



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101900723 B

(45) 授权公告日 2013. 05. 08

(21) 申请号 200910085655. 2

(22) 申请日 2009. 05. 27

(73) 专利权人 中国科学技术大学

地址 230026 安徽省合肥市金寨路 96 号中国科技大学科技处

(72) 发明人 崔华 田大勇

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 21/66(2006. 01)

G01N 33/552(2006. 01)

(56) 对比文件

US 20070275383 A1, 2007. 11. 29,

US 20070275383 A1, 2007. 11. 29,

Hua Cui et al. Synthesis,

Characterization, and

Electrochemiluminescence of

Luminol-Reduced Gold Nanoparticles and

Their Application in a Hydrogen Peroxide Sensor. 《Chem. Eur. J. 》. 2007, 第 13 卷 6975-6984.

Hua Cui et al. Synthesis, Characterization, and Electrochemiluminescence of Luminol-Reduced Gold Nanoparticles and Their Application in a Hydrogen Peroxide Sensor. 《Chem. Eur. J. 》. 2007, 第 13 卷 6975-6984.

Dayong Tian et al. Sandwich-type electrochemiluminescence immunosensor based on N-(Aminobutyl)-N-ethylisoluminol labeling and gold nanoparticle amplification. 《Talanta》. 2008, 第 78 卷 399-404.

Dayong Tian et al. Sandwich-type electrochemiluminescence immunosensor based on N-(Aminobutyl)-N-ethylisoluminol labeling and gold nanoparticle amplification. 《Talanta》. 2008, 第 78 卷 399-404.

审查员 杨佳倩

权利要求书3页 说明书14页 附图3页

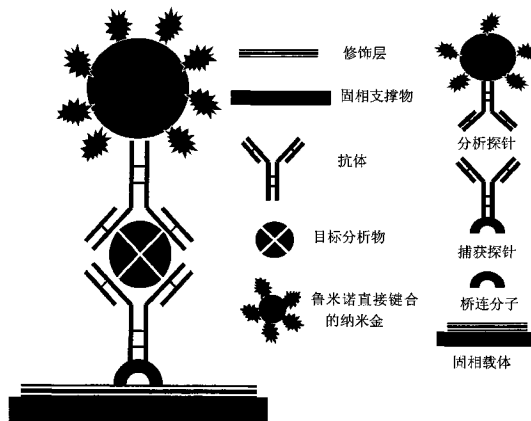
(54) 发明名称

鲁米诺直接键合的纳米金在免疫分析中的应用

(57) 摘要

本发明公开了鲁米诺直接键合的纳米金在免疫分析中的应用。其一是鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针,该分析探针由鲁米诺直接键合的纳米金标记的抗体所组成。其中,鲁米诺直接键合的纳米金是由鲁米诺一步还原氯金酸得到的。其二是基于该鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针的化学发光免疫分析方法。其三是实施该分析方法的试剂盒。本发明的化学发光免疫分析方法具有灵敏度高(如测定人 IgG 的检测限可达 1. 0pg/mL)、线性范围宽、重现性好、操作简单、成本低廉等优点,可用于各种样品中的多种分析

物的测定。在临床诊断与治疗、药物分析、食品安全检测、环境监测等领域具有重要的应用前景。



CN 101900723 B

1. 一种鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针,其特征在于,所述免疫分析探针为鲁米诺直接键合的纳米金标记的抗体或抗原。
2. 根据权利要求1所述的鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针,其特征在于,所述鲁米诺直接键合的纳米金是利用鲁米诺还原氯金酸一步合成法得到的。
3. 根据权利要求1或2所述的鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针,其特征在于,所述免疫分析探针为化学发光免疫分析探针。
4. 根据权利要求3所述的鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针,其特征在于,所述化学发光免疫分析探针为电致化学发光免疫分析探针。
5. 一种非诊断目的的化学发光免疫分析方法,包括如下步骤:
 - A、合成如权利要求1至4任一项所述的鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针;
 - B、孵育捕获探针与固相载体,使捕获探针连接到固相载体上,形成捕获探针/固相载体复合物;
 - C、孵育步骤B所得到的捕获探针/固相载体复合物与目标分析物,使捕获探针/固相载体复合物与目标分析物结合,形成目标分析物/捕获探针/固相载体复合物;
 - D、孵育步骤C所得到的目标分析物/捕获探针/固相载体复合物与步骤A所得到的免疫分析探针,形成免疫分析探针/目标分析物/捕获探针/固相载体夹心式免疫复合物;
 - E、将步骤D得到的所述免疫分析探针/目标分析物/捕获探针/固相载体夹心式免疫复合物放入化学发光池中,加入底液,产生化学发光,用发光仪进行检测。
6. 如权利要求5所述的化学发光免疫分析方法,其特征在于,所述的化学发光免疫分析方法为电致化学发光免疫分析方法。
7. 根据权利要求5或6所述的化学发光免疫分析方法,其特征在于,所述的捕获探针为抗体或连接有桥连分子的抗体。
8. 根据权利要求7所述的化学发光免疫分析方法,其特征在于,所述桥连分子为生物素。
9. 如权利要求5或6所述的化学发光免疫分析方法,其特征在于,所述固相载体为电极、磁微珠、微孔板、尼龙或玻璃之一。
10. 如权利要求9所述的化学发光免疫分析方法,其特征在于,所述电极为纳米金修饰的电极。
11. 如权利要求10所述的化学发光免疫分析方法,其特征在于,所述纳米金修饰的电极为纳米金修饰的金电极、纳米金修饰的铂电极、纳米金修饰的玻碳电极、纳米金修饰的石墨电极、纳米金修饰的石墨充蜡电极或纳米金修饰的氧化铟锡电极之一。
12. 如权利要求11所述的化学发光免疫分析方法,其特征在于,所述纳米金修饰的金电极选用的桥连分子为双巯基化合物或同时具有氨基和巯基的化合物之一。
13. 如权利要求12所述的化学发光免疫分析方法,其特征在于,所述双巯基化合物为1,3'-丙二硫醇。
14. 如权利要求10至13中任意一项所述的化学发光免疫分析方法,其特征在于,所述纳米金修饰的电极上,所述纳米金连接有链霉亲和素。
15. 如权利要求10至13中任意一项所述的化学发光免疫分析方法,其特征在于,所述纳米金修饰的电极上,所述纳米金的粒径为10-38nm。

16. 如权利要求 15 所述的化学发光免疫分析方法,其特征在于,所述纳米金修饰的电极上,所述纳米金的粒径为 16nm。

17. 根据权利要求 5 或 6 中所述的化学发光免疫分析方法,其中,步骤 E 中所述化学发光池为电致化学发光池,在加入底液和施加电压的条件下,可以使得所述夹心式免疫复合物产生化学发光。

18. 根据权利要求 17 所述的化学发光免疫分析方法,其特征在于,所述步骤 E 中的底液为含有过氧化氢的碳酸盐缓冲液。

19. 根据权利要求 17 所述的化学发光免疫分析方法,其特征在于,所述步骤 E 中所述施加电压为脉冲电压、循环伏安或线性伏安。

20. 根据权利要求 19 所述的化学发光免疫分析方法,其中所述脉冲电压为双阶脉冲电压。

21. 如权利要求 5 或 6 所述的化学发光免疫分析方法,其特征在于,所述目标分析物为抗体或抗原;所述目标分析物的样品来自药物、水样品、生物样品、空气样品、食品样品和饮料样品之一。

22. 一种实施权利要求 5-21 所述的化学发光免疫分析方法的试剂盒,包括:

a、权利要求 1-4 任一所述的免疫分析探针;

b、捕获探针;

c、固相载体;

d、底液;

e、洗液。

23. 如权利要求 22 所述的试剂盒,其特征在于,所述免疫分析探针为鲁米诺直接键合的纳米金标记的抗体。

24. 如权利要求 22 所述的试剂盒,其特征在于,所述免疫分析探针上,所述纳米金粒径为 14-25nm。

25. 如权利要求 24 所述的试剂盒,其特征在于,所述免疫分析探针上,所述纳米金粒径为 25nm。

26. 如权利要求 22 所述的试剂盒,其特征在于,所述捕获探针为生物素标记的抗体。

27. 如权利要求 22 所述的试剂盒,其特征在于,所述固相载体为纳米金修饰的金电极。

28. 如权利要求 27 所述的试剂盒,其特征在于,所述纳米金修饰的金电极是通过 1, 3'-丙二硫醇将纳米金组装在金电极表面。

29. 如权利要求 28 所述的试剂盒,其特征在在于,所述纳米金修饰的金电极上,所述纳米金为连接有链霉亲和素的纳米金。

30. 如权利要求 29 所述的试剂盒,其特征在于,所述纳米金修饰的金电极上,所述纳米金的粒径为 10-38nm。

31. 如权利要求 30 所述的试剂盒,其特征在于,所述纳米金修饰的金电极上,所述纳米金的粒径为 16nm。

32. 如权利要求 22 所述的试剂盒,其特征在于,所述底液为含有过氧化氢的碳酸盐缓冲液;其中碳酸盐是由碳酸钠和碳酸氢钠所组成。

33. 如权利要求 32 所述的试剂盒,其特征在于,所述过氧化氢浓度为 1mmol/L。

34. 如权利要求 32 所述的试剂盒,其特征在于,所述碳酸钠和碳酸氢钠浓度均为 0.02mol/L。

35. 如权利要求 22 所述的试剂盒,其特征在于,所述洗液为磷酸盐缓冲液,所述磷酸盐缓冲液的组成为磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠和氯化钾。

