



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102914646 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 20

(21) 申请号 201210463931. 6

(22) 申请日 2012. 11. 16

(73) 专利权人 湖南大学

地址 410082 湖南省长沙市岳麓区麓山南路  
2 号

(72) 发明人 王玉 蒋健晖 楚霞 唐丽娟  
俞汝勤

(74) 专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责  
任公司 43113

代理人 马强

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 21/65 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1444045 A, 2003. 09. 24, 全文.

CN 101679022 A, 2010. 03. 24, 全文.

US 2010/0255599 A1, 2010. 10. 07, 全文.

CN 102221542 A, 2011. 10. 19, 全文.

WO 2011/071343 A2, 2011. 06. 16, 全文.

Yu Wang, et al.. Surface-Enhanced  
Raman Spectroscopy-Based,  
Homogeneous, Multiplexed Immunoassay  
with Antibody-Fragments-Decorated  
Gold Nanoparticles. 《Analytical  
Chemistry》. 2013, 第 85 卷 (第 19

期), 9213-9220.

Ximei Qian, et al.. Surface-Enhanced  
Raman Nanoparticle Beacons Based on  
Bioconjugated Gold Nanocrystals and Long  
Range Plasmonic Coupling. 《Journal of the  
American Chemical Society》. 2008, 第 130 卷  
(第 45 期), 第 14934-14935 页.

任斌 等. 表面等离子体耦合效应与表面  
增强拉曼光谱. 《第十四届全国光散射学术会  
议》. 2007, 第 64 页.

Ximei Qian, et al.. Stimuli-Responsive  
SERS Nanoparticles: Conformational Control  
of Plasmonic Coupling and Surface Raman  
Enhancement. 《Journal of the American  
Chemical Society》. 2009, 第 131 卷 (第 22 期),  
第 7540-7541 页.

Yu Wang, et al.. Enzymatic Control of  
Plasmonic Coupling and Surface Enhanced  
Raman Scattering Transduction for Sensitive  
Detection of DNA Demethylation. 《Journal of  
the American Chemical Society》. 2012, 第 84  
卷 (第 20 期), 第 8602-8606 页.

仇晓燕 等. 蛋白质中二硫键的定位及其质  
谱分析. 《化学进展》. 2008, 第 20 卷 (第 6 期),  
第 975-983 页.

审查员 赵晓明

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

基于表面等离子体耦合效应的均相多组分免  
疫分析方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于表面等离子体耦合效  
应的均相多组分免疫分析方法, 分别制备了表面  
修饰有拉曼活性染料和捕获抗体的金纳米球探针  
和表面修饰有拉曼活性染料和检测抗体的金纳米  
棒探针, 拉曼活性染料自身带有巯基且无荧光背  
景, 抗体经 TCEP 还原处理. 待测物抗原与抗体发  
生免疫夹心反应, 生成免疫复合物, 拉近纳米颗粒  
之间的距离, 产生表面等离子体耦合效应, 显著增

强了纳米颗粒表面修饰染料的拉曼信号, 利用耦  
合增强效应实现了对抗原的 SERS 定量分析. 该  
方法简单、快速, 检测过程只需要一步操作, 不  
需要反复洗脱, 无需对样品进行分离, 实现了样  
品中含有多个组分的同步定量分析, 灵敏度高,  
特异性好, 有望成为蛋白组学研究和药物疗效评  
估的一种新方法.

1. 一种基于表面等离子体耦合效应的均相多组分免疫分析方法,包括制备表面修饰有拉曼活性染料和抗体的金纳米颗粒探针,抗原与抗体免疫夹心反应使纳米颗粒之间的距离拉近,产生表面等离子体耦合效应,显著增强纳米颗粒表面修饰染料的拉曼信号,利用耦合增强效应和拉曼光谱自身性质实现了多组分 SERS 定量分析;所述抗体均经过三(2-羧乙基)膦酸盐还原处理。

2. 根据权利要求 1 所述的基于表面等离子体耦合效应的均相多组分免疫分析方法,包括如下步骤:

(1) 制备表面修饰有拉曼活性染料和抗体的金纳米颗粒探针;

(2) 将待测物样品加入到含有步骤(1)所述的金纳米颗粒探针的 PBS 缓冲溶液中,进行免疫夹心反应;

(3) 对反应后的样品溶液进行检测。

3. 如权利要求 2 所述的分析方法,其特征在于,步骤(1)所述的金纳米颗粒探针包括修饰有拉曼活性染料和抗体的金纳米棒探针,修饰有拉曼活性染料和抗体的金纳米球探针。

4. 如权利要求 2 所述的分析方法,其特征在于,步骤(3)所述的检测是对反应后的样品溶液进行拉曼光谱扫描。

5. 如权利要求 2 至 4 任一项所述的方法,其特征在于,所述方法的具体步骤如下:

(1) 制备表面修饰有拉曼活性染料和抗体的金纳米棒探针:

(a) 取三(2-羧乙基)膦酸盐溶液加入到抗体溶液中,充分混匀,37℃培育;

(b) 取金纳米棒溶液,离心去除多余的 CTAB 保护剂,将金纳米棒重新分散在灭菌水中,取中性表面活性剂 Brij 56 溶液加入到金纳米棒溶液中,充分混匀,37℃培育,置换掉金纳米棒表面的 CTAB 保护剂,再次离心去除多余的 Brij 56,将金纳米棒重新分散在灭菌水中;

(c) 向步骤(b)所得的金纳米棒溶液中加入经步骤(a)还原处理后的抗体溶液,30℃培育;取拉曼染料溶液加入到该溶液中,充分混匀,30℃培育;再加入 BSA 溶液,充分混匀,30℃培育;标记过程结束后,反复离心三次去除多余的抗体和拉曼染料,将离心得到的金纳米棒重新分散在 PB 溶液中,4℃储存备用;

(2) 制备表面修饰有拉曼活性染料和抗体的金纳米球探针:

(a) 取三(2-羧乙基)膦酸盐溶液加入到抗体溶液中,充分混匀,37℃培育;

(b) 取金纳米球溶液,离心去除上层溶液,将金纳米球重新分散在灭菌水中,取拉曼染料溶液加入到该溶液中,充分混匀,37℃培育;加入经步骤(a)还原处理后的抗体溶液,充分混匀,37℃培育;再加入 BSA 溶液,充分混匀,37℃培育;标记过程结束后,反复离心三次去除多余的抗体和拉曼染料,将离心得到的金纳米球重新分散在 PB 溶液中,4℃储存备用;

(3) 对反应后的样品溶液进行检测:分别取步骤(1)制备的金纳米棒探针,步骤(2)制备的金纳米球探针和含有待测物抗原的样品溶液加入到 PBS 缓冲溶液中,充分混匀,37℃培育,反应结束后,使用拉曼光谱仪对产物溶液进行拉曼光谱扫描。

## 基于表面等离子体耦合效应的均相多组分免疫分析方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于一种基于表面等离子体耦合效应的均相多组分免疫分析方法,具体是指纳米材料的生物功能化和应用,表面增强拉曼共振(SERS)以及耦合增强效应,蛋白质定量和免疫分析技术。

### 背景技术

[0002] 蛋白质分子标志物的定量检测对于蛋白组学研究具有重要的意义,它作为一种分析指标,可以灵敏的反应治疗药物在疾病模型中的药效。目前的免疫分析技术都是利用了抗原抗体免疫夹心反应原理,传统的检测方法多以固相反应为主,先固定捕获抗体,再依次结合抗原和检测抗体,洗脱步骤多,费时费力。另外,还建立了一些新的免疫分析技术,如磁分离分析技术,微流控免疫分析技术,基于场效应晶体管的纳米管技术等,这些分析方法灵敏、快速、特异,但是,需要借助于复杂的仪器,操作难度高,实验人员需要掌握一定的技术。

### 发明内容

[0003] 本发明针对现有技术存在的不足,提出了一种基于表面等离子体耦合效应的均相多组分免疫分析方法,检测过程只需要一步操作,简单、快速,不需要洗脱,无需对样品进行分离,实现了样品中含有多个组分的同步定量分析,灵敏度高,特异性好。

