



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106248924 A

(43)申请公布日 2016.12.21

(21)申请号 201610627388.7

(22)申请日 2016.08.02

(71)申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号

(72)发明人 王光丽 曹根霞 董玉明 李小琴

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

B82Y 30/00(2011.01)

B82Y 40/00(2011.01)

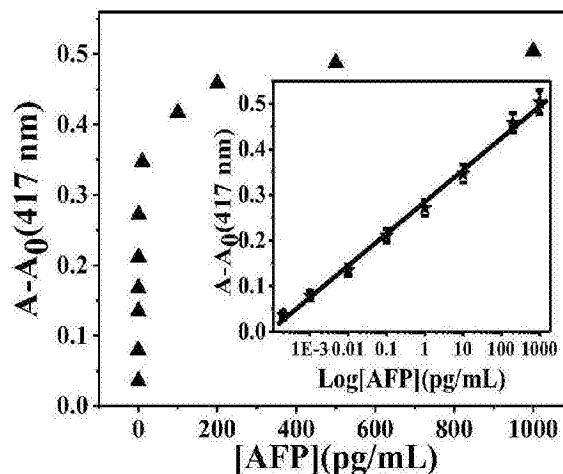
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

一种基于氧化石墨烯光活化辣根过氧化物酶的免疫分析方法

(57)摘要

本发明提供了一种基于氧化石墨烯光活化辣根过氧化物酶(HRP)的免疫分析检测方法。氧化石墨烯在光照下可以产生活性中间体光生空穴和超氧阴离子自由基,使HRP在没有H₂O₂的存在下能够催化氧化色原底物。以甲胎蛋白(AFP)为模型物,通过DNA杂交链式反应以放大信号,通过氧化石墨烯的光活化HRP作用实现底物的催化氧化,以实现免疫检测。本发明将纳米材料和天然酶的优势相结合,使得AFP的检测限达到0.0001pg/mL。本发明不仅提供了一种新型的通过光激励的纳米材料调控HRP活性的方法,同时为超灵敏的酶联免疫分析法提供了一种新途径。



1. 一种基于氧化石墨烯光活化辣根过氧化物酶的免疫分析方法,其特征在于:

a、氧化石墨烯纳米材料的制备:0℃冰浴条件下,将0.5g石墨原料与0.5g NaNO_3 置于16.5mL的98% H_2SO_4 中,室温下持续搅拌24h;随后在冰浴中保持10分钟,将3g KMnO_4 缓慢加入到混合物中,持续搅拌1h;在一定温度下继续搅拌一定时间后加入40mL去离子水;最后加入1400mL去离子水和30% H_2O_2 来终止反应;产物经过滤,经5% HCl 多次洗涤并置于50℃烘箱烘干;

b、在Au纳米粒子上固定甲胎蛋白二抗抗体和碱基序列为5'-SH-(CH_2)₆-AAAAAAGAAGGAGGGGCGACT-3'的捕获DNA₁,形成Au NPs/Ab₂/DNA₁复合物,作为信号标签诱导检测信号的产生;Au NPs/Ab₂/DNA₁复合物的制备方法如下:100mL0.01% HAuCl_4 溶液在剧烈搅拌下煮沸,然后快速加入2.5mL 1%的柠檬酸三钠溶液;当溶液的颜色由黄色转变为酒红色,继续搅拌冷却至室温得到Au纳米粒子;将40μL浓度为0.1mg/mL的甲胎蛋白二抗抗体与1.0mL Au纳米粒子在室温下混合搅拌2h,然后加入捕获DNA₁,静置过夜后用牛血清白蛋白溶液将非活性位点进行封闭,12000rpm下离心洗涤三次,并重新分散于200μL1%牛血清白蛋白溶液中;

c、甲胎蛋白的测定:将20μL 0.1mg/mL的甲胎蛋白一抗抗体固定于96孔板中,经过洗涤以及牛血清白蛋白溶液封闭后加入抗原甲胎蛋白使其充分发生免疫反应,随后96孔板中依次加入25μL的Au NP/Ab₂/DNA₁复合物,30μL浓度为5μM的生物素标记的碱基序列为5'-biotin-(CH_2)₆-GGGGCGACTTGAACAGTCGCCCTCTCTC-3'的DNA₂,浓度为5μM的碱基序列为5'-biotin-(CH_2)₆-GTTTCAAGTCGCCCCGAAGGAGGGGCGACT-3'的生物素标记的DNA₃,亲和素标记的辣根过氧化物酶,孵育洗涤后加入10μL的50mg/L的氧化石墨烯溶液,100μL pH=3.0的醋酸缓冲溶液和20μL的5mmol/L辣根过氧化物酶的特征底物,40℃条件下置于300W氙灯下用 $\lambda \geq 400\text{nm}$ 的可见光照射15min微孔板,用酶标仪测定氧化后的底物的吸收光谱。

