



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103575875 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 12

(21) 申请号 201310560157. 5

(22) 申请日 2013. 11. 12

(71) 申请人 镇江市第一人民医院

地址 212002 江苏省镇江市电力路 8 号

申请人 唐亮

(72) 发明人 汪雪峰 唐亮 王钧 钱伟

倪鸿昌

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任

公司 32218

代理人 徐冬涛 傅婷婷

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

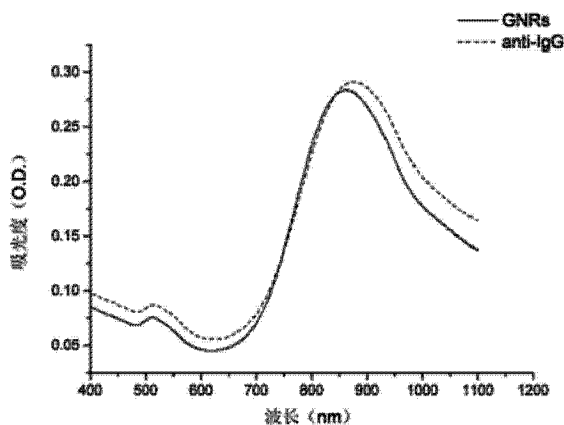
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54) 发明名称

一种新的功能化金纳米棒免疫探针及金纳米棒生物芯片的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明公开一种新的功能化金纳米棒免疫探针及金纳米棒生物芯片的制备方法及应用。本发明通过 Traut's 试剂修饰人 IgG 抗体, 修饰后的 IgG 抗体偶联了与金有高亲和力的巯基, 可以通过 -SH 直接与金纳米棒共价结合。操作简单, 条件温和、并快速实现金纳米棒的功能化, 固定于玻片的功能化金纳米棒可作为非标记的生物芯片, 特异地检测人 IgG 抗原, 根据纳米棒纵向等离子吸收峰的偏移量效关系曲线得出, 每纳米纵向等离子吸收峰偏移, 可以检测出 137pM 的人 IgG 抗原。因而, 用该方法制备的金纳米棒免疫探针进行抗原抗体检测, 具有操作简单、检测灵敏度高、特异性好, 且所需仪器设备少等优点, 有向临床推广的可能性。



1. 一种金纳米棒免疫探针的制备方法,其特征在于首先修饰 IgG 抗体,使其偶联上与金有高度亲和力的巯基,修饰后的 IgG 抗体直接与金纳米棒共价结合成为纳米棒免疫探针。

2. 根据权利要求 1 所述的金纳米棒免疫探针的制备方法,其特征在于用 Traut's 试剂修饰 IgG 抗体使其偶联上与金有高度亲和力的巯基。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的金纳米棒免疫探针的制备方法,其特征在于包括如下步骤:合成金纳米棒,用 Traut's 试剂修饰 IgG 抗体,修饰后 IgG 抗体直接与金纳米棒共价结合成为纳米棒免疫探针。

4. 根据权利要求 3 所述的金纳米棒免疫探针的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

1) 制备金纳米种子:在表面活性剂十六烷基三甲基溴化胺 CTAB 的存在下,通过化学还原剂硼氢化钠 NaBH_4 将氯金酸溶液中的正三价金还原为金纳米种子;

2) 金纳米棒的制备:将步骤 1) 制备的金纳米种子加入到金纳米棒的生长溶液中制备金纳米棒,离心去除过量的 CTAB,将金纳米棒浓缩保存;

3) 抗体修饰:向 IgG 抗体溶液中加入 Traut's 试剂,室温反应 0.5 ~ 1.5h 后,去除未反应的 Traut's 试剂;

4) 金纳米棒的功能化:将步骤 3) 中去除未反应的 Traut's 试剂的 IgG 抗体逐滴加入金纳米棒中,形成功能化的金纳米棒免疫探针。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的金纳米棒免疫探针的制备方法,其特征在于所述的 IgG 抗体为人或动物的 IgG 抗体或含荧光的 IgG 抗体。

6. 按照权利要求 1 的制备方法制备的金纳米棒免疫探针在检测 IgG 抗原中的应用。

7. 一种功能化金纳米棒生物芯片的制备方法,其特征在于将玻片经(3-巯基丙基)三甲氧基硅烷处理使玻片上带有 -SH,金纳米棒通过 -SH 固定于玻片上,将上述固定于玻片上的金纳米棒,浸入经 Traut's 试剂修饰后的 IgG 抗体中,形成功能化的金纳米棒生物芯片。

8. 根据权利要求 7 所述的功能化金纳米棒生物芯片的制备方法,其特征在于所述的 IgG 抗体为人或动物的 IgG 抗体或含荧光的 IgG 抗体。

9. 按照权利要求 7 的制备方法制备的功能化金纳米棒生物芯片在检测 IgG 抗原中的应用。

10. 一种检测 IgG 抗原的方法,其特征在于将按照权利要求 7 的制备方法制备的功能化金纳米棒生物芯片加入到待检测介质中,孵育,读取检测后金纳米棒生物芯片的纵向等离子吸收峰的偏移,进行定性定量分析。

11. 根据权利要求 10 所述的检测 IgG 抗原的方法,其特征在于:所述孵育温度为 $25^{\circ}\text{C} \sim 37^{\circ}\text{C}$,孵育时间为 0.5 ~ 1h。

