



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110907370 A

(43)申请公布日 2020.03.24

(21)申请号 201911229954.9

(22)申请日 2019.12.04

(71)申请人 桂林理工大学

地址 541004 广西壮族自治区桂林市建干路12号

(72)发明人 张云 姚茂茂 聂瑾芳 邓子豪

(51)Int.Cl.

G01N 21/29(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

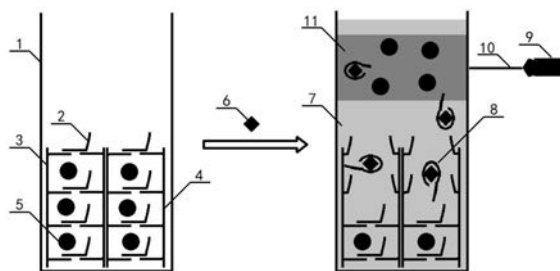
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

一种普适性的超灵敏化学与生物比色传感方法

(57)摘要

本发明公开了一种普适性的超灵敏化学与生物比色传感方法。该方法有两个主要步骤：将样品溶液与检测试剂反应，样品所含分析物通过特异性识别反应触发混合溶液中产生某种胶体；利用激光束照射所得混合溶液，获得其丁达尔效应光学信号。该信号的强度与样品中分析物浓度相关。本发明方法具有分析成本低、检测灵敏度高突出优点。通过与免疫反应等特异性识别反应结合，本发明中的方法可直接应用于医学诊断、环境监测、食品安全等诸多领域里各类型样本中无机离子、有机离子、有机小分子、多肽、蛋白质、核酸、细胞、病毒或细菌分析物的快速、特异、超灵敏的化学与生物比色传感检测。



1. 一种普适性的超灵敏化学与生物比色传感方法,其特征就在于具体步骤为:

步骤一、将样品溶液与检测试剂反应,样品中的分析物能通过特异性识别反应触发反应溶液中产生某种胶体;

步骤二、采用激光束照射步骤一中的反应溶液,目视观察所产生的丁达尔效应光学信号进行定性分析,进而拍照记录该信号用于定量分析,丁达尔效应光学信号的强度随样品中分析物浓度的改变而变化;

所述分析物是指无机离子、有机离子、有机小分子、多肽、蛋白质、核酸、细胞、病毒和细菌中的一种;

所述检测试剂是指本身含有能被分析物触发释放但其尺寸与形貌不改变的某种胶体的检测试剂、本身含有能被分析物介导其尺寸与形貌发生改变的某种胶体的检测试剂、以及本身的组成成分能被分析物触发其原位生成某种胶体的检测试剂中的一种;

所述样品溶液与检测试剂反应的界面是溶液均相、酶标板固相表面、微流控芯片固相表面、微珠固相表面、以及电极固相表面中的一种;

所述特异性识别反应是指抗原-抗体之间的免疫反应、核酸之间的杂交反应、分析物与其核酸适配体之间的结合反应、酶与底物之间的催化反应、分析物与其分子印迹材料之间的结合反应、分析物与其检测探针之间的氧化还原反应、以及分析物与其检测探针之间的络合反应中的一种;

所述胶体是指尺寸在1 nm-10 μm范围的零维、一维、二维、三维的实心、中空微米、纳米无机材料胶体和有机材料胶体中的一种;

所述激光束的来源是市售的波长不可调节型激光笔以及波长可调型专业激光器中的一种;

所述定性分析的标准是丁达尔效应光学信号的产生、消失、以及强度变化中的一种;

所述拍照记录中使用的设备是便携式可拍照摄像手机、数码相机、手持式摄像机、以及台式拍摄设备中的一种;

所述定量分析的模式是利用丁达尔效应光学照片的信号强度即体现为灰度值和颜色像素值中的一种与分析物浓度呈正相关关系以及负相关关系中的一种。

一种普适性的超灵敏化学与生物比色传感方法

技术领域

[0001] 本发明属于化学与生物传感领域,具体涉及一种普适性的超灵敏化学与生物比色传感方法。

背景技术

[0002] 化学与生物传感是化学、生物、材料、物理等多学科交叉融合而发展起来的一个新兴而活跃的研究领域。一般而言,化学与生物传感方法是以生物活性单元(如蛋白质、核酸、酶、微生物、细胞、组织等)作为特异性生物识别元件,或引入特异性的氧化还原反应、络合反应与分子印迹技术,进而结合物理或化学转换元件(如电化学电极、光学检测元件、微/纳米检测探针、压电石英晶体、微流控分析装置等),对目标物进行选择性的检测。化学与生物传感方法已在医学诊断、食品分析和环境监测等领域获得了广泛的应用。目前的化学与生物传感方法主要包括电化学传感器、荧光传感技术、化学发光传感方法、质量传感技术、比色传感方法等。其中,比色传感方法具有操作简单、成本低廉、适于现场分析与即时检验等突出优势,近年来受到科学家越来越多的关注。然而,绝大多数现有的化学与生物比色传感方法不同程度地存在仅能获得 μM 水平的检测灵敏度、定量分析时依赖紫外-可见分光光度计等大型专业仪器等关键科学问题,极大地限制了其在各领域中更大范围的推广应用。

发明内容

[0003] 本发明的目的是针对大多数现有方法的不足,提供一种普适性的超灵敏化学与生物比色传感方法。

[0004] 本发明的思路:发明人团队在实验中偶然发现,不管是痕量浓度的微/纳米胶体,还是微/纳米胶体仅发生细微的形貌改变,都可导致溶液中产生明显的可视化丁达尔效应光学信号。利用这一发现,进而结合分子特异性识别反应,则为发展新型的超灵敏化学与生物比色传感机制与方法提供了一个全新的思路。

