



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103675279 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 08

(21) 申请号 201310713154. 0

(22) 申请日 2013. 12. 23

(73) 专利权人 山东理工大学

地址 255086 山东省淄博市高新技术产业开发区高创园 D 座 1012 室

(72) 发明人 李月云 韩健 魏琴 董云会
任祥 陈润海

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102980925 A, 2013. 03. 20,

CN 103454417 A, 2013. 12. 18,

CN 102735728 A, 2012. 10. 17,

CN 102749373 A, 2012. 10. 24,

WO 2009/027708 A2, 2009. 03. 05,

US 2013/0177934 A1, 2013. 07. 11,

KR 10-0853104 B1, 2008. 08. 21,

Zhihui Dai 等. Bioanalysis based on nanoporous materials. 《Trends in Analytical Chemistry》. 2012, 第 39 卷

Yueyun Li 等. Label electrochemical immunosensor for prostate-speciﬁ

c antigen based on graphene and silver hybridized mesoporous silica. 《Analytical Biochemistry》. 2014, 第 469 卷

赵冬娇. 基于石墨烯的若干新型电化学传感器的制备及应用研究. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库 信息科技辑》. 20131215, 2013, (第 12 期),

Lieven Huang 等. Prostate-speciﬁ c antigen immunosensing based on

mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays. 《Biosensors and Bioelectronics》. 2004, 第 21 卷 (第 3 期),

Mohammad Hasanzadeh 等. Mesoporous silica-based materials for use in biosensors. 《Trends in Analytical Chemistry》. 2012, 第 33 卷

审查员 段晓露

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种前列腺肿瘤标志物免疫传感器的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种前列腺肿瘤标志物免疫传感器的制备方法, 制备包括以下步骤: (1) 取银杂化的 NH₂-MCM-48 溶于磷酸盐缓冲溶液中, 超声分散均匀, 再加入前列腺特异抗原二抗, 4℃ 震荡, 离心后除去上清液, 得到二抗标记物 Ag@NH₂-MCM-48/Ab₂; (2) 以玻碳电极为工作电极, 先用氨基化石墨烯一二茂铁甲醛复合材料水溶液修饰玻碳电极表面, 后修饰上戊二醛, 再用前列腺特异抗原一抗溶液进行修饰, 再滴涂牛血清白蛋白溶液后, 继续修饰前列腺特异抗原, 最后修饰 Ag@NH₂-MCM-48/Ab₂后, 即得前列腺肿瘤标志物免疫传感器。本发明制备的传感器应用于前列腺特异抗原的测定, 灵敏度高, 特异性好。

CN 103675279 B

1. 一种前列腺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) 二抗标记物 $\text{Ag@NH}_2\text{-MCM-48/Ab}_2$ 的制备,取 0.5 ~ 1.5mg 银杂化的 $\text{NH}_2\text{-MCM-48}$ 介孔材料溶于 1mL、 $\text{pH} = 7.4$ 的磷酸盐缓冲溶液中,超声 1 ~ 3h 使其分散均匀,再加入 1 ~ 3mL、 $10 \sim 20 \mu\text{g/mL}$ 的前列腺特异抗原二抗,4℃ 震荡 12 ~ 24h,离心后除去上清液,得到二抗标记物 $\text{Ag@NH}_2\text{-MCM-48/Ab}_2$;

(2) 免疫传感器的制备,以玻碳电极为工作电极,先用氨基化石墨烯—二茂铁甲醛复合材料水溶液修饰玻碳电极表面,后修饰上戊二醛,再用前列腺特异抗原一抗溶液进行修饰,再滴涂牛血清白蛋白溶液后,继续修饰前列腺特异抗原,最后修饰 $\text{Ag@NH}_2\text{-MCM-48/Ab}_2$ 后,即得前列腺肿瘤标志物免疫传感器。

