



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106226514 A

(43)申请公布日 2016.12.14

(21)申请号 201610517767.0

(22)申请日 2016.06.30

(71)申请人 天津大学

地址 300072 天津市南开区卫津路92号

(72)发明人 常津 武玉东 宫晓群

(74)专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代
理事务所 12201

代理人 王丽

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种金纳米棒偶联辣根过氧化物酶和癌胚
抗原标记抗体的制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种金纳米棒偶联辣根过氧化物酶和癌胚抗原标记抗体的制备方法;利用金纳米棒和癌胚抗原标记抗体以及辣根过氧化物酶的静电吸附作用,制备多酶标记的金纳米粒子甲胎蛋白免疫探针,对癌胚抗原(carcino-embryonic antigen CEA),这种广泛存在于内胚叶起源的消化系统癌的蛋白标志物进行定性定量的检测,建立蛋白标志物检测的新方法,提高检测的灵敏度和特异性。本发明的特点在于:整个制备过程简单,适合于产业化生产;可定性定量检测癌胚抗原,且特异性良好;整个检测过程,成本低廉且操作非常简便,适合高危人群的社区肿瘤筛选,建立了一种肿瘤检测的新方法。



1. 一种金纳米棒偶联辣根过氧化物酶和癌胚抗原标记抗体的制备方法;其特征是步骤如下:

(1)将摩尔质量配比为氯金酸和十六烷基三甲基溴化铵加入到反应器,加入硼氢化钠得到金种溶液;

(2)取上述金种溶液加入到反应器,加入氯金酸、十六烷基三甲基溴化铵、抗坏血酸和硝酸银混合液,制备得到金纳米棒(AuNRs);

(3)将金纳米棒加入反应器,通过碳酸钾水溶液调节金纳米棒pH为9.0~9.5,将癌胚抗原CEA标记抗体(Ab_1)和辣根过氧化物酶(HRP)混合液与金纳米棒混合,所得AuNRs、HRP和 Ab_1 混合液在旋转混合架上旋转混匀后静置处理;

(4)将牛血清白蛋白加入上述AuNRs、HRP和 Ab_1 混合液封闭,最后得到multi-HRP-AuNRs- Ab_1 检测探针。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征是氯金酸是四水合氯金酸。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征是氯金酸和十六烷基三甲基溴化铵摩尔配比为1:400~500;氯金酸和硼氢化钠摩尔配比为1:1~3。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征是步骤2)中氯金酸:硝酸银:十六烷基三甲基溴化铵:抗坏血酸的摩尔配比为=1:400:2:40~240。

5. 如权利要求1所述CEA标记抗体(Ab_1):辣根过氧化物酶(HRP)质量配比为1:1~9;金纳米棒AuNRs:(HRP和 Ab_1)混合液质量配比为100~500:1。

6. 如权利要求1所述的方法,其特征是AuNRs:牛血清白蛋白的质量配比为5~10:1。

一种金纳米棒偶联辣根过氧化物酶和癌胚抗原标记抗体的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米材料制备技术领域,更具体的是涉及一种金纳米棒偶联辣根过氧化物酶和癌胚抗原标记抗体的制备方法。

背景技术

[0002] 酶是一种有机催化剂,很少量的酶即可导致大量的催化过程,免疫酶技术就是将抗原和抗体的免疫反应和酶的催化反应相结合而建立的一种新技术。酶与抗体或抗原结合后,既不改变抗体成抗原的免疫学反应的特异性,也不影响酶本身的酶学活性,即在相应而合适的作用底物参与下,使基质水解而呈色,或使供氢体由无色的还原型变为有色的氧化型。呈色反应显示了酶的存在,从而证明发生了相应的免疫反应。这是一种特异而敏感的技术,可以在细胞或亚细胞水平上示踪抗原或抗体的所在部位。酶联免疫吸附试验兼有荧光标记和放射免疫试验的优点,由于酶标记结合物具有制备容易、稳定、有效期长、敏感性高等优点,同时可以直接用肉眼观察或光学显微镜观察,所得结果因而客观可靠。辣根过氧化物酶是一种临床检验试剂中一种最常用的酶之一,广泛用于多个生化检测项目,也广泛运用于免疫类(ELISA)试剂盒的显色反应。

