



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104634852 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 21

(21) 申请号 201510063266. 5

(22) 申请日 2015. 02. 06

(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 魏琴 马洪敏 曹伟 罗川南

王晓东 杜斌 庞雪辉 李贺

范大伟 吴丹 胡丽华 张勇

(51) Int. Cl.

G01N 27/48(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102854235 A, 2013. 01. 02, 全文.

CN 104133059 A, 2014. 11. 05, 全文.

CN 104155357 A, 2014. 11. 19, 全文.

US 4746539 A, 1988. 05. 24, 全文.

审查员 郑瑜

权利要求书2页 说明书6页

(54) 发明名称

一种基于金杂化 ZSM-5 分子筛负载电子媒介体构建的三通道生物传感器的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及一种基于金杂化 ZSM-5 分子筛负载电子媒介体构建的三通道生物传感器的制备方法及应用。属于新型功能材料与生物传感检测技术领域。本发明具体是采用金杂化 ZSM-5 分子筛负载电子媒介体标记的电化学免疫传感器, 实现了三个肿瘤标志物抗原的高灵敏同步检测, 对癌症的早期诊断具有重要的意义。

1. 一种基于金杂化 ZSM-5 分子筛负载电子媒介体构建的三通道生物传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)依次用 1.0、0.3、0.05  $\mu\text{m}$  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;

(2)在电极表面滴加 6  $\mu\text{L}$  浓度为 1 ~ 2 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛的水溶液,干燥;

(3)继续将 6  $\mu\text{L}$  浓度为 8 ~ 12  $\mu\text{g/mL}$  的三个肿瘤标志物抗原的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;

(4)用 3  $\mu\text{L}$  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 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中孵化 1 h,清洗干净;

(5)将 6  $\mu\text{L}$  浓度为 0.000003 ~ 18 ng/mL 的一系列不同浓度的三个肿瘤标志物抗原用于和对应的的捕获抗体的特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净;

(6)将 6  $\mu\text{L}$  浓度为 1 ~ 2 mg/mL 分别为金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红、金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝和金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的三种肿瘤标记物的检测抗体溶液滴在电极上,与对应的三种肿瘤标记物抗原进行特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净,于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中储存备用。

2. 如权利要求 1 所述的一种基于金杂化 ZSM-5 分子筛负载电子媒介体构建的三通道生物传感器的制备方法,所述金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红、金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝和金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的三种肿瘤标记物的检测抗体溶液的制备,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 金杂化 ZSM-5 分子筛的制备

取 0.5 ~ 1 g ZSM-5 分子筛溶于 10 ~ 20 mL 无水甲苯中,加入 0.5 ~ 1 mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷,在 70 $^{\circ}\text{C}$  下回流 1.5 h;离心后于 110 $^{\circ}\text{C}$  下干燥 1 h,得到粉末为氨基功能化的 ZSM-5 分子筛,将 50 ~ 100 mg 氨基化 ZSM-5 分子筛溶于 10 mL 超纯水中,在搅拌下缓缓加入到 100 ~ 200 mL 金纳米粒子溶液中,溶液立即变为不透明的深紫色,离心,除去上清液,在 35 $^{\circ}\text{C}$  下真空干燥,得到的紫色固体粉末为金杂化 ZSM-5 分子筛;

(2) 金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红标记的肿瘤标记物的检测抗体的制备

取 1 mL 浓度为 1 ~ 2 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛水溶液与 1 mL 浓度为 10 ~ 20  $\mu\text{g/mL}$  的第一种肿瘤标志物的检测抗体混合,震荡 12 h,离心洗涤后,继续加入 1 mL 浓度为 1 ~ 2 mg/mL 的中性红溶液,继续震荡 12 h,离心洗涤后,将沉淀物重新分散在 1 mL 超纯水中,制得金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红标记的肿瘤标记物的检测抗体溶液,于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中储存备用;

