



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103529208 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 22

(21) 申请号 201210230562. 6

(22) 申请日 2012. 07. 04

(71) 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 任吉存 兰韬 黄香宜

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 许亦琳 余明伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

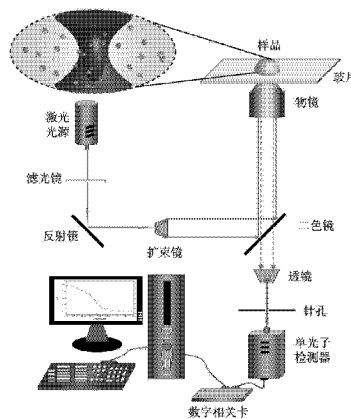
权利要求书1页 说明书11页 附图3页

(54) 发明名称

一种均相免疫分析方法

(57) 摘要

本发明公开了一种均相免疫分析方法,为采用均相夹心免疫分析法或者均相竞争免疫分析法,将含有待测物的样本与两种被纳米贵金属标记的抗体(或者一种被纳米贵金属标记的抗体及一种被纳米贵金属标记的抗原)在均相的免疫反应体系中进行夹心免疫反应或竞争免疫反应,通过散射相关光谱技术获得表征反应液中含纳米贵金属的粒子的粒径大小的表征参数,根据该表征参数与待测物浓度之间的关系,获知样本中待测物的浓度。本发明的方法避免了免疫分析中繁琐的步骤,使得操作非常简便,且检测灵敏度高,具备良好的应用前景。



1. 一种均相免疫分析方法,选自以下任一:

方法一,包括下列步骤:

采用均相夹心免疫分析法,将含有待测物的样本与两种被纳米贵金属标记的抗体,在均相的免疫反应体系中进行夹心免疫反应,通过散射相关光谱技术获得表征反应液中含纳米贵金属的粒子的粒径大小的表征参数,根据该表征参数与待测物浓度之间的关系,获知样本中待测物的浓度;

方法二,包括下列步骤:

采用均相竞争免疫分析法,将含有待测物的样本与被纳米贵金属标记的抗体和被纳米贵金属标记的抗原或半抗原在均相的免疫反应体系中进行竞争免疫反应,通过散射相关光谱技术获得表征反应液中含纳米贵金属的粒子的粒径大小的表征参数,根据该表征参数与待测物浓度之间的关系,获知样本中待测物的浓度。

2. 如权利要求 1 所述均相免疫分析方法,其特征在于,所述待测物选自抗体或抗原,所述均相免疫反应体系为液相反应体系。

3. 如权利要求 1 所述均相免疫分析方法,其特征在于,所述纳米贵金属选自纳米金、纳米银和纳米铂。

4. 如权利要求 1 所述均相免疫分析方法,其特征在于,纳米贵金属标记抗体或抗原的摩尔比为 1:1 到 1:50。

5. 如权利要求 1 所述均相免疫分析方法,其特征在于,所述纳米贵金属标记抗原或抗体是将抗原或抗体经二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇修饰后与纳米贵金属共价连接而得。

6. 如权利要求 1-5 任一权利要求所述均相免疫分析方法,其特征在于,所述通过散射相关光谱技术获得表征反应液中含纳米贵金属的粒子的粒径大小的表征参数的方法具体为:采用激光照射反应液,采集反应液受激光照射后产生的散射光,获得散射相关光谱曲线,从而获得表征反应液中含纳米贵金属的粒子的粒径大小的表征参数。

7. 如权利要求 6 所述均相免疫分析方法,其特征在于,所述表征参数为反应液中粒子的特征扩散时间。

8. 如权利要求 6 所述均相免疫分析方法,其特征在于,照射至反应液上的激光能量为 100 纳瓦到 1 毫瓦。

9. 如权利要求 6-8 任一所述均相免疫分析方法,其特征在于,激光照射反应液的方法为:激发光源发射激光,经连续可调中性衰减片后,由扩束镜对激光进行扩束,激光扩束后经二色镜以 45 度反射进入高数值孔径物镜,聚焦在盖玻片上或微反应孔中的反应液中;所述采集散射光,获得散射相关光谱曲线的方法为:用同一物镜收集反应液的散射光,经过聚光镜聚焦后,经针孔进入单光子检测器,由单光子检测器得到散射光信号经处理得到散射相关光谱曲线。

10. 如权利要求 1 均相免疫分析方法,其特征在于,方法一中,所述均相的反应体系中,以最终反应液的总体积为基准计,纳米贵金属标记抗体的初始浓度为 10 皮摩尔/升至 1 纳摩尔/升;方法二中,所述均相的反应体系中,以最终反应液的总体积为基准计,纳米贵金属标记抗体及纳米贵金属标记抗原的初始浓度均为 10 皮摩尔/升至 1 纳摩尔/升。

一种均相免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于纳米技术和生物分析技术领域,具体涉及一种均相免疫分析方法。

背景技术

[0002] 免疫分析是目前最常用的生物分析技术,它们在临床诊断,食品和公共安全检测中发挥十分重要的作用。目前免疫分析几乎均采用微孔板为分析平台的非均相免疫反应模式。这种方法存在某些严重的缺陷例如需要抗体包埋,缓慢的异相免疫反应,多次冲洗和酶放大反应等步骤后才能进行离线检测分析。因此,这种方法操作复杂,耗费很长的分析时间,不能满足某些快速检测和诊断的要求。另外该模式需要样品和试剂的量较大,一般反应体积为 50 微升以上,检测成本较高,不适用于大规模人群的普查和筛选。更重要的是目前免疫分析大都采用荧光、吸光度和化学发光等检测方法,这些方法存在固有缺陷,会影响分析的灵敏度和选择性。在荧光检测中,生物样品的自荧光以及标记荧光探针光漂白会影响分析结果的灵敏度和可靠性。吸光度法和化学发光检测是基于酶放大技术,选择性和灵敏度不够理想,常常会产生假阳性结果。总体来说,现行免疫分析方法灵敏度和选择性不够高,很难用于某些疾病(如恶性肿瘤)的早期诊断。

[0003] 液相法(或称为均相法)的免疫反应和信号测定在溶液中一步完成,没有固相的参与,因此反应速度较快,操作也相对简单,其中均相荧光免疫测定应用最为广泛。目前均相荧光免疫分析是基于荧光共振能量转移原理构建的。

[0004] 但是荧光共振能量转移分析系统结构复杂,仪器价格昂贵。另外,生物体内自身荧光会增加背景的干扰,其应用也受到一定的限制。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于针对现有技术的不足,提供一种均相免疫分析新方法。

