



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105259158 B

(45)授权公告日 2019.02.19

(21)申请号 201510783487.X

(22)申请日 2015.11.13

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105259158 A

(43)申请公布日 2016.01.20

(73)专利权人 暨南大学  
地址 510632 广东省广州市黄埔大道西601号

(72)发明人 唐勇 付强强 吴泽

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245  
代理人 苏运贞 陈燕娴

(51)Int.Cl.  
G01N 21/65(2006.01)  
G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件  
Yuan Zhao et al..Au nanoflower-Ag

nanoparticle assembled SERS-active substrates for sensitive MC-LR detection.《ChemComm》.2015,第51卷(第95期),

Jianping Xie et al..The Synthesis of ERS-Active Gold Nanoflower Tags for In Vivo Applications.《ACSNANO》.2008,第2卷(第12期),

常化仿.表面增强拉曼光谱结合胶体免疫层析技术(SERS-ICA)的研究和应用.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技I辑》.2014,(第05期),

谭学斌.基于银纳米聚集体的SERS探针的制备及特性研究.《万方数据》.2010,

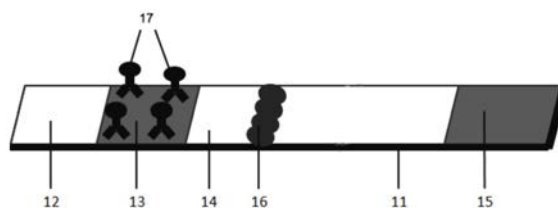
李文鹏等.Au@Ag双金属纳米粒子制备及其SERS性能.《青岛科技大学学报(自然科学版)》.2015,第36卷(第1期),

审查员 杨涛

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称  
一种表面增强拉曼散射免疫层析试纸条及制备方法与应用

(57)摘要  
本发明公开一种表面增强拉曼散射免疫层析试纸条及制备方法与应用。该试纸条包含底衬、样品吸收垫、结合垫、层析膜和吸水垫；样品吸收垫、结合垫、层析膜和吸水垫依次紧密相连、且附着在底衬上；其中，结合垫上附着金核银壳纳米花标记的抗体I；层析膜上设置检测线；检测线上附着有抗体II或者抗原A。本发明通过将金核银壳纳米花标记的抗体I分散在结合垫上，将抗原A或者抗体II呈直线型附着在层析膜上，形成检测线；在底衬上将样品吸收垫、结合垫、层析膜和吸水垫依次相互搭接；得到表面增强拉曼散射免疫层析试纸条。本发明具有操作安全、简便、低成本、快速、灵敏度高优点，应用范围广。



1. 一种表面增强拉曼散射免疫层析试纸条,其特征在于:包含底衬、样品吸收垫、结合垫、层析膜和吸水垫;样品吸收垫、结合垫、层析膜和吸水垫依次紧密相连、且附着在底衬上;其中,结合垫上附着金核银壳纳米花标记的抗体I;层析膜上设置检测线;检测线上附着有抗体II或者抗原A;

所述的金核银壳纳米花标记的抗体I通过如下方法制备得到:将金核银壳纳米花与抗体I混合,搅拌均匀;再加入牛血清白蛋白封闭得到;

所述的金核银壳纳米花的制备过程如下:

(1) 金纳米花的制备:0.2mL浓度为25mM的氯金酸加入到10mL 20mM、pH 7.4的HEPES溶液中后,静止反应30min,得到金纳米花;

(2) 金核银壳纳米花的制备:40 $\mu$ L浓度为0.1M的NaOH溶液和30 $\mu$ L浓度为0.1M的抗坏血酸加入到1mL步骤(1)制备的金纳米花中,搅拌后加入400 $\mu$ L浓度为10mM的AgNO<sub>3</sub>溶液,反应半小时,得到金核银壳纳米花。

