



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108918853 B

(45) 授权公告日 2021.03.12

(21) 申请号 201810305885.4	CN 106802314 A,2017.06.06
(22) 申请日 2018.04.08	CN 105954339 A,2016.09.21
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 108918853 A	CN 106848210 A,2017.06.13 CN 106645351 A,2017.05.10 JP H0566210 A,1993.03.19
(43) 申请公布日 2018.11.30	JP H03120456 A,1991.05.22
(73) 专利权人 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	Shuyan Song et al..Achieving the Trade-Off between Selectivity and Activity in Semihydrogenation of Alkynes by Fabrication of (Asymmetrical Pd@Ag Core)@(CeO ₂ Shell) Nanocatalysts via Autoredox Reaction.《Adv Mater》.2017,第29 卷(第8期), 韩健.基于碳纳米材料的免疫传感器的构建 及在肿瘤标志物检测中的应用.《万方数据》 .2017,
(72) 发明人 李月云 张晓波 吕慧 张春燕 张栓 贾翌雷	审查员 杨玉路
(51) Int.Cl. G01N 33/531 (2006.01) G01N 27/416 (2006.01) G01N 27/327 (2006.01)	权利要求书2页 说明书8页
(56) 对比文件 CN 107525835 A,2017.12.29	

(54) 发明名称

一种Pd@Ag@CeO₂标记的免疫传感器的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明属于免疫分析和生物传感技术领域,提供了一种Pd@Ag@CeO₂标记的免疫传感器的制备方法及应用。本发明利用CeO₂包覆双金属Pd@Ag纳米粒子作为催化材料,与检测抗体孵化后作为标记物,同时利用金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球作为电极修饰材料,成功构建了夹心型免疫传感器,从而实现了对肿瘤标志物CA199、CA125的检测,具备灵敏度高,特异性强,检测限低的优势,对肿瘤的早期检测具有重要的科学意义和应用价值。

1. 一种Pd@Ag@CeO₂标记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4 mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨成镜面,超纯水清洗干净;

(2) 取6 μL、1.0 ~ 3.0 mg/mL的金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液滴涂到电极表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;

(3) 将6 μL、8 ~ 12 μg/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、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 °C冰箱中晾干;

(5) 滴加6 μL、0.1pg/mL ~ 100 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 °C冰箱中晾干;

(6) 将6 μL、1.5 ~ 3.5 mg/mL检测抗体孵化物Pd@Ag@CeO₂-Ab₂溶液滴至电极表面,置于4 °C冰箱中孵化40 min,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干,制得一种Pd@Ag@CeO₂标记的免疫传感器;

所述金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液的制备,步骤如下:

(1) 金纳米粒子溶液的制备

在300 mL的三口烧瓶中加入1 ~ 3 mL、质量分数为1%的氯金酸和99 mL超纯水;100 °C油浴加热,溶液开始沸腾时加入1.5 ~ 3.5 mL、质量分数为1%的柠檬酸钠溶液,回流10 ~ 30 min,冷却至室温,得到酒红色的金纳米粒子溶液;

(2) 微孔碳球的制备

在烧杯中加入40 mL超纯水,16 mL无水乙醇,0.2 mL的质量分数为25 %的氨水,搅拌10 ~ 30 min;依次加入0.4 ~ 0.8 g苯酚、0.50 ~ 0.70 mL、质量分数为37%的甲醛溶液,转移到30 °C恒温水浴中,在搅拌条件下反应24 h;将溶液转移到聚四氟乙烯高压釜中,100 °C下反应24 h,离心洗涤,所得固体产物在40 °C真空干燥箱中干燥24 h;干燥好的固体与KOH按质量比4:1混合,研磨1 h,进行活化,将活化后的固体放入管式电阻炉内在氮气的保护下进行碳化;碳化后的固体用10 %的盐酸浸泡1 h,离心洗涤,40 °C的真空干燥箱中干燥24 h,制得的微孔碳球;

所述碳化,具体步骤如下:管式电阻炉采用程序升温控制,以1 °C/min的速度升温到350 °C,保持1 h;再以2 °C/min升温到700 °C,保持2 h,后冷却至室温;