36. 如权利要求 35 所述的试剂盒,其特征在于,所述磷酸盐缓冲液浓度为 0.02mol/L,其中磷酸二氢钾浓度为 0.2g/L、磷酸氢二钠浓度为 2.9g/L、氯化钠浓度为 0.8g/L、氯化钾浓度为 0.2g/L。

37. 鲁米诺直接键合的纳米金在制备免疫分析探针中的应用;

所述免疫分析探针为鲁米诺直接键合的纳米金标记的抗体或抗原。

鲁米诺直接键合的纳米金在免疫分析中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及鲁米诺直接键合的纳米金的应用,特别涉及其在免疫分析中的应用。

背景技术

[0002] 化学发光是化学反应过程中产生的光发射现象。作为一种光学检测手段,它不需要光源,具有灵敏度高、线性范围宽、背景噪声小、仪器简单、价格便宜等优点,已被广泛用于免疫分析中(Wu, A. H. B. Clin. Chim. Acta 2006, 369, 119; Zhan, W.; Bard, A. J. Anal. Chem. 2007, 79, 459; Yin, X. B.; Qi, B.; Sun; X. P.; Yang; X. R.; Wang; E. K. Anal. Chem. 2004, 77, 3525; Jie, G. F.; Huang, H. P.; Sun, X. l.; Zhu, J. J. Biosens. Bioelectron. 2008, 23, 1896; Egashira, N.; Morita, S.; Hifumi, E.; Mitoma, Y.; Uda, T. Anal. Chem. 2008, 80, 4020), 目前已经成为许多大医院的主要临床分析手段之一。各种化学发光免疫分析方法的性能很大程度上取决于所采用的探针。现有商业化的化学发光分析探针主要包括以下两类:(a) 化学发光分子:如异鲁米诺及其衍生物、吖啶酯和联吡啶钌等。采用发光分子作为探针,不仅需要缩合反应将发光分子与生物分子结合,还需要对缩合反应后的产物进行纯化,操作过程十分复杂、耗时。(b) 酶:如过氧化物酶、碱性磷酸酶等。利用酶分子对特定化学发光反应的催化作用,建立了一系列酶促化学发光生物分析方法。这类方法的主要问题是酶分子容易失活,影响分析的稳定性。此外,上述以发光分子和酶作为探针的分析技术还存在下列一些缺陷,比如分析成本高,难以进行低含量组分的检测,难以进行快速、现场的分析。

[0003] 近年来,由于纳米材料独特的生物相容性、表面特性和化学发光特性,人们开始尝试将纳米材料作为探针应用于化学发光免疫分析中。纳米金由于其良好的稳定性和生物相容性已被用作化学发光免疫分析的探针。2005年, Lu 研究小组和 Li 研究小组各自建立了纳米金标记的“溶出”化学发光免疫分析方法,其原理均是在免疫反应后将纳米金氧化溶解为三价金离子 Au(III), 然后利用 Au(III) 对鲁米诺化学发光体系的催化或氧化作用进行检测(Fan, A. P.; Lau, C. W.; Lu, J. Z. Anal. Chem. 2005, 77, 3238; Li, Z. F.; Wang, Y. C.; Liu, C. H.; Li, Y. K. Anal. Chim. Acta 2005, 551, 85)。这种方法的主要缺陷在于溶解氧化纳米金需要十分苛刻的实验条件(如高浓度的 $\text{HNO}_3\text{-HCl}$, 或者有毒的 HBr-Br_2), 导致较高的背景化学发光。之后,两个研究小组相继报道了以纳米金直接作为催化型探针的免疫分析方法(Wang, Z. P.; Hu, J. Q.; Jin, Y.; Yao, X.; Li, J. H. Clin. Chem. 2006, 52, 1958; Duan, C. F.; Yu, Y. Q.; Cui, H. Analyst 2008, 133, 1250), 利用纳米金对化学发光反应的催化作用直接进行发光检测,避免了“溶出”过程。Li 研究小组利用不规则纳米金对鲁米诺-过氧化氢体系化学发光的增强作用进行直接测定。虽然这种方法避免了苛刻的溶出过程,但是,这种不规则纳米金的合成难以控制,需要长时间恒温反应(40℃, 24h) 和除氧操作,同时合成的纳米金单分散性差,影响批次之间的重现性,限制了该方法的实际应用。Duan 等人研究发现,粒径为 8~68nm 的普通球状纳米金能够诱导鲁米诺-硝酸银体系在 425nm 处产生快速的强光发射(Duan, C. F.; Yu, Y. Q.; Cui, H. Analyst 2008, 133, 1250)。在此基础上,将常规的柠

柠檬酸盐保护的纳米金粒子作为免疫分析的探针,利用纳米金对鲁米诺-硝酸银化学发光反应的催化作用,建立了一种测定人体 IgG 的微孔板化学发光免疫分析新方法。与已经报道的基于纳米金的化学发光免疫分析方法相比,该方法避免了苛刻的溶出过程,避免了不规则纳米金的合成,提高了该化学发光免疫分析方法在临床诊断中的可用性。但是上述基于纳米金的化学发光免疫分析方法,其检测限为 0.5-100ng/mL IgG,分析灵敏度有待提高。并且发光试剂仍需免疫反应后单独引入,因此在免疫分析的应用中具有一定的局限性。因此,开发能够克服上述缺陷的新型免疫分析探针和化学发光免疫分析新技术是十分必要的。

[0004] 鲁米诺 (luminol),又名发光氨。化学名称为 3-氨基邻苯二甲酰肼,化学式为 $C_8H_7N_3O_2$ 。常温下是一种黄色晶体或者米黄色粉末,是一种比较稳定的人工合成的有机化合物。它结构简单、易于合成、水溶性好,是目前应用最广泛的化学发光试剂之一。鲁米诺分子本身并不适合直接作为免疫分析的探针,因为利用其芳香胺基团标记抗原或抗体分子后,空间位阻增大,发光效率降低。但鲁米诺常作为发光底物,应用于酶标记的化学发光酶免疫分析中。

[0005] 最近,文献报道可将鲁米诺通过化学反应键合到纳米金的表面形成鲁米诺键合的纳米金 (Cui, H. ;Wang, W. ;Duan, C. F. ;Dong, Y. P. ;Guo, J. Z. Chem. Eur. J. 2007,13, 6975 ;Roux, S. ;Garcia, B. ;Bridot, J. L. ;Salom, Marquette, C. Langmuir. 2005,21, 2526),并发现这些鲁米诺键合的纳米金具有电致化学发光活性,但其在生物分析中的应用尚未研究。2005年,Roux 等人 (Roux, S. ;Garcia, B. ;Bridot, J. L. ;Salom, Marquette, C. Langmuir. 2005,21,2526) 用二氢硫辛酸作为保护试剂,硼氢化钠 ($NaBH_4$) 还原氯金酸 ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$) 合成了二氢硫辛酸保护的纳米金。利用 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化纳米金表面的二氢硫辛酸的羧基,然后通过鲁米诺的 $-NH_2$ 和二氢硫辛酸的 $-COOH$ 进行缩合反应将鲁米诺嫁接到纳米金的表面。这个过程需要多步反应、沉淀洗涤、减压蒸馏、过滤、分散等多个步骤才能完成,非常麻烦、耗时。研究结果表明通过二氢硫辛酸键合到纳米金表面的鲁米诺仍具有较好电致化学发光活性。但是其是否能连接到生物分子上如蛋白质和 DNA 分子,以及连接生物分子后其复合物的化学发光与电致化学发光活性尚未进行研究。用该方法所得到的鲁米诺键合的纳米金,其表面大部分被二氢硫辛酸分子和鲁米诺分子所覆盖,我们推测通过纳米金表面和鲁米诺分子直接连接蛋白质和 DNA 分子将是困难的。而通过二氢硫辛酸连接蛋白质和 DNA 分子的量将是非常有限的。因为大部分二氢硫辛酸活性位点已被鲁米诺和纳米金占据,而且连接后很难保证鲁米诺仍有高的发光活性。2007年,本课题组直接利用鲁米诺还原氯金酸一步合成得到了鲁米诺直接键合的纳米金 (Cui, H. ;Wang, W. ;Duan, C. F. ;Dong, Y. P. ;Guo, J. Z. Chem. Eur. J. 2007,13,6975),表征的结果显示鲁米诺以弱的 Au-N 键直接连接到纳米金的表面。通过半胱氨酸桥联分子的静电相互作用,将该鲁米诺直接键合的纳米金组装到金电极的表面,发现该修饰电极在碱性溶液中具有电致化学发光活性且强度随 H_2O_2 浓度的增加而增强,就此发展了一个 H_2O_2 电致化学发光传感器。但是测定 H_2O_2 的灵敏度较低,其检测限仅为 $1 \times 10^{-7} mol/L H_2O_2$ 。此外该分析方法的稳定性也不理想,难以用于实际样品的测定。在上述工作中,鲁米诺直接键合的纳米金在生物分析如免疫分析中的应用没有进行研究。

