(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102169119 A
(43)申请公布日 2011.08.31

(21)申请号 201010617002.7

(22)申请日 2010.12.31

(71)申请人 西安交通大学
地址 710049 陕西省西安市咸宁西路 28 号

(72)发明人 李剑君 翁国军 朱键 赵军武

(74)专利代理机构 西安通大专利代理有限责任公司 61200
代理人 陆万寿

(51)Int.Cl.
G01N 33/531(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54)发明名称

一种纳米金免疫探针的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种纳米金免疫探针的制备方法，该方法采用化学反应将抗体共价固定在纳米金的表面，形成抗体-纳米金复合物免疫探针。该免疫探针由纳米金、抗体以及偶联剂 16-巯基烷酸(16-MHDA)三部分组成，16-MHDA 通过基团交换替代纳米金表面的柠檬酸基团，与纳米金形成稳定性高的 Au-S 键，之后抗体 C 末端的赖氨酸残基的 ε-NH_2通过 EDC/NHS 反应与 16-MHDA 末端的羧基形成类似肽键的共价键。该制备方法可根据具体应用情况，选择对应的抗体来满足不同对象的免疫受体。本发明制备的抗体共价偶联纳米金的免疫探针，具有高的特异性、稳定性和选择性，在生化免疫分析，生物组织标记等领域具有很好的应用前景。

CN 102169119 A

1. 一种纳米金免疫探针的制备方法，其特征在于，纳米金与抗体之间通过共价键偶联形成免疫探针，该免疫探针的制备方法包含以下步骤：

(1) 纳米金的制备：用柠檬酸三钠还原氯金酸制备 30nm 的纳米金颗粒；用 80-120ml 超纯水加热至沸腾并进行磁力搅拌，取 0.3-0.5mL 1.0％柠檬酸三钠溶液迅速加入沸腾的水中，反应进行 2-5min 后加入 1.0mL0.50-0.70％氯金酸溶液，35-45min 后关闭热源，之后再 15-20min 停止搅拌，自然冷却至室温，最后定容 50.0mL 冰箱保存；

(2)16- 巯基烷酸 16-MHDA 自组装：在非离子表面活性剂 Tween-20 存在的条件下，16-MHDA 取代柠檬酸基团通过 Au-S 键自组装在纳米金的表面，取 2.0-2.5ml 纳米金溶胶添加 1.0-1.2mL Tween-20，室温振荡混匀 40-60min，之后再加 0.8-1.2mL 16-MHDA 乙醇溶液混匀，室温振荡 3.5-4.5h。过量的 Tween-20 以及 16-MHDA 通过重复离心三次除去，油状沉淀用 1.5-2.0mL pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲液溶解，辅以超声分散 3-5min；

(3)16-MHDA 末端羧基激活：先将 0.2-0.4mol/L 的 1-(3- 二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺 EDC 水溶液和 0.03-0.06mol/L 的 N- 羟琥珀二酰胺 NHS 水溶液混合得到 EDC/NHS 的混合溶液，再取 16-MHDA 修饰的纳米金 0.3-0.6mL，加入 80-120μL 新配置的 EDC/NHS 混合液中反应 10-15min，之后离心，倾倒上清除去过量的 EDC/NHS，沉淀用 0.3-0.5mL pH 7.0 的磷酸盐缓冲液重悬，用超声分散 3-5min；

(4) 抗体偶联：抗体的 C 末端赖氨酸残基的 ε -NH_2 与激活的琥珀酰亚胺酯结合形成共价键，纳米金与抗体共价偶联，80-100μL，2μg/mL 抗体加入到 0.3-0.6mL 步骤 (3) 得到的溶液中反应 2.5-3h 后离心 15-20min，倾去上清，下层沉淀用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液溶解，超声分散 3-5min，4℃保存。

一种纳米金免疫探针的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米金免疫探针的制备，特别涉及到一种抗体与纳米金共价键合制备免疫探针。

背景技术

[0002] 纳米金颗粒以其独特物理化学性质，以及良好的生物相容性，尤其是表面等离体子共振(Surface Plasmon Resonance，SPR)引起的可调控光学特性，近年在生化分析、生物成像、催化、载体系统、医学诊断等领域获得广泛应用，特别是以纳米金偶联生物分子作为探针在生化分析、组织成像等方面显示出巨大潜力，已成功应用于蛋白质、DNA、脂质体等生物大分子的检测与分析，并在癌细胞识别、细胞核标记等领域获得了初步的成功。

[0003] 目前，构建应用于免疫分析的纳米金探针方法多种多样，根据纳米金与抗体之间的成键类型，偶联的可分为共价方法和非共价方法。在非共价的偶联方法下，纳米金颗粒与抗体子之间通过静电作用或疏水作用（范德华力）结合在一起，形成的免疫探针的稳定性和偶联的特异性比较差，但因其制备过程简单、省时，在一些免疫分析检测中还是比较常用，如蛋白质A。与非共价偶联相比，制备共价偶联的纳米金与抗体复合物要复杂且费时，但共价偶联具有非共价偶联无可比拟的优势，稳定性和偶联的特异性大为提高，更为重要的是应用共价偶联制备的复合物进行检测时的检测限可大大提高，甚至达到单分子水平。这对于医学检测与疾病早期诊断具有重要意义。

