



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109900911 A

(43)申请公布日 2019.06.18

(21)申请号 201910181945.0

(22)申请日 2019.03.11

(71)申请人 西安交通大学

地址 710049 陕西省西安市咸宁西路28号

(72)发明人 赵婧 吴晨 李剑君 翁国军

朱键 赵军武

(74)专利代理机构 西安通大专利代理有限责任
公司 61200

代理人 徐文权

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/65(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

一种运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法

(57)摘要

本发明公开了一种运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法,该方法基于表面增强拉曼散射原理,运用核壳结构纳米星作为基底检测肝癌肿瘤标志物甲胎蛋白。先运用种子生长法合成金纳米星,为了增强纳米星的SERS活性,在金纳米星的表面包裹银层形成金银双金属纳米颗粒。通过在其表面包裹硅层提高纳米颗粒的稳定性,然后在硅层表面修饰抗体形成免疫探针。将免疫探针与硝酸纤维素膜上的不同浓度的抗原通过特异性结合,形成三明治结构,从而进行拉曼光谱的检测,实现甲胎蛋白的高灵敏度特异性检测。该检测方法简单,检测的灵敏度较高、检测范围宽,具有较好的应用前景。



1. 一种运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 在TX100溶液中加入氯金酸以及硼氢化钠溶液,然后静置制得种子溶液;在TX100溶液中加入硝酸银以及氯金酸,混合均匀制备生长液;然后向生长液中加入抗坏血酸以及种子溶液,制备得到金纳米星溶液;

2) 在金纳米星溶液中加入不同浓度的硝酸银和抗坏血酸溶液,然后加入氨水,混合均匀直至颜色不再变化,使得金纳米星表面包裹银层,最终合成金银双金属纳米星溶液;

3) 在金银双金属纳米星溶液中加入mPEG-SH,然后离心重悬在乙醇与水的混合液中;再向溶液中加入TEOS以及氨水,搅拌后进行离心清洗,最后重悬在水中,制备得到金银硅核壳结构纳米星;

4) 对合成的金银硅核壳结构纳米星表面进行氨基化,然后向溶液中加入甲胎蛋白抗体,完成免疫探针的制备;

5) 运用硝酸纤维素膜作为基底,根据抗原与抗体的特异性结合,通过拉曼光谱的测量,实现甲胎蛋白的检测。

2. 根据权利要求1所述的运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法,其特征在于,步骤1)中,氯金酸以及硼氢化钠的摩尔比为(20:6)~(25:6);硝酸银与氯金酸的摩尔比为(5:20)~(5:26);抗坏血酸与种子溶液的加入体积比为(16:1)~(28:1)。

3. 根据权利要求1所述的运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法,其特征在于,步骤2)之前还包括表面活性剂的替换步骤:取已制备好的金纳米星溶液,室温下离心,然后去上清,加入CTAB进行清洗。

4. 根据权利要求1所述的运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法,其特征在于,步骤2)中,硝酸银和抗坏血酸的摩尔比为1:1。

5. 根据权利要求1所述的运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法,其特征在于,步骤3)之前还包括银层外面修饰步骤:在金银双金属纳米星溶液中加入4-MBA溶液,进行离心,再用水清洗,完成银层外面修饰。

6. 根据权利要求1所述的运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法,其特征在于,步骤3)中,mPEG-SH加入后在金银双金属纳米星溶液中的浓度为0.05mg/mL。

7. 根据权利要求1所述的运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法,其特征在于,步骤3)中,TEOS与氨水体积比为(3:10)~(7:10)。

8. 根据权利要求1所述的运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法,其特征在于,步骤3)中,乙醇与水的体积比为9:2。

9. 根据权利要求1所述的运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法,其特征在于,步骤4)中,氨基化的具体步骤为:在金银硅核壳结构纳米星溶液中加入APTES搅拌后进行离心,离心后去上清液,用水重悬,然后再加入EDC和NHS,搅拌均匀。

10. 根据权利要求1所述的运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法,其特征在于,步骤5)中,甲胎蛋白的检测范围为0.3 μ g/mL-3pg/mL,其检测限为0.7pg/mL。

一种运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法。

背景技术

[0002] 肝癌的发生不仅严重影响了人们的正常生活,而且死亡率高。目前对于肝癌的早期诊断和治疗仍然是一个难以突破的科学难题。肿瘤标志物是一种存在于癌症相关的血液或组织中的分子,对于肿瘤标志物的检测和识别有利于病人的诊断和临床管理。研究表明,甲胎蛋白与肝癌及多种肿瘤的发生发展密切相关,在多种肿瘤中均可表现出较高浓度,可以作为多种肿瘤的阳性检测指标,临床上主要作为原发性肝癌的血清标志物,用于原发性肝癌的诊断及疗效监测。因此,血清中甲胎蛋白的高灵敏度特异性检测对于肝癌的早期诊断和治疗具有重要的意义。然而,建立一种灵敏度高,选择性强,易于操作的检测方法仍然存在巨大的挑战。

