



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104597235 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 06

(21) 申请号 201510051622. 1

(22) 申请日 2015. 01. 31

(71) 申请人 苏州大学

地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区仁
爱路 199 号

(72) 发明人 姚建林 葛明 房聪维

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有
限公司 32103

代理人 陶海锋

(51) Int. Cl.

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

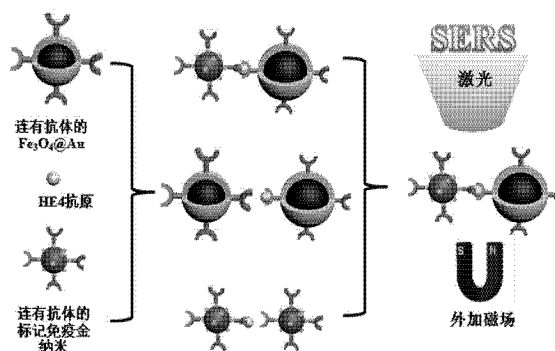
权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54) 发明名称

一种人附睾蛋白免疫检测试剂盒及其使用方
法

(57) 摘要

本发明公开了一种人附睾蛋白免疫检测试剂盒及其使用方法,它的有效成分包括按体积比为 1:1 的标记免疫金纳米粒子试剂和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ 免疫纳米粒子试剂,是一种基于表面增强拉曼光谱和核壳磁性材料。将金纳米中表面羧基活化处理后,注入人附睾蛋白抗体,得到标记免疫金纳米粒子试剂;对 Fe_3O_4 表面进行氨基化修饰后再与金纳米粒子混合,注入人附睾蛋白抗体,得到具良好磁性及优良 SERS 增强活性的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ 免疫纳米粒子试剂。本发明提供的试剂盒使用条件温和,可采用便携式的检测仪器,无需大型仪器设备;对人附睾蛋白的检测限可达到飞克级水平,具有高灵敏性;试剂盒的基底具有可循环使用的特点,降低了检测成本。



1. 一种人附睾蛋白免疫检测试剂盒,其特征在于它的有效成分包括按体积比为 1:1 的标记免疫金纳米粒子试剂和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ 免疫纳米粒子试剂;

所述的标记免疫金纳米粒子的制备方法为:制备质量体积比为 0.6%~1% 的粒径为 35~50 nm 的金纳米粒子分散液,取浓度为 1mmol/l 的 4-巯基苯甲酸标记分子 2 μl 加入到 1 ml 的金纳米粒子分散液中,离心分散后,按摩尔比 2~5:1,依次加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 N-羟基琥珀酰亚胺,进行表面羧基活化处理后,注入人附睾蛋白抗体,孵育 2~3 h,再进行离心分散,加入牛血清白蛋白封闭剩下的活性位,得到标记免疫金纳米粒子试剂;

所述的核壳结构 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ 免疫纳米粒子的制备方法为:制备质量体积比为 15~20% 的 Fe_3O_4 分散液,取浓度为 1mmol/l 的氨丙基三甲基硅烷 90~100 μl 加入到 1 ml 的 Fe_3O_4 分散液中,得到表面氨基化修饰的 Fe_3O_4 ;按质量比 5~10:1,将粒径为 2~5nm 的金纳米粒子加入到表面氨基化修饰的 Fe_3O_4 分散液中混合,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4-\text{Au}$ 纳米复合物;利用种子生长法制备得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ 核壳纳米粒子;注入浓度为 5mg/ml 的人附睾蛋白抗体 8~10 μl ,得到核壳结构 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ 免疫纳米粒子试剂。

2. 如权利要求 1 所述的人附睾蛋白免疫检测试剂盒的使用方法,其特征在于包括如下步骤:

(1) 将标记免疫金纳米粒子试剂、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ 免疫纳米粒子试剂与待测抗原混合,组装形成“标记免疫金纳米粒子-抗原- $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ 免疫纳米粒子”磁性复合夹心结构;

(2) 将磁性复合夹心结构通过钕铁硼磁铁富集后转移至载玻片,用于进行表面增强拉曼光谱检测。

3. 根据权利要求 2 所述的人附睾蛋白免疫检测试剂盒的使用方法,其特征在于:以酸化甲醇溶液为解离剂,解离磁性复合夹心结构,实现免疫磁性纳米粒子的循环使用。

4. 根据权利要求 3 所述的人附睾蛋白免疫检测试剂盒的使用方法,其特征在于:所述的酸化甲醇溶液,甲醇的质量浓度为 25%,用 HCl 调节甲醇溶液的 pH 为 2~3。

一种人附睾蛋白免疫检测试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种人附睾蛋白免疫检测试剂盒及其使用方法,属于生物材料及检测技术领域。

