

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910096093.1

[51] Int. Cl.

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/551 (2006.01)

[43] 公开日 2009年7月15日

[11] 公开号 CN 101482561A

[22] 申请日 2009.2.9

[21] 申请号 200910096093.1

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号

[72] 发明人 陈志春 奚凤娜 林贤福

[74] 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司

代理人 胡红娟

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称

碳纳米管表面层层自组装制备增敏型免疫反应探针的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种碳纳米管表面层层自组装制备增敏型免疫反应探针的方法，将表面自组装改性的碳纳米管分别分散于伴刀豆球蛋白溶液、过氧化物酶溶液中，依靠伴刀豆球蛋白与过氧化物酶的特异性生物识别作用，可以层层自组装达到预定厚度，得到增敏型免疫反应探针。本发明利用层层自组装制备的增敏型免疫反应探针，将大量的过氧化物酶与抗体共固定在碳纳米管表面。该探针与待测样品中和抗原特异性结合形成结合体时，每个待测抗原对应增敏型探针上大量的过氧化物酶，可显著提高免疫反应的检测灵敏度。本发明利用层层自组装制备增敏型免疫反应探针的方法制备条件温和，标记酶、抗体固定量可控。

1、一种碳纳米管表面层层自组装制备增敏型免疫反应探针的方法，将表面自组装改性的碳纳米管依次分散于溶液A、溶液B中进行自组装操作使碳纳米管表面附着修饰层，按预定次数循环所述的自组装操作得到增敏型免疫反应探针；

所述的溶液A为伴刀豆球蛋白溶液。

所述的溶液B为过氧化物酶和过氧化物酶标记抗体的混合溶液。

2、如权利要求1所述的方法，其特征在于：所述的表面自组装改性的碳纳米管是表面经过阳离子聚电解质、阴离子聚电解质和过氧化物酶层层自组装改性的碳纳米管。

3、如权利要求2所述的方法，其特征在于：所述的表面自组装改性的碳纳米管的制备方法如下：

(1) 将碳纳米管经纯化、羧基化后得到表面带负电的碳纳米管；

(2) 将表面带负电的碳纳米管依次分散于溶液C、溶液D、溶液E中进行自组装操作使碳纳米管表面附着改性层，循环所述的碳纳米管在溶液D、溶液E中的组装操作1~10次直至碳纳米管表面的改性层为预定厚度，得到表面自组装改性的碳纳米管；

所述的溶液C为阳离子聚电解质溶液，所述的阳离子聚电解质可以为壳聚糖、聚烯丙基胺盐酸盐、聚二甲基二烯丙基氯化铵，聚乙烯亚胺；溶液C中聚电解质的浓度为0.01-5mg/mL。

所述的溶液D为阴离子聚电解质溶液，所述的阴离子聚电解质为聚对苯乙烯磺酸钠、硫酸酯化多糖、多糖硫酸酯、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸或海藻酸钠；溶液D中聚电解质的浓度为0.01-5mg/mL。

所述的溶液E为过氧化物酶溶液，溶液的浓度为0.1-5mg/mL。

4、如权利要求1所述的方法，其特征在于：所述的溶液B的配制方法

如下:

在 0.01-5mg/mL 的过氧化物酶溶液中加入过氧化物酶标记抗体, 过氧化物酶标记抗体在溶液 B 中的浓度为 0.1ng/mL-5mg/mL;

5、如权利要求1所述的方法, 其特征在于: 所述的伴刀豆球蛋白溶液的浓度为0.01-5mg/mL。

6、如权利要求 1~5 任一项所述的方法, 其特征在于: 所述的过氧化物酶为辣根过氧化物酶、芦笋过氧化物酶或马铃薯过氧化物酶。

7、如权利要求1所述的方法, 其特征在于: 所述的表面自组装改性的碳纳米管每次在溶液A及溶液B中分散后作用的时间均为5-60min。

8、如权利要求 7 所述的方法, 其特征在于: 循环所述的自组装操作 1-10 次, 得到增敏型免疫反应探针。

碳纳米管表面层层自组装制备增敏型免疫反应探针的方法

技术领域

本发明涉及一种增敏型免疫反应探针的制备方法，尤其涉及一种碳纳米管表面层层自组装制备增敏型免疫反应探针的方法。

背景技术

酶免疫分析技术是以酶为标记物的免疫分析技术，它将高特异性的免疫反应和酶促反应相结合，已被广泛应用于临床诊断、食品分析和环境分析等领域。过氧化物酶(oxidase)是酶免疫分析技术中应用最广泛的标记酶。酶免疫分析技术的灵敏度在很大程度上依赖于标记酶催化反应产生检测信号的灵敏度。开发新型增敏型酶标免疫反应体系具有重要的应用前景。

