



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104316698 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 28

(21) 申请号 201410498519. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 02. 21

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

(30) 优先权数据

10-2010-0016157 2010. 02. 23 KR

(62) 分案原申请数据

201180019524. X 2011. 02. 21

(71) 申请人 韩国食品研究院

地址 韩国京畿道

(72) 发明人 金南洙 赵镛珍 金钟泰

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

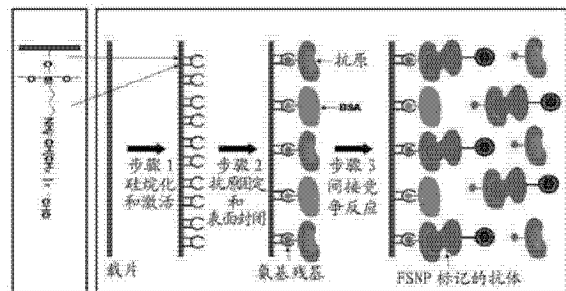
权利要求书1页 说明书13页 附图3页

(54) 发明名称

固定有抗原的免疫荧光载片的制备方法和由该方法制备的免疫荧光载片

(57) 摘要

制备固定有抗原的免疫荧光载片的方法,所述方法包括:将C反应蛋白固定在载片上制备蛋白芯片;将能够特异结合靶蛋白的抗体与链霉亲和素混合从而给抗体标记上荧光纳米颗粒;通过竞争混合与抗体免疫反应,利用荧光相机分析,其中C反应蛋白在载片上的固定包括:用3-氨丙基三甲氧基硅烷修饰载片来制备经过修饰的载片;将3-氨丙基三甲氧基硅烷修饰的载片水合;利用戊二醛溶液活化修饰过的载片;将C反应蛋白以0.01-0.5mg/ml的浓度溶解在30-70mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5-7.8)中从而制备用于固定的抗原溶液;将容纳载片的培养皿放在点样模板上,在点样点上加1-100μl抗原溶液;和在如上制备的载片上反应1-6小时以便固定抗原。利用所述方法制备的免疫荧光载片。



1. 制备固定有抗原的免疫荧光载片的方法,所述方法包括:将C反应蛋白固定在载片上制备蛋白芯片;用荧光纳米颗粒标记能够特异结合C反应蛋白的抗体;将由标本获得的靶蛋白与荧光标记抗体混合,使混合液与载片上固定的抗原反应,以及通过利用荧光显微镜测量荧光强度或荧光颗粒的数量进行分析,

其中用荧光纳米颗粒对抗体进行的标记包括:

将链霉亲和素修饰的荧光二氧化硅纳米颗粒溶液超声处理 10-30 分钟;

取所得溶液 200-600  $\mu$ l 加入 1-3ml 0.05-0.25mg/ml 生物素化抗体溶液中,室温反应 1-3 小时,期间以 30 分钟的间隔于 30-200rpm 的低速进行搅拌,每次搅拌 2-7 分钟;

反应溶液在 3-10 $^{\circ}$ C 的温度下以 7000-17000rpm 的速率离心 20-40 分钟,弃去上清液,收集沉淀;

用 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5-7.8) 将沉淀物洗一到五次,每次洗涤后,在和以上描述的相同的条件下离心,获取沉淀物;和

将沉淀物重悬于 0.4-1.2ml 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5-7.8) 中。

2. 利用权利要求 1 所述方法制备的免疫荧光载片,其中所述免疫荧光载片是用 3-氨基三甲氧基硅烷或 3-巯基丙基三甲氧基硅烷 -N- $\gamma$  马来酰亚胺基丁酰氧基琥珀酰亚胺酯进行表面修饰过的,并且包含 1-100  $\mu$ l 0.01-0.5mg/ml C 反应蛋白。

3. 利用权利要求 2 所述的免疫荧光载片测量标本中 C 反应蛋白的方法。

## 固定有抗原的免疫荧光载片的制备方法和由该方法制备的 免疫荧光载片

[0001] 本申请是申请日为 2011 年 2 月 21 日、申请号为 201180019524.X(国际申请号为 PCT/KR2011/001126)、名称为“固定有抗原的免疫荧光载片的制备方法和由该方法制备的免疫荧光载片”的发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及制备抗原固定化免疫荧光载片的方法,所述方法包括:将 C 反应蛋白固定在载片上制成蛋白芯片,将能够特异结合靶蛋白的抗体与链霉亲和素混合给抗体标记上荧光纳米颗粒,通过竞争性混合使抗体进行免疫反应,用荧光照相相机进行检验;并涉及用所述方法制备的免疫荧光载片。

### 背景技术

[0003] 生物芯片包括多种类型的固定在固体支持物单位表面上的探针,使用这类生物芯片时,仅需少量样品,即可很方便地大规模进行疾病诊断、高通量筛选(HTS)和酶活测量。

[0004] 多数将探针固定在载片上的方法包括将探针固定在用包被材料预先处理过的玻璃载片上。已有多种表面化学材料被提议用于这些方法,例如可以使用自组单层膜(韩国专利公开 2003-0038932)。

[0005] 这方面,作为提高被固定探针的量和维持探针活性的一个试验,开发建立了三维(3D)固定方法(Gill and Ballesteros, Trends in Biotechnology 18:282, 2000)。这类 3D 固定方法的例子有使用 Packard Bioscience 的 Hydrogel<sup>®</sup> 包被载片的方法、使用 Biocept Company 的基于聚乙二醇的水凝胶的方法和使用 LG Chemical Co., Ltd 的 solgel 的方法等。

[0006] 用于免疫传感器的载片选自玻璃、硅、水凝胶、金属、陶瓷和多孔膜。

[0007] 当前,根据抗原或抗体的特异反应性,通过将抗体或抗原固定在基片上制成的抗体或抗原探针板被广泛用于检测。这类应用中有代表性的试剂盒是快速检验试剂盒、常规检验试剂盒和生物芯片试剂盒。

[0008] 这些试剂盒被用于检测固定化抗体探针或抗原探针所对应的靶抗原或靶抗体。

[0009] 某些情况中,多种反应基团被组装到单个探针板上,这些反应基团中的每一个包括用于检测抗原或抗体的测试条。

[0010] 同时,随着 Health Functional Food Act 的生效,即使在韩国也有可能制造基于天然材料的食物物料和加工食品,并且获得认可是健康功能性食品。然而,为了做到这一点,需要提供材料从技术上证明健康功能性食品的功能,例如预防心血管疾病、防衰老、预防癌症、预防肥胖、调节免疫功能或者预防胃肠道相关疾病。相应地,食品功能评估变得更重要,因此功能评估有更高的商业化价值。

[0011] 食品功能评估包括根据那六种功能类型进行的体外功能评估、用实验动物(比如

大鼠) 进行的体内功能评估和临床试验。就食品工业来说,对开发体内功能检测技术的需求增加,所述检测技术可以利用实验动物快速有效地对食物物料和功能性食品进行功能评估。

[0012] 要被认可为功能性食品,需要具有科学上证实的目标功能,比如心血管功能,食品功能评估的重要性如何强调都不为过 (Kim et al., Detecting C-reactive protein by using direct binding quartz crystal microbalance immunosensor, Journal of The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, Vol. 22, p. 443, 2007)。传统上,在临床试验前使用实验动物进行的体内功能评估是为了评估身体因素,比如体重、血压和器官状况的变化。但是,这种方法产生的结果不一致,而且要求评估方案的变化性,技术高超的专业人员和高成本的检测仪器。统一的体内食品功能评估方法是测量实验动物(比如大鼠)中与特定疾病或代谢症状相关的特定生物标记物的增加或减少。从这方面,含有希望被认可为功能性食品的食品被给予实验动物。