2. 如权利要求 1 所述的一种前列腺肿瘤标志物免疫传感器的制备方法,其特征在于:步骤 (2) 中氨基化石墨烯—二茂铁甲醛复合材料的制备步骤如下:

1) 室温下,将 100 ~ 150mg 氧化石墨烯分散在 40 ~ 60mL 乙二醇中,超声分散均匀,搅拌下滴加浓氨水 1.0 ~ 1.5mL,得到黑棕色溶液,转移到聚四氟乙烯高压釜,150 ~ 180℃ 反应 6 ~ 10h,冷却后离心,去掉上清液,用超纯水洗涤 3 次后,再在 65℃ 干燥箱内干燥,得到氨基化石墨烯;

2) 将 0.8 ~ 1.2mg 氨基化石墨烯和 1.0 ~ 1.5mg 二茂铁甲醛分散于 1mL、质量分数为 0.5% ~ 1.0% 的羧甲基壳聚糖溶液中,震荡 12h ~ 24h,即得氨基化石墨烯—二茂铁甲醛复合材料。

3. 如权利要求 1 所述的一种前列腺肿瘤标志物免疫传感器的制备方法,其特征在于:步骤 (1) 中银杂化的 $\text{NH}_2\text{-MCM-48}$ 介孔材料的制备步骤如下:

1) 将 1.0 ~ 1.5g 正硅酸四乙酯加入锥形瓶中,加超纯水 62 ~ 95mL 搅拌 10min 后,加入氢氧化钾 0.5 ~ 1.0g,再一次性加入十六烷基三甲基溴化铵 0.65 ~ 1.5g,搅拌 30 ~ 40min 后转入高压釜,120℃ 水热晶化 62 ~ 72h,所得白色粉末依次用超纯水和乙醇分别彻底清洗后,室温干燥,然后在马弗炉中以 1℃ /min 的速度程序升温至 550℃,保温 6 ~ 8h,即得到 MCM-48;

2) 取 1.0g MCM-48 和 1mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷溶于 80 ~ 90mL 无水甲苯中,70℃ 回流 1.5 ~ 2h,离心后于 110℃ 干燥 1 ~ 2h,得到粉末状的 $\text{NH}_2\text{-MCM-48}$;

3) 在锥形瓶加入 48mL 超纯水,在搅拌下加入 1mL 浓度为 50mmol/L 硝酸银溶液和 1mL 质量分数为 5 ~ 8% 的柠檬酸钠溶液,再加入 5 ~ 10mg 硼氢化钠固体持续搅拌 10min,直至颜色不再变化;

4) 将 20mg $\text{NH}_2\text{-MCM-48}$ 加入到上述溶液中,离心,除去上清液,再在 35℃ 真空干燥,制得银杂化的 $\text{NH}_2\text{-MCM-48}$ 介孔材料。

一种前列腺肿瘤标志物免疫传感器的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种前列腺肿瘤标志物免疫传感器的制备方法,属于新型纳米功能材料和生物传感技术领域。

背景技术

[0002] 肿瘤(tumor)是人体组织细胞由于内在和外界致病因素长时间的作用,导致细胞的遗传物质—脱氧核糖核酸(DNA)产生突变,使细胞的生长和分裂失去控制,从而发生异常增生和功能失调。肿瘤严重威胁人民健康,是近年来医学领域中备受重视的重大研究课题。

[0003] 肿瘤标志物(tumor marker)是指肿瘤组织及细胞所产生的活性物质的异常表达,肿瘤标志物在正常组织或良性疾病不产生或产量甚微,而肿瘤病人的组织、体液及排泄物中则有大量分泌,测得值异常升高。肿瘤标志物在肿瘤普查、诊断、治疗、病情监测、判断愈后、评价疗效和高危人群随访观察等方面都具有很大的实用价值。

[0004] 前列腺癌列男性恶性肿瘤发病率的第6位,2102年我国肿瘤登记地区前列腺癌发病率为9.92/10万,严重影响了广大男性的健康,引起了社会各界和医学领域的广泛关注。

