



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102662050 B

(45) 授权公告日 2014. 02. 19

(21) 申请号 201210163971. 9

(22) 申请日 2012. 05. 24

(73) 专利权人 东北师范大学

地址 130024 吉林省长春市人民大街 5268 号

(72) 发明人 洪霞 刘益春 丁亚丹

(74) 专利代理机构 长春市东师专利事务所
22202

代理人 刘延军 李荣武

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 21/35(2014. 01)

(56) 对比文件

CN 1580775 A, 2005. 02. 16, 全文.

JP 2009115822 A, 2009. 05. 28, 全文.

JP 2011252819 A, 2011. 12. 15, 全文.

石慧等. 二氧化硅纳米与微米颗粒作为固定化酶载体的生物效应. 《高等学校化学学报》. 2007, 第 28 卷 (第 9 期), 1690-1695.

李浩. 荧光二氧化硅纳米粒子的制备与优化. 《工程科技 I 辑》. 2009, B020-80.

A. van Blaaderen et al. Synthesis and Characterization of Colloidal Dispersions of fluorescent, Monodisperse silica spheres. 《Langmuir》. 1992, 第 8 卷 2921-2931.

柯荣秦. 辣根过氧化物酶标记二氧化硅纳米颗粒的制备及其在免疫分析中的应用. 《基础科学辑》. 2009, A006-28.

Xiao-xiao He et al. Bioconjugated Nanoparticles for DNA Protection from Cleavage. 《Journal of American Chemistry》. 2003, 第 125 卷 7168-7169.

审查员 李宏悦

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

基于二氧化硅纳米粒子的红外吸收性质的免疫分析方法

(57) 摘要

本发明属于纳米生物技术领域, 特别涉及一种利用二氧化硅纳米粒子的红外指纹信号进行免疫分析的方法. 其检测步骤如下: 首先, 制备二氧化硅红外纳米探针; 然后, 将生物分子固定到金基底上; 待二氧化硅纳米探针俘获目标分析物后, 与金基底上固定的生物分子进行免疫识别, 形成三明治结构的免疫组装芯片; 最后, 测试免疫组装芯片的傅里叶变换红外反射吸收光谱, 根据二氧化硅的 TO 和 LO 声子信号来确定目标分析物的存在与否. 本发明涉及的纳米探针制备工艺简单, 成本低, 免疫检测方法简便、快捷、灵敏度高, 不仅可实现抗原、蛋白、DNA 等生物分子的检测, 而且有望用于药物筛选、司法鉴定、食品和环境监督等领域。

CN 102662050 B

1. 基于二氧化硅纳米粒子的红外吸收性质的免疫分析方法,其特征在于:

(1)、对利用 Stöber 法合成的二氧化硅纳米粒子进行表面功能基团的修饰,与抗体进行偶联后用牛血清白蛋白进行封闭,得到二氧化硅纳米探针:

将乙醇、水、氨水和正硅酸乙酯 TEOS 按照 50:1:1.7:1.5~50:3:4:4 的体积比混合,在 20° C~40° C 条件下搅拌反应 4~15 小时,通过正硅酸乙酯 TEOS 的水解和缩聚得到尺寸为 60 nm~150 nm 的二氧化硅纳米粒子;

将二氧化硅纳米粒子与 3-氨基丙基三乙氧基硅烷在 20° C~60° C 条件下搅拌反应 1~12 小时,对二氧化硅纳米粒子进行表面氨基化修饰,之后与 10% 的戊二醛按照 4:1~3:2 的体积比在 20° C~37° C 条件下搅拌反应 2~24 小时,进行醛基功能基团的修饰,再先后与 660 nm 的抗体溶液和 10 mg/ml 的牛血清白蛋白溶液在 4° C~37° C 条件下反应 1~48 小时;

(2)、在金基底上固定抗体,并用牛血清白蛋白进行封闭:

