



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102072955 B

(45) 授权公告日 2013. 08. 07

(21) 申请号 201010532947. 9

(22) 申请日 2010. 11. 05

(73) 专利权人 苏州大学

地址 215123 江苏省苏州市工业园区仁爱路  
199 号

(72) 发明人 陈红 周峰 袁琳

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有  
限公司 32103

代理人 陶海锋

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1435493 A, 2003. 08. 13,

Hai-Jing Bai et al.. Patterned Au/  
poly(dimethylsiloxane) substrate  
fabricated by chemical plating coupled  
with electrochemical etching for cell  
patterning..《Langmuir》. 2009, 第 25 卷 (第 17  
期),

审查员 毕秀华

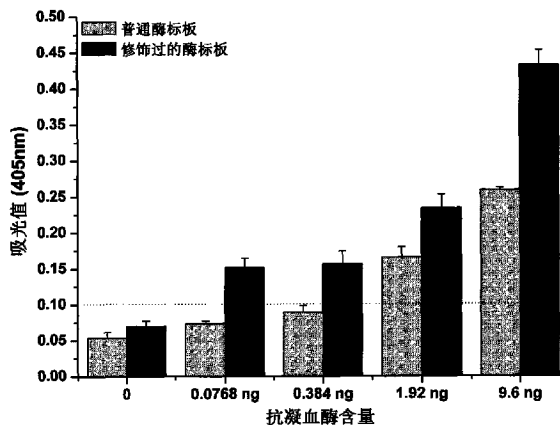
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种改性多孔板的制备方法

(57) 摘要

本发明属于医疗器械改性领域和纳米材料领域,具体涉及一种改性多孔板的制备方法,包括以下步骤:(1)在 0~25℃范围内,配制含有碳酸氢钾、葡萄糖,氯金酸的水溶液,然后用碱溶液将溶液 pH 调节至 9.0~10.0,然后冷却;(2)以每孔 50~250 μL 的量,将步骤 (1) 所得溶液加入到多孔板的孔中,然后于 25~50℃下加热 1~6 小时,弃去孔中溶液,再用去离子水冲洗 2~3 次后,即制得稳定的纳米金颗粒聚集体修饰的多孔板。本发明采用化学还原的方法生成金纳米粒子并通过物理沉降作用吸附在多孔板表面形成稳定、形貌均一的纳米金颗粒聚集体,由于这种纳米金聚集体巨大的比表面积和独特的三维结构,这种经过修饰的表面可以提高蛋白结合量,因此,修饰后的多孔板可以实现超高灵敏度的酶联免疫吸附测试。



1. 一种改性多孔板的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 在 0 ~ 25℃ 范围内,配制含有碳酸氢钾、葡萄糖,氯金酸的水溶液,然后用碱溶液将溶液 pH 调节至 8.0 ~ 10.0,然后在 0 ~ 4℃ 冷却;最终所得溶液中,碳酸氢钾、葡萄糖、氯金酸的终浓度依次为:20-60mg/mL, 2-8mg/mL, 2-8mg/mL;

(2) 以每孔 50 ~ 250  $\mu$ L 的量,将步骤 (1) 所得溶液加入到多孔板的孔中,然后于 25 ~ 50℃ 下加热 1 ~ 6 小时,弃去孔中溶液,再用去离子水冲洗 2 ~ 3 次后,即制得稳定的纳米金颗粒聚集体修饰的多孔板。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,所述碱溶液选自氢氧化钠、氢氧化钾或碳酸钠。

## 一种改性多孔板的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于医疗器械改性领域和纳米材料领域,具体涉及一种在酶标板表面修饰纳米金粒子层的方法,采用修饰了纳米金粒子层的多孔板(包括酶标板)可显著提高传统酶联免疫吸附试验的检测限。

### 背景技术

[0002] 在基于固相载体的多种免疫诊断领域中,酶联免疫吸附测试(ELISA)作为一种最重要的疾病诊断技术具有灵敏度高,操作简单,低成本,适应性强等优点,因此被广泛应用于科研及医疗领域。

