

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



PCT



(10) 国际公布号

WO 2011/106963 A1

(43) 国际公布日
2011 年 9 月 9 日 (09.09.2011)

- (51) 国际专利分类号:
C09K 11/06 (2006.01) G01N 33/531 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 21/76 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2010/075064
- (22) 国际申请日: 2010 年 7 月 8 日 (08.07.2010)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201010117687.9 2010 年 3 月 3 日 (03.03.2010) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 中国科学技术大学 (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA) [CN/CN]; 中国安徽省合肥市金寨路 96 号, Anhui 230026 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 崔华 (CUI, Hua) [CN/CN]; 中国安徽省合肥市金寨路 96 号, Anhui 230026 (CN)。 田大勇 (TIAN, Dayong) [CN/CN]; 中国安徽省合肥市金寨路 96 号, Anhui 230026 (CN)。
- (74) 代理人: 北京集佳知识产权代理有限公司 (UNITALEN ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市朝阳区建国门外大街 22 号赛特广场 7 层, Beijing 100004 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,

[见续页]

(54) Title: LUMINESCENT NANOGOLD FUNCTIONALIZED BY N-(4-AMINOBTYL)-N-ETHYLISOLUMINOL, PREPARATION AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金及其制备方法和应用

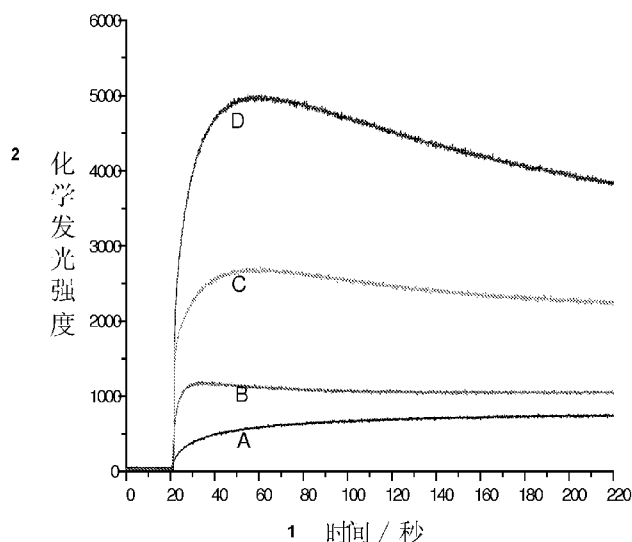


图8 / Fig. 8

(57) Abstract: Luminescent nanogold functionalized by N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol, the preparation and application thereof are provided. The functionalized nanogold is fabricated by linking N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol to the surface of gold nanoparticles. The functionalized nanogold is prepared by directly reducing chloroauric acid with N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol, wherein N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol acts as reducer and stabilizer simultaneously. The preparation method is simple, fast and there is no need of special conditions. The preparation method can be performed in a wide temperature range of 15-35°C. Diameters and patterns of the functionalized nanogold can be adjusted and controlled by the ratio of chloroauric acid to N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol. The obtained functionalized nanogold exhibits excellent chemiluminescence characteristics. Said functionalized nanogold can be combined with biomolecules to form biomolecular probe, which can be used for immunoassay, nucleic acid analysis, molecular imaging, sensor, etc., and has broad application prospect in the field of biomedicine, food safety, environment monitoring, etc.

[见续页]

1 TIME / SECOND
2 CHEMILUMINESCENCE INTENSITY

WO 2011/106963 A1



CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, **本国际公布:**
TG)。

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(57) 摘要:

提供一种 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金及其制备方法和应用。该功能化纳米金由 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺连接在纳米金粒子的表面而成。该功能化纳米金由 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺直接还原氯金酸制得, 合成过程中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺同时作为还原剂和稳定剂。制备方法简单、快速、无需特殊条件, 制备温度范围宽, 可为 15-35℃。所述功能化纳米金的粒径和形貌可以由氯金酸与 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的比例进行调控, 并且所制得的功能化纳米金具有优良的化学发光特性。所述功能化纳米金可与生物分子结合形成生物分子探针, 用于免疫分析、核酸分析、分子成像、传感器等, 在生物医学、食品安全、环境监测等领域具有广阔的应用前景。

一种 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金 及其制备方法和应用

本申请要求于2010年3月3日提交中国专利局、申请号为201010117687.9、发明名称为“一种 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金及其制备方法和应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本发明涉及一种 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金及其制备、性质和应用。属于材料科学和生物化学领域。

背景技术

金纳米材料具有独特的、与尺寸相关的光学、热学、电学、磁学以及化学等方面的性质，如表面等离子体共振吸收（SPR）、拉曼散射（RS）、催化活性和生物相容性，这些特性使得金纳米材料在催化、生物传感器、生物医学等方面具有重要的应用。大量研究表明，金纳米材料的性质受其形貌、尺寸和表面组成的强烈影响，因此金纳米材料的合成方法和性质研究对纳米材料的基础理论研究及其实际应用都具有重要意义。

金纳米材料的功能化主要包括两个方面的方向和内容：其一是获得形貌和大小可控的金纳米材料，以调节其 SPR 吸收性质和催化活性；其二是对已有的金纳米材料进行表面修饰，使得金纳米材料具有其表面配体的丰富性质，如荧光性质、氧化还原性、生物活性和电化学活性。

在各种形貌的金纳米颗粒的制备研究中，起步最早的是对球形金纳米粒子的制备研究。现已能成功制备尺寸在几纳米至数百纳米范围内各种尺寸、分散性好的球形金颗粒。虽然金纳米颗粒的 SPR 吸收会随着颗粒尺寸的变化有所迁移，但是迁移范围不大。相比而言，改变纳米颗粒的形貌是调节其 SPR 特性更有效的手段，以棒状或线状金纳米为典型代表的各向异性金纳米材料如纳米片、纳米花等独特可调的 SPR 吸收性能是近年来该领域的研究热点。

在金纳米材料的表面修饰上，常见的金纳米粒子表面往往为无机离子和有

机分子层所保护,这些保护分子在稳定纳米金粒子的同时还能保持其自身的光学、电化学或氧化还原活性,因此将各种具有光学、电化学活性的有机分子或生物分子修饰到纳米材料表面或掺杂到纳米材料内部也是获得功能化纳米材料的另一种有效方式。由于金属纳米材料内部结构较为致密,因此对于金属纳米材料多采用表面化学修饰的方法进行功能化。如利用金和硫之间的强相互作用,以硫醇分子作为金纳米粒子表面的配体以稳定纳米金粒子,是近十年来制备稳定的金纳米最有效的方法 (Brust, M.; Wallker, M.; Bethell, D. J. Chem. Soc.Chem. Commun., 1994, 801)。

纳米粒子特殊的光学性质包含着有关纳米粒子能级结构和表面状态等的丰富信息,一直以来都是纳米科学研究的重点之一。目前对于纳米材料光学性质的研究主要包括表面等离子体共振吸收、表面增强拉曼散射和光致发光等光学行为。

化学发光是伴随化学反应的一种光发射现象,与以上光学现象不同,化学发光不需要外界光源激发,具有灵敏度高、线性范围宽、背景噪声小、仪器简单、价格便宜等优点。而近几年,金属纳米材料在化学发光中的应用也已成为一个重要的研究课题。尽管半导体量子点的化学发光、金属纳米材料直接和间接参与的化学发光已经逐渐受到研究者的关注,但目前的研究主要集中于未修饰的纳米材料直接参与、或在其他条件诱导下参与化学发光,改性或功能化金纳米材料在化学发光理论及分析应用中的研究工作则鲜见报道。2005 年, Roux 等人 (Roux, S.; Garcia, B.; Bridot, J. L.; Salom, Marquette, C. Langmuir. 2005, 21, 2526) 用二氢硫辛酸作为保护试剂, 硼氢化钠 (NaBH_4) 还原氯金酸 (氯金酸 $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 合成了二氢硫辛酸保护的纳米金。利用 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化纳米金表面的二氢硫辛酸的羧基, 然后通过鲁米诺的 $-\text{NH}_2$ 和二氢硫辛酸的 $-\text{COOH}$ 进行缩合反应将鲁米诺嫁接到纳米金的表面。这个过程需要多步反应、沉淀洗涤、减压蒸馏、过滤、分散等多个步骤才能完成,非常麻烦、耗时。研究结果表明通过二氢硫辛酸键合到纳米金表面的鲁米诺仍具有较好电致化学发光活性。2007 年, 本课题组直接利用鲁米诺还原氯金酸一步合成得到了鲁米诺直接键合的纳米金 (Cui, H.; Wang, W.; Duan, C. F.; Dong, Y. P.; Guo, J. Z. Chem. Eur. J. 2007, 13, 6975), 表征的结果显示鲁米诺以弱的 Au-N 键直接连接到纳米金的表面。通

过半胱氨酸桥联分子的静电相互作用,将该鲁米诺直接键合的纳米金组装到金电极的表面,发现该修饰电极在碱性溶液中具有电致化学发光活性且强度随 H_2O_2 浓度的增加而增强,就此发展了一个 H_2O_2 电致化学发光传感器。

N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺是一种鲁米诺的异构体异鲁米诺的衍生物,化学式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$ 。常温下是一种白色粉末,是一种比较稳定的人工合成的有机化合物,其化学发光特性优于鲁米诺。因为其分子中的脂肪胺基团容易与被标记物相连接,且保持高的发光效率,所以适合直接作为生物分析的探针。因此,直接利用N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺代替鲁米诺还原氯金酸合成的纳米金有可能获得比鲁米诺直接键合的纳米金化学发光效率更高的发光功能化的纳米金。可是,实验发现在鲁米诺还原氯金酸合成鲁米诺直接键合的纳米金的条件下(即将100 mL 0.01 % (w/w)的 HAuCl_4 水溶液加热至沸,在冷凝回流并充分搅拌的条件下,加入1.5–2.0 mL 含有0.01 mol/L 鲁米诺和0.01 mol/L 氢氧化钠的溶液,保持沸腾并继续搅拌回流反应30 min,然后除去加热源继续搅拌15 min以上得到纳米金溶液。),用N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺代替鲁米诺不能得到稳定的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺功能化的纳米金溶胶。因此,探索N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺功能化的纳米金的合成方法、化学发光特性及其在生物分析的应用具有重要的意义。

发明内容

本发明的目的是提供N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金及其制备方法和在生物分析中的应用,其内容包括以下几个方面:

第一是提供一种功能化纳米金。该功能化纳米金由金纳米粒子和N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺连接而成,所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺通过共价键Au-N连接在所述金纳米粒子的表面。

所述功能化纳米金具有化学发光特性。所述功能化纳米金与氧化剂反应产生化学发光。所述氧化剂包括但不限于 H_2O_2 、 O_2 、 ClO^- 、 I_2 、 IO_4^- 、 MnO_4^- 。

第二是提供一种上述功能化纳米金的制备方法,包括如下步骤:

(1) 将氯金酸水溶液A与N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液在搅拌状态下混合得到混合液;所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质

的量的2-4倍；。

(2) 在搅拌状态下，再将氯金酸水溶液B加入步骤(1)得到的混合液中，继续搅拌至形成金溶胶，得到的金溶胶即为功能化纳米金；所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的1-3倍。

所述氯金酸水溶液A的摩尔浓度可为1-10 mmol/L、1-6 mmol/L、6-10 mmol/L、6-8 mmol/L或8-10 mmol/L；

所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液的摩尔浓度可为0.5-8.0 mmol/L、0.5-4.0 mmol/L、0.5-6.0 mmol/L、4.0-6.0 mmol/L、4.0-8.0 mmol/L或6.0-8.0 mmol/L；

所述氯金酸水溶液B的摩尔浓度可为1-10 mmol/L、1-6 mmol/L 或6-10 mmol/L。

所述氯金酸水溶液A、N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液和所述氯金酸水溶液B的配比为下述h1-h10中的任一种：

h1、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的4倍，所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的1倍；

h2、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2倍，所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的3倍；

h3、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2.7倍，所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的1.8倍；

h4、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2.3倍，所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的1.4倍；

