

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102269758 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 20

(21) 申请号 201010191564. X

WO 2009/111470 A2, 2009. 09. 11,

(22) 申请日 2010. 06. 04

WO 2008/091364 A2, 2008. 07. 31,

(73) 专利权人 国家纳米科学中心

Yang Zhou et al. Visual Detection

地址 100190 北京市海淀区中关村北一条
11 号

of Copper(II) by Azide- and

Alkyne-Functionalized Gold Nanoparticles

Using Click Chemistry. 《Angew. Chem》. 2008,

第 47 卷 (第 39 期),

(72) 发明人 蒋兴宇 曲伟思 刘颖旻 王卓

审查员 舒霏霏

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理
有限公司 11280

代理人 刘丹妮

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101309856 A, 2008. 11. 19,

CN 101435778 A, 2009. 05. 20,

US 2006/014172 A1, 2006. 01. 19,

WO 2010/006201 A2, 2010. 01. 14,

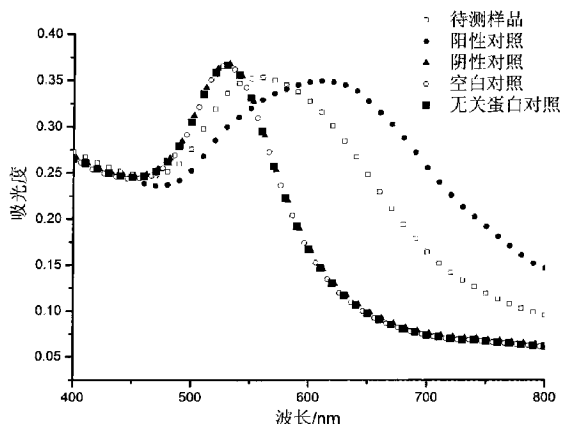
权利要求书3页 说明书11页 附图4页

(54) 发明名称

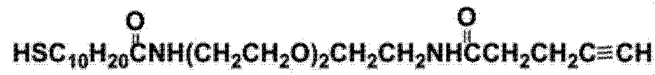
可视化检测抗原抗体反应的方法、试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种可视化检测抗原抗体反应的方法,具体地,该方法通过先使标记了氧化铜纳米颗粒与待检测样品发生反应,然后采用表面功能化的金纳米粒子,对标记在抗体上的纳米氧化铜颗粒进行检测,从而提供关于抗原抗体反应的信息,为基于免疫反应的疾病检测和诊断提供了一种新工具。本发明涉及的方法不需要借助任何仪器,通过肉眼即可完成,适合野外作业。本发明还提供该方法的应用。本发明进一步提供用于可视化检测抗原抗体反应的试剂盒及其应用。

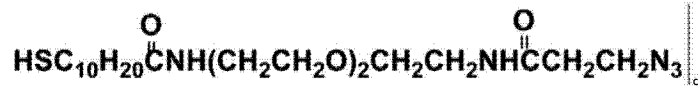


1. 一种可视化检测抗原抗体反应的方法,所述方法包括以下步骤:
 - 1) 抗原抗体反应:将氧化铜纳米颗粒标记的抗体加入到待检测样品中,充分反应后去除未反应的多余的氧化铜纳米颗粒标记的抗体;
 - 2) 可视化检测:向步骤 1) 反应体系中加入酸;反应后,加入还原剂、表面炔基功能化的金纳米粒子和表面叠氮基功能化的金纳米粒子,充分反应后根据反应体系颜色的变化判断样品中是否发生。
2. 如权利要求 1 的方法,其特征为,在步骤 1) 之前还包括对待检测样品进行处理的步骤。
3. 如权利要求 1 的方法,其特征为,在步骤 1) 之前,还包括对待检测样品进行封闭的步骤。
4. 如权利要求 3 的方法,其特征为,所述封闭剂选自胎牛血清、山羊血清、马血清。
5. 如权利要求 4 的方法,其特征为,所述封闭剂为胎牛血清。
6. 如权利要求 3-5 所述的方法,其特征为,封闭反应时间为 30 ~ 120 分钟,封闭温度为 25 ~ 40℃。
7. 如权利要求 6 所述的方法,其特征为,封闭反应时间为 60 分钟,封闭温度为 37℃。
8. 如权利要求 1 的方法,其特征为,在所述方法步骤 1) 中,氧化铜纳米颗粒标记的抗体为一抗。
9. 如权利要求 1 的方法,其特征为,在所述方法步骤 1) 中,氧化铜纳米颗粒标记的抗体为二抗。
10. 如权利要求 1 的方法,其特征为,在所述方法步骤 1) 中,抗原抗体反应的孵育时间为 30 ~ 120 分钟,孵育温度为 25 ~ 40℃。
11. 如权利要求 10 的方法,其特征为,在所述方法步骤 1) 中,抗原抗体反应的孵育时间为 60 分钟,孵育温度为 37℃。
12. 如权利要求 1 的方法,其特征为,在所述方法步骤 2) 中,加入的酸选自 HCl、HNO₃、H₂SO₄。
13. 如权利要求 12 的方法,其特征为,在所述方法步骤 2) 中,加入的酸为 HCl。
14. 如权利要求 12 或 13 的方法,其特征为,加入的酸在反应体系中的浓度为 0.1 ~ 1mM,酸反应时间为 5 ~ 20 分钟。
15. 如权利要求 14 的方法,其特征为,所述酸在反应体系中的浓度 1mM,酸反应时间为 10 分钟。
16. 如权利要求 1 的方法,其特征为,在所述方法步骤 2) 中,加入的还原剂选自抗坏血酸钠、柠檬酸钠、硼氢化钠。
17. 如权利要求 16 的方法,其特征为,在所述方法步骤 2) 中,加入的还原剂为抗坏血酸钠。
18. 如权利要求 16 或 17 的方法,其特征为,加入的还原剂在反应体系中的浓度为 0.01 ~ 0.1M。
19. 如权利要求 18 的方法,其特征为,所述还原剂在反应体系中的浓度为 0.05M。
20. 如权利要求 1 的方法,其特征为,在所述方法步骤 2) 中,所述加入的表面炔基功能化的金纳米粒子的炔基为包含化学式 I 的化合物:



I

加入的表面叠氮基功能化的金纳米粒子的叠氮基为包含化学式 II 的化合物：



II

21. 如权利要求 20 的方法,其特征为,所述加入的表面炔基功能化的金纳米粒子和所述表面叠氮基功能化的金纳米粒子的摩尔比为 1:1。

22. 如权利要求 1 的方法,其特征为,在所述方法步骤 2) 中,所述还原剂和两种功能化金纳米粒子以检测体系的形式同时提供。

23. 如权利要求 22 的方法,其特征为,还原剂在检测体系中的浓度为 0.01 ~ 0.1mM。

24. 如权利要求 23 的方法,其特征为,所述还原剂在检测体系的浓度为 0.05mM。

25. 如权利要求 1 的方法,其特征为,所述方法步骤 2) 中,所述反应体系的颜色变化和沉淀现象在 5 ~ 30 分钟时间内出现。

26. 如权利要求 25 的方法,其特征为,所述反应体系的颜色变化和沉淀现象在 10 ~ 15 分钟时间内出现。

27. 如权利要求 1 的方法,其特征为,所述待检测样品包括临床检测样品。

28. 如权利要求 27 的方法,其特征为,所述待检测样品来自患有或被怀疑患有某种疾病的患者。

29. 如权利要求 28 的方法,其特征为,所述疾病为免疫相关疾病。

30. 如权利要求 29 的方法,其特征为,所述疾病为病毒引起的免疫相关疾病。

31. 一种用于可视化检测抗原抗体反应的试剂盒,所述试剂盒包括:还原剂、表面炔基功能化的金纳米粒子、表面叠氮基功能化的金纳米粒子以及氧化铜纳米颗粒标记的抗体。

32. 如权利要求 31 的试剂盒,其特征为,所述试剂盒中还包括氧化铜纳米颗粒。

33. 如权利要求 31 的试剂盒,其特征为,所述试剂盒中还包括抗体。

34. 如权利要求 33 的试剂盒,其特征为,所述抗体为一抗或二抗。

35. 如权利要求 31 的试剂盒,其特征为,所述试剂盒中的还原剂选自抗坏血酸钠、柠檬酸钠、硼氢化钠。

36. 如权利要求 35 的试剂盒,其特征为,所述试剂盒中的还原剂为抗坏血酸钠。

37. 如权利要求 35 的试剂盒,其特征为,所述试剂盒中还包括封闭剂。

38. 如权利要求 37 的试剂盒,其特征为,所述封闭剂选自胎牛血清、山羊血清、马血清。

39. 如权利要求 38 的试剂盒,其特征为,所述封闭剂为胎牛血清。

40. 如权利要求 35 的试剂盒,其特征为,所述试剂盒中还包括以下试剂的一种或多种:阳性对照品、阴性对照品、样品稀释液、缓冲液。

41. 如权利要求 31-40 中任一项的试剂盒在制备用于疾病检测和诊断的产品中的应用。

42. 如权利要求 41 的应用,其特征为,所述疾病为免疫相关疾病。

43. 如权利要求 42 的应用,其特征为,所述免疫相关疾病为病毒引起的免疫相关疾病。

可视化检测抗原抗体反应的方法、试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析和诊断技术领域。具体地,本发明涉及对抗体标记信号放大的方法,特别是采用一种表面功能化的金纳米粒子,可以通过检测抗体标记物,直接用肉眼来判断抗原抗体反应。

