



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111693689 A

(43)申请公布日 2020.09.22

(21)申请号 201910195758.8

(22)申请日 2019.03.14

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 刘丹 阎锡蕴 段德民 郑继燕
张德玺 王艳芳

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 张国梁 张莹

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

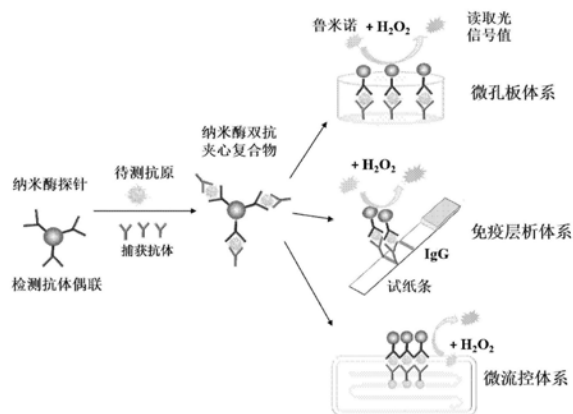
权利要求书1页 说明书10页 附图8页

(54)发明名称

一种用于酶促化学发光检测的纳米酶及其用途

(57)摘要

本发明提供一种模拟HRP酶活性的纳米酶，所述纳米酶为表面修饰有氯化血红素的铁基纳米材料。本发明还提供所述纳米酶的制备和使用方法及其用途。



1. 一种模拟HRP酶活性的纳米酶,所述纳米酶为表面修饰有氯化血红素的铁基纳米材料。

2. 权利要求1的纳米酶,其中所述铁基纳米材料选自 Fe_3O_4 纳米材料、 Fe_2O_3 纳米材料、掺入Co的铁基纳米材料或纳米水铁矿。

3. 权利要求1的纳米酶,其中通过在铁基纳米材料的醋酸钠悬浮液中加入氯化血红素制备所述表面修饰有氯化血红素的铁基纳米材料。

4. 权利要求1-3中任一项的纳米酶用于模拟HRP酶活性的用途。

5. 一种用于检测液体样品中的待测物的纳米模拟酶化学发光免疫检测方法,所述方法包括以下步骤:1) 提供检测探针,所述检测探针通过将权利要求1-3中任一项的纳米酶与能够与所述待测物特异性结合的第一分子偶联制备;2) 提供捕获探针,所述捕获探针是固定化的能够与所述待测物特异性结合的第二分子;3) 使所述液体样品与所述检测探针接触;4) 使与所述检测探针接触过的所述液体样品与所述捕获探针接触;以及5) 向经过步骤4)的所述捕获探针加入鲁米诺类化学发光底物和激发剂进行化学发光催化反应。

6. 权利要求5的方法,其中所述鲁米诺类化学发光底物选自鲁米诺、异鲁米诺或其衍生物。

7. 权利要求5的方法,其中所述激发剂是过氧化物或碱性氢氧化物。

8. 权利要求5的方法,其中所述待测物是蛋白质、多肽或核酸,任选地所述第一分子和所述第二分子是针对所述蛋白质或多肽的特异性抗体,优选是单克隆抗体,或是针对所述核酸的适配体。

9. 用于进行权利要求5-8中任一项的方法的纳米模拟酶免疫检测系统,所述系统是免疫微孔板检测系统、免疫层析检测系统(例如,免疫层析试纸条)或微流控免疫检测系统。

10. 试剂盒,其包含下述任意一项或多项:1) 权利要求1-3中任一项的纳米酶,2) 权利要求5-8中任一项定义的检测探针、捕获探针、鲁米诺类化学发光底物和/或激发剂,和3) 权利要求9定义的纳米模拟酶免疫检测系统。

一种用于酶促化学发光检测的纳米酶及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于纳米技术及免疫检测技术领域,具体涉及能够高效催化鲁米诺类化学发光底物的无机过氧化物模拟酶及纳米酶化学发光免疫检测技术及其应用。

背景技术

[0002] 目前,免疫检测技术相关产品占体外诊断领域40%的市场份额,现行免疫检测技术主要包括:放射性免疫分析法(RIA)、胶体金免疫层析法、酶联免疫分析法(ELISA)、时间分辨荧光法(TRFIA)和化学发光免疫分析法(CLIA)。其中放射性免疫分析灵敏度较高,但需使用放射性同位素,易造成放射性污染;胶体金免疫层析法灵敏度较低,仅适用于即时定性检测;ELISA技术较为成熟、成本低,适用于批量样品半定量检测,但操作繁琐耗时,依赖于HRP酶稳定性;TRFIA灵敏度较高,特异性较好,但需激发光源,且试剂成本较高。而CLIA不仅具有灵敏度高、特异性好、线性范围宽、无需外接光源、背景干扰小等优异性能,且操作简便、易于实现自动化,适用于高通量筛查或急诊术前检查,是目前最先进的体外免疫诊断技术。现阶段CLIA已成为体外诊断最大的细分领域,其临床应用需求巨大,且保持15%的增速,逐渐替代ELISA检测,成为免疫诊断行业的主流技术。

[0003] CLIA从原理上结合了免疫反应和化学发光反应:一方面通过抗原抗体反应特异结合待测物质,另一方面利用化学发光物质或能够催化化学发光底物的酶标记检测抗体,在激发剂和发光底物存在下,促使发光物质形成不稳定的中间体,当由激发态返回至基态时释放出光子,蓝色光信号被化学发光仪采集;其中所结合待测物质的含量与化学发光强度呈正比,从而实现由光信号转换成待测物含量的定量分析[1]。根据固相载体的不同可分为板式化学发光和管式化学发光。板式化学发光检测,与ELISA类似,原料抗体包被及反应物结合在微孔板上;管式化学发光则采用超顺磁微粒作为固相载体,反应物结合于反应管中,外加磁场进行清洗。随着化学发光技术的不断演变迭代,根据发光底物和反应机理的不同,化学发光技术又可细分为:直接化学发光、酶促化学发光和电化学发光。直接化学发光包括:异鲁米诺和吡啶酯发光体系,第一代异鲁米诺直接化学发光试剂,由于性能不佳已被淘汰;吡啶酯直接化学发光为近年来新兴的第三代发光试剂,性能优异,发展迅速,但市场已被海外厂家(罗氏、雅培等)进口品牌所垄断。其中酶促化学发光主要分为:辣根过氧化物酶(HRP)-鲁米诺(Luminol)发光体系和碱性磷酸酶(ALP)-金刚烷(AMPPD)发光体系,以HRP-luminol发光体系最为常见,是我国体外诊断产业早期化学发光产品的主要形式,多用于肿瘤、传染病、激素、心血管疾病、肝功能、肾功能、代谢、药物浓度等项目检查[2],后来逐渐被ALP酶促化学发光及直接化学发光产品挤占市场。第四代电化学发光技术灵敏度和准确度高,目前产品主要来源于进口厂家,如罗氏等,仪器及试剂多为封闭式系统,价格昂贵,应用推广有限。

[0004] 由于化学发光技术壁垒高,研发难度较大,我国市场进口产品占比80%以上;此外,由于化学发光试剂使用依赖于封闭式、高精密的自动化仪器,国内企业研发资金门槛高,试剂和仪器绑定销售,价格昂贵,因而国产化学发光产品在国内三甲医院等高端市场渗

透率不高,临床应用缺口较大,基层检验普及率不高,尚有较大的发展空间。在当前的市场经济形势下,进口产品价格上调,国产替代迫在眉睫。进口化学发光产品以全自动管式直接化学发光为主,而国产化学发光品牌多集中在半自动板式酶促化学发光产品。方法学和发光底物的选择,决定了酶促化学发光产品在灵敏度和准确性方面受限。HRP-luminol发光系统逐渐暴露出较多缺陷:第一,核心原料HRP属于生物蛋白酶,对酸碱度、温度十分敏感,叠氮化物、氧化物、硫化物等均可抑制其活性,稳定性较差,影响化学发光检测的准确性和稳定性;第二,HRP最适催化pH值(pH5.0左右)与鲁米诺底物发光反应最适pH值(pH11~pH12.0)不匹配,碱性条件下并不能最大限度的催化鲁米诺化学发光,需使用增强剂以提高化学发光强度及灵敏度;第三,高纯度的HRP多源自于进口,价格昂贵,试剂成本较高。上述瓶颈严重制约了HRP酶促化学发光产品的推广应用。

