



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104801722 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 29

(21) 申请号 201510112120. 5

(22) 申请日 2015. 03. 13

(71) 申请人 武汉理工大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区珞狮路
122 号

(72) 发明人 黄进 张娣 黄海涛 原弘 夏涛
余家会

(74) 专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限
公司 42102

代理人 唐万荣

(51) Int. Cl.

B22F 9/24(2006. 01)

C09K 11/58(2006. 01)

B82Y 40/00(2011. 01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种人血清白蛋白金纳米簇的制备方法

(57) 摘要

本发明属纳米材料技术领域,具体涉及一种人血清白蛋白金纳米簇的制备方法。包括如下步骤:1) 将氯金酸溶液缓慢加入到人血清白蛋白溶液中,剧烈搅拌后加入 NaOH 溶液调节 pH 值为 11 ~ 12.5,于室温 ~ 37℃ 下,选择超声开-关比例对混合溶液进行超声,得到金纳米簇溶液;2) 将金纳米簇溶液与 ZnCl₂ 溶液进行共轭沉淀,离心后取沉淀并用蒸馏水洗涤,再将沉淀物重新溶入 PBS 缓冲液中,于 PBS 缓冲液、去离子水中分别透析后得到人血清白蛋白金纳米簇溶液。本发明采用人血清白蛋白代替异源蛋白作为保护剂和还原剂来制备金簇,消除了人体的免疫原性,在短时间内可以制备出粒径小且分布均一,量子产率高,具有强烈近红外荧光的金纳米簇。

1. 一种人血清白蛋白金纳米簇的制备方法,其特征在于,它包括如下步骤:

1) 将氯金酸溶液缓慢加入到人血清白蛋白溶液中,剧烈搅拌混合均匀,然后加入 NaOH 溶液调节 pH 值为 11~12.5,于室温 ~37℃ 下,选择合适的超声开-关比例,对混合溶液施加一定功率的超声,即可得到深褐色的金纳米簇溶液;

2) 将步骤 1) 制备好的金纳米簇溶液与 $ZnCl_2$ 溶液共轭沉淀得到浑浊溶液,离心后取沉淀,采用蒸馏水洗涤,然后将沉淀重新溶入 PBS 缓冲液中,于 PBS 缓冲液、去离子水中分别透析后得到清亮的棕色溶液,即为人血清白蛋白金纳米簇溶液。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述超声的开-关比例为 5:5~9:1,即超声开 5~9min,关 1~5min,多次重复循环,共超声 30~120min。

3. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述超声的开-关比例为 7:3,即超声开 7min,关 3min,多次重复循环,共超声 90min。

4. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述氯金酸溶液的浓度为 10 g/L,用量为 1.03 mL;所述人血清白蛋白溶液的浓度为 50 mg/mL,用量为 2.5 mL;所述 NaOH 溶液的浓度为 1 mol/L,加入量为 0.25 mL。

5. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述金纳米簇溶液与 $ZnCl_2$ 溶液的体积比为 1:1,所述 $ZnCl_2$ 溶液的浓度为 10 g/L。

6. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述离心的转速为 2000 rpm,离心时间为 15min。

7. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,所述 PBS 缓冲液的 pH 值为 7.4。

一种人血清白蛋白金纳米簇的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属纳米材料技术领域,具体涉及一种人血清白蛋白金纳米簇的制备方法。

背景技术

[0002] 癌症,又称为恶性肿瘤,严重威胁着人类的健康和性命,在当今医学上仍被看作不治之症。在癌症的治疗过程中,对肿瘤细胞进行有效的初期诊断和实时追踪,是提升其治愈率和存活率的重要手段。而一些传统荧光成像诊断材料在一定的光激发下很轻易地被漂白,成分上具有毒性,生物相容性、稳定性差,对肿瘤进行诊断成像的同时,对其它正常组织也造成了严重的伤害。

