

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/532 G01N 33/58

G01N 21/65



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03111477.6

[43] 公开日 2003年9月24日

[11] 公开号 CN 1444045A

[22] 申请日 2003.4.15 [21] 申请号 03111477.6

[71] 申请人 吉林大学

地址 130012 吉林省长春市前卫路10号

[72] 发明人 白玉白 王连英 纪小会 徐蔚青

杨文胜 李铁津

[74] 专利代理机构 长春吉大专利代理有限责任公
司

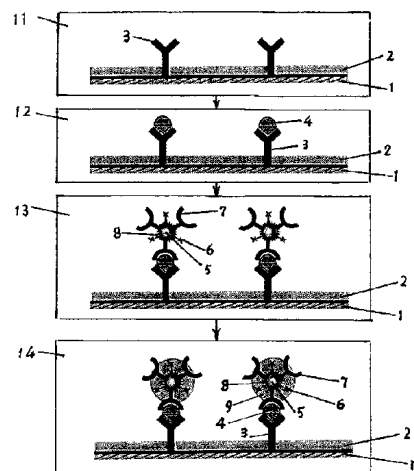
代理人 王恩远

权利要求书1页 说明书6页 附图3页

[54] 发明名称 表面增强拉曼散射标记免疫检测法

[57] 摘要

本发明为表面增强拉曼散射标记免疫检测法属免疫检测领域。以硅或二氧化硅作检测基片1，以表面增强拉曼散射活性分子6作为标记物，经形成组装体11—制备SERS免疫金探针—免疫复合反应—银染色14的过程，形成识别抗体/抗原/表达抗体的三层夹心结构样品，最后对样品进行拉曼光谱检测。其中抗原是待检测物4，识别抗体3和表达抗体7与抗原是配对抗体抗原。通过对标记的免疫金粒子5进行银染色，实现对标记物的拉曼信号增强放大。本发明可用于一些特殊疾病、传染病和癌症的检测，也可用于毒品检测和环保监测。本发明在对同时检测多种待检测物方面具有巨大的应用潜力，为解决一种疾病多致病因素的诊断问题提供可能。



ISSN 1008-4274

1、一种表面增强拉曼散射标记免疫检测法，包括银染色（14）的过程，其特征在于，以硅或二氧化硅作检测基片（1），经形成组装体（11）——制备 SERS 免疫金探针——免疫复合反应——银染色（14）——拉曼光谱检测过程完成的；所说的形成组装体（11）是利用醛基化合物将单克隆识别抗体（3）固定在修饰有氨基硅烷（2）的硅片或二氧化硅检测基片（1）的表面，并用赖氨酸封闭表面未反应完全的醛基；所说的制备表面增强拉曼散射免疫金探针是，以表面增强拉曼散射活性分子（6）作为标记物，将表面增强拉曼散射活性分子（6）与单克隆表达抗体（7）共同吸附在金纳米粒子（5）表面，形成表面增强拉曼散射免疫金探针，用牛血清白蛋白（8）封闭金纳米粒子（5）表面空位；所说的免疫复合反应是，将待检测物（4）的溶液滴在组装体上，构成检测载体，再将表面增强拉曼散射免疫金探针滴加在检测载体上进行免疫应答形成三层夹心结构的样品；所说的银染色（14）是将三层夹心结构的样品浸泡在对苯二酚和硝酸银混合水溶液中；最后通过拉曼光谱仪对银染色的三层夹心结构的样品进行检测。

2、按照权利要求 1 所述的表面增强拉曼散射标记免疫检测法，其特征在于，表面增强拉曼散射活性分子（6）是巯基苯酸或亮甲酚蓝或对巯基苯胺或对巯基吡啶。

3、按照权利要求 1 或 2 所述的表面增强拉曼散射标记免疫检测法，其特征在于，拉曼光谱检测采用的激发光源的波长范围为 400~800 nm。

表面增强拉曼散射标记免疫检测法

技术领域

本发明属免疫检测领域，特别涉及一种利用表面增强拉曼散射（SERS）活性分子标记抗原抗体特异性反应的免疫检测技术。

背景技术

随着检验医学的飞速发展，免疫标记测定的新方法、新技术不断出现。按照标记物的不同可分为：同位素标记、酶标记、金标记等免疫分析方法。

跟本发明相近的现有技术是 1993 年 9 月 15 日公开的中国专利“免疫检测的金属溶胶银显色方法”，公开号 CN1076281A。它公开了以胶体金为检测标记物的银显色的免疫检测方法。经过包被抗原、洗板、加抗血清、加金标葡萄球菌 A 蛋白、洗涤、显色等过程，用肉眼观察结果或用光度计测定光密度值。

