(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101923088 B
(45)授权公告日 2013.11.13

(21)申请号 201010225715.9

(22)申请日 2010.07.05

(73)专利权人 中国人民解放军军事医学科学院野战输血研究所
地址 100850 北京市海淀区太平路27号

(72)发明人 詹林盛 王小慧 李媛

(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322
代理人 鲁兵

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)

(56)对比文件
CN 1444045 A,2003.09.24, 全文.
CN 101343778 A,2009.01.14, 说明书第1页.
郭红燕.SERS标记的金纳米棒探针用于免疫检测.《化学学报》.2009, 第67卷(第14期),
Mohammad Eghtedari.Engineering of Hetero-Functional GoldNanorods for the in vivo Molecular targeting of breast cancer cells.《nano letters》.2008, 第9卷(第1期),
郭红燕.SERS标记的金纳米棒探针用于免疫检测.《化学学报》.2009, 第67卷(第14期),
彭剑淳.人IgG标记金纳米棒并用于抗人IgG抗体的检测.《生物技术通讯》.2009, 第20卷(第5期),
Nikoobakht、EI-Sayed.Preparation and growth mechanism of gold nanorods using seed-mediated growth method..《Chemistry Mater》.2003, 第15卷(第10期),1958.
杨玉东等.金纳米棒的表面改性及其在生物医学领域的应用.《化学通报》.2010,(第3期),全文.

审查员 刘迎鸣

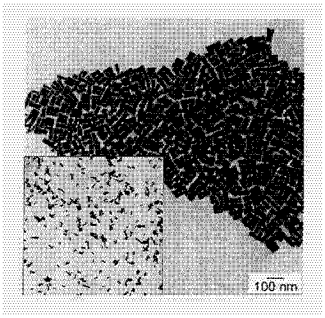
权利要求书2页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种金纳米棒免疫探针及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种适用于多种介质的金纳米棒免疫探针及其制备方法与应用。该金纳米棒免疫探针是经金纳米种子的制备、金纳米棒的生长及浓缩、抗体修饰、封闭后得到的产品。这种免疫探针的特异性识别可在缓冲溶液、血清、血浆或尿液、唾液等多种介质中进行,最终通过读取金纳米棒纵向等离子吸收峰的偏移进行定性及定量分析。用该免疫探针进行相应抗原的检测具有操作简单、检测灵敏度高、特异性好、所需仪器设备少等优点,而且,因为其特殊的修饰方式,使纳米复合物对外界介质具有良好的适应性,扩大了该免疫探针的应用范围,有向临床推广的可能性。



CN 101923088 B

1. 一种金纳米棒免疫探针的制备方法，包括以下步骤：

1) 制备金纳米种子：在表面活性剂十六烷基三甲基溴化胺 (CTAB) 的存在下，通过化学还原法把氯金酸溶液中的正三价金还原为金纳米种子；

2) 金纳米棒的制备及浓缩：将步骤 1) 制备的金纳米种子加入到金纳米棒的生长溶液中制备金纳米棒，离心去除过量的 CTAB，并将金纳米棒浓缩；具体操作为：将 4mL10mmol/L 的氯金酸溶液、0.6mL10mmol/L 的硝酸银溶液与 0.64mL0.01mol/L 的抗坏血酸溶液依次加入到 95mL0.01mol/L 的 CTAB 溶液中，接着向其中加入步骤 1) 制备的 0.1mL 金纳米种子溶液，混匀，静置陈化后得到金纳米棒；

3) 抗体修饰：将浓缩后的 0.2mL 金纳米棒加入到 1.0mL 浓度为 0.1mg/mL 的抗体溶液中，混匀后静置 30min，使金纳米棒与抗体之间通过静电相互作用反应，得到与抗体偶联的金纳米棒 - 抗体复合物；所述抗体为 HIgG 或乙肝表面抗体；

4) 封闭：用无关蛋白溶液作为封闭剂对金纳米棒 - 抗体复合物洗涤，再经离心分离、浓缩、纯化，得到能特异性识别相应抗原的金纳米棒免疫探针；所述无关蛋白溶液为 1wt％牛血清白蛋白溶液；封闭是指用经 8000 转 / 分离心 15min 纯化的 1wt％牛血清白蛋白溶液对金纳米棒 - 抗体复合物洗涤 3 次。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于：所述步骤 1) 金纳米种子的制备具体操作为：首先，将 0.25mL0.01mol/L 的氯金酸溶液加入到 7.5mL0.1mol/L 的 CTAB 溶液中，混匀后再将 0.6mL0.01mol/L 新鲜制备、置于冰水浴中的硼氢化钠溶液加入到上述的溶液中，来回倒置混匀 2 分钟，得到金纳米种子的亮棕黄色溶液。

