



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106248951 B

(45)授权公告日 2018.03.06

(21)申请号 201610539941.1

(22)申请日 2016.07.11

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106248951 A

(43)申请公布日 2016.12.21

(73)专利权人 福州市传染病医院  
地址 350025 福建省福州市鼓楼区西洪路  
312号

(72)发明人 刘景丰 曾永毅 刘小龙 张晓龙  
郑爱仙 廖乃顺

(74)专利代理机构 杭州千克知识产权代理有限公司 33246  
代理人 冷红梅

(51)Int.Cl.  
G01N 33/68(2006.01)  
G01N 33/532(2006.01)  
G01N 21/64(2006.01)

(56)对比文件  
CN 104330393 A,2015.02.04,  
CN 102495207 A,2012.06.13,  
CN 105543211 A,2016.05.04,  
CN 104262487 A,2015.01.07,  
CN 104087572 A,2014.10.08,  
EP 0490839 A2,1992.06.17,  
WO 2012174402 A2,2012.12.20,  
Xiaoling Wu et al..Facile synthesis

of multiple enzyme-containing metal-

organic frameworks in a  
biomoleculefriendly environment.《Chem.  
Commun.》.2015,第51卷  
Dingbin Liu et al..Glucose Oxidase-  
Catalyzed Growth of Gold Nanoparticles  
Enables Quantitative Detection of  
Attomolar Cancer Biomarkers.《Analytical  
Chemistry》.2014,第86卷  
Xiaoling Wu et al..Metal-organic  
frameworks and inorganic nanoflowers: a  
type of emerging inorganic crystal  
nanocarrier for enzyme immobilization.  
《Catalysis Science & Technology》.2015,第5  
卷  
Fengjiao Lyu et al..One-Pot Synthesis  
of Protein-Embedded Metal-Organic  
Frameworks with Enhanced Biological  
Activities.《Nano Letters》.2014,第14卷(续)  
审查员 杨玉路

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称  
一种检测galectin-4的荧光酶联免疫分析  
方法

(57)摘要  
本发明涉及一种检测galectin-4的荧光酶  
联免疫分析方法,该方法通过目标物质结合的酶  
标复合物上的葡萄糖氧化酶催化葡萄糖产生过  
氧化氢,再加入亚铁离子溶液产生活性氧来淬灭  
金纳米簇溶液的荧光,利用荧光光谱仪测定荧光

变化进行对目标分子的定量检测。本方法所用荧  
光金纳米簇发光稳定、对活性氧的响应灵敏,用  
作检测探针在可控性上更稳定、操作更方便。本  
方法所构建检测体系具有合成简单、成本低、灵  
敏度和稳定性高等优点,有望在临床生物分子检  
测上得到更广泛应用扩展。

CN 106248951 B

[接上页]

(56)对比文件

Zhentaο Luo et al..From Aggregation-Induced Emission of Au(I)-Thiolate Complexes to Ultrabright Au(0)@Au(I)-Thiolate Core-Shell Nanoclusters.《Journal

of the American Chemical Society》.2012,第134卷

Xiaoling Wu et al..Polydopamine tethered enzyme/metal-organic framework composites with high stability and reusability.《Nanoscale》.2015,第7卷

1. 一种检测galectin-4的荧光酶联免疫分析方法,所述方法包括:

(1) 合成荧光金纳米簇;

(2) 固定葡萄糖氧化酶:将醋酸锌溶液或者硝酸锌溶液或者氯化锌溶液中的一种或者几种二价锌离子混合溶液与2-甲基咪唑溶液混合,锌离子与2-甲基咪唑溶液的摩尔浓度比为1:4,再加入葡萄糖氧化酶溶液至葡萄糖氧化酶浓度为0.25mg/mL,反应30分钟后,离心洗涤收集得G0x/Z1F-8;将G0x/Z1F-8分散于浓度10mM的Tris-HCl缓冲液中加入多巴胺溶液至多巴胺终浓度为0.5mg/mL,进行自聚合反应1小时,离心洗涤收集得G0x/Z1F-8-PDA;将G0x/Z1F-8-PDA 200 $\mu$ L与2 $\mu$ L 1mg/mL的STV溶液于25 $\mu$ L pH 8.0的100mM PBS缓冲液中,4 $^{\circ}$ C振荡反应过夜,离心洗涤收集得G0x/Z1F-8-PDA-STV;

(3) 目标蛋白检测:

(a) 酶标板以包被稀释液包被待测蛋白,孵育后,再以洗涤液洗板;所述包被稀释液为10mM、pH 7.4的PBS;所述洗涤液组成如下:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.05%Tween-20,溶剂为50mM、pH 7.4的PBS;

(b) 加入封闭液进行封闭,再以洗涤液洗板;所述封闭液为1%BSA,溶剂为前述洗涤液;

(c) 加入生物素标记抗体孵育形成抗原-检测抗体特异反应,再以洗涤液洗板;

(d) 再加入步骤(2)所得G0x/Z1F-8-PDA-STV孵育,利用链霉亲和素与生物素特异结合将酶复合物链接至抗体上,再以洗涤液洗板;

(e) 加入5mM的葡萄糖溶液100 $\mu$ L孵育反应,37 $^{\circ}$ C反应30分钟,生成过氧化氢;

(f) 将反应液转移至离心管;

(4) 在离心管中,分别加入硫酸亚铁溶液和步骤(1)合成的荧光金纳米簇,用荧光光谱仪分别检测溶液荧光值;

(5) 梯度浓度的Galectin-4蛋白标准品按照步骤(3)、(4)方法进行检测,处理步骤(4)所得数据,绘制标准曲线;

(6) 根据待测蛋白的检测结果,对照标准曲线,获得待测蛋白的浓度数据。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于所述荧光金纳米团簇是以谷胱甘肽为还原剂和保护剂还原氯金酸溶液得到;所述荧光金纳米团簇激发波长为375nm,发射波长为500~700nm,发射峰为610nm。

## 一种检测galectin-4的荧光酶联免疫分析方法

### (一) 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测galectin-4的荧光酶联免疫分析方法。

### (二) 背景技术

[0002] Galectin-4(半乳糖凝集素-4)是 $\beta$ -半乳糖苷结合蛋白,属凝集素家族成员,它具有CRD结构域,与含 $\beta$ -半乳糖苷的糖蛋白和糖脂具有很高的亲和力,在细胞与细胞、细胞与基质之间起到特异性粘附作用,与肿瘤的转移、浸润、生长和粘附密切相关。研究表明,galectin-4的异常表达与某些癌症有关,例如,在某些发生转移的结肠癌、乳腺癌患者血清中的galectin-4含量显著提高;另外,在胰腺癌、肝细胞癌、胃癌患者中galectin-4含量也是上调的。因为galectin-4在癌细胞转移、生长等方面的重要功能,其有望成为重要的靶标分子用于诊断和治疗,所以开发灵敏的选择的检测galectin-4的方法具有重要应用价值。

[0003] 酶联免疫分析方法是最为常用的一种免疫分析方法,为了达到更好的检测灵敏度,通过纳米材料载体来提高酶与检测抗体的比率是一种常用且有效的方法。目前,已有许多纳米材料如金纳米材料、碳纳米管、石墨烯纳米片、脂质体等材料被用做酶与抗体的载体。但是,这些固定方法有些存在长时间的、共价的修饰或者复杂的组装过程、所用载体成本高等不足,限制了这些方法的应用。所以,开发一种简单、低成本、高效的酶固定方法,有很大应用价值的。

### (三) 发明内容

[0004] 本发明目的是基于简单、低成本、高效的酶固定方法,提供一种合成简单、成本低、灵敏度和稳定性高的检测galectin-4的荧光酶联免疫分析方法。

[0005] 一种检测galectin-4的荧光酶联免疫分析方法,所述方法包括:

[0006] (1) 合成荧光金纳米簇;

[0007] (2) 固定葡萄糖氧化酶:先合成葡萄糖氧化酶-金属有机框架复合物GO<sub>x</sub>/ZIF-8,然后在GO<sub>x</sub>/ZIF-8外层包裹聚多巴胺壳层得到GO<sub>x</sub>/ZIF-8-PDA,再修饰上链霉亲和素得到GO<sub>x</sub>/ZIF-8-PDA-STV;

[0008] (3) 目标蛋白检测:

[0009] i. 酶标板以包被稀释液包被目标蛋白,孵育后,再以洗涤液洗板;

[0010] ii. 加入封闭液进行封闭,再以洗涤液洗板;

[0011] iii. 加入生物素标记抗体孵育形成抗原-检测抗体特异反应,再以洗涤液洗板;

[0012] iv. 再加入步骤(2)所得GO<sub>x</sub>/ZIF-8-PDA-STV孵育,利用链霉亲和素与生物素特异结合将酶复合物链接至抗体上,再以洗涤液洗板;