发明内容

[0006] 在本发明中,发明人发现用鲁米诺直接还原氯金酸一步合成的鲁米诺直接键合的纳米金可有效地与蛋白质分子连接,且其复合物具有良好的发光活性和稳定性。在此基础上本发明提供鲁米诺直接键合的纳米金的以下三个新用途。

[0007] 第一个新用途是提供一种鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针。

[0008] 所述免疫分析探针具体可为鲁米诺直接键合的纳米金标记的抗体(如多克隆抗体或单克隆抗体)或抗原或蛋白质。

[0009] 所述鲁米诺直接键合的纳米金是利用鲁米诺还原氯金酸一步合成法得到的。

[0010] 进一步地,所述免疫分析探针为化学发光免疫分析探针,特别是电致化学发光免疫分析探针。

[0011] 第二个新用途是提供一种基于上述任一种鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针的化学发光免疫分析方法,可包括如下步骤:

[0012] A、合成上述的鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针;

[0013] B、孵育捕获探针与固相载体,使捕获探针连接到固相载体上,形成捕获探针/固相载体复合物;

[0014] C、孵育步骤B所得到的捕获探针/固相载体复合物与目标分析物,使捕获探针/固相载体复合物与目标分析物结合,形成目标分析物/捕获探针/固相载体复合物;

[0015] D、孵育步骤C所得到的目标分析物/捕获探针/固相载体复合物与步骤A所得到的免疫分析探针,形成如图1所示的免疫分析探针/目标分析物/捕获探针/固相载体夹心式免疫复合物;

[0016] E、将步骤D得到的所述免疫分析探针/目标分析物/捕获探针/固相载体夹心式免疫复合物放入化学发光池中,加入底液,产生化学发光,用发光仪进行检测。

[0017] 上述化学发光免疫分析方法中,所述的捕获探针可为抗体或连接有桥连分子的抗体;所述桥连分子可为生物素。

[0018] 上述化学发光免疫分析方法中的所述固相载体可为磁微珠、微孔板、尼龙、玻璃和电极之一。

[0019] 上述磁微珠可为常规磁微珠或纳米金修饰的磁微珠。其中,所述常规磁微珠可为聚苯乙烯包裹的四氧化三铁的磁性纳米颗粒。上述微孔板可为常规微孔板或纳米金修饰的微孔板。其中,所述常规微孔板可为聚苯乙烯微孔板。上述尼龙可为常规尼龙或纳米金修饰的尼龙。其中,所述常规尼龙可为聚酰胺类的尼龙。上述玻璃可为常规玻璃或纳米金修饰的玻璃。其中,所述常规玻璃可为醛基化玻璃、氨基化玻璃或巯基化的玻璃。所述纳米金修饰的玻璃中的玻璃可为镀有金或银的玻璃。

[0020] 进一步地,本发明所述化学发光免疫分析方法为电致化学发光免疫分析方法。此时,所述固相载体为电极。

[0021] 进一步地,所述电极可为纳米金修饰的电极。所述纳米金修饰的电极可为纳米金修饰的金电极、纳米金修饰的铂电极、纳米金修饰的玻碳电极、纳米金修饰的石墨电极、纳米金修饰的石墨充蜡电极和纳米金修饰的氧化铟锡电极之一。

[0022] 所述纳米金修饰的金电极选用的桥连分子可为双巯基化合物和同时具有氨基和巯基的化合物之一;所述的双巯基化合物可为1,3'-丙二硫醇。

[0023] 所述固相载体上的所述纳米金可连接有链霉亲和素。所述纳米金的粒径为 10-38nm, 优选为 16nm。

[0024] 上述的化学发光免疫分析方法为电致化学发光免疫分析方法时, 其中, 步骤 E 中所述化学发光池为电致化学发光池, 在加入底液和施加电压的条件下, 可以使得所述夹心式免疫复合物产生化学发光。

[0025] 所述底液可为含有过氧化氢的碳酸盐缓冲液。

[0026] 所述施加的工作电压可为脉冲电压、循环伏安或线性伏安。其中, 所述脉冲电压可为双阶脉冲电压。

[0027] 根据现有技术, 上述电致化学发光免疫分析方法中所述固相载体也可以为连接磁微珠的电极。

[0028] 上述化学发光免疫分析方法中, 所述目标分析物可为抗体、抗原或蛋白质。所述目标分析物的样品可为临床样品、药物、水样品、生物样品、空气样品、食品样品或饮料样品之一。

[0029] 第三个新用途是提供实施上述化学发光免疫分析方法的试剂盒, 所述试剂盒包括:

[0030] a、上述任一种鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针;

[0031] b、捕获探针;

[0032] c、固相载体;

[0033] d、底液;

[0034] e、洗液。

[0035] 所述鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针为鲁米诺直接键合的纳米金标记的抗体。所述分析探针中的纳米金粒径可为 14-25nm, 优选为 25nm。

[0036] 所述捕获探针可为生物素标记的抗体。

[0037] 所述固相载体可为纳米金修饰的金电极。所述纳米金修饰的金电极是通过 1, 3' - 丙二硫醇将纳米金组装在金电极表面。所述纳米金可为连接有链霉亲和素的纳米金。所述纳米金的粒径可为 10-38nm, 优选为 16nm。

[0038] 所述底液包括能与鲁米诺发生反应的任何试剂缓冲溶液和任何能增强化学发光的物质。所述底液具体可为含有过氧化氢的碳酸盐缓冲液, 其中碳酸盐是由碳酸钠和碳酸氢钠所组成。所述过氧化氢浓度为 1mmol/L。所述碳酸钠和碳酸氢钠浓度均为 0.02mol/L。

[0039] 所述洗液为磷酸盐缓冲液, 其组成为磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠和氯化钾。所述磷酸盐缓冲液浓度为 0.02mol/L, 其中磷酸二氢钾浓度为 0.2g/L、磷酸氢二钠浓度为 2.9g/L、氯化钠浓度为 0.8g/L、氯化钾浓度为 0.2g/L。

[0040] 本发明的鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针、分析方法和试剂盒可用于各种样品中的多种分析物的测定, 适用于临床分析、药物分析、食品安全检测、环境监测等领域。所述的分析物包括但不限于微生物(如病毒、细菌、真菌)、蛋白质、抗体、抗原、生物毒素、化学毒素等。所述的样品包括但不限于临床样品、药物、水样品、生物样品、空气样品、食品样品和饮料样品等。

[0041] 与现有技术相比, 本发明具有如下的优点:

[0042] (1) 首次将鲁米诺直接键合的纳米金用作免疫分析的探针, 提出了新一代免疫分

析标记技术。

[0043] (2) 利用鲁米诺还原氯金酸一步合成就能得到鲁米诺直接键合的纳米金,将其作为发光标记物标记抗体制备分析探针的方法简单、快捷、操作简便、成本低廉,克服了现有以发光试剂为标记物的标记技术麻烦、费时、成本高的重要缺陷。

[0044] (3) 由于纳米金具有良好的生物兼容性,利用纳米金标记抗体,最大程度上保持了抗体的活性。

[0045] (4) 鲁米诺分子本身并不适合直接作为免疫分析的探针,因为利用其芳香胺基团标记抗原或抗体分子后,空间位阻增大,发光效率降低。本发明显示当鲁米诺键合到纳米金表面可以直接标记抗原或抗体构建免疫分析探针,且其具有较高和稳定的发光效率。由于鲁米诺比常用的化学发光标记试剂 4-氨基丁基乙基异鲁米诺 (ABEI)、吡啶酯和联吡啶钆等便宜许多,且标记方法简单、易行,因此本发明的鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针具有重要的商业价值。

[0046] (5) 基于鲁米诺直接键合的纳米金分析探针所发明的化学发光免疫分析方法,通过双层纳米金的放大作用使得目标分析物的检测限低,方法的灵敏度高。实验证明,测定人体 IgG 的检测限可达到 1.0pg/mL。其检测限比现行以纳米金和以发光试剂为标记物、采用双抗夹心模式的化学发光免疫分析低约 1-5 个数量级,且方法简单、重现性好、成本低廉。

