



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105223347 B

(45)授权公告日 2017.03.08

(21)申请号 201510604707.8

G01N 21/78(2006.01)

(22)申请日 2015.09.22

审查员 黄晓丽

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105223347 A

(43)申请公布日 2016.01.06

(73)专利权人 福州大学

地址 350108 福建省福州市闽侯县上街镇  
大学城学园路2号福州大学新区

(72)发明人 郭隆华 许梢华 马小明 林振宇

邱彬 陈国南

(74)专利代理机构 福州元创专利商标代理有限公司

公司 35100

代理人 蔡学俊

(51)Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图3页

(54)发明名称

一种半定量可视化酶联免疫分析方法

(57)摘要

发明公开了一种半定量可视化酶联免疫分析新方法,包括以下步骤:(1)显色纳米金的制备(2)酶联免疫吸附及显色反应。本发明原料易得,成本低,无需任何复杂检测设备,通过肉眼即可判断检测结果,并且方法操作简单,重现性、稳定性好,能够直接用于半定量快速检测各种临床标志蛋白,有望在生命科学及医学临床检测等领域得到广泛应用。

1. 一种半定量可视化酶联免疫分析方法,其特征在于:所述方法包括以下步骤:

(1)显色纳米金的制备:首先根据柠檬酸钠还原法合成纳米金,其粒径为 $15\pm 5$  nm;然后根据金种生长法,合成十六烷基三甲基溴化铵包裹的纳米金,其粒径为 $45\pm 15$  nm;

(2)可视化检测蛋白抗原:首先根据经典ELISA法,捕获抗体—抗原—检测抗体发生特异性反应,然后将链霉亲和素化的辣根过氧化物酶与生物素化的检测抗体相结合,从而将辣根过氧化物酶链接在抗体上;加入相应的TMB显色剂后,反应30min,加入盐酸终止酶促反应;同时生成了黄色的 $\text{TMB}^{2+}$ ;此时加入步骤(1)制备好的十六烷基三甲基溴化铵包裹的纳米金, $\text{TMB}^{2+}$ 就会与纳米金发生反应,从而将原来单一的黄色变化转变为红—黄双色变化,通过目测溶液颜色的变化可以对目标抗原进行半定量分析。

2. 根据权利要求1所述半定量可视化酶联免疫分析方法,其特征在于:步骤(1)中柠檬酸钠还原法具体步骤为在剧烈搅拌下将100 mL、 $2.5\times 10^{-4}$  M氯金酸放在 $120^{\circ}\text{C}$ 油浴锅中回流30 min;然后向其中加入10 mL 1wt% 的柠檬酸钠溶液,在搅拌状态下反应20 min,然后关闭加热,继续搅拌回流至室温。

3. 根据权利要求1所述半定量可视化酶联免疫分析方法,其特征在于:所述金种生长法为首先配制生长液60 mL,其中含有氯金酸 $2.5\times 10^{-4}$  M、十六烷基三甲基溴化铵0.01 M,然后加入0.1 M 的抗坏血酸3 mL作为还原剂,搅拌2 min,最后加入柠檬酸钠还原法合成的纳米金30 mL,混合均匀后在 $30^{\circ}\text{C}$ 的水浴中放置6-8 h,合成十六烷基三甲基溴化铵包裹的纳米金。

4. 根据权利要求1所述半定量可视化酶联免疫分析方法,其特征在于:步骤(2)中黄色 $\text{TMB}^{2+}$ 和十六烷基三甲基溴化铵包裹的纳米金的反应时间为5~30 min,反应温度为室温。

## 一种半定量可视化酶联免疫分析方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于分析化学领域,具体涉及一种半定量可视化酶联免疫分析方法。

### 背景技术

[0002] 酶联免疫吸附测定法(Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay),简称ELISA,采用抗原与抗体的特异反应将待测物与酶连接,然后通过酶与底物产生颜色反应,对受检物质进行定性或定量分析的一种检测方法。由于其具有快速、敏感、简便、易于标准化等优点,使其得到迅速的发展和广泛应用。它以免疫学反应为基础,将抗体、抗原的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合的一种具有高特异性和高敏感性的实验技术。

