



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109406770 A

(43)申请公布日 2019.03.01

(21)申请号 201811159246.8

(22)申请日 2018.09.30

(71)申请人 华南理工大学

地址 510640 广东省广州市天河区五山路
381号

(72)发明人 唐本忠 沈建磊 秦安军

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有
限公司 44245

代理人 陈智英

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

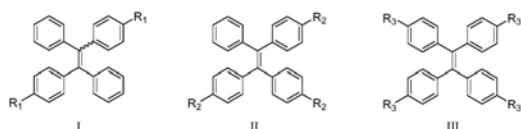
权利要求书2页 说明书7页
序列表1页 附图6页

(54)发明名称

一种双模式ELISA酶免显色剂及其制备与应用

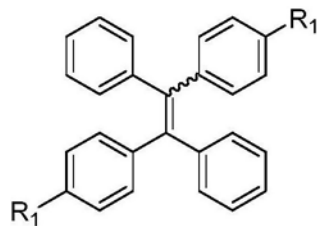
(57)摘要

本发明属于免疫学的技术领域,公开了一种双模式ELISA酶免显色剂及其制备与应用。所述显色剂包括具有酶催化响应的聚集诱导发光材料;该聚集诱导发光材料为式I、II、III中一种以上。所述显色剂还包括双氧水和PBS溶液。本发明的显色剂在ELISA酶免诊断试剂盒中的应用。本发明的酶免显色剂具有更快的酶响应速度和灵敏度、更好的光稳定性;利用双氧水和PBS溶液以及上述聚集诱导发光材料,在与酶反应后,通过加入水或硫酸终止反应,一次测试中产生双重模式信号(吸收信号和荧光信号),实现免疫检测灵敏度与线性检测区间的双提升,如前列腺特异抗原的检测灵敏度达到1.6pg/mL,线性检测区间覆盖7个数量级。

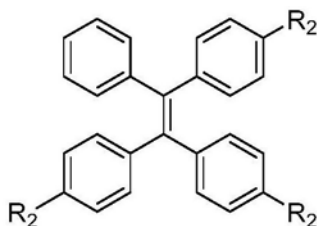


1. 一种双模式ELISA酶免显色剂,其特征在于:包括具有酶催化响应的聚集诱导发光材料;

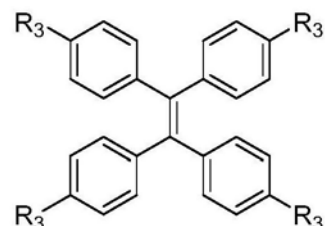
所述具有酶催化响应的聚集诱导发光材料为式I、II、III中一种以上:



I



II

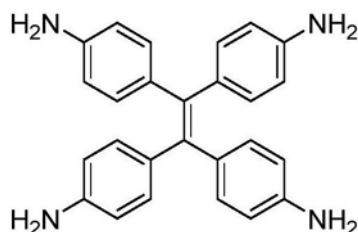


III

其中 R_1, R_2, R_3 各自独立地为羟基或氨基基团。

2. 根据权利要求1所述双模式ELISA酶免显色剂,其特征在于: R_1, R_2, R_3 各自独立地为氨基。

3. 根据权利要求2所述双模式ELISA酶免显色剂,其特征在于:所述具有酶催化响应的聚集诱导发光材料为式IV化合物:



IV

4. 根据权利要求1所述双模式ELISA酶免显色剂,其特征在于:还包括双氧水和PBS溶液。

5. 根据权利要求4所述双模式ELISA酶免显色剂,其特征在于:所述PBS溶液的pH为5~8,浓度为0.05M~0.2M。

6. 根据权利要求1~5任一项所述双模式ELISA酶免显色剂的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

采用有机溶剂将具有酶催化响应的聚集诱导发光材料配成溶液,然后将聚集诱导发光材料溶液、双氧水以及PBS溶液混合,获得酶免显色液即双模式ELISA酶免显色剂。

7. 根据权利要求6所述双模式ELISA酶免显色剂的制备方法,其特征在于:所述聚集诱导发光材料在有机溶剂中的浓度为0.5~50mM;

所述聚集诱导发光材料溶液与PBS溶液的体积比为(1~5):(5~9);所述双氧水的浓度为1 μ M~0.5M;

所述集诱导发光材料溶液与双氧水的体积比为3:(0.1~3);

所述有机溶剂为1,4-二氧六环、DMSO、四氢呋喃、乙二醇、丙酮、羟基丙酸或DMF中一种以上。

8. 根据权利要求1~5任一项所述双模式ELISA酶免显色剂在ELISA酶免诊断试剂盒中的应用。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于:所述ELISA酶免诊断试剂盒包括双模式

ELISA酶免显色剂,反应终止液;当采用双模式ELISA酶免显色剂时,反应终止液为水或2M H_2SO_4 溶液。

10.根据权利要求8所述的应用,其特征在于:所述ELISA酶免诊断试剂盒,还包括酶;所述酶为过氧辣根化物酶、漆酶、葡萄糖氧化酶/HRP混合酶、金纳米粒子/HRP混合酶或G-四联体/Hemin复合物。

一种双模式ELISA酶免显色剂及其制备与应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学及免疫检测学领域,具体涉及一种双模式ELISA酶免显色剂及其制备方法与应用。本发明使用一种酶响应的双模式ELISA显色剂实现免疫检测灵敏度与线性检测区间的双提升。

背景技术

[0002] 高效的将生物识别过程中的信号转换为可分析处理光物理信号是现代分析检测领域的研究主要内容。通过信号转换,一些与疾病相关的生物标志物的踪迹将会得到显示。这些生物标志物的信息不仅可以用于鉴定疾病的种类,评估治疗手段的效率,还可以检测肿瘤的发展阶段。在现今的实验室及临床检验中,酶联免疫分析(ELISA)是应用最为广泛的生物识别信号转换工具。ELISA具有操作简单、适用性广等优点。相比于其它工具,如聚合酶链式反应(PCR)、电化学、表面增强拉曼、表面等离子体共振、石英晶体微平台及表面等离子体学等,ELISA转换生成的吸收或荧光信号更加易于数据采集及处理。尽管如此,传统的ELISA仍然存在一些缺陷,如:(1)传统ELISA的检测灵敏度通常要高于 10^{-12} M。而对于一些疾病相关的肿瘤标志物而言,这个检测灵敏度并不足够。尤其是在疾病早期阶段,如在艾滋病感染早期血液中的p24抗原的浓度通常会低于 10^{-14} M。(2)传统ELISA线性检测区间通常只有4-5个数量级。然而,很多病人由于体质或感染阶段的不同,血液中病原体的含量可能会有很大的波动。因此,发展一种新的技术同时提高ELISA检测过程检测灵敏度及线性检测区间具有重要的意义。

