



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101498719 B

(45) 授权公告日 2013.05.29

(21) 申请号 200910025737.8

(22) 申请日 2009.03.09

(73) 专利权人 东南大学

地址 210096 江苏省南京市四牌楼2号

(72) 发明人 刘松琴 吴亚锋 陈成良

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

32200

代理人 叶连生

(51) Int. Cl.

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 27/26 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1410546 A, 2003.04.16, 全文.

CN 101358973 A, 2009.02.04, 全文.

Yafeng Wu et al. Enzyme-Functionalized

Silica Nanoparticles as Sensitive Labels in Biosensing. 《Analytical Chemistry》. 2009, 第81卷(第4期), 参见第1602页左栏倒数第12行至右栏第1段最后一行.

审查员 黄丽君

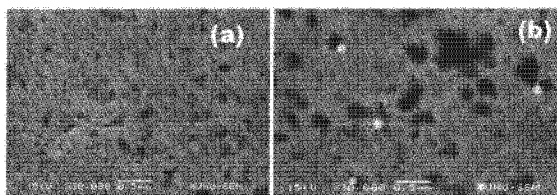
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

酶功能化纳米免疫标记物的制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种酶功能化纳米免疫标记物的制备技术。利用二氧化硅纳米微球表面羟基与GPMS的硅烷化反应,使二氧化硅纳米微球表面环氧基化,再利用该环氧基团与辣根过氧化物酶和anti-AFP分子中的活性氨基反应,得到辣根过氧化物酶和anti-AFP第二抗体共修饰的二氧化硅微球免疫标记物。由于微球表面富含酶,使得单个免疫过程的检测信号得到发大,提高了低浓度生物分子检测的灵敏度。同时由于使用的二氧化硅小球的粒径和表面的高度均一性,使得单个二氧化硅小球上荷载的酶和生物分子的量几乎相同,从而极大的提高了检测的可重复性。



1. 利用酶功能化纳米免疫标记物制备夹心免疫过程修饰后的金电极的方法,其特征在于步骤为:

a. 称取 0.2g 粒径为 $100 \pm 2\text{nm}$ 的二氧化硅纳米微球,加入到 5mL 5wt% GPMS 的甲苯溶液中,在室温下搅拌反应 24h,反应结束后,将二氧化硅微球离心分离,转速为 12000r/min,分别用甲苯和无水乙醇清洗表面吸附的 GPMS,然后在氮气保护下,加热至 100°C 烘干,得到表面修饰有环氧基官能团的二氧化硅微球;取 15mg 环氧基官能化的二氧化硅微球,加入到 $450 \mu\text{L}$ 1mg/mL HRP 和 $50 \mu\text{L}$ $12.7 \mu\text{g/mL}$ anti-AFP 抗体的混合溶液中,在 4°C 下搅拌反应 24h,离心分离后用含磷酸盐缓冲溶液清洗三次以除去吸附态的 HRP 和 anti-AFP 抗体,然后,用 $500 \mu\text{L}$ 质量分数为 1% BSA 处理上述修饰后的二氧化硅微球 3 小时后得酶功能化纳米免疫标记物;

b. anti-AFP 第一抗体修饰金电极的制备:将洁净金片置于 $100 \mu\text{L}$ 10mM 1 : 1 MUA/MU 的乙醇溶液中浸泡 15 小时,用蒸馏水清洗干净后在 10mM EDC 和 10mM NHS 的混合溶液中活化 30 分钟,然后浸入含 12.7 微克每毫升的 anti-AFP 第一抗体溶液中温育 1 小时,得到 anti-AFP 第一抗体修饰金电极;

c. 基于酶功能化二氧化硅纳米免疫标志物的夹心免疫方法:将上述 anti-AFP 第一抗体修饰金电极浸泡在含有不同浓度 AFP 抗原的溶液中温育 30 分钟,通过免疫反应捕获 AFP 抗原,然后将该金片置于 15mg/mL 酶功能化纳米免疫标记物悬浮液中温育 30 分钟,利用标志物表面修饰的 anti-AFP 第二抗体与金电极表面捕捉到的 AFP 抗原之间的免疫反应,将酶功能化纳米免疫标记物捕捉到金电极表面,完成一个完整的夹心免疫过程;得到经夹心免疫过程修饰后的金电极作为工作电极。