12. 根据权利要求 10 所述的检测方法,其特征在于:通过对前面步骤标准化及多次平行实验获得可靠性高的线性范围进行定量分析。

一种新的功能化金纳米棒免疫探针及金纳米棒生物芯片的 制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于纳米免疫技术领域,涉及一种新的功能化金纳米棒免疫探针及金纳米棒生物芯片的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 金纳米棒(GNRs)拥有独特的光学性质使其可用于光热治疗、生物传感器、分子成像、肿瘤及感染性疾病的药物传递等。特别是金纳米棒免疫探针,与传统检测手段相比,具有无需对样品进行标记、实时动态检测、高灵敏度等突出优点。因而,在生物分子反应研究、免疫学、早期癌症检测等领域中有着巨大的优势。

[0003] 但上述所有这些应用都需要将金纳米棒进行功能化,连接不同的生物化学基团。然而,金纳米棒的功能化是一个具有挑战性的过程,通常需要多个反应步骤,且易导致金纳米棒的形状改变或自我组装而引起的聚积。

[0004] 目前大多数的工作主要是通过修饰金纳米棒,例如用一些巯基化的小分子,如:巯基十一酸(11-mercapto-undecanoic acid, MUA)化学修饰金纳米棒,再用N-乙基-N'-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺[N-(3-dimethylamino-propyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC]、琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)对其进一步活化,进而与抗体偶联。这种功能化的过程繁琐,而且大多数生物分子如抗体或蛋白本身含有大量的氨基和羧基,易与金纳米棒之间引起交叉连接而导致聚积,从而限制了金纳米棒的应用(Sperling RA, Rivera Gil P, Zhang F, Zanella M, Parak WJ. Biological applications of gold nanoparticles. Chem Soc Rev, 2008, 37(9):1896 - 1908)。

[0005] 另一方面,金纳米棒也可以通过包被一层二氧化硅后,进而连接生物分子进行功能化修饰。但包被二氧化硅的厚度严格依赖于金纳米棒CTAB的量、加入碱的数量,以及乙醇或甲醇与水的比率等。这种功能化的过程也是相当的繁琐而且耗时,且易引起金纳米棒的聚积,从而限制了金纳米棒的生物医学应用。(Li X, Kao FJ, Chuang CC, He S Enhancing fluorescence of quantum dots by silica-coated gold nanorods under one- and two-photon excitation. 2010, Opt Express 18(11):11335 - 11346.)

[0006] 国内有学者,通过金纳米棒与抗体之间的静电作用,构建功能化的金纳米棒免疫探针,但金纳米棒与抗体间通过静电作用的连接不稳定,而且金纳米棒溶液中的CTAB具有高毒性,会干扰生物过程,阻碍金纳米棒与生物分子的偶联。(Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. Small, 2005, 1(3):325 - 327)

[0007] 因而,简化金纳米棒功能化的过程,构建低毒性、并易于生物修饰、简便、经济的金纳米棒免疫探针,具有很大的应用前景。但目前尚未见到通过Traut's试剂修饰抗体,直接与金纳米棒通过牢固的金-硫键共价相连,构建金纳米棒免疫探针的报道。

发明内容

[0008] 在针对原有金纳米棒功能化过程的局限性,本发明的目的是提供一种操作简单、低毒性、且不易聚积的金纳米棒免疫探针。

[0009] 本发明的另一目的在于提供一种功能化金纳米棒生物芯片。

[0010] 本发明的又一目的是提供功能化金纳米棒生物芯片的应用。

[0011] 本发明的目的可通过如下技术方案实现:

[0012] 一种金纳米棒免疫探针的制备方法,首先修饰 IgG 抗体,使其偶联上与金有高度亲和力的巯基,修饰后 IgG 抗体直接与金纳米棒共价结合成为纳米棒免疫探针。

[0013] 所述的金纳米棒免疫探针的制备方法,优选用 Traut's 试剂修饰 IgG 抗体使其偶联上与金有高度亲和力的巯基。

[0014] 所述的金纳米棒免疫探针的制备方法,优选包括如下步骤:合成金纳米棒,用 Traut's 试剂修饰 IgG 抗体,修饰后 IgG 抗体直接与金纳米棒共价结合成为纳米棒免疫探针。

[0015] 所述的金纳米棒免疫探针的制备方法,进一步优选包括如下步骤:

[0016] 1) 制备金纳米种子:在表面活性剂十六烷基三甲基溴化胺 CTAB 的存在下,通过化学还原剂硼氢化钠 NaBH_4 将氯金酸溶液中的正三价金还原为金纳米种子;

[0017] 2) 金纳米棒的制备:将步骤 1) 制备的金纳米种子加入到金纳米棒的生长溶液中制备金纳米棒,离心去除过量的 CTAB,将金纳米棒浓缩保存;

[0018] 3) 抗体修饰:将 IgG 抗体溶液中加入 Traut's 试剂,室温反应 0.5 ~ 1.5h 后,去除未反应的 Traut's 试剂;