3. 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于：所述步骤 1) 制备的金纳米种子应静置于 25℃水浴中，制备后 2 ～ 5h 可使用。

4. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于：所述步骤 2) 中陈化是指静置于 25℃水浴中，时间为至少 3h；所述离心去除过量 CTAB 的次数为 2 次，转速为 8000 转 / 分，时间为 10min，所述浓缩为第二次离心后将金纳米棒胶体溶液的体积缩小为原来的二十分之一。

5. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于：所述步骤 4) 具体操作为：将 1wt％牛血清白蛋白溶液加入金纳米棒 - 抗体复合物中，静置 15min 后于 4000 转 / 分离心分离，弃去上清，取下层物加水重悬，再用 1wt％牛血清白蛋白溶液重复洗涤 2 次，最后将得到的金纳米棒 - 抗体复合物浓缩，并重悬于 pH7.40.01mol/L 的 Tris 缓冲液中，800 转 / 分离心 3min 纯化，去除可能存在的聚集物，取上清重悬于 Tris 缓冲液中，得到金纳米棒免疫探针液。

6. 一种金纳米棒免疫探针，是按权利要求 1 至 5 任一所述方法经金纳米种子的制备、金纳米棒的制备及浓缩、抗体修饰及封闭后得到的产品。

7. 一种与金纳米棒免疫探针上修饰抗体相应抗原的检测方法，是将权利要求 6 所述的金纳米棒免疫探针加入到待检测介质中，孵育，再将介质与金纳米棒免疫探针离心分离，读取检测后金纳米棒免疫探针与空白对照或阴性对照的纵向等离子吸收峰的偏移来对结果进行判读，即计算差值 $\Delta\lambda$ (nm)，以进行定性及定量分析。

8. 根据权利要求 7 所述的检测方法，其特征在于：所述检测方法适用于缓冲液、血清、血浆、尿液、唾液介质的相应抗原检测，所述缓冲液为水、PBS、TBS 或 Tris。

9. 根据权利要求 7 所述的检测方法，其特征在于：所述孵育温度为 37℃，孵育时间为

1h。

10. 根据权利要求 7 所述的检测方法，其特征在于：所述计算出来的差值 Δλ(nm) 若在 ±3nm 以内，则认为是系统误差或实验噪音，不判定为阳性结果。

11. 根据权利要求 7 所述的检测方法，其特征在于：在水相介质，可通过对前面步骤的标准化及多次平行实验获得可靠性高的线性范围进行定量分析。

一种金纳米棒免疫探针及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于纳米免疫技术领域，特别是涉及一种适用于多种介质的金纳米棒免疫探针及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 免疫学检测在如今的诊断科学中担当着十分重要的角色，比如对肿瘤的早期检出、感染性疾病及免疫性疾病的诊断等。免疫学检测的基本原理是抗原和抗体之间在多种力作用下的非共价结合反应，最初的免疫反应仅在抗原抗体间进行。随着相关学科的发展，尤其是材料科学领域的飞速前进为检验科学的发展带来了新的契机。通过相关反应，抗原和抗体的任一方均可连接相应的新型纳米标记物，通过免疫反应的发生对标记物的磁学、光学、电学等性质的改变作为监测手段，起到对免疫反应的放大作用，提升免疫检测的灵敏度水平。如量子点、金纳米材料、碳纳米管、磁性纳米粒子等，金纳米棒就是其中较为活跃的一种。

[0003] 与球形金纳米粒子相比，金纳米棒状材料具有一些显著的优点：如金纳米棒的吸收和散射截面比同体积的球形金颗粒高一个数量级；金纳米棒的纵向等离子体共振峰的峰位可以简单通过改变其长径比实现在可见及近红外光谱范围的连续可调；金纳米棒对周围环境折射率变化的敏感性远远高于球形金颗粒。本发明中，就是将它的这一光学特性作为纳米生物传感研究的理论基础。一般情况下，物质表面等离子共振特征的峰移动 Δλ 与材料的灵敏度因子、表面所吸附分子和溶解介质的折光指数、吸附层的有效厚度等因素有关（Nature Materials，2008，vol(7)，442-453）。当免疫反应在金纳米棒周围发生时，抗原抗体的结合必然会造成上述诸多因素的变化，从而改变其相对灵敏的纵向等离子吸收峰位置。目前为止，国际上有许多研究小组开展了相关研究，但他们中的大多数均采用化学修饰的方法偶联抗体与金纳米棒，操作较为繁琐。而且，前期实验也证明化学修饰后的金纳米棒对介质环境的耐受性差，高的离子强度仍会导致聚集（生物技术通讯，2009，vol 20，680-682）。这一点，与被广泛使用的金纳米粒子（胶体金）相比具有一定差距。

