

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810124479.4

[43] 公开日 2009年2月18日

[11] 公开号 CN 101368949A

[22] 申请日 2008.7.8

[21] 申请号 200810124479.4

[71] 申请人 东南大学

地址 210096 江苏省南京市四牌楼2号

[72] 发明人 赵祥伟 扈靖 赵远锦 李娟

赵文举 顾忠泽

[74] 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

代理人 叶连生

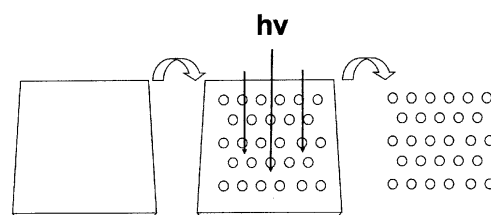
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

[54] 发明名称

以颜色和形状复合编码的水凝胶非标记多元免疫检测方法

[57] 摘要

本发明公开了一种以颜色及形状复合编码的水凝胶非标记多元免疫检测方法，该方法采用具有编码的光子晶体水凝胶薄膜，使抗体或者抗原与光子晶体水凝胶薄膜结合，抗体或者抗原的种类用光子晶体水凝胶薄膜的编码来标识，通过多种利用光子晶体水凝胶薄膜标识的抗体或者抗原，同时非标记检测同一个待测样品中相应的抗原或者抗体，待检测分子的有无或者多少由光子晶体水凝胶薄膜的反射峰位移反应。这种以颜色及形状复合编码的水凝胶非标记多元免疫检测方法不用对生物分子进行标记，只需要比较反应前后的反射光谱就可以同时测定待测分子的种类和浓度，具有灵敏度高，检测通量大，操作简单，检测成本低廉等优点。



1. 一种以颜色和形状复合编码的水凝胶非标记多元免疫检测方法，其特征在于检测步骤为：

第一步，制备各种不同形状不同颜色的光子晶体水凝胶薄膜：将质量体积比为 10%的非紧密堆积型二氧化硅胶体晶体用丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺混合液稀释至质量体积比在 3%~6%范围内的具有不同浓度的一组溶液，分别加入光引发剂，排出空气，灌入模具中，在不同浓度的光子晶体凝胶聚合前体溶液的模具上加盖不同形状的掩模，静置 20~30min，然后经紫外光照射聚合 40~60min，即得不同形状不同颜色的光子晶体水凝胶薄膜，将所得到的光子晶体水凝胶薄膜从模具上剥落，洗涤后置于纯水中保存；

第二步，制备多元免疫检测用具有复合编码的光子晶体水凝胶薄膜：将一种颜色或一种形状作为一种编码，选取由第一步制得的具有不同颜色或者不同形状的光子晶体水凝胶薄膜，在具有同种编码的水凝胶薄膜表面包被同种特异性抗原或者抗体制成一种免疫水凝胶薄膜，将分别制备好的免疫水凝胶薄膜用磷酸盐缓冲液洗涤，封闭缓冲液之后，测定得到的每种复合编码光子晶体水凝胶薄膜的反射光谱，将制备的各种不同形状和不同颜色的水凝胶薄膜进行混合，即得到多元免疫检测用具有复合编码的光子晶体水凝胶薄膜；

第三步，检测：将第二步得到的多元免疫检测用具有复合编码的光子晶体水凝胶薄膜与待测样品混合进行抗原和抗体的特异性结合反应，反应完毕，用洗涤缓冲液洗涤，分别测定每个光子晶体水凝胶薄膜的反射光谱，同时与没有反应前光子晶体水凝胶薄膜的反射光谱相对比，结合形状以确定其编码，根据编码就能够确定待测抗原或者抗体的种类以及含量。

2.如权利要求 1 所述的以颜色和形状复合编码的水凝胶非标记多元免疫检测方法，其特征在于所述的光子晶体水凝胶薄膜的形状为星形、三角形、圆形、正方形、正五边形中的任意一种或几种。

3.如权利要求 1 所述的以颜色和形状复合编码的水凝胶非标记多元免疫检测方法，其特征在于所述的第三步中的待测样品可以是体液、组织液、细胞裂解液、血液、血清中的病原微生物抗原或其抗体、细胞因子、肿瘤标志物、自身抗体、