-5-

h5、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2.7倍，所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2.1倍；

h6、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2.7倍，所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2.4倍；

h7、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2.7倍，所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2.7倍；

h8、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的3倍，所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2倍；

h9、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的27/11倍，所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的18/11倍；

h10、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2.25倍，所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的1.5倍。

所述方法还包括将所述金溶胶通过离心进行纯化的步骤。

所述功能化纳米金可在如下条件下离心：将初始合成的纳米金溶胶在17120 * g下离心45分钟，然后将沉淀用蒸馏水或二次水或超纯水溶解。

所述功能化纳米金的制备方法中，其反应温度可以为15-35℃，如15-25℃、15-30℃、25-35℃或25-30℃。

-6-

上述步骤(1)的反应时间可为2小时以上,上述步骤(2)的反应时间可为1.5小时以上;N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺同时作为合成过程中的还原剂和稳定剂。

配制所述氯金酸水溶液A、氯金酸水溶液B和N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液所用的水的电阻率大于等于 $1.0\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$;所述水选自下述三种水中的至少一种:二次蒸馏水、纯净水和超纯水。

上述方法制备的功能化纳米金,其形貌可呈单分散球状、球状纳米金组装的链状或球状纳米金组装的网状,并且粒径大小也可控。其粒径大小为10-30纳米。其形貌呈球状纳米金组装的链状时,链长为400-500纳米。

第三是提供一种生物分析探针,是由上述的功能化纳米金标记生物分子形成的复合物。

所述生物分子为蛋白质或核酸分子。

所述的生物分析探针为免疫分析探针或核酸分析探针。

所述免疫分析探针制备的方法为下述A或B的方法:

A、将所述蛋白质分子端基修饰生物素,然后与连接有链霉亲和素的功能化纳米金相连接;

B、将所述蛋白质分子直接与所述的功能化纳米金相连接。

所述免疫分析探针中所述蛋白质为抗原或抗体。

所述核酸分析探针制备的方法下述a或b的方法:

a、将所述核酸分子端基修饰生物素,然后与连接有链霉亲和素的功能化纳米金相连接;

b、将所述核酸分子端基修饰巯基,然后与所述的功能化的纳米金相连接。

所述的核酸分析探针中所述核酸分子为DNA、RNA或适配体。

与现有技术相比,本发明具有如下的优点:

1. 提供了一种新的纳米金的合成方法,该法具有简单、快速、无需特殊条件等优点。

2. 首次采用N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺还原氯金酸合成纳米金,在合成过程中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺同时作为还原剂和稳定剂,无需在加入其他反应试剂。此合成方法不同于文献报道(Cui, H.; Wang, W.; Duan, C. F.;

Dong, Y. P.; Guo, J. Z. Chem. Eur. J. 2007, 13, 6975) 的鲁米诺还原氯金酸的合成方法。

3. 本发明所合成的纳米金的形貌和粒径, 可由N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺和氯金酸的用量来进行调控: 可以通过调节步骤(1)中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的量得到不同形貌的纳米金; 可调节步骤(2)中氯金酸的量得到不同粒径的纳米金。

4. 由该方法所得到的纳米金为发光功能化的纳米金, 其表面键合有发光试剂N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺, 该发光功能化的纳米金具有优良的化学发光特性。其发光效率优于文献报道的(Cui, H.; Wang, W.; Duan, C. F.; Dong, Y. P.; Guo, J. Z. Chem. Eur. J. 2007, 13, 6975) 鲁米诺发光功能化的纳米金。

5. 将功能化的纳米金作为发光标记物标记生物分子, 可构建生物分析探针。制备该生物分析探针的方法简单、快捷、操作简便、结合效果好, 克服了现有的以发光试剂和酶为标记物的标记技术操作麻烦、费时、分析成本高等重要缺陷。

附图说明

图1: 不同浓度的氯金酸和N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺合成的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金:

A: 1.0 mmol/L氯金酸 + 0.5 mmol/L的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 1.0 mmol/L氯金酸, 得到呈单分散球状的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金;

B: 6 mmol/L氯金酸 + 4 mmol/L的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 6 mmol/L氯金酸, 得到呈球状纳米金组装的链状的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金;

C: 8 mmol/L氯金酸 + 5 mmol/L的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 10 mmol/L氯金酸, 得到呈球状纳米金组装的网状的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金;

D: 10 mmol/L氯金酸 + 8 mmol/L的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 6 mmol/L氯金酸, 得到呈球状纳米金组装的网状的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金;

-8-

图2: 不同氯金酸的用量制备的不同粒径的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的电镜照片, 其中:

A: 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 5 mL 4 mmol/L 的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸制备的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金, 其粒径为18 nm;

B: 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 5 mL 4 mmol/L 的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 7 mL 6 mmol/L 氯金酸制备的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金, 其粒径为22 nm;

C: 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 5 mL 4 mmol/L 的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 8 mL 6 mmol/L 氯金酸制备的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金, 其粒径为25 nm;

D: 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 5 mL 4 mmol/L 的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 9 mL 6 mmol/L 氯金酸制备的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金, 其粒径为30 nm;

图3: 不同N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的用量制备的不同形貌的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的电镜照片, 其中:

A: 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 4.5 mL 4 mmol/L 的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸制备的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金呈单分散球状;

B: 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 5.0 mL 4 mmol/L 的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸制备的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金呈球状纳米金组装的链状;

C: 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 5.5 mL 4 mmol/L 的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸制备的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金呈球状纳米金组装的准网状;

D: 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 6 mL 4 mmol/L 的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸制备的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金呈球状纳米金组装的网状;

图4: 不同温度下合成的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金:

—9—

A: 9 mL 6 mmol/L 氯金酸 + 5.0 mL 4 mmol/L N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸在 15℃ 下制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金;

B: 9 mL 6 mmol/L 氯金酸 + 5.0 mL 4 mmol/L N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸在 25℃ 下制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金;

C: 9 mL 6 mmol/L 氯金酸 + 5.0 mL 4 mmol/L N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸在 30℃ 下制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金;

D: 9 mL 6 mmol/L 氯金酸 + 5.0 mL 4 mmol/L N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸在 35℃ 下制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金;

图5: 二次蒸馏水、纯净水和超纯水对合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的影响:

A: 9 mL 6 mmol/L 氯金酸 + 5.0 mL 4 mmol/L N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸 + 30.0 mL 的二次蒸馏水在 25℃ 下制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金;

B: 9 mL 6 mmol/L 氯金酸 + 5.0 mL 4 mmol/L N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸 + 30.0 mL 的纯净水在 25℃ 下制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金;

C: 9 mL 6 mmol/L 氯金酸 + 5.0 mL 4 mmol/L N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸 + 30.0 mL 的超纯水在 25℃ 下制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金;

图6: 制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金粒子的 X 射线电子能谱图与 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺纯样的 X 射线电子能谱图, 其中:

A: 为 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺纯样中的 C1s 能谱;

B: 为 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺纯样中的 N1s 能谱;

C: 为制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的 C1s 能谱;

-10-

D: 为制备的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的N1s能谱;

E: 为制备的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的Au4f能谱;

图7: 制备的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金粒子的紫外-可见吸收光谱图, 其中:

A: 纯N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液的紫外-可见吸收光谱;

B: 初始N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米的紫外-可见吸收光谱;

C: 透析后的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米溶液的紫外-可见吸收光谱;

D: 透析-离心-干燥后水分散-盐析-沉淀再溶解后的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米溶液紫外-可见吸收光谱;

E: 透析-离心-干燥后水分散-盐析-上清液的紫外-可见吸收光谱;

图8: 不同形貌N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金的化学发光曲线(实验条件: 制备的发光功能化纳米金粒子离心后的沉淀用pH=13的NaOH溶液进行分散放入检测池中, 再注入浓度为 0.1 mol/L H_2O_2 溶液), 其中:

A: 9 mL 6 mmol/L氯金酸+ 4.5 mL 的4 mmol/L的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 6 mL 6 mmol/L氯金酸;

B: 9 mL 6 mmol/L氯金酸+ 5.0 mL 的4 mmol/L的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 6 mL 6 mmol/L氯金酸;

C: 9 mL 6 mmol/L氯金酸+ 5.5 mL 的4 mmol/L的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 6 mL 6 mmol/L氯金酸;

D: 9 mL 6 mmol/L氯金酸+ 6.0 mL 的4 mmol/L的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺 + 6 mL 6 mmol/L氯金酸;

图 9: pH=13条件N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺合成的发光功能化纳米金和文献(Cui, H.; Wang, W.; Duan, C. F.; Dong, Y. P.; Guo, J. Z. Chem. Eur. J. 2007, 13, 6975)合成的鲁米诺直接键合的发光功能化纳米金的发光比较示意图, 其中:

A: 500 μL 经离心分离后的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺合成的发光功能化纳米金再注入400 μL 浓度为0.1 mol/L H_2O_2 溶液的化学发光信号;

B: 500 μL 经离心分离后的鲁米诺合成的发光功能化纳米金再注入400 μL 浓度为0.1 mol/L H_2O_2 溶液的化学发光信号;

图10: 基于N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金制备的免疫和核酸分析探针的发光特性。

具体实施方式

下面对本发明得到的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金、该发光功能化的纳米金的制备方法以及基于该发光功能化的纳米金的生物分析探针的具体实施方式进行详细描述。

1. 本发明的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金。

该功能化纳米金由金纳米粒子和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺连接而成, 所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺通过共价键 Au-N 连接在所述金纳米粒子的表面。

所述功能化纳米金具有化学发光特性。所述功能化纳米金与氧化剂反应产生化学发光。

根据文献 (U. Isacsson, G. Wettermark, Anal. Chim. Acta. 1974. 68. 339.), 所述氧化剂包括但不限于 H_2O_2 、 O_2 、 ClO^- 、 I_2 、 IO_4^- 、 MnO_4^- , 本发明以 H_2O_2 作为氧化剂为例。

所述功能化纳米金与 H_2O_2 反应产生化学发光; 其反应条件为: 将 0.1 mol/L H_2O_2 溶液注入到经离心分离后的功能化纳米金溶胶中; 其中, H_2O_2 溶液为 400 μL , 功能化纳米金溶胶为 500 μL 。

2. 本发明的功能化纳米金的制备方法, 包括如下步骤:

(1) 将氯金酸水溶液 A 与 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液在搅拌状态下混合得到混合液; 所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2-4 倍; .

(2) 在搅拌状态下, 再将氯金酸水溶液 B 加入步骤 (1) 得到的混合液

中,继续搅拌至形成金溶胶,得到的金溶胶即为功能化纳米金;所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1-3 倍。

所述氯金酸水溶液 A 的摩尔浓度可为 1-10 mmol/L、1-6 mmol/L、6-10 mmol/L、6-8 mmol/L 或 8-10 mmol/L;

所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液的摩尔浓度可为 0.5-8.0 mmol/L、0.5-4.0 mmol/L、0.5-6.0 mmol/L、4.0-6.0 mmol/L、4.0-8.0 mmol/L 或 6.0-8.0 mmol/L;

所述氯金酸水溶液 B 的摩尔浓度可为 1-10 mmol/L、1-6 mmol/L 或 6-10 mmol/L。

所述氯金酸水溶液 A、N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液和所述氯金酸水溶液 B 的配比为下述 h1-h10 中的任一种:

h1、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 4 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1 倍;

h2、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 3 倍;

h3、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1.8 倍;

h4、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.3 倍,所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1.4 倍;

h5、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍,

所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.1 倍;

h6、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍, 所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.4 倍;

h7、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍, 所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.7 倍;

h8、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 3 倍, 所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2 倍;

h9、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 27/11 倍, 所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 18/11 倍;

h10、所述氯金酸水溶液 A 中氯金酸的物质的量是所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 2.25 倍, 所述氯金酸水溶液 B 中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的 1.5 倍.

