



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108982834 B

(45) 授权公告日 2021.04.23

(21) 申请号 201810402304.9

(22) 申请日 2018.04.28

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108982834 A

(43) 申请公布日 2018.12.11

(73) 专利权人 公安部物证鉴定中心

地址 100038 北京市西城区木樨地南里17号

专利权人 中国科学院生物物理研究所

(72) 发明人 杜鸿雁 段德民 宋歌 阎锡蕴

丰蕾 董颖 魏春明 高艳梅
于忠山(74) 专利代理机构 北京冠榆知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 11666

代理人 朱亚琦 朱永飞

(51) Int. Cl.

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101037676 A, 2007.09.19

CN 103808926 A, 2014.05.21

WO 2015023715 A1, 2015.02.19

WO 2011133504 A2, 2011.10.27

梁龙辉等. 相思子毒素磁性纳米颗粒免疫捕获法的建立.《细胞与分子免疫学杂志》.2014, 第30卷(第10期), 第1095-1098页.

Lizeng Gao等. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles.《Nature Nanotechnology》.2007, 第2卷(第9期), 第577-583页.

高利增等. 纳米酶的发现与应用.《生物化学与生物物理进展》.2013, 第40卷(第10期), 第892-902页.

李琦雯. GP73单克隆抗体的制备、鉴定及免疫检测方法的建立与应用研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》.2016, 第2016年卷(第4期), 第43-61页.

审查员 胡晓佳

权利要求书3页 说明书6页 附图1页

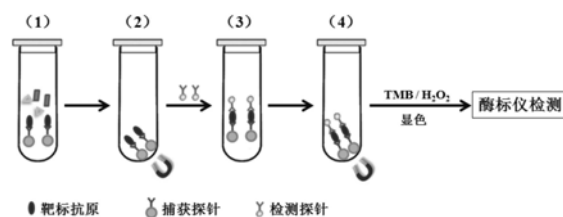
(54) 发明名称

纳米酶免疫夹心新技术检测生物分子的方法

(57) 摘要

本发明公开纳米酶免疫夹心新技术检测生物分子的方法, 包括如下步骤: (1) 将第一单克隆抗体偶联于第一磁性纳米酶颗粒上, 获得捕获探针; (2) 将第二单克隆抗体偶联于第二磁性纳米酶颗粒上, 获得检测探针; (3) 将待测样品与捕获探针温育; (4) 从步骤(3)的溶液中得到捕获探针-抗原复合物; (5) 重悬捕获探针-抗原复合物, 加入检测探针, 温育; (6) 从步骤(5)的溶液中得到捕获探针-抗原-检测探针复合物; (7) 加入过氧化物和催化底物显色, 通过酶联仪检测溶液的光吸收值; (8) 测量已知浓度的生物分子, 绘制标准曲线, 从而获得待测生物样品中的抗原含量。该方法操作步骤简单快捷, 且对环境友好, 适合

各种化学或生物分子的检测。



1. 纳米酶免疫夹心技术检测生物分子的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 将第一单克隆抗体偶联于第一磁性纳米酶颗粒上,获得捕获探针;

(2) 将第二单克隆抗体偶联于第二磁性纳米酶颗粒上,获得检测探针;

(3) 将待测样品与捕获探针温育;

(4) 第一次分离:从步骤(3)的溶液中得到捕获探针-抗原复合物;

(5) 重悬捕获探针-抗原复合物,加入检测探针,温育;

(6) 第二次分离:从步骤(5)的溶液中得到捕获探针-抗原-检测探针复合物;

(7) 加入过氧化物和催化底物显色,通过酶联仪检测溶液的光吸收值;

(8) 按照步骤(1)至步骤(7)中的方法,测量已知浓度的生物分子,绘制标准曲线,从而获得待测生物样品中的抗原含量;

所述第一单克隆抗体和所述第二单克隆抗体为待测生物样品中抗原的不同单克隆抗体;

所述第一磁性纳米酶颗粒和所述第二磁性纳米酶颗粒为尺寸大小不同的磁性纳米酶颗粒;

所述第一磁性纳米酶颗粒的粒径为0.1微米~100微米;所述第二磁性纳米酶颗粒的粒径为1纳米~100纳米;

在所述第一磁性纳米酶颗粒表面修饰二氧化硅或葡聚糖,以封闭其过氧化物酶活性;所述第二磁性纳米酶颗粒为裸露的磁颗粒或蛋白外壳包被的磁颗粒,所述蛋白外壳为病毒外壳或铁蛋白外壳;

