



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103411948 A

(43) 申请公布日 2013. 11. 27

(21) 申请号 201310254265. X

(22) 申请日 2013. 06. 24

(71) 申请人 吉林大学

地址 130012 吉林省长春市前进大街 2699
号

(72) 发明人 王旭 王爱敬 赵冰 宋薇
阮伟东 陈雷

(74) 专利代理机构 长春吉大专利代理有限责任
公司 22201

代理人 张景林 王恩远

(51) Int. Cl.

G01N 21/65 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

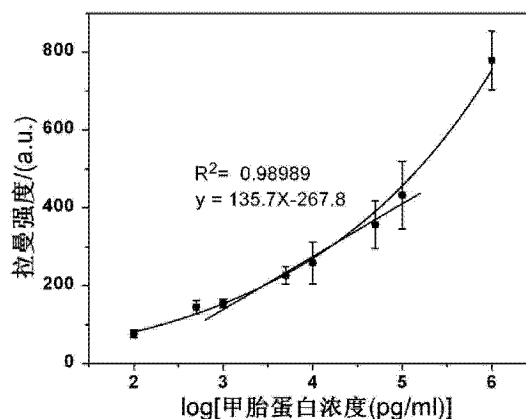
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

基于探针标记免疫金-磁性复合材料检测甲胎蛋白的 SERS 方法

(57) 摘要

一种基于探针标记免疫金-磁性复合材料检测甲胎蛋白的 SERS 方法,属于蛋白质分析检测技术领域。包括 P- 巯基苯甲酸 (MBA) 分子修饰的金纳米粒子与甲胎蛋白抗体结合、制备表面功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 磁性复合材料、血清中的甲胎蛋白吸附到此功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 磁性复合材料上、免疫金探针和修饰了甲胎蛋白抗原的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 磁性复合材料发生免疫反应;进行拉曼光谱检测等步骤;将得到的待测蛋白质的拉曼图谱特征峰的拉曼强度值代入“拉曼强度与甲胎蛋白抗原浓度工作曲线”,即可测得甲胎蛋白的浓度。此方法具有超灵敏性,高选择性和检测条件温和等优点,在临床分析诊断中具有非常重要的意义。



1. 一种基于探针标记免疫金- Fe_3O_4 磁性复合材料检测血清中甲胎蛋白含量的表面增强拉曼光谱 SERS 方法,其特征在于:

(a) 制备 P- 巯基苯甲酸 MBA 分子标记的金纳米粒子溶液,并与甲胎蛋白抗体结合,同时用 BSA 试剂进行封闭;

(b) 制备 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料;

(c) 制备醛基化的 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料,然后配制成 PBS 分散液;

(d) 将一系列已知浓度的甲胎蛋白抗原的 PBS 溶液分别和步骤 (c) 的溶液等体积混合,同时用等体积的 BSA 试剂进行封闭;

(e) 将步骤 (a) 溶液和步骤 (d) 溶液按体积比 1:1 混合,在 37°C 下温育 1 ~ 2 小时进行免疫反应;此时,结合在金纳米粒子上的甲胎蛋白抗体和吸附到醛基化 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料上的甲胎蛋白抗原发生免疫反应;

(f) 将上步骤免疫反应后的溶液进行拉曼光谱检测,得到一系列已知浓度的甲胎蛋白抗原的拉曼图谱,以甲胎蛋白抗原浓度的对数值为横坐标,以对应的 1078cm^{-1} 位置处的拉曼强度值为纵坐标,绘制定量分析标准工作曲线;

(g) 将待测甲胎蛋白浓度的血清和步骤 (c) 溶液等体积混合,在 37°C 下温育 1 ~ 2 小时;然后将步骤 (a) 溶液和本步骤溶液等体积混合,在 37°C 下温育 1 ~ 2 小时,二者发生免疫反应;将免疫反应后溶液进行拉曼光谱检测,得到拉曼光谱图,读出此光谱在 1078cm^{-1} 位置处的拉曼强度值,将此拉曼强度值带入定量分析标准工作曲线,即可得到血清中甲胎蛋白的浓度。

2. 如权利要求 1 所述的基于探针标记免疫金- Fe_3O_4 磁性复合材料检测血清中甲胎蛋白含量的表面增强拉曼光谱 SERS 方法,其特征在于:步骤 (a) 中 MBA 分子标记的金纳米粒子的制备是取 15 ~ 20mL 金纳米粒子加入到 $100\mu\text{L}$ 、 10^{-3}mol/L 的 MBA 的乙醇溶液,搅拌反应 10 ~ 12h;然后离心、清洗 2 ~ 4 次,用 PBS 缓冲溶液重悬浮。

