



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103969445 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 06

(21) 申请号 201410192532. X

(22) 申请日 2014. 05. 08

(71) 申请人 中南大学

地址 410083 湖南省长沙市岳麓区麓山南路  
932 号

(72) 发明人 阳明辉 郭林燕 周苗

(74) 专利代理机构 长沙市融智专利事务所  
43114

代理人 魏娟

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

亚铁血红素—二氧化锰复合物的制备及其用于检测人 IgG 的方法

(57) 摘要

本发明公开了亚铁血红素—二氧化锰复合物的制备及其用于检测人 IgG 的方法。本发明将亚铁血红素在氨水作用下溶于磷酸盐缓冲溶液,再依次加入  $MnAc_2$  溶液和 NaOH 溶液反应,制得亚铁血红素—二氧化锰复合物 ( $Hemin-MnO_2$ );  $Hemin-MnO_2$  具有过氧化物酶活性,能催化双氧水氧化 TMB 使其由无色变为蓝色,通过传统的“三明治”夹心结构法,以  $Hemin-MnO_2$  作为兔抗人 IgG 标记物,来进行人体免疫球蛋白 IgG 抗原的检测,使用  $Hemin-MnO_2$  的比色免疫法检测具有稳定性好、灵敏度高、选择性好、重现性优、分析速度快等优点;该免疫传感方法简单,价格低廉,肉眼即可观察其颜色变化,具有广泛的应用前景。

1. 亚铁血红素—二氧化锰复合物的制备方法,其特征在于,将亚铁血红素与磷酸盐缓冲溶液混合后,加入氨水促使亚铁血红素溶解,再在混合溶液中依次加入过量的  $\text{MnAc}_2$  溶液和过量的  $\text{NaOH}$  溶液,搅拌均匀,再离心处理后,除去未反应完的  $\text{MnAc}_2$  和  $\text{NaOH}$ ,即得。

2. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,所述的离心处理是在  $8000 \sim 10000\text{rpm}$  的速率下离心  $15 \sim 25\text{min}$ 。

3. 如权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于,所述的磷酸盐缓冲溶液  $\text{pH}$  为 7.4。

4. 基于权利要求 1~3 任一项所述制备方法制备的亚铁血红素—二氧化锰复合物检测人  $\text{IgG}$  的方法,其特征在于,在聚苯乙烯 96 孔板的各个孔的底表面先固定羊抗人  $\text{IgG}$ ,并用牛血清白蛋白将所述各个孔的底表面封闭;再在所述牛血清白蛋白封闭过的各个孔的底表面分别组装不同摩尔量的人  $\text{IgG}$  后,进一步组装亚铁血红素—二氧化锰复合物修饰兔抗人  $\text{IgG}$ ;组装完成后,在各个孔中加入等量的含  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 3,3',5,5'-四甲基联苯胺的柠檬酸缓冲液进行反应,反应完成后,用酶标仪测定各个孔中 3,3',5,5'-四甲基联苯胺的氧化产物在  $652\text{nm}$  的吸光度值,进行比色分析。

5. 如权利要求 4 所述的方法,其特征在于,先在聚苯乙烯 96 孔板的各个孔中加入羊抗人  $\text{IgG}$  静置  $8 \sim 12\text{h}$ ,除去多余的羊抗人  $\text{IgG}$ ,再在所述的各个孔中加入牛血清白蛋白静置  $2 \sim 3\text{h}$ ,除去多余的牛血清白蛋白;再在各个孔中分别加入等体积不同浓度的人  $\text{IgG}$  溶液,在  $37^\circ\text{C}$  下温育  $0.8 \sim 1.2\text{h}$ ,除去各孔中的剩余人  $\text{IgG}$  溶液,再在各个孔中加入亚铁血红素—二氧化锰复合物修饰兔抗人  $\text{IgG}$ ,在  $37^\circ\text{C}$  下温育  $1.2 \sim 1.7\text{h}$ ,除去各孔中的剩余亚铁血红素—二氧化锰复合物修饰兔抗人  $\text{IgG}$ ;最后在各个孔中加入等量的含  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 3,3',5,5'-四甲基联苯胺的柠檬酸缓冲液进行反应  $10 \sim 20\text{min}$  后,用酶标仪测定各个孔中 3,3',5,5'-四甲基联苯胺的氧化产物在  $652\text{nm}$  的吸光度值,进行比色分析。