[0013] 韩国专利 10-921237 公开的一种快速检测食物物料和功能性食品的心血管功能方法是通过利用石英晶体微天平型免疫传感器高灵敏度检测 C-反应蛋白的方法 (Biosensors and Bioelectronics, Vol. 19, p. 1193, 2004; Clinical Chemistry, Vol. 47, p. 403, 2001; New England Journal of Medicine, Vol. 340, p. 448, 1999; Biochemical Journal, Vol. 327, p. 425, 1997), 其中所述 C-反应蛋白是一种已知是冠状动脉疾病、高血压等的主要生物标记物的五聚体蛋白,其由白介素-6 和白介素-1 $\beta$  诱导刺激在哺乳动物肝脏内合成,具有大约 118 千道尔顿 (kDa) 的分子量。

[0014] 与检测 C 反应蛋白的酶联免疫分析法 (ELISA) (American Journal of Cardiology, Vol. 1, p. 155, 2005; American Journal of Veterinary Research, Vol. 1, p. 62, 2005; Journal of Clinical Laboratory Analysis, Vol. 18, p. 280, 2004) 相比,该方法易于使用,测量不需被着色物质干扰,并且比其他典型传感器测量方法有更好或等同的测量灵敏度 (Biosensors and Bioelectronics, Vol. 22, p. 973, 2007; Biosensors and Bioelectronics, Vol. 21, p. 1987, 2006; Biosensors and Bioelectronics, Vol. 21, p. 1631, 2006; Biosensors and Bioelectronics, Vol. 21, p. 1141, 2006; Analytical Biochemistry, Vol. 328, p. 210, 2004)。

[0015] 近年,使用生物传感器的传感器测量方法更常使用的是纳米材料,比如金属胶体、纳米碳管、荧光二氧化硅纳米颗粒或半导体量子点,这类纳米材料的使用促使传感器信号有更高的灵敏度、稳定性或选择性 (Analytical Chemistry, Vol. 79, p. 630-707, 2007; Biosensors and Bioelectronics, Vol. 21, p. 1900, 2006; Langmuir, Vol. 22, p. 4357, 2006; Nano Letters, Vol. 5, p. 113, 2005; Biosensors and Bioelectronics, Vol. 20, p. 2454, 2005; Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 100, p. 4984, 2003; Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 274, p. 817, 2000)。

[0016] 当使用生物传感器通过测量实验动物血液中存在的作为生物标记物的 C 反应蛋白来评估体内心血管功能时,传感器灵敏度的提高仍是一个关键问题,人们不断地追求便于操作的测量方法。

[0017] 发明详述

**[0018] 技术问题**

**[0019]** 本发明提供了具有高传感器灵敏度的一次性免疫传感器载片,所述载片在没有诸如生物芯片点样仪或微阵列扫描仪的复杂仪器情况下,保证使用者能够用微量移液枪将一定体积的抗原固定在载片上来制作或测量生物芯片从而在靶蛋白与抗体和荧光纳米颗粒的结合体之间进行免疫反应,或者在免疫荧光载片的抗原包被位点处固定化抗原和包含荧光纳米探针和特定靶分子的混合物之间进行免疫反应,然后利用荧光显微镜测量通过免疫反应特异结合在载片表面的纳米探针的荧光强度或荧光颗粒数量,从而鉴定靶分子(比如身体指征分子)的浓度。

**[0020] 技术解决方案**

**[0021]** 根据本发明,靶蛋白(抗原)被固定在载片上,与该抗原特异结合的抗体被标记了荧光物质,从标本中收集的靶蛋白与荧光标记抗体混合,混合物与载片上的固定化抗原位点反应,未反应的抗体和抗原用蒸馏水洗涤,载片被放置在培养箱中干燥,利用荧光显微镜测量荧光颗粒的荧光强度或数量。

**[0022]** 根据本发明,为了对样品进行检测分析,使用了间接竞争分析形式。但是,本领域普通技术人员很容易知道本发明还可以利用直接竞争分析形式或三明治分析形式来体现。

**[0023]** 用于本发明实施方案的免疫传感器可以选自玻璃、硅、水凝胶、金属、陶瓷和多孔膜,并且大小可以在 20-40x70-80mm。

**[0024]** 虽然在本发明的实施方案中,C 反应蛋白(下文以“CRP”指代)是作为靶样品,对本领域技术人员显而易见的本发明的方法也可以使用其他食品-功能生物标记物,包括心血管生物标记物,比如 LDL、纤维蛋白原、血管紧张素 II 或心肌肌钙蛋白;或者生物标记蛋白,其与抑制衰老、预防癌症、预防肥胖、免疫调节、预防胃肠道疾病有关。

**[0025]** C 反应蛋白抗体可以通过利用 C 反应蛋白由哺乳动物,比如大鼠、小鼠、兔、猴或人诱导制备的任何一种抗体。

**[0026]** 由标本收集的样品可以是任何一种参照溶液,其中 C 反应蛋白被溶解在反应缓冲液中,并可以是采自血液、血清、血浆、唾液、体液和肝脏的组织提取物。

**[0027]** 1-5%牛血清白蛋白(BSA)液、1-5%大鼠血清白蛋白(RSA)液、1-5%人血清白蛋白(HSA)液、1-5%小鼠血清白蛋白(MSA)液和 1-5%山羊血清白蛋白(GSA)液中的任何一种都可以作为封闭载片表面不与抗原反应的部分的溶液。

**[0028]** 以下详细描述了本发明方法的每个步骤。

**[0029]** 可以利用以下方法中的任一种将作为抗原的 C 反应蛋白固定在载片上。

**[0030]** 作为第一种固定方法,抗原的固定可以利用 3-氨丙基三甲氧基硅烷(APTMS)进行。对于该方法,首先利用 APTMS 制备修饰的载片。为了进行修饰,将载片浸泡在食人鱼(piranha)洗液( $H_2SO_4:H_2O_2 = 2:1-4:1$ )中至少 5-15 分钟,然后用蒸馏水洗涤载片,在蒸馏水中超声处理 3-10 分钟,用温度 85-95°C 的热水水合洗涤 30-90 分钟,然后在拭净纸上室温干燥 20-120 分钟。将表面洗涤过的载片放置在含有溶解在丙酮中的 5-15% APTMS 溶液的培养皿中,室温下反应 30-90 分钟。载片的前后面用丙酮、30-70mM 磷酸盐缓冲液(pH6.5-7.8)和蒸馏水顺序洗涤三到四次,然后将载片在容有蒸馏水的烧杯中浸泡 1-60 分钟。载片放在拭净纸上室温干燥 20-120 分钟,在对流式烤箱中以 30-150°C 的温度加热处理 3-7 小时,放置冷却,然后以干燥态保存在干燥器中待用。

[0031] 将 APTMS 修饰过的载片浸泡在蒸馏水中 10-20 分钟进行水合。浸泡过的载片放置在容有 1-4% 戊二醛溶液的培养皿中, 反应 30-90 分钟从而活化载片, 使蛋白能够结合到载片表面上。经过活化的载片前后表面用 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5-7.8) 洗涤三到四次。然后将载片在装有蒸馏水的烧杯中浸泡 1-60 分钟。从烧杯中取出载片, 放置在拭净纸上, 室温干燥 20-120 分钟。

[0032] 以上使用的戊二醛是将 1-4ml 30-70% 戊二醛加入 46-49ml 蒸馏水中制备的, 所制溶液使用了 30-70ml。

[0033] 为了固定靶蛋白, 例如 C 反应蛋白, 首先将 0.01-0.5mg/ml C 反应蛋白溶解在 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5-7.8) 中, 制备用于固定的抗原溶液。装有戊二醛活化载片的培养皿放在具有格子构型的点样模板上, 用 1-100  $\mu$ l 先前制备的抗原溶液在载片上对应点样模板上样点的部分进行点样, 然后给得到的结构盖上盖片, 反应进行 1-6 小时来固定抗原。然后, 载片的前后表面用 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5-7.8) 洗涤三到四次, 然后在含有蒸馏水的烧杯中浸泡 1 分钟。为了将戊二醛活化载片表面中要固定抗原的那部分 (不与抗原在表面上反应的那部分) 封闭, 将载片放在小塑料培养皿中, 所述培养皿含有溶于 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5-7.8) 的 1-5% BSA 溶液, 然后, 给得到的结构盖上盖片, 反应进行 1-5 小时, 待反应停止, 用 BSA 封闭过的载片前后表面用 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5-7.8) 洗涤三到四次, 然后在装有蒸馏水的烧杯中浸泡 1-60 分钟。将载片放置在拭净纸上, 室温干燥 20-120 分钟。

