



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104181292 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 03

(21) 申请号 201410426738. 4

(22) 申请日 2014. 08. 27

(71) 申请人 湖南师范大学

地址 410081 湖南省长沙市麓山路 36 号

(72) 发明人 谢青季 覃晓丽 刘玲 徐爱贵

谭月明 傅迎春 陈超 姚守拙

(74) 专利代理机构 长沙星耀专利事务所 43205

代理人 张慧 宁星耀

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 27/48 (2006. 01)

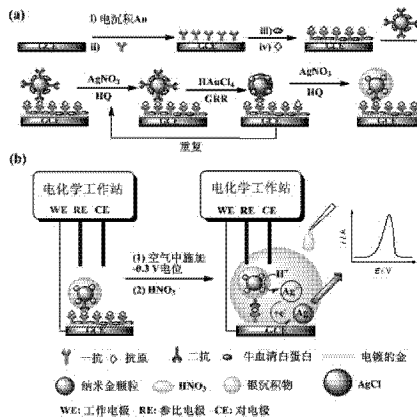
权利要求书1页 说明书7页 附图5页

(54) 发明名称

一种蛋白质单分子水平安培免疫分析方法

(57) 摘要

一种蛋白质单分子水平安培免疫分析方法，包括以下步骤：①以纳米金标记的免疫电极为工作电极，在工作电极上以纳米金标记物为中心，进行金标银染和原电池置换反应，通过银染层和金盐的原电池置换反应，选择性地放大纳米金标记物的尺寸，可显著增大银染量和放大金属标记物电化学分析信号；②将这种多重放大的方法用于电化学免疫分析，用原位阳极溶出伏安法获得该工作电极上所富集到的金属层的阳极溶出电流信号，从而间接实现样品中目标分析物的定量分析，使得电化学方法可以检测低至单分子水平的蛋白质。本发明可用于基于生物亲和、金属标记和阳极溶出伏安法的单目标分析物检测与多目标分析物多通道检测。



1. 一种蛋白质单分子水平安培免疫分析方法,其特征在于,包括以下步骤:

①以免疫电极为工作电极,在工作电极上以纳米金标记物为中心,进行金标银染和原电池置换反应的多次反应,通过银染层和金盐的原电池置换反应,选择性地放大纳米金标记物的尺寸,可显著增大银染量和放大金属标记物电化学分析信号;

②将这种多重放大的方法用于电化学免疫分析,用原位阳极溶出伏安法获得该工作电极上所富集到的金属层的阳极溶出电流信号,从而间接实现样品中目标分析物的定量分析,使得电化学方法可以检测低至单分子水平的蛋白质。

2. 根据权利要求1所述的蛋白质单分子水平安培免疫分析方法,其特征在于,所述金盐为能置换银染层的金盐溶液。

3. 根据权利要求2所述的蛋白质单分子水平安培免疫分析方法,其特征在于,所述金盐的浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 稀溶液 ~ 饱和溶液。

4. 根据权利要求2或3所述的蛋白质单分子水平安培免疫分析方法,其特征在于,所述金盐为氯金酸、氯金酸钾、氯金酸钠、亚硫酸金钠或者亚硫酸金钾。

5. 根据权利要求4所述的蛋白质单分子水平安培免疫分析方法,其特征在于,所述金盐的浓度为 $1 \mu\text{mol/L} \sim 0.1 \text{mol/L}$ 。

6. 根据权利要求1所述的蛋白质单分子水平安培免疫分析方法,其特征在于,所述金盐体积为 $1 \mu\text{L} \sim 10 \text{mL}$ 体积的能置换银染层的溶液。

7. 根据权利要求1~6之一所述的蛋白质单分子水平安培免疫分析方法,其特征在于,所述纳米金标记物的制备步骤为:将金纳米粒子与生物配体结合成生物复合物,所述生物配体为抗原或抗体,或蛋白质。

8. 根据权利要求1~6所述的蛋白质单分子水平安培免疫分析方法,其特征在于,使用阳极溶出伏安法对金属离子进行定量分析时,采用1组,2组或2组以上电极,每组电极之间形成一个测量通道;每组电极为两电极或三电极体系。

9. 根据权利要求1~8所述的蛋白质单分子水平安培免疫分析方法,其特征在于,所述目标分析物可为蛋白质。

10. 根据权利要求1~9所述的蛋白质单分子水平安培免疫分析方法,其特征在于,所述金标银染和原电池置换反应的次数为 $1 \sim 10$ 次。

一种蛋白质单分子水平安培免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种蛋白质单分子水平安培免疫分析方法,尤其是涉及一种基于金属标记和信号多重放大的蛋白质单分子水平安培免疫分析方法。

背景技术

[0002] 基于各种生物亲和反应的生物分析已经吸引了学术界和产业界的极大关注 [Satori, C. P.; Henderson, M. M.; Krautkramer, E. A.; Kostal, V.; Distefano, M. M.; Arriaga, E. A. *Chem. Rev.* 2013, 113, 2733]。从本质上讲,生物亲和有高的特异性,因此生物分析对其分析物有很高的特异性和选择性。所以,提高基于生物亲和的生物分析方法的检测灵敏度,是生物分析领域的重点研究内容,也是基于疾病标志物检测的重大疾病早期预警、食品药品安全、环境分析等方面急需解决的问题 [Song, Y. J.; Zhang, Y. Q.; Bernard, P. E.; Reuben, J. M.; Ueno, N. T.; Arlinghaus, R. B.; Zu, Y. L.; Qin, L. D. *Nat. Commun.* 2012, 3, 1283]。同时,发展单分子水平的定量分析检测方法,长期以来一直是广受关注的分析化学学科重点研究方向 [Weiss, S. *Science* 1999, 283, 1676.]。大多数情况下,很难直接从生物亲和反应本身去获得很大的生物分析信号,所以经常采用合适的生物标记方法来放大和输出分析信号 [Zhang, L. B.; Zhu, J. B.; Guo, S. J.; Li, T.; Li, J.; Wang, E. K. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 2403]。迄今为止,生物分析法中的标记方法通常可分为两大类,分子标记(如放射性标记和酶标记)法和纳米材料标记法。纳米材料标记法中,通常采用纳米金(AuNPs)、纳米银(AgNPs)、金属硫化物/硒化物/碲化物量子点(QDs)、碳纳米管和石墨烯等纳米材料进行标记。

[0003] 在材料、环境、能源等众多学科领域的基础研究和应用开发中,欠活泼金属的盐类(氧化剂)和较活泼金属(还原剂)之间的原电池置换反应(GRR)技术已得到了广泛应用。例如,GRR技术已用于研制结构可控和性能增强的各种金属材料(如Au、Pt、Pd),包括制备具有特殊形状的纳米材料用于生物标记 [Sun, Y.; Xia, Y. *Science* 2002, 298, 2176.]。另外,金标银染技术已广泛用于金纳米颗粒(AuNPs)标记的生物亲和型分析传感,能可靠放大生物分析的信号,因为常用的氢醌化学还原 Ag^+ 的银染现象,只能选择性地发生在催化性的金纳米颗粒(AuNP)表面 [Taton, T. A.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Science* 2000, 289, 1757.]。

