



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103645315 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 19

(21) 申请号 201310701342. 1

(22) 申请日 2013. 12. 18

(71) 申请人 国家纳米科学中心

地址 100190 北京市海淀区中关村北一条
11 号

(72) 发明人 吴晓春 阿迪蒂亚萨兰 胡晓娜
张会

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

代理人 巩克栋

(51) Int. Cl.

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

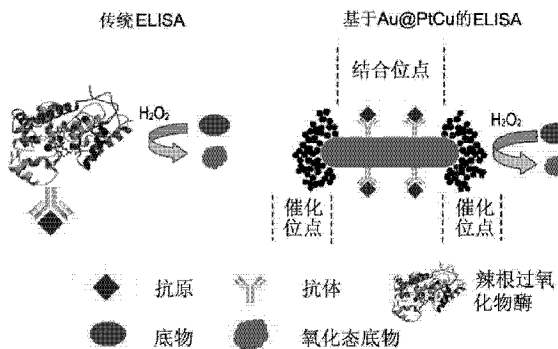
权利要求书2页 说明书8页 附图5页

(54) 发明名称

一种铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液及在 ELISA 中的应用

(57) 摘要

本发明涉及一种铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液及在 ELISA 中的应用。所述铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液, 含有由圆柱状金纳米棒内核、包覆于所述圆柱状金纳米棒内核外表面的岛状铂基合金结构及包被于所述圆柱状金纳米棒内核外表面的抗体或抗原构成的金核-铂基合金-抗体或抗原复合结构。本发明的铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液应用于 ELISA 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 pg/mL 的水平。尤其是使用金核/铜铂合金壳纳米棒时, 可以实现结合位点与催化位点的分离, 共存的蛋白对纳米结构的催化活性没有明显的影响。



1. 一种铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液,含有由圆柱状金纳米棒内核、包覆于所述圆柱状金纳米棒内核外表面的岛状铂基合金结构及包被于所述圆柱状金纳米棒内核外表面的抗体或抗原构成的金核-铂基合金-抗体或抗原复合结构。

2. 根据权利要求1所述的铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液,其特征在于,所述铂基合金结构的纳米棒选自金核/铂壳纳米棒、金核/铜铂合金壳纳米棒、金核/铂钯合金壳纳米棒和金核/银铂合金壳纳米棒中的一种或多种;优选为金核/铜铂合金壳纳米棒,其中铜铂主要在圆柱状金纳米棒内核的两端呈岛状沉积,而抗体或抗原主要包被于所述圆柱状金纳米棒内核两端之间的棒体外表面。

3. 一种制备如权利要求1或2所述的铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液的方法,包括:

(1) 将铂基合金结构的纳米棒溶液与表面活性剂混合摇匀,放置至少3小时后离心,得到表面带负电的铂基合金结构的纳米棒沉淀,弃上清并重悬;

(2) 在步骤(1)重悬所得的溶液中加入包被缓冲液及抗体或抗原,混合均匀后恒温孵育,然后离心去除游离的抗体或抗原,得到抗体或抗原修饰的铂基合金结构的纳米棒,重悬得到所述铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述表面活性剂溶液选自聚苯乙烯磺酸钠、聚乙烯亚胺、聚乙烯吡咯烷酮和聚二烯丙基二甲基氯化铵中的一种或多种,优选为聚苯乙烯磺酸钠。

5. 根据权利要求3或4所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)中用去离子水或包被缓冲液重悬沉淀,优选去离子水重悬沉淀;

优选地,所述步骤(1)中重悬所得的溶液中表面带负电的铂基合金结构的纳米棒浓度为0.1-5nM,更优选为2nM。

6. 根据权利要求3-5任一项所述的方法,其特征在于,所述步骤(2)中包被缓冲液选自含BSA的缓冲溶液;

优选地,所述缓冲溶液选自三羟甲基氨基甲烷缓冲液、羟乙基哌嗪乙硫磺酸缓冲液和磷酸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;

优选地,所述步骤(2)中恒温孵育的温度为37℃;

优选地,所述步骤(2)中恒温孵育的时间为15-120min,更优选为30min;

优选地,所述步骤(2)中抗体为羊抗人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,更优选为羊抗人IgG;

优选地,所述步骤(2)中相对于0.1-5pmol表面带负电的铂基合金结构的纳米棒,抗体的加入量为0.5-10μg;

更优选地,所述步骤(2)中相对于2pmol表面带负电的铂基合金结构的纳米棒,抗体的加入量为5μg。

7. 一种使用如权利要求1或2所述的铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液检测抗原或者抗体的方法,包括:

(1) 将抗体或抗原包被的铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液加入抗原或抗体包被的微孔板中,孵育后用缓冲溶液进行清洗;

(2) 然后加入含有显色底物的磷酸-柠檬酸缓冲溶液进行反应;

(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。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)中的微孔板为 96 孔的微孔板;

优选地,所述微孔板上的抗原选自能与所述铂基合金结构的纳米棒上的抗体免疫识别的人 IgG、鼠 IgG、兔 IgG 和小鼠白介素抗原中的一种或者多种,更优选为人 IgG;

优选地,所述步骤(1)中孵育的温度为 4-44℃,更优选为 37℃;

优选地,所述步骤(1)中孵育的时间为 30-360min,更优选为 240min;

优选地,所述步骤(1)中模拟酶溶液的加量为 75-200 μ L,更优选为 100 μ L;

优选地,所述步骤(2)中显色底物为 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,更优选为 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺或 2, 2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐;

优选地,所述步骤(2)中磷酸-柠檬酸缓冲溶液的 pH 为 3-6,更优选为 4.2;

优选地,所述步骤(2)中反应的时间为 10-30min,更优选为 20min;

优选地,所述步骤(2)中终止液为硫酸溶液或十二烷基磺酸钠溶液。

9. 如权利要求 1 或 2 所述的铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液在酶联免疫分析中的应用。

