



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107064487 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201710077713.1

(22)申请日 2017.02.14

(71)申请人 安徽雷根生物技术有限公司

地址 235000 安徽省淮北市凤凰山经济开发  
区凤冠路三期标准化厂房三号厂房

(72)发明人 刘涛 王国强 王红 郭喜  
孙夏青 徐娜娜

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

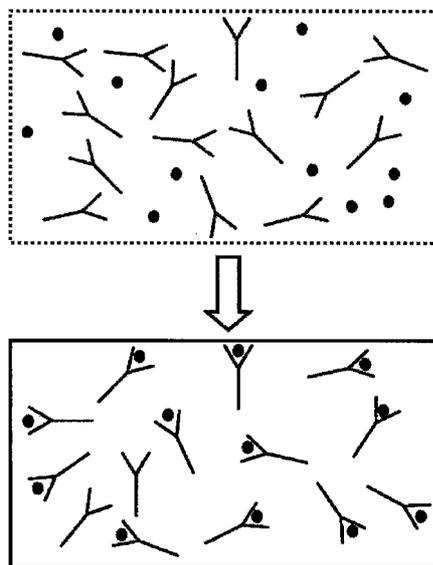
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

一种石墨烯加速ELISA技术

(57)摘要

本发明“一种石墨烯加速ELISA技术”，其特征是一种新材料石墨烯与ELISA相结合的新性能加速抗原抗体结合的改良ELISA技术，利用石墨烯高吸附和高比表面特性，在ELISA反应体系中增加抗原抗体之间的接触效率，加速ELISA(酶联免疫吸附测定)反应及包被过程。该技术涉及免疫学及免疫检测领域，是一种石墨烯与ELISA相结合的理论创新，即利用石墨烯具有吸附分子和高比表面特性增加抗原抗体之间的接触概率，解决ELISA反应和包被时间过长的的问题。



1. 一种石墨烯加速ELISA技术,其特征是一种新材料石墨烯与ELISA相结合的新性能加速抗原抗体结合的改良ELISA技术,利用石墨烯高吸附和高比表面特性,在ELISA反应体系中增加抗原抗体之间的接触,加速ELISA(酶联免疫吸附测定)反应及包被过程。

2. 根据权利要求1所述的一种石墨烯加速ELISA技术,其特征在于,所述的新材料石墨烯狭义概念是指由碳原子以 $sp^2$ 杂化轨道组成六角型蜂巢晶格结构的只有一个碳原子厚度的二维晶体,亦可采用广义石墨烯(多层)尤以10层以内的多层石墨烯为佳,且具有较高的吸附和高比表面特性的石墨烯。

3. 根据权利要求1所述的一种石墨烯加速ELISA技术,其特征在于,所述的ELISA其英文表述为Enzyme Linked Immunosorbent Assay,其中文表述为酶联免疫吸附测定,是指将可溶性的抗原或抗体结合到聚苯乙烯等固相载体上,利用抗原抗体结合专一性进行免疫反应的定性和定量检测的过程。

4. 根据权利要求1所述的一种石墨烯加速ELISA技术,其特征在于,所述的石墨烯与ELISA相结合的新性能加速抗原抗体结合的改良ELISA技术,可以在ELISA过程前、中、后根据具体物质特性加入适量的石墨烯,以缩短ELISA反应时间,解决了常规ELISA一次检测时间过长(需要2~3小时)和包被时间过长(需要过夜)的问题。

5. 根据权利要求1所述的一种石墨烯加速ELISA技术,其特征在于,所述的抗原是一种能在有机体中引起特异性免疫应答的物质,该物质进入机体后可刺激机体产生抗体和引起细胞免疫,在免疫测定中抗原是指能与抗体结合的物质;其特征在于所述的抗体是一种由浆细胞(效应B细胞)分泌的被免疫系统用来鉴别与中和外来物质如细菌、病毒等的大型Y形蛋白质。

6. 根据权利要求1所述的一种石墨烯加速ELISA技术,其特征在于,所述的抗原抗体结合是指抗原与抗体具有专一性结合的特性,即抗原与其相应的抗体具有特异性结构,由很弱的短距引力而结合的,该结合力是一种高度特异性的非共价键作用力,可以在某种程度上进行特异性结合。

7. 根据权利要求1所述的一种石墨烯加速ELISA技术,所述的增加抗原抗体之间的接触是指通过石墨烯吸附、分散抗原和(或)抗体分子,以增加抗原和抗体之间的接触概率,进而提高抗原与抗体的结合效率,不但能加速孵育(反应)过程,亦能加速包被过程,上述策略不但可以用于常规ELISA技术,亦可用于荧光ELISA技术、化学发光ELISA技术、PCR-ELISA技术、NSP-ELISA技术、Dot-ELISA技术、TP-ELISA技术、IMS-ELISA技术、PPA-ELISA技术等。

8. 根据权利要求1所述的一种石墨烯加速ELISA技术,其特征在于,所述的石墨烯与ELISA相结合增加抗原抗体之间的接触概率这一策略可大大减少ELISA反应和包被时间,适用于畜牧、农业、食品安全、临床诊断、科研检测以及酶免疫检测及诊断的免疫学领域,亦适用于体外诊断试剂II类和III产品中的免疫相关试剂,还适用于检测其他样本中的抗原、抗体以及半抗原等。

9. 根据权利要求1所述的一种石墨烯加速ELISA技术,其特征在于,通过一种新材料石墨烯的吸附和高比表面特性来增加抗原和抗体之间的接触加速ELISA的策略应用于计算机软件程序和网络程序编写,提高ELISA检测效率、缩减ELISA反应和包被时间,进一步完善石墨烯与ELISA相结合的加速ELISA过程的免疫学技术。

10. 根据权利要求1所述的一种石墨烯加速ELISA技术,其特征在于,通过一种新材料石

墨烯的吸附和高比表面特性来增加抗原和抗体之间的接触加速ELISA的策略应用于酶标仪、荧光酶标仪、分光光度计、荧光分光光度计、自动酶免分析仪等提供检测吸光度值的仪器设计和开发以提高ELISA反应和包被的效率,其主要成分包括包被板、酶标记抗体和(或)抗原、标准品、缓冲液、显色液、终止液、洗涤液等。