[0004] 当贵金属纳米颗粒表面等离子体受到激发,在颗粒表面产生电磁场,显著增强了表面吸附分子的拉曼信号;当纳米颗粒之间的距离足够接近时,表面等离子体产生耦合作用,形成了更强的电磁场,对表面吸附分子的拉曼信号能达到 $10^4\sim 10^{15}$ 倍的增强作用。

[0005] 本发明所述的基于表面等离子体耦合效应的均相多组分免疫分析方法,包括制备表面修饰有拉曼活性染料和抗体的纳米颗粒探针,抗原抗体结合拉近纳米颗粒之间的距离,表面等离子体产生耦合,利用耦合增强效应进行SERS定量分析。其中,所述的纳米颗粒表面功能化修饰是通过Au-S键共价作用来实现的,拉曼活性染料自身带有巯基且无荧光背景,抗体经三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)还原处理。

[0006] 本发明所述的免疫分析方法,分别制备了表面修饰有拉曼活性染料和捕获抗体的金纳米球探针和表面修饰有拉曼活性染料和检测抗体的金纳米棒探针,待测物抗原与抗体发生免疫夹心反应,生成免疫复合物,拉近纳米颗粒之间的距离,产生表面等离子体耦合效应,显著增强了纳米颗粒表面修饰染料的拉曼信号,利用这种耦合增强效应实现了对抗原的SERS定量分析。

[0007] 本发明所述的多组分免疫分析方法包括如下步骤:

[0008] (1) 制备修饰有拉曼活性染料和检测抗体(多抗)的金纳米棒探针;

[0009] (2) 制备修饰有拉曼活性染料和捕获抗体(单抗)的金纳米球探针;

[0010] (3) 将待测物样品加入到含有步骤(1)和(2)所述的两种金纳米颗粒探针的缓冲溶液中,发生免疫夹心反应;

[0011] (4) 对反应后的样品溶液进行检测。

[0012] 其中,针对不同的待测物抗原,步骤(1)所述的金纳米棒探针是表面修饰有不同的拉曼活性染料和不同的检测抗体的纳米颗粒探针。

[0013] 其中,针对不同的待测物抗原,步骤(2)所述的金纳米球探针是表面修饰有不同的拉曼活性染料和不同的捕获抗体的纳米颗粒探针。

[0014] 其中,针对一种待测物抗原,步骤(1)所述的金纳米棒探针和步骤(2)所述的金纳米球探针是表面修饰有同一种拉曼活性染料的纳米颗粒探针。

[0015] 其中,步骤(4)所述的检测手段是利用拉曼光谱仪对产物溶液进行定量分析。

[0016] 其中,所述的检测抗体和捕获抗体均经过三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)还原处理。

[0017] 以下结合具体的操作步骤对本发明做进一步的说明(以样品中含有三种待测抗原为例):

[0018] (1)分别制备了三种能与待测抗原(I,II,III)特异性结合的金纳米棒探针I,金纳米棒探针II,金纳米棒探针III。金纳米棒探针I是表面修饰有拉曼染料(1),检测抗体(1)和BSA的纳米颗粒探针,金纳米棒探针II是表面修饰有拉曼染料(2),检测抗体(2)和BSA的纳米颗粒探针,金纳米棒探针III是表面修饰有拉曼染料(3),检测抗体(3)和BSA的纳米颗粒探针。

[0019] (2)分别制备了三种能与待测抗原(I,II,III)特异性结合的金纳米球探针I,金纳米球探针II,金纳米球探针III。金纳米球探针I是表面修饰有拉曼染料(1),捕获抗体(1)和BSA的纳米颗粒探针,金纳米球探针II是表面修饰有拉曼染料(2),捕获抗体(2)和BSA的纳米颗粒探针,金纳米球探针III是表面修饰有拉曼染料(3),捕获抗体(3)和BSA的纳米颗粒探针。

