



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106290896 B

(45)授权公告日 2018.05.18

(21)申请号 201610598160.X

CN 104267190 A,2015.01.07,

(22)申请日 2016.07.27

CN 102288593 A,2011.12.21,

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106290896 A

Qiaoling Yu, et.al..Capillary-based three-dimensional immunosensor assembly for high-performance detection of carcinoembryonic antigen using laser-induced fluorescence spectrometry..《Anal Chem》.2014,第86卷

(43)申请公布日 2017.01.04

(73)专利权人 东北师范大学

地址 130024 吉林省长春市人民大街5268号

Yuqing Lin, et.al..Electrochemical immunosensor for detection of epidermal growth factor reaching lower detection limit: toward oxidized glutathione as a more efficient blocking reagent for the antibody functionalized silver nanoparticles and antigen interaction..《Anal Chem》.2015,第87卷

(72)发明人 杨丽 刘晓霞 宋星达 田苗苗

(74)专利代理机构 长春市东师专利事务所

22202

代理人 刘延军 李荣武

A.Duval, et.al..Photonic crystal fiber based antibody detection..《Sensors, 2004 IEEE》.2005,第3卷

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

审查员 毕秀华

(56)对比文件

US 4447546 A,1984.05.08,

CN 101813629 A,2010.08.25,

CN 103063828 A,2013.04.24,

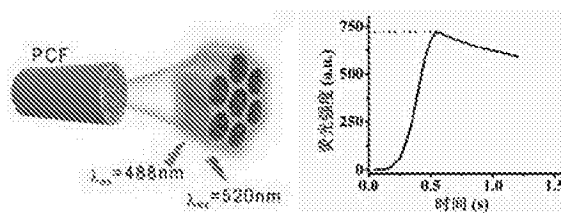
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54)发明名称

一种光子晶体光纤免疫传感器及其应用

(57)摘要

本发明属于免疫检测分析技术领域。具体涉及一种基于光子晶体光纤免疫传感器及其制作方法及应用。将甲胎蛋白抗体Ab₁通过共价键结合于PCF内表面,依次加入抗原、荧光标记抗体(Ab₂)二抗,通过抗体抗原之间的作用,形成一种夹心的结构Ab₁-AFP-Ab₂,定量地检测原发性肝癌的肿瘤标志物AFP。与现有产品和技术相比,整个制备过程简单,适合于产业化生产;抗原浓度与荧光强度正相关,可定性定量检测甲胎蛋白;检测过程操作非常简便,并能够满足较高检测灵敏度的需求,具有重要的临床诊断意义。



1. 一种用于甲胎蛋白抗原检测的光子晶体光纤免疫传感器,它是由下述方法制备的:

1) 光子晶体光纤的预处理

依次用0.1M HCl,0.1M NaOH清洗PCF,时间分别为30min和60min,使内表面硅羟基进行活化,然后用水清洗、N₂吹干,通入1% v/v氨丙基二乙氧基甲基硅烷3-ADMS的甲苯溶液,通过相互反应使得PCF内表面覆盖一层氨基,依次用甲苯、水清洗后,再通入2.5% 戊二醛GA水溶液,其中一端的醛基与PCF内壁的氨基相互作用,另外一端的醛基用来结合包被抗体Ab1;

2) 抗体Ab1的固定

向醛基活化的PCF中通入15 μg/mL 甲胎蛋白抗体Ab1,两端封口,置于4℃冰箱过夜,

0.1M pH 7.4 PBS溶液洗去未结合的Ab1;

3) 消除非特异性吸附

通入10mg/mL 氧化型谷胱甘肽GSSG溶液至PCF中,两端封口,室温放置2h,消除非特异性吸附,PBS清洗后,将其截为多根,每根长度为6cm,用小刀除去PCF表面的一小块丙烯酸酯涂层,作为检测窗口,置于4℃冰箱;

