



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103536295 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 29

(21) 申请号 201310493595. 4

(22) 申请日 2013. 10. 18

(71) 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路
38 号

(72) 发明人 苏彬 许林茹

(74) 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限
公司 33224

代理人 胡红娟

(51) Int. Cl.

A61B 5/117(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

基于电化学发光免疫分析的潜在指纹成像的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于电化学发光免疫分析的潜在指纹成像的方法,包括:将指印按在电极基底上,得到指印样本;往所述指印样本的指印上加入待检测目标代谢物的抗体溶液进行孵育,孵育完成后用缓冲液进行冲洗;将所述的指印样本吹干,然后向指印上加入辣根过氧化物酶标记的二抗进行孵育;或者将所述的指印样本吹干,然后向指印上加入生物素标记的二抗,孵育一段时间后冲洗、吹干指印样本,再向指印上加入链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶进行孵育;孵育后,用所述的缓冲液冲洗指印样本,吹干后制备得到工作电极,然后通过电化学发光成像系统采集指纹图像。本发明的方法在获取指纹图像的同时可实现潜在指纹中目标代谢物的特异性高灵敏检测。

1. 一种基于电化学发光免疫分析的潜在指纹成像的方法,其特征在于,包括:
 - (1) 将指印转移到电极基底上,得到指印样本;
 - (2) 往所述指印样本的指印上加入手指代谢物的抗体溶液进行孵育,孵育完成后用缓冲液进行冲洗;
 - (3) 将所述的指印样本干燥,然后向指印上加入辣根过氧化物酶标记的二抗进行孵育;
或者将所述的经(2)处理后的指印样本干燥,然后向指印上加入生物素标记的二抗,孵育一段时间后冲洗、吹干指印样本,再向指印上加入链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶进行孵育;
 - (4) 孵育后,用所述的缓冲液冲洗指印样本,干燥后制备得到工作电极,然后通过电化学发光成像系统采集指纹图像。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的电极基底为聚苯乙烯镀金片。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤(1)中,所述的指印为血指印或汗潜指印。
4. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述的指印为血指印时,所述的手指代谢物为 IgG。
5. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述的指印为汗潜指印时,所述的手指代谢物为表皮生长因子、溶菌酶或汗腺抗菌肽 Dermcidin。
6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗体溶液的浓度为 0.05 ~ 0.2mg/mL。
7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述辣根过氧化物酶标记的二抗的浓度为 0.04 ~ 0.06mg/mL。
8. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述生物素标记的二抗的浓度为 0.005 ~ 0.02mg/mL。
9. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶的浓度为 3 ~ 6 μ g/mL。
10. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的缓冲液为含 0.1%吐温-20 的 PBS 缓冲液。

基于电化学发光免疫分析的潜在指纹成像的方法

技术领域

[0001] 本发明属于分析化学和指纹检测技术领域,尤其涉及一种基于电化学发光免疫分析的潜在指纹成像的方法。

背景技术

[0002] 潜在指纹是经身体自然分泌物(如汗液)转移形成的指纹纹路,目视不易发现,是案发现场中最常见的指纹。据我国各地不完全统计,警方侦破的刑事案件中,利用指纹破案占七成以上,并且比例正在逐年上升。通常情况下,指纹是犯罪分子在现场留下的最直接物证,所以,研究潜在指纹的显现技术,是提高指纹物证的采取率和利用率的重要环节。

[0003] 现代指纹学的发展已经具有上百年的历史,按照显现原理的不同,传统的潜在指纹显现方法主要分为三类:光学显现法、化学显现法以及物理吸附法。其基本原理是使用一种光线或物质作用于指纹印痕的汗液物质,使不能看见的潜在指纹变为可见的。发展至今,指纹检测不仅在法医鉴定、个体识别方面起着重要作用,同时广泛应用于日常生活中的安全检验、访问控制、个人认证等领域。近年来随着分析科学的发展,人们对指纹的研究已不仅仅停留在利用传统物理或化学手段对其形貌进行观察,同时更加致力于发展各种新兴技术如质谱成像、红外/拉曼成像、扫描电化学显微镜以及荧光免疫成像等,对指纹中的成分进行分析检测,从而发掘出更多有价值的生物学和医学信息。比如,恐怖分子是否接触过爆炸物、一个人是否具有吸烟的习惯,科学家都可以通过指纹检测来获取相关信息。