2. 根据权利要求1所述的一种基于氧化石墨烯光活化辣根过氧化物酶的免疫分析检测方法,其特征在于所示制备氧化石墨烯时选用的原料,选自石墨粉、膨胀石墨。

3. 根据权利要求1所述的一种基于氧化石墨烯光活化辣根过氧化物酶的免疫分析检测方法,其特征在于制备氧化石墨烯时的温度为30-50℃,搅拌时间为20-60分钟。

4. 根据权利要求1所述的一种基于氧化石墨烯光活化辣根过氧化物酶的免疫分析检测方法,其特征在于所述的辣根过氧化物酶的特征底物有3,3',5,5'-四甲基联苯胺、2,2'-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐。

一种基于氧化石墨烯光活化辣根过氧化物酶的免疫分析方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及纳米材料科技领域和生物分析检测领域，尤其涉及基于纳米材料的光诱导酶催化及其在免疫分析检测中的应用。

背景技术：

[0002] 酶联免疫吸附测定法(ELISA)是在免疫酶技术的基础上发展起来的一种新型免疫测定技术，为分析化学领域的前沿课题。其核心技术是抗原或者抗体与酶的复合物相结合，然后通过酶催化反应产生信号来检测抗原或者抗体[Kawatsu K.; Hamano Y.; Sugiyama A. et al. J. Food Protect. 2002, 65, 1304-1308; Micheli L.; Di Stefano S.; Moscone D. et al. Anal. Bioanal. Chem. 2002, 373, 678-684]。其具有快速、特异性强和操作简便等优点，在化学、生命科学各领域得到广泛应用，并且已迈出医药、临床领域，步入农业、渔业、畜牧业和食品加工业。

[0003] 传统的酶联免疫吸附测定法是先酶标记抗体，再进行抗原抗体间的免疫反应，最后结合标记酶的抗体。标记在抗体上的酶通过其催化反应而产生有颜色的物质(显色)，根据颜色的深浅来判断待检测的抗原和抗体的含量。此常规方法虽然简便，但是结果的灵敏度不是令人十分满意[Duffy S.L.; Murphy J.T. Biotechniques 2001, 31, 495-496, 498, 500-501; Roda A.; Simoni P.; Mirasoli M. et al. Anal. Bioanal. Chem. 2002, 372, 751-758]。因此，寻求更高灵敏度的酶联免疫分析检测方法仍然是科学研究的目標。

[0004] 随着纳米科技的发展，纳米材料所具备的优异的性能被逐渐发现，并应用于分析检测领域，取得了可喜的成就。氧化石墨烯是一种新型的二维单原子层纳米薄片，一般是由石墨粉经化学氧化及剥离后获得的产物。由于它具有独特的电子性能，热力学特性，优异的机械性能以及光学特性，其在化学，材料，生物医学等领域引起了广泛的关注[Li X.; Ma K.; Zhu S. et al. Anal. Chem. 2013, 86, 298-303]。本发明中，我们发现了氧化石墨烯的一种独特的性能，即其能够在可见光照射下诱导出辣根过氧化物酶(HRP)的催化活性。通常，辣根过氧化物酶(作为催化剂)需要借助于过氧化氢作为触发试剂来实现对底物的催化氧化反应(反应方程式为： $\text{底物} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{HRP}} \text{氧化产物} + \text{H}_2\text{O}$)，我们通过改进后的Hummers法合成得到的氧化石墨烯能够在光照下产生超氧阴离子以及光生空穴等活性物种，这些活性物种能够活化HRP，使其在没有过氧化氢的存在下就能氧化其特征的色原底物。与通常的借助于过氧化氢/浓硫酸来引发/终止HRP的催化活性不同，我们成功的利用光照射氧化石墨烯来控制活性物种的产生，从而提供了一种更为方便、绿色(不需要额外的加入过氧化氢和浓硫酸这些破坏性的化学试剂)的调控HRP的催化活性的方法。考虑到HRP是免疫分析中广泛使用的标记物，在此基础上，我们将此种调控酶活性的方法与DNA杂交链式放大技术相结合，实现了甲胎蛋白(作为免疫分析的模型物质)的高灵敏测定。该发明不仅提供了一种新型的通过光激励的纳米材料调控HRP酶活性的方法，同时为超灵敏的酶联免疫分析法提供了一种新途径，具有广阔的应用前景。