所述的光子晶体光纤免疫传感器还包括AF-488标记的甲胎蛋白抗体Ab2。

一种光子晶体光纤免疫传感器及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析技术领域。具体涉及一种基于光子晶体光纤免疫传感器及甲胎蛋白抗原的检测方法。

背景技术

[0002] 原发性肝癌(Primary Hepatic Carcinoma PHC) 是临床上最常见的恶性肿瘤之一。当下,肝癌在全球的发病率都呈上升趋势。据世界卫生组织发表的《全球癌症报2014》报道,中国新增癌症病例高居世界第一位,其中肝癌的新增病例和死亡人数均居世界首位。因此,原发性肝癌的早期诊断、治疗意义重大。

[0003] 甲胎蛋白(α -fetoprotein 或AFP) 是单一多聚体肽键蛋白,由590个氨基酸组成,分子量约70kD,含糖4%。AFP主要由胎肝和卵黄囊合成,其次是胃肠道粘膜,肾脏也可少量合成。胎儿6周开始合成,12~15周达高峰,出生后1~2年降至成人水平。AFP是迄今为止发现的原发性肝癌最灵敏、最特异的肿瘤标志物,70.95%的原发性肝癌患者呈现AFP水平升高。中国肝癌研究协会报导正常人血清AFP<20ng/ml,而原发性肝癌患者血清AFP多数在500ng/ml左右。血液中甲胎蛋白水平对于肿瘤的早期发现,病情的发展、治疗后的评价、监测复发和转移等方面都具有一定的应用价值,可以为患者争取治疗时间,延长患者生命。其临床诊断价值已得到广泛认可,随着试剂灵敏度的不断提高,其临床应用价值也更为广泛。

[0004] 荧光免疫检测技术具有专一性强、灵敏度高、实用性好等优点,已被广泛用于测量含量很低的生物活性化合物,例如蛋白质(酶、接受体、抗体)、激素(甾族化合物、甲状腺激素、肽激素)、药物及微生物等。在过去十年里,毛细管广泛被用于制作荧光免疫传感器,基于毛细管的免疫分析具有快速、试剂消耗量小、易操作等优点,毛细管作为样品池的同时,管壁也可作为光导介质。尽管具有以上优势,毛细管作为一维的圆柱形,检测灵敏度受到了一定限制。

[0005] 段等人用石英管将8根毛细管包裹其中,并且用铝箔片作为反光材质更有效的收集荧光,制作出了三维的毛细管荧光免疫传感器用来检测癌胚抗原。相比于二维毛细管荧光免疫传感器(8根毛细管排成一排),所设计的三维传感器由于增加了传感面积,灵敏度提高了3.4倍。(参考文献:“Capillary-Based Three-Dimensional Immunosensor Assembly for High-Performance Detection of Carcinoembryonic Antigen Using Laser-Induced Fluorescence Spectrometry”,Qiaoling Yu, Xu Wang, Yixiang Duan. Analytical. Chemistry. 2014, 86, 1518-1524.)

[0006] 1996年,英国南安普顿大学光电研究中心和丹麦技术大学电磁系首次成功制备出光子晶体光纤。由于其独特的光学特性,已广泛被用于通讯、非线性设备、高功率激光器等领域。除此之外,光子晶体光纤也可被当成一束具有多个微通道的毛细管,从而作为一种微反应器或生物传感器。本文拟研制基于光子晶体光纤的甲胎蛋白荧光免疫传感器,由于微通道大大地增加了比表面积,从而实现肝癌肿瘤标志物进行快速、方便、灵敏检测。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种基于光子晶体光纤免疫传感器及其制备方法,另一目的是提供甲胎蛋白抗原的检测方法。