[0003] 酶联免疫吸附测定法的检测结果在于加入底物后的颜色反应。传统的酶联免疫吸附法通常是将酶的底物通过化学转变为颜色信号或者化学发光信号,这种方式的酶联免疫吸附法对于高浓度的目标物的测定具有很大的优势。然而对于低浓度的目标物,尚存一些问题,比如说:在低浓度时,产生的颜色信号非常小,以至于不能区分是否产生了颜色信号;并且,在实际的目标物分析中,没有目标物存在的情况下,也有可能因为非特异性吸附而产生淡的颜色信号。因此需要一种颜色更容易辨认的信号产生方式,比如说产生不同的颜色。近年来,随着表面等离子共振技术(SPR)的发展与成熟,对于将表面等离子共振引入传统的酶联免疫吸附法也越来越引起人们的兴趣。该项技术的特点在于所用的贵金属材料的表面等离子体共振信号与该金属的结构参数极其相关。利用该项技术用肉眼检测铜离子的检测限能达纳摩尔级别。基于贵金属的表面等离子体共振性质的高敏感性与颜色的丰富性使得等离子酶联免疫吸附法成为了一种非常有潜力的检测技术。

[0004] 虽然SPR检测技术在ELISA领域有非常好的应用前景,然而与传统的ELISA相比,基于表面等离子体共振的酶联免疫吸附法检测技术的开发与应用却相对滞后,迄今为止还没有相关的商品化仪器报导。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种半定量可视化酶联免疫分析方法。该方法具有操作简单、成本低、重现性好等优点,可操作性强。使用该方法能够直接用于检测各种生物样品,有望在生命科学及医学临床检测等领域得到广泛应用,具有显著的经济效益。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] (1)显色纳米金的制备:首先根据柠檬酸钠还原法合成所需要的金种溶胶,其粒径为 $15 \pm 5$  nm;然后根据金种生长法,合成十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)包裹的纳米金(CTAB@Au),其粒径为 $45 \pm 15$  nm。

[0008] (2)目标物的可视化免疫分析:首先根据经典ELISA,捕获抗体—抗原—检测抗体发生特异性反应,然后将链霉亲和素化的辣根过氧化物酶(HRP)与生物素化的检测抗体相结合,从而将HRP链接在抗体上;加入底物后,反应一段时间,加入盐酸终止酶促反应;同时生成了黄色的 $\text{TMB}^{2+}$ 。此时加入事先制备好的CTAB包裹的纳米金, $\text{TMB}^{2+}$ 就会与纳米金发生反

应,从而产生明显的颜色变化,高灵敏检测抗原蛋白。

[0009] 其具体方法步骤为:

[0010] (1)在合成前将所需要用到的玻璃器皿全部用王水浸泡,然后用大量的水冲洗,最后用超纯水润洗干净;

[0011] (2)合成粒径在 $15 \pm 5$ nm的纳米金:采用柠檬酸钠还原法合成,在剧烈搅拌下将100 mL、 $2.5 \times 10^{-4}$  M氯金酸放在 $120^\circ\text{C}$ 油浴锅中回流30 min;然后向其中加入10 mL 1wt% 的柠檬酸钠溶液,在搅拌状态下反应20 min,然后关闭加热,继续搅拌回流至室温。

[0012] (3)合成粒径在 $45 \pm 15$ nm的纳米金:采用金种生长法合成,首先配制生长液60 mL,其中含有氯金酸 $2.5 \times 10^{-4}$  M,十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)0.01 M,然后加入0.1 M 的抗坏血酸(Vc)3 mL,搅拌2 min,最后加入上述15 nm左右的纳米金30 mL,混合均匀后在 $30^\circ\text{C}$ 的水浴中放置6-8h。

[0013] (4)将上述纳米金在10000rpm的转速下离心10min,弃去上清液,沉淀用等量的0.1 M 的CTAB重新分散。

[0014] (5)将试剂盒从冰箱中取出,并恢复至室温;按照传统ELISA的方式将抗体抗原和酶连接在一起,然后向其中加入相应的TMB显色剂,孵育30min后加入2 M的HCl终止反应,并生成相应量的 $\text{TMB}^{2+}$ 。

[0015] (6)最后将用0.1M重新分散的纳米金加入到酶标板的孔中,不同量的 $\text{TMB}^{2+}$ 和纳米金将会发生不同的刻蚀效果,从而出现不同的颜色。

[0016] 本发明的有益效果:

[0017] (1)传统ELISA方法只产生一种颜色变化(黄色由浅到深),而本发明所述可视化半定量免疫分析法能够产生两种颜色变化,从而大大增加了本方法用于肉眼检测的准确度。

[0018] (2)本发明所述可视化半定量免疫分析法相比于传统ELISA方法显色敏感度更高,检出限更低。

[0019] (3)显色纳米金制备简单,成本低,重现性高。

[0020] (4)本发明所述半定量可视化酶联免疫分析方法由传统ELISA试剂盒和显色纳米金组成,原料易得,容易实现商品化生产。

## 附图说明

[0021] 图1是本发明所述的等离子体酶联免疫吸附试验法的示意图。其中左半部分为传统的ELISA示意图,右半部分为等离子传感示意图。

[0022] 图2是本发明所述的显色纳米金的透射电镜图。

[0023] 图3是应用等离子酶联免疫吸附法进行抗原的检测(前列腺特异抗原,Prostate Specific Antigen)的比色图与光谱图。

## 具体实施方式

[0024] 实施例1

[0025] 以下实施例结合附图来说明应用本发明制备的微流控芯片进行实际样品分析的操作过程:

[0026] (1)在合成前将所需要用到的玻璃器皿全部用王水浸泡,然后用大量的水冲洗,最

后用超纯水润洗干净；

[0027] (2)合成粒径在 $15 \pm 5$  nm的纳米金：采用柠檬酸钠还原法合成，在剧烈搅拌下将100 mL、 $2.5 \times 10^{-4}$  M氯金酸放在 $120^\circ\text{C}$ 油浴锅中回流30 min；然后向其中加入10 mL 1wt% 的柠檬酸钠溶液，在搅拌状态下反应20 min，然后关闭加热，继续搅拌回流至室温。

[0028] (3)合成粒径在 $45 \pm 15$  nm的纳米金：采用金种生长法合成，首先配制生长液60 mL，其中含有氯金酸 $2.5 \times 10^{-4}$  M，十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)0.01 M，然后加入0.1 M 的抗坏血酸(Vc)3 mL，搅拌2 min，最后加入上述15 nm左右的纳米金30 mL，混合均匀后在 $30^\circ\text{C}$ 的水浴中放置6 h。

[0029] (4)将上述纳米金在10000 rpm 的转速下离心10 min，弃去上清液，沉淀用等量的0.1 M 的CTAB重新分散。

[0030] 首先制备粒径为45 nm左右的纳米金，并将纳米金用0.1 M的CTAB重新分散，附图2为该粒径的纳米金的透射电镜图。

[0031] 在本实例中，所选的目标物为前列腺特异性抗原，因此需要将相应的抗体和酶连接起来，具体实施方法如下：将载有捕获抗体的酶标板固定，向其中加入100 uL PSA抗原溶液，用摇床在室温下孵育2.5 h，捕获抗体和抗原将自动连接，然后用清洗液洗涤四次，并将孔中的水吸干；再向其中加入100 uL 生物素化的检测抗体，用摇床室温下孵育1 h，重复清洗步骤；然后向各孔中加入100 uL 链霉亲和素-辣根过氧化物酶(HRP)，室温下孵育45min；最终使所有的抗体、抗原和酶按照图1左半部分的方式连接。

[0032] 然后加入100 uL TMB显色剂，孵育30 min后加入50 uL 2 M HCl终止反应。最后加入100 uL 纳米金(4.182 nM)反应5 min。

[0033] 图3即为采用此等离子酶联免疫吸附法测定PSA的比色图和光谱图，该比色图从左往右PSA浓度依次为0, 0.15, 0.40, 0.60, 0.80, 1.0, 2.0, 3.0 ng/mL，该方法目视比色的检出限为0.15 ng/mL。