发明内容

随着纳米制备技术的发展，通过控制纳米晶的粒径调节纳米晶的荧光位置可实现多生物分子标记，成为近几年来研究的热点，是继同位素、酶、金标记技术之后的一种新型标记技术。拉曼光谱是分子特征指纹振动光谱，不同结构的分子具有不同特征振动的拉曼峰。一般分子的拉曼信号非常弱（散射界面约为 10^{-30} cm^{-2} ），应用表面增强拉曼技术可以得到比常规拉曼光谱大 10^6 倍的增强系数。典型的拉曼振动谱带宽约为 0.1 nm，理论上在典型的整个拉曼光谱检测范围内，可选择 1000 个具有不同拉曼特征振动的分子，即使考虑谱带的重叠问题，可选范围缩小 10 倍，仍可标记 100 种待检测物，SERS 技术在多道同时免疫标记领域具有潜在应用价值。本发明要解决的技术问题就是，提供一种表面增强拉曼散射（SERS）活性分子标记的免疫检测手段，提高免疫检测的灵敏度，并且实现多成分标记的特异性生物分子的识别。

本发明是以表面增强拉曼活性分子作为标记物，应用与抗原抗体特异性反应的一种新型免疫标记方法。由于表面增强拉曼光谱振动峰极其狭窄，可选择大量具有不同表面增强拉曼特征振动的分子作为标记物同时检测多种待检物，为解决一种疾病多致病因素时需做多次检测诊断的问题提供可能。克服了金属溶胶银显色免疫检测方法显色单一，在多种待检物同时检测方面存在的局限性。

本发明的表面增强拉曼散射标记免疫检测法是以硅或二氧化硅作检测基片，经形成组装体——制备 SERS 免疫金探针——免疫复合反应——银染色——拉曼光谱检测等过程完成的。所说的形成组装体是利用醛基化合物将单克隆第一种抗体(IgG-1, 亦称识别抗体)固定在修饰有氨基硅烷的硅片或二氧化硅等检测基片的表面，并用赖氨酸封闭表面未反应完全的醛基；所说的制备 SERS 免疫金探针是，以 SERS 活性分子作为标记物，将 SERS 活性分子与单克隆第二种抗体(IgG-2, 亦称表达抗体，与 IgG-1 相对应，属于对应于同一种抗原不同活性位置的抗体)共同吸附在金纳米粒子表面，形成 SERS 免疫金探针，用牛血清白蛋白(BSA)封闭金纳米粒子表面空位；所说的免疫复合反应是，先形成识别抗体/抗原检测载体，即将待检测物(抗原)的溶液滴在上述的组装体上，构成检测载体；再将 SERS 免疫金探针滴加在检测载体上进行免疫应答形成三层夹心结构的样品；所说的银染色是将三层夹心结构的样品浸泡在对苯二酚和硝酸银混合水溶液中；最后通过拉曼光谱仪对银染色的三层夹心结构的样品进行检测。

本发明的三层夹心结构的样品及其制作过程可以用图 1 形象的进行表述。所说的三层夹心结构就是抗体/抗原/抗体的结构形态。图 1 中，1 为检测基片，2 为氨基硅烷，3 为识别抗体(IgG-1)，4 为待检测物，5 为金纳米粒子，6 为 SERS 活性分子，7 为表达抗体(IgG-2)，8 为牛血清白蛋白(BSA)，9 为银染色。11 表示形成组装体过程，识别抗体 3 固定在检测基片 1 的表面，构成“夹心”结构的第一层；12 表示形成识别抗体/抗原检测载体的过程，待检测物 4 与识别抗体 3 进行特异识别构成“夹心”结构的第二层；13 表示形成三层夹心结构样品的过程，即将 SERS 免疫金探针滴加在识别抗体/抗原检测载体上进行免疫应答形成“夹心”结构的第三层；14 表示银染色过程，形成能够用于拉曼光谱检测的三层夹心结构的样品。形成识别抗体/抗原检测载体的过程 12 和形成三层夹心结构样品的过程 13，构成本发明的免疫复合反应过程。

