



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106168622 A

(43)申请公布日 2016. 11. 30

(21)申请号 201610517740.1

(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.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

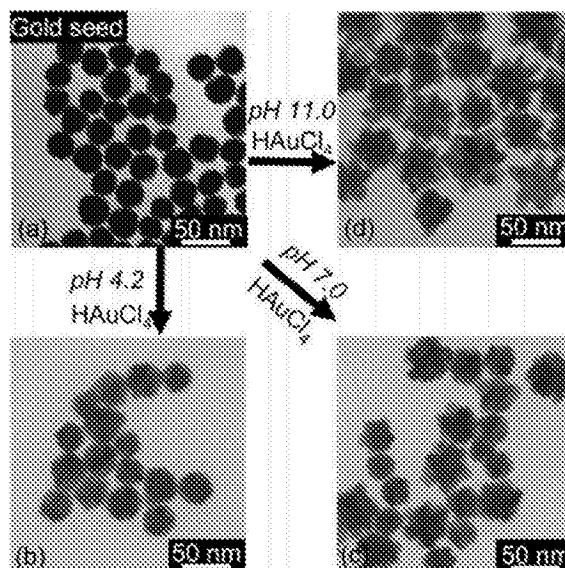
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种金纳米花偶联辣根过氧化物酶和前列腺特异抗原标记抗体的制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种金纳米花偶联辣根过氧化物酶和前列腺特异抗原标记抗体的制备方法;利用金纳米花纳米粒子和前列腺特异抗原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花前列腺特异抗原免疫探针,对前列腺特异抗原(PSA),这种广泛存在前列腺疾病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;金纳米花纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和前列腺特异抗原标记抗体,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. 一种金纳米花偶联辣根过氧化物酶和前列腺特异抗原标记抗体的制备方法;其特征是步骤如下:

(1)将氯金酸(HAuCl_4)加入到反应器,加热煮沸后注入柠檬酸钠,冷却至室温,得到金种溶液(Gold seeds);

(2)通过氢氧化钠调节氯金酸 $\text{pH}4.2\sim 11.0$,加入羟胺盐酸($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$)和上述金种溶液,其中 $\text{HAuCl}_4:\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}:\text{Gold seeds}=14:17:1$,最后得到金纳米花纳米粒子(AuNFs);

(3)将金纳米花纳米粒子(AuNFs)超声处理加入反应器,加入前列腺特异抗原PSA标记抗体(Ab_1)和辣根过氧化物酶(HRP)混合液,所得 AuNFs 、HRP和 Ab_1 混合液在旋转混合架上旋转过夜,最后离心得到 $\text{multi-HRP-AuNFs-Ab}_1$ 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摩尔质量配比为 $1:5\sim 10$ 。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征是通过氢氧化钠调节氯金酸 $\text{pH}4.2\sim 11.0$ 。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征是步骤2)中 $\text{HAuCl}_4:\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}:\text{Gold seeds}$ 摩尔质量配比= $14:10\sim 20:1$ 。

5. 如权利要求1所述的方法,其特征是前列腺特异抗原标记抗体(Ab_1):辣根过氧化物酶(HRP)质量配比为 $1:1\sim 9$;金纳米粒子 $\text{AuNFs}:(\text{HRP}$ 和 $\text{Ab}_1)$ 混合液质量配比为 $100\sim 500:1$ 。

6. 如权利要求1所述的方法,其特征是步骤(3)中, AuNFs-HRP-Ab_1 检测探针为多酶标记探针。

一种金纳米花偶联辣根过氧化物酶和前列腺特异抗原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花偶联辣根过氧化物酶和前列腺特异抗原标记抗体的制备方法。