[0008] 鉴于肿瘤标志物在肿瘤检测中的重要地位、光子晶体光纤独特的多通道结构以及荧光免疫技术的优势。我们将结合光子晶体光纤和荧光免疫两种技术实现对甲胎蛋白抗原的定量检测。预处理过的光子晶体光纤内表面富含醛基,可以和甲胎蛋白单克隆抗体(Ab₁)的氨基反应,从而使Ab₁共价结合于光子晶体光纤表面。荧光标记的甲胎蛋白抗体(Ab₂)、甲胎蛋白抗原和结合在光子晶体光纤表面的甲胎蛋白抗体(Ab₁)通过抗体抗原之间的作用,形成一种夹心结构Ab₁-AFP-Ab₂。通过测量荧光强度的大小即可对甲胎蛋白抗原进行定量检测。

[0009] 本发明的具体技术方案如下:

[0010] 1. 光子晶体光纤免疫传感器的制作方法:

[0011] 1) 光子晶体光纤的预处理

[0012] 依次用0.1M HCl,0.1M NaOH清洗PCF,使内表面硅羟基进行活化。然后用水清洗、N₂吹干。通入1% v/v氨丙基二乙氧基甲基硅烷(3-ADMS)的甲苯溶液,通过相互反应使得PCF内表面覆盖一层氨基。清洗后,再通入2.5% 戊二醛(GA)水溶液,其中一端的醛基与PCF内壁的氨基相互作用,另外一端的醛基用来结合包被抗体Ab₁。

[0013] 2) 抗体Ab₁的固定

[0014] 向醛基活化的PCF中通入15 μg/mL 甲胎蛋白抗体Ab₁,置于4℃冰箱过夜,0.1M pH 7.4 PBS溶液洗去未结合的Ab₁。

[0015] 3) 消除非特异性吸附

[0016] 通入10mg/mL 氧化型谷胱甘肽(GSSG)溶液至PCF中,室温放置2h,消除非特异性吸附。PBS清洗后,置于4℃冰箱,待用。

[0017] 2. 甲胎蛋白抗原的检测方法,采用权利要求1所述的PCF免疫传感器,包括如下步骤:

[0018] 1) 将待测样品通入所述PCF中,37℃免疫反应60min,PBST(含0.05% v/v Tween-20的PBS)洗去未结合的AFP。

[0019] 2) 将AF-488标记的甲胎蛋白抗体(Ab₂)通入PCF中,37℃免疫反应60min,PBST洗去未结合的Ab₂。

[0020] 3) 除去PCF表面的丙烯酸酯涂层(长度约1cm),作为检测窗口。

[0021] 3. 采用激光诱导荧光(LIF)作为检测方法检测, LIF检测激发波长为488nm,发射波长为520nm。

附图说明

[0022] 图1是本发明所使用的光子晶体光纤横截面的扫描电镜图片

[0023] 图2是本发明的检测甲胎蛋白抗原的原理图

[0024] 图3是本发明的甲胎蛋白抗原的LIF检测示意图

[0025] 图4是不同浓度GSSG的非特异性吸附值大小

- [0026] 图5是Ab1浓度的优化图
- [0027] 图6本发明制备的基于光子晶体光纤的甲胎蛋白(AFP) 样品定量检测拟合曲线。
- [0028] 图7传统ELISA检测结果
- [0030] 图8是不同干扰试剂对测定的影响
- [0031] 图9不同方法检测临床血清样品的结果对比
- [0032] 本发明的优势在于：
- [0033] 1. 采用光子晶体光纤作为免疫反应载体,由于具有排列均匀的多通道结构(126个直径为4-5 μm 的微通道),使其具有大的比表面积(约为相同截面积毛细管的10-12倍),一方面可以结合更多的Ab₂,使其荧光信号增强;另一方面,光子晶体光纤的三维结构,可以更有效地收集荧光信号。
- [0034] 2. 采用氧化型谷胱甘肽作为封闭剂消除非特异性吸附,由于其分子量小,可以提供足够的空间使抗原抗体有效结合。
- [0035] 3. 采用光子晶体光纤内壁的醛基和抗体的氨基之间的反应形成的牢固的化学键,而非传统的静电吸附作用,提高了抵抗非特异性吸附的能力,荧光强度和甲胎蛋白浓度之间正相关关系可同时实现定性和定量检测,且灵敏度高,最低可检测出0.1ng/mL。

