



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103116019 B

(45) 授权公告日 2015. 03. 18

(21) 申请号 201310015549. 3

(22) 申请日 2013. 01. 16

(73) 专利权人 宁波大学

地址 315211 浙江省宁波市江北区风华路
818 号

(72) 发明人 周骏 束磊 马亚楠 王彬彬
赖魏 张琪 颜承恩

(74) 专利代理机构 宁波奥圣专利代理事务所
(普通合伙) 33226

代理人 周珏

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 21/65(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1444045 A, 2003. 09. 24,

WO 2006065762 A2, 2006. 06. 22,

CN 102253027 A, 2011. 11. 23,

CN 101676711 A, 2010. 03. 24,

CN 101294904 A, 2008. 10. 29,

CN 102072931 A, 2011. 05. 25,

CN 102156119 A, 2011. 08. 17,

CN 101775594 A, 2010. 07. 14,

审查员 肖吉

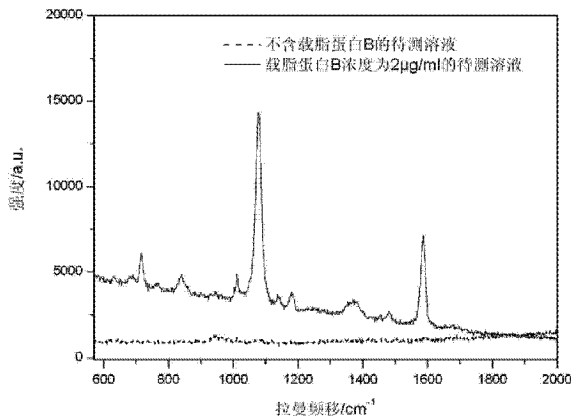
权利要求书3页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

一种免疫基底的制备方法及抗原或抗体的免疫检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种免疫基底的制备方法及抗原或抗体的免疫检测方法,该免疫基底制备方法利用金或银纳米粒子修饰硅片,再在金或银纳米粒子表面修饰抗体/抗原,用于捕获待测抗原/抗体;该抗原或抗体的免疫检测方法应用上述免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底以及金或银纳米粒子免疫探针,通过抗原-抗体的免疫复合反应,形成免疫基底-抗原/抗体-免疫探针三层夹心结构,利用金或银纳米粒子的表面增强拉曼散射效应,检测免疫探针表面拉曼标记物的特征指纹谱实现待测抗原/抗体检测,该方法能够大大提高免疫检测的灵敏度,而且可进行高通量的多抗原或多抗体检测。



1. 一种免疫基底的制备方法,其特征包括以下步骤:

①-1、将单面抛光的硅片浸入有机溶剂中,并对硅片进行超声波清洗 20 ~ 40 分钟,然后用去离子水冲洗超声波清洗后的硅片,再对冲洗干净的硅片进行干燥处理;

①-2、在冰浴条件下,按体积比为 1:3 的比例,将质量百分比为 20% ~ 40% 的过氧化氢溶液缓慢加入到质量百分比为 80% ~ 98% 的浓硫酸溶液中,制备得到氧化剂溶液;

①-3、将经步骤①-1 清洗并干燥过的硅片浸入由步骤①-2 制备得到的氧化剂溶液中,在氧化剂溶液中反应 0.5 ~ 1 小时以去除硅片上的有机物,之后取出硅片,用去离子水冲洗硅片数次,然后对硅片进行干燥处理;

①-4、将经步骤①-3 处理后的硅片浸入质量百分比为 5% ~ 20% 的氢氟酸溶液中,在氢氟酸溶液中反应 0.5 ~ 1 小时后,立即取出硅片并浸入质量百分比为 1% ~ 3% 的硝酸银溶液或质量百分比为 0.05% ~ 2% 的氯金酸溶液中,缓慢搅拌 1 ~ 3 分钟,即得到银纳米粒子或金纳米粒子修饰的硅片,取出硅片进行干燥处理;

①-5、将用于进行抗原检测的抗体溶液或用于进行抗体检测的抗原溶液滴加到经步骤①-4 处理后得到的银纳米粒子或金纳米粒子修饰的硅片的抛光面上,并在温度为 2 ~ 8℃、湿度为 40 ~ 80% 的条件下静置 10 ~ 12 小时,之后依次用三羟甲基氨基甲烷缓冲液和去离子水冲洗硅片,以去除未吸附到银纳米粒子或金纳米粒子上的抗体或抗原,最后对吸附有抗体或抗原的银纳米粒子或金纳米粒子修饰的硅片进行干燥处理;

①-6、在经步骤①-5 处理后的硅片的抛光面上,滴加与步骤①-5 中滴加的抗体溶液或抗原溶液相同体积的牛血清白蛋白溶液,在室温下反应 2 ~ 4 小时,之后依次用含有 0.05% Tween 20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液和去离子水对硅片进行冲洗,以去除未吸附到银纳米粒子或金纳米粒子上的牛血清白蛋白,再对硅片进行干燥处理,制备得到具有特异性选择功能的免疫基底。

2. 根据权利要求 1 所述的一种免疫基底的制备方法,其特征包括所述的步骤①-1 中的有机溶剂为丙酮或酒精或甲苯。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种免疫基底的制备方法,其特征包括所述的步骤①-5 中所滴加的抗体溶液为一种抗体的溶液或为多种抗体的混合溶液,所滴加的抗体溶液的浓度为 1 ~ 3mg/ml;或所滴加的抗原溶液为一种抗原的溶液或为多种抗原的混合溶液,所滴加的抗原溶液的浓度为 1 ~ 3mg/ml。

4. 根据权利要求 3 所述的一种免疫基底的制备方法,其特征包括所述的步骤①-5 中所滴加的抗体溶液的种类由待检测的抗原决定;或所滴加的抗原溶液的种类由待检测的抗体决定。

5. 根据权利要求 4 所述的一种免疫基底的制备方法,其特征包括所述的步骤①-5 中所滴加的抗体溶液的体积由所选用的硅片的抛光面的大小决定;或所滴加的抗原溶液的体积由所选用的硅片的抛光面的大小决定。

6. 根据权利要求 5 所述的一种免疫基底的制备方法,其特征包括所述的步骤①-6 中所滴加的牛血清白蛋白溶液的质量百分比为 2 ~ 4%。

7. 一种利用权利要求 1 所述的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底实现抗原或抗体的免疫检测方法,其特征包括以下步骤:

②-1、制备免疫探针溶液,其中免疫探针溶液中的免疫探针的表面所吸附的抗体或抗

原的种类与权利要求 1 所述的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底上所吸附的抗体或抗原的种类相同；

②-2、将待测抗原溶液或待测抗体溶液滴加到利用权利要求 1 所述的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底的吸附有抗体或抗原的表面上，在温度为 30 ~ 38℃ 的条件下反应 2 小时；之后依次用含有 0.05% Tween 20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液和去离子水对免疫基底进行冲洗，以去除未与免疫基底上的抗体或抗原发生免疫复合反应的抗原或抗体，再对免疫基底进行干燥处理；

②-3、在经步骤②-2 处理后得到的免疫基底的吸附有待测抗原或待测抗体的表面上，滴加与步骤②-2 中所滴加的待测抗原溶液或待测抗体溶液相同体积的免疫探针溶液，在温度为 4℃ 的恒温条件下反应 1.5 ~ 3 小时；之后依次用含有 0.05% Tween 20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液和去离子水对免疫基底进行冲洗，以去除未与免疫基底上所固定的待测抗原或待测抗体发生免疫复合反应的免疫探针，再对免疫基底进行干燥处理；

