



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111007239 A

(43)申请公布日 2020.04.14

(21)申请号 201911049073.9

(22)申请日 2019.10.31

(71)申请人 南京浦光生物科技有限公司

地址 211800 江苏省南京市浦口区江浦街  
道新浦路120号

(72)发明人 曹丹

(74)专利代理机构 南京瑞华腾知识产权代理事  
务所(普通合伙) 32368

代理人 梁金娟

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

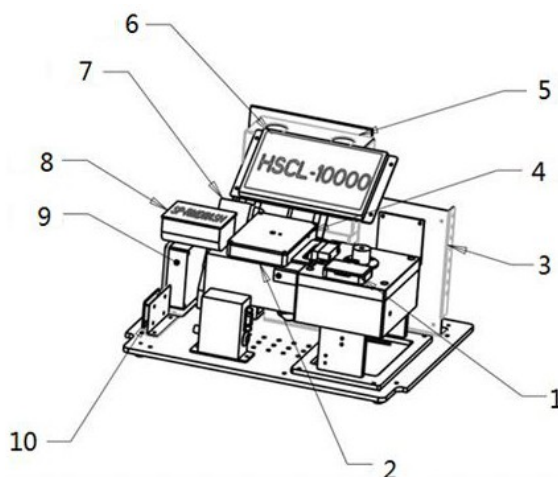
权利要求书2页 说明书10页 附图3页

### (54)发明名称

基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法及使用设备

### (57)摘要

本发明涉及化学发光免疫分析法技术领域，尤其是一种基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法及使用设备；所述分析方法中采用的检测溶液包括DNA1-偶联物、DNA2-偶联物、标记吡啶酯(AE)的DNA3和氧化石墨烯(GO)结合抗氧化剂(AOD)等；本方法为均相化学发光免疫分析方法，无需分离清洗步骤，操作简单，同时大大缩短了临床检验标本周转时间(TAT)，血液标本也不需要离心处理，可以全血上样，在5-10分钟内出检测报告；吡啶酯衍生物(AE)有别于荧光素(Cy5等)物质，能够实现抗干扰化学发光检测；该方法除了能够进行大分子蛋白和抗体的检测，还能够实现对化学小分子的免疫检测。



1. 基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法, 其特征在于: 所述分析方法中采用的检测溶液包括DNA1-偶联物、DNA2-偶联物、标记吡啶酯(AE)的DNA3和氧化石墨烯(GO)结合抗氧化剂(AOD)。

2. 根据权利要求1所述的基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法, 其特征在于: 所述分析方法的检测对象为蛋白质类物质, 所述分析方法中采用的检测溶液包含DNA1- 抗体1 偶联物、DNA2- 抗体2 偶联物、标记吡啶酯(AE)的DNA3和氧化石墨烯(GO)结合抗氧化剂(AOD)。

3. 根据权利要求1所述的基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法, 其特征在于: 所述分析方法的检测对象为抗体类物质, 所述分析方法中采用的检测溶液包括DNA1- 支架蛋白1 偶联物(ZJ-Ag1)、DNA2-支架蛋白2 偶联物(ZJ-Ag2)、标记吡啶酯(AE)的DNA3和氧化石墨烯(GO)结合抗氧化剂(AOD)。

4. 根据权利要求1所述的基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法, 其特征在于: 所述分析方法的检测对象为小分子类物质, 所述分析方法中采用的检测溶液包括DNA1- 抗体1 偶联物、DNA2-支架小分子偶联物(ZJ-XFZ)、标记吡啶酯(AE)的DNA3和氧化石墨烯(GO)结合抗氧化剂(AOD)。

5. 根据权利要求2或4中任一项所述的基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法, 其特征在于: 所述DNA1 含有54个碱基, 3' 端修饰NH<sub>2</sub>C7, 通过偶联剂二(磺基琥珀) 辛二酸(BS3)与抗体1上的氨基共价结合, 形成DNA1-抗体1偶联物。

6. 根据权利要求3所述的基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法, 其特征在于: 支架被1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)活化羧基, 与蛋白上的氨基共价结合; 所述DNA1 含有54个碱基, 3' 端修饰NH<sub>2</sub>C7, 通过偶联剂二(磺基琥珀) 辛二酸(BS3), 与支架蛋白上的氨基共价结合, 形成DNA1-支架蛋白1偶联物。

7. 根据权利要求2所述的基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法, 其特征在于: 所述DNA2 含有52个碱基, 5' 端修饰NH<sub>2</sub>C6, 通过偶联剂BS3与抗体2上的氨基共价结合, 形成DNA2- 抗体2偶联物。

8. 根据权利要求3所述的基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法, 其特征在于: 支架被1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)活化羧基, 与蛋白上的氨基共价结合; 所述DNA2 含有52个碱基, 5' 端修饰NH<sub>2</sub>C6, 通过偶联剂BS3与支架蛋白上的氨基共价结合, 形成DNA2- 支架蛋白2偶联物。

9. 根据权利要求4所述的基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法, 其特征在于: 所述DNA2 含有52个碱基, 5' 端修饰NH<sub>2</sub>C6, 通过偶联剂BS3与支架上的氨基共价结合, 形成DNA2- 支架小分子偶联物; 支架被1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)活化羧基, 与小分子上的氨基共价结合。

10. 根据权利要求1所述的基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法, 其特征在于: 所述DNA1与DNA2有7个碱基互补, 所述DNA3分别有8个碱基和DNA1、DNA2互补配对。

11. 根据权利要求1所述的基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法, 其特征在于: 所述DNA3含有21个碱基, 5' 端修饰吡啶酯衍生物(AE); DNA3从5' 端开始的3-10与DNA2从3' 端开始的3-10碱基位点的碱基完全互补; DNA3从3' 端开始的

5-12与DNA1从5'端开始的3-10碱基位点的碱基完全互补。

12. 根据权利要求1所述的基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吖啶酯化学发光的均相免疫分析方法,其特征在于:所述DNA1的序列(5'-3')如下:ACGCTGAGTTATCAACGACTTTTTTTATCACATCAGGCTCTAGCGTATGCTATTG-NH<sub>2</sub>C7;

