



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104089950 B

(45)授权公告日 2017.12.26

(21)申请号 201410338965.1
 (22)申请日 2014.07.16
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 104089950 A
 (43)申请公布日 2014.10.08
 (73)专利权人 国家纳米科学中心
 地址 100190 北京市海淀区中关村北一条11号
 (72)发明人 蒋兴宇 鲜于运雷
 (74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
 11332
 代理人 巩克栋
 (51)Int.Cl.
 G01N 21/76(2006.01)
 G01N 33/53(2006.01)
 G01N 33/569(2006.01)

CN 102269758 A,2011.12.07,
 CN 101435778 A,2009.05.20,
 CN 102621134 A,2012.08.01,
 CN 102323312 A,2012.01.18,
 CN 102269760 A,2011.12.07,
 WO 2011/150541 A1,2011.12.08,
 KR 10-1324026 B1,2013.11.13,
 鲜于运雷.Enzymatic Assay for Cu(II)
 with Horseradish Peroxidase and Its
 Application in Colorimetric Logic Gate.<
 analytical chemistry>.2013,第85卷(第15
 期),
 周阳.Visual Detection of Copper(II)
 by Azide- and Alkyne-Functionalized Gold
 Nanoparticles Using Click Chemistry.<
 Angewandte Chemie>.2008,第47卷(第52期),

审查员 张若剑

(56)对比文件
 CN 102495207 A,2012.06.13,

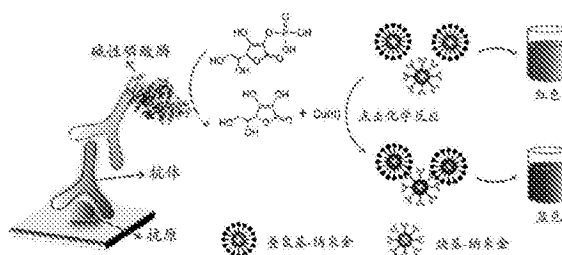
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种可视化检测抗原-抗体反应的方法及其
应用

(57)摘要

本发明涉及一种可视化检测抗原-抗体反应的方法及其应用,所述方法利用酶催化底物反应产生具有还原性的产物,其将二价铜离子还原成一价铜离子,通过表面功能化的金纳米粒子和一价铜催化的点击化学反应来可视化地分析酶的含量;结合酶标记抗体技术,将酶标记的抗体用于抗原-抗体相互作用的免疫分析中,利用所述可视化分析酶含量的方法达到可视化分析抗原-抗体相互作用的目的;将所述方法用于临床样本中相关抗原抗体的可视化检测。本发明仅靠肉眼即可完成对抗原-抗体反应的检测,具有灵敏度高,操作简单,成本低,稳定性好等优点。



1. 一种可视化检测抗原-抗体反应的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1) 抗原抗体反应:将酶标记的抗体加入到包被的待检测样品中,充分反应后洗涤去除未反应的酶标记抗体;所述待检测样品为人抗肺炎支原体IgG;所述酶标记的抗体为一抗或二抗;

(2) 酶催化底物反应:向步骤(1)反应体系中加入酶的底物,使酶和底物充分反应;所述酶的底物为磷酸化抗坏血酸;所述酶为碱性磷酸酶;所述酶的底物浓度为1-500mM;所述酶与底物反应的时间为5-180分钟;

(3) 可视化检测:向步骤(2)反应体系中加入二价铜离子和表面功能化的金纳米粒子,充分反应后根据反应体系颜色的变化判断样品中是否发生反应;所述加入的表面功能化的金纳米粒子为表面炔基功能化的金纳米粒子和表面叠氮基功能化的金纳米粒子的组合;所述二价铜离子为硫酸铜、硝酸铜或氯化铜中的任意一种;所述二价铜离子的浓度为0.01-10mM;所述反应体系的颜色变化在10-15分钟内出现。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤(1)之前还包括对待检测样品进行封闭的步骤。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述封闭采用的试剂为动物血清。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述封闭采用的试剂为胎牛血清。

5. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述封闭时间为30-120分钟,封闭温度为25-40℃。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述封闭时间为60分钟;封闭温度为37℃。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤(1)中,所述抗原抗体反应的孵育时间为30-120分钟,孵育温度为25-40℃。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,在步骤(1)中,所述孵育时间为60分钟,孵育温度为37℃。

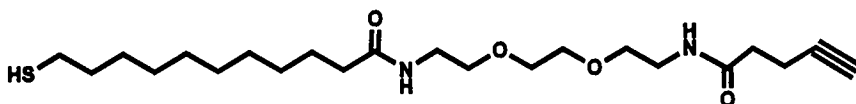
9. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤(2)中,所述酶的底物浓度为20mM。

10. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤(2)中,所述酶与底物反应的时间为60分钟。

11. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤(3)中,所述二价铜离子为硫酸铜。

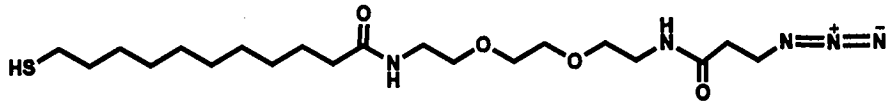
12. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤(3)中,所述二价铜离子的浓度为0.5mM。

13. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤(3)中,所述表面炔基功能化的金纳米粒子的炔基为包含化学式I的化合物:



I。

14. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤(3)中,所述表面叠氮基功能化的金纳米粒子的叠氮基为包含化学式II的化合物:



II.

15. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤(3)中,所述表面叠氮基功能化的金纳米粒子和表面炔基功能化的金纳米粒子的摩尔比为1:(0.5-2)。

16. 根据权利要求15所述的方法,其特征在于,在步骤(3)中,所述表面叠氮基功能化的金纳米粒子和表面炔基功能化的金纳米粒子的摩尔比为1:1。

17. 根据权利要求1-16任一项所述的方法在用于非诊断或治疗目的的人抗肺炎支原体IgG的可视化检测中的应用。

一种可视化检测抗原-抗体反应的方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析技术领域。具体涉及一种检测抗原-抗体反应的方法及其应用,尤其涉及一种可视化检测抗原-抗体反应的方法及其应用。

背景技术

[0002] 免疫标记分析方法是将免疫反应的高特异性和生物标记的高灵敏性结合在一起而发展出来的生物分析方法。这一分析方法不仅灵敏度高、特异性强、重复性好、准确性高,而且操作简单,易于商品化和自动化。

[0003] 免疫标记分析方法的应用范围极其广泛,可以测定内分泌激素、蛋白质、核酸、细胞表面抗原、肿瘤标志物等各种具有生物活性的物质,对基础医学研究和临床医学发展起到了促进作用。按照不同标记物可以分为放射性免疫分析、酶免疫分析、荧光免疫分析、化学发光免疫分析、胶体金免疫分析等。

[0004] 其中,酶免疫标记操作简便,使用成本低廉,目前在临床医学诊断中应用最为广泛。虽然被广泛应用于实验研究和临床诊断,但是现有的酶联免疫分析方法需要使用酶标仪来进行检测信号的读出,对仪器的依赖性限制了其在条件落后及不发达地区的开展和应用。

[0005] 因此,发展一种简单有效、便于开展和无需仪器读出的免疫分析方法有着重大的需求,这对改善条件落后和不发达地区的医疗诊断状况具有十分重要的意义。

[0006] 纳米技术是当前的热门研究领域,纳米材料在生物医学研究中扮演着越来越重要的角色。由于其独特的光学性质,不同聚集状态的金纳米粒子在可见光范围内呈现不同的颜色,这为发展肉眼可视化的生化分析检测方法提供了良好的平台。

