



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108008123 B

(45)授权公告日 2020.06.30

(21)申请号 201711226111.4

(22)申请日 2017.11.23

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108008123 A

(43)申请公布日 2018.05.08

(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 吴晓春 阿迪蒂亚·萨兰 张会
纪英露 李海芸

(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 33/53(2006.01)

(56)对比文件

CN 103645315 A,2014.03.19,

CN 103645315 A,2014.03.19,

CN 101706504 A,2010.05.12,

CN 104502614 A,2015.04.08,

Zhihong Xuan,et al.Plasmonic ELISA

based on the controlled growth of silver nanoparticles.《Nanoscale》.2016,第8卷

Xiaona Hu,et al.Rod-shaped Au@PtCu nanostructures with enhanced peroxidase-like activity and their ELISA application.《Chin. Sci. Bull.》.2014,第59卷(第21期),

Xiaona Hu,et al.Rod-shaped Au@PtCu nanostructures with enhanced peroxidase-like activity and their ELISA application.《Chin. Sci. Bull.》.2014,第59卷(第21期), (续)

审查员 许珊萍

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

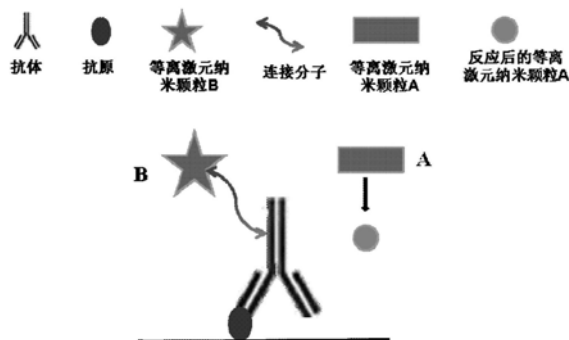
(54)发明名称

一种全等离激元酶联免疫吸附试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明提出一种全等离激元酶联免疫吸附检测的概念,公开了一种新型全等离激元酶联免疫吸附试剂盒及其应用,并用实施例展示了该概念的可行性。所述试剂盒主要包括:等离激元纳米颗粒(A)、等离激元纳米颗粒(B)和检测抗体;其中,等离激元纳米颗粒(A)有显色功能,等离激元纳米颗粒(B)有催化功能,检测抗体与等离激元纳米颗粒(B)相结合组成纳米酶标记抗体。本发明利用等离激元纳米酶调控具有显色功能的等离激元纳米颗粒的生长、刻蚀或聚集,实现生物分子的超灵敏探测,显色底物和酶的选择和调

控更为多样,检测灵敏度显著提高,稳定性和环境耐受性更高,具有广阔的应用前景和市场价格。



[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Jianbo Liu, et al. Au@Pt core/shell nanorods with peroxidase- and ascorbate oxidase-like activities for improved detection of glucose.《Sensors and Actuators B》.2012,第166-167卷

Roberto de la Rica and Molly M. Stevens. Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye.《NATURE NANOTECHNOLOGY》.2012,第7卷

1. 一种全等离激元酶联免疫吸附试剂盒,其特征在于,主要包括:

- (1) 银纳米颗粒生长溶液,用于生长等离激元纳米颗粒A;
- (2) 等离激元纳米颗粒B;和
- (3) 检测抗体;

其中,所述等离激元纳米颗粒A具有显色功能,为银纳米颗粒;所述等离激元纳米颗粒B具有催化功能,为具有类抗坏血酸酶活性的Au@PtCu核壳纳米颗粒;所述检测抗体与等离激元纳米颗粒B相结合构成纳米酶标记抗体。

2. 一种制备如权利要求1所述试剂盒的方法,其特征在于,包括如下步骤:

- (1) 制备Au@PtCu核壳纳米颗粒;
- (2) 制备银纳米颗粒生长溶液;
- (3) 将Au@PtCu核壳纳米颗粒、银纳米颗粒生长溶液、检测抗体和其他ELISA的常规试剂组装为试剂盒。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,步骤(1)所述Au@PtCu核壳纳米颗粒的制备方法包括如下步骤:

(1') 配制NaBH₄储备液,将其加入含有HAuCl₄的CTAB溶液,搅拌后静置至NaBH₄分解,制备金晶种;

