



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105181953 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201510363249. 3

(22) 申请日 2015. 06. 26

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号

(72) 发明人 彭池方 刘春丽 潘娜 吴亮亮

(74) 专利代理机构 南京利丰知识产权代理事务所 (特殊普通合伙) 32256

代理人 王锋

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

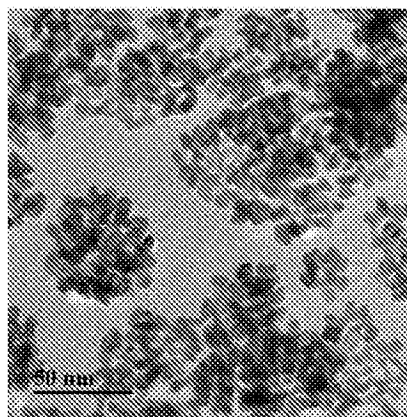
权利要求书2页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

葡萄串样纳米粒子、免疫探针、其制备方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种葡萄串样纳米粒子(GCNPs),其可通过采用表面吸附蛋白的纳米银三角片为模板、氯金酸为氧化剂,经伽凡尼取代反应而制备,并具有比表面积大,分散性良好等特点。本发明还公开了基于所述 GCNPs 的信号放大 GCNPs-酶-免疫探针,其可以通过将酶标记抗体吸附在 GCNPs 表面而得到。本发明还提供了所述的 GCNPs-酶-免疫探针在酶联免疫检测方法中的应用。较之传统的酶标记抗体免疫探针,本发明的 GCNPs-酶-免疫探针信号和检测灵敏度显著提升,而基于该免疫探针的酶联免疫检测分析方法在较少改变传统检测方法的成本的前提下,检测性能也显著地提高。



1. 一种葡萄串样纳米粒子的制备方法,其特征在于包括:以蛋白修饰的纳米银三角片作为模板,并以氯金酸作为氧化剂,通过伽凡尼取代反应制备葡萄串样纳米粒子。

2. 根据权利要求1所述的葡萄串样纳米粒子的制备方法,其特征在于包括:

(1) 将牛血清蛋白加入尺寸为15nm~30nm的纳米银三角的溶液中混合均匀,使形成的混合溶液中牛血清蛋白的浓度为0.01mg/mL~5mg/mL,且牛血清蛋白与纳米银三角的摩尔比为5:1~20:1,并静置过夜;

(2) 向步骤(1)所获混合反应溶液中加入抗坏血酸,使形成的混合物中抗坏血酸的浓度为0.08mM~5mM之后以0.1mL/min~2mL/min的速度注入浓度为0.01mM~0.5mM的 HAuCl_4 溶液,获得葡萄串样纳米粒子。

3. 由权利要求1或2所述方法制备的葡萄串样纳米粒子,其粒径为20nm~50nm。

4. 一种免疫探针,其特征在于包含权利要求3所述的葡萄串样纳米粒子,所述葡萄串样纳米粒子上修饰有辣根过氧化物酶标记的抗体,所述辣根过氧化物酶标记的抗体包括辣根过氧化物酶标记单克隆抗体或多克隆抗体。

5. 一种免疫探针的制备方法,其特征在于包括:将权利要求3所述的葡萄串样纳米粒子分散于含有0.1mM~10mM碳酸钾或碳酸钠的0.01~0.2mg/mL辣根过氧化物酶标记的抗体溶液中,0°C~8°C震荡1h~5h,之后于8000rpm~10000rpm离心10min~20min,进而于沉淀中获得所述免疫探针。

6. 根据权利要求5所述的免疫探针的制备方法,其特征在于还包括:将离心获得的沉淀以含有0.01mg/mL~0.1mg/mL辣根过氧化物酶的溶液重悬,备用。

7. 权利要求4所述的免疫探针或由权利要求5-6中任一项方法制备的免疫探针在酶联免疫检测中的应用。

8. 一种酶联免疫检测方法,其特征在于包括:

将权利要求4所述的免疫探针或由权利要求5-6中任一项方法制备的免疫探针与一系列不同浓度的目标抗原标准样品在适于使免疫探针中所含抗体与所述抗原特异性结合的液相环境中进行酶联免疫反应,并记录检测型号,由此建立免疫探针检测信号与抗原浓度之间的标准对应关系;

以及,将所述免疫探针与含有未知浓度的目标抗原的待测样品在适于使免疫探针中所含抗体与所述抗原特异性结合的液相环境中进行酶联免疫反应,并依据检测型号及所述标准对应关系而确定待测样品中的目标抗原浓度。

9. 一种基于权利要求4所述的免疫探针或由权利要求5-6中任一项方法制备的免疫探针的间接竞争酶联免疫分析方法,其特征在于包括以下步骤:

a. 将作为包被抗原的小分子半抗原与卵清蛋白或牛血清蛋白的偶联物溶于碳酸盐缓冲液而形成包被液,25°C~37°C孵育1~4h,再以磷酸盐缓冲液洗涤后,加入以作为封闭液的、浓度为0.001wt%的分子量为2000~10000的聚乙二醇溶液于0°C~8°C封闭过夜;

b. 将步骤a所获的包被抗原溶液与一系列不同浓度的小分子标准品的磷酸盐缓冲液溶液混合,再加入含小分子抗体的酶标稀释液,25°C~37°C孵育后,以磷酸盐缓冲液洗涤,所述酶标稀释液采用包含0.1wt%明胶和0.05v/v%吐温-20的pH值为7.0~8.0、浓度为0.01M~0.05M的磷酸盐缓冲液;

c. 向步骤b所获的各竞争反应混合体系中加入含有所述免疫探针的抗体稀释液,所

述抗体稀释液采用包含 0.1wt%明胶和 0.05v/v%吐温-20 的 pH 值为 7.0 ~ 8.0、浓度为 0.01M ~ 0.05M 的磷酸盐缓冲液, 25°C ~ 37°C 孵育 0.5h ~ 2h 后, 以磷酸盐缓冲液洗涤;

d. 向步骤 c 所获的各混合反应体系中分别加入显色液, 25°C ~ 37°C 显色 10min ~ 30min, 再加入作为终止液的、浓度为 2M ~ 4M 的硫酸溶液, 之后测量各混合反应体系于波长为 450nm ~ 650nm 时的吸光值 A, 建立 A 与抗原量的标准对应关系。