附图说明

[0047] 图 1 为本发明所提供的化学发光免疫分析方法涉及的连接在固相载体上的捕获探针与目标分析物和分析探针形成的夹心式免疫复合物示意图;

[0048] 图 2 为本发明所提供的电致化学发光免疫分析方法涉及的修饰电极制备过程示意图;

[0049] 图 3 为裸金电极、1,3'-丙二硫醇修饰的金电极、链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极和鲁米诺直接键合的纳米金标记的二抗/抗原/一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极的电致化学发光信号对比。

[0050] 图中标号含义如下:

[0051] a. 裸金电极;

[0052] b. 1,3'-丙二硫醇修饰的金电极;

[0053] c. 链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极;

[0054] d. 实施例 2 制备的鲁米诺直接键合的纳米金标记的二抗/抗原/一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极。

[0055] 图 4 为实施例 3 中的电致化学发光免疫分析方法测定人体 IgG 浓度的工作曲线,图 4 中的插图表示不同人体 IgG 的浓度对应的发光强度。

具体实施方式

[0056] 下面分别阐述鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针和含有鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针的化学发光免疫分析方法、相应试剂盒及其应用。

[0057] 1. 一种鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针。所述免疫分析探针是将鲁米诺直接键合的纳米金标记抗体或抗原,如标记多克隆抗体或单克隆抗体或其它蛋白质。所述的

鲁米诺直接键合的纳米金是用鲁米诺还原氯金酸一步合成得到的。所述免疫分析探针为化学发光免疫分析探针,如电致化学发光免疫分析探针。

[0058] 本发明的鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针的制备方法包括以下步骤:

[0059] (1) 将 100mL 0.01% (w/w) 的 HAuCl_4 溶液加热至沸,在冷凝回流并充分搅拌的条件下,加入 1.5-2.0mL 含有 0.01mol/L 鲁米诺和 0.01mol/L 氢氧化钠的溶液,保持沸腾并继续搅拌回流反应 30min,然后除去加热源继续搅拌 15min 以上,得到颗粒直径为 14-25nm 的纳米金溶液;

[0060] (2) 将合成的纳米金溶液在常温下渗析 2 天,每 8 小时换一次超纯水渗析液,即得到鲁米诺直接键合的纳米金;

[0061] (3) 将 0.5mL 的 1.0mg/mL 抗体加到用 0.1mol/L 的氢氧化钠将 pH 调至 8.0 的上述步骤 (2) 中渗析过的金胶溶液中去,在室温培育 30 分钟后,再把 5% (w/w) 的牛血清白蛋白加到溶液中不断搅拌 5 分钟,使其最终浓度为 1%,最后在 17120*g 下离心 45 分钟,以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的鲁米诺分子,然后将沉淀用含有 1% (w/w) 牛血清白蛋白的 0.1mol/LpH = 7.4 磷酸盐缓冲液溶解,即得到鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针。

[0062] 2. 本发明的化学发光免疫分析方法包括如下步骤:

[0063] A、合成所述的鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针;

[0064] B、孵育捕获探针与固相载体,使捕获探针连接到固相载体上,形成捕获探针 / 固相载体复合物;

[0065] C、孵育步骤 B 所得到的捕获探针 / 固相载体复合物与目标分析物,使捕获探针 / 固相载体复合物与目标分析物结合,形成目标分析物 / 捕获探针 / 固相载体复合物;

[0066] D、孵育步骤 C 所得到的目标分析物 / 捕获探针 / 固相载体复合物与步骤 A 所得到的免疫分析探针,形成如图 1 所示的免疫分析探针 / 目标分析物 / 捕获探针 / 固相载体夹心式免疫复合物;

[0067] E、将步骤 D 得到的所述免疫分析探针 / 目标分析物 / 捕获探针 / 固相载体夹心式免疫复合物放入化学发光池中,加入底液,产生化学发光,用发光仪进行检测。

[0068] 这里所述的捕获探针为抗体或连接有桥连分子的抗体,所述抗体可通过任何现有方法连接到固相载体上。这些固相载体包括但不限于电极材料、磁微珠、微孔板、尼龙、玻璃等。这些现有方法包括但不限于下面列举的文献报道:Yin, X. B. ;Qi, B. ;Sun ;X. P. ;Yang ;X. R. ;Wang ;E. K. Anal. Chem. 2004, 77, 3525 ;Wang, Z. P. ;Hu, J. Q. ;Jin, Y. ;Yao, X. ;Li, J. H. Clin. Chem. 2006, 52, 1958 ;Jie, G. F. ;Liu, B. ;Pan, H. C. ;Zhu, J. J. ;Chen, G. N. Anal. Chem. 2007, 79, 5574 ;Zhan, W. ;Bard, A. J. Anal. Chem. 2007, 79, 459 ;Yang, Z. J. ;Xie, Z. Y. ;Liu, H. ;Yan, F. ;Ju, H. X. Adv. Funct. Mater. 2008, 18, 3991 ;Miao, W. J. ;Bard, A. J. Anal. Chem. 2003, 75, 5825。

[0069] 所述固相载体本发明优选为纳米金修饰的固相载体。所述捕获探针通过任何现有连接蛋白质与纳米金的方法连接到固相载体上。这些现有方法包括但不限于下面列举的文献报道:Yin, X. B. ;Qi, B. ;Sun ;X. P. ;Yang ;X. R. ;Wang ;E. K. Anal. Chem. 2004, 77, 3525 ;Wang, Z. P. ;Hu, J. Q. ;Jin, Y. ;Yao, X. ;Li, J. H. Clin. Chem. 2006, 52, 1958 ;Gonzalez-Garcia, M. B. ;Fernandez-Sanchez, C. ;Costa-Garcia, A. Biosens.

Bioelectron. 2000,15,315。本发明优选为链霉亲和素和生物素。链霉亲和素与纳米金结合、生物素与抗体结合,通过链霉亲和素与生物素的特异性相互作用将抗体嫁接在纳米金修饰的固相载体上。

[0070] 进一步地,本发明所述化学发光免疫分析方法为电致化学发光免疫分析方法。此时,所述固相载体为电极。本发明优选为纳米金修饰的电极,所述纳米金修饰的电极可为纳米金修饰的金电极、纳米金修饰的铂电极、纳米金修饰的玻碳电极、纳米金修饰的石墨电极、纳米金修饰的石墨充蜡电极和纳米金修饰的氧化铟锡电极之一。本发明优选为纳米金修饰的金电极,纳米金修饰金电极可选用的桥连分子包括但不限于双巯基化合物、同时具有氨基和巯基的化合物等。

[0071] 这里所述的纳米金修饰的金电极,其中纳米金为连接链霉亲和素的纳米金。可以从任何商业渠道购买或用文献方法合成。所述纳米金为柠檬酸盐保护的纳米金,其粒径为10-38nm,本发明优选为16nm。

[0072] 本发明所述的电致化学发光免疫分析方法,包括以下步骤:

[0073] a、合成上述任一种鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针;

[0074] b、在洁净的纯金电极上组装连接有链霉亲和素的纳米金,得到链霉亲和素/纳米金修饰的金电极;

[0075] c、孵育含有生物素的捕获探针与步骤b得到链霉亲和素/纳米金修饰的金电极,使捕获探针连接到纳米金修饰的电极上,得到捕获探针/生物素/链霉亲和素/纳米金修饰的金电极;

[0076] d、孵育含有目标分析物的样品与步骤c所得到的捕获探针/生物素/链霉亲和素/纳米金修饰的金电极,使目标分析物连接到捕获探针上,得到目标分析物/捕获探针/生物素/链霉亲和素/纳米金修饰的金电极;

[0077] e、孵育步骤a所得到的免疫分析探针与步骤d所得到的目标分析物/捕获探针/生物素/链霉亲和素/纳米金修饰的金电极,使免疫分析探针连接到目标分析物上,得到如图2所示的免疫分析探针/目标分析物/捕获探针/生物素/链霉亲和素/纳米金修饰的金电极;

[0078] f、将步骤e所得到的免疫分析探针/目标分析物/捕获探针/生物素/链霉亲和素/纳米金修饰的金电极放入电致化学发光池中,加入底液,施加电压,产生化学发光,用发光仪进行检测。

[0079] 所述步骤b是通过双巯基化合物将连接有链霉亲和素的纳米金修饰在金电极的表面。所述的双巯基化合物优选为1,3'-丙二硫醇。

[0080] 所述步骤f中的底液可为含有过氧化氢的碳酸盐缓冲液。

[0081] 所述步骤f中所施加的工作电压可为脉冲电压、循环伏安或线性伏安。本发明优选为脉冲电压,所述脉冲电压可为双阶脉冲电压。

[0082] 下面以连接链霉亲和素的纳米金修饰的金电极为固相载体、连接有生物素的抗体为捕获探针、以电化学方法诱导化学发光为例,具体说明本发明的可用于多种分析物测定的电致化学发光免疫分析方法。