(2') 将步骤(1')得到的金晶种与K₂PtCl₄、CuCl₂和抗坏血酸混合均匀,加入NaOH并剧烈搅拌启动PtCu壳层的生长反应,得到的产物进行超离纯化,得到所述Au@PtCu核壳纳米颗粒。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,步骤(1')所述的金晶种的直径为2.8-3.2nm。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,步骤(1')所述的金晶种的直径为3nm。

6. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,步骤(1')所述金晶种的摩尔浓度为(1.5-2.5) × 10⁻⁷M。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,步骤(1')所述金晶种的摩尔浓度为2 × 10⁻⁷M。

8. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,步骤(2')所述反应的时间为30-50min。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,步骤(2')所述反应的时间为39min。

10. 一种如权利要求1所述试剂盒用于全等离激元酶联免疫吸附测定的应用。

11. 一种如权利要求1所述试剂盒在检测生物分子中的应用。

一种全等离激元酶联免疫吸附试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,主要涉及一种新型全等离激元酶联免疫吸附试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 酶联免疫吸附测定(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是生物大分子定量的主要方法,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敏感性的实验技术。

[0003] 表面等离激元(surface plasmons, SPs)是金属纳米结构中自由电子的共振振荡,具有一系列新奇的光学性质,例如对光的选择性吸收和散射、局域电场增强、电磁波的亚波长束缚等。随着纳米加工和制备技术以及理论模拟分析手段的发展,人们对表面等离激元的机理和应用的研究逐渐广泛和深入,其在生物、化学、能源、信息等领域具有重要的应用前景。

[0004] 近些年,随着纳米颗粒模拟酶(也称纳米酶, Nanozymes)的迅速发展,利用纳米颗粒取代传统ELISA中的起信号放大作用的天然酶(如辣根过氧化物酶)的新型ELISA模式不断涌现,展示了纳米技术与传统生物技术相结合在超灵敏生物分子探测领域广阔的应用前景。例如,金纳米棒@铂铜合金(AuNR@PtCu)核壳结构纳米颗粒表现出类过氧化物酶活性,可以在室温下高效催化双氧水氧化常见的过氧化物酶底物(TMB, OPD, ABTS等)。将探测抗体修饰AuNR@PtCu用于传统ELISA,可实现IgG纳克量级的探测。2012年, Stevens课题组将传统ELISA中的显色底物从传统的有机小分子变成金纳米颗粒,利用酶催化纳米颗粒生长造成的颜色变化进行显色,展示了血清中低至 10^{-18} g mL⁻¹前列腺特异性抗原的检测。他们将该方法命名为等离激元ELISA。

[0005] 但上述现有技术均存在可调控性不高,环境耐受性和稳定性较差的缺点。因此,开发一种新型的酶联免疫试剂盒,提高ELISA检测的灵敏度、环境耐受性、稳定性和适用性具有十分重要的现实意义。

发明内容

[0006] 本发明提出了一种全等离激元酶联免疫吸附测定的概念,利用等离激元纳米酶调控具有显色功能的等离激元纳米颗粒的生长、刻蚀或聚集来实现生物分子的超灵敏探测;在此基础上公开了一种新型全等离激元酶联免疫吸附试剂盒及其应用,表明了本发明的可行性。本发明提供的试剂盒操作与传统ELISA高度兼容,检测灵敏度更高,动态范围更宽,环境耐受性更好,因而具有广阔的应用前景和 market 价值。

[0007] 第一方面,本发明提供一种新型全等离激元酶联免疫吸附试剂盒,所述试剂盒主要包括:等离激元纳米颗粒A、等离激元纳米颗粒B和检测抗体;其中,等离激元纳米颗粒A有显色功能,等离激元纳米颗粒B有催化功能,检测抗体与等离激元纳米颗粒B相结合为纳米酶标记抗体。

[0008] 发明人在充分研究现有技术的基础上,进行高度总结和概况,提出一种新型的酶联免疫吸附测定方法(概念原理图见图1),将传统酶联免疫吸附测定方法中的两个重要组成部分:起显色作用的有机小分子底物和起信号放大作用的酶分别换成了具有显色功能和催化功能的等离激元纳米颗粒来实现生物分子的超灵敏探测,制备成试剂盒并实践成功,与传统酶联免疫吸附测定试剂盒相比,该方法显色底物和酶的选择和调控更为多样,检测灵敏度显著提高,动态范围更宽。

