



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109444405 A

(43)申请公布日 2019.03.08

(21)申请号 201811175579.X

(22)申请日 2018.10.10

(71)申请人 东南大学

地址 210018 江苏省南京市玄武区四牌楼2号

(72)发明人 张若虎 王著元 恽斌峰 胡国华 崔一平

(74)专利代理机构 南京众联专利代理有限公司 32206

代理人 张慧清

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

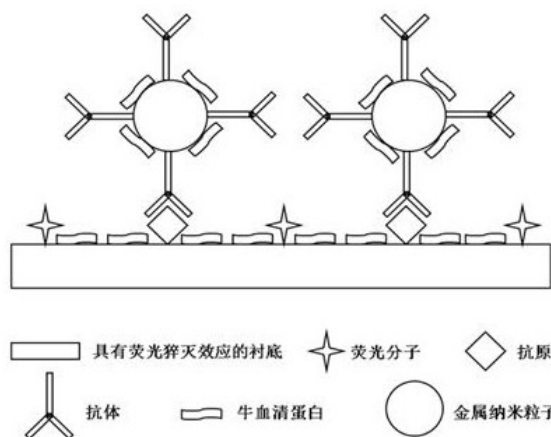
权利要求书2页 说明书4页 附图4页

(54)发明名称

一种基于荧光猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法

(57)摘要

本发明涉及免疫检测技术领域,具体涉及基于荧光猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法,该方法包括如下步骤:第一步、制备金属纳米粒子-抗体复合物;第二步、制备荧光猝灭免疫基底;第三步、利用荧光猝灭免疫基底和金属纳米粒子-抗体复合物进行免疫检测。本发明将荧光猝灭和表面增强荧光效应相结合,能够实现低检测限的免疫检测,并且具有成本低廉,操作简单特点。



1. 一种基于荧光猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法,其特征在于:包括以下步骤:

S1:制备金属纳米粒子-抗体复合物;

S2:制备荧光猝灭免疫基底;

S3:利用S2中制备的荧光猝灭免疫基底和S1中制备的金属纳米粒子-抗体复合物进行免疫检测。

2. 根据权利要求1所述的基于荧光猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法,其特征在于:所述金属纳米粒子-抗体复合物为银纳米粒子-抗体复合物或者为金纳米粒子-抗体复合物,其中优选的为银纳米粒子-抗体复合物。

3. 根据权利要求1所述的基于荧光猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法,其特征在于:所述荧光猝灭免疫基底的基底为经过聚乙烯亚胺表面修饰的硅片;并且进一步优选的是,当荧光猝灭免疫基底的基底为经过聚乙烯亚胺表面修饰的硅片时,所述荧光剂为孟加拉玫瑰红。

4. 根据权利要求1所述的基于荧光猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法,其特征在于:所述金属纳米粒子-抗体复合物的制备方法包括以下步骤:

S1-1:从含有金属粒子的盐溶液中制备获得金属纳米粒子;

S1-2:将步骤S1-1中获得的金属纳米粒子提纯后,重新分散在盐缓冲溶液中,并加入抗体溶液,振荡;

S1-3:向含有抗体的溶液中加入牛血清蛋白溶液,再次振荡反应;

S1-4:将振荡后的溶液离心提纯,再次重新分散在盐缓冲溶液中,获得金属纳米粒子-抗体复合物。

5. 根据权利要求4所述的基于荧光猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法,其特征在于:所述金属纳米粒子-抗体复合物为银纳米粒子-抗体复合物,其制备方法为:将硝酸银溶液加热到85-100℃,加入柠檬酸钠溶液,持续加热反应30-90分钟后冷却至室温,得到银纳米粒子;取银纳米粒子离心提纯,重新分散于硼酸盐缓冲液中,用碳酸钾调节溶液pH至8-10,加入浓度为1 mg/mL的抗体溶液,振荡反应30-90分钟,然后加入质量分数5%的牛血清蛋白(BSA)溶液,再次振荡反应15-45分钟,离心提纯,重新分散于硼酸盐缓冲液中,即得到银纳米粒子-抗体复合物。

