



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101696972 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 07

(21) 申请号 200910035791. 0

Au nanorods using biorecognition system.

(22) 申请日 2009. 10. 16

《Chemical Communications》. 2005, (第 8 期), 1092 - 1094.

(73) 专利权人 江南大学

审查员 苗荻

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号江南大学食品学院

(72) 发明人 胥传来 朱颖越 陈伟 徐丽广 马伟 彭池方

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所 32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

B82B 3/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101166793 A, 2008. 04. 23, 全文.

王春刚. 金纳米棒的表面修饰及其生物识别的研究. 《中国博士学位论文全文数据库 工程科技 I 辑》. 2007, (第 5 期), 全文.

J. Y. Chang et al. Oriented assembly fo

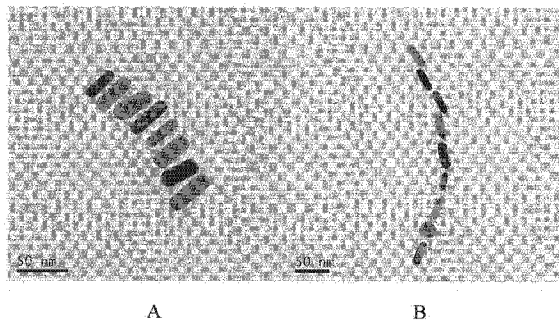
权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种基于抗原 - 抗体反应的可控的金纳米棒组装的方法

(57) 摘要

一种基于抗原 - 抗体反应的可控的金纳米棒组装的方法, 属于纳米免疫技术领域。本发明通过不同方法将抗原抗体定向的偶联到金纳米棒的端面或侧面, 在通过抗原抗体间的识别反方实现金纳米棒的组装。组装过程在液体环境中反应, 操作方法简单, 条件温和并快速的实现金纳米棒的可控组装, 在一定时间内就能生成大规模的组装产物。



1. 一种基于抗原 - 抗体反应的可控的金纳米棒组装的方法,其特征是包括金纳米棒侧面组装或金纳米棒端面组装;

(1) 金纳米棒侧面组装:

a. 抗体修饰金纳米棒:100 μ g/mL 的庆大霉素抗体 0.5mL 逐滴加入用 0.1mol/L 的碳酸钾预调至 pH 8.5-8.8、0.5mL、2nmol/L 金纳米棒溶液中,室温震荡混匀,37 $^{\circ}$ C 反应 1h,反应结束 6000rpm 离心 20min,去除未结合的抗体,重悬在 pH 7.4、含 0.5% 聚乙二醇 20000 的 0.01mol/L PBS 中,制得庆大霉素抗体修饰的金纳米棒探针;

b. 包被原修饰金纳米棒:100 μ g/mL 的庆大霉素包被原 0.5mL 逐滴加入用 0.1mol/L 的盐酸预调至 pH 5、0.5mL、2nmol/L 金纳米棒溶液中,室温震荡混匀,37 $^{\circ}$ C 反应 1h,反应结束 6000rpm 离心 20min,去除未结合的包被原,重悬在 pH7.4、含 0.5% 聚乙二醇 20000 的 0.01mol/L PBS 中,制得庆大霉素包被原修饰的金纳米棒探针;

c. 在抗原 - 抗体作用下的金纳米棒侧面靠侧面组装:

10 μ L 修饰庆大霉素包被原的金纳米棒溶液中加入 10 μ L 修饰庆大霉素抗体的金纳米棒溶液,漩涡混匀,37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5h 后反应结束,取 10 μ L 反应液稀释 5 倍后透射电镜表征产物;

或 (2) 金纳米棒端面组装:

a. 抗体的修饰:

抗体的修饰采用碳二亚胺法进行硫辛酸和庆大霉素抗体的结合,操作步骤如下:

①含 1.625mg 硫辛酸的乙醇溶液 0.3mL 与 0.4mL 的庆大霉素抗体混合;

