



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104849449 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201510243543. 0

(22) 申请日 2015. 05. 13

(71) 申请人 东南大学

地址 210009 江苏省南京市玄武区四牌楼 2 号

(72) 发明人 张宇 范霖 田艳艳 娄豆豆
张熙之 马明 顾宁

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

代理人 沈振涛

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

酶标抗体 - 金纳米探针在二氨基联苯胺催化显色及暗场成像的应用

(57) 摘要

本发明提供了酶标抗体 - 金纳米探针在二氨基联苯胺催化显色及暗场成像中的应用。还提供了一种包括上述酶标抗体 - 金纳米探针免疫组化检测试剂盒。本发明将酶标抗体 - 金纳米探针催化二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 从而可实现协同增强的暗场免疫组化检测, 并建立了量化判读。

1. 酶标抗体 - 金纳米探针在二氨基联苯胺催化显色及协同增强暗场成像中的应用。

2. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在於:所述酶标抗体 - 金纳米探针 (GNP-Ab-HRP) 采用以下方法制得:选用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔鼠通用酶标二抗构建酶标抗体 - 金纳米探针 (GNP-Ab-HRP),采用静电吸附法将鼠兔通用型酶标二抗偶联到金纳米颗粒上,并用 1% BSA 封闭,离心即得 GNP-Ab-HRP 探针。

3. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在於:所述酶标抗体 - 金纳米探针 (GNP-Ab-HRP) 的粒径为 10-100nm,每个酶标抗体 - 金纳米探针 (GNP-Ab-HRP) 表面有 5-500 酶标抗体。

4. 一种包括权利要求 1 至 3 任一项中所述的酶标抗体 - 金纳米探针免疫组化检测试剂盒,其特征在於:

包括彼此独立的一抗溶液、酶标抗体 - 金纳米探针溶液、DAB 显色液和洗涤液;

所述一抗溶液包括:一抗、防腐剂和磷酸盐缓冲液 (pH = 7-8);

所述酶标抗体 - 金纳米探针溶液包括:10-500 μ g/ml 酶标抗体 - 金纳米探针、0.1-5% 封闭蛋白和磷酸盐缓冲液 (pH = 8-10);

所述 DAB 显色液包括彼此独立的 DAB 显色液 I、DAB 显色液 II 和 1-60% 过氧化氢,使用前按 1:1:1 混合;

所述洗涤液包括质量百分比为 0.01-2% 吐温 -20 和磷酸盐缓冲液 (pH = 7-8);

各组分用量如下表:

试剂	用量
一抗溶液	1-5 μ l
酶标抗体 - 金纳米探针溶液	20-300 μ l
DAB 显色液	50-300 μ l
洗涤液	100-1000 μ l/ 次洗涤

5. 权利要求 3 所述的免疫组化试剂盒在肿瘤细胞检测中的应用。

6. 如权利要求 4 所述的应用,其特征在於:包括以下步骤:

(1) 酶标抗体 - 金纳米探针的构建

选用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔鼠通用酶标二抗构建酶标抗体 - 金纳米探针 (GNP-Ab-HRP),采用静电吸附法将鼠兔通用型酶标二抗偶联到金纳米颗粒上,并用 1% BSA 封闭,离心即得 GNP-Ab-HRP 探针;

(2) 暗场免疫组化检测方法

GNP-Ab-HRP 催化 DAB 显色,再利用其进行双模态免疫组化检测,并实现量化判读:将待测样品按常规方法预处理后,先与一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,再与酶标抗体 - 金纳米探针 (GNP-Ab-HRP) 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,用 PBS-T 洗涤后进行 DAB 显色,在暗场显微镜下观察;

(3) 判读方法及标准

1) 对暗场成像图进行取色;

2) 分析目标颜色面积,计算红色面积 (R) 和红色与黄绿色面积和 (S) 的比值 N;

3) 通过将 R 值和 N 值和标准区间比对,确定目标颜色面积处于哪种阴性 / 阳性区间;其中,区间判断标准为:当 $R < 400$ 时,为“-”;当 $400 < R < 10000$ 且 $N < 0.26$ 时,为“+”;当 $400 < R < 10000$ 且 $0.26 \leq N \leq 0.35$ 时,为“++”;当 $S \geq 10000$ 且 $N > 0.35$ 时,为“+++”;

4) 得出检测结论;

