



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110927378 A

(43)申请公布日 2020.03.27

(21)申请号 201911125727.1

(22)申请日 2019.11.18

(71)申请人 广东工业大学

地址 510060 广东省广州市越秀区东风东路729号

(72)发明人 何绮怡 赵肃清 方岩雄 杨慧怡
崔锡平 陈莹珊

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 陈嘉毅

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

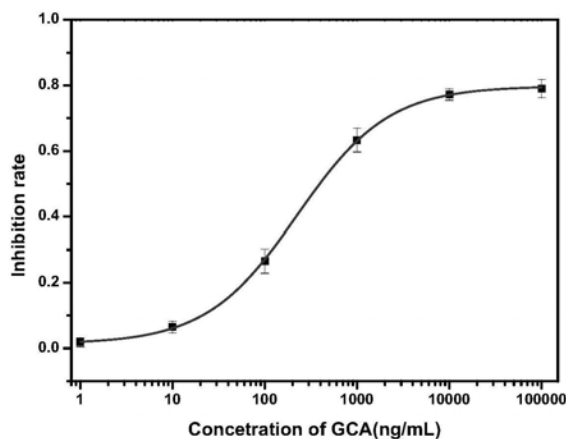
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种用于检测甘胆酸的纳米酶联免疫吸附分析方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于检测甘胆酸的纳米酶联免疫吸附分析方法。该方法包括以下步骤：S1. 普鲁士蓝纳米立方体的合成：采用PVP作为稳定剂，一锅法得到普鲁士蓝纳米立方体；S2. 普鲁士蓝纳米立方体-单克隆抗体的偶联：调整普鲁士蓝纳米立方体，通过静电作用结合单克隆抗体；S3. 棋盘模拟酶联免疫分析方法确定包被浓度与抗体用量：改变包被GCA-OVA的浓度，改变抗体偶联的稀释比例，确定包被浓度与抗体用量；S4. 甘胆酸标准曲线的确定：以甘胆酸浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，得到甘胆酸标准曲线。该方法特异性高，灵敏度好，在检测尿液中的甘胆酸方面具有广泛的应用前景。



1. 一种用于检测甘胆酸的纳米酶联免疫吸附分析方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1. 普鲁士蓝纳米立方体的合成:采用PVP作为稳定剂,一锅法得到普鲁士蓝纳米立方体;

S2. 普鲁士蓝纳米立方体-单克隆抗体的偶联:调整普鲁士蓝纳米立方体,通过静电作用结合单克隆抗体;

S3. 棋盘模拟酶联免疫分析方法确定包被浓度与抗体用量:改变包被GCA-OVA的浓度,改变抗体偶联的稀释比例,确定包被浓度与抗体用量;

S4. 甘胆酸标准曲线的确定:以甘胆酸浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,得到甘胆酸标准曲线。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤S1所述普鲁士蓝纳米立方体的合成的具体步骤为:将PVP与普鲁士蓝溶解在HCl中,均匀搅拌后,放置于烘箱中反应10~30小时,冷却,离心后取沉淀,即得所述普鲁士蓝纳米立方体。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述HCl的物质的量浓度为0.005~0.015M。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤S2所述普鲁士蓝纳米立方体-单克隆抗体的偶联的具体步骤为:取普鲁士蓝纳米立方体溶液,加入K₂CO₃和腹水进行反应后,再加入BSA溶液进行反应,离心后取沉淀,即得所述普鲁士蓝纳米立方体-单克隆抗体的偶联。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述BSA溶液的浓度为0.05~0.15mg/mL。

6. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述K₂CO₃的物质的量浓度为0.1~0.3M。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤S3所述棋盘模拟酶联免疫分析方法确定包被浓度与抗体用量的具体步骤为:分别包被GCA-OVA包被抗原,温浴后加入脱脂奶粉,随后加入普鲁士蓝纳米立方体-单克隆抗体进行反应,确定包被浓度与抗体用量。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述GCA-OVA的浓度为1.25~10μg/mL。

9. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述普鲁士蓝纳米立方体和单克隆抗体的稀释比为1:20~1:1280。

一种用于检测甘胆酸的纳米酶联免疫吸附分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测技术领域。更具体地,涉及一种用于检测甘胆酸的纳米酶联免疫吸附分析方法。

背景技术

[0002] 肝细胞受损并积累引起肝脏疾病,检测肝细胞受损程度并对肝功能进行实时评价,对于早期诊断、预防和治疗肝脏疾病具有重要意义。甘胆酸是胆汁酸的主要成分之一,由胆固醇与肝内的甘氨酸结合而成,其含量的测定对肝病诊断较具敏感性,是评价肝功能的一项很重要的指标。相关研究指出,胆汁酸经肾脏排泄很明显,并与肝胆疾病程度相关;因此,检测尿液中的甘胆酸对临床有一定指导价值。但是,临床上检测甘胆酸多取静脉血,而针对一些小儿患者、不便于取静脉血的患者,检测其尿液中的甘胆酸有着便利性与对疾病诊断的指导意义。

[0003] 辣根过氧化物酶,作为目前免疫分析方法中最常用的信号指示酶,被广泛地应用于ELISA的定量检测。随着科技的发展,具有类酶活性的纳米材料也逐渐展现了它们优异的性能,例如,可人工合成,不受温度和酸碱度的影响,稳定性好等。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是克服在尿液中检测甘胆酸的技术空白,提供一种普鲁士蓝纳米立方体用于模拟酶联免疫分析方法,即一种用于检测甘胆酸的纳米酶联免疫吸附分析方法。

[0005] 本发明的目的是提供一种普鲁士蓝纳米立方体用于模拟酶联免疫分析方法。

[0006] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0007] 本发明提供了一种普鲁士蓝纳米立方体用于模拟酶联免疫分析方法,包括以下步骤:

[0008] S1. 普鲁士蓝纳米立方体的合成:采用聚乙烯吡咯烷酮(PVP)作为稳定剂,一锅法得到普鲁士蓝纳米立方体;

[0009] S2. 普鲁士蓝纳米立方体-单克隆抗体的偶联:调整普鲁士蓝纳米立方体,通过静电作用结合单克隆抗体;

[0010] S3. 棋盘模拟酶联免疫分析方法确定包被浓度与抗体用量:改变包被GCA-OVA的浓度,改变抗体偶联的稀释比例,确定包被浓度与抗体用量;

[0011] S4. 甘胆酸标准曲线的确定:以甘胆酸浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,得到甘胆酸标准曲线。

[0012] 优选地,步骤S1所述普鲁士蓝纳米立方体的合成的具体步骤为:将PVP与普鲁士蓝溶解在HCl中,均匀搅拌后,放置于烘箱中反应10~30小时,冷却,离心后取沉淀,即得所述普鲁士蓝纳米立方体。