10. 一种基于权利要求 4 所述的免疫探针或由权利要求 5-6 中任一项方法制备的免疫探针的夹心酶联免疫分析方法, 其特征在于包括以下步骤:

a. 将抗体溶于浓度为 0.01M ~ 0.1M、pH 值为 9 ~ 10 的碳酸盐包被缓冲液, 形成蛋白质含量为 1 μ g/ml ~ 20 μ g/ml 的溶液, 再于 25°C ~ 37°C 孵育 1h ~ 4h, 之后以磷酸盐缓冲液洗涤, 之后加入作为封闭液的、浓度为 0.1wt% ~ 5wt% 的牛血清蛋白溶液, 并于 0°C ~ 8°C 封闭过夜;

b. 将步骤 a 所获的包被抗原溶液与一系列不同浓度的大分子标准品的磷酸盐缓冲液溶液混合, 25°C ~ 37°C 孵育 0.5h ~ 2h, 之后以磷酸盐缓冲液洗涤;

c. 向步骤 b 所获的各结合反应混合体系中加入含有所述免疫探针的抗体稀释液, 所述抗体稀释液采用包含 0.1wt 明胶和 0.05v/v%吐温-20 的 pH 值为 7.0 ~ 8.0、浓度为 0.01M ~ 0.05M 的磷酸盐缓冲液, 25°C ~ 37°C 孵育 0.5h ~ 3h, 以磷酸盐缓冲液洗涤;

d. 向步骤 c 所获的各混合反应体系中分别加入显色液, 25°C ~ 37°C 显色 10min ~ 30min, 再加入作为终止液的、浓度为 2M ~ 4M 的硫酸溶液, 之后测量各混合反应体系于波长为 450nm ~ 650nm 时的吸光值 A, 建立 A 与抗原量的标准对应关系。

葡萄串样纳米粒子、免疫探针、其制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析技术领域,具体涉及一种葡萄串样纳米颗粒 (GCNPs)-酶-免疫探针的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 酶联免疫分析技术是一种非常成熟的固相免疫分析模式,在临床诊断分析中已经获得了多年的应用,同时,近十年来,也在环境监测、食品安全危害物检测等领域中获得了广泛的应用。临床诊断和食品安全检测领域所面临的重要问题是低浓度抗原的免疫检测,以及其检测的准确性和可靠性。提高免疫检测灵敏度的方法之一就是制备高灵敏的免疫探针。

[0003] 贵金属纳米材料是一种重要的纳米材料,不仅具有纳米材料的宏观特征,同时其自身的物理化学性质也与纳米材料的性能有机结合起来,具有粒径均一,分散性好,比表面积大等特性,因此可用于纳米免疫探针的制备。

[0004] 目前,在环境监测、食品危害物分析等许多领域,都对更高灵敏度的免疫分析方法具有迫切的需求,因此,提高传统的酶联免疫分析方法的检测性能,具有重要的应用价值。许多研究采用新的检测模式,如化学发光、电化学发光,与传统酶联免疫分析方法相比,它们具有更灵敏的检测能力,但是这些免疫分析方法需要较昂贵的设备和试剂,因此,检测成本显著提高,这极大地阻碍了其在环境监测、食品危害物分析等许多领域的应用。

发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明的目的之一在于提供一种葡萄串样纳米粒子 (GCNPs) 及其制备方法。

[0006] 本发明的目的之二在于提供所述葡萄串样纳米粒子的用途,例如,其在制备免疫探针中的用途。

[0007] 本发明的目的之三在于提供一种基于所述葡萄串样纳米粒子的免疫探针(葡萄串样纳米-酶-免疫探针,或称 GCNPs-酶-免疫探针,或者信号放大 GCNPs-酶-免疫探针,简称免疫探针)及其制备方法。

[0008] 本发明的目的之四在于提供所述免疫探针在酶联免疫检测中的应用,例如,基于所述免疫探针的酶联免疫检测方法。

[0009] 为实现前述发明目的,本发明采用的技术方案包括:

[0010] 一种葡萄串样纳米粒子 (GCNPs) 的制备方法,其包括:以蛋白修饰的纳米银三角片作为模板,并以氯金酸作为氧化剂,通过伽凡尼取代反应制备葡萄串样纳米粒子。

[0011] 所述 GCNPs 具有比表面积大、分散性良好等特性。

[0012] 其中,所述纳米银三角可以采用常规方法制备,例如可参考 Zhang, Q. ;Li, N. ;Goebel, J. ;Lu, Z. ;Yin, Y. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 18931-18939 等文献制备。

[0013] 在一较佳实施方案之中,所述的葡萄串样纳米粒子的制备方法包括:

[0014] (1) 将牛血清蛋白加入尺寸为 15nm ~ 30nm 的纳米银三角的溶液中混合均匀,使形成的混合溶液中牛血清蛋白的浓度为 0.01mg/mL ~ 5mg/mL,且牛血清蛋白与纳米银三角的摩尔比为 5:1 ~ 20:1,并静置过夜;

[0015] (2) 向步骤 (1) 所获混合反应溶液中加入抗坏血酸,使形成的混合物中抗坏血酸的浓度为 0.08mM ~ 5mM 之后以 0.1mL/min ~ 2mL/min 的速度注入浓度为 0.01mM ~ 0.5mM 的 HAuCl_4 溶液,获得葡萄串样纳米粒子。

[0016] 由前述方法制备的葡萄串样纳米粒子,其粒径为 20nm ~ 50nm。

[0017] 一种免疫探针,其包含所述的葡萄串样纳米粒子,所述葡萄串样纳米粒子上修饰有辣根过氧化物酶标记的抗体 (IgG-HRP)。

[0018] 其中, IgG-HRP 是吸附在 GCNPs 表面。

[0019] 一种免疫探针的制备方法,其包括:将所述的葡萄串样纳米粒子分散于含有 0.1mM ~ 10mM 碳酸钾或碳酸钠的 0.01 ~ 0.2mg/mL 辣根过氧化物酶标记的抗体溶液中, 0°C ~ 8°C 震荡 1h ~ 5h,之后于 8000rpm ~ 10000rpm 离心 10min ~ 20min,进而于沉淀中获得所述免疫探针。

[0020] 进一步的,所述的免疫探针的制备方法还可包括:将离心获得的沉淀以含有 0.01mg/mL ~ 0.1mg/mL 辣根过氧化物酶的溶液重悬,备用。

[0021] 所述 IgG-HRP 是针对不同检测物的一个结构域、或者有效基团的辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体,或多克隆抗体。

[0022] 在一典型实施案例中,所述免疫探针的制备方法可以包括:将 0.5-2mL GCNPs 复合材料 8000rpm 离心 10min,用含有 0.001M 碳酸钾的 0.01-0.2mg/mL IgG-HRP (辣根过氧化物酶标记的抗体) 溶液重悬,4°C 震荡 3h,9000rpm 离心 15min,用 0.5-1mL 含有 0.01-0.1mg/mL 辣根过氧化物酶的酶标稀释液重悬。

