(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110133246 A
(43)申请公布日 2019.08.16

(21)申请号 201910396483.4

(22)申请日 2019.05.14

(71)申请人 江苏师范大学
地址 221000 江苏省徐州市铜山区上海路101号

(72)发明人 盖宏伟 张玉苏 刘晓君

(51)Int.Cl.
G01N 33/532(2006.01)
G01N 33/58(2006.01)
G01N 21/47(2006.01)
G01N 30/02(2006.01)
G01N 30/74(2006.01)

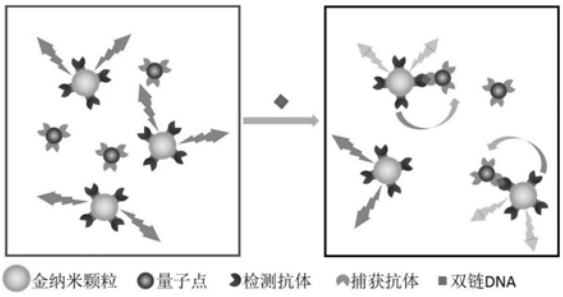
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

一种单颗粒水平上的均相免疫分析方法

(57)摘要

一种单颗粒水平上的均相免疫分析方法，包括，将捕获抗体和检测抗体分别修饰在金纳米颗粒CA-AuNP和量子点DA-QD上；将样品加入到CA-AuNP和DA-QD混合液中，震荡、孵育一段时间，形成CA-AuNP-抗原-DA-QD的夹心结构；取制备的溶液滴于载玻片上，将载玻片置于暗场显微镜下成像；照射载玻片一段时间，在照射过程中记录金颗粒的散射强度；夹心结构中的金颗粒与量子点发生等离子共振能量转移，导致金颗粒散射强度降低。没有形成夹心结构的CA-AuNP散射强度与颗粒数目分布为正态分布，以该正态分布的期望值为基准值；统计低于和高于基准值的金颗粒数目，计算两者比例，以该比例定量抗原浓度。本方法为均相免疫分析，简单快捷，使用样品量少，在单颗粒水平上成像，检测限低、检测灵敏度高。



CN 110133246 A

1.一种单颗粒水平上的均相免疫分析方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1:将捕获抗体和检测抗体分别修饰在金纳米颗粒CA-AuNP和量子点DA-QD上;

S2:将样品加入到CA-AuNP和DA-QD混合液中,震荡、孵育一段时间,形成CA-AuNP-抗原-DA-QD的夹心结构;

S3:取S2制备的溶液滴于载玻片上,将载玻片置于暗场显微镜下成像;

S4:照射载玻片一段时间,在照射过程中记录金颗粒的散射强度;夹心结构中的金颗粒与量子点发生等离子共振能量转移,导致金颗粒散射强度降低;没有形成夹心结构的CA-AuNP散射强度与颗粒数目分布为正态分布,以该正态分布的期望值为基准值,统计步骤S4中低于和高于基准值的金颗粒数目,计算两者比例;

S5:将步骤S4中的低于基准值的金颗粒数量与高于基准值的金颗粒数量之比与抗原浓度关联。

2.根据权利要求1所述的分析方法,其特征在于,所述步骤S1中的金纳米颗粒包括金纳米球、金纳米棒、金纳米星和不规则的金纳米颗粒;所述步骤S2中的孵育时间为10～100分钟;所述步骤S3具体包括:取1～5微升S2制备的溶液滴于载玻片上,将载玻片置于暗场显微镜下成像;所述步骤S4中的照射时间为2～30分钟;所述步骤S5中的关联为以步骤S4获得的比例为纵坐标,以抗原浓度的对数值为横坐标获得标准曲线或标准加入法。

3.权利要求1-2任一所述的分析方法在简单溶液中肿瘤标志物定量检测中的应用。

4.权利要求1-2任一所述的分析方法在血清肿瘤标志物定量检测中的应用。

一种单颗粒水平上的均相免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物化学和医学检测技术领域，具体涉及一种单颗粒水平上的均相免疫分析方法。