[0013] v. 加入1~100mM的葡萄糖溶液孵育反应,20~37℃反应5~60分钟,生成过氧化氢;

[0014] vi. 将反应液转移至离心管;

[0015] (4) 在离心管中,分别加入硫酸亚铁溶液和步骤(1)合成的荧光金纳米簇,用荧光

光谱仪分别检测溶液荧光值；

[0016] (5) 梯度浓度的Galectin-4蛋白标准品按照步骤(3)、(4)方法进行检测,处理步骤(4)所得数据,绘制标准曲线；

[0017] (6) 根据待测蛋白样品的检测结果,对照标准曲线,获得待测蛋白样品的浓度数据。

[0018] 所述步骤(2)方法如下:将醋酸锌溶液或者硝酸锌溶液或者氯化锌溶液中的一种或者几种二价锌离子混合溶液与2-甲基咪唑溶液混合,锌离子与2-甲基咪唑溶液的摩尔浓度比为10:1~1:10,再加入葡萄糖氧化酶溶液至葡萄糖氧化酶浓度为0.1~10mg/mL,反应30分钟后,离心洗涤收集得G0x/Z1F-8;将G0x/Z1F-8分散于浓度5~50mM的Tris-HCl缓冲液中加入多巴胺溶液至多巴胺终浓度为0.05~10mg/mL,进行自聚合反应10分钟~12小时,离心洗涤收集得G0x/Z1F-8-PDA;将G0x/Z1F-8-PDA与STV溶液于pH 8.0~8.5缓冲液中,STV终浓度为1 $\mu$ g/mL~1mg/mL,共价反应10分钟~12小时,离心洗涤收集得G0x/Z1F-8-PDA-STV。

[0019] 所述荧光金纳米团簇是以谷胱甘肽为还原剂和保护剂还原氯金酸溶液得到;所述荧光金纳米团簇激发波长为375nm,发射波长为500~700nm,发射峰为610nm。

[0020] 所述包被稀释液为10mM、pH 7.4的PBS;所述洗涤液组成如下:8g/L NaCl,0.2g/L KCl,0.05% Tween-20,溶剂为50mM、pH 7.4的PBS;所述封闭液为1% BSA,溶剂为前述洗涤液。

[0021] 金属有机框架材料(MOFs)在多个领域如气体存储、传感、催化等具有良好应用。近年来,MOFs与生物分子结合构建生物复合物,可以有效提高生物分子稳定性,且合成方法简单、低成本,在生物传感方面展现潜在应用价值。金纳米簇具有良好生物相容性、光物理性质,在传感、成像等多个领域得到良好应用。本发明整合这些优点,设计了一种具有良好选择性和灵敏度的galectin-4荧光免疫分析方法。

[0022] 本发明的检测原理是基于荧光金纳米簇在活性氧存在下,荧光被显著猝灭;利用金属有机框架材料与葡萄糖氧化酶形成酶-MOFs复合材料,在其外层包裹聚多巴胺壳层,再与链霉亲和素共价反应,形成酶标探针;类似传统酶联免疫吸附反应过程,将目标蛋白吸附于酶标板,目标蛋白与生物素标记抗体形成特异结合,再与酶标探针通过生物素-链霉亲和素特异结合作用形成复合物;葡萄糖氧化酶复合物在酶标板上的吸附量与待测蛋白成比例关系,利用葡萄糖氧化酶与葡萄糖反应产生过氧化氢,再加入亚铁离子和金纳米簇,过氧化氢与亚铁离子产生活性氧,淬灭金纳米簇荧光,通过荧光光谱仪检测荧光值,实现对待测蛋白质的特异分析检测目的。

[0023] 本发明的有益效果如下:

[0024] (1) 本发明提供了一种检测galectin-4的荧光酶联免疫分析方法,具有合成简单、成本低、灵敏度和稳定性高等优点。

[0025] (2) 利用金属有机框架与酶形成复合物可以保持甚至提高酶的催化活性、稳定性;修饰聚多巴胺壳层可在温和条件下与含氨基或者巯基的蛋白或者生物化学分子反应,具有良好扩展性,有望扩宽至其它目标检测体系。