- 5) 输出只含有目标颜色的检测图片。
7. 酶标抗体 - 金纳米探针在二氨基联苯胺催化显色反应中的应用。

酶标抗体 - 金纳米探针在二氨基联苯胺催化显色及暗场成像的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及酶标抗体 - 金纳米探针在二氨基联苯胺催化显色及暗场成像中的应用,属于纳米材料及生物医学纳米技术领域。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤居高不下的死亡率和高昂的治疗费用给患者和家属都带来巨大的痛苦和压力,准确灵敏的检测方法不仅可以实现肿瘤的早期诊断,也能更好地给患者提供个体化医疗,降低患者的痛苦。

[0003] 现今,免疫酶标法以其定位准确、对比度高等优点已成为临床肿瘤诊断中不可缺少的重要诊断手段。其基本原理是先以功能性酶标记的抗体与细胞或组织上的待测物质直接或间接结合,接着加入酶的显色底物,生成有色的不溶于水的产物,利用光学显微镜或电子显微镜观察,对细胞表面或细胞内的待测抗原成分进行定位研究。自 2007 年阎锡蕴研究组首次提出氧化铁纳米颗粒模拟酶的概念,许多纳米材料的类酶特性被相继发现,其中金纳米颗粒作为一类功能性纳米颗粒,因其独特的表面等离子体共振、表面化学特性和催化活性,在生物和化学检测中被格外关注。金的氧化还原电位为 +1.68,具有极强的夺电子能力。对于有氧化还原电位较小的生物大分子参加的生化反应,具有很强的催化作用,能明显提高生物大分子的活性,可催化 H_2O_2 氧化底物发生显色反应。但无论是传统的酶标二抗还是新兴的金属模拟过氧化物酶,催化活性都有限,这就大大限制了临床检测的灵敏度,同时,目前的免疫组化检测为人工读片,主观性较强,准确性得不到保证。

[0004] 暗场显微镜以其分辨能力高等优点成为生物医学领域新的表征技术之一,金纳米颗粒又以其优越的暗场散射性质在肿瘤成像方面的应用获得了科学家的认可,国内外很多研究组利用金纳米颗粒的暗场散射性质实现了恶性肿瘤的检测。但金纳米颗粒的散射强度有限,当单独使用金纳米颗粒标记肿瘤细胞或组织进行暗场观察难以达到临床检测的要求。

发明内容

[0005] 发明目的:为了克服上述现有技术的不足,本发明的目的在于酶标抗体 - 金纳米探针在二氨基联苯胺催化显色及协同增强暗场成像中的应用。该方法通过将金纳米颗粒作为大量酶标二抗的载体同时利用其本身的类酶活性和暗场散射特性,以及催化产物 DAB 聚合体的暗场散射特性,提高该方法的暗场散射强度。

[0006] 技术方案:本发明提供的酶标抗体 - 金纳米探针在二氨基联苯胺催化显色及暗场成像中的应用。

[0007] 其中,所述酶标抗体 - 金纳米探针 (GNP-Ab-HRP) 采用以下方法制得:选用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔鼠通用酶标二抗构建酶标抗体 - 金纳米探针 (GNP-Ab-HRP),采用静电吸附法将鼠兔通用型酶标二抗偶联到金纳米颗粒上,并用 1% BSA 封闭,离心即得

GNP-Ab-HRP 探针。

- [0008] 本发明还提供了一种免疫组化检测试剂盒,包括以下组份:
- [0009] 包括彼此独立的一抗溶液、酶标抗体-金纳米探针溶液、DAB 显色液和洗涤液;
- [0010] 所述一抗溶液包括:一抗、防腐剂和磷酸盐缓冲液 (pH = 7-8);
- [0011] 所述酶标抗体-金纳米探针溶液包括:10-500 μ g/ml 酶标抗体-金纳米探针、0.1-5%
- [0012] 封闭蛋白和磷酸盐缓冲液 (pH = 8-10);
- [0013] 所述 DAB 显色液包括彼此独立的 DAB 显色液 I、DAB 显色液 II 和 1-60%过氧化氢,使
- [0014] 用前按 1:1:1 混合;
- [0015] 所述洗涤液包括质量百分比为 0.01-2%吐温-20 和磷酸盐缓冲液 (pH = 7-8);
- [0016] 各组分用量如下表:
- [0017]