[0006] 本发明均相免疫分析方法的原理为:首先将纳米贵金属分别标记在两种抗体(或一种抗体和抗原)上,当纳米贵金属标抗体和/或抗原加入到含有待测抗原的溶液中,将会发生夹心免疫反应或竞争免疫反应,生成的二聚或多聚免疫复合物的半径大于游离的纳米贵金属标抗体,夹心免疫反应中,待测抗原浓度越高,含纳米贵金属的粒子的平均粒径将变得越大;竞争免疫反应中,待测抗原浓度越低,含纳米贵金属的粒子的平均粒径将变得越大,因此可根据表征含纳米贵金属的粒子的粒径的表征参数与待测抗原或抗体浓度之间的关系建立定量分析方法。

[0007] 为了灵敏地检测含贵金属纳米粒子的复合物的平均粒径变化,本发明还进一步将散射相关光谱与贵金属纳米粒子的标记技术结合,采用散射相关光谱灵敏地测定贵金属纳米粒子的粒径变化。散射相关光谱是一种单颗粒分析方法,它的原理是基于在高聚焦的激光束下,单个贵金属纳米粒子由于布朗运动,产生散射信号的涨落,通过相关分析可获得激光照射区内粒子的特征扩散时间(或水合动力学半径)和粒子的数目等的特征参数。在免疫分析中,一般采用粒子的特征扩散时间为特征参数。

[0008] 基于上述原理,本发明提供了一种均相免疫分析新方法,选自以下任一:

[0009] 方法一:

[0010] 包括下列步骤:采用均相夹心免疫分析法,将含有待测物的样本与两种被纳米贵金属标记的抗体,在均相的免疫反应体系中进行夹心免疫反应,通过散射相关光谱技术获得表征反应液中含纳米贵金属的粒子的粒径大小的表征参数,根据该表征参数与待测物浓度之间的关系,获知样本中待测物的浓度;

[0011] 方法二:

[0012] 包括下列步骤:采用均相竞争免疫分析法,将含有待测物的样本与被纳米贵金属标记的抗体和被纳米贵金属标记的抗原或半抗原在均相的免疫反应体系中进行竞争免疫反应,通过散射相关光谱技术获得表征反应液中含纳米贵金属的粒子大小的表征参数,根据该表征参数与待测物浓度之间的关系,获知样本中待测物的浓度。

[0013] 本发明的方法,可用于对待测物的定性或定量分析。

[0014] 所述待测物为抗原或半抗原。

[0015] 所述样本可为各种常规液体样本,如血清、体液、排泄物、分泌物等液体采样的原样本或经常规稀释的样本,或者如毛发、指甲等固定样本经常规溶解或提取处理后的液体样本。

[0016] 所述纳米贵金属可选自纳米金,纳米银和纳米铂。纳米贵金属可市购或自行制备。

[0017] 纳米贵金属的粒径优选 10 纳米至 100 纳米。

[0018] 较佳的,纳米贵金属标记抗体或抗原的摩尔比为 1:1 到 1:50。

[0019] 纳米贵金属标记抗原或抗体可采用现有技术标记,如共价连接或吸附连接。较佳的,所述纳米贵金属标记抗原或抗体是将抗原或抗体经二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇(4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53-hexadeca-28, 29-dithiahexapentacontanedioic acid di-N-succinimidyl ester)修饰后与纳米贵金属共价连接而得。二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇的修饰,能使纳米贵金属与抗体或抗原的共价连接更为牢固,不易断裂,检测体系稳定性会更优。

[0020] 所述通过动态光散射技术获得表征反应液中含纳米贵金属的粒子的粒径大小的表征参数的方法具体为:采用激光照射反应液,采集反应液受激光照射后产生的散射光,获得散射相关光谱曲线,从而获得表征反应液中含纳米贵金属的粒子的粒径大小的表征参数。

[0021] 所述表征参数为任意可表征反应液中粒子大小的表征参数,如特征扩散时间、扩散系数和平均动力学半径等。

[0022] 优选的,所述表征参数为反应液中粒子的特征扩散时间。所述表征参数中,特征扩散时间与待测物的浓度呈线性关系,因此更为优选。

[0023] 照射至反应液上激光能量一般为 100 纳瓦到 1 毫瓦。

[0024] 优选的,照射反应液的激光为单一波长的激光,激光波长选自 400-700nm。最佳的,所述激光波长为所选纳米贵金属散射能力最强的波长。

[0025] 所述照射至反应液上的激光为高聚焦的激光束。所述高聚焦的激光束可通过将激光扩束并通过高数值孔径的物镜获得。较佳的,所述物镜的数值孔径为 0.9-1.60。

[0026] 更为具体的,激光照射反应液的方法为:激发光源发射激光,经连续可调中性衰减

片后,由扩束镜对激光进行扩束,激光扩束后经二色镜以 45 度反射进入高数值孔径物镜,聚焦在盖玻片上或微反应孔中的反应液中。

[0027] 所述激发光源发射的激光可以是连续激光或脉冲激光,激光照射的时间一般在 30 秒以上。

[0028] 受激光照射的反应液区域为微区(一般小于 10-15 升)。

[0029] 受激光照射的反应液可位于载玻片上或者至于微反应孔中。

[0030] 所述采集散射光,获得散射相关光谱曲线的方法为现有技术,如:用同一物镜收集反应液的散射光,经过聚光镜聚焦后,经针孔进入单光子检测器,由单光子检测器得到散射光信号经处理得到散射相关光谱曲线。

[0031] 根据该表征参数与待测物浓度之间的关系,获知样本中待测物的浓度可具体为:根据所选表征参数与待测物浓度的工作曲图线或标准曲线图,获知样本中待测物的浓度。

[0032] 进一步的,在方法一中,选择与两种被纳米贵金属标记的抗体与待测物发生夹心免疫反应,所述两种被纳米贵金属标记的抗体均是待测物的特异性抗体。

[0033] 方法一中,所述特异性抗体可为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0034] 在方法一中,待测物、被纳米贵金属标记的抗体可以任意顺序加入均相反应体系。

[0035] 方法一中,所述均相的免疫反应体系中,以最终反应液的总体积为基准计,纳米贵金属标记抗体的初始浓度为 10 皮摩尔 / 升至 1 纳摩尔 / 升。

[0036] 进一步的,方法二中,所述被纳米贵金属标记的抗体为待测物的特异性抗体,所述被纳米贵金属标记的抗原为待测物的竞争抗原(即能与待测物竞争与待测物的特异性抗体结合的抗原)。

[0037] 方法二中,先将待测物与被纳米贵金属标记的抗体在均相反应体系中免疫反应,而后加入被纳米贵金属标记的抗原进行免疫反应。

[0038] 方法二中,所述特异性抗体可为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0039] 方法二中,所述均相的免疫反应体系中,以最终反应液的总体积为基准计,纳米贵金属标记抗体及纳米贵金属标记抗原的初始浓度均为 10 皮摩尔 / 升至 1 纳摩尔 / 升。

