



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105572356 B

(45)授权公告日 2017.05.31

(21)申请号 201610104965.4

(22)申请日 2016.02.25

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105572356 A

(43)申请公布日 2016.05.11

(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

(72)发明人 李月云 李明党 董云会 王平

刘青 刘会 陈磊 张道鹏

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/551(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

审查员 王在竹

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器的制备
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，提供了一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器的制备方法及应用；采用银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管标记的电化学免疫传感器，实现了常见乳腺癌肿瘤标志物的检测，具有特异性强，灵敏度高，检测限低，对乳腺癌的检测具有重要的科学意义和应用价值。

1. 一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将直径为3 ~ 5mm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 ~ 2.0mg/mL的负载金纳米粒子石墨烯滴加到电极表面,室温下晾干,用超纯水冲洗电极表面,晾干;

(3) 继续将6 μL 、5 ~ 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 μL 、1~ 2 mg/mL的BSA溶液滴加到电极表面,用以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 °C冰箱中晾干;滴加6 μL 、0.001 ~ 30 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;

(5) 将6 μL 、1~ 3 mg/mL的银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体 Ab_2 孵化物溶液,滴涂于电极表面,置于4°C冰箱中晾干,制得一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器;

其中负载金纳米粒子石墨烯的制备步骤如下:①氨基化石墨烯的制备取40 ~ 60mg氧化石墨烯溶解在10mL的无水甲苯中,加入0.2mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷,油浴加热至60 ~ 70 °C,磁力搅拌1.5h,后在110 °C下烘干得到氨基化石墨烯;②金纳米粒子溶液的制备将1~ 2mL、质量分数为1%的 HAuCl_4 加入到99mL超纯水中,加热至沸腾加入1.5~3.5mL、质量分数为1%的柠檬酸钠溶液,回流15 ~ 30min,后冷却至室温,得到酒红色的金纳米粒子溶液;③负载金纳米粒子的石墨烯的制备取20~ 30mg氨基化石墨烯加入到上述步骤②制得的金纳米粒子溶液中,振荡12h,制得负载金纳米粒子石墨烯;

银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体 Ab_2 孵化物溶液的制备步骤如下:①磺化碳纳米管的制备称取0.5 ~ 1.5g的多壁碳纳米管置于250mL三口烧瓶中,依次加入66mL浓硫酸和22mL浓硝酸,120 °C油浴下反应30~ 50min,冷却至室温后,将所得悬浊液移入500mL烧杯,加300mL超纯水稀释,抽滤,用超纯水洗涤至滤液成中性,所得固体于75~ 85 °C真空干燥箱内干燥10~ 14h,得到磺化碳纳米管;②对苯硫酚功能化磺化碳纳米管的制备在250mL圆底烧瓶中依次加入9~15mg磺化碳纳米管,50mL、1mol/L的盐酸溶液,超声分散1h,加入1.0g 4,4'-二氨基二苯二硫醚,冰浴冷却至0 °C,在搅拌下缓慢加入10mL亚硝酸钠水溶液,反应1h,升温至40 °C,继续搅拌下反应1.5~2.5 h,用0.45 μm 的聚四氟乙烯膜抽滤,超纯水洗涤3次,无水乙醇洗涤3次,得到的固体超声分散到50mL乙醇中,依次加入50mL乙腈和520mg三苯基磷,搅拌1h,用0.45 μm 的聚四氟乙烯膜抽滤,用无水乙醇洗涤5次,所得固体80 °C真空干燥箱内干燥12h,得到对苯硫酚功能化磺化碳纳米管;所述的亚硝酸钠水溶液是将280mg固体亚硝酸钠溶于10mL超纯水制得;③银纳米粒子溶液的制备将1mL、50mmol/L的硝酸银和1mL、5%的柠檬酸钠,在搅拌下加入到48mL超纯水中,然后加入45~ 55mg硼氢化钠,在搅拌下反应10min,溶液变为棕黄色,持续搅拌,至溶液颜色不再变化,冷却至室温,在转速5000rpm下离心5min,所得的上清液为银纳米粒子溶液;④银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体 Ab_2 孵化物溶液的制备取5~10 mg对苯硫酚功能化磺化碳纳米管加入到20~40mL银纳米粒子溶液中,130rpm转速下振荡10 ~14h,离心,80 °C真空干燥箱内干燥,制得银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管;将2~6 mg的银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管分散到1mL超纯水中,加入100 μL 、80~120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的肿瘤标志物检测抗体 Ab_2 溶液和900 μL 、50mmol/L的pH 7.4磷酸盐缓冲溶液,4 °C恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h;在4 °C下,6000 rpm转速下离心15 min,得到下层沉淀,加入1mL、50mmol/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1mL、50mmol/L 的pH=7.4磷酸盐缓冲溶液,制得银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体Ab₂孵化物溶液,4 °C下保存备用。

