



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102662049 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 12

(21) 申请号 201210138986. X

(22) 申请日 2012. 05. 07

(71) 申请人 清华大学

地址 100084 北京市海淀区 100084 信箱 82  
分箱清华大学专利办公室

(72) 发明人 林金明 林珍 周云 张炜奋

(74) 专利代理机构 北京丰宏知识产权代理有限公司 11372

代理人 吴大建 欧颖

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

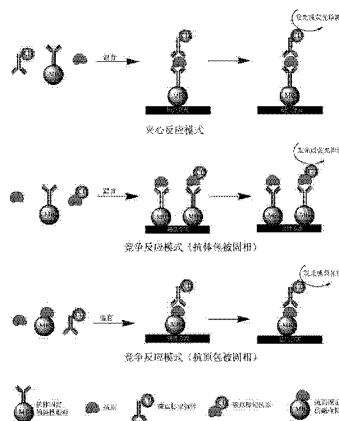
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 3 页

## (54) 发明名称

基于碳纳米材料的免疫分析方法

## (57) 摘要

本发明提供一种基于碳纳米材料(碳点)的免疫检测方法,包括如下步骤:步骤A,制备碳点并在碳点的表面标记免疫试剂抗原或抗体,使之成为免疫试剂标记碳点;步骤B,将免疫试剂标记碳点、待测样本、以及免疫试剂抗原或抗体包被的固相物质混合完成免疫反应形成免疫复合物;将所述免疫复合物与游离免疫试剂进行分离;和步骤C,对所述免疫复合物加入氧化剂进行化学发光检测,和/或对其直接进行荧光检测。在本发明中,利用该碳纳米材料可进行化学发光和荧光两种免疫检测,其光学稳定性好。



1. 一种基于碳纳米材料的免疫分析方法,其中,所述碳纳米材料又称为碳点,所述方法包括如下步骤:

步骤 A,制备碳点并在碳点的表面标记免疫试剂抗原或抗体,使之成为免疫试剂标记碳点;

步骤 B,将免疫试剂标记碳点、待测样本、以及免疫试剂抗原或抗体包被的固相物质混合完成免疫反应形成免疫复合物;将所述免疫复合物与游离免疫试剂进行分离;

步骤 C,对所述免疫复合物加入氧化剂进行化学发光检测,和/或对其直接进行荧光检测。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述碳点为以 PEG1500、甘油和丝氨酸混合制备得到,碳点制备方法为微波合成法或水热合成法。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,所述碳点粒径为 3~4nm,其表面带有羧基和羟基基团。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 A 中碳点与免疫试剂抗原或抗体的结合为化学键直接结合或生物方法间接键合。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 B 中固相物质为磁性颗粒、聚合物微球、玻璃微珠和 96 孔微板中的一种或多种。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 B 中待测样本为小分子目标物或者大分子目标物。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,根据待测样本的特点,选择所述步骤 B 中免疫反应的模式为夹心反应模式或竞争反应模式。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述步骤 B 中夹心反应模式免疫反应的完成采取如下两种方式之一:即待测样本、免疫试剂包被的固相物质混合发生免疫反应形成一种免疫复合物,再与免疫试剂标记碳点混合形成免疫复合物;或者免疫试剂标记碳点、待测样本、以及免疫试剂包被的固相物质三者混合发生免疫反应形成免疫复合物。

9. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 C 中所述化学发光检测为氧化剂与碳点产生化学发光后,由光电倍增管对产生的化学发光强度进行采集记录;所述荧光检测为使用荧光分光光度计对碳点的荧光强度进行检测。

10. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,在步骤 A 中用磷酸盐缓冲液洗涤和/或保存所述免疫试剂标记碳点,在步骤 B 中用磷酸盐缓冲液洗涤所述免疫复合物;所述磷酸盐缓冲液由磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠和氯化钾溶液组成;步骤 C 中所述氧化剂为高锰酸钾、硫酸铈、高碘酸钾和铁氰化钾中的一种或多种。