6. 根据权利要求4或5所述的基于荧光猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法,其特征在于:所述柠檬酸钠溶液的加入体积为硝酸银溶液体积的1/50。

7. 根据权利要求6所述的基于荧光猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法,其特征在于:所述硝酸银的摩尔浓度为0.5-5mM;所述柠檬酸钠溶液的质量分数为0.5%-5%。

8. 根据权利要求4所述的基于荧光猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法,其特征在于:所述银纳米粒子的体积为1mL,抗体溶液的体积为10-100μL,所述牛血清蛋白(BSA)的体积为10-100μL。

9. 根据权利要求1所述的基于荧光猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法,其特征在于:所述荧光猝灭免疫基底的制备方法包括以下步骤:

S2-1:将硅片浸泡在表面修饰溶液中,然后清洗吹干,获得经表面修饰的硅片,

S2-1':将荧光剂与EDC、NHS溶液混合,制备获得荧光溶液,

S2-2:将经过表面修饰的硅片浸泡在荧光溶液中,然后在戊二醛溶液中浸泡,

S2-3:用去离子水清洗干净,获得荧光预猝灭免疫基底;

其中S2-1与S2-1'无先后顺序;

在一个优选的技术方案中,本发明以聚乙烯亚胺为表面修饰溶液,以孟加拉玫瑰红为荧光剂,其制备方法为:一方面,将清洗干净的硅片在聚乙烯亚胺(PEI)水溶液中浸泡15-120分钟,清洗吹干,得到经表面修饰的硅片;另一方面,将孟加拉玫瑰红(RB)与EDC、NHS溶液混合,在30-40℃振荡反应0.5-2小时;然后将经表面修饰的硅片在上述含有荧光剂的混合溶液中浸泡30-180分钟,之后再在质量分数2.5%的戊二醛(GA)溶液中浸泡2-4小时,最后用去离子水清洗干净,即得到荧光预猝灭免疫基底;

优选的,其中孟加拉玫瑰红(RB)的摩尔浓度为5-20 μ M,EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)的摩尔浓度为2.5-40 μ M,NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)的摩尔浓度为3-48 μ M。

10.根据权利要求1所述的基于荧光预猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法,其特征在于:所述金属纳米粒子-抗体复合物与荧光预猝灭免疫基底免疫检测的方法是:

S3-1:在荧光预猝灭基底上滴加人抗原溶液,并在30-40℃孵育,

S3-2:孵育完成后,清洗,并用BSA在30-40℃下封闭,

S3-3:滴加金属纳米粒子-抗体复合物,在30-40℃孵育,

S3-4:清洗后测量荧光光谱;

进一步优选的,步骤S3-1中,在30-40℃下孵育1-5小时;

更为优选的是,在步骤S3-2中用BSA在30-40℃下封闭0.5-3小时;

同时,作为进一步的优选,在步骤S3-3中30-40℃下孵育0.5-3小时;

其中BSA溶液的质量分数为0.1%-10%;

优选的所述人抗原溶液是指不同浓度的人抗原溶液,具体来说,在一个优选的技术方案中,所述人抗原溶液的浓度分别为:1 μ g/mL、100ng/mL、1ng/mL、1pg/mL、以及空白。

一种基于荧光猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,具体涉及基于荧光猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法。

背景技术

[0002] 免疫检测是基于免疫亲和结合(抗体与抗原的结合)原理对特定的生化物质进行的定性或定量检测。荧光免疫检测是常见的免疫检测技术之一,该技术一般采用荧光分子对抗体进行标记,使标记抗体与抗原发生免疫反应之后,通过检测荧光信号实现对抗原的间接测定。

[0003] 检测限是免疫检测的重要性能指标之一,如何降低免疫检测的检测限,是荧光免疫检测研究的重要课题。

[0004] 荧光免疫检测的检测限与荧光信号的强度和空白信号水平密切相关。并且荧光信号的强度与荧光免疫检测的检测限为负相关,也就是说荧光信号越强则荧光免疫检测的检测限越低。而空白信号水平则与荧光免疫检测的检测限呈正相关,也就是说空白信号水平越低,则荧光免疫检测的检测限越低。因此,增强荧光信号的强度和/或降低空白信号水平,都有助于降低免疫检测的检测限。