## 一种石墨烯加速ELISA技术

### 技术领域：

[0001] 本发明属于免疫学及免疫检测领域，具体涉及通过石墨烯的高吸附和高比表面特性来增加抗原与抗体之间的接触，加速ELISA(酶联免疫吸附剂测定)反应过程的技术领域。

### 背景技术：

[0002] 免疫一词由拉丁字“immunis”演变而来，其原意为“免除税收”(exceptionfromcharges)，也包含“免于疫患”之意。生命科学中的免疫狭义概念是指机体识别“自身”与“非己”抗原，对自身抗原形成天然免疫耐受，对“非己”抗原产生排斥作用的一种生理功能。正常情况下，这种生理功能对机体有益，可产生抗感染、抗肿瘤等维持机体生理平衡和稳定的免疫保护作用。在一定条件下，当免疫功能失调时，也会对机体产生有害的反应和结果，如引发超敏反应、自身免疫病和肿瘤等。

[0003] 免疫学是研究生物体对抗原物质免疫应答性及其方法的生物-医学科学。免疫应答是机体对抗原刺激的反应，也是对抗原物质进行识别和排除的一种生物学过程。一般认为免疫学的发展经历了四个时期即经验免疫学时期、经典免疫学时期、近代免疫学时期和现代免疫学时期。

[0004] 1、经验免疫学时期：早在公元11世纪，中国医学家在实践中创造性地发明了人痘苗，即用人工轻度感染的方法预防天花。在明代隆庆年间(1567~1572)，人痘苗已在中国广泛应用。在17世纪人痘苗接种预防天花的方法引起其他国家的注意，先后传入俄国、朝鲜、日本、土耳其、英国等地，进而使人痘苗预防天花的方法得以推广和验证，此即经验免疫学时期，该时期发现了免疫现象，是人类认识机体免疫性的开端，为以后英国医生Jenner发明牛痘苗奠定了基础。

[0005] 2、经验免疫学时期：18世纪至20世纪中叶为经典免疫学时期，在这一时期，人们对免疫功能的认识由人体现象的观察进入了科学实验时期。首先，牛痘苗的发明是英国医生Jenner在观察到患过牛痘的挤奶女工，不再患天花的事实后，通过长期研究的科学成果。牛痘苗的发明是继人痘苗之后免疫学的一个重要发展，该疫苗给人体接种后，只引起局部反应并不造成严重损害，但能有效地预防天花，亦可在实验室大量生产，因此很快地代替了人痘苗，被医学界所接受。其次，减毒活疫苗的发明是法国免疫学家Pasteur和德国细菌学家Koch在创立了细菌分离培养技术的基础上，通过系统地科学研究，利用物理、化学、生物学方法获得了减毒菌苗，并用于疾病的预防和治疗，Pasteur用高温培养法制备了炭疽疫苗，用狂犬病毒在兔体内经连续传代制备了狂犬病疫苗。再次，抗体是Behring和Kitasato在1890年用白喉外毒素免疫动物时发现的。在被免疫的动物血清中有一种能中和外毒素的物质，最初称为抗毒素。将此免疫血清被动转移给正常动物，使后者获得了中和外毒素的能力。上述科学家将白喉抗毒素正式用于白喉的治疗，开创了人工被动免疫疗法之先河，因此Behring在1901年获得诺贝尔医学和生理学奖。后来，人们相继发现了凝集素、沉淀素等能与细菌或细胞特异性反应的物质，统称为抗体；而将能引起抗体产生的物质称为抗原，从而确立了抗原和抗体的概念。随后在1894年Pfeiffer发现了免疫溶菌现象进而发现了补体，

补体是一种对热不稳定的物质,属于正常血清中的成分,无特异性,但具有协助抗体溶解细菌或细胞的作用。随着血清学方法的建立、免疫化学的研究、抗体生成理论的提出以及对机体保护性免疫机制的研究,免疫学的发展加快了速度。

[0006] 3、近代免疫学时期:20世纪中叶至60年代期间,为近代免疫学时期。这一时期人们冲破了抗感染免疫模板学说的束缚,对生物体的免疫反应性有了比较全面的认识,使免疫学开始研究生物问题,出现了全新的免疫学理论。这一时期发现了迟发型超敏反应、免疫耐受现象,提出了细胞系选择学说,免疫学技术得到快速发展,建立了间接凝集反应和免疫标记技术,这些都进一步促进了免疫学基础理论的研究和应用。

[0007] 4、近代免疫学时期:现代免疫学时期指20世纪60年代至今的时期。在这一时期,确认了淋巴细胞系在免疫反应中的地位,阐明了免疫球蛋白的分子结构与功能,对免疫系统特别是细胞因子、粘附分子等进行了大量研究,并从分子水平对免疫球蛋白的多样性、类别转化等进行了有益的探讨,在许多方面取得了突破性成就。在应用免疫学领域,1975年Kohler和Milstein首创杂交瘤技术。他们将小鼠骨髓瘤细胞和经绵羊红细胞(SRBC)致敏的B细胞在体外进行融合形成杂交瘤(hybridoma)。这种杂交瘤细胞既保持了骨髓瘤细胞大量无限制生长繁殖的特性,又具有合成和分泌抗体的能力。应用该技术可产生均一的、只针对单一抗原决定基的抗体,称为单克隆抗体(McAb)。McAb具有纯度高、特异性强、可大量生产等优点,已被广泛应用于血清学诊断、免疫细胞及其它组织细胞表面分子的检测,并通过与核素、各种毒素或药物化学偶联进行肿瘤导向治疗研究。将分子生物学技术应用于免疫学研究也是一项突破性成就,利用分子杂交技术和分子遗传学理论制备的基因工程抗体如完全人源化抗体、单链抗体及双特异性抗体等较McAb更具优越性。

