



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102191034 A

(43) 申请公布日 2011.09.21

(21) 申请号 201010117687.9

G01N 33/531 (2006.01)

(22) 申请日 2010.03.03

G01N 21/76 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(71) 申请人 中国科学技术大学

地址 230026 安徽省合肥市金寨路 96 号中
国科技大学科技处

(72) 发明人 崔华 田大勇

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限
公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

C09K 11/06 (2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 20 页 附图 9 页

(54) 发明名称

一种 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光
功能化的纳米金及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金及其制备方法和应用。该功能化纳米金,由金纳米粒子和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺连接而成,所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺连接在所述金纳米粒子的表面。本发明用 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺直接还原氯金酸制备纳米金,在合成过程中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺同时作为还原剂和稳定剂。该方法具有简单、快速、无需特殊条件等优点,是一种温宽为 15-35℃ 合成纳米金的新技术。由该方法合成得到的纳米金的粒径和形貌,可以由氯金酸与 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的比例进行调控,并且所得的纳米金具有优良的化学发光特性。本发明还公开了一种生物分析探针,它是由 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金与生物分子结合形成的,可作为免疫分析、核酸分析、分子成像、传感器等的分析探针,在生物医学、食品安全、环境监测等领域具有广阔的应用前景。

1. 一种功能化纳米金,由金纳米粒子和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺连接而成,所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺连接在所述金纳米粒子的表面。

2. 根据权利要求 1 所述的功能化纳米金,其特征在于:所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺通过共价键 Au-N 连接在所述金纳米粒子的表面。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的功能化纳米金,其特征在于:所述功能化纳米金具有化学发光特性。

4. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的功能化纳米金,其特征在于:所述功能化纳米金与氧化剂反应产生化学发光。

5. 根据权利要求 4 所述的功能化纳米金,其特征在于:所述氧化剂为 H_2O_2 、 O_2 、 ClO^- 、 I_2 、 IO_4^- 或 MnO_4^- 。

6. 根据权利要求 1-5 中任一所述的功能化纳米金,其特征在于:所述功能化纳米金按照下述权利要求 7-13 中任一所述的方法制备。

7. 权利要求 1 至 6 中任一所述的功能化纳米金的制备方法,包括如下步骤:

(1) 将氯金酸水溶液 A 与 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液在搅拌状态下混合得到混合液;所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2-4 倍;

(2) 在搅拌状态下,再将氯金酸水溶液 B 加入步骤 (1) 得到的混合液中,继续搅拌至形成金溶胶,得到的金溶胶即为功能化纳米金;所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1-3 倍。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在于:所述氯金酸水溶液 A 的摩尔浓度为 1-10mmol/L、1-6mmol/L、6-10mmol/L、6-8mmol/L 或 8-10mmol/L;

所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液的摩尔浓度为 0.5-8.0mmol/L、0.5-4.0mmol/L、0.5-5.0mmol/L、4.0-8.0mmol/L、5.0-8.0mmol/L 或 4.0-5.0mmol/L;

所述氯金酸水溶液 B 的摩尔浓度为 1-10mmol/L、1-6mmol/L 或 6-10mmol/L。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的方法,其特征在于:所述氯金酸水溶液 A、N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液和所述氯金酸水溶液 B 的配比为下述 h1-h10 中的任一种:

h1、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 4 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1 倍;

h2、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 3 倍;

h3、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1.8 倍;

h4、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.3 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1.4 倍;

h5、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.1 倍;

h6、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.4 倍;

h7、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍;

h8、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 3 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2 倍;

h9、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 27/11 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 18/11 倍;

h10、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.25 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1.5 倍。

10. 根据权利要求 7 或 8 或 9 所述的方法,其特征在于:所述方法还包括将所述金溶胶通过离心进行纯化的步骤。

11. 根据权利要求 10 所述的功能化纳米金,其特征在于:离心的条件为:将所述金溶胶在 17120*g 下离心 45 分钟。

12. 根据权利要求 7-11 中任一所述的方法,其特征在于,步骤 (1) 和步骤 (2) 的反应温度均为 15-35°C、15-25°C、15-30°C、25-35°C 或 25-30°C。

13. 根据权利要求 7-12 中任一所述的方法,其特征在于,步骤 (1) 的反应时间为 2 小时以上,步骤 (2) 的反应时间 1.5 小时以上。

14. 根据权利要求 7-13 中任一所述的方法,其特征在于,配制所述氯金酸水溶液 A、氯金酸水溶液 B 和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液所使用的水的电阻率大于等于 1.0MΩ*cm;所述水选自下述三种水中的至少一种:二次蒸馏水、纯净水和超纯水。

15. 权利要求 7 至 14 中任一所述方法制备的功能化纳米金。

16. 权利要求 1 至 6 和 15 中任一所述的功能化纳米金,其特征在於,所述功能化纳米金的形貌呈单分散球状、球状纳米金组装的链状或球状纳米金组装的网状。

17. 根据权利要求 16 所述的功能化纳米金,其特征在於,所述功能化纳米金的形貌呈单分散球状,单分散球的粒径大小为 10-30 纳米;或,组装成链状或网状的球状纳米金的粒径大小为 10-30 纳米。

18. 根据权利要求 16 所述的功能化纳米金,其特征在於,所述功能化纳米金的形貌呈球状纳米金组装的链状,链长为 400-500 纳米。

19. 一种生物分析探针,是由功能化纳米金标记生物分子形成的复合物;所述功能化纳米金为权利要求 1 至 6 中任一所述功能化纳米金或权利要求 15 所述功能化纳米金。

20. 根据权利要求 19 中所述的生物分析探针,其特征在於,所述生物分子为抗体或核酸分子。

21. 根据权利要求 20 所述的生物分析探针,其特征在於,所述生物分子为抗体的生物分析探针的制备方法为下述 A 或 B 的方法:

A. 将所述抗体分子的端基修饰生物素,然后与连接有链霉亲和素的所述功能化纳米金相连接;

B. 将所述抗体分子直接与所述功能化纳米金相连接。

22. 根据权利要求 20 所述的生物分析探针,其特征在於,所述生物分子为核酸的分析探针的制备方法为下述 a 或 b 的方法:

a、将所述核酸分子端基修饰生物素,然后与连接有链霉亲和素的所述功能化纳米金相连接;

b、将所述核酸分子端基修饰巯基,然后与所述功能化的纳米金相连接。

23. 根据权利要求 20 或 22 中所述的生物分析探针,其特征在於,所述核酸分子为 DNA、RNA 或适配体。

一种 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金及其制备、性质和应用。属于材料科学和生化学中的领域。

背景技术

[0002] 金纳米材料具有独特的、与尺寸相关的光学、热学、电学、磁学以及化学等方面的性质,如表面等离子体共振吸收 (SPR)、拉曼散射 (RS)、催化活性和生物相容性,这些特性使得金纳米材料在催化、生物传感器、生物医学等方面具有重要的应用。大量研究表明,金纳米材料的性质受其形貌、尺寸和表面组成的强烈影响,因此金纳米材料的合成方法和性质研究对纳米材料的基础理论研究及其实际应用都具有重要意义。

[0003] 金纳米材料的功能化主要包括两个方面的方向和内容:其一是获得形貌和大小可控的金纳米材料,以调节器 SPR 吸收性质和催化活性;其二是对已有的金纳米材料进行表面修饰,使得金纳米材料具有其表面配体的丰富性质,如荧光性质、氧化还原性、生物活性和电化学活性。

[0004] 在各种形貌的金纳米颗粒的制备研究中,起步最早的是对球形金纳米粒子的制备研究。现已能成功制备尺寸在几纳米至数百纳米范围内各种尺寸、分散性好的球形金颗粒。虽然金纳米颗粒的 SPR 吸收会随着颗粒尺寸的变化有所迁移,但是迁移范围不大。相比而言,改变纳米颗粒的形貌是调节其 SPR 特性更有效的手段,以棒状或线状金纳米为典型代表的各向异性金纳米材料如纳米片、纳米花等独特可调的 SPR 吸收性能是近年来该领域的研究热点。

[0005] 在金纳米材料的表面修饰上,常见的金纳米粒子表面往往为无机离子和有机分子层所保护,这些保护分子在稳定纳米金粒子的同时还能保持其自身的光学、电化学或氧化还原活性,因此将各种具有光学、电化学活性的有机分子或生物分子修饰到纳米材料表面或掺杂到纳米材料内部也是相应功能化纳米材料的另一种有效方式。由于金属纳米材料内部结构较为致密,因此对于金属纳米材料多采用表面化学修饰的方法进行功能化。如利用金和硫之间的强相互作用,以硫醇分子作为金纳米粒子表面的配体以稳定纳米金粒子,是近十年来制备稳定的金纳米最有效的方法 (Brust, M. ;Wallker, M. ;Bethell, D. J. Chem. Soc. Chem. Commun. ,1994,801)。

[0006] 纳米粒子特殊的光学性质包含着有关纳米粒子能级结构和表面状态等的丰富信息,一直以来都是纳米科学研究的重点之一。目前对于纳米材料光学性质的研究主要包括表面等离子体共振吸收、表面增强拉曼散射和光致发光等光学行为。

[0007] 化学发光是伴随化学反应的一种光发射现象,与以上光学现象不同,化学发光不需要外界光源激发,具有灵敏度高、线性范围宽、背景噪声小、仪器简单、价格便宜等优点。而近几年,金属纳米材料在化学发光中的应用也已成为一个重要的研究课题。尽管半导体量子点的化学发光、金属纳米材料直接和间接参与的化学发光已经逐渐受到研究

者的关注,但目前的研究主要集中于未修饰的纳米材料直接参与、或在其他条件诱导下参与化学发光,改性或功能化金纳米材料在化学发光理论及分析应用中的研究工作则鲜见报道。2005年,Roux等人(Roux, S.; Garcia, B.; Bridot, J. L.; Salom, Marquette, C. Langmuir. 2005, 21, 2526)用二氢硫辛酸作为保护试剂,硼氢化钠(NaBH_4)还原氯金酸(氯金酸 $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$)合成了二氢硫辛酸保护的纳米金。利用1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化纳米金表面的二氢硫辛酸的羧基,然后通过鲁米诺的 $-\text{NH}_2$ 和二氢硫辛酸的 $-\text{COOH}$ 进行缩合反应将鲁米诺嫁接到纳米金的表面。这个过程需要多步反应、沉淀洗涤、减压蒸馏、过滤、分散等多个步骤才能完成,非常麻烦、耗时。研究结果表明通过二氢硫辛酸键合到纳米金表面的鲁米诺仍具有较好电致化学发光活性。2007年,本课题组直接利用鲁米诺还原氯金酸一步合成得到了鲁米诺直接键合的纳米金(Cui, H.; Wang, W.; Duan, C. F.; Dong, Y. P.; Guo, J. Z. Chem. Eur. J. 2007, 13, 6975),表征的结果显示鲁米诺以弱的Au-N键直接连接到纳米金的表面。通过半胱氨酸桥联分子的静电相互作用,将该鲁米诺直接键合的纳米金组装到金电极的表面,发现该修饰电极在碱性溶液中具有电致化学发光活性且强度随 H_2O_2 浓度的增加而增强,就此发展了一个 H_2O_2 电致化学发光传感器。

