



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105067803 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201510430364. 8

(22) 申请日 2015. 07. 21

(71) 申请人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市鼓楼区汉口路
22 号

(72) 发明人 李根喜 李超 吴丹 卫璐明
黎天琪

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207
代理人 胡锡瑜

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种可视化多色检测抗原 - 抗体反应试剂盒
及使用方法

(57) 摘要

本发明属于免疫分析和诊断技术领域, 具体涉及一种可视化多色检测抗原 - 抗体反应试剂盒及使用方法。本发明所述试剂盒由标记了甲基红修饰石墨烯的 CEA 抗体, 标记了酚酞修饰石墨烯的 NSE 抗体, 标记了百里酚酞修饰石墨烯的 Cyfra21-1 抗体和包被有 CEA、NSE 和 Cyfra21-1 单抗混合物的 96 孔板, pH 值为 12.0 碱水, PBST 缓冲液组成。本发明所述试剂盒可同时多色检测 CEA、NSE 和 Cyfra21-1。本发明所述试剂盒操作简单, 效率高, 成本低, 便于在资源匮乏和落后地区使用。

1. 一种可视化多色检测抗原 - 抗体反应试剂盒,其特征是由标记了甲基红修饰石墨烯的 CEA 抗体,标记了酚酞修饰石墨烯的 NSE 抗体,标记了百里酚酞修饰石墨烯的 Cyfra21-1 抗体和包被有 CEA、NSE 和 Cyfra21-1 单抗混合物的 96 孔板,pH 值为 12.0 碱水,PBST 缓冲液组成。

2. 根据权利要求 1 所述一种可视化多色检测抗原 - 抗体反应试剂盒的使用方法,其特征是由以下步骤构成:

(1) 制备多抗体标记的 96 孔板:将多抗原的单抗以一定浓度比例混合后孵育 96 孔板,洗涤后再用胎牛血清或山羊血清或马血清进行封闭,封闭时间为 30 ~ 120 分钟,封闭温度为 25 ~ 40℃,处理的目的是为了使标记的抗体能够与待测样品充分而稳定的反应;

(2) 抗原抗体反应:向步骤(1)中加入待测样品,洗涤后加入修饰有变色小分子的石墨烯标记的抗体,充分反应后去除未反应的多余石墨烯标记的抗体,所述变色小分子为甲基红 MR 或酚酞 PP 或百里酚酞 TP 或溴甲酚紫 BP 或溴甲酚绿 BG;优选为 MR、PP 和 TP,MR、PP 和 TP 与石墨烯分子的质量比分别为 1:13.4 ~ 53.8,1:15.9 ~ 95.4,1:4.3 ~ 43,所述石墨烯标记的抗体为单抗或多抗,三种变色分子功能化石墨烯的抗体混合物中的浓度配比为 1.5:1:0.5,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℃;

(3) 可视化检测:向步骤(2)反应体系中加入碱性水,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,所述碱性水 pH 值为 10.0 ~ 13.0,用 20mM 氢氧化钠调配,所述反应体系的颜色变化在 3 ~ 15 分钟内出现。

3. 根据权利要求 1 所述一种可视化多色检测抗原 - 抗体反应试剂盒,其特征是可同时可视化检测多种抗原抗体反应。

一种可视化多色检测抗原 - 抗体反应试剂盒及使用方法

一、技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析和诊断技术领域,具体涉及一种可视化多色检测抗原 - 抗体反应试剂盒及使用方法。

二、背景技术

[0002] 酶联免疫吸附实验是将已知的抗原或抗体吸附在固相载体表面,使酶标记的抗原抗体反应在固相表面进行的技术。该技术可用于检测大分子抗原和特异性抗体等,具有反应快速,检测灵敏,操作简便,使用成本低廉,载体易于标准化等优点。

