



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104407141 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201410742743. 6

(22) 申请日 2014. 12. 09

(73) 专利权人 济南大学

地址 250022 山东省济南市济微路 106 号

(72) 发明人 纪磊 杜斌 闫涛 王晓东 魏琴

李月云 马洪敏 曹伟 庞雪辉

吴丹 范大伟 胡丽华

Nanoparticles for Catalytic Applications. 《Appl. Mater. Interfaces》. 2010, 第 3 卷 (第 1 期), 摘要, 第 2. 2-2. 4 节.

赵廷凯 等. 多壁碳纳米管 / 壳聚糖复合材料的制备及电催化性能. 《中国有色金属学报》. 2010, 第 20 卷 (第 9 期), 摘要, 1732 页左栏至 1733 页右栏第 2 段.

审查员 胡晓佳

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102658176 A, 2012. 09. 12, 全文.

US 2012034711 A1, 2012. 02. 09, 全文.

KR 20130127998 A, 2013. 11. 25, 全文.

CN 104181299 A, 2014. 12. 03, 权利要求

1-5, 说明书第 5-15 段.

Lirong Kong et al.. Constructing Carbon-Coated Fe₃O₄ Microspheres as Antiacid and Magnetic Support for Palladium

权利要求书 2 页 说明书 8 页

(54) 发明名称

一种基于羧基化多壁碳纳米管与 Fe₃O₄@C@Pd 构建的乳腺癌标志物免疫传感器的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及一种基于羧基化多壁碳纳米管与 Fe₃O₄@C@Pd 构建的乳腺癌标志物免疫传感器的制备方法及应用, 属于新型功能材料、生物传感检测技术领域。基于 Fe₃O₄@C@Pd 比表面积大, 催化效率高等特点, 显著提高了免疫传感器的灵敏度和稳定性, 对肿瘤的早期诊断具有重要的意义。

1. 一种基于羧基化多壁碳纳米管与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 构建的乳腺癌标志物免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤如下:

(1) 羧基化多壁碳纳米管的壳聚糖溶液的制备

将 1~3 mg 羧基化多壁碳纳米管加入到 1 mL、0.1% 的壳聚糖溶液中,超声分散 10~20 min,将溶液保存在 4 °C 下备用;所述 0.1% 的壳聚糖溶液,是将 1 g 的壳聚糖溶于 10 mL、0.02 mol/L 的稀盐酸溶液制得;

(2) 检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}-\text{Ab}_2$ 溶液的制备

1) 钯纳米颗粒溶液的制备

将 0.20~0.30 mmol Na_2PdCl_4 和 0.15~0.35 mmol 柠檬酸三钠,溶于 20 mL 超纯水中,立即加入 0.6 mL、0.01~0.03 mol/L NaBH_4 溶液,持续搅拌 25~35 s,溶液变为棕黑色,制得钯纳米颗粒溶液;

2) Fe_3O_4 磁性微球的制备

将 0.75~1.85 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于 75 mL 乙二醇中,磁力搅拌 0.5~1 h,得到亮黄色的溶液,加入 2.6~4.6 g 的乙酸钠,搅拌 0.5~1 h,将得到的溶液移至 200 mL 聚四氟乙烯衬里的高压反应釜中,在 180~220 °C 高压反应釜中密封加热 12~24 h,冷却至室温,将制得的黑色磁微球用磁铁收集,依次用乙醇和超纯水冲洗 6 次,在 45~55 °C 真空条件下干燥 12 h,制得 Fe_3O_4 磁性微球;

3) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 磁性微球的制备

将 0.15~0.25 g 的 Fe_3O_4 磁性微球加入到 150~240 mL、0.08~0.12 mol/L HNO_3 溶液中,超声处理 10~15 min,超纯水冲洗,处理后的 Fe_3O_4 磁性微球与 0.4~0.6 mol/L 葡萄糖溶液共混,分散并超声处理 10~15 min,得到的悬浮液转移至高压反应釜中,在 180 °C 下加热 5~7 h,冷却至室温,用磁铁分离,超纯水冲洗 6 次,50 °C 真空条件下干燥 12 h,制得 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 磁性微球;