[0003] 目前甲胎蛋白检测方法,如放射免疫法(RIA)、时间分辨荧光免疫法(TRFIA)和酶联免疫吸附试验(ELISA)等,在临床研究中都有广泛的应用,但都存在着不足。RIA试剂不稳定,随时间而衰减。此外,该方法重现性差。TRFIA法的信噪比太低,无法达到最佳检测限。ELISA法不能提供定量数据,线性范围较窄。因此,建立一种简单、快速、选择性和灵敏度高的AFP检测方法至关重要。

[0004] 金纳米颗粒独特的光学特性主要集中在表面等离子体共振(SPR)特性,即金属表面的自由电子与电磁场相互作用通过共振产生表面等离子激元。这种特性与纳米粒子的形貌、大小和聚集状态相关。由于纳米粒子的等离子激元共振在空间上受到限制,将电子震荡局限在纳米尺寸范围,此时等离子激元就成为局域等离子激元(LSPR)。当发生表面等离子激元共振时,纳米粒子表面的局域电场大幅度增强,不同形貌的金纳米粒子会显示出不同的电场增强效果,可被应用于表面增强光谱如表面增强拉曼光谱(SERS)和表面增强荧光光谱中。相对于球状金纳米颗粒或棒状金纳米颗粒,星型结构的金纳米颗粒由于具有尖锐的枝杈结构,枝杈尖端附近会产生的各向同性的电磁场,使得金纳米星具有良好的光学特性。此外,纳米星由于等离子激元极化现象而在其枝杈尖端部位产生了具有高SERS增强效果的“热点”,提高了SERS的检测灵敏度。与金相比,银具有更大的表面等离子激元共振可调范围、更高的等离子激元强度以及更低的造价。金银核壳结构双金属纳米星在保留金纳米星尖端热点的同时,在中心部位包被银壳层,显著提高了纳米颗粒的局域场,从而提高了检测的灵敏度。这种增强对于运用表面增强拉曼散射来检测分子具有广泛的应用前景。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法,本发明运用表面增强拉曼散射的原理,用合成的核壳结构纳米星作为免疫探针,用硝酸纤维素膜作为基底检测甲胎蛋白。该检测方法操作简单、检测灵敏度高且选择性好,具有较

高的检测灵敏度和较好的检测范围。

[0006] 为实现上述目的,本发明是通过以下技术方案来实现:

[0007] 一种运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法,包括以下步骤:

[0008] 1) 在TX100溶液中加入氯金酸以及硼氢化钠溶液,然后静置制得种子溶液;在TX100溶液中加入硝酸银以及氯金酸,混合均匀制备生长液;然后向生长液中加入抗坏血酸以及种子溶液,制备得到金纳米星溶液;

[0009] 2) 在金纳米星溶液中加入不同浓度的硝酸银和抗坏血酸溶液,然后加入氨水,混合均匀直至颜色不再变化,使得金纳米星表面包裹银层,最终合成金银双金属纳米星溶液;

[0010] 3) 在金银双金属纳米星溶液中加入mPEG-SH,然后离心重悬在乙醇与水的混合液中;再向溶液中加入TEOS以及氨水,搅拌后进行离心清洗,最后重悬在水中,制备得到金银硅核壳结构纳米星;

[0011] 4) 对合成的金银硅核壳结构纳米星表面进行氨基化,然后向溶液中加入甲胎蛋白抗体,完成免疫探针的制备;

[0012] 5) 运用硝酸纤维素膜作为基底,根据抗原与抗体的特异性结合,通过拉曼光谱的测量,实现甲胎蛋白的检测。

[0013] 步骤1)中,氯金酸以及硼氢化钠的摩尔比为(20:6)~(25:6);硝酸银与氯金酸的摩尔比为(5:20)~(5:26);抗坏血酸与种子溶液的加入体积比为(16:1)~(28:1)。

[0014] 步骤2)之前还包括表面活性剂的替换步骤:取已制备好的金纳米星溶液,室温下离心,然后去上清,加入CTAB进行清洗。

[0015] 步骤2)中,硝酸银和抗坏血酸的摩尔比为1:1。

[0016] 步骤3)之前还包括银层外面修饰步骤:在金银双金属纳米星溶液中加入4-MBA溶液,进行离心,再用水清洗,完成银层外面修饰。

[0017] 步骤3)中,mPEG-SH加入后在金银双金属纳米星溶液中的浓度为0.05mg/mL。

[0018] 步骤3)中,TEOS与氨水体积比为(3:10)~(7:10)。

[0019] 步骤3)中,乙醇与水的体积比为9:2。

[0020] 步骤4)中,氨基化的具体步骤为:在金银硅核壳结构纳米星溶液中加入APTES搅拌后进行离心,离心后去上清液,用水重悬,然后再加入EDC和NHS,搅拌均匀。

[0021] 步骤5)中,甲胎蛋白的检测范围为0.3 μ g/mL-3pg/mL,其检测限为0.7pg/mL。

[0022] 与现有技术相比,本发明具有以下有益的技术效果:

[0023] 本发明的运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法具体是先运用种子生长法合成金纳米星;再在金纳米星表面包裹银层,用以增强纳米星的SERS特性;对包银后的双金属纳米星进行包硅,制备得到金银硅核壳结构纳米星。在制得的核壳结构纳米星的表面修饰抗体;运用硝酸纤维素膜作为基底,根据抗原与抗体的特异性结合,形成三明治结构,通过拉曼光谱的测量,实现甲胎蛋白的检测。本发明公开的金纳米星的制备方法简单、快速,合成的金纳米星产率较高,生长均匀,同时枝杈长度可调。合成的金银双金属纳米星银层厚度的可调,同时其SERS特性可以通过调节银层厚度来进行调整。在进行AFP检测过程中,检测方法简单,检测限低,同时检测范围宽,在以后的实际应用中具有广泛的应用前景。

附图说明

- [0024] 图1不同枝杈长度金纳米星吸收光谱图；
- [0025] 图2金纳米星透射电镜图 (AA的量为80 μ L)；
- [0026] 图3不同银层厚度金银核壳结构纳米星吸收光谱图；
- [0027] 图4不同银层厚度金银核壳结构纳米星对应的电镜图；
- [0028] 图5不同银层厚度金银核壳结构纳米星的拉曼光谱图；(a) 为不同银层厚度金银双金属纳米星拉曼光谱图，(b) 为613 cm^{-1} 处对应的折线图。
- [0029] 图6包硅后核壳结构纳米星吸收光谱图；
- [0030] 图7包硅后核壳结构纳米星透射电镜图；
- [0031] 图8修饰抗体后核壳结构纳米星的透射电镜图；
- [0032] 图9检测甲胎蛋白拉曼光谱图；
- [0033] 图10检测甲胎蛋白标准曲线。

具体实施方式

[0034] 下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0035] 实施例1

[0036] 本发明一种运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法，包括以下步骤：

[0037] 1) 金纳米星的制备

[0038] 采用种子生长法制备形貌均一，且枝杈长度可调的金纳米星；

[0039] 种子的制备：在15mL的试管中将5mL 0.2M的TX100溶液与5mL 0.0005M的 HAuCl_4 溶液相混合，混合液呈淡黄色；紧接着向上述混合液中加入0.6mL 0.01M的冰硼氢化钠溶液，微微晃动摇匀，同时溶液迅速由淡黄色转变为红褐色，将此混合液放入4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置数小时后使用；

[0040] 生长液的制备：首先向2.5mL 0.2M的TX100中加入0.125mL 0.004M的硝酸银溶液；然后向其中加入2.2mL 0.001M的 HAuCl_4 溶液，此时，溶液为淡黄色；紧接着向上述混合溶液中加入85 μ L 0.0788M的抗坏血酸溶液，此时混合液逐渐由黄色变为无色透明液体；最后加入5 μ L的种子溶液，将上述混合液微微摇晃，此时混合液由无色透明逐渐呈现为粉红色后又迅速变为蓝绿色，最终呈现为暗绿色溶液。将此生长液置于27 $^{\circ}\text{C}$ 水浴环境下1h之后即可获得金纳米星。

[0041] 2) 金银核壳结构纳米星的制备

[0042] 由于在金纳米星合成的过程中采用非离子态的TX100作为表面活性剂，不能进行离心。因此，需要运用CTAB溶液进行表面活性剂的替换。然后向进行替换后的金纳米星溶液中加入不同浓度的硝酸银和抗坏血酸溶液及氨水，合成具有不同银层厚度的金银双金属纳米星。对不同银层厚度的金银双金属纳米星进行拉曼光谱的测量，从而研究其SERS特性；具体方法为：

[0043] 取上述已制备好的金纳米星，室温下离心8000rpm、10min，然后去上清，加0.08M的

CTAB进行清洗。然后向溶液加入不同体积0.1M的硝酸银和同体积0.1M的抗坏血酸溶液(AA),最后向混合溶液中加入3 μ L的氨水,轻轻摇匀,溶液颜色逐渐变深,直到5min后溶液颜色不再变化时说明已完成金银核壳结构纳米星的制备,然后室温下离心10min,去上清,用水进行重悬。

[0044] 3) 金银核壳结构纳米星的SERS特性研究

[0045] 对上述制备的不同银层厚度的金银核壳结构纳米星进行两次离心,第一次离心后用水清洗,第二次离心后去上清,留下沉淀,保留其体积约为100 μ L,然后向沉淀中分别加20 μ L 10^{-6} M的罗丹明6G(R6G)溶液,混合半小时后,取20 μ L的溶液滴加在干净的玻璃片上,待玻璃片烘干后进行拉曼光谱的测量。

[0046] 4) 金银硅三层结构纳米星(AuNS@Ag@SiO₂)的制备及表征

[0047] 为了保证纳米颗粒的稳定性,对合成的金银双金属纳米星进行包硅。并通过对不同硅层厚度的核壳结构纳米星进行拉曼光谱的测量,研究硅层厚度的对其SERS特性的影响。

[0048] 选择上述样品中SERS特性最好的样品进行包硅。首先选择 10^{-4} M的巯基苯甲酸(4-MBA)作为拉曼信号分子修饰在银层外面,然后进行包硅。在5mL的AuNS@Ag溶液中加入150 μ L的4-MBA溶液,混合1h后进行离心,用水清洗。

