



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104195127 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201410391019. 3

(22) 申请日 2014. 08. 11

(71) 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 徐宏 瞿振元 古宏晨

(74) 专利代理机构 上海旭诚知识产权代理有限公司 31220

代理人 郑立

(51) Int. Cl.

C12N 11/08 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

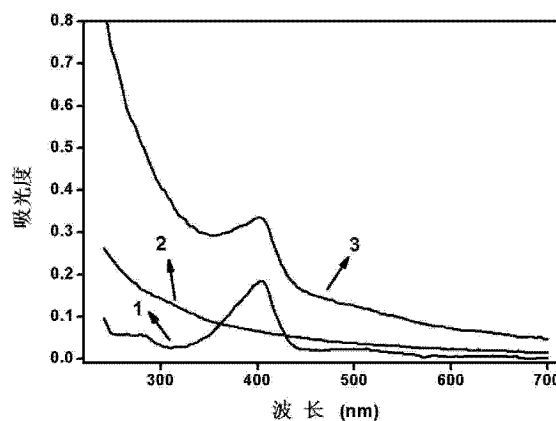
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种酶固定化载体的制备及在免疫分析中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种酶固定化载体的制备方法及应用,尤其公开了一种利用聚电解质球刷为载体,采用静电吸附后化学偶联法实现对酶的固定化,并将制备得到的复合物应用于酶联免疫检测。本发明的方法实现了酶的高结合量和高活性,应用于酶联免疫检测中,显著提高酶联免疫检测的灵敏度。



1. 一种利用聚电解质球刷固定酶的方法,其特征在于:用静电吸附后化学偶联法将酶以共价键固定于聚电解质球刷内部,得到具有催化能力的聚电解质球刷-酶复合物。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,具体过程如下:

在缓冲液A中,将所述聚电解质球刷与过量的所述酶在室温下混合,使所述酶充分吸附于所述聚电解质球刷内部;用所述缓冲液A洗涤除去过量的所述酶;在所述缓冲液A中用交联剂EDC将所述酶以共价键形式与所述聚电解质球刷偶联;用缓冲液B洗涤所述聚电解质球刷-酶复合物并将所述聚电解质球刷-酶复合物分散于缓冲液B中。

3. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述缓冲液A的选择方法如下:

当所述酶为等电点低于7的酸性酶时:

针对聚丙烯酸或其他含有羧基的聚电解质球刷,优选为选择pH = 5.0的10mM MES缓冲液;

针对聚N-(2-氨基乙基)丙烯酰胺或其他含有氨基的聚电解质球刷,选择pH = 7.4的10mM 磷酸缓冲液;

当所述酶为等电点高于7的碱性酶时:

针对聚丙烯酸或其他含有羧基的聚电解质球刷,选择pH = 7.4的10mM 磷酸缓冲液;

针对聚N-(2-氨基乙基)丙烯酰胺或其他含有氨基的聚电解质球刷,选择pH = 8.5的10mM 磷酸缓冲液。

4. 一种利用聚电解质球刷-酶复合物偶联抗体的方法,其特征在于:用共价偶联过程将抗体共价固定于聚电解质球刷外侧,得到能够特异性识别待测抗原的聚电解质球刷-酶-抗体复合物。

5. 如权利要求4所述的方法,其特征在于,偶联抗体方法采取如下选择:

对聚丙烯酸或其他含有羧基的聚电解质球刷,采用NHS/EDC过程偶联抗体;

对聚N-(2-氨基乙基)丙烯酰胺或其他含有氨基的聚电解质球刷,采用戊二醛作为交联剂偶联抗体。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,所述NHS/EDC过程的具体操作为:

在缓冲液中,将聚电解质球刷-酶复合物与浓度为50 mg/ml的NHS和EDC混合,室温反应15 ~ 30min以活化所述聚电解质球刷上的羧基;用所述缓冲液洗涤除去多余的反应物;加入过量抗体,室温反应2小时,使抗体与活化的所述聚电解质球刷-酶复合物通过共价键加以固定;离心,弃去上清液后,加入0.1M Tris-HCl,室温反应0.5小时以淬灭剩余NHS酯的反应位点;产物用含有0.5% BSA的PBS洗涤后,4℃封闭过夜;封闭后的产物4℃保存于PBS中。