[0003] 血清蛋白标志物检测肿瘤已经越来越引起人们的关注,蛋白标志物检测肿瘤简便无创,检测结果直观且可以定量,可以动态监测肿瘤患者,在临床上具有很高的应用价值。蛋白标志物可以是在恶性肿瘤发生和增殖过程中,由肿瘤细胞的基因表达而合成分泌的,存在于细胞、组织或体液中,能够用一定方法来定量且能证实肿瘤存在的物质。癌胚抗原CEA是大肠癌组织产生的一种糖蛋白,可广泛存在于内胚叶起源的消化系统癌,也存在于正常胚胎的消化管组织中,在正常人血清中也可有微量存在。癌胚抗原是一个广谱性肿瘤标志物,它能向人们反映出多种肿瘤的存在,对大肠癌、乳腺癌和肺癌的疗效判断、病情发展、监测和预后估计是一个较好的肿瘤标志物,但其特异性不强,灵敏度不高,对肿瘤早期诊断作用不明显。金纳米棒是一种棒状金纳米颗粒,有丰富的表面积,在体外诊断领域常用于标记抗体和酶分子等。所以本文拟研制一种金纳米棒偶联辣根过氧化物酶和癌胚抗原标记抗体的制备方法,用于检测癌胚抗原肿瘤标志物。

发明内容

[0004] 鉴于蛋白标志物在肿瘤检测中的重要地位、HRP检测独特的显色性质以及酶联免疫检测技术的优势。我们将利用金纳米棒和癌胚抗原标记抗体以及辣根过氧化物酶的静电吸附作用,制备多酶标记的金纳米粒子甲胎蛋白免疫探针,对癌胚抗原(carcino-embryonic antigen CEA),这种广泛存在于内胚叶起源的消化系统癌的蛋白标志物进行定性定量的检测,建立蛋白标志物检测的新方法,提高检测的灵敏度和特异性。

[0005] 本发明的技术方案如下:

[0006] 一种金纳米棒偶联辣根过氧化物酶和癌胚抗原标记抗体的制备方法;其步骤如

下:

[0007] (1)将摩尔质量配比为氯金酸和十六烷基三甲基溴化铵加入到反应器,加入硼氢化钠得到金种溶液;

[0008] (2)取上述金种溶液加入到反应器,加入氯金酸、十六烷基三甲基溴化铵、抗坏血酸和硝酸银混合液,制备得到金纳米棒(AuNRs);

[0009] (3)将金纳米棒加入反应器,通过碳酸钾水溶液调节金纳米棒pH为9.0~9.5,将癌胚抗原CEA标记抗体(Ab_1)和辣根过氧化物酶(HRP)混合液与金纳米棒混合,所得AuNRs、HRP和 Ab_1 混合液在旋转混合架上旋转混匀后静置处理;

[0010] (4)将牛血清白蛋白加入上述AuNRs、HRP和 Ab_1 混合液封闭,最后得到multi-HRP-AuNRs- Ab_1 检测探针。

[0011] 所述氯金酸是四水合氯金酸。

[0012] 所述氯金酸和十六烷基三甲基溴化铵摩尔配比为1:400~500;氯金酸和硼氢化钠摩尔配比为1:1~3。

[0013] 所述步骤2)中氯金酸:硝酸银:十六烷基三甲基溴化铵:抗坏血酸的摩尔比为=1:400:2:40~240。

[0014] 所述CEA标记抗体(Ab_1):辣根过氧化物酶(HRP)质量配比为1:1~9;金纳米棒AuNRs:(HRP和 Ab_1)混合液质量配比为100~500:1。

[0015] 所述AuNRs:牛血清白蛋白的质量配比为5~10:1。

[0016] 如图3所示,一个金纳米棒分子上面可以同时偶联多个HRP分子和癌胚抗原标记抗体分子,有效提高了酶分子和抗体分子的偶联效率;如图1所示本发明制备的金纳米棒等离子体带在700~1250nm之间;如图2所示金纳米粒子偶联辣根过氧化物酶和甲胎蛋白标记抗体后粒径增加60nm左右,表明辣根过氧化物酶和癌胚抗原标记抗体已经成功标记到金纳米棒上。如图4所示,以CEA抗原浓度为横坐标,抑制率Inhibition(%)作为纵坐标,拟合出一条曲线: $R^2=0.9966y=-4E-07x^2+0.0014x+0.2783$,可知multi-HRP-AuNRs- Ab_1 检测探针为多酶标记探针可有效提高检测灵敏度。