[0003] 为了提高ELISA的检测灵敏度,各种信号放大技术被整合进传统ELISA中。如PCR、DNA编码技术、纳米晶体的信号放大、微流控、微阵列技术等。通过这些信号方法技术,虽然极大的提高的检测灵敏度,但是同时也增加了实验操作步骤,牺牲了传统ELISA的简便性。现有的ELISA并不同时具有高的检测灵敏度和线性检测区间。

发明内容

[0004] 针对现有技术中存在的问题,发展一种提高检测灵敏度及线性检测区间的ELISA是非常有意义的,本发明的目的在于提供一种同时提高检测灵敏度与检测线性区间的双模式ELISA酶免显色剂及其制备方法。

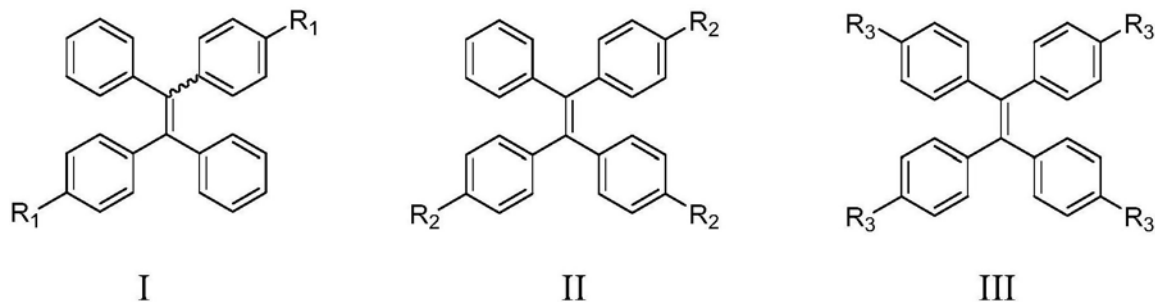
[0005] 本发明的另一目的在于提供上述双模式ELISA酶免显色剂的应用。

[0006] 为了达到上述目的,本发明采用以下技术方案实现:

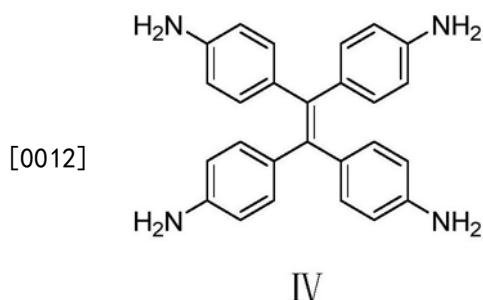
[0007] 一种双模式ELISA酶免显色剂,包括具有酶催化响应的聚集诱导发光材料;

[0008] 所述具有酶催化响应的聚集诱导发光材料为式I、II、III中一种以上:

[0009]

[0010] 其中 R_1, R_2, R_3 各自独立地为羟基或氨基基团,优选为氨基。

[0011] 所述具有酶催化响应的聚集诱导发光材料优选为式IV化合物:

[0013] 式IV结构命名为TPE- $(NH_2)_4$ 。

[0014] 所述双模式ELISA酶免显色剂,还包括双氧水和PBS溶液;

[0015] 所述PBS溶液的pH为5~8,浓度为0.05M-0.2M。

[0016] 所述双模式ELISA酶免显色剂的制备方法,包括以下步骤:

[0017] 采用有机溶剂将具有酶催化响应的聚集诱导发光材料配成溶液,然后将聚集诱导发光材料溶液、双氧水以及PBS溶液混合,获得酶免显色液即双模式ELISA酶免显色剂。

[0018] 所述聚集诱导发光材料在有机溶剂中的浓度为0.5-50mM,优选为1~20mM;

[0019] 所述聚集诱导发光材料溶液与PBS溶液的体积比为(1~5):(5~9),优选为3:7。所述双氧水的浓度为 $1\mu M \sim 0.5M$,优选为0.1M。

[0020] 所述集诱导发光材料溶液与双氧水的体积比为3:(0.1~3),优选为3:1。

[0021] 所述有机溶剂为1,4-二氧六环、二甲基亚砜(DMSO)、四氢呋喃、乙二醇、丙酮、羟基丙酸或二甲基甲酰胺(DMF)中一种以上,优选为1,4-二氧六环。

[0022] 所述双模式ELISA酶免显色剂的显色方法,包括以下步骤:

[0023] 将双模式ELISA酶免显色剂与酶孵育,加入反应终止液终止反应,测试溶液的光吸收值及荧光值。所述反应终止液为水或2M H_2SO_4 溶液;所述酶为过氧辣根化物酶(HRP)、漆酶、葡萄糖氧化酶/HRP混合酶、金纳米粒子/HRP混合酶或G-四联体/Hemin复合物。

[0024] 所述酶为游离的酶或通过抗原-抗体结合方式固定于界面的酶。

[0025] 所述双模式ELISA酶免显色剂在ELISA酶免诊断试剂盒中的应用。

[0026] 所述试剂盒,包括双模式ELISA酶免显色剂,反应终止液;当采用双模式ELISA酶免显色剂时,反应终止液为水或2M H_2SO_4 溶液。所述反应终止液的用量为双模式ELISA酶免显色剂的1~10倍。

[0027] 所述试剂盒,还包括酶;所述酶为过氧辣根化物酶(HRP)、漆酶、葡萄糖氧化酶/HRP混合酶、金纳米粒子/HRP混合酶或G-四联体/Hemin复合物。

[0028] 所述试剂盒还包括抗原,所述抗原为前列腺特异抗原(PSA)、甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、糖类抗原125、糖类抗原199、糖类抗原153、HIV抗体或p24抗原中一种或多种。

[0029] 所述试剂盒还包括抗体,所述抗体为抗前列腺特异抗原(PSA)抗体、抗甲胎蛋白(AFP)抗体、抗癌胚抗原(CEA)抗体、抗糖类抗原125抗体、抗糖类抗原199抗体、抗糖类抗原153抗体、抗HIV抗体或抗p24抗体中一种或多种,抗体来源为小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、人、豚鼠、猪、马、牛、鸡或鸭(一般又称为一抗)。

[0030] 所述试剂盒还包括酶标记的二抗,所述的酶为过氧辣根化物酶(HRP)、漆酶、葡萄糖氧化酶或G-四联体。所述的二抗来源为小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、人、豚鼠、猪、马、牛、鸡或鸭。

[0031] 所述试剂盒还包括抗体吸附基底,所述的抗体吸附基底为由光学透明纯聚苯乙烯材料制备的6孔板,12孔板,24孔板,96孔板或384孔板。

[0032] 使用试剂盒时,酶需通过抗原-抗体结合方式进行固定。

[0033] 与现有酶免显色剂相比,本发明的酶免显色剂具有更快的酶响应速度和灵敏度、更好的光稳定性,反应结束可以通过加入水来终止反应,一次测试中可以产生双重模式信号(吸收信号和荧光信号),结合两种信号可以实现疾病标志物的灵敏检测,以前列腺特异抗原(PSA)为例,其检测灵敏度可以达到1.6pg/mL (4.7×10^{-14} M),线性检测区间覆盖7个数量级。