7. 如权利要求6所述的方法,其特征在于,所述缓冲液是指:

对等电点低于7的酸性抗体,选择pH = 5.0的10mM MES缓冲液;

对等电点高于7的碱性抗体,选择pH = 7.4的10mM 磷酸缓冲液。

8. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,戊二醛偶联的具体操作为:

在pH = 7.4的10mM 磷酸缓冲液中,将聚电解质球刷-酶复合物与浓度为100mg/ml的戊二醛混合,室温反应1小时;用所述磷酸缓冲液洗涤除去多余的所述戊二醛;加入过量抗体,室温反应2小时;离心,弃去上清液后,加入0.1M Tris-HCl和10mM NaCNBH₃,室温反应1小时;产物用含有0.5% BSA的PBS洗涤后,4℃封闭过夜;封闭后的产物4℃保存于PBS

中。

9. 如权利要求 4-8 任一所述的方法制备得到的聚电解质球刷-酶-抗体复合物。
10. 如权利要求 9 所述的复合物在酶联免疫检测的应用。

一种酶固定化载体的制备及在免疫分析中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物材料技术领域,尤其涉及一种酶固定化载体的制备方法以及在酶联免疫分析中的应用。

背景技术

[0002] 酶的固定化在催化、检测等诸多领域有广泛的用途,固定化酶载体能够在发挥酶的功能的同时实现简便的分离,从而获得更加纯净的产物。为了提高催化效率,通常希望载体具有较高的酶结合量,同时能够较好地保持酶的活性。

[0003] 酶的固定化通常是借助载体表面与酶的物理吸附或化学反应来实现的。然而,常规载体通常面临酶结合量低,结合过程对酶的活性影响大等问题,使得固定化酶的催化效率大幅下降。利用聚电解质刷的三维结构能够固定多层的酶,从而大幅提高酶的结合量。同时,柔性的聚合物链能够更好地保持固定化酶的活性,进一步提高催化活性。

[0004] Haupt 等在 2005 年《生物大分子》第 6 期 948-955 页报道用聚电解质球刷,通过静电吸附的方式结合葡萄糖淀粉酶和 β -葡萄糖苷酶,结果表明,两种酶固定化后的活性基本保持不变。Kudina 等在 2014 年《德国应用化学》第 53 期 483-487 页报道用含有磁核的聚丙烯酸球刷,通过静电吸附结合纤维素酶进行催化,发现由于聚丙烯酸球刷对酶的高结合量、高活性以及球刷的三维结构增大了载体和基体的接触面积、酶在球刷内可移动等特点,大幅提高了催化效率。然而,在上述方法中,球刷对酶的结合是可逆的,必须在应用过程中保持盐浓度和 pH 值不变,否则会导致酶的释放。这一缺陷大大限制了这种酶载体的应用领域。

[0005] 免疫分析技术是一种利用抗原-抗体之间高亲和性的特异性结合而建立的高灵敏度检测方法。酶联免疫分析 (Elisa) 是以酶作为检测标记,将酶的高效催化能力与免疫反应相结合而发展起来的一种常用的免疫分析技术。

[0006] 疾病的早期诊断对检测灵敏度提出了更高的要求,提高检测灵敏度的重要途径之一是在检测系统中引入信号放大机制,以纳米颗粒或微球作为集群酶的载体是一种重要的放大方法。

[0007] 在常规酶联免疫 (Elisa) 体系中,通常是以酶标记的抗体作为信号分子,它能够识别待测物并催化底物给出检测信号。但是,一个抗体通常只能结合 1~2 个酶,因此,待测物与作为标记的酶之间基本是一一对应的关系,不具有信号放大的效果。而用颗粒代替抗体作为酶的载体可以大幅提高酶结合量,使待测物与酶之间形成一对多的关系,从而显著放大信号,提高检测灵敏度。