(3) 金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝标记的肿瘤标记物的检测抗体的制备

取 1 mL 浓度为 1 ~ 2 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛水溶液与 1 mL 浓度为 10 ~ 20  $\mu\text{g/mL}$  的第二种肿瘤标志物的检测抗体混合,震荡 12 h,离心洗涤后,继续加入 1 mL 浓度为 1 ~ 2 mg/mL 的甲苯胺蓝溶液,继续震荡 12 h,离心洗涤后,将沉淀物重新分散在 1 mL 超纯水中,制得金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝标记的肿瘤标记物的检测抗体溶液,于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中储存备用;

(4) 金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的肿瘤标记物的检测抗体的制备

取 1 mL 浓度为 1 ~ 2 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛水溶液与 1 mL 浓度为 10 ~ 20  $\mu$ g/mL 的第三个肿瘤标志物的检测抗体混合, 震荡 12 h, 离心洗涤后, 继续加入 1 mL 浓度为 1 ~ 2 mg/mL 的二茂铁甲酸溶液, 继续震荡 12 h, 离心洗涤后, 将沉淀物重新分散在 1 mL 超纯水中, 制得金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的肿瘤标记物的检测抗体溶液, 于 4°C 冰箱中储存备用。

3. 根据权利要求 1 所述的一种基于金杂化 ZSM-5 分子筛负载电子媒介体构建的三通道生物传感器的制备方法, 所述 ZSM-5 分子筛为高硅三维交叉直通道的纳米介孔材料, 交叉孔道直径为 0.9 nm, 粒径为 50~100 nm。

4. 根据权利要求 1 所述的一种基于金杂化 ZSM-5 分子筛负载电子媒介体构建的三通道生物传感器的制备方法, 所述肿瘤标志物抗原选自肺癌肿瘤标志物、胰腺癌肿瘤标志物、乳腺癌肿瘤标志物; 其中, 肺癌肿瘤标志物选自 CEA、SCC、Cyfra21-1、TPA、CA125、CA242、NSE 中的任意三个; 胰腺癌肿瘤标志物选自 CA19-9、CA242、CA724、CA50、CEA、DU-PAN-2、Span-1、IAP 中的任意三个; 乳腺癌肿瘤标志物选自 CA153、CEA、CA549、hCG、降钙素、铁蛋白中的任意三个。

5. 如权利要求 1 所述的制备方法制备的一种三通道生物传感器用于三个肿瘤标志物抗原的检测, 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, 所制备的免疫传感器为工作电极, 在 10 mL 的 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

(2) 选择方波伏安法对三个肿瘤标志物抗原进行检测, 在 -0.8 ~ 0.8 V 下进行扫描, 记录电流变化, 绘制工作曲线;

(3) 将待测样品溶液代替三个肿瘤标志物抗原标准溶液进行检测。

6. 如权利要求 5 所述的用于三个肿瘤标志物抗原的检测, 是指可以同时检测同一类肿瘤标志物中的三个标志物。

## 一种基于金杂化 ZSM-5 分子筛负载电子媒介体构建的三通 道生物传感器的制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明一种基于金杂化 ZSM-5 分子筛负载电子媒介体构建的三通道生物传感器的制备方法及应用。具体是采用金杂化 ZSM-5 分子筛负载电子媒介体做为标记物,制备一种同步检测三个肿瘤标志物抗原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] 肿瘤标志物是肿瘤细胞本身存在或分泌的特异性物质,迄今所知的肿瘤标志物中,绝大多数不但存在于恶性肿瘤中,而且也存在于良性肿瘤、胚胎组织,甚至正常组织中。因此,这些肿瘤标志物并非恶性肿瘤的特异性产物,但在恶性肿瘤患者中明显增多。肿瘤的预防、诊断和治疗是目前医学领域研究的重大课题。电化学免疫传感器具有选择性好,灵敏度高,检测限低,适合联机化,操作简便等优点,可实现在线电化学检测,样品预处理简单或不需预处理,检测不受样品物理性质的影响,所需仪器设备相对简单,具有简便、快速、体积小等特点,目前已经广泛应用于肿瘤标志物的检测。因此本发明制备了一种基于金杂化的 ZSM-5 分子筛标记的三通道电化学免疫传感器,实现了对三个肿瘤标志物抗原的同步检测。首先, ZSM-5 分子筛具有大的比表面积和良好的吸附性能,能够负载大量的电子媒介体;其次,金杂化的 ZSM-5 分子筛具有良好的生物相容性,能够和检测抗体有效键合;最后,中性红、甲苯胺蓝和二茂铁甲酸能够在电极表面发生氧化还原作用,产生具有不同峰位的峰电流,分别为三个肿瘤标志物抗原提供电化学信号。该方法具有成本低、灵敏度高、特异性好、快速同步检测等优点,而且制备过程较为简单,为癌症的有效预警提供了新方法。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的之一是基于金杂化 ZSM-5 分子筛负载电子媒介体,构建了一种无酶、快速且超灵敏的双通道夹心型电化学免疫传感器。