6. 如权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述的亚铁血红素—二氧化锰复合物修饰兔抗人  $\text{IgG}$  通过以下方法制备得到,将所述的亚铁血红素—二氧化锰复合物依次置于壳聚糖溶液、戊二醛溶液和兔抗人  $\text{IgG}$  中反应、离心处理,即得。

7. 如权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述的亚铁血红素—二氧化锰复合物依次置于  $0.3 \sim 0.8\text{wt}\%$  的壳聚糖溶液中反应  $1.8 \sim 2.2\text{h}$ ,离心  $3 \sim 7\text{min}$ ,于  $0.2 \sim 0.3\text{wt}\%$  的戊二醛溶液中反应  $0.4 \sim 0.6\text{h}$ ,离心  $3 \sim 7\text{min}$ ,于  $40 \sim 60 \mu\text{g mL}^{-1}$  的兔抗人  $\text{IgG}$  中  $0.8 \sim 1.2\text{h}$ ,离心处理后,将离心物分散到磷酸盐缓冲溶液中,得到亚铁血红素—二氧化锰复合物修饰兔抗人  $\text{IgG}$  溶液。

## 亚铁血红素—二氧化锰复合物的制备及其用于检测人 IgG 的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及亚铁血红素—二氧化锰复合物的制备及其用于检测人 IgG 的方法,属于生物传感领域。

### 背景技术

[0002] 近年来,新型生物传感技术的构建及应用发展迅速,在临床早期诊断、环境监测、食品检测等领域得到了广泛应用。而很多传感方法及其应用受仪器及相关技术专业人员的限制而无法在许多发展中国家普及,所以构建一种简单、经济且无需借助精密仪器设备的传感方法成为科研热门研究领域。基于颜色变化来实现检测的生物免疫传感方法,因其反应迅速、方便经济、操作简单等特点而受到众多科研工作者青睐。

[0003] 现有的定量检测人 IgG 的方法包括电化学检测法,荧光检测法、化学发光法等。但 these 方法依赖于一定的仪器设备,而且不能同一时间检测多种样品,所耗时间较长。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是在于提供一种结构稳定、具有过氧化物酶活性的亚铁血红素—二氧化锰复合物的制备方法,该制备方法简单、成本低。

[0005] 本发明的另一个目的是在于提供了一种基于亚铁血红素—二氧化锰复合物的检测人 IgG 的方法,该方法利用亚铁血红素—二氧化锰复合物催化双氧水氧化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)产生颜色变化,实现了人 IgG 检测,该方法相对传统的酶联免疫法相比,不需要使用酶作为抗体标记物,具有稳定性好、简单、灵敏度高、选择性好、价格低廉等优点,实现了人体内免疫球蛋白 IgG 的高通量检测。

[0006] 本发明提供了一种亚铁血红素—二氧化锰复合物的制备方法,该制备方法是将亚铁血红素与磷酸盐缓冲溶液混合后,加入氨水促使亚铁血红素溶解,再在混合溶液中依次加入过量的  $MnAc_2$  溶液和过量的 NaOH 溶液,搅拌均匀,再离心处理后,除去未反应完的  $MnAc_2$  和 NaOH,即得。

[0007] 本发明的亚铁血红素—二氧化锰复合物的制备方法包括以下优选方案:

[0008] 所述的离心处理是在 8000 ~ 10000rpm 的速率下离心 15 ~ 25min。

[0009] 所述的磷酸盐缓冲溶液 pH 为 7.4。

[0010] 所制得的亚铁血红素—二氧化锰复合物 PBS 缓冲溶液清洗 2 ~ 3 遍,于不大于 4℃ 的环境下储存备用。

[0011] 本发明还提供了一种基于亚铁血红素—二氧化锰复合物的检测人 IgG 的方法,该方法是在聚苯乙烯 96 孔板的各个孔的底表面先固定羊抗人 IgG,并用牛血清白蛋白将所述各个孔的底表面封闭;再在所述牛血清白蛋白封闭过的各个孔的底表面分别组装不同摩尔量的人 IgG 后,进一步组装亚铁血红素—二氧化锰复合物修饰兔抗人 IgG;组装完成后,在各个孔中加入等量的含  $H_2O_2$  和 3,3',5,5'-四甲基联苯胺的柠檬酸缓冲液进行反应,反应

完成后,用酶标仪测定各个孔中 3,3',5,5'-四甲基联苯胺的氧化产物在 652nm 的吸光度值,进行比色分析。

[0012] 本发明的基于亚铁血红素—二氧化锰复合物的检测人 IgG 的方法还包括以下优选方案:

[0013] 优选的方法是先在聚苯乙烯 96 孔板的各个孔中加入羊抗人 IgG 静置 8 ~ 12h,除去多余的羊抗人 IgG,再在所述的各个孔中加入牛血清白蛋白静置 2 ~ 3h,除去多余的牛血清白蛋白;再在各个孔中分别加入等体积不同浓度的人 IgG 溶液,在 37℃ 下温育 0.8 ~ 1.2h,除去各孔中的剩余人 IgG 溶液,再在各个孔中加入亚铁血红素—二氧化锰复合物修饰兔抗人 IgG,在 37℃ 下温育 1.2 ~ 1.7h,除去各孔中的剩余亚铁血红素—二氧化锰复合物修饰兔抗人 IgG;最后在各个孔中加入等量的含 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 3,3',5,5'-四甲基联苯胺的柠檬酸缓冲液进行反应 10 ~ 20min 后,用酶标仪测定各个孔中 3,3',5,5'-四甲基联苯胺的氧化产物在 652nm 的吸光度值,进行比色分析。

[0014] 所述的亚铁血红素—二氧化锰复合物修饰兔抗人 IgG 通过以下方法制备得到,将所述的亚铁血红素—二氧化锰复合物依次置于壳聚糖溶液、戊二醛溶液和兔抗人 IgG 中反应、离心处理,即得。

[0015] 所述的亚铁血红素—二氧化锰复合物依次置于 0.3 ~ 0.8wt% 的壳聚糖溶液中反应 1.8 ~ 2.2h,离心 3 ~ 7min,于 0.2 ~ 0.3wt% 的戊二醛溶液中反应 0.4 ~ 0.6h,离心 3 ~ 7min,于 40 ~ 60 μg mL<sup>-1</sup> 的兔抗人 IgG 中 0.8 ~ 1.2h,离心处理后,将离心物分散到磷酸盐缓冲溶液中,得到亚铁血红素—二氧化锰复合物修饰兔抗人 IgG 溶液。所述的磷酸盐缓冲溶液 pH 值优选为 pH = 7.4。所述的亚铁血红素—二氧化锰复合物修饰兔抗人 IgG 溶液浓度为 1mg mL<sup>-1</sup>。

[0016] 本发明的有益效果:本发明首次通过简单的方法合成了亚铁血红素—二氧化锰复合物 (Hemin-MnO<sub>2</sub>),发现其具有过氧化物酶活性,能催化双氧水氧化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 使其由无色变为蓝色;本发明申请进一步将亚铁血红素—二氧化锰复合物作为抗体标记物应用于人 IgG 的检测,具有较高灵敏度,用肉眼即可辨别其颜色变化。本发明采用传统的“三明治”夹心结构法,在聚苯乙烯 96 孔微量滴定板上固定羊抗人 IgG,用所合成的 Hemin-MnO<sub>2</sub> 复合物作为兔抗人 IgG 标记物,来进行人体免疫球蛋白 IgG 抗原的检测,发现随着抗原浓度增大,最终氧化的产物颜色也出现有规律的变化(无色—浅蓝—深蓝),可以借助酶标仪测定的吸光度值实现人 IgG 的定量分析。使用 Hemin-MnO<sub>2</sub> 复合物的比色免疫法检测相对现有技术中传统的酶联免疫法,不需要使用酶作为抗体标记物,具有稳定性好、灵敏度高、选择性好、重现性优、分析速度快等优点。该免疫传感方法简单,价格低廉,肉眼即可观察其颜色变化,在生物技术、生物测定和生物医学方面具有潜在的应用前景。