所述的功能化纳米金的制备方法, 其特征在于, 采用了如下具体步骤:

1) 将 9 mL 6.0 mmol/L 氯金酸水溶液 A 与 30 mL 水在搅拌状态下混合, 然后加入 4.5-6 mL 浓度为 4 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌;

2) 在搅拌状态下, 再将 6-9 mL 6.0 mmol/L 氯金酸水溶液 B 加入 1) 得到的溶液中, 继续搅拌至形成金溶胶。

所述方法还包括将所述金溶胶通过离心进行纯化的步骤, 具体如下: 将初

始合成的纳米金溶胶在 $17120 \times g$ 下离心 45 分钟, 然后将沉淀用二次蒸馏水或纯净水或超纯水溶解。

所述功能化纳米金的制备方法, 其反应温度可以为 $15-35^{\circ}\text{C}$; 上述步骤 (1) 或 1) 的反应时间为 2 小时以上, 上述步骤 (2) 或 2) 的反应时间为 1.5 小时以上; N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺同时作为合成过程中的还原剂和稳定剂。

配制所述氯金酸水溶液 A、氯金酸水溶液 B 和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液所用的水的电阻率大于等于 $1.0 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$; 所述水选自下述三种水中的至少一种: 二次蒸馏水、纯净水和超纯水。

所述的功能化纳米金, 其形貌可呈单分散球状、球状纳米金组装的链状或球状纳米金组装的网状, 并且粒径大小也可控。其粒径大小为 10-30 纳米。其形貌呈球状纳米金组装的链状时, 链长为 400-500 纳米。

增加氯金酸的量, 所得到的发光功能化纳米金的粒径逐渐增加; 增加 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的量可以分别得到单分散球状、球状纳米金组装的链状或球状纳米金组装的网状的发光功能化的纳米金。

所述的功能化纳米金, 其特征在于, 在发光试剂用量、氯金酸用量和发光实验条件等同的情况下要比文献 (Cui, H.; Wang, W.; Duan, C. F.; Dong, Y. P.; Guo, J. Z. Chem. Eur. J. 2007, 13, 6975) 合成的鲁米诺直接键合的发光功能化纳米金发光效率高。

3. 基于功能化纳米金的一种生物分析探针, 是由上述的功能化纳米金标记生物分子形成的。

所述生物分子为蛋白质或核酸分子。

所述的生物分析探针为免疫分析探针或核酸分析探针。

所述免疫分析探针制备的方法为下述 A 或 B 的方法:

A、将所述蛋白质分子端基修饰生物素, 然后与连接有链霉亲和素的功能化纳米金相连接;

B、将所述蛋白质分子直接与所述的功能化纳米金相连接。

所述免疫分析探针中所述蛋白质为抗原或抗体。

所述免疫分析探针的制备方法 A, 包括如下步骤:

A) 将本发明所得到的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺直接还原氯金酸的

纳米金溶胶中加入链霉亲和素,使其终浓度为25 $\mu\text{g/mL}$ 。混合均匀后在室温下培育30分钟,再把5% (w/w) 的牛血清白蛋白加到溶液中不断搅拌5分钟,使其最终浓度为1%。最后在17120 * g下离心20分钟,以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子,然后将沉淀用含有1% (w/w) 的牛血清白蛋白的0.1 mol/L pH=7.4磷酸盐缓冲液溶解,得到连接链霉亲和素的功能化纳米金;

B) 在步骤A) 中所得的连接链霉亲和素的功能化的纳米金中加入端基经生物素修饰的抗体或抗原溶液,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30分钟,在17120 * g下离心30分钟,以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子,将所得沉淀分散于250 μL 含有1% (w/w) 的牛血清白蛋白的0.1 mol/L pH=7.4 磷酸盐缓冲液溶解。即得到功能化纳米金免疫分析探针。

所述免疫分析探针的制备方法B, 包括如下步骤:

将0.5 mL 的1.0 mg/mL 抗体或抗原分子加到用0.1 mol/L 的氢氧化钠将pH调至8.0的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺直接还原氯金酸所得到的金胶溶液中去,在室温培育30分钟后,再把5% (w/w) 的牛血清白蛋白加到溶液中不断搅拌5分钟,使其最终浓度为1% (w/w)。最后在17120 * g下离心30分钟,以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子,然后将沉淀用含有1% (w/w) 的牛血清白蛋白的0.1 mol/L pH=7.4 磷酸盐缓冲液溶解,即得到功能化的纳米金免疫分析探针。

所述核酸分析探针制备的方法为下述a或b的方法:

a、将所述核酸分子端基修饰生物素,然后与连接有链霉亲和素的功能化纳米金相连接;

b、将所述核酸分子端基修饰巯基,然后与所述的功能化的纳米金相连接。

所述核酸分析探针的制备方法a, 包括如下步骤:

q1) 将本发明所得到的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺直接还原氯金酸的纳米金溶胶中加入链霉亲和素,使其终浓度为25 $\mu\text{g/mL}$ 。混合均匀后在室温下培育30分钟,再把5% (w/w) 的牛血清白蛋白加到溶液中不断搅拌5分钟,使其最终浓度为1%。最后在17120 * g下离心20分钟,以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子,然后将沉淀用含有0.3 mol/L 的氯化钠的0.05 mol/L pH=8.0 Tris-HCl 缓冲液分散,得到

连接链霉亲和素的功能化的纳米金;

q2) 在步骤 q1) 中所得的连接链霉亲和素的功能化的纳米金中加入端基经生物素修饰的核酸溶液, 在 37 °C 下孵育 1 小时, 在 17120 * g 下离心 10 分钟, 以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子, 将所得沉淀分散于 250 μ L 含有 0.3 mol/L 的氯化钠的 0.05 mol/L pH=8.0 Tris-HCl 缓冲液。即得到功能化的纳米金核酸分析探针。

所述核酸分析探针的制备方法 b, 包括如下步骤:

将功能化的纳米金中加入端基经巯基修饰的核酸溶液, 再慢慢加入含有 1 mol/L 氯化钠的 0.1 mol/L pH=7.4 磷酸盐缓冲液继续反应 40 小时。然后在室温下孵育 24 小时, 在 17120 * g 下离心 20 分钟, 以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子, 将所得沉淀分散于 0.3 mol/L 的氯化钠的 0.05 mol/L pH=8.0 Tris-HCl 缓冲液。即得到功能化的纳米金核酸分析探针。

所述的核酸分析探针中所述核酸分子为 DNA、RNA 或适配体。

下面以实施例 1 至实施例 9 进一步说明本发明专利的内容。

实施例 1: 合成 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金中氯金酸和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺浓度的影响

将 10 mL 1.0 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 A) 和 30 mL 超纯水 (电阻率为 18.2 M Ω *cm) 在 25 °C 下搅拌, 加入 5 mL 0.5 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后, 再加入 2.5 mL 1.0 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 B) 继续搅拌 1.5 小时后, 得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶, 避光保存在 4 °C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为: 将 1 mL 所述金溶胶在 17120 * g 下离心 45 分钟后, 再用超纯水将沉淀物溶解, 得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金的形貌呈单分散球型, 如附图 1A 所示。单分散球的粒径大小以 16 纳米为主。

将 9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 A) 和 30 mL 超纯水 (电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) 在 25°C 下搅拌, 加入 5 mL 4 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后, 再加入 6 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 B) 继续搅拌 1.5 小时后, 得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶, 避光保存在 4°C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为: 将 1 ml 所述金溶胶在 $17120 \times g$ 下离心 45 分钟后, 再用超纯水将沉淀物溶解, 得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金的形貌呈球状纳米金组装的链状, 如附图 1 B 所示。单分散球的粒径大小以 18 纳米为主。

将 10 mL 8 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 A) 和 30 mL 超纯水 (电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) 在 25°C 下搅拌, 加入 8 mL 5 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后, 再加入 12 mL 10 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 B) 继续搅拌 1.5 小时后, 得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶, 避光保存在 4°C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为: 将 1 ml 所述金溶胶在 $17120 \times g$ 下离心 45 分钟后, 再用超纯水将沉淀物溶解, 得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金的形貌呈球状纳米金组装的网状, 如附图 1 C 所示。单分散球的粒径大小以 10 纳米为主。

将 15 mL 10 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 A) 和 30 mL 超纯水 (电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) 在 25°C 下搅拌, 加入 8 mL 8 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后, 再加入 15 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 B) 继续搅拌 1.5 小时后, 得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶, 避光保存在 4°C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为: 将 1 ml 所述金溶胶在 $17120 \times g$ 下离心 45 分钟后, 再用超纯水将沉淀物溶解, 得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发

光功能化的纳米金的形貌呈球状纳米金组装的网状，如附图 1 D 所示。单分散球的粒径大小以 9 纳米为主。

该实施例中的氯金酸水溶液 A、氯金酸水溶液 B 和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液均由超纯水（电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ）配制。

实施例 2: N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的合成方法中氯金酸的用量对粒径的影响

将 9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 A）和 30 mL 超纯水（电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ）在 25°C 下搅拌，加入 5 mL 4 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后，再加入 6 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 B）继续搅拌 1.5 小时后，得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶，避光保存在 4°C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为：将 1 mL 所述金溶胶在 $17120 \times g$ 下离心 45 分钟后，再用超纯水将沉淀物溶解，得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径大小以 18 纳米为主，如附图 2 A 所示。

将 9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 A）和 30 mL 超纯水（电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ）在 25°C 下搅拌，加入 5 mL 4 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后，再加入 7 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 B）继续搅拌 1.5 小时后，得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶，避光保存在 4°C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为：将 1 mL 所述金溶胶在 $17120 \times g$ 下离心 45 分钟后，再用超纯水将沉淀物溶解，得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径大小以 22 纳米为主，如附图 2 B 所示。

将 9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液 A）和 30 mL 超纯水（电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ）在 25°C 下搅拌，加入 5 mL 4 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-

乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后,再加入 8 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 B)继续搅拌 1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在 4 °C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为:将 1 ml 所述金溶胶在 17120 * g 下离心 45 分钟后,再用超纯水将沉淀物溶解,得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径大小以 25 纳米为主,如附图 2 C 所示。

将 9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 A)和 30 mL 超纯水(电阻率为 18.2 MΩ*cm)在 25 °C 下搅拌,加入 5 mL 4 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后,再加入 9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 B)继续搅拌 1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在 4 °C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为:将 1 ml 所述金溶胶在 17120 * g 下离心 45 分钟后,再用超纯水将沉淀物溶解,得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径大小以 30 纳米为主,如附图 2 D 所示。

该实施例中的氯金酸水溶液 A、氯金酸水溶液 B 和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液均由超纯水(电阻率为 18.2 MΩ*cm)配制。

实施例 3: N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的合成方法中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的量对形貌的影响

将 9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 A)和 30 mL 超纯水(电阻率为 18.2 MΩ*cm)在 25 °C 下搅拌,加入 4.5 mL 4 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后,再加入 6 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 B)继续搅拌 1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在 4 °C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为:将 1 ml 所述金溶胶在 17120 * g 下离心 45 分钟后,再用超纯水将沉淀物溶解,得到纯化的功能化纳米金。纯

化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的形貌呈单分散球型, 粒径大小以 11 纳米为主, 如附图 3 A 所示。

将 9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 A) 和 30 mL 超纯水 (电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) 在 25°C 下搅拌, 加入 5 mL 4 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后, 再加入 6 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 B) 继续搅拌 1.5 小时后, 得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶, 避光保存在 4°C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为: 将 1 ml 所述金溶胶在 $17120 \times g$ 下离心 45 分钟后, 再用超纯水将沉淀物溶解, 得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的形貌呈球状纳米金组装的链状, 球状纳米金粒径以 18 纳米为主, 其链长为 400-500 纳米, 如附图 3 B 所示。

将 9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 A) 和 30 mL 超纯水 (电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) 在 25°C 下搅拌, 加入 5.5 mL 4 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后, 再加入 6 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 B) 继续搅拌 1.5 小时后, 得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶, 避光保存在 4°C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为: 将 1 ml 所述金溶胶在 $17120 \times g$ 下离心 45 分钟后, 再用超纯水将沉淀物溶解, 得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的形貌为由球状纳米金组装的准网状, 金纳米球粒径以 11 纳米为主, 如附图 3 C 所示。

将 9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 A) 和 30 mL 超纯水 (电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) 在 25°C 下搅拌, 加入 6 mL 4 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后, 再加入 6 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 B) 继续搅拌 1.5 小时后, 得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶, 避光保存在 4°C 下。将所述金溶胶通