[0008] 抗原(antigen,Ag)是一种能在有机体中引起特异性免疫应答的物质,该物质进入机体后可刺激机体产生抗体和引起细胞免疫,在免疫测定中抗原是指能与抗体结合的物质。所谓抗原的反应原性是指能与由它刺激所产生的抗体或致敏淋巴细胞发生特异性反应,具备免疫原性和反应原性两种能力的物质称为完全抗原,如病原体、异种动物血清等。只具有反应原性而没有免疫原性的物质,称为半抗原,没有免疫原性,不会引起免疫反应,如青霉素、磺胺等。但在某些特殊情况下,如果半抗原与大分子蛋白质结合后,就获得了免疫原性而变成完全抗原,也就可以刺激免疫系统产生抗体和效应细胞。抗原的基本性质具有异物性、大分子性和特异性。具体而言,异物性是指进入机体组织内的抗原物质,必须与该机体组织细胞的成分不相同;大分子性是指构成抗原的物质通常是相对分子质量大于10000的大分子物质,分子量越大,抗原性越强;特异性是指一种抗原只能与相应的抗体或效应T细胞发生特异性结合。根据抗原性质分为两类:完全抗原和不完全抗原。完全抗原(complete antigen)简称抗原,是一类既有免疫原性,又有免疫反应性的物质,如大多数蛋白质、细菌、病毒、细菌外毒素等。不完全抗原又称半抗原(hapten),是只具有免疫反应性而无免疫原性的物质,半抗原与蛋白质载体结合后,就获得了免疫原性。

[0009] 抗体(antibody)是一种由浆细胞(效应B细胞)分泌的被免疫系统用来鉴别与中和外来物质如细菌、病毒等的大型Y形蛋白质,狭义概念是指能与抗原特异性结合的免疫球蛋白(immunoglobulin,Ig),与ELISA有关的主要为IgG和IgM。抗体具有4条多肽链的对称结构,其中2条较长、相对分子量较大的相同的重链(H链),2条较短、相对分子量较小的相同的轻链(L链),链间由二硫键和非共价键联结形成一个由4条多肽链构成的单体分子。轻链有 $\kappa$

和 $\lambda$ 两种,重链有 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 和 $\alpha$ 五种,整个抗体分子可分为恒定区和可变区两部分。在给定的物种中,不同抗体分子的恒定区都具有相同的或几乎相同的氨基酸序列,可变区位于“Y”的两臂末端,在可变区内有一小部分氨基酸残基变化特别强烈,这些氨基酸的残基组成和排列顺序更易发生变异区域称高变区,高变区位于分子表面,最多由17个氨基酸残基构成,少则只有2~3个,高变区氨基酸序列决定了该抗体结合抗原抗原的特异性。一个抗体分子上的两个抗原结合部位是相同的,位于两臂末端称抗原结合片段(antigen-binding fragment, Fab),“Y”的柄部称结晶片段(crystalline fragment, FC),糖结合在FC上。按理化性质和生物学功能,抗体可将其分为IgM、IgG、IgA、IgE、IgD五类。安康提的制备,抗体可分为单克隆抗体和多克隆抗体。抗体的主要作用是与抗原(包括外来的和自身的)相结合,从而有效地清除侵入机体内的微生物、寄生虫等异物,抗体(antibody)是一种应答抗原产生的、可与抗原特异性结合的蛋白质,每种抗体与特定的抗原决定基结合,这种结合可以使抗原失活,也可能无效但有时也会对机体造成病理性损害。

[0010] 抗原抗体之间是通过很弱的短距引力而结合的,该结合力是一种高度特异性的非共价键作用力,如氢键、静电引力、疏水相互作用力、范德华引力等。其中疏水相互作用力和静电引力是主要的作用力,只有这两种作用力使抗体和抗原分子接近到一定程度,范德华力和氢键作用才会开始起作用。以上几种作用力均比共价键作用弱,只有存在大量的上述作用力,并且抗原与抗体间有非常好的配合,抗原与抗体间才能发生有效作用,这反应了抗原抗体作用高度特异性的特征。抗体的亲和力是指抗原抗体间的固有结合力,可以用平衡常数K表示: $K = [Ag \cdot Ab] / [Ag][Ab]$  Ag·Ab的解离程度与K值有关,高亲和力抗体的抗原位点与抗原的决定簇在空间构型上非常合适,二者结合牢固,不易解离。抗原抗体反应具有最适比例,此最适范围称为等价带,在等价带前后分别为抗体过剩带和抗原过剩带。如果抗原或抗体极度过剩,则无沉淀物形成,在免疫测定中称为带现象,抗体过剩称为前带,抗原过剩称为后带。在用免疫学方法测定抗原时,应使反应系统中有足够的抗体数量,否则测得的量会小于实际含量,甚至出现假阴性。抗原抗体反应具有特异性,抗原抗体的结合实质上只发生在抗原的抗原决定簇与抗体的抗原结合位点之间,由于二者在化学结构和空间构型上呈互补关系,所以抗原抗体反应具有高度特异性。抗原抗体反应还具有敏感性,在测定血清中物质含量的时候,酶反应测定的敏感度约为5-10 $\mu$ g/ml,而化学比色法灵敏度为mg/ml水平。

[0011] 酶联免疫吸附测定(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)是指将可溶性的抗原或抗体结合到聚苯乙烯等固相载体上,利用抗原抗体结合专一性进行酶标记免疫反应的定性和定量检测方法。1971年Engvall和Perlmann发表了酶联免疫吸附剂测定用于IgG定量测定的文章,其基本原理是:①抗原或抗体物理性结合到某种固相载体表面,并保持其免疫活性。②抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体,这种酶标抗原或抗体既保留其免疫活性,又保留酶的活性。③把受检标本(测定其中的抗体或抗原)和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应,用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开,最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例,加入酶反应的底物后,底物被酶催化变为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据颜色反应的深浅定性或定量分析。由于酶的催化效率很高,故可极大地放大反应效果,从而使测定方法达到很高的敏感度。

[0012] ELISA是随着免疫学的发展而发展起来的,已广泛应用于蛋白质工程、医疗、农林、畜牧、环保、食品等系列领域,尤其在疾病治疗、疾病检测、科研中的蛋白检测领域得到广泛应用,已经成为二十一世纪生命科学的重要技术。其主要方法有如下四种:

[0013] 1、直接ELISA:是将抗原按照一定的比例用包被缓冲液稀释包被到固相载体上,包被完成后简单洗涤,再加入封闭液封闭,洗去多于封闭液,加入适量的特异性酶抗体,37℃孵育1h或4℃孵育过夜,洗涤除去多余的抗体,加入底物显色读取结果,显色深浅与加入的酶标抗体量成正比。该法主要适用于检测单抗亚型、血清种属以及初筛单克隆抗体。

[0014] 2、间接法:其原理是利用酶标记的抗抗体检测与固相抗原结合的受检抗体,是将抗原按照一定的比例用包被缓冲液稀释包被到固相载体上,包被完成后简单洗涤,再加入封闭液封闭,洗去多余封闭液,加入适量的非酶标抗体,引入经过酶标的第二种抗体(与第一种抗体结合的抗体,即二抗)与第一种抗体(与抗原直接结合的抗体,即一抗)特异性结合,最后加入底物显色并判断结果,当二抗的浓度一定的时候,显色结果与一抗的量呈正相关。间接ELISA是检测标志性抗体的重要手段,主要用于检测病原体抗体、抗体效价、血清效价、单克隆抗体等,一般的操作步骤为:①将已知的抗原固着于固相载体联结,洗去多余的未结合抗原及杂质。②加入待测样本,待检样本中的特异性抗体与固相抗原结合,形成固相抗原抗体复合物,经洗涤后固相载体上只留下特异性抗体,待检样本中其他成分在洗涤过程中被洗去。③加入带有酶标的二抗,固相免疫复合物中的抗体与酶标抗体结合,从而间接的标记上酶。④洗去多余未结合的二抗,加入底物显色读取结果,显色深浅与加入的酶标抗体量成正比。

[0015] 3、夹心ELISA:又被称为三明治ELISA,该法常用于检测大分子抗原,可分为直接夹心ELISA和间接夹心ELISA,前者又分为双抗夹心ELISA和双抗原夹心ELISA。直接双抗夹心ELISA是检测抗原最常用的方法,其主要原理是:将第一种抗体包被在固相载体上,封闭后加入待检抗原,孵育后加入经过酶标的第二种抗体,第一种抗体和第二种抗体可以是针对不同表位的二种单抗,也可是针对同一抗原的一种单抗与一种多抗。其操作步骤如下:①将特异性抗体与固相载体联结,形成固相抗体,洗去未结合的抗体及杂质。②加入待测样本,待检样本中的抗原与固相抗体结合,形成固相抗原抗体复合物,经洗涤除去其他未结合物质。③加入带有酶标的二抗,固相免疫复合物中的抗原与酶标抗体结合,经洗涤除去其他未结合物质,固相载体上的酶量与受检抗原的量呈正相关。④加入底物显色读取结果,显色深浅与加入的受检抗原成正比。

[0016] 4、竞争ELISA:又称竞争抑制ELISA或封闭ELISA,其原理是用待检抗原或抗体去干扰已经预先设计好的体系,最终显色的结果与待检抗原或抗体的干扰程度成负相关,是一种较少用到的检测方法,一般用于检测小分子抗原,其操作步骤为:①将具有专一性的抗体固着于固相载体上,洗去多余抗体。②加入待测样本,使样本中的待测抗原与固相抗体进行专一性结合。③加入带有酶标记的抗原,此抗原也可与固相抗体进行专一性结合,由于固相抗体数量有限,因此当样本中抗原的量越多,则带有酶标记的抗原与固相抗体就越少,亦即两种抗原皆竞相与固相抗体结合。④洗去样本与带有酶标记的抗原,加入底物显色,当样本中抗原量越多,带有酶标记的抗原越少,显色也就越浅,以肉眼或仪器读取呈色结果。

[0017] 石墨烯(Graphene)是最近十年余年来发现的极其重要的新材料,石墨烯狭义概念是指由碳原子以sp<sup>2</sup>杂化轨道组成六角型蜂巢晶格结构的只有一个碳原子厚度的二维晶

体。石墨烯层数呈正态分布,广义石墨烯大多数是指多层石墨烯,如寡层石墨烯(3~5层),多层石墨烯(10层左右)。英国曼彻斯特大学物理学家安德烈·海姆和康斯坦丁·诺沃肖洛夫于2004年从石墨中分离出石墨烯,而且证实石墨烯可以单独存在,两人也因在“二维石墨烯材料的开创性研究”共同获得2010年诺贝尔物理学奖。石墨烯是良好的导体,不但非常坚硬而且导电性极佳,其电子迁移率可达 $200,000\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,电阻率可达 $10^{-6}\Omega\cdot\text{cm}$ ,是世界上电阻率最小的材料,亦是极佳的常温超导材料。石墨烯亦具有较好的生物兼容性和吸附各种原子与分子的特性。

[0018] 抗原和抗体均属于蛋白质分子,极其微小,其分子之间的相对距离较大,彼此离的较远,如果能够增加抗原和抗体之间的接触,就能够增加抗原与抗体结合的效率。由于石墨烯具有较好的生物兼容性,同时具有吸附各种原子与分子和高达 $2600\text{m}^2/\text{g}$ 比表面的特性,石墨烯可吸附抗原和(或)抗体,并进一步迅速分散至抗原抗体结合的空间内,大大加速抗原抗体之间的接触面积和结合效率。而常规抗ELISA仅仅利用非共价键作用力,如氢键、静电引力、疏水相互作用力、范德华引力,通过石墨烯与抗原、抗体的有机结合,大大缩短二者结合时间,确保结果的可靠性。

#### 发明内容:

[0019] 为了解决ELISA反应时间和包被时间过长的问题,本发明“一种石墨烯加速ELISA技术”综合了一种新材料石墨烯与ELISA相结合的加速ELISA过程的改良ELISA技术,利用石墨烯具有高吸附和高比表面的特性,增加抗原抗体之间的接触面积和效率,大大缩短了ELISA反应时间,同时可以加速包被过程,让科研和临床检验人员及时了解检测结果,提高了检测效率和准确性。