#### 附图说明

[0017] 【图 1】为本发明实施例 1 制备的 Hemin-MnO<sub>2</sub> 复合物的透射电子显微镜图像。

[0018] 【图 2】为本发明实施例 1 制备的 Hemin-MnO<sub>2</sub> 复合物的能量色散 X 射线光谱图。

[0019] 【图 3】为本发明实施例 1 制备的 Hemin-MnO<sub>2</sub> 复合物以及 Hemin、MnO<sub>2</sub> 和 TMB 催化双氧水氧化 TMB 的显色变化图以及相应的吸光度—波长曲线图;1 为 TMB;2 为 MnO<sub>2</sub>,3 为 Hemin,4 为 Hemin-MnO<sub>2</sub> 复合物;显色变化图从上到下依次对应曲线 4、3、2 和 1。

[0020] 【图 4】为不同浓度的本发明实施例 1 制备的 Hemin-MnO<sub>2</sub> 复合物催化氧化等量 TMB 的显色变化图以及相应的吸光度—波长曲线图；曲线 9、8、7、6 和 5 依次对应 Hemin-MnO<sub>2</sub> 复合物浓度到由高到低，显色变化图从上到下依次对应 9、8、7、6 和 5。

[0021] 【图 5】为是本发明实施例 1 制备的 Hemin-MnO<sub>2</sub> 复合物采用双抗夹心法修饰后的免疫传感器测定不同浓度人 IgG 抗原所得的标准曲线图。

### 具体实施方式

[0022] 以下实施例旨在进一步说明本发明内容，而不是限制本发明的保护范围。

#### [0023] 实施例 1

[0024] 新型亚铁血红素—二氧化锰复合物 (Hemin-MnO<sub>2</sub>) 的合成：将 15mg 的 Hemin 与 10mL pH = 7.4 的 PBS 缓冲溶液混合后，加入 50 μL 的氨水，搅拌溶解，然后边搅拌边加入 1.6mL 100mM 的 MnAc<sub>2</sub> 溶液，室温下搅拌 5min，然后加入 100 μL 1M 的 NaOH 溶液，继续搅拌 6 ~ 8h，最终得到 Hemin-MnO<sub>2</sub> 复合物，然后在 9000rpm 下离心 20min，除去多余的 MnAc<sub>2</sub> 和 NaOH，再用 PBS 缓冲溶液清洗 2 ~ 3 遍，最后将离心得到的产物储存在 4℃ 的冰箱中备用。

[0025] 本发明的亚铁血红素—二氧化锰复合物修饰兔抗人 IgG 合成方法：将合成的 Hemin-MnO<sub>2</sub> 复合物分散到 0.5wt% 的壳聚糖溶液中，反应 2h，离心 5min；再用 0.25wt% 的戊二醛分散 0.5h，离心 5min；然后用 50 μg mL<sup>-1</sup> 的兔抗人 IgG 与之反应 1h，离心；最后将其分散到 pH = 7.4 的 PBS 中，制得 1mg mL<sup>-1</sup> 的溶液，储存在 4℃ 的冰箱中备用。

