



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104614527 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 13

(21) 申请号 201510013542. 7

(22) 申请日 2015. 01. 12

(71) 申请人 济南大学

地址 250022 山东省济南市市中区南辛庄西路 336 号

(72) 发明人 于京华 孙国强 张彦 葛慎光  
颜梅 刘海云 杨红梅 马超

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 27/26(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

### (54) 发明名称

一种检测癌胚抗原的电化学免疫传感器的构建方法

### (57) 摘要

本发明涉及一种检测癌胚抗原的电化学免疫传感器的构建方法,尤其是基于石墨烯/牛血清蛋白稳定的银纳米粒子(GR/Ag@BSA)复合材料的检测癌胚抗原的电化学免疫传感器的构建方法。其特征在于:首先使用电位沉积方法在玻碳电极表面电沉积一层金纳米粒子,然后依次将一抗和抗原固载到电极表面,最后通过抗原抗体间的特异性反应来固定 GR/Ag@BSA 标记的二抗溶液。金纳米粒子具有优良的导电性,使用的 GR/Ag@BSA 复合材料不仅集合了 GR 优异的导电性和 BSA 良好的生物兼容性,而且还对双氧水还原有高的催化活性,基于该材料构建的电化学免疫传感器对癌胚抗原的检测有较高的灵敏度和低的检测限。

1. 一种检测癌胚抗原(CEA)的电化学免疫传感器的构建方法,其特征在于包括以下步骤:

- (1) 电化学沉积金纳米粒子修饰的玻碳电极;
- (2) 聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA)功能化石墨烯(GR)的制备;
- (3) 牛血清蛋白稳定银纳米粒子(Ag@BSA)的制备;
- (4) 牛血清蛋白稳定银纳米粒子与功能化还原石墨烯复合材料(GR/Ag@BSA)的制备;
- (5) GR/Ag@BSA 标记癌胚抗原第二抗体(GR/Ag@BSA-Ab<sub>2</sub>)的制备;
- (6) 利用夹心免疫法构建电化学免疫传感器。

2. 根据权利要求1所述的一种检测CEA的电化学免疫传感器的构建方法,其特征在于所述步骤(1)具体为:

a 依次用1.0, 0.3和0.5 μm的三氧化二铝抛光粉抛光处理玻碳电极,然后用超纯水冲洗干净,自然晾干;

b 将处理清洁的玻碳电极浸入3 mL质量分数为1%的氯金酸溶液中,用玻碳电极为工作电极,铂丝电极为对电极,银/氯化银电极为参比电极,在室温下,以-0.2 V的工作电位恒电位沉积30 s制备金纳米粒子修饰的玻碳电极,超纯水清洗干净,晾干。

3. 根据权利要求1所述的一种检测CEA的电化学免疫传感器的构建方法,其特征在于所述步骤(2)具体为:

a 氧化石墨烯的制备:称量0.75 g石墨粉溶解到100 mL体积比为1:9的磷酸和浓硫酸的混合溶液中,并在水浴锅中加热到30 °C,将4.5 g高锰酸钾加入到上述混合液中,升温至50 °C,磁力搅拌反应12 h后,将样品倒入预先加入4 mL双氧水的300 mL冰水中,得到的混合溶液10000转离心分离15 min,用超纯水洗涤7次,在真空干燥箱中60 °C干燥12 h后得到固体氧化石墨烯;

b 还原石墨烯的制备:称取25 mg步骤(2)a制得的氧化石墨烯溶解到150 mL超纯水中,超声波处理30 min,依次向溶液中加入100 μL水合肼,560 μL氨水,10 mg聚乙烯吡咯烷酮,在90 °C反应1 h,得到的混合溶液10000转离心分离15 min,用超纯水洗涤5次,在真空干燥箱中60 °C干燥12 h后得到固体GR;

c PDDA功能化GR的制备:称取2.5 mg步骤(2)b制得的GR固体溶解到5 mL超纯水中,超声波处理30 min,向溶液中加入10 mL质量分数为1%的PDDA,室温下搅拌2 h,得到的混合溶液10000转离心分离10 min,用超纯水洗涤3次后重新溶解到5 mL超纯水中,这样就成功制备了PDDA-GR溶液。