2. 根据权利要求1所述的表面增强拉曼散射免疫层析试纸条,其特征在于:所述的金核银壳纳米花标记的抗体I通过如下步骤制备得到:

(1) 金纳米花的制备:0.2mL浓度为25mM的氯金酸加入到10mL 20mM、pH 7.4的HEPES溶液中后,静止反应30min,得到金纳米花;

(2) 金核银壳纳米花的制备:40 $\mu$ L浓度为0.1M的NaOH溶液和30 $\mu$ L浓度为0.1M的抗坏血酸加入到1mL步骤(1)制备的金纳米花中,搅拌后加入400 $\mu$ L浓度为10mM的AgNO<sub>3</sub>溶液,反应半小时,得到金核银壳纳米花;

(3) 金核银壳纳米花标记的抗体I的制备:0.2 $\mu$ L浓度为20mM的4-巯基苯甲酸加入到1mL步骤(2)制备得到的金核银壳纳米花中,室温静置1小时后加入3 $\mu$ L浓度为1mg/mL的单克隆抗体I和15 $\mu$ L浓度为1mg/mL的聚乙烯吡咯烷酮(PVP);室温反应30min后,再加入100 $\mu$ L浓度为10mg/mL的牛血清白蛋白;室温反应30min后,离心,去上清,再用1mL浓度为12mM的磷酸缓冲液重新分散,得到金核银壳纳米花标记的抗体I。

3. 根据权利要求2所述的表面增强拉曼散射免疫层析试纸条,其特征在于:

步骤(3)中所述的室温为20~30 $^{\circ}$ C;

步骤(3)中所述的离心的条件为7000rpm离心10分钟。

4. 根据权利要求1所述的表面增强拉曼散射免疫层析试纸条,其特征在于:还包含塑料外壳,塑料外壳包裹底衬和附着在底衬且依次紧密连接样品吸收垫、结合垫、层析膜和吸水垫;其中,塑料外壳上设置有加样孔和观察孔,加样孔位于样品吸收垫的位置,观察孔位于检测线。

5. 根据权利要求1~4任一项所述的表面增强拉曼散射免疫层析试纸条,其特征在于:

所述的底衬的材质为聚氯乙烯;

所述的样品吸收垫的材质为玻璃纤维;

所述的结合垫的材质为聚酯膜或者玻璃纤维素膜;

所述的层析膜的材质为硝酸纤维素膜;

所述的吸水垫的材质为吸水纸。

6. 根据权利要求1~4任一项所述的表面增强拉曼散射免疫层析试纸条,其特征在于:

所述的抗原A为完全抗原Cd<sup>2+</sup>-iEDTA-BSA或血红蛋白;

所述的抗体I为抗 $\text{Cd}^{2+}$ -EDTA抗体；

所述的抗体II为抗血红蛋白抗体。

7. 权利要求1~6任一项所述的表面增强拉曼散射免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于包含以下步骤:

(A) 将金核银壳纳米花标记的抗体I分散在结合垫上;

(B) 将抗原A或者抗体II呈直线型附着在层析膜上,形成检测线;

(C) 在底衬上将样品吸收垫、步骤(1)得到的结合垫、步骤(2)得到的层析膜和吸水垫依次相互搭接;得到表面增强拉曼散射免疫层析试纸条。

8. 根据权利要求7所述的表面增强拉曼散射免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:

步骤(A)为:用喷金划膜仪将金核银壳纳米花标记的抗体I喷到结合垫上;

步骤(B)中所述的抗原A或者抗体II通过喷金划膜仪包裹到层析膜上。

9. 权利要求1~6任一项所述的表面增强拉曼散射免疫层析试纸条在检测领域中的应用。

## 一种表面增强拉曼散射免疫层析试纸条及制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于光谱及免疫学检测检测领域,特别涉及一种表面增强拉曼散射免疫层析试纸条及制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 免疫学检测方法是应用免疫学理论设计的一系列检测抗原、抗体、免疫细胞及其分泌的细胞因子,小分子的实验方法。在免疫学检测中,国内外主要采用放射性免疫技术,酶联免疫吸附法(ELISA),电化学免疫分析技术,电化学发光免疫分析技术,胶体金免疫层析法等方法以实现定量或者定性检测。但是这些方法都存在不同程度的缺点:

[0003] ①酶联免疫吸附法检测有较高的的灵敏度,但是需要一些配套的专业仪器仪器,需要专业的人员进行操作,对检测环境有一定的要求,检测时间较长,步骤繁琐。

[0004] ②胶体金免疫层析试纸条具有成本低,快速,操作便捷等特点。经过多年的研究,胶体金免疫层析试纸条具有成熟的工艺流程。目前胶体金免疫层析试纸条在疾病诊断,环境污染监测和食品安全监控方面有着重要的作用。但是由于胶体金颗粒信号放大作用有限,所以胶体金免疫层析试纸条灵敏度不高,并且胶体金免疫层析试纸条很难实现准确定量检测。

[0005] ③胶体金免疫层析试纸条相比,荧光免疫层析试纸条具有灵敏度高,可实现准确检测的目的。荧光免疫层析试纸条的示踪剂有有机荧光染料,荧光乳胶微球,镧系元素,量子点等。单个荧光染料信号放大能力有限,并且在光照条件线容易发生荧光淬灭现象,影响了试纸条的灵敏度和稳定性。量子点具有激发光谱宽,发射光谱窄,斯托克斯位移大、稳定性高等特点,但是量子点也有一些不足:量子点亮度中等、价格较高,这些影响了试纸条的灵敏度,增加了试纸条的研发和生产的成本。荧光乳胶微球具有荧光信号强,稳定性高,易于和蛋白标记等优点,是一种很好的免疫层析试纸条的示踪剂。但是荧光乳胶微球和有机荧光染料一样,斯托克斯位移较小,容易受到背景光的干扰,影响其灵敏度。因此,仍需进一步研究,以期获得一种高灵敏度、操作简单、快速、低成并且可定量检测的方法。

### 发明内容

[0006] 本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供一种表面增强拉曼散射(Surface-enhanced Raman scattering,SERS)免疫层析试纸条。该试纸条以金核银壳纳米花为基底。

[0007] 本发明的另一目的在于提供上述表面增强拉曼散射免疫层析试纸条的制备方法。

[0008] 本发明的另一目的在于提供上述表面增强拉曼散射免疫层析试纸条的应用。

[0009] 本发明的目的通过下述技术方案实现:一种表面增强拉曼散射免疫层析试纸条,包含底衬、样品吸收垫、结合垫、层析膜和吸水垫;样品吸收垫、结合垫、层析膜和吸水垫依次紧密相连、且附着在底衬上;其中,结合垫上附着金核银壳纳米花标记的抗体I;层析膜上设置检测线;检测线上附着有抗体II或者抗原A;抗体I与抗体II是不同的抗体,且都能与待

检测蛋白质抗原结合;抗体I能与抗原A结合,抗原A与待检测抗原是竞争性抗原。在检测蛋白质抗原时:对于检测阴性样品,金核银壳纳米花标记的抗体I与检测线上的抗体II不结合,对于检测阳性样品,金核银壳纳米花标记的抗体I与检测物结合,再通过所结合的检测物与检测线上的抗体II结合。在检测小分子抗原时:对于检测阴性样品,金核银壳纳米花标记的抗体I与检测线上的抗原A结合,对于检测阳性样品,金核银壳纳米花标记的抗体I与检测线上的抗原A不结合。

[0010] 所述的表面增强拉曼散射免疫层析试纸条,还包含塑料外壳,塑料外壳包裹底衬和附着在底衬且依次紧密连接样品吸收垫、结合垫、层析膜和吸水垫;其中,塑料外壳上设置有加样孔和观察孔,加样孔位于样品吸收垫的位置,观察孔位于检测线;塑料外壳的作用是防止基于SERS免疫层析试纸条受到污染以及便携易用。