所述第一磁性纳米酶颗粒和所述第二磁性纳米酶颗粒均为四氧化三铁颗粒;所述第一磁性纳米酶颗粒和所述第二磁性纳米酶颗粒都是球形、棒形、立方形、三角形和多角形中的一种或多种;所述第一次分离和所述第二分离的方法为磁场分离;步骤(3)和步骤(5)中的温育时间均为20-40min;

所述磁场分离是通过调节磁场强度进行分离的,利用电磁体或不同磁场强度的永磁体来调节磁场强度,根据第一磁性纳米酶颗粒和第二磁性纳米酶颗粒的尺寸大小不同而磁响应性不同,改变磁场强度,使得该磁场下适于富集捕获探针,但不富集检测探针。

2. 根据权利要求1所述的纳米酶免疫夹心技术检测生物分子的方法,其特征在于,步骤(7)中所述过氧化物为过氧化氢或过氧化脲;所述催化底物为四甲基联苯胺、四甲基联苯胺硫酸盐、邻苯二胺、二氨基联苯胺、二氨基联苯胺四盐酸、5-氨基水杨酸、邻联甲苯胺和连氮二铵盐中的一种或多种。

3. 根据权利要求1所述的纳米酶免疫夹心技术检测生物分子的方法,其特征在于,所述生物分子为蓖麻毒素,具体检测方法如下:

(1) 采用EDC-NHS活化羧基法将蓖麻毒素的单克隆抗体6A6偶联于粒径为1微米的二氧化硅包埋式四氧化三铁磁性颗粒,制成捕获探针;其中:EDC为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,NHS为N-羟基丁二酰亚胺;

偶联的具体步骤如下:称取1mg二氧化硅修饰的粒径为1微米的四氧化三铁磁性颗粒,加入浓度为50mg/mL的N-羟基丁二酰亚胺溶液和浓度为50mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐溶液各50 μ L,室温孵育30分钟,用去离子水清洗,除去多余的NHS/EDC;加入1 mL、pH为6.0、浓度为50mmol/L的乙酸钠溶液,并加入100 μ g的抗蓖麻毒素单克隆抗

体6A6,混匀,4℃孵育2小时,用pH为7.0、浓度为10mmol/L 的磷酸盐缓冲液洗涤,再加入浓度为50mmol/L、pH为 7.4的三羟甲基氨基甲烷封闭活化的羧基,用pH为7.0、浓度为10mmol/L 的磷酸盐缓冲液重悬,4℃保存;偶联效果采用点印迹方法检测;

(2) 采用EDC-NHS活化羧基法将蓖麻毒素将单克隆抗体7G7偶联于粒径为30纳米的四氧化三铁磁性颗粒上,获得检测探针;其中:EDC为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,NHS为N-羟基丁二酰亚胺;

偶联的具体的步骤如下:称取1mg粒径为30纳米的四氧化三铁磁性颗粒,加入浓度为50mg/mL的N-羟基丁二酰亚胺和浓度为50mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐各50μL,室温孵育30分钟,用去离子水清洗,除去多余的NHS/EDC;加入1 mL、pH为 6.0、浓度为50mmol/L的乙酸钠溶液,并加入100μg的抗蓖麻毒素单克隆抗体7G7,混匀,4℃孵育2小时,用pH为7.0、浓度为10mmol/L 的磷酸盐缓冲液洗涤,再加入浓度为50mmol/L、pH为7.4的三羟甲基氨基甲烷封闭活化的羧基,用pH为7.0、浓度为10mmol/L 的磷酸盐缓冲液重悬,4℃保存;偶联效果采用点印迹方法检测;

(3) 将含蓖麻毒素的待测样品与捕获探针温育30min;

(4) 第一次分离:利用磁场从步骤(3)的溶液中富集分离得到捕获探针-抗原复合物;

(5) 加入pH为7.0、浓度为10mmol/L 的磷酸盐缓冲液重悬捕获探针-抗原复合物,加入检测探针,温育30min;

(6) 第二次分离:利用磁场从步骤(5)的溶液中分离捕获探针-抗原-检测探针复合物,加入pH为7.0、浓度为10mmol/L 的磷酸盐缓冲液重悬;

(7) 加入浓度为0.6mol/L的过氧化氢和浓度为1mmol/L的四甲基联苯胺,反应5分钟,用硫酸溶液终止反应,通过酶联仪检测溶液450nm处的光吸收值;

(8) 按照上述方法,测量已知浓度的蓖麻毒素,绘制标准曲线,从而获得待测生物样品中的抗原含量。

4. 根据权利要求1所述的纳米酶免疫夹心技术检测生物分子的方法,其特征在于,所述生物分子为甲胎蛋白,具体检测方法如下:

(1) 采用过碘酸氧化法将甲胎蛋白的单克隆抗体Ab-1偶联于葡聚糖修饰的粒径为2微米的四氧化三铁磁性颗粒上,制成捕获探针;

偶联的具体步骤如下:称取葡聚糖修饰的粒径为2微米的磁性颗粒溶解于1mL新鲜配制的、浓度为0.05mol/L的 NaIO_4 溶液,室温下避光搅拌20分钟;磁吸附去除上清液,用浓度为1mmol/L、pH为4.4的醋酸钠缓冲液洗涤三次;加入浓度为0.2mol/L、pH为9.5的碳酸盐缓冲液,然后立即加入的单克隆抗体Ab-1,再加入1mL、浓度为0.01mol/L的碳酸盐缓冲液,4℃搅拌过夜;加入0.1mL新鲜配制的、浓度为4mg/mL的 NaBH_4 溶液,置4℃处理2小时;去除上清,用pH为7.4、浓度为10mmol/L 的磷酸盐缓冲液缓冲液洗涤三到五次,4℃保存;偶联效果采用点印迹方法检测;

(2) 采用过碘酸氧化法将甲胎蛋白的单克隆抗体Ab-2偶联于葡聚糖修饰的粒径为20纳米的四氧化三铁磁性颗粒上,制成检测探针;

偶联的具体的步骤如下:称取葡聚糖修饰的粒径为20纳米的磁性颗粒溶解于1mL新鲜配制的、浓度为0.05mol/L的 NaIO_4 溶液,室温下避光搅拌20分钟;磁吸附去除上清液,用浓度为1mmol/L、pH为4.4的醋酸钠缓冲液洗涤三次;加入浓度为0.2mol/L、pH为9.5的碳酸盐

缓冲液,然后立即加入的单克隆抗体Ab-2,再加入1mL、浓度为0.01mol/L的碳酸盐缓冲液,4℃搅拌过夜;加入0.1mL新鲜配制的、浓度为4mg/mL的 NaBH_4 溶液,置4℃处理2小时;去除上清,用pH为7.4、浓度为10mmol/L 的磷酸盐缓冲液洗涤三到五次,4℃保存;偶联效果采用点印迹方法检测;

(3) 将含甲胎蛋白AFP的待测样品与捕获探针温育30min;

(4) 第一次分离:利用磁场从步骤(3)的溶液中富集分离得到捕获探针-抗原复合物;

(5) 加入pH为7.0、浓度为10mmol/L 的磷酸盐缓冲液重悬捕获探针-抗原复合物,加入检测探针,温育30min;

(6) 第二次分离:利用磁场从步骤(5)的溶液中分离捕获探针-抗原-检测探针复合物,加入pH为7.0、浓度为10mmol/L 的磷酸盐缓冲液重悬;

(7) 加入浓度为0.6mol/L的过氧化氢和浓度为1mmol/L的四甲基联苯胺,反应5分钟,用硫酸溶液终止反应,通过酶联仪检测溶液450nm处的光吸收值;

(8) 按照上述方法,测量已知浓度的甲胎蛋白,绘制标准曲线,从而获得待测生物样品中的抗原含量。

纳米酶免疫夹心新技术检测生物分子的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米材料及生物学纳米技术领域。更具体地,涉及一种纳米酶免疫夹心新技术检测生物分子的方法。

背景技术

[0002] 随着纳米技术的快速发展,纳米材料特别是磁性纳米颗粒在生物学领域引起了人们极大的研究兴趣。磁性纳米颗粒是一类智能型的纳米材料,既具有纳米材料所特有的性质,如粒径小、比表面积大、偶联容量高,又具有磁响应性及超顺磁性,可以在恒定磁场下聚集和定位、在交变磁场下吸收电磁波产热。利用这些特性磁性纳米颗粒被应用于生物标记与分离、核磁共振成像、组织修复、药物载体以及疾病诊断与治疗等方面。