试剂	用量
一抗溶液	1-5 μ l
酶标抗体-金纳米探针溶液	20-300 μ l
DAB 显色液	50-300 μ l
洗涤液	100-1000 μ l/次洗涤

- [0018] 本发明还提供了上述免疫组化试剂盒在肿瘤细胞检测中的应用。
- [0019] 具体的,所述应用包括以下步骤:
- [0020] (1) 酶标抗体-金纳米探针的构建
- [0021] 选用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔鼠通用酶标二抗构建酶标抗体-金纳米探针 (GNP-Ab-HRP),采用静电吸附法将鼠兔通用型酶标二抗偶联到金纳米颗粒上,并用 1% BSA 封闭,离心即得 GNP-Ab-HRP 探针;
- [0022] (2) 暗场免疫组化检测方法
- [0023] GNP-Ab-HRP 催化 DAB 显色,再利用其进行双模态免疫组化检测,并实现量化判读:将待测样品按常规方法预处理后,先与一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,再与酶标抗体-金纳米探针 (GNP-Ab-HRP) 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,用 PBS-T 洗涤后进行 DAB 显色,在暗场显微镜下观察;
- [0024] (3) 判读方法及标准
- [0025] 1) 对暗场成像图进行取色;
- [0026] 2) 分析目标颜色面积,计算红色面积 (R) 和红色与黄绿色面积和 (S) 的比值 N;
- [0027] 3) 通过将 R 值和 N 值和标准区间比对,确定目标颜色面积处于哪种 HER2 阳性区间;其中,区间判断标准为:当 $R < 400$ 时,为“-”;当 $400 < R < 10000$ 且 $N < 0.26$ 时,为“+”;当 $400 < R < 10000$ 且 $0.26 \leq N \leq 0.35$ 时,为“++”;当 $S \geq 10000$ 且 $N > 0.35$ 时,为“+++”;
- [0028] (4) 得出检测结论;
- [0029] (5) 输出只含有目标颜色的检测图片。
- [0030] 本发明还提供了酶标抗体-金纳米探针在二氨基联苯胺催化显色反应中的应用。
- [0031] 有益效果:本发明将酶标抗体-金纳米探针催化二氨基联苯胺 (DAB) 显色,从而可实现协同增强的暗场免疫组化检测,并建立了量化判读。
- [0032] 相对于现有技术,具有以下突出的优势:

[0033] (1) 本发明以金纳米颗粒作为载体偶联大量标记抗体,同时也引入了大量过氧化物酶,进而大大提高催化效率;金纳米颗粒具有类酶活性和暗场散射特性,其本身也可对过氧化物酶催化的 DAB 暗场散射成像起到双重协同增强的效果。金纳米探针在检测中同时实现作为载体引入标记抗体及大量过氧化物酶,发挥类酶活性协同增强过氧化物酶对 DAB 的催化作用,利用本身散射特性增强 DAB 暗场散射强度等三种功能。

[0034] (2) 本发明利用 DAB 沉积实现增强的暗场免疫检测,具体而言:本发明利用 DAB 氧化反应形成的沉积物的暗场散射作用进行标记检测, DAB 氧化产物特异性沉积在特异性分子处,使得阳性样本表现出明显的发光特征。

[0035] (3) 本发明并建立了量化判读方法,代替了传统的利用 DAB 明场显色反应和单纯纳米金标记暗场散射成像及其人工判读方法;具体而言:所述量化判读方法包括判读标准,即不同阳性程度的肿瘤病理组织切片和细胞涂片经 DAB 染色后发光面积和发光特征不同,通过采集统计导入的病理照片的发光面积和发光特征,根据发光特征计算和发光面积判断可获得样本阳性程度结果。

附图说明

[0036] 图 1 为 GNP-Ab-HRP 参与的增强型免疫组化检测图 (a) 和传统免疫组化检测图 (b);图 1 显示:由 GNP-Ab-HRP 参与的增强型免疫组化检测 (a),相对于传统免疫组化检测 (b) 进行了信号放大,更有利于 HER2 阳性“+”、“++”和“+++”病例的检测和区分。

[0037] 图 2 为传统免疫组化 (a) (b) 和 GNP-Ab-HRP 催化增强型免疫组化检测 (c) (d) 的明场显色 (a、c) 及暗场成像 (b、d) 图。