上述的待检测物 4 可以是乙肝病毒表面抗原(HBsAg)、艾滋病毒抗原、前列腺特异性抗原、毒品吗啡、还可以是其他的待检测物。相应的识别抗体 3 和表达抗体 7 可以是乙肝病毒表面抗原抗体(Anti-HBsAg)、艾滋病毒抗体、前列腺特异性抗原抗体、吗啡抗原抗体及与待检测物 4 对应的抗体等。对不同的待检测物 4，作为标记物 SERS 活性分子 6 也是不同的，与前述的待检测物 4 相应的 SERS

活性分子6可以分别是巯基苯酸(MBA)、亮甲酚蓝(Brilliant cresyl Blue, BCB)、对巯基苯胺、对巯基吡啶等任一具有SERS活性且不具有破坏生物活性特征分子。

上述的形成组装体过程11, 可以将检测基片1经过3-氨丙基三甲氧基硅烷(APTMS)处理后浸泡在戊二醛溶液中反应。再将带有氨基集团的起识别作用的识别抗体(IgG-1)3溶液滴在检测基片1上, 反应1~24小时。

上述的制备SERS免疫金探针过程可以是, 将纳米金溶胶与SERS活性分子6标记物的乙醇溶液搅拌反应。经旋转离心, 将下部沉淀用硼酸钠缓冲溶液重悬浮, 再加入表达抗体(IgG-2)7水溶液混匀搅拌。在加入牛血清白蛋白封闭表面的金空位之后, 旋转离心和用硼酸钠缓冲溶液重悬浮, 如此反复离心重悬浮2~6次。

上述的免疫复合反应过程包括了形成识别抗体/抗原检测载体的过程12和形成三层夹心结构样品过程13, 即免疫复合反应过程就是分先后滴加待检测物(抗原)和滴加SERS免疫金探针, 之后用去离子水充分淋洗。

拉曼光谱检测最好是在银染色后立即进行, 拉曼光谱检测可采用的激发光源的波长范围为400~800 nm。

本发明在对同时检测多种待检物方面具有巨大的应用潜力, 为解决一种疾病多致病因素时需做多次检测诊断的问题提供可能。

附图说明

图1是本发明的三层夹心结构的样品及其制作过程示意图。

图2是本发明的对乙肝病毒表面抗原(HBsAg)检测的拉曼光谱图。

图3是本发明的对不含乙肝病毒表面抗原(HBsAg)样品检测的拉曼光谱图。

图4是本发明的对艾滋病毒抗原检测的拉曼光谱图。

图5是本发明的对前列腺特异性抗原检测的拉曼光谱图。

图6是本发明的对毒品吗啡检测的拉曼光谱图。

具体实施方式

为了更好地理解本发明, 通过实施例进行说明, 但本发明的实施并不限于以下各实施例。

实施例1: 乙肝病毒表面抗原(HBsAg)的SERS免疫检测

一 形成组装体的过程，即将第一种乙肝病毒表面抗原抗体 (Anti-HBsAg-IgG-1) 在硅检测基片 1 表面的固定：

1) 大小为 1cm^2 的硅片经过 3-氨丙基三甲氧基硅烷(APTMS)处理后浸泡在 2.5% (v/v) 的戊二醛溶液中反应 1h。

2) 去离子水充分淋洗，去除未反应的戊二醛。

3) $50\ \mu\text{L}$ $50\ \text{mM}$ 的 Anti-HBsAg-IgG-1 溶液作为识别抗体滴在 1cm^2 的基片上，在 4°C 环境中反应 12h。

