



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110333348 A

(43)申请公布日 2019.10.15

(21)申请号 201910660011.5

(22)申请日 2019.07.22

(71)申请人 安阳师范学院

地址 455000 河南省安阳市高新技术开发
区弦歌大道436号

(72)发明人 夏宁 刘林 孙婷 常勇 邓德华
黄雅亮

(74)专利代理机构 安阳金泰专利代理事务所
(普通合伙) 41150

代理人 王晖

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

B82Y 15/00(2011.01)

B01J 23/72(2006.01)

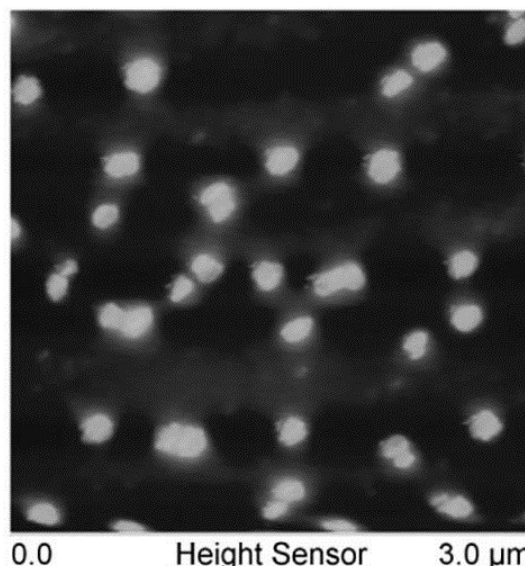
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

多肽与铜离子形成的纳米颗粒及制备方法
及应用

(57)摘要

多肽与铜离子形成的纳米颗粒,所述的多肽
的序列特征是:氨基酸序列是K_{biotin}GHFF.制备方
法如下:将含硫酸铜的磷酸缓冲溶液加入到含
K_{biotin}GHFF多肽的二甲基甲酰胺溶液中,震荡10
分钟,继续室温孵育反应24小时左右,在中性条
件下自组装形成的纳米颗粒,即得到多肽与铜离
子组装形成的纳米颗粒溶液。多肽与铜离子形
成的纳米颗粒的应用,采用上述的多肽与铜离
子形成的纳米颗粒溶液,应用于可视化免疫分析。本
发明具有简单灵敏、直观、高通量、不需要特殊仪
器等优点,该技术的研制成功将实现不同类型抗
原的检测。



1. 多肽与铜离子形成的纳米颗粒,其特征在於:所述的多肽的序列特征是:氨基酸序列是K_{biotin}GHFF,由三部分构成,疏水性的二肽FF、三肽KGH、与赖氨酸侧链上的胺基偶联的生物素biotin。

2. 多肽与铜离子形成的纳米颗粒的制备方法,所述的多肽的序列特征是:氨基酸序列是K_{biotin}GHFF,由三部分构成,疏水性的二肽FF、三肽KGH、与赖氨酸侧链上的胺基偶联的生物素biotin,其特征在於:所述的制备方法如下:将含硫酸铜的磷酸缓冲溶液加入到含K_{biotin}GHFF多肽的二甲基甲酰胺溶液中,震荡10分钟,继续室温孵育反应24小时左右,在中性条件下自组装,即得到多肽与铜离子组装形成的纳米颗粒溶液。

3. 多肽与铜离子形成的纳米颗粒的应用,采用权利要求1或权利要求2所述的多肽与铜离子形成的纳米颗粒溶液,其特征在於:应用于可视化免疫分析。

4. 根据权利要求3所述的多肽与铜离子形成的纳米颗粒的应用:其特征在於:应用于可视化免疫分析的步骤如下:向免疫分析的酶标板中加入含抗原的磷酸缓冲溶液,反应2.5小时左右,用洗涤缓冲液浸泡五次;然后加入链霉亲和素标记的抗体溶液,孵育1小时左右,再次用洗涤缓冲液浸泡洗涤;然后加入多肽与铜离子组装形成的纳米颗粒溶液,室温孵育1小时左右,用2-吗啉乙磺酸缓冲液洗涤三次,再加入新配制的含有3,3',5,5'-四甲基联苯胺、氯化钠和过氧化氢的2-吗啉乙磺酸缓冲液,室温孵育5分钟,用肉眼观察溶液颜色变化或者用分光光度计测定溶液在655 nm处的吸收值。