4) 检测抗体标记物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 磁性微球的制备

将 8~12 mg 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 磁性微球分散于 20 mL、含有 1.0×10^{-2} ~ 3.0×10^{-2} mol/L 三羟甲基氨基甲烷和 2.0×10^{-2} mol/L NaCl 的质量分数为 0.10%~0.30% 聚二烯丙基二甲基胺盐酸盐 PDDA 的水溶液中,搅拌 40 min,剩余的聚二烯丙基二甲基胺盐酸盐 PDDA 用磁铁移除;吸收了聚二烯丙基二甲基胺盐酸盐 PDDA 的微球用超纯水冲洗 3~6 次,将此微球分散于 12~18 mL 钯纳米颗粒溶液中,搅拌 40 min,利用磁铁将上清液分离,所得固体用超纯水冲洗 3 次,在 50 °C 真空条件下干燥 12 h,制得检测抗体标记物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 磁性微球;

5) 检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}-\text{Ab}_2$ 溶液的制备

将 1 mL、8~12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乳腺癌标志物检测抗体 Ab_2 溶液,加入到 2 mg 检测抗体标记物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 磁性微球中,4 °C 恒温振荡培养箱中振荡孵化 12 h;利用磁铁分离得到固体,向该固体中加入 1 mL、pH=7.4 磷酸盐缓冲溶液,制得核壳检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}-\text{Ab}_2$ 溶液,4 °C 下保存备用;

(3) 免疫传感器的制备方法

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) 将 4~6 μL 、1~3 mg/mL 羧基化多壁碳纳米管的壳聚糖溶液滴涂在电极表面,滴加 4~6 μL 、含有 0.1~0.4 mol/L EDC 和 0.1 mol/L NHS 的混合溶液至电极表面,待电极微干;

3) 滴加 4~6 μL 、6~14 $\mu\text{g/mL}$ 的乳腺癌标志物捕获抗体 Ab_1 溶液至电极表面, 超纯水冲洗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;

4) 滴加 4~6 μL 、质量分数为 0.1%~0.3% 的牛血清白蛋白 BSA 溶液至电极表面, 以封闭电极表面上非特异性活性位点, 超纯水冲洗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;

5) 滴加 4~6 μL 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ ~10 ng/mL 的一系列不同浓度的乳腺癌标志物标准溶液至电极表面, 超纯水冲洗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干;

6) 滴加 4~6 μL 、1~3 mg/mL 的检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C@Pd}-\text{Ab}_2$ 溶液至电极表面, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中晾干, 制得一种基于羧基化多壁碳纳米管与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C@Pd}$ 构建的乳腺癌标志物免疫传感器。

2. 如权利要求 1 所述的制备方法制备的一种免疫传感器用于乳腺癌标志物的检测方法, 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、 $\text{pH}=5.0 \sim 8.5$ 磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2) 用计时电流法对乳腺癌标志物进行检测, 输入电压为 -0.4 V, 取样间隔 0.1 s, 运行时间 250 s;

(3) 当背景电流趋于稳定后, 每隔 50 s 向 10 mL $\text{pH}=5.0 \sim 8.5$ 磷酸盐缓冲溶液中注入 10 μL 、5~10 mol/L 的双氧水溶液, 记录电流变化。

3. 如权利要求 1 所述的一种基于羧基化多壁碳纳米管与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C@Pd}$ 构建的乳腺癌标志物免疫传感器的制备方法, 其特征在于, 所述乳腺癌标志物选自下列之一: CA153、CEA、CA549、hCG、降钙素、铁蛋白。

一种基于羧基化多壁碳纳米管与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 构建的乳腺癌标志物免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于羧基化多壁碳纳米管与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 构建的乳腺癌标志物免疫传感器。具体是采用核壳 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$, 制备一种检测乳腺癌标志物的夹心型电化学免疫传感器, 属于新型功能材料与生物传感检测技术领域。

背景技术

[0002] 免疫传感器是将免疫学方法与分析化学方法相结合的一种生物传感器, 通过抗原与抗体之间的特性性结合, 使得它具有高灵敏性、高选择性、分析快速和操作简便等优点。电化学免疫传感器具有灵敏度高、选择性好、结构简单、操作简便、易于小型化、可连续、快速自动化检测分析等优点, 因此本发明一种基于羧基化多壁碳纳米管与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 构建的乳腺癌标志物免疫传感器, 实现了对乳腺癌标志物的检测。

[0003] 本发明将羧基化多壁碳纳米管引入到电化学免疫传感器的制备中, 利用其生物相容性及大的比表面积, 实现抗体在电极表面的有效固定; 利用其优异的电子传递能力, 起到增强电化学信号的作用。通过 EDC 和 NHS 对羧基的活化作用, 实现了抗体在电极表面的固定; 将 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 引入传感器的制备中, 构建了一种超灵敏的夹心型电化学免疫传感器。在不使用酶的情况下, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 对双氧水 H_2O_2 有良好的催化能力, 并在检测过程中产生良好的电化学信号, 有效地降低了传感器的检出限, 可用于多种乳腺癌标志物的分析。该方法具有成本低、灵敏度高、特异性好、检测快速等优点, 而且制备过程较为简单, 有效克服了目前乳腺癌标志物检测方法的不足。