[0023] 在一更为具体的实施案例之中,所述免疫探针的制备方法包括以下具体步骤:

[0024] I. 利用基于蛋白修饰的纳米银三角片为模板,氯金酸为氧化剂,通过伽凡尼取代反应制备 GCNPs:

[0025] a. 将 200 μL 牛血清蛋白溶液 (10mg/mL) 加入到 40mL 纳米银三角 (0.1 μM) 溶液中,混合均匀,静置过夜。

[0026] b. 取 5-10mL 上述混合溶液,加入 825 μL , 0.01-0.6M 抗坏血酸 (AA),再将 5-20mL, 0.08mM 的 HAuCl_4 以 1mL/min 的速度注射入,得到 GCNPs;

[0027] II. GCNPs-酶-免疫探针的制备

[0028] a. 将 0.5-2mL 步骤 Ib 所获的 GCNPs 8000rpm 离心 10min,用含有 0.001M 碳酸钾的 0.01-0.2mg/mL IgG-HRP 溶液重悬,4°C 震荡 3h,9000rpm 离心 15min,用 0.5-1mL 含有 0.01-0.1mg/mL 辣根过氧化物酶的酶标稀释液重悬,即得到信号放大 GCNPs-酶-免疫探针。

[0029] 本发明中由于 GCNPs 具有极高的比表面积,单个纳米材料可以同时负载多个酶标记抗体分子,进而极大提高免疫探针中酶与抗体的比例,因此,使用该免疫探针进行免疫分析,特别是对微量的待分析物进行免疫检测时,可放大免疫检测的信号,提高检测灵敏度。

[0030] 所述的免疫探针在酶联免疫检测中的应用。

[0031] 一种酶联免疫检测方法,其包括:

[0032] 将所述的免疫探针与一系列不同浓度的目标抗原标准样品在适于使免疫探针中

所含抗体与所述抗原特异性结合的液相环境中进行酶联免疫反应,并记录检测型号,由此建立免疫探针检测信号与抗原浓度之间的标准对应关系;

[0033] 以及,将所述免疫探针与含有未知浓度的目标抗原的待测样品在适于使免疫探针中所含抗体与所述抗原特异性结合的液相环境中进行酶联免疫反应,并依据检测型号及所述标准对应关系而确定待测样品中的目标抗原浓度。

[0034] 一种基于所述免疫探针的间接竞争酶联免疫分析方法,包括以下步骤:

[0035] a. 将作为包被抗原的小分子半抗原与卵清蛋白或牛血清蛋白的偶联物溶于碳酸盐缓冲液而形成包被液,25℃~37℃孵育1~4h,再以磷酸盐缓冲液洗涤后,加入以作为封闭液的、浓度为0.001wt%的分子量为2000~10000的聚乙二醇溶液于0℃~8℃封闭过夜;

[0036] b. 将步骤a所获的包被抗原溶液与一系列不同浓度的小分子标准品的磷酸盐缓冲液溶液混合,再加入含小分子抗体的酶标稀释液,25℃~37℃孵育后,以磷酸盐缓冲液洗涤,所述酶标稀释液采用包含0.1wt%明胶和0.05v/v%吐温-20的pH值为7.0~8.0、浓度为0.01M~0.05M的磷酸盐缓冲液;

[0037] c. 向步骤b所获的各竞争反应混合体系中加入含有所述免疫探针的抗体稀释液,所述抗体稀释液采用包含0.1wt%明胶和0.05v/v%吐温-20的pH值为7.0~8.0、浓度为0.01M~0.05M的磷酸盐缓冲液,25℃~37℃孵育0.5h~2h后,以磷酸盐缓冲液洗涤;

[0038] d. 向步骤c所获的各混合反应体系中分别加入显色液,25℃~37℃显色10min~30min,再加入作为终止液的、浓度为2M~4M的硫酸溶液,之后测量各混合反应体系于波长为450nm~650nm时的吸光值A,建立A与抗原量的标准对应关系。

[0039] 在一更为具体的实施方案之中,所述间接竞争酶联免疫分析方法包括以下步骤:

[0040] a. 以小分子半抗原与卵清蛋白或牛血清蛋白的偶联物作为包被抗原,并以浓度为0.01-0.1M、pH值为9-10的碳酸盐缓冲液按1:2000~1:16000的体积比进行稀释后作为包被液加入酶标板的不同孔中,25-37℃孵育1-4h, PBST 洗涤液洗涤3-5次,然后加入作为封闭液的、浓度为0.001wt-%的分子量为2000-10000的聚乙二醇溶液,0-8℃封闭过夜;

[0041] b. 在前述酶标板的不同孔中再分别加入含有一系列不同浓度的小分子标准品的磷酸盐缓冲液溶液,再加入含小分子抗体的酶标稀释液,25-37℃孵育0.5-2h后以PBST洗涤液洗涤3~5次,所述酶标稀释液采用包含0.1wt%明胶和0.05% (v/v) 吐温-20的pH值为7.0-8.0、浓度为0.01-0.05M的磷酸盐缓冲液;

[0042] c. 在前述酶标板的不同孔中再分别加入含有所述免疫探针的抗体稀释液,所述抗体稀释液采用包含0.1wt-%明胶和0.05% (v/v) 吐温-20的pH值为7.0-8.0、浓度为0.01-0.05M的磷酸盐缓冲液,25-37℃孵育0.5-2h后,以PBST洗涤液洗涤3~5次;

[0043] d. 在前述酶标板的不同孔中再分别加入显色液,25-37℃显色10-30min,最后每孔加入作为终止液的、浓度为2-4M的硫酸溶液,再测量各孔混合反应体系于波长为450-650nm时的吸光值A,建立A与抗原量的标准对应关系。

[0044] 在一些实施案例之中,所述间接竞争酶联免疫分析方法可以包括以下步骤:

[0045] a. 抗原的包被:以小分子半抗原与卵清蛋白或牛血清蛋白的偶联物作为包被抗原,以0.05M、pH 9.6的碳酸盐缓冲液将包被抗原以1:2000~1:16000进行稀释,作为包被液,在酶标板的每孔中加入100 μL,37℃孵育2h, PBST 洗涤液洗涤3次,然后用0.001%分

子量为 6000 的聚乙二醇 PEG 作为封闭液,每孔 200 μ L,4 $^{\circ}$ C 封闭过夜;