[0004] 另一方面，纵观当前研究，少有研究将金纳米棒免疫探针的应用扩展到与临床相关的介质，如血清、尿液、唾液中（Anal.Chem.，2007，79(14)，5278-5283）。实际上，将新型纳米材料应用于生物传感器方面的研究浩如烟海，但是由于纳米材料本身的表面与界面效应、小尺寸效应、量子尺寸效应等特性，使这些传感器的研制和应用受到制约，长期处于实验室研制阶段。具体地说，其相关生物传感器的检测介质很少能够脱离“缓冲体系”的温床，排除实际检测介质中诸如蛋白、葡萄糖、无机离子、酶等成分的干扰，而进入临床应用阶段。

发明内容

[0005] 在于针对原有纳米生物传感器对检测介质的局限性，本发明的目的之一是提供一种适用于多种介质的金纳米棒免疫探针。

[0006] 该金纳米棒免疫探针，是经金纳米种子的制备、金纳米棒的制备及浓缩、抗体修饰

以及封闭后得到的产品。

[0007] 本发明的第二个目的是提供一种金纳米棒免疫探针的制备方法。

[0008] 本发明所提供的制备方法，可包括以下步骤：

[0009] 1) 制备金纳米种子：在表面活性剂十六烷基三甲基溴化胺 (CTAB) 存在的情况下，通过化学还原法把氯金酸中的正三价金还原为金纳米种子；

[0010] 2) 金纳米棒的制备及浓缩：将步骤 1) 制备的金纳米种子加入到金纳米棒的生长溶液中制备金纳米棒，离心去除过量的 CTAB，并将金纳米棒浓缩；

[0011] 3) 抗体修饰：将浓缩后的金纳米棒加入到抗体溶液中，使金纳米棒与抗体之间通过静电相互作用反应，得到与抗体偶联的金纳米棒 - 抗体复合物；

[0012] 4) 封闭：用无关蛋白溶液作为封闭剂对金纳米棒 - 抗体复合物洗涤，再经离心分离、浓缩、纯化，得到能特异性识别相应抗原的金纳米棒免疫探针。

[0013] 在上述金纳米棒免疫探针的制备方法中，所述步骤 1) 金纳米种子的制备方法具体为：首先，将 0.25mL 0.01mol/L 的氯金酸溶液加入到 7.5mL 0.1mol/L 的 CTAB 溶液中，混匀后再将 0.6mL 0.01mol/L 新鲜制备、置于冰水浴中的硼氢化钠溶液加入到上述的溶液中，来回倒置混匀 2 分钟，得到金纳米种子的亮棕黄色溶液。

[0014] 所述步骤 1) 制备的金纳米种子应静置于 25℃水浴中，制备后 2 ～ 5h 可使用。

[0015] 所述步骤 2) 金纳米棒生长的方法具体为：将 4mL 10mmol/L 的氯金酸溶液、0.6mL10mmol/L 的硝酸银溶液与 0.64mL 0.01mol/L 的抗坏血酸溶液依次加入到 95mL0.01mol/L 的 CTAB 溶液中，接着向其中加入步骤 1) 制备的 0.1mL 金纳米种子溶液，混匀，静置陈化后得到金纳米棒；所述陈化方法是指静置于 25℃水浴中，时间为至少 3h；所述离心去除过量 CTAB 的次数为 2 次，转速为 8000 转 / 分，时间为 10min，所述浓缩为第二次离心后将金纳米棒胶体溶液的体积缩小为原来的二十分之一。

[0016] 所述步骤 3) 抗体修饰的方法具体为：将 0.2mL 金纳米棒浓缩液加入到 1.0mL 浓度为 0.1mg/mL 的抗体溶液中，混匀后静置 30min，得到金纳米棒 - 抗体复合物。

[0017] 所述步骤 4) 中的无关蛋白溶液为 1% wt 牛血清白蛋白溶液；封闭是指用经 8000 转 / 分离心 15min 纯化的 1% wt 牛血清白蛋白溶液对金纳米棒 - 抗体复合物洗涤 3 次，具体方法为：将 1% wt 牛血清白蛋白溶液加入金纳米棒 - 抗体复合物中，静置 15min 后于 4000 转 / 分离心分离，弃去上清，取下层物加水重悬，再用 1% wt 牛血清白蛋白溶液重复洗涤 2 次，最后将得到的金纳米棒 - 抗体复合物浓缩，并重悬于 pH7.4 0.01mol/L 的 Tris 缓冲液中，800 转 / 分离心 3min 纯化，去除可能存在的聚集物，取上清重悬于 Tris 缓冲液中，得到金纳米棒免疫探针液。