背景技术

[0002] 为了能快速、准确、早期发现恶性肿瘤,医务工作者经过长期的科学研究,已发现有许多肿瘤标记物可为恶性肿瘤的诊断提供科学依据。肿瘤标记物是指肿瘤细胞产生和释放的某种物质,常以抗原、酶、激素等代谢产物的形式存在于肿瘤细胞内或患者体液中。临床上可通过生化或免疫检测手段检测这些特异性物质而诊断相关的肿瘤。常用的肿瘤标记物有肝癌的甲胎蛋白(AFP)、大肠癌的癌胚抗原(CEA)、前列腺癌的前列腺特异抗原(PSA)等。肿瘤标志物阳性,可能是恶性肿瘤,也可能不是。要看具体是什么项目,检测结果升高多少,有无其他影响因素等。有时需要两周后复查,看是否继续升高,如继续升高,则还需要进一步进行CT、B超等方法检查,并结合临床情况,最后才能做出诊断。肿瘤标志物只是诊断肿瘤的辅助指标。目前,由于特异性100%的肿瘤标志物仍然没有找到,所以还达不到我们希望的理想标准;有的良性肿瘤、囊肿、炎症也会导致肿瘤标志物的升高。

[0003] 肿瘤诊断中,虽然目前病理诊断才是肿瘤诊断的“金标准”,但是由于肿瘤标志物检测简便易行,对人体伤害也小,仅需要血液或者体液就可以检测到早期癌症的踪迹,所以成为体检中大量采用的手段。肿瘤标志物并非与肿瘤一一对应,一方面许多肿瘤患者指标全部正常,另一方面许多指标出现异常的咨询者并未患肿瘤。所以对于指标正常的人不应忽视疾病的症状及时就诊,对于后者则应放松心情定期复查。前列腺特异性抗原(Prostate Specific Antigen,PSA):男性正常血清PSA为0-4纳克/毫升,PSA对前列腺癌的诊断特异性达90%~97%,目前PSA被认为是最有价值的前列癌的肿瘤标志物,大部分前列腺癌患者血清PSA浓度会明显升高。前列腺癌手术后,PSA浓度可逐渐降至正常,若手术后PSA浓度不降或下降后再次升高,应考虑肿瘤转移或复发的可能。

[0004] 总之,大家要知道目前肿瘤标记物在临床上主要用于肿瘤的筛查和肿瘤患者的复查、肿瘤发展程度及预后的判断、肿瘤治疗效果观察和评价等。肿瘤标志物进行性升高的意义比较大,提倡肿瘤标志物联合检测,但不建议用于健康人体检。肿瘤标志物只能作为辅助诊断肿瘤的指标之一,在没有明确病理组织学诊断前,千万不要因为见到某项指标轻度升高就认定患了癌症,甚至进行抗肿瘤治疗,这样会造成不必要的伤害和损失,应当提高警惕,做进一步的检查和观察。所以本文拟研制一种金纳米花偶联辣根过氧化物酶和前列腺特异抗原标记抗体,用于检测前列腺特异抗原肿瘤标志物。

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。我们将利用金纳米花纳米粒子和前列腺特异抗原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花前列腺特异抗原免疫探针,对前列腺特异抗原(PSA),这种广泛存在前列腺疾病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(HAuCl_4)加入到反应器,加热煮沸后注入柠檬酸钠,冷却至室温,得到金种溶液(Gold seeds);

[0009] (2)通过氢氧化钠调节氯金酸 $\text{pH}4.2\sim 11.0$,加入羟胺盐酸($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$)和上述金种溶液,其中摩尔质量配比 $\text{HAuCl}_4:\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}:\text{Gold seeds}=14:10\sim 20:1$,最后得到金纳米花纳米粒子(AuNFs);

[0010] (3)将金纳米花纳米粒子(AuNFs)超声处理加入反应器,加入前列腺特异抗原PSA标记抗体(Ab_1)和辣根过氧化物酶(HRP)混合液,所得 AuNFs 、HRP和 Ab_1 混合液在旋转混合架上旋转过夜,最后离心得到 $\text{multi-HRP-AuNFs-Ab}_1$ 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摩尔质量配比为 $1:5\sim 10$ 。

[0012] 所述步骤2)是通过氢氧化钠调节氯金酸 $\text{pH}4.2\sim 11.0$;摩尔质量配比 $\text{HAuCl}_4:\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}:\text{Gold seeds}=14:10\sim 20:1$ 。