[0004] 申请号为201310459224.4的中国发明专利申请,公开了“一种基于金属标记和生物亲和的原位阳极溶出伏安分析方法”,虽然使得检测下限得到有效的降低,但是灵敏度还不够高,不能达到单分子水平的检测下限。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是,克服现有技术的不足,结合金标银染与GRR法,提供一种蛋白质单分子水平安培免疫分析方法。该方法可以多次地对金纳米标记物进行放大,并转换成为可测电化学信号,再利用申请号为201310459224.4发明专利申请中的原位阳

极溶出伏安分析,对样品中的目标分析物(如蛋白质)进行定量分析。该方法通用性好,操作简便,使得检测下限可以低至单分子水平(检测下限能达到检测 5 个人免疫球蛋白 G(hIgG)和人甲胎蛋白(hAFP))。

[0006] 本发明解决其技术问题采用的技术方案是,一种蛋白质单分子水平安培免疫分析方法,包括以下步骤:

①以免疫电极为工作电极,在工作电极上以纳米金标记物为中心,进行金标银染[参见 Taton, T. A.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Science*2000, 289, 1757.]和原电池置换反应[参见 Sun, Y.; Xia, Y. *Science*2002, 298, 2176.]的多次反应(优选 1~10 次),通过银染层和金盐的原电池置换反应,选择性地放大纳米金标记物的尺寸(在纳米金上银染后,纳米金表面生成大量的银单质,使得纳米金得到放大,在银染层上再进行原电池置换反应,则在纳米金的表面生成又生成了金单质,使得纳米金又一次得到放大),可显著增大银染量和放大金属标记物电化学分析信号;

②将这种多重放大的方法用于电化学免疫分析,用原位阳极溶出伏安法获得该工作电极上所富集到的金属层的阳极溶出电流信号,从而间接实现样品中目标分析物的定量分析,使得电化学方法可以检测低至单分子水平的蛋白质。

[0007] 进一步,所述金盐为能置换银染层的金盐溶液;所述金盐为 1 μL ~ 10 mL(浓度不同则体积不同)体积的能置换银染层的金盐溶液。(金盐足量,银反应完则反应即停止)

进一步,所述金盐的浓度为 1 mmol/L 稀溶液 ~ 饱和溶液。

[0008] 进一步,所述金盐为氯金酸、氯金酸钾、氯金酸钠、亚硫酸金钠或者亚硫酸金钾。

[0009] 进一步,所述金盐的浓度范围为 1 $\mu\text{mol/L}$ ~0.1 mol/L;置换银纳米粒子的氯金酸浓度优选 5 mmol/L。

[0010] 进一步,所述纳米金标记物的生物复合物的制备步骤为:将金纳米粒子与生物配体结合,形成生物复合物,所述生物复合物对样品中目标分析物具有生物亲和性。

[0011] 进一步,所述生物配体为抗原或抗体,或蛋白质。例如,可以将金纳米粒子与抗体或抗原结合,形成生物复合物;再将待测的抗体或抗原与该生物复合物结合,形成免疫电极。

[0012] 进一步,所述空气中预先施加的能够实现金属标记物的金属离子电沉积的阴极电位(申请号为 201310459224.4,发明专利申请中)为足够实现扩散控制的金属电沉积的阴极电位;所述足够实现扩散控制的金属电沉积的阴极电位为 1.0 V(vs. SCE)~ -2.0 V(vs. SCE);“V vs. SCE”意为相对于饱和甘汞电极的电位(伏特)。

[0013] 进一步,使用阳极溶出伏安法对金属离子进行定量分析时,采用 1 组,2 组或 2 组以上电极,每组电极之间形成一个测量通道;每组电极均为两电极或三电极体系。

[0014] 进一步,所述目标分析物可为蛋白质。

[0015] 所述欠活泼金属的盐类(氧化剂)和较活泼金属(还原剂)之间的原电池置换反应技术用于金标银染后的银染层反应。

[0016] 本发明的有益效果:(1)金标银染技术用于金纳米颗粒标记的生物亲和型分析传感,能可靠放大生物分析的信号,因为常用的氢醌化学还原银离子的银染现象,只能选择性地发生在有催化活性的金纳米颗粒表面,通过银染层和金盐的原电池置换反应,选择性地放大金纳米颗粒标记物的尺寸,可显著增大银染量和放大金属标记物的安培免疫分析信

号；(2) 在金盐的原电池置换反应后在金纳米颗粒上又生成了纳米金颗粒，进一步可以进行更大量的金标银染，多次重复两种反应来最大程度地放大生物分析的信号，可实现蛋白质单分子水平的安培免疫分析。

[0017] 本发明是一种基于免疫亲和、金标银染、原电池置换反应和阳极溶出伏安分析法对样品中蛋白质目标分析物进行定量分析的方法，并且是在单分子水平检测目标分析物的电化学分析方法。本发明结合金标银染与原电池置换反应(GRR)用于生物亲和型超敏分析传感，通过 GRR 方法和金标银染对金属标记物进行多重放大，进行电化学检测，使得灵敏度显著提高，检测下限可降低至单分子水平。

[0018] 经实验证明，本发明与原申请的发明专利“基于金属标记和生物亲和的原位阳极溶出伏安分析方法”(申请号：201310459224.4)相比，本发明基于金属标记物和信号多重放大的电化学免疫分析响应信号增大了至少 5 倍，可以检测到单分子水平的蛋白质。对人免疫球蛋白(hIgG)和甲胎蛋白(hAFP)的分析检测实验表明，本发明具有跨至少 9 个数量级的宽线性范围，检测下限低至单分子水平(检测下限能达到检测 5 个人免疫球蛋白 G (hIgG) 和人甲胎蛋白(hAFP))，显著优于文献报道值(现有同类技术的检测跨度 8 个数量级，不能进行单分子水平检测)。本发明用于实际样品检测亦获满意结果。