[0018] 本发明的另一个目的是提供一种与金纳米棒免疫探针上修饰抗体相应抗原的检测方法。

[0019] 本发明的所提供的检测方法，是将上述金纳米棒免疫探针加入到待检测介质中，孵育，再将介质与金纳米棒免疫探针离心分离，读取检测后金纳米棒免疫探针与空白对照或阴性对照的纵向等离子吸收峰的偏移来对结果进行判读（计算差值 Δλ (nm))，以进行定性及定量分析。

[0020] 本发明的检测方法适用于缓冲液（水或 PBS、TBS、Tris 等）、血清、血浆、尿液、唾液等临床样本常用多种介质的相应抗原检测。

[0021] 所述孵育温度优选为37℃，孵育时间优选为1h。

[0022] 所述计算出来的差值 Δλ(nm) 若在 ±3nm 以内，则认为是系统误差或实验噪音，不判定为阳性结果。

[0023] 在水相介质（即水或缓冲溶液中），可通过对前面步骤的标准化及多次平行实验获得可靠性高的线性范围进行定量分析。

[0024] 本发明提供了一种适用于多种介质的金纳米棒免疫探针及其制备方法和应用。用本发明方法制备的金纳米棒免疫探针由于其与抗体间静电相互作用（Zata 电位表征结果支持）的“全包围”式修饰方式及封闭剂的较完全封闭，会在金纳米棒的周围形成由蛋白构成的柔性的外壳，使之对介质中的诸多种其它成分不敏感（减少金纳米棒对环境介质的敏感性），从而实现该免疫探针对相应抗原的高灵敏和高特异性检测，扩大这种免疫探针的应用范围；这种免疫探针的特异性识别可在缓冲溶液、血清、血浆或尿液、唾液等多种介质中进行，最终通过读取金纳米棒纵向等离子吸收峰的偏移进行定性及定量分析。用该免疫探针进行相应抗原的检测具有操作简单、检测灵敏度高、特异性好、所需仪器设备少等优点，而且，因为其特殊的修饰方式，使纳米复合物对外界介质具有良好的适应性，扩大了该免疫探针的应用范围，有向临床推广的可能性。

[0025] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

附图说明

[0026] 图1为本发明制备出的规则金纳米棒的透射电镜照片；

[0027] 图2为本发明制备出的“金纳米棒－人 IgG”免疫探针于 Tris 缓冲液中检测不同浓度的抗人 IgG 谱峰偏移曲线；

[0028] 图3为本发明制备出的“金纳米棒－乙肝表面抗体”免疫探针于 Tris 缓冲液中检测乙肝表面抗原标准物质的谱峰偏移量效关系曲线；

[0029] 图4为本发明制备出的“金纳米棒－乙肝表面抗体”免疫探针检测乙肝表面抗原阴阳性血清的谱峰偏移，(a) 为全图，(b) 为波峰局部放大图；

[0030] 图5为本发明制备出的“金纳米棒－乙肝表面抗体”免疫探针在唾液和尿液介质中的等离子吸收光谱图。

具体实施方式

[0031] 本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施，给出了详细的实施方式和具体的操作过程，但本发明的保护范围不限于下述的实施例。任何在相关领域具备经验的人，都可以按照本专利的原理，利用其它类似抗原抗体或者反应条件实现本发明所描述的免疫探针。这些并不脱离本发明描述的基本概念。因此，这些修改或不同的应用都在本发明的覆盖范围之内。

[0032] 下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法。

[0033] 实施例1、“金纳米棒 -HIgG”免疫探针的制备与在 Tris 缓冲液中检测 anti-HIgG

[0034] 一、“金纳米棒 -HIgG”免疫探针的制备

[0035] 用本发明的方法制备“金纳米棒 -HIgG”免疫探针，具体方法包括以下步骤：

[0036] (1) 制备金纳米种子：首先，将 0.25mL 0.01mol/L 的氯金酸溶液加入到 7.5mL

0.1mol/L 的 CTAB 溶液中，混匀后再将 0.6mL 0.01mol/L 新鲜制备、置于冰水浴中的硼氢化钠溶液加入到上述的溶液中，来回倒置混匀 2 分钟，得到金纳米种子的亮棕黄色溶液。金纳米种子静置于 25℃水浴中，3h 后使用。

[0037] (2) 金纳米棒的制备及浓缩：将 4mL 10mmol/L 的氯金酸溶液、0.6mL 10mmol/L 的硝酸银溶液与 0.64mL 0.01mol/L 的抗坏血酸溶液依次加入到 95mL 0.01mol/L 的 CTAB 溶液中，接着向其中加入 0.1mL 步骤 (1) 制备的金纳米种子溶液，混匀，静置于 25℃水浴中，陈化 3h 后使用。使用前 8000 转 / 分离心两次，每次 10min 以去除过量 CTAB，并在第二次离心后将金纳米棒胶体溶液的体积缩小为原来的二十分之一。金纳米棒的透射电镜照片如图 1 所示。