[0019] 4) 金纳米棒的功能化:将步骤 3) 中去除未反应的 Traut's 试剂的抗体逐滴加入金纳米棒中,形成功能化的金纳米棒免疫探针。

[0020] 所述的金纳米棒免疫探针的制备方法中所述的 IgG 抗体为人或动物的 IgG 抗体或含荧光的 IgG 抗体。

[0021] 按照本发明方法制备的金纳米棒免疫探针在检测 IgG 抗原中的应用。

[0022] 一种功能化金纳米棒生物芯片的制备方法,将玻片经(3-巯基丙基)三甲氧基硅烷处理使玻片上带有-SH,金纳米棒通过-SH固定于玻片上,将上述固定于玻片上的金纳米棒,浸入经 Traut's 试剂修饰后的 IgG 抗体中,形成功能化的金纳米棒生物芯片。

[0023] 其中,所述的 IgG 抗体为人或动物的 IgG 抗体或含荧光的 IgG 抗体。

[0024] 按照本发明制备方法制备的功能化金纳米棒生物芯片在检测 IgG 抗原中的应用。

[0025] 一种检测 IgG 抗原的方法,将按照本发明制备方法制备的功能化金纳米棒生物芯片加入到待检测介质中,孵育,读取检测后金纳米棒生物芯片的纵向等离子吸收峰的偏移,进行定性定量分析。

[0026] 所述孵育温度为 25°C ~ 37°C ,孵育时间为 0.5 ~ 1h。

[0027] 所述的检测方法,通过对前面步骤标准化及多次平行实验获得可靠性高的线性范围进行定量分析。

[0028] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0029] 本发明用 Traut's 试剂修饰抗体,在抗体上连接与金有高度亲和力的-SH,可通过-SH,直接与金纳米棒共价结合,该连接方法操作简单,不需要中间反应过程,整个功能

化过程仅需要 3 - 4h ;用 PEG 替换高毒性的 CTAB, 构建低毒性的金纳米棒免疫探针, 而且形成的功能化金纳米棒不容易聚积, 结果稳定, 4℃冰箱放置 2 个月后, 无聚积现象发生(见图 3)。

[0030] 用本发明形成的生物功能化金纳米棒生物芯片免疫探针能特异地检测人 IgG 抗原, 灵敏度较高, 每纳米纵向等离子吸收峰偏移, 可以检测出 137pM 的人 IgG 抗原。而且, 操作简单、特异性好、所需仪器设备少等优点, 向临床推广的可能性更高。

[0031] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

附图说明

[0032] 图 1 为本发明制备出的规则金纳米棒的透射电镜照片 ;

[0033] 图 2 为本发现制备出的“金纳米棒 - 人 IgG 抗体共价结合”及其相关对照的吸收光谱图 ;

[0034] 图 3 为本发明制备出的“功能化的金纳米棒”溶液 4℃冰箱放置 2 个月后的照片。

[0035] 图 4 为本发明制备出的固定于玻片的“金纳米棒与连接有荧光(FITC)的人 IgG 抗体共价结合”的吸收光谱图

[0036] 图 5 为本发明制备出的固定于玻片的“金纳米棒与连接有 FITC 的人 IgG 抗体共价结合”的荧光显微镜照片 ;

[0037] 图 6 为本发明制备出的金纳米棒生物芯片免疫探针检测人 IgG 抗原的吸收光谱图 ;

[0038] 图 7 为本发明制备出的“金纳米棒生物芯片免疫探针”检测人 IgG 抗原的谱峰偏移量效关系曲线 ;

[0039] 图 8 为本发明制备出的“金纳米棒生物芯片免疫探针”检测无关抗原、人血浆的吸收光谱图。

[0040] 图 9 为本发明制备出的“金纳米棒生物芯片免疫探针”检测无关抗原、人肌红蛋白的吸收光谱图。

[0041] 图 10 为本发明制备出的“金纳米棒生物芯片免疫探针”检测无关抗原、人肌钙蛋白 I 的吸收光谱图。

具体实施方式

[0042] 在本发明中所使用的术语, 除非有另外说明, 一般具有本领域普通技术人员通常理解的含义。

[0043] 下面结合具体的制备实施例和应用实施例, 并参照数据进一步详细地描述本发明。应理解, 这些实施例只是为了举例说明本发明, 而非以任何方式限制本发明的范围。

[0044] 在以下的实施例中, 未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法。所用试剂的来源、商品名以及有必要列出其组成成分者, 均在首次出现时标明, 其后所用相同试剂如无特殊说明, 均以首次标明的内容相同。

[0045] 实施例 1 金纳米棒共价结合人 IgG 抗体

[0046] (1) 一定长径比的金纳米棒的制备 :

[0047] 取 0.625mL2mmol/L 的氯金酸(HAuCl_4) 溶液加入到 1.88mL0.2mol/L 的 CTAB 溶液

中,然后加入 0.45mL0.01mol/L 冷冻的 NaBH_4 ,混匀后得到种子溶液,水浴 28℃ 下静置 3h 后备用。取 11.875mL0.2mol/L 的 CTAB 溶液,加入 0.35mL0.01mol/L 的 AgNO_3 溶液,混合后加入 5mL0.002mol/L 的 HAuCl_4 ,然后加入 0.16mL0.01mol/L 的抗坏血酸,最后加入 108 μL 种子溶液,混匀,在水浴 28℃ 下静置 1d 后,10000r/min 离心 25min2 次,弃去上层清液,将下层的金纳米棒重悬于 2-3mL 双蒸水中保存备用。金纳米棒的长径比约为 4:1 (图 1),大小均匀,在水溶液中分散性好,无聚积。