[0004] 尽管指纹显现技术在刑侦及分析科学中发挥着重大作用,但是目前在指纹显现领域中仍然存在诸多困难。例如,在传统方法中,大多要引用一种外源物质来对潜在指纹进行显现,处理过程较为繁琐复杂,同时对样本具有破坏性。目前广泛使用的烟熏法和刷粉法中采用的小粒度粉末对技术人员存在一定的身体损伤。而新兴的指纹技术如质谱成像法和红外/拉曼成像法,则需要用到昂贵的大型仪器和专业的操作知识,不利于普及。因此目前仍然需要一种简单、快速、适用范围广的方法对潜在指纹进行显现。

[0005] 电化学发光是电化学反应和化学发光相结合的产物。由于电化学发光是发生在电极表面产生的,因此可以反应出电极反应活性,并且具有背景低、时空可控等优点。因此,电化学发光被广泛用于成像研究。电化学发光成像是一种全新的成像技术,兼有化学发光成像和电化学的优点,能同时提供光学图像与电化学两种信号,进行高灵敏高通量检测。目前并未有利用电化学发光免疫分析来对指纹进行检测和成像的报道。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种基于电化学发光免疫分析的潜在指纹成像的方法,该方法简单、快速、灵敏且发光强度高,能够对指纹进行清晰的成像。

[0007] 一种基于电化学发光免疫分析的潜在指纹成像的方法,包括:

[0008] (1) 将指印转移到电极基底上,得到指印样本;

[0009] (2) 往所述指印样本的指印上加入手指代谢物的抗体溶液进行孵育,孵育完成后

用缓冲液进行冲洗；

[0010] (3) 将所述的指印样本干燥,然后向指印上加入辣根过氧化物酶标记的二抗进行孵育；

[0011] 或者将所述的经(2)处理后的指印样本干燥,然后向指印上加入生物素标记的二抗,孵育一段时间后冲洗、吹干指印样本,再向指印上加入链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶进行孵育；

[0012] (4) 孵育后,用所述的缓冲液冲洗指印样本,干燥后制备得到工作电极,然后通过电化学发光成像系统采集指纹图像。

[0013] 人类指纹皮肤表面布满汗腺,触物留痕。一般来说留在客体表面的指纹物质较少,一般为 0.11mg,其中 99% 为水分,会迅速蒸发掉;固体物质只占 1%,其中 2/3 是有机物质,如:氨基酸、蛋白质、脂肪酸、尿素等;剩余 1/3 是无机物质。首先选择手指代谢物的抗体(一抗),以及辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗或者生物素标记的二抗、链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶,通过抗体与手指代谢物的特异性免疫反应,使 HRP 间接标记到指纹上,然后通过电化学发光反应,即可显示出指纹纹路。

[0014] 所述的电极基底为聚苯乙烯镀金片,也可以为玻碳电极、铂电极等。

[0015] 步骤(1)中,所述的指印为血指印或汗潜指印。

[0016] 当所述的指印为血指印时,所述的手指代谢物具体可以为 IgG。

[0017] 当所述的指印为汗潜指印时,所述的手指代谢物为表皮生长因子、溶菌酶或汗腺抗菌肽 Dermcidin。

[0018] 其中,IgG 的抗体为羊抗人 IgG,具体可购自生工生物工程有限公司,货号为 DAC1011;表皮生长因子抗体具体可购自生工生物工程有限公司,货号为 DA1709;溶菌酶抗体可购自生工生物工程有限公司,货号为 DA2322;人汗腺抗菌肽 Dermcidin 抗体可购自百奇生物科技有限公司,货号 AP6718b。

[0019] 所述抗体溶液的浓度为 0.05 ~ 0.2mg/mL,优选的,所述抗体溶液的浓度为 0.1mg/mL。抗体溶液的浓度过高不仅浪费试剂,还会导致非特异性结合,或显色背景重,而浓度过低,则会导致抗原与抗体的反应不完全,电化学发光强度弱,从而影响指纹成像效果。

[0020] 为使反应充分进行,加入抗体溶液后,所述孵育的时间为 25 ~ 35min,优选为 30min。

[0021] 所述辣根过氧化物酶标记的二抗的浓度为 0.04 ~ 0.06mg/mL,优选为 0.05mg/mL,二抗浓度过高会增加非特异性结合,且容易造成发光强度过强,二抗浓度过低则导致发光强度弱,指纹成像不清晰。