[0003] 虽然酶联免疫吸附实验有诸多优点,但是由于需要使用酶标记的抗体来实现信号转导与输出,导致其每次只能单色的检测一种物质,极大地限制了检测效率,而且使用的酶如辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶等易受到微生物或体内内源性氧化物酶或外源酶抑制剂(如叠氮化钠)的干扰,容易带来假阳性或假阴性的结果。最后,在低浓度目标分子存在下,往往需要 20 分钟以上的时间才可以读出可靠的结果,进一步延长了反应所需的时间。因此,现在存在对操作反应简单、体系稳定、可同时检测、灵敏度好,响应快速的免疫标记和检测技术的需求。

[0004] 目前,利用纳米材料开发可同时检测多种抗原的免疫检测方法是当前开发新型免疫传感器的一个热门方向,例如, Fan 小组报道了一种基于量子点的微流控平台来同时检测两种肿瘤标志物的方法,其利用的主要是微流控技术和具有不同发射光的量子点纳米颗粒(参考文献:Hu, M.; Yan, J., He, Y.; Lu, H., Weng, L., Song, S.; Fan, C., Wang, L. *Acs Nano*, 2010, 4, 488-494); Wang 小组报道了一种利用磁纳米颗粒的多通道微芯片来实现同时检测多种疾病标志物(参考文献:Gaster, R. S., Hall, D. A.; Nielsen, C. H., Osterfeld, S. J., Yu, H., Mach, K. E., Wilson, R. J., Murmann, B., Liao, J. C.; Gambhir, S. S., Wang, S. X. *Nat. Med.* 2009, 15, 1327-1332); Kelley 小组报道了一种采用基于电化学平台的检测抗原抗体反应的方法,其主要采用了多种贵金属纳米颗粒标记抗体和电化学溶出技术(参考文献:Wan, Y.; Zhou, Y., Poudineh, M., Safaei, T. S., Mohamadi, R. M., Sargent, E. H., Kelley, S. O. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 2014, 53, 13145-13149)。但是,可以同时多色可视化的检测出多种抗原抗体反应的免疫传感方法仍然处于探索阶段。

三、发明内容

[0005] 本发明需要解决的问题是提供一种可视化多色检测抗原 - 抗体反应试剂盒及使用方法。

[0006] 本发明所述试剂盒的由标记了甲基红修饰石墨烯的 CEA 抗体,标记了酚酞修饰石墨烯的 NSE 抗体,标记了百里酚酞修饰石墨烯的 Cyfra21-1 抗体和包被有 CEA、NSE 和 Cyfra21-1 单抗混合物的 96 孔板, pH 值为 12.0 碱水, PBST 缓冲液组成。

[0007] 本发明所述试剂盒的使用方法:

[0008] (1) 制备多抗体标记的 96 孔板:将多抗原的单抗以一定浓度比例混合后孵育 96

孔板,洗涤后再用胎牛血清或山羊血清或马血清进行封闭,封闭时间为 30 ~ 120 分钟,封闭温度为 25 ~ 40°C,处理的目的是为了使标记的抗体能够与待测样品充分而稳定的反应。

[0009] (2) 抗原抗体反应:向步骤 1) 中加入待测样品,洗涤后加入修饰有变色小分子的石墨烯标记的抗体,充分反应后去除未反应的多余石墨烯标记的抗体,所述变色小分子为甲基红 (MR),或酚酞 (PP) 或百里酚酞 (TP) 或溴甲酚紫 (BP) 或溴甲酚绿 (BG);优选为 MR、PP 和 TP,MR、PP 和 TP 与石墨烯分子的质量比分别为 1:(13.4 ~ 53.8),1:(15.9 ~ 95.4),1:(4.3 ~ 43)。所述石墨烯标记的抗体为单抗或多抗。三种变色分子功能化石墨烯的抗体混合物中的浓度配比为 1.5:1:0.5。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°C;

[0010] (3) 可视化检测:向步骤 2) 反应体系中加入碱性水,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,所述碱性水 pH 值为 10.0 ~ 13.0,用 20mM 氢氧化钠调配,所述反应体系的颜色变化在 3 ~ 15 分钟内出现。

