



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106117356 A

(43)申请公布日 2016. 11. 16

(21)申请号 201610507224.0

(22)申请日 2016.06.30

(71)申请人 天津大学

地址 300072 天津市南开区卫津路92号

(72)发明人 常津 武玉东 宫晓群

(74)专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代理  
事务所 12201

代理人 王丽

(51)Int. Cl.

C07K 16/18(2006.01)

C07K 1/13(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

B82Y 40/00(2011.01)

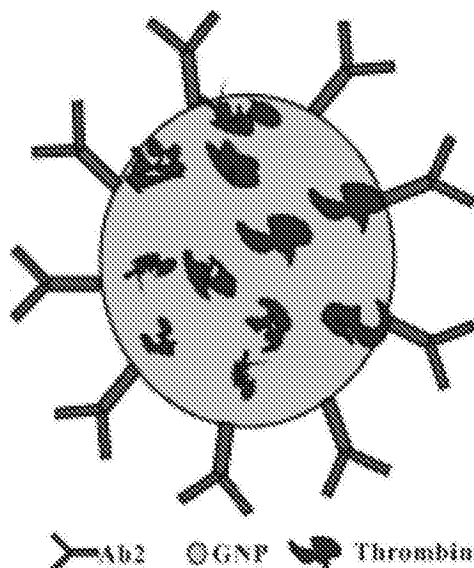
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

## (54)发明名称

一种金纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和甲胎蛋白标记抗体的制备方法

## (57)摘要

本发明涉及一种金纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和甲胎蛋白标记抗体的制备方法;利用金纳米粒子和甲胎蛋白标记抗体以及辣根过氧化物酶的静电吸附作用,制备多酶标记的金纳米粒子甲胎蛋白免疫探针,对甲胎蛋白(alpha fetoprotein AFP),这种广泛存在原发性肝癌的蛋白标志物进行定性定量的检测,建立蛋白标志物检测的新方法,极大程度提高了检测灵敏度。本发明的特点在于:整个制备过程简单,适合于产业化生产;金纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和甲胎蛋白标记抗体,检测探针将同时具有免疫活性和酶催化活性,所得检测探针为多酶标记探针,实现了纳米领域的纳米增强效应,可有效提高检测灵敏度。



1. 一种金纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和甲胎蛋白标记抗体的制备方法;其特征是步骤如下:

(1)将氯金酸加入到反应器,加热煮沸后注入柠檬酸钠,冷却至室温,得到金纳米粒子(AuNPs);

(2)将上述金纳米粒子加入反应器,通过碳酸钾水溶液调节金纳米粒子pH为8.3~8.5,将甲胎蛋白标记抗体( $Ab_1$ )和辣根过氧化物酶(HRP)混合液与金纳米粒子混合,所得AuNPs、HRP和 $Ab_1$ 混合液在旋转混合架上旋转混匀后静置处理;

(3)将牛血清白蛋白(BSA)加入到上述AuNPs、HRP和 $Ab_1$ 混合液封闭处理,离心得到多酶标记AuNPs-HRP- $Ab_1$ 检测探针。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征是氯金酸是四水合氯金酸,氯金酸和柠檬酸钠的质量配比为1:0.8~3。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征是通过碳酸钾水溶液调节金纳米粒子pH为8.3~8.5。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征是甲胎蛋白标记抗体( $Ab_1$ ):辣根过氧化物酶(HRP)质量配比为1:1~9;金纳米粒子AuNPs:(HRP和 $Ab_1$ )混合液质量配比为100~500:1。

5. 如权利要求1所述的方法,其特征是金纳米粒子:牛血清白蛋白质量配比10~20:1。

6. 如权利要求1所述的方法,其特征是AuNPs-HRP- $Ab_1$ 检测探针为多酶标记探针。

## 一种金纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和甲胎蛋白标记抗体的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及纳米材料制备技术领域,更具体的是涉及一种金纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和甲胎蛋白标记抗体的制备方法。

