



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110045106 A

(43)申请公布日 2019.07.23

(21)申请号 201910315251.1

(22)申请日 2019.04.18

(71)申请人 桂林理工大学

地址 541004 广西壮族自治区桂林市七星区建干路12号

(72)发明人 张云 刘召应 聂瑾芳 黄锦坤

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

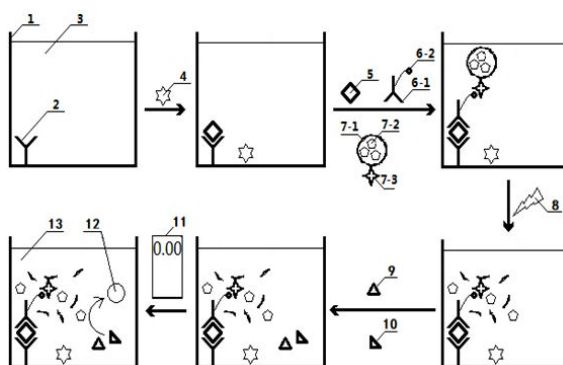
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种免仪器酶联免疫吸附测定方法

(57)摘要

本发明公开了一种免仪器酶联免疫吸附测定方法。该方法通过在96孔板中进行抗原-抗体特异性免疫反应,捕获样本中的分析物抗原或抗体,随后引入纳米颗粒催化氯金酸-还原剂之间生成纳米金的反应,并使用手表或手机记录混合溶液呈现红色所需的时间,该时间与样品中目标抗原或抗体的浓度呈负相关,即完成免仪器酶联免疫吸附测定。本发明使用随处可见的手表或手机进行信号读取,降低了定量分析的成本。它还协同使用脂质体包裹大量纳米颗粒以及它们对氯金酸被还原剂还原生成纳米金反应的高效催化活性,放大单个抗原-抗体特异性结合反应的响应信号,提高了检测灵敏度。



1. 一种免仪器酶联免疫吸附测定方法,其特征在于具体步骤为:

步骤一,在96孔板中固定抗体或抗原;

步骤二,封闭96孔板的剩余活性位点;

步骤三,依次加入样品溶液、生物素标记的抗体或二抗、链霉亲和素标记的包裹了具有催化活性的纳米颗粒的脂质体探针;

步骤四,超声作用下裂解脂质体以释放催化活性纳米颗粒,随后加入氯金酸和还原剂的混合水溶液,在催化活性纳米颗粒的催化作用下,氯金酸被还原剂快速还原生成纳米金,通过目视观测溶液颜色变化,同时使用手表或手机记录自加入氯金酸和还原剂的混合水溶液到混合溶液完全呈现红色所需的时间,该时间与样品中目标抗原或抗体的浓度呈负相关;

所述步骤一中的抗体或抗原在96孔板中的固定方式为物理吸附和共价结合中的一种;

所述步骤二中的96孔板的剩余活性位点的封闭过程通过加入封闭试剂溶液来实现,封闭试剂在96孔板中的固定方式与抗体或抗原在96孔板中的固定方式一样,其作用是完全封闭96孔板的剩余活性位点,避免后续加入到样品中的抗原或抗体、生物素标记的抗体或二抗、链霉亲和素标记的包裹了具有催化活性的纳米颗粒的脂质体探针在96孔板表面产生非特异性吸附影响;

所述步骤三中的三种溶液是依次加入,通过抗原-抗体特异性免疫反应,样品中的抗体或抗原在被96孔板上的抗原或抗体特异性捕获后,进一步结合生物素标记的抗体或二抗,随后在生物素-亲和素反应下,将链霉亲和素标记的包裹了催化活性的纳米颗粒的脂质体探针捕获到96孔板表面;

所述步骤四中的超声作用裂解脂质体探针,所有被捕获到96孔板表面的脂质体都完全裂解,所有被包裹的纳米颗粒完全被释放到溶液中;

所述具有催化活性的纳米颗粒是金属纳米颗粒、无机纳米颗粒和有机纳米颗粒中的一种,能够高效催化氯金酸-还原剂之间的氧化还原反应,快速还原生成外观颜色为红色的纳米金溶液。

一种免仪器酶联免疫吸附测定方法

技术领域

[0001] 本发明属于酶联免疫吸附测定(Enzyme-Linked Immune-Sorbent Assay,简称为ELISA)技术领域,具体涉及一种免仪器酶联免疫吸附测定方法。