[0007] 目前,对于可视化检测抗原-抗体反应的方法已有诸多相关专利申请公开,例如,CN102269758A公开了一种可视化检测抗原抗体反应的方法、试剂盒及其应用,其主要是采用氧化铜纳米颗粒标记抗体技术达到可视化检测的目的;CN101639476A公开了一种可视化结核抗体检测蛋白芯片、制备方法及应用,其利用的主要是蛋白芯片技术和免疫金银染色读出方法;CN103645185A和CN103713134A都披露了一种可视化检测碱性磷酸酶的方法,均采用碱性磷酸酶可以诱导金属银单质沉积到纳米金表面形成金核银壳结构的特点实现可视化检测;CN101504416A公开了一种金包覆磁粒原位引发高灵敏化学发光检测大肠杆菌的新方法,该发明的重点在于表面覆盖金的磁性纳米颗粒的制备以及化学发光方法的读出;等等。

[0008] 蒋兴宇等报道了通过合成表面功能化的金纳米粒子,利用一价铜催化的点击化学反应来检测溶液中的二价铜离子(参考文献:Yang Zhou, Shixing Wang, Ke Zhang, Xingyu Jiang. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 7454-7456)。与传统的仪器分析方法相比,利用金纳米粒子结合点击化学反应进行铜离子检测的方法具有快速简便、选择性好、灵敏度高、成本低廉的特点,适合现场实时检测。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种检测抗原-抗体反应的方法及其应用,特别是一种可视化检测抗原-抗体反应的方法及其应用。

[0010] 为达到此发明目的,本发明采用以下技术方案:

[0011] 一方面,本发明提供一种可视化检测抗原-抗体反应的方法,该方法包括以下步骤:

[0012] (1) 抗原抗体反应:将酶标记的抗体加入到包被的待检测样品中,充分反应后洗涤去除未反应的酶标记抗体;

[0013] (2) 酶催化底物反应:向步骤(1)反应体系中加入酶的底物,使酶和底物充分反应;

[0014] (3) 可视化检测:向步骤(2)反应体系中加入二价铜离子和表面功能化的金纳米粒子,充分反应后根据反应体系颜色的变化判断样品中是否发生反应。

[0015] 作为优选技术方案,在步骤(1)之前还包括对待检测样品进行封闭的步骤,该处理的目的是标记的抗体能够与待检测样品进行充分而稳定的反应。

[0016] 优选地,所述封闭试剂为动物血清,例如可以是胎牛血清、山羊血清或马血清中的任意一种,进一步优选地,所述封闭试剂为胎牛血清。

[0017] 优选地,所述封闭时间为30-120分钟,封闭温度为25-40℃;进一步优选地,所述封闭时间为60分钟;封闭温度为37℃。

[0018] 作为优选技术方案,在步骤(1)中,所述酶为辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酶(ALP),优选为碱性磷酸酶(ALP)。

[0019] 优选地,所述酶标记的抗体为一抗或二抗。

[0020] 优选地,所述抗原-抗体反应的孵育时间为30-120分钟,孵育温度为25-40℃;进一步优选地,所述孵育时间为60分钟,孵育温度为37℃。

[0021] 作为优选技术方案,在步骤(2)中,所述酶的底物为磷酸化抗坏血酸、磷酸化柠檬酸、磷酸化抗坏血酸钠或磷酸化柠檬酸钠中的任意一种;优选为磷酸化抗坏血酸钠。