[0005] 本发明的具体步骤为:

[0006] (1) 将样本溶液与检测试剂反应,样本中的分析物能通过特异性识别反应触发反应溶液中产生某种胶体;

[0007] (2) 采用激光束照射步骤(1)中的反应溶液,目视观察所产生的丁达尔效应光学信号进行定性分析,进而拍照记录该信号用于定量分析,丁达尔效应光学信号的强度随样本中分析物浓度的改变而变化;

[0008] 所述分析物是指无机离子、有机离子、有机小分子、多肽、蛋白质、核酸、细胞、病毒和细菌中的一种;

[0009] 所述检测试剂是指本身含有能被分析物触发释放但其尺寸与形貌不改变的某种胶体的检测试剂、本身含有能被分析物介导其尺寸与形貌发生改变的某种胶体的检测试剂、以及本身的组成成分能被分析物触发其原位生成某种胶体的检测试剂中的一种;

[0010] 所述样本溶液与检测试剂反应的界面是溶液均相、酶标板固相表面、微流控芯片

固相表面、微珠固相表面、以及电极固相表面中的一种；

[0011] 所述特异性识别反应是指抗原-抗体之间的免疫反应、核酸之间的杂交反应、分析物与其核酸适配体之间的结合反应、酶与底物之间的催化反应、分析物与其分子印迹材料之间的结合反应、分析物与其检测探针之间的氧化还原反应、以及分析物与其检测探针之间的络合反应中的一种；

[0012] 所述胶体是指尺寸在1nm-10 μ m范围的零维、一维、二维、三维的实心、中空的微米、纳米无机材料胶体和有机材料胶体中的一种；

[0013] 所述激光束的来源是市售的波长不可调节型激光笔以及波长可调型专业激光器中的一种；

[0014] 所述定性分析的标准是丁达尔效应光学信号的产生、消失、以及强度变化中的一种；

[0015] 所述拍照记录中使用的设备是便携式可拍照摄像手机、数码相机、手持式摄像机、以及台式拍摄设备中的一种；

[0016] 所述定量分析的模式是利用丁达尔效应光学照片的信号强度(体现为灰度值和颜色像素值中的一种)与分析物浓度呈正相关关系以及负相关关系中的一种。

[0017] 与现有化学与生物比色传感方法相比,本发明的突出优点在于:

[0018] 1) 由于痕量微/纳米胶体或细微的微/纳米胶体形貌改变即可产生明显的丁达尔效应光学信号,本发明可获得极高的检测灵敏度。

[0019] 2) 反应溶液中丁达尔效应光学信号的产生不依赖大型仪器;肉眼观察该溶液的丁达尔效应光学信号的产生、消失或强度变化即可开展分析物的定性分析;若进一步使用手持式拍摄设备(代替紫外-可见分光光度计等大型专业分析仪器)还能进行便携式定量信号读取;从而在极大降低分析成本的同时还有望实现分析物的现场分析和即时检测。

[0020] 3) 因所有胶体均具有丁达尔效应,本发明可直接推广至所有已报道的基于胶体的化学与生物比色传感方法和平台。

[0021] 4) 将本发明方法与抗原-抗体之间的免疫反应、核酸之间的杂交反应、分析物与其核酸适配体之间的结合反应、酶与底物之间的催化反应、分析物与其分子印迹材料之间的结合反应、分析物与其检测探针之间的氧化还原反应以及分析物与其检测探针之间的络合反应相结合,可直接应用于医学诊断、环境监测、食品安全等诸多领域里各类型样本中无机离子、有机离子、有机小分子、多肽、蛋白质、核酸、细胞、病毒或细菌分析物的快速、特异、超灵敏的化学与生物比色传感检测。

附图说明

[0022] 图1为本发明实施例1和2中的基于包埋超顺磁性纳米四氧化三铁胶体的目标响应核酸适配体智能凝胶协同丁达尔效应的腺苷比色传感方法的原理示意图。图中标记:1-透明检测试管;2-腺苷核酸适配体;3-DNA1修饰聚丙烯酰胺;4-DNA2修饰聚丙烯酰胺;5-超顺磁性纳米四氧化三铁颗粒;6-腺苷;7-反应溶液;8-腺苷-核酸适配体复合物;9-激光笔;10-激光束;11-丁达尔效应光学信号。

[0023] 图2为实施例1中使用本发明的基于包埋超顺磁性纳米四氧化三铁胶体的目标响应核酸适配体智能凝胶协同丁达尔效应的腺苷比色传感方法分析125 μ mol/L腺苷

(adenosine) 样本溶液所得丁达尔效应光学信号与空白样本 (blank, 10mmol/L 磷酸盐缓冲溶液, pH 8) 所得空白丁达尔效应光学信号的比较。

[0024] 图3为实施例2中使用本发明的基于包埋超顺磁性纳米四氧化三铁胶体的目标响应核酸适配体智能凝胶协同丁达尔效应的腺苷比色传感方法分析一系列浓度范围为0.97~500pmol/L的腺苷样本时所得丁达尔效应光学信号灰度值 ($G_{\text{adenosine}}$) 与图2中空白丁达尔效应光学信号灰度值 (G_{blank}) 的差值 ($\Delta G = G_{\text{blank}} - G_{\text{adenosine}}$) 与腺苷浓度的Log值 ($\text{Log}C_{\text{adenosine}}$) 之间的工作曲线。灰度值是通过处理从华为手机拍摄的丁达尔效应光学信号照片所得。每个样本均进行三次平行实验。