发明内容：

[0005] 本发明的目的是提供一种基于氧化石墨烯光活化辣根过氧化物酶(HRP)的免疫分析检测方法,此方法融合了纳米材料与天然酶的优点,以甲胎蛋白为模型物质,实现了超灵敏的免疫测定。

[0006] 本发明的目的可通过如下技术措施来实现：

[0007] a、氧化石墨烯纳米材料的制备:0℃冰浴条件下,将0.5g石墨原料与0.5g NaNO₃置于16.5mL的98% H₂SO₄中,室温下持续搅拌24h;随后在冰浴中保持10分钟,将3g KMnO₄缓慢加入到混合物中,持续搅拌1h;在一定温度下继续搅拌一定时间后加入40mL去离子水;最后加入1400mL去离子水和30% H₂O₂来终止反应;产物经过滤,经5% HCl多次洗涤并置于50℃烘箱烘干;

[0008] b、在Au纳米粒子上固定甲胎蛋白二抗抗体和碱基序列为5'-SH-(CH₂)₆-AAAAAGAAGGAGGGCGACT-3'的捕获DNA₁,形成Au NPs/Ab₂/DNA₁复合物,作为信号标签诱导检测信号的产生;Au NPs/Ab₂/DNA₁复合物的制备方法如下:100mL 0.01% HAuCl₄溶液在剧烈搅拌下煮沸,然后快速加入2.5mL 1%的柠檬酸三钠溶液;当溶液的颜色由黄色转变为酒红色,继续搅拌冷却至室温得到Au纳米粒子;将40μL浓度为0.1mg/mL的甲胎蛋白二抗抗体与1.0mL Au纳米粒子在室温下混合搅拌2h,然后加入捕获DNA₁,静置过夜后用牛血清白蛋白溶液将非活性位点进行封闭,12,000rpm下离心洗涤三次,并重新分散于200μL 1%牛血清白蛋白溶液中;

[0009] c、甲胎蛋白的测定:将20μL 0.1mg/mL的甲胎蛋白一抗抗体固定于96孔板中,经过洗涤以及牛血清白蛋白溶液封闭后加入抗原甲胎蛋白使其充分发生免疫反应,随后96孔板中依次加入25μL的Au NP/Ab₂/DNA₁复合物,30μL浓度为5μM的生物素标记的碱基序列为5'-biotin-(CH₂)₆-GGGGCGACTTGAACAGTCGCCCTCTTC-3'的DNA₂,浓度为5μM的碱基序列为5'-biotin-(CH₂)₆-GTTTCAAGTCGCCCCGAAGGAGGGGCGACT-3'的生物素标记的DNA₃,亲和素标记的辣根过氧化物酶,孵育洗涤后加入10μL的50mg/L的氧化石墨烯溶液,100μL pH=3.0的醋酸缓冲溶液和20μL的5mmol/L辣根过氧化物酶的特征底物,40℃条件下置于300W氙灯下用λ≥400nm的可见光照射15min微孔板,用酶标仪测定氧化后的底物的吸收光谱。

[0010] 本发明的目的还可通过如下技术措施来实现：

[0011] 所述的制备氧化石墨烯时选用的原料,选自石墨粉、膨胀石墨;所述的制备氧化石墨烯时的温度为30-50℃,搅拌时间为20-60分钟;所述的辣根过氧化物酶的特征底物有3,3',5,5'-四甲基联苯胺、2,2'-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐。

