

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510030659.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008年2月6日

[11] 授权公告号 CN 100367034C

[22] 申请日 2005.10.20

[21] 申请号 200510030659.2

[73] 专利权人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路800号

[72] 发明人 高峰 崔大祥 贺蓉 敖丽梅

潘碧峰

[56] 参考文献

WO01/96871A2 2001.12.20

US2002127623A1 2002.9.12

CN1563951A 2005.1.12

US2002/0177241A1 2002.11.28

US2003/0059850A1 2003.3.27

US5434088A 1995.7.18

Fluorescence of Dyes Adsorbed on Highly Organized, Nanostructured Gold Surfaces. Stefano A. Levi, Ahmed Mourran, Joachim P. Spatz et al. Chem. Eur. J, Vol. 16 No. 8. 2002

Immobilization and Biocatalytic Activity of Fungal Protease on Gold Nanoparticle - Loaded Zeolite Microspheres. Sumant Phadtare, V. P. Vind, Kausik Mukhopadhyay et al. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 85 No. 6. 2004

审查员 吴江明

[74] 专利代理机构 上海交达专利事务所

代理人 王锡麟 王桂忠

权利要求书1页 说明书4页

[54] 发明名称

免疫胶体金粒子荧光淬灭的测量方法

[57] 摘要

一种检测技术领域的免疫胶体金粒子荧光淬灭的测量方法，将被测物的抗体或抗原连接在微小颗粒或微孔上形成固相载体，加入被测样品，再加入过量胶体金标记物，样品中的被测物与固定在微颗粒或微孔板上的抗体或抗原进行免疫反应，形成抗原抗体的固相载体复合物，及未反应的胶体金标记物，分离复合物与未反应的胶体金标记物，在未反应的胶体金标记物中加入荧光物质，使得荧光信号淬灭，信号淬灭的程度与体系中未反应的金标记物的量相关，未反应的胶体金标记物的量与被测物的量相关，从而对被测物进行定量检测。本发明检测灵敏度高，定量范围广，方法简单，成本低。

1、一种免疫胶体金粒子荧光淬灭的测量方法，其特征在于，将被测物的抗体或抗原连接在微小颗粒或微孔上形成固相载体，加入被测样品，再加入过量胶体金标记物，样品中的被测物与固定在微小颗粒或微孔板上的抗体或抗原进行免疫反应，形成抗原抗体的固相载体复合物，及未反应的胶体金标记物，分离复合物与未反应的胶体金标记物，在未反应的胶体金标记物中加入荧光物质，使得荧光信号淬灭，信号淬灭的程度与体系中未反应的金标记物的量相关，未反应的胶体金标记物的量与被测物的量相关，从而对被测物进行定量检测。

2、根据权利要求1所述的免疫胶体金粒子荧光淬灭的测量方法，其特征是，所述的微小颗粒选用磁性颗粒、聚丙烯酰胺颗粒、聚苯乙烯颗粒、玻璃颗粒、聚丙烯颗粒、硅橡胶颗粒、纤维素颗粒、交联葡聚糖颗粒、金黄色葡萄球菌的菌体中的任意一种。

3、根据权利要求2所述的免疫胶体金粒子荧光淬灭的测量方法，其特征是，所述的颗粒粒径是纳米至微米级。

4、根据权利要求1所述的免疫胶体金粒子荧光淬灭的测量方法，其特征是，所述的微孔选用塑料制品做成的小试管、离心管、微孔板中的任意一种。

5、根据权利要求4所述的免疫胶体金粒子荧光淬灭的测量方法，其特征是，所述的微孔，孔径是毫米级。

6、根据权利要求1所述的免疫胶体金粒子荧光淬灭的测量方法，其特征是，所述的固相载体形成是通过静电作用、疏水作用、生物分子间的特异作用、化学连接剂将目标物的抗体或抗原连接到微小颗粒或微孔载体的表面。

