

## (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 2011/107003 A1

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

- (51) 国际专利分类号:  
*G01N 33/53* (2006.01) *G01N 21/76* (2006.01)  
*G01N 33/543* (2006.01) *G01N 21/66* (2006.01)  
*G01N 33/532* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2011/070843
- (22) 国际申请日: 2011 年 1 月 31 日 (31.01.2011)
- (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)。 沈
- 雯 (SHEN, Wen) [CN/CN]; 中国安徽省合肥市金寨路 96 号, Anhui 230026 (CN)。 柴颖 (CHAI, Ying) [CN/CN]; 中国安徽省合肥市金寨路 96 号, Anhui 230026 (CN)。 于秀霞 (YU, Xiuxia) [CN/CN]; 中国安徽省合肥市金寨路 96 号, Anhui 230026 (CN)。
- (74) 代理人: 上海专利商标事务所有限公司 (SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE, LLC); 中国上海市桂平路 435 号, Shanghai 200233 (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,

[见续页]

(54) Title: N-(4-AMINOBTYL)-N-ETHYLISOLUMINOL FUNCTIONALIZED GOLD NANOPARTICLES, PREPARATION METHOD AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺功能化纳米金及其制备方法和应用

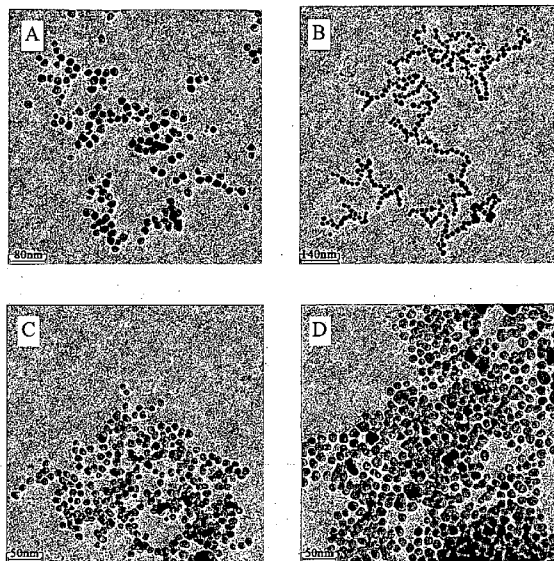


图 1 / FIG. 1

(57) Abstract: Functionalized gold nanoparticles, preparation methods and applications thereof are disclosed. The functionalized gold nanoparticles are formed by bonding gold nanoparticles with N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol, and N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol is directly coated on the surface of the gold nanoparticles. The functionalized gold nanoparticles are prepared by directly reducing  $\text{HAuCl}_4$  with N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol, wherein N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol is used as reducing and stabilizing reagents. The diameter and morphology of the prepared gold nanoparticles can be regulated by changing the ratio of  $\text{HAuCl}_4$  to N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol. Moreover, The functionalized gold nanoparticles can be used as chemiluminescent bio-probe.

[见续页]

WO 2011/107003 A1



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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

**本国际公布:**

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括经修改的权利要求及声明(条约第 19 条(1))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

---

**(57) 摘要:**

公开了功能化纳米金及其制备方法和应用。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, N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺直接连接在所述金纳米粒子的表面。该功能化纳米金通过使用 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺直接还原  $\text{HAuCl}_4$  制得, 其中, N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺用作还原剂和稳定剂, 合成得到的纳米金的粒径和形貌可以通过控制  $\text{HAuCl}_4$  和 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺的比例来进行调控。并且, 所述的功能化纳米金可以用作化学发光生物探针。

# N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺功能化纳米金及其制备方法和应用

## 技术领域

本发明属于材料科学、分析化学、生物和医学领域。具体而言，本发明涉及一种N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺(ABEI)发光功能化纳米金及其制备、性质和应用，进一步涉及采用该功能化纳米金制备的探针(尤其是免疫分析探针和核酸探针)及其制备方法，以及基于该探针的生物分析方法和试剂盒。

## 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，如氧化还原性、生物活性和电化学活性。

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相应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，例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. et al., *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、或在其它条件诱导下参与化学发光，而改性或功能化

金纳米材料在化学发光理论及分析应用中的研究工作则较少。

近年来,化学发光功能化金纳米材料的研究引起人们的关注。相关工作主要采用间接的方式通过桥联分子(bridge molecule)将发光试剂连接于金纳米材料的表面。2005年,Roux等人(Roux, S. et al., *Langmuir*, 2005, 21, 2526)用二氢硫辛酸作为保护试剂,以硼氢化钠( $\text{NaBH}_4$ )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。Xing等人(Zhou, X.M. et al., *Anal. Chem.* **2009**, 81, 255)利用DNA作桥联分子通过缩合反应将联吡啶钉连接于纳米金的表面。2007年,本课题组率先尝试直接的方式制备化学发光功能化金纳米材料,并成功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Au-N键直接连接到纳米金的表面。

N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺(ABEI),是鲁米诺的异构体——异鲁米诺的衍生物,化学式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$ 。常温下该化合物是白色粉末,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。由于ABEI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,如果能够直接利用ABEI代替鲁米诺还原氯金酸合成纳米金,则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 $\text{HAuCl}_4$ 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ABEI代替鲁米诺不能得到稳定的ABEI功能化的纳米金溶胶。因此,探索ABEI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。

化学发光生物分析,包括化学发光免疫分析和化学发光核酸分析等,是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的分子识别反应相结合的一种分析技术,其可用于各种蛋白质或多肽(抗原、抗体、多肽)、核酸(DNA、RNA、适配体)、微生物(如病毒、细菌、真菌)、脂肪酸、维生素、药物、金属离子、有机物、氨基酸、生物毒素、化学毒素或细胞等的检测。目前该方法已成为临床分析、食品安全、环境监测等领域的重要分析手段。

目前,化学发光生物分析方法主要依赖于标记技术。由各种标记物与识别分子或目标分子(即探测分子)形成的分析探针(即标记产物),不仅稳定性要好,

而且不降低探测分子与目标分析物或探测分子与捕获探针间特异性反应性及标记基团的发光效率。因此，制备特异、灵敏的生物分析探针是这一技术成功的关键。

现有商业化的用于化学发光生物分析探针的标记物主要包括以下两类：(a) 化学发光分子：如异鲁米诺及其衍生物、吖啶酯和联吡啶钌等。采用发光分子作为探针，不仅需要缩合反应将发光分子与识别分子或目标分子(即探测分子)结合，还需要对缩合反应后的产物进行纯化，操作过程十分复杂、耗时；(b)酶：如过氧化物酶、碱性磷酸酶等。利用酶分子对特定化学发光反应的催化作用，建立了一系列酶促化学发光生物分析方法。这类方法的主要问题是酶分子容易失活，影响分析的稳定性。此外，上述以发光分子和酶作为探针的分析技术还存在下列一些缺陷，比如分析成本高，难以进行低含量组分的检测，难以进行快速、现场的分析。

最近，基于发光功能化纳米材料作为纳米生物分析探针成为研究热点。发光功能化纳米材料实现了在一个信号探针上富集多个信号分子，将其作为一种新的标记物制备分析探针，可以大大提高灵敏度。已报道的发光功能化纳米探针主要包括以下两种形式：(i) “核-壳”结构的纳米探针，即化学发光试剂掺在纳米材料中(Edwards, K.A. et al., *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 386, 1335; Chang, Z. et al., *Electrochim. Acta* 2006, 52, 575; Yan, L. et al., *Talanta* 2007, 72, 1704)。其中，“壳”为各种纳米球，如纳米二氧化硅、聚合物微球、聚电解质、脂质体、碳纳米管等。而“核”则由各种发光试剂如鲁米诺、联吡啶钌、铈复合物等构成。这种“核-壳”结构的纳米探针，实现了在纳米球内多个发光分子的富集，灵敏度得到大大提高；(ii) “树枝”结构的纳米探针，即化学发光试剂通过桥联分子间接连接在纳米材料的表面(Zhang, S. S. et al., *Anal. Chem.* 2008, 80, 7206; Zhu, D. B. et al., *Anal. Chem.* 2008, 80, 3566; Patolsky, F. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 2372)。在微纳结构(如纳米金、磁珠、聚合物微球、亚微米级乳胶微球等)的表面固载多个“信号源”(如CuS纳米、钌配合物、辣根过氧化物酶)，形成树枝结构的探针。“信号源”通过桥联分子或层层组装的办法连接到微纳结构的表面。尽管一些基于发光功能化纳米探针的分析方法可以达到很高的灵敏度，但仍存在一些缺点，例如：分析过程复杂且耗时；掺杂的试剂易泄露；标记过程复杂等。这些问题限制了这些方法在实际中的应用。

因此，发展高灵敏度、稳定、生物兼容、低成本、简单、快速的基于发光功能化纳米材料的新型探针，并在此基础上开发出高灵敏度的免疫分析和核酸分析等化学发光分析新方法，具有重要的意义。

## 发明内容

本发明的主要目的在于提供一种新型的发光功能化纳米金材料——ABEI功能化的纳米金材料及其制备方法。本发明的另一主要目的在于提供本发明新型纳米金材料的应用，即提供一种基于该材料的分析探针(如免疫分析探针或核

酸分析探针)。本发明的另一主要目的还在于提供基于本发明的分析探针构建的分析方法、相应的试剂盒以及在样品检测中的用途和使用方法。

在本发明的第一方面中,提供了一种功能化纳米金,其包含:金纳米粒子和与该金纳米粒子连接的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺(ABEI),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。

在一个实施方式中,所述ABEI通过共价键Au-N连接于所述金纳米粒子的表面。

在另一个实施方式中,所述功能化纳米金的形貌选自下组:单分散球状、球状纳米金组装的链状、或球状纳米金组装的准网状或网状。在一个优选例中,所述功能化纳米金的形貌呈单分散球状,且其粒径为5-50纳米,优选8-40纳米,更优选10-30纳米。在另一优选例中,所述功能化纳米金的形貌呈球状纳米金组装的链状、准网状或网状,且所述球状纳米金的粒径为5-50纳米,优选8-40纳米,更优选10-30纳米。在另一优选例中,所述功能化纳米金的形貌呈球状纳米金组装的链状,且链长为200-800纳米,更优选400-500纳米。

在另一个实施方式中,所述功能化纳米金与氧化剂反应产生化学发光。

在另一个实施方式中,所述氧化剂选自: $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2$ 、 $\text{ClO}^-$ 、 $\text{I}_2$ 、 $\text{IO}_4^-$ 或 $\text{MnO}_4^-$ 。

在本发明的第二方面中,提供了一种制备本发明ABEI功能化纳米金的方法,所述方法包括如下步骤:

(1) 将氯金酸水溶液A与ABEI水溶液混合,得到混合液;

(2) 在步骤(1)所得的混合液中加入氯金酸水溶液B,混合至形成金溶胶,所述金溶胶即为功能化纳米金。

在一个优选例中,所述步骤(1)和步骤(2)是在搅拌或涡旋下进行的。

在一个实施方式中,所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述ABEI水溶液中ABEI的物质的量的1-6倍。在一个优选例中,所述氯金酸水溶液A中氯金酸的物质的量是所述ABEI水溶液中ABEI的物质的量的1.5-5倍,最优选2-4倍。

在另一个实施方式中,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ABEI水溶液中ABEI的物质的量的0.5-5倍。在一个优选例中,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ABEI水溶液中ABEI的物质的量的0.8-4倍,最优选1-3倍。

在另一个实施方式中,所述氯金酸水溶液A和B中氯金酸的物质的量的总和是步骤(1)中所述ABEI水溶液中ABEI的物质的量的2-10倍。在一个优选例中,所述氯金酸水溶液A和B中氯金酸的物质的量的总和是步骤(1)中所述ABEI水溶液中ABEI的物质的量的3-8倍,优选3.5-6倍,更优选3.7-5.5倍。

在另一个实施方式中,所述氯金酸水溶液A的摩尔浓度为1-10 mmol/L;所述ABEI水溶液的摩尔浓度为0.5-8.0 mmol/L;所述氯金酸水溶液B的摩尔浓度为1-10 mmol/L。在一个优选例中,所述氯金酸水溶液A的摩尔浓度为1-6 mmol/L,优选1-4 mmol/L;或者其摩尔浓度为6-10 mmol/L,优选6-8 mmol/L或8-10

mmol/L。在另一优选例中，所述ABEI水溶液的摩尔浓度为0.5-4.0 mmol/L，优选0.5-3.0 mmol/L；或者其摩尔浓度为4.0-8.0 mmol/L，优选5.0-8.0 mmol/L。在另一优选例中，所述氯金酸水溶液B的摩尔浓度为1-8 mmol/L，优选1-6 mmol/L。

5 在一个优选例中，所述ABEI水溶液为中性或碱性水溶液，其pH为7-14，优选8-13。

在另一个实施方式中，所述氯金酸水溶液A、ABEI水溶液与所述氯金酸水溶液B的物质的量的比例(摩尔比)选自h1-h10：

h1: 4: 1: 1; h2: 2: 1: 3; h3: 2.7: 1: 1.8; h4: 2.3: 1: 1.4;  
h5: 2.7: 1: 2.1; h6: 2.7: 1: 2.4; h7: 2.7: 1: 2.7; h8: 3: 1: 2;  
h9:  $\frac{27}{11}$ : 1:  $\frac{18}{11}$ ; h10: 2.25: 1: 1.5。

10 在另一个实施方式中，所述方法还包括对步骤(2)所得的金溶胶进行纯化的步骤。在一个优选例中，所述纯化是通过离心、透析或它们的组合进行的，优选通过离心进行纯化。在另一个优选例中，所述纯化是通过将所述金溶胶在17120 \* g下离心30-60分钟，优选45分钟进行的。

在另一个实施方式中，所述步骤(1)和步骤(2)各自在10-40℃的温度范围内进行。在一个优选例中，所述步骤(1)和步骤(2)各自在15-35℃，优选15-30℃，更优选15-25℃的温度范围内进行，通常在室温下进行。

15 在另一个实施方式中，步骤(1)和步骤(2)的反应时间分别为1-10小时。在一个优选例中，步骤(1)的反应时间为2小时以上，优选2-8小时，步骤(2)的反应时间为1.5小时以上，优选1.5-8小时。

20 在另一个实施方式中，所述方法中配制水溶液或稀释反应体系用的水的电阻率大于或等于1.0 MΩ\*cm。在一个优选例中，所述方法中配制水溶液或稀释反应体系用的水选自下组：二次蒸馏水、纯净水、或超纯水。

在本发明的第三方面中，提供了一种分析探针，其包含作为发光标记物的本发明的功能化纳米金。

25 在另一个实施方式中，所述分析探针是化学发光分析探针。在一个优选例中，所述分析探针是生物分析探针。在另一个优选例中，所述分析探针优选为电致化学发光分析探针。

在另一个实施方式中，本发明的功能化纳米金与选自下组的探测分子直接相连、或通过结合对或连接基团间接相连：

30 (a)对目标分析物具有结合特异性的结合分子；或  
(b)与目标分析物竞争结合捕获探针的竞争性分子。

在一个优选例中，所述竞争性分子选自：与目标分析物具有相同结构的物质、与目标分析物具有相同结合结构域的物质、或与目标分析物具有相似结构且能与捕获探针结合的物质。

35 在另一个实施方式中，所述结合对选自：生物素-链霉亲和素、生物素-亲和素、或生物素-中性亲和素、凝集素与糖类、葡萄球菌A蛋白(SPA)与IgG、抗原

与抗体、阳离子与阴离子、激素维生素和脂质与受体；所述连接基团选自：巯基或氨基。在一个优选例中，所述结合对为生物素-链霉亲和素、生物素-亲和素、或生物素-中性亲和素。

5 在另一个实施方式中，所述分析探针为免疫分析探针，其包含与功能化纳米金连接的、选自下组的探测分子：抗体、抗原或半抗原、或它们的活性片段。

在一个优选例中，所述抗体或其活性片段选自：单克隆抗体、多克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、Fab、(Fab')<sub>2</sub>、抗体重链或抗体轻链。

10 在另一个实施方式中，所述探测分子与功能化纳米金直接连接；或者，所述探测分子通过其端基修饰的结合对成员，与连接有结合对另一成员的功能化纳米金连接。在一个优选例中，所述探测分子与功能化纳米金直接连接。在另一个优选例中，所述探测分子通过结合对与功能化纳米金连接，所述结合对选自生物素-链霉亲和素、生物素-亲和素、或生物素-中性亲和素、凝集素与糖类、葡萄球菌A蛋白(SPA)与IgG、抗原与抗体、阳离子与阴离子、激素维生素和脂质与受体，优选生物素-链霉亲和素、生物素-亲和素、或生物素-中性亲和素。

15 在另一个实施方式中，所述分析探针为核酸分析探针，其包含与功能化纳米金连接的核酸分子。在一个优选例中，所述核酸分子选自：DNA或RNA(优选与目标分析物互补、或可在严格条件下与目标分析物结合的DNA或RNA分子)、或适配体分子。

20 在另一个实施方式中，所述核酸分子通过其端基修饰的结合对成员，与连接有结合对另一成员的功能化纳米金连接；或者，所述核酸分子通过其端基修饰的巯基与功能化纳米金连接。

25 在一个优选例中，所述核酸分子通过结合对与功能化纳米金连接，所述结合对选自：生物素-链霉亲和素、生物素-亲和素、或生物素-中性亲和素、凝集素与糖类、葡萄球菌A蛋白(SPA)与IgG、抗原与抗体、阳离子与阴离子、激素维生素和脂质与受体，优选生物素-链霉亲和素、生物素-亲和素、或生物素-中性亲和素。优选所述核酸分子通过其端基修饰的生物素，与连接有链霉亲和素的功能化纳米金连接。

30 在本发明的第四方面中，提供了一种制备分析探针的方法，所述方法包括使得本发明的功能化纳米金与探测分子连接的步骤。在一个优选例中，所述探测分子选自(a)对目标分析物具有结合特异性的结合分子；或(b)与目标分析物竞争结合捕获探针的竞争性分子。在一个优选例中，所述分析探针的制备包括采用本发明的上述方法制备功能化纳米金的步骤。

35 在另一个实施方式中，所述分析探针是免疫分析探针，所述方法包括：1) 在所述探测分子端基修饰结合对成员，然后通过结合对另一成员与所述功能化纳米金连接；或者2) 将所述探测分子直接与所述功能化纳米金连接。

在另一个实施方式中，所述方法包括：i) 提供功能化纳米金；以及ii) 孵育功能化纳米金与探测分子，得到所述免疫分析探针。

在另一个实施方式中，所述分析探针是核酸探针，所述方法包括：

1') 提供端基修饰有结合对成员的核酸分子，然后通过结合对的另一成员与所述功能化纳米金连接；或者

2') 在所述核酸分子端基修饰巯基，然后与所述功能化纳米金连接。

5 在另一个实施方式中，所述方法包括：

i') 提供端基修饰有结合对成员的核酸分子；

ii') 提供功能化纳米金，并将其与结合对另一成员一起孵育，得到连接有结合对另一成员的功能化纳米金；

10 iii') 孵育所述端基修饰有结合对成员的核酸分子与所述连接有结合对另一成员的功能化纳米金，得到所述核酸分析探针。

在一个优选例中，所述结合对选自：生物素-链霉亲和素、生物素-亲和素、或生物素-中性亲和素、凝集素与糖类、葡萄球菌A蛋白(SPA)与IgG、抗原与抗体、阳离子与阴离子、激素维生素和脂质与受体，优选生物素-链霉亲和素、生物素-亲和素、生物素-中性亲和素。优选所述核酸分子通过其端基修饰的生物素，  
15 与连接有链霉亲和素的功能化纳米金连接。

在本发明的第五方面中，提供了一种采用本发明分析探针的分析方法，其包括：将本发明的分析探针与待测样品和捕获探针接触，形成包含分析探针/目标分析物/捕获探针复合物或分析探针/捕获探针复合物的体系；检测包含分析探  
20 针的复合物的发光，从而确定所述样品中目标分析物的含量。

在一个优选例中，所述方法还包括提供阳性或阴性对照。在另一个优选例中，所述方法还包括提供表明发光强度与样品中目标分析物含量相关性的标准曲线。

在另一个优选例中，所述方法还包括对包含分析探针/目标分析物/捕获探针复合物或分析探针/捕获探针复合物的体系中的包含分析探针的复合物进行分离的步  
25 骤，优选采用色谱法(如HPLC)、电泳(如CE)、离心(如密度梯度离心)、透析、磁场分离等方式分离。

在另一个优选例中，所述捕获探针还与固相载体或固相载体/修饰层连接。

在另一个实施方式中，所述分析方法是化学发光分析方法，更优选电致化学发光分析方法。

30 在另一个实施方式中，所述样品选自：生物样品、食品或饮料样品、化学样品或环境样品。在一个优选例中，所述生物样品是临床样品或实验室样品，例如血液、血浆、血清、尿液、粪便、痰液、分泌物(如汗液、泪液等)、培养物等；所述化学样品包括药物样品；所述环境样品是空气样品、水样、土壤样品；所述化学样品包括中间物、终产物。

35 在另一个实施方式中，所述方法包括：

A) 提供本发明的分析探针，所述分析探针包含对目标分析物具有结合特异性的结合分子；

B) 提供捕获探针；

- C) 将待测样品与所述捕获探针一起孵育, 形成目标分析物/捕获探针复合物;
- D) 孵育所述目标分析物/捕获探针复合物与步骤A)中的分析探针, 形成分析探针/目标分析物/捕获探针复合物;
- E) 对所述分析探针/目标分析物/捕获探针复合物进行发光检测。

5 在另一个实施方式中, 本发明的方法包括:

A') 提供本发明的分析探针, 所述分析探针包含与目标分析物竞争结合捕获探针的竞争性分子;

B') 提供捕获探针;

10 C') 将待测样品和分析探针同时与所述捕获探针孵育, 使目标分析物或分析探针竞争性结合捕获探针, 形成目标分析物/捕获探针复合物和/或分析探针/捕获探针复合物;

D') 对步骤C'所得的分析探针/捕获探针复合物进行发光检测。

在另一个实施方式中, 步骤B或B'中的捕获探针与固相载体或带有修饰层的固相载体连接。

15 在另一个实施方式中, 所述方法包括步骤:

A、提供本发明的分析探针;

B、提供固相载体, 或组装有具有连接功能的修饰层的修饰层/固相载体;

20 C、孵育捕获探针与步骤B的固相载体或修饰层/固相载体, 使捕获探针连接到固相载体或修饰层/固相载体上, 形成捕获探针/固相载体复合物或捕获探针/修饰层/固相载体复合物;

D、孵育目标分析物与步骤C所得到的复合物, 使所述复合物与目标分析物结合, 形成目标分析物/捕获探针/固相载体复合物或目标分析物/捕获探针/修饰层/固相载体复合物;

25 E、孵育步骤D所得到的复合物与步骤A的分析探针, 形成分析探针/目标分析物/捕获探针/固相载体夹心式复合物或分析探针/目标分析物/捕获探针/修饰层/固相载体夹心式复合物;

F、检测步骤E所得到的夹心式复合物的发光。在一个优选例中, 所述分析方法为化学发光分析方法, 优选为电致化学发光免疫分析方法。

30 在另一个优选例中, 所述方法还包括在步骤C-E中的一步或多步之后去除未形成复合物的多余物质。

在另一个实施方式中, 所述固相载体为电极、磁微珠、微孔板、尼龙或玻璃; 所述修饰层由下述1)和2)的物质组成: 1)具有连接功能的桥联分子或具有连接功能的桥联基团; 2)连接有链霉亲和素的纳米金; 所述连接有链霉亲和素的纳米金通过所述桥联分子或所述桥联基团连接到所述固相载体上。

35 在另一个实施方式中, 所述步骤B中的组装是通过方式a)或方式b)进行的:

a) 所述固相载体为电极, 所述修饰层中的连接有链霉亲和素的纳米金通过所述桥联分子连接到所述电极上; 所述电极为金电极时, 所述桥联分子为双巯基化合物或同时具有氨基和巯基的化合物; 所述电极为氧化铟锡电极时, 所述

桥联分子为具有巯基或氨基的硅烷化试剂或同时具有氨基和巯基的化合物；所述电极为玻碳电极时，所述桥联分子为双巯基化合物、双氨基化合物、具有巯基或氨基的硅烷化试剂或同时具有氨基和巯基的化合物；所述电极为铂电极时，所述桥联分子为同时具有氨基和巯基的化合物；