背景技术

[0002] 卵巢癌是妇科常见的恶性肿瘤,也是妇科肿瘤死亡率最高的肿瘤类型。目前,卵巢癌的诊断主要依据两种检测手段。一种是经阴道超声检查(TUV),这种成像方法可用于检查女性的生殖器官,包括子宫、卵巢、宫颈及阴道。尽管其应用较为普遍,但是这种方法并不能准确检测出肿块是良性还是恶性。此外,该方法还需要经验丰富的临床技师对检测结果进行解读。另一种常规检测方法是检测生物标志物 CA125 (carbohydrate antigen 125),这种方法被视为卵巢癌诊断的“金标准”。但是,CA125 的特异性及敏感度较低,容易出现假阴性或假阳性。大约 50% 的卵巢癌 I 期患者并没有 CA125 水平升高的现象,也就是说有一半的卵巢癌患者可能被漏诊。某些良性卵巢疾病也会导致 CA125 水平升高,造成假阳性。因此,在临床诊断上亟需一种更好的诊断标志物及检测工具以尽早诊断卵巢癌。人附睾蛋白 4 (HE4) 是一种新的肿瘤标志物,88% 的卵巢癌患者都会出现 HE4 升高的现象,其可用于卵巢癌的早期诊断、鉴别、治疗监测及预后评估。与 CA125 相比,HE4 的敏感度更高、特异性更强,尤其是在疾病初期无症状阶段,疾病早期 HE4 诊断的敏感度是 82.7%,而 CA125 却仅有 45.9%。与 CA125 较低的特异性相比,HE4 的特异性高达 99%。这意味着,临床医生对 HE4 的检测结果会更具信心。

[0003] 因此,如何对 HE4 进行快速有效的高灵敏检测成为研究热点,目前 HE4 的检测方法主要为生物酶联法(参见文献:S. Wang, X. Zhao, I. Khimji, R. Akbas, W. Qiu, D. Edwards, D. W. Cramer, B. Ye, U. Demirci, *Lab Chip*. 2011, 11, 3411.)及电化学发光免疫检测(参见文献:J. J. Yang, M. Sa, M. Huang, J. J. Yang, Z. Y. Xiang, B. Liu, A. G. Tang, *Clin Biochem*. 2013, 46, 1705.),然而这些技术或多或少都存在着缺陷,譬如样品准备繁琐,检测时间长以及检测灵敏度并不高等,目前这两种方法的检测限大约在 $10 \text{ pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 水平(参见文献:F. Plotti, S. Capriglione, C. Terranova, R. Montera, A. Aloisi, P. Damiani, L. Muzii, G. Scaletta, P. Benedetti-Panici, R. Angioli, *Tumor Biology*. 2012, 33, 2117.),而疾病早期时 HE4 浓度极低,这就对 HE4 抗原的高灵敏准确检测提出了挑战。表面增强拉曼光谱(SERS)是一种具有极高灵敏度的检测表面物种信息的光谱技术,其在贵金属 Au、Ag、Cu 上的增强可达 10^6 倍以上。自 1974 年 Fleischmann 在粗糙银电极上获得了吡啶吸附的高质量拉曼光谱以来(参见文献:S M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.* 1974, 26, 163.),ERS 在表面科学中迅速崛起,目前在生物医学、食品卫生、催化等各领域都得到了广泛的应用。同时,金包覆的铁氧化物功能性核壳纳米粒子(铁氧化物 @Au)兼具内核铁氧化物的强顺磁性和外层 Au 的高 SERS 活性,已成为理想的 SERS 基底材料,利用其有效的磁富集作用进行现场极低浓度物质的检测具有极大的潜力。

发明内容

[0004] 本发明的目的是针对现有人附睾蛋白检测存在的灵敏度较低的不足,提供一种基于表面增强拉曼光谱及磁性能的复合磁性材料实现人附睾蛋白的高灵敏检测的试剂盒及其使用方法。通过 SERS 技术使检测限达到飞克级水平,并实现了磁性免疫复合纳米粒子的循环使用。

[0005] 为达到上述发明目的,本发明采用的技术方案是:一种人附睾蛋白免疫检测试剂盒,它的有效成分包括按体积比为 1:1 的标记免疫金纳米粒子试剂和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ 免疫纳米粒子试剂;

所述的标记免疫金纳米粒子的制备方法为:制备质量体积比为 0.6%~1% 的粒径为 35~50 nm 的金纳米粒子分散液,取浓度为 1mmol/l 的 4-巯基苯甲酸标记分子 2 μl 加入到 1 ml 的金纳米粒子分散液中,离心分散后,按摩尔比 2~5:1,依次加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 N-羟基琥珀酰亚胺,进行表面羧基活化处理后,注入人附睾蛋白抗体,孵育 2~3 h,再进行离心分散,加入牛血清白蛋白封闭剩下的活性位,得到标记免疫金纳米粒子试剂;

所述的核壳结构 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ 免疫纳米粒子的制备方法为:制备质量体积比为 15~20% 的 Fe_3O_4 分散液,取浓度为 1mmol/l 的氨丙基三甲基硅烷 90~100 μl 加入到 1 ml 的 Fe_3O_4 分散液中,得到表面氨基化修饰的 Fe_3O_4 ;按质量比 5~10:1,将粒径为 2~5nm 的金纳米粒子加入到表面氨基化修饰的 Fe_3O_4 分散液中混合,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ 纳米复合物;利用种子生长法制备得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ 核壳纳米粒子;注入浓度为 5mg/ml 的人附睾蛋白抗体 8~10 μl ,得到核壳结构 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ 免疫纳米粒子试剂。