[0009] 优选地,所述等离激元纳米颗粒A包括等离激元吸收位于可见光谱区的纳米颗粒及其杂化结构,优选为金纳米颗粒和/或银纳米颗粒,进一步优选为银纳米颗粒。

[0010] 优选地,所述等离激元纳米颗粒B包括具有催化功能的纳米颗粒及其杂化结构,优选为具有类抗坏血酸酶活性的Au@PtCu核壳纳米颗粒。

[0011] 第二方面,本发明提供一种制备如第一方面所述试剂盒的方法,包括如下步骤:

[0012] (1) 制备可以调控纳米颗粒生长的等离激元纳米颗粒B;

[0013] 优选地,所述等离激元纳米颗粒B为有类抗坏血酸酶活性的小尺寸Au@PtCu核壳纳米颗粒。

[0014] (2) 制备等离激元吸收可发生明显变化的纳米颗粒A;

[0015] 优选地,所述纳米颗粒A优选为金纳米颗粒和/或银纳米颗粒,进一步优选为银纳米颗粒。

[0016] (3) 将Au@PtCu核壳纳米颗粒、银纳米颗粒生长溶液、检测抗体和其他ELISA的常规试剂组装为试剂盒。

[0017] 优选地,步骤(1)所述Au@PtCu核壳纳米颗粒的制备方法包括如下步骤:

[0018] (1') 配制NaBH₄储备液,将其加入含有HAuCl₄的CTAB溶液,搅拌后静置至NaBH₄分解,制备金晶种;

[0019] (2') 将步骤(1')得到的金晶种与K₂PtCl₄、CuCl₂和抗坏血酸混合均匀,加入NaOH并剧烈搅拌启动PtCu壳层的生长反应,得到的产物进行超离纯化,得到所述Au@PtCu核壳纳米颗粒。

[0020] 本发明中制备了具有类抗坏血酸酶活性的小尺寸Au@PtCu核壳纳米颗粒,其催化溶解氧化抗坏血酸;后者用于还原银离子形成等离激元吸收在400纳米附近的银纳米颗粒,抗体标记的抗坏血酸纳米酶消耗抗坏血酸,影响银纳米颗粒在400纳米附近的等离激元吸收,利用该吸收值的变化可以检测抗原,探测限可达阿克量级。

[0021] 优选地,步骤(1')所述的金晶种的直径为2.8-3.2nm,例如可以是2.8nm、2.9nm、3.0nm、3.1nm或3.2nm,优选为3nm。

[0022] 优选地,步骤(1')所述金晶种的摩尔浓度为 $(1.5-2.5) \times 10^{-7}M$,例如可以是 $1.5 \times 10^{-7}M$ 、 $2.0 \times 10^{-7}M$ 或 $2.5 \times 10^{-7}M$,优选为 $2 \times 10^{-7}M$ 。

[0023] 优选地,步骤(2')所述反应的时间为30-50min,例如可以是30min、32min、34min、36min、39min、40min、45min或50min,优选为39min。

[0024] 第三方面,本发明提供一种如第一方面所述试剂盒用于全等离激元酶联免疫吸附测定的应用。

[0025] 第四方面,本发明提供一种如第一方面所述试剂盒在检测生物分子的应用。

[0026] 与现有技术相比,本发明具有如下优点:

[0027] (1) 本发明提供的试剂盒与传统ELISA操作方法高度兼容,将天然酶换成具有酶催化功能的等离激元纳米颗粒,组成和结构可调控性高,催化活性可调控范围宽,温度和环境耐受性显著增强,弥补了天然酶因其蛋白组成稳定性较低的不足;等离激元纳米颗粒合成方法简便,原材料价格低,可回收利用,因而性价比高于天然酶;显色底物换成具有显色功能的等离激元纳米颗粒,显色范围宽,显色模式多。

[0028] (2) 本发明提供的试剂盒应用于酶联免疫吸附测定中,与传统酶联免疫吸附测定方法相比,显色底物和酶的选择和调控更为多样,检测灵敏度显著提高,具有广阔的应用前景和巨大的市场价值。