3. 如权利要求 1 所述的基于探针标记免疫金- Fe_3O_4 磁性复合材料检测血清中甲胎蛋白含量的表面增强拉曼光谱 SERS 方法,其特征在于:步骤 (a) 是取 MBA 分子标记的金纳米粒子溶液 15 ~ 20mL,向此溶液中加入 200 ~ 300 μL 、100 $\mu\text{g/mL}$ 的甲胎蛋白抗体,充分混合后 37°C 下反应 1 ~ 2h,然后离心、重悬浮后除去未反应的甲胎蛋白抗体,从而使得 P- 巯基苯甲酸 MBA 分子标记的金纳米粒子与甲胎蛋白抗体结合。

4. 如权利要求 3 所述的基于探针标记免疫金- Fe_3O_4 磁性复合材料检测血清中甲胎蛋白含量的表面增强拉曼光谱 SERS 方法,其特征在于:甲胎蛋白抗体为鼠抗人甲胎蛋白抗体或兔抗人甲胎蛋白抗体。

5. 如权利要求 1 所述的基于探针标记免疫金- Fe_3O_4 磁性复合材料检测血清中甲胎蛋白含量的表面增强拉曼光谱 SERS 方法,其特征在于:步骤 (a) 用 BSA 试剂进行封闭是将 BSA 的 PBS 溶液加入到溶液中, 37°C 下反应 1 ~ 2h,使金纳米粒子表面空位被 BSA 占据。

6. 如权利要求 1 所述的基于探针标记免疫金- Fe_3O_4 磁性复合材料检测血清中甲胎蛋白含量的表面增强拉曼光谱 SERS 方法,其特征在于:步骤 (c) 是将 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料分散到 30mL、1wt% 的 3- 氨丙基三甲氧基硅烷的乙醇溶液中,电动搅拌 20 ~ 24 小时后分离洗涤,再将其分散到 30mL、2.5wt% 的戊二醛的水溶液中,搅拌过夜,得到醛基化的 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料,然后分散到 30mL PBS 缓冲溶液中,最终浓度为 $4 \times 10^{-3}\text{mol/L}$

L。

7. 如权利要求 1 所述的基于探针标记免疫金- Fe_3O_4 磁性复合材料检测血清中甲胎蛋白含量的表面增强拉曼光谱 SERS 方法,其特征在于:步骤(d)是将甲胎蛋白抗原溶解在 PBS 中,得到不同浓度的甲胎蛋白抗原溶液,将 $100\ \mu\text{L}$ 醛基化的 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料的 PBS 分散液与 $100\ \mu\text{L}$ 甲胎蛋白抗原的 PBS 溶液混合,在 37°C 下温育 $1\sim 2$ 小时;然后,加入 $100\ \mu\text{L}$ 、 $1\text{wt}\%$ 的 BSA,在 37°C 下温育 $1\sim 2$ 小时。

8. 如权利要求 1 所述的基于探针标记免疫金- Fe_3O_4 磁性复合材料检测血清中甲胎蛋白含量的表面增强拉曼光谱 SERS 方法,其特征在于:步骤(g)是取 $100\ \mu\text{L}$ 醛基化的 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料的 PBS 分散液与 $100\ \mu\text{L}$ 待测甲胎蛋白浓度的血清混合,在 37°C 下温育 $1\sim 2$ 小时;然后,加入 $100\ \mu\text{L}$ 、 $1\text{wt}\%$ BSA 在 37°C 下温育 $1\sim 2$ 小时;最后将 $100\ \mu\text{L}$ 上述溶液和 $100\ \mu\text{L}$ 步骤(a)得到的溶液混合,在 37°C 下温育 $1\sim 2$ 小时;取混合溶液进行拉曼检测,得到拉曼光谱图,读出此光谱在 1078cm^{-1} 位置处的拉曼强度值,将此拉曼强度值带入定量分析标准工作曲线,即可得到血清中甲胎蛋白的浓度。

基于探针标记免疫金-磁性复合材料检测甲胎蛋白的 SERS 方法

技术领域

[0001] 本发明属于蛋白质分析检测技术领域,具体涉及一种基于探针标记免疫金- Fe_3O_4 磁性复合材料检测血清中甲胎蛋白含量的表面增强拉曼光谱(SERS)方法。

背景技术

[0002] 癌症迄今仍是难以治愈的顽症之一。由于人口增长和寿命延长等因素,世界各地的癌症患者人数正逐年增长。按照目前国际医学界公认的常规疗法,治疗癌症一般需手术切除并配合进行放、化疗,然而放、化疗往往在杀灭癌细胞的同时,也严重损毁了人体多个脏器的功能。为此,科学家一直在努力寻找着更好更直接且副作用较小的方法来治疗癌症。

[0003] 甲胎蛋白是单链多肽糖蛋白,分子量大约为 70KD。其理化特性以及氨基酸组成与白蛋白相似。甲胎蛋白最初在胎儿的肝脏以及卵黄囊中合成。随后分泌到胎儿血清中,妊娠第 13 周时,达到峰值,之后逐渐降低。