5. 根据权利要求4所述的多肽与铜离子形成的纳米颗粒的应用:其特征在於:所述的可视化免疫分析为前列腺特异性抗原的检测,所述的抗原为前列腺特异性抗原,所述的抗体为前列腺特异性抗原的抗体。

多肽与铜离子形成的纳米颗粒及制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析检测,主要涉及一种用于免疫分析检测的多肽与铜离子组装形成的纳米颗粒及检测方法,属于化学领域。

背景技术

[0002] 生物分子的检测在生物医学诊断(特别是早期诊断)和治疗方面具有重要意义。例如,前列腺特异性抗原是前列腺疾病的一种标志物,科研工作者建立了一系列用于前列腺特异性抗原等生物标志物检测的免疫分析法,包括电化学、荧光光谱、比色法、电致化学发光和表面增强拉曼光谱等。其中,比色酶联免疫分析法具有性价比高、分析速度快、无需特殊仪器设备和专业技能等优点,是目前常用的一种免疫检测方法。传统的比色酶联免疫分析法主要基于抗原与抗体的特异性免疫作用和酶催化显色反应进行信号输出,其中,辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶和碱性磷酸酶在比色酶联免疫分析法中得到广泛的应用。但是,基于天然酶催化的比色酶联免疫分析法存在一些缺陷,比如灵敏度低、酶活性受外界环境影响较大等。因此,建立无酶、高灵敏度和简便的免疫分析法具有一定的必要性。

[0003] 近年来,纳米科学技术的发展推动了无酶生物传感器的发展。如今,基于纳米材料的各种可视化检测分析法纷纷涌现,包括碳纳米材料、贵金属纳米材料、金属氧化物或硫化物纳米材料、金属有机骨架纳米材料等。这些纳米材料的主要功能包括:作为纳米酶催化显色反应;作为显色底物,起到指示剂的作用;作为载体,用于负载酶、小分子显色剂或者催化剂。其中,基于纳米酶的可视化检测分析法受到了人们的广泛关注。然而,在纳米酶表面修饰的外源分子(包括分子识别基团和封闭剂等)导致了纳米酶的催化活性位点减少和催化活性降低,因而进一步降低了分析方法的灵敏度,因此限制了该分析方法的实际应用。比色分析的灵敏度取决于检测物引起的检测体系吸光度变化的大小。因此,将成百上千个信号分子或催化剂(比如酶、金属离子和小分子等)负载于纳米颗粒上,将极大的提高检测的灵敏度。例如,在外界刺激作用下,纳米材料包裹的小分子显色剂可以被释放出来,产生较大的检测信号。另外,将含有特定金属元素的纳米粒子溶解为游离的金属离子,通过金属离子的催化反应或者配位作用,可以产生显色反应。例如,二价铜离子具有类似于过氧化物酶的能力,能够催化过氧化氢氧化3,3',5,5'-四甲基联苯胺,导致溶液颜色发生变化,所以含有铜元素的纳米材料,比如氧化铜纳米粒子和含二价铜离子的金属有机骨架纳米材料,可以用于可视化检测的信号标记物。但是,这些纳米材料的制备和表面修饰程序复杂,非特异性吸附作用较大。因此,开发一种通过简单方法制备得到的负载信号分子和分子识别基团的多功能纳米材料,并以此建立一种简单灵敏、抗干扰能力强、高通量的比色免疫分析方法是十分必要的。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服目前的免疫检测分析中存在的上述问题,提供一种多肽与铜离子形成的纳米颗粒及制备方法及应用。

[0005] 为实现本发明的目的,采用了下述的技术方案:多肽与铜离子形成的纳米颗粒,所述的多肽的序列特征是:氨基酸序列是K_{biotin}GHFF,由三部分构成,疏水性的二肽FF、三肽KGH、与赖氨酸侧链上的胺基偶联的生物素biotin。

[0006] 多肽与铜离子形成的纳米颗粒的制备方法,所述的多肽的序列特征是:氨基酸序列是K_{biotin}GHFF,由三部分构成,疏水性的二肽FF、三肽KGH、与赖氨酸侧链上的胺基偶联的生物素biotin,其特征在于:所述的制备方法如下:将含硫酸铜的磷酸缓冲溶液加入到含K_{biotin}GHFF多肽的二甲基甲酰胺溶液中,震荡10分钟,继续室温孵育反应24小时左右,在中性条件下自组装形成的纳米颗粒,即得到多肽与铜离子组装形成的纳米颗粒溶液。