[0003] 随着纳米科技的快速发展,纳米材料与医学的联系亦愈发紧密。金纳米簇是近几年来发展比较快的一种新型荧光纳米材料,由于具有粒径小,抗光漂白,斯托克位移大,毒性低,高强荧光,良好的生物相容及合成条件简单等优点,在近红外分子成像和医学诊断等方面具有潜在的发展前景。而当前的一些关于金纳米簇制备方法及其性能的研究存在以下几个方面的问题:(1)以牛血清蛋白/谷胱甘肽等异源蛋白作为还原剂和保护价剂来制备金纳米簇是最为常见的方法之一,但这种异源蛋白质在进入人体后会诱发抗体抗原反应而被清除,引起免疫原性,甚至会导致过敏反应;(2)水浴法也是制备金纳米簇最为常见的方法,但反应时间耗时过长,通常需要 24h,量子产率低;此外,金纳米簇的粒径、量子产率、最大发射峰的波长等均会对金纳米簇的荧光特性造成一定的影响,如何快速制备出具有优异荧光特性的金纳米簇仍是亟待解决的问题;(3)可见光区成像:可见光区成像会存在许多问题,比如遭受活体组织中内源性物质的吸收、散射等对光学成像会造成一定的影响;而在近红外波段(650nm~900nm),组织的吸收、散射现象及本身的自发荧光很低,在此波长范围内组织的自发荧光对被监控的生物体的影响甚微,能显著提高成像的准确度和灵敏度。

发明内容

[0004] 本发明针对现有技术存在的不足,目的在于提供一种人血清白蛋白金纳米簇(HSA-AuNCs)的制备方法。

[0005] 为解决上述发明目的,本发明所采用的技术方案为:

[0006] 一种人血清白蛋白金纳米簇的制备方法,它包括如下步骤:

[0007] 1) 将氯金酸溶液缓慢加入到人血清白蛋白(HSA)溶液中,剧烈搅拌混合均匀,然后加入 NaOH 溶液调节 pH 值为 11~12.5,于室温~37℃下,选择合适的超声开-关比例,对混合溶液施加一定功率的超声,即可得到深褐色的金纳米簇溶液;

[0008] 2) 将步骤 1) 制备好的金纳米簇溶液与 ZnCl₂ 溶液共轭沉淀得到浑浊溶液,离心后取沉淀,采用蒸馏水洗涤,然后将沉淀重新溶入 PBS 缓冲液中,于 PBS 缓冲液、去离子水中分别透析后得到清亮的棕色溶液,即为人血清白蛋白金纳米簇溶液。

[0009] 按上述方案,步骤(1)中所述超声的开-关比例为 5:5~9:1,即超声开 5~9min,

关 1 ~ 5min, 多次重复循环, 共超声 30 ~ 120min。

[0010] 按上述方案, 步骤 (1) 中所述超声的开 - 关比例为 7:3, 即超声开 7min, 关 3min, 多次重复循环, 共超声 90min。

[0011] 按上述方案, 步骤 (1) 中所述氯金酸溶液的浓度为 10g/L, 用量为 1.03mL; 所述人血清白蛋白溶液的浓度为 50mg/mL, 用量为 2.5mL; 所述 NaOH 溶液的浓度为 1mol/L, 加入量为 0.25mL。

[0012] 按上述方案, 步骤 (2) 中所述金纳米簇溶液与 $ZnCl_2$ 溶液的体积比为 1:1, 所述 $ZnCl_2$ 溶液的浓度为 10g/L。

[0013] 按上述方案, 步骤 (2) 中所述离心的转速为 2000rpm, 离心时间为 15min。

[0014] 按上述方案, 所述 PBS 缓冲液的 pH 值为 7.4。

[0015] 本发明的有益效果是:

[0016] (1) 本发明利用超声化学具有强激发能量的特性对物质的化学反应进行加速, 提高反应产率, 采用人血清白蛋白 (HSA) 代替牛血清白蛋白等异源蛋白作为保护剂和还原剂来制备金簇, 消除了人体的免疫原性, 在短时间内成功制备出了粒径小且分布均一, 量子产率高, 具有强烈近红外荧光的金纳米簇, 并且该金纳米簇在模拟人体环境中比较稳定。

[0017] (2) 本发明初次尝试将制备得到的人血清白蛋白金纳米簇进行近红外成像测试, 结果显示, 人血清白蛋白金纳米簇能够发出明亮的近红外荧光, 具有潜在的分子成像应用前景。