[0005] 前列腺特异抗原(PSA)是由前列腺腺泡和导管的上皮细胞分泌的一种单链糖蛋白,在功能上属于类激肽释放酶的一种丝氨酸蛋白酶,是临床常规用于前列腺良性与恶性疾病诊断与鉴别诊断及前列腺癌患者术后随访的重要指标,对临床及病情监测有重要参考价值。

[0006] 肿瘤标志物的检测方法有许多。其中,具有推广应用价值或已被广泛应用的主要有:放射免疫分析法(RIA)、酶标记免疫分析技术(EIA)、免疫放射分析法(IRMA)、免疫化学发光分析(CLIA)、时间分辨荧光免疫分析技术(TrFLA)、液体芯片检测技术和SELDI-TOF-MS等。但这些技术一般需要复杂的监测仪器,检测时间长,普及性差,且有些试剂具有放射性,对人体有一定的危害。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种能克服上述缺陷、高灵敏的、特异性好和相对简单的一种前列腺肿瘤标志物免疫传感器的制备方法。其技术方案为:

[0008] 一种前列腺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:

[0009] (1) 二抗标记物 $Ag@NH_2-MCM-48/Ab_2$ 的制备,取 0.5 ~ 1.5mg 银杂化的 $NH_2-MCM-48$ 介孔材料溶于 1mL、pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中,超声 1 ~ 3h 使其分散均匀,再加入 1 ~ 3mL、10 ~ 20 $\mu g/mL$ 的前列腺特异抗原二抗,4°C 震荡 12 ~ 24h,离心后除去上清液,得到二抗标记物 $Ag@NH_2-MCM-48/Ab_2$;

[0010] (2) 免疫传感器的制备,以玻碳电极为工作电极,先用氨基化石墨烯—二茂铁甲醛复合材料水溶液修饰玻碳电极表面,后修饰上戊二醛,再用前列腺特异抗原一抗溶液进行修饰,再滴涂牛血清白蛋白溶液后,继续修饰前列腺特异抗原,最后修饰 $Ag@NH_2-MCM-48/Ab_2$

后,即得前列腺肿瘤标志物免疫传感器。

[0011] 所述的一种前列腺肿瘤标志物免疫传感器的制备方法,步骤(2)中氨基化石墨烯—二茂铁甲醛复合材料的制备步骤如下:

[0012] 1) 室温下,将100~150mg氧化石墨烯分散在40~60mL乙二醇中,超声分散均匀,搅拌下滴加浓氨水1.0~1.5mL,得到黑棕色溶液,转移到聚四氟乙烯高压釜,150~180℃反应6~10h,冷却后离心,去掉上清液,用超纯水洗涤3次后,再在65℃干燥箱内干燥,得到氨基化石墨烯;

[0013] 2) 将0.8~1.2mg氨基化石墨烯和1.0~1.5mg二茂铁甲醛分散于1mL、质量分数为0.5%~1.0%的羧甲基壳聚糖溶液中,震荡12h~24h,即得氨基化石墨烯—二茂铁甲醛复合材料。

[0014] 所述的一种前列腺肿瘤标志物免疫传感器的制备方法,步骤(1)中银杂化的NH₂-MCM-48介孔材料的制备步骤如下:

[0015] 1) 将1.0~1.5g正硅酸四乙酯加入锥形瓶中,加超纯水62~95mL搅拌10min后,加入氢氧化钾0.5~1.0g,再一次性加入十六烷三甲基溴化铵0.65~1.5g,搅拌30~40min后转入高压釜,120℃水热晶化62~72h,所得白色粉末依次用超纯水和乙醇分别彻底清洗后,室温干燥,然后在马弗炉中以1℃/min的速度程序升温至550℃,保温6~8h,即得到MCM-48;

[0016] 2) 取1.0g MCM-48和1mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷溶于80~90mL无水甲苯中,70℃回流1.5~2h,离心后于110℃干燥1~2h,得到粉末状的NH₂-MCM-48;