附图说明

[0019] 图 1 为本发明方法的实验步骤示意图；

图 2 (A) 为本发明实施例 1 中常规制备方法在金纳米颗粒(AuNPs) 标记的 hIgG 免疫电极上，采用差分脉冲阳极溶出伏安法检测标准样品的原图；

图 2 (B) 为实施例 1 中常规制备方法在金纳米颗粒(AuNPs) 标记的 hIgG 免疫电极上检测得到的标准曲线图；

图 2 (C) 为实施例 1 中本发明方法在 AuNPs 标记的 hIgG 免疫电极上，采用差分脉冲阳极溶出伏安法检测标准样品的原图；

图 2 (D) 为实施例 1 中本发明方法在 AuNPs 标记的 hIgG 免疫电极上检测得到的标准曲线图；

图 3 (A) 为实施例 2 中常规制备方法采用 AuNPs 标记的甲胎蛋白(hAFP) 免疫电极上检测标准样品的原图；

图 3 (B) 为实施例 2 中常规制备方法采用 AuNPs 标记的甲胎蛋白(hAFP) 免疫电极上检测标准曲线图；

图 3 (C) 为实施例 2 中本发明方法采用 AuNPs 标记的甲胎蛋白(hAFP) 免疫电极上检测标准样品的原图；

图 3 (D) 为实施例 2 中本发明方法采用 AuNPs 标记的甲胎蛋白(hAFP) 免疫电极上检测标准曲线图。

具体实施方式

[0020] 以下结合实施例对本发明作进一步详细说明。

[0021] 参考例 1

以下为实施例 1 使用的 hIgG 免疫电极和纳米材料按照以下方法制备：

实施例 1 使用的金纳米粒子 (AuNPs) 标记的二抗、免疫电极按照下述方法制备：

(1) AuNPs 标记的二抗的制备 (Ab_2 -AuNPs)：在 100 mL 沸水中，剧烈搅拌下，加入 250 mL 4% (质量浓度) 的 $H AuCl_4$ ，再逐滴滴加 1% (质量浓度) 的柠檬酸钠 2.5 mL，当溶液变成酒红色后，再加热 15 min；停止加热后，搅拌冷却至室温；在 1 mL 的金胶中加入 30 μg 的二抗 (Ab_2)，吸附过夜；4800 rpm 低速离心 30 min 后，磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗两次；最后，结合物再次分散在含有 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 1 mL 0.1 mol/L PBS 中，增加免疫金胶的稳定性，减小分析中的非特异性吸附；未使用时，制备的 Ab_2 -AuNPs 保存于冰箱 (4 $^{\circ}C$) 中；

(2) 免疫电极的制备：玻碳电极 (GCE) 先后在 0.5 微米 (μm) 和 0.05 μm 的氧化铝悬浊液中打磨抛光处理，再用超纯水充分地冲洗电极表面 (将电极表面的氧化铝粉冲洗干净)，接下来分别在超纯水、乙醇、超纯水中各超声 5 min 以除去电极表面残留的氧化铝粉末；然后，在电极表面滴加浓 H_2SO_4 (浓 H_2SO_4 的浓度是 18.4 mol/L) 洗液并保持 15s，用超纯水冲洗；最后用电化学清洗以彻底除去污染物；电化学清洗步骤为：在 10 mL 0.50 mol/L H_2SO_4 中以 -1.0 V 到 1.0 V 以 0.1 V/s 的扫速循环伏安扫描至稳定；处理好的玻碳电极用 50~500 mL 超纯水冲洗 (将电极表面残留的 H_2SO_4 冲洗干净)，然后用氮气吹干用于电沉积 Au_{plate} ；

通过双电位阶跃法将 Au_{plate} 沉积到处理好的玻碳电极上，即在含有 2.0 mmol/L $H AuCl_4$ 的 0.50 mol/L H_2SO_4 中，从 1.1 V 至 0 V 脉冲电镀 180 s (Au_{plate}/GCE) 即可；将电极洗净，氮气吹干，迅速将 6.0 μL 含有 1.0 mg/mL 一抗 (Ab_1) 的 PBS 溶液滴至 Au_{plate}/GCE 电极上，冰箱 (4 $^{\circ}C$) 保存、过夜，以保证抗体在电极表面的饱和吸附，得到 $Ab_1/Au_{plate}/GCE$ 修饰电极；将 $Ab_1/Au_{plate}/GCE$ 修饰电极依次用 PBS 溶液清洗、吹干后，将 6.0 μL 含有 3wt% BSA 的 PBS 溶液滴至电极上，4 $^{\circ}C$ 保持 1 h 以封闭非特异性吸附位点，得到 BSA/ $Ab_1/Au_{plate}/GCE$ 修饰电极；未使用时，电极保存在 4 $^{\circ}C$ 的 PBS 中。

[0022] 将制备好的 BSA/ $Ab_1/Au_{plate}/GCE$ 修饰电极，滴加 6.0 μL 含有不同浓度抗原 (hIgG，人免疫球蛋白 G) 的 PBS，在 37 $^{\circ}C$ 下温育 1 h，然后用 PBS 溶液清洗电极表面，得到 hIgG/BSA/ $Ab_1/Au_{plate}/GCE$ 修饰电极，该修饰电极上再滴加 6 mL 含 Ab_2 -AuNPs 的 PBS 溶液 (Ab_2 -AuNPs 质量浓度 0.5 mg/mL) 于 37 $^{\circ}C$ 下温育 40 min，得到 Ab_2 -AuNPs/hIgG/BSA/ $Ab_1/Au_{plate}/GCE$ 电极 (Ab_1 、 Ab_2 为羊抗人免疫球蛋白 G)；

免疫电极的金标银染步骤如下： Ab_2 -AuNPs/hIgG/BSA/ $Ab_1/Au_{plate}/GCE$ 电极用 PBS 溶液充分清洗，以除去非特异性吸附的二抗，待干后，滴加 6.0 μL 的银增强溶液 (组分：1.0 g 对苯二酚，35 mg 硝酸银，50 mL pH 3.5 柠檬酸缓冲液 (0.243 mol/L $C_6H_8O_7 \times H_2O + 0.163$ mol/L $Na_3C_6H_5O_7 \times 2H_2O$) 和 50 mL 去离子水)，暗反应 30 min，用超纯水洗净，得到 silver/ Ab_2 -AuNPs/hIgG/BSA/ $Ab_1/Au_{plate}/GCE$ 电极。

[0023] 参考例 2

实施例 2 使用的 Au NPs 标记的甲胎蛋白 (hAFP) 免疫电极按照以下方法制备：

(1) AuNPs 标记的二抗的制备 (Ab_2 -AuNPs)：在 100 mL 沸水中，剧烈搅拌下，加入 250 μL 4% (质量浓度) 的 $H AuCl_4$ ，再逐滴滴加 1% (质量浓度) 的柠檬酸钠 2.5 mL，当溶液变成酒红色后，再加热 15 min；停止加热后，搅拌冷却至室温；在 1 mL 的金胶中加入 30 μg 的二抗 (Ab_2)，吸附过夜；4800rpm 低速离心 30 min 后，磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗两次；最后，结合物再次分散在含有 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 1 mL 0.1 mol/L PBS 中，增加免疫金胶的稳定性，减小分析中的非特异性吸附；未使用时，制备的 Ab_2 -AuNPs 保存于冰箱 (4 $^{\circ}C$) 中；