[0022] 优选地,所述酶的底物浓度为1-500mM,优选为20mM。

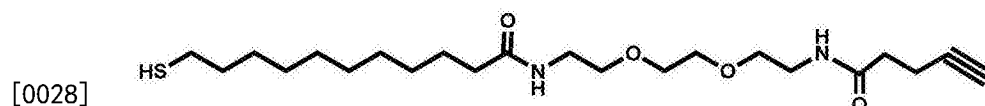
[0023] 优选地,所述酶与底物反应的时间为5-180分钟,优选为60分钟。

[0024] 作为优选技术方案,在步骤(3)中,所述二价铜离子为硫酸铜、硝酸铜或氯化铜中的任意一种,优选为硫酸铜。

[0025] 优选地,所述二价铜离子的浓度为0.01-10mM,优选为0.5mM。

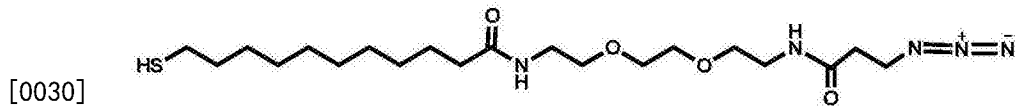
[0026] 作为优选技术方案,在步骤(3)中,所述加入的表面功能化的金纳米粒子为表面炔基功能化的金纳米粒子和表面叠氨基功能化的金纳米粒子的组合。

[0027] 优选地,所述表面炔基功能化的金纳米粒子的炔基为包含化学式I的化合物:



I。

[0029] 优选地,所述表面叠氨基功能化的金纳米粒子的叠氨基为包含化学式II的化合物:



II。

[0031] 优选地,所述表面叠氮基功能化的金纳米粒子和表面炔基功能化的金纳米粒子的摩尔比为1:(0.5-2),优选为1:1。

[0032] 作为优选技术方案,在步骤(3)中,所述反应体系的颜色变化在5-30分钟内出现,优选为10-15分钟。

[0033] 作为优选技术方案,所述待检测样品包括临床检测样品;优选地,所述待检测样品为人抗肺炎支原体IgG。

[0034] 另一方面,本发明提供所述可视化检测抗原抗体反应的方法在生物医学和/或医学检验中的应用,例如可以是免疫相关疾病的检测和诊断中的应用,优选地,所述免疫相关疾病为病毒引起的免疫相关疾病等。

[0035] 作为优选技术方案,将所述方法用于人抗肺炎支原体IgG的可视化检测。

[0036] 本发明的可视化检测抗原-抗体反应的原理在于:首先,利用酶催化底物反应产生具有还原性的抗坏血酸或柠檬酸等,它能将二价铜离子还原成一价铜离子,通过表面功能化的金纳米粒子和一价铜催化的点击化学反应来可视化地分析碱性磷酸酶的含量;结合酶标记抗体技术,将碱性磷酸酶标记的抗体用于抗原-抗体相互作用的免疫分析中,利用上述可视化分析碱性磷酸酶的方法可达到可视化分析抗原-抗体相互作用的目的(图1),通过肉眼观察金纳米粒子的溶液颜色从红色变成蓝色或紫色,从而实现对待检测样品中抗原抗体反应的可视化检测。

[0037] 与现有技术相比,本发明至少具有以下有益效果:

[0038] 1、与现有的酶标记免疫分析方法相比,本发明利用了一价铜催化的点击化学反应和表面功能化的金纳米粒子,由于金纳米粒子在可见光范围内(400nm-800nm)有较强的表面等离子体共振吸收峰,所以仅靠肉眼即可完成对抗原-抗体反应的检测,从而摆脱了对酶标仪等仪器设备的依赖。

[0039] 2、与现有的酶标记免疫分析方法相比,本发明不需要进行额外的复杂操作,如抗体的标记等,只是改变现有方法的读出方式即可实现更加便捷的结果读出;另外,由于本发明对碱性磷酸酶的检出限低(0.2U/L),因此在采用酶标抗体进行免疫分析时可以达到更高的灵敏度。