将清洗后的金基底浸入到硫辛酸乙醇溶液中 10~48 小时,之后浸入到 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺的绝对乙氰溶液中 5~24 小时或者 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺与 N-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐的磷酸盐缓冲液中 30 分钟~12 小时进行生物功能化,再将其泡入抗体溶液中,在 4° C~37° C 条件下孵化 1~48 小时,然后与 10 mg/ml 的牛血清白蛋白溶液在 4° C~37° C 条件下反应 1~48 小时;

(3)、二氧化硅纳米探针俘获分析物之后,和金基底上固定的抗体形成三明治结构的免疫组装芯片;

(4)、将免疫组装芯片进行彻底的清洗,吹干后根据测得的傅里叶变换红外反射吸收光谱中是否有二氧化硅的红外指纹信号检测分析物:

如果红外反射吸收光谱中能观察到二氧化硅位于 1075 cm^{-1} 和 1260 cm^{-1} 的 T0 和 L0 声子模式对,则表明存在相应的分析物,反之亦然。

2. 按照权利要求 1 的基于二氧化硅纳米粒子的红外吸收性质的免疫分析方法,其特征在于:所述的抗体用单链 DNA 替换,所述的分析物用相应的可进行特异性识别的 DNA、蛋白生物分子进行替换。

3. 按照权利要求 1 的基于二氧化硅纳米粒子的红外吸收性质的免疫分析方法,其特征在于:直接利用二氧化硅的可读取信号进行免疫分析。

4. 按照权利要求 1 的基于二氧化硅纳米粒子的红外吸收性质的免疫分析方法,其特征在于:免疫组装芯片的傅里叶变换红外反射吸收光谱在 60° 至 85° 的入射角下获得。

5. 按照权利要求 1 的基于二氧化硅纳米粒子的红外吸收性质的免疫分析方法在生物检测中的应用。

基于二氧化硅纳米粒子的红外吸收性质的免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于纳米生物技术领域,特别涉及一种利用二氧化硅纳米粒子的红外指纹信号进行免疫分析的方法。

背景技术

[0002] [0002] 免疫分析技术对于实现一些重要疾病标志物的检测有着至关重要的意义。酶联免疫检测法(ELISA)自1971年建立以来,便由于其所具有的快速、敏感、简便、易于标准化等优点,得到迅速的发展和运用,逐步成为应用最广泛的免疫检测方法之一,涉及到免疫学检验的各个领域。在疾病发展初期待测生物样品的含量通常很低,因此,如何实现简单、快速、高灵敏的免疫检测对重大疾病的早期诊断和治疗意义重大。纳米技术的出现,为生物医学的发展开阔了新的视野。纳米材料所具有的比表面积大及独特的光、电、磁等性能在生物检测中具有独特的优势,不仅可以发挥信号载体的作用,还可以对检测信号进行放大,从而使检测灵敏度得到大幅度的提高。目前,ELISA和纳米技术相结合用于免疫分析的信号检测技术有很多种,包括电化学、化学发光、荧光、拉曼及红外光谱技术等。其中,红外光谱检测技术由于具有简单、便利、成本低、无污染、穿透深度大、不损伤样品等优点而备受人们关注,已经被成功用于蛋白质和有机小分子的检测[W. Liao, F. Wei, D. Liu, M. X. Qian, G. Yuan, and X. S. Zhao, *Sensor. Actuat. B* 114, 445 (2006).]。

[0003] 依据已有的报道,二氧化硅材料中Si-O-Si键的反对称伸缩振动的TO和LO模式在红外光谱中有明显的吸收[B. Harbecke, B. Heinz, and P. Grosse, *Appl. Phys. A* 38, 263 (1985); K. Furukawa, Y. Liu, D. Gao, H. Nakashima, K. Uchino, and K. Muraoka, *Appl. Surf. Sci.* 121, 228 (1997).],且二氧化硅纳米粒子易于与生物分子偶联,具有良好的生物相容性、水溶性和化学稳定性,在纳米生物检测领域中,常作为表面包覆材料修饰其它具有光、电、磁功能的纳米材料。如果能够直接利用二氧化硅纳米粒子的红外信号进行检测,将不需要任何酶的靶向及信号放大技术,有望实现一种方便快捷、易推广的检测途径。该方法不仅对生物体造成的损伤小,有望用于体内检测,还可进行定量/半定量的检测。因此,利用二氧化硅纳米粒子的红外光谱进行免疫检测具有重大的实际意义。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是,针对目前二氧化硅用于生物检测的途径仅限于表面修饰的现状,设计一种直接利用二氧化硅的本征可读信号进行免疫分析的方法,以简化纳米探针制备工艺,提供一种灵敏度高、简单、快捷的纳米生物检测方法。