附图说明

[0029] 图1是本发明的全等离激元酶联免疫吸附测定概念原理图;

[0030] 图2为本发明实施例1的试剂盒工作原理图;

[0031] 图3为本发明实施例2中检测人IgG结果图。

具体实施方式

[0032] 为进一步阐述本发明所采取的技术手段及其效果,以下结合附图并通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案,但本发明并非局限在实施例范围内。

[0033] 实施例1

[0034] 1具有催化功能的等离激元纳米颗粒B的制备

[0035] (1.1) 制备金晶种

[0036] 将0.19149g NaBH_4 溶于50mL超纯水中配制成0.1M NaBH_4 储备液(在冰水浴中配置)。反应前,将该储备液在冰水浴中稀释成10mM NaBH_4 反应液。将7.5mL 0.1M的CTAB溶液加入到25mL圆底烧瓶,并用超纯水稀释至9.4mL。随后将烧瓶放置于30℃的水浴中,在磁搅拌下加入100 μL HAuCl_4 (25mM) 混合均匀后迅速加入600 μL 从冰水浴中取出的 NaBH_4 (10mM) 溶液。继续搅拌3分钟后静置30分钟以上让过量的 NaBH_4 分解,得到尺寸为3纳米的金晶种,摩尔浓度为 $2 \times 10^{-7}\text{M}$,新合成的金晶种需在2-5h内使用。

[0037] (1.2) 制备Au@PtCu核壳颗粒

[0038] 将37.5 μL K_2PtCl_4 (2mM), 120 μL CuCl_2 (10mM) 和67.5 μL 抗坏血酸(AA, 0.1M) 加入到1mL金晶种溶液中混合均匀。之后,在剧烈搅拌条件下加入5 μL NaOH (2M) 启动PtCu壳层的生长反应,39分钟后将反应产物通过超离进行纯化。

[0039] 2制备银纳米颗粒生长溶液

[0040] 将900 μL CTAB和900 μL AgNO_3 加入10mL H_2O 中,混合均匀得到银纳米颗粒生长溶液。

[0041] 3Au@PtCu核壳颗粒标记羊抗人IgG

[0042] 将0.5 μL 的L-半胱氨酸(Cys, 10mM) 加入到400 μL 纯化的Au@PtCu颗粒胶体溶液,在30℃的水浴中孵化30分钟,得到Au@PtCu@Cys之后,加入0.82 μL 氮-琥珀星氩氨-3 (2-吡啶二硫代)-酸酯(SPDP, 10mg/mL) 继续孵化30分钟,得到Au@PtCu@Cys@SPDP。超离2次纯化Au@PtCu@Cys@SPDP并用超纯水分散。之后,加入1 μL 羊抗人IgG (1mg/mL) 中在30℃孵化30分钟,得到标记了羊抗人IgG的Au@PtCu纳米酶,超离2次后用PBS缓冲液分散备用。

[0043] 将以上组分:标记抗体的具有抗坏血酸酶活性的Au@PtCu核壳颗粒、银纳米颗粒生长溶液和酶联免疫常规试剂:PBS缓冲溶液,清洗溶液和封闭溶液,组装成试剂盒,试剂盒的工作原理如图2所示,将酶标检测抗体标记Au@PtCu核壳颗粒后,加入到已经孵化抗原的多孔板进行反应,反应后清洗多次,再加入抗坏血酸和银纳米颗粒生长溶液,抗坏血酸还原银离子形成等离激元吸收在400纳米附近的银纳米颗粒,具有抗坏血酸酶活性的Au@PtCu核壳纳米颗粒催化氧气氧化抗坏血酸,影响银纳米颗粒在400纳米附近的等离激元吸收,利用该吸收值的变化可以检测抗原,探测限可达阿克量级。

