



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109725149 A

(43)申请公布日 2019.05.07

(21)申请号 201910041393.3

(22)申请日 2019.01.16

(71)申请人 安徽科技学院

地址 233100 安徽省滁州市凤阳县东华路

(72)发明人 刘国东 于庆才 张静 钱立生

张学记

(74)专利代理机构 合肥广源知识产权代理事务

所(普通合伙) 34129

代理人 宋宇晴

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

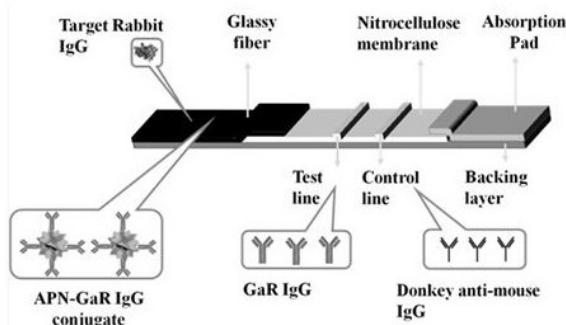
(54)发明名称

一种基于金铂纳米花的侧向流动生物传感

器

(57)摘要

本发明属于免疫测定和其他生物检测技术领域，具体涉及一种基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器，所述金铂纳米花为铂纳米线在金纳米颗粒表面上生长得到的纳米复合材料，由金铂纳米花为原料制备金铂纳米花-抗体1混合液与蛋白质靶标混合，然后由侧向流动生物传感器对蛋白质靶标进行检测，所述蛋白质靶标为兔免疫球蛋白。本发明相比现有技术具有以下优点：以金铂纳米花为基础制备金铂纳米花-抗体1混合液，用于所制备的侧向流动生物传感器，能够检测较低浓度的目标蛋白，具有优异的抗干扰性，通过便携式条带读取器测量测试带的峰面积来进行定量检测，出峰信号好，灵敏度高、操作简单、特异性好、适于推广使用。



1. 一种基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器，其特征在于，所述金铂纳米花为铂纳米线在金纳米颗粒表面上生长得到的纳米复合材料，由金铂纳米花为原料制备金铂纳米花-抗体1混合液与蛋白质靶标混合，然后由侧向流动生物传感器对蛋白质靶标进行检测，所述蛋白质靶标为兔免疫球蛋白，所述侧向流动生物传感器的制备方法包括以下内容：

(1) 组装样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，得到传感器组件，所述样品垫与硝酸纤维素膜之间、硝酸纤维素膜与吸水垫之间分别重叠2mm以上；

(2) 所述硝酸纤维素膜喷射测试线和控制线，测试线和控制线之间的距离为4-6mm，将抗体1羊抗兔IgG作为测试线喷在硝酸纤维素膜上，喷膜重复5次，将抗体2驴抗羊IgG作为控制线喷在硝酸纤维素膜上；

(3) 步骤(2)处理后传感器组件组装在粘性塑料背衬板上，用切条机切割成条带在低温条件下储存。

2. 如权利要求1所述一种基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器，其特征在于，所述金铂纳米花的制备方法为，将0.5mL的1wt%氯金酸溶液加入到50mL水溶液中，得到氯金酸预制液，加热至沸腾，并在搅拌条件下，将0.8mL的1wt%柠檬酸钠溶液快速加入；直到出现金红色溶液，再次加热至沸腾，加入1mL的0.1M抗坏血酸，再加入1.25 mL的1wt%氯铂酸，持续加热25分钟后，即得。

3. 如权利要求1所述一种基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器，其特征在于，所述金铂纳米花-抗体1混合液的制备方法为：在9000转/分钟的条件下离心10分钟洗涤500微升浓度为1.0mg/mL的金铂纳米花溶液，完成后弃去上清液，得到沉淀重悬于1.0mL、pH值为9.0的水中，然后加入25微升浓度为1.0mg/mL的抗体1，在室温条件下搅拌反应2小时，加入相当于其重量5%乙醇胺溶液搅拌30分钟，再加入相当于其重量10%BSA搅拌1小时，然后将所得混合物在9000转/分钟的条件下离心10分钟；