## 基于碳纳米材料的免疫分析方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测和分析领域,具体涉及一种基于碳纳米材料(碳点)的免疫分析方法。

### 背景技术

[0002] 免疫分析因其独有的特异性,在临床诊断和环境检测等方面得到广泛利用。在免疫分析诸多的检测方法中,化学发光检测方法因其灵敏度高、线性范围宽、仪器简单、分析快速和自动化程度高等优点得到重视。目前常用的化学发光免疫分析的常用标记可以分为三类。其一,化学发光物质直接标记。该类物质主要有酰肼类化合物(例如鲁米诺,异鲁米诺及其衍生物)、吖啶酯及其衍生物、和咪唑类化合物。鲁米诺及其衍生物必须在适当的催化剂存在下才可以观测其化学发光反应。吖啶酯及其衍生物在双氧水的引发下可直接完成瞬时光发;但吖啶酯的稳定性及吖啶酯衍生物的制备是限制该标记物广泛应用的因素。其二,使用酶对免疫试剂进行标记。因以酶所用底物作为发光剂,故可将其归类于化学发光免疫分析。目前常用的酶标记物有辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶和葡萄糖氧化酶等。在免疫试剂的标记和保存过程中需考虑酶活性保持等问题。其三,纳米材料标志物。纳米材料是指三位空间尺寸中至少有一维处于纳米数量级的材料。因其尺寸处于纳米级别,使其具有特殊的光电性质。在免疫分析中,常用的纳米材料标记物有金属纳米粒子、CdTe 和 CdSe 等半导体量子点、荧光二氧化硅纳米球、和纳米稀土荧光配合物材料等。卢建忠研究小组使用纳米金作为标记物,在免疫反应之后用溴水等氧化物物质将其氧化成三价金离子,利用其对鲁米诺发光体系的催化作用进行检测 [A. P. Fan et al., Anal. Chem., 2005, 77:3238]。李等利用硝酸和盐酸将金纳米离子溶解后,用于发光体系 [Z. P. Li et al., Anal. Chim. Acta, 2005, 551:85];方法需要引进毒性较大或氧化性的物质,不是最为理想的。CdTe 和 CdSe 等半导体量子点虽具有传统荧光染料试剂不具备的特点,诸如光稳定性好,发光强度高,激发光谱宽,发光光谱狭窄以及荧光寿命长等的优点,但是大多数光学性能好的量子点均含有重金属物质,存在一定的生物毒害性,其真正的应用还有很多问题需要解决。因此在化学发光免疫分析中,光学性能优异,且稳定好,无毒害作用的标记物的开发具有极其重要的意义。碳点是一类生物兼容性好,且光学性能优异的碳纳米材料。碳点在免疫分析中的应用很少;目前仅有将其作为抗体载体,用于电化学免疫分析的报道 [D. Du et al., Anal. Chem., 2010, 82:2989] [R. J. Cui et al., Adv. Funct. Mater. 2008, 18:2197]。其优异的光学性能尚未在免疫分析中得到应用。

### 发明内容

[0003] 本发明中,发明人合成一种具备荧光性质且光学性能稳定的碳纳米材料粒子。当其与一些氧化试剂共存时候,可以观察到很强的化学发光。通过红外表征,该材料表面具备丰富的羧基和羟基官能团,证实该材料具有很好的生物标记前景。在对该材料进行免疫试剂标记之后,利用其可以建立高灵敏且安全无毒的免疫分析方法。

[0004] 本发明提供一种基于碳纳米材料(碳点)的免疫分析方法,包括如下步骤:步骤A,制备碳点并在碳点的表面标记免疫试剂抗原或抗体,使之成为免疫试剂标记碳点;步骤B,将免疫试剂标记碳点、待测样本、以及免疫试剂抗原或抗体包被的固相物质混合完成免疫反应形成免疫复合物;将所述免疫复合物与游离免疫试剂进行分离;和步骤C,对所述免疫复合物加入氧化剂进行化学发光检测,和/或对其直接进行荧光检测。

[0005] 依据本发明,优选所述碳点为以 PEG1500、甘油和丝氨酸混合制备得到。合成本发明中碳纳米材料的途径有两种。第一种,微波加热法合成:利用微波加热的方式将 PEG1500 和甘油先混合,在微波加热下形成透明黏稠状液体,而后加入碳源丝氨酸,利用微波对碳源进一步加热,使得试剂之间互相交联形成碳点(碳纳米材料);第二种,水热法合成法:将 PEG1500、甘油和丝氨酸放入反应釜中,密封反应釜后于 250℃ 加热 3 小时即得。本发明中,所述碳点粒径优选为 3~4nm,其表面带有羧基和羟基基团。3-4nm 的碳点在免疫试剂上的标记对免疫试剂生物活性影响较小,且碳点材料原料无毒、环保。