[0020] (3)将步骤(1)和(2)所述的两种金纳米颗粒探针加入到含有三种待测抗原的样品溶液中,抗原与抗体发生免疫夹心反应。

[0021] (4)对反应后的样品溶液进行拉曼光谱扫描。

[0022] 对于样品中含有三种待测抗原的定量分析,检测过程是:取金纳米棒探针I,II,III和金纳米球探针I,II,III的储备液以及缓冲溶液于微量管中,加入含有三种待测抗原的样品溶液,于37℃恒温水浴中培育15分钟,反应结束后,取一定体积的样品进行拉曼光谱扫描。

[0023] 本发明中,制备金纳米棒探针的具体步骤是:(1)取1 mL 50 mM TCEP溶液加入到检测抗体溶液(0.1 mg/mL, 150 mL)中,充分混匀,放入37℃摇床中培育30分钟;(2)取金纳米棒(长径比 $\sim 2.7$ )溶液4 mL,8000 rpm离心10min,去除上层溶液,将金纳米棒分散在5 mL灭菌水中,取280 mL 15 mM Brij 56溶液加入到金纳米棒溶液中,充分混匀,于37℃摇床中培育30分钟后,取出,8000 rpm离心10min,去除上层溶液,将金纳米棒分散在2 mL灭菌水中;(3)取检测抗体溶液(0.1 mg/mL, 180 mL)加入到金纳米棒溶液中,充分混匀,放入30℃摇床中培育2小时;(4)取拉曼染料溶液(50 mM,6 mL)加入到金纳米棒溶液中,充分混匀,放入30℃摇床中培育2小时;(5)取90 mL 5% BSA溶液加入到金纳米棒溶液中,充分混匀,于30℃摇床中继续培育2小时后,取出,8000 rpm离心10min,去除上层溶液,将金纳米棒分散在10 mM PB溶液中,反复离心洗涤三次后,用0.6 mL 10 mM PB溶液定容,4℃储存备用。

[0024] 制备金纳米球探针的具体步骤是：(1) 取 1 mL 50 mM TCEP 溶液加入到捕获抗体溶液 (0.1 mg/mL, 150 mL) 中, 充分混匀, 放入 37°C 摇床中培育 30 分钟; (2) 取金纳米球溶液 1 mL, 10000 rpm 离心 10min, 去除上层溶液, 将金纳米球分散在 300 mL 灭菌水中, 取拉曼染料溶液 (50 mM, 6 mL) 加入到金纳米球溶液中, 充分混匀, 放入 37°C 摇床中培育 15 分钟; (3) 取捕获抗体溶液 (0.1 mg/mL, 112 mL) 加入到金纳米球溶液中, 充分混匀, 放入 37°C 摇床中培育 1 小时; (4) 取 17 mL 5% BSA 溶液加入到金纳米球溶液中, 充分混匀, 于 37°C 摇床中继续培育 1 小时后, 取出, 8000 rpm 离心 10min, 去除上层溶液, 将金纳米球分散在 10 mM PB 溶液中, 反复离心洗涤三次后, 用 300 mL 10 mM PB 溶液定容, 4 °C 储存备用。

[0025] 对于样品中含有三种待测抗原的定量分析, 具体的操作步骤是: 分别取三种金纳米棒探针 I, II, III ( $\sim 2$  nM, 1.25 mL) 和三种金纳米球探针 I, II, III ( $\sim 50$  pM, 2 mL) 加入到 17.25 mL PBS 缓冲溶液 (10 mM PB, 200 mM NaCl) 中, 取 3 mL 含有待测抗原的样品溶液加入到该溶液中, 充分混匀后, 放入 37°C 恒温水浴中反应 15 分钟。反应结束后, 使用拉曼光谱仪对产物溶液进行拉曼光谱扫描。