[0040] 所述方法一或方法二中的均相的免疫反应体系均为液相反应体系,免疫反应体系的反应液中的其余成分均为常规液相免疫反应中的成分,如溶剂采用磷酸盐缓冲液。反应体系的反应条件也为常规,如在 37 摄氏度下孵育合适的时间。

[0041] 本发明的均相免疫分析的方法,包括纳米贵金属标记抗体和 / 或抗原过程和散射光相关光谱检测过程。这种方法避免了免疫分析中繁琐的步骤,使得操作非常简便。贵金属纳米粒子具有优异的光散射性质和良好的生物相容性,使得检测非常灵敏。在检测过程中使用了新颖的散射光相关光谱系统,其具有快速、灵敏、操作简单,试剂和样品消耗量少等优点,在均相免疫分析中有很好的应用前景。

附图说明

[0042] 图 1 为散射光相关光谱系统示意图。

[0043] 图 2 为均相夹心免疫分析原理示意图。

[0044] 图 3 为均相竞争免疫分析原理示意图。

[0045] 图 4. 实施例 1 甲胎蛋白测定的工作曲线(均相夹心免疫分析)。

[0046] 图 5. 实施例 2 甲胎蛋白测定的工作曲线(均相竞争免疫分析)。

[0047] 图 6. 实施例 317 β -雌二醇测定的工作曲线。

具体实施方式

[0048] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0049] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。

[0050] 除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。实施例中未写明来源的原料均可经市购途径获得。

[0051] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组 DNA 技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明,具体可参见 Sambrook 等 MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989and Third edition,2001;Ausubel 等, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York,1987and periodic updates; the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego;Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego,1998;METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, Chromatin(P. M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego,1999; 和 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol.119, Chromatin Protocols(P. B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa,1999 等。

[0052] 本发明实施例所使用的检测设备如图 1 所示,由(1)激发光源和激光扩束系统;(2)激光共聚焦和信号收集系统;(3)信号采集和数据处理系统三部分组成。即激发光源—激光器发射激光后,经环形连续可调中性衰减片衰减后,由扩束镜对激光进行扩束。激光扩束后经二色镜以 45 度反射进入物镜,聚焦在盖玻片上的样品溶液中。激光照射产生的散射光由物镜收集,经过聚光镜收集,进入针孔和单光子检测器。单光子检测器得到散射光信号经关联卡后得到相关数字信号,即散射相关光谱曲线。

[0053] 本发明构建的均相免疫分析方法主要有两种,即均相夹心免疫分析和均相竞争免疫分析,这两种方法的原理图如图 2 和图 3 所示。在均相夹心免疫分析中纳米贵金属标记抗原和 / 或抗体将形成二聚或多聚的免疫复合物,使溶液中纳米粒子水合动力学半径增大,散射光相关光谱系统能灵敏地检测到纳米粒子粒径的变化。在均相竞争免疫分析中,纳米贵金属标记抗原能替换免疫复合物中的抗原,并形成新的免疫复合物,从而改变溶液中纳米粒子的水合动力学半径,散射光相关光谱系统能灵敏地检测到纳米粒子粒径的变化。

[0054] 纳米金制备:

[0055] 纳米金通过柠檬酸三钠还原氯金酸溶液制得。即 100 毫升 0.01% 氯金酸溶液加热至沸腾,并保持此状态 15 分钟,然后加入 0.5-5 毫升的 1% 的柠檬酸三钠溶液。加入柠檬酸三钠溶液的体积将决定纳米金的粒径,例如 1 毫升的柠檬酸三钠溶液可以制得约 36 纳米金。持续加热 5-30 分钟直到溶液颜色不发生改变为止。制得粒径约为 10-60 纳米的纳米金。将溶液冷却到室温后,在 4 摄氏度保存待用。

[0056] 纳米贵金属与蛋白连接:

[0057] (1) 用二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇对抗体进行修饰;

[0058] 二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇修饰抗体或抗原,可在磷酸盐缓冲液中,将二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇与抗体混合,室温反应并纯化获得。所述磷酸盐缓冲液可选择 pH 7.4, 0.01 摩尔/升的磷酸盐缓冲液。

[0059] 具体的,在 100 微升磷酸盐缓冲液(pH 7.4, 0.01 摩尔/升)中分别加入 10 微升 1-10 毫克/毫升抗体溶液和 90 微升的 0.05 摩尔/升的含二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇溶液,室温下反应 8 小时。反应物用 50000 分子量的超滤膜超滤分离三次,去除未反应的含二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇。膜上沉积物用 100 微升磷酸盐缓冲液(pH 7.4, 0.01 摩尔/升)重新溶解,在 4 摄氏度保存待用。该步骤可以得到用含二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇修饰过的抗体溶液,溶液中二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇修饰过的抗体的浓度可通过加入磷酸盐缓冲液的体积进行调整。

[0060] 二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇修饰抗原的方法除原料由抗体变更为抗原外,其余同抗体。

[0061] (2) 纳米金与抗体共价连接;

[0062] 在 160 微升 10 至 1000 皮摩尔/升纳米金溶液中,加入 20 微升第(1)步得到的含二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇修饰的抗体溶液(5 纳摩尔/升)和 20 微升 0.01 摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.4, 含 0.3 毫克/毫升牛血清白蛋白),混匀后室温下反应 3 小时。反应物以 5000 转/分钟转速离心分离两次,去除未结合到纳米金表面的抗体。管中沉积物用 0.01 摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.4, 含 0.3 毫克/毫升牛血清白蛋白)重新溶解,在 4 摄氏度保存待用。该步骤可以得到蛋白修饰的纳米金溶液。

[0063] 纳米金同抗原共价连接的方法除原料由抗体变更为抗原外,其余同抗体。

[0064] (3) 纳米银与抗体共价连接;

[0065] 在 500 微升 10 至 1000 皮摩尔/升纳米银溶液中加入 5 微升 50 纳摩尔/升含二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇修饰的抗体溶液混匀后,4 摄氏度下反应 8 小时。反应产物加入 5 微升聚乙二醇 5000 (0.01%),混匀后在室温下反应 1 小时后以 14000 转/分钟转速离心分离一次,去除未结合到纳米银表面的抗体。管中沉积物用 0.01 摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.4, 含 0.01% 牛血清白蛋白)重新溶解至 100 微升,在 4 摄氏度保存待用。

[0066] (4) 纳米银与抗原共价连接;

[0067] 在 500 微升 10 至 1000 皮摩尔/升纳米银溶液中加入 5 微升 50 纳摩尔/升含二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇修饰的抗原溶液混匀后 4 摄氏度下反应 8 小时。反应产物加入 5 微升聚乙二醇 5000 (0.01%),混匀后在室温下反应 1 小时后以 14000 转/分钟转速离心分离一次,去除未结合到纳米银表面的抗原。管中沉积物用 0.01 摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.4, 含 0.01% 牛血清白蛋白)重新溶解至 100 微升,在 4 摄氏度保存待用。

