



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110231473 A

(43)申请公布日 2019.09.13

(21)申请号 201910522057.0

G01N 21/552(2014.01)

(22)申请日 2019.06.17

(71)申请人 华东理工大学

地址 200237 上海市徐汇区梅陇路130号

申请人 蓝怡科技股份有限公司

浙江蓝怡医药有限公司

(72)发明人 马巍 李大伟 韩焕兴 郭丹

许多 于汝佳

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

代理人 巩克栋

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

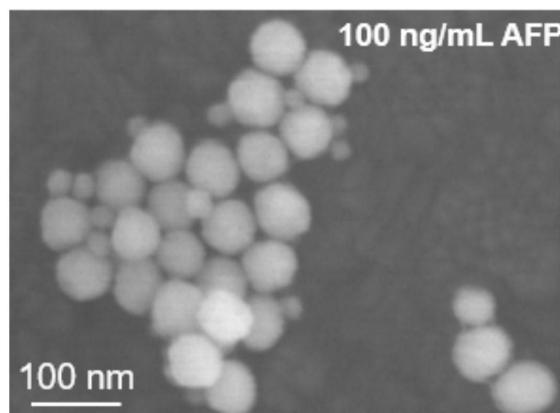
权利要求书3页 说明书10页 附图7页

(54)发明名称

一种基于金纳米微球等离子共振的生物标志物检测方法及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种基于金纳米微球等离子共振的生物标志物检测方法及其应用,所述生物标志物检测方法为:采用包被抗体和标记抗体分别对两种不同粒径的金纳米微球进行功能化处理,然后与待检测的生物标志物发生特异性结合,使两种不同粒径的金纳米微球发生等离子共振,得到具有等离子共振散射效应的免疫纳米阵列芯片,从而实现对生物标志物的定量检测。该方法用到的金纳米颗粒的等离子共振信号稳定,采集单颗粒信号检测灵敏度高,分析速度快,简单、重复性强,并且由统计得到的检测数据更为可靠;该方法不仅可以应用于免疫检测方面,在医学、环境保护以及食品安全检测方面同样适用,适用范围很广。



1. 一种基于金纳米微球等离子共振的生物标志物检测方法,其特征在于,所述生物标志物检测方法为:采用包被抗体和标记抗体分别对两种不同粒径的金纳米微球进行功能化处理,然后与待检测的生物标志物发生特异性结合,使两种不同粒径的金纳米微球发生等离子共振,得到具有等离子共振散射效应的免疫纳米阵列芯片,从而实现对生物标志物的定量检测。

2. 如权利要求1所述的生物标志物检测方法,其特征在于,所述生物标志物检测方法包括如下步骤:

(1) 制备粒径不同的第一金纳米微球和第二金纳米微球;

(2) 分别在步骤(1)得到的第一金纳米微球和第二金纳米微球上修饰鼠抗单抗标记抗体和鼠抗单抗包被抗体,得到修饰有抗体的第一金纳米微球和第二金纳米微球;

(3) 对步骤(2)得到的修饰有抗体的第一金纳米微球和第二金纳米微球进行封闭;

(4) 将步骤(3)得到的封闭好的修饰有抗体的第一金纳米微球和第二金纳米微球混合,再与待测生物标志物共孵育,得到具有三明治免疫夹心结构的金纳米微球混合溶液;

(5) 获取步骤(4)中金纳米微球混合溶液的散射光谱位移信息,根据待测生物标志物标准品建立的标准曲线计算得到待测生物标志物的含量。

3. 如权利要求2所述的生物标志物检测方法,其特征在于,步骤(1)所述第一金纳米微球的粒径为5-30nm;

优选地,所述第二金纳米微球的粒径为40-100nm;

优选地,所述第一金纳米微球的制备方法为柠檬酸三钠还原法;

优选地,所述第一金纳米微球的制备方法为:将1-2%的四氯金酸溶液与超纯水混合,加热至沸腾后加入1-2%的柠檬酸三钠溶液,继续加热保持沸腾至溶液颜色无变化,再加热10-20min,得到所述第一金纳米微球的溶液;

优选地,所述超纯水与四氯金酸溶液的体积比为(50-500):1;

优选地,所述超纯水与柠檬酸三钠溶液的体积比为(3-15):1。

4. 如权利要求2或3所述的生物标志物检测方法,其特征在于,步骤(1)所述第二金纳米微球的制备方法为种子生长法;

优选地,所述第二金纳米微球的制备方法为:在第一金纳米微球的溶液中加入0.1-0.3M盐酸羟胺和超纯水,再在搅拌状态下加入0.01%-0.03%的氯金酸溶液,得到所述第二金纳米微球的溶液;

优选地,所述第一金纳米微球溶液与盐酸羟胺的体积比为(8-12):1;

优选地,所述第一金纳米微球溶液与超纯水的体积比为1:(10-15);

优选地,所述第一金纳米微球溶液与氯金酸溶液的体积比为1:(1-5)。

5. 如权利要求2-4中任一项所述的生物标志物检测方法,其特征在于,步骤(2)所述在第一金纳米微球上修饰标记抗体的方法为:将第一金纳米微球与标记抗体混合并反应,得到所述修饰有抗体的第一金纳米微球;

优选地,所述第一金纳米微球与标记抗体的质量比为 $1.28 \times 10^{-7} : (1.5 \times 10^{-4} - 1.5 \times 10^{-2})$;

优选地,所述反应的时间为10-14h;

优选地,所述反应的温度为20-30℃;

优选地,步骤(2)所述在第二金纳米微球上修饰包被抗体的方法为:将第二金纳米微球与包被抗体混合并反应,得到所述修饰有抗体的第二金纳米微球;

优选地,所述第二金纳米微球与包被抗体的质量比为 1.28×10^{-8} : $(2.5 \times 10^{-4}-1 \times 10^{-3})$;

优选地,所述反应的时间为10-14h;

优选地,所述反应的温度为20-30℃。

6. 如权利要求2-5中任一项所述的生物标志物检测方法,其特征在于,步骤(3)所述对修饰有抗体的第一金纳米微球和第二金纳米微球进行封闭的试剂为牛血清白蛋白溶液;

优选地,所述牛血清白蛋白溶液的质量浓度为0.1-1%;

优选地,所述封闭的时间为10-14h;

优选地,所述封闭完成后对第一金纳米微球和第二金纳米微球分别离心并重新分散于牛血清白蛋白溶液中;

优选地,所述对第一金纳米微球的离心速度为9000-12000rpm/min;

优选地,所述对第二金纳米微球的离心速度为4000-6500rpm/min;

优选地,所述离心的时间为3-10min。

7. 如权利要求2-6中任一项所述的生物标志物检测方法,其特征在于,步骤(4)所述混合时第一金纳米微球和第二金纳米微球的质量比为(3-7):1;

优选地,所述待测生物标志物与第一金纳米微球的质量为 $(10^{-10}-10^{-4})$: 1.28×10^{-7} ;

优选地,所述共孵育的时间为0.5-2h;

优选地,所述共孵育的温度为35-40℃。

8. 如权利要求2-7中任一项所述的生物标志物检测方法,其特征在于,步骤(5)所述获取金纳米微球混合溶液的散射光谱位移信息的具体方法为:

将ITO导电玻璃片放入金纳米微球混合溶液中浸泡1-3min后,洗净并氮气吹干,置于倒置暗场显微镜下统计得到待测生物标志物的散射光谱位移;

优选地,所述待测生物标志物标准品的标准曲线是通过如下方法建立的:

选取4-10个不同浓度的待测生物标志物标准品溶液,按照权利要求2所述步骤对各标准品的散射光谱位移进行测定,以待测生物标志物标准品与空白对照品的散射光谱位移差为纵坐标,以待测生物标志物标准品的浓度对数值为横坐标,建立标准曲线,求出标准曲线的方程;其中空白对照品是指与待测生物标志物标准品等体积的PBS缓冲液。

9. 如权利要求2-8中任一项所述的生物标志物检测方法,其特征在于,所述生物标志物检测方法包括如下步骤:

(1) 采用柠檬酸三钠还原法制备粒径为5-30nm的第一金纳米微球,采用种子生长法制备粒径为40-100nm的第二金纳米微球;