[0026] 本发明的亚铁血红素—二氧化锰复合物用于免疫分析检测对免疫球蛋白 IgG 的检测方法：将 150 μL 羊抗人 IgG (用缓冲液稀释至 10 μg mL<sup>-1</sup>) 加入聚苯乙烯 96 孔微量滴定板中，在 4℃ 下孵育一整夜，将抗体固定到孔中。未固定的羊抗人 IgG 溶液用 300 μL 洗涤缓冲液冲洗三次洗去。接着在 37℃ 下，加入 250 μL 封闭缓冲液，温育 2.5h，减少人 IgG 的非特异吸附，过量的 BSA 则用 300 μL 的洗涤缓冲液冲洗三次。以 pH = 7.4 的 PBS 溶液分别配制不同浓度的 IgG 溶液 (0, 1, 2, 5, 10, 50, 100, 500, 1000pg mL<sup>-1</sup>)，然后分别将 150 μL 所配不同浓度的人 IgG 溶液加入孔中，孵育 1h，再冲洗三次。随后加入 150 μL Hemin-MnO<sub>2</sub> 修饰兔抗人 IgG，孵育 1.5h。在用 300 μL 的洗涤缓冲液冲洗四次。最后，在每个孔中加入 150 μL 含 4.3mM 双氧水的柠檬酸缓冲液配制的 2.5mM TMB，反应 15min，继而用酶标仪测定 TMB 氧化产物的吸光度值，制得的标准曲线如图 5 所示。

#### [0027] 实施例 2

[0028] 利用亚铁血红素—二氧化锰复合物用于临床免疫分析检测对人血清中人 IgG 回收率的测定：将人血清样品用 pH = 7.4 的 PBS 缓冲液逐级稀释到 10<sup>-10</sup> 倍，然后加入不同浓度的 0pg mL<sup>-1</sup>、10pg mL<sup>-1</sup>、50pg mL<sup>-1</sup>、100pg mL<sup>-1</sup> 和 500pg mL<sup>-1</sup> 的人 IgG 溶液。以加入 0pg mL<sup>-1</sup> 人 IgG 的纯血清溶液为空白参比溶液，按照实施例 1 的具体操作测定 TMB 氧化产物的吸光度值，制得回收率如表 1，从表 1 数据可以看出人 IgG 回收率高，可以证明实施例 1 的检测方法的可行性和准确性。

[0029] 表 1. 人血清中人 IgG 回收率的测定 (pg mL<sup>-1</sup>)

[0030]

样本号	0	1	2	3	4
加入的人 IgG 浓度	0	10	50	100	200
测出的人 IgG 浓度	1.20	11.07	47.64	93.54	476.43
实际的人 IgG 浓度	1.20	9.87	46.44	92.34	475.23
回收率		98.70%	92.88%	92.34%	95.05%