- 5       b) 所述固相载体为磁微珠或尼龙，所述修饰层中连接有链霉亲和素的纳米金通过桥联基团连接到氨基化磁微珠或尼龙上，所述桥联基团为氨基；所述固相载体为微孔板或玻璃时，所述修饰层中的连接有链霉亲和素的纳米金通过桥联基团连接到巯基或氨基化的微孔板或玻璃上，所述桥联基团为巯基或氨基。

- 10       在一个优选例中，所述电极为金电极时，所述桥联分子优选为1,3'-丙二硫醇；所述电极为氧化铟锡电极时，所述桥联分子优选为3-巯基丙基-三甲氧基硅烷；所述电极为玻碳电极时，所述桥联分子优选为半胱氨酸；所述电极为铂电极时，所述桥联分子优选为半胱氨酸。

- 15       在另一个实施方式中，所述修饰层中的连接有链霉亲和素的纳米金的粒径为5-50 nm。在一个优选例中，所述连接有链霉亲和素的纳米金的粒径为10-38 nm，优选为16 nm。

在另一个实施方式中，所述的捕获探针为抗体或连接有桥联分子的抗体、或端基修饰有桥联分子或桥联基团的核酸分子。在一个优选例中，所述核酸分子选自：DNA、RNA或适配体分子。在另一个实施方式中，所述桥联分子为生物素；所述桥联基团为巯基。

- 20       在另一个实施方式中，所述目标分析物选自：蛋白质或多肽(抗原、抗体、多肽)、核酸(DNA、RNA、适配体)、微生物(如病毒、细菌、真菌)、脂肪酸、维生素、药物、金属离子、有机物、氨基酸、生物毒素、化学毒素或细胞。

在一个优选例中，所述目标分析物选自：蛋白质(如抗体、抗原或其片段)、或DNA。

- 25       在另一个实施方式中，所述发光的检测是化学发光检测。

在另一个实施方式中，所述化学发光检测包括：将包含待测复合物的体系放入化学发光池中，加入底液，产生化学发光，并用发光检测仪进行检测。

在另一个实施方式中，所述化学发光池为电致化学发光池，在加入底液和施加电压的条件下产生化学发光。

- 30       在一个优选例中，所施加的电压为脉冲电压、循环伏安或线性伏安，所述脉冲电压优选为双阶脉冲电压。

在另一个实施方式中，所述底液为氧化剂或其溶液。

在一个优选例中，所述氧化剂选自： $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2$ 、 $\text{ClO}^-$ 、 $\text{I}_2$ 、 $\text{IO}_4^-$ 或 $\text{MnO}_4^-$ 。

- 35       在另一个优选例中，所述底液为含有过氧化氢的碳酸盐缓冲液，优选所述碳酸盐由碳酸钠和碳酸氢钠所组成，优选所述过氧化氢浓度为0.1 mmol/L-50 mmol/L，优选1-10 mmol/L，更优选1.5-5 mmol/L；所述碳酸盐缓冲液的浓度为2-200 mmol/L，优选为10-100 mmol/L，更优选为20 mmol/L，所述含有过氧化氢的碳酸盐缓冲液的pH为9-10或为8.94-11.37，优选为pH 9.95。

在另一个实施方式中，在发光检测前，还包括用洗液洗去未结合的分析探针的步骤。在一个优选例中，所述分析方法为免疫分析方法，所述洗液为磷酸盐缓冲液，所述磷酸盐缓冲液的组成为磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠和氯化钾，优选所述磷酸盐缓冲液浓度为0.02 mol/L，其中磷酸二氢钾浓度为0.2 g/L、磷酸氢二钠浓度为2.9 g/L、氯化钠浓度为0.8 g/L、氯化钾浓度为0.2 g/L。在另一个优选例中，所述分析方法为核酸分析方法，所述洗液为含有氯化钠的Tris-HCl缓冲液，该缓冲液是由三羟甲基氨基甲烷、盐酸和氯化钠所组成，优选所述含氯化钠的Tris-HCl缓冲液的浓度为0.01 mol/L，pH为7.4-8.5，如7.4，其中三羟甲基氨基甲烷浓度为1.21 g/L、盐酸浓度为0.36 g/L、氯化钠浓度为5.85 g/L。

在本发明的第六方面中，提供了一种试剂盒，其包含本发明的分析探针或用于本发明的分析方法。除了本发明的分析探针之外，本发明的试剂盒还任选包含选自下组的物质：捕获探针、固相载体、固相载体修饰物、底液、洗液、缓冲液、一个或多个容器、化学发光发生和/或检测仪器；其中，所述固相载体、固相载体修饰物、捕获探针可任选的以修饰层/固相载体、捕获探针/修饰层或捕获探针/修饰层/固相载体的形式存在。

在本发明试剂盒中所包含的物质与上文所述的本发明分析方法中所用的物质相对应。

在本发明的其它方面中，还提供了本发明的功能化纳米金在制备探针、以及包含该探针的试剂盒中的用途。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。本发明其它方面由于本文的公开内容，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

与现有技术相比，本发明具有如下的优点：

1. 提供了一种新颖的 ABEI 功能化的纳米金材料，该材料具有制备简便、发光性能佳、形貌及粒径可控、应用范围广泛等特点：

a.首次采用 ABEI 还原氯金酸合成了纳米金，在合成过程中 ABEI 同时作为还原剂和稳定剂，无需在加入其它反应试剂。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，而是提供了一种新的纳米金的合成方法。本发明的方法具有简单、快速、无需特殊条件等优点。

b.本发明纳米金的形貌和粒径，可由 ABEI 和氯金酸的用量比来进行调控：可以通过调节步骤(1)中 ABEI 的量得到不同形貌的纳米金；还可以通过调节步骤(2)中氯金酸的量得到不同粒径的纳米金。由此，普通技术人员可非常简便地对纳米金的形貌和粒径进行调控，从而满足实际应用中的各种不同需要。

c. 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 ABEI,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。

2. 首次将 ABEI 发光功能化的纳米金用于分析探针,尤其使其作为免疫分析探针和核酸分析探针,进一步发展了分析技术(如免疫和核酸分析标记技术)。

a. 以 ABEI 发光功能化的纳米金用作分析探针,实现了在单个信号探针(即产生化学发光信号的分析探针)上多个信号分子 ABEI 的富集,发光效率远大于单个 ABEI 分子;另一方面,纳米金具有良好的生物兼容性,利用纳米金标记抗体或核酸等分子,最大程度上保持了这些分子的生物反应活性。此外,本发明的核酸探针中可采用单端基修饰的核酸,且目标分析物不需要标记,避免了核酸的双基团修饰和目标物的标记修饰,一定程度上降低了分析成本。因此,ABEI 发光功能化的纳米金用于分析探针(尤其是生物分析探针),是一种新颖、有效的多标记策略,可以大大提高化学发光分析方法的灵敏度。

b. 利用 ABEI 发光功能化的纳米金作为发光标记物,标记抗体或核酸等分子制备分析探针的方法简单、快捷、操作简便、结合效果好,克服了现有以发光试剂和酶为标记物的标记技术麻烦、费时的重要缺陷。

c. 基于 ABEI 发光功能化的纳米金分析探针所发明的发光分析方法,并任选结合双层纳米金的放大作用,使得目标分析物的检测限低,方法的灵敏度高、重现性好、可靠性强。实验证明,以测定人体心肌肌钙蛋白 cTnI 为例,采用本发明免疫分析探针的检测限可达到 2.0 pg/mL,该检测限比现行以纳米金和以发光试剂为标记物、采用双抗夹心模式的化学发光免疫分析低约 1-4 个数量级,且方法简便易行。本发明示例性 DNA 探针测定特定序列 DNA(即结核分支杆菌(*Tubercule bacillus*)的特异插入序列 IS6110 的基因保守序列,如 SEQ ID NO: 5 所示)检测限可达  $3.3 \times 10^{-16}$  mol/L。利用 ABEI 发光功能化的纳米金和人血小板源生长因子 BB 适配体探针测定人血小板源生长因子 BB 的检测限可达到  $2.7 \times 10^{-14}$  mol/L,其检测限比现有的 ELISA 测定人血小板源生长因子 BB 试剂盒低约 3 个数量级,且首次将发光试剂直接功能化纳米金用于适配体探针,方法简单、重现性好、成本低廉、可用于实际血清样品中人血小板源生长因子 BB 的检测。

因此,基于 ABEI 发光功能化的纳米金分析探针的化学发光分析方法,在临床分析、食品安全、环境监测和药物分析等领域具有巨大的应用潜力和良好的应用前景。

## 附图说明

下面结合附图对本发明作进一步说明。

图 1: 不同浓度的氯金酸和 ABEI 合成的 ABEI 发光功能化纳米金的电镜照片:

A: 1.0 mmol/L 氯金酸 + 0.5 mmol/L 的 ABEI + 1.0 mmol/L 氯金酸,得到呈单分散球状的 ABEI 发光功能化纳米金; B: 6 mmol/L 氯金酸 + 4 mmol/L 的 ABEI + 6

mmol/L 氯金酸，得到呈球状纳米金组装的链状的 ABEI 发光功能化纳米金；C：8 mmol/L 氯金酸 + 5 mmol/L 的 ABEI + 10 mmol/L 氯金酸，得到呈球状纳米金组装的网状的 ABEI 发光功能化纳米金；D：10 mmol/L 氯金酸 + 8 mmol/L 的 ABEI + 6 mmol/L 氯金酸，得到呈球状纳米金组装的网状的 ABEI 发光功能化纳米金。

5 图 2：以不同用量的氯金酸制备的不同粒径的 ABEI 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 ABEI + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸制备的 ABEI 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 ABEI + 7 mL 6 mmol/L 氯金酸制备的 ABEI 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 ABEI + 8 mL 6 mmol/L 氯金酸制备的 ABEI 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 ABEI + 9 mL 6 mmol/L 氯金酸制备的 ABEI 发光功能化纳米金，其粒径为 30 nm。

图 3：以不同用量的 ABEI 制备的不同形貌的 ABEI 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 ABEI + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸制备的 ABEI 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 ABEI + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸制备的 ABEI 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 ABEI + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸制备的 ABEI 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 ABEI + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸制备的 ABEI 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 ABEI 发光功能化纳米金的电镜照片，显示了以 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 5.0 mL 4 mmol/L ABEI + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸在 15℃(A)、25℃(B)、30℃(C)或 35℃(D)下制备的 ABEI 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 ABEI 发光功能化纳米金的影响，采用 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 5.0 mL 4 mmol/L ABEI + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 30.0 mL 的二次蒸馏水(图 5A)、纯净水(图 5B)或超纯水(图 5C)，在 25℃下制备所述 ABEI 功能化纳米金。

图 6：制备的 ABEI 发光功能化纳米金粒子的 X 射线电子能谱图与 ABEI 纯样的 X 射线电子能谱图，其中：A：ABEI 纯样中的 C1s 能谱；B：ABEI 纯样中的 N1s 能谱；C：制备的 ABEI 发光功能化纳米金的 C1s 能谱；D：制备的 ABEI 发光功能化纳米金的 N1s 能谱；E：制备的 ABEI 发光功能化纳米金的 Au4f 能谱。

图 7：制备的 ABEI 发光功能化纳米金粒子的紫外-可见吸收光谱图，其中：A：纯 ABEI 水溶液的紫外-可见吸收光谱；B：初始 ABEI 发光功能化纳米的紫外-可见吸收光谱；C：透析后的 ABEI 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 ABEI 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 ABEI 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液),其中:A: 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 4.5 mL 的 4 mmol/L 的 ABEI + 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 ABEI + 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 ABEI + 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 ABEI + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸;

图9: pH=13条件下ABEI合成的发光功能化纳米金与文献(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的发光比较示意图,其中:A: 500  $\mu\text{L}$ 经离心分离后的ABEI合成的发光功能化纳米金再注入400  $\mu\text{L}$ 浓度为0.1 mol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液的化学发光信号;B: 500  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ 浓度为0.1 mol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液的化学发光信号。

图10: 基于ABEI功能化纳米金制备的免疫和核酸分析探针的发光特性。

图11: 本发明化学发光免疫分析方法中通过修饰层连接在固相载体的捕获探针与目标分析物和分析探针形成的“夹心式”免疫复合物示意图。

图12: 基于ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针的电致化学发光免疫分析方法涉及的修饰电极制备过程示意图。

图13: 各种金电极的电致化学发光信号比较,所述的电极: a、裸金电极; b、1,3'-丙二硫醇修饰的金电极; c、链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极; d、目标分析物/捕获探针中的抗原分子/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极; 和e、ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针/目标分析物/捕获探针中的抗原分子/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极。

图14: 各种测定条件对电致化学发光信号的影响,所述的测定条件: a、碳酸盐底液pH; b、过氧化氢浓度; c、施加的脉冲电压; d、施加的脉冲周期; e、施加的脉冲时间; f、施加的起始电压。

图15: 用实施例II.4中最终确定的优化电致化学发光免疫分析方法测定人cTnI浓度的工作曲线,图中横坐标、纵坐标中的对数以10为底(即 $\log_{10}$ )。

图16: 用实施例II.4中优化的电致化学发光免疫分析方法检测不同样品所得的相对电致化学发光信号比较,所述样品: a、人cTnI; b、人肌红蛋白Mb; c、人IgG; d、牛血清蛋白BSA。相对化学发光强度 $\Delta I = I - I_0$ , I为各种被测物产生的电致化学发光信号,  $I_0$ 为没有被测物、其余操作相同时的空白信号。

图17: 本发明化学发光分析方法涉及的通过修饰层连接在固相载体的捕获探针与目标分析物和分析探针形成的“夹心式”复合物示意图。

图18: 基于ABEI发光功能化的的纳米金核酸分析探针的电致化学发光分析方法涉及的修饰电极制备过程示意图。

图19: 实施例III.3中各种金电极的电致化学发光信号比较,所述的电极: a、裸金电极; b、1,3'-丙二硫醇修饰的金电极; c、链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极; d、目标DNA/捕获探针中的DNA/生物素/链霉亲和素/纳米

金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极；和e、ABEI直接键合的纳米金DNA分析探针/目标物DNA/捕获探针中的DNA/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极。

图20：实施例III.3中的电致化学发光DNA分析方法测定实施例III.2中的目标DNA(即结核分支杆菌特异插入序列IS6110基因片段)的工作曲线，图中横坐标中的对数是以10为底的对数，即 $\log_{10}$ 。

图21：实施例III.4中各种金电极的电致化学发光信号比较，所述的电极：a、裸金电极；b、1,3'-丙二硫醇修饰的金电极；c、链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极；d、人血小板源生长因子BB /人血小板源生长因子BB适配体/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇的金电极；和e、实施例III.2中ABEI发光功能化的纳米金适配体分析探针/人血小板源生长因子BB/人血小板源生长因子BB适配体/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极。

图22：实施例III.4中的电致化学发光DNA分析方法测定实施例III.2中的人血小板源生长因子BB的工作曲线，其中横坐标中的对数是以10为底的对数。

图23：用实施例III.4的电致化学发光分析方法检测不同样品所得的相对电致化学发光信号强度比较，所述样品为：a、人血小板源生长因子BB；b、人免疫球蛋白G；c、葡萄糖氧化酶；d、血红蛋白；e、肌钙蛋白；以及f、空白。

### 具体实施方式

本发明人经过长期而深入的研究发现了可通过简单、快速的方式利用 ABEI 作为还原剂直接合成纳米金，即在合成过程中直接将 ABEI 作为保护试剂键合在纳米金的表面，以获得发光功能化的纳米金。并且，通过控制制备过程中 ABEI 和氯金酸的用量，可对本发明纳米金的形貌和粒径进行调控，以满足实际应用中的各种不同需要。本发明人还进一步对该功能化纳米金的应用进行了研究，证明了该功能化的纳米金可作为发光标记物构建分析探针，以及基于该分析探针可构建各种化学发光免疫分析及核酸分析等分析方法，从而可广泛用于临床分析、食品安全和药物分析等领域。在此基础上，本发明人完成了本发明。

下面对本发明得到的 ABEI 发光功能化纳米金、其制备方法、基于该发光功能化纳米金的分析探针、以及基于该分析探针的分析方法和相应试剂盒的具体实施方式进行详细描述。

#### 1. ABEI发光功能化纳米金

如本发明所用，术语“ABEI发光功能化纳米金”或“ABEI功能化纳米金”等可互换使用，均是指包含金纳米粒子和ABEI的连接物的功能化纳米金，所述ABEI通过共价键Au-N连接在所述金纳米粒子的表面。本发明的功能化纳米金具有发光特性，其与氧化剂反应可产生化学发光。

根据文献(U. Isacsson, G. Wettermark, Anal. Chim. Acta. 1974. 68. 339.)，可用于化学发光的氧化剂包括但不限于： $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2$ 、 $\text{ClO}^-$ 、 $\text{I}_2$ 、 $\text{IO}_4^-$ 、 $\text{MnO}_4^-$ 。本发明以 $\text{H}_2\text{O}_2$ 氧化剂为例，但本领域普通技术人员理解在实际应用中可用的氧化

剂及其用量并不仅限于本发明中所记载的具体方案。例如，本发明的功能化纳米金可与 $\text{H}_2\text{O}_2$ 反应产生化学发光，示例性的反应条件为：将0.1 mol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液注入到经离心分离后的功能化纳米金溶胶中；其中， $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液为400  $\mu\text{L}$ ，功能化纳米金溶胶为500  $\mu\text{L}$ 。

5 本发明功能化纳米金的形貌可呈单分散球状、球状纳米金组装的链状(例如链长为200-800纳米，更优选400-500纳米)、或球状纳米金组装的准网状或网状。如本文所用，术语“准网状”是指：介于链状和链状组成的网状之间的中间态。并且，本发明功能化纳米金的粒径大小也是可控的，其范围可为5-50纳米，优选8-40纳米，更优选10-30纳米。上述形貌和粒径特征可通过制备方法中的条件控制

10 控制和参数设定来控制(详见下文)。

## 2. ABEI发光功能化纳米金的制备

本发明中提供了简便、快速生产ABEI发光功能化纳米金的方法，该方法与现有技术中制备鲁米诺发光功能化纳米金的方法存在较大差异。

本发明的方法包括如下步骤：

15 (1) 将氯金酸水溶液A与ABEI水溶液混合，得到混合液；(2) 在步骤(1)所得的混合液中加入氯金酸水溶液B，混合形成功能化纳米金的金溶胶。优选步骤(1)和(2)中各混合液是混合均匀的，例如通过搅拌、涡旋等方式。

步骤(1)中氯金酸的物质的量是ABEI物质的量的1-6倍，优选1.5-5倍，最优选2-4倍；步骤(2)中氯金酸水溶液B中氯金酸的物质的量是步骤(1)中ABEI水溶液中ABEI的物质的量的0.5-5倍，优选0.8-4倍，最优选1-3倍。整个制备过程中氯金酸的物质的量可为ABEI物质的量的2-10倍，优选3-8倍，更优选3.5-6或3.7-5.5倍。

20

所述氯金酸水溶液A的摩尔浓度可为1-10 mmol/L，优选1-6 mmol/L，更优选1-4 mmol/L；或者其摩尔浓度为6-10 mmol/L，优选6-8 mmol/L或8-10 mmol/L。ABEI水溶液的摩尔浓度可为0.5-8.0 mmol/L，优选0.5-4.0 mmol/L，更优选0.5-3.0 mmol/L；或者其摩尔浓度为4.0-8.0 mmol/L，优选5.0-8.0 mmol/L。氯金酸水溶液B的摩尔浓度可为1-10 mmol/L，优选1-8 mmol/L，更优选1-6 mmol/L；或者其摩尔浓度可为6-10 mmol/L。

25

本发明所述的水溶液可为中性或碱性水溶液，优选ABEI水溶液的pH为7-14，更优选8-13，可用本领域常用的试剂和方法对水溶液的pH进行调整，例如加入NaOH。

30

本发明方法中，示例性的氯金酸水溶液A中氯金酸、ABEI水溶液中ABEI和氯金酸水溶液B中氯金酸的配比(摩尔比)为下述h1-h10中的任一种：

h1: 4: 1: 1; h2: 2: 1: 3; h3: 2.7: 1: 1.8; h4: 2.3: 1: 1.4;  
h5: 2.7: 1: 2.1; h6: 2.7: 1: 2.4; h7: 2.7: 1: 2.7; h8: 3: 1: 2;  
h9:  $\frac{27}{11}$ : 1:  $\frac{18}{11}$ ; h10: 2.25: 1: 1.5。

本发明功能化纳米金的示例性制备方法可采用如下具体步骤：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

35

4 mmol/L的ABEI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。本领域普通技术人员可根据具体的需要对上述方法中的具体条件进行适当调整。

本发明的方法还包括对所得功能化纳米金的金溶胶进行纯化和分离的步骤，例如通过离心(如17120 \* g，离心30-60分钟，优选45分钟)、透析、或它们的组合进行纯化。在进一步使用前可用二次蒸馏水或纯净水或超纯水溶解所得的功能化纳米金纯化分离物。

在本发明的制备方法中，步骤(1)和(2)的反应温度可以为10-40℃，优选15-35℃，更优选室温；反应时间通常为1-10小时，步骤(1)的反应时间为2小时以上，优选2-8小时，步骤(2)的反应时间为1.5小时以上，优选1.5-8小时。

配制所述氯金酸水溶液A、氯金酸水溶液B和ABEI水溶液所用的水的电阻率大于等于1.0 MΩ\*cm；可采用以任何合适的方法得到的符合上述电阻率的水，例如所述水可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。

可通过(例如)增加ABEI的量可以使得功能化纳米金的形貌由单分散球状向链状、准网状、和网状依次递变。可通过(例如)增加氯金酸的量，使得发光功能化纳米金的粒径逐渐增加。

通过本发明方法所得的ABEI功能化纳米金，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。

在理解了本发明之后，本领域普通技术人员可根据需要(例如功能化纳米金颗粒的形貌或粒径)对各物质的用量、摩尔浓度及相互比例、以及反应条件等进行适当调整。

### 3. 基于ABEI发光功能化纳米金的分析探针

本发明ABEI发光功能化纳米金因具有优异的发光性能，而可用作各种分析探针中的发光标记物从而进一步用于检测领域。如本发明所用，术语“分析探针”或“本发明的分析探针”是指包含本发明的ABEI功能化纳米金的、可用于检测和分析样品中目标分析物的标记性分子。本发明的分析探针可为化学发光分析探针，更优选为电致化学发光分析探针。

本发明的分析探针中ABEI功能化纳米金可与探测分子直接或间接相连。如本文所用，术语“探测分子”是分析探针中与产生发光信号的功能化纳米金相连的分子。根据所采用的分析方法不同，探测分子可采用不同类型的分子，例如在夹心式分析法中，探测分子可为与目标分析物具有结合特异性的结合分子；在竞争分析法中，探测分子可为与目标分析物竞争性结合捕获探针的分子。本领域普通技术人员可根据所用的分析方法和目标分析物的种类，对探测分子进行选择，并可基于所选定探测分子的具体结构对其与功能化纳米金的连接方式进行选择。

本发明的示例性分析探针根据探测分子的不同可分为免疫分析探针、核酸

分析探针等类型。

### A.免疫分析探针

如本文所用，“免疫分析探针”是指可用于免疫分析中、包含本发明功能化纳米金的分析探针，其可用于通过高特异性的免疫反应对各种抗原、半抗原、  
5 抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素和药物等物质进行分析。其中的探测分子可  
为例如抗体、抗原或半抗原、或它们的活性片段(如Fab、(Fab')<sub>2</sub>等)。

可通过结合对(如生物素体系)使得本发明的功能化纳米金与探测分子结合。  
采用该方法制备本发明免疫分析探针的示例性过程如下：

A)将本发明所得到的ABEI直接还原氯金酸的纳米金溶胶中加入链霉亲和  
10 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ABEI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  
15 素修饰的抗体溶液，在37 °C下孵育30分钟，在17120 \* g下离心30分钟，以除去  
未与纳米金连接或与纳米金表面弱结合的ABEI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。

也可使得本发明的功能化纳米金与探测分子直接连接得到本发明免疫分析  
20 探针，其示例性制备方法如下：将0.5 mL的1.0 mg/mL抗体分子加到用0.1 mol/L  
的氢氧化钠将pH调至8.0的本发明功能化纳米金的溶液中去，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  
25 米金表面弱结合的ABEI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。