[0034] 作为第二种固定方法, 抗原的固定化可以利用 3- 巯基丙基三甲氧基硅烷 -N-  $\gamma$  - 马来酰亚胺基丁酰氧基琥珀酰胺酯 (MPTMS-GMBS) 进行。首先, 为了清洁表面, 将载片在含有浓盐酸 (18-36%) 和甲醇 (50-100%) 的混合液 (HCl:MeOH = 1:1-1:2, 体积比) 中浸泡 15-45 分钟, 然后载片前后表面用蒸馏水洗涤三到四次。载片用 85-95°C 蒸馏水洗涤后, 放置在拭净纸上, 室温干燥 20-120 分钟。

[0035] 为了将这样得到的载片硅烷化, 制备 50-500ml MPTMS 溶液, 其中在选自甲苯、二甲基甲酰胺和丙酮的有机溶剂液中溶解了 1-3% 的 MPTMS。将载片放在容有所述溶液的培养皿中, 室温反应 1-3 小时。载片前后表面用制备 MPTMS 溶液使用的相同有机溶剂洗涤三到四次, 然后将载片放置在拭净纸上, 室温干燥 20-120 分钟。

[0036] 为了活化载片表面, 如下所述制备 1-3mM GMBS 溶液。将 14-42mg GMBS 样品溶解在 100  $\mu$ l N, N- 二甲基甲酰胺 (DMF; Sigma-Aldrich Company, USA) 中, 然后, 向其中加入 49.9ml 乙醇。经过硅烷化的载片被放在容有 GMBS 溶液的培养皿中, 室温下反应 30-90 分钟。载片前后表面用蒸馏水和 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH6.5-7.8) 洗涤三到四次。然后将载片放置在拭净纸上, 室温干燥 20-120 分钟。

[0037] 按照以下方式将 CRP 抗原固定。首先, 将 C 反应蛋白以 0.01-0.5mg/ml 的浓度溶解在 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5-7.8) 中, 制备用于固定化的抗原溶液。将容有 GMBS 活化载片的培养皿放在点样模板上, 然后用 1-100  $\mu$ l 先前制备的抗原溶液在载片上对应点样模板上样点的部分进行点样, 然后给得到的结构盖上盖片, 反应进行 1-6 小时来固定抗原。然后, 载片的前后表面用 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5-7.8) 洗涤三到四次, 载片在装有蒸馏水的烧杯中浸泡 1-60 分钟。为了提高分析的准确性, 将载片放在容有 1-5% BSA 溶液的小塑料培养皿中, 得到的结构盖上盖片, 进行反应 1-5 小时。载片的前后表面用以上描述

的磷酸盐缓冲液洗涤三到四次。然后将载片在盛有蒸馏水的烧杯中浸泡 1-60 分钟,之后置于拭净纸上,室温干燥 20-120 分钟。

[0038] 图 1 中示意了这两种方法。

[0039] 为了用本发明免疫传感器载片来分析具体蛋白质,对与载片上所固定的抗原特异结合的抗体进行标记。抗体的标记可以利用灵敏度和重复性高的荧光染色法进行,为此,根据本发明使用了荧光二氧化硅纳米颗粒(下文以“FSNP”指代)。

[0040] 以下简要描述了制备 FSNP 的方法。用于对特异结合抗原的抗体进行标记的 FSNP 可以利用下述方法来制备,所述方法是染料捕获法(其中在二氧化硅结构中包含有机荧光色素)、核壳法(其中活性有机荧光色素与氨基硅烷化合物共价结合,得到的结构包含在二氧化硅结构中)、或者反转的核壳法(其中二氧化硅结构包含了有机荧光色素,形成的颗粒与有机硅烷化合物反应从而引入官能团获得功能性)。这方面来说,这类有机荧光色素的例子是二氯三(1,10-邻二氮杂菲)钌(II)水合物、荧光素、罗丹明 B 和 5(6)-羧基四甲基罗丹明;活性有机荧光色素的例子是异硫氰酸荧光素、5(6)-羧基四甲基罗丹明 N-琥珀酰亚胺酯、四甲基罗丹明 5-异硫氰酸酯、双(2,2'-联吡啶)-4'-甲基-4-羰基联吡啶钌-N-琥珀酰亚胺酯双(六氟磷酸酯)和双(2,2'-联吡啶)-4,4'-二羧基联吡啶钌双(N-琥珀酰亚胺酯)双(六氟磷酸酯)、氨基硅烷化合物的例子是(3-氨丙基)三乙氧基硅烷、有机硅烷化合物的例子是包含羧酸酯、胺基、胺基/膦酸酯、聚(乙二醇)和十八烷基、羧酸根/十八烷基诸官能团的化合物。

[0041] 以下描述了用 FSNP 标记抗体的方法。首先,需要用与生物素特异结合的链霉亲和素(SA)对 FSNP 进行修饰。进行该修饰使结合有 SA 的 FSNP(下文另有描述)与生物素化的抗体结合。要用 SA 修饰 FSNP,首先将 FSNP 与(3-巯基丙基)三甲氧基硅烷(MPTMS)反应,制备巯基修饰的 FSNP。将 1-5mg FSNP 和 5-15ml 醇(比如乙醇、甲醇或丙醇)加入容量 10-70ml 的带盖试管中,充分摇匀混合液,然后超声处理 10-30 分钟使 FSNP 完全溶于醇。随后,向该试管中加入 30-70 到 200  $\mu$ l MPTMS,将所得混合液在室温下以 30-200rpm 的低速搅拌,反应 2-6 小时。反应混合液在 3-10 $^{\circ}$ C 的温度下以 7000-17000rpm 的速度离心 20-40 分钟,将得到的沉淀物用反应中使用的同样的醇洗一到五次,每次洗涤后,按照以上描述的条件离心,获得沉淀物。从试管上取下盖子,用铝箔轻轻覆盖试管,室温下干燥。沉淀物溶于 2-6ml 30-70mM 磷酸盐缓冲液(pH 6.5-7.8)中,制得巯基修饰的 FSNP 溶液。

[0042] 向巯基修饰的 FSNP 中加入经马来酰亚胺活化的 SA 来制备结合有 SA 的 FSNP。具体来说,将 0.1-0.5mg SA-马来酰亚胺溶解在容量 10-70ml 的带盖试管中的 3-7ml 30-70mM 磷酸盐缓冲液(pH 6.5-7.8)中,制备 SA-马来酰亚胺溶液。然后,向其中加入 0.5-2.0ml 巯基修饰的 FSNP 溶液,将混合液以 30-200rpm 的低速持续搅拌,室温下反应 1-3 小时。反应产物在 3-10 $^{\circ}$ C 的温度下以 7000-17000rpm 的速度离心 20-40 分钟,得到沉淀物。沉淀物用 30-70mM 磷酸盐缓冲液(pH 6.5-7.8)洗一到五次,每次洗涤后,按照以上描述的同样的条件进行离心,获得沉淀物。将沉淀物用 1-5ml 30-70mM 磷酸盐缓冲液(pH 6.5-7.8)重悬。悬浮液加入带盖试管中,用铝箔包裹冷藏,与下文描述的生物素化抗体反应。