弃去上清液，将沉淀重悬于洗涤缓冲液中，重复上述步骤3次，将沉淀重悬于含有20mM磷酸钠缓冲液、5wt%牛血清白蛋白、10wt%蔗糖和0.25wt%吐温-20的洗脱缓冲液中，得到金铂纳米花-抗体1混合液，在4℃的条件下备用。

4. 如权利要求1所述一种基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器，其特征在于，所述样品垫由玻璃纤维制成。

5. 如权利要求1所述一种基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器，其特征在于，所述步骤(2)完成后将传感器组件在37℃下干燥1小时后在4℃的条件下储存备用。

6. 如权利要求1所述一种基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器，其特征在于，所述样品垫的规格为22mm×30cm，所述硝酸纤维素膜的规格为25mm×30cm，所述粘性塑料背衬板的规格为300×60mm。

7. 如权利要求1所述一种基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器，其特征在于，所述条带的宽度为3.5mm。

一种基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器

技术领域

[0001] 本发明属于免疫测定和其他生物检测技术领域,具体涉及一种基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器。

背景技术

[0002] 蛋白质是生命的物质基础,在生物过程中起着关键作用。蛋白质靶标的检测在各种研究领域引起了相当大的兴趣,包括临床诊断,治疗监测,食品安全和环境分析。通常用于检测蛋白质的技术包括银染色、琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶电泳、放射免疫测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹和质谱。然而,这些技术花费大量时间和金钱,并且由于需要复杂的仪器和训练有素的人员而限于实验室使用。因此,开发易于操作且简单的快速检测蛋白质的方法仍然是必需的并且是非常重要的。

[0003] 侧向流动免疫分析法是一种实时监控的纸基生物传感器,由于其成本低,操作简单等优点而备受关注。侧向流动免疫分析的另一个主要优点是它可以在各种生物样本上进行,包括血浆、汗、唾液、血清、尿和全血。此外,用于检测所需的样本量比常规检测中所需的检测要小得多。因此,侧向流动免疫分析作为一种非常实用的便携式分析工具已被广泛用于蛋白质的快速检测。目前,包含金纳米颗粒、量子点、磁性纳米颗粒、上转换发光纳米颗粒和活性拉曼纳米材料在内的各种纳米颗粒都已被用作侧向流动免疫分析的标记。在这些材料中,金纳米颗粒是应用最广泛的标签,因为它们具有独特的光学性质和容易表面修饰。然而,由于金纳米颗粒的表面积有限,基于金纳米颗粒的侧向流动免疫分析不能检测生理液体中某些低浓度的蛋白质生物标记物。与高灵敏度传感器相关的其他纳米粒子标签确实可以大大提高侧向流动免疫分析的灵敏度,但不幸的是这些定量方法都依赖于用于复杂的信号读出仪器,并且这些纳米材料标签难以制备。因此,迫切需求没有上述缺点的高灵敏度的新型侧向流动分析信号策略对于蛋白质靶标的快速检测,并且对于许多基础研究和医学诊断是有很有用的。

[0004] 包括铂纳米颗粒和铂纳米线在内的铂基纳米材料表现出与天然酶类似的优异催化能力,被称为纳米酶。作为超级催化剂,铂纳米酶在替代辣根过氧化物酶在传统酶联免疫吸附测定和其它生物检测中表现出优异的性能,与天然酶相比,铂纳米酶具有低成本的可控合成和催化活性可调性的优点,在本发明中,我们把通过在金纳米颗粒表面生长铂纳米线来制备的金铂纳米花用作侧向流动免疫技术中的双重标签,在金铂纳米花有比色和催化的双重标签的情况下,被捕获在测试条带上金铂纳米花,呈现出黑色特征条带(金铂纳米花作为比色标签),金铂纳米花会进一步催化添加的显色底物并产生有色产物来增强测试条带的强度(金铂纳米花作为纳米酶标签),通过研究制备基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器的方法,发现不同制备方法所得性能不同,因此,需要对如何制备基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器进一步研究。

发明内容

[0005] 本发明的目的是针对现有问题,提供了一种基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器。

[0006] 本发明是通过以下技术方案实现的:一种基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器,所述金铂纳米花为铂纳米线在金纳米颗粒表面上生长得到的纳米复合材料,由金铂纳米花为原料制备金铂纳米花-抗体1混合液与蛋白质靶标混合,然后由侧向流动生物传感器对蛋白质靶标进行检测,所述蛋白质靶标为兔免疫球蛋白,所述侧向流动生物传感器的制备方法包括以下内容:

(1)组装样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,得到传感器组件,所述样品垫与硝酸纤维素膜之间、硝酸纤维素膜与吸水垫之间分别重叠2mm以上;

(2)所述硝酸纤维素膜喷射测试线和控制线,测试线和控制线之间的距离为4-6mm,将抗体1羊抗兔IgG作为测试线喷在硝酸纤维素膜上,喷膜重复5次,将抗体2驴抗羊IgG作为控制线喷在硝酸纤维素膜上;

(3)步骤(2)处理后传感器组件组装在粘性塑料背衬板上,用切条机切割成条带在低温条件下储存。

[0007] 作为对上述方案的进一步改进,所述金铂纳米花的制备方法为,将0.5mL的1wt%氯金酸溶液加入到50mL水溶液中,得到氯金酸预制液,加热至沸腾,并在搅拌条件下,将0.8mL的1wt%柠檬酸钠溶液快速加入;直到出现金红色溶液,再次加热至沸腾,加入1mL的0.1M抗坏血酸,再加入1.25 mL的1wt%氯铂酸,持续加热25分钟后,即得。

[0008] 作为对上述方案的进一步改进,所述金铂纳米花-抗体1混合液的制备方法为:在9000转/分钟的条件下离心10分钟洗涤500微升浓度为1.0mg/mL的金铂纳米花溶液,完成后弃去上清液,得到沉淀重悬于1.0mL、pH值为9.0的水中,然后加入25微升浓度为1.0mg/mL的抗体1,在室温条件下搅拌反应2小时,加入相当于其重量5%乙醇胺溶液搅拌30分钟,再加入相当于其重量10%BSA搅拌1小时,然后将所得混合物在9000转/分钟的条件下离心10分钟;

弃去上清液,将沉淀重悬于洗涤缓冲液中,重复上述步骤3次,将沉淀重悬于含有20mM磷酸钠缓冲液、5wt%牛血清白蛋白、10wt%蔗糖和0.25wt%吐温-20的洗脱缓冲液中,得到金铂纳米花-抗体1混合液,在4℃的条件下备用。

[0009] 作为对上述方案的进一步改进,所述样品垫由玻璃纤维制成。

[0010] 作为对上述方案的进一步改进,所述步骤(2)完成后将传感器组件在37℃下干燥1小时后在4℃的条件下储存备用。

[0011] 作为对上述方案的进一步改进,所述样品垫的规格为22mm×30cm,所述硝酸纤维素膜的规格为25mm×30cm,所述粘性塑料背衬板的规格为300×60mm。

[0012] 作为对上述方案的进一步改进,所述条带的宽度为3.5mm。

[0013] 所述乙醇胺溶液和BSA作为封闭蛋白。

[0014] 本发明相比现有技术具有以下优点:以金铂纳米花为基础制备金铂纳米花-抗体1混合液,用于所制备的侧向流动生物传感器,能够检测较低浓度的目标蛋白,具有优异的抗干扰性,通过便携式条带读取器测量测试带的峰面积来进行定量检测,出峰信号好,灵敏度高、操作简单、特异性好、适于推广使用。

附图说明

- [0015] 图1是本发明侧向流动生物传感器的结构示意图。
- [0016] 图2是基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器的检测分析过程。
- [0017] 图3是金铂纳米花制备过程表征图。
- [0018] 图4是基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器测试照片图像。