[0034] 相对于现有技术,本发明具有如下优点及有益效果:

[0035] 本发明的双模式ELISA显色剂在进行抗原检测时可以同时产生两种光学信号(光学吸收及荧光信号),该双模式ELISA显色剂并不增加信号采集和处理的难度,具有更加优异的光学稳定性,而且具有高检测灵敏度与检测线性区间(在针对PSA的ELISA检测中检测灵敏度达到1.6pg/mL (4.7×10^{-14} M),线性检测区间达到7个数量级)。

附图说明

[0036] 图1为实施例1步骤(4)中TPE-(NH₂)₄在酶催化反应前后吸收的光谱(a)及荧光光谱的变化(b);

[0037] 图2为实施例1步骤(4)过氧辣根化物酶(HRP)催化化合物TPE-(NH₂)₄进行十次重复反应的信号强度变化曲线;

[0038] 图3为实施例2步骤(1)不同反应条件下催化反应效果图;从上至下依次优化参数为TPE-(NH₂)₄浓度,HRP浓度及H₂O₂浓度;对于TPE-(NH₂)₄而言,从左至右,浓度依次为10mM, 1mM, 100μM, 10μM, 1μM, 100nM, 10nM, 1nM;对于HRP浓度而言,从左至右2mg/mL, 1mg/mL, 100μg/mL, 10μg/mL, 1μg/mL, 100ng/mL, 10ng/mL, 1ng/mL;对于H₂O₂浓度而言,从左至右,100mM, 10mM, 1mM, 100μM, 10μM, 1μM, 100nM, 10nM;

[0039] 图4为实施例2步骤(2) TPE-(NH₂)₄与传统显色化合物(OPD, TMB, ABTS)对不同浓度酶响应速度的对比;(a)反应时间为5分钟;(b)反应时间为30分钟;每一显色化合物下,从左至右,每个孔道中HRP的浓度依次为2mg/mL, 1mg/mL, 100μg/mL, 10μg/mL, 1μg/mL, 100ng/mL, 10ng/mL, 1ng/mL;双氧水浓度为10mM;

[0040] 图5为实施例2步骤(3) TPE-(NH₂)₄与传统显色化合物(TMB)光稳定性比较;从左至右,加入HRP浓度依次为2mg/mL, 1mg/mL, 100μg/mL, 10μg/mL, 1μg/mL, 100ng/mL, 10ng/mL,

1ng/mL;

[0041] 图6为实施例3步骤(1)不同酶催化体系催化TPE-(NH₂)₄溶液的变色反应;(a)葡萄糖氧化酶(GOx)与HRP酶形成酶级联反应催化变色反应的过程图;(b)金纳米粒子(Au NPs)与辣根过氧化物酶结合的级联酶催化变色反应;(c)DNAG-四联体结构(G-quadruplex)与Hemin分子结合模拟辣根过氧化物酶催化变色反应;(d)三种不同酶体系反应后样品在可见光与紫外光下的照片,对照组没有加入任何酶;

[0042] 图7为实施例4步骤(1)基于TPE-(NH₂)₄溶液催化反应产生双模式信号图;(a)不同酶浓度下催化反应在加水终止反应前后其在可见光及紫外光照射下的图,从左至右HRP浓度为1ng/mL,10ng/mL,100ng/mL,1μg/mL,10μg/mL,100μg/mL,1mg/mL,2mg/mL;(b)归一化的荧光强度与吸收强度随着HRP浓度变化的变化曲线;

[0043] 图8为实施例4步骤(2)和(3)利用TPE-(NH₂)₄溶液与商业化ELISA试剂盒(PSA(Total)/KLK3Human ELISA kit,货号:EHLK3T,Thermo Fisher,美国)结合进行PSA检测;(a)步骤(2)中TPE-(NH₂)₄与商业化TMB显色液在不同浓度PSA检测中可见光(上图)和紫外光(下图)下显色结果图;(b)不同浓度PSA经过ELISA反应处理后产生的荧光及吸收信号,从左至右,PSA浓度为0pg/mL,1.6pg/mL,8pg/mL,40pg/mL,200pg/mL,1ng/mL,5ng/mL,25ng/mL;

[0044] 图9为实施例5利用TPE-(NH₂)₄与商业化ELISA试剂盒(PSA(Total)/KLK3Human ELISA kit,货号:EHLK3T,Thermo Fisher,美国)结合进行病人血液样本中PSA检测;图中数值显示相同样本通过电化学发光测试测得的PSA浓度。

具体实施方式

[0045] 下面结合实施例对本发明进行具体地描述,但本发明的保护范围不限于以下实施例。

[0046] 实施例1

[0047] 本实施例中双模式ELISA酶免显色剂包括具有酶催化响应的聚集诱导发光材料TPE-(NH₂)₄。所述显色剂还包括双氧水、PBS缓冲溶液。

[0048] 双模式ELISA酶免显色剂的制备及其显色方法如下:

[0049] (1)将TPE-(NH₂)₄溶解于1,4-二氧六环里,终浓度为10mM;

[0050] (2)将HRP溶解于1×PBS缓冲液里,终浓度为1mg/mL;

[0051] (3)配置H₂O₂溶液,浓度为0.1M;

[0052] (4)取30μL TPE-(NH₂)₄溶液,加入70μL 1×PBS缓冲液,加入10μL双氧水溶液,混匀,获得双模式ELISA酶免显色剂溶液;然后加入10μL HRP溶液,反应30分钟;重复上述相同操作10次,测量每个溶液的吸收光谱,取600nm处吸收值强度做图。

[0053] 本实施例步骤(4)中TPE-(NH₂)₄在酶催化反应前后吸收光谱及发射光谱如图1所示;(a)为反应前后溶液的吸收光谱变化,内插图片为反应前后溶液颜色的变化;(b)为反应前后溶液荧光光谱的变化,其中反应前荧光的采集时加入等体积的去离子水使得TPE-(NH₂)₄析出,内插图片为反应前后溶液在紫外照射下荧光的变化。

[0054] 本实施例步骤(4)中采用相同的条件和步骤进行十次酶催化反应,获得10个溶液,测试每个溶液吸收光谱并提取600nm处吸收值做图如图2所示,十次实验结果溶液的吸收强度变化微小。图2为实施例1步骤(4)过氧辣根化物酶(HRP)催化化合物TPE-(NH₂)₄进行十次

