

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102253194 B

(45) 授权公告日 2013.08.28

(21) 申请号 201110174132.2

(22) 申请日 2011.06.25

(73) 专利权人 南方医科大学

地址 510515 广东省广州市白云区沙太南路 1023 号

(72) 发明人 郑磊 贾立永 干宁 王前 李博 巫远招

(74) 专利代理机构 广州市天河庐阳专利事务所 44244

代理人 胡济元

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 27/60 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102087283 A, 2011.06.08,

CN 101168781 A, 2008.04.30,

CN 101400800 A, 2009.04.01,

CN 102072954 A, 2011.05.25,

CN 1943560 A, 2007.04.11,

US 2010/0092985 A1, 2010.04.15,

US 2006/014172 A1, 2006.01.19,

WO 2011/042564 A1, 2011.04.14,

US 6773928 B1, 2004.08.10,

WO 2004/011672 A1, 2004.02.05,

Ruchika Malhotra 等. Ultrasensitive Electrochemical Immunosensor for Oral Cancer Biomarker IL-6 Using Carbon Nanotube Forest Electrodes and Multilabel Amplification. 《Anal. Chem.》. 2010, 3118 - 3123.

Ying Zhuo 等. Ultrasensitive electrochemical strategy for NT-proBNP detection with gold nanochains and horseradish peroxidase complex amplification. 《Biosensors and Bioelectronics》. 2010, 2188 - 2193.

Xin Yu 等. Carbon Nanotube Amplification Strategies for Highly Sensitive Immunodetection of Cancer Biomarkers. 《J Am Chem Soc》. 2006, 11199 - 11205.

Lijuan Bai 等. Bi-enzyme functionized hollow PtCo nanochains as labels for an electrochemical aptasensor. 《Biosensors and Bioelectronics》. 2011, 4331 - 4336.

审查员 段晓露

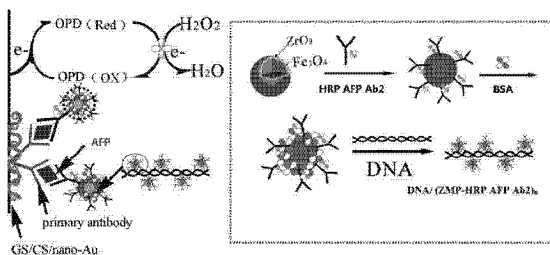
权利要求书1页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

一种采用安培免疫传感器进行夹心免疫反应的二抗探针

(57) 摘要

本发明涉及生物监测领域,具体涉及一种采用安培免疫传感器进行夹心免疫反应的二抗探针,其中所述的二抗探针由小牛胸腺 DNA 分子链和附着在小牛胸腺 DNA 分子链上的纳米球构成,其中所述的纳米球的表面为酶标记的抗体蛋白,内部为磁性纳米颗粒,该颗粒为在四氧化三铁纳米颗粒表面沉积一层无定形氧化锆形成。本发明所述的二抗探针适于采用安培免疫传感器进行夹心免疫反应测量抗原的浓度,且具有检测线性范围宽,检测极限低的优点。



CN 102253194 B

1. 一种采用安培免疫传感器进行夹心免疫反应的二抗探针,该探针由小牛胸腺 DNA 分子链和附着在小牛胸腺 DNA 分子链上的纳米球构成,其中所述的纳米球的表面为酶标记的抗体蛋白,内部为磁性纳米颗粒,该颗粒为在四氧化三铁纳米颗粒表面沉积一层无定形氧化锆形成;所述的二抗探针呈“串珠状”,每个探针分子上具有 10 个以上所述的磁性纳米颗粒。

2. 权利要求 1 所述的二抗探针的制备方法,该方法由以下步骤组成:

1)将 10mg 磁性纳米粒子分散在 5mL pH7.0 磷酸盐缓冲液中,加入 1mg 辣根过氧化物酶标记的甲胎蛋白二抗,搅拌 6h 后,外加磁性条件下磁性分离,得到负载抗体的纳米微球;

2)将 10mg 负载抗体的纳米微球分散在 5mL 的 pH7.0 磷酸盐缓冲液中,依次加入 5mg 辣根过氧化物酶、10mg 牛血清白蛋白,4℃搅拌 6h,利用外加磁场分离磁性纳米颗粒,洗涤,得到纳米球;

3)将 10mg 纳米球分散在 5mL 的 pH7.0 磷酸盐缓冲液中,加入 12mg 小牛胸腺 DNA,室温下搅拌 6h,磁性分离即获得二抗探针。

3. 一种采用权利要求 1 所述的二抗探针测量抗原浓度的方法,该方法由以下步骤组成:

(a) 定量标准曲线的制备:

(1) 配制一系列不同浓度的抗原标准品溶液;

(2) 按相同的体积分别将每一浓度的抗原标准品溶液加入到安培免疫传感器的反应腔中,先 37℃温育 30min;再将所制备的二抗探针滴加在安培免疫传感器的工作电极表面,37℃温育 30min;然后,反应腔中加入含有浓度为 5mmol/L 过氧化脲溶液和 1mmol/L 邻苯二酚的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲溶液,反应 3min 后,在电化学工作站上用循环伏安法(CV)或者示差脉冲伏安法(DPV)记录还原峰电流;

(3)将步骤(2)所得到的抗原标准品溶液的浓度及其对应的还原峰电流的一组数据,以还原峰电流对抗原标准品溶液浓度进行线性回归便得到,还原峰电流与抗原标准品溶液浓度对应关系的直线方程,即标准曲线;

(b) 样品的检测:

将待测样品加入到安培免疫传感器的反应腔中,以步骤(a)同样的方法和反应条件采用循环伏安法(CV)记录还原峰电流,然后,将检测样品得到的还原峰电流值代入步骤(a)所得到的直线方程中即可算出待测样品中抗原的浓度。