### B.核酸分析探针

如本文所用，术语“核酸分析探针”或“核酸探针”可互换使用，是指以  
本发明的ABEI功能化的纳米金标记的核酸单链，如单链DNA、单链RNA或适配  
30 体单链(相应称为DNA探针、RNA探针和适配体探针)等，其可用于DNA、RNA、  
金属离子、有机物、氨基酸、肽等目标分析物的分析。

对核酸探针中核酸单链的序列和碱基数并无特殊限制，只要其能与目标分  
析物特异性结合或与目标分析物竞争性结合捕获分子即可。优选的核酸单链序  
列可为与目标分析物互补的核酸序列(特异性结合)、与目标分析物具有相同序列  
35 的核酸序列(竞争性结合)、或目标分析物的适配体核酸序列。本领域技术人员可  
根据现有技术中已知的设计针对目标分析物的适配体的方法(例如参见Bing, T.  
et al., Biosens Bioelectron, 2010,25,1487)设计用于本发明的适配体，或可通过市  
售获得适配体分子。优选本发明核酸探针中核酸单链的碱基数为5-500bp，更优

选10-200bp。

本发明的核酸分析探针中可采用单端基修饰的核酸与ABEI功能化的纳米金连接，而无需对目标分析物进行标记，避免了核酸的双基团修饰和目标物的标记修饰，一定程度上降低了分析成本和简便了分析过程。

- 5 本发明核酸分析探针中的核酸分子可与功能化纳米金通过结合对连接或通过修饰的端基基团连接，其示例性的制备方法如a或b所述：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。

本发明核酸分析探针的制备方法a，可例如包括步骤：

- 10 q1)在本发明的ABEI功能化纳米金的溶胶中加入链霉亲和素，使链霉亲和素终浓度为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，使牛血清白蛋白最终浓度为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ABEI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，  
15 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  $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1小时，在17120 \* g下离心10分钟，以除去未与纳米金连接的核酸分子和纳米金表面弱结合的ABEI分子，将所得沉淀分散于250  $\mu\text{L}$ 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  
20 功能化的纳米金核酸分析探针。

本发明核酸分析探针的制备方法b，可例如包括步骤：

- 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  
25 合的ABEI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。

- 以上仅是制备本发明核酸探针的示例性方法，在具体制备时所能采用的方法并不局限于此，而可包括任何能使纳米金与核酸连接的方法，例如以下文献所报道的方法：Zhou, X.M. et al., Anal. Chem. 2009, 81, 255; Li, B.L. et al., Anal.  
30 Chem. 2009, 81, 255; Hazarika, P. et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2004, 43, 6469; Li, M. et al., J. Mater. Chem. 2004, 14, 2260; Steel, A. B. et al., Anal. Chem. 1998, 70, 4670; Zhang, J. et al., Nature Protocols 2007, 2, 2888; Fan, A.P. et al., Analyst 2008, 133, 219。

#### 4. 分析方法及试剂盒

- 35 在本发明中还提供了采用本发明探针进行样品分析的方法，以及与该方法对应的试剂盒。应理解，在获得了本发明的功能化纳米金或分析探针之后，本领域普通技术人员可根据具体的需要和本领域中的常识，将该功能化纳米金或分析探针灵活应用于各种分析方法中以及制备和使用包含本发明功能化纳米金

或分析探针的各种相应试剂盒。

本发明的分析方法可广泛应用于各种领域和各种样品的检测和分析，包括(但不限于)生物样品、食品或饮料样品、药物样品、环境样品、化学样品的检测和分析。生物样品可为临床样品或实验室样品，例如血液、血浆、血清、尿液、粪便、痰液、分泌物(如汗液、泪液等)、培养物等；所述环境样品可为空气样品、水样、土壤样品；所述化学样品可包括中间物、终产物等等。

本发明分析方法所针对的目标分析物包括但不限于：微生物(如病毒、细菌、真菌)、蛋白质或多肽(如抗原、半抗原、抗体、肽类激素、酶)、核酸(如DNA、RNA片段)、脂肪酸、维生素、药物等。本发明中示例性的目标分析物包括：蛋白质或多肽(如心肌肌钙蛋白、人血小板源生长因子)、特定序列的核酸序列(如结核分支杆菌的特异插入序列IS6110的基因保守序列)。优选本发明的分析方法所针对的目标分析物为疾病特异性标志物，从而可在临床上用于疾病的诊断、分型和疗效评估等。

本发明的分析方法中包括夹心式分析法，该方法中所用分析探针包含对目标分析物具有结合特异性的结合分子，通过该结合分子，分析探针与目标分析物和捕获探针(优选偶联于固相载体上)可结合形成分析探针/目标分析物/捕获探针夹心复合物。所述分析方法在包括但不限于下面例举的文献中报道：Tang, J. et al., Biosens. Bioelectron., 2010, 25, 2657; Ambrosi, A. et al., Anal. Chem., 2010, 82, 1151; Zhang, S.S. et al., Anal. Chem., 2008, 80, 7206; Pavlov, V. et al., J. Am. Chem. Soc., 2004, 126, 11768。

本发明的分析方法中也可采用竞争分析法，该方法中所用分析探针包含与目标分析物竞争结合捕获探针的竞争性分子。所述分析方法包括但不限于下面例举的文献报道：Chen, L.F. et al., Chem. Comm. 2010, 46, 7751; Liu, J. et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2005, 45, 90; Zhang, Y.X. et al., Chromatographia 2007, 66, 539; Zhang, R.Q. et al., Anal. Chim. Acta. 2007, 600, 105。

#### A.采用免疫分析探针的免疫分析法

如本文所用，“化学发光免疫分析”是指将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应结合，用于各种抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素和药物等的检测分析技术。在本发明中，该术语特指采用本发明ABEI发光功能化纳米金作为其中化学发光标记分子的化学发光免疫分析。

例如，采用夹心式免疫分析法时，本发明的分析方法可包括如下步骤：

A、提供本发明的免疫分析探针；

B、提供固相载体，或组装有具有连接功能的修饰层的修饰层/固相载体；

C、孵育捕获探针与步骤B的固相载体或修饰层/固相载体，使捕获探针连接到固相载体或修饰层/固相载体上，形成捕获探针/固相载体复合物或捕获探针/修饰层/固相载体复合物；

D、孵育目标分析物与步骤C所得到的复合物，使所述复合物与目标分析物结合，形成目标分析物/捕获探针/固相载体复合物或目标分析物/捕获探针/修饰

层/固相载体复合物；

E、孵育步骤D所得到的复合物与步骤A的分析探针，形成分析探针/目标分析物/捕获探针/固相载体夹心式免疫复合物或分析探针/目标分析物/捕获探针/修饰层/固相载体夹心式复合物；

5 F、检测步骤E所得到的夹心式复合物的发光。

应理解，本发明也包括将步骤B和C替换为直接提供捕获探针/固相载体或捕获探针/修饰层/固相载体复合物(如通过市售获得)。

可用于本发明方法中的固相载体包括但不限于电极材料、磁微珠、微孔板、尼龙、玻璃、聚合物微珠等。可用于本发明方法中的捕获探针优选为针对目标分析物的抗体或连接有桥联分子的抗体，所述抗体可通过任何现有方法连接到固相载体上。这些现有方法包括但不限于下面例举的文献报道：Yin, X. B. et al., Anal. Chem. 2004, 77, 3525; Wang, Z. P. et al., Clin. Chem. 2006, 52, 1958; Jie, G. F. et al., Anal. Chem. 2007, 79, 5574; Zhan, W. et al., Anal. Chem. 2007, 79, 459; Yang, Z. J. et al., Adv. Funct. Mater. 2008, 18, 3991; Miao, W. J. et al., Anal. Chem. 2003, 75, 5825。

15 固相载体上也可组装有修饰层。所述修饰层由下述1)和2)的物质组成：1)具有连接功能的桥联分子或具有连接功能的桥联基团；2)连接有链霉亲和素的纳米金；所述连接有链霉亲和素的纳米金通过所述桥联分子或所述桥联基团连接到所述固相载体上。

20 上述化学发光分析方法步骤B中在固相载体上组装具有连接功能的修饰层的方法为下述a) 或b)：

a) 所述固相载体为电极，所述修饰层中的连接有链霉亲和素的纳米金通过所述桥联分子连接到所述电极上；所述电极为金电极时，所述桥联分子为双巯基化合物或同时具有氨基和巯基的化合物，所述双巯基化合物优选为1,3'-丙二硫醇；所述电极为氧化铟锡电极时，桥联分子为3-巯丙基-三甲氧基硅烷，桥联分子可通过文献 Fang, L.Y. et al., Anal.Chimi. Acta, 2008, 628, 80所述方法连接到氧化铟锡电极上；所述电极为玻碳电极时，所述桥联分子为双巯基化合物、双氨基化合物、具有巯基或氨基的硅烷化试剂或同时具有氨基和巯基的化合物，优选为半胱氨酸，桥联分子可通过文献Wei, X. et al., Analyst 2010, 135, 2286所述方法连接到玻碳电极上；所述电极为铂电极时，所述桥联分子为同时具有氨基和巯基的化合物，优选为半胱氨酸，桥联分子可通过文献Yang, G. et al., Colloids Surf. B Biointerfaces 2008, 61, 93所述方法连接到铂电极上。

35 b) 所述固相载体为磁微珠或尼龙，根据文献Weizmann, Y. et al., J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 3452或Nan, C. F. et al., Enz. Microb. Technol. 2009, 44, 249所述方法，所述修饰层中连接有链霉亲和素的纳米金通过所述桥联基团连接到氨基化磁微珠或尼龙上，所述桥联基团为氨基；所述固相载体为微孔板或玻璃时，所述修饰层中的连接有链霉亲和素的纳米金通过所述桥联基团连接到巯基或氨基化的微孔板或玻璃上，所述桥联基团为巯基或氨基，所述巯基或氨基化的微孔板或玻璃可直接从商业渠道购买。

上述步骤B中的修饰层可包含连接有链霉亲和素的纳米金，其粒径可为10-38 nm，优选为16 nm；所述纳米金为柠檬酸盐保护的纳米金。

捕获探针可通过任何现有连接蛋白质或多肽与纳米金的方法连接到固相载体上。这些现有方法包括但不限于下面例举的文献报道：Yin, X. B. et al., Anal. Chem. 2004, 77, 3525; Wang, Z. P. et al., Clin. Chem. 2006, 52, 1958; Gonzalez-Garcia, M. B. et al., Biosens. Bioelectron. 2000, 15, 315。可将捕获探针中的抗体分子端基生物素化，通过链霉亲和素与生物素的特异性相互作用将捕获探针中的抗体分子连接于纳米金修饰的固相载体上。也可将捕获探针中的抗体分子直接连接于纳米金修饰的固相载体上。即捕获探针可为端基生物素化的抗体分子或未修饰的抗体分子本身。本发明优选端基生物素化的抗体分子为捕获探针，通过链霉亲和素将捕获探针连接于纳米金修饰的固相载体上。

进一步地，本发明所述化学发光免疫分析方法为电致化学发光免疫分析方法。此时，所述固相载体为电极。含有修饰层的电极本发明优选为纳米金修饰的电极，所述纳米金修饰的电极可为纳米金修饰的金电极、纳米金修饰的铂电极、纳米金修饰的玻碳电极、纳米金修饰的石墨电极、纳米金修饰的石墨充蜡电极和纳米金修饰的氧化铟锡电极之一。本发明优选为纳米金修饰的金电极，纳米金修饰金电极可通过桥联分子连接到电极上，可选用的桥联分子包括但不限于双巯基化合物、同时具有氨基和巯基的化合物等。

这里所述的纳米金修饰的金电极，其中纳米金为连接链霉亲和素的纳米金。可以从任何商业渠道购买或用文献方法合成。所述纳米金为柠檬酸盐保护的纳米金，其粒径为10-38 nm，本发明优选为16 nm。

以优选条件端基修饰生物素的抗体分子为捕获探针，纳米金修饰的金电极为组装有修饰层的固相载体为例，本发明的电致化学发光免疫分析方法包括以下步骤：

a、合成上述任一种ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针；

b、在洁净纯金电极上修饰桥联分子，通过该分子的连接作用，将表面连接有链霉亲和素的纳米金组装到金电极上，得到链霉亲和素/纳米金/桥联分子/金电极；

c、孵育捕获探针(端基修饰有生物素的抗原分子)与步骤b得到链霉亲和素/纳米金/桥联分子/金电极，得到捕获探针中的抗原分子/生物素/链霉亲和素/纳米金/桥联分子/金电极；

d、孵育含有目标分析物的样品与步骤c所得到的捕获探针中的抗原分子/生物素/链霉亲和素/纳米金/桥联分子/金电极，使目标分析物连接到捕获探针上，得到目标分析物/捕获探针中的抗原分子/生物素/链霉亲和素/纳米金/桥联分子/金电极；

e、孵育步骤a所得到的ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针与步骤d所得到的目标分析物/捕获探针中的抗原分子/生物素/链霉亲和素/纳米金/桥联分子/金电极，得到ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针/目标分析物/捕获探针中的抗原分子/生物素/链霉亲和素/纳米金/桥联分子/金电极；

f、将步骤e所得到的ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针/目标分析物/捕获探针中的抗原分子/生物素/链霉亲和素/纳米金/桥联分子/金电极放入电致化学发光

池中，加入底液，施加电压，产生化学发光，用发光仪进行检测。

步骤b是通过双巯基化合物将连接有链霉亲和素的纳米金通过双巯基化合物修饰在金电极的表面，所述双巯基化合物优选为1,3'-丙二硫醇。所述步骤f中的底液可为含有过氧化氢的碳酸盐缓冲液。所述步骤f中所施加的工作电压可为脉冲电压、  
5 循环伏安或线性伏安。本发明优选为脉冲电压，所述脉冲电压可为双阶脉冲电压。

下面以金电极为固相载体、纳米金修饰的金电极为组装有修饰层的固相载体、端基修饰有生物素的抗体分子为捕获探针、以电化学方法诱导化学发光为例，具体说明本发明的可用于多种分析物测定的电致化学发光免疫分析方法的步骤。

(1) 制备ABEI发光功能化纳米金免疫分析探针(同前);

10 (2) 制备纳米金修饰的电极

a-2. 将表面打磨为镜面并经超纯水、乙醇超声清洗后的裸金电极放入2 mmol/L的1,3'-丙二硫醇中，在常温下浸泡20小时，取出后用乙醇和超纯水清洗，获得1,3'-丙二硫醇修饰的金电极；

b-2. 将连接链霉亲和素的纳米金滴在步骤a-2制得的1,3'-丙二硫醇修饰电极上，  
15 在4℃暗处中放4小时，取出后用超纯水清洗，得到链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极；

其中，连接链霉亲和素的纳米金按照如下方法制备：

i). 将0.01wt%的HAuCl<sub>4</sub>溶液加热至沸，在冷凝回流并充分搅拌的条件下，加入2.0-5.0 mL 含有1wt%柠檬酸三钠的溶液，保持沸腾并继续搅拌回流反应45 分钟，  
20 然后除去加热源继续搅拌30分钟以上，得到颗粒直径为10-38 nm的纳米金溶液；

ii). 在步骤i)所得的纳米金溶胶中加入链霉亲和素，使其终浓度为1 μg/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45分钟，以除去未反应试剂，  
25 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磷酸盐缓冲液分散，得到连接链霉亲和素的纳米金。

(3) “夹心式”复合物在纳米金修饰电极上的固载

a-3. 将捕获探针即端基生物素化的一抗分子溶液滴加到步骤(2)得到的修饰电极上，在37℃下作用40分钟后，用0.02 mol/L pH=7.4的磷酸盐缓冲溶液清洗，得到捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极；然后将  
30 1%(w/w)的牛血清白蛋白滴在捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极，在37℃下作用40分钟，再用0.02 mol/L pH=7.4的磷酸盐缓冲溶液清洗；

b-3. 将抗原作为目标分析物滴加到步骤a-3得到的捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极上面，在37℃下作用40分钟，再用  
35 0.02 mol/L pH=7.4的磷酸盐缓冲溶液清洗，得到抗原/捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极；

c-3. 将步骤(1)得到的ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针滴加在步骤b-3得到的抗原/捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金

电极上, 在37℃下作用40分钟后, 用0.02 mol/L pH=7.4的磷酸盐缓冲溶液清洗, 得到ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针和待测抗原经特异性结合的修饰电极, 即如图2所示的ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针/抗原/捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极;

#### 5 (4)电致化学发光免疫测定

将(3)中所得的修饰电极, 即ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针/抗原/捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极放入电致化学发光池中, 加入含有1 mmol/L过氧化氢的0.02 mol/L pH=9.95的碳酸盐底液, 施加脉冲电压为0.8 V、脉冲周期为30 s、脉冲时间为0.1 s、起始电压为0 V的双阶脉冲电压, 产生化学发光, 用发光仪进行检测。

以目标分析物为人体心肌肌钙蛋白cTnI为例, 步骤(3)a-3中所述端基生物素化的一抗可为生物素标记的抗人cTnI单克隆抗体; 步骤(3)b-3中所述抗原可为人体心肌肌钙蛋白cTnI; 步骤(3)c-3中所述ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针可为ABEI发光功能化的纳米金标记的抗人cTnI单克隆抗体。

#### 15 B. 采用核酸分析探针的分析方法

本发明中采用核酸探针的分析方法中可采用与免疫分析方法中相同或类似的总体步骤、固相载体、修饰层、检测方式及分析仪器(可参考“A.采用免疫分析探针的免疫分析法”)。

在采用本发明核酸分析探针的分析方法中所采用的捕获探针可为端基修饰有桥联分子或桥联基团的核酸分子(如DNA、RNA或适配体分子)、或抗体或连接有桥联分子的抗体等, 只要其能与目标分析物和/或分析探针特异性结合。

当捕获探针是核酸分子时, 其采用端基巯基或氨基化的核酸分子同固相载体表面的氨基或羧基等形成共价键而将核酸连接于固相载体表面, 或利用生物素与链霉亲和素或中性亲和素的亲和作用, 将生物素化的核酸分子连接于表面链霉亲和素或中性亲和素化的固相载体上。所述捕获探针可通过任何现有方法连接到固相载体上, 这些现有方法包括但不限于下面列举的文献报道: Livache, T. et al., *Nucleic Acids Res.* 1994, 22, 2915; Zhao Y.D. et al., *Talanta* 1999, 49, 751。

捕获探针也可通过任何现有连接核酸与纳米金的方法连接到固相载体上。这些现有方法包括但不限于下面列举的文献报道: Li, Y. et al., *Microchim. Acta.* 2009, 164, 69; Zhang, Z.Y. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 118。可将捕获探针中的核酸分子端基巯基化, 通过巯基与纳米金表面形成Au-S键而将核酸分子自组装在纳米金表面, 此纳米金可与巯基化的固相载体进行自组装, 将捕获探针中的核酸分子连接到纳米金修饰的固相载体上。也可将捕获探针中的核酸分子端基生物素化, 通过链霉亲和素与生物素的特异性相互作用将捕获探针中的核酸分子连接于纳米金修饰的固相载体上。即捕获探针可为端基生物素化的核酸分子或端基巯基化的核酸分子。本发明优选端基生物素化的核酸分子为捕获探针, 通过链霉亲和素将捕获探针连接于纳米金修饰的固相载体上。

下面以金电极为固相载体、纳米金修饰的金电极为组装有修饰层的固相载

体、端基修饰生物素的核酸分子为捕获探针、以电化学方法诱导化学发光为例，具体说明本发明的可用于多种分析物测定的电致化学发光分析方法的步骤。

1) 提供本发明的ABEI功能化纳米金核酸分析探针；

2) 提供纳米金修饰的电极；

5 3) “夹心式”复合物在纳米金修饰电极上的固载

a-3. 将捕获探针即端基生物素化的核酸分子溶液滴加到步骤2)所得的修饰电极上，在37℃下作用60分钟后，用含0.1 mol/L氯化钠的0.01 mol/L pH=7.4 Tris-HCl缓冲溶液清洗，得到捕获探针中的核酸分子/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极；然后将1%(w/w)的牛血清白蛋白滴加在捕获探针中的核酸分子/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极，在37℃下作用40分钟，再用含0.1 mol/L氯化钠的0.01 mol/L pH=7.4 Tris-HCl缓冲溶液清洗；

b-3. 将目标分析物滴加到步骤a-3得到的捕获探针中的核酸分子/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极表面，在37℃下作用60分钟，再用含0.1 mol/L氯化钠的0.01 mol/L pH=7.4 Tris-HCl缓冲溶液清洗，得到连接目标分析物和捕获探针的修饰电极，即目标分析物/捕获探针中的核酸分子/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极；

c-3. 将步骤1)得到的ABEI发光功能化的纳米金核酸分析探针滴加在步骤b-3得到的目标分析物/捕获探针中的核酸分子/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极上，在37℃下作用60分钟后，用含0.1 mol/L氯化钠的0.01 mol/L pH=7.4 Tris-HCl缓冲溶液清洗，得到ABEI发光功能化的纳米金核酸分析探针和待测分析物经杂交或适配体特异性反应结合的修饰电极，即ABEI发光功能化的纳米金核酸分析探针/目标分析物/捕获探针中的核酸分子/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极；

25 4)电致化学发光测定

将3)中所得的修饰金电极，放入电致化学发光池中，加入含有1.75 mmol/L过氧化氢的0.02 mol/L pH=9.8的碳酸盐底液，施加脉冲电压0.8 V、脉冲周期30 s、脉冲时间0.1s、起始电压0 V的双阶脉冲电压，产生化学发光，用发光仪检测电致化学发光信号。

30 步骤3)中所述目标分析物为某一特定序列DNA、RNA或适配体分子对应配体。步骤1)和3)中ABEI发光功能化的纳米金核酸分析探针中的核酸分子，以及所述步骤3)中所述捕获探针中的核酸分子均可为DNA、RNA或适配体分子。当目标分析物为DNA或RNA时，所述核酸分析探针中所述的DNA或RNA的序列与目标DNA或RNA的一部分序列互补，所述捕获探针中所述的DNA或RNA的序列与目标DNA或RNA的另一部分序列互补。当目标分析物为适配体分子对应配体时，所述核酸分析探针和所述捕获探针中的所述适配体分子均与适配体分子对应配体具有特异性相互作用。

### C. 试剂盒

本发明中还提供了包含本发明功能化纳米金或分析探针、和/或可用于本发明分析方法的试剂盒。除了本发明的分析探针以外，本发明的试剂盒还任选包含选自下组的物质：捕获探针、固相载体、固相载体修饰物、底液、洗液、缓冲液、一个或多个容器、化学发光发生和/或检测仪器；其中，所述固相载体、固相载体修饰物、捕获探针可任选的以修饰层/固相载体、捕获探针/修饰层或捕获探针/修饰层/固相载体的形式存在。本发明的试剂盒中还任选包含记载了其使用方法的说明书。

本发明试剂盒中包含的物质与本发明分析方法中所用的物质对应，本领域普通技术人员可根据所用分析方法对试剂盒中所包含的物质进行选择和搭配。

## 实施例

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件(例如可参考通常按照常规条件如《分子克隆：实验室指南》中所述的条件、或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

### 实施例I：ABEI发光功能化纳米金的制备工艺研究、表征及应用

#### 实施例I.1：ABEI发光功能化纳米金的合成

该实施例中的氯金酸水溶液A、氯金酸水溶液B和ABEI水溶液均由超纯水(电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ )配制。纯化条件：将1 ml如下制得的金溶胶在 $17120 \times g$ 下离心45分钟后，再用超纯水溶解沉淀物，得到纯化的功能化纳米金。表征方法：电镜(Jeol Ltd., JEOL-2010, 日本)。ABEI购自TCI东京化成工业株式会社，CAS号为66612-29-1。

#### A. 1.0 mmol/L 氯金酸 + 0.5 mmol/L 的ABEI + 1.0 mmol/L 氯金酸

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 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ )在 $25^\circ\text{C}$ 下搅拌，加入5 mL 0.5 mmol/L的ABEI水溶液后持续搅拌2小时，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ABEI发光功能化的纳米金溶胶，避光保存在 $4^\circ\text{C}$ 下。

纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明：合成的ABEI发光功能化的纳米金的形貌呈单分散球型(如图1A所示)，单分散球的粒径大小以16纳米为主。

#### B. 6 mmol/L 氯金酸 + 4 mmol/L 的ABEI + 6 mmol/L 氯金酸

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 $25^\circ\text{C}$ 下搅拌，加入5 mL 4 mmol/L的ABEI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ABEI发光功能化的纳米金溶胶，避光保存在 $4^\circ\text{C}$ 下。

纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明：合成的ABEI发光功能化的纳米金的形貌呈球状纳米金组装的链状(图1B)，单分散球的粒径以18纳米为主。

C. 8 mmol/L 氯金酸 + 5 mmol/L 的ABEI + 10 mmol/L 氯金酸

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 MΩ\*cm)在25℃下搅拌，加入8 mL 5 mmol/L的ABEI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ABEI发光功能化的纳米金溶胶，避光保存在4℃下。

纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明：合成的ABEI发光功能化的纳米金的形貌呈球状纳米金组装的网状(图1C)，单分散球的粒径以10纳米为主。

D. 10 mmol/L 氯金酸 + 8 mmol/L 的ABEI + 6 mmol/L 氯金酸

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 MΩ\*cm)在25℃下搅拌，加入8 mL 8 mmol/L的ABEI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ABEI发光功能化的纳米金溶胶，避光保存在4℃下。

纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明：合成的ABEI发光功能化的纳米金的形貌呈球状纳米金组装的网状(图1D)，单分散球的粒径以9纳米为主。

实施例 I.2: ABEI 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

该实施例中的氯金酸水溶液A、氯金酸水溶液B和ABEI水溶液均由超纯水(电阻率为18.2 MΩ\*cm)配制。纯化条件和表征方法同实施例I.1。

A. 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 5 mL 4 mmol/L 的ABEI + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸

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ABEI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ABEI发光功能化的纳米金溶胶，避光保存在4℃下。

纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明：合成的ABEI发光功能化纳米金的粒径以18纳米为主(图2A)。

B. 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 5 mL 4 mmol/L 的ABEI + 7 mL 6 mmol/L 氯金酸

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ABEI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ABEI发光功能化的纳米金溶胶，避光保存在4℃下。

纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的ABEI发光功能化纳米金的粒径以22纳米为主(图2B)。

C. 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 5 mL 4 mmol/L 的ABEI + 8 mL 6 mmol/L 氯金酸

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ABEI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ABEI发光功能化的纳米金溶胶, 避光保存在4℃下。

纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的ABEI发光功能化纳米金的粒径以25纳米为主(图2C)。

*D. 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 5 mL 4 mmol/L 的ABEI + 9 mL 6 mmol/L 氯金酸*

- 5 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ABEI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ABEI发光功能化的纳米金溶胶, 避光保存在4℃下。

- 10 纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的ABEI发光功能化纳米金的粒径以30纳米为主(图2D)。

### 实施例I.3: ABEI发光功能化纳米金的合成方法中ABEI的量对形貌的影响

该实施例中的氯金酸水溶液A、氯金酸水溶液B和ABEI水溶液均由超纯水(电阻率为18.2 MΩ\*cm)配制。纯化条件和表征方法同实施例I.1。

- 15 A. 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 4.5 mL 4 mmol/L 的ABEI + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸

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4.5 mL 4 mmol/L 的ABEI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ABEI发光功能化的纳米金溶胶, 避光保存在4℃下。

- 20 纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的ABEI发光功能化纳米金的形貌呈单分散球型, 粒径以11纳米为主(图3A)。

B. 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 5.0 mL 4 mmol/L 的ABEI + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸

- 25 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ABEI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ABEI发光功能化的纳米金溶胶, 避光保存在4℃下。

纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的ABEI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(图3B)。

- 30 C. 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 5.5 mL 4 mmol/L 的ABEI + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸

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5.5 mL 4 mmol/L 的ABEI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ABEI发光功能化的纳米金溶胶, 避光保存在4℃下。

- 35 纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的ABEI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(图3C)。

D: 9 mL 6 mmol/L 氯金酸+ 6 mL 4 mmol/L 的ABEI + 6 mL 6 mmol/L 氯金酸

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6 mL 4 mmol/L的ABEI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ABEI发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在4℃下。

纯化后的功能化纳米金经电镜分析结果表明合成的ABEI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(图3D)。

#### 实施例 I.4: 温度对 ABEI 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 MΩ\*cm)分别在不同温度(即: A.15℃; B.25℃; C.30℃; 和D.35℃)下搅拌,加入5 mL 4 mmol/L的ABEI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ABEI发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在4℃下。将所述金溶胶通过离心纯化进行电镜表征。该实施例中的氯金酸水溶液A、氯金酸水溶液B和ABEI水溶液均由超纯水(电阻率为18.2 MΩ\*cm)配制。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分别如图4A-D所示,结果表明:在15℃、25℃、30℃和35℃下分别合成的ABEI发光功能化纳米金的粒径分别以13 纳米(图4A)、18纳米(图4B)、8纳米(图4C)和10纳米(图4D)为主。

#### 实施例 I.5: 二次蒸馏水、纯净水和超纯水对 ABEI 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各种不同的水[即 A. 二次蒸馏水(电阻率为1.0 MΩ\*cm); B. 纯净水(电阻率为6.1 MΩ\*cm); C. 超纯水(电阻率为18.2 MΩ\*cm)]在25℃下搅拌,加入5 mL 4 mmol/L的ABEI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ABEI发光功能化的纳米金溶胶,避光保存在4℃下。氯金酸水溶液A、氯金酸水溶液B和ABEI水溶液均用相应的水配制。

将金溶胶离心纯化后进行电镜表征。纯化条件为:将1 ml所述金溶胶在17120 \* g下离心45分钟后,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分别如图5A-C所示,结果表明:用二次蒸馏水、纯净水和超纯水分别制备的ABEI发光功能化纳米金的粒径分别以8纳米(图5A)、20纳米(图5B)和18纳米(图5C)为主。

#### 实施例I.6: ABEI直接还原氯金酸得到的发光功能化纳米金的表征

将实施例 I.1 中得到的图 1B 的金溶胶和市售的 ABEI 纯样品(购自 TCI 东京化成工业株式会社, CAS 号为 66612-29-1)分别通过经透析、盐析、两次离心-洗涤并干燥纯化进行表征。

纯化条件为:1.渗析: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 ABEI 及其氧化产物;

2.盐析：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；3.二次离心-洗涤：将所述金溶胶在盐析的作用后经 17120 \* g 下离心 45 分钟后，再用超纯水将沉淀物溶解；4.干燥：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℃。

图6是如上纯化所得ABEI纯样品和ABEI发光功能化纳米金纳米粒子的 Au4f、C1s和N1s的X射线光电能谱(ESCALABMK II electron spectrograph, VG Scientific, 英国, ABEI发光功能化纳米金纳米样品首先经过离心然后再经红外灯干燥后进行测试)。图6A和B分别为ABEI纯样中的C1s能谱和N1s能谱；图6C-D 分别为ABEI发光功能化纳米金的C1s能谱、N1s能谱和Au4f能谱。

图6E显示 Au4f双峰(Au4f<sub>7/2</sub>和Au4f<sub>5/2</sub>)的自旋-轨道裂分为3.7 eV，与文献 (Ganesan, P. G. et al., *Appl. Phys. Lett*, 2004, 85, 579.)报道的零价金纳米粒子相一致。如图6A所示，ABEI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ABEI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(-CO-NH-)所致。图6C则显示了ABEI还原的金纳米粒子的C1s能谱。与ABEI纯样的C1s能谱相比，发现了一个位于288.1 eV的新组分，其它组分的位置基本与ABEI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ABEI的各种碳组分，而288.1 eV的新组分对应于ABEI的氧化产物中的羧基碳组分。这一结果表明ABEI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。如图6B所示，ABEI纯样品包含的399.5 eV和400.8 eV 的组分，而ABEI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(-NH<sub>2</sub>)和酰胺氮原子(-CO-NH-)。考虑到ABEI及其氧化产物中均含有氨基氮原子而酰胺氮原子则为ABEI所独有，这个结果进一步支持ABEI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. et al., *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 (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) 组分 (Seitz O. et al., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2003, 218, 225.)，从而排除了ABEI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ABEI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I.1中得到的图1B的ABEI发光功能化纳米金。为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(图7)。渗析条件为：渗析过程是将金溶胶在常温下渗析2天，每8小时换一次超纯水渗析液。与纯的ABEI水溶液(图7A)和刚合成好的金溶胶(图7B)比较，透析后的金溶胶(图7C)在291 nm和319 nm处的吸收峰显著减弱。该处的吸收峰为ABEI的特征吸收，这表明溶胶中ABEI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(530nm)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ABEI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  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 重新溶解,并进行紫外-可见吸收光谱表征(图7D),同样得到了ABEI的特征峰。与此同时,还在离心后的上清液(图7E)中再次观察到了ABEI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ABEI的吸收峰。因此,这些结果也表明ABEI存在于金纳米粒子表面。

#### 实施例I.7: ABEI发光功能化纳米金的发光特性

将实施例I.3中合成的图3A-D的1 mL不同形貌的ABEI发光功能化纳米金溶胶17120 \* g下离心45分钟后的沉淀用300  $\mu\text{L}$  pH=13的NaOH溶液进行分散放入检测池(Universal 320, Hettich, 德国)中,再注入100  $\mu\text{L}$ 浓度为0.1 mol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液,测定其化学发光动力学曲线(图8)。

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(图8 A-D)不断增加,表明本发明合成的ABEI发光功能化的纳米金具有良好的化学发光特性。

图9是本发明的ABEI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根据文献(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  $\mu\text{L}$ 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I.1中得到的图1B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ABEI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  $\mu\text{L}$ 浓度为0.1 mol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液检测化学发光。

实验结果发现本发明的ABEI发光功能化金纳米粒子(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根据现有技术文献合成的鲁米诺直接键合的发光功能化纳米金(图9B)发光效率明显提高,这表明本发明的ABEI发光功能化纳米金具有很高的发光效率。

#### 实施例I.8: 基于ABEI发光功能化纳米金免疫分析探针的制备

##### 制备方案一:

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 $^\circ\text{C}$ 下搅拌,加入5 mL 4 mmol/L的ABEI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ABEI发光功能化的纳米金溶胶;

B)在步骤A)中所得的ABEI发光功能化纳米金溶胶中加入链霉亲和素, 使链霉亲和素终浓度为25  $\mu\text{g/mL}$ 。混匀后在室温下培育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)。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ABEI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ABEI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ABEI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, 索莱宝, 北京)溶液, 在37℃下孵育30分钟, 然后在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ABEI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ABEI发光功能化纳米金免疫分析探针。

#### 制备方案二:

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℃下搅拌, 加入5 mL 4 mmol/L的ABEI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ABEI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, 索莱宝, 北京)加到用0.1 mol/L的氢氧化钠将pH调至8.0的上述步骤a)所得的ABEI发光功能化的金胶溶液中, 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ABEI分子, 然后将沉淀用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ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针。

### 实施例I.9: 基于ABEI发光功能化纳米金的核酸分析探针的制备

#### 制备方案一:

(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℃下搅拌, 加入5 mL 4 mmol/L的ABEI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ABEI发光功能化的纳米金溶胶。

(B)将步骤(A)中所得到的ABEI发光功能化的纳米金溶胶中加入链霉亲和素, 使链霉亲和素最终浓度为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 % (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ABEI分子, 然后将沉淀用500  $\mu\text{L}$ 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ABEI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ABEI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-生物素(SEQ ID NO: 1, 所示序列不含修饰基团), 生工生物工程有限公司, 上海), 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ABEI分子, 将所得沉淀分散于250 μL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ABEI发光功能化的纳米金DNA分析探针。

#### 制备方案二:

(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°C下搅拌, 加入5 mL 4 mmol/L的ABEI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ABEI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)中所得的ABEI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GATCAGATTCGC-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-SH(SEQ ID NO: 2, 所示序列不含修饰基团), 生工生物工程有限公司, 上海), 在室温下反应24小时, 再慢慢加入含有1mol/L氯化钠的0.1mol/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 μL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ABEI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ABEI水溶液均由超纯水(电阻率为18.2 MΩ\*cm)配制。

#### 实施例I.10: 基于ABEI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I.8方案一制备的ABEI发光功能化纳米金溶胶标记的免疫分析探针和实施例I.9方案一制备的ABEI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1 mmol/L过氧化氢的0.02 mol/L pH=9.95的碳酸盐底液(由浓度均为0.02 mol/L碳酸钠和碳酸氢钠以3:1的摩尔比组成), 测定其化学发光动力学曲线(如图10所示)。

结果表明: 用本发明的ABEI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均具有良好的化学发光特性。

#### **实施例II. 基于ABEI功能化纳米金的免疫分析探针及基于该探针的分析方法**

##### 实施例II.1: ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针的制备

(1) 将7 mL 6 mmol/L氯金酸水溶液和45 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 ABEI的碱性水溶液(含0.1mol/L氢氧化钠)后

持续搅拌2小时后,再加入6 mL 6 mmol/L氯金酸水溶液继续搅拌1.5 小时后,得到稳定的ABEI发光功能化的纳米金溶胶,粒径为10~30nm。

- (2) 将0.5 mL 1.0 mg/mL二抗(抗人cTnI单克隆抗体, Hytest有限公司, 芬兰图尔库)加到用0.1 mol/L的氢氧化钠将pH调至8.0的步骤(1)中所得的ABEI发光功能化的纳米金溶液中去, 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ABEI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ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针(ABEI发光功能化的纳米金标记的抗体)。

### 实施例II.2: “夹心式”免疫复合物在纳米金修饰电极上的固载

如图12所示, 本发明的化学发光免疫分析方法涉及的“夹心式”免疫复合物在纳米金修饰电极上的固载包括以下步骤:

- (1)纳米金修饰电极的制备:

A. 将表面打磨为镜面并经超纯水、乙醇超声清洗后的裸金电极放入2 mmol/L的1,3'-丙二硫醇中, 在常温下浸泡20小时, 取出后用乙醇和超纯水清洗, 获得1,3'-丙二硫醇修饰的金电极;

- B. 将50 $\mu$ L连接链霉亲和素的纳米金滴在步骤A制得的1,3'-丙二硫醇修饰电极上, 在4 $^{\circ}$ C暗处中放入4小时, 取出后用超纯水清洗, 得到链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极;

其中, 连接链霉亲和素的纳米金按照如下方法制备:

- i) 将100 mL0.01 %(重量)的HAuCl<sub>4</sub>溶液加热至沸, 在冷凝回流并充分搅拌的条件下, 加入3.8 mL含有1%(重量)柠檬酸三钠的溶液(溶剂为超纯水), 保持沸腾并继续搅拌回流反应45分钟, 然后除去加热源继续搅拌30分钟以上, 得到颗粒直径为16 nm的纳米金溶液;

- ii) 在1 mL步骤i) 所得的纳米金溶胶中加入25  $\mu$ L浓度为1 mg/mL链霉亲和素(北京博奥森生物有限公司)。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%(w/w)。最后在17120 \* g下离心45分钟, 以除去未反应试剂, 然后将沉淀用250  $\mu$ L含有1 %(w/w)的牛血清白蛋白的0.1 mol/L pH=7.4磷酸盐缓冲液分散, 得到连接链霉亲和素的纳米金。

(2) “夹心式”免疫复合物在纳米金修饰电极上的固载:

- A. 将50  $\mu$ L捕获探针, 即生物素标记的一抗(抗人cTnI单克隆抗体), 滴加到步骤(1)得到的链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极上, 在37 $^{\circ}$ C下作用40分钟后, 用0.02 mol/L pH=7.4的磷酸盐缓冲溶液清洗, 得到捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极; 然后将50  $\mu$ l 1 %(w/w) 的牛血清白蛋白滴在捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金

/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极，在37℃下作用40分钟，再用0.02 mol/L pH=7.4的磷酸盐缓冲溶液清洗。

B. 将50  $\mu$ l浓度分别为2.5、5、10、100、1000、10000 pg/ml的抗原(Hytest有限公司，芬兰图尔库)滴加到步骤A得到的捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极上面，在37℃下作用40分钟，再用0.02 mol/L pH=7.4的磷酸盐缓冲溶液清洗，得到不同浓度的人体cTnI和捕获探针中的一抗进行特异性结合的修饰电极，即抗原/捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极；

C. 将50  $\mu$ l实施例II.1制备的ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针，滴加在步骤B得到的抗原/捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极上，在37℃下作用40分钟后，用0.02 mol/L pH=7.4的磷酸盐缓冲溶液清洗，得到ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针和待测抗原(人cTnI)进行特异性结合的修饰电极，即如图12所示的ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针/抗原/捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极。

### 实施例II.3：电致化学发光免疫测定人cTnI

将实施例II.2得到的ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针/抗原/捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极放入电致化学发光池中，加入含有1 mmol/L过氧化氢的0.02 mol/L pH=9.95的碳酸盐底液(碳酸钠和碳酸氢钠浓度均为0.02 mol/L)，施加脉冲电压为0.8 V、脉冲周期为30 s、脉冲时间为0.1 s、起始电压为0 V的双阶脉冲电压，产生化学发光，用发光仪检测电致化学发光信号。

图13是分别在裸金电极(图13a)、1,3'-丙二硫醇修饰的金电极(图13b)、链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极(图13c)、抗原/捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极(图13d)、ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针/抗原/捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极(图13e)上施加双阶脉冲电压得到的化学发光随时间变化的曲线，其中待测抗原浓度为100 pg/mL。

实验结果表明：只有含有ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针的修饰电极才会产生电致化学发光信号，而裸金电极、1,3'-丙二硫醇修饰的金电极、链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极、抗原/捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极无信号产生。

### 实施例II.4：各种测定条件对电致化学发光信号的影响

为了获得最大的电致化学发光强度，研究了碳酸盐底液中的过氧化氢浓度、pH值、施加的脉冲电压、脉冲周期、脉冲时间和起始电压对电致化学发光信号的影响(如图14所示)。

### (1)过氧化氢浓度对电致化学发光强度的影响

将实施例II.2得到的ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针/抗原/捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极放入电致化学发光池中,加入含有过氧化氢的0.02 mol/L pH=9.95的碳酸盐底液(碳酸钠和碳酸氢钠浓度均为0.02 mol/L),施加脉冲电压为0.8 V、脉冲周期为30 s、脉冲时间为0.1 s、起始电压为0 V的双阶脉冲电压,产生化学发光,用发光仪检测电致化学发光信号。其中,过氧化氢浓度在0~2 mmol/L范围内变化,得到结果如图14a所示,过氧化氢浓度优选为1 mmol/L。

### (2)碳酸盐底液的pH值对电致化学发光强度的影响

将实施例II.2得到的ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针/抗原/捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极放入电致化学发光池中,加入含有1 mmol/L过氧化氢的0.02 mol/L的碳酸盐底液(碳酸钠和碳酸氢钠浓度均为0.02 mol/L),施加脉冲电压为0.8 V、脉冲周期为30 s、脉冲时间为0.1 s、起始电压为0 V的双阶脉冲电压,产生化学发光,用发光仪检测电致化学发光信号。其中,碳酸盐底液的pH值在8.94~11.37范围内变化(用如下试剂调节pH:由浓度均为0.02 mol/L碳酸钠和碳酸氢钠以1:9-10:0的摩尔比组成,总体积数为10),得到结果如图14b所示,碳酸盐底液的pH值优选为9.95。

### (3)脉冲电压对电致化学发光强度的影响

将实施例II.2得到的ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针/抗原/捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极放入电致化学发光池中,加入含有1 mmol/L过氧化氢的0.02 mol/L pH=9.95的碳酸盐底液(碳酸钠和碳酸氢钠浓度均为0.02 mol/L),施加脉冲周期为30 s、脉冲时间为0.1 s、起始电压为0 V的双阶脉冲电压,产生化学发光,用发光仪检测电致化学发光信号。其中,脉冲电压值在0.5 V~1.0 V范围内变化,得到结果如图14c所示,脉冲电压值优选为0.8 V。

### (4)脉冲周期对电致化学发光强度的影响

将实施例II.2得到的ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针/抗原/捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极放入电致化学发光池中,加入含有1 mmol/L过氧化氢的0.02 mol/L pH=9.95的碳酸盐底液(碳酸钠和碳酸氢钠浓度均为0.02 mol/L),施加脉冲电压为0.8 V、脉冲时间为0.1 s、起始电压为0 V的双阶脉冲电压,产生化学发光,用发光仪检测电致化学发光信号。其中,脉冲周期值在5 s~60 s范围内变化,得到结果如图14d所示,脉冲周期值优选为30 s。

### (5)脉冲时间对电致化学发光强度的影响

将实施例II.2得到的ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针/抗原/捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极放入电致化学发光池中,加入含有1 mmol/L过氧化氢的0.02 mol/L pH=9.95的碳酸盐底液(碳酸钠和碳酸氢钠浓度均为0.02 mol/L),施加脉冲电压为0.8 V、脉冲周期为30 s、

起始电压为0 V的双阶脉冲电压，产生化学发光，用发光仪检测电致化学发光信号。其中，脉冲时间值在0.025 s~0.125 s范围内变化，得到结果如图14e所示，脉冲时间值优选为0.1 s。

#### (6)起始电压对电致化学发光强度的影响

- 5 将实施例II.2得到的ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针/抗原/捕获探针中的一抗/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极放入电致化学发光池中，加入含有1 mmol/L过氧化氢的0.02 mol/L pH=9.95的碳酸盐底液(碳酸钠和碳酸氢钠浓度均为0.02 mol/L)，施加脉冲电压为0.8 V、脉冲周期为30 s、脉冲时间为0.1 s的双阶脉冲电压，产生化学发光，用发光仪检测电致化学发光信号。其中，起始电压值在-0.3 V~0.3 V范围内变化，得到结果如图14f所示，起始电压值优选为0 V。

综上，最终选定在1 mmol/L过氧化氢的0.02 mol/L pH=9.95的碳酸盐底液(碳酸钠和碳酸氢钠浓度均为0.02 mol/L)，施加脉冲电压为0.8V、脉冲周期为30 s、脉冲时间为0.1 s、起始电压为0 V的双阶脉冲电压进行电致化学发光的测定。

- 15 用本发明的电致化学发光免疫分析方法测定实施例II.2中的抗原(人cTnI)的工作曲线如图15所示，所述方法测定人体cTnI的线性范围是2.5 pg/mL ~10000 pg/mL，线性回归方程 $\log I = 2.904 + 0.268 \log C$ ，相关系数为0.9969。以三倍信噪比(S/N)计算，检测限为2.0 pg/mL。图15中的数据为5次测量信号的平均值±标准差。对浓度为100 pg/mL的人cTnI进行精密度实验，得到其批间相对标准偏差 Inter-day R.S.D. 为 7.41%(其中 n=7)；批内相对标准偏差 Intra-day R.S.D. 为 3.86%(其中 n=3)。

#### 实施例II.5：电致化学发光免疫分析方法测定实际人血浆样品中的cTnI

- 25 将本发明的电致化学发光免疫分析方法(同实施例II.4中最终所得出的优选方法)用于实际人血浆样品(由江苏省人民医院提供)中的cTnI的测定，结果显示用该方法所得的回收率为126%。该结果表明本发明的分析方法可用于人血清样品的测定。本发明的化学发光免疫分析方法与临床上采用ELISA方法测定相同样品(采用Troponin I (Human Cardiac-Specific) Enzyme Immunoassay ELISA测试试剂盒，Percipio生物科学公司，希腊，根据说明书中所示方法测定)得到的结果相比，其相对偏差为19.2%，显示了本发明的电致化学发光免疫分析方法的测定结果是可靠的。

表1.本发明的电致化学发光免疫分析方法测定实际人血浆样品中cTnI的回收率

| 样品中cTnI浓度(pg/mL)<br>(平均值±偏差; 次数=5) | 加入cTnI浓度<br>(pg/mL) | 总cTnI浓度(pg/mL)<br>(平均值±偏差; 次数=5) | 回收率<br>(%) |
|------------------------------------|---------------------|----------------------------------|------------|
| 404±6.5                            | 500                 | 1030±50.7                        | 126.0      |

回收率=(总cTnI浓度 - 样品中cTnI浓度)/加入cTnI浓度×100%; 起始电压, 0V; 脉冲周期, 30s; 脉冲时间, 0.1 s; 脉冲电压, 0.8 V; 电解液组成: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1.0 mM; CBS, 0.02 mM (pH 9.95)

表2.本发明的电致化学发光免疫分析方法与临床方法对实际人血清样品中的cTnI测定结果的比较

| 临床方法<br>(pg/mL) | 本发明方法 (pg/mL)<br>(平均值±偏差; 次数=5) | 相对偏差<br>(%) |
|-----------------|---------------------------------|-------------|
| 500             | 404 ± 6.5                       | 19.2        |