酶功能化纳米免疫标记物的制备方法及其应用

一、技术领域

[0001] 本发明涉及一种酶功能化纳米免疫标记物的制备技术,特别涉及了由辣根过氧化物酶(HRP)和第二抗体(Ab₂)共修饰的二氧化硅微球免疫标记物的制备方法,以及利用该酶功能化纳米免疫标记物进行低浓度生物分子检测的电化学方法。

二、背景技术

[0002] 现有技术:随着生物技术的发展以及生物信息学领域的进步,使得目前的临床早期诊断、疗效观察及预后监测方法越来越完善,发现了许多具有特定靶向的分子标志物。然而,在疾病的发生发展初期,这些肿瘤相关抗原或肿瘤标志物的表达水平很低,或者产生一些其他特定的细胞因子,但由于检测方法与灵敏度和检测限的限制而难以实现疾病的早期诊断。因此发展新的检测方法和技术,实现血清中肿瘤相关性抗原的灵敏、准确检测,对于研究疾病的发生、发展和疾病的早期预警和诊断,对于疾病临床诊断、治疗和预后等具有重要的意义。

[0003] 过氧化物酶,比活性高,稳定,分子量小,且纯酶容易制备,因此在临床检验中得到广泛使用,以 HRP 标记的抗体已经用于酶联免疫和化学发光免疫检测,但是当生物分子浓度非常低时,其检测的灵敏度就受到了限制。因此,需要在此基础上寻找将酶的催化信号放大的方法。已有多种生物和纳米技术被用于生物分子检测的信号放大,如聚合酶链反应(PCR)、酶催化作用、金属纳米颗粒和量子纳米颗粒的信号放大等,这些方法需要特别仪器或技术来辅助检测,酶的放大作用也易被环境污染和繁琐的实验步骤所影响。因此,发现新的信号放大方法,并用于分子识别与诊断新方法研究具有重要意义。本发明利用二氧化硅小球表面功能化增加了酶的载荷量,制得了一种酶功能化纳米免疫标记物,实现了低浓度生物分子的灵敏、准确检测。

三、发明内容

[0004] 技术问题:本发明的目的是针对生物分子检测信号放大的关键问题,通过对二氧化硅小球酶功能化,制得由 HRP 和生物分子共修饰,可用于低浓度生物分子检测且具有信号放大作用的复合纳米粒子标记物,并将其用于生物分子的灵敏检测。

[0005] 技术方案:

[0006] 一种酶功能化纳米免疫标记物制备方法,制备方法为:利用二氧化硅纳米微球表面羟基与 GPMS 发生硅烷化反应,在二氧化硅纳米微球表面嫁接环氧基团,再利用该环氧基团与辣根过氧化物酶和 anti-AFP 分子中的活性氨基反应,将辣根过氧化物酶和 anti-AFP 分子共固定在二氧化硅小球表面,用 1% BSA 封闭后得到酶和抗体共修饰的功能化纳米免疫标记物。

[0007] 酶功能化纳米免疫标记物制备方法,制备步骤为:称取 0.2g 粒径为 $100 \pm 2\text{nm}$ 的二氧化硅纳米微球,加入到 5mL 5wt% GPMS 的甲苯溶液中,在室温下搅拌反应 24h,反应结束后,将二氧化硅微球离心分离,转速为 12000r/min,分别用甲苯和无水乙醇清洗表面吸附的

GPMS,然后在氮气保护下,加热至 100℃烘干,得到表面修饰有环氧基官能团的二氧化硅微球;取 15mg 环氧基官能化的二氧化硅微球,加入到 450 μ L 1mg/mL HRP 和 50 μ L 12.7 μ g/mL anti-AFP 抗体的混合溶液中,在 4℃下搅拌反应 24h,离心分离后用含磷酸盐缓冲溶液清洗三次以除去吸附态的 HRP 和 anti-AFP 抗体,然后,用 500 μ L 质量分数为 1% BSA 处理上述修饰后的二氧化硅微球 3 小时后得酶功能化纳米免疫标记物。