近年来，纳米材料在酶免疫分析技术领域的应用引起了分析工作者广泛的兴趣。其中碳纳米管由于其独特的理化性质如导体和半导体性质、极高的机械强度、良好的吸附能力、较大的比表面积和长径比、较多的催化位点等而备受关注。将碳纳米管应用于免疫分析中，可以增加固定生物分子的数量，从而增强反应信号。同时，碳纳米管对生物分子活性中心与电极间电子传递具有促进作用，能够提高电化学酶免疫分析的检测性能。

然而，目前碳纳米管在免疫分析技术领域的应用还有待于进一步改进。首先，目前碳纳米管的增敏方式比较单一，大多将碳纳米管作为抗体或抗原的固定化基质使用，通过增大抗体或抗原的固定量来提高待测物中抗原或抗体的结合量来增加信号响应。将碳纳米管改性制备增敏型免疫反应探针，这一新型碳纳米管增敏作用方式，有望取得更好的增强效果。

发明内容

本发明提供一种碳纳米管表面层层自组装制备增敏型免疫反应探针的方法。本发明针对不同的被检测物选用不同的氧化物酶标记抗体，在碳纳米管表面层层自组装制备增敏型免疫反应探针。

一种碳纳米管表面层层自组装制备增敏型免疫反应探针的方法，将表面自组装改性的碳纳米管依次分散于溶液 A、溶液 B 中进行自组装操作使碳纳米管表面附着修饰层，按预定次数循环所述的组装操作使碳纳米管表面的修饰层达到一定厚度，得到增敏型免疫反应探针；

所述的溶液 A 为伴刀豆球蛋白溶液，伴刀豆球蛋白溶液的浓度为 0.01-5mg/mL。

所述的溶液 B 为过氧化物酶和过氧化物酶标记抗体混合溶液。

含糖的生物分子或用糖基标记的生物分子与植物凝集素间具有特异性生物亲和作用，过氧化物酶分子含糖基，与凝集素伴刀豆球蛋白具有较强的生物识别作用。伴刀豆球蛋白修饰层可用于亲和组装过氧化物酶以及过氧化物酶标记抗体。

所述的表面自组装改性的碳纳米管是表面经过阳离子聚电解质、阴离子聚电解质和过氧化物酶层层自组装改性的碳纳米管。

所述的表面自组装改性的碳纳米管的制备方法如下：

(1) 将碳纳米管在 3mol L^{-1} 硝酸中回流纯化 4-12h 后，离心分离，得到纯化的碳纳米管，将纯化的碳纳米管放入浓硝酸和浓硫酸混合液（体积比 1: 3）中超声 2-6h 使碳纳米管羧基化，离心分离并反复用二次蒸馏水冲洗直到碳纳米管溶液达到中性。用 $0.5\text{-}15\text{mol L}^{-1}$ 氢氧化钠将羧基化的碳纳米管溶液的 pH 值调节为 7.0-10.0，使碳纳米管表面带上 COO^- ，得到表面带负电的碳纳米管；

(2) 将表面带负电的碳纳米管依次分散于溶液 C、溶液 D、溶液 E 中进行自组装操作使碳纳米管表面附着改性层，循环所述的碳纳米管在溶液

D、溶液E中的组装操作1~10次直至碳纳米管表面的改性层为预定厚度，得到表面自组装改性的碳纳米管；

所述的溶液C为阳离子聚电解质溶液，所述的阳离子聚电解质可以为壳聚糖、聚烯丙基胺盐酸盐、聚二甲基二烯丙基氯化铵，聚乙烯亚胺；溶液C中阳离子聚电解质的浓度为0.01-5mg/mL。

所述的溶液D为阴离子聚电解质溶液，所述的阴离子聚电解质为聚对苯乙烯磺酸钠、硫酸酯化多糖、多糖硫酸酯、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸或海藻酸钠；溶液D中阴离子聚电解质的浓度为0.01-5mg/mL。