[0004] 申请号为 CN200810031756.7 的专利涉及到 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒的酶免疫传感器; CN201110391104.6 的专利涉及到 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒电化学发光免疫传感器; CN201210088850.2 的专利涉及到 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒与功能化的多壁碳纳米管的复合膜的免疫传感器; CN201210378644.5 的专利涉及到 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒负载金和酶的化学发光免疫传感器。本发明在 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒表面包覆一层碳后再进行钯纳米粒子的负载, 形成一种核壳的结构。本发明在没有使用酶的情况下, 利用钯纳米粒子对 H_2O_2 的催化作用实现信号的放大作用。

发明内容

[0005] 本发明的目的之一在于, 提供了一种灵敏度高、特异性强、重现性好、操作简便的免疫传感器;

[0006] 本发明的目的二在于实现了对乳腺癌标志物的灵敏检测。

[0007] 为了实现上述目的, 本发明是通过以下措施来实现的。本发明的技术方案, 包括以下步骤。

[0008] 1. 一种基于羧基化多壁碳纳米管与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 构建的乳腺癌标志物免疫传感器的制备方法

- [0009] (1) 将直径为 3~5 mm 的玻璃碳电极用 Al_2O_3 抛光粉打磨,超纯水清洗干净;
- [0010] (2) 将 4~6 μL 、1~3 mg/mL 羧基化多壁碳纳米管的壳聚糖溶液滴涂在电极表面,滴加 4~6 μL 、含有 0.1~0.4 mol/L EDC 和 0.1 mol/L NHS 的混合溶液至电极表面,待电极微干;
- [0011] (3) 滴加 4~6 μL 、6~14 $\mu\text{g/mL}$ 的乳腺癌标志物捕获抗体 Ab_1 溶液至电极表面,超纯水冲洗,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干;
- [0012] (4) 滴加 4~6 μL 、质量分数为 0.1%~0.3% 的牛血清白蛋白 BSA 溶液至电极表面,以封闭电极表面上非特异性活性位点,超纯水冲洗,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干;
- [0013] (5) 滴加 4~6 μL 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ ~10 ng/mL 的一系列不同浓度的乳腺癌标志物标准溶液至电极表面,超纯水冲洗,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干;
- [0014] (6) 滴加 4~6 μL 、1~3 mg/mL 的检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C@Pd-Ab}_2$ 溶液至电极表面,置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干,制得一种基于羧基化多壁碳纳米管与 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C@Pd}$ 构建的乳腺癌标志物免疫传感器。

[0015] 2. 检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C@Pd-Ab}_2$ 溶液的制备

[0016] (1) 羧基化多壁碳纳米管的壳聚糖溶液的制备

[0017] 将 1~3 mg 羧基化多壁碳纳米管加入到 1 mL、0.1% 的壳聚糖溶液中,超声分散 10~20 min,将溶液保存在 4 $^\circ\text{C}$ 下备用;所述 0.1% 的壳聚糖溶液,是将 1 g 的壳聚糖溶于 10 mL、0.02 mol/L 的稀盐酸溶液制得;

[0018] (2) 检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C@Pd-Ab}_2$ 溶液的制备

[0019] 1) 钯纳米颗粒溶液的制备

[0020] 将 0.20~0.30 mmol Na_2PdCl_4 和 0.15~0.35 mmol 柠檬酸三钠,溶于 20 mL 超纯水中,立即加入 0.6 mL、0.01~0.03 mol/L NaBH_4 溶液,持续搅拌 25~35 s,溶液变为棕黑色,制得钯纳米颗粒溶液;

[0021] 2) Fe_3O_4 磁性微球的制备

[0022] 将 0.75~1.85 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于 75 mL 乙二醇中,磁力搅拌 0.5~1 h,得到亮黄色的溶液,加入 2.6~4.6 g 的乙酸钠,搅拌 0.5~1 h,将得到的溶液移至 200 mL 聚四氟乙烯衬里的高压反应釜中,在 180~220 $^\circ\text{C}$ 高压反应釜中密封加热 12~24 h,冷却至室温,将制得的黑色磁微球用磁铁收集,依次用乙醇和超纯水冲洗 6 次,在 45~55 $^\circ\text{C}$ 真空条件下干燥 12 h,制得 Fe_3O_4 磁性微球;