背景技术

[0002] 酶联免疫吸附测定(ELISA)方法是以免疫学反应为基础,将抗体、抗原的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合的一种具有高特异性和高灵敏度的实验技术。根据样品中待测目标物的种类及性质不同,可以设计出各种不同类型的ELISA方法,包括抗体夹心法、抗原夹心法、竞争法、间接法及捕获包被法等。自1971瑞典斯德哥尔摩大学的Engvall和Perlmann首次建立酶联免疫吸附测定方法,经过40余年的不断发展和完善,ELISA方法已经被广泛应用于临床诊断、医学研究、食品安全、环境监测等诸多领域。目前传统的ELISA方法主要借助酶标仪、荧光仪等光学分析仪器实现目标物的定量检测。但是,这些光学仪器价格较为昂贵且体积庞大,导致传统ELISA方法的分析成本较高,同时不能用于现场分析和即时检测(Point-of-Care Testing,POCT)。此外,在一些重要的应用方面,例如,疾病的早期诊断,还需要进一步提高ELISA方法的检测灵敏度。

发明内容

[0003] 本发明的目的是针对现有技术的不足,提供一种免仪器酶联免疫吸附测定方法。

[0004] 本发明的思路:一方面,使用常见的价格低廉的手表或手机代替酶标仪、荧光仪等传统的光学分析仪器进行信号读取,降低定量分析的成本。另一方面,使用脂质体包裹大量的纳米颗粒,进而结合这些纳米颗粒对氯金酸被还原剂还原生成纳米金反应的高效催化活性,放大在96孔板上进行的单个抗原-抗体结合反应的响应信号,从而显著提高检测灵敏度。

[0005] 具体步骤为:

步骤一,在96孔板中固定抗体或抗原。

[0006] 步骤二,封闭96孔板的剩余活性位点。

[0007] 步骤三,依次加入样品溶液、生物素标记的抗体或二抗、链霉亲和素标记的包裹了具有催化活性的纳米颗粒的脂质体探针。

[0008] 步骤四,超声作用下裂解脂质体以释放催化活性纳米颗粒,随后加入氯金酸和还原剂的混合水溶液,在催化活性纳米颗粒的催化作用下,氯金酸被还原剂快速还原生成纳米金,通过目视观测溶液颜色变化,同时使用手表或手机记录自加入氯金酸和还原剂的混合水溶液到混合溶液完全呈现红色所需的时间,该时间与样品中目标抗原或抗体的浓度呈负相关。

[0009] 所述步骤一中的抗体或抗原在96孔板中的固定方式为物理吸附和共价结合中的一种。

[0010] 所述步骤二中的96孔板的剩余活性位点的封闭过程通过加入封闭试剂溶液来实

现,封闭试剂在96孔板中的固定方式与抗体或抗原在96孔板中的固定方式一样,其作用是完全封闭96孔板的剩余活性位点,避免后续加入到样品中的抗原或抗体、生物素标记的抗体或二抗、链霉亲和素标记的包裹了具有催化活性的纳米颗粒的脂质体探针在96孔板表面产生非特异性吸附影响。

[0011] 所述步骤三中的三种溶液是依次加入,通过抗原-抗体特异性免疫反应,样品中的抗体或抗原在被96孔板上的抗原或抗体特异性捕获后,进一步结合生物素标记的抗体或二抗,随后在生物素-亲和素反应下,将链霉亲和素标记的包裹了催化活性的纳米颗粒的脂质体探针捕获到96孔板表面。

[0012] 所述步骤四中的超声作用裂解脂质体探针,所有被捕获到96孔板表面的脂质体都完全裂解,所有被包裹的纳米颗粒完全被释放到溶液中。

[0013] 所述具有催化活性的纳米颗粒是金属纳米颗粒、无机纳米颗粒和有机纳米颗粒中的一种,能够高效催化氯金酸-还原剂之间的氧化还原反应,快速还原生成外观颜色为红色的纳米金溶液。

[0014] 与现有的ELISA方法相比,本发明的突出优点在于:1)使用价格低廉的手表或手机进行信号读取,在降低分析成本的同时,还可实现样品现场分析和POCT检测;2)在保持传统ELISA方法良好特异性的同时,协同使用脂质体包裹大量纳米颗粒以及它们对氯金酸被还原剂还原生成纳米金反应的高效催化活性,放大单个抗原-抗体特异性结合反应的响应信号,显著提高检测灵敏度;3)与现有ELISA方法完全兼容,可直接推广应用于尿液、血液、血清、唾液、水等各种溶液样品中目标物的定量检测,在临床诊断、医学研究、食品安全、环境监测等领域具有广阔的应用前景。