[0017] 3) 在锥形瓶加入48mL超纯水,在搅拌下加入1mL浓度为50mmol/L硝酸银溶液和1mL质量分数为5~8%的柠檬酸钠溶液,再加入5~10mg硼氢化钠固体持续搅拌10min,直至颜色不再变化。

[0018] 4) 将20mg NH₂-MCM-48加入到上述溶液中,离心,除去上清液,再在35℃真空干燥,制得银杂化的NH₂-MCM-48介孔材料。

[0019] 本发明与现有技术相比,其优点在于:

[0020] 1) 本发明首次将银杂化的NH₂-MCM-48用于电化学免疫传感器的制备,结合氨基化石墨烯、二茂铁甲醛等,可显著提高电化学信号,从而提高了本发明传感器的灵敏度。

[0021] 2) 本发明传感器的制备过程中,通过滴涂法将氨基化石墨烯—二茂铁甲醛、前列腺特异抗原一抗和Ag@NH₂-MCM-48/Ab₂修饰在玻碳电极表面,使制备的免疫传感器在后续的检测使用时,克服了现有检测方法中存在的仪器设备复杂、操作过程繁琐及普及性差等缺点,操作简便。

具体实施方式

[0022] 现将本发明通过具体实施方式进一步说明,但不限于此。

[0023] 实施例1,采用以下步骤:

[0024] 步骤1银杂化的NH₂-MCM-48介孔材料的制备,具体采用以下工序:1) 将1.0g正硅酸四乙酯加入锥形瓶中,加超纯水62mL,搅拌10min后,加入0.5g氢氧化钾,再一次性加入十六烷三甲基溴化铵0.65g,搅拌30min后转入高压釜,120℃水热晶化62h,所得白色粉末依次用超纯水和乙醇分别彻底清洗后,室温干燥,然后在马弗炉中以1℃/min的速度程序

升温至 550℃,保温 6h,即得到 MCM-48 ;2) 取 1.0g MCM-48 和 1mL 3- 氨丙基三乙氧基硅烷溶于 80mL 无水甲苯中,70℃回流 1.5h,离心后于 110℃干燥 1h,得到粉末状的 NH₂-MCM-48 ;3) 在锥形瓶加入 48mL 超纯水,在搅拌下加入 1mL 浓度为 50mmol/L 硝酸银溶液和 1mL 质量分数为 5% 的柠檬酸钠溶液,再加入 5mg 硼氢化钠固体持续搅拌 10min,直至颜色不再变化 ;4) 将 20mg NH₂-MCM-48 加入到上述溶液中,离心,除去上清液,再在 35℃真空干燥,制得银杂化的 NH₂-MCM-48 介孔材料。

[0025] 步骤 2 二抗标记物 Ag@NH₂-MCM-48/Ab₂的制备 :取 0.5mg 银杂化的 NH₂-MCM-48 介孔材料溶于 1mL、pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中,超声 1h 使其分散均匀,再加入 1mL、10 μg/mL 的前列腺特异抗原二抗,4℃震荡 12h,离心后除去上清液,得到二抗标记物 Ag@NH₂-MCM-48/Ab₂;

[0026] 步骤 3 氨基化石墨烯—二茂铁甲醛复合材料的制备,具体采用以下工序 :1) 20℃,将 100mg 氧化石墨烯分散在 40mL 乙二醇中,超声分散均匀,搅拌下滴加浓氨水 1.0mL,得到黑棕色溶液,转移到聚四氟乙烯高压釜,150℃反应 10h,冷却后离心,去掉上清液,用超纯水洗涤 3 次后,再在 65℃干燥箱内干燥,得到氨基化石墨烯 ;2) 将 0.8mg 氨基化石墨烯和 1.0mg 二茂铁甲醛分散于 1mL、质量分数为 0.5% 的羧甲基壳聚糖溶液中,震荡 12h,即得氨基化石墨烯—二茂铁甲醛溶液。