10. 根据权利要求 9 所述的应用,其特征在于,所述铂基合金结构的纳米棒为金核/铜铂合金壳纳米棒,其中铜铂主要在圆柱状金纳米棒内核的两端呈岛状沉积,而抗体或抗原主要包被于所述圆柱状金纳米棒内核两端之间的棒体外表面。

一种铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液及在 ELISA 中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及铂基合金结构的纳米棒及其应用,尤其涉及一种铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液及在 ELISA 中的应用。

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。比如需要大量昂贵的蛋白、对扩散控制的反应需要很多步孵化及需要很多清洗步骤等。过去的这些年里,人们主要致力于 ELISA 如何提高检测范围,增加灵敏度及特异性识别等的研究。

[0003] 纳米颗粒参与的 ELISA 有以下几种方式。纳米颗粒连接生物分子后可以为传统的 ELISA 提供更有用的工具。一方面,由于纳米颗粒的比表面积较大,可以为识别抗体或者 HRP 提供更多的连接位点,从而实现信号的放大(Anal. Chem. 2013, 85, 6228-6232)。另一方面,在等离激元 ELISA 中,纳米颗粒可以作为显色底物。这主要是由于等离激元纳米颗粒的尺寸变化(包括团聚)会带来颜色的改变,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 在全血中的检测限可低至 $1 \times 10^{-18} \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Nat. Chem. 2012, 7, 821-824)。另外,纳米颗粒自身具有类过氧化物酶活性,可以直接取代传统 ELISA 中的 HRP。

[0004] 近些年来, Fe_3O_4 、 CeO_2 和 Pt 等纳米颗粒相继发现具有类氧化物酶和类过氧化物酶活性,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 Fe_3O_4 的类过氧化物酶活性设计的多种免疫检测方法,可以实现对乙肝病毒表面抗原和肌钙蛋白的检测(Nat. Nanotechnol. 2007, 2, 577-583)。在前期,对金核/铂壳纳米结构(Au@Pt)类过氧化物酶活性的研究发现,其可以取代传统 ELISA 中 HRP 实现对小鼠白介素高灵敏度的检测(Biomaterials, 2011, 32, 1139-1147)。

[0005] 然而,目前对铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液作为类过氧化物酶取代 HRP 在 ELISA 中的检测尚缺乏深入研究和报导。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液及在 ELISA 中的应用,所述铂基合金结构的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 pg/mL 的水平。

[0007] 为实现本发明的目的,本发明采用以下技术方案:

[0008] 在第一方面,本发明提供一种铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液,含有由圆柱状金纳米棒内核、包覆于所述圆柱状金纳米棒内核外表面的岛状铂基合金结构及包被于所述圆柱状金纳米棒内核外表面的抗体或抗原构成的金核-铂基合金-抗体或抗原复合结构。

[0009] 本发明的铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液中含有的金核-铂基合金-抗体或抗原复合结构含有三部分结构:作为内核的圆柱状金纳米棒;作为催化中心的岛状铂基合金结构,其包覆于所述圆柱状金纳米棒内核外表面,尤其是所述圆柱状金纳米棒内核外表面的头部部分;和作为免疫结合位点的抗体或抗原,其包被于所述圆柱状金纳米棒内核外表面。上述结构的复合结构由于圆柱状金纳米棒内核的比表面积大,为免疫反应提供更多的结合位点,因此信号的放大效应明显;岛状铂基合金结构具有类似于 HRP 等的酶促活性,能够实现模拟酶特性的 ELISA 反应。

[0010] 作为本发明的优选,所述铂基合金结构的纳米棒选自金核/铂壳纳米棒、金核/铜铂合金壳纳米棒、金核/铂钯合金壳纳米棒和金核/银铂合金壳纳米棒中的一种或多种;更优选为金核/铜铂合金壳纳米棒,其中铜铂主要在圆柱状金纳米棒内核的两端呈岛状沉积,而抗体或抗原主要包被于所述圆柱状金纳米棒内核两端之间的棒体外表面。

[0011] 本文中,其它部分金核/铂壳纳米棒又称作“金核/铂纳米岛壳结构的纳米棒”,金核/铜铂合金壳纳米棒又称作“金核/铜铂合金纳米岛壳结构的纳米棒”,本领域的技术人员能够理解其含义是相同的。

[0012] 当使用金核/铜铂合金壳纳米棒时,可以实现结合位点与催化位点的分离,共存的蛋白对纳米结构的催化活性没有明显的影响。

[0013] 在第二方面,本发明提供一种制备如第一方面所述的铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液的方法,包括:

[0014] (1) 将铂基合金结构的纳米棒溶液与表面活性剂混合摇匀,放置至少 3 小时后离心,得到表面带负电的铂基合金结构的纳米棒沉淀,弃上清并重悬;

[0015] (2) 在步骤(1)重悬所得的溶液中加入包被缓冲液及抗体或抗原,混合均匀后恒温孵育,然后离心去除游离的抗体或抗原,得到抗体或抗原修饰的铂基合金结构的纳米棒,重悬得到所述铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液。

[0016] 其中,步骤(1)中用表面活性剂处理主要是为增加纳米棒在缓冲溶液中的稳定性,也为降低生物毒性。所述表面活性剂溶液可以是聚苯乙烯磺酸钠(PSS)、聚乙烯亚胺(PEI)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDAC)中的一种或多种,优选为聚苯乙烯磺酸钠(PSS)。

[0017] 其中,所述步骤(1)中可以用去离子水或包被缓冲液重悬沉淀,优选去离子水重悬沉淀。

[0018] 优选地,所述步骤(1)中重悬所得的溶液中表面带负电的铂基合金结构的纳米棒浓度为 0.1-5nM,例如 0.2nM、0.3nM、0.5nM、0.8nM、1nM、2nM、3nM、4nM 或 5nM,更优选为 2nM。

[0019] 优选地,所述步骤(2)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(Tris)缓冲液、羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液和磷酸(PBS)缓冲液中的一种或者多种,更优选为三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲液。

[0020] 优选地,所述步骤(2)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。

[0021] 优选地,所述步骤(2)中恒温孵育的时间为 15-120min,例如 18min、20min、25min、30min、45min、60min、80min、100min 或 110min,更优选为 30min。