具体实施方式

[0036] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0037] 图2是本发明的检测甲胎蛋白抗原的原理图,图3是本发明的甲胎蛋白抗原的LIF检测示意图。

[0038] 实施例1

[0039] 所用的试剂仪器设备来源:

[0040] 1 甲胎蛋白抗原及其抗体:北京博奥森生物技术有限公司;

[0041] 2 抗原稀释液:北京科跃中楷生物技术有限公司;

[0042] 3 氧化型谷胱甘肽:西格玛奥德里奇;

[0043] 4 氨丙基二乙氧基甲基硅烷、戊二醛:西格玛奥德里奇;

[0044] 5 LMA-20 光子晶体光纤:NKT 光子学(丹麦)

[0045] 6 二极管激光器:Cobolt AB, (瑞典)

[0046] 7 光学元件:北京卓立汉光仪器有限公司

[0047] 8 光电倍增管:北京滨松光子学商贸(中国)有限公司

[0048] 9 色谱工作站:上海万象仪器有限公司

[0049] 光子晶体光纤免疫传感器的制备

[0050] 1) 光子晶体光纤的预处理

[0051] 依次用0.1M HCl,0.1M NaOH清洗PCF,时间分别为30min和60min,使内表面硅羟基进行活化。用水清洗30min后,N₂吹干。注射泵推入1% v/v氨丙基二乙氧基甲基硅烷(3-ADMS)的甲苯溶液,反应1h,使得PCF内表面具有氨基。依次用甲苯、水各清洗15min后,再通入2.5% 戊二醛(GA)水溶液反应1h,其中一端的醛基与PCF内壁的氨基相互作用,另外一端

的醛基用来结合包被抗体Ab₁。

[0052] 2) 抗体Ab₁的固定

[0053] 向醛基活化的PCF中通入15 μg/mL 甲胎蛋白抗体Ab₁,用橡皮塞将其两端封口,置于4℃冰箱过夜,PBS溶液冲洗10min,洗去未结合的Ab₁。

[0054] 3) 消除非特异性吸附

[0055] 通入10mg/mL 氧化型谷胱甘肽(GSSG)至PCF中,两端封口,室温放置2h,消除非特异性吸附。PBS清洗后,将其截为多根,每根长度为6cm,置于4℃冰箱,待用。

[0056] 实施例2

[0057] 1、甲胎蛋白抗原标准曲线的制作

[0058] 1) 用抗原稀释液配置将一系列不同浓度的甲胎蛋白抗原标准物质,依次通入不同根PCF中,37℃免疫反应60min,PBST洗去未结合的AFP。

[0059] 2) 将AF-488标记的甲胎蛋白抗体(Ab₂)通入PCF中,37℃免疫反应60min,PBST洗去未结合的Ab₂。

[0060] 3) 用小刀除去PCF表面的丙烯酸酯涂层(长度约1cm),作为LIF检测窗口。

[0061] 4) 设置激光器功率为1mW,光电倍增管(PMT)收集520nm处荧光强度。

[0062] 5) 以荧光强度为纵坐标,AFP浓度为横坐标,绘制标准曲线。该抗原的最低检出限为0.1ng/mL,如图6所示。而毛细管荧光免疫传感器的最低检出限为0.5ng/mL,传统的ELISA的最低检出限为3.5 ng/mL,如图7所示,说明本发明的PCF荧光免疫传感器具有更高的灵敏度。