[0008] N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺是一种鲁米诺的异构体异鲁米诺的衍生物,化学式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$ 。常温下是一种白色粉末,是一种比较稳定的人工合成的有机化合物,其化学发光特性优于鲁米诺。因为其分子中的脂肪胺基团容易与被标记物相连接,且保持高的发光效率,所以适合直接作为生物分析的探针。因此,直接利用N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺代替鲁米诺还原氯金酸合成的纳米金有可能获得比鲁米诺直接键合的纳米金化学发光效率更高的发光功能化的纳米金。可是,实验发现在鲁米诺还原氯金酸合成鲁米诺直接键合的纳米金的条件下(即将100mL 0.01% (w/w)的 HAuCl_4 水溶液加热至沸,在冷凝回流并充分搅拌的条件下,加入1.5-2.0mL含有0.01mol/L鲁米诺和0.01mol/L氢氧化钠的溶液,保持沸腾并继续搅拌回流反应30min,然后除去加热源继续搅拌15min以上得到纳米金溶液。),用N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺代替鲁米诺不能得到稳定的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺功能化的纳米金溶胶。因此,探索N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺功能化的纳米金的合成方法、化学发光特性及其在生物分析的应用具有重要的意义。

发明内容

[0009] 本发明的目的是提供N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金及其制备方法和在生物分析中的应用,其内容包括以下几个方面:

[0010] 第一是提供一种功能化纳米金。该功能化纳米金由金纳米粒子和N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺连接而成,所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺通过共价键Au-N连接在所述金纳米粒子的表面。

[0011] 所述功能化纳米金具有化学发光特性。所述功能化纳米金与氧化剂反应产生化学发光。所述氧化剂包括但不限于 H_2O_2 、 O_2 、 ClO^- 、 I_2 、 IO_4^- 、 MnO_4^- 。

[0012] 第二是提供一种上述功能化纳米金的制备方法,包括如下步骤:

[0013] (1) 将氯金酸水溶液A与N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液在搅拌状态下混合得到混合液;所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙

基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2-4 倍；

[0014] (2) 在搅拌状态下,再将氯金酸水溶液 B 加入步骤 (1) 得到的混合液中,继续搅拌至形成金溶胶,得到的金溶胶即为功能化纳米金;所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1-3 倍。

[0015] 所述氯金酸水溶液 A 的摩尔浓度可为 1-10mmol/L、1-6mmol/L、6-10mmol/L、6-8mmol/L 或 8-10mmol/L；

[0016] 所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液的摩尔浓度可为 0.5-8.0mmol/L、0.5-4.0mmol/L、0.5-6.0mmol/L、4.0-6.0mmol/L、4.0-8.0mmol/L 或 6.0-8.0mmol/L；

[0017] 所述氯金酸水溶液 B 的摩尔浓度可为 1-10mmol/L、1-6mmol/L 或 6-10mmol/L。

[0018] 所述氯金酸水溶液 A、N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液和所述氯金酸水溶液 B 的配比为下述 h1-h10 中的任一种：

[0019] h1、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 4 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1 倍；

[0020] h2、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 3 倍；

[0021] h3、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1.8 倍；

[0022] h4、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.3 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1.4 倍；

[0023] h5、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.1 倍；

[0024] h6、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.4 倍；

[0025] h7、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中

N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍；

[0026] h8、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 3 倍，所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2 倍；

[0027] h9、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 27/11 倍，所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 18/11 倍；

[0028] h10、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.25 倍，所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1.5 倍。

[0029] 所述方法还包括将所述金溶胶通过离心进行纯化的步骤。

[0030] 所述功能化纳米金可在如下条件下离心：将初始合成的纳米金溶胶在 17120*g 下离心 45 分钟，然后将沉淀用蒸馏水或二次水或超纯水溶解。

[0031] 所述功能化纳米金的制备方法中，其反应温度可以为 15-35℃，如 15-25℃、15-30℃、25-35℃或 25-30℃。

[0032] 上述步骤 (1) 的反应时间可为 2 小时以上，上述步骤 (2) 的反应时间可为 1.5 小时以上；N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺同时作为合成过程中的还原剂和稳定剂。

[0033] 配制所述氯金酸水溶液 A、氯金酸水溶液 B 和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液所用的水的电阻率大于等于 1.0MΩ*cm；所述水选自下述三种水中的至少一种：二次蒸馏水、纯净水和超纯水。

[0034] 上述方法制备的功能化纳米金，其形貌可呈单分散球状、球状纳米金组装的链状或球状纳米金组装的网状，并且粒径大小也可控。其粒径大小为 10-30 纳米。其形貌呈球状纳米金组装的链状时，链长为 400-500 纳米。

[0035] 第三是提供一种生物分析探针，是由上述的功能化纳米金标记生物分子形成的复合物。

[0036] 所述生物分子为抗体或核酸分子。

[0037] 所述的生物分析探针为免疫分析探针或核酸分析探针。

[0038] 所述免疫分析探针制备的方法为下述 A 或 B 的方法：

[0039] A、将所述抗体分子端基修饰生物素，然后与连接有链霉亲和素的功能化纳米金相连接；

[0040] B、将所述抗体分子直接与所述的功能化纳米金相连接。

[0041] 所述核酸分析探针制备的方法下述 a 或 b 的方法：

[0042] a、将所述核酸分子端基修饰生物素，然后与连接有链霉亲和素的功能化纳米金相连接；

[0043] b、将所述核酸分子端基修饰巯基，然后与所述的功能化的纳米金相连接。

[0044] 所述的核酸分析探针中所述核酸分子为 DNA、RNA 或适配体。

[0045] 与现有技术相比,本发明具有如下的优点:

[0046] 1. 提供了一种新的纳米金的合成方法,该法具有简单、快速、无需特殊条件等优点。

[0047] 2. 首次采用N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺还原氯金酸合成纳米金,在合成过程中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺同时作为还原剂和稳定剂,无需在加入其他反应试剂。此合成方法不同于文献报道(Cui, H.; Wang, W.; Duan, C. F.; Dong, Y. P.; Guo, J. Z. Chem. Eur. J. 2007, 13, 6975)的鲁米诺还原氯金酸的合成方法。

[0048] 3. 本发明所合成的纳米金的形貌和粒径,可由N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺和氯金酸的用量来进行调控;可以通过调节步骤(1)中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的量得到不同形貌的纳米金;可调节步骤(2)中氯金酸的量得到不同粒径的纳米金。

[0049] 4. 由该方法所得到的纳米金为发光功能化的纳米金,其表面键合有发光试剂N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺,该发光功能化的纳米金具有优良的化学发光特性。其发光效率优于文献报道的(Cui, H.; Wang, W.; Duan, C. F.; Dong, Y. P.; Guo, J. Z. Chem. Eur. J. 2007, 13, 6975)鲁米诺发光功能化的纳米金。

[0050] 5. 将功能化的纳米金作为发光标记物标记生物分子,可构建生物分析探针。制备该生物分析探针的方法简单、快捷、操作简便、结合效果好,克服了现有的以发光试剂和酶为标记物的标记技术操作麻烦、费时、分析成本高等重要缺陷。

附图说明

[0051] 下面结合附图对本发明作进一步说明。

[0052] 图1:不同浓度的氯金酸和N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺合成的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金:

[0053] A:1.0mmol/L氯金酸+0.5mmol/L的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺+1.0mmol/L氯金酸,得到呈单分散球状的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金;

[0054] B:6mmol/L氯金酸+4mmol/L的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺+6mmol/L氯金酸,得到呈球状纳米金组装的链状的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金;

[0055] C:8mmol/L氯金酸+5mmol/L的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺+10mmol/L氯金酸,得到呈球状纳米金组装的网状的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金;

[0056] D:10mmol/L氯金酸+8mmol/L的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺+6mmol/L氯金酸,得到呈球状纳米金组装的网状的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金;

[0057] 图2:不同氯金酸的用量制备的不同粒径的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的电镜照片,其中:

[0058] A:9mL 6mmol/L氯金酸+5mL 4mmol/L的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺+6mL 6mmol/L氯金酸制备的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金,其粒径为18nm;

[0059] B:9mL 6mmol/L氯金酸+5mL 4mmol/L的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺

+7mL6mmol/L 氯金酸制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金,其粒径为 22nm ;

[0060] C :9mL 6mmol/L 氯金酸 +5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 +8mL 6mmol/L 氯金酸制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金,其粒径为 25nm ;

[0061] D :9mL 6mmol/L 氯金酸 +5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 +9mL 6mmol/L 氯金酸制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金,其粒径为 30nm ;

[0062] 图 3 :不同 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的用量制备的不同形貌的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的电镜照片,其中 :

[0063] A :9mL 6mmol/L 氯金酸 +4.5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 +6mL 6mmol/L 氯金酸制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金呈单分散球状 ;

[0064] B :9mL 6mmol/L 氯金酸 +5.0mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 +6mL 6mmol/L 氯金酸制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金呈球状纳米金组装的链状 ;

[0065] C :9mL 6mmol/L 氯金酸 +5.5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 +6mL 6mmol/L 氯金酸制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金呈球状纳米金组装的准网状 ;

[0066] D :9mL 6mmol/L 氯金酸 +6mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 +6mL 6mmol/L 氯金酸制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金呈球状纳米金组装的网状 ;

[0067] 图 4 :不同温度下合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金 :

[0068] A :9mL 6mmol/L 氯金酸 +5.0mL 4mmol/L N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 +6mL 6mmol/L 氯金酸在 15℃下制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金 ;

[0069] B :9mL 6mmol/L 氯金酸 +5.0mL 4mmol/L N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 +6mL 6mmol/L 氯金酸在 25℃下制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金 ;

[0070] C :9mL 6mmol/L 氯金酸 +5.0mL 4mmol/L N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 +6mL 6mmol/L 氯金酸在 30℃下制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金 ;

[0071] D :9mL 6mmol/L 氯金酸 +5.0mL 4mmol/L N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 +6mL 6mmol/L 氯金酸在 35℃下制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金 ;

[0072] 图 5 :二次蒸馏水、纯净水和超纯水对合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的影响 :

[0073] A :9mL 6mmol/L 氯金酸 +5.0mL 4mmol/L N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 +6mL 6mmol/L 氯金酸 +30.0mL 的二次蒸馏水在 25℃下制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金 ;

[0074] B :9mL 6mmol/L 氯金酸 +5.0mL 4mmol/L N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 +6mL 6mmol/L 氯金酸 +30.0mL 的纯净水在 25℃下制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金 ;

[0075] C:9mL 6mmol/L 氯金酸 +5.0mL 4mmol/L N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 +6mL 6mmol/L 氯金酸 +30.0mL 的超纯水在 25℃下制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金;

[0076] 图 6:制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金粒子的 X 射线电子能谱图与 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺纯样的 X 射线电子能谱图,其中:

[0077] A:为 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺纯样中的 C1s 能谱;

[0078] B:为 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺纯样中的 N1s 能谱;

[0079] C:为制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的 C1s 能谱;

[0080] D:为制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的 N1s 能谱;

[0081] E:为制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的 Au4f 能谱;

[0082] 图 7:制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金粒子的紫外-可见吸收光谱图,其中:

[0083] A:纯 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液的紫外-可见吸收光谱;

[0084] B:初始 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米的紫外-可见吸收光谱;

[0085] C:透析后的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米溶液的紫外-可见吸收光谱;

[0086] D:透析-离心-干燥后水分散-盐析-沉淀再溶解后的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米溶液紫外-可见吸收光谱;

[0087] E:透析-离心-干燥后水分散-盐析-上清液的紫外-可见吸收光谱;

[0088] 图 8:不同形貌 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金的化学发光曲线(实验条件:制备的发光功能化纳米金粒子离心后的沉淀用 pH = 13 的 NaOH 溶液进行分散放入检测池中,再注入浓度为 0.1mol/L H₂O₂ 溶液),其中:

[0089] A:9mL 6mmol/L 氯金酸 +4.5mL 的 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 +6mL 6mmol/L 氯金酸;

[0090] B:9mL 6mmol/L 氯金酸 +5.0mL 的 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 +6mL 6mmol/L 氯金酸;

[0091] C:9mL 6mmol/L 氯金酸 +5.5mL 的 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 +6mL 6mmol/L 氯金酸;

[0092] D:9mL 6mmol/L 氯金酸 +6.0mL 的 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 +6mL 6mmol/L 氯金酸;

[0093] 图 9:pH = 13 条件 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺合成的发光功能化纳米金和文献(Cui, H.; Wang, W.; Duan, C. F.; Dong, Y. P.; Guo, J. Z. Chem. Eur. J. 2007, 13, 6975)合成的鲁米诺直接键合的发光功能化纳米金的发光比较示意图,其中:

[0094] A:500 μL 经离心分离后的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺合成的发光功能化纳米金再注入 400 μL 浓度为 0.1mol/L H₂O₂ 溶液的化学发光信号;

[0095] B:500 μL 经离心分离后的鲁米诺合成的发光功能化纳米金再注入 400 μL 浓度为 0.1mol/L H₂O₂ 溶液的化学发光信号;

[0096] 图 10:基于 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金制备的免疫和

核酸分析探针的发光特性

具体实施方式

[0097] 下面对本发明得到的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金、该发光功能化的纳米金的制备方法以及基于该发光功能化的纳米金的生物分析探针的具体实施方式进行详细描述。

[0098] 1. 本发明的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金。

[0099] 该功能化纳米金由金纳米粒子和N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺连接而成,所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺通过共价键 Au-N 连接在所述金纳米粒子的表面。

[0100] 所述功能化纳米金具有化学发光特性。所述功能化纳米金与氧化剂反应产生化学发光。

[0101] 根据文献 (U. Isacson, G. Wettermark, Anal. Chim. Acta. 1974. 68. 339.), 所述氧化剂包括但不限于 H_2O_2 、 O_2 、 ClO^- 、 I_2 、 IO_4^- 、 MnO_4^- , 本发明以 H_2O_2 作为氧化剂为例。

[0102] 所述功能化纳米金与 H_2O_2 反应产生化学发光; 其反应条件为: 将 0.1mol/L H_2O_2 溶液注入到经离心分离后的功能化纳米金溶胶中; 其中, H_2O_2 溶液为 400 μ L, 功能化纳米金溶胶为 500 μ L。

[0103] 2. 本发明的功能化纳米金的制备方法, 包括如下步骤:

[0104] (1) 将氯金酸水溶液 A 与 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液在搅拌状态下混合得到混合液; 所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2-4 倍;

[0105] (2) 在搅拌状态下, 再将氯金酸水溶液 B 加入步骤 (1) 得到的混合液中, 继续搅拌至形成金溶胶, 得到的金溶胶即为功能化纳米金; 所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1-3 倍。

[0106] 所述氯金酸水溶液 A 的摩尔浓度可为 1-10mmol/L、1-6mmol/L、6-10mmol/L、6-8mmol/L 或 8-10mmol/L;

[0107] 所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液的摩尔浓度可为 0.5-8.0mmol/L、0.5-4.0mmol/L、0.5-6.0mmol/L、4.0-6.0mmol/L、4.0-8.0mmol/L 或 6.0-8.0mmol/L;

[0108] 所述氯金酸水溶液 B 的摩尔浓度可为 1-10mmol/L、1-6mmol/L 或 6-10mmol/L。

[0109] 所述氯金酸水溶液 A、N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液和所述氯金酸水溶液 B 的配比为下述 h1-h10 中的任一种:

[0110] h1、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 4 倍, 所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1 倍;

[0111] h2、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2 倍, 所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 3 倍;

[0112] h3、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1.8 倍;

[0113] h4、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.3 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1.4 倍;

[0114] h5、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.1 倍;

[0115] h6、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.4 倍;

[0116] h7、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍;

[0117] h8、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 3 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2 倍;

[0118] h9、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 $\frac{27}{11}$ 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 $\frac{18}{11}$ 倍;

[0119] h10、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.25 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤 (1) 中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1.5 倍。

[0120] 所述的功能化纳米金的制备方法,其特征在于,采用了如下具体步骤:

[0121] 1) 将 9mL 6.0mmol/L 氯金酸水溶液 A 与 30mL 水在搅拌状态下混合,然后加入 4.5-6mL 浓度为 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌;

[0122] 2) 在搅拌状态下,再将 6-9mL 6.0mmol/L 氯金酸水溶液 B 加入 1) 得到的溶液中,继续搅拌至形成金溶胶。

[0123] 所述方法还包括将所述金溶胶通过离心进行纯化的步骤,具体如下:将初始合成的纳米金溶胶在 $17120 \times g$ 下离心 45 分钟,然后将沉淀用二次蒸馏水或纯净水或超纯水溶

解。

[0124] 所述功能化纳米金的制备方法,其反应温度可以为 15-35℃;上述步骤(1)或1)的反应时间为2小时以上,上述步骤(2)或2)的反应时间为1.5小时以上;N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺同时作为合成过程中的还原剂和稳定剂。

[0125] 配制所述氯金酸水溶液A、氯金酸水溶液B和N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液所用的水的电阻率大于等于 $1.0\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$;所述水选自下述三种水中的至少一种:二次蒸馏水、纯净水和超纯水。

[0126] 所述的功能化纳米金,其形貌可呈单分散球状、球状纳米金组装的链状或球状纳米金组装的网状,并且粒径大小也可控。其粒径大小为10-30纳米。其形貌呈球状纳米金组装的链状时,链长为400-500纳米。

[0127] 增加氯金酸的量,所得到的发光功能化纳米金的粒径逐渐增加;增加N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的量可以分别得到单分散球状、球状纳米金组装的链状或球状纳米金组装的网状的发光功能化的纳米金。

[0128] 所述的功能化纳米金,其特征在于,在发光试剂用量、氯金酸用量和发光实验条件等同的情况下要比文献(Cui, H.; Wang, W.; Duan, C. F.; Dong, Y. P.; Guo, J. Z. Chem. Eur. J. 2007, 13, 6975)合成的鲁米诺直接键合的发光功能化纳米金发光效率高。

[0129] 3. 基于功能化纳米金的一种生物分析探针,是由上述的功能化纳米金标记生物分子形成的。

[0130] 所述生物分子为抗体或核酸分子。

[0131] 所述的生物分析探针为免疫分析探针或核酸分析探针。

[0132] 所述免疫分析探针制备的方法为下述A或B的方法:

[0133] A、将所述抗体分子端基修饰生物素,然后与连接有链霉亲和素的功能化纳米金相连接;

[0134] B、将所述抗体分子直接与所述的功能化纳米金相连接。

[0135] 所述免疫分析探针的制备方法A,包括如下步骤:

[0136] A) 将本发明所得到的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺直接还原氯金酸的纳米金溶胶中加入链霉亲和素,使其终浓度为 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 。混合均匀后在室温下培育30分钟,再把5%(w/w)的牛血清白蛋白加到溶液中不断搅拌5分钟,使其最终浓度为1%。最后在 $17120\times\text{g}$ 下离心20分钟,以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子,然后将沉淀用含有1%(w/w)的牛血清白蛋白的 $0.1\text{mol}/\text{L}$ pH = 7.4磷酸盐缓冲液溶解,得到连接链霉亲和素的功能化纳米金;

[0137] B) 在步骤A)中所得的连接链霉亲和素的功能化的纳米金中加入端基经生物素修饰的抗体溶液,在37℃下孵育30分钟,在 $17120\times\text{g}$ 下离心30分钟,以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子,将所得沉淀分散于 $250\mu\text{L}$ 含有1%(w/w)的牛血清白蛋白的 $0.1\text{mol}/\text{L}$ pH = 7.4磷酸盐缓冲液溶解。即得到功能化纳米金免疫分析探针。

[0138] 所述免疫分析探针的制备方法B,包括如下步骤:

[0139] 将0.5mL的 $1.0\text{mg}/\text{mL}$ 抗体分子加到用 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 的氢氧化钠将pH调至8.0的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺直接还原氯金酸所得到的金胶溶液中去,在室温培育30

分钟后,再把 5% (w/w) 的牛血清白蛋白加到溶液中不断搅拌 5 分钟,使其最终浓度为 1% (w/w)。最后在 17120*g 下离心 30 分钟,以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子,然后将沉淀用含有 1% (w/w) 的牛血清白蛋白的 0.1mol/L pH = 7.4 磷酸盐缓冲液溶解,即得到功能化的纳米金免疫分析探针。

[0140] 所述核酸分析探针制备的方法为下述 a 或 b 的方法:

[0141] a、将所述核酸分子端基修饰生物素,然后与连接有链霉亲和素的功能化纳米金相连接;

[0142] b、将所述核酸分子端基修饰巯基,然后与所述的功能化的纳米金相连接。

[0143] 所述核酸分析探针的制备方法 a,包括如下步骤:

[0144] q1) 将本发明所得到的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺直接还原氯金酸的纳米金溶胶中加入链霉亲和素,使其终浓度为 25 μ g/mL。混合均匀后在室温下培育 30 分钟,再把 5% (w/w) 的牛血清白蛋白加到溶液中不断搅拌 5 分钟,使其最终浓度为 1%。最后在 17120*g 下离心 20 分钟,以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子,然后将沉淀用含有 0.3mol/L 的氯化钠的 0.05mol/L pH = 8.0Tris-HCl 缓冲液分散,得到连接链霉亲和素的功能化的纳米金;

[0145] q2) 在步骤 q1) 中所得的连接链霉亲和素的功能化的纳米金中加入端基经生物素修饰的核酸溶液,在 37°C 下孵育 1 小时,在 17120*g 下离心 10 分钟,以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子,将所得沉淀分散于 250 μ L 含有 0.3mol/L 的氯化钠的 0.05mol/L pH = 8.0Tris-HCl 缓冲液。即得到功能化的纳米金核酸分析探针。

[0146] 所述核酸分析探针的制备方法 b,包括如下步骤:

[0147] 将功能化的纳米金中加入端基经巯基修饰的核酸溶液,再慢慢加入含有 1mol/L 氯化钠的 0.1mol/L pH = 7.4 磷酸盐缓冲液继续反应 40 小时。然后在室温下孵育 24 小时,在 17120*g 下离心 20 分钟,以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子,将所得沉淀分散于 0.3mol/L 的氯化钠的 0.05mol/L pH = 8.0Tris-HCl 缓冲液。即得到功能化的纳米金核酸分析探针。

[0148] 所述的核酸分析探针中所述核酸分子为 DNA、RNA 或适配体。

[0149] 下面以实施例 1 至实施例 9 进一步说明本发明的内容。

[0150] 实施例 1:合成 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金中氯金酸和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺浓度的影响

[0151] 将 10mL 1.0mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 A)和 30mL 超纯水(电阻率为 18.2M Ω *cm)在 25°C 下搅拌,加入 5mL 0.5mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后,再加入 2.5mL 1.0mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 B)继续搅拌 1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在 4°C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为:将 1ml 所述金溶胶在 17120*g 下离心 45 分钟后,再用超纯水将沉淀物溶解,得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金的形貌呈单分散球型,如附图 1A 所示。单分散球的粒径大小以 16 纳米为主。