4) 用 $10\ \text{mg/mL}$ 的赖氨酸封闭基片上未反应的醛基空位，之后用去离子水充分淋洗，制成组装体。

5) 组装有 Anti-HBsAg-IgG-1 的硅片的组装体放在 PH 值为 7.0 的 0.1M 的 Tris/HCl 缓冲溶液中保存待用。

二 SERS 免疫金探针的制备：

1) $2.5 \times 10^{-4}\text{M}$ 的 13nm 金溶胶 1mL 与 $5\ \mu\text{L}$ 10^{-3}M 的巯基苯酸 (MBA, 作为标记物) 乙醇溶液搅拌反应 12 h。

2) 12000rpm 离心 6min。

3) 下部疏松的沉淀用 $2\ \text{mM}$ 的硼酸钠缓冲溶液重悬浮。

4) $20\ \mu\text{g}$ 的第二种乙肝病毒表面抗原抗体 (Anti-HBsAg-IgG-2) 水溶液作为表达抗体加入到上述的重悬浮溶液中，混匀搅拌 1h。

5) 加入 $10\ \mu\text{L}$, 2% 的 BSA, 反应 20min 封闭表面的金空位。

6) 在 12000rpm 转速下离心 6min, 用 $2\ \text{mM}$ 的硼酸钠缓冲溶液重悬浮, 如此反复离心重悬浮 3 次, 以洗净未吸附的抗体 Anti-HBsAg-IgG-2 和 BSA。

7) 最后, 所制备 MBA/Au/ Anti-HBsAg-IgG-2 复合体系用 PH=7.6 的 aTRIS 缓冲溶液重悬浮, 保存待用。

三 免疫复合反应：

1) 将 $100\ \mu\text{L}$, $1\ \mu\text{g/mL}$ 的乙肝病毒表面抗原 (HbsAg) 待检样本滴加在组装体上进行特异性识别, 室温反应 1h 后用去离子水冲洗。

2) 将保存待用的 MBA/Au/Anti-HBsAg-IgG-2 复合溶液滴加在已经和 HBsAg 发生特异识别反应的 Anti-HBsAg-IgG-1 组装体上, 即将 SERS 免疫金探针滴加在前述的检测载体上, 4°C 下反应 3 h。

3)去离子水充分淋洗。

四 银染色：

将经过以上步骤处理的基底放入新配制的体积比为 2: 1 的硝酸银 (1×10^{-3} M) 和对苯二酚 (1×10^{-3} M) 的混合水溶液中染色 20 分钟，取出后，立即用高纯水中多次漂洗，然后用高纯氮气吹干。

五 拉曼检测：

拉曼光谱的测量可以采用英国雷尼绍(Renishaw)公司生产的 Renishaw-1000 型共聚焦拉曼光谱仪。光谱仪采用的激发光源为空气制冷的氩离子激光器 (Spectra-Physics Model 163-C4260)，激发波长为 514.5 nm。光谱分辨率为 2.5 cm^{-1} ，到达样品的激光功率约为 20 mW，积分时间为 10 s，叠加次数为 10 次。

实施例 1 中，由于抗体 Anti-HBsAg-IgG-1 和 Anti-HBsAg-IgG-2 与抗原 HBsAg 是配对抗体抗原，结合有 SERS 活性分子 (MBA) 的 MBA/Au/Anti-HBsAg-IgG-2 复合体系通过待检测物 HBsAg 与固定在硅片上的 Anti-HBsAg-IgG-1 形成三层“夹心”结构，MBA 的拉曼信号银染色后得到增强(见图 2)。图 2 中 1075 、 1360 、 1583 cm^{-1} 的振动峰是 MBA 的典型特征振动，因而从检测到 MBA 的 SERS 信号，可判断待检样品中含有 HBsAg。

实施例 2：乙肝病毒表面抗原 (HBsAg) 的 SERS 免疫检测的专一性

为了说明免疫检测结果的专一特异性，用 BSA 代替 HBsAg 作为待检样本进行免疫检测，重复实施例 1 的全过程。

实施例 2 中，抗体 Anti-HBsAg-IgG-1 和 Anti-HBsAg-IgG-2 与 BSA (作为待检测抗原) 是非配对抗体抗原，不具有选择性的识别作用，大量去离子水充分淋洗后，结合有 SERS 活性分子 (MBA) 的 MBA/Au/Anti-HBsAg-IgG-2 复合体系无法形成三层“夹心”结构而被冲洗掉，即使经过银染色之后也无法检测到 MBA 的拉曼信号(见图 3)。图 3 中没有检测到 MBA 的 SERS 信号，说明待检样品中不含有 HBsAg。