[0013] 所述步骤3)前列腺特异抗原标记抗体(Ab_1):辣根过氧化物酶(HRP)质量配比为 $1:1\sim 9$;金纳米粒子 $\text{AuNFs}:(\text{HRP}$ 和 $\text{Ab}_1)$ 混合液质量配比为 $100\sim 500:1$

[0014] 所述步骤3) AuNFs-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,一个金纳米花纳米粒子分子上面可以同时偶联多个HRP分子和前列腺特异抗原标记抗体分子,有效提高了酶分子和抗体分子的偶联效率;如图1(a)所示本发明制备的金纳米花纳米粒子种子为 20nm 的金纳米球,(b-d) $\text{pH}=4.2,7.0$ 和 11.0 时所得纳米粒子形貌均为花状;如图2金纳米花纳米粒子紫外吸收光谱所示, pH 在 $4.2\sim 11$ 之间所得金纳米花纳米粒子吸收波长在 $500\sim 620\text{nm}$ 之间,可有效偶联蛋白分子。如图3所示金纳米花纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和前列腺特异抗原标记抗体后粒径由 35nm 增加到 110nm 左右,表明辣根过氧化物酶和前列腺特异抗原标记抗体已经成功标记到金纳米花纳米粒子上。如图5所示, $\text{multi-HRP-AuNFs-Ab}_1$ 检测探针ELISA测试明显优于传统的ELISA,说明 $\text{multi-HRP-AuNFs-Ab}_1$ 检测探针具有较高的检测灵敏度。

[0016] 本发明制备的金纳米花偶联辣根过氧化物酶和前列腺特异抗原标记抗体优势在于:

[0017] 1.通过调整体系的 pH 值,即可制备不同形貌、不同性能的金纳米花纳米粒子,从而为后续的免疫实验提供良好的物质基础。

[0018] 2.金纳米花纳米粒子 AuNFs 与前列腺特异抗原标记抗体 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,检测探针将同时具有免疫活性和酶催化活性。

[0019] 3.金纳米花纳米粒子因其丰富的比表面积,性能明显优于球状金纳米粒子,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

[0020] 图1本发明制备的金纳米花纳米粒子AuNFs透射电镜照片(a)20nm金球纳米粒子；(b-d)pH 4.2、pH7.0、pH11.0所得金纳米花纳米粒子。

[0021] 图2本发明制备的金纳米花纳米粒子AuNFs紫外吸收曲线,从左至右依次为pH4.2、pH4.6、pH5.6、pH7.0、pH10.8和pH11.0。

[0022] 图3本发明制备的金纳米花纳米粒子AuNFs粒度数据。

[0023] 图4本发明制备的金纳米花纳米粒子AuNFs偶联辣根过氧化物酶和前列腺特异抗原标记抗体示意图。

[0024] 图5本发明制备的multi-HRP-AuNFs-Ab₁检测探针免疫实验Enhanced ELISA与传统检测探针免疫实验Traditional ELISA拟合曲线。

具体实施方式

[0025] 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。

[0026] 实施案例1:

[0027] (1)将0.025mmol氯金酸(HAuCl₄)加入到反应器,加水加热煮沸后注入0.17mmol柠檬酸钠,冷却至室温,得到金种溶液(Gold seeds);

[0028] (2)通过氢氧化钠调节氯金酸pH为4.2(氯金酸含量为0.105mmol),加入0.12mmol羟胺盐酸(NH₂OH.HCl)和0.0075mmol上述金种溶液,最后得到金纳米花纳米粒子(AuNFs);

[0029] (3)将5mg金纳米花纳米粒子(AuNFs)超声处理加入反应器,加入0.01mg前列腺特异抗原PSA标记抗体(Ab₁)和0.04mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液,所得AuNFs、HRP和Ab₁混合液在旋转混合架上旋转过夜,最后离心得到multi-HRP-AuNFs-Ab₁检测探针。multi-HRP-AuNFs-Ab₁检测探针在96孔酶标板完成免疫吸附实验ELISA,选取PSA抗原浓度分别0.001ng/mL、0.01ng/mL、0.1ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、500ng/mL和1000ng/mL。