(2) 将第一金纳米微球与标记抗体以质量比为 1.28×10^{-7} : $(1.5 \times 10^{-4}-1.5 \times 10^{-2})$ 混合并在20-30℃下反应10-14h,得到所述修饰有抗体的第一金纳米微球;将第二金纳米微球与包被抗体以质量比为 1.28×10^{-8} : $(2.5 \times 10^{-4}-1 \times 10^{-3})$ 混合并在20-30℃下反应10-14h,得到所述修饰有抗体的第二金纳米微球;

(3) 对步骤(2)得到的修饰有抗体的第一金纳米微球和第二金纳米微球用质量浓度为0.1-1%的牛血清白蛋白溶液进行封闭10-14h,封闭完成后对第一金纳米微球和第二金纳

米微球分别以9000-12000rpm/min和4000-6500rpm/min离心3-10min并重新分散于牛血清白蛋白溶液中；

(4) 将步骤(3)得到的封闭好的修饰有抗体的第一金纳米微球和第二金纳米微球以质量比为(3-7):1混合，再与待测生物标志物在35-40℃下共孵育0.5-2h，得到具有三明治免疫夹心结构的金纳米微球混合溶液；

(5) 将ITO导电玻璃片放入步骤(4)中金纳米微球混合溶液中浸泡1-3min后，洗净并氮气吹干，置于倒置暗场显微镜下统计得到待测生物标志物的散射光谱位移；根据待测生物标志物标准品建立的标准曲线计算得到待测生物标志物的含量。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的生物标志物检测方法在检测生物标志物中的应用。

一种基于金纳米微球等离子共振的生物标志物检测方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析技术领域,具体涉及一种基于金纳米微球等离子共振的生物标志物检测方法及其应用。

背景技术

[0002] 贵金属纳米粒子,尤其是金纳米粒子,由于其独特的光学、电学性质以及良好的生物相容性,被广泛用于传感器的制备、诊疗、环境监测以及生命分析等领域。当贵金属纳米粒子的尺寸远小于入射光波波长时,在入射光的激发下,纳米粒子表面会产生局域表面等离子共振现象。近年来,由于暗场显微成像技术等在纳米材料方面的应用,实现了在单个纳米粒子水平上的实时监测,并且使传感器尺寸降低到纳米级表面,极大地提高了检测灵敏度。

[0003] 酶联免疫吸附测定(ELISA)作为传统的夹心免疫测定是基于抗原抗体的特异性结合并引入酶标抗体,最终通过检测酶催化反应的程度对抗原或抗体进行定量检测的实验。这种方法检测速度快、费用低廉,在一定程度上为血清标志物检测分析提供了技术支持,但仍然无法很好地满足癌症血清诊断检测需求。这种检测方法的检测限度有限,检测过程需要多步骤洗涤、繁琐耗时。更重要的是,酶标抗体不仅储存不方便,而且酶的活性容易受pH、温度等外部条件的影响,酶催化反应对实验条件的苛刻要求也限制了这种检测方法的广泛应用。因而,开发一种信号稳定、高灵敏的,具有普遍性和易于实施的生物标志物检测策略在临床诊断和治疗监测中具有的重要意义。

[0004] CN102109517A公开了一种心脑血管疾病生物标志物的联合检测方法及其诊断试剂盒,即通过液相芯片的制备,形成“信号标记的检测抗体-心脑血管疾病生物标志物-捕获抗体-微球”的四联复合体,通过检测四联复合体中不同微球的标记信号,从而确定待检测样品中各种不同的心脑血管疾病生物标志物的存在及含量,本发明还公开了该诊断试剂盒的组成成分及该诊断试剂盒的应用。本发明所述的方法及试剂盒具有高通量性、高灵敏度和特异性、检测快速准确等突出优点,能够对心脑血管疾病的多种生物标志物同时进行定性和定量检测。

[0005] CN107764803A公开一种运用电化学发光成像识别技术的生物标志物检测方法,首先构建电化学发光放大探针,往提取样品中加入所述电化学发光放大探针,使生物标志物与电化学发光信号放大探针连接,得到体系1;往体系1中加入捕捉探针,使生物标志物与捕捉探针连接,得到体系2;往体系2中加入链霉亲和素磁珠,充分涡旋混匀后使生物标志物与链霉亲和素磁珠连接,然后用磁分离器分离,用PBS缓冲液冲洗;用超纯水混匀所得产物,然后置于电化学发光成像系统中检测发光信号。该发明的检测过程简单,经过简单的样品提取过程即可进行生物标志物监测,耗时短,省去了扩增步骤,检测快速。

[0006] CN107607501A公开了一种基于荧光淬灭的生物标志物多重检测方法,包括:羧基量子点修饰适配体DNA分子,金纳米粒子修饰适配体分子的互补序列,荧光淬灭体系的形成

以及荧光信号的测定。该发明借助于三种不同生物标志物适配体修饰的三种不同发射波长的量子点作为荧光探针,通过适配体与生物标志物的识别作用,使得未与生物标志物结合的适配体将与金纳米粒子上修饰的三种对应的适配体互补序列杂交,从而导致金纳米粒子对量子点的荧光产生淬灭,通过测定体系中三种量子点荧光信号变化,从而实现对每种生物标志物的检测。该方法操作简单、灵敏度高、特异性好,能够实现生物标志物的多重检测,为疾病的快速诊断提供了一种高效的检测方法。

[0007] 基于上述现有技术,本发明开发出一种新的生物标志物检测策略,能够实现信号稳定,高灵敏性,普遍性且易于实施,其在临床诊断和治疗监测中具有的重要意义。

发明内容

[0008] 针对现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种基于金纳米微球等离子共振的生物标志物检测方法及其应用。

[0009] 为达到此发明目的,本发明采用以下技术方案:

[0010] 一方面,本发明提供一种基于金纳米微球等离子共振的生物标志物检测方法,所述生物标志物检测方法为:采用包被抗体和标记抗体分别对两种不同粒径的金纳米微球进行功能化处理,然后与待检测的生物标志物发生特异性结合,使两种不同粒径的金纳米微球发生等离子共振,得到具有等离子共振散射效应的免疫纳米阵列芯片,从而实现对生物标志物的定量检测。

[0011] 本发明所涉及的生物标志物检测方法是基于金纳米微球产生等离子共振用于生物标志物检测的新方法,该方法不需要使用酶标抗体,从而克服了酶催化反应对实验条件要求苛刻的缺点;该方法用到的金纳米颗粒的等离子共振信号稳定,采集单颗粒信号检测灵敏度高,分析速度快,简单、重复性强,并且由统计得到的检测数据更为可靠;该方法不仅可以应用于免疫检测方面,在医学、环境保护以及食品安全检测方面同样适用,适用范围很广。

[0012] 在本发明中,所述生物标志物检测方法包括如下步骤:

[0013] (1)制备粒径不同的第一金纳米微球和第二金纳米微球;

[0014] (2)分别在步骤(1)得到的第一金纳米微球和第二金纳米微球上修饰鼠抗单抗标记抗体和鼠抗单抗包被抗体,得到修饰有抗体的第一金纳米微球和第二金纳米微球;

[0015] (3)对步骤(2)得到的修饰有抗体的第一金纳米微球和第二金纳米微球进行封闭;

[0016] (4)将步骤(3)得到的封闭好的修饰有抗体的第一金纳米微球和第二金纳米微球混合,再与待测生物标志物共孵育,得到具有三明治免疫夹心结构的金纳米微球混合溶液;

[0017] (5)获取步骤(4)中金纳米微球混合溶液的散射光谱位移信息,根据待测生物标志物标准品建立的标准曲线计算得到待测生物标志物的含量。

[0018] 在本发明中,步骤(1)所述第二金纳米微球的粒径为40-100nm,例如40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm或100nm等。

[0019] 优选地,所述第一金纳米微球的粒径为5-30nm,例如5nm、10nm、15nm、18nm、20nm、22nm、25nm、26nm或30nm等。

[0020] 所述第一金纳米微球的粒径选择为5-30nm、第二金纳米微球的粒径选择为40-100nm的原因是:当粒径增大到一定程度后,其LSPR效应逐渐减弱,在此粒径范围内金纳米