[0038] (3) 抗体修饰：将 0.2mL 步骤 (2) 得到的金纳米棒浓缩液加入到 1.0mL 0.1mg/mL 的 HIgG 水溶液中，混匀后静置 30min，得到金纳米棒 - 抗体复合物。

[0039] (4) 封闭：配置 10% wt 的牛血清白蛋白溶液并于 8000 转 / 分离心 15min，取上清液加入步骤 (3) 得到的金纳米棒 - 抗体复合物中，使牛血清白蛋白封闭剂的终浓度为 1% wt，静置 15min 后于 4000 转 / 分离心分离，弃去上清，取下层物加水重悬，再以 1% wt 的牛血清白蛋白溶液重复洗涤 2 次，最后将得到的金纳米棒 - 抗体复合物浓缩，并重悬于 pH7.4 0.01mol/L 的 Tris 缓冲液中，800 转 / 分离心 3min 纯化，去除可能存在的聚集物，取上清重悬于 Tris 缓冲液中，得到金纳米棒免疫探针液。

[0040] 二、用“金纳米棒 -HIgG”免疫探针在 Tris 缓冲液中检测 anti-HIgG

[0041] (1) 用 pH7.4 0.01mol/L 的 Tris 缓冲液配置系列浓度的 anti-HIgG 溶液。

[0042] (2) 将待测不同浓度的 anti-HIgG 溶液分别加入步骤一制备的金纳米棒免疫探针液中，使检测体系中金纳米棒的纵向等离子吸收峰 O.D. 值约为 1.0。37℃水浴中孵育 1h 后离心分离，去除未反应蛋白，再将下层物于 Tris 缓冲液中重悬。采用紫外 - 可见分光光度计扫描每个样本的 400-1000nm 的表面等离子吸收光谱。观察金纳米棒纵向等离子吸收峰位置与检测前金纳米棒免疫探针液的区别，计算其 Δλ (nm)，进行定性或定量分析。若计算出的样本的偏移量 Δλ (nm) 在 ±3nm 以内，可认为是系统误差或实验噪音，不判定为阳性结果。

[0043] 典型检测谱图如图 2 所示，即可以在 Tris 缓冲液中检测到纳克级的 anti-HIgG。

[0044] 实施例 2、“金纳米棒 - 乙肝表面抗体”免疫探针的制备与在 Tris 缓冲液中的检测

[0045] 一、“金纳米棒 - 乙肝表面抗体”免疫探针的制备

[0046] 用本发明的方法制备“金纳米棒 - 乙肝表面抗体”免疫探针，具体方法包括以下步骤：

[0047] (1) 制备金纳米种子：与实施例 1 相同。

[0048] (2) 金纳米棒的制备及浓缩：与实施例 1 相同。

[0049] (3) 抗体修饰：将 0.2mL 金纳米棒浓缩液加入到 1.0mL 0.1mg/mL 的单克隆乙肝表面抗体水溶液中，混匀后静置 30min，得到金纳米棒 - 抗体复合物。

[0050] (4) 封闭：与实施例 1 相同。

[0051] 二、用“金纳米棒 - 乙肝表面抗体”免疫探针在 Tris 缓冲液中检测乙肝表面抗原

[0052] (1) 以 pH7.4 0.01mol/L 的 Tris 缓冲液配置系列浓度的乙肝表面抗原 (HBsAg) 标准物质的溶液，及 250ng/mL 或 500ng/mL 的牛血清白蛋白溶液。

[0053] (2) 将待测样本、空白样本（水）、控制样本（(1) 中所述的牛血清白蛋白溶液）分别加入步骤一制备的“金纳米棒 - 乙肝表面抗体”免疫探针液中，使检测体系中金纳米棒的纵向等离子吸收峰 O.D. 值约为 0.5。每组设三个平行实验。37℃水浴中孵育 1h 后离心分离，去除未反应蛋白，再将下层物于 Tris 缓冲液中重悬。采用紫外 - 可见分光光度计扫描每个样本的 400-1000nm 的表面等离子吸收光谱。观察金纳米棒纵向等离子吸收峰位置与空白样本或控制样本的峰位置平均值的差值，计算其 Δλ(nm)，进行定性及定量分析。通常，空白样本与控制样本的峰位置会较好地吻合，而这可以作为实验成功与否的重要判据。若计算出的样本的偏移量 Δλ(nm) 在 ±3nm 以内，可认为是系统误差或实验噪音，不判定为阳性结果。

