



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104865247 B

(45)授权公告日 2017. 11. 03

(21)申请号 201510272184.1

(22)申请日 2015.05.25

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104865247 A

(43)申请公布日 2015.08.26

(73)专利权人 华东理工大学

地址 200237 上海市徐汇区梅陇路130号

(72)发明人 马巍 于汝佳 刘晓院 彭茂潘

韩焕兴 龙亿涛

(74)专利代理机构 上海翼胜专利商标事务所

(普通合伙) 31218

代理人 翟羽 曾人泉

(51)Int. Cl.

G01N 21/78(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

(56)对比文件

CN 102269758 A,2011.12.07,

CN 102269760 A,2011.12.07,

CN 104089950 A,2014.10.08,

CN 103454268 A,2013.12.18,

CN 101435778 A,2009.05.20,

KR 20140059608 A,2014.05.16,

KR 20130102334 A,2013.09.17,

Weisi Qu et al.Copper-Mediated

Amplification Allows Readout of

Immunoassays by the Naked Eye.《Angew.

Chem. Int. Ed》.2011,

Weisi Qu et al.Copper-Mediated

Amplification Allows Readout of

Immunoassays by the Naked Eye.《Angew.

Chem. Int. Ed》.2011,

(续)

审查员 张银平

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

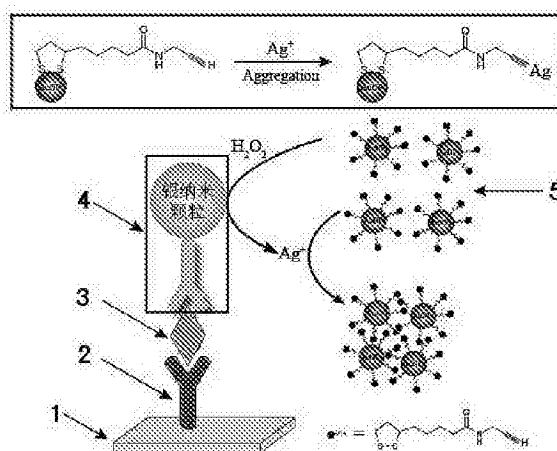
(54)发明名称

基于纳米金聚集的显色方法在免疫检测中的应用

(57)摘要

本发明基于纳米金聚集的显色方法在免疫检测中的应用,是用含有末端炔基的化合物对纳米金进行修饰,修饰后的功能化纳米金对银离子或一价铜离子有积极的响应,再加入银离子或一价铜离子,使功能化纳米金因不同程度的聚集而产生显色反应;纳米金溶液由原本的红色变为蓝色;将功能化纳米金因不同程度的聚集而产生的显色反应应用于免疫检测,由于纳米金聚集程度的不同其紫外可见吸收的光谱是有变化的,因此,通过仪器能对变化的吸收光谱进行测量,实现免疫检测中的定量检测.本发明不仅能通过肉眼观察而且能通过仪器对显色反应的紫外可见

吸收光谱进行表征,对化学检测,尤其是对做免疫检测有积极的帮助。



CN 104865247 B

[接上页]

(56)对比文件

陈雯雯等.金纳米颗粒可视化传感器在生物分子分析中的研究进展.《分析化学》.2014,第42卷(第3期),

Abdolhamid Alizadeha et al..Naked-eye

colorimetric detection of Cu²⁺ and Ag⁺ ions based on close-packed aggregation of pyridines-functionalized gold nanoparticles.《Sensors and Actuators B》.2013,第190卷

1. 一种基于纳米金聚集的显色方法在免疫检测中的应用,所述的显色方法为利用银离子或者一价铜离子引起功能化纳米金的聚集而产生的显色反应,所述功能化纳米金的聚集会使溶液由红色变为蓝色,这种颜色的变化是裸眼能够观测的,其特征在于,所述功能化纳米金为利用含有末端炔基的有机分子对纳米金进行修饰后的功能化的纳米金;将含有金属银或者铜的纳米颗粒与免疫检测中的反应物结合在一起,使所述含有金属银或者铜的纳米颗粒作为反应物,通过化学反应产生银离子或者一价铜离子,将所述功能化纳米金作为显色液,从而引起纳米金的聚集;不同浓度的银离子或者一价铜离子引起功能化纳米金的聚集程度是不同的,其紫外可见吸收光谱也是有变化的,因此,可通过紫外可见吸收光谱来表征纳米金的聚集程度,进而对待测物进行定量检测。