[0006] 本发明提供的人附睾蛋白免疫检测试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

1、将标记免疫金纳米粒子试剂、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ 免疫纳米粒子试剂与待测抗原混合,组装形成“标记免疫金纳米粒子-抗原- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ 免疫纳米粒子”磁性复合夹心结构;

2、将磁性复合夹心结构通过钕铁硼磁铁富集后转移至载玻片,用于进行表面增强拉曼光谱检测。

[0007] 本发明提供的试剂盒的使用,还可以酸化甲醇溶液为解离剂,解离磁性复合夹心结构,实现免疫磁性纳米粒子的循环使用。所述的酸化甲醇溶液,甲醇的质量浓度为 25%,用 HCl 调节甲醇溶液的 pH 为 2~3。

[0008] 由于上述技术方案的采用,与现有技术相比,本发明具有如下优点:

1、采用 EDC 和 NHS 进行活化,可有效增加金纳米粒子及磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ 纳米粒子与抗体蛋白的结合能力,从而提高待测物质的检测有效性。

[0009] 2、本发明将磁性纳米粒子与表面增强拉曼光谱有效结合,能快速有效富集待测抗原,磁性富集可极大增加 SERS 的热点,可实现比其他方法更低的检测限,在卵巢癌疾病早期的超痕量检测方面具有实际应用价值。

[0010] 3、通过酸化甲醇解离复合三明治结构,使免疫磁性纳米粒子实现循环使用,为本发明的低成本打下了基础。

[0011] 4、本发明的实施条件温和,采用便携式拉曼光谱仪,无需任何大型仪器设备,有利于推广应用。

附图说明

[0012] 图 1 为本发明实施例制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ 纳米粒子的 TEM 谱图；

图 2 为本发明实施例制备的磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ 纳米粒子在无外加磁场 (A) 和有外加磁场 (B) 作用下的对比图像；

图 3 为“标记免疫金纳米粒子-抗原 HE4-免疫磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ 纳米粒子”三明治夹心结构的 TEM 形貌图；

图 4 为本发明实施例提供的免疫金溶胶与磁性核壳免疫纳米粒子为试剂盒有效成分对 HE4 抗原检测的原理示意图；

图 5 为本发明实施例中不同浓度的抗原 HE4 富集后得到的磁性复合结构的 SERS 光谱对比图；

图 6 为在图 5 基础上,以 4-MBA 的 1578cm^{-1} 苯环振动谱峰强度与 HE4 抗原浓度作剂量反应的曲线图；

图 7 为本发明实施例中的三明治结构进行解离后,将得到的免疫磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ 纳米粒子循环利用,每次完成组装后的上层清液中抗原 HE4 的 SERS 检测对比谱图。

具体实施方式

[0013] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步描述。

[0014] 实施例 1

一、基底的制备

1、免疫金纳米粒子的制备:先制备 35nm 粒径的金纳米,取 1 mL 0.01 g/mL 的 HAuCl_4 (1%) 配制成 100 mL 1.0×10^{-4} g/mL HAuCl_4 (0.01%), 剧烈搅拌下加热煮沸后迅速加入 1mL 1.0×10^{-2} g/mL 的柠檬酸钠水溶液,保持沸腾 15 min 后,搅拌下冷却至室温。加入 2 μL 4-MBA 标记分子,离心分散后依次加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC $\cdot$ HCl) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) (EDC 和 NHS 的体积比为 2:1) 溶液活化,再将 HE4 抗体注入,孵育 2 ~ 3 h,再次离心后分散加入 10 μL 5% (质量体积比) BSA 封闭剩下的活性位。

[0015] 2、 Fe_3O_4 纳米粒子的合成:将 0.65 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 0.2 g 柠檬酸钠加入到 20 mL 乙二醇 (EG) 中,超声搅拌均匀。剧烈搅拌下加入 1.2 g 醋酸钠 (NaAc), 搅拌 0.5 h 后,将混合溶液转入至 50 mL 聚四氟乙烯内衬的高压反应釜中,加热并保持 200°C 10 h。自然冷却至室温,弃去上层清液,所得黑色 Fe_3O_4 磁性纳米粒子通过磁分离洗涤 3-5 次后,分散于 20 mL 水中待用。

[0016] 3、磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ 核壳纳米粒子的制备

Fe_3O_4 表面的氨基化修饰:取 1 mL Fe_3O_4 水溶液,加入 50 mL 乙醇中,超声分散 5 min, 加入 100 μL 氨丙基三甲硅烷 (APTMS) 于上述溶液中,室温下搅拌 12 h, 然后加热冷凝回流 2 h, 待自然冷却后,用乙醇洗涤 5 次以除去过量的 APTMS, 磁分离后的产物分散在 15 mL 乙醇中。