DNA2序列(5'-3')如下:NH<sub>2</sub>C6-TACGTCCAGAACTTTACCAAACCAACACCCCTTTTTTTGTGTCGTTGGCTGAGATTTC;

DNA3序列(5'-3')如下:AE-NH<sub>2</sub>C6-CGATCTCAGCAACTCAGCAGCG。

13. 根据权利要求1所述的基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吖啶酯化学发光的均相免疫分析方法,其特征在于:所述检测溶液中DNA1-目标物1偶联物、DNA2-目标物2偶联物、修饰AE的DNA3、GO-AOD的浓度分别为:1-20nM、1-20nM、0.05-0.2μM、20U/mL。

14. 根据权利要求1所述的基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吖啶酯化学发光的均相免疫分析方法,其特征在于:所述检测方法包括以下步骤:

(1) 将检测试剂与含有待测目标蛋白质/抗体/小分子的全血//血清/血浆/其它样本在反应杯内混合并置于转子测量模块内,温育;

(2) 温育结束,转动转子测量模块内的检测孔对准光源模块,仪器通过微量泵向反应杯中加入含有碱性双氧水的激发物试剂;

(3) 光源模块中的PMT启动,进行光信号采集,并通过标准曲线换算得到浓度值,浓度值在显示模块上显示。

15. 基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吖啶酯化学发光的均相免疫分析方法的使用设备,其特征在于:包括转子测量模块、光源模块、激发物仓模块、激发物泵、激发物加热模块、显示模块和打印模块,上述各模块分别与电路板模块以及上位机软件控制模块通信连接;

转子测量模块,转子上有一到多个检测孔,检测孔有温育功能,温育时间结束,检测孔转到检测位置,光源模块的窗口与检测孔对齐,完成检测;

光源模块:由光子计数探测器和计数单元组成,光子计数探测器是由端窗光电倍增管、高压电源模块以及比较成形电路组成的具有较大敏感面积的光子计数探测器;计数单元包括计数控制电路和上位机采集软件,计数单元直接与光子计数探测器或闪烁探测器组合作为计数器使用;

激发物仓模块用于承载激发物瓶;

激发物泵为微量注射泵,激发物试剂通过管路和激发物泵注射到检测孔反应杯中,

激发物加热模块用于激发物试剂在管路中进行控温,保证检测结果的精确;

扫码模块包括射频卡扫码装置,试剂信息和标准曲线通过该装置导入上位机中;

显示模块用于显示和编辑仪器上的各个参数;

打印模块用于检测报告的输出;

电路板模块用于控制其他各模块的运行。

16. 根据权利要求15所述的基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吖啶酯化学发光的均相免疫分析方法的使用设备,其特征在于:所述设备还包括散热模块,所述散热模块用于将设备工作过程中产生的热量排出。

## 基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法及使用设备

### 技术领域

[0001] 本发明涉及化学发光免疫分析法技术领域,尤其是一种基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法及使用设备。

### 背景技术

[0002] 化学发光免疫分析(chemiluminescence immunoassay,CLIA),是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合,用于各种抗原、半抗原、小分子、抗体和药物等的分析技术。按是否存在分离清洗步骤,分为异相化学发光法和均相化学发光法。目前,在体外诊断检测领域,国内外检测产品基本都使用异相化学发光法。国外厂家包括罗氏、雅培、贝克曼、西门子、索林和希斯美康等,国内厂家包括新产业、安图、迈克、迈瑞、泽成、长光华医等。异相化学发光法依赖于物理分离,分离典型要求是反应物被固定化到一些固体载体上,以使得一些物理过程例如过滤、沉积、聚结或者磁分离可以被采用;并且还要求洗涤步骤,以便除去游离的成分。故异相化学发光法整个分析过程步骤多、仪器设备庞大、模块复杂、故障率高、检测耗时长、操作复杂、成本高,大多情况下需要专业技术人员操作专用仪器。而均相化学发光免疫分析无需分离和清洗步骤,在纯液相条件下直接进行化学发光检测,仪器设备便携模块少、故障率低、操作简便快速,适合床旁现场检测(POCT)。

[0003] 现阶段国外有西门子和珀金埃尔默两家公司使用纯态氧介导的光激化学发光产品上市,检测需要特殊的LOCI模块。LOCI技术是一步式化学发光夹心免疫检测方法,试剂中含有两种合成珠试剂和一种生物素化学的单克隆抗体。第一种珠试剂(敏感珠)包被有链霉亲和素,并含有光敏染料;第二种珠试剂(化学珠)包被另一种抗体,并含有化学发光染料;样本和化学珠及生物素化抗体进行孵育后形成夹心复合物;然后加入敏感珠,与生物素结合后形成聚集的免疫复合物;复合物在680nm光照射下其中的敏感珠会产生单线态氧,单线态氧弥散到化学珠后可引发化学发光反应,在612nm波长下测量反应所产生的化学发光信号。该方法需要激发光激发,对设备要求高,标记材料特殊,不易稳定获取。国内有科美生物和爱兴生物使用该项技术,并有相应的产品上市,产品质量还有待市场检验。光激化学发光因为需要外来激发光的激发,比真正意义上的均相化学发光要求复杂。

[0004] 邻位触击效应通过免疫反应使一对与抗体偶联的DNA间距离拉近,进而引发DNA组装、触发级联DNA组装并产生检测信号,使对蛋白质的检测转化为对DNA的检测。通过与各种DNA信号放大技术相结合,可实现对蛋白质的灵敏检测。该方法可均相进行,简单、快速、灵敏。南京大学吴洁等提出一种采用邻位触及反应调控化学发光共振能量转移的免洗均相分析技术用于检测CEA 癌胚抗原,其中使用氧化石墨烯作为能量开关对TCP0-H202-Cy5发光体系进行调节,然而这个开关调节无法达到100%有效。另外,上面的文章还提到了使用限制性内切酶循环放大系统,我们的研究发现该系统的信号放大功能有限,并且由于存在酶,不仅成本提高,稳定性也存在问题,推测其原因可能是因为 TCP0-H202-Cy5发光体系发光系统需要通过酶切将荧光素Cy5切下来才能够有效发光。

