



## (12)发明专利



(10)授权公告号 CN 107703306 B

(45)授权公告日 2019.08.23

(21)申请号 201710902956.4

(22)申请日 2017.09.29

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107703306 A

(43)申请公布日 2018.02.16

(73)专利权人 成都理工大学

地址 610059 四川省成都市成华区二仙桥  
东三路1号

(72)发明人 张信凤 吴鹏 侯贤灯 邓莉  
黄承鹏

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

(56)对比文件

CN 107140750 A,2017.09.08,

CN 105067751 A,2015.11.18,

CN 107084976 A,2017.08.22,

WO 2017132618 A1,2017.08.03,

CN 105784799 A,2016.07.20,

Xinfeng Zhang et

al.Photosensitization of Molecular Oxygen  
on Graphene Oxide for Ultrasensitive  
Signal Amplification.《Chemistry-A  
European Journal》.2018,第24卷(第11期),

Hao Hu et al.Modulation of the  
Singlet Oxygen Generation from the Double  
Strand DNA-SYBR Green I Complex Mediated  
by T-Melamine-T Mismatch for Visual  
Detection of Melamine.《Analytical  
Chemistry》.2017,第89卷(第9期),

陈亚红等.酶催化动力学光度法测定H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  
《分析实验室》.2008,第27卷(第10期),

郭彦秀.基于石墨烯纳米杂化材料的免标记  
电化学生物传感器的设计与研究.《中国优秀硕  
士学位论文全文数据库》.2016,

审查员 马立楠

权利要求书1页 说明书2页

(54)发明名称

一种在线标记光敏剂的光催化可视化免疫  
分析方法

(57)摘要

一种在线标记光敏剂的光催化可视化免疫  
分析方法,是利用石墨烯能同时吸附核酸与光敏  
剂的特殊性能,将光敏剂在线的标记于免疫分析  
过程中的核酸适配体上,在LED灯的照射下,光敏  
剂产生单线态氧,氧化无色TMB变为蓝色,实现可  
视化半定量分析,同时通过分光光度法实现定量  
分析.该法避免使用生物酶,稳定性好,使用的抗  
体或适配体无需标记,具有成本的优点,用肉眼  
可检测低至0.1 ng mL<sup>-1</sup>癌胚抗原、血管内皮生  
长因子等蛋白质.该法可大幅度降低医院免疫分  
析的成本,也适用于偏远、设备缺乏地区疾病的  
现场诊断。

1. 一种在线标记光敏剂的光催化可视化免疫分析方法,其特征在于包括以下步骤:
  - (1) 将抗体溶液在酶标板中孵育洗净后,用牛血清白蛋白封闭剩余位点;
  - (2) 加入抗原标准溶液或样品溶液,孵育一段时间后用超纯水及缓冲溶液洗去剩余的抗体或样品溶液;
  - (3) 加入能识别抗原的适配体DNA,孵育一段时间后用超纯水及缓冲溶液洗去剩余DNA;
  - (4) 向酶标板中加入石墨烯和光敏剂荧光桃红混合溶液,用超纯水及缓冲溶液洗去剩余的石墨烯和荧光桃红;
  - (5) 加入3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(TMB)溶液,用LED灯照射一段时间,实现光敏催化氧化TMB显色;
  - (6) 根据(5)溶液颜色进行半定量分析或用分光光度计测定吸光度值进行定量分析。
2. 按权利要求1 所述的方法,其特征在于加入的适配体DNA既含有识别抗体的序列又含有捕捉石墨烯的DNA序列。
3. 按权利要求1 所述的方法,其特征在于所使用的光敏剂为荧光桃红。
4. 按权利要求1 所述的方法,其特征在于以石墨烯为桥梁,将光敏剂在线标记于DNA上。
5. 按权利要求1 所述的方法,其特征在于所用的显色剂为3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺。