颗粒的散射光谱变化显著,适合用做对目标物的考察。

[0021] 在本发明中,所述第一金纳米微球的制备方法为柠檬酸三钠还原法。

[0022] 具体地,采用如下方法进行制备:将1-2% (例如1%、1.2%、1.5%或2%等)的四氯金酸溶液与超纯水混合,加热至沸腾后加入1-2% (例如1%、1.2%、1.5%或2%等)的柠檬酸三钠溶液,继续加热保持沸腾至溶液颜色无变化,再加热10-20min (例如10min、12min、14min、15min、18min或20min等),得到所述第一金纳米微球的溶液。

[0023] 优选地,所述超纯水与四氯金酸溶液的体积比为(50-500):1,例如50:1、100:1、150:1、200:1、250:1、300:1、350:1、400:1或500:1等。

[0024] 优选地,所述超纯水与柠檬酸三钠溶液的体积比为(3-15):1,例如3:1、4:1、5:1、8:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1或15:1等。

[0025] 在本发明中,步骤(1)所述第二金纳米微球的制备方法为种子生长法。

[0026] 具体地,采用如下方法进行制备:在第一金纳米微球的溶液中加入0.1-0.3M (0.1M、0.15M、0.18M、0.2M、0.25M或0.3M等)盐酸羟胺和超纯水,再在搅拌状态下加入0.01%-0.03% (0.01%、0.015%、0.02%、0.025%或0.03%等)的氯金酸溶液,得到所述第二金纳米微球的溶液。

[0027] 优选地,所述第一金纳米微球溶液与盐酸羟胺的体积比为(8-12):1,例如8:1、8.5:1、9:1、9.5:1、10:1、11:1或12:1等。

[0028] 优选地,所述第一金纳米微球溶液与超纯水的体积比为1:(10-15),1:10、1:11、1:12、1:13、1:14或1:15等。

[0029] 优选地,所述第一金纳米微球溶液与氯金酸溶液的体积比为1:(1-5),例如1:1、1:2、1:3、1:4或1:5等。

[0030] 在本发明中,步骤(2)所述在第一金纳米微球上修饰标记抗体的方法为:

[0031] 将第一金纳米微球与标记抗体混合并反应,得到所述修饰有抗体的第一金纳米微球。具体地,将制备好的第一金纳米微球溶液以9000-12000rpm/min高速离心3-10min,然后分散在浓度为1-10mM, pH=7.4的PBS溶液中,向离心好的第一金纳米颗粒溶液中加入10⁻⁹-10⁻⁷M的标记抗体,置于摇床上进行反应。

[0032] 优选地,所述第一金纳米微球与标记抗体的质量比为1.28×10⁻⁷:(1.5×10⁻⁴-1.5×10⁻²),例如1.28×10⁻⁷:1.5×10⁻⁴、1.28×10⁻⁷:5×10⁻⁴、1.28×10⁻⁷:1×10⁻³、1.28×10⁻⁷:1.5×10⁻³、1.28×10⁻⁷:5×10⁻³或1.28×10⁻⁷:1.5×10⁻²等。

[0033] 优选地,所述反应的时间为10-14h,例如10h、11h、12h、13h或14h等。

[0034] 优选地,所述反应的温度为20-30℃,例如20℃、22℃、24℃、25℃、26℃、28℃、29℃或30℃等。

[0035] 在本发明中,步骤(2)所述在第二金纳米微球上修饰标记抗体的方法为:

[0036] 将第二金纳米微球与包被抗体混合并反应,得到所述修饰有抗体的第二金纳米微球。具体地,将制备好的第二金纳米微球溶液用1mM的NaOH溶液调至pH=7.4后加入用50mM、pH=9.6的碳酸盐缓冲溶液稀释500-2000倍的包被抗体,置于摇床上进行反应。

[0037] 优选地,所述第二金纳米微球与包被抗体的质量比为1.28×10⁻⁸:(2.5×10⁻⁴-1×10⁻³),例如1.28×10⁻⁸:2.5×10⁻⁴、1.28×10⁻⁸:3×10⁻⁴、1.28×10⁻⁸:5×10⁻⁴、1.28×10⁻⁸:6×10⁻⁴、1.28×10⁻⁸:8×10⁻⁴或1.28×10⁻⁸:1×10⁻³等。

[0038] 优选地,所述反应的时间为10-14h,例如10h、11h、12h、13h或14h等。

[0039] 优选地,所述反应的温度为20-30℃,例如20℃、22℃、24℃、25℃、26℃、28℃、29℃或30℃等。

[0040] 在本发明中,步骤(3)所述对修饰有抗体的第一金纳米微球和第二金纳米微球进行封闭的试剂为牛血清白蛋白溶液。

[0041] 优选地,所述牛血清白蛋白溶液的质量浓度为0.1-1%,例如0.1%、0.2%、0.4%、0.5%、0.6%、0.8%或1%等。

[0042] 优选地,所述封闭的时间为10-14h,例如10h、11h、12h、13h或14h等。

[0043] 优选地,所述封闭完成后对第一金纳米微球和第二金纳米微球分别离心并重新分散于牛血清白蛋白溶液中。

[0044] 优选地,所述对第二金纳米微球的离心速度为4000-6500rpm/min,例如4000rpm/min、4500rpm/min、5000rpm/min、5500rpm/min、6000rpm/min或6500rpm/min等。

[0045] 优选地,所述对第一金纳米微球的离心速度为9000-12000rpm/min,9000rpm/min、9500rpm/min、10000rpm/min、10500rpm/min、11000rpm/min、11500rpm/min或12000rpm/min等。

[0046] 所述对第一金纳米微球和第二金纳米微球的离心速度分别为9000-12000rpm/min和4000-6500rpm/min的原因是:粒径越小,受重力作用需要的转速就会越大,相反粒径越大,受重力作用需要的转速就会越小。

[0047] 优选地,所述离心的时间为3-10min,例如3min、4min、5min、6min、7min、8min、9min或10min等。

[0048] 在本发明中,步骤(4)所述混合时第一金纳米微球和第二金纳米微球的质量比为(3-7):1,例如3:1、4:1、5:1、6:1或7:1等。

[0049] 优选地,所述待测生物标志物与第一金纳米微球的质量比为(10^{-10} - 10^{-4}):1.28×10⁻⁷,例如 10^{-10} :1.28×10⁻⁷、 10^{-9} :1.28×10⁻⁷、 10^{-8} :1.28×10⁻⁷、 10^{-7} :1.28×10⁻⁷、 10^{-6} :1.28×10⁻⁷、 10^{-5} :1.28×10⁻⁷或 10^{-4} :1.28×10⁻⁷等。

[0050] 优选地,所述共孵育的时间为0.5-2h,例如0.5h、0.8h、1h、1.5h或2h等。

[0051] 优选地,所述共孵育的温度为35-40℃,例如35℃、36℃、37℃、38℃、39℃或40℃等。

[0052] 优选地,所述共孵育结束后以3000-10000rpm/min的速度进行离心3-10min,以去除没有结合的游离的第一金纳米微球和第二金纳米微球。

[0053] 在本发明中,步骤(5)所述获取金纳米微球混合溶液的散射光谱位移信息的具体方法为:

[0054] 将ITO导电玻璃片放入金纳米微球混合溶液中浸泡1-3min(例如1min、2min或3min等)后,洗净并氮气吹干,置于倒置暗场显微镜下统计得到待测生物标志物的散射光谱位移。

[0055] 优选地,所述待测生物标志物标准品的标准曲线是通过如下方法建立的:

[0056] 选取5-10个不同浓度的待测生物标志物标准品溶液,按照权利要求2所述步骤对各标准品的散射光谱位移进行测定,以待测生物标志物标准品与空白对照品的散射光谱位移差为纵坐标,以待测生物标志物标准品的浓度对数值为横坐标,建立标准曲线,求出标准