[0152] 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 A）和 30mL 超纯水（电阻率为 $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ）在 25°C 下搅拌，加入 5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后，再加入 6mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 B）继续搅拌 1.5 小时后，得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶，避光保存在 4°C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为：将 1ml 所述金溶胶在 $17120\times g$ 下离心 45 分钟后，再用超纯水将沉淀物溶解，得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金的形貌呈球状纳米金组装的链状，如附图 1B 所示。单分散球的粒径大小以 18 纳米为主。

[0153] 将 10mL 8mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 A）和 30mL 超纯水（电阻率为 $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ）在 25°C 下搅拌，加入 8mL 5mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后，再加入 12mL 10mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 B）继续搅拌 1.5 小时后，得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶，避光保存在 4°C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为：将 1ml 所述金溶胶在 $17120\times g$ 下离心 45 分钟后，再用超纯水将沉淀物溶解，得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金的形貌呈球状纳米金组装的网状，如附图 1C 所示。单分散球的粒径大小以 10 纳米为主。

[0154] 将 15mL 10mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 A）和 30mL 超纯水（电阻率为 $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ）在 25°C 下搅拌，加入 8mL 8mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后，再加入 15mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 B）继续搅拌 1.5 小时后，得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶，避光保存在 4°C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为：将 1ml 所述金溶胶在 $17120\times g$ 下离心 45 分钟后，再用超纯水将沉淀物溶解，得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金的形貌呈球状纳米金组装的网状，如附图 1D 所示。单分散球的粒径大小以 9 纳米为主。

[0155] 该实施例中的氯金酸水溶液 A、氯金酸水溶液 B 和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液均由超纯水（电阻率为 $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ）配制。

[0156] 实施例 2：N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的合成方法中氯金酸的用量对粒径的影响

[0157] 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 A）和 30mL 超纯水（电阻率为 $18.2\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ）在 25°C 下搅拌，加入 5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后，再加入 6mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 B）继续搅拌 1.5 小时后，得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶，避光保存在 4°C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为：将 1ml 所述金溶胶在 $17120\times g$ 下离心 45 分钟后，再用超纯水将沉淀物溶解，得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径大小以 18 纳米为主，如附图 2A 所示。

[0158] 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 A）和 30mL 超纯水（电阻率为 18.2MΩ*cm）在 25℃下搅拌，加入 5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后，再加入 7mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 B）继续搅拌 1.5 小时后，得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶，避光保存在 4℃下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为：将 1ml 所述金溶胶在 17120*g 下离心 45 分钟后，再用超纯水将沉淀物溶解，得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径大小以 22 纳米为主，如附图 2B 所示。

[0159] 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 A）和 30mL 超纯水（电阻率为 18.2MΩ*cm）在 25℃下搅拌，加入 5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后，再加入 8mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 B）继续搅拌 1.5 小时后，得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶，避光保存在 4℃下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为：将 1ml 所述金溶胶在 17120*g 下离心 45 分钟后，再用超纯水将沉淀物溶解，得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径大小以 25 纳米为主，如附图 2C 所示。

[0160] 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 A）和 30mL 超纯水（电阻率为 18.2MΩ*cm）在 25℃下搅拌，加入 5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后，再加入 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 B）继续搅拌 1.5 小时后，得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶，避光保存在 4℃下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为：将 1ml 所述金溶胶在 17120*g 下离心 45 分钟后，再用超纯水将沉淀物溶解，得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径大小以 30 纳米为主，如附图 2D 所示。

[0161] 该实施例中的氯金酸水溶液 A、氯金酸水溶液 B 和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液均由超纯水（电阻率为 18.2MΩ*cm）配制。

[0162] 实施例 3：N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的合成方法中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的量对形貌的影响

[0163] 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 A）和 30mL 超纯水（电阻率为 18.2MΩ*cm）在 25℃下搅拌，加入 4.5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后，再加入 6mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 B）继续搅拌 1.5 小时后，得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶，避光保存在 4℃下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为：将 1ml 所述金溶胶在 17120*g 下离心 45 分钟后，再用超纯水将沉淀物溶解，得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的形貌呈单分散球型，粒径大小以 11 纳米为主，如附图 3A 所示。

[0164] 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 A）和 30mL 超纯水（电阻率为 18.2MΩ*cm）在 25℃下搅拌，加入 5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后，再加入 6mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 B）继续搅拌

1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在 4℃ 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为:将 1ml 所述金溶胶在 17120*g 下离心 45 分钟后,再用超纯水将沉淀物溶解,得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的形貌呈球状纳米金组装的链状,球状纳米金粒径以 18 纳米为主,其链长为 400-500 纳米,如附图 3B 所示。

[0165] 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 A)和 30mL 超纯水(电阻率为 18.2MΩ*cm)在 25℃ 下搅拌,加入 5.5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后,再加入 6mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 B)继续搅拌 1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在 4℃ 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为:将 1ml 所述金溶胶在 17120*g 下离心 45 分钟后,再用超纯水将沉淀物溶解,得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的形貌为由球状纳米金组装的准网状,金纳米球粒径以 11 纳米为主,如附图 3C 所示。

[0166] 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 A)和 30mL 超纯水(电阻率为 18.2MΩ*cm)在 25℃ 下搅拌,加入 6mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后,再加入 6mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 B)继续搅拌 1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在 4℃ 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为:将 1ml 所述金溶胶在 17120*g 下离心 45 分钟后,再用超纯水将沉淀物溶解,得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的形貌为由球状纳米金组装的网状,金纳米球粒径以 12 纳米为主,如附图 3D 所示。

[0167] 该实施例中的氯金酸水溶液 A、氯金酸水溶液 B 和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液均由超纯水(电阻率为 18.2MΩ*cm)配制。

[0168] 实施例 4:温度对 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金合成的影响

[0169] 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 A)和 30mL 超纯水(电阻率为 18.2MΩ*cm)在 15℃ 下搅拌,加入 5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后,再加入 6mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 B)继续搅拌 1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在 4℃ 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为:将 1ml 所述金溶胶在 17120*g 下离心 45 分钟后,再用超纯水将沉淀物溶解,得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径以 13 纳米为主,如附图 4A 所示。

[0170] 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 A)和 30mL 超纯水(电阻率为 18.2MΩ*cm)在 25℃ 下搅拌,加入 5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后,再加入 6mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 B)继续搅拌

1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在 4℃ 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为:将 1ml 所述金溶胶在 17120*g 下离心 45 分钟后,再用超纯水将沉淀物溶解,得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径以 18 纳米为主,如附图 4B 所示。

[0171] 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 A)和 30mL 超纯水(电阻率为 18.2MΩ*cm)在 30℃ 下搅拌,加入 5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后,再加入 6mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 B)继续搅拌 1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在 4℃ 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为:将 1ml 所述金溶胶在 17120*g 下离心 45 分钟后,再用超纯水将沉淀物溶解,得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径以 8 纳米为主,如附图 4C 所示。

[0172] 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 A)和 30mL 超纯水(电阻率为 18.2MΩ*cm)在 35℃ 下搅拌,加入 5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后,再加入 6mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 B)继续搅拌 1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在 4℃ 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为:将 1ml 所述金溶胶在 17120*g 下离心 45 分钟后,再用超纯水将沉淀物溶解,得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径以 10 纳米为主,如附图 4D 所示。

[0173] 该实施例中的氯金酸水溶液 A、氯金酸水溶液 B 和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液均由超纯水(电阻率为 18.2MΩ*cm)配制。

[0174] 实施例 5:二次蒸馏水、纯净水和超纯水对 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金合成的影响

[0175] 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 A)和 30mL 二次蒸馏水(电阻率为 1.0MΩ*cm)在 25℃ 下搅拌,加入 5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后,再加入 6mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 B)继续搅拌 1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在 4℃ 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为:将 1ml 所述金溶胶在 17120*g 下离心 45 分钟后,再用超纯水将沉淀物溶解,得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径以 8 纳米为主,如附图 5A 所示。氯金酸水溶液 A、氯金酸水溶液 B 和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液均用二次蒸馏水(电阻率为 1.0MΩ*cm)配制。

[0176] 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 A)和 30mL 纯净水(电阻率为 6.1MΩ*cm)在 25℃ 下搅拌,加入 5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后,再加入 6mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 B)继续搅拌 1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在 4℃ 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为:将 1ml 所述金溶

胶在 17120*g 下离心 45 分钟后,再用超纯水将沉淀物溶解,得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径以 20 纳米为主,如附图 5B 所示。氯金酸水溶液 A、氯金酸水溶液 B 和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液均用纯净水(电阻率为 6.1MΩ*cm)配制。

[0177] 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 A)和 30mL 超纯水(电阻率为 18.2MΩ*cm)在 25℃下搅拌,加入 5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后,再加入 6mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 B)继续搅拌 1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在 4℃下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为:将 1ml 所述金溶胶在 17120*g 下离心 45 分钟后,再用超纯水将沉淀物溶解,得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径以 18 纳米为主,如附图 5C 所示。氯金酸水溶液 A、氯金酸水溶液 B 和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液均由超纯水(电阻率为 18.2MΩ*cm)配制。

[0178] 实施例 6:N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺直接还原氯金酸得到的发光功能化纳米金的表征

[0179] 附图 6-7 是下述实验条件下得到的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的表征结果。将实施例 1 中得到的图 1b 的金溶胶通过经透析、盐析、两次离心-洗涤并干燥纯化进行征。纯化条件为:渗析过程是将合成的所述金溶胶在常温下渗析 2 天,每 8 小时换一次超纯水渗析液,通过渗析操作可以充分去除游离的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺及其氧化产物;盐析过程是将 NaCl 加入所述金溶胶中使 NaCl 的最终浓度为 0.5mol/L,形成的沉淀物;二次离心-洗涤的过程是将所述金溶胶在盐析的作用后经 17120*g 下离心 45 分钟后,再用超纯水将沉淀物溶解;干燥过程是将所述纳米金溶胶经渗析、盐析和离心-洗涤作用后放入烘箱作用 12 个小时,温度为 40℃。

[0180] 附图 6 是 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺纯样品(N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺纯样在 TCI 东京化成工业株式会社购买,CAS 号为 66612-29-1)和实施例 1 中得到的图 1b 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金溶胶经透析、盐析、两次离心-洗涤并干燥后的金纳米粒子的 Au4f、C1s 和 N1s 的 X 射线光电子能谱。附图 6E 显示 Au4f 双峰(Au4f_{7/2} 和 Au4f_{5/2})的自旋-轨道裂分为 3.7eV,与文献(Ganesan, P. G.; Singh, A. P.; Ramanath, G. Appl. Phys. Lett., 2004, 85, 579.)报道的零价金纳米粒子相一致。如附图 6A 所示,N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺纯样品中的 C1s 能谱包括三个分别位于 284.9、286.0 和 287.3eV 的组分。284.9eV 的组分来自于 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子中芳香环上的碳原子。286.0eV 的组分则与芳香环上和脂肪链上的碳原子相关。287.3eV 的组分是由酰胺基团中的碳原子(-CO-NH-)所致。附图 6C 则显示了 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺还原的金纳米粒子的 C1s 能谱。与 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺纯样的 C1s 能谱相比,发现了一个位于 288.1eV 的新组分,其他组分的位置基本与 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺各组分的位置相同。因此,C1s 能谱数据表明在金纳米粒子表面有 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的各种碳组分,而 288.1eV 的新组分对应于 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的氧化产物中的羧基碳组分。这一结果表明 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺存在于纳米粒子表面上。