起始电压压, 0 V; 脉冲周期, 30 s; 脉冲时间, 0.1 s; 脉冲电压, 0.8 V;

底液组成: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1.0 mM; CBS, 0.02 mM (pH 9.95); 临床方法为ELISA

5

本发明电致化学发光免疫分析方法测定人体cTnI的特异性实验结果如图16所示, 图中所示抗原浓度均为1 ng/mL, 其它条件均相同, 可见相同浓度下, 人体IgG、牛血清蛋白(BSA)、人体肌红蛋白(Mb)的相对电致化学发光强度信号响应均远远低于人体cTnI的响应信号, 其中, 相对电致化学发光强度  $\Delta I = I - I_0$ , I为各种被测物产生的电致化学发光信号, I<sub>0</sub>为没有被测物、其余操作相同时的空白信号。说明该方法测定人cTnI具有良好的特异性。图16中的数据为5次测量信号的平均值±标准差。

10

应理解, 本发明并不局限于上述的具体实施例, 此种原理可用于多种分析物的测定。任何基于ABEI发光功能化的纳米金免疫分析探针的化学发光免疫分析方法均属于本发明的保护范围, 比如改变目标分析物、捕获探针、免疫分析探针连接方式、更换纳米金粒径和形状、改变电极材料、更换抗体、将固相载体变换为磁珠或微孔板等均属于对本专利实质相同的变通或替换。

15

### 实施例III. 基于ABEI功能化纳米金的核酸分析探针及基于该探针的分析方法

20

本实施例中制备了分别以结核分支杆菌的特异性插入序列IS6110的基因保守序列(如SEQ ID NO: 5所示, McEvoy, C.R.E. et al., Tuberculosis 2007, 87, 393)和人血小板源生长因子BB为目标分析物的核酸分析探针, 并提供了使用所述核酸分析探针的分析方法。

#### 实施例III.1: ABEI发光功能化的纳米金核酸探针的制备

25

(1) 将9 mL 6 mmol/L氯金酸水溶液和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ABEI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ABEI发光功能化的纳米金溶胶, 避光保存在4℃下。

30

(2) 在1 mL步骤(1)中得到的金溶胶中加入25 μL浓度为1 mg/ml的链霉亲和素, 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ABEI分子, 然后将沉淀用200 μL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鲁ABEI发光功能化的纳米金;

35

(3)在步骤(2)所得的连接链霉亲和素的鲁ABEI发光功能化的纳米金中加入

23  $\mu\text{L}$ 浓度为 $1 \times 10^{-5}$  mol/L端基经生物素修饰的DNA(如SEQ ID NO:3所示, 其为SEQ ID NO: 5的目标DNA的部分互补序列)或端基经生物素修饰的人血小板源生长因子BB适配体(如SEQ ID NO: 6所示)溶液, 在 $37^\circ\text{C}$ 下孵育1小时, 在 $17120 \times g$ 下离心10分钟, 以除去未与纳米金连接的DNA或适配体分子, 将所得沉淀分散于 $250 \mu\text{L}$ 含有 $0.3 \text{ mol/L}$ 的氯化钠的 $0.05 \text{ mol/L}$  pH=8.0 Tris-HCl缓冲液, 即得到ABEI发光功能化的纳米金DNA或适配体分析探针。

### 实施例III.2. “夹心式”复合物在纳米金修饰电极上的固载

如图18所示, 本发明的化学发光方法涉及的“夹心式”复合物在纳米金修饰电极上的固载包括以下步骤:

#### (1)纳米金修饰电极的制备

- a. 将表面打磨为镜面并经超纯水、乙醇超声清洗后的裸金电极放入 $2 \text{ mmol/L}$ 的1,3'-丙二硫醇中, 在常温下浸泡20小时, 取出后用乙醇和超纯水清洗, 获得1,3'-丙二硫醇修饰的金电极;
- b. 将 $50 \mu\text{L}$ 连接链霉亲和素的纳米金滴在步骤a制得的1,3'-丙二硫醇修饰电极上, 在 $4^\circ\text{C}$ 暗处中放置4小时, 取出后用超纯水清洗, 得到链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极;

其中, 连接链霉亲和素的纳米金按照如下方法制备:

- i) 将 $100 \text{ mL}$   $0.01 \%$ (重量)的 $\text{HauCl}_4$ 溶液加热至沸, 在冷凝回流并充分搅拌的条件下, 加入 $3.8 \text{ mL}$  含有 $1\%$ (重量)柠檬酸三钠的溶液(溶剂为超纯水), 保持沸腾并继续搅拌回流反应45分钟, 然后除去加热源继续搅拌30分钟以上, 得到颗粒直径为 $16 \text{ nm}$ 的纳米金溶液;
- ii) 在 $1 \text{ mL}$ 步骤 i)所得的纳米金溶胶中加入 $25 \mu\text{L}$ 浓度为 $1 \text{ mg/mL}$ 链霉亲和素(索莱宝, 北京)。混匀后在室温下培育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, 使牛血清白蛋白最终浓度为 $1\%$ 。最后在 $17120 \times g$ 下离心45分钟, 以除去未反应试剂, 将沉淀用 $200 \mu\text{L}$ 含有 $0.3 \text{ mol/L}$ 的氯化钠的 $0.05 \text{ mol/L}$  pH=8.0 Tris-HCl缓冲液分散, 得到连接链霉亲和素的纳米金。

#### (2)“夹心式”复合物在纳米金修饰电极上的固载

- a. 将 $50 \mu\text{L}$   $4 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 捕获探针[即端基生物素化的DNA分子(如SEQ ID NO: 4所示, 其为SEQ ID NO: 5所示目标DNA的另一部分互补序列)或人血小板源生长因子BB适配体分子(SEQ ID NO: 6, 端基经生物素修饰)滴加到步骤(1)所得的修饰电极上, 在 $37^\circ\text{C}$ 下作用60分钟后, 用含 $0.1 \text{ mol/L}$ 氯化钠的 $0.01 \text{ mol/L}$  pH=7.4 Tris-HCl缓冲溶液清洗, 得到捕获探针中的DNA分子或人血小板源生长因子BB适配体/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极; 然后将 $50 \mu\text{L}$   $1\%$ (w/w)的牛血清白蛋白滴加在捕获探针中的DNA分子或人血小板源生长因子BB适配体/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极, 在 $37^\circ\text{C}$ 下作用40分钟, 再用含 $0.1 \text{ mol/L}$ 氯化钠的 $0.01 \text{ mol/L}$  pH=7.4 Tris-HCl缓冲溶液清洗;

b. 将60  $\mu\text{L}$ 目标DNA分子或人血小板源生长因子BB滴加到步骤a得到的捕获探针中的DNA或人血小板源生长因子BB适配体/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极表面, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用60分钟, 再用含0.1 mol/L氯化钠的0.01 mol/L pH=7.4 Tris-HCl缓冲溶液清洗, 得到连接目标DNA或人血小板源生长因子BB和DNA捕获探针或适配体捕获探针的修饰电极, 即目标DNA或人血小板源生长因子BB /捕获探针中的DNA或人血小板源生长因子BB适配体/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极;

c. 将50  $\mu\text{L}$ 实施例III.1制备的ABEI发光功能化的纳米金DNA或适配体分析探针, 滴加在步骤b得到的目标DNA或人血小板源生长因子BB/捕获探针中的DNA或人血小板源生长因子BB适配体/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极上, 在37  $^{\circ}\text{C}$ 下作用60分钟后, 用含0.1 mol/L氯化钠的0.01 mol/L pH=7.4 Tris-HCl缓冲溶液清洗, 得到ABEI发光功能化的的纳米金DNA或适配体分析探针和待测分析物经特殊识别反应结合的修饰电极, 即ABEI发光功能化的的纳米金DNA或适配体分析探针/目标DNA或人血小板源生长因子BB /捕获探针中的DNA或人血小板源生长因子BB适配体/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极。

### 实施例III.3. 电致化学发光测定结核分枝杆菌特异性IS6110插入序列基因片段

将实施例III.2中得到ABEI直接键合的纳米金DNA分析探针/目标DNA/捕获探针中的DNA/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极放入电致化学发光池中, 加入含有1.75 mmol/L过氧化氢的0.02 mol/L pH=9.8的碳酸盐底液(碳酸钠和碳酸氢钠浓度均为0.02 mol/L), 施加脉冲电压为0.8 V、脉冲周期为30 s、脉冲时间为0.1 s、起始电压为0 V的双阶脉冲电压, 产生化学发光, 用发光仪检测电致化学发光信号。

图19所示分别为在裸金电极(图19a)、1,3'-丙二硫醇修饰的金电极(图19b)、链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极(图19c)、目标DNA/捕获探针中的DNA/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极(图19d)、ABEI直接键合的纳米金DNA分析探针/目标DNA/捕获探针中的DNA/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极(图19e)上施加双阶脉冲电压得到的化学发光随时间变化的曲线, 其中目标DNA的浓度为 $1 \times 10^{-13}$  mol/L。

实验结果显示: 只有含有ABEI直接键合的纳米金DNA分析探针的修饰电极上才会产生电致化学发光信号, 而采用其它金电极均无信号产生。

用本发明的电致化学发光分析方法测定实施例III.2中的目标DNA(如表1所示)的工作曲线如图20所示, 所述方法测定该链DNA的线性范围是 $1.0 \times 10^{-15}$ - $1.0 \times 10^{-12}$  mol/L, 检测限为 $3.3 \times 10^{-16}$  mol/L。图20中的数据为9次测量信号的平均单值 $\pm$ 标准差。对浓度为 $1 \times 10^{-13}$  mol/L 的目标DNA进行5次平行测定, 得到其相对标准偏差为2.4 %, 说明该方法测定目标DNA具有良好的重现性。

#### 实施例III.4. 电致化学发光测定人血小板源生长因子BB

将实施例III.2中得到ABEI发光功能化的纳米金适配体分析探针/人血小板源生长因子BB/人血小板源生长因子BB适配体/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极放入电致化学发光池中, 加入含有1.75 mmol/L过氧化氢的0.02 mol/L pH=9.8的碳酸盐底液(碳酸钠和碳酸氢钠浓度均为0.02 mol/L), 施加脉冲电压为0.8 V、脉冲周期为30 s、脉冲时间为0.1 s、起始电压为0 V的双阶脉冲电压, 产生化学发光, 用发光仪检测电致化学发光信号。

图21分别为在裸金电极(图21a)、1,3'-丙二硫醇修饰的金电极(图21b)、链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极(图21c)、人血小板源生长因子BB/人血小板源生长因子BB适配体/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极(图21d)、ABEI发光功能化的的纳米金适配体分析探针/人血小板源生长因子BB/人血小板源生长因子BB适配体/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极上(图21e)施加双阶脉冲电压得到的化学发光随时间变化的曲线, 其中人血小板源生长因子BB的浓度为 $1 \times 10^{-12}$  mol/L。

实验结果表明: 只有含有ABEI发光功能化的纳米金适配体分析探针的修饰电极上才会产生电致化学发光信号, 而采用其它金电极均无信号产生。

用本发明的电致化学发光分析方法测定实施例III.2中的人血小板源生长因子BB的工作曲线如图22所示, 所述方法测定人血小板源生长因子的线性范围是 $1.0 \times 10^{-13}$ - $1.0 \times 10^{-11}$  mol/L, 检测限为 $2.7 \times 10^{-14}$  mol/L。图22中的数据为9次测量信号的平均值±标准差。

本发明电致化学发光分析方法测定人血小板源生长因子BB的特异性实验结果如图23所示, 图中所示蛋白质的浓度条件均为 $1 \times 10^{-12}$  mol/L, 其它条件均相同, 可见相同浓度下, 人免疫球蛋白G(图23b)、葡萄糖氧化酶(图23c)、血红蛋白(图23d)、肌钙蛋白(图23e)的信号响应均远远低于人血小板源生长因子BB(图23a)响应信号, 说明该方法测定人血小板源生长因子BB具有良好的特异性。其中图23f所示信号为空白信号, 即噪音信号。图23中的数据为9次测量信号的平均值±标准差。对浓度为 $1 \times 10^{-12}$  mol/L的人血小板源生长因子BB进行5次平行测定, 得到其相对标准偏差为2.5 %, 说明该方法测定人血小板源生长因子具有良好的重现性。

#### 实施例III.5. 电致化学发光测定实际人血清样品中的人血小板源生长因子BB

将本发明的电致化学发光分析方法用于实际人血清样品中的人血小板源生长因子BB的测定, 结果如表4所示, 其回收率在98 %-111 %之间, 表明该分析方法可用于实际人血清样品的测定。表5比较了本发明的化学发光分析方法与采用临床所用的酶联免疫吸附法试剂盒(锐聪科技发展有限公司, 上海)对人血清样品中人血小板源生长因子的测定结果, 其相对偏差小于8.8 %, 显示了本发明的电致化学发光分析方法的测定结果是可靠的。

表3 实施例III.1-III.5中所采用的核酸分子的序列

| SEQ ID NO | 序列名称                                    | 碱基序列(5'-3')                                                                                 |
|-----------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3         | 实施例III.1分析探针中3'端基生物素化的DNA               | GGTGAGGTCTGCTACCCAC-生物素                                                                     |
| 4         | 实施例III.2的捕获探针                           | 生物素-GGCCACGTAGGCGAACC                                                                       |
| 5         | 实施例III.2的目标DNA (结核分支杆菌特异插入序列IS6110基因片段) | CCAGCACCTAACCGGCTGTGGGTAGCAGACCTCA<br>CCTATGTGTGCGACCTGGGCAGGGTTTCGCCTACGTG<br>GCCTTTGTCACC |
| 6         | 实施例III.1、2、4、5中的人血小板源生长因子适配体探针          | 生物素-CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATG<br>ATCCTG                                                 |

注：序列表中所示序列均为不含修饰的原序列

表4. 本发明的电致化学发光分析方法测定  
实际人血清样品中的人血小板源生长因子BB的回收率

| 样品中人血小板源生长因子BB的浓度<br>( $10^{-12}$ mol/L) <sup>a</sup> | 加入人血小板源生长因子BB的浓度<br>( $10^{-12}$ mol/L) | 总人血小板源生长因子BB的浓度(平均值±偏差;n=5)( $10^{-12}$ mol/L) | 回收率(%) |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------|--------|
| 0.84 ± 0.07                                           | 5.0                                     | 6.01 ± 0.30                                    | 103    |
| 1.39 ± 0.08                                           | 5.0                                     | 6.32 ± 0.29                                    | 99     |
| 1.43 ± 0.16                                           | 5.0                                     | 6.78 ± 0.68                                    | 107    |
| 1.58 ± 0.04                                           | 5.0                                     | 7.14 ± 0.51                                    | 111    |
| 2.66 ± 0.12                                           | 5.0                                     | 7.85 ± 0.64                                    | 104    |
| 1.22 ± 0.06                                           | 5.0                                     | 6.30 ± 0.21                                    | 102    |
| 1.94 ± 0.15                                           | 5.0                                     | 6.83 ± 0.40                                    | 98     |

回收率 = (总人血小板源生长因子BB浓度 - 样品中人血小板源生长因子BB浓度) / 加入人血小板源生长因子BB浓度 × 100 %。 起始电压, 0 V; 脉冲周期, 30 s; 脉冲时间, 0.1 s; 脉冲电压, 0.8 V; 底液组成: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1.75 mM; CBS, 0.02 mM (pH 9.95)。

表5. 本发明的电致化学发光分析方法与临床方法  
对实际人血清样品中的人血小板源生长因子BB测定结果的比较

| 样品 | 本发明方法( $10^{-12}$ mol/L)<br>(平均值±偏差; 次数=5) | 临床方法<br>( $10^{-12}$ mol/L) | 相对偏差(%) |
|----|--------------------------------------------|-----------------------------|---------|
| 1  | 4.22 ± 0.35                                | 4.18                        | 1.0     |
| 2  | 6.94 ± 0.38                                | 7.61                        | 8.8     |
| 3  | 7.15 ± 0.78                                | 7.65                        | 6.5     |
| 4  | 7.91 ± 0.20                                | 8.00                        | 1.1     |
| 5  | 13.31 ± 0.62                               | 12.98                       | 2.5     |
| 6  | 6.10 ± 0.30                                | 5.69                        | 7.2     |
| 7  | 9.68 ± 0.75                                | 8.99                        | 7.7     |

起始电压, 0 V; 脉冲周期, 30 s; 脉冲时间, 0.1 s; 脉冲电压, 0.8 V; 底液组成: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1.0 mM; CBS, 0.02 mM (pH 9.95); 临床方法为酶联免疫吸附法。

5

### 实施例III.6. 基于RNA分析探针的化学发光分析方法测定RNA

本发明的基于ABEI发光功能化的纳米金核酸分析探针的化学发光分析方法也可用于测定RNA。所述方法原理和步骤与实施例1-3中所述测定特定序列DNA方法类似, 不同之处在于, 测定RNA时所采用捕获探针中的核酸分子、目标分析物均为RNA分子, 分析探针为ABEI发光功能化的纳米金RNA分析探针。

10

RNA探测分子与ABEI发光功能化的纳米金的连接可通过例如(但不限于)以

下文献所报道的方法来实现: Giljohann, D.A. et al., J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 2072; Li, H.X, et al., RNA 2007, 13, 2034; Yang, W.J. et al., Anal. Biochem. 2008, 376, 183。例如通过实施例I.9中所述的方法制备ABEI发光功能化的纳米金RNA分析探针,即通过端基生物素化的RNA分子与结合有链霉亲和素的ABEI发光功能化的纳米金作用而形成ABEI发光功能化的纳米金RNA分析探针。或通过文献

5 Yang, W.J. et al., Anal. Biochem. 2008, 376, 183所述纳米金与端基巯基化RNA分子连接的方法,通过巯基与纳米金表面形成Au-S键而将RNA分子连接在纳米金表面;同样ABEI发光功能化的纳米金也可与RNA分子端基上的巯基作用形成共价键,从而制备ABEI发光功能化的纳米金RNA分析探针。

10 类似于实施例III.1-3,以纳米金修饰的金电极为含有修饰层的固相载体。通过实施例III.2中步骤(1)所述方法制备链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极,再将端基生物素化的捕获探针通过生物素-链霉亲和素相互作用连接到修饰电极表面,得到捕获探针中的RNA/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极。最后将此修饰电极进一步与目标分析物RNA和ABEI发光功能化的纳米金RNA分析探针结合形成“夹心式”复合物,得到ABEI发光功能化的纳米金RNA分析探针/目标RNA/捕获探针中的RNA/生物素/链霉亲和素/纳米金/1,3'-丙二硫醇修饰的金电极,用电致化学发光进行检测。

15

捕获探针也可以通过任何现有其它方法将RNA连接到电极上。当捕获探针为RNA时,可采用的现有连接方法包括但不限于以下列举的文献报道: Kralj, J.G. et al., Lab Chip, 2009, 9, 917; Yang, W.J. et al., Anal. Biochem. 2008, 376, 183; Cissell, K.A. et al., Anal. Chem. 2008, 80, 2319。例如以文献Ferapontova, E. E. et al., J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 4256, 可通过端基巯基化的捕获探针与金电极表面形成自组装单分子层从而将捕获探针固载。再通过杂交反应连接目标RNA和ABEI发光功能化的纳米金RNA分析探针,形成“夹心式”RNA复合物,

20

25 再用电致化学发光进行检测。

应理解,本发明并不局限于上述的具体实施例,此种原理可用于多种分析物的测定。任何基于ABEI发光功能化的纳米金核酸分析探针的化学发光分析方法均属于本发明的保护范围,比如改变目标分析物、捕获探针、核酸分析探针连接方式、更换纳米金粒径和形状、改变电极材料、将固相支持物变换为磁珠或微孔板等均属于对本专利实质相同的变通或替换。

30

#### 实施例IV 基于金电极以外的其它固相载体的分析方法

本实施例中的分析方法中可采用与基于金电极的分析方法中相同或类似的总体步骤、检测方式及分析仪器(可参考“实施例II. 基于ABEI发光功能化纳米金的免疫分析探针及分析方法”与“实施例III. 基于ABEI发光功能化纳米金的核酸探针及分析方法”)。

35

##### 实施例IV.1. 以磁微珠为固相载体的分析方法

本发明的化学发光分析方法也可以用磁微珠为固相载体，常规的磁微珠主要为聚苯乙烯包裹的四氧化三铁的磁纳米颗粒。在免疫分析中，捕获探针可以通过任何现有连接蛋白质或核酸与磁微珠的方法结合到磁微珠上。这些现有方法包括但不限于下面例举的文献报道：Zhan, W. et al., *Anal. Chem.* 2004, 76, 7109; Yang, S. Y. et al., *Biosens. Bioelectron.* 2008, 24, 855; Wang, J.; et al. *Anal. Chem.* 2001, 73, 5576; Weizmann, Y.; et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 3452。例如，蛋白质可以直接和磁微珠结合，也可以通过链霉亲和素和生物素结合到磁微珠上。因此捕获探针可以直接或通过链霉亲和素和生物素结合到磁微珠上，结合有捕获探针的磁微珠再进一步与目标分析物和分析探针结合形成夹心式免疫复合物，用化学发光进行检测。在核酸分析中，可以通过巯基与氨基的反应将端基巯基化的核酸分子即捕获探针连接于氨基修饰的磁性微球表面，或通过链霉亲和素和生物素作用将生物素化核酸分子即捕获探针结合到链霉亲和素化的磁微珠表面。结合有捕获探针的磁微珠再进一步与目标分析物和核酸分析探针结合形成“夹心式”核酸复合物，用化学发光进行检测。

也可以用纳米金修饰的磁微珠为固相载体。首先可在磁微珠表面修饰氨基(Weizmann, Y. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 3452)，通过氨基可以和纳米金形成弱的共价键方式，将纳米金结合到磁微珠表面。在免疫分析中，纳米金与捕获探针可通过任何现有连接蛋白质与纳米金的方法进行连接(Yin, X. B. et al., *Anal. Chem.* 2004, 77, 3525; Gonzalez-Garcia, M. B et al., *Biosens. Bioelectron.* 2000, 15, 315)，例如通过链霉亲和素和生物素的作用，将端基生物素化的一抗即捕获探针连接于表面包裹了链霉亲和素的纳米金修饰的磁微珠，进一步与目标分析物和免疫分析探针结合形成“夹心式”免疫复合物，用化学发光进行检测。在核酸分析中，纳米金与捕获探针的结合也可以通过任何现有连接核酸与纳米金的方法进行连接：Li, Y.; et al. *Microchim. Acta* 2009, 164, 69; Zhang, Z.Y.; et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 118。例如通过链霉亲和素和生物素的作用，将端基生物素化的核酸分子即捕获探针连接于表面包裹了链霉亲和素的纳米金修饰的磁微珠，进一步与目标分析物和核酸分析探针形成“夹心式”复合物，用化学发光进行测定。或通过巯基与Au作用形成Au-S键将端基巯基化的核酸分子即捕获探针连接到纳米金上，形成捕获探针连接的纳米金，此纳米金通过纳米金和氨基的弱共价作用连接到表面氨基化的磁微珠上，进一步与目标分析物和核酸分析探针形成“夹心式”复合物，用化学发光进行测定。

#### 实施例IV.2. 以微孔板为固相载体的分析方法

本发明的化学发光分析方法也可用微孔板为固相载体，常规的微孔板主要为聚苯乙烯材料。捕获探针可以通过任何现有连接蛋白质或核酸与微孔板的方法结合到微孔板上。这些现有方法包括但不限于下面例举的文献报道：Duan, C. F.; Yu, Y. Q.; Cui, H. *Analyst.* 2008, 133, 1250; Piermarini, S. et al., *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 1434; himada, J.; et al. *Biotechnol. Lett.* 2008, 30, 2001; Lee,

A.C.; et al. Anal. Chem. 2008, 80, 9402。例如, 在免疫分析中, 蛋白质可以直接和微孔板结合, 也可以通过链霉亲和素和生物素结合到微孔板上。因此捕获探针可以直接或通过链霉亲和素和生物素结合到微孔板上, 连接有捕获探针的微孔板再进一步与目标分析物和分析探针结合形成“夹心式”免疫复合物, 用化学发光进行检测。在核酸分析中, 可将端基生物素化的核酸分子即捕获探针连接到表面链霉亲和素或中性亲和素化的微孔板上, 连接了捕获探针的微孔板进一步与目标分析物和核酸分析探针结合形成“夹心式”核酸复合物, 用化学发光进行检测。

