



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103536297 B

(45) 授权公告日 2015.06.17

(21) 申请号 201310493747.0

CN 102156119 A, 2011.08.17, 说明书第 3

(22) 申请日 2013.10.18

段、第 6-18 段及附图 2.

(73) 专利权人 浙江大学

审查员 胡新芬

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路
38 号

(72) 发明人 苏彬 许林茹 何亚芸

(74) 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限
公司 33224

代理人 胡红娟

(51) Int. Cl.

A61B 5/117(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101703404 A, 2010.05.12, 全文.

CN 102727213 A, 2012.10.17, 全文.

CN 101268946 A, 2008.09.24, 全文.

EP 2005179 B1, 2011.07.13, 全文.

WO 2011130332 A1, 2011.10.20, 全文.

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

基于免疫胶体金的潜在指纹成像的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于免疫胶体金的潜在指纹成像的方法,包括:将指印转移到基底上,得到指印样本;往所述指印样本的指印上加入纳米金标记的手指代谢物抗体溶液进行孵育,孵育完成后用缓冲液进行冲洗;将所述的指印样本干燥,然后向指印上加入银染液,避光显色后,将指印样本冲洗、干燥。本发明的方法简单、快速、灵敏,能够对指纹进行清晰的成像。

1. 一种基于免疫胶体金的潜在指纹成像的方法,其特征在于,包括:

(1) 将指印转移到基底上,得到指印样本;

(2) 往所述指印样本的指印上加入浓度为 0.05 ~ 0.2mg/mL 的纳米金标记的手指代谢物抗体溶液孵育 25 ~ 35min,孵育完成后用缓冲液进行冲洗;

(3) 将所述的指印样本干燥,然后向指印上加入银染液,避光显色后,将指印样本冲洗、干燥;

步骤(1)中,所述的指印为血指印或汗潜指印;

所述的指印为血指印时,手指代谢物为 IgG;所述的指印为汗潜指印时,手指代谢物为溶菌酶;

所述纳米金标记的手指代谢物抗体溶液的溶剂为含 2% BSA,0.1%吐温-20 的 PBS。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的基底为玻璃板、塑料板、不锈钢板、锡箔、硬纸片或胶带。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的银染液为 Sigma-aldrich 银增强溶液。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述避光显色的时间为 15 ~ 20min。

基于免疫胶体金的潜在指纹成像的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物分析和指纹检测技术领域,特别涉及一种基于免疫胶体金的潜在指纹成像的方法。

背景技术

[0002] 潜在指纹是经身体自然分泌物(如汗液)转移形成的指纹纹路,目视不易发现,是案发现场中最常见的指纹。据我国各地不完全统计,警方侦破的刑事案件中,利用指纹破案占七成以上,并且比例正在逐年上升。通常情况下,指纹是犯罪分子在现场留下的最直接物证,所以,研究潜在指纹的显现技术,是提高指纹物证的采取率和利用率的重要环节。

[0003] 现代指纹学的发展已经具有上百年的历史,按照显现原理的不同,传统的潜在指纹显现方法主要分为三类:光学显现法、化学显现法以及物理吸附法。其基本原理是使用一种光线或物质作用于指纹印痕的汗液物质,使不能看见的潜在指纹变为可见的。发展至今,指纹检测不仅在法医鉴定、个体识别方面起着重要作用,同时广泛应用于日常生活中的安全检验、访问控制、个人认证等领域。近年来随着分析科学的发展,人们对指纹的研究已不仅仅停留在利用传统物理或化学手段对其形貌进行观察,同时更加致力于发展各种新兴技术如质谱成像、红外/拉曼成像、扫描电化学显微镜以及荧光免疫成像等,对指纹中的成分进行分析检测,从而发掘出更多有价值的生物学和医学信息。比如,恐怖分子是否接触过爆炸物、一个人是否具有吸烟的习惯,科学家都可以通过指纹检测来获取相关信息。

[0004] 尽管指纹显现技术在刑侦及分析科学中发挥着重大作用,但是目前在指纹显现领域中仍然存在诸多困难。例如,在传统方法中,大多要引用一种外源物质来对潜在指纹进行显现,处理过程较为繁琐复杂,同时对样本具有破坏性。目前广泛使用的烟熏法和刷粉法中采用的小粒度粉末对技术人员存在一定的身体损伤。而新兴的指纹技术如质谱成像法和红外/拉曼成像法,则需要用到昂贵的大型仪器和专业的操作知识,不利于普及。因此目前仍然需要一种简单、快速、适用范围广的方法对潜在指纹进行显现。