[0083] (1) 制备鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针;

[0084] a-1. 将100mL 0.01% (w/w) 的 HAuCl_4 溶液加热至沸,在冷凝回流并充分搅拌的条

件下,加入 1.5-2.0mL 含有 0.01mol/L 鲁米诺和 0.01mol/L 氢氧化钠的溶液,保持沸腾并继续搅拌回流反应 30min,然后除去加热源继续搅拌 15min 以上,得到颗粒直径为 14-25nm 的纳米金溶液;

[0085] b-1. 将合成的纳米金溶液在常温下渗析 2 天,每 8 小时换一次超纯水渗析液,得到鲁米诺直接键合的纳米金;

[0086] c-1. 将 0.5mL 的 1.0mg/mL 抗体(二抗)加到用 0.1mol/L 的氢氧化钠将 pH 调至 8.0 的上述步骤 b-1 中渗析过的金胶溶液中去,在室温培育 30 分钟后,再把 5% (w/w) 的牛血清白蛋白加到溶液中不断搅拌 5 分钟,使其最终浓度为 1%,最后在 17120*g 下离心 45 分钟,然后将沉淀用含有 1% (w/w) 牛血清白蛋白的 0.1mol/L pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液溶解。即得到鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针;

[0087] (2) 纳米金修饰电极的制备

[0088] a-2. 将打磨好的裸金电极放入 2mmol/L 的 1,3' - 丙二硫醇中,在常温下浸泡 20 小时,取出后用乙醇和超纯水清洗,获得 1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极;

[0089] b-2. 将连接链霉亲和素的纳米金滴在步骤 a-2 制得的 1,3' - 丙二硫醇修饰电极上,在 4°C 暗处中放 4 小时,取出后用超纯水清洗,得到链霉亲和素 / 纳米金 / 1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极;

[0090] (3) 夹心复合物在纳米金修饰电极上的固载

[0091] a-3. 将生物素标记的一抗滴加到步骤 (2) 得到的链霉亲和素 / 纳米金 / 1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极,在 37°C 下作用 60 分钟后,用 0.02mol/L pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液清洗,得到一抗 / 生物素 / 链霉亲和素 / 纳米金 / 1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极;然后将 1% (w/w) 的牛血清白蛋白滴在一抗 / 生物素 / 链霉亲和素 / 纳米金 / 1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极,在 37°C 下作用 40 分钟,再用 0.02mol/L pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液清洗;

[0092] b-3. 将抗原作为目标分析物滴加到步骤 a-3 得到的一抗 / 生物素 / 链霉亲和素 / 纳米金 / 1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极上面,在 37°C 下作用 60 分钟,再用 0.02mol/L pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液清洗,得到抗原 / 一抗 / 生物素 / 链霉亲和素 / 纳米金 / 1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极;

[0093] c-3. 将步骤 (1) 得到的鲁米诺直接键合的纳米金标记的二抗即分析探针滴加在步骤 b-3 得到的抗原 / 一抗 / 生物素 / 链霉亲和素 / 纳米金 / 1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极上,用 0.02mol/L pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液清洗,在 37°C 下作用 60 分钟后,获得鲁米诺直接键合的纳米金标记的二抗和待测抗原进行特异性结合的修饰电极,即如图 2 所示的鲁米诺直接键合的纳米金标记的二抗 / 抗原 / 一抗 / 生物素 / 链霉亲和素 / 纳米金 / 1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极;

[0094] (4) 电致化学发光免疫测定

[0095] 将 (3) 制备的鲁米诺直接键合的纳米金标记的二抗 / 抗原 / 一抗 / 生物素 / 链霉亲和素 / 纳米金 / 1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极放入电致化学发光池中,加入含有 1mmol/L 过氧化氢的 0.02mol/L pH = 9.95 的碳酸盐底液,施加脉冲电压为 0.8V、脉冲周期为 30s、脉冲时间为 0.1s、起始电压为 0V 的双阶脉冲电压,产生化学发光,用发光仪进行检测。

[0096] 所述步骤 (3) a-3 中所述生物素标记的一抗具体可为生物素标记的羊抗人 IgG。

[0097] 所述步骤 (3) b-3 中,所述抗原具体可为人 IgG。

[0098] 所述步骤 (3) c-3 中所述鲁米诺直接键合的纳米金标记的二抗具体可为鲁米诺直接键合的纳米金标记的羊抗人 IgG。

[0099] 3. 本发明还涉及 2 所述化学发光免疫分析方法对应的试剂盒。所述试剂盒包括：

[0100] A'、上述任一种鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针；

[0101] B'、捕获探针；

[0102] C'、固相载体；

[0103] D'、底液；

[0104] E'、洗液。

[0105] 所述鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针可为鲁米诺直接键合的纳米金标记的抗体。所述免疫分析探针中的纳米金粒径可为 14-25nm, 优选为 25nm。

[0106] 所述捕获探针可为生物素标记的抗体。

[0107] 所述固相载体可为纳米金修饰的金电极。所述纳米金修饰的金电极是通过 1, 3'-丙二硫醇将纳米金组装在金电极表面。所述纳米金可为连接有链霉亲和素的纳米金。所述纳米金的粒径可为 10-38nm, 优选为 16nm。

[0108] 所述底液包括能与鲁米诺发生反应的任何试剂缓冲溶液和任何能增强化学发光的物质。所述底液具体可为含有过氧化氢的碳酸盐缓冲液, 其中碳酸盐是由碳酸钠和碳酸氢钠所组成。所述过氧化氢浓度为 1mmol/L。所述碳酸钠和碳酸氢钠浓度均为 0.02mol/L。

[0109] 所述洗液为磷酸盐缓冲液, 其组成为磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠和氯化钾。所述磷酸盐缓冲液浓度为 0.02mol/L, 其中磷酸二氢钾浓度为 0.2g/L、磷酸氢二钠浓度为 2.9g/L、氯化钠浓度为 0.8g/L、氯化钾浓度为 0.2g/L。

[0110] 本发明的分析方法和试剂盒可用于各种样品中的多种分析物的测定, 适用于临床分析、药物分析、食品安全检测、环境监测等领域。

[0111] 所述的分析物包括但不限于微生物 (如病毒、细菌、真菌)、蛋白质、抗体、抗原、生物毒素、化学毒素等。

[0112] 所述的样品包括但不限于临床样品、药物、水样品、生物样品、空气样品、食品样品和饮料样品等。

[0113] 下面实施例 1~4 以连接链霉亲和素的纳米金修饰的金电极为固相载体、连接有生物素的抗体为捕获探针、电致化学发光为检测手段测定人 IgG 为例, 阐明本发明的鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针和化学发光免疫分析方法的检测效果。

[0114] 实施例 1. 本发明的化学发光免疫探针的制备

[0115] (1) 将 100mL 0.01% (w/w) 的 HAuCl_4 溶液加热至沸, 在冷凝回流并充分搅拌的条件下, 快速加入 1.5ml 含有 0.01mol/L 鲁米诺和 0.01mol/L 氢氧化钠的溶液, 保持沸腾并继续搅拌回流反应 30min, 然后除去加热源继续搅拌 15min 以上, 得到粒径为 25nm 的纳米金溶液, 冷却到室温, 避光保存在 4℃ 下；

[0116] (2) 将步骤 (1) 合成的纳米金溶液在常温下渗析 2 天, 每 8 小时换一次超纯水渗析液, 通过渗析操作可以充分去除游离的鲁米诺及其氧化产物, 这样在纳米金中的鲁米诺分子只以和纳米金表面键合的形式存在, 即得到鲁米诺直接键合的纳米金；

[0117] (3) 将 0.5mL 的 1.0mg/mL 二抗 (羊抗人 IgG) 加到用 0.1mol/L 的氢氧化钠将 pH 调至 8.0 的上述步骤 (2) 中渗析过的金胶溶液中去, 在室温培育 30 分钟后, 再把 5% (w/w)

的牛血清白蛋白加到溶液中不断搅拌 5 分钟,使其最终浓度为 1% (w/w)。最后在 17120*g 下离心 45 分钟,以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的鲁米诺分子,然后将沉淀用含有 1% (w/w) 的牛血清白蛋白的 0.1mol/LpH = 7.4 磷酸盐缓冲液溶解,即得到鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针(鲁米诺直接键合的纳米金标记的抗体)。

[0118] 实施例 2. 夹心式免疫复合物在纳米金修饰电极上的固载

[0119] 如图 2 所示,本发明的化学发光免疫分析方法涉及的夹心式免疫复合物在纳米金修饰电极上的固载包括以下步骤:

[0120] (1) 纳米金修饰电极的制备:

[0121] A. 将打磨好的裸金电极放入 2mmol/L 的 1,3' - 丙二硫醇中,在常温下浸泡 20 小时,取出后用乙醇和超纯水清洗,获得 1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极;

