



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109283166 A

(43)申请公布日 2019.01.29

(21)申请号 201811295032.3

C09K 11/58(2006.01)

(22)申请日 2018.11.01

(71)申请人 东南大学

地址 210096 江苏省南京市玄武区四牌楼2号

(72)发明人 张若虎 王著元 胡国华 恽斌峰
崔一平

(74)专利代理机构 南京众联专利代理有限公司
32206

代理人 张伟

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

C09K 11/02(2006.01)

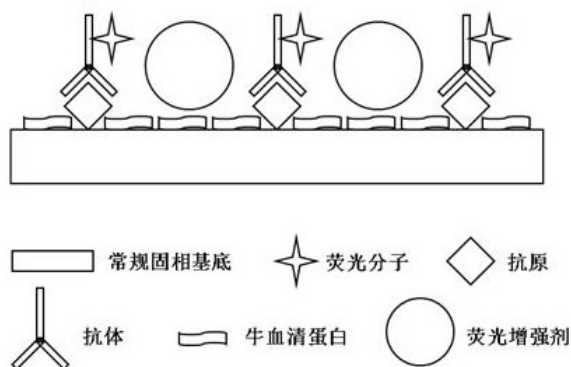
权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54)发明名称

一种固相荧光免疫检测的原位增强方法

(57)摘要

本发明公开一种固相荧光免疫检测的原位增强方法,涉及荧光增强技术领域。包括如下步骤:第一步、制备荧光增强剂;第二步、在常规固相基底上进行荧光免疫检测;第三步、将荧光增强剂自组装到常规固相基底上的蛋白质分子表面,进行荧光原位增强。本发明利用荧光增强剂对固相荧光免疫检测进行原位增强,提高了荧光信号强度,避免了因引入金属纳米基底而带来的应用范围受限、批次间一致性、稳定性及生物活性等问题,并且具有操作简单,成本低廉的特点。



1. 一种固相荧光免疫检测的原位增强方法,其特征在于,包括如下步骤:
S1:制备荧光增强剂;
S2:在常规固相基底上进行荧光免疫检测;
S3:将S1中制备的荧光增强剂自组装到S2中常规固相基底上的蛋白质分子表面,进行荧光原位增强。
2. 根据权利要求1所述的固相荧光免疫检测的原位增强方法,其特征在于,所述荧光增强剂为银纳米粒子、金纳米粒子、金-银核壳纳米粒子、金-二氧化硅核壳纳米粒子、银-二氧化硅核壳纳米粒子中的一种或多种。
3. 根据权利要求2所述的固相荧光免疫检测的原位增强方法,其特征在于:所述荧光增强剂为银纳米粒子。
4. 根据权利要求3所述的固相荧光免疫检测的原位增强方法,其特征在于:所述银纳米粒子采用柠檬酸钠还原法制备,其制备方法为:将硝酸银溶液加热到85-100℃,加入柠檬酸钠溶液,持续加热反应30-90分钟后冷却至室温,即得到银纳米粒子;所述柠檬酸钠溶液的加入体积为硝酸银溶液体积的1/50。
5. 根据权利要求4所述的固相荧光免疫检测的原位增强方法,其特征在于:所述硝酸银的摩尔浓度为0.5-5mM;所述柠檬酸钠溶液的质量分数为0.5%-5%。
6. 根据权利要求1所述的固相荧光免疫检测的原位增强方法,其特征在于:所述常规固相基底为氨基化后戊二醛修饰的玻璃基底或者多聚赖氨酸包被的玻璃基底。
7. 根据权利要求6所述的固相荧光免疫检测的原位增强方法,其特征在于:所述常规固相基底为多聚赖氨酸包被的玻璃基底。
8. 根据权利要求1所述的固相荧光免疫检测的原位增强方法,其特征在于:所述荧光免疫检测包括如下步骤:
S2-1:在常规固相基底上滴加抗原溶液,并在30-40℃下孵育1-5小时;
S2-2:孵育完成后,清洗,并用BSA在30-40℃下封闭0.5-3小时;
S2-3:滴加荧光标记抗体,在30-40℃下孵育0.5-3小时;
S2-4:清洗后测量荧光光谱;
其中BSA溶液的质量分数为0.1%-10%;
优选的所述抗原溶液浓度为1 pg/mL-100μg/mL。
9. 根据权利要求8所述的固相荧光免疫检测的原位增强方法,其特征在于:所述抗原溶液的浓度为1μg/mL。
10. 根据权利要求1所述的固相荧光免疫检测的原位增强方法,其特征在于:所述荧光增强剂自组装进行荧光原位增强的方法是:
S3-1:将已完成免疫反应的常规固相基底在荧光增强剂中浸泡0.5-24小时;
S3-2:清洗后测量荧光光谱。