[0006] 在本发明中,所述步骤 A 中碳点与免疫试剂抗原或抗体的结合为化学键直接结合或生物方法间接键合。所述化学键直接结合,即碳点通过化学共价键直接和免疫试剂(特异性抗原或抗体)相连,因在碳纳米材料上有丰富的羧基基团,则如利用 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)及其水溶性同系物 Sulfo-NHS 与缩合剂如 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与碳纳米材料表面的羧基混合后反应生成具有氨基反应活性的 NHS 活泼酯,而后将其与免疫试剂上的氨基进行结合,实现碳纳米材料的免疫试剂标记。所述生物方法间接键合,即通过间接方式将碳点与免疫试剂偶联,具体使用如生物素-亲和素方式、互补 DNA 之间的相互作用方式等方式。例如,将免疫试剂进行生物素化,而碳纳米材料与亲和素结合,通过生物素-亲和素之间特异性以及强作用力,将免疫试剂与碳纳米材料相连。

[0007] 优选所述步骤 B 中固相物质为磁性颗粒、聚合物微球、玻璃微珠和 96 孔微板中的一种或多种。

[0008] 在本发明中,所述步骤 B 中待测样本优选为小分子目标物或者大分子目标物;具体为小分子抗体、抗原,或为大分子抗体、抗原。且可根据待测样本的特点,选择所述步骤 B 中免疫反应的模式为夹心反应模式或竞争反应模式。在所述夹心反应模式中,其免疫反应的完成采取如下两种方式之一:即待测样本、免疫试剂包被的固相物质混合发生免疫反应形成一种免疫复合物,再与免疫试剂标记碳点混合形成免疫复合物(两步法);或者免疫试剂标记碳点、待测样本、以及免疫试剂包被的固相物质三者混合发生免疫反应形成免疫复合物(一步法)。

[0009] 本发明中,优选步骤 C 中所述化学发光检测为氧化剂与碳点产生化学发光后,由光电倍增管对产生的化学发光强度进行采集记录;所述荧光检测为使用荧光分光光度计对碳点的荧光强度进行检测。

[0010] 优选本发明的步骤 A 中用磷酸盐缓冲液洗涤和/或保存所述免疫试剂标记碳点,在步骤 B 中用磷酸盐缓冲液洗涤所述免疫复合物;所述磷酸盐缓冲液由磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠和氯化钾溶液组成;步骤 C 中所述氧化剂为高锰酸钾、硫酸铈、高碘酸钾和铁氰化钾中的一种或多种。

[0011] 在本发明中,利用该碳纳米材料可进行化学发光和荧光两种免疫检测,其光学稳定性好。在化学发光免疫检测中,直接加入单一的氧化物质如硫酸铈、高锰酸钾或铁氰化钾

等强氧化剂便能引发化学发光反应；避免传统方法中复杂的化学发光底物的制备和保存问题。

#### 附图说明

- [0012] 图 1 是碳纳米材料的荧光光谱图；
- [0013] 图 2 是碳纳米材料的红外表征图；
- [0014] 图 3 是免疫反应的模式图(上为双抗体夹心模式,下为竞争法模式)；
- [0015] 图 4 是免疫检测 IgG 时化学发光强度与荧光强度随 IgG 浓度变化图。

#### 具体实施方式

[0016] 以下实施方式仅为本发明的优选实施例,不能以此限制本发明的范围。

[0017] 实施例 1

[0018] 一、荧光碳纳米材料的合成

[0019] 微波加热法合成荧光碳纳米材料:将 1.0g PEG1500 和 15mL 甘油混合,微波加热 1 分钟后形成透明黏稠状液体,而后加入 0.5g 丝氨酸作碳源,利用微波对该混合物加热 10 分钟,试剂之间互相交联形成碳点;通过透析除去杂质后,将碳点存储于 4℃ 冰箱,或将碳点旋转蒸干后保存。