## 发明内容

[0005] 本发明的目的是：克服现有技术中的不足，提供一种简单、快速、灵敏的基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吖啶酯化学发光的均相免疫分析方法。

[0006] 本发明的另一个目的是：提供一种模块数量少，成本低，故障率大幅降低的用于基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吖啶酯化学发光的均相免疫分析方法的设备，该设备不仅能够设计成自动化设备，也能小型化便携式用于床旁检测。

[0007] 为解决上述技术问题，本发明采用的技术方案如下：

[0008] 基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吖啶酯化学发光的均相免疫分析方法，所述分析方法中采用的检测溶液包括DNA1-偶联物、DNA2-偶联物、标记吖啶酯 (AE) 的DNA3和氧化石墨烯 (GO) 结合抗氧化剂 (AOD)。

[0009] 进一步的，所述分析方法的检测对象为蛋白质类物质，所述分析方法中采用的检测溶液包含DNA1-抗体1偶联物、DNA2-抗体2偶联物、标记吖啶酯 (AE) 的DNA3和氧化石墨烯 (GO) 结合抗氧化剂 (AOD)。

[0010] 进一步的，所述分析方法的检测对象为抗体类物质，所述分析方法中采用的检测溶液包括DNA1-支架蛋白1偶联物 (ZJ-Ag1)、DNA2-支架蛋白2偶联物 (ZJ-Ag1)、标记吖啶酯 (AE) 的DNA3和氧化石墨烯 (GO) 结合抗氧化剂 (AOD)。支架可以是牛血清白蛋白 (BSA)、血蓝蛋白 (KLH)、免疫球蛋白 (IgG等)、链霉亲和素和右旋糖苷等。

[0011] 进一步的，所述分析方法的检测对象为小分子类物质，所述分析方法中采用的检测溶液包括DNA1-抗体1偶联物、DNA2-支架小分子偶联物 (ZJ-XFZ)、标记吖啶酯 (AE) 的DNA3和氧化石墨烯 (GO) 结合抗氧化剂 (AOD)。支架可以是牛血清白蛋白 (BSA)、血蓝蛋白 (KLH)、免疫球蛋白 (IgG等)、链霉亲和素和右旋糖苷等。

[0012] 进一步的，所述DNA1含有54个碱基，3' 端修饰NH<sub>2</sub>C7，通过偶联剂二 (磺基琥珀) 辛二酸 (BS3) 与抗体1上的氨基共价结合，形成DNA1-抗体1 偶联物。

[0013] 进一步的，支架被1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 活化羧基，与蛋白上的氨基共价结合；所述DNA1含有54个碱基，3' 端修饰NH<sub>2</sub>C7，通过偶联剂二 (磺基琥珀) 辛二酸 (BS3)，与支架蛋白上的氨基共价结合，形成DNA1-支架蛋白1偶联物。

[0014] 进一步的，所述DNA2含有52个碱基，5' 端修饰NH<sub>2</sub>C6，通过偶联剂 BS3与抗体2上的氨基共价结合，形成DNA2-抗体2偶联物。

[0015] 进一步的，支架被1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 活化羧基，与蛋白上的氨基共价结合；所述DNA2含有52个碱基，5' 端修饰NH<sub>2</sub>C6，通过偶联剂BS3与支架蛋白上的氨基共价结合，形成DNA2-支架蛋白2偶联物。

[0016] 进一步的，支架被1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 活化羧基，与小分子上的氨基共价结合；所述DNA2含有52个碱基，5' 端修饰 NH<sub>2</sub>C6，通过偶联剂BS3与支架上的氨基共价结合，形成DNA2-支架小分子偶联物。

[0017] 进一步的，所述DNA1与DNA2有7个碱基互补，所述DNA3分别有8个碱基和DNA1、DNA2互补配对。

[0018] 进一步的，所述DNA3含有21个碱基，5' 端修饰吖啶酯衍生物 (AE)；DNA3从5' 端开始的3-10与DNA2从3' 端开始的3-10碱基位点的碱基完全互补；DNA3从3' 端开始的5-12与DNA1从5' 端开始的3-10碱基位点的碱基完全互补。

[0019] 进一步的,所述DNA1的序列(5'-3')如下:ACGCTGAGTTATC AACGACTTTTTTTATCACA TCAGGCTCTAGCGTA TGCTATTG-NH2C7;

[0020] DNA2序列(5'-3')如下:NH2C6-TACGTCCAGAACTTTAC CAAACCACACCCTTTTTTTGTCGT TGGCTGAGAT TC;

[0021] DNA3序列(5'-3')如下:AE-NH2C6-CGATCTCAGCAACTCA GCAGCG。

[0022] 进一步的,所述检测溶液中DNA1-偶联物、DNA2-偶联物、修饰AE的 DNA3、GO-AOD的浓度分别为:1-20nM、1-20nM、0.05-0.2 $\mu$ M、20U/mL。

[0023] 进一步的,所述检测方法包括以下步骤:

[0024] (1)将检测试剂与含有待测目标蛋白质/抗体/小分子的全血//血清/血浆/其它样本在反应杯内混合并置于转子测量模块内,温育;

[0025] (2)温育结束,转动转子测量模块内的检测孔对准光源模块,仪器通过微量泵向反应杯中加入含有碱性双氧水的激发物试剂;

[0026] (3)光源模块中的PMT启动,进行光信号采集,并通过标准曲线换算得到浓度值,浓度值在显示模块上显示。

[0027] 一种用于基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法的设备,包括转子测量模块、光源模块、激发物仓模块、激发物泵、激发物加热模块、显示模块和打印模块,上述各模块分别与电路板模块以及上位机软件控制模块通信连接;