背景技术

[0002] 免疫分析是生物化学和医学检测中使用最广泛的技术之一。它是利用抗原与抗体特异性结合来定性、定量抗原(可以是药物、激素、蛋白质、微生物等物质)或抗体的一种分析方法；一般以抗原抗体结合物或游离抗体含量为定量依据的检测技术。

[0003] 免疫分析按照是否需要分离操作步骤可以分为两类，即非均相免疫分析和均相免疫分析。前者需要先将抗原抗体反应混合液的某组分分离后再对各组分检测，灵敏度高，检测限低；但其操作步骤多，过程复杂，费时、费力。后者无需分离抗原抗体反应混合液中各组分，一步完成，具有操作简单、时间短、易实现自动化等优点；但相对于非均相免疫分析，均相免疫分析法灵敏度较差。

[0004] 最近几年文献中报道了一些均相免疫分析方法，包括共振能量转移法、动态散射法、共振散射相关光谱、磁弛豫、化学发光法等。这些方法的问题在于检测限不够低，复杂体系中可靠性不够高、样品使用量较大。因此，发展一种微量血液中高灵敏均相免疫分析方法具有十分重要的意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种单颗粒水平上的均相免疫分析方法，以夹心结构中的金颗粒与量子点发生等离子共振能量转移而导致的金颗粒散射强度降低为定量基础，快速、灵敏、准确检测血液中肿瘤标志物浓度。

[0006] 为实现上述发明目的，本发明的技术方案具体如下：

[0007] 一种单颗粒水平上的均相免疫分析方法，其特征在于，包括以下步骤：

[0008] S1:将捕获抗体和检测抗体分别修饰在金纳米颗粒CA-AuNP和量子点DA-QD上；

[0009] S2:将样品加入到CA-AuNP和DA-QD混合液中，震荡、孵育一段时间，形成CA-AuNP-抗原-DA-QD的夹心结构；

[0010] S3:取S2制备的溶液滴于载玻片上，将载玻片置于暗场显微镜下成像；

[0011] S4:照射载玻片一段时间，在照射过程中记录金颗粒的散射强度；夹心结构中的金颗粒与量子点发生等离子共振能量转移，导致金颗粒散射强度降低，没有形成夹心结构的CA-AuNP散射强度与颗粒数目分布为正态分布，以该正态分布的期望值为基准值，统计步骤S4中低于和高于基准值的金颗粒数目，计算两者比例；

[0012] S5:将步骤S4中的低于基准值的金颗粒数量与高于基准值的金颗粒数量之比与抗原浓度关联。

[0013] 进一步的，所述步骤S1中的金纳米颗粒包括金纳米球、金纳米棒、金纳米星和不规则的金纳米颗粒；所述步骤S2中的孵育时间为10～100分钟；所述步骤S3具体包括:取1.8微

升S2制备的溶液滴于载玻片上，将载玻片置于暗场显微镜下成像；所述步骤S4中的照射时间为2～30分钟；所述步骤S5中关联为以步骤S4获得的比例为纵坐标，以抗原浓度的对数值为横坐标获得标准曲线或标准加入法。

[0014] 本发明还提供了上述分析方法在简单溶液中前列腺特异性抗原PSA定量检测中的应用。

[0015] 本发明还提供了上述分析方法在血清PSA定量检测中的应用。

[0016] 与现有技术相比，本发明的有益效果：

[0017] 本发明的均相免疫分析，无需固定、分离、清洗等步骤；使用样品量少，只需几微升；

[0018] 本发明的分析方法将待测样品加入到CA-AuNP和DA-QD混合液中，进行免疫反应，随后以暗场显微镜为检测平台，取样观察金颗粒的散射强度，以夹心结构中金颗粒与量子点发生等离子共振能量转移而导致金颗粒散射强度降低为定量基础，具有检测限低、检测灵敏度高优点，可达到fM级别；可用于简单溶液中肿瘤标志物的定量检测，也可用于血清中肿瘤标志物的定量检测。