[0013] 更优选地,所述HCl的物质的量浓度为0.005~0.015M。

- [0014] 更进一步优选地,所述HCl的物质的量浓度为0.01M。
- [0015] 优选地,步骤S2所述普鲁士蓝纳米立方体-单克隆抗体的偶联的具体步骤为:取普鲁士蓝纳米立方体溶液,加入K₂CO₃和腹水进行反应后,再加入BSA溶液进行反应,离心后取沉淀,即得所述普鲁士蓝纳米立方体-单克隆抗体的偶联。
- [0016] 更优选地,所述BSA溶液的浓度为0.05~0.15mg/mL。
- [0017] 更进一步优选地,所述BSA溶液的浓度为0.1mg/mL。
- [0018] 更优选地,所述K₂CO₃的物质的量浓度为0.1~0.3M。
- [0019] 更进一步优选地,所述K₂CO₃的物质的量浓度为0.2M。
- [0020] 优选地,步骤S3所述棋盘模拟酶联免疫分析方法确定包被浓度与抗体用量的具体步骤为:分别包被GCA-OVA包被抗原,温浴后加入脱脂奶粉,随后加入普鲁士蓝纳米立方体-单克隆抗体进行反应,确定包被浓度与抗体用量。
- [0021] 更优选地,所述GCA-OVA的浓度为1.25~10μg/mL。
- [0022] 更进一步优选地,所述GCA-OVA的浓度为5μg/mL。
- [0023] 更优选地,所述普鲁士蓝纳米立方体和单克隆抗体的稀释比为1:20~1:1280。
- [0024] 更进一步优选地,所述普鲁士蓝纳米立方体和单克隆抗体的稀释比为1:500。
- [0025] 本发明具有以下有益效果:
- [0026] 本发明提供了一种用于检测甘胆酸的纳米酶联免疫吸附分析方法。该方法是直接利用合成的普鲁士蓝纳米立方体替代辣根过氧化物酶在传统酶联免疫分析中的作用,使用普鲁士蓝纳米立方体建立分析方法,以甘胆酸为标准品,甘胆酸单克隆抗体为抗体,建立甘胆酸的模拟酶联免疫分析方法,建立的甘胆酸的模拟酶联免疫分析的标准抑制曲线IC₅₀为225.1ng/mL,线性范围为46.4~1092.0ng/mL,该方法特异性高,灵敏度好,为在尿液中检测甘胆酸提供了一种快速、准确、可靠的检测方法。

附图说明

- [0027] 图1是本发明普鲁士蓝纳米立方体的合成的技术路线;其中,“GCA-OVA”代表甘胆酸偶联卵清蛋白;“GCA”代表甘胆酸,“anti-GCA Mab”代表抗甘胆酸单克隆抗体。
- [0028] 图2是本发明棋盘模拟酶联免疫分析方法的结果。
- [0029] 图3是甘胆酸的模拟酶联免疫分析的标准抑制曲线。

具体实施方式

- [0030] 以下结合具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。
- [0031] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。
- [0032] 本发明普鲁士蓝纳米立方体的合成的技术路线如图1所示。本发明棋盘模拟酶联免疫分析方法的结果如图2所示。
- [0033] 实施例1普鲁士蓝纳米立方体的合成
- [0034] 1、实验方法
- [0035] 普鲁士蓝纳米立方体的合成具体按照以下步骤:
- [0036] 6g PVP与250mg的普鲁士蓝溶解在80mL的HCl中,混合物在室温下均匀搅拌1个小

时,随后将混合物放置于80℃的烘箱中,反应20小时。等待反应结束后,室温下冷却,9000rpm,离心30分钟后取沉淀。沉淀先用乙醇清洗两次,随后再用纯水清洗两次(目的是为了除去未反应的PVP以及普鲁士蓝)。沉淀最后在50℃烘箱中进行干燥,称重处理随后,利用TMB+H₂O₂体系鉴定普鲁士蓝纳米立方体类酶活性以及形貌。

[0037] 2、实验结果

[0038] 当加入定量的普鲁士蓝立方体后,溶液变蓝,生成了oxTMB,证明合成的普鲁士蓝纳米立方体具有类酶活性,同时,通过扫描电镜可以观察到立方体的合成,平均粒径为150nm。

[0039] 实施例2普鲁士蓝纳米立方体-单克隆抗体的偶联

[0040] 1、实验方法

[0041] 普鲁士蓝纳米立方体-单克隆抗体的偶联具体按照以下步骤:

[0042] 取1mL实施例1制备得到的普鲁士蓝纳米立方体溶液,分别加入2μL 0.2M K₂CO₃,随后加入10μL腹水,室温下反应一个小时,然后加入100μL 0.1mg/mL BSA溶液用于封闭未结合位点。反应一个小时后,离心取沉淀。随后,通过Zeta电位的测定鉴定普鲁士蓝纳米立方体与单克隆抗体的偶联情况。

