



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109738634 A

(43)申请公布日 2019.05.10

(21)申请号 201910040701.0

(22)申请日 2019.01.16

(71)申请人 安徽科技学院

地址 233100 安徽省滁州市凤阳县东华路

(72)发明人 刘国东 于庆才 张静 钱立生

张学记

(74)专利代理机构 合肥广源知识产权代理事务

所(普通合伙) 34129

代理人 宋宇晴

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

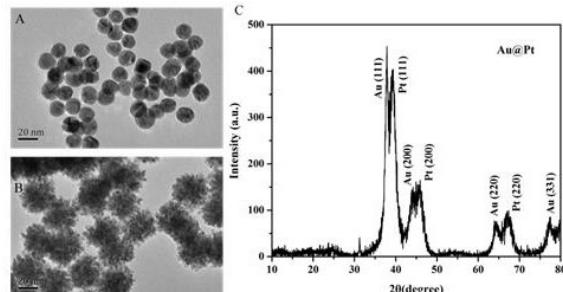
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种提高侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测灵敏性的催化剂

(57)摘要

本发明属于侧向流动免疫分析技术领域,具体涉及一种提高侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测灵敏性的催化剂,所述目标蛋白为兔免疫球蛋白,所述催化剂为金铂纳米花,所述金铂纳米花作为标记物与抗体相连得到金铂纳米花-抗体混合液,用于侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测,检测前添加显色底物。本发明相比现有技术具有以下优点:由本发明中方法制备所得金铂纳米花用于兔免疫球蛋白相比现有技术对过氧化酶的显色底物AEC有催化作用,在检测目标蛋白的情况下,对显色底物的催化作用较强,提高侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测灵敏性。



1. 一种提高侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测灵敏性的催化剂,其特征在于,所述目标蛋白为兔免疫球蛋白,所述催化剂为金铂纳米花,所述金铂纳米花的制备方法包括以下步骤:

(1) 将0.5mL的1wt%氯金酸溶液加入到50mL水溶液中,得到氯金酸预制液,加热至沸腾,并在搅拌条件下,将0.8mL的1wt%柠檬酸钠溶液快速加入,得到金红色溶液,即得到了金纳米颗粒溶液;

(2) 将上述金纳米颗粒溶液加热至沸腾,加入1mL的0.1M抗坏血酸,再加入1.25mL的1wt%氯铂酸溶液持续加热25分钟后,得到金铂纳米花溶液。

2. 如权利要求1所述一种提高侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测灵敏性的催化剂,其特征在于,所述金铂纳米花作为标记物与抗体相连得到金铂纳米花-抗体混合液,用于侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测,检测前添加显色底物。

3. 如权利要求2所述一种提高侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测灵敏性的催化剂,其特征在于,所述目标蛋白为兔免疫球蛋白,抗体为羊抗兔IgG。

4. 如权利要求3所述一种提高侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测灵敏性的催化剂,其特征在于,所述金铂纳米花-抗体混合液的制备方法包括:在9000转/分钟的条件下离心10分钟洗涤500微升浓度为1.0mg/mL的金铂纳米花溶液,完成后弃去上清液,得到沉淀重悬于1.0mL、pH9.0的水中,然后加入25微升浓度为1.0mg/mL的抗体,在室温条件下搅拌反应2小时,加入相当于其重量5%乙醇胺溶液搅拌30分钟,再加入相当于其重量10%BSA搅拌1小时,然后将所得混合物在9000转/分钟的条件下离心10分钟;

弃去上清液,将沉淀重悬于洗涤缓冲液中,重复上述步骤3次,将沉淀重悬于含有20mM磷酸钠缓冲液、5wt%牛血清白蛋白、10wt%蔗糖和0.25wt%吐温-20的洗脱缓冲液中,得到金铂纳米花-抗体混合液,在4℃的条件下备用。