曲线的方程；其中空白对照品是指与待测生物标志物标准品等体积的PBS缓冲液。

[0057] 作为本发明的优选技术方案，所述生物标志物检测方法包括如下步骤：

[0058] (1) 采用柠檬酸三钠还原法制备粒径为5-30nm的第一金纳米微球，采用种子生长法制备粒径为40-100nm的第二金纳米微球；

[0059] (2) 将第一金纳米微球与标记抗体以质量比为 1.28×10^{-7} ：(1.5×10^{-4} - 1.5×10^{-2})混合并在20-30℃下反应10-14h，得到所述修饰有抗体的第一金纳米微球；将第二金纳米微球与包被抗体以质量比为 1.28×10^{-8} ：(2.5×10^{-4} - 1×10^{-3})混合并在20-30℃下反应10-14h，得到所述修饰有抗体的第二金纳米微球；

[0060] (3) 对步骤(2)得到的修饰有抗体的第一金纳米微球和第二金纳米微球用质量浓度为0.1-1%的牛血清白蛋白溶液进行封闭10-14h，封闭完成后对第一金纳米微球和第二金纳米微球分别以9000-12000rpm/min和4000-6500rpm/min离心3-10min并重新分散于牛血清白蛋白溶液中；

[0061] (4) 将步骤(3)得到的封闭好的修饰有抗体的第一金纳米微球和第二金纳米微球以质量比为(3-7)：1混合，再与待测生物标志物在35-40℃下共孵育0.5-2h，得到具有三明治免疫夹心结构的金纳米微球混合溶液；

[0062] (5) 将ITO导电玻璃片放入步骤(4)中金纳米微球混合溶液中浸泡1-3min后，洗净并氮气吹干，置于倒置暗场显微镜下统计得到待测生物标志物的散射光谱位移；根据待测生物标志物标准品建立的标准曲线计算得到待测生物标志物的含量。

[0063] 另一方面，本发明提供一种如上所述的生物标志物检测方法在检测生物标志物中的应用。需要说明的是，该方法不仅可以应用于免疫检测方面，在医学、环境保护以及食品安全检测方面同样适用，适用范围很广。

[0064] 相对于现有技术，本发明具有以下有益效果：

[0065] 本发明所涉及的生物标志物检测方法是基于金纳米微球产生等离子共振用于生物标志物检测的新方法，该方法不需要使用酶标抗体，从而克服了酶催化反应对实验条件要求苛刻的缺点；该方法用到的金纳米颗粒的等离子共振信号稳定，采集单颗粒信号检测灵敏度高，分析速度快，简单、重复性强，并且由统计得到的检测数据更为可靠；该方法不仅可以应用于免疫检测方面，在医学、环境保护以及食品安全检测方面同样适用，适用范围很广。

附图说明

[0066] 图1为合成的第一金纳米微球溶液的紫外-可见吸收光谱图；

[0067] 图2为合成的第二金纳米微球溶液的紫外-可见吸收光谱图；

[0068] 图3为抗体修饰前、抗体修饰后以及封闭后的第一金纳米微球溶液的紫外-可见吸收光谱图；

[0069] 图4为抗体修饰前、抗体修饰后以及封闭后的第二金纳米微球溶液的紫外-可见吸收光谱图；

[0070] 图5添加AFP前金纳米微球混合溶液的倒置暗场显微镜彩色图；

[0071] 图6添加AFP后金纳米微球混合溶液的倒置暗场显微镜彩色图；

[0072] 图7添加AFP前用Matlab采集金纳米微球混合溶液的散射光谱图；

- [0073] 图8添加AFP后用Matlab采集金纳米微球混合溶液的散射光谱图；
- [0074] 图9添加AFP前金纳米微球混合溶液的SEM表征图；
- [0075] 图10添加AFP后金纳米微球混合溶液的SEM表征图；
- [0076] 图11添加AFP前金纳米微球混合溶液的动态光散射图；
- [0077] 图12添加AFP后金纳米微球混合溶液的动态光散射图；
- [0078] 图13甲胎蛋白AFP的标准曲线图；
- [0079] 图14阴性和阳性临床血清样品对应的散射位移差值的垂直散点图；
- [0080] 图15实际样品检测结果的ROC曲线。

具体实施方式

[0081] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0082] 实施例1

[0083] 本实施例提供一种检测肝癌血清标志物甲胎蛋白AFP的方法(此处用的标记抗体和包被抗体分别是鼠抗单抗标记抗体和鼠抗单包被抗体,两种抗体分别识别AFP的不同表位),具体操作方法如下:

[0084] 1、正式试验:

[0085] (1)采用柠檬酸三钠还原法制备粒径为20nm(粒径通过将测得的吸收光谱波长与文献中波长和粒径对应表进行比对来确定其粒径)的第一金纳米微球:向干净的烧杯中加入500 μ L的1%四氯金酸和50mL超纯水,加热至沸腾后迅速滴加10mL质量浓度为1%柠檬酸三钠,继续加热并保持溶液沸腾,直至溶液颜色保持不变,再继续加热15min,得到所述第一金纳米微球溶液。用紫外-可见吸收光谱对合成的第一金纳米微球溶液进行表征,如图1所示,由图可知:紫外吸收波长在521.57nm,由粒径和波长的对应关系可知,粒径约为20nm。

[0086] 采用种子生长法制备粒径为60nm的第二金纳米微球:向干净的烧杯中加入2mL上述合成的第一金纳米微球溶液,200 μ L 0.2M盐酸羟胺和25mL超纯水,搅拌状态下向溶液中逐滴滴加5mL 0.01%氯金酸溶液,得到所述第二金纳米微球溶液。用紫外-可见吸收光谱对合成的第二金纳米微球溶液进行表征,如图2所示,由图可知:紫外吸收波长在536.58nm,由粒径和波长的对应关系可知,粒径约为60nm。

[0087] (2)将制备好的第一金纳米微球溶液以10000rpm/min高速离心10min,然后分散在浓度为10mM,pH=7.4的PBS溶液中,向离心好的金纳米颗粒溶液中加入10⁻⁸M标记抗体,在25℃下反应12h,得到所述修饰有抗体的第一金纳米微球;

[0088] 将制备好的第二金纳米微球溶液用1mM NaOH溶液调至pH=7.4后加入用10 μ L 50mM pH=9.6的碳酸盐缓冲溶液稀释1000倍的包被抗体,在25℃下反应12h,得到所述修饰有抗体的第二金纳米微球。

[0089] (3)对步骤(2)得到的修饰有抗体的第一金纳米微球和第二金纳米微球用质量浓度为1%的牛血清白蛋白溶液进行封闭12h,封闭完成后对第一金纳米微球和第二金纳米微球分别以9000rpm/min和5000rpm/min离心10min并重新分散于牛血清白蛋白溶液中。

[0090] 用紫外-可见吸收光谱对抗体修饰前、后以及封闭后的第一金纳米微球溶液进行表征,如图3所示,由图可知:裸的金纳米微球的紫外吸收波长在521.57nm,当修饰上标记抗

体后紫外吸收波长红移到527.83nm,进一步用BSA进行封闭后波长变为527.92nm,说明金纳米微球表面成功修饰上标记抗体并且封闭成功。

[0091] 用紫外-可见吸收光谱对抗体修饰前、后以及封闭后的第二金纳米微球溶液进行表征,如图4所示,由图可知:裸的金纳米微球的紫外吸收波长在536.58nm,当修饰上标记抗体后紫外吸收波长红移到537.95nm,进一步用BSA进行封闭后波长变为538.81nm,说明金纳米微球表面成功修饰上标记抗体并且封闭成功。

[0092] (4) 将步骤(3)得到的封闭好的修饰有抗体的第一金纳米微球和第二金纳米微球以质量比为5:1混合,再与不同浓度的甲胎蛋白AFP标准品(浓度分别为0.01ng/mL,0.1ng/mL,1ng/mL,100ng/mL,1000ng/mL)在37℃下共孵育1h,结束后以6000rpm/min离心10min,去掉未结合的游离金纳米微球,得到具有三明治免疫夹心结构的金纳米微球混合溶液。

[0093] (5) 将ITO导电玻璃片放入步骤(4)中稀释20倍的金纳米微球混合溶液中浸泡2min后,洗净并氮气吹干,置于倒置暗场显微镜下用Matlab统计得到不同浓度的甲胎蛋白AFP标准品的散射光谱位移。以100ng/mL的甲胎蛋白AFP标准品为例进行下述表征实验。