[0003] 近年,阎锡蕴课题组发现磁纳米颗粒具有过氧化物酶的催化功能(Nature Nanotechnology, 2007)并研制了三功能(识别、催化、磁性)于一体的新型检测试剂,发现磁颗粒表面包裹蛋白分子后仍然具有酶活性(阎锡蕴等, Nature Nanotechnology, 2012)。这种催化活性与辣根过氧化物酶相似,在过氧化氢存在下,磁性纳米颗粒可以催化辣根过氧化物酶的底物,如可以催化3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)生成蓝色的产物,催化二氨基联苯胺(DAB)生成棕色沉淀,催化邻苯二胺(OPD)生成橘红色产物,催化活性依赖于pH值、温度和过氧化氢浓度,其催化机理符合乒乓机制。同时还发现磁性纳米颗粒的催化活性随着颗粒粒径的减小而增强,颗粒的粒径越小,其催化活性越高。磁性颗粒的粒径达微米量级后,催化活性降低至接近零值。

[0004] 与蛋白酶相比,磁性纳米颗粒具有更多的优势:(1)蛋白酶在极端pH和温度下容易变性,同时也容易被蛋白酶降解,而磁性纳米颗粒在极端条件下很稳定;(2)蛋白酶的生产成本很高,而磁性纳米颗粒制备简单、廉价;(3)由于磁性纳米颗粒具有超顺磁性,用磁铁可以回收反复利用;同时基于磁性纳米颗粒的磁可控性,拓展了其作为模拟酶的应用领域。

[0005] 传统的分离技术主要包括沉淀、离心等过程,这些纯化方法的步骤繁杂、费时长、收率低,接触有毒试剂,很难实现自动化操作。而磁分离技术具有快速、简便的特点,能够高效、可靠地捕获特定的蛋白质或其它生物大分子。基于磁性纳米颗粒的超顺磁性,在外加磁场下纳米颗粒被磁化,然而一旦去掉磁场,它们将立即重新分散于溶液中,通常磁分离技术主要包括以下两个步骤:(1)将要研究的生物实体标记于磁性颗粒上;(2)利用磁性分离设备将被标记的生物实体分离出来。目前,磁分离方法已经拓展到对细胞、蛋白质和核酸(DNA, RNA)等多种生物体的分离和纯化。

发明内容

[0006] 本发明的一个目的在于提供一种新颖的夹心免疫检测技术检测生物分子的方法,该方法集磁性纳米颗粒过氧化物酶催化活性及磁分离特性于一体,可以省略传统ELISA方法中引入辣根过氧化物酶标记抗体的步骤,基于此新技术的生物样本检测,简便快速。

[0007] 为达到上述目的,本发明采用下述技术方案:纳米酶免疫夹心新技术检测生物分

子的方法,包括如下步骤:

- [0008] (1) 将第一单克隆抗体偶联于第一磁性纳米酶颗粒上,获得捕获探针;
[0009] (2) 将第二单克隆抗体偶联于第二磁性纳米酶颗粒上,获得检测探针;
[0010] (3) 将待测样品与捕获探针温育;
[0011] (4) 第一次分离:从步骤(3)的溶液中得到捕获探针-抗原复合物;
[0012] (5) 重悬捕获探针-抗原复合物,加入检测探针,温育;
[0013] (6) 第二次分离:从溶液步骤(5)的溶液中得到捕获探针-抗原-检测探针复合物;
[0014] (7) 加入过氧化物和催化底物显色,通过酶联仪检测溶液的光吸收值;
[0015] (8) 按照步骤(1)至步骤(7)中的方法,测量已知浓度的生物分子,绘制标准曲线,从而获得待测生物样品中的抗原含量。

[0016] 上述纳米酶免疫夹心新技术检测生物分子的方法,所述第一单克隆抗体和所述第二单克隆抗体为待测生物样品中抗原的不同单克隆抗体。

[0017] 上述纳米酶免疫夹心新技术检测生物分子的方法,所述第一磁性纳米酶颗粒和所述第二磁性纳米酶颗粒为尺寸大小不同的磁性纳米酶颗粒。

[0018] 上述纳米酶免疫夹心新技术检测生物分子的方法,所述第一磁性纳米酶颗粒的粒径为0.1微米~100微米;所述第二磁性纳米酶颗粒的粒径为1纳米~100纳米。

[0019] 上述纳米酶免疫夹心新技术检测生物分子的方法,在所述第一磁性纳米酶颗粒表面修饰二氧化硅或葡聚糖,以封闭其过氧化物酶活性;所述第二磁性纳米酶颗粒为裸露的磁颗粒或蛋白外壳包被的磁颗粒,所述蛋白外壳为病毒外壳或铁蛋白外壳。

[0020] 上述纳米酶免疫夹心新技术检测生物分子的方法,所述第一磁性纳米酶颗粒和所述第二磁性纳米酶颗粒均为四氧化三铁颗粒;所述第一磁性纳米酶颗粒和所述第二磁性纳米酶颗粒都是球形、棒形、立方形、三角形和多角形中的一种或多种;所述第一次分离和所述第二次分离的方法为离心分离或磁场分离;步骤(3)和步骤(5)中的温育时间均为20-40min。