[0022] 优选地,所述步骤(2)中抗体为羊抗人 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,更优选为羊抗人 IgG。

[0023] 优选地,所述步骤(2)中相对于 0.1-5pmol 表面带负电的铂基合金结构的纳米棒,抗体的加入量为 0.5-10 μ g。其中,表面带负电的铂基合金结构的纳米棒可以从 0.1-5pmol, 例如 0.2pmol、0.5pmol、0.8pmol、1pmol、1.2pmol、2pmol、3pmol、3.2pmol、3.8pmol、4.5pmol 或 4.8pmol 中选择;抗体可以从 0.5-10 μ g, 例如 0.5 μ g、0.7 μ g、0.9 μ g、1.2 μ g、1.5 μ g、2 μ g、4 μ g、6 μ g、8 μ g 或 9 μ g 中选择。当然,本领域的技术人员能够理解表面带负电的铂基合金结构的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。

[0024] 更优选地,所述步骤(2)中相对于 2pmol 表面带负电的铂基合金结构的纳米棒,抗体的加入量为 5 μ g。

[0025] 在第三方面,本发明提供一种使用如第一方面所述的铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液检测抗原或者抗体的方法,包括:

[0026] (1) 将抗体或抗原包被的铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液加入抗原或抗体包被的微孔板中,孵育后用缓冲溶液进行清洗;

[0027] (2) 然后加入含有显色底物的磷酸-柠檬酸缓冲溶液进行反应;

[0028] (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。

[0029] 优选地,所述步骤(1)中的微孔板为 96 孔的微孔板;96 孔的微孔板是 ELISA 中最常用的微孔板,但是也不排除其它微孔板用于本发明的情况。

[0030] 优选地,所述微孔板上的抗原选自能与所述铂基合金结构的纳米棒上的抗体免疫识别的人 IgG、鼠 IgG、兔 IgG 和小鼠白介素抗原中的一种或者多种,更优选为人 IgG。

[0031] 优选地,所述步骤(1)中孵育的温度为 4-44 $^{\circ}$ C,例如 5 $^{\circ}$ C、7 $^{\circ}$ C、9 $^{\circ}$ C、10 $^{\circ}$ C、12 $^{\circ}$ C、13 $^{\circ}$ C、15 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C、32 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、42 $^{\circ}$ C 或 43 $^{\circ}$ C,更优选为 37 $^{\circ}$ C。

[0032] 优选地,所述步骤(1)中孵育的时间为 30-360min,例如 40min、60min、100min、150min、180min、210min、240min、280min、300min、320min、40-120min、50-300min 或 120-280min,更优选为 240min。

[0033] 优选地,所述步骤(1)中模拟酶溶液的加入量为 75-200 μ L,例如 80 μ L、90 μ L、100 μ L、120 μ L、130 μ L、150 μ L、170 μ L 或 190 μ L,更优选为 100 μ L。

[0034] 优选地,所述步骤(2)中显色底物为 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(TMB)或 2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS)。

[0035] 优选地,所述步骤(2)中磷酸-柠檬酸缓冲溶液的 pH 为 3-6,例如 3.2、3.5、3.7、3.9、4.2、4.5、4.8、5.2、5.4、5.6、5.8、3.5-5 或 3.8-5.5,更优选为 4.2。

[0036] 优选地,所述步骤(2)中反应的时间为 10-30min,例如 12min、15min、18min、21min、24min、26min 或 28min,更优选为 20min。

[0037] 优选地,所述步骤(2)中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%。

[0038] 在第四方面,本发明提供如第一方面所述的铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液在

酶联免疫分析中的应用。

[0039] 作为本发明的优选,所述铂基合金结构的纳米棒为金核/铜铂合金壳纳米棒,其中铜铂主要在圆柱状金纳米棒内核的两端呈岛状沉积,而抗体或抗原主要包被于所述圆柱状金纳米棒内核两端之间的棒体外表面。

[0040] 本发明的有益效果为:本发明的铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液中含有金核-铂基合金-抗体或抗原复合结构,其中铂基合金作为催化中心类似于HRP酶;本发明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pg/mL的水平。尤其是使用金核/铜铂合金壳纳米棒,以ABTS为底物时,检测限为90pg/mL,以TMB为底物时,检测限比90pg/mL更低。此外,使用金核/铜铂合金壳纳米棒时,可以实现结合位点与催化位点的分离,共存的蛋白对纳米结构的催化活性没有明显的影响。本发明所提供的方法简单易操作、重复性高,所使用的纳米颗粒成本低廉、易于制备。

附图说明

[0041] 图1是本发明实施例1所制备的金核/铂壳(Au@Pt)(a)与金核/铜铂合金壳(Au@PtCu)(b)纳米颗粒的透射电子显微镜照片及相应的紫外可见吸收谱图(c),其中Au NRs表示金纳米棒,曲线(I)、(II)和(III)分别代表Au@Pt、Au@PtCu和Au NRs紫外可见吸收谱。

[0042] 图2是本发明实施例2中Au@Pt纳米棒和Au@PtCu纳米棒作为类过氧化物酶的底物浓度与催化氧化反应速度的关系,以及利用双倒数法求得的米氏常数。

[0043] 图3是本发明实施例4中蛋白存在的情况对Au@Pt纳米棒和Au@PtCu纳米棒催化的TMB氧化速度的影响,其中(a)显示共存的蛋白会明显降低Au@Pt的催化活性,Au@Pt+0.05%BSA表示有0.05%BSA共存的情况,Au@Pt+对照表示没有蛋白共存的情况;(b)显示共存的蛋白对Au@PtCu带来的影响几乎可以忽略,Au@PtCu-对照表示没有蛋白共存的情况,Au@PtCu@抗体+0.05%BSA表示有抗体和0.05%BSA共存的情况,Au@PtCu+0.05%BSA表示有0.05%BSA共存的情况。

