



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104792980 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201510213393. 9

(22) 申请日 2015. 04. 29

(71) 申请人 西安交通大学

地址 710049 陕西省西安市咸宁西路 28 号

(72) 发明人 瞿永泉 马媛媛 田志敏

(74) 专利代理机构 西安通大专利代理有限责任
公司 61200

代理人 陆万寿

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

B01J 23/10(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页 附图5页

(54) 发明名称

一种多孔二氧化铈纳米棒复合结构及基于该结构的酶溶液的制备方法和酶联免疫分析应用

(57) 摘要

本发明公开了一种多孔二氧化铈纳米棒复合结构及基于该结构的酶溶液的制备方法和酶联免疫分析应用,属于纳米材料技术领域。该多孔二氧化铈纳米棒复合结构由二氧化铈纳米棒及包被于其外表面的抗原或抗体组成;该氧化铈纳米棒复合结构制备的模拟酶溶液对抗体或抗原的检测响应范围宽、灵敏度高,检测限能够达到 10pg/mL 的水平,制备方法简单易行,Elisa 检测方法易操作、环境适应性好、不受环境温度影响。

1. 一种多孔二氧化铈纳米棒-抗原或抗体复合结构,其特征在于,由二氧化铈纳米棒及包被于其外表面的抗原或抗体组成;该复合结构中每0.1~10mg的二氧化铈纳米棒加入的抗原或抗体的量为0.5~20 μg。

2. 根据权利要求1所述的一种多孔二氧化铈纳米棒-抗原或抗体复合结构,其特征在于,所述二氧化铈纳米棒为圆柱状,且表面密布介孔。

3. 根据权利要求1所述的种多孔二氧化铈纳米棒-抗原或抗体复合结构,其特征在于,所述抗体为兔抗人IgG、羊抗鼠IgG、羊抗兔IgG和小鼠白介素抗体中的一种或几种;所述的抗原为人乳腺癌的特异性抗原CA15-3、卵巢癌抗原CA125、胃癌抗原CA72-4或前列腺癌抗原PSA。

4. 一种二氧化铈纳米棒模拟酶溶液的制备方法,其特征在于,先将二氧化铈纳米棒、抗原或抗体及包被缓冲液,混合均匀后,恒温孵育;然后离心去除游离的抗原或抗体,制得抗原或抗体包覆后的二氧化铈纳米棒;最后经重悬处理,制得二氧化铈纳米棒模拟酶溶液。

5. 根据权利要求4所述的一种二氧化铈纳米棒模拟酶溶液的制备方法,其特征在于,将1~10mg的二氧化铈纳米棒和0.5~20 μg抗原或抗体分散到10~50mL包被缓冲液中,混合均匀后,恒温孵育;然后在10000~12000rpm下离心并清洗处理,制得抗原或抗体包覆后的二氧化铈纳米棒,最后经重悬处理,制得二氧化铈纳米棒模拟酶溶液。

6. 根据权利要求4或5所述的一种二氧化铈纳米棒模拟酶溶液的制备方法,其特征在于,所述包被缓冲液为含有BSA的缓冲溶液,该缓冲溶液选用三羟甲基氨基甲烷缓冲液、磷酸缓冲液或4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液中的一种或几种。

7. 根据权利要求4或5所述的一种二氧化铈纳米棒模拟酶溶液的制备方法,其特征在于,恒温孵育是在25~38℃下进行,孵育时间为6~12h。

8. 权利要求4~7中任意一项所述的二氧化铈纳米棒模拟酶溶液在酶联免疫分析中的应用。

9. 采用权利要求4~7中任意一项制得的二氧化铈纳米棒模拟溶液检测抗体或抗原的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将75~200 μL的二氧化铈纳米棒模拟酶溶液加入抗原或抗体包被的微孔板中,在4~44℃孵育30~120min后用缓冲溶液进行清洗;

2) 然后加入含有显色底物的磷酸-柠檬酸缓冲溶液反应10~45min,磷酸-柠檬酸缓冲溶液的pH值为3~6;

3) 最后加入终止液终止反应,并使用酶标仪监测其吸光度的变化。

10. 根据权利要求9所述的检测抗体或抗原的方法,其特征在于,所述显色底物为3,3',5,5'-四甲基联苯胺、2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐或邻苯二胺;所述终止液为硫酸溶液或十二烷基磺酸钠溶液。

一种多孔二氧化铈纳米棒复合结构及基于该结构的酶溶液的制备方法和酶联免疫分析应用

技术领域

[0001] 本发明属于纳米材料技术领域,涉及多孔二氧化铈纳米棒及其应用,具体涉及一种多孔二氧化铈纳米棒复合结构及基于该结构的酶溶液的制备方法和酶联免疫分析应用。

背景技术

[0002] 酶联免疫分析(Elisa)是一种被广泛认可的强有力的检测蛋白的方法。该方法具有高灵敏度及标准的操作程序,通常使用辣根过氧化物酶(HRP)标记的免疫试剂产生信号来检测目标分子。尽管具有方法多样及灵敏度较高等优点,但其也有一些缺点。比如需要复杂且昂贵的提取工艺、蛋白酶的溫度及pH稳定性差,反应过程对溫度依赖性强等缺点。过去的十年里,研究者都希望出现一种易于大量制备并且易于储运,反应条件要求不高的Elisa模拟酶,同时该体系具有足够的灵敏度和准确性。