[0068] (5) 纳米银与半抗原吸附连接

[0069] 在 500 微升 10 至 1000 皮摩尔 / 升纳米银溶液中加入 5 微升 50 纳摩尔 / 升半抗原溶液混匀后 4 摄氏度下反应 8 小时。反应产物加入 5 微升牛血清白蛋白溶液(0.01%),混匀后在室温下反应 1 小时后以 14000 转 / 分钟转速离心分离一次,去除未结合到纳米银表面的半抗原。管中沉积物用 0.01 摩尔 / 升磷酸盐缓冲液(pH7.4,含 0.01%牛血清白蛋白)重新溶解至 100 微升,在 4 摄氏度保存待用。

[0070] 散射相关光谱免疫分析

[0071] (1) 人血清中抗原分子夹心免疫分析

[0072] (I) 测定抗原的工作曲线

[0073] 将 20 微升 40 至 4000 皮摩尔 / 升的纳米金 - 抗体 1 溶液,20 微升 40 至 4000 皮摩尔 / 升的纳米金 - 抗体 2 溶液,20 微升 0.01 摩尔 / 升磷酸盐缓冲液(pH 7.4,含 0.3 毫克 / 毫升牛血清白蛋白)与 20 微升浓度分别为 1 皮摩尔 / 升、10 皮摩尔 / 升、100 皮摩尔 / 升、1 纳摩尔 / 升的抗原标样混合均匀后在 37 摄氏度下反应 50 分钟。然后,在光散射相关光谱系统上采用 633nm 激光对免疫结合产物进行检测。每个样品的采样时间为 300 秒。反复采样三次。以纳米金的特征扩散时间与抗原浓度作图,获得测定抗原的工作曲线。

[0074] (II) 癌症病人血清样品中抗原浓度的测定

[0075] 将癌症病人的血清样品用 0.01 摩尔 / 升磷酸盐缓冲液(pH7.4,含 0.3 毫克 / 毫升牛血清白蛋白)稀释 1000 倍后,取 20 微升稀释后的癌症病人血清样品与 20 微升 40 至 4000 皮摩尔 / 升的纳米金 - 抗体 1 溶液、20 微升 40 至 4000 皮摩尔 / 升的纳米金 - 抗体 2 溶液、20 微升 0.01 摩尔 / 升磷酸盐缓冲液(pH7.4,含 0.3 毫克 / 毫升牛血清白蛋白)混合均匀后在 37 摄氏度下反应 50 分钟,然后在光散射相关光谱系统上采用 633nm 激光对样品进行检测。每个样品的采样时间为 300 秒。反复采样三次。根据工作曲线,获得测定抗原的浓度。

[0076] (2) 样品中抗原分子竞争免疫分析

[0077] (I) 测定抗原的工作曲线

[0078] 将 10 微升 40 至 4000 皮摩尔 / 升的纳米银 - 抗体溶液、20 微升浓度分别为 5 皮摩尔 / 升、10 皮摩尔 / 升、50 皮摩尔 / 升、100 皮摩尔 / 升、500 皮摩尔 / 升、1 纳摩尔 / 升、5 纳摩尔 / 升、10 纳摩尔 / 升的抗原标样混合均匀后在 37 摄氏度下反应 50 分钟。向反应产物中加入 10 微升 40 至 4000 皮摩尔 / 升的纳米银 - 抗原溶液,混合均匀后在 37 摄氏度下反应 50 分钟。然后在光散射相关光谱系统上采用 488nm 激光进行检测。每个样品的采样时间为 300 秒。反复采样三次。以纳米银的特征扩散时间与抗原浓度作图,获得测定抗原的工作曲线。

[0079] (II) 实际样品中抗原浓度的测定

[0080] 将样品用 0.01 摩尔 / 升磷酸盐缓冲液(pH7.4,含 0.3 毫克 / 毫升牛血清白蛋白)稀释,取 20 微升稀释的样品与 10 微升 40 至 4000 皮摩尔 / 升的纳米银 - 抗体溶液混合均匀后在 37 摄氏度下反应 50 分钟。向反应产物中加入 10 微升 40 至 4000 皮摩尔 / 升的纳米银 - 抗原溶液,混合均匀后在 37 摄氏度下反应 50 分钟。然后在散射相关光谱系统上采用 488nm 激光进行检测。每个样品的采样时间为 300 秒。反复采样三次。根据工作曲线,获得测定抗原的浓度。

[0081] 实施例 1 甲胎蛋白的均相夹心免疫分析

[0082] 1. 纳米金制备

[0083] 纳米金通过柠檬酸三钠还原氯金酸溶液制得。即 100 毫升 0.01% 氯金酸溶液加热至沸腾,并保持此状态 15 分钟,然后加入 1 毫升的 1% 的柠檬酸三钠溶液。持续加热 15 分钟直到溶液颜色不发生改变为止。制得粒径约为 36 纳米的纳米金。将溶液冷却到室温后,在 4 摄氏度保存待用。

[0084] 2. 纳米金与甲胎蛋白抗体连接

[0085] (1) 用二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇对甲胎蛋白抗体 1 (北京北方生物技术研究提供) 和抗体 2 (北京北方生物技术研究提供) 进行修饰;

[0086] 在 100 微升磷酸盐缓冲液(pH 7.4, 0.01 摩尔/升)中分别加入 10 微升 1 毫克/毫升甲胎蛋白抗体(抗体 1 或抗体 2)和 90 微升的 0.05 摩尔/升的含二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇(4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53-hexadeca-28, 29-dithiahexapentacontanedioic acid di-N-succinimidyl ester)(Sigma-Aldrich 化学公司)溶液,室温下反应 8 小时。反应物用 50000 分子量的超滤膜超滤分离三次,去除未反应的含二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇。膜上沉积物用 100 微升 0.01 摩尔/升磷酸盐缓冲溶液重新溶解,在 4 摄氏度保存待用。该步骤可以得到浓度为 0.34 纳摩尔/升二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇修饰的抗体 1 和抗体 2。

[0087] (2) 纳米金与甲胎蛋白抗体共价连接;

[0088] 在 160 微升 340 皮摩尔/升纳米金溶液中加入 20 微升第一步得到的二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇修饰的甲胎蛋白抗体溶液(抗体 1 和抗体 2)和 20 微升 0.01 摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.4, 含 0.3 毫克/毫升牛血清白蛋白),混匀后室温下反应 3 小时。反应物以 5000 转/分钟转速离心分离两次,去除未结合到纳米金表面的抗体。管中沉积物用 0.01 摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.4, 含 0.3 毫克/毫升牛血清白蛋白)重新溶解,在 4 摄氏度保存待用。该步骤可以得到甲胎蛋白抗体 1 和抗体 2 修饰的两种纳米金溶液。