[0030] 如图1(a)所示,步骤(1)所得金种溶液为球状纳米粒子,粒径在20nm左右;1(b)为pH4.2时所得金纳米花纳米粒子;图2可知,pH4.2所得金纳米花纳米粒子在500nm处有最强吸收;如图5所示,multi-HRP-AuNFs-Ab₁检测探针ELISA测试明显优于传统的ELISA,说明multi-HRP-AuNFs-Ab₁检测探针具有较高的检测灵敏度。

[0031] 实施案例2:

[0032] (1)将0.025mmol氯金酸(HAuCl₄)加入到反应器,加水加热煮沸后注入0.17mmol柠檬酸钠,冷却至室温,得到金种溶液(Gold seeds);

[0033] (2)通过氢氧化钠调节氯金酸pH为4.6(氯金酸含量为0.105mmol),加入0.12mmol羟胺盐酸(NH₂OH.HCl)和0.0075mmol上述金种溶液,最后得到金纳米花纳米粒子(AuNFs);

[0034] (3)将5mg金纳米花纳米粒子(AuNFs)超声处理加入反应器,加入0.01mg前列腺特异抗原PSA标记抗体(Ab₁)和0.04mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液,所得AuNFs、HRP和Ab₁混合液在旋转混合架上旋转过夜,最后离心得到multi-HRP-AuNFs-Ab₁检测探针。图2可知,pH4.6所得金纳米花纳米粒子在540nm处有最强吸收;

[0035] 实施案例3:

[0036] (1)将0.025mmol氯金酸(HAuCl_4)加入到反应器,加水加热煮沸后注入0.17mmol柠檬酸钠,冷却至室温,得到金种溶液(Gold seeds);

[0037] (2)通过氢氧化钠调节氯金酸pH为5.6(氯金酸含量为0.105mmol),加入0.12mmol羟胺盐酸($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$)和0.0075mmol上述金种溶液,最后得到金纳米花纳米粒子(AuNFs);

[0038] (3)将5mg金纳米花纳米粒子(AuNFs)超声处理加入反应器,加入0.01mg前列腺特异抗原PSA标记抗体(Ab_1)和0.04mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液,所得 AuNFs 、HRP和 Ab_1 混合液在旋转混合架上旋转过夜,最后离心得到multi-HRP- AuNFs - Ab_1 检测探针。图2可知,pH5.6所得金纳米花纳米粒子在560nm处有最强吸收;

[0039] 实施案例4:

[0040] (1)将0.025mmol氯金酸(HAuCl_4)加入到反应器,加水加热煮沸后注入0.17mmol柠檬酸钠,冷却至室温,得到金种溶液(Gold seeds);

[0041] (2)通过氢氧化钠调节氯金酸pH为7.0(氯金酸含量为0.105mmol),加入0.12mmol羟胺盐酸($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$)和0.0075mmol上述金种溶液,最后得到金纳米花纳米粒子(AuNFs);

[0042] (3)将5mg金纳米花纳米粒子(AuNFs)超声处理加入反应器,加入0.01mg前列腺特异抗原PSA标记抗体(Ab_1)和0.04mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液,所得 AuNFs 、HRP和 Ab_1 混合液在旋转混合架上旋转过夜,最后离心得到multi-HRP- AuNFs - Ab_1 检测探针。

[0043] 图1(c)为pH7.0时所得金纳米花纳米粒子;图2可知,pH7.0所得金纳米花纳米粒子在590nm处有最强吸收;

[0044] 实施案例5:

[0045] (1)将0.025mmol氯金酸(HAuCl_4)加入到反应器,加水加热煮沸后注入0.17mmol柠檬酸钠,冷却至室温,得到金种溶液(Gold seeds);