一种固相荧光免疫检测的原位增强方法

技术领域

[0001] 本发明涉及荧光增强技术领域,具体涉及利用荧光增强剂对固相荧光免疫检测进行原位增强的方法。

背景技术

[0002] 荧光技术在化学传感、生物医学检测与成像等诸多领域具有重要的应用。然而,在对微量生化物质进行定量检测时,其信号强度还有待进一步提高。近年来,表面增强荧光效应得到了广泛关注。这一效应是指当荧光分子、半导体量子点等荧光材料分布于金、银等贵金属纳米结构表面附近时,其荧光强度相对于自由态荧光强度可能得到显著增加。表面增强荧光效应的物理机制可能包括几个方面:(1)金属纳米结构的表面等离子体共振效应导致其表面附近局域场显著增强,当荧光分子位于金属纳米结构表面附近时,其激发速率将得到提高;(2)荧光分子的辐射衰减速率得到提高;(3)荧光分子与金属纳米结构发生耦合,激发态能量通过近场能量转移过程传递至金属并重新辐射至远场。将表面增强荧光效应应用于常规荧光检测中,有助于提高荧光检测的灵敏度,减低荧光检测的检测限。

[0003] 目前基于表面增强荧光效应的固相免疫检测,主要是将荧光免疫检测从常规的固相免疫基底上移植到金属纳米结构基底上实现的。后者一般由在玻璃、石英、硅片等固相衬底上生长或者自组装金属纳米结构制得。由于蛋白质分子的尺寸一般在纳米量级,因此作为荧光标记的荧光分子与金属纳米结构之间的距离为纳米量级,二者之间通过近场耦合使得荧光强度获得增强。目前的研究重点主要集中在针对金属纳米基底的设计上,通过制备高效的基底,提高荧光免疫检测的性能。但是这种方案存在一些固有的缺陷。比如,传统的荧光免疫检测往往需要在特定生物分析的标准基底上进行,基底的更换会对免疫检测的应用范围造成限制;引入非标准的金属纳米基底可能影响免疫检测的批次间一致性,为实际应用带来困扰;金属纳米结构对生物分子的稳定性及生物活性等方面的影响也需要进一步评估。为真正将基于表面增强荧光效应的固相免疫检测推向实用,解决上述问题至关重要。一种无需更换原有固相基底即可获得增强荧光信号的免疫检测方法将极具潜力。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种固相荧光免疫检测的原位增强方法,利用荧光增强剂对固相荧光免疫检测进行原位增强,从而解决目前基于表面增强荧光效应的固相免疫检测方案因引入金属纳米基底而带来的应用范围受限、批次间一致性、稳定性及生物活性等问题。

[0005] 为解决上述问题,本发明采用以下技术方案:

一种固相荧光免疫检测的原位增强方法,包括如下步骤:

S1:制备荧光增强剂;所述荧光免疫检测包括如下步骤:

S2:在常规固相基底上进行荧光免疫检测;