[0025] 图4为本发明实施例3和4中的基于原位生成纳米金胶体协同丁达尔效应的新型酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 的原理示意图。图中标记: 1-透明酶标板孔; 2-人癌基因蛋白质 (Human Oncogene Protein, HOP) p190/bcr-abl 抗原的单克隆抗体; 3-HOP 抗原; 4-生物素标记的 HOP 抗原的多克隆抗体; 4-1-HOP 抗原的多克隆抗体; 4-2-生物素; 5-链霉亲和素与碱性磷酸酯酶共同修饰的 SiO_2 纳米颗粒; 5-1- SiO_2 纳米颗粒; 5-2-碱性磷酸酯酶; 5-3-链霉亲和素; 6-L-抗坏血酸-2-磷酸三钠; 7-2-(N-吗啉) 乙磺酸; 8-氯金酸; 9-反应溶液; 10-纳米金颗粒; 11-激光笔; 12-激光束; 13-丁达尔效应光学信号。

[0026] 图5为实施例3中使用本发明的基于原位生成纳米金胶体协同丁达尔效应的新型 ELISA 检测 100fmol/L HOP 抗原样本时所得丁达尔效应光学信号与空白样本 (blank, 10mmol/L 磷酸盐缓冲溶液, pH 7.4) 所得空白丁达尔效应光学信号的比较。

[0027] 图6为实施例4中使用本发明的基于原位生成纳米金胶体协同丁达尔效应的新型 ELISA 检测一系列浓度范围为 3.1~800fmol/L 的 HOP 抗原样本所得丁达尔效应光学信号灰度值 (G_{HOP}) 与图5中空白丁达尔效应光学信号灰度值 (G_{blank}) 的差值 ($\Delta G = G_{\text{blank}} - G_{\text{HOP}}$) 与 HOP 抗原浓度的Log值 ($\text{Log}C_{\text{HOP}}$) 之间的工作曲线。灰度值是通过处理从华为手机拍摄的丁达尔效应光学信号照片所得。每个样本均进行三次平行实验。

[0028] 图7为本发明实施例5和6中的基于分析物介导纳米中空金壳形变协同丁达尔效应的超灵敏二价汞离子 (Hg^{2+}) 可视化传感方法的原理示意图。图中标记: 1-透明检测试管; 2-纳米中空金壳; 3-激光笔; 4-激光束; 5-丁达尔效应光学信号; 6- Hg^{2+} ; 7-金-汞合金; 8-反应溶液。

[0029] 图8为实施例5中使用本发明的基于分析物介导纳米中空金壳形变协同丁达尔效应的超灵敏 Hg^{2+} 可视化传感方法检测不含分析物离子的空白样本 (blank, 不含 Hg^{2+} 的电阻率为 $18.2\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 的超纯水)、其他15种金属离子样本 (即 Na^+ 、 K^+ 、 Ag^+ 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 和 Al^{3+} ; 离子浓度均为 $10\mu\text{mol/L}$) 以及这些金属离子与 5nmol/L Hg^{2+} 的混合样本所得丁达尔效应光学信号的比较。

[0030] 图9为实施例6中使用本发明的基于分析物介导纳米中空金壳形变协同丁达尔效应的超灵敏 Hg^{2+} 可视化传感方法检测一系列浓度范围为 0.62~320nmol/L 的 Hg^{2+} 样本所得丁达尔效应光学信号灰度值 ($G_{\text{Hg}^{2+}}$) 与图8中空白丁达尔效应光学信号灰度值 (G_{blank}) 的差值 ($\Delta G = G_{\text{blank}} - G_{\text{Hg}^{2+}}$) 与 Hg^{2+} 浓度的Log值 ($\text{Log}C_{\text{Hg}^{2+}}$) 之间的工作曲线。灰度值是通过处理从华为手机拍摄的丁达尔效应光学信号照片所得。每个样本均进行三次平行实验。

具体实施方式

[0031] 以下实施例将对本发明予以进一步的说明,但并不因此而限制本发明。

[0032] 实施例1:使用本发明的基于包埋超顺磁性纳米四氧化三铁胶体的目标响应核酸适配体智能凝胶协同丁达尔效应的腺苷比色传感方法分析125pmol/L腺苷(adenosine)样本与空白样本(blank,10mmol/L磷酸盐缓冲溶液,pH 8)。

[0033] 首先,制备图1中所示包埋超顺磁性纳米四氧化三铁胶体的腺苷响应核酸适配体智能凝胶。将10 μ L超顺磁性纳米四氧化三铁胶体溶液(粒径 \sim 20nm;1mg/mL;由10mmol/L磷酸盐缓冲溶液配制,pH 8)、10 μ L DNA1修饰聚丙烯酰胺溶液(50 μ mol/L;由10mmol/L磷酸盐缓冲溶液配制,pH 8)、10 μ L DNA2修饰聚丙烯酰胺溶液(50 μ mol/L;由10mmol/L磷酸盐缓冲溶液配制,pH 8)、10 μ L腺苷响应核酸适配体溶液(50 μ mol/L;由10mmol/L磷酸盐缓冲溶液配制,pH 8)在透明的1.5mL检测试管中混合;由于DNA1和DNA2中的部分碱基与腺苷响应核酸适配体的碱基可以杂交,这四种试剂室温下反应30分钟即可制得具有网络结构、物理包埋超顺磁性纳米四氧化三铁胶体的腺苷响应核酸适配体智能凝胶。