发明内容

[0005] 本发明的目的是针对现有技术的不足,提供一种基于免疫胶体金的潜在指纹成像的方法,简单、快速、灵敏,能够对指纹进行清晰的成像。

[0006] 一种基于免疫胶体金的潜在指纹成像的方法,包括:

[0007] (1) 将指印转移到基底上,得到指印样本;

[0008] (2) 往所述指印样本的指印上加入纳米金标记的手指代谢物抗体溶液进行孵育,孵育完成后用缓冲液进行冲洗;

[0009] (3) 将所述的指印样本干燥,然后向指印上加入银染液,避光显色后,将指印样本冲洗、干燥。

[0010] 人类指纹皮肤表面布满汗腺,触物留痕。一般来说留在客体表面的指纹物质较少,一般为0.11mg,其中99%为水分,会迅速蒸发掉;固体物质只占1%,其中2/3是有机物质,

如：氨基酸、蛋白质、脂肪酸、尿素等；剩余 1/3 是无机物质。本发明首先选择手指代谢物的抗体，制备出纳米金-抗体复合物（即免疫胶体金），通过抗体与手指代谢物的特异性免疫反应，使纳米金间接标记到指纹上，然后将银染增强溶液滴在样本上，在纳米金的催化作用下，银增强溶液中的银离子还原成黑色的金属银，从而显现出可视化的指纹纹路。

[0011] 步骤(1)中，所述的指印为血指印或汗潜指印。

[0012] 所述的基底为玻璃板、塑料板、不锈钢板、锡箔、硬纸片、胶带等。

[0013] 当所述的指印为血指印时，手指代谢物为 IgG。

[0014] 当所述的指印为汗潜指印时，手指代谢物为溶菌酶。

[0015] 试验发现，以 IgG、溶菌酶为目标对象进行检测，可成功对指纹成像，且指纹纹理清晰。

[0016] 所述纳米金标记的手指代谢物抗体溶液的浓度为 0.05 ~ 0.2mg/mL，优选为 0.1 ~ 0.2mg/mL。抗体溶液的浓度过高不仅浪费试剂，还会导致非特异性结合，或显色背景重，而浓度过低，则会导致抗原与抗体的反应不完全，化学发光强度弱，从而影响指纹成像效果。其中，纳米金的粒径为一般为 15nm。

[0017] 所述纳米金标记的手指代谢物抗体溶液的溶剂为含 2%BSA, 0.1%吐温-20 的 PBS，PBS 的浓度为 0.01M, pH 为 7.4。PBS 中添加适量的 BSA 和吐温-20 后可降低抗体对基底的吸附作用，使指纹图像更清晰。

[0018] 为使反应充分进行，所述孵育的时间为 25 ~ 35min，优选为 30min。

[0019] 所述的缓冲液为含 0.1%吐温-20 的 PBS 缓冲液。

[0020] 所述的银染液为 Sigma-aldrich 银增强溶液，购买公司为 Sigma-aldrich，包括 A 液和 B 液，其中 A 液货号为 S5020, B 液货号为 S5145，使用时将 A 液和 B 液按体积比 1:1 混合。

[0021] 所述避光显色的时间为 15 ~ 20min，优选为 15min。显色时间过长过短均不利于指纹的清晰成像，若时间太短反应不充分，时间太长则背景过深。

[0022] 与现有技术相比，本发明的有益效果为：

[0023] (1) 本发明的方法步骤简单、检测迅速，只需免疫标记和显色反应两步，50min 即可得到指纹图像。

[0024] (2) 与广泛使用的荧光法相比，本发明的方法不需要荧光显微镜等昂贵复杂的仪器，通过目测或数码相机即可获得结果，便于现场快速实时检测。

[0025] (3) 该方法不需要外加激发光源，因此不存在背景光干扰，指纹图像更加显著清晰。

[0026] (4) 本发明的方法灵敏度高，可实现指印中痕量代谢物的特异性检测，在进行个体识别的同时还能实现指印成分（IgG、溶菌酶等）分析的目的。

附图说明

[0027] 图 1a 为用纳米金-羊抗人 IgG 抗体复合物（PBS 稀释）检测得到的血指印银染显色图；

[0028] 图 1b 为用纳米金-羊抗人 IgG 抗体复合物（PBS-T-BSA 稀释）检测得到的血指印银染显色图；

[0029] 图 2a 为用纳米金-羊抗人 IgG 抗体复合物(浓度为 0.02mg/mL)检测得到的血指印银染显色图;

[0030] 图 2b 为用纳米金-羊抗人 IgG 抗体复合物(浓度为 0.20mg/mL)检测得到的血指印银染显色图;

