



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107328928 A

(43)申请公布日 2017. 11. 07

(21)申请号 201710433510.1

(22)申请日 2017.06.09

(71)申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72)发明人 杨占军 黄英 李娟

(74)专利代理机构 南京理工大学专利中心

32203

代理人 刘海霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

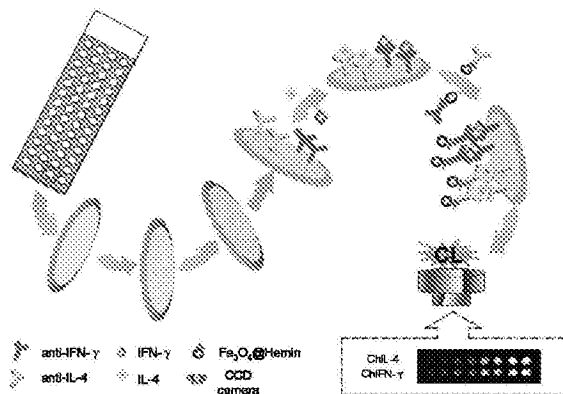
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

基于Hemin@Fe₃O₄MPs模拟酶的化学发光免疫检测鸡细胞因子的方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于Hemin@Fe₃O₄MPs模拟酶的化学发光免疫检测鸡细胞因子的方法。所述方法采用双酶协同催化信号放大技术,免疫传感阵列用硅烷化的可抛式玻片制得,将不同鸡细胞因子的捕获抗体用共价结合的方式包被于相应结合位点,并将不同的鸡细胞因子的标记抗体固定在Hemin@Fe₃O₄MPs纳米粒子上制备形成相应的Hemin@Fe₃O₄MPs-Ab₂信号放大纳米探针。本发明通过二级抗体对抗原的特异性识别形成稳定的夹心的鸡细胞因子免疫复合物,催化化学发光反应,产生强烈的化学发光。本发明方法的检测范围为0.005~0.1ng/mL,能够实现双酶协同催化信号放大的多组分鸡细胞因子的化学发光免疫检测。



CN 107328928 A

1. 一种基于Hemin@Fe₃O₄MPs模拟酶的化学发光免疫检测鸡细胞因子的方法,其特征在于,具体步骤如下:

步骤1,可抛式免疫阵列的制备:将载玻片用水虎鱼酸活化,使其表面带有氨基,水洗,氮气吹干,浸泡在1%的 γ -(2,3-环氧丙氧基)丙基三甲氧基硅烷的甲苯溶液中,过夜,得到硅烷化载玻片,利用丝网印刷技术在硅烷化载玻片上印刷阵列;

步骤2,免疫传感阵列的制备:将鸡细胞因子的捕获抗体均匀滴在阵列中,室温下反应后,置于4℃下晾干,磷酸缓冲溶液冲洗,滴加1.0~5.0wt.%的牛血清白蛋白溶液进行封闭,磷酸盐缓冲溶液冲洗,得免疫传感阵列;

步骤3,Hemin@Fe₃O₄MPs-Ab₂的制备:按氯化血红素和氨基化Fe₃O₄纳米粒子的摩尔比为1:11,将氯化血红素溶液和Fe₃O₄纳米粒子溶液搅拌混合形成Hemin@Fe₃O₄MPs复合物,加入鸡细胞因子标记抗体,搅拌均匀形成Hemin@Fe₃O₄MPs-Ab₂生物复合物,4℃离心去除过量的鸡细胞因子标记抗体,沉淀重新分散在0.01M PBS中,重复离心和重悬步骤,得到Hemin@Fe₃O₄MPs-Ab₂信号放大纳米探针重悬液;