[0022] 为使反应充分进行,加入辣根过氧化物酶标记的二抗后,所述孵育的时间为 25 ~ 35min,优选为 30min。

[0023] 本申请中,通过两步法(经手指代谢物的抗体溶液、辣根过氧化物酶标记的二抗检测)或三步法(经手指代谢物的抗体溶液、生物素标记的二抗检测和链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶)均可显现指纹图像,但对于表皮生长因子、溶菌酶或汗腺抗菌肽 Dermcidin,三步法的效果更好,因此,以汗潜指印中的表皮生长因子、溶菌酶或汗腺抗菌肽 Dermcidin 为检测对象时,优选采用三步法。

[0024] 三步法中,所述生物素标记的二抗的浓度为 0.005 ~ 0.02mg/mL,优选为 0.01mg/

mL。所述链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶的浓度为 $3 \sim 6 \mu\text{g/mL}$ ，优选为 $5 \mu\text{g/mL}$ 。采用上述浓度，得到的指纹图像清晰，发光强度高。

[0025] 为使反应充分进行，加入生物素标记的二抗后，所述孵育的时间为 $25 \sim 35\text{min}$ ，优选为 30min ，加入链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶后，所述孵育的时间为 $25 \sim 35\text{min}$ ，优选为 30min 。

[0026] 步骤(2)和(4)中，所述的缓冲液为含 0.1% 吐温-20 的 PBS 缓冲液。

[0027] 通过电化学发光成像系统采集指纹图像时，电位为 $-1 \sim -0.5\text{V}$ ，优选为 -0.75V 。

[0028] 通过电化学发光成像系统采集指纹图像时，电化学发光反应溶液为含 0.15M NaCl、 $3.0 \times 10^{-4}\text{M}$ 鲁米诺、 $1.4 \times 10^{-4}\text{M}$ 对碘苯酚的 Tris-HCl 缓冲溶液，Tris-HCl 缓冲溶液的 pH 为 8.5。

[0029] 电化学反应使电化学发光反应溶液中的溶解 O_2 还原生成 H_2O_2 ，在指纹 HRP 的催化作用下， H_2O_2 与鲁米诺在指纹上产生波长 425nm 的化学发光，从而显现出指纹纹路。

[0030] 与现有技术相比，本发明的有益效果是，

[0031] (1) 本发明的方法简单、检测迅速，只需数秒钟即可得到完整的指纹图像，远远快于扫描电化学显微镜技术(十几至几十小时)。

[0032] (2) 本发明的方法不需要昂贵仪器，便于现场快速实时检测，且发光试剂具有造价低、环境友好的优点。

[0033] (3) 本发明以酶联免疫分析为检测手段、电化学发光成像为信号获取方式，与广泛使用的荧光法相比，本发明的方法不需要外加激发光源，因此不存在背景光干扰，指纹图像更加显著清晰。

[0034] (4) 本发明方法的灵敏度高，可实现汗潜指印中痕量代谢物(表皮生长因子、溶菌酶、人汗腺抗菌肽 Dermcidin 等)的特异性检测，能够在进行个体识别的同时还能实现汗潜指印成分分析的目的。

附图说明

[0035] 图 1 为电化学发光成像系统示意图；

[0036] 图 2 为图 1 中电化学反应池的结构示意图；

[0037] 图 1～图 2 中，1、电化学反应池；2、电化学工作站；3、CCD 照相机；4、底座；5、池体；6、凹槽；7、O 型密封圈；8、螺栓；9、电极孔；10、工作电极；11、对电极；12、参比电极；

[0038] 图 3 为用羊抗人 IgG 检测得到的血指印电化学发光图；

[0039] 图 4a 为用表皮生长因子抗体检测(三步法)得到的潜在指纹电化学发光图；

[0040] 图 4b 为用表皮生长因子抗体检测(两步法)得到的潜在指纹电化学发光图；

[0041] 图 5a 为用溶菌酶抗体检测(三步法)得到的潜在指纹电化学发光图；

[0042] 图 5b 为用溶菌酶抗体检测(两步法)得到的潜在指纹电化学发光图；

[0043] 图 6a 为用人汗腺抗菌肽 Dermcidin 抗体检测(三步法)得到的潜在指纹电化学发光图；

[0044] 图 6b 为用人汗腺抗菌肽 Dermcidin 抗体检测(两步法)得到的潜在指纹电化学发光图；

[0045] 图 6c 为用人汗腺抗菌肽 Dermcidin 抗体检测(两步法，羊抗兔 IgG/HRP 的浓度分

别为 0.005mg/mL) 得到的潜在指纹电化学发光图;