[0017] 本发明制备的金纳米棒偶联辣根过氧化物酶和癌胚抗原标记抗体优势在于:

[0018] 1.采用种子生长法制备金纳米棒,硼氢化钠、抗坏血酸、十六烷基溴化铵以及硝酸银的存在有利于制备尺寸均一的金纳米棒。

[0019] 2.采用金纳米棒同时标记酶和抗体,在实现多酶多抗体标记的基础上将大大提高检测的灵敏度,简便有效。

[0020] 3.采用碱性条件下金纳米棒与甲胎蛋白标记抗体 Ab_1 和辣根过氧化物酶(HRP)的静电吸附相互作用得到检测探针,彻底解决了传统酶标抗体步骤繁琐的问题。

附图说明

[0021] 图1本发明制备的金纳米棒的电子透射电镜照片,等离子体带700nm(a);760nm(b);790nm(c);880nm(d);1130nm(e);1250nm(f)。

[0022] 图2本发明制备的金纳米棒偶联辣根过氧化物酶和癌胚抗原标记抗体粒度数据。

[0023] 图3本发明制备的金纳米棒偶联辣根过氧化物酶和癌胚抗原标记抗体图。

[0024] 图4本发明制备的金纳米棒偶联辣根过氧化物酶和癌胚抗原标记抗体免疫实验标

准曲线。

具体实施方式

[0025] 下面的实施案例中将对本发明作进一步的阐述,但本发明不限于此。

[0026] 实施案例1:

[0027] (1)将2.5 μ mol摩尔质量配比为氯金酸(HAuCl₄)和1000 μ mol十六烷基三甲基溴化铵(Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide CTAB)加入到反应器,加入6 μ mol硼氢化钠(NaBH₄)得到金种溶液;

[0028] (2)取上述金种溶液加入到反应器,加入摩尔质量配比为氯金酸:十六烷基三甲基溴化铵:抗坏血酸:硝酸银=1:400:2:40,制备得到金纳米棒;

[0029] (3)将5mg金纳米棒(AuNRs)加入反应器,通过碳酸钾水溶液调节金纳米棒pH为9.0,将0.01mg癌胚抗原CEA标记抗体(Ab₁)和0.04mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液与金纳米棒混合,所得AuNRs、HRP和Ab₁混合液在旋转混合架上旋转混匀后静置处理;

[0030] (4)将1mg牛血清白蛋白加入上述AuNRs、HRP和Ab₁混合液封闭,最后得到multi-HRP-AuNRs-Ab₁检测探针。以浓度为0ng/mL、30ng/mL、62.5ng/mL、125ng/mL、250ng/mL、500ng/mL、1000ng/mL CEA抗原完成免疫实验。

[0031] 如图1(a)所示,所得金纳米棒等离子体带在700nm处。如图4所示,以CEA抗原浓度为横坐标,抑制率Inhibition(%)作为纵坐标,拟合出一条曲线: $R^2=0.9966y=-4E-07x^2+0.0014x+0.2783$

[0032] 实施案例2:

[0033] (1)将2.5 μ mol摩尔质量配比为氯金酸(HAuCl₄)和1000 μ mol十六烷基三甲基溴化铵(Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide CTAB)加入到反应器,加入6 μ mol硼氢化钠(NaBH₄)得到金种溶液;

[0034] (2)取上述金种溶液加入到反应器,加入摩尔质量配比为氯金酸:十六烷基三甲基溴化铵:抗坏血酸:硝酸银=1:400:2:80,制备得到金纳米棒;

[0035] (3)将5mg金纳米棒(AuNRs)加入反应器,通过碳酸钾水溶液调节金纳米棒pH为9.0,将0.01mg癌胚抗原CEA标记抗体(Ab₁)和0.04mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液与金纳米棒混合,所得AuNRs、HRP和Ab₁混合液在旋转混合架上旋转混匀后静置处理;

[0036] (4)将1mg牛血清白蛋白加入上述AuNRs、HRP和Ab₁混合液封闭,最后得到multi-HRP-AuNRs-Ab₁检测探针。如图1(b)所示,所得金纳米棒等离子体带在760nm处。

[0037] 实施案例3:

[0038] (1)将2.5 μ mol摩尔质量配比为氯金酸(HAuCl₄)和1000 μ mol十六烷基三甲基溴化铵(Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide CTAB)加入到反应器,加入6 μ mol硼氢化钠(NaBH₄)得到金种溶液;