[0008] 在基于颗粒的检测体系中,灵敏度的放大倍数取决于载体对酶的结合量。Nilsson 在 1989 年《免疫学方法杂志》122 期 273~277 页报道用 40nm 氧化硅颗粒作为载体,以共价键固定辣根过氧化物酶 (HRP) 和抗体,实现了基于颗粒的免疫检测。但在该方法中,酶的结合量相对较低 ($20 \mu\text{g}/\text{mg}$),并且抗体和酶的结合存在竞争关系,因而在检测过程中需要加入大量的颗粒 ($150 \sim 300 \mu\text{g}$),且只在低浓度的检测范围内实现了有限的信号放大(约

4 倍)。Ke 等人 2010 年《分析生物化学》406 期第 8-13 页发表的论文中对上述工作进行了改进,采用层层自组装 (LBL) 技术,实现了对辣根过氧化物酶 (HRP) 和抗体的分别结合,提高了酶的结合量,同时克服了酶和抗体在结合时相互竞争的问题。但这一方法过程较为繁琐,多步的化学修饰和偶联反应将不可避免地对酶的活性产生影响,削弱了载体的信号放大效果。

[0009] 上述工作的共同问题在于载体的外表面只能结合单层的酶和抗体,因此结合量相对较为有限,而酶的结合过程通常伴随着酶活性的大幅下降,进一步制约了载体的信号放大效果。

[0010] 基于上述问题,需要一种以共价键实现酶的稳定固定化,同时又能保持高的酶结合量和酶活性的固定化方法,以实现酶的高效催化并扩大固定化酶载体的应用范围。

发明内容

[0011] 有鉴于现有技术的上述缺陷,本发明所要解决的技术问题是提供一种利用聚电解质球刷为载体进行酶固定化的制备方法,以及应用在酶联免疫检测中,显著提高现有酶联免疫检测的灵敏度。

[0012] 本发明是通过以下技术路线实现的:

[0013] 本发明提供了一种利用聚电解质球刷固定酶的方法,其特征在于:用静电吸附后化学偶联 (CCEE) 法将酶以共价键固定于聚电解质球刷内部,得到具有催化能力的聚电解质球刷-酶复合物;

[0014] 本发明中,具体过程如下:

[0015] 在缓冲液 A 中,将所述聚电解质球刷与所述过量酶在室温下混合,使所述酶充分吸附于所述聚电解质球刷内部;用所述缓冲液 A 洗涤除去过量的所述酶;在所述缓冲液 A 中用交联剂 EDC 将所述酶以共价键形式与所述聚电解质球刷偶联;用缓冲液 B 洗涤所述聚电解质球刷-酶复合物并将所述聚电解质球刷-酶复合物分散于所述缓冲液 B 中。

[0016] 本发明中,所述缓冲液 A 的选择方法如下:

[0017] 当所述酶为等电点低于 7 的酸性酶时:

[0018] 针对聚丙烯酸或其他含有羧基的聚电解质球刷,选择 pH = 5.0 的 10mM MES 缓冲液;

[0019] 针对聚 N-(2-氨基乙基)丙烯酰胺或其他含有氨基的聚电解质球刷,选择 pH = 7.4 的 10mM 磷酸缓冲液;

[0020] 当酶为等电点高于 7 的碱性酶时:

[0021] 针对聚丙烯酸或其他含有羧基的聚电解质球刷,选择 pH = 7.4 的 10mM 磷酸缓冲液;

[0022] 针对聚 N-(2-氨基乙基)丙烯酰胺或其他含有氨基的聚电解质球刷,选择 pH = 8.5 的 10mM 磷酸缓冲液。

[0023] 优选地,所述的聚电解质球刷是指将聚电解质链段的一端接枝在球形载体表面所形成的材料结构。

[0024] 优选地,其中所述的球形载体可以是粒径 5 纳米至 1000 纳米的微球。

[0025] 优选地,所述聚电解质为带有电荷且具有可反应基团的聚合物。

[0026] 本发明还提供了一种利用聚电解质球刷-酶复合物偶联抗体的方法,其特征在于:用共价偶联过程将抗体共价固定于聚电解质球刷外侧,得到能够特异性识别待测抗原的聚电解质球刷-酶-抗体复合物。