[0004] 本发明的目的之二是将该三通道夹心型电化学免疫传感器应用于三个肿瘤标志物的检测。

[0005] 本发明的技术方案如下:

[0006] 1. 一种基于金杂化 ZSM-5 分子筛负载电子媒介体构建的三通道生物传感器的制备方法

[0007] (1)依次用 1.0、0.3、0.05  $\mu\text{m}$  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;

[0008] (2)在电极表面滴加 6  $\mu\text{L}$  浓度为 1 ~ 2  $\text{mg/mL}$  的金杂化 ZSM-5 分子筛的水溶液,干燥;

[0009] (3)继续将 6  $\mu\text{L}$  浓度为 8 ~ 12  $\mu\text{g/mL}$  的三个肿瘤标志物抗原的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;

[0010] (4)用 3  $\mu\text{L}$  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 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中孵化 1 h,清洗干净;

[0011] (5)将 6  $\mu\text{L}$  浓度为 0.000003 ~ 18 ng/mL 的一系列不同浓度的三个肿瘤标志物抗原用于和对应的的捕获抗体的特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净;

[0012] (6)将 6  $\mu\text{L}$  浓度为 1 ~ 2 mg/mL 分别为金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红、金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝和金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的三个肿瘤标记物的检测抗体溶液滴在电极上,与对应的三个肿瘤标记物抗原进行特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净,于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中储存备用。

[0013] 2. 金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红、金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝和金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的三个肿瘤标记物的检测抗体溶液的制备

[0014] (1)金杂化 ZSM-5 分子筛的制备

[0015] 取 0.5 ~ 1 g ZSM-5 分子筛溶于 10 ~ 20 mL 无水甲苯中,加入 0.5 ~ 1 mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷,在 70 $^{\circ}\text{C}$  下回流 1.5 h。离心后于 110 $^{\circ}\text{C}$  下干燥 1 h,得到粉末为氨基功能化的 ZSM-5 分子筛,将 50 ~ 100 mg 氨基化 ZSM-5 分子筛溶于 10 mL 超纯水中,在搅拌下缓缓加入到 100 ~ 200 mL 金纳米粒子溶液中,溶液立即变为不透明的深紫色,离心,除去上清液,在 35 $^{\circ}\text{C}$  下真空干燥,得到的紫色固体粉末为金杂化 ZSM-5 分子筛;

[0016] (2)金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红标记的肿瘤标记物的检测抗体的制备

[0017] 取 1 mL 浓度为 1 ~ 2 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛水溶液与 1 mL 浓度为 10 ~ 20  $\mu\text{g/mL}$  的第一种肿瘤标志物的检测抗体混合,震荡 12 h,离心洗涤后,继续加入 1 mL 浓度为 1 ~ 2 mg/mL 的中性红溶液,继续震荡 12 h,离心洗涤后,将沉淀物重新分散在 1 mL 超纯水中,制得金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红标记的肿瘤标记物的检测抗体溶液,于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中储存备用;

[0018] (3)金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝标记的肿瘤标记物的检测抗体的制备

[0019] 取 1 mL 浓度为 1 ~ 2 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛水溶液与 1 mL 浓度为 10 ~ 20  $\mu\text{g/mL}$  的第二种肿瘤标志物的检测抗体混合,震荡 12 h,离心洗涤后,继续加入 1 mL 浓度为 1 ~ 2 mg/mL 的甲苯胺蓝溶液,继续震荡 12 h,离心洗涤后,将沉淀物重新分散在 1 mL 超纯水中,制得金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝标记的肿瘤标记物的检测抗体溶液,于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中储存备用;