具体实施方式

- [0019] 下面结合附图对本发明进一步说明。
- [0020] 在实施时所用试剂来源如下：氯金酸四水合物(HAuCl₄.4H₂O)购自百灵威科技有限公司(中国北京)；3-氨基-9-乙基-咔唑(AEC)，过氧化氢溶液(H₂O₂)，乙醇胺，牛血清白蛋白(BSA)，蔗糖，吐温20，兔IgG，磷酸盐缓冲溶液(0.1M PBS, pH7.4)购自上海生工生物工程有限公司(中国上海)；羊抗兔IgG(GaR IgG, Ab1)和驴抗羊IgG(Ab2)购自北京博奥生物有限公司(中国北京)。玻璃纤维样品垫，聚氯乙烯(PVC)粘性塑料背衬板，纤维素纤维和硝酸纤维素膜(Pall 90)均购自上海捷宁生物技术有限公司(中国上海)。
- [0021] 部分实验仪器及用途包括：切条机CM3010和XYZ3010喷膜平台购自上海捷宁生物科技有限公司(中国上海)；佳能EOS 1000D相机(佳能,日本)用于拍摄侧向流动生物传感器的照片图像；使用从上海金标生物科技有限公司(中国上海)购买的便携式测试条读取器(DT2032)收集定量数据；用酶标仪1510(赛默飞世尔科技)测量紫外吸收光谱；使用Hitachi JEM-2100F场透射电子显微镜(日本东京)拍摄金纳米花的微观图。
- [0022] 一种基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器，所述金铂纳米花为铂纳米线在金纳米颗粒表面上生长得到的纳米复合材料，由金铂纳米花为原料制备金铂纳米花-抗体1混合液与蛋白质靶标混合，然后由侧向流动生物传感器对蛋白质靶标进行检测，所述蛋白质靶标为兔免疫球蛋白，所述侧向流动生物传感器的制备方法结合图1，图1中给出了侧向流动传感器结构，包括测试线和控制线的位置，包括以下内容：

- (1) 组装样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，得到传感器组件，所述样品垫由玻璃纤维制成，所述样品垫与硝酸纤维素膜之间、硝酸纤维素膜与吸水垫之间分别重叠2mm以上；
- (2) 所述硝酸纤维素膜喷射测试线和控制线，完成后将传感器组件在37℃下干燥1小时后在4℃的条件下储存备用；所述测试线和控制线之间的距离为4-6mm，将抗体1羊抗兔IgG作为测试线喷在硝酸纤维素膜上，喷膜重复5次，将抗体2驴抗羊IgG作为控制线喷在硝酸纤维素膜上；
- (3) 步骤(2)处理后传感器组件组装在粘性塑料背衬板上，用切条机切割成条带在低温条件下储存。

- [0023] 其中，如图2(A)中所示为金铂纳米花的制备过程，所述金铂纳米花的制备方法为，将0.5mL的1wt%氯金酸溶液加入到50mL水溶液中，得到氯金酸预制液，加热至沸腾，并在搅拌条件下，将0.8mL的1wt%柠檬酸钠溶液快速加入；等到出现金红色溶液，表明出现了金纳米粒子，图3(A)中为金纳米粒子的典型透射电子显微图像，其粒径约为16.41nm；然后保持沸腾，加入1mL的0.1M抗坏血酸，再加入1.25 mL的1wt%氯铂酸，持续加热25分钟后，即得金铂纳米花，图3(B)中为金铂纳米花的典型透射电子显微图像，其粒径约为31.11nm，其中在金铂纳米花表面生长的铂纳米线的长度约为15纳米，直径为2纳米；如图3(C)中所示，通过

能量色散X射线衍射(XRD)来测定金铂纳米花的化学组成金铂核壳结构,纳米花的XRD图谱显示出了Au fcc和Pt fcc峰,表明其是非合金结构。并且金铂纳米花的峰位于纯金和纯铂纳米颗粒之间,表明所得到的纳米花不是单个纳米颗粒的混合物而是双金属纳米结构。

[0024] 其中,所述金铂纳米花-抗体1混合液的制备方法为:在9000转/分钟的条件下离心10分钟洗涤500微升浓度为1.0mg/mL的金铂纳米花溶液,完成后弃去上清液,得到沉淀重悬于1.0mL、pH值为9.0的水中,然后加入25微升浓度为1.0mg/mL的抗体1,在室温条件下搅拌反应2小时,加入相当于其重量5%乙醇胺溶液搅拌30分钟,再加入相当于其重量10%BSA搅拌1小时,然后将所得混合物在9000转/分钟的条件下离心10分钟;

弃去上清液,将沉淀重悬于洗涤缓冲液中,重复上述步骤3次,将沉淀重悬于含有20mM磷酸钠缓冲液、5wt%牛血清白蛋白、10wt%蔗糖和0.25wt%吐温-20的洗脱缓冲液中,得到金铂纳米花-抗体1混合液,在4℃的条件下备用。

