性 Fe₃O₄和 30 mL pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液,37°C下搅拌 12 h,分别用 N,N-二甲基甲酰胺和水进行三次洗涤,室温干燥,制得生物素化氨基化 Fe₃O₄;

(3) 生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B-Ab₂溶液的制备

将 1 mg 生物素氨基乙酸 n- 羟基琥珀酰亚胺溶于 1 mL 的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中, 震荡溶解, 再加入 100 μ L、80 μ g/mL 的肿瘤标志物检测抗体溶液和 900 μ L、50 mmol/L 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液, 4 $^{\circ}$ C 恒温振荡培养箱中振荡, 孵化 12 h, 制得生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B-Ab₂ 溶液, 4 $^{\circ}$ C 下保存备用。

[0018] 实施例 5 SnO₂ 负载石墨烯聚苯胺、生物素化氨基化 Fe₃O₄、生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B-Ab₂ 溶液的制备

(1) SnO₂ 负载石墨烯聚苯胺的制备

称取 50 mg 的 SnO₂ 负载石墨烯, 量取 10 mL N, N- 二甲基甲酰胺, 混合于 50 mL 烧杯中, 继续加入 0.05 mL 苯胺, 1 ~ 2 mL, 质量分数为 37% 的盐酸 HCl 溶液, 磁力搅拌 1 h, 后称取 0.10 g 过硫酸铵加入上述烧杯中, 室温下超声反应 12 h; 离心分离得到 SnO₂ 负载石墨烯聚苯胺;

(2) 生物素化氨基化 Fe₃O₄ 的制备

①氨基化 Fe₃O₄ 的合成

称取 1.0 g Fe₃O₄ 溶解于 50 ml 无水乙醇中, 超声时间 1 h, 在恒温 40 $^{\circ}$ C、搅拌条件下加入 4 g 的 3- 氨丙基三乙氧基硅烷, 搅拌时间 8 h; 后磁分离, 水洗三次, 乙醇洗涤三次, 室温干燥, 制得氨基化 Fe₃O₄;

②生物素化氨基化 Fe₃O₄ 的合成

将 2.0 mg 生物素氨基乙酸 n- 羟基琥珀酰亚胺溶于 1 ml 的 N, N- 二甲基甲酰胺中, 然后加入 20 mg 氨基化磁性 Fe₃O₄ 和 30 mL pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液, 37 $^{\circ}$ C 下搅拌 12 h, 分别用 N, N- 二甲基甲酰胺和水进行三次洗涤, 室温干燥, 制得生物素化氨基化 Fe₃O₄;

(3) 生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B-Ab₂ 溶液的制备

将 2 mg 生物素氨基乙酸 n- 羟基琥珀酰亚胺溶于 1 mL 的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中, 震荡溶解, 再加入 100 μ L、100 μ g/mL 的肿瘤标志物检测抗体溶液和 900 μ L、50 mmol/L 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液, 4 $^{\circ}$ C 恒温振荡培养箱中振荡, 孵化 12 h, 制得生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B-Ab₂ 溶液, 4 $^{\circ}$ C 下保存备用。

[0019] 实施例 6 SnO₂ 负载石墨烯聚苯胺、生物素化氨基化 Fe₃O₄、生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B-Ab₂ 溶液的制备

(1) SnO₂ 负载石墨烯聚苯胺的制备

称取 60 mg 的 SnO₂ 负载石墨烯, 量取 10 mL N, N- 二甲基甲酰胺, 混合于 50 mL 烧杯中, 继续加入 0.06 mL 苯胺, 2 mL, 质量分数为 37% 的盐酸 HCl 溶液, 磁力搅拌 1 h, 后称取 0.15 g 过硫酸铵加入上述烧杯中, 室温下超声反应 12 h; 离心分离得到 SnO₂ 负载石墨烯聚苯胺;

(2) 生物素化氨基化 Fe₃O₄ 的制备

①氨基化 Fe₃O₄ 的合成

称取 1.5 g Fe₃O₄ 溶解于 50 ml 无水乙醇中, 超声时间 1 h, 在恒温 40 $^{\circ}$ C、搅拌条件下加入 6 g 的 3- 氨丙基三乙氧基硅烷, 搅拌时间 8 h; 后磁分离, 水洗三次, 乙醇洗涤三次, 室温干燥, 制得氨基化 Fe₃O₄;

②生物素化氨基化 Fe₃O₄ 的合成

将 2.5 mg 生物素氨基乙酸 n- 羟基琥珀酰亚胺溶于 1 ml 的 N, N- 二甲基甲酰胺中, 然

后加入 30 mg 氨基化磁性 Fe_3O_4 和 30 mL pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液, 37°C 下搅拌 12 h, 分别用 N, N- 二甲基甲酰胺和水进行三次洗涤, 室温干燥, 制得生物素化氨基化 Fe_3O_4 ;

(3) 生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B-Ab₂ 溶液的制备

将 3 mg 生物素氨基乙酸 n- 羟基琥珀酰亚胺溶于 1 mL 的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中, 震荡溶解, 再加入 100 μL 、120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的肿瘤标志物检测抗体溶液和 900 μL 、50 mmol/L 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液, 4°C 恒温振荡培养箱中振荡, 孵化 12 h, 制得生物素化的肿瘤标志物检测抗体 B-Ab₂ 溶液, 4°C 下保存备用。

[0020] 实施例 7 肿瘤标志物 AFP 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, 所制备的传感器为工作电极, 在 10 mL、50 mmol/L 的 pH 5.0 ~ 8.0 磷酸盐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、50 mmol/L 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液中注入 10 μL 、5 mol/L 的双氧水溶液, 记录电流变化;

(4) 根据所得电流强度与 AFP 浓度之间的线性关系, 绘制工作曲线, 测得线性范围为 0.0005 ~ 10 ng/mL, 检测限为 0.1 pg/mL。

[0021] 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 0.001~10 ng/mL, 检测限为 0.2 pg/mL。

[0022] 实施例 9 肿瘤标志物 PSA 的检测

按照实施例 7 的方法对样品中 PSA 进行检测, 其线性范围为 0.0005 ~10 ng/mL, 检测限为 0.1 pg/mL。

专利名称(译)	一种基于生物素化氨基化Fe ₃ O ₄ 与链霉亲和素的免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN105158469A	公开(公告)日	2015-12-16
申请号	CN201510598028.4	申请日	2015-09-18
[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 姜丽萍 王平 刘青 董云会		
发明人	李月云 姜丽萍 王平 刘青 董云会		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/5438 G01N33/57484		
其他公开文献	CN105158469B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于新型功能材料与生物传感检测技术领域，提供了一种基于生物素化氨基化Fe₃O₄与链霉亲和素的免疫传感器的制备方法及应用。具体是采用生物素化Fe₃O₄作为标记物，制备了一种检测肿瘤标志物抗原的电化学免疫传感器。