[0017] 2nm Au 纳米粒子的制备:将 1.5 mL 0.2mol/L 的 NaOH 加入到 45.5 mL 水中,然后加入 1 mL 四羟甲基氯化磷 (THPC) 水溶液 (将 1.2 mL THPC 原溶液稀释至 100 mL)。5 min

后,剧烈搅拌下快速将 2 mL 1% HAuCl_4 加至其中。溶液颜色由无色逐渐变为黄色,最后转变为棕黑色,反应溶液在室温下继续搅拌 2 小时。

[0018] Fe_3O_4 -2nm Au 的制备:将上述制备的 Fe_3O_4 乙醇溶液与 25 mL 2nm Au 溶胶混合,超声 15 min 后,室温下搅拌 12 h。对 Fe_3O_4 -2nm Au 纳米粒子进行磁分离,弃去上层过量的 Au 溶胶,用超纯水分散,多次洗涤直至上层呈无色,最后将产物分散于 15 mL 水中。

[0019] 参见附图 1,它为本实施例制备的 Fe_3O_4 @Au 纳米粒子的 TEM 谱图; Fe_3O_4 @Au 核壳纳米粒子的制备步骤:(1)Au 生长溶液的配制:0.05g K_2CO_3 溶解至 200mL 超纯水中,搅拌 15 分钟,然后向其中加入 4mL 1% HAuCl_4 ,溶液由黄色逐渐变为无色,继续搅拌 1 小时后,避光保存待用。(2) Fe_3O_4 @Au 核壳纳米粒子是利用种子生长法制得,取 2 mL 制备的 Fe_3O_4 -2nm Au,加入到 15 mL Au 生长溶液中,超声分散,搅拌下向其中加入 20 μL 37% HCHO 溶液后溶液逐渐变为蓝色,表明 Au 壳的形成。此复合纳米在外加磁场作用下,可在极短时间内迅速有效的富集。参见附图 2,它为本实施例制备的磁性 Fe_3O_4 @Au 纳米粒子在无外加磁场 (A) 和有外加磁场 (B) 作用下的对比图像。

[0020] 4、将免疫金溶胶与磁性核壳免疫纳米粒子各 1 mL 混合,加入 HE4 抗原,振荡孵育 6 h 以上,得到“标记免疫金-抗原-免疫 Fe_3O_4 @Au”夹心结构,参见附图 3,它为“标记免疫金纳米粒子-抗原 HE4-免疫磁性 Fe_3O_4 @Au 纳米粒子”三明治夹心结构的 TEM 形貌图。用外加磁场将“三明治”结构富集至溶液底部,弃上层清液,用硼砂缓冲液多次超声重悬浮分散复合纳米结构。取溶液滴加在硅片上,进行 SERS 检测。在施加磁场富集纳米粒子时,只有含有磁性核壳纳米粒子的结构会被定向富集。参见附图 4,它是本实施例提供的免疫金溶胶与磁性核壳免疫纳米粒子为试剂盒有效成分对 HE4 抗原检测的原理示意图。

[0021] 二、HE4 磁免疫检测的检测限

将标记免疫金和免疫 Fe_3O_4 @Au 混合,加入特异抗原 HE4,磁吸后进行 SERS 检测(采用便携式拉曼光谱仪)。当加入 HE4 抗原浓度逐渐减少,所采集到的 SERS 信号也逐渐减弱。参见附图 5,它为本实施例中不同浓度的抗原 HE4 富集后得到的磁性复合结构的 SERS 光谱对比图,所加抗原 HE4 浓度分别为 (a) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, (b) 100 ng/ml , (c) 10 ng/ml , (d) 1 ng/ml , (e) 100 pg/ml , (f) 10 pg/ml , (g) 1 pg/ml , (h) 100 fg/ml , (i) 0 fg/ml 。参见附图 6,它为在图 5 基础上,以 4-MBA 的 1578cm^{-1} 苯环振动谱峰强度与 HE4 抗原浓度作剂量反应的曲线图,并进行拟合,图中各点均为同一样品多个不同区域采集到的信号平均值。浓度范围为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至 100 fg/ml ,在高浓度范围内,SERS 信号下降较快,在低浓度区间,降低趋势变小,在更低浓度下则基本检测不到标记分子的 SERS 信号,检测限 (LOD) 约为 100 fg/ml 。本发明利用磁性核壳纳米结构定向富集进行 SERS 免疫检测的方法可有效地增加 SERS 热点,提高痕量蛋白的检测灵敏度。

[0022] 三、磁分离效率及免疫磁性纳米的循环利用

为了降低检测成本,本发明提供的磁性免疫纳米基底具有循环利用性能。采用酸化甲醇(含量为 25%,加入 30% HCl 调节 PH 至 2~3)为免疫复合物的解离剂解离复合夹心结构,将解离后的免疫磁性纳米粒子循环使用,再次与免疫金纳米粒子结合检测 HE4,所加入 HE4 浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,检测每次富集后上层溶液中残余的抗原时均无明显 SERS 信号,循环使用次数 5 次,参见附图 7,它为本实施例中的三明治结构进行解离后,将得到的免疫磁性 Fe_3O_4 @Au 纳米粒子循环利用,每次完成组装后的上层清液中抗原 HE4 的 SERS 检测对比谱图,图 7 表