[0011] 所述的底衬为不透水物质,优选为聚氯乙烯(PVC)。

[0012] 所述的样品吸收垫的材质优选为玻璃纤维。

[0013] 所述的结合垫的材质优选为聚酯膜或者玻璃纤维素膜。

[0014] 所述的层析膜的材质优选为硝酸纤维素膜。

[0015] 所述的吸水垫的材质优选为吸水纸。

[0016] 所述的抗原A为完全抗原,优选为完全抗原 $\text{Cd}^{2+}$ -iEDTA-BSA或血红蛋白。

[0017] 所述的抗体I优选为抗 $\text{Cd}^{2+}$ -EDTA抗体。

[0018] 所述的抗体II优选为抗血红蛋白抗体。

[0019] 所述的金核银壳纳米花标记的抗体I通过如下方法制备得到:将金核银壳纳米花与抗体I混合,搅拌均匀;再加入牛血清白蛋白封闭即可。

[0020] 所述的金核银壳纳米花的制备过程如下:

[0021] (1) 金纳米花的制备:0.2mL浓度为25mM的氯金酸加入到10mL 20mM、pH 7.4的HEPES溶液中后,静止反应30min,得到金纳米花;

[0022] (2) 金核银壳纳米花的制备:40 $\mu\text{L}$ 浓度为0.1M的NaOH溶液和30 $\mu\text{L}$ 浓度为0.1M的抗坏血酸加入到1mL步骤(1)制备的金纳米花中,搅拌后加入400 $\mu\text{L}$ 浓度为10mM的 $\text{AgNO}_3$ 溶液,反应半小时,得到金核银壳纳米花。

[0023] 所述的金核银壳纳米花标记的抗体I优选通过如下具体步骤制备得到:

[0024] (1) 金纳米花的制备:0.2mL浓度为25mM的氯金酸加入到10mL 20mM、pH 7.4的HEPES溶液中后,静止反应30min,得到金纳米花;

[0025] (2) 金核银壳纳米花的制备:40 $\mu\text{L}$ 浓度为0.1M的NaOH溶液和30 $\mu\text{L}$ 浓度为0.1M的抗坏血酸加入到1mL步骤(1)制备的金纳米花中,搅拌后加入400 $\mu\text{L}$ 浓度为10mM的 $\text{AgNO}_3$ 溶液,反应半小时,得到金核银壳纳米花;

[0026] (3) 金核银壳纳米花标记的抗体I的制备:0.2 $\mu\text{L}$ 浓度为20mM的4-巯基苯甲酸加入到1mL步骤(2)制备得到的金核银壳纳米花中,室温静置1小时后加入3 $\mu\text{L}$ 浓度为1mg/mL的单克隆抗体I和15 $\mu\text{L}$ 浓度为1mg/mL的聚乙烯吡咯烷酮(PVP);室温反应30min后,再加入100 $\mu\text{L}$ 浓度为10mg/mL的牛血清白蛋白;室温反应30min后,离心,去上清,再用1mL浓度为12mM的磷酸缓冲液重新分散,得到金核银壳纳米花标记的抗体I。

[0027] 步骤(3)中所述的室温指的是20~30 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0028] 步骤(3)中所述的离心的条件优选为7000rpm离心10分钟。

