



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104459157 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 25

(21) 申请号 201410783166. 5

(22) 申请日 2014. 12. 17

(71) 申请人 济南大学

地址 250022 山东省济南市济微路 106 号

(72) 发明人 王玉兰 闫涛 李月云 曹伟

刘振 吴丹 杜斌 魏琴

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 27/327(2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页

(54) 发明名称

一种基于二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的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二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的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。基于二茂铁功能化的氧化亚铜立方纳米框架具有良好的催化能力,显著提高了免疫传感器的灵敏度,对甲胎蛋白的早期诊断具有重要的意义。

1. 一种基于二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)依次用 1.0、0.3、0.05 μm 的氧化铝粉末对玻碳电极进行抛光,分别在超纯水和乙醇中超声清洗,氮气吹干,在电极表面滴加 6 μL 、1~3 mg/mL 的三氨丙基三乙氧基硅烷功能化的石墨烯水溶液,干燥;

(2)继续将 6 μL 浓度为 8 ~ 12 $\mu\text{g/mL}$ 的甲胎蛋白捕获抗体溶液滴加到修饰电极表面,于 4℃ 冰箱中孵化 1 h,清洗干净;

(3)用 3 μL 浓度为 5 ~ 15 mg/mL 的牛血清白蛋白溶液封闭非特异性活性位点,于 4℃ 冰箱中孵化 1 h,清洗干净;

(4)将 6 μL 浓度为 0.000005 ~ 10 ng/mL 的一系列不同浓度的甲胎蛋白用于和捕获抗体的特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净;

(5)将 6 μL 浓度为 1 ~ 3 mg/mL 的二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液滴在电极上与抗原特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净,于 4℃ 冰箱中储存备用。

2. 如权利要求 1 所述的一种基于二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的免疫传感器的制备方法,所述二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液的制备,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 氧化亚铜立方纳米框架的制备

首先,将 8.32 ~ 16.64 mL 超纯水、0.50 ~ 1.00 mL 浓度为 0.1 mmol/L 的氯化铜溶液和 0.087 ~ 0.174 g 十二烷基硫酸钠在持续搅拌下混合,将装有该混合液的玻璃瓶放在温度为 32~34℃ 的水浴中,当十二烷基硫酸钠粉末完全溶解后,加入 0.18 ~ 0.36 mL 浓度为 1.0 mmol/L 的氢氧化钠溶液,该溶液立刻变为明亮的蓝色,表明生成了氢氧化铜沉淀,然后,在 1 s 内将 0.92 ~ 1.84 mL 浓度为 0.1 mmol/L 的盐酸羟胺溶液立刻注入玻璃瓶,搅拌 20 s,在几秒钟之内溶液立即从亮蓝色变成了绿色,最后,加入 0.08 ~ 0.16 mL 浓度为 1.0 mmol/L 的盐酸溶液,继续搅拌 20 s,在几秒钟之内溶液的颜色由绿色变为黄色,溶液的全部体积为 10 ~ 20 mL,将该溶液在水浴中老化 1 h 用于纳米晶体的生长,将 3 ~ 6 mL 体积分数为 95% 的乙醇加入到溶液中,静置 1 h 后超声 1 min,清晰的淡黄色变为絮状,将该样品在 5000 rpm 下离心 3 min,去除顶层溶液,沉淀用 10 ~ 20 mL 体积比为 1:1 的水和乙醇清洗,最后用 5 ~ 10 mL 的乙醇清洗,离心后干燥;

(2) 二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液的制备

将 1 ~ 2 mL 浓度为 2 mg/mL 的氧化亚铜立方纳米框架溶液、1 ~ 2 mL 浓度为 2 mg/mL 二茂铁溶液、1 ~ 2 mL 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (10 mmol/L)/N-羟基琥珀酰亚胺 (2 mmol/L) 和 1 ~ 2 mL 浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 甲胎蛋白检测抗体混合,震荡 12 h,离心洗涤,将得到的二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体孵化物分散于 1 mL、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中,将制得的二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液,于 4℃ 冰箱中储存备用。

3. 如权利要求 1 所述的制备方法制备的一种基于二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的免疫传感器,其特征在于,用于甲胎蛋白的检测,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,所制备的免疫传感器为工作电极,在 10 mL 的 pH 值为 6.8 的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2)选择计时电流法对甲胎蛋白进行检测,将输入电压设置为 -0.4 V,取样间隔设置为 0.1 s,运行时间设置为 400 s;