步骤4,待检测鸡细胞因子的检测:将待检测鸡细胞因子溶液滴加到免疫传感阵列中,温育,PBST溶液清洗载玻片并吹干,滴加Hemin@Fe₃O₄MPs-Ab₂信号放大纳米探针,反应结束后,清洗吹干,滴加含有鲁米诺、对碘苯酚和H₂O₂的化学发光底物溶液,触发化学发光反应,检测其化学发光信号,根据化学发光信号的强度和鸡细胞因子浓度的线性关系,分析得到待检测鸡细胞因子的种类和浓度。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤1中,所述的水虎鱼溶液中H₂SO₄与30% H₂O₂的体积比为7:3,所述的活化时间为10~16h。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤2中,所述的鸡细胞因子的捕获抗体选自鸡白介素-2、鸡白介素-4、鸡 γ 干扰素、鸡 β 干扰素,所述的鸡细胞因子的捕获抗体的浓度为50 μ g/mL。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤3中,所述的氨基化Fe₃O₄纳米粒子浓度为4.3mM,Hemin浓度为0.38mM,鸡细胞因子标记抗体浓度为100 μ g/mL,离心速度为10000rpm,重复次数为两次。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤4中,所述的化学发光底物溶液为鲁米诺、对碘苯酚和H₂O₂的Tris-HCl缓冲溶液。

基于Hemin@Fe₃O₄MPs模拟酶的化学发光免疫检测鸡细胞因子的方法

技术领域

[0001] 本发明属于禽类细胞因子检测领域,具体涉及了一种基于Hemin@Fe₃O₄MPs模拟酶的化学发光免疫检测鸡细胞因子的方法。

背景技术

[0002] 细胞因子通过自分泌、旁分泌或内分泌等方式在细胞间信息传递、机体免疫、刺激造血干细胞再生、参与组织修复等机体反应中发挥着重要作用。当前,细胞因子的检测方法较少,传统的检测方法多为生物学和免疫学上的方法,主要包括生物活性测定法,免疫测定法、分子生物学法等。

[0003] Zhao等通过对兔子体内白细胞介素-6进行酶联免疫吸附试验、对正常和梗死组的IFN- γ 的表达进行免疫组织化学法测定,研究炎症对兔急性心肌缺血再灌注现象的影响,并对单剂量阿托伐他汀对炎症和心急无复流的影响作出评价(Zhao X J, et al. Effects of single-dose atorvastatin on interleukin-6, interferon gamma, and myocardial no-reflow in a rabbit model of acute myocardial infarction and reperfusion [J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2014, 47 (3) : 245-251.)。Bhavsar等通过使用电镀印刷电路板的电极,采用无标记电化学阻抗谱法检测了血清中的细胞因子(IL-12)含量,通过印刷电路板和电路技术结合,利用金对蛋白类物质的强吸附能力固定抗体,制得传感器。此传感器从样品分析到检测可在90s内完成,实现了细胞因子的快速、无标记检测(Bhavsar K, et al. A cytokine immunosensor for Multiple Sclerosis detection based upon label-free electrochemical impedance spectroscopy using electroplated printed circuit board electrodes [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2009, 25 (2) : 506-509.)。

[0004] 以上方法均存在检测组分单一的缺陷。免疫分析的实际运用中,需要测定复杂体系中多种组分的含量,如肿瘤细胞的检测、不同细胞因子的检测以及临床疾病的诊断等。目前,多种免疫分析方法已经被发展用来检测单一禽类细胞因子,但尚无多种禽类细胞因子联合检测的多组分免疫分析方法的报道。基于对多种组分含量的测定需求,多组分免疫分析成像技术在免疫分析领域中受到了人们广泛地关注与研究。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种能够实现多种鸡细胞因子同时检测的、基于Hemin@Fe₃O₄MPs模拟酶的化学发光免疫检测鸡细胞因子的方法。

[0006] 为实现上述目的,本发明的技术方案如下:

[0007] 一种基于Hemin@Fe₃O₄MPs模拟酶的化学发光免疫检测鸡细胞因子的方法,首先借助丝网印刷技术在硅烷化载玻片上印刷阵列,然后将不同鸡细胞因子的捕获抗体共价键合免疫阵列的不同行,牛血清蛋白封闭后制得多种鸡细胞因子同时检测的化学发光传感器,

其后在每个微孔中滴入待检测的抗原样品,再滴入酶标记的相应的Hemin@Fe₃O₄MPs-Ab₂信号放大纳米探针,形成捕获抗体-抗原-酶标抗体三层夹心免疫复合物,最后通入化学发光底物,检测不同鸡细胞因子的化学发光信号,根据化学发光信号强度和抗原浓度直接的线性关系,检测分析待检测鸡细胞因子的种类和浓度,具体步骤如下:

[0008] 步骤1,可抛式免疫阵列的制备:将载玻片用水虎鱼酸活化,使其表面带有氨基,水洗,氮气吹干,浸泡在1%的 γ -(2,3-环氧丙氧基)丙基三甲氧基硅烷(GPTMS)的甲苯溶液中,过夜,得到硅烷化载玻片,利用丝网印刷技术在硅烷化载玻片上印刷阵列;

[0009] 步骤2,免疫传感阵列的制备:将鸡细胞因子的捕获抗体均匀滴在阵列中,室温下反应后,置于4℃下晾干,磷酸缓冲溶液冲洗,滴加1.0~5.0wt.%的牛血清白蛋白溶液进行封闭,磷酸盐缓冲溶液冲洗,得免疫传感阵列;

[0010] 步骤3,Hemin@Fe₃O₄MPs-Ab₂的制备:按氯化血红素(Hemin)和氨基化Fe₃O₄纳米粒子的摩尔比为1:11,将氯化血红素(Hemin)溶液和Fe₃O₄纳米粒子溶液搅拌混合形成Hemin@Fe₃O₄MPs复合物,加入鸡细胞因子标记抗体(Ab₂),搅拌均匀形成Hemin@Fe₃O₄MPs-Ab₂生物复合物,4℃离心去除过量的Ab₂,沉淀重新分散在0.01M PBS中,重复离心和重悬步骤,得到Hemin@Fe₃O₄MPs-Ab₂信号放大纳米探针重悬液;

[0011] 步骤4,待检测鸡细胞因子的检测:将待检测鸡细胞因子溶液滴加到免疫传感阵列中,温育,PBST溶液清洗载玻片并吹干,滴加Hemin@Fe₃O₄MPs-Ab₂信号放大纳米探针,反应结束后,清洗吹干,滴加含有鲁米诺、对碘苯酚和H₂O₂的化学发光底物溶液,触发化学发光反应,检测其化学发光信号,根据化学发光信号的强度和鸡细胞因子浓度的线性关系,分析得到待检测鸡细胞因子的种类和浓度。

[0012] 步骤1中,所述的水虎鱼溶液中H₂SO₄与30%H₂O₂的体积比为7:3,所述的活化时间为10~16h。

[0013] 步骤2中,所述的鸡细胞因子的捕获抗体选自鸡白介素2(Ch1L-2)、鸡白介素4(Ch1L-4)、鸡 γ 干扰素(Ch1FN- γ)、鸡 β 干扰素(Ch1FN- β)等,所述的鸡细胞因子的捕获抗体的浓度为50 μ g/mL。

[0014] 步骤3中,所述的氨基化Fe₃O₄纳米粒子浓度为4.3mM,Hemin浓度为0.38mM,鸡细胞因子标记抗体浓度为100 μ g/mL,离心速度为10000rpm,重复次数为两次。

[0015] 步骤4中,所述的化学发光底物溶液为鲁米诺、对碘苯酚和H₂O₂的Tris-HCl缓冲溶液。

[0016] 与现有技术相比,本发明具有以下显著效果:

[0017] (1) 本发明采用丝网印刷技术在硅烷化载玻片上制作化学发光免疫传感阵列,通过载玻片上的环氧基和捕获抗体带有的氨基共价结合,将捕获抗体修饰在载玻片上,通入抗原和酶标抗体后,基于夹心免疫反应,每一个检测位点捕捉到的Hemin@Fe₃O₄MPs会触发化学发光,能够同时检测不同细胞因子的化学发光信号,实现多种鸡细胞因子的同时检测;

[0018] (2) 本发明利用化学发光成像免疫分析技术,借助捕获抗体、抗原和酶标抗体形成双抗体夹心复合结构,结合电感耦合CCD检测不同细胞因子的化学发光信号,构建了良好的化学发光成像免疫分析系统,检测范围为0.005~0.1ng/mL,检测限可达0.010ng/mL,具有高通量、低成本、少消耗、易操作且对特定鸡细胞因子的联合检测具有高灵敏性的优点。