[0038] 图 3 为 HER2 过表达程度相同的乳腺癌 BT474 细胞涂片采用 GNP-Ab-HRP 催化增强型免疫细胞化学明场显色成像图 (a) 和暗场散射成像图 (b)、金纳米探针直接标记免疫组化明场显色成像图 (c) 和暗场散射成像图 (d)、传统免疫组化染色的明场显色成像图 (e)、暗场散射成像图 (f)。

具体实施方式

[0039] (一) 酶标抗体-金纳米探针 (GNP-Ab-HRP) 的构建

[0040] 选用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔鼠通用酶标二抗构建酶标抗体-金纳米探针 (GNP-Ab-HRP):采用静电吸附法将鼠兔通用型酶标二抗偶联到金纳米颗粒上,并用 1% BSA 封闭,离心纯化后获得 GNP-Ab-HRP 探针,并分散于 PBS 溶液中。

[0041] 1. 试剂及设备:

[0042] 金纳米颗粒,由实验室根据柠檬酸三钠法合成。

[0043] 无水碳酸钾,购自阿拉丁试剂(上海)有限公司。

[0044] 牛血清白蛋白 (BSA),购自南京生兴 (Sunshine) 生物技术有限产品公司。

[0045] II 抗鼠兔通用型免疫组化检测试剂盒,购自 Dako。

[0046] 封闭电炉 (FD2),精密增力电动搅拌器 (JJ-1),冷冻离心机 (5430R)。

[0047] 2. 实施方法:

[0048] 用 0.1mol/L 碳酸钾溶液将 1ml 金纳米颗粒溶液(粒径范围为 10-100nm,溶于超纯水,浓度为 50 μ g/ml) 的 pH 调节至 9.5 左右,加入 20 μ l 鼠兔通用型酶标二抗,振荡后静

置 30min, 加入终浓度为 1% BSA(g/ml) 封闭 15min; 2000-4000rpm 离心 20min, 沉淀用 1% BSA 的 PBS 溶液 (pH = 8.0) 溶解, 4℃ 保存。

[0049] 3. 实施结果:

[0050] 采用此方法构建的 GNP-Ab-HRP 探针, 抗体偶联效率达 90% -95%, 平均一个金纳米颗粒偶联 5-500 个抗体。

[0051] (二) 暗场免疫组化检测方法

[0052] 提供一种 GNP-Ab-HRP 催化 DAB 显色及暗场成像的方法, 进而利用其进行暗场免疫组化检测, 并实现量化判读: 将金纳米颗粒与酶标二抗偶联, 构建酶标二抗-金纳米探针; 一抗标记肿瘤病理切片或细胞涂片; 酶标二抗-金纳米探针标记一抗; DAB 显色, 在暗场显微镜下观察并拍照; 将暗场照片经软件分析处理, 给出结果, 可同时实现清晰的明场成像并与暗场结果互相补充验证, 从而实现对肿瘤病理切片和细胞涂片恶性程度的判别。

[0053] 具体的, 以 HER2 过表达的乳腺癌病理切片为例, 以临床针对 HER2 的鼠源单抗为一抗, 分别采用临床获得的 HER2 表达阴/阳性的乳腺癌患者病理切片及 HER2 过表达的人乳腺癌细胞 BT474 作为样本; 病理切片和细胞涂片按常规方法预处理后, 先后与一抗 4℃ 孵育过夜, 再与 GNP-Ab-HRP 探针 37℃ 孵育 30min; 用 PBS-T 洗涤后进行 DAB 显色, 分别在明场和暗场显微镜下观察。

[0054] 1. 试剂及仪器:

[0055] 双氧水 (H₂O₂), 氯化钠, 中性树胶, 购自阿拉丁试剂(上海)有限公司。

[0056] 磷酸氢二钠, 磷酸二氢钾, 氯化钾, 购自上海凌峰化学试剂有限公司。

[0057] Tween-20, 购自南京生兴(Sunshine)生物技术有限产品公司。

[0058] 丙酮, 二甲苯, 无水乙醇, 柠檬酸, 苏木素, 购自国药集团化学试剂有限公司。

[0059] 多克隆兔抗人 HER2 癌蛋白, 购自 Dako。

[0060] 电热恒温培养箱 (DNP-9052), 不锈钢压力锅 (SUPOR), 光学显微镜 (E2000)。

[0061] 2. 实施方法:

[0062] 肿瘤细胞涂片检测

[0063] (1) 冰丙酮固定 HER2 过表达的乳腺癌 BT474 细胞涂片, 空气干燥;

[0064] (2) 3% H₂O₂ 孵育 15min;

[0065] (3) 封闭血清孵育 20min;

[0066] (4) 加入多克隆兔抗人 HER2 癌蛋白, 4℃ 下孵育过夜;

[0067] (5) 加入 GNP-Ab-HRP, 37℃ 孵育 30min;

[0068] (6) DAB 显色至棕色, 自来水停显;

[0069] (7) 分别于明场、暗场显微镜下观察切片并拍照。

[0070] 病理切片检测

[0071] (1) 将病理切片在 90℃ 烘箱中烤片 40min;

[0072] (2) 石蜡切片脱蜡: 将切片在二甲苯中浸泡 3 次, 每次 10min; 然后将其在无水乙醇中浸泡 2 次, 每次 10min; 接着将切片在梯度乙醇 (95%、90%、80%、70%) 中依次浸泡 10min; 最后用蒸馏水洗净;

[0073] (3) 抗原修复: 使用不锈钢压力锅将 pH = 6.0 的柠檬酸盐抗原修复液稍微加热后, 将切片放入锅内, 加热至沸腾, 加压 5min 后关火, 用冷水使高压锅冷却后取出切片;

- [0074] (4) PBS-T (0.05% Tween-20) 洗涤；
- [0075] (5) 加入多克隆兔抗人 HER2 癌蛋白, 4°C 下孵育过夜；
- [0076] (6) 加入 GNP-Ab-HRP, 37°C 孵育 30min；
- [0077] (7) DAB 显色至棕色, 自来水停显；
- [0078] (8) 切片脱水: 在梯度酒精 (70%、80%、90%、95%、100%) 中依次浸泡 5min；
- [0079] (9) 二甲苯透明: 将切片在二甲苯中浸泡 3 次, 每次 10min；
- [0080] (10) 树胶封片: 在切片的组织部位滴加中性树胶, 并用盖玻片封片；
- [0081] (11) 镜下观察: 分别于明场、暗场显微镜下观察切片并拍照。

[0082] 3. 实施结果：

[0083] 该方法引入了更多 HRP (图 1), 提高了传统免疫酶标的催化效率, 使得检测灵敏度显著增强 (图 2), 相比于简单金纳米探针标记, 由于增强催化形成的 DAB 沉积进一步增强了暗场成像能力, 因此得到的暗场散射成像也更加明亮、清晰、更易于识别 (图 3)。

[0084] 判读标准及判读软件

[0085] 1. 实施方法：

[0086] 基于暗场成像的新型免疫组化判读软件的整体工作流程为：

[0087] ①对暗场成像图进行取色→②分析目标颜色面积, 计算红色面积 (R) 和红色与黄绿色面积和 (S) 的比值 N→③通过将 R 值和 N 值和标准区间比对, 确定目标颜色面积处于哪种 HER2 阳性区间→④得出检测结论→⑤输出只含有目标颜色的检测图片。第③步中的标准区间是通过对 20 例医院确诊病例的免疫组化暗场成像图取色得到: 当 $R < 400$ 时, 为“-”; 当 $400 < R < 10000$ 且 $N < 0.26$ 时, 为“+”; 当 $400 < R < 10000$ 且 $0.26 \leq N \leq 0.35$ 时, 为“++”; 当 $S \geq 10000$ 且 $N > 0.35$ 时, 为“+++”。

[0088] 2. 实施结果：

[0089] 在乳腺癌病理切片上完成验证, 并将暗场成像图用本软件进行判别验证。通过计算, 本发明提供的检测方法灵敏度为 97%, 特异度为 85%, 误诊率为 3%, 漏诊率为 15%, 说明了此方法具有较强的检出病例和排除非病例能力。约旦指数为 0.81, 表明本染色法也具有较好的检测准确性。

[0090] 基于暗场成像的免疫组化染色法的阳性预测值为 96%, 阴性预测值为 88%, 我国乳腺癌的先验概率约为 41.64/10 万, 本染色法的阳性结论对患病的概率是 99%, 说明基于暗场成像的免疫组化染色法检测的准确度很高。