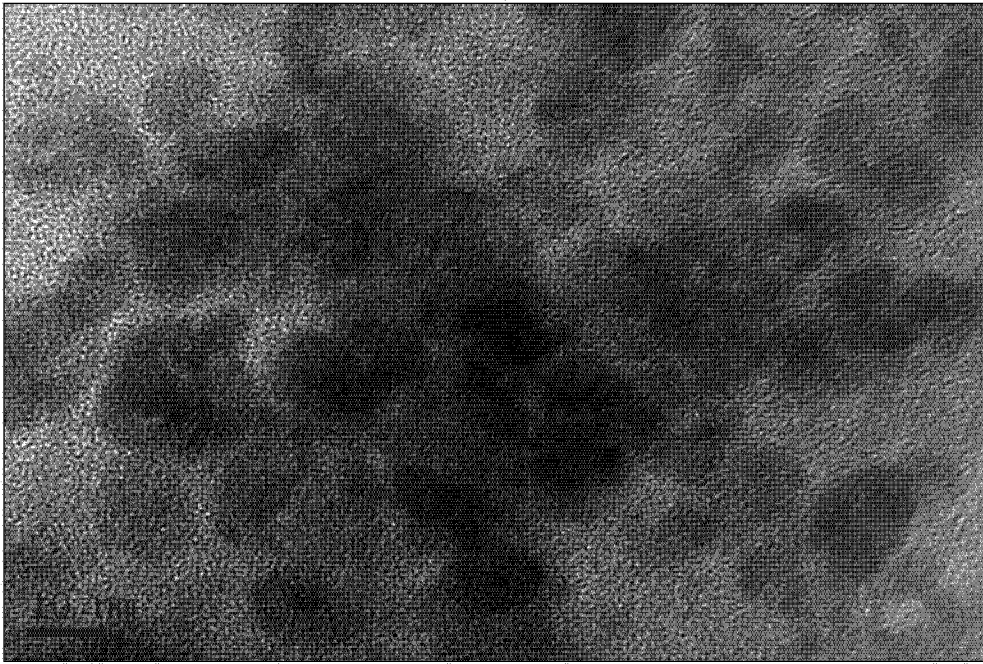


图 1

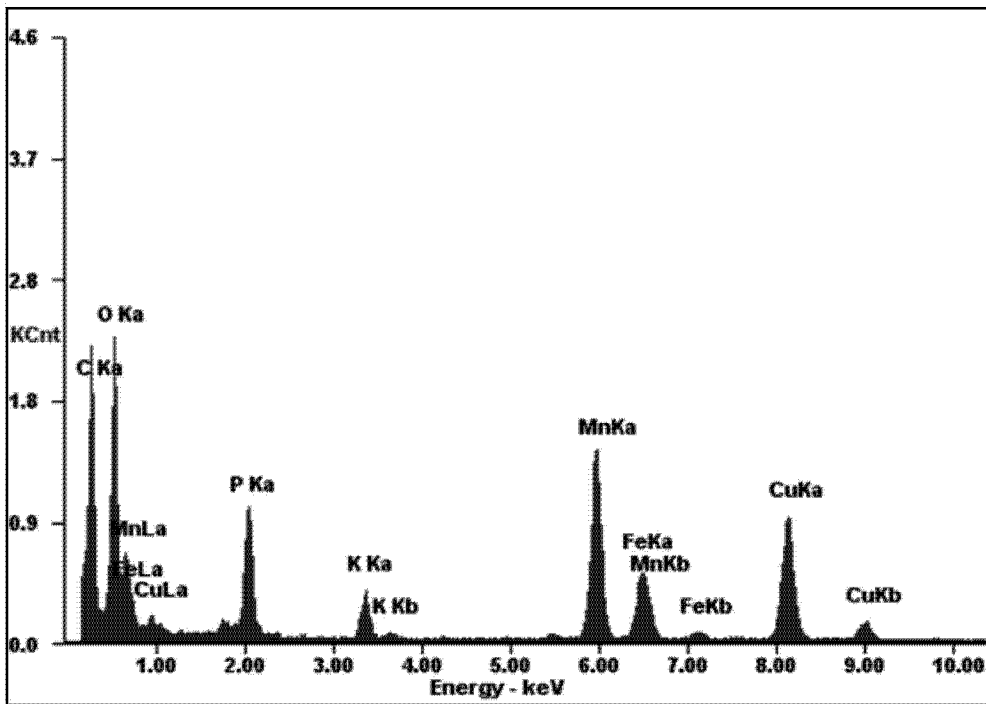


图 2

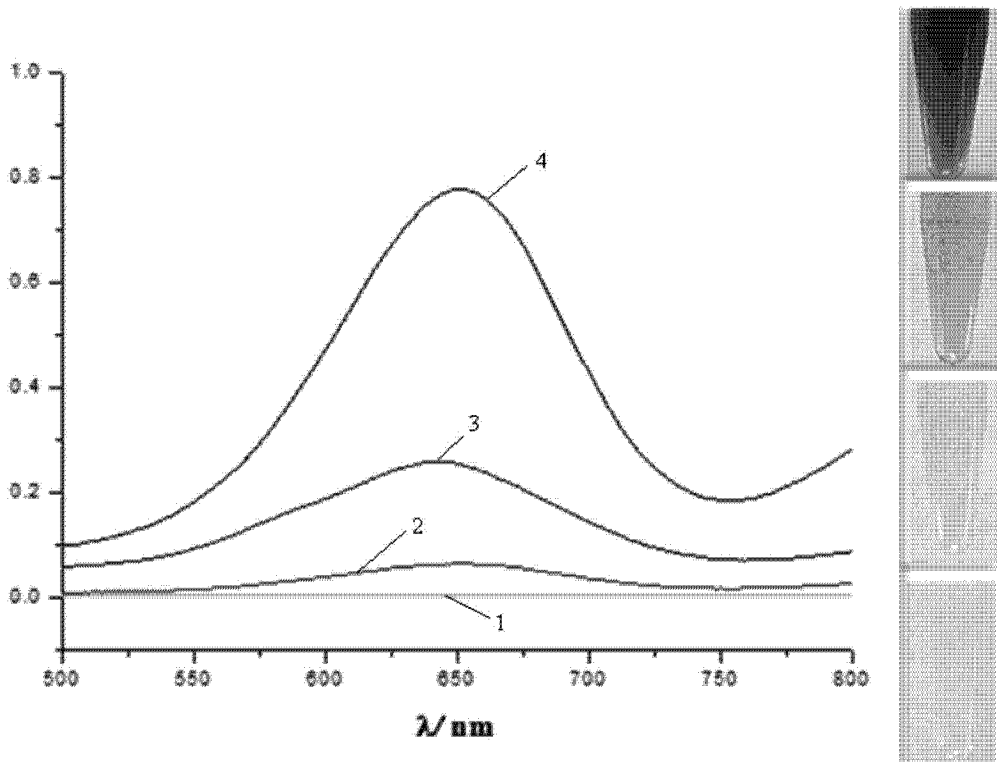


图 3

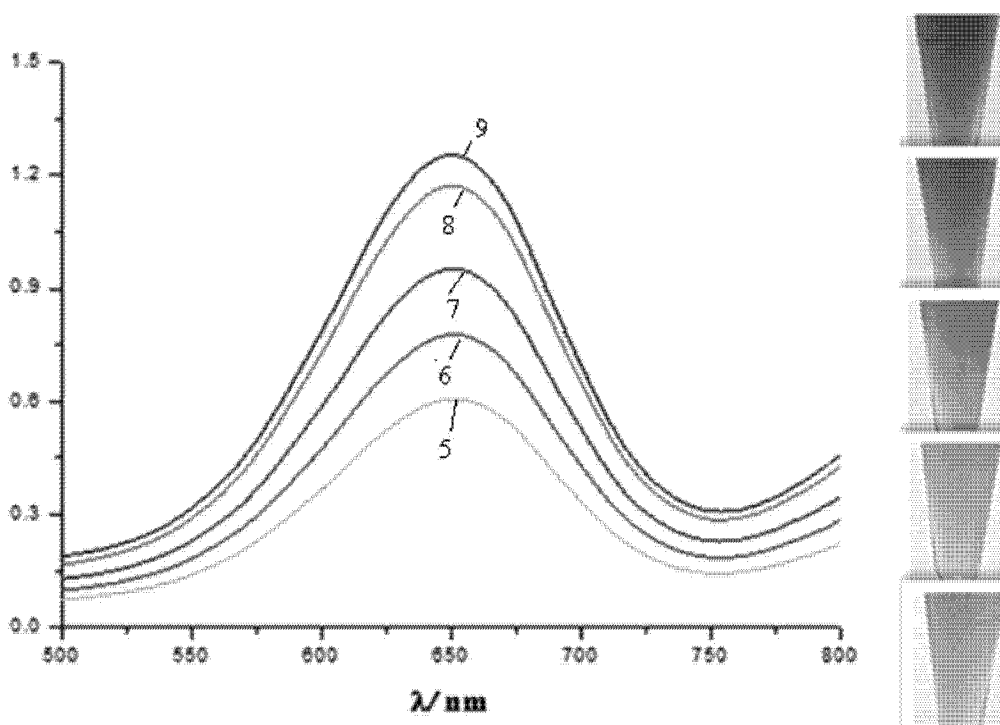


图 4

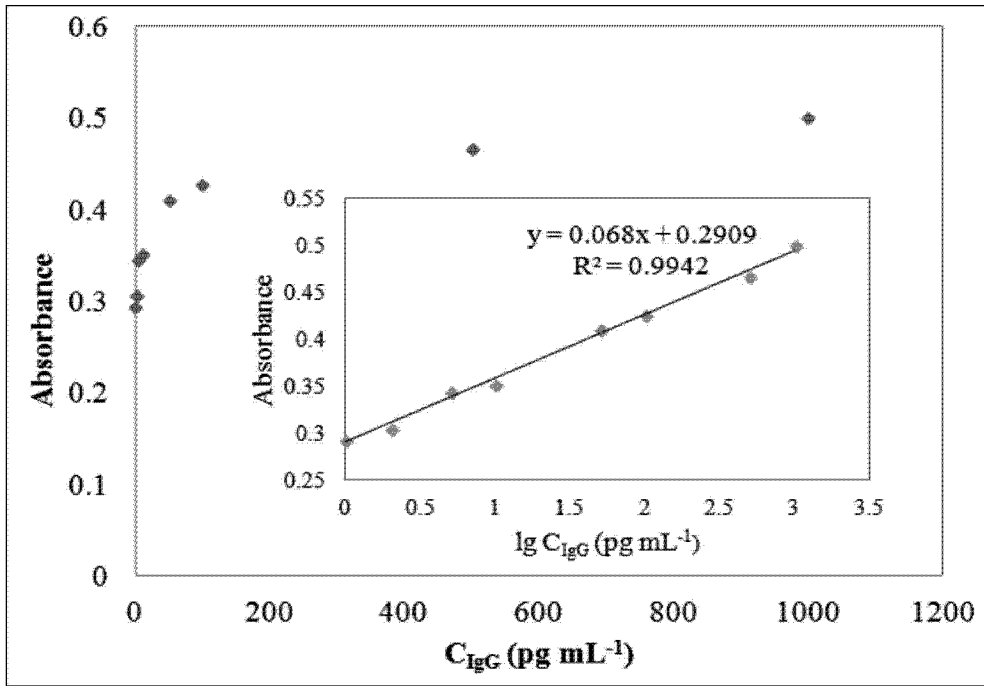


图 5

专利名称(译)	亚铁血红素—二氧化锰复合物的制备及其用于检测人IgG的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103969445A</a>	公开(公告)日	2014-08-06