[0008] 一种利用酶功能化纳米免疫标记物进行低浓度生物分子检测的夹心免疫检测方法,夹心免疫检测过程为:anti-AFP 第一抗体修饰金电极的制备:在洁净的金电极表面修饰 MUA/MU 杂合单层,然后在 EDC 和 NHS 活化下与 anti-AFP 第一抗体分子中的氨基反应,将 anti-AFP 第一抗体固定在金电极表面;基于酶功能化二氧化硅纳米免疫标志物的夹心免疫方法:将上步得到的 anti-AFP 第一抗体修饰金电极在含有 AFP 抗原的磷酸盐缓冲溶液中浸泡捕捉溶液中游离的 AFP 抗原,然后将其置于酶功能化二氧化硅纳米免疫标志物悬浮液中温育,将该免疫标志物嫁接到金电极表面,并利用电化学和化学发光方法检测金电极表面捕捉到的标志物上 HRP 的量,实现低浓度生物分子的灵敏检测。

[0009] 酶功能化纳米免疫标记物进行低浓度生物分子检测的夹心免疫检测方法,夹心免疫检测过程为:anti-AFP 第一抗体修饰金电极的制备:将洁净金片置于 100 μ L 10mM 摩尔比为 1:1 的 MUA/MU 乙醇溶液中浸泡 15 小时,用蒸馏水清洗干净后在 10mM EDC 和 10mM NHS 的混合溶液中活化 30 分钟,然后浸入含 12.7 微克每毫升的 anti-AFP 第一抗体溶液中温育 1 小时,得到 anti-AFP 第一抗体修饰金电极;基于酶功能化二氧化硅纳米免疫标志物的夹心免疫方法:将上述 anti-AFP 第一抗体修饰金电极浸泡在含 AFP 抗原的溶液中温育 30 分钟,通过免疫反应捕获 AFP 抗原,然后将该金片置于 15mg/mL 酶功能化纳米免疫标记物悬浮液中温育 30 分钟,利用标记物表面修饰的 anti-AFP 第二抗体与金电极表面捕捉到的 AFP 抗原之间的免疫反应,将酶功能化纳米免疫标记物捕捉到金电极表面,完成一个完整的夹心免疫过程。

[0010] 二氧化硅纳米粒子的比表面大,表面富含羟基,利用其与环氧丙基醚基三甲氧基硅烷(GPMS)反应,室温下就可在其表面嫁接上环氧基团。环氧基功能化的二氧化硅粒子进一步与 HRP 和第二抗体(如 anti-AFP 抗体)分子中的赖氨酸残基上的氨基发生竞争反应,得到表面共修饰有 HRP 和 anti-AFP 二抗的二氧化硅微球酶功能化纳米免疫标记物。该酶功能化二氧化硅微球标记物,由于表面荷载大量 HRP 和 anti-AFP 二抗分子,可用作血清抗原夹心免疫检测过程中的信号标记物,并增加单次免疫反应中识别的酶的量,极大的提高检测的灵敏度。

[0011] 有益效果:

[0012] (1) 本发明涉及的酶功能化纳米免疫标记物制备技术,通过在二氧化硅纳米微球表面嫁接环氧基团,并与 HRP 及 anti-AFP 第二抗体分子中的活性氨基反应,使酶和二抗能在较温和的条件下被固定在二氧化硅微球表面,得到大量酶和 anti-AFP 第二抗体荷载的二氧化硅纳米免疫标志物。

[0013] (2) 选用单分散性的二氧化硅微球作为 HRP 和 anti-AFP 第二抗体的载体,由于二氧化硅微球粒径和表面的均一性,使单个二氧化硅小球上荷载的酶和生物分子的量几乎相同,从而极大的提高了检测的灵敏度和可重复性。

[0014] (3) 固定在二氧化硅小球表面上的 HRP 和 anti-AFP 抗体能保持他们的生物活性和

免疫活性,并能被金电极表面捕捉到的 AFP 抗原进行免疫识别反应,从而将该酶功能化纳米免疫标记物嫁接到金电极表面。由于该标记物表面富含 HRP,使其对过氧化氢还原的电催化活性以及鲁米诺系统的化学发光性能得到增强,提高了对低浓度生物分子检测的灵敏度。

四、附图说明

[0015] 图 1 为酶功能化纳米免疫标记物的合成示意图;