重复反应的信号强度变化曲线。

[0055] 实施例2

[0056] (1) 取96孔板,分别加入70 μ L 1 $\times$ PBS,不同浓度的30 μ L TPE-(NH₂)₄溶液,从左至右,加入TPE-(NH₂)₄溶液浓度分别为10mM,1mM,100 μ M,10 μ M,1 μ M,100nM,10nM,1nM;随后分别加入10 μ L HRP (1mg/mL) 和10 μ L H₂O₂ (0.1M);

[0057] 另起一行,分别加入70 μ L 1 $\times$ PBS,然后加入30 μ L TPE-(NH₂)₄溶液 (10mM),随后加入10 μ L H₂O₂,最后加入10 μ L不同浓度HRP,从左至右,HRP浓度分别为2mg/mL,1mg/mL,100 μ g/mL,10 μ g/mL,1 μ g/mL,100ng/mL,10ng/mL,1ng/mL;

[0058] 再起一行,分别加入70 μ L 1 $\times$ PBS,30 μ L TPE-(NH₂)₄溶液 (10mM),随后加入10 μ L不同浓度H₂O₂,从左至右,H₂O₂浓度依次为100mM,10mM,1mM,100 μ M,10 μ M,1 μ M,100nM,10nM,最后每孔中加入10 μ L HRP (1mg/mL)。

[0059] (2) 取96孔板,向四排孔中分别加入70 μ L 1 $\times$ PBS,第一排孔中加入30 μ L OPD (10mM),第二排中加入30 μ L TMB (10mM),第三排中加入ABTS (10mM),第四排中加入TPE-(NH₂)₄ (10mM);然后向每排96孔板中加入不同浓度的HRP溶液,从左至右,HRP溶液加入浓度分别为2mg/mL,1mg/mL,100 μ g/mL,10 μ g/mL,1 μ g/mL,100ng/mL,10ng/mL,1ng/mL;最后向每个孔中加入10 μ L H₂O₂ (0.1M)。

[0060] (3) 取96孔板,在两排中分别加入70 μ L 1 $\times$ PBS,从左至右,每排中分别加入10 μ L HRP,浓度依次为2mg/mL,1mg/mL,100 μ g/mL,10 μ g/mL,1 μ g/mL,100ng/mL,10ng/mL,1ng/mL;随后,每孔中分别加入10 μ L H₂O₂ (0.1M);最后,第一排每孔中加入30 μ L TMB溶液 (10mM),反应10分钟,用1M H₂SO₄终止反应;第二排每孔中加入30 μ L TPE-(NH₂)₄溶液 (10mM),反应30分钟用去离子水中和反应;拍照,然后在紫外灯下照射两分钟,拍照,室温放置24小时,拍照。

[0061] 本实施例步骤(1)中不同反应条件下(不同TPE-(NH₂)₄浓度,HRP浓度及H₂O₂浓度)催化反应效果图如图3所示。随着TPE-(NH₂)₄浓度的减小,反应后溶液颜色深度减弱。随着HRP浓度的减小,溶液颜色深度逐渐减小。随着H₂O₂浓度的减小,溶液的颜色左起1,2孔内颜色先加深,随后2-8孔颜色逐渐减弱。

[0062] 本实施例步骤(2)中TPE-(NH₂)₄与传统显色化合物(OPD,TMB,ABTS)对不同浓度酶响应速度的对比如图4所示((a)反应时间为5分钟;(b)反应时间为30分钟),每一显色化合物下,从左至右,酶的浓度分别为2mg/mL,1mg/mL,100 μ g/mL,10 μ g/mL,1 μ g/mL,100ng/mL,10ng/mL,1ng/mL。相比于其它三种显色底物,在5分钟及30分钟时,TPE-(NH₂)₄均表现出最佳的酶响应速度。

[0063] 本实施例步骤(3)中TPE-(NH₂)₄与TMB的光稳定性比较如图5所示,第一排和第二排中从左至右,HRP浓度分别为2mg/mL,1mg/mL,100 μ g/mL,10 μ g/mL,1 μ g/mL,100ng/mL,10ng/mL,1ng/mL。反应终止后,左起1-4孔均具有一定的颜色,而5-8孔颜色较弱。经过2分钟的紫外灯照射后,TPE-(NH₂)₄组颜色并没有明显变化,而TMB组所有孔中均出现颜色。放置24小时后,TPE-(NH₂)₄组颜色仍然没有什么变化,而TMB组的颜色全部变得澄清。TPE-(NH₂)₄表现出了最佳的稳定性。

[0064] 实施例3

[0065] (1) 配置葡萄糖氧化酶溶液 (1 $\times$ PBS,1mg/mL),葡萄糖溶液 (0.1M);取70 μ L 1 $\times$ PBS,加入30 μ L TPE-(NH₂)₄溶液,再依次加入10 μ L葡萄糖溶液,葡萄糖氧化酶溶液 (10 μ L,

2mg/mL),最后加入10 μ L HRP酶,反应30分钟后,用100 μ L去离子水终止反应。

[0066] (2)取金纳米粒子(15nm,10nM,)溶液10 μ L,加入10葡萄糖溶液(0.1M),反应半小时,离心除去金纳米粒子,保留上清液;另取一个试管,先后往里面加入70 μ L 1 $\times$ PBS,30 μ L TPE-(NH₂)₄,将上述获取金纳米催化上清液,最后加入10 μ L HRP酶溶液(1mg/mL),反应2小时后用100 μ L去离子水终止反应。

[0067] (3)DNA与Hemin在溶液中形成G-四联体/Hemin复合物结构,DNA浓度为100nM,Hemin的浓度为200nM,缓冲液为10mM Tris,50mM KCl,MgCl₂,pH为8.0,孵育半小时;另取一个试管,依次加入70 μ L 1 $\times$ PBS,30 μ L TPE-(NH₂)₄,10 μ L H₂O₂(0.1M),最后加入100 μ L上述制备的G-四联体/Hemin复合物,反应2小时后用100 μ L去离子水终止反应。

[0068] DNA序列:5'-GTGGGTAGGGCGGGTTGG-3'

[0069] 图6为实施例3步骤(1)不同酶催化体系催化TPE-(NH₂)₄溶液的变色反应。本实施例步骤(1)中利用葡萄糖氧化酶(GOx)与HRP酶形成酶级联反应催化变色反应的过程图如图6(a)所示。本实施例步骤(2)中,利用金纳米粒子(Au NPs)与HRP酶形成酶级联反应催化变色反应的过程图如图6(b)所示。本实施例(3)中,利用G-四联体/Hemin复合物(G-quadruplex+Hemin)催化变色反应的过程图如图6(c)所示。图6(d)是三种酶体系的催化效果(三种不同酶体系反应后样品在可见光与紫外光下的照片),其中葡萄糖与HRP形成的级联催化效应效果最好。对照组没有加入任何酶进行催化。