申请号	CN201410192532.X	申请日	2014-05-08
[标]申请(专利权)人(译)	中南大学		
申请(专利权)人(译)	中南大学		
当前申请(专利权)人(译)	中南大学		
[标]发明人	阳明辉 郭林燕 周苗		
发明人	阳明辉 郭林燕 周苗		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/6803		
代理人(译)	魏娟		
其他公开文献	CN103969445B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了亚铁血红素—二氧化锰复合物的制备及其用于检测人IgG的方法。本发明将亚铁血红素在氨水作用下溶于磷酸盐缓冲溶液，再依次加入MnAc<sub>2</sub>溶液和NaOH溶液反应，制得亚铁血红素—二氧化锰复合物(Hemin-MnO<sub>2</sub>)；Hemin-MnO<sub>2</sub>具有过氧化物酶活性，能催化双氧水氧化TMB使其由无色变为蓝色，通过传统的“三明治”夹心结构法，以Hemin-MnO<sub>2</sub>作为兔抗人IgG标记物，来进行人体免疫球蛋白IgG抗原的检测，使用Hemin-MnO<sub>2</sub>的比色免疫法检测具有稳定性好、灵敏度高、选择性好、重现性优、分析速度快等优点；该免疫传感方法简单，价格低廉，肉眼即可观察其颜色变化，具有广泛的应用前景。