7、根据权利要求1所述的免疫胶体金粒子荧光淬灭的测量方法，其特征是，所述的荧光物质是指：荧光素、羧基荧光素、2-甲氧基荧光素、4, 5-二甲氧基荧光素、罗丹明、藻红蛋白、量子点中的任意一种，发射的光谱能被胶体金颗粒吸收的荧光物质。

8、根据权利要求1所述的免疫胶体金粒子荧光淬灭的测量方法，其特征是，所述的胶体金标记物是指：被测物的抗体、抗原中的任意一种与胶体金的连接物。

免疫胶体金粒子荧光淬灭的测量方法

技术领域

本发明涉及的是一种检测技术领域的方法，具体是一种免疫胶体金粒子荧光淬灭的测量方法。

背景技术

胶体金粒子作为标记物应用于免疫分析是 20 世纪 70 年代由 Faulk 等发明的，主要是利用它的光学性能，即胶体金粒子本身有颜色，可通过肉眼观察免疫分析结果。目前应用较多的分析方法为斑点免疫金渗滤法和胶体金免疫层析法，该技术已经在临床医学检验中得到了广泛应用，有大量的报道，其基本原理是以微孔膜为固相载体，包被目标物（即被测物）的抗原或抗体，加入待测样本后，经微孔膜的渗滤作用或毛细管虹吸作用使标本中的目标物与膜上包被的抗原或抗体结合，再通过胶体金标记物与之反应形成红色的可见结果。但是这两种方法要求固相载体膜必须有较好的蛋白结合力、合适的孔径大小、较好的抗张强度，对膜的要求较高，目前应用的膜大多是从国外进口，成本高，另一方面，单纯以胶体金显色深浅来判断结果，只能进行定性或半定量测定，灵敏度低，对于某些抗原或抗体含量极低的样本，会造成假阴性，检出率较低。

经对现有技术的文献检索发现，为了改进上述方法的缺陷，中国专利名称：“免疫胶体金和免疫磁性粒子双标记快速诊断试剂盒”，公开号：CN 1335503A，该专利将磁珠和胶体金同时标记在目标物的抗体或抗原上，通过免疫反应与膜上包被的抗原或抗体结合，形成一检测带，用肉眼对检测带进行初步定性或半定量检测的基础上，以磁性测定仪对该检测带进行定量检测，该方法提供了定量检测的思路，但需要价格昂贵的超微量磁定量检测仪，且对于极微量磁珠的检测灵敏度低。

发明内容

本发明针对现有技术的不足和缺陷，提供一种免疫胶体金粒子荧光淬灭的测量方法，使其利用胶体金的荧光淬灭特性，对被测物进行定量检测，检测灵敏度

高，定量范围广，方法简单，成本低。

本发明是通过以下技术方案实现的，本发明将被测物的抗体或抗原连接在微小颗粒或微孔上形成固相载体，加入被测样品，再加入过量胶体金标记物，样品中的目标物与固定在微颗粒或微孔上的抗体或抗原进行免疫反应，形成抗原抗体的固相载体复合物，及未反应的胶体金标记物，分离复合物与未反应的胶体金标记物，在未反应的胶体金标记物中加入荧光物质，使得荧光信号淬灭，信号淬灭的程度与体系中未反应的胶体金标记物的量相关，未反应的胶体金标记物的量与被测物的量相关，从而对被测物进行定量检测。

所述的微小颗粒可以选用磁性颗粒、聚丙烯酰胺颗粒、聚苯乙烯颗粒、玻璃颗粒、聚丙烯颗粒、硅橡胶颗粒、纤维素颗粒、交联葡聚糖颗粒、金黄色葡萄球菌的菌体中的任意一种，颗粒粒径根据原料和制备方法的不同可以是纳米至毫米级。