[0040] 3、本发明的检测方法操作流程简单,成本低,稳定性好,便于开展,有望在资源匮乏和落后地区应用。

附图说明

[0041] 图1是本发明的酶促点击化学反应可视化检测抗原-抗体反应原理图

[0042] 图2是反应体系中不同物质对点击化学反应的影响

[0043] 图3是不同浓度的碱性磷酸酶与纳米金溶液颜色变化的关系图

[0044] 图4是本发明的点击化学方法用于可视化检测人的抗肺炎支原体IgG的结果图

具体实施方式

[0045] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0046] 实施例1

[0047] 表面炔基功能化金纳米粒子的合成

[0048] 利用氯金酸还原法制备纳米金,将所得到的纳米金在高速离心机下离心,然后收集沉淀,将沉淀分散在水和叔丁醇的混合溶剂中(水:叔丁醇=2:1)。将4mL上述纳米金溶液分散于16mL的水和叔丁醇的混合溶剂中(水:叔丁醇=2:1),然后加入50 μ L的氢氧化钠(0.5M),调节pH值为9,在搅拌状态下加入100 μ L的末端炔基功能化的硫醇配体(10mM)和30 μ L的末端硫醇结尾的聚乙二醇(200mM),配体交换24小时后得到表面炔基功能化的金纳米粒子。

[0049] 实施例2

[0050] 表面叠氮基功能化金纳米粒子的合成

[0051] 利用氯金酸还原法制备纳米金,将所得到的纳米金在高速离心机下离心,然后收集沉淀,将沉淀分散在水和叔丁醇的混合溶剂中(水:叔丁醇=2:1)。将4mL上述纳米金溶液分散于16mL的水和叔丁醇的混合溶剂中(水:叔丁醇=2:1),然后加入50 μ L的氢氧化钠(0.5M),调节pH值为9,在搅拌状态下加入100 μ L的末端叠氮基功能化的硫醇配体(10mM)和30 μ L的末端硫醇结尾的聚乙二醇(200mM),配体交换24小时后得到表面叠氮基功能化的金纳米粒子。

[0052] 实施例3

[0053] 反应体系中不同物质对点击化学反应的影响

[0054] 将表面炔基功能化和表面叠氮基功能化的金纳米粒子按照1:1的比例混合备用。分别在金纳米粒子的混合液中加入二价铜离子,二价铜离子与抗坏血酸,二价铜与磷酸化抗坏血酸,碱性磷酸酶,二价铜与磷酸化抗坏血酸和碱性磷酸酶,反应一段时间后观察并记录溶液颜色的变化,结果见图2。

[0055] 从图2可以看出,分别加入二价铜离子,二价铜离子与磷酸化抗坏血酸,碱性磷酸酶时,溶液呈红色;分别加入二价铜与抗坏血酸,二价铜与磷酸化抗坏血酸和碱性磷酸酶时,溶液呈蓝色。该结果说明碱性磷酸酶可以催化磷酸化抗坏血酸的水解,将其去磷酸化产生具有还原性的抗坏血酸,后者作为还原剂与二价铜反应产生一价铜,从而触发一价铜催化的点击化学反应和功能化纳米金粒子的聚集。

[0056] 实施例4

[0057] 表面功能化的金纳米粒子对碱性磷酸酶的检测

[0058] 将碱性磷酸酶(购自Sigma公司)稀释成一系列不同浓度梯度,酶催化底物反应体系的组成如下:20 μ L不同浓度的碱性磷酸酶,20 μ L的磷酸化抗坏血酸,60 μ L的Tris-HCl缓冲液,在37 $^{\circ}$ C反应1小时。取上述反应后的溶液20 μ L,加入20 μ L的二价铜离子(5mM),加入表面炔基功能化和表面叠氮基功能化的金纳米粒子,使体系中的碱性磷酸酶的终浓度为0.2U/L到20U/L,反应5-10分钟,观察记录溶液颜色的变化,结果见图3。

[0059] 从图3可以看出,在磷酸化抗坏血酸和二价铜存在的条件下,不同终浓度的碱性磷

酸酶会导致功能化纳米金粒子的紫外-可见吸收光谱发生明显的变化,在宏观上表现为溶液颜色的变化。空白对照的检测体系没有发生颜色变化,含有终浓度为0.2U/L到20U/L的碱性磷酸酶检测体系溶液从红色变成蓝色。因此,该检测体系实现了对碱性磷酸酶的检测,从而间接地实现了对碱性磷酸酶标记抗体的检测,并且检测结果可通过肉眼进行判断。此外,该结果也显示了本发明对碱性磷酸酶的最低检出限可达到0.2U/L。