[0028] 转子测量模块,转子上有一到多个检测孔,检测孔有温育功能,温育时间结束,检测孔转到检测位置,光源模块的窗口与检测孔对齐,完成检测;

[0029] 光源模块:由光子计数探测器和计数单元组成,光子计数探测器是由端窗光电倍增管、高压电源模块以及比较成形电路组成的具有较大敏感面积的光子计数探测器;计数单元包括计数控制电路和上位机采集软件,计数单元直接与光子计数探测器或闪烁探测器组合作为计数器使用;

[0030] 激发物仓模块用于承载激发物瓶;

[0031] 激发物泵为微量注射泵,激发物试剂通过管路和激发物泵注射到检测孔反应杯中,

[0032] 激发物加热模块用于激发物试剂在管路中进行控温,保证检测结果的精确;

[0033] 扫码模块包括射频卡扫码装置,试剂信息和标准曲线通过该装置导入上位机中;

[0034] 显示模块用于显示和编辑仪器上的各个参数;

[0035] 打印模块用于检测报告的输出;

[0036] 电路板模块用于控制其他各模块的运行。

[0037] 进一步的,所述设备还包括散热模块,所述散热模块用于将设备工作过程中产生的热量排出。

[0038] 采用本发明的技术方案的有益效果是:

[0039] (1)本方法为均相免疫分析方法,操作简单,同时大大缩短了临床检验标本周转时间(TAT),无需血液标本的离心处理,可以全血上样,在5分钟左右出检测报告。

[0040] (2)吡啶酯衍生物(AE)有别于荧光素(Cy5等)物质,能够实现抗干扰化学发光检测,因为全血红细胞中的血红蛋白等成分不影响AE发光的检测,然而对荧光素的荧光检测影响很大,荧光素无法用于全血样本检测。

[0041] (3) 吡啶酯-H2O2发光体系比TCPO-H2O2-Cy5发光体系发光效率更高,检测灵敏度更高,适用于检测灵敏度要求更高的项目,除了能进行蛋白类和抗体类项目检测,还能检测化学小分子项目。

[0042] (4) 针对抗体类和小分子类项目检测时,使用支架作为载体偶联蛋白和小分子,有效地促进免疫反应的进行。支架可以是牛血清白蛋白(BSA)、血蓝蛋白(KLH)、免疫球蛋白(IgG等)、链霉亲和素和右旋糖苷等。

[0043] (5) 通过免疫反应诱发氧化石墨烯-抗氧化剂淬灭机制的开关,开关效率达到了100%,结合邻位触击效应从而释放化学发光信号,无需分离和清洗步骤。

[0044] (6) 配套检测设备要求降低,模块减少,成本降低,故障率大幅降低,不仅能够设计成自动化设备,也能小型化便携式用于床旁检测(POCT)。

## 附图说明

[0045] 下面结合附图和实施例对本发明进一步说明。

[0046] 图1为基于氧化石墨烯-抗氧化剂淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法对全血中肌钙蛋白I的检测原理图。

[0047] 图2为基于氧化石墨烯-抗氧化剂淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法对全血中乙肝表面抗体(HBsAb)的检测原理图。

[0048] 图3为基于氧化石墨烯-抗氧化剂淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法对全血中游离甲状腺素(fT4)的检测原理图。

[0049] 图4为DNA3和DNA1、DNA2互补配对图。

[0050] 图5为用于基于氧化石墨烯与抗氧化剂双重淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法的设备结构示意图。

[0051] 图中:1转子测量模块,2光源模块,3电路板模块,4激发物加热模块,5 激发物仓模块,6显示模块,7激发物泵,8打印模块,9散热模块,10扫码模块。

## 具体实施方式

[0052] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合具体附图说明和实施方式对本发明作进一步详细的描述。

[0053] 首先,此处所称的“一个实施例”或“实施例”是指可包含于本发明至少一个实现方式中的特定特征、结构或特性。在本说明书中不同地方出现的“在一个优选实施方式中”并非均指同一个实施例,也不是单独的或选择性的与其他实施例相互排斥的实施例。

[0054] 本发明涉及一种基于氧化石墨烯与抗氧化剂双重淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法及配套检测设备,如图1-3所示。

[0055] 图1针对蛋白类项目检测,其原理在于该方法的检测溶液包含DNA1-抗体1偶联物、DNA2-抗体2偶联物、标记吡啶酯(AE)的DNA3和氧化石墨烯(GO)结合抗氧化剂(AOD)。设计的DNA3分别有8个碱基和DNA1、DNA2 互补配对(图4)。当没有目标蛋白质存在时,DNA3通过 $\pi$ - $\pi$ 堆积作用吸附在GO表面,其末端标记的AE由于抗氧化剂在GO上的存在无法氧化发光,即使是少部分的化学发光也因发生化学发光共振能量转移(CRET)而被淬灭。在有目标蛋白存在时,两个抗体-DNA复合物上的抗体实现双抗夹心,使DNA1 和DNA2足够接近而形成邻位

复合物,并能与DNA3杂交。复合物几乎不会被GO吸附,偶联在石墨烯上的AOD也几乎不影响复合物上的AE发光。

[0056] 图2针对抗体类项目检测,其原理在于该方法的检测溶液包含DNA1-支架蛋白1偶联物(ZJ-Ag1)、DNA2-支架蛋白2偶联物(ZJ-Ag2)、标记吡啶酯(AE)的DNA3和氧化石墨烯(GO)结合抗氧化剂(AOD)。设计的DNA3 分别有8个碱基和DNA1、DNA2互补配对。当没有目标抗体存在时,DNA3通过 $\pi$ - $\pi$ 堆积作用吸附在GO表面,其末端标记的AE由于抗氧化剂在GO上的存在无法氧化发光,即使是少部分的化学发光也因发生化学发光共振能量转移(CRET)而被淬灭。在有目标抗体存在时,两个支架蛋白-DNA复合物上的蛋白实现夹心,使DNA1和DNA2足够接近而形成邻位复合物,并能与DNA3杂交。复合物几乎不会被GO吸附,偶联在石墨烯上的AOD也几乎不影响复合物上的AE发光。

