



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111693721 A

(43)申请公布日 2020.09.22

(21)申请号 202010571694.X

(22)申请日 2020.06.22

(71)申请人 济南大学

地址 250022 山东省济南市市中区南辛庄  
西路336号

(72)发明人 马洪敏 李丽 邢振远 赵彦华  
樊琪 范波波 胡璐琳 魏琴

(74)专利代理机构 济南誉丰专利代理事务所  
(普通合伙企业) 37240

代理人 赵凤

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页

(54)发明名称

基于普鲁士蓝纳米酶标记物的酶联免疫吸附实验的制备方法及应用

(57)摘要

本发明公开了基于普鲁士蓝纳米酶标记物的酶联免疫吸附实验的制备方法及应用,涉及纳米科学、生物免疫技术、酶免疫测定技术等领域。本发明利用普鲁士蓝优异的催化性能,制备了负载在四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料上的普鲁士蓝纳米酶标记物。通过利用四氧化三铁球芯的磁性和聚多巴胺优异的生物相容性,实现了生物分子的固定以及磁分离。通过利用聚多巴胺在酸性条件下具有还原三价铁离子的能力,成功在聚多巴胺表面生成普鲁士蓝纳米酶作为标记物。普鲁士蓝纳米酶通过催化过氧化氢的氧化反应,使底物四甲基联苯胺由无色变为蓝色。该标记物可以适用于多种酶联免疫试验的制备,在科研和临床中具有广泛的应用前景。

1. 基于普鲁士蓝纳米酶标记物的酶联免疫吸附实验的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 四氧化三铁纳米粒子的制备: 将0.2 g十二烷基硫酸钠、1.5 g醋酸钠和0.5 g三氯化铁加入到15 mL乙二醇中, 在室温下搅拌30分钟; 然后将该混合溶液转移到聚四氟乙烯高温反应釜中并在200 °C下加热12小时; 将所得产物用超纯水和乙醇分别洗涤三次; 最终产物在35 °C下真空干燥12小时; 干燥后研磨并在室温保存;

(2) 四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料的制备: 将100 mg四氧化三铁纳米粒子和200 mg多巴胺加入到120 mL、pH=8.8 Tris-HCl缓冲液和100 mL异丙醇混合溶液中; 搅拌13小时后, 得到黑色的悬浊液; 通过磁分离收集产物, 并将产物用超纯水洗涤五次以除去未反应的物质, 然后在35 °C真空中干燥; 干燥后称重并重新分散在5 mL超纯水中, 放于4 °C冰箱冷藏保存;

(3) 取50  $\mu\text{L}$ 四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料分散液用5 mL、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液稀释, 向其中加入2 mL浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的降钙素原检测抗体溶液, 在4 °C下孵化2 h, 离心; 再加入100  $\mu\text{L}$ 、0.1%的牛血清白蛋白溶液封闭非特异性结合位点, 在4 °C下孵化2 h, 离心分离得到固体产物, 将其重新分散于5 mL、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液中, 制得四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料标记的降钙素原抗体溶液;

(4) 将四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料标记的降钙素原抗体溶液与 $0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗原以体积比为1:1混合, 室温下孵化1 h, 离心分离, 得到与抗原特异性结合的四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料标记的降钙素原抗体溶液;

(5) 向96微孔板中加入100  $\mu\text{L}$ 、 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 降钙素原的抗体溶液, 在4 °C下孵育12 h, 用磷酸盐缓冲液洗涤微孔板三次; 再加入100  $\mu\text{L}$ 、0.1%的牛血清白蛋白溶液封闭微孔板上的非特异性结合位点, 室温下孵育1 h, 再用磷酸盐缓冲液洗板三次; 向其中加入特异性结合上抗原的四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料标记的降钙素原抗体溶液, 孵育1 h, 用超纯水洗板三次; 向微孔中加入200  $\mu\text{L}$ 、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三氯化铁和铁氰化钾的混合溶液, 反应1 min后去除混合铁液, 超纯水洗板三次, 制得负载普鲁士蓝纳米酶的标记物;

