



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102565381 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 18

(21) 申请号 201010591472. 0

(22) 申请日 2010. 12. 08

(73) 专利权人 中国科学院生态环境研究中心

地址 100085 北京市海淀区双清路 18 号

(72) 发明人 郭良宏 黄荣富 赵利霞

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

代理人 周国城

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 21/66 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101900723 A, 2010. 12. 01, 权利要求 1-34, 实施例 1-3 以及说明书附图 1-3 幅.

WO 96/21154 A1, 1996. 07. 11, 全文.

CN 101458215 A, 2009. 06. 17, 全文.

王辉 等. 纳米金修饰电极和探针载体的 DNA 电化学发光分析方法研究. 《陕西师范大学学报

(自然科学版)》. 2006, 第 34 卷 (第 4 期), 69-72.

Jianguo Bai et al.. [Ru(bpy)₂(dcbpy) NHS] Labeling/Aptamer-Based Biosensor for the Detection of Lysozyme by Increasing Sensitivity with Gold Nanoparticle Amplification. 《Chem. Asian J. 》. 2008, (第 3 期), 1935-1941.

张军瑞 等. 电化学发光免疫检测技术研究进展. 《分析化学评述与进展》. 2010, 第 38 卷 (第 8 期), 1219-1226.

Dayong Tian et al.. Ultrasensitive electrochemiluminescence immunosensor based on luminol functionalized gold nanoparticle labeling. 《Biosensors and Bioelectronics》. 2010, 第 25 卷 2290-2295.

审查员 周洋

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

导电微粒子介导电化学发光信号的免疫检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种导电微粒子介导电化学发光信号的免疫检测方法,包括:a) 以一种具有电化学发光活性的导电材料制成微粒子,在微粒子表面固定针对待测物的抗体分子;b) 在非电化学发光活性的电极上固定能与 a) 步中抗体分子形成二元免疫复合物的抗原分子,或固定能与 a) 步中抗体分子和待测物形成三元夹心免疫复合物的抗体分子;c) 加入待测物后,微粒子通过特异性的抗原-抗体免疫反应,在电极表面形成免疫复合物;d) 在有电化学发光物质和共反应物存在时,向电极施加电压,在微粒子表面产生电化学发光信号,进而对待测物进行定量测量。本发明具有背景低、信噪比高等优点,可以实现高灵敏度检测待测物的电化学发光免疫分析方法。

1) 制备微粒子



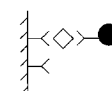
2) 抗体在微粒子上固定



3) 抗原或抗体在电极上固定



4) 加入待测物



5) 加入发光剂/共反应剂, 信号测量

1. 一种导电微粒子介导电化学发光信号的免疫检测方法,其特征在于:利用具有生物特异性结合反应性能的导电微粒子作为惰性电极的活化剂,使标记物正常发光,产生电化学发光信号;包括步骤:

a) 以一种具有电化学发光活性的导电材料制成微粒子,在微粒子表面固定针对待测物的抗体分子;

b) 在一个非电化学发光活性的电极上,固定能与 a) 步中抗体分子形成二元免疫复合物的抗原分子,或固定能与 a) 步中抗体分子和待测物形成三元夹心免疫复合物的抗体分子;

c) 加入待测物后,微粒子通过特异性的抗原-抗体免疫反应,在电极表面形成免疫复合物;

d) 在有电化学发光物质和共反应物存在时,向上述电极施加电压,在微粒子表面产生电化学发光信号,进而对待测物进行定量测量。

2. 如权利要求 1 所述的电化学发光信号的免疫检测方法,其特征在于:所述微粒子的尺寸是微米级或纳米级;微粒子的形状是圆形、椭圆形或棒状。

3. 如权利要求 1 所述的电化学发光信号的免疫检测方法,其特征在于:所述具有电化学发光活性的导电材料,为金、铂金材料,或碳材料。

4. 如权利要求 1 所述的电化学发光信号的免疫检测方法,其特征在于:所述的待测物是有机化合物。

5. 如权利要求 4 所述的电化学发光信号的免疫检测方法,其特征在于:所述的有机化合物是核苷酸、核糖核酸、脱氧核糖核酸、单糖、多糖、氨基酸、多肽或蛋白质。

6. 如权利要求 1 所述的电化学发光信号的免疫检测方法,其特征在于:所述非电化学发光活性的电极,是氧化铟锡金属氧化物电极,或镍金属电极。

7. 如权利要求 1 所述的电化学发光信号的免疫检测方法,其特征在于:所述电化学发光物质通过化学方法固定在导电微粒子的表面。

8. 如权利要求 1 所述的电化学发光信号的免疫检测方法,其特征在于:所述电化学发光物质和共反应物,存在于检测溶液中。

导电微粒子介导电化学发光信号的免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及电化学发光免疫检测技术领域,是一种导电微粒子介导电化学发光信号的免疫检测方法。