[0049] 取上述修饰完信号分子的溶液,加入250 μ L 1mg/mL的mPEG-SH溶液,将磁力搅拌器调至150rpm进行1h的密封搅拌。然后在8000rpm、10min进行离心,离心后去上清,重悬于5mL乙醇和水的混合液中(体积乙醇:水=9:2)。将磁力搅拌转速调至170rpm,搅拌条件下加入50 μ L氨水以及15 μ L10%的TEOS溶液,密封反应12h。最后离心清洗3遍重悬于乙醇中。

[0050] 5) AFP抗体的修饰

[0051] 选择SERS活性最好的核壳结构纳米星,在其表面修饰甲胎蛋白抗体形成免疫探针。

[0052] 对包完硅层之后的样品进行抗体的修饰。在5mL溶液中加入3 μ L APTES搅拌24h后进行离心,离心后去上清液,用水重悬。然后再加入4mg EDC和1.6mg NHS,搅拌十分钟后然后加入10 μ L的AFP抗体,混合4h后进行离心清洗。

[0053] 6) 基底的制备

[0054] 选择可以吸附蛋白的硝酸纤维素膜作为基底,在其表面修饰抗体以及不同浓度的抗原,然后通过抗原与抗体的特异性结合,形成三明治结构,然后进行拉曼光谱的测量,从而实现甲胎蛋白的检测。

[0055] 基底选择能吸附蛋白的硝酸纤维素膜作为基底,在其表面修饰抗体和不同浓度的抗原,然后将膜在修饰抗体的纳米颗粒溶液中孵育3h。最后在TBST溶液中进行清洗,清洗3次,烘干后进行拉曼光谱的测量。在硝酸纤维素膜上修饰抗体以及不同浓度的抗原,抗原与抗体的特异性结合,将免疫探针修饰在硝酸纤维素膜上,然后进行拉曼光谱的测量,最终实现甲胎蛋白的检测。

[0056] 实施例2

[0057] 运用种子生长法首先制备种子,在生长液的制备过程中,AA的量分别为80 μ L、100 μ L、120 μ L及140 μ L,然后制备出的金纳米星的吸收光谱如图1所示。可以看出,随着AA量的增加,其吸收峰不断发生红移。其中80 μ L的AA的吸收光谱对应的透射电镜图如图2所示。可以

看出,制备的金纳米星枝杈数量约为4-6个,分布均匀且具有较高的产率。

[0058] 实施例3

[0059] 用80 μ L的AA制备金纳米星,然后用CTAB替换表面活性剂。然后在2mL的离心管中分别加入1mL的金纳米星。分别向金纳米星中加入1 μ L、2 μ L、3 μ L、4 μ L、5 μ L、6 μ L、7 μ L、8 μ L、9 μ L、10 μ L的0.1M的硝酸银溶液和0.1M同体积的AA溶液完成不同银层厚度金银双金属纳米星的制备,其吸收光谱如图3所示。从图中可以看出,随着硝酸银浓度的增加,其吸收光谱逐渐蓝移。对应的电镜图如图4所示,可以看出包银后,银层主要覆盖在金纳米星的核上,同时随着硝酸银的体积增加,其银层厚度逐渐增厚。对包银后的金银双金属纳米星进行离心,然后去上清,向沉淀中加入20 μ L的罗丹明6G溶液,混合均匀后,取20 μ L滴加在干净的玻璃片上,干燥后进行拉曼光谱的测量。测量的拉曼光谱如图5所示,可以看出,随着硝酸银体积的增加,其拉曼强度呈现先增强后减弱的趋势,当硝酸银的体积达到8 μ L时,其拉曼强度最强,SERS特性最好。

[0060] 实施例4

[0061] 用实施例一的方法制备金纳米星,其中AA的量固定为80 μ L,用实施例二的方法进行包银,金纳米星的体积为5mL,硝酸银的体积为40 μ L。然后进行离心清洗二次,重悬在5mL的水中。加入200 μ L的1mg/mL的m-PEG溶液,缓慢搅拌1小时后进行离心,然后重悬在乙醇与水的混合溶液中。向溶液中加入10 μ L的氨水和15 μ L的TEOS溶液,缓慢搅拌12小时,最后用乙醇清洗三次重悬在5mL的乙醇中,完成金银硅核壳结构纳米颗粒的制备。核壳结构纳米星的吸收光谱图如图6所示,包硅后的透射电镜图如图7所示。