也可以用纳米金修饰的微孔板为含有修饰层的固相载体。在微孔板表面先吸附一层蛋白质如牛血清白蛋白(BSA), 通过纳米金可以和蛋白质结合的特点, 将纳米金结合到微孔板上。纳米金与捕获探针的连接方式可通过实施例IV.1中所述纳米金与捕获探针的连接方式进行连接, 形成捕获探针/纳米金修饰层/微孔板, 进一步与目标分析物和生物分析探针(包括免疫分析探针和核酸分析探针)形成“夹心式”复合物, 用化学发光检测。

#### 实施例IV.3. 以尼龙为固相载体的分析方法

本发明的化学发光分析方法也可以用尼龙为固相载体, 常规的尼龙主要为聚酰胺类的尼龙。捕获探针可以通过任何现有连接蛋白质或核酸与尼龙的方法结合到尼龙上。这些现有方法包括但不限于下面列举的文献报道: Rubtsova, M. Y. et al., Biosens. Bioelectron. 1998, 13, 715; Zhang, F. H. et al., Biosens. Bioelectron. 2007, 22, 1419; Zhou, D.R.; et al. Anal. Biochem. 2006, 351, 26; Kim, S.; et al. Biomol. Engin. 2006, 23, 129。例如, 在免疫分析中, 蛋白质可以直接和尼龙结合, 也可以通过链霉亲和素和生物素结合到尼龙上。因此捕获探针可以直接或通过链霉亲和素和生物素结合到尼龙上, 结合有捕获探针的尼龙再进一步与目标分析物和分析探针结合形成“夹心式”免疫复合物, 用化学发光进行检测。在核酸分析中, 可利用带正电荷的尼龙膜具有高强度、不易破损、DNA结合容量较大的特点, 它能够吸附变性DNA, 核酸分子以共价结合方式不可逆的结合在尼龙膜上, 从而可将捕获探针连接到尼龙膜上。结合有捕获探针的尼龙再进一步与目标分析物和核酸分析探针结合形成“夹心式”核酸复合物, 用化学发光进行检测。

也可以用纳米金修饰的尼龙为含有修饰层的固相载体。首先如文献所述使尼龙氨基功能化(Nan, C. F. et al., Enz. Microb. Technol. 2009, 44, 249), 以氨基可以和纳米金形成弱的共价键方式, 将纳米金结合到尼龙表面。纳米金与捕获探针的连接方式可通过实施例IV.1中所述纳米金与捕获探针的连接方式进行连接, 形成捕获探针/纳米金修饰层/尼龙, 进一步与目标分析物和生物分析探针(包括免疫分析探针和核酸分析探针)形成“夹心式”复合物, 用化学发光检测。

#### 实施例IV.4. 以玻璃为固相载体的分析方法

本发明的化学发光免疫分析方法也可以用玻璃为固相载体，常规的玻璃主要为表面醛基化、氨基化和巯基化的玻璃。捕获探针可以通过任何现有连接蛋白质或核酸与玻璃的方法结合到玻璃上。这些现有方法包括但不限于下面例举的文献报道：Yang, Z. J. et al., *Adv. Funct. Mater.*; Ho, D.; et al. *Anal. Chem.* 2009, 81, 3159; Kurita, H.; et al. *Magnet. Mater.* 2009, 321, 655。例如，在免疫分析中，蛋白质可以通过链霉亲和素和生物素结合到聚合物修饰的玻璃上。因此捕获探针可以直接或通过链霉亲和素和生物素结合到玻璃上，结合有捕获探针的玻璃再进一步与目标分析物和分析探针结合形成“夹心式”免疫复合物，用化学发光进行检测。在核酸分析中，也可在玻璃表面通过有机硅烷引入氨基或羧基等，再通过EDC反应将端基羧基化或氨基化的核酸分子即捕获探针连接于玻璃表面，结合有捕获探针的玻璃再进一步与目标分析物和核酸分析探针结合形成“夹心式”核酸复合物，用化学发光进行检测。

也可以用纳米金修饰的玻璃为含有修饰层的固相载体。在表面巯基或氨基化的玻璃基上通过纳米金和巯基或氨基的共价作用将纳米金结合到玻璃上。也可在镀有金膜的玻璃表面修饰一层双巯基化合物(Wang, Z. P. et al., *Clin. Chem.* 2006, 52, 1958.)，通过巯基可以和纳米金形成共价键方式，将纳米金结合到玻璃表面。纳米金与捕获探针的连接方式可通过实施例IV.1中所述纳米金与捕获探针的连接方式进行连接，形成捕获探针/纳米金修饰层/玻璃，进一步与目标分析物和生物分析探针(包括免疫分析探针和核酸分析探针)形成“夹心式”复合物，用化学发光检测。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

# 权 利 要 求 书

1. 一种功能化纳米金，其包含：金纳米粒子和与该金纳米粒子连接的N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺，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. 如权利要求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连接于所述金纳米粒子的表面。

3. 如权利要求1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选自下组：单分散球状、球状功能化纳米金组装的链状、球状功能化纳米金组装的准网状、或球状功能化纳米金组装的网状。

4. 如权利要求3所述的功能化纳米金，其特征在于，所述单分散球状的功能化纳米金、或者组装成链状、准网状或网状的球状功能化纳米金的粒径为5-50纳米。

5. 如权利要求1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。

6. 如权利要求5所述的功能化纳米金，其特征在于，所述氧化剂选自： $H_2O_2$ 、 $O_2$ 、 $ClO^-$ 、 $I_2$ 、 $IO_4^-$ 或 $MnO_4^-$ 。

7. 一种制备权利要求1-6中任一项所述的功能化纳米金的方法，所述方法包括如下步骤：

(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混合，得到混合液；

(2) 在步骤(1)所得的混合液中加入氯金酸水溶液B，混合至形成金溶胶，所述金溶胶即为功能化纳米金。

8. 如权利要求7所述的方法，其特征在于，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1-6倍。

9. 如权利要求7所述的方法，其特征在于，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0.5-5倍。

10. 如权利要求7所述的方法，其特征在于，所述氯金酸水溶液A和B中氯金酸的物质的量的总和是步骤(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2-10倍。

11. 如权利要求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；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；所述氯金酸水溶液B的摩尔浓度为1-10 mmol/L。

12. 如权利要求7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与所述氯金酸水溶液B的物质的量的比例选自h1-h10：

h1: 4: 1: 1; h2: 2: 1: 3; h3: 2.7: 1: 1.8; h4: 2.3: 1: 1.4;

h5: 2.7: 1: 2.1; h6: 2.7: 1: 2.4; h7: 2.7: 1: 2.7; h8: 3: 1: 2;  
h9:  $\frac{27}{11}$ : 1:  $\frac{18}{11}$ ; h10: 2.25: 1: 1.5。

13. 如权利要求7所述的方法，其特征在于，所述方法还包括对步骤(2)所得的金溶胶进行纯化的步骤。

14. 如权利要求7所述的方法，其特征在于，所述步骤(1)和步骤(2)各自在10-40℃的温度范围内进行。

5 15. 如权利要求7的方法，其特征在于，步骤(1)和步骤(2)的反应时间分别为1-10小时。

16. 如权利要求7所述的方法，其特征在于，所述方法中配制水溶液或稀释反应体系用的水的电阻率大于或等于1.0 MΩ\*cm。

10 17. 一种分析探针，其包含作为发光标记物的权利要求1-6中任一项所述的功能化纳米金。

18. 如权利要求17所述的分析探针，其特征在于，所述分析探针是化学发光分析探针。

15 19. 如权利要求17所述的分析探针，其特征在于，所述功能化纳米金与选自下组的探测分子直接相连、或通过结合对或连接基团间接相连：

(a)对目标分析物具有结合特异性的结合分子；或

(b)与目标分析物竞争结合捕获探针的竞争性分子。

20 20. 如权利要求19所述的分析探针，其特征在于，所述结合对选自：生物素-链霉亲和素、生物素-亲和素、生物素-中性亲和素、凝集素与糖类、葡萄球菌A蛋白与IgG、抗原与抗体、阳离子与阴离子、或激素维生素和脂质与受体；所述连接基团选自：巯基或氨基。

21. 如权利要求17所述的分析探针，其特征在于，所述分析探针为免疫分析探针，其包含与功能化纳米金连接的、选自下组的探测分子：抗体、抗原或半抗原、或它们的活性片段。

25 22. 如权利要求21所述的分析探针，其特征在于，所述探测分子与功能化纳米金直接连接；或者，所述探测分子通过其端基修饰的结合对成员，与连接有结合对另一成员的功能化纳米金连接。

23. 如权利要求17所述的分析探针，其特征在于，所述分析探针为核酸分析探针，其包含与功能化纳米金连接的核酸分子。

30 24. 如权利要求23所述的分析探针，其特征在于，所述核酸分子通过其端基修饰的结合对成员，与连接有结合对另一成员的功能化纳米金连接；或者，所述核酸分子通过其端基修饰的巯基与功能化纳米金连接。

35 25. 一种制备分析探针的方法，所述方法包括使得权利要求1-7中任一项所述的功能化纳米金与探测分子连接的步骤。

26. 如权利要求25所述的方法，其特征在于，所述分析探针是免疫分析探针，所述方法包括：

1) 在所述探测分子端基修饰结合对成员, 然后通过结合对另一成员与所述功能化纳米金连接; 或者

2) 将所述探测分子直接与所述功能化纳米金连接。

27. 如权利要求26所述的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

- 5       i) 提供功能化纳米金; 以及  
      ii) 孵育功能化纳米金与探测分子, 得到所述免疫分析探针。

28. 如权利要求25所述的方法, 其特征在于, 所述分析探针是核酸探针, 所述方法包括:

10       1') 提供端基修饰有结合对成员的核酸分子, 然后通过结合对的另一成员与所述功能化纳米金连接; 或者

      2') 在所述核酸分子端基修饰巯基, 然后与所述功能化纳米金连接。

29. 如权利要求28所述的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

- i) 提供端基修饰有结合对成员的核酸分子;  
      ii') 提供功能化纳米金, 并将其与结合对另一成员一起孵育, 得到连接有  
15       结合对另一成员的功能化纳米金;  
      iii') 孵育所述端基修饰有结合对成员的核酸分子与所述连接有结合对另一成员的功能化纳米金, 得到所述核酸分析探针。

30. 一种采用权利要求17-24中任一项所述的分析探针的分析方法, 其包括:  
20       将权利要求17-24中任一项所述的分析探针与待测样品和捕获探针接触, 形成包含分析探针/目标分析物/捕获探针复合物或分析探针/捕获探针复合物的体系;

      检测包含分析探针的复合物的发光, 以确定所述样品中目标分析物的含量。

31. 如权利要求30所述的分析方法, 其特征在于, 所述分析方法是化学发光分  
25       析方法。

32. 如权利要求30所述的分析方法, 其特征在于, 所述样品选自: 生物样品、食品或饮料样品、化学样品或环境样品。

33. 如权利要求30所述的分析方法, 其特征在于, 所述方法包括:

30       A) 提供权利要求17-24中任一项所述的分析探针, 所述分析探针包含对目标分析物具有结合特异性的结合分子;

      B) 提供捕获探针;

      C) 将待测样品与所述捕获探针一起孵育, 形成目标分析物/捕获探针复合物;

      D) 孵育所述目标分析物/捕获探针复合物与步骤A)中的分析探针, 形成分析探  
      针/目标分析物/捕获探针复合物;

35       E) 对所述分析探针/目标分析物/捕获探针复合物进行发光检测。

34. 如权利要求30所述的分析方法, 其特征在于, 所述方法包括:

      A') 提供权利要求17-24中任一项所述的分析探针, 所述分析探针包含与目标分析物竞争结合捕获探针的竞争性分子;

      B') 提供捕获探针;

40       C') 将待测样品和分析探针同时与所述捕获探针孵育, 使目标分析物或分析探

针竞争性结合捕获探针，形成目标分析物/捕获探针复合物和/或分析探针/捕获探针复合物；

D') 对步骤C'所得的分析探针/捕获探针复合物进行发光检测。

35. 如权利要求33或34所述的分析方法，其特征在于，步骤B或B'中的捕获探针与固相载体或带有修饰层的固相载体连接。

36. 如权利要求30所述的分析方法，其特征在于，所述方法包括步骤：

A、提供权利要求17-24中任一项所述的分析探针；

B、提供固相载体，或组装有具有连接功能的修饰层的修饰层/固相载体；

10 C、孵育捕获探针与步骤B的固相载体或修饰层/固相载体，使捕获探针连接到固相载体或修饰层/固相载体上，形成捕获探针/固相载体复合物或捕获探针/修饰层/固相载体复合物；

D、孵育目标分析物与步骤C所得到的复合物，使所述复合物与目标分析物结合，形成目标分析物/捕获探针/固相载体复合物或目标分析物/捕获探针/修饰层/固相载体复合物；

15 E、孵育步骤D所得到的复合物与步骤A的分析探针，形成分析探针/目标分析物/捕获探针/固相载体夹心式复合物或分析探针/目标分析物/捕获探针/修饰层/固相载体夹心式复合物；

F、检测步骤E所得到的夹心式复合物的发光。

20 37. 如权利要求所述的36所述的分析方法，其特征在于，所述固相载体为电极、磁微珠、微孔板、尼龙或玻璃；所述修饰层由下述1)和2)的物质组成：1)具有连接功能的桥联分子或具有连接功能的桥联基团；2)连接有链霉亲和素的纳米金；所述连接有链霉亲和素的纳米金通过所述桥联分子或所述桥联基团连接到所述固相载体上。

25 38. 如权利要求36所述的分析方法，其特征在于，所述步骤B中的组装是通过方式a)或方式b)进行的：

30 a) 所述固相载体为电极，所述修饰层中的连接有链霉亲和素的纳米金通过所述桥联分子连接到所述电极上；所述电极为金电极时，所述桥联分子为双巯基化合物或同时具有氨基和巯基的化合物；所述电极为氧化铟锡电极时，所述桥联分子为具有巯基或氨基的硅烷化试剂或同时具有氨基和巯基的化合物；所述电极为玻碳电极时，所述桥联分子为双巯基化合物、双氨基化合物、具有巯基或氨基的硅烷化试剂或同时具有氨基和巯基的化合物；所述电极为铂电极时，所述桥联分子为同时具有氨基和巯基的化合物；

35 b) 所述固相载体为磁微珠或尼龙，所述修饰层中连接有链霉亲和素的纳米金通过桥联基团连接到氨基化磁微珠或尼龙上，所述桥联基团为氨基；所述固相载体为微孔板或玻璃时，所述修饰层中的连接有链霉亲和素的纳米金通过桥联基团连接到巯基或氨基化的微孔板或玻璃上，所述桥联基团为巯基或氨基。

39. 如权利要求38所述的分析方法，其特征在于，所述修饰层中的连接有链霉亲和素的纳米金的粒径为5-50 nm。

40 40. 如权利要求36所述的分析方法，其特征在于，所述的捕获探针为抗体或连接有桥联分子的抗体、或端基修饰有桥联分子或桥联基团的核酸分子。

41. 如权利要求40所述的分析方法，其特征在于，所述桥联分子为生物素；所述桥联基团为巯基。

42. 如权利要求36所述的方法，其特征在于，所述目标分析物选自：蛋白质或多肽(抗原、抗体、多肽)、核酸(DNA、RNA、适配体)、微生物(如病毒、细菌、真菌)、脂肪酸、维生素、药物、金属离子、有机物、氨基酸、生物毒素、化学毒素或细胞。

43. 如权利要求30或36所述的分析方法，其特征在于，所述发光的检测是化学发光检测。

44. 如权利要求43所述的分析方法，其特征在于，所述化学发光检测包括：将包含待测复合物的体系放入化学发光池中，加入底液，产生化学发光，并用发光检测仪进行检测。

45. 如权利要求44所述的分析方法，其特征在于，所述化学发光池为电致化学发光池，在加入底液和施加电压的条件下产生化学发光。

46. 如权利要求44所述的分析方法，其特征在于，所述底液为氧化剂或其溶液。

47. 如权利要求43所述的分析方法，其特征在于，在发光检测前，还包括用洗液洗去未结合的分析探针的步骤。

48. 一种试剂盒，其包含权利要求17-24中任一项所述的分析探针，或用于权利要求30-47中任一项所述的分析方法。

49. 如权利要求48所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒还任选包含选自下组的物质：

捕获探针、固相载体、固相载体修饰物、底液、洗液、缓冲液、一个或多个容器、化学发光发生和/或检测仪器，

其中，所述固相载体、固相载体修饰物、捕获探针任选以修饰层/固相载体、捕获探针/修饰层、或捕获探针/修饰层/固相载体的形式存在。

## 经修改的权利要求

国际局收到日：2011年6月22日（22.06.2011）

权 利 要 求 书

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。

5 2. 如权利要求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连接于所述金纳米粒子的表面。

3. 如权利要求1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选自下组：单分散球状、球状功能化纳米金组装的链状、球状功能化纳米金组装的准网状、或球状功能化纳米金组装的网状。

10 4. 如权利要求3所述的功能化纳米金，其特征在于，所述单分散球状的功能化纳米金、或者组装成链状、准网状或网状的球状功能化纳米金的粒径为5-50纳米。

5. 如权利要求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。

15 6. 如权利要求1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。

7. 如权利要求6所述的功能化纳米金，其特征在于，所述氧化剂选自： $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2$ 、 $\text{ClO}^-$ 、 $\text{I}_2$ 、 $\text{IO}_4^-$ 或 $\text{MnO}_4^-$ 。

20 8. 一种制备权利要求1-7中任一项所述的功能化纳米金的方法，所述方法包括如下步骤：

(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混合，得到混合液；

25 (2) 在步骤(1)所得的混合液中加入氯金酸水溶液B，混合至形成金溶胶，所述金溶胶即为功能化纳米金。

9. 如权利要求8所述的方法，其特征在于，所述方法包括如下步骤：

30 (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。

35 10. 如权利要求8所述的方法，其特征在于，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1-6倍。

40 11. 如权利要求8所述的方法，其特征在于，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0.5-5倍。

12. 如权利要求8所述的方法, 其特征在于, 所述氯金酸水溶液A和B中氯金酸的物质的量的总和是步骤(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2-10倍。

13. 如权利要求8或9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; 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; 所述氯金酸水溶液B的摩尔浓度为1-10 mmol/L。

14. 如权利要求8或9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与所述氯金酸水溶液B的物质的量的比例选自h1-h10:

h1: 4: 1: 1; h2: 2: 1: 3; h3: 2.7: 1: 1.8; h4: 2.3: 1: 1.4;  
h5: 2.7: 1: 2.1; h6: 2.7: 1: 2.4; h7: 2.7: 1: 2.7; h8: 3: 1: 2;  
h9:  $\frac{27}{11}$ : 1:  $\frac{18}{11}$ ; h10: 2.25: 1: 1.5。

15. 如权利要求8或9所述的方法, 其特征在于, 所述方法还包括对步骤(2)所得的金溶胶进行纯化的步骤。

16. 如权利要求8或9所述的方法, 其特征在于, 所述步骤(1)和步骤(2)各自在10-40℃的温度范围内进行。

17. 如权利要求8或9所述的方法, 其特征在于, 步骤(1)和步骤(2)的反应时间分别为1-10小时。

18. 如权利要求8或9所述的方法, 其特征在于, 所述方法中配制水溶液或稀释反应体系用的水的电阻率大于或等于1.0 MΩ\*cm。

19. 一种分析探针, 其包含作为发光标记物的权利要求1-7中任一项所述的功能化纳米金。

20. 如权利要求19所述的分析探针, 其特征在于, 所述分析探针是化学发光分析探针。

21. 如权利要求19所述的分析探针, 其特征在于, 所述功能化纳米金与选自下组的探测分子直接相连、或通过结合对或连接基团间接相连:

(a)对目标分析物具有结合特异性的结合分子; 或  
(b)与目标分析物竞争结合捕获探针的竞争性分子。

22. 如权利要求21所述的分析探针, 其特征在于, 所述结合对选自: 生物素-链霉亲和素、生物素-亲和素、生物素-中性亲和素、凝集素与糖类、葡萄糖球菌A蛋白与IgG、抗原与抗体、阳离子与阴离子、或激素维生素和脂质与受体; 所述连接基团选自: 巯基或氨基。

23. 如权利要求19所述的分析探针, 其特征在于, 所述分析探针为免疫分析探针, 其包含与功能化纳米金连接的、选自下组的探测分子: 抗体、抗原或半抗原、或它们的活性片段。

24. 如权利要求23所述的分析探针, 其特征在于, 所述探测分子与功能化纳米金直接连接; 或者, 所述探测分子通过其端基修饰的结合对成员, 与连接有结合对另一成员的功能化纳米金连接。

25. 如权利要求19所述的分析探针，其特征在于，所述分析探针为核酸分析探针，其包含与功能化纳米金连接的核酸分子。

26. 如权利要求25所述的分析探针，其特征在于，所述核酸分子通过其端基修饰的结合对成员，与连接有结合对另一成员的功能化纳米金连接；或者，  
5 所述核酸分子通过其端基修饰的巯基与功能化纳米金连接。

27. 一种制备分析探针的方法，所述方法包括使得权利要求1-7中任一项所述的功能化纳米金与探测分子连接的步骤。

28. 如权利要求27所述的方法，其特征在于，所述分析探针是免疫分析探针，所述方法包括：  
10

1) 在所述探测分子端基修饰结合对成员，然后通过结合对另一成员与所述功能化纳米金连接；或者

2) 将所述探测分子直接与所述功能化纳米金连接。

29. 如权利要求28所述的方法，其特征在于，所述方法包括：

15 i) 提供功能化纳米金；以及

ii) 孵育功能化纳米金与探测分子，得到所述免疫分析探针。

30. 如权利要求27所述的方法，其特征在于，所述分析探针是核酸探针，所述方法包括：

20 1') 提供端基修饰有结合对成员的核酸分子，然后通过结合对的另一成员与所述功能化纳米金连接；或者

2') 在所述核酸分子端基修饰巯基，然后与所述功能化纳米金连接。

31. 如权利要求30所述的方法，其特征在于，所述方法包括：

i') 提供端基修饰有结合对成员的核酸分子；

25 ii') 提供功能化纳米金，并将其与结合对另一成员一起孵育，得到连接有结合对另一成员的功能化纳米金；

iii') 孵育所述端基修饰有结合对成员的核酸分子与所述连接有结合对另一成员的功能化纳米金，得到所述核酸分析探针。

32. 一种采用权利要求19-26中任一项所述的分析探针的分析方法，其包括：  
30 将权利要求19-26中任一项所述的分析探针与待测样品和捕获探针接触，形成包含分析探针/目标分析物/捕获探针复合物或分析探针/捕获探针复合物的体系；

检测包含分析探针的复合物的发光，以确定所述样品中目标分析物的含量。

33. 如权利要求32所述的分析方法，其特征在于，所述分析方法是化学发光分析  
35 析方法。

34. 如权利要求32所述的分析方法，其特征在于，所述样品选自：生物样品、食品或饮料样品、化学样品或环境样品。

35. 如权利要求32所述的分析方法，其特征在于，所述方法包括：

40 A) 提供权利要求19-26中任一项所述的分析探针，所述分析探针包含对目标分析物具有结合特异性的结合分子；

B) 提供捕获探针；  
C) 将待测样品与所述捕获探针一起孵育，形成目标分析物/捕获探针复合物；  
D) 孵育所述目标分析物/捕获探针复合物与步骤A)中的分析探针，形成分析探针/目标分析物/捕获探针复合物；