2.如权利要求1所述的制备方法制备的一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器,用于乳腺癌肿瘤标志物的检测,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 5.10 ~ 7.98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pH=7.4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。

3.如权利要求1所述的一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器的制备方法制备的传感器,用于乳腺癌肿瘤标志物的测定,其特征在于,所述肿瘤标志物选自下列之一:癌胚抗原、糖类抗原125、糖类抗原15-3。

一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于新型功能纳米材料、免疫分析和生物传感技术领域,提供了一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 癌症如果能够早期诊断、及时治疗,三分之一的癌症是可以治愈的;血清中各种肿瘤标志物的灵敏测定对癌症的早期诊断起着重要的作用;因此建立快速、灵敏准确检测血清中肿瘤标志物的分析方法成为了当今的研究热点,引起了大家的广泛关注。

[0003] 乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,据有关资料统计,乳腺癌的发病率占全身各种恶性肿瘤的10%,是一种严重影响妇女的身心健康甚至危及生命的常见恶性肿瘤;癌胚抗原(CEA),糖类抗原125(CA125)、糖类抗原15-3(CA15-3)等常见的肿瘤标志物,对于乳腺癌的诊断都能起到一定的作用。

[0004] 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,在临床分析、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。

[0005] 随着纳米技术的发展,各种纳米粒子广泛的应用于传感器的构建过程中。石墨烯表面有大量的羧基官能团,且具有大的比表面积,良好的电子传递能力和催化性能,能有效吸附固载抗体;负载金纳米粒子的石墨烯具有更好的导电性;银纳米粒子具有很好的催化性能,对苯硫酚功能化磺化碳纳米管不仅具有碳纳米管的优良性能,而且经过磺化、功能化更是大大增加了固载抗体的能力,因此银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管作为检测抗体标记物能够更好的对测定信号实现放大,提高肿瘤标志物检测的灵敏度。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器的制备方法及应用,实现了对乳腺癌肿瘤标志物的超灵敏检测。

[0007] 本发明的目的之一是提供一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器的制备方法。

[0008] 本发明的目的之二是将所制备的一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器,用于乳腺癌肿瘤标志物的检测。

[0009] 本发明的技术方案,包括以下步骤

[0010] 1. 一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器的制备方法,步骤如下:

[0011] (1) 将直径为3~5mm的玻碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨,超纯水清洗干净;

[0012] (2) 取6 μ L、0.5 ~ 2.0mg/mL的负载金纳米粒子石墨烯滴加到电极表面,室温下晾干,用超纯水冲洗电极表面,晾干;

[0013] (3) 继续将6 μ L、5~ 15 μ 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 $^{\circ}$ C冰箱中干燥;

[0014] (4) 继续将3 μ L、1~ 2 mg/mL的BSA溶液滴加到电极表面,用以封闭电极表面上非

特异性活性位点,超纯水冲洗电极表面,4 °C冰箱中晾干;滴加6 μL、0.001 ~ 30 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;

[0015] (5)将6 μL、1~ 3 mg/mL的银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体Ab₂孵化物溶液,滴涂于电极表面,置于4°C冰箱中晾干,制得一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器。

[0016] 2.一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器的制备方法,所述相关材料的制备,包括以下几个步骤:

[0017] (1)负载金纳米粒子石墨烯的制备

[0018] ①氨基化石墨烯的制备

[0019] 取40 ~ 60mg氧化石墨烯溶解在10mL的无水甲苯中,加入0.2mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷,油浴加热至60 ~ 70 °C,磁力搅拌1.5h,后在110 °C下烘干得到氨基化石墨烯;