[0122] B. 将 60 μ L 连接链霉亲和素的纳米金滴在步骤 A 制得的 1,3' - 丙二硫醇修饰电极上,在 4 $^{\circ}$ C 暗处中放入 4 小时,取出后用超纯水清洗,得到链霉亲和素/纳米金/1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极;

[0123] (2) 双抗夹心复合物在纳米金修饰电极上的固载:

[0124] a. 将生物素标记的一抗(羊抗人 IgG)滴加到步骤(1)得到的链霉亲和素/纳米金/1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极,在 37 $^{\circ}$ C 下作用 60 分钟后,用 0.02mol/L pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液清洗,得到一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极;然后将 60 μ l 1% (w/w) 的牛血清白蛋白滴在一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极,在 37 $^{\circ}$ C 下作用 40 分钟,再用 0.02mol/L pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液清洗。

[0125] b. 将 60 μ l 浓度分别为 7.5、10、20、30、40、50、70、90、100pg/ml 的抗原(人 IgG)滴加到步骤 a 得到的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极上面,在 37 $^{\circ}$ C 下作用 60 分钟,再用 0.02mol/L pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液清洗,得到不同浓度的人 IgG 和一抗进行特异性结合的修饰电极,即抗原/一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极;

[0126] c. 将 60 μ l 实施例 1 制备的鲁米诺直接键合的纳米金标记的二抗,即分析探针,滴加在步骤 b 得到的抗原/一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极上,用 0.02mol/L pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液清洗,在 37 $^{\circ}$ C 下作用 60 分钟后,获得鲁米诺直接键合的纳米金标记的抗体和待测抗原(人 IgG)进行特异性结合的修饰电极,即如图 2 所示的鲁米诺直接键合的纳米金标记的二抗/抗原/一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极。

[0127] 实施例 3. 电致化学发光免疫测定

[0128] 将实施例 2 得到的夹心式免疫复合物连接的纳米金修饰电极,即鲁米诺直接键合的纳米金标记的二抗/抗原/一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极,放入电致化学发光池中,加入含有 1mmol/L 过氧化氢的 0.02mol/L pH = 9.95 的碳酸盐底液,施加脉冲电压为 0.8V、脉冲周期为 30s、脉冲时间为 0.1s、起始电压为 0V 的双阶脉冲电压,产生化学发光。图 3 是分别在裸金电极、1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极、链霉亲和素/纳米金/1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极、鲁米诺直接键合的纳米金标记的二抗/抗原/一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3' - 丙二硫醇修饰的金电极上施加双阶

脉冲电压得到的化学发光随时间变化的曲线,其中待测抗原浓度为 100pg/mL。实验结果表明只有含有鲁米诺直接键合的纳米金分析探针的修饰电极才会产生电致化学发光信号,而裸金电极、1,3'-丙二硫醇修饰的金电极、链霉亲和素 / 纳米金 / 1,3'-丙二硫醇修饰的金电极无信号产生。

[0129] 图 4 为本发明的电致化学发光免疫分析方法测定人 IgG 的工作曲线,结果表明测定人 IgG 的线性范围是 7.5-100pg/mL,检测限为 1.0pg/mL。分别对浓度为 30pg/mL,50pg/mL 和 70pg/mL 的人 IgG 进行 9 次平行测定,得到其相对标准偏差分别为 4.38%,2.13%和 2.60%。

[0130] 实施例 4. 电致化学发光免疫分析方法测定实际人血清样品中的 IgG

[0131] 将本发明的电致化学发光免疫分析方法用于实际人血清样品中的 IgG 的测定,结果如表 1 所示。其回收率在 106% -118.6%之间,表明该分析方法可用于人血清样品的测定。表 2 比较了本发明的化学发光免疫分析方法与临床所用的浊度法对人血清样品中 IgG 的测定结果,其相对偏差小于 11.2%,显示了本发明的电致化学发光免疫分析方法的测定结果是可靠的。

[0132]

表 1 本发明的电致化学发光免疫分析方法测定实际人血清样品中 IgG 的回收率

样品中 IgG 浓度 (pg/mL)	加入 IgG 浓度 (pg/mL)	总 IgG 浓度 (pg/mL) (平均值±偏差; 次数=5)	回收率 (%)
11.33	50	64.32 ± 1.49	106.0
10.52	50	69.20 ± 1.97	117.4
9.74	50	67.37 ± 1.83	115.3
11.32	50	70.62 ± 1.34	118.6
10.39	50	65.17 ± 1.65	109.6

回收率 = (总 IgG 浓度 - 样品中 IgG 浓度) / 加入 IgG 浓度 × 100 %.

起始点压, 0 V; 脉冲周期, 30 s; 脉冲时间, 0.1 s; 脉冲电压, 0.8 V;

电解液组成: H₂O₂, 1.0 mM; CBS, 0.02 mM (pH 9.95)。

[0133]

表 2 本发明的电致化学发光免疫分析方法与临床方法对实际人血清样品中的 IgG 测定结果的比较

样品	临床方法 (mg/mL)	本发明方法 (mg/mL) (平均值±偏差; 次数=5)	相对偏差 (%)
1	10.62	11.33 ± 0.31	6.7
2	9.98	10.52 ± 0.69	5.4
3	10.97	9.74 ± 0.56	11.2
4	10.46	11.32 ± 0.53	8.2
5	9.63	10.39 ± 0.82	7.9

起始点压, 0 V; 脉冲周期, 30 s; 脉冲时间, 0.1 s; 脉冲电压, 0.8 V;

底液组成: H₂O₂, 1.0 mM; CBS, 0.02 mM (pH 9.95); 临床方法为浊度法。

[0134] 实施例 5. 以磁微珠为固相载体的化学发光免疫分析方法

[0135] 本发明的化学发光免疫分析方法也可以用磁微珠为固相载体, 常规的磁微珠主要为聚苯乙烯包裹的四氧化三铁的磁纳米颗粒。捕获探针可以通过任何现有连接蛋白质与磁微珠的方法结合到磁微珠上。这些现有方法包括但不限于下面例举的文献报道: Zhan, W. ; Bard, A. J. Anal. Chem. 2007, 79, 459 ; Miao, W. J. ; Bard, A. J. Anal. Chem. 2004, 76, 7109 ; Yang, S. Y. ; Lien, K. Y. ; Huang, K. J. Biosens. Bioelectron. 2008, 24, 855 ; Selvaraju, T. ; Das, J. ; Han, S. W. Biosens. Bioelectron. 2008, 23, 932 ; Zhang, R. Q. ; Hirakama, K. ; Seto, D. Talanta. 2005, 68, 231。例如, 蛋白质可以直接和磁微珠结合, 也可以通过链霉亲和素和生物素结合到磁微珠上。因此捕获探针可以直接或通过链霉亲和素和生物素结合到磁微珠上, 结合有捕获探针的磁微珠再进一步与目标分析物和分析探针结合形成夹心式免疫复合物, 用化学发光进行检测。

[0136] 也可以用纳米金修饰的磁微珠为固相载体。首先可在磁微珠表面修饰氨基 (Weizmann, Y. ; Patolsky, F. ; Katz, E. ; Willner, I. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 3452), 通过氨基可以和纳米金形成弱的共价键方式, 将纳米金结合到磁微珠表面。纳米金与捕获探针可通过任何现有连接蛋白质与纳米金的方法进行连接 (Yin, X. B. ; Qi, B. ; Sun, X. P. ; Yang, X. R. ; Wang, E. K. Anal. Chem. 2004, 77, 3525 ; Gonzalez-Garcia, M. B. ; Fernandez-Sanchez, C. ; Costa-Garcia, A. Biosens. Bioelectron. 2000, 15, 315), 如链霉亲和素和生物素, 然后进一步与目标分析物和分析探针结合形成夹心式免疫复合物, 用化学发光进行检测。

[0137] 实施例 6. 以微孔板为固相载体的化学发光免疫分析方法

[0138] 本发明的化学发光免疫分析方法也可用微孔板为固相载体, 常规的微孔板主要为聚苯乙烯材料。捕获探针可以通过任何现有连接蛋白质与微孔板的方法结合到微孔板上。这些现有方法包括但不限于下面例举的文献报道: Duan, C. F. ; Yu, Y. Q. ; Cui,

H. *Analyst*. 2008, 133, 1250 ;Piermarini, S. ;Micheli, L. ;Ammida, N. H. S. *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 1434 ;Kiening, M. ;Niessner, E. R. ;Weller, M. G. *Analyst*. 2005, 130, 1580 ;R, M. ;Cervino, C. ;Sauceda, J. C. ;Niessner, R. ;Knopp, D. *Anal. Chem.* 2009, 81, 2373。例如, 蛋白质可以直接和微孔板结合, 也可以通过链霉亲和素和生物素结合到微孔板上。因此捕获探针可以直接或通过链霉亲和素和生物素结合到微孔板上, 连接有捕获探针的微孔板再进一步与目标分析物和分析探针结合形成夹心式免疫复合物, 用化学发光进行检测。