[0026] 注意, 以上反应条件为最优条件, 所述溶液体积均可成倍变化不改变最优结果。改变比例或试剂加入顺序可使信号的变化程度在 1%~100% 内变化。

[0027] 本发明提出了一种基于表面等离子体耦合效应的均相多组分免疫分析方法, 分别制备了表面修饰有拉曼活性染料和捕获抗体的金纳米球探针和表面修饰有拉曼活性染料和检测抗体的金纳米棒探针, 拉曼活性染料自身带有巯基且无荧光背景, 抗体经 TCEP 还原处理。待测物抗原与抗体发生免疫夹心反应, 生成免疫复合物, 拉近纳米颗粒之间的距离, 产生表面等离子体耦合效应, 显著增强了纳米颗粒表面修饰染料的拉曼信号, 利用这种耦合增强效应实现了对抗原的 SERS 定量分析。该方法简单、快速, 检测过程只需要一步操作, 不需要反复洗脱, 无需对样品进行分离, 实现了样品中含有多个组分的同步定量分析, 灵敏度高, 特异性好, 有望成为蛋白组学研究和药物疗效评估的一种新方法。

## 具体实施方式

[0028] 实施例 1: 人干扰素- $\gamma$  检测

[0029] 具体的操作步骤是:

[0030] (1) 制备金纳米棒探针和金纳米球探针

[0031] 金纳米棒探针的制备方法: (1) 取 1 mL 50 mM TCEP 溶液加入到人干扰素- $\gamma$  抗体溶液 (多抗, 0.1 mg/mL, 150 mL) 中, 充分混匀, 放入 37°C 摇床中培育 30 分钟; (2) 取金纳米棒 (长径比  $\sim 2.7$ ) 溶液 4 mL, 8000 rpm 离心 10min, 去除多余的十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 溶液, 将金纳米棒重新分散在 5 mL 灭菌水中; 取 280 mL 15 mM Brij 56 溶液加入到金纳米棒溶液中, 充分混匀, 放入 37°C 摇床中培育 30 分钟, 置换掉金纳米棒表面的 CTAB; 取出, 8000 rpm 离心 10min, 去除上层溶液, 将金纳米棒重新分散在 2 mL 灭菌水中; (3) 取经 TCEP 还原处理后的人干扰素- $\gamma$  抗体溶液 (多抗, 0.1 mg/mL, 180 mL) 加入到金纳米棒溶液中, 充分混匀, 放入 30°C 摇床中培育 2 小时; (4) 取 DTNB (5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)) 溶液 (50 mM, 6 mL) 加入到金纳米棒溶液中, 充分混匀, 放入 30°C 摇床中培育 2 小时; (5) 取 90 mL 5% BSA 溶液加入到金纳米棒溶液中, 充分混匀, 于 30°C 摇床中继续培育 2 小时后, 取出, 8000 rpm 离心 10min, 去除上层溶液, 将金纳米棒分散

在 10 mM PB 溶液中,反复离心洗涤三次后,用 0.6 mL 10 mM PB 溶液定容,4 °C 储存备用。

[0032] 金纳米球探针的制备方法:(1) 取 1 mL 50 mM TCEP 溶液加入到人干扰素- $\gamma$  抗体溶液(单抗,0.1 mg/mL, 150 mL)中,充分混匀,放入 37°C 摇床中培育 30 分钟;(2) 取金纳米球溶液 1 mL,10000 rpm 离心 10min,去除上层溶液,将金纳米球分散在 300 mL 灭菌水中,取拉曼染料溶液(50 mM, 6 mL)加入到金纳米球溶液中,充分混匀,放入 37°C 摇床中培育 15 分钟;(3) 取经 TCEP 还原处理后的人干扰素- $\gamma$  抗体溶液(单抗,0.1 mg/mL, 112 mL)加入到金纳米球溶液中,充分混匀,放入 37°C 摇床中培育 1 小时;(4) 取 17 mL 5% BSA 溶液加入到金纳米球溶液中,充分混匀,于 37°C 摇床中继续培育 1 小时后,取出,8000 rpm 离心 10min,去除上层溶液,将金纳米球分散在 10 mM PB 溶液中,反复离心洗涤三次后,用 300 mL 10 mM PB 溶液定容,4 °C 储存备用。