[0020] ②金纳米粒子溶液的制备

[0021] 将1~ 2mL、质量分数为1%的 HAuCl₄加入到99mL超纯水中,加热至沸腾加入1.5~ 3.5mL、质量分数为1%的柠檬酸钠溶液,回流15 ~ 30min,后冷却至室温,得到酒红色的金纳米粒子溶液;

[0022] ③负载金纳米粒子的石墨烯的制备

[0023] 取20~ 30mg氨基化石墨烯加入到上述步骤②制得的金纳米粒子溶液中,振荡12h,制得负载金纳米粒子石墨烯;

[0024] (2)银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体Ab₂孵化物溶液的制备

[0025] ①磺化碳纳米管的制备

[0026] 称取0.5~ 1.5g的多壁碳纳米管置于250mL三口烧瓶中,依次加入66mL浓硫酸和22mL浓硝酸,120 °C油浴下反应30~ 50min,冷却至室温后,将所得悬浊液移入500mL烧杯,加300mL超纯水稀释,抽滤,用超纯水洗涤至滤液成中性,所得固体于75~ 85 °C真空干燥箱内干燥10~ 14h,得到磺化碳纳米管;

[0027] ②对苯硫酚功能化磺化碳纳米管的制备

[0028] 在250mL圆底烧瓶中依次加入9~15mg磺化碳纳米管,50mL、1mol/L的盐酸溶液,超声分散1h,加入1.0g 4,4'-二氨基二苯二硫醚,冰浴冷却至0 °C,在搅拌下缓慢加入10mL亚硝酸钠水溶液,反应1h,升温至40 °C,继续搅拌下反应1.5~2.5 h,用0.45μm的聚四氟乙烯膜抽滤,超纯水洗涤3次,无水乙醇洗涤3次,得到的固体超声分散到50mL乙醇中,依次加入50mL乙腈和520mg三苯基磷,搅拌1h,用0.45μm的聚四氟乙烯膜抽滤,用无水乙醇洗涤5次,所得固体80 °C真空干燥箱内干燥12h,得到对苯硫酚功能化磺化碳纳米管;

[0029] 所述的亚硝酸钠水溶液是将280mg固体亚硝酸钠溶于10mL超纯水制得;

[0030] ③银纳米粒子溶液的制备

[0031] 将1mL、50mmol/L的硝酸银和1mL、5%的柠檬酸钠,在搅拌下加入到48mL超纯水中,然后加入45~ 55mg硼氢化钠,在搅拌下反应10min,溶液变为棕黄色,持续搅拌,至溶液颜色不再变化,冷却至室温,在转速5000rpm下离心5min,所得的上清液为银纳米粒子溶液;

[0032] ④银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体Ab₂孵化物溶液的制备

[0033] 取5~10 mg对苯硫酚功能化磺化碳纳米管加入到20~40mL银纳米粒子溶液中,130rpm转速下振荡10 ~14h,离心,80 °C真空干燥箱内干燥,制得银纳米粒子@对苯硫酚功能

化磺化碳纳米管；

[0034] 将2~6 mg的银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管分散到1mL超纯水中，加入100 μ L、80~120 μ g/mL的肿瘤标志物检测抗体Ab₂溶液和900 μ L、50mmol/L的pH 7.4磷酸盐缓冲溶液，4 $^{\circ}$ C恒温振荡培养箱中振荡孵化12 h；在4 $^{\circ}$ C下，6000 rpm转速下离心15 min，得到下层沉淀，加入1mL、50mmol/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1mL、50mmol/L的pH=7.4磷酸盐缓冲溶液，制得银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体Ab₂孵化物溶液，4 $^{\circ}$ C下保存备用。

[0035] 一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器，用于乳腺癌肿瘤标志物的检测，步骤如下：

[0036] (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 5.10 ~ 7.98磷酸盐缓冲溶液中进行测试；

[0037] (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；

[0038] (3) 当背景电流趋于稳定后，每隔50 s向10 mL、50 mmol/L的pH=7.4磷酸盐缓冲溶液中注入10 μ L、5 mol/L的双氧水溶液，记录电流变化。