[0003] 纳米粒子参与的Elisa有以下几种方式:纳米颗粒修饰生物大分子后可以为传统的Elisa体系提供更强大的检测能力。在直接的目视化分析中(许多的胶体金法试纸条),纳米粒子本身可以作为显色物参与检测,这种检测体系的主要机制是纳米粒子的尺寸发生变化(主要是团聚)带来颜色的变化(Nat Protoc. 2013Sep ;8(9):1759-64.)。基于这一理念,前列腺特异抗原(prostate specific antigen,PSA)和HIV-1衣壳抗原p24在全血样本中的检测限可低至2pg(Nat Nanotechnol. 2012Dec ;7(12):821-4.)。此外,鉴于纳米粒子具有很高的比表面积,相对于传统的体系中的微孔板可以提供更多的抗原/抗体结合位点,具有增强检测信号的作用(Chem Commun. 2012Nov 11 ;48(87):10784-6),可以大大提高检测限。最重要的是,许多种纳米颗粒自身具有过氧化物模拟酶活性,可以直接取代传统Elisa反应中的HRP酶,近年来越来越多的研究者进入到这一领域开展研究,以期望克服传统Elisa体系成本昂贵,保存条件相对较高的缺点。

[0004] 近些年来,Fe₃O₄、TiO₂、Co₃O₄和Au/rGO等纳米颗粒相继发现具有过氧化物模拟酶活性,可以取代传统Elisa中的HRP,实现对目标分子的高灵敏度检测。如利用Fe₃O₄的过氧化物模拟酶活性开发出的多种Elisa检测体系,可以实现对乙型肝炎病毒表面抗原和肌钙蛋白的检测(Nat Nanotechnol. 2007Sep ;2(9):577-83)。Co₃O₄纳米颗粒发挥其过氧化物模拟酶活性取代传统的Elisa体系中HRP酶的作用,实现了对肿瘤组织中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)的检测(ACS Appl Mater Interfaces. 2014Feb12 ;6(3):1959-70)。前面所研究的材料都存在模拟酶催化能力受溫度影响比较大的缺点,这给实际应用带来很大困难。

发明内容

[0005] 为了克服上述现有技术存在的缺陷,本发明的目的在于提供一种多孔二氧化铈纳米棒复合结构及基于该结构的酶溶液的制备方法和酶联免疫应用,该氧化铈纳米棒复合结构制备的模拟酶溶液对抗体或抗原的检测响应范围宽、灵敏度高,检测限能够达到10pg/mL

的水平,制备方法简单易行,Elisa 检测方法易操作、环境适应性好、不受环境温度影响。

[0006] 本发明是通过以下技术方案来实现:

[0007] 一种多孔二氧化铈纳米棒-抗原或抗体复合结构,由二氧化铈纳米棒及包被于其外表面的抗原或抗体组成;该复合结构中每 0.1~10mg 的二氧化铈纳米棒加入的抗原或抗体的量为 0.5~20 μ g。

[0008] 所述二氧化铈纳米棒为圆柱状,且表面密布介孔。

[0009] 所述抗体为兔抗人 IgG、羊抗鼠 IgG、羊抗兔 IgG 和小鼠白介素抗体中的一种或几种;所述的抗原为人乳腺癌的特异性抗原 CA15-3、卵巢癌抗原 CA125、胃癌抗原 CA72-4 或前列腺癌抗原 PSA。

[0010] 一种二氧化铈纳米棒模拟酶溶液的制备方法,先将二氧化铈纳米棒、抗原或抗体及包被缓冲液,混合均匀后,恒温孵育;然后离心去除游离的抗原或抗体,制得抗原或抗体包覆后的二氧化铈纳米棒;最后经重悬处理,制得二氧化铈纳米棒模拟酶溶液。

[0011] 一种二氧化铈纳米棒模拟酶溶液的制备方法,将 1~10mg 的二氧化铈纳米棒和 0.5~20 μ g 抗原或抗体分散到 10~50mL 包被缓冲液中,混合均匀后,恒温孵育;然后在 10000~12000rpm 下离心并清洗处理,制得抗原或抗体包覆后的二氧化铈纳米棒,最后经重悬处理,制得二氧化铈纳米棒模拟酶溶液。

[0012] 所述包被缓冲液为含有 BSA 的缓冲溶液,该缓冲溶液选用三羟甲基氨基甲烷缓冲液、磷酸缓冲液或 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液中的一种或几种。

[0013] 恒温孵育是在 25~38℃ 下进行,孵育时间为 6~12h。

[0014] 本发明制得的二氧化铈纳米棒模拟酶溶液在酶联免疫分析中的应用。

[0015] 采用本发明制得的二氧化铈纳米棒模拟溶液检测抗体或抗原的方法,包括以下步骤:

[0016] 1) 将 75~200 μ L 的二氧化铈纳米棒模拟酶溶液加入抗原或抗体包被的微孔板中,在 4~44℃ 孵育 30~120min 后用缓冲溶液进行清洗;

[0017] 2) 然后加入含有显色底物的磷酸-柠檬酸缓冲溶液反应 10~45min,磷酸-柠檬酸缓冲溶液的 pH 值为 3~6;

[0018] 3) 最后加入终止液终止反应,并使用酶标仪监测其吸光度的变化。

[0019] 所述显色底物为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺、2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐或邻苯二胺;所述终止液为硫酸溶液或十二烷基磺酸钠溶液。

[0020] 与现有技术相比,本发明具有以下有益的技术效果:

[0021] 本发明公开的多孔二氧化铈纳米棒-抗原或抗体复合结构中含有两部分结构:作为催化场所的二氧化铈纳米棒外表面和作为免疫结合位点的抗体或抗原,其包被于二氧化铈纳米棒外表面。该复合结构由于二氧化铈纳米棒的比表面积大,为免疫反应提供更多的结合位点,因此信号的放大,增强灵敏度;可以实现结合位点与催化位点的互不干扰,共存的抗原或抗体蛋白对纳米结构的催化活性没有明显的影响。表面的 Ce^{3+} 具有类似于 HRP 酶的过氧化物模拟酶活性,能够替代传统的 HRP 酶实现 Elisa 检测,并且具有更好的反应稳定性,易于储运。