## 一种在线标记光敏剂的光催化可视化免疫分析方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物分析技术领域,具体涉及一种生物样品中蛋白的定量分析方法。

### 背景技术

[0002] 免疫分析法是利用抗原抗体特异性结合反应检测各种待测物的分析方法,广泛的用于各种蛋白质特别是疾病标志蛋白的定量分析。简单、高灵敏的免疫分析方法对临床诊断具有重要的意义。免疫分析方法按照检测方式分类主要有放射免疫分析、荧光免疫分析、酶联免疫分析等。放射免疫分析灵敏度高、特异性强、技术成熟,但具有放射性污染,试剂贵;荧光免疫分析方法采用荧光素代替放射性元素进行标记,灵敏度低,难以用于痕量蛋白质的测定;最近出现的时间分辨荧光免疫分析方法灵敏度高,但仪器昂贵;酶联免疫分析采用生物酶来代替放射性元素,利用酶催化底物的生物放大作用,实现高灵敏的分析,是目前是临床中常用的蛋白质定量分析方法,但生物酶不稳定且酶标记后的抗体或抗原昂贵,测试成本高。为了避免使用不稳定的生物酶(如辣根过氧化物酶HRP),很多科学家采用了纳米粒子模拟酶代替生物酶,但也面临着需要标记、纳米粒子粒径不均一等问题。因此,仍有必要开发稳定性好、灵敏度高、成本低的免疫分析方法用于蛋白质的定量分析。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于利用染料分子光敏催化氧化3,3',5,5'-四甲基联苯胺的能力及石墨烯纳米材料的强吸附能力,建立一种在线标记光敏剂的光催化可视化免疫分析方法,具有成本低、灵敏度高、稳定性好的优点。其技术方案如下:

[0004] (1) 将100  $\mu\text{L}$  浓度为0.67mg/L抗体加入到300  $\mu\text{L}$ 可拆卸酶标板中过夜孵育约12 h,将抗体吸附于酶标板上;

[0005] (2) 用超纯水及磷酸二氢钠缓冲溶液洗净后,加入20% BSA封闭剩余位点,孵育2 h后倒干净孔中液体,洗净;

[0006] (3) 加入目标蛋白质标准溶液或样品溶液,孵育2 h后倒干净孔中液体,洗净;

[0007] (4) 加入蛋白质适配体延长适配体链(终浓度为500 nM),孵育2 h,之后倒干净孔中液体,洗净;

[0008] (5) 依次加入25  $\mu\text{L}$  1 mg/mL GO(终浓度500  $\mu\text{g/mL}$ )与25 $\mu\text{L}$  400  $\mu\text{M}$  PB(终浓度200  $\mu\text{M}$ ),孵育2 h后,用超纯水轻轻洗4次,pH 4.5 的50 mM甘氨酸缓冲溶液(含氯化钠200 mM)洗2次;

[0009] (6) 加入200  $\mu\text{g/mL}$  TMB溶液,用绿色LED光照20分钟,.显色后根据颜色深浅可进行半定量分析;也可通过测定吸光度对蛋白质进行准确定量。

[0010] 发明效果

[0011] 与现有技术相比,本发明具有如下优点:

[0012] (1) 成本低。本发明避免使用传统的生物酶标记的抗体,而是通过氧化石墨烯吸附适配体及光敏剂荧光桃红,实现将光敏剂在线标记适配体上,因此可显著降低成本;

[0013] (2) 灵敏度高。相比于传统的酶联免疫分析方法,灵敏度可高50倍;

[0014] (3) 所使用的光敏催化剂稳定性好。酶联免疫分析法中使用的生物酶易受环境条件的影响,进而影响其测定的稳定性,该发明使用的光敏催化剂荧光桃红稳定性好。

## 具体实施方式

### [0015] 实施例1

[0016] 将100  $\mu\text{L}$  浓度为0.5mg/L的CEA抗体加入到300  $\mu\text{L}$ 可拆卸酶标板中过夜孵育约12 h,将抗体吸附于酶标板上;用超纯水轻洗酶标板4次,20 mM pH 7.2 磷酸二氢钠缓冲液洗2次;加入20% BSA封闭剩余位点,孵育2 h后倒干净孔中液体,用超纯水轻洗酶标板4次,20 mM pH 7.2 磷酸二氢钠缓冲液洗2次;加入癌胚抗原(CEA)标准溶液或样品溶液,孵育2 h后倒干净孔中液体,用超纯水轻洗4次,100mM pH 7.2 磷酸二氢钠缓冲液洗2次;加入500 nM延长的CEA适配体链(终浓度),孵育2 h,之后倒干净孔中液体,用超纯水轻轻洗4次,20 mM pH 7.2 磷酸二氢钠缓冲液洗2次;依次加入25  $\mu\text{L}$  1 mg/mL GO(终浓度500  $\mu\text{g/mL}$ )与25 $\mu\text{L}$  400  $\mu\text{M}$  PB(终浓度200  $\mu\text{M}$ ),孵育2 h后,用超纯水轻洗4次,pH 4.5 的50 mM甘氨酸缓冲溶液(含氯化钠200 mM)洗2次;加入200  $\mu\text{g/mL}$  TMB溶液(用pH 4.5甘氨酸50 mM+氯化钠200 mM+5%乙醇配置),绿色LED光照20分钟,显色后根据颜色深浅对CEA进行半定量分析;通过测定吸光度对CEA进行准确定量。