(3)当背景电流趋于稳定后,每隔 50 s 向磷酸盐缓冲溶液中注入 10 μ L 浓度为 10 mol/L 的双氧水溶液,然后记录电流随时间的变化,绘制工作曲线;

(4)将待测样品溶液代替甲胎蛋白标准溶液进行检测。

一种基于二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的免疫传感器的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明一种基于二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的免疫传感器的制备方法及应用。具体是采用二茂铁功能化的氧化亚铜立方纳米框架,制备一种检测甲胎蛋白的电化学免疫传感器,属于新型功能材料与生物传感检测技术领域。

背景技术

[0002] 甲胎蛋白是一种糖蛋白,正常情况下,这种蛋白主要来自胚胎的肝细胞,但当肝细胞发生癌变时,会产生大量甲胎蛋白,而且随着病情恶化,甲胎蛋白在血清中的含量会急剧增加,甲胎蛋白就成了诊断原发性肝癌的一个特异性临床指标,因此对甲胎蛋白的早期诊断很重要。目前已有的甲胎蛋白的临床检测方法很多,如放射免疫分析、酶联免疫分析、化学发光免疫分析等。电化学免疫传感器是将免疫学方法与电化学方法相结合的一种生物传感器,利用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。因此本发明制备了一种基于二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的免疫传感器,实现了对甲胎蛋白的检测。

[0003] 本发明利用氧化亚铜立方纳米框架具有良好的电化学催化性能,将其氨基化后,通过氨基和羧基之间的相互作用,将二茂铁甲酸连接到氧化亚铜立方纳米框架的内部和外部,增加了二茂铁的负载量,得到的二茂铁功能化的氧化亚铜立方纳米框架实现了对双氧水的多重信号放大。在检测甲胎蛋白的过程中产生了逐步放大的电化学信号,有效地增强了电化学免疫传感器的灵敏度。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,为目前有效检测甲胎蛋白提供了新途径。

发明内容

[0004] 本发明的目的之一是基于二茂铁功能化的氧化亚铜立方纳米框架,构建了一种无酶、快速且超灵敏的夹心型电化学免疫传感器。

[0005] 本发明的目的之二是将该夹心型电化学免疫传感器应用于甲胎蛋白的检测。

[0006] 本发明的技术方案如下:

1. 一种基于二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的免疫传感器的制备方法

(1)依次用 1.0、0.3、0.05 μm 的氧化铝粉末对玻碳电极进行抛光,分别在超纯水和乙醇中超声清洗,氮气吹干,在电极表面滴加 6 μL 、1~3 mg/mL 的三氨丙基三乙氧基硅烷功能化的石墨烯水溶液,干燥;

(2)继续将 6 μL 浓度为 8 ~ 12 $\mu\text{g/mL}$ 的甲胎蛋白捕获抗体溶液滴加到修饰电极表面,于 4℃ 冰箱中孵化 1 h,清洗干净;

(3)用 3 μL 浓度为 5 ~ 15 mg/mL 的牛血清白蛋白溶液封闭非特异性活性位点,于 4℃ 冰箱中孵化 1 h,清洗干净;

(4)将 6 μL 浓度为 0.000005 ~ 10 ng/mL 的一系列不同浓度的甲胎蛋白用于和捕获

抗体的特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净;

(5)将 6 μL 浓度为 1 ~ 3 mg/mL 的二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液滴在电极上与抗原特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净,于 4℃冰箱中储存备用。

[0007] 二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液的制备

(1) 氧化亚铜立方纳米框架的制备

首先,将 8.32 ~ 16.64 mL 超纯水、0.50 ~ 1.00 mL 浓度为 0.1 mmol/L 的氯化铜溶液和 0.087 ~ 0.174 g 十二烷基硫酸钠在持续搅拌下混合,将装有该混合液的玻璃瓶放在温度为 32~34℃的水浴中,当十二烷基硫酸钠粉末完全溶解后,加入 0.18 ~ 0.36 mL 浓度为 1.0 mmol/L 的氢氧化钠溶液,该溶液立刻变为明亮的蓝色,表明生成了氢氧化铜沉淀,然后,在 1 s 内将 0.92 ~ 1.84 mL 浓度为 0.1 mmol/L 的盐酸羟胺溶液立刻注入玻璃瓶,搅拌 20 s,在几秒钟之内溶液立即从亮蓝色变成了绿色,最后,加入 0.08 ~ 0.16 mL 浓度为 1.0 mmol/L 的盐酸溶液,继续搅拌 20 s,在几秒钟之内溶液的颜色由绿色变为黄色,溶液的全部体积为 10 ~ 20 mL,将该溶液在水浴中老化 1 h 用于纳米晶体的生长,将 3 ~ 6 mL 体积分数为 95% 的乙醇加入到溶液中,静置 1 h 后超声 1 min,清晰的淡黄色变为絮状,将该样品在 5000 rpm 下离心 3 min,去除顶层溶液,沉淀用 10 ~ 20 mL 体积比为 1:1 的水和乙醇清洗,最后用 5 ~ 10 mL 的乙醇清洗,离心后干燥;