[0016] 图 2 为夹心免疫过程将酶功能化纳米免疫标记物修饰到金片电极表面电镜图,其中 (a) 为未经免疫过程的金片表面, (b) 为经过免疫过程后酶功能化纳米免疫标记物修饰到金片电极表面,图中白色圆点为二氧化硅小球;

[0017] 图 3 为 anti-AFP 第一抗体修饰金电极制备及夹心免疫过程原理图;

[0018] 图 4 为酶功能化纳米免疫标记物对 AFP 抗原检测信号的放大作用。图中曲线 (a) 为 anti-AFP 第一抗体修饰金电极在含有 3ng/mL AFP 抗原溶液中温育 30 分钟, (b) 和 (c) 分别为 (a) 在 12.7 μ g/mL HRP-anti-AFP 抗体中 (b) 或在 15mg/mL 酶功能化纳米免疫标记物悬浮液中 (c) 温育 30 分钟的循环伏安图。电解液为含有 24 μ M 硫堇和 4mM H_2O_2 , pH 为 7.0 的磷酸盐溶液,扫速为 50mV s^{-1} 。

[0019] 图 5 为 anti-AFP 第一抗体修饰金电极在含有不同浓度 AFP 抗原溶液中温育 30 分钟后再在 15mg/mL 酶功能化纳米免疫标记物悬浮液中温育 30 分钟得到的化学发光响应,发光体系为 0.5mM 鲁米诺、0.5mM 对碘苯酚和 4mM H_2O_2 的 0.1M pH 8.5 Tris-HCl 缓冲溶液。

[0020] 图 6 为发光强度与温育液中 AFP 抗原浓度的线性关系,检测条件同图 5。

五、具体实施方式

[0021] 实施例 1:

[0022] 酶功能化纳米免疫标记物的制备

[0023] 称取 0.2g 粒径为 100 ± 2 nm 的二氧化硅纳米微球,加入到 5mL 5% GPMS 的甲苯溶液中,在室温下搅拌反应 24h。反应结束后,将二氧化硅微球离心分离(转速为 12000r/min),分别用甲苯和无水乙醇清洗表面吸附的 GPMS,然后在氮气保护下,加热至 100 $^{\circ}$ C 烘干,得到表面修饰有环氧基官能团的二氧化硅微球。

[0024] 取 15mg 环氧基官能化的二氧化硅微球,加入到 450 μ L 1mg/mL HRP 和 50 μ L 12.7 μ g/mL anti-AFP 抗体的混合溶液中,在 4 $^{\circ}$ C 下搅拌反应 24h,离心分离后用含磷酸盐缓冲溶液清洗三次以除去吸附态的 HRP 和 anti-AFP 抗体,然后,用 500 μ L 质量分数为 1% BSA 处理上述修饰后的二氧化硅微球 3 小时,封闭微球表面残留的活性环氧基团和非特异性的结合位置,洗涤离心后置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。使用时将其分散于 1mL pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液中。

[0025] 实施例 2:

[0026] 夹心免疫过程

[0027] 将洁净金片置于 100 μ L 10mM 1:1 MUA/MU 的乙醇溶液中浸泡 15 小时,用蒸馏水清洗干净后在 10mM EDC 和 10mM NHS 的混合溶液中活化 30 分钟,然后浸入含 12.7 微克每毫升的 anti-AFP 第一抗体溶液中温育 1 小时,得到 anti-AFP 第一抗体修饰金电极。

[0028] 将上述 anti-AFP 第一抗体修饰金电极浸泡在含有不同浓度 AFP 抗原的溶液中温育 30 分钟,通过免疫反应捕获 AFP 抗原,然后将该金片置于 15mg/mL 酶功能化纳米免疫标记物(实施例 1 制得)悬浮液中温育 30 分钟,利用标志物表面修饰的 anti-AFP 第二抗体与金电极表面捕捉到的 AFP 抗原之间的免疫反应,将酶功能化纳米免疫标记物捕捉到金电极表面,完成一个完整的夹心免疫过程。

[0029] 实施例 3:

[0030] 免疫检测

[0031] (1) 电化学检测方法:以上述实施例 2 中所得经夹心免疫过程修饰后的金电极作为工作电极,铂丝为辅助电极,饱和甘汞电极为参比电极,在含有 24 μ M 硫堇和 4mM H_2O_2 , pH 为 7.0 的磷酸盐溶液中,以 50mV s^{-1} 的扫速进行循环扫描,由于电极上修饰的 HRP 催化 H_2O_2 的还原反应,且还原电流响应随电极上 HRP 量的增加而增大,而电极上 HRP 的量与溶液中 AFP 抗原的浓度大小有直接关系,因此检测电极上 HRP 的量的变化即可反应溶液中抗原浓度,同时由于本发明使用二氧化硅小球作为酶的载体,使单个免疫过程荷载的酶量大大增加,从而使检测的灵敏度大大提高。

[0032] 通过对不同浓度 AFP 抗原溶液的检测,以电流响应绘制标准曲线,在 0.05 到 10ng mL^{-1} 浓度范围内呈线性,并且实验表明该检测方法具有良好的重现性,对同一浓度抗原检测的标准偏差为 6.8%,同时 AFP 的最低检出限可达到 0.01ng mL^{-1} 。

[0033] (2) 化学发光检测方法:将上述经夹心免疫过程修饰后的金电极置于化学发光检测池内,加入含 0.5mM 鲁米诺、0.5mM 对碘苯酚和 4mM H_2O_2 的 0.1M pH8.5 Tris-HCl 缓冲溶液,测定其发光强度。由于电极上修饰的 HRP 能催化鲁米诺、对碘苯酚和 H_2O_2 体系的发光强度,且该发光强度随电极上 HRP 量的增加而增大,而电极上 HRP 的量与溶液中 AFP 抗原的浓度大小有直接关系,因此检测电极上 HRP 的量的变化即可反应溶液中抗原浓度,同时由于本发明使用二氧化硅小球作为酶的载体,使单个免疫过程荷载的酶量大大增加,从而使检测的灵敏度大大提高(图 5)。

[0034] 通过对 0.01-3ng mL^{-1} 浓度 AFP 抗原溶液的检测,绘制得到呈线性的标准曲线(图 6)。另外,将检测使用后的金电极用 pH 3.5 酪氨酸洗脱抗原和酶功能化纳米免疫标记物,进行再生实验,化学发光强度有很好的重现性,在 20 次再生实验之后其发光强度仍能达到初次测试时的 96.2%。

[0035] 实施例 4:

[0036] 酶功能化纳米免疫标记物的制备方法为:

[0037] 将单分散二氧化硅纳米微球与过量 GPMS 在室温下反应 24 小时,离心分离并用甲苯洗涤小球三次,以除去过量的 GPMS,再加入体积比为 9:1 的 1mg/mL HRP 和 12.7 μ g/mL 的 anti-AFP 抗体,在 4 $^{\circ}$ C 下反应 24 小时,离心分离并用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液洗涤三次后,用 1wt% BSA 处理,以封闭微球表面残留的活性环氧基团和非特异性的结合位置,离心清洗后即得到大量酶和 anti-AFP 第二抗体荷载的二氧化硅纳米免疫标志物,保存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。制备过程见示意图 1。

[0038] 夹心免疫过程为:

[0039] (1) anti-AFP 第一抗体修饰金电极的制备:在洁净的金电极表面在十一巯基酸(MUA)和十一巯基醇(MU)的混合溶液中浸泡 15 小时,利用 Au-S⁰ 键将 MUA 和 MU 共组装

在金电极表面,在金电极表面形成 MUA/MU 杂合单层,使其表面带有 $-COOH$ 。再将该电极在含 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 以及 anti-AFP 第一抗体的混合溶液中温育 2 小时,利用金电极表面的活性羧基与 anti-AFP 分子中赖氨酸残基上的活性氨基反应形成的 Schiff 碱,将 anti-AFP 第一抗体固定在金电极表面。