附图说明

[0018] 图 1 为实施例 3 制备的人血清白蛋白金纳米簇的粒径表征图。

[0019] 图 2 为实施例 1 ~ 5 制备的人血清白蛋白金纳米簇的荧光测试光谱图。

[0020] 图 3 为本发明制备的人血清白蛋白金纳米簇置于 pH 值为 7.4 的缓冲溶液中随时间延长变化的荧光光谱图。

[0021] 图 4 为本发明制备的人血清白蛋白金纳米簇置于等渗溶液中随时间延长变化的荧光光谱图。

具体实施方式

[0022] 为了更好地理解本发明, 下面结合实施例进一步阐明本发明的内容, 但本发明的内容不仅仅局限于下面的实施例。

[0023] 实施例 1

[0024] 利用超声优化制备人血清白蛋白为模板的金纳米簇 (HSA-AuNCs) 的方法, 它包括如下步骤:

[0025] 1) 将 1.03mL 氯金酸溶液 (10g/L) 缓慢加入到 2.5mL 人血清白蛋白 (HSA) 溶液 (50mg/mL) 中, 剧烈搅拌混合均匀, 然后加入 0.25mL 1mol/L 的 NaOH, 搅拌几分钟彻底混合后, 室温下, 对其施加功率为 150W 的超声, 设定超声的开关时间比例为 5:5, 即超声开 5min, 关 5min, 多次循环重复, 超声一小时即可得到深褐色金簇溶液;

[0026] 2) 取 3ml 制备好的金簇溶液装入玻璃瓶中, 迅速注入 3ml 10g/L 的 $ZnCl_2$ 溶液, 共轭沉淀得浑浊溶液, 2000rpm 下离心 15min; 然后取沉淀用蒸馏水洗涤, 整个过程重复三次;

然后将沉淀物重新溶于 1ml PBS (PH = 7.4) 缓冲液中,于 PBS 缓冲液中透析两天,去离子水中透析两天,得到清亮的棕色溶液,即为人血清白蛋白金纳米簇。

[0027] 实施例 2

[0028] 利用超声优化制备人血清白蛋白为模板的金纳米簇 (HSA-AuNCs) 的方法,它包括如下步骤:

[0029] 1) 将 1.03ml 氯金酸溶液 (10g/L) 加入到 2.5ml 人血清白蛋白 (HSA) 溶液 (50mg/mL) 中,剧烈搅拌混合均匀,然后加入 0.25ml 1mol/L 的 NaOH,搅拌几分钟彻底混合后,室温下,对其施加功率为 150W 的超声,设定超声的开关时间比例为 6:4,即超声开 6min,关 4min,多次循环重复,超声一小时即得到褐色溶液;

[0030] 2) 取 3ml 制备好的金簇溶液装入玻璃瓶中,迅速注入 3ml 10g/L 的 $ZnCl_2$ 溶液,共轭沉淀得浑浊溶液,2000rpm 下离心 15min,然后取沉淀用蒸馏水洗涤,整个过程重复三次;然后将沉淀物重新溶于 1ml PBS (PH = 7.4) 缓冲液中,于 PBS 缓冲液中透析两天,去离子水中透析两天,得到清亮的棕色溶液,即为人血清白蛋白金纳米簇。

[0031] 实施例 3

[0032] 利用超声优化制备人血清白蛋白为模板的金纳米簇 (HSA-AuNCs) 的方法,它包括如下步骤:

[0033] 1) 将 1.03ml 氯金酸溶液 (10g/L) 加入到 2.5ml 人血清白蛋白 (HSA) 溶液 (50mg/mL) 中,剧烈搅拌混合均匀,然后加入 0.25ml 1mol/L 的 NaOH,搅拌几分钟彻底混合后,室温下,对其施加功率为 150W 的超声,设定超声的开关时间比例为 7:3,即超声开 7min,关 3min,多次循环重复,超声一小时得到褐色溶液;

[0034] 2) 取 3ml 制备好的金簇溶液装入玻璃瓶中,迅速注入 3ml 10g/L 的 $ZnCl_2$ 溶液,共轭沉淀得浑浊溶液,2000rpm 下离心 15min;然后沉淀,用蒸馏水洗涤,整个过程重复三次;然后将沉淀物重新溶于 1ml PBS (PH = 7.4) 缓冲液中,于 PBS 缓冲液中透析两天,去离子水中透析两天,得到清亮的棕色溶液,即为人血清白蛋白金纳米簇。

[0035] 实施例 4

[0036] 利用超声优化制备人血清白蛋白为模板的金纳米簇 (HSA-AuNCs) 的方法,它包括如下步骤:

[0037] 1) 将 1.03ml 氯金酸溶液 (10g/L) 加入到 2.5ml 人血清白蛋白 (HSA) 溶液 (50mg/mL) 中,剧烈搅拌混合均匀,然后加入 0.25ml 1mol/L 的 NaOH,搅拌几分钟彻底混合后,室温下,对其施加功率为 150W 的超声,设定超声的开关时间比例为 8:2,即超声开 8min,关 2min,多次循环重复,超声一小时即可得到褐色溶液;

[0038] 2) 取 3ml 制备好的金簇溶液装入玻璃瓶中,迅速注入 3ml 10g/L 的 $ZnCl_2$ 溶液,共轭沉淀得浑浊溶液,2000rpm 下离心 15min,然后取沉淀,用蒸馏水洗涤,整个过程重复三次,然后将沉淀物重新溶于 1ml PBS (pH = 7.4) 缓冲液中,于 PBS 缓冲液中透析两天,去离子水中透析两天,得到清亮的棕色溶液,即为人血清白蛋白金纳米簇。=

[0039] 实施例 5

[0040] 利用超声优化制备人血清白蛋白为模板的金纳米簇 (HSA-AuNCs) 的方法,它包括如下步骤:

[0041] 1) 将 1.03ml 氯金酸溶液 (10g/L) 加入到 2.5ml 人血清白蛋白 (HSA) 溶液 (50mg/

mL) 中, 剧烈搅拌混合均匀, 然后加入 0.25mL 1mol/L 的 NaOH, 搅拌几分钟彻底混合后, 室温下, 对其施加功率为 150W 的超声, 设定超声的开关时间比例为 9:1, 即超声开 9min, 关 1min, 多次循环重复, 超声一小时得到褐色溶液;

[0042] 2) 取 3ml 制备好的金簇溶液装入玻璃瓶中, 迅速注入 3ml 10g/L 的 $ZnCl_2$ 溶液, 共轭沉淀得浑浊溶液, 2000rpm 下离心 15min, 然后取出沉淀, 用蒸馏水洗涤, 整个过程重复三次; 然后将沉淀重新溶于 1ml PBS (pH = 7.4) 缓冲液中, 于 PBS 缓冲液中透析两天, 去离子水中透析两天, 得到清亮的棕色溶液, 即为人血清白蛋白金纳米簇。

[0043] 将上述实施例 3 制备得到的人血清白蛋白金纳米簇进行粒径表征测试, 测试结果见图 1, 由图 1 的 DLS 测试中可以看出, 人血清白蛋白金纳米簇表现出了良好的单分散性, 粒径分布比较均一, 金纳米簇的平均粒径约为 2.7nm。这种比生物分子还要小的尺寸, 更有利于金纳米簇进入更深的组织内部, 达到良好的成像效果。将上述实施例 1 ~ 5 制备得到的人血清白蛋白金纳米簇进行荧光测试, 测试结果见图 2, 图 2 的金纳米簇荧光测试谱图可知, 本发明采用合适的超声开 - 关时间比例可得到较高荧光强度的金纳米簇, 开 - 关时间比例从 5:5 到 7:3 (a 到 c 线), 金簇荧光强度是增强的, 当开 - 关时间比例到 8:2 的时候, 荧光峰降低, 这是由于开关比例过低, 超声不能提供充足的能量促使其反应, 开关比例过大又会造成局部温度过高, 蛋白失活, 荧光强度降低, 即开关比例为 7:3 时为最佳反应条件。

[0044] 实施例 6

[0045] 利用超声优化制备人血清白蛋白为模板的金纳米簇 (HSA-AuNCs) 的方法, 它包括如下步骤:

[0046] 1) 将 1.03mL 氯金酸溶液 (10g/L) 加入到 2.5mL 人血清白蛋白 (HSA) 溶液 (50mg/mL) 中, 剧烈搅拌混合均匀, 然后加入 0.25mL 1mol/L 的 NaOH, 搅拌几分钟彻底混合后, 分别于室温或 37°C 下, 对其施加功率为 150W 的超声, 设定超声的开关时间比例为 7:3, 即超声开 7min, 关 3min, 多次循环重复, 超声 30min 即可得到褐色溶液;