[0043] C 反应蛋白抗体的生物素化可以利用下述方法之一进行。

[0044] 根据本发明实施方案的 C 反应蛋白抗体的生物素化方法包括:给 C 反应蛋白抗体加入碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液,得到含有 C 反应蛋白抗体的碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液;将生

物素氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (NHS-LC-生物素) 溶液与碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液反应,前一种溶液是溶解在有机溶剂二甲基甲酰胺中的生物素化试剂;并将获得的溶液在氯化钠溶液中透析以便除去未反应的生物素化试剂。

[0045] 具体来说,生物素化方法包括给 C 反应蛋白抗体添加碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液,得到含有 1.0-3.0mg/ml C 反应蛋白抗体的碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液,取 30-100  $\mu$ l NHS-LC-生物素溶液(溶解在二甲基甲酰胺中的 1-5mg/ml NHS-LC-生物素)与 25-75  $\mu$ l 碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液在冰水中反应 1-5 小时,将 75-175  $\mu$ l 得到的溶液在 0.1-0.3M 氯化钠溶液中透析过夜,除去未反应的生物素化试剂。

[0046] 根据本发明另一实施方案的 C 反应蛋白抗体生物素化方法包括:给 C 反应蛋白抗体添加磷酸盐缓冲液,制备含有 C 反应蛋白抗体的磷酸盐缓冲液,将磺基琥珀酰亚氨基-6-(生物素酰胺)己酸酯(磺基-NHS-LC-生物素)溶液(溶于重蒸水的水溶性生物素化试剂)与磷酸盐缓冲液反应,将得到的溶液在磷酸盐缓冲液中透析以除去未反应的生物素化试剂。

[0047] 具体来说,根据该实施方案的生物素化方法包括给 C 反应蛋白抗体加入磷酸盐缓冲液,制备 C 反应蛋白抗体浓度在 0.5-3.0mg/ml 范围的磷酸盐缓冲液,取 5-20  $\mu$ l 磺基-NHS-LC-生物素溶液(其中 2-20mM 磺基-NHS-LC-生物素溶于重蒸水)与 30-800  $\mu$ l 磷酸盐缓冲液在冰水中反应 1-5 小时,将得到的溶液取 55-820  $\mu$ l 在 0.05-0.25M 磷酸盐缓冲液中过夜透析,除去未反应的生物素化试剂。

[0048] 接下来,制备结合有纳米材料的抗体。当 SA 修饰的 FSNP 与生物素化抗体被混合时,由于生物素和 SA 之间的特异结合,就制得标记了荧光材料的抗体。

[0049] 具体来说,将 SA 修饰的 FSNP 溶液超声处理 10-30 分钟,然后将 200-600  $\mu$ l 所得溶液加入 1-3ml 0.05-0.25mg/ml 生物素化抗体溶液中。一方面混合液以 30 分钟的间隔于 30-200rpm 的低速搅拌 2-7 分钟,一方面使反应在室温下进行 1-3 小时。反应产物在 3-10 $^{\circ}$ C 的温度以 7000-17000rpm 的速率离心 20-40 分钟,弃去上清液,采用沉淀物。用 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5-7.8) 将沉淀物洗一到五次,每次洗涤后,在和以上描述的不同条件下离心,使用所得沉淀物。将沉淀物重悬于 0.4-1.2ml 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5-7.8) 中。

[0050] 图 2 阐述了根据本发明,用荧光材料对特异结合 CRP 的抗体进行标记的示意性方法。

[0051] 利用本发明的免疫传感器载片对具体蛋白进行检测分析时,将由样本获得的靶蛋白与标记抗体混合。

[0052] 具体来说,用 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5-7.8) 在 Eppendorf 管中制备不同浓度的 C 反应蛋白样品液,并向各浓度的 C 反应蛋白样品溶液中加入 C 反应蛋白抗体溶液,后者是通过生物素和 SA 之间的特异结合制备的并且结合有作为纳米材料的 FSNP,其中 C 反应蛋白抗体溶液和 C 反应蛋白样品溶液的量是相同的,该混合液室温下静置 5-300 分钟。

[0053] 然后,使混合液与固定在载片上的抗原进行反应。

[0054] 具体来说,将容有作为生物传感器的载片的培养皿放在带有格子结构的点样模板上,其中所述载片上通过戊二醛方法或者 MPTMS-GMBS 方法固定了 C 反应蛋白作为抗原并且通过胎牛血清白蛋白 (BSA) 封闭方法使非选择性蛋白的吸附最小化;在固定有抗原的载片

位置进行混合,然后取 1-100  $\mu$  l 混合液(在室温下静置了 5-300 分钟的包含由样本获得的靶蛋白和标记抗体)准确地点样,给得到的结构盖上盖片,反应于室温下进行 0.5-16 小时,从而使固定在载片上的抗原和采集自样本的抗 FSNP 标记抗体的靶蛋白之间发生间接竞争分析。终止反应后,通过用蒸馏水将载片前后面洗涤三到四次并将载片在含有蒸馏水的烧杯中浸泡 1-60 分钟来除去未反应的抗体和抗原。

[0055] 图 3 描述的是解释固定在载片上的抗原如何通过间接竞争分析结合荧光标记抗体的示意图,图 4 显示了用 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5-7.8) 代替采集自样本的 C 反应蛋白与如上所述的标记抗体混合,然后将混合液点样在固定在载片上的抗原上进行抗原-抗体反应时,结合在载片上的荧光颗粒数量随时间的变化图。

[0056] 载片在培养箱中干燥 20-120 分钟。

[0057] 利用荧光显微镜测量荧光强度和荧光颗粒的数量。当样品中 CRP 的浓度高时,更多的 CRP 与荧光标记抗体反应。相应地,更少荧光标记抗体与载片上固定的抗原结合,因此荧光强度和荧光颗粒的数量下降。正如以上描述的,载片上固定的抗原和由样本获得的抗原竞争与荧光标记抗体相互作用,从而显示出不同的荧光强度水平。因此,可以在相对短的时间内容易地测量 CRP。

[0058] 有益的效果

[0059] 本发明提供了免疫传感器载片,所述载片通过将 C 反应蛋白包被在载片上、并且使 C 反应蛋白与结合了荧光纳米探针的抗体反应,在纳摩尔水平上进行评估,以此来高度灵敏地简易测量作为体内食品功能指示物的生物标记物,其中所述 C 反应蛋白已知是冠状动脉疾病、高血压和炎症的主要生物标记物。

[0060] 本发明可以为将来超级灵敏地快速同时测量例如实验动物血液中以较宽浓度范围存在的生物标记物(除了 C 反应蛋白以外,还比如低密度脂蛋白 (LDL)、纤维蛋白原或者血管紧张素 II) 建立所需的与食品功能评估相关的基础技术。

[0061] 本发明还涉及以下方面:

[0062] 项 1. 制备固定有抗原的免疫荧光载片的方法,所述方法包括:将 C 反应蛋白固定在载片上制备蛋白芯片;用荧光纳米颗粒标记能够特异结合 C 反应蛋白的抗体;将由标本获得的靶蛋白与荧光标记抗体混合,使混合液与载片上固定的抗原反应;以及通过利用荧光显微镜测量荧光强度或荧光颗粒的数量进行分析,

[0063] 其中 C 反应蛋白在载片上的固定包括:

[0064] 用 3- 氨基丙基三甲氧基硅烷修饰载片来制备经过修饰的载片;

[0065] 将 3- 氨基丙基三甲氧基硅烷修饰的载片水合;

[0066] 利用戊二醛溶液活化修饰过的载片;

[0067] 将靶蛋白以 0.01-0.5mg/ml 的浓度溶解在 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH6.5-7.8) 中从而制备用于固定的抗原溶液;