附图说明

[0019] 图1为本发明的基于Hemin@Fe₃O₄MPs模拟酶的化学发光免疫检测鸡细胞因子的方法的原理示意图。

[0020] 图2为Ch1FN- γ (a) 和Ch1L-4 (b) 的标准样品检测曲线图。

具体实施方式

[0021] 下面结合具体实施例和附图对本发明进一步说明。

[0022] 实施例1

[0023] 本实施例的免疫传感阵列包括了4排 \times 12列, 共计48个检测位点, 每个位点直径2mm。Ch1L-4, Ch1FN- γ 的捕获抗体分别固定在不同行。每一列可以用于同时检测单个样品的2种抗原, 因此12列可以同时检测12个样品各自所含有的2种细胞因子, 可同时检测24个样品。基于Hemin@Fe₃O₄MPs模拟酶的化学发光免疫检测鸡细胞因子的方法, 具体步骤为:

[0024] (1) 将载玻片用水虎鱼溶液 (H₂SO₄/30% H₂O₂, 7:3 体积比) 活化10-16小时使其表面带有羟基, 用水冲洗并用氮气吹干后, 用1% GPTMS/甲苯溶液室温过夜, 使之硅烷化。依次用甲苯和乙醇冲洗, 除去物理吸附的硅烷, 洗净后氮气吹干。

[0025] (2) 利用一层4排 \times 12列格式48孔的疏水性无光活性膜 (直径2mm, 边缘间距4mm), 借助模板通过丝网印刷技术印刷在处理过的载玻片上。

[0026] (3) 取5 μ L 50 μ g/mL Ch1L-4, Ch1FN- γ 的捕获抗体分别滴在四排环氧硅烷化的位点, 4 $^{\circ}$ C温育过夜。玻片以冲洗缓冲液冲洗后, 氮气吹干。

[0027] (4) 将1.0-5.0 wt. % 牛血清蛋白溶液5 μ L加至各检测位点, 反应过夜, 封闭未反应的环氧基。免疫传感器通过冲洗缓冲液清洗, 制得检测多种鸡细胞因子的化学发光免疫传感阵列。

[0028] 实施例2

[0029] 1. 制作化学发光信号的强度和鸡细胞因子浓度的线性关系的标准曲线

[0030] (1) 将5 μ L Ch1L-4和Ch1FN- γ 不同浓度的抗原标准样品加入到实施例1制得的免疫传感阵列中相应排不同的检测位点, 在线温育20-30min, 清洗吹干。

[0031] (2) 氨基化Fe₃O₄纳米粒子通过经典的水热法合成 (C. Bendicho, F. Pena, M. Costas, et al. Photochemistry-based sample treatments as greenet approaches for trace-element analysis and speciation. Trends Anal. Chem, 29 (2010): 681-691), 将氯化血红素 (Hemin) 和氨基化Fe₃O₄MPs以摩尔比1:11的比例混合, 混合溶液温和地搅拌0.5-1h以形成Hemin@Fe₃O₄MPs复合物。再加入10 μ L 100 μ g/mL Ch1L-4标记抗体 (Ch1L-4-Ab₂) 或Ch1FN- γ 标记抗体 (Ch1FN- γ -Ab₂), 混合溶液温和地搅拌2-3小时以形成Hemin@Fe₃O₄MPs-Ab₂生物复合物。过量的Ab₂通过离心去除, 4 $^{\circ}$ C下以10000rpm离心30min, 沉淀重新分散在0.01M PBS中。重复两次, 最后得到的Hemin@Fe₃O₄MPs-Ab₂生物复合物悬浮分散在1.0mL 0.01M PBS中, 4 $^{\circ}$ C下保存。

[0032] (3) 将5 μ L的酶标记的Ch1L-4标记抗体 (Hemin@Fe₃O₄MPs-Ch1L-4-Ab₂), 酶标记的Ch1FN- γ 标记抗体 (Hemin@Fe₃O₄MPs-Ch1FN- γ -Ab₂) 分别加入相应位点反应30min, 后清洗吹干。