[0040] (2) 基于酶功能化二氧化硅纳米免疫标志物的夹心免疫方法:将上述 anti-AFP 第一抗体修饰金电极在含有 AFP 抗原的磷酸盐缓冲溶液中温育 30 分钟,利用金电极上固定的 anti-AFP 第一抗体与溶液中 AFP 抗原的免疫反应将溶液中游离的 AFP 抗原捕捉到金电极表面。将已进行第一次免疫反应后的金电极用磷酸盐缓冲溶液清洗后,置于酶功能化二氧化硅纳米免疫标志物悬浮液中温育 30 分钟,由于标志物表面含有 AFP 第二抗体,因此,可通过该 anti-AFP 二抗与金电极表面捕捉到的 AFP 抗原的免疫识别反应,将该标志物嫁接到金电极表面(见图 2),完成一个完整的夹心免疫过程,将得到的金电极经充分清洗后用于下一步检测。Anti-AFP 第一抗体修饰金电极制备及其夹心免疫过程原理(见示意图 3)。

[0041] 检测方法为:

[0042] (1) 电化学检测方法:以上述经夹心免疫过程修饰后的金电极作为工作电极,铂丝为辅助电极,饱和甘汞电极为参比电极,在含有 $24 \mu M$ 硫堇和 $4mM H_2O_2$, pH 为 7.0 的磷酸盐溶液中,以 $50mV s^{-1}$ 的扫速进行循环扫描,由于电极上修饰的 HRP 催化 H_2O_2 的还原反应,且还原电流响应随电极上 HRP 量的增加而增大,而电极上 HRP 的量与溶液中 AFP 抗原的浓度大小有直接关系,因此检测电极上 HRP 的量的变化即可反应溶液中抗原浓度,同时由于本发明使用二氧化硅小球作为酶的载体,使单个免疫过程荷载的酶量大大增加,从而使检测的灵敏度大大提高(图 4)。

[0043] (2) 化学发光检测方法:将上述经夹心免疫过程修饰后的金电极置于化学发光检测池内,加入含 $0.5mM$ 鲁米诺、 $0.5mM$ 对碘苯酚和 $4mM H_2O_2$ 的 $0.1M$ pH 8.5 Tris-HCl 缓冲溶液,测定其发光强度。由于电极上修饰的 HRP 能催化鲁米诺、对碘苯酚和 H_2O_2 体系的发光强度,且该发光强度随电极上 HRP 量的增加而增大,而电极上 HRP 的量与溶液中 AFP 抗原的浓度大小有直接关系,因此检测电极上 HRP 的量的变化即可反应溶液中抗原浓度,同时由于本发明使用二氧化硅小球作为酶的载体,使单个免疫过程荷载的酶量大大增加,从而使检测的灵敏度大大提高(图 5)。