[0046] b. 竞争反应:每孔分别加入以标准品稀释液磷酸盐缓冲液 PBS 稀释的系列浓度之一的小分子标准品 50 μ L 到各自的酶标孔中,将小分子抗体以酶标稀释液:含 0.1% 明胶,0.05% 吐温 -20、pH 7.4、0.01M 的磷酸盐缓冲液 PBST,按 1:8000 ~ 1:64000 比例稀释后,加入酶标板中,每孔 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 30min 后以 PBST 洗涤液洗涤 3 ~ 5 次;

[0047] c. 加 GCNPs-酶-免疫探针:以抗体稀释液将 GCNPs-酶-免疫探针以 1:1 ~ 1:8 稀释,每孔加 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后以 PBST 洗涤液洗涤 3 ~ 5 次;

[0048] d. 显色:每孔加入显色液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 显色 15min;最后每孔加入终止液 2M 硫酸溶液 50 μ L;用酶标仪测量波长为 450nm 时的吸光值 A_{450} ,建立 A_{450} 与抗原量的关系。

[0049] 之后,再用实际样品检测时得到的紫外吸收强度与此标准对应关系相对照即可确定实际样品中的抗原浓度。

[0050] 一种基于所述免疫探针的夹心酶联免疫分析方法,包括:

[0051] a. 将抗体溶于浓度为 0.01M ~ 0.1M、pH 值为 9 ~ 10 的碳酸盐包被缓冲液,形成蛋白质含量为 1 μ g/ml ~ 20 μ g/ml 的溶液,再于 25 $^{\circ}$ C ~ 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h ~ 4h,之后以磷酸盐缓冲液洗涤,之后加入作为封闭液的、浓度为 0.1wt% ~ 5wt% 的牛血清蛋白溶液,并于 0 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C 封闭过夜;

[0052] b. 将步骤 a 所获的包被抗原溶液与一系列不同浓度的大分子标准品的磷酸盐缓冲液溶液混合,25 $^{\circ}$ C ~ 37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5h ~ 2h,之后以磷酸盐缓冲液洗涤;

[0053] c. 向步骤 b 所获的各结合反应混合体系中加入含有所述免疫探针的抗体稀释液,所述抗体稀释液采用包含 0.1wt 明胶和 0.05v/v% 吐温 -20 的 pH 值为 7.0 ~ 8.0、浓度为 0.01M ~ 0.05M 的磷酸盐缓冲液,25 $^{\circ}$ C ~ 37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5h ~ 3h,以磷酸盐缓冲液洗涤;

[0054] d. 向步骤 c 所获的各混合反应体系中分别加入显色液,25 $^{\circ}$ C ~ 37 $^{\circ}$ C 显色 10min ~ 30min,再加入作为终止液的、浓度为 2M ~ 4M 的硫酸溶液,之后测量各混合反应体系于波长为 450nm ~ 650nm 时的吸光值 A,建立 A 与抗原量的标准对应关系。

[0055] 在一更为具体的实施方案之中,所述夹心酶联免疫分析方法包括以下步骤:

[0056] a. 以浓度为 0.01-0.1M、pH 值为 9-10 的碳酸盐包被缓冲液将抗体稀释形成蛋白质含量为 1 ~ 20 μ g/ml 的溶液,再分别加入酶标板的不同孔中,25-37 $^{\circ}$ C 孵育 1-4h,之后以 PBST 洗涤液洗涤 3-5 次,再加入作为封闭液的、浓度为 0.1-5wt-% 的牛血清蛋白溶液,0-8 $^{\circ}$ C 封闭过夜;

[0057] b. 在前述酶标板的不同孔中再分别加入一系列不同浓度的大分子标准品的磷酸盐缓冲液,25-37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5-2h,之后以 PBST 洗涤液洗涤 3-5 次。;

[0058] c. 在前述酶标板的不同孔中再分别加入含有所述免疫探针的抗体稀释液,所述抗体稀释液采用包含 0.1wt% 明胶和 0.05% (v/v) 吐温 -20 的 pH 值为 7.0-8.0、浓度为 0.01-0.05M 的磷酸盐缓冲液。25-37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5-2h 后,以 PBST 洗涤液洗涤 3 ~ 5 次;

[0059] d. 在前述酶标板的不同孔中再分别加入显色液,25-37 $^{\circ}$ C 显色 10-30min,再加入作为终止液的、浓度为 2-4M 的硫酸溶液,之后测量各混合反应体系于波长为 450-650nm 时的吸光值 A,建立 A 与抗原量的标准对应关系。

[0060] 在一些实施案例之中,所述夹心酶联免疫分析方法可以包括以下步骤:

[0061] a. 包被:用 0.05M PH9.6 碳酸盐包被缓冲液将抗体稀释至蛋白质含量为 1 ~

20 $\mu\text{g/ml}$, 在酶标板的每孔中加入 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2h, PBST 洗涤液洗涤 3 次。用 0.1-5% 的牛血清蛋白作为封闭液, 每孔 200 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜;

[0062] b. 结合反应: 每孔分别加入以标准品稀释液磷酸盐缓冲液 PBS 稀释的系列浓度之一的大分子标准品或者处理好的样品 100 μL 到各自的酶标孔中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30min。PBST 洗涤液洗涤 3 次。(同时做空白孔, 阴性对照孔及阳性对照孔);

[0063] c. 加 GCNPs-酶-免疫探针: 以抗体稀释液将 GCNPs-酶-免疫探针以 1:1 ~ 1:8 稀释, 每孔加 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h 后以 PBST 洗涤液洗涤 3 ~ 5 次;

[0064] d. 显色: 每孔加入显色液 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 15min; 最后每孔加入终止液 2M 硫酸溶液 50 μL ; 用酶标仪测量波长为 450nm 时的吸光值 A_{450} , 建立 A_{450} 与抗原量的关系。

[0065] 之后, 再用实际样品检测时得到的紫外吸收强度与此标准对应关系相对照即可确定实际样品中的抗原浓度。

[0066] 前述显色液可以选用业界已知的合适类型。

[0067] 优选的, 所述显色液可以包括:

[0068] A 液: 0.933g 柠檬酸, 3.68g 十二水合磷酸氢二钠, 18 μL 质量分数 30% 过氧化氢用超纯水定容至 100mL;

[0069] B 液: 60mg 3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶于 100mL 乙二醇中;

[0070] 使用前将 A 液与 B 液以 5:1 体积比混合。

[0071] 与现有的技术相比较, 本发明具有以下优点:

[0072] 1、本发明采用基于蛋白修饰的纳米银三角片为模板、氯金酸为氧化剂, 通过伽凡尼取代反应制备 GCNPs, 设备和工艺简单, 分散性好, 比表面积大;

[0073] 2、本发明采用酶联免疫反应验证了 GCNPs-酶-免疫探针的活性, 该方法简便快速, 重复性高;