[0039] (2)取上述金种溶液加入到反应器,加入摩尔质量配比为氯金酸:十六烷基三甲基溴化铵:抗坏血酸:硝酸银=1:400:2:120,制备得到金纳米棒;

[0040] (3)将5mg金纳米棒(AuNRs)加入反应器,通过碳酸钾水溶液调节金纳米棒pH为9.0,将0.01mg癌胚抗原CEA标记抗体(Ab₁)和0.04mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液与金纳米棒混合,所得AuNRs、HRP和Ab₁混合液在旋转混合架上旋转混匀后静置处理;

[0041] (4)将1mg牛血清白蛋白加入上述AuNRs、HRP和Ab₁混合液封闭,最后得到multi-HRP-AuNRs-Ab₁检测探针。如图1(c)所示,所得金纳米棒等离子体带在790nm处。

[0042] 实施案例4:

[0043] (1)将2.5 μ mol摩尔质量配比为氯金酸(HAuCl₄)和1000 μ mol十六烷基三甲基溴化铵(Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide CTAB)加入到反应器,加入6 μ mol硼氢化钠(NaBH₄)得到金种溶液;

[0044] (2)取上述金种溶液加入到反应器,加入摩尔质量配比为氯金酸:十六烷基三甲基溴化铵:抗坏血酸:硝酸银=1:400:2:160,制备得到金纳米棒;

[0045] (3)将5mg金纳米棒(AuNRs)加入反应器,通过碳酸钾水溶液调节金纳米棒pH为9.3,将0.025mg癌胚抗原CEA标记抗体(Ab₁)和0.025mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液与金纳米棒混合,所得AuNRs、HRP和Ab₁混合液在旋转混合架上旋转混匀后静置处理;

[0046] (4)将1mg牛血清白蛋白加入上述AuNRs、HRP和Ab₁混合液封闭,最后得到multi-HRP-AuNRs-Ab₁检测探针。如图1(d)所示,所得金纳米棒等离子体带在880nm处。

[0047] 实施案例5:

[0048] (1)将2.5 μ mol摩尔质量配比为氯金酸(HAuCl₄)和1000 μ mol十六烷基三甲基溴化铵(Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide CTAB)加入到反应器,加入6 μ mol硼氢化钠(NaBH₄)得到金种溶液;

[0049] (2)取上述金种溶液加入到反应器,加入摩尔质量配比为氯金酸:十六烷基三甲基溴化铵:抗坏血酸:硝酸银=1:400:2:200,制备得到金纳米棒;

[0050] (3)将5mg金纳米棒(AuNRs)加入反应器,通过碳酸钾水溶液调节金纳米棒pH为9.5,将0.005mg癌胚抗原CEA标记抗体(Ab₁)和0.045mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液与金纳米棒混合,所得AuNRs、HRP和Ab₁混合液在旋转混合架上旋转混匀后静置处理;

[0051] (4)将1mg牛血清白蛋白加入上述AuNRs、HRP和Ab₁混合液封闭,最后得到multi-HRP-AuNRs-Ab₁检测探针。如图1(e)所示,所得金纳米棒等离子体带在1130nm处。

[0052] 实施案例6:

[0053] (1)将2.5 μ mol摩尔质量配比为氯金酸(HAuCl₄)和1000 μ mol十六烷基三甲基溴化铵(Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide CTAB)加入到反应器,加入6 μ mol硼氢化钠(NaBH₄)得到金种溶液;

[0054] (2)取上述金种溶液加入到反应器,加入摩尔质量配比为氯金酸:十六烷基三甲基溴化铵:抗坏血酸:硝酸银=1:400:2:240,制备得到金纳米棒;

[0055] (3)将5mg金纳米棒(AuNRs)加入反应器,通过碳酸钾水溶液调节金纳米棒pH为9.0,将0.02mg癌胚抗原CEA标记抗体(Ab₁)和0.02mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液与金纳米棒混合,所得AuNRs、HRP和Ab₁混合液在旋转混合架上旋转混匀后静置处理;

[0056] (4)将0.8mg牛血清白蛋白加入上述AuNRs、HRP和Ab₁混合液封闭,最后得到multi-HRP-AuNRs-Ab₁检测探针。如图1(f)所示,所得金纳米棒等离子体带在1250nm处。