[0005] 因此,通过增强荧光信号的强度,或者降低空白信号水平,从而降低荧光免疫检测的检测限,对于生物医学以及临床应用具有重要的科学意义和应用价值。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是提供一种检测方法,从而可以显著降低荧光免疫检测方法中的检测限,同时,该方法具有成本低、复杂度低等优势,从而相较于传统的现有技术中的荧光免疫检测方法,可以提供更好的检测效果和更为广泛的应用前景。

[0007] 为了解决上述技术问题,本发明公开了一种基于荧光猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法,包括以下步骤:

S1:制备金属纳米粒子-抗体复合物;

S2:制备荧光猝灭免疫基底;

S3:利用S2中制备的荧光猝灭免疫基底和S1中制备的金属纳米粒子-抗体复合物进行免疫检测。

[0008] 作为优选,所述金属纳米粒子-抗体复合物为银纳米粒子-抗体复合物,或者为金纳米粒子-抗体复合物,其中优选的为银纳米粒子-抗体复合物。

[0009] 同时,作为优选,所述荧光猝灭免疫基底的基底为经过聚乙烯亚胺表面修饰的硅片;并且进一步优选的是,当荧光猝灭免疫基底的基底为经过聚乙烯亚胺表面修饰的硅片时,所述荧光剂为孟加拉玫瑰红。

[0010] 进一步优选的是,所述金属纳米粒子-抗体复合物的制备方法包括以下步骤:

S1-1:从含有金属粒子的盐溶液中制备获得金属纳米粒子;

S1-2:将步骤S1-1中获得的金属纳米粒子提纯后,重新分散在盐缓冲溶液中,并加入抗体溶液,振荡;

S1-3:向含有抗体的溶液中加入牛血清蛋白溶液,再次振荡反应;

S1-4:将振荡后的溶液离心提纯,再次重新分散在盐缓冲溶液中,获得金属纳米粒子-抗体复合物。

[0011] 在一个优选的技术方案中,所述金属纳米粒子-抗体复合物为银纳米粒子-抗体复合物,其制备方法为:将硝酸银溶液加热到85-100℃,加入柠檬酸钠溶液,持续加热反应30-90分钟后冷却至室温,得到银纳米粒子;取银纳米粒子离心提纯,重新分散于硼酸盐缓冲液中,用碳酸钾调节溶液pH至8-10,加入浓度为1 mg/mL的抗体溶液,振荡反应30-90分钟,然后加入质量分数5%的牛血清蛋白(BSA)溶液,再次振荡反应15-45分钟,离心提纯,重新分散于硼酸盐缓冲液中,即得到银纳米粒子-抗体复合物。

[0012] 其中,进一步优选的是,所述柠檬酸钠溶液的加入体积为硝酸银溶液体积的1/50。

[0013] 更为优选的是,所述硝酸银的摩尔浓度为0.5-5mM;所述柠檬酸钠溶液的质量分数为0.5%-5%。

[0014] 进一步优选的,在一个优选的技术方案中,所述银纳米粒子的体积为1mL,抗体溶液的体积为10-100μL,所述牛血清蛋白(BSA)的体积为10-100μL。

[0015] 同时,作为优选,所述荧光猝灭免疫基底的制备方法包括以下步骤:

S2-1:将硅片浸泡在表面修饰溶液中,然后清洗吹干,获得经表面修饰的硅片,

S2-1':将荧光剂与EDC、NHS溶液混合,制备获得荧光溶液,

S2-2:将经过表面修饰的硅片浸泡在荧光溶液中,然后在戊二醛溶液中浸泡,

S2-3:用去离子水清洗干净,获得荧光猝灭免疫基底;