(2) 免疫电极的制备: 玻碳电极(GCE)先后在 0.5 μm 和 0.05 μm 的氧化铝悬浊液中打磨抛光处理,再用超纯水充分地冲洗电极表面(将电极表面的氧化铝粉冲洗干净),接下来分别在超纯水、乙醇、超纯水中各超声 5 min 以除去电极表面残留的氧化铝粉末;然后,在电极表面滴加浓 H_2SO_4 (浓 H_2SO_4 的浓度是 18.4 mol/L) 洗液并保持 15s,用超纯水冲洗;最后用电化学清洗以彻底除去污染物;电化学清洗步骤为:在 10 mL 0.50 mol/L H_2SO_4 中以 -1.0 V 到 1.0 V 以 0.1 V/s 的扫速循环伏安扫描至稳定;处理好的玻碳电极用 50~500 mL 水冲洗(将电极表面残留的 H_2SO_4 冲洗干净),然后用氮气吹干用于电沉积 Au_{plate} ;

通过双电位阶跃法将 Au_{plate} 沉积到处理好的玻碳电极上,即在含有 2.0 mmol/L HAuCl_4 的 0.50 mol/L H_2SO_4 中,从 1.1 V 至 0 V 脉冲电镀 180 s (Au_{plate} /GCE) 即可;将电极洗净,氮气吹干,迅速将 6.0 μL 含有 1.0 mg/mL 一抗(Ab_1) 的 PBS 溶液滴至 Au_{plate} /GCE 电极上,冰箱(4 $^\circ\text{C}$)保存、过夜,以保证抗体在电极表面的饱和吸附,得到 $\text{Ab}_1/\text{Au}_{\text{plate}}$ /GCE 修饰电极;将 $\text{Ab}_1/\text{Au}_{\text{plate}}$ /GCE 修饰电极依次用 PBS 溶液清洗、吹干后,将 6.0 μL 含有 3wt% BSA 的 PBS 溶液滴至电极上,4 $^\circ\text{C}$ 保持 1 h 以封闭非特异性吸附位点,得到 $\text{BSA}/\text{Ab}_1/\text{Au}_{\text{plate}}$ /GCE 修饰电极;未使用时,电极保存在 4 $^\circ\text{C}$ 的 PBS 中;

将制备好的 $\text{BSA}/\text{Ab}_1/\text{Au}_{\text{plate}}$ /GCE 修饰电极,滴加 6.0 μL 含有不同浓度抗原(hAFP,人甲胎蛋白)的 PBS,在 37 $^\circ\text{C}$ 下温育 1 h,然后用 PBS 溶液清洗电极表面,得到 $\text{hAFP}/\text{BSA}/\text{Ab}_1/\text{Au}_{\text{plate}}$ /GCE 修饰电极,该修饰电极上再滴加 6 mL 含 Ab_2 -AuNPs 的 PBS 溶液(Ab_2 -AuNPs 质量浓度是 0.5 mg/mL)于 37 $^\circ\text{C}$ 下温育 40 min,得到 Ab_2 -AuNPs/hAFP/BSA/ $\text{Ab}_1/\text{Au}_{\text{plate}}$ /GCE 电极。(此实施例中 Ab_1 、 Ab_2 为鼠抗人甲胎蛋白)。

[0024] 免疫电极的金标银染步骤如下:除用甲胎蛋白(hAFP)代替免疫球蛋白 hIgG 外,其他与参考例 1 中“免疫电极的金标银染步骤”相同。

[0025] 实施例 1:hIgG 免疫电分析

本实施例为基于免疫亲和、金属标记和阳极溶出伏安法的检测目标分析物 hIgG 的电分析,比较本发明方法与常规制备方法在免疫电极中的响应。

[0026] 本实施例包括以下步骤:

(1) 本发明方法:①在制备好的免疫电极上进行金标银染反应(参见参考例 1),再进行原电池置换反应(GRRs),免疫电极的原电池置换反应步骤如下:silver/ Ab_2 -AuNPs/hIgG/BSA/ $\text{Ab}_1/\text{Au}_{\text{plate}}$ /GCE 电极上滴加 6.0 μL 5.0 mmol/L 的氯金酸溶液(HAuCl_4),反应 10 分钟,吹干用超纯水洗净,得到 Au-silver/ Ab_2 -AuNPs/hIgG/BSA/ $\text{Ab}_1/\text{Au}_{\text{plate}}$ /GCE 电极;使得在原纳米金表面上又生成了纳米金颗粒,对标记的纳米金进行了尺寸的放大。也可类似地滴加 6.0 μL 5.0 mmol/L 氯金酸钾、氯金酸钠、亚硫酸金钠或者亚硫酸金钾溶液,进行同样的 GRR 反应进行信号的放大;②由于生成了更多的纳米金,所以在原电池置换反应之后,又可以在电极表面上进行金标银染反应,生成更多的银纳米粒子,使得可以溶解富集到电极表面上的银的量增加,电化学响应信号增大;将金标银染反应和原电池置换反应交替进行 4 次后,最后一次金标银染得到更多的纳米银,因而得到了更大的电化学响应信号。

[0027] (2) 常规制备方法:在参考例 1 中的免疫电极上,只进行一次金标银染反应。

[0028] (3) 检测方法:即原申请的中国发明专利“基于金属标记和生物亲和的原位阳极溶出伏安分析方法”(申请号:201310459224.4),①在三电极系统中(工作电极为上述参考例中的金标银染的免疫电极),空气中接上电化学仪器并预先施加能够实现金标银染的

金属 Ag 离子电沉积的阴极电位 -0.3 V (vs. SCE), 再将 $8\text{ uL } 1\text{ mol/L HNO}_3$ 加至免疫电极表面并导通电解池, 使金属标记物溶解为 Ag^+ , 并同时将 Ag^+ 电还原成原子态金属 Ag, 从而在免疫电极表面富集上金属银。②直接在原工作电极表面, 使用差分脉冲阳极溶出伏安法 (DPV) 检测金属银阳极溶出为银离子的信号, 检测条件为: -0.3 V (vs. SCE (饱和甘汞电极)) 沉积 10 min , 扫描区间为 $-0.3 \sim 0.7\text{ V}$, 获得该工作电极上所富集到的金属银的阳极溶出电流信号, 从而间接实现样品中目标分析物 hIgG 的定量分析。