过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为：将 1 ml 所述金溶胶在 $17120 \times g$ 下离心 45 分钟后,再用超纯水将沉淀物溶解,得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的形貌为由球状纳米金组装的网状,金纳米球粒径以 12 纳米为主,如附图 3 D 所示。

该实施例中的氯金酸水溶液 A、氯金酸水溶液 B 和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液均由超纯水(电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)配制。

实施例 4: 温度对 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金合成的影响

将 9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 A)和 30 mL 超纯水(电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)在 15°C 下搅拌,加入 5 mL 4 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后,再加入 6 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 B)继续搅拌 1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在 4°C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为：将 1 ml 所述金溶胶在 $17120 \times g$ 下离心 45 分钟后,再用超纯水将沉淀物溶解,得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径以 13 纳米为主,如附图 4 A 所示。

将 9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 A)和 30 mL 超纯水(电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)在 25°C 下搅拌,加入 5 mL 4 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后,再加入 6 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液(氯金酸水溶液 B)继续搅拌 1.5 小时后,得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在 4°C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为：将 1 ml 所述金溶胶在 $17120 \times g$ 下离心 45 分钟后,再用超纯水将沉淀物溶解,得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径以 18 纳米为主,如附图 4 B 所示。

将 9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 A) 和 30 mL 超纯水 (电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) 在 30°C 下搅拌, 加入 5 mL 4 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后, 再加入 6 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 B) 继续搅拌 1.5 小时后, 得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶, 避光保存在 4°C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为: 将 1 mL 所述金溶胶在 $17120 \times g$ 下离心 45 分钟后, 再用超纯水将沉淀物溶解, 得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径以 8 纳米为主, 如附图 4 C 所示。

将 9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 A) 和 30 mL 超纯水 (电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) 在 35°C 下搅拌, 加入 5 mL 4 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后, 再加入 6 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 B) 继续搅拌 1.5 小时后, 得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶, 避光保存在 4°C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为: 将 1 mL 所述金溶胶在 $17120 \times g$ 下离心 45 分钟后, 再用超纯水将沉淀物溶解, 得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径以 10 纳米为主, 如附图 4 D 所示。

该实施例中的氯金酸水溶液 A、氯金酸水溶液 B 和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液均由超纯水 (电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) 配制。

实施例 5: 二次蒸馏水、纯净水和超纯水对 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金合成的影响

将 9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 A) 和 30 mL 二次蒸馏水 (电阻率为 $1.0 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) 在 25°C 下搅拌, 加入 5 mL 4 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后, 再加入 6 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 B) 继续搅拌 1.5 小时后, 得到稳定的 N-(4-氨基丁

基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶, 避光保存在 4 °C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为: 将 1 ml 所述金溶胶在 17120 * g 下离心 45 分钟后, 再用超纯水将沉淀物溶解, 得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径以 8 纳米为主, 如附图 5 A 所示。氯金酸水溶液 A、氯金酸水溶液 B 和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液均用二次蒸馏水 (电阻率为 1.0 MΩ*cm) 配制。

将 9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 A) 和 30 mL 纯净水 (电阻率为 6.1 MΩ*cm) 在 25 °C 下搅拌, 加入 5 mL 4 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后, 再加入 6 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 B) 继续搅拌 1.5 小时后, 得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶, 避光保存在 4 °C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为: 将 1 ml 所述金溶胶在 17120 * g 下离心 45 分钟后, 再用超纯水将沉淀物溶解, 得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径以 20 纳米为主, 如附图 5 B 所示。氯金酸水溶液 A、氯金酸水溶液 B 和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液均用纯净水 (电阻率为 6.1 MΩ*cm) 配制。

将 9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 A) 和 30 mL 超纯水 (电阻率为 18.2 MΩ*cm) 在 25 °C 下搅拌, 加入 5 mL 4 mmol/L 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌 2 小时后, 再加入 6 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液 (氯金酸水溶液 B) 继续搅拌 1.5 小时后, 得到稳定的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶, 避光保存在 4 °C 下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。纯化条件为: 将 1 ml 所述金溶胶在 17120 * g 下离心 45 分钟后, 再用超纯水将沉淀物溶解, 得到纯化的功能化纳米金。纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的粒径以 18 纳米为主, 如附图 5 C 所示。氯金酸水溶液 A、氯金酸水溶液 B 和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液均由超纯水 (电阻

率为 $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) 配制。

实施例 6: N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺直接还原氯金酸得到的发光功能化纳米金的表征

附图 6-7 是下述实验条件下得到的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的表征结果。将实施例 1 中得到的图 1 b 的金溶胶通过经透析、盐析、两次离心-洗涤并干燥纯化进行征。纯化条件为: 渗析过程是将合成的所述金溶胶在常温下渗析 2 天, 每 8 小时换一次超纯水渗析液, 通过渗析操作可以充分去除游离的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺及其氧化产物; 盐析过程是将 NaCl 加入所述金溶胶中使 NaCl 的最终浓度为 0.5 mol/L , 形成的沉淀物; 二次离心-洗涤的过程是将所述金溶胶在盐析的作用后经 $17120 \times g$ 下离心 45 分钟后, 再用超纯水将沉淀物溶解; 干燥过程是将所述纳米金溶胶经渗析、盐析和离心-洗涤作用后放入烘箱作用 12 个小时, 温度为 40°C 。

附图 6 是 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺纯样品 (N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺纯样在 TCI 东京化成工业株式会社购买, CAS 号为 66612-29-1) 和实施例 1 中得到的图 1 b 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金溶胶经透析、盐析、两次离心-洗涤并干燥后的金纳米粒子的 Au4f、C1s 和 N1s 的 X 射线光电电子能谱。附图 6 E 显示 Au4f 双峰 ($\text{Au4f}_{7/2}$ 和 $\text{Au4f}_{5/2}$) 的自旋-轨道裂分为 3.7 eV , 与文献 (Ganesan, P. G.; Singh, A. P.; Ramanath, G. Appl. Phys. Lett, 2004, 85, 579.) 报道的零价金纳米粒子相一致。如附图 6A 所示, N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺纯样品中的 C1s 能谱包括三个分别位于 284.9 、 286.0 和 287.3 eV 的组分。 284.9 eV 的组分来自于 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子中芳香环上的碳原子。 286.0 eV 的组分则与芳香环上和脂肪链上的碳原子相关。 287.3 eV 的组分是由酰胺基团中的碳原子 ($-\text{CO}-\text{NH}-$) 所致。附图 6 C 则显示了 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺还原的金纳米粒子的 C1s 能谱。与 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺纯样的 C1s 能谱相比, 发现了一个位于 288.1 eV 的新组分, 其他组分的位置基本与 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺各组分的位置相同。因此, C1s 能谱数据表明在金纳米粒子表面有 N-(4-

氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的各种碳组分, 而 288.1 eV 的新组分对应于 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的氧化产物中的羧基碳组分。这一结果表明 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺存在于纳米粒子表面上。

对于 N1s 能谱实验结果分析与上述讨论也较为一致。如附图 6 B 所示, N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺纯样品包含的 399.5 eV 和 400.8 eV 的组分, 而 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化金纳米粒子的 N1s 能谱也包含了 399.2 eV 和 400.3 eV 两个类似的组分, 均分别对应氨基氮原子 ($-\text{NH}_2$) 和酰胺氮原子 ($-\text{CO}-\text{NH}-$)。考虑到 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺及其氧化产物中均含有氨基氮原子而酰胺氮原子则为 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺所独有, 这个结果进一步支持 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺存在金纳米表面。有报道指出对于脂肪胺保护的金纳米粒子而言 (Kumar, A.; Mandal, S.; Selvakannan, P. R. *Langmuir*, 2003, 19, 6277.), 除了 Au-N 弱共价作用之外, 还可能存在质子化氨基与带负电的金纳米粒子之间的静电吸引力。在本工作中则未观察到位于 402.3 eV 处的质子化氨基氮原子 ($-\text{NH}_3^+$) 组分 (Seitz O, Chehimi MM, Cabot-Deliry E, et al., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2003, 218, 225.), 从而排除了 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺以质子化氨基与带负电的金纳米粒子通过静电相互作用连接的可能性。因此, Au-N 弱共价相互作用是连接 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺在金纳米粒子表面的唯一作用力。

进一步, 用紫外-可见吸收光谱表征了实施例 1 中得到的图 1 b 的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金。为了避免溶胶中游离反应物和产物对表面鉴定的干扰, 首先利用多次透析的方法将小分子溶质与金纳米粒子相分离, 并检测透析前后的紫外-可见吸收光谱如附图 7 所示。透析条件为: 透析过程是将金溶胶在常温下透析 2 天, 每 8 小时换一次超纯水透析液。与纯的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液 (附图 7 A 所示) 和刚合成好的金溶胶 (附图 7 B 所示) 比较, 透析后的金溶胶 (附图 7 C 所示) 在 291 nm 和 319 nm 处的吸收峰显著减弱。该处的吸收峰为 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的特征吸收, 这表明溶胶中 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺含量在透析后显著降低。更为重要的是, 溶胶的最大吸收波长 (530 nm) 保持不变。这表明透析过程不会改变金纳米粒子的分散状态和粒径大小。这些结果表明通过透析离心等

方法可以有效的将 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺从溶胶中分离除去，并且保持金纳米粒子的分散性和稳定性。

随后对透析过的金溶胶中加入足量电解质盐使得金纳米粒子团聚并最终沉淀下来。离心后的沉淀物用 0.1 mol/L Na_2CO_3 重新溶解，并进行紫外-可见吸收光谱表征（附图 7 D 所示），同样得到了 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的特征峰。与此同时，还在离心后的上清液（附图 7 E 所示）中再次观察到了 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的紫外吸收特征峰。这些结果表明，金纳米粒子表面的保护剂在盐析过程中部分解离下来并在离心之后存在于上清液中，所以能够在上清液中再次观察到 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的吸收峰。因此，这些结果也表明 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺存在于金纳米粒子表面。

实施例 7: N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的发光特性

将实施例 3 中合成的图 3 a、图 3 b、图 3 c 和图 3 d 的 1 mL 不同形貌的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金溶胶 17120 * g 下离心 45 分钟后的沉淀用 500 μL pH=13 的 NaOH 溶液进行分散放入检测池中，再注入 400 μL 浓度为 0.1 mol/L H_2O_2 溶液，测定其化学发光动力学曲线如附图 8 所示。实验结果表明发光强度随着发光功能化纳米金粒子形貌呈单分散球型、球状纳米金组装链、球状纳米金组装的准网状和球状纳米金组装的网状（附图 8 A-D）不断增加，表明本发明合成的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金具有良好的化学发光特性。

附图 9 是本发明的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化金纳米粒子在发光试剂用量、氯金酸用量和发光实验条件等同的情况下与文献（Cui, H.; Wang, W.; Duan, C. F.; Dong, Y. P.; Guo, J. Z. Chem. Eur. J. 2007, 13, 6975）合成的鲁米诺直接键合的发光功能化纳米金发光效率的比较。其实验条件为：将 500 μL 用 0.1 mol/L 的氢氧化钠分散离心分离后的本发明的实施例 1 中得到的图 1 b 的金溶胶和鲁米诺直接键合的发光功能化纳米粒子放入检测池中（其中本发明的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化金纳米粒子和鲁米诺直接键合的发光功能化纳米粒子中纳米粒子含量都为 0.3 mmol/L）注入 400 μL 浓度为 0.1 mol/L H_2O_2 溶液检测化学发光。实验结果发现本发明的 N-(4-氨基

丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化金纳米粒子(附图9A)在发光试剂用量、氯金酸用量和发光实验条件等同的情况下比文献(Cui, H.; Wang, W.; Duan, C. F.; Dong, Y. P.; Guo, J. Z. Chem. Eur. J. 2007, 13, 6975)合成的鲁米诺直接键合的发光功能化纳米金(附图9B)发光效率高,表明本发明的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金具有很高的发光效率。