[0020] (4)金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的肿瘤标记物的检测抗体的制备

[0021] 取 1 mL 浓度为 1 ~ 2 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛水溶液与 1 mL 浓度为 10 ~ 20  $\mu\text{g/mL}$  的第三个肿瘤标志物的检测抗体混合,震荡 12 h,离心洗涤后,继续加入 1 mL 浓度为 1 ~ 2 mg/mL 的二茂铁甲酸溶液,继续震荡 12 h,离心洗涤后,将沉淀物重新分散在 1 mL 超纯水中,制得金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的肿瘤标记物的检测抗体溶液,于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中储存备用。

[0022] 3. 三个肿瘤标志物抗原的检测方法

[0023] (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 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

[0024] (2)选择方波伏安法对三个肿瘤标志物抗原进行检测,在 -0.8 ~ 0.8 V 下进行扫

描,记录电流变化,绘制工作曲线;

[0025] (3) 将待测样品溶液代替三个肿瘤标志物抗原标准溶液进行检测。

[0026] 4. 上述所述 ZSM-5 分子筛为高硅三维交叉直通道的纳米介孔材料,交叉孔道直径为 0.9 nm,粒径为 50~100nm。

[0027] 5. 上述所述肿瘤标志物抗原选自肺癌肿瘤标志物、胰腺癌肿瘤标志物、乳腺癌肿瘤标志物;其中,肺癌肿瘤标志物选自 CEA、SCC、Cyfra21-1、TPA、CA125、CA242、NSE 中的任意三个;胰腺癌肿瘤标志物选自 CA19-9、CA242、CA724、CA50、CEA、DU-PAN-2、Span-1、IAP 中的任意三个;乳腺癌肿瘤标志物选自 CA153、CEA、CA549、hCG、降钙素、铁蛋白中的任意三个。

[0028] 6. 所述的用于三个肿瘤标志物抗原的检测,是指可以同时检测同一类肿瘤标志物中的任意三个标志物。

[0029] 本发明的有益成果

[0030] (1) 本发明所采用的 ZSM-5 分子筛比表面积大,能够负载大量的金纳米粒子,有利于抗体的固定。

[0031] (2) 本发明所采用的 ZSM-5 分子筛的孔道结构独特,孔口较多,孔道较短,可以稳定电子媒介体的负载。

[0032] (3) 本发明制备出具有良好吸附性能的金杂化 ZSM-5 分子筛来负载电子媒介体,实现了对三个肿瘤标志物抗原的同步检测。

[0033] (4) 本发明制备的夹心电化学免疫的检测限低,线性范围宽,可以实现简单、快速、灵敏和特异性检测,本发明用于检测三个肿瘤标志物的线性范围为 0.000003 ~ 18 ng/mL,检测限达到 0.15 fg/mL。

## 具体实施方式

[0034] 实施例 1 一种基于金杂化 ZSM-5 分子筛负载电子媒介体构建的三通道生物传感器的制备方法

[0035] (1) 依次用 1.0、0.3、0.05  $\mu\text{m}$  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;

[0036] (2) 在电极表面滴加 6  $\mu\text{L}$  浓度为 1 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛的水溶液,干燥;

[0037] (3) 继续将 6  $\mu\text{L}$  浓度为 8  $\mu\text{g/mL}$  的三个肿瘤标志物抗原的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;

[0038] (4) 用 3  $\mu\text{L}$  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;

[0039] (5) 将 6  $\mu\text{L}$  浓度为 0.000003 ~ 18 ng/mL 的一系列不同浓度的三个肿瘤标志物抗原用于和对应的的捕获抗体的特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净;

[0040] (6) 将 6  $\mu\text{L}$  浓度为 1 mg/mL 分别为金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红、金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝和金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的三个肿瘤标记物的检测抗体溶液滴在电极上,与对应的三个肿瘤标记物抗原进行特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净,于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中储存备用。