[0004] 纳米金共价偶联抗体的方式主要有以下两种：一是标记抗体中的巯基，抗体中的巯基以二硫键的形式存在，用还原剂（巯基乙醇或二硫苏糖醇）还原，巯基释放出来，抗体裂解为2分子Fac片段，修饰在纳米金颗粒表面的马来酰亚胺与释放的巯基发生反应，Fac抗体片段偶联在纳米金颗粒表面。第二种是通过抗体中的赖氨酸残基侧链的氨基。该方法主要有两步，首先两端分别带有巯基和羧基的烷基硫醇通过巯基偶联在纳米金颗粒的表面，羧基暴露在外侧；接着在NHS和EDC存在的条件下，暴露的羧基与抗体中赖氨酸残基侧链氨基形成肽键，抗体共价偶联上纳米金颗粒。

[0005] 当前制备共价偶联的纳米金与抗体复合物应用第一种方法比较多，采用的交联剂有巯基乙酸、3-巯基丙酸、半胱氨酸、11-MUA等，由于这些交联剂不能很好的自组装在纳米金的表面，造成纳米金表面抗体的被覆率低，导致纳米金免疫探针在实际应用中达不到预期的目标。在实际应用中，偶联在纳米金表面的抗体量越多，免疫探针的灵敏度越高，而抗体固定量的多少又与所用偶联剂密切相关。因此，选择一种能提高纳米金表面抗体被覆率的偶联剂，是解决纳米金免疫探针在实际应用中存在问题的关键。因此，开发一种提高纳米金表面抗体被覆率的免疫探针制备方法，是解决纳米金免疫探针在实际应用中存在问题的关键。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种纳米金免疫探针的制备方法，通过选择长链16-MHDA

作为偶联剂，不仅制备的免疫探针中抗体与纳米金之间是共价偶联，而且纳米金表面抗体的被覆率大大提高，具有比普通纳米金免疫探针更优良的稳定性和特异性。

[0007] 本发明的技术方案是这样实现的：

[0008] 纳米金免疫探针制备方法，步骤如下：

[0009] 纳米金与抗体之间通过共价键偶联形成免疫探针，该免疫探针的制备方法包含以下步骤：

[0010] (1) 纳米金的制备：用柠檬酸三钠还原氯金酸制备 30nm 左右的纳米金颗粒；用 80-120ml 超纯水加热至沸腾并进行磁力搅拌，取 0.3-0.5mL 1.0％柠檬酸三钠溶液迅速加入沸腾的水中，反应进行 2-5min 后加入 1.0mL0.50-0.70％氯金酸溶液，35-45min 后关闭热源，之后再 15-20min 停止搅拌，自然冷却至室温，最后定容 50.0mL 冰箱保存；

[0011] (2)16- 巯基烷酸 16-MHDA 自组装：在非离子表面活性剂 Tween-20 存在的条件下，16-MHDA 取代柠檬酸基团通过 Au-S 键自组装在纳米金的表面，取 2.0-2.5ml 纳米金溶胶添加 1.0-1.2mL Tween-20，室温振荡混匀 40-60min，之后再加 0.8-1.2mL 16-MHDA 乙醇溶液混匀，室温振荡 3.5-4.5h。过量的 Tween-20 以及 16-MHDA 通过重复离心三次除去。油状沉淀用 1.5-2.0mL pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲液溶解，辅以超声分散 3-5min；

[0012] (3)16-MHDA 末端羧基激活：先将 0.2-0.4mol/L 的 1-(3- 二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺 EDC 水溶液和 0.03-0.06mol/L 的 N- 羟琥珀二酰胺 NHS 水溶液混合得到 EDC/NHS 的混合溶液，再取 16-MHDA 修饰的纳米金 0.3-0.6mL，加入 80-120μL 新配置的 EDC/NHS 混合液中反应 10-15min，之后离心，倾倒上清除去过量的 EDC/NHS，沉淀用 0.3-0.5mL pH 7.0 的磷酸盐缓冲液重悬，用超声分散 3-5min；

[0013] (4) 抗体偶联：抗体的 C 末端赖氨酸残基的 ε -NH_2 与激活的琥珀酰亚胺酯结合形成共价键，纳米金与抗体共价偶联。80-100μL，2μg/mL 抗体加入到 0.3-0.6mL 步骤 (3) 得到的溶液中反应 2.5-3h 后离心 15-20min，倾去上清，下层沉淀用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液溶解，超声分散 3-5min，4℃保存。1-(3- 二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺【N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide，EDC】N- 羟琥珀二酰胺【N-hydroxysuccinimide succinimide，NHS】

[0014] 本发明的效果体现在：

[0015] (1) 本发明提出的纳米金免疫探针的制备方法，以 16-MHDA 为偶联剂制，反应条件温和，技术成熟，设备要求低，制备工艺简单，广泛的适应性，易于实现产业化生产。