[0005] 寻找性能优良的过氧化物模拟酶替代HRP酶,将有助于克服上述局限和不足,在提高酶促化学发光检测灵敏度和稳定性的同时,降低试剂成本。目前,已发现的HRP模拟酶包括金属有机纳米片层等。据报道,贵金属、金属氧化物等纳米材料可用作化学发光反应的增敏剂、标记物或能量受体等,用于增强化学发光,制备小分子葡萄糖等生物传感器[3,4]。但实验表明,报道中的大多数纳米材料催化活性较天然HRP酶低,尚不能替代HRP酶用于化学发光免疫检测。2007年,申请者所在实验室首次报道 Fe_3O_4 纳米材料具有内源过氧化物模拟酶特性[5]。研究团队同时利用铁基纳米酶催化HRP酶底物DAB显色,开创了纳米酶免疫层析、免疫组化新技术,应用于环境监测、污水处理、传染病检测、疾病诊断等多个领域[6,7]。但与天然酶相比, Fe_3O_4 纳米酶活性及催化效率均有待进一步提高。

[0006] 氯化血红素(Hemin)是一类含铁的天然卟啉化合物,作为辣根过氧化物酶HRP的辅基,能模拟过氧化物酶作用,具有一定的过氧化物酶催化活性,但因缺少HRP的蛋白结构,催化选择性不佳。因hemin具有 π 共轭结构,易于通过离子- π 或 π - π 非共价键相互作用固定于其他材料表面[8],从而形成新的功能化复合材料。

发明内容

[0007] 针对上述应用需求和现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种具有高过氧化物酶活性的纳米材料,以替代天然HRP酶高效催化鲁米诺类底物化学发光反应,建立新型纳米酶促化学发光免疫分析及平台,以突破上述背景技术中核心原材料HRP酶不稳定及催化效率不能最大化而导致的传统酶促化学发光免疫检测的局限性。本技术方法主要通过微孔板、免疫层析及微流控检测体系,实现高灵敏度化学发光免疫定量检测,为分子诊断、传染病检测、环境监测等提供新的技术手段;其中免疫层析及微流控检测体系操作简单快速,适用于现场即时检测(POCT),本发明具有显著的创新性和潜在应用价值。

[0008] 本发明首先提供一种具有较高内源过氧化物酶活性的纳米酶,其能替代天然HRP酶,用于催化鲁米诺类底物化学发光,实现酶促化学发光技术核心原材料的国产替代。

[0009] 本发明所述纳米酶是在铁基纳米材料基础上通过修饰氯化血红素(Hemin)而制得。其中铁基纳米颗粒可以是四氧化三铁(Fe_3O_4)纳米材料、三氧化二铁(Fe_2O_3)纳米材料、掺入Co的铁基纳米材料或纳米水铁矿等,优选是四氧化三铁(Fe_3O_4)纳米材料或掺入钴的铁基纳米材料(Co-Fe),最优选是掺入钴的铁基纳米材料(Co-Fe)。对于掺入钴的铁基纳米材料,在本发明优选的实施方案中,在制备中通过控制原料的投入量而使纳米材料所含的Co

与Fe的摩尔比例在1:1~1:4之间。

[0010] 所述纳米材料表面修饰有羧基、氨基或巯基等基团,以便于偶联抗体。本发明所述纳米酶的粒径优选为10~300nm。

[0011] 本发明的修饰氯化血红素的铁基纳米材料可以例如通过以下方法制备:通过在铁基纳米材料的醋酸钠悬浮溶液中,投入足量的Hemin溶液,快速搅拌反应即可。制备过程中Hemin可能通过离子- π 或 π - π 堆积等非共价键相互作用固定到铁基纳米材料表面。根据复合材料的紫外可见吸收光谱在360~440nm处是否出现Hemin特征吸收峰来确定Hemin是否修饰成功。

[0012] 本发明所述纳米酶在抗体标记后仍能高效催化化学发光底物(鲁米诺、异鲁米诺或其衍生物)产生化学发光,在部分实施例中,优选鲁米诺作为发光底物。

[0013] 本发明所述纳米酶属于无机材料,对酸碱度不敏感,在较大的酸碱度范围(pH9.0~pH14.0)内对鲁米诺等发光底物保持较高的催化活性,而HRP蛋白酶在超出pH8.5范围时对鲁米诺的催化活性急剧下降。

[0014] 本发明所述纳米酶在低温或高温环境下(4~100℃)仍能保持对鲁米诺底物较高的催化活性,相对于HRP(100℃时失活)热稳定性更好。

[0015] 本发明所述纳米酶在多种溶剂(水相、乙醇、DMSO等)均能保持较高的鲁米诺底物催化活性,而HRP在DMSO等溶剂中易失活。

[0016] 本发明所述纳米酶的化学发光催化活性不易受防腐剂(如叠氮化钠等)的影响,易于长期保存。

[0017] 本发明所述纳米酶在4℃或室温能够长期保存而不丧失催化活性,相对HRP酶(4℃仅能稳定保存1个月)更方便储存。

[0018] 本发明另一个方面公开了一种高灵敏纳米酶促化学发光免疫检测分析方法,其基本原理结合了双抗夹心酶联免疫检测与纳米酶促化学发光反应,利用纳米酶抗体标记探针,特异性结合待测物质中抗原,并与固相包被抗体结合,形成纳米酶-双抗夹心复合物,在激发剂(H_2O_2 和氢氧化钠)存在下,纳米酶氧化鲁米诺底物发出蓝光,根据化学发光仪器采集到的发光信号强度与待测物中抗原呈正比,从而实现由光信号转换成待测物含量的定量分析。根据固相包被载体及反应体系的不同,该方法原理可应用到微孔板、免疫层析及微流控等不同的纳米酶促化学发光检测体系。

[0019] 本发明所述方法,主要通过以下技术方案及步骤实现:

[0020] (1) 制备纳米酶促化学发光检测探针:去离子水清洗纳米酶,超声分散,利用活化剂活化纳米酶表面基团;超声清洗后加入偶联缓冲液及一定量抗原特异性检测抗体,室温孵育偶联;磁吸附吸弃上清;加入Tris封闭缓冲液封闭纳米酶表面暴露的未结合活性位点,平衡缓冲液清洗后最后加入封闭液孵育纳米酶抗体标记探针,降低非特异性结合,最后用平衡缓冲液重悬并保存于4℃或固定到纳米酶结合垫上保存于4℃或室温。

[0021] (2) 包被固相抗体:使用包被缓冲液稀释抗原特异性捕获抗体,固定于固相表面如微孔板或硝酸纤维素膜或微流控芯片上,微孔板包被后进行清洗处理,硝酸纤维素膜包被后与背衬、吸收垫、样品垫、结合垫组装在一起制成试纸板,再作干燥处理。或在固相载体上包被链霉亲和素,其能够结合生物素标记捕获抗体。

[0022] (3) 与待测抗原结合形成复合物:在反应孔或纳米酶结合垫上使纳米酶促化学发

光检测探针与待测物抗原混合或接触,并与固定捕获抗体的固相载体孵育或进行层析,形成纳米酶-双抗夹心复合物,微孔板或微流控检测中继续加入清洗缓冲液洗去未结合的纳米酶探针。对于包被链霉亲和素的固相结合体系,使纳米酶促化学发光检测探针与待测物抗原及生物素标记捕获抗体混合,并与固相载体孵育,利用抗原抗体免疫反应及生物素-亲和素结合体系形成纳米酶-双抗夹心-生物素-亲和素复合物。

[0023] (4) 催化化学发光反应:采用手动或自动化化学发光检测仪向上述复合物中加入鲁米诺类化学发光底物工作液,复合物中纳米酶在激发剂存在下高效催化Luminol-H₂O₂体系产生化学发光,利用化学发光仪即时检测发光强度,根据标准物质浓度梯度检测绘制发光强度-浓度曲线,根据待测样品发光强度推算实际待测抗原含量。

[0024] 优选的,本发明所述方法步骤(1)中,纳米酶表面修饰基团若为羧基,则采用1-(3-二甲氨基丙基-3)-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)进行活化;若修饰基团为氨基,则采用戊二醛活化;若修饰基团为羟基,则采用溴化脒活化。

[0025] 优选的,本发明所述方法步骤(1)中,平衡缓冲液为pH6.0~8.0,0.1M 磷酸盐缓冲液(PBS)或pH6.0~8.0,50mM Tris-HCl缓冲液。

[0026] 优选的,本发明所述方法步骤(1)中,偶联缓冲液为pH5.0~8.0,50mM 醋酸钠(NaAc)溶液或pH5.0~8.0,50mM吗啉乙磺酸(MES)溶液或 pH6.0~9.0,50mM四硼酸钠缓冲液(NaB₄O₇)。

[0027] 优选的,本发明所述方法步骤(1)中,封闭液为5%的牛血清白蛋白、酪蛋白、羊血清等。

[0028] 优选的,本发明所述方法步骤(2)中,包被缓冲液为pH7.0~9.0,10 mM磷酸缓冲液(PB)或pH7.0~9.0,10mM碳酸盐缓冲液。

[0029] 优选的,本发明所述方法步骤(2)中,包被固相载体为聚苯乙烯/聚丙烯微孔板或硝酸纤维素薄膜或微流控芯片。

[0030] 优选的,本发明所述方法步骤(3)中,清洗缓冲液为pH7.4,0.1M 磷酸盐缓冲液(PBS),或添加0.05%~0.1%吐温(Tween-20)的磷酸盐缓冲液(PBST)。