②将 75 μ L 的碳二亚胺在磁力搅拌的条件下逐滴滴入上述步骤①溶液中后室温反应 4h;

③用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 3 天,每天换 3 次透析液;

④将硫辛酸修饰的庆大霉素抗体放在 4 $^{\circ}$ C 备用;

b. 抗体修饰金纳米棒端面

采用晶种生长法合成金纳米棒首先要经过 7500rpm 离心 15min 去除溶液中多余的 Vc、AgNO₃ 和小的球形粒子金纳米棒后,利用 pH 3.8、含有 0.1% 聚乙二醇 20000 的 0.005mol/L 十六烷基三甲基溴化铵 CTAB 溶液进行重悬,重悬液用 1mol/L HCl 调整至 pH 3.8,0.5mL、2nmol/L 重悬后的金纳米棒溶液 GNRs 逐滴滴加到由 50 μ L 稀释到 1mL 的硫辛酸修饰的庆大霉素抗体稀释液中,室温搅拌反应 4h,反应结束后 6000rpm 离心 10min,运用 pH 3.8、含有 0.1% 聚乙二醇 20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液 1mL 中进行重分散,用该溶液洗涤两遍,最后用 pH 3.8、含有 0.1% 聚乙二醇 20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液 50 μ L 进行重分散,此偶联物置于 4 $^{\circ}$ C 保存;

c. 包被原的修饰:

包被原的修饰采用碳二亚胺法进行硫辛酸和包被原的结合,步骤如下:

①含 1.625mg 的硫辛酸的乙醇溶液 0.3mL 与 0.2mL 的庆大霉素包被原溶液混合;

②将 75 μ L 的碳二亚胺在磁力搅拌的条件下逐滴滴入上述步骤①溶液中后室温反应 4h;

③用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 3 天,每天换液 3 次;

④将硫辛酸修饰后的庆大霉素包被原放在 4 $^{\circ}$ C 备用;

d. 包被原修饰金纳米棒端面：

硫辛酸修饰的庆大霉素包被原 60 μ L 用 940 μ L 的 pH 3.80、含有 0.1% 聚乙二醇 20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液进行稀释；

将 pH 3.8、0.5mL、2nmol/L 重悬后的金纳米棒溶液 GNRs 逐滴滴加到硫辛酸修饰的庆大霉素包被原的稀释液中，室温搅拌反应 4h，反应结束后 6000rpm 离心 10min，运用 pH 3.8、含有 0.1% 聚乙二醇 20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液 1mL 中进行重分散，用该溶液洗涤两遍，最后用 pH 3.8、含有 0.1% 聚乙二醇 20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液 50 μ L 进行重分散，此偶联物置于 4 $^{\circ}$ C 保存；

e. 在抗原 - 抗体作用下的金纳米棒端面对端面的组装：

10 μ L 硫辛酸修饰后的庆大霉素包被原的金纳米棒溶液中加入 10 μ L 硫辛酸修饰庆大霉素抗体的金纳米棒溶液，漩涡混匀，37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5h 后反应结束，取 10 μ L 反应液稀释 5 倍后透射电镜表征产物。

一种基于抗原 - 抗体反应的可控的金纳米棒组装的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于抗原 - 抗体反应的可控的金纳米棒组装的方法,属于纳米免疫技术领域。

背景技术

[0002] 金纳米棒由于具有丰富的表面等离子共振所衍生出来的许多性质,当今分散的金纳米棒广泛的应用于许多领域。例如用于光学数据存储、纳米传感器、生物成像、控制基因输送和光热治疗肿瘤等。

[0003] 抗原 - 抗体免疫反应是最为常见的生物识别反应之一,常常应用于免疫反应。当今,科学和技术的发展要求用到组装的金纳米棒,一维、二维,甚至三维功能化结构。因为组装的金纳米棒不仅拥有单一金纳米棒的性质,更衍生出许多群体性质。这些光学和电子学的性质是单个金纳米棒所不具有的,这些性质的产生是由于组装后的金纳米棒每个单体和其相邻的金纳米棒所作用产生的。