[0041] 实施例 2 一种基于金杂化 ZSM-5 分子筛负载电子媒介体构建的三通道生物传感器的制备方法

[0042] (1)依次用 1.0、0.3、0.05  $\mu\text{m}$  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;

[0043] (2)在电极表面滴加 6  $\mu\text{L}$  浓度为 1.5 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛的水溶液,干燥;

[0044] (3)继续将 6  $\mu\text{L}$  浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  的三个肿瘤标志物抗原的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;

[0045] (4)用 3  $\mu\text{L}$  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;

[0046] (5)将 6  $\mu\text{L}$  浓度为 0.000003 ~ 18 ng/mL 的一系列不同浓度的三个肿瘤标志物抗原用于和对应的的捕获抗体的特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净;

[0047] (6)将 6  $\mu\text{L}$  浓度为 1.5 mg/mL 分别为金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红、金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝和金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的三个肿瘤标记物的检测抗体溶液滴在电极上,与对应的三个肿瘤标记物抗原进行特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净,于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中储存备用。

[0048] 实施例 3 一种基于金杂化 ZSM-5 分子筛负载电子媒介体构建的三通道生物传感器的制备方法

[0049] (1)依次用 1.0、0.3、0.05  $\mu\text{m}$  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;

[0050] (2)在电极表面滴加 6  $\mu\text{L}$  浓度为 2 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛的水溶液,干燥;

[0051] (3)继续将 6  $\mu\text{L}$  浓度为 12  $\mu\text{g/mL}$  的三个肿瘤标志物抗原的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;

[0052] (4)用 3  $\mu\text{L}$  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;

[0053] (5)将 6  $\mu\text{L}$  浓度为 0.000003 ~ 18 ng/mL 的一系列不同浓度的三个肿瘤标志物抗原用于和对应的的捕获抗体的特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净;

[0054] (6)将 6  $\mu\text{L}$  浓度为 2 mg/mL 分别为金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红、金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝和金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的三个肿瘤标记物的检测抗体溶液滴在电极上,与对应的三个肿瘤标记物抗原进行特异性识别,室温下孵化 1 h,清洗干净,于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中储存备用。

[0055] 实施例 4 金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红、金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝和金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的三个肿瘤标记物的检测抗体溶液的制备

[0056] (1)金杂化 ZSM-5 分子筛的制备

[0057] 取 0.5 g ZSM-5 分子筛溶于 10 mL 无水甲苯中,加入 0.5 mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷,在 70 $^{\circ}\text{C}$  下回流 1.5 h。离心后于 110 $^{\circ}\text{C}$  下干燥 1 h,得到粉末为氨基功能化的 ZSM-5 分子筛,将 50 mg 氨基化 ZSM-5 分子筛溶于 10 mL 超纯水中,在搅拌下缓缓加入到 100 mL 金纳米粒子溶液中,溶液立即变为不透明的深紫色,离心,除去上清液,在 35 $^{\circ}\text{C}$  下真空干燥,得

到的紫色固体粉末为金杂化 ZSM-5 分子筛；

[0058] (2) 金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红标记的肿瘤标记物的检测抗体的制备

[0059] 取 1 mL 浓度为 1 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛水溶液与 1 mL 浓度为 10  $\mu$ g/mL 的第一种肿瘤标志物的检测抗体混合, 震荡 12 h, 离心洗涤后, 继续加入 1 mL 浓度为 1 mg/mL 的中性红溶液, 继续震荡 12 h, 离心洗涤后, 将沉淀物重新分散在 1 mL 超纯水中, 制得金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红标记的肿瘤标记物的检测抗体溶液, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中储存备用；

[0060] (3) 金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝标记的肿瘤标记物的检测抗体的制备

[0061] 取 1 mL 浓度为 1 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛水溶液与 1 mL 浓度为 10  $\mu$ g/mL 的第二种肿瘤标志物的检测抗体混合, 震荡 12 h, 离心洗涤后, 继续加入 1 mL 浓度为 1 mg/mL 的甲苯胺蓝溶液, 继续震荡 12 h, 离心洗涤后, 将沉淀物重新分散在 1 mL 超纯水中, 制得金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝标记的肿瘤标记物的检测抗体溶液, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中储存备用；