[0057] 图3针对小分子类项目检测,其原理在于该方法的检测溶液包含DNA1-抗体1偶联物、DNA2-支架小分子偶联物(ZJ-XFZ)、标记吡啶酯(AE)的DNA3 和氧化石墨烯(GO)结合抗氧化剂(AOD)。设计的DNA3分别有8个碱基和 DNA1、DNA2互补配对。当没有目标小分子存在时,DNA1-抗体1偶联物与 DNA2-支架小分子偶联物结合,使DNA1和DNA2足够接近而形成邻位复合物,并能与DNA3杂交。复合物几乎不会被GO吸附,偶联在石墨烯上的AOD也几乎不影响复合物上的AE发光。在有目标小分子存在时,竞争结合DNA1-抗体 1偶联物,使得部分DNA1-抗体1偶联物与DNA2-支架小分子偶联物不能结合,部分DNA3通过 $\pi$ - $\pi$ 堆积作用吸附在GO表面,发光被淬灭。通过便携式 HSCL-10000化学发光仪自动温育,接着加入化学发光底物,可获得化学发光(CL)信号。基于氧化石墨烯与抗氧化剂双重调控机制,本发明构建了一种快速实现蛋白/抗体/小分子的高灵敏度、高特异性检测的平台。

[0058] 针对蛋白类和小分子类检测项目,DNA1含有54个碱基,3'端修饰NH<sub>2</sub>C7,通过偶联剂二(磺基琥珀)辛二酸(BS3),与抗体1上的氨基共价结合,形成 DNA1-抗体1偶联物。针对抗体类检测项目,支架被1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)活化羧基,与蛋白上的氨基共价结合;DNA1含有54个碱基,3'端修饰NH<sub>2</sub>C7,通过偶联剂二(磺基琥珀)辛二酸(BS3),与支架蛋白上的氨基共价结合,形成DNA1-支架蛋白1偶联物。

[0059] 针对蛋白类检测项目,DNA2含有52个碱基,5'端修饰NH<sub>2</sub>C6,通过偶联剂BS3与抗体2上的氨基共价结合,形成DNA2-抗体2偶联物。针对抗体类检测项目,支架被1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)活化羧基,与蛋白上的氨基共价结合;DNA2含有52个碱基,5'端修饰NH<sub>2</sub>C6,通过偶联剂BS3与支架蛋白上的氨基共价结合,形成DNA2-支架蛋白2偶联物。针对小分子类检测项目,支架被1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)活化羧基,与小分子上的氨基共价结合;DNA2含有52个碱基,5'端修饰NH<sub>2</sub>C6,通过偶联剂BS3与支架上的氨基共价结合,形成DNA2-支架小分子偶联物。

[0060] DNA1与DNA2有7个碱基互补(图4)。

[0061] DNA3含有21个碱基,5'端修饰吡啶酯衍生物(AE)。DNA3从5'端开始的3-10与DNA2从3'端开始的3-10碱基位点的碱基完全互补;DNA3从3'端开始的5-12与DNA1从5'端开始的3-10碱基位点的碱基完全互补,如图2所示。

[0062] DNA3通过 $\pi$ - $\pi$ 堆积作用吸附在GO表面,其末端标记的AE由于抗氧化剂的存在无法氧化发光,即使是少部分的化学发光也因发生CRET而被淬灭。

[0063] DNA1序列(5'-3'):ACGCTGAGTTATCAACGACTTTT TTTATCACATCAGGCTCTAGCGTATGCT

ATTG -NH<sub>2</sub>C7

[0064] DNA2序列(5' -3') :NH<sub>2</sub>C6-TACGTCCAGAACTTTACCA AACCACACCCTTTTTTGTGCGTTGGC TGAGATTC

[0065] DNA3序列(5' -3') :AE-NH<sub>2</sub>C6-CGATCTCAGCAACTCAGC AGCG

[0066] 抗氧化剂(AOD)种类:包括大麻二酚、维生素C、维生素E、茶多酚、谷胱甘肽等。

[0067] 氧化石墨烯偶联AOD:氧化石墨烯上的羧基通过氧化亚砷缩合剂与AOD 上羟基结合;氧化石墨烯上的羧基通过1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐活化与AOD上氨基结合。

[0068] 上述检测试剂与含有待测目标蛋白/抗体/小分子的全血//血清/血浆/其它样本混合,在HSCL-10000化学发光仪上37℃温育反应,加入化学发光底物过氧化氢和氢氧化钠,产生化学发光信号。

[0069] 上述免疫分析方法的检测步骤如下:

[0070] 1、将全血//血清/血浆/其它样本和检测试剂混合,并在37℃条件下温育5-10 分钟;

[0071] 2、加入化学发光底物,通过化学发光检测仪中PMT检测模块进行光信号采集;

[0072] 3、仪器自动调用标准曲线,从而报出样品中物质的浓度。

[0073] 实施例1:结合附图1,说明基于氧化石墨烯-抗氧化剂淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法对全血中肌钙蛋白I的检测

[0074] 1、配置检测试剂:将DNA1-抗体1偶联物、DNA2-抗体2偶联物、修饰 AE的DNA3、GO-AOD(AOD为维生素C)混合,使它们的最终浓度分别为1-20nM、1-20nM、0.05-0.2μM和20μg/ml(最优条件是10nM、10nM、0.15 μM和20μg/ml)。

[0075] 2、将50μL不同浓度的校准溶液或者含有肌钙蛋白I全血样本与200μL 检测溶液混合,置于转子检测孔内,启动温育,37℃条件下温育5-10分钟,温育结束,检测孔转到检测位置,与光源模块正对。