[0048] (2) 用 Traut's 试剂修饰人 IgG 抗体

[0049] 取 100 μL 人 IgG 抗体重悬于 400 μL 含 2mM EDTA 的 PBS 溶液中,加入 5 μL 5mg/mL 的 Traut's 试剂,室温反应 1h,反应结束后,通过 Zeba™ Spin 脱盐的柱子(Zeba™ Spin Desalting Columns)去除未反应的 Traut's 试剂。

[0050] (3) 金纳米棒共价结合人 IgG 抗体的制备:

[0051] 取 50 μL 经 Traut's 试剂修饰后的人 IgG 抗体,逐滴加入 1mL0.6nM 的金纳米棒中,室温振摇 5min 后,逐滴加入 150 μM 聚乙二醇 5000 (PEG),继续振摇 2h 后,8000r/min 离心 10min,弃去上清液,功能化的金纳米棒探针重悬于 0.01M PBS 中,4℃ 保存备用。偶联了人 IgG 抗体的金纳米棒及其阴性对照的吸收光谱图见图 2,由图可知,单纯的金纳米棒其纵向吸收峰为 809nm,加入 PEG 后,其纵向峰红移了 3nm,为 812nm;但加入 IgG 抗体后,其纵向峰红移了 10nm,为 819nm。而且,该功能化的金纳米棒结果稳定,4℃ 放置 2 个月后仍呈溶液状态,无聚积发生,见图 3。

[0052] 实施例 2 固定于玻片上的金纳米棒共价结合含荧光(FITC)的人 IgG 抗体

[0053] (1) 一定长径比金纳米棒的制备:与实施例 1 相同。

[0054] (2) 金纳米棒固定于玻片的制备:

[0055] 取 7mm×50mm×0.7mm 的玻片经硫酸/过氧化氢($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$;3:1v/v)处理 40min 后,浸入乙醇配制的 10%MPTMS 中室温 2h,在玻璃表面形成甲基化的硅烷单分子层,将处理好的玻片浸入含 5mM NaCl 的 1mL 金纳米棒中 20min,将金纳米棒固定于玻片上形成生物芯片;

[0056] (3) 用 Traut's 试剂修饰含 FITC 的人 IgG 抗体:与实施例 1 相同。

[0057] (4) 金纳米棒生物芯片的功能化制备:

[0058] 将固定金纳米棒的生物芯片浸入经 Traut's 试剂处理后的人 IgG 溶液中,室温 1h,功能化金纳米棒生物芯片,其吸收光谱及荧光显微镜照片见图 4、图 5。由图 4 可知,单纯的金纳米棒其纵向吸收峰为 861nm,结合 IgG 抗体后,其纵向峰红移了 16nm,为 877nm;图 5 的荧光显微镜照片进一步证实了金纳米棒结合了含 FITC 的 IgG 抗体。

[0059] 实施例 3 金纳米棒生物芯片免疫探针的检测

[0060] (1) 一定长径比金纳米棒的制备:与实验例 1 相同。

[0061] (2) 金纳米棒固定于玻片的制备:与实验例 2 相同。

[0062] (3) 用 Traut's 试剂修饰人 IgG 抗体:与实施例 1 相同。

[0063] (4) 金纳米棒生物芯片的功能化制备:与实验例 2 相同。

[0064] (5) 金纳米棒生物芯片免疫探针的检测

[0065] 将上述功能化的金纳米棒生物芯片免疫探针加入到 10nM、20nM、40nM、60nM、80nM 人 IgG 溶液中,室温孵育,每个浓度孵育 1h,用水冲洗未结合的 IgG 后,读取检测后金纳米

棒免疫探针的纵向等离子吸收峰的偏移,进行定性定量分析。检测人 IgG 抗原的吸收光谱图见图 6、其谱峰偏移量效关系曲线见图 7;由图 6 可知,单独的金纳米棒,其纵向吸收峰为 868nm,结合 IgG 抗体后,其纵向峰红移了 10nm,为 878nm;功能化的金纳米棒生物芯片分别检测 10nM、20nM、40nM、60nM、80nM 人 IgG 后,其纵向峰分别红移了 9nm、12nm、17nm、18nm、20nm;每个 IgG 浓度至少重复检测 3 次,得到金纳米棒生物芯片谱峰偏移与 IgG 浓度的关系曲线见图 7,通过拟合的直线公式可知,该纳米棒生物芯片检测 IgG 有很高的敏感性,每 nm 的谱峰偏移可检测出 137pM 的 IgG。同时检测生理浓度的人血浆、肌红蛋白、肌钙蛋白 I 三种无关抗原的吸收光谱,检测金纳米棒生物芯片免疫探针的特异性。三种无关抗原的吸收光谱分别见图 8 - 10,由图 8 - 10 可知,单独的金纳米棒其纵向峰分别为 860nm、879nm、859nm,结合 IgG 抗体后,其纵向峰分别红移了 20nm、22nm、17nm,分别为 880nm、901nm、875nm;检测生理浓度的无关抗原:血浆、肌红蛋白、肌钙蛋白 I,其纵向峰无偏移,仍然分别为 880nm、901nm、875nm。上述结果表明,通过本发明制备的金纳米棒生物芯片探针可以高度灵敏、特异地检测相应抗原 / 抗体,向临床推广的可能性更高。