S3:将S1中制备的荧光增强剂自组装到S2中常规固相基底上的蛋白质分子表面,进行荧光原位增强。

[0006] 作为本发明的优选,所述荧光增强剂为银纳米粒子、金纳米粒子、金-银核壳纳米粒子、金-二氧化硅核壳纳米粒子、银-二氧化硅核壳纳米粒子中的一种或多种。

[0007] 作为本发明的优选,所述荧光增强剂为银纳米粒子。

[0008] 作为本发明的优选,所述银纳米粒子采用柠檬酸钠还原法制备,其制备方法为:将硝酸银溶液加热到85-100℃,加入柠檬酸钠溶液,持续加热反应30-90分钟后冷却至室温,即得到银纳米粒子;所述柠檬酸钠溶液的加入体积为硝酸银溶液体积的1/50。

[0009] 作为本发明的优选,所述硝酸银的摩尔浓度为0.5-5mM;所述柠檬酸钠溶液的质量分数为0.5%-5%。

[0010] 作为本发明的优选,所述常规固相基底为氨基化后戊二醛修饰的玻璃基底或者多聚赖氨酸包被的玻璃基底。

[0011] 作为本发明的优选,所述常规固相基底为多聚赖氨酸包被的玻璃基底。

[0012] 作为本发明的优选,所述荧光免疫检测包括如下步骤:

S2-1:在常规固相基底上滴加抗原溶液,并在30-40℃下孵育1-5小时;

S2-2:孵育完成后,清洗,并用BSA在30-40℃下封闭0.5-3小时;

S2-3:滴加荧光标记抗体,在30-40℃下孵育0.5-3小时;

S2-4:清洗后测量荧光光谱。

[0013] 其中BSA溶液的质量分数为0.1%-10%;

优选的所述抗原溶液浓度为1 pg/mL-100μg/mL。

[0014] 作为本发明的优选,所述抗原溶液的浓度为1μg/mL。

[0015] 作为本发明的优选,所述荧光增强剂自组装进行荧光原位增强的方法是:

S3-1:将已完成免疫反应的常规固相基底在荧光增强剂中浸泡0.5-24小时;

S3-2:清洗后测量荧光光谱。

[0016] 有益效果:

本发明利用荧光增强剂对固相荧光免疫检测进行原位增强,提高了荧光信号强度,同时无需更换常规固相基底,避免了因引入金属纳米基底而带来的应用范围受限、批次间一致性、稳定性及生物活性等问题,并且具有操作简单,成本低廉的特点,具有较高的应用价值。

附图说明

[0017] 图1是本发明提出的固相荧光免疫检测的原位增强方法示意图;

图2是银纳米粒子的透射电镜图;

图3是实施例中增强前后的免疫荧光光谱。

具体实施方式

[0018] 下面结合实施例和附图对本发明做更进一步的解释。下列实施例仅用于说明本发明,但并不用来限定发明的实施范围。

[0019] 一种固相荧光免疫检测的原位增强方法,如图1所示。

[0020] 在本实施例中,所述抗原采用人抗原,所述荧光标记抗体采用异硫氰基荧光素标记的羊抗人免疫球蛋白抗体,利用本发明的方法进行固相荧光免疫检测的原位增强。

[0021] 步骤一、制备银纳米粒子

将500 mL, 1 mM硝酸银水溶液在磁力搅拌下加热至沸腾, 迅速注入10 mL, 1%的柠檬酸钠水溶液。混合溶液持续沸腾60分钟后, 在搅拌下自然冷却至室温, 即得到银纳米粒子。将银纳米粒子避光保存备用。