[0033] (2) 人干扰素- $\gamma$  检测

[0034] 分别取 3.75 mL 金纳米棒探针和 6 mL 金纳米球探针加入到 17.25 mL PBS 缓冲溶液(含 10 mM PB, 200 mM NaCl)中,取 3 mL 含有人干扰素- $\gamma$  的样品溶液加入到缓冲溶液中,充分混匀,放入 37°C 恒温水浴中反应 15 分钟。反应结束后,取产物溶液 10  $\mu$ L 滴在硅片上,使用激光共聚焦拉曼光谱仪对产物溶液进行拉曼光谱扫描。选用 He-Ne 激发器(激发波长 632 nm),曝光时间 10 秒,扫描圈数 1 圈,扫描范围 600 nm-2000 nm。

[0035] 实验结果:

[0036] 待测物人干扰素- $\gamma$  的浓度与响应呈现良好的线性关系,线性范围是 1.2 nM ~1.2 pM,能达到 3 个数量级,检测下限是 1.0 pM。

[0037] 实施例 2:细胞因子多组分检测

[0038] 选取含有三种细胞因子(干扰素- $\gamma$ ,白介素-2,肿瘤坏死因子- $\alpha$ )的待测样品作为模型体系。对于三种待测细胞因子,分别制备了三种金纳米棒探针 I, II, III 和三种金纳米球探针 I, II, III,金纳米棒探针 I 与金纳米球探针 I 能特异性结合人干扰素- $\gamma$ ,金纳米棒探针 II 与金纳米球探针 II 能特异性结合人白介素-2,金纳米棒探针 III 与金纳米球探针 III 能特异性结合肿瘤坏死因子- $\alpha$ 。

[0039] 具体的操作步骤是:

[0040] (1) 制备金纳米棒探针和金纳米球探针

[0041] 修饰有拉曼染料 DTNB 和人干扰素- $\gamma$  抗体的金纳米棒探针 I 的制备方法:(1) 取 1 mL 50 mM TCEP 溶液加入到人干扰素- $\gamma$  抗体溶液(多抗,0.1 mg/mL, 150 mL)中,充分混匀,放入 37°C 摇床中培育 30 分钟;取金纳米棒(长径比 ~2.7)溶液 4 mL,8000 rpm 离心 10min,去除多余的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)溶液,将金纳米棒重新分散在 5 mL 灭菌水中;取 280 mL 15 mM Brij 56 溶液加入到金纳米棒溶液中,充分混匀,放入 37°C 摇床中培育 30 分钟,置换掉金纳米棒表面的 CTAB;取出,8000 rpm 离心 10min,去除上层溶液,将金纳米棒重新分散在 2 mL 灭菌水中;(2) 取经 TCEP 还原处理后的人干扰素- $\gamma$  抗体溶液(多抗,0.1 mg/mL, 180 mL)加入到金纳米棒溶液中,充分混匀,放入 30°C 摇床中培育 2 小时;(3) 取 DTNB 溶液(50 mM,6 mL)加入到金纳米棒溶液中,充分混匀,放入 30°C 摇床中培育 2 小时;(4) 取 90 mL 5% BSA 溶液加入到金纳米棒溶液中,充分混匀,于 30°C 摇床中继续培育 2 小时后,取出,8000 rpm 离心 10min,去除上层溶液,将金纳米棒分散在 10 mM PB 溶液中,反复离心洗涤三次后,用 0.6 mL 10 mM PB 溶液定容,4 °C 储存备用。

[0042] 修饰有拉曼染料DTNB和人干扰素- $\gamma$ 抗体的金纳米球探针I的制备方法:(1)取1 mL 50 mM TCEP溶液加入到人干扰素- $\gamma$ 抗体溶液(单抗,0.1 mg/mL, 150 mL)中,充分混匀,放入37°C摇床中培育30分钟;(2)取金纳米球溶液1 mL,10000 rpm离心10min,去除上层溶液,将金纳米球分散在300 mL灭菌水中,取拉曼染料溶液(50 mM, 6 mL)加入到金纳米球溶液中,充分混匀,放入37°C摇床中培育15分钟;(3)取经TCEP还原处理后的人干扰素- $\gamma$ 抗体溶液(单抗,0.1 mg/mL, 112 mL)加入到金纳米球溶液中,充分混匀,放入37°C摇床中培育1小时;(4)取17 mL 5% BSA溶液加入到金纳米球溶液中,充分混匀,于37°C摇床中继续培育1小时后,取出,8000 rpm离心10min,去除上层溶液,将金纳米球分散在10 mM PB溶液中,反复离心洗涤三次后,用300 mL 10 mM PB溶液定容,4 °C储存备用。