4. 根据权利要求1所述的一种检测CEA的电化学免疫传感器的构建方法,其特征在于所述步骤(3)具体为:

将45 mg BSA溶解到10 mL超纯水中,室温下搅拌5 min后,在水浴锅中加热到60 °C,迅速向溶液中加入10 mL 8 mmol/L的硝酸银,继续搅拌45 min,得到的混合溶液10000转离心分离5 min,用超纯水洗涤5次,室温下干燥后得到固体Ag@BSA。

5. 根据权利要求1所述的一种检测CEA的电化学免疫传感器的构建方法,其特征在于所述步骤(4)具体为:

称取1 mg步骤(3)制备的Ag@BSA溶解到1 mL超纯水中,搅拌5 min后与1 mL步骤(2)制备的PDDA-GR溶液混合,室温下搅拌4 h,将得到的混合液10000转离心分离5 min,

弃去上清液,溶解到 1 mL pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液中,制得 GR/Ag@BSA 溶液。

6. 根据权利要求 1 所述的一种检测 CEA 的电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于所述步骤(5)具体为:

a 将步骤(4)制备的 1 mL GR/Ag@BSA 溶液与 3 mL 质量分数为 2.5% 的戊二醛溶液混合,室温下搅拌 2 h,得到的混合液 10000 转离心分离 5 min,弃去上清液,溶解到 1 mL pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液中;

b 将 1 mL 20  $\mu$ g/mL 的 Ab<sub>2</sub>加入上述溶液中,室温下搅拌孵育 2 h,10000 转离心分离 5 min,弃去上清液,重新溶解到 1 mL pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液中,得到 GR/Ag@BSA-Ab<sub>2</sub>溶液。

7. 根据权利要求 1 所述的一种检测 CEA 的电化学免疫传感器的制备方法,其特征在于所述步骤(6)具体为:

a 滴涂 5  $\mu$ L 1 mg/mL 的 CEA 第一抗体至上述步骤(1)制备的金纳米粒子修饰的玻碳电极表面,室温下孵育 1 h, pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液清洗 3 次,晾干;

b 在上述电极表面滴加 5  $\mu$ L 质量分数为 1% 的 BSA 溶液以封闭电极表面的非特异性活性位点, pH 7.4 的 PBS 溶液清洗 3 次,晾干;

c 将 5  $\mu$ L 0.005-150 ng/mL 的 CEA 抗原溶液分别滴涂到不同电极表面,室温下孵育 40 min, pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液清洗 3 次,晾干;

d 将 5  $\mu$ L GR/Ag@BSA-Ab<sub>2</sub>滴到电极表面,室温下孵育 40 min, pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液清洗 3 次,晾干,即得到电化学免疫传感器的工作电极;

e 将银 / 氯化银参比电极、铂丝对电极和上述制备的工作电极连接在电化学工作站上;

f pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液作为底液,通过计时电流法检测工作电极对双氧水的响应,根据所得的电流值与 CEA 浓度的对数呈线性关系,绘制工作曲线。

## 一种检测癌胚抗原的电化学免疫传感器的构建方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于电化学免疫传感器技术领域,具体涉及一种检测癌胚抗原的电化学免疫传感器的构建方法。

### 背景技术

[0002] 癌胚抗原(CEA)是一个广谱性肿瘤标志物,它能向人们反映出多种肿瘤的存在,对大肠癌、乳腺癌和肺癌的疗效判断、病情发展、监测和预后估计是一个较好的肿瘤标志物。目前检测 CEA 的免疫分析方法主要有放射性免疫测定法、酶联免疫分析法、压电免疫分析法、荧光免疫分析法等。虽然这些方法灵敏可靠,但是存在一些缺点:有辐射危害、分析时间长、需要复杂的电器仪表等。