所述的溶液E为过氧化物酶溶液，溶液的浓度为0.1-5mg/mL，溶液pH值低于过氧化物酶的等电点。所述的过氧化物酶，为辣根过氧化物酶、芦笋过氧化物酶或马铃薯过氧化物酶。

层层自组装(LBL)技术是制备有序纳米生物复合物的有效方法，具有条件温和、过程可重复、可在分子水平上控制组装量等优点。可用于高效、可控地构建基于碳纳米管的增敏型免疫反应探针-信号放大型酶标抗体(peroxidase)_n-Ab。

LbL技术可在分子水平上控制组装量、调节组装膜结构，且组装条件温和，组装过程高度可重复，组装层数可调。静电作用力和生物亲和作用，是LbL技术中最常应用的驱动力。静电层层自组装法在层层自组装法技术中应用最为广泛，它是一种以静电力为驱动力，通过阴、阳离子聚电解质交替沉积构造多层膜的新技术。图1为碳纳米管表面静电自组装过程示意图，表面带负电的碳纳米管表面可以通过静电自组装法得到阳离子聚电解质改性膜。阳离子聚电解质改性膜又可进一步与带有相反电荷的阴离子聚电解质溶液组装。溶液pH值低于过氧化物酶的等电点时，过氧化物酶带正电，也可与表面带负电的阴离子聚电解质发生静电自组装。重复在聚阴离子和过氧化物酶中的组装操作1~10次直至碳纳米管表面的改性层为预定厚度，得到自组装改性的碳纳米管。

所述的溶液B的配制方法如下:

在 0.01-5mg/mL 的过氧化物酶溶液中加入过氧化物酶标记抗体, 过氧化物酶标记抗体在溶液 B 中的浓度为 0.1ng/mL-5mg/mL, 所述的过氧化物酶, 为辣根过氧化物酶、芦笋过氧化物酶或马铃薯过氧化物酶。

所述的表面自组装改性的碳纳米管每次在溶液A及溶液B中分散后作用的时间均为5-60min。

循环所述的自组装操作 1-10 次, 可得到增敏型免疫反应探针。

本发明增敏型免疫反应探针制备的基本原理是以过氧化物为标记酶, 将大量的过氧化物酶与抗体共固定在碳纳米管表面。该探针与待测样品中和抗原特异性结合形成结合体时, 每个待测抗原对应增敏型探针上大量的过氧化物酶。与常规免疫分析中每个待测抗原对应单个或少量过氧化物酶相比, 使用增敏型免疫反应探针的免疫分析体系具有显著提高的检测灵敏度。

本发明方法一般均可在常温下的水溶液中操作, 所述的溶液A~E也均采用水溶液体系。

碳纳米管由于其独特的理化性质如导体和半导体性质、极高的机械强度、良好的吸附能力、较大的比表面积、较多的结合位点等而备受关注。将碳纳米管应用于免疫分析中, 可以增加固定生物分子的数量, 从而增强反应信号。图 2 为自组装改性的碳纳米管表面亲和组装制备增敏型免疫反应探针的示意图。通过静电作用制备的改性膜最外层的过氧化物酶与凝集素伴刀豆球蛋白具有较强的生物识别作用。可与伴刀豆球蛋白层层自组装得到修饰层。循环在伴刀豆球蛋白和过氧化物酶中的组装操作直至碳纳米管表面的修饰层为预定厚度, 得到增敏型免疫反应探针。

本发明针对不同的被检测物选用不同的氧化物酶标记抗体, 在碳纳米管表面层层自组装制备增敏型免疫反应探针。本发明制备的增敏型免疫反应探针与待测样品中和抗原特异性结合形成结合体时, 每个待测抗原对应