[0074] 3、本发明的 GCNPs-酶-免疫探针较之传统的酶标记抗体免疫探针信号和检测灵敏度显著提升;

[0075] 4、基于本发明 GCNPs-酶-免疫探针的酶联免疫检测分析方法在较少改变传统检测方法的成本的前提下, 检测性能显著地提高。

附图说明

[0076] 图 1 是本发明实施例 1 中纳米银三角片的 TEM 图;

[0077] 图 2 是本发明实施例 1 中 GCNPs 的 TEM 图;

图 2a- 图 2b 分别是赭曲霉毒素 A (OTA) 的传统酶联免疫反应标准曲线和实施例 2 中 OTA 的酶联免疫反应标准曲线;

[0078] 图 3a- 图 3b 分别是赭曲霉毒素 A (OTA) 的传统酶联免疫反应标准曲线和本发明实施例 2 中赭曲霉毒素 A (OTA) 的酶联免疫反应标准曲线;

[0079] 图 4 分别是前列腺特异抗原 (PSA) 的传统酶联免疫反应标准曲线和本发明实施例 3 中前列腺特异抗原 (PSA) 的酶联免疫反应标准曲线。

具体实施方式

[0080] 现结合若干实施例及附图对本发明的技术方案作进一步地描述, 但本发明的实施

方式并不仅限于此。

[0081] 下述实施例中,如无特殊说明所用方法均为常规方法,所用试剂例如磷酸盐缓冲液、碳酸盐缓冲液、显色液等也均可以是业界习知的适用类型,以及,如下出现的%若非特别说明则均指 wt%。

[0082] 实施例 1:葡萄串样纳米粒子 (GCNPs)-酶-免疫探针的制备

[0083] a. 纳米银三角形的制备:40mL 水溶液体系,包括 400 μ L, 0.01M 硝酸银溶液, 600 μ L, 0.1M 柠檬酸三钠溶液, 96 μ L, 30wt% H_2O_2 室温下强力搅拌 10min。然后,快速注入 400 μ L, 0.1M 硼氢化钠溶液。

[0084] b. 将 200 μ L 牛血清蛋白溶液 (10mg/mL) 加入到纳米银三角胶体溶液中,混合均匀,静置过夜。

[0085] c. 取 8.2mL 上述混合溶液,加入 825 μ L, 0.015M AA,再将 10mL, 0.08mM 的 $H AuCl_4$ 以 1mL/min 的速度注射入,得到 GCNPs 粒子。

[0086] d. 将 1mL GCNPs 粒子 8000rpm 离心 10min,用含有 0.001M 碳酸钾的 0.1mg/mL 辣根过氧化物酶标记的抗体溶液重悬,4 $^{\circ}$ C 震荡 3h, 9000rpm 离心 15min,用 0.5mL 含有 0.05mg/mL 辣根过氧化物酶的酶标稀释液重悬,即得到 GCNPs-酶-免疫探针。

[0087] 实施例 2:赭曲霉毒素 A (OTA) 的检测

[0088] a. OTA 包被抗原合成采用碳化二亚胺 (CDI) 法。OTA 分子上的羧基,可以通过 CDI 活化后,偶联到蛋白分子上的赖氨酸氨基上。合成的主要步骤,1mg 的 OTA 溶解于 0.2mL 无水二甲基亚砜中,加入 2mg CDI,在室温下,磁力搅拌溶解后,避光继续反应 10min;5mg 的卵清蛋白 (OVA),溶解到 1mL pH9.6 的碳酸盐缓冲液中,磁力搅拌溶解。将活化好的 OTA 溶液,逐滴加入到 OVA 溶液中。加完后,继续磁力搅拌,避光室温反应 4h。反应结束后,反应溶液在 CBS 溶液中透析 3 次,以除去未反应的 OTA 及其他小分子;最后一次透析液换成 PB (磷酸盐缓冲液)。合成的包被抗原分装后,置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

[0089] b. 抗原的包被:以 OTA 与 OVA 的偶联物作为包被抗原,以 0.05M、pH 9.6 的碳酸盐缓冲液将包被抗原以 1:2000 ~ 1:16000 进行稀释,作为包被液,在酶标板的每孔中加入 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,然后用 0.001% 分子量为 6000 的聚乙二醇 PEG 作为封闭液,4 $^{\circ}$ C 封闭过夜;

[0090] c. 竞争反应:每孔分别加入以 OTA 标准品稀释液磷酸盐缓冲液 PBS 稀释的 0.01ng/mL, 0.02ng/mL, 0.05ng/mL, 0.1ng/mL, 0.2ng/mL, 0.5ng/mL, 1ng/mL 系列浓度之一的小分子标准品或者处理好的样品 50 μ L 到各自的酶标孔中,将小分子抗体以酶标稀释液:含 0.1% 明胶, 0.05% (v/v) 吐温 -20、pH 7.4、0.01M 的磷酸盐缓冲液 PBST,按 1:8000 ~ 1:64000 比例稀释后,加入酶标板中,每孔 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min 后以 PBST 洗涤液洗涤 3 ~ 5 次;

[0091] d. 加吸附了金银纳米复合材料的酶标二抗:以抗体稀释液将加吸附了金银纳米复合材料的酶标二抗以 1:1 ~ 1:8 稀释,每孔加 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后以 PBST 洗涤液洗涤 3 ~ 5 次;

[0092] e. 显色:每孔加入显色液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 显色 15min;最后每孔加入终止液 2M 硫酸溶液 50 μ L;用酶标仪测量波长为 450nm 时的吸光值 A_{450} ,与所作标准曲线对比算出待测样品中 OTA 的浓度。参阅图 3a-图 3b,本实施例中得到 OTA 检测的 IC_{50} 为 0.05ng/mL,比传统

的 ELISA 方法检测的 IC_{50} 0.27ng/mL 提高了 5 倍。

[0093] 实施例 3 :前列腺特异抗原 (PSA) 的检测

[0094] a. 包被 :用 0.05M PH9.6 碳酸盐包被缓冲液将 PSA 抗体稀释至蛋白质含量为 1 ~ 20 μ g/ml, 在酶标板的每孔中加入 100 μ L, 37°C 孵育 2h, PBST 洗涤液洗涤 3 次。用 0.1-5% 的牛血清蛋白作为封闭液, 每孔 200 μ L, 4°C 封闭过夜 ;

[0095] b. 结合反应 :每孔分别加入以标准品稀释液磷酸盐缓冲液 PBS 稀释的系列浓度之一的 PSA 标准品或处理好的样品 100 μ L 到各自的酶标孔中, 置 37°C 孵育 30min。PBST 洗涤液洗涤 3 次。(同时做空白孔, 阴性对照孔及阳性对照孔) ;