[0029] 测定结果分析: 结合图 2 进行讨论, 图 2 给出了两种方法中 AuNPs 标记物构建的免疫电极对不同浓度抗原的信号响应, 图 2(A) 为本发明实施例 1 中常规制备方法在金纳米颗粒 (AuNPs) 标记的 hIgG 免疫电极上, 采用差分脉冲阳极溶出伏安法检测标准样品的原图; 图 2 (B) 为实施例 1 中常规制备方法在金纳米颗粒 (AuNPs) 标记的 hIgG 免疫电极上检测得到的标准曲线图; 图 2 (C) 为实施例 1 中本发明方法在 AuNPs 标记的 hIgG 免疫电极上, 采用差分脉冲阳极溶出伏安法检测标准样品的原图; 图 2 (D) 为实施例 1 中本发明方法在 AuNPs 标记的 hIgG 免疫电极上检测得到的标准曲线图; 从图中可知, 随着抗原浓度增加, 电流响应也随之增加; 对于同一抗原浓度, 本发明法的响应信号明显大于常规制备方法; 本发明中电流与抗原浓度线性范围为 $0.4\text{ fg/mL} \sim 400\text{ ng/mL}$, AuNPs 标记的检测限为 0.2 fg/mL (相当于在 6 uL 样品中只有 5 个蛋白质分子, 信噪比为 3), 而常规制备方法检测线则为 1.2 fg/mL ; 本发明方法线性范围宽, 检测限低, 结合原申请的国家发明专利“基于金属标记和生物亲和的原位阳极溶出伏安分析方法” (申请号: 201310459224.4) 的电化学检测方法使得检测下限达到了单分子水平。

[0030] 实施例 2 基于本发明方法的甲胎蛋白免疫电分析

本实施例为基于免疫亲和、金属标记和阳极溶出伏安法的检测甲胎蛋白的电分析, 用本发明的技术方案得到甲胎蛋白电极中的响应。

[0031] 本实施例包括以下步骤:

样品测定:

1. 金标银染的甲胎蛋白分析:

(1) 除用甲胎蛋白 (hAFP) 代替免疫球蛋白 hIgG 外, 其他与实施例 1 中的“本发明方法”的实施步骤相同。即①在制备好的免疫电极上进行金标银染反应 (参见参考例 2), 再进行原电池置换反应 (GRRs), 免疫电极的原电池置换反应步骤如下: $\text{silver/Ab}_2\text{-AuNPs/hIgG/BSA/Ab}_1\text{/Au}_{\text{plate}}\text{/GCE}$ 电极上滴加 $6.0\text{ uL } 5.0\text{ mmol/L}$ 的氯金酸溶液 (HAuCl_4), 反应 10 min , 吹干用超纯水洗净, 得到 $\text{Au-silver/Ab}_2\text{-AuNPs/hIgG/BSA/Ab}_1\text{/Au}_{\text{plate}}\text{/GCE}$ 电极; 使得在原纳米金表面上又生成了纳米金颗粒, 对标记的纳米金进行了尺寸的放大; 也可类似地滴加 $6.0\text{ uL } 5.0\text{ mmol/L}$ 氯金酸钾、氯金酸钠、亚硫酸金钠或者亚硫酸金钾溶液, 进行同样的 GRR 反应进行信号的放大; ②由于生成了更多的纳米金, 所以在原电池置换反应之后, 又可以在电极表面上进行金标银染反应, 生成更多的银纳米粒子, 使得可以溶解富集到电极表面上的银的量增加, 电化学响应信号增大; 将金标银染反应和原电池置换反应交替进行 4 次后, 最后一次金标银染得到更多的纳米银, 因而得到了更大的电化学响应信号。

[0032] (2) 常规制备方法: 除用甲胎蛋白 (hAFP) 代替免疫球蛋白 hIgG 外, 其他与实施例 1 中的“常规制备方法”的实施步骤相同。即在参考例 2 中的免疫电极上, 只进行一次金标银染反应。

[0033] (3) 检测方法:除用甲胎蛋白(hAFP)代替免疫球蛋白 hIgG 外,其他与实施例 1 中的“检测方法”的实施步骤相同。

[0034] 测定结果分析:结合图 3 进行讨论,图 3 给出了两种方法中 AuNPs 标记物构建的免疫电极对不同浓度抗原的信号响应,图 3(A)为实施例 2 中常规制备方法采用 AuNPs 标记的甲胎蛋白(hAFP)免疫电极上检测标准样品的原图;图 3(B)为实施例 2 中常规制备方法采用 AuNPs 标记的甲胎蛋白(hAFP)免疫电极上检测标准曲线图;图 3(C)为实施例 2 中本发明方法采用 AuNPs 标记的甲胎蛋白(hAFP)免疫电极上检测标准样品的原图;图 3(D)为实施例 2 中本发明方法采用 AuNPs 标记的甲胎蛋白(hAFP)免疫电极上检测标准曲线图;从图中可知,随着抗原浓度增加,电流响应也随之增加;对于同一抗原浓度,本发明法的响应信号明显大于常规法;本发明中电流与抗原浓度线性范围为 0.5 fg/mL~500 ng/mL, AuNPs 标记的检测限为 0.1 fg/mL(相当于在 6 uL 样品中只有 5 个蛋白质分子,信噪比为 3),而常规制备方法的检测下限则为 1.6 fg/mL;本发明方法线性范围宽,检测限低,结合原申请的发明专利“基于金属标记和生物亲和的原位阳极溶出伏安分析方法”(申请号:201310459224.4)的电化学检测方法使得具有更低的检测下限。

[0035] 综上所述,本发明涉及的分析方法灵敏度高、操作简便、通用性好,与“基于金属标记和生物亲和的原位阳极溶出伏安分析方法”发明专利(申请号:201310459224.4)方法的联用,实现了金属标记物用于电化学免疫分析检测单分子水平的蛋白质,并且在实际血样中的检测结果令人满意,可广泛用于基于生物亲和、金属标记和阳极溶出伏安法的单目标分析物检测与多目标分析物多通道检测。