[0025] 其中,所述样品垫的规格为22mm×30cm,所述硝酸纤维素膜的规格为25mm×30cm,所述粘性塑料背衬板的规格为300×60mm;所述条带的宽度为3.5mm。

[0026] 如图2中所示,以兔免疫球蛋白作为蛋白质靶标,图2(A)公开了金铂纳米花的制备过程,以金铂纳米花为基础制备金铂纳米花-抗体1混合液,配合侧向流动生物传感器用于目标蛋白的检测,其中图2(B)分别给出了测试线和控制线处的反应过程,如图2(C)通过添加显色底物(AEC+H₂O₂)进一步增强测试线的颜色强度,所述显色底物由金铂纳米花上捕获的铂纳米线催化以产生有色产物,通过观察测试区域的颜色变化简单地获得定性分析;如图2(D)所示通过使用便携式条带读取器读取测试带强度获得定量分析;

通过最低能检测到0.05ng/mL的目标蛋白,按照上述方法分别在0ng/mL和0.5ng/mL兔免疫蛋白的条件下检测,得到图4中照片图像,图左为目标蛋白为0ng/mL时的检测图像,图左为目标蛋白为1ng/mL时的检测图像,这比传统的基于金纳米颗粒的侧向流动免疫分析低了20倍,说明其具有显著的灵敏性,此外,通过检测掺入人血浆样品中的兔免疫球蛋白,说明基于金铂纳米花的侧向流动传感器对兔免疫蛋白具有高度特异性。