[0066] 上述实施例为本发明的一种实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

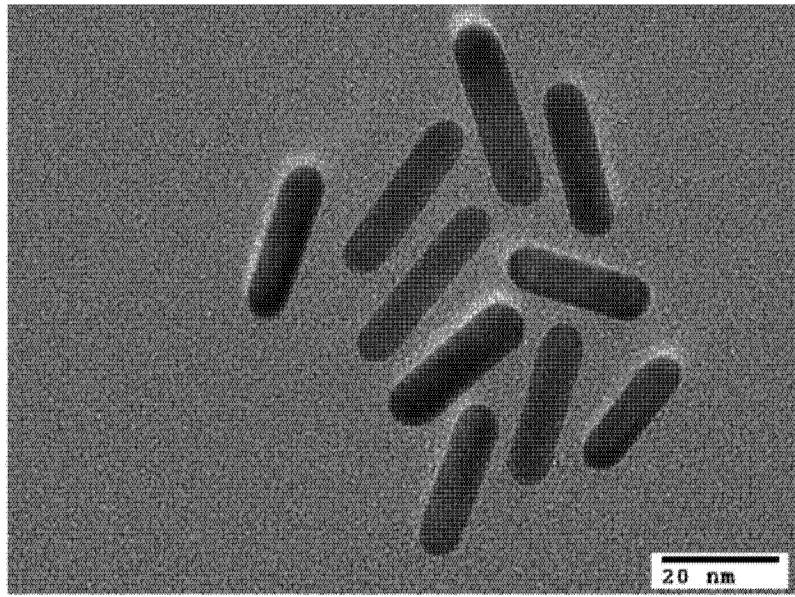


图 1

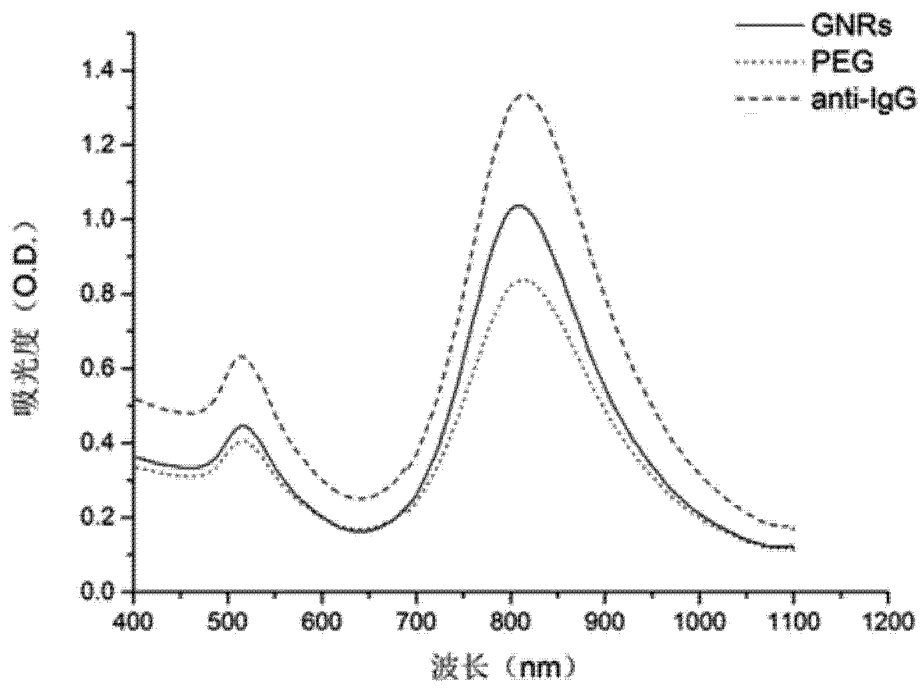


图 2

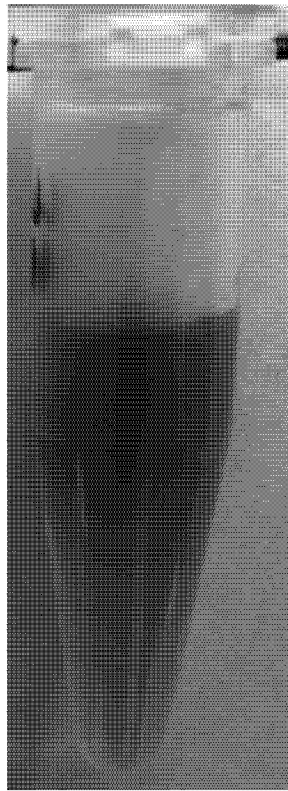


图 3

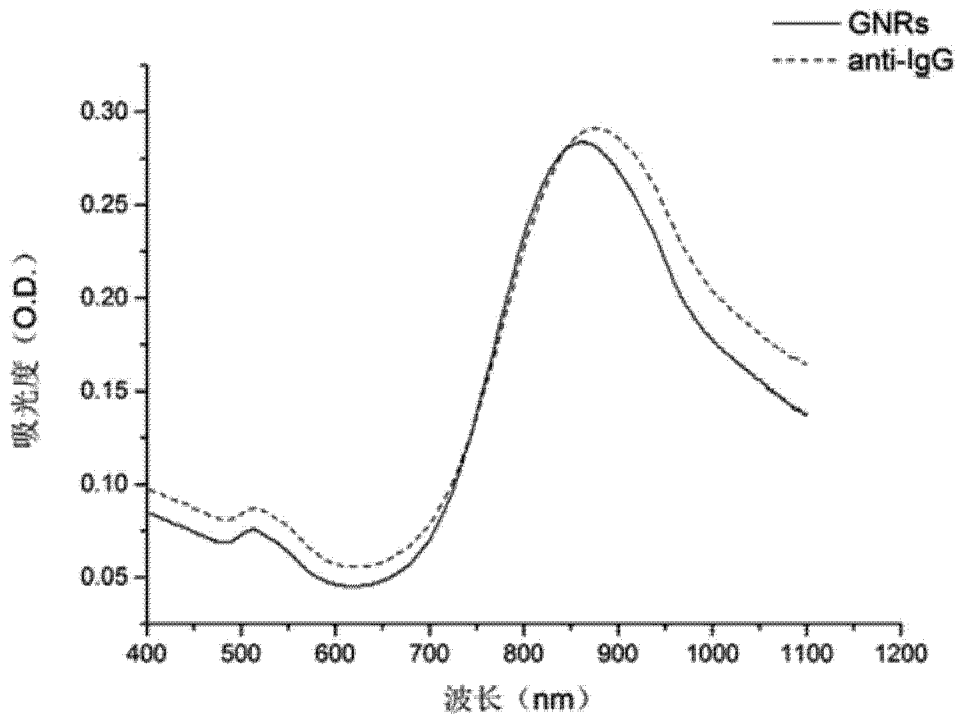


图 4

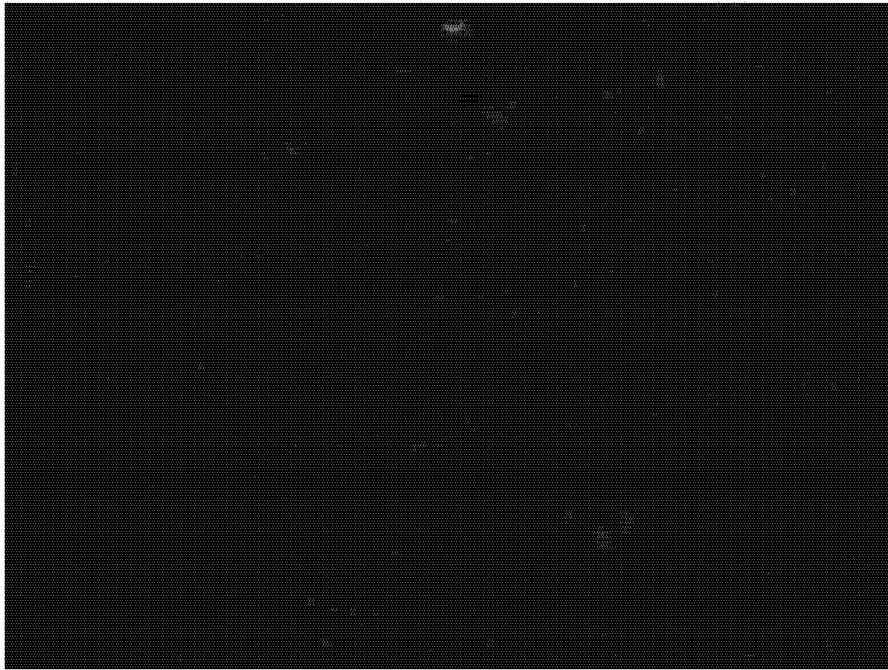


图 5