[0039] 上述所述肿瘤标志物选自下列之一：癌胚抗原、糖类抗原125、糖类抗原15-3。

[0040] 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。

[0041] 本发明的有益成果

[0042] (1) 本发明使用了负载金纳米粒子石墨烯作为基底，石墨烯有大的比表面积，具有大量的抗体的结合位点，表面含有大量的羧基，且羧基能与抗体上的氨基有效结合，实现抗体的固载，金纳米粒子具有良好的导电性能，以及大的比表面积固载抗体，能够加速电子传递，对于提高传感器灵敏度具有重要作用。

[0043] (2) 采用银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管作为检测抗体标记物，碳纳米管有极高的强度和良好的导电性，且对过氧化氢有催化作用，对苯硫酚功能化磺化的碳纳米管有更好的分散性及生物相容性，且功能化的基团可以更好的抗体结合，银纳米粒子对过氧化氢也有催化作用，因此，银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管对过氧化氢的催化作用呈多重的放大作用，从而提高了传感器的灵敏度，降低了检测限。

[0044] (3) 一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器对不同乳腺癌肿瘤标志物的检测，其对癌胚抗原的线性范围为0.5 pg/mL~25 ng/mL，检测限为0.12 pg/mL；对糖类抗原125的线性范围为0.5pg/mL~20ng/mL，检测限为0.12 pg/mL；对糖类抗原15-3的线性范围为1 pg/mL~20 ng/mL，检测限为0.21 pg/mL；表明一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器可以达到准确测定的目的。

具体实施方式

[0045] 现将本发明通过具体实施方式进一步说明，但不限于此。

[0046] 实施例1 一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器的制备

[0047] (1) 将直径为3mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨，超纯水清洗干净；

[0048] (2) 取6 μ L、0.5 mg/mL的负载金纳米粒子石墨烯滴加到电极表面，室温下晾干，用超纯水冲洗电极表面，晾干；

[0049] (3)继续将6 μL 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的肿瘤标志物捕获抗体Ab₁滴加到电极表面,超纯水冲洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中干燥;

[0050] (4)继续将3 μL 、1 mg/mL 的BSA溶液滴加到电极表面,用以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 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;滴加6 μL 、0.001 ~ 30 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;

[0051] (5)将6 μL 、1 mg/mL 的银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体Ab₂孵化物溶液,滴涂于电极表面,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,制得一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器。

[0052] 实施例2一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器的制备

[0053] (1)将直径为4mm的玻碳电极用Al₂O₃抛光粉打磨,超纯水清洗干净;

[0054] (2)取6 μL 、1.0 mg/mL 的负载金纳米粒子石墨烯滴加到电极表面,室温下晾干,用超纯水冲洗电极表面,晾干;

[0055] (3)继续将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 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中干燥;

[0056] (4)继续将3 μL 、1.5 mg/mL 的BSA溶液滴加到电极表面,用以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 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;滴加6 μL 、0.001 ~ 30 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;

[0057] (5)将6 μL 、2 mg/mL 的银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体Ab₂孵化物溶液,滴涂于电极表面,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,制得一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器。

[0058] 实施例3 一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器的制备

[0059] (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;

[0060] (2)取6 μL 、2.0 mg/mL 的负载金纳米粒子石墨烯滴加到电极表面,室温下晾干,用超纯水冲洗电极表面,晾干;

[0061] (3)继续将6 μL 、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的肿瘤标志物捕获抗体Ab₁滴加到电极表面,超纯水冲洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中干燥;

[0062] (4)继续将3 μL 、2 mg/mL 的BSA溶液滴加到电极表面,用以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 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;滴加6 μL 、0.001 ~ 30 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;

[0063] (5)将6 μL 、3 mg/mL 的银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体Ab₂孵化物溶液,滴涂于电极表面,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干,制得一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器。

[0064] 实施例4一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器的制备方法,所述相关材料的制备,包括以下几个步骤:

[0065] (1)负载金纳米粒子石墨烯的制备

[0066] ①氨基化石墨烯的制备

[0067] 取40 mg 氧化石墨烯溶解在10 mL 的无水甲苯中,加入0.2 mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷,油浴加热至60 $^{\circ}\text{C}$,磁力搅拌1.5 h ,后在110 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干得到氨基化石墨烯;