[0062] (4) 金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的肿瘤标记物的检测抗体的制备

[0063] 取 1 mL 浓度为 1 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛水溶液与 1 mL 浓度为 10  $\mu$ g/mL 的第三个肿瘤标志物的检测抗体混合, 震荡 12 h, 离心洗涤后, 继续加入 1 mL 浓度为 1 mg/mL 的二茂铁甲酸溶液, 继续震荡 12 h, 离心洗涤后, 将沉淀物重新分散在 1 mL 超纯水中, 制得金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的肿瘤标记物的检测抗体溶液, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中储存备用。

[0064] 实施例 5 金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红、金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝和金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的三个肿瘤标记物的检测抗体溶液的制备

[0065] (1) 金杂化 ZSM-5 分子筛的制备

[0066] 取 0.75 g ZSM-5 分子筛溶于 15 mL 无水甲苯中, 加入 0.75 mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷, 在 70 $^{\circ}$ C 下回流 1.5 h。离心后于 110 $^{\circ}$ C 下干燥 1 h, 得到粉末为氨基功能化的 ZSM-5 分子筛, 将 75 mg 氨基化 ZSM-5 分子筛溶于 10 mL 超纯水中, 在搅拌下缓缓加入到 150 mL 金纳米粒子溶液中, 溶液立即变为不透明的深紫色, 离心, 除去上清液, 在 35 $^{\circ}$ C 下真空干燥, 得到的紫色固体粉末为金杂化 ZSM-5 分子筛；

[0067] (2) 金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红标记的肿瘤标记物的检测抗体的制备

[0068] 取 1 mL 浓度为 1.5 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛水溶液与 1 mL 浓度为 15  $\mu$ g/mL 的第一种肿瘤标志物的检测抗体混合, 震荡 12 h, 离心洗涤后, 继续加入 1 mL 浓度为 1.5 mg/mL 的中性红溶液, 继续震荡 12 h, 离心洗涤后, 将沉淀物重新分散在 1 mL 超纯水中, 制得金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红标记的肿瘤标记物的检测抗体溶液, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中储存备用；

[0069] (3) 金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝标记的肿瘤标记物的检测抗体的制备

[0070] 取 1 mL 浓度为 1.5 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛水溶液与 1 mL 浓度为 15  $\mu$ g/mL 的第二种肿瘤标志物的检测抗体混合, 震荡 12 h, 离心洗涤后, 继续加入 1 mL 浓度为 1.5 mg/mL 的甲苯胺蓝溶液, 继续震荡 12 h, 离心洗涤后, 将沉淀物重新分散在 1 mL 超纯水中, 制得金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝标记的肿瘤标记物的检测抗体溶液, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中储存备用；

[0071] (4) 金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的肿瘤标记物的检测抗体的制备

[0072] 取 1 mL 浓度为 1.5 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛水溶液与 1 mL 浓度为 15  $\mu$ g/mL 的第三个肿瘤标志物的检测抗体混合, 震荡 12 h, 离心洗涤后, 继续加入 1 mL 浓度为 1.5 mg/mL 的二茂铁甲酸溶液, 继续震荡 12 h, 离心洗涤后, 将沉淀物重新分散在 1 mL 超纯水中, 制得金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的肿瘤标记物的检测抗体溶液, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中储存备用。

[0073] 实施例 6 金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红、金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝和金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的三个肿瘤标记物的检测抗体溶液的制备

[0074] (1) 金杂化 ZSM-5 分子筛的制备

[0075] 取 0.5 ~ 1 g ZSM-5 分子筛溶于 20 mL 无水甲苯中, 加入 1 mL 3-氨基三乙氧基硅烷, 在 70 $^{\circ}$ C 下回流 1.5 h。离心后于 110 $^{\circ}$ C 下干燥 1 h, 得到粉末为氨基功能化的 ZSM-5 分子筛, 将 100 mg 氨基化 ZSM-5 分子筛溶于 10 mL 超纯水中, 在搅拌下缓缓加入到 200 mL 金纳米粒子溶液中, 溶液立即变为不透明的深紫色, 离心, 除去上清液, 在 35 $^{\circ}$ C 下真空干燥, 得到的紫色固体粉末为金杂化 ZSM-5 分子筛;