[0044] 实施例2

[0045] (1) 抗原孵化和标准曲线样品的制备

[0046] 将人IgG (10 μ g/ μ L) 储备液配制成不同浓度的人IgG溶液。将1 μ L储备液加入到1mL 0.05M PBS缓冲液中,混匀后得到10ng/ μ L人IgG溶液。将100 μ L储备液加入到900 μ L 0.05M PBS缓冲液中得到1ng/ μ L人IgG溶液。类似的,制备出100pg/ μ L、10pg/ μ L和1pg/ μ L的人IgG溶液。用0.05M pH 7.4的PBS缓冲液将聚苯乙烯多孔板冲洗三次。将不同浓度的人IgG溶液接种到不同孔中,每个浓度三个样品,在4 $^{\circ}$ C孵化过夜。之后,将多孔板用pH 8的清洗液清洗3次。之后,加入200 μ L封闭液(1%BSA的清洗液)室温放置2小时封闭非特异性反应位点,最后用pH=8的清洗液将多孔板清洗3次。

[0047] (2) 全等离激元免疫吸附法检测人IgG

[0048] 将100 μ L纳米酶标抗体加入到多孔板的孔中,在室温下孵化4小时。之后,将多孔板用清洗液(pH=8)清洗3次,用超纯水清洗2次。在每个孔中加入50 μ L新配的碱性AA溶液(10mL 2.88mM AA溶液中加入50 μ L 2M NaOH)。之后,将200 μ L新配的银纳米颗粒生长溶液加入到每个孔中,10分钟后记录银纳米颗粒在400纳米处的吸收值,结果如图3所示。

[0049] 由图3可知,本发明提供的试剂盒及其应用的探测限可达阿克量级,探测范围 $2.5 \times 10^{-9} \sim 100$ ng/ μ L。

[0050] 综上所述,本发明提出一种全等离激元酶联免疫吸附检测的概念,公开了一种新型全等离激元酶联免疫吸附试剂盒及其应用,并用实施例展示了该概念的可行性,创造性地将传统酶联免疫吸附测定方法中的两个重要组成部分:起显色作用的有机小分子底物和起信号放大作用的酶分别换成了具有显色功能和催化功能的等离激元纳米颗粒来实现生物分子的超灵敏探测,该试剂盒显色底物和酶的选择和调控更为多样,检测灵敏度显著提高,动态范围更宽。

[0051] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细方法,但本发明并不局限于上述详细方法,即不意味着本发明必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各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。