[0004] 肝癌是常见的造成甲胎蛋白偏高的原因之一,一般正常人血清中甲胎蛋白的含量不到 $20 \mu\text{g/L}$,但当肝细胞发生癌变时,却又恢复了产生这种蛋白质的功能,据调查发现约有 80% 的肝癌患者血清中甲胎蛋白会升高,通常以 $400 \mu\text{g/L}$ 为标准,高于此数值应该考虑肝癌的可能性,一般在肝癌出现症状之前的 8 个月甲胎蛋白就已经升高,所以肝硬化、慢性肝炎病人、家族中有肝癌患者的人应该根据自己的情况做定期的检查。因此,甲胎蛋白的检测对肝癌的早期诊断具有一定的参考意义。

[0005] 目前,医学上检测甲胎蛋白的方法虽有许多,但都有各自的缺点和不足。比如,时间分辨荧光免疫分析法,信噪比差,检测线低;酶联免疫吸附分析法,缺少准确的定量,而且线性范围窄;放射免疫分析法,存在着放射性污染的问题。

[0006] SERS (表面增强拉曼光谱)具有超灵敏性,高选择性和检测条件温和等优点,在生物分析化学领域具有广泛的应用。与 Raman (拉曼散射光谱)相比, SERS 的增强因子可达 $10^4 \sim 10^7$ 。因此 SERS 在痕量分析中具有很大的优势, SERS 的检测限可达到 ng 水平,对不少化合物的检测限更低。随着理论研究的深入和实验方法的改进, SERS 的灵敏度有了很大提高,尤其是利用 SERS 进行单分子检测,使得 SERS 在超灵敏分子检测中发挥着越来越大的作用,并且使 SERS 可以达到比荧光光谱更低的检测极限。

[0007] 与本发明相近的技术是 2003 年 9 月 24 日公开的中国专利“表面增强拉曼散射标记免疫检测法”,公开号 CN1444045A。它公开了用表面增强拉曼散射光谱检测抗原抗体特异性反应的免疫检测技术。经过形成组装体、制备 SERS 免疫金探针、免疫复合反应、银染色等过程,用拉曼光谱仪检测标记免疫复合物。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种基于标记免疫金-磁性复合材料检测甲胎蛋白的 SERS 方法,探针标记免疫金-磁性复合材料为三明治结构,克服了传统检测蛋白质的方法在操

作步骤复杂、检测效率低等方面的局限性。

[0009] 本发明首先制备探针标记免疫金复合物,修饰甲胎蛋白抗体;然后,制备 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料,浸泡到血清中,修饰上了甲胎蛋白抗原;最后,通过抗原-抗体的免疫识别捕获血清中的甲胎蛋白抗原。通过免疫金标记,检测信号被有效地放大。此外,在外磁场的诱导下, Fe_3O_4 磁性纳米粒子聚集,可以提供巨大的电磁场贡献,达到对蛋白质的超灵敏检测,得到的 SERS 信号就更强。

[0010] 本发明所述的方法,主要包含以下步骤:

[0011] (a) 制备 P- 巯基苯甲酸(MBA) 分子标记的金纳米粒子溶液,并与甲胎蛋白抗体结合,同时用 BSA 试剂进行封闭;

[0012] (b) 制备 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料;

[0013] (c) 制备醛基化的 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料,然后配制成 PBS 分散液;

[0014] (d) 将一系列已知浓度的甲胎蛋白抗原的 PBS 溶液分别和步骤(c) 的溶液等体积混合,同时用等体积的 BSA 试剂进行封闭;

[0015] (e) 将步骤(a) 溶液和步骤(d) 溶液按体积比 1:1 混合,在 37°C 下温育 1 ~ 2 小时进行免疫反应;此时,结合在金纳米粒子上的甲胎蛋白抗体和吸附到醛基化 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料上的甲胎蛋白抗原发生免疫反应;

[0016] (f) 将上述步骤免疫反应后的溶液进行拉曼光谱检测,得到一系列已知浓度的甲胎蛋白抗原的拉曼图谱,以甲胎蛋白抗原浓度的对数值为横坐标,以对应的 1078cm^{-1} 位置处的拉曼强度值为纵坐标,绘制定量分析标准工作曲线;

[0017] (g) 将待测甲胎蛋白浓度的血清和步骤(c) 溶液等体积混合,在 37°C 下温育 1 ~ 2 小时;然后将步骤(a) 溶液和本步骤溶液等体积混合,在 37°C 下温育 1 ~ 2 小时,二者发生免疫反应;将免疫反应后溶液进行拉曼光谱检测,得到拉曼光谱图,读出此光谱在 1078cm^{-1} 位置处的拉曼强度值,将此拉曼强度值带入定量分析标准工作曲线,即可得到血清中甲胎蛋白的浓度。

[0018] 步骤(a) 的具体步骤如下:

[0019] 1) 金纳米粒子的制备;将 100mL、浓度为 10^{-3}mol/L 的 HAuCl_4 水溶液加热至沸腾,剧烈搅拌下迅速加入 9 ~ 10mL、浓度为 1wt% (0.0378mol/L) 的柠檬酸钠水溶液;保持沸腾状态,继续搅拌反应 10 ~ 20min,自然冷却至室温,从而得到浓度为 0.025mol/L 的金纳米粒子。紫外吸收光谱显示,该方法制备的金纳米粒子的共振吸收峰位于 518nm。用透射电子显微镜观察溶胶形貌,其平均粒子半径约 15 ~ 20nm 的球形粒子。