(3) 金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液的制备

在300 mL的三口烧瓶中加入0.1 ~ 0.3 g微孔碳球和10 ~ 30 mL无水乙醇,超声震荡30 min,用微量移液枪准确量取0.1 ~ 0.3 mL的3-氨基三乙氧基硅烷加入三口烧瓶中,70 °C搅拌加热1.5 h,得到氨基功能化微孔碳球的悬浊液,然后取10 mL金纳米粒子溶液加入上述悬浊液中持续震荡30 min,无水乙醇离心洗涤,在40 °C的真空干燥箱中干燥24 h,制得金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳粉末;

取10 ~ 30 mg金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳粉末,超声分散于10 mL的超纯水中,制得金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液,放置在4 °C的冰箱中,备用。

2. 如权利要求1所述的一种Pd@Ag@CeO₂标记的免疫传感器的制备方法,所述检测抗体孵化物Pd@Ag@CeO₂-Ab₂溶液的制备,步骤如下:

(1) Pd NPs的制备

分别取60 ~ 80 mg抗坏血酸,110 ~ 120 mg聚乙烯吡咯烷酮和600 ~ 800 mg溴化钾溶于8 mL超纯水中,在80 °C下加热10 min,再将3.0 ~ 4.0 mL、0.0625 mol/L四氯化钯酸钠水溶液快速注入反应溶液中,反应3 h后,依次用超纯水和丙酮离心洗涤3次,得到Pd NPs,重新分散在10 mL超纯水中,制成Pd NPs分散液,备用;

(2) Pd@Ag@CeO₂的制备

依次将1.0 ~ 2.0 mL的Pd NPs分散液,2.5 ~ 3.5 mL、0.02 mol/L的硝酸银溶液加至10 mL超纯水中,搅拌10 min,使其形成胶体溶液,再加入0.2 ~ 0.4 mL、0.1 mol/L的醋酸铈溶液,于100 °C下油浴加热3 h,所得产物依次用丙酮和超纯水离心洗涤三次,在40 °C的真空干燥箱中干燥,制得Pd@Ag@CeO₂;

(3) 检测抗体孵化物Pd@Ag@CeO₂-Ab₂溶液的制备

将1 ~ 3 mg的Pd@Ag@CeO₂加至1 mL、pH=7.0的磷酸盐缓冲溶液中,超声分散,再加入100 μL、80 ~ 120 μg/mL的肿瘤标志物检测抗体溶液和900 μL、50 mmol/L的 pH = 7.0的磷酸盐缓冲溶液,4 °C恒温振荡培养箱中振荡,孵化12 h,离心分离,将下层沉淀重新分散至1 mL、50 mmol/L的pH为7.0的磷酸盐缓冲溶液中,制得检测抗体孵化物Pd@Ag@CeO₂-Ab₂溶液,4 °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Pd@Ag@CeO₂标记的免疫传感器的应用,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,含10 mmol/L铁氰化钾的pH为7.0的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2) 用差分脉冲伏安法对分析物进行检测,初始电位为0 V,终止电位为0.5 V,脉冲振幅为50 mV,脉冲宽度为50 ms,脉冲周期为50 ms,记录电流变化;

(3) 记录不同浓度下的肿瘤标志物抗原所对应的电流峰值;

(4) 利用工作曲线法,得到待测样品中肿瘤标志物抗原的浓度;

所述肿瘤标志物选自下列之一:CA199、CA125。

一种Pd@Ag@CeO₂标记的免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于纳米功能材料、免疫分析以及生物传感技术领域,涉及一种Pd@Ag@CeO₂标记的免疫传感器的制备方法及应用。具体是采用Pd@Ag@CeO₂为检测抗体标记物,实现了对肿瘤标志物CA199、CA125的灵敏检测。