[0044] 图4是本发明中Au@PtCu纳米棒的结构示意图,及其参与的ELISA反应过程示意图。

[0045] 图5是本发明实施例6和7中以TMB(a)和ABTS(b)为底物时,得到的吸光度和待测蛋白浓度之间的关系。

具体实施方式

[0046] 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。

[0047] 以下实施例中,所述试剂如下所示:十六烷基三甲基溴化铵(CTAB, Amresco),氯铂酸钾(K_2PtCl_4 , Alfa),氯化铜($CuCl_2$, Alfa),抗坏血酸(AA, Alfa),聚苯乙烯磺酸钠

(PSS, Alfa), 羊抗人 IgG (ZSGB-Bio), 人 IgG (ZSGB-Bio), HRP 标记的羊抗人 IgG (Bioss), 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺 (TMB, Alfa), 2, 2' - 联氨 - 双(3- 乙基苯并噻唑啉 -6- 磺酸) 二胺盐 (ABTS, Alfa)。

[0048] 测试仪器有: 酶标仪 (Infinite™ M200), Varian Cary50, TEM (Tecnai G²20S-TWIN), Delsa Nano C (Beckman Coulter)。

[0049] 实施例 1: 金核 / (铜) 铂合金纳米岛壳结构的纳米棒的制备纯化

[0050] 本发明中所述金核 / (铜) 铂合金纳米岛壳结构的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, 我们使用金纳米棒为种子, 通过还原剂还原 Pt 或者 Pt 和 Cu 的共沉积实现纳米结构的制备。

[0051] 金核 / 铂纳米岛壳结构的纳米棒 (Au@Pt) 的制备: 取 1mL 纯化的金纳米棒溶液, 依次加入 75 μ L 的 2mM 的 K₂PtCl₄ 溶液, 22.5 μ L 的 0.1M 的 AA 溶液, 混合均匀后放置在 30°C 水浴中反应半小时, 之后加入 0.5mL 的 0.1M 的 CTAB 溶液, 于 12000rpm 下离心 5 分钟一次, 沉淀分散在去离子水中备用。

[0052] 金核 / 铜铂合金纳米岛壳结构的纳米棒 (Au@PtCu) 的制备: 取 1mL 纯化金纳米棒溶液, 依次加入 75 μ L 的 2mM 的 K₂PtCl₄ 溶液, 40 μ L 的 10mM 的 CuCl₂ 溶液, 22.5 μ L 的 0.1M 的 AA 溶液, 混合均匀后放置在 30°C 水浴中反应半小时, 之后加入 0.5mL 的 0.1M 的 CTAB 溶液, 于 12000rpm 下离心 5 分钟一次, 沉淀分散在去离子水中备用。

[0053] Au@Pt 和 Au@PtCu 纳米棒的 TEM 形貌图及相应的紫外可见吸收图如图 1 所示。从图 1 (a) 可以看出, Pt 在金纳米棒表面呈岛状生长模式; 引入 Cu 后, Cu 和 Pt 的共沉积仍然保持岛状生长, 不同的是, 这些岛主要是沉积在棒的两端 (b)。另外, Pt 的沉积和 Pt 与 Cu 的共沉积都会导致局域等离子共振峰 (LSPR) 产生红移 (c)。

[0054] 实施例 2: 酶动力学参数分析

[0055] 通过监测 TMB 氧化产物吸收峰吸光度的变化来考察其反应动力学。使用 Varian Cary50 动力学模式, 每隔 0.1min 间隔测量一次。测试条件为: Au@Pt 或者 Au@PtCu 纳米棒的浓度为 15 μ M, 2.4mL 的 0.1M 的 pH4.5 的磷酸缓冲溶液, 反应温度设定为 30°C。当以 TMB 为底物时, H₂O₂ 的浓度固定在 2mM; 当以 H₂O₂ 为底物时, TMB 的浓度固定在 0.13mM。表观动力学参数从 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。

[0056] 得到的动力学参数如表 1 和图 2 所示。

[0057] 表 1 Au@Pt 和 Au@PtCu 纳米棒作为类过氧化物酶的表现动力学参数

[0058]

纳米棒	底物	K_m (mM)	V_{max} [M s ⁻¹]	$K_{cat} \times 10^3$ [s ⁻¹]
Au@Pt	TMB	0.026±0.002	$(2.3 \pm 0.1) \times 10^{-8}$	1.5±0.1
	H ₂ O ₂	219±15	$(6.8 \pm 0.6) \times 10^{-7}$	45.3±4.0
Au@PtCu	TMB	0.036±0.004	$(8.1 \pm 0.7) \times 10^{-8}$	5.4±0.5
	H ₂ O ₂	23±2	$(10.4 \pm 0.6) \times 10^{-7}$	69.3±4.0

[0059] 其中, $K_{cat} = V_{max} / [E]$, $[E]$ 是酶的浓度, K_{cat} 是催化剂常数。

[0060] 酶催化反应动力学可用方程(1)描述:

[0061]



[0062] $K_m = ((k_{-1} + k_2) / k_1)$

[0063] $V = k_2 [E_0] \times \frac{[S]}{K_m + [S]} = V_{max} \times \frac{[S]}{K_m + [S]}$

[0064] 在此, K_m 是由 k_{-1} 、 k_1 和 k_2 决定。对纳米颗粒模拟酶来说, 表面包覆和 k_2 对表观 K_m 都有贡献。从表 1 可以看出, 以 TMB 为底物时, Au@PtCu 纳米棒有较大的 K_m 和 V_{max} ; 以 H₂O₂ 为底物时, Au@PtCu 纳米棒有较小的 K_m 和较大的 V_{max} , K_m 的降低主要来源于 k_1 的增加, 说明 Pt 和 Cu 形成合金后, 其对电子结构带来的变化会影响对底物的亲近性, 对 H₂O₂ 的亲合力增强。