5. 如权利要求4所述一种提高侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测灵敏性的催化剂,其特征在于,所述兔免疫球蛋白与金铂纳米花-抗体混合液混合发生免疫反应,得到金铂纳米花-抗体-兔免疫球蛋白复合物,所述侧向流动生物传感器的测试区设有抗体,当金铂纳米花-抗体-兔免疫球蛋白复合物到达测试区时,通过二次免疫反应,得到夹心型复合物金铂纳米花-抗体-兔免疫球蛋白-抗体,在兔免疫球蛋白的浓度为0.5ng/mL的情况下,测试区出现可见测试条带;

在二次免疫反应完成后在测试区添加显色底物AEC 和H₂O₂,在兔免疫球蛋白的浓度为0.05ng/mL的情况下,测试区出现可见测试条带。

一种提高侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测灵敏性的催化剂

技术领域

[0001] 本发明属于侧向流动免疫分析技术领域,具体涉及一种提高侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测灵敏性的催化剂。

背景技术

[0002] 蛋白质是生命的物质基础,在生物过程中起着关键作用。蛋白质靶标的检测在各种研究领域引起了相当大的兴趣,包括临床诊断,治疗监测,食品安全和环境分析。通常用于检测蛋白质的技术包括银染色、琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶电泳、放射免疫测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹和质谱。然而,这些技术花费大量时间和金钱,并且由于需要复杂的仪器和训练有素的人员而限于实验室使用。因此,开发易于操作且简单的快速检测蛋白质的方法仍然是必需的并且是非常重要的。

[0003] 侧向流动免疫分析法是一种实时监控的纸基生物传感器,由于其成本低,操作简单等优点而备受关注。侧向流动免疫分析的另一个主要优点是它可以在各种生物样本上进行,包括血浆、汗、唾液、血清、尿和全血。此外,用于检测所需的样本量比常规检测中所需的检测要小得多。因此,侧向流动免疫分析作为一种非常实用的便携式分析工具已被广泛用于蛋白质的快速检测。目前,包含金纳米颗粒、量子点、磁性纳米颗粒、上转换发光纳米颗粒和活性拉曼纳米材料在内的各种纳米颗粒都已被用作侧向流动免疫分析的标记。在这些材料中,金纳米颗粒是应用最广泛的标签,因为它们具有独特的光学性质和容易表面修饰。然而,由于金纳米颗粒的表面积有限,基于金纳米颗粒的侧向流动免疫分析不能检测生理液体中某些低浓度的蛋白质生物标记物。与高灵敏度传感器相关的其他纳米粒子标签确实可以大大提高侧向流动免疫分析的灵敏度,但不幸的是这些定量方法都依赖于用于复杂的信号读出仪器,并且这些纳米材料标签难以制备。因此,迫切需求没有上述缺点的高灵敏度的新型侧向流动分析信号策略对于蛋白质靶标的快速检测,并且对于许多基础研究和医学诊断是有很有用的。

[0004] 包括铂纳米颗粒和铂纳米线在内的铂基纳米材料表现出与天然酶类似的优异催化能力,被称为纳米酶,作为超级催化剂,铂纳米酶在替代辣根过氧化物酶在传统酶联免疫吸附测定和其它生物检测中表现出优异的性能,与天然酶相比,铂纳米酶具有低成本的可控合成和催化活性可调性的优点,本发明中通过制备金铂纳米花作为催化剂,以提高侧向流动分析信号的灵敏性,以实现快速检测。

发明内容

[0005] 本发明的目的是针对现有问题,提供了一种提高侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测灵敏性的催化剂。

[0006] 本发明是通过以下技术方案实现的:一种提高侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测灵敏性的催化剂,所述目标蛋白为兔免疫球蛋白,所述催化剂为金铂纳米花,所述

金铂纳米花的制备方法包括以下步骤：

(1) 将0.5mL的1wt%氯金酸溶液加入到50mL水溶液中,得到氯金酸预制液,加热至沸腾,并在搅拌条件下,将0.8mL的1wt%柠檬酸钠溶液快速加入,得到金红色溶液,即得到了金纳米颗粒溶液;

(2) 将上述金纳米颗粒溶液加热至沸腾,加入1mL的0.1M抗坏血酸,再加入1.25 mL的1wt%氯铂酸溶液持续加热25分钟后,得到金铂纳米花溶液。

[0007] 作为对上述方案的进一步改进,所述金铂纳米花作为标记物与抗体相连得到金铂纳米花-抗体混合液,用于侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测,检测前添加显色底物。