[0022] 本发明还公开二氧化铈纳米棒模拟酶溶液的制备方法,使用的纳米颗粒成本低廉、易于制备和储运、反应环境适应性好、不受环境温度影响,同时具有极高的灵敏度和准

确性。该氧化铈纳米棒模拟酶溶液对抗体或抗原的检测响应范围宽、灵敏度高,检测限能够达到 10pg/mL 的水平。

附图说明

[0023] 图 1 是本发明实施例 1 所制备的二氧化铈纳米棒的透射电子显微镜照片;

[0024] 图 2 为本发明实施例 1 所制备的二氧化铈纳米棒的比表面积和 Ce^{3+} 比例数据图;

[0025] 图 3 为本发明实施例 2 中二氧化铈纳米棒作为过氧化物模拟酶的反应动力学分析即底物浓度与催化氧化反应速度的关系;

[0026] 其中,A、B 分别为以 TMB 为底物时,HRP 酶和二氧化铈纳米棒模拟酶的反应动力学曲线;C、D 分别为以 H_2O_2 为底物时,HRP 酶和二氧化铈纳米棒模拟酶的反应动力学曲线;

[0027] 图 4-1 为本发明实施例 3 中经过不同温度处理后的二氧化铈纳米棒的相对反应活性;

[0028] 图 4-2 为本发明实施例 3 中经过不同 pH 值处理后的二氧化铈纳米棒的相对反应活性;

[0029] 图 4-3 为本发明实施例 4 中在不同的反应温度下二氧化铈纳米棒的相对反应活性;

[0030] 图 5 为本发明实施例 6 中二氧化铈纳米棒参与 Elisa 反应的流程示意图;

[0031] 图 6 为本发明检测体系检测灵敏度的待测抗原和吸光度之间指数关系图;

[0032] 图 7 为本发明检测体系对待测物的专一性分析柱状分析图。

具体实施方式

[0033] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解,以下实施例仅为本发明的优选实施例,以便于更好地理解本发明,因而不应视为限定本发明的范围。对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换或改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;所用的实验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂厂商购买得到的。

[0034] 为实现本发明的目的,本发明采用以下技术方案:

[0035] 第一点,本发明提供一种多孔二氧化铈纳米棒-抗原或抗体复合结构,由二氧化铈纳米棒及包被于其外表面的抗原或抗体组成,二氧化铈纳米棒为圆柱状,且表面密布介孔;该复合结构中每 0.1~10mg 的二氧化铈纳米棒加入的抗原或抗体的量为 0.5~20 μg 。

[0036] 本发明的多孔二氧化铈纳米棒-抗原或抗体复合结构含有两部分结构:作为催化场所的二氧化铈纳米棒外表面和作为免疫结合位点的抗体或抗原,其包被于所述圆柱状二氧化铈纳米棒外表面。上述结构的复合结构由于圆柱状二氧化铈纳米棒的比表面积大,为免疫反应提供更多的结合位点,因此信号的放大,增强灵敏度;表面的 Ce^{3+} 具有类似于 HRP 酶的过氧化物模拟酶活性,能够替代传统的 HRP 酶实现 Elisa 检测,并且具有更好的反应稳定性,易于储运。当使用二氧化铈纳米棒时,可以实现结合位点与催化位点的互不干扰,共存的抗原或抗体蛋白对纳米结构的催化活性没有明显的影响。

[0037] 第二点,本发明提供一种二氧化铈纳米棒模拟酶溶液的制备方法,包括:

[0038] 先将二氧化铈纳米棒、抗原或抗体及包被缓冲液,混合均匀后,恒温孵育;然后离心去除游离的抗原或抗体,制得抗原或抗体包覆后的二氧化铈纳米棒;最后经重悬处理,制得二氧化铈纳米棒模拟酶溶液。

[0039] 其中,可以用去离子水或包被缓冲液重悬沉淀。重悬所得的二氧化铈纳米棒模拟酶溶液中的二氧化铈纳米棒浓度为 0.1-10mg/mL,如 0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.5mg/mL、1mg/mL、5mg/mL 或 10mg/mL,更优选为 1mg/mL。

[0040] 优选地,所述步骤中包被缓冲液选自含牛血清蛋白(BSA)的缓冲溶液;其中,缓冲溶液可以是三羟甲基氨基甲烷缓冲液(Tris)、磷酸缓冲液(PBS)和羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES)缓冲液中的一种或者多种,更优选为三羟甲基氨基甲烷缓冲液(Tris)。

[0041] 优选地,所述步骤中恒温孵育的温度为 37℃,当然也可以是其它适合温度,比如 25℃、30℃、35℃、40℃、35-39℃或 33-38℃等。

[0042] 优选地,所述步骤中恒温孵育的时间为 6~12h。

[0043] 优选地,所述步骤中抗体为兔抗人 IgG、羊抗鼠 IgG、羊抗兔 IgG 和小鼠白介素抗体中的一种或者多种,更优选为兔抗人 IgG;所述的抗原为人乳腺癌的特异性抗原 CA15-3、卵巢癌抗原 CA125、胃癌抗原 CA72-4 或前列腺癌抗原 PSA。

[0044] 优选地,所述步骤中相对于 0.1~10mg 的二氧化铈纳米棒,抗体的加入量为 0.5~20 μg;当然,本领域的技术人员能够理解二氧化铈纳米棒和抗体的用量并非仅限于上述数值范围,也可以在上述比例的基础上适当扩大或者缩小。

[0045] 第三点,本发明提供一种使用二氧化铈纳米棒模拟酶溶液检测抗原或者抗体的方法,包括:

[0046] (1) 将将二氧化铈纳米棒模拟酶溶液加入抗原或抗体对微孔板进行包被并封闭未结合位点;

[0047] (2) 加入不同浓度的待测抗原进行吸附;

[0048] (3) 加入含有显色底物的磷酸-柠檬酸缓冲溶液进行反应;