[0007] 多肽与铜离子形成的纳米颗粒的应用,采用上述的多肽与铜离子形成的纳米颗粒溶液,其特征在于:应用于可视化免疫分析。

[0008] 进一步的;应用于可视化免疫分析时步骤如下:向免疫分析的酶标板中加入含抗原的磷酸缓冲溶液,反应2.5小时左右,用洗涤缓冲液浸泡五次;然后加入链霉亲和素标记的抗体溶液,孵育1小时左右,再次用洗涤缓冲液浸泡洗涤;然后加入多肽与铜离子组装形成的纳米颗粒溶液,室温孵育1小时左右,用2-吗啉乙磺酸缓冲液洗涤三次,再加入新配制的含有3,3',5,5'-四甲基联苯胺、氯化钠和过氧化氢的2-吗啉乙磺酸缓冲液,室温孵育5分钟左右,用肉眼观察溶液颜色变化或者用分光光度计测定溶液在655 nm处的吸收值。

[0009] 进一步的;所述的抗原为前列腺特异性抗原,所述的抗体为前列腺特异性抗原的抗体。

[0010] 本发明的积极有益技术效果在下:(1)纳米粒子的制备过程简便,不需要额外的负载催化剂和修饰特异性识别分子的步骤;(2)构建的方法包含两个信号放大过程:一个是每个纳米粒子含有大量的铜离子,另一个是铜离子对3,3',5,5'-四甲基联苯胺的氧化反应的高催化能力,具有简单灵敏、直观、高通量、不需要特殊仪器等优点,该技术的研制成功将实现不同类型抗原的检测。

附图说明

[0011] 图1多肽与铜离子组装形成的纳米颗粒的原子力显微镜图。

[0012] 图2是该方法对不同浓度的前列腺特异性抗原检测的紫外可见吸收光谱图。

[0013] 图3是吸收值与前列腺特异性抗原浓度之间的的线性关系曲线。

[0014] 图4是本发明的选择性图示。

具体实施方式

[0015] 为了更充分的解释本发明的实施,提供本发明的实施实例。这些实施实例仅仅是对该工艺的阐述,不限制本发明的范围,本发明中用以下实施例说明,但不限于下述实施例,任何变化实施都包含在本发明的技术范围内。

[0016] 本发明中抗体是前列腺特异性抗原的抗体。以下实施例以前列腺特异性抗原为例进行具体阐述。

[0017] 对附图进一步的解释,图1是多肽与铜离子组装形成的纳米颗粒的原子力显微镜图。从图1中可以看出,多肽与铜离子组装形成了纳米颗粒。

[0018] 图2是溶液的紫外可见吸收光谱与前列腺特异性抗原浓度之间的关系,前列腺特

异性抗原的浓度依次是0, 0.001, 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 ng/mL。

[0019] 图4是其他常见蛋白质对紫外吸收值的影响,从1到6依次对应的是:50 ng/mL的人血清蛋白,50 ng/mL的免疫球蛋白G,50 ng/mL的甲胎蛋白,50 ng/mL的凝血酶,0.75 ng/mL的前列腺特异性抗原,含0.75 ng/mL的前列腺特异性抗原和10%胎牛血清的溶液。

[0020] 实施例:

一、多肽与铜离子组装形成的纳米颗粒的制备:

具体操作如下:将含硫酸铜的磷酸缓冲溶液(20 mM, pH 7.4)加入到含K_{biotin}GHFF多肽(5 mM)的二甲基甲酰胺溶液中,多肽与铜离子的摩尔比控制在1.2:1,震荡10分钟,继续室温孵育反应24小时左右,即得到多肽与铜离子组装形成的纳米颗粒溶液,于4 °C下保存备用。

