

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810051302.6

[43] 公开日 2009年3月18日

[11] 公开号 CN 101387640A

[22] 申请日 2008.10.22

[21] 申请号 200810051302.6

[71] 申请人 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所

地址 130033 吉林省长春市东南湖大路16号

[72] 发明人 孔祥贵 张友林 曾庆辉 孙雅娟
刘晓敏

[74] 专利代理机构 长春菁华专利商标代理事务所
代理人 赵炳仁

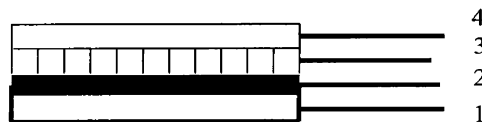
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

[54] 发明名称

定向固定抗体的光纤生物探针及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及用于免疫检测用的倏逝波光纤生物传感器上的光纤生物探针，特别是一种在光纤表面上定向固定抗体的光纤生物探针及其制备方法。该生物探针由光纤和固定在该光纤表面上的捕获抗体分子层构成，其特点是在光纤和捕获抗体分子层之间还包括一层蛋白G分子层。是将处理干净的光纤浸入到蛋白G溶液中，得到蛋白G的饱和吸附层后再浸入到捕获抗体分子溶液中，以蛋白G结合捕获抗体分子至饱和状态即制得定向固定抗体光纤生物探针。克服了纤芯表面上直接固定抗体引起的抗体生物活性下降的缺点，减少了抗体分子的空间位阻；并有效的降低了表面的非特异性吸附，提高检测抗原的分析灵敏度。



1. 一种定向固定抗体的光纤生物探针，由光纤和固定在该光纤表面上的捕获抗体分子层构成，其特征在于：在光纤和捕获抗体分子层之间还包括一层蛋白 G 分子层。

2. 根据权利要求 1 所述的定向固定抗体的光纤生物探针，其特征在于：在所述的光纤和蛋白 G 分子层之间还有一层亲水极化层。

3. 根据权利要求 1 所述的定向固定抗体的光纤生物探针，其特征在于：所述的蛋白 G 分子层、亲水极化表面层和捕获抗体分子层均为单分子层。

4. 一种权利要求 1 所述的光纤生物探针的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

a. 选择所需直径大小的光纤，用常规清洁处理方法进行表面清洁处理；

b. 将经过上述步骤 a 清洁处理干净的光纤浸入到蛋白 G 溶液中，浸泡的时间依赖溶液浓度来定，以达到饱和吸附为止，取出后用去离子水洗净，即得到蛋白 G 的饱和吸附分子层；

c. 将经过上述步骤 b 处理的光纤浸入到捕获抗体分子溶液中，浸泡的时间依赖溶液浓度来定，以蛋白 G 结合捕获抗体分子至饱和状态为止，取出后用去离子水洗净，得到捕获抗体分子层，即制得定向固定抗体光纤生物探针。

5. 一种权利要求 2 所述的光纤生物探针的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

a. 选择所需直径大小的光纤，经常规清洁处理后，在洗液 1 中清洗 30 分钟，再在清洗液 2 中清洗 30 分钟，然后在清洗液 3 中煮沸 10 分钟，用去离子水清洗至中性，即得到表面上具有亲水极化层的光纤；

其中所述清洗液 1 为：浓 HCl:乙醇=1:1 (V/V)

清洗液 2 为：浓硫酸

清洗液 3 为：超纯水；

b. 将经过上述步骤 a 处理的光纤浸入到蛋白 G 溶液中，浸泡的时间依赖溶液浓度来定，以达到饱和吸附为止，取出后用去离子水洗净，即得到蛋白 G 的饱和吸附分子层；

c. 将经过上述步骤 b 处理的光纤浸入到捕获抗体分子溶液中，浸泡的时间依赖溶液浓度来定，以蛋白 G 结合捕获抗体分子至饱和状态为止，取出后用去离子水洗净，得到捕获抗体分子层，即制得定向固定抗体光纤生物探针。

定向固定抗体的光纤生物探针及其制备方法

技术领域

本发明涉及用于免疫检测用的倏逝波光纤生物传感器上的光纤生物探针，特别是一种在光纤表面上定向固定抗体的光纤生物探针及其制备方法。

背景技术

目前，广泛使用的基于光纤倏逝波生物传感器的生物检测系统，是采用光波在光纤内以全反射方式传输过程中产生的倏逝波激发以生物亲和反应而结合于光纤探针表面生物分子上标记的荧光染料。把表面固定了一种捕获生物分子的光纤探针置于被检测样品中，该样品中如果存在与固定在光纤探针表面的生物分子同种生物物质，则两者将发生亲和反应形成复合分子，样品中的被测生物分子则结合到光纤探针的表面。然后再把该光纤探针置于具有荧光染料标记的识别生物分子溶液中，同样两者也会发生特异反应，该溶液中的识别生物分子与光纤生物探针上的复合分子结合，则将荧光染料固定于光纤探针的表面。通过倏逝波激发光纤探针表面倏逝波场范围内的荧光染料，从而检测被检测分子的生物物质的属性及其含量。