②-4、利用拉曼光谱仪对经步骤②-3 处理后得到的免疫基底进行光谱测量，如果步骤②-2 中所滴加的待测抗原溶液中的抗原与权利要求 1 所述的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底上的抗体以及免疫探针中的抗体发生免疫复合反应，则能够检测到免疫探针中的拉曼标记物的特征指纹谱；或如果步骤②-2 中所滴加的待测抗体溶液中的抗体与权利要求 1 所述的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底上的抗原以及免疫探针中的抗原发生免疫复合反应，则能够检测到免疫探针中的拉曼标记物的特征指纹谱。

8. 根据权利要求 7 所述的一种抗原或抗体的免疫检测方法，其特征在于所述的步骤②-1 中免疫探针溶液的制备过程为：

a、制备粒径大小为 15 ~ 70nm 的银纳米粒子溶液或金纳米粒子溶液；

b、取 1 ~ 3ml 的银纳米粒子溶液或金纳米粒子溶液，并滴入到离心管中，然后将装有银纳米粒子溶液或金纳米粒子溶液的离心管置放于高速离心机中，以 8000 ~ 12000 rpm 的转速离心 10 ~ 30 分钟；之后去除离心管中的上层清液，再将沉积物溶于相同体积的去离子水中；

c、向步骤 b 处理后得到的溶液中加入 2 ~ 10 μ l 且浓度为 1 ~ 5mM 的拉曼标记物溶液，在室温条件下放置 1 ~ 12 小时后，以 8000 ~ 12000rpm 的转速离心 30 分钟，之后去除离心管中的上层清液，再将沉积物溶于 1 ~ 3ml 的磷酸盐缓冲溶液或硼酸盐缓冲溶液中；

d、在缓慢搅拌的情况下，向经步骤 c 处理后得到的溶液中，加入 15 ~ 30 μ l 且浓度为 1 ~ 3mg/ml 的抗体溶液或抗原溶液，在 4℃ 恒温下反应 1 ~ 1.5 小时后，以 8000 ~ 12000 rpm 的转速离心 10 ~ 30 分钟，以去除未吸附在银纳米粒子或金纳米粒子上的抗体或抗原，之后去除离心管中的上层清液，再在超声波振荡环境下，将离心管中的沉积物溶于 1 ~ 3ml 的磷酸盐缓冲溶液或硼酸盐缓冲溶液中；在此，要求加入的抗体溶液中的抗体与权利要求 1 所述的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底上所吸附的抗体的种类相同，或要求加入的抗原溶液中的抗原与权利要求 1 所述的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底上所吸附的抗原的种类相同；

e、在缓慢搅拌的情况下，向步骤 d 处理后得到的溶液中，加入 10 ~ 20 μ l 的牛血清白蛋白溶液，在室温条件下静置 1 ~ 1.5 小时后，以 8000 ~ 12000 rpm 的转速离心 10 ~ 30

分钟,之后去除离心管中的上层清液,再在超声波振荡环境下,将离心管中的沉积物溶于 0.5 ~ 3ml 的磷酸盐缓冲溶液或硼酸盐缓冲溶液中,制备得到具有特异性选择功能的免疫探针溶液。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的一种抗原或抗体的免疫检测方法,其特征在于所述的步骤②-2 中所滴加的待测抗原溶液的体积由权利要求 1 所述的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底的吸附有抗体或抗原的表面的大小决定;或所滴加的待测抗体溶液的体积由权利要求 1 所述的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底的吸附有抗体或抗原的表面的大小决定。

10. 根据权利要求 8 所述的一种抗原或抗体的免疫检测方法,其特征在于所述的步骤 c 中拉曼标记物溶液中的拉曼标记物为四巯基苯甲酸、或为异硫氰酸罗丹明 B、或为对巯基苯胺、或为对巯基吡啶;所述的步骤 e 中所加入的牛血清白蛋白溶液的质量百分比为 2 ~ 4%。

一种免疫基底的制备方法及其抗原或抗体的免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种拉曼光谱检测技术,尤其是涉及一种免疫基底的制备方法及其抗原或抗体的免疫检测方法。

背景技术

[0002] 拉曼散射是光子的非弹性散射,由分子振动或转动能级跃迁产生。利用拉曼散射光谱技术可以在分子水平分析生物组织、细胞的物质组成及含量变化。由于拉曼散射光谱技术具有快速、无损、灵敏度高等特点,因此被广泛地应用于生命科学、生化材料以及药物的检测和分析。然而,通常情况下拉曼信号较弱,不能满足高灵敏度检测分析的要求。1974年, Fleischmann 等人首次从电化学池中银电极表面单分子层吡啶吸附物的拉曼散射实验中发现了表面增强拉曼散射(Surface-Enhanced Raman scattering, SERS)现象,为拉曼散射光谱技术的应用开辟了新的途径,特别适用于吸附在贵金属纳米粒子表面化合物分子的检测和分析。另一方面,金属(金或银)纳米粒子除了具有小尺寸效应、表面效应和宏观量子隧道效应等特性,还具有良好的生物相容性,适合作为载体使生物分子(如抗原或抗体)和荧光染料分子作为拉曼标记物吸附在金属(金或银)纳米粒子表面制备成免疫探针,使得拉曼标记物的拉曼信号能够被放大 $10^{12} \sim 10^{15}$ 倍,弥补了通常情况下拉曼信号较弱的缺点,满足了生物医学上免疫检测和分析的高灵敏度要求。

[0003] 目前,抗原与抗体的检测方法主要有:放射免疫检测法、酶联免疫检测法、荧光免疫检测法和表面增强拉曼散射(SERS)免疫检测法等,这些方法各有特点,例如:放射免疫分析法和荧光免疫分析法的检测灵敏度较高,但放射性物质的放射辐射和污染、传统荧光团的发射谱线较宽(半峰全宽(FWHM)约为 $50 \sim 100\text{nm}$)以及易于光降解等问题限制了放射免疫分析法与荧光免疫法的应用;酶联免疫分析法具有高通量检测的功能,但不适用于超灵敏检测;表面增强拉曼散射(SERS)免疫检测法,灵敏度高,光谱谱线窄,适用于高通量无损检测分析,但是利用SERS效应进行免疫检测,需要良好的SERS基底。尽管通过光刻、电子束刻蚀、反应离子刻蚀、纳米压印等微纳加工技术可以制备出精度高、形貌复杂的SERS基底,但是所采用的微纳加工设备构造复杂、费用昂贵,且制作过程耗时长、成本高、制备得到的基底面积小并不易大规模量产。而利用化学方法合成金属(金和银)纳米粒子作为SERS基底,相对容易,但是金属纳米粒子处于溶液相,在检测过程中,纳米粒子很容易随机聚集,且很难控制,得到的SERS信号的稳定性和可重复性较差。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的第一个技术问题是提供一种工艺过程简单、成本低且耗时少的免疫基底的制备方法。

[0005] 本发明所要解决的另一个技术问题是利用第一个技术问题中的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底实现抗原或抗体免疫检测的方法,该方法能够有效地提高抗原或抗体检测分析的灵敏度和稳定性,能够实现高通量多抗原或多抗体检测。

[0006] 本发明解决上述第一个技术问题所采用的技术方案为：一种免疫基底的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

[0007] ①-1、将单面抛光的硅片浸入有机溶剂中，并对硅片进行超声波清洗 20 ~ 40 分钟，然后用去离子水冲洗超声波清洗后的硅片，再对冲洗干净的硅片进行干燥处理；

[0008] ①-2、在冰浴条件下，按体积比为 1:3 的比例，将质量百分比为 20% ~ 40% 的过氧化氢溶液缓慢加入到质量百分比为 80% ~ 98% 的浓硫酸溶液中，制备得到氧化剂溶液；

[0009] ①-3、将经步骤①-1 清洗并干燥过的硅片浸入由步骤①-2 制备得到的氧化剂溶液中，在氧化剂溶液中反应 0.5 ~ 1 小时以去除硅片上的有机物，之后取出硅片，用去离子水冲洗硅片数次，然后对硅片进行干燥处理；