[0034] 随后,根据图1所示,本实施例中每个样本分析的具体实施过程如下:步骤一、往上述透明检测试管中所制得的智能凝胶表面滴加400 μ L待测腺苷样本溶液,室温下反应10分钟;步骤二、利用激光笔(得力品牌)产生的红色激光束照射所得反应溶液,目视观察其产生的丁达尔效应光学信号,并使用华为手机拍摄记录该信号。

[0035] 根据相同的步骤,将方法应用于分析空白样本,即10mmol/L磷酸盐缓冲溶液(pH 8),并使用华为手机拍摄记录该信号。

[0036] 从图2可以看出,检测空白样本所得的丁达尔效应光学信号几乎可以忽略不计,而分析125pmol/L腺苷样本溶液时可得明显的丁达尔效应光学信号。这是因为,腺苷可以与凝胶中的核酸适配体发生特异性识别反应,使得适配体发生结构转变导致该凝胶中包埋的超顺磁性纳米四氧化三铁胶体被大量释放并游离到溶液中,最后在红色激光束照射下产生明显的丁达尔效应光学信号。图2中的对比实验结果表明,本发明的基于包埋超顺磁性纳米四氧化三铁胶体的目标响应核酸适配体智能凝胶协同丁达尔效应用于腺苷的比色传感检测方法切实可行。

[0037] 实施例2:使用本发明的基于包埋超顺磁性纳米四氧化三铁胶体的目标响应核酸适配体智能凝胶协同丁达尔效应的腺苷比色传感方法分析一系列浓度范围为0.97 \sim 500pmol/L的腺苷样本。

[0038] 首先,制备图1中所示包埋超顺磁性纳米四氧化三铁胶体的腺苷响应核酸适配体智能凝胶。将10 μ L超顺磁性纳米四氧化三铁胶体溶液(粒径 \sim 20nm;1mg/mL;由10mmol/L磷酸盐缓冲溶液配制,pH 8)、10 μ L DNA1修饰聚丙烯酰胺溶液(50 μ mol/L;由10mmol/L磷酸盐缓冲溶液配制,pH 8)、10 μ L DNA2修饰聚丙烯酰胺溶液(50 μ mol/L;由10mmol/L磷酸盐缓冲溶液配制,pH 8)、10 μ L腺苷响应核酸适配体溶液(50 μ mol/L;由10mmol/L磷酸盐缓冲溶液配制,pH 8)在透明的1.5mL检测试管中混合;由于DNA1和DNA2中的部分碱基与腺苷响应核酸适配体的碱基可以杂交,这四种试剂室温下反应30分钟即可制得具有网络结构、物理包埋超顺磁性纳米四氧化三铁胶体的腺苷响应核酸适配体智能凝胶。

[0039] 随后,根据图1所示,本实施例中每个腺苷样本分析的具体实施过程如下:步骤一、往上述透明检测试管中所制得的智能凝胶表面滴加400 μ L待测腺苷样本溶液,室温下反应

10分钟;步骤二、利用激光笔(得力品牌)产生的红色激光束照射所得反应溶液,目视观察其产生的丁达尔效应光学信号,并使用华为手机拍摄记录该信号,进而计算相关灰度值($G_{\text{Adenosine}}$)。将所有样本的 $G_{\text{Adenosine}}$ 与实施例1中的空白灰度值(G_{blank})的差值($\Delta G = G_{\text{blank}} - G_{\text{Adenosine}}$)对腺苷浓度的Log值($\text{Log}C_{\text{Adenosine}}$)作图(图3),即完成腺苷的免仪器定量检测。

[0040] 由图3可知,随着腺苷浓度的增加,相应的丁达尔效应光学信号灰度值差值,即 ΔG 值逐渐增大。这是因为,当样本中腺苷浓度较大时,其在相同时间里与凝胶中的适配体发生特异性识别反应,使得适配体发生结构转变导致凝胶中包埋的超顺磁性纳米四氧化三铁胶体被释放的量越大,从而使所得丁达尔效应光学信号越强。此外,图3显示,利用手机量测所得 ΔG 值与腺苷浓度的Log值($\text{Log}C_{\text{Adenosine}}$)在0.97~500pmol/L的浓度范围内呈现良好的线性关系。

[0041] 实施例3:使用本发明的基于原位生成纳米金胶体协同丁达尔效应的新型酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测100fmol/L人癌基因蛋白质(Human Oncogene Protein,HOP)p190/bcr-abl抗原样本和空白样本(blank,10mmol/L磷酸盐缓冲溶液,pH 7.4)。

[0042] 根据图4所示,本实施例中每个样本分析的具体实施过程如下:步骤一,往修饰了HOP抗原的单克隆抗体的透明酶标板上的单个酶标孔依次加入40 μL 100fmol/L HOP抗原样本(10mmol/L磷酸盐缓冲溶液配制,pH 7.4)、10 μL 1mg/mL生物素标记的HOP抗原的多克隆抗体(10mmol/L磷酸盐缓冲溶液配制,pH 7.4)以及50 μL 1mg/mL链霉亲和素与碱性磷酸酯酶同时标记的 SiO_2 纳米颗粒(粒径~100nm)悬浊液(10mmol/L磷酸盐缓冲溶液配制,pH 7.4),轻微震荡混匀后室温下反应20分钟,接着弃去液体,甩干,将每个孔加满洗涤液(10mmol/L磷酸盐缓冲溶液,pH 7.4),静置30秒后弃去,如此重复2次,将孔倒置在平铺的卷筒纸上拍干;步骤二、随后往单个酶标孔加入100 μL 10mmol/L L-抗坏血酸-2-磷酸三钠盐水溶液、500 μL 1.3mmol/L的2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)水溶液(预先使用1mol/L氢氧化钠水溶液将其pH值调节至6.8)、以及5 μL 28mmol/L的氯金酸(HAuCl_4)水溶液,轻微震荡混匀于室温下反应20分钟;步骤三、利用激光笔(得力品牌)产生的红色激光束照射所得反应溶液,目视观察其产生的丁达尔效应光学信号,并使用华为手机拍摄记录该信号。