[0076] 3、通过电路板模块和上位机软件控制,启动激发物试剂注入反应杯步骤,激发物试剂通过激发物泵驱动,经过加热模块,最终向反应杯中加入200μL化学发光底物,并立即通过光电倍增管(PMT)检测该溶液的化学发光信号,结合计数单元,报告得到原始光子数值(RLU),检测时间3s。光子数值通过标准曲线(由扫码模块导入的)换算得到浓度值;根据记录的化学发光值(RLU),获得cTnI的校准曲线和待测样本中cTnI的浓度。最终,检测报告通过上位机上的菜单选择,并结合打印模块打印出来。散热模块在整个检测流程中一直处在运行状态,保证温控可靠。

[0077] 具体数据见表1和表2

[0078] 表1

[0079]

DNA1-抗体1偶联物 (nM)		1	5	10	20
DNA2-抗体2偶联物 (nM)		1	5	10	20
修饰 AE 的 DNA3 (uM)		0.05	0.1	0.15	0.2
GO-AOD (ug/ml)		20	20	20	20
DNA1-抗体1偶联物 (nM)		1	5	10	20
DNA2-抗体2偶联物 (nM)		1	5	10	20
校准品	cTnI (ng/ml)	RLU (发光值)	S/S0 (信噪比)	RLU (发光值)	S/S0 (信噪比)
S0	0	1860		1890	
S1	0.1	2509	1.3	3546	1.9
S2	0.5	8900	4.8	15083	8
S3	1	12028	6.5	32933	17.4
S4	10	90303	48.6	309221	163.6
S5	50	402893	216.6	1530020	809.5
S6	100	703982	378.5	3089223	1634.5

[0080] 表2

[0081]

DNA1-抗体1偶联物 (nM)		10	10
DNA2-抗体2偶联物 (nM)		10	10
修饰 AE 的 DNA3 (uM)		0.15	0.15
GO-AOD (ug/ml)		20	20
温育时间 (min)		5	10
校准品	cTnI (ng/ml)	RLU (发光值)	S/S0 (信噪比)
S0	0	2165	
S1	0.1	5647	2.6
S2	0.5	27897	12.9
S3	1	55820	25.8
S4	10	632278	292

[0082]

S5	50	3502899	1618
S6	100	7626130	3522.5

[0083] 实施例2:结合附图2,说明基于氧化石墨烯-抗氧化剂淬灭吖啶酯化学发光的均相免疫分析方法对全血中乙肝表面抗体(HBsAb)的检测

[0084] 1、配置检测试剂:将DNA1-支架蛋白1偶联物(ZJ-Ag1)、DNA2-抗体蛋白2偶联物(ZJ-Ag2)、修饰AE的DNA3、GO-AOD(AOD为维生素E)混合,使它们的最终浓度分别为1-20nM、1-20nM、0.05-0.2μM和20μg/ml(最优条件是10nM、10nM、0.15μM和20μg/ml)。支架为项目无关的免疫球蛋白IgG。

[0085] 2、将50μL不同浓度的校准溶液或者含有HBsAb全血样本与200μL检测溶液混合,置于转子检测孔内,启动温育,37℃条件下温育5分钟,温育结束,检测孔转到检测位置,与光源模块正对。

[0086] 3、通过电路板模块和上位机软件控制,启动激发物试剂注入反应杯步骤,激发物试剂通过激发物泵驱动,经过加热模块,最终向反应杯中加入200μL化学发光底物,并立即通过光电倍增管(PMT)检测该溶液的化学发光信号,结合计数单元,报告得到原始光子数值(RLU),检测时间3s。光子数值通过标准曲线(由扫码模块导入的)换算得到浓度值;根据记

录的化学发光值 (RLU)，获得HBsAb的校准曲线和待测样本中HBsAb的浓度。最终，检测报告通过上位机上的菜单选择，并结合打印模块打印出来。散热模块在整个检测流程中一直处在运行状态，保证温控可靠。

[0087] 具体数据见表3

[0088] 表3

[0089]	DNA1-支架蛋白 1 偶联物 (nM)	1	5	10	20
	DNA2-支架蛋白 2 偶联物 (nM)	1	5	10	20

[0090]	修饰 AE 的 DNA3 (uM)		0.05		0.1		0.15		0.2	
	GO-AOD (ug/ml)		20		20		20		20	
	校准品	HBsAb (mIU/ml)	RLU (发光值)	S/S0 (信噪比)	RLU (发光值)	S/S0 (信噪比)	RLU (发光值)	S/S0 (信噪比)	RLU (发光值)	S/S0 (信噪比)
	S0	0	1230		1560		1500		2385	
	S1	5	2300	1.9	2709	1.7	3876	2.6	4382	1.8
	S2	10	4683	3.8	5200	3.3	7590	5.1	8900	3.7
	S3	50	20383	16.6	26398	16.9	43040	28.7	45927	19.3
	S4	200	78038	63.4	98762	63.3	153200	102.1	156383	65.6
	S5	500	201983	164.2	230328	147.6	402834	268.6	420389	176.3
	S6	1000	351083	285.4	452108	289.8	890843	593.9	922098	386.6

[0091] 实施例3:结合附图3,说明基于氧化石墨烯-抗氧化剂淬灭吡啶酯化学发光的均相免疫分析方法对全血中游离甲状腺素 (fT4) 的检测

[0092] 1、配置检测试剂:将DNA1-抗体1偶联物、DNA2-支架小分子偶联物 (ZJ-XFZ)、修饰AE的DNA3、GO-AOD (AOD为大麻二酚) 混合,使它们的最终浓度分别为1-5nM、5-20nM、0.05-0.2μM和20μg/ml (最优条件是1nM、10nM、0.1μM和20μg/ml)。支架为项目无关的免疫球蛋白IgG。

[0093] 2、将50μL不同浓度的校准溶液或者含有fT4全血样本与200μL检测溶液混合,置于转子检测孔内,启动温育,37℃条件下温育5分钟,温育结束,检测孔转到检测位置,与光源模块正对。