[0068] 将包含载片的培养皿放在点样模板上,在各个点样点上加 1-100  $\mu$  l 抗原溶液;和

[0069] 在如上制备的载片上反应 1-6 小时以便固定抗原。

[0070] 项 2. 制备固定有抗原的免疫荧光载片的方法,所述方法包括:将 C 反应蛋白固定在载片上制备蛋白芯片;用荧光纳米颗粒标记能够特异结合 C 反应蛋白的抗体;将由标本获得的靶蛋白与荧光标记抗体混合,使混合液与载片上固定的抗原反应;以及通过利用荧

光显微镜测量荧光强度或荧光颗粒的数量进行分析,

[0071] 其中 C 反应蛋白在载片上的固定包括:

[0072] 通过将载片在包含浓盐酸和甲醇的混合液 (HCl:MeOH = 1:1-1:2, 体积比) 中浸泡 15-45 分钟来洗涤载片;

[0073] 对载片进行硅烷化, 方法是, 制备 3- 巯基丙基三甲氧基硅烷溶液, 其中将 1-3% 的 3- 巯基丙基三甲氧基硅烷溶液溶于选自甲苯和二甲基甲酰胺的有机溶剂中, 用与制备 3- 巯基丙基三甲氧基硅烷溶液所用的相同的有机溶剂将载片的前表面和后表面洗三到四次;

[0074] 用 1-3mM N- $\gamma$  马来酰亚胺基丁酰氧基琥珀酰亚胺酯溶液活化载片表面;

[0075] 将 0.01-0.5mg/ml 的 C 反应蛋白溶解在 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5-7.8) 中从而制备用于固定的抗原溶液;

[0076] 将含有载片的培养皿放在点样模板上, 在各个点样点上加 1-100  $\mu$ l 抗原溶液; 和

[0077] 在如上制备的载片上反应 1-6 小时以便固定抗原。

[0078] 项 3. 制备固定有抗原的免疫荧光载片的方法, 所述方法包括: 将 C 反应蛋白固定在载片上制备蛋白芯片; 用荧光纳米颗粒标记能够特异结合 C 反应蛋白的抗体; 将由标本获得的靶蛋白与荧光标记抗体混合, 使混合液与载片上固定的抗原反应, 以及通过利用荧光显微镜测量荧光强度或荧光颗粒的数量进行分析,

[0079] 其中用荧光纳米颗粒对抗体进行的标记包括:

[0080] 将 3- 巯基丙基三甲氧基硅烷与荧光二氧化硅纳米颗粒反应从而制备巯基修饰的荧光二氧化硅纳米颗粒;

[0081] 向巯基修饰的荧光二氧化硅纳米颗粒加入经马来酰亚胺活化的链霉亲和素来制备结合有链霉亲和素的荧光二氧化硅纳米颗粒;

[0082] 将 C 反应蛋白抗体生物素化; 和

[0083] 将链霉亲和素修饰的荧光二氧化硅纳米颗粒与生物素化抗体混合, 制备标记有荧光材料的抗体。

[0084] 项 4. 项 3 所述的方法, 其中 C 反应蛋白抗体的生物素化包括:

[0085] 给 C 反应蛋白抗体加入碳酸盐 - 碳酸氢盐缓冲液, 得到包含 C 反应蛋白抗体的碳酸盐 - 碳酸氢盐缓冲液;

[0086] 将溶于二甲基甲酰胺中作为生物素化试剂的生物素氨基己酸 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (NHS-LC- 生物素) 溶液与包含 C 反应蛋白抗体的碳酸盐 - 碳酸氢盐缓冲液反应; 和

[0087] 将反应溶液在氯化钠溶液中透析以便除去未反应的生物素化试剂。

[0088] 项 5. 项 3 所述的方法, 其中 C 反应蛋白抗体的生物素化包括:

[0089] 给 C 反应蛋白抗体添加磷酸盐缓冲液以获得包含 C 反应蛋白抗体的磷酸盐缓冲液;

[0090] 将溶于重蒸水中作为水溶性生物素化试剂的磺基琥珀酰亚胺基 -6- (生物素酰胺基) 己酸酯 (磺基 -NHS-LC- 生物素) 溶液与包含 C 反应蛋白抗体的磷酸盐缓冲液反应; 和

[0091] 将反应溶液在磷酸盐缓冲液中透析以除去未反应的生物素化试剂。

[0092] 项 6. 制备固定有抗原的免疫荧光载片的方法, 所述方法包括: 将 C 反应蛋白固定在载片上制备蛋白芯片; 用荧光纳米颗粒标记能够特异结合 C 反应蛋白的抗体; 将由标本

获得的靶蛋白与荧光标记抗体混合,使混合液与载片上固定的抗原反应,以及通过利用荧光显微镜测量荧光强度或荧光颗粒的数量进行分析,

[0093] 其中用荧光纳米颗粒对抗体进行的标记包括:

[0094] 将链霉亲和素修饰的荧光二氧化硅纳米颗粒溶液超声处理 10-30 分钟;

[0095] 取所得溶液 200-600  $\mu$ l 加入 1-3ml 0.05-0.25mg/ml 生物素化抗体溶液中,室温反应 1-3 小时,期间以 30 分钟的间隔于 30-200rpm 的低速进行搅拌,每次搅拌 2-7 分钟;

[0096] 反应溶液在 3-10°C 的温度下以 7000-17000rpm 的速率离心 20-40 分钟,弃去上清液,收集沉淀;

[0097] 用 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5-7.8) 将沉淀物洗一到五次,每次洗涤后,在和以上描述的相同的条件下离心,获取沉淀物;和

[0098] 将沉淀物重悬于 0.4-1.2ml 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5-7.8) 中。

[0099] 项 7. 利用项 1-6 之一所述方法制备的免疫荧光载片,其中所述免疫荧光载片是用 3-氨基丙基三甲氧基硅烷或 3-巯基丙基三甲氧基硅烷 -N- $\gamma$  马来酰亚胺基丁酰氧基琥珀酰亚胺酯进行表面修饰过的,并且包含 1-100  $\mu$ l 0.01-0.5mg/ml C 反应蛋白。

[0100] 项 8. 利用项 7 所述的免疫荧光载片测量标本中 C 反应蛋白的方法。

[0101] 附图描述

[0102] 图 1 是解释将 C 反应蛋白固定在载片的两种方法的示意图。

[0103] 图 2 示意用荧光材料对特异结合 CRP 的抗体进行标记的方法。

[0104] 图 3 是说明荧光标记的抗体通过间接竞争与固定在载片上的抗原结合的示意图。

[0105] 图 4 显示了用 30-70mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5-7.8) 代替采集自样本的 C 反应蛋白与如上所述的标记抗体混合,然后将混合液点样在载片上固定了抗原的地方进行抗原-抗体反应时,结合在载片上的荧光颗粒数量随时间的变化图。

[0106] 图 5A、5B 和 5C 显示的图像表明在用食人鱼洗液处理前载片表面存在的污染物质(比如杂质)抑制点通过食人鱼溶液处理被除去,即使在使用 APTMS 硅烷化后,也观察不到抑制点。图 5D 显示用 2.5% 戊二醛溶液处理的基板图像,其中没有观察到抑制点。图 5E 显示的图像是抗原被固定后,载片表面用 BSA 封闭的部分没有抑制点。图 5F 显示的图像含有荧光二氧化硅纳米颗粒标记的抗体的荧光点,所述结合在载片表面的抗体经过间接竞争反应。

[0107] 图 6 展示了荧光检测使用的仪器。

[0108] 图 7 展示了固定有抗原的免疫荧光载片和基于 FSNP 标记抗体的 C 反应蛋白的校准曲线图。

[0109] 发明实施方式

[0110] 以下参照实施例对发明方法进行了详细描述。但是,本发明的范围不限于这些实施例。

[0111] 本试验中使用的材料如下所述:

[0112] 在小鼠骨髓瘤细胞系 (NSO) 中表达的带有组氨酸标签的重组 CRP (纯态) 购自 R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA), 贯穿在本试验中使用。其同质五聚体结构由三个非共价亚基和两个共价亚基构成。此外,由小鼠骨髓瘤和 B 细胞融合得到的杂交瘤所产生的单克隆抗大鼠 CRP 抗体 (来自用纯化 NSO 诱导的重组大鼠 CRP 免疫的小鼠) 购自