背景技术

[0002] 目前在生物化学和生物物质中,对于痕量待测物包括环境污染物、药物、激素、抗体、核酸等的高灵敏度定量筛选和检测已经成为广大研究工作者和临床工作者关注的焦点之一。为了实现痕量待测物的高特异性检测,各种基于生物特异性反应如抗原-抗体技术、核酸杂交技术、蛋白-配体技术等不同生物化学方法和体系日益发展起来,这种体系可以通过在生物分子上标记不同标记物进行定量检测。例如,最初使用 ^{125}I 作为标记物,通过放射性信号测量进行检测定量。这些方法精密度高,测定可靠,但由于放射性元素的使用,需要建立特殊的实验室,否则对人体造成很大的伤害。另外, ^{125}I 有一定的半衰期。为了克服这些缺点,后来发展了使用荧光物质如 FITC 等作为标记物,采用生物荧光的方法进行检测。但其灵敏度受到了限制。后来在 20 世纪 90 年代,Leland 等人建立了电化学发光反应系统之后,以电子得失过程中的电位差做能量激发源的电化学发光分析相应建立。

[0003] 电化学发光 (ECL) 是指由电化学反应引起的化学发光过程。在电极上施加一定的电压或电流时,电极上发生电化学反应,在电极反应产物之间、或电极反应产物与溶液中某种组分之间发生化学反应而产生激发态,当激发态返回到基态时产生发光现象。电化学发光的现象很早就被发现,运用电化学发光进行检测分析的文献报道直至 80 年代初才出现,90 年代开始用于试剂的临床检测中。从整体上讲,电化学发光包括了电化学和化学发光两个过程,故是化学发光的一种发展,但同时与化学发光又有一定的区别和其独特的优势:一般的化学发光生物分析的标记物是化学发光反应催化酶(如过氧化物酶、碱性磷酸酶等)或化学发光分子(如鲁米诺、吖啶酯等),其发光强度受周围环境的影响较大,而且稳定性不高,特别是生物酶。另外,在生物特异性检测时,必须分离游离和结合相,操作步骤较多。而电化学发光免疫分析一般采用联吡啶钌 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 为标记物, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 在三丙胺阳离子自由基($\text{TPA}^{\cdot+}$)的催化及三角形脉冲电压激发下,只需毫秒内就可发出稳定的光。 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 在发光过程中的再循环利用大大提高了分析的灵敏度;无需将结合相和游离相分开,从而使检测步骤大大简化;小分子的金属配合物作为标记物,稳定性高。因此,电化学发光生物分析有其突出的优点:标记物稳定,灵敏度高,可实现多元检测,可实现均相免疫分析,可实现全自动化。ECL 具有更好的发展趋势。

[0004] 目前报道的电化学发光生物分析方法,主要是将生物分子通过各种不同的技术固定在具有较高电化学发光活性的金、铂金等金属电极或碳、玻碳等非金属电极表面,然后通过特异性结合反应,实现对待测物的电化学发光检测。但是,由于用于电化学发光检测的共反应物 TPA 在上述电极上都能产生少量的发光,采用这种技术具有无法克服的背景光,因而仍然无法满足痕量物质的检测要求。

发明内容

[0005] 本发明的目的是公开一种导电微粒子介导电化学发光信号的免疫检测方法,通过克服现有技术中的背景发光问题,建立一种可以实现高灵敏度检测的新型电化学发光免疫分析方法,该方法背景低、信噪比高,可满足痕量物质的检测要求。

[0006] 为达到上述目的,本发明的技术解决方案是:

[0007] 一种导电微粒子介导电化学发光信号的检测方法,其利用具有生物特异性结合反应性能的导电微粒子介导电化学发光信号;包括步骤:

[0008] a) 以一种具有电化学发光活性的导电材料制成微粒子,在微粒子表面固定针对待测物的抗体分子;

[0009] b) 在一个非电化学发光活性的电极上,固定能与 a) 步中抗体分子形成二元免疫复合物的抗原分子,或固定能与 a) 步中抗体分子和待测物形成三元夹心免疫复合物的抗体分子;

[0010] c) 加入待测物后,微粒子通过特异性的免疫结合反应,在电极表面形成抗原-抗体免疫复合物;

[0011] d) 在有电化学发光物质和共反应物存在时,向上述电极施加电压,在微粒子表面产生电化学发光信号,进而对待测物进行定量测量。

[0012] 所述的电化学发光信号的检测方法,其所述微粒子的尺寸是微米级或纳米级;微粒子的形状是圆形、椭圆形或棒状。

[0013] 所述的电化学发光信号的检测方法,其所述具有电化学发光活性的导电材料,为金、铂金材料,或碳材料。

[0014] 所述的电化学发光信号的检测方法,其所述的待测物是有机化合物、核苷酸、核糖核酸、脱氧核糖核酸、单糖、多糖、氨基酸、多肽、或蛋白质。

[0015] 所述的电化学发光信号的检测方法,其所述非电化学发光活性的电极,是氧化铟锡的金属氧化物电极,或镍金属电极。

[0016] 所述的电化学发光信号的检测方法,其所述电化学发光分子通过化学方法固定在导电微粒子的表面。

[0017] 所述的电化学发光信号的检测方法,其所述电化学发光物质和共反应物,存在于检测溶液中。

[0018] 本发明与现有的其他方法相比具有以下优点:

[0019] 1) 目前流行的电化学发光免疫方法,均使用具有电化学发光活性的材料作为电极,如金,玻碳电极等。在此类电极上进行检测,共反应物 TPA 的背景发光较高。本发明使用了非电化学发光活性材料如氧化铟锡或镍作为电极,大大降低了 TPA 的背景发光。由于微粒子使用具有电化学发光活性的导电材料,特异性免疫反应发生后电化学发光信号的检测不受电极材料的影响。

[0020] 2) 在目前流行的电化学发光免疫检测方法中,必须事先通过复杂的化学反应将电化学发光信号分子标记在生物分子上,然后进行免疫反应。本发明由于使用了非电化学发光活性材料作为电极,可以将电化学发光信号分子放在检测溶液中,而不产生背景发光。因此,本发明免去了繁琐的标记步骤。

[0021] 3) 在目前流行的电化学发光免疫检测方法中,标记在生物分子上的电化学发光信

号分子的数目有限,一般在 10 个以下,因而产生的电化学发光信号有限。在本发明中,电化学发光信号分子可以固定在微粒子表面。由于微粒子的表面积比较大,可以固定大量的信号分子,每个微粒子上固定的信号分子数目可以高达几十甚至几百个。由此提高了检测信号的强度,进而提高了方法的灵敏度和动态范围。

附图说明

[0022] 图 1 本发明的导电微粒子介导电化学发光信号的免疫检测方法原理图;

[0023] 图 2 本发明的导电微粒子介导电化学发光信号的免疫检测方法流程图;

[0024] 图 3 合成的粒径为 21nm 的金纳米颗粒的透射电子显微镜照片;

[0025] 图 4 结合在氧化铟锡 ITO 电极表面的粒径为 21nm 的金纳米颗粒的扫描电子显微镜照片;

[0026] 图 5 不同电极在 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /三丙胺体系中的电化学发光信号曲线图,其中,曲线(a)是结合了纳米金的氧化铟锡 ITO 电极曲线;曲线(b)是没有结合纳米金的氧化铟锡 ITO 电极曲线。