背景技术

[0002] 随着工业化进程的加快,肿瘤的发病率呈现出不断增加的趋势。肿瘤几乎在人体各个器官、组织皆可出现,但在早期不易察觉,并且肿瘤的生长和转移的速度快,严重威胁人们健康和生命。肿瘤标志物在肿瘤的辅助诊断、疗效监测、预后判断等方面发挥了重要作用。因此,降低肿瘤死亡率的主要途径是实现早期对肿瘤标志物的灵敏检测。目前,对于肿瘤标志物的检测方法有很多,如酶联免疫法,放射免疫法,时间分辨荧光法等,但这些方法在环境保护、操作速度、定量检测等方面各有不足之处,因此,发明一种特异性强,灵敏度高,检测速度快,操作简便的免疫传感器十分重要。

[0003] 电化学免疫传感器依靠抗原与其相应抗体的特异性结合,已经广泛应用于各种肿瘤标志物的检测,一般可分为夹心型免疫传感器和无标记型免疫传感器。夹心型电化学免疫传感器结合了高灵敏的传感技术和高特异的免疫反应,具有检测快速、分析灵敏度高、特异性强、使用简便且成本低等优点,已广泛应用于环境监测、食品安全控制、生物监测、临床检验等领域。

[0004] 金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球具有大的比表面积和良好的生物相容性,可以显著提高捕获Ab₁的固载量;良好的电子传递能力可以增强电极的导电性。Pd@Ag@CeO₂能够提供良好的协同催化作用,同时CeO₂作为保护层可以有效地保护贵金属,减少贵金属的团聚作用。本发明采用金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球作为基底材料,Pd@Ag@CeO₂作为催化材料与检测抗体进行孵化作为标记物,构建了用于肿瘤标志物检测的夹心型电化学免疫传感器。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种Pd@Ag@CeO₂标记的免疫传感器的制备方法及应用,实现了对肿瘤标志物的灵敏检测。

[0006] 本发明的目的之一是提供一种Pd@Ag@CeO₂标记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基于Pd@Ag@CeO₂标记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Pd@Ag@CeO₂标记的免疫传感器的制备方法,步骤如下:

[0010] (1)将直径为4 mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨成镜面,超纯水清洗干净;

[0011] (2)取6 μL、1.0 ~ 3.0 mg/mL的金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液滴涂到电极表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;

[0012] (3)将6 μL 、8 ~ 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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;

[0013] (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 °C冰箱中晾干;

[0014] (5)滴加6 μL 、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 100 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 °C冰箱中晾干;

[0015] (6)将6 μL 、1.5 ~ 3.5 mg/mL 检测抗体孵化物Pd@Ag@CeO₂-Ab₂溶液滴至电极表面,置于4 °C冰箱中孵化40 min,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干,制得一种Pd@Ag@CeO₂标记的免疫传感器。

[0016] 2.所述金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液的制备,步骤如下:

[0017] (1)金纳米粒子溶液的制备

[0018] 在300 mL的三口烧瓶中加入1 ~ 3 mL、质量分数为1%的氯金酸和99 mL超纯水;100 °C油浴加热,溶液开始沸腾时加入1.5 ~ 3.5 mL、质量分数为1%的柠檬酸钠溶液,回流10 ~ 30 min,冷却至室温,得到酒红色的金纳米粒子溶液;

[0019] (2)微孔碳球的制备

[0020] 在烧杯中加入40 mL超纯水,16 mL无水乙醇,0.2 mL的质量分数为25 %的氨水,搅拌10 ~ 30 min;依次加入0.4 ~ 0.8 g苯酚、0.50 ~ 0.70 mL、质量分数为37%的甲醛溶液,转移到30 °C恒温水浴中,在搅拌条件下反应24 h;将溶液转移到聚四氟乙烯高压釜中,100 °C下反应24 h,离心洗涤,所得固体产物在40 °C真空干燥箱中干燥24 h;干燥好的固体与KOH按质量比4:1混合,研磨1 h,进行活化,将活化后的固体放入管式电阻炉内在氮气的保护下进行碳化;碳化后的固体用10 %的盐酸浸泡1 h,离心洗涤,40 °C的真空干燥箱中干燥24 h,制得的微孔碳球;

[0021] 所述碳化,具体步骤如下:管式电阻炉采用程序升温控制,以1 °C/min的速度升温到350 °C,保持1 h;再以2 °C/min升温到700 °C,保持2 h,后冷却至室温;