## 一种采用安培免疫传感器进行夹心免疫反应的二抗探针

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,特别是涉及分子识别的探针,该探针适于采用安培免疫传感器进行夹心免疫反应测量抗原的浓度。

### 背景技术

[0002] 1990 年 Henry 等提出了免疫传感器的概念,免疫传感器利用抗原、抗体作为分子识别原件,把抗原-抗体特异性反应过程中产生的信号通过换能器转变成电信号,从而对被测物进行定量分析。与传统的检测技术相比较,具有高灵敏度、高特异性、操作简便、分析速度快、价格低廉等优势,且易于实现自动化操作,在临床诊断、医疗保健、环境监测、食品安全等领域显示出良好的应用前景。然而已报道的电化学安培传感器在使用中也存在以下不足:①多采用“一步法”即采用抗原抗体结合后形成的免疫复合物导致电极表面电流下降,根据下降电流来进行定量,这样就不可避免的难以克服非特异性吸附的影响;②当电极表面的抗原/抗体发生免疫结合后生成物很难除去,电极无法更新,使用多为一次性;③尽管安培免疫传感器有诸多优点,但是面对背景非常复杂的具体检测对象(如血清样品),往往需通过一定的样品提纯处理后再进行检测,影响了其易用性。所以,上述问题在一定程度上限制了免疫传感器的优势。

[0003] 近年来,基于夹心免疫的纳米修饰电化学传感器由于其卓越的灵敏度引起人们的广泛关注。由于夹心免疫传感器与“一步法”传感器相比具有较高的敏感性和特异性,制备此类传感器最关键的就在于对二抗的富集。已经有报道采用多种纳米材料对二抗进行富集,如碳纳米球、二氧化硅、纳米 Pt、二氧化锰、石墨烯(GS)、碳纳米管(CNTs)、纳米金(nano-Au)、量子点等。然而这些富集过程繁琐,需要离心才能分离探针和未结合抗体;有研究使用磁性纳米材料(如四氧化三铁、金磁纳米颗粒)等富集抗体,避免了繁琐的离心过程,但是其合成的磁性材料容易团聚,稳定性差,且单个纳米颗粒对抗体的富集效果有限。袁若等报道了通过抗坏血酸的还原作用形成一种“链状金线”,由多个纳米金原子形成串珠状,由此可大量富集抗体,但是此“链状金线”的合成过程至少需要 5 天时间,且无磁性,依然需要通过离心来进行分离,探针的分离过程繁琐。因此研发一种新的具有分离简便、富集率高的抗体富集材料并应用到电化学免疫传感器中具有重要的意义。

[0004]  $ZrO_2$  作为一种 Lewis 强酸,通过与蛋白分子上的羧酸和 DNA 上的磷酸等基团(Lewis 强碱)特异性取向结合,可被直接用来固定酶及抗体。由于抗体和酶包被在极细( $1 \sim 2 \mu m$ )且表面积很大的纳米  $ZrO_2$  上,标记量显著增加且能较长时间地保持生物活性。但是单个纳米颗粒对二抗抗体的富集效果有限。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种二抗探针,该探针适于采用安培免疫传感器进行夹心免疫反应测量抗原的浓度,且具有富集抗体效果优异和检测限低的优点。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:

[0007] 一种采用安培免疫传感器进行夹心免疫反应的二抗探针,该探针由小牛胸腺 DNA 分子链和附着在小牛胸腺 DNA 分子链上的纳米球构成,其中所述的纳米球的表面为酶标记的抗体蛋白,内部为磁性纳米颗粒,该颗粒为在四氧化三铁纳米颗粒表面沉积一层无定形氧化锆形成;所述的二抗探针呈“串珠状”,每个探针分子上具有 10 个以上所述的磁性纳米颗粒。

[0008] 本发明所述的二抗探针,其中所述的磁性纳米颗粒为公知材料,具体制备方法可参照公开号为 CN101302361A 的发明专利申请所述方案进行。

[0009] 本发明所述的二抗探针的制备方法由以下步骤组成:

[0010] 1) 将磁性纳米颗粒加入 pH7.0 磷酸盐缓冲液中,再加入重量为磁性纳米粒子 0.1 倍的辣根过氧化物酶标记抗体,4℃下反应 6h,分离得到负载抗体的纳米微球;

[0011] 2) 将所得到的纳米微球加入 pH7.0 磷酸盐缓冲液中,再加入重量为所述纳米微球 0.5 倍的过氧化物酶和重量为所述纳米微球 1.0 倍的牛血清白蛋白,4℃下反应 6h,分离得到纳米球;

[0012] 3) 将纳米球加入 pH7.0 磷酸盐缓冲液中,再加入重量为纳米球 1.2 倍的小牛胸腺 DNA,室温下反应 6h,分离得到二抗探针。

[0013] 本发明所述的探针中,首先制备了具有核壳结构的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (核)/ $\text{ZrO}_2$  (壳)磁性纳米粒子,该磁性纳米粒子表面含有  $\text{ZrO}_2$  可以和抗体结合,对抗体进行富集。该探针具有以下优点:1) 磁性材料的使用,使探针具有磁性,在外加磁场的作用下即可实现分离,省去了探针合成过程中繁琐的离心和洗涤过程;2) 该探针呈“串珠状”,每个探针分子上具有 10 个以上磁珠,增加探针表面标记酶抗体浓度,因此提高免疫传感器的敏感性。3) 二氧化锆具有很好的生物相容性,能够长时间保持抗体的活性,使抗体不易失活,使本探针可以一次制备而长期保存。

[0014] 本发明所述的二抗探针可以用来检测抗原浓度,具体检测由以下步骤组成:

[0015] (a) 定量标准曲线的制备:

[0016] (1) 配制一系列不同浓度的抗原标准品溶液;