影响光纤生物传感器的效率主要由两大因素：光纤传感器的工程设计和生物学问题，生物学因素与工程学一样，决定着光纤传感器的成败。光纤表面生物敏感分子的固定对于检测的敏感性和特异性至关重要。然而被直接固定在光纤纤芯表面上的抗体分子的生物活性通常低于溶液中的抗体分子，生物活性降低的主要原因是被直接固定在纤芯表面上的抗体分子空间位阻增大，不利于抗体-抗原的结合，如文献《A quantitative assessment of heterogeneity for surface-immobilized proteins》（Anal. Chem.

73(2001),471-480) 所述, 界面的微环境导致生物分子的构象改变甚至会发生变性。另外一个原因是被直接固定在纤芯表面上的抗体分子的功能域在纤芯表面上趋向向下或趋向侧面时, 不利于抗原-抗体的结合; 如果抗体分子上与抗原结合的功能域吸附在纤芯表面上, 抗体分子就不能同抗原发生结合, 如图 1 所示, 抗体分子 5 含有两个抗原结合域 7, 其中一个与固相表面结合在一起, 从而失去了与抗原分子结合的能力。

发明内容

本发明的目的在于, 为克服上述被直接固定在固相表面上的抗体分子的空间位阻大、抗体分子的功能域在固相表面上趋向向下或趋向侧面、抗体分子上与抗原结合的功能域吸附在固相表面上, 不利于抗体-抗原结合, 以及抗体分子容易失活的缺点, 为了提高光纤生物探针上的抗体与抗原的结合能力, 提供一种定向固定抗体的光纤生物探针及其制备方法。

本发明定向固定抗体的光纤生物探针, 由光纤和固定在该光纤表面上的捕获抗体分子层构成, 其特点是在光纤和捕获抗体分子层之间还包括一层蛋白 G 分子层。

为更好的促进蛋白 G 分子层的形成, 在所述的光纤和蛋白 G 分子层之间还有一层亲水极化层。

本发明定向固定抗体的光纤生物探针使用蛋白 G 来定向固定抗体分子。蛋白 G 是细菌胞壁蛋白, 它能够同抗体的 Fc 片段 8 特异性结合。蛋白 G 特异性的结合抗体分子的 Fc 片段 8, 使抗体分子上同抗原分子特异性结合的两个功能域 Fab 7 伸向表面外以便于同抗原分子结合。如图 2 所示, 通过蛋白 G 特异性结合而定向固定在光纤纤芯表面上的抗体分子 5 同抗原分子 6 结合的两个功能域 7 伸向表面外, 自由的同抗原分子 6 结合。结合在光纤纤芯表面上的蛋白 G 起到桥梁的作用, 使被连接的抗体分子在溶液中充分伸展, 极大的降低了空间位阻效应, 使抗体-抗原之间的结合类似于在溶液中一样自由。

另外，蛋白 G 分子层还能够钝化光纤的表面，有效的降低光纤表面的非特异性吸附，提高免疫检测即检测抗原的分析灵敏度。

所述的捕获抗体分子层的抗体包括各种用于免疫检测的抗体，如抗体人免疫球蛋白 G (antiIgG)、抗体牛血清白蛋白 (antiBSA) 或抗体人血清凝血蛋白原 (antiFIB)。

本发明定向固定抗体的光纤生物探针的制备方法包括以下步骤：

a. 选择所需直径大小的光纤，用常规清洁处理方法进行表面清洁处理；
b. 将经过上述步骤 a 清洁处理干净的光纤浸入到蛋白 G 溶液中，浸泡的时间依赖溶液浓度来定，以达到饱和吸附为止，取出后用去离子水洗净，即得到蛋白 G 的饱和吸附分子层；

c. 将经过上述步骤 b 处理的光纤浸入到捕获抗体分子溶液中，浸泡的时间依赖溶液浓度来定，以蛋白 G 结合捕获抗体分子至饱和状态为止，取出后用去离子水洗净，得到捕获抗体分子层，即制得定向固定抗体光纤生物探针。