[0063] 本发明所提出的检测方法能够放大信号,提高检测灵敏度,在实际应用中,对于特定的目标物具有潜在的应用价值。

[0064] 2、样品检测

[0065] 1) 将样品溶液通入PCF中,37℃免疫反应60min,PBST洗去未结合的AFP。

[0066] 2) 将AF-488标记的甲胎蛋白抗体(Ab₂)通入PCF中,37℃免疫反应60min,PBST洗去未结合的Ab₂。

[0067] 3) 用小刀除去PCF表面的一小块丙烯酸酯涂层(长度约1cm),作为LIF检测窗口。

[0068] 4) 设置激光器功率为1mW,光电倍增管(PMT)收集520nm处荧光强度。

[0069] 5) 测得的荧光强度代入甲胎蛋白抗原标准曲线,求出样品中甲胎蛋白抗原浓度。

[0070] 3、干扰测定

[0071] 用抗原稀释液配置浓度为50 ng/mL的AFP溶液,将其作为溶剂配置一系列浓度为5 μg/mL的干扰试剂(抗坏血酸,葡萄糖,亮氨酸,甘氨酸,谷氨酸,癌胚抗原,免疫球蛋白G),浓度比AFP: 干扰试剂=1:100。按照上述方法测其荧光强度,计算含不同干扰试剂与不含干扰试剂的荧光强度比值,如图8所示,比值在87.0%-107.2%之间,说明在干扰试剂存在下不影响甲胎蛋白的检测。

[0072] 实施例3

[0073] 实际样品检测

[0074] 取一份血清样品,加入不同已知浓度的AFP标样,计算加标回收率。结果列于下表。

加入值 (ng/mL)	所测总值 (ng/mL)	所测加入值 (ng/mL)	相对标准偏差 (n=5)	回收率
0	1.41	1.41	2.58	--
1	2.60	1.19	1.72	119.0%
2	3.45	2.04	1.14	102.0%
5	5.70	4.29	3.26	85.8%
10	9.84	8.43	3.38	84.3%

[0076] 用本发明所制备的传感器对10份已知浓度的实际血清样本进行检测。将荧光强度代入标准曲线,所得结果与已知浓度进行比较,如图9所示,说明该方法具有较高的准确性。