[0027] 步骤 4 传感器的制备,具体采用以下工序 :1) 玻碳电极的处理,将直径 4mm 的玻碳电极依次用 1.0 μm、0.3 μm 和 0.05 μm 的三氧化二铝抛光粉分别抛光处理后,用乙醇超声清洗,再用超纯水冲洗干净,然后将电极置于 5mmol/L 铁氰化钾溶液中,在 -0.2 ~ 0.6V 电位下扫描,使峰电位差小于 100mV ;2) 先将 6 μL 已制得的氨基化石墨烯—二茂铁甲醛溶液修饰于玻碳电极表面,20℃干燥 ;3) 再将 3 μL、质量分数为 2.5% 的戊二醛滴涂到工序 2) 修饰的玻碳电极表面,20℃干燥 ;4) 将 6 μL、浓度为 10 μg/mL 的前列腺特异抗原一抗滴涂到工序 3) 修饰的电极表面,放于 4℃冰箱中,晾干 ;5) 用超纯水清洗掉未结合的前列腺特异抗原一抗后,4℃晾干,将 3 μL 浓度为 100 μg/mL 的牛血清白蛋白滴涂到工序 4) 修饰的玻碳电极表面,放于 4℃冰箱中,晾干 ;6) 用超纯水清洗掉未结合的牛血清白蛋白,放于 4℃冰箱中,晾干,将前列腺特异抗原滴涂在工序 5) 修饰的玻碳电极表面,20℃孵化 1h 后,用超纯水清洗掉没有特异性结合的前列腺特异抗原,放于 4℃冰箱中,晾干 ;7) 将二抗标记物 Ag@NH₂-MCM-48/Ab₂滴涂在工序 6) 修饰的玻碳电极表面,20℃孵化 1h,用超纯水彻底清洗后,放于 4℃冰箱中晾干,即得前列腺肿瘤标志物免疫传感器,放于 4℃冰箱中保存使用。

[0028] 实施例 2,采用以下步骤 :

[0029] 步骤 1 银杂化的 NH₂-MCM-48 介孔材料的制备,具体采用以下工序 :1) 将 1.2g 正硅酸四乙酯加入锥形瓶中,加超纯水 80mL,搅拌 10min 后,加入 1.0g 氢氧化钾,再一次性加入十六烷三甲基溴化铵 1.0g,搅拌 35min 后转入高压釜,120℃水热晶化 67h,所得白色粉末依次用超纯水和乙醇分别彻底清洗后,室温干燥,然后在马弗炉中以 1℃ /min 的速度程序升温至 550℃,保温 7h,即得到 MCM-48 ;2) 取 1.0g MCM-48 和 1mL 3- 氨丙基三乙氧基硅烷溶于 85mL 无水甲苯中,70℃回流 2h,离心后于 110℃干燥 1.5h,得到粉末状的 NH₂- 化 MCM-48 ;3) 在锥形瓶加入 48mL 超纯水,在搅拌下加入 1mL 浓度为 50mmol/L 硝酸银溶液和 1mL 质量分数为 6.5% 的柠檬酸钠溶液,再加入 7.5mg 硼氢化钠固体持续搅拌 10min,直至颜色不再变化 ;4) 将 20mg NH₂-MCM-48 加入到上述溶液中,离心,除去上清液,再在 35℃真空干燥,制

得银杂化的 $\text{NH}_2\text{-MCM-48}$ 介孔材料。

[0030] 步骤 2 二抗标记物 $\text{Ag@NH}_2\text{-MCM-48/Ab}_2$ 的制备:取 1.0mg 银杂化的 $\text{NH}_2\text{-MCM-48}$ 介孔材料溶于 1mL、 $\text{pH} = 7.4$ 的磷酸盐缓冲溶液中,超声 2h 使其分散均匀,再加入 1mL、 $15 \mu\text{g/mL}$ 的前列腺特异抗原二抗, 4°C 震荡 18h,离心后除去上清液,得到二抗标记物 $\text{Ag@NH}_2\text{-MCM-48/Ab}_2$;