明,解离后的免疫磁性纳米粒子与抗原之间仍具有很好的结合能力,而上层清液中的抗原浓度极低,说明磁性免疫纳米适合重复使用。

[0023] 本发明在制备磁性能优良且具备高 SERS 活性的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 核壳纳米粒子的基础上,通过连接 HE4 抗体、待测抗原、标记免疫金纳米粒子获得免疫磁性夹心复合结构,此复合结构通过磁场有效富集待测物质,通过 SERS 检测表明了该方法具有极高的检测灵敏度,HE4 抗原的检测限可达 100 fg/ml,同时验证了其具有较好的循环使用性能。

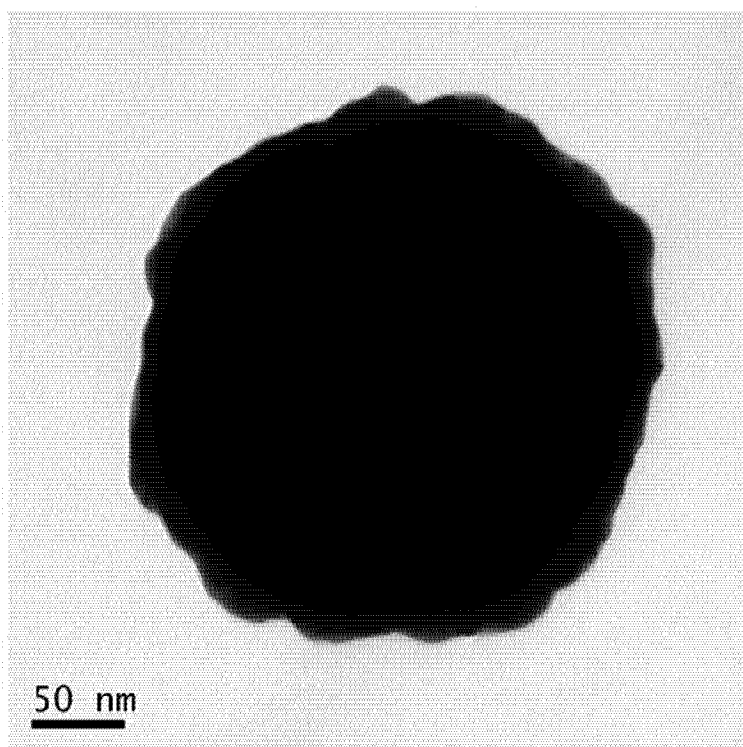


图 1

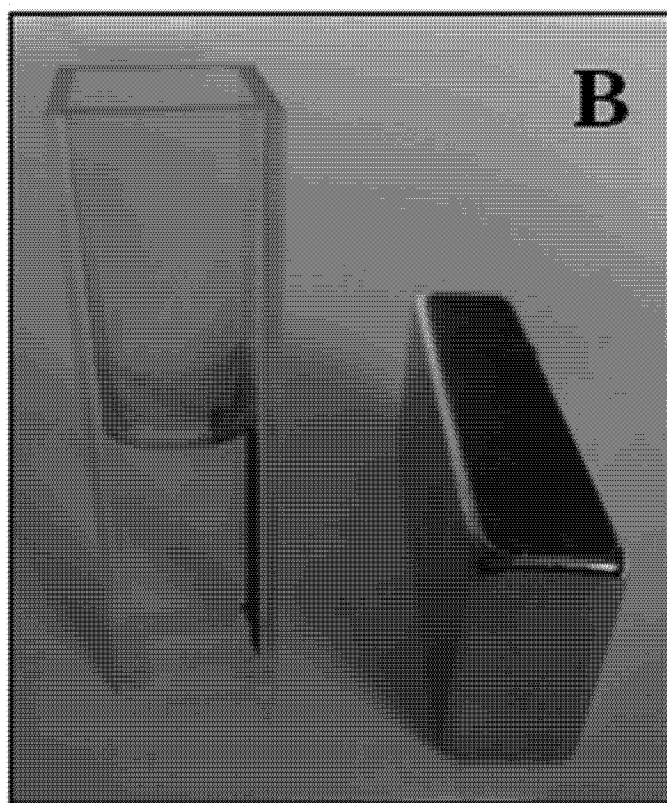
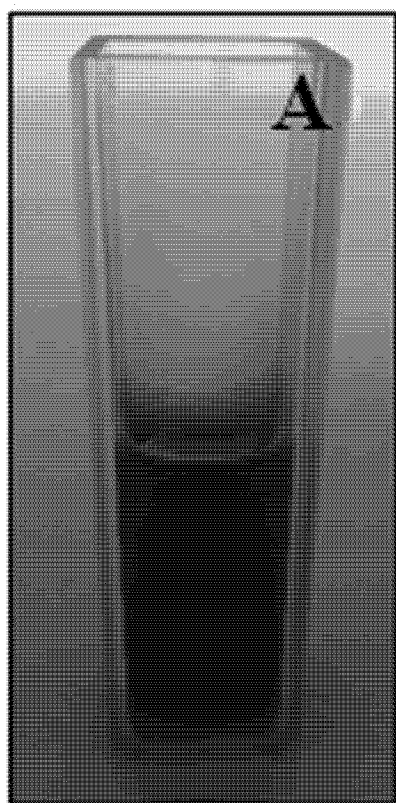