所述的微孔可以选用塑料制品做成的小试管、离心管、微孔板中的任意一种，孔径是毫米级。

所述的固相载体形成是通过常规方法即静电作用、疏水作用、生物分子间的特异作用、化学连接剂将目标物的抗体或抗原连接到微小颗粒或微孔载体的表面。

所述的胶体金标记物的制备，首先用氯金酸（ HAuCl_4 ）通过柠檬酸三钠还原法制备胶体金粒子，再用胶体金粒子标记抗体，标记的方法有三种，一是当 $\text{pH}=9$ 时通过静电作用使抗体和胶体金粒子相互结合；二是将抗体水解使抗体的Fab'片断上的巯基裸露出来，能够和胶体金粒子形成稳定的Au-S共价键，将胶体金标记在抗体上；三是使用含巯基的连接剂将胶体金粒子标记到抗体上。

所述的荧光物质可以是荧光素、羧基荧光素、2-甲氧基荧光素、4,5-二甲氧基荧光素、罗丹明、藻红蛋白、量子点（10nm以下的半导体材料）通过光激发可发出荧光信号，且用胶体金粒子可以使其荧光信号淬灭的物质。

本发明将免疫反应的高特异性与胶体金的荧光淬灭性相结合，建立高效、特异、定量的胶体金免疫检测方法，通过荧光物质与免疫反应中未反应的胶体金标记物作用使得荧光信号减弱，根据信号减弱的大小对被测物进行定量检测，检测灵敏度高，定量范围广，方法简单，成本低，适用于血样、尿样、唾液等样本，

可应用于激素、蛋白质、病毒、毒品、细菌、环境污染等检测，常规的生化实验室都具备实验条件，便于推广。

具体实施方式

实施例 1，对于纳米颗粒，以磁性颗粒为例，建立免疫胶体金荧光淬灭测量方法，采取如下步骤：

1、免疫磁颗粒的制备：首先用硫酸亚铁和三氯化铁在碱性条件下制备纳米四氧化三铁 (Fe_3O_4) 粒子，再采用有机分子处理纳米 Fe_3O_4 粒子使其表面带有功能基团（羧基、氨基、醛基、巯基等）。这里选用表面带有羧基的磁粒子粒径为 100 纳米左右，在连接剂碳二亚胺的作用下与抗癌胚抗原 (CEA) 的单抗连接，制得固相免疫磁颗粒。

2、胶体金标记抗体的制备：首先用氯金酸 (HAuCl_4) 通过柠檬酸三钠还原法制备胶体金粒子，通过调节原料比可得到粒径不同的纳米金颗粒，使用时用 0.1 摩尔浓度的 Na_2CO_3 调节 pH 9，再加入抗癌胚抗原 (CEA) 的多抗，在室温下反应 1 小时，9500 转/分离心分离，得到胶体金标记的多抗。

3、建立测量方法：在试管中加入 100 μL 癌胚抗原 (CEA) 的标准品（浓度梯度为 0, 10, 20, 40, 80, 120ng/mL）或待测样品（血清），200 毫克 (0.1mL) 单抗包被的磁颗粒，以及 50 μL 胶体金标记的多抗，室温反应 3 小时，在外加磁场下分离磁颗粒，上清液中加入荧光物质，因为上清液中有未反应的胶体金标记物能使荧光信号淬灭，未反应的胶体金标记物的量与荧光信号淬灭程度成正比。这里荧光物质选用荧光素，用荧光光度计测荧光信号的强度，激发波长为 490nm，发射波长为 520nm，通过测发射光的强度值对 CEA 浓度作标准曲线，根据标准曲线求得待测样品中 CEA 的含量。该检测方法的灵敏度为 3.8ng/ml，平均回收率 98.7%，批内误差小于 7%，批间误差小于 10%。

实施例 2，对于微米颗粒，以金黄色葡萄球菌的菌体为例，建立免疫胶体金荧光淬灭测量方法，采取如下步骤：

1、胶体金标记抗原的制备：首先用氯金酸 (HAuCl_4) 通过柠檬酸三钠还原法制备胶体金粒子，使用时用 0.1 摩尔浓度的 Na_2CO_3 调节 pH 8，再加入甲胎蛋白 (AFP)，在室温下反应 1 小时，9500 转/分离心分离，得到胶体金标记的甲胎蛋白 (AFP)。