[0139] 也可以用纳米金修饰的微孔板为固相载体。在微孔板表面先吸附一层蛋白质如牛血清白蛋白 (BSA), 通过纳米金可以和蛋白质结合的特点, 将纳米金结合到微孔板上。纳米金与捕获探针可通过任何现有连接蛋白质与纳米金的方法进行连接 (Yin, X. B. ;Qi, B. ;Sun ;X. P. ;Yang ;X. R. ;Wang ;E. K. *Anal. Chem.* 2004, 77, 3525 ;Gonzalez-Garcia, M. B. ;Fernandez-Sanchez, C. ;Costa-Garcia, A. *Biosens. Bioelectron.* 2000, 15, 315), 如链霉亲和素和生物素, 然后进一步与目标分析物和分析探针结合形成夹心式免疫复合物, 用化学发光进行检测。

[0140] 实施例 7. 以尼龙为固相载体的化学发光免疫分析方法

[0141] 本发明的化学发光免疫分析方法也可以用尼龙为固相载体, 常规的尼龙主要为聚酰胺类的尼龙。捕获探针可以通过任何现有连接蛋白质与尼龙的方法结合到尼龙上。这些现有方法包括但不限于下面例举的文献报道 :Rubtsova, M. Y. ;Kovba, G. V. ;Egorov, A. M. *Biosens. Bioelectron.* 1998, 13, 715 ;Zhang, F. H. ;Yang, S. H. ;Kang, T. Y. ;Cha, G. S. ;Nam, H. ;Meyehoff, M. E. *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 1419 ;Shah, J. ;Chemburu, S. ;Wilkins, E. ;Abdel-Hamin, I. *Electroanalysis.* 2003, 15, 1809。例如, 蛋白质可以直接和尼龙结合, 也可以通过链霉亲和素和生物素结合到尼龙上。因此捕获探针可以直接或通过链霉亲和素和生物素结合到尼龙上, 结合有捕获探针的尼龙再进一步与目标分析物和分析探针结合形成夹心式免疫复合物, 用化学发光进行检测。

[0142] 也可以用纳米金修饰的尼龙为固相载体。首先使尼龙氨基功能化 (Nan, C. F. ;Zhang, Y. ;Zhang, G. M. ;Dong, C. ;Shuang, S. M. ;Choi, M. M-F. *Enz. Microb. Technol.* 2009, 44, 249), 通过氨基可以和纳米金形成弱的共价键方式, 将纳米金结合到尼龙表面。纳米金与捕获探针可通过任何现有连接蛋白质与纳米金的方法进行连接 (Yin, X. B. ;Qi, B. ;Sun ;X. P. ;Yang ;X. R. ;Wang ;E. K. *Anal. Chem.* 2004, 77, 3525 ;Gonzalez-Garcia, M. B. ;Fernandez-Sanchez, C. ;Costa-Garcia, A. *Biosens. Bioelectron.* 2000, 15, 315), 如链霉亲和素和生物素, 然后进一步与目标分析物和分析探针结合形成夹心式免疫复合物, 用化学发光进行检测。

[0143] 实施例 8. 以玻璃为固相载体的化学发光免疫分析方法

[0144] 本发明的化学发光免疫分析方法也可以用玻璃为固相载体, 常规的玻璃主要为表面醛基化、氨基化和巯基化的玻璃。捕获探针可以通过任何现有连接蛋白质与玻璃的方法结合到玻璃上。这些现有方法包括但不限于下面例举的文献报道 :Yang, Z. J. ;Xie, Z. Y. ;Liu, H. ;Yan, F. ;Ju, H. X. *Adv. Funct. Mater.* 例如, 蛋白质可以通过链霉亲和素和生物素结合到聚合物修饰的玻璃上。因此捕获探针可以直接或通过链霉亲和素和生物素结合到玻璃上, 结合有捕获探针的玻璃再进一步与目标分析物和分析探针结合形成夹心式免疫复合

物,用化学发光进行检测。

[0145] 也可以用纳米金修饰的玻璃为固相载体。首先可在镀有金膜的玻璃表面修饰一层双巯基化合物 (Wang, Z. P. ;Hu, J. Q. ;Jin, Y. ;Yao, X. ;Li, J. H. Clin. Chem. 2006, 52, 1958 ;), 通过巯基可以和纳米金形成共价键方式, 将纳米金结合到玻璃表面。纳米金与捕获探针可通过任何现有连接蛋白质与纳米金的方法进行连接 (Yin, X. B. ;Qi, B. ;Sun ;X. P. ;Yang ;X. R. ;Wang ;E. K. Anal. Chem. 2004, 77, 3525 ;Gonzalez-Garcia, M. B. ;Fernandez-Sanchez, C. ;Costa-Garcia, A. Biosens. Bioelectron. 2000, 15, 315), 如链霉亲和素和生物素, 然后进一步与目标分析物和分析探针结合形成夹心式免疫复合物, 用化学发光进行检测。

[0146] 本发明专利并不局限于上述的具体实施方式, 此种原理可用于多种分析物的测定。任何以鲁米诺直接键合的纳米金作为发光标记物的化学发光免疫分析方法均属于本发明的保护范围, 比如改变目标分析物的连接方式、更换纳米金粒径和形状、改变电极材料、更换分析物、更换抗体、将固相载体变换为磁珠或微孔板等均属于对本专利实质相同的变通或替换。