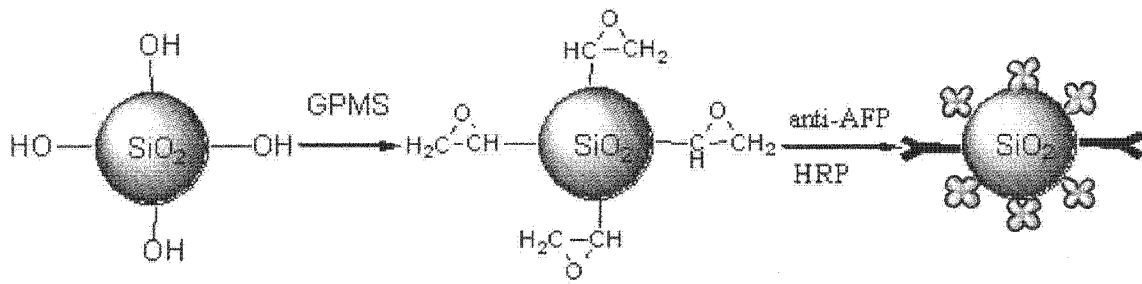


图 1

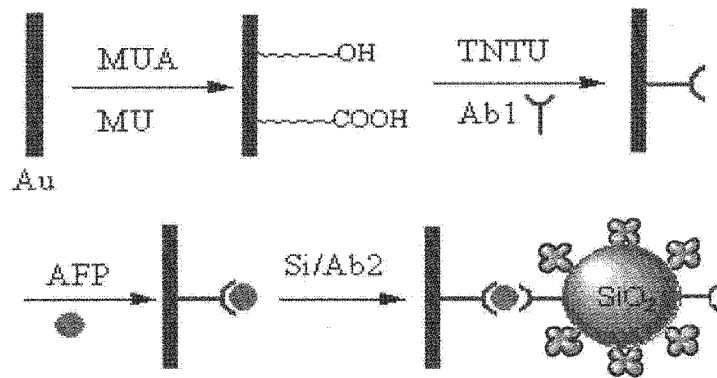


图 2

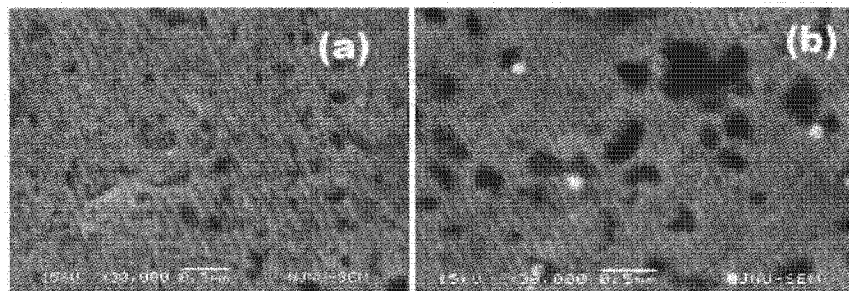


图 3

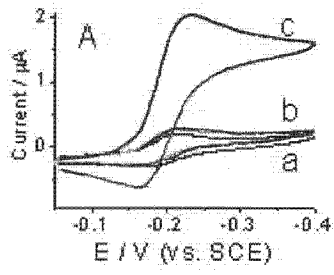


图 4

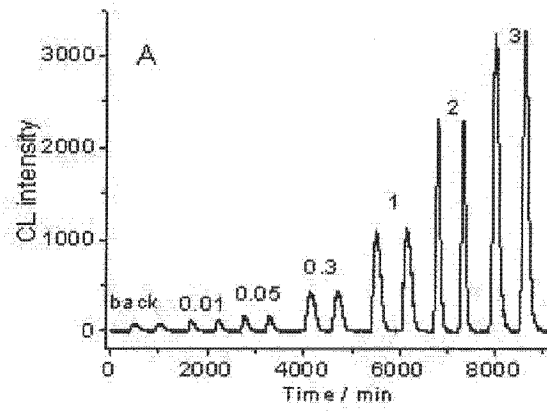


图 5

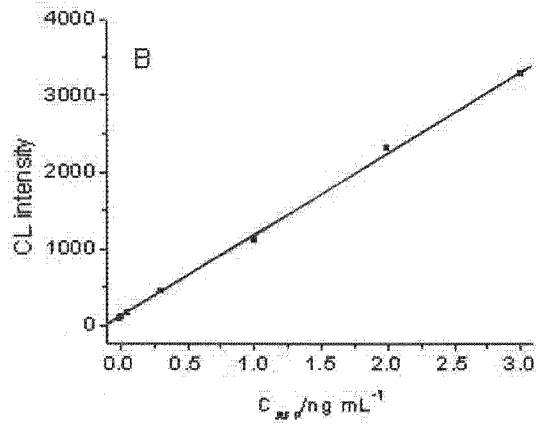


图 6

专利名称(译)	酶功能化纳米免疫标记物的制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN101498719B	公开(公告)日	2013-05-29
申请号	CN200910025737.8	申请日	2009-03-09
[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	刘松琴 吴亚锋 陈成良		
发明人	刘松琴 吴亚锋 陈成良		
IPC分类号	G01N33/535 G01N27/26 G01N21/76		
代理人(译)	叶连生		
审查员(译)	黄丽君		
其他公开文献	CN101498719A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种酶功能化纳米免疫标记物的制备技术。利用二氧化硅纳米微球表面羟基与GPMS的硅烷化反应，使二氧化硅纳米微球表面环氧基化，再利用该环氧基团与辣根过氧化物酶和anti-AFP分子中的活性氨基反应，得到辣根过氧化物酶和anti-AFP第二抗体共修饰的二氧化硅微球免疫标记物。由于微球表面富含酶，使得单个免疫过程的检测信号得到放大，提高了低浓度生物分子检测的灵敏度。同时由于使用的二氧化硅小球的粒径和表面的高度均一性，使得单个二氧化硅小球上荷载的酶和生物分子的量几乎相同，从而极大的提高了检测的可重复性。