增敏型探针上大量的过氧化物酶。与常规免疫分析中每个待测抗原对应单个或少量过氧化物酶相比，使用增敏型免疫反应探针的免疫分析体系具有显著提高的检测灵敏度。

本发明利用层层自组装制备增敏型免疫反应探针的方法制备条件温和，标记酶、抗体固定量可控。

附图说明

图1为制备表面自组装改性的碳纳米管的流程示意图。

图2为本发明中在表面自组装改性的碳纳米管上层层自组装制备增敏型免疫反应探针的流程示意图。

具体实施方式

实施例1 增敏型癌胚抗原免疫反应探针的制备

将碳纳米管在 3mol L^{-1} 硝酸中回流纯化 6h 后，离心分离，得到纯化的碳纳米管，将纯化的碳纳米管放入浓硝酸和浓硫酸混合液（体积比 1:3）中超声 4h 使碳纳米管羧基化，离心分离并反复用二次蒸馏水冲洗直到碳纳米管溶液达到中性。用 5mol L^{-1} 氢氧化钠将羧基化的碳纳米管溶液的 pH 值调节为 8.0，使碳纳米管表面带上 COO^- ，得到表面带负电的碳纳米管；

将表面带负电的碳纳米管依次分散于聚烯丙基胺盐酸盐溶液、聚对苯乙烯磺酸钠溶液、辣根过氧化物酶溶液中进行自组装操作使碳纳米管表面附着改性层，聚烯丙基胺盐酸盐溶液和聚对苯乙烯磺酸钠溶液的浓度均为 0.5mg/mL ，辣根过氧化物酶溶液的浓度为 0.5mg/mL ，辣根过氧化物酶溶液的 pH 值为 6.0，循环所述的碳纳米管在聚对苯乙烯磺酸钠溶液、辣根过氧化物酶中的组装操作 4 次，得到表面自组装改性的碳纳米管；

将表面自组装改性的碳纳米管依次分散于溶液 A（伴刀豆球蛋白溶液）、溶液 B（辣根过氧化物酶和辣根过氧化物酶标记癌胚抗原抗体的混

合溶液)中进行自组装操作使碳纳米管表面附着修饰层,伴刀豆球蛋白溶液的浓度为0.3mg/mL,溶液B中辣根过氧化物酶溶液的浓度为1mg/mL,辣根过氧化物酶标记癌胚抗原抗体的浓度为0.1mg/mL,循环所述的组装操作5次,得到增敏型癌胚抗原免疫反应探针。

实施例2 增敏型癌抗原 125 免疫反应探针的制备

将碳纳米管在 3mol L^{-1} 硝酸中回流纯化8h后,离心分离,得到纯化的碳纳米管,将纯化的碳纳米管放入浓硝酸和浓硫酸混合液(体积比1:3)中超声6h使碳纳米管羧基化,离心分离并反复用二次蒸馏水冲洗直到碳纳米管溶液达到中性。用 3mol L^{-1} 氢氧化钠将羧基化的碳纳米管溶液的pH值调节为9.0,使碳纳米管表面带上 COO^- ,得到表面带负电的碳纳米管;

将表面带负电的碳纳米管依次分散于聚二甲基二烯丙基氯化铵溶液、海藻酸钠溶液、芦笋过氧化物酶溶液中进行自组装操作使碳纳米管表面附着改性层,聚二甲基二烯丙基氯化铵溶液和海藻酸钠溶液的浓度均为2mg/mL,芦笋过氧化物酶溶液的浓度为1mg/mL,芦笋过氧化物酶溶液的pH值为6.5,循环所述的碳纳米管在海藻酸钠溶液、芦笋过氧化物酶中的组装操作6次,得到表面自组装改性的碳纳米管;

将表面自组装改性的碳纳米管依次分散于溶液A(伴刀豆球蛋白溶液)、溶液B(芦笋过氧化物酶和芦笋过氧化物酶标记癌抗原125抗体的混合溶液)中进行自组装操作使碳纳米管表面附着修饰层,伴刀豆球蛋白溶液的浓度为0.8mg/mL,溶液B芦笋过氧化物酶溶液的浓度为2mg/mL,芦笋过氧化物酶标记癌抗原125抗体的浓度为0.01mg/mL,循环所述的组装操作4次,得到增敏型癌抗原125免疫反应探针。

实施例3 增敏型铁蛋白免疫反应探针的制备

将碳纳米管在 3mol L^{-1} 硝酸中回流纯化4h后,离心分离,得到纯化的碳纳米管,将纯化的碳纳米管放入浓硝酸和浓硫酸混合液(体积比1:3)