[0043] 根据相同的步骤,将方法用于分析空白样本,即10mmol/L磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4),并使用华为手机拍摄记录该信号。

[0044] 从图5可以看出,检测空白样本所得的丁达尔效应光学信号几乎可以忽略不计,而分析100fmol/L HOP抗原样本溶液时可得明显的丁达尔效应光学信号。这是因为,只有通过HOP抗原分析物触发的抗原-抗体以及生物素-亲和素之间的特异性反应,链霉亲和素与碱性磷酸酯酶同时标记的 SiO_2 纳米颗粒才能被捕获到酶标板表面,碱性磷酸酯酶随后催化L-抗坏血酸-2-磷酸三钠盐生成抗坏血酸。该抗坏血酸产物进而加速MES与 HAuCl_4 体系氧化还原反应,快速生成大量的纳米金胶体,最后在红色激光束照射下产生明显的丁达尔效应光学信号。图2中的对比实验结果表明,基于原位生成纳米金胶体协同丁达尔效应的新型ELISA切实可行。

[0045] 实施例4:使用本发明的基于原位生成纳米金胶体协同丁达尔效应的新型ELISA检测一系列浓度范围为3.1~800fmol/L的HOP抗原样本。

[0046] 根据图4所示,本实施例中每个HOP抗原样本分析的具体实施过程如下:步骤一,往修饰了HOP抗原的单克隆抗体的透明酶标板上的单个酶标孔依次加入40 μL 待测HOP抗原样

本(10mmol/L磷酸盐缓冲溶液配制,pH 7.4)、10 μ L 1mg/mL生物素标记的HOP抗原的多克隆抗体(10mM磷酸盐缓冲溶液配制,pH 7.4)以及50 μ L 1mg/mL链霉亲和素与碱性磷酸酯酶同时标记的SiO₂纳米颗粒(粒径~100nm)悬浊液(10mmol/L磷酸盐缓冲溶液配制,pH 7.4),轻微震荡混匀后室温下反应20分钟,接着弃去液体,甩干,将每个孔加满洗涤液(10mmol/L磷酸盐缓冲溶液,pH 7.4),静置30秒后弃去,如此重复2次,将孔倒置在平铺的卷筒纸上拍干;步骤二、随后往单个酶标孔加入100 μ L 10mmol/L L-抗坏血酸-2-磷酸三钠盐水溶液、500 μ L 1.3mmol/L的MES水溶液(预先使用1mol/L氢氧化钠水溶液将其pH值调节至6.8)、以及5 μ L 28mmol/L的HAuCl₄水溶液,轻微震荡混匀于室温下反应20分钟;步骤三、利用激光笔(得力品牌)产生的红色激光束照射所得反应溶液,目视观察其产生的丁达尔效应光学信号,并使用华为手机拍摄记录该信号,进而计算相关灰度值(G_{HOP})。将所有样本的 G_{HOP} 与实施例3中的空白灰度值(G_{blank})的差值($\Delta G = G_{blank} - G_{HOP}$)对HOP抗原浓度的Log值($\text{Log}C_{HOP}$)作图(图3),即完成HOP抗原的免仪器定量检测。

[0047] 由图6可知,随着HOP抗原浓度的增加,相应的丁达尔效应光学信号灰度值差值,即 ΔG 值逐渐增大。这是因为,当样本中HOP抗原浓度较大时,其在相同时间里通过与酶标板表面单克隆抗体发生特异性识别反应,可将更多的链霉亲和素与碱性磷酸酯酶同时标记的SiO₂纳米颗粒捕获到酶标板表面,导致更多抗坏血酸产物被生成,进而介导更大浓度纳米金胶体产生,从而使所得丁达尔效应光学信号越强。此外,图6显示,利用手机量测所得 ΔG 值与HOP抗原浓度的Log值($\text{Log}C_{HOP}$)在3.1~800fmol/L的浓度范围内呈现良好的线性关系。

[0048] 实施例5:使用本发明的基于分析物介导纳米中空金壳形变协同丁达尔效应的超灵敏Hg²⁺可视化传感方法检测不含分析物离子的空白样本(blank,不含Hg²⁺的电阻率为18.2M $\Omega \cdot$ cm的超纯水)、其他15种金属离子样本(即Na⁺、K⁺、Ag⁺、Cu²⁺、Pb²⁺、Mg²⁺、Co²⁺、Cd²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Cr³⁺和Al³⁺;离子浓度均为10 μ mol/L)以及这些金属离子与5nmol/L Hg²⁺的混合样本。

[0049] 根据图7所示,本实施例中每个样本分析的具体实施过程如下:步骤一、往装载了200 μ L 50 μ g/mL纳米中空金壳(直径~50nm,壳厚~5nm)胶体溶液的1.5mL透明检测试管中,混合200 μ L 5nmol/L Hg²⁺样本溶液(含10 μ mol/L Na⁺、K⁺、Ag⁺、Cu²⁺、Pb²⁺、Mg²⁺、Co²⁺、Cd²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Cr³⁺和Al³⁺),室温下反应10分钟;步骤二、利用激光笔(得力品牌)产生的红色激光束照射所得反应溶液,目视观察其产生的丁达尔效应光学信号,并使用华为手机拍摄记录该信号。