[0031] 优选的,本发明所述方法步骤(4)中,所述化学发光底物工作液是鲁米诺发光底物和激发剂(过氧化氢和氢氧化钠)的混合溶液。分为A液和B液独立储存,A液含有鲁米诺、增强剂等;B液含有过氧化氢、氢氧化钠等。

[0032] 优选的,本发明所述方法步骤(4)中,采用微孔板作为固相载体时,可选用EnVision多功能酶标仪等进行信号采集;采用硝酸纤维素膜作为固相载体时,可选用Clinx ChemiScope化学发光成系统进行信号采集;采用微流控芯片作为固相载体时,可选用微流控检测仪进行信号采集。

[0033] 本发明还一方面提供一种试剂盒,所述试剂盒可以包含下述任意一项或多项:1)本文描述的纳米酶,2)本文描述的检测探针、捕获探针、鲁米诺类化学发光底物和/或激发剂,和3)本文描述的纳米模拟酶免疫检测系统。本发明的试剂盒可以用于多种用途,例如用于化学发光检测等。因此,在一些实施方案中,本发明的试剂盒还可以包含适于进行化学发光检测的另外的试剂或组分。在一些实施方案中,本发明的试剂盒可以包含容器和在容器上或与容器一起的标签或包装说明书。在一些实施方案中,所述容器中可以装有组合物,所述组合物可以单独地与用于检测目的的另一组合物或试剂组合。在一些实施方案中,组

合物中可以包含本文描述的纳米酶、检测探针、捕获探针、鲁米诺类化学发光底物、激发剂或免疫检测系统中的任何一种或多种。在一些实施方案中,本发明的试剂盒可以包含适合进行检测的相关试剂和装置,例如缓冲剂,微量滴定板、层析试纸条、酶底物等。

[0034] 从上述技术方案可以看出,本发明中的纳米酶用于酶促化学发光免疫检测具有以下有益效果:

[0035] 1) 利用纳米酶实现传统HRP蛋白酶的国产替代。相对于HRP酶,纳米酶制备简单,成本低廉,且通过合成条件控制其粒径、形貌或修饰,可实现催化活性的调控。此外,在不同温度(4~100℃)及酸碱度(pH9~14)范围内,纳米酶仍能保持较高的催化活性,比HRP酶更稳定,易于保存和运输,且具有磁性便于分离富集,可回收再利用。纳米酶具有生物相容性,可介由表面修饰偶联抗体,实现特异性识别,因而集靶向识别、富集、催化等多功能于一体。HRP蛋白酶多数依赖进口、原料昂贵且不稳定,以纳米酶替代传统HRP催化鲁米诺化学发光,在提高化学发光催化效率的同时,显著提高了化学发光试剂的稳定性,且有助于降低研发成本和试剂价格,助力化学发光试剂的国产替代。

[0036] 2) 纳米酶促化学发光免疫分析实现传统HRP酶促化学发光方法学的替代,有助于突破传统酶促化学发光免疫检测的瓶颈,在保持化学发光高灵敏度及免疫分析高特异性的同时,填补传统酶促化学发光检测受制于HRP酶催化效率有限、稳定性不足等缺陷,将有助于推动国内化学发光产业的技术革新,符合目前医疗改革的大趋势,长远上讲有望惠及分级诊疗模式下的基层检验。

[0037] 3) 本发明中的纳米酶促化学发光免疫分析可根据应用场景需求采用不同的检测体系(图1)。其中纳米酶促微孔板式化学发光检测体系,相比传统板式化学发光检测,具有更高的稳定性和灵敏度,适用于批量样品的化学发光定量分析。而纳米酶促化学发光免疫层析检测体系,有助于实现传统免疫层析的技术革新,相对于胶体金免疫层析检测,灵敏度更高,能够实现定量检测;相对于普通荧光免疫层析检测,无需外接激发光源,降低背景干扰,信噪比更高,因而更适用于快速即时定量检测;相对于时间分辨免疫层析检测,无需镧系元素作为标记物,成本较低,操作更便捷。纳米酶促化学发光免疫层析检测,将有望实现化学发光技术的“POCT”化,成为下一代的POCT检测新技术。综上所述,本发明提供的纳米酶促化学发光免疫分析技术,具有较大的创造性和广阔的应用前景。

[0038] 在具体的方面中,本发明提供以下各项:

[0039] 1. 一种模拟HRP酶活性的纳米酶,所述纳米酶为表面修饰有氯化血红素的铁基纳米材料。

[0040] 2. 第1项的纳米酶,其中所述铁基纳米材料选自 Fe_3O_4 纳米材料、 Fe_2O_3 纳米材料、掺入Co的铁基纳米材料或纳米水铁矿。

[0041] 3. 第1项的纳米酶,其中通过在铁基纳米材料的醋酸钠悬浮液中加入氯化血红素制备所述表面修饰有氯化血红素的铁基纳米材料。

[0042] 4. 第1-3项中任一项的纳米酶用于模拟HRP酶活性的用途。

[0043] 5. 一种用于检测液体样品中待测物的纳米模拟酶化学发光免疫检测方法,所述方法包括以下步骤:1) 提供检测探针,所述检测探针通过将第1-3项中任一项的纳米酶与能够与所述待测物特异性结合的第一分子偶联制备;2) 提供捕获探针,所述捕获探针是固定化的能够与所述待测物特异性结合的第二分子;3) 使所述液体样品与所述检测探针接触;

4) 使与所述检测探针接触过的所述液体样品与所述捕获探针接触;以及5) 向经过步骤4) 的所述捕获探针加入鲁米诺类化学发光底物和激发剂进行化学发光催化反应。

[0044] 6. 第5项的方法,其中所述鲁米诺类化学发光底物选自鲁米诺、异鲁米诺或其衍生物如ABEI、AHEI、ITCI、ITCBEI等。

[0045] 7. 第5项的方法,其中所述激发剂是过氧化物或碱性氢氧化物。

[0046] 8. 第5项的方法,其中所述待测物是蛋白质、多肽或核酸,任选地所述第一分子和所述第二分子是针对所述蛋白质或多肽的特异性抗体,优选是单克隆抗体,或是针对所述核酸的适配体。

[0047] 9. 用于进行第5-8项中任一项的方法的纳米模拟酶免疫检测系统,所述系统是免疫微孔板检测系统、免疫层析检测系统(例如,免疫层析试纸条)或微流控检测系统。

[0048] 10. 试剂盒,其包含下述任意一项或多项:1) 第1-3项中任一项的纳米酶,2) 第5-8项中任一项定义的检测探针、捕获探针、鲁米诺类化学发光底物和/或激发剂,和3) 第9项中定义的纳米模拟酶免疫检测系统。

附图说明

[0049] 图1:纳米酶促化学发光免疫检测分析示意图。

[0050] 图2:纳米酶形貌与粒径透射电镜表征。

[0051] 图3:纳米酶紫外-可见光吸收光谱分析。图3A:Co-Fe-hemin、hemin、Co-Fe分析;图3B:、Fe₃O₄-hemin、hemin及Fe₃O₄分析。

[0052] 图4:纳米酶过氧化物酶活性测定及酶活力单位换算。图4A:纳米材料在652nm波长下酶促反应动力学曲线;图4B-E:酶活力单位测量。

[0053] 图5:不同pH、温度、溶剂条件下纳米酶催化鲁米诺发光效率比较。图5A:不同pH条件下催化鲁米诺的最大发光值;图5B:不同温度处理后催化鲁米诺的最大发光值;图5C:不同的溶剂稀释和保存后的最大发光值。

[0054] 图6:纳米酶及HRP催化鲁米诺化学发光最大发光强度的比较。

[0055] 图7:纳米酶及传统HRP酶促微孔板化学发光检测sCD146蛋白标准曲线。

[0056] 图8:纳米酶促化学发光免疫层析及传统基于DAB显色的纳米酶免疫层析检测青霉特异性糖蛋白Mp1p。图8A:化学发光信号采集;图8B:化学发光标准曲线。

具体实施方式

[0057] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白,以下结合具体实施例,并参照附图,对本发明作进一步的详细说明。

[0058] 实施例1. 纳米酶制备与表征

[0059] 采用液相水热法制备羧基修饰的铁基纳米酶。在王水浸泡过的烧杯内投入7.2g FeCl₃·6H₂O (Sigma, Cat. no. F2877) 及400mL乙二醇(参考中国专利申请号201410015610.9的描述)(以制备Fe₃O₄纳米材料),或在上述原料中进一步掺入3.2g CoCl₂·6H₂O(以制备Co-Fe纳米材料),快速搅拌下,加入30g无水NaAc和3g PAA,快速搅拌30min,置于200℃高温反应釜内反应12h~14h后,所得溶液进行磁分离,弃上清,加入乙醇超声分散清洗,弃上清,烘干定量,制得铁基纳米颗粒(Fe₃O₄纳米材料或Co-Fe 纳米材料)。取20mg上述制得的铁基纳米