[0031] 图 2c 为用纳米金-羊抗人 IgG 抗体复合物(浓度为 0.40mg/mL)检测得到的血指印银染显色图;

[0032] 图 3a 为用纳米金-羊抗人 IgG 抗体复合物(显色时间为 10min)检测得到的血指印银染显色图;

[0033] 图 3b 为用纳米金-羊抗人 IgG 抗体复合物(显色时间为 15min)检测得到的血指印银染显色图;

[0034] 图 3c 为用纳米金-羊抗人 IgG 抗体复合物(显色时间为 20min)检测得到的血指印银染显色图;

[0035] 图 4 为用纳米金-羊抗人 IgG 抗体复合物(较优试验条件)检测得到的血指印银染显色图;

[0036] 图 5 为用纳米金-溶菌酶抗体检测得到的潜在指纹银染显色图。

具体实施方式

[0037] 下面结合附图和实施例对本发明进一步详细说明。

[0038] 本发明是基于免疫胶体金的潜在指纹成像的方法,将一枚指印用纳米金-抗体复合物进行免疫标记后,再将银增强溶液滴在指印样本上,通过银染显色显现出指纹纹路,处理后的样本可直接用肉眼进行观察。胶体金是由氯金酸(HAuCl_4)在还原剂作用下,聚合而成的一定大小的纳米级金颗粒,并由于静电作用成为一种稳定的胶体状态,故称胶体金。胶体金是一种常用的标记技术,是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体的一种新型的免疫标记技术。结合银染显色法,可以通过金属银的沉积将纳米金的检测信号在特定位置进行增强,具有检测快速、便捷、不需要特殊设备、结果判断直观等特点。

[0039] 实验试剂:

[0040] 纳米金-羊抗人 IgG 抗体复合物和纳米金-溶菌酶抗体复合物由上海生工生物股份有限公司合成,其中,纳米金为粒径 15nm 的柠檬酸修饰的金纳米粒子,羊抗人 IgG 的货号为 DAC1011(生工生物工程有限公司);溶菌酶抗体的货号为 DA2322(生工生物工程有限公司)。

[0041] PBS-T 为含 0.1% 吐温-20 的 PBS 缓冲液。

[0042] 银增强溶液:购买公司为 Sigma-aldrich,包括 A 液和 B 液,其中,A 液货号为 S5020,B 液货号为 S5145。

[0043] 实施例 1

[0044] 1、抗体溶剂对指纹成像的影响

[0045] (1) 血指印样本的制备:手指上蘸少量新鲜血液,在载玻片上按一枚血指印;

[0046] (2) 免疫标记:用免疫组化笔在指印周围画一个圈,以避免抗体溶液扩散,将 100 μL 0.1mg/mL 纳米金-羊抗人 IgG 抗体复合物(溶剂为含 2%BSA,0.1%吐温-20 的 0.01M PBS, pH 为 7.4;以 pH 为 7.4 的 PBS 为对照)滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗

以洗去未结合的抗体,用氩气将表面吹干。

[0047] (3) 银染显色:将 200 μ L 银增强溶液滴在指印上,于暗室中避光显色 15min,用去离子水冲洗后氩气吹干。

[0048] (4) 图像采集:经显色后的样本可直接用肉眼进行观察,或用数码相机拍照采集图像。

[0049] 如图 1a 和图 1b 所示,采用 PBS 稀释纳米金-羊抗人 IgG 抗体复合物,抗体对基底吸附严重(图 1a),指纹成像不清晰,在 PBS 中添加了吐温和 BSA 后,明显减少了其对基底的吸附,指纹纹理清晰(图 1b)。

[0050] 2、不同浓度的纳米金-羊抗人 IgG 抗体复合物对指纹成像的影响

[0051] (1) 血指印样本的制备:手指上蘸少量新鲜血液,在载玻片上按一枚血指印;

[0052] (2) 免疫标记:用免疫组化笔在指印周围画一个圈,以避免抗体溶液扩散,将 100 μ L 纳米金-羊抗人 IgG 抗体复合物(溶剂为含 2%BSA,0.1%吐温-20 的 0.01M PBS, pH 为 7.4)滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗以洗去未结合的抗体,用氩气将表面吹干。