[0008] 作为对上述方案的进一步改进,所述目标蛋白为兔免疫球蛋白,抗体为羊抗兔IgG。

[0009] 作为对上述方案的进一步改进,所述金铂纳米花-抗体混合液的制备方法包括:在9000转/分钟的条件下离心10分钟洗涤500微升浓度为1.0mg/mL的金铂纳米花溶液,完成后弃去上清液,得到沉淀重悬于1.0mL、pH9.0的水中,然后加入25微升浓度为1.0mg/mL的抗体,在室温条件下搅拌反应2小时,加入相当于其重量5%乙醇胺溶液搅拌30分钟,再加入相当于其重量10%BSA搅拌1小时,然后将所得混合物在9000转/分钟的条件下离心10分钟;

弃去上清液,将沉淀重悬于洗涤缓冲液中,重复上述步骤3次,将沉淀重悬于含有20mM磷酸钠缓冲液、5wt%牛血清白蛋白、10wt%蔗糖和0.25wt%吐温-20的洗脱缓冲液中,得到金铂纳米花-抗体混合液,在4°C的条件下备用。

[0010] 作为对上述方案的进一步改进,所述兔免疫球蛋白与金铂纳米花-抗体混合液混合发生免疫反应,得到金铂纳米花-抗体-兔免疫球蛋白复合物,所述侧向流动生物传感器的测试区设有抗体,当金铂纳米花-抗体-兔免疫球蛋白复合物到达测试区时,通过二次免疫反应,得到夹心型复合物金铂纳米花-抗体-兔免疫球蛋白-抗体,在兔免疫球蛋白的浓度为0.5ng/mL的情况下,测试区出现可见测试条带;

在二次免疫反应完成后在测试区添加显色底物AEC 和H₂O₂,在兔免疫球蛋白的浓度为0.05ng/mL的情况下,测试区出现可见测试条带。

[0011] 本发明相比现有技术具有以下优点:由本发明中方法制备所得金铂纳米花用于兔免疫球蛋白相比现有技术对过氧化酶的显色底物AEC有催化作用,在检测目标蛋白的情况下,对显色底物的催化作用较强,提高侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测灵敏性,由兔免疫球蛋白的浓度为0.5ng/mL时测试区出现测试条带改进为在浓度为0.05ng/mL时测试区出现测试条带。

附图说明

[0012] 图1是金铂纳米花制备过程表征图。

[0013] 图2是基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器在蛋白质靶标不同浓度条件下便携式条形读取器的相应响应。

[0014] 图3是金铂纳米花表征实验图。

具体实施方式

[0015] 下面结合附图对本发明进一步说明。

[0016] 如图1中所示,一种提高侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测灵敏性的催化剂,所述目标蛋白为兔免疫球蛋白,所述催化剂为金铂纳米花,所述金铂纳米花的制备方法包括以下步骤:

(1) 将0.5mL的1wt%氯金酸溶液加入到50mL水溶液中,得到氯金酸预制液,加热至沸腾,并在搅拌条件下,将0.8mL的1wt%柠檬酸钠溶液快速加入,得到金红色溶液,即得到了金纳米颗粒溶液,如图1(A)中金纳米粒子的典型透射电子显微图像,其粒径约为16.41nm;;

(2) 将上述金纳米颗粒溶液加热至沸腾,加入1mL的0.1M抗坏血酸,再加入1.25 mL的1wt%氯铂酸溶液持续加热25分钟后,得到金铂纳米花溶液,图1(B)中为金铂纳米花的典型透射电子显微图像,其粒径约为31.11nm,其中在金铂纳米花表面生长的铂纳米线的长度约为15纳米,直径为2纳米;图1(C)中所示,通过能量色散X射线衍射(XRD)来测定金铂纳米花的化学组成金铂核壳结构,纳米花的XRD图谱显示出了Au fcc和Pt fcc峰,表明其是非合金结构。并且金铂纳米花的峰位于纯金和纯铂纳米颗粒之间,表明所得到的纳米花不是单个纳米颗粒的混合物而是双金属纳米结构。