- [0029] 所述的表面增强拉曼散射免疫层析试纸条的制备方法,包含以下步骤:
- [0030] (A) 将金核银壳纳米花标记的抗体I分散在结合垫上;
- [0031] (B) 将抗原A或者抗体II呈直线型附着在层析膜上,形成检测线;
- [0032] (C) 在底衬上将样品吸收垫、步骤(1)得到的结合垫、步骤(2)得到的层析膜和吸水垫依次相互搭接;得到表面增强拉曼散射免疫层析试纸条。
- [0033] 步骤(A)优选为:用喷金划膜仪将金核银壳纳米花标记的抗体I喷到结合垫上。
- [0034] 步骤(B)中所述的抗原A或者抗体II优选通过喷金划膜仪包裹到层析膜上。
- [0035] 所述的表面增强拉曼散射免疫层析试纸条在检测领域中的应用。
- [0036] 本发明的原理:表面增强拉曼散射(surface enhancement of Raman scattering, SERS)是指一些分子在接近一些金属纳米颗粒的表面后,拉曼信号有所增强的现象。目前主要用于增强拉曼信号的纳米颗粒有金纳米颗粒,银纳米颗粒。在这两种材料中,金纳米颗粒制备简单,化学性质稳定,但是其拉曼增强因子比较低,在 $10^2$ - $10^6$ 之间。银纳米颗粒的拉曼增强较高,平均在 $10^6$ 左右,但是银纳米颗粒的稳定性和均一性较金纳米颗粒而言较差。研究证明,和表面光滑的纳米颗粒相比较,表面粗糙的纳米颗粒具有更加强的拉曼增强效果。本发明以金纳米花为核,制备出了金银壳核结构的纳米颗粒,该纳米颗粒表面具有粗糙的突起结构,我们命名为金核银壳纳米花。本发明以金核银壳纳米花为SERS基底,制备出了高灵敏度的SERS免疫层析试纸条。对于检测蛋白质抗原,当样品中存在检测蛋白质时,金核银壳纳米花标记的抗体先和检测蛋白结合,之后通过检测蛋白和检测线上的抗体结合,故在检测线上可以检测到拉曼信号。当样品中没有检测蛋白质时,金核银壳纳米颗粒标记的抗体无法结合在检测线上,所以检测线上的拉曼信号很弱。对于检测小分子抗原,当样品中不存在检测物时,金核银壳纳米颗粒标记的抗体和检测线上的抗原结合,故在检测线上可以检测到拉曼信号。当样品中有检测小分子抗原时时,金核银壳纳米颗粒标记的抗体无法结合在检测线上,所以检测线上的拉曼信号很弱。
- [0037] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:
- [0038] (1) 本发明所述的基于金核银壳纳米颗粒作为SERS基底的免疫层析试纸条与放射性免疫技术、ELISA相比,具有操作安全(无放射物污染),简便,低成本,快速等优点。与胶体金免疫层析试纸条比较,具有灵敏度高,可以量化检测等特点。
- [0039] (2) 本发明利用较易制备的金花颗粒做核心,在金的表面包裹一层银,可简便的制备出具有极强拉曼增强作用的金属基底,且制作工艺更为稳定、便捷,使高灵敏拉曼试纸条的产业化成为可能。
- [0040] (3) 本发明所提供的SERS免疫层析试纸条应用范围广,能够用于单项检测或者一检多项等快速检测项目;检测基质可以是全血,血清,唾液,尿液,食品样本,水样等;检测对象可以是食品中的毒素,抗生素,疾病标志物,环境中的有害物质或者国家禁止生产和使用的如毒品等一些物质。

## 附图说明

- [0041] 图1是本发明提供的表面增强拉曼散射免疫层析试纸条的示意图;其中:
- [0042] 11-底衬,12-样品吸收垫,13-结合垫,14-层析膜,15-吸水垫,16-检测线,17-金核银壳纳米花标记的抗体。

## 具体实施方式

[0043] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

### [0044] 实施例1

[0045] 快速检测二价镉离子的SERS免疫层析试纸条的制备和应用,包括如下步骤:

[0046] (1) 金纳米花的制备:0.2mL的氯金酸(25mM)加到10mL HEPES(20mM、pH 7.4)中后,静止反应30min,液体的颜色从无色变为蓝色,则表明金纳米花制备成功。