其中S2-1与S2-1'无先后顺序。

[0016] 在一个优选的技术方案中,本发明以聚乙烯亚胺为表面修饰溶液,以孟加拉玫瑰红为荧光剂,其制备方法为:一方面,将清洗干净的硅片在聚乙烯亚胺(PEI)水溶液中浸泡15-120分钟,清洗吹干,得到经表面修饰的硅片;另一方面,将孟加拉玫瑰红(RB)与EDC、NHS溶液混合,在30-40℃振荡反应0.5-2小时;然后将经表面修饰的硅片在上述含有荧光剂的混合溶液中浸泡30-180分钟,之后再在质量分数2.5%的戊二醛(GA)溶液中浸泡2-4小时,最后用去离子水清洗干净,即得到荧光猝灭免疫基底。

[0017] 优选的,其中孟加拉玫瑰红(RB)的摩尔浓度为5-20μM,EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)的摩尔浓度为2.5-40μM,NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)的摩尔浓度为3-48μM。

[0018] 最后,本发明中还进一步公开所述金属纳米粒子-抗体复合物与荧光猝灭免疫基底免疫检测的方法是:

S3-1:在荧光猝灭基底上滴加人抗原溶液,并在30-40℃孵育,

S3-2:孵育完成后,清洗,并用BSA在30-40℃下封闭,

S3-3:滴加金属纳米粒子-抗体复合物,在30-40℃孵育,

S3-4:清洗后测量荧光光谱。

[0019] 进一步优选的,步骤S3-1中,在30-40℃下孵育1-5小时。

[0020] 更为优选的是,在步骤S3-2中用BSA在30-40℃下封闭0.5-3小时。

[0021] 同时,作为进一步的优选,在步骤S3-3中30-40℃下孵育0.5-3小时。

[0022] 其中BSA溶液的质量分数为0.1%-10%。

[0023] 优选的所述人抗原溶液是指不同浓度的人抗原溶液。具体来说,在一个优选的技术方案中,所述人抗原溶液的浓度分别为:1 μ g/mL、100ng/mL、1ng/mL、1pg/mL、以及空白。

[0024] 本发明通过金属纳米结构,利用所形成的金属纳米粒子使位于其表面附近的荧光分子的荧光信号显著增强,同时,利用荧光猝灭效应的衬底对荧光进行预猝灭,从而将荧光预猝灭和表面增强荧光效应相结合,从而有效提高荧光强度,降低空白信号,实现低检测限的免疫检测。同时,本发明以硅片对荧光分子进行预猝灭,其作为衬底,不仅成本低,而且无需复杂策略,具有较高的应用和推广价值。

[0025]

附图说明

[0026] 图1是本发明提出的基于荧光预猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法示意图;

图2为透射电镜图,其中2a为银纳米粒子的透射电镜图,2b为银纳米粒子-抗体复合物的透射电镜图;

图3是实施例中银纳米粒子和银纳米粒子-抗体复合物的消光光谱;

图4是实施例中荧光预猝灭免疫基底对荧光分子的猝灭效果;

图5是实施例中采用不同浓度的抗原进行免疫检测测得的荧光光谱;

图6是实施例中抗原浓度校准曲线。

具体实施方式

[0027] 为了更好的理解本发明,下面我们结合具体的实施例和附图对本发明进行进一步的阐述,但值得注意的是本发明的实施不仅限于此。

[0028] 实施例1

一种基于荧光预猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法,如图1所示。

[0029] 在本实施例中,所述抗体采用羊抗人免疫球蛋白抗体(羊抗人IgG),所述抗原选用人免疫球蛋白抗原(人IgG),利用本发明的方法进行免疫检测。

[0030] 步骤一、制备银纳米粒子-抗体复合物

将500 mL,1 mM硝酸银水溶液在磁力搅拌下加热至90℃,迅速注入10 mL,1%的柠檬酸钠水溶液。混合溶液在90℃下持续反应60分钟后,在搅拌下自然冷却至室温,即得到银纳米粒子。取1 mL银纳米粒子离心一次,弃掉上层清液,将沉淀物重新分散于硼酸盐缓冲液中,超声振荡使粒子均匀分散。用碳酸钾溶液调节溶液pH至9.0,加入50 μ L,1 mg/ml羊抗人IgG,在37℃下振荡60分钟,然后加入50 μ L,5%的BSA溶液,继续振荡30分钟,离心提纯两次,重新分散于200 μ L硼酸盐缓冲液中,在4℃下保存备用。