基于纳米金聚集的显色方法在免疫检测中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及化学检测技术领域,涉及利用银离子或一价铜离子引起功能化纳米金的聚集来作为显色反应,并将这一显色变化应用到免疫检测中。具体地说,是采用含有末端炔基的有机分子对纳米金进行功能化处理,含有末端炔基的有机分子与银或一价铜离子反应会引起功能化纳米金的聚集,溶液颜色发生变化,并将这一显色反应应用于免疫检测中。

背景技术

[0002] 纳米材料具有表面效应、量子尺寸效应、小尺寸效应等这几个特殊的性质。纳米金的表面等离子共振会随着颗粒间的距离而改变,溶液中的纳米金从分散到聚集状态时会产生明显的由红到蓝的颜色变化,这种由聚集而导致的颜色变化应用非常广泛,可用于检测金属离子、小分子、DNA、蛋白质及肿瘤细胞等,并通过肉眼观测检测结果。通过有机分子修饰纳米金颗粒,获得的功能化纳米金由于功能化分子的不同而表现出不同的性质,可以对不同的分子或离子有响应。

[0003] 目前,应用比较广泛的免疫检测技术主要有免疫荧光法、免疫层析法、酶联免疫法等。这些免疫检测技术主要是利用了抗原抗体特异性结合的原理。就酶联免疫来说,酶联免疫吸附实验是基于抗原抗体的特异性结合并引入酶标抗体,最终通过检测酶催化反应的程度对抗原或抗体进行定量检测的方法。该方法的缺点是检测限比较高、耗时并且需要借助仪器分析。更重要的是,在检测过程中使用酶标抗体,不仅储存不方便,而且酶的活性容易受到外部条件的影响。酶催化反应对实验条件的苛刻要求限制了这种检测方法的广泛应用。

[0004] 纳米金的消光系数极高,当浓度低至纳摩尔时其溶液的颜色依旧可以观察到。目前,纳米金(又称胶体金)技术被逐渐用于免疫检测。这一检测技术主要是利用纳米金的红色,通过抗体与纳米金结合(金标抗体),当抗原浓度较高时,金标抗体浓度也比较高,聚集产生红色代表阳性反应。由于这一检测技术本身的显色机理的原因,灵敏度较低,不适合用于检测很低浓度待测物。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服以上不足,提出一种新的、基于纳米金聚集的显色方法并将这一显色方法应用于免疫检测中。

[0006] 为实现上述目的,本发明采取了以下技术方案。

[0007] 一种基于纳米金聚集的显色方法在免疫检测中的应用。

[0008] 进一步,所述显色方法为利用银离子或者一价铜离子引起功能化纳米金的聚集而产生的显色反应,所述功能化纳米金的聚集会使溶液由红色变为蓝色,这种颜色的变化是肉眼能够观测的。

[0009] 进一步,所述功能化纳米金为利用含有末端炔基的有机分子对纳米金进行修饰后的功能化的纳米金。

[0010] 进一步,将含有金属银或者铜的纳米颗粒与免疫检测中的反应物结合在一起,使所述含有金属银或者铜的纳米颗粒作为反应物,通过化学反应产生银离子或者一价铜离子,将所述功能化纳米金作为显色液,从而引起纳米金的聚集;不同浓度的银离子或者一价铜离子引起功能化纳米金的聚集程度是不同的,其紫外可见吸收光谱也是有变化的,因此,可通过紫外可见吸收光谱来表征纳米金的聚集程度,进而对待测物进行定量检测。

[0011] 本发明的积极效果是:

[0012] (1) 将末端炔化合物与银离子或一价铜离子的反应引入到显色反应中,显色迅速且稳定。

[0013] (2) 提供了一种银离子或一价铜离子调控纳米金聚集的显色方法,使功能化纳米金溶液产生由红色到蓝色的变化,这一聚集过程不仅能通过肉眼观察进行定性分析而且能通过紫外可见吸收光谱的表征实现定量检测。

[0014] (3) 将基于纳米金聚集的显色方法应用于免疫检测,用肉眼观察纳米金溶液的颜色变化过程,能用之替代传统免疫试验中的酶催化反应过程,既能实现肉眼检测抗原或抗体,又能解决因酶催化反应对实验条件要求苛刻而产生的问题。

[0015] (4) 利用化学反应代替传统的酶催化过程并将上述显色反应引入生物检测,缩短了反应时间,提高了体系的稳定性,降低了体系的成本,对将化学反应引入免疫检测体系有积极的帮助。

附图说明

[0016] 附图1为本发明基于纳米金聚集的显色方法在免疫检测中的应用的流程说明图。

[0017] 图中的标号分别为:

[0018] 1、酶标板;2、抗体;3、抗原;

[0019] 4、银标抗体;5、功能化纳米金。

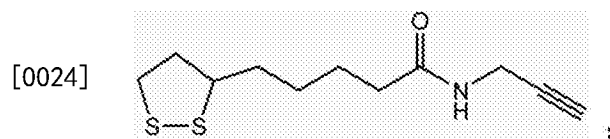
具体实施方式

[0020] 以下结合附图继续介绍本发明一种基于纳米金聚集的显色方法在免疫检测中的应用的具体实施方式。本发明的实施以银标抗体为例,通过双氧水腐蚀产生银离子;以化合物1为例,制备功能化纳米金;以甲胎蛋白为例进行免疫检测。但是应当指出,发明的实施,还可用氧化银、氧化铜、铜等其它纳米颗粒标记抗体,通过酸腐蚀或其它方法产生银离子或一价铜离子。另外,功能化纳米金也可以用其它含有末端炔基的化合物制备。因此,本发明的实施不限于以下所述的实施方式。

[0021] 实施例1

[0022] 一、制备功能化纳米金

[0023] 1、选择含有末端炔基的化合物,对纳米金进行修饰,本发明以化合物1为例,其结构式为:



[0025] 所述含有末端炔基的目标分子含有双硫键,可以通过金-硫键与纳米金结合。

[0026] 2、选择直径为5nm~500nm的纳米金：取6mL纳米金溶液，边搅拌边加入100 μ L化合物1 (1mM,溶于乙醇)，用NaOH调节溶液的pH至碱性以保证纳米金良好的分散性。

[0027] 3、将混合好的溶液置于摇床上混合24小时，用高速离心机离心、清洗以除去溶液中存在的过量的化合物1。

[0028] 4、用去离子水重新分散获得功能化的纳米金，将其作为显色液在4 $^{\circ}$ C条件下保存备用。

[0029] 二、对制备的功能化纳米金的测试

[0030] 实施例1制得的功能化纳米金的测试结果为：

[0031] 1、经紫外可见吸收光谱表征，证明获得的是功能化的纳米金。

[0032] 2、在功能化纳米金溶液中滴加微量银离子时，溶液颜色由红变蓝，即该功能化纳米金对银离子有灵敏相应，可应用于免疫检测。

[0033] 三、制备银标抗体

[0034] 1、将银纳米颗粒与抗体结合，选择直径为5nm~1000nm的银纳米颗粒：取10mL银纳米颗粒溶液，加入一定量的甲胎蛋白的多克隆抗体，将混合好的溶液置于摇床上混合24小时。

[0035] 2、经多次离心除去多余的抗体，得到银标抗体。

[0036] 3、在得到的银标抗体溶液中加入200 μ L 10%牛血清白蛋白以稳定溶液，并在4 $^{\circ}$ C条件下保存备用。

[0037] 四、对制备的银标抗体的测试

[0038] 实施例1制得的银标抗体的测试结果为：

[0039] 1、经紫外可见吸收光谱表征，证明获得的是银标抗体。

[0040] 2、经抗体活性测试，证明银标抗体保持了原有的抗体活性。

[0041] 3、结论：实施例1制备的银标抗体可用于免疫检测。

[0042] 应用实施例1

[0043] 一、基于纳米金聚集的显色方法在甲胎蛋白检测中的应用，包括以下步骤(参见图1)：

[0044] (1)将甲胎蛋白的单克隆抗体2溶于pH值9.6的碳酸盐缓冲液中(4 μ g mL⁻¹)，在酶标板1的每孔中加入100 μ L的上述溶液，4 $^{\circ}$ C条件下过夜。

[0045] (2)用磷酸盐吐温缓冲液(PBST)清洗步骤(1)的酶标板1三次，加入200 μ L1%的牛血清白蛋白封闭。

[0046] (3)用磷酸盐吐温缓冲液(PBST)清洗步骤(2)的酶标板1三次，加入不同浓度的甲胎蛋白3，在37 $^{\circ}$ C条件下孵育1小时。

[0047] (4)用磷酸盐吐温缓冲液(PBST)清洗步骤(3)的酶标板1三次，加入100 μ L实施例1“三”制备的银标抗体，在37 $^{\circ}$ C条件下孵育1小时。

[0048] (5)用磷酸盐吐温缓冲液(PBST)清洗步骤(4)的酶标板1三次，加入50 μ L双氧水溶液，反应几分钟后再加入50 μ L实施例1“一”制备的功能化纳米金溶液，对显色的溶液进行拍照并用紫外可见吸收光谱定量检测。