图 2

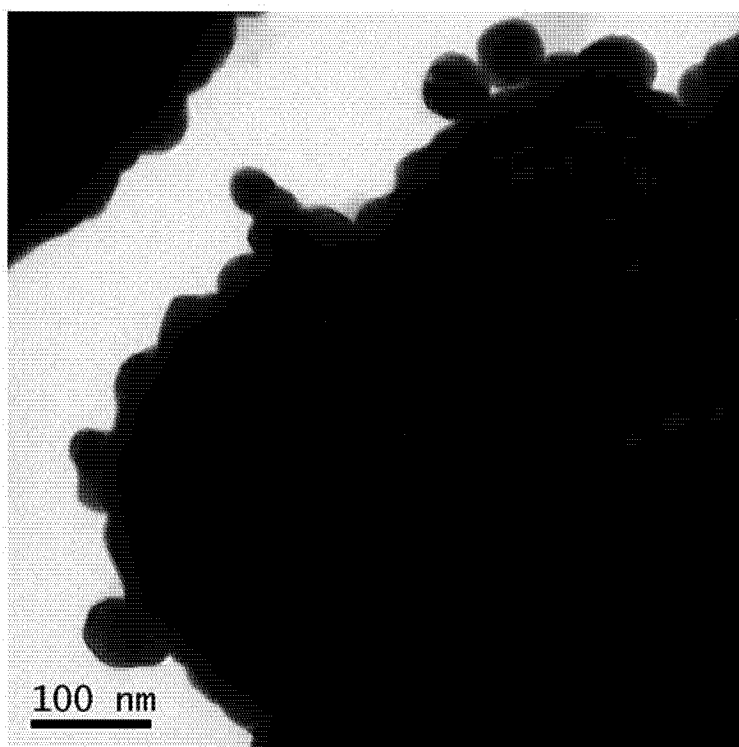


图 3

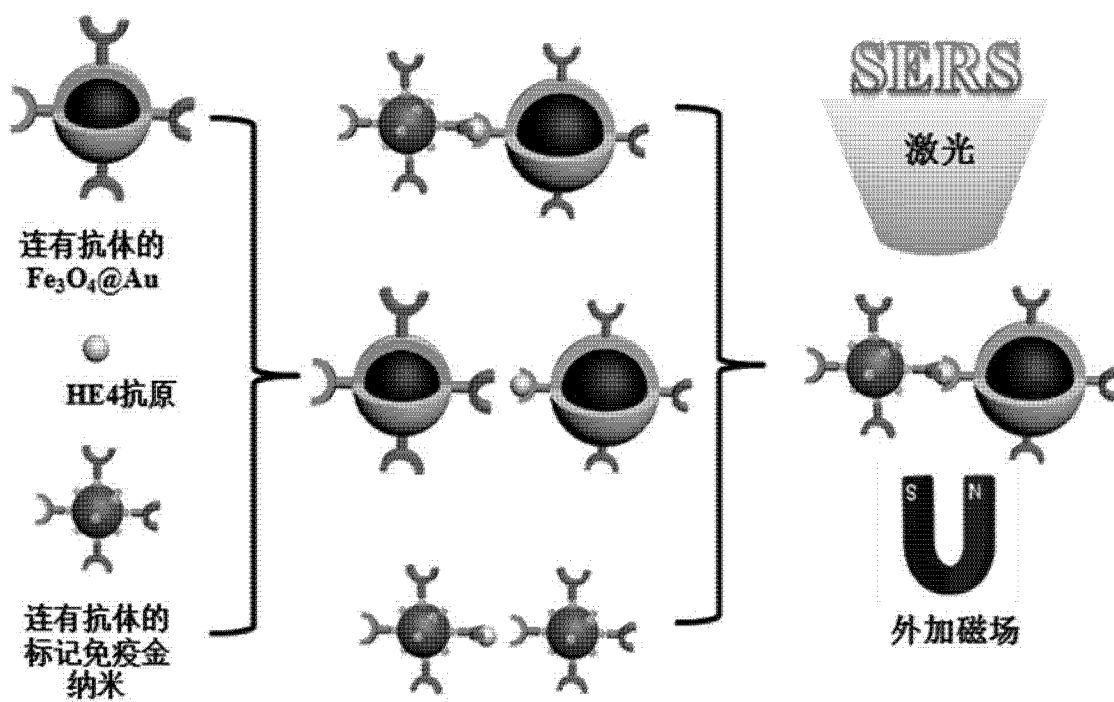


图 4

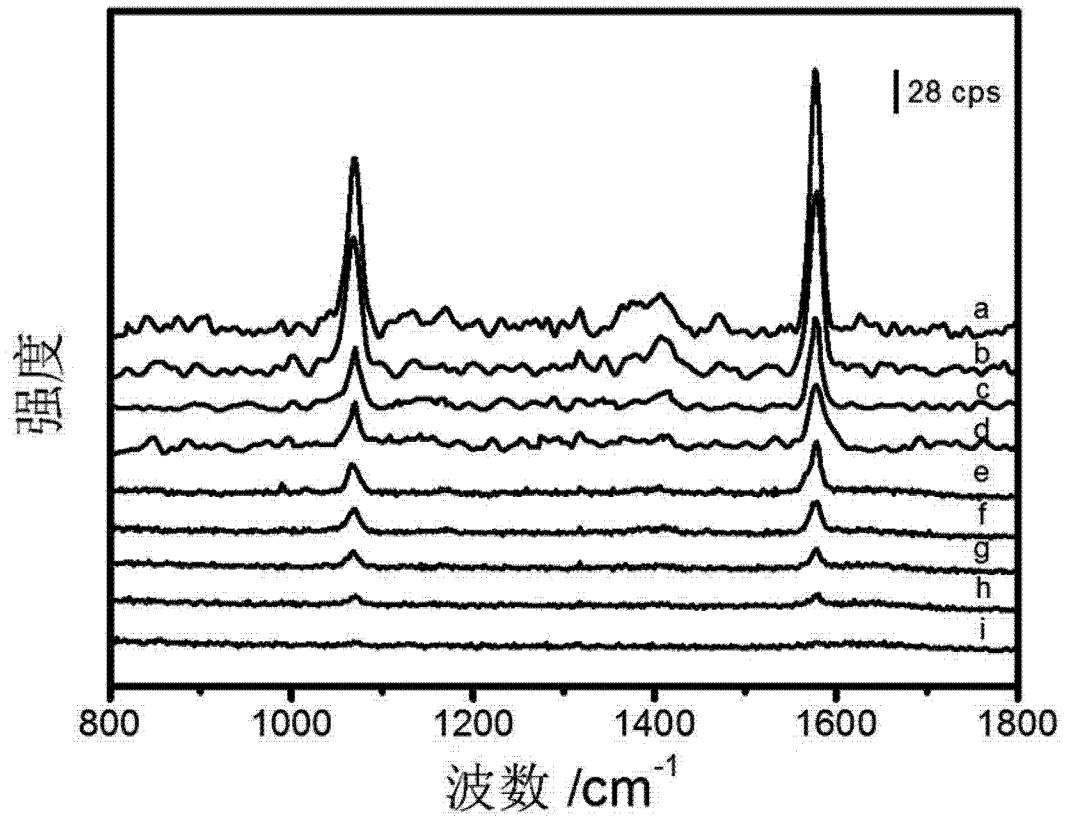


图 5

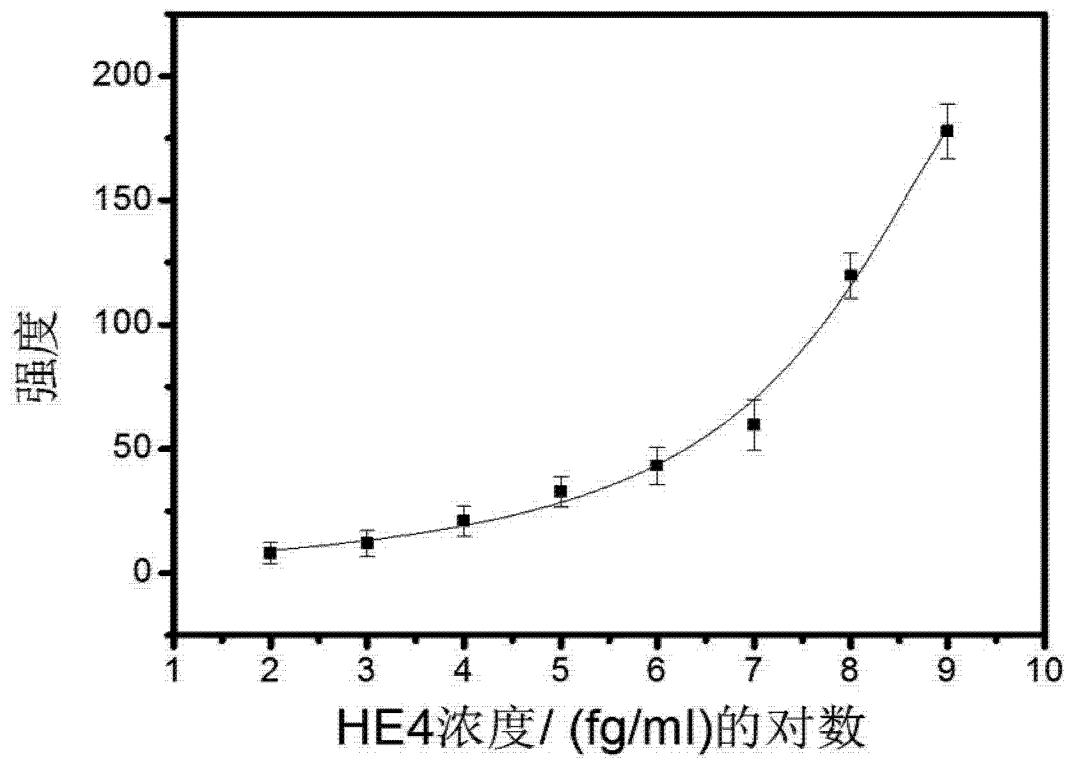


图 6

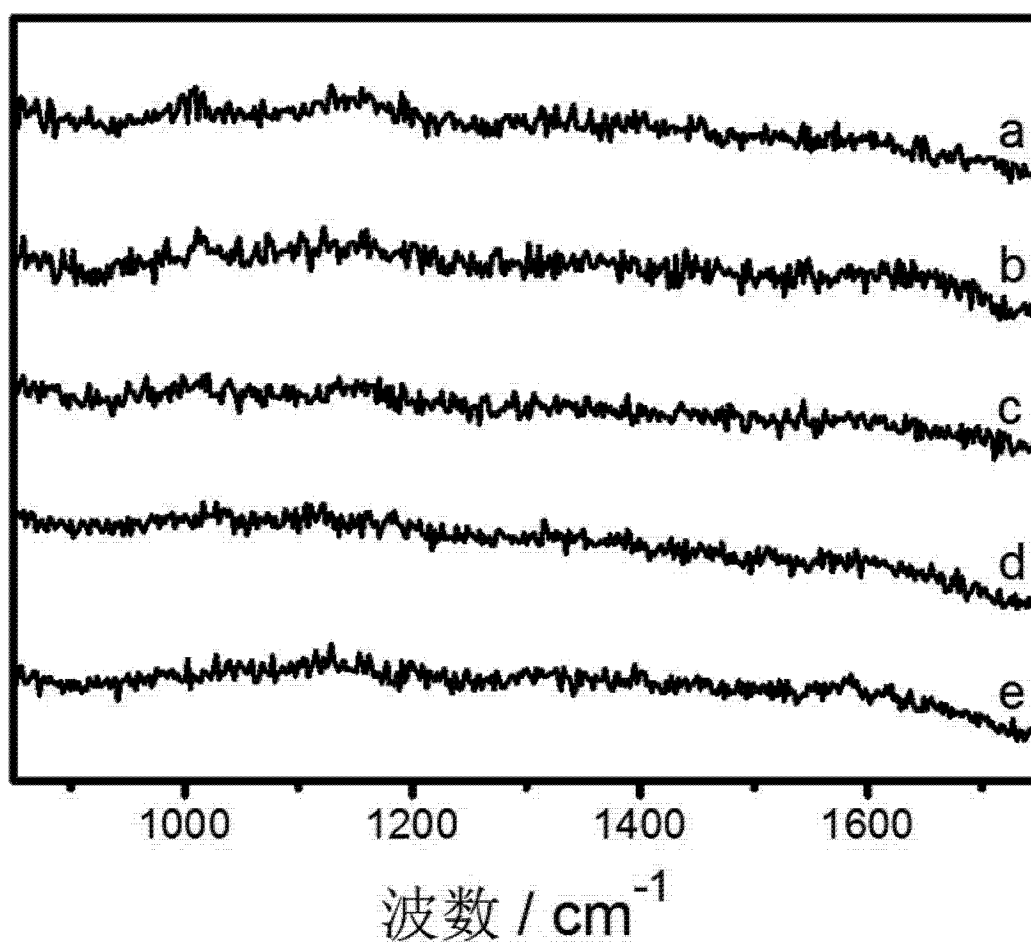


图 7

专利名称(译)	一种人附睾蛋白免疫检测试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN104597235A	公开(公告)日	2015-05-06
申请号	CN201510051622.1	申请日	2015-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	苏州大学		
申请(专利权)人(译)	苏州大学		
当前申请(专利权)人(译)	苏州大学		
[标]发明人	姚建林 葛明 房聪维		
发明人	姚建林 葛明 房聪维		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/57449 G01N33/68		
代理人(译)	陶海锋		
其他公开文献	CN104597235B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人附睾蛋白免疫检测试剂盒及其使用方法，它的有效成分包括按体积比为1:1的标记免疫金纳米粒子试剂和Fe₃O₄Au免疫纳米粒子试剂，是一种基于表面增强拉曼光谱和核壳磁性材料。将金纳米中表面羧基活化处理后，注入人附睾蛋白抗体，得到标记免疫金纳米粒子试剂；对Fe₃O₄表面进行氨基化修饰后再与金纳米粒子混合，注入人附睾蛋白抗体，得到具良好磁性及优良SERS增强活性的Fe₃O₄Au免疫纳米粒子试剂。本发明提供的试剂盒使用条件温和，可采用便携式的检测仪器，无需大型仪器设备；对人附睾蛋白的检测限可达到飞克级水平，具有高灵敏性；试剂盒的基底具有可循环使用的特点，降低了检测成本。