[0026] (3) 荧光金纳米簇发光稳定、对活性氧的响应灵敏,用作检测探针在可控性上更稳定、操作更方便。

[0027] (4) 通过改变识别抗体,利用该酶标签和检测探针,可扩宽至其它免疫、适配体和

基因检测,本方法可扩展到毒素、蛋白、核酸和药物等目标物分析。

#### (四)附图说明

[0028] 图1为检测galectin-4的荧光酶联免疫分析方法原理示意图。

[0029] 图2为合成的金纳米簇的吸收与荧光光谱图。

[0030] 图3为合成的G0x/Z1F-8-PDA的透射电镜图。

[0031] 图4为检测Galectin-4蛋白浓度的检测标准曲线图。

#### (五)具体实施方式

[0032] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于此:

[0033] 实施例1:

[0034] 1、金纳米团簇的合成

[0035] 合成前将所用玻璃器皿于王水中浸泡,然后用大量的水冲洗,最后用超纯水润洗待用。准确移取5毫升4mM氯金酸溶液与5毫升8mM谷胱甘肽溶液于圆底烧瓶中室温搅拌均匀。然后将烧瓶转移至70℃油浴锅反应24小时。冷却至室温后,将反应溶液移至1000Da截留分子量透析袋以超纯水透析24小时,以除去未反应完全的氯金酸和谷胱甘肽分子,将所得透析液10000rpm离心10分钟,除去沉淀,得金纳米簇溶液,保存于4度冰箱避光待用。所合成的金纳米簇的光谱图如图2所示,在375nm激发时,金纳米簇显示出明亮红色荧光,最大吸收峰位于610nm。

[0036] 2、葡萄糖氧化酶-金属有机框架复合材料-聚多巴胺-链霉亲和素合成

[0037] 在室温条件下,将2毫升40mM的醋酸锌溶液加至圆底烧瓶中,往烧瓶中加入2毫升的160mM 2-甲基咪唑溶液,之后加入含200微升含1mg葡萄糖氧化酶的水溶液,搅拌反应1分钟后,室温静置老化30分钟。之后于6500rpm离心10分钟,水洗3次以除去未反应的物质。沉淀重分散于2毫升超纯水中,得G0x/Z1F-8。

[0038] 取200微升的G0x/Z1F-8溶液加入140微升超纯水加入20微升10mg/mL多巴胺溶液再加入40微升100mM Tris-HCl缓冲液,室温振荡反应1小时。之后将反应液于9000rpm 10分钟离心,水洗3次以除去未反应物质,沉淀重分散于200微升超纯水中得G0x/Z1F-8-PDA。

[0039] 取所得G0x/Z1F-8-PDA溶液200微升加入25微升100mM PBS (pH8.0) 缓冲液,再加入2微升1mg/mL链霉亲和素溶液,四度振荡反应过夜,之后将反应液于9000rpm10分钟离心,水洗3次以除去未反应物质,沉淀重分散于200微升超纯水中。再加入25微升1%BSA溶液封闭空白位点以减少非特异吸附,反应4小时后,反应液于9000rpm 10分钟离心,重分散于0.1%BSA溶液中,得G0x/Z1F-8-PDA-STV保存于4度冰箱待用。所合成的G0x/Z1F-8-PDA的透射电镜图如图3所示,酶复合材料尺寸在400~800nm范围,外层有明显的聚多巴胺壳层。

[0040] 3、目标蛋白galectin-4检测

[0041] 图1为本发明的荧光免疫分析原理示意图,具体步骤如下:

[0042] (1) 溶液配制

[0043] 蛋白包被稀释液:10mM PBS (pH7.4);

[0044] 洗涤液:50mM PBS (pH7.4)+8g/L NaCl+0.2g/L KCl+0.05% (w/w) tween-20;

- [0045] 封闭液:1% (w/w) BSA溶液,溶剂为前述洗涤液;
- [0046] (2) 检测过程
- [0047] 包被:不同浓度的待测蛋白质用包被稀释液稀释到适当浓度,取50微升溶液加入至酶标板,4℃吸附12小时,弃去孔中溶液,洗涤液洗涤3次;
- [0048] 封闭:将300微升封闭液加至各反应孔并置于37℃2h,封闭结束后用洗涤液洗3遍;
- [0049] 检测抗体识别:加入50微升生物素标记galectin-4抗体250ng/mL并置于37℃孵育1小时,弃去孔中溶液,洗涤液洗涤5次;
- [0050] 酶标复合结合:加入50微升含5微升G0x/Z1F-8-PDA-SA溶液于酶标板中,并置于37℃振荡孵育30分钟,弃去孔中溶液,洗涤液洗涤5次;
- [0051] 催化葡萄糖反应:往酶标板各反应孔中加入100微升5mM葡萄糖溶液,置于37℃孵育30分钟;
- [0052] 荧光检测:将酶标板中的溶液移至1.5毫升离心管中,加入78微升超纯水,加入20微升金纳米簇溶液,再加入2微升1mM硫酸亚铁溶液,混匀后,用荧光光谱仪检测荧光值。设定激发波长375nm,扫描500~700nm处荧光光谱,读取610nm处荧光值。
- [0053] 梯度浓度的Galectin-4蛋白标准品按照上述方法进行检测,获得标准曲线如图4所示,随着Galectin-4蛋白浓度增加,金纳米簇荧光逐渐减弱,结果显示可检出10pg/mL的Galectin-4。
- [0054] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,凡依本发明申请专利范围所做的均等变化与修饰,皆应属本发明的涵盖范围。