[0062] 实施例5

[0063] 运用实施例三中的方法进行包硅,然后在5mL金银硅核壳结构纳米星溶液中加入3 μ L APTES搅拌24h后进行离心,离心后去上清液,用水重悬。然后再加入4mg EDC和1.6mg NHS,搅拌十分钟然后加入10 μ L的AFP抗体,混合4h后进行离心清洗。修饰抗体后的透射电镜图如图8所示。然后将离心后修饰抗体的溶液重悬在5mL的水中,加入20 μ L的10%的BSA溶液,离心清洗,从重悬在5mL水中。然后在硝酸纤维素膜上修饰抗体和不同浓度的抗原,然后将修饰抗原的硝酸纤维素膜在探针溶液中孵育3小时后在TBST溶液中进行清洗,清洗3次,烘干后进行拉曼光谱的测量。测量的拉曼光谱如图9所示,可以看出随着抗原浓度的增加,其拉曼强度逐渐增强,其检测范围为0.3 μ g/mL-3pg/mL。经过计算其检测限为0.7pg/mL。将抗原浓度的对数值作为横坐标,在613 cm^{-1} 处的拉曼强度作为纵坐标做标准曲线,如图10所示,可以看出运用该方法检测AFP,在检测范围内具有良好的线性关系。

[0064] 实施例6

[0065] 一种运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法,包括以下步骤:

[0066] 1) 在TX100溶液中加入氯金酸以及硼氢化钠溶液,然后静置制得种子溶液;在TX100溶液中加入硝酸银以及氯金酸,混合均匀制备生长液;然后加入抗坏血酸以及种子溶液,制备得到金纳米星溶液;氯金酸以及硼氢化钠的摩尔比为25:6;硝酸银与氯金酸的摩尔比为5:26;抗坏血酸与种子溶液的加入体积比为28:1。

[0067] 2) 表面活性剂的替换步骤:取已制备好的金纳米星溶液,室温下离心,然后去上清,加入CTAB进行清洗。

[0068] 在金纳米星溶液中加入不同浓度的硝酸银和抗坏血酸溶液,然后加入氨水,混合

均匀直至颜色不再变化,使得金纳米星表面包裹银层,最终合成金银双金属纳米星溶液;硝酸银和抗坏血酸的摩尔比为1:1。

[0069] 3) 银层外面修饰步骤:在金银双金属纳米星溶液中加入4-MBA溶液,进行离心,再用水清洗,完成银层外面修饰。

[0070] 在金银双金属纳米星溶液中加入mPEG-SH,然后离心重悬在乙醇与水的混合液中;再向溶液中加入TEOS以及氨水,搅拌后进行离心清洗,最后重悬在水中,制备得到金银硅核壳结构纳米星;mPEG-SH加入后在金银双金属纳米星溶液中的浓度为0.05mg/mL。TEOS与氨水体积比为7:10。乙醇与水的体积比为9:2。

[0071] 4) 对合成的金银硅核壳结构纳米星表面进行氨基化,然后向溶液中加入甲胎蛋白抗体,完成免疫探针的制备;氨基化的具体步骤为:在金银硅核壳结构纳米星溶液中加入APTES搅拌后进行离心,离心后去上清液,用水重悬,然后再加入EDC和NHS,搅拌均匀。

[0072] 5) 运用硝酸纤维素膜作为基底,根据抗原与抗体的特异性结合,通过拉曼光谱的测量,实现甲胎蛋白的检测。

[0073] 实施例7

[0074] 一种运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法,包括以下步骤:

[0075] 1) 在TX100溶液中加入氯金酸以及硼氢化钠溶液,然后静置制得种子溶液;在TX100溶液中加入硝酸银以及氯金酸,混合均匀制备生长液;然后加入抗坏血酸以及种子溶液,制备得到金纳米星溶液;氯金酸以及硼氢化钠的摩尔比为20:6;硝酸银与氯金酸的摩尔比为5:20;抗坏血酸与种子溶液的加入体积比为16:1。

[0076] 2) 表面活性剂的替换步骤:取已制备好的金纳米星溶液,室温下离心,然后去上清,加入CTAB进行清洗。

[0077] 在金纳米星溶液中加入不同浓度的硝酸银和抗坏血酸溶液,然后加入氨水,混合均匀直至颜色不再变化,使得金纳米星表面包裹银层,最终合成金银双金属纳米星溶液;硝酸银和抗坏血酸的摩尔比为1:1。

[0078] 3) 银层外面修饰步骤:在金银双金属纳米星溶液中加入4-MBA溶液,进行离心,再用水清洗,完成银层外面修饰。

[0079] 在金银双金属纳米星溶液中加入mPEG-SH,然后离心重悬在乙醇与水的混合液中;再向溶液中加入TEOS以及氨水,搅拌后进行离心清洗,最后重悬在水中,制备得到金银硅核壳结构纳米星;mPEG-SH加入后在金银双金属纳米星溶液中的浓度为0.05mg/mL。TEOS与氨水体积比为3:10。乙醇与水的体积比为9:2。

[0080] 4) 对合成的金银硅核壳结构纳米星表面进行氨基化,然后向溶液中加入甲胎蛋白抗体,完成免疫探针的制备;氨基化的具体步骤为:在金银硅核壳结构纳米星溶液中加入APTES搅拌后进行离心,离心后去上清液,用水重悬,然后再加入EDC和NHS,搅拌均匀。

[0081] 5) 运用硝酸纤维素膜作为基底,根据抗原与抗体的特异性结合,通过拉曼光谱的测量,实现甲胎蛋白的检测。

[0082] 实施例8

[0083] 一种运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法,包括以下步骤:

[0084] 1) 在TX100溶液中加入氯金酸以及硼氢化钠溶液,然后静置制得种子溶液;在TX100溶液中加入硝酸银以及氯金酸,混合均匀制备生长液;然后加入抗坏血酸以及种子溶

液,制备得到金纳米星溶液;氯金酸以及硼氢化钠的摩尔比为23:6;硝酸银与氯金酸的摩尔比为5:25;抗坏血酸与种子溶液的加入体积比为20:1。

[0085] 2) 表面活性剂的替换步骤:取已制备好的金纳米星溶液,室温下离心,然后去上清,加入CTAB进行清洗。

[0086] 在金纳米星溶液中加入不同浓度的硝酸银和抗坏血酸溶液,然后加入氨水,混合均匀直至颜色不再变化,使得金纳米星表面包裹银层,最终合成金银双金属纳米星溶液;硝酸银和抗坏血酸的摩尔比为1:1。

[0087] 3) 银层外面修饰步骤:在金银双金属纳米星溶液中加入4-MBA溶液,进行离心,再用水清洗,完成银层外面修饰。

[0088] 在金银双金属纳米星溶液中加入mPEG-SH,然后离心重悬在乙醇与水的混合液中;再向溶液中加入TEOS以及氨水,搅拌后进行离心清洗,最后重悬在水中,制备得到金银硅核壳结构纳米星;mPEG-SH加入后在金银双金属纳米星溶液中的浓度为0.05mg/mL。TEOS与氨水体积比为5:10。乙醇与水的体积比为9:2。

[0089] 4) 对合成的金银硅核壳结构纳米星表面进行氨基化,然后向溶液中加入甲胎蛋白抗体,完成免疫探针的制备;氨基化的具体步骤为:在金银硅核壳结构纳米星溶液中加入APTES搅拌后进行离心,离心后去上清液,用水重悬,然后再加入EDC和NHS,搅拌均匀。

[0090] 5) 运用硝酸纤维素膜作为基底,根据抗原与抗体的特异性结合,通过拉曼光谱的测量,实现甲胎蛋白的检测。

[0091] 综上所述,本发明公开了一种运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法。基于表面增强拉曼散射原理,运用核壳结构纳米星作为基底检测肝癌肿瘤标志物甲胎蛋白。先运用种子生长法合成金纳米星,为了增强纳米星的SERS活性,在金纳米星的表面包裹银层形成金银双金属纳米颗粒。通过在其表面包裹硅层提高纳米颗粒的稳定性,然后在硅层表面修饰抗体形成免疫探针。将免疫探针与硝酸纤维素膜上的不同浓度的抗原通过特异性结合,形成三明治结构,从而进行拉曼光谱的检测,实现甲胎蛋白的高灵敏度特异性检测。本发明运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法,该检测方法简单,检测的灵敏度较高、检测范围宽,具有较好的应用前景。

[0092] 需要说明的是,在本文中,诸如第一和第二等之类的关系术语仅仅用来将一个实体或者操作与另一个实体或操作区分开来,而不一定要求或者暗示这些实体或操作之间存在任何这种实际的关系或者顺序。而且,术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含,从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者设备不仅包括那些要素,而且还包括没有明确列出的其他要素,或者是还包括为这种过程、方法、物品或者设备所固有的要素。在没有更多限制的情况下,由语句“包括一个……”限定的要素,并不排除在包括所述的要素的过程、方法、物品或者设备中还存在另外的相同要素。