[0003] 然而,对于很多恶性疾病的早期阶段,血液中相关特征蛋白含量极其微量,往往低于市售的商品化 ELISA 试剂盒的检测限。其中一个重要原因在于,市售 ELISA 试剂盒中酶标板由于自身理化性质的局限,而使得其对样品中疾病特征抗原的结合量较低,结合上的抗原表位的暴露不充分。因此,对酶标板表面进行改性以提高单位面积特征抗原的结合量并促进抗原表位的充分暴露已成为提高检测限的必然途径。

[0004] 现有技术中,常用的方法有以下几种:

[0005] (1) 通常采用紫外照射法,等离子体处理法等方法来处理酶标板表面以提高其对抗原的结合能力;但这种方法都需要特殊设备,成本高,操作较为复杂,此外,这些方法改性后的表面只能一定程度上增加抗原的结合量,并不能促进抗原表位的充分暴露。

[0006] (2) 而珠式、管式及磁性球 ELSIA 法虽然可以解决这一问题,但是整个实验过程复杂,成本高,需要特殊的仪器设备。

[0007] 因此,需要研发一种成本低且工艺简单的修饰改性多孔板(包括酶标板)的方法,使得改性后的多孔板对样品中疾病特征抗原的结合量提高,能充分暴露结合上的抗原表位。

### 发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种改性多孔板的制备方法,得改性后的多孔板对样品中疾病特征抗原的结合量提高,能充分暴露结合上的抗原表位。

[0009] 为了实现上述目的,本发明的技术方案为:一种改性多孔板的制备方法,包括以下步骤:

[0010] (1) 在  $0 \sim 25^{\circ}\text{C}$  范围内,配制含有碳酸氢钾、葡萄糖,氯金酸的水溶液,然后用碱溶液将溶液 pH 调节至  $8.0 \sim 10.0$ ,然后在  $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$  冷却;最终所得溶液中,碳酸氢钾、葡萄糖、氯金酸的终浓度依次为:  $20\text{--}60\text{mg/mL}$ ,  $2\text{--}8\text{mg/mL}$ ,  $2\text{--}8\text{mg/mL}$ ;

[0011] (2) 以每孔  $50 \sim 250 \mu\text{L}$  的量,将步骤(1)所得溶液加入到多孔板的孔中,然后于  $25 \sim 50^{\circ}\text{C}$  下加热  $1 \sim 6$  小时,弃去孔中溶液,再用去离子水冲洗至少 2 次后,即制得稳定的纳米金颗粒聚集体修饰的多孔板。

[0012] 上述技术方案中,碳酸氢钾、葡萄糖,氯金酸粉末均为分析纯,所用溶剂水为去离

子水。

[0013] 上述技术方案中,所述碱溶液为本领域技术人员公知的中强碱,不与反应体系中物质发生反应且能将最终溶液的 pH 值调节到 8.0 ~ 10.0 即可,如氢氧化钠、氢氧化钾或碳酸钠。

[0014] 上述技术方案中,所述多孔板包括商用 384 孔板、96 孔组织培养板、96 孔酶标板、可拆卸的酶标板、48 孔组织培养板或 24 孔组织培养板等。

[0015] 本发明的原理是:采用化学还原的方法生成金纳米粒子并通过物理沉降作用吸附在多孔板(包括酶标板)表面形成稳定、形貌均一的纳米金颗粒聚集层,由于这种纳米金聚集层巨大的比表面积和独特的三维结构,这种经过修饰的表面可以提高蛋白结合量,因此,修饰后的多孔板可以实现超高灵敏度的酶联免疫吸附测试。

[0016] 由于上述技术方案的应用,与现有技术相比,本发明具有以下突出特点:

[0017] 1. 本发明所述技术方案中,配制好反应溶液后,将溶液于冰浴中冷却平衡至低温,然后再将这种冷却的反应液加入到微孔板中,然后将微孔板置于 25 ~ 50°C 下反应;由于进行了低温冷却操作,降低了溶液中初始氧化还原反应速率,从而有利于形成粒径较小的金纳米粒子,这种最初形成的极细粒径的金纳米粒子与高温时反应生成的较大粒径的金纳米粒子聚集体相比更容易在微孔板表面形成稳定,致密的吸附层;反应过程中,随着微孔板内反应液温度达到 25 ~ 50°C 时,溶液反应速率增大,后续快速形成的金纳米粒子以先前沉积的小金纳米粒子为晶种,在其表面发生聚集,并最终形成了我们所得到的稳定的金膜。