附图说明

[0019] 图1为本发明实施例1中的分析方法的原理示意图；

[0020] 图2为本发明实施例1中的金颗粒与量子点不发生等离子共振能量转移时，金颗粒散射强度分布图；

[0021] 图3为本发明实施例1中的金颗粒与量子点发生等离子共振能量转移后，金颗粒散射强度分布图；

[0022] 图4为本发明实施例2中的简单溶液中PSA的定量标准曲线；

[0023] 图5为本发明实施例3中的标准加入法测量血清中PSA含量。

具体实施方式：

[0024] 下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0025] 实施例1

[0026] 如图1所示，一种单颗粒水平上的均相免疫分析方法，包括如下步骤：

[0027] 1)根据待测物(抗原)性质，分别将捕获抗体和检测抗体修饰到金颗粒(CA-AuNP)和量子点(DA-QD)表面；

[0028] 2)将样品加入CA-AuNP和DA-QD混合液中，孵育10-100分钟，形成CA-AuNP-抗原-DA-QD夹心结构；

[0029] 3)取上述体系中溶液1.8微升滴于载玻片上，置于暗场显微镜下成像；

[0030] 4)照射载玻片2－30min，在照射过程中记录金颗粒的散射强度；

[0031] 5)夹心结构中的金颗粒与量子点发生等离子共振能量转移，导致金颗粒散射强度降低，如图2和图3所示。图2所示为金颗粒与量子点不发生等离子共振能量转移时，金颗粒

散射强度分布图。金颗粒散射强度为单个左右对称的高斯分布峰，峰高在880-920之间。散射强度小于880的金颗粒数目，与散射强度大于920的金颗粒数目大致相同。图3所示为金颗粒与量子点发生等离子共振能量转移后，金颗粒散射强度分布图。散射强度分布出现两个峰，一个峰峰高在880-920之间，另一峰峰高在800-840之间；可见散射强度小于880的金颗粒数目多于散射强度大于920的金颗粒数目。原因为金颗粒与量子点发生等离子体共振能量转移，导致金颗粒散射强度降低。

[0032] 以低于和高于峰高的金颗粒数量之比为定量基础，图4所示为简单溶液中前列腺特异性抗原(PSA)的定量标准曲线。信噪比为3时，PSA的检测限达到0.4fM。图5所示为标准加入法测量血清中PSA含量。这种分析方法在均相溶液中一步一次性完成，无需抗体包埋固定、游离抗体分离，利用步骤2)中的夹心结构进行抗原检测，检测限摩尔浓度达到飞摩级别(fM)。可用于简单溶液中PSA的定量检测，也可用于血清中PSA的定量检测。

[0033] 实施例2简单溶液中PSA的检测

[0034] a.按照一定比例迅速混匀金颗粒、单链DNA 1、DNA 2、PBS、4M氯化钠，立即将混合液置于-20℃冷冻过夜。混合液中磷酸，氯化钠，金颗粒，单链DNA 1和DNA 2的终浓度分别为4.2mM，155mM，196pM，1.7μM和1.7μM。然后于18℃下，以13000rpm转速，将自然解冻至室温的混合液离心8min，去除上清后，加入PBS重新悬浮金颗粒。重复洗涤两次，去除过量的DNA。最后于18℃下，以2500rpm转速，将悬浮液离心2min取上清，以去除金颗粒团聚体。将2μL新鲜配制的10mg/mL EDC(155mM氯化钠溶解的)加入到上述纯化后的金颗粒(70nm)中，室温震荡、混合20分钟。以155mM NaCl溶液离心洗涤金颗粒1次，去除过量的EDC。立即将金颗粒与PSA捕获抗体(CA)和BSA按照1:96:384比例混合，室温下孵育3小时。加入tris-HCl(4mM，pH7.4)于上述反应混合液中，终止反应；以PBS(先以13000rpm后以2500rpm)离心洗涤金颗粒，去除过量的蛋白质和金颗粒团聚体，得到的金颗粒标记的捕获抗体(CA-AuNP)。

[0035] b.检测抗体通过其伯氨基团与量子点的羧基反应而固定在量子点表面。混合20μL PSA检测抗体(DA，1.2mg/ml)和10μL活化后的量子点溶液。避光孵育4小时后，采用排阻色谱柱纯化抗体修饰的量子点。色谱条件如下：色谱柱尺寸为250*4.6mm*mm，填料为Superose6，流动相为50mM NaHCO3，pH 9.0；流速为0.1mL/min，进样体积为15μL，检测波长为224nm。收集量子点标记的检测抗体(DA-QD)馏分，将其置于4度冰箱保存备用。