[0017] (2) 按相同的体积分别将每一浓度的抗原标准品溶液加入到安培免疫传感器的反应腔中,先 37℃温育 30min,洗涤;再将所制备的二抗探针滴加在安培免疫传感器的反应腔中,37℃温育 30min,洗涤;然后,反应腔中加入含有浓度为 5mmol/L 过氧化脲溶液和 1mmol/L 邻苯二酚的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲溶液,反应 3min 后,在电化学工作站上用循环伏安法 (CV) 或示差脉冲伏安法 (DPV) 记录还原峰电流;

[0018] (3) 将步骤(2)所得到的抗原标准品溶液的浓度及其对应的还原峰电流的一组数据,以还原峰电流对抗原标准品溶液浓度进行线性回归便得到,还原峰电流与抗原标准品溶液浓度对应关系的直线方程,即标准曲线;

[0019] (b) 样品的检测:

[0020] 将待测样品加入到安培免疫传感器的反应腔中,以步骤(a)同样的方法和反应条件采用循环伏安法 (CV) 记录还原峰电流,然后,将检测样品得到的还原峰电流值代入步骤(a)所得到的直线方程中即可算出待测样品中抗原的浓度。

[0021] 上述检测抗原浓度的方法中所使用的安培免疫传感器可根据待测抗原按公知的方法自行制备。

[0022] 本发明所述的二抗探针适用于采用安培免疫传感器进行夹心免疫反应测量抗原的浓度,由于本发明所述的二抗探针具有一维“串珠状”结构,极大的提高探针表面二抗的负载量,由于电化学免疫传感器的线性范围和灵敏度与二抗富集效果正相关,因此本发明所述检测抗原浓度的方法具有线性范围宽,检测限低的优点。

### 附图说明

[0023] 图 1 是二抗探针的检测原理及二抗探针合成过程示意图。右侧方框内是二抗探针的合成过程示意图。

[0024] 图 2 是合成的探针利用外加磁场进行分离结果图。

[0025] 图 3 是下述实施例 1 所合成的二抗探针的透射电镜图;

[0026] 图 4 是不同浓度 AFP 检测时的电化学 CV 响应图。内插图为测定标准曲线。

[0027] 图 5 是不同浓度 HIV p24 检测时的电化学 DPV 响应图。内插图为测定标准曲线。

### 具体实施方式

[0028] 实施例 1

[0029] 1、二抗探针的制备和表征

[0030] (1) 磁性纳米颗粒的制备

[0031] 磁性纳米颗粒的制备:具体制备方法可参照公开号为 CN101302361A 的发明专利申请。

[0032] 磁性纳米颗粒的表征:采用 X 射线荧光光谱(XRF)对  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZrO}_2$  进行表征,出现了 Zr-K $_{\beta}$  (17.8keV)、Zr-K $_{\alpha}$  (15.8keV)、Zr-L $_{\beta}$  (2.1ke)、Zr-L $_{\alpha}$  (2.0keV) 峰和 Fe-K $_{\beta}$  (7.1KeV)、Fe-K $_{\alpha}$  (6.4keV) 峰,说明该磁性微粒中存在 Zr 和 Fe 元素。

[0033] (2) 负载抗体的纳米微球的制备和表征

[0034] 负载抗体的纳米微球的制备:将 10mg 磁性纳米粒子分散在 5mL pH7.0 磷酸盐缓冲液中,加入 1mg 辣根过氧化物标记的甲胎蛋白二抗(HRP-anti-AFP),搅拌 6h 后,外加磁性条件下磁性分离,得到负载抗体的纳米微球。

[0035] (3) 纳米球的制备

[0036] 将 10mg 负载抗体的纳米微球分散在 5mL 的 pH7.0 磷酸盐缓冲液中,依次加入 5mg 辣根过氧化物酶、10mg 牛血清白蛋白(BSA),4℃ 搅拌 6h,利用外加磁场分离磁性纳米颗粒,洗涤,得到纳米球。

[0037] (4) 二抗探针的制备

[0038] 将 10mg 纳米球分散在 5mL 的 pH7.0 磷酸盐缓冲液中,加入 12mg 小牛胸腺 DNA,室温下搅拌 6h,磁性分离即获得二抗探针。

[0039] 二抗探针的表征:采用透射电镜对探针制备过程进行了表征(图 3)。由图 3 可见二抗探针具有一维“珠链状”线性结构。

[0040] 采用 X 射线荧光光谱(测定元素范围为  $^9\text{F} \sim ^{92}\text{U}$ ) 对二抗探针进行了表征,显示了 Zr-k $_{\alpha}$  峰 2.1keV、Fe-k $_{\alpha}$  峰 6.4keV、P-k $_{\alpha}$  峰 1.13keV 和 S-k $_{\alpha}$  峰 2.3keV,由于 DNA 含有大量磷酸基团,故而 P 峰的出现进一步说明了磁性纳米粒子表面包覆了 DNA。

[0041] 测定磁性纳米颗粒与 DNA 作用后的紫外光谱,发现 DNA 特征吸收峰由 520nm 红移

至 524nm, 说明 DNA 与磁性纳米颗粒子发生了相互作用, 使吸收峰发生红移。由图 2 可见, 在 0.3mTde 外磁场作用下二抗探针磁性探针具有良好的超顺磁性。

[0042] 2. 安培免疫传感器的制备

[0043] 对商品化的丝网印刷电极进行修饰:

[0044] (a) 石墨烯 / 壳聚糖(GS/CS) 在丝网印刷电极表面修饰成膜

[0045] 在 5mL 离心管中加入 2mL pH5.0 的 0.2% 的壳聚糖(CS) 醋酸溶液和 1mg 的 GS, 混合得到悬浊液; 将 5mL 悬浊液滴在丝网印刷电极中的工作电极表面, 室温下自然干燥, 然后用 pH7.0 磷酸盐缓冲溶液洗涤除去结合不牢固纳米颗粒。

[0046] (b) 采用电流时间曲线法在丝网印刷电极的工作电极表面直接电镀金: 将 20  $\mu$  L 1% 的 H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub> 滴加在工作电极表面, 施加 -0.2V 恒电位 30S。电镀后用 PBS 充分洗涤。