[0023] 3) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C}$ 磁性微球的制备

[0024] 将 0.15~0.25 g 的 Fe_3O_4 磁性微球加入到 150~240 mL、0.08~0.12 mol/L HNO_3 溶液中,超声处理 10~15 min,超纯水冲洗,处理后的 Fe_3O_4 磁性微球与 0.4~0.6 mol/L 葡萄糖溶液共混,分散并超声处理 10~15 min,得到的悬浮液转移至高压反应釜中,在 180 $^\circ\text{C}$ 下加热 5~7 h,冷却至室温,用磁铁分离,超纯水冲洗 6 次,50 $^\circ\text{C}$ 真空条件下干燥 12 h,制得 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C}$ 磁性微球;

[0025] 4) 检测抗体标记物 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C@Pd}$ 磁性微球的制备

[0026] 将 8~12 mg 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C}$ 磁微球分散于 20 mL、含有 1.0×10^{-2} ~ 3.0×10^{-2} mol/L 三羟甲基氨基甲烷和 2.0×10^{-2} mol/L NaCl 的质量分数为 0.10%~0.30% 聚二烯丙基二甲基胺盐酸盐 PDDA 的水溶液中,搅拌 40 min,剩余的聚二烯丙基二甲基胺盐酸盐 PDDA 用磁铁

移除；吸收了聚二烯丙基二甲基胺盐酸盐 PDDA 的微球用超纯水冲洗 3~6 次，将此微球分散于 12~18 mL 钯纳米颗粒溶液中，搅拌 40 min，利用磁铁将上清液分离，所得固体用超纯水冲洗 3 次，在 50 °C 真空条件下干燥 12 h，制得检测抗体标记物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 磁性微球；

[0027] 5) 检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}-\text{Ab}_2$ 溶液的制备

[0028] 将 1 mL、8~12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乳腺癌标志物检测抗体 Ab_2 溶液，加入到 2 mg 检测抗体标记物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 磁性微球中，4 °C 恒温振荡培养箱中振荡孵化 12 h；利用磁铁分离得到固体，向该固体中加入 1 mL、pH=7.4 磷酸盐缓冲溶液，制得核壳检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}-\text{Ab}_2$ 溶液，4 °C 下保存备用。

[0029] 3. 乳腺癌标志物的检测

[0030] (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、pH=5.0 ~ 8.5 磷酸盐缓冲溶液中进行测试；

[0031] (2) 用计时电流法对乳腺癌标志物进行检测，输入电压为 -0.4 V，取样间隔 0.1 s，运行时间 250 s；

[0032] (3) 当背景电流趋于稳定后，每隔 50 s 向 10 mL pH=5.0~8.5 磷酸盐缓冲溶液中注入 10 μL 、5~10 mol/L 的双氧水溶液，记录电流变化。

[0033] 上述所述乳腺癌标志物选自下列之一：CA153、CEA、CA549、hCG、降钙素、铁蛋白。

[0034] 本发明的有益成果

[0035] (1) 本发明采用的基底材料为羧基化多壁碳纳米管，其与多壁碳纳米管相比较，其保留了多壁碳纳米管较大的表面积和较好的导电性，以及良好的生物相容性和稳定性，另外，其表面还有大量的羧基官能团，能够增加抗体在其表面的负载量和水中的分散性，增加了传感器灵敏度和稳定性。

[0036] (2) 将壳聚糖应用到电化学免疫传感器的制备当中，利用其优异的成膜性能，防止了羧基化多壁碳纳米管从电极表面上脱落，同时利用壳聚糖具有很好的生物相容性和低毒性，有利于抗体在电极表面的固定。

[0037] (3) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 为立体球状结构，具有亚微米尺寸，其大的表面积能够增加钯在其表面的负载量，进而增加检测抗体的负载量，使传感器实现了对肿瘤标志物的超灵敏检测。

[0038] (4) 将 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 与肿瘤标志物检测抗体直接孵化，利用贵金属优异的生物相容性和较高的催化性能，在检测抗体的标记中不必使用酶，避免了因酶的失活和泄漏造成的检测误差，简化了检测抗体标记物的制作步骤，显著提高了电化学免疫传感器的重现性和稳定性。

[0039] (5) 本发明利用抗原、抗体的免疫反应，提高了检测方法的特异性。

[0040] (6) 本发明制备的电化学免疫传感器用于多种肿瘤标志物的检测，响应时间短，检测限低，线性范围宽，可以实现简单、快速、高灵敏和特异性检测，对乳腺癌标志物检测限最低可达 0.033 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