[0017] 其中,所述金铂纳米花作为标记物与抗体相连得到金铂纳米花-抗体混合液,用于侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测,检测前添加显色底物;所述目标蛋白为兔免疫球蛋白,抗体为羊抗兔IgG。

[0018] 其中,所述金铂纳米花-抗体混合液的制备方法包括:在9000转/分钟的条件下离心10分钟洗涤500微升浓度为1.0mg/mL的金铂纳米花溶液,完成后弃去上清液,得到沉淀重悬于1.0mL、pH9.0的水中,然后加入25微升浓度为1.0mg/mL的抗体,在室温条件下搅拌反应2小时,加入相当于其重量5%乙醇胺溶液搅拌30分钟,再加入相当于其重量10%BSA搅拌1小时,然后将所得混合物在9000转/分钟的条件下离心10分钟;

弃去上清液,将沉淀重悬于洗涤缓冲液中,重复上述步骤3次,将沉淀重悬于含有20mM磷酸钠缓冲液、5wt%牛血清白蛋白、10wt%蔗糖和0.25wt%吐温-20的洗脱缓冲液中,得到金铂纳米花-抗体混合液,在4℃的条件下备用。

[0019] 其中,所述兔免疫球蛋白与金铂纳米花-抗体混合液混合发生免疫反应,得到金铂纳米花-抗体-兔免疫球蛋白复合物,所述侧向流动生物传感器的测试区设有抗体,当金铂纳米花-抗体-兔免疫球蛋白复合物到达测试区时,通过二次免疫反应,得到夹心型复合物金铂纳米花-抗体-兔免疫球蛋白-抗体,在兔免疫球蛋白的浓度为0.5ng/mL的情况下,测试区出现可见测试条带,如图2(A)所示,在添加显色底物前,在兔免疫球蛋白不同浓度的条件下,基于金铂纳米花用侧向流动生物传感器检测后得到对应的测试线和控制线的照片图像与由便携式条带读取器读取得到相应测试条带的峰面积结果;

在二次免疫反应完成后在测试区添加显色底物AEC 和H₂O₂,在兔免疫球蛋白的浓度为0.05ng/mL的情况下,测试区出现可见测试条带,如图2(B)所示,在添加显色底物后,在蛋白质靶标不同浓度的条件下,基于金铂纳米花用侧向流动生物传感器检测后得到对应的测试线和控制线的照片图像与由便携式条带读取器读取得到相应测试条带的峰面积结果。

[0020] 在检测时,在上样缓冲液中,将100微升含有不同浓度的兔免疫球蛋白样品溶液与2.5微升金铂纳米花-抗体偶联物溶液混合,得到混合物; 10分钟后,再加入60微升的上样

缓冲液洗涤侧向流动生物传感器；在20分钟内目测评估测试线和控制线，拍摄侧向流动生物传感器的图像用于定性分析；使用便携式条形读取器记录测试线和控制线的强度，即所得曲线的峰面积，用于定量分析；

在侧向流动生物传感器添加含3-氨基-9-乙基-咔唑和过氧化氢的显色底液显色，然后拍摄侧向流动生物传感器的图像用于定性分析，使用便携式条形读取器记录测试线和控制线的强度，即所得曲线的峰面积，用于定量分析。

[0021] 将抗体羊抗兔IgG作为测试线喷在硝酸纤维素膜上，喷膜重复5次，将二抗驴抗羊IgG作为控制线喷在硝酸纤维素膜上。

[0022] 设计实验，对金铂纳米花的催化效果进一步表征，设置4个实验组，实验组1为水，实验组2为金纳米颗粒溶液，实验组3为金铂纳米花溶液，实验组4为金铂纳米花-抗体混合液；对各组在添加AEC显色底物之前和之后分别制作光学图像，并在400-700nm处紫外吸收；