[0020] 一种石墨烯加速ELISA技术,其特征是一种新材料石墨烯与ELISA相结合的新性能加速抗原抗体结合的改良ELISA技术,利用石墨烯高吸附和高比表面特性,在ELISA反应体系中增加抗原抗体之间的接触,加速ELISA(酶联免疫吸附测定)反应过及包被过程。上述所述的ELISA是指将可溶性的抗原或抗体结合到聚苯乙烯等固相载体上,利用抗原抗体结合专一性进行免疫反应的定性和定量检测方法。

[0021] 一种石墨烯加速ELISA技术,其特征在于所述的新材料石墨烯狭义概念是指由碳原子以 $\text{sp}^2$ 杂化轨道组成六角型蜂巢晶格结构的只有一个碳原子厚度的二维晶体,亦可采用广义石墨烯(多层)尤以10层以内的多层石墨烯为佳,且具有较高的吸附和高比表面特性的石墨烯。

[0022] 一种石墨烯加速ELISA技术,其特征在于所述的ELISA其英文表述为Enzyme Linked Immunosorbent Assay,其中文表述为酶联免疫吸附测定,是指将可溶性的抗原或抗体结合到聚苯乙烯等固相载体上,利用抗原抗体结合专一性进行免疫反应的定性或定量检测的过程。

[0023] 一种石墨烯加速ELISA技术,其特征在于所述的石墨烯与ELISA相结合的新性能加速抗原抗体结合的改良ELISA技术,可以在ELISA过程前、中、后根据具体物质特性加入适量的石墨烯,以缩短ELISA反应时间,解决了ELISA一次检测时间过长(需要2~3小时)和包被时间过长(需要过夜)的问题,使在较短时间内了解实验或检测结果以及获得更可靠的数据成为可能。

[0024] 一种石墨烯加速ELISA技术,其特征就在于所述的抗原是一种能在有机体中引起特异性免疫应答的物质,该物质进入机体后可刺激机体产生抗体和引起细胞免疫,在免疫测定中抗原是指能与抗体结合的物质;其特征就在于所述的抗体是一种由浆细胞(效应B细胞)分泌的被免疫系统用来鉴别与中和外来物质如细菌、病毒等的大型Y形蛋白质。

[0025] 一种石墨烯加速ELISA技术,其特征就在于所述的抗原抗体结合是指抗原与抗体具有专一性结合的特性,即抗原与其相应的抗体具有特异性结构,由很弱的短距引力而结合的,该结合力是一种高度特异性的非共价键作用力,可以在某种程度上进行特异性结合。

[0026] 一种石墨烯加速ELISA技术,其特征就在于所述的增加抗原抗体之间的接触是指通过石墨烯吸附、分散抗原和(或)抗体分子,以增加抗原和抗体之间的接触概率,进而提高抗原与抗体的结合效率,不但能加速反应(孵育)过程,亦能加速包被过程,上述策略不但可以用于常规ELISA技术,亦可用于荧光ELISA技术、化学发光ELISA技术、PCR-ELISA技术、NSP-ELISA技术、Dot-ELISA技术、TP-ELISA技术、IMS-ELISA技术、PPA-ELISA技术等。

[0027] 一种石墨烯加速ELISA技术,其特征就在于所述的石墨烯与ELISA相结合增加抗原抗体之间的接触概率这一策略可大大减少ELISA反应和包被时间,适用于畜牧、农业、食品安全、临床诊断、科研检测以及酶免疫检测及诊断的免疫学领域,亦适用于体外诊断试剂II类和III产品中的免疫相关试剂,还适用于检测其他样本中的抗原、抗体以及半抗原等。

[0028] 一种石墨烯加速ELISA技术,其特征就在于通过一种新材料石墨烯的高吸附和高比表面特性来增加抗原和抗体之间的接触加速ELISA的策略应用于计算机软件程序和网络程序编写,提高ELISA检测效率、缩减ELISA反应和包被时间,进一步完善石墨烯与ELISA相结合的加速ELISA过程的免疫学技术。

[0029] 一种石墨烯加速ELISA技术,其特征就在于通过一种新材料石墨烯的高吸附和高比表面特性来增加抗原和抗体之间的接触加速ELISA的策略应用于酶标仪、荧光酶标仪、分光光度计、荧光分光光度计、自动酶免分析仪等提供检测吸光度值的仪器设计和开发以提高ELISA反应和包被的效率,其主要成分包括包被板、酶标记抗体和(或)抗原、标准品、缓冲液、显色液、终止液、洗涤液等。

[0030] 本发明“一种石墨烯加速ELISA技术”目的是为了增加抗原和抗体之间的接触以加速ELISA(酶联免疫吸附测定),反应时间和包被时间缩短更有利于观察结果并确保其可靠性。ELISA的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记,结合在固相载体表面的抗原或抗体仍然保持其免疫学活性,酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性又保留酶的活性。ELISA基本步骤如下:①抗原或抗体结合到固相载体表面并保持其免疫活性;②抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体,该酶标抗原或抗体既有免疫活性又有酶活性;③待检标本(测定其中的抗体或抗原)和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应,洗去未结合的抗原或抗体以及其他物质,结合在固相载体上酶量与标本中待检物质量成一定的比例,加入酶反应的底物后底物被酶催化变为有色产物,产物量与标本中待检物质量直接相关,故可根据颜色反应的深浅定性或定量分析。由于在获得包被好的抗原或抗体的固相载体所花时间比较长,37℃孵育需要2-3小时,4℃孵育需要过夜,而采用37℃孵育容易导致抗原或抗体、酶活性下降,降低检测准确性。另外在其具体检测过程中一般需要2-3小时左右,所以一个完整的ELISA过程需要3h以上。随着科技工作者和临床检验人员的工作量和接触的信息量越来越大,有效利用有限的时间完成更多的工作就极为迫

切了。本发明“一种石墨烯加速ELISA技术”利用一种新材料石墨烯与ELISA相结合的新性能加速抗原抗体结合的改良ELISA技术,利用石墨烯高吸附和高比表面特性,在ELISA反应体系中增加抗原抗体之间的接触,不仅加速了ELISA反应和包被过程,同时提高了检测的真实性和准确性。