[0096] c. GCNPs- 酶 - 免疫探针的结合 :以抗体稀释液将 GCNPs- 酶 - 免疫探针以 1:1 ~ 1:8 稀释, 每孔加 100 μ L, 37°C 孵育 1h 后以 PBST 洗涤液洗涤 3 ~ 5 次 ;

[0097] d. 显色 :每孔加入显色液 100 μ L, 37°C 显色 15min ;最后每孔加入终止液 2M 硫酸溶液 50 μ L ;用酶标仪测量波长为 450nm 时的吸光值 A_{450} , 建立 A_{450} 与抗原量的关系。与所作标准曲线对比算出待测样品中 PSA 的浓度。参阅图 4a- 图 4b, 本实施例中得到 PSA 检测的 IC_{50} 为 2ng/mL, 比传统的 ELISA 方法检测的 IC_{50} 0.1ng/mL 提高了 20 倍。

[0098] 需要说明的是, 在本文中, 术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含, 从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者设备不仅包括那些要素, 而且还包括没有明确列出的其他要素, 或者是还包括为这种过程、方法、物品或者设备所固有的要素。在没有更多限制的情况下, 由语句“包括一个……”限定的要素, 并不排除在包括所述要素的过程、方法、物品或者设备中还存在另外的相同要素。

[0099] 以上所述仅是本发明的具体实施方式, 应当指出, 对于本技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明原理的前提下, 还可以做出若干改进和润饰, 这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