[0018] 2. 本发明所述技术方案中,选择 pH 值 8-10 的条件进行金纳米粒子的均匀沉积,较低的 pH 值不能及时消除反应产生的酸性物质,阻碍了反应的进一步进行;而较高的 pH 值导致金纳米粒子的快速生成和团聚。因此,只有 pH 值 8-10 的条件才能在微孔板表面产生稳定均匀的金膜。

[0019] 3. 本发明所述修饰多孔板的方法无污染,低成本,工艺简单,工艺过程容易控制,整个制备反应过程温度不超过 50°C;利用本方法制备的纳米金聚集层修饰的多孔板,可以根据实际检测需要,来进行多种形式的免疫检测。如在本发明制备的多孔板表面上吸附上含待测抗原的样本就可以进行间接法或竞争法检测;预先吸附上检测特征抗原的抗体就可以进行双抗体夹心法检测。

[0020] 4. 本发明对材料的适用性好,材料可以是各种常见的多孔板,如商用 384 孔板,96 孔组织培养板,96 孔酶标板、可拆卸的酶标板,48 孔组织培养板或 24 孔组织培养板。

[0021] 5. 本方法为纯粹的化学方法,不需要紫外光照,等离子体等昂贵设备处理,经济可行;采用化学还原的方法生成金纳米粒子并通过物理沉降作用吸附在多孔板(包括酶标板)表面形成稳定、形貌均一的纳米金颗粒聚集层,由于这种纳米金聚集层巨大的比表面积和独特的三维结构,这种经过修饰的表面可以提高蛋白结合量,因此,修饰后的多孔板可以实现超高灵敏度的酶联免疫吸附测试。

#### 附图说明

[0022] 图 1 中为实施例一中利用间接法 ELISA 分别于普通 96 孔高吸附酶标板以及经过纳米金聚集层修饰过的酶标板(由 100  $\mu$ L 工作液形成)检测单一抗凝血酶溶液中抗凝血酶含量的结果对比;

[0023] 图 2 中为实施例二中利用间接法 ELISA 分别于普通 96 孔高吸附酶标板以及经过纳米金聚集层修饰过的酶标板（由 250  $\mu$  L 工作液形成）检测人血浆稀释液中抗凝血酶含量的结果对比。

### 具体实施方式

[0024] 以下实施例提供了金纳米颗粒修饰多孔板的制备方法，以及修饰后的多孔板在疾病诊断中的应用，是通过化学方法在普通多空板表面形成三维的金纳米颗粒聚集层，再以这种经过修饰的多孔板进行超低检测限的间接法酶联免疫吸附测试。

[0025] 下面结合实施例和附图对本发明作进一步说明，但不限制本发明。

#### [0026] 实施例一

[0027] (1) 将 0.3g 碳酸氢钾（分子量 100），0.03g 葡萄糖（分子量 198），30mg 氯金酸粉末溶解于 6mL 去离子水中，并用氢氧化钠溶液将 pH 值调节到 9.0。

[0028] (2) 吸取该工作溶液 100  $\mu$  L 加入酶标板中，再将酶标板置于 25 $^{\circ}$ C 烘箱中反应 6 小时。弃去孔中反应液，再用去离子水冲洗 3 次即制得纳米金颗粒聚集层修饰的酶标板。