[0003] 近年来,电化学免疫传感器受到了广泛关注,这是由于它具有良好的可移植性、低耗费、高的检测灵敏度等内在优势。在电化学免疫分析过程中,通常使用酶作信号探针,但是酶容易灭活、价格昂贵,因此,构建无酶免疫传感器引起了分析者们的注意。银纳米粒子对双氧水的还原有高的催化活性,这一催化特性使银纳米粒子成为构建无酶免疫传感器的潜在材料。然而,单纯银纳米材料的生物兼容性不好,因此需要制备具有高催化活性和好生物兼容性的材料来构建无酶传感器。牛血清蛋白稳定的银纳米粒子(Ag@BSA)集合了银纳米粒子的催化活性和 BSA 的良好生物兼容性,在传感器的构建方面有很好的应用前景。

[0004] 石墨烯(GR)具有优异的电化学稳定性、高的导电性、大的比表面积,是人们关注的焦点。此外,基于 GR 的复合材料综合了不同材料各自的特性,也受到了人们的广泛关注。因此,将 GR 和 Ag@BSA 复合制得的材料不仅具有好的的导电性、高的催化性能、良好的生物兼容性,可以更好地应用于抗体的固定。

[0005] 本发明用电沉积的方法将金纳米修饰到玻碳电极表面,然后依次固载一抗和抗原,用 GR/Ag@BSA 复合材料标记二抗,制备了一种检测 CEA 的电化学免疫传感器,该传感器具有高的灵敏度、选择性和稳定性。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种检测 CEA 的电化学免疫传感器的构建方法,尤其是基于 GR/Ag@BSA 复合材料的检测 CEA 的电化学免疫传感器的构建方法。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用如下技术问题:

本发明的电化学免疫传感器的构建方法包括如下步骤:

- (1) 电化学沉积金纳米粒子修饰的玻碳电极;
- (2) 聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA)功能化还原石墨烯(GR)的制备;
- (3) 牛血清蛋白(BSA)稳定银纳米粒子的制备;
- (4) 牛血清蛋白保护银纳米粒子与功能化还原石墨烯复合材料(GR/Ag@BSA)的制备;
- (5) GR/Ag@BSA 标记癌胚抗原第二抗体(GR/Ag@BSA-Ab<sub>2</sub>)的制备;
- (6) 利用夹心免疫法构建电化学免疫传感器。

[0008] 所述步骤(1) 电化学沉积金纳米粒子修饰的玻璃碳电极,具体包括以下步骤:

a 依次用 1.0, 0.3 和 0.5  $\mu\text{m}$  的三氧化二铝抛光粉抛光处理玻璃碳电极,然后用超纯水冲洗干净,自然晾干;

b 将处理清洁的玻璃碳电极浸入 3 mL 质量分数为 1% 的氯金酸溶液中,用玻璃碳电极为工作电极,铂丝电极为对电极,银 / 氯化银电极为参比电极,在室温下,以  $-0.2\text{ V}$  的工作电位恒电位沉积 30 s 制备金纳米粒子修饰的玻璃碳电极,超纯水清洗干净,晾干。

[0009] 所述步骤(2) PDDA 功能化 GR 的制备,具体包括以下步骤:

a 氧化石墨烯的制备:称量 0.75 g 石墨粉加入到 100 mL 体积比为 1:9 的磷酸和浓硫酸的混合溶液中,并在水浴锅中加热到  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,称量 4.5 g 高锰酸钾加入到上述混合液中,升温至  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,磁力搅拌反应 12 h 后,将样品倒入预先加入 4 mL 双氧水的 300 mL 冰水中,得到的混合溶液 10000 转离心分离 15 min,用超纯水洗涤 7 次,在真空干燥箱中  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  干燥 12 h 后得到固体氧化石墨烯;