[0031] 步骤二、制备荧光预猝灭免疫基底

将硅片依次在体积比为1:1的乙醇/丙酮溶液、乙醇和去离子水中超声清洗各20分钟后,置于体积比为1:3的浓硫酸/双氧水混合溶液中,在60℃下浸泡4 小时。取出后用去离子水冲洗三次,用氮气吹干。然后将硅片置于浓度为2 mg/mL的聚乙烯亚胺(PEI)溶液中,浸泡

30分钟,使硅片表面富含氨基而带正电。另一方面,在1 mL,100 μ M的RB水溶液中加入新配10 mM的EDC水溶液10 μ L和0.1 M的NHS水溶液2.5 μ L,用去离子水稀释至RB浓度为10 μ M,在37 $^{\circ}$ C下振荡反应30分钟。将经表面修饰的硅片在上述混合溶液中浸泡60分钟,取出硅片,用去离子水冲洗3次,用氮气吹干,然后在质量分数2.5%的GA水溶液中浸泡3小时,用去离子水冲洗3次,用氮气吹干,即得到荧光猝灭免疫基底。

[0032] 步骤三、利用步骤一得到的银纳米粒子-抗体复合物和步骤二得到的荧光猝灭免疫基底进行免疫检测

将一系列不同浓度的人IgG溶液滴加到在步骤二中得到的荧光猝灭免疫基底上,放置于湿度为65%~75%的湿盒中,在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时。然后依次用含0.1%吐温20的磷酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液和去离子水清洗基底3次,用氮气吹干。将5%的BSA溶液滴加到基底上,在37 $^{\circ}$ C下封闭2小时,取出后用含0.1% Tween 20的磷酸盐缓冲液和去离子水清洗,用氮气吹干。将步骤二中得到的银纳米粒子-抗体复合物50 μ L滴加到基底上,在37 $^{\circ}$ C下培育1小时,用含0.1%吐温20的磷酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液和去离子水清洗,用氮气小心吹干。最后测量荧光光谱。

[0033] 本实施例步骤一中制备得到的银纳米粒子和银纳米粒子-抗体复合物的透射电镜图分别如图2a和图2b所示,可见与银纳米粒子相比,银纳米粒子-抗体复合物的表面存在一层包覆层,表明抗体已成功连接到银纳米粒子的表面。两种粒子的消光光谱如图3所示。银纳米粒子在416nm处有一个明显的消光峰,这是银纳米粒子的典型表面等离子体共振峰。与银纳米粒子相比,银纳米粒子-抗体复合物的表面等离子体共振峰红移至425nm,这是由表面固定的抗体等蛋白质分子增加了银纳米粒子表面附近的折射率所致。步骤二中制备得到的荧光猝灭免疫基底的荧光光谱如图4中虚线所示。相对于采用相同方法制备的、无猝灭效应的玻璃免疫基底(图4中实线),其荧光强度减弱至约1/40。这一有效的荧光猝灭一方面提供了减弱的空白信号,另一方面也有利于实现高效的荧光增强。图5是步骤三中采用不同浓度的抗原(包括0抗原浓度的空白对照组)进行免疫检测测得的典型的荧光光谱。可以看出,免疫反应使得基底的荧光强度得到增加,这是由于银纳米粒子-抗体复合物和被固定的抗原发生了免疫结合,银纳米粒子对基底表面固定的荧光分子产生了明显的荧光增强效应。当抗原浓度为1 μ g/mL时,相对于荧光猝灭免疫基底,其荧光增强因子为8.2倍。另外,荧光强度随着抗原浓度的降低而减弱,这是由于随着被固定的抗原数量的减少,通过免疫反应连接到表面的银纳米粒子-抗体复合物也随之减少,对基底表面固定的荧光分子的荧光增强效果也越来越低。图6是根据人抗原浓度和相应的免疫荧光强度所绘制的人抗原浓度校准曲线,可见,本实施例的检测限为31.4 μ g/mL。因此,本发明具有较低检测限。