背景技术

[0002] 在对某些抗原或特异性蛋白进行检测时,通常会应用到免疫标记技术。免疫标记技术是将一些既容易测定又具有高敏感性的物质标记到特异性抗原或者抗体分子上,通过这些标记物的增强放大作用来显示反应体系中抗原或者抗体的性质和含量。目前常用的标记物包括荧光素,酶和放射性核素等。但在实际应用中,这三大免疫标记技术都存在不同缺陷。例如在荧光素标记技术中,荧光素存在荧光寿命和荧光效率的问题,且标记到抗原或抗体上的方法复杂;酶标记技术中,酶容易失活,从而影响待测物的检出限;放射性核素标记技术中,核素具有放射性,存在强烈的环境污染和健康危害。此外,采用以上三种方法在对某些抗原或特异性蛋白进行检测时,在读出方式上需要借助各类仪器才能进行。其中,荧光素标记技术需要荧光显微镜,酶标技术需要酶标仪,放射性核素技术需要自动计数器等探测仪器,对仪器的依赖决定了很多检测不能在条件落后及不发达地区开展。因此,现在存在对操作简单、反应体系稳定、便于开展、对环境无污染以及对人体无危害的免疫标记和检测技术的需求。

[0003] 目前,纳米技术是当前的热门研究领域,其中金纳米粒子由于其表面等离子共振效应而显示独特的颜色,被广泛应用于可视化检测。Mirkin 小组首次报道了用表面功能化的金纳米粒子通过比色的方法检测 DNA(参考文献:Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Mucic, R. C., Storhoff, J. J. Nature, 1996, 382, 607-609)。蒋兴宇小组报道了通过合成功能化金纳米粒子,利用 click 反应来检测溶液中的铜离子(参考文献:Yang Zhou, Shixing Wang, Ke Zhang, Xingyu Jiang*. Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, 7454-7456)。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种可视化检测抗原抗体反应的方法,该方法采用表面功能化的金纳米粒子,实现对抗体标记物、尤其是对标记物氧化铜纳米颗粒的检测,进而实现对抗原抗体反应的检测。本发明的另一个目的是提供所述方法的应用。本发明的又一个目的是提供一种用于可视化检测抗原抗体反应的试剂盒。本发明的再一个目的是提供所述试剂盒的应用。

[0005] 用于实现上述目的的技术方案如下:

[0006] 一方面,本发明提供一种可视化检测抗原抗体反应的方法,该方法包括以下步骤:

[0007] 1) 抗原抗体反应:将氧化铜纳米颗粒标记的抗体加入到待检测样品中,充分反应后去除未反应的多余氧化铜纳米颗粒标记的抗体;

[0008] 2) 可视化检测:向步骤1) 反应体系中加入酸,将氧化铜纳米颗粒中的 Cu^{2+} 释放出来;反应后,加入还原剂、表面炔基功能化的金纳米粒子和表面叠氮基功能化的金纳米粒子,充分反应后根据反应体系颜色的变化判断样品中是否发生反应。

[0009] 优选地,在所述方法中,在步骤1) 之前还包括对待检测样品进行处理的步骤,处理的目的是为了标记的抗体能够与样品充分而稳定的反应。

[0010] 优选地,在步骤1) 之前,还包括对待检测样品进行封闭的步骤;优选地,所述封闭剂选自胎牛血清、山羊血清、马血清;进一步优选地,所述封闭剂为胎牛血清。其中,优选地,在步骤2) 中,封闭反应时间为 30 ~ 120 分钟,封闭温度为 25 ~ 40℃;进一步优选地,封闭反应时间为 60 分钟,封闭温度为 37℃。

[0011] 优选地,在步骤1) 中,氧化铜纳米颗粒标记的抗体为一抗;

[0012] 优选地,在步骤1) 中,氧化铜纳米颗粒标记的抗体为二抗;

[0013] 优选地,在步骤1) 中,抗原抗体反应的孵育时间为 30 ~ 120 分钟,孵育温度为 25 ~ 40℃;进一步优选地,孵育时间为 60 分钟,孵育温度为 37℃。

[0014] 优选地,在步骤2) 中,加入的酸选自 HCl 、 HNO_3 、 H_2SO_4 ,进一步优选为 HCl 。

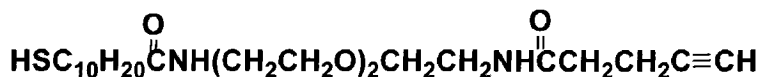
[0015] 优选地,在步骤2) 中,加入的酸在反应体系中的浓度为 0.1 ~ 1mM,酸反应时间为 5 ~ 20 分钟;进一步优选地,所述酸在反应体系中的浓度 1mM,酸反应时间为 10 分钟。

[0016] 优选地,在步骤2) 中,加入的还原剂选自抗坏血酸钠、柠檬酸钠、硼氢化钠,进一步优选为抗坏血酸钠。

[0017] 优选地,在步骤2) 中,加入的还原剂在反应体系中的浓度为 0.01 ~ 0.1M,进一步优选地,所述还原剂在反应体系中的浓度为 0.05M。

[0018] 优选地,在步骤2) 中,加入的表面炔基功能化的金纳米粒子的炔基为包含化学式 I 的化合物:

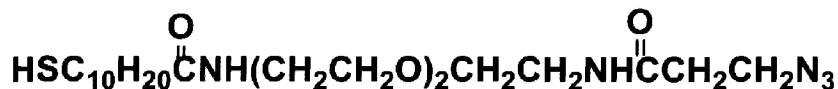
[0019]



I

[0020] 加入的表面叠氮基功能化的金纳米粒子的叠氮基为包含化学式 II 的化合物:

[0021]



II

[0022] 优选地,在步骤2) 中,加入的表面炔基功能化的金纳米粒子和表面叠氮基功能化的金纳米粒子的摩尔比为 1 : 0.5 ~ 1 : 2,进一步优选地,摩尔比为 1 : 1。

[0023] 优选地,在步骤2) 中,还原剂和两种功能化金纳米粒子以检测体系的形式同时提供。优选地,还原剂在检测体系中的浓度为 0.01 ~ 0.1mM,进一步优选为 0.05mM。

[0024] 优选地,在步骤2) 中,所述反应体系的颜色变化和沉淀现象在 5 ~ 30 分钟时间内出现,进一步优选在 10 ~ 15 分钟时间内出现。

[0025] 优选地,在所述方法中,待检测样品包括临床检测样品,进一步优选地,待检测样品来自患有或被怀疑患有某种疾病的患者。更优选地,所述疾病为免疫相关疾病,如病毒引

起的免疫相关疾病。

[0026] 另一方面,本发明提供所述方法在生物、生物医学、医学检验等领域的应用。

[0027] 优选地,本发明提供所述方法在免疫相关疾病的检测和诊断中的应用,进一步优选地,所述免疫相关疾病为病毒引起的免疫相关疾病。

[0028] 优选地,本发明提供所述方法在制备用于疾病检测和诊断的试剂中的应用。进一步优选地,所述疾病为免疫相关疾病;更优选地,所述免疫相关疾病为病毒引起的免疫相关疾病。