[0036] c.将纯化后DA-QD和CA-AuNP按浓度比1:1混合后，加入不同浓度的PSA，室温孵育30分钟，形成CA-AuNP-PSA-DA-QD夹心结构；

[0037] d.取上述溶液1.8L，滴于载玻片，上暗场显微镜成像，观察，拍摄。

[0038] e.定量实验：将d得到的不同浓度抗原下的暗场成像图用imageJ进行处理，计算出PSA不同浓度下低于和高于峰高的金颗粒数量之比。以PSA浓度的对数值为横坐标，低于和高于峰高的金颗粒数量之比为纵坐标作图(图4)，在0.32-200fM范围内呈线性关系，线性相关系数为0.9958。

[0039] 实验3血清中PSA的检测

[0040] a.按照一定比例迅速混匀金颗粒、单链DNA 1、DNA 2、PBS、4M氯化钠，立即将混合液置于-20℃冷冻过夜。混合液中磷酸，氯化钠，金颗粒，单链DNA 1和DNA 2的终浓度分别为4.2mM，155mM，196pM，1.7μM和1.7μM。然后于18℃下，以13000rpm转速，将自然解冻至室温的混合液离心8min，去除上清后，加入PBS重新悬浮金颗粒。重复洗涤两次，去除过量的DNA。最

后于18℃下，以2500rpm转速，将悬浮液离心2min取上清，以去除金颗粒团聚体。将2μL新鲜配制的10mg/mL EDC(155mM氯化钠溶解的)加入到上述纯化后的金颗粒(70nm)中，室温震荡、混合20分钟。以155mM NaCl溶液离心洗涤金颗粒1次，去除过量的EDC。立即将金颗粒与PSA捕获抗体(Capture antibody，CA)和BSA按照1:96:384比例混合，室温下孵育3小时。加入tris-HCl(4mM，pH7.4)于上述反应混合液中，终止反应；以PBS(先以13000rpm后以2500rpm)离心洗涤金颗粒，去除过量的蛋白质和金颗粒团聚体，得到的金颗粒标记的捕获抗体(CA-AuNP)。

[0041] b.检测抗体通过其伯氨基团与量子点的羧基反应而固定在量子点表面。混合20μL PSA检测抗体(Detection antibody，DA，1.2mg/ml)和10μL活化后的量子点溶液。避光孵育4小时后，采用排阻色谱柱纯化抗体修饰的量子点。色谱条件如下：色谱柱尺寸为250*4.6mm*mm，填料为Superose 6，流动相为50mM NaHCO3，pH 9.0；流速为0.1mL/min，进样体积为15μL，检测波长为224nm。收集量子点标记的检测抗体(DA-QD)馏分，将其置于4度冰箱保存备用。

[0042] c.将纯化后DA-QD和CA-AuNP按浓度比1:1混合后，分成若干份。向每份中加入一定量的血清和不同浓度的PSA，室温孵育30分钟，形成CA-AuNP-PSA-DA-QD夹心结构；

[0043] d.取上述溶液1.8L，滴于载玻片，上暗场显微镜成像，观察，拍摄。

[0044] e.定量实验：Image J软件处理操作d得到的不同浓度抗原下的暗场成像图，计算出加入不同浓度PSA时低于和高于峰高的金颗粒数量之比。以加入的PSA浓度为横坐标，低于和高于峰高的金颗粒数量之比为纵坐标做图(图5)。X轴截距为来自血清中的PSA在上镜液中的终浓度。经计算，血清中PSA的浓度为7.42nM，与临床检验值(6.18nM)一致。