[0047] (c) 在丝网印刷电极的反应腔中加入 10  $\mu$  L AFP 单克隆一抗后, 丝网印刷电极放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱低温温育 12 小时后用 PBS 充分洗涤未结合和结合不牢固抗体。

[0048] (d) 用 3mg/mL 牛血清白蛋白(BSA) 封闭未结合电极表面未结合活性位点, 得到安培免疫传感器。

[0049] 3. 抗原浓度的检测

[0050] 对抗原的检测过程是利用固定好一抗的传感器依次与样品和制备的二抗探针进行温育, 若样品中含有所待测抗原, 则制备的二抗探针通过免疫复合物的形式固定在电极表面, 加入底物后可以催化底物发生氧化还原反应, 产生电信号。其检测原理如附图 1。

[0051] (1) 定量标准曲线制备:

[0052] (a) 将 AFP 抗原溶液标准品稀释成 0.01ng/ml, 0.05ng/ml, 0.1ng/ml, 1ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 150ng/ml, 200ng/ml, 在安培免疫传感器的反应腔中分别加入 10  $\mu$  L 不同浓度的 AFP 抗原溶液标准品, 并在 37 $^{\circ}$ C 下温育 30min。反应完后用 PBS 小心洗去未反应抗原。

[0053] (b) 将步骤 1 合成的二抗探针配成 1mg/ml 悬液, 在安培免疫传感器的反应腔中滴加 10mL 二抗探针悬液, 37 $^{\circ}$ C 温育 30min, PBS 小心洗涤;

[0054] (c) 在安培免疫传感器的反应腔中加入含有浓度为 5mmol/L 过氧化脲溶液和 1mmol/L 邻苯二酚的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲溶液反应 3min; 在电化学工作站上, 用循环伏安法(CV) 记录还原峰电流 I (扫描范围从 -0.3V 至 -0.8V)。

[0055] (d) 步骤(C)所得到还原峰电流与对应抗原标准品溶液的浓度一组数据, 采用平均斜率法以还原峰电流对抗原标准品溶液浓度进行线性回归分析, 便得到还原峰电流与抗原标准品溶液浓度对应关系的直线方程, 即标准曲线。CV 还原峰电流和 AFP 抗原浓度数值见图 4 内插图。线性方程为  $\log I = 0.66 \log [C_{AFP}] - 5.15$ 。

[0056] 将待测样品加入到安培免疫传感器的反应腔中, 以步骤(1)同样的方法和反应条件采用循环伏安法(CV) 记录还原峰电流, 然后, 将检测样品得到的还原峰电流值代入步骤(a)所得到的直线方程中即可算出待测样品中抗原的浓度。采用 10 个空白样品进行检测, 计算平均值  $\bar{x}$  和标准差  $s$ , 以  $\bar{x} + 3s$  作为检测限。

[0057] 在本例中, 对 AFP 的检测范围为 0.01 ~ 200ng/mL, 检测限为 4pg/mL。

[0058] 实施例 2 (对比实验 1)

[0059] 一、实验材料

[0060] 1. 抗原和抗体 :AFP 抗原标准品、甲胎蛋白单克隆一抗(anti-AFP)、辣根过氧化物酶标记的甲胎蛋白多克隆抗体(HRP-anti-AFP)和 AFP ELISA 试剂盒均购置郑州博赛生物技术股份有限公司。

[0061] 2. 安培免疫传感器 :按实施例 1 所述方法制得。

[0062] 3. 二抗探针

[0063] 3.1、样品 : 按实施例 1 所述方法制得的二抗探针。

[0064] 3.2、对照品

[0065] 对照品 1 :

[0066] (1) 磁性纳米颗粒的制备

[0067] 磁性纳米颗粒的制备 :具体制备方法可参照公开号为 CN101302361A 的发明专利申请。

[0068] (2) 负载抗体的纳米微球的制备和表征

[0069] 负载抗体的纳米微球的制备 :将 10mg 磁性纳米粒子分散在 5mL pH7.0 磷酸盐缓冲液中,加入 1mg 辣根过氧化物酶标记的甲胎蛋白二抗(HRP-anti-AFP),搅拌 6h 后,外加磁场分离未结合的抗体,外加磁性条件下磁性分离,得到负载抗体的纳米微球。

[0070] (3) 磁性探针的制备

[0071] 将 10mg 负载抗体的纳米微球分散在 5mL 的 pH7.0 磷酸盐缓冲液中,依次加入 5mg 辣根过氧化物酶、10mg 牛血清白蛋白(BSA),4℃ 搅拌 6h,利用外加磁场分离磁性纳米颗粒,洗涤,得到磁性探针用 HRP-anti-AFP-ZMPs 探针表示。

[0072] 对照品 2 :参照下述文献报告的方法制备获得 :Tang J, Su B, Tang D, et al. Conductive carbon nanoparticles-based electrochemical immunosensor with enhanced sensitivity for [alpha]-fetoprotein using irregular-shaped gold nanoparticles-labeled enzyme-linked antibodies as signal improvement[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2010, 25(12):2657-2662。所得二抗探针用代号 HRP-anti-AFP-GNGs 表示。

[0073] 对照品 3 :参照下述文献报告的方法制备获得 :Zhuo Y, Yi W J, Lian W B, et al. Ultrasensitive electrochemical strategy for NT-proBNP detection with gold nanochains and horseradish peroxidase complex amplification[J]. Biosens Bioelectron. 2011, 26(5):2188-2193。所得二抗探针用代号 AuNCs-HRP-Ab<sub>2</sub> 表示。

[0074] 对照品 4 :以 AFP ELISA 试剂盒(购自郑州博赛生物技术股份有限公司)中的辣根过氧化物酶标记的 AFP 多克隆抗作为对照品 4。以 HRP-anti-AFP 表示。