[0094] 3、通过电路板模块和上位机软件控制,启动激发物试剂注入反应杯步骤,激发物试剂通过激发物泵驱动,经过加热模块,最终向反应杯中加入200μL化学发光底物,并立即通过光电倍增管 (PMT) 检测该溶液的化学发光信号,结合计数单元,报告得到原始光子数值 (RLU),检测时间3s。光子数值通过标准曲线 (由扫码模块导入的) 换算得到浓度值;根据记录的化学发光值 (RLU),获得fT4的校准曲线和待测样本中fT4的浓度。最终,检测报告通过上位机上的菜单选择,并结合打印模块打印出来。散热模块在整个检测流程中一直处在运行状态,保证温控可靠。

[0095] 具体数据见表4

[0096] 表4

[0097]

DNA1-抗体 1 偶联物 (nM)		1		5		1		5	
DNA2-支架小分子偶联物 (nM)		5		10		10		20	
修饰 AE 的 DNA3 (uM)		0.05		0.1		0.1		0.2	
GO-AOD (ug/ml)		20		20		20		20	
校准品	fT4 (pmol/L)	RLU(发光值)	信号抑制率	RLU(发光值)	信号抑制率	RLU(发光值)	信号抑制率	RLU(发光值)	信号抑制率
S0	0	1303994	0%	2649374	0%	1690283	0%	3420049	0%
S1	1.3	1230494	5.60%	2404467	9.20%	1530384	9.50%	3348997	2.10%
S2	11.5	1092334	16.20%	2048384	22.70%	1203894	28.80%	3084874	9.80%
S3	22.7	872391	33.10%	1738435	34.40%	730873	56.80%	2639478	22.80%
S4	50	673093	48.40%	1305983	50.70%	453762	73.20%	2048871	40.10%
S5	100	540239	58.60%	980834	63%	234089	86.20%	1673234	51.10%
S6	155	452183	65.30%	742842	72%	143989	91.50%	1204941	64.80%

[0098] 实施例1-3中的分析方法所使用的设备,具体包括以下功能模块:转子测量模块1、光源模块2、激发物仓模块5、激发物泵7、激发物加热模块4、显示模块6和打印模块8,上述各模块分别与电路板模块3以及上位机软件控制模块通信连接;

[0099] 光源模块2:外购标准组合件,日本滨松公司的光子计数探测器和计数单元组成,光子计数探测器是由端窗光电倍增管、高压电源模块以及比较成形电路组成的具有较大敏感面积的新一代光子计数探测器;计数单元包括计数控制电路和上位机采集软件,计数单元可直接与光子计数探测器或闪烁探测器组合作为计数器使用。

[0100] 转子测量模块1:转子上有一到多个检测孔,检测孔有温育功能(自带加热装置),温育时间结束,检测孔转到检测位置,光源模块2的窗口与检测孔对齐,完成检测。

[0101] 激发物仓模块5:用于承载激发物瓶。

[0102] 激发物泵7:微量注射泵,激发物试剂通过管路和激发物泵7注射到检测孔反应杯中。

[0103] 激发物加热模块4:激发物试剂在管路中进行控温,保证检测结果的精确。

[0104] 显示模块6:液晶显示屏结合上位机软件,用于显示和编辑仪器上的各个参数。

[0105] 打印模块8:打印机,检测报告的输出。

[0106] 散热模块9:静音风扇,将热风吸出,冷风从底盘和对面吸入。

[0107] 扫码模块10:射频卡扫码装置,试剂信息和标准曲线通过该装置导入上位机中。

[0108] 电路板模块3:两块电路板,控制其他各模块的运行。

[0109] 各模块的衔接流程如下:手动加完试剂和样本(全血)的塑料反应杯被放入到转子检测孔,启动温育,温育结束,检测孔转到检测位置,与光源模块2 正对,通过电路板模块3和上位机软件控制,启动激发物试剂注入反应杯步骤,激发物试剂通过激发物泵7驱动,经过加热模块,最终到反应杯中;此时,光源模块2中的PMT启动,结合计数单元,报告得到原始光子数值(RLU),光子数值通过标准曲线(由扫码模块10导入的)换算得到浓度值;最终,检测报告通过上位机上的菜单选择,并结合打印模块8打印出来。散热模块9在整个检测流程中一直处在运行状态,保证温控可靠。

[0110] 综上所述:本发明中使用氧化石墨烯的基础上添加了抗氧化剂类物质,抗氧化剂被偶联在氧化石墨烯上,开关调节作用几乎达到了100%,而且吡啶酯-H2O2发光体系比TCP0-H2O2-Cy5发光体系发光效率更高,检测灵敏度更高,适用于检测灵敏度要求更高的项

目,除了能进行蛋白类和抗体类项目检测,还能检测小分子项目。再者,本发明无需酶切,吡啶酯在含有DNA的免疫复合物中一样能够有效发光,这样保证了整个反应体系更简单,易于产业化。

[0111] 以上述依据本发明的理想实施例为启示,通过上述的说明内容,相关工作人员完全可以在不偏离本项发明技术思想的范围内,进行多样的变更以及修改。凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。本项发明的技术性范围并不局限于说明书上的内容,必须要根据权利要求范围来确定其技术性范围。