[0011] 本发明的多色可视化检测抗原抗体反应的原理在于:当待测样品中存在作为检测目标的抗原或抗体时,标记了变色分子功能化石墨烯的抗体与待测样品中的抗原或抗体相结合,石墨烯上修饰的变色有机酸小分子因为碱水的加入而改变颜色,同时解离出氢离子有机酸溶解度的增加导致其可以被释放到碱水中,通过肉眼观察检测反应体系从无色变成有色,从而实现对待测样品中抗原抗体反应的可视化检测。同时,将不同的标记了变色分子功能化石墨烯的抗体以相应比例配合使用,可以达到同时可视化检测多种抗原抗体反应的目的(图 1)。

[0012] 本发明所述试剂盒可同时多色检测癌胚抗原 (CEA),神经元特异烯醇化酶 (NSE) 和细胞角蛋白 19 的可溶性片段 (Cyfra21-1) 和多种抗原抗体反应

[0013] 与现有技术相比,本发明至少具有以下有益效果:

[0014] 1、与现有的酶标记免疫分析方法相比,本发明利用了一种表面功能化的石墨烯分子,由于石墨烯分子超高的比表面积 ($2630\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$),可以吸附大量变色小分子,所以仅靠肉眼就可以完成对抗原或抗体的检测,从而摆脱了对酶标仪等仪器设备的依赖。

[0015] 2、与现有的酶标记免疫分析方法相比,标记了不同变色分子的石墨烯可修饰特定抗体分子,彼此相互搭配使用,可以实现同时多色检测不同的抗原-抗体反应。

[0016] 3、与现有的酶标记免疫分析方法相比,不仅颜色信号读出迅速,在 5 分钟之内就可以完成,而且反应体系稳定,不受外源酶或抑制剂的干扰。

[0017] 4、本发明的检测方法操作简单,效率高,成本低,便于在资源匮乏和落后地区使用。

四、附图说明

[0018] 图 1 是本发明的变色石墨烯分子可视化检测抗原-抗体反应原理图。

[0019] 图 2 是合成的三种变色分子功能化的石墨烯及其变色反应。

[0020] 图 3 是本发明用于可视化检 CEA、NSE、Cyfra21-1、CEA+NSE、CEA+Cyfra21-1 和 CEA+NSE+Cyfra21-1 的结果图。

五、具体实施方式

[0021] 下面通过具体实施方案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。

[0022] 实施例 1

[0023] (1) 三种标记了变色分子功能化石墨烯的抗体的合成

[0024] 称取 10mg 市售纳米氧化石墨烯(购于南京先丰公司),先加入 10mL 纯水,超声分散 0.5~1 小时。取 1mL 上述纳米氧化石墨烯溶液,先用 0.5M 的氢氧化钠调节 pH 值为 6.0,然后加入 4mg N-羟基琥珀酰亚胺和 2mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐于室温下低速震荡反应 20 分钟,所得的反应物在 13000rpm 的高速离心机下离心 10 分钟,将沉淀分散在 0.7mL pH 值为 8.0 的 PBS 缓冲液中。接着将浓度为 $0.1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗体稀释液 200 μL 加入到处理过的纳米羧基氧化石墨烯溶液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 低速震荡 6 小时后,向溶液中加入 100 μL 5% 的 BSA 溶液,BSA 溶液在这里起到封闭和稳定剂的作用,4 $^{\circ}\text{C}$ 低速震荡 2 小时后,8000~10000rpm 离心 5~15 分钟,去掉含有没有标记到石墨烯上蛋白质分子的上清液,然后再将离心管中的石墨烯沉淀用 10mL pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液重新分散。取 0.1mL 上述抗体标记的石墨烯分子,向其逐滴加入 100 μL 溶于 DMSO 中的 MR(1mM),或 PP(1mM) 或 TP(0.5mM),室温低速震荡 0.5 小时后,6000~8000rpm 离心 5~15 分钟,去除上清液,用 1mL pH 值为 7.4 的 PBS 缓冲液重新分散,这里得到的分别是,标记了 MR 修饰石墨烯的 CEA 抗体,标记了 PP 修饰石墨烯的 NSE 抗体,和标记了 TP 修饰石墨烯的 Cyfra21-1 抗体,结果如图 2 所示。