[0075] 二、实验方法

[0076] 1. 实验分为 5 组,每组中实验除加入的二抗探针不同外,其余操作相同。

[0077] 2. 实验过程

[0078] 2.1 定量标准曲线制备 :

[0079] (a)将 AFP 抗原溶液标准品稀释成 0.01ng/ml,0.05ng/ml,0.1ng/ml,1ng/ml,5ng/ml,10ng/ml,50ng/ml,100ng/ml,150ng/ml,200ng/ml,将制备的安培免疫传感器分为 5 组,每组含 10 个传感器,安培免疫传感器的反应腔中分别加入 10 μ L 不同浓度的 AFP 抗原溶液标准品,并在 37℃ 下温育 30min。反应完后用 PBS 小心洗去未反应抗原。

[0080] (b) 将本例中制备的样品和对照品配合成的配成 1mg/ml 悬液, 组 1 中安培免疫传感器的反应腔中滴加 10  $\mu$ L 样品, 组 2 ~ 组 5 传感器的反应腔中分别滴加加对照品 1 ~ 4 探针悬液 10  $\mu$ L, 37°C 温育 30min。

[0081] (c) 在安培免疫传感器的反应腔中加入含有浓度为 5mmol/L 过氧化脲溶液和 1mmol/L 邻苯二酚的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲溶液反应 3min; 在电化学工作站上, 用循环伏安法(CV) 记录还原峰电流 I (扫描范围从 -0.3V 至 -0.8V)。

[0082] (d) 步骤(C) 所得到还原峰电流与对应抗原标准品溶液的浓度一组数据, 采用平均斜率法以还原峰电流对抗原标准品溶液浓度进行线性回归分析, 便得到还原峰电流与抗原标准品溶液浓度对应关系的直线方程, 即标准曲线; 采用 10 个空白标本进行检测, 计算平均值  $\bar{x}$  和标准差 s, 以  $\bar{x}+3s$  作为检测限。

[0083] 表 1 是不同二抗探针检测 AFP 抗原效果的比较, 由表 1 可以得出, 本申请所制备的二抗探针进行电化学检测时, 与其他方法制备的二抗探针相比具有线性范围宽、灵敏度高的优点。

[0084] 表 1 不同二抗探针检测 AFP 抗原的效果比较

二抗探针	线性范围	检测限
样品	0.01~200ng/mL	4pg/mL
对照品 1	0.05~10ng/ng/mL	6pg/mL
对照品 2	0.02~4ng/mL	10pg/mL
对照品 3	0.02~ 100ng/mL	20pg/mL
对照品 4	0.5-16ng/mL	0.5ng/mL

[0085]

[0086] 实施例 3

[0087] 1、二抗探针的制备和表征

[0088] (1) 磁性纳米颗粒的制备和表征

[0089] 同实施例 1 步骤 1 所示。

[0090] (2) 负载抗体的纳米微球的制备和表征

[0091] 负载抗体的纳米微球的制备: 将 10mg 磁性纳米颗粒分散在 5mL pH7.0 磷酸盐缓冲液中, 加入 1mg 辣根过氧化物酶标记的 HIV p24 抗体(HRP-anti-HIV p24)。搅拌 6h 后, 外加磁场分离未结合的抗体, 得到负载抗体的纳米微球。

[0092] (3) 纳米球的制备

[0093] 同实施例 1 步骤 3 所示。

[0094] (4) 二抗探针的制备

[0095] 同实施例 1 步骤 4 所示。

[0096] 2. 采用二抗探针检测抗原浓度

- [0097] (1) 安培免疫传感器的制备
- [0098] (a) 石墨烯 / 壳聚糖(GS/CS) 在丝网印刷电极表面修饰成膜
- [0099] 同实施例 1 中步骤 2 中 (a)。
- [0100] (b) 电镀金
- [0101] 同实施例 1 中的步骤 2 中(b)
- [0102] (c)在丝网印刷电极的反应腔中加入 10  $\mu$  L HIV p24 单克隆一抗后,丝网印刷电极放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱低温温育 12 小时后,用 PBS 充分洗涤未结合和结合不牢固抗体。
- [0103] (d) BSA 封闭
- [0104] 同实施例 1 中的步骤 2 中(d)
- [0105] (2) 定量标准曲线制备 :
- [0106] (a) 将 HIV 抗原溶液标准品稀释成 0. 01ng/ml, 0. 05ng/ml, 0. 1ng/ml, 0. 5ng/ml, 1ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 15ng/ml, 25ng/ml, 在安培免疫传感器的反应腔中加入 10  $\mu$  L 不同浓度的 HIV 抗原溶液标准品,并在 37 $^{\circ}$ C 下温育 30min。反应完后用 PBS 小心洗去未反应抗原。
- [0107] (b) 将步骤 1 合成的二抗探针配成 1mg/ml 悬液,在安培免疫传感器的反应腔中滴加 10mL 二抗探针悬液,37 $^{\circ}$ C 温育 30min ;
- [0108] (c) 在安培免疫传感器的反应腔中加入含有浓度为 5mmol/L 过氧化脲溶液和 1mmol/L 邻苯二酚的 0. 1mol/L 磷酸盐缓冲溶液反应 3min ;在电化学工作站上,用示差脉冲伏安法(DPV) 记录还原峰电流 I, (扫描范围从 0. 2V 至 -0. 5V)。
- [0109] (d) 步骤(C)所得到还原峰电流与对应抗原标准品溶液的浓度一组数据,采用平均斜率法以还原峰电流对抗原标准品溶液浓度进行线性回归分析,便得到还原峰电流与抗原标准品溶液浓度对应关系的直线方程,即标准曲线。DPV 还原峰电流和 HIV 抗原浓度数值见图 5 内插图,其线性方程为 : $I=15+0. 97\text{Log}[C_{p24}]$ 。
- [0110] 将待测样品加入到安培免疫传感器的反应腔中,以步骤(1) 同样的方法和反应条件采用 DPV 记录还原峰电流,然后,将检测样品得到的还原峰电流值代入步骤(a)所得到的直线方程中即可算出待测样品中抗原的浓度。采用 10 个空白样品进行检测,计算平均值  $\bar{x}$  和标准差 s,以  $\bar{x}+3s$  作为检测限。
- [0111] 在本例中,对 AFP 的检测范围为 0. 01 ~ 200ng/mL,检测限为 4pg/mL。
- [0112] 实施例 4 (对比实验 2)
- [0113] 一、实验材料
- [0114] 1. 抗原和抗体 :HIV p24 抗原标准品、HIV p24 单克隆抗体(anti-HIV p24)、辣根过氧化物酶标记的 HIV p24 抗体(HRP-anti-HIV p24) 和 HIV p24ELIS 试剂盒均购自美国 Abcam 公司。
- [0115] 2. 安培免疫传感器 :按实施例 3 所述方法制得。
- [0116] 3. 二抗探针
- [0117] 3. 1 样品 : 按实施例 3 所述方法制得的二抗探针。
- [0118] 3. 2 对照品
- [0119] 对照品 1 :
- [0120] (1) 磁性纳米颗粒的制备