[0022] (3)金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液的制备

[0023] 在300 mL的三口烧瓶中加入0.1 ~ 0.3 g微孔碳球和10 ~ 30 mL无水乙醇,超声震荡30 min,用微量移液枪准确量取0.1 ~ 0.3 mL的3-氨丙基三乙氧基硅烷加入三口烧瓶中,70 °C搅拌加热1.5 h,得到氨基功能化微孔碳球的悬浊液,然后取10 mL金纳米粒子溶液加入上述悬浊液中持续震荡30 min,无水乙醇离心洗涤,在40 °C的真空干燥箱中干燥24 h,制得金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳粉末;

[0024] 取10 ~ 30 mg金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳粉末,超声分散于10 mL的超纯水中,制得金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液,放置在4 °C的冰箱中,备用。

[0025] 3.所述检测抗体孵化物Pd@Ag@CeO₂-Ab₂溶液的制备,步骤如下:

[0026] (1)Pd NPs的制备

[0027] 分别取60 ~ 80 mg抗坏血酸,110 ~ 120 mg聚乙烯吡咯烷酮和600 ~ 800 mg溴化钾溶于8 mL超纯水中,在80 °C下加热10 min,再将3.0 ~ 4.0 mL、0.0625 mol/L四氯化钯酸钠水溶液快速注入反应溶液中,反应3 h后,依次用超纯水和丙酮离心洗涤3次,得到Pd NPs,重新分散在10 mL超纯水中,制成Pd NPs分散液,备用;

[0028] (2)Pd@Ag@CeO₂的制备

[0029] 依次将1.0 ~ 2.0 mL的Pd NPs分散液,2.5 ~ 3.5 mL、0.02 mol/L的硝酸银溶液加至10 mL超纯水中,搅拌10 min,使其形成胶体溶液,再加入0.2 ~ 0.4 mL、0.1 mol/L的醋酸铈溶液,于100 °C下油浴加热3 h,所得产物依次用丙酮和超纯水离心洗涤三次,在40 °C的真空干燥箱中干燥,制得Pd@Ag@CeO₂;

[0030] (3) 检测抗体孵化物Pd@Ag@CeO₂-Ab₂溶液的制备

[0031] 将1 ~ 3 mg的Pd@Ag@CeO₂加至1 mL、pH=7.0的磷酸盐缓冲溶液中,超声分散,再加入100 μL、80 ~ 120 μg/mL的肿瘤标志物检测抗体溶液和900 μL、50 mmol/L的 pH = 7.0的磷酸盐缓冲溶液,4 °C恒温振荡培养箱中振荡,孵化12 h,离心分离,将下层沉淀重新分散至1 mL、50 mmol/L的pH为7.0的磷酸盐缓冲溶液中,制得检测抗体孵化物Pd@Ag@CeO₂-Ab₂溶液,4 °C下保存备用。

[0032] 4. 肿瘤标志物的检测,步骤如下:

[0033] (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,含10 mmol/L铁氰化钾的pH为7.0的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

[0034] (2) 用差分脉冲伏安法对分析物进行检测,初始电位为0 V,终止电位为0.5 V,脉冲振幅为50 mV,脉冲宽度为50 ms,脉冲周期为50 ms,记录电流变化;

[0035] (3) 记录不同浓度下的肿瘤标志物抗原所对应的电流峰值;

[0036] (4) 利用工作曲线法,得到待测样品中肿瘤标志物抗原的浓度。

[0037] 上述肿瘤标志物选自下列之一:CA199、CA125。

[0038] 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。

[0039] 本发明的有益成果

[0040] (1) 金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球,可以提高电极表面的导电性,同时它具有大的比表面积和良好的生物相容性,可以结合更多抗体。Pd@Ag@CeO₂为核壳型纳米复合材料,具有良好的催化性能,并且CeO₂作为保护层可以有效地减少贵金属的团聚作用,提高了催化剂的稳定性。Pd@Ag@CeO₂由于具有大的比表面积能有效吸附并固载抗体。采用金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球作为基底材料,Pd@Ag@CeO₂作为检测抗体标记物构建的夹心型免疫传感器,实现了对测定信号放大,提高了肿瘤标志物检测的灵敏度,降低了检测限;