### 背景技术

[0002] 近年来,随着人们的生活方式发生了急剧变化,精神压力也不断增大,我国肿瘤的发病率逐年攀升。在我国部分城市和农村,恶性肿瘤已成为导致居民死亡的“第一杀手”。世界卫生组织已经作出最新的权威性的结论,恶性肿瘤患者如果能在发病早期发现,治愈率可以达到80%以上,肿瘤的早期诊断与治疗已经成为近年来研究的热点。

[0003] 血清蛋白标志物检测肿瘤已经越来越引起人们的关注,蛋白标志物检测肿瘤简便无创,检测结果直观且可以定量,可以动态监测肿瘤患者,在临床上具有很高的应用价值。蛋白标志物可以是在恶性肿瘤发生和增殖过程中,由肿瘤细胞的基因表达而合成分泌的,存在于细胞、组织或体液中,能够用一定方法来定量且能证实肿瘤存在的物质;也可以是由于机体对肿瘤产生反应,导致体内异常产生或升高的,可以反映肿瘤存在和生长的、能够监测肿瘤治疗和预后的一类物质,这些物质在正常人的体内不存在,或者在正常人体内出现的水平显著低于肿瘤患者体内的水平。

[0004] 甲胎蛋白是一种糖蛋白,正常情况下,这种蛋白主要来自胚胎的肝细胞,胎儿出生后约两周甲胎蛋白从血液中消失,因此正常人血清中甲胎蛋白的含量尚不到20微克/升。但当肝细胞发生癌变时,却又恢复了产生这种蛋白质的功能,而且随着病情恶化它在血清中的含量会急剧增加,甲胎蛋白就成了诊断原发性肝癌的一个特异性临床指标。辣根过氧化物酶是一种临床检验试剂中一种最常用的酶之一,广泛用于多个生化检测项目,也广泛应用于免疫类(ELISA)试剂盒的显色反应。所以本文拟研制一种金纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和甲胎蛋白标记抗体的制备方法,用于检测甲胎蛋白肿瘤标志物。

### 发明内容

[0005] 鉴于蛋白标志物在肿瘤检测中的重要地位、HRP检测独特的显色性质以及酶联免疫检测技术的优势。我们将利用金纳米粒子和甲胎蛋白标记抗体以及辣根过氧化物酶的静电吸附作用,制备多酶标记的金纳米粒子甲胎蛋白免疫探针,对甲胎蛋白( $\alpha$ lpha fetoprotein AFP),这种广泛存在原发性肝癌的蛋白标志物进行定性定量的检测,建立蛋白标志物检测的新方法,极大程度提高了检测灵敏度。

[0006] 本发明的技术方案如下:

[0007] 一种金纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和甲胎蛋白标记抗体的制备方法;其步骤如下:

[0008] (1)将氯金酸加入到反应器,加热煮沸后注入柠檬酸钠,冷却至室温,得到金纳米粒子(AuNPs);

[0009] (2)将上述金纳米粒子加入反应器,通过碳酸钾水溶液调节金纳米粒子pH为8.3~8.5,将甲胎蛋白标记抗体( $Ab_1$ )和辣根过氧化物酶(HRP)混合液与金纳米粒子混合,所得AuNPs、HRP和 $Ab_1$ 混合液在旋转混合架上旋转混匀后静置处理;

[0010] (3)将牛血清白蛋白(BSA)加入到上述AuNPs、HRP和 $Ab_1$ 混合液封闭处理,离心得到多酶标记AuNPs-HRP- $Ab_1$ 检测探针。

[0011] 所述步骤1)氯金酸是四水合氯金酸,氯金酸和柠檬酸钠的质量配比为1:0.8~3。

[0012] 所述步骤2)是通过碳酸钾水溶液调节金纳米粒子pH为8.3~8.5;甲胎蛋白标记抗体( $Ab_1$ ):辣根过氧化物酶(HRP)质量配比为1:1~9;金纳米粒子AuNPs:(HRP和 $Ab_1$ )混合液质量配比为100~500:1。