实施例 3：艾滋病毒抗原的 SERS 免疫检测

如同实施例 1 的各步骤操作，不同于实施例 1 的是用 BCB 取代 MBA 作为 SERS 标记物；第一、二种抗体为艾滋病毒抗体。同样将 $100 \mu\text{L}$ ， $1 \mu\text{g/mL}$ 的艾滋病毒抗原作为待检样本。

图 4 为实例 3 的检测结果。图 4 中，以 583cm^{-1} 处的振动为最强特征振动的 SERS 谱是 BCB 的典型 SERS 特征振动谱，因而可判断待检样品中含有艾滋病毒抗原。

实施例 4：前列腺特异性抗原的 SERS 免疫检测

如同实施例 1 的各步骤操作，不同于实施例 1 的是用对巯基苯胺取代 MBA 作为 SERS 标记物；第一、二种抗体为前列腺特异性抗原抗体。同样将 $100\ \mu\text{L}$ ， $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的前列腺特异性抗原作为待检样本。

图 5 为实施例 4 的检测结果。图 5 中，以 1437 、 1392 、 1148 和 1082cm^{-1} 处的振动为最强特征振动的 SERS 谱是对巯基苯胺的典型 SERS 特征振动谱，因而可判断待检样品中含有前列腺特异性抗原。

实施例 5：毒品吗啡的 SERS 免疫检测

如同实施例 1 的各步骤操作，不同于实施例 1 的是用对巯基吡啶取代 MBA 作为 SERS 标记物；第一、二种抗体为吗啡抗原抗体（吗啡与牛血清白蛋白的共价结合物为抗原）。同样将 $100\ \mu\text{L}$ ， $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的吗啡作为待检样本。

图 6 为实施例 5 的检测结果。图 6 中，以 1580 、 1097 和 1010cm^{-1} 处的振动为最强特征振动的 SERS 谱是对巯基吡啶的典型 SERS 特征振动谱，因而可判断待检样品中含有毒品吗啡。