[0070] 实施例4

[0071] (1)取一排96孔板,依次加入70 μ L 1 $\times$ PBS,30 μ L TPE-(NH₂)₄,10 μ L H₂O₂(0.1M),从左至右每孔依次加入10 μ L 1ng/mL,10ng/mL,100ng/mL,1 μ g/mL,10 μ g/mL,100 μ g/mL,1mg/mL,2mg/mL HRP酶溶液。反应30分钟,分别在可见光及紫外光下拍照。然后加入100 μ L去离子水,再分别在可见光下及紫外光下拍照。然后测试每个孔中在600nm的吸收强度及500nm的荧光强度。

[0072] (2)首先按照商业化PSA的ELISA检测试剂盒(PSA(Total)/KLK3Human ELISA kit,货号:EHLK3T,Thermo Fisher,美国)的说明将PSA抗体,抗原,HRP酶进行固定,然后将商业化的TMB溶液替换为TPE-(NH₂)₄及H₂O₂混合液。同时,商业化试剂盒自带的TMB显色液作为显色对照进行实验对比。取一排八个孔道分别加入不同浓度的PSA,从左至右,PSA浓度分别为0,10.24,25.6,64,160,400,1000,2500pg/mL。随后进行HRP的捕获,实验组加入100 μ L TPE-(NH₂)₄、1 $\times$ PBS、H₂O₂的混合液(30/70/10,体积比)。对照组,加入100 μ L TMB显色液。反应半小时后,实验组用100 μ L去离子水终止反应,对照组中加入50 μ L终止液。在可见光下及紫外光下分别进行拍照。

[0073] (3)取一排商业化PSA检测ELISA 96孔板,分别往里面加入PSA浓度为0pg/mL,1.6pg/mL,8pg/mL,40pg/mL,200pg/mL,1ng/mL,5ng/mL,25ng/mL,PSA及HRP酶的固定操作后,加入100 μ L TPE-(NH₂)₄显色液(TPE-(NH₂)₄/1 $\times$ PBS/H₂O₂,体积比30/70/10)。显色反应30分钟,加入100 μ L去离子水终止反应。用酶标仪分别测量溶液在600nm处的吸收和500nm处的发射并绘制曲线。

[0074] 本实施例步骤(1)中基于TPE-(NH₂)₄溶液利用不同浓度酶催化反应产生双模式的信号的图如图7所示;(a)不同酶浓度下催化反应在加水终止反应前后其在可见光及紫外光照射下的图。从左至右,HRP的浓度依次加入10 μ L 1ng/mL,10ng/mL,100ng/mL,1 μ g/mL,10 μ

g/mL, 100 μ g/mL, 1mg/mL, 2mg/mL。(b) 反应终止后600nm处的吸收峰和500nm处的荧光峰分别对HRP的浓度做图即反应终止后, 不同HRP浓度下的归一化的荧光强度与吸收强度曲线。

[0075] 本实施例步骤(2)中比较TPE-(NH₂)₄与商业化TMB显色液在不同浓度PSA检测中可见光(上图)和紫外光(下图)下显色结果如图8(a)所示;(a)从左至右, PSA的浓度分别为0, 10.24, 25.6, 64, 160, 400, 1000, 2500pg/mL, 反应终止后, TMB只能产生单峰信号, 而TPE-(NH₂)₄显色液可以产生两种信号。

[0076] 本实施例步骤(3)利用TPE-(NH₂)₄检测PSA的结果如图8(b)所示, 图8(b)为不同浓度PSA经过ELISA反应处理后产生的荧光及吸收信号图, 从左至右, PSA浓度为0pg/mL, 1.6pg/mL, 8pg/mL, 40pg/mL, 200pg/mL, 1ng/mL, 5ng/mL, 25ng/mL。针对PSA的检测其检测线可以达到1.6pg/mL, 线性检测区间可以达到7个数量级。

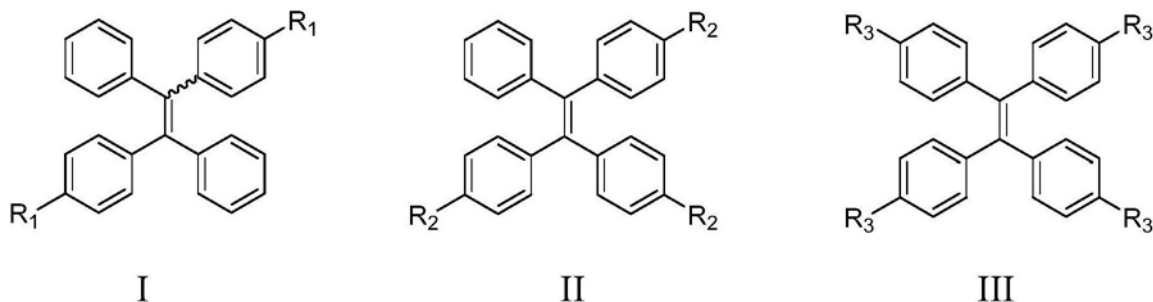
[0077] 实施例5

[0078] 利用商业化的PSA试剂盒(PSA(Total)/KLK3Human ELISA kit, 货号:EHLK3T, Thermo Fisher, 美国), 向里面加入病人血清溶液, 按照商业化操作指南进行PSA的固定及HRP的固定, 最后每个孔中加入100 μ L TPE-(NH₂)₄显色液进行显色。反应30分钟后, 用去离子水终止反应。进行拍照。

[0079] 本实施例中利用TPE-(NH₂)₄取代商业上的显色液进行血清中的PSA含量检测结果如图9所示。图9为实施例5利用TPE-(NH₂)₄与商业化ELISA试剂盒(PSA(Total)/KLK3Human ELISA kit, 货号:EHLK3T, Thermo Fisher, 美国)结合进行病人血液样本中PSA检测; 图中数值显示相同样本通过电化学发光测试测得的血清样本中PSA浓度。该实验可以清晰的显示血清中PSA浓度的变化。

[0080] 本发明的双模式ELISA酶免显色剂包括具有酶催化响应的聚集诱导发光材料, 结构为式I、II、III中一种以上:

[0081]



[0082] (化合物参考文献制备, J.Chem.Soc.1959,0,678-682; J.Am.Chem.Soc.2017,139,10150-10156)。