(6) 免疫显色过程: 向成功负载普鲁士蓝纳米酶标记物的微孔板中加入100  $\mu\text{L}$ 、浓度为 $1.248 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色液和100  $\mu\text{L}$ 、浓度为 $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的过氧化氢溶液, 微孔板中的溶液由无色变为蓝色; 显色时间为15 min, 显色结束后加入50  $\mu\text{L}$ 、浓度为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸终止液, 微孔板中的溶液由蓝色变为黄色; 用酶标仪测量350 nm-900 nm溶液的吸光度。

2. 根据权利要求1所述的普鲁士蓝纳米酶标记物的制备方法, 其特征在于, 所述的标记物用于对显色液进行催化显色。

3. 根据权利要求1所述的制备的普鲁士蓝纳米酶标记物作为降钙素原检测的酶联免疫吸附实验的应用。

4. 根据权利要求3所述的酶联免疫吸附实验作为降钙素原检测的应用, 其特征在于, 检测步骤如下:

(1) 包被: 向96微孔板中加入100  $\mu\text{L}$ 、 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 降钙素原的抗体溶液, 4 °C下孵化12 h; 用磷酸盐缓冲液洗板三次, 甩干;

(2) 封闭: 用100  $\mu\text{L}$ 封闭液封闭, 37 °C下孵化1 h;

(3) 加样:甩去封闭液,加入特异性结合上抗原的四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料标记的降钙素原抗体溶液,37 °C下孵化1 h;用磷酸盐缓冲液洗板三次,甩干;

(3) 纳米酶:向微孔中加入200 uL三氯化铁和铁氰化钾的混合溶液,反应1 min后去除铁液,超纯水洗板三次;

(4) 显色:每孔先后加入显色剂A、B各100 μL;

(5) 终止:每孔加入50 μL终止液;

(6) 检测:于TECAN酶标仪上检测450 nm吸收值。

## 基于普鲁士蓝纳米酶标记物的酶联免疫吸附实验的制备方法 及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及纳米科学、生物免疫技术、酶免疫测定技术等领域,具体涉及一种酶联免疫反应标记物的制备方法及免疫显色应用。

### 背景技术

[0002] 生物标志物检测是目前唯一无创的早期预警癌症等疾病的方法,在临床中对肿瘤的普查、诊断及判断预后等具有十分重要的意义。在众多的生物标志物检测方法中,酶联免疫技术由于其检测迅速,方法简单,特异性强和灵敏性高等优点而成为生物分子定量检测的主要分析技术。

[0003] 酶联免疫吸附试验是利用吸附在固相载体上的抗原或抗体与酶标记抗体发生特异性结合。向其中加入底物溶液后,底物会在酶的作用下使其所含的供氢体由无色的还原型变成有色的氧化型,发生颜色反应。因此,可以根据底物的颜色反应来判断有无对应的免疫反应,颜色反应的深浅与标本中相应抗体或抗原的量呈正比。这种显色反应可通过酶标仪进行定量测定,通过将抗原抗体反应的特异性和酶化学反应的敏感性相结合,使酶联免疫吸附试验成为一种既特异又灵敏的检测方法。鉴于此,发明一种具有催化性能的纳米酶作为标记物用于酶联免疫吸附试验中,具有重要的现实意义。

[0004] 通过利用四氧化三铁球芯的磁性和聚多巴胺优异的生物相容性,不仅实现了生物分子的固定以及磁分离,而且大大提高了纳米复合物表面抗体的结合量,实现易于标记的制备效果。普鲁士蓝纳米酶被称为“人工酶过氧化物酶”,因为它对还原过氧化氢表现出高特异性和催化性能。与传统的将铁盐和六氰基铁酸盐与不同氧化态的铁原子混合制备普鲁士蓝的方法不同,使用四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料还原铁氰化物-铁离子混合物可以在复合材料表面得到普鲁士蓝纳米酶用做标记物,进一步实现对显色液的催化显色。通过酶标仪进行定量测定实现对抗原浓度的检测。

[0005] 本发明利用普鲁士蓝优异的催化性能,制备了负载在四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料上的普鲁士蓝纳米酶标记物。通过利用四氧化三铁球芯的磁性和聚多巴胺优异的生物相容性,实现了生物分子的固定以及磁分离。通过利用聚多巴胺酸性条件下具有还原三价铁离子的能力,成功在聚多巴胺表面生成普鲁士蓝纳米酶作为标记物。普鲁士蓝纳米酶通过催化过氧化氢的氧化反应,使底物四甲基联苯胺由无色变为蓝色。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的之一是提出一种利用聚多巴胺还原铁氰化物-铁离子混合物在四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料表面制备普鲁士蓝纳米酶的方法。