[0049] 二、检测结果中最终溶液颜色红色与蓝色的表征意义(原理)

[0050] 当甲胎蛋白浓度较高时，结合相应量的银标抗体，加入双氧水腐蚀后产生较高浓

度的银离子,容易造成功能化的纳米金的聚集,从而出现蓝色。

[0051] 当甲胎蛋白浓度较低或者浓度为0时,相应产生的银离子浓度低或者没有,就不会对功能化的纳米金产生影响,纳米金基本保持其分散状态,显示的颜色即为红色。

[0052] 因此,本发明基于纳米金聚集的显色方法在免疫检测中的应用利用银标抗体在对甲胎蛋白的检测中实现了用裸眼检测甲胎蛋白。

[0053] 三、对紫外可见吸收光谱的解释

[0054] 分散状态的功能化纳米金在波长520nm处有紫外吸收峰而其聚集后在620nm处有一个新吸收峰。随着银离子浓度的升高,功能化纳米金聚集程度越大,620nm处的吸收峰强度增强,而520nm处的峰强度减弱。紫外可见吸收光谱中两个峰强度的比值与甲胎蛋白的浓度(银离子的浓度)线性相关。因此,通过两个峰强度的比值可以做出功能化纳米金聚集强度与甲胎蛋白浓度的标准曲线,用于临床未知样本的定量检测。

[0055] 应用实施例2

[0056] 一、基于纳米金聚集的显色方法在肝癌病人和非肝癌病人血清样本检测中的应用,包括以下步骤:

[0057] 基本步骤同应用实施例1。应用实施例2与应用实施例1所不同的是:应用实施例2的步骤(3)为:

[0058] 用磷酸盐吐温缓冲液(PBST)清洗步骤(2)的酶标板1三次,加入100 μ L用磷酸盐缓冲液稀释50倍的肝癌病人和非肝癌病人的血清样本,在37 $^{\circ}$ C条件下培养1小时。

[0059] 二、检测结果中最终溶液颜色红色与蓝色的表征意义

[0060] 阳性样本(肝癌病人的血清样本)由于其甲胎蛋白含量较高,对应溶液的颜色为蓝色。而阴性样本(非肝癌病人的血清样本)由于甲胎蛋白含量较少,对应溶液颜色为红色。

[0061] 通过紫外可见吸收光谱的测量,再与甲胎蛋白浓度的标准曲线进行比对,本发明基于纳米金聚集的显色方法在免疫检测中的应用能方便地用裸眼检测到每一例待测血清样本中甲胎蛋白的含量。

[0062] 三、应用实施例2证明:在免疫吸附试验中,通过裸眼能观察到因纳米金聚集而引起的颜色变化,可以实现临床样本的检测,而且检测方便易行。

[0063] 应用实施例3

[0064] 一、基于纳米金聚集的显色方法在侧向流免疫层析试验中的应用,包括以下步骤:

[0065] (1) 组装好试验装置,在反应膜上喷涂甲胎蛋白的单克隆抗体2作为检测线,喷涂第二抗体(银标抗体4的抗体,简称“二抗”)作为对照线,室温下放置10分钟。

[0066] (2) 在结合物释放垫上滴加实施例1“三”制备的银标抗体,37 $^{\circ}$ C烘干,备用。

[0067] (3) 在样品垫上滴加100 μ L甲胎蛋白,液滴通过层析作用向吸收垫方向移动,10分钟后在样品垫上滴加100 μ L磷酸盐吐温缓冲液(PBST),继续层析约10分钟,放入37 $^{\circ}$ C烘干。

[0068] (4) 在检测线及对照线上滴加双氧水溶液,反应几分钟后加入实施例1“一”制备的功能化纳米金进行显色。

[0069] 二、检测应用中检测线与对照线颜色红色与蓝色的表征意义

[0070] (1) 检测线颜色的表征意义

[0071] 当甲胎蛋白浓度较高时,结合相应量的银标抗体,加入双氧水腐蚀后产生较高浓度的银离子,容易造成功能化的纳米金的聚集,从而出现蓝色。

[0072] 当甲胎蛋白浓度较低或者浓度为0时,相应产生的银离子浓度低或者没有,就不会对功能化的纳米金产生影响,纳米金基本保持其分散状态,显示的颜色即为红色。

[0073] (2) 对照线颜色的表征意义

[0074] 无论甲胎蛋白浓度的高低,银标抗体的浓度及量是固定的,对照线上的“二抗”与银标抗体4结合,加入双氧水腐蚀后产生的银离子会导致功能化纳米金的聚集,因此出现蓝色。