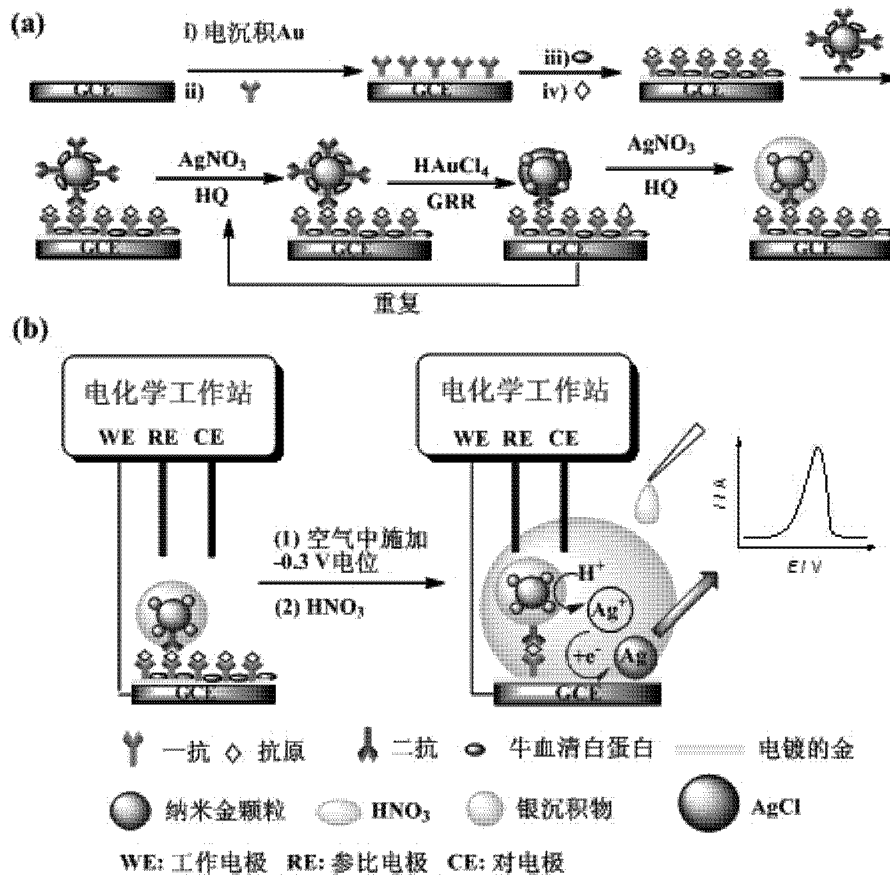


图 1

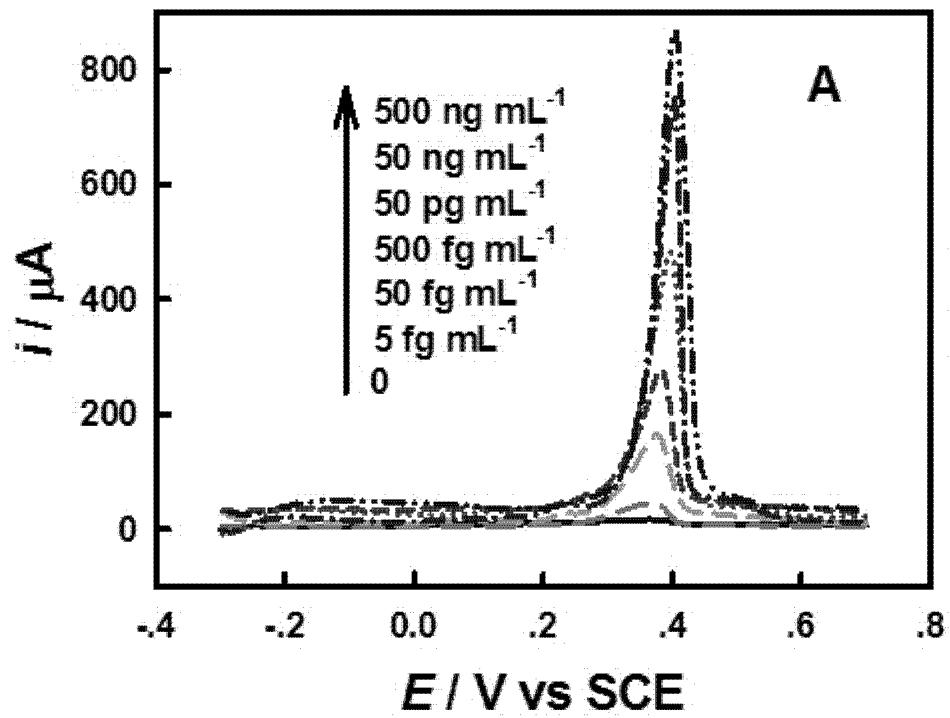


图 2(A)

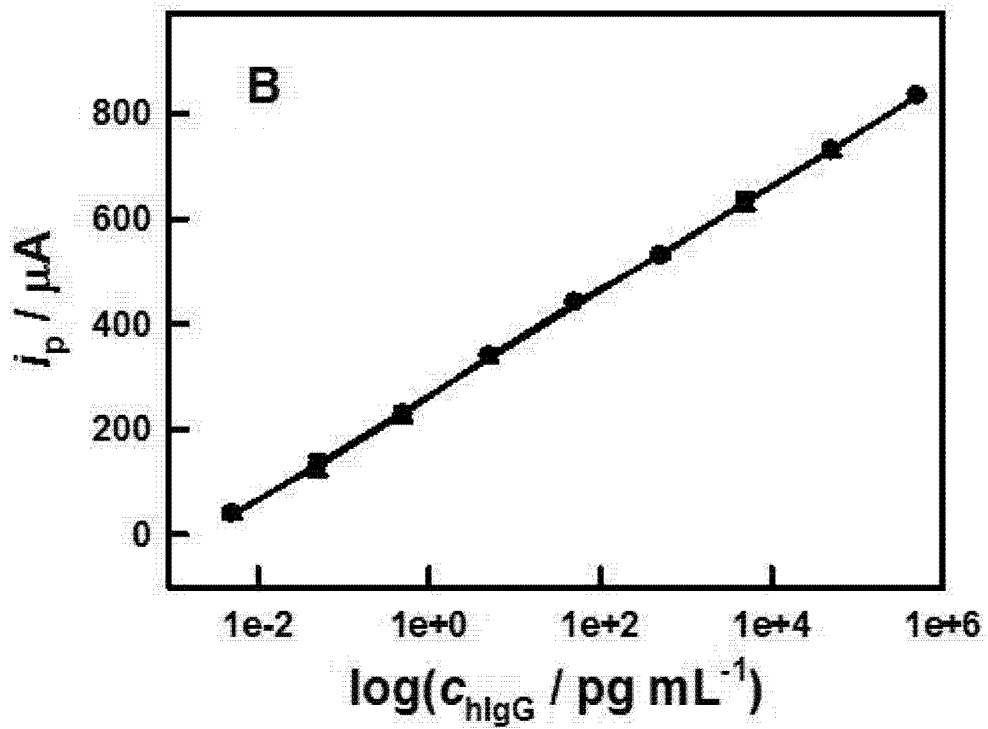


图 2(B)