[0027] 本发明中,偶联抗体方法采取如下选择:

[0028] 对聚丙烯酸或其他含有羧基的聚电解质球刷,采用 NHS/EDC 过程偶联抗体;

[0029] 对聚 N-(2-氨基乙基)丙烯酰胺或其他含有氨基的聚电解质球刷,采用戊二醛作为交联剂偶联抗体。

[0030] 本发明中,NHS/EDC 过程的具体操作为:

[0031] 在所述缓冲液中,将所述聚电解质球刷-酶复合物与浓度为 50mg/ml 的 NHS 和 EDC 混合,室温反应 15 ~ 30min 以活化所述聚电解质球刷上的羧基;用所述缓冲液洗涤除去多余的反应物;加入过量抗体,室温反应 2 小时,使抗体与活化的球刷通过共价键加以固定;离心,弃去上清液后,加入 0.1M Tris-HCl,室温反应 0.5 小时以淬灭剩余 NHS 酯的反应位点;产物用含有 0.5% BSA 的 PBS 洗涤后,4℃ 封闭过夜;封闭后的产物 4℃ 保存于 PBS 中。

[0032] 优选地,所述的缓冲液是指:

[0033] 对等电点低于 7 的酸性抗体,优选为 pH = 5.0 的 10mM MES 缓冲液;

[0034] 对等电点高于 7 的碱性抗体,优选为 pH = 7.4 的 10mM 磷酸缓冲液。

[0035] 本发明中,戊二醛偶联的具体操作为:

[0036] 在 pH = 7.4 的 10mM 磷酸缓冲液中,将所述聚电解质球刷-酶复合物与浓度为 100mg/ml 的戊二醛混合,室温反应 1 小时;用所述缓冲液洗涤除去多余的戊二醛;加入过量抗体,室温反应 2 小时;离心,弃去上清液后,加入 0.1M Tris-HCl 和 10mM NaCNBH₃,室温反应 1 小时;产物用含有 0.5% BSA 的 PBS 洗涤后,4℃ 封闭过夜;封闭后的产物 4℃ 保存于 PBS 中。

[0037] 另一方面,本发明中,还提供了依据上述制备方法得到的复合物在酶联免疫检测的应用。

[0038] 在本发明的优选实施方式中,所述复合物在酶联免疫检测的应用方法,具体包括以下步骤:

[0039] 将 15 μg 结合了捕获抗体的磁珠、100 μl 待测样本以及 1 μg 上述结合了酶和抗体的球刷加入到微孔板中,混匀,37℃ 培养 1 小时;产物磁分离;弃去上清后,加入底物,催化反应一段时间后,上机读取信号值。

[0040] 聚合物球刷是将聚合物一端以较高密度固定于球形载体表面而形成的具有三维结构的新型载体,具有结合多层蛋白的能力。并且,柔性的聚合物链在作为固定化的模板时能够较好地保留酶的活性。同时,由于球刷含有大量的蛋白结合位点,能够在结合了大量酶后进一步结合充足的抗体用于识别待测物,从而克服了常规载体中酶和抗体的竞争性结合问题。

[0041] 本发明采用聚电解质球刷为载体固定高活性高结合量的酶,在本发明中,辣根过氧化物酶以共价键结合到球刷的三维聚合物网络内部实现多层固定化,其结合量较常规载体提高 45 倍。同时,固定化酶的活性得到了较好的保持,达到自由酶的 59.4%,比常规载体提高了一个数量级。所得的复合物作为酶的集群化载体,其催化活性等效于 5300 个自由酶,比传统羧基载体提高近 3 个数量级。

[0042] 以下将具体实施例对本发明的构思、具体结构及产生的技术效果作进一步说明，以充分地了解本发明的目的、特征和效果。

附图说明

[0043] 图 1 是本发明实施例 1 的紫外 - 可见分光光度图谱；

[0044] 图 2 是酶催化底物显色的动力学特征图。

具体实施方式

[0045] 下面对本发明的实施例作详细说明，本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施，给出了详细的实施方式和具体的操作过程，但本发明的保护范围不限于下述实施例。