[0043] 修饰有拉曼染料2-thiouracil和人白介素-2抗体的金纳米棒探针II和金纳米球探针II,以及修饰有拉曼染料4-acetamidothiophenol和人肿瘤坏死因子- $\alpha$ 抗体的金纳米棒探针III和金纳米球探针III与上述步骤完全一致。

[0044] (2) 细胞因子多组分检测

[0045] 分别取三种金纳米棒探针I, II, III ( $\sim$ 2 nM, 1.25 mL)和三种金纳米球探针I, II, III ( $\sim$ 50 pM, 2 mL)加入到17.25 mL PBS缓冲溶液(10 mM PB, 200 mM NaCl)中,取3 mL样品溶液加入到缓冲溶液中,充分混匀,放入37°C恒温水浴中反应15分钟。反应结束后,取产物溶液10 $\mu$ L滴在硅片上,使用激光共聚焦拉曼光谱仪对产物溶液进行拉曼光谱扫描。选用He-Ne激发器(激发波长632 nm),曝光时间10秒,扫描圈数1圈,扫描范围600 nm-2000 nm。

[0046] 实验结果:

[0047] 选择的三种拉曼染料(DTNB, 2-thiouracil, 4-acetamidothiophenol),每种染料都各自有一个特征峰不受其它两种染料拉曼峰的干扰,以此特征峰的强度值作为待测物的定量分析依据。

[0048] 待测物人干扰素- $\gamma$ 的浓度与响应呈现良好的线性关系,线性范围是1.2 nM  $\sim$ 1.2 pM,能达到3个数量级,检测下限是1.0 pM;待测物人白介素-2的浓度与响应呈现良好的线性关系,线性范围是1.3 nM  $\sim$ 3.25 pM,接近3个数量级,检测下限是2.75 pM;待测物人肿瘤坏死因子- $\alpha$ 的浓度与响应呈现良好的线性关系,线性范围是1.14 nM  $\sim$ 0.57 pM,能达到3个数量级,检测下限是0.45 pM。

专利名称(译)	基于表面等离子体耦合效应的均相多组分免疫分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102914646B</a>	公开(公告)日	2014-08-20
申请号	CN201210463931.6	申请日	2012-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	湖南大学		
申请(专利权)人(译)	湖南大学		
当前申请(专利权)人(译)	湖南大学		
[标]发明人	王玉 蒋健晖 楚霞 唐丽娟 俞汝勤		
发明人	王玉 蒋健晖 楚霞 唐丽娟 俞汝勤		
IPC分类号	G01N33/558 G01N21/65 G01N33/531		
代理人(译)	马强		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN102914646A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种基于表面等离子体耦合效应的均相多组分免疫分析方法，分别制备了表面修饰有拉曼活性染料和捕获抗体的金纳米球探针和表面修饰有拉曼活性染料和检测抗体的金纳米棒探针，拉曼活性染料自身带有巯基且无荧光背景，抗体经TCEP还原处理。待测物抗原与抗体发生免疫夹心反应，生成免疫复合物，拉近纳米颗粒之间的距离，产生表面等离子体耦合效应，显著增强了纳米颗粒表面修饰染料的拉曼信号，利用耦合增强效应实现了对抗原的SERS定量分析。该方法简单、快速，检测过程只需要一步操作，不需要反复洗脱，无需对样品进行分离，实现了样品中含有多个组分的同步定量分析，灵敏度高，特异性好，有望成为蛋白组学研究和药物疗效评估的一种新方法。