[0041] (2) 一种Pd@Ag@CeO₂标记的免疫传感器实现了对肿瘤标志物CA199的检测,其线性范围0.4pg ~ 100 ng/mL,检测限最低0.13pg/mL,对肿瘤标志物 CA125的检测,其线性范围0.4pg ~ 80 ng/mL,检测限最低0.13pg/mL,表明一种Pd@Ag@CeO₂标记的免疫传感器可以达到准确测定的目的。

具体实施方式

[0042] 现将本发明通过具体实施方式进一步说明,但不限于此。

[0043] 实施例1一种Pd@Ag@CeO₂标记的免疫传感器的制备方法,步骤如下:

[0044] (1) 将直径为4 mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨成镜面,超纯水清洗干净;

[0045] (2) 取6 μL、1.0 mg/mL的金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液滴涂到电极表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;

[0046] (3)将6 μL 、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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;

[0047] (4)继续将3 μL 、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;

[0048] (5)滴加6 μL 、0.1 pg/mL ~ 100 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 °C冰箱中晾干;

[0049] (6)将6 μL 、1.5 mg/mL 检测抗体孵化物Pd@Ag@CeO₂-Ab₂溶液滴至电极表面,置于4 °C冰箱中孵化40 min,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干,制得一种Pd@Ag@CeO₂标记的免疫传感器。

[0050] 实施例2一种Pd@Ag@CeO₂标记的免疫传感器的制备方法,步骤如下:

[0051] (1)将直径为4 mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨成镜面,超纯水清洗干净;

[0052] (2)取6 μL 、2.0 mg/mL 的金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液滴涂到电极表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;

[0053] (3)将6 μL 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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;

[0054] (4)继续将3 μL 、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;

[0055] (5)滴加6 μL 、0.1 pg/mL ~ 100 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 °C冰箱中晾干;

[0056] (6)将6 μL 、2.5 mg/mL 检测抗体孵化物Pd@Ag@CeO₂-Ab₂溶液滴至电极表面,置于4 °C冰箱中孵化40 min,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干,制得一种Pd@Ag@CeO₂标记的免疫传感器。

[0057] 实施例3一种Pd@Ag@CeO₂标记的免疫传感器的制备方法,步骤如下:

[0058] (1)将直径为4 mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨成镜面,超纯水清洗干净;

[0059] (2)取6 μL 、3.0 mg/mL 的金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液滴涂到电极表面,室温下晾干,超纯水冲洗电极表面,晾干;

[0060] (3)将6 μL 、12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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;

[0061] (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;

[0062] (5)滴加6 μL 、0.1 pg/mL ~ 100 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 °C冰箱中晾干;

[0063] (6)将6 μL 、3.5 mg/mL 检测抗体孵化物Pd@Ag@CeO₂-Ab₂溶液滴至电极表面,置于4 °C冰箱中孵化40 min,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干,制得一种Pd@Ag@CeO₂标记的免疫传感器。

[0064] 实施例4所述金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液的制备,步骤如下:

[0065] (1)金纳米粒子溶液的制备

[0066] 在300 mL的三口烧瓶中加入1 mL、质量分数为1%的氯金酸和99 mL超纯水;100 °C油浴加热,溶液开始沸腾时加入1.5 mL、质量分数为1%的柠檬酸钠溶液,回流10 min,冷却

至室温,得到酒红色的金纳米粒子溶液;

[0067] (2)微孔碳球的制备

[0068] 在烧杯中加入40 mL超纯水,16 mL无水乙醇,0.2 mL的质量分数为25 %的氨水,搅拌10 min;依次加入0.4 g苯酚、0.50 mL、质量分数为37%的甲醛溶液,转移到30 °C恒温水浴中,在搅拌条件下反应24 h;将溶液转移到聚四氟乙烯高压釜中,100 °C下反应24 h,离心洗涤,所得固体产物在40 °C真空干燥箱中干燥24 h;干燥好的固体与KOH按质量比4:1混合,研磨1 h,进行活化,将活化后的固体放入管式电阻炉内在氮气的保护下进行碳化;碳化后的固体用10 %的盐酸浸泡1 h,离心洗涤,40 °C的真空干燥箱中干燥24 h,制得的微孔碳球;