[0022] 步骤二、在多聚赖氨酸包被的玻璃基底上进行荧光免疫检测

将1 $\mu\text{g/mL}$ 的人抗原溶液滴加到多聚赖氨酸包被的玻璃基底上, 放置于湿度为65%~75%的湿盒中, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育3小时。然后依次用含0.1% 吐温 20的磷酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液和去离子水清洗基底3次, 用氮气吹干。将5%的BSA溶液滴加到基底上, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 下封闭2 小时, 取出后用含0.1% 吐温 20的磷酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液和去离子水清洗, 用氮气吹干。将1 mg/mL, 50 μL 的异硫氰基荧光素标记的羊抗人免疫球蛋白抗体溶液滴加到基底上, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 下培育2 小时, 用含0.1% 吐温 20的磷酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液和去离子水清洗, 用氮气吹干。测量荧光光谱。

[0023] 步骤三、自组装银纳米粒子, 测量荧光光谱

将步骤二中已完成免疫反应的多聚赖氨酸包被的玻璃基底在步骤一中得到的银纳米粒子溶胶中浸泡, 静置3小时, 用去离子水冲洗, 用氮气小心吹干。测量荧光光谱。

[0024] 本实施例步骤一中制备得到的银纳米粒子的透射电镜图如图2所示, 可见银纳米粒子的尺寸一般在40~80纳米之间, 但也存在较小及较大的粒子, 形状多为近似球形, 但也存在部分棒状粒子。根据以往文献报导, 此种银纳米粒子一般具有较强的荧光增强效应。已完成免疫反应的多聚赖氨酸包被的玻璃基底在银纳米粒子溶胶中结束浸泡后, 基底表面呈现淡黄色, 这是由于蛋白质分子存在氨基、羧基、巯基等基团, 能够以静电、共价键等方式使银纳米粒子自组装在蛋白质表面。自组装于蛋白质分子表面的银纳米粒子由于靠近标记的异硫氰基荧光素分子, 因而能够对后者的荧光进行增强。图3所示为自组装银纳米粒子前后的荧光光谱, 可见自组装银纳米粒子将免疫荧光的强度增强了近5倍。因此本发明能够对固相荧光免疫检测实现原位增强。

[0025] 以上所述是本发明的具体实施方式。应当指出, 对于本技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明原理的前提下, 还可以做出若干改进和润饰, 这些改进和润饰也视为本发明的保护范围。