[0031] 步骤 3 氨基化石墨烯—二茂铁甲醛复合材料的制备,具体采用以下工序:1) 20°C ,将 125mg 氧化石墨烯分散在 50mL 乙二醇中,超声分散均匀,搅拌下滴加浓氨水 1.0mL,得到黑棕色溶液,转移到聚四氟乙烯高压釜, 170°C 反应 8h,冷却后离心,去掉上清液,用超纯水洗涤 3 次后,再在 65°C 干燥箱内干燥,得到氨基化石墨烯;2) 将 1.0mg 氨基化石墨烯和 1.0mg 二茂铁甲醛分散于 1mL、质量分数为 0.8% 的羧甲基壳聚糖溶液中,震荡 18h,即得氨基化石墨烯—二茂铁甲醛溶液。

[0032] 步骤 4 传感器的制备,具体技术内容同实施例 1 中的步骤 4。

[0033] 实施例 3,采用以下步骤:

[0034] 步骤 1 银杂化的 $\text{NH}_2\text{-MCM-48}$ 介孔材料的制备,具体采用以下工序:1) 将 1.5g 正硅酸四乙酯加入锥形瓶中,加超纯水 95mL,搅拌 10min 后,加入 1.0g 氢氧化钾,再一次性加入十六烷三甲基溴化铵 1.5g,搅拌 40min 后转入高压釜, 120°C 水热晶化 72h,所得白色粉末依次用超纯水和乙醇分别彻底清洗后,室温干燥,然后在马弗炉中以 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度程序升温至 550°C ,保温 8h,即得到 MCM-48;2) 取 1.0g MCM-48 和 1mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷溶于 90mL 无水甲苯中, 70°C 回流 2h,离心后于 110°C 干燥 2h,得到粉末状的 $\text{NH}_2\text{-MCM-48}$;3) 在锥形瓶加入 48mL 超纯水,在搅拌下加入 1mL 浓度为 50mmol/L 硝酸银溶液和 1mL 质量分数为 8% 的柠檬酸钠溶液,再加入 10mg 硼氢化钠固体持续搅拌 10min,直至颜色不再变化;4) 将 20mg $\text{NH}_2\text{-MCM-48}$ 加入到上述溶液中,离心,除去上清液,再在 35°C 真空干燥,制得银杂化的 $\text{NH}_2\text{-MCM-48}$ 介孔材料。

[0035] 步骤 2 二抗标记物 $\text{Ag@NH}_2\text{-MCM-48/Ab}_2$ 的制备:取 1.5mg 银杂化的 $\text{NH}_2\text{-MCM-48}$ 介孔材料溶于 1mL、 $\text{pH} = 7.4$ 的磷酸盐缓冲溶液中,超声 3h 使其分散均匀,再加入 1mL、 $20 \mu\text{g/mL}$ 的前列腺特异抗原二抗, 4°C 震荡 24h,离心后除去上清液,得到二抗标记物 $\text{Ag@NH}_2\text{-MCM-48/Ab}_2$;

[0036] 步骤 3 氨基化石墨烯—二茂铁甲醛复合材料的制备,具体采用以下工序:1) 20°C ,将 150mg 氧化石墨烯分散在 60mL 乙二醇中,超声分散均匀,搅拌下滴加浓氨水 1.5mL,得到黑棕色溶液,转移到聚四氟乙烯高压釜, 180°C 反应 6h,冷却后离心,去掉上清液,用超纯水洗涤 3 次后,再在 65°C 干燥箱内干燥,得到氨基化石墨烯;2) 将 1.2mg 氨基化石墨烯和 1.5mg 二茂铁甲醛分散于 1mL、质量分数为 1.0% 的羧甲基壳聚糖溶液中,震荡 24h,即得氨基化石墨烯—二茂铁甲醛溶液。