[0020] 2) 染料分子 MBA 标记的金纳米粒子的制备;取 15 ~ 20mL 上述步骤制备的金纳米粒子,加入 $100\mu\text{L}$ MBA (10^{-3}mol/L) 的乙醇溶液,搅拌反应 10 ~ 12h。MBA 通过巯基吸附在金纳米粒子表面。通过对金纳米粒子表面积和 MBA 分子体积粗略计算可知,MBA 加入量远远小于完全包裹金纳米粒子表面的量,为抗体吸附保留一定空位。为防止微量游离的 MBA 分子干扰,将溶胶离心(10000 转/分,离心 10 ~ 15 分钟)清洗两次,用 PBS 缓冲溶液($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 150mM, $\text{pH}=7.4 \sim 7.6$)重悬浮。重悬浮后的金纳米粒子的浓度基本不变,仍为 0.025mol/L (因为离心转速较大,基本所有的金纳米粒子均被离心到底部,所以金纳米粒子在离心过程损失很少。同时,在重悬浮时,悬浮体积和离心前一致。所以,重悬浮后的金纳米粒子的浓度基本保持不变)。

[0021] 3) 与甲胎蛋白抗体结合 ; 取 MBA 标记的金纳米粒子溶液 15 ~ 20mL, 向此溶液中加入 200 ~ 300uL、100ug/mL 的甲胎蛋白抗体, 充分混合后 37℃ 下反应 1 ~ 2h, 然后离心、重悬浮后除去未反应的甲胎蛋白抗体(离心、重悬浮过程同上), 甲胎蛋白抗体分子通过氢键等相互作用吸附在金纳米粒子表面。所述甲胎蛋白抗体可为鼠抗人甲胎蛋白抗体、兔抗人甲胎蛋白抗体。

[0022] 4) BSA (牛血清白蛋白) 封闭 ; 将 BSA (10uL, 1% m/m) 的 PBS 溶液加入到步骤 3) 溶液中, 37℃ 下反应 1 ~ 2h, 使金纳米粒子表面空位被 BSA 占据, 在 4℃ 保存备用。

[0023] 步骤(b) 的步骤具体如下 :

[0024] Fe_3O_4 磁性纳米粒子的制备 : 将 1.60 ~ 1.65g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 4.30 ~ 4.35g 无水醋酸钠溶解在 50 ~ 60mL 乙二醇中, 搅拌使其充分溶解 ; 然后装入反应釜中, 在 200 ~ 220℃ 条件下反应 8 ~ 10 小时后取出 ; 倒掉上层清液, 下层的磁性纳米粒子用乙醇和水分别洗涤 5 ~ 8 次, 60 ~ 80℃ 真空干燥 6 ~ 10 小时 ;

[0025] SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料的制备 : 称取 30mg 上述步骤得到的 Fe_3O_4 磁性纳米粒子超声分散到 10mL、0.1mol/L 盐酸溶液中, 保持 10 ~ 20 分钟 ; 然后在磁铁的吸附下进行磁性分离, 再经水和乙醇分别洗涤 3 ~ 5 次, 将得到的磁性纳米粒子再分散到 120 ~ 130mL 无水乙醇中, 最后加入到 1.0 ~ 1.2mL、28%(wt%) 的氨水和 1.10mL 正硅酸乙酯中, 电动搅拌 10 ~ 12 个小时, 乙醇洗涤 3 ~ 5 次 ;

[0026] 步骤(c) 的步骤具体如下 :

[0027] 将上述制备的 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料分散到 30mL、1wt% 的 APTMS (3- 氨丙基三甲氧基硅烷) 乙醇溶液中, 电动搅拌 20 ~ 24 小时后分离洗涤, 再将其分散到 30mL、2.5wt% 戊二醛的水溶液中, 搅拌过夜, 得到醛基化的 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料, 然后分散到 30mL PBS 缓冲溶液中, 最终浓度约为 $4 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 。

[0028] 步骤(d) 的步骤具体如下 :

[0029] 将甲胎蛋白抗原溶解在 PBS 中, 得到不同浓度的甲胎蛋白抗原溶液, 将 100 μL 醛基化的 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料的 PBS 分散液与 100 μL 甲胎蛋白抗原的 PBS 溶液混合。在 37℃ 下温育 1 ~ 2 小时 ; 然后, 加入 100 μL 、1wt% 的 BSA, 在 37℃ 下温育 1 ~ 2 小时 ;

[0030] 步骤(e) 的步骤具体如下 :

[0031] 将 100 μL 步骤(a) 得到的溶液和 100 μL 步骤(d) 得到的溶液混合, 在 37℃ 下温育 1 ~ 2 小时。此时, 金探针上的甲胎蛋白抗体和吸附到 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料上的甲胎蛋白抗原发生免疫反应。