(2) 二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液的制备

将 1 ~ 2 mL 浓度为 2 mg/mL 的氧化亚铜立方纳米框架溶液、1 ~ 2 mL 浓度为 2 mg/mL 二茂铁溶液、1 ~ 2 mL 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (10 mmol/L)/N-羟基琥珀酰亚胺 (2 mmol/L) 和 1 ~ 2 mL 浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 甲胎蛋白检测抗体混合,震荡 12 h,离心洗涤,将得到的二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体孵化物分散于 1 mL、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中,将制得的二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液,于 4℃冰箱中储存备用。

[0008] 甲胎蛋白的检测方法

(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,所制备的免疫传感器为工作电极,在 10 mL 的 pH 值为 6.8 的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2)选择计时电流法对甲胎蛋白进行检测,将输入电压设置为 -0.4 V,取样间隔设置为 0.1 s,运行时间设置为 400 s;

(3)当背景电流趋于稳定后,每隔 50 s 向磷酸盐缓冲溶液中注入 10 μL 浓度为 10 mol/L 的双氧水溶液,然后记录电流随时间的变化,绘制工作曲线;

(4)将待测样品溶液代替甲胎蛋白标准溶液进行检测。

[0009] 本发明的有益成果

(1)本发明首次将氧化亚铜立方纳米框架引入电化学免疫传感器作为标记物,利用其对双氧水具有良好的催化效果,在构建电化学免疫传感器的过程中,实现了对双氧水的多重信号放大作用。

[0010] (2)本发明通过氨基和羧基之间的相互作用,将二茂铁甲酸分子同时固定在氧化亚铜立方纳米框架的外表面和内表面,增加了二茂铁的负载量,负载量增大到 100%,使检测

信号增大一倍,显著提高了检测的灵敏度。

[0011] (3) 本发明将制备的夹心电化学免疫传感器用于甲胎蛋白的检测,检测限低,线性范围宽,可以实现简单、快速、灵敏和特异性检测。本发明用于甲胎蛋白的检测,检测限可达到 2.5 fg/mL。

具体实施方式

[0012] 实施例 1 一种基于二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的免疫传感器的制备方法

(1) 依次用 1.0、0.3、0.05 μm 的氧化铝粉末对玻碳电极进行抛光,分别在超纯水和乙醇中超声清洗,氮气吹干,在电极表面滴加 6 μL 、1 mg/mL 的三氨丙基三乙氧基硅烷功能化的石墨烯水溶液,干燥;

(2) 继续将 6 μL 浓度为 8 $\mu\text{g/mL}$ 的甲胎蛋白捕获抗体溶液滴加到修饰电极表面,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化 1 h,清洗干净;

(3) 用 3 μL 浓度为 5 mg/mL 的牛血清白蛋白溶液封闭非特异性活性位点,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化 1 h,清洗干净;

(4) 将 6 μL 浓度为 0.000005 ~ 10 ng/mL 的一系列不同浓度的甲胎蛋白用于和捕获抗体的特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净;

(5) 将 6 μL 浓度为 1 mg/mL 的二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液滴在电极上与抗原特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存备用。

[0013] 实施例 2 一种基于二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的免疫传感器的制备方法

(1) 依次用 1.0、0.3、0.05 μm 的氧化铝粉末对玻碳电极进行抛光,分别在超纯水和乙醇中超声清洗,氮气吹干,在电极表面滴加 6 μL 、2 mg/mL 的三氨丙基三乙氧基硅烷功能化的石墨烯水溶液,干燥;

(2) 继续将 6 μL 浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的甲胎蛋白捕获抗体溶液滴加到修饰电极表面,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化 1 h,清洗干净;

(3) 用 3 μL 浓度为 10 mg/mL 的牛血清白蛋白溶液封闭非特异性活性位点,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化 1 h,清洗干净;

(4) 将 6 μL 浓度为 0.000005 ~ 10 ng/mL 的一系列不同浓度的甲胎蛋白用于和捕获抗体的特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净;

(5) 将 6 μL 浓度为 2 mg/mL 的二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液滴在电极上与抗原特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存备用。