b GR 的制备:称取 25 mg 步骤(2) a 制得的氧化石墨烯固体溶解到 150 mL 超纯水中,超声波处理 30 min,依次向溶液中加入 100  $\mu\text{L}$  水合肼,560  $\mu\text{L}$  氨水,10 mg 聚乙烯吡咯烷酮,在  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应 1 h,得到的混合溶液 10000 转离心分离 15 min,用超纯水洗涤 5 次,在真空干燥箱中  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  干燥 12 h 后得到固体 GR;

c PDDA 功能化 GR 的制备:称取 2.5 mg 步骤(2) b 制得的 GR 固体溶于 5 mL 超纯水中,超声波处理 30 min,向溶液中加入 10 mL 质量分数为 1% 的 PDDA,室温下搅拌 2 h,得到的混合溶液 10000 转离心分离 10 min,用超纯水洗涤 3 次后重新溶解到 5 mL 超纯水中,成功制得 PDDA-GR 溶液。

[0010] 所述步骤(3) 牛血清蛋白(BSA) 稳定银纳米粒子的制备,具体包括以下步骤:

将 45 mg BSA 溶解到 10 mL 超纯水中,室温下搅拌 5 min 后,加热至  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,迅速向溶液中加入 10 mL 8 mmol/L 的硝酸银,继续搅拌 45 min,得到的混合溶液 10000 转离心分离 5 min,用超纯水洗涤 5 次,室温下干燥后得到固体 Ag@BSA。

[0011] 所述步骤(4) 牛血清蛋白保护银纳米粒子与功能化还原石墨烯复合材料(GR/Ag@BSA) 的制备,具体包括以下步骤:

称取 1 mg 步骤(3) 制备的 Ag@BSA 溶解到 1 mL 超纯水中,搅拌 5 min 后和 1 mL 步骤(2) 制备的 PDDA-GR 溶液混合,室温下搅拌 4 h,将得到的混合液 1000 转离心分离 5 min,弃去上清液,溶解到 1 mL pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液中制得 GR/Ag@BSA 溶液。

[0012] 所述步骤(5) 制备 GR/Ag@BSA 标记的  $\text{Ab}_2$ ,具体包括以下步骤:

a 将步骤(4) 制备的 1 mL GR/Ag@BSA 溶液与 3 mL 质量分数为 2.5% 的戊二醛溶液混合,室温下搅拌 2 h,得到的混合液 10000 转离心分离 5 min,弃去上清液,溶解到 1 mL pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液中;

b 将 1 mL 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的  $\text{Ab}_2$  加入上述溶液中搅拌孵育 2 h,10000 转离心分离 5 min,弃去上清液,重新溶解到 1 mL pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液中,得到 GR/Ag@BSA- $\text{Ab}_2$  溶液。

[0013] 所述步骤(6) 构建电化学免疫传感器,具体包括以下步骤:

a 滴涂 5  $\mu\text{L}$  1 mg/mL 的 CEA 第一抗体至上述步骤(1) 制备的金纳米粒子修饰的玻璃碳电极表面,室温下孵育 1 h, pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液清洗 3 次,晾干;

b 在上述电极表面滴加 5  $\mu\text{L}$  质量分数为 1% 的 BSA 溶液以封闭电极表面的非特异性

活性位点, pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液清洗 3 次, 晾干;

c 将 5  $\mu$ L 0.005-150 ng/mL 的 CEA 抗原溶液分别滴涂到不同电极表面, 室温下孵育 40 min, pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液清洗 3 次, 晾干;

d 将 5  $\mu$ L GR/Ag@BSA-Ab<sub>2</sub> 滴到电极表面, 室温下孵育 40 min, pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液清洗 3 次, 晾干, 即得到电化学免疫传感器的工作电极;

e 将银 / 氯化银参比电极、铂丝对电极和上述制备的工作电极连接在电化学工作站上;

f pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液作为底液, 通过计时电流法检测工作电极对双氧水的响应, 根据所得的电流值与 CEA 浓度的对数呈线性关系, 绘制工作曲线。