[0089] 3. 人血清中甲胎蛋白的光散射相关光谱免疫分析

[0090] (1) 测定甲胎蛋白的工作曲线;

[0091] 将 20 微升 340 皮摩尔/升的纳米金-抗体 1 溶液、20 微升 340 皮摩尔/升的纳米金-抗体 2 溶液、20 微升 0.01 摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH 7.4, 含 0.3 毫克/毫升牛血清白蛋白)与 20 微升浓度分别为 1 皮摩尔/升、10 皮摩尔/升、100 皮摩尔/升、1 纳摩尔/升的甲胎蛋白抗原标样(北京北方生物技术研究提供)混合均匀后在 37 摄氏度下反应 50 分钟,然后在共振光散射相关光谱系统上进行检测。每个样品的采样时间为 300 秒。根据金纳米的扩散时间与甲胎蛋白浓度相关,绘制甲胎蛋白测定的工作曲线。如图 4 所示。

[0092] (2) 癌症病人血清样品中甲胎蛋白分析

[0093] 将癌症病人的血清样品用 0.01 摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.4, 含 0.3 毫克/毫升牛血清白蛋白)稀释 1000 倍后,取 20 微升稀释后的癌症病人血清样品与 20 微升 340 皮摩尔/升的纳米金-抗体 1 溶液、20 微升 340 皮摩尔/升的纳米金-抗体 2 溶液、20 微升 0.01 摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.4, 含 0.3 毫克/毫升牛血清白蛋白)混合均匀后在 37 摄氏度下反应 50 分钟,然后在共振光散射相关光谱系统上进行检测。每个样品的采样时间为 300 秒。反复采样三次。根据甲胎蛋白测定的工作曲线,获得癌症病人血清样品中甲胎蛋白

的浓度。

[0094] 结果 :检测了 8 份样本,测得的甲胎蛋白的浓度与免疫分析试剂盒(北京北方生物技术研究所提供)的测定结果基本符合。其中,8 份样本的检测数据如表 1。

[0095] 表 1、正常人与癌症病人血清中甲胎蛋白含量测定

样品	试剂盒方法 (摩尔/升)	本方法 (摩尔/升)
正常人 1	1.54×10^{-10}	1.52×10^{-10}
正常人 2	1.96×10^{-10}	1.81×10^{-10}
正常人 3	1.91×10^{-10}	2.22×10^{-10}
[0096] 正常人 4	3.43×10^{-10}	3.07×10^{-10}
癌症病人 1	2.69×10^{-8}	2.83×10^{-8}
癌症病人 2	1.72×10^{-7}	1.48×10^{-7}
癌症病人 3	8.20×10^{-8}	7.07×10^{-8}
癌症病人 4	3.82×10^{-8}	4.00×10^{-8}

[0097] 实施例 2 甲胎蛋白的均相竞争免疫分析

[0098] 1. 纳米银与甲胎蛋白抗体、抗原连接

[0099] (1) 用二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇对甲胎蛋白抗体和甲胎蛋白抗原进行修饰;

[0100] 在 75 微升磷酸盐缓冲液(pH7.4, 0.01 摩尔/升)中分别加入 10 微升 1 毫克/毫升甲胎蛋白抗体和 500 微克/毫升甲胎蛋白抗原和 15 微升的 0.05 摩尔/升的含二硫键的羧基-聚乙二醇溶液,室温下反应 8 小时。反应物用 50000 分子量的超滤膜超滤分离三次,去除未反应的含二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇。膜上沉积物用 100 微升 0.01 摩尔/升磷酸盐缓冲液重新溶解该步骤可以得到含二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇修饰过的抗体和抗原,在 4 摄氏度保存待用。

[0101] (2) 纳米银与甲胎蛋白抗体共价连接;

[0102] 在 500 微升 100 皮摩尔/升纳米银(20 纳米)溶液中加入 5 微升 0.1 摩尔/升氢氧化钠溶液和 5 微升 50 纳摩尔/升含二硫键-琥珀酰胺酯-聚乙二醇修饰的甲胎蛋白抗体溶液混匀后 4 摄氏度下反应 8 小时。反应产物加入 5 微升含巯基的聚乙二醇 5000 (0.01%),混匀后在室温下反应 1 小时后以 14000 转/分钟转速离心分离一次,去除未结合到纳米银表面的抗体。管中沉积物用 0.01 摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.4, 含 0.01% 牛血清白蛋白)重新溶解至 100 微升,在 4 摄氏度保存待用。

[0103] (3) 纳米银与甲胎蛋白抗原共价连接;

[0104] 在 500 微升 100 皮摩尔/升纳米银溶液中加入 5 微升 50 纳摩尔/升含二硫键的羧基-聚乙二醇修饰的甲胎蛋白抗原溶液混匀后 4 摄氏度下反应 8 小时。反应产物加入 5 微升含巯基-聚乙二醇 5000 (0.01%),混匀后在室温下反应 1 小时后以 14000 转/分钟转速离心分离一次,去除未结合到纳米银表面的抗原。管中沉积物用 0.01 摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.4, 含 0.01% 牛血清白蛋白)重新溶解至 100 微升,在 4 摄氏度保存待用。

[0105] 3. 人血清中甲胎蛋白的光散射相关光谱免疫分析

[0106] (1) 测定甲胎蛋白的工作曲线；

[0107] 将 10 微升 500 皮摩尔 / 升的纳米银 - 抗体溶液、20 微升浓度分别为 5 皮摩尔 / 升、10 皮摩尔 / 升、50 皮摩尔 / 升、100 皮摩尔 / 升、500 皮摩尔 / 升、1 纳摩尔 / 升、5 纳摩尔 / 升、10 纳摩尔 / 升的抗原标样混合均匀后在 37 摄氏度下反应 50 分钟。向反应产物中加入 10 微升 500 皮摩尔 / 升的纳米银 - 抗原溶液，混合均匀后在 37 摄氏度下反应 50 分钟。然后在共振光散射相关光谱系统上进行检测。每个样品的采样时间为 300 秒。反复采样三次。根据银纳米的扩散时间与甲胎蛋白浓度相关数据，绘制甲胎蛋白测定的工作曲线(如图 5 所示)。

[0108] (2) 人血清样品中甲胎蛋白光散射相关光谱免疫分析；

[0109] 癌症病人血清样品中甲胎蛋白抗原浓度的共振光散射相关光谱免疫分析

[0110] 将癌症病人的血清样品用 0.01 摩尔 / 升磷酸盐缓冲液(pH7.4, 含 0.01% 牛血清白蛋白) 稀释 1000 倍后, 取 20 微升稀释的样品与 10 微升 500 皮摩尔 / 升的纳米银 - 抗体 1 溶液混合均匀后在 37 摄氏度下反应 50 分钟。向反应产物中加入 10 微升 500 皮摩尔 / 升的纳米银 - 抗原溶液, 混合均匀后在 37 摄氏度下反应 50 分钟。然后在共振光散射相关光谱系统上进行检测。每个样品的采样时间为 300 秒。反复采样三次。根据甲胎蛋白的工作曲线, 获得人血清中甲胎蛋白的浓度。