5 E) 对所述分析探针/目标分析物/捕获探针复合物进行发光检测。

36. 如权利要求32所述的分析方法，其特征在于，所述方法包括：

A') 提供权利要求19-26中任一项所述的分析探针，所述分析探针包含与目标分析物竞争结合捕获探针的竞争性分子；

B') 提供捕获探针；

10 C') 将待测样品和分析探针同时与所述捕获探针孵育，使目标分析物或分析探针竞争性结合捕获探针，形成目标分析物/捕获探针复合物和/或分析探针/捕获探针复合物；

D') 对步骤C'所得的分析探针/捕获探针复合物进行发光检测。

15 37. 如权利要求35或36所述的分析方法，其特征在于，步骤B或B'中的捕获探针与固相载体或带有修饰层的固相载体连接。

38. 如权利要求32所述的分析方法，其特征在于，所述方法包括步骤：

A、提供权利要求19-26中任一项所述的分析探针；

B、提供固相载体，或组装有具有连接功能的修饰层的修饰层/固相载体；

20 C、孵育捕获探针与步骤B的固相载体或修饰层/固相载体，使捕获探针连接到固相载体或修饰层/固相载体上，形成捕获探针/固相载体复合物或捕获探针/修饰层/固相载体复合物；

D、孵育目标分析物与步骤C所得到的复合物，使所述复合物与目标分析物结合，形成目标分析物/捕获探针/固相载体复合物或目标分析物/捕获探针/修饰层/固相载体复合物；

25 E、孵育步骤D所得到的复合物与步骤A的分析探针，形成分析探针/目标分析物/捕获探针/固相载体夹心式复合物或分析探针/目标分析物/捕获探针/修饰层/固相载体夹心式复合物；

F、检测步骤E所得到的夹心式复合物的发光。

30 39. 如权利要求所述的38所述的分析方法，其特征在于，所述固相载体为电极、磁微珠、微孔板、尼龙或玻璃；所述修饰层由下述1)和2)的物质组成：1)具有连接功能的桥联分子或具有连接功能的桥联基团；2)连接有链霉亲和素的纳米金；所述连接有链霉亲和素的纳米金通过所述桥联分子或所述桥联基团连接到所述固相载体上。

35 40. 如权利要求38所述的分析方法，其特征在于，所述步骤B中的组装是通过方式a)或方式b)进行的：

40 a) 所述固相载体为电极，所述修饰层中的连接有链霉亲和素的纳米金通过所述桥联分子连接到所述电极上；所述电极为金电极时，所述桥联分子为双巯基化合物或同时具有氨基和巯基的化合物；所述电极为氧化铟锡电极时，所述桥联分子为具有巯基或氨基的硅烷化试剂或同时具有氨基和巯基的化合物；所述电极为玻碳电极时，所述桥联分子为双巯基化合物、双氨基化合物、具有巯

基或氨基的硅烷化试剂或同时具有氨基和巯基的化合物；所述电极为铂电极时，所述桥联分子为同时具有氨基和巯基的化合物；

- 5 b) 所述固相载体为磁微珠或尼龙，所述修饰层中连接有链霉亲和素的纳米金通过桥联基团连接到氨基化磁微珠或尼龙上，所述桥联基团为氨基；所述固相载体为微孔板或玻璃时，所述修饰层中的连接有链霉亲和素的纳米金通过桥联基团连接到巯基或氨基化的微孔板或玻璃上，所述桥联基团为巯基或氨基。

41. 如权利要求40所述的分析方法，其特征在于，所述修饰层中的连接有链霉亲和素的纳米金的粒径为5-50 nm。

- 10 42. 如权利要求38所述的分析方法，其特征在于，所述的捕获探针为抗体或连接有桥联分子的抗体、或端基修饰有桥联分子或桥联基团的核酸分子。

43. 如权利要求42所述的分析方法，其特征在于，所述桥联分子为生物素；所述桥联基团为巯基。

- 15 44. 如权利要求38所述的方法，其特征在于，所述目标分析物选自：蛋白质或多肽(抗原、抗体、多肽)、核酸(DNA、RNA、适配体)、微生物(如病毒、细菌、真菌)、脂肪酸、维生素、药物、金属离子、有机物、氨基酸、生物毒素、化学毒素或细胞。

45. 如权利要求32或38所述的分析方法，其特征在于，所述发光的检测是化学发光检测。

- 20 46. 如权利要求45所述的分析方法，其特征在于，所述化学发光检测包括：将包含待测复合物的体系放入化学发光池中，加入底液，产生化学发光，并用发光检测仪进行检测。

47. 如权利要求46所述的分析方法，其特征在于，所述化学发光池为电致化学发光池，在加入底液和施加电压的条件下产生化学发光。

- 25 48. 如权利要求46所述的分析方法，其特征在于，所述底液为氧化剂或其溶液。

49. 如权利要求45所述的分析方法，其特征在于，在发光检测前，还包括用洗液洗去未结合的分析探针的步骤。

- 30 50. 一种试剂盒，其包含权利要求19-26中任一项所述的分析探针，或用于权利要求32-49中任一项所述的分析方法。

51. 如权利要求50所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒还任选包含选自下组的物质：

捕获探针、固相载体、固相载体修饰物、底液、洗液、缓冲液、一个或多个容器、化学发光发生和/或检测仪器，

- 35 其中，所述固相载体、固相载体修饰物、捕获探针任选以修饰层/固相载体、捕获探针/修饰层、或捕获探针/修饰层/固相载体的形式存在。

## 按条约 19 条第(1)所作的声明

### 一、关于修改

申请人在收到国际检索报告后对原始提交的权利要求书做出如下修改，这些修改均基于原始公开的说明书和权利要求书，并未引入新的内容：

**1. 将原权利要求 1 修改为封闭式权利要求；**

该权利要求的技术方案可从权利要求 1 中直接而毫无疑义地获得。

**2. 新增权利要求 5；**

该权利要求的技术方案基于例如说明书第 11 页第 1-2 行中的记载。

**3. 新增权利要求 9；**

该权利要求的技术方案基于原始申请权利要求 7 和说明书第 4 页第 18-30 行中的记载。

**4. 适应性的修改了其余权利要求的序号及引用部分**

### 二、关于修改后的权利要求享有优先权的说明

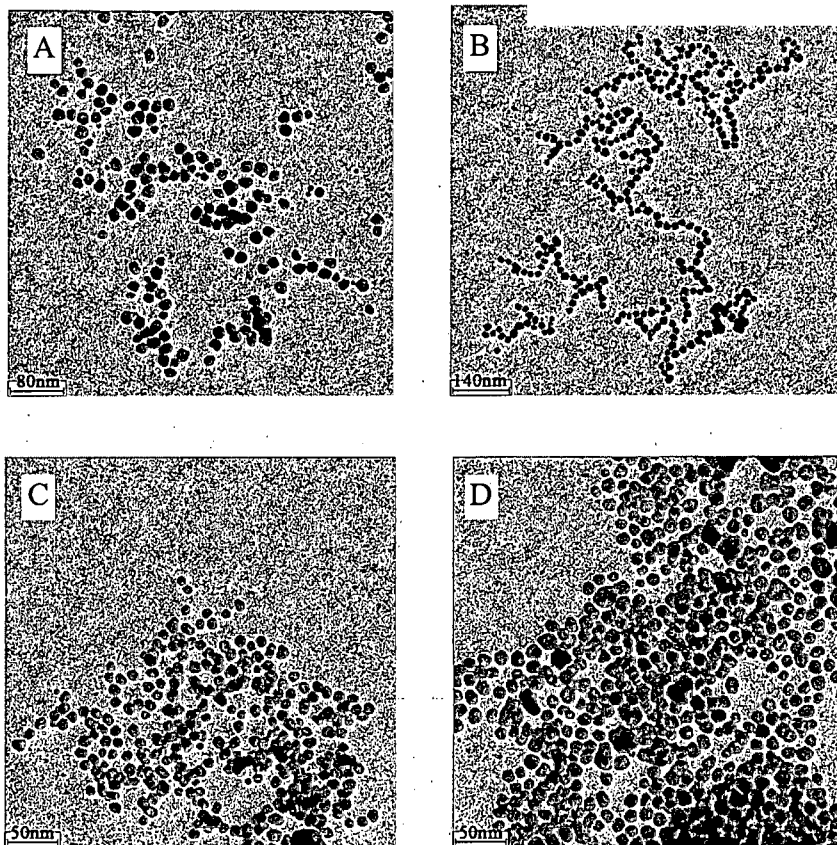
国际检索单位书面意见第 II 栏中指出“权利要求 1 的主题与在先申请权利要求 1 的主题不同，而且也未在要求优先权的在先申请中记载。因而。权利要求 1 所要求的优先权是无效的，直接或间接引用该权利要求的权利要求 2-49 所要求的优先权也是无效的”。

本 PCT 申请的权利要求 1 的主题是“一种功能化纳米金，其包含：金纳米粒子和与该金纳米粒子连接的 N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺”，而在先申请权利要求 1 的主题是“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”。

显然，以开放式形式撰写的本申请的权利要求中隐含且毫无疑义地包含了相应的、以封闭式形式表达的技术方案，即包含在先申请权利要求 1 的技术方案。因此，本申请权利要求 1 中对应于在先申请权利要求 1 的技术方案应当享有优先权。

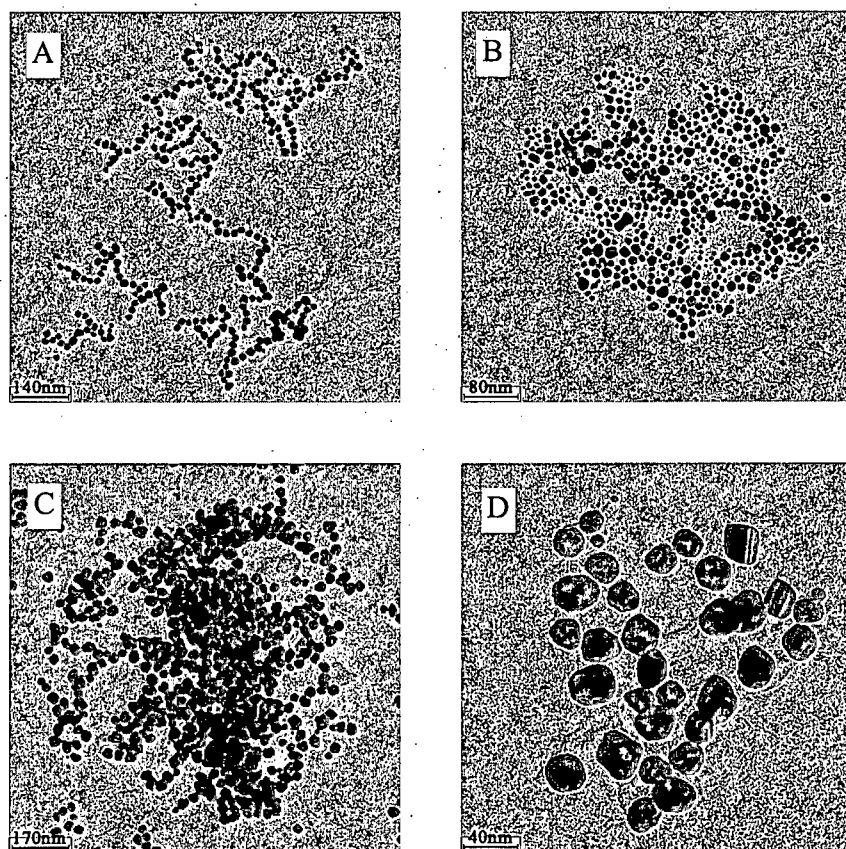
然而，为了便于今后的审查，申请人将本申请的权利要求 1 的主题修改为与在先申请权利要求 1 的主题完全一致。

修改后的新权利要求 1 的主题与在先申请权利要求 1 的主题一致，因此可享有在先申请的优先权。并且，直接或间接引用该权利要求的权利要求 2-51 所要求的优先权也是有效的。