[0050] 根据相同的步骤,将方法应用于分析空白样本(不含Hg²⁺的电阻率为18.2M $\Omega \cdot$ cm的超纯水)和15种金属离子样本(即Na⁺、K⁺、Ag⁺、Cu²⁺、Pb²⁺、Mg²⁺、Co²⁺、Cd²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Cr³⁺和Al³⁺;离子浓度均为10 μ mol/L),并使用华为手机拍摄记录该信号。

[0051] 从图8可以看出,检测空白样本和15种非目标金属离子样本所得的丁达尔效应光学信号非常明显,且相互之间肉眼难以区分。另一方面,分析5nmol/L Hg²⁺样本溶液时产生的丁达尔效应光学信号则要明显弱很多,同时添加在样本中的其他15种金属离子对该信号也无影响。这是因为,只有Hg²⁺可以与纳米中空金壳特异性地生成金-汞齐,进而将该胶体探针刻蚀以显著降低其浓度,最后在红色激光束照射下仅产生微弱的丁达尔效应光学信号。图2中的对比实验结果表明,本发明的基于分析物介导纳米中空金壳形变协同丁达尔效应的超灵敏Hg²⁺可视化传感方法切实可行。

[0052] 实施例6:使用本发明的基于分析物介导纳米中空金壳形变协同丁达尔效应的超灵敏 Hg^{2+} 可视化传感方法检测一系列浓度范围为 $0.62\sim 320\text{nmol/L}$ 的 Hg^{2+} 样本。

[0053] 根据图7所示,本实施例中每个 Hg^{2+} 样本分析的具体实施过程如下:步骤一、往装载了 $200\mu\text{L}$ $50\mu\text{g/mL}$ 纳米中空金壳(直径 $\sim 50\text{nm}$,壳厚 $\sim 5\text{nm}$)胶体溶液的 1.5mL 透明检测试管中,混合 $200\mu\text{L}$ 待测 Hg^{2+} 样本溶液,室温下反应10分钟;步骤二、利用激光笔(得力品牌)产生的红色激光束照射所得反应溶液,目视观察其产生的丁达尔效应光学信号,并使用华为手机拍摄记录该信号,进而计算相关灰度值($G_{\text{Hg}^{2+}}$)。将所有样本的 $G_{\text{Hg}^{2+}}$ 和实施例5中的空白灰度值(G_{blank})的差值($\Delta G = G_{\text{Hg}^{2+}} - G_{\text{blank}}$)对 Hg^{2+} 浓度的Log值($\text{Log}C_{\text{Hg}^{2+}}$)作图(图9),即完成 Hg^{2+} 的免仪器定量检测。

[0054] 由图9可知,随着 Hg^{2+} 浓度的增加,相应的丁达尔效应光学信号灰度值差值,即 ΔG 值逐渐增大。这是因为,当样本中 Hg^{2+} 浓度较大时,其在相同时间里与纳米中空金壳特异性地生成的金-汞齐的量越大,进而该胶体探针浓度的降低幅度越大,从而使所得丁达尔效应光学信号越弱。此外,图9显示,利用手机量测所得 ΔG 值与 Hg^{2+} 浓度的Log值($\text{Log}C_{\text{Hg}^{2+}}$)在 $0.62\sim 320\text{nmol/L}$ 的浓度范围内呈现良好的线性关系。