[0111] 实施例 317 β - 雌二醇(E2) 的均相竞争免疫分析

[0112] 1. 纳米银与 E2 抗体、半抗原(牛血清白蛋白 -E2) 共价连接

[0113] (1) 用含二硫键 - 琥珀酰胺酯 - 聚乙二醇对 E2 抗体进行修饰；

[0114] 在 75 微升 0.01 摩尔 / 升磷酸盐缓冲液(pH 7.4) 中分别加入 10 微升 1 毫克 / 毫升 E2 抗体(Sigma-Aldrich 化学公司) 和 15 微升的 0.05 摩尔 / 升的含二硫键 - 琥珀酰胺酯 - 聚乙二醇溶液, 室温下反应 8 小时。反应物用 50000 分子量的超滤膜超滤分离三次, 去除未反应的含二硫键 - 琥珀酰胺酯 - 聚乙二醇。膜上沉积物用 100 微升 0.01 摩尔 / 升磷酸盐缓冲液重新溶解, 在 4 摄氏度保存待用。该步骤可以得到用含二硫键 - 琥珀酰胺酯 - 聚乙二醇修饰过的 E2 抗体。

[0115] (2) 纳米银与 E2 抗体共价连接；

[0116] 在 500 微升 100 皮摩尔 / 升纳米银溶液中加入 5 微升 50 纳摩尔 / 升含二硫键 - 琥珀酰胺酯 - 聚乙二醇修饰的 E2 抗体溶液混匀后 4 摄氏度下反应 8 小时。反应产物加入 5 微升牛血清白蛋白溶液(0.01%), 混匀后在室温下反应 1 小时后以 14000 转 / 分钟转速离心分离一次, 去除未结合到纳米银表面的抗体。管中沉积物用 0.01 摩尔 / 升磷酸盐缓冲液(pH7.4, 含 0.01% 牛血清白蛋白) 重新溶解至 100 微升, 在 4 摄氏度保存待用。

[0117] (3) 纳米银与半抗原(牛血清白蛋白 -E2) 吸附连接；

[0118] 在 500 微升 100 皮摩尔 / 升纳米银溶液中加入 5 微升 50 纳摩尔 / 升牛血清白蛋白 -E2 溶液混匀后 4 摄氏度下反应 8 小时。反应产物加入 5 微升牛血清白蛋白溶液(0.01%), 混匀后在室温下反应 1 小时后以 14000 转 / 分钟转速离心分离一次, 去除未结合到纳米银表面的抗原。管中沉积物用 0.01 摩尔 / 升磷酸盐缓冲液(pH7.4, 含 0.01% 牛血清白蛋白) 重新溶解至 100 微升, 在 4 摄氏度保存待用。

[0119] 3. 人尿液中 E2 的光散射相关光谱竞争免疫分析

[0120] (1) 测定 E2 的工作曲线；

[0121] 将 10 微升 500 皮摩尔 / 升的纳米银 - 抗体溶液、20 微升浓度分别为 5 皮摩尔 / 升、10 皮摩尔 / 升、50 皮摩尔 / 升、100 皮摩尔 / 升、500 皮摩尔 / 升、1 纳摩尔 / 升、5 纳摩尔 / 升、10 纳摩尔 / 升的 E2 标样混合均匀后在 37 摄氏度下反应 50 分钟。向反应产物中加入 10 微升 500 皮摩尔 / 升的纳米银 - 牛血清白蛋白 -E2 溶液，混合均匀后在 37 摄氏度下反应 50 分钟。然后在共振光散射相关光谱系统上进行检测。每个样品的采样时间为 300 秒。根据银纳米的扩散时间与 E2 浓度相关，绘制 E2 测定的工作曲线。如图 6 所示

[0122] (2) 实际人尿液样品中 E2 浓度的共振光散射相关光谱免疫分析；

[0123] 取 20 微升尿液样品与 10 微升 500 皮摩尔 / 升的纳米银 - 抗体溶液混合均匀后在 37 摄氏度下反应 50 分钟。向反应产物中加入 10 微升 500 皮摩尔 / 升的纳米银 - 牛血清白蛋白 -E2 溶液，混合均匀后在 37 摄氏度下反应 50 分钟。然后在共振光散射相关光谱系统上进行检测。每个样品的采样时间为 300 秒。根据 E2 的工作曲线，获得尿液样品中 E2 的浓度。

[0124] 结果：检测了 5 份样本，测得的 E2 的浓度与 17 β -雌二醇免疫分析试剂盒(上海研辉生物技术有限公司)的测定结果基本符合。其中，5 份样本的检测数据如表 2。

[0125] 表 2、尿液中 17- β 雌二醇含量测定

样品	试剂盒方法 (摩尔/升)	本方法 (摩尔/升)
正常男性	3.2×10^{-11}	6.5×10^{-12}
孕妇 1	3.3×10^{-11}	2.9×10^{-11}
[0126] 孕妇 2	5.1×10^{-11}	4.9×10^{-11}
孕妇 3	4.4×10^{-11}	5.9×10^{-11}
孕妇 4	3.0×10^{-11}	2.8×10^{-11}
孕妇 5	3.6×10^{-11}	3.2×10^{-11}

[0127] 实施例 4 本发明方法灵敏度检测

[0128] 灵敏度检测方法实施例 1 中测定甲胎蛋白的工作曲线方法相同。将 20 微升 340 皮摩尔 / 升的纳米金 - 抗体 1 溶液、20 微升 340 皮摩尔 / 升的纳米金 - 抗体 2 溶液、20 微升 0.01 摩尔 / 升磷酸盐缓冲液 (pH 7.4, 含 0.3 毫克 / 毫升牛血清白蛋白) 与 20 微升浓度分别为 1 皮摩尔 / 升、10 皮摩尔 / 升、100 皮摩尔 / 升、1 纳摩尔 / 升的甲胎蛋白抗原标样 (北京北方生物技术研究所) 混合均匀后在 37 摄氏度下反应 50 分钟，然后在共振光散射相关光谱系统上进行检测。每个样品的采样时间为 300 秒。根据金纳米的扩散时间与甲胎蛋白浓度相关，绘制甲胎蛋白测定的工作曲线。根据工作曲线，该方法测定甲胎蛋白的灵敏度为 1 皮摩尔 / 升。