[0049] (4) 最后加入终止液终止反应,并使用酶标仪监测其吸光度的变化。

[0050] 优选地,微孔板为 96 孔的微孔板;96 孔的微孔板是 ELISA 中最常用的微孔板,但是也不排除其它类型的微孔板应用于本发明的情况。

[0051] 优选地,所述微孔板上的抗体选自能与所述待测抗原免疫识别的鼠抗兔 IgG、羊抗兔 IgG、牛抗兔 IgG 和小鼠白介素抗体中的一种或者多种,更优选为羊抗兔 IgG。

[0052] 优选地,孵育的温度为 4-44℃,如 5℃、7℃、9℃、10℃、12℃、15℃、20℃、25℃、35℃、40℃、或 43℃,更优选为 37℃。

[0053] 优选地,孵育的时间为 30-120min,如 40min、60min、90min、100min、110min、120min,更优选为 60min。

[0054] 优选地,模拟酶溶液的加入量为 75-200 μL,例如 80 μL、90 μL、100 μL、120 μL、130 μL、150 μL、170 μL 或 190 μL,更优选为 100 μL。

[0055] 优选地,显色底物为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS)或邻苯二胺(OPD),更优选为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺。

[0056] 优选地,磷酸-柠檬酸缓冲溶液的 pH 值为 3-6,例如 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 或 6.0,更优选为 4.0。

[0057] 优选地,加入含有显色底物的磷酸-柠檬酸缓冲溶液反应的时间为 10-45min,如 12min、15min、18min、20min、25min、30min 或 40min,更优选为 15min。

[0058] 优选地,终止液为硫酸溶液或十二烷基磺酸钠 (SDS) 溶液,其中硫酸溶液的浓度可以是 1.5M、2M 或 3M,十二烷基磺酸钠溶液的质量浓度可以是 0.1%、0.5%、1% 或 2%。

[0059] 在第四点,本发明提供如二氧化铈纳米棒模拟酶溶液在酶联免疫分析中的应用。

[0060] 以下实施例中,所述试剂如下所示:六水合硝酸铈 $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,氢氧化钠 (NaOH),辣根过氧化物酶 (HRP),人 IgG (Human IgG),兔抗人 IgG (Rabbit Anti-Human IgG Fraction Polyclonal Antibody),3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB),三羟甲基氨基甲烷 (Tris)。

[0061] 测试仪器有:酶标仪 (Bio-Rad),UV-Vis (PerkinElmer),TEM (Hatchie HT-7700),X 射线光电子能谱分析仪 (Thermo Electron Model K-Alpha),化学吸附仪 (Chembet TPR/TPD)。

[0062] 实施例 1:二氧化铈纳米棒的制备纯化

[0063] 本发明中所述二氧化铈纳米棒可以用本领域技术人员所熟知的方法获得。在本发明中,我们先制备氧化铈纳米棒前驱体,之后通过水热法得到纯的二氧化铈纳米棒。

[0064] 二氧化铈纳米棒的制备:取 5mL 的硝酸铈水溶液 (0.8M) 与 75mL 的 NaOH 水溶液 (6.4M) 室温下混合 30min 后,100℃ 水热处理 24h。水和乙醇反复清洗三次干燥后,重新分散到水中 (2mg/mL),180℃ 水热处理 12h。12000rpm 离心 10min,去除上清后,60℃ 过夜干燥备用。

[0065] 二氧化铈纳米棒的 TEM 形貌图及相应的比表面积及 Ce^{3+} 比例图谱如图 1 和图 2 所示。从图 1 可以看出所制备的氧化铈纳米棒表面带有大量微孔大大增加了材料的比表面积。图 2 显示纳米材料相对于其它形貌的氧化铈纳米而言具有更高的比表面积和 Ce^{3+} 比例。

[0066] 一种多孔二氧化铈纳米棒-抗原或抗体复合结构,由二氧化铈纳米棒及包被于其外表面的抗原或抗体组成;该复合结构中每 1mg 的二氧化铈纳米棒加入的抗原或抗体的量为 10 μg 。

[0067] 所述抗体为兔抗人 IgG、羊抗鼠 IgG、羊抗兔 IgG 和小鼠白介素抗体中的一种或几种;所述的抗原为人乳腺癌的特异性抗原 CA15-3、卵巢癌抗原 CA125、胃癌抗原 CA72-4 或前列腺癌抗原 PSA。

[0068] 一种二氧化铈纳米棒模拟酶溶液的制备方法,将 mg 的二氧化铈纳米棒和 10 μg 抗原或抗体分散到 20mL 包被缓冲液中,混合均匀后,恒温孵育;然后在 12000rpm 下离心并清洗处理 3 次,制得抗原或抗体包覆后的二氧化铈纳米棒,最后经重悬处理,制得二氧化铈纳米棒模拟酶溶液。

[0069] 采用制得的二氧化铈纳米棒模拟溶液检测抗体或抗原的方法,包括以下步骤:

[0070] 1) 将 100 μL 的二氧化铈纳米棒模拟酶溶液加入抗原或抗体包被的微孔板中,在 37℃ 孵育 60min 后用缓冲溶液进行清洗;

[0071] 2) 然后加入含有显色底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺的磷酸-柠檬酸缓冲溶液反应 15min,磷酸-柠檬酸缓冲溶液的 pH 值为 4.0;