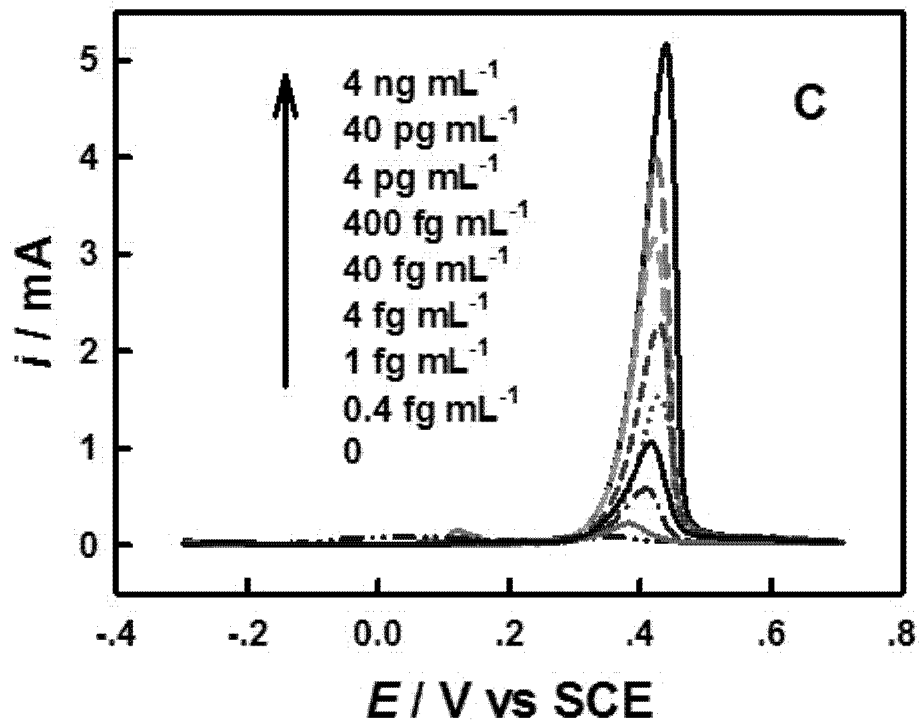


图 2(C)

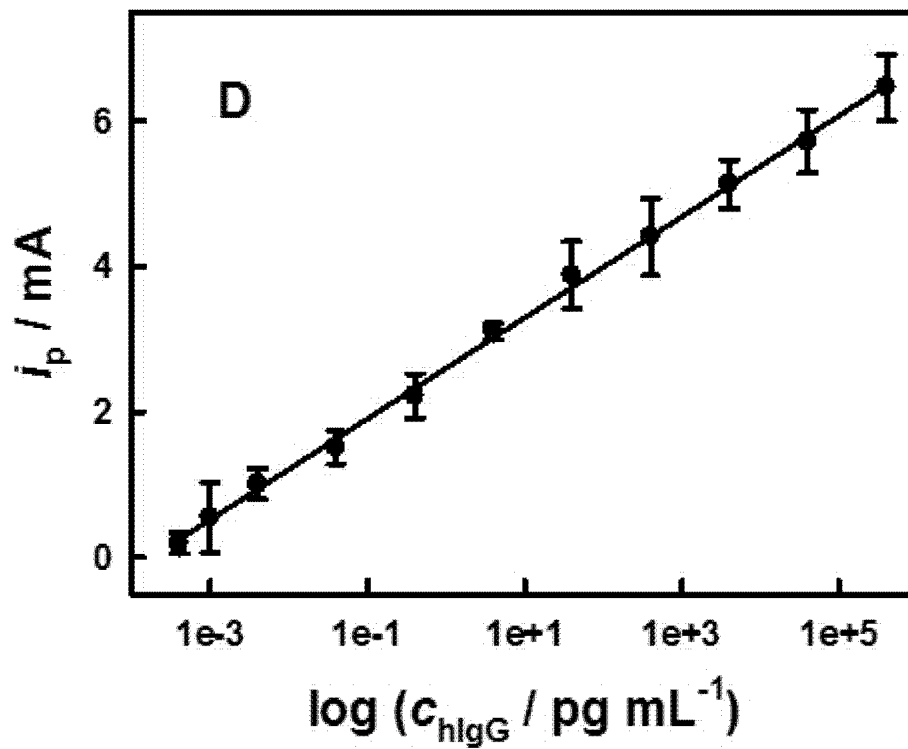


图 2(D)

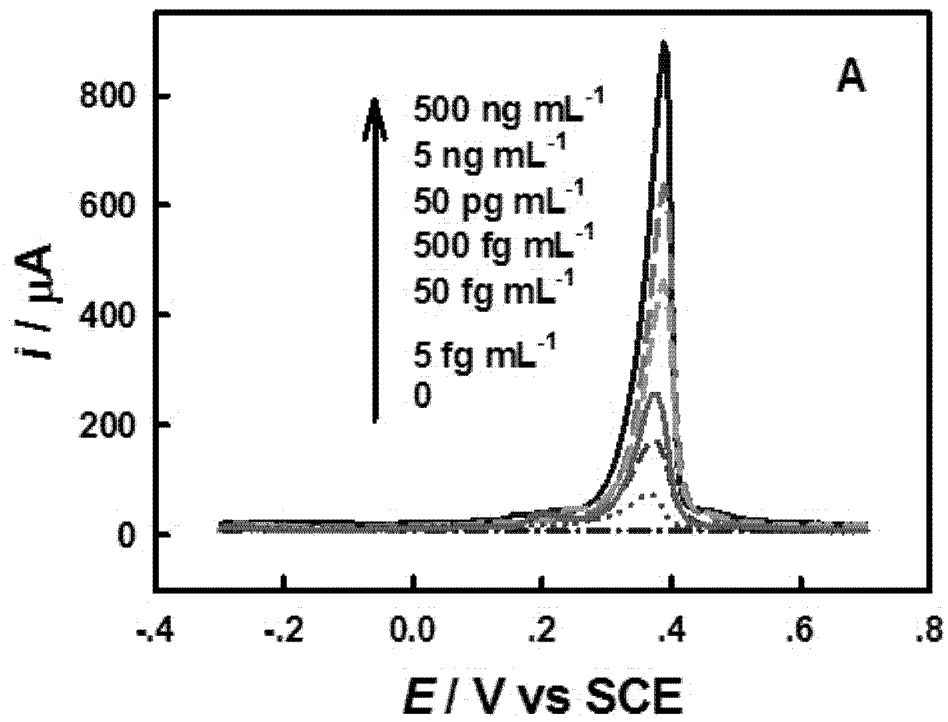


图 3(A)

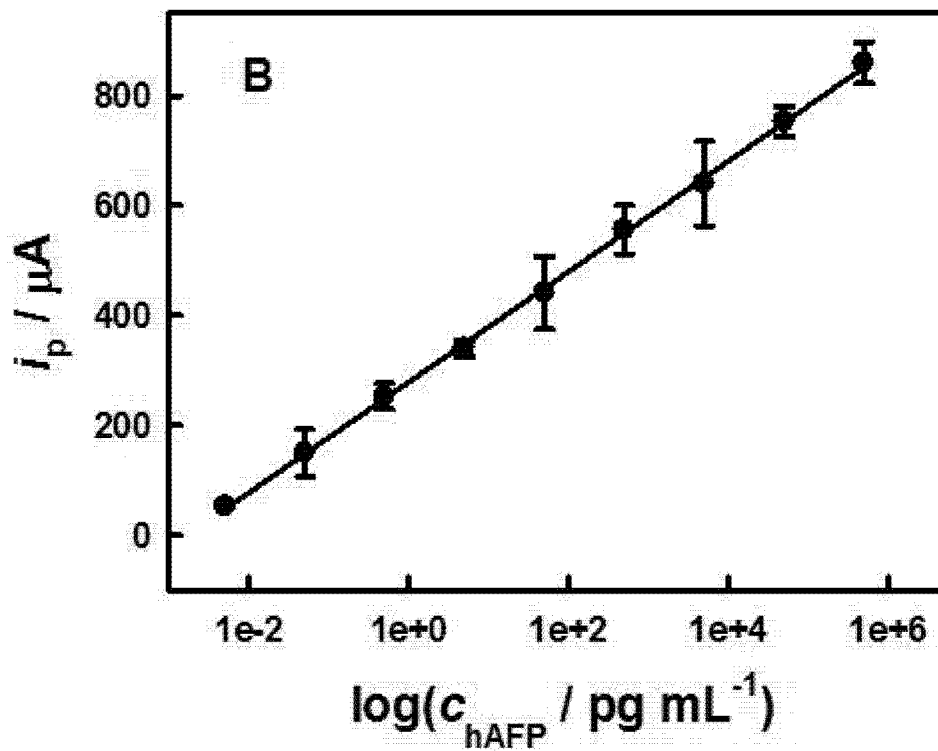


图 3(B)