[0032] 步骤(f) 的步骤具体如下 :

[0033] 取上述步骤(e) 反应后的溶液, 滴于铝坩埚中, 利用拉曼仪器“ARAMIS”检测, 得到待测蛋白质的拉曼图谱。以甲胎蛋白抗原浓度的对数值为横坐标, 以对应的 1078cm^{-1} 位置处的拉曼强度值为纵坐标, 绘制定量分析标准工作曲线。

[0034] 步骤(g) 的步骤具体如下 :

[0035] 取 100 μL 醛基化的 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料的 PBS 分散液与 100 μL 待测甲胎蛋白浓度的血清混合, 在 37℃ 下温育 1 ~ 2 小时 ; 然后, 加入 100 μL 、1wt% BSA 在 37℃ 下温育 1 ~ 2 小时 ; 此时, 血清中的甲胎蛋白抗原吸附到醛基化的 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复

合材料上。

[0036] 将 100 μL 上述溶液和 100 μL 步骤(a)得到的溶液混合,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 1 ~ 2 小时。取混合溶液进行拉曼检测,得到拉曼光谱图,读出此光谱在 1078 cm^{-1} 位置处的拉曼强度值,将此拉曼强度值带入定量分析标准工作曲线,即可得到血清中甲胎蛋白的浓度。

附图说明

[0037] 图 1 : SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料的透射电镜图 ;

[0038] 图 2 :金 - 对巯基苯甲酸,对巯基苯甲酸固体的拉曼曲线 ;

[0039] 图 3 :不同浓度的甲胎蛋白抗原,所得到的 SERS 谱图 ;

[0040] 图 4 :1078 cm^{-1} 处的峰强随甲胎蛋白抗原浓度变化的定量分析关系曲线。

[0041] 图 1 为所得到的 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料的透射电镜图,可以看出此复合材料的尺寸大约为 150nm 左右。

[0042] 图 2 上下两条曲线分别代表金纳米粒子吸附了对巯基苯甲酸后的 SERS 曲线和对巯基苯甲酸的固体拉曼图。可以看出,当金纳米粒子吸附了对巯基苯甲酸后, SERS 信号产生了很大的增强,有助于后续吸附步骤中, SERS 信号的检测。

[0043] 图 3 为吸附到 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料上的不同浓度的甲胎蛋白抗原和吸附到金探针上的甲胎蛋白抗体发生免疫反应后,进行拉曼测试,得到的一系列不同浓度甲胎蛋白抗原下的 SERS 谱图。从图中看出,随着甲胎蛋白抗原浓度的降低, SERS 信号明显降低。当甲胎蛋白抗原浓度低于 100 pg/ml 时,检测不到 SERS 信号。这说明,此方法对甲胎蛋白的检测限可以达到 100 pg/ml 。

[0044] 图 4,对图 3 中的 SERS 谱图,以 1078 cm^{-1} 处的峰强为基准,所建立的甲胎蛋白定量分析曲线。根据此定量分析曲线,实现对甲胎蛋白的间接定量分析。

具体实施方式

[0045] 实施例 1 :甲胎蛋白的 SERS 免疫检测

[0046] 主要包含以下步骤 :

[0047] (a) 制备 P- 巯基苯甲酸 (MBA) 分子修饰的金纳米粒子溶液,然后与甲胎蛋白抗体结合,之后用 BSA 试剂进行封闭 ;

[0048] (b) 制备 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料 ;

[0049] (c) 制备醛基化的 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料,并配制成 PBS 分散液 ;

[0050] (d) 用 PBS 配制不同浓度的甲胎蛋白抗原溶液,并分别与此醛基化的 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料等体积混合,之后用等体积的 BSA 试剂进行封闭 ;

[0051] (e) 金纳米粒子上的甲胎蛋白抗原和 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料上的甲胎蛋白抗体发生免疫反应,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1.5 小时 ;

[0052] (f) 进行拉曼光谱检测,得到拉曼图谱。以甲胎蛋白抗原浓度的对数值为横坐标,以对应的 1078 cm^{-1} 位置处的拉曼强度值为纵坐标,绘制定量分析标准工作曲线 ;

[0053] (g) 将待测甲胎蛋白浓度的血清和步骤 (c) 溶液等体积混合,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1.5 小时,然后将步骤 (a) 溶液和本步骤溶液等体积混合,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 1.5 小时,二者发生免疫反应 ;将免疫反应后溶液进行拉曼光谱检测,得到拉曼光谱图,读出此光谱在 1078 cm^{-1} 位置

处的拉曼强度值,将此拉曼强度值带入定量分析标准工作曲线,即可得到血清中甲胎蛋白的浓度。

[0054] 步骤(a)所述的步骤具体如下:

[0055] 1) 金纳米粒子的制备;将 100mL、浓度为 10^{-3}mol/L 的 HAuCl_4 水溶液加热至沸腾,剧烈搅拌下迅速加入 10mL、浓度为 1wt% (0.0378mol/L) 的柠檬酸钠水溶液。保持沸腾状态,继续搅拌反应 15min 后,自然冷却至室温,从而得到浓度为 0.025mol/L 的金纳米粒子。紫外吸收光谱显示,该方法制备的金纳米粒子的共振吸收峰位于 518nm。用透射电子显微镜观察溶胶形貌,其平均粒子半径约 20nm 的球形粒子。

[0056] 2) 染料分子 MBA 标记金纳米粒子的制备;取 18mL 上述制备的金纳米粒子,加入 $100\mu\text{L}$ MBA (10^{-3}mol/L) 的乙醇溶液,搅拌反应 12h。MBA 通过巯基吸附在金纳米粒子的表面。对金纳米粒子表面积和 MBA 分子体积粗略计算可知 MBA 加入量远远小于完全包裹金纳米粒子表面的量,为抗体吸附保留一定空位。为防止微量游离的 MBA 分子干扰,将反应溶液离心 (10000 转/分 , 离心 10 分钟)清洗两次,用 PBS 缓冲溶液 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 150mM , $\text{pH}=7.6$) 等体积重悬浮。

[0057] 3) MBA 标记的金纳米粒子吸附甲胎蛋白抗体;向 20mL MBA 标记的金纳米粒子溶液中加入 200 μL 甲胎蛋白抗体。充分混合后 37°C 下反应 1.5h,然后离心除去未反应的甲胎蛋白抗体。抗体分子通过氢键等相互作用吸附在金纳米粒子的表面。

[0058] 4) BSA (牛血清白蛋白) 封闭;将 BSA ($10\mu\text{L}$, 1%/m) 的 PBS 溶液加入到上述 3) 溶液中, 37°C 下反应 1.5h,然后在 4°C 保存备用。

[0059] 步骤(b)“制备 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料”所述的步骤具体如下:

[0060] Fe_3O_4 磁性纳米粒子的制备:1.62g 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 4.32g 无水醋酸钠溶解在 60mL 乙二醇中,搅拌使其充分溶解,装入反应釜中, 200°C , 8 个小时后取出。倒掉上层清液,下层的磁性纳米粒子用乙醇和水分别洗涤 6 次, 60°C 真空干燥 6 个小时。

[0061] SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料的制备:称 30mg 上述处理完的 Fe_3O_4 纳米粒子,超声分散到 10mL, 0.1mol/L 盐酸溶液中,保持 10 分钟。然后取一块磁铁,在磁铁的吸附下磁性分离,再经水和乙醇分别洗涤 3 次,将得到的磁性纳米粒子分散到 126.6mL 无水乙醇中,加入 1.05mL、28%(wt%) 的氨水和 1.10mL 正硅酸乙酯中,电动搅拌 12 个小时,后乙醇洗涤 5 次。

[0062] 步骤(c)“ SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料的醛基化”所述的步骤具体如下:

[0063] 将所有上述步骤(b)得到的 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料分散到 1wt% 的 APTMS (3-氨丙基三甲氧基硅烷) 乙醇溶液中,电动搅拌 24 小时后分离洗涤后,再将其分散到含 2.5wt% 戊二醛水溶液中,搅拌过夜,得到经醛基化的 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料,分散到 30mL PBS 缓冲溶液中。最终的浓度 $4 \times 10^{-3}\text{mol/L}$ 。

[0064] 步骤(d)“已知浓度的甲胎蛋白抗原溶液吸附到此醛基化的 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 磁性复合材料上”所述的步骤具体如下:

[0065] 将 100 μL 步骤(c)的溶液分别与 100 μL 已知浓度 ($100\mu\text{g/L}$ 、 $10\mu\text{g/L}$ 、 $1\mu\text{g/L}$ 、 100pg/L 、 10pg/L 、 1pg/L) 的甲胎蛋白抗原的 PBS 溶液混合,在 37°C 下温育 1.5 小时。然后,加入 100 μL 、1wt% 的 BSA 试剂在 37°C 下温育 1.5 小时。

[0066] 步骤(e)“修饰了甲胎蛋白抗体的金纳米粒子和修饰了甲胎蛋白抗原的 SiO_2 包覆

的 Fe_3O_4 磁性复合材料发生免疫反应”所述的步骤具体如下：

[0067] 100 μL 溶液(a)和 100 μL 溶液(d)混合,在 37℃下温育 1.5 小时。

[0068] 步骤(f)“进行拉曼光谱检测”所述的步骤具体如下：

[0069] 取 20 μL (e) 反应后的溶液,滴于铝坩埚中,利用拉曼仪器“ARAMIS”检测,得到待测蛋白质的拉曼图谱。

[0070] 步骤(g)“血清中的甲胎蛋白抗原做同样的拉曼测试”所述的步骤具体如下：

[0071] 取 100 μL 待测甲胎蛋白浓度的血清和 100 μL 步骤(c) 溶液等体积混合,在 37℃下温育 1.5 小时。然后,加入 100 μL 、1wt% 的 BSA 试剂,在 37℃下温育 1.5 小时。之后取 100 μL 此溶液和 100 μL 溶液(a)混合,在 37℃下温育 1.5 小时,二者发生免疫反应。进行拉曼光谱检测,得到拉曼光谱图,读出此光谱在 1078cm^{-1} 位置处的拉曼强度值,将此拉曼强度值带入定量分析标准工作曲线,即可得到血清中甲胎蛋白的浓度。将其对比已知的浓度值测得平均回收率为 98.7%。