[0094] 对加AFP前、后的金纳米微球混合溶液用倒置暗场显微镜观察,分别如图5和图6所示,并用Matlab采集散射光谱,分别如图7和图8所示,由图7和图8可知:加入AFP后,散射光谱发生了明显的红移,由562cm到596cm,说明两种不同粒径的金纳米微球通过抗原抗体耦合到一起使得LSPR发生了明显的红移。

[0095] 对加AFP前、后的金纳米微球混合溶液进行SEM表征,分别如图9和图10所示,由图可知:没加入AFP时,两种粒径的金纳米微球单独存在;当加入AFP后,由于抗原抗体的特异性反应使得金纳米颗粒结合到一起。

[0096] 对加AFP前、后的金纳米微球混合溶液用动态光散射仪采集DLS光谱,分别如图11和图12所示,由图可知:加入AFP后,动态光散射光谱发生了明显的红移,由102.6cm到161.2cm,说明两种不同粒径的金纳米微球通过抗原抗体耦合到一起。

[0097] 2、建立标准曲线:

[0098] 以甲胎蛋白AFP标准品与空白对照品(空白对照品是指用与甲胎蛋白AFP标准品等体积的PBS缓冲液代替标准品)的散射光谱位移差为纵坐标,以甲胎蛋白AFP标志物标准品的浓度的对数值为横坐标,建立标准曲线,求出标准曲线的方程,标准曲线为 $y=5.5395x+20.9924, R^2=0.9846$,如图13所示,由图可知:随着AFP浓度增加,散射光谱位移差也在增大,并且成良好的线性关系,说明本方法可以用于检测AFP的含量。

[0099] 3、甲胎蛋白AFP的检测:

[0100] 重复上述正式试验的步骤,将5例来自肝癌患者的AFP阳性血清样本,4例正常人的AFP阴性样本代替AFP标准品,实验过程中将上述样品随机打乱顺序。将临床样本先用PBS缓冲液稀释10倍后,在倒置暗场显微镜下用Matlab统计,测定其与空白对照品的散射光谱位移差,将散射光谱位移差值代入标准曲线中,实验结果如图14和图15所示。由图14的数据可知,诊断结果为:真阳性=5,真阴性=4,假阳性=0,假阴性=0;图15中的受试者工作曲线(ROC曲线)的横坐标反映了方法特异性,坐标为1-特异性,纵坐标反映了敏感性,该方法的灵敏度为100%,特异性为100%,ROC曲线下的面积(AUC)计算为1,说明该方法对AFP有良好的检测效果,可将正常人和病人样品很好的区分出来。

[0101] 实施例2

[0102] 本实施例提供一种检测前列腺特异性抗原PSA的方法(此处用的标记抗体和包被抗体分别是鼠抗单抗标记抗体和鼠抗单包被记抗体,两种抗体分别识别PSA的不同表位),具体操作方法如下:

[0103] 1、正式试验:

[0104] (1)采用柠檬酸三钠还原法制备粒径为5nm的第一金纳米微球:向干净的烧杯中加入200 μ L的1%四氯金酸和50mL超纯水,加热至沸腾后迅速滴加15mL质量浓度为1%柠檬酸三钠,继续加热并保持溶液沸腾,直至溶液颜色保持不变,再继续加热15min,得到所述第一金纳米微球溶液。

[0105] 采用种子生长法制备粒径为40nm的第二金纳米微球:向干净的烧杯中加入2mL上述合成的第一金纳米微球溶液,200 μ L 0.2M盐酸羟胺和25mL超纯水,搅拌状态下向溶液中逐滴滴加3mL 0.01%氯金酸溶液,得到所述第二金纳米微球溶液。

[0106] (2)将制备好的第一金纳米微球溶液以12000rpm/min高速离心10min,然后分散在浓度为10mM,pH=7.4的PBS溶液中,向离心好的金纳米颗粒溶液中加入10⁻⁷M标记抗体,在25℃下反应12h,得到所述修饰有抗体的第一金纳米微球;

[0107] 将制备好的第二金纳米微球溶液用1mM NaOH溶液调至pH=7.4后加入用10 μ L 50mM pH=9.6的碳酸盐缓冲溶液稀释500倍的包被抗体,在25℃下反应12h,得到所述修饰有抗体的第二金纳米微球。

[0108] (3)对步骤(2)得到的修饰有抗体的第一金纳米微球和第二金纳米微球用质量浓度为1%的牛血清白蛋白溶液进行封闭12h,封闭完成后对第一金纳米微球和第二金纳米微球分别以12000rpm/min和6000rpm/min离心10min并重新分散于牛血清白蛋白溶液中。

[0109] (4)将步骤(3)得到的封闭好的修饰有抗体的第一金纳米微球和第二金纳米微球以质量比为3:1混合,再与不同浓度的前列腺特异性抗原PSA标准品在37℃下共孵育1h,结束后以7000rpm/min离心10min,去掉未结合的游离金纳米微球,得到具有三明治免疫夹心结构的金纳米微球混合溶液。

[0110] (5)将ITO导电玻璃片放入步骤(4)中稀释20倍的金纳米微球混合溶液中浸泡2min后,洗净并氮气吹干,置于倒置暗场显微镜下用Matlab统计得到不同浓度的前列腺特异性抗原PSA标准品的散射光谱位移。

[0111] 2、建立标准曲线:

[0112] 以上述前列腺特异性抗原PSA标准品与空白对照品(空白对照品是指用与前列腺特异性抗原PSA标准品等体积的PBS缓冲液代替标准品)的散射光谱位移差为纵坐标,以上述前列腺特异性抗原PSA标志物标准品的浓度为横坐标,建立标准曲线。

[0113] 3、前列腺特异性抗原PSA的检测:

[0114] 重复上述正式试验的步骤,仅把前列腺特异性抗原PSA标准品替换为含有前列腺特异性抗原PSA的样品,在倒置暗场显微镜下用Matlab统计,测定其与空白对照品的散射光谱位移差,将散射光谱位移差值代入标准曲线中,计算得到样品溶液中前列腺特异性抗原PSA的浓度值,将其乘以溶液稀释的倍数即得到样品中前列腺特异性抗原PSA的实际浓度值。

[0115] 实施例3

[0116] 本实施例提供一种检测癌胚抗原CEA的方法(此处用的标记抗体和包被抗体分别

是鼠抗单抗标记抗体和鼠抗单包被抗体,两种抗体分别识别CEA的不同表位),具体操作方法如下:

[0117] 1、正式试验:

[0118] (1)采用柠檬酸三钠还原法制备粒径为30nm的第一金纳米微球:向干净的烧杯中加入100 μ L的1%四氯金酸和50mL超纯水,加热至沸腾后迅速滴加5mL质量浓度为1%柠檬酸三钠,继续加热并保持溶液沸腾,直至溶液颜色保持不变,再继续加热15min,得到所述第一金纳米微球溶液。

[0119] 采用种子生长法制备粒径为100nm的第二金纳米微球:向干净的烧杯中加入2mL上述合成的第一金纳米微球溶液,200 μ L 0.2M盐酸羟胺和25mL超纯水,搅拌状态下向溶液中逐滴滴加8mL 0.01%氯金酸溶液,得到所述第二金纳米微球溶液。

[0120] (2)将制备好的第一金纳米微球溶液以8000rpm/min高速离心10min,然后分散在浓度为10mM,pH=7.4的PBS溶液中,向离心好的金纳米颗粒溶液中加入 10^{-9} M标记抗体,在25℃下反应12h,得到所述修饰有抗体的第一金纳米微球;

[0121] 将制备好的第二金纳米微球溶液用1mM NaOH溶液调至pH=7.4后加入用10 μ L 50mM pH=9.6的碳酸盐缓冲溶液稀释2000倍的包被抗体,在25℃下反应12h,得到所述修饰有抗体的第二金纳米微球。

[0122] (3)对步骤(2)得到的修饰有抗体的第一金纳米微球和第二金纳米微球用质量浓度为1%的牛血清白蛋白溶液进行封闭12h,封闭完成后对第一金纳米微球和第二金纳米微球分别以8000rpm/min和4000rpm/min离心10min并重新分散于牛血清白蛋白溶液中。

[0123] (4)将步骤(3)得到的封闭好的修饰有抗体的第一金纳米微球和第二金纳米微球以质量比为7:1混合,再与不同浓度的癌胚抗原CEA标准品在37℃下共孵育1h,结束后以3500rpm/min离心10min,去掉未结合的游离金纳米微球,得到具有三明治免疫夹心结构的金纳米微球混合溶液。