[0020] 水热法合成荧光碳纳米材料:将 1.0g PEG1500、15mL 甘油和 0.5g 丝氨酸混于反应釜中,密封后于 250℃ 加热 3 小时;待其恢复至室温,通过透析除去杂质后,将碳点存储于 4℃ 冰箱。

[0021] 不管是以微波加热法还是水热法合成的荧光碳纳米材料,其碳点性质相同;图 1 为碳点的荧光光谱图,从左至右激发波长由 260nm 开始,依次递增 20nm;从图可见,碳点具有强荧光发射峰且发射峰的位置与其激发波长有光。图 2 为碳点的红外光谱表征图;从图中可知碳点表面含有丰富的羟基和羧基结构,这非常有利于碳点与生物物质的结合。

[0022] 二、碳点在羊抗人 IgG 上的标记

[0023] 取 5mg 碳点将其溶于 1mL 0.01M 磷酸盐缓冲液中,加入 0.4mg 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 0.6mg 的 N-羟基琥珀酰亚胺,室温反应 15 分钟;再加入 1.4 μL 2-巯基乙醇淬灭 EDC;在反应液中加入 1mg 羊抗人 IgG,室温反应 2 小时;然后用 0.01M 赖氨酸封闭碳点上多余的氨基结合位点以减小非特异吸附。将上述溶液转移至透析袋中透析过夜后,于磷酸盐缓冲液中密封保存。

[0024] 三、磁性微粒子与抗体的结合

[0025] 取 1mL 羧基修饰的磁性微粒子(5mg/mL),将其置于 0.01M 磷酸盐缓冲液中,加入 0.4mg EDC 和 0.6mg NHS,室温反应 15 分钟;再加入 1.4 μL 2-巯基乙醇淬灭 EDC;在反应液中加入 1mg 兔抗人 IgG,室温反应 2 小时;然后用 0.01M 赖氨酸封闭碳点上多余的氨基结合位点以减小非特异吸附;最后通过磁性分离将与磁性微粒子结合的抗体与未结合的抗体相分离。

[0026] 四、夹心反应模式的免疫反应及其免疫检测

[0027] 在此实施例中,待测样本为人 IgG。

[0028] 该免疫分析方法(免疫反应)可使用一步法和两步法。一步法:将 IgG 抗原、碳点

标记羊抗人 IgG 和磁性微粒子标记的兔抗人 IgG 进行混合,在 37℃ 下反应 1 小时形成免疫复合物;利用磁性微粒子的磁性将形成的免疫复合物与游离的免疫试剂相分离;加入氧化试剂硫酸铈或高锰酸钾,使其与碳点作用发生化学发光反应,使用 BPCL 超微弱化学发光检测仪对该体系产生的光学信号进行采集。或者采用荧光分光光度计,对免疫复合物上碳点的荧光强度进行定量。从图 4 可见,化学发光检测和荧光检测均能准确地检出碳点信号。

[0029] 两步法:将 IgG 抗原和磁性微粒子标记的兔抗人 IgG 进行混合,在 37℃ 下反应 1 小时形成免疫复合物;利用磁性微粒子的磁性将形成的免疫复合物与游离的免疫试剂相分离;在上述复合物中加入碳点标记羊抗人 IgG,使之形成磁颗粒兔抗人 IgG- 人 IgG- 碳点标记羊抗人 IgG 免疫复合物,于 37℃ 反应 1 小时后,利用磁性分离出免疫复合物;加入氧化试剂硫酸铈或高锰酸钾,使其与碳点作用发生化学发光反应,使用 BPCL 超微弱化学发光检测仪对该体系产生的光学信号进行采集。或者采用荧光分光光度计,对免疫复合物上碳点的荧光强度进行定量。

[0030] 上述方法中,不论使用一步法还是两步法,均能顺利实现本发明的免疫分析目的。

[0031] 需要说明的是,在本发明中,待测样本可以为抗原或抗体。图 3 反应模式中的待测样本均显示为抗原形式,实质上该待测样本本身可以是一种抗体,如本实施例中“人 IgG”本身是一种抗体,在此例和此图中却显示为待测样本抗原并作为抗原使用;相应的“羊抗人 IgG”即为其抗原“人 IgG”的抗体。

[0032] 实施例 2

[0033] 竞争反应模式的免疫反应及其免疫检测:

[0034] 在此实施例中,待测样本为疾病标志物。具体为大分子疾病标志物如肿瘤标志物 CA153、CEA 和 AFP 等,或为小分子化合物如三碘甲腺原氨酸、雌二醇和雌三醇等。

[0035] 首先使用如实施例 1 中步骤三相似的方法将抗小分子抗体(如抗三碘甲腺原氨酸抗体)与磁性颗粒结合;然后使用如实施例 1 中步骤二相似的方法将小分子标准物质三碘甲腺原氨酸进行碳点标记;再将抗体磁颗粒复合物、该碳点标记三碘甲腺原氨酸(免疫碳点)、以及待测样本溶液加入反应器内进行竞争反应 1 小时后形成免疫复合物,利用磁性分离器分离出免疫复合物。加入氧化试剂硫酸铈或高锰酸钾,使其与碳点作用发生化学发光反应,使用 BPCL 超微弱化学发光检测仪对该体系产生的光学信号进行采集。或者采用荧光分光光度计,对免疫复合物上碳点的荧光强度进行定量。

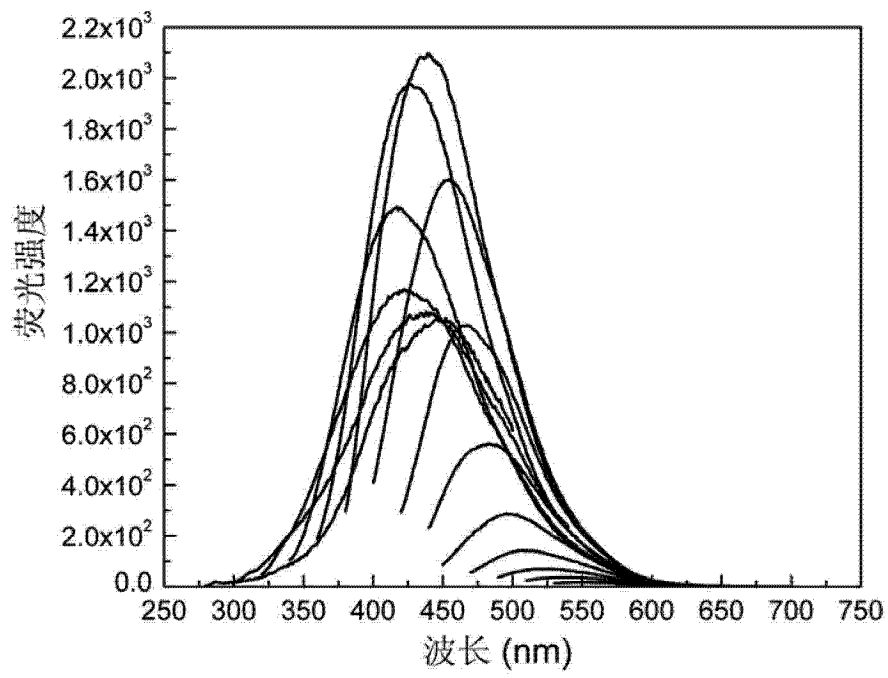