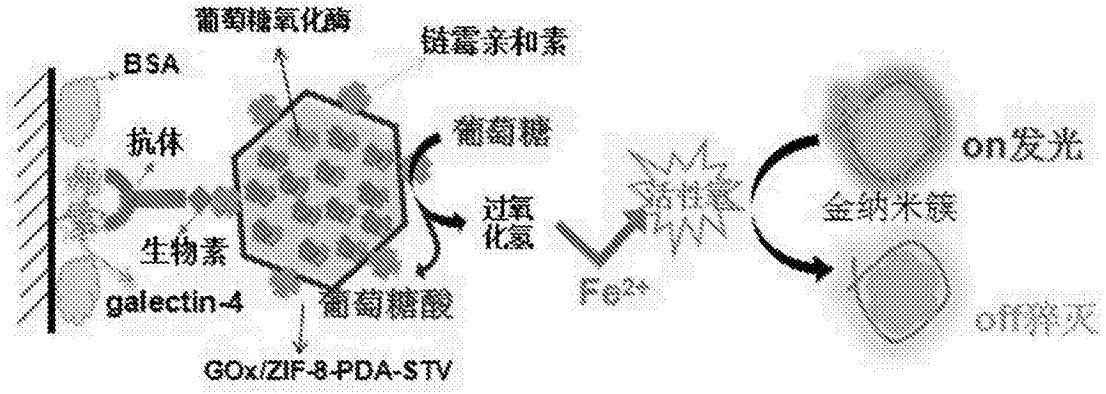


图1

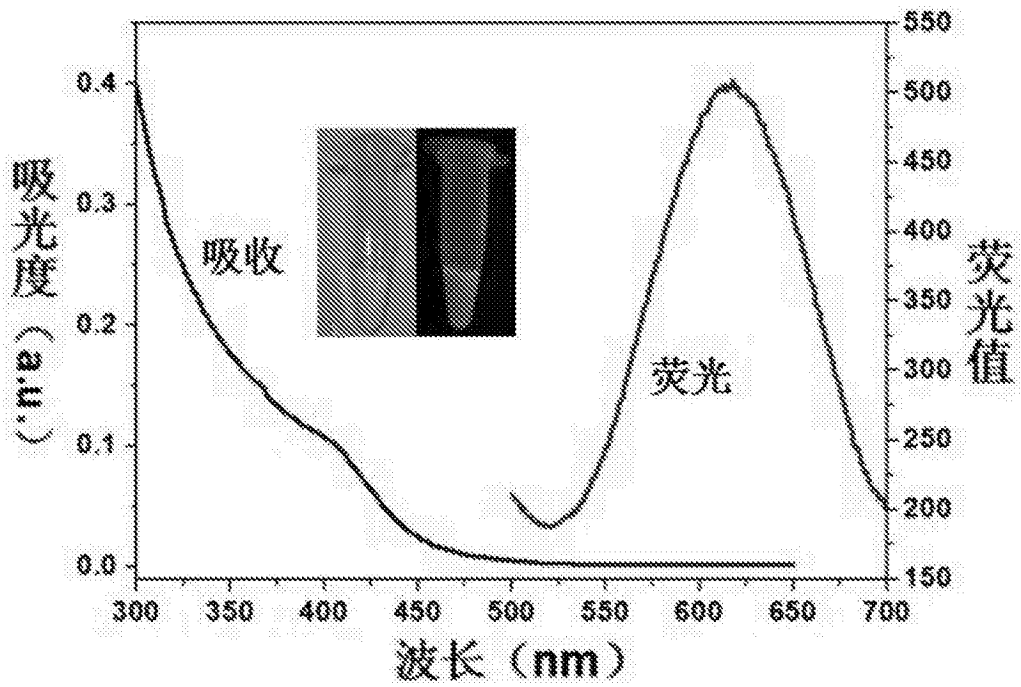


图2

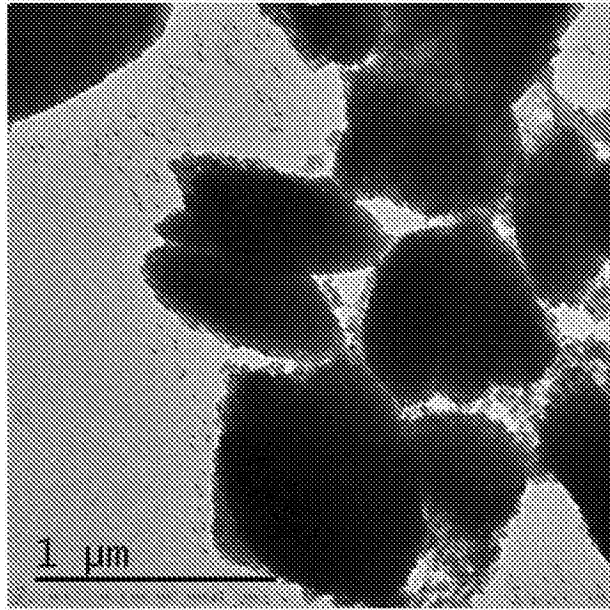


图3

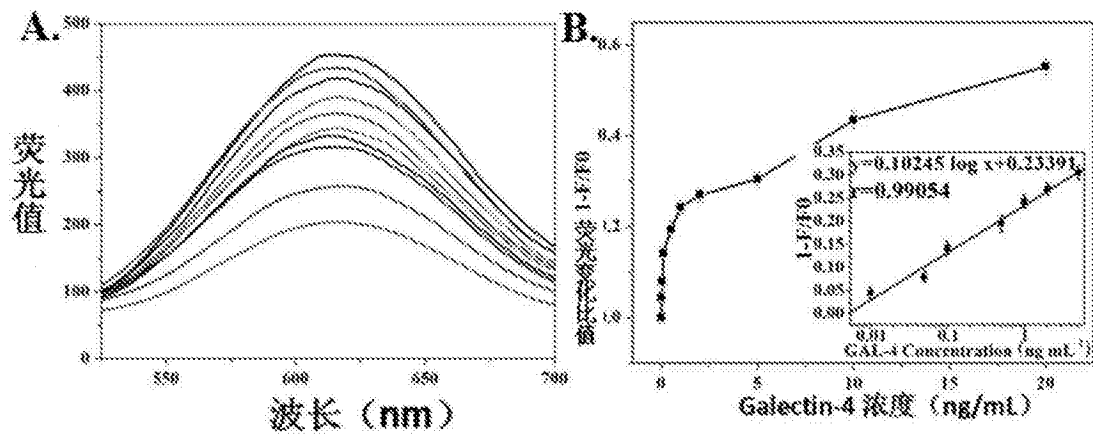


图4

专利名称(译)	一种检测galectin-4的荧光酶联免疫分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106248951B</a>	公开(公告)日	2018-03-06
申请号	CN201610539941.1	申请日	2016-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	福州市传染病医院		
申请(专利权)人(译)	福州市传染病医院		
当前申请(专利权)人(译)	福州市传染病医院		
[标]发明人	刘景丰 曾永毅 刘小龙 张晓龙 郑爱仙 廖乃顺		
发明人	刘景丰 曾永毅 刘小龙 张晓龙 郑爱仙 廖乃顺		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/532 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N33/532 G01N33/68 G01N2021/6439		
其他公开文献	CN106248951A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种检测galectin-4的荧光酶联免疫分析方法，该方法通过目标物质结合的酶标复合物上的葡萄糖氧化酶催化葡萄糖产生过氧化氢，再加入亚铁离子溶液产生活性氧来淬灭金纳米簇溶液的荧光，利用荧光光谱仪测定荧光变化进行对目标分子的定量检测。本方法所用荧光金纳米簇发光稳定、对活性氧的响应灵敏，用作检测探针在可控性上更稳定、操作更方便。本方法所构建检测体系具有合成简单、成本低、灵敏度和稳定性高等优点，有望在临床生物分子检测上得到更广泛应用扩展。