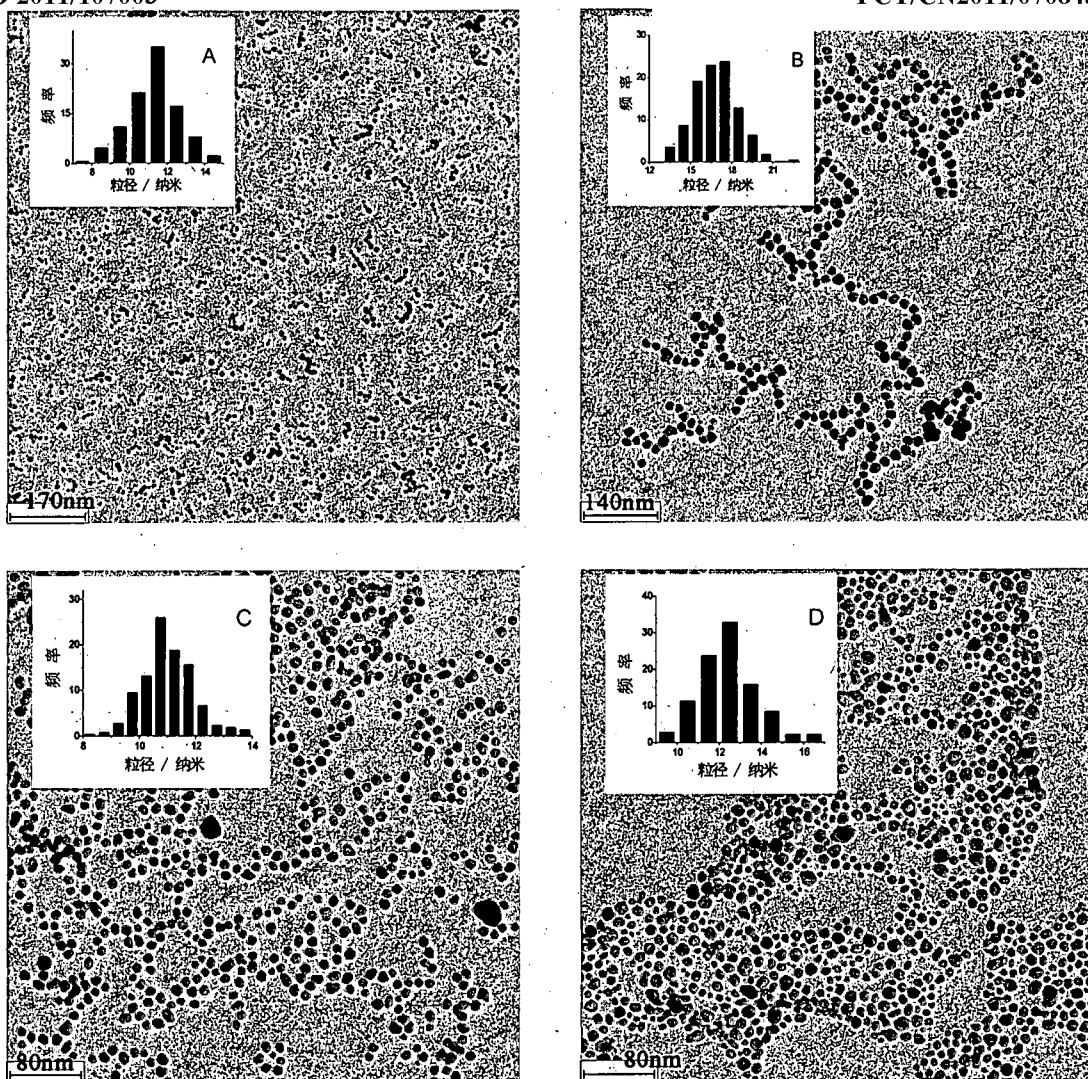
图

1



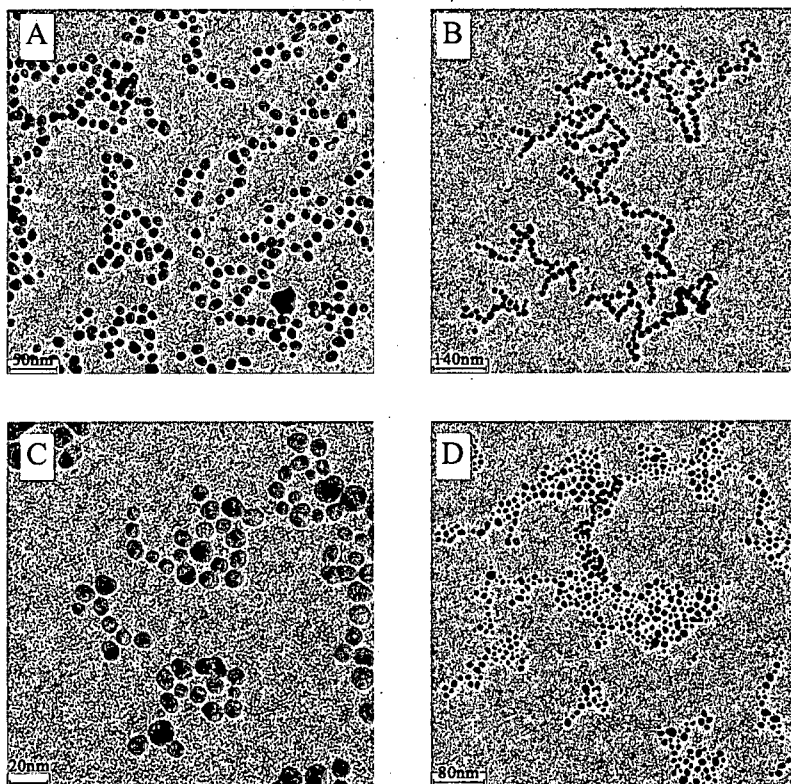
图

2



图

3



图

4

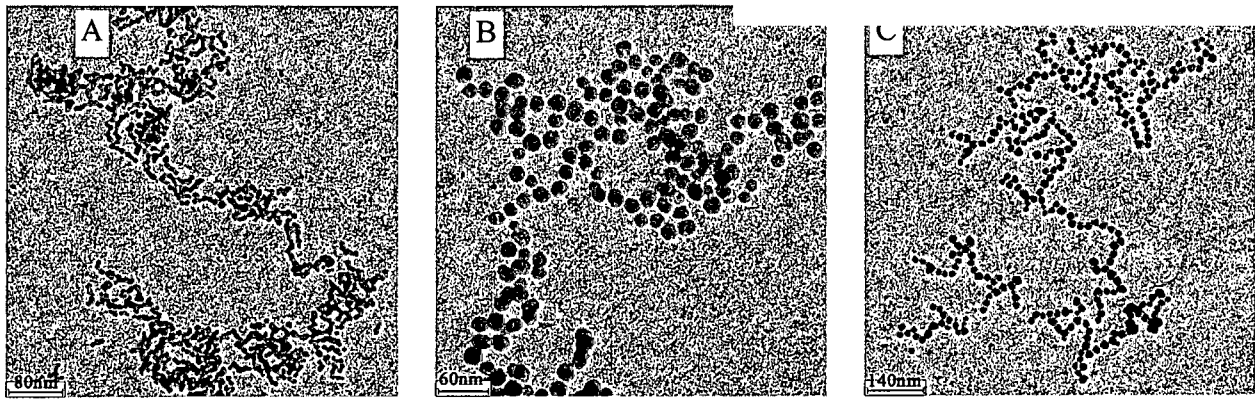


图 5

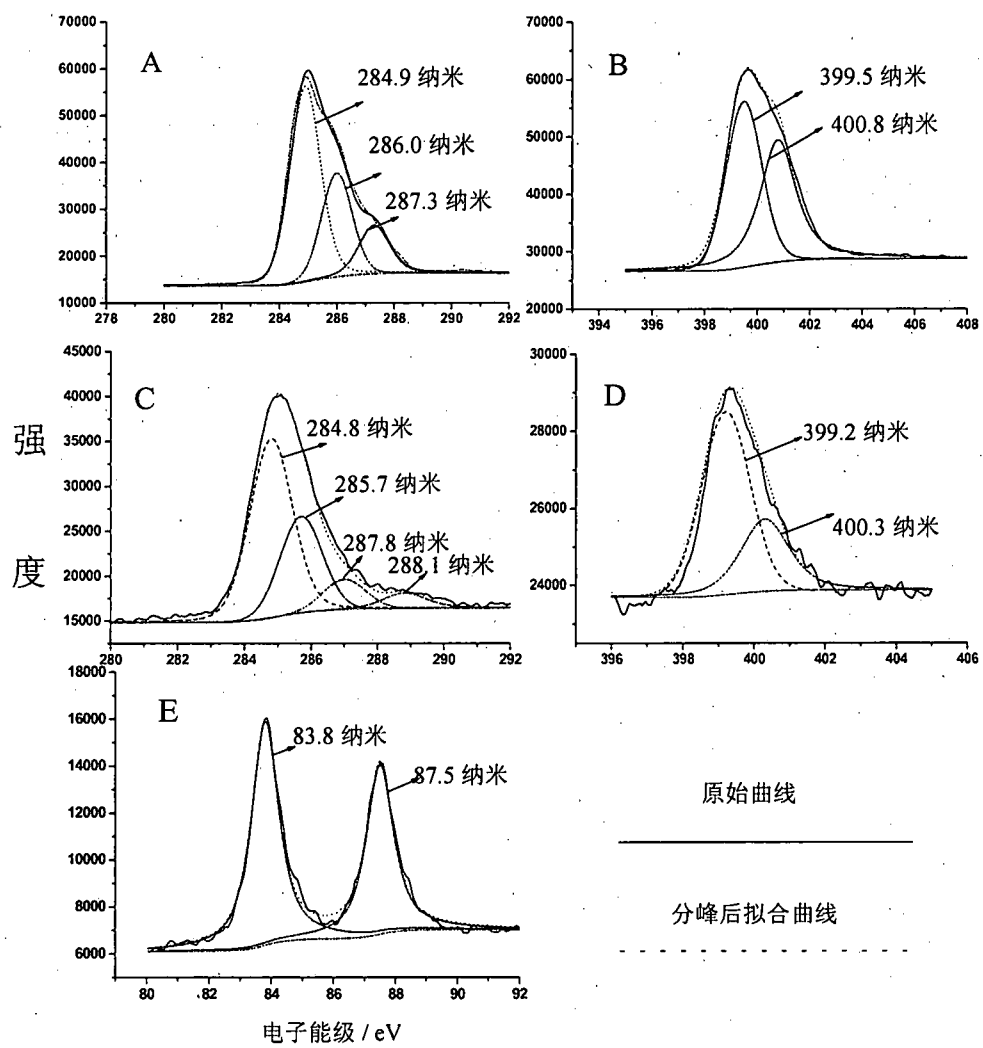


图 6

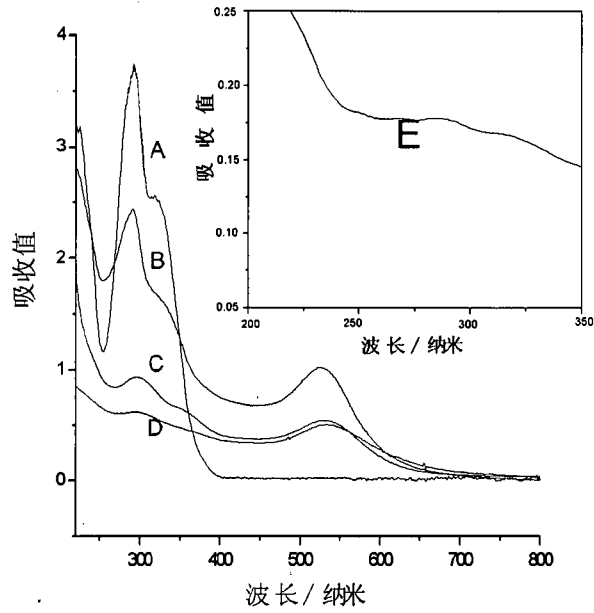


图 7

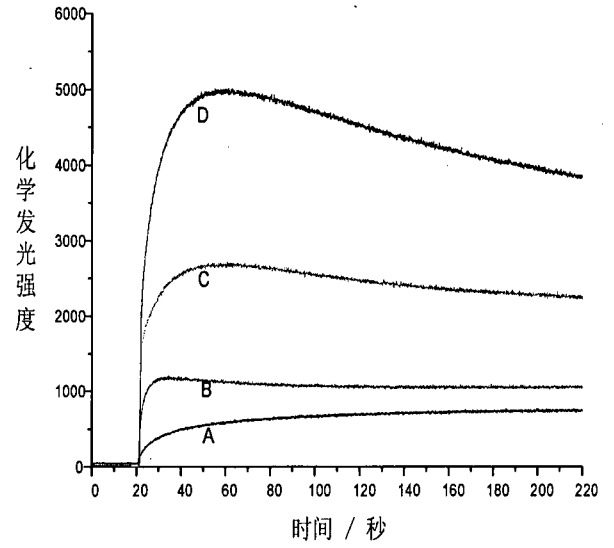


图 8

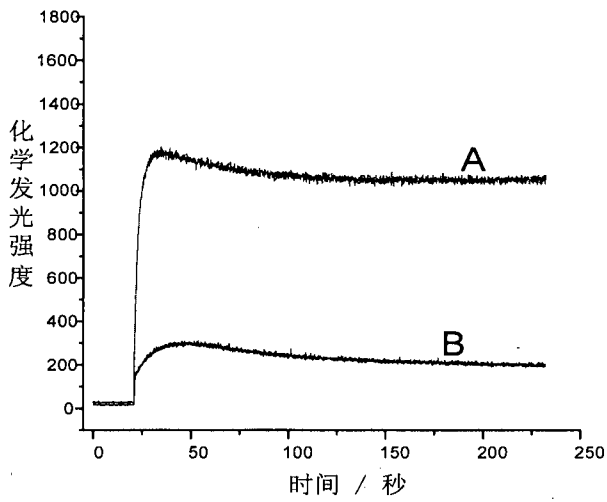


图 9

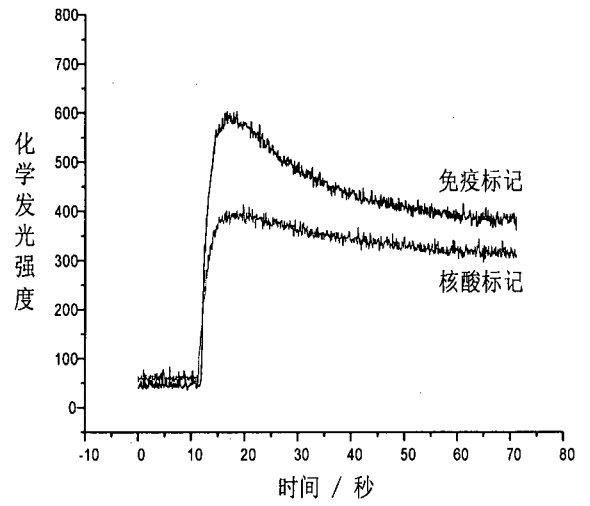


图 10

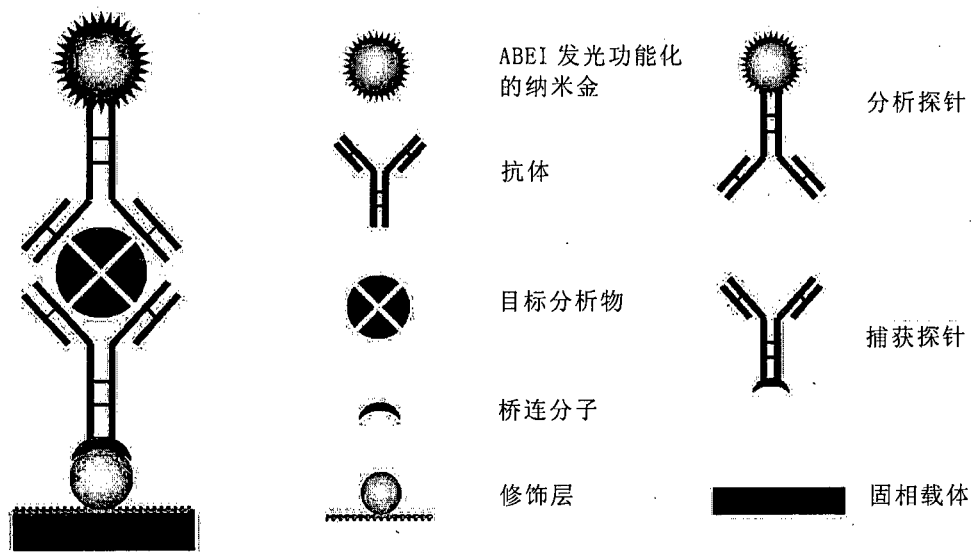


图 11

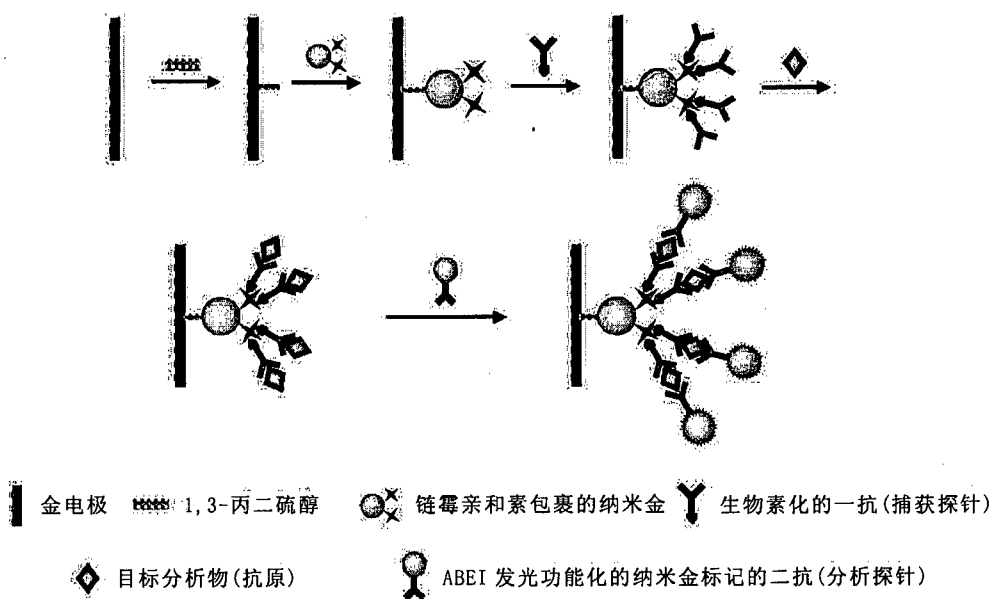


图 12

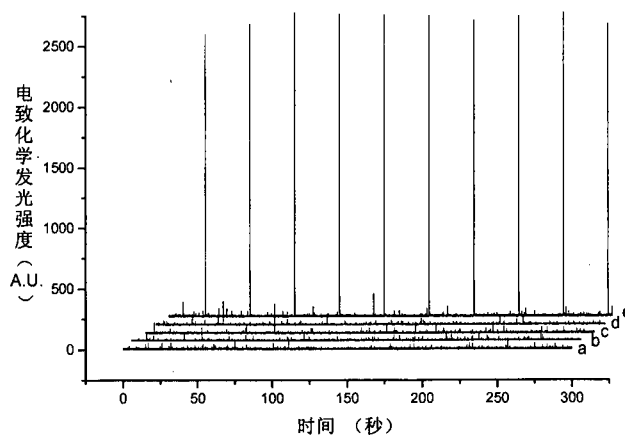


图 13

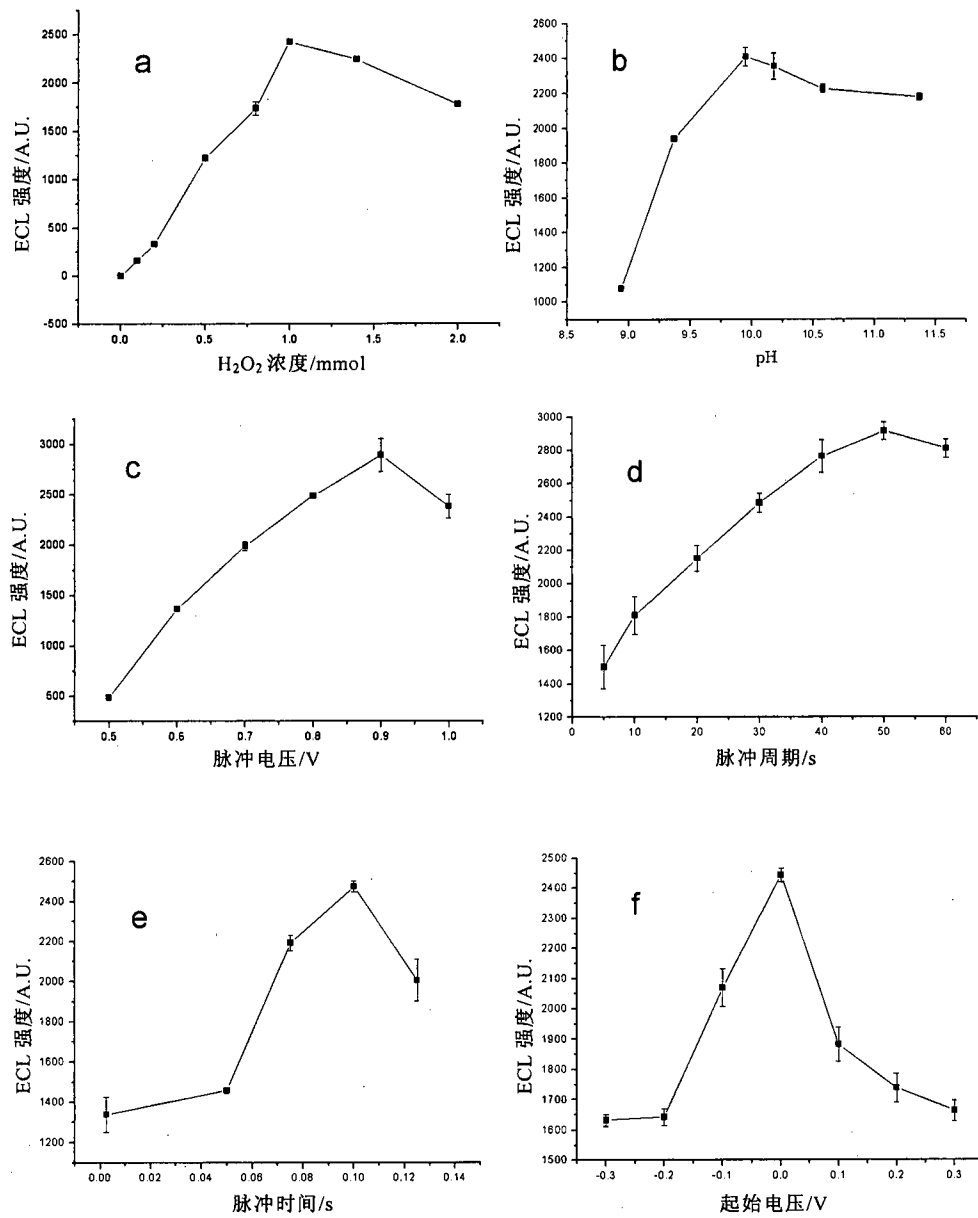


图 14

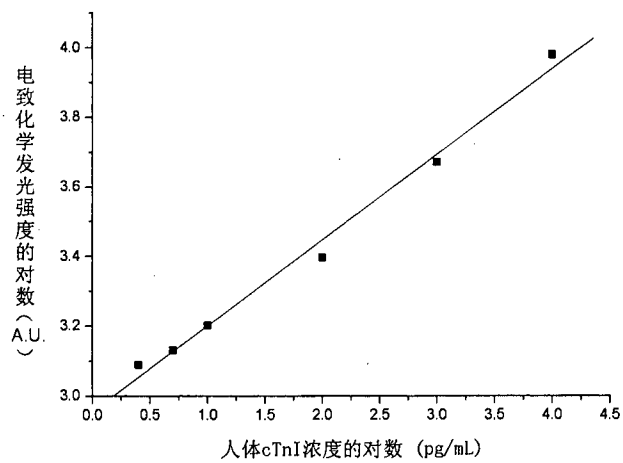


图 15

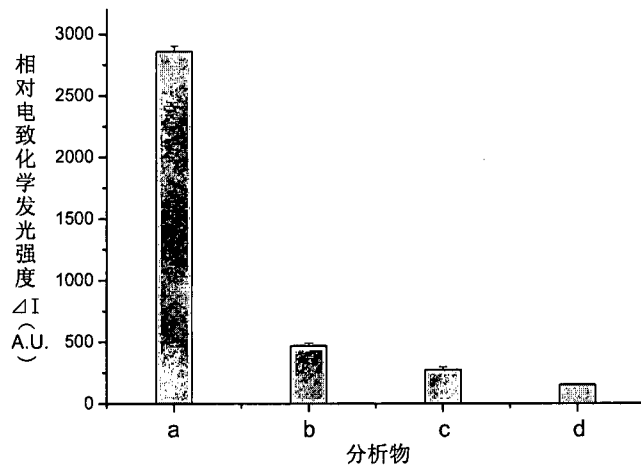


图 16

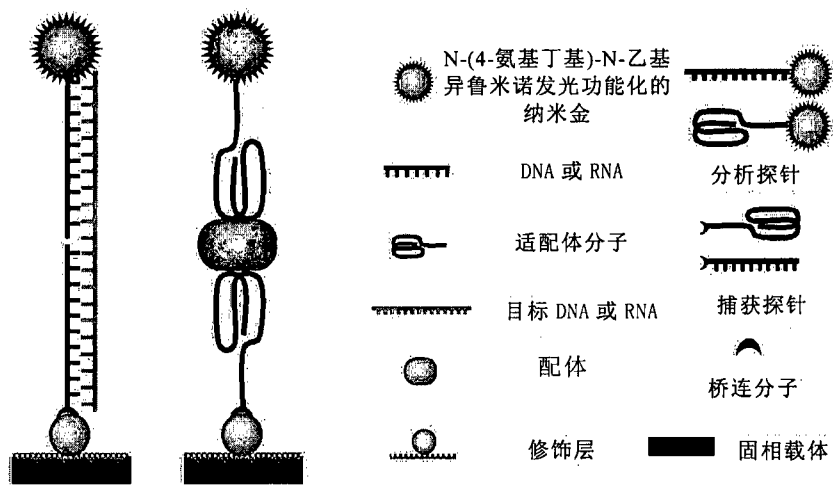


图 17

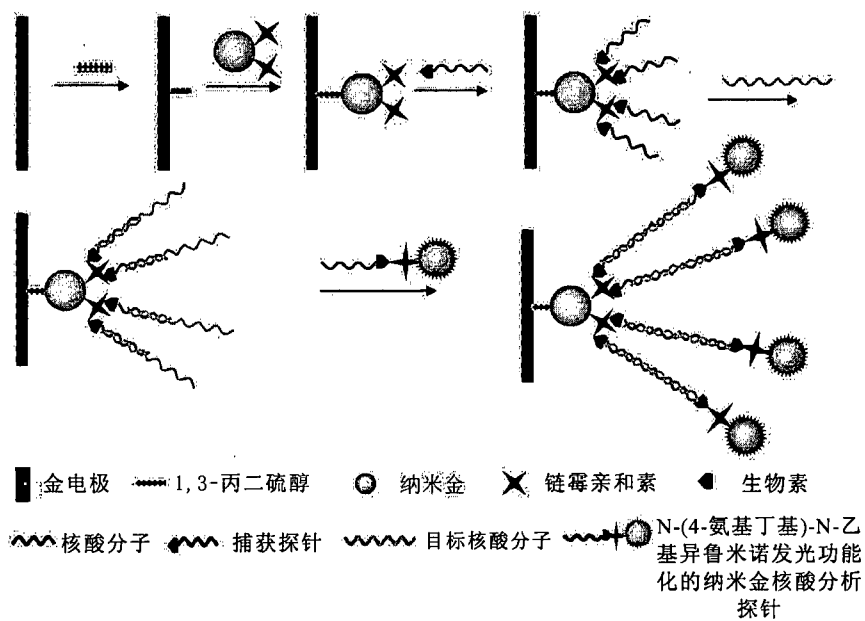


图 18

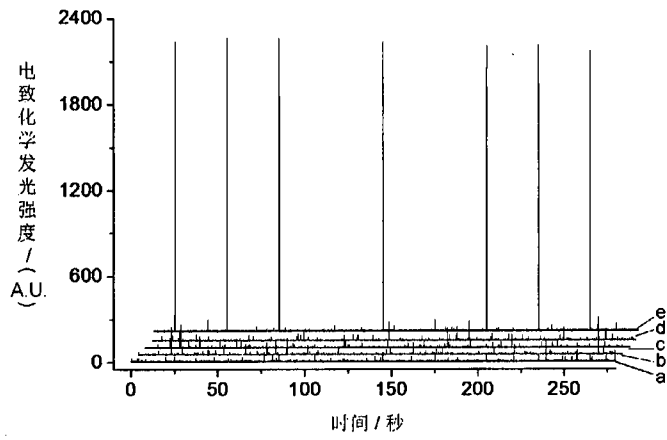


图 19

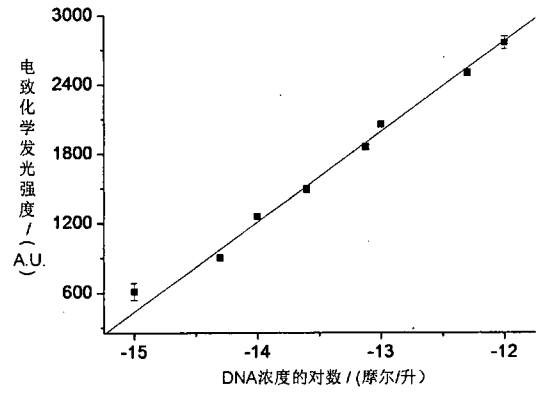


图 20

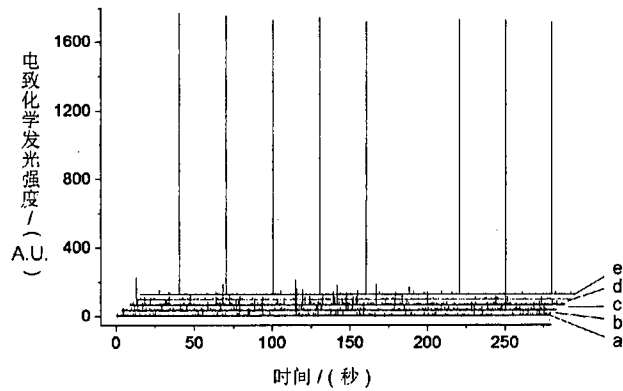


图 21

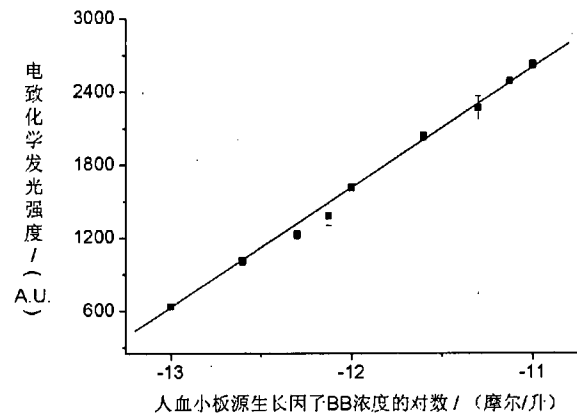


图 22

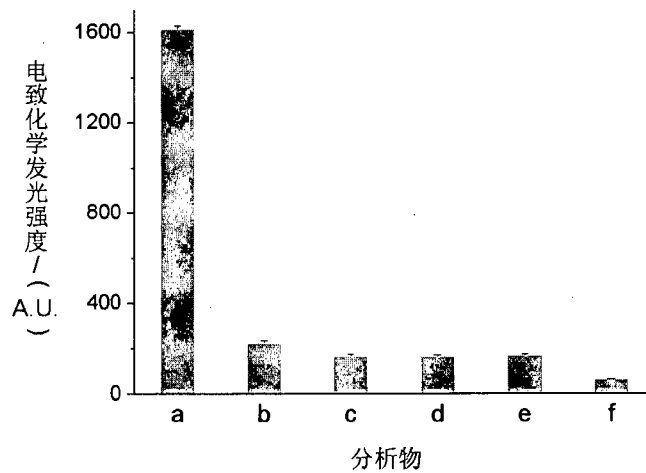


图 23

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/070843

## 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: G01N 33/-, G01N 21/-

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)

Databases: WPI; EPODOC; CNPAT; CNKI; CAplus (STN); REGISTRY (STN); CASREACT(STN); Keywords: luminol, gold, nanoparticle, electro, chemiluminescence, sensor, probe, aminobutyl, ethylisoluminol, ABEI, CAS No.: 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. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| PX        | CN101900723A (UNIV SCI&TECHNOLOGY CHINA), 01 Dec. 2010 (01.12.2010), see abstract, claims 1-20, paragraphs [0005]-[0039], [0059]-[0061] and figures 1-2, examples 1-7                                               | 1-49                  |
| PX        | TIAN D.Y. et al., "Ultrasensitive electrochemiluminescence immunosensor based on luminol functionalized gold nanoparticle labeling", Biosensors and Bioelectronics, 2010, Vol. 25, pages 2290-2295                  | 1-49                  |
| X         | CUI H. 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 | 1-49                  |

☒ 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  
10 Apr. 2011 (10.04.2011)

Date of mailing of the international search report  
**05 May 2011 (05.05.2011)**

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  
**WEN, Guoyong**  
Telephone No. (86-10)82245644

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/CN2011/070843

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                 | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | QI H. L. 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 | 1-49                  |
| A         | TIAN D.Y. et al., "Sandwich-type electrochemiluminescence immunosensor based on N-(aminobutyl)-N-ethylisoluminol labeling and gold nanoparticle amplification", Talanta, 2009, Vol. 78, pages 399-404                                                                              | 1-49                  |
| A         | US20070154967A1 (INTEL CORPORATION), 05 Jul. 2007 (05.07.2007), see columns 5-7 of description.                                                                                                                                                                                    | 1-49                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2011/070843

| Patent Documents referred<br>in the Report | Publication Date | Patent Family  | Publication Date |
|--------------------------------------------|------------------|----------------|------------------|
| CN101900723A                               | 01.12.2010       | None           |                  |
| US2007154967A1                             | 05.07.2007       | US7537934B2    | 26.05.2009       |
|                                            |                  | US2010055713A1 | 04.03.2010       |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/070843

Continuation of “CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER”

G01N 33/53 (2006.01) i

G01N 33/543 (2006.01) i

G01N 33/532 (2006.01) i

G01N 21/76 (2006.01) i

G01N 21/66 (2006.01) i

# 国际检索报告

国际申请号

**PCT/CN2011/070843**

## 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: G01N 33/-, G01N 21/-

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))

Databases: WPI; EPODOC; CNPAT; CNKI; CAlplus (STN); REGISTRY (STN); CASREACT(STN); Keywords: luminol, gold, nanoparticle, electro, chemiluminescence, sensor, probe, aminobutyl, ethylisoluminol, 鲁米诺, 纳米金, 化学发光, 免疫, 探针, 传感器, ABEL, CAS No.: 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 |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| PX   | CN101900723A (中国科学技术大学), 01. 12 月 2010 (01.12.2010), 参见摘要, 权利要求 1-20, 第[0005]-[0039], [0059]-[0061]段, 附图 1-2, 以及实施例 1-7                                                                                      | 1-49    |
| PX   | TIAN D.Y. 等, "Ultrasensitive electrochemiluminescence immunosensor based on luminol functionalized gold nanoparticle labeling", Biosensors and Bioelectronics, 2010 年, 第 25 卷, 第 2290-2295 页                 | 1-49    |
| X    | CUI H.等, "Synthesis, Characterization, and Electrochemiluminescence of Luminol-Reduced Gold Nanoparticles and Their Application in a Hydrogen Peroxide Sensor", Chem. Eur. J., 2007 年, 第 13 卷, 第 6975-6984 页 | 1-49    |

☒ 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

10. 4 月 2011 (10.04.2011)

国际检索报告邮寄日期

**05.5 月 2011 (05.05.2011)**

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

授权官员

**温国永**

电话号码: (86-10) **82245644**

## C(续). 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   | QI H. L. 等, “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, 第 75 卷, 第 684–690 页 | 1-49    |
| A   | TIAN D.Y. 等, “Sandwich-type electrochemiluminescence immunosensor based on N-(aminobutyl)-N-ethylisoluminol labeling and gold nanoparticle amplification”, Talanta, 2009 年, 第 78 卷, 第 399–404 页                                                                              | 1-49    |
| A   | US20070154967A1 (英特尔公司), 05. 7 月 2007 (05.07.2007), 参见说明书第 5-7 栏                                                                                                                                                                                                             | 1-49    |

**国际检索报告**  
关于同族专利的信息

国际申请号  
**PCT/CN2011/070843**

| 检索报告中引用的<br>专利文件 | 公布日期       | 同族专利           | 公布日期       |
|------------------|------------|----------------|------------|
| CN101900723A     | 01.12.2010 | 无              |            |
| US2007154967A1   | 05.07.2007 | US7537934B2    | 26.05.2009 |
|                  |            | US2010055713A1 | 04.03.2010 |

主题的分类:

|             |             |
|-------------|-------------|
| G01N 33/53  | (2006.01) i |
| G01N 33/543 | (2006.01) i |
| G01N 33/532 | (2006.01) i |
| G01N 21/76  | (2006.01) i |
| G01N 21/66  | (2006.01) i |