激素、神经递质、毒品、兴奋剂、各种细胞表面的可溶性标记或者各种可溶性受体分子中的任意一种或几种。

4.如权利要求1所述的以颜色和形状复合编码的水凝胶非标记多元免疫检测方法，其特征在于第一步中的光引发剂为偶氮异二丁腈。

以颜色和形状复合编码的水凝胶非标记多元免疫检测方法

技术领域

本发明涉及一种多元免疫检测方法，特别涉及一种由光子晶体和水凝胶薄膜的不同形状复合编码的非标记多元免疫检测方法。

背景技术

人类基因组序列得以解码之后，基因的功能以及基因编码的蛋白质之间的相互作用成为研究的热点，人类进入了后基因组时代。后基因组时代的一个显著特点就是研究大量的蛋白与核酸之间、蛋白质与蛋白质之间以及蛋白质与药物之间的相互作用，这些相互作用的研究再采用传统的试验方法几乎是不可能的，因此需要一种高通量的试验平台。而高通量的试验平台则要求有高通量的分子载体，来标识不同的分子发生的不同相互作用，即所谓的编码过程。传统方法如阵列式生物芯片，是利用分子所固定的不同位置也就是坐标作为编码来区别不同的生物分子，这样的编码量有限，而且限制其反应速度和应用。近年来新型的编码载体相继出现，以光子晶体水凝胶薄膜作为载体进行编码成为高通量筛选以及组合化学等领域关注的热点。

相对于其他形式的载体，水凝胶具有显著的优势：第一，光子晶体水凝胶具有高度的亲水性，可以响应外界的刺激，体积发生显著的收缩或者膨胀，在一定的收缩和膨胀范围内不影响已锁定的胶体晶格结构，只会改变的晶面间距，引起晶胶阵列衍射峰位置的变化，甚至会引起薄膜结构色的变化，可以逆向判断环境所发生的变化，进而可以检测相应的外界环境的变化；第二，可以在水凝胶上结合多克隆抗体，进行抗原检测。当抗原结合到抗体上时，就会改变凝胶的体积，根据布拉格衍射定理，相应的光子晶体薄膜的反射峰发生了蓝移，甚至能够引起光子晶体薄膜结构色薄膜。从而能够快速准确的进行抗原的检测。第三，形状编码又有其独特的优势，可以根据形状通过肉眼就能简单的对检测物加以分辨，具有其他编码没有的优势；第四，以水凝胶为载体可以保持蛋白的活性，提高检测的稳定性。

免疫分析主要是利用抗体能够与相应抗原及半抗原发高特异性结合这一性质,通过将特定抗体或抗原作为选择性试剂来对相应待测抗原或抗体进行分析测定的方法。它的提出及发展是 20 世纪以来在生物分析化学领域所取得的最伟大的成就之一。免疫分析技术具有高度的准确性和特异性,因而在临床检验领域中倍受重视,发展迅速,成为检验方法中最为重要的技术之一。

采用非标记的检测方式,直接检测自然原始(native)状态的生物分子,将去除生物分子标记的影响,不但使检测结果更加准确和具有说服力而且省去了生物分子标记的时间与成本。非标记检测需要将生物分子相互作用转化为可测量的信号,而不是直接测量标记分子的信号。因此,近几年来一些能传感生物分子相互作用对周围环境参数如膜厚度、电导率、折射率等改变的材料或者技术被相继应用到生物检测中。由于利用非标记检测技术可以实现生物分子的实时、原位检测,因此对于快速低成本检测以及生物分子相互作用的动力学研究具有非常重要的意义。

发明内容

技术问题:为了解决现有检测技术成本高,编码量有限的缺点,本发明提供一种以颜色和形状复合编码的水凝胶非标记多元免疫检测方法,该检测方法用于多元免疫分析具有稳定性高,编码量大,有效保持蛋白活性等优点。

技术方案:本发明的目的可以通过以下方案实现:一种以颜色和形状复合编码的水凝胶非标记多元免疫检测方法,检测步骤为:

第一步,制备各种不同形状不同颜色的光子晶体水凝胶薄膜:将质量体积比为 10%的非紧密堆积型二氧化硅胶体晶体用丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺混合液稀释至质量体积比在 3%~6%范围内的具有不同浓度的一组溶液,分别加入光引发剂。排出空气,灌入模具中,在不同浓度的光子晶体凝胶聚合前体溶液的模具上加盖不同形状的掩模,静置 20~30min,然后经紫外光照射聚合 40~60min,即得不同形状不同颜色的光子晶体水凝胶薄膜,将所得到的光子晶体水凝胶薄膜从模具上剥落,洗涤后置于纯水中保存;

第二步,制备多元免疫检测用复合编码光子晶体水凝胶薄膜:将一种颜色或一种形状作为一种编码,选取由第一步制得的具有不同颜色或者不同形状的光子晶体水凝胶薄膜,在具有同种编码的水凝胶薄膜表面包被同种特异性抗原或者抗

体制成一种免疫水凝胶薄膜，将分别制备好的免疫水凝胶薄膜用磷酸盐缓冲液洗涤，封闭缓冲液之后，测定得到的每种复合编码光子晶体水凝胶薄膜的反射光谱，将制备的各种形状的水凝胶薄膜进行混合，即得到多元免疫检测用复合编码光子晶体水凝胶薄膜；所述的光子晶体水凝胶薄膜的形状可以为星形、三角形、圆形、正方形、正五边形中的任意一种或几种。

第三步，检测：将第二步得到的多元免疫检测用复合编码光子晶体水凝胶薄膜与待测样品混合进行抗原和抗体的特异性结合反应，反应完毕，用洗涤缓冲液洗涤，分别测定每个光子晶体水凝胶薄膜的反射光谱，同时与没有反应前光子晶体水凝胶薄膜的反射光谱相对比，结合形状以确定其编码，以确定待测抗原或者抗体的种类，以及其含量。待测样品可以是体液、组织液、细胞裂解液、血液、血清中的病原微生物抗原或其抗体、细胞因子、肿瘤标志物、自身抗体、激素、神经递质、毒品、兴奋剂、各种细胞表面的可溶性标记或者各种可溶性受体分子中的任意一种或几种。

有益效果：本发明的以颜色和形状复合编码的水凝胶非标记多元免疫检测方法与现有非标记多元免疫检测方法相比具有以下优点：

- (1) 本发明就是将光子晶体编码和水凝胶薄膜形状相结合，大大增加了编码量，如果 m 种特征反射峰的光子晶体有 n 种特征反射峰强度，那么就可以得到 n^m-1 种编码，同时可以有 k 种不同形状的光子晶体水凝胶薄膜，那么编码量就可以达到 $k(n^m-1)$ 种。
- (2) 采用不同浓度的光子晶体可以得到不同的反射峰位置编码，反射峰位置可以涵盖可见区域，而且半峰宽窄，本身编码量大。加之水凝胶薄膜可以制成不同的形状，可以与反射峰进行复合编码。从而，光子晶体水凝胶薄膜的编码量大大提高，可以满足同时检测多个指标的需要，也可以满足高通量检测的需要。
- (3) 光子晶体水凝胶薄膜具有高度亲水性，可以响应外界的刺激。
- (4) 光子晶体水凝胶薄膜荧光本底低，利于提高荧光的强度和检测反应的灵敏度。

附图说明

图 1 不同形状光子晶体水凝胶薄膜生成方式示意图。

具体实施方式

一种以颜色和形状复合编码的水凝胶非标记多元免疫检测方法，检测步骤为：

第一步，如图 1 所示，制备不同形状不同颜色的光子晶体水凝胶薄膜：将质量体积比为 10%的非紧密堆积型二氧化硅胶体晶体用丙烯酸胺和甲叉双丙烯酸酯混合液稀释至质量体积比在 3%~6%范围内的具有不同浓度的一组溶液，其中丙烯酸胺和甲叉双丙烯酸酯混合液中丙烯酸胺和甲叉丙烯酸酯是按摩尔比丙烯酸酯：甲叉丙烯酸酯=29：1 配制的，分别加入光引发剂，光引发剂可以是偶氮异二丁腈。排出空气，灌入模具中，在不同浓度的光子晶体凝胶聚合前体溶液的模具上加盖不同形状的掩模，静置 20~30min，以上操作均在医用净化操作台内进行，然后经紫外光照射聚合 40~60min，即得不同形状不同颜色的光子晶体水凝胶薄膜，将所得到的光子晶体水凝胶薄膜从模具上剥落，洗涤后置于 4℃纯水中保存；