[0046] (2)通过氢氧化钠调节氯金酸pH为10.8(氯金酸含量为0.105mmol),加入0.12mmol羟胺盐酸($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$)和0.0075mmol上述金种溶液,最后得到金纳米花纳米粒子(AuNFs);

[0047] (3)将5mg金纳米花纳米粒子(AuNFs)超声处理加入反应器,加入0.01mg前列腺特异抗原PSA标记抗体(Ab_1)和0.04mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液,所得 AuNFs 、HRP和 Ab_1 混合液在旋转混合架上旋转过夜,最后离心得到multi-HRP- AuNFs - Ab_1 检测探针。图2可知,pH10.8所得金纳米花纳米粒子在600nm处有最强吸收;

[0048] 实施案例6:

[0049] (1)将0.025mmol氯金酸(HAuCl_4)加入到反应器,加水加热煮沸后注入0.17mmol柠檬酸钠,冷却至室温,得到金种溶液(Gold seeds);

[0050] (2)通过氢氧化钠调节氯金酸pH为11.0(氯金酸含量为0.105mmol),加入0.12mmol羟胺盐酸($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$)和0.0075mmol上述金种溶液,最后得到金纳米花纳米粒子(AuNFs);

[0051] (3)将5mg金纳米花纳米粒子(AuNFs)超声处理加入反应器,加入0.01mg前列腺特异抗原PSA标记抗体(Ab_1)和0.04mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液,所得 AuNFs 、HRP和 Ab_1 混合液在旋转混合架上旋转过夜,最后离心得到multi-HRP- AuNFs - Ab_1 检测探针。如图1(d)为pH11.0时所得金纳米花纳米粒子;图2可知,pH11.0所得金纳米花纳米粒子在620nm处有最强吸收;

[0052] 实施案例7:

[0053] (1)将0.025mmol氯金酸(HAuCl_4)加入到反应器,加水加热煮沸后注入0.125mmol

柠檬酸钠,冷却至室温,得到金种溶液(Gold seeds);

[0054] (2)通过氢氧化钠调节氯金酸pH为11.0(氯金酸含量为0.105mmol),加入0.075mmol羟胺盐酸($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$)和0.0075mmol上述金种溶液,最后得到金纳米花纳米粒子(AuNFs);

[0055] (3)将5mg金纳米花纳米粒子(AuNFs)超声处理加入反应器,加入0.005mg前列腺特异抗原PSA标记抗体(Ab_1)和0.005mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液,所得AuNFs、HRP和 Ab_1 混合液在旋转混合架上旋转过夜,最后离心得到multi-HRP-AuNFs- Ab_1 检测探针。

[0056] 实施案例8:

[0057] (1)将0.025mmol氯金酸(HAuCl_4)加入到反应器,加水加热煮沸后注入0.125mmol柠檬酸钠,冷却至室温,得到金种溶液(Gold seeds);

[0058] (2)通过氢氧化钠调节氯金酸pH为11.0(氯金酸含量为0.105mmol),加入0.15mmol羟胺盐酸($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$)和0.0075mmol上述金种溶液,最后得到金纳米花纳米粒子(AuNFs);

[0059] (3)将5mg金纳米花纳米粒子(AuNFs)超声处理加入反应器,加入0.002mg前列腺特异抗原PSA标记抗体(Ab_1)和0.018mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液,所得AuNFs、HRP和 Ab_1 混合液在旋转混合架上旋转过夜,最后离心得到multi-HRP-AuNFs- Ab_1 检测探针。