颗粒重悬于200mL NaAc溶液中,快速搅拌下滴加800 μ L 10mg/mL的氯化血红素溶液(Hemin, Sigma, Cat.no.51280),反应2小时,反应结束后用去离子水(ddH₂O)清洗所制得Hemin修饰的复合铁基纳米材料(Fe₃O₄-hemin或Co-Fe-hemin),取适量纳米酶溶液拷干定量。取少量纳米酶分散于乙醇或水溶液中,通过透射电子显微镜(TEM, JEOL, JEM-1400)表征所制备纳米酶粒径和形态,其中标尺代表200nm,图2所示Fe₃O₄-hemin材料为粒径60nm左右的球形颗粒,Co-Fe-hemin材料为粒径100nm左右的球形颗粒。

[0060] 实施例2. 纳米酶紫外-可见吸收光谱分析

[0061] 取适量Co-Fe-hemin、Fe₃O₄-hemin、Co-Fe及Fe₃O₄纳米材料,用ddH₂O 稀释成0.02mg/mL溶液,同时根据复合材料制备中Hemin的投入质量比例配制成0.0057mg/mL Hemin溶液(溶于DMSO),使用紫外分光光度计(Hitachi,U-3900),对上述各组分材料进行紫外-可见吸收光谱扫描定性分析,结果如图3所示,Hemin分子在404nm左右有最大特征吸收峰,而Co-Fe或Fe₃O₄纳米酶在230nm左右有最大吸收峰,Co-Fe-hemin或Fe₃O₄-hemin复合材料除了在230nm波长处有最大吸收峰,同时在360~410nm范围出现新的吸收峰。由于Hemin二聚体通常在360nm左右有最大吸收峰,其单体形式最大吸收峰在400nm左右,上述复合材料新特征吸收峰的出现及偏移,说明Co-Fe或Fe₃O₄纳米材料与Hemin存在相互作用,表明Co-Fe或Fe₃O₄纳米材料成功修饰上Hemin辅基(图3A、3B)。

[0062] 实施例3. 纳米酶过氧化物酶活性检测及酶活力单位换算

[0063] 取适量根据实施例1制备的纳米材料,用ddH₂O稀释成0.2mg/mL溶液,用PBS稀释HRP至0.2mg/ml,Hemin根据复合材料制备中投入质量比稀释成0.057mg/mL溶液。并配制酶促反应底物工作液:每毫升单组份TMB底物(湖州英创,TMB-S-001)加入70 μ L 30%过氧化氢溶液。以10 μ L/孔在96孔酶标板中加入上述稀释的纳米酶及HRP、Hemin溶液,每组3个平行孔。Co-Fe纳米材料、Fe₃O₄纳米材料(根据实施例1中液相水热法合成)、Hemin(Sigma, Cat.no.51280)及HRP(Sigma,Cat.no.P8375)作为对照组。反应孔中每孔加入90 μ L底物液,立即采用酶标仪检测30min内652nm波长下酶促反应动力学曲线,如图4A,Co-Fe-hemin和Fe₃O₄-hemin 过氧化物酶活性显著高于Co-Fe纳米材料、Fe₃O₄纳米材料及Hemin,活性与HRP相近。

[0064] 纳米材料酶活力单位换算:使用DMSO配制10mg/mL TMB底物液(sigma, Cat.no.861510),配制pH3.6,0.2M醋酸/醋酸钠(HAc/NaAc)缓冲液,并加入30%过氧化氢溶液(100 μ L/mL),避光保存。打开紫外分光光度计(Hitachi,U-3900),将上述底物液及缓冲液置于循环水浴箱内预热至37 $^{\circ}$ C。将实施例1中制备的纳米酶(Fe₃O₄-Hemin或Co-Fe-hemin)用去离子水按下列浓度梯度:1.0mg/mL、0.5mg/mL、0.25mg/mL、0.125mg/mL、0.0625mg/mL稀释;Co-Fe纳米酶按1.0mg/ml、0.75mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.1mg/ml稀释;Fe₃O₄纳米酶按:2mg/mL、1.5mg/mL、1.0mg/mL、0.5mg/mL、0.1mg/mL稀释。于石英比色皿中依次加入10 μ L纳米酶溶液、2.1mL HAc/NaAc缓冲液及100 μ L TMB底物液,迅速混匀,置于紫外分光光度仪光路中检测反应起始1min内652nm波长处吸光值及反应速率,加入纳米酶及空白缓冲液的比色皿置于对照光路中用于扣除背景,每个浓度组测试3个平行样。根据不同浓度纳米酶催化TMB的起始反应速率,绘制反应速率-浓度曲线,得出曲线斜率及R²值,根据酶活力单位换算公式:(斜率值 \times 2200)/39000[9],计算纳米酶活力单位。如图4B-4D,Co-Fe-hemin酶活力单位为92.85U/mg,Fe₃O₄-hemin酶活力单位为71.03U/mg,显著高于Co-Fe纳米酶

(7.52U/mg)及Fe₃O₄纳米酶(5.40U/mg)。

[0065] 实施例4. 纳米酶在不同反应条件下催化鲁米诺化学发光反应

[0066] 测试在不同pH、温度、溶剂、添加防腐剂条件下,纳米酶对鲁米诺底物的催化发光效果。取适量根据实施例1制备的纳米酶(Co-Fe-hemin 或Fe₃O₄-hemin)及HRP,用ddH₂O或PBS稀释至0.2mg/ml,按10 μ L/孔加入至96孔聚苯乙烯白色酶标版(Nunc,Cat.no.463201)中,配制不同pH值的化学发光底物工作液:取等体积鲁米诺底物A液和B液,分别加入一定量的H₂O₂(0.69mol/L)和适量NaOH溶液(0~1mol/L),于试管中混匀。打开EnVision全自动化学发光仪(PerkinElmer公司),清洗进样管道,设置仪器参数及反应温度(37 $^{\circ}$ C),使用自动进样泵,于反应孔中加入90 μ L混合化学发光底物工作液,并实时采集10min内的化学发光信号,得到纳米酶催化鲁米诺反应的发光强度-时间曲线,比较根据实施例1制备的纳米酶及HRP在不同pH条件下催化鲁米诺的最大发光值,结果如图5A,Co-Fe-hemin或Fe₃O₄-hemin纳米酶在pH9.5~14.0范围内能高效催化鲁米诺发光(最大发光值 $\geq 9.00E+07$),而HRP酶催化酸碱度范围较窄(pH8.5~9.5),表明在鲁米诺最适发光pH值附近,纳米酶催化鲁米诺发光活性显著高于HRP酶,适用酸碱度范围更宽。

[0067] 同时将上述两种纳米酶及HRP酶分别置于25 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C及100 $^{\circ}$ C水浴放置2小时后再进行化学发光检测,比较纳米酶及HRP在各自最适pH值及不同温度处理后催化鲁米诺的最大发光值,结果如图5B,HRP在高温下(100 $^{\circ}$ C)易失活,而Fe₃O₄-hemin和Co-Fe-hemin在较宽的温度范围(25~100 $^{\circ}$ C)内仍保持较高的鲁米诺发光催化活性。此外,采用不同的溶剂稀释和保存纳米酶及HRP,再进行化学发光检测,测试催化鲁米诺最大发光值,结果如图5C,HRP蛋白酶对部分有机溶剂(如二甲亚砜DMSO)等更敏感,易失去对鲁米诺的催化活性,而Fe₃O₄-hemin和Co-Fe-hemin在多种溶剂(水相、乙醇、DMSO)中活性受影响较小,仍保持对鲁米诺较高的催化活性。此外,在本发明的纳米酶溶液中加入叠氮化钠NaN₃、Proclin 300等防腐剂后,再进行化学发光检测,纳米酶催化活性不受显著影响。进一步在上述最适pH条件和37 $^{\circ}$ C水相溶剂中比较本发明的两种纳米酶及HRP酶催化鲁米诺发光效果(图6)。图6显示Co-Fe-hemin或Fe₃O₄-hemin与HRP催化最大发光强度相当。上述结果表明,Co-Fe-hemin和Fe₃O₄-Hemin纳米酶用于催化鲁米诺化学发光反应,催化效率与HRP酶相当,但活性受pH、温度、溶剂、防腐剂等影响较HRP小,稳定性更好,利于保存或运输。

[0068] 实施例5. 纳米酶促化学发光检测探针制备(本发明的纳米酶在免疫分析中的应用)