[0034] 以上所述仅为本发明的较佳实施例，凡依本发明申请专利范围所做的均等变化与修饰，皆应属本发明的涵盖范围。

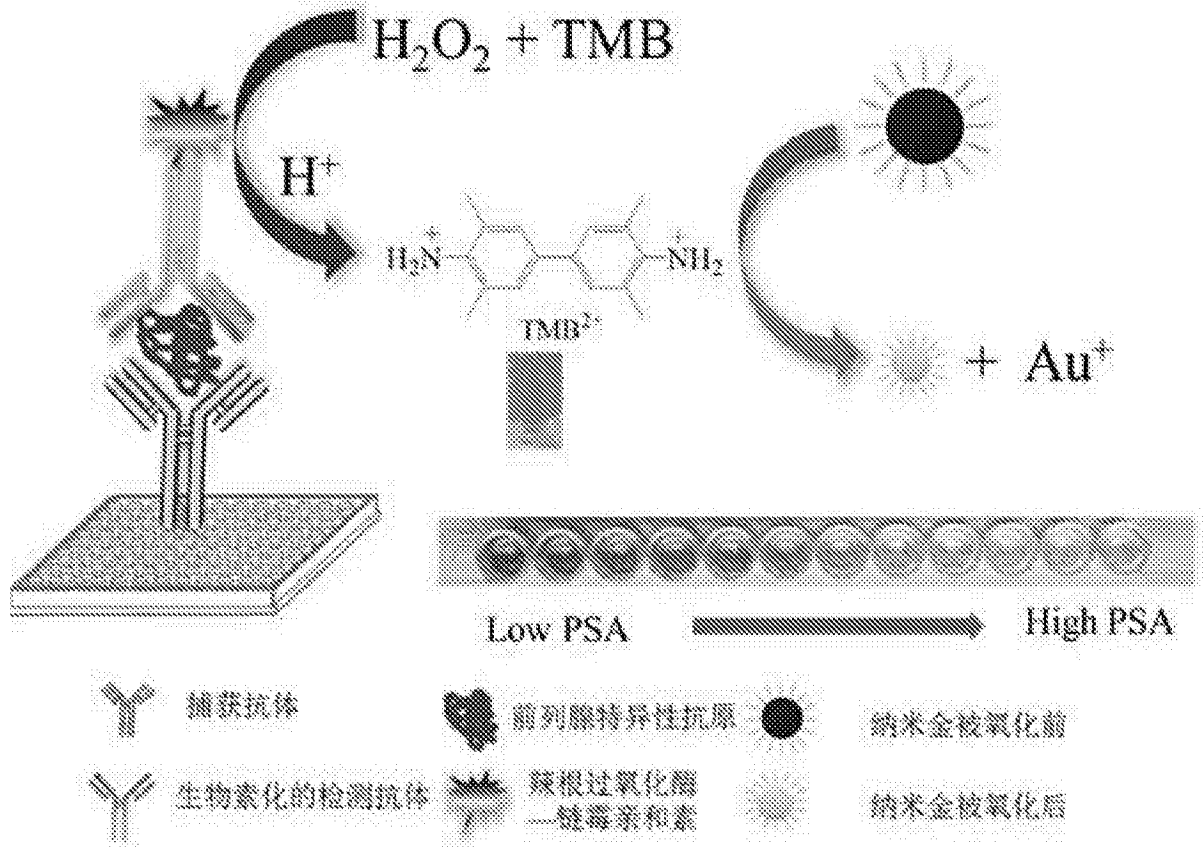


图1

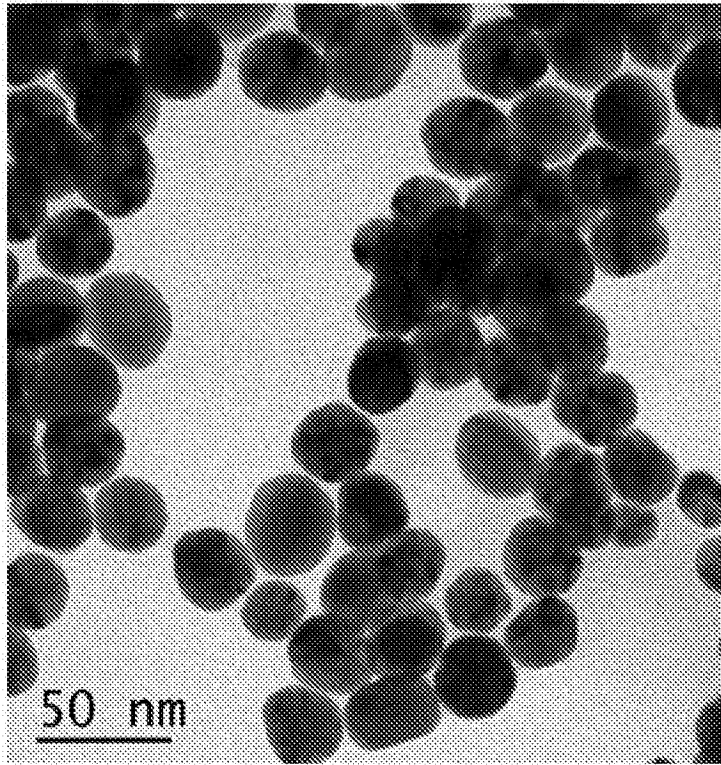


图2

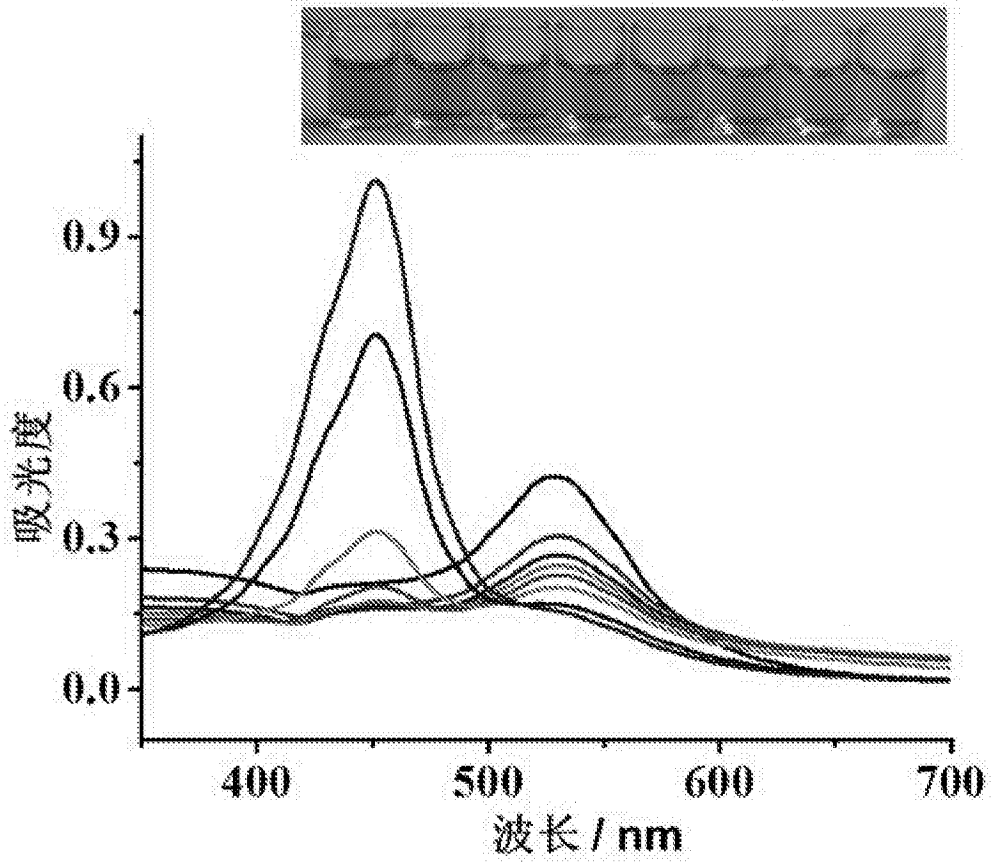


图3

专利名称(译)	一种半定量可视化酶联免疫分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105223347B</a>	公开(公告)日	2017-03-08
申请号	CN201510604707.8	申请日	2015-09-22
[标]申请(专利权)人(译)	福州大学		
申请(专利权)人(译)	福州大学		
当前申请(专利权)人(译)	福州大学		
[标]发明人	郭隆华 许梢华 马小明 林振宇 邱彬 陈国南		
发明人	郭隆华 许梢华 马小明 林振宇 邱彬 陈国南		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/78		
CPC分类号	G01N21/78 G01N33/53		
代理人(译)	蔡学俊		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN105223347A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

发明公开了一种半定量可视化酶联免疫分析新方法，包括以下步骤：  
 (1) 显色纳米金的制备 (2) 酶联免疫吸附及显色反应。本发明原料易得，成本低，无需任何复杂检测设备，通过肉眼即可判断检测结果，并且方法操作简单，重现性、稳定性好，能够直接用于半定量快速检测各种临床标志蛋白，有望在生命科学及医学临床检测等领域得到广泛应用。