R&D Systems Inc. 玻璃载片购自 Corning Inc. (Kennebunk, ME, USA)。水溶性生物素化试剂(磺基琥珀酰亚氨基-6-(生物素酰胺基)己酸酯:磺基-NHS-LC-生物素)购自 Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL, USA)。3-氨丙基三甲氧基硅烷 (APTMS)、戊二醛和牛血清白蛋白 (BSA) 购自 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)。以下试验中使用的其他化合物由不同供应商提供, 试验过程使用双蒸水。

#### [0113] 实施例 1: 抗原在用 APTMS-GA 处理过的载片上的固定

[0114] 如下将抗原固定在载片上。即为了清洁表面, 将载片在食人鱼洗液 ( $H_2SO_4:H_2O_2 = 3:1$ , 体积比) 中浸泡 10 分钟, 用蒸馏水洗涤, 在蒸馏水中超声处理 5 分钟, 通过用温度为  $90^\circ C$  的热水杂交来洗涤 1 小时, 放置在拭净纸 (kimwipes) 上, 然后室温干燥 30 分钟。

[0115] 为了进行硅烷化从而给载片表面引入固定抗原所需要的氨基基团 ( $-NH_2$ ), 将表面清洁过的载片置于含有 APTMS 溶液 (溶于丙酮的 10% APTMS) 的培养皿中, 室温反应 1 小时。载片前后面用 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 和蒸馏水顺序洗涤各三次, 然后在含有蒸馏水的烧杯中浸泡 1 分钟。取出这样生成的载片, 然后在拭净纸上室温干燥 30 分钟, 在对流型烤箱中于  $120^\circ C$  热处理 5 小时, 静置冷却, 获取其荧光图像 (参见图 5A、5B 和 5C)。如图 5A、5B 和 5C 所示, 确认用食人鱼洗液处理前载片表面上存在的污染物质 (比如杂质) 抑制点通过食人鱼溶液处理已被除去, 即使在用 APTMS 硅烷化后, 也未再观察到抑制点荧光图像。

[0116] 为了活化 APTMS 修饰过的载片, 将载片在蒸馏水中浸泡 15 分钟, 取出置于含有戊二醛 2.5% 溶液的培养皿中, 反应进行 1 小时以便蛋白质结合到载片表面上。将活化后载片的前后表面用 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 洗涤三次, 然后在含有蒸馏水的烧杯中浸泡 1 分钟。取出载片, 放在拭净纸上室温干燥 30 分钟, 其荧光图像也显示 GA 活化载片表面没有抑制点 (参见图 5D)。

[0117] 为了将抗原 (CRP, C 反应蛋白) 固定在载片上, 首先将 C 反应蛋白以 0.1mg/ml 的浓度溶解在 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中制备用于固定的抗原溶液。将含有戊二醛活化载片的培养皿放在具有格子结构的点样模板上, 用  $20 \mu l$  抗原溶液在载片上对应点样模板上样点的部分进行点样, 然后给培养皿盖上盖子, 反应进行 1 小时来固定抗原。然后, 载片的前后表面用 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 洗涤三次, 在含有蒸馏水的烧杯中浸泡 1 分钟。为了将戊二醛活化后要进行抗原固定的载片的表面上不与抗原反应的那部分封闭, 将载片放在小塑料培养皿中, 所述培养皿含有溶于 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 的 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 溶液, 然后, 给培养皿盖上盖子, 反应进行 1 小时。然后载片前后表面用 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 洗涤三次, 在含有蒸馏水的烧杯中浸泡 1 分钟, 将载片放置在拭净纸上, 室温干燥 30 分钟, 其荧光图像也显示抗原固定后, 在 BSA 封闭的载片表面没有抑制点 (参见图 5E)。

#### [0118] 实施例 2: 抗原在用 MTS-GMBS 处理过的载片上的固定

[0119] 通过以下过程将抗原固定在载片上。即为了清洁表面, 将载片在含有体积比 1:1 的浓盐酸 (35%) 和甲醇 (70%) 的混合液中浸泡 30 分钟, 然后载片用蒸馏水洗涤三次。在浓硫酸中浸泡 30 分钟后, 载片前后表面用蒸馏水洗涤三次, 用沸腾的蒸馏水洗涤, 放在拭净纸上室温干燥 30 分钟。

[0120] 为了进行硅烷化从而给载片表面引入固定抗原所需要的反应基团巯基 ( $-SH$ ), 将

2ml (3- 巯基丙基) 三甲氧基硅烷 (MPTMS) 加入 98ml 甲苯, 制备 2% MPTMS 溶液。将载片放在含有所述溶液的培养皿中, 室温反应 2 小时。之后载片用甲苯洗涤三次, 然后放在拭净纸上, 室温干燥 30 分钟。

[0121] 为了活化经 MPTMS 修饰的载片, 将 28mg GMBS 溶于 100  $\mu$ l N, N- 二甲基甲酰胺 (DMF, **chromosilvr**<sup>®</sup> Plus, St. Louis MO, USA, HPLC  $\geq$  99.9%) 中, 并向其中加入 49.9ml 乙醇来制备 2mM GMBS 溶液。经过硅烷化的载片被置于含有 2mM GMBS 溶液的培养皿中, 室温反应 1 小时。载片的前后表面用蒸馏水和 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 洗涤三次, 放在拭净纸上室温干燥 30 分钟。

[0122] 为了将抗原 (CRP, C 反应蛋白) 固定在载片上, 首先, 将 0.1mg/ml C 反应蛋白溶解在 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 中, 制备用于固定化的抗原溶液。将含有 GMBS 活化载片的培养皿放在点样模板上, 用 20  $\mu$ l 抗原溶液在载片上对应点样模板上样点的部分进行点样, 然后给培养皿盖上盖子, 反应进行 1 小时来固定抗原。然后, 载片的前后表面用 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 洗涤三次, 在含有蒸馏水的烧杯中浸泡 1 分钟。为了将 GMBS 活化后要要进行抗原固定的载片的表面上不与抗原反应的那部分封闭, 将载片放在小塑料培养皿中, 所述培养皿含有溶于 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 的 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 溶液, 给培养皿盖上盖子, 反应进行 1 小时。然后载片前后表面用 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 洗涤三次, 载片在含有蒸馏水的烧杯中浸泡 1 分钟, 放在拭净纸上, 室温干燥 30 分钟。

[0123] 在将抗原固定到 MTS-GMBS 处理过的载片的过程中的各个相应步骤 (即表面清洁、硅烷化、活化、抗原固定和 BSA 封闭) 获取载片的荧光图像。结果证实所有荧光图像中都没有显示会抑制传感器在载片表面进行的测量的抑制点, 除了用含有浓盐酸和甲醇 (1:1, 体积比) 的混合液处理前的载片之外。

#### [0124] 实施例 3: SA 修饰的 FSNP 的制备

[0125] 将 2mg FSNP 和 10ml 乙醇加入容量为 25ml 的带盖试管中, 混合液充分摇匀, 然后超声处理 15 分钟使 FSNP 完全溶于乙醇。随后, 向该试管中加入 100  $\mu$ l MPTMS, 室温下以 100rpm 的低速搅拌, 反应 4 小时。反应混合液在 4°C 的温度下以 13000rpm 的速度离心 30 分钟, 将得到的沉淀物用乙醇洗三次, 每次洗涤后, 按照以上描述的同样条件离心获得沉淀物。从试管上取下盖子, 用铝箔轻轻覆盖试管, 室温下干燥。每份沉淀物溶解在 4ml 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中, 制备巯基修饰的 FSNP 溶液。