[0046] 在实施例中，所采用的试剂除另有说明外均为市售商品。

[0047] 实施例 1

[0048] 用静电吸附后化学偶联 (CCEE) 法将辣根过氧化物酶共价固定化于聚丙烯酸球刷内部

[0049] 首先，采用《胶体与界面科学杂志》2013 年第 398 卷 82 ~ 87 页发表的表面引发 RAFT 聚合法制备得到球核为 80 纳米的氧化硅，聚合物毛刷状链段在中性水溶液中的长度为 145 纳米，接枝密度为 0.34nm^{-2} 的聚丙烯酸球刷。

[0050] 采用离心 - 重悬的方式，将所述聚丙烯酸球刷用 10mM pH = 5.0 的 MES 缓冲液洗涤 2 次，超声分散于所述缓冲液中。同时，用该缓冲液溶解辣根过氧化物酶配制成蛋白溶液，加入到所述聚丙烯酸球刷分散液中，均匀混合。最终所述聚丙烯酸球刷浓度为 0.8mg/ml，所述辣根过氧化物酶浓度为 2mg/ml。室温培养 15 分钟，使所述辣根过氧化物酶充分吸附于所述聚丙烯酸球刷内部。

[0051] 离心，弃去上清，用所述 MES 缓冲液洗涤产物 1 次。同时用该缓冲液溶解 EDC 配制成浓度为 0.5mM 的 EDC 溶液，并加入到含有产物的离心管中，混合均匀。继续在室温培养 2 小时，使吸附在所述聚丙烯酸球刷上的蛋白通过共价键连接在所述聚丙烯酸球刷上。

[0052] 离心，弃去上清，用 10mM PBS (pH = 7.4) 洗涤产物除去多余的 EDC 和未偶联的辣根过氧化物酶，产物以 2 mg/ml 分散于 PBS 中。通过 nanodrop 检测产物在 403nm 处的 HRP 特征吸收峰可确定所述辣根过氧化物酶成功结合到所述聚丙烯酸球刷内部，并可估算出所述辣根过氧化物酶的结合量约为 550 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 球刷。用 TMB 作为底物测定所述聚丙烯酸球刷 - 辣根过氧化物酶复合物的活性可确定单个固定化酶相对于所述自由辣根过氧化物酶的活性为 60%，计算可得每个球刷上结合的所述有效的辣根过氧化物酶数约为 5000 个。所述聚丙烯酸球刷 - 辣根过氧化物酶复合物在 PBS 等条件下能够稳定存在，不存在释放现象。

[0053] 图 1 所示，编号 1 为辣根过氧化物酶的光谱图，2 为聚丙烯酸球刷的光谱图，3 为聚丙烯酸球刷 - 辣根过氧化物酶复合物的光谱图，所述聚丙烯酸球刷 - 辣根过氧化物酶的复合物和纯的辣根过氧化物酶均在 403nm 处表现出明显的特征吸收峰，未结合辣根过氧化物酶的聚丙烯酸球刷不存在特征峰。

[0054] 图 2 所示，在催化反应初期，生成的产物与反应时间呈线性关系，其斜率反映了酶催化的活性。设自由 HRP 的活性为 100%，则用 CCEE 法固定于聚丙烯酸球刷内的 HRP 活性为 67%，固定于常规羧基氧化硅载体上的 HRP 活性为 5%。聚丙烯酸球刷作为酶的载体固

定化酶的相对活性提高了 13.4 倍。

[0055] 实施例 2

[0056] 用 CCEE 法将辣根过氧化物酶共价固定化于聚 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺球刷内部

[0057] 在本例中,所用的聚电解质球刷为含有氨基功能基团的聚 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺球刷,其球核为 80 纳米,聚合物毛刷状链段在中性水溶液中的长度为 75 纳米,接枝密度为 0.3nm^{-2} 。