本发明提供的定向固定抗体的光纤生物探针制备方法还可以进一步包括在光纤纤芯的表面和蛋白 G 分子层之间的亲水极化表面层的制备方法，其制备方法步骤如下：

a. 选择所需直径大小的光纤，经常规清洁处理后，在洗液 1 中清洗 30 分钟，再在清洗液 2 中清洗 30 分钟，然后在清洗液 3 中煮沸 10 分钟，用去离子水清洗至中性，即得到表面上具有亲水极化层的光纤；

其中所述清洗液 1 为：浓 HCl:乙醇=1:1 (V/V)

清洗液 2 为：浓硫酸

清洗液 3 为：超纯水；

b. 将经过上述步骤 a 处理的光纤浸入到蛋白 G 溶液中，浸泡的时间依赖溶液浓度来定，以达到饱和吸附为止，取出后用去离子水洗净，即得到蛋白 G 的饱和吸附分子层；

c. 将经过上述步骤 b 处理的光纤浸入到捕获抗体分子溶液中，浸泡的时间依赖溶液浓度来定，以蛋白 G 结合捕获抗体分子至饱和状态为止，取出后用去离子水洗净，得到捕获抗体分子层，即制得定向固定抗体光纤生物探针。

该方法是在光纤表面上首先形成亲水极化层，然后在亲水极化表面层上形成蛋白 G 分子层，再在蛋白 G 分子层上形成捕获抗体分子层。该亲水极化表面层有利于在蛋白 G 分子层的制备过程中从溶液中吸附蛋白 G，促进蛋白 G 分子层的形成。

本发明提供的定向固定抗体的光纤生物探针的用途包括：

- 1) 优化免疫测定；
- 2) 内分泌激素检测；
- 3) 药物筛选；
- 4) 毒素检测
- 5) 污染物检测。

本发明定向固定抗体的光纤生物探针可对多种生物分子溶液进行免疫检测。将本发明的光纤生物探针浸入到待测分析物溶液，经一定反应时间（时间长短依赖溶液浓度），溶液中的分子与光纤生物探针上的捕获抗体分子特异性结合形成抗原—抗体复合物。然后放入荧光物质标记的识别分子溶液，识别分子与复合分子特异性结合把荧光物质固定在光纤生物探针的表面，荧光物质的荧光通过倏逝波光纤生物传感器系统观察到，以此判定溶液中待测生物分子是否存在。

本发明的优点及效果：

1. 本发明提供的定向固定抗体的光纤生物探针克服了纤芯表面上直接固定抗体引起的抗体生物活性下降的缺点；
2. 本发明的光纤生物探针，定向固定抗体分子，使抗体分子上的抗原结合域伸向纤芯表面外，自由的同抗原结合；

3. 本发明的光纤生物探针，其中蛋白 G 起到了桥梁的作用，减少了抗体分子的空间位阻；

4. 蛋白 G 分子层还能够钝化表面，有效的降低了表面的非特异性吸附，提高检测抗原的分析灵敏度；

附图说明

图 1 是直接固定在光纤表面上的抗体分子示意图；

图 2 是本发明的定向固定的抗体分子示意图；

图 3 是本发明的实施例 1 制备的定向固定抗体的光纤生物探针的结构示意图；

图中：1 为光纤纤芯，2 为亲水极化表面层，3 为蛋白 G 分子层，4 为捕获抗体分子层，5 为抗体分子，6 为抗原分子，7 为抗原结合域，8 为抗体的 Fc 片段

具体实施方式

实施例 1

制备在光纤表面上定向固定抗 BSA 的光纤生物探针，其结构包括：如图 3 所示，光纤 1，在光纤的表面上形成单分子层的亲水极化层 2，在亲水极化层 2 上形成的蛋白 G 单分子层 3，以及在蛋白 G 分子层 3 上形成的捕获抗 BSA 抗体分子层 4。

该光纤生物探针的制备按以下步骤进行：

1. 光纤表面的清洁处理

用常规清洁处理方法对其进行表面清洁处理。

2. 亲水极化层的形成

将上述步骤 1 清洁处理干净的光纤纤芯先在清洗液 1 中清洗 30 分钟，再在清洗液 2 中清洗 30 分钟，然后在清洗液 3 中煮沸 10 分钟，制备出在光纤纤芯上具有亲水的极化层。

其中清洗液 1 为：浓 HCl:乙醇=1:1 (V/V)

清洗液 2 为：浓硫酸

清洗液 3 为：超纯水

3. 蛋白 G 分子层的制备

将经过步骤 2 处理的光纤浸入到 1mg/mL 的蛋白 G 溶液中,浸泡 30 分钟后,取出后用去离子水将上面的残存物清除干净,即形成了第三层蛋白 G 的分子层。