[0005] 本发明基于二氧化硅纳米粒子的红外吸收性质的免疫分析方法是:1、对利用Stöber法合成的二氧化硅纳米粒子进行表面氨基修饰,与抗体进行偶联后用牛血清白蛋白进行封闭,得到二氧化硅纳米探针;2、在金基底上固定抗体,并用牛血清白蛋白进行封闭;3、二氧化硅纳米探针俘获分析物之后,和金基底上固定的抗体形成三明治结构的免疫组装芯片;4、在60°至85°的入射角下,测试免疫组装芯片的傅里叶变换红外反射吸收光谱,

根据光谱中是否有二氧化硅的红外指纹信号检测分析物。

[0006] 所述的抗体可用单链 DNA 等替换,所述的分析物用相应的可进行特异性识别的生物分子进行替换。

[0007] 所述的 Stöber 法合成二氧化硅纳米粒子的方法是,将乙醇、水、氨水和正硅酸乙酯(TEOS)按照 50:1:1.7:1.5 至 50:3:4:4 的体积比混合,在 20° C~40° C 条件下搅拌反应 3~15 小时,通过 TEOS 的水解和缩聚得到尺寸为 60 nm~150 nm 的二氧化硅纳米粒子。

[0008] 所述的对二氧化硅纳米粒子进行表面功能基团修饰的方法是,先将二氧化硅纳米粒子与 3-氨丙基三乙氧基硅烷在 20° C~60° C 条件下搅拌反应 1~12 小时,对二氧化硅纳米粒子进行氨基修饰,之后再与 10% 的戊二醛按照 4:1 至 3:2 的体积比在 20° C~37° C 条件下搅拌反应 2~24 小时,进行醛基功能基团的修饰。

[0009] 所述的在金基底上固定抗体的方法是,将清洗后的金基底浸入到硫辛酸乙醇溶液中 10~48 小时,之后再浸入到 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)的绝对乙氰溶液中 5~24 小时或者 EDC 与 N-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐(NHS)的磷酸盐缓冲液(PBS)中 30 分钟至 12 小时进行生物功能化,最后将其泡入抗体溶液中,在 4° C~37° C 条件下孵化 1~48 小时,并与 10 mg/ml 的牛血清白蛋白溶液在 4° C~37° C 条件下反应 1~48 小时,对基底上未完全作用的活性位点进行封闭。

[0010] 所述的二氧化硅的红外指纹信号是,红外光谱中分别位于 1075 cm^{-1} 和 1260 cm^{-1} 左右的 T0 和 L0 声子模式对。

[0011] 本发明方法具有以下优点:

[0012] 1. 二氧化硅纳米探针制备简单,成本低,可批量生产。

[0013] 2. 可直接利用二氧化硅纳米粒子的红外指纹信号进行生物检测,检测方法简单、快捷、便利,对生物组织损伤小,灵敏度高。

[0014] 3. 适用范围广。本发明的方法不仅可以实现抗体、DNA、蛋白等生物分子的检测,也可应用于药物筛选、司法鉴定、食品和环境监督等领域。

具体实施方式

[0015] 实施例 1:

[0016] 1. 将 50 ml 乙醇、1.0 ml 水、1.7 ml 氨水和 1.5 ml TEOS 混合,200 rpm 搅拌,40° C 水浴反应 3 小时,即得到粒径约为 60 nm 的二氧化硅纳米粒子。加入 20 μl 的 3-氨丙基三乙氧基硅烷,40° C 搅拌反应 5 小时,离心水洗三次,分散在 30 ml 水中,与 10% 的戊二醛按照 4:1 的体积比进行混合,37° C 条件下搅拌反应 2 小时,所得到的粒子离心水洗三次,分散至 PBS 缓冲溶液中,与 40 nM 的抗体溶液混合,在 37° C 条件下反应 1 小时,离心并用 PBS 清洗后即得到二氧化硅纳米探针。