[0075] 三、应用实施例3证明:在侧向流免疫层析试验中,能用肉眼观察到因功能化纳米金的聚集而引起的颜色变化,从而能够对待测物进行检测,而且这样的检测方便易行。

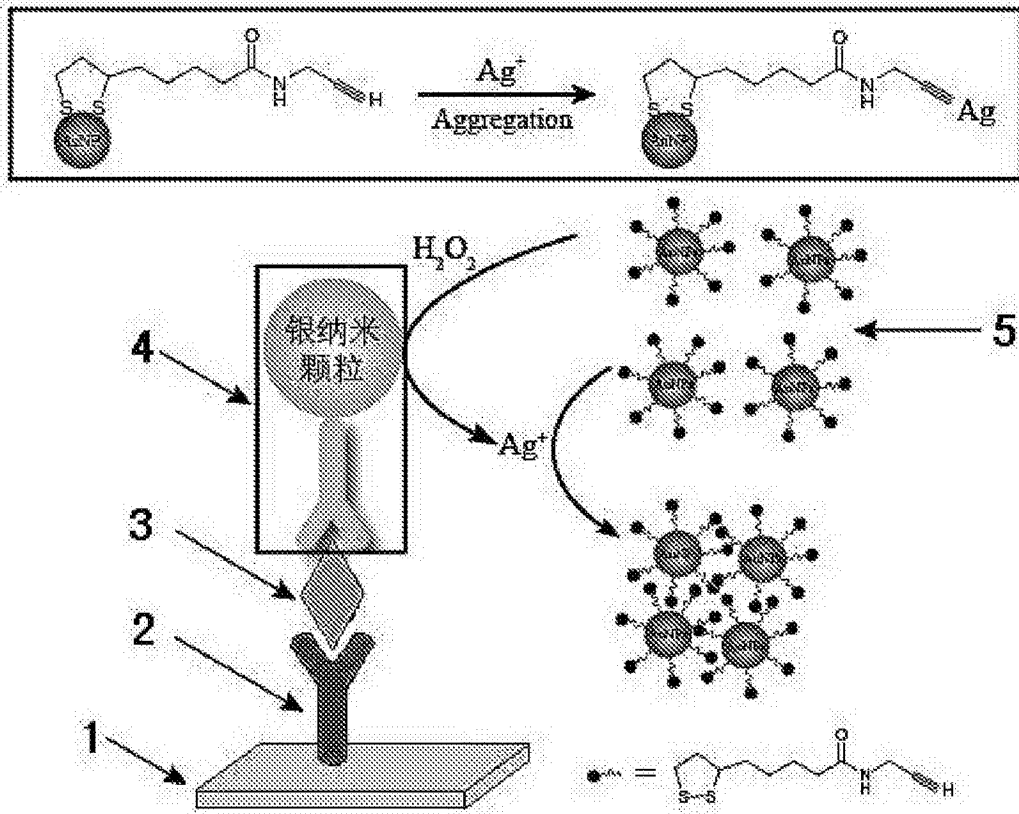


图1

专利名称(译)	基于纳米金聚集的显色方法在免疫检测中的应用		
公开(公告)号	CN104865247B	公开(公告)日	2017-11-03
申请号	CN201510272184.1	申请日	2015-05-25
[标]申请(专利权)人(译)	华东理工大学		
申请(专利权)人(译)	华东理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	华东理工大学		
[标]发明人	马巍 于汝佳 刘晓院 彭茂潘 韩焕兴 龙亿涛		
发明人	马巍 于汝佳 刘晓院 彭茂潘 韩焕兴 龙亿涛		
IPC分类号	G01N21/78 G01N33/53 G01N33/68		
代理人(译)	翟羽		
审查员(译)	张银平		
其他公开文献	CN104865247A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明基于纳米金聚集的显色方法在免疫检测中的应用，是用含有末端炔基的化合物对纳米金进行修饰，修饰后的功能化纳米金对银离子或一价铜离子有积极的响应，再加入银离子或一价铜离子，使功能化纳米金因不同程度的聚集而产生显色反应：纳米金溶液由原本的红色变为蓝色；将功能化纳米金因不同程度的聚集而产生的显色反应应用于免疫检测，由于纳米金聚集程度的不同其紫外可见吸收的光谱是有变化的，因此，通过仪器能对变化的吸收光谱进行测量，实现免疫检测中的定量检测。本发明不仅能通过肉眼观察而且能通过仪器对显色反应的紫外可见吸收光谱进行表征，对化学检测，尤其是对做免疫检测有积极的帮助。