具体实施方式

[0027] 前期科研工作发现,在氧化铟锡、镍等工作电极上,共反应物 TPA 不能发生电化学氧化反应,因此不产生背景发光信号,与电化学发光分子共存时也不产生电化学发光特异信号。基于上述原理,本发明提出了一种利用具有生物亲和反应性能的导电微粒子介导电化学发光的检测方法。本发明方法通过特异性的生物亲和反应,将具有电化学发光活性的导电微粒子(金、铂金、碳等)引入到没有电化学发光活性的电极(氧化铟锡、镍等)上,使电极得到活化。在加入电化学发光物质和共反应物后,能在微粒子表面产生电化学发光信号,进而对待测物进行定量测量。当待测物质不存在时,特异性生物结合反应不发生,微粒子不会引入到电极上。由于电极材料没有电化学发光活性,即使有电化学发光分子和共反应物存在,发光强度也非常低,因此检测背景非常低。而当待测物质存在时,微粒子通过特异性生物结合反应被引入到电极上。虽然电化学发光分子和共反应物在非电化学发光活性的电极上不产生电化学发光信号,但它们在活性的导电微粒子上产生电化学发光信号。简而言之,由于在非电化学发光活性的电极表面进行生物亲和反应,背景信号得到有效抑制;通过生物特异性反应引入高活性的电化学发光材料作为电极反应界面,改善了电化学发光行为特征,提高了分析的灵敏度。与现有的其他电化学发光分析方法相比,该方法具有背景低、信噪比高等优点。目前国内外还没有采用这种方法的科研文献和专利。

[0028] 图 1 为本发明的导电微粒子介导电化学发光信号的免疫检测方法原理图。以夹心免疫检测方式为例,其中,1:非电化学发光活性的电极(如氧化铟锡);2:能够特异性结合待测物的抗体;3:待测物;4:固定在微粒子表面、能够与 2 和待测物形成三元夹心免疫复合物的抗体;5:有电化学发光活性的微粒子。

[0029] 本发明方法在实施过程中使用的试剂包括以下几种成分:固定有抗原或抗体生物分子的微粒子,固定有抗体或抗原生物分子的电极,待测物质,以及可以产生电化学发光信号的信号分子和共反应物。使用的装置包括恒电位仪和弱光检测器(光电倍增管 PMT 或 CCD 成像仪等)。待测物质、固定有生物分子的微粒子和固定有生物分子的电极在一定条件

下孵育一段时间后,可以形成一种特异性的免疫复合物。电极清洗后,加入电化学发光信号分子和共反应物,通过恒电位仪向电极施加电压,可在产生电化学发光信号。根据电化学发光信号的强度对待测物质进行定量分析。

[0030] 以氧化铟锡 ITO 电极为非电化学发光活性电极,金纳米颗粒为电化学发光活性微粒子,亲和素 (avidin) - 抗 avidin 抗体的特异性免疫结合反应为例,来说明本发明方法的具体实施流程,参见图 2 所示:

[0031] (1) 粒径为 21nm 的金纳米颗粒的合成:

[0032] 用于合成纳米金的所有玻璃仪器均在王水 ($\text{HNO}_3 : \text{HCl} = 1 : 3, \text{V/V}$) 中彻底浸泡 24 小时,然后用超纯水清洗,100℃烘干 2-3 小时备用。简而言之,100mL 0.01% 的 HClO_4 回流加热至沸腾后,加入 1% 的柠檬酸钠 1.5mL;继续加热搅拌沸腾 15min,冷却至室温后加入适量高纯水至溶液体积为 100mL,4℃保存备用。图 3 为合成的金纳米颗粒的透射电子显微镜照片,粒径大约为 21nm。

[0033] (2) 纳米金修饰 ITO 电极的电化学发光响应:

[0034] 将裸 ITO 电极经过硅烷化处理,即:首先将 ITO 电极在 1% 氨水,80℃回流 1h,再用大量的纯水清洗 (5min,三次),烘干。再将其浸入 2% (V/V) 氨基硅烷化试剂 (3-氨基丙基-三乙氧基硅烷) 的无水甲苯溶液中室温缓慢振荡反应一定时间:反应完成后取出,清洗除去表面非特异吸附的硅烷试剂。接下来将 (1) 步中合成的纳米金滴涂在电极表面,利用 Au-NH_2 键将纳米金固定在 ITO 电极表面。图 4 即为纳米金修饰 ITO 电极的扫描电子显微镜图。