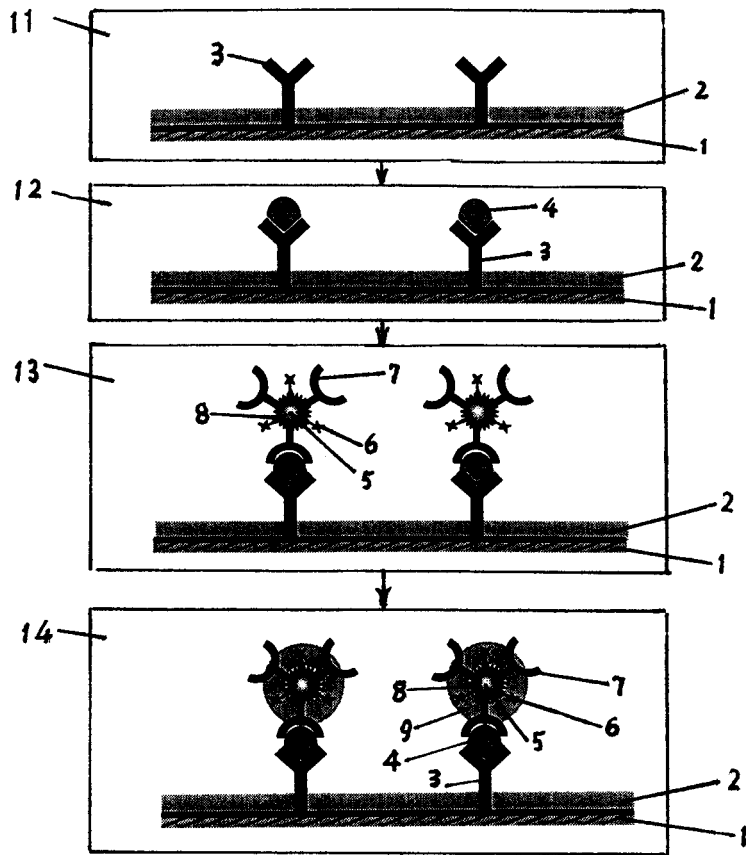


图 1

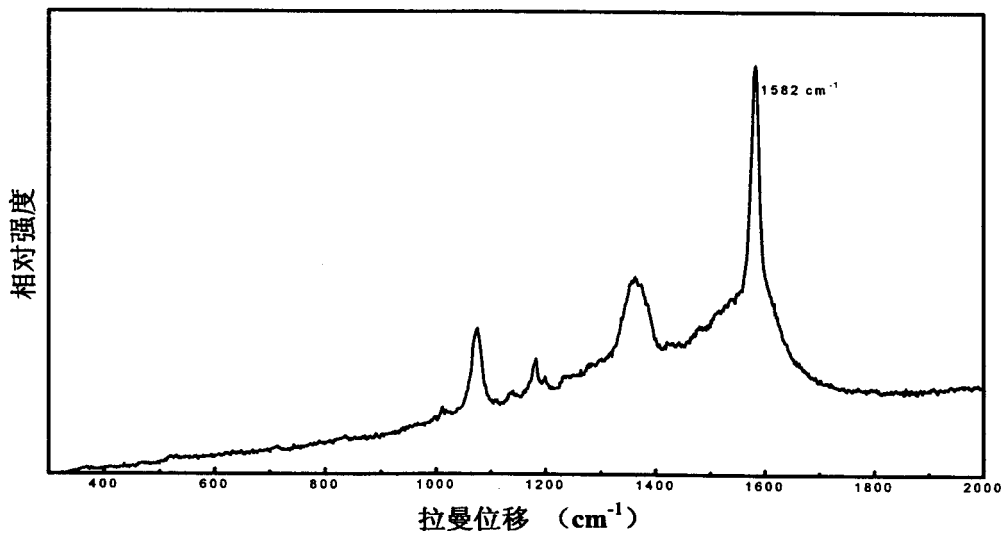


图 2

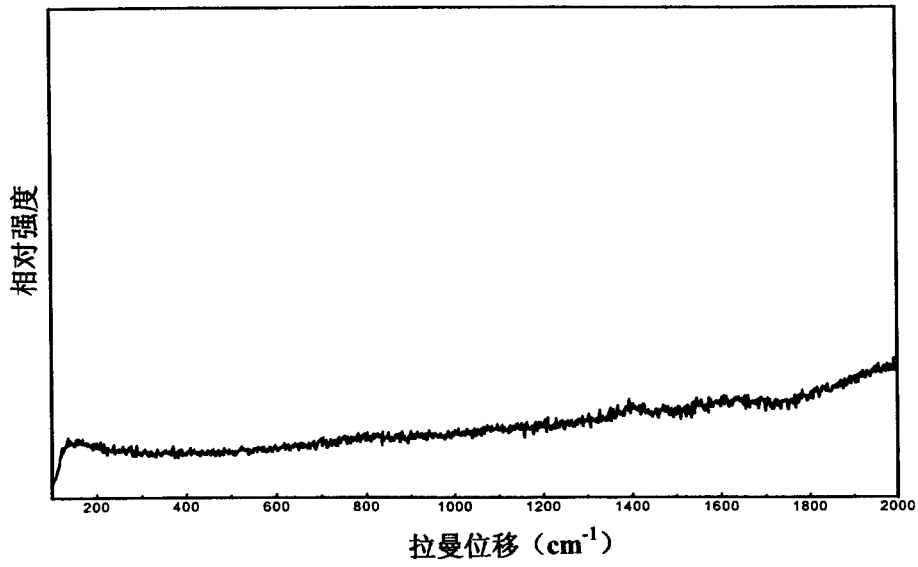


图 3

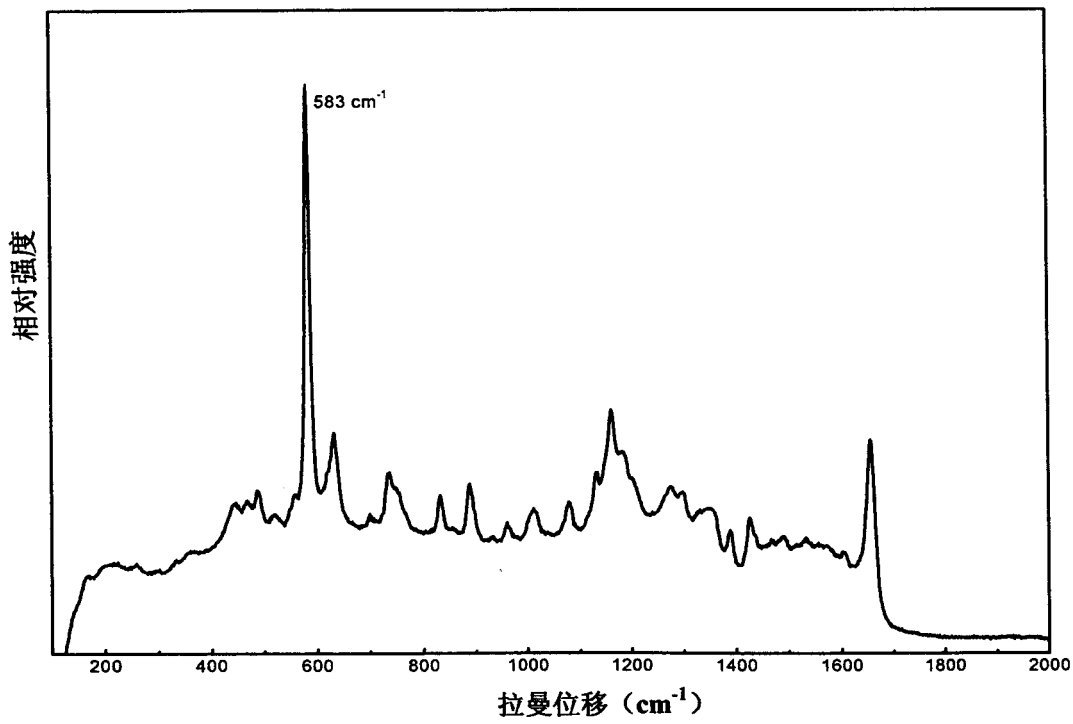


图 4

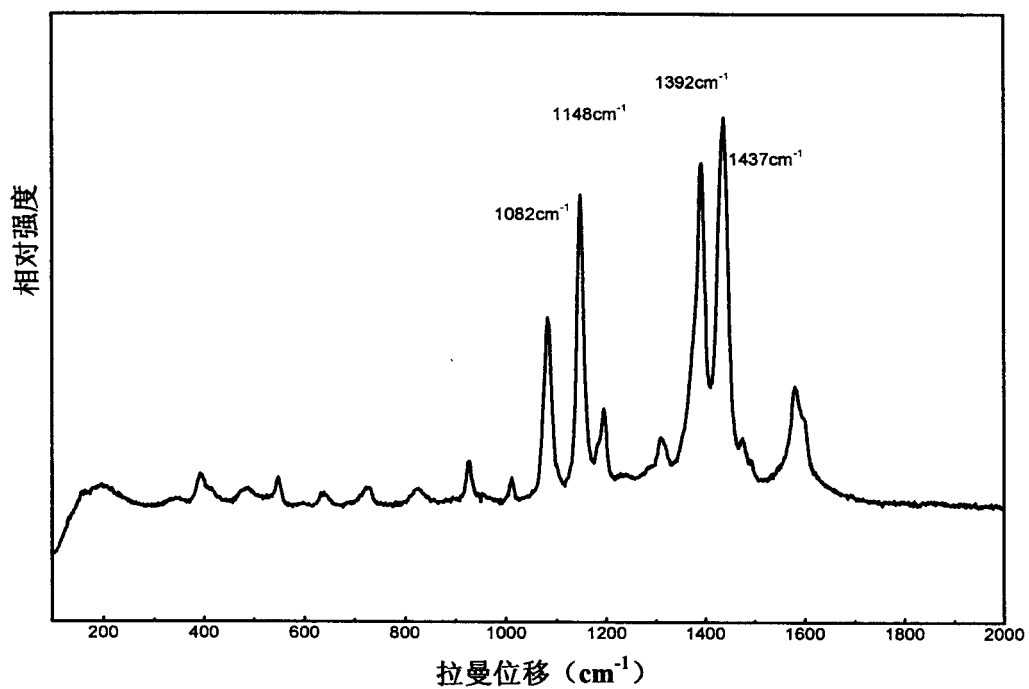


图 5

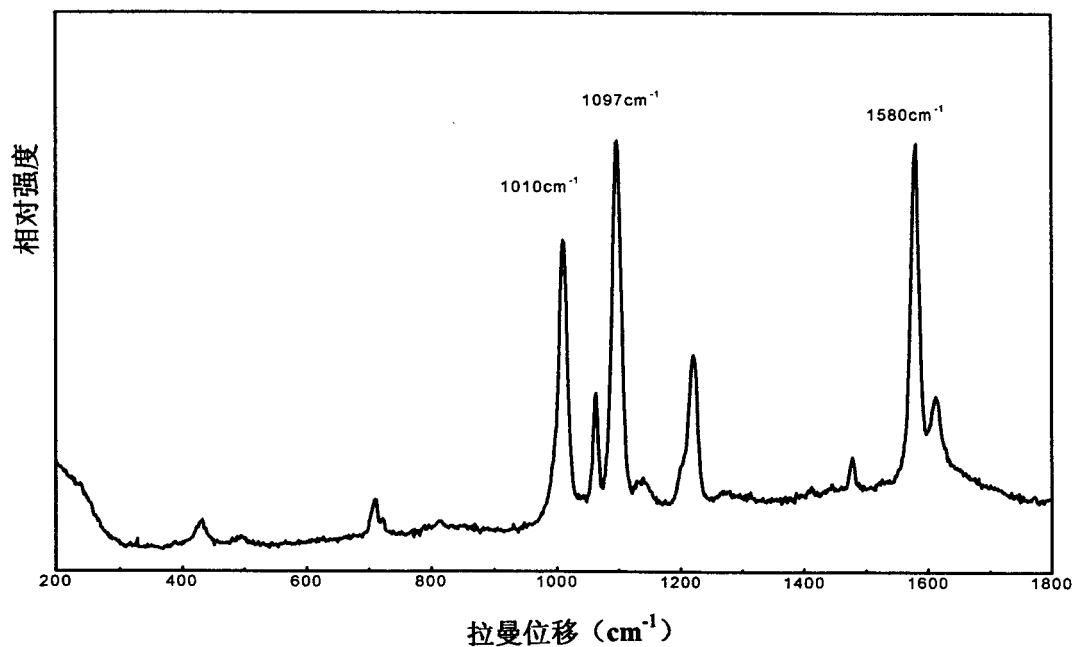


图 6