[0053] (3) 银染显色:将 200 μ L 银增强溶液滴在指印上,于暗室中避光显色 15min,用去离子水冲洗后氩气吹干。

[0054] (4) 图像采集:经显色后的样本可直接用肉眼进行观察,或用数码相机拍照采集图像。

[0055] 图 2a-2c 示出了纳米金-羊抗人 IgG 抗体复合物的浓度分别为 0.02、0.20、0.40mg/mL 时采集的指纹图像,纳米金-羊抗人 IgG 抗体复合物的浓度太低(0.02mg/mL),银染显色效果不够明显(图 2a);浓度太高(0.40mg/mL)会使背景颜色加深(图 2c);0.20mg/mL 的显色效果最好(图 2b)。

[0056] 3、银染显色时间对指纹成像的影响

[0057] (1) 血指印样本的制备:手指上蘸少量新鲜血液,在载玻片上按一枚血指印;

[0058] (2) 免疫标记:用免疫组化笔在指印周围画一个圈,以避免抗体溶液扩散,将 100 μ L 0.1mg/mL 纳米金-羊抗人 IgG 抗体复合物(含 2%BSA,0.1%吐温-20 的 0.01M PBS, pH 为 7.4)滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗以洗去未结合的抗体,用氩气将表面吹干。

[0059] (3) 银染显色:将 200 μ L 银增强溶液滴在指印上,于暗室中避光显色,用去离子水冲洗后氩气吹干。

[0060] (4) 图像采集:经显色后的样本可直接用肉眼进行观察,或用数码相机拍照采集图像。

[0061] 图 3a-3c 示出了避光显色时间分别为 10、15、25min 时采集的指纹图像,银染时间太短(10min),颜色较浅,显色不够深(图 3a);银染时间太长(25min),会使背景颜色加深(图 3c);显色 15min 较为合适(图 3b)。

[0062] 4、血指印最优条件的检测

[0063] (1) 血指印样本的制备:手指上蘸少量新鲜血液,在载玻片上按一枚血指印;

[0064] (2) 免疫标记:用免疫组化笔在指印周围画一个圈,以避免抗体溶液扩散,将 100 μ L 0.1mg/mL 纳米金-羊抗人 IgG 抗体复合物(溶剂为含 2%BSA,0.1%吐温-20 的 0.01M

PBS, pH 为 7.4)滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗以洗去未结合的抗体,用氩气将表面吹干。

[0065] (3) 银染显色:将 200 μ L 银增强溶液滴在指印上,于暗室中避光显色 15min,用去离子水冲洗后氩气吹干。

[0066] (4) 图像采集:经显色后的样本可直接用肉眼进行观察,或用数码相机拍照采集图像,图像如图 4,可见指纹图像纹理清晰可见。

[0067] 实施例 2

[0068] (1) 汗潜指印样本的制备:测试者用香皂将手洗净,热风吹干后,戴上 PE 手套捂汗 5min,然后在基底上按 1min,得到汗潜指印。

[0069] (2) 免疫标记:用免疫组化笔在指印周围画一个圈,以避免抗体溶液扩散,将 100 μ L 0.1mg/mL 纳米金-溶菌酶抗体复合物(溶剂为含 2%BSA,0.1%吐温-20 的 0.01M PBS, pH 为 7.4)滴在指印上,于室温培养 30min,用 PBS-T 冲洗以洗去未结合的抗体,用氩气将表面吹干。

[0070] (3) 银染显色:将 200 μ L 银增强溶液滴在指印上,于暗室中避光显色 15min,用去离子水冲洗后氩气吹干。

[0071] (4) 图像采集:经显色后的样本可直接用肉眼进行观察,或用数码相机拍照采集图像,图像如图 5,可见指纹图像纹理清晰可见。

[0072] 上述实施例用来解释说明本发明,而不是对本发明进行限制,在本发明的精神和权利要求的保护范围内,对本发明作出的任何修改和改变,都落入本发明的保护范围。



图 1a



图 1b



图 2a



图 2b



图 2c



图 3a



图 3b



图 3c



图 4



图 5

专利名称(译)	基于免疫胶体金的潜在指纹成像的方法		
公开(公告)号	CN103536297B	公开(公告)日	2015-06-17
申请号	CN201310493747.0	申请日	2013-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	苏彬 许林茹 何亚芸		
发明人	苏彬 许林茹 何亚芸		
IPC分类号	A61B5/117 G01N33/531		
代理人(译)	胡红娟		
其他公开文献	CN103536297A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于免疫胶体金的潜在指纹成像的方法，包括：将指印转移到基底上，得到指印样本；往所述指印样本的指印上加入纳米金标记的手指代谢物抗体溶液进行孵育，孵育完成后用缓冲液进行冲洗；将所述的指印样本干燥，然后向指印上加入银染液，避光显色后，将指印样本冲洗、干燥。本发明的方法简单、快速、灵敏，能够对指纹进行清晰的成像。