[0047] 2) 取 3ml 制备好的金簇溶液装入玻璃瓶中, 迅速注入 3ml 10g/L 的 $ZnCl_2$ 溶液, 共轭沉淀得浑浊溶液, 2000rpm 下离心 15min; 然后取出沉淀, 用蒸馏水洗涤, 整个过程重复三次; 然后将沉淀重新溶于 1ml PBS (pH = 7.4) 缓冲液中, 于 PBS 缓冲液中透析两天, 去离子水中透析两天, 得到清亮的棕色溶液, 即为人血清白蛋白金纳米簇, 其荧光测试结果见表 1、表 2。

[0048] 实施例 7

[0049] 利用超声优化制备人血清白蛋白为模板的金纳米簇 (HSA-AuNCs) 的方法, 它包括如下步骤:

[0050] 1) 将 1.03mL 氯金酸溶液 (10g/L) 加入到 2.5mL 人血清白蛋白 (HSA) 溶液 (50mg/mL) 中, 剧烈搅拌混合均匀, 然后加入 0.25mL 1mol/L 的 NaOH, 搅拌几分钟彻底混合后, 分别于室温或 37°C 下, 对其施加功率为 150W 的超声, 设定超声的开关时间比例为 7:3, 即超声开 7min, 关 3min, 多次循环重复, 超声 60min 即可得到褐色溶液;

[0051] 2) 取 3ml 制备好的金簇溶液装入玻璃瓶中, 迅速注入 3ml 10g/L 的 $ZnCl_2$ 溶液, 共轭沉淀得浑浊溶液, 2000rpm 下离心 15min; 然后取出沉淀, 用蒸馏水洗涤, 整个过程重复三次; 然后将沉淀重新溶于 1ml PBS (pH = 7.4) 缓冲液中, 于 PBS 缓冲液中透析两天, 去离子水中透析两天, 得到清亮的棕色溶液, 即为人血清白蛋白金纳米簇, 其荧光测试结果见表 1、

表 2。

[0052] 实施例 8

[0053] 利用超声优化制备人血清白蛋白为模板的金纳米簇 (HSA-AuNCs) 的方法, 它包括如下步骤:

[0054] 1) 将 1.03mL 氯金酸溶液 (10g/L) 加入到 2.5mL 人血清白蛋白 (HSA) 溶液 (50mg/mL) 中, 剧烈搅拌混合均匀, 然后加入 0.25mL 1mol/L 的 NaOH, 搅拌几分钟彻底混合后, 分别于室温或 37℃ 下, 对其施加功率为 150W 的超声, 设定超声的开关时间比例为 7:3, 即超声开 7min, 关 3min, 多次循环重复, 超声 90min 即可得到褐色溶液;

[0055] 2) 取 3ml 制备好的金簇溶液装入玻璃瓶中, 迅速注入 3ml 10g/L 的 $ZnCl_2$ 溶液, 共轭沉淀得浑浊溶液, 2000rpm 下离心 15min; 然后取出沉淀, 用蒸馏水洗涤, 整个过程重复三次, 然后将沉淀重新溶于 1ml PBS (pH = 7.4) 缓冲液中, 于 PBS 缓冲液中透析两天, 去离子水中透析两天, 得到清亮的棕色溶液, 即为人血清白蛋白金纳米簇, 其荧光测试结果见表 1、表 2。

[0056] 实施例 9

[0057] 利用超声优化制备人血清白蛋白为模板的金纳米簇 (HSA-AuNCs) 的方法, 它包括如下步骤:

[0058] 1) 将 1.03mL 氯金酸溶液 (10g/L) 加入到 2.5mL 人血清白蛋白 (HSA) 溶液 (50mg/mL) 中, 剧烈搅拌混合均匀, 然后加入 0.25mL 1mol/L 的 NaOH, 搅拌几分钟彻底混合后, 分别于室温或 37℃ 下, 对其施加功率为 150W 的超声, 设定超声的开关时间比例为 7:3, 即超声开 7min, 关 3min, 多次循环重复, 超声 120min 即可得到褐色溶液;