2、建立测量方法：在试管中加入 100 μ L 甲胎蛋白（AFP）的标准品（浓度梯度为 0, 15, 30, 100, 200, 400ng/mL）或待测样品（血清），100 μ L 兔抗人 AFP 的多抗（滴度为 1: 15000），以及 50 μ L 胶体金标记的 AFP，37 $^{\circ}$ C 反应 2 小时，再加入 0.1mL 含有金黄色葡萄球菌的菌体的溶液，室温下反应 15 分钟，3000 转/分离心，因为金黄色葡萄球菌可分泌蛋白 A 在细胞壁的粘膜上，蛋白 A 能与 AFP 的多抗结合成复合物，通过离心可分离复合物和未反应的胶体金标记物，取上清液，加入荧光物质，因为上清液中有未反应的胶体金标记物能使荧光信号淬灭，这里荧光物质选用藻红蛋白，用荧光光度计测荧光信号的强度，激发波长为 490nm，发射波长为 595nm，通过测发射光的强度值对 AFP 浓度作标准曲线，根据标准曲线求得待测样品中 AFP 的含量。该检测方法的灵敏度为 8.6ng/ml，平均回收率 101.7%，批内误差小于 10%，批间误差小于 10%。

实施例 3，对于微孔，以聚苯乙烯制成的塑料试管为例，建立免疫胶体金荧光淬灭测量方法，采取如下步骤：

1、试管抗体的包被：在聚苯乙烯的试管中加入 0.5mL 用碳酸盐缓冲液（pH9.5）配成的抗癌胚抗原（CEA）的单抗（4 μ g/mL），4 $^{\circ}$ C 下反应过夜，倒掉液体，用磷酸缓冲液洗 3 次后，加入含 1%牛血清白蛋白的磷酸缓冲液封闭 1 小时，得到包被抗体的反应试管。

2、建立测量方法：在包被抗体的试管中加入 100 μ L 癌胚抗原（CEA）的标准品（浓度梯度为 0, 10, 20, 40, 80, 120ng/mL）或待测样品（血清），100 μ L 胶体金标记的多抗（实施例 1 中方法制备的），室温反应 3 小时，取反应管中 150 μ L 上清液，再加入荧光物质，因为上清液中有未反应的胶体金标记物能使荧光信号淬灭，这里的选用荧光物质量子点 CdTe，用荧光光度计检测溶液的荧光强度，激发波长为 450nm，发射波长为 560nm，通过测发射光的强度值对 CEA 浓度作标准曲线，根据标准曲线求得待测样品中 CEA 的含量。该检测方法的灵敏度为 5.2ng/ml，平均回收率 97.1%，批内误差小于 10%，批间误差小于 15%。

专利名称(译)	免疫胶体金粒子荧光淬灭的测量方法		
公开(公告)号	CN100367034C	公开(公告)日	2008-02-06
申请号	CN200510030659.2	申请日	2005-10-20
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	高峰 崔大祥 贺蓉 敖丽梅 潘碧峰		
发明人	高峰 崔大祥 贺蓉 敖丽梅 潘碧峰		
IPC分类号	G01N33/542 G01N33/543 G01N33/52 G01N33/531		
代理人(译)	王锡麟 王桂忠		
审查员(译)	吴江明		
其他公开文献	CN1773281A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测技术领域的免疫胶体金粒子荧光淬灭的测量方法，将被测物的抗体或抗原连接在微小颗粒或微孔上形成固相载体，加入被测样品，再加入过量胶体金标记物，样品中的被测物与固定在微颗粒或微孔板上的抗体或抗原进行免疫反应，形成抗原抗体的固相载体复合物，及未反应的胶体金标记物，分离复合物与未反应的胶体金标记物，在未反应的胶体金标记物中加入荧光物质，使得荧光信号淬灭，信号淬灭的程度与体系中未反应的金标记物的量相关，未反应的胶体金标记物的量与被测物的量相关，从而对被测物进行定量检测。本发明检测灵敏度高，定量范围广，方法简单，成本低。