[0007] 本发明的目的之二是利用普鲁士蓝对过氧化氢的催化作用,实现显色液颜色的变化。

[0008] 本发明的目的之三是所制备的标记物用于标记抗体构建夹心型酶联免疫吸附试

验,既可以对生物标志物进行高效灵敏的检测,还可以实现定量检测。

[0009] 本发明的技术方案如下:

基于普鲁士蓝纳米酶标记物的酶联免疫吸附实验的制备方法,包括以下步骤:

(1) 四氧化三铁纳米粒子的制备:将0.2 g十二烷基硫酸钠、1.5 g醋酸钠和0.5 g三氯化铁加入到15 mL乙二醇中,在室温下搅拌30分钟;然后将该混合溶液转移到聚四氟乙烯高温反应釜中并在200 °C下加热12小时;将所得产物用超纯水和乙醇分别洗涤三次;最终产物在35 °C下真空干燥12小时;干燥后研磨并在室温保存;

(2) 四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料的制备:将100 mg四氧化三铁纳米粒子和200 mg多巴胺加入到120 mL、pH=8.8 Tris-HCl缓冲液和100 mL异丙醇混合溶液中;搅拌13小时后,得到黑色的悬浊液;通过磁分离收集产物,并将产物用超纯水洗涤五次以除去未反应的物质,然后在35 °C真空中干燥;干燥后称重并重新分散在5 mL超纯水中,放于4 °C冰箱冷藏保存;

(3) 取50  $\mu\text{L}$ 四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料分散液用5 mL、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液稀释,向其中加入2 mL浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的降钙素原检测抗体溶液,在4 °C下孵化2 h,离心;再加入100  $\mu\text{L}$ 、0.1%的牛血清白蛋白溶液封闭非特异性结合位点,在4 °C下孵化2 h,离心分离得到固体产物,将其重新分散于5 mL、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液中,制得四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料标记的降钙素原抗体溶液;

(4) 将四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料标记的降钙素原抗体溶液与 $0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗原以体积比为1:1混合,室温下孵化1 h,离心分离,得到与抗原特异性结合的四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料标记的降钙素原抗体溶液;

(5) 向96微孔板中加入100  $\mu\text{L}$ 、 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 降钙素原的抗体溶液,在4 °C下孵育12 h,用磷酸盐缓冲液洗涤微孔板三次;再加入100  $\mu\text{L}$ 、0.1%的牛血清白蛋白溶液封闭微孔板上的非特异性结合位点,室温下孵育1 h,再用磷酸盐缓冲液洗板三次;向其中加入特异性结合上抗原的四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料标记的降钙素原抗体溶液,孵育1 h,用超纯水洗板三次;向微孔中加入200  $\mu\text{L}$ 、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三氯化铁和铁氰化钾的混合溶液,反应1 min后去除混合铁液,超纯水洗板三次,制得负载普鲁士蓝纳米酶的标记物;

(6) 免疫显色过程:向成功负载普鲁士蓝纳米酶标记物的微孔板中加入100  $\mu\text{L}$ 、浓度为 $1.248 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色液和100  $\mu\text{L}$ 、浓度为 $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的过氧化氢溶液,微孔板中的溶液由无色变为蓝色;显色时间为15 min,显色结束后加入50  $\mu\text{L}$ 、浓度为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸终止液,微孔板中的溶液由蓝色变为黄色;用酶标仪测量350 nm-900 nm溶液的吸光度。

[0010] 本发明的有益成果

与现有技术相比,本发明具有如下优点:

1) 该标记物制备方法利用聚多巴胺还原铁氰化物-铁离子混合物制备出具有优异催化性能的普鲁士蓝纳米酶,制备简单;

2) 该方法制备的标记物利用了普鲁士蓝纳米酶对双氧水的催化作用实现显色液颜色的变化,使酶联免疫吸附试验的效率大大提高;