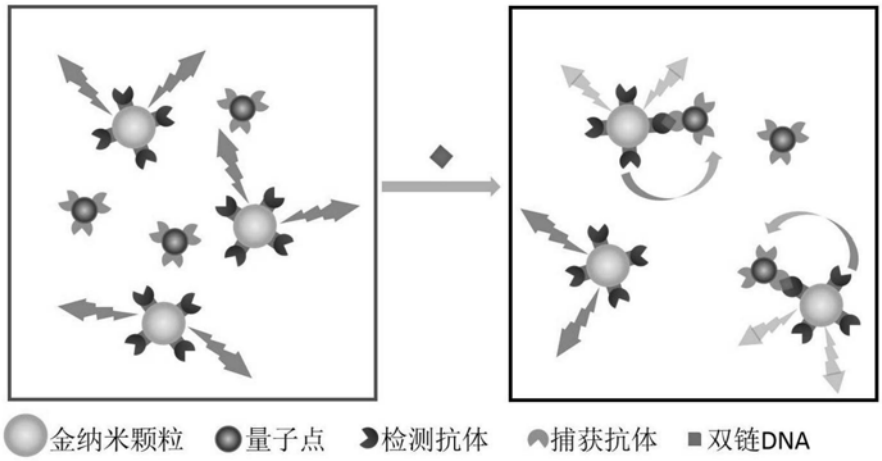

金纳米颗粒
量子点
检测抗体
捕获抗体
双链DNA

图1

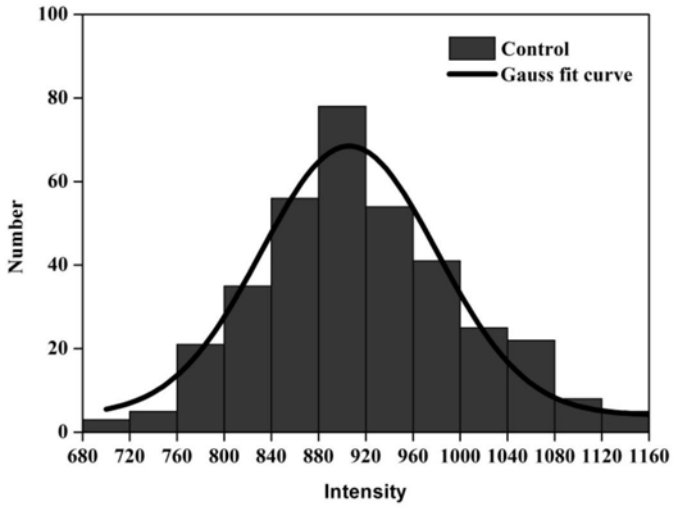

Control
Gauss fit curve
Number
Intensity
0
20
40
60
80
100
680 720 760 800 840 880 920 960 1000 1040 1080 1120 1160

图2

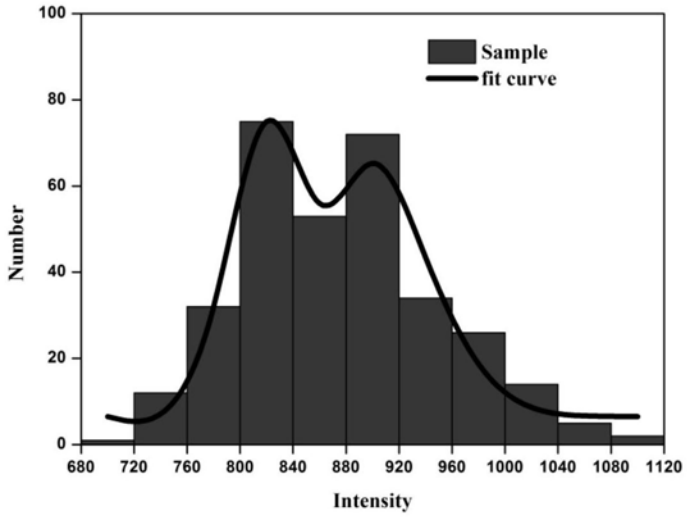

Sample
fit curve
Number
Intensity
0
20
40
60
80
100
680
720
760
800
840
880
920
960
1000
1040
1080
1120