[0025] (2) 三种抗原与三种标记了变色分子功能化石墨烯的抗体的反应

[0026] 在 96 孔板中加入浓度为 $0.04\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 CEA、NSE 和 Cyfra21-1 单抗 100 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,然后用 150 μL PBST 洗液(含有 0.1%吐温的 PBS 缓冲液)洗板三次,每孔加入 200 μL 5% 的胎牛血清进行封闭,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时。然后用 150 μL PBST 洗液洗板三次,每孔加入 100 μL 待测蛋白质样品,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时。然后 150 μL PBST 洗液洗板三次,每孔加入三种变色分子功能化石墨烯的抗体混合物 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时。然后用去离子水洗板两次,去除未反应的多余的变化色分子功能化石墨烯的抗体混合物。同时为了确保后续的检测结果可信,在完成抗原抗体反应的过程中,在板上其他孔内还加入了 BSA 作为无关蛋白对照。

[0027] (3) 三种标记了变色分子功能化石墨烯的抗体的可视化检测

[0028] 在孔板每孔中加入 100 μL pH 值为 12.0 的碱性水,石墨烯上的变色分子通过酸碱中和反应解离出质子带上负电荷,溶解度和带电性的变化使得变色分子可以迅速的释放到水中,同时表现出相应 pH 值下这些变色分子应有的颜色。反应 5 分钟后,通过肉眼观察到,1 号孔中的待测样品只有 CEA,孔内呈明显的黄色,2 号孔中的待测样品只有 NSE,孔内呈明显的粉红色,3 号孔中的待测样品只有 Cyfra21-1,孔内呈明显的蓝色,4 号孔中的待测样品有 CEA 和 NSE,孔内呈明显的橘红色,5 号孔中的待测样品有 CEA 和 Cyfra21-1,孔内呈明显的浅绿色,6 号孔中的待测样品有 NSE 和 Cyfra21-1,孔内呈明显的紫色,7 号孔中的待测样品有 CEA、NSE 和 Cyfra21-1,孔内呈明显的咖啡色,8 号孔中的 BSA 无关蛋白对照检测体系中则基本没有发生颜色变化,结果如图 3 所示。因此通过肉眼进行判断即可实现对三种蛋白质 CEA、NSE 和 Cyfra-21-1 及其混合物的多色检测。