[0014] 实施例 3 一种基于二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的免疫传感器的制备方法

((1) 依次用 1.0、0.3、0.05 μm 的氧化铝粉末对玻碳电极进行抛光,分别在超纯水和乙醇中超声清洗,氮气吹干,在电极表面滴加 6 μL 、3 mg/mL 的三氨丙基三乙氧基硅烷功能化的石墨烯水溶液,干燥;

(2) 继续将 6 μL 浓度为 12 $\mu\text{g/mL}$ 的甲胎蛋白捕获抗体溶液滴加到修饰电极表面,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵化 1 h,清洗干净;

(3) 用 3 μL 浓度为 15 mg/mL 的牛血清白蛋白溶液封闭非特异性活性位点,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰

箱中孵化 1 h, 清洗干净;

(4) 将 6 μL 浓度为 0.000005 ~ 10 ng/mL 的一系列不同浓度的甲胎蛋白用于和捕获抗体的特异性识别, 室温下孵化 1 h, 清洗干净;

(5) 将 6 μL 浓度为 3 mg/mL 的二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液滴在电极上与抗原特异性识别, 室温下孵化 1 h, 清洗干净, 于 4℃ 冰箱中储存备用。

[0015] 实施例 4 二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液的制备

(1) 氧化亚铜立方纳米框架的制备

首先, 将 8.32 mL 超纯水、0.50 mL 浓度为 0.1 mmol/L 的氯化铜溶液和 0.087 g 十二烷基硫酸钠在持续搅拌下混合, 将装有该混合液的玻璃瓶放在温度为 32~34℃ 的水浴中, 当十二烷基硫酸钠粉末完全溶解后, 加入 0.18 mL 浓度为 1.0 mmol/L 的氢氧化钠溶液, 该溶液立刻变为明亮的蓝色, 表明生成了氢氧化铜沉淀, 然后, 在 1 s 内将 0.92 mL 浓度为 0.1 mmol/L 的盐酸羟胺溶液立刻注入玻璃瓶, 搅拌 20 s, 在几秒钟之内溶液立即从亮蓝色变成了绿色, 最后, 加入 0.08 mL 浓度为 1.0 mmol/L 的盐酸溶液, 继续搅拌 20 s, 在几秒钟之内溶液的颜色由绿色变为黄色, 溶液的全部体积为 10 mL, 将该溶液在水浴中老化 1 h 用于纳米晶体的生长, 将 3 mL 体积分数为 95% 的乙醇加入到溶液中, 静置 1 h 后超声 1 min, 清晰的淡黄色变为絮状, 将该样品在 5000 rpm 下离心 3 min, 去除顶层溶液, 沉淀用 10 mL 体积比为 1:1 的水和乙醇清洗, 最后用 5 mL 的乙醇清洗, 离心后干燥;

(2) 二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液的制备

将 1 mL 浓度为 2 mg/mL 的氧化亚铜立方纳米框架溶液、1 mL 浓度为 2 mg/mL 二茂铁溶液、1 mL 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (10 mmol/L)/N-羟基琥珀酰亚胺 (2 mmol/L) 和 1 mL 浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 甲胎蛋白检测抗体混合, 震荡 12 h, 离心洗涤, 将得到的二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体孵化物分散于 1 mL、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中, 将制得的二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液, 于 4℃ 冰箱中储存备用。

[0016] 实施例 5 二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液的制备

(1) 氧化亚铜立方纳米框架的制备

首先, 将 12.48 mL 超纯水、0.75 mL 浓度为 0.1 mmol/L 的氯化铜溶液和 0.131 g 十二烷基硫酸钠在持续搅拌下混合, 将装有该混合液的玻璃瓶放在温度为 32~34℃ 的水浴中, 当十二烷基硫酸钠粉末完全溶解后, 加入 0.27 mL 浓度为 1.0 mmol/L 的氢氧化钠溶液, 该溶液立刻变为明亮的蓝色, 表明生成了氢氧化铜沉淀, 然后, 在 1 s 内将 1.38 mL 浓度为 0.1 mmol/L 的盐酸羟胺溶液立刻注入玻璃瓶, 搅拌 20 s, 在几秒钟之内溶液立即从亮蓝色变成了绿色, 最后, 加入 0.12 mL 浓度为 1.0 mmol/L 的盐酸溶液, 继续搅拌 20 s, 在几秒钟之内溶液的颜色由绿色变为黄色, 溶液的全部体积为 15 mL, 将该溶液在水浴中老化 1 h 用于纳米晶体的生长, 将 4.5 mL 体积分数为 95% 的乙醇加入到溶液中, 静置 1 h 后超声 1 min, 清晰的淡黄色变为絮状, 将该样品在 5000 rpm 下离心 3 min, 去除顶层溶液, 沉淀用 15 mL 体积比为 1:1 的水和乙醇清洗, 最后用 8 mL 的乙醇清洗, 离心后干燥;