实施例8: 基于N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金免疫分析探针的制备

所述免疫分析探针的制备可采用下述方案一或方案二:

方案一, 包括如下步骤:

A) 将9 mL 6 mmol/L氯金酸水溶液(氯金酸水溶液A)和30 mL超纯水(电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) 在 25°C 下搅拌, 加入5 mL 4 mmol/L的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌2小时后, 再加入6 mL 6 mmol/L氯金酸水溶液(氯金酸水溶液B)继续搅拌1.5 小时后, 得到稳定的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶。

B) 将步骤A)中所得到的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金溶胶中加入链霉亲和素, 使其终浓度为 $25 \mu\text{g/mL}$ 。混合均匀后在室温下培育30分钟, 再向其中加入5% (w/w) 的牛血清白蛋白溶液, 不断搅拌5分钟, 使牛血清白蛋白最终浓度为1%。最后在 $17120 \times g$ 下离心20分钟, 以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子, 然后将沉淀用 $500 \mu\text{L}$ 含有1% (w/w) 的牛血清白蛋白的 0.1 mol/L pH=7.4磷酸盐缓冲液溶解, 得到连接链霉亲和素的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金;

C) 在步骤B)中所得的连接链霉亲和素的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金中加入端基经生物素修饰的抗体(生物素修饰的羊抗人IgG)溶液, 在 37°C 下孵育30分钟, 在 $17120 \times g$ 下离心30分钟, 以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子, 将所得沉淀分散于 $250 \mu\text{L}$ 含有1% (w/w) 的牛血清白蛋白的 0.1 mol/L pH=7.4磷酸盐缓冲液溶解。即得到N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米

金免疫分析探针。

方案二，包括如下步骤：

a) 将9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液A）和30 mL超纯水（电阻率为18.2 MΩ*cm）在25℃下搅拌，加入5 mL 4 mmol/L的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌2小时后，再加入6 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液B）继续搅拌1.5 小时后，得到稳定的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶。

b) 将0.5 mL 1.0 mg/mL 抗体（羊抗人 IgG）加到用0.1 mol/L 的氢氧化钠将步骤a)中所得的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的金胶溶液的pH调至8.0，在室温培育30分钟后，再向其中加入5%（w/w）的牛血清白蛋白溶液，不断搅拌5分钟，使牛血清白蛋白最终浓度为1%（w/w）。最后在17120 * g下离心30分钟，以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子，然后将沉淀用250 μL含有1%（w/w）的牛血清白蛋白的0.1 mol/L pH=7.4 磷酸盐缓冲液溶解，即得到N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金免疫分析探针。

实施例9：基于N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的核酸分析探针的制备

所述核酸分析探针的制备可采用下述方案一或方案二：

方案一，包括如下步骤：

(A) 将9 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液A）和30 mL超纯水（电阻率为18.2 MΩ*cm）在25℃下搅拌，加入5 mL 4 mmol/L的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌2小时后，再加入6 mL 6 mmol/L 氯金酸水溶液（氯金酸水溶液B）继续搅拌1.5 小时后，得到稳定的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶。

(B) 将步骤(A)中所得到的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶中加入链霉亲和素，使其终浓度为25 μg/mL。混合均匀后在室温下培育30分钟，再向其中加入5%（w/w）的牛血清白蛋白溶液，不断搅拌5

分钟,使牛血清白蛋白最终浓度为1% (w/w) 最后在17120 * g下离心20分钟,以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子,然后将沉淀用500 μ L含有0.3 mol/L的氯化钠的0.05 mol/L pH=8.0 Tris-HCl缓冲液分散,得到连接链霉亲和素的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金;

(C) 在步骤(B)中所得的连接链霉亲和素的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金中加入端基经生物素修饰的DNA溶液(碱基序列为GGGTTTATGAAAAACACTTT-biotin),在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时,在17120 * g下离心10分钟,以除去未反应试剂和纳米金表面弱结合的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺分子,将所得沉淀分散于250 μ L含有0.3 mol/L的氯化钠的0.05 mol/L pH=8.0 Tris-HCl缓冲液。即得到N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金DNA分析探针。

方案二,包括如下步骤:

(a) 将9 mL 6 mmol/L氯金酸水溶液(氯金酸水溶液A)和30 mL超纯水(电阻率为18.2 M Ω *cm)在25 $^{\circ}$ C下搅拌,加入5 mL 4 mmol/L的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液后持续搅拌2小时后,再加入6 mL 6 mmol/L氯金酸水溶液(氯金酸水溶液B)继续搅拌1.5 小时后,得到稳定的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金溶胶。

(b) 根据文献(Demers, L., M.; Mrikin, C., A. Anal. Chem. 2000, 72, 5535-5541)将步骤(a)中所得到的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金中加入端基经巯基修饰的DNA溶液(碱基序列为GAT CAG ATT CGC-(CH₂)₆-SH),在室温下反应24小时,再慢慢加入含有1 mol/L氯化钠的0.1 mol/L pH=7.4磷酸盐缓冲液继续反应40小时。最后在17120 * g下离心20分钟,将所得沉淀分散于500 μ L 0.3 mol/L的氯化钠的0.05 mol/L pH=8.0 Tris-HCl缓冲液。即得到N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金DNA分析探针。

该实施例中的氯金酸水溶液A、氯金酸水溶液B和N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液均由超纯水(电阻率为18.2 M Ω *cm)配制。

实施例 10: 基于 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金的免疫和核酸分析探针的发光特性

将 1 mL 由实施例 8 方案一制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金溶胶标记的免疫分析探针和实施例 9 方案一制备的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化纳米金溶胶标记的核酸分析探针经离心分离后的沉淀分别用 0.1 mol/L pH=7.4 磷酸盐缓冲液和含有 0.3 mol/L 氯化钠的 0.05 mol/L pH=8.0 Tris-HCl 缓冲液进行分散放入检测池中, 再注入含有 0.1 mol/L 过氧化氢的 0.02 mol/L pH=9.95 的碳酸盐底液, 测定其化学发光动力学曲线如附图 10 所示。表明用本发明的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺发光功能化的纳米金制备的免疫分析探针和核酸分析探针具有良好的化学发光特性。

权 利 要 求

1、一种功能化纳米金，由金纳米粒子和N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺连接而成，所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺连接在所述金纳米粒子的表面。

2、根据权利要求1所述的功能化纳米金，其特征在于：所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺通过共价键Au-N连接在所述金纳米粒子的表面。

3、根据权利要求1或2所述的功能化纳米金，其特征在于：所述功能化纳米金具有化学发光特性。

4、根据权利要求1或2或3所述的功能化纳米金，其特征在于：所述功能化纳米金与氧化剂反应产生化学发光。

5、根据权利要求4所述的功能化纳米金，其特征在于：所述氧化剂为 H_2O_2 、 O_2 、 ClO^- 、 I_2 、 IO_4^- 或 MnO_4^- 。

6、根据权利要求1-5中任一所述的功能化纳米金，其特征在于：所述功能化纳米金按照下述权利要求7-13中任一所述的方法制备。

7、权利要求1至6中任一所述的功能化纳米金的制备方法，包括如下步骤：

(1) 将氯金酸水溶液A与N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液在搅拌状态下混合得到混合液；所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2-4倍；

(2) 在搅拌状态下，再将氯金酸水溶液B加入步骤(1)得到的混合液中，继续搅拌至形成金溶胶，得到的金溶胶即为功能化纳米金；所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的1-3倍。

8、根据权利要求7所述的方法，其特征在于：所述氯金酸水溶液A的摩尔浓度为1-10 mmol/L、1-6 mmol/L、6-10 mmol/L、6-8 mmol/L或8-10 mmol/L；

所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液的摩尔浓度为0.5-8.0 mmol/L、0.5-4.0 mmol/L、0.5-5.0 mmol/L、4.0-8.0 mmol/L、5.0-8.0 mmol/L或4.0-5.0 mmol/L；

所述氯金酸水溶液B的摩尔浓度为1-10 mmol/L、1-6 mmol/L 或6-10

mmol/L。

9、根据权利要求7或8所述的方法，其特征在于：所述氯金酸水溶液A、N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液和所述氯金酸水溶液B的配比为下述h1-h10中的任一种：

h1、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的4倍，所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的1倍；

h2、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2倍，所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的3倍；

h3、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2.7倍，所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的1.8倍；

h4、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2.3倍，所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的1.4倍；

h5、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2.7倍，所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2.1倍；

h6、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2.7倍，所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2.4倍；

h7、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2.7倍，所

述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2.7倍;

h8、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的3倍,所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2倍;

h9、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的27/11倍,所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的18/11倍;

h10、所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的2.25倍,所述氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中所述N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液中N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的物质的量的1.5倍。

10、根据权利要求7或8或9所述的方法,其特征在于:所述方法还包括将所述金溶胶通过离心进行纯化的步骤。

11、根据权利要求10所述的功能化纳米金,其特征在于:离心的条件为:将所述金溶胶在 $17120 \times g$ 下离心45分钟。

12、根据权利要求7-11中任一所述的方法,其特征在于,步骤(1)和步骤(2)的反应温度均为 $15-35^{\circ}\text{C}$ 、 $15-25^{\circ}\text{C}$ 、 $15-30^{\circ}\text{C}$ 、 $25-35^{\circ}\text{C}$ 或 $25-30^{\circ}\text{C}$ 。

13、根据权利要求7-12中任一所述的方法,其特征在于,步骤(1)的反应时间为2小时以上,步骤(2)的反应时间1.5小时以上。

14、根据权利要求7-13中任一所述的方法,其特征在于,配制所述氯金酸水溶液A、氯金酸水溶液B和N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺水溶液所使用的水的电阻率大于等于 $1.0 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$;所述水选自下述三种水中的至少一种:二次蒸馏水、纯净水和超纯水。

15、权利要求7至14中任一所述方法制备的功能化纳米金。

16、权利要求1至6和15中任一所述的功能化纳米金,其特征在于,所述功能化纳米金的形貌呈单分散球状、球状纳米金组装的链状或球状纳米金组装的

网状。

17、根据权利要求16所述的功能化纳米金，其特征在于，所述功能化纳米金的形貌呈单分散球状，单分散球的粒径大小为10-30纳米；或，组装成链状或网状的球状纳米金的粒径大小为10-30纳米。