[0037] 步骤 4 传感器的制备,具体技术内容同实施例 1 中的步骤 4。

[0038] 实施例 4: 实施例 1 ~ 3 制备的传感器在前列腺特异抗原检测中的应用,具体步骤如下:

[0039] (1) 标准溶液配制:配制一组包括空白标样在内的不同浓度的前列腺特异抗原标准溶液,底液为浓度为 0.067mol/L $\text{pH} 7.4$ 的磷酸盐缓冲溶液;

[0040] (2) 工作电极修饰:将实施例 1 ~ 3 制备的传感器作为工作电极,将步骤 (1) 中配

制的不同浓度的前列腺特异抗原标准溶液分别滴涂到工作电极表面,4℃冰箱中保存;

[0041] (3) 工作曲线绘制:将饱和甘汞电极作为参比电极,铂丝电极作为辅助电极,与步骤(2)所修饰好的工作电极组成三电极系统,连接电化学工作站,采用时间-电流方法,记录电流变化;根据所得电流差值 ΔI 与前列腺特异抗原的浓度呈线性关系,绘制 $\Delta I-C$ 工作曲线;

[0042] (4) 前列腺特异抗原的检测:用待测样品代替步骤(1)中的前列腺特异抗原标准溶液,按照步骤(2)和步骤(3)中的方法进行检测,根据响应电流降低的差值 ΔI 和工作曲线,得到待测样品中前列腺肿瘤标志物即前列腺特异抗原的含量。

[0043] 测定结果如表1所示:

[0044] 表1 人血清中前列腺特异抗原的测定

[0045]

人血清(ng/mL)	加入浓度 (ng/mL)	检测浓度 (ng/mL)	相对偏差(% ,n=5)	回收率 ρ
1.20	1.00	2.18	3.2	97.0 ρ
1.20	2.00	3.22	5.4	102.5 ρ
1.20	3.00	4.33	3.4	99.7 ρ
1.20	4.00	5.09	4.1	101.8 ρ

[0046] 由检测结果可知,测定结果的相对标准偏差小于5.5%,平均回收率为97.0~102.5%,表明本发明制备的电化学传感器可用于人血清中前列腺特异抗原的检测,方法的灵敏度高、特异性强,结果准确可靠。

专利名称(译)	一种前列腺肿瘤标志物免疫传感器的制备方法		
公开(公告)号	CN103675279B	公开(公告)日	2015-04-08
申请号	CN201310713154.0	申请日	2013-12-23
[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 韩健 魏琴 董云会 任祥 陈润海		
发明人	李月云 韩健 魏琴 董云会 任祥 陈润海		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N33/57434		
审查员(译)	段晓露		
其他公开文献	CN103675279A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种前列腺肿瘤标志物免疫传感器的制备方法，制备包括以下步骤：(1)取银杂化的NH₂-MCM-48溶于磷酸盐缓冲溶液中，超声分散均匀，再加入前列腺特异抗原二抗，4℃震荡，离心后除去上清液，得到二抗标记物AgNH₂-MCM-48/Ab₂；(2)以玻碳电极为工作电极，先用氨基化石墨烯—二茂铁甲醛复合材料水溶液修饰玻碳电极表面，后修饰上戊二醛，再用前列腺特异抗原一抗溶液进行修饰，再滴涂牛血清白蛋白溶液后，继续修饰前列腺特异抗原，最后修饰AgNH₂-MCM-48/Ab₂后，即得前列腺肿瘤标志物免疫传感器。本发明制备的传感器应用于前列腺特异抗原的测定，灵敏度高，特异性好。

人血清(ng/mL)	加入浓度(ng/mL)	检测浓度(ng/mL)	相对偏差(%,n=5)	回收率(%)
1.20	1.00	2.18	3.2	97.0
1.20	2.00	3.22	5.4	102.5
1.20	3.00	4.33	3.4	99.7
1.20	4.00	5.09	4.1	101.8