[0029] 又一方面,本发明提供一种用于可视化检测抗原抗体反应的试剂盒,该试剂盒包括:还原剂、表面炔基功能化的金纳米粒子以及表面叠氮基功能化的金纳米粒子。

[0030] 优选地,所述试剂盒中还包括氧化铜纳米颗粒标记的抗体。

[0031] 优选地,所述试剂盒中还包括氧化铜纳米颗粒。

[0032] 优选地,所述试剂盒中还包括抗体。进一步优选地,所述抗体为一抗或二抗。

[0033] 优选地,所述试剂盒中的还原剂选自抗坏血酸钠、柠檬酸钠、硼氢化钠,进一步优选为抗坏血酸钠。

[0034] 优选地,所述试剂盒中还包括封闭剂;进一步优选地,所述封闭剂选自胎牛血清、山羊血清、马血清;更优选地,所述封闭剂为胎牛血清。

[0035] 优选地,所述试剂盒中还包括以下试剂的一种或多种:阳性对照品、阴性对照品、样品稀释液、缓冲液等。

[0036] 再一方面,本发明提供所述试剂盒在生物、生物医学、医学检验等领域的应用。

[0037] 优选地,本发明提供所述试剂盒在疾病检测和诊断中的应用。进一步优选地,所述试剂盒应用于免疫相关疾病的检测和诊断中,更优选地,所述免疫相关疾病为病毒引起的免疫相关疾病。

[0038] 所述可视化检测抗原抗体反应的原理在于:当待检测样品中存在作为检测目标的抗原或抗体时,标记了纳米氧化铜颗粒的抗体与待检测样品中的抗原或抗体相结合,抗体上标记的氧化铜纳米颗粒因为酸溶液的加入而释放出 Cu^{2+} ,加入还原剂将 Cu^{2+} 还原成 Cu(I) , Cu(I) 作为催化剂在常温常压下使功能化金纳米粒子上的末端炔基和叠氮基发生成环反应(图1),从而使金纳米粒子发生反应而产生聚集和沉淀,进而通过肉眼观察检测反应体系从红色变成蓝紫色,进一步当金纳米粒子严重聚集时会有沉淀的出现,从而实现对待检测样品中抗原抗体反应的检测。此外,本文还提供了氧化铜纳米颗粒标记抗体的制备方法,将在下文的发明详述部分进行具体描述。

[0039] 与现有技术相比,本发明至少具有以下优点:

[0040] 1、本发明方法的读出形式不需要借助于任何仪器,直接肉眼读取检测结果,摆脱了目前通常采用的三大免疫检测技术对测量仪器的依赖。

[0041] 2、在检测反应中,对功能化金纳米颗粒的配体进行了改进,使金纳米颗粒检测体系更加稳定,对标记在抗体上的氧化铜纳米颗粒的检出限更低,可达到 $1\ \mu\text{M}$,在10分钟之内就可以完成检测。

[0042] 3、本发明的方法及试剂盒不需要昂贵仪器,检测流程简单,成本低,稳定性好,便于开展,有望改善非洲等落后不发达地区的检测条件。

[0043] 以下是本发明的详细描述:

[0044] 本发明的目的是建立一种可视化检测抗原抗体反应的新方法,通过先使标记了氧化铜纳米颗粒的抗体与待检测样品发生反应,然后采用表面功能化的金纳米粒子检测体系,对标记在抗体上的纳米氧化铜颗粒进行检测,从而提供关于抗原抗体反应的信息,为基于免疫反应的疾病检测和诊断提供了一种新工具。

[0045] 本发明中所使用的氧化铜纳米颗粒标记的抗体可以通过以下方法提供:

[0046] 称取 1 ~ 5mg 市售氧化铜纳米颗粒(购于 Sigma 公司,粒径小于 50nm),加入 1 ~ 5mL PBS 缓冲液中,超声分散 10 ~ 20 分钟,然后将浓度为 0.1 ~ 0.4mg/mL 的抗体稀释液 50 ~ 500 μ L 在 3 分钟内逐滴加入含有氧化铜纳米颗粒的溶液中,低速振荡 2 ~ 4 小时后,8000 ~ 11000rpm 离心 5 ~ 15 分钟,去掉含有没有标记氧化铜纳米颗粒抗体的上清液,然后再将离心管中的氧化铜用 1 ~ 5mL PBS 缓冲液重新分散,并向溶液中加入 20 ~ 200 μ L 10% 的 BSA 溶液,BSA 溶液在这里起到稳定剂的作用,搅拌 30 ~ 60 分钟,5000 ~ 8000rpm 离心 5 ~ 15 分钟,去掉沉淀得到氧化铜纳米颗粒标记的抗体,4 $^{\circ}$ C 保存待用。

[0047] 本发明采用的示例性的技术方案如下:

[0048] 1) 抗原抗体反应

[0049] 在 96 孔板中加入浓度为 0.01 ~ 0.05mg/mL 的抗原 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 过夜,然后用 200 μ L PBST 洗液(含有 0.1% 吐温的 PBS 缓冲液)洗板三次,每孔加入 200 μ L 5% 的胎牛血清作为封闭剂进行封闭,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 ~ 2 小时。然后用 200 μ L PBST 洗液洗板三次,每孔加入经过氧化铜纳米颗粒标记的抗体 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 ~ 2 小时。然后用 200 μ L 去离子水洗板三次,完成抗原抗体免疫反应。

[0050] 2) 可视化检测

[0051] 在孔中加入 20 μ L 0.1 ~ 1mM 的 HCl 溶液,通过酸碱中和反应将标记在抗体上氧化铜纳米颗粒中的 Cu^{2+} 释放出来,反应 10 分钟后,加入表面功能化的金纳米粒子检测体系(金纳米粒子表面分别带有炔基和叠氮基),检测体系中的还原剂将 Cu^{2+} 还原成 Cu(I),Cu(I) 作为催化剂在常温常压下使金纳米粒子的末端炔基和叠氮基发生成环反应,从而使功能化的金纳米粒子发生反应而产生聚积和沉淀现象,进而通过肉眼观察金纳米粒子颜色和沉淀现象的变化即可实现对溶液中 Cu^{2+} 的检测,通过对抗体表面氧化铜纳米颗粒标记物的检测间接地实现对抗原抗体反应的检测。

[0052] 本发明的有益效果在于:

[0053] 1、与现有抗体标记物的检测方法相比,本发明不需要借助精密仪器实施检测,仅凭肉眼即可完成对抗原抗体标记的定性检测。

[0054] 2、在检测反应中所使用的对功能化金纳米颗粒的配体(炔基和叠氮基)为一种新合成的、用于金纳米粒子的新型配体,这两种配体使得金纳米颗粒检测体系更加稳定,当铜离子存在时配体之间易于反应,对标记在抗体上的氧化铜纳米颗粒的检出限更低,可达到 1 μ M,并且在 10 分钟之内就可以完成检测。

[0055] 3、本发明的方法及试剂盒不需要昂贵仪器,检测流程简单,成本低,稳定性好,便于开展,有望改善非洲等落后不发达地区的检测条件。

[0056] 本发明方法是一种新的检测抗原抗体反应的方法,可以应用于基于免疫反应的重大疾病的诊断和检测,例如 HBV, AIDS 等,同时可以被制成试剂盒,实现商品化,因为整个检测流程的成本低,有望改善非洲等落后不发达地区的诊断条件。

附图说明

[0057] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施例,其中:

[0058] 图 1:在 Cu(I) 催化下,功能化金纳米粒子上的末端炔基和叠氮基发生成环反应的示意图。

[0059] 图 2:化合物 6 的质谱(图 2A)和红外图谱(图 2B)。

[0060] 图 3:化合物 9 的质谱(图 3A)和红外图谱(图 3B)。

[0061] 图 4:采用本发明的方法对抗原抗体反应进行检测时,检测体系发生颜色变化的紫外吸收光谱。

具体实施方式

[0062] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述。应当理解给出的实施例仅为了对制备和使用本发明的特定方法进行说明,而不是为了限制本发明的范围。