[0057] 实施案例7:

[0058] (1)将2.5 μ mol摩尔质量配比为氯金酸(HAuCl₄)和1250 μ mol十六烷基三甲基溴化铵(Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide CTAB)加入到反应器,加入2.5 μ mol硼氢化钠(NaBH₄)得到金种溶液;

[0059] (2)取上述金种溶液加入到反应器,加入摩尔质量配比为氯金酸:十六烷基三甲基溴化铵:抗坏血酸:硝酸银=1:400:2:400,制备得到金纳米棒;

[0060] (3)将5mg金纳米棒(AuNRs)加入反应器,通过碳酸钾水溶液调节金纳米棒pH为9.0,将0.005mg癌胚抗原CEA标记抗体(Ab_1)和0.005mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液与金纳米棒混合,所得AuNRs、HRP和 Ab_1 混合液在旋转混合架上旋转混匀后静置处理;

[0061] (4)将0.5mg牛血清白蛋白加入上述AuNRs、HRP和 Ab_1 混合液封闭,最后得到multi-HRP-AuNRs- Ab_1 检测探针。

[0062] 实施案例8:

[0063] (1)将2.5 μ mol摩尔质量配比为氯金酸($HAuCl_4$)和1125 μ mol十六烷基三甲基溴化铵(Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide CTAB)加入到反应器,加入7.5 μ mol硼氢化钠($NaBH_4$)得到金种溶液;

[0064] (2)取上述金种溶液加入到反应器,加入摩尔质量配比为氯金酸:十六烷基三甲基溴化铵:抗坏血酸:硝酸银=1:400:2:400,制备得到金纳米棒;

[0065] (3)将5mg金纳米棒(AuNRs)加入反应器,通过碳酸钾水溶液调节金纳米棒pH为9.0,将0.01mg癌胚抗原CEA标记抗体(Ab_1)和0.01mg辣根过氧化物酶(HRP)混合液与金纳米棒混合,所得AuNRs、HRP和 Ab_1 混合液在旋转混合架上旋转混匀后静置处理;