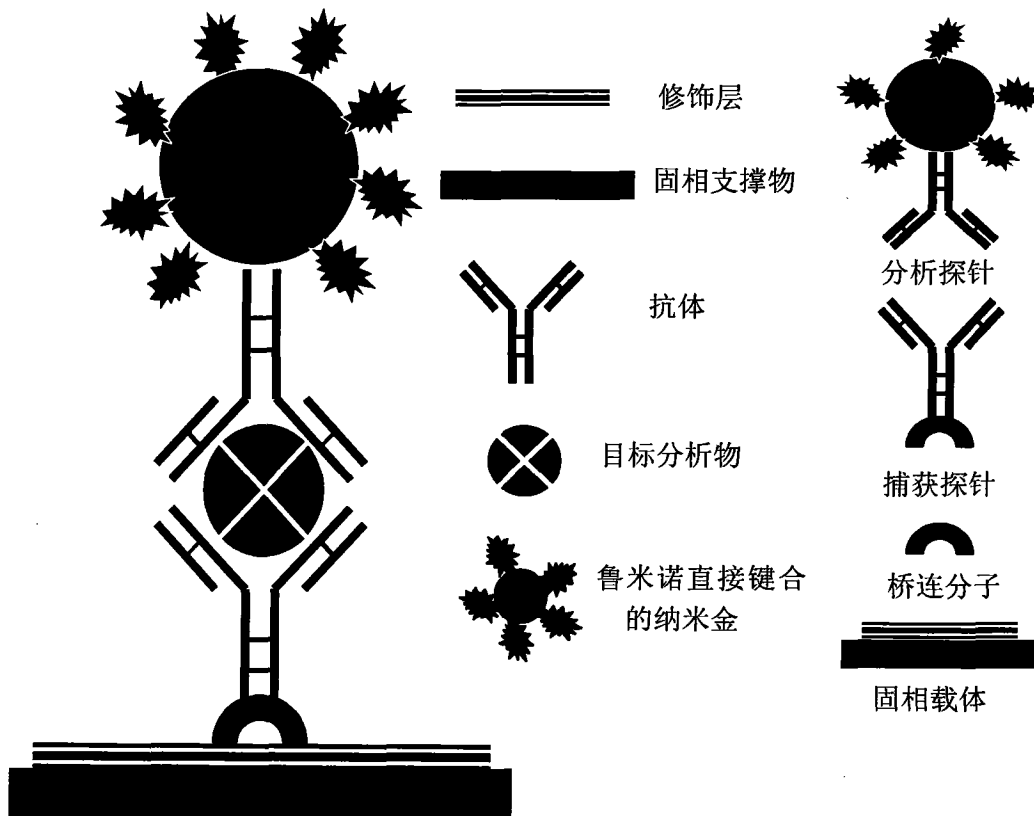


图 1

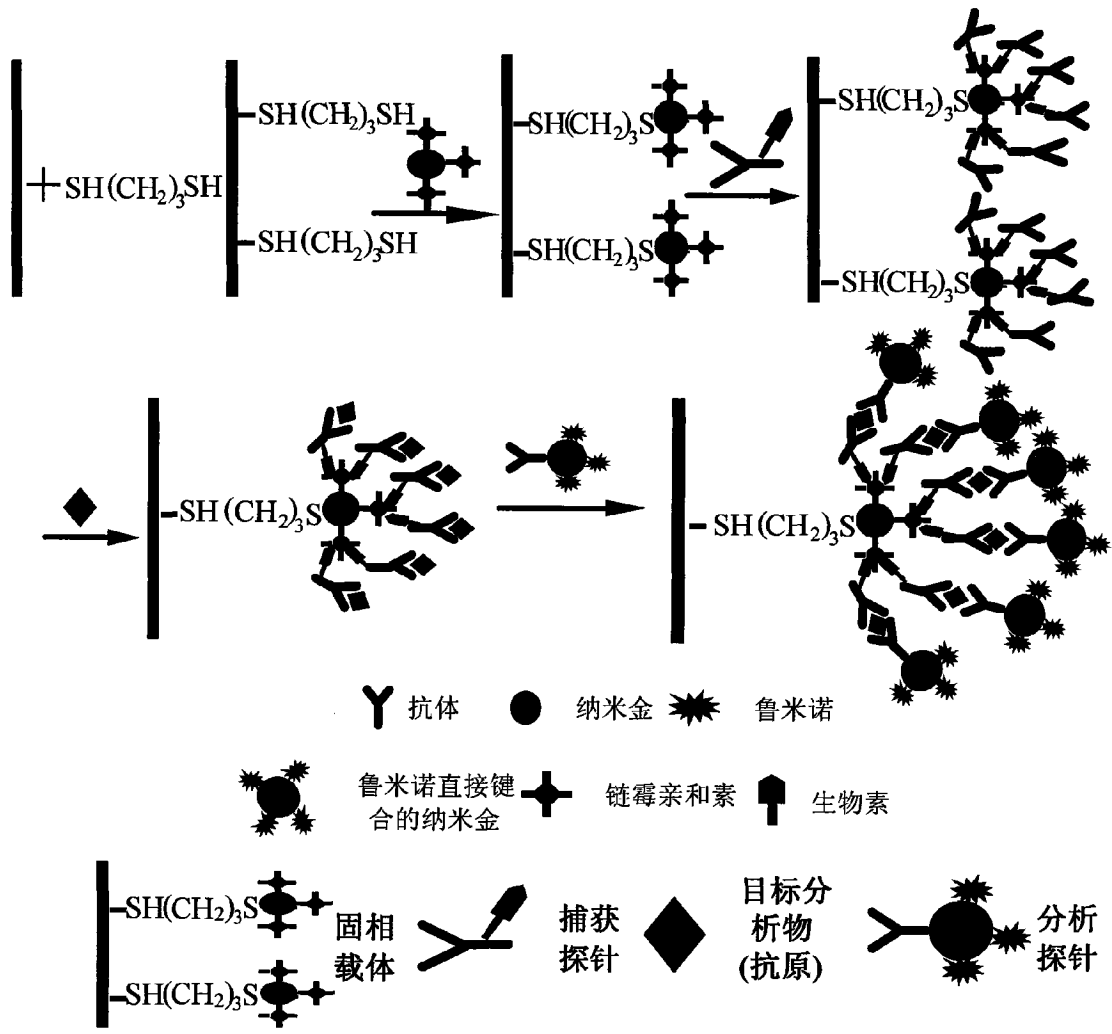


图 2

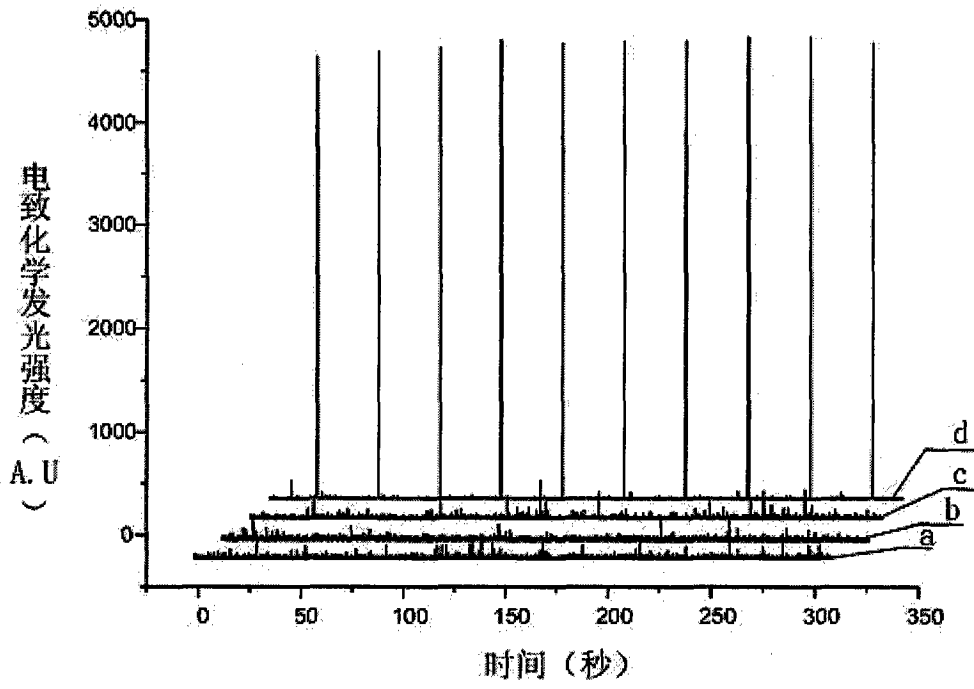


图 3

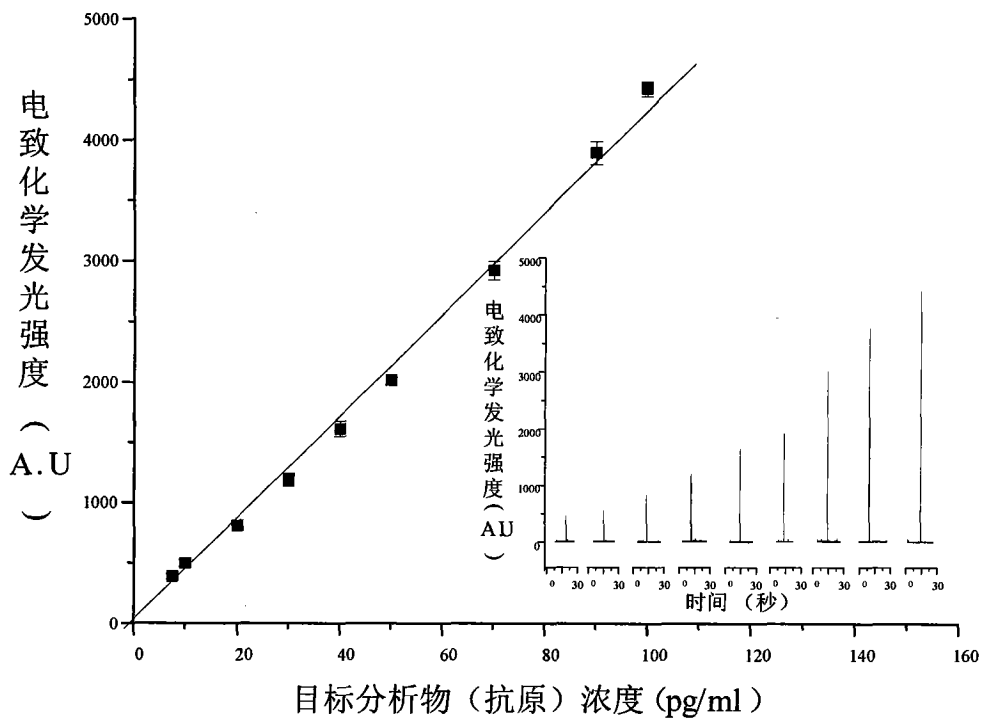


图 4

专利名称(译)	鲁米诺直接键合的纳米金在免疫分析中的应用		
公开(公告)号	CN101900723B	公开(公告)日	2013-05-08
申请号	CN200910085655.2	申请日	2009-05-27
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学技术大学		
申请(专利权)人(译)	中国科学技术大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学技术大学		
[标]发明人	崔华 田大勇		
发明人	崔华 田大勇		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/532 G01N21/66 G01N33/552		
CPC分类号	G01N33/54346 G01N33/587 G01N33/533 G01N33/553 G01N33/582		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101900723A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了鲁米诺直接键合的纳米金在免疫分析中的应用。其一是鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针，该分析探针由鲁米诺直接键合的纳米金标记的抗体所组成。其中，鲁米诺直接键合的纳米金是由鲁米诺一步还原氯金酸得到的。其二是基于该鲁米诺直接键合的纳米金免疫分析探针的化学发光免疫分析方法。其三是实施该分析方法的试剂盒。本发明的化学发光免疫分析方法具有灵敏度高(如测定人IgG的检测限可达1.0pg/mL)、线性范围宽、重现性好、操作简单、成本低廉等优点，可用于各种样品中的多种分析物的测定。在临床诊断与治疗、药物分析、食品安全检测、环境监测等领域具有重要的应用前景。