[0034] 以上所述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,这些改进和润饰也视为本发明的保护范围。

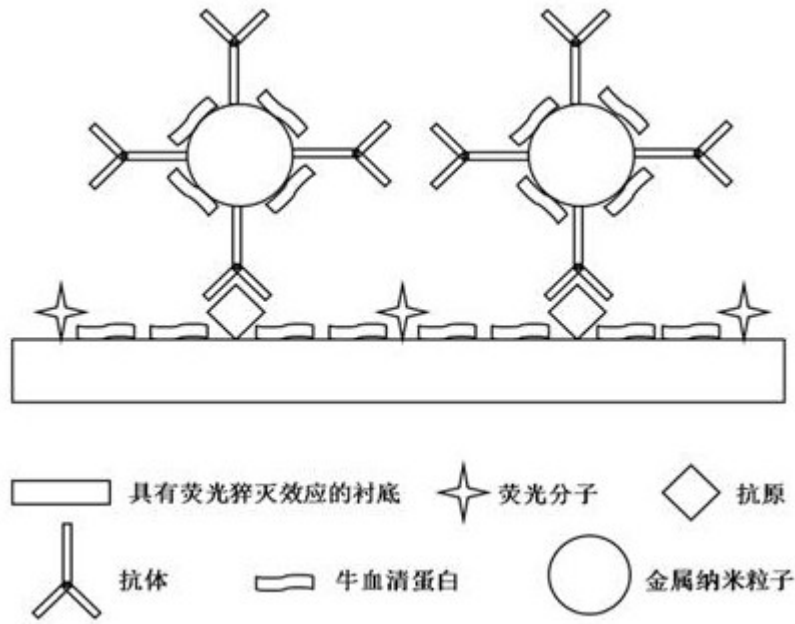


图1

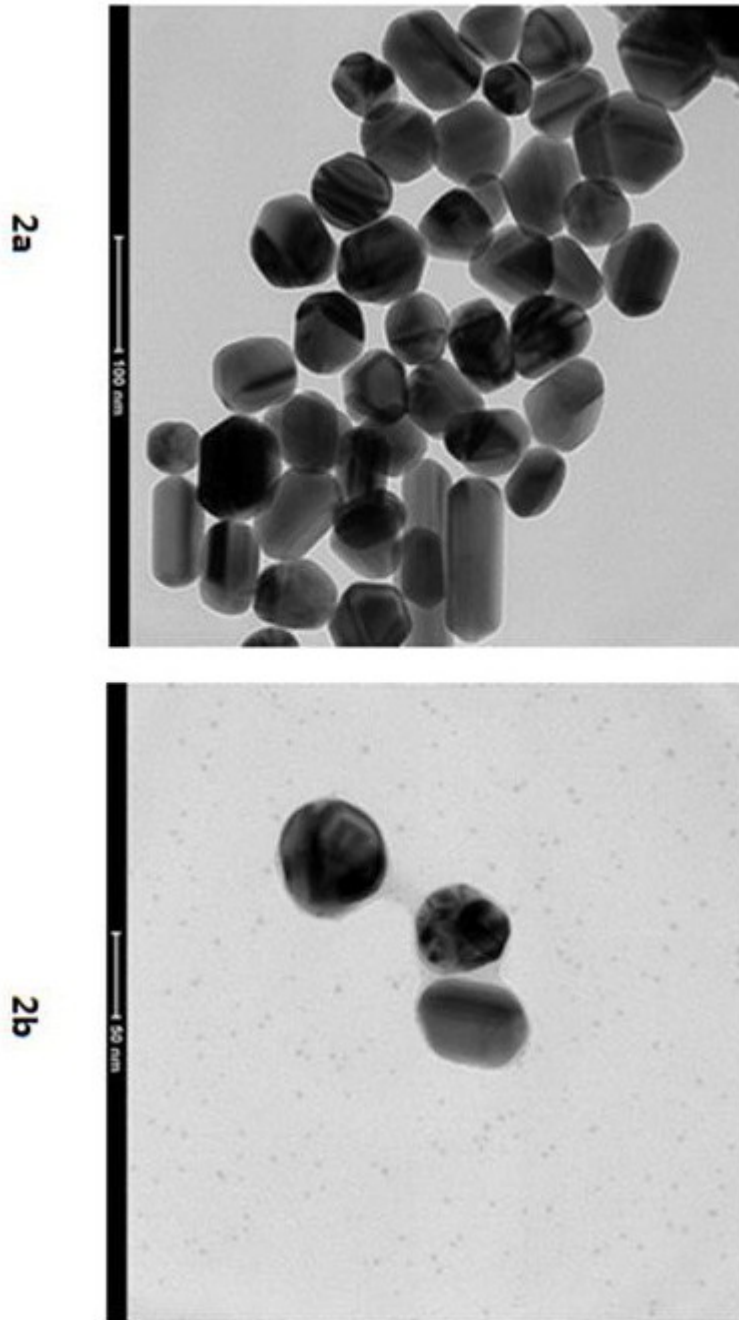


图2

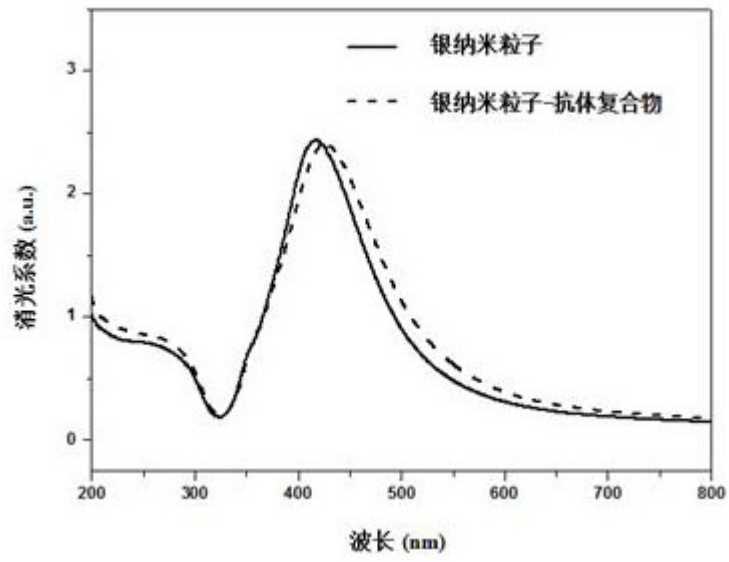


图3

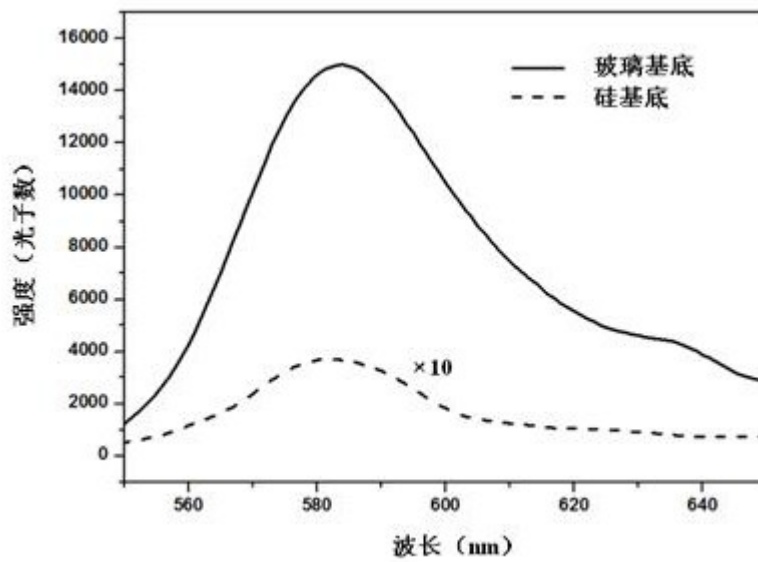


图4

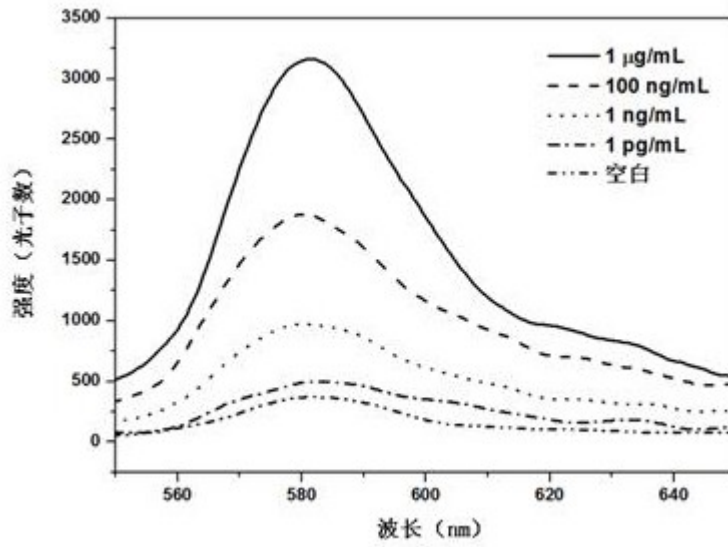


图5