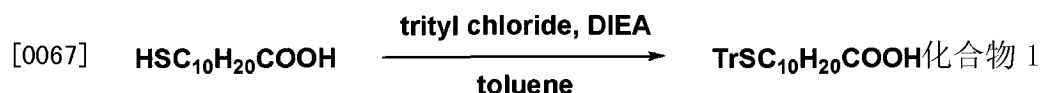
[0063] 本发明所使用的主要试剂或原料的商购途径如下表所示:

[0064]

原料名称	规格	来源
三苯基氯甲烷	CR	国药集团化学试剂有限公司
<i>N,N</i> -二异丙基乙胺(DIEA)	99 %	Alfa-Aesar
11-巯基十一烷酸	95 %	Sigma-Aldrich
1-乙基-(3-二甲基氨基丙基碳二亚胺盐(EDC-HCl)	99 %	上海共价化学科技有限公司
4-二甲氨基吡啶(DMAP)	99 %	Alfa-Aesar
三聚乙二醇(EG3)	97 %	Sigma-Aldrich
三氟乙酸(TFA)	CR	国药集团化学试剂有限公司
三乙基硅烷(TESi)	97 %	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -羟基琥珀酰亚胺(NHS)	99 %	上海共价化学科技有限公司

[0065] 其余未列出常见试剂皆购于北京化工厂,规格为 AR,不需要做进一步纯化处理。

[0066] 实施例 1:化合物 1 的合成



[0068] 步骤:

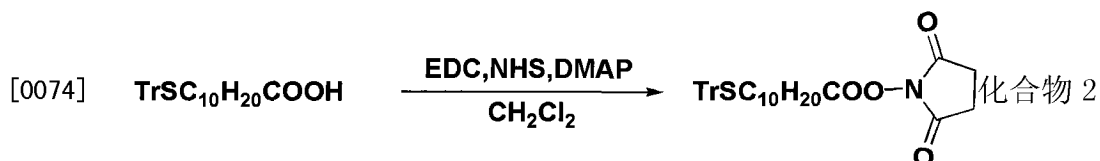
[0069] 1、将 100mL 的两口烧瓶 (19#) 抽真空, 充入氮气。

[0070] 2、氮气保护下向该烧瓶中加入 50mL 甲苯, 将三苯基氯甲烷 (4.60g, 16.5mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (DIEA, 4.20g, 33.0mmol) 溶解于该甲苯里面, 磁力搅拌下加入 11- 巯基十一烷酸 (3.00g, 13.8mmol), 氮气保护下在室温反应 5 小时。

[0071] 3、反应毕, 将溶剂减压蒸出, 向残余的产物中加入 50mL 二氯甲烷, 充分溶解后, 用饱和食盐水 (3×100mL) 洗三次, 再用无水硫酸钠干燥二氯甲烷溶液, 静置过夜。

[0072] 4、过滤去掉干燥剂无水硫酸钠, 将滤液减压蒸馏, 浓缩得到化合物 1 的粗品。用少许二氯甲烷溶解该粗品后, 用柱层析的方法进行纯化。洗脱剂为石油醚: 乙酸乙酯 = 10 : 1, 最后得到纯品为无色油状液体, 共 5.80g (12.6mmol), 产率为 92%。

[0073] 实施例 2: 化合物 2 的合成



[0075] 步骤:

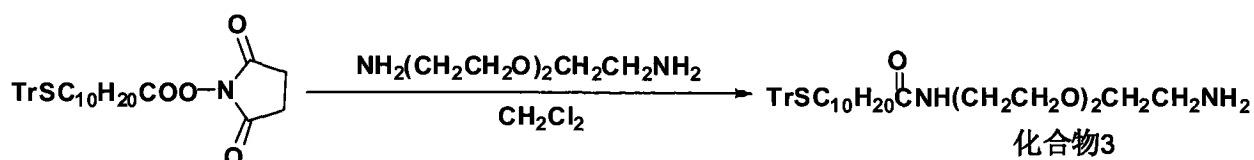
[0076] 1、向一个 50mL 的单口烧瓶 (19#) 中加入化合物 1 (1.50g, 3.3mmol), EDC-HCl (0.69g, 3.6mmol) 催化量的 DMAP, 加入 25mL 无水二氯甲烷, 磁力搅拌使之溶解, 最后向该混合液中加入 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS, 0.45g, 3.9mmol)。

[0077] 2、该混合溶液在 5℃ 搅拌一个小时, 随后在室温下反应 24 小时。

[0078] 3、反应毕, 用 25mL 二氯甲烷稀释反应液, 再用饱和食盐水 (3×50mL) 洗三次, 用无水硫酸钠干燥有机相, 浓缩得到化合物 2 (1.80g, 3.23mmol), 该化合物为化合物 1 的活化酯。产率为 99%。

[0079] 实施例 3: 化合物 3 的合成

[0080]



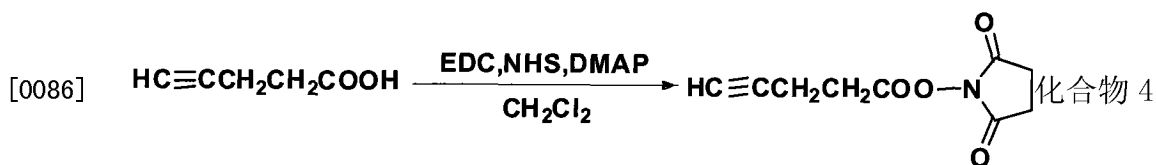
[0081] 步骤:

[0082] 1、将 $\text{NH}_2\text{C}_2\text{H}_4\text{OC}_2\text{H}_4\text{OC}_2\text{H}_4\text{NH}_2$ (8mL, 55mmol) 溶解到无水二氯甲烷中, 搅拌下向该混合溶液中缓慢滴加化合物 2 (1.80g, 3.23mmol) 的二氯甲烷溶液 10mL, 滴加完毕后, 再在室温下反应过夜。

[0083] 2、用 50mL 二氯甲烷稀释反应液, 再用饱和食盐水 (3×50mL) 洗有机相三次, 用无水硫酸钠干燥有机相, 减压浓缩, 得到化合物 3 的粗品。

[0084] 3、用少许二氯甲烷溶解粗品后上样, 进行柱层析分离, 洗脱剂为氯仿: 甲醇: 氨水 = 20 : 1 : 0.05, 得到纯品为无色油状液体, 共 1.78g (3.0mmol), 产率为 94%。

[0085] 实施例 4: 化合物 4 的合成



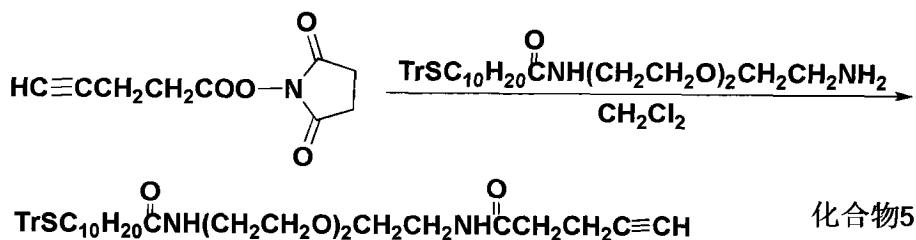
[0087] 步骤：

[0088] 1、将 4-戊炔酸 (490.5mg, 5mmol), NHS (690mg, 6mmol), DMAP (100mg) 溶于 30mL 无水 DCM 中, 搅拌下加入 EDC (1.15g, 6mmol) 5°C 反应 1h, 室温搅拌过夜。

[0089] 2、反应完毕, 有机相用饱和食盐水 (3×50mL) 洗三次, 用无水硫酸钠干燥, 旋去溶剂, 得黄色油状液体, 产率为 99%。

[0090] 实施例 5: 化合物 5 的合成

[0091]



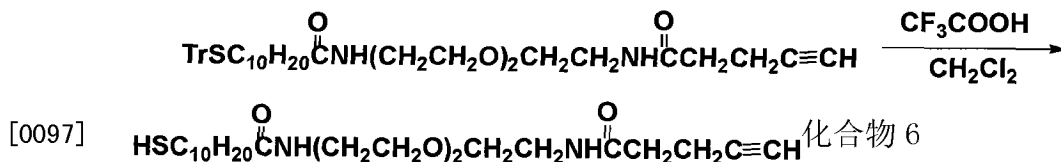
[0092] 步骤：

[0093] 1、将化合物 4 (1g, 5mmol) 溶于 30mL 无水 DCM 中, 搅拌下加入化合物 3 (3.25g, 5.5mmol), 室温下搅拌过夜。