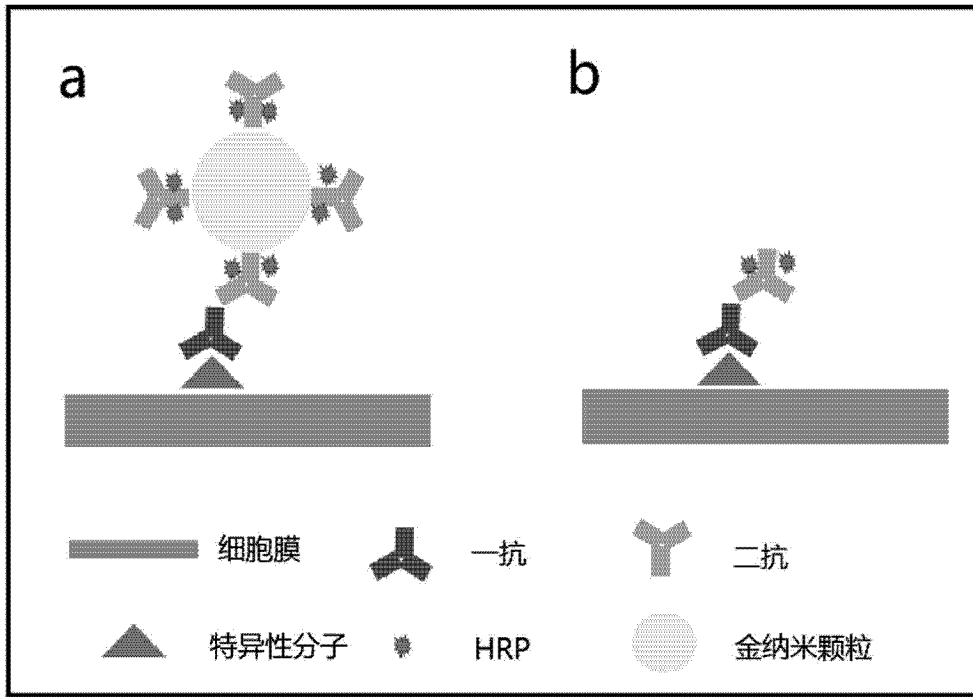


图 1

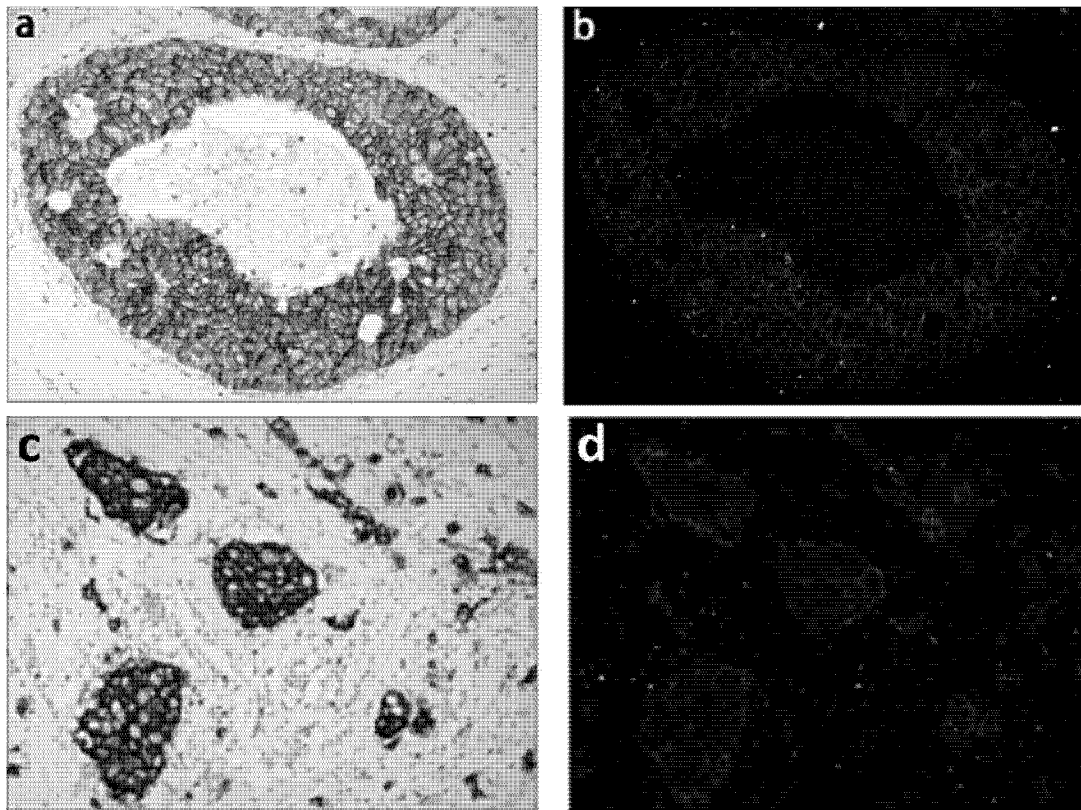


图 2

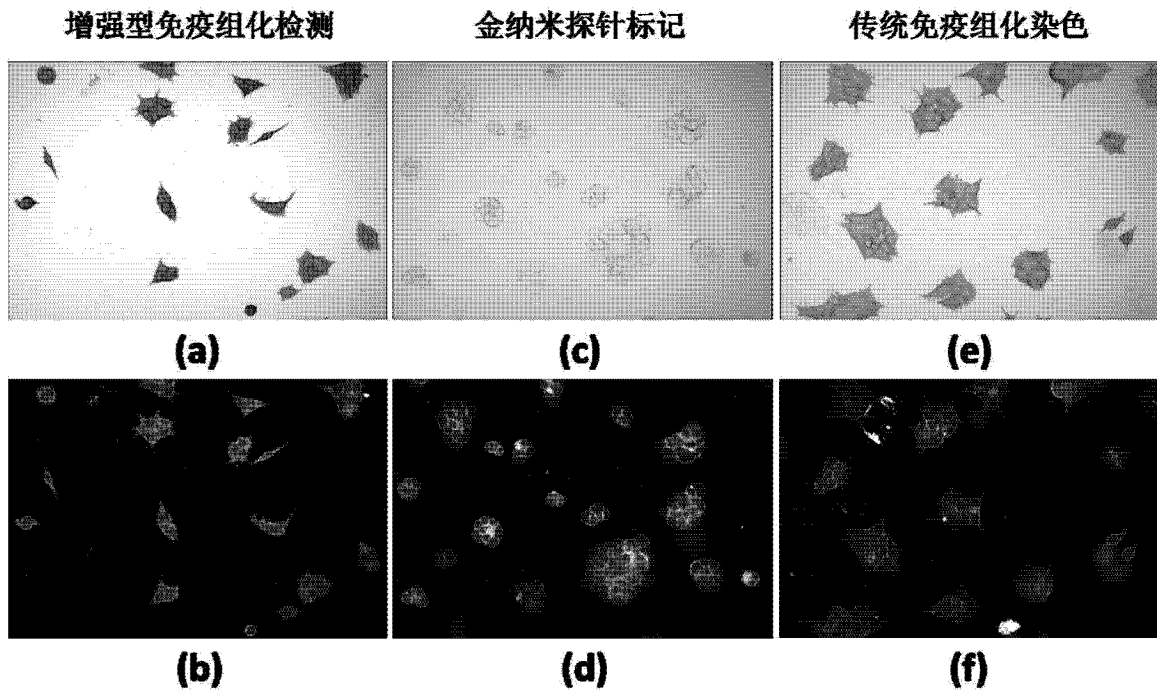


图 3

专利名称(译)	酶标抗体-金纳米探针在二氨基联苯胺催化显色及暗场成像的应用		
公开(公告)号	CN104849449A	公开(公告)日	2015-08-19
申请号	CN201510243543.0	申请日	2015-05-13
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	东南大学		
[标]发明人	张宇 范霖 田艳艳 娄豆豆 张熙之 马明 顾宁		
发明人	张宇 范霖 田艳艳 娄豆豆 张熙之 马明 顾宁		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/574 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54346 G01N33/574 G01N33/57415		
其他公开文献	CN104849449B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了酶标抗体-金纳米探针在二氨基联苯胺催化显色及暗场成像中的应用。还提供了一种包括上述酶标抗体-金纳米探针免疫组化检测试剂盒。本发明将酶标抗体-金纳米探针催化二氨基联苯胺(DAB)显色，从而可实现协同增强的暗场免疫组化检测，并建立了量化判读。