[0058] 采用离心-重悬的方式,将所述聚 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺球刷用 10mM pH = 7.4 的磷酸缓冲液洗涤 2 次,超声分散于所述磷酸缓冲液中。同时,用所述磷酸缓冲液溶解辣根过氧化物酶配制成蛋白溶液,加入到球刷分散液中,均匀混合。最终所述聚 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺球刷浓度为 1.2mg/ml,所述辣根过氧化物酶浓度为 2mg/ml。室温培养 15 分钟,使所述辣根过氧化物酶充分吸附于所述聚 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺球刷内部。

[0059] 离心,弃去上清,用所述磷酸缓冲液洗涤产物 1 次,同时用所述缓冲液溶解 EDC 配制成浓度为 2mM 的 EDC 溶液,并加入到含有产物的离心管中,混合均匀。继续在室温培养 2 小时,使吸附在所述聚 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺球刷上的蛋白通过共价键连接在所述聚 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺球刷上。

[0060] 离心,弃去上清,用 10mM PBS (pH = 7.4) 洗涤产物除去多余的 EDC 和未偶联的辣根过氧化物酶,产物以 2mg/ml 分散于 PBS 中。通过 nanodrop 检测产物在 403nm 处的 HRP 特征吸收峰可确定所述辣根过氧化物酶成功结合到所述聚 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺球刷内部,并可估算出所述辣根过氧化物酶的结合量约为 $1500\mu\text{g}/\text{mg}$ 球刷。用 TMB 作为底物测定所述聚 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺球刷-辣根过氧化物酶复合物的活性可确定单个固定化酶相对于自由 HRP 的活性为 58%,计算可得每个所述聚 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺球刷上结合的有效辣根过氧化物酶数约为 11000 个。所述聚 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺球刷-辣根过氧化物酶复合物在 PBS 等条件下能够稳定存在,不存在释放现象。

[0061] 实施例 3

[0062] 用 NHS/EDC 过程将抗 β -hCG 抗体共价固定于聚丙烯酸球刷外侧

[0063] 将实施例 1 中得到的所述聚丙烯酸球刷-辣根过氧化物酶的复合物以离心-重悬的方式分散于 10mM pH = 5.0 的 MES 缓冲液中,浓度为 2mg/ml。将 NHS 和 EDC 溶解于 MES 中配制成浓度为 50mg/ml 的溶液,加入到含有聚丙烯酸球刷-辣根过氧化物酶复合物的离心管中,室温反应 15 ~ 30min 以活化所述聚丙烯酸球刷上的剩余羧基。用缓冲液洗涤 3 次除去多余的反应物。

[0064] 弃去上清液后,将过量的抗 β -hCG 抗体溶于 MES 中加入到离心管中,室温反应 2 小时,使抗体与活化的所述聚丙烯酸球刷通过共价键加以固定。离心,弃去上清液后,加入 0.1M Tris-HCl,室温反应 0.5 小时以淬灭剩余 NHS 酯的反应位点。

[0065] 得到的聚丙烯酸球刷-辣根过氧化物酶-抗体复合物用含有 0.5% BSA 的 PBS 洗涤后,4℃封闭过夜。封闭后的产物以 0.5mg/ml 的浓度 4℃保存于 PBS 中。

[0066] 经 BCA 法测试,用上述方法得到的所述聚丙烯酸球刷-辣根过氧化物酶-抗体复合物的抗体结合量为 $58\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

[0067] 实施例 4

[0068] 用戊二醛作为交联剂将抗 β -hCG 抗体共价固定于聚 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺球刷外侧

[0069] 将聚 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺球刷-辣根过氧化物酶复合物以离心-重悬的方式分散于 10mM pH = 7.4 的磷酸缓冲液中, 浓度为 2mg/ml。将戊二醛溶解于磷酸缓冲液中配制成浓度为 100mg/ml 的溶液, 加入到含有所述聚 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺球刷-辣根过氧化物酶复合物的离心管中, 室温反应 1 小时以活化所述聚 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺球刷上的剩余氨基。用缓冲液洗涤 3 次除去多余的反应物。