[0124] (5)将ITO导电玻璃片放入步骤(4)中稀释20倍的金纳米微球混合溶液中浸泡1min后,洗净并氮气吹干,置于倒置暗场显微镜下用Matlab统计得到不同浓度的癌胚抗原CEA标准品的散射光谱位移。

[0125] 2、建立标准曲线:

[0126] 以上述癌胚抗原CEA标准品与空白对照品(空白对照品是指用与癌胚抗原CEA标准品等体积的PBS缓冲液代替标准品)的散射光谱位移差为纵坐标,以上述癌胚抗原CEA标志物标准品的浓度为横坐标,建立标准曲线。

[0127] 3、癌胚抗原CEA的检测:

[0128] 重复上述正式试验的步骤,仅把癌胚抗原CEA标准品替换为含有癌胚抗原CEA的样品,在倒置暗场显微镜下用Matlab统计,测定其与空白对照品的散射光谱位移差,将散射光谱位移值代入标准曲线中,计算得到样品溶液中癌胚抗原CEA的浓度值,将其乘以溶液稀释的倍数即得到样品中癌胚抗原CEA的实际浓度值。

[0129] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的基于金纳米微球等离子共振的生物标志物检测方法及其应用,但本发明并不局限于上述实施例,即不意味着本发明必须依赖上述实施例才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保

护范围和公开范围之内。

[0130] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0131] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