[0060] 实施例5

[0061] 人抗肺炎支原体IgG的可视化检测

[0062] 在包被有肺炎支原体抗原的96孔板(购自欧蒙公司)中加入100 μ L 500倍稀释的阳性样本血清、阴性样本血清和空白对照(Tris-HCl缓冲液),37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。洗板后加入100 μ L碱性磷酸酶标记的兔抗人IgG(购自Jackson Immuno),37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。洗板后加入50 μ L磷酸化抗坏血酸,37 $^{\circ}$ C孵育1小时。然后取20 μ L反应后的产物用于测定,测定步骤同上述实施例4,观察记录溶液颜色的变化,结果见图4。

[0063] 从图4可以看出,阴性样本和空白对照中的溶液颜色没有发生变化(红色),而含有阳性样本血清的溶液变成紫色。这是由于抗原-抗体特异性识别和相互作用的结果,阳性样本血清中含有能与肺炎支原体抗原特异性结合的抗体,通过加入碱性磷酸酶标记的兔抗人IgG从而导致酶促点击化学反应的产生,纳米金溶液颜色由红色变为蓝色。而阴性样本和空白对照中不含有与肺炎支原体抗原特异性结合的抗体,因此不会导致酶促点击化学反应的产生,纳米金溶液颜色仍为红色。因此,通过肉眼进行判断即可实现对人的抗肺炎支原体IgG的检测。

[0064] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的工艺方法,但本发明并不局限于上述工艺步骤,即不意味着本发明必须依赖上述工艺步骤才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明所选用原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