[0065] 实施例 3: 金核 / (铜) 铂合金纳米岛壳结构的纳米棒表面进行羊抗人 IgG 抗体修饰

[0066] 取 1mL 纯化一次的原始 CTAB 包覆的金核 / (铜) 铂合金壳纳米结构溶液, 加入 50 μ L 的 20mg/mL 的 PSS 溶液, 混合均匀后在室温下放置 3h 以上, 之后于 12000rpm 下离心 5 分钟一次, 沉淀分散在 200 μ L 去离子水中备用, 纯化后合金纳米棒的浓度约为 2nM。

[0067] 取 1mL 纯化的 PSS 包覆的 2nM 合金纳米棒溶液, 分散在 1mL 含 0.05%BSA 的 Tris 缓冲溶液 (0.05M, pH8) 中。加入 5 μ L 的 1mg/mL 羊抗人 IgG 溶液, 混合均匀后放入 37°C 恒温箱中, 孵化 30 分钟之后, 于 8000rpm 转速下离心 5 分钟去掉游离的羊抗人 IgG 分子。倒掉上清液, 将沉淀物分散在 1mL 含 0.05%BSA 的 Tris 缓冲液 (50mM, pH8) 中备用。

[0068] 实施例 4: 共存的蛋白对催化活性的影响研究

[0069] 1mL TMB 底物溶液 (1mg/mL TMB 的 DMSO 溶液溶解于 9mL 0.05M pH4.2 的磷酸-柠檬酸缓冲溶液中, 并加入 2 μ L 30% H₂O₂) 中, 用去离子水稀释一倍后, 加入 20 μ L 2nM 的 Au@PtCu 纳米棒溶液, 监测其氧化 TMB 的动力学变化。

[0070] 向 1mL TMB 底物溶液中, 加入 20 μ L 2nM 的 Au@PtCu 纳米棒溶液, 5 μ L 1mg/mL 羊抗人 IgG 溶液及 0.05%BSA 溶液, 监测其氧化 TMB 的动力学变化。

[0071] 向 1mL TMB 底物溶液中, 加入 20 μ L 2nM 的 Au@PtCu 纳米棒溶液, 0.05%BSA 溶液, 监测其氧化 TMB 的动力学变化。

[0072] 作为对比,我们对 Au@Pt 纳米棒溶液(含或不含 0.05%BSA)也进行了氧化 TMB 的实验。结果如图 3 所示。

[0073] 从图 3 可以看到,共存的蛋白会明显降低 Au@Pt 的催化活性(图 3 (a));但是对 Au@PtCu 来说,蛋白带来的影响几乎可以忽略,说明催化活性并未受到抑制,这主要是由于蛋白倾向于吸附在纳米棒的侧面,而对 Au@PtCu 来说,侧面几乎没有催化位点,所以未受到影响。这一现象暗示 Au@PtCu 具有实现催化位点和结合位点分离的潜力。

[0074] 表 2 是对不同包覆的 Au@PtCu 纳米棒尺寸和 zeta 电位测量的数据。结果显示 PSS 包覆的纳米棒(Au@PtCu)带负电;与 0.05%BSA 孵化(Au@PtCu@0.05%BSA)后,纳米棒的表面电荷稍微增大;进一步与羊抗人 IgG 孵化(Au@PtCu@0.05%BSA@抗体),电荷会继续增加,说明纳米棒表面蛋白的存在。

[0075] 表 2 不同包覆的 Au@PtCu 纳米棒的尺寸和 zeta 电位

[0076]

材料	颗粒尺寸(nm)	Zeta 电位(mV)
Au@PtCu	182.3±1.1	-54.7±0.5
Au@PtCu@0.05% BSA	192.5±4.4	-45.7±0.9
Au@PtCu@0.05% BSA@抗体	187.0±3.5	-43.1±0.8

[0077] 实施例 5 :免疫识别反应

[0078] 将透明、平底聚乙烯 96 孔板首先用 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 单抗人 IgG 溶液。其中人 IgG 浓度范围从 9pg 到 0.9 μ g,在 4 $^{\circ}$ C 下孵化过夜。之后用 50mM pH8 的 Tris buffer(含 0.05%Tween-20)清洗 2 次,最后用 50mM pH8 的 Tris buffer 再次清洗。然后用 1%BSA 的 Tris buffer 于 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 小时。最后再用 Tris buffer (0.05M,pH8)清洗 3 次。然后向每个孔中加入 100 μ L 羊抗人 IgG 修饰的 Au@PtCu 纳米棒溶液,于 37 $^{\circ}$ C 孵化 4 小时。之后用含 0.05%Tween-20 的 Tris buffer (50mM,pH8)清洗,最后再用 50mM pH8 的 Tris buffer 清洗一次。

[0079] 图 4 显示了本发明中 Au@PtCu 纳米棒的结构示意图,及其参与的 ELISA 反应过程示意图。可以看出,本发明中 Au@PtCu 纳米棒参与的 ELISA 反应可以实现结合位点与催化位点的分离。

[0080] 实施例 6 :以 TMB 为显色底物时的检测反应

[0081] 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 9mL0.05M pH4.2 的磷酸-柠檬酸缓冲溶液中,并加入 2 μ L30% H_2O_2)。反应 20 分钟后加入 25 μ L2M H_2SO_4 终止反应,检测 450nm 处的吸光度。整个实验设立了对比、阳性对比、阴性对比和空白对照。

[0082] 结果如图 5 (a)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 90pg/mL-9 μ g/mL,最低检测限要低于 90pg/mL。

[0083] 实施例 7 :以 ABTS 为显色底物时的检测反应

[0084] 向实施例 5 的微孔板的每个孔中加入 100 μ L ABTS 的底物溶液(0.4mg/mL 溶于

0.1M pH4.2 的磷酸-柠檬酸缓冲液,含 2 μ L30% H_2O_2)。反应 20 分钟后加入 100 μ L1%SDS 终止液停止反应,检测 405nm 的吸光度。整个实验设置了对比,阳性对比,阴性对比和空白对照。

[0085] 结果如图 5 (b)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 90pg/mL-9 μ g/mL,最低检测限为 90pg/mL。