[0043] 2、实验结果

[0044] 单纯的普鲁士蓝纳米立方体的Zeta电位在-20mV,而成功偶联上抗体的普鲁士蓝纳米立方体-单克隆抗体复合物的Zeta电位在-14mV。这是由于静电结合,使得普鲁士蓝纳米立方体的带电呈中性化,即部分负电与抗体的正电荷进行结合。

[0045] 实施例3甘胆酸标准曲线的确定

[0046] 1、实验方法

[0047] (1)包被甘胆酸偶联的卵清蛋白(GCA-OVA):用碳酸盐缓冲液(pH=9.5)配制2.5μg/mL的GCA-OVA,100μL/孔,37℃温浴2小时后,用PBST(磷酸缓冲液+0.001%Tween 20)洗涤4次。

[0048] (2)封闭奶粉:加入3%脱脂奶粉,270μL/孔,37℃温浴1小时后,用PBST(磷酸缓冲液+0.001%Tween 20)洗涤4次。

[0049] (3)加入待测甘胆酸标准样品与普鲁士蓝纳米立方体-单克隆抗体复合物:加入50μL/孔待测甘胆酸标准样品,同时加入50μL/孔1:40普鲁士蓝纳米立方体-单克隆抗体复合物,混匀,37℃温浴1小时后,用PBST(磷酸缓冲液+0.001%Tween 20)洗涤4次。

[0050] (4)显色:加入TMB显色液,100μL/孔,反应15分钟后,加入0.1M浓硫酸进行反应终止,50μL/孔,用酶标仪进行OD_{450nm}测定。

[0051] (5)绘制荧光偏振免疫分析标准曲线:使用origin8.5软件,以A/A₀为纵坐标,甘胆酸标准溶液浓度为横坐标,拟合四参数曲线,得到甘胆酸的模拟酶联免疫分析的标准抑制曲线。

[0052] 2、实验结果

[0053] 甘胆酸的模拟酶联免疫分析的标准抑制曲线如图3所示,可以看出,IC₅₀为225.1ng/mL,线性范围为46.4~1092.0ng/mL,该方法特异性高,灵敏度好,为在尿液中检测甘胆酸提供了一种快速、准确、可靠的检测方法。