[0070] 弃去上清液后, 将过量的抗 β -hCG 抗体溶于磷酸缓冲液中加入到离心管中, 室温反应 2 小时, 使抗体与活化的聚 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺球刷通过共价键加以固定。离心, 弃去上清液后, 加入 0.1M Tris-HCl 和 10mM NaCNBH₃, 室温反应 1 小时以淬灭剩余醛基的反应并将 Schiff 碱还原。

[0071] 得到的聚 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺球刷-辣根过氧化物酶-抗体复合物用含有 0.5% BSA 的 PBS 洗涤后, 4℃ 封闭过夜。封闭后的产物以 0.5mg/ml 的浓度 4℃ 保存于 PBS 中。

[0072] 经 BCA 法测试, 用上述方法聚 N-(2-氨基乙基) 丙烯酰胺球刷-辣根过氧化物酶-抗体复合物的抗体结合量为 50 μ g/mg。

[0073] 实施例 5

[0074] 用聚电解质球刷作为酶结合物载体检测 hCG 抗原

[0075] 在本实施例中, 所用的磁珠为 Dynal M-270 链霉亲和素 (SA) 磁珠。所用的捕获抗体为生物素标记的抗 α -hCG 抗体 (biotin- α -hCG)。所用的聚电解质球刷-酶-抗体复合物可以是实施例 3 或实施例 4 得到的复合物。

[0076] 首先, 将 SA 磁珠与过量的 biotin- α -hCG 在室温下混合 30min, 使抗 α -hCG 抗体结合到磁珠上。

[0077] 将 15 μ g 结合了捕获抗体的磁珠、100 μ l 含有 hCG 抗原的待测样本以及 1 μ g 结合了酶和抗体的聚电解质球刷加入到微孔板中, 混匀, 37℃ 培养 1 小时。产物磁分离, 用 PBS 洗涤 5 次除去未反应的杂质。弃去上清后, 加入 100 μ l TMB 底物, 25℃ 反应 10min。磁分离后取出 50 μ l, 用 50 μ l 4M H₂SO₄ 终止, 读取 450nm 处的吸光度值。

[0078] 经测试, 采用所述聚电解质球刷-酶复合物的检测所得到的检测信号和灵敏度比常规体系提高了 100 倍。

[0079] 实施例 6

[0080] 采用化学发光作为检测方法得到检测信号

[0081] 基于聚电解质球刷的 Elisa 检测过程与实施例 5 相同。在 Elisa 检测过程中, 将底物由实施例 5 中的 TMB 替换为鲁米诺化学发光底物。检测过程为: 加入 100 μ l 化学发光工作液, 室温培养 5min, 上机读取化学发光值。

[0082] 经测试, 采用聚电解质球刷-酶-抗体复合物的检测所得到的检测信号和灵敏度比常规体系提高了 500 倍。

[0083] 实施例 7

[0084] 采用球核为 500 纳米的聚丙烯酸球刷作为酶结合物载体检测 hCG 抗原

[0085] 基于球刷的 Elisa 检测过程与实施例 5 相同。

[0086] 经 nanodrop 测试,聚电解质球刷-辣根过氧化物酶复合物对辣根过氧化物酶的结合量约为 $100\ \mu\text{g}/\text{mg}$ 球刷。TMB 测试表明,固定化酶的相对活性为 63%,计算可得每个球刷上结合的有效 HRP 数约为 1.7×10^5 个。

[0087] 用 TMB 作为底物进行 Elisa 检测,采用聚电解质球刷-酶-抗体复合物的检测所得到的检测信号和灵敏度比常规体系提高了 3000 倍。

[0088] 以上详细描述了本发明的较佳具体实施例。应当理解,本领域的普通技术无需创造性劳动就可以根据本发明的构思作出诸多修改和变化。因此,凡本技术领域中技术人员依本发明的构思在现有技术的基础上通过逻辑分析、推理或者有限的实验可以得到的技术方案,皆应在由权利要求书所确定的保护范围内。