得到以下结果，其实验结果如图3所示：

在添加3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)前

如图3(A)左图所示，实验组1为无色，实验组2为偏红色，实验组3和实验组4均为黑色；

如图3(A)右图所示，实验组2观察到在520nm附近存在强吸收峰，并且在其他组溶液或水汇总未显示吸收峰；

在添加3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)后

如图3(B)左图所示，实验组3和实验组4中溶液由黑色变为红色，表明金铂纳米花催化AEC底物产生为红色产物；实验组2由红色变为蓝色，表明金纳米颗粒对AEC底物催化作用较弱；

如图3(B)右图所示，在实验组2、实验组3和实验组4中观察到增宽的吸收峰，并且在实验组2中520nm处的吸收峰消失。

[0023] 上述结果表明，铂纳米线成功的负载在金纳米颗粒表面，对AEC显色底物具有良好的催化作用，能够有效提高侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测灵敏性。

[0024] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

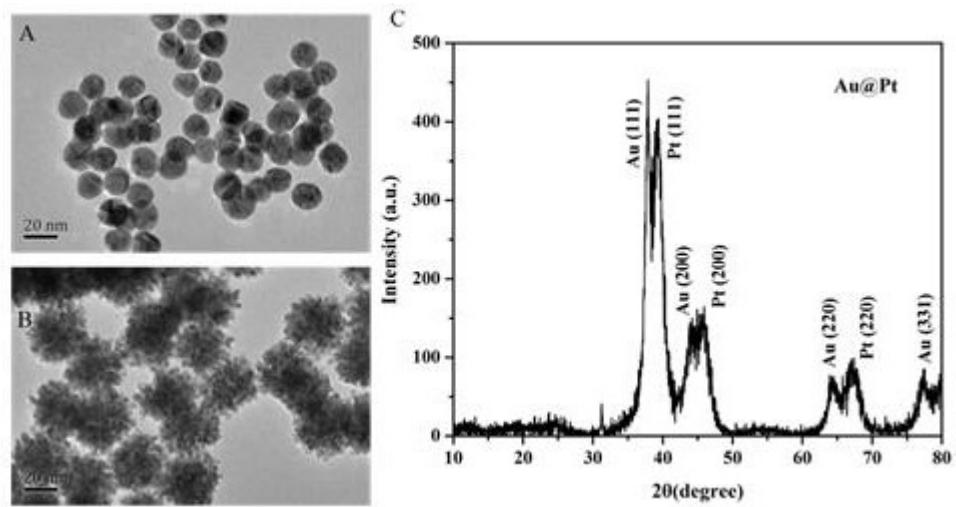


图1

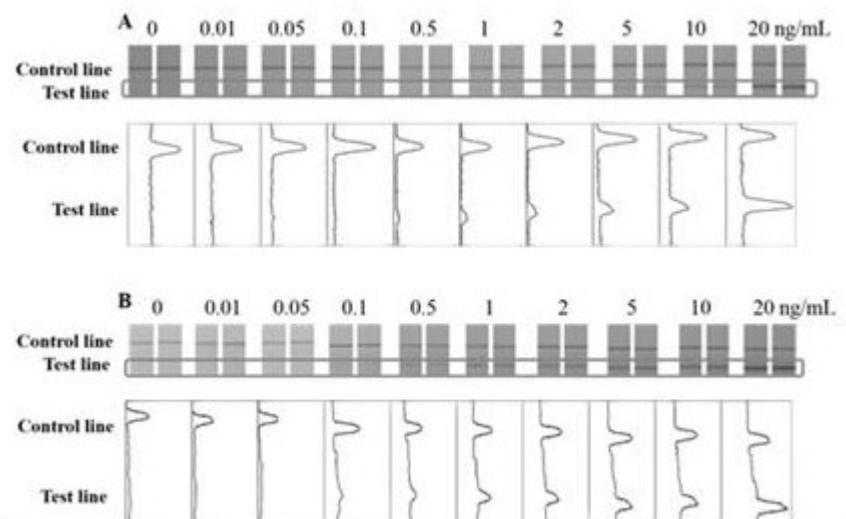


图2