中超声 3h 使碳纳米管羧基化，离心分离并反复用二次蒸馏水冲洗直到碳纳米管溶液达到中性。用 10mol L^{-1} 氢氧化钠将羧基化的碳纳米管溶液的 pH 值调节为 9.5，使碳纳米管表面带上 COO^- ，得到表面带负电的碳纳米管；

将表面带负电的碳纳米管依次分散于聚乙烯亚胺溶液、羧甲基纤维素钠溶液、马铃薯过氧化物酶溶液中进行自组装操作使碳纳米管表面附着改性层，聚乙烯亚胺溶液和羧甲基纤维素钠溶液的浓度均为 0.1mg/mL ，马铃薯过氧化物酶溶液的浓度为 0.1mg/mL ，马铃薯过氧化物酶溶液的 pH 值为 5.5，循环所述的碳纳米管在羧甲基纤维素钠溶液、马铃薯过氧化物酶中的组装操作 3 次，得到表面自组装改性的碳纳米管；

将表面自组装改性的碳纳米管依次分散于溶液 A 伴刀豆球蛋白溶液、溶液 B（马铃薯过氧化物酶和马铃薯过氧化物酶标记铁蛋白抗体的混合溶液）中进行自组装操作使碳纳米管表面附着修饰层，伴刀豆球蛋白溶液的浓度为 0.05mg/mL ，溶液 B 马铃薯过氧化物酶溶液的浓度为 0.1mg/mL ，马铃薯过氧化物酶标记铁蛋白抗体的浓度为 1mg/mL ，循环所述的组装操作 7 次，得到增敏型铁蛋白免疫反应探针。

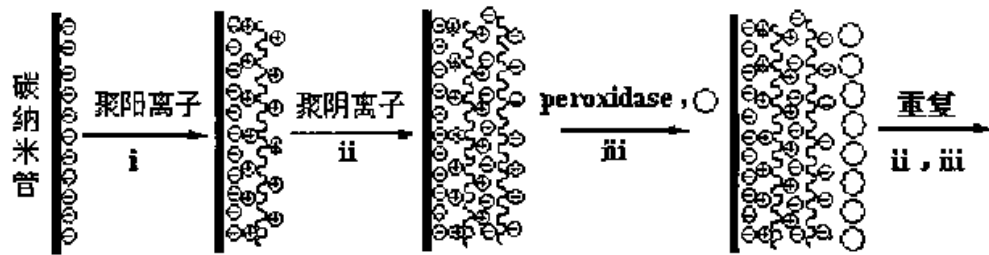


图 1

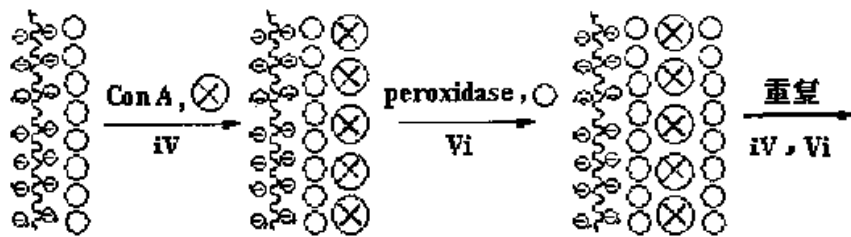


图 2

专利名称(译)	碳纳米管表面层层自组装制备增敏型免疫反应探针的方法		
公开(公告)号	CN101482561A	公开(公告)日	2009-07-15
申请号	CN200910096093.1	申请日	2009-02-09
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	陈志春 奚凤娜 林贤福		
发明人	陈志春 奚凤娜 林贤福		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/551		
代理人(译)	胡红娟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种碳纳米管表面层层自组装制备增敏型免疫反应探针的方法，将表面自组装改性的碳纳米管分别分散于伴刀豆球蛋白溶液、过氧化物酶溶液中，依靠伴刀豆球蛋白与过氧化物酶的特异性生物识别作用，可以层层自组装达到预定厚度，得到增敏型免疫反应探针。本发明利用层层自组装制备的增敏型免疫反应探针，将大量的过氧化物酶与抗体共固定在碳纳米管表面。该探针与待测样品中和抗原特异性结合形成结合体时，每个待测抗原对应增敏型探针上大量的过氧化物酶，可显著提高免疫反应的检测灵敏度。本发明利用层层自组装制备增敏型免疫反应探针的方法制备条件温和，标记酶、抗体固定量可控。