具体实施方式

[0041] 实施例 1 一种基于羧基化多壁碳纳米管与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 构建的乳腺癌标志物免疫传感器的制备方法

[0042] (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;

[0043] (2) 将 4 μL 、1 mg/mL 羧基化多壁碳纳米管的壳聚糖溶液滴涂在电极表面, 滴加 4 μL 、含有 0.1 mol/L EDC 和 0.1 mol/L NHS 的混合溶液至电极表面, 待电极微干;

[0044] (3) 滴加 4 μL 、6 $\mu\text{g/mL}$ 的乳腺癌标志物捕获抗体 Ab_1 溶液至电极表面, 超纯水冲洗, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干;

[0045] (4) 滴加 4 μL 、质量分数为 0.1% 的牛血清白蛋白 BSA 溶液至电极表面, 以封闭电极表面上非特异性活性位点, 超纯水冲洗, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干;

[0046] (5) 滴加 4 μL 、0.5 pg/mL~10 ng/mL 的一系列不同浓度的乳腺癌标志物标准溶液至电极表面, 超纯水冲洗, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干;

[0047] (6) 滴加 4 μL 、1 mg/mL 的检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C@Pd-Ab}_2$ 溶液至电极表面, 置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干, 制得一种基于羧基化多壁碳纳米管与 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C@Pd}$ 构建的乳腺癌标志物免疫传感器。

[0048] 实施例 2 一种基于羧基化多壁碳纳米管与 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C@Pd}$ 构建的乳腺癌标志物免疫传感器的制备方法

[0049] (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;

[0050] (2) 将 5 μL 、2 mg/mL 羧基化多壁碳纳米管的壳聚糖溶液滴涂在电极表面, 滴加 5 μL 、含有 0.2 mol/L EDC 和 0.1 mol/L NHS 的混合溶液至电极表面, 待电极微干;

[0051] (3) 滴加 5 μL 、10 $\mu\text{g/mL}$ 的乳腺癌标志物捕获抗体 Ab_1 溶液至电极表面, 超纯水冲洗, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干;

[0052] (4) 滴加 5 μL 、质量分数为 0.2% 的牛血清白蛋白 BSA 溶液至电极表面, 以封闭电极表面上非特异性活性位点, 超纯水冲洗, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干;

[0053] (5) 滴加 5 μL 、0.5 pg/mL~10 ng/mL 的一系列不同浓度的乳腺癌标志物标准溶液至电极表面, 超纯水冲洗, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干;

[0054] (6) 滴加 5 μL 、2 mg/mL 的检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C@Pd-Ab}_2$ 溶液至电极表面, 置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干, 制得一种基于羧基化多壁碳纳米管与 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C@Pd}$ 构建的乳腺癌标志物免疫传感器。

[0055] 实施例 3 一种基于羧基化多壁碳纳米管与 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C@Pd}$ 构建的乳腺癌标志物免疫传感器的制备方法

[0056] (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;

[0057] (2) 将 6 μL 、3 mg/mL 羧基化多壁碳纳米管的壳聚糖溶液滴涂在电极表面, 滴加 6 μL 、含有 0.4 mol/L EDC 和 0.1 mol/L NHS 的混合溶液至电极表面, 待电极微干;

[0058] (3) 滴加 6 μL 、14 $\mu\text{g/mL}$ 的乳腺癌标志物捕获抗体 Ab_1 溶液至电极表面, 超纯水冲洗, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干;

[0059] (4) 滴加 6 μL 、质量分数为 0.3% 的牛血清白蛋白 BSA 溶液至电极表面, 以封闭电极表面上非特异性活性位点, 超纯水冲洗, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干;

[0060] (5) 滴加 6 μL 、0.5 pg/mL~10 ng/mL 的一系列不同浓度的乳腺癌标志物标准溶液至电极表面, 超纯水冲洗, 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干;

[0061] (6) 滴加 6 μL 、3 mg/mL 的检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C@Pd-Ab}_2$ 溶液至电极表面, 置于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中晾干, 制得一种基于羧基化多壁碳纳米管与 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C@Pd}$ 构建的乳腺癌标志物免

疫传感器。

[0062] 实施例 4 检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}-\text{Ab}_2$ 溶液的制备

[0063] (1) 羧基化多壁碳纳米管的壳聚糖溶液的制备

[0064] 将 1 mg 羧基化多壁碳纳米管加入到 1 mL、0.1% 的壳聚糖溶液中, 超声分散 10 min, 将溶液保存在 4 °C 下备用; 所述 0.1% 的壳聚糖溶液, 是将 1 g 的壳聚糖溶于 10 mL、0.02 mol/L 的稀盐酸溶液制得;