[0054] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的

限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

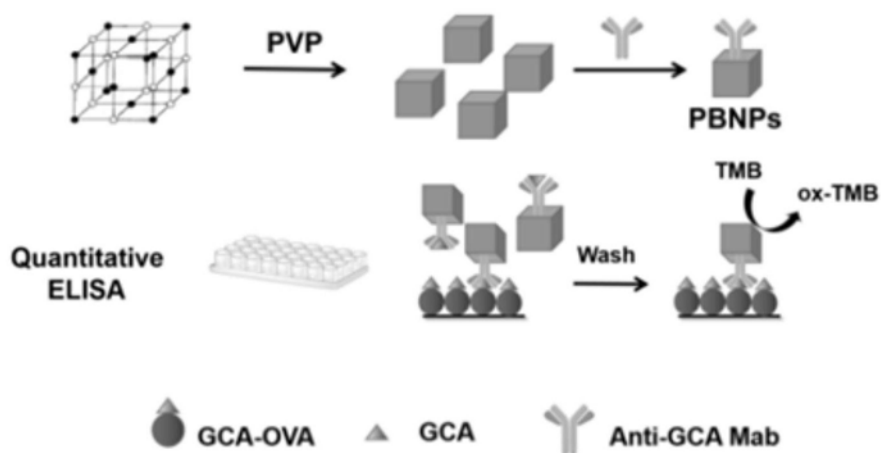


图1

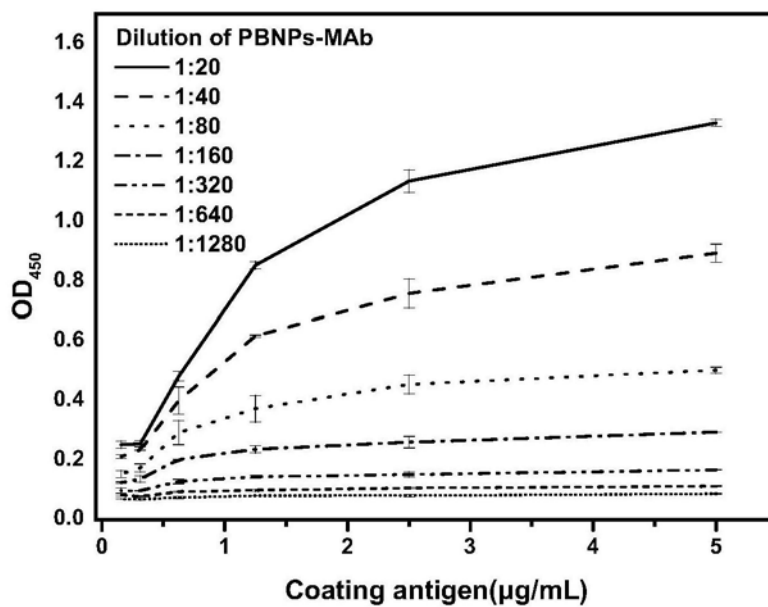


图2

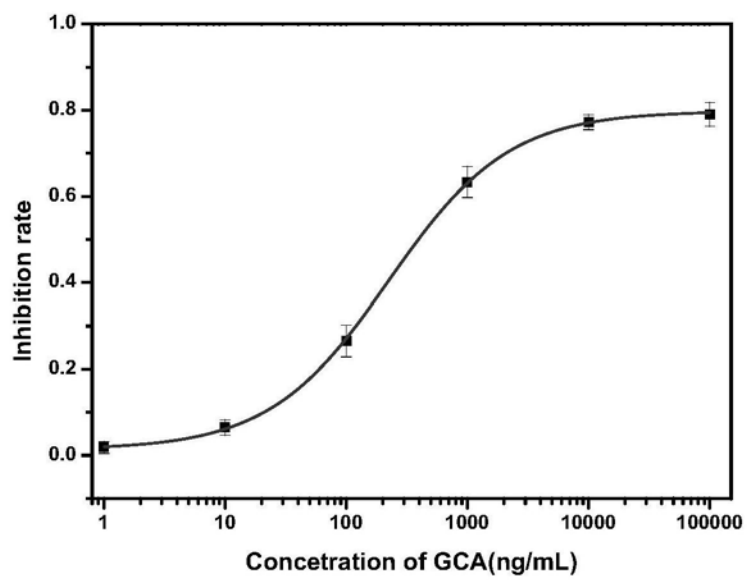


图3

专利名称(译)	一种用于检测甘胆酸的纳米酶联免疫吸附分析方法		
公开(公告)号	CN110927378A	公开(公告)日	2020-03-27
申请号	CN201911125727.1	申请日	2019-11-18
[标]申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
[标]发明人	何绮怡 赵肃清 方岩雄 杨慧怡 崔锡平 陈莹珊		
发明人	何绮怡 赵肃清 方岩雄 杨慧怡 崔锡平 陈莹珊		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5308 G01N33/577		
代理人(译)	陈嘉毅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于检测甘胆酸的纳米酶联免疫吸附分析方法。该方法包括以下步骤：S1.普鲁士蓝纳米立方体的合成：采用PVP作为稳定剂，一锅法得到普鲁士蓝纳米立方体；S2.普鲁士蓝纳米立方体-单克隆抗体的偶联：调整普鲁士蓝纳米立方体，通过静电作用结合单克隆抗体；S3.棋盘模拟酶联免疫分析方法确定包被浓度与抗体用量：改变包被GCA-OVA的浓度，改变抗体偶联的稀释比例，确定包被浓度与抗体用量；S4.甘胆酸标准曲线的确定：以甘胆酸浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，得到甘胆酸标准曲线。该方法特异性高，灵敏度好，在检测尿液中的甘胆酸方面具有广泛的应用前景。