[0054] 通过对前面步骤的标准化及多次平行实验获得了如图 3 所示的量效关系曲线。如图所示，该免疫探针对 HBsAg 标准物质的检测下限为 0.01IU/mL，即达到皮摩尔量级，相比常规的酶联免疫方法检测灵敏度提高两个数量级。

[0055] 实施例 3：“金纳米棒 - 乙肝表面抗体”免疫探针的制备及对乙肝表面抗原阴、阳性血清的判读

[0056] 一、“金纳米棒 - 乙肝表面抗体”免疫探针的制备

[0057] 用本发明的方法制备“金纳米棒 - 乙肝表面抗体”免疫探针，具体方法包括以下步骤：

[0058] (1) 制备金纳米种子：与实施例 1 相同。

[0059] (2) 金纳米棒的制备及浓缩：与实施例 1 相同。

[0060] (3) 抗体修饰：与实施例 2 相同。

[0061] (4) 封闭：与实施例 1 相同。

[0062] 二、用“金纳米棒 - 乙肝表面抗体”免疫探针对乙肝表面抗原阴、阳性血清的判读

[0063] (1) 从乙肝表面抗原检测试剂盒（购自英科新创（厦门）科技有限公司）中选取阴、阳性对照血清作为样品。

[0064] (2) 将待测阴阳性血清样本、空白样本（水）及控制样本（实施例 2 步骤二 (1) 中的牛血清白蛋白溶液）分别加入金纳米棒免疫探针液中，使检测体系中金纳米棒的纵向等离子吸收峰 O.D. 值约为 0.5。每组设三个平行实验。37℃水浴中孵育 1h 后离心分离，去除未反应物，再将下层物于 Tris 缓冲液中重悬。采用紫外 - 可见分光光度计扫描每个样本的 400-1000nm 的表面等离子吸收光谱。观察金纳米棒纵向等离子吸收峰位置与空白样本或控制样本的峰位置平均值的差值，计算其 Δλ(nm)，进行定性分析。通常，阴性血清、空白样本及控制样本的峰位置平均值差在 ±3nm 以内，而阳性血清的峰位置与它们的相差至少为 8nm 以上。

[0065] 图 4 为归一化后的“金纳米棒 - 乙肝表面抗体”免疫探针检测乙肝表面抗原阴、阳性血清的典型等离子吸收光谱图 (a) 及谱峰偏移位置的为局部放大图 (b)，其中 1 为空白样本，2 为控制样本，3 和 4 分别为阳性血清及阴性血清。

[0066] 实施例 4：“金纳米棒 - 乙肝表面抗体”免疫探针的制备及其在唾液、尿液介质中的表面等离子吸收光谱性质

[0067] 一、“金纳米棒 - 乙肝表面抗体”免疫探针的制备

[0068] 用本发明的方法制备“金纳米棒 - 乙肝表面抗体”免疫探针，具体方法包括以下步

骤：

[0069] (1) 制备金纳米种子：与实施例 1 相同。

[0070] (2) 金纳米棒的制备及浓缩：与实施例 1 相同。

[0071] (3) 抗体修饰：与实施例 2 相同。

[0072] (4) 封闭：与实施例 1 相同。

[0073] 二、“金纳米棒－乙肝表面抗体”免疫探针在唾液、尿液介质中的表面等离子吸收光谱性质

[0074] 将步骤一中制备的金纳米棒免疫探针液分别分散于 10％及 40％唾液 (saliva) 或尿液 (urine) 介质中，得到如附图 5 所示的表面等离子吸收光谱图。由图 5 可见，在上述的两种介质中，金纳米棒免疫探针均能稳定存在，特别是其纵向等离子共振吸收峰位置不会受到介质颜色、粘度等的影响。由此可以推断，用本发明方法制备的金纳米棒免疫探针可用来在唾液、尿液等临床常用介质中检测相应抗原 / 抗体。