(2) 二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液的制备

将 2 mL 浓度为 2 mg/mL 的氧化亚铜立方纳米框架溶液、2 mL 浓度为 2 mg/mL 二茂

铁溶液、2 mL 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (10 mmol/L)/N-羧基琥珀酰亚胺 (2 mmol/L) 和 2 mL 浓度为 10 μ g/mL 甲胎蛋白检测抗体混合,震荡 12 h,离心洗涤,将得到的二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体孵化物分散于 1 mL、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中,将制得的二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液,于 4℃冰箱中储存备用。

[0017] 实施例 6 二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液的制备

(1) 氧化亚铜立方纳米框架的制备

首先,将 16.64 mL 超纯水、1.00 mL 浓度为 0.1 mmol/L 的氯化铜溶液和 0.174 g 十二烷基硫酸钠在持续搅拌下混合,将装有该混合液的玻璃瓶放在温度为 32~34℃的水浴中,当十二烷基硫酸钠粉末完全溶解后,加入 0.36 mL 浓度为 1.0 mmol/L 的氢氧化钠溶液,该溶液立刻变为明亮的蓝色,表明生成了氢氧化铜沉淀,然后,在 1 s 内将 1.84 mL 浓度为 0.1 mmol/L 的盐酸羟胺溶液立刻注入玻璃瓶,搅拌 20 s,在几秒钟之内溶液立即从亮蓝色变成了绿色,最后,加入 0.16 mL 浓度为 1.0 mmol/L 的盐酸溶液,继续搅拌 20 s,在几秒钟之内溶液的颜色由绿色变为黄色,溶液的全部体积为 20 mL,将该溶液在水浴中老化 1 h 用于纳米晶体的生长,将 6 mL 体积分数为 95% 的乙醇加入到溶液中,静置 1 h 后超声 1 min,清晰的淡黄色变为絮状,将该样品在 5000 rpm 下离心 3 min,去除顶层溶液,沉淀用 20 mL 体积比为 1:1 的水和乙醇清洗,最后用 10 mL 的乙醇清洗,离心后干燥;

(2) 二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液的制备

将 2 mL 浓度为 2 mg/mL 的氧化亚铜立方纳米框架溶液、2 mL 浓度为 2 mg/mL 二茂铁溶液、2 mL 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (10 mmol/L)/N-羧基琥珀酰亚胺 (2 mmol/L) 和 2 mL 浓度为 10 μ g/mL 甲胎蛋白检测抗体混合,震荡 12 h,离心洗涤,将得到的二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体孵化物分散于 1 mL、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中,将制得的二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的甲胎蛋白检测抗体溶液,于 4℃冰箱中储存备用。

[0018] 实施例 7 甲胎蛋白的检测步骤

(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,所制备的免疫传感器为工作电极,在 10 mL 的 pH 值为 6.8 的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2) 选择计时电流法对甲胎蛋白进行检测,将输入电压设置为 -0.4 V,取样间隔设置为 0.1 s,运行时间设置为 400 s;

(3) 当背景电流趋于稳定后,每隔 50 s 向磷酸盐缓冲溶液中注入 10 μ L 浓度为 10 mol/L 的双氧水溶液,然后记录电流随时间的变化,绘制工作曲线;

(4) 将待测样品溶液代替甲胎蛋白标准溶液进行检测。

[0019] (5) 该电化学免疫传感器甲胎蛋白检测线性范围为 0.000005 ~ 10 ng/mL,检测限 2.5 fg/mL。

专利名称(译)	一种基于二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的免疫传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN104459157A	公开(公告)日	2015-03-25
申请号	CN201410783166.5	申请日	2014-12-17
[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	王玉兰 闫涛 李月云 曹伟 刘振 吴丹 杜斌 魏琴		
发明人	王玉兰 闫涛 李月云 曹伟 刘振 吴丹 杜斌 魏琴		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N27/327		
CPC分类号	G01N27/327 G01N33/531 G01N33/68		
其他公开文献	CN104459157B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于二茂铁-氧化亚铜立方纳米框架标记的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。基于二茂铁功能化的氧化亚铜立方纳米框架具有良好的催化能力，显著提高了免疫传感器的灵敏度，对甲胎蛋白的早期诊断具有重要的意义。