附图说明

[0015] 图1为本发明的免仪器酶联免疫吸附测定方法的原理示意图。采用的是双抗体夹心法检测目标物抗原。

[0016] 图中标记:1—96孔板上的一个孔;2—抗体;3—无色溶液;4—封闭剂(牛血清白蛋白);5—目标物抗原;6-1—生物素标记抗体上的抗体;6-2—生物素标记抗体上的生物素;7-1—脂质体;7-2—包裹在脂质体内的纳米颗粒(纳米铜颗粒);7-3—标记在脂质体表面的链霉亲和素;8—超声作用;9—氯金酸;10—还原剂(抗坏血酸);11—手机;12—纳米金;13—红色溶液。

[0017] 图2为本发明实施例1中使用本发明的免仪器酶联免疫吸附测定方法检测1 pg/mL人癌基因蛋白质(Human Oncogene Protein,HOP)p190/bcr-abl抗原时所记录的时间值(Time)与空白样品(blank)所得时间值的比较。

[0018] 图3为本发明实施例2中使用本发明的免仪器酶联免疫吸附测定方法检测一系列不同浓度的HOP抗原时所记录的时间值(Time)与HOP浓度的Log值(LogC_{HOP})之间的工作曲线。

具体实施方式

[0019] 下面以基于双抗体夹心法免疫反应模式检测HOP抗原(模型目标物)的ELISA方法为例,在该方法中利用手机进行信号读取,并通过协同使用脂质体包裹大量纳米颗粒以及

它们对氯金酸被还原剂还原生成纳米金反应的高效催化活性来提高检测灵敏度。以下实施例将对本发明予以进一步的说明,但并不因此而限制本发明。

[0020] 实施例1:

使用本发明的免仪器酶联免疫吸附测定方法检测1 pg/mL HOP抗原和空白样品(blank,不含分析物的缓冲溶液)。如图1所示,本实施例的具体步骤为:

步骤一,往96孔板上的一个孔中加入100 μ L 0.2 mg/mL HOP抗体(12 mM碳酸氢钠-碳酸钠缓冲溶液配制,pH 9.5),冰箱4 $^{\circ}$ C下静置过夜。弃去液体,甩干。将每个孔加满洗涤液(10 mM磷酸二氢钠-磷酸氢二钾缓冲溶液,pH 7.2),静置40 s后弃去,如此重复5次后将孔倒置在平铺的卷筒纸上拍干。

[0021] 步骤二,往单个孔加入100 μ L 15 mg/mL牛血清白蛋白(BSA)(12 mM碳酸氢钠-碳酸钠缓冲溶液配制,pH 9.5),室温下静置5 h。弃去液体,甩干。随后加满洗涤液,静置30 s后弃去,如此重复5次后将孔倒置在平铺的卷筒纸上拍干。

[0022] 步骤三,往单个酶标孔依次加入100 μ L 1 pg/mL HOP抗原样品溶液(10 mM磷酸二氢钠-磷酸氢二钾缓冲溶液配制,pH 7.2)、100 μ L 0.1 mg/mL生物素标记的HOP抗体(10 mM磷酸二氢钠-磷酸氢二钾缓冲溶液配制,pH 7.2)以及100 μ L 0.1 mg/mL链霉亲和素标记的包裹了纳米铜颗粒(粒径约为10 nm)的脂质体(粒径约为300 nm)探针悬浊液(10 mM磷酸二氢钠-磷酸氢二钾缓冲溶液配制,pH 7.2),轻微震荡混匀后置于37 $^{\circ}$ C反应1 h,弃去液体,甩干,将每个孔加满洗涤液,静置30 s后弃去,如此重复5次后将孔倒置在平铺的卷筒纸上拍干。

[0023] 步骤四,往孔加入100 μ L 10 mM磷酸二氢钠-磷酸氢二钾缓冲溶液(pH 7.2),超声器中超声处理20 s后继续加入100 μ L 500 μ M氯金酸和1 mM抗坏血酸混合水溶液。