[0086] 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。

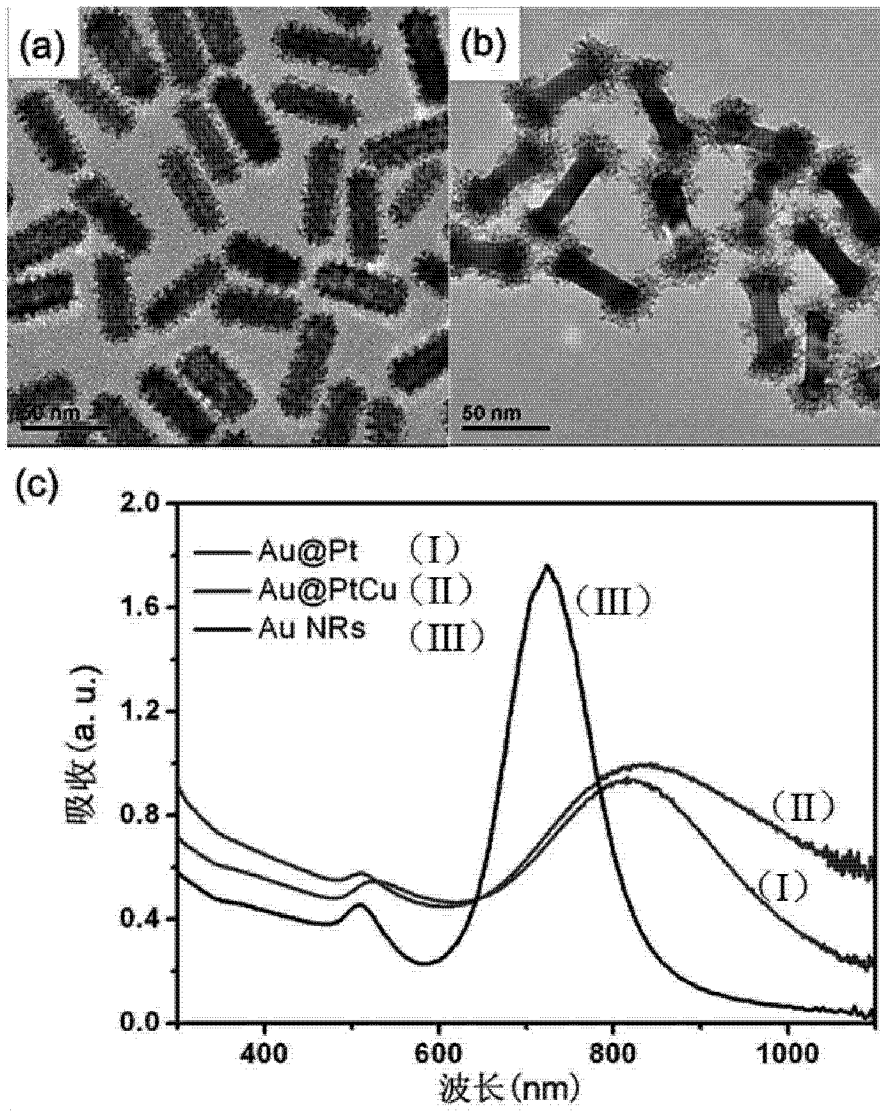


图 1

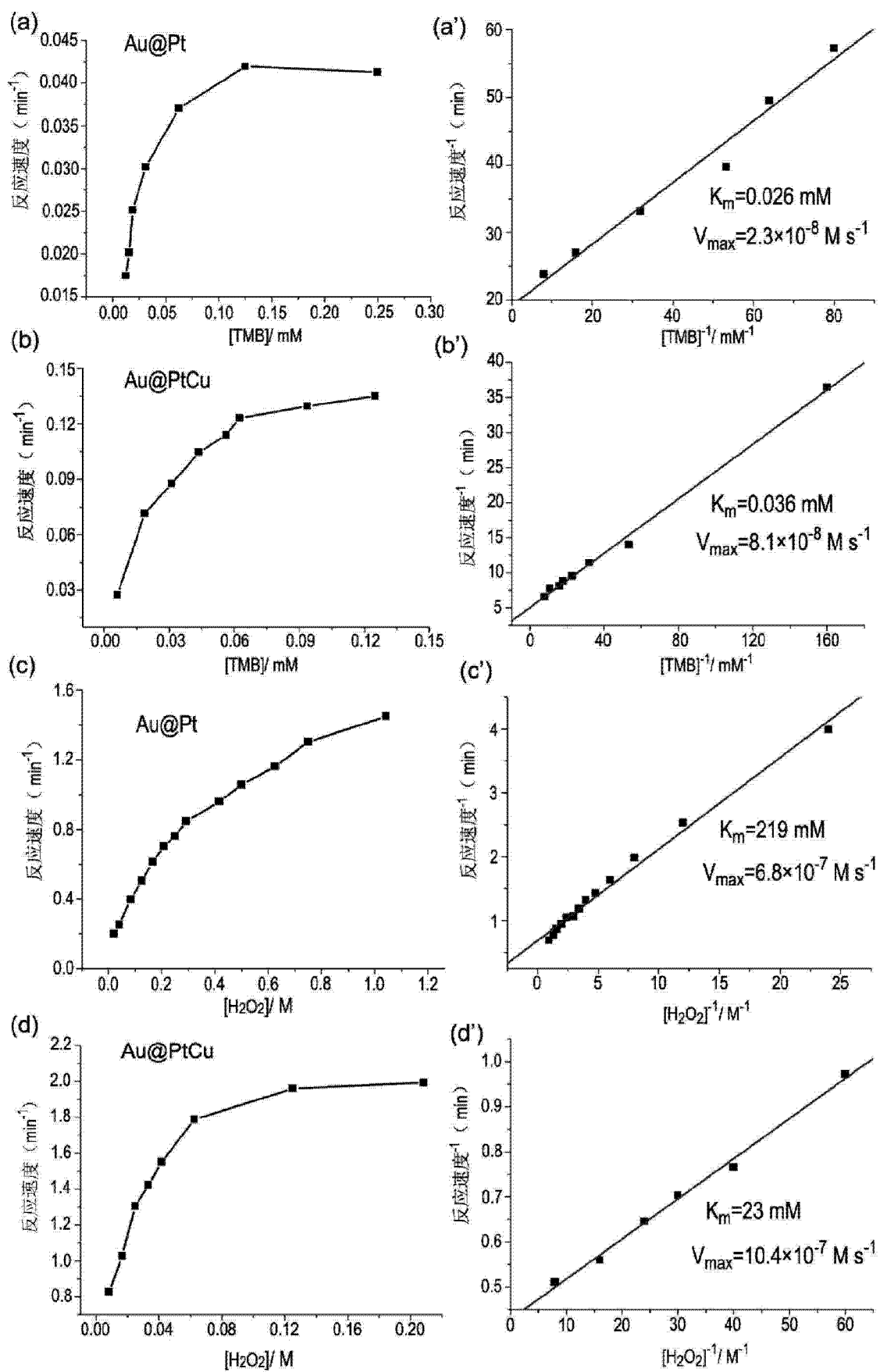


图 2

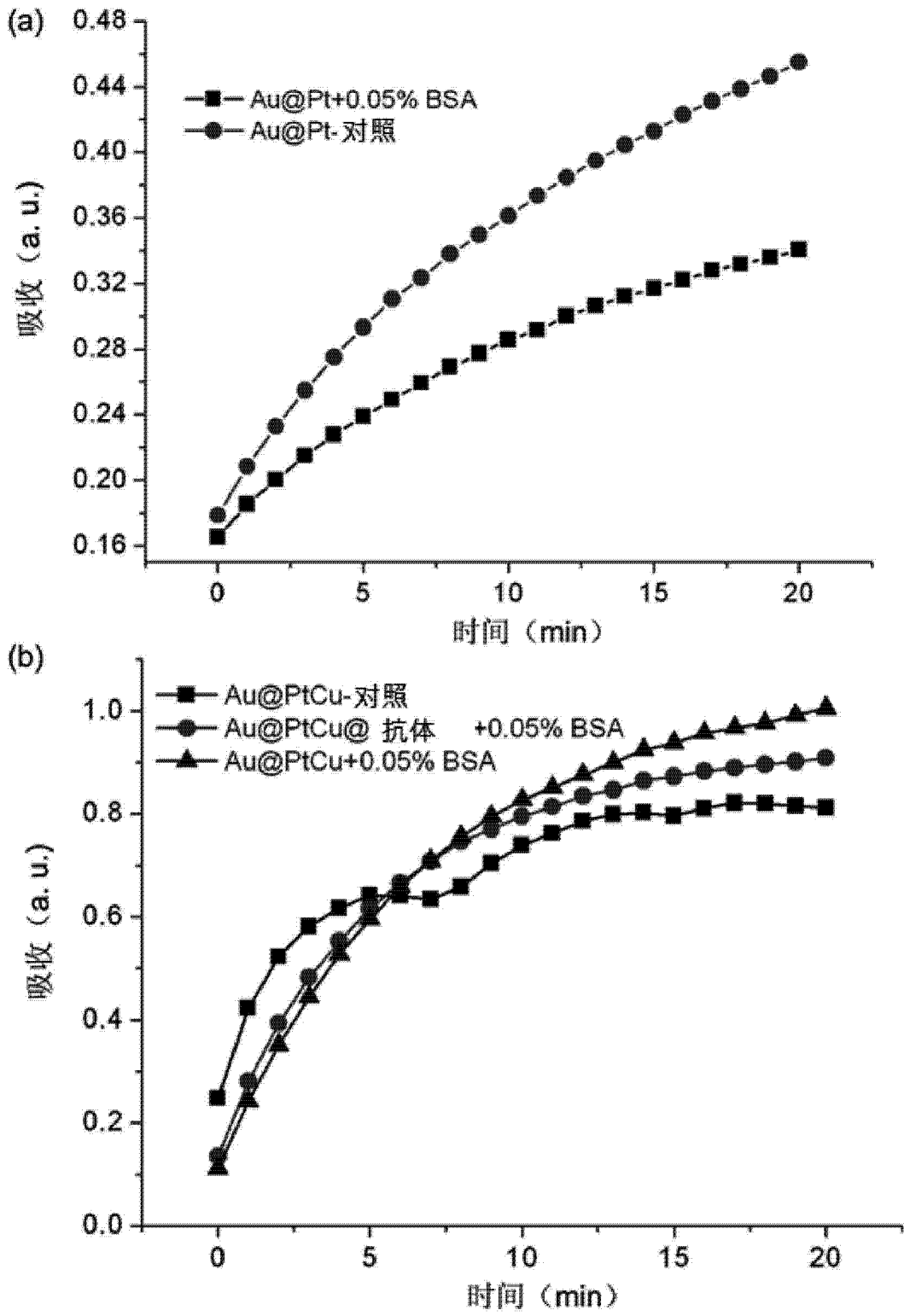


图 3

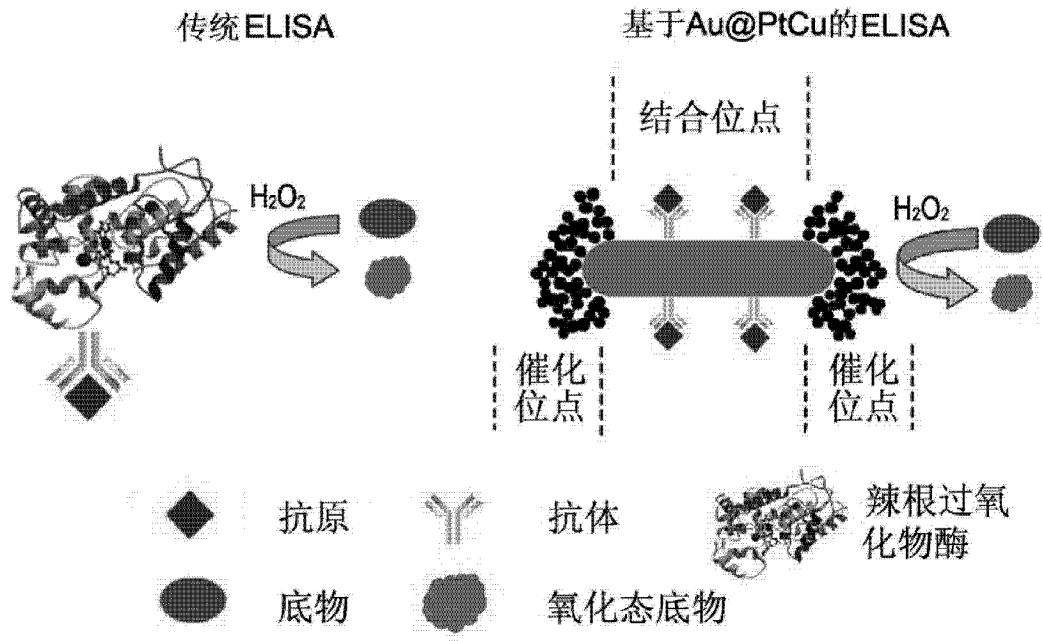


图 4

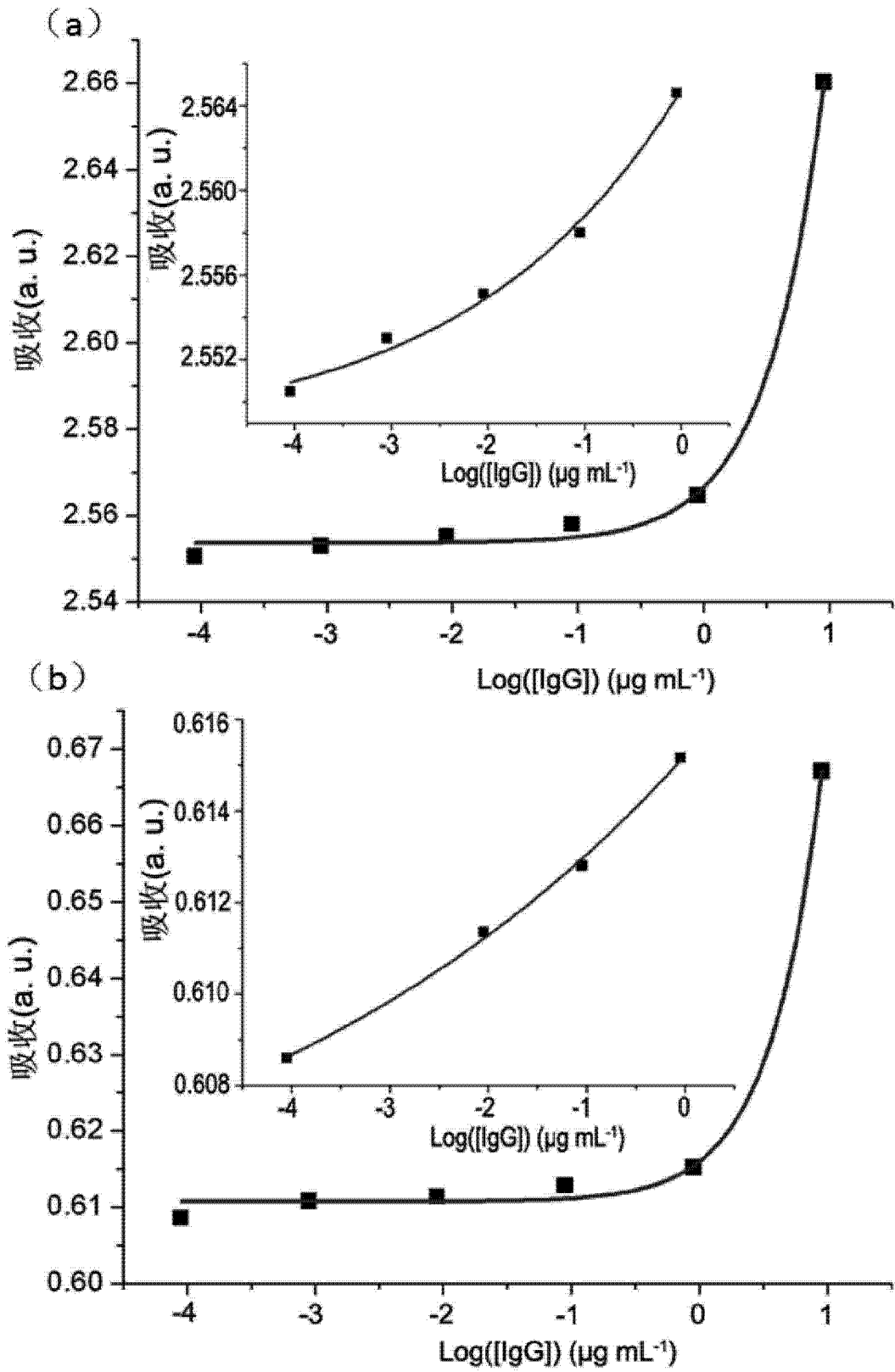


图 5

专利名称(译)	一种铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液及在ELISA中的应用		
公开(公告)号	CN103645315A	公开(公告)日	2014-03-19
申请号	CN201310701342.1	申请日	2013-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
当前申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
[标]发明人	吴晓春 阿迪蒂亚萨兰 胡晓娜 张会		
发明人	吴晓春 阿迪蒂亚萨兰 胡晓娜 张会		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54306 G01N33/558 G01N33/68		
其他公开文献	CN103645315B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液及在ELISA中的应用。所述铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液，含有由圆柱状金纳米棒内核、包覆于所述圆柱状金纳米棒内核外表面的岛状铂基合金结构及包覆于所述圆柱状金纳米棒内核外表面的抗体或抗原构成的金核-铂基合金-抗体或抗原复合结构。本发明的铂基合金结构的纳米棒模拟酶溶液应用于ELISA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pg/mL的水平。尤其是使用金核/铜铂合金壳纳米棒时，可以实现结合位点与催化位点的分离，共存的蛋白对纳米结构的催化活性没有明显的影响。