[0129] 以上所述，仅为本发明的较佳实施例，并非对本发明任何形式上和实质上的限制，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员，在不脱离本发明方法的前提下，还将可以做出若干改进和补充，这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。凡熟悉本专业的技术人员，在不脱离本发明的精神和范围的情况下，当可利用以上所揭示的技术内容而做出的些许更

动、修饰与演变的等同变化,均为本发明的等效实施例;同时,凡依据本发明的实质技术对上述实施例所作的任何等同变化的更动、修饰与演变,均仍属于本发明的技术方案的范围

内。

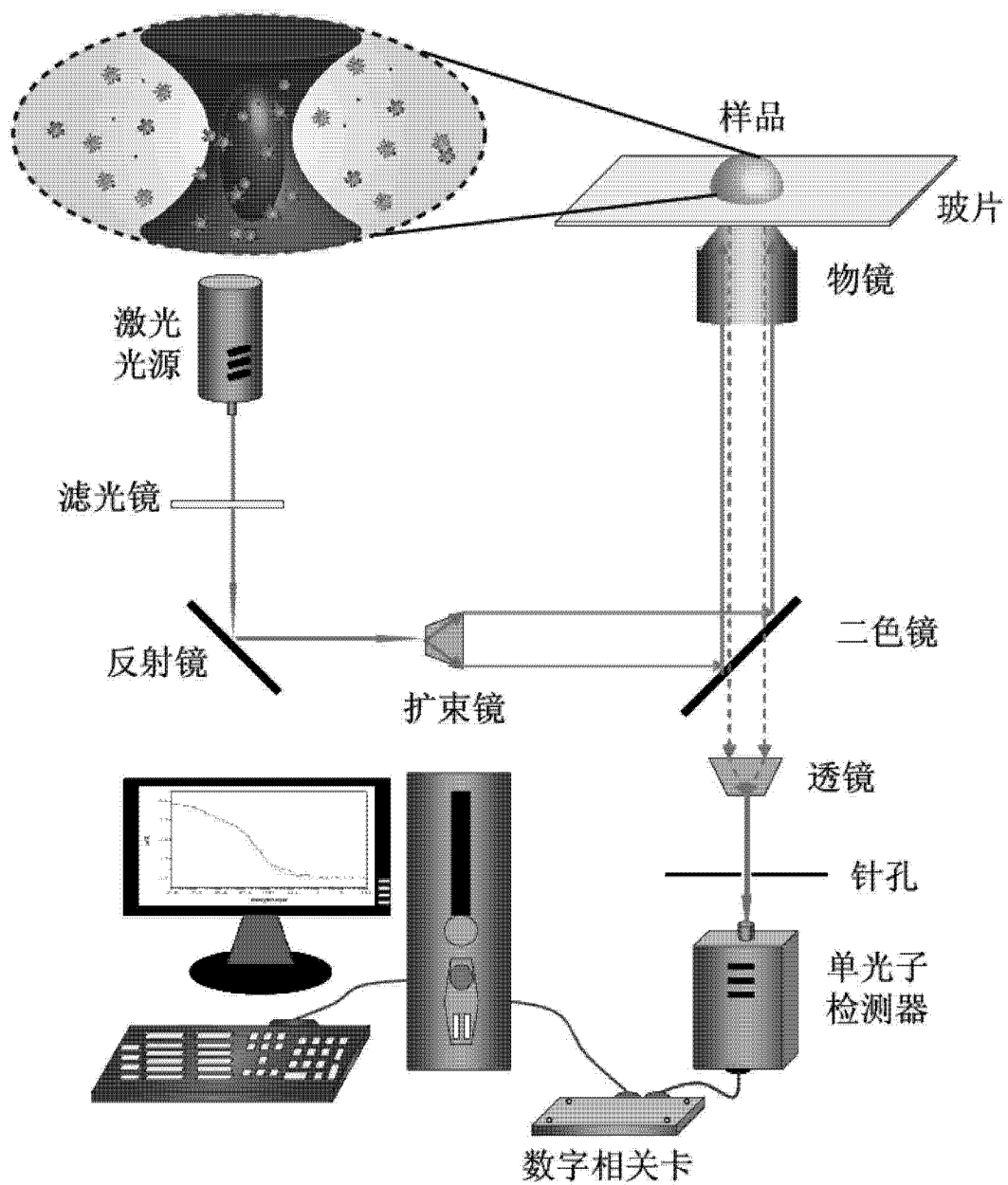


图 1

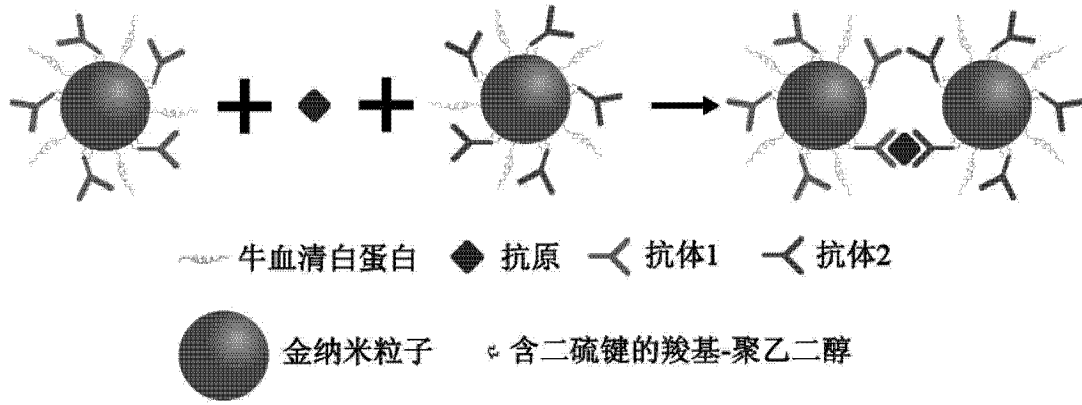


图 2

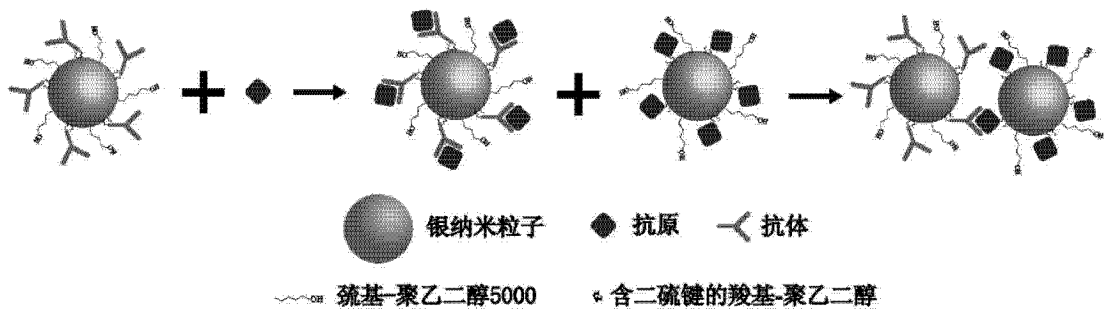


图 3

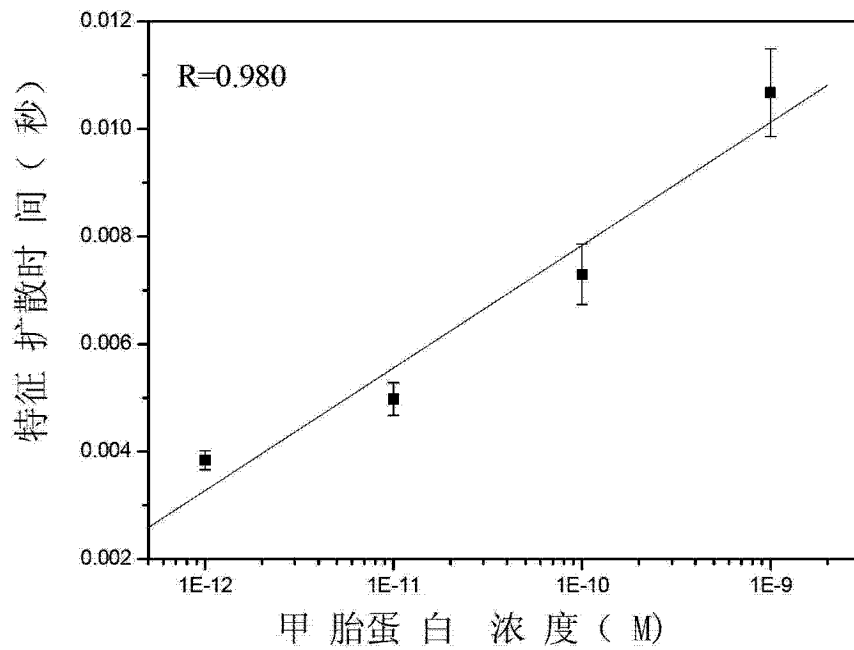


图 4

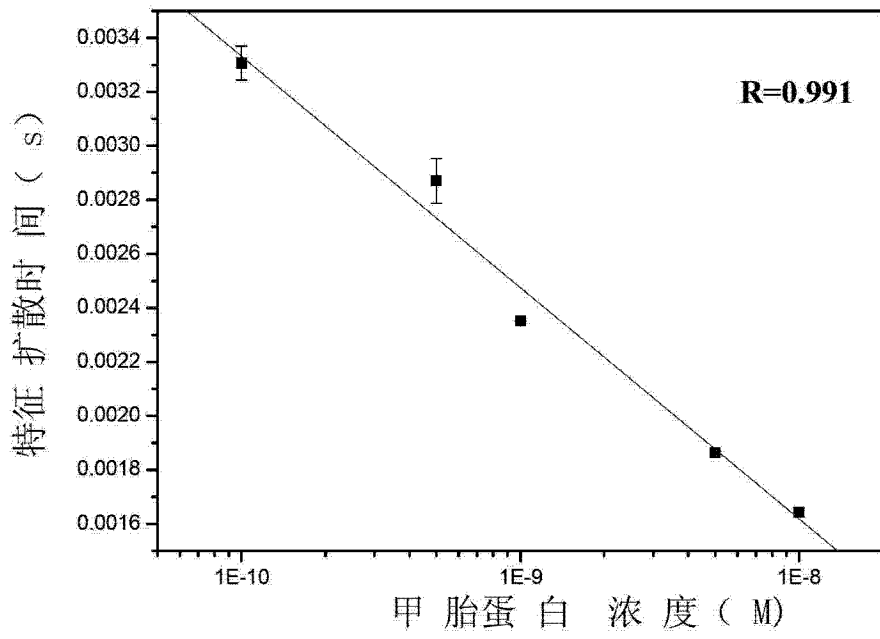


图 5

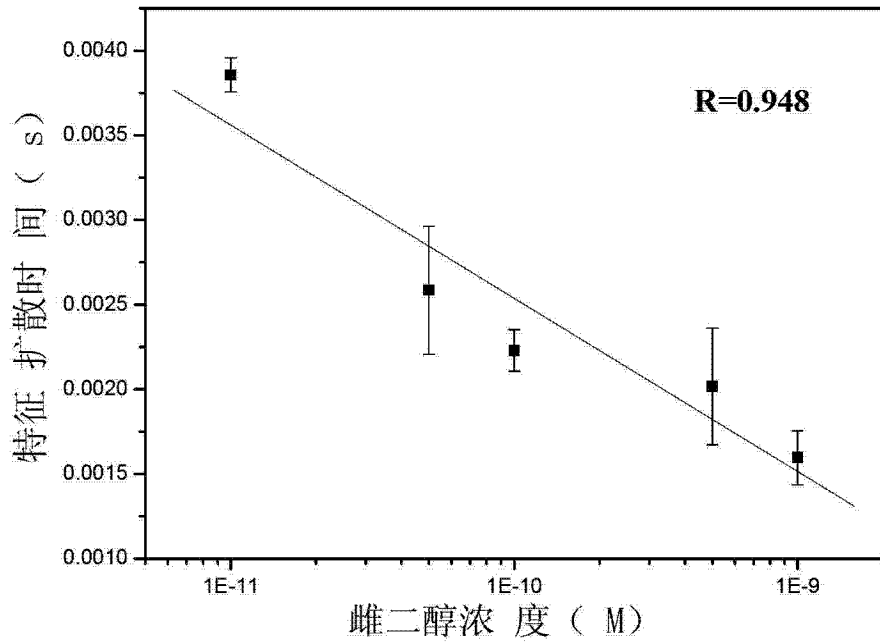


图 6

专利名称(译)	一种均相免疫分析方法		
公开(公告)号	CN103529208A	公开(公告)日	2014-01-22
申请号	CN201210230562.6	申请日	2012-07-04
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	任吉存 兰韬 黄香宜		
发明人	任吉存 兰韬 黄香宜		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/68 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/536 G01N15/0211 G01N2015/0065 G01N2015/0222		
代理人(译)	余明伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种均相免疫分析方法，为采用均相夹心免疫分析法或者均相竞争免疫分析法，将含有待测物的样本与两种被纳米贵金属标记的抗体（或者一种被纳米贵金属标记的抗体及一种被纳米贵金属标记的抗原）在均相的免疫反应体系中进行夹心免疫反应或竞争免疫反应，通过散射相关光谱技术获得表征反应液中含纳米贵金属的粒子的粒径大小的表征参数，根据该表征参数与待测物浓度之间的关系，获知样本中待测物的浓度。本发明的方法避免了免疫分析中繁琐的步骤，使得操作非常简便，且检测灵敏度高，具备良好的应用前景。