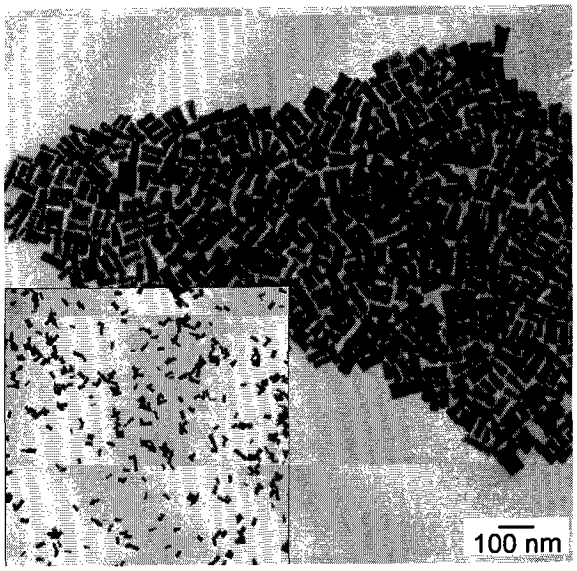

100 nm

图 1

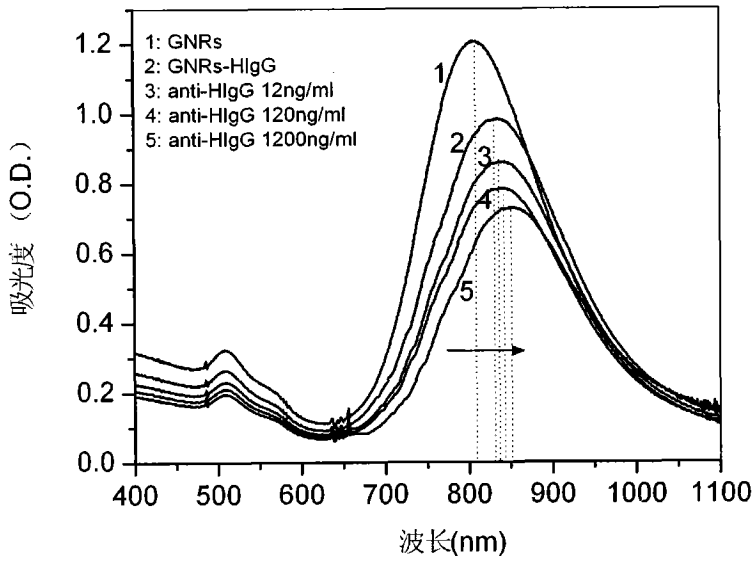

1: GNRs
2: GNRs-HIgG
3: anti-HIgG 12ng/ml
4: anti-HIgG 120ng/ml
5: anti-HIgG 1200ng/ml
1
2
3
4
5
吸光度（O.D.）
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
400
500
600
700
800
900
1000
1100
波长(nm)

图 2

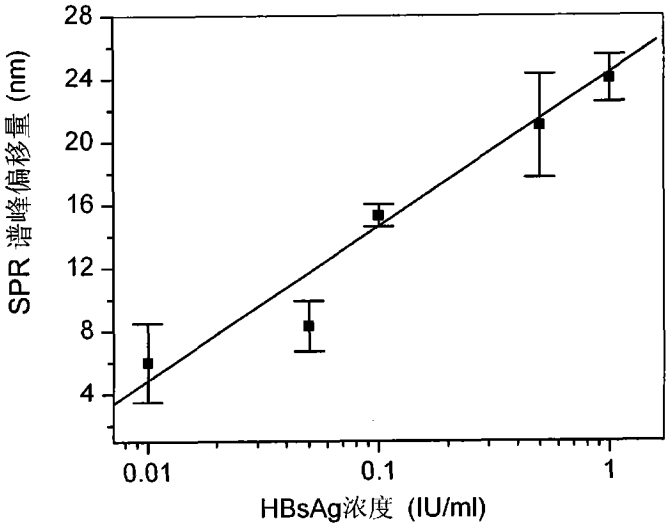

28
24
20
16
12
8
4
SPR 谱峰偏移量 (nm)
0.01
0.1
1
HBsAg浓度 (IU/ml)