[0024] 步骤五,当加入抗坏血酸水溶液后,用手机开始计时,且当混合溶液完全呈现红色后停止计时。

[0025] 此外,根据相同的步骤,将方法用于分析空白样品(blank,不含分析物的缓冲溶液),即10 mM磷酸二氢钠-磷酸氢二钾缓冲溶液(pH 7.2),并使用手机记录最终混合溶液变红的时间。

[0026] 从图2可以看出,与检测空白样品所得的溶液变红时间值(Time)相比,检测1 pg/mL HOP抗原所得的溶液变红时间值有了显著降低。这是因为,通过抗原-抗体、生物素-亲和素之间的特异性反应,链霉亲和素标记的包裹了具有催化活性的纳米铜颗粒的脂质体探针被捕获到96孔板表面。纳米铜颗粒被释放出来后,可高效催化氯金酸与抗坏血酸之间的氧化还原反应,从而导致混合溶液因快速生成的大量的纳米金而在更短的时间内显示出红色。图2中的对比实验结果表明,本发明的免仪器酶联免疫吸附测定方法切实可行。

[0027] 实施例2:

使用本发明的免仪器酶联免疫吸附测定方法检测浓度范围为0.1 fg/mL~100 pg/mL的HOP抗原。如图1所示,本实施例的具体步骤为:

步骤一,往96孔板上的一个孔中加入100 μ L 0.2 mg/mL HOP抗体(12 mM碳酸氢钠-碳酸钠缓冲溶液配制,pH 9.5),冰箱4 $^{\circ}$ C下静置过夜。弃去液体,甩干。将每个孔加满洗涤液(10 mM磷酸二氢钠-磷酸氢二钾缓冲溶液,pH 7.2),静置40 s后弃去,如此重复5次后将孔倒置在平铺的卷筒纸上拍干。

[0028] 步骤二,往单个孔加入100 μL 15 mg/mL牛血清白蛋白(BSA)(12 mM碳酸氢钠-碳酸钠缓冲溶液配制,pH 9.5),室温下静置5 h。弃去液体,甩干。随后加满洗涤液,静置30 s后弃去,如此重复5次后将孔倒置在平铺的卷筒纸上拍干。

[0029] 步骤三,往单个酶标孔依次加入100 μL 含有某一浓度HOP抗原的样品溶液(10 mM磷酸二氢钠-磷酸氢二钾缓冲溶液配制,pH 7.2)、100 μL 0.1 mg/mL生物素标记的HOP抗体(10 mM磷酸二氢钠-磷酸氢二钾缓冲溶液配制,pH 7.2)以及100 μL 0.1 mg/mL 链霉亲和素标记的包裹了纳米铜颗粒(粒径约为10 nm)的脂质体(粒径约为300 nm)探针悬浊液(10 mM磷酸二氢钠-磷酸氢二钾缓冲溶液配制,pH 7.2),轻微震荡混匀后置于37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1 h,弃去液体,甩干,将每个孔加满洗涤液,静置30 s后弃去,如此重复5次后将孔倒置在平铺的卷筒纸上拍干。

[0030] 步骤四,往孔加入100 μL 10 mM磷酸二氢钠-磷酸氢二钾缓冲溶液(pH 7.2),超声器中超声处理20 s后继续加入100 μL 500 μM 氯金酸和1 mM抗坏血酸混合水溶液。

[0031] 步骤五,当加入抗坏血酸水溶液后,用手机开始计时,且当混合溶液完全呈现红色后停止计时。

[0032] 将从所有的HOP抗原样品得到的溶液变红时间值(Time)对HOP浓度的Log值($\text{Log}C_{\text{HOP}}$)作图(图3),即完成HOP的免仪器ELISA检测。由图3可知,随着HOP浓度的增加,相应的溶液变红时间值逐渐降低。这是因为,当样品中HOP浓度较大时,通过抗原-抗体、生物素-亲和素之间的特异性反应,被捕获到96孔板表面的链霉亲和素标记的包裹了具有催化活性的纳米铜颗粒的脂质体探针的数量也会越多。此时,被释放的纳米铜颗粒的数量也越多,随之催化氯金酸与抗坏血酸之间的氧化还原反应的速率也会更快,从而使得混合溶液变红的时间也更短。