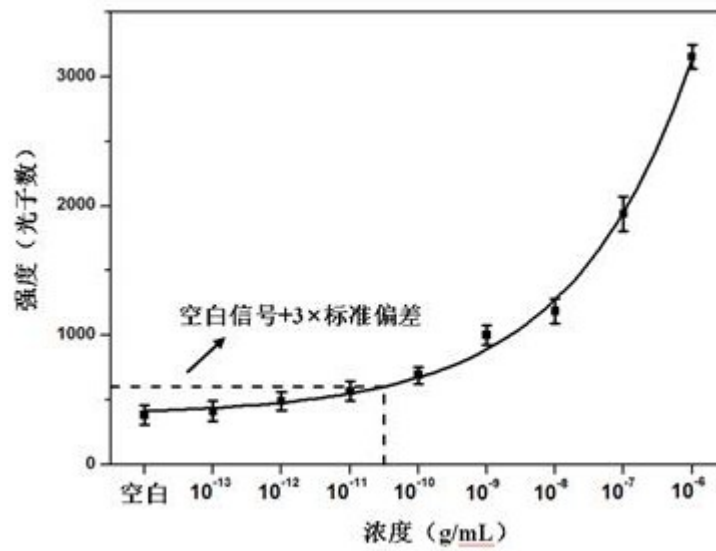


图6

专利名称(译)	一种基于荧光猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法		
公开(公告)号	CN109444405A	公开(公告)日	2019-03-08
申请号	CN201811175579.X	申请日	2018-10-10
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	东南大学		
[标]发明人	张若虎 王著元 恽斌峰 胡国华 崔一平		
发明人	张若虎 王著元 恽斌峰 胡国华 崔一平		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/533 G01N21/64 G01N21/6428 G01N33/54346 G01N2021/6417 G01N2021/6432 G01N2021/6439 G01N2021/6495		
代理人(译)	张慧清		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫检测技术领域，具体涉及基于荧光猝灭和表面增强荧光效应的免疫检测方法，该方法包括如下步骤：第一步、制备金属纳米粒子-抗体复合物；第二步、制备荧光猝灭免疫基底；第三步、利用荧光猝灭免疫基底和金属纳米粒子-抗体复合物进行免疫检测。本发明将荧光猝灭和表面增强荧光效应相结合，能够实现低检测限的免疫检测，并且具有成本低廉，操作简单的特点。