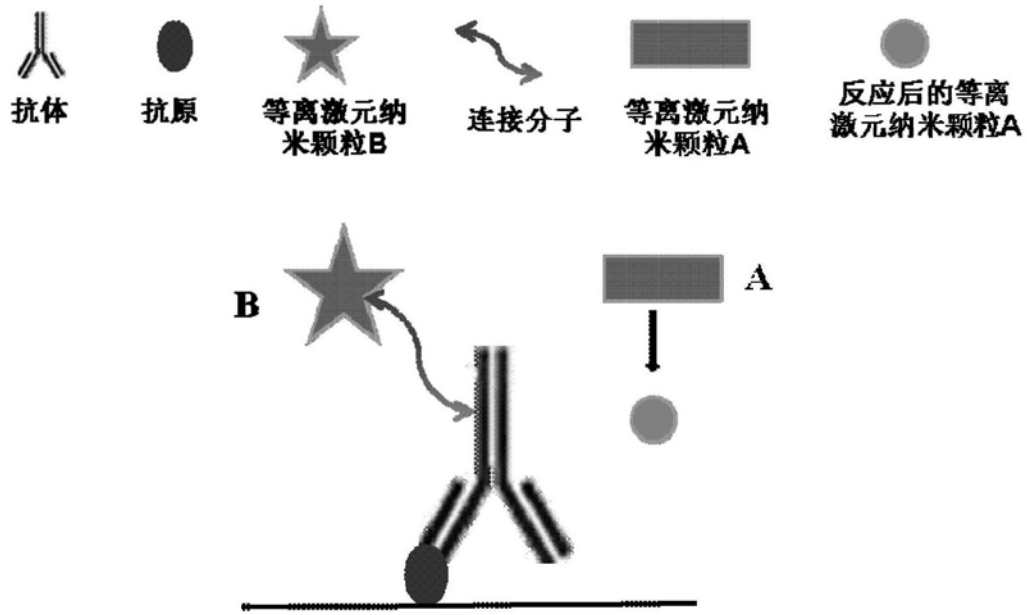


图1

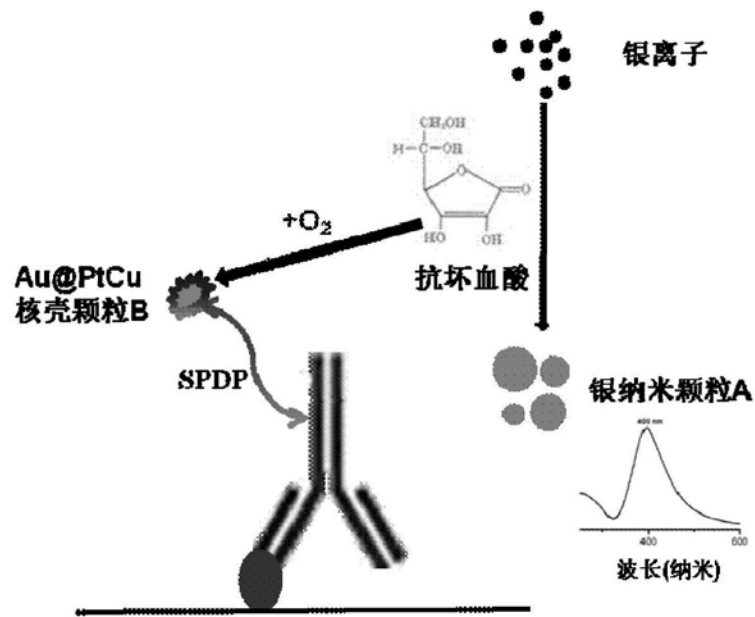


图2

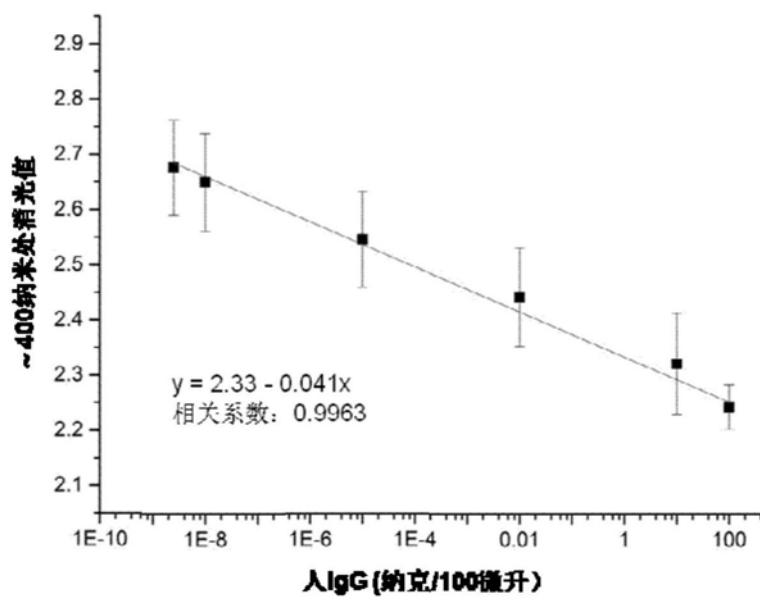


图3

专利名称(译)	一种全等离激元酶联免疫吸附试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN108008123B	公开(公告)日	2020-06-30
申请号	CN201711226111.4	申请日	2017-11-23
[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	吴晓春 阿迪蒂亚萨兰 张会 纪英露 李海芸		
发明人	吴晓春 阿迪蒂亚·萨兰 张会 纪英露 李海芸		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53		
其他公开文献	CN108008123A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提出一种全等离激元酶联免疫吸附检测的概念，公开了一种新型全等离激元酶联免疫吸附试剂盒及其应用，并用实施例展示了该概念的可行性。所述试剂盒主要包括：等离激元纳米颗粒(A)、等离激元纳米颗粒(B)和检测抗体；其中，等离激元纳米颗粒(A)有显色功能，等离激元纳米颗粒(B)有催化功能，检测抗体与等离激元纳米颗粒(B)相结合组成纳米酶标记抗体。本发明利用等离激元纳米酶调控具有显色功能的等离激元纳米颗粒的生长、刻蚀或聚集，实现生物分子的超灵敏探测，显色底物和酶的选择和调控更为多样，检测灵敏度显著提高，稳定性和环境耐受性更高，具有广阔的应用前景和市场价值。