[0083] 本发明的双模式信号, 包括荧光信号、吸收信号、化学发光信号或磷光信号, 通过酶标仪或其它任意光学工具采集信号。

序列表

<110> 华南理工大学

<120> 一种双模式ELISA酶免显色剂及其制备与应用

<160> 1

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> DNA序列

<400> 1

gtgggtaggg cgggttgg

18

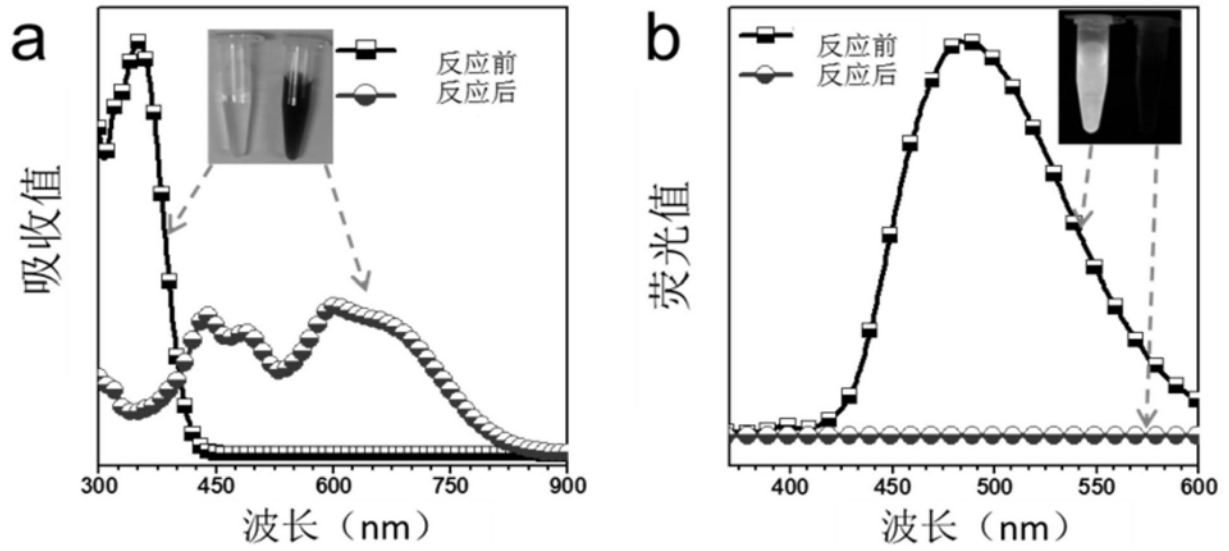


图1

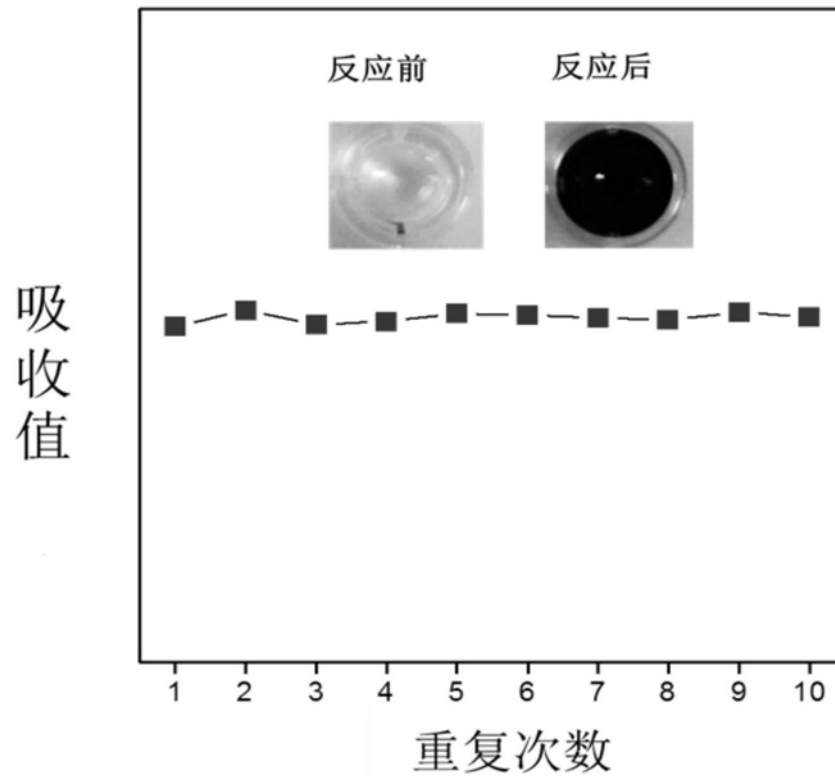


图2

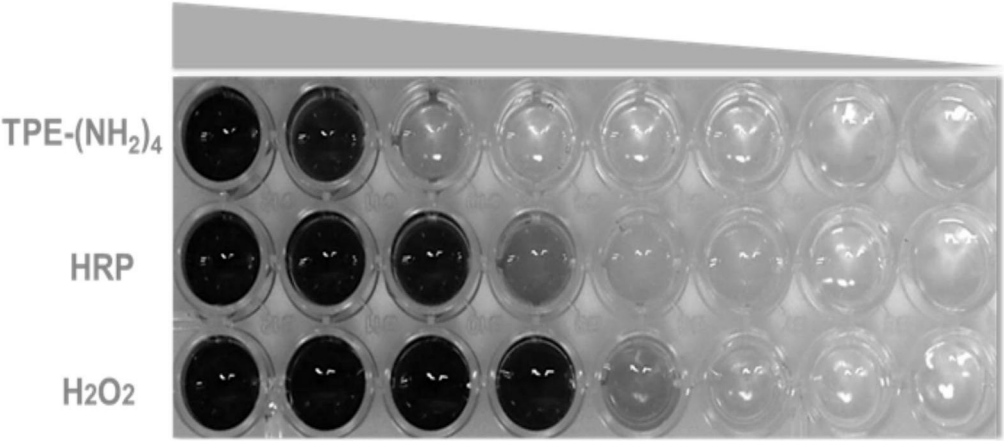


图3

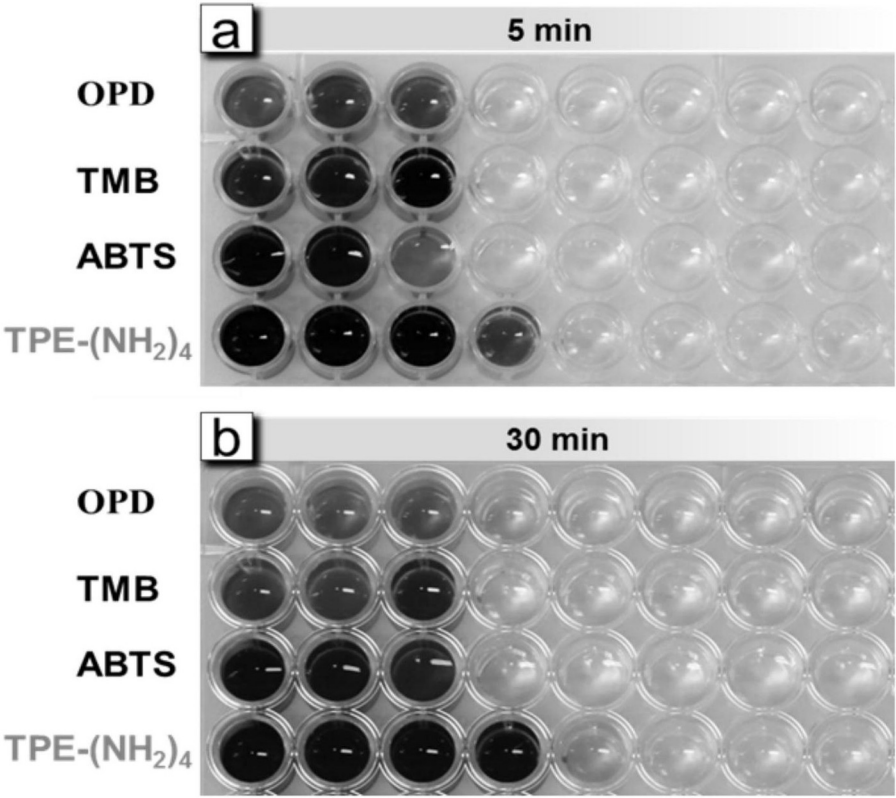


图4

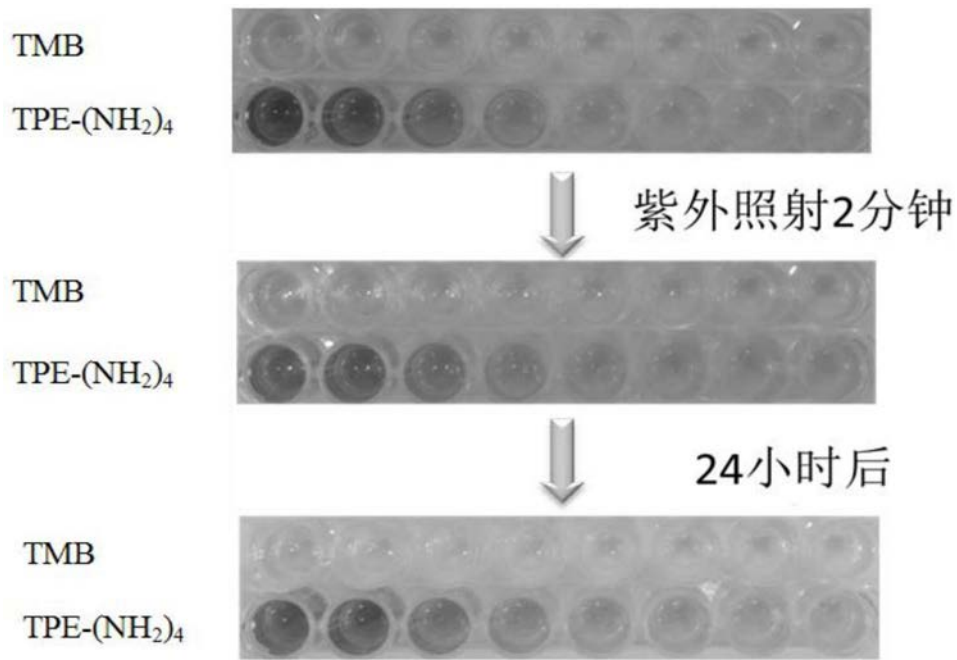