[0010] ①-4、将经步骤①-3 处理后的硅片浸入质量百分比为 5% ~ 20% 的氢氟酸溶液中，在氢氟酸溶液中反应 0.5 ~ 1 小时后，立即取出硅片并浸入质量百分比为 1% ~ 3% 的硝酸银溶液或质量百分比为 0.05% ~ 2% 的氯金酸溶液中，缓慢搅拌 1 ~ 3 分钟，即得到银纳米粒子或金纳米粒子修饰的硅片，取出硅片进行干燥处理；

[0011] ①-5、将用于进行抗原检测的抗体溶液或用于进行抗体检测的抗原溶液滴加到经步骤①-4 处理后得到的银纳米粒子或金纳米粒子修饰的硅片的抛光面上，并在温度为 2 ~ 8℃、湿度为 40 ~ 80% 的条件下静置 10 ~ 12 小时，之后依次用三羟甲基氨基甲烷缓冲液和去离子水冲洗硅片，以去除未吸附到银纳米粒子或金纳米粒子上的抗体或抗原，最后对吸附有抗体或抗原的银纳米粒子或金纳米粒子修饰的硅片进行干燥处理；

[0012] ①-6、在经步骤①-5 处理后的硅片的抛光面上，滴加与步骤①-5 中滴加的抗体溶液或抗原溶液相同体积的牛血清白蛋白溶液，在室温下反应 2 ~ 4 小时，之后依次用含有 0.05% Tween 20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液和去离子水对硅片进行冲洗，以去除未吸附到银纳米粒子或金纳米粒子上的牛血清白蛋白，再对硅片进行干燥处理，制备得到具有特异性选择功能的免疫基底。

[0013] 所述的步骤①-1 中的有机溶剂为丙酮或酒精或甲苯。

[0014] 所述的步骤①-5 中所滴加的抗体溶液为一种抗体的溶液或为多种抗体的混合溶液，所滴加的抗体溶液的浓度为 1 ~ 3mg/ml；或所滴加的抗原溶液为一种抗原的溶液或为多种抗原的混合溶液，所滴加的抗原溶液的浓度为 1 ~ 3mg/ml。

[0015] 所述的步骤①-5 中所滴加的抗体溶液的种类由待检测的抗原决定；或所滴加的抗原溶液的种类由待检测的抗体决定。

[0016] 所述的步骤①-5 中所滴加的抗体溶液的体积由所选用的硅片的抛光面的大小决定；或所滴加的抗原溶液的体积由所选用的硅片的抛光面的大小决定。

[0017] 所述的步骤①-6 中所滴加的牛血清白蛋白溶液的质量百分比为 2 ~ 4%。

[0018] 本发明解决上述另一个技术问题所采用的技术方案为：一种利用上述的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底实现抗原或抗体的免疫检测方法，其特征在于包括以下步骤：

[0019] ②-1、制备免疫探针溶液，其中免疫探针溶液中的免疫探针的表面吸附的抗体或抗原的种类与上述第一个技术问题中所述的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底上所吸附的抗体或抗原的种类相同；

[0020] ②-2、将待测抗原溶液或待测抗体溶液滴加到利用上述第一个技术问题中所述的

免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底的吸附有抗体或抗原的表面上,在温度为 30 ~ 38℃的条件下反应 2 小时;之后依次用含有 0.05% Tween 20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液和去离子水对免疫基底进行冲洗,以去除未与免疫基底上的抗体或抗原发生免疫复合反应的抗原或抗体,再对免疫基底进行干燥处理;

[0021] ②-3、在经步骤②-2 处理后得到的免疫基底的吸附有待测抗原或待测抗体的表面上,滴加与步骤②-2 中所滴加的待测抗原溶液或待测抗体溶液相同体积的免疫探针溶液,在温度为 4℃的恒温条件下反应 1.5 ~ 3 小时;之后依次用含有 0.05% Tween 20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液和去离子水对免疫基底进行冲洗,以去除未与免疫基底上所固定的待测抗原或待测抗体发生免疫复合反应的免疫探针,再对免疫基底进行干燥处理;

[0022] ②-4、利用拉曼光谱仪对经步骤②-3 处理后得到的免疫基底进行光谱测量,如果步骤②-2 中所滴加的待测抗原溶液中的抗原与上述第一个技术问题中所述的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底上的抗体以及免疫探针中的抗体发生免疫复合反应,则能够检测到免疫探针中的拉曼标记物的特征指纹谱;或如果步骤②-2 中所滴加的待测抗体溶液中的抗体与上述第一个技术问题中所述的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底上的抗原以及免疫探针中的抗原发生免疫复合反应,则能够检测到免疫探针中的拉曼标记物的特征指纹谱。

[0023] 所述的步骤②-1 中免疫探针溶液的制备过程为:

[0024] a、制备粒径大小为 15 ~ 70nm 的银纳米粒子溶液或金纳米粒子溶液;

[0025] b、取 1 ~ 3ml 的银纳米粒子溶液或金纳米粒子溶液,并滴入到离心管中,然后将装有银纳米粒子溶液或金纳米粒子溶液的离心管置放于高速离心机中,以 8000 ~ 12000 rpm 的转速离心 10 ~ 30 分钟;之后去除离心管中的上层清液,再将沉积物溶于相同体积的去离子水中;

[0026] c、向步骤 b 处理后得到的溶液中加入 2 ~ 10 μ l 且浓度为 1 ~ 5mM 的拉曼标记物溶液,在室温条件下放置 1 ~ 12 小时后,以 8000 ~ 12000rpm 的转速离心 30 分钟,之后去除离心管中的上层清液,再将沉积物溶于 1 ~ 3ml 的磷酸盐缓冲溶液或硼酸盐缓冲溶液中;

[0027] d、在缓慢搅拌的情况下,向经步骤 c 处理后得到的溶液中,加入 15 ~ 30 μ l 且浓度为 1 ~ 3mg/ml 的抗体溶液或抗原溶液,在 4℃恒温下反应 1 ~ 1.5 小时后,以 8000 ~ 12000 rpm 的转速离心 10 ~ 30 分钟,以去除未吸附在银纳米粒子或金纳米粒子上的抗体或抗原,之后去除离心管中的上层清液,再在超声波振荡环境下,将离心管中的沉积物溶于 1 ~ 3ml 的磷酸盐缓冲溶液或硼酸盐缓冲溶液中;在此,要求加入的抗体溶液中的抗体的种类与上述第一个技术问题中所述的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底上所吸附的抗体的种类相同,或要求加入的抗原溶液中的抗原与上述第一个技术问题中所述的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底上所吸附的抗原的种类相同;

[0028] e、在缓慢搅拌的情况下,向步骤 d 处理后得到的溶液中,加入 10 ~ 20 μ l 的牛血清白蛋白溶液,在室温条件下静置 1 ~ 1.5 小时后,以 8000 ~ 12000 rpm 的转速离心 10 ~ 30 分钟,之后去除离心管中的上层清液,再在超声波振荡环境下,将离心管中的沉积物溶于 0.5 ~ 3ml 的磷酸盐缓冲溶液或硼酸盐缓冲溶液中,制备得到具有特异性选择功能的免疫探针溶液。

[0029] 所述的步骤②-2中所滴加的待测抗原溶液的体积由上述第一个技术问题中所述的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底的吸附有抗体或抗原的表面的大小决定；或所滴加的待测抗体溶液的体积由上述第一个技术问题中所述的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底的吸附有抗体或抗原的表面的大小决定。

[0030] 所述的步骤c中拉曼标记物溶液中的拉曼标记物为四巯基苯甲酸、或为异硫氰酸罗丹明B、或为对巯基苯胺、或为对巯基吡啶；所述的步骤e中所加入的牛血清白蛋白溶液的质量百分比为2~4%。

[0031] 与现有技术相比,本发明的优点在于:

[0032] 1) 本发明提出的免疫基底的制备方法,工艺过程简单、成本低、耗时少,易于高通量检测多种待测抗原或抗体；且可根据所需待检测的抗原或抗体的种类来制备相应的用于检测该种抗原或抗体的免疫基底。

[0033] 2) 在免疫基底的制备过程中,利用贵金属(金或银)纳米粒子修饰硅片,由于金属(金或银)纳米粒子具有良好的生物相容性,因此可使得免疫基底能很好地保持抗原或抗体的生物活性,同时硅片上修饰的贵金属(金或银)纳米粒子也具有极好的表面增强拉曼散射效应。

[0034] 3) 本发明提出的抗原或抗体的免疫检测方法,其利用贵金属(金或银)纳米粒子的表面增强拉曼散射效应来进行拉曼信号检测,不仅能够大大提高抗原或抗体检测分析的灵敏度,而且拉曼光谱带宽很窄,可用于高通量多抗原或抗体检测；另一方面,拉曼信号检测过程是在固态的免疫基底上进行的,因此避免了在溶液相情况下可能产生的信号不稳定和不可重复等问题。

[0035] 4) 在抗原或抗体的免疫检测过程中,所用免疫探针的制备过程简单、成本低、耗时少,与免疫基底相结合用来检测抗原或抗体,不仅灵敏度高,而且特异性好。

[0036] 5) 在免疫探针的制备过程中所用的金或银纳米粒子溶液是通过水相法制备得到的,因此金或银纳米粒子表面只有一层保护剂柠檬酸根离子,易被拉曼标记物以及牛血清白蛋白所取代,也不会对检测信号产生影响。

附图说明

[0037] 图1为利用银纳米粒子修饰的免疫基底与金纳米粒子免疫探针检测载脂蛋白B抗原时,四巯基苯甲酸(拉曼标记物)的拉曼光谱图；

[0038] 图2为利用金纳米粒子修饰的免疫基底与金纳米粒子免疫探针检测载脂蛋白B抗原时,四巯基苯甲酸(拉曼标记物)的拉曼光谱图；

[0039] 图3为利用银纳米粒子修饰的免疫基底与银纳米粒子免疫探针检测载脂蛋白B抗原时,四巯基苯甲酸(拉曼标记物)的拉曼光谱图；

[0040] 图4为利用金纳米粒子修饰的免疫基底与银纳米粒子免疫探针检测载脂蛋白B抗原时,四巯基苯甲酸(拉曼标记物)的拉曼光谱图。

具体实施方式

[0041] 以下结合实施例及其附图对本发明作进一步详细描述。

[0042] 实施例一：

- [0043] 本实施例提出的一种银纳米粒子修饰的免疫基底的制备方法,其包括以下步骤:
- [0044] ①-1、取边长为 5mm 的正方形的单面抛光的硅片,将其浸入有机溶剂中,并对硅片进行超声波清洗 30 分钟,然后用去离子水冲洗超声波清洗后的硅片,再对冲洗干净的硅片进行干燥处理。
- [0045] 在此,单面抛光的硅片也可以选用其他形状和大小硅片;有机溶剂可采用丙酮、酒精或甲苯等。
- [0046] ①-2、配制氧化剂溶液:在冰浴条件下,按体积比为 1:3 的比例,将质量百分比为 30% 的过氧化氢溶液缓慢加入到质量百分比为 98% 的浓硫酸溶液中,制备得到氧化剂溶液。例如,取 12ml 的质量百分比为 98% 的浓硫酸溶液注入玻璃烧杯中,然后将玻璃烧杯置于装有冰块与水的混合物的容器中,再取 4ml 的质量百分比为 30% 的过氧化氢溶液,缓慢滴加到浓硫酸溶液中,之后静置 10 分钟,即制备得到氧化剂溶液。
- [0047] ①-3、将经步骤①-1 清洗并干燥过的硅片浸入由步骤①-2 制备得到的氧化剂溶液中,在氧化剂溶液中反应 0.8 小时以去除硅片上的有机物,之后取出硅片,用去离子水冲洗硅片数次,然后对硅片进行干燥处理。
- [0048] ①-4、将经步骤①-3 处理后的硅片浸入质量百分比为 10% 的氢氟酸溶液中,在氢氟酸溶液中反应 0.8 小时后,立即取出硅片并浸入质量百分比为 2% 的硝酸银溶液中,缓慢搅拌 1 分钟后,即得到银纳米粒子修饰的硅片,取出硅片进行干燥处理。
- [0049] 在此步骤中,硅片在氢氟酸溶液中反应后,在硅片的抛光面上形成一层 Si-H 键,然后在硝酸银溶液中,硅片的抛光面上的 Si-H 键还原银离子,在硅片的抛光面上形成一层银纳米粒子。
- [0050] ①-5、将用于进行抗原检测的 $13\mu\text{l}$ 的浓度为 2mg/ml 的抗载脂蛋白 B 抗体溶液滴加到经步骤①-4 处理后得到的银纳米粒子修饰的硅片的抛光面上,并在温度为 4°C 、湿度为 65% 的条件下静置 12 小时,之后依次用三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBS)和去离子水冲洗硅片,以去除未吸附到银纳米粒子上的抗体,最后对吸附有抗体的银纳米粒子修饰的硅片进行干燥处理。
- [0051] 在此,所滴加的抗体溶液可以是其他种类的抗体溶液;或者滴加的抗体溶液是多种抗体的混合溶液,可以用于对多种抗原进行特异性选择。
- [0052] 在此,在银纳米粒子修饰的硅片上也可以滴加抗原溶液,用于进行抗体检测。
- [0053] 在此,所滴加的抗体溶液的种类由待检测的抗原决定;或所滴加的抗原溶液的种类由待检测的抗体决定。
- [0054] 在此,所滴加的抗体溶液或抗原溶液的体积由所用硅片的抛光面的大小决定,一般要求可涂满覆盖整个抛光面。
- [0055] ①-6、在经步骤①-5 处理后的硅片的抛光面上,滴加与步骤①-5 中滴加的抗载脂蛋白 B 抗体溶液相同体积的牛血清白蛋白(BSA)溶液,在室温下反应 3 小时,之后依次用含有 0.05% Tween 20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液和去离子水对硅片进行冲洗,以去除未吸附到银纳米粒子上的牛血清白蛋白,再对硅片进行干燥处理,制备得到对载脂蛋白 B 具有特异性选择功能的免疫基底。
- [0056] 在本实施例中,三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBS)的 PH 值为 7.6;含有 0.05% Tween 20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液的 PH 值为 8.0;牛血清白蛋白溶液的质量百分比为 3%,在具

体实施过程中,也可以用人血清白蛋白或脱脂奶粉制成的溶液替代牛血清白蛋白溶液;干燥处理在氩气或氮气的环境中进行。

[0057] 实施例二:

[0058] 本实施例提出了一种银纳米粒子修饰的免疫基底的制备方法,本实施例的银纳米粒子修饰的免疫基底的制备方法制备与实施例一给出的银纳米粒子修饰的免疫基底的制备方法的过程基本相同,不同之处仅在于本实施例所采用的氢氟酸的质量百分比为 5%,硝酸银溶液的质量百分比为 3%,硅片浸入到硝酸银溶液中的时间为 2 分钟。

[0059] 实施例三:

[0060] 本实施例提出了一种银纳米粒子修饰的免疫基底的制备方法,本实施例的银纳米粒子修饰的免疫基底的制备方法与实施例一给出的银纳米粒子修饰的免疫基底的制备方法的过程基本相同,不同之处仅在于本实施例所采用的氢氟酸的质量百分比为 15%,硝酸银溶液的质量百分比为 1%,硅片浸入到硝酸银溶液中的时间为 3 分钟。

[0061] 实施例四:

[0062] 本实施例提出了一种金纳米粒子修饰的免疫基底的制备方法,本实施例的金纳米粒子修饰的免疫基底的制备方法与实施例一给出的银纳米粒子修饰的免疫基底的制备方法的过程基本相同,不同之处仅在于本实施例是将实施例一步骤①-4 中质量百分比为 2% 的硝酸银溶液换成质量百分比为 0.5% 的氯金酸溶液,硅片浸入到氯金酸溶液中的时间为 3 分钟。

[0063] 实施例五:

[0064] 本实施例提出的一种金纳米粒子修饰的免疫基底的制备方法,其包括以下步骤:

[0065] ①-1、取边长为 10mm 的正方形的单面抛光的硅片,将其浸入有机溶剂中,并对硅片进行超声波清洗 40 分钟,然后用去离子水冲洗超声波清洗后的硅片,再对冲洗干净的硅片进行干燥处理。

[0066] ①-2、配制氧化剂溶液:在冰浴条件下,按体积比为 1:3 的比例,将质量百分比为 38% 的过氧化氢溶液缓慢加入到质量百分比为 90% 的浓硫酸溶液中,制备得到氧化剂溶液。

[0067] ①-3、将经步骤①-1 清洗并干燥过的硅片浸入由步骤①-2 制备得到的氧化剂溶液中,在氧化剂溶液中反应 1 小时以去除硅片上的有机物,之后取出硅片,用去离子水冲洗硅片数次,然后对硅片进行干燥处理。

[0068] ①-4、将经步骤①-3 处理后的硅片浸入质量百分比为 15% 的氢氟酸溶液中,在氢氟酸溶液中反应 0.5 小时后,立即取出硅片并浸入质量百分比为 1% 的氯金酸溶液中,缓慢搅拌 2 分钟后,即得到金纳米粒子修饰的硅片,取出硅片进行干燥处理。

[0069] 在此步骤中,硅片在氢氟酸溶液中反应后,在硅片的抛光面上形成一层 Si-H 键,然后在氯金酸溶液中,硅片的抛光面上的 Si-H 键还原金离子,在硅片的抛光面形成一层金纳米粒子。

[0070] ①-5、将用于进行抗原检测的 $60 \mu\text{l}$ 的浓度为 1mg/ml 的抗载脂蛋白 B 抗体溶液滴加到经步骤①-4 处理后得到的金纳米粒子修饰的硅片的抛光面上,并在温度为 8°C 、湿度为 80% 的条件下静置 11 小时,之后依次用三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBS)和去离子水冲洗硅片,以去除未吸附到金纳米粒子上的抗体,最后对吸附有抗体的金纳米粒子修饰的硅片进行干燥处理。

[0071] 在此,所滴加的抗体溶液可以是其他种类的抗体溶液;或者滴加的抗体溶液是多种抗体的混合溶液,可以用于对多种抗原进行特异性选择。

[0072] 在此,在金纳米粒子修饰的硅片上也可以滴加抗原溶液,用于进行抗体检测。

[0073] 在此,所滴加的抗体溶液或抗原溶液的种类由待检测的抗原或抗体决定。

[0074] 在此,所滴加的抗体溶液或抗原溶液的体积由所用硅片的抛光表面大小决定,要求可涂满覆盖整个抛光表面。

[0075] ①-6、在经步骤①-5处理后的硅片上,滴加与步骤①-5中滴加的载脂蛋白B抗体溶液相同体积的牛血清白蛋白(BSA)溶液,在室温下反应2.5小时,之后依次用含有0.05% Tween 20的三羟甲基氨基甲烷缓冲液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液(Tris缓冲液)和去离子水对硅片进行冲洗,以去除未吸附到金纳米粒子上的牛血清白蛋白,再对硅片进行干燥处理,制备得到对载脂蛋白B具有特异性选择功能的免疫基底。

[0076] 在本实施例中,三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBS)的PH值为7.6;含有0.05% Tween 20的三羟甲基氨基甲烷缓冲液的PH值为8.0;牛血清白蛋白溶液的质量百分比为3%,在具体实施过程中,也可以用人血清白蛋白或脱脂奶粉制成的溶液替代牛血清白蛋白溶液;干燥处理在氩气或氮气的环境中进行。

[0077] 实施例六:

[0078] 本实施例提出的一种金纳米粒子修饰的免疫基底的制备方法,其包括以下步骤:

[0079] ①-1、取边长为10mm的正方形的单面抛光的硅片,将其浸入有机溶剂中,燕对硅片进行超声波清洗30分钟,然后用去离子水冲洗超声波清洗后的硅片,再对冲洗干净的硅片进行干燥处理。

[0080] ①-2、配制氧化剂溶液:在冰浴条件下,按体积比为1:3的比例,将质量百分比为20%的过氧化氢溶液缓慢加入到质量百分比为80%的浓硫酸溶液中,制备得到氧化剂溶液。

[0081] 在此,氧化剂溶液的作用是去除基片表面的有机物。

[0082] ①-3、将经步骤①-1清洗并干燥过的硅片浸入由步骤①-2制备得到的氧化剂溶液中,在氧化剂溶液中反应1小时,之后取出硅片,用去离子水冲洗硅片数次,然后对硅片进行干燥处理。

[0083] ①-4、将经步骤①-3处理后的硅片浸入质量百分比为20%的氢氟酸溶液中,在氢氟酸溶液中反应1小时后,立即取出硅片并浸入质量百分比为2%的氯金酸溶液中,缓慢搅拌1分钟后,即得到金纳米粒子修饰的硅片,取出硅片进行干燥处理。

[0084] 在此步骤中,硅片在氢氟酸溶液中反应后,在硅片的抛光面上形成一层Si-H键,然后在氯金酸溶液中,硅片的抛光面上的Si-H键还原金离子,在硅片表面形成一层金纳米粒子。

[0085] ①-5、将用于进行抗原检测的60 μ l的浓度为3mg/ml的抗载脂蛋白B抗体溶液滴加到经步骤①-4处理后得到的金纳米粒子修饰的硅片的抛光面上,并在温度为6 $^{\circ}$ C、湿度为45%的条件下静置10小时,之后依次用三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBS)和去离子水冲洗硅片,以去除未吸附到金纳米粒子上的抗体,最后对吸附有抗体的金纳米粒子修饰的硅片进行干燥处理。

[0086] 在此,所滴加的抗体溶液可以是其他种类的抗体溶液;或者滴加的抗体溶液是多种抗体的混合溶液,可以用于对多种抗原进行特异性选择。

[0087] 在此,在金纳米粒子修饰的硅片上也可以滴加抗原溶液,用于进行抗体检测。

[0088] 在此,所滴加的抗体溶液或抗原溶液的种类由待检测的抗原或抗体决定。

[0089] 在此,所滴加的抗体溶液或抗原溶液的体积由所用硅片的抛光表面大小决定,要求可涂满覆盖整个抛光表面。

[0090] ①-6、在经过步骤①-5处理后的硅片上,滴加与步骤①-5中滴加的抗载脂蛋白B抗体溶液相同体积的牛血清白蛋白(BSA)溶液,在室温下反应3小时,之后依次用含有0.05% Tween 20的三羟甲基氨基甲烷缓冲液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液(Tris缓冲液)和去离子水对硅片进行冲洗,以去除未吸附到金纳米粒子上的牛血清白蛋白,再对硅片进行干燥处理,制备得到对载脂蛋白B具有特异性选择功能的免疫基底。

[0091] 在此,三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBS)的PH值可以为7.6;含有0.05% Tween 20的三羟甲基氨基甲烷缓冲液的PH值可以为8.0;牛血清白蛋白溶液的质量百分比可以为2%,牛血清白蛋白可以由人血清白蛋白或脱脂奶粉等替代;干燥处理在氩气或氮气的环境中进行。

[0092] 实施例七:

[0093] 本实施例为利用一种免疫基底的制备方法所制备得到的免疫基底实现抗原或抗体免疫检测的方法,其基本原理是:对于抗原检测,利用待测抗原与免疫基底表面抗体之间的免疫复合反应,将待测抗原吸附在免疫基底表面,再利用待测抗原与免疫探针表面的抗体之间的免疫复合反应,使免疫探针被吸附在免疫基底表面,形成免疫基底-抗原-免疫探针三层夹心结构,然后通过检测免疫探针表面吸附的拉曼标记物四巯基苯甲酸的特征指纹谱来检测待测抗原;在进行抗体检测时,先利用待测抗体与免疫基底表面抗原之间的免疫复合反应,将待测抗体吸附在免疫基底表面,再利用待测抗体与免疫探针表面的抗原之间发生免疫复合反应,使免疫探针被吸附在免疫基底表面,形成免疫基底-抗体-免疫探针三层夹心结构,通过检测免疫探针表面吸附的拉曼标记物四巯基苯甲酸的特征指纹谱来检测待测抗体。其具体包括以下步骤:

[0094] ②-1、制备含有与实施例一和实施例四给出的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底上所吸附的抗体(抗载脂蛋白B抗体)相同种类的抗体的免疫探针溶液;免疫探针溶液的具体制备过程如下:

[0095] a、制备金纳米粒子溶液,其具体制备过程如下:1)取0.01g的氯金酸粉末溶于2ml的去离子水中,然后稀释到200ml,得到200ml的质量百分比为0.01%的氯金酸溶液;2)然后利用水浴法对氯金酸溶液进行加热直至氯金酸溶液的温度达到100℃;3)取0.1g的柠檬酸钠粉末,溶于9.9ml的去离子水中,超声波振荡10分钟,配置成质量百分比为1%的柠檬酸钠溶液;4)在剧烈搅拌的条件下,向温度为100℃的氯金酸溶液中加入4ml的质量百分比为1%的柠檬酸钠溶液,持续搅拌并加热20分钟直至溶液变成酒红色后停止搅拌与加热,再将溶液置于室温下使其自然冷却,即得到金纳米粒子溶液。

[0096] b、取3ml的金纳米粒子溶液,滴入到离心管中,然后将装有金纳米粒子溶液的离心管置放于高速离心机中,以11000rpm的转速离心30分钟;之后去除离心管中的上层清液,再将离心管中的沉积物溶于相同体积的去离子水中。

[0097] 在此,所取的金纳米粒子溶液的量可为1ml或2ml等不同体积。

[0098] c、向步骤b处理后得到的溶液中加入8 μ l且浓度为1mM的拉曼标记物(四巯基苯

甲酸(4MBA))溶液,在室温条件下放置 12 小时后,进行离心处理,以 11000rpm 的转速离心 30 分钟,之后去除离心管中的上层清液,再将沉积物溶于 1ml 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中。

[0099] d、在缓慢搅拌的情况下,向经步骤 c 处理后得到的溶液中,加入 20 μ l 且浓度为 2mg/ml 的抗载脂蛋白 B 抗体溶液,在 4 $^{\circ}$ C 恒温下反应 1.5 小时,再离心处理,以 11000rpm 的转速离心 30 分钟,以去除未吸附在金属纳米粒子表面的载脂蛋白 B 抗体,之后去除离心管中的上层清液,再在超声波振荡环境下,将离心管中的沉积物溶于 1ml 的磷酸盐缓冲溶液中。

[0100] 在此,加入的抗体溶液的量可以控制在 15 ~ 30 μ l 范围内,浓度可控制在 1 ~ 3mg/ml 范围内;磷酸盐缓冲溶液的 PH 值可以为 7.0;磷酸盐缓冲溶液的量可控制在 1 ~ 3ml 范围内;磷酸盐缓冲溶液可由硼酸盐缓冲溶液替代,硼酸盐缓冲溶液的 PH 值可以为 9.2。

[0101] 在此,值得注意的是要求加入的抗体溶液中的抗体与实施例一和实施例四给出的免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底上所吸附的抗体的种类相同,如果免疫基底上所吸附的是抗原,则要求加入的抗原溶液中的抗原与免疫基底上所吸附的抗原的种类相同。

[0102] e、在缓慢搅拌的情况下,向步骤 d 处理后得到的溶液中,加入 10 μ l 的牛血清白蛋白(BSA)溶液,在室温条件下静置 1 小时,再进行离心处理,以 11000rpm 的转速离心 30 分钟;之后去除离心管中的上层清液,再在超声波振荡环境下,将离心管中的沉积物溶于 0.5ml 的磷酸盐缓冲溶液中,制备得到表面吸附有抗载脂蛋白 B 抗体和拉曼标记物四巯基苯甲酸的金纳米粒子免疫探针溶液。

[0103] 在此,牛血清白蛋白溶液的质量百分比可以为 3%;牛血清白蛋白溶液也可替换为人血清白蛋白溶液或脱水牛奶。

[0104] 在此,高速离心机的转速可设置为 8000 ~ 12000 rpm,时间可设置为 10 ~ 30 分钟。高转速情况下,时间设置可相应缩短。

[0105] 在此,拉曼标记物四巯基苯甲酸可以用异硫氰酸罗丹明 B、对巯基苯胺、对巯基吡啶等物质代替。

[0106] ②-2、分别将浓度为 2 μ g/ml 的载脂蛋白 B (待测抗原)溶液,滴加涂满覆盖到上述实施例一和实施例四制备得到的免疫基底上,在温度为 37 $^{\circ}$ C 的条件下反应 2 小时;之后依次用含有 0.05% Tween 20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液、Tris 缓冲液和去离子水对免疫基底进行冲洗,与免疫基底表面的抗载脂蛋白 B 抗体发生免疫复合反应的载脂蛋白 B 被保留在基底表面,而未与免疫基底表面的抗载脂蛋白 B 抗体发生免疫复合反应的载脂蛋白 B 被清洗掉,然后再对免疫基底进行干燥处理。

[0107] 在此,待测抗原载脂蛋白 B 溶液的浓度可以为任意浓度。

[0108] ②-3、取经步骤②-1 制备得到的免疫探针溶液,滴加涂满覆盖经步骤②-2 处理后得到的免疫基底上,在温度为 4 $^{\circ}$ C 的恒温条件下反应 2 小时;之后依次用含有 0.05% Tween 20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液、Tris 缓冲液和去离子水对免疫基底进行冲洗,与免疫基底表面的载脂蛋白 B 发生免疫复合反应的免疫探针被保留在基底表面,未与保留在免疫基底表面的抗原发生免疫复合反应的免疫探针被清洗掉,再对免疫基底进行干燥处理。

[0109] ②-4、利用现有的拉曼光谱仪(拉曼光谱仪的激光波长为 785nm、激光功率为 49.5mW)对步骤②-3 处理后得到的免疫基底进行拉曼光谱测量(测量时间为 10s),检测免疫探针中的拉曼标记物的特征指纹谱拉曼。

[0110] 在此,拉曼光谱仪的激光波长可以为 633 nm 或者 532nm 等,激光功率可以为 30mW 或 60mW 等,测量时间可以设为 5s 或 20s 等。

[0111] 在此,干燥处理在氩气或氮气的环境中进行。

[0112] 图 1 给出了利用实施例一制备得到的银纳米粒子修饰的免疫基底与本实施例制备得到的金纳米粒子免疫探针检测待测抗原(载脂蛋白 B)时,四巯基苯甲酸的拉曼光谱图。图 1 中,实线对应待测溶液中载脂蛋白 B 的浓度为 $2\mu\text{g/ml}$;虚线对应不含载脂蛋白 B 的待测溶液。当待测溶液中含有抗原(载脂蛋白 B)时,载脂蛋白 B 与免疫基底表面的抗载脂蛋白 B 抗体以及免疫探针表面的抗载脂蛋白 B 抗体之间发生免疫复合反应,形成免疫基底-抗原(载脂蛋白 B)-免疫探针三层夹心结构,从而可以检测到强的拉曼标记物四巯基苯甲酸的特征指纹峰;当待测溶液中不含有抗原(载脂蛋白 B)时,不形成免疫基底-抗原(载脂蛋白 B)-免疫探针三层夹心结构,但由于免疫探针与免疫基底发生非特异性吸附,在免疫基底表面残留极少量的免疫探针,仅得到很弱的拉曼光谱。