[0094] 2、反应完毕, 浓缩粗产品, 用柱层析的方法进行纯化, 洗脱剂为 (氯仿 : 甲醇 = 50 : 1), 得到纯品为白色粉末, 共 3.0g, 产率为 79%。

[0095] 实施例 6: 化合物 6 的合成

[0096]



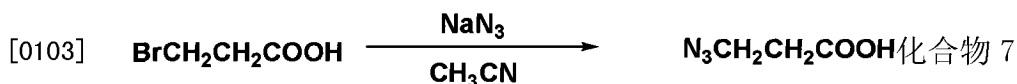
[0097] 步骤：

[0099] 1、将 25mL 的两口烧瓶 (19#) 抽真空, 充入氮气。

[0100] 2、氮气保护下将 0.5mL 三氟乙酸 (TFA) 加入 9.5mL 无水二氯甲烷里, 得到 5% (v/v) 的三氟乙酸溶液。搅拌下向该溶液中加入化合物 5 (2.01g, 3mmol), 随后加入三乙基硅烷 (TESi, 2.3mL, 15mmol), 室温搅拌过夜。

[0101] 3、反应完毕, 反应完毕后用 0.2M 的氢氧化钠溶液 (3×5mL) 洗三次, 然后用饱和食盐水 (2×5mL) 洗两次, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸馏除去溶剂, 将残余物用少许二氯甲烷溶解后上样, 进行柱层析分离, 洗脱剂为氯仿 : 甲醇 = 50 : 1, 得到白色固体, 共 960mg, 产率为 77%, 化合物 6 即为功能化金纳米粒子的炔基配体。其中, 化合物 6 的质谱图见图 2A, 红外谱图见图 2B。

[0102] 实施例 7: 化合物 7 的合成



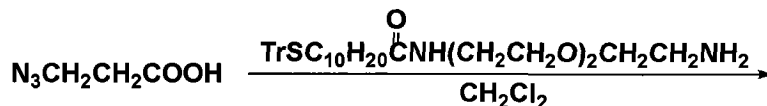
[0104] 步骤：

[0105] 1、将 3- 溴丙酸 (1.5g, 9.8mmol) 加入到 10mL 乙腈中, 搅拌下加入叠氮钠 (1.27g, 19.6mmol), 70°C 回流 6 小时。

[0106] 2、反应完毕后, 加入 30mL DCM 稀释, 加入 50mL 0.1M 的 HCl 洗, 然后用氯仿萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 旋蒸除去溶剂, 得到棕色液体。产率为 99%。

[0107] 实施例 8 : 化合物 8 的合成

[0108]



[0109] $\text{TrSC}_{10}\text{H}_{20}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CNH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ 化合物 8

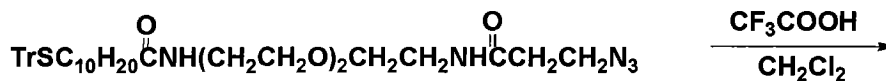
[0110] 步骤：

[0111] 1、将化合物 7 (654mg, 5.7mmol) 和化合物 3 (2.8g, 4.75mmol) 溶于 40mL 无水 DCM 中, 然后加入 EDC (1.09g, 5.7mmol,) 和 DMAP (100mg), 室温搅拌过夜。

[0112] 2、反应完毕, 用饱和食盐水洗有机相 (2×15mL) 两次, 然后用氯仿萃取水相, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 粗产品进行柱层析分离, 洗脱剂为氯仿 : 甲醇 = 20 : 1, 得到白色固体, 共 2.82g, 产率为 86%。

[0113] 实施例 9 : 化合物 9 的合成

[0114]



[0115] $\text{HSC}_{10}\text{H}_{20}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CNH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ 化合物 9

[0116] 步骤：

[0117] 1、将 25mL 的两口烧瓶 (19#) 抽真空, 充入氮气。

[0118] 2、氮气保护下将 0.5mL 三氟乙酸 (TFA) 加入 9.5mL 无水二氯甲烷里, 得到 5% (v/v) 的三氟乙酸溶液。搅拌下向该溶液中加入化合物 8 (1.93g, 2.8mmol), 随后加入三乙基硅烷 (TESi, 2.3mL, 15mmol), 室温搅拌过夜。

[0119] 3、反应完毕后用 0.2M 的氢氧化钠溶液 (3×5mL) 洗三次, 然后用饱和食盐水 (2×5mL) 洗两次, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸馏除去溶剂, 将残余物用少许二氯甲烷溶解后上样, 进行柱层析分离, 洗脱剂为氯仿 : 甲醇 = 50 : 1, 得到白色固体, 共 830mg, 产率为 68%, 化合物 9 即为功能化金纳米粒子的叠氮基配体。其中, 化合物 9 的质谱图见图 3A, 红外谱图见图 3B。

[0120] 实施例 10 : 金纳米粒子的合成

[0121] 将 41.2mg 氯金酸 (99.95%) 溶于 100mL 水中, 搅拌状态下加热至沸腾, 将 114mg 柠檬酸钠溶于 10mL 水, 然后迅速加入到沸腾的氯金酸溶液中, 溶液从黄色变为无色, 到紫色再到酒红色, 继续加热搅拌 15 分钟, 自然冷却到室温搅拌 2 小时, 得柠檬酸钠稳定的酒红色的金纳米粒子。

[0122] 实施例 11 : 炔基功能化金纳米粒子的合成

[0123] 将制得柠檬酸钠稳定的金纳米粒子 1.5mL, 用去离子水稀释成 10mL 溶液, 然后滴加浓度为 0.5M 的氢氧化钠溶液, 直至调节 pH 值为 9, 搅拌状态下, 同时加入共稳定剂 (11- 巯基烷基聚乙二醇 (3), $3 \mu\text{mol}$) 和末端炔基功能化的硫醇配体 (化合物 6, $0.5 \mu\text{mol}$), 搅拌 24 小时, 离心分离 20 分钟, 经过水洗三次, 再离心分离后得到表面炔基功能化的金纳米粒子。

[0124] 实施例 12 : 叠氮基功能化金纳米粒子的合成

[0125] 将制得柠檬酸钠稳定的金纳米粒子 1.5mL, 用去离子水稀释成 10mL 溶液, 然后滴加浓度为 0.5M 的氢氧化钠溶液, 直至调节 pH 值为 9, 搅拌状态下, 同时加入共稳定剂 (11- 巯基烷基聚乙二醇 (3), $3 \mu\text{mol}$) 和末端叠氮基功能化的硫醇配体 (化合物 9, $0.5 \mu\text{mol}$), 搅拌 24 小时, 离心分离 20 分钟, 经过水洗三次, 再离心分离后得到表面叠氮基功能化的金纳米粒子。

[0126] 实施例 13 : 功能化金纳米粒子检测体系的制备

[0127] 将制备好的炔基功能化金纳米粒子溶液和叠氮基功能化金纳米粒子溶液各取 1mL 加入到离心管中, 向溶液中加入浓度为 0.05M 的还原剂抗坏血酸钠 $20 \mu\text{L}$, 超声振荡 5 分钟, 即得到功能化金纳米粒子的检测体系。

[0128] 实施例 14 : 功能化金纳米粒子检测体系对铜离子的检测

[0129] 取 7 只玻璃小瓶, 在每个小瓶中加入 1mL 功能化金纳米粒子检测体系溶液, 然后在小瓶中依次加入浓度为 10mM、1mM、 $100 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、100nM 和 10nM 的硫酸铜溶液 $10 \mu\text{L}$, 10 分钟后瓶中铜离子浓度大于 $1 \mu\text{M}$ (包括 $1 \mu\text{M}$) 的检测体系都发生了颜色变化, 由红色变为蓝紫色, 检出限为 $1 \mu\text{M}$ 。