[0126] 将 0.25mg SA- 马来酰亚胺和 5ml 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 加入容量 25ml 的带盖试管中, 使 SA- 马来酰亚胺溶解, 制备 SA- 马来酰亚胺溶液。然后, 向其中加入 1ml 巯基修饰的 FSNP 溶液, 将混合液以 100rpm 的低速持续搅拌, 室温下反应 2 小时。反应产物在 4°C 的温度下以 10000rpm 的速度离心 20 分钟得到沉淀物。沉淀物用 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 洗三次, 每次洗涤后, 按照以上描述的同样条件进行离心。将沉淀物重悬在 2ml 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中。得到的产物加入带盖试管中, 用铝箔包裹冷藏, 与下文描述的生物素化抗体反应。

#### [0127] 实施例 4: 抗体的生物素化

[0128] 将冷藏的 1mg 管的水溶性生物素化试剂磺基琥珀酰亚氨基-6-(生物素酰胺基) 己酸酯 (磺基-NHS-LC-生物素) 转移到室温条件, 取 30-700  $\mu$ l 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 溶于 30-700  $\mu$ g 管单克隆抗大鼠 CRP 抗体。给 1mg 管磺基-NHS-LC-生物素加入 180  $\mu$ l

蒸馏水,制备 10mM 磺基-NHS-LC-生物素溶液,然后取 6.67  $\mu$ l 混合液加入抗体溶液,将生物素对抗体的分子比率控制在 20:1。将含有反应液的小管轻柔震荡,然后放在 Eppendorf 管架上,置于冰水中反应 2 小时。然后将反应混合液加样到 slide-A-lyzer 试剂盒 (Pierce Biotechnology, Inc) 中,对 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 透析过夜,除去未反应的试剂并回收透析膜内存留的透析液,然后利用和制备生物素化抗体使用的相同磷酸盐缓冲液将透析液总体积控制在 1ml。

#### [0129] 实施例 5:结合纳米材料的抗体的制备

[0130] 将 SA 修饰的 FSNP 溶液超声处理 15 分钟,然后取 400  $\mu$ l 得到的溶液加入 2ml 0.1mg/ml 生物素化抗体溶液中,一方面以 30 分钟的间隔于 100rpm 的低速进行搅拌,每次搅拌 5 分钟,一方面使反应在室温下进行 2 小时。将反应产物在 4 $^{\circ}$ C 的温度以 10000rpm 的速率离心 20 分钟,弃去上清液,收集沉淀物。用 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 将沉淀物洗三次,每次洗涤后,在和以上描述的不同条件下离心获得沉淀物。将沉淀物重悬于 0.8ml 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中。

#### [0131] 实施例 6:样本溶液和标记抗体的混合

[0132] 向不同浓度的 C 反应蛋白样品溶液中加入 C 反应蛋白抗体溶液,其中所述 C 反应蛋白抗体溶液是基于生物素和 SA 之间的特异结合制备的并且结合有作为纳米材料的 FSNP,所述 C 反应蛋白样品溶液是用 Eppendorf 管中的 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 稀释而制备的,其中 C 反应蛋白抗体溶液和 C 反应蛋白样品溶液的量是相同的,将这些溶液混合,室温下反应 1 小时。

#### [0133] 实施例 7:间接竞争反应

[0134] 将含有作为生物传感器的载片的培养皿放在带有格子结构的点样模板上,其中根据实施例 1 和 2 所述载片上固定了作为抗原的 C 反应蛋白并且通过 BSA 封闭过程使非选择性蛋白的吸附最小化;在固定有抗原的载片位置进行混合,然后取 20  $\mu$ l 包含从标本采集的靶蛋白并且在室温静置了 1 小时的混合液准确地点样,将得到的结构盖上,反应于室温下进行 2 小时,从而使固定在载片上的抗原和采集自标本的抗 FSNP 标记抗体的靶蛋白之间发生间接竞争反应。反应终止后,通过用蒸馏水将载片前后面洗涤三次并将载片在含有蒸馏水的烧杯中浸泡 1 分钟来除去未反应的抗体和抗原。

#### [0135] 实施例 8:荧光图像分析

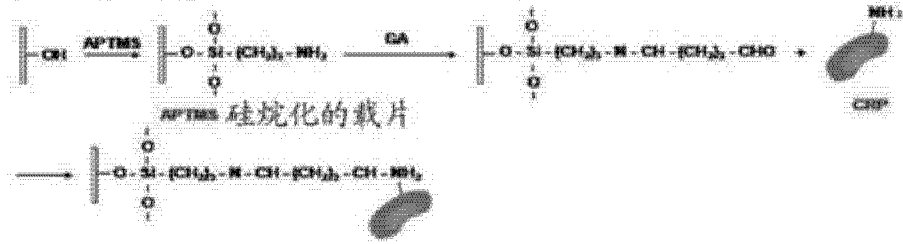
[0136] 将按照实施例 7 进行了间接竞争反应的载片放在培养箱中干燥。利用荧光显微镜对干燥好的载片进行荧光图像分析,并测量荧光强度和荧光颗粒的数量。图 6 展示了荧光分析使用的仪器,获取的荧光图像显示出结合在载片表面的经过间接竞争反应的 FSNP 标记抗体的荧光点(参见图 5F)。图 7 显示了利用 FSNP 标记抗体,通过测量由 C 反应蛋白的浓度依赖性荧光图像获得的相对荧光水平而得出的校准曲线图。当样本中 CRP 浓度提高时,更多 CRP 与标记抗体反应,因此固定在载片上的抗原和标记抗体之间的结合下降。此外,图形在非常低的 C 反应蛋白浓度范围内呈现线性。这表明,利用这种免疫荧光载片测量 CRP 时的检测极限非常高,是 0.1-1.0ng/ml。

#### [0137] 实施例 9:免疫荧光载片的制备

[0138] 根据实施例 1-8,通过对 30X70mm 大小的显微镜用透明载片用 3-氨基丙基三甲氧基硅烷或 3-巯基丙基三甲氧基硅烷-N- $\gamma$  马来酰亚胺基丁酰氧基琥珀酰亚胺酯进行表面修

饰、并在上面固定 1-100  $\mu$  l 0.01-0.5mg/ml C 反应蛋白,来制备一次性免疫荧光载片。

A. APTMS 方法



B. MPTMS-GMBS 方法

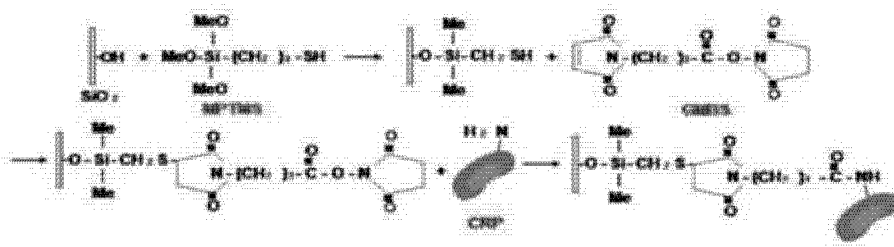
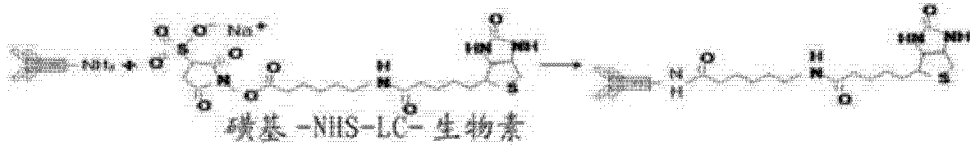