[0068] ②金纳米粒子溶液的制备

[0069] 将1 mL 、质量分数为1%的 H₂AuCl₄加入到99 mL 超纯水中,加热至沸腾加入1.5 mL 、质量分数为1%的柠檬酸钠溶液,回流15 min ,后冷却至室温,得到酒红色的金纳米粒子溶液;

[0070] ③负载金纳米粒子的石墨烯的制备

[0071] 取20mg氨基化石墨烯加入到上述步骤②制得的金纳米粒子溶液中,振荡12h,制得负载金纳米粒子石墨烯;

[0072] (2)银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体Ab₂孵化物溶液的制备

[0073] ①磺化碳纳米管的制备

[0074] 称取0.5g的多壁碳纳米管置于250mL三口烧瓶中,依次加入66mL浓硫酸和22mL浓硝酸,120℃油浴下反应30min,冷却至室温后,将所得悬浊液移入500mL烧杯,加300mL超纯水稀释,抽滤,用超纯水洗涤至滤液成中性,所得固体于75℃真空干燥箱内干燥10h,得到磺化碳纳米管;

[0075] ②对苯硫酚功能化磺化碳纳米管的制备

[0076] 在250mL圆底烧瓶中依次加入9mg磺化碳纳米管,50mL、1mol/L的盐酸溶液,超声分散1h,加入1.0g 4,4'-二氨基二苯二硫醚,冰浴冷却至0℃,在搅拌下缓慢加入10mL亚硝酸钠水溶液,反应1h,升温至40℃,继续搅拌下反应1.5h,用0.45μm的聚四氟乙烯膜抽滤,超纯水洗涤3次,无水乙醇洗涤3次,得到的固体超声分散到50mL乙醇中,依次加入50mL乙腈和520mg三苯基磷,搅拌1h,用0.45μm的聚四氟乙烯膜抽滤,用无水乙醇洗涤5次,所得固体80℃真空干燥箱内干燥12h,得到对苯硫酚功能化磺化碳纳米管;

[0077] 所述的亚硝酸钠水溶液是将280mg固体亚硝酸钠溶于10mL超纯水制得;

[0078] ③银纳米粒子溶液的制备

[0079] 将1mL、50mmol/L的硝酸银和1mL、5%的柠檬酸钠,在搅拌下加入到48mL超纯水中,然后加入45mg硼氢化钠,在搅拌下反应10min,溶液变为棕黄色,持续搅拌,至溶液颜色不再变化,冷却至室温,在转速5000rpm下离心5min,所得的上清液为银纳米粒子溶液;

[0080] ④银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体Ab₂孵化物溶液的制备

[0081] 取5mg对苯硫酚功能化磺化碳纳米管加入到20mL银纳米粒子溶液中,130rpm转速下振荡10h,离心,80℃真空干燥箱内干燥,制得银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管;

[0082] 将2mg的银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管分散到1mL超纯水中,加入100μL、80μg/mL的肿瘤标志物检测抗体Ab₂溶液和900μL、50mmol/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12h;在4℃下,6000rpm转速下离心15min,得到下层沉淀,加入1mL、50mmol/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1mL、50mmol/L的pH=7.4磷酸盐缓冲溶液,制得银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体Ab₂孵化物溶液,4℃下保存备用。

[0083] 实施例5一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器的制备方法,所述相关材料的制备,包括以下几个步骤:

[0084] (1)负载金纳米粒子石墨烯的制备

[0085] ①氨基化石墨烯的制备

[0086] 取50mg氧化石墨烯溶解在10mL的无水甲苯中,加入0.2mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷,油浴加热至65℃,磁力搅拌1.5h,后在110℃下烘干得到氨基化石墨烯;

[0087] ②金纳米粒子溶液的制备

[0088] 将1.5mL、质量分数为1%的HAuCl₄加入到99mL超纯水中,加热至沸腾加入2.5mL、质量分数为1%的柠檬酸钠溶液,回流20min,后冷却至室温,得到酒红色的金纳米粒子溶液;