[0035] 将此修饰有纳米金的 ITO 电极在 0.1M 三丙胺和 $1 \mu\text{M}$ 的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶液中进行测定,并与未修饰纳米金的裸 ITO 电极进行比较。电化学装置为 CHI 660B 电化学分析仪 (上海辰华仪器公司),采用的三电极体系为:修饰了纳米金的 ITO 或裸 ITO 为工作电极, Ag/AgCl 电极为参比电极 (3MKCl),铂片为辅助电极,工作电极接触面积为 0.25cm^2 。电化学发光信号使用光电倍增管 (日本滨松,型号 H9306-03) 转化为电信号,利用 CHI 660B 电化学分析仪对产生的电信号进行辅助记录,以电压方式输出,电化学发光检测在密闭的暗箱中进行。结果如图 5 所示:不同电极在 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/$ 三丙胺体系中的电化学发光信号曲线,曲线 (a) 是结合了纳米金的氧化铟锡 ITO 电极曲线;曲线 (b) 是没有结合纳米金的氧化铟锡 ITO 电极曲线。测量条件: $1 \mu\text{M}$ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, 0.1M 三丙胺, 150mM 磷酸缓冲液, pH 7.4。参比电极: Ag/AgCl (3M KCl), 电压扫速: 100mV/s。

[0036] (3) 抗 avidin 抗体在金纳米颗粒上的固定:

[0037] 用 0.1mol/L K_2CO_3 分别将上述合成的金纳米颗粒和抗 avidin 抗体溶液的 pH 调至 9.0,电磁搅拌抗体溶液,加入金纳米颗粒溶液,继续搅拌 10min,加入 1% 聚乙二醇 (分子量 20KD) 作为稳定剂,以防止抗体与金颗粒聚合发生沉淀。将此纳米金-抗体结合物在 4℃重力 14000G 离心 1h,仔细吸去上层清液,将沉淀物用含有 0.1% 聚乙二醇的 5mM 硼酸钠溶液 (pH = 8.8) 重新悬浮。重复上述离心、分散步骤以去除溶液中残留的抗体。

[0038] (4) 免疫反应步骤:

[0039] 将氧化铟锡 (ITO) 电极分别用洗涤剂 (15min),纯水 (5min,两次),丙酮 (5min),异丙醇 (5min) 和纯水 (10min,三次) 超声清洗,置于烘箱 50℃烘干,切割成 $2.5 \times 0.5\text{cm}^2$ 的片。吸取 $10 \mu\text{L}$ 浓度为 0.25mg/mL 的 avidin (20mM PB, pH = 7.4) 溶液,将其均匀铺展到上

述 ITO 电极表面,溶液接触面积为 $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$ 。反应一小时后,电极用水摇洗 5 分钟,氮气吹干。吸取 $10 \mu\text{L}$ 上述制备的纳米金-抗体复合物溶液均匀涂敷在固定了 avidin 的电极表面, 37°C 反应 2h 后,用 20mM PBT (0.05% Tween 20, $\text{pH} = 7.4$) 洗剂三次,氮气吹干。

[0040] (5) 电化学发光信号的检测

[0041] 电化学发光信号检测在 0.1M 三丙胺和 $1 \mu\text{M}$ 的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 溶液中 ($\text{pH} 7.4$, 150mM 磷酸缓冲液) 进行。电化学装置为 CHI 660B 电化学分析仪 (上海辰华仪器公司), 采用的三电极体系为: 经过免疫反应后的氧化铟锡电极 (ITO) 为工作电极, Ag/AgCl 电极为参比电极 (3M KCl), 铂片为辅助电极, 工作电极接触面积为 0.25 cm^2 。电化学发光信号使用光电倍增管 (日本滨松, 型号 H9306-03) 转化为电信号, 利用 CHI 660B 电化学分析仪对产生的电信号进行辅助记录, 以电压方式输出, 电化学发光检测在密闭的暗箱中进行。

[0042] 本发明方法通过特异性的生物亲和反应, 将具有电化学发光活性的导电微粒子引入到没有电化学发光活性的电极上, 使电极得到活化。在加入电化学发光物质和共反应物后, 能在微粒子上产生电化学发光信号, 进而对待测物进行定量测量。与现有的其他电化学发光分析方法相比, 该方法具有背景低、信噪比高等优点, 可以用于环境化学污染物、药物、激素、抗体、蛋白质、核酸等各类物质的高灵敏检测。