[0029] (3) 将人抗凝血酶用碳酸盐缓冲液（pH = 9.6）进行逐级稀释，得到浓度依次为 96ng/mL, 19.2ng/mL, 3.84ng/mL, 0.768ng/mL 的蛋白溶液。以每孔 100  $\mu$  L 用量将上述梯度溶液包被于普通酶标板和经过修饰的酶标板中，于 37 $^{\circ}$ C 烘箱温育 2 小时。弃去板中包被溶液，用洗板液洗涤 3 次后于吸水纸上拍干多孔板中残余液体，以每孔 300  $\mu$  L 加入含 1.5% 牛血清白蛋白的封闭液，于 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时。弃去封闭液，于吸水纸上拍干多孔板中残余液体。每孔加入 100  $\mu$  L 羊抗人抗凝血酶抗体稀释液（1 : 1000 稀释），于 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。弃去板中抗体溶液，用洗板液洗涤 5 次后于吸水纸上拍干多孔板中残余液体。每孔加入 100  $\mu$  L 碱性磷酸酶标记的兔抗羊二抗稀释液（1 : 2500 稀释），于 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。弃去板中抗体溶液，用洗板液洗涤 5 次后于吸水纸上拍干多孔板中残余液体。每孔加入 100  $\mu$  L 1mg/mL 对硝基苯磷酸二钠溶液后，于 37 $^{\circ}$ C 反应 15 分钟后每孔加入 50  $\mu$  L 2mol/L 的氢氧化钠水溶液终止反应。将酶标板中显色溶液以每孔 100  $\mu$  L 转移至酶标板空白孔中。在酶标仪上于 405nm 读取各孔吸光值。

[0030] 结果如图 1 所示，普通酶标板的检测限是 1.92ng，而经过修饰的酶标板的检测限为 0.0768ng（S/N = 2，吸光值  $\geq$  0.1 被认为是有效信号）。可见经过修饰的酶标板显著放大了信号，降低了检测限。

#### [0031] 实施例二

[0032] (1) 将 0.3g 碳酸氢钾（分子量 100），0.03g 葡萄糖（分子量 198），30mg 氯金酸粉末溶解于 6mL 去离子水中，并用氢氧化钠溶液将 pH 值调节到 9.0。

[0033] (2) 吸取该工作溶液 250  $\mu$  L 加入酶标板中，再将酶标板置于 50 $^{\circ}$ C 烘箱中反应 1 小时。弃去孔中反应液，再用去离子水冲洗 3 次即制得纳米金颗粒聚集层修饰的酶标板。

[0034] (3) 将人血浆用碳酸盐缓冲液（pH = 9.6）进行逐级稀释，稀释度依次为：1 : 100, 1 : 500, 1 : 2500, 1 : 12500, 1 : 62500，然后以每孔 100  $\mu$  L 包被于普通酶标板及经过修饰的酶标板中，于 37 $^{\circ}$ C 烘箱温育 2 小时。弃去板中包被溶液，用洗板液洗涤 3 次后于吸水纸上拍干多孔板中残余液体，以每孔 300  $\mu$  L 加入含 1.5% 牛血清白蛋白的封闭液，于 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时。弃去封闭液，于吸水纸上拍干多孔板中残余液体。每孔加入 100  $\mu$  L 羊

抗人抗凝血酶抗体稀释液,于 37℃温育 1 小时。弃去板中抗体溶液,用洗板液洗涤 5 次后于吸水纸上拍干多孔板中残余液体。每孔加入 100  $\mu$  L 碱性磷酸酶标记的兔抗羊二抗稀释液,于 37℃温育 1 小时。弃去板中抗体溶液,用洗板液洗涤 5 次后于吸水纸上拍干多孔板中残余液体。每孔加入 100  $\mu$  L 1mg/mL 对硝基苯磷酸二钠溶液后,于 37℃反应 15 分钟后每孔加入 50  $\mu$  L 12mol/L 的氢氧化钠水溶液终止反应。将酶标板中显色溶液以每孔 100  $\mu$  L 转移至酶标板空白中。在酶标仪上于 405nm 读取各孔吸光值。

[0035] 结果如图 2 所示,在实验所采用的稀释度范围内普通酶标板不能得到有效信号,而经过修饰的酶标板在稀释度为 1 : 500 时仍能得到有效信号 ( $S/N = 2$ ,吸光值  $\geq 0.1$  被认为是有效信号)。可见对于混合蛋白溶液,经过修饰的酶标板仍然可以显著放大信号,从而检测出极低含量的蛋白。