附图说明：

[0012] 图1是发明制备的氧化石墨烯纳米材料的(A)红外光谱,(B)拉曼光谱和(C)XRD图谱。其中,插图是氧化石墨烯的透射电镜图。

[0013] 图2是不同物质的混合物在光照条件下的吸收光谱图:(a)辣根过氧化物酶与2,2'-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐的混合物;(b)氧化石墨烯与2,2'-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐的混合物;(c)辣根过氧化物酶,氧化石墨烯与2,2'-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐的混合物。辣根过氧化物酶的浓度为80mg/L,

氧化石墨烯的浓度为5mg/L,2,2'-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐的浓度为 5×10^{-4} mol/L。

[0014] 图3是不同的活性中间体清除剂对氧化石墨烯自身光氧化底物以及氧化石墨烯活化辣根过氧化物酶催化氧化底物的影响,底物为2,2'-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐。

[0015] 图4分别以氧化石墨烯自身光氧化以及氧化石墨烯活化辣根过氧化物酶催化氧化0.5mM 2,2'-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐的光开关性能。

[0016] 图5是以氧化石墨烯活化辣根过氧化物酶作为信号产生来源,以2,2'-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐为底物进行免疫检测甲胎蛋白的线性关系图(A)以及选择性(B)。

[0017] 实施实例1:

[0018] a、氧化石墨烯纳米材料的制备:0℃冰浴条件下,将0.5g石墨粉与0.5g NaNO_3 置于16.5mL的98% H_2SO_4 中,室温下持续搅拌24h;随后在冰浴中保持10分钟,将3g KMnO_4 缓慢加入到混合物中,持续搅拌1h;将温度保持在35℃继续搅拌50min后加入40mL去离子水;最后加入1400mL去离子水和30% H_2O_2 来停止反应;产物经过滤,经5% HCl 多次洗涤并置于50℃烘箱烘干;

[0019] b、在Au纳米粒子上固定甲胎蛋白二抗抗体和碱基序列为5'-SH-(CH_2)₆-AAAAAGAAGGAGGGGCGACT-3'的捕获DNA₁,形成Au NPs/Ab₂/DNA₁复合物,作为信号标签诱导检测信号的产生;Au NPs/Ab₂/DNA₁复合物的制备方法如下:100mL 0.01% HAuCl_4 溶液在剧烈搅拌下煮沸,然后快速加入2.5mL 1%的柠檬酸三钠溶液;当溶液的颜色由黄色转变为酒红色,继续搅拌冷却至室温得到Au纳米粒子;将40μL浓度为0.1mg/mL的甲胎蛋白二抗抗体与1.0mL Au纳米粒子在室温下混合搅拌2h,然后加入捕获DNA₁,静置过夜后用牛血清白蛋白溶液将非活性位点进行封闭,12000rpm下离心洗涤三次,并重新分散于200μL 1%牛血清白蛋白溶液中;

[0020] c、甲胎蛋白的测定:20μL 0.1mg/mL的甲胎蛋白一抗抗体固定于96孔板中,经过洗涤,BSA封闭后加入抗原甲胎蛋白使其充分发生免疫反应,随后96孔板中依次加入25μL的Au NP/Ab₂/DNA₁复合物,30μL浓度为5μM的生物素标记的碱基序列为5'-biotin-(CH_2)₆-GGGGCGACTTGAAACAGTCGCCCTCTTC-3'的DNA₂,浓度为5μM的碱基序列为5'-biotin-(CH_2)₆-GTTTCAAGTCGCCCCGAAGGAGGGGCGACT-3'的生物素标记的DNA₃,亲和素标记的辣根过氧化物酶,孵育洗涤后加入10μL的50mg/L的氧化石墨烯溶液,100μL pH=3.0的醋酸缓冲溶液和20μL的5mmol/L的3,3',5,5'-四甲基联苯胺,40℃条件下置于300W氙灯下用 $\lambda \geq 400\text{nm}$ 的可见光照射15min,用酶标仪测定3,3',5,5'-四甲基联苯胺氧化后的吸收光谱。

[0021] 实施实例2:

[0022] a、氧化石墨烯纳米材料的制备:0℃冰浴条件下,将0.5g膨胀石墨与0.5g NaNO_3 置于16.5mL的98% H_2SO_4 中,室温下持续搅拌24h;随后在冰浴中保持10分钟,将3g KMnO_4 缓慢加入到混合物中,持续搅拌1h;将温度保持在40℃继续搅拌30min后加入40mL去离子水;最后加入1400mL去离子水和30% H_2O_2 来停止反应;产物经过滤,经5% HCl 多次洗涤并置于50℃烘箱烘干;