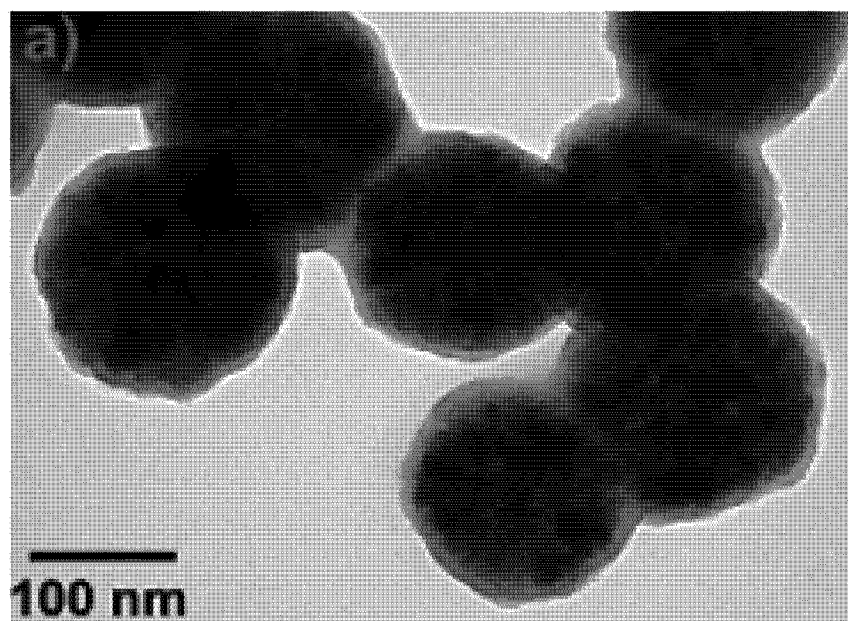


图 1

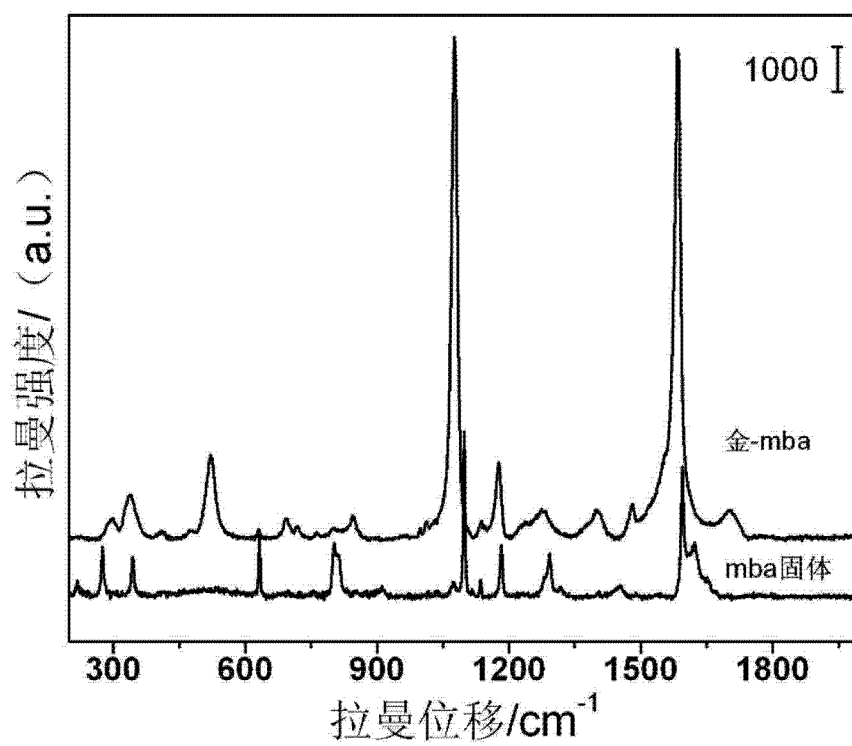


图 2

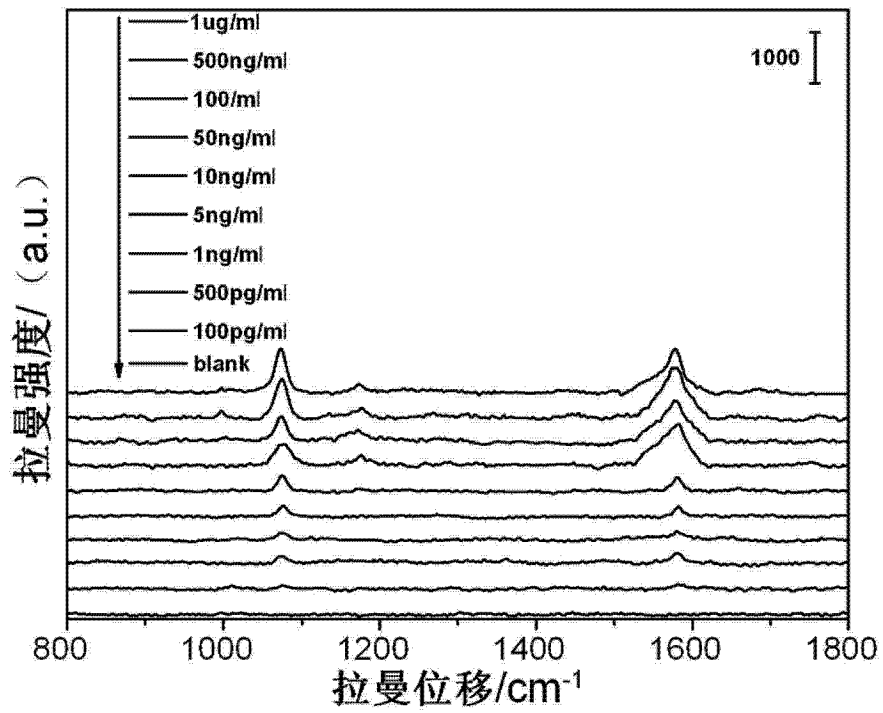


图 3

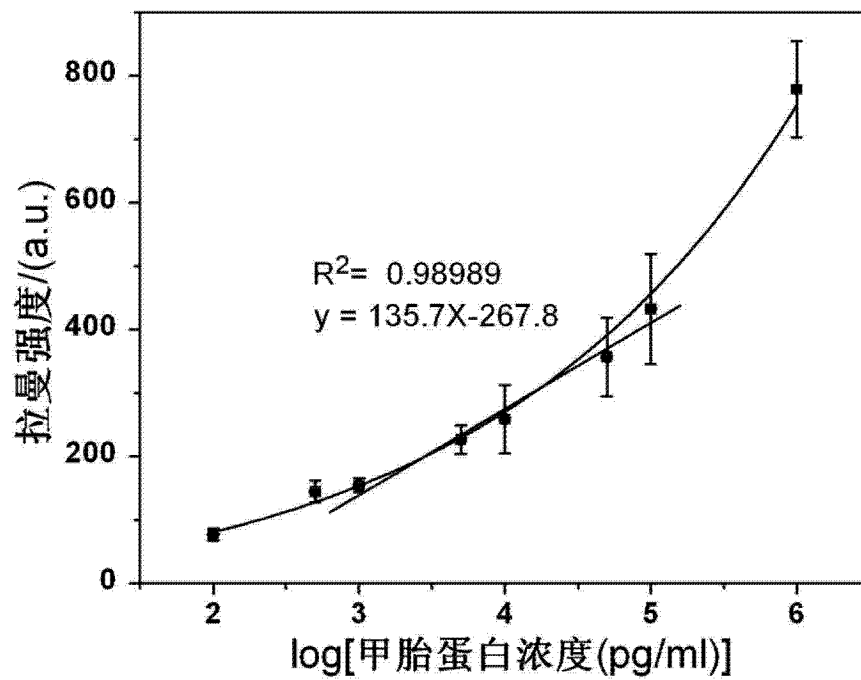


图 4

专利名称(译)	基于探针标记免疫金-磁性复合材料检测甲胎蛋白的SERS方法		
公开(公告)号	CN103411948A	公开(公告)日	2013-11-27
申请号	CN201310254265.X	申请日	2013-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	王旭 王爱敬 赵冰 宋薇 阮伟东 陈雷		
发明人	王旭 王爱敬 赵冰 宋薇 阮伟东 陈雷		
IPC分类号	G01N21/65 G01N33/68 G01N33/531		
代理人(译)	张景林 王恩远		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种基于探针标记免疫金-磁性复合材料检测甲胎蛋白的SERS方法，属于蛋白质分析检测技术领域。包括P-巯基苯甲酸(MBA)分子修饰的金纳米粒子与甲胎蛋白抗体结合、制备表面功能化的Fe₃O₄SiO₂磁性复合材料、血清中的甲胎蛋白吸附到此功能化的Fe₃O₄SiO₂磁性复合材料上、免疫金探针和修饰了甲胎蛋白抗原的Fe₃O₄SiO₂磁性复合材料发生免疫反应；进行拉曼光谱检测等步骤；将得到的待测蛋白质的拉曼图谱特征峰的拉曼强度值代入“拉曼强度与甲胎蛋白抗原浓度工作曲线”，即可测得甲胎蛋白的浓度。此方法具有超灵敏性，高选择性和检测条件温和等优点，在临床分析诊断中具有非常重要的意义。