[0021] 上述纳米酶免疫夹心新技术检测生物分子的方法,所述磁场分离是通过调节磁场强度进行分离的,利用电磁体或不同磁场强度的永磁体来调节磁场强度。

[0022] 上述纳米酶免疫夹心新技术检测生物分子的方法,步骤(5)中所述过氧化物为过氧化氢和过氧化脲的一种或两种;所述催化底物为四甲基联苯胺TMB、四甲基联苯胺硫酸盐TMBS、邻苯二胺OPD、二氨基联苯胺DAB、二氨基联苯胺四盐酸DAB-4HCl、5-氨基水杨酸5-AS、邻联甲苯胺OT和连氮二铵盐ABTS中的一种或多种。

[0023] 上述纳米酶免疫夹心新技术检测生物分子的方法,所述生物分子为蓖麻毒素,具体检测方法如下:

[0024] (1) 采用EDC-NHS活化羧基法将蓖麻毒素的单克隆抗体6A6偶联于粒径为1微米的二氧化硅包埋式四氧化三铁磁性颗粒,制成捕获探针;

[0025] 偶联的具体步骤如下:称取1mg二氧化硅修饰的粒径为1微米的四氧化三铁磁性颗粒,加入浓度为50mg/mL的N-羟基丁二酰亚胺NHS溶液和浓度为50mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐EDC溶液各50μL,室温孵育30分钟,用去离子水清洗,除去多余的NHS/EDC;加入1mL、pH为6.0、浓度为50mmol/L的乙酸钠溶液,并加入100μg的抗蓖麻毒素单克隆抗体6A6,混匀,4℃孵育2小时,用pH为7.0、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS洗

涤,再加入浓度为50mmol/L、pH为7.4的三羟甲基氨基甲烷Tris-Cl封闭活化的羧基,用pH为7.0、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS重悬,4℃保存;偶联效果采用点印迹方法(Dot blot)检测;

[0026] (2) 采用EDC-NHS活化羧基法将蓖麻毒素将单克隆抗体7G7偶联于粒径为30纳米的四氧化三铁磁性颗粒上,获得检测探针;

[0027] 偶联的具体的步骤如下:称取1mg粒径为30纳米的四氧化三铁磁性颗粒,加入浓度为50mg/mL的N-羟基丁二酰亚胺NHS和浓度为50mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐EDC各50μL,室温孵育30分钟,用去离子水清洗,除去多余的NHS/EDC;加入1mL、pH为6.0、浓度为50mmol/L的乙酸钠溶液,并加入100μg的抗蓖麻毒素单克隆抗体7G7,混匀,4℃孵育2小时,用pH为7.0、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS洗涤,再加入浓度为50mmol/L、pH为7.4的三羟甲基氨基甲烷Tris-Cl封闭活化的羧基,用pH为7.0、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS重悬,4℃保存;偶联效果采用点印迹方法(Dot blot)检测;

[0028] (3) 将含蓖麻毒素的待测样品与捕获探针温育30min;

[0029] (4) 第一次分离:利用磁场从步骤(3)的溶液中富集分离得到捕获探针-抗原复合物;

[0030] (5) 加入pH为7.0、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS重悬捕获探针-抗原复合物,加入检测探针,温育30min;

[0031] (6) 第二次分离:利用磁场从步骤(5)的溶液中分离捕获探针-抗原-检测探针复合物,加入pH为7.0、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS重悬;

[0032] (7) 加入浓度为0.6mol/L的过氧化氢和浓度为1mmol/L的TMB,反应5分钟,用硫酸溶液终止反应,通过酶联仪检测溶液450nm处的光吸收值;

[0033] (8) 按照上述方法,测量已知浓度的蓖麻毒素,绘制标准曲线,从而获得待测生物样品中的抗原含量。

[0034] 上述纳米酶免疫夹心新技术检测生物分子的方法,所述生物分子为甲胎蛋白AFP,具体检测方法如下:

[0035] (1) 采用过碘酸氧化法将甲胎蛋白AFP的单克隆抗体Ab-1偶联于葡聚糖修饰的粒径为2微米的四氧化三铁磁性颗粒上,制成捕获探针;