[0021] 二、前列腺特异性抗原的检测

向抗体覆盖的酶标板中加入100 μL待检测的前列腺特异性抗原的磷酸缓冲溶液,反应2.5小时左右,用200 μL洗涤缓冲液洗涤五次;然后加入100 μL链霉亲和素标记的检测抗体溶液,孵育1小时左右,再次用200 μL洗涤缓冲液浸泡洗涤;然后加入200 μL多肽与铜离子组装形成的纳米颗粒溶液,室温孵育1小时左右,用200 μL 2-吗啉乙磺酸缓冲液(5 mM, pH 6.0)洗涤三次,再加入100 μL新配制的含有0.5 mM 3,3',5,5'-四甲基联苯胺、100 mM氯化钠和0.75 M过氧化氢的2-吗啉乙磺酸缓冲液(5 mM, pH 4.0),室温孵育5分钟左右,用肉眼观察溶液颜色变化或者用分光光度计测定溶液在655 nm处的吸收值。图2是该方法对不同浓度的前列腺特异性抗原检测的紫外可见吸收光谱图,从图中可以看出,前列腺特异性抗原的浓度越大,溶液在655 nm处的吸收值越大,该吸收值是由溶液中生成的氧化态的3,3',5,5'-四甲基联苯胺产生的,表明根据生成的氧化态的3,3',5,5'-四甲基联苯胺的吸收强度变化,可以测定前列腺特异性抗原的浓度,线性范围是0.001 ~ 1 ng/mL(见图3),当前列腺特异性抗原的浓度高于0.01 ng/mL时,用肉眼即可观察到溶液颜色的变化,采用分光光度计可以检测到0.001 ng/mL 前列腺特异性抗原,表明该方法可以用于前列腺特异性抗原的比色分析检测。

[0022] 三、选择性

步骤参照实施例2步骤,将前列腺特异性抗原换成待测试的物质,其他的步骤条件不改变,实验结果如图4。从图中可以看出,只有前列腺特异性抗原能够导致溶液吸收值的增加和溶液变为蓝色,其它物质没有引起溶液颜色变为蓝色,这些物质引起的紫外吸收值变化可以忽略不计,表明该方法对前列腺特异性抗原的检测具有较好的选择性。另外,测试结果表明,前列腺特异性抗原在胎牛血清中的测定值与在缓冲溶液中的测定值基本一致,表明血清中的其它成分不影响前列腺特异性抗原的检测,因此,该方法适用于血清样品分析。

[0023] 本发明的机理探讨:设计的多肽的氨基酸序列是K_{biotin}GHFF,由三部分构成,疏水性的二肽FF、三肽KGH、与赖氨酸侧链上的胺基偶联的生物素biotin。N-端的KGH片段能够与二价铜离子以1:1的比例形成高亲和力的螯合物。多肽与铜离子形成的络合物在pH为中性的缓冲溶液中会自组装形成纳米颗粒,其中,疏水性的二肽FF发挥着成核的作用。形成的纳米颗粒表面含有生物素分子,其与链霉亲和素具有很强的分子亲和力。当前列腺特异性抗原被酶标板上的抗体捕获后,加入链霉亲和素修饰的检测抗体,进而纳米颗粒被固定在酶标板的表面。在酸性条件下,被捕获的多肽与铜离子组装形成的纳米颗粒释放出大量的

铜离子,催化3,3',5,5'-四甲基联苯胺的氧化反应,溶液的颜色变为蓝色。采用肉眼或者分光光度计即可监测这一变化过程。具体技术方案为:向捕获抗体覆盖的酶标板中加入100 μ L待检测的前列腺特异性抗原的磷酸缓冲溶液,反应2.5小时左右,用200 μ L洗涤缓冲液洗涤五次;然后加入100 μ L链霉亲和素标记的检测抗体溶液,孵育1小时左右,再次用200 μ L洗涤缓冲液浸泡洗涤;然后加入200 μ L多肽与铜离子组装形成的纳米颗粒溶液,室温孵育1小时左右,用200 μ L 2-吗啉乙磺酸缓冲液(5 mM, pH 6.0)洗涤三次,再加入100 μ L新配制的含有0.5 mM 3,3',5,5'-四甲基联苯胺、100 mM氯化钠和0.75 M过氧化氢的2-吗啉乙磺酸缓冲液(5 mM, pH 4.0),室温孵育5分钟左右,用肉眼观察溶液颜色变化或者用分光光度计测定溶液在655 nm处的吸收值。