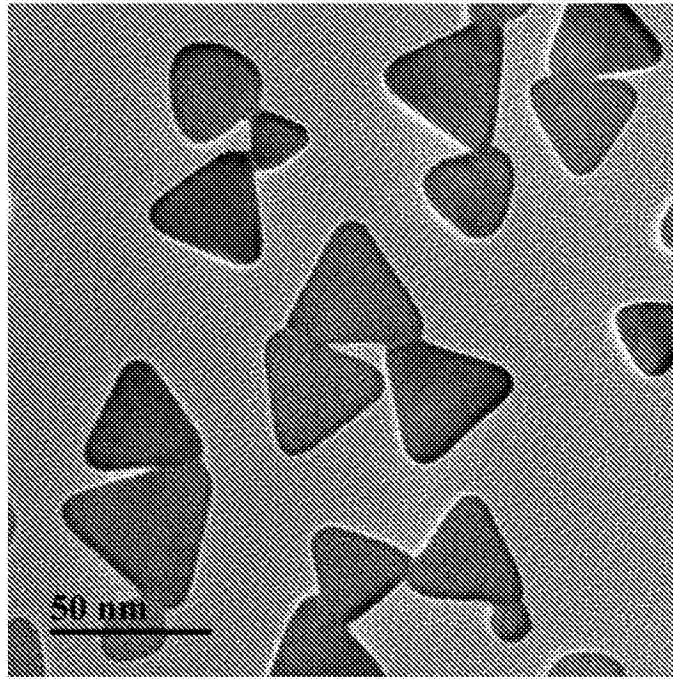


图 1

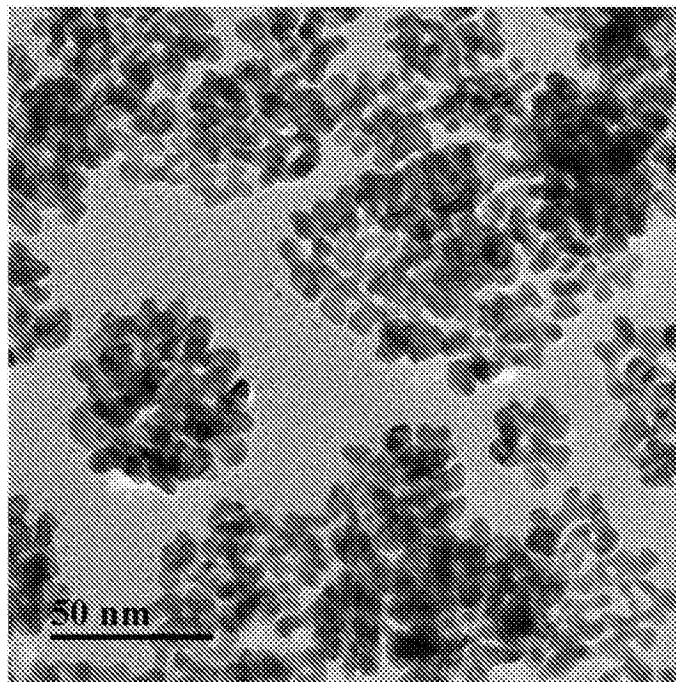


图 2

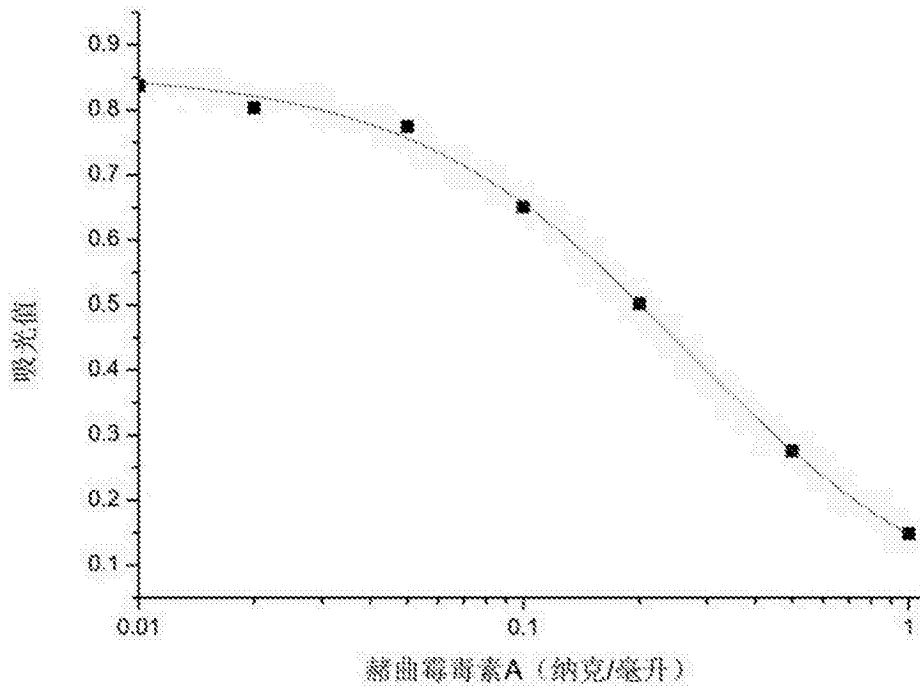


图 2a

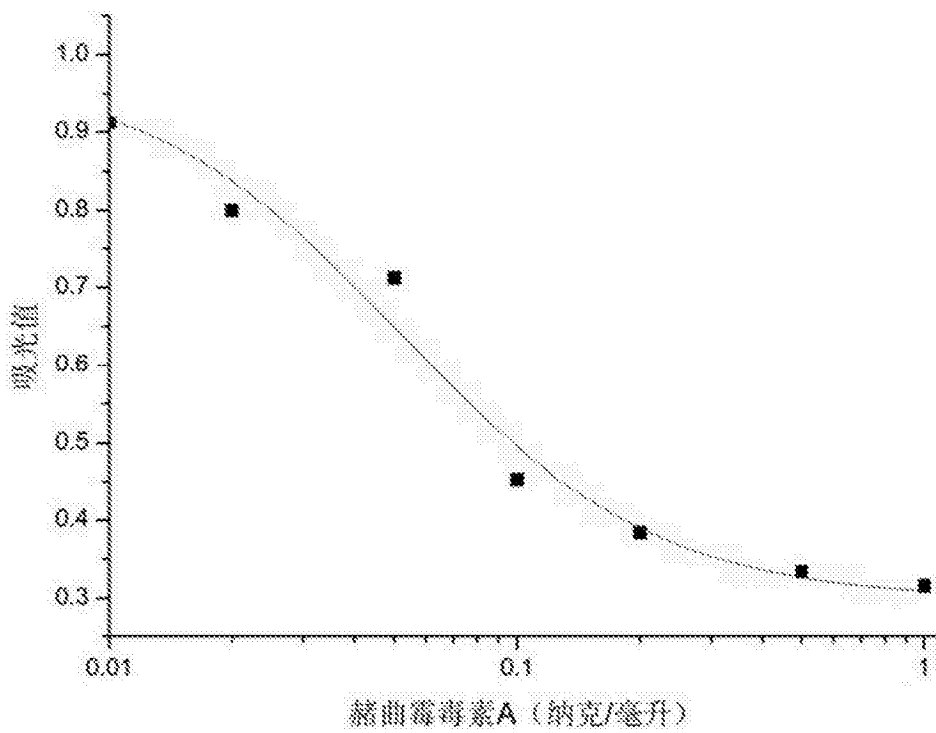


图 2b

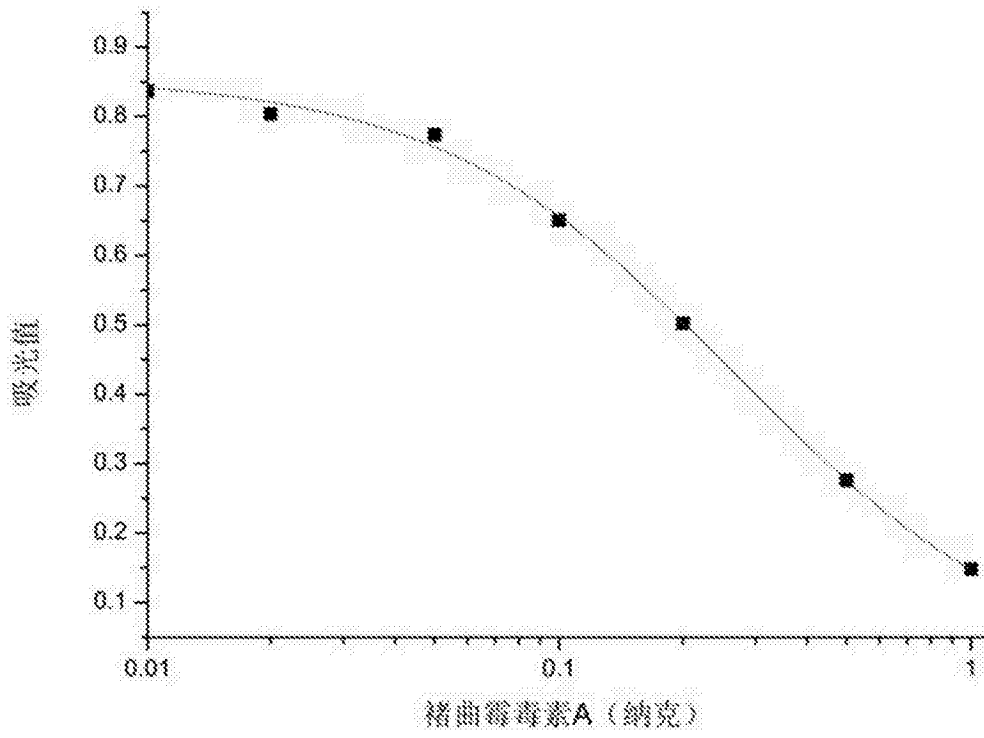


图 3a

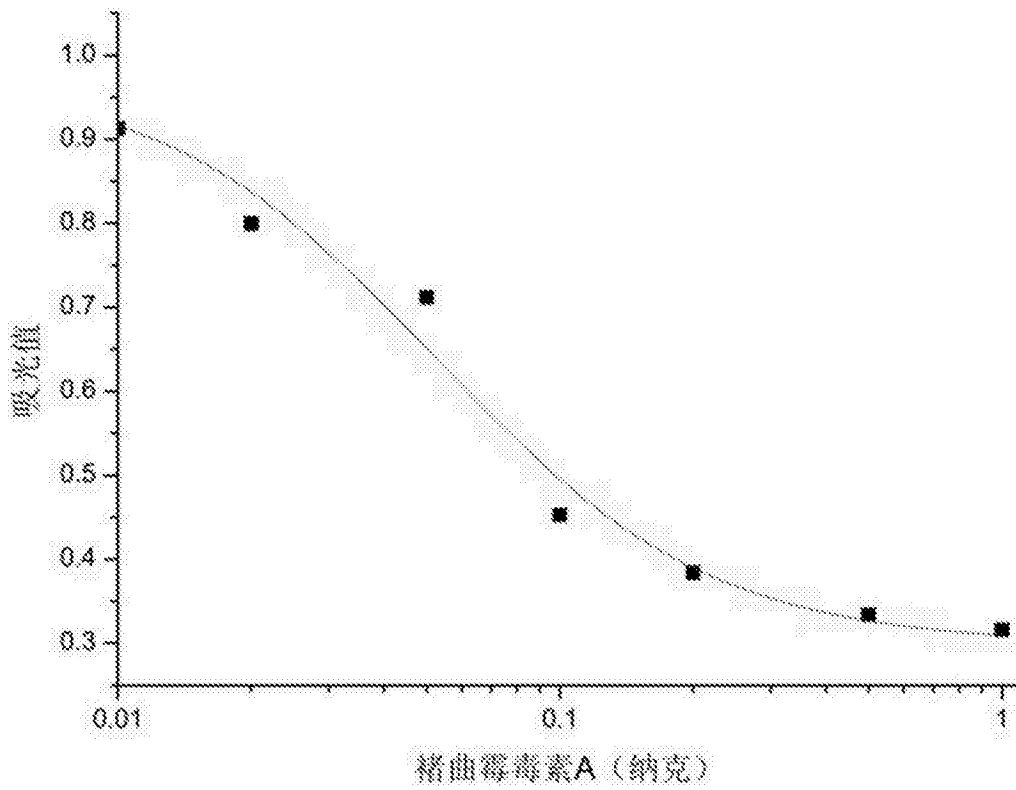


图 3b

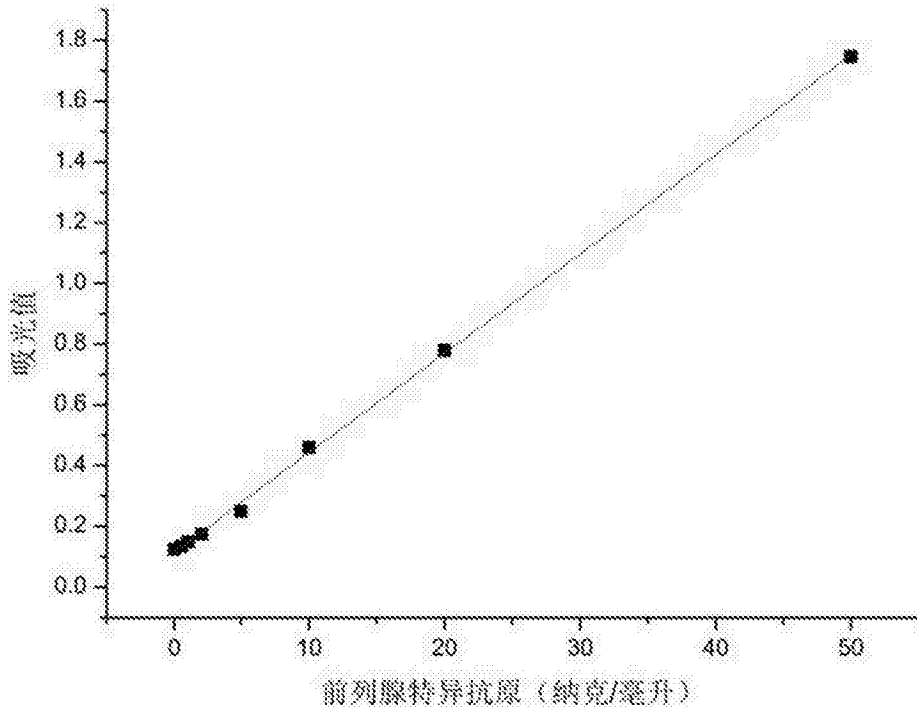


图 4a

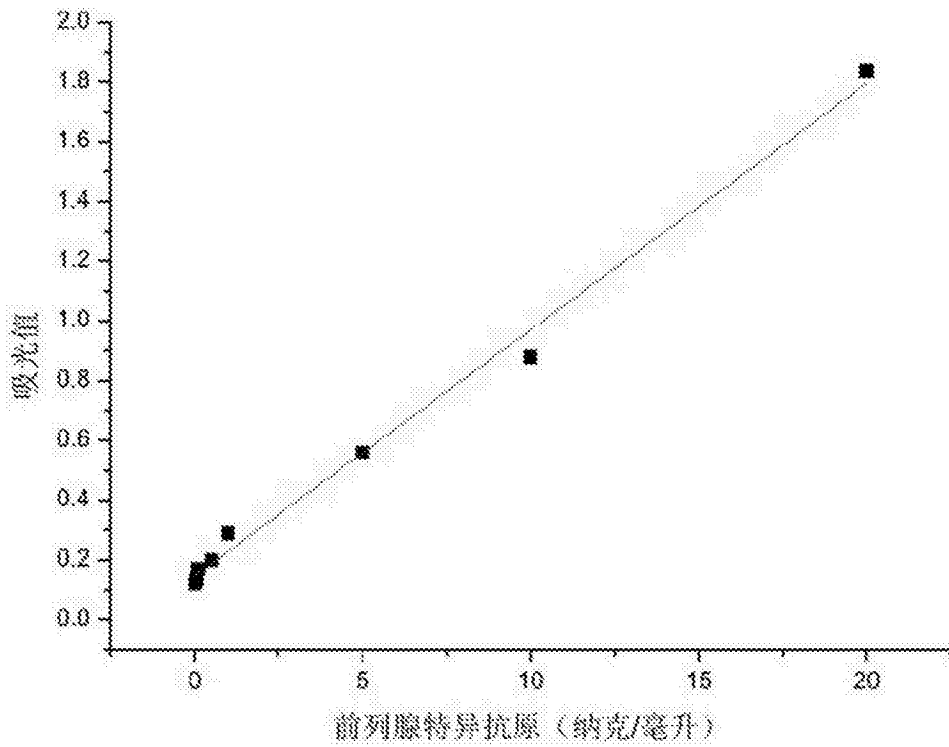


图 4b

专利名称(译)	葡萄串样纳米粒子、免疫探针、其制备方法及应用		
公开(公告)号	CN105181953A	公开(公告)日	2015-12-23
申请号	CN201510363249.3	申请日	2015-06-26
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	彭池方 刘春丽 潘娜 吴亮亮		
发明人	彭池方 刘春丽 潘娜 吴亮亮		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	王锋		
其他公开文献	CN105181953B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种葡萄串样纳米粒子(GCNPs)，其可通过采用表面吸附蛋白的纳米银三角片为模板、氯金酸为氧化剂，经伽凡尼取代反应而制备，并具有比表面积大，分散性良好等特点。本发明还公开了基于所述GCNPs的信号放大GCNPs-酶-免疫探针，其可以通过将酶标记抗体吸附在GCNPs表面而得到。本发明还提供了所述的GCNPs-酶-免疫探针在酶联免疫检测方法中的应用。较之传统的酶标记抗体免疫探针，本发明的GCNPs-酶-免疫探针信号和检测灵敏度显著提升，而基于该免疫探针的酶联免疫检测分析方法在较少改变传统检测方法的成本的前提下，检测性能也显著地提高。