[0036] 偶联的具体步骤如下:称取葡聚糖修饰的粒径为2微米的磁性颗粒溶解于1mL新鲜配制的、浓度为0.05mol/L的 NaIO_4 溶液,室温下避光搅拌20分钟;磁吸附去除上清液,用浓度为1mmol/L、pH为4.4的醋酸钠缓冲液洗涤三次;加入浓度为0.2mol/L、pH为9.5的碳酸盐缓冲液,然后立即加入的单克隆抗体Ab-1,再加入1mL、浓度为0.01mol/L的碳酸盐缓冲液,4℃搅拌过夜;加入0.1mL新鲜配制的、浓度为4mg/mL的 NaBH_4 溶液,置4℃处理2小时;去除上清,用pH为7.4、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS缓冲液洗涤三到五次,4℃保存;偶联效果采用点印迹(Dot blot)方法检测;

[0037] (2) 采用过碘酸氧化法将甲胎蛋白AFP的单克隆抗体Ab-2偶联于葡聚糖修饰的粒径为20纳米的四氧化三铁磁性颗粒上,制成检测探针;

[0038] 偶联的具体的步骤如下:称取葡聚糖修饰的粒径为20纳米的磁性颗粒溶解于1mL新鲜配制的、浓度为0.05mol/L的 NaIO_4 溶液,室温下避光搅拌20分钟;磁吸附去除上清液,用浓度为1mmol/L、pH为4.4的醋酸钠缓冲液洗涤三次;加入浓度为0.2mol/L、pH为9.5的碳

酸盐缓冲液,然后立即加入的单克隆抗体Ab-2,再加入1mL、浓度为0.01mol/L的碳酸盐缓冲液,4℃搅拌过夜;加入0.1mL新鲜配制的、浓度为4mg/mL的 NaBH_4 溶液,置4℃处理2小时;去除上清,用pH为7.4、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS洗涤三到五次,4℃保存;偶联效果采用点印迹(Dot blot)方法检测;

[0039] (3) 将含甲胎蛋白AFP的待测样品与捕获探针温育30min;

[0040] (4) 第一次分离:利用磁场从步骤(3)的溶液中富集分离得到捕获探针-抗原复合物;

[0041] (5) 加入pH为7.0、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS重悬捕获探针-抗原复合物,加入检测探针,温育30min;

[0042] (6) 第二次分离:利用磁场从步骤(5)的溶液中分离捕获探针-抗原-检测探针复合物,加入pH为7.0、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS重悬;

[0043] (7) 加入浓度为0.6mol/L的过氧化氢和浓度为1mmol/L的TMB,反应5分钟,用硫酸溶液终止反应,通过酶联仪检测溶液450nm处的光吸收值;

[0044] (8) 按照上述方法,测量已知浓度的甲胎蛋白AFP,绘制标准曲线,从而获得待测生物样品中的抗原含量。

[0045] 本发明的有益效果如下:

[0046] 本发明利用磁性纳米粒子具有类似过氧化物酶的活性以及可磁分离的特点,采用两种不同尺寸的磁性颗粒,其中一种尺寸达微米量级,主要利用其磁分离的特性,另一种尺寸为纳米量级,主要利用其过氧化物酶的活性。在大尺寸磁性颗粒表面固定一种单克隆抗体,将其作为捕获探针;在小尺寸磁性颗粒表面固定另一种单克隆抗体,作为检测探针。根据两种不同尺寸颗粒的磁响应性不同,采用磁场强度可调的磁体(磁场强度可调的电磁体或者是磁性大小不同的永磁体),改变磁场强度,使得该磁场下能够将捕获探针富集起来,但不富集检测探针。或者可以采用离心的方法,选择合适的离心力,能够将捕获探针富集起来,但不富集检测探针。根据夹心免疫原理,当捕获探针与待测样本中的抗原物质反应后,采用磁分离技术将捕获探针富集起来,然后撤去磁场,使捕获探针重悬在溶液中,再加入检测探针进行温育反应,使形成捕获探针-抗原-检测探针复合物,撤去磁场,加入过氧化氢和催化底物显色,通过酶标仪检测光密度值,对样本中的抗原物质进行定量分析。

[0047] 相比传统的ELISA方法,本发明的新方法能够确保抗原抗体的反应始终处于溶液状态、操作简便、产率高、检测快捷、大大缩短了检测时间,溶液环境下磁性颗粒的比表面积大,可以提高检测敏感性。同时用磁颗粒替代了酶制剂,既节省了成本又保证了检测过程的稳定性,可以高效实现待测样本的定量检测,并可实现自动化控制。