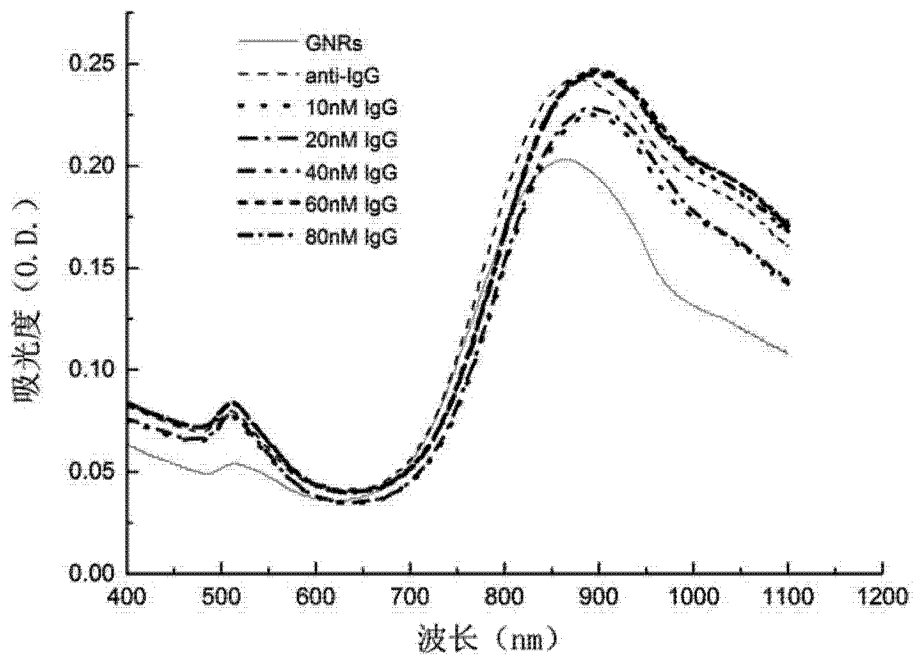


图 6

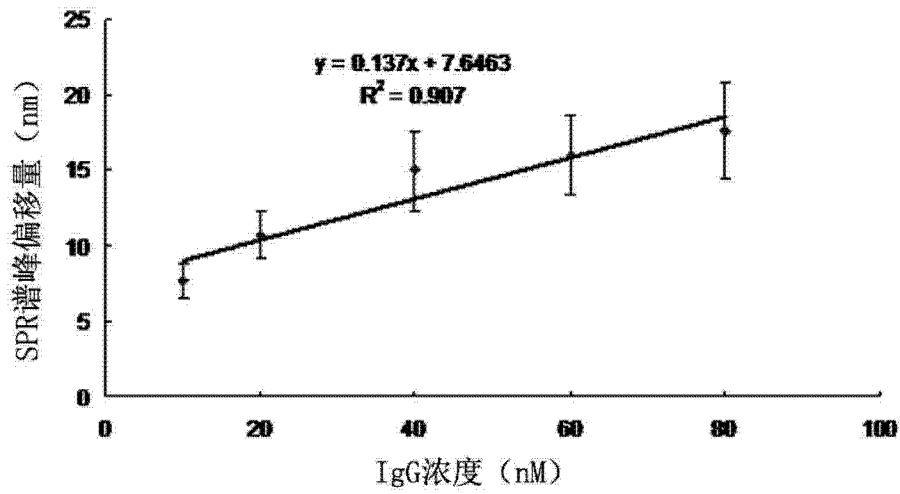


图 7

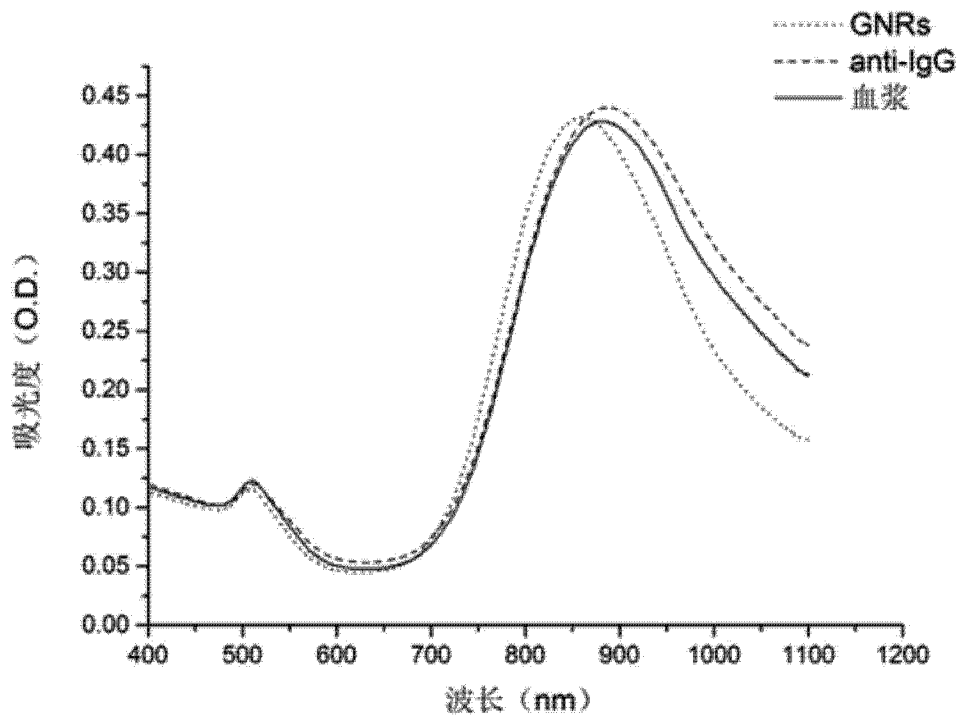


图 8

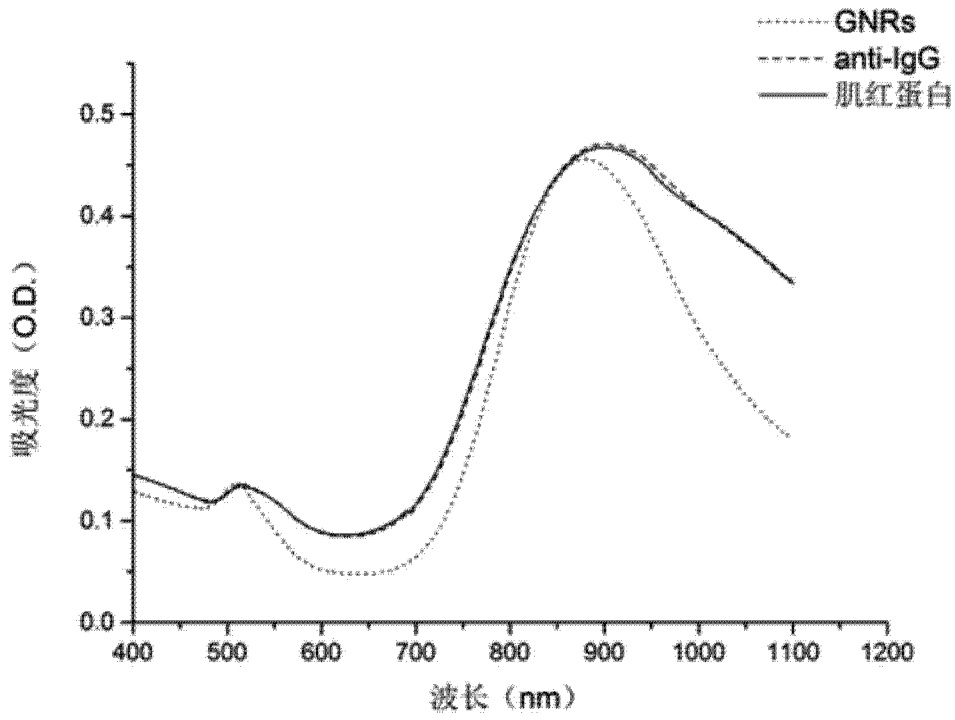


图 9

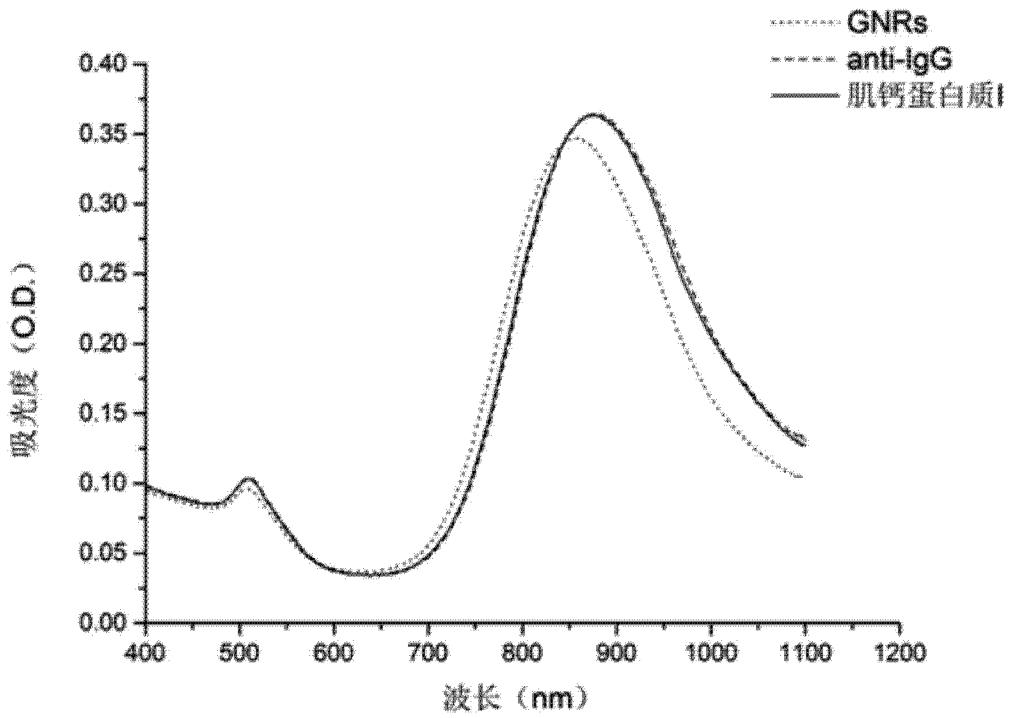


图 10

专利名称(译)	一种新的功能化金纳米棒免疫探针及金纳米棒生物芯片的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN103575875A	公开(公告)日	2014-02-12