[0017] 2. 用热蒸发法在单晶硅基底上镀一层金膜,将金基底浸入到 2% 的硫辛酸乙醇溶液(w/v)中 10 小时,漂洗吹干后再浸入到 1% EDC 的乙氰溶液(w/v)中 5 小时进行生物功能化,再次漂洗吹干后,将其浸入 660 nM 的抗体溶液中,在 37° C 条件下孵化 1 小时。清洗并用氮气吹干后,将基底浸入 10 mg/ml 的牛血清白蛋白溶液中,37° C 条件下反应 1 小时,对基底上未完全作用的活性位点进行封闭。

[0018] 3. 向步骤 1 得到的二氧化硅纳米探针溶液中加入 0.5 mol/L 的 NaBH_4 溶液,37° C

反应 15 分钟,离心清洗后,再次分散至 PBS 缓冲溶液中。之后加入抗原溶液,37° C 条件下孵化 1 小时,离心洗掉未被纳米探针俘获的抗原后,将固定有抗体的金基底浸入,继续在 37° C 条件下孵化 1 小时,漂洗吹干,即得到三明治结构的免疫组装芯片。

[0019] 4. 在 60° 入射角下,利用傅里叶变换红外吸收光谱仪对免疫组装芯片进行红外反射吸收光谱测试。如果得到的红外反射吸收光谱中存在 1075 cm^{-1} 和 1260 cm^{-1} 左右的二氧化硅的 Si-O-Si 桥键反对称伸缩振动的 TO 和 LO 声子模式对,则表明所测溶液中存在相应的抗原分析物,反之亦然。

[0020] 实施例 2 :

[0021] 将实施例 1 步骤 1 中的将 50 ml 乙醇、1.0 ml 水、1.7 ml 氨水和 1.5 ml TEOS 混合换成 50 ml 乙醇、2.0 ml 水、2.5 ml 氨水和 3.0 ml TEOS 混合,40° C 水浴反应 4 小时换成 30° C 水浴反应 10 小时,即得到粒径约为 80 nm 的二氧化硅纳米粒子。

[0022] 实施例 3 :

[0023] 将实施例 1 步骤 1 中的将 50 ml 乙醇、1.0 ml 水、1.7 ml 氨水和 1.5 ml TEOS 混合换成 50 ml 乙醇、3.0 ml 水、4.0 ml 氨水和 4.0 ml TEOS 混合,40° C 水浴反应 4 小时换成 20° C 水浴反应 15 小时,即得到粒径约为 150 nm 的二氧化硅纳米粒子。

[0024] 实施例 4 :

[0025] 将实施例 1 步骤 1 中的 3- 氨丙基三乙氧基硅烷的体积换为 150 μl ,反应温度换为 60° C,反应时间换为 1 小时,其余反应过程和条件不变。

[0026] 实施例 5 :

[0027] 将实施例 1 步骤 1 中的 3- 氨丙基三乙氧基硅烷的体积换为 300 μl ,反应温度换为 20° C,反应时间换为 12 小时,其余反应过程和条件不变。

[0028] 实施例 6 :

[0029] 将实施例 1 步骤 1 中的二氧化硅与戊二醛的体积比换成 3:2,反应温度换为 20° C,反应时间换成 24 小时,其余反应过程和条件不变。

[0030] 实施例 7 :

[0031] 将实施例 1 步骤 1 中在抗体溶液中的反应温度换为 4° C,反应时间换为 48 小时,其余反应过程和条件不变。

[0032] 实施例 8 :

[0033] 将实施例 1 步骤 2 中在硫辛酸乙醇溶液和 EDC 乙氰溶液的浸泡时间分别换为 48 小时和 24 小时,其余反应过程和条件不变。

[0034] 实施例 9 :