[0031] 本发明“一种石墨烯加速ELISA技术”可应用于含有各种ELISA技术,包括各种细菌ELISA技术、各种真菌ELISA技术、各种寄生虫ELISA技术、各种病毒ELISA技术、各种致敏原ELISA技术、各种生物毒素ELISA技术、兽药农药残留ELISA技术、PCR-ELISA技术、NSP-ELISA技术、Dot-ELISA技术、TP-ELISA技术、IMS-ELISA技术、PPA-ELISA技术等领域。

[0032] ELISA是将可溶性的抗原或抗体结合到聚苯乙烯等固相载体上,利用抗原抗体结合专一性进行酶标记免疫反应的定性和定量检测方法。1971年Engvall和Perlmann发表了酶联免疫吸附剂测定用于IgG定量测定的文章,其基本原理是:①抗原或抗体物理性结合到某种固相载体表面,并保持其免疫活性。②抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体,这种酶标抗原或抗体既保留其免疫活性,又保留酶的活性。③把受检标本(测定其中的抗体或抗原)和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应,用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开,最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例,加入酶反应的底物后,底物被酶催化变为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据颜色反应的深浅定性或定量分析。由于酶的催化效率很高,故可极大地放大反应效果,从而使测定方法达到很高的敏感度。

[0033] 石墨烯具有以下主要特性:1、极高的电子迁移率:可达 $200,000\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ;2、极低的电阻率,电阻率可达 $10^{-6}\Omega\cdot\text{cm}$ ,是世界上电阻率最小的材料,亦是常温下的超导材料;3、优良的机械性能:Young's modulus  $1.1\text{Tpa}$ ;4、高比表面,质量较好的石墨烯比表面可达 $2600\text{m}^2/\text{g}$ ;5、极好的稳定性;6、生物兼容性;7、可吸附各种原子和分子等等。石墨烯扫描电镜结果见附图1。本发明“一种石墨烯加速ELISA技术”其原理是利用石墨烯高比表面、可吸附各种原子与分子、生物兼容性这一系列特性,增加抗原和抗体之间的接触以加速ELISA,反应时间缩短更有利于观察结果并确保其可靠性。石墨烯与抗原和抗体的作用原理见附图2。

[0034] 本发明“一种石墨烯加速ELISA技术”是改良的ELISA技术,并不是针对具体单个产品,无法一一详细描述。其核心操作过程有:1、含石墨烯试剂的配制:将石墨烯溶解于缓冲液及抗原或抗体以,轻轻搅动使其完全溶解,密闭保存。2、包被含有石墨烯的抗原或抗体。3、加入待测样品、质控品。4、孵育、洗涤、显色、终止反应。5、酶标仪检测。

[0035] 本发明应用领域举例:

[0036] (1) 传染病筛查或定量检测:传染性疾病是较早开始使用ELISA的领域,可用于如艾滋病、病毒性肝炎、梅毒等病原体的筛查。

[0037] (2) 耐药细菌或病毒筛查或定量检测:抗生素的耐药问题越来越受到重视,新药研发速度远远赶不上细菌抗药性的发展,ELISA技术能为耐药性问题提供前期预警以及后期检测。

[0038] (3) 食品安检的筛查或定量检测:食品安全越来越受到大家的重视,肠道病毒和致病菌以及食品安检中的转基因成分、致敏原、生物毒素、兽药残留、农药残留等可以采用本发明进行ELISA筛查或定量检测。

[0039] (4) 动物检疫筛查或定量检测:动物疾病让养殖人员蒙受巨大的经济损失,只有检查出动物所患的疾病,才能尽可能的减少养殖人员的损失,从而促进畜牧业的发展,如动物病毒、动物细菌、动物真菌、动物寄生虫、动物朊病毒等可以采用本发明进行ELISA筛查或定量检测。

[0040] (5) 其他用于ELISA筛查、定量检测的领域:如发酵工业细菌定量检测、环保有害细菌定量检测、农业病虫害筛查或定量检测、农业真菌细菌筛查或定量检测等。

#### 附图说明:

[0041] 图1为单层石墨烯SEM扫描电镜结果。

[0042] 图2为石墨烯作用于抗原抗体的原理图。代表抗体,●代表抗原,代表不含石墨烯ELISA反应体系,代表含石墨烯的ELISA反应体系。

[0043] 图3为常规不加石墨烯的ELISA实验。

[0044] 图4为缩减时间加入石墨烯的ELISA实验。

#### 具体实施方式:

[0045] 以下具体实施方式进一步阐明本发明“一种石墨烯加速ELISA技术”的内容,但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、条件、步骤及应用所做的修改或替换,均属于本发明的范围。

[0046] 主要含石墨烯试剂的配制方式:

[0047] (1) 抗原石墨烯混合物的配制:主要由抗原、缓冲液、优质石墨烯组成。具体配制过程如下:将抗原加入缓冲液中,充分混匀,加入适量的优质石墨烯即可使用。

[0048] (2) 抗体石墨烯混合物的配制:主要由抗体、缓冲液、优质石墨烯组成。具体配制过程如下:将抗体加入缓冲液中,充分混匀,加入适量的优质石墨烯即可使用。

[0049] 上述两种试剂配制方式,仅仅是为了举例方便所述,凡是把石墨烯以不同方式加入ELISA反应体系内,均应理解为石墨烯试剂配制的应有之义,即本发明的所述范围。以下实施例以第二种方式为例,即抗体石墨烯混合物配制。

[0050] 具体实施例一:大鼠C反应蛋白ELISA检测

[0051] C反应蛋白(C-reactive protein,CRP)是指在机体受到感染或组织损伤时血浆中一些急剧上升的蛋白质(急性蛋白),CRP可以激活补体和加强吞噬细胞的吞噬而起调理作用,从而清除入侵机体的病原微生物和损伤,坏死,凋亡的组织细胞,在机体的天然免疫过程中发挥重要的保护作用。本发明选用双抗夹心法检测C反应蛋白的抗原,以96孔板为例。