专利名称(译)	表面增强拉曼散射标记免疫检测法		
公开(公告)号	CN1444045A	公开(公告)日	2003-09-24
申请号	CN03111477.6	申请日	2003-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	白玉白 王连英 纪小会 徐蔚青 杨文胜 李铁津		
发明人	白玉白 王连英 纪小会 徐蔚青 杨文胜 李铁津		
IPC分类号	G01N21/65 G01N33/53 G01N33/532 G01N33/58		
代理人(译)	王恩远		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明为表面增强拉曼散射标记免疫检测法属免疫检测领域。以硅或二氧化硅作检测基片1，以表面增强拉曼散射活性分子6作为标记物，经形成组装体11—制备SERS免疫金探针—免疫复合反应—银染色14的过程，形成识别抗体/抗原/表达抗体的三层夹心结构样品，最后对样品进行拉曼光谱检测。其中抗原是待检测物4，识别抗体3和表达抗体7与抗原是配对抗体抗原。通过对标记的免疫金粒子5进行银染色，实现对标记物的拉曼信号增强放大。本发明可用于一些特殊疾病、传染病和癌症的检测，也可用于毒品检测和环保监测。本发明在对同时检测多种待检测物方面具有巨大的应用潜力，为解决一种疾病多致病因素的诊断问题提供可能。