[0121] 磁性纳米颗粒的制备:具体制备方法可参照公开号为 CN101302361A 的发明专利申请。

[0122] (2) 负载抗体的纳米微球的制备和表征

[0123] 负载抗体的纳米微球的制备:将 10mg 磁性纳米粒子分散在 5mL pH7.0 磷酸盐缓冲液中,加入 1mg HRP-anti-HIV p24,搅拌 6h 后,外加磁场分离未结合的抗体,外加磁性条件下磁性分离,得到负载抗体的纳米微球。

[0124] (3) 磁性探针的制备

[0125] 将 10mg 负载抗体的纳米微球分散在 5mL 的 pH7.0 磷酸盐缓冲液中,依次加入 5mg 辣根过氧化物酶、10mg 牛血清白蛋白(BSA),4℃ 搅拌 6h,利用外加磁场分离磁性纳米颗粒,洗涤,得到磁性探针用 HRP-anti-HIV p24-ZMPs 探针表示。

[0126] 对照品 2 :HIV p24ELISA 试剂盒中的酶标二抗作为对照品 2。称为 HRP-anti-HIV p24。

[0127] 二、实验方法

[0128] 1. 实验分为 3 组,每组中实验除加入的二抗探针不同外,实验方法的操作过程完全相同。

[0129] 2. 实验过程

[0130] 2.1 定量标准曲线制备:

[0131] (a) 将 p24 抗原标准品稀释成 0.01ng/ml,0.05ng/ml,0.1ng/ml,0.5ng/ml,1ng/ml,5ng/ml,10ng/ml,15ng/ml,25ng/ml,将制备的安培免疫传感器分为 3 组,每组含 9 个传感器,安培免疫传感器的反应腔中分别加入 10  $\mu$  L 不同浓度的 p24 抗原标准品,并在 37℃ 下温育 30min。反应完后用 PBS 小心洗去未反应抗原。

[0132] (b) 将本例中制备的样品和对照品配合成的 1mg/ml 悬液,组 1 中安培免疫传感器的反应腔中滴加 10  $\mu$  L 样品,组 2 ~ 组 3 传感器的反应腔中分别滴加对照品 1 ~ 2 探针悬液 10  $\mu$  L,37℃ 温育 30min,洗涤。

[0133] (c) 在安培免疫传感器的反应腔中加入含有浓度为 5mmol/L 过氧化脲溶液和 1mmol/L 邻苯二酚的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲溶液反应 3min;在电化学工作站上,用示差脉冲伏安法(DPV)记录还原峰电流 I (扫描范围从 0.2V 至 -0.5V)。

[0134] (d) 步骤(C)所得到还原峰电流与对应抗原标准品溶液的浓度一组数据,采用平均斜率法以还原峰电流对抗原标准品溶液浓度进行线性回归分析,便得到还原峰电流与抗原标准品溶液浓度对应关系的直线方程,即标准曲线;采用 10 个空白标本进行检测,计算平均值  $\bar{x}$  和标准差  $s$ ,以  $\bar{x}+3s$  作为检测限。

[0135] 表 2 是不同二抗探针检测 HIV p24 抗原效果的比较,由表 2 可以得出,本申请所制备的二抗探针进行电化学检测时,与其他方法制备的二抗探针相比具有线性范围宽、灵敏度高的优点。

[0136] 表 2 不同二抗探针检测 HIV p24 抗原的效果比较

	二抗探针	线性范围	检测限
	样品	0.01~25 ng/mL	4pg/mL
[0137]	对照品 1	0.05~16 ng/mL	0.5ng/ mL
	对照品 2	0.5~15ng/ml	1ng/mL

[0138] 实施例 5 (实际样品检测)

[0139] 采用上述例 1 中制备的二抗探针与例 1 中制备的传感器对三个未知样品进行电化学免疫检测,并同时利用 AFP ELISA 试剂盒对此三个实际样品进行检测。过程如下:

[0140] 1、二抗探针的制备和表征

[0141] 同实施例 1 所示步骤 1 所示

[0142] 2、安培免疫传感器的制备

[0143] 同实施例 1 所示步骤 2 所示

[0144] 3、安培免疫传感器法检测三个未知浓度检测样品

[0145] 同实施例 1 所示步骤 3 所示

[0146] 4、ELISA 法检测未知上述步骤 3 中的三个未知浓度样品

[0147] 参照 AFP ELISA 试剂盒说明书操作,包括:

[0148] (a) 准备:从冰箱取出试剂盒,室温复温平衡 30 分钟。

[0149] (b) 配液:用蒸馏水将 20 倍浓缩洗涤液稀释成原倍的洗涤液。

[0150] (c) 加标准品和待测样本:取足够数量的酶标包被板,固定于框架上,分别设置标准品孔、待测样本孔和空白对照孔,记录各孔位置,在标准品孔中加入标准品 50  $\mu$  L;待测样本孔中先加入待测样本 10  $\mu$  L,再加样本稀释液 40  $\mu$  L(即样本稀释 5 倍);空白对照孔不加。