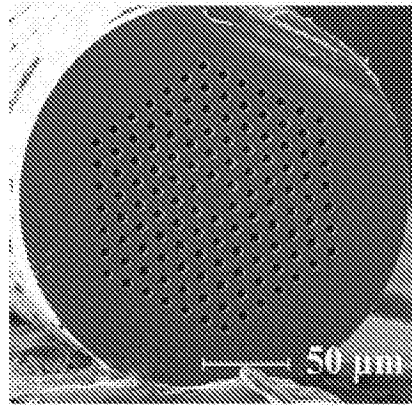


图 1

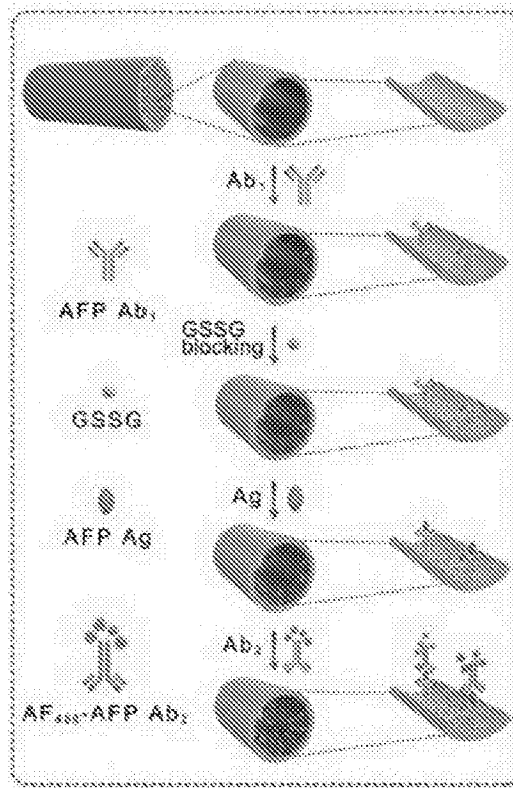


图 2

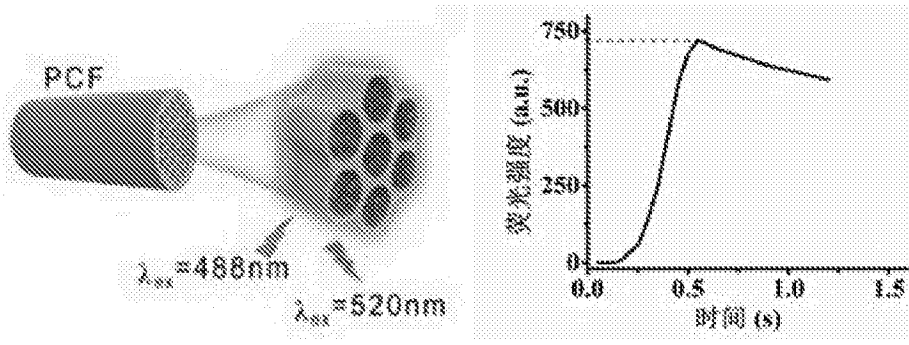


图 3