18、根据权利要求16所述的功能化纳米金，其特征在于，所述功能化纳米金的形貌呈球状纳米金组装的链状，链长为400-500纳米。

19、一种生物分析探针，是由功能化纳米金标记生物分子形成的复合物；所述功能化纳米金为权利要求1至6中任一所述功能化纳米金或权利要求15所述功能化纳米金。

20、根据权利要求19中所述的生物分析探针，其特征在于，所述生物分子为蛋白质或核酸分子。

21、根据权利要求20所述的生物分析探针，其特征在于，所述生物分子为蛋白质的生物分析探针的制备方法为下述A或B的方法：

A. 将所述蛋白质分子的端基修饰生物素，然后与连接有链霉亲和素的所述功能化纳米金相连接；

B. 将所述蛋白质分子直接与所述功能化纳米金相连接。

22、根据权利要求20或21所述的生物分析探针，其特征在于，所述蛋白质为抗原或抗体。

23、根据权利要求20所述的生物分析探针，其特征在于，所述生物分子为核酸的分析探针的制备方法为下述a或b的方法：

a、将所述核酸分子端基修饰生物素，然后与连接有链霉亲和素的所述功能化纳米金相连接；

b、将所述核酸分子端基修饰巯基，然后与所述功能化的纳米金相连接。

24、根据权利要求20或23中所述的生物分析探针，其特征在于，所述核酸分子为DNA、RNA或适配体。

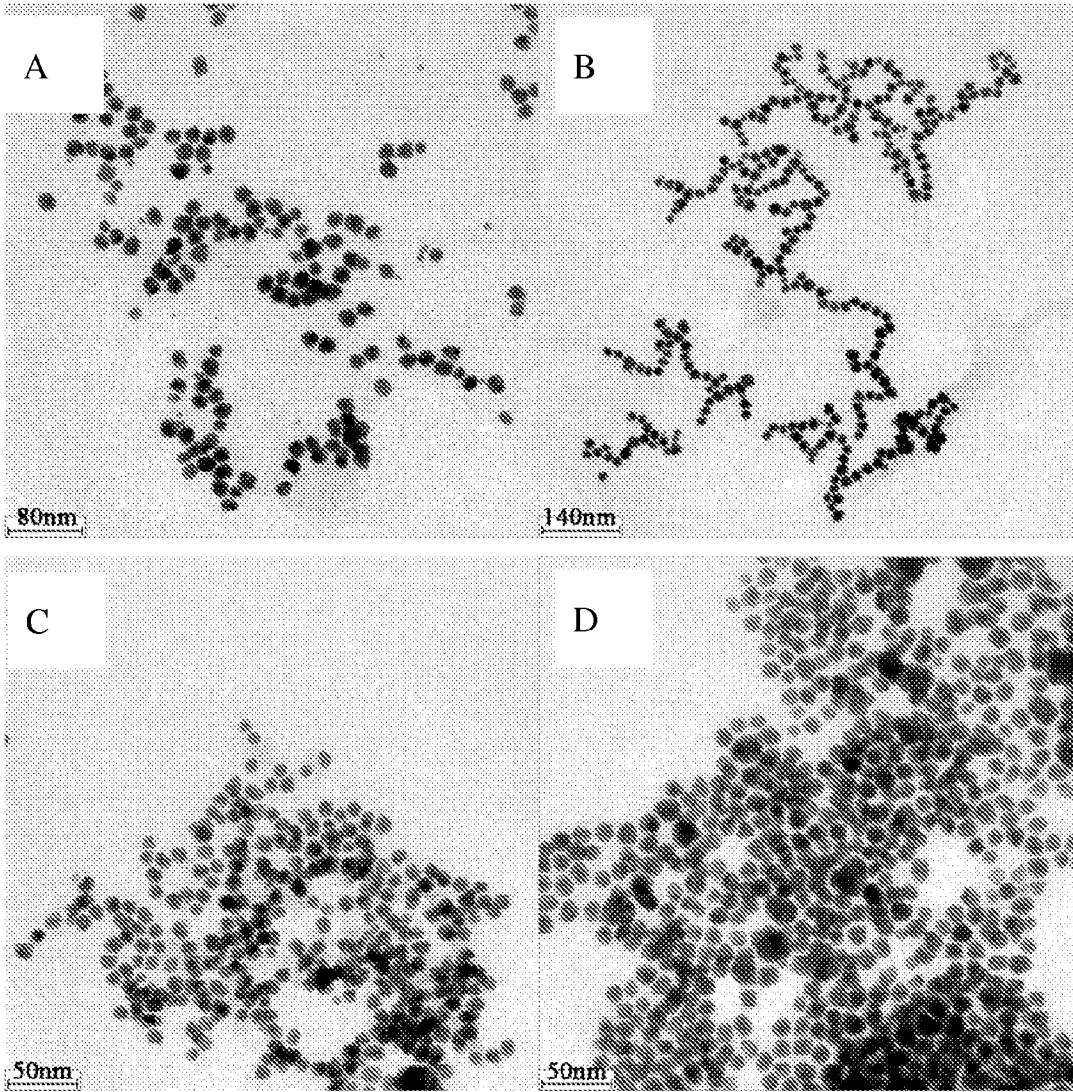


图1

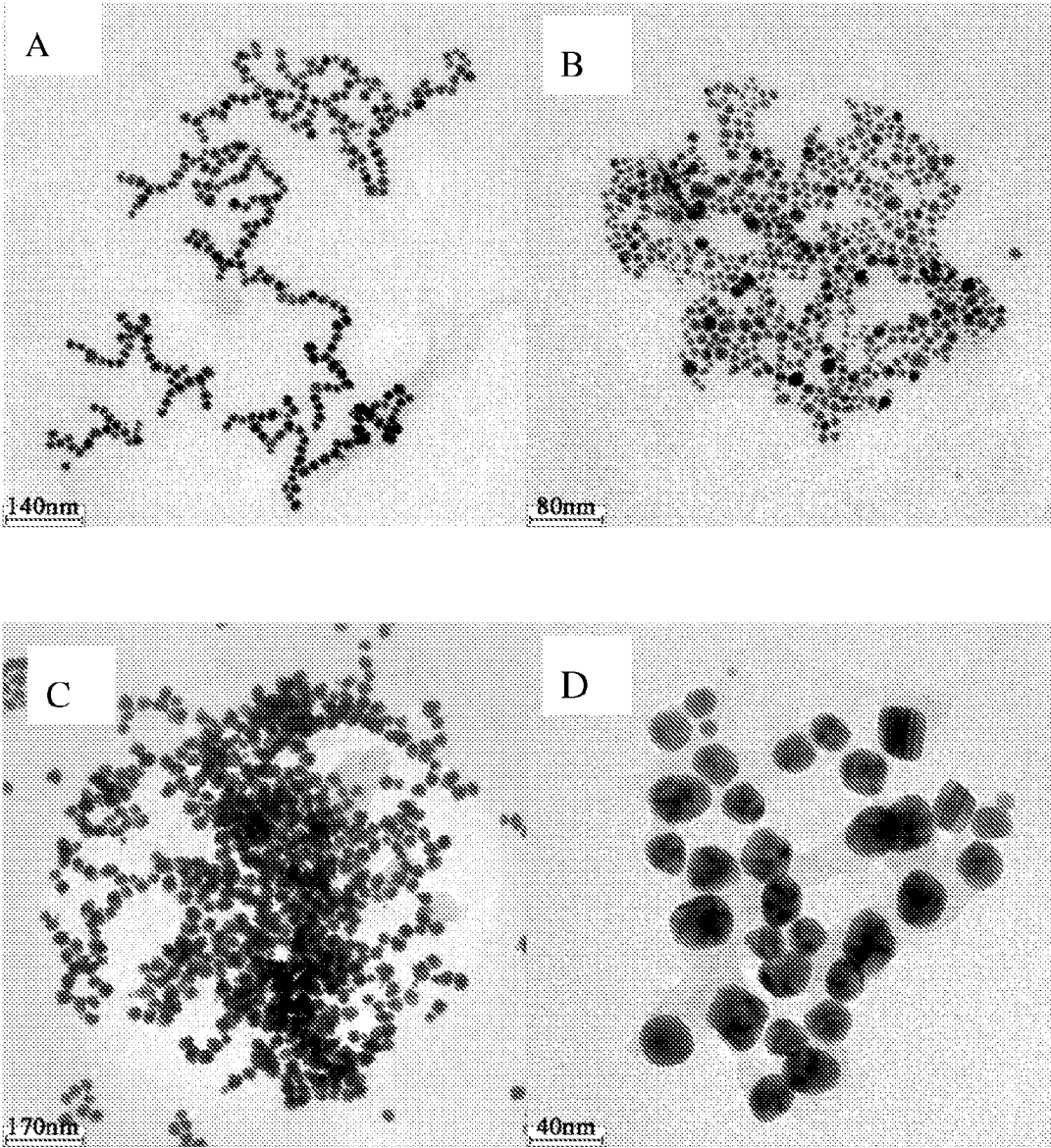


图2

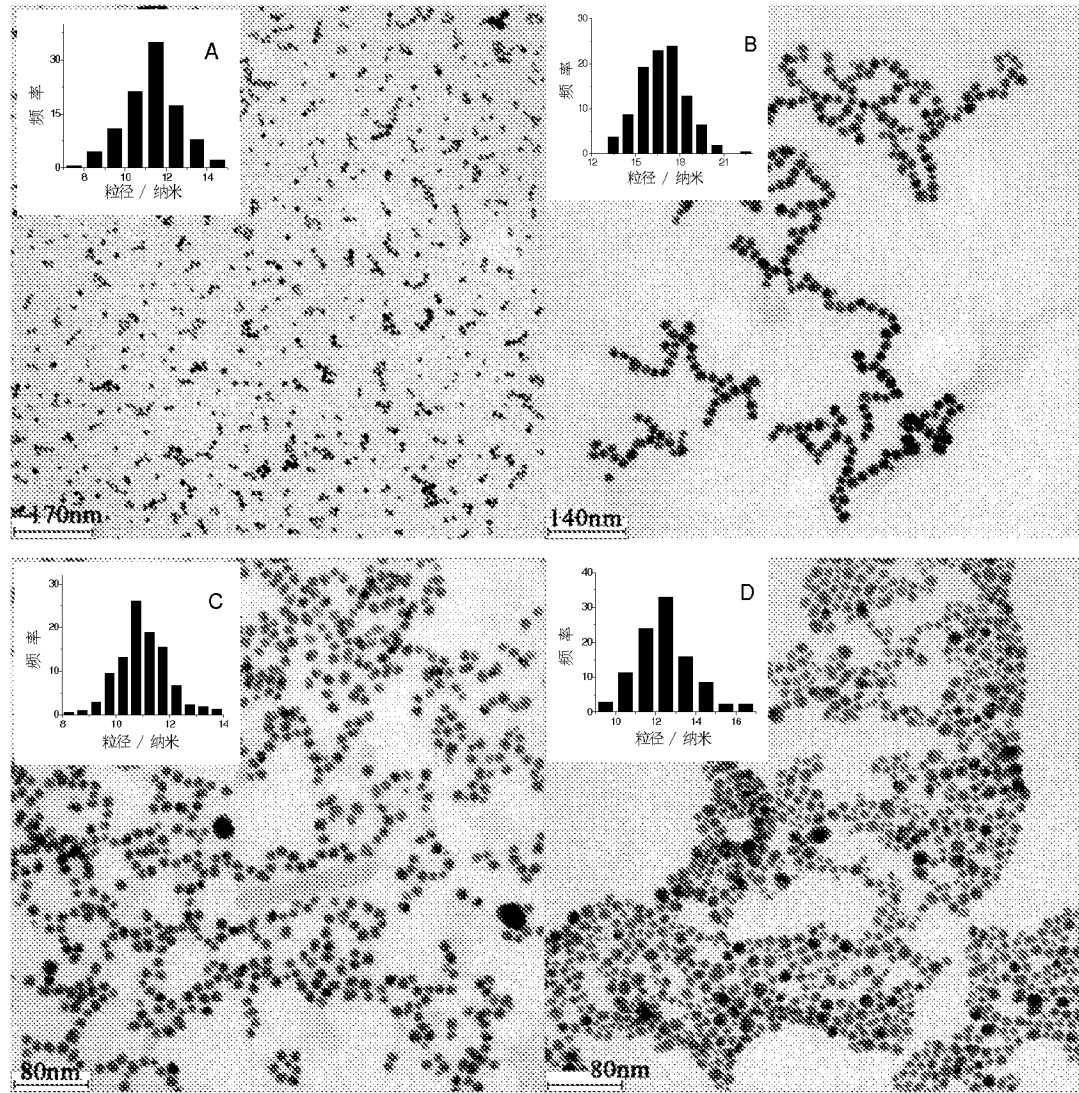


图3

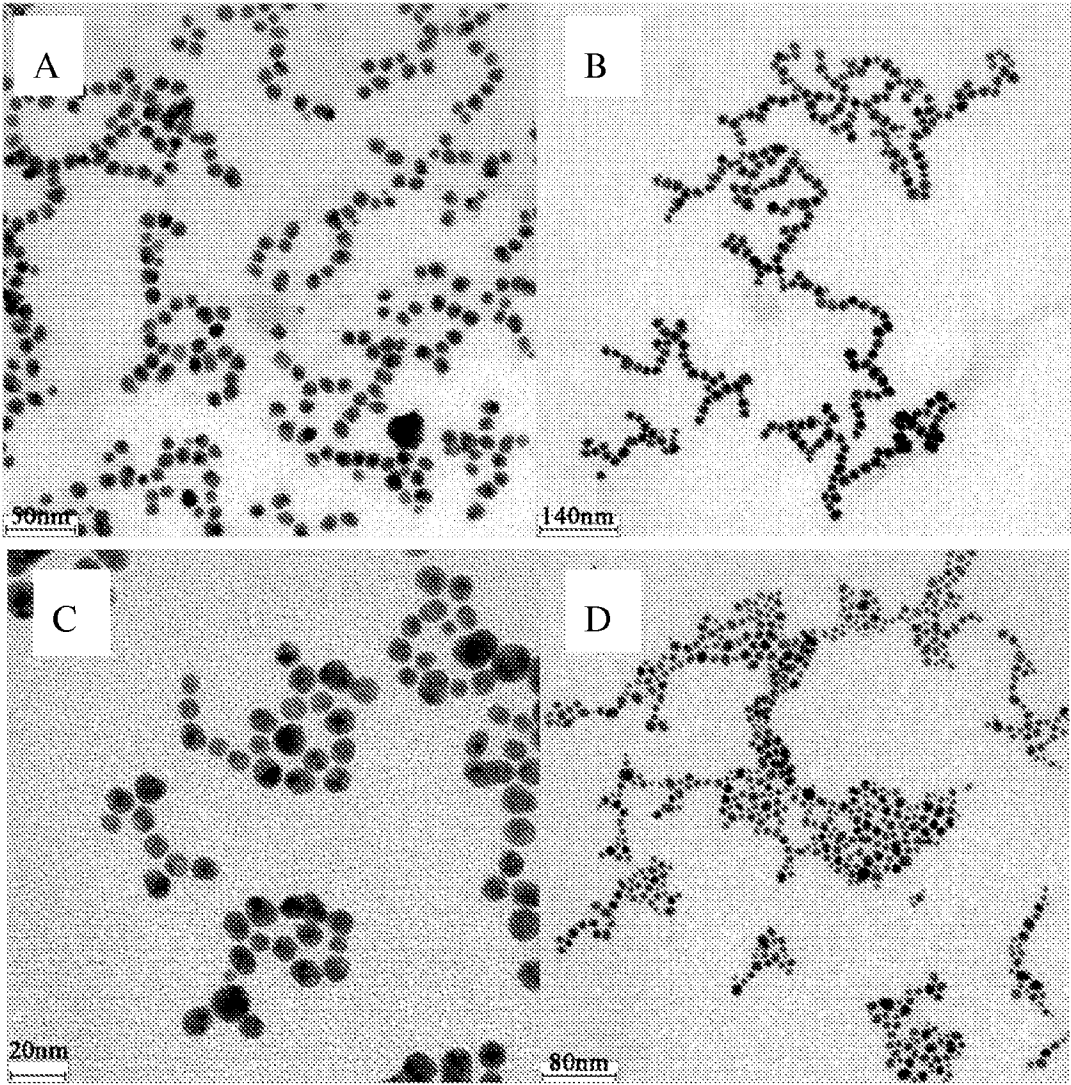


图4

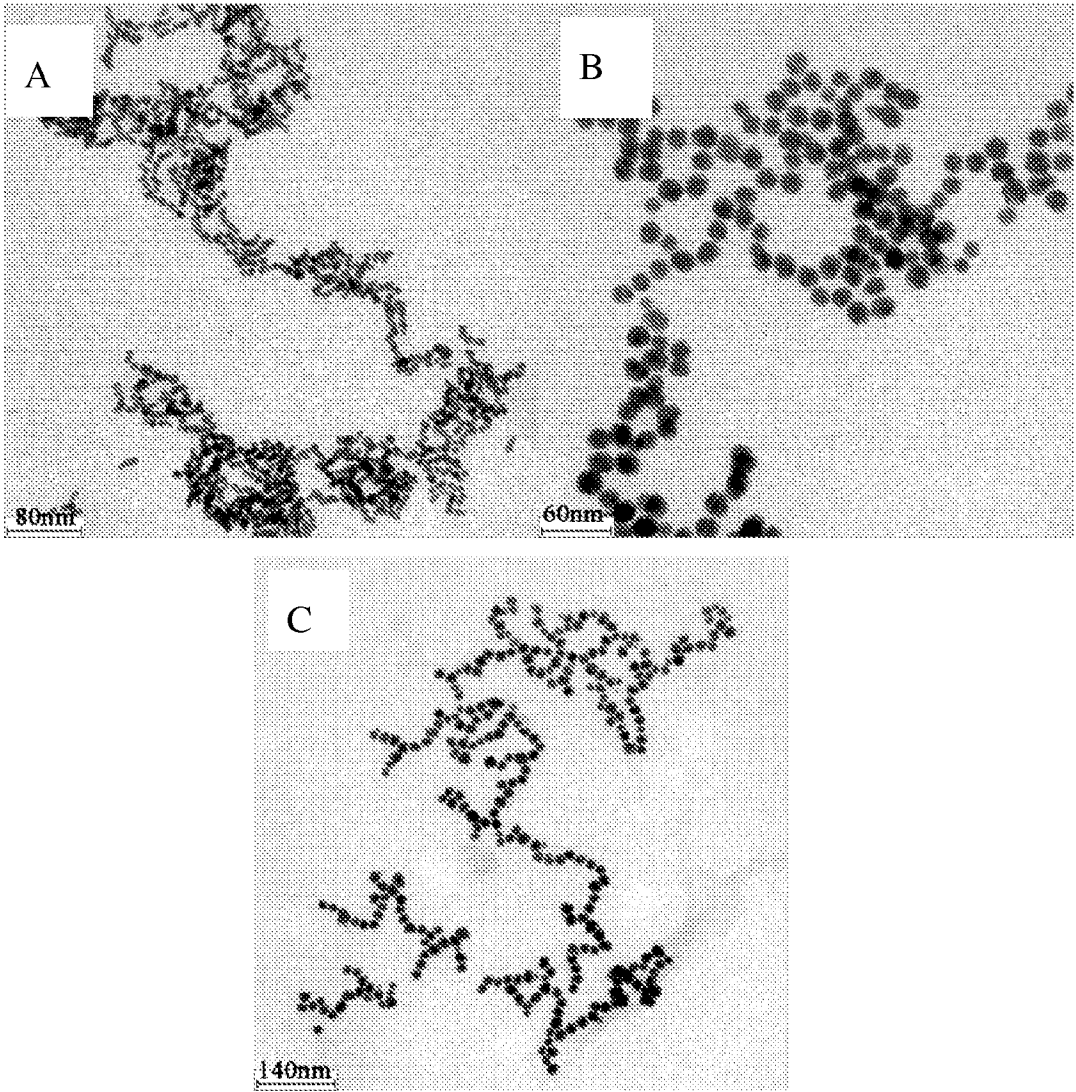


图5

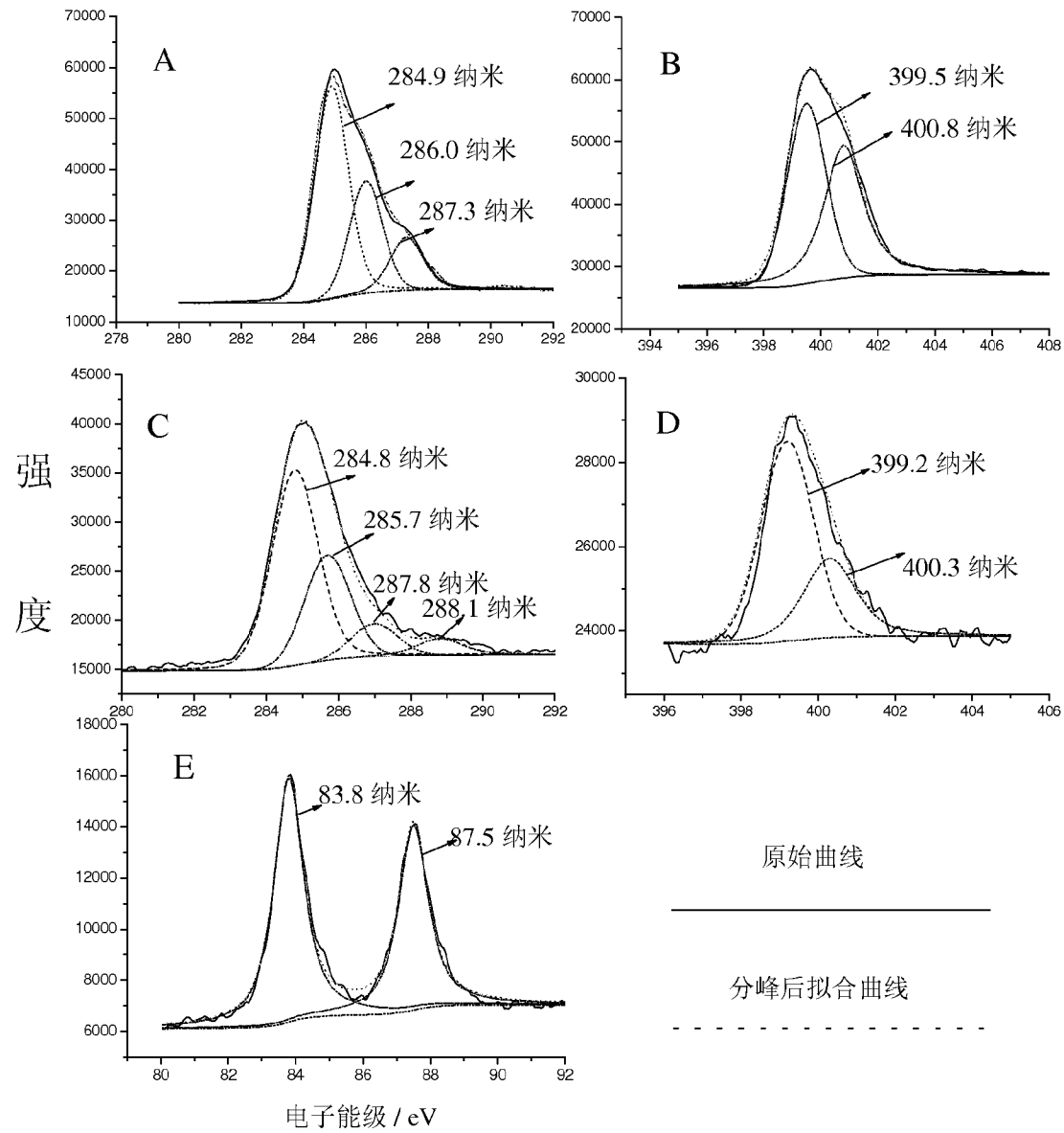


图6

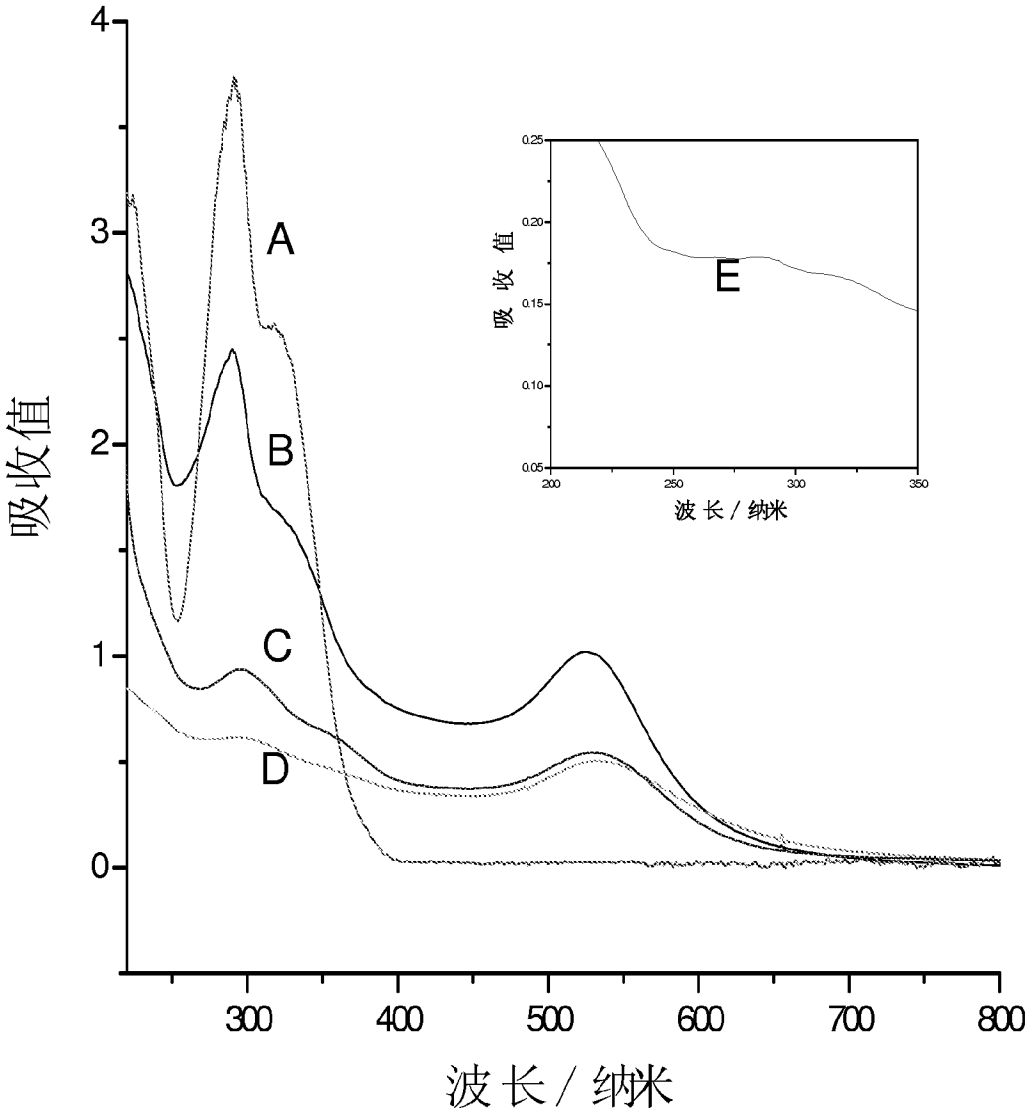


图7

— 8/9 —

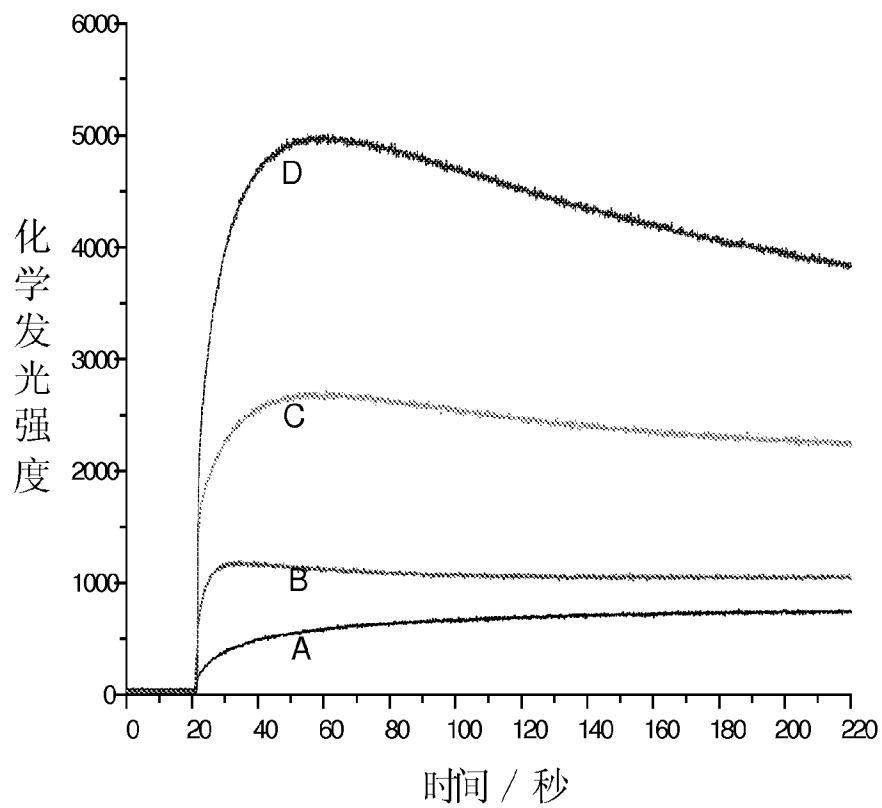


图8

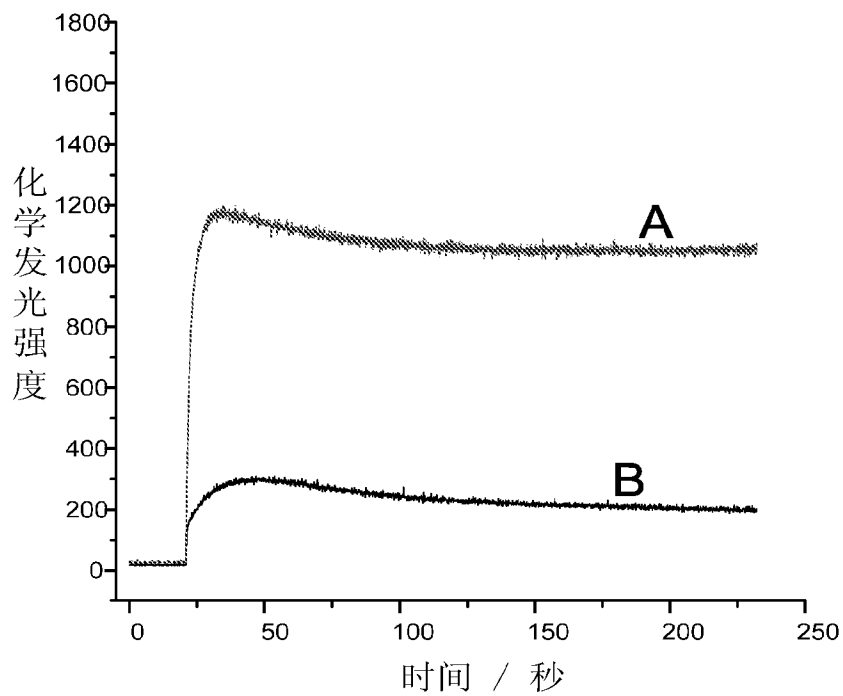


图9

—9/9—

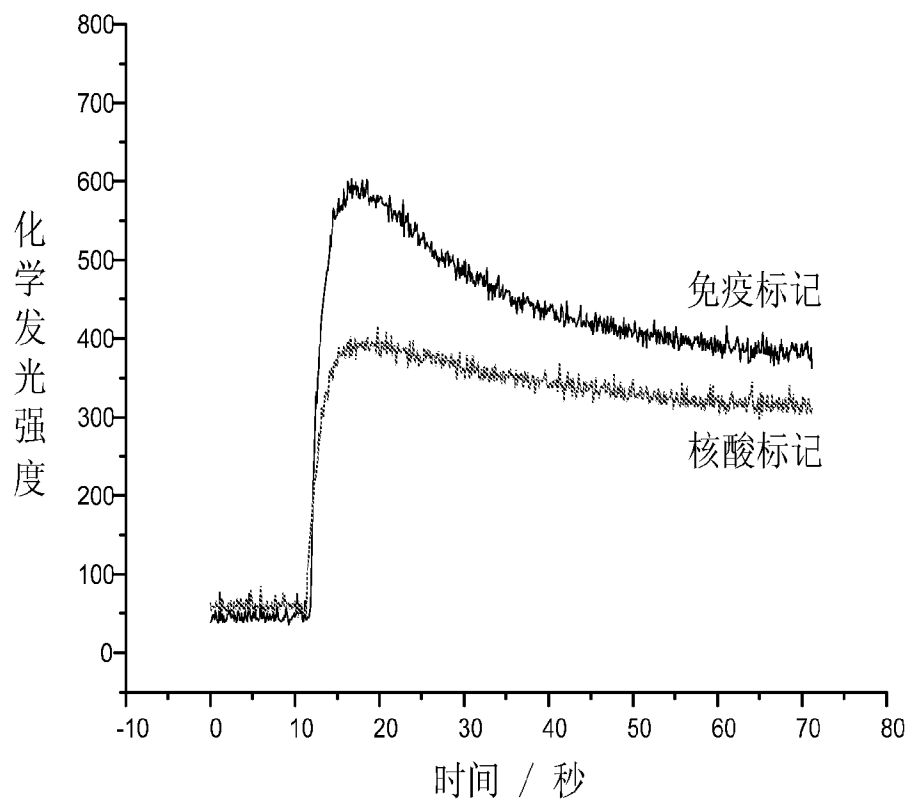


图10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/075064

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C09K11/-; C12Q1/-; G01N21/-; G01N33/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, CA, ISI WEB OF SCIENCE, GOOGLE SCHOLAR:

+isoluminol, aminobutyl and phthalhydrazide, gold, Au, ABEI

search formula in CA: C14H20N4O2; search CARNS in CA: 66612-29-1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TIAN, Dayong et al. Sandwich-type electrochemiluminescence immunosensor based on N-(aminobutyl)-N-ethylisoluminol labeling and gold nanoparticle amplification. Talanta. 2009, vol. 78, pages 339-404	1-24