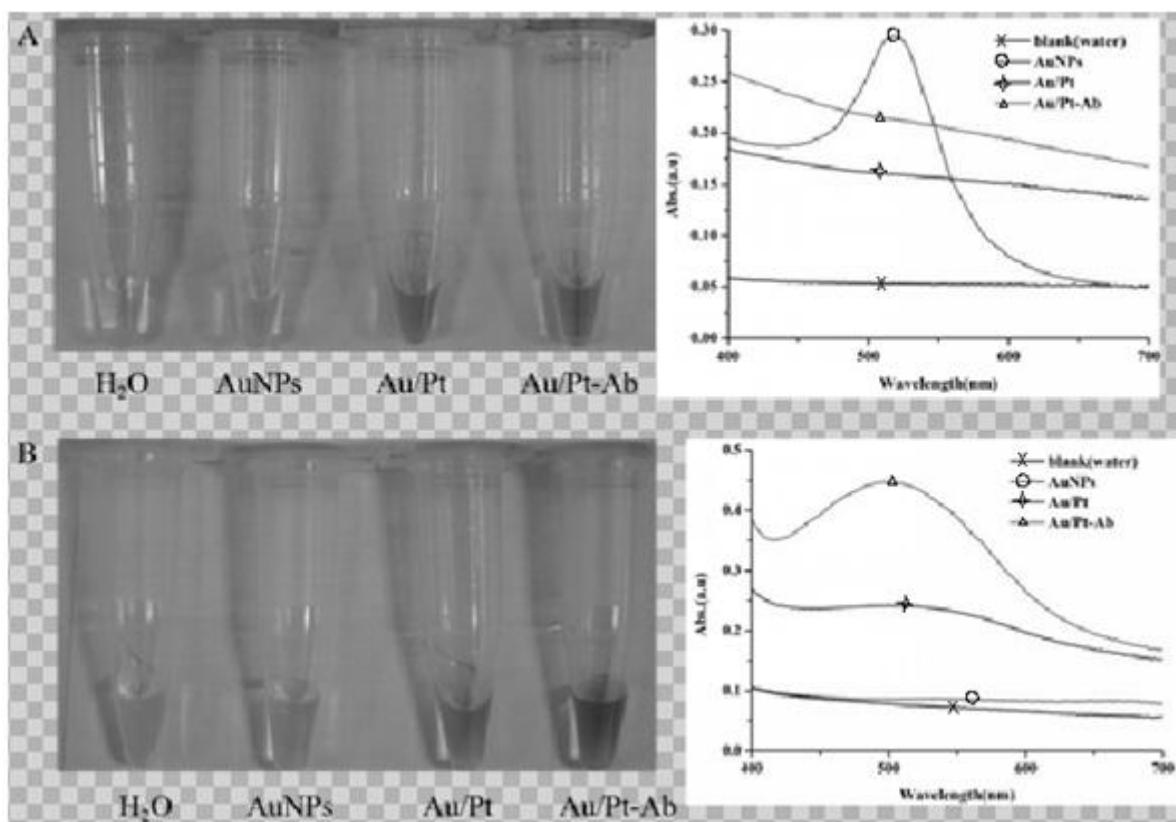


图3

专利名称(译)	一种提高侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测灵敏性的催化剂		
公开(公告)号	CN109738634A	公开(公告)日	2019-05-10
申请号	CN201910040701.0	申请日	2019-01-16
[标]申请(专利权)人(译)	安徽科技学院		
申请(专利权)人(译)	安徽科技学院		
当前申请(专利权)人(译)	安徽科技学院		
[标]发明人	刘国东 于庆才 张静 钱立生 张学记		
发明人	刘国东 于庆才 张静 钱立生 张学记		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明属于侧向流动免疫分析技术领域，具体涉及一种提高侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测灵敏性的催化剂，所述目标蛋白为兔免疫球蛋白，所述催化剂为金铂纳米花，所述金铂纳米花作为标记物与抗体相连得到金铂纳米花-抗体混合液，用于侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测，检测前添加显色底物。本发明相比现有技术具有以下优点：由本发明中方法制备所得金铂纳米花用于兔免疫球蛋白相比现有技术对过氧化酶的显色底物AEC有催化作用，在检测目标蛋白的情况下，对显色底物的催化作用较强，提高侧向流动生物传感器对低浓度目标蛋白检测灵敏性。