[0013] 所述步骤3)金纳米粒子:牛血清白蛋白质量配比10~20:1。

[0014] 所述步骤3)AuNPs-HRP- $Ab_1$ 检测探针为多酶标记探针,可有效提高检测灵敏度。

[0015] 如图4所示,一个金纳米粒子分子上面可以同时偶联多个HRP分子和甲胎蛋白标记抗体分子,有效提高了酶分子和抗体分子的偶联效率;如图1所示本发明制备的金纳米粒子粒径为10~60nm;如图2所示金纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和甲胎蛋白标记抗体后粒径增加20nm左右,表明辣根过氧化物酶和甲胎蛋白标记抗体已经成功标记到金纳米粒子上。

[0016] 如图3金纳米粒子紫外吸收光谱所示,金纳米粒子吸收波长在520~550nm之间,可有效偶联蛋白分子。如图5所示,muIti-HRP-AuNPs- $Ab_1$ 检测探针免疫吸附实验明显优于HRP- $Ab_1$ 检测探针免疫吸附实验,说明muIti-HRP-AuNPs- $Ab_1$ 检测探针比传统的HRP- $Ab_1$ 检测探针检测灵敏度更高。

[0017] 本发明制备的金纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和甲胎蛋白标记抗体优势在于:

[0018] 1.采用碱性条件下金纳米粒子AuNPs与甲胎蛋白标记抗体 $Ab_1$ 和辣根过氧化物酶(HRP)的静电吸附相互作用得到检测探针。

[0019] 2.金纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和甲胎蛋白标记抗体,检测探针将同时具有免疫活性和酶催化活性。

[0020] 3.金纳米粒子因其丰富的比表面积,所得检测探针为多酶标记探针,实现了纳米领域的纳米增强效应,可有效提高检测灵敏度。

## 附图说明

[0021] 图1本发明制备的金纳米粒子AuNPs透射电镜照片(a)14.2nm(b)25.7nm(c)25.4nm(d)48.1nm(e)58.2nm(f)67nm。

[0022] 图2本发明制备的金纳米粒子以及多酶标记AuNPs-HRP- $Ab_1$ 检测探针粒度图片。

[0023] 图3本发明制备的金纳米粒子紫外-吸收可见光光谱曲线。

[0024] 图4本发明制备的金纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和甲胎蛋白标记抗体图。

[0025] 图5本发明制备的检测探针muIti-HRP-AuNPs- $Ab_1$ 免疫实验和传统检测探针HRP- $Ab_1$ 免疫实验拟合曲线。

## 具体实施方式

[0026] 下面的实施案例中将对本发明作进一步的阐述,但本发明不限于此。

[0027] 实施案例1:

[0028] (1)将0.01g氯金酸加入到反应器,加热煮沸后注入0.018g柠檬酸钠,冷却至室温,得到金纳米粒子(AuNPs);

[0029] (2)将5mg上述金纳米粒子加入反应器,通过碳酸钾水溶液调节金纳米粒子pH为8.3,将0.025mg甲胎蛋白标记抗体(Ab<sub>1</sub>)和0.025mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液与金纳米粒子混合,所得AuNPs、HRP和Ab<sub>1</sub>混合液在旋转混合架上旋转混匀后静置处理;

[0030] (3)将0.5mg牛血清白蛋白(BSA)加入到上述AuNPs、HRP和Ab<sub>1</sub>混合液封闭处理,离心得到多酶标记AuNPs-HRP-Ab<sub>1</sub>检测探针。 $\mu$ Iti-HRP-AuNPs-Ab<sub>1</sub>检测探针在96孔酶标板完成免疫吸附实验ELISA,选取AFP抗原浓度分别0.25ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、1ng/mL、1.5ng/mL、2ng/mL、2.5ng/mL、3ng/mL、3.5ng/mL和4ng/mL。