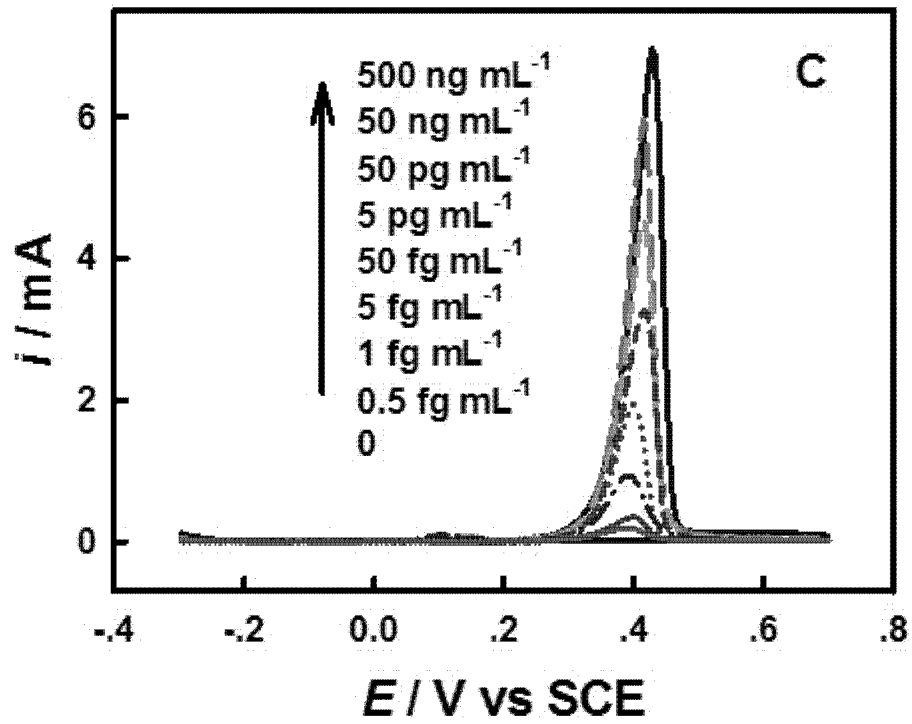


图 3(C)

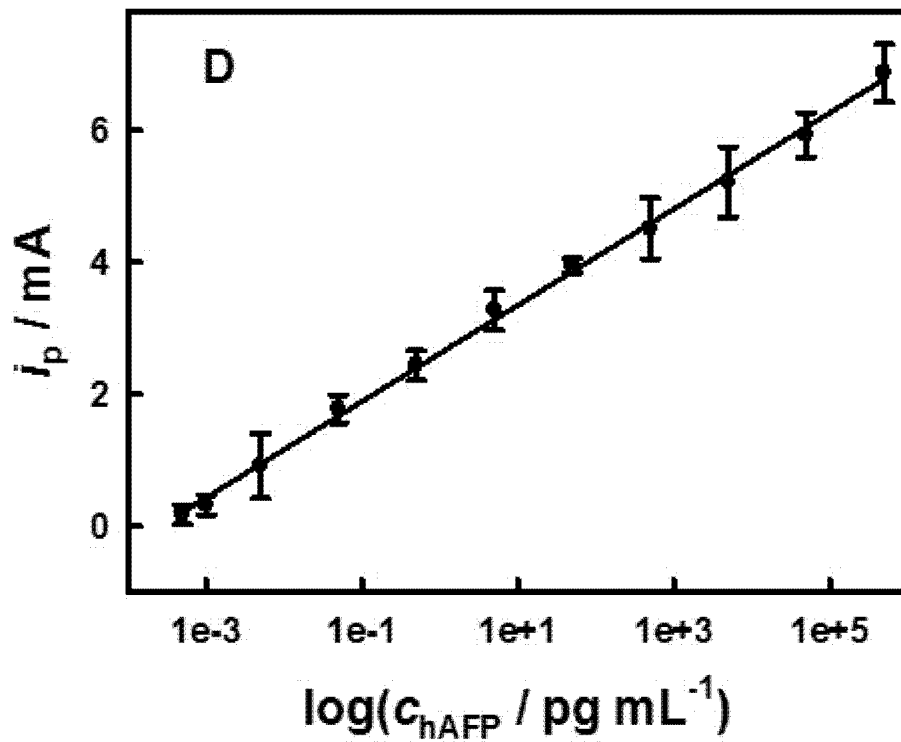


图 3(D)

专利名称(译)	一种蛋白质单分子水平安培免疫分析方法		
公开(公告)号	CN104181292A	公开(公告)日	2014-12-03
申请号	CN201410426738.4	申请日	2014-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	湖南师范大学		
申请(专利权)人(译)	湖南师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	湖南师范大学		
[标]发明人	谢青季 覃晓丽 刘玲 徐爱贵 谭月明 傅迎春 陈超 姚守拙		
发明人	谢青季 覃晓丽 刘玲 徐爱贵 谭月明 傅迎春 陈超 姚守拙		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68 G01N27/48		
CPC分类号	G01N27/48 G01N33/53 G01N33/68		
代理人(译)	张慧		
其他公开文献	CN104181292B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种蛋白质单分子水平安培免疫分析方法，包括以下步骤：①以纳米金标记的免疫电极作为工作电极，在工作电极上以纳米金标记物为中心，进行金标银染和原电池置换反应，通过银染层和金盐的原电池置换反应，选择性地放大纳米金标记物的尺寸，可显著增大银染量和放大金属标记物电化学分析信号；②将这种多重放大的方法用于电化学免疫分析，用原位阳极溶出伏安法获得该工作电极上所富集到的金属层的阳极溶出电流信号，从而间接实现样品中目标分析物的定量分析，使得电化学方法可以检测低至单分子水平的蛋白质。本发明可用于基于生物亲和、金属标记和阳极溶出伏安法的单目标分析物检测与多目标分析物多通道检测。