[0048] 本发明利用两种尺寸不同的磁性纳米颗粒,通过夹心免疫原理,实现化学或生物分子的快速定量检测。该方法操作步骤简单快捷,且对环境友好,适合各种化学或生物分子的检测,解决了现有技术无法同时利用磁性分离特点和磁性纳米颗粒过氧化物酶的功能,具有十分广阔的应用前景。

附图说明

[0049] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细的说明。

[0050] 图1本发明纳米酶免疫夹心新技术检测生物分子的反应流程示意图。

具体实施方式

[0051] 实施例一检测蓖麻毒素

[0052] 本实施例纳米酶免疫夹心新技术检测生物分子的方法如下：

[0053] (1) 采用EDC-NHS活化羧基法将蓖麻毒素的单克隆抗体6A6偶联于粒径为1微米的二氧化硅包埋式四氧化三铁磁性颗粒，制成捕获探针；

[0054] 偶联的具体步骤如下：称取二氧化硅修饰的粒径为1微米的1mg四氧化三铁磁性颗粒，加入浓度为50mg/mL的N-羟基丁二酰亚胺NHS溶液和浓度为50mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐EDC溶液各50μL，室温孵育30分钟，用去离子水清洗，除去多余的NHS/EDC；加入1mL、pH为6.0、浓度为50mmol/L的乙酸钠溶液，并加入100μg的抗蓖麻毒素单克隆抗体6A6，混匀，4℃孵育2小时，用pH为7.0、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS洗涤，再加入浓度为50mmol/L、pH为7.4的三羟甲基氨基甲烷Tris-Cl封闭活化的羧基，用pH为7.0、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS重悬，4℃保存；偶联效果采用点印迹方法(Dot blot)检测；

[0055] (2) 采用EDC-NHS活化羧基法将蓖麻毒素将单克隆抗体7G7偶联于粒径为30纳米的四氧化三铁磁性颗粒上，获得检测探针；

[0056] 偶联的具体的步骤如下：称取粒径为30纳米的1mg四氧化三铁磁性颗粒，加入浓度为50mg/mL的N-羟基丁二酰亚胺NHS和浓度为50mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐EDC各50μL，室温孵育30分钟，用去离子水清洗，除去多余的NHS/EDC；加入1mL、pH为6.0、浓度为50mmol/L的乙酸钠溶液，并加入100μg的抗蓖麻毒素单克隆抗体7G7，混匀，4℃孵育2小时，用pH为7.0、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS洗涤，再加入浓度为50mmol/L、pH为7.4的三羟甲基氨基甲烷Tris-Cl封闭活化的羧基，用pH为7.0、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS重悬，4℃保存；偶联效果采用点印迹方法(Dot blot)检测；

[0057] (3) 将含蓖麻毒素的待测样品与捕获探针温育30min；

[0058] (4) 第一次分离：利用磁场从步骤(3)的溶液中富集分离得到捕获探针-抗原复合物；

[0059] (5) 加入pH为7.0、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS重悬捕获探针-抗原复合物，加入检测探针，温育30min；

[0060] (6) 第二次分离：利用磁场从步骤(5)的溶液中分离捕获探针-抗原-检测探针复合物，加入pH为7.0、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS重悬；

[0061] (7) 加入浓度为0.6mol/L的过氧化氢和浓度为1mmol/L的TMB，反应5分钟，用硫酸溶液终止反应，通过酶联仪检测溶液450nm处的光吸收值；

[0062] (8) 按照上述方法，测量已知浓度的蓖麻毒素，绘制标准曲线，从而获得待测生物样品中的抗原含量。

[0063] 实施例二检测肿瘤标志物甲胎蛋白AFP

[0064] 本实施例纳米酶免疫夹心新技术检测生物分子的方法如下：

[0065] (1) 采用过碘酸氧化法将甲胎蛋白AFP的单克隆抗体Ab-1偶联于葡聚糖修饰的粒径为2微米的四氧化三铁磁性颗粒上，制成捕获探针；

[0066] 偶联的具体步骤如下：称取葡聚糖修饰的粒径为2微米的1mg四氧化三铁磁性颗粒溶解于1mL新鲜配制的、浓度为0.05mol/L的NaIO₄溶液，室温下避光搅拌20分钟；磁吸附去

除上清液,用浓度为1mmol/L、pH为4.4的醋酸钠缓冲液洗涤三次;加入1mL、浓度为0.2mol/L、pH为9.5的碳酸盐缓冲液(如用碳酸钠和碳酸氢钠配制的缓冲溶液),然后立即加入的单克隆抗体Ab-1,再加入1mL、浓度为0.01mol/L的碳酸盐缓冲液(如用碳酸钠和碳酸氢钠配制的缓冲溶液),4℃搅拌过夜;加入0.1mL新鲜配制的、浓度为4mg/mL的 NaBH_4 溶液,置4℃处理2小时;去除上清,用pH为7.4、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS缓冲液洗涤三到五次,4℃保存;偶联效果采用点印迹(Dot blot)方法检测;