[0069] 运用氨基活化偶联法制备抗体标记的纳米酶促化学发光检测探针:取0.5mg纳米酶,去离子水清洗两遍,磁吸附并吸弃上清,采用EDC(Sigma, E6383)和NHS(Sigma,56485)活化Co-Fe-hemin或Fe₃O₄-hemin纳米酶表面羧基,加入10mg/ml NHS和EDC水溶液各500 μ L,混匀并超声分散,室温孵育30min后,磁吸附,吸弃上清,PBS缓冲液清洗一次后,加入500 μ L 50mM pH6.0MES偶联缓冲液及100 μ g/ml抗CD146鼠单克隆抗体AA98(实验室自制,根据中国专利申请号CN99107586.2的描述获得)或抗马尔尼菲青霉Mp1p的M4单抗(南方医科大学提供)[10],超声分散后室温孵育2~3小时,磁吸附,吸弃上清,PBS清洗一遍后,加入0.5mL 50mM pH7.4 Tris-HCL缓冲液,室温孵育30min,封闭未结合的活化位点,磁吸附弃上清,用PBS重悬清洗一次,最后用含5%BSA的层析缓冲液重悬,置于4 $^{\circ}$ C保存备用。在较优的实施例中,为便于长期保存,标记好的纳米酶检测探针溶液可根据以下步骤进行冻干:采用含

5%BSA的层析缓冲液稀释纳米酶探针原液(约70倍稀释),经超声分散后,每70 μ L分装至冻干管,置于冻干机中按特定程序冻干,冻干完毕,取出迅速盖封。或采用喷膜方式固定于玻璃纤维结合垫上,上述纳米酶探针冻干粉或结合垫可置于4 $^{\circ}$ C或室温稳定保存半年以上。

[0070] 实施例6. 纳米酶促微孔板化学发光免疫检测疾病标志物可溶性 CD146 (sCD146) 蛋白

[0071] 采用pH9.6的碳酸盐缓冲液稀释sCD146特异性捕获抗体AA1 (5 μ g/mL,根据中国专利申请号201210394856.2的描述制备),包被96孔聚苯乙烯白色酶标版(50 μ L/孔),4 $^{\circ}$ C包被过夜,PBST洗3次,PBS洗1次后,加入5%的脱脂牛奶,37 $^{\circ}$ C封闭2h,按前述操作清洗后,分别加入不同浓度梯度的sCD146蛋白标准品(0、0.625ng/mL、1.25ng/mL、2.5ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、40ng/mL、80ng/mL、160ng/mL),100 μ L/孔,每个浓度3个平行孔,37 $^{\circ}$ C孵育1.5h,清洗4次后拍干,加入实施例5中制得的纳米酶促化学发光检测探针(Co-Fe-hemin-AA98)稀释液(50 μ L/孔),或50 μ L/孔稀释HRP酶标AA98抗体作为对照组,37 $^{\circ}$ C闭光孵育40min,清洗4~5次后拍干,置于EnVision全自动化学发光仪(PerkinElmer)中。根据实施例4的描述,利用仪器自动加样向反应孔内加入100 μ L鲁米诺底物工作液,立即测定不同抗原浓度下最大发光强度,绘制发光强度-浓度曲线。结果如图7,纳米酶促化学发光探针Co-Fe-hemin-AA98检测sCD146标准曲线,线性较好,发光信号显著高于传统HRP酶促板式化学发光检测,检测灵敏度达到0.85ng/mL,较传统HRP板式化学发光法(1.25ng/mL)有所提高。

[0072] 实施例7. 纳米酶促化学发光免疫层析检测传染性病原体青霉特异性糖蛋白Mplp

[0073] 制备化学发光检测用免疫层析试纸条:将吸水垫及硝酸纤维素膜(Merk Millipore, HF13502S25)交叠2mm依次粘贴于PCV底板(上海良信科技有限公司, S018070181)上制成试纸板;用pH7.4,10mM磷酸盐缓冲液(PB)分别稀释质控线抗体羊抗鼠IgG(北京华兴博创生物技术中心, HX2119)和马尔尼菲青霉特异性捕获抗体M12抗体(南方医科大学提供[10])至1mg/mL,使用划膜仪在试纸板硝酸纤维素膜上进行抗体包被,置于37 $^{\circ}$ C烘箱干燥30min,再使用切条机将试纸板切割成4mm宽度的试纸条,加入干燥剂封存备用。

[0074] 免疫层析反应:在连接上述试纸条的结合垫上或样品池里加入5 μ L青霉Mplp特异性抗体M4标记的纳米酶促化学发光检测探针稀释液(Co-Fe-hemin-M4,根据实施例5制备),分别加入65 μ L梯度稀释的Mplp重组抗原(0、0.0156ng/mL、0.0625ng/mL、0.25ng/mL、1ng/mL、4ng/mL、16ng/mL、64ng/mL、128ng/mL、256ng/mL),室温层析15min,于T线处形成双抗夹心抗原-纳米酶探针复合物,未结合抗原的纳米酶探针与羊抗鼠IgG结合,聚集于C线处。上述浓度梯度层析试验同时做两组,重复三次试验。

[0075] 化学发光检测:加入100 μ L根据实施例4描述配制的鲁米诺化学发光底物工作液于试纸条T线及C线处,立即采用Clinx ChemiScope化学发光成像系统进行1min内的化学发光信号采集(图8A),根据T线及C线发光强度比值-Mplp浓度对数绘制化学发光标准曲线(图8B)。同时,另一组层析试纸条采用传统纳米酶显色底物DAB(中杉金桥, ZLI-9019)进行显色(7min),采用ImageJ软件进行灰度值分析。如图8A、8B,结果显示:相对于传统纳米酶免疫层析检测灵敏度1ng/mL,纳米酶促化学发光免疫层析检测灵敏度可达到0.25g/mL,灵敏度提高4倍,且操作更快捷,仅需15min左右即可完成检测,较传统纳米酶免疫层析检测更灵敏准确。其化学发光反应无需外接激发光源,因而比免疫荧光层析检测更具优势。

[0076] 上文所述实施例,对本发明的技术方案和有益效果作了详细的阐述和说明,但本发明的保护范围并不限于上述实施例,但在本发明的基础上,所作修改、替换或改进,均属于本发明要求保护的范畴。

[0077] 参考文献

[0078] [1]Tsaplev,Y.B.,Chemiluminescence determination of hydrogen peroxide, J Anal Chem, 2012,67(6),506-514.

[0079] [2]Liu,M.,et al.,Recent Advance in Chemiluminescence Assay and Its Biochemical Applications,Chinese J Anal Chem,2016,44(12),1934-1941.

[0080] [3]Mao Deng,et al.,Enhanced chemiluminescence of the luminol-hydrogen 1 peroxide system by BSA-stabilized Au nanoclusters as peroxidase mimic and its application,Anal Methods,2014,6(9),3177-3123.

[0081] [4]Chaichi,M.J.,et al.,A novel glucose sensor based on immobilization of glucose oxidase on the chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles and the luminol-H₂O₂-gold nanoparticle chemiluminescence detection system,Sensor Actuat B-Chem,2016,223,713-722.

[0082] [5]Gao,L.Z.,et al.,Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles,Nat Nanotechnol,2007,2(9),577-583.

[0083] [6]Liang,M.M.,et al.,Application of Nanomaterials in Environmental Analysis and Monitoring,J Nanosci Nanotechnol,2009,9(4),2283-2289.

[0084] [7]Duan,D.,et al.,Nanozyme-strip for rapid local diagnosis of Ebola, Biosens Bioelectron, 2015,74,134-141.

[0085] [8]Cheng,F.Y.,et al.,Noncovalent functionalization and solubilization of carbon nanotubes by using a conjugated Zn-porphyrin polymer.Chem-Eur J, 2006,12(19): 5053-5059.

[0086] [9].Jiang,B.,et al.Standardized assays for determining the catalytic activity and kinetics of peroxidase-like nanozymes.Nat Protoc,2018,13(7): 1506-1520.

[0087] [10]Wang,Y.F.,et al.Immunoassays based on Penicillium marneffeii Mplp derived from Pichia pastoris expression system for diagnosis of penicilliosis.PLoS One,2011,6(12): e28796.