[0004] 金纳米棒组装有 2 种方式:(1) 端面对端面组装,(2) 侧面靠侧面组装。组装的方法主要是通过静电作用或共价偶联;通过核酸分子的杂交;金纳米棒上修饰高聚物在选择性溶剂下自我作用;最后就是通过生物识别的方法,如生物素 - 亲和素,抗原 - 抗体作用。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种操作方法简单并快速的金纳米棒实现可控组装的方法,用于端面对端面组装及侧面靠侧面组装。

[0006] 通过不同方法将抗原抗体定向的偶联到金纳米棒的端面或侧面,在通过抗原抗体间的识别反方实现金纳米棒的组装。实验以庆大霉素抗原及抗体来阐述。包括以下内容:

[0007] (1) 庆大霉素抗体及包被原与金纳米棒的侧面偶联;

[0008] (2) 金纳米棒在抗原抗体作用下的侧面靠侧面组装;

[0009] (3) 抗体与金纳米棒的顶端偶联修饰;

[0010] (4) 包被原与金纳米棒的顶端偶联修饰;

[0011] (5) 金纳米棒在抗原抗体作用下的端面对端面的组装。

[0012] 本发明的技术方案:一种基于抗原 - 抗体反应的可控的金纳米棒组装的方法,包括金纳米棒侧面组装或金纳米棒端面组装;

[0013] (1) 金纳米棒侧面组装:

[0014] a 抗体修饰金纳米棒:100 μ g/mL 的庆大霉素抗体 0.5mL 逐滴加入用 0.1mol/L 的碳酸钾预调至 pH 8.5-8.8、0.5mL、2n mol/L 金纳米棒溶液中,室温震荡混匀,37 $^{\circ}$ C 反应 1h,反应结束 6000rpm 离心 20min,去除未结合的抗体,重悬在 pH 7.4、含 0.5% 聚乙二醇 PEG20000 的 0.01mol/L PBS 中,制得庆大霉素抗体修饰的金纳米棒探针;

[0015] b. 包被原修饰金纳米棒:方法与抗体修饰金纳米棒偶联类似,100 μ g/mL 的庆大霉素包被原 0.5mL 逐滴加入用 0.1mol/L 的盐酸预调至 pH5、0.5mL、2n mol/L 金纳米棒溶液

中,室温震荡混匀,37℃反应 1h,反应结束 6000rpm 离心 20min,去除未结合的包被原,重悬在 pH 7.4、含 0.5% PEG20000 的 0.01mol/L PBS 中,制得庆大霉素包被原修饰的金纳米棒探针;

[0016] c. 在抗原-抗体作用下的金纳米棒侧面靠侧面组装:

[0017] 10 μL 修饰庆大霉素包被原的金纳米棒溶液中加入 10 μL 修饰庆大霉素抗体的金纳米棒溶液,漩涡混匀,37℃孵育 0.5h 后反应结束,取 10 μL 反应液稀释 5 倍后透射电镜表征产物;

[0018] 或 (2) 金纳米棒端面组装:

[0019] a. 抗体的修饰:

[0020] 抗体的修饰采用碳二亚胺法进行硫辛酸和庆大霉素抗体的结合,操作步骤如下:

[0021] ①含 1.625mg 硫辛酸的乙醇溶液 0.3mL 与 0.4mL 的庆大霉素抗体混合;

[0022] ②将 75 μL 的碳二亚胺在磁力搅拌的条件下逐滴滴入上述步骤①溶液中后室温反应 4h;

[0023] ③用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 3 天,每天换 3 次透析液;

[0024] ④将硫辛酸修饰的庆大霉素抗体放在 4℃备用;