图 1

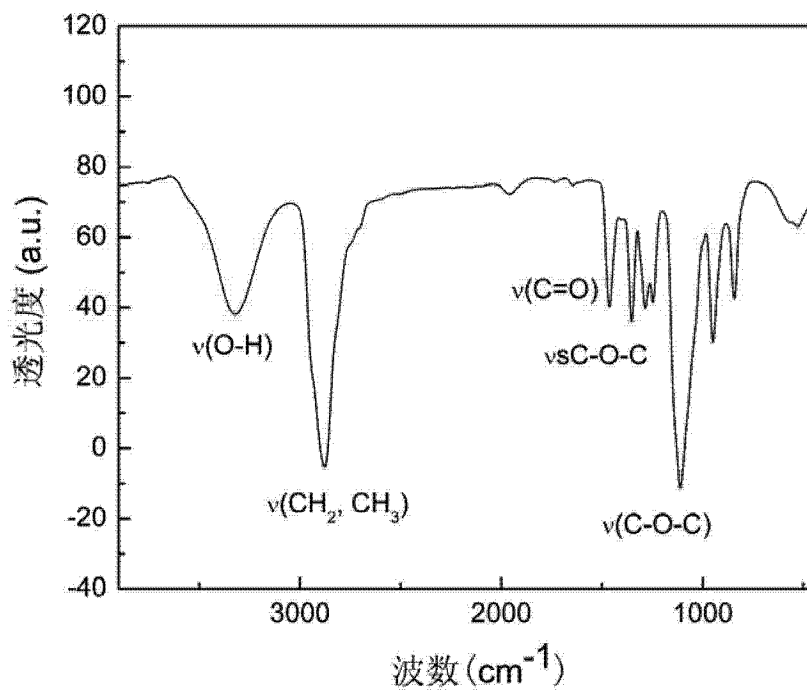


图 2

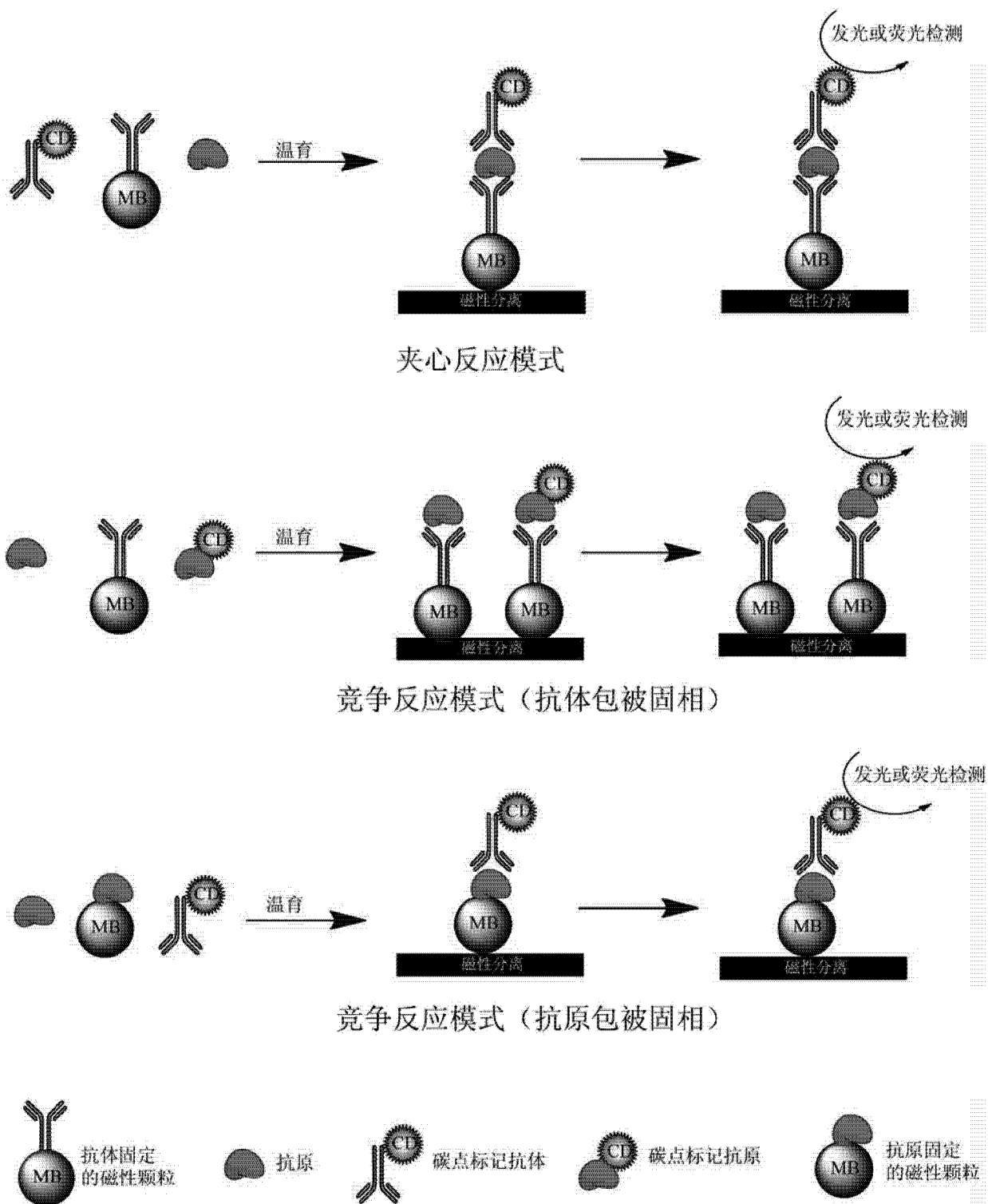


图 3

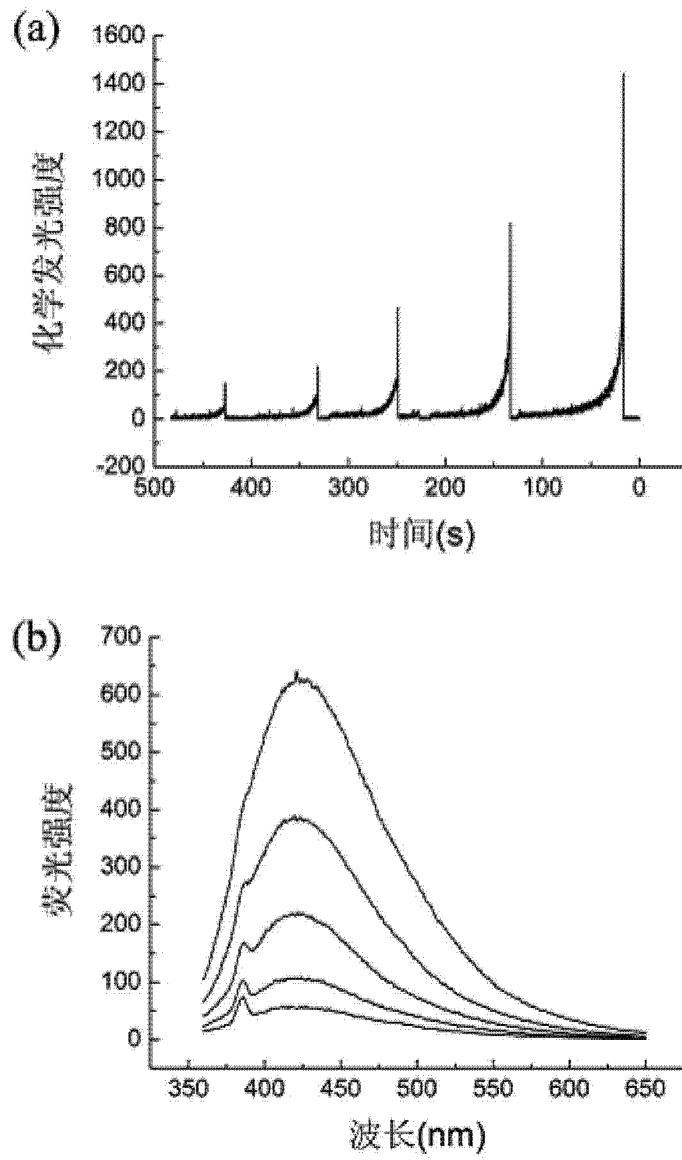


图 4

专利名称(译)	基于碳纳米材料的免疫分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102662049A</a>	公开(公告)日	2012-09-12
申请号	CN201210138986.X	申请日	2012-05-07
[标]申请(专利权)人(译)	清华大学		
申请(专利权)人(译)	清华大学		
当前申请(专利权)人(译)	清华大学		
[标]发明人	林金明 林珍 周云 张炜奋		
发明人	林金明 林珍 周云 张炜奋		
IPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	欧颖		
其他公开文献	CN102662049B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种基于碳纳米材料(碳点)的免疫检测方法,包括如下步骤:步骤A,制备碳点并在碳点的表面标记免疫试剂抗原或抗体,使之成为免疫试剂标记碳点;步骤B,将免疫试剂标记碳点、待测样本、以及免疫试剂抗原或抗体包被的固相物质混合完成免疫反应形成免疫复合物;将所述免疫复合物与游离免疫试剂进行分离;和步骤C,对所述免疫复合物加入氧化剂进行化学发光检测,和/或对其直接进行荧光检测。在本发明中,利用该碳纳米材料可进行化学发光和荧光两种免疫检测,其光学稳定性好。