[0033] (4) 0.5mL鲁米诺, 0.6mL对碘苯酚, 50 μ LH₂O₂混合后用Tris-HCl缓冲溶液定容至100mL, 配制化学发光底物溶液, 避光低温保存。取5 μ L化学发光底物溶液加入检测点触发化学发光反应。化学发光信号被CCD照相机收集, 动态积分方式曝光30min, 所得到的发光点则由分析软件(AlphaView SA)自动识别, 直接读出每个光斑的化学发光强度。

[0034] 图1为本发明的基于Hemin@Fe₃O₄MPs模拟酶的化学发光免疫检测鸡细胞因子的方法的原理示意图。如图1所示, 整个免疫传感器原理流程图为: 首先采用丝网印刷技术在硅烷化的载玻片上制作免疫传感阵列, 对载玻片进行硅烷化, 使其表面带有环氧基, 通过载玻片上的环氧基可以将带有氨基的捕获抗体Ch1L-4和Ch1FN- γ 分别固定在不同行。接下来将不同浓度的抗原标准样品滴入相应微孔中, 温育后分别滴入相应的Hemin@Fe₃O₄MPs-Ab₂信号放大纳米探针, 通过抗原抗体特异性识别形成夹心免疫反应, 通入发光底物后, 传感器上捕获的大量酶可以催化发光, 结合电感耦合CCD检测不同细胞因子的化学发光信号。

[0035] 图2为测定不同浓度的Ch1FN- γ 和Ch1L-4标准样品, 分别制得的Ch1FN- γ (a)和Ch1L-4 (b)标准样品的线性曲线。对应的线性范围分别是Ch1FN- γ (0.005-0.1ng/mL)和Ch1L-4 (0.005-0.1ng/mL), 由化学发光信号的3倍标准偏差得到的检测限分别为0.010ng/mL和0.011ng/mL, 低检测限 (LOD) 和高灵敏度可以提高检测的准确性并且可以检测血清中低浓度的蛋白质, 说明制得的传感器具有高度的灵敏度和准确性。

[0036] 2. 回收率测定

[0037] 为考察该方法的准确性与实际应用价值, 通过分别加入0.01、0.02、0.04、0.08、0.10ng/mL Ch1L-4于血清样品中来测定其回收率, 回收率如表1所示。

[0038] 表1 Ch1L-4蛋白回收率测定结果

样品编号	加入量 (ng/mL)	回收量 (ng/mL)	回收率 (%)	相对误差 (%)
1	0.01	0.0097	97	-3.00
2	0.02	0.0208	104	4.0
3	0.04	0.0413	103.25	3.25
4	0.08	0.0796	99.5	2.87
5	0.10	0.0974	97.4	-2.6