图3

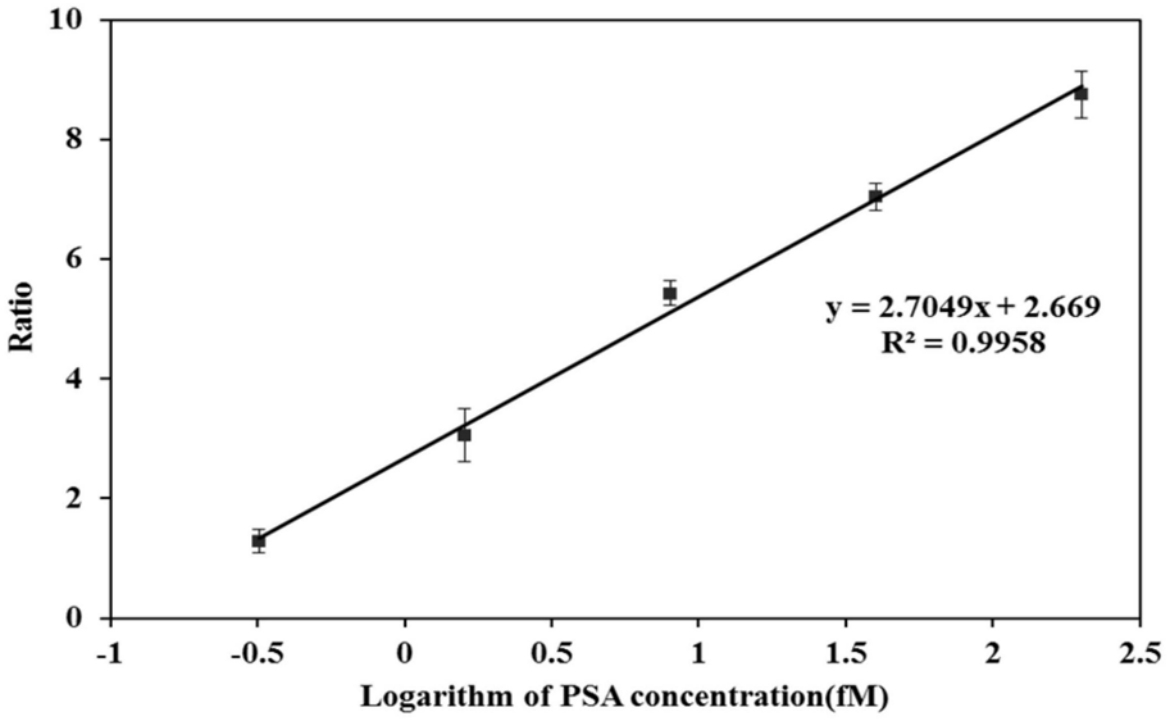

y = 2.7049x + 2.669
R² = 0.9958
Ratio
Logarithm of PSA concentration(fM)
0
2
4
6
8
10
-1
-0.5
0
0.5
1
1.5
2
2.5