[0046] 图 6d 为用人汗腺抗菌肽 Dermcidin 抗体检测(两步法,羊抗兔 IgG/HRP 的浓度分别为 0.01mg/mL) 得到的潜在指纹电化学发光图;

[0047] 图 6e 为用人汗腺抗菌肽 Dermcidin 抗体检测(两步法,羊抗兔 IgG/HRP 的浓度分别为 0.05mg/mL) 得到的潜在指纹电化学发光图。

具体实施方式

[0048] 下面结合具体实施方式进一步阐释本发明。

[0049] 本发明在电化学发光成像系统上实现,该电化学发光成像系统可采用常规结构。

[0050] 如图 1 和图 2 所示,电化学发光成像系统包括电化学反应池 1、电化学工作站 2 和 CCD 照相机 3。

[0051] 电化学工作站 2 包括由工作电极 10、对电极 11 和参比电极 12 组成的三电极体系,其中,工作电极为聚苯乙烯镀金片,对电极为铂环,参比电极为 Ag/AgCl 电极或饱和甘汞电极。

[0052] 聚苯乙烯镀金片可依据文献(Electrophoresis, 2006, 27 :2940-2950) 的方法进行制备,首先将聚苯乙烯片放在紫外灯下曝光 3h,依次浸在胺化液、1mM HAuCl_4 、0.1mM NaBH_4 及镀金液中,分别反应 3h、2.5h、15min 及 3h,最后在烘箱中 80℃ 下烘干 3h。

[0053] 电化学反应池 1 包括底座 4 和池体 5,均可采用聚四氟乙烯材料,底座 4 上具有用于容纳工作电极 10 的凹槽 6。

[0054] 池体 5 通过螺栓 8 固定在底座 4 上,池体 5 的一侧设有电极孔 9,工作时,参比电极 12 位于该电极孔 9 内,池体 5 中空,池体 5 的中空部位正对凹槽 6,且该中空部位设有 O 型密封圈 7。

[0055] 使用时,将工作电极置于凹槽内、对电极置于池体内,参比电极置于电极孔内,向池体内加入电化学发光溶液,工作电极表面产生的电化学发光会被上方的高灵敏 CCD 照相机捕获,由此得到指印图像。

[0056] 试剂溶液

[0057] (1) 表皮生长因子抗体:购自生工生物工程有限公司,货号为 DA1709;

[0058] (2) 溶菌酶抗体:购自生工生物工程有限公司,货号为 DA2322;

[0059] (3) 人汗腺抗菌肽 Dermcidin 抗体:购自百奇生物科技有限公司,货号为 AP6718b

[0060] (4) 羊抗人 IgG:购自生工生物工程有限公司,货号为 DAC1011;

[0061] (5) 兔抗羊 IgG/HRP:购自 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., 货号为 305-065-003;

[0062] (6) 羊抗兔 IgG/HRP:购自北京博奥森生物技术有限公司,货号为 bsb-0295G;

[0063] (7) 羊抗兔 IgG/生物素:购自北京博奥森生物技术有限公司,货号为 bsb-0295G;

[0064] (8) 链霉亲和素 /HRP:购自北京博奥森生物技术有限公司,货号为 bse-0437P;

[0065] (9) PBS-T:0.1% 吐温 -20 的 PBS 缓冲液, pH 为 7.4。

[0066] (10) 电化学发光反应溶液:含 0.15M NaCl、 3.0×10^{-4} M 鲁米诺、 1.4×10^{-4} M 对碘苯酚的 Tris-HCl 缓冲溶液, Tris-HCl 缓冲溶液的 pH 为 8.5。

[0067] 实施例 1

[0068] (1) 手指上蘸少量新鲜血液,在聚苯乙烯镀金片上按一枚血指印;

[0069] (2) 免疫标记:用免疫组化笔在指印周围画一个圈,以避免抗体溶液扩散,将 100 μ L 0.1mg/mL 羊抗人 IgG (溶解抗体的溶剂均为含 2%BSA,0.1%吐温-20 的 PBS)滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗以洗去未结合的抗体,用氩气将表面吹干,再将 100 μ L 0.05mg/mL 兔抗羊 IgG/HRP 滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗后氩气吹干。

[0070] (3) 电化学发光成像:将上述处理的聚苯乙烯镀金片(工作电极)、对电极和参比电极置于电化学反应池中,加入电化学发光反应溶液,电化学工作站通电,CCD 照相机采集指纹图像。