## 附图说明

[0014] 图 1 是本发明的电化学免疫传感器对 CEA 测定的工作曲线。

## 具体实施方式

[0015] 以下通过具体实施例来说明本发明的技术方案, 但是本发明的保护范围并不局限于此。

[0016] 实施例 1 制备检测 CEA 标准样品的电化学免疫传感器。

[0017] 步骤 1. 制备 PDDA 功能化的 GR

a 氧化石墨烯的制备: 将 100 mL 体积比为 1:9 的磷酸和浓硫酸混合溶液加入到三口瓶中, 然后称取 0.75 g 石墨粉加入到上述溶液中, 加热到 30  $^{\circ}$ C, 向溶液中加入 4.5 g 高锰酸钾后, 调节水浴锅温度到 50  $^{\circ}$ C, 磁力搅拌条件下反应 12 h, 反应停止后, 将样品倒入预先加入了 4 mL 双氧水的 300 mL 冰水中, 充分搅拌, 得到的混合液经离心分离, 用超纯水洗涤 7 次, 随后在真空干燥箱中 60  $^{\circ}$ C 干燥, 干燥后得到棕黄色氧化石墨烯固体;

b GR 的制备: 将 25 mg 上述步骤 a 制备的氧化石墨烯溶解到 150 mL 超纯水中, 超声波处理 30 min, 依次向溶液中加入 100  $\mu$ L 水合肼, 560  $\mu$ L 氨水, 10 mg 聚乙烯吡咯烷酮, 水浴锅中 90  $^{\circ}$ C 反应 1 h, 得到的混合液离心分离, 用超纯水洗涤 5 次, 弃去上清液, 在真空干燥箱中 60  $^{\circ}$ C 干燥, 干燥后得到黑色 GR 固体;

c PDDA 功能化 GR 的制备: 称取 2.5 mg 上述步骤 b 制备的 GR 加入到 5 mL 超纯水中, 超声波处理 30 min, 将预先配好的 10 mL 质量分数为 1% 的 PDDA 加入到上述溶液中, 室温下搅拌 2 h, 得到的混合液经离心分离, 用超纯水洗涤 3 次, 弃去上清液, 重新溶解到 5 mL 超纯水中, 成功制得 PDDA-GR 溶液。

[0018] 步骤 2. Ag@BSA 的制备: 将 45 mg BSA 固体粉末溶解到 10 mL 超纯水中, 室温下搅拌 5 min, 在水浴锅中加热到 60  $^{\circ}$ C, 迅速加入 10 mL 8 mmol/L 的硝酸银溶液, 继续在 60  $^{\circ}$ C 下搅拌 45 min, 得到的混合溶液经离心分离, 用超纯水洗涤 5 次, 弃去上清液, 在室温下干燥, 得到固体 Ag@BSA。

[0019] 步骤 3. GR/Ag@BSA 复合材料的制备: 将 1 mg 步骤 2 制得的 Ag@BSA 溶解到 1 mL 超纯水中, 充分搅拌 5 min, 向溶液中加入 1 mL 步骤 1 制得的 PDDA-GR, 继续在室温下搅拌 4 h, 得到的混合液经离心分离, 弃去上层清液, 得到的混合物溶解到 1 mL pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液中, 得到 GR/Ag@BSA 溶液。

[0020] 步骤 4. GR/Ag@BSA 标记第二抗体溶液的制备:将步骤 3 制得的 1 mL GR/Ag@BSA 溶液与 3 mL 质量分数为 2.5% 的戊二醛溶液混合,室温下搅拌 2 h,得到的混合溶液离心分离,弃去上清液,溶解到 1 mL pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液中;将 1 mL 20  $\mu\text{g/mL}$  的  $\text{Ab}_2$  加入上述溶液中,室温下搅拌孵育 2 h,离心分离,弃去上层清液,重新溶解到 1 mL pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液中,即得到 GR/Ag@BSA- $\text{Ab}_2$  混合溶液。