[0023] b、在Au纳米粒子上固定甲胎蛋白二抗和碱基序列为5'-SH-(CH_2)₆-

AAAAAAGAAGGAGGGGCGACT-3'的捕获DNA₁,形成Au NPs/Ab₂/DNA₁复合物,作为信号标签诱导检测信号的产生;Au NPs/Ab₂/DNA₁复合物的制备方法如下:100mL 0.01%HAuCl₄溶液在剧烈搅拌下煮沸,然后快速加入2.5mL 1%的柠檬酸三钠溶液;当溶液的颜色由黄色转变为酒红色,继续搅拌冷却至室温得到Au纳米粒子;将40μL浓度为0.1mg/mL的甲胎蛋白二抗与1.0mL Au纳米粒子在室温下混合搅拌2h,然后加入捕获DNA₁,静置过夜后用牛血清白蛋白溶液将非活性位点进行封闭,12000rpm下离心洗涤三次,并重新分散于200μL 1%BSA溶液中;

[0024] c、甲胎蛋白的测定:20μL 0.1mg/mL的甲胎蛋白一抗固定于96孔板中,经过洗涤,BSA封闭后加入抗原甲胎蛋白使其充分发生免疫反应,随后96孔板中依次加入25μL的Au NP/Ab₂/DNA₁复合物,30μL浓度为5μM的生物素标记的碱基序列为5'-biotin-(CH₂)₆-GGGGCGACTTGAAACAGTCGCCCTCCTTC-3'的DNA₂,浓度为5μM的碱基序列为5'-biotin-(CH₂)₆-GTTTCAAGTCGCCCCGAAGGAGGGGCGACT-3'的生物素标记的DNA₃,亲和素标记的辣根过氧化物酶,孵育洗涤后加入10μL的50mg/L的氧化石墨烯溶液,100μL pH=3.0的醋酸缓冲溶液和20μL的5mmol/L的2,2'-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐,40℃条件下置于300W氙灯下用λ≥400nm的可见光照射15min,用酶标仪测定2,2'-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐氧化后的吸收光谱。