[0181] 对于 N1s 能谱实验结果分析与上述讨论也较为一致。如附图 6B 所示, N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺纯样品包含的 399.5ev 和 400.8ev 的组分, 而 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化金纳米粒子的 N1s 能谱也包含了 399.2ev 和 400.3ev 两个类似的组分, 均分别对应氨基氮原子 ($-\text{NH}_2$) 和酰胺氮原子 ($-\text{CO}-\text{NH}-$)。考虑到 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺及其氧化产物中均含有氨基氮原子而酰胺氮原子则为 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺所独有, 这个结果进一步支持 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺存在金纳米表面。有报道指出对于脂肪胺保护的金纳米粒子而言 (Kumar, A.; Mandal, S.; Selvakannan, PR. Langmuir, 2003, 19, 6277.), 除了 Au-N 弱共价作用之外, 还可能存在质子化氨基与带负电的金纳米粒子之间的静电吸引力。在本工作中则未观察到位于 402.3eV 处的质子化氨基氮原子 ($-\text{NH}_3^+$) 组分 (Seitz O, ChehimiMM, Cabet-Deliry E, et al., Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2003, 218, 225.), 从而排除了 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺以质子化氨基与带负电的金纳米粒子通过静电相互作用连接的可能性。因此, Au-N 弱共价相互作用是连接 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺在金纳米粒子表面的唯一作用力。

[0182] 进一步, 用紫外-可见吸收光谱表征了实施例 1 中得到的图 1b 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金。为了避免溶胶中游离反应物和产物对表面鉴定的干扰, 首先利用多次透析的方法将小分子溶质与金纳米粒子相分离, 并检测透析前后的紫外-可见吸收光谱如附图 7 所示。透析条件为: 透析过程是将金溶胶在常温下透析 2 天, 每 8 小时换一次超纯水透析液。与纯的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液 (附图 7A 所示) 和刚合成好的金溶胶 (附图 7B 所示) 比较, 透析后的金溶胶 (附图 7C 所示) 在 291nm 和 319nm 处的吸收峰显著减弱。该处的吸收峰为 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的特征吸收, 这表明溶胶中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺含量在透析后显著降低。更为重要的是, 溶胶的最大吸收波长 (530nm) 保持不变。这表明透析过程不会改变金纳米粒子的分散状态和粒径大小。这些结果表明通过透析离心等方法可以有效的将 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺从溶胶中分离除去, 并且保持金纳米粒子的分散性和稳定性。

[0183] 随后对透析过的金溶胶中加入足量电解质盐使得金纳米粒子团聚并最终沉淀下来。离心后的沉淀物用 0.1mol/L Na_2CO_3 重新溶解, 并进行紫外-可见吸收光谱表征 (附图 7D 所示), 同样得到了 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的特征峰。与此同时, 还在离心后的上清液 (附图 7E 所示) 中再次观察到了 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的紫外吸收特征峰。这些结果表明, 金纳米粒子表面的保护剂在盐析过程中部分解离下来并在离心之后存在于上清液中, 所以能够在上清液中再次观察到 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的吸收峰。因此, 这些结果也表明 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺存在于金纳米粒子表面。

[0184] 实施例 7: N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的发光特性

[0185] 将实施例 3 中合成的图 3a、图 3b、图 3c 和图 3d 的 1mL 不同形貌的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金溶胶 17120*g 下离心 45 分钟后的沉淀用 300 μL pH = 13 的 NaOH 溶液进行分散放入检测池中, 再注入 100 μL 浓度为 0.1mol/L H_2O_2 溶液, 测定其化学发光动力学曲线如附图 8 所示。实验结果表明发光强度随着发光功能化纳米金粒子形貌呈单分散球型、球状纳米金组装链、球状纳米金组装的准网状和球状纳米金组装

的网状（附图 8A-D）不断增加，表明本发明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金具有良好的化学发光特性。

[0186] 附图 9 是本发明的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化金纳米粒子在发光试剂用量、氯金酸用量和发光实验条件等同的情况下与文献 (Cui, H. ;Wang, W. ;Duan, C. F. ;Dong, Y. P. ;Guo, J. Z. Chem. Eur. J. 2007, 13, 6975) 合成的鲁米诺直接键合的发光功能化纳米金发光效率的比较。其实验条件为：将 500 μ L 用 0.1mol/L 的氢氧化钠分散离心分离后的本发明的实施例 1 中得到的图 1b 的金溶胶和鲁米诺直接键合的发光功能化纳米粒子放入检测池中（其中本发明的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化金纳米粒子和鲁米诺直接键合的发光功能化纳米粒子中纳米粒子含量都为 0.3mmol/L）注入 400 μ L 浓度为 0.1mol/L H_2O_2 溶液检测化学发光。实验结果发现本发明的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化金纳米粒子（附图 9A）在发光试剂用量、氯金酸用量和发光实验条件等同的情况下比文献 (Cui, H. ;Wang, W. ;Duan, C. F. ;Dong, Y. P. ;Guo, J. Z. Chem. Eur. J. 2007, 13, 6975) 合成的鲁米诺直接键合的发光功能化纳米金（附图 9B）发光效率高，表明本发明的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金具有很高的发光效率。

[0187] 实施例 8：基于 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金免疫分析探针的制备

[0188] 所述免疫分析探针的制备可采用下述方案一或方案二：

[0189] 方案一，包括如下步骤：

[0190] A) 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 A）和 30mL 超纯水（电阻率为 18.2M Ω *cm）在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌，加入 5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后，再加入 6mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 B）继续搅拌 1.5 小时后，得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶。

[0191] B) 将步骤 A) 中所得到的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金溶胶中加入链霉亲和素，使其终浓度为 25 μ g/mL。混合均匀后在室温下培育 30 分钟，再向其中加入 5% (w/w) 的牛血清白蛋白溶液，不断搅拌 5 分钟，使牛血清白蛋白最终浓度为 1%。最后在 17120*g 下离心 20 分钟，以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子，然后将沉淀用 500 μ L 含有 1% (w/w) 的牛血清白蛋白的 0.1mol/L pH = 7.4 磷酸盐缓冲液溶解，得到连接链霉亲和素的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金；

[0192] C) 在步骤 B) 中所得的连接链霉亲和素的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金中加入端基经生物素修饰的抗体（生物素修饰的羊抗人 IgG）溶液，在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟，在 17120*g 下离心 30 分钟，以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子，将所得沉淀分散于 250 μ L 含有 1% (w/w) 的牛血清白蛋白的 0.1mol/L pH = 7.4 磷酸盐缓冲液溶解。即得到 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金免疫分析探针。

[0193] 方案二，包括如下步骤：

[0194] a) 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 A）和 30mL 超纯水（电阻率为 18.2M Ω *cm）在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌，加入 5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后，再加入 6mL 6mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 B）继续搅拌

1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶。

[0195] b) 将 0.5mL 1.0mg/mL 抗体(羊抗人 IgG) 加到用 0.1mol/L 的氢氧化钠将步骤 a) 中所得的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的金胶溶液的 pH 调至 8.0, 在室温培育 30 分钟后,再向其中加入 5% (w/w) 的牛血清白蛋白溶液,不断搅拌 5 分钟,使牛血清白蛋白最终浓度为 1% (w/w)。最后在 17120*g 下离心 30 分钟,以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子,然后将沉淀用 250 μ L 含有 1% (w/w) 的牛血清白蛋白的 0.1mol/L pH = 7.4 磷酸盐缓冲液溶解,即得到 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金免疫分析探针。

[0196] 实施例 9:基于 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的核酸分析探针的制备

[0197] 所述核酸分析探针的制备可采用下述方案一或方案二:

[0198] 方案一,包括如下步骤:

[0199] (A) 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 A) 和 30mL 超纯水(电阻率为 18.2M Ω *cm) 在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌,加入 5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后,再加入 6mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 B) 继续搅拌 1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶。

[0200] (B) 将步骤(A) 中所得到的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶中加入链霉亲和素,使其终浓度为 25 μ g/mL。混合均匀后在室温下培育 30 分钟,再向其中加入 5% (w/w) 的牛血清白蛋白溶液,不断搅拌 5 分钟,使牛血清白蛋白最终浓度为 1% (w/w) 最后在 17120*g 下离心 20 分钟,以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子,然后将沉淀用 500 μ L 含有 0.3mol/L 的氯化钠的 0.05mol/L pH = 8.0Tris-HCl 缓冲液分散,得到连接链霉亲和素的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金;

[0201] (C) 在步骤(B) 中所得的连接链霉亲和素的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金中加入端基经生物素修饰的 DNA 溶液(碱基序列为 GGGTTTATGAAAAACTTT-biotin),在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时,在 17120*g 下离心 10 分钟,以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子,将所得沉淀分散于 250 μ L 含有 0.3mol/L 的氯化钠的 0.05mol/L pH = 8.0Tris-HCl 缓冲液。即得到 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金 DNA 分析探针。

[0202] 方案二,包括如下步骤:

[0203] (a) 将 9mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 A) 和 30mL 超纯水(电阻率为 18.2M Ω *cm) 在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌,加入 5mL 4mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后,再加入 6mL 6mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 B) 继续搅拌 1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶。

[0204] (b) 根据文献(Demers, L., M.; Mrikin, C., A. Anal. Chem. 2000, 72, 5535-5541) 将步骤(a) 中所得到的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金中加入端基经巯基修饰的 DNA 溶液(碱基序列为 GAT CAG ATT CGC-(CH₂)₆-SH),在室温下反应 24 小时,再慢慢加入含有 1mol/L 氯化钠的 0.1mol/L pH = 7.4 磷酸盐缓冲液继续反应 40 小时。最后在 17120*g 下离心 20 分钟,将所得沉淀分散于 500 μ L 0.3mol/L 的氯化钠的 0.05mol/L

pH = 8.0 Tris-HCl 缓冲液。即得到 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金 DNA 分析探针。

[0205] 该实施例中的氯金酸水溶液 A、氯金酸水溶液 B 和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液均由超纯水（电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ）配制。

[0206] 实施例 10：基于 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的免疫和核酸分析探针的发光特性

[0207] 将 1mL 由实施例 8 方案一制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金溶胶标记的免疫分析探针和实施例 9 方案一制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金溶胶标记的核酸分析探针经离心分离后的沉淀分别用 0.1 mol/L pH = 7.4 磷酸盐缓冲液和含有 0.3 mol/L 氯化钠的 0.05 mol/L pH = 8.0 Tris-HCl 缓冲液进行分散放入检测池中，再注入含有 1 mmol/L 过氧化氢的 0.02 mol/L pH = 9.95 的碳酸盐底液，测定其化学发光动力学曲线如附图 10 所示。表明用本发明的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金制备的免疫分析探针和核酸分析探针具有良好的化学发光特性。