图5

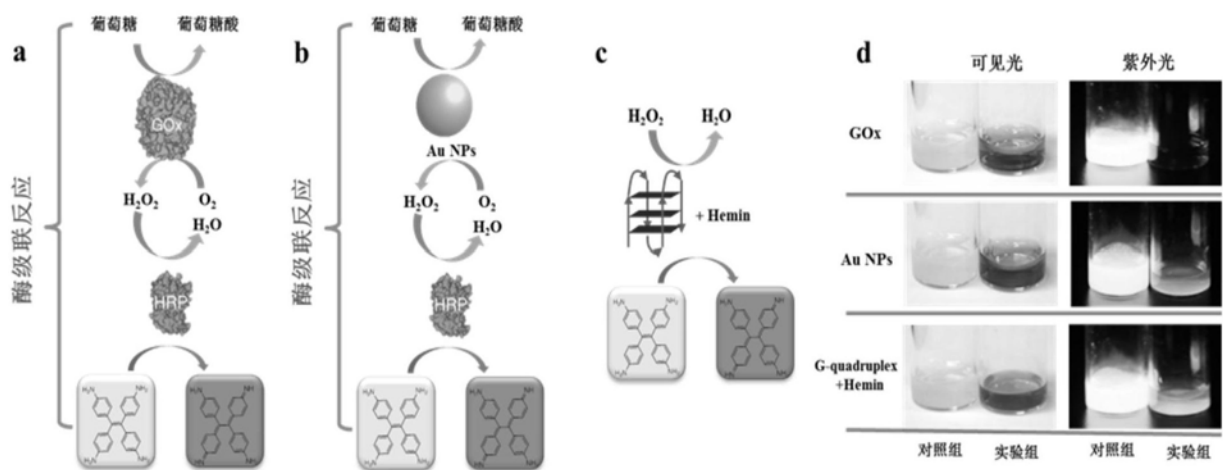


图6

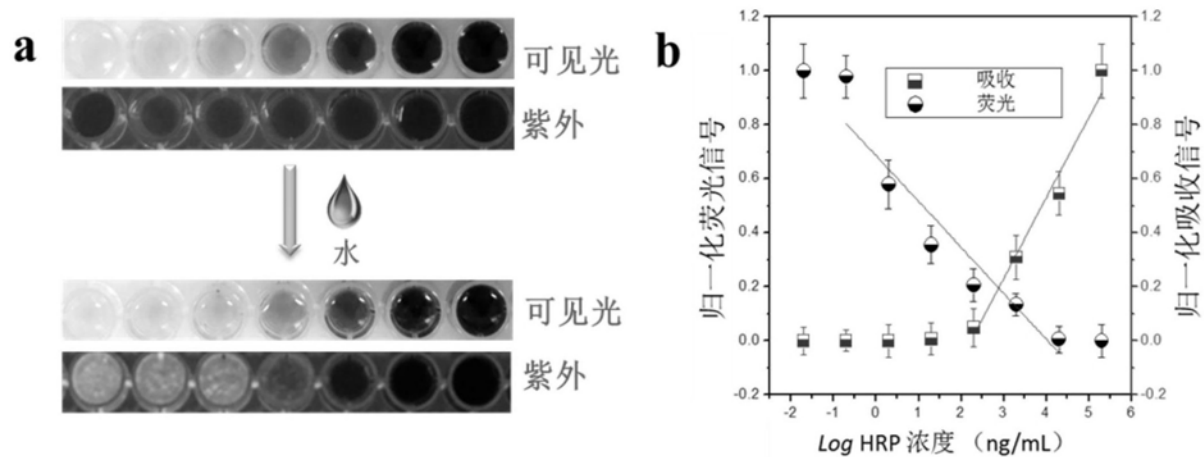


图7

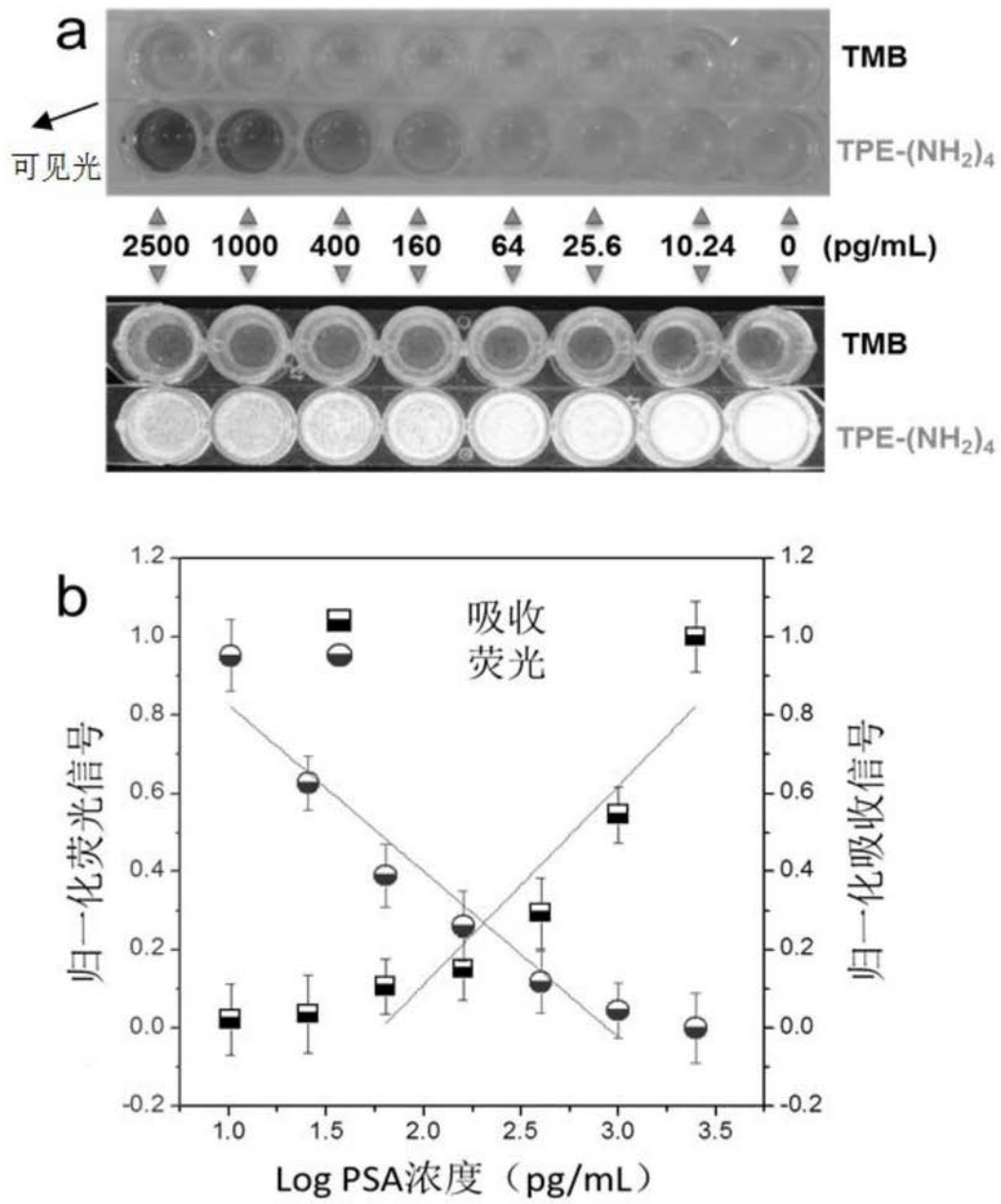


图8

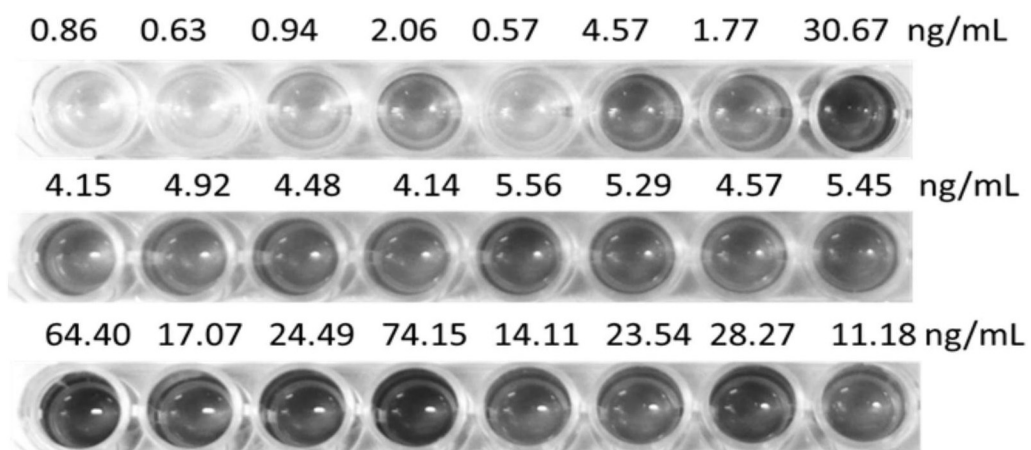


图9

专利名称(译)	一种双模式ELISA酶免显色剂及其制备与应用		
公开(公告)号	CN109406770A	公开(公告)日	2019-03-01
申请号	CN201811159246.8	申请日	2018-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	华南理工大学		
申请(专利权)人(译)	华南理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南理工大学		
[标]发明人	唐本忠 沈建磊 秦安军		
发明人	唐本忠 沈建磊 秦安军		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
代理人(译)	陈智英		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫学的技术领域，公开了一种双模式ELISA酶免显色剂及其制备与应用。所述显色剂包括具有酶催化响应的聚集诱导发光材料；该聚集诱导发光材料为式I、II、III中一种以上。所述显色剂还包括双氧水和PBS溶液。本发明的显色剂在ELISA酶免诊断试剂盒中的应用。本发明的酶免显色剂具有更快的酶响应速度和灵敏度、更好的光稳定性；利用双氧水和PBS溶液以及上述聚集诱导发光材料，在与酶反应后，通过加入水或硫酸终止反应，一次测试中产生双重模式信号(吸收信号和荧光信号)，实现免疫检测灵敏度与线性检测区间的双提升，如前列腺特异抗原的检测灵敏度达到1.6pg/mL，线性检测区间覆盖7个数量级。