[0065] (2) 检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}-\text{Ab}_2$ 溶液的制备

[0066] 1) 钯纳米颗粒溶液的制备

[0067] 将 0.20 mmol Na_2PdCl_4 和 0.15 mmol 柠檬酸三钠, 溶于 20 mL 超纯水中, 立即加入 0.6 mL、0.01 mol/L NaBH_4 溶液, 持续搅拌 25s, 溶液变为棕黑色, 制得钯纳米颗粒溶液;

[0068] 2) Fe_3O_4 磁性微球的制备

[0069] 将 0.75 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于 75 mL 乙二醇中, 磁力搅拌 0.5 h, 得到亮黄色的溶液, 加入 2.6g 的乙酸钠, 搅拌 0.5 h, 将得到的溶液移至 200 mL 聚四氟乙烯衬里的高压反应釜中, 在 180 °C 高压反应釜中密封加热 12 h, 冷却至室温, 将制得的黑色磁微球用磁铁收集, 依次用乙醇和超纯水冲洗 6 次, 在 45 °C 真空条件下干燥 12 h, 制得 Fe_3O_4 磁性微球;

[0070] 3) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 磁性微球的制备

[0071] 将 0.15g 的 Fe_3O_4 磁性微球加入到 150 mL、0.08 mol/L HNO_3 溶液中, 超声处理 10 min, 超纯水冲洗, 处理后的 Fe_3O_4 磁性微球与 0.4 mol/L 葡萄糖溶液共混, 分散并超声处理 10 min, 得到的悬浮液转移至高压反应釜中, 在 180 °C 下加热 5h, 冷却至室温, 用磁铁分离, 超纯水冲洗 6 次, 50 °C 真空条件下干燥 12 h, 制得 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 磁性微球;

[0072] 4) 检测抗体标记物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 磁性微球的制备

[0073] 将 8 mg 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 磁微球分散于 20 mL、含有 1.0×10^{-2} mol/L 三羟甲基氨基甲烷和 2.0×10^{-2} mol/L NaCl 的质量分数为 0.10% 聚二烯丙基二甲基胺盐酸盐 PDDA 的水溶液中, 搅拌 40 min, 剩余的聚二烯丙基二甲基胺盐酸盐 PDDA 用磁铁移除; 吸收了聚二烯丙基二甲基胺盐酸盐 PDDA 的微球用超纯水冲洗 3 次, 将此微球分散于 12 mL 钯纳米颗粒溶液中, 搅拌 40 min, 利用磁铁将上清液分离, 所得固体用超纯水冲洗 3 次, 在 50 °C 真空条件下干燥 12 h, 制得检测抗体标记物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 磁性微球;

[0074] 5) 检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}-\text{Ab}_2$ 溶液的制备

[0075] 将 1 mL、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乳腺癌标志物检测抗体 Ab_2 溶液, 加入到 2 mg 检测抗体标记物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 磁性微球中, 4 °C 恒温振荡培养箱中振荡孵化 12 h; 利用磁铁分离得到固体, 向该固体中加入 1 mL、pH=7.4 磷酸盐缓冲溶液, 制得核壳检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}-\text{Ab}_2$ 溶液, 4 °C 下保存备用。

[0076] 实施例 5 检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}-\text{Ab}_2$ 溶液的制备

[0077] (1) 羧基化多壁碳纳米管的壳聚糖溶液的制备

[0078] 将 2 mg 羧基化多壁碳纳米管加入到 1 mL、0.1% 的壳聚糖溶液中, 超声分散 15min, 将溶液保存在 4 °C 下备用; 所述 0.1% 的壳聚糖溶液, 是将 1 g 的壳聚糖溶于 10 mL、0.02 mol/L 的稀盐酸溶液制得;

[0079] (2) 检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}-\text{Ab}_2$ 溶液的制备

[0080] 1) 钯纳米颗粒溶液的制备

[0081] 将 0.25 mmol Na_2PdCl_4 和 0.25 mmol 柠檬酸三钠,溶于 20 mL 超纯水中,立即加入 0.6 mL、0.02 mol/L NaBH_4 溶液,持续搅拌 30 s,溶液变为棕黑色,制得钯纳米颗粒溶液;