[0040] 从表1可以看出, 回收率在97%-104% (n=5) 之间, 表明本发明的检测方法在实际样品检测中具有较好的准确性。

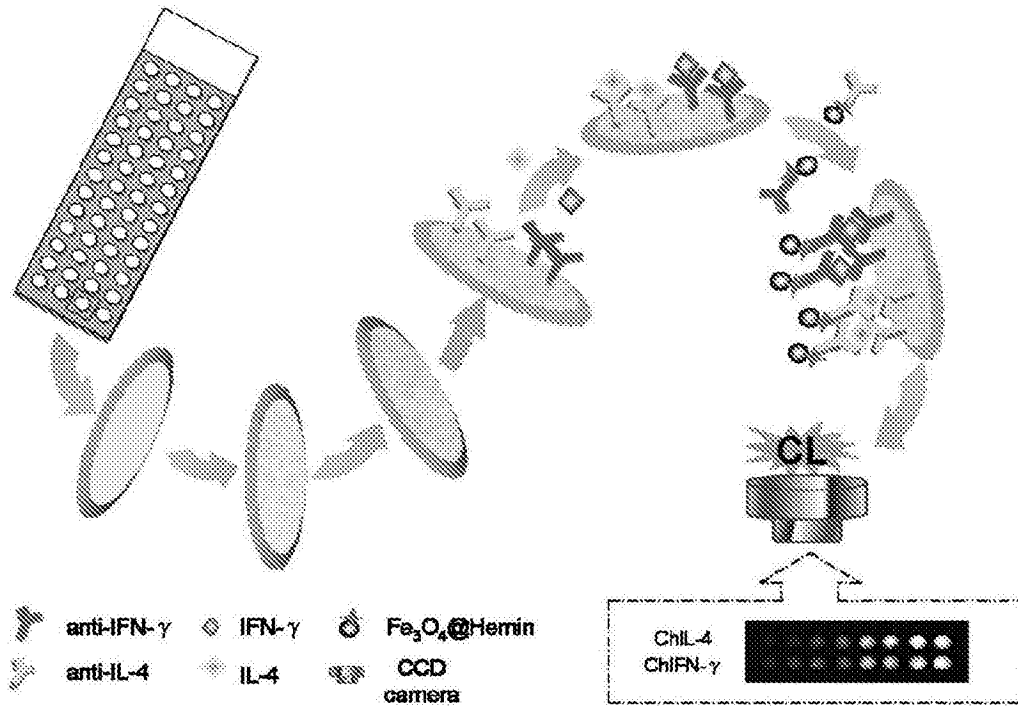


图1

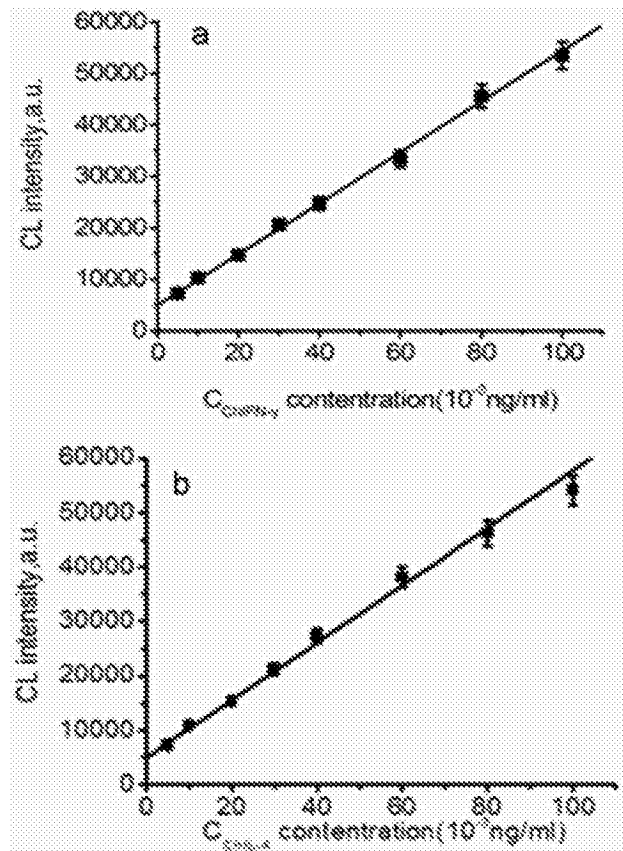


图2

专利名称(译)	基于Hemin@Fe ₃ O ₄ MPs模拟酶的化学发光免疫检测鸡细胞因子的方法		
公开(公告)号	CN107328928A	公开(公告)日	2017-11-07
申请号	CN2017110433510.1	申请日	2017-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	扬州大学		
申请(专利权)人(译)	扬州大学		
当前申请(专利权)人(译)	扬州大学		
[标]发明人	杨占军 黄英 李娟		
发明人	杨占军 黄英 李娟		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/532 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/535 G01N33/5436		
代理人(译)	刘海霞		
其他公开文献	CN107328928B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于Hemin@Fe₃O₄MPs模拟酶的化学发光免疫检测鸡细胞因子的方法。所述方法采用双酶协同催化信号放大技术，免疫传感阵列用硅烷化的可抛式玻片制得，将不同鸡细胞因子的捕获抗体用共价结合的方式包被于相应结合位点，并将不同的鸡细胞因子的标记抗体固定在Hemin@Fe₃O₄MPs纳米粒子上制备形成相应的Hemin@Fe₃O₄MPs-Ab₂信号放大纳米探针。本发明通过二级抗体对抗原的特异性识别形成稳定的夹心的鸡细胞因子免疫复合物，催化化学发光反应，产生强烈的化学发光。本发明方法的检测范围为0.005~0.1ng/mL，能够实现双酶协同催化信号放大的多组分鸡细胞因子的化学发光免疫检测。