申请号	CN201310560157.5	申请日	2013-11-12
[标]申请(专利权)人(译)	镇江市第一人民医院 唐亮		
申请(专利权)人(译)	镇江市第一人民医院 唐亮		
当前申请(专利权)人(译)	镇江市第一人民医院 唐亮		
[标]发明人	汪雪峰 唐亮 王钧 钱伟 倪鸿昌		
发明人	汪雪峰 唐亮 王钧 钱伟 倪鸿昌		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/54353 G01N33/6854		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种新的功能化金纳米棒免疫探针及金纳米棒生物芯片的制备方法及应用。本发明通过Traut's试剂修饰人IgG抗体，修饰后的IgG抗体偶联了与金有高亲和力的巯基，可以通过-SH直接与金纳米棒共价结合。操作非常简单，条件温和、并快速实现金纳米棒的功能化，固定于玻片的功能化金纳米棒可作为非标记的生物芯片，特异地检测人IgG抗原，根据纳米棒纵向等离子吸收峰的偏移量效关系曲线得出，每纳米纵向等离子吸收峰偏移，可以检测出137pM的人IgG抗原。因而，用该方法制备的金纳米棒免疫探针进行抗原抗体检测，具有操作简单、检测灵敏度高、特异性好，且所需仪器设备少等优点，有向临床推广的可能性。