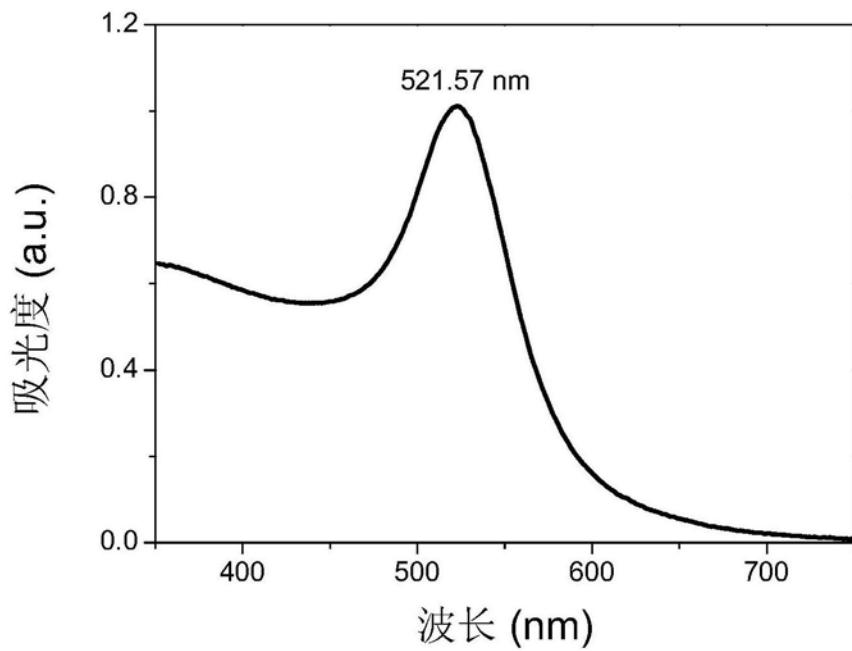


图1

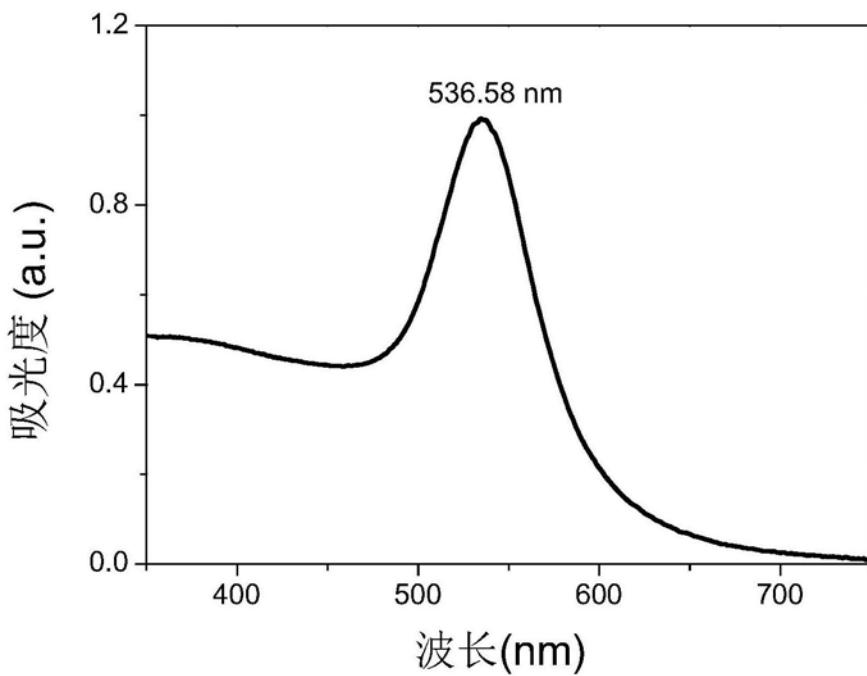


图2

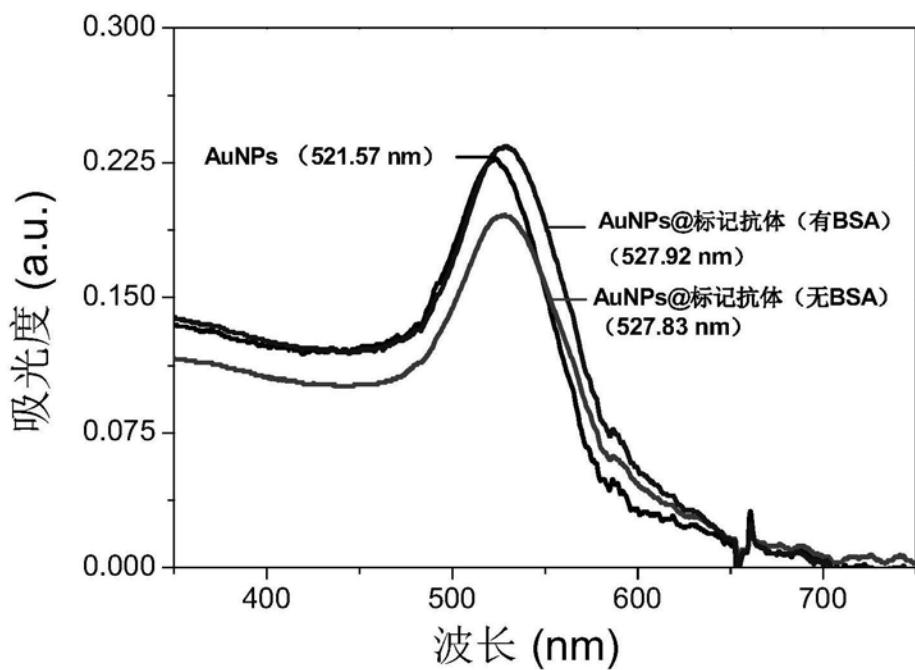


图3

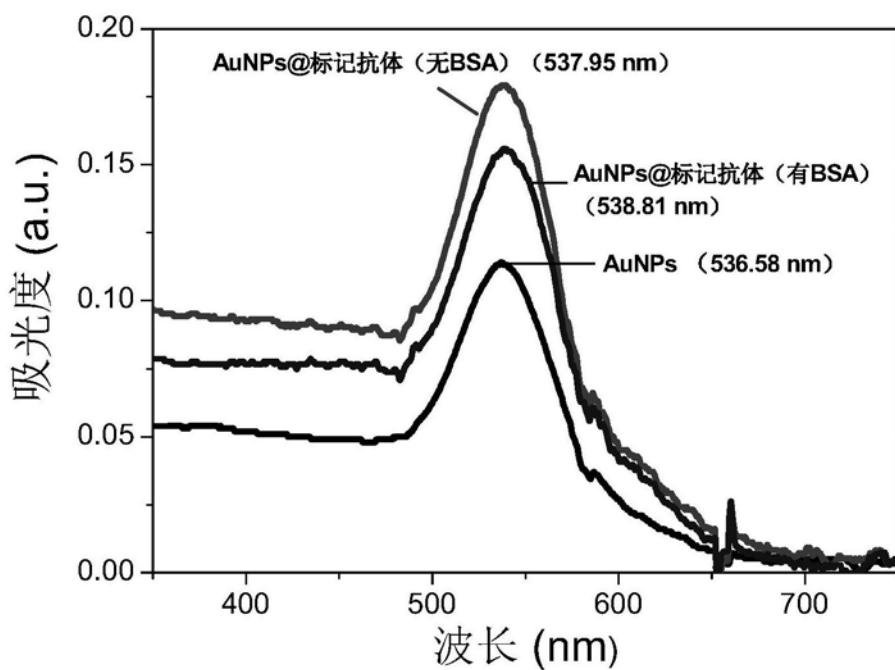


图4

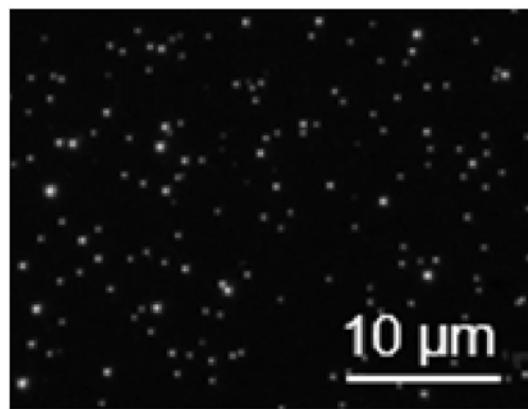


图5

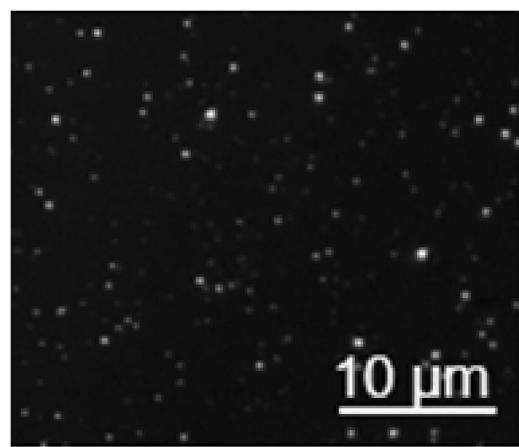


图6

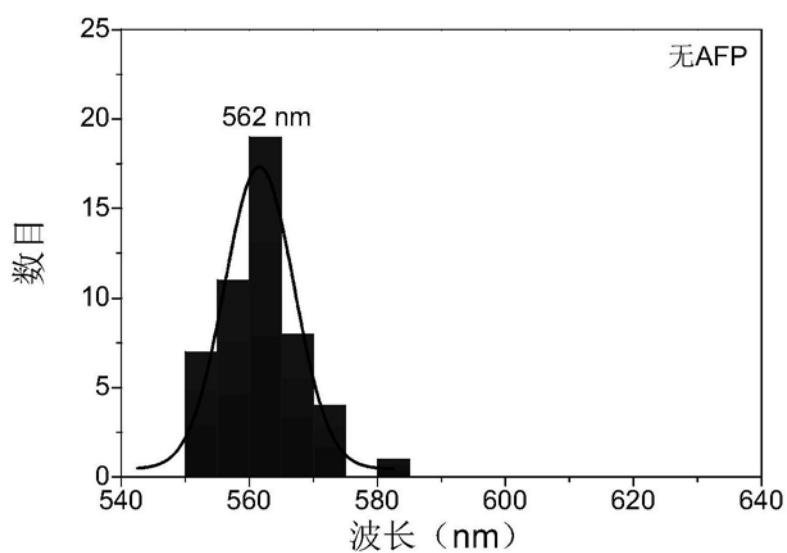


图7

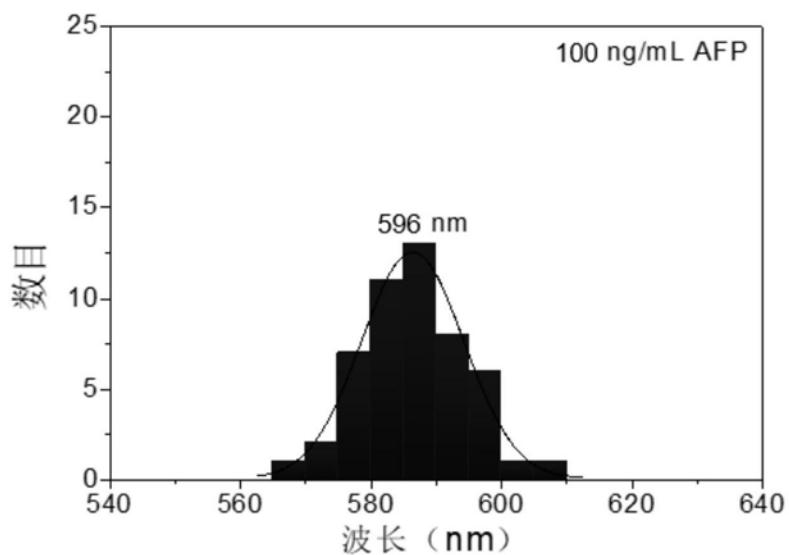


图8

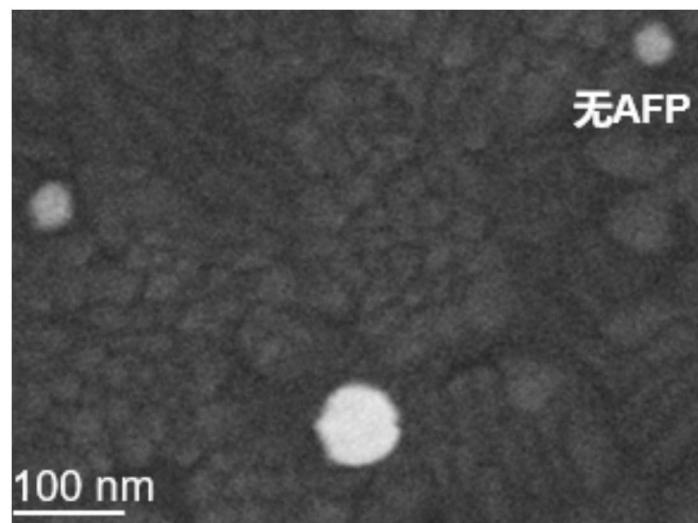


图9

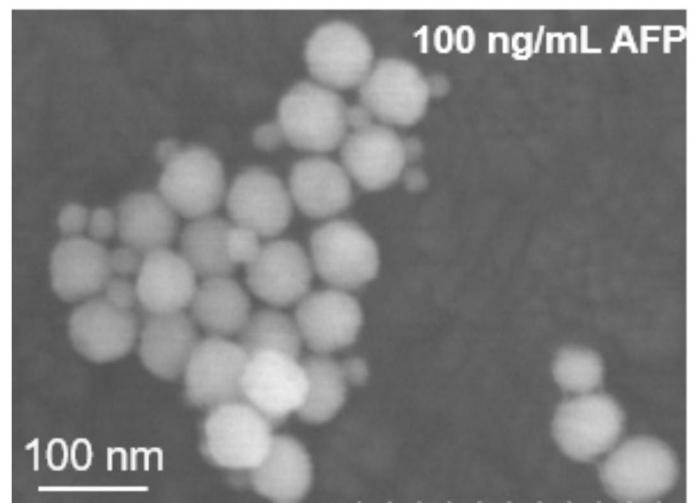


图10

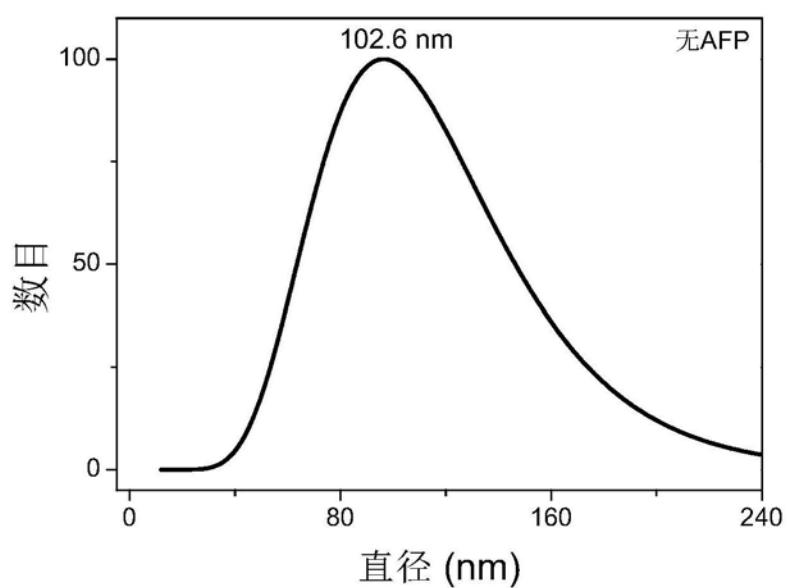


图11

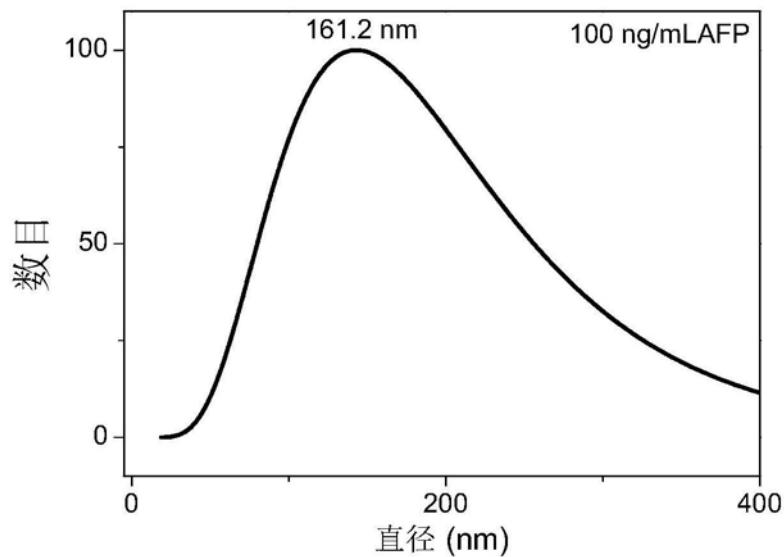


图12

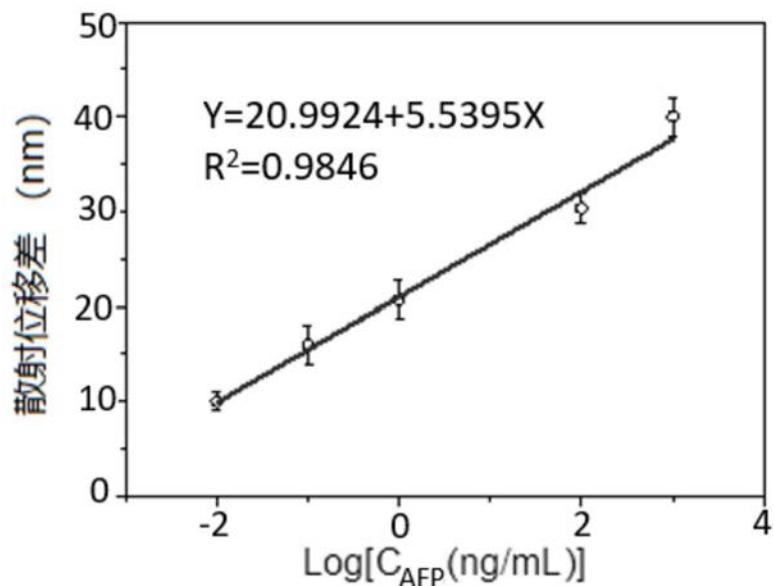


图13

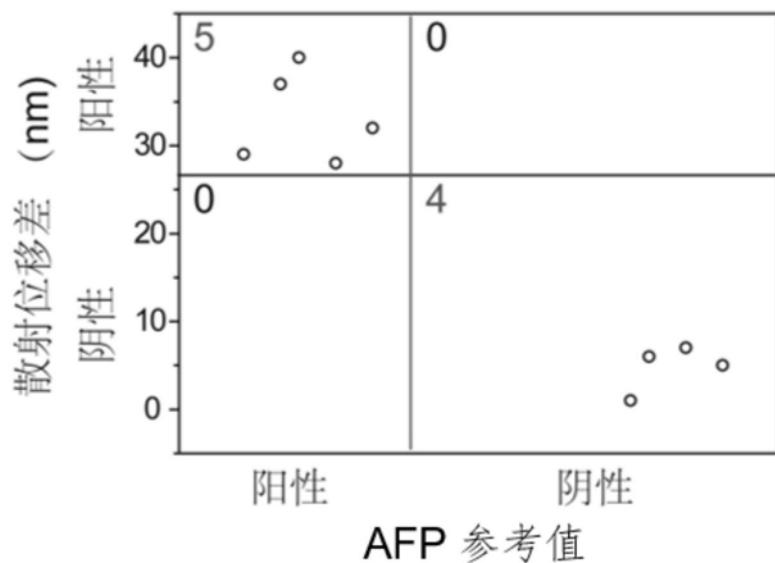


图14

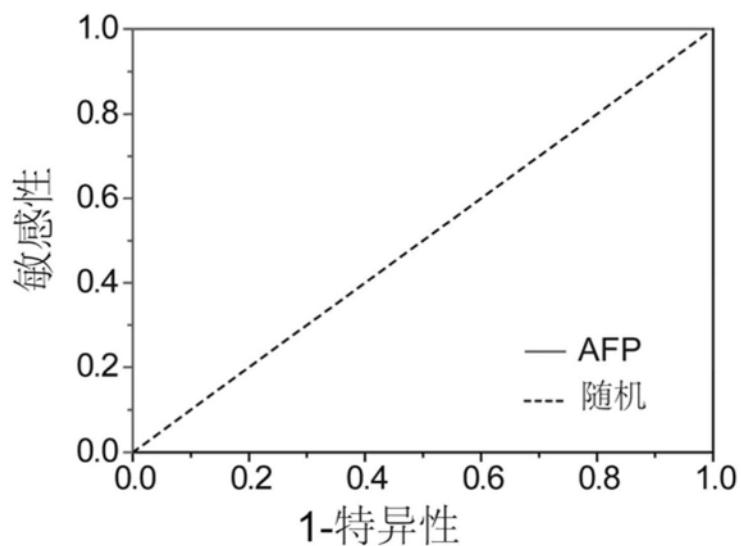


图15

专利名称(译)	一种基于金纳米微球等离子共振的生物标志物检测方法及其应用		