[0130] 实施例 15 : 用氧化铜纳米颗粒标记兔抗 OVA (鸡卵白蛋白, ovalbumin, OVA) 抗体

[0131] 称取 1mg 市售氧化铜纳米颗粒 (购于 Sigma 公司, 粒径小于 50nm), 加入 1mL PBS 缓冲液中, 超声分散 10 分钟, 然后将浓度为 0.2mg/mL 的兔抗 OVA 抗体 (购于博奥森公司, 产品货号 bs-0283R) 稀释液 $500 \mu\text{L}$ 在 3 分钟内逐滴加入含有氧化铜纳米颗粒的溶液中, 低速振荡 3 小时后, 10000rpm 离心 10 分钟, 去掉含有没有标记氧化铜纳米颗粒抗体的上清液, 然后再将离心管中的氧化铜用 1.5mL PBS 缓冲液重新分散, 并向溶液中加入 $200 \mu\text{L}$ 10% 的 BSA 溶液, BSA 溶液在这里起到稳定剂的作用, 搅拌 30 分钟, 5000rpm 离心 10 分钟, 去掉没有标记在抗体上的过量氧化铜, 得到氧化铜纳米颗粒标记的兔抗 OVA 抗体复合体, 4°C 保存待用。

[0132] 实施例 16 : OVA 抗原与氧化铜标记的兔抗 OVA 抗体反应

[0133] 在 96 孔板中加入浓度为 0.02mg/mL 的 OVA 抗原 (购于 Sigma 公司, 货号为 A5503) $100 \mu\text{L}$, 4°C 过夜, 然后用 $200 \mu\text{L}$ PBST 洗液 (含有 0.1% 吐温的 PBS 缓冲液) 洗板三次, 每孔加入 $200 \mu\text{L}$ 5% 的胎牛血清作为封闭剂进行封闭, 37°C 孵育 1 小时。然后用 $200 \mu\text{L}$ PBST 洗液洗板三次, 每孔加入经过氧化铜纳米颗粒标记的兔抗 OVA 抗体 $100 \mu\text{L}$, 37°C 孵育 1 小时。然后用 $200 \mu\text{L}$ 去离子水洗板三次, 去除未反应的多余氧化铜标记的兔抗 OVA 抗体, 完成抗原抗体免疫反应。同时, 为了确保后续的检测结果可信, 在完成抗原抗体反应的过程中, 在板上其他孔内还加入了兔 IgG 作为阴性对照, BSA 作为无关蛋白对照, 以及空白对照。制备方法同 OVA 抗原与氧化铜标记的兔抗 OVA 抗体反应。在另一孔内加入 $10 \mu\text{L}$ 的浓度为 $10 \mu\text{M}$ 铜离子作为阳性对照。

[0134] 实施例 17 :标记氧化铜纳米颗粒兔抗 OVA 抗体的可视化检测

[0135] 在孔板每孔中加入 20 μL 1mmol/L 的 HCl 溶液,通过酸碱中和反应将标记在抗体上氧化铜纳米颗粒中的 Cu^{2+} 释放出来,反应 10 分钟后,加入表面功能化的金纳米粒子检测体系 200 μL ,检测体系中的还原剂抗坏血酸钠会将 Cu^{2+} 还原成 Cu(I),Cu(I) 作为催化剂在常温常压下使末端炔基和叠氮基发生成环反应,从而使功能化的金纳米粒子发生反应而产生聚集和沉淀现象。反应 10 分钟后,通过肉眼观察到,待测孔内的检测体系从红色变成紫色,阳性对照孔内的检测体系由红色变为了蓝色,阴性对照、无关蛋白对照和空白对照孔内的检测体系没有发生颜色变化,通过酶标仪对各孔的紫外吸收光谱,可以明显的看到待测孔和阳性对照孔的紫外吸收峰发生了红移(图 4)。因此,实现了对溶液中 Cu^{2+} 的检测,从而间接的实现了对氧化铜纳米颗粒标记抗体的检测,并且该检测可通过肉眼进行判断。

[0136] 实施例 18 :用氧化铜纳米颗粒标记羊抗兔 IgG

[0137] 参考实施例 15 的制备方法,将其中的兔抗 OVA 抗体换为羊抗兔 IgG(购于博奥森公司,货号为 bs-0295G)。

[0138] 实施例 19 :OVA 抗原、兔抗 OVA 抗体与与氧化铜标记的羊抗兔 IgG 反应

[0139] 在 96 孔板中加入浓度为 0.02mg/mL 的 OVA 抗原 100 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,然后用 200 μL PBST 洗液(含有 0.1%吐温的 PBS 缓冲液)洗板三次,每孔加入 200 μL 5%的胎牛血清作为封闭剂进行封闭,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时。然后用 200 μL PBST 洗液洗板三次,每孔加入兔抗 OVA 抗体 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时。然后用 200 μL PBST 洗液洗板三次,每孔加入经过氧化铜纳米颗粒标记的羊抗兔 IgG 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时。然后用 200 μL 去离子水洗板三次,去除未反应的多余氧化铜标记的羊抗兔 IgG,完成抗原、一抗、二抗免疫反应。同时,为了确保后续的检测结果可信,在完成抗原、一抗、二抗反应的过程中,在板上其他孔内还加入了兔 IgG 作为阴性对照,BSA 作为无关蛋白对照,以及空白对照。制备方法同该实施例中前面所述的抗原、一抗、二抗的制备方法。在另一孔内加入 10 μL 的浓度为 10 μM 铜离子作为阳性对照。

[0140] 实施例 20 :标记氧化铜纳米颗粒羊抗兔 IgG 的可视化检测

[0141] 在孔板每孔中加入 20 μL 1mmol/L 的 HCl 溶液,通过酸碱中和反应将标记在羊抗兔 IgG 上氧化铜纳米颗粒中的 Cu^{2+} 释放出来,反应 10 分钟后,加入表面功能化的金纳米粒子检测体系 200 μL ,检测体系中的还原剂抗坏血酸钠会将 Cu^{2+} 还原成 Cu(I),Cu(I) 作为催化剂在常温常压下使末端炔基和叠氮基发生成环反应,从而使功能化的金纳米粒子发生反应而产生聚集和沉淀现象。反应 10 分钟后,通过肉眼观察到,待测孔内的检测体系从红色变成紫色,阳性对照孔内的检测体系由红色变为了蓝色,阴性对照、无关蛋白对照和空白对照孔内的检测体系没有发生颜色变化,通过酶标仪对各孔的紫外吸收光谱,可以明显的看到待测孔和阳性对照孔的紫外吸收峰发生了红移。因此,实现了对溶液中 Cu^{2+} 的检测,从而间接的实现了对氧化铜纳米颗粒标记羊抗兔 IgG 的检测。

[0142] 实施例 21 :用氧化铜纳米颗粒标记兔抗人 IgG

[0143] 参考实施例 15 的制备方法,将其中的兔抗 OVA 抗体换为兔抗人 IgG(购于博奥森公司,货号为 bs-0297R)。

[0144] 实施例 22 :HIV-1 gp41 抗原、人血清与氧化铜标记的兔抗人 IgG 反应

[0145] 在 96 孔板中加入浓度为 0.02mg/mL 的 HIV-1 gp41 抗原(购于博奥森公司,货

号为 bs-0239P) 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 然后用 200 μ L PBST 洗液 (含有 0.1% 吐温的 PBS 缓冲液) 洗板三次, 每孔加入 200 μ L 5% 的胎牛血清作为封闭剂进行封闭, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。然后用 200 μ L PBST 洗液洗板三次, 每孔加入 HIV 阳性血清 10 倍稀释液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。然后用 200 μ L PBST 洗液洗板三次, 每孔加入经过氧化铜纳米颗粒标记的兔抗人 IgG 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。然后用 200 μ L 去离子水洗板三次, 去除未反应的多余氧化铜标记的兔抗人 IgG, 完成抗原、一抗、二抗免疫反应。同时, 为了确保后续的检测结果可信, 在完成抗原、一抗、二抗反应的过程中, 在板上其他孔内还加入了阴性血清作为阴性对照, BSA 作为无关蛋白对照, 以及空白对照。制备方法同该实施例中前面所述的抗原、一抗、二抗的制备方法。在另一孔内加入 10 μ L 的浓度为 10 μ M 铜离子作为阳性对照。