[0069] 所述碳化,具体步骤如下:管式电阻炉采用程序升温控制,以1 °C/min的速度升温到350 °C,保持1 h;再以2 °C/min升温到700 °C,保持2 h,后冷却至室温;

[0070] (3)金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液的制备

[0071] 在300 mL的三口烧瓶中加入0.1 g微孔碳球和10 mL无水乙醇,超声震荡30 min,用微量移液枪准确量取0.1 mL的3-氨丙基三乙氧基硅烷加入三口烧瓶中,70 °C搅拌加热1.5 h,得到氨基功能化微孔碳球的悬浊液,然后取10 mL金纳米粒子溶液加入上述悬浊液中持续震荡30 min,无水乙醇离心洗涤,在40 °C的真空干燥箱中干燥24 h,制得金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳粉末;

[0072] 取10 mg金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳粉末,超声分散于10 mL的超纯水中,制得金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液,放置在4 °C的冰箱中,备用。

[0073] 实施例5所述金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液的制备,步骤如下:

[0074] (1)金纳米粒子溶液的制备

[0075] 在300 mL的三口烧瓶中加入2 mL、质量分数为1%的氯金酸和99 mL超纯水;100 °C油浴加热,溶液开始沸腾时加入2.5 mL、质量分数为1%的柠檬酸钠溶液,回流20 min,冷却至室温,得到酒红色的金纳米粒子溶液;

[0076] (2)微孔碳球的制备

[0077] 在烧杯中加入40 mL超纯水,16 mL无水乙醇,0.2 mL的质量分数为25 %的氨水,搅拌20 min;依次加入0.6 g苯酚、0.60 mL、质量分数为37%的甲醛溶液,转移到30 °C恒温水浴中,在搅拌条件下反应24 h;将溶液转移到聚四氟乙烯高压釜中,100 °C下反应24 h,离心洗涤,所得固体产物在40 °C真空干燥箱中干燥24 h;干燥好的固体与KOH按质量比4:1混合,研磨1 h,进行活化,将活化后的固体放入管式电阻炉内在氮气的保护下进行碳化;碳化后的固体用10 %的盐酸浸泡1 h,离心洗涤,40 °C的真空干燥箱中干燥24 h,制得的微孔碳球;

[0078] 所述碳化,具体步骤如下:管式电阻炉采用程序升温控制,以1 °C/min的速度升温到350 °C,保持1 h;再以2 °C/min升温到700 °C,保持2 h,后冷却至室温;

[0079] (3)金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液的制备

[0080] 在300 mL的三口烧瓶中加入0.2 g微孔碳球和20 mL无水乙醇,超声震荡30 min,用微量移液枪准确量取0.2 mL的3-氨丙基三乙氧基硅烷加入三口烧瓶中,70 °C搅拌加热1.5 h,得到氨基功能化微孔碳球的悬浊液,然后取10 mL金纳米粒子溶液加入上述悬浊液中持续震荡30 min,无水乙醇离心洗涤,在40 °C的真空干燥箱中干燥24 h,制得金纳米粒

子负载氨基功能化微孔碳粉末；

[0081] 取20 mg金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳粉末，超声分散于10 mL的超纯水中，制得金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液，放置在4 °C的冰箱中，备用。

[0082] 实施例6所述金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液的制备，步骤如下：

[0083] (1) 金纳米粒子溶液的制备

[0084] 在300 mL的三口烧瓶中加入3 mL、质量分数为1%的氯金酸和99 mL超纯水；100 °C油浴加热，溶液开始沸腾时加入3.5 mL、质量分数为1%的柠檬酸钠溶液，回流30 min，冷却至室温，得到酒红色的金纳米粒子溶液；