[0052] 取适量的优质石墨烯先溶于缓冲液中,充分混匀,加入适量优质石墨烯即可使用,其中缓冲液配制:

	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	1.59g
	$\text{NaHCO}_3$	2.93g
[0053]	$\text{NaN}_3$	0.05g
	超纯水	800ml

[0054] 以上物质充分溶解,调节pH至9.6,补超纯水至1000ml。再加入适量的石墨烯,配制

成含有石墨烯的缓冲液。

[0055] 抗体石墨烯混合物的配制:

Anti-C Reactive Protein 抗体 10 μg

[0056] 缓冲液(含石墨烯) 10ml

10ml

[0057] 常规抗体混合物的配制:

Anti-C Reactive Protein 抗体 10 μg

[0058] 缓冲液(不石墨烯) 10ml

10ml

[0059] 取适量的抗体石墨烯混合物加入酶标板(亦可为其他固相载体)每个凹孔中37℃孵育2h后无需4℃过夜;同时取适量的常规抗体混合物加入酶标板(亦可为其他固相载体)每个凹孔中37℃孵育2h后,4℃过夜。用封闭液对包被的酶标板(亦可为其他固相载体)37℃2h进行封闭,采用人工洗板或机器洗板每孔注入洗液350μl,浸泡1min,洗板5次。设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的标准品50μl,样本孔先加待测样本10μl,再加稀释液40μl,空白孔不加。除空白孔外,标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗原100μl,用封板膜封住反应孔,37℃水浴锅或恒温箱温育30min。弃去液体,吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液,静置1min,甩去洗涤液,吸水纸上拍干,如此重复洗板5次(也可用洗板机洗板)。每孔加入TMB显色底物和氧化剂各50μl,37℃避光孵育20min。每孔加入终止液(2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 50μl,15min内在450nm波长处测定各孔的OD值。

[0060] 实验结果分析:以已知浓度抗原作为定量标准品,依次稀释2倍作为标准曲线,以标准品浓度作纵坐标,对应OD值作横坐标,绘制出标准品线性回归曲线,按曲线方程计算各样本浓度值。

[0061] 设置常规不加石墨烯的ELISA实验(附图3)。其包被时间为:37℃孵育2h后,4℃过夜;其反应时间为:37℃孵育2h。其标准品浓度与对应OD值如下,其公式为: $y = 32.909x - 2.3476$   $R^2 = 0.997$ 。

[0062]

Con	0pg/ml	3pg/ml	6pg/ml	12pg/ml	24pg/ml	48pg/ml
OD	0.005	0.153	0.245	0.497	0.791	1.518

[0063] 样本孔OD值为0.264,根据公式计算其浓度CRP为6.340pg/ml

[0064] 设置缩短时间加入石墨烯的ELISA实验(附图4)。其包被时间为:直接37℃孵育1h;其反应时间为:37℃孵育30min。其标准品浓度与对应OD值如下,其公式为: $y = 33.223x - 2.2189$   $R^2 = 0.9962$ 。

[0065]

Con	0pg/ml	3pg/ml	6pg/ml	12pg/ml	24pg/ml	48pg/ml
OD	0.037	0.149	0.24	0.493	0.787	1.494

[0066] 样本孔OD值为0.259,根据公式计算其浓度CRP为6.386pg/ml

[0067] 附图3、4分析:加入石墨烯并且缩短孵育时间和包被时间后,其结果与正常不加石墨烯的ELISA实验未见明显差异。综上可知,在其他条件不变的情况下,加入石墨烯能明