[0024] 在详细说明本发明的实施方式之后,熟悉该项技术的人士可清楚地了解,在不脱离上述申请专利范围与精神下可进行各种变化与修改,凡依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰,均属于本发明技术方案的范围,且本发明亦不受限于说明书中所举实例的实施方式。

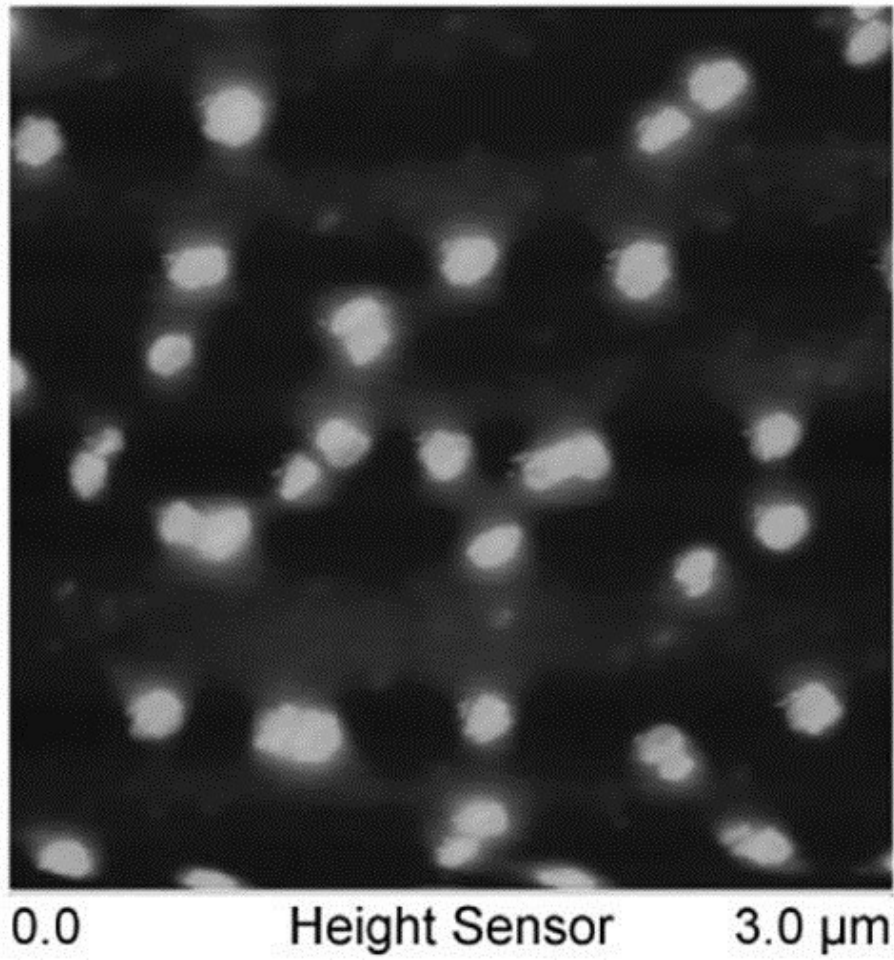


图1

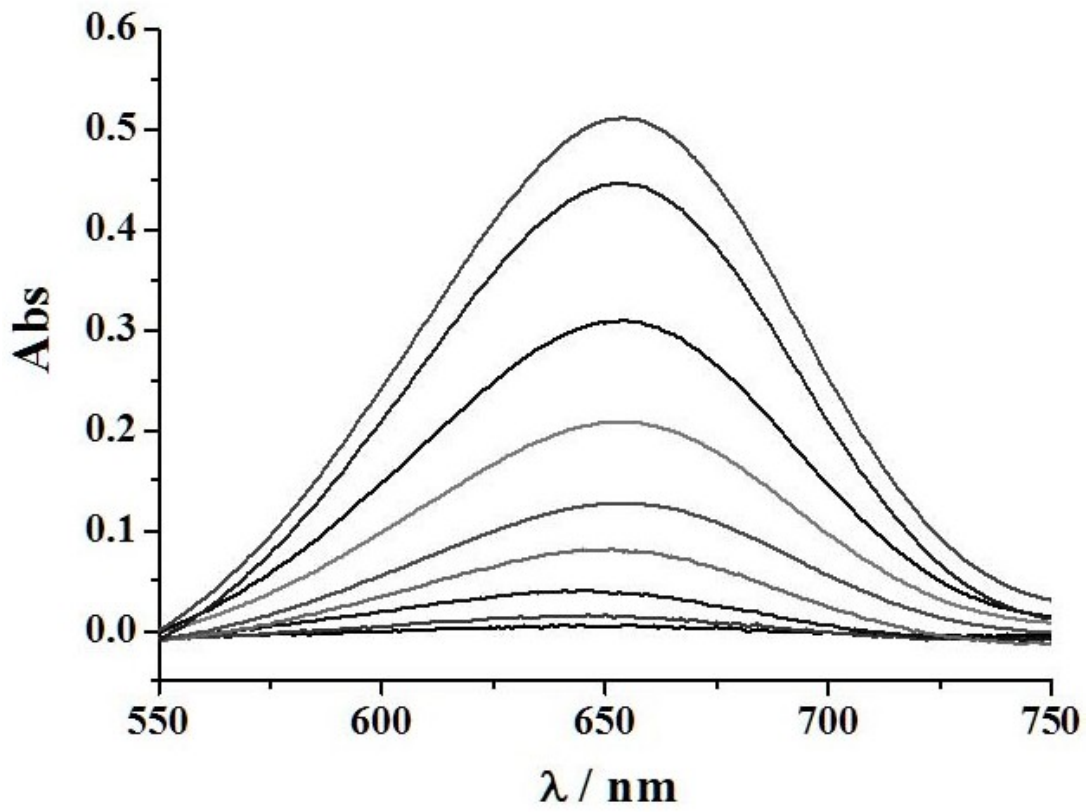


图2

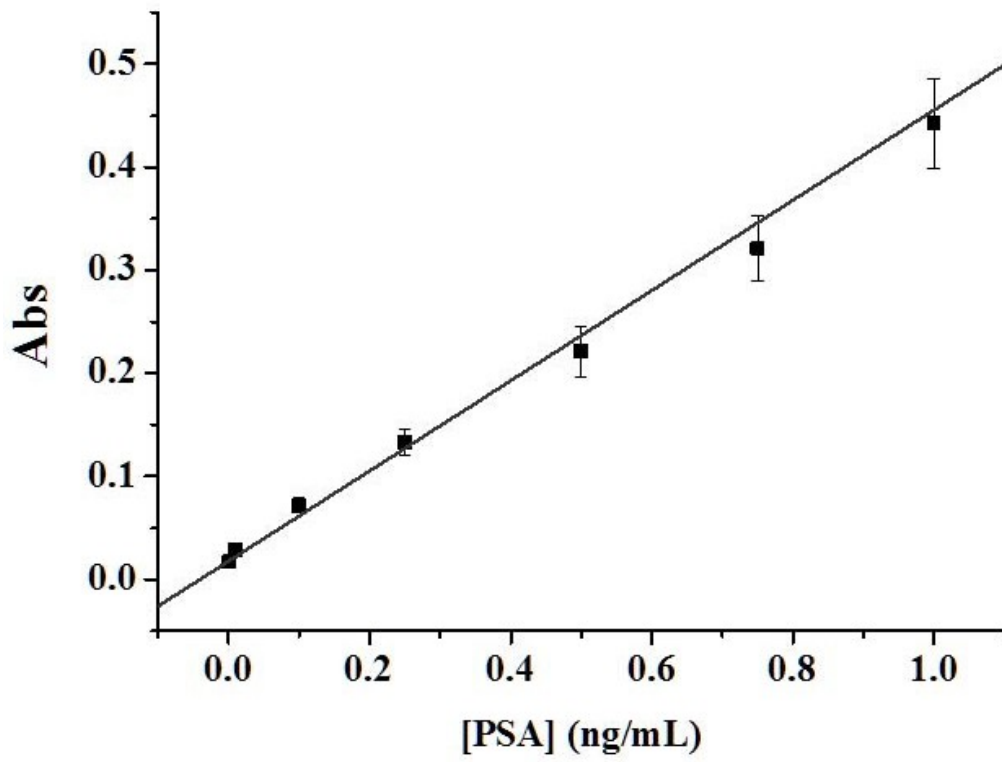


图3

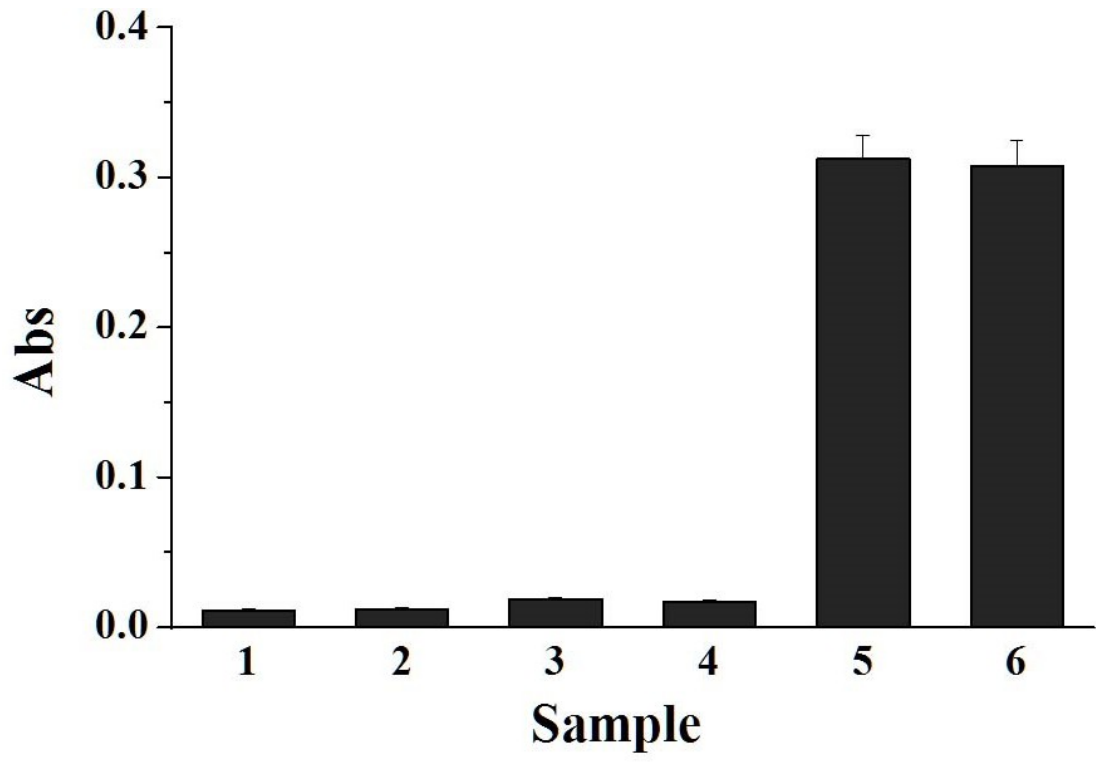


图4