[0151] (d) 温育:37 $^{\circ}$ C 水浴锅或恒温箱温育 30min。

[0152] (e) 洗板:弃去液体,吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液,静置 1min,甩去洗涤液,吸水纸上拍干,如此重复洗板 4 次。

[0153] (f) 加酶标工作液:每孔加入酶标工作液 50  $\mu$  L,空白对照孔不加。

[0154] (g) 温育:37 $^{\circ}$ C 水浴锅或恒温箱温育 30min。

[0155] (h) 洗板:弃去液体,吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液,静置 1min,甩去洗涤液,吸水纸上拍干,如此重复洗板 4 次(也可用洗板机按说明书操作洗板)。

[0156] (i) 显色:每孔先加入显色剂 A 液 50  $\mu$  L,再加入显色剂 B 液 50  $\mu$  L,平板混匀器混匀 30s(或用手轻轻震荡混匀 30s),37 $^{\circ}$ C 避光显色 15min。

[0157] (j) 终止:取出酶标板,每孔加终止液 50  $\mu$  L,终止反应(颜色由蓝色立转黄色)。

[0158] (k) 测定:以空白孔调零,在终止后 15 分钟内,用 450nm 波长测量各孔的吸光值(OD 值)。

[0159] (1) 计算:根据标准品的浓度及对应的 OD 值,计算出标准曲线的直线回归方程,再根据样本的 OD 值,在回归方程上计算出对应的样品浓度,也可以使用各种应用软件来计

算。最终浓度为实际测定浓度乘以稀释倍数。

[0160] 5 实际样品回收率

[0161] 上述步骤 3 中的三个样品中,分别加入不同浓度 AFP 标准品,并利用采用上述步骤 3 检测加入标准品后的样品中 AFP 浓度,计算回收率,回收率计算公式为回收率 =100%\*(本法检测值 - 本方法)/加入量。

[0162] 在本例中检测结果见表 3,由表 3 可以得出,该方法检测结果与 ELISA 具有较好的符合性,其回收百分比在 95%-101% 之间。结合实施例 1 中的结论可以得出,与其他方法相比,利用本方法检测对 AFP 检测准确性高,灵敏度好。

[0163] 表 3 人血清中 AFP 检测结果

[0164]

样品号	AFP 浓度(ng/mL)				
	本方法	ELISA	加入量	回收值	回收百分比 <sup>a</sup>
1	5.32	5.18	5.0	10.2	97.6
2	9.74	10.3	9.0	18.3	95.1
3	20.52	21.3	20.0	40.7	100.9