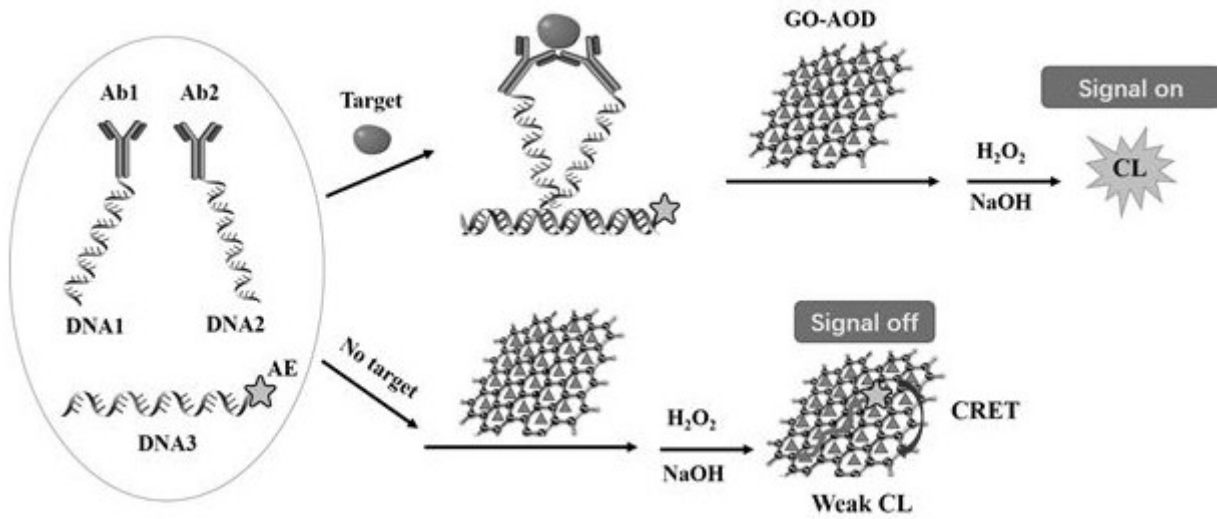


图1

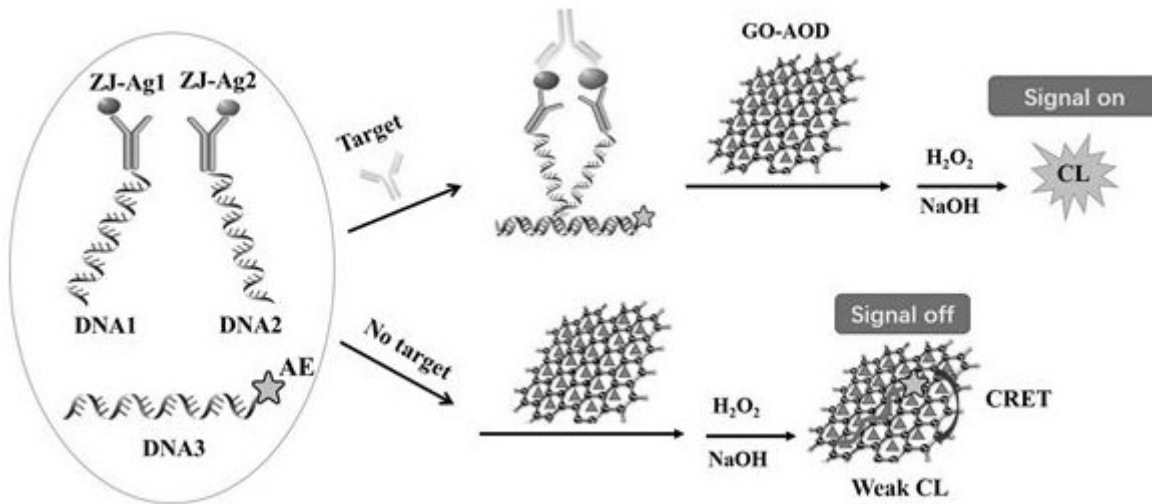


图2



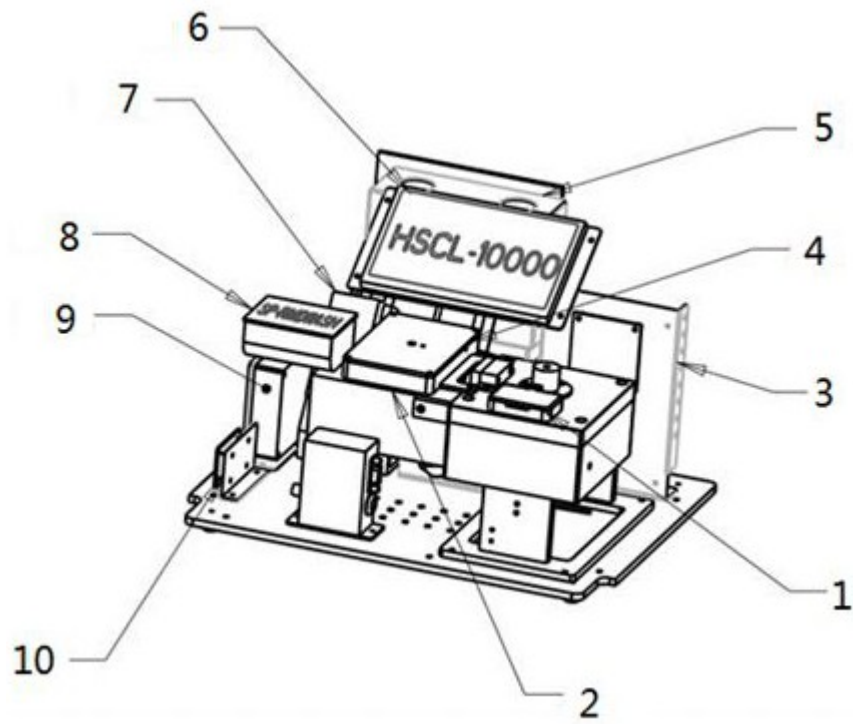


图5

专利名称(译)	基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吖啶酯化学发光的均相免疫分析方法及使用设备		
公开(公告)号	<a href="#">CN111007239A</a>	公开(公告)日	2020-04-14
申请号	CN201911049073.9	申请日	2019-10-31
[标]发明人	曹丹		
发明人	曹丹		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/5302		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及化学发光免疫分析法技术领域，尤其是一种基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吖啶酯化学发光的均相免疫分析方法及使用设备；所述分析方法中采用的检测溶液包括DNA1-偶联物、DNA2-偶联物、标记吖啶酯（AE）的DNA3和氧化石墨烯（GO）结合抗氧化剂（AOD）等；本方法为均相化学发光免疫分析方法，无需分离清洗步骤，操作简单，同时大大缩短了临床检验标本周转时间（TAT），血液标本也不需要离心处理，可以全血上样，在5-10分钟内出检测报告；吖啶酯衍生物（AE）有别于荧光素（Cy5等）物质，能够实现抗干扰化学发光检测；该方法除了能够进行大分子蛋白和抗体的检测，还能够实现对化学小分子的免疫检测。