[0021] 步骤 5. 金纳米粒子修饰玻碳电极的制备:依次用 1.0, 0.3 和 0.5  $\mu\text{m}$  的三氧化二铝抛光粉抛光处理玻碳电极,然后用超纯水冲洗,自然晾干;将处理清洁的玻碳电极浸入 3 mL 质量分数为 1% 的氯金酸溶液中,用玻碳电极为工作电极,铂丝电极为对电极,银/氯化银电极为参比电极,在室温下,以 -0.2 V 的工作电位恒电位沉积 30 s 制备金纳米粒子修饰的玻碳电极,超纯水清洗,晾干。

[0022] 步骤 6. 滴涂 5  $\mu\text{L}$  1 mg/mL 的 CEA 第一抗体至步骤 5 制得的金纳米粒子修饰的玻碳电极表面,室温下孵育 1 h,超纯水清洗,晾干。

[0023] 步骤 7. 将 5  $\mu\text{L}$  质量分数为 1% 的 BSA 溶液滴涂至步骤 6 制得的电极表面,用于封闭电极的非特异性活性位点,用 pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液溶液对电极清洗,晾干。

[0024] 步骤 8. 将 5  $\mu\text{L}$  0.005-150 ng/mL 的 CEA 抗原溶液分别滴涂到 BSA 掩蔽的不同电极表面,室温下孵育 40 min, pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液清洗,晾干。

[0025] 步骤 9. 将 5  $\mu\text{L}$  步骤 4 制得的 GR/Ag@BSA- $\text{Ab}_2$  滴到步骤 8 制得的电极表面,室温下孵育 40 min, pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液清洗,晾干,即得到电化学免疫传感器的工作电极。

[0026] 步骤 10. 将银/氯化银参比电极、铂丝对电极和根据上述步骤制备的工作电极连接在电化学工作站上。

[0027] 步骤 11. pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液作为底液,通过计时电流法检测工作电极对双氧水的响应,根据所得的电流值与 CEA 浓度的对数呈线性关系,绘制工作曲线。

[0028] 步骤 12. 得到的“响应电流-CEA 浓度”的线性曲线为  $\text{Current} (\mu\text{A}) = 40.20 + 15.26 \lg [\text{CEA}] (\text{ng/mL})$ , 线性相关系数为 0.9997, 由图 1 可知, CEA 在 0.005-150 ng/mL 范围内, 响应电流值与 CEA 浓度的对数保持良好的线性关系, 检测限为 0.002 ng/mL。

[0029] 实施例 2 制备检测含 CEA 的血清样品的电化学免疫传感器。

[0030] 步骤 1. 制备 PDDA 功能化的 GR

a 氧化石墨烯的制备:将 100 mL 体积比为 1:9 的磷酸和浓硫酸混合溶液加入到三口瓶中,然后称取 0.75 g 石墨粉加入到上述溶液中,加热到 30  $^{\circ}\text{C}$ ,向溶液中加入 4.5 g 高锰酸钾后,调节水浴锅温度到 50  $^{\circ}\text{C}$ ,磁力搅拌条件下反应 12 h,反应停止后,将样品倒入预先加入了 4 mL 双氧水的 300 mL 冰水中,充分搅拌,得到的混合液经离心分离,用超纯水洗涤 7 次,随后在真空干燥箱中 60  $^{\circ}\text{C}$  干燥,干燥后得到棕黄色氧化石墨烯固体;