[0165] a. 回收率 =100%\*(回收值 - 本方法)/加入量

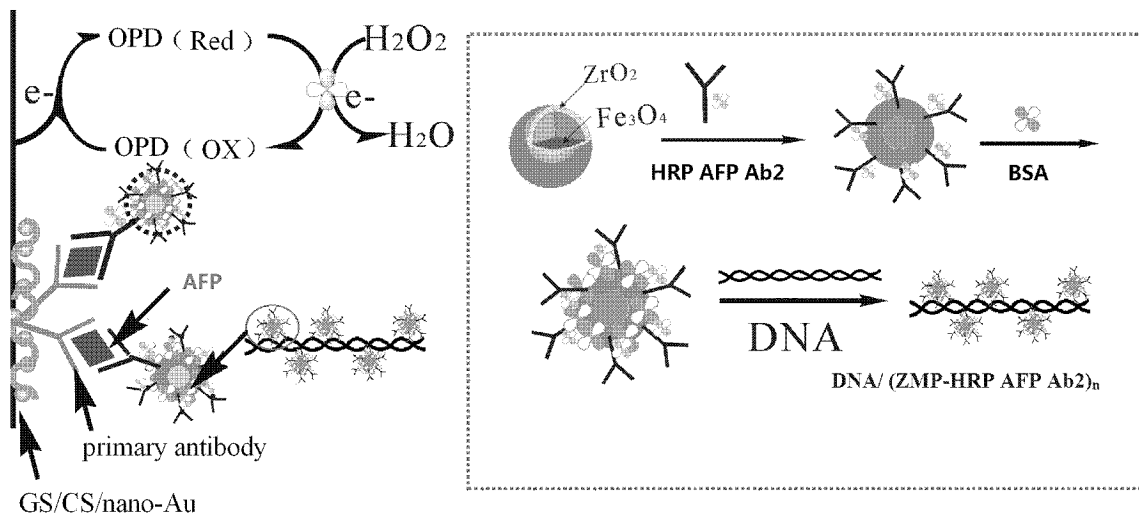


图 1

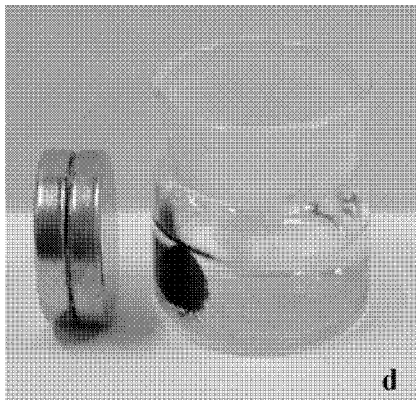


图 2

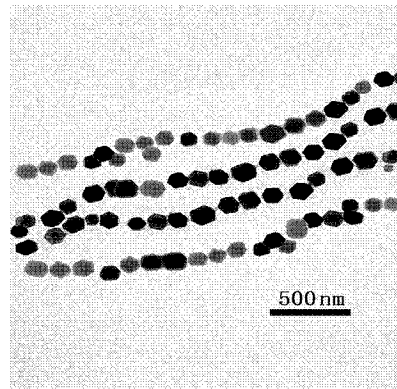


图 3

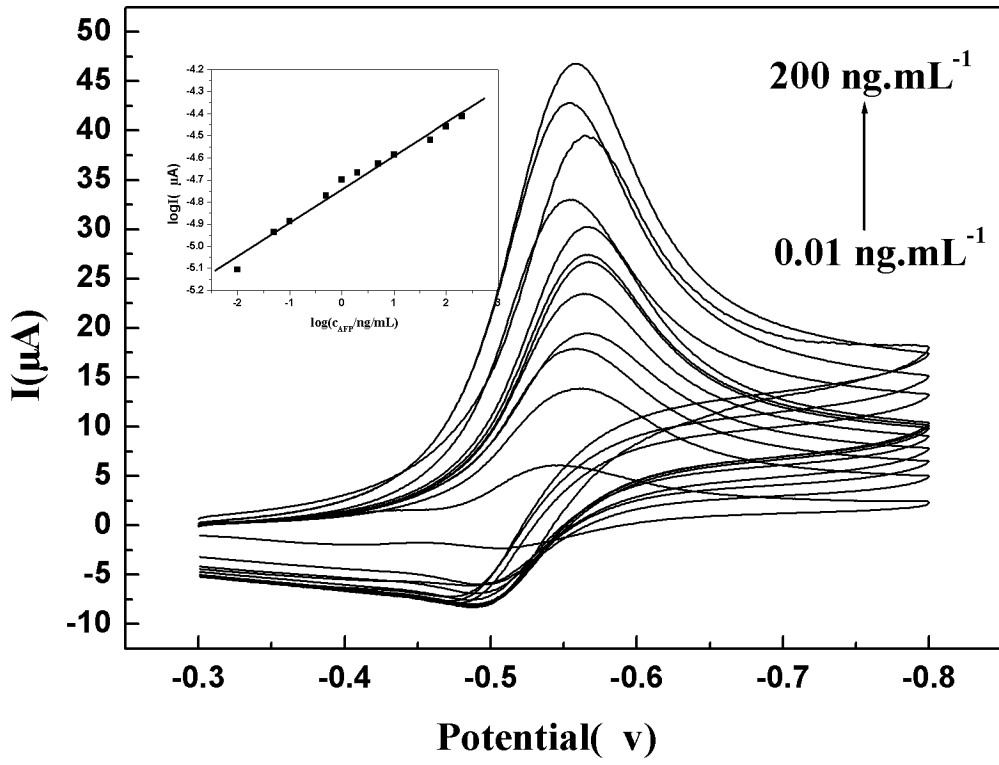


图 4

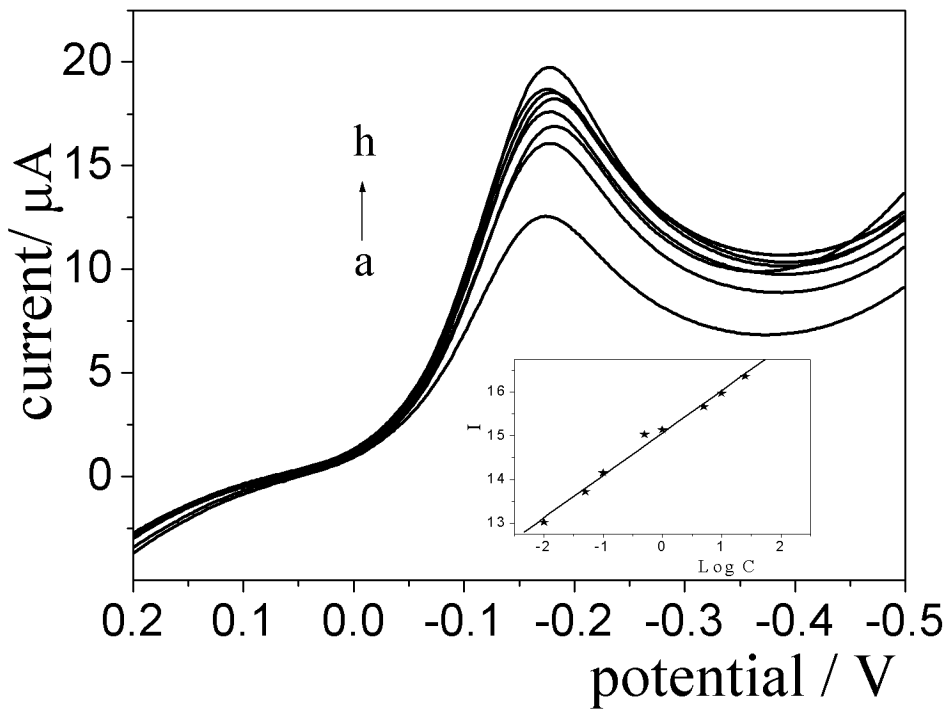


图 5

专利名称(译)	一种采用安培免疫传感器进行夹心免疫反应的二抗探针		
公开(公告)号	<a href="#">CN102253194B</a>	公开(公告)日	2013-08-28
申请号	CN201110174132.2	申请日	2011-06-25
[标]申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	南方医科大学学报		
[标]发明人	郑磊 贾立永 干宁 王前 李博 巫远招		
发明人	郑磊 贾立永 干宁 王前 李博 巫远招		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/60		
审查员(译)	段晓露		
其他公开文献	CN102253194A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及生物监测领域，具体涉及一种采用安培免疫传感器进行夹心免疫反应的二抗探针，其中所述的二抗探针由小牛胸腺DNA分子链和附着在小牛胸腺DNA分子链上的纳米球构成，其中所述的纳米球的表面为酶标记的抗体蛋白，内部为磁性纳米颗粒，该颗粒为在四氧化三铁纳米颗粒表面沉积一层无定形氧化锆形成。本发明所述的二抗探针适于采用安培免疫传感器进行夹心免疫反应测量抗原的浓度，且具有检测线性范围宽，检测极限低的优点。