[0082] 2) Fe_3O_4 磁性微球的制备

[0083] 将 1.50 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于 75 mL 乙二醇中,磁力搅拌 0.75 h,得到亮黄色的溶液,加入 3.6 g 的乙酸钠,搅拌 0.8 h,将得到的溶液移至 200 mL 聚四氟乙烯衬里的高压反应釜中,在 200 °C 高压反应釜中密封加热 18 h,冷却至室温,将制得的黑色磁微球用磁铁收集,依次用乙醇和超纯水冲洗 6 次,在 50 °C 真空条件下干燥 12 h,制得 Fe_3O_4 磁性微球;

[0084] 3) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 磁性微球的制备

[0085] 将 0.20 g 的 Fe_3O_4 磁性微球加入到 200 mL、0.10 mol/L HNO_3 溶液中,超声处理 12 min,超纯水冲洗,处理后的 Fe_3O_4 磁性微球与 0.5 mol/L 葡萄糖溶液共混,分散并超声处理 12 min,得到的悬浮液转移至高压反应釜中,在 180 °C 下加热 6 h,冷却至室温,用磁铁分离,超纯水冲洗 6 次,50 °C 真空条件下干燥 12 h,制得 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 磁性微球;

[0086] 4) 检测抗体标记物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 磁性微球的制备

[0087] 将 10 mg 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 磁微球分散于 20 mL、含有 2.0×10^{-2} mol/L 三羟甲基氨基甲烷和 2.0×10^{-2} mol/L NaCl 的质量分数为 0.20% 聚二烯丙基二甲基胺盐酸盐 PDDA 的水溶液中,搅拌 40 min,剩余的聚二烯丙基二甲基胺盐酸盐 PDDA 用磁铁移除;吸收了聚二烯丙基二甲基胺盐酸盐 PDDA 的微球用超纯水冲洗 4 次,将此微球分散于 15 mL 钯纳米颗粒溶液中,搅拌 40 min,利用磁铁将上清液分离,所得固体用超纯水冲洗 3 次,在 50 °C 真空条件下干燥 12 h,制得检测抗体标记物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 磁性微球;

[0088] 5) 检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}-\text{Ab}_2$ 溶液的制备

[0089] 将 1 mL、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乳腺癌标志物检测抗体 Ab_2 溶液,加入到 2 mg 检测抗体标记物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 磁性微球中,4 °C 恒温振荡培养箱中振荡孵化 12 h;利用磁铁分离得到固体,向该固体中加入 1 mL、pH=7.4 磷酸盐缓冲溶液,制得核壳检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}-\text{Ab}_2$ 溶液,4 °C 下保存备用。

[0090] 实施例 6 检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}-\text{Ab}_2$ 溶液的制备

[0091] (1) 羧基化多壁碳纳米管的壳聚糖溶液的制备

[0092] 将 3 mg 羧基化多壁碳纳米管加入到 1 mL、0.1% 的壳聚糖溶液中,超声分散 20 min,将溶液保存在 4 °C 下备用;所述 0.1% 的壳聚糖溶液,是将 1 g 的壳聚糖溶于 10 mL、0.02 mol/L 的稀盐酸溶液制得;

[0093] (2) 检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}-\text{Ab}_2$ 溶液的制备

[0094] 1) 钯纳米颗粒溶液的制备

[0095] 将 0.30 mmol Na_2PdCl_4 和 0.35 mmol 柠檬酸三钠,溶于 20 mL 超纯水中,立即加入 0.6 mL、0.03 mol/L NaBH_4 溶液,持续搅拌 35 s,溶液变为棕黑色,制得钯纳米颗粒溶液;

[0096] 2) Fe_3O_4 磁性微球的制备

[0097] 将 1.85 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于 75 mL 乙二醇中,磁力搅拌 1 h,得到亮黄色的溶液,加入 4.6 g 的乙酸钠,搅拌 1 h,将得到的溶液移至 200 mL 聚四氟乙烯衬里的高压反应釜中,在 220 °C 高压反应釜中密封加热 24 h,冷却至室温,将制得的黑色磁微球用磁铁收集,依次用乙醇和超纯水冲洗 6 次,在 55 °C 真空条件下干燥 12 h,制得 Fe_3O_4 磁性微球;

[0098] 3) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 磁性微球的制备

[0099] 将 0.25 g 的 Fe_3O_4 磁性微球加入到 240 mL、0.12 mol/L HNO_3 溶液中, 超声处理 15 min, 超纯水冲洗, 处理后的 Fe_3O_4 磁性微球与 0.6 mol/L 葡萄糖溶液共混, 分散并超声处理 15 min, 得到的悬浮液转移至高压反应釜中, 在 180 °C 下加热 7 h, 冷却至室温, 用磁铁分离, 超纯水冲洗 6 次, 50 °C 真空条件下干燥 12 h, 制得 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 磁性微球;