b GR 的制备:将 25 mg 上述步骤 a 制备的氧化石墨烯溶解到 150 mL 超纯水中,超声波处理 30 min,依次向溶液中加入 100  $\mu\text{L}$  水合肼,560  $\mu\text{L}$  氨水,10 mg 聚乙烯吡咯烷酮,水浴锅中 90  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h,得到的混合液离心分离,用超纯水洗涤 5 次,弃去上清液,在真空干燥箱中 60  $^{\circ}\text{C}$  干燥,干燥后得到黑色 GR 固体;

c PDDA 功能化 GR 的制备:称取 2.5 mg 上述步骤 b 制备的 GR 加入到 5 mL 超纯水中,超声波处理 30 min,将预先配好的 10 mL 质量分数为 1% 的 PDDA 加入到上述溶液中,室温下搅拌 2 h,得到的混合液经离心分离,用超纯水洗涤 3 次,弃去上清液,重新溶解到 5 mL 超纯

水中,成功制得 PDDA-GR 溶液。

[0031] 步骤 2. Ag@BSA 的制备:将 45 mg BSA 固体粉末溶解到 10 mL 超纯水中,室温下搅拌 5 min,在水浴锅中加热到 60 °C,迅速加入 10 mL 8 mmol/L 的硝酸银溶液,继续在 60 °C 下搅拌 45 min,得到的混合溶液经离心分离,用超纯水洗涤 5 次,弃去上清液,在室温下干燥,得到固体 Ag@BSA。

[0032] 步骤 3. GR/Ag@BSA 复合材料的制备:将 1 mg 步骤 2 制得的 Ag@BSA 溶解到 1 mL 超纯水中,充分搅拌 5 min,向溶液中加入 1 mL 步骤 1 制得的 PDDA-GR,继续在室温下搅拌 4 h,得到的混合液经离心分离,弃去上层清液,得到的混合物溶解到 1 mL pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液中,得到 GR/Ag@BSA 溶液。

[0033] 步骤 4. GR/Ag@BSA 标记第二抗体溶液的制备:将步骤 3 制得的 1 mL GR/Ag@BSA 溶液与 3 mL 质量分数为 2.5% 的戊二醛溶液混合,室温下搅拌 2 h,得到的混合溶液离心分离,弃去上清液,溶解到 1 mL pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液中;将 1 mL 20  $\mu$ g/mL 的 Ab<sub>2</sub> 加入上述溶液中,室温下搅拌孵育 2 h,离心分离,弃去上层清液,重新溶解到 1 mL pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液中,即得到 GR/Ag@BSA-Ab<sub>2</sub> 混合溶液。

[0034] 步骤 5. 金纳米粒子修饰玻碳电极的制备:依次用 1.0, 0.3 和 0.5  $\mu$ m 的三氧化二铝抛光粉抛光处理玻碳电极,然后用超纯水冲洗,自然晾干;将处理清洁的玻碳电极浸入 3 mL 质量分数为 1% 的氯金酸溶液中,用玻碳电极为工作电极,铂丝电极为对电极,银/氯化银电极为参比电极,在室温下,以 -0.2 V 的工作电位恒电位沉积 30 s 制备金纳米粒子修饰的玻碳电极,超纯水清洗,晾干。

[0035] 步骤 6. 滴涂 5  $\mu$ L 1 mg/mL 的 CEA 第一抗体至步骤 5 制得的金纳米粒子修饰的玻碳电极表面,室温下孵育 1 h,超纯水清洗,晾干。

[0036] 步骤 7. 将 5  $\mu$ L 质量分数为 1% 的 BSA 溶液滴涂至步骤 6 制得的电极表面,用于封闭电极的非特异性活性位点,用 pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液溶液对电极清洗,晾干。

[0037] 步骤 8. 将 5  $\mu$ L 含 CEA 的血清样品滴涂到 BSA 掩蔽的电极表面,室温下孵育 40 min, pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液清洗,晾干。