3) 该方法制备的标记物利用四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料负载免疫物质,达到易于标记的制备效果。

## 具体实施方式

[0011] 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。

### [0012] 实施例1

普鲁士蓝纳米酶标记物的制备方法

(1) 四氧化三铁纳米粒子的制备:将0.2 g十二烷基硫酸钠、1.5 g醋酸钠和0.5 g三氯化铁加入到15 mL乙二醇中,在室温下搅拌30分钟;然后将该混合溶液转移到聚四氟乙烯高温反应釜中并在200 °C下加热12小时;将所得产物用超纯水和乙醇分别洗涤三次;最终产物在35 °C下真空干燥12小时;干燥后研磨并在室温保存;

(2) 四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料的制备:将100 mg四氧化三铁纳米粒子和200 mg多巴胺加入到120 mL、pH=8.8 Tris-HCl缓冲液和100 mL异丙醇混合溶液中;搅拌13小时后,得到黑色的悬浊液;通过磁分离收集产物,并将产物用超纯水洗涤五次以除去未反应的物质,然后在35 °C真空中干燥;干燥后称重并重新分散在5 mL超纯水中,放于4 °C冰箱冷藏保存;

(3) 取50  $\mu\text{L}$ 四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料分散液用5 mL、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液稀释,向其中加入2 mL浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的降钙素原检测抗体溶液,在4 °C下孵化2 h,离心;再加入100  $\mu\text{L}$ 、0.1%的牛血清白蛋白溶液封闭非特异性结合位点,在4 °C下孵化2 h,离心分离得到固体产物,将其重新分散于5 mL、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液中,制得四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料标记的降钙素原抗体溶液;

(4) 将四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料标记的降钙素原抗体溶液与 $0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗原以体积比为1:1混合,室温下孵化1 h,离心分离,得到与抗原特异性结合的四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料标记的降钙素原抗体溶液;

(5) 向96微孔板中加入100  $\mu\text{L}$ 、 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 降钙素原的抗体溶液,在4 °C下孵育12 h,用磷酸盐缓冲液洗涤微孔板三次;再加入100  $\mu\text{L}$ 、0.1%的牛血清白蛋白溶液封闭微孔板上的非特异性结合位点,室温下孵育1 h,再用磷酸盐缓冲液洗板三次;向其中加入特异性结合上抗原的四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料标记的降钙素原抗体溶液,孵育1 h,用超纯水洗板三次;向微孔中加入200  $\mu\text{L}$ 、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三氯化铁和铁氰化钾的混合溶液,反应1 min后去除混合铁液,超纯水洗板三次,制得负载普鲁士蓝纳米酶的标记物。

### [0013] 实施例2

夹心型降钙素原酶联免疫吸附试验的构建

(1) 包被:向96微孔板中加入100  $\mu\text{L}$ 、 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 降钙素原的抗体溶液,4 °C下孵化12 h;用磷酸盐缓冲液洗板三次,甩干;

(2) 封闭:用100  $\mu\text{L}$  0.1%的牛血清白蛋白溶液封闭非特异性结合位点,37 °C下孵化1 h;

(3) 加样:甩去封闭液,加入特异性结合上抗原的四氧化三铁@聚多巴胺核壳复合材料标记的降钙素原抗体溶液,37 °C下孵化1 h;用磷酸盐缓冲液洗板三次,甩干;

(3) 纳米酶:向微孔中加入200  $\mu\text{L}$ 三氯化铁和铁氰化钾的混合溶液,反应1 min后去除铁液,超纯水洗板三次;

(4) 显色:每孔先后加入显色剂A、B各100  $\mu\text{L}$ (显色A液:醋酸钠2.72 g,柠檬酸0.3 g,

30%双氧水60  $\mu\text{L}$ ,蒸馏水加至100 mL。显色B液:乙二胺四乙酸二钠0.04 g,柠檬酸0.19 g,甘油10 mL,取0.03 g四甲基联苯胺溶于0.6 mL二甲基亚砷中,加入少量水中避光搅拌至溶解,定容至100 mL);

(5) 终止:每孔加入50  $\mu\text{L}$ 浓度为 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸终止液;

(6) 检测:于TECAN酶标仪上检测450 nm吸收值。