[0113] 图 2 给出了利用实施例四制备得到的金纳米粒子修饰的免疫基底与本实施例制备得到的金纳米粒子免疫探针检测待测抗原(载脂蛋白 B)时,四巯基苯甲酸的拉曼光谱图。图 2 中,实线对应待测溶液中载脂蛋白 B 的浓度为 $2\mu\text{g/ml}$;虚线对应不含载脂蛋白 B 的待测溶液。当待测溶液中含有抗原(载脂蛋白 B)时,载脂蛋白 B 与免疫基底表面的抗载脂蛋白 B 抗体以及免疫探针表面的抗载脂蛋白 B 抗体之间发生免疫复合反应,形成免疫基底-抗原(载脂蛋白 B)-免疫探针三层夹心结构,从而可以检测到强的拉曼标记物四巯基苯甲酸的特征指纹峰;当待测溶液中不含有抗原(载脂蛋白 B)时,不形成免疫基底-抗原(载脂蛋白 B)-免疫探针三层夹心结构,但由于免疫探针与免疫基底发生非特异性吸附,在免疫基底表面残留极少量的免疫探针,仅得到很弱的拉曼光谱。

[0114] 实施例八:

[0115] 本实施例为利用一种免疫基底的制备方法所制备得到的免疫基底实现免疫检测抗原或抗体的方法,其过程与实施例七的过程基本相同,不同之处在于制备免疫探针时用银纳米粒子代替金纳米粒子。

[0116] 在本实施例中,免疫探针所用的银纳米粒子溶液的制备过程为:1)取 0.018g 的硝酸银粉末溶于 100ml 的去离子水中得到硝酸银溶液,然后利用水浴法对硝酸银溶液加热至 100°C ;2)取 0.1g 的柠檬酸钠粉末,溶于 9.9ml 的去离子水中,超声波振荡 3 分钟,配置成质量百分比为 1% 的柠檬酸钠溶液;3)待硝酸银溶液达到 100°C 时,在剧烈搅拌的条件下,加入 2ml 的质量百分比为 1% 的柠檬酸钠溶液,持续搅拌并加热 20 分钟直至溶液变成青黄色,然后停止搅拌与加热,再将溶液置于室温下使其自然冷却,冷却后得到银纳米粒子溶液。

[0117] 图 3 给出了利用实施例二制备得到的银纳米粒子修饰的免疫基底与本实施例制备得到的银纳米粒子免疫探针检测待测抗原(载脂蛋白 B)时,四巯基苯甲酸的拉曼光谱图。图 3 中,实线对应待测溶液中载脂蛋白 B 的浓度为 $2\mu\text{g/ml}$;虚线对应不含载脂蛋白 B 的待测溶液。当待测溶液中含有抗原(载脂蛋白 B)时,载脂蛋白 B 与免疫基底表面的抗载脂蛋白 B 抗体以及免疫探针表面的抗载脂蛋白 B 抗体之间发生免疫复合反应,形成免疫基底-抗原(载脂蛋白 B)-免疫探针三层夹心结构,从而可以检测到强的拉曼标记物四巯基苯甲酸的特征指纹峰;当待测溶液中不含有抗原(载脂蛋白 B)时,不形成免疫基底-抗原(载脂蛋白 B)-免疫探针三层夹心结构,但由于免疫探针与免疫基底发生非特异性吸附,在免疫基底表

面残留极少量的免疫探针,仅得到很弱的拉曼光谱。

[0118] 图 4 给出了利用实施例五制备得到的金纳米粒子修饰的免疫基底与本实施例制备得到的银纳米粒子免疫探针检测待测抗原(载脂蛋白 B)时,四巯基苯甲酸的拉曼光谱图。图 4 中,实线对应待测溶液中载脂蛋白 B 的浓度为 $2\mu\text{g/ml}$;虚线对应不含载脂蛋白 B 的待测溶液。当待测溶液中含有抗原(载脂蛋白 B)时,载脂蛋白 B 与免疫基底表面的抗载脂蛋白 B 抗体以及免疫探针表面的抗载脂蛋白 B 抗体之间发生免疫复合反应,形成免疫基底-抗原(载脂蛋白 B)-免疫探针三层夹心结构,从而可以检测到强的拉曼标记物四巯基苯甲酸的特征指纹峰;当待测溶液中不含有抗原(载脂蛋白 B)时,不形成免疫基底-抗原(载脂蛋白 B)-免疫探针三层夹心结构,但由于免疫探针与免疫基底发生非特异性吸附,在免疫基底表面残留极少量的免疫探针,仅得到很弱的拉曼光谱。