[0038] 步骤 9. 将 5  $\mu$ L 步骤 4 制得的 GR/Ag@BSA-Ab<sub>2</sub> 滴到步骤 8 制得的电极表面,室温下孵育 40 min, pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液清洗,晾干,即得到电化学免疫传感器的工作电极。

[0039] 步骤 10. 将银/氯化银参比电极、铂丝对电极和根据上述步骤制备的工作电极连接在电化学工作站上。

[0040] 步骤 11. pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液作为底液,通过计时电流法检测工作电极对双氧水的响应。

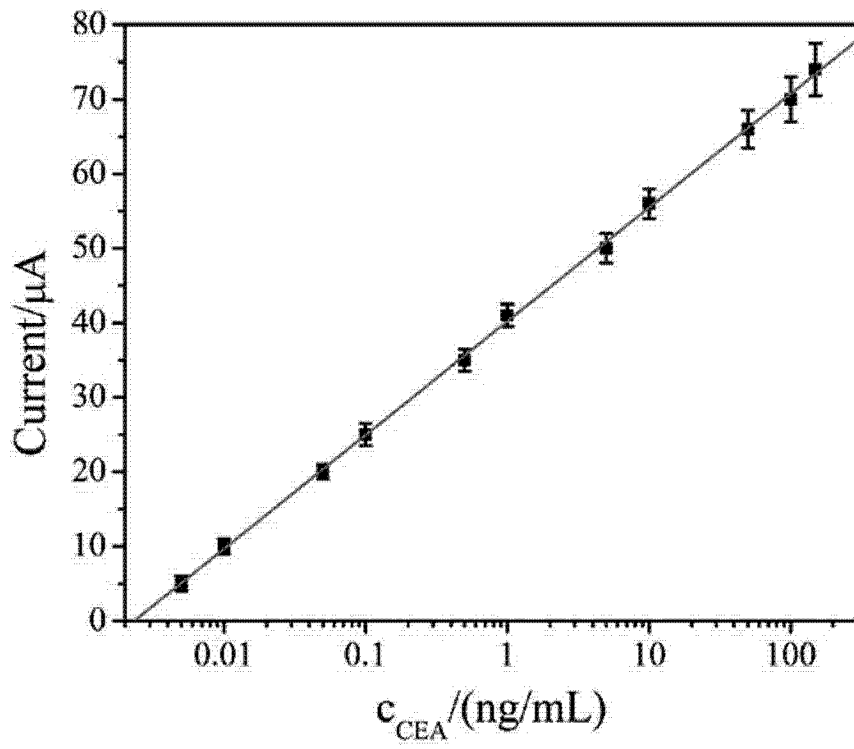


图 1

专利名称(译)	一种检测癌胚抗原的电化学免疫传感器的构建方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104614527A</a>	公开(公告)日	2015-05-13
申请号	CN201510013542.7	申请日	2015-01-12
[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	于京华 孙国强 张彦 葛慎光 颜梅 刘海云 杨红梅 马超		
发明人	于京华 孙国强 张彦 葛慎光 颜梅 刘海云 杨红梅 马超		
IPC分类号	G01N33/574 G01N27/26 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/57473 G01N27/3275 G01N33/5438		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种检测癌胚抗原的电化学免疫传感器的构建方法，尤其是基于石墨烯/牛血清蛋白稳定的银纳米粒子 ( GR/AgBSA ) 复合材料的检测癌胚抗原的电化学免疫传感器的构建方法。其特征在于：首先使用电位沉积方法在玻碳电极表面电沉积一层金纳米粒子，然后依次将一抗和抗原固载到电极表面，最后通过抗原抗体间的特异性反应来固定GR/AgBSA标记的二抗溶液。金纳米粒子具有优良的导电性，使用的GR/AgBSA复合材料不仅集合了GR优异的导电性和BSA良好的生物兼容性，而且还对双氧水还原有高的催化活性，基于该材料构建的电化学免疫传感器对癌胚抗原的检测有较高的灵敏度和低的检测限。