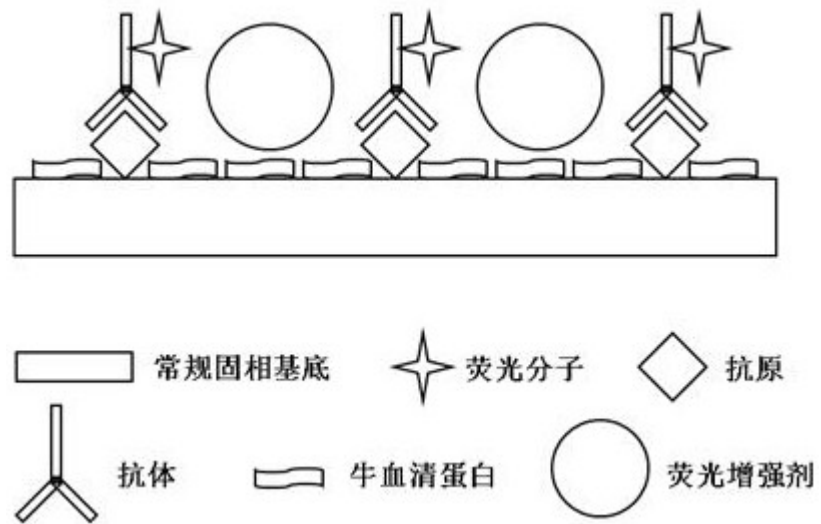


图1

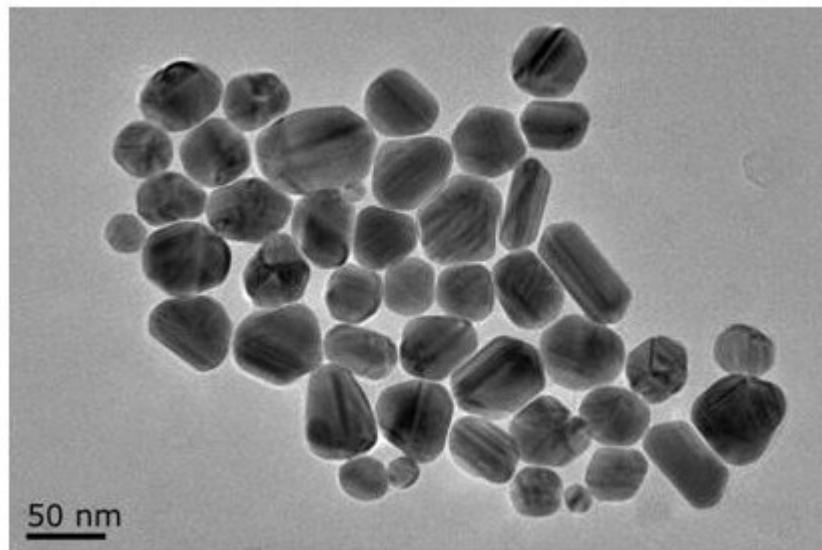


图2

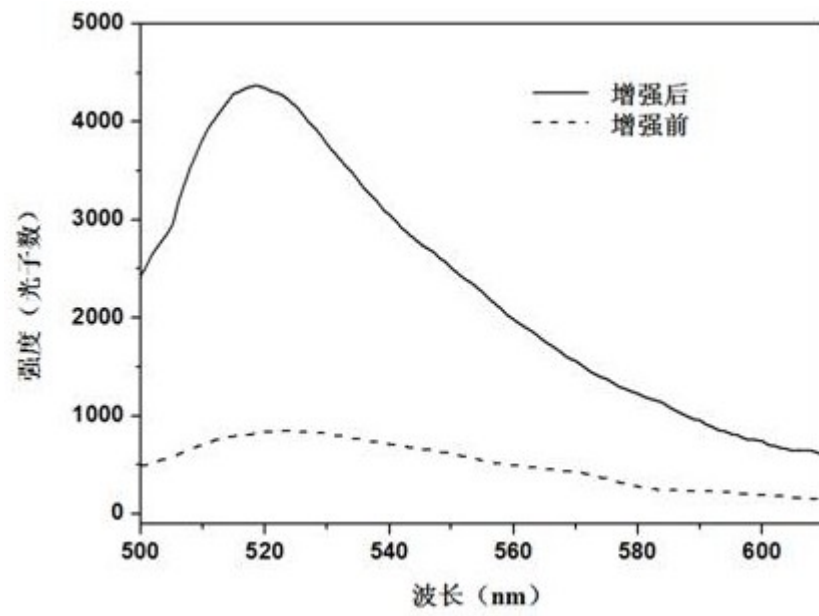


图3

专利名称(译)	一种固相荧光免疫检测的原位增强方法		
公开(公告)号	CN109283166A	公开(公告)日	2019-01-29
申请号	CN201811295032.3	申请日	2018-11-01
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	东南大学		
[标]发明人	张若虎 王著元 胡国华 恽斌峰 崔一平		
发明人	张若虎 王著元 胡国华 恽斌峰 崔一平		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/533 G01N33/543 C09K11/02 C09K11/58		
CPC分类号	G01N21/6428 C09K11/025 C09K11/58 G01N33/533 G01N33/54366		
代理人(译)	张伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种固相荧光免疫检测的原位增强方法，涉及荧光增强技术领域。包括如下步骤：第一步、制备荧光增强剂；第二步、在常规固相基底上进行荧光免疫检测；第三步、将荧光增强剂自组装到常规固相基底上的蛋白质分子表面，进行荧光原位增强。本发明利用荧光增强剂对固相荧光免疫检测进行原位增强，提高了荧光信号强度，避免了因引入金属纳米基底而带来的应用范围受限、批次间一致性、稳定性及生物活性等问题，并且具有操作简单，成本低廉的特点。