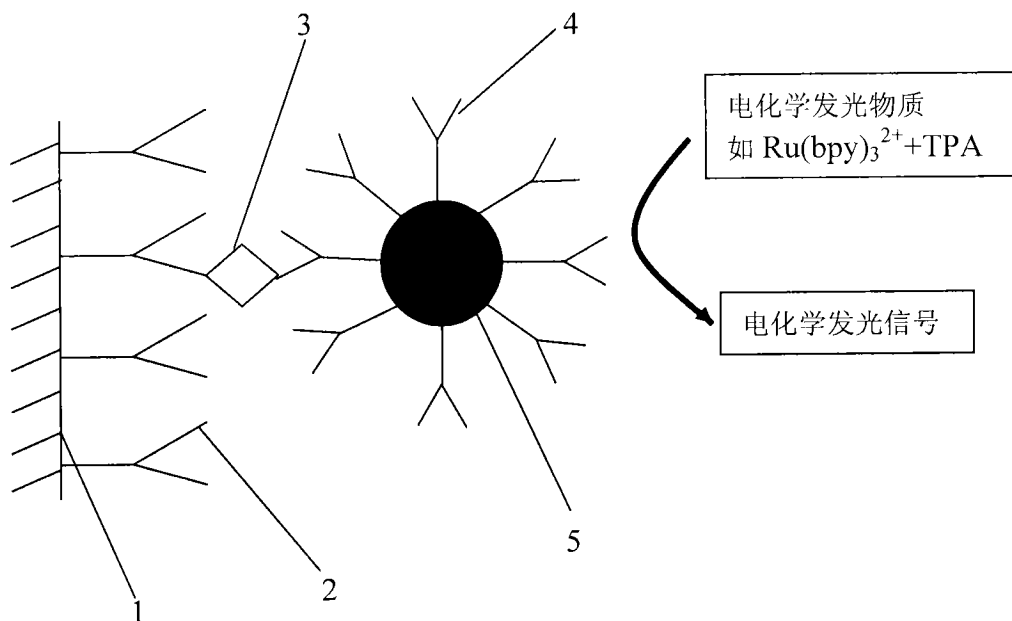


图 1

1) 制备微粒子



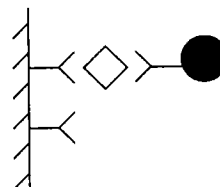
2) 抗体在微粒子上固定



3) 抗原或抗体在电极上固定



4) 加入待测物



5) 加入发光剂/共反应剂, 信号测量

图 2

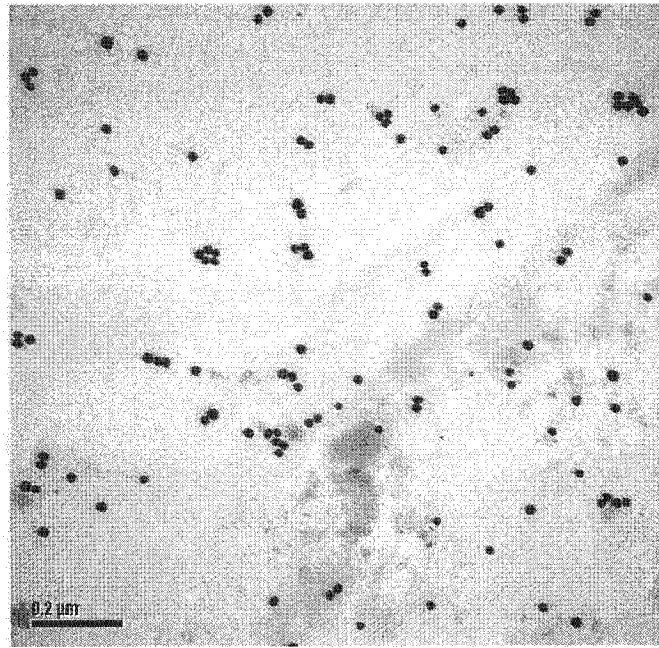


图 3

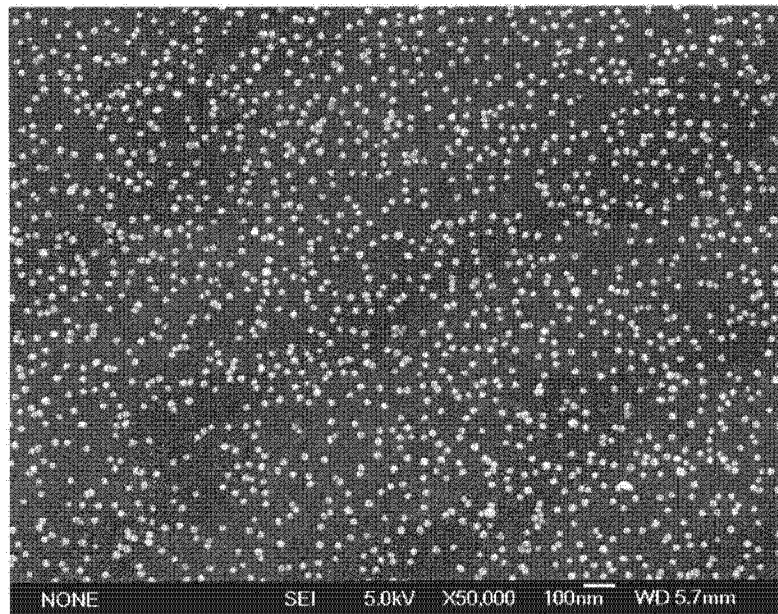


图 4

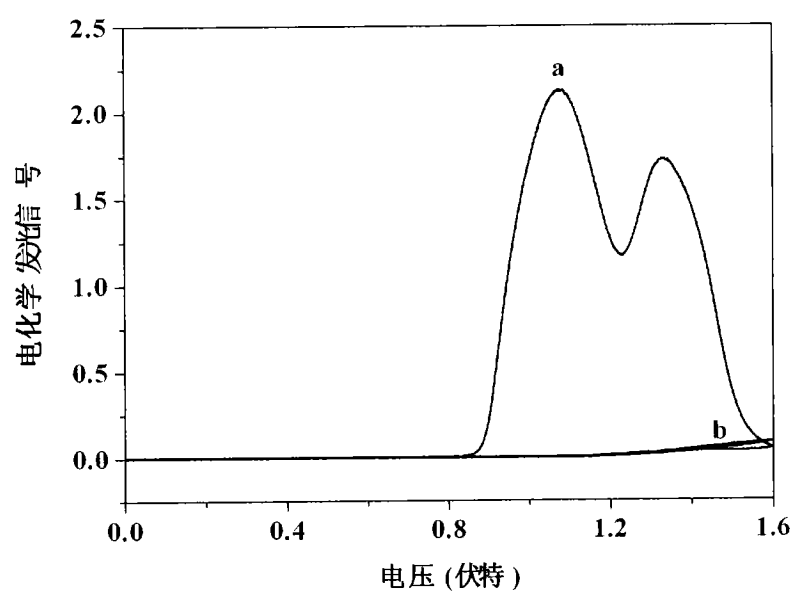


图 5

专利名称(译)	导电微粒子介导电化学发光信号的免疫检测方法		
公开(公告)号	CN102565381B	公开(公告)日	2014-06-18
申请号	CN201010591472.0	申请日	2010-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院生态环境研究中心		
申请(专利权)人(译)	中国科学院生态环境研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院生态环境研究中心		
[标]发明人	郭良宏 黄荣富 赵利霞		
发明人	郭良宏 黄荣富 赵利霞		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/66		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN102565381A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种导电微粒子介导电化学发光信号的免疫检测方法，包括：a)以一种具有电化学发光活性的导电材料制成微粒子，在微粒子表面固定针对待测物的抗体分子；b)在非电化学发光活性的电极上固定能与a)步中抗体分子形成二元免疫复合物的抗原分子，或固定能与a)步中抗体分子和待测物形成三元夹心免疫复合物的抗体分子；c)加入待测物后，微粒子通过特异性的抗原-抗体免疫反应，在电极表面形成免疫复合物；d)在有电化学发光物质和共反应物存在时，向电极施加电压，在微粒子表面产生电化学发光信号，进而对待测物进行定量测量。本发明具有背景低、信噪比高等优点，可以实现高灵敏度检测待测物的电化学发光免疫分析方法。

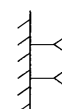
1) 制备微粒子



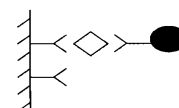
2) 抗体在微粒子上固定



3) 抗原或抗体在电极上固定



4) 加入待测物



5) 加入发光剂/共反应剂，信号测量