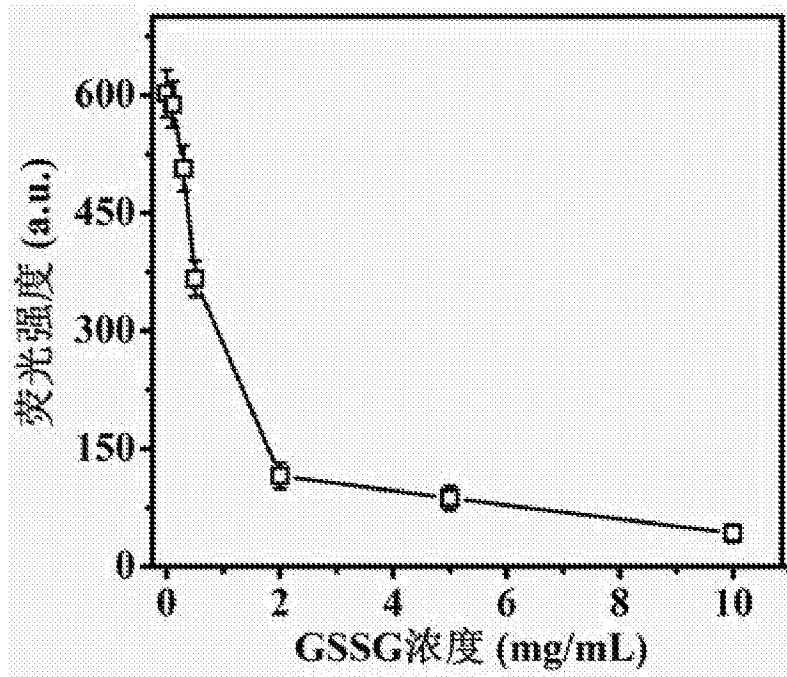


图 4

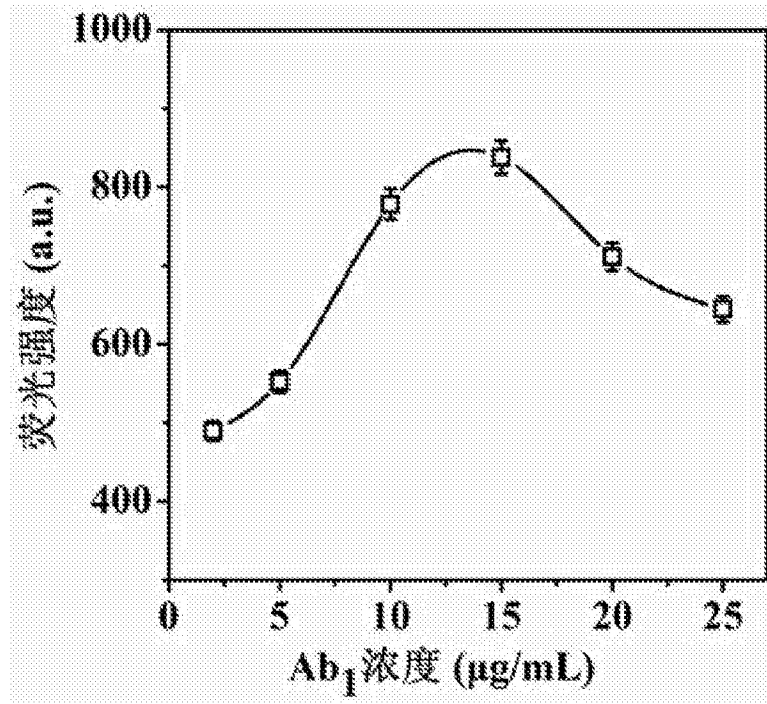


图 5

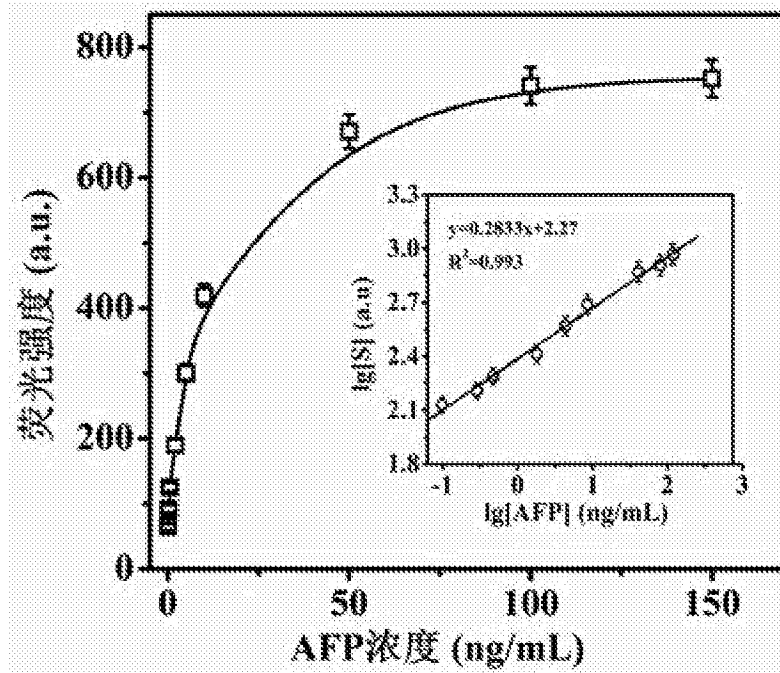


图 6