[0067] (2) 采用过碘酸氧化法将甲胎蛋白AFP的单克隆抗体Ab-2偶联于葡聚糖修饰的粒径为20纳米的四氧化三铁磁性颗粒上,制成检测探针;

[0068] 偶联的具体的步骤如下:称取葡聚糖修饰的粒径为20纳米的1mg四氧化三铁磁性颗粒溶解于1mL新鲜配制的、浓度为0.05mol/L的 NaIO_4 溶液,室温下避光搅拌20分钟;磁吸附去除上清液,用浓度为1mmol/L、pH为4.4的醋酸钠缓冲液洗涤三次;加入1mL、浓度为0.2mol/L、pH为9.5的碳酸盐缓冲液(如用碳酸钠和碳酸氢钠配制的缓冲溶液),然后立即加入的单克隆抗体Ab-2,再加入1mL、浓度为0.01mol/L的碳酸盐缓冲液,4℃搅拌过夜(如用碳酸钠和碳酸氢钠配制的缓冲溶液);加入0.1mL新鲜配制的、浓度为4mg/mL的 NaBH_4 溶液,置4℃处理2小时;去除上清,用pH为7.4、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS洗涤三到五次,4℃保存;偶联效果采用点印迹(Dot blot)方法检测;

[0069] (3) 将含甲胎蛋白AFP的待测样品与捕获探针温育30min;

[0070] (4) 第一次分离:利用磁场从步骤(3)的溶液中富集分离得到捕获探针-抗原复合物;

[0071] (5) 加入pH为7.0、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS重悬捕获探针-抗原复合物,加入检测探针,温育30min;

[0072] (6) 第二次分离:利用磁场从步骤(5)的溶液中分离捕获探针-抗原-检测探针复合物,加入pH为7.0、浓度为10mmol/L的磷酸盐缓冲液PBS重悬;

[0073] (7) 加入浓度为0.6mol/L的过氧化氢和浓度为1mmol/L的TMB,反应5分钟,用硫酸溶液终止反应,通过酶联仪检测溶液450nm处的光吸收值;

[0074] (8) 按照上述方法,测量已知浓度的甲胎蛋白AFP,绘制标准曲线,从而获得待测生物样品中的抗原含量。

[0075] 显然,本发明的上述实施例仅仅是为清楚地说明本发明所作的举例,而并非是对本发明的实施方式的限定,对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动,这里无法对所有的实施方式予以穷举,凡是属于本发明的技术方案所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明的保护范围之列。

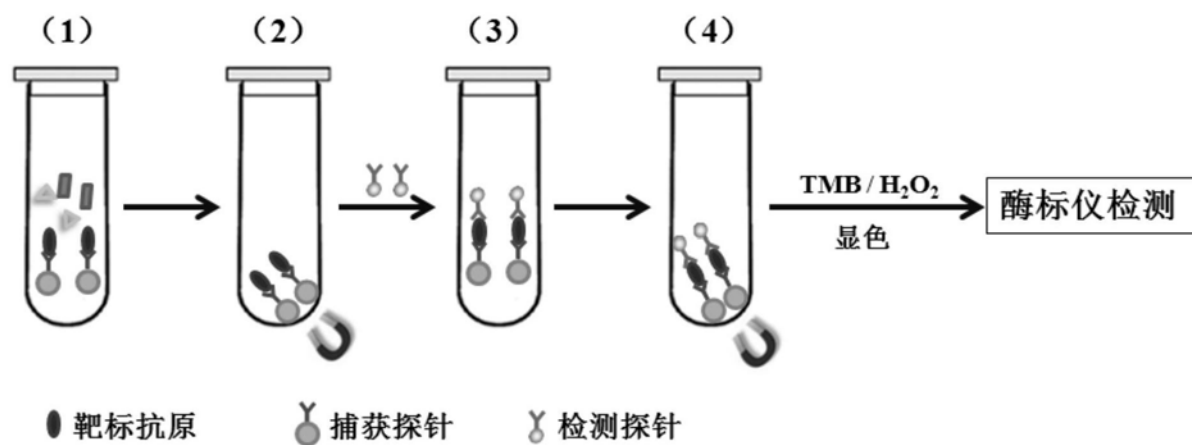


图1