[0033] 此外,图3显示,利用手机记录所得的溶液变红时间值(Time)与HOP浓度的Log值($\text{Log}C_{\text{HOP}}$)在1 fg/mL~ 10 pg/mL范围内呈现良好的线性关系。而传统的基于价格昂贵且体积庞大的酶标仪的ELISA分析HOP样品时的线性检测范围是10 ~ 160 pg/mL。基于溶液变红时间量测策略的ELISA方法表现出更好的检测灵敏度主要归因于一个脂质体中可包裹大量的纳米铜颗粒,同时这些金属颗粒对氯金酸被还原剂还原生成纳米金反应具有极高的催化活性,从而放大了单个抗原-抗体特异性结合反应的响应信号。

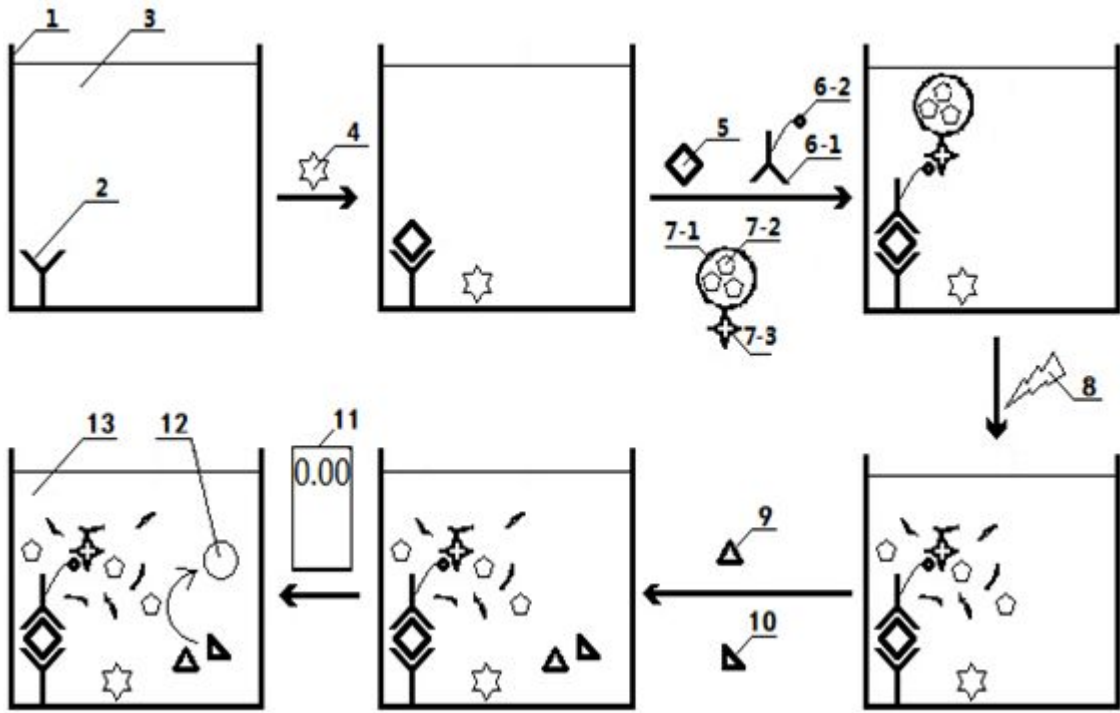


图 1

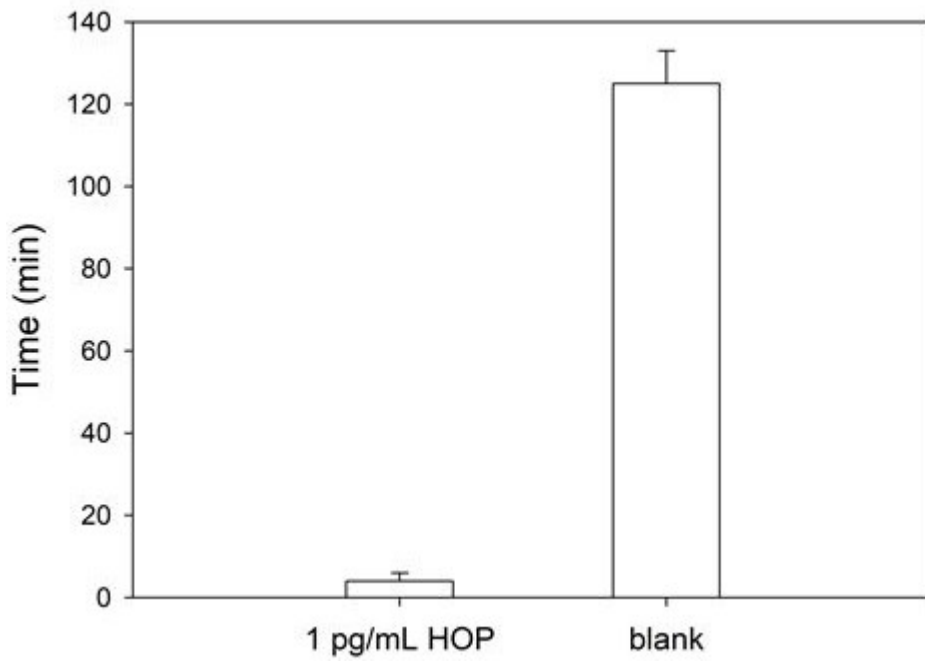


图 2

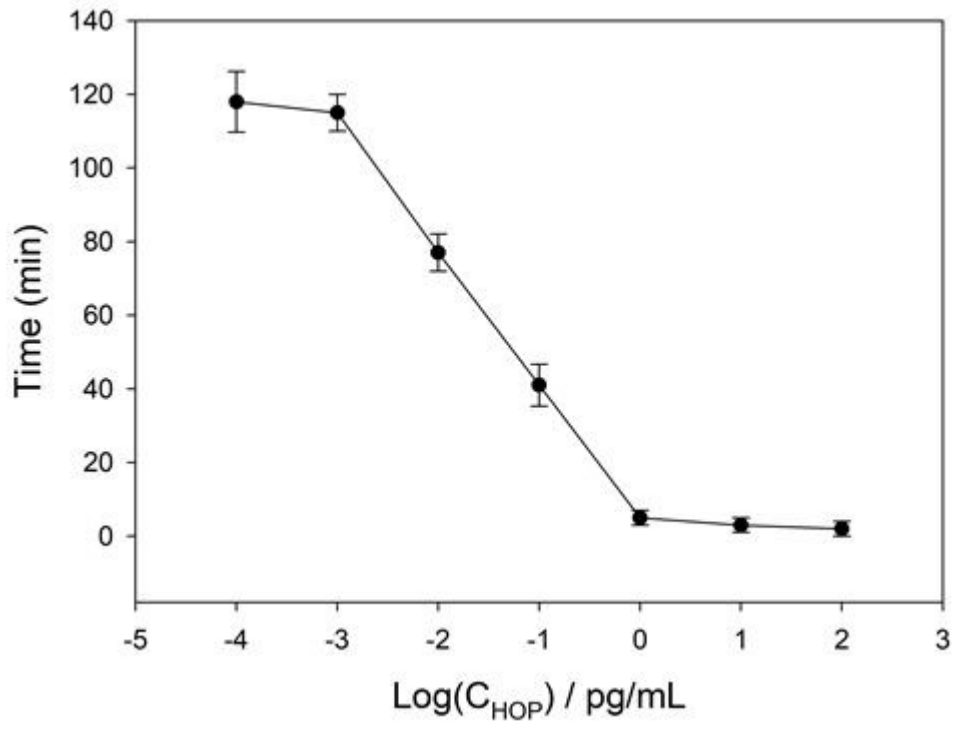


图 3

专利名称(译)	一种免仪器酶联免疫吸附测定方法		
公开(公告)号	CN110045106A	公开(公告)日	2019-07-23
申请号	CN201910315251.1	申请日	2019-04-18
[标]申请(专利权)人(译)	桂林理工大学		
申请(专利权)人(译)	桂林理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	桂林理工大学		
[标]发明人	张云 聂瑾芳 黄锦坤		
发明人	张云 刘召应 聂瑾芳 黄锦坤		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/5306		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种免仪器酶联免疫吸附测定方法。该方法通过在96孔板中进行抗原-抗体特异性免疫反应，捕获样本中的分析物抗原或抗体，随后引入纳米颗粒催化氯金酸-还原剂之间生成纳米金的反应，并使用手表或手机记录混合溶液呈现红色所需的时间，该时间与样品中目标抗原或抗体的浓度呈负相关，即完成免仪器酶联免疫吸附测定。本发明使用随处可见的手表或手机进行信号读取，降低了定量分析的成本。它还协同使用脂质体包裹大量纳米颗粒以及它们对氯金酸被还原剂还原生成纳米金反应的高效催化活性，放大单个抗原-抗体特异性结合反应的响应信号，提高了检测灵敏度。