[0029] 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现、所述技术领域的

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。

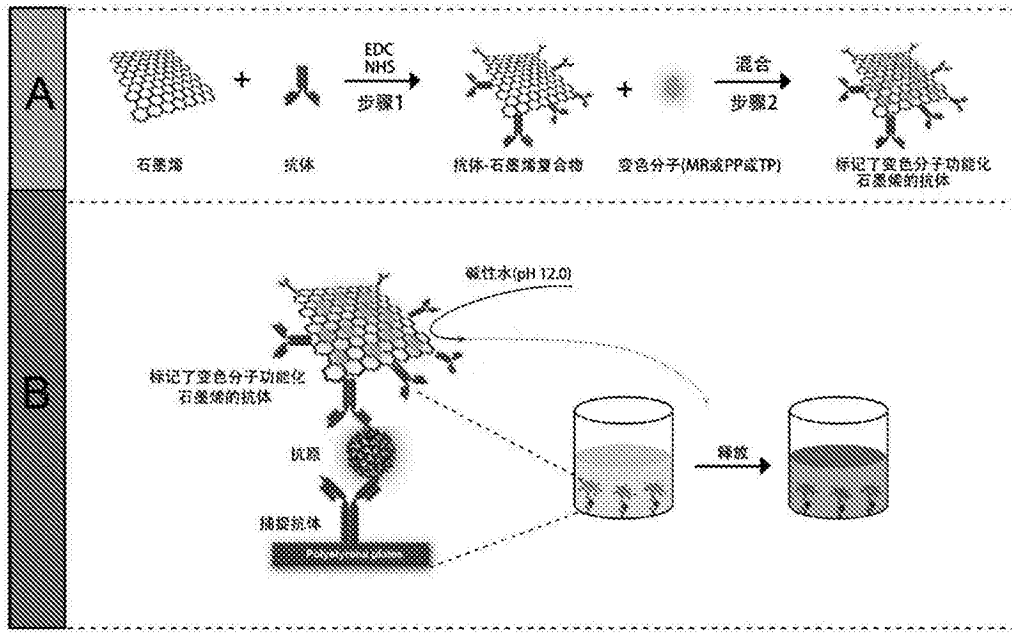


图 1

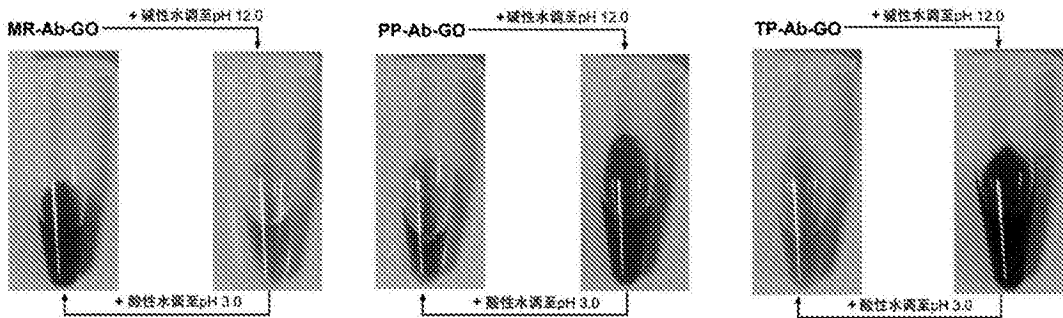


图 2

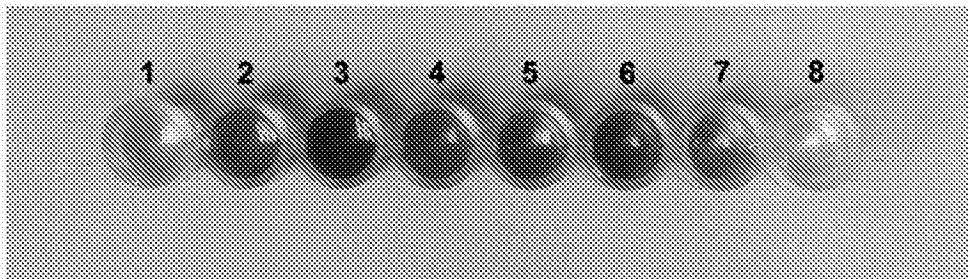


图 3

专利名称(译)	一种可视化多色检测抗原-抗体反应试剂盒及使用方法		
公开(公告)号	CN105067803A	公开(公告)日	2015-11-18
申请号	CN201510430364.8	申请日	2015-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	南京大学		
申请(专利权)人(译)	南京大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京大学		
[标]发明人	李根喜 李超 吴丹 卫璐明 黎天琪		
发明人	李根喜 李超 吴丹 卫璐明 黎天琪		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53		
其他公开文献	CN105067803B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫分析和诊断技术领域，具体涉及一种可视化多色检测抗原-抗体反应试剂盒及使用方法。本发明所述试剂盒由标记了甲基红修饰石墨烯的CEA抗体，标记了酚酞修饰石墨烯的NSE抗体，标记了百里酚酞修饰石墨烯的Cyfra21-1抗体和包被有CEA、NSE和Cyfra21-1单抗混合物的96孔板，pH值为12.0碱水，PBST缓冲液组成。本发明所述试剂盒可同时多色检测CEA，NSE和Cyfra21-1。本发明所述试剂盒操作简单，效率高，成本低，便于在资源匮乏和落后地区使用。