[0016] (2) 采用本发明技术所制备的纳米金免疫探针，抗体活性得到很好的保留，对目标受体的识别能力大大提高。

[0017] (3) 本发明所制备的纳米金免疫探针具有优良的抗干扰能力，对环境中 pH 和离子强度的变化具有很强的耐受力。

[0018] (4) 该纳米金免疫探针的制备方法具有优良的适应性，能应用于不同的目标受体，为多目标受体同时识别提供了可能，适合于制备多组分、多功能一步检测的免疫探针。

具体实施方式

[0019] 纳米金免疫探针制备方法，步骤如下：

[0020] (1) 纳米金的制备：用柠檬酸三钠还原氯金酸制备 30nm 左右的纳米金颗粒；用

80-120ml 超纯水加热至沸腾并进行磁力搅拌，取 0.3-0.5mL 1.0％柠檬酸三钠溶液迅速加入沸腾的水中，反应进行 2-5min 后加入 1.0mL0.50-0.70％氯金酸溶液，40-45min 后关闭热源，之后再 15-20min 停止搅拌，自然冷却至室温，最后定容 50.0mL 冰箱保存。

[0021] (2)16-MHDA（巯基十六酸）自组装：16-MHDA 是由十六个碳原子组成的长链巯基烷酸，末端分别是巯基和羧基，巯基连接在纳米金上，羧基连接抗体，16-MHDA 连接纳米金和抗体，起类似“桥”的功能。16-MHDA 的自组装实现了 16-MHDA 分子的巯基官能团在纳米金表面的连接。在非离子表面活性剂 Tween-20 存在的条件下，16-MHDA 取代柠檬酸基团通过 Au-S 键自组装在纳米金的表面。Tween-20 的存在能阻止 16-MHDA 自组装过程中纳米金的自发聚集。取 2.0-2.5ml 纳米金溶胶添加 1.0-1.2mL Tween-20，室温振荡混匀 40-60min，之后再加 0.8-1.2mL 16-MHDA 乙醇溶液混匀，室温振荡 3.5-4.5h。过量的 Tween-20 以及 16-MHDA 通过重复离心三次除去。油状沉淀用 1.5-2.0mL pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲液溶解，辅以 25-30kHz 超声分散 3-5min。

[0022] (3)16-MHDA 末端羧基激活：先将 0.2-0.4mol/L 的 EDC 水溶液和 0.03-0.06mol/L 的 NHS 水溶液混合得到 EDC/NHS 的混合溶液。EDC/NHS 混合溶液是交联化学中常用的交联剂，实现羧基和氨基的键合。取 16-MHDA 修饰的纳米金 0.3-0.6mL，加入 80-120μL 新配置的混合液中反应 10-15min，之后离心，倾倒上清除去过量的 EDC/NHS，沉淀用 0.3-0.5mL pH 7.0 的磷酸盐缓冲液重悬，用超声分散 3-5min。

[0023] (4) 抗体偶联：抗体 C 末端赖氨酸残基的 ε -NH_2 与激活的琥珀酰亚胺酯结合形成共价键，纳米金与抗体共价偶联。80-100μL，2μg/mL 抗体加入到 0.3-0.6mL 步骤 (3) 得到的溶液中反应 2.5-3h 后离心 15-20min，倾去上清，下层沉淀用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液溶解，超声分散 3-5min，4℃保存。

[0024] 本发明解决的技术关键在于选择 16-MHDA 为偶联剂制备纳米金免疫探针，使得所制备的免疫探针抗体覆被率大大提高，从而保证了所得到的免疫探针具有高稳定的同时还具有高的选择性和特异性。

专利名称(译)	一种纳米金免疫探针的制备方法		
公开(公告)号	CN102169119A	公开(公告)日	2011-08-31
申请号	CN201010617002.7	申请日	2010-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	西安交通大学		
申请(专利权)人(译)	西安交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	西安交通大学		
[标]发明人	李剑君 翁国军 朱键 赵军武		
发明人	李剑君 翁国军 朱键 赵军武		
IPC分类号	G01N33/531		
其他公开文献	CN102169119B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种纳米金免疫探针的制备方法，该方法采用化学反应将抗体共价固定在纳米金的表面，形成抗体-纳米金复合物免疫探针。该免疫探针由纳米金、抗体以及偶联剂16-巯基烷酸(16-MHDA)三部分组成，16-MHDA通过基团交换替代纳米金表面的柠檬酸基团，与纳米金形成稳定性高的Au-S键，之后抗体C末端的赖氨酸残基的ε-NH2通过EDC/NHS反应与16-MHDA末端的羧基形成类似肽键的共价键。该制备方法可根据具体应用情况，选择对应的抗体来满足不同对象的免疫受体。本发明制备的抗体共价偶联纳米金的免疫探针，具有高的特异性、稳定性和选择性，在生化免疫分析，生物组织标记等领域具有很好的应用前景。