专利名称(译)	多肽与铜离子形成的纳米颗粒及制备方法及应用		
公开(公告)号	CN110333348A	公开(公告)日	2019-10-15
申请号	CN201910660011.5	申请日	2019-07-22
[标]申请(专利权)人(译)	安阳师范学院		
申请(专利权)人(译)	安阳师范学院		
当前申请(专利权)人(译)	安阳师范学院		
[标]发明人	夏宁 刘林 孙婷 常勇 邓德华 黄雅亮		
发明人	夏宁 刘林 孙婷 常勇 邓德华 黄雅亮		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 B82Y15/00 B01J23/72		
CPC分类号	B01J23/72 B82Y15/00 G01N33/531 G01N33/54346 G01N33/54353		
代理人(译)	王晖		
其他公开文献	CN110333348B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

多肽与铜离子形成的纳米颗粒，所述的多肽的序列特征是：氨基酸序列是KbiotinGHFF。制备方法如下：将含硫酸铜的磷酸缓冲溶液加入到含KbiotinGHFF多肽的二甲基甲酰胺溶液中，震荡10分钟，继续室温孵育反应24小时左右，在中性条件下自组装形成的纳米颗粒，即得到多肽与铜离子组装形成的纳米颗粒溶液。多肽与铜离子形成的纳米颗粒的应用，采用上述的多肽与铜离子形成的纳米颗粒溶液，应用于可视化免疫分析。本发明具有简单灵敏、直观、高通量、不需要特殊仪器等优点，该技术的研制成功将实现不同类型抗原的检测。