图 3

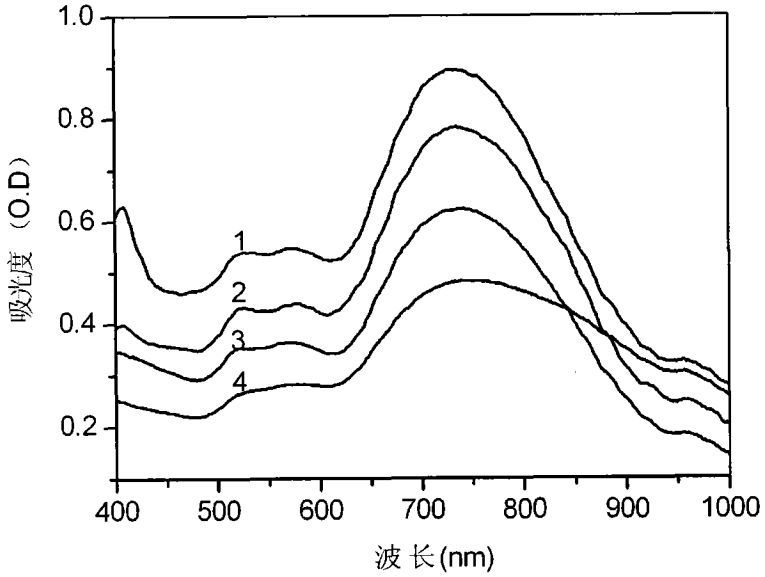
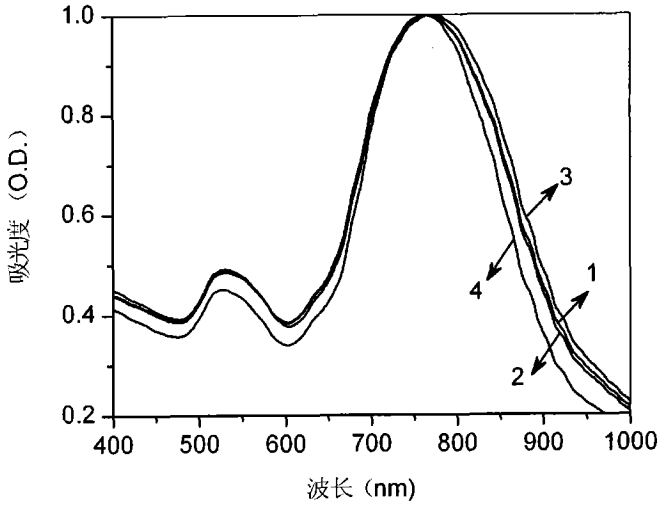
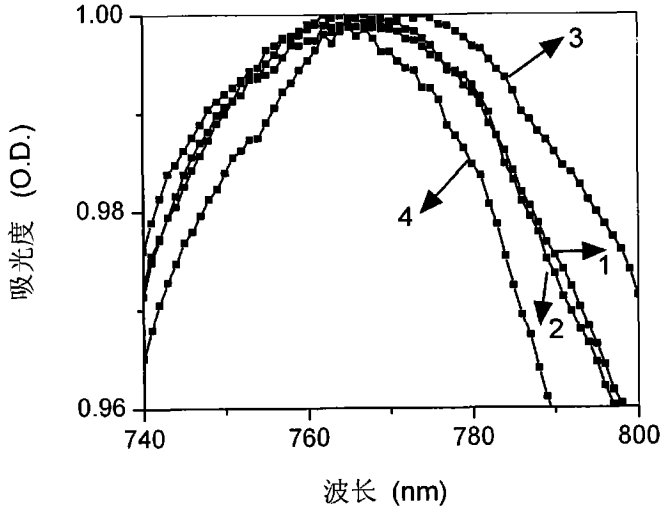

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
吸光度 (O.D)
1
2
3
4
400
500
600
700
800
900
1000
波长(nm)

图 5


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
吸光度（O.D.）
400
500
600
700
800
900
1000
波长（nm）
1
2
3
4

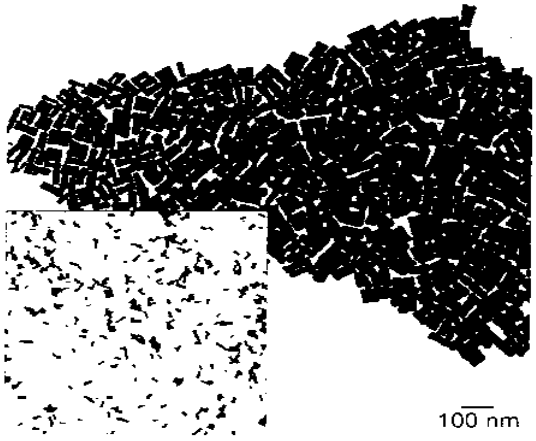
（a）


1.00
0.98
0.96
吸光度（O.D.）
740
760
780
800
波长（nm）
1
2
3
4

(b)

图 4

专利名称(译)	一种金纳米棒免疫探针及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN101923088B	公开(公告)日	2013-11-13
申请号	CN201010225715.9	申请日	2010-07-05
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院野战输血研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院野战输血研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院野战输血研究所		
[标]发明人	詹林盛 王小慧 李媛		
发明人	詹林盛 王小慧 李媛		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	鲁兵		
其他公开文献	CN101923088A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种适用于多种介质的金纳米棒免疫探针及其制备方法与应用。该金纳米棒免疫探针是经金纳米种子的制备、金纳米棒的生长及浓缩、抗体修饰、封闭后得到的产品。这种免疫探针的特异性识别可在缓冲溶液、血清、血浆或尿液、唾液等多种介质中进行，最终通过读取金纳米棒纵向等离子吸收峰的偏移进行定性及定量分析。用该免疫探针进行相应抗原的检测具有操作简单、检测灵敏度高、特异性好、所需仪器设备少等优点，而且，因为其特殊的修饰方式，使纳米复合物对外界介质具有良好的适应性，扩大了该免疫探针的应用范围，有向临床推广的可能性。