[0076] (2) 金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红标记的肿瘤标记物的检测抗体的制备

[0077] 取 1 mL 浓度为 2 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛水溶液与 1 mL 浓度为 20  $\mu$ g/mL 的第一种肿瘤标志物的检测抗体混合, 震荡 12 h, 离心洗涤后, 继续加入 1 mL 浓度为 2 mg/mL 的中性红溶液, 继续震荡 12 h, 离心洗涤后, 将沉淀物重新分散在 1 mL 超纯水中, 制得金杂化 ZSM-5 分子筛负载中性红标记的肿瘤标记物的检测抗体溶液, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中储存备用;

[0078] (3) 金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝标记的肿瘤标记物的检测抗体的制备

[0079] 取 1 mL 浓度为 2 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛水溶液与 1 mL 浓度为 20  $\mu$ g/mL 的第二种肿瘤标志物的检测抗体混合, 震荡 12 h, 离心洗涤后, 继续加入 1 mL 浓度为 2 mg/mL 的甲苯胺蓝溶液, 继续震荡 12 h, 离心洗涤后, 将沉淀物重新分散在 1 mL 超纯水中, 制得金杂化 ZSM-5 分子筛负载甲苯胺蓝标记的肿瘤标记物的检测抗体溶液, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中储存备用;

[0080] (4) 金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的肿瘤标记物的检测抗体的制备

[0081] 取 1 mL 浓度为 2 mg/mL 的金杂化 ZSM-5 分子筛水溶液与 1 mL 浓度为 20  $\mu$ g/mL 的第三个肿瘤标志物的检测抗体混合, 震荡 12 h, 离心洗涤后, 继续加入 1 mL 浓度为 2 mg/mL 的二茂铁甲酸溶液, 继续震荡 12 h, 离心洗涤后, 将沉淀物重新分散在 1 mL 超纯水中, 制得金杂化 ZSM-5 分子筛负载二茂铁甲酸标记的肿瘤标记物的检测抗体溶液, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中储存备用。

[0082] 实施例 7 肺癌肿瘤标志物 CEA、SCC 和 CA125 的检测方法

[0083] (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 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中进行测试;

[0084] (2) 选择方波伏安法对 CEA、SCC 和 CA125 进行检测, 在 -0.8 ~ 0.8 V 下进行扫描, 记录电流变化, 绘制工作曲线;

[0085] (3) 将待测样品溶液代替 CEA、SCC 和 CA125 标准溶液进行检测。

[0086] (4) 该双通道电化学免疫传感器对 CEA、SCC 和 CA125 的检测线性范围均为 0.000003 ~ 18 ng/mL, 检测限达到 0.15 fg/mL。

专利名称(译)	一种基于金杂化ZSM-5分子筛负载电子媒介体构建的三通道生物传感器的制备方法及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN104634852B</a>	公开(公告)日	2015-10-21
申请号	CN201510063266.5	申请日	2015-02-06
[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	魏琴 马洪敏 曹伟 罗川南 王晓东 杜斌 庞雪辉 李贺 范大伟 吴丹 胡丽华 张勇		
发明人	魏琴 马洪敏 曹伟 罗川南 王晓东 杜斌 庞雪辉 李贺 范大伟 吴丹 胡丽华 张勇		
IPC分类号	G01N27/48 G01N33/574 G01N33/531		
审查员(译)	郑瑜		
其他公开文献	CN104634852A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种基于金杂化ZSM-5分子筛负载电子媒介体构建的三通道生物传感器的制备方法及应用。属于新型功能材料与生物传感检测技术领域。本发明具体是采用金杂化ZSM-5分子筛负载电子媒介体标记的电化学免疫传感器，实现了三个肿瘤标志物抗原的高灵敏同步检测，对癌症的早期诊断具有重要的意义。