[0027] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

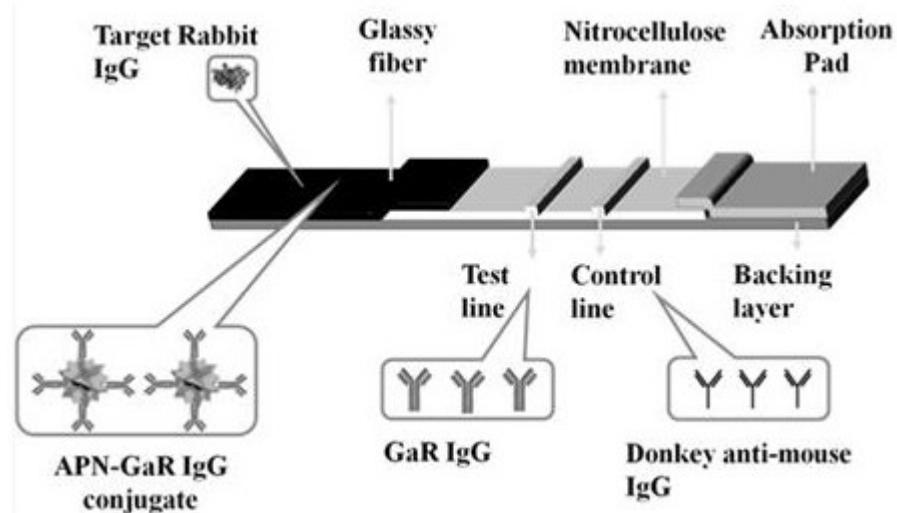


图1

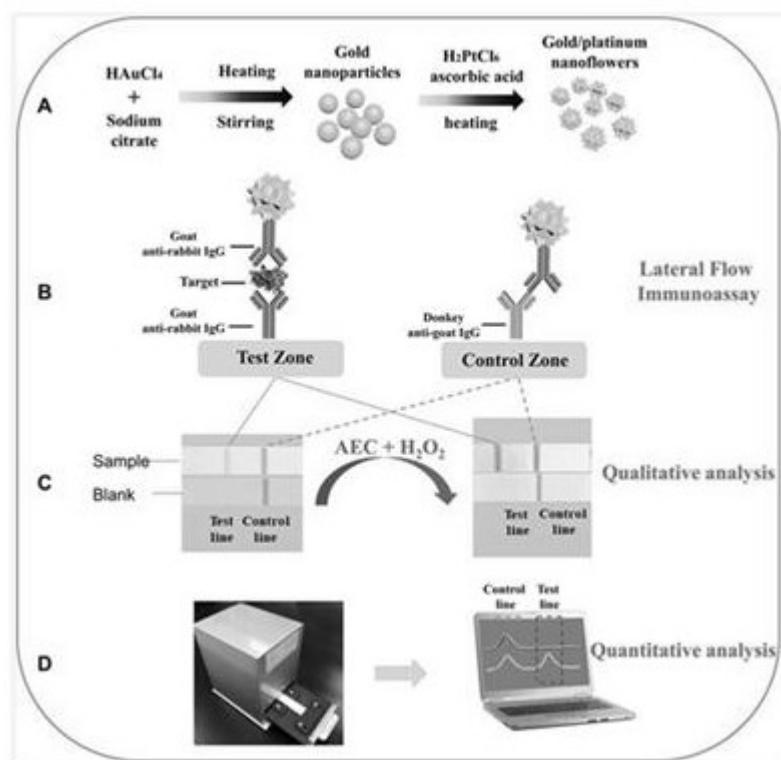


图2

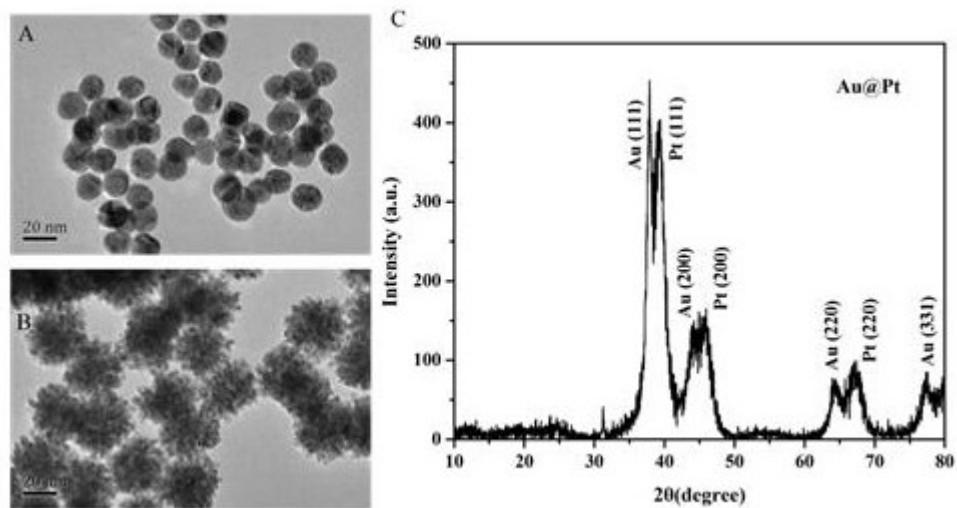


图3

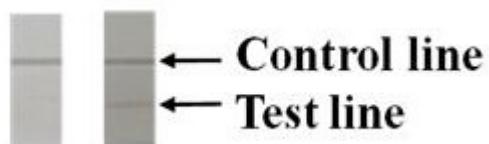


图4

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器器 | | |
| 公开(公告)号 | CN109725149A | 公开(公告)日 | 2019-05-07 |
| 申请号 | CN201910041393.3 | 申请日 | 2019-01-16 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 安徽科技学院 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 安徽科技学院 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 安徽科技学院 | | |
| [标]发明人 | 刘国东 于庆才 张静 钱立生 张学记 | | |
| 发明人 | 刘国东 于庆才 张静 钱立生 张学记 | | |
| IPC分类号 | G01N33/543 G01N33/558 G01N33/535 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPo | | |

摘要(译)

本发明属于免疫测定和其他生物检测技术领域，具体涉及一种基于金铂纳米花的侧向流动生物传感器，所述金铂纳米花为铂纳米线在金纳米颗粒表面上生长得到的纳米复合材料，由金铂纳米花为原料制备金铂纳米花-抗体1混合液与蛋白质靶标混合，然后由侧向流动生物传感器对蛋白质靶标进行检测，所述蛋白质靶标为兔免疫球蛋白。本发明相比现有技术具有以下优点：以金铂纳米花为基础制备金铂纳米花-抗体1混合液，用于所制备的侧向流动生物传感器，能够检测较低浓度的目标蛋白，具有优异的抗干扰性，通过便携式条带读取器测量测试带的峰面积来进行定量检测，出峰信号好，灵敏度高、操作简单、特异性好、适于推广使用。