[0093] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

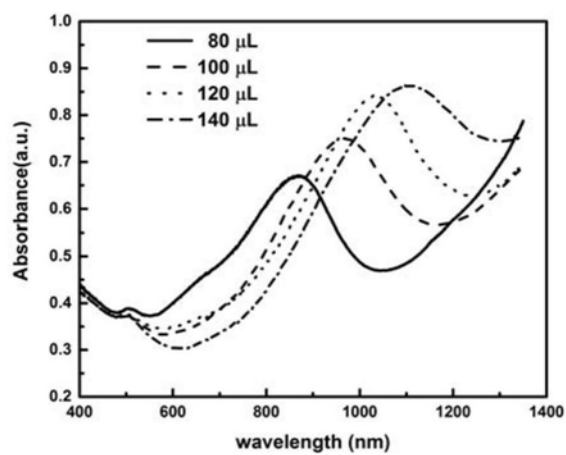


图1



图2

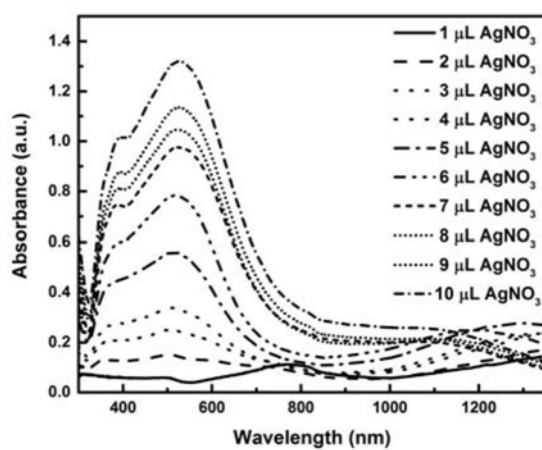


图3

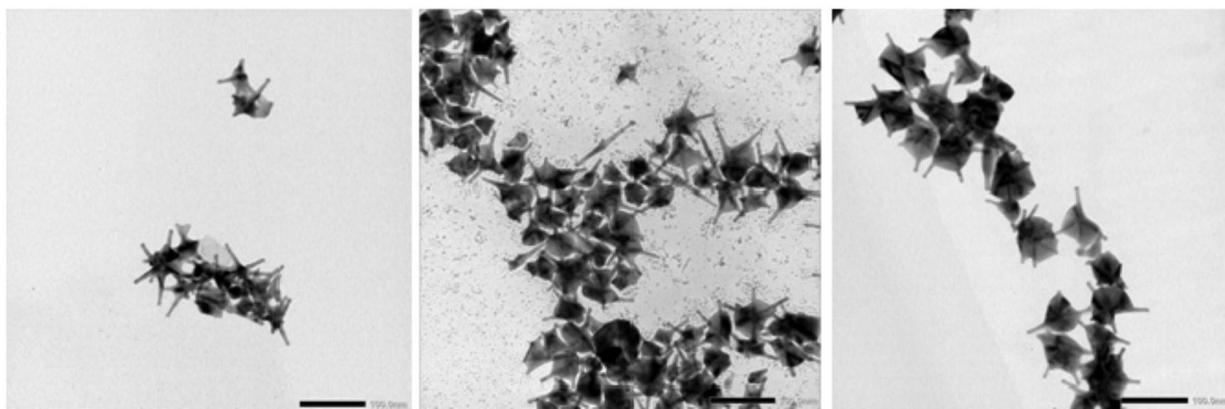


图4

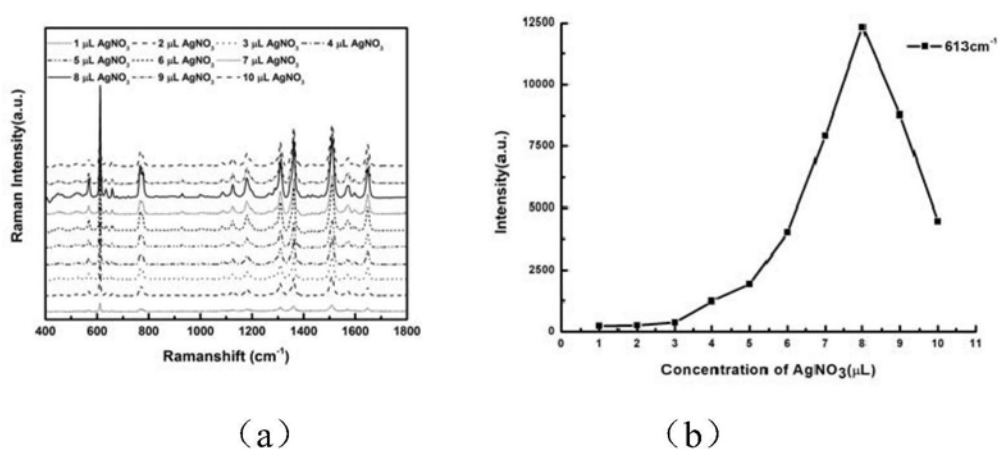


图5

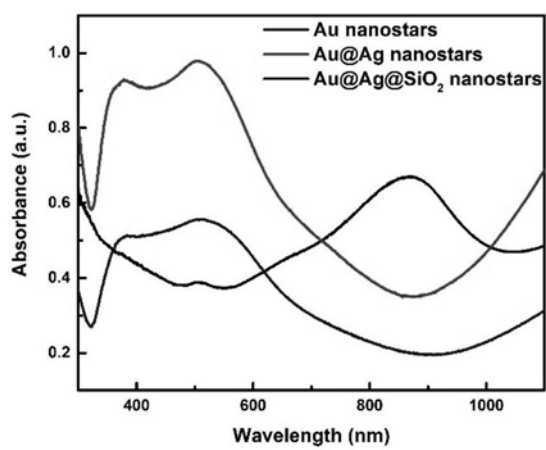


图6

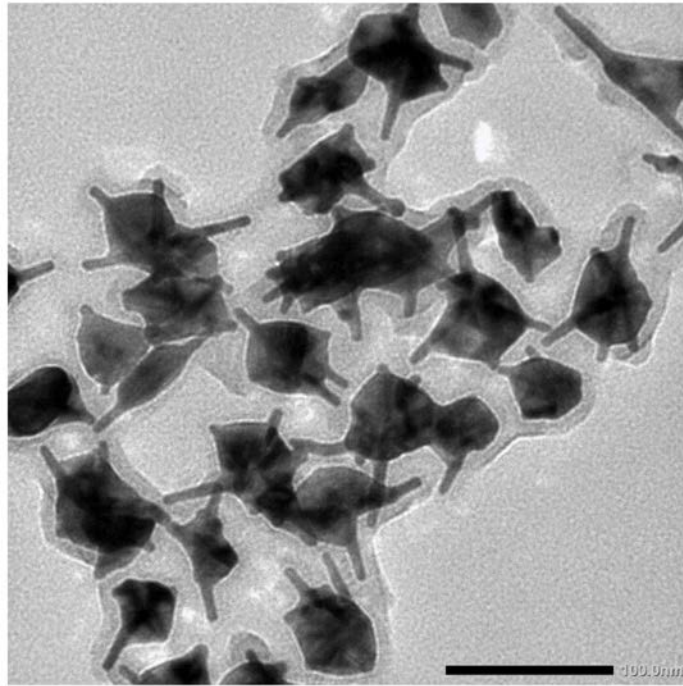


图7

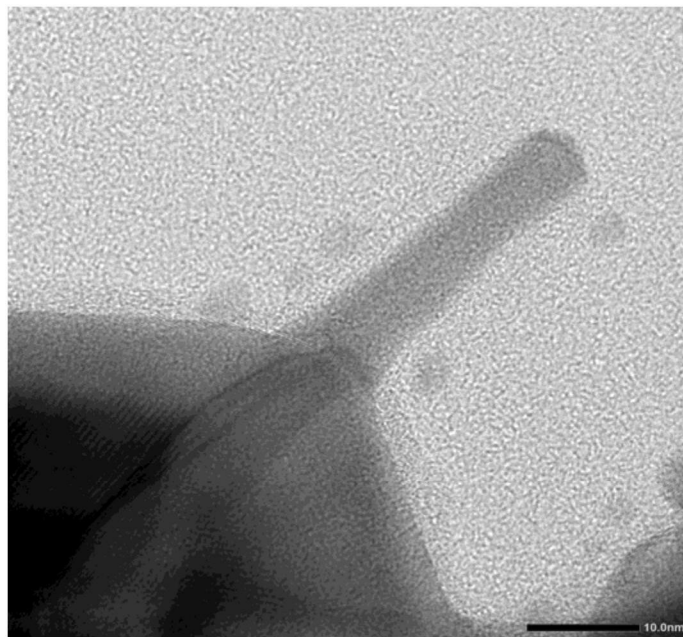


图8

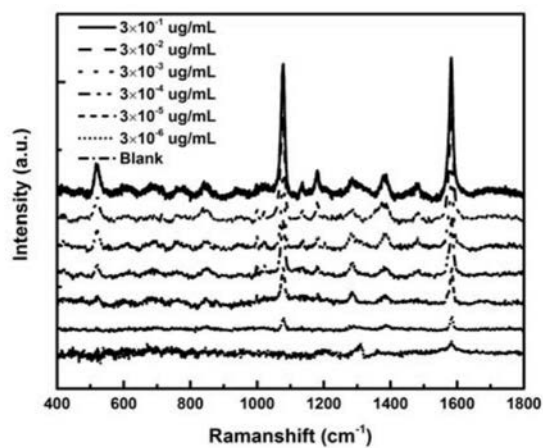


图9

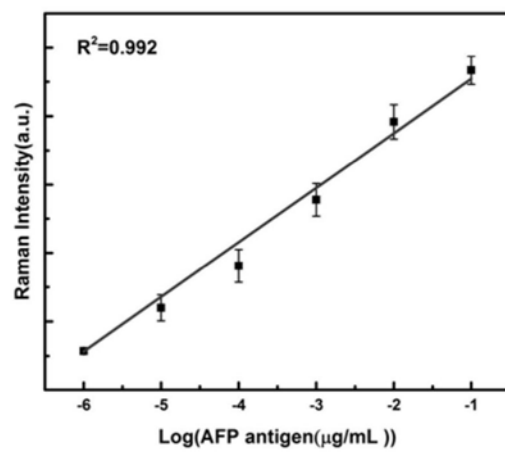


图10

专利名称(译)	一种运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法		
公开(公告)号	CN109900911A	公开(公告)日	2019-06-18
申请号	CN201910181945.0	申请日	2019-03-11
[标]申请(专利权)人(译)	西安交通大学		
申请(专利权)人(译)	西安交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	西安交通大学		
[标]发明人	赵婧 吴晨 李剑君 翁国军 朱键 赵军武		
发明人	赵婧 吴晨 李剑君 翁国军 朱键 赵军武		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N21/65		
代理人(译)	徐文权		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种运用核壳结构纳米星检测肝癌肿瘤标志物AFP的方法，该方法基于表面增强拉曼散射原理，运用核壳结构纳米星作为基底检测肝癌肿瘤标志物甲胎蛋白。先运用种子生长法合成金纳米星，为了增强纳米星的SERS活性，在金纳米星的表面包裹银层形成金银双金属纳米颗粒。通过在其表面包裹硅层提高纳米颗粒的稳定性，然后在硅层表面修饰抗体形成免疫探针。将免疫探针与硝酸纤维素膜上的不同浓度的抗原通过特异性结合，形成三明治结构，从而进行拉曼光谱的检测，实现甲胎蛋白的高灵敏度特异性检测。该检测方法简单，检测的灵敏度较高、检测范围宽，具有较好的应用前景。