[0146] 实施例 23: 标记氧化铜纳米颗粒兔抗人 IgG 的可视化检测

[0147] 在 96 孔板每孔中加入 20 μ L 1mmol/L 的 HCl 溶液, 通过酸碱中和反应将标记在兔抗人 IgG 上氧化铜纳米颗粒中的 Cu^{2+} 释放出来, 反应 10 分钟后, 加入表面功能化的金纳米粒子检测体系 200 μ L, 检测体系中的还原剂抗坏血酸钠会将 Cu^{2+} 还原成 Cu(I), Cu(I) 作为催化剂在常温常压下使末端炔基和叠氨基发生成环反应, 从而使功能化的金纳米粒子发生反应而产生聚集和沉淀现象。反应 10 分钟后, 通过肉眼观察到, 待测孔内的检测体系从红色变成紫色, 阳性对照孔内的检测体系由红色变为了蓝色, 阴性对照、无关蛋白对照和空白对照孔内的检测体系没有发生颜色变化。因此, 实现了对溶液中 Cu^{2+} 的检测, 从而间接的实现了对氧化铜纳米颗粒标记兔抗人 IgG 的检测。同时, 该实施例也证明, 该检测方法可以用来定性的检测 HIV 血清样品, 为基于免疫的疾病检测提供了一种新的检测方法。

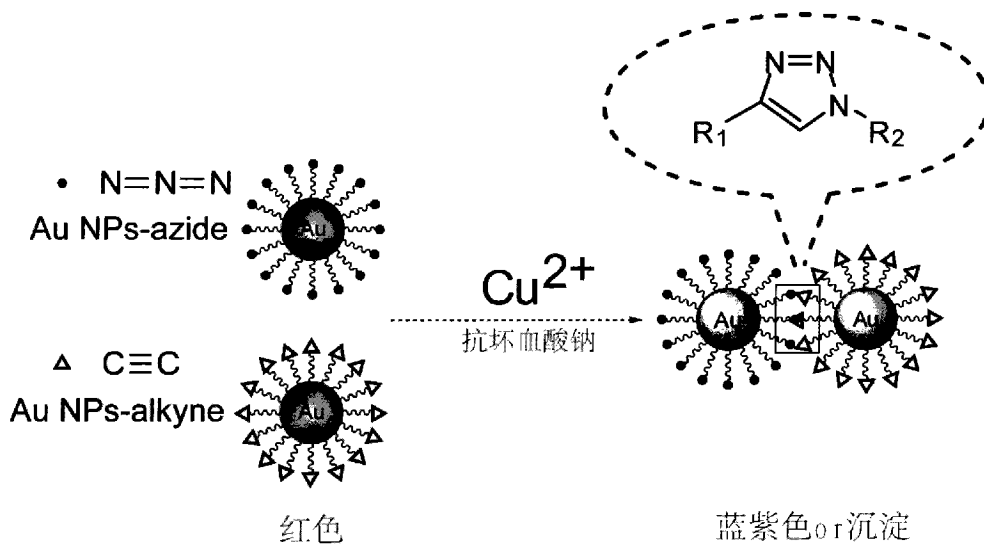
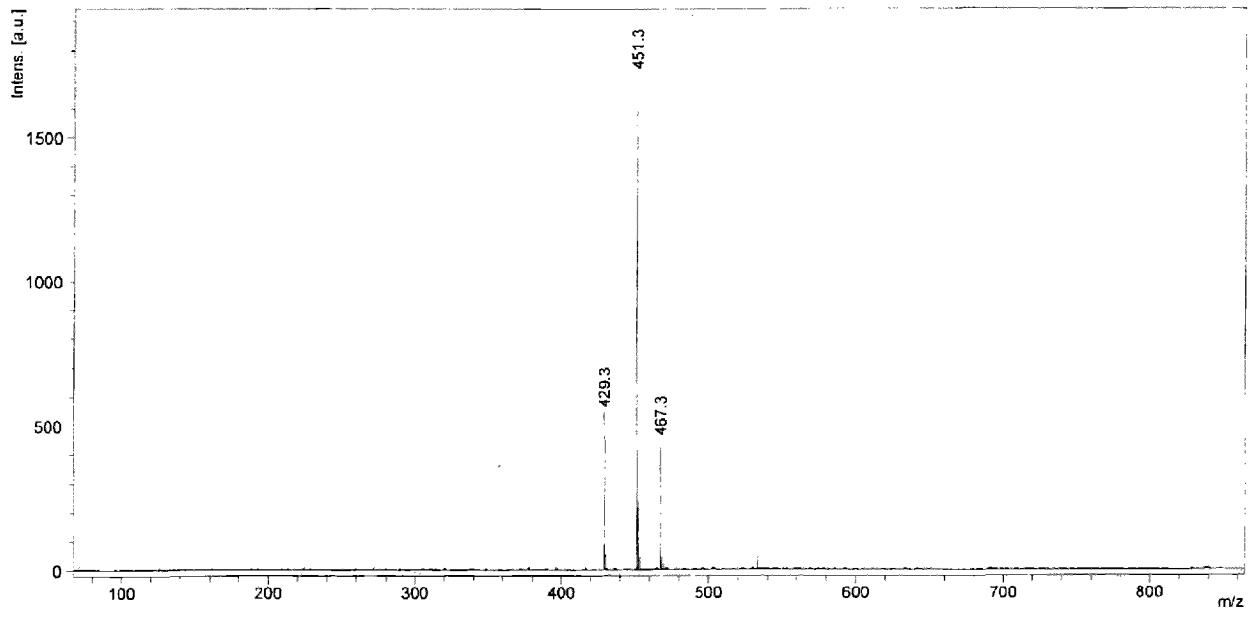
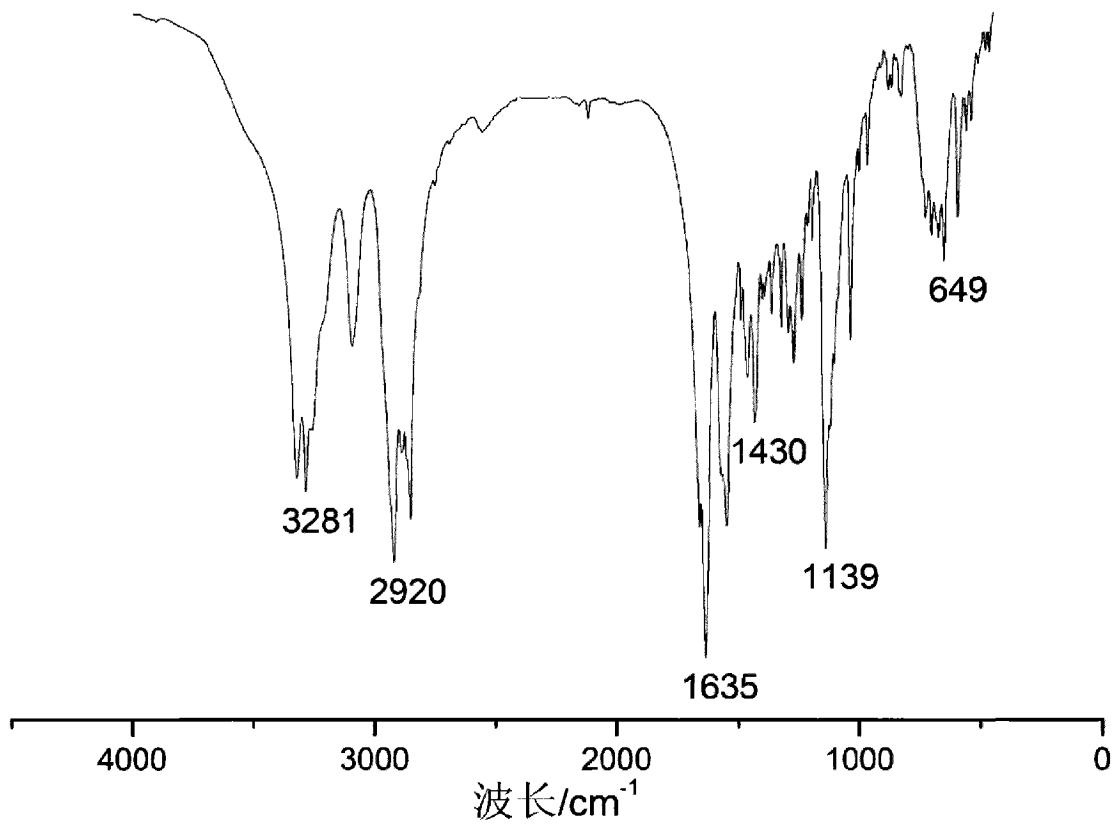