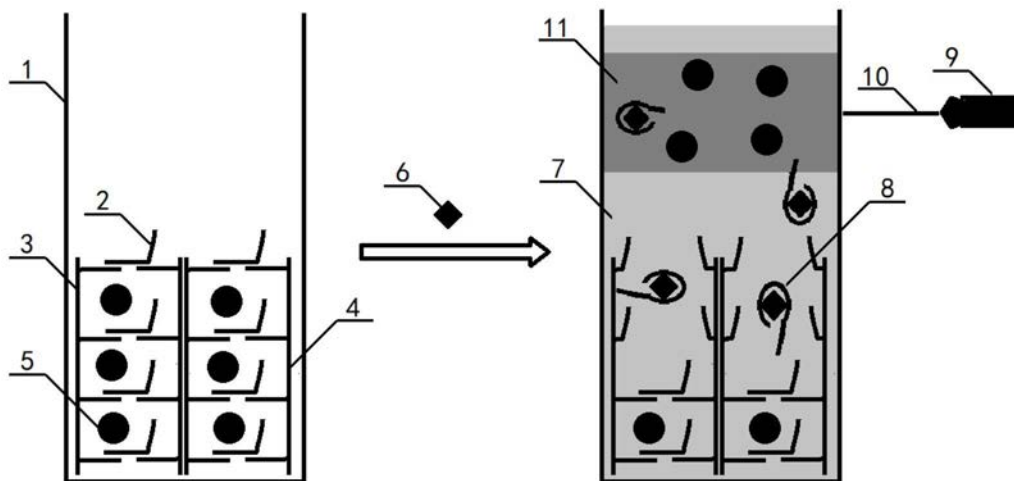


图1

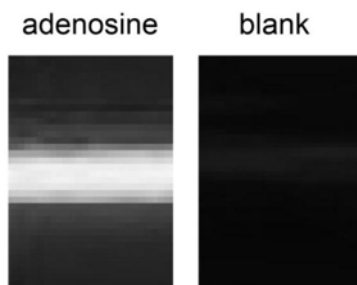


图2

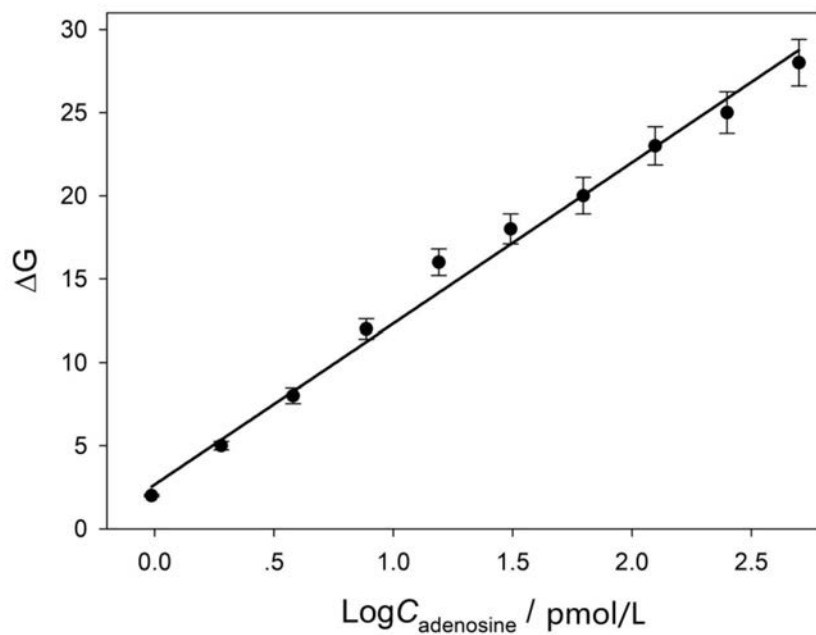


图3

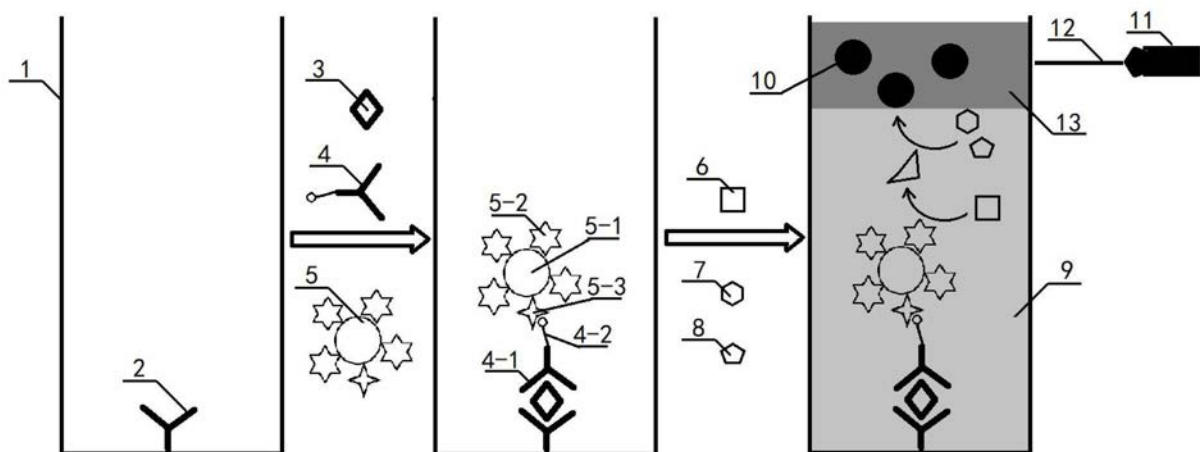


图4

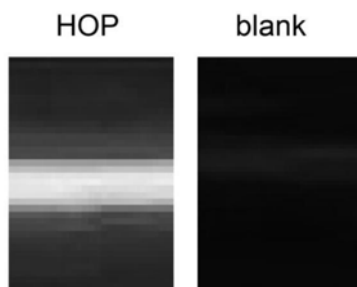


图5

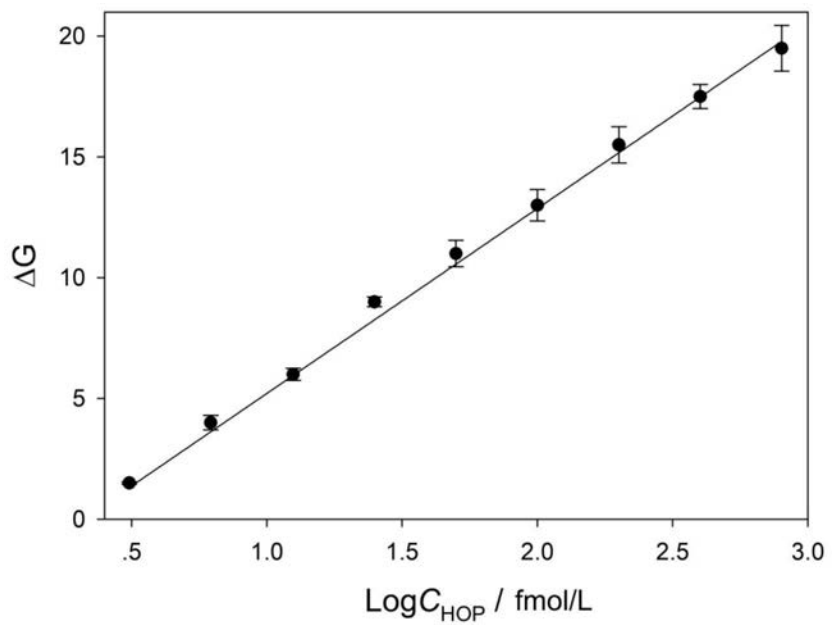


图6

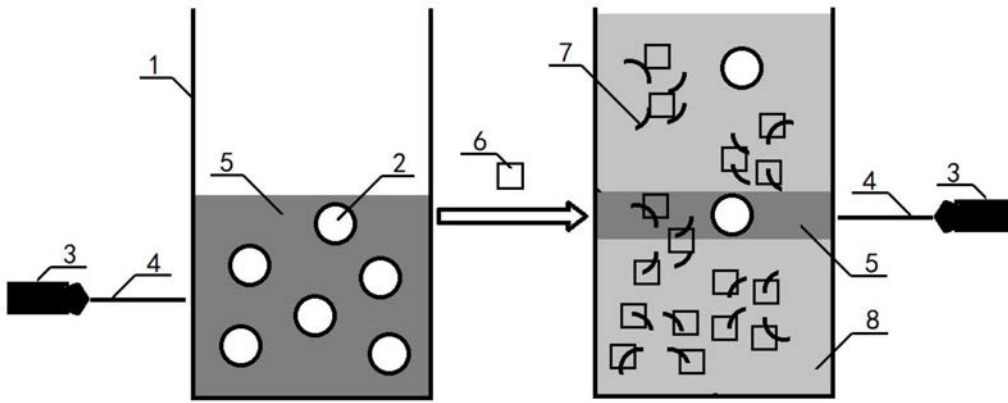


图7

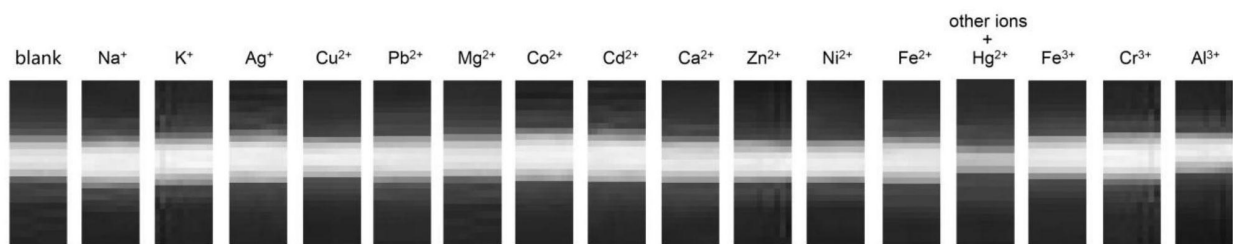


图8

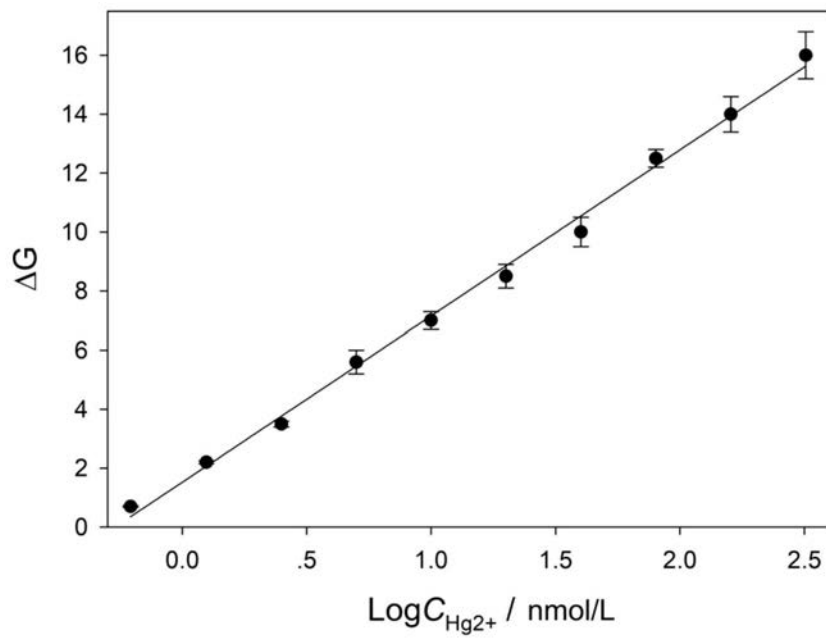


图9

专利名称(译)	一种普适性的超灵敏化学与生物比色传感方法		
公开(公告)号	CN110907370A	公开(公告)日	2020-03-24
申请号	CN201911229954.9	申请日	2019-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	桂林理工大学		
申请(专利权)人(译)	桂林理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	桂林理工大学		
[标]发明人	张云 姚茂茂 聂瑾芳 邓子豪		
发明人	张云 姚茂茂 聂瑾芳 邓子豪		
IPC分类号	G01N21/29 G01N33/53		
CPC分类号	G01N21/29 G01N33/5302		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种普适性的超灵敏化学与生物比色传感方法。该方法有两个主要步骤：将样品溶液与检测试剂反应，样品所含分析物通过特异性识别反应触发混合溶液中产生某种胶体；利用激光束照射所得混合溶液，获得其丁达尔效应光学信号。该信号的强度与样品中分析物浓度相关。本发明方法具有分析成本低、检测灵敏度高突出优点。通过与免疫反应等特异性识别反应结合，本发明中的方法可直接应用于医学诊断、环境监测、食品安全等诸多领域里各类型样本中无机离子、有机离子、有机小分子、多肽、蛋白质、核酸、细胞、病毒或细菌分析物的快速、特异、超灵敏的化学与生物比色传感检测。