公开(公告)号	CN110231473A	公开(公告)日	2019-09-13
申请号	CN201910522057.0	申请日	2019-06-17
[标]申请(专利权)人(译)	华东理工大学 浙江蓝怡医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	华东理工大学 浙江蓝怡医药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	华东理工大学 浙江蓝怡医药有限公司		
[标]发明人	马巍 李大伟 韩焕兴 郭丹 许多 于汝佳		
发明人	马巍 李大伟 韩焕兴 郭丹 许多 于汝佳		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532 G01N33/543 G01N21/552		
CPC分类号	G01N21/554 G01N33/53 G01N33/532 G01N33/54313		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及一种基于金纳米微球等离子共振的生物标志物检测方法及其应用，所述生物标志物检测方法为：采用包被抗体和标记抗体分别对两种不同粒径的金纳米微球进行功能化处理，然后与待检测的生物标志物发生特异性结合，使两种不同粒径的金纳米微球发生等离子共振，得到具有等离子共振散射效应的免疫纳米阵列芯片，从而实现对生物标志物的定量检测。该方法用到的金纳米颗粒的等离子共振信号稳定，采集单颗粒信号检测灵敏度高，分析速度快，简单、重复性强，并且由统计得到的检测数据更为可靠；该方法不仅可以应用于免疫检测方面，在医学、环境保护以及食品安全检测方面同样适用，适用范围很广。