A	QI, Honglan et al. Homogenous electrogenerated chemiluminescence immunoassay for human immunoglobulin G using N-(aminobutyl)-N-ethylisoluminol as luminescence label at gold nanoparticles modified paraffin-impregnated graphite electrode. Talanta. 2008, vol. 75, pages 684-690	1-24
A	CUI, Hua et al. Synthesis, Characterization, and Electrochemiluminescence of Luminol-Reduced Gold Nanoparticles and Their Application in a Hydrogen Peroxide Sensor. Chem. Eur. J. 2007, vol. 13, pages 6975-6984	1-24
A	US2007/0154967A1 (INTEL CORP.) 05 Jul. 2007 (05.07.2007) the whole document	1-24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 22 Oct. 2010 (22.10.2010)	Date of mailing of the international search report 09 Dec. 2010 (09.12.2010)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer XU, Yuanyuan Telephone No. (86-10)82245512

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2010/075064

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US2007/0154967A1	05.07.2007	US7537934B	26.05.2009
		US2010/0055713A1	04.03.2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/075064

Continuation of **CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:**

C09K11/06 (2006.01) i

C12Q1/68 (2006.01) i

G01N33/531 (2006.01) i

G01N21/76 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2010/075064

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C09K11/-; C12Q1/-; G01N21/-; G01N33/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, CA, ISI WEB OF SCIENCE, GOOGLE SCHOLAR:

异鲁米诺, 氨基丁基 and 邻苯二甲酰肼, 金, Au, ABEI, +isoluminol, aminobutyl and phthalhydrazide, gold

在 CA 中用分子式检索: C14H20N4O2; 在 CA 中化学物质登记号检索: 66612-29-1

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	TIAN, Dayong et al. Sandwich-type electrochemiluminescence immunosensor based on N-(aminobutyl)-N-ethylisoluminol labeling and gold nanoparticle amplification. Talanta. 2009 年, 78 卷, 339~404 页	1-24
A	QI, Honglan et al. Homogenous electrogenerated chemiluminescence immunoassay for human immunoglobulin G using N-(aminobutyl)-N-ethylisoluminol as luminescence label at gold nanoparticles modified paraffin-impregnated graphite electrode. Talanta. 2008 年, 75 卷, 684~690 页	1-24
A	CUI, Hua et al. Synthesis, Characterization, and Electrochemiluminescence of Luminol-Reduced Gold Nanoparticles and Their Application in a Hydrogen Peroxide Sensor. Chem. Eur. J. 2007 年, 13 卷, 6975~6984 页	1-24
A	US2007/0154967A1 (INTEL CORP.) 05.7 月 2007 (05.07.2007) 全文	1-24

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期
22.10 月 2010 (22.10.2010)

国际检索报告邮寄日期
09.12 月 2010 (09.12.2010)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:
中华人民共和国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088
传真号: (86-10)62019451

受权官员

徐圆圆
电话号码: (86-10) **82245512**

国际申请号	PCT/CN2010/075064
-------	--------------------------

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2009 年 7 月)

续:

主题的分类:

C09K11/06 (2006.01) i

C12Q1/68 (2006.01) i

G01N33/531 (2006.01) i

G01N21/76 (2006.01) i