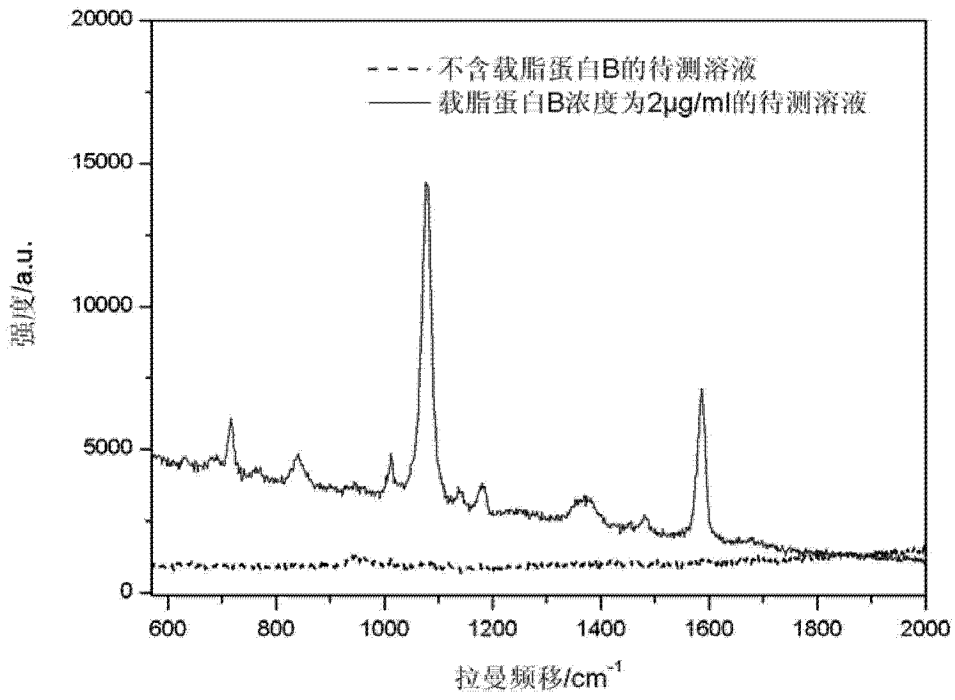


图 1

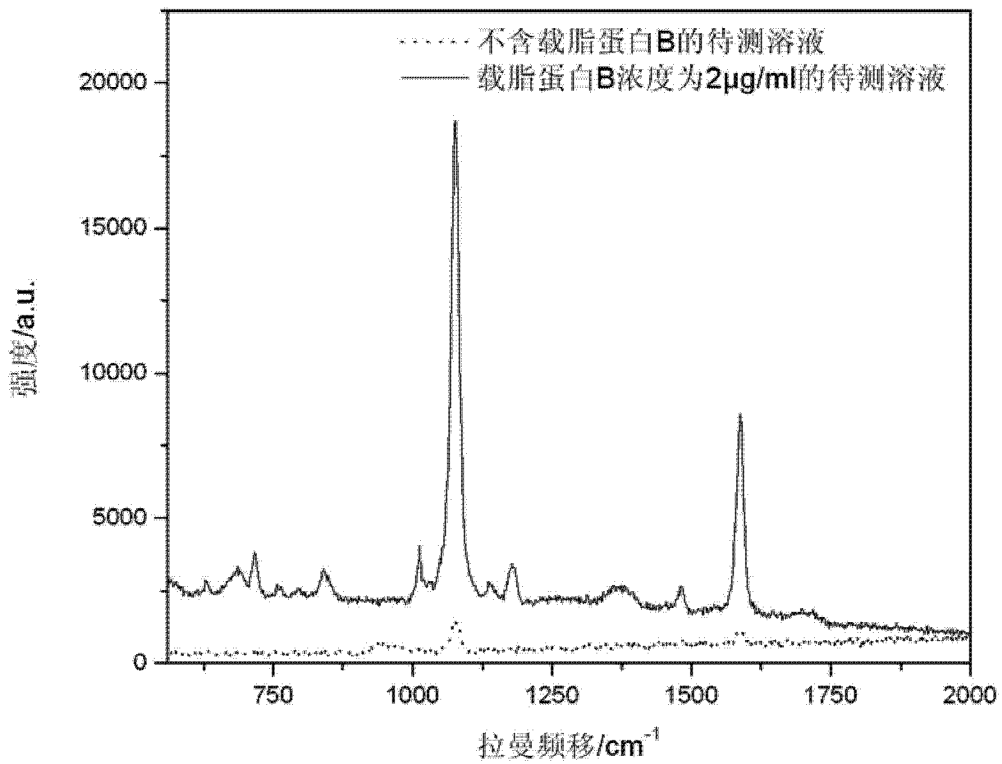


图 2

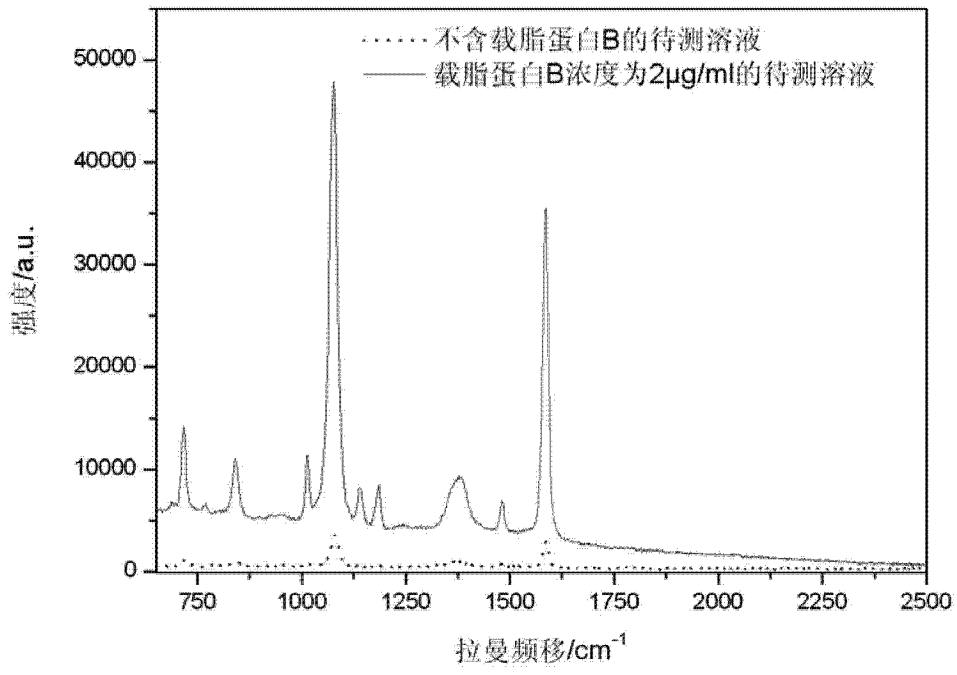


图 3

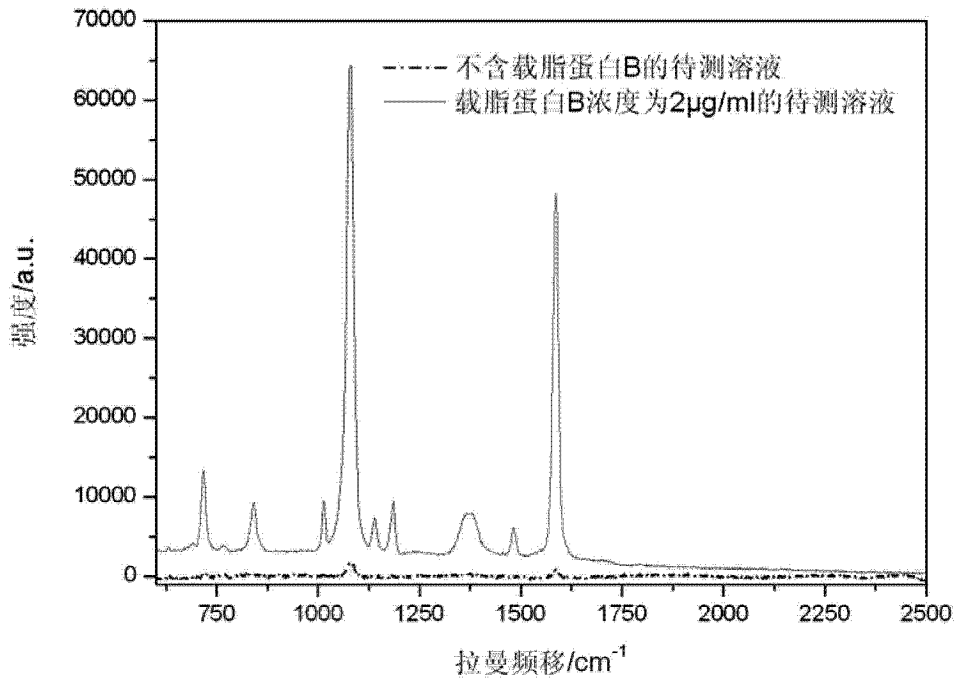


图 4

专利名称(译)	一种免疫基底的制备方法及其抗原或抗体的免疫检测方法		
公开(公告)号	CN103116019B	公开(公告)日	2015-03-18
申请号	CN201310015549.3	申请日	2013-01-16
[标]申请(专利权)人(译)	宁波大学		
申请(专利权)人(译)	宁波大学		
当前申请(专利权)人(译)	宁波大学		
[标]发明人	周骏 束磊 马亚楠 王彬彬 赖魏 张琪 颜承恩		
发明人	周骏 束磊 马亚楠 王彬彬 赖魏 张琪 颜承恩		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/558 G01N21/65		
代理人(译)	周珏		
审查员(译)	肖吉		
其他公开文献	CN103116019A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种免疫基底的制备方法及其抗原或抗体的免疫检测方法，该免疫基底制备方法利用金或银纳米粒子修饰硅片，再在金或银纳米粒子表面修饰抗体/抗原，用于捕获待测抗原/抗体；该抗原或抗体的免疫检测方法应用上述免疫基底的制备方法制备得到的免疫基底以及金或银纳米粒子免疫探针，通过抗原-抗体的免疫复合反应，形成免疫基底-抗原/抗体-免疫探针三层夹心结构，利用金或银纳米粒子的表面增强拉曼散射效应，检测免疫探针表面拉曼标记物的特征指纹谱实现待测抗原/抗体检测，该方法能够大大提高免疫检测的灵敏度，而且可进行高通量的多抗原或多抗体检测。