[0059] 2) 取 3ml 制备好的金簇溶液装入玻璃瓶中, 迅速注入 3ml 10g/L 的 $ZnCl_2$ 溶液, 共轭沉淀得浑浊溶液, 2000rpm 下离心 15min。然后取出沉淀, 用蒸馏水洗涤, 整个过程重复三次; 然后将沉淀重新溶于 1ml PBS (pH = 7.4) 缓冲液中, 于 PBS 缓冲液中透析两天, 去离子水中透析两天, 得到清亮的棕色溶液, 即为人血清白蛋白金纳米簇, 其荧光测试结果见表 1、表 2。

[0060] 表 1 室温下 (23℃) 不同超时间制备金簇的荧光测试

[0061]

实施例	超声时间 (min)	最大激发波长 (nm)	最大发射波长 (nm)	荧光强度
6	30	510	610	218
7	60	520	615	496

[0062]

8	90	550	638	660
9	120	550	640	574

[0063] 表 2 37℃下不同超声时间合成金簇的荧光测试

[0064]

实施 例	超声时间 (min)	最大激发波长 (nm)	最大发射波长 (nm)	荧光强度
6	30	510	615	314
7	60	520	620	595
8	90	550	639	731
9	120	550	640	689

[0065] 由表 1 和表 2 可以看出,本发明中超声温度及超声时间的设置都会对金纳米簇粒径的最大发射波长,荧光强度等造成一定的影响。在超声 30min 后,可以检测到发射光,且在 610nm 处形成了一个荧光峰。荧光的强度随着超声时间增长到 90min 的过程中不断增强。继续超声,荧光强度反而下降。与此同时,随着超声时间增长,荧光发射波长逐渐红移(粒径增大),显示了金纳米簇的尺寸的变化,制备出的金纳米簇最大发射波长位于 640nm 左右已经趋于稳定。对比表 1 和表 2 可以看出,温度较高(37℃)制备的金纳米簇其荧光强度也相对较高,本发明通过对比优化实验工艺条件发现 37℃下,超声 90min 是制备稳定、强荧光金纳米簇的最佳反应条件。

[0066] 将本发明制备的人血清白蛋白金纳米簇置于模拟人体环境(人体中最常见到的两种环境为 PH = 7.4 的组织液以及等渗环境)中进行稳定性测试,金纳米簇在组织中的稳定性对近红外成像的效果至关重要,结果见图 3~4。如图所示,随着存放时间的延长,无论是在缓冲溶液中还是在等渗溶液中,550nm 光激发下,金纳米簇的最大发射波长均没有发生明显的变化,仍位于 640nm 左右,既没有发生红移也没有发生蓝移,但是由于光漂白的作用,金纳米簇的荧光强度稍微减弱,但幅度很小,说明合成的人血清白蛋白金纳米簇在模拟的人体环境中还是比较稳定的,不会发生团聚,荧光强度也不会发生显著的变化,对其成像效果影响甚微。

[0067] 本发明所列举的各原料(浓度),以及工艺参数(如温度、时间、超声开关比列等)的上下限、区间取值都能实现本发明,在此不一一列举实施例。以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明创造构思的前提下,还可以做出若干改进和变换,这些都属于本发明的保护范围。