第二步，制备多元免疫检测用复合编码光子晶体水凝胶薄膜：将一种颜色或一种形状作为一种编码，选取由第一步制得的具有不同颜色或者不同形状的光子晶体水凝胶薄膜，在具有同种编码的水凝胶薄膜表面包被同种特异性抗原或者抗体制成一种免疫水凝胶薄膜，将分别制备好的免疫水凝胶薄膜用磷酸盐缓冲液洗涤，封闭缓冲液之后，测定得到的每种复合编码光子晶体水凝胶薄膜的反射光谱，将制备的各种形状的水凝胶薄膜进行混合，即得到多元免疫检测用复合编码光子晶体水凝胶薄膜；所述的光子晶体水凝胶薄膜的形状可以为星形、三角形、圆形、正方形、正五边形中任意一种或几种。这样将具有不同反射峰的水凝胶薄膜及其不同形状结合可以大大扩大编码量。

第三步，检测：将第二步得到的多元免疫检测用复合编码光子晶体水凝胶薄膜与待测样品混合进行抗原和抗体的特异性结合反应，反应完毕，用洗涤缓冲液洗涤，分别测定每个光子晶体水凝胶薄膜的反射光谱，同时与没有反应前光子晶体水凝胶薄膜的反射光谱相对比，结合形状以确定其编码，以确定待测抗原或者抗体的种类，以及其含量。待测样品可以是体液、组织液、细胞裂解液、血液、血清中的病原微生物抗原或其抗体、细胞因子、肿瘤标志物、自身抗体、激素、

神经递质、毒品、兴奋剂、各种细胞表面的可溶性标记或者各种可溶性受体分子中的任意一种或几种。

在第一步的开始质量体积比为 10% 的非紧密堆积型二氧化硅的质量体积比检测方法如下：取 100 μ l 的二氧化硅溶液，将其在烘箱中烘干，称量其质量 m ，质量体积比浓度= $m/100$ ，将其换算成 mg/ml 即为实验中所提到的质量体积比浓度。在这个基础上再用丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺混合溶液稀释至实验所需的浓度。

第一步中稀释后的二氧化硅胶体晶体在丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺混合液中的质量体积比可以是 3%~6% 范围内的任意数值，比如 3%、4.2% 或者 6%；光子晶体凝胶聚合前体溶液的模具加盖掩模后静置 20~30min，可以是 20min、25min 或者 30min，为了非紧密堆积型交替晶体的形成。然后经过紫外光照射可以用高压汞灯在 4 $^{\circ}$ C 下照射反应 40~60min，如 40min、51min 或者 60min。

实施例 1

一种以颜色及形状复合编码的水凝胶非标记多元免疫检测方法，检测步骤为：

第一步，制备各种不同形状不同颜色的光子晶体水凝胶薄膜：将质量体积比为 10% 的非紧密堆积型二氧化硅胶体晶体用丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺混合液稀释至质量体积比为 3%、4% 的具有不同浓度的一组溶液，分别加入光引发剂，排出空气，灌入模具中，在不同浓度的光子晶体凝胶聚合前体溶液的模具上依次加盖三角形、圆形、正方形的掩模，静置 20min，然后经紫外光照射聚合 60min，即得不同形状不同颜色的光子晶体水凝胶薄膜，将所得到的光子晶体水凝胶薄膜从模具上剥落，洗涤后置于纯水中保存；

第二步，制备多元免疫检测用具有复合编码的光子晶体水凝胶薄膜：在质量体积比为 3% 圆形的表面包被一种毒素，质量体积比为 3% 三角形的表面再包被一种激素，在质量体积比为 3% 正方形的表面包被一种肿瘤标志物，在质量体积比为 4% 圆形的表面包被一种神经递质，在质量体积比为 4% 三角形的表面包被一种兴奋剂，在质量体积比为 4% 正方形表面包被一种细胞因子，将分别制备好的免