[0089] ③负载金纳米粒子的石墨烯的制备

[0090] 取25mg氨基化石墨烯加入到上述步骤②制得的金纳米粒子溶液中,振荡12h,制得负载金纳米粒子石墨烯;

[0091] (2)银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体Ab₂孵化物溶液的制备

[0092] ①磺化碳纳米管的制备

[0093] 称取1.0g的多壁碳纳米管置于250mL三口烧瓶中,依次加入66mL浓硫酸和22mL浓硝酸,120℃油浴下反应40min,冷却至室温后,将所得悬浊液移入500mL烧杯,加300mL超纯水稀释,抽滤,用超纯水洗涤至滤液成中性,所得固体于80℃真空干燥箱内干燥12h,得到磺化碳纳米管;

[0094] ②对苯硫酚功能化磺化碳纳米管的制备

[0095] 在250mL圆底烧瓶中依次加入12mg磺化碳纳米管,50mL、1mol/L的盐酸溶液,超声分散1h,加入1.0g 4,4'-二氨基二苯二硫醚,冰浴冷却至0℃,在搅拌下缓慢加入10mL亚硝酸钠水溶液,反应1h,升温至40℃,继续搅拌下反应2.0h,用0.45μm的聚四氟乙烯膜抽滤,超纯水洗涤3次,无水乙醇洗涤3次,得到的固体超声分散到50mL乙醇中,依次加入50mL乙腈和520mg三苯基磷,搅拌1h,用0.45μm的聚四氟乙烯膜抽滤,用无水乙醇洗涤5次,所得固体80℃真空干燥箱内干燥12h,得到对苯硫酚功能化磺化碳纳米管;

[0096] 所述的亚硝酸钠水溶液是将280mg固体亚硝酸钠溶于10mL超纯水制得;

[0097] ③银纳米粒子溶液的制备

[0098] 将1mL、50mmol/L的硝酸银和1mL、5%的柠檬酸钠,在搅拌下加入到48mL超纯水中,然后加入50mg硼氢化钠,在搅拌下反应10min,溶液变为棕黄色,持续搅拌,至溶液颜色不再变化,冷却至室温,在转速5000rpm下离心5min,所得的上清液为银纳米粒子溶液;

[0099] ④银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体Ab₂孵化物溶液的制备

[0100] 取7.5mg对苯硫酚功能化磺化碳纳米管加入到30mL银纳米粒子溶液中,130rpm转速下振荡12h,离心,80℃真空干燥箱内干燥,制得银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管;

[0101] 将4mg的银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管分散到1mL超纯水中,加入100μL、100μg/mL的肿瘤标志物检测抗体Ab₂溶液和900μL、50mmol/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12h;在4℃下,6000rpm转速下离心15min,得到下层沉淀,加入1mL、50mmol/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1mL、50mmol/L的pH=7.4磷酸盐缓冲溶液,制得银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体Ab₂孵化物溶液,4℃下保存备用。

[0102] 实施例6一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器的制备方法,所述相关材料的制备,包括以下几个步骤:

[0103] (1)负载金纳米粒子石墨烯的制备

[0104] ①氨基化石墨烯的制备

[0105] 取60mg氧化石墨烯溶解在10mL的无水甲苯中,加入0.2mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷,油浴加热至70℃,磁力搅拌1.5h,后在110℃下烘干得到氨基化石墨烯;

[0106] ②金纳米粒子溶液的制备

[0107] 将2mL、质量分数为1%的HAuCl₄加入到99mL超纯水中,加热至沸腾加入3.5mL、质

量分数为1%的柠檬酸钠溶液,回流30min,后冷却至室温,得到酒红色的金纳米粒子溶液;

[0108] ③负载金纳米粒子的石墨烯的制备

[0109] 取30mg氨基化石墨烯加入到上述步骤②制得的金纳米粒子溶液中,振荡12h,制得负载金纳米粒子石墨烯;

[0110] (2)银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体Ab₂孵化物溶液的制备

[0111] ①磺化碳纳米管的制备

[0112] 称取1.5g的多壁碳纳米管置于250mL三口烧瓶中,依次加入66mL浓硫酸和22mL浓硝酸,120℃油浴下反应50min,冷却至室温后,将所得悬浊液移入500mL烧杯,加300mL超纯水稀释,抽滤,用超纯水洗涤至滤液成中性,所得固体于85℃真空干燥箱内干燥14h,得到磺化碳纳米管;