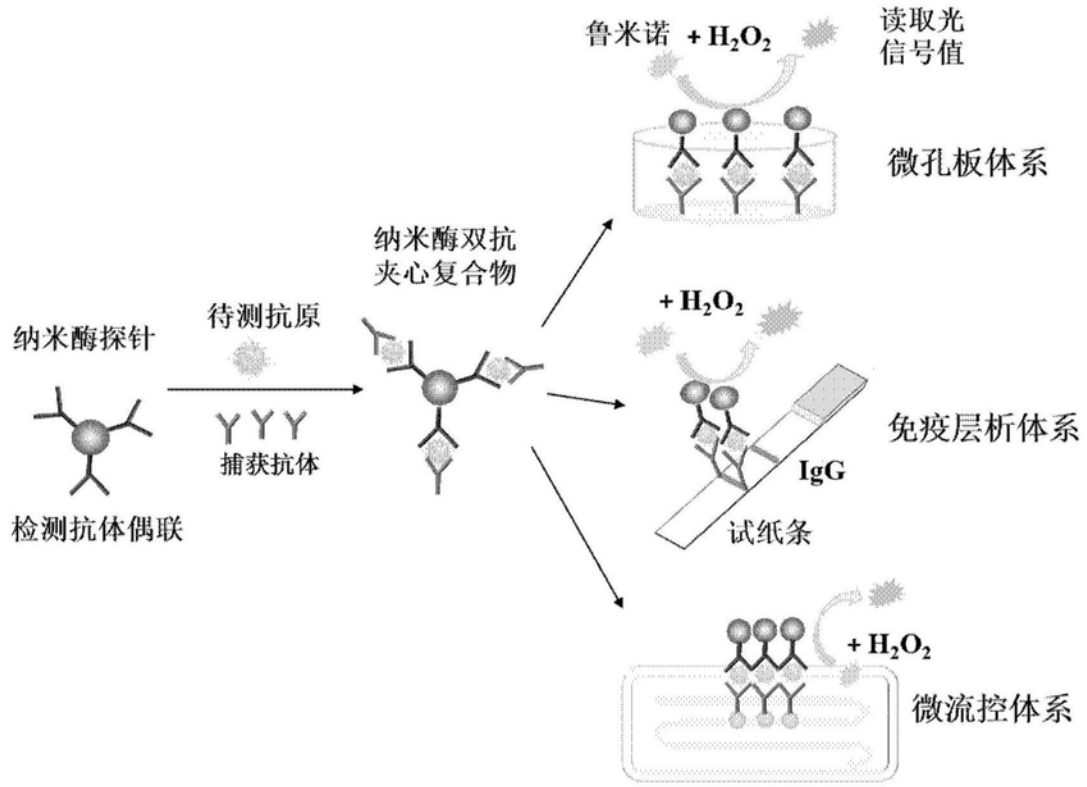


图1

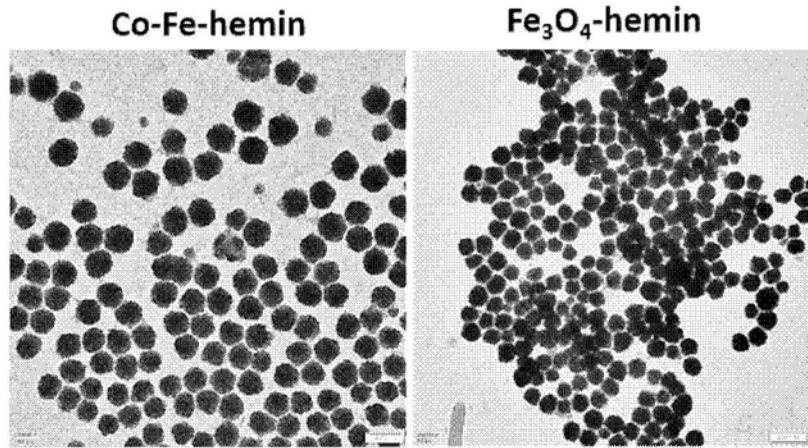


图2

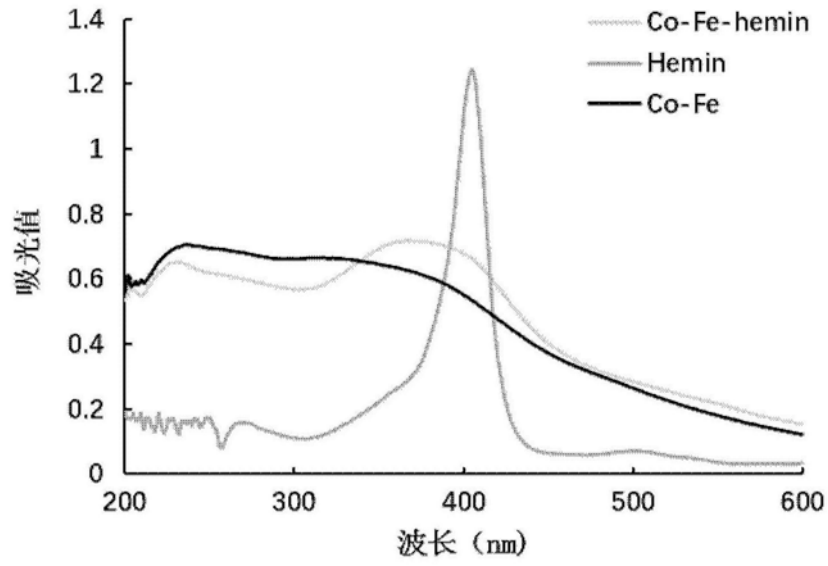


图3A

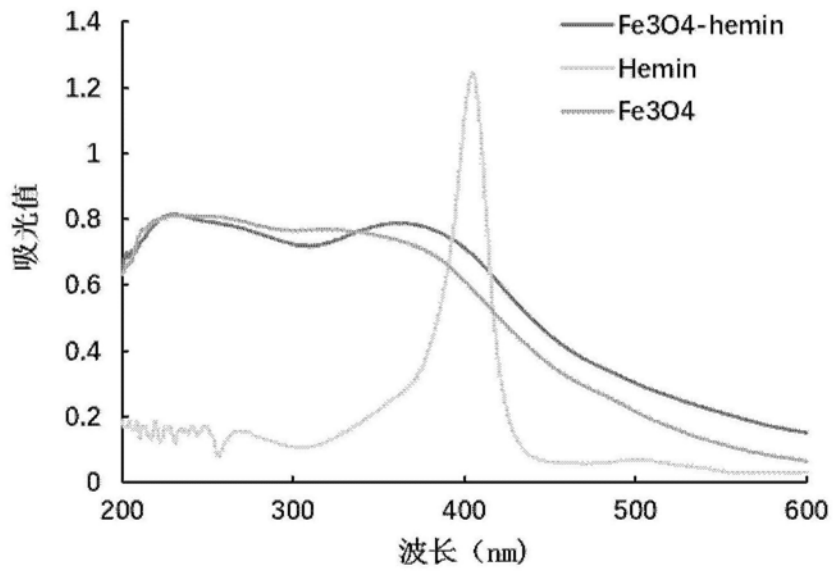


图3B

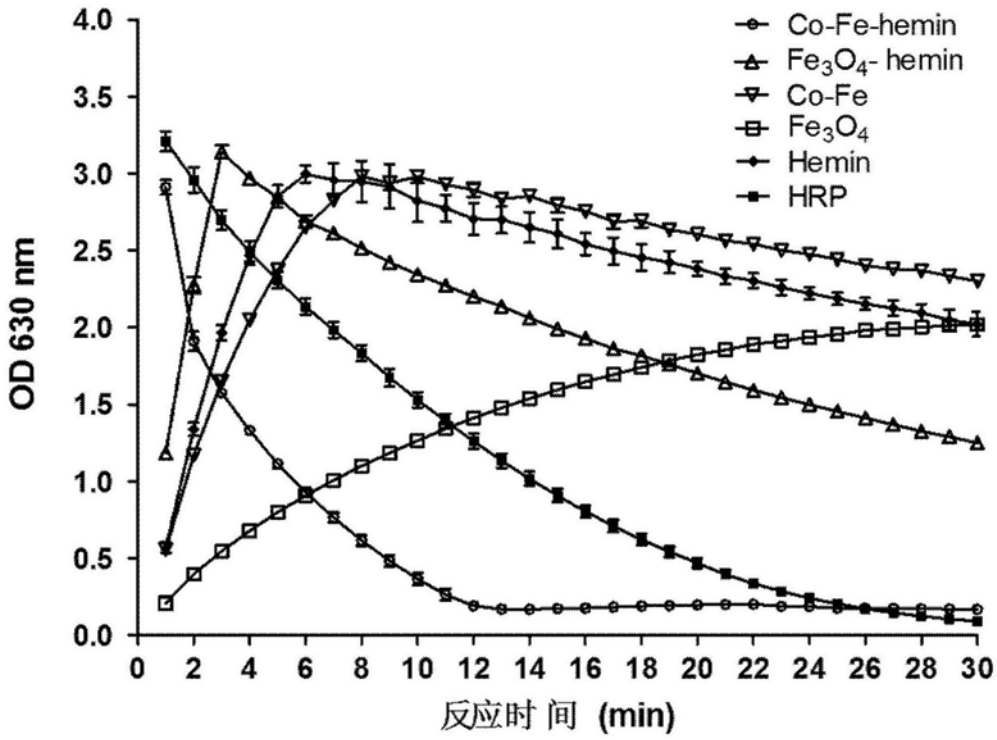


图4A