[0072] 3) 最后加入终止液终止反应,并使用酶标仪监测其吸光度的变化。

[0073] 实施例 2 :酶动力学参数分析

[0074] 通过监测 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺氧化产物吸收峰吸光度的变化来考察其反应动力学。使用连续监测模式,每隔 1s 间隔测量一次。测试条件为:二氧化铈纳米棒的浓度为 $0.2 \mu\text{g/mL}$, 作为对照的 HRP 浓度为 1ng/mL , 1.0mL 的 0.2M 的 $\text{pH}4.0$ 的醋酸缓冲溶液,反应温度设定为 25°C 。以 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺为底物时, H_2O_2 的浓度固定在 100mM ; 当以 H_2O_2 为底物时, TMB 的浓度固定在 0.8mM 。表观动力学参数参照 Lineweaver-Burk 方程: $1/V = (K_m/V_{\max})(1/[C]) + 1/V_{\max}$ 获得。其中, V 是反应速度, $V_{\max}$ 是最大反应速度, $[C]$ 是底物浓度, K_m 是米氏常数。

[0075] 得到的动力学参数如表 1 和图 3 所示:

[0076] 表 1 二氧化铈纳米棒 (PN-Ceria) 作为过氧化物模拟酶和作为对照的 HRP 酶的表观动力学参数

[0077]

底物		E (M)	K_m (mM)	K_{cat}
PN-Ceria	TMB	1.16×10^{-9}	0.147	5.35×10^4
PN-Ceria	H_2O_2	1.16×10^{-9}	293	3.28×10^4
HRP	TMB	2.5×10^{-13}	0.415	1.30×10^4
HRP	H_2O_2	2.5×10^{-13}	5.2	3.21×10^4

[0078]

[0079] 其中, $V = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]}$, $[E]$ 是酶的浓度, $V_{\max}$ 是最大反应速率, K_m 是米氏常数。

[0080] 联合表 1 和图 3, 比较以 TMB 为底物时二氧化铈纳米棒 (PN-Ceria) 过氧化物模拟酶和 HRP 酶的 K_m 值和 K_{cat} 值, 二氧化铈纳米棒过氧化物模拟酶的 K_m 值远小于 HRP, K_{cat} 值则是 HRP 酶的 4 倍。表明该模拟酶对底物 TMB 有更好的亲和能力以及更快的催化速度, 可以更快的催化底物的氧化。从而缩短反应时间, 提高反应的灵敏度, 从而对下游的生化分析检测带来了巨大的优势。

[0081] 实施例 3 :储运稳定性分析

[0082] 取 10mL 的 10mg/mL 二氧化铈纳米棒溶液和 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 的 HRP 溶液各在 $4-200^\circ\text{C}$ 下保存 7 天。同时另一组 10mg/mL 二氧化铈纳米棒溶液和 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 的 HRP 溶液则各在 $0-14$ 的 pH 环境处理 6 小时。之后参照实施例 2 的条件, 比较其相对活性。

[0083] 二氧化铈纳米棒溶液和作为对照的 HRP 溶液经过不同温度和 pH 值处理后的相对活性如图 4-1 和图 4-2 所示。可以看到经过不同温度和 pH 值处理后, 二氧化铈纳米棒模拟酶依旧保持了很高的相对催化活性。而传统的天然过氧化物酶 HRP 则相对活性下降严重。这一结果显示了二氧化铈纳米棒模拟酶优秀的储运稳定性, 方便日常的储存和运输。

[0084] 实施例 4 :反应温度稳定性分析

[0085] 参照实施例 2 的条件,只改变反应温度。对比二氧化铈纳米棒溶液和作为对照的 HRP 溶液在反应温度 4-60℃之间的相对反应活性。

[0086] 二氧化铈纳米棒溶液和作为对照的 HRP 溶液在不同的反应温度下相对活性如图 4-3 所示,可以看到在不同的反应温度下,二氧化铈纳米棒模拟酶依旧保持了很高的相对催化活性。而传统的天然过氧化物酶 HRP 则相对活性下降严重。这一结果显示了二氧化铈纳米棒模拟酶对反应温度不敏感,适用于不同温度下的检测环境,这一特性对下游的应用有着重要意义。

[0087] 实施例 5: 二氧化铈纳米棒表面进行兔抗人 IgG 抗体修饰

[0088] 取 1mL 的 1mg/mL 二氧化铈纳米棒溶液,分散在 1mL 含 0.05% BSA 的 Tris 缓冲溶液 (0.05M, pH = 8) 中。加入 5 μ L 的 1mg/mL 兔抗人 IgG 溶液,混合均匀后放入 37℃恒温箱中,孵育 30min 之后,于 12000rpm 转速下离心 5 分钟去掉游离的兔抗人 IgG 分子。弃掉上清液,将沉淀物分散在 1mL 含 0.05% BSA 的 Tris 缓冲液 (50mM, pH = 8) 中备用。

[0089] 实施例 6 :免疫识别反应

[0090] 将透明的平底聚乙烯 96 孔板先用 0.05M pH7.4 的 PBS 清洗。之后向孔中分别加入 100 μ L 不同浓度的分散在 0.05M pH7.4 的 PBS 羊抗兔 IgG 溶液。其中羊抗兔 IgG 浓度范围从 1pg-10 μ g/mL,4℃下包被过夜。之后用 50mM 的 Tris buffer (含 0.05% Tween-20, pH = 8.0) 清洗 3 次,最后用 50mM 的 Tris buffer (pH = 8.0) 再次清洗。然后用含有 1% BSA 的 Tris buffer 于 37℃封闭 2 小时。最后再用 Tris buffer (0.05M, pH = 8.0) 清洗 3 次。加入 50 μ L 人 IgG (浓度 1pg-100 μ g/mL),37℃孵育 2 小时,弃去上清,之后用 50mM 的 Tris buffer (含 0.05% Tween-20, pH = 8.0) 清洗 3 次。然后向每个孔中加入 100 μ L 兔抗人 IgG 修饰的二氧化铈纳米棒溶液,于 37℃孵育 1 小时。之后用含 0.05% Tween-20 的 Tris buffer (50mM, pH = 8.0) 清洗,最后再用 50mM 的 Tris buffer (pH = 8.0) 清洗一次。图 5 显示了本发明中二氧化铈纳米棒参与 Elisa 检测的流程示意图。