4. 捕获分子层的制备

把上述步骤 3 形成的蛋白 G 的分子层浸入到浓度为 1mg/mL 的 antiBSA 溶液中,浸泡 30 分钟后,取出用去离子水洗净,即在蛋白 G 分子层上得到捕获抗 BSA 分子层,从而制得在光纤纤芯表面上定向固定抗 BSA 的光纤生物探针,其结构如图 3 所示。

定向固定抗 BSA 的光纤生物探针对 BSA 的检测:

把本实施例制备的定向固定抗 BSA 的光纤生物探针全部浸入到待测溶液中,如果溶液中含有 BSA 分子,就会同光纤生物探针上的抗体发生特异性结合,形成复合分子,然后放入荧光物质标记的识别分子溶液,识别分子与复合分子特异性结合把荧光物质固定在光纤生物探针的表面,荧光物质的荧光通过倏逝波光纤生物传感器系统观察到,以此判定溶液中待测生物分子是否存在。

实施例 2

制备一在光纤纤芯表面上定向固定抗 HbsAg 的光纤生物探针,其结构包括:光纤纤芯 1,在光纤纤芯的表面上形成单分子层的亲水表面极化层 2,在亲水极化层 2 上形成的蛋白 G 单分子层 3,以及在蛋白 G 分子层 3 上形成的抗 HbsAg 捕获抗体分子层 4。

采用实施例 1 中的步骤得到蛋白 G 分子层,捕获分子层的制备,

把上述步骤 3 形成的蛋白 G 的分子层浸入到浓度为 1mg/mL 的抗 HbsAg 溶液中，浸泡 30 分钟后，取出用去离子水洗净，即在蛋白 G 分子层上得到捕获抗体分子抗 HbsAg 分子层，从而制得在光纤纤芯表面上定向固定抗 HbsAg 的光纤生物探针，其结构如图 3 所示。

定向固定抗 HbsAg 的光纤生物探针对 BSA 的检测：

把本实施例制备的定向固定抗 HbsAg 的光纤生物探针全部浸入到待测溶液中，如果溶液中含有 HbsAg 分子，就会同光纤生物探针上的抗体发生特异性结合，形成复合分子，然后放入荧光物质标记的识别分子溶液，识别分子与复合分子特异性结合把荧光物质固定在光纤生物探针的表面，荧光物质的荧光通过倏逝波光纤生物传感器系统观察到，以此判定溶液中待测生物分子是否存在。

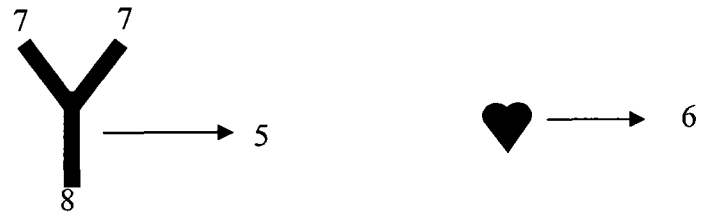
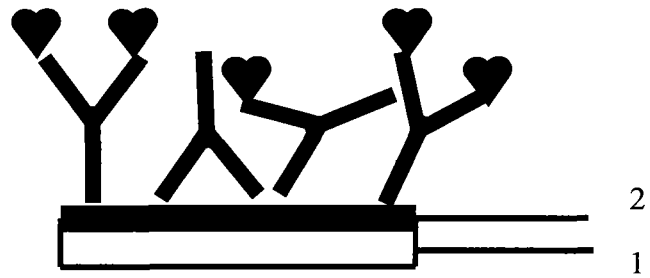


图 1

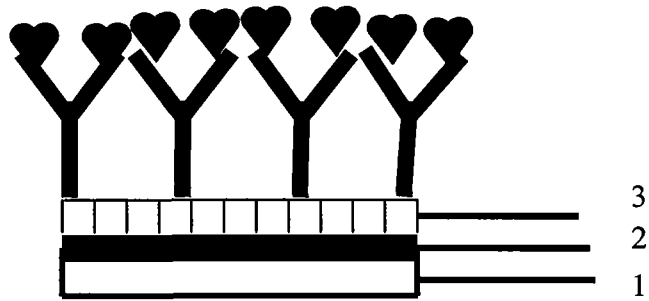


图 2

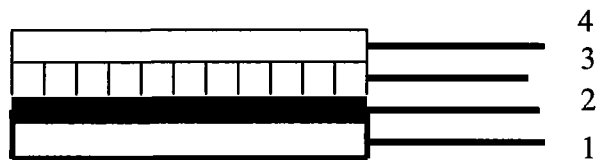


图 3