图 1

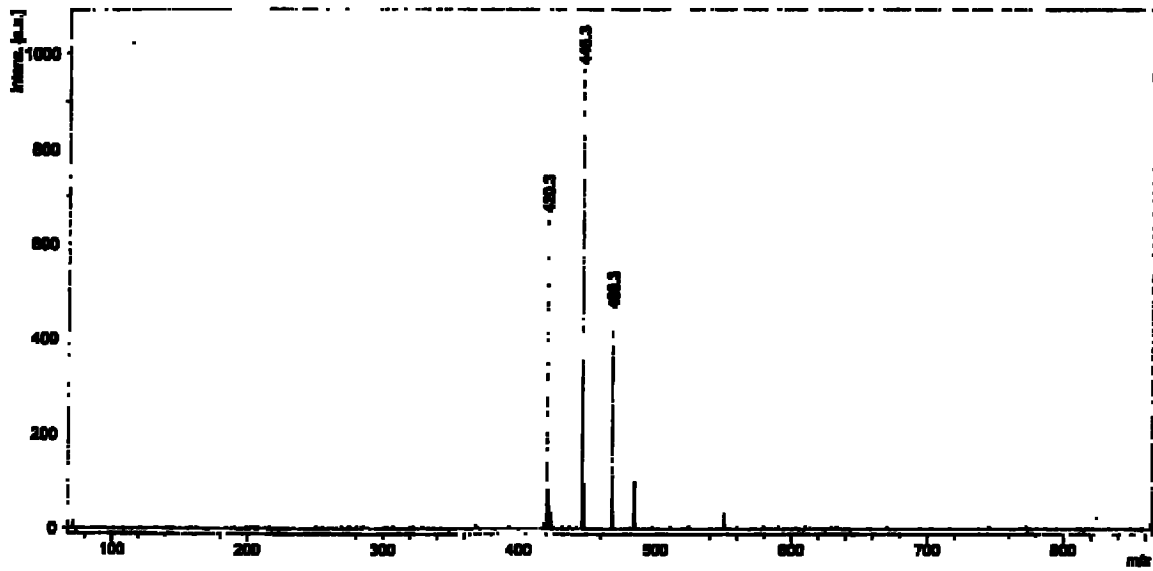


A

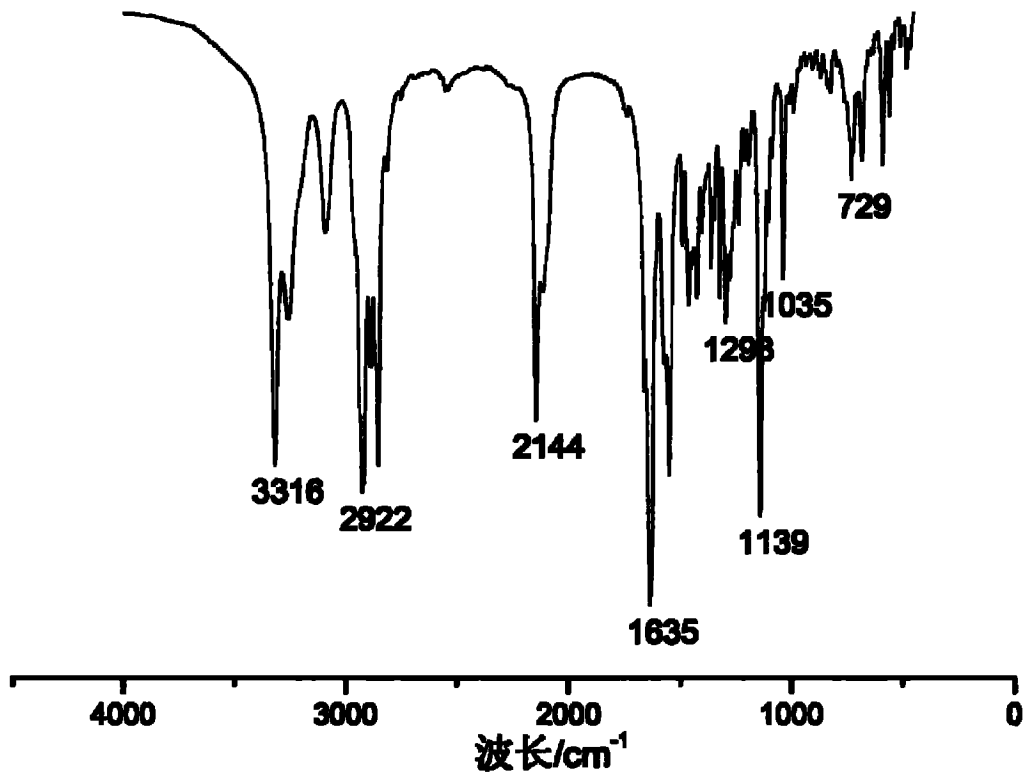


B

图 2



A



B

图 3

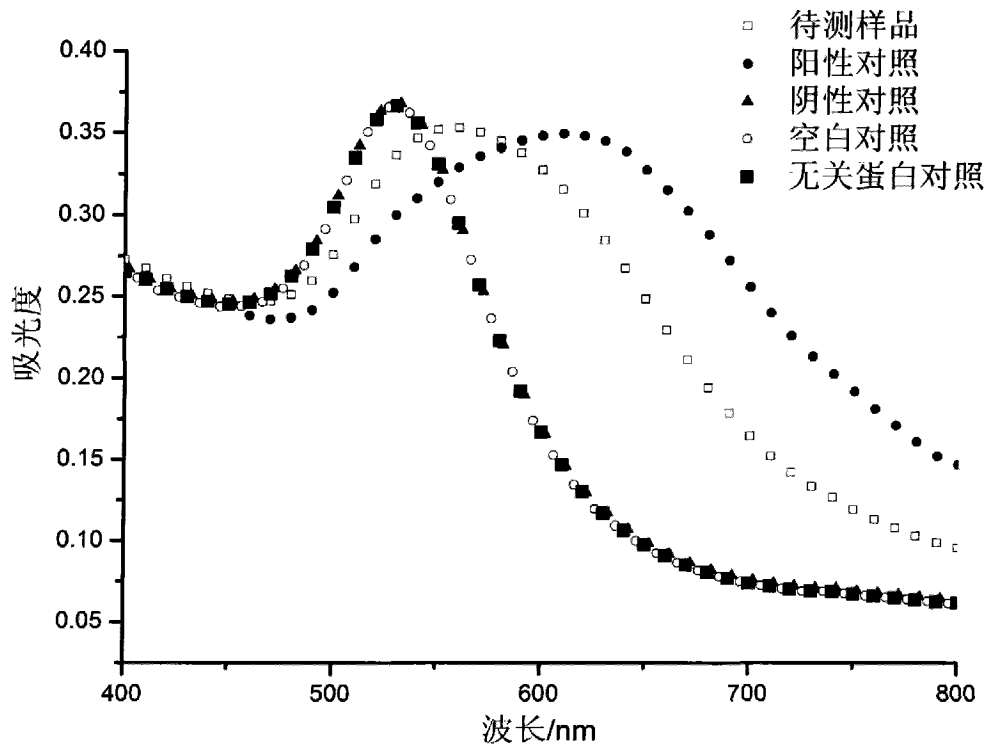


图 4

专利名称(译)	可视化检测抗原抗体反应的方法、试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN102269758B	公开(公告)日	2013-11-20
申请号	CN201010191564.X	申请日	2010-06-04
[标]申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
当前申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
[标]发明人	蒋兴宇 曲伟思 刘颖昶 王卓		
发明人	蒋兴宇 曲伟思 刘颖昶 王卓		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/558 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/587		
代理人(译)	刘丹妮		
其他公开文献	CN102269758A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种可视化检测抗原抗体反应的方法，具体地，该方法通过先使标记了氧化铜纳米颗粒与待检测样品发生反应，然后采用表面功能化的金纳米粒子，对标记在抗体上的纳米氧化铜颗粒进行检测，从而提供关于抗原抗体反应的信息，为基于免疫反应的疾病检测和诊断提供了一种新工具。本发明涉及的方法不需要借助任何仪器，通过肉眼即可完成，适合野外作业。本发明还提供该方法的应用。本发明进一步提供用于可视化检测抗原抗体反应的试剂盒及其应用。