[0091] 实施例 7 :以 TMB 为显色底物时的检测反应

[0092] 向实施例 5 的微孔板的每个孔中加入 100 μ L TMB 底物溶液 (1mg/mL TMB 的 DMSO 溶液溶解于 9mL 0.05M 的磷酸-柠檬酸缓冲溶液 (pH = 4.2) 中,并加入 2 μ L 30% H_2O_2)。反应 15min 后加入 50 μ L 2M H_2SO_4 终止反应,检测 450nm 处的吸光度。整个实验设立了阳性对比 (BSA)、阴性对比 (H_2O)。

[0093] 结果如图 6 所示,可以看出待测抗原和吸光度之间存在很好的指数关系,响应范围为 10pg/mL-100 μ g/mL,最低检测限达到了 10pg/mL。同时,图 7 显示出该 Elisa 检测体系具有很好的专一性和抗干扰能力,可以适用于多种复杂的检材。

[0094] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细特征以及详细方法,但本发明并不局限于上述详细特征以及详细方法,即不意味着本发明必须依赖上述详细特征以及详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明选用组分的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

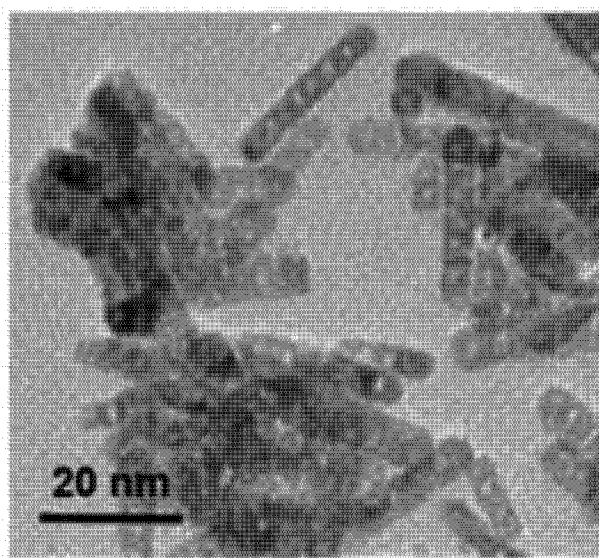


图 1

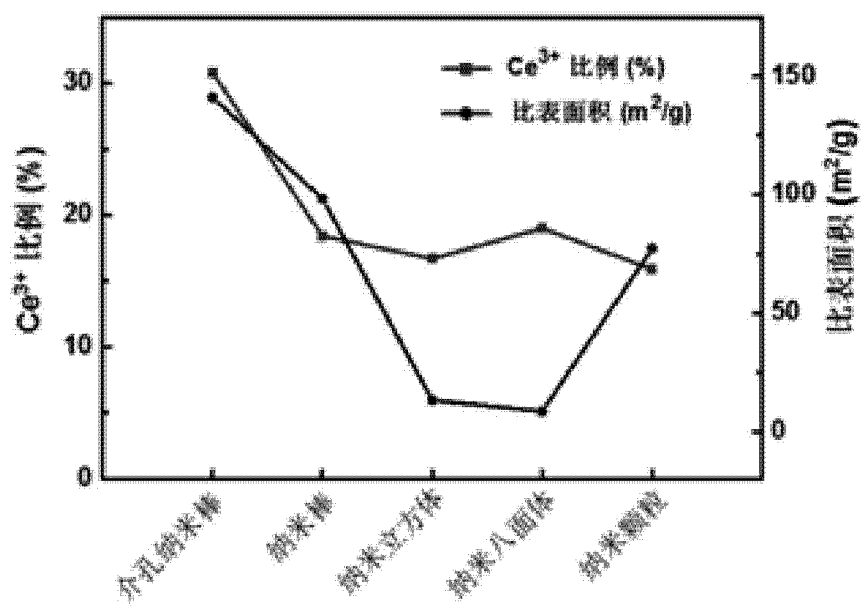


图 2

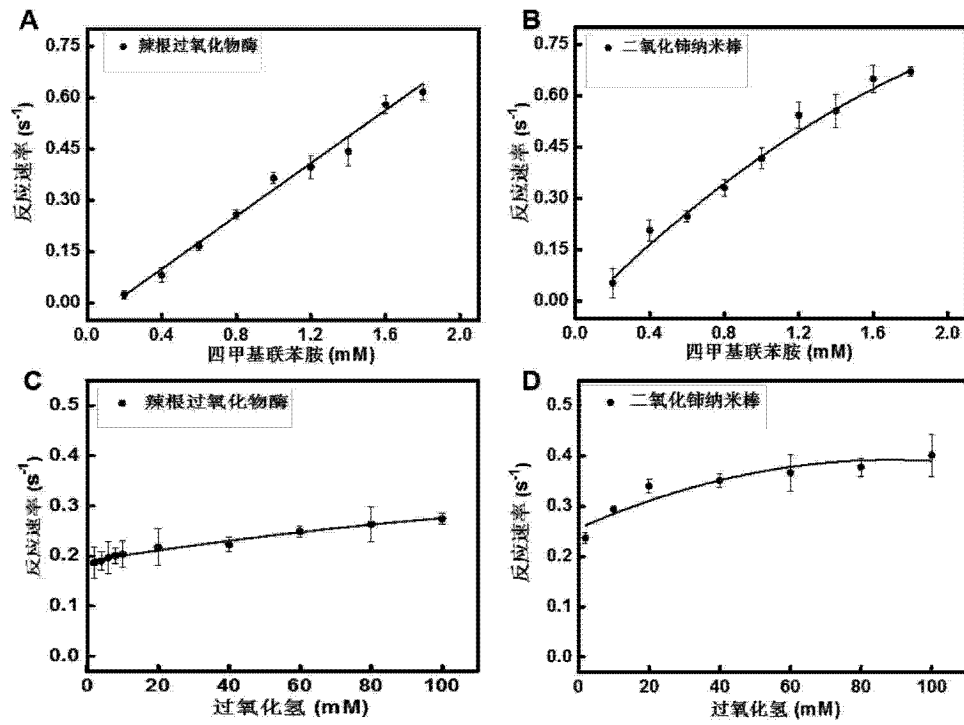


图 3

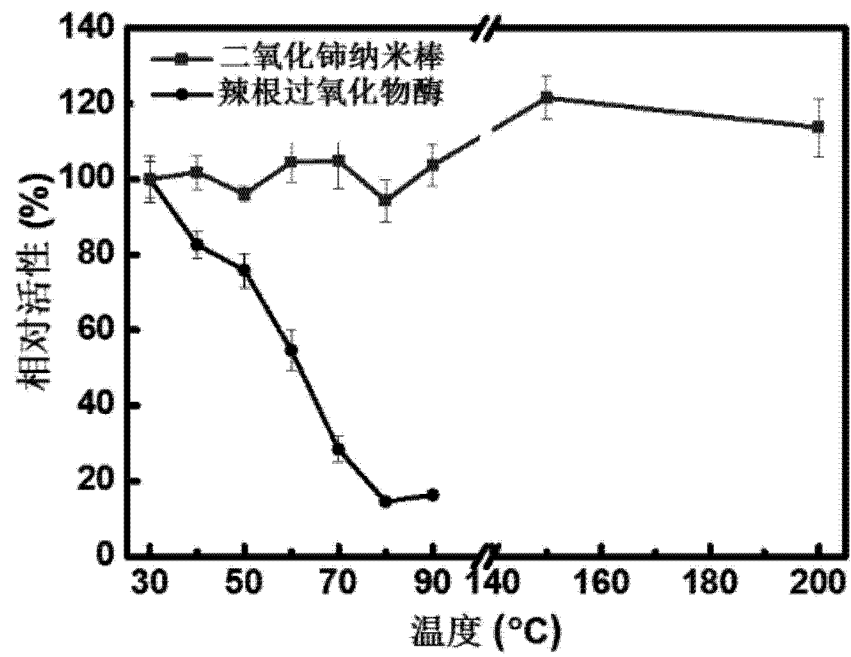


图 4-1

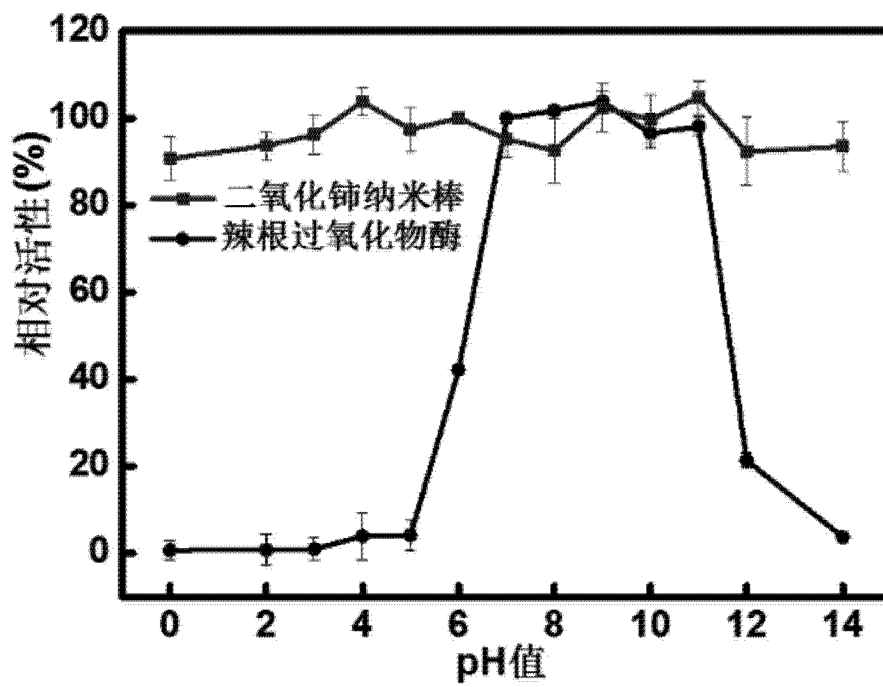


图 4-2

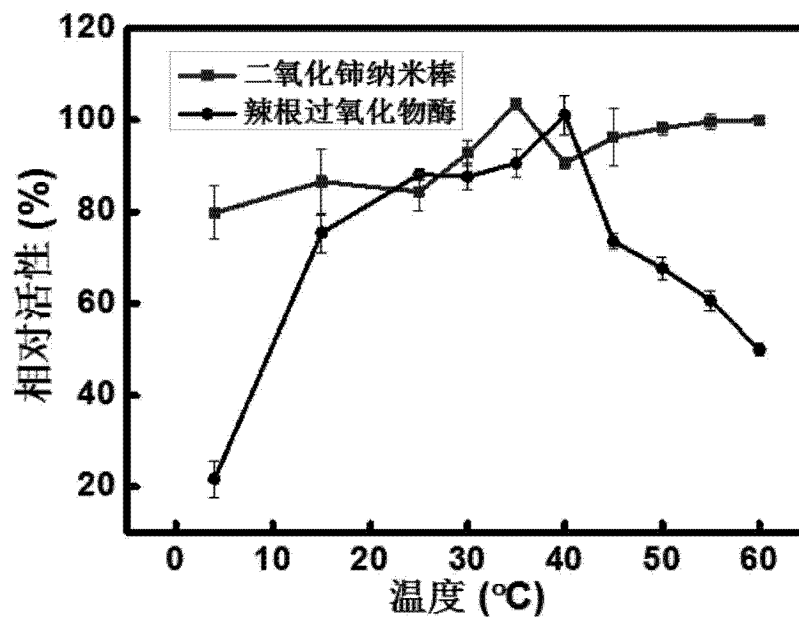


图 4-3

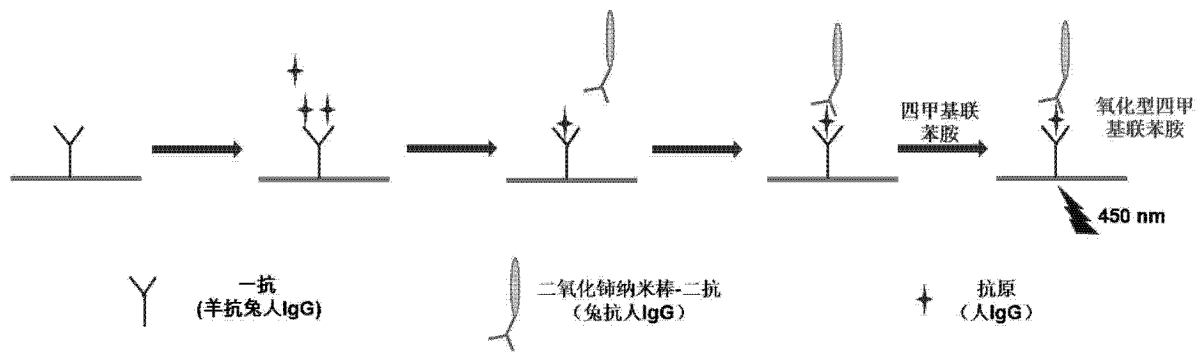


图 5

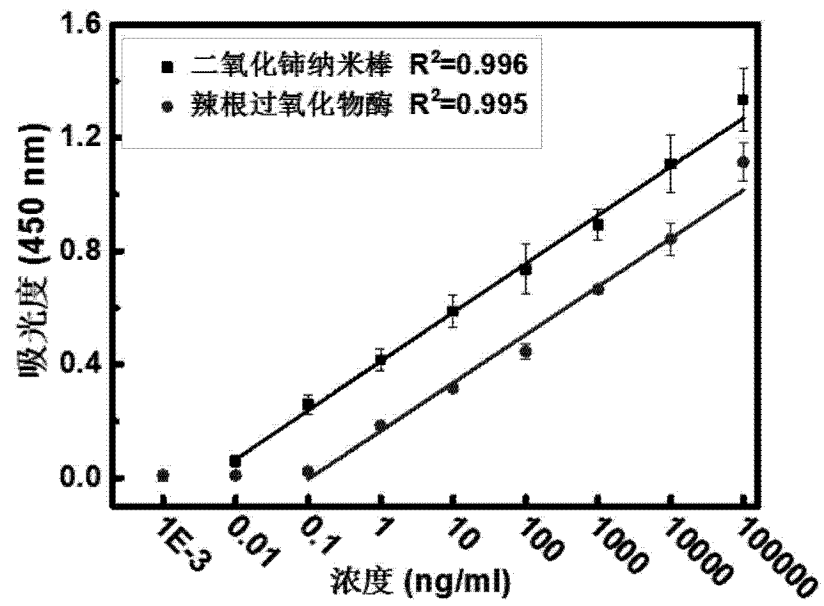


图 6

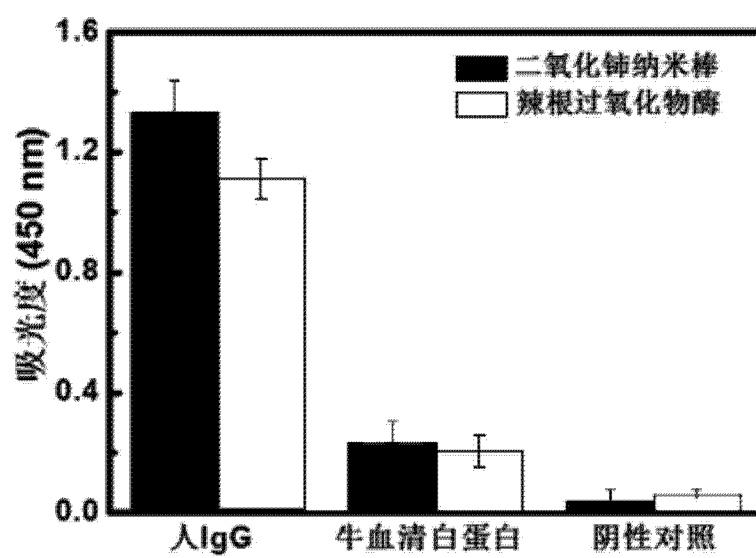


图 7

专利名称(译)	一种多孔二氧化铈纳米棒复合结构及基于该结构的酶溶液的制备方法和酶联免疫分析应用		
公开(公告)号	CN104792980A	公开(公告)日	2015-07-22
申请号	CN201510213393.9	申请日	2015-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	西安交通大学		
申请(专利权)人(译)	西安交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	西安交通大学		
[标]发明人	瞿永泉 马媛媛 田志敏		
发明人	瞿永泉 马媛媛 田志敏		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 B01J23/10		
CPC分类号	B01J23/10 B01J35/10 G01N33/54346		
其他公开文献	CN104792980B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种多孔二氧化铈纳米棒复合结构及基于该结构的酶溶液的制备方法和酶联免疫分析应用，属于纳米材料技术领域。该多孔二氧化铈纳米棒复合结构由二氧化铈纳米棒及包被于其外表面的抗原或抗体组成；该氧化铈纳米棒复合结构制备的模拟酶溶液对抗体或抗原的检测响应范围宽、灵敏度高，检测限能够达到10pg/mL的水平，制备方法简单易行，Elisa检测方法易操作、环境适应性好、不受环境温度影响。