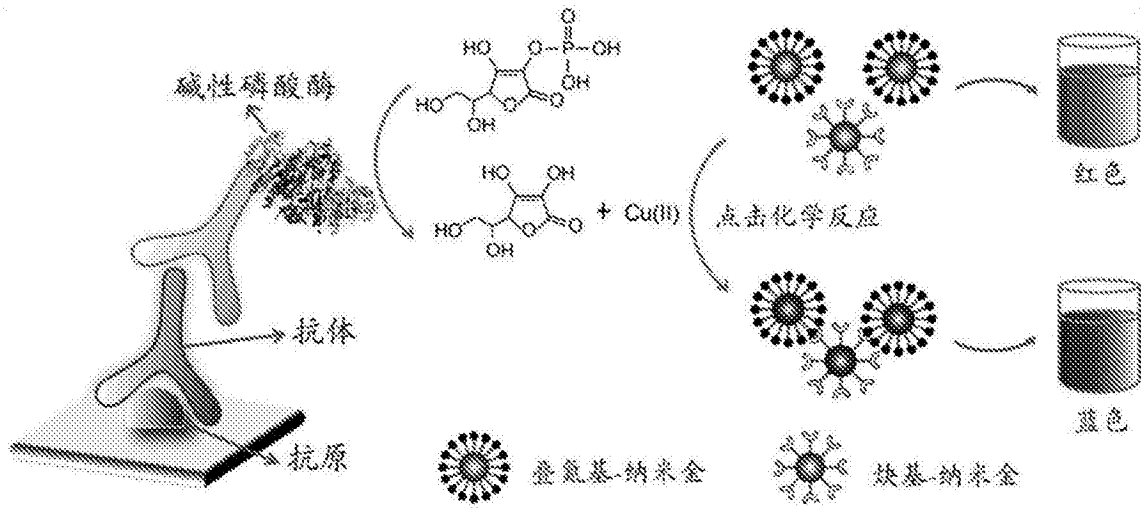


图1

	红色	蓝色	红色	红色	蓝色
二价铜	√	√	√		√
抗坏血酸		√			
磷酸化抗坏血酸			√		√
碱性磷酸酶				√	√

图2

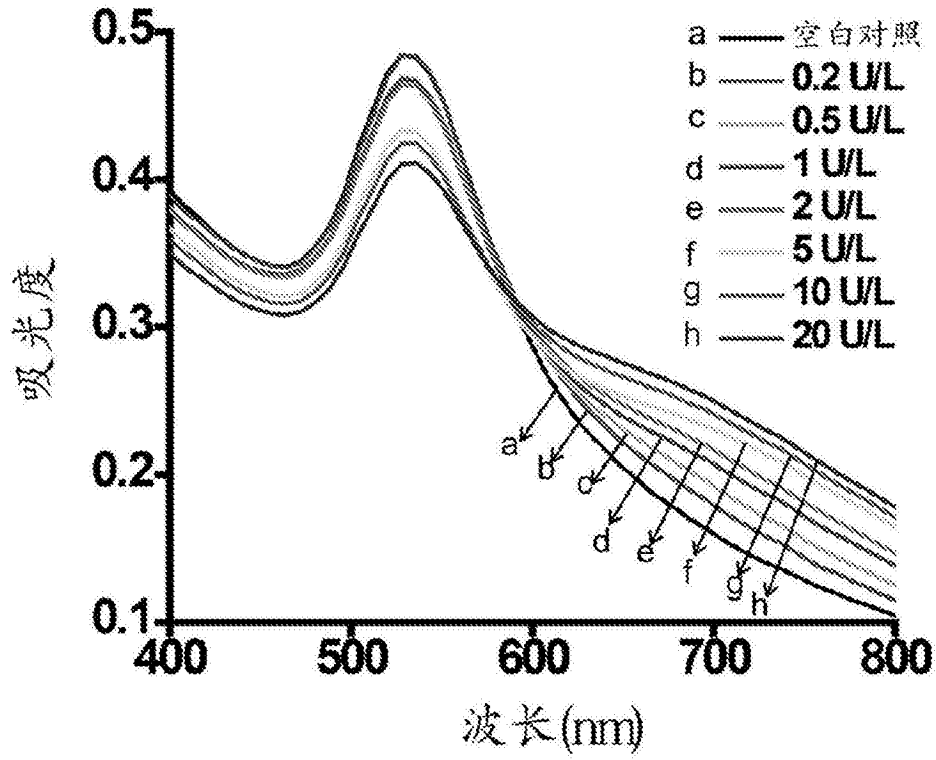


图3

点击化学方法	红色	棕色	红色	黑色	紫色	紫色	紫色
肺炎支原体抗原	√	√	√	√	√	√	√
牛血清白蛋白	√	√	√	√	√	√	√
阳性样本血清				P1	P2	P3	P4
阴性样本血清		N1	N2				
碱性磷酸酶免疫人IgG	√	√	√	√	√	√	√

图4

专利名称(译)	一种可视化检测抗原-抗体反应的方法及其应用		
公开(公告)号	CN104089950B	公开(公告)日	2017-12-26
申请号	CN201410338965.1	申请日	2014-07-16
[标]申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
当前申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
[标]发明人	蒋兴宇 鲜于运雷		
发明人	蒋兴宇 鲜于运雷		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/53 G01N33/569		
其他公开文献	CN104089950A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种可视化检测抗原-抗体反应的方法及其应用，所述方法利用酶催化底物反应产生具有还原性的产物，其将二价铜离子还原成一价铜离子，通过表面功能化的金纳米粒子和一价铜催化的点击化学反应来可视化地分析酶的含量；结合酶标记抗体技术，将酶标记的抗体用于抗原-抗体相互作用的免疫分析中，利用所述可视化分析酶含量的方法达到可视化分析抗原-抗体相互作用的目的；将所述方法用于临床样本中相关抗原抗体的可视化检测。本发明仅靠肉眼即可完成对抗原-抗体反应的检测，具有灵敏度高，操作简单，成本低，稳定性好等优点。