显加速ELISA反应。

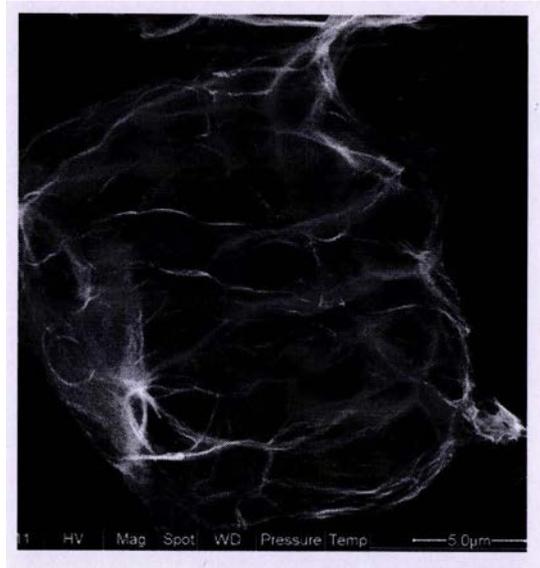


图1

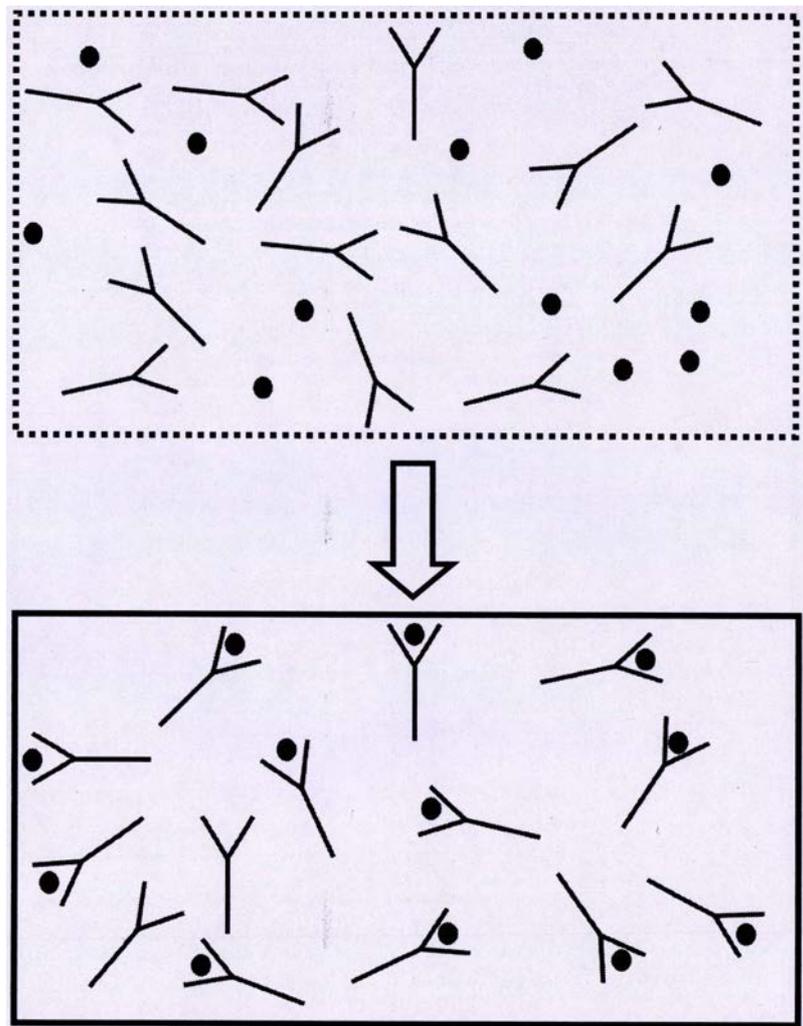


图2

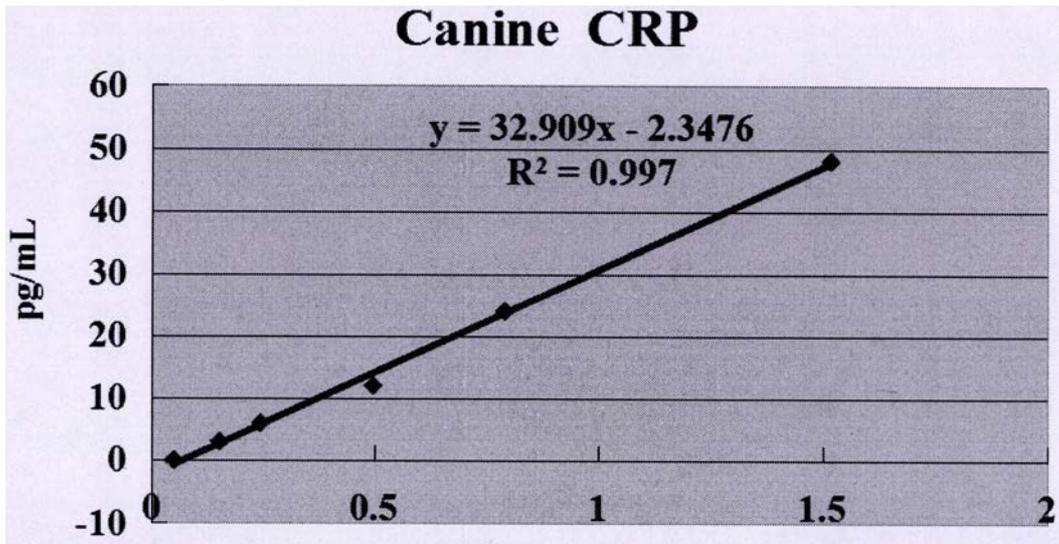


图3

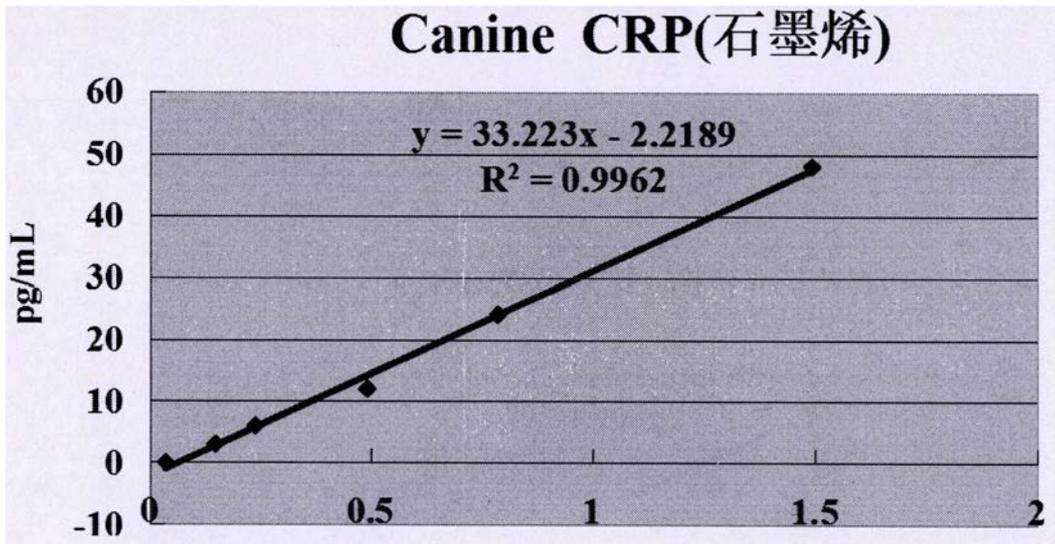


图4

专利名称(译)	一种石墨烯加速ELISA技术		
公开(公告)号	<a href="#">CN107064487A</a>	公开(公告)日	2017-08-18
申请号	CN2017110077713.1	申请日	2017-02-14
[标]发明人	刘涛 王国强 王红 郭喜 孙夏青 徐娜娜		
发明人	刘涛 王国强 王红 郭喜 孙夏青 徐娜娜		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5306		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明“一种石墨烯加速ELISA技术”，其特征是一种新材料石墨烯与ELISA相结合的新性能加速抗原抗体结合的改良ELISA技术，利用石墨烯高吸附和高比表面特性，在ELISA反应体系中增加抗原抗体之间的接触效率，加速ELISA(酶联免疫吸附测定)反应及包被过程。该技术涉及免疫学及免疫检测领域，是一种石墨烯与ELISA相结合的理论创新，即利用石墨烯具有吸附分子和高比表面特性增加抗原抗体之间的接触概率，解决ELISA反应和包被时间过长的问题。