疫水凝胶薄膜用磷酸盐缓冲液洗涤，封闭缓冲液之后，测定得到的每种复合编码光子晶体水凝胶薄膜的反射光谱，将制备的各种不同形状和不同颜色的水凝胶薄膜进行混合，即得到多元免疫检测用具有复合编码的光子晶体水凝胶薄膜；

第三步，检测：将第二步得到的多元免疫检测用具有复合编码的光子晶体水凝胶薄膜与待测样品（比如说为细胞裂解液、血液、体液等）混合进行抗原和抗体的特异性结合反应，反应完毕，用洗涤缓冲液洗涤，分别测定每个光子晶体水凝胶薄膜的反射光谱，同时与没有反应前光子晶体水凝胶薄膜的反射光谱相对比，结合形状以确定其编码，根据编码就能够确定待测抗原或者抗体的种类以及含量。

实施例 2

使用光子晶体水凝胶薄膜进行血液中艾滋病病毒（HIV）和乙型肝炎病毒（HBV）的检测：

1. 分别在两种不同颜色的正方形的光子晶体水凝胶薄膜上包被艾滋病病毒合成肽抗原和乙型肝炎表面抗原，在另外一种圆形的光子晶体水凝胶薄膜上包被牛血清白蛋白做为对照。三种包被过的编码水凝胶薄膜分别用磷酸盐缓冲液（PBS）洗两次，加入质量体积比为 1% 的牛血清白蛋白（BSA）封闭。磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤两次后，用显微光谱仪测定三种光子晶体水凝胶薄膜的反射峰，将三种包被过的编码水凝胶薄膜混合，得到不同特异性的非标记多元免疫检测用水凝胶薄膜。

2. 将混合后的三种编码水凝胶薄膜，加入到 100ul 待测血清中，37℃ 孵育 30 分钟，吸去反应液，PBS 洗涤两次后测量三种水凝胶薄膜的反射光谱。

3. 通过反射峰位置也就是水凝胶的颜色以及所用水凝胶薄膜的形状来确定艾滋病病毒合成肽的水凝胶薄膜，乙型肝炎表面抗原的水凝胶薄膜，以及对照水凝胶薄膜。然后根据测得的反射峰位置与红移距离来判断艾滋病抗体以及乙型肝炎表面抗原抗体的含量

实施例 3

使用多元免疫水凝胶薄膜进行 TORCH（TORCH 是指可导致先天性宫内感

染及围产期感染而引起围产儿畸形的病原体，它是一组病原微生物的英文名称缩写，其中 T (Toxoplasma) 是弓形虫，R(Rubella.Virus) 是风疹病毒，C(Cytomegalo.Virus)是巨细胞，H(Herpes.Virus)即是单纯疱疹 I/II 型。) 诊断：

1. 分别在 5 种不同颜色的三角形或圆形等形状的光子晶体水凝胶水凝胶薄膜上固定 T.gondii, Rubella virus, CMV, HSV Type II 抗原和对照牛血清白蛋白，用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗两次，加入质量体积比为 1% 的牛血清白蛋白 (BSA) 封闭，磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤两次后，测得反射峰位置，将 5 种编码水凝胶薄膜混合得到不同特异性的多元非标记免疫检测水凝胶薄膜。

2. 将混合后的 5 种编码水凝胶薄膜，加入到 100ul 待测血清中，37℃ 孵育 30 分钟，吸去反应液，PBS 洗涤两次后测量水凝胶薄膜的反射峰位置，并分别与形状对应得到水凝胶薄膜的编码，同时根据反射峰的红移距离来判断待测分子的浓度。

实施例 4

使用光子晶体水凝胶薄膜进行四种肿瘤标记物 (AFP, CEA, CA125, CA199) 的检测：

1. 分别在不同颜色的三角形、圆形、正方形、星形和正五边形的光子晶体水凝胶薄膜上包 AFP, CEA, CA125, CA199 抗原和对照牛血清白蛋白，用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗两次，加入质量体积比为 1% 的牛血清白蛋白 (BSA) 封闭，磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤两次后，用显微光谱仪测定 5 种光子晶体水凝胶薄膜的反射峰，将 5 种包被过的编码水凝胶薄膜混合得到不同特异性的多元免疫水凝胶薄膜。

2. 将混合后的五种复合编码水凝胶薄膜，加入到 100ul 待测血清中，37℃ 孵育 30 分钟，吸去反应液，PBS 洗涤两次后测量 5 种不同形状、颜色水凝胶薄膜的反射峰。