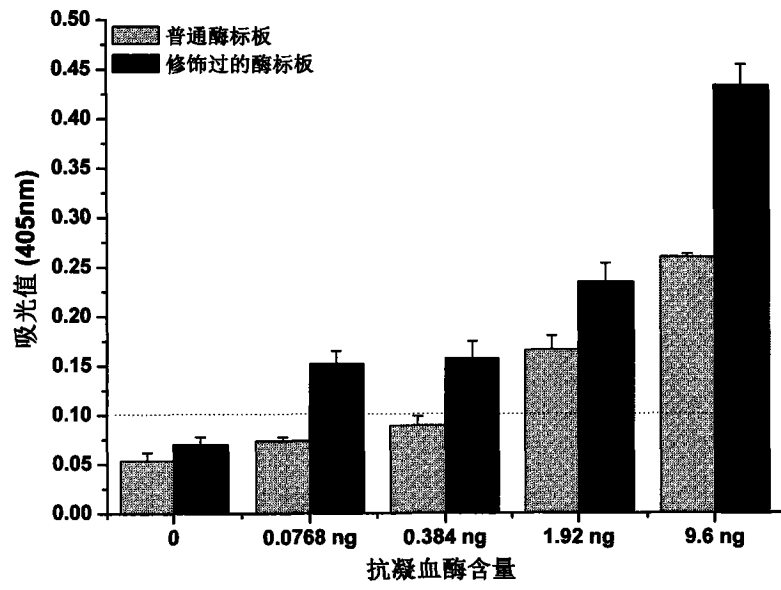


图 1

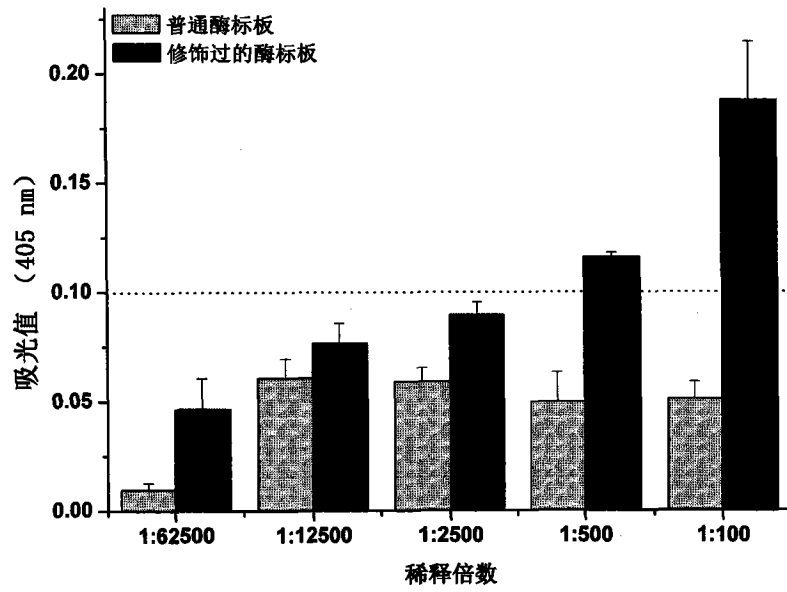


图 2

专利名称(译)	一种改性多孔板的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102072955B</a>	公开(公告)日	2013-08-07
申请号	CN201010532947.9	申请日	2010-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	苏州大学		
申请(专利权)人(译)	苏州大学		
[标]发明人	陈红 周峰 袁琳		
发明人	陈红 周峰 袁琳		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535 G01N33/68		
代理人(译)	陶海锋		
其他公开文献	CN102072955A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于医疗器械改性领域和纳米材料领域，具体涉及一种改性多孔板的制备方法，包括以下步骤：(1)在0~25℃范围内，配制含有碳酸氢钾、葡萄糖、氯金酸的水溶液，然后用碱溶液将溶液pH调节至9.0~10.0，然后冷却；(2)以每孔50~250μL的量，将步骤(1)所得溶液加入到多孔板的孔中，然后于25~50℃下加热1~6小时，弃去孔中溶液，再用去离子水冲洗2~3次后，即制得稳定的纳米金颗粒聚集体修饰的多孔板。本发明采用化学还原的方法生成金纳米粒子并通过物理沉降作用吸附在多孔板表面形成稳定、形貌均一的纳米金颗粒聚集体，由于这种纳米金聚集体巨大的比表面积和独特的三维结构，这种经过修饰的表面可以提高蛋白结合量，因此，修饰后的多孔板可以实现超高灵敏度的酶联免疫吸附测试。