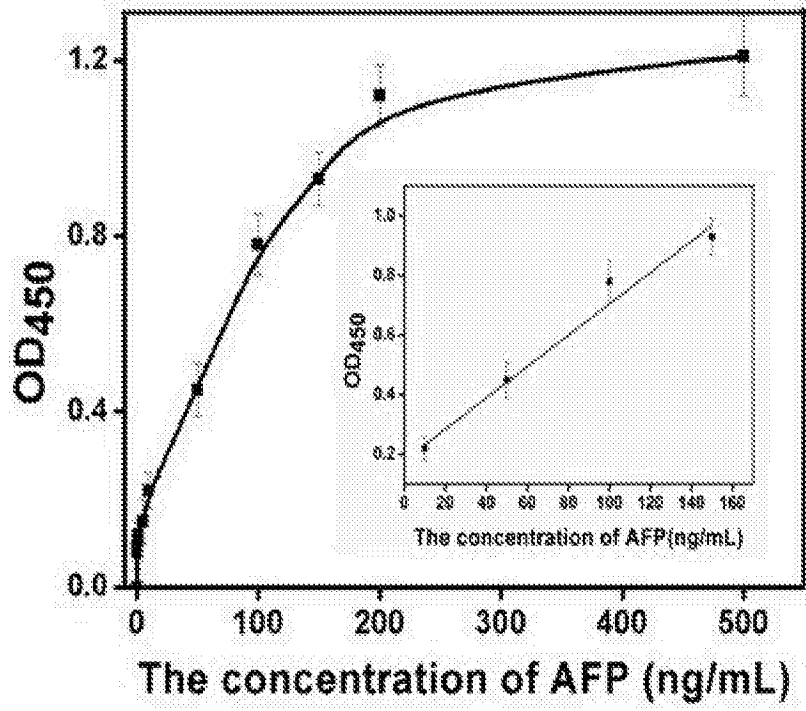


图 7

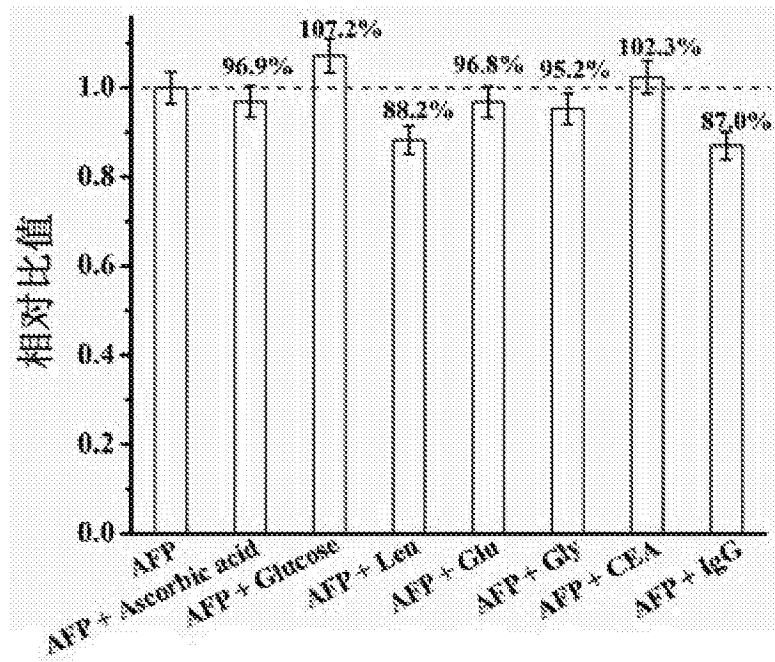


图 8

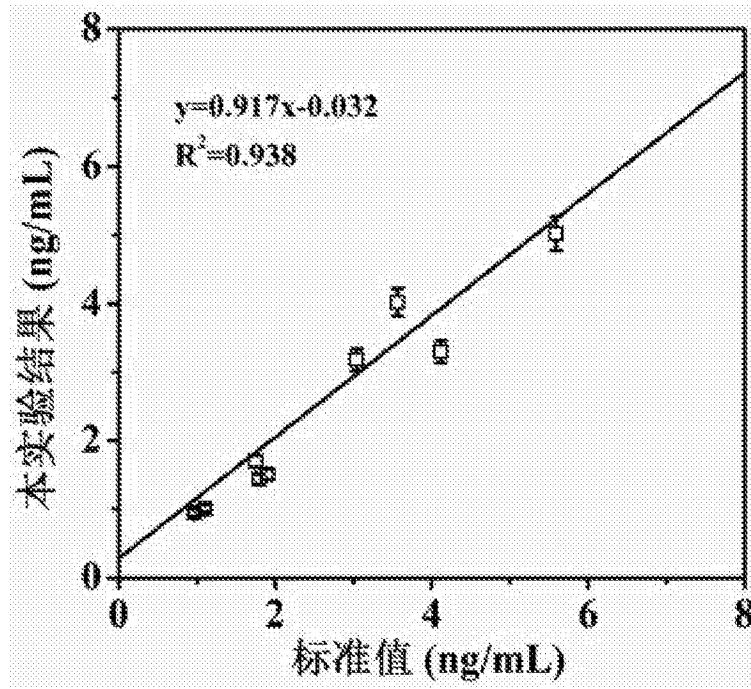


图 9