[0100] 4) 检测抗体标记物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 磁性微球的制备

[0101] 将 12 mg 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 磁微球分散于 20 mL、含有 3.0×10^{-2} mol/L 三羟甲基氨基甲烷和 2.0×10^{-2} mol/L NaCl 的质量分数为 0.30% 聚二烯丙基二甲基胺盐酸盐 PDDA 的水溶液中, 搅拌 40 min, 剩余的聚二烯丙基二甲基胺盐酸盐 PDDA 用磁铁移除; 吸收了聚二烯丙基二甲基胺盐酸盐 PDDA 的微球用超纯水冲洗 6 次, 将此微球分散于 18 mL 钡纳米颗粒溶液中, 搅拌 40 min, 利用磁铁将上清液分离, 所得固体用超纯水冲洗 3 次, 在 50 °C 真空条件下干燥 12 h, 制得检测抗体标记物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 磁性微球;

[0102] 5) 检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}-\text{Ab}_2$ 溶液的制备

[0103] 将 1 mL、12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乳腺癌标志物检测抗体 Ab_2 溶液, 加入到 2 mg 检测抗体标记物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}$ 磁性微球中, 4 °C 恒温振荡培养箱中振荡孵化 12 h; 利用磁铁分离得到固体, 向该固体中加入 1 mL、pH=7.4 磷酸盐缓冲溶液, 制得核壳检测抗体孵化物 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}@\text{Pd}-\text{Ab}_2$ 溶液, 4 °C 下保存备用。

[0104] 实施例 7 CEA 的检测步骤

[0105] (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、pH=5.0 ~ 8.5 磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

[0106] (2) 用计时电流法对 CEA 进行检测, 输入电压为 -0.4 V, 取样间隔 0.1 s, 运行时间 250 s;

[0107] (3) 当背景电流趋于稳定后, 每隔 50 s 向 10 mL pH=5.0~8.5 磷酸盐缓冲溶液中注入 10 μL 、5~10 mol/L 的双氧水溶液, 记录电流变化;

[0108] (4) 线性范围为 0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~10 ng/mL ; 对 CA153 检测限可达 0.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0109] 实施例 8 CA153 的检测步骤

[0110] 按照实施例 7(1)~(3) 的步骤进行测定, 得到 CA153 的线性范围为 0.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~10 ng/mL ; 对 CA153 检测限可达 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0111] 实施例 9 CA549 的检测步骤

[0112] 按照实施例 7(1)~(3) 的步骤进行测定, 得到 CA549 的线性范围为 0.30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~10 ng/mL ; CA549 检测限可达 0.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0113] 实施例 10 hCG 的检测步骤

[0114] 按照实施例 7(1)~(3) 的步骤进行测定, 得到 hCG 的线性范围为 0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~10 ng/mL ; hCG 检测限可达 0.033 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0115] 实施例 11 降钙素的检测步骤

[0116] 按照实施例 7(1)~(3) 的步骤进行测定, 得到降钙素的线性范围为 0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~10 ng/mL ; 降钙素检测限可达 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0117] 实施例 12 铁蛋白的检测步骤

[0118] 按照实施例 7(1)~(3) 的步骤进行测定, 得到铁蛋白的线性范围为 0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~10

ng/mL ;铁蛋白检测限可达 0.16 pg/mL。

专利名称(译)	一种基于羧基化多壁碳纳米管与Fe ₃ O ₄ CPd构建的乳腺癌标志物免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN104407141B	公开(公告)日	2015-08-19
申请号	CN201410742743.6	申请日	2014-12-09
[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	纪磊 杜斌 闫涛 王晓东 魏琴 李月云 马洪敏 曹伟 庞雪辉 吴丹 范大伟 胡丽华		
发明人	纪磊 杜斌 闫涛 王晓东 魏琴 李月云 马洪敏 曹伟 庞雪辉 吴丹 范大伟 胡丽华		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/543 G01N33/57415		
审查员(译)	胡晓佳		
其他公开文献	CN104407141A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于羧基化多壁碳纳米管与Fe₃O₄CPd构建的乳腺癌标志物免疫传感器的制备方法及应用，属于新型功能材料、生物传感检测技术领域。基于Fe₃O₄CPd比表面积大，催化效率高等特点，显著提高了免疫传感器的灵敏度和稳定性，对肿瘤的早期诊断具有重要的意义。