[0031] 图1(a)所示所得金纳米粒子粒径为14.2nm;图2粒度数据显示,金纳米粒子偶联HRP酶和甲胎蛋白标记抗体分子前后粒度由15nm增加到35nm左右,说明辣根过氧化物酶和甲胎蛋白标记抗体已经成功标记到金纳米粒子上;图3显示所得金纳米粒子在520nm处有强烈紫外吸收。如图5所示, $\mu$ Iti-HRP-AuNPs-Ab<sub>1</sub>检测探针免疫吸附实验明显优于HRP-Ab<sub>1</sub>检测探针免疫吸附实验,说明 $\mu$ Iti-HRP-AuNPs-Ab<sub>1</sub>检测探针比传统的HRP-Ab<sub>1</sub>检测探针检测灵敏度更高。

[0032] 实施案例2:

[0033] (1)将0.01g氯金酸加入到反应器,加热煮沸后注入0.02g柠檬酸钠,冷却至室温,得到金纳米粒子(AuNPs);

[0034] (2)将5mg上述金纳米粒子加入反应器,通过碳酸钾水溶液调节金纳米粒子pH为8.3,将0.01mg甲胎蛋白标记抗体(Ab<sub>1</sub>)和0.04mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液与金纳米粒子混合,所得AuNPs、HRP和Ab<sub>1</sub>混合液在旋转混合架上旋转混匀后静置处理;

[0035] (3)将0.5mg牛血清白蛋白(BSA)加入到上述AuNPs、HRP和Ab<sub>1</sub>混合液封闭处理,离心得到多酶标记AuNPs-HRP-Ab<sub>1</sub>检测探针。

[0036] 图1(b)所示所得金纳米粒子粒径为25.7nm;图3显示所得金纳米粒子在526nm处有强烈紫外吸收。

[0037] 实施案例3:

[0038] (1)将0.01g氯金酸加入到反应器,加热煮沸后注入0.03g柠檬酸钠,冷却至室温,得到金纳米粒子(AuNPs);

[0039] (2)将5mg上述金纳米粒子加入反应器,通过碳酸钾水溶液调节金纳米粒子pH为8.4,将0.005mg甲胎蛋白标记抗体(Ab<sub>1</sub>)和0.045mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液与金纳米粒子混合,所得AuNPs、HRP和Ab<sub>1</sub>混合液在旋转混合架上旋转混匀后静置处理;

[0040] (3)将0.5mg牛血清白蛋白(BSA)加入到上述AuNPs、HRP和Ab<sub>1</sub>混合液封闭处理,离心得到多酶标记AuNPs-HRP-Ab<sub>1</sub>检测探针。

[0041] 图1(c)所示所得金纳米粒子粒径为35.4nm;图3显示所得金纳米粒子在530nm处有强烈紫外吸收。

[0042] 实施案例4:

[0043] (1)将0.01g氯金酸加入到反应器,加热煮沸后注入0.008g柠檬酸钠,冷却至室温,得到金纳米粒子(AuNPs);

[0044] (2)将5mg上述金纳米粒子加入反应器,通过碳酸钾水溶液调节金纳米粒子pH为

8.4,将0.01mg甲胎蛋白标记抗体(Ab<sub>1</sub>)和0.01mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液与金纳米粒子混合,所得AuNPs、HRP和Ab<sub>1</sub>混合液在旋转混合架上旋转混匀后静置处理;

[0045] (3)将0.4mg牛血清白蛋白(BSA)加入到上述AuNPs、HRP和Ab<sub>1</sub>混合液封闭处理,离心得到多酶标记AuNPs-HRP-Ab<sub>1</sub>检测探针。

[0046] 图1(d)所示所得金纳米粒子粒径为48.1nm;图3显示所得金纳米粒子在534nm处有强烈紫外吸收。

[0047] 实施案例5:

[0048] (1)将0.01g氯金酸加入到反应器,加热煮沸后注入0.01g柠檬酸钠,冷却至室温,得到金纳米粒子(AuNPs);

[0049] (2)将5mg上述金纳米粒子加入反应器,通过碳酸钾水溶液调节金纳米粒子pH为8.5,将0.005mg甲胎蛋白标记抗体(Ab<sub>1</sub>)和0.005mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液与金纳米粒子混合,所得AuNPs、HRP和Ab<sub>1</sub>混合液在旋转混合架上旋转混匀后静置处理;

[0050] (3)将0.25mg牛血清白蛋白(BSA)加入到上述AuNPs、HRP和Ab<sub>1</sub>混合液封闭处理,离心得到多酶标记AuNPs-HRP-Ab<sub>1</sub>检测探针。

[0051] 图1(e)所示所得金纳米粒子粒径为58.2nm;图3显示所得金纳米粒子在540nm处有强烈紫外吸收。

[0052] 实施案例6:

[0053] (1)将0.01g氯金酸加入到反应器,加热煮沸后注入0.018g柠檬酸钠,冷却至室温,得到金纳米粒子(AuNPs);

[0054] (2)将5mg上述金纳米粒子加入反应器,通过碳酸钾水溶液调节金纳米粒子pH为8.5,将0.01mg甲胎蛋白标记抗体(Ab<sub>1</sub>)和0.04mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液与金纳米粒子混合,所得AuNPs、HRP和Ab<sub>1</sub>混合液在旋转混合架上旋转混匀后静置处理;

[0055] (3)将0.25mg牛血清白蛋白(BSA)加入到上述AuNPs、HRP和Ab<sub>1</sub>混合液封闭处理,离心得到多酶标记AuNPs-HRP-Ab<sub>1</sub>检测探针。