[0071] 图 3 示出了本实施例采集的电化学发光图像,指纹的纹线清晰分明。

[0072] 实施例 2

[0073] 1、三步法

[0074] (1) 在聚苯乙烯镀金片上按一枚汗潜指印;

[0075] (2) 免疫标记:用免疫组化笔在指印周围画一个圈,以避免抗体溶液扩散,将 100 μ L 0.1mg/mL 表皮生长因子抗体滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗以洗去未结合的抗体,用氩气将表面吹干,再将 100 μ L 0.01mg/mL 羊抗兔 IgG/生物素滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗后氩气吹干,再将 100 μ L 5 μ g/mL 链霉亲和素/HRP 滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗后氩气吹干。

[0076] (3) 电化学发光成像:将上述处理的聚苯乙烯镀金片(工作电极)、对电极和参比电极置于电化学反应池中,加入电化学发光反应溶液,电化学工作站通电,CCD 照相机采集指纹图像。

[0077] 图 4a 示出了本实施例采集的电化学发光图像,指纹的纹线清晰分明。

[0078] 2、两步法

[0079] (1) 在聚苯乙烯镀金片上按一枚汗潜指印;

[0080] (2) 免疫标记:用免疫组化笔在指印周围画一个圈,以避免抗体溶液扩散,将 100 μ L 0.1mg/mL 表皮生长因子抗体滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗以洗去未结合的抗体,用氩气将表面吹干,再将 100 μ L 0.01mg/mL 羊抗兔 IgG/HRP 滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗后氩气吹干。

[0081] (3) 电化学发光成像:将上述处理的聚苯乙烯镀金片(工作电极)、对电极和参比电极置于电化学反应池中,加入电化学发光反应溶液,电化学工作站通电,CCD 照相机采集指纹图像。

[0082] 如图 4b 所示,尽管经一抗、二抗/HRP 处理(两步法)后也可采集到指纹图像,但与经一抗、二抗/生物素、链霉亲和素/HRP 处理的样本图像(三步法)相比,两步法采集的指纹图像发光强度弱,纹理不清晰。

[0083] 实施例 3

[0084] 1、三步法

[0085] (1) 在聚苯乙烯镀金片上按一枚汗潜指印;

[0086] (2) 免疫标记:用免疫组化笔在指印周围画一个圈,以避免抗体溶液扩散,将 100 μ L 0.1mg/mL 溶菌酶抗体滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗以洗去未结合

的抗体,用氩气将表面吹干,再将 100 μ L 0.01mg/mL 羊抗兔 IgG/生物素滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗后氩气吹干,再将 100 μ L 5 μ g/mL 链霉亲和素 /HRP 滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗后氩气吹干。

[0087] (3) 电化学发光成像:将上述处理的聚苯乙烯镀金片(工作电极)、对电极和参比电极置于电化学反应池中,加入电化学发光反应溶液,电化学工作站通电,CCD 照相机采集指纹图像。

[0088] 图 5a 示出了本实施例采集的电化学发光图像,指纹的纹线清晰分明。

[0089] 2、两步法

[0090] (1) 在聚苯乙烯镀金片上按一枚汗潜指印;

[0091] (2) 免疫标记:用免疫组化笔在指印周围画一个圈,以避免抗体溶液扩散,将 100 μ L 0.1mg/mL 溶菌酶抗体滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗以洗去未结合的抗体,用氩气将表面吹干,再将 100 μ L 0.01mg/mL 羊抗兔 IgG/HRP 滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗后氩气吹干。

[0092] (3) 电化学发光成像:将上述处理的聚苯乙烯镀金片(工作电极)、对电极和参比电极置于电化学反应池中,加入电化学发光反应溶液,电化学工作站通电,CCD 照相机采集指纹图像。

[0093] 如图 5b 所示,尽管经一抗、二抗 /HRP 处理(两步法)后也可采集到指纹图像,但与经一抗、二抗 /生物素、链霉亲和素 /HRP 处理的样本图像(三步法)相比,两步法采集的指纹图像发光强度弱,不均匀,纹理不清晰。

[0094] 实施例 4

[0095] 1、三步法

[0096] (1) 在聚苯乙烯镀金片上按一枚汗潜指印;