[0047] (2) 金核银壳纳米花的制备:40 $\mu$ L的NaOH(0.1M)和30 $\mu$ L的抗坏血酸(0.1M)加入到1mL金纳米花中,搅拌之后加入400 $\mu$ L的AgNO<sub>3</sub>(10mM)。反应半小时之后,当纳米颗粒变为红色,意味着金核银壳纳米花制备成功。

[0048] (3) 金核银壳纳米花标记抗体的制备:0.2 $\mu$ L的四巯基苯甲酸(20mM)加入到1mL金核银壳纳米花中。室温静置1小时后加入3 $\mu$ L 1mg/mL的抗Cd<sup>2+</sup>-EDTA单克隆抗体(王建华.镉离子多克隆抗体E L ISA竞争法的初步建立[J].中国生物制品学杂志,2008,21(1))和15 $\mu$ L浓度为10mg/mL的PVP。室温反应30min后,再加入100 $\mu$ L 10mg/mL的牛血清白蛋白。室温反应30min后,7000转每分钟离心10分钟,去上清,再用1mL 12mM的磷酸缓冲液重新分散。

[0049] (4) SERS免疫层析试纸条的组装

[0050] 如图1所示,SERE免疫层析试纸条包括底衬11、以及附着在底衬11上依次紧密相连的样品吸收垫12、结合垫13、层析膜14和吸水垫15。

[0051] 金核银壳纳米花标记的抗体17以2mg/cm的量喷到结合垫上;把包被抗原Cd<sup>2+</sup>-EDTA(王建华.镉离子多克隆抗体E L ISA竞争法的初步建立[J].中国生物制品学杂志,2008,21(1))(1mg/mL)用喷金划膜仪以1mg/cm的量包被到层析膜(硝酸纤维素膜)上,作为检测线16,并且在37℃烘箱烘两天。在底衬11上顺次相互搭接样品吸收垫12、结合垫13、层析膜14和吸水垫15,得到的试纸板按要求切割成4mm的试纸条。再装进塑料卡壳(塑料卡壳开有加样孔和检测孔,加样孔的位置位于样品吸收垫位置;检测孔的位置位于检测线所在区域)组成完整的SERS免疫试纸条。

[0052] (5) 样本前处理

[0053] 取100ml珠江猎德大桥水样,用滤纸初步过滤除去杂质之后取其中的50ml,用10M NaOH和10M盐酸调节pH值至7.0~7.2,再加入0.5 $\mu$ M整合剂EDTA-Na<sub>2</sub>0.5ml,反应10~15min。

[0054] (6) 试纸条的使用

[0055] 在浓度为50nM的EDTA-Na<sub>2</sub>水溶液中加入氯化镉,分别配制如下浓度的标准溶液:三价镉离子浓度为100ng/ml,50ng/ml,25ng/ml,12.5ng/ml,6.25ng/ml,3.13ng/ml,1.56ng/ml,0.78ng/ml,0.38ng/ml,0.2ng/ml,0.1ng/ml,0.05ng/ml,0.025ng/ml,0.013ng/ml,0ng/ml。将前述配制的15种浓度的标准溶液60 $\mu$ l分别加到步骤(4)制备的表面增强拉曼散射免疫试纸条的加样孔中,15min后通过便携式拉曼光谱仪(功率60mw,检测时间20s,激发光785nm)检测检测线上拉曼散射强度,并且以镉离子浓度为横坐标,拉曼信号强度为纵坐标绘制标准曲线。本实验的灵敏度为0.05ng/ml,在0.05ng/ml到25ng/ml的检测范围内线性为 $y = -220.27x + 2290.6$

[0056] (7) 结果观察:阳性结果为检测线上拉曼信号强度低于2250a.u,阴性结果检测线上拉曼信号强度为2250a.u。

[0057] 实施例2

[0058] 快速检测血红蛋白的SERS免疫试纸条的制备和应用,包括如下步骤:

[0059] (1) 金纳米花的制备:0.2mL的氯金酸(25mM)就到10mL HEPES(20mM,pH 7.4)中后,静止反应30min,液体颜色从无色变为蓝色,则表明金纳米花制备成功。

[0060] (2) 金核银壳纳米花的制备:40 $\mu$ L的NaOH(0.1M)和30 $\mu$ L的抗坏血酸(0.1M)加入到1mL金纳米花中,搅拌之后加入400 $\mu$ L的AgNO<sub>3</sub>(10mM)。反应半小时之后,当纳米颗粒变为红色,意味着金核银壳纳米花制备成功。

[0061] (3) 金核银壳纳米花标记抗体的制备:0.2 $\mu$ L的四巯基苯甲酸(20mM)加入到1mL金核银壳纳米花中。室温静置1小时后加入3 $\mu$ L 1mg/mL的抗Cd<sup>2+</sup>-EDTA单克隆抗体和15 $\mu$ L 10mg/mL的PVP。室温反应30min后,再加入100 $\mu$ L 10mg/mL的牛血清白蛋白。室温反应30min后,7000转每分钟离心10分钟,去上清,再用1mL 12mM的磷酸缓冲液重新分散。

[0062] (4) SERS免疫层析试纸条的组装

[0063] 如图1所示,SERS免疫层析试纸条包括底衬11、以及附着在底衬11上依次紧密相连的样品吸收垫12、结合垫13、层析膜14和吸水垫15。

[0064] 金核银壳纳米花标记的抗体17以2mg/cm的量喷到结合垫上;把包被抗体(抗血红蛋白抗体)(1mg/mL)用喷金划膜仪以1mg/cm的量包被到层析膜(硝酸纤维素膜)上,作为检测线16,并且在37 $^{\circ}$ C烘箱烘两天。在底衬11上顺次相互搭接样品吸收垫12、结合垫13、层析膜14和吸水垫15,得到的试纸板按要求切割成4mm的试纸条。再装进塑料卡壳(塑料卡壳开有加样孔和检测孔,加样孔的位置位于样品吸收垫位置;检测孔的位置位于检测线所在区域)组成完整的表面增强拉曼散射免疫试纸条。

[0065] (5) 样品前处理:取1.0g大便样品,加入5mL的pH7.4的磷酸缓冲液,15min后离心,取上清,并且用所制备的SERS免疫层析试纸条检测。

[0066] (6) 配制浓度分别为10ng/ml、5ng/ml、2.5ng/ml、1.25ng/ml、0.625ng/ml、0.3125ng/ml、0.15625ng/ml的血红蛋白标准品(用0.01M,PH7.2的PBS溶解得到)滴加到加样孔中后,用便携式拉曼光谱仪检测检测线上拉曼信号的强度,其中拉曼光谱仪的激发波长为785nm,功率为60mW,检测时间为20s。以血红蛋白的浓度为横坐标,拉曼信号强度为纵坐标,绘制标准曲线。本实验的灵敏度为15.6ng/ml。

[0067] (7) 结果观察:阳性结果为检测线上的拉曼信号强度高于500a.u.,阴性结果为检测线上的拉曼信号强度低于500a.u。

[0068] 本发明检测血红蛋白的灵敏度为32ng/mL,Cd<sup>2+</sup>的灵敏度为0.5ng/mL;目前尚无血红蛋白和Cd<sup>2+</sup>的拉曼试纸条报道,而用已建立的胶体金试纸条检测的灵敏度分别是1000ng/mL和25ng/mL,本发明建立的拉曼试纸条敏感度比传统金标试纸条敏感约31和50倍。