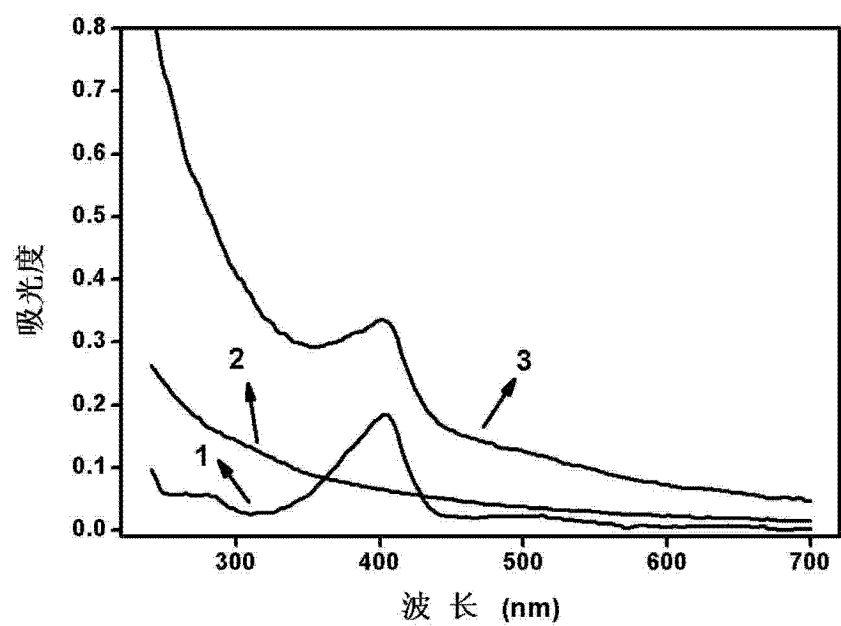


图 1

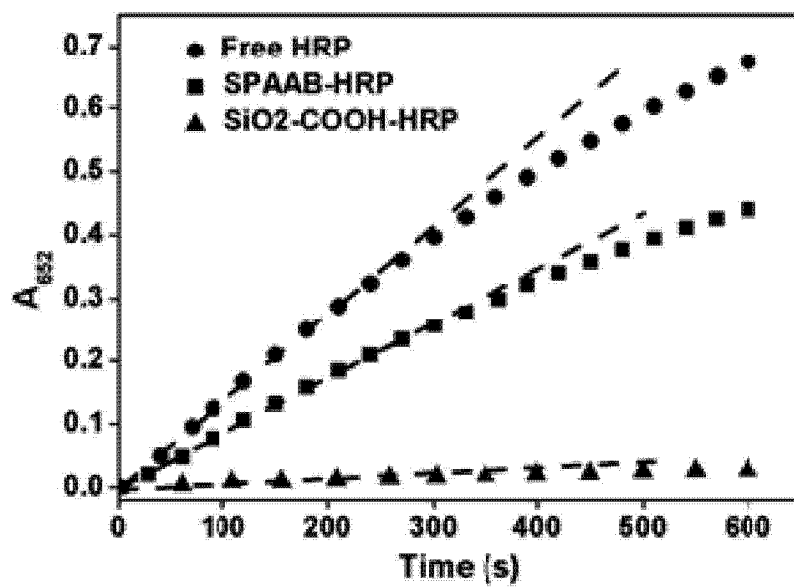


图 2

专利名称(译)	一种酶固定化载体的制备及在免疫分析中的应用		
公开(公告)号	CN104195127A	公开(公告)日	2014-12-10
申请号	CN201410391019.3	申请日	2014-08-11
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	徐宏 瞿振元 古宏晨		
发明人	徐宏 瞿振元 古宏晨		
IPC分类号	C12N11/08 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	郑立		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种酶固定化载体的制备方法及应用,尤其公开了一种利用聚电解质球刷为载体,采用静电吸附后化学偶联法实现对酶的固定化,并将制备得到的复合物应用于酶联免疫检测。本发明的方法实现了酶的高结合量和高活性,应用于酶联免疫检测中,显著提高酶联免疫检测的灵敏度。