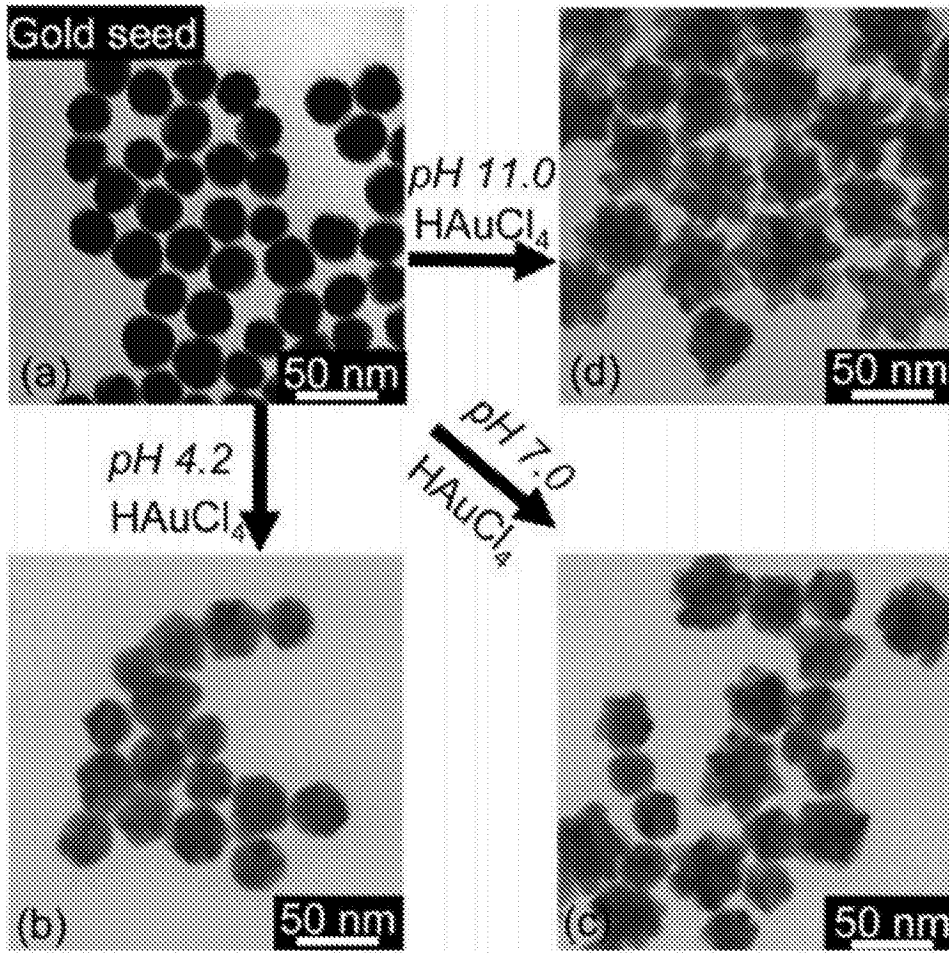


图1

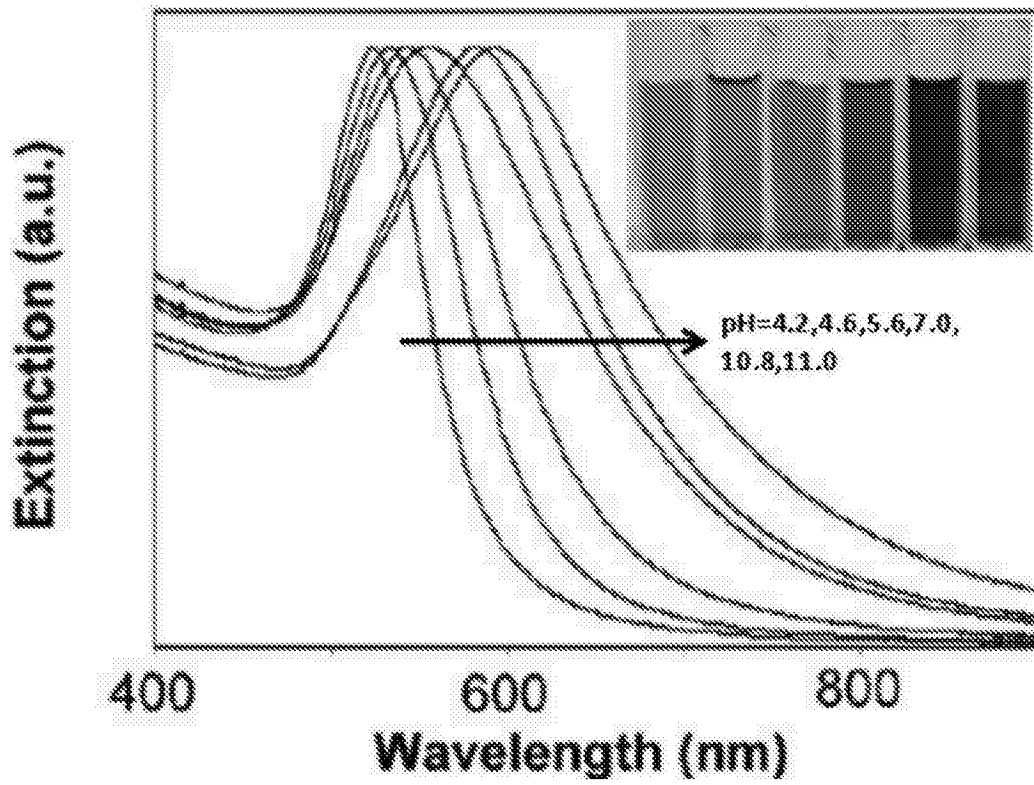


图2

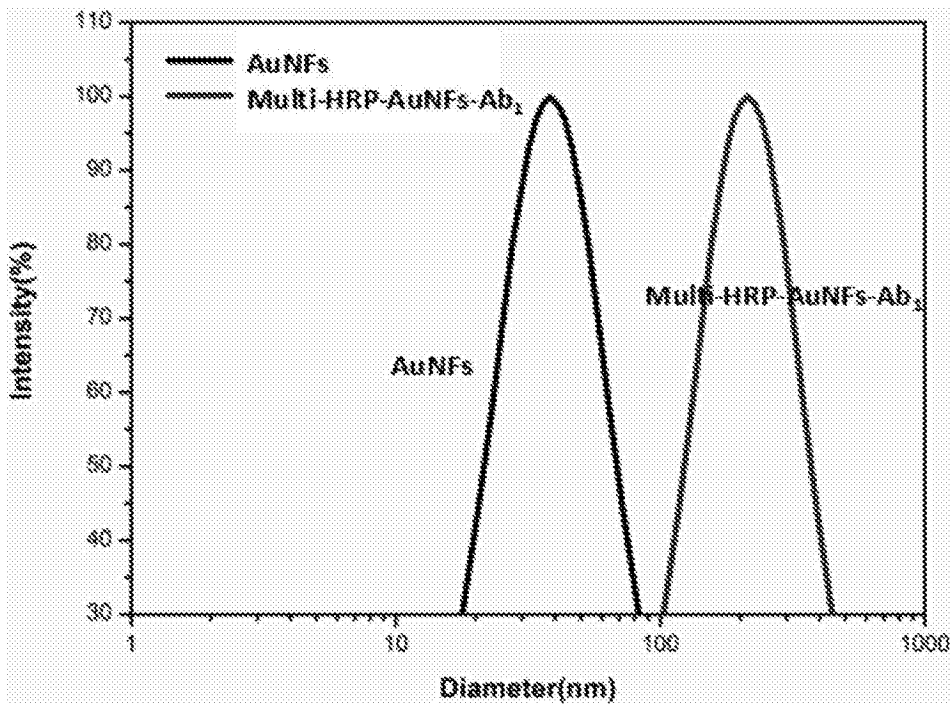


图3

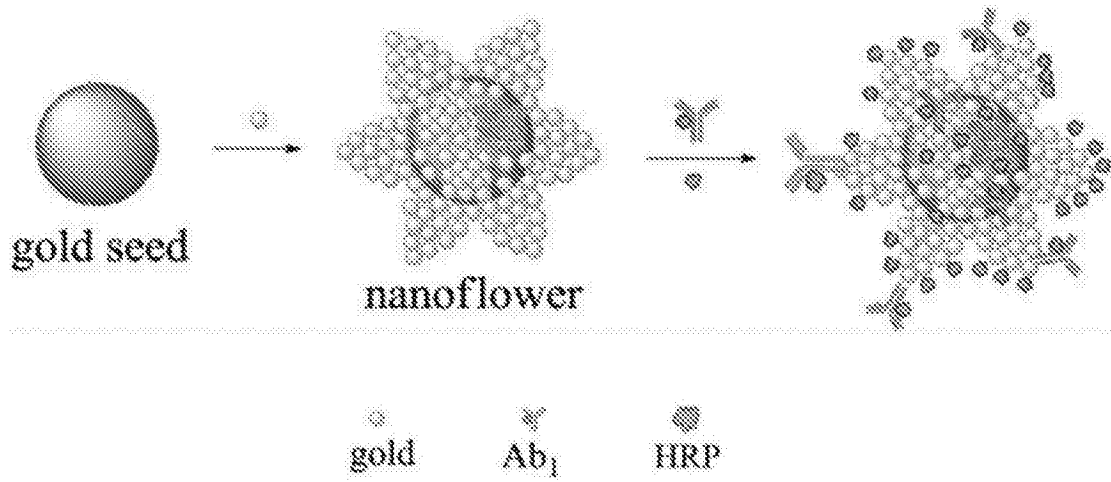


图4

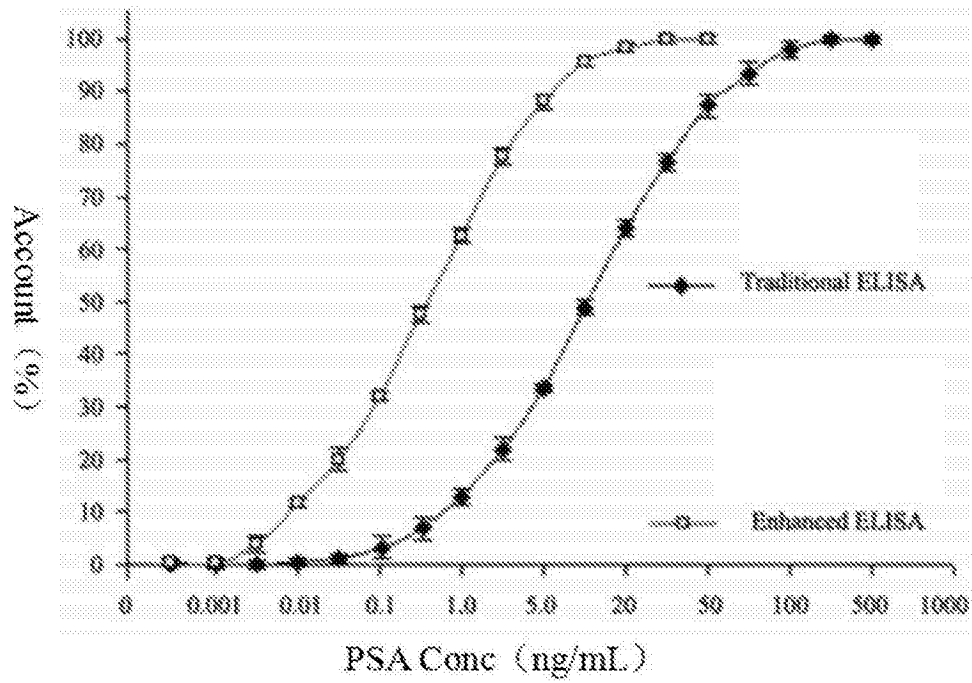


图5

专利名称(译)	一种金纳米花偶联辣根过氧化物酶和前列腺特异抗原标记抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN106168622A	公开(公告)日	2016-11-30
申请号	CN201610517740.1	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	G01N33/535 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/57434		
代理人(译)	王丽		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种金纳米花偶联辣根过氧化物酶和前列腺特异抗原标记抗体的制备方法；利用金纳米花纳米粒子和前列腺特异抗原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花前列腺特异抗原免疫探针，对前列腺特异抗原(PSA)，这种广泛存在前列腺疾病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；金纳米花纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和前列腺特异抗原标记抗体，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。