### [0017] 实施例2

[0018] 将100  $\mu\text{L}$  浓度为0.5 mg/L的血管内皮生长因子(VEGF)抗体加入到300  $\mu\text{L}$ 可拆卸酶标板中过夜孵育约12 h,将抗体吸附于酶标板上;用超纯水轻洗酶标板4次,20 mM pH 7.2 磷酸二氢钠缓冲液洗2次;加入20% BSA封闭剩余位点,孵育2 h后倒干净孔中液体,用超纯水轻洗酶标板4次,20 mM pH 7.2 磷酸二氢钠缓冲液洗2次;加入血管内皮生长因子(VEGF)标准溶液或样品溶液,孵育2 h后倒干净孔中液体,用超纯水轻洗4次,100mM pH 7.2 磷酸二氢钠缓冲液洗2次;加入500 nM延长的VEGF适配体链(终浓度),孵育2 h,之后倒干净孔中液体,用超纯水轻轻洗4次,20 mM pH 7.2 磷酸二氢钠缓冲液洗2次;依次加入25  $\mu\text{L}$  1 mg/mL GO(终浓度500  $\mu\text{g/mL}$ )与25 $\mu\text{L}$  400  $\mu\text{M}$  PB(终浓度200  $\mu\text{M}$ ),孵育2 h后,用超纯水轻洗4次,pH 4.5 的50 mM甘氨酸缓冲溶液(含氯化钠200 mM)洗2次;加入200  $\mu\text{g/mL}$  TMB溶液(用pH 4.5甘氨酸50 mM+氯化钠200 mM+5%乙醇配置),绿色LED光照20分钟,显色后根据颜色深浅对VEGF进行半定量分析;通过测定吸光度对VEGF进行准确定量。

[0019] 采用实施例1、2 可分别对0.02–20 ng/mL的CEA和0.1–10 ng/mL的VEGF进行可视化的半定量分析及分光光度法的定量分析,线性关系良好(相关系数 $R^2 > 0.9900$ ),5次平行测定的相对标准偏差 $< 3\%$ 。用于癌症病人血清中CEA的检测,其检测结果能与医院提供的检测结果很好的吻合,但成本仅为医院使用的酶联免疫分析方法(ELISA)的五分之一左右。

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种在线标记光敏剂的光催化可视化免疫分析方法                         |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN107703306B</a>                   | 公开(公告)日 | 2019-08-23 |
| 申请号            | CN201710902956.4                               | 申请日     | 2017-09-29 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 成都理工大学   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 成都理工大学   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 成都理工大学   |         |            |
| [标]发明人         | 张信凤<br>吴鹏<br>侯贤灯<br>邓莉<br>黄承鹏                  |         |            |
| 发明人            | 张信凤<br>吴鹏<br>侯贤灯<br>邓莉<br>黄承鹏                  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/68 G01N33/533                           |         |            |
| 其他公开文献         | CN107703306A                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

一种在线标记光敏剂的光催化可视化免疫分析方法，是利用石墨烯能同时吸附核酸与光敏剂的特殊性能，将光敏剂在线的标记于免疫分析过程中的核酸适配体上，在LED灯的照射下，光敏剂产生单线态氧，氧化无色TMB变为蓝色，实现可视化半定量分析，同时通过分光光度法实现定量分析。该法避免使用生物酶，稳定性好，使用的抗体或适配体无需标记，具有成本的优点，用肉眼可检测低至0.1 ng mL<sup>-1</sup>癌胚抗原、血管内皮生长因子等蛋白质。该法可大幅度降低医院免疫分析的成本，也适用于偏远、设备缺乏地区疾病的现场诊断。