[0056] 图1(f)所示所得金纳米粒子粒径为67.0nm;图3显示所得金纳米粒子在550nm处有强烈紫外吸收。

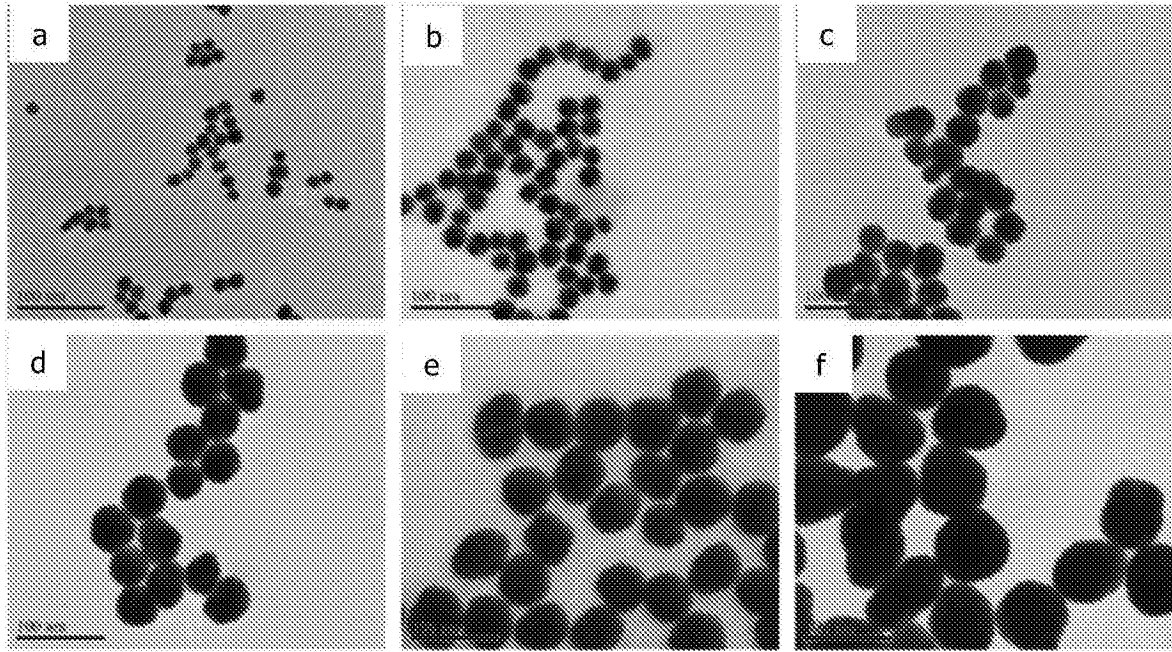


图1

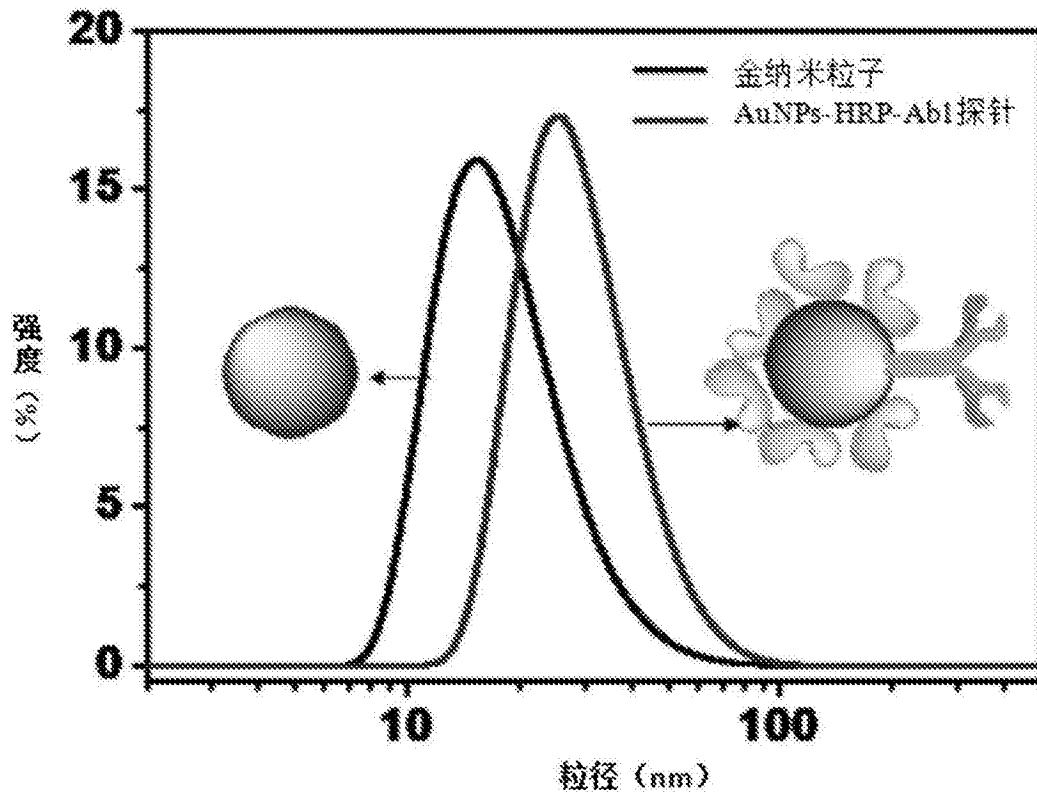


图2

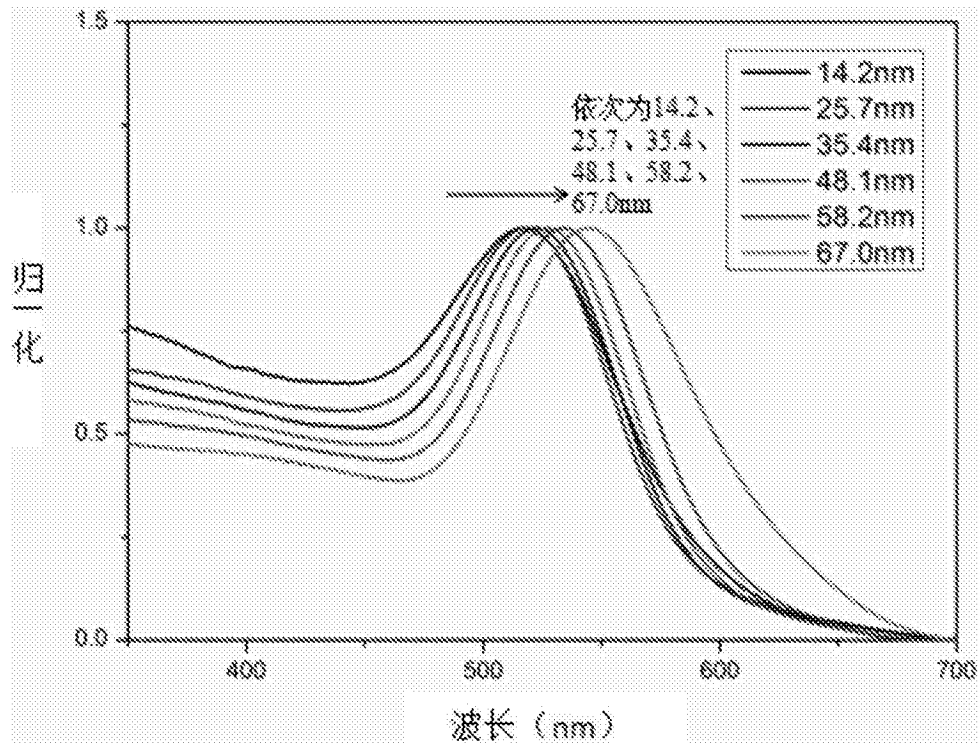


图3

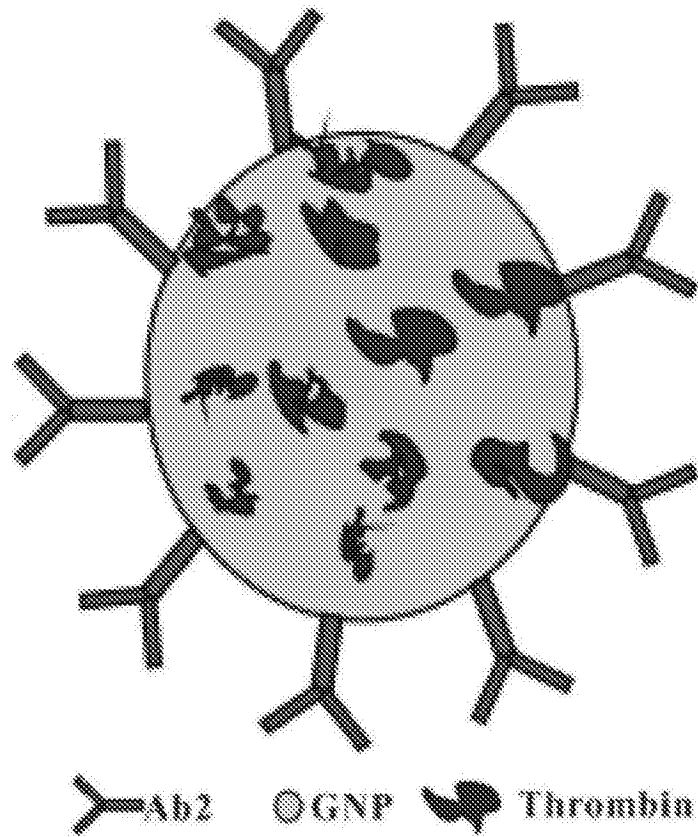


图4

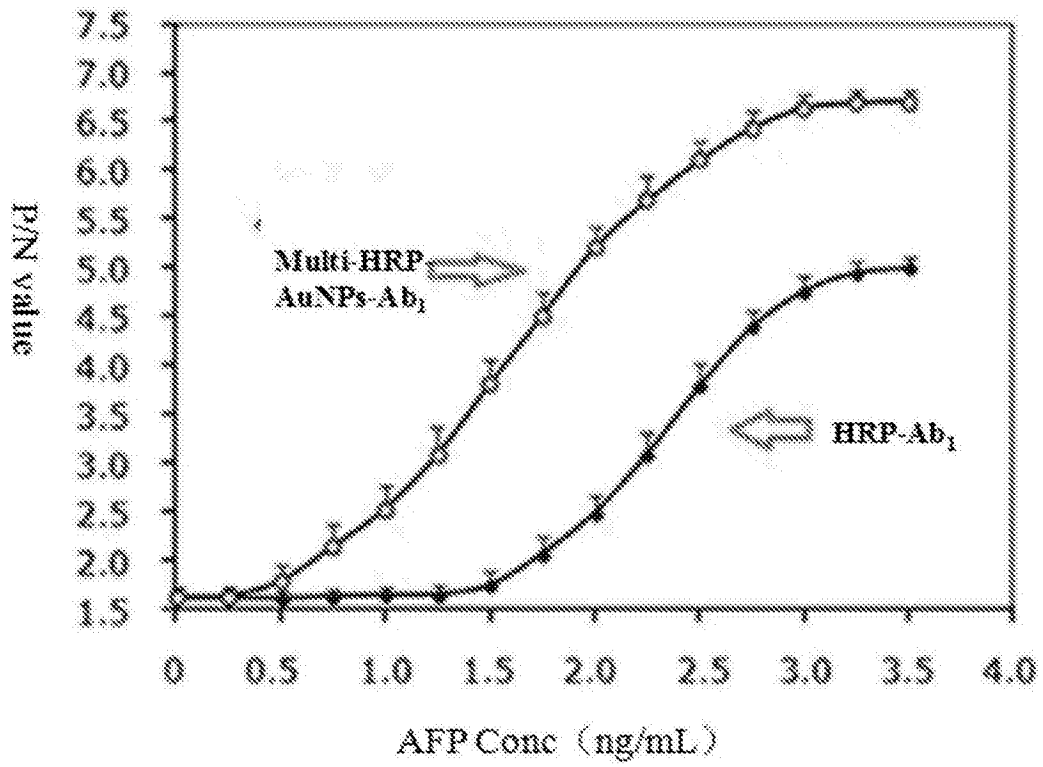


图5

专利名称(译)	一种金纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和甲胎蛋白标记抗体的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106117356A</a>	公开(公告)日	2016-11-16
申请号	CN201610507224.0	申请日	2016-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	天津大学		
申请(专利权)人(译)	天津大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津大学		
[标]发明人	常津 武玉东 宫晓群		
发明人	常津 武玉东 宫晓群		
IPC分类号	C07K16/18 C07K11/13 C07K19/00 G01N33/535 B82Y40/00		
CPC分类号	C07K16/18 B82Y40/00 C07K2319/61 G01N33/535		
代理人(译)	王丽		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种金纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和甲胎蛋白标记抗体的制备方法；利用金纳米粒子和甲胎蛋白标记抗体以及辣根过氧化物酶的静电吸附作用，制备多酶标记的金纳米粒子甲胎蛋白免疫探针，对甲胎蛋白(alpha fetoprotein AFP)，这种广泛存在原发性肝癌的蛋白标志物进行定性定量的检测，建立蛋白标志物检测的新方法，极大程度提高了检测灵敏度。本发明的特点在于：整个制备过程简单，适合于产业化生产；金纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和甲胎蛋白标记抗体，检测探针将同时具有免疫活性和酶催化活性，所得检测探针为多酶标记探针，实现了纳米领域的纳米增强效应，可有效提高检测灵敏度。