[0035] 将实施例 1 步骤 2 中的 1% EDC 的乙氰溶液换为 EDC/NHS (0.1 M / 0.02 M) 的 PBS 缓冲溶液,5 小时换为 30 分钟,其余反应过程和条件不变。

[0036] 实施例 10 :

[0037] 将实施例 1 步骤 2 中的 1% EDC 的乙氰溶液换为 EDC/NHS (0.1 M / 0.02 M) 的 PBS 缓冲溶液,5 小时换为 12 小时,其余反应过程和条件不变。

[0038] 实施例 11 :

[0039] 将实施例 1 步骤 2 中在抗体溶液中的反应温度换为 4° C,反应时间换为 48 小时,其余反应过程和条件不变。

[0040] 实施例 12：

[0041] 将实施例 1 步骤 2 中在牛血清白蛋白溶液中的反应温度换为 4° C, 反应时间换为 48 小时, 其余反应过程和条件不变。

[0042] 实施例 13：

[0043] 将实施例 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 中步骤 3 中的抗原溶液换为与抗体有特异性识别作用的蛋白溶液, 其余反应过程和条件不变, 可对蛋白进行检测。

[0044] 实施例 14：

[0045] 将实施例 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或 13 中步骤 3 中的 37° C 条件下孵化 1 小时换为 4° C 条件下孵化 48 小时, 其余反应过程和条件不变。

[0046] 实施例 15：

[0047] 将实施例 1 步骤 1 中的抗体换成末端氨基化的单链 DNA；步骤 2 换成用热蒸发法在单晶硅基底上镀一层金膜, 将金基底浸入到 1.0 μ M 单链 DNA 溶液中 24 小时, 漂洗吹干；步骤 3 换成向二氧化硅纳米探针溶液中加入目标单链 DNA 待测溶液, 37° C 孵化 1 小时, 离心洗掉未被探针俘获的目标单链 DNA 后, 将步骤 2 制得的固定有末端巯基化的单链 DNA 的金基底浸入, 继续在 37° C 条件下孵化 1 小时, 漂洗吹干；其余反应过程和条件不变, 可对目标单链 DNA 进行检测。

[0048] 实施例 16：

[0049] 将实施例 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 中步骤 4 的 60° 换为 70°，其余反应过程和条件不变, 依然可对相应的分析物(抗原、蛋白、DNA 等)进行检测。

[0050] 实施例 17：

[0051] 将实施例 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 中步骤 4 的 60° 换为 80°，其余反应过程和条件不变, 依然可对相应的分析物(抗原、蛋白、DNA 等)进行检测。

[0052] 实施例 18：

[0053] 将实施例 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 中步骤 4 的 60° 换为 85°，其余反应过程和条件不变, 依然可对相应的分析物(抗原、蛋白、DNA 等)进行检测。

专利名称(译)	基于二氧化硅纳米粒子的红外吸收性质的免疫分析方法		
公开(公告)号	CN102662050B	公开(公告)日	2014-02-19
申请号	CN201210163971.9	申请日	2012-05-24
[标]申请(专利权)人(译)	东北师范大学		
申请(专利权)人(译)	东北师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	东北师范大学		
[标]发明人	洪霞 刘益春 丁亚丹		
发明人	洪霞 刘益春 丁亚丹		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/35		
代理人(译)	刘延军 李荣武		
其他公开文献	CN102662050A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于纳米生物技术领域，特别涉及一种利用二氧化硅纳米粒子的红外指纹信号进行免疫分析的方法。其检测步骤如下：首先，制备二氧化硅红外纳米探针；然后，将生物分子固定到金基底上；待二氧化硅纳米探针俘获目标分析物后，与金基底上固定的生物分子进行免疫识别，形成三明治结构的免疫组装芯片；最后，测试免疫组装芯片的傅里叶变换红外反射吸收光谱，根据二氧化硅的TO和LO声子信号来确定目标分析物的存在与否。本发明涉及的纳米探针制备工艺简单，成本低，免疫检测方法简便、快捷、灵敏度高，不仅可实现抗原、蛋白、DNA等生物分子的检测，而且有望用于药物筛选、司法鉴定、食品和环境监督等领域。