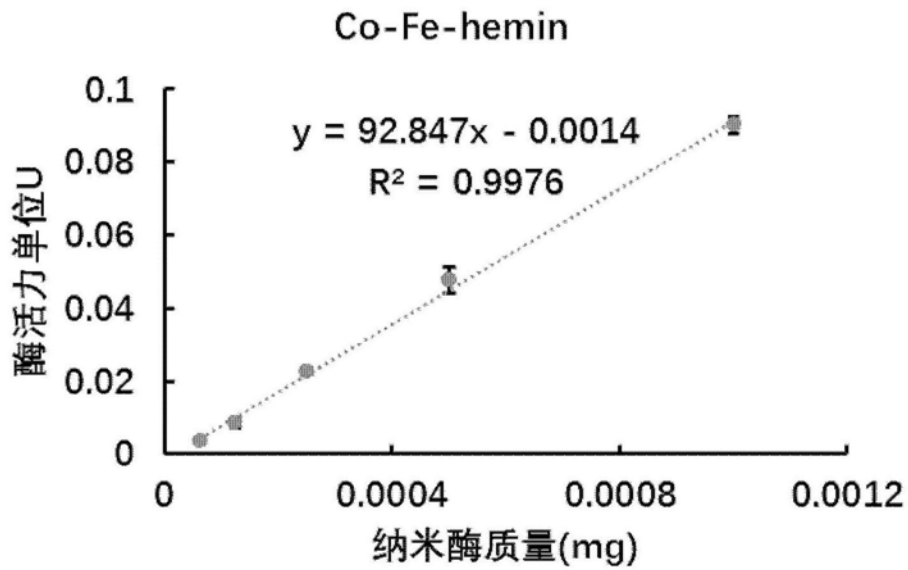


图4B

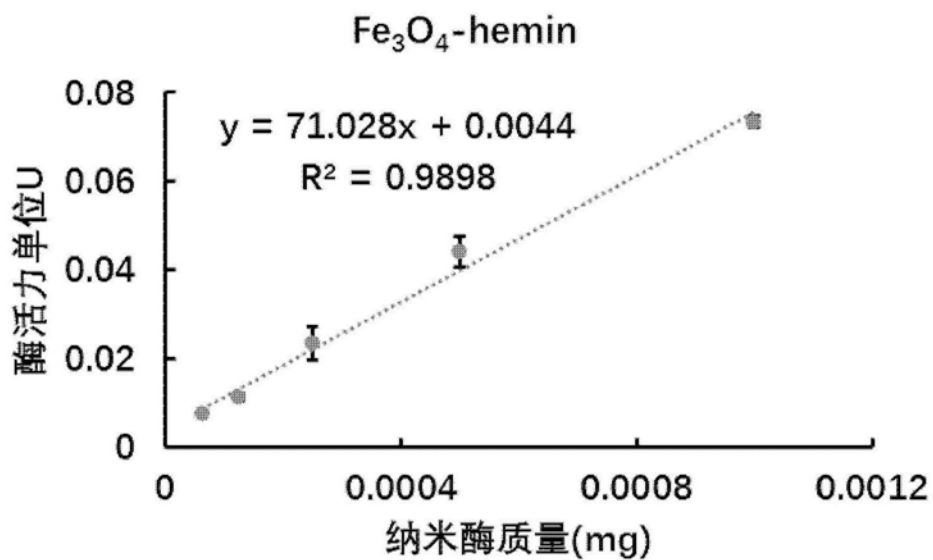


图4C

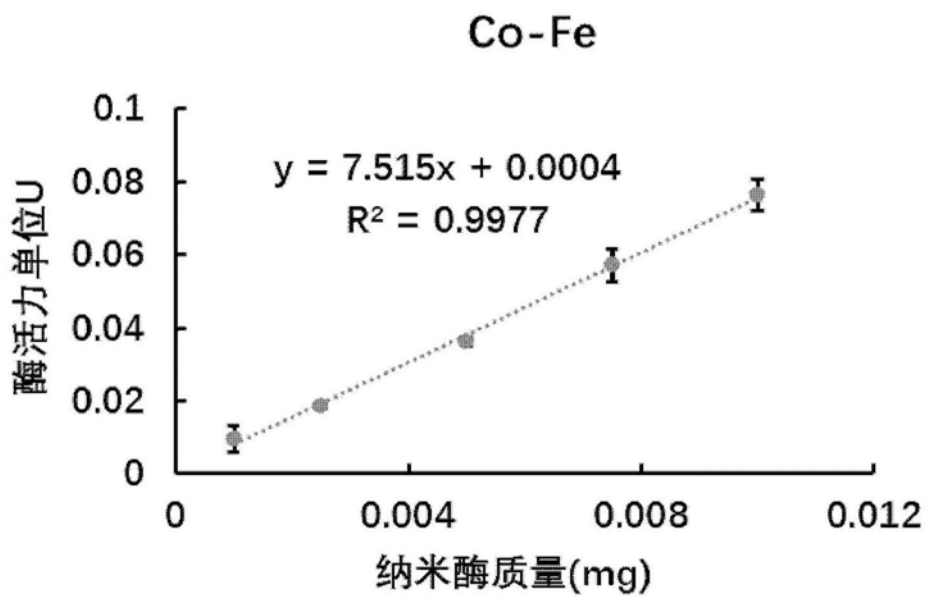


图4D

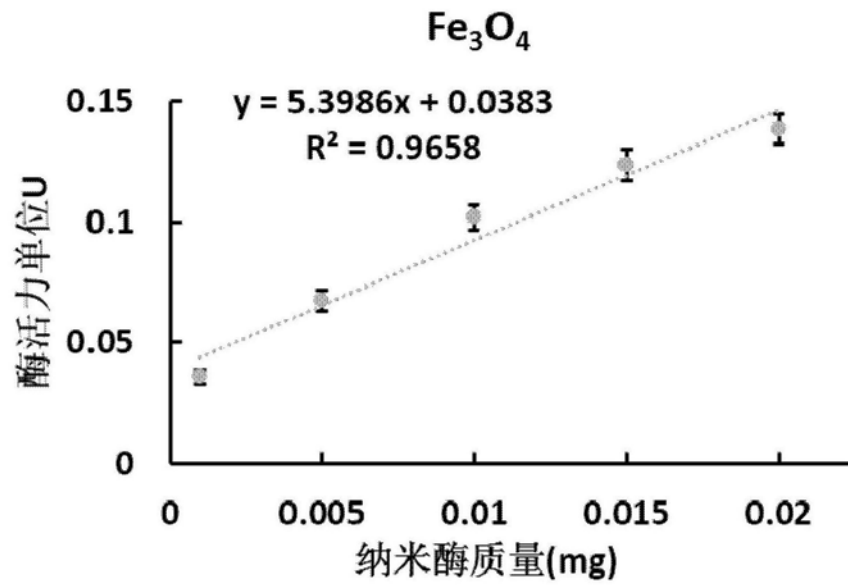


图4E

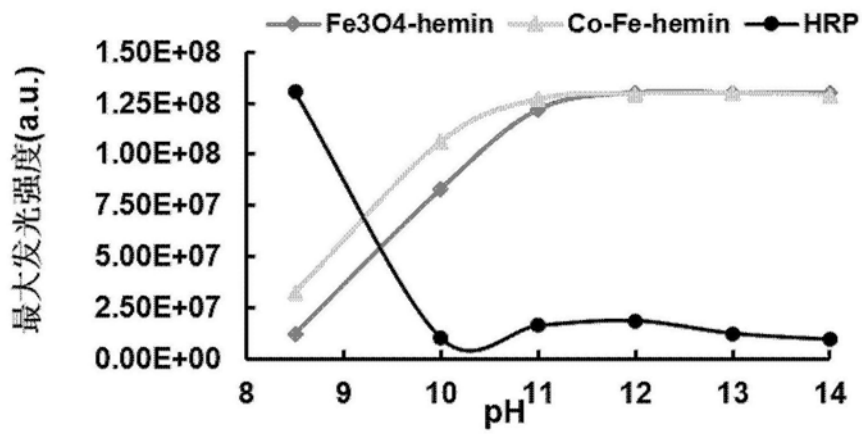


图5A

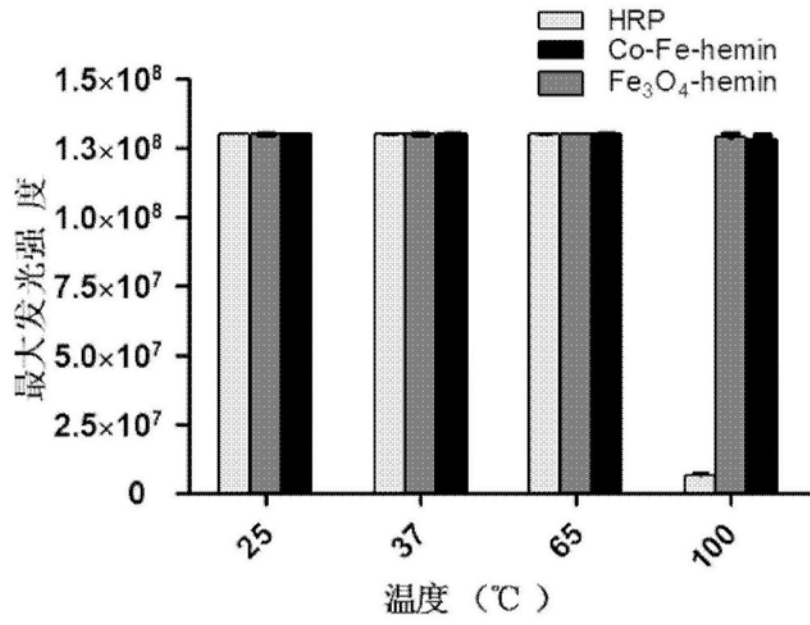