[0025] b. 抗体修饰金纳米棒端面

[0026] 采用晶种生长法合成金纳米棒首先要经过 7500rpm 离心 15min 去除溶液中多余的 Vc、AgNO₃ 和小的球形粒子金纳米棒后,利用 pH 3.8、含有 0.1% 聚乙二醇 PEG20000 的 0.005mol/L 十六烷基三甲基溴化铵 CTAB 溶液进行重悬,重悬液用 1mol/L HCl 调整至 pH 3.8,在金纳米棒的制备过程中 CTAB 起着非常关键的作用,CTAB 主要是分布在金纳米棒的侧面从而金纳米棒的侧面带有正电荷而金纳米棒的端面的分布很少,因此采用硫辛酸修饰的抗体会修饰到金纳米棒的端面而非侧面上。0.5mL、2n mol/L 重悬后的金纳米棒溶液 GNRs 逐滴滴加到由 50 μL 稀释到 1mL 的硫辛酸修饰的庆大霉素抗体稀释液中,室温搅拌反应 4h,反应结束后 6000rpm 离心 10min,运用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液 1mL 中进行重分散,用该溶液洗涤两遍,最后用 pH3.8、含 0.1% PEG20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液 50 μL 进行重分散,此偶联物置于 4℃保存;

[0027] c. 包被原的修饰:

[0028] 包被原的修饰采用碳二亚胺法进行硫辛酸和包被原的结合,步骤如下:

[0029] ①含 1.625mg 的硫辛酸的乙醇溶液 0.3mL 与 0.2mL 的庆大霉素包被原溶液混合;

[0030] ②将 75 μL 的碳二亚胺在磁力搅拌的条件下逐滴滴入上述步骤①溶液中后室温反应 4h;

[0031] ③用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 3 天,每天换液 3 次;

[0032] ④将硫辛酸修饰后的庆大霉素包被原放在 4℃备用;

[0033] d. 包被原修饰金纳米棒端面:

[0034] 包被原和金纳米棒的偶联与 (b) 抗体和金纳米棒的偶联相似,只是在包被原的量上有区别,硫辛酸修饰的庆大霉素包被原 60 μL 用 940 μL 的 pH 3.80、含有 0.1% PEG20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液进行稀释;

[0035] 将 pH 3.8、0.5mL、2n mol/L 重悬后的金纳米棒溶液 GNRs 逐滴滴加到硫辛酸修饰的庆大霉素包被原的稀释液中,室温搅拌反应 4h,反应结束后 6000rpm 离心 10min,运用 pH

3.8、含有 0.1% PEG20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液 1mL 中进行重分散,用该溶液洗涤两遍,最后用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液 50 μ L 进行重分散,此偶联物置于 4 $^{\circ}$ C 保存;

[0036] e. 在抗原-抗体作用下的金纳米棒端面对端面的组装:

[0037] 10 μ L 硫辛酸修饰的庆大霉素包被原的金纳米棒溶液中加入 10 μ L 硫辛酸修饰庆大霉素抗体的金纳米棒溶液,漩涡混匀,37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5h 后反应结束,取 10 μ L 反应液稀释 5 倍后透射电镜表征产物。

[0038] 本发明的有益效果:本发明提供了一种新的金纳米棒组装的方法,通过不同方法将抗原抗体定向的偶联到金纳米棒的端面或侧面,在通过抗原抗体间的识别反方实现金纳米棒的组装。组装过程在液体环境中反应,操作简单,条件温和并快速的实现金纳米棒的可控组装,在一定时间内就能生成大规模的组装产物。

附图说明

[0039] 图 1 基于抗原-抗体反应的组装金纳米棒的透射电镜图。A、金纳米棒的侧面对侧面组装,B、金纳米棒的端面对端面组装。

[0040] 图 2 基于抗原-抗体反应的组装金纳米棒的紫外可见图。

具体实施方式

[0041] 实施例 1 庆大霉素抗体及包被原与金纳米棒的侧面偶联:

[0042] a. 抗体与金纳米棒偶联:0.5mL、100 μ g/mL 的庆大霉素抗体逐滴加入用 0.1mol/L 的碳酸钾预调至 pH 8.5-8.8 的 0.5mL、2n mol/L 金纳米棒溶液中,室温震荡混匀,37 $^{\circ}$ C 反应 1h,反应结束 6000rpm 离心 20min,去除未结合的抗体,重悬在 0.01mol/L、pH 7.4 的 PBS 中(含 0.5% PEG2000),制得庆大霉素抗体修饰的金纳米棒探针;

[0043] b. 包被原与金纳米棒偶联:方法与抗体与金纳米棒偶联类似,0.5mL、100 μ g/mL 的庆大霉素包被原逐滴加入用 0.1mol/L 的盐酸预调至 pH 5、0.5mL、2n mol/L 的金纳米棒溶液中,室温震荡混匀,37 $^{\circ}$ C 反应 1h,反应结束 6000rpm 离心 20min,去除未结合的包被原,重悬在 0.01mol/L、pH 7.4 的 PBS 中(含 0.5% PEG20000),制得庆大霉素包被原修饰的金纳米棒探针;

[0044] 实施例 2 在抗原抗体作用下的金纳米棒侧面靠侧面组装:

[0045] 10 μ L 修饰庆大霉素包被原的金纳米棒溶液中加入 10 μ L 修饰庆大霉素抗体的金纳米棒溶液,漩涡混匀,37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5h 后反应结束,取 10 μ L 反应液稀释 5 倍后透射电镜表征产物。

[0046] 实施例 3 抗体与金纳米棒的顶端偶联修饰:

[0047] A. 抗体的修饰

[0048] 抗体的修饰采用碳二亚胺法进行硫辛酸和抗体的结合,具体操作步骤如下:

[0049] ① 0.3mL 的硫辛酸的乙醇溶液(含硫辛酸 1.625mg)与 0.4mL 的抗体混合。

[0050] ② 将 75 μ L 的碳二亚胺在磁力搅拌的条件下逐滴滴入上述溶液中后室温反应 4h。

[0051] ③ 用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 3 天,每天换 3 次透析液。

[0052] ④ 将修饰后的抗体放在 4 $^{\circ}$ C 备用。

[0053] B. 抗体和金纳米棒端面偶联

[0054] 采用晶种生长法合成金纳米棒首先要经过 7500rpm 离心 15min 去除溶液中多余的 Vc、AgNO₃ 和小的球形粒子金纳米棒后利用 pH 3.8、0.005M 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 含有 0.1% 聚乙二醇 (PEG) 的溶液进行重悬。重悬液的 pH 值用 1mol/L HCl 进行调整。在金纳米棒的制备过程中 CTAB 起着非常关键的作用。CTAB 主要是分布在金纳米棒的侧面从而金纳米棒的侧面带有正电荷而金纳米棒的端面的分布很少,因此采用硫辛酸修饰的抗体会修饰到金棒的端面而非侧面上。0.5mL 重分散的 2n mol/L GNRs 逐滴滴加到由 50 μL 修饰后抗体稀释到 1mL 的抗体的稀释液中。室温搅拌反应 4h。反应结束后 6000rpm 离心 10min, 运用 1mL 的 0.005M CTAB(pH 3.8) 含有 0.1% PEG20000 的溶液进行重分散。用该溶液洗涤两遍。最后用 50 μL 的 0.005M CTAB(pH 3.8) 含有 0.1% PEG20000 的溶液进行重分散。此偶联物置于 4℃ 保存。

[0055] 实施例 4 包被原与金纳米棒的顶端偶联修饰

[0056] A. 包被原修饰:

[0057] 包被原的修饰采用碳二亚胺法进行硫辛酸和包被原的结合,具体操作步骤如下:

[0058] ① 0.3mL 的硫辛酸的乙醇溶液(含硫辛酸 1.625mg)与 0.2mL 的庆大霉素包被原溶液混合。

[0059] ② 将 75 μL 的碳二亚胺在磁力搅拌的条件下逐滴滴入上述溶液中后室温反应 4h。

[0060] ③ 用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液透析 3 天,每天换液 3 次。

[0061] ④ 将修饰后的包被原放在 4℃ 备用。

[0062] B. 包被原和金纳米棒端面偶联

[0063] 包被原和金纳米棒的偶联与抗体和金纳米棒的偶联相似,只是在包被原的量上有区别,即加入的包被原 60 μL 后用 940 μL 的 0.005M CTAB(pH 3.8) 含有 0.1% PEG20000 的溶液进行稀释。

[0064] 将 pH 3.8、0.5mL、2n mol/L 重悬后的金纳米棒溶液 GNRs 逐滴滴加到硫辛酸修饰的庆大霉素包被原的稀释液中,室温搅拌反应 4h,反应结束后 6000rpm 离心 10min,运用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液 1mL 中进行重分散,用该溶液洗涤两遍,最后用 pH 3.8、含有 0.1% PEG20000 的 0.005mol/L CTAB 溶液 50 μL 进行重分散,此偶联物置于 4℃ 保存。

[0065] 实施例 5 在抗原抗体作用下的金纳米棒端面对端面的组装

[0066] 10 μL 修饰庆大霉素包被原的金纳米棒溶液中加入 10 μL 修饰庆大霉素抗体的金纳米棒溶液,漩涡混匀,37℃ 孵育 0.5h 后反应结束,取 10 μL 反应液稀释 5 倍后透射电镜表征产物。