图4

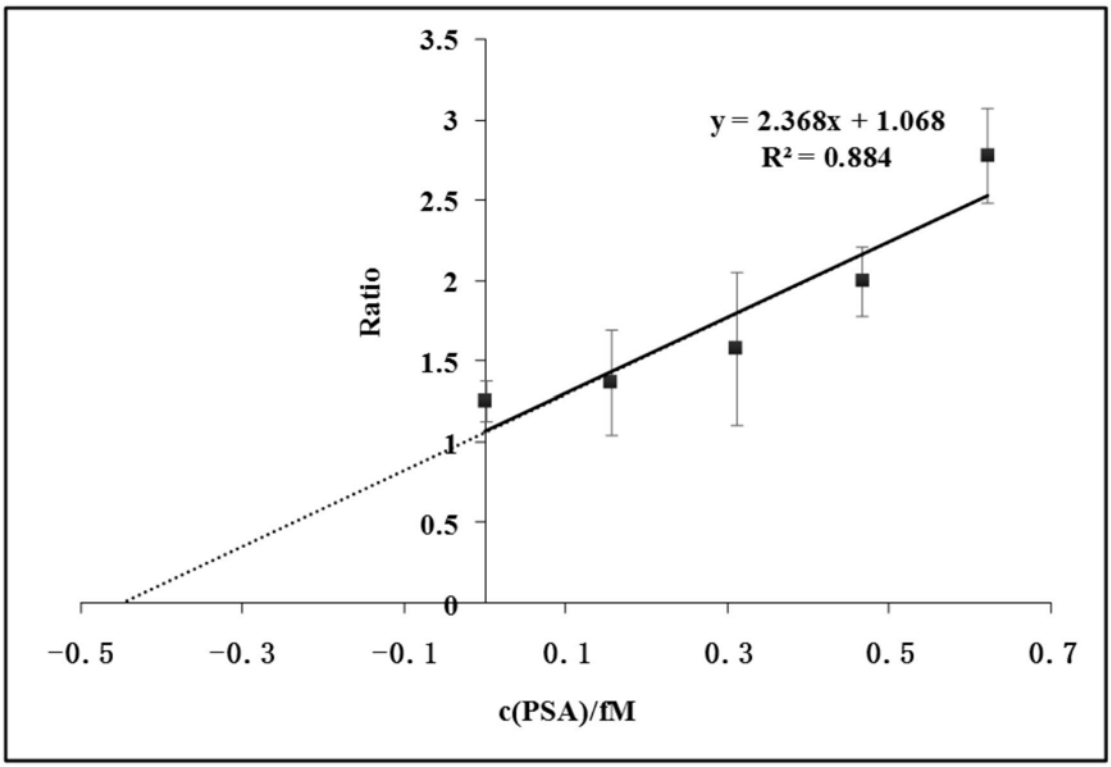
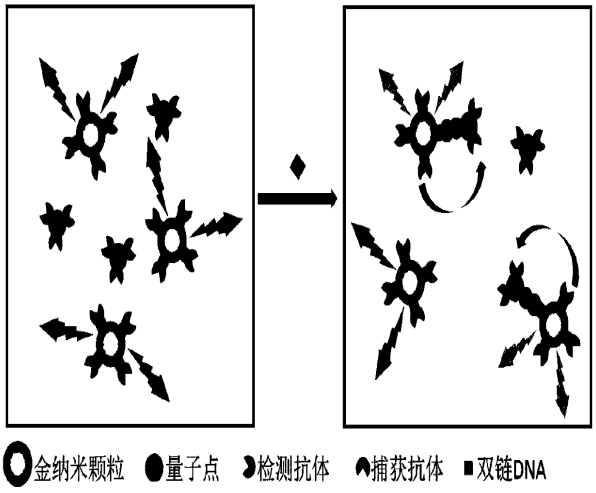

y = 2.368x + 1.068
R² = 0.884
Ratio
c(PSA)/fM
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
-0.3
-0.1
0.1
0.3
0.5
0.7

图5

专利名称(译)	一种单颗粒水平上的均相免疫分析方法		
公开(公告)号	CN110133246A	公开(公告)日	2019-08-16
申请号	CN201910396483.4	申请日	2019-05-14
[标]申请(专利权)人(译)	江苏师范大学		
申请(专利权)人(译)	江苏师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	江苏师范大学		
[标]发明人	盖宏伟 刘晓君		
发明人	盖宏伟 张玉苏 刘晓君		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/58 G01N21/47 G01N30/02 G01N30/74		
CPC分类号	G01N21/47 G01N30/02 G01N30/74 G01N33/532 G01N33/587 G01N33/588 G01N2030/027		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种单颗粒水平上的均相免疫分析方法，包括，将捕获抗体和检测抗体分别修饰在金纳米颗粒CA-AuNP和量子点DA-QD上；将样品加入到CA-AuNP和DA-QD混合液中，震荡、孵育一段时间，形成CA-AuNP-抗原-DA-QD的夹心结构；取制备的溶液滴于载玻片上，将载玻片置于暗场显微镜下成像；照射载玻片一段时间，在照射过程中记录金颗粒的散射强度；夹心结构中的金颗粒与量子点发生等离子共振能量转移，导致金颗粒散射强度降低。没有形成夹心结构的CA-AuNP散射强度与颗粒数目分布为正态分布，以该正态分布的期望值为基准值；统计低于和高于基准值的金颗粒数目，计算两者比例，以该比例定量抗原浓度。本方法为均相免疫分析，简单快捷，使用样品量少，在单颗粒水平上成像，检测限低、检测灵敏度高。