[0085] (2) 微孔碳球的制备

[0086] 在烧杯中加入40 mL超纯水，16 mL无水乙醇，0.2 mL的质量分数为25 %的氨水，搅拌30 min；依次加入0.8 g苯酚、0.60 mL、质量分数为37%的甲醛溶液，转移到30 °C恒温水浴中，在搅拌条件下反应24 h；将溶液转移到聚四氟乙烯高压釜中，100 °C下反应24 h，离心洗涤，所得固体产物在40 °C真空干燥箱中干燥24 h；干燥好的固体与KOH按质量比4:1混合，研磨1 h，进行活化，将活化后的固体放入管式电阻炉内在氮气的保护下进行碳化；碳化后的固体用10 %的盐酸浸泡1 h，离心洗涤，40 °C的真空干燥箱中干燥24 h，制得的微孔碳球；

[0087] 所述碳化，具体步骤如下：管式电阻炉采用程序升温控制，以1 °C/min的速度升温到350 °C，保持1 h；再以2 °C/min升温到700 °C，保持2 h，后冷却至室温；

[0088] (3) 金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液的制备

[0089] 在300 mL的三口烧瓶中加入0.3 g微孔碳球和30 mL无水乙醇，超声震荡30 min，用微量移液枪准确量取0.3 mL的3-氨基三乙氧基硅烷加入三口烧瓶中，70 °C搅拌加热1.5 h，得到氨基功能化微孔碳球的悬浊液，然后取10 mL金纳米粒子溶液加入上述悬浊液中持续震荡30 min，无水乙醇离心洗涤，在40 °C的真空干燥箱中干燥24 h，制得金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳粉末；

[0090] 取30 mg金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳粉末，超声分散于10 mL的超纯水中，制得金纳米粒子负载氨基功能化微孔碳球分散液，放置在4 °C的冰箱中，备用。

[0091] 实施例7所述检测抗体孵化物Pd@Ag@CeO₂-Ab₂溶液的制备，步骤如下：

[0092] (1) Pd NPs的制备

[0093] 分别取60 mg抗坏血酸，110 mg聚乙烯吡咯烷酮和600 mg溴化钾溶于8 mL超纯水中，在80 °C下加热10 min，再将3.0 mL、0.0625 mol/L四氯化钯酸钠水溶液快速注入反应溶液中，反应3 h后，依次用超纯水和丙酮离心洗涤3次，得到Pd NPs，重新分散在10 mL超纯水中，制成Pd NPs分散液，备用；

[0094] (2) Pd@Ag@CeO₂的制备

[0095] 依次将1.0 mL的Pd NPs分散液，2.5 mL、0.02 mol/L的硝酸银溶液加至10 mL超纯水中，搅拌10 min，使其形成胶体溶液，再加入0.2 mL、0.1 mol/L的醋酸铈溶液，于100 °C下油浴加热3 h，所得产物依次用丙酮和超纯水离心洗涤三次，在40 °C的真空干燥箱中干燥，制得Pd@Ag@CeO₂；

[0096] (3) 检测抗体孵化物Pd@Ag@CeO₂-Ab₂溶液的制备

[0097] 将1 mg的Pd@Ag@CeO₂加至1 mL、pH=7.0的磷酸盐缓冲溶液中，超声分散，再加入

100 μL 、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的肿瘤标志物检测抗体溶液和900 μL 、50 mmol/L 的 $\text{pH} = 7.0$ 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,离心分离,将下层沉淀重新分散至1 mL 、50 mmol/L 的 pH 为7.0的磷酸盐缓冲溶液中,制得检测抗体孵化物 $\text{Pd@Ag@CeO}_2\text{-Ab}_2$ 溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

[0098] 实施例8所述检测抗体孵化物 $\text{Pd@Ag@CeO}_2\text{-Ab}_2$ 溶液的制备,步骤如下:

[0099] (1)Pd NPs的制备

[0100] 分别取70 mg抗坏血酸,115 mg聚乙烯吡咯烷酮和700 mg溴化钾溶于8 mL 超纯水中,在80 $^{\circ}\text{C}$ 下加热10 min,再将3.5 mL 、0.0625 mol/L 四氯化钯酸钠水溶液快速注入反应溶液中,反应3 h后,依次用超纯水和丙酮离心洗涤3次,得到Pd NPs,重新分散在10 mL 超纯水中,制成Pd NPs分散液,备用;