[0113] ②对苯硫酚功能化磺化碳纳米管的制备

[0114] 在250mL圆底烧瓶中依次加入15mg磺化碳纳米管,50mL、1mol/L的盐酸溶液,超声分散1h,加入1.0g 4,4'-二氨基二苯二硫醚,冰浴冷却至0℃,在搅拌下缓慢加入10mL亚硝酸钠水溶液,反应1h,升温至40℃,继续搅拌下反应2.5h,用0.45μm的聚四氟乙烯膜抽滤,超纯水洗涤3次,无水乙醇洗涤3次,得到的固体超声分散到50mL乙醇中,依次加入50mL乙腈和520mg三苯基磷,搅拌1h,用0.45μm的聚四氟乙烯膜抽滤,用无水乙醇洗涤5次,所得固体80℃真空干燥箱内干燥12h,得到对苯硫酚功能化磺化碳纳米管;

[0115] 所述的亚硝酸钠水溶液是将280mg固体亚硝酸钠溶于10mL超纯水制得;

[0116] ③银纳米粒子溶液的制备

[0117] 将1mL、50mmol/L的硝酸银和1mL、5%的柠檬酸钠,在搅拌下加入到48mL超纯水中,然后加入55mg硼氢化钠,在搅拌下反应10min,溶液变为棕黄色,持续搅拌,至溶液颜色不再变化,冷却至室温,在转速5000rpm下离心5min,所得的上清液为银纳米粒子溶液;

[0118] ④银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体Ab₂孵化物溶液的制备

[0119] 取10mg对苯硫酚功能化磺化碳纳米管加入到40mL银纳米粒子溶液中,130rpm转速下振荡14h,离心,80℃真空干燥箱内干燥,制得银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管;

[0120] 将6mg的银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管分散到1mL超纯水中,加入100μL、120μg/mL的肿瘤标志物检测抗体Ab₂溶液和900μL、50mmol/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12h;在4℃下,6000rpm转速下离心15min,得到下层沉淀,加入1mL、50mmol/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1mL、50mmol/L的pH=7.4磷酸盐缓冲溶液,制得银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管检测抗体Ab₂孵化物溶液,4℃下保存备用。

[0121] 实施例7 乳腺癌肿瘤标志物癌胚抗原的检测

[0122] (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10mL、50mmol/L的pH 5.10~7.98磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

[0123] (2)用时间-电流法对分析物进行检测,输入电压为-0.4V,取样间隔0.1s,运行时间400s;

[0124] (3)当背景电流趋于稳定后,每隔50s向10mL、50mmol/L的pH=7.4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;

[0125] (4)测定样品中癌胚抗原的线性范围为0.5 pg/mL ~25 ng/mL ,检测限为0.12 pg/mL 。

[0126] 实施例8乳腺癌肿瘤标志物糖类抗原125的检测

[0127] 按照实施例7的方法对样品中糖类抗原125进行检测,其线性范围为0.5 pg/mL ~20 ng/mL ,检测限为0.12 pg/mL 。

[0128] 实施例9乳腺癌肿瘤标志物糖类抗原15-3的检测

[0129] 按照实施例7的方法对样品中糖类抗原15-3进行检测,其线性范围为1 pg/mL ~20 ng/mL ,检测限为0.21 pg/mL 。

专利名称(译)	一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN105572356B	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201610104965.4	申请日	2016-02-25
[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 李明党 董云会 王平 刘青 刘会 陈磊 张道鹏		
发明人	李月云 李明党 董云会 王平 刘青 刘会 陈磊 张道鹏		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/551 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/551 G01N33/57473 G01N33/57484		
其他公开文献	CN105572356A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫分析和生物传感技术领域，提供了一种乳腺癌肿瘤标志物免疫传感器的制备方法及应用；采用银纳米粒子@对苯硫酚功能化磺化碳纳米管标记的电化学免疫传感器，实现了常见乳腺癌肿瘤标志物的检测，具有特异性强，灵敏度高，检测限低，对乳腺癌的检测具有重要的科学意义和应用价值。