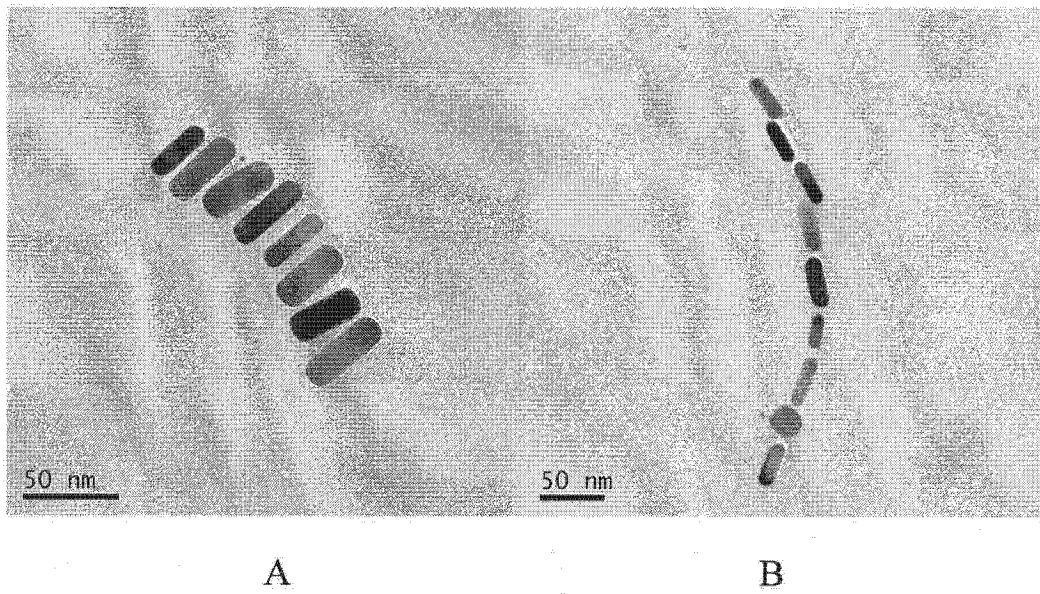


图 1

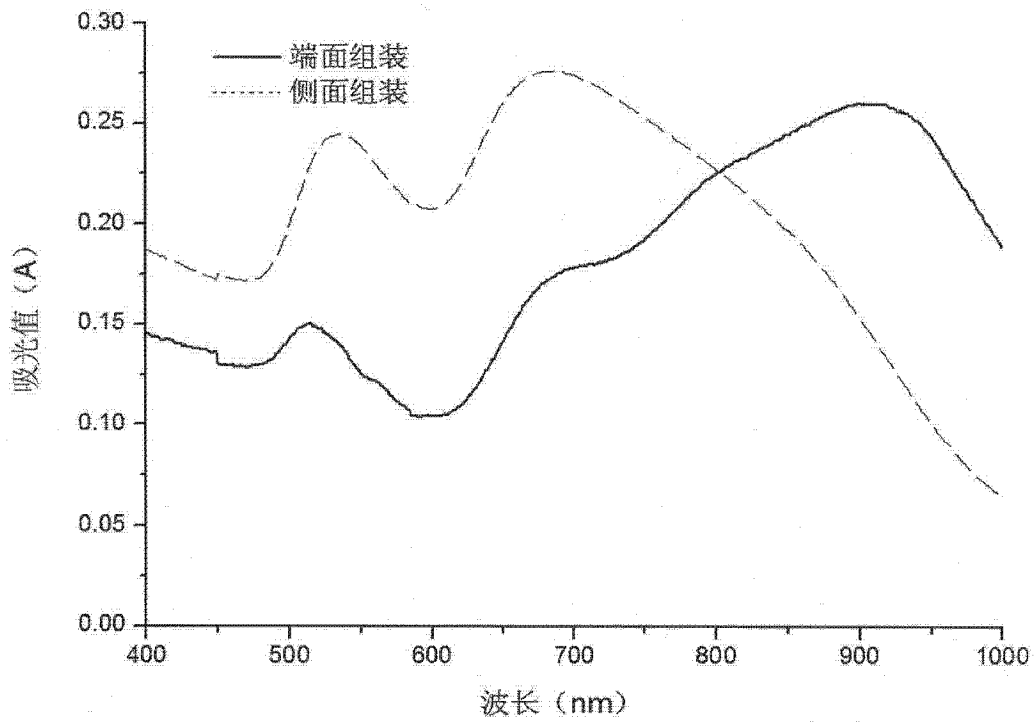
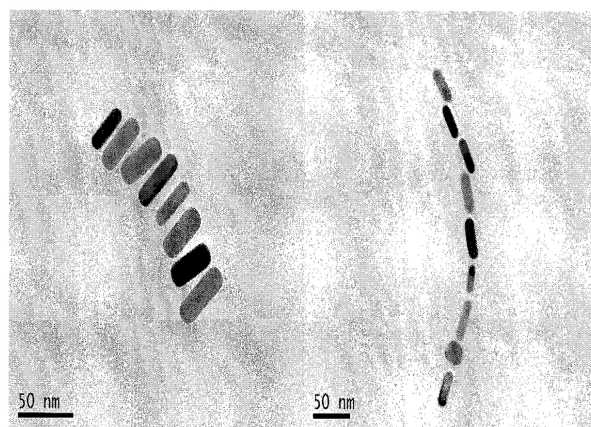


图 2

专利名称(译)	一种基于抗原-抗体反应的可控的金纳米棒组装的方法		
公开(公告)号	CN101696972B	公开(公告)日	2012-11-07
申请号	CN200910035791.0	申请日	2009-10-16
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	胥传来 朱颖越 陈伟 徐丽广 马伟 彭池方		
发明人	胥传来 朱颖越 陈伟 徐丽广 马伟 彭池方		
IPC分类号	G01N33/531 B82B3/00		
审查员(译)	苗荻		
其他公开文献	CN101696972A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种基于抗原-抗体反应的可控的金纳米棒组装的方法，属于纳米免疫技术领域。本发明通过不同方法将抗原抗体定向的偶联到金纳米棒的端面或侧面，在通过抗原抗体间的识别反方实现金纳米棒的组装。组装过程在液体环境中反应，操作简单，条件温和并快速的实现金纳米棒的可控组装，在一定时间内就能生成大规模的组装产物。



A

B