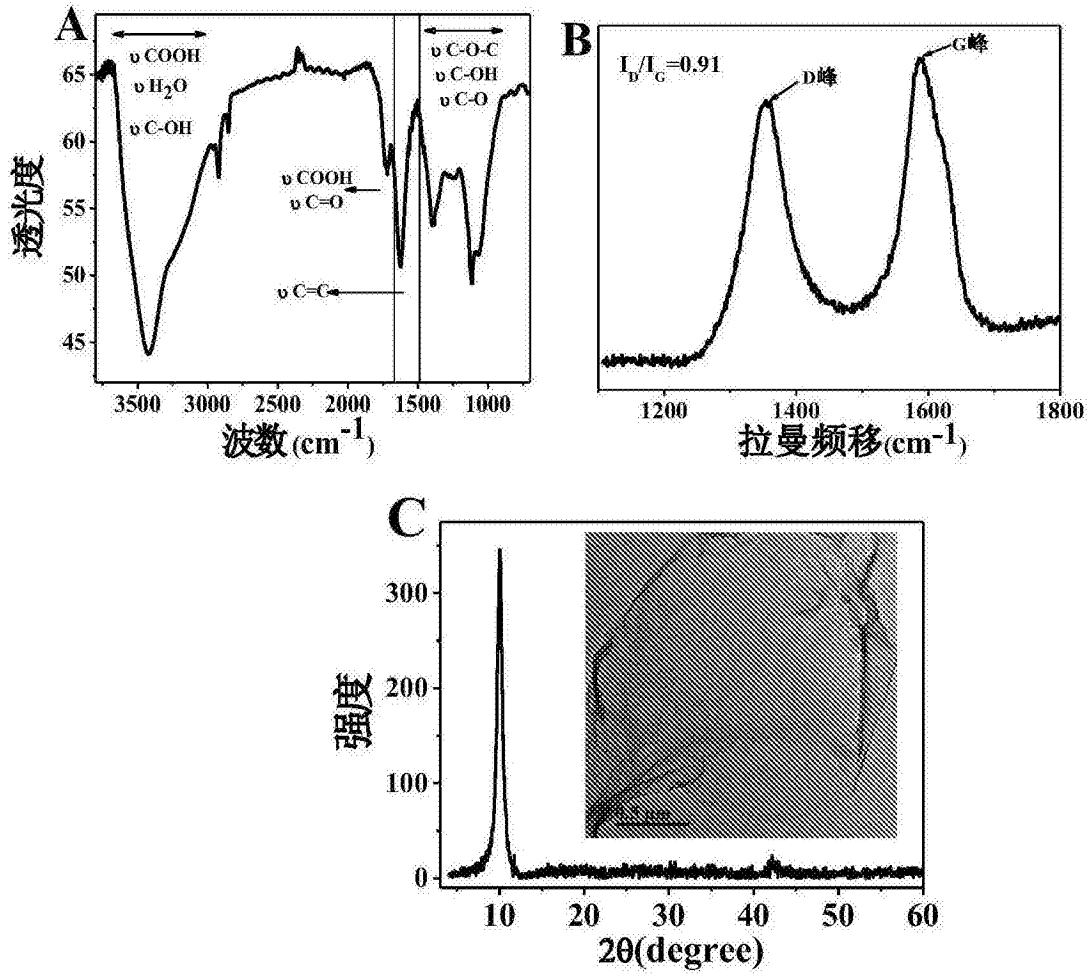


图1

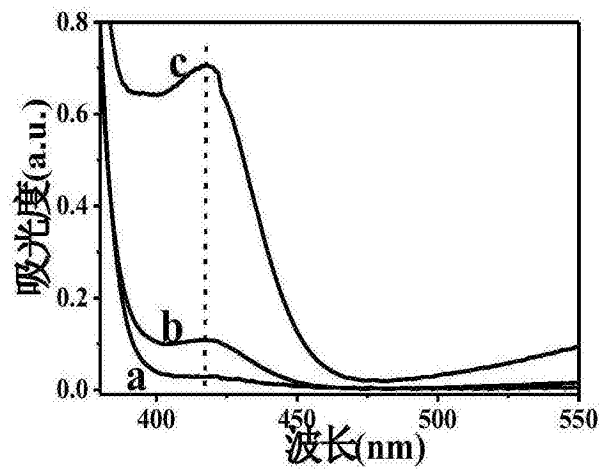


图2

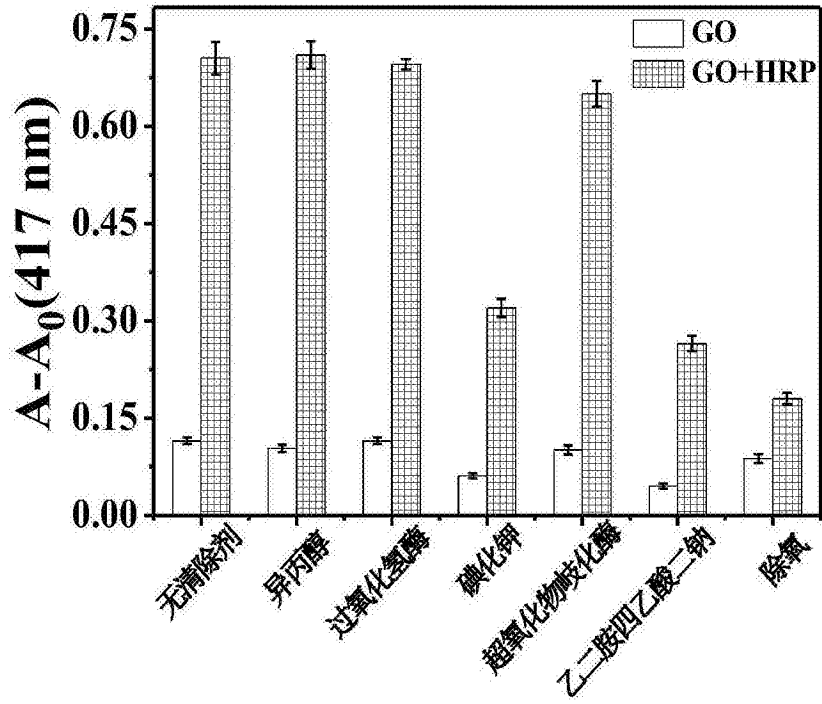


图3

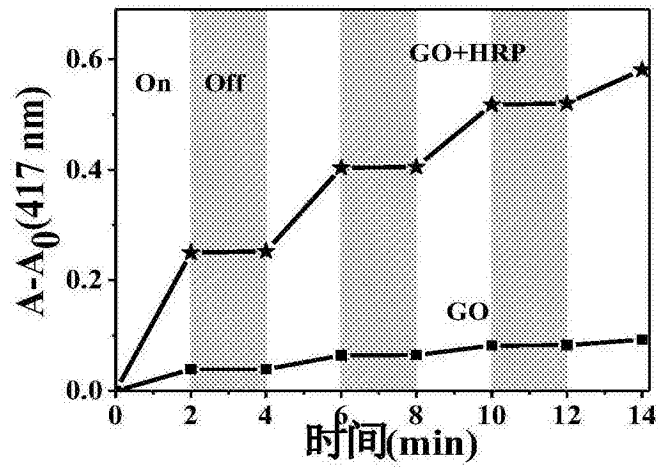


图4

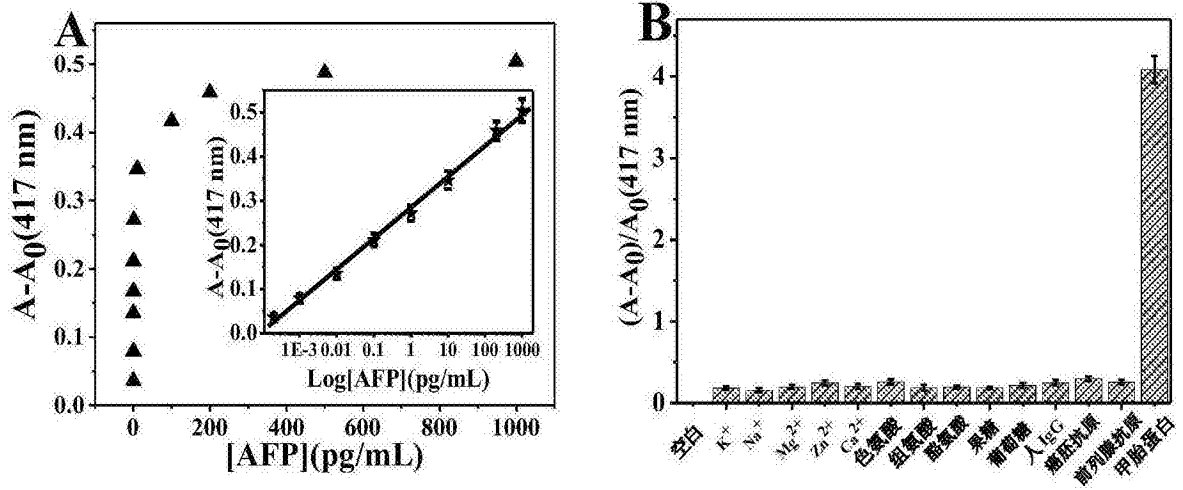


图5

专利名称(译)	一种基于氧化石墨烯光活化辣根过氧化物酶的免疫分析方法		
公开(公告)号	CN106248924A	公开(公告)日	2016-12-21
申请号	CN201610627388.7	申请日	2016-08-02
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	王光丽 曹根霞 董玉明 李小琴		
发明人	王光丽 曹根霞 董玉明 李小琴		
IPC分类号	G01N33/535 B82Y30/00 B82Y40/00		
CPC分类号	B82Y30/00 B82Y40/00 G01N33/535		
其他公开文献	CN106248924B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种基于氧化石墨烯光活化辣根过氧化物酶(HRP)的免疫分析检测方法。氧化石墨烯在光照下可以产生活性中间体光生空穴和超氧阴离子自由基,使HRP在没有H₂O₂的存在下能够催化氧化色原底物。以甲胎蛋白(AFP)为模型物,通过DNA杂交链式反应以放大信号,通过氧化石墨烯的光活化HRP作用实现底物的催化氧化,以实现免疫检测。本发明将纳米材料和天然酶的优势相结合,使得AFP的检测限达到0.0001pg/mL。本发明不仅提供了一种新型的通过光激励的纳米材料调控HRP活性的方法,同时为超灵敏的酶联免疫分析法提供了一种新途径。