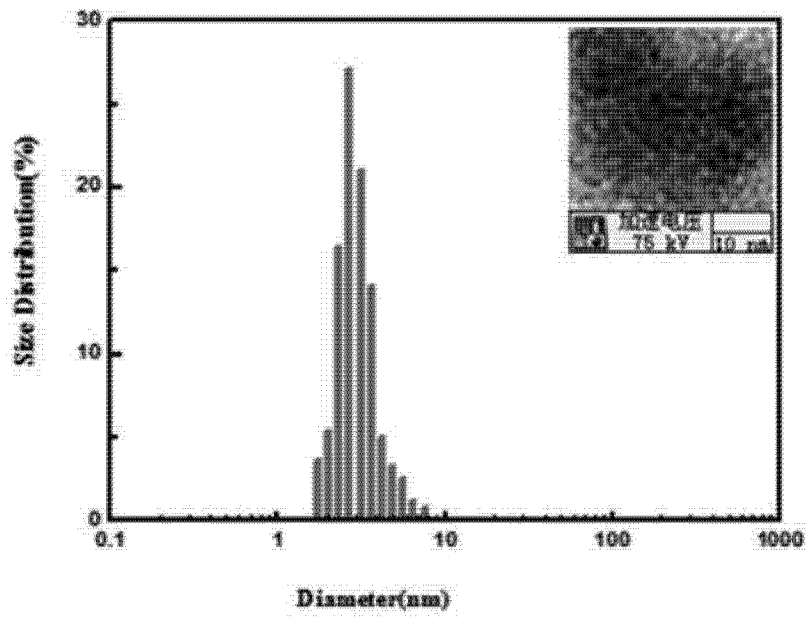


图 1

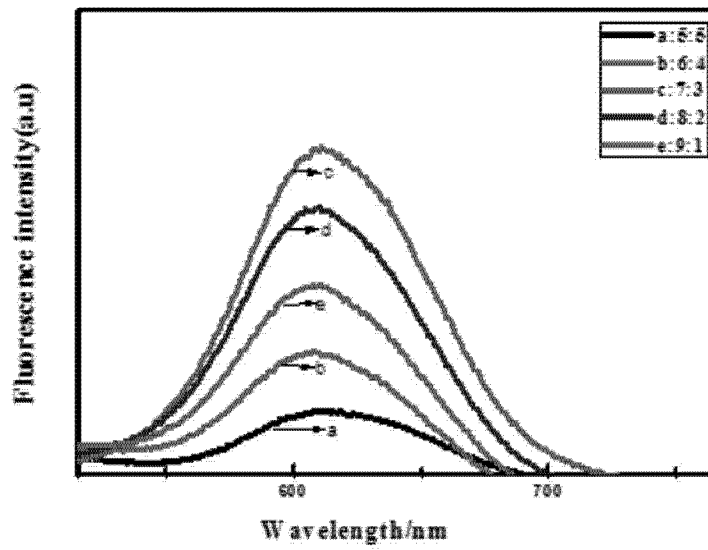


图 2

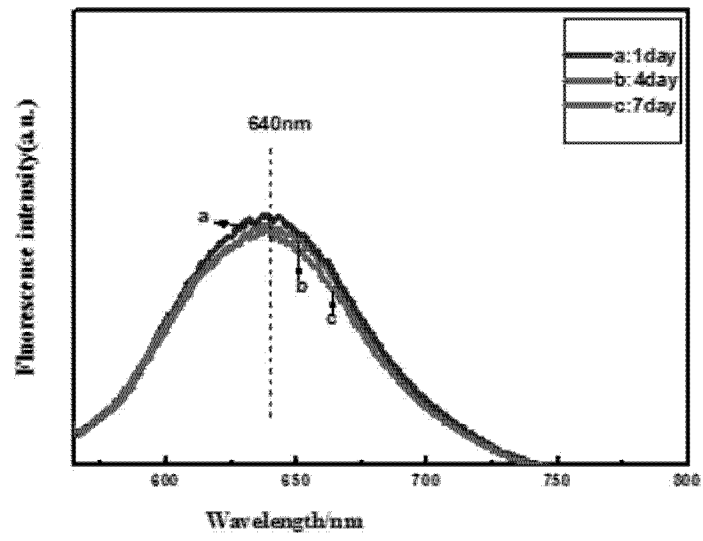


图 3

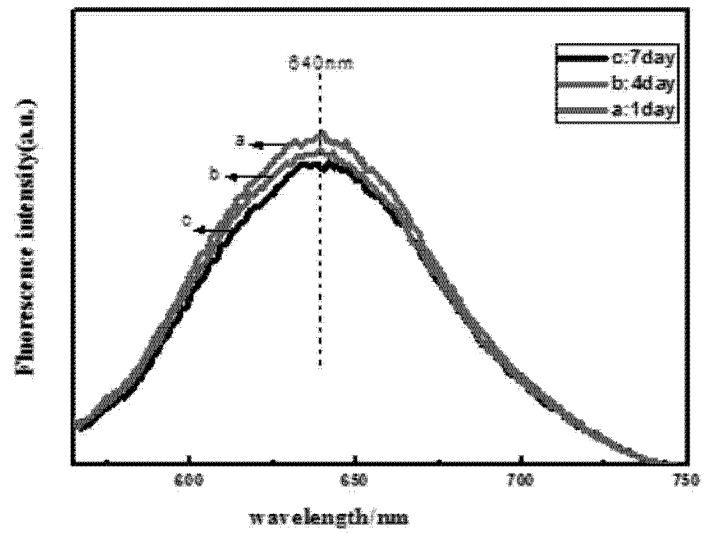


图 4