[0097] (2) 免疫标记:用免疫组化笔在指印周围画一个圈,以避免抗体溶液扩散,将 100 μ L 0.1mg/mL 人汗腺抗菌肽 Dermcidin 抗体滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗以洗去未结合的抗体,用氩气将表面吹干,再将 100 μ L 0.01mg/mL 羊抗兔 IgG/生物素滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗后氩气吹干,再将 100 μ L 5 μ g/mL 链霉亲和素 /HRP 滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗后氩气吹干。

[0098] (3) 电化学发光成像:将上述处理的聚苯乙烯镀金片(工作电极)、对电极和参比电极置于电化学反应池中,加入电化学发光反应溶液,电化学工作站通电,CCD 照相机采集指纹图像。

[0099] 图 6a 示出了本实施例采集的电化学发光图像,指纹的纹线清晰分明。

[0100] 2、两步法

[0101] (1) 在聚苯乙烯镀金片上按一枚汗潜指印;

[0102] (2) 免疫标记:用免疫组化笔在指印周围画一个圈,以避免抗体溶液扩散,将 100 μ L 0.1mg/mL 人汗腺抗菌肽 Dermcidin 抗体滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗以洗去未结合的抗体,用氩气将表面吹干,再将 100 μ L 0.01mg/mL 羊抗兔 IgG/HRP 滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗后氩气吹干。

[0103] (3) 电化学发光成像:将上述处理的聚苯乙烯镀金片(工作电极)、对电极和参比电极置于电化学反应池中,加入电化学发光反应溶液,电化学工作站通电,CCD 照相机采集指

纹图像。

[0104] 如图 6b 所示,尽管经一抗、二抗 /HRP 处理(两步法)后也可采集到指纹图像,但与经一抗、二抗 / 生物素、链霉亲和素 /HRP 处理的样本图像(三步法)相比,两步法采集的指纹图像发光强度弱,纹理不清晰。

[0105] 3、不同羊抗兔 /HRP 浓度对指纹图像的影响

[0106] (1) 在聚苯乙烯镀金片上按一枚汗潜指印;

[0107] (2) 免疫标记:用免疫组化笔在指印周围画一个圈,以避免抗体溶液扩散,将 100 μ L 0.1mg/mL 人汗腺抗菌肽 Dermcidin 抗体滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗以洗去未结合的抗体,用氩气将表面吹干,再将 100 μ L 羊抗兔 IgG/HRP 滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗后氩气吹干。

[0108] (3) 电化学发光成像:将上述处理的聚苯乙烯镀金片(工作电极)、对电极和参比电极置于电化学反应池中,加入电化学发光反应溶液,电化学工作站通电,CCD 照相机采集指纹图像。

[0109] 羊抗兔 IgG/HRP 的浓度分别为 0.005、0.01、0.05mg/mL。

[0110] 采集的指纹图像如图 6c-6e 所示,可以看出羊抗兔 IgG/HRP 的浓度(0.005mg/mL)太低时电化学发光很弱,无法显示指纹(图 6c),二抗的浓度为 0.01mg/mL 可以使反应充分,继续提高二抗的浓度(0.05mg/mL)时会使电化学发光太强,也不利于指纹的显现(图 6e),所以二抗的浓度为 0.01mg/mL 时效果较佳(图 6d)。