3. 分别结合颜色与形状，对应得到水凝胶薄膜的编码，同时根据反射峰的红移距离来判断待测分子的浓度。

实施例 5

使用光子晶体水凝胶薄膜进行冠心病的检测：

1. 分别在红色三角形、蓝色圆形、绿色正方形的光子晶体水凝胶薄膜上包 C-reactive protein (CRP) and interleukin-6 (IL-6) 抗原和对照牛血清白蛋白, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗两次, 加入质量体积比为 1% 的牛血清白蛋白 (BSA) 封闭, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤两次后, 将 3 种包被过的编码水凝胶薄膜混合得到不同特异性的多元免疫水凝胶薄膜。

2. 将混合后的 3 种复合编码水凝胶薄膜, 加入到 100ul 待测血清中, 37℃ 孵育 30 分钟, 吸去反应液, PBS 洗涤两次后测量 3 种不同形状、颜色的水凝胶的反射峰。

3. 分别与形状对应得到水凝胶薄膜的编码, 同时根据反射峰的红移距离来判断待测分子的浓度。

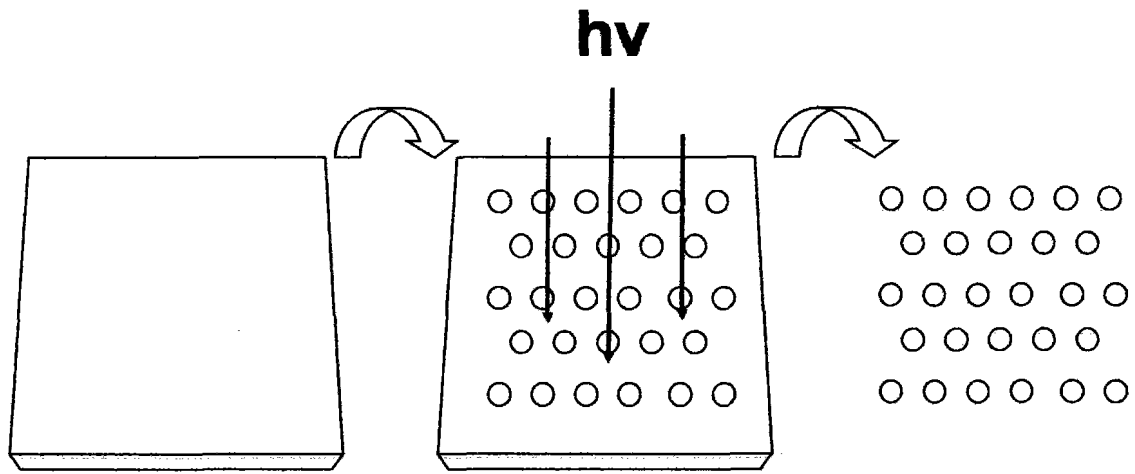


图 1

专利名称(译)	以颜色和形状复合编码的水凝胶非标记多元免疫检测方法		
公开(公告)号	CN101368949A	公开(公告)日	2009-02-18
申请号	CN200810124479.4	申请日	2008-07-08
[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	赵祥伟 扈靖 赵远锦 李娟 赵文举 顾忠泽		
发明人	赵祥伟 扈靖 赵远锦 李娟 赵文举 顾忠泽		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532		
代理人(译)	叶连生		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种以颜色及形状复合编码的水凝胶非标记多元免疫检测方法，该方法采用具有编码的光子晶体水凝胶薄膜，使抗体或者抗原与光子晶体水凝胶薄膜结合，抗体或者抗原的种类用光子晶体水凝胶薄膜的编码来标识，通过多种利用光子晶体水凝胶薄膜标识的抗体或者抗原，同时非标记检测同一个待测样品中相应的抗原或者抗体，待检测分子的有无或者多少由光子晶体水凝胶薄膜的反射峰位移反应。这种以颜色及形状复合编码的水凝胶非标记多元免疫检测方法不用对生物分子进行标记，只需要比较反应前后的反射光谱就可以同时测定待测分子的种类和浓度，具有灵敏度高，检测通量大，操作简单，检测成本低廉等优点。