[0066] (4)将0.5mg牛血清白蛋白加入上述AuNRs、HRP和 Ab_1 混合液封闭,最后得到multi-HRP-AuNRs- Ab_1 检测探针。

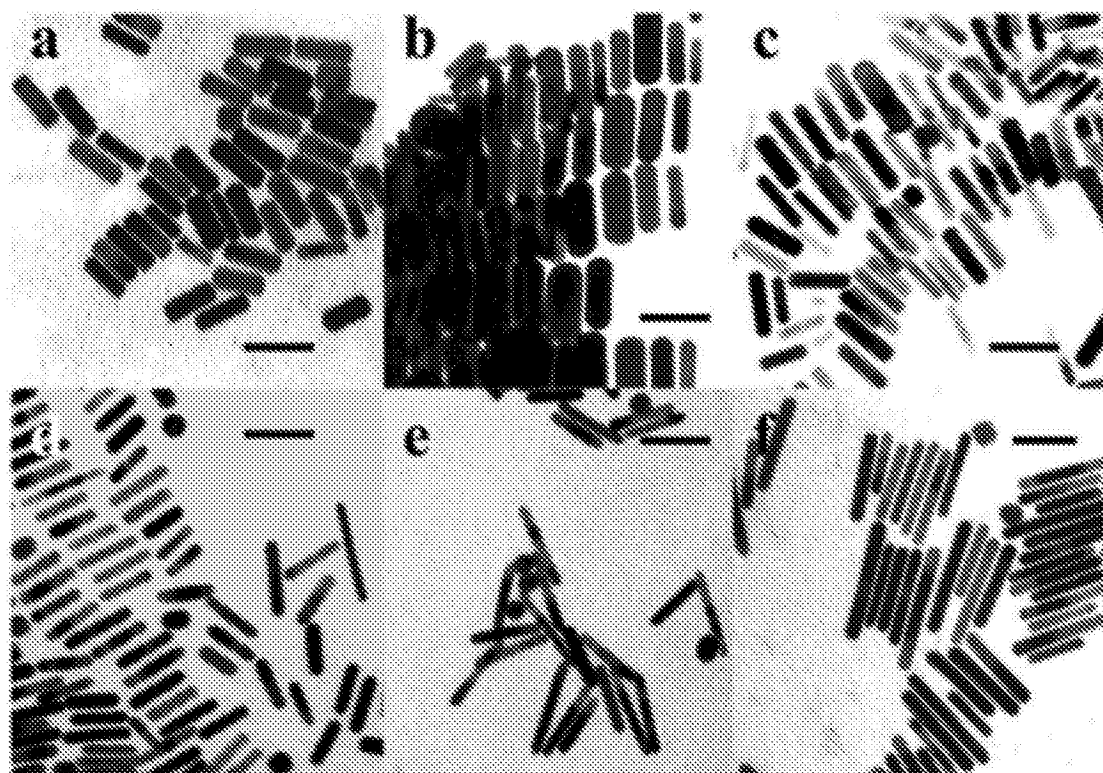


图1

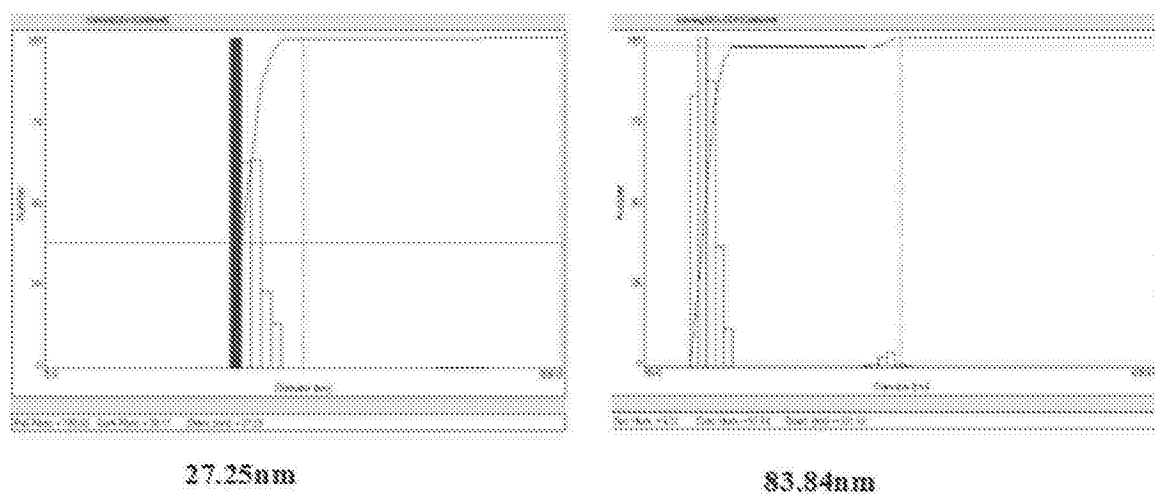


图2

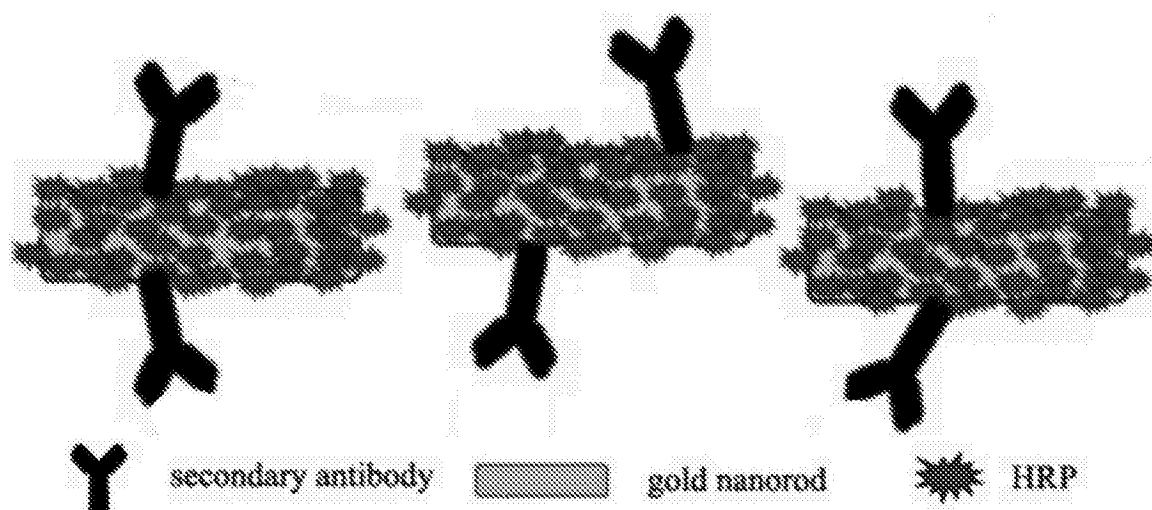


图3

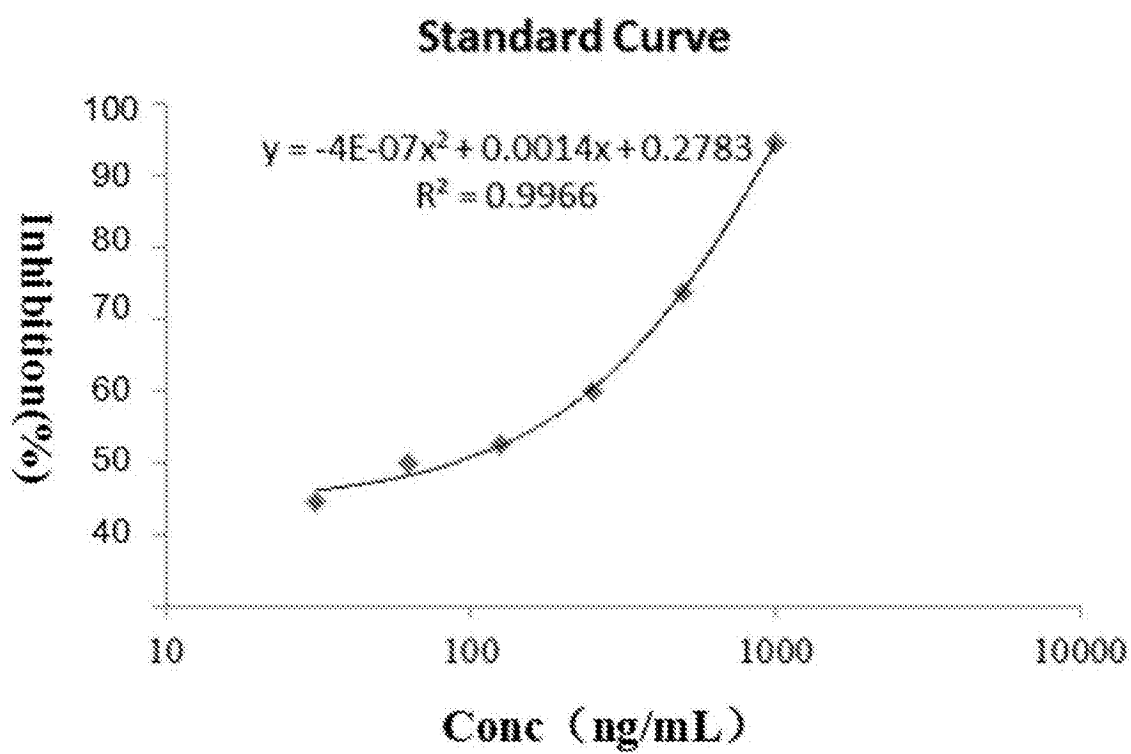


图4

专利名称(译)	一种金纳米棒偶联辣根过氧化物酶和癌胚抗原标记抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN106226514A	公开(公告)日	2016-12-14
申请号	CN201610517767.0	申请日	2016-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	天津大学		
申请(专利权)人(译)	天津大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津大学		
[标]发明人	常津 武玉东 宫晓群		
发明人	常津 武玉东 宫晓群		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/57473		
代理人(译)	王丽		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种金纳米棒偶联辣根过氧化物酶和癌胚抗原标记抗体的制备方法；利用金纳米棒和癌胚抗原标记抗体以及辣根过氧化物酶的静电吸附作用，制备多酶标记的金纳米粒子甲胎蛋白免疫探针，对癌胚抗原(carcino-embryonic antigen CEA)，这种广泛存在于内胚叶起源的消化系统癌蛋白标志物进行定性定量的检测，建立蛋白标志物检测的新方法，提高检测的灵敏度和特异性。本发明的特点在于：整个制备过程简单，适合于产业化生产；可定性定量检测癌胚抗原，且特异性良好；整个检测过程，成本低廉且操作非常简便，适合高危人群的社区肿瘤筛选，建立了一种肿瘤检测的新方法。