[0111] 上述实施例用来解释说明本发明,而不是对本发明进行限制,在本发明的精神和权利要求的保护范围内,对本发明作出的任何修改和改变,都落入本发明的保护范围。

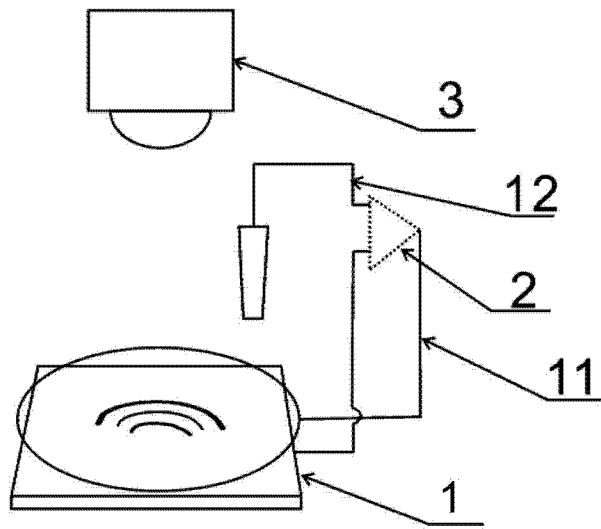


图 1

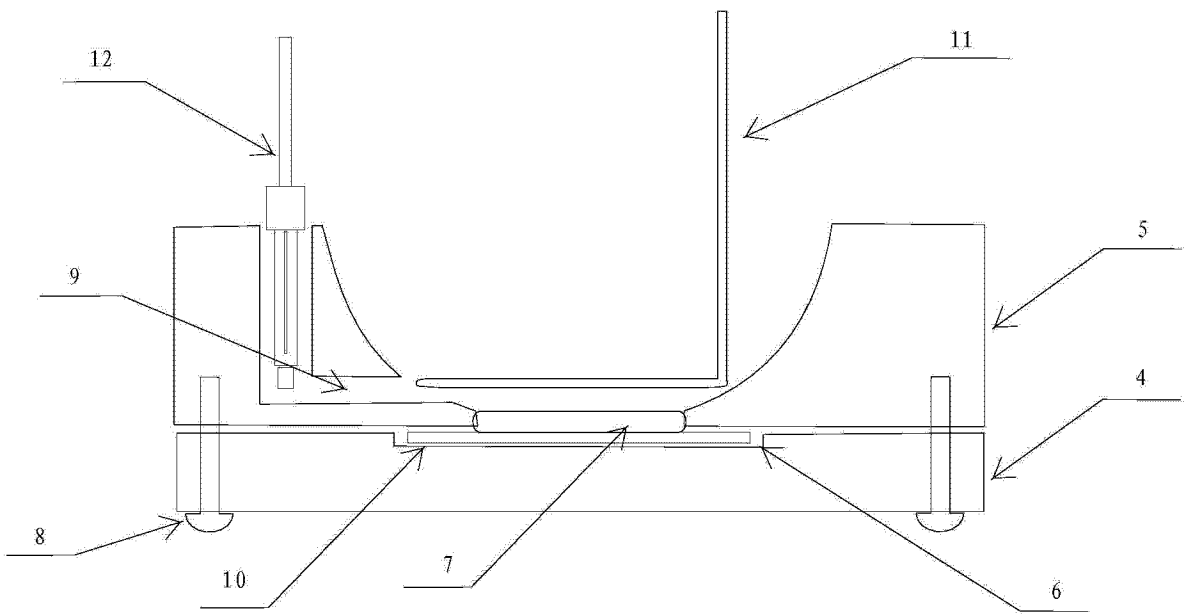


图 2



图 3



图 4a

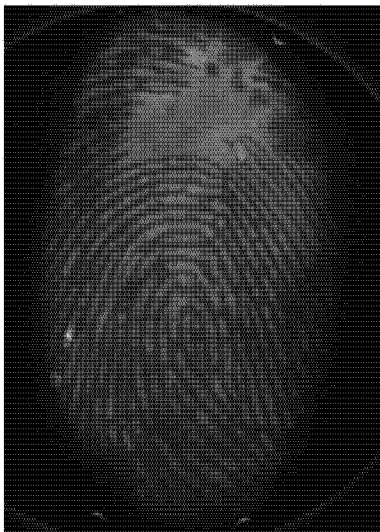


图 4b



图 5a

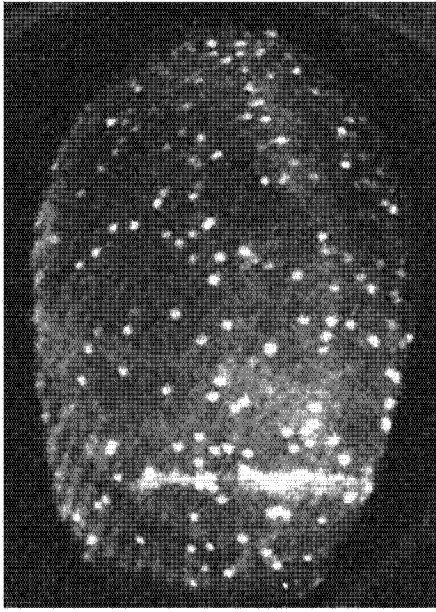


图 5b



图 6a

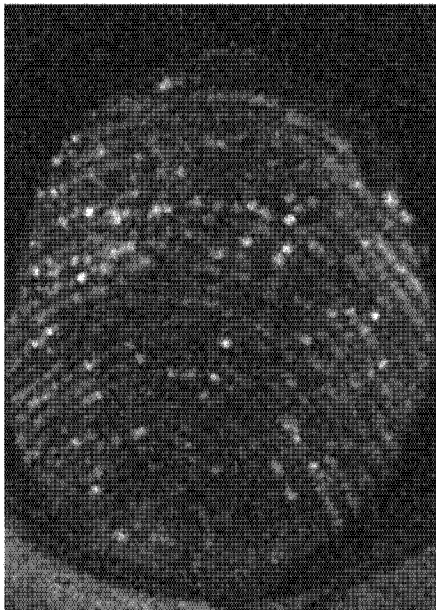


图 6b

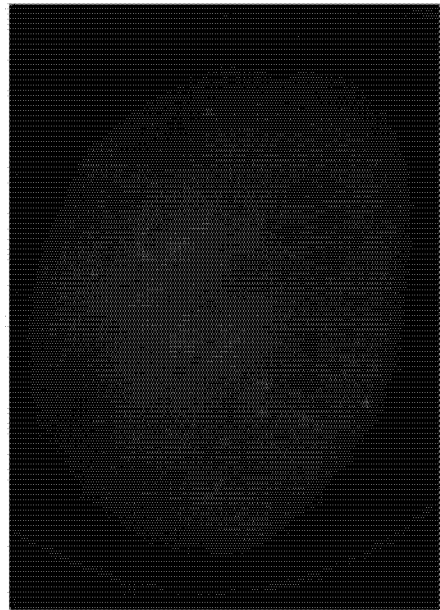


图 6c

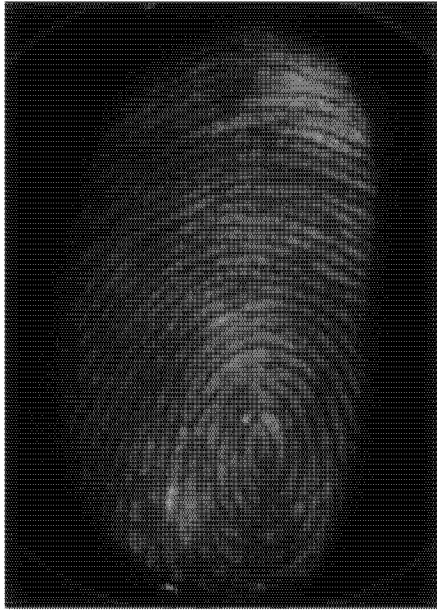


图 6d

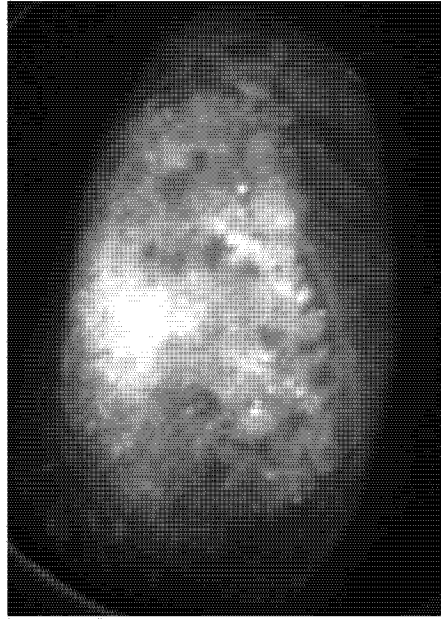


图 6e

专利名称(译)	基于电化学发光免疫分析的潜在指纹成像的方法		
公开(公告)号	CN103536295A	公开(公告)日	2014-01-29
申请号	CN201310493595.4	申请日	2013-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	苏彬 许林茹		
发明人	苏彬 许林茹		
IPC分类号	A61B5/117 G01N33/535 G01N21/76		
代理人(译)	胡红娟		
其他公开文献	CN103536295B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于电化学发光免疫分析的潜在指纹成像的方法，包括：将指印按在电极基底上，得到指印样本；往所述指印样本的指印上加入待检测目标代谢物的抗体溶液进行孵育，孵育完成后用缓冲液进行冲洗；将所述的指印样本吹干，然后向指印上加入辣根过氧化物酶标记的二抗进行孵育；或者将所述的指印样本吹干，然后向指印上加入生物素标记的二抗，孵育一段时间后冲洗、吹干指印样本，再向指印上加入链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶进行孵育；孵育后，用所述的缓冲液冲洗指印样本，吹干后制备得到工作电极，然后通过电化学发光成像系统采集指纹图像。本发明的方法在获取指纹图像的同时可实现潜在指纹中目标代谢物的特异性高灵敏检测。