[0069] 比较实施例

[0070] (1) 制备金核银壳纳米球:100mL超纯水加热到沸腾后,再加入2mL浓度为质量百分比1%的氯金酸和4mL浓度为质量百分比1%的柠檬酸三钠溶液,之后100 $^{\circ}$ C加热搅拌15min,液体溶液变为红色,说明金纳米球制备成功。取10mL所制备的金纳米球,再加入30 $\mu$ L 100mM抗坏血酸,40 $\mu$ L 100mM AgNO<sub>3</sub>以及30 $\mu$ L 100mM NaOH,搅拌反应30min后,纳米溶胶变为橙黄色,说明金核银壳纳米球制备成功。

[0071] (2) 制备银纳米球:500mL三蒸水加热到沸腾后加入90mg AgNO<sub>3</sub>和10mL浓度为质量

百分比1%的柠檬酸三钠,100℃加热搅拌1h后,溶胶变为黄色,说明银纳米球制备成功。

[0072] (3)对实施例1制备的金核银壳纳米花以及本比较实施例制备的金核银壳纳米球、银纳米球检测拉曼信号强度

[0073] 本发明制备的金核银壳纳米花增强的拉曼报告分子4MBA的拉曼信号强度在 $1077\text{cm}^{-1}$ 的拉曼信号为34500a.u,对比金核银壳纳米球增强4MBA的拉曼信号强度为4800a.u,直接以银纳米球增强4MBA的拉曼信号强度为2500a.u,本发明制备的金核银壳纳米花基底对拉曼探针的增强效果约是金核银壳纳米球和银纳米球的7倍和14倍。

[0074] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

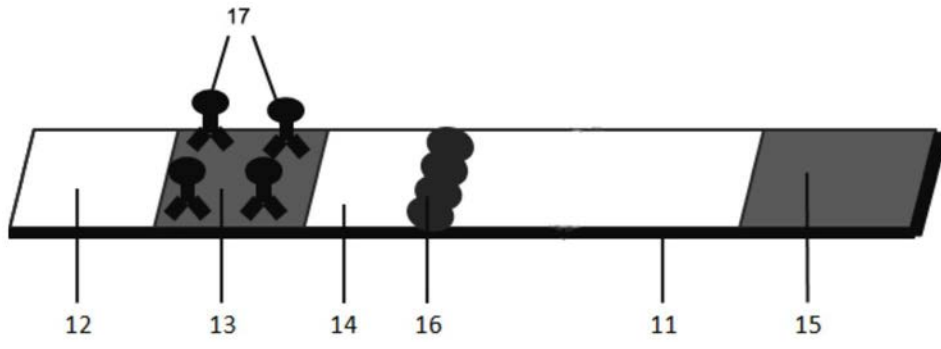


图1

专利名称(译)	一种表面增强拉曼散射免疫层析试纸条及制备方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN105259158B</a>	公开(公告)日	2019-02-19
申请号	CN201510783487.X	申请日	2015-11-13
[标]申请(专利权)人(译)	暨南大学		
申请(专利权)人(译)	暨南大学		
当前申请(专利权)人(译)	暨南大学		
[标]发明人	唐勇 付强强 吴泽		
发明人	唐勇 付强强 吴泽		
IPC分类号	G01N21/65 G01N33/53		
审查员(译)	杨涛		
其他公开文献	CN105259158A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开一种表面增强拉曼散射免疫层析试纸条及制备方法与应用。该试纸条包含底衬、样品吸收垫、结合垫、层析膜和吸水垫；样品吸收垫、结合垫、层析膜和吸水垫依次紧密相连、且附着在底衬上；其中，结合垫上附着金核银壳纳米花标记的抗体I；层析膜上设置检测线；检测线上附着有抗体II或者抗原A。本发明通过将金核银壳纳米花标记的抗体I分散在结合垫上，将抗原A或者抗体II呈直线型附着在层析膜上，形成检测线；在底衬上将样品吸收垫、结合垫、层析膜和吸水垫依次相互搭接；得到表面增强拉曼散射免疫层析试纸条。本发明具有操作安全、简便、低成本、快速、灵敏度高等优点，应用范围广。