图 1

A. 纳米材料的 SA 底物



B. 抗体的生物素化



C. 结合纳米材料的抗体的制备

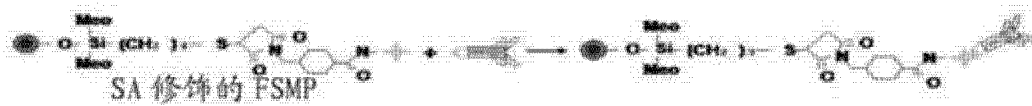


图 2

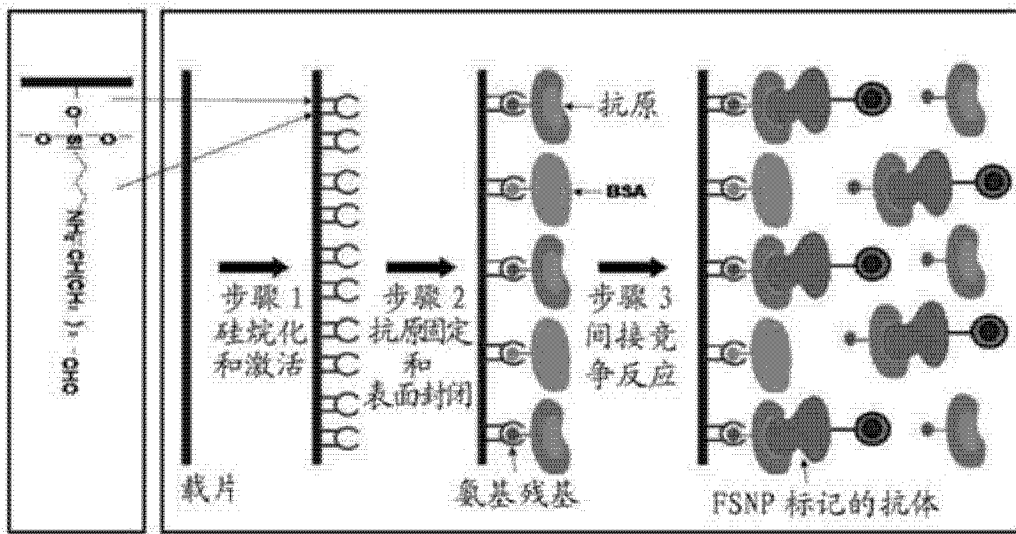


图 3

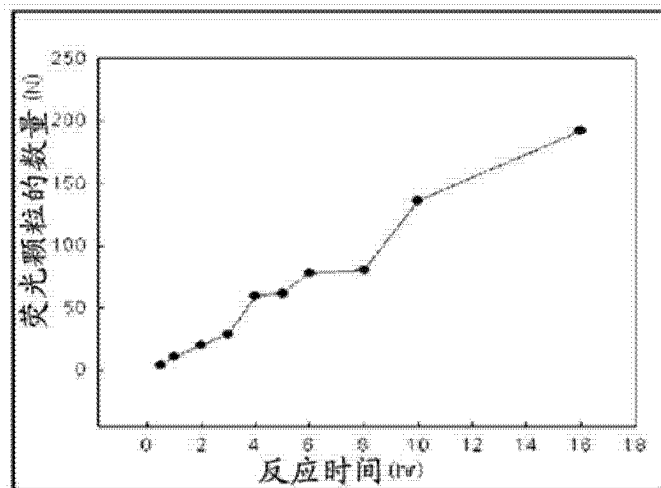


图 4

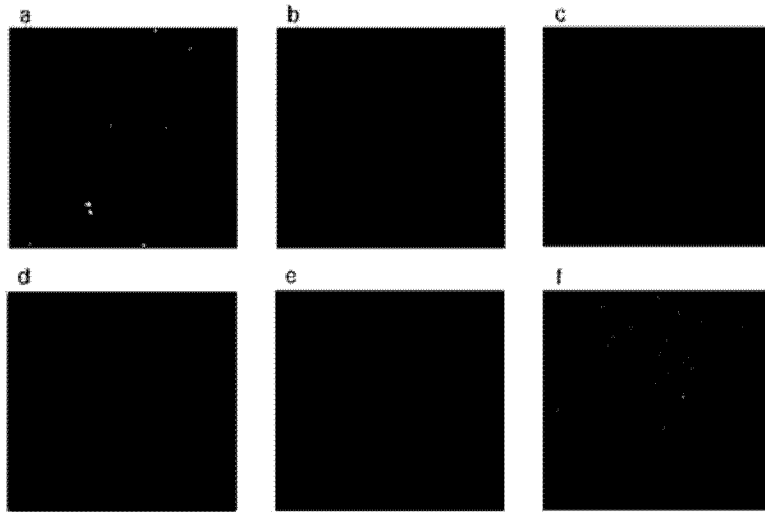


图 5

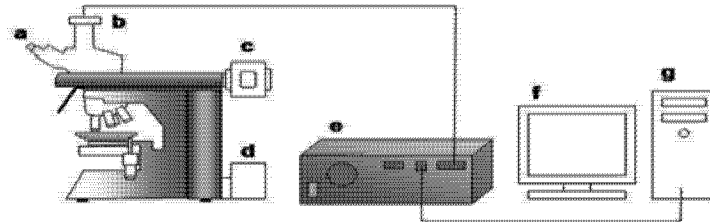


图 6

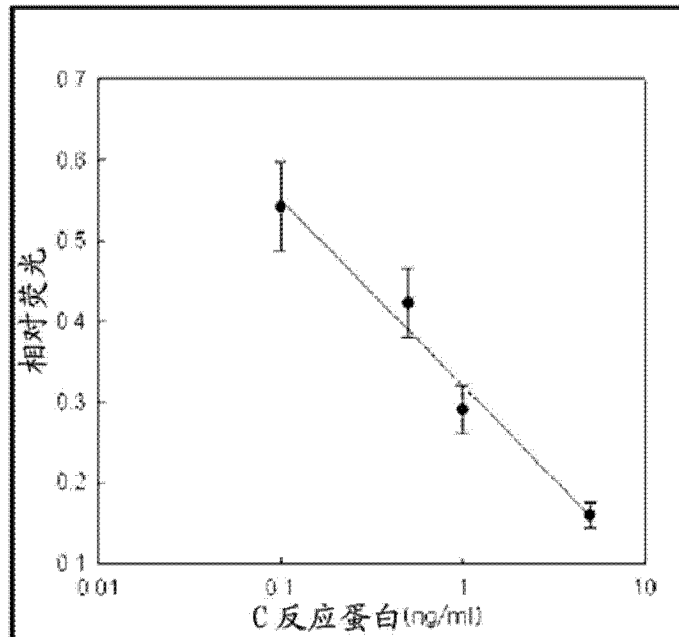


图 7

专利名称(译)	固定有抗原的免疫荧光载片的制备方法和由该方法制备的免疫荧光载片		
公开(公告)号	<a href="#">CN104316698A</a>	公开(公告)日	2015-01-28
申请号	CN201410498519.7	申请日	2011-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	韩国食品研究院		
申请(专利权)人(译)	韩国食品研究院		
当前申请(专利权)人(译)	韩国食品研究院		
[标]发明人	金南洙 赵镛珍 金钟泰		
发明人	金南洙 赵镛珍 金钟泰		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/54366		
代理人(译)	张文辉		
优先权	1020100016157 2010-02-23 KR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

制备固定有抗原的免疫荧光载片的方法，所述方法包括：将C反应蛋白固定在载片上制备蛋白芯片；将能够特异结合靶蛋白的抗体与链霉亲和素混合从而给抗体标记上荧光纳米颗粒；通过竞争混合与抗体免疫反应，利用荧光照相机分析，其中C反应蛋白在载片上的固定包括：用3-氨丙基三甲氧基硅烷修饰载片来制备经过修饰的载片；将3-氨丙基三甲氧基硅烷修饰的载片水合；利用戊二醛溶液活化修饰过的载片；将C反应蛋白以0.01-0.5mg/ml的浓度溶解在30-70mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5-7.8)中从而制备用于固定的抗原溶液；将容纳载片的培养皿放在点样模板上，在点样点上加1-100μl抗原溶液；和在如上制备的载片上反应1-6小时以便固定抗原。利用所述方法制备的免疫荧光载片。