图5B

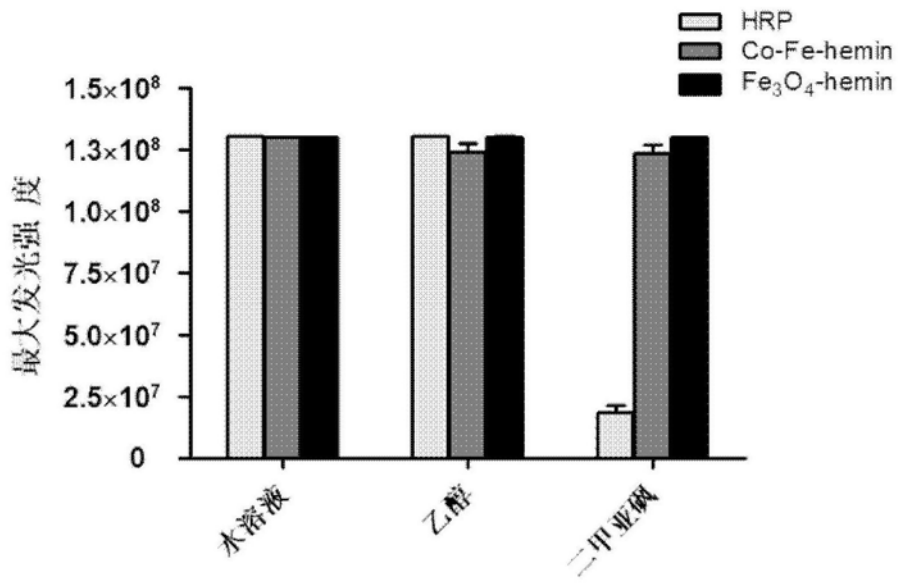


图5C

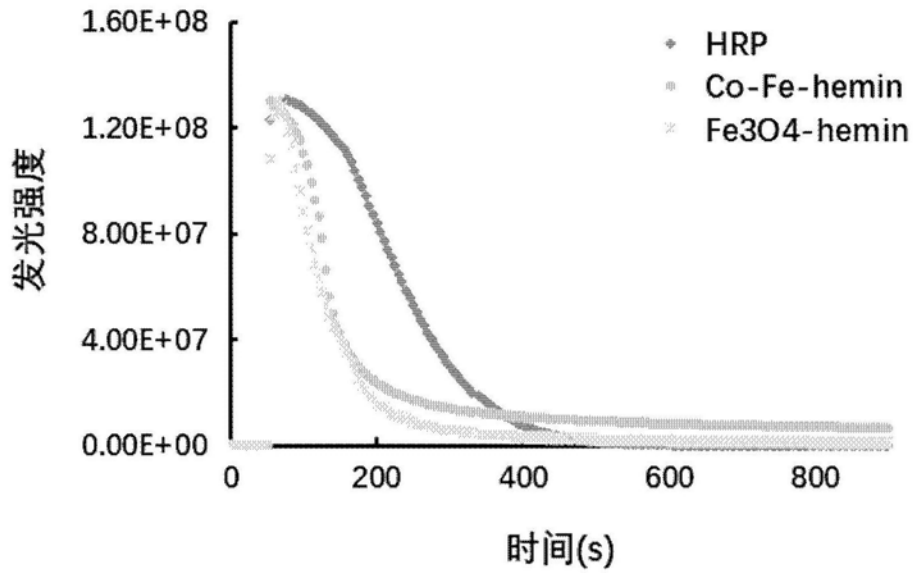


图6

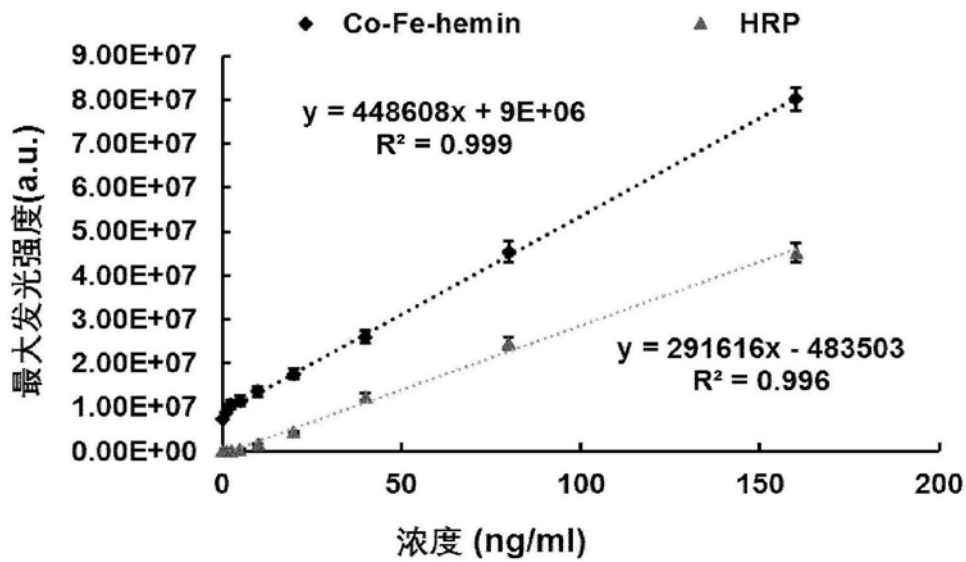


图7

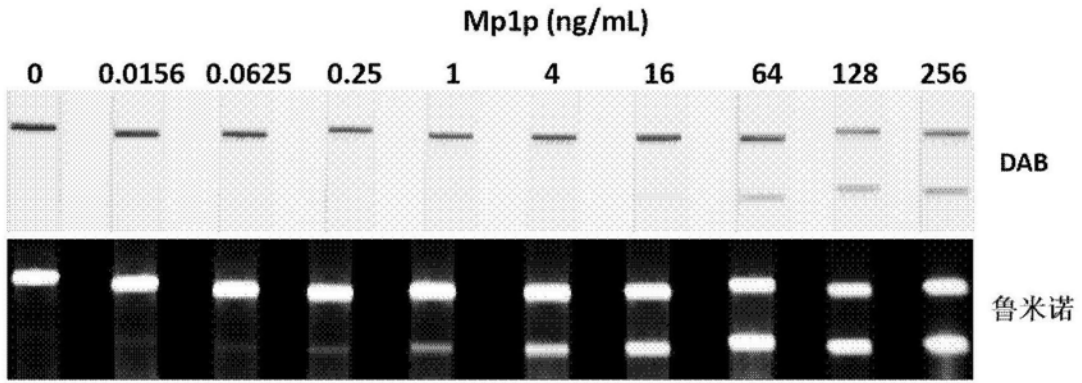


图8A

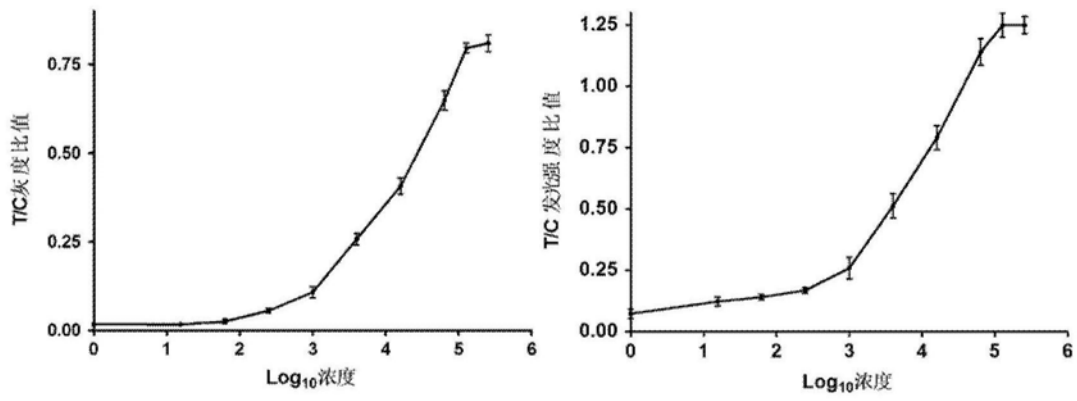


图8B