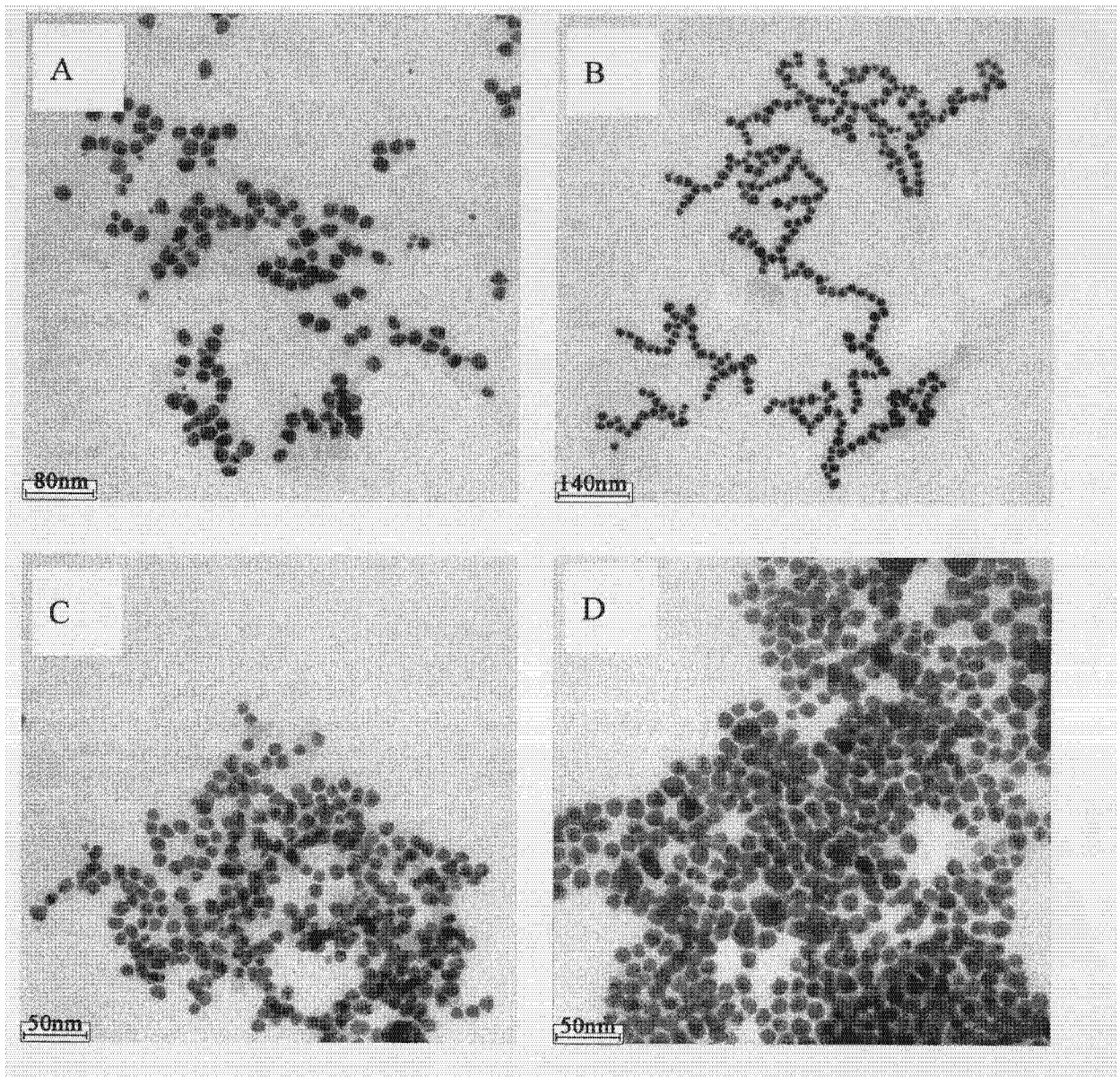


图 1

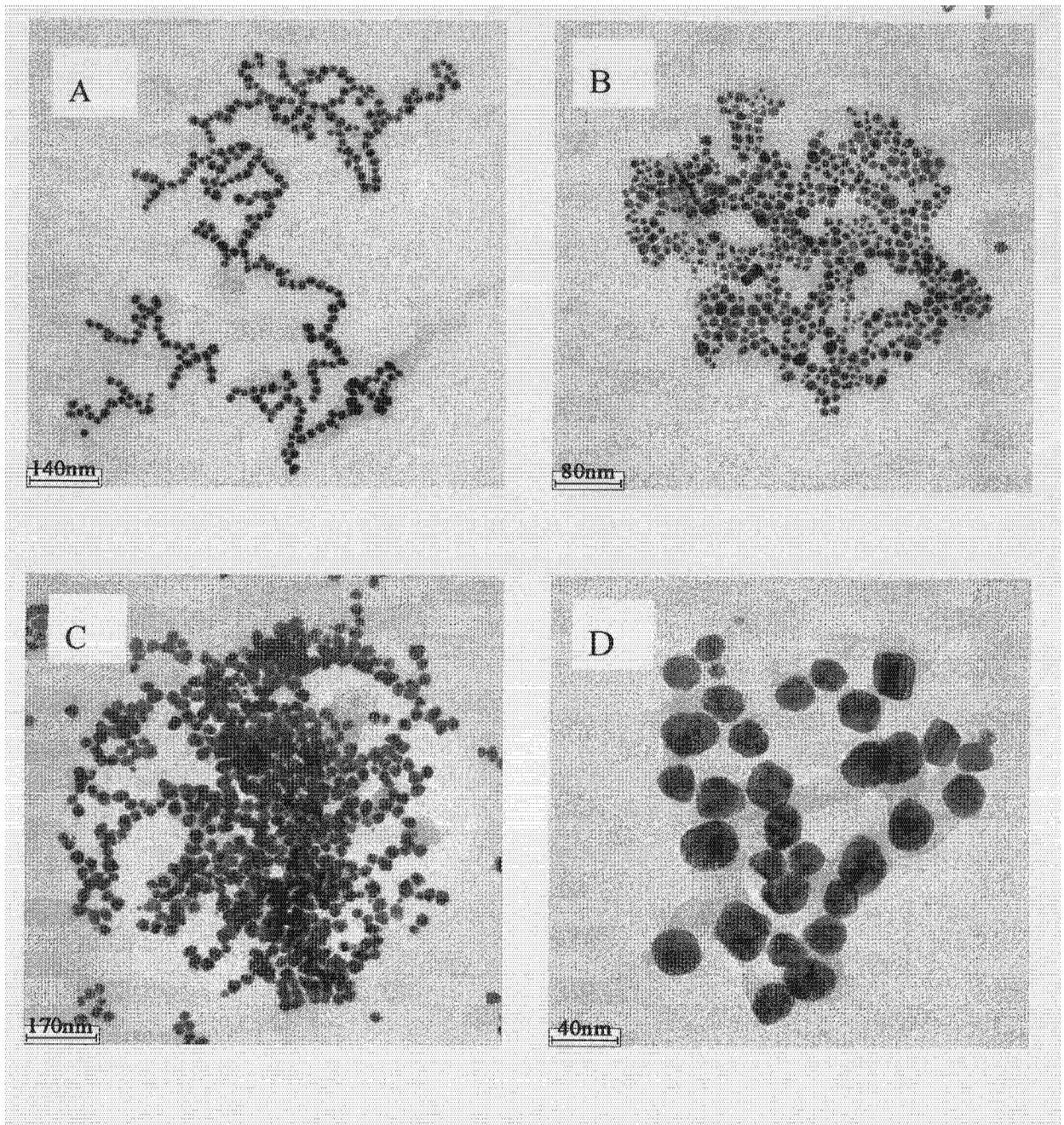


图 2

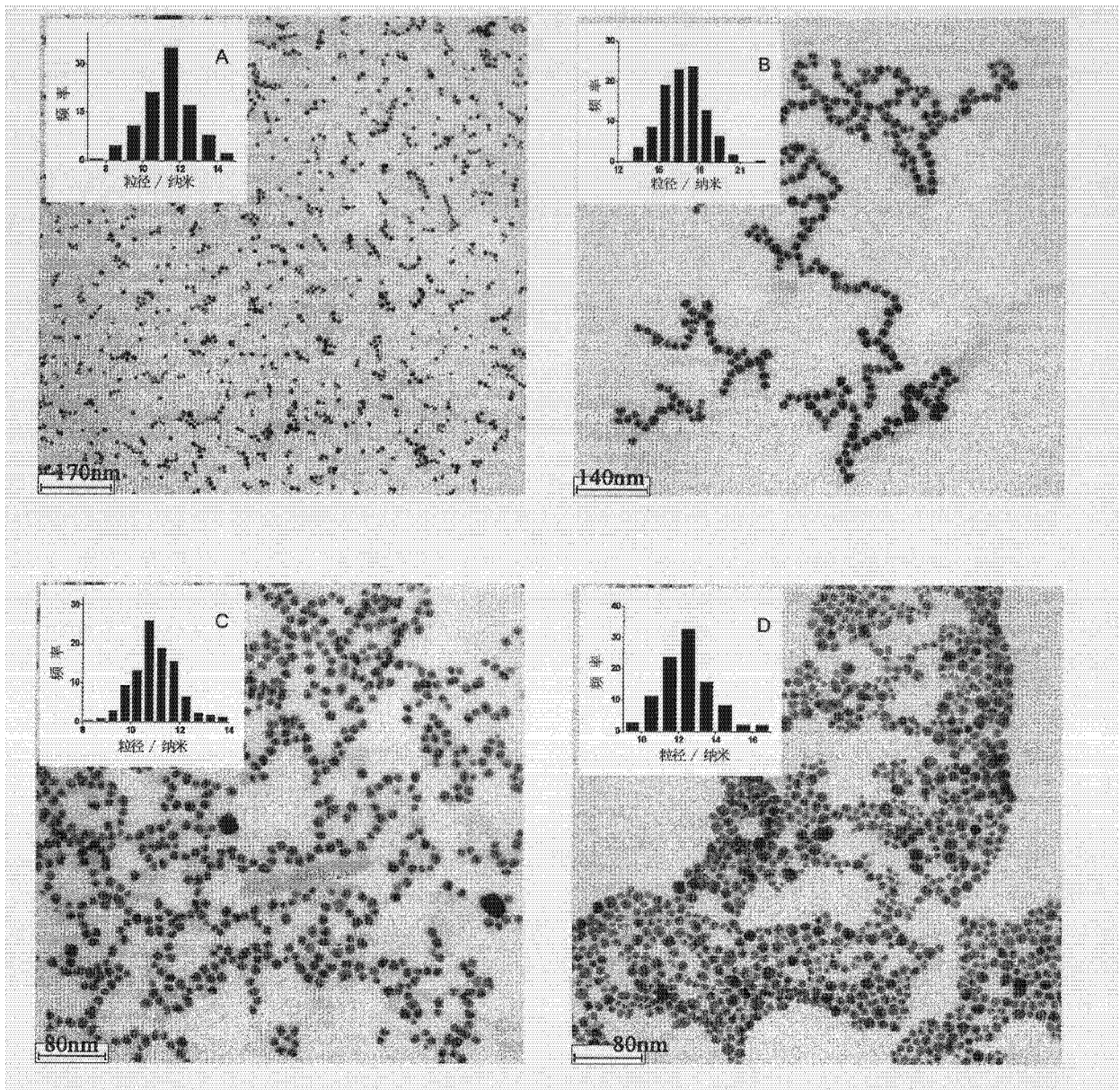


图 3

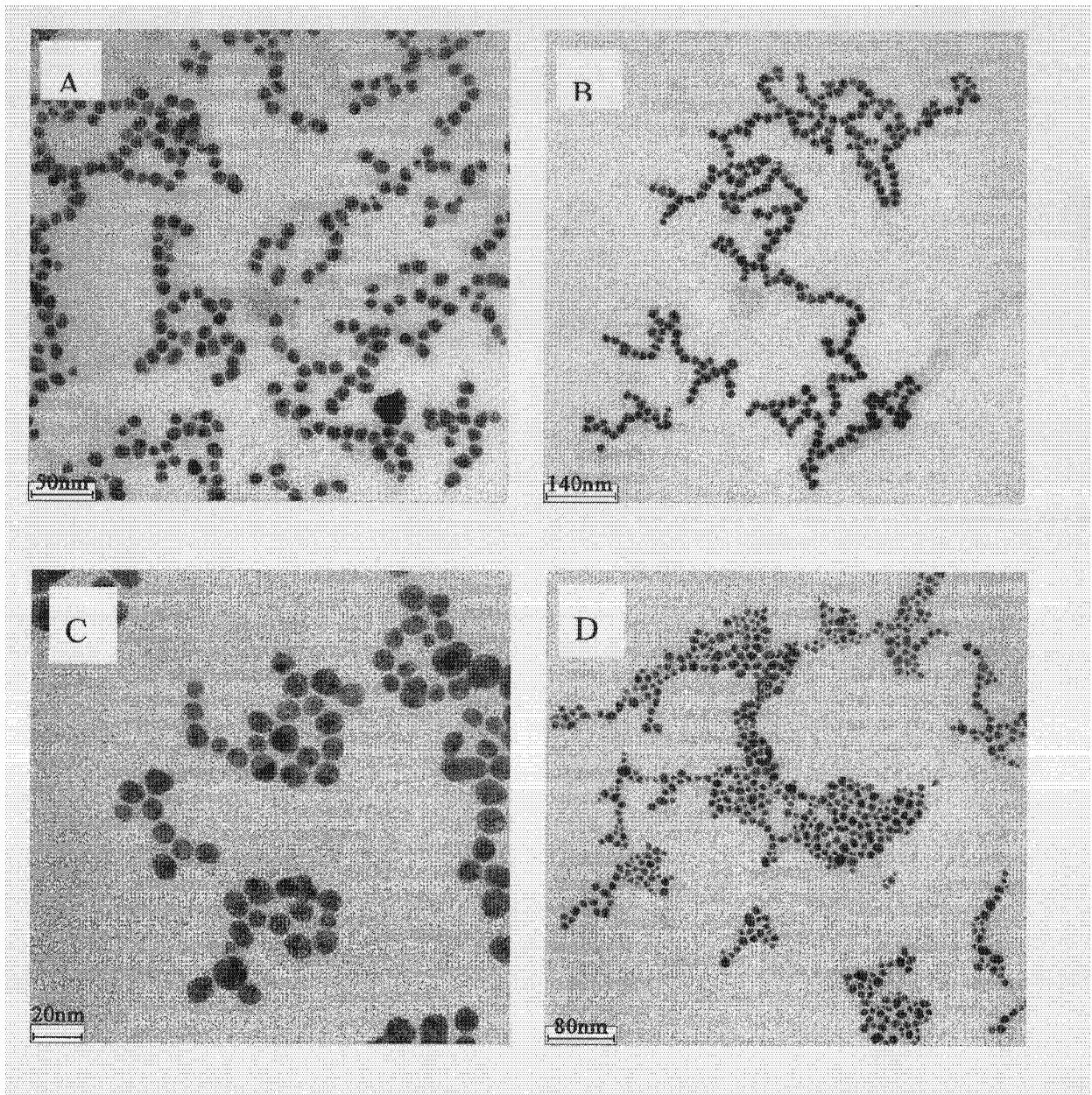


图 4

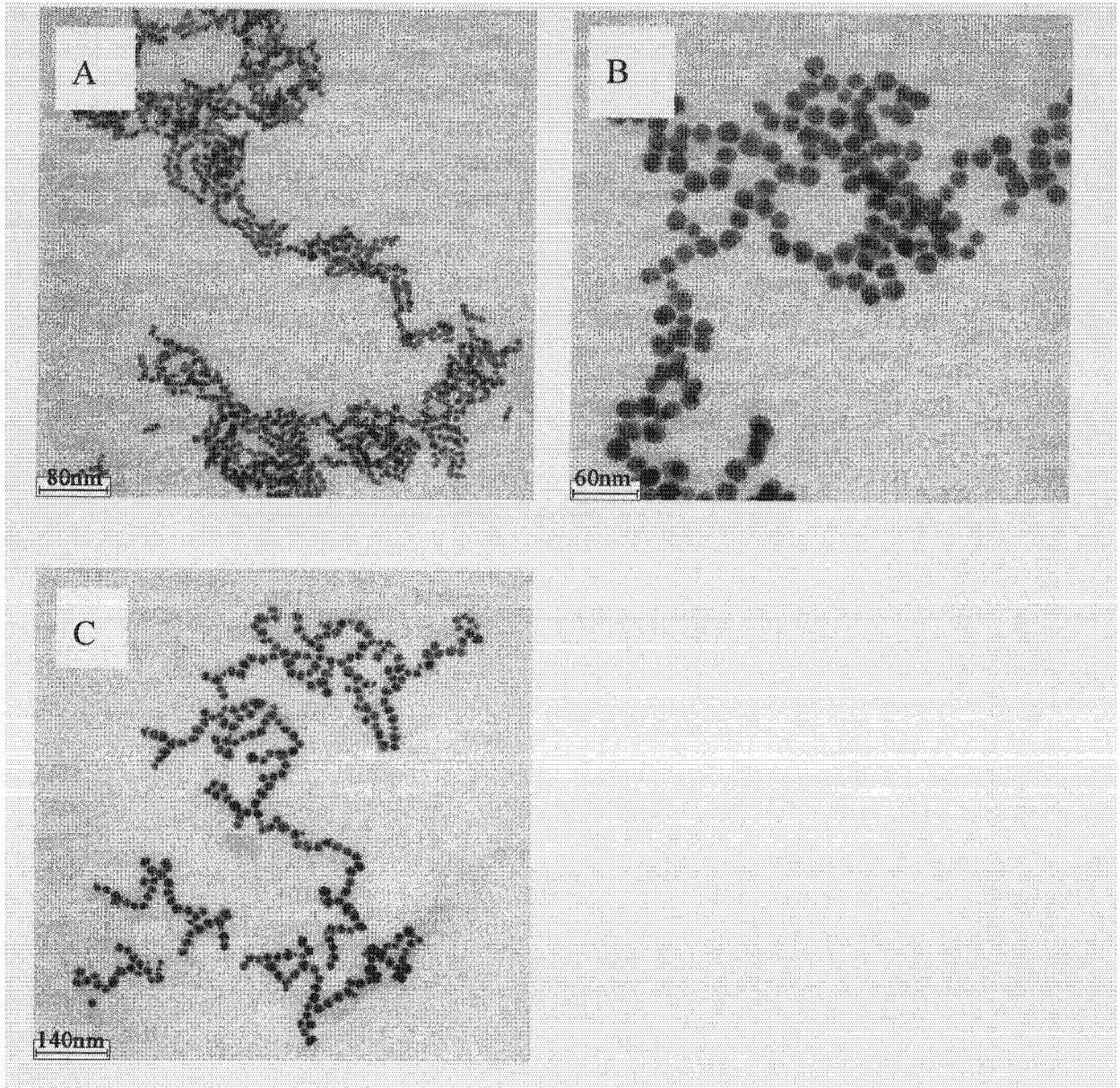


图 5

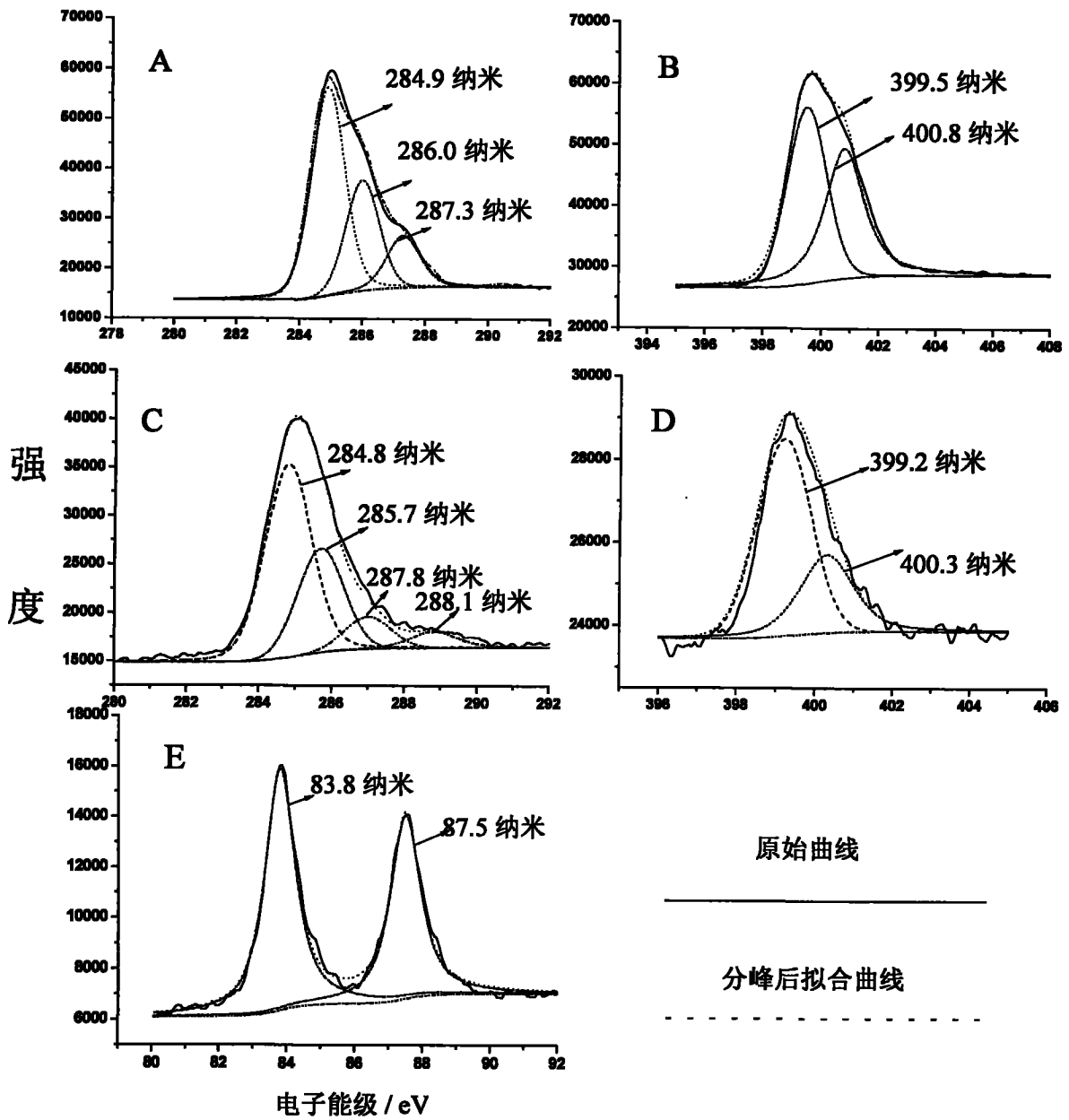


图 6

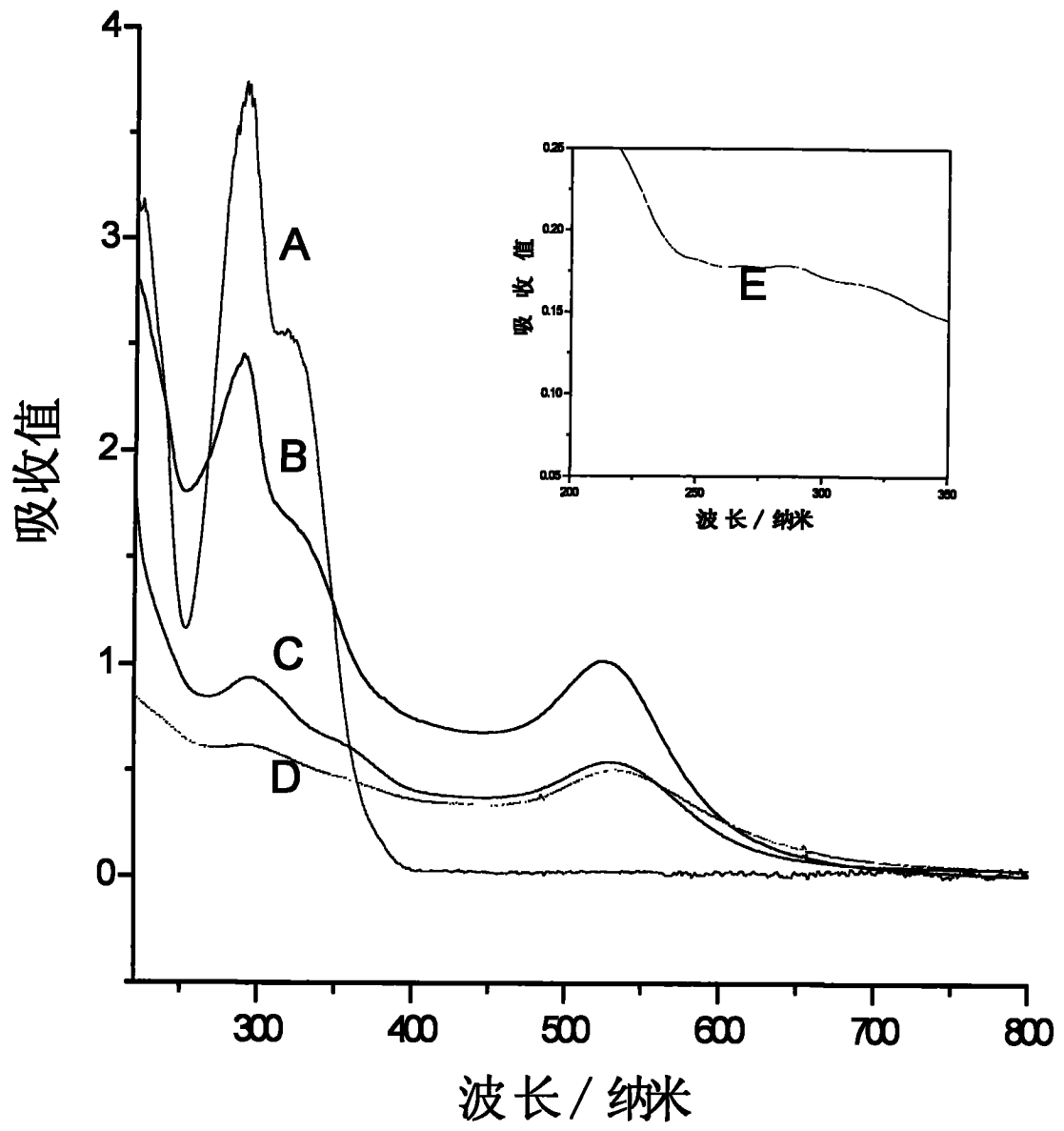


图 7

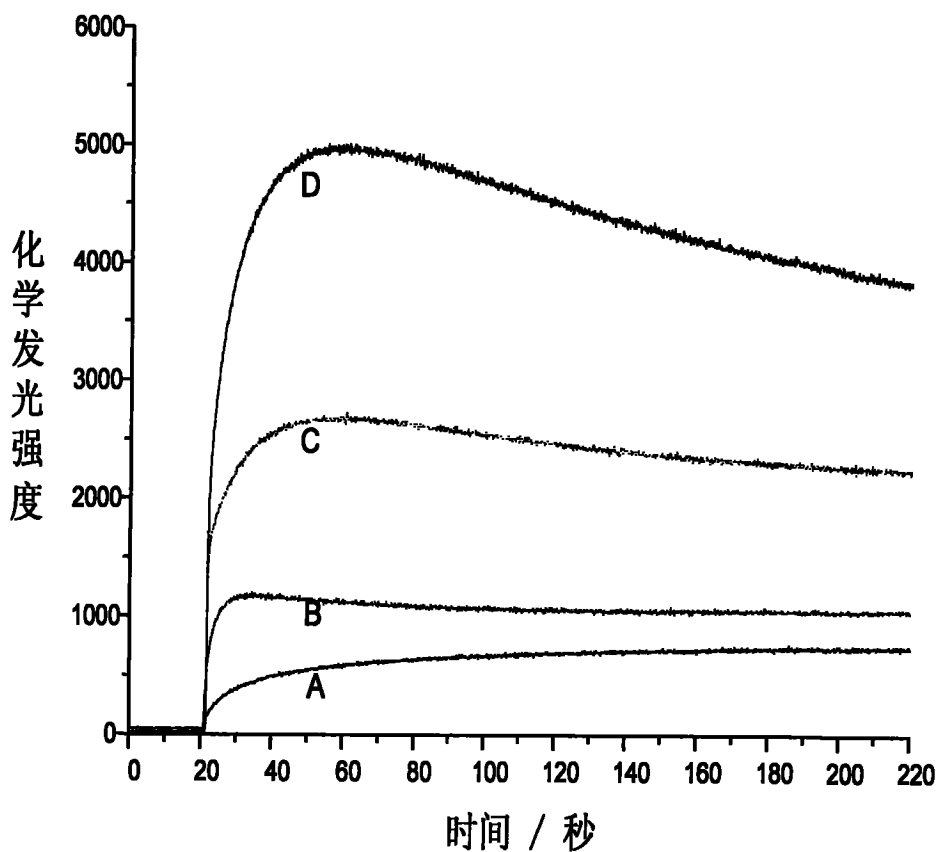


图 8

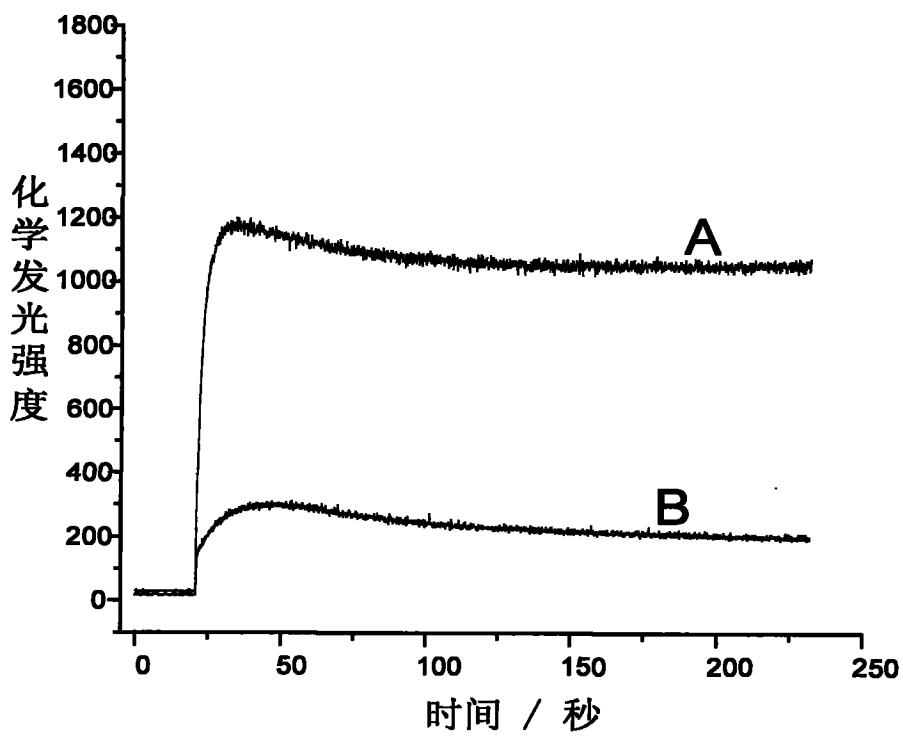


图 9

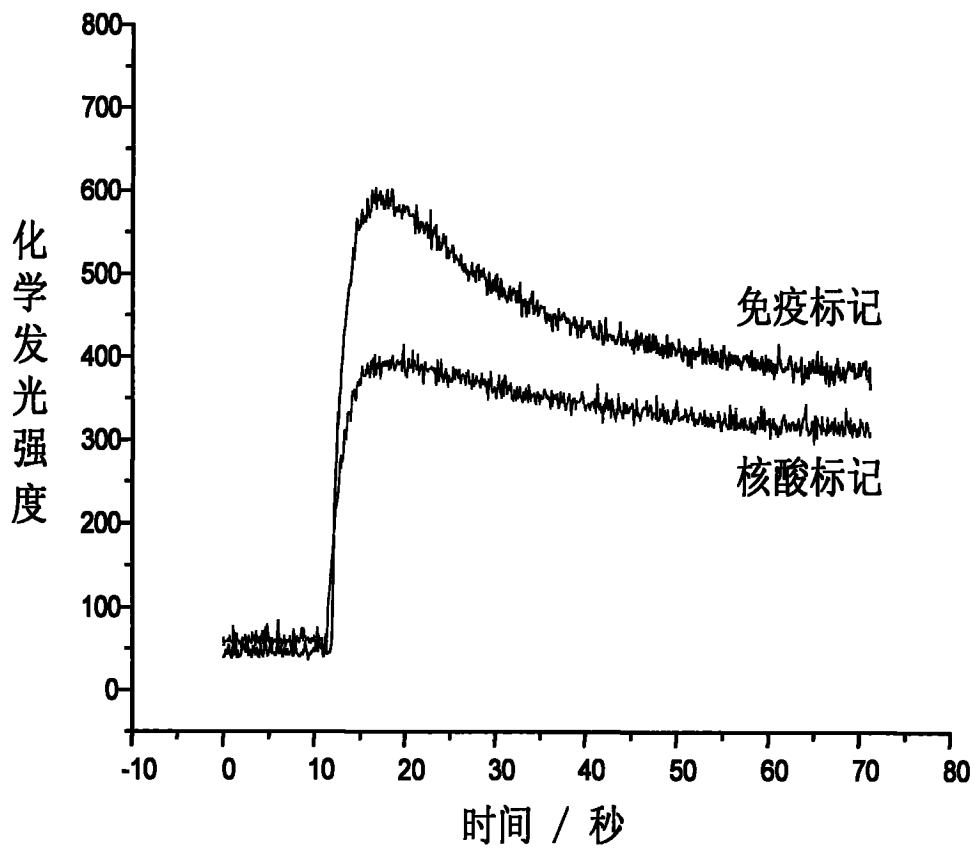


图 10

专利名称(译)	一种N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN102191034A	公开(公告)日	2011-09-21
申请号	CN201010117687.9	申请日	2010-03-03
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学技术大学		
申请(专利权)人(译)	中国科学技术大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学技术大学		
[标]发明人	崔华 田大勇		
发明人	崔华 田大勇		
IPC分类号	C09K11/06 G01N33/531 G01N21/76 C12Q1/68		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/54346 G01N33/553 G01N33/582		
代理人(译)	关畅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金及其制备方法和应用。该功能化纳米金，由金纳米粒子和N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺连接而成，所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺连接在所述金纳米粒子的表面。本发明用N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺直接还原氯金酸制备纳米金，在合成过程中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺同时作为还原剂和稳定剂。该方法具有简单、快速、无需特殊条件等优点，是一种温宽为15-35°C合成纳米金的新技术。由该方法合成得到的纳米金的粒径和形貌，可以由氯金酸与N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的比例进行调控，并且所得的纳米金具有优良的化学发光特性。本发明还公开了一种生物分析探针，它是由N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金与生物分子结合形成的，可作为免疫分析、核酸分析、分子成像、传感器等的分析探针，在生物医学、食品安全、环境监测等领域具有广阔的应用前景。