[0101] (2) Pd@Ag@CeO_2 的制备

[0102] 依次将1.5 mL 的Pd NPs分散液,3.0 mL 、0.02 mol/L 的硝酸银溶液加至10 mL 超纯水中,搅拌10 min,使其形成胶体溶液,再加入0.3 mL 、0.1 mol/L 的醋酸铈溶液,于100 $^{\circ}\text{C}$ 下油浴加热3 h,所得产物依次用丙酮和超纯水离心洗涤三次,在40 $^{\circ}\text{C}$ 的真空干燥箱中干燥,制得 Pd@Ag@CeO_2 ;

[0103] (3)检测抗体孵化物 $\text{Pd@Ag@CeO}_2\text{-Ab}_2$ 溶液的制备

[0104] 将2 mg的 Pd@Ag@CeO_2 加至1 mL 、 $\text{pH}=7.0$ 的磷酸盐缓冲溶液中,超声分散,再加入100 μL 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的肿瘤标志物检测抗体溶液和900 μL 、50 mmol/L 的 $\text{pH} = 7.0$ 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,离心分离,将下层沉淀重新分散至1 mL 、50 mmol/L 的 pH 为7.0的磷酸盐缓冲溶液中,制得检测抗体孵化物 $\text{Pd@Ag@CeO}_2\text{-Ab}_2$ 溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

[0105] 实施例9所述检测抗体孵化物 $\text{Pd@Ag@CeO}_2\text{-Ab}_2$ 溶液的制备,步骤如下:

[0106] (1)Pd NPs的制备

[0107] 分别取80 mg抗坏血酸,120 mg聚乙烯吡咯烷酮和800 mg溴化钾溶于8 mL 超纯水中,在80 $^{\circ}\text{C}$ 下加热10 min,再将4.0 mL 、0.0625 mol/L 四氯化钯酸钠水溶液快速注入反应溶液中,反应3 h后,依次用超纯水和丙酮离心洗涤3次,得到Pd NPs,重新分散在10 mL 超纯水中,制成Pd NPs分散液,备用;

[0108] (2) Pd@Ag@CeO_2 的制备

[0109] 依次将2.0 mL 的Pd NPs分散液,3.5 mL 、0.02 mol/L 的硝酸银溶液加至10 mL 超纯水中,搅拌10 min,使其形成胶体溶液,再加入0.4 mL 、0.1 mol/L 的醋酸铈溶液,于100 $^{\circ}\text{C}$ 下油浴加热3 h,所得产物依次用丙酮和超纯水离心洗涤三次,在40 $^{\circ}\text{C}$ 的真空干燥箱中干燥,制得 Pd@Ag@CeO_2 ;

[0110] (3)检测抗体孵化物 $\text{Pd@Ag@CeO}_2\text{-Ab}_2$ 溶液的制备

[0111] 将3 mg的 Pd@Ag@CeO_2 加至1 mL 、 $\text{pH}=7.0$ 的磷酸盐缓冲溶液中,超声分散,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 $\text{pH} = 7.0$ 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,离心分离,将下层沉淀重新分散至1 mL 、50 mmol/L 的 pH 为7.0的磷酸盐缓冲溶液中,制得检测抗体孵化物 $\text{Pd@Ag@CeO}_2\text{-Ab}_2$ 溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

[0112] 实施例10肿瘤标志物CA199的检测

[0113] (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,含10 mmol/L铁氰化钾的pH为7.0的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

[0114] (2)用差分脉冲伏安法对分析物进行检测,初始电位为0 V,终止电位为0.5 V,脉冲振幅为50 mV,脉冲宽度为50 ms,脉冲周期为50 ms,记录电流变化;

[0115] (3)记录不同浓度下的肿瘤标志物抗原所对应的电流峰值;

[0116] (4)利用工作曲线法,得到待测样品中肿瘤标志物抗原的浓度;

[0117] (5)根据所得电流强度与CA199浓度之间的线性关系,绘制工作曲线,测得线性范围为0.4 pg ~ 100 ng/mL,检测限为0.13pg/mL。

[0118] 实施例11肿瘤标志物CA125的检测

[0119] 按照实施例10的方法对样品中CA125进行检测,其线性范围为0.4 pg ~ 80 ng/mL,检测限为0.13pg/mL。