

抗体与多酶负载纳米金的合成表征及纸上化学发光性能研究 ——介绍一个仪器分析综合实验

刘 伟* 褚伟茹 陈 莹 李慧芳

(陕西师范大学化学化工学院, 西安 710119)

摘要: 对抗体及多酶负载纳米金的合成、表征及纸上化学发光性能进行了研究, 实验结合了目前的研究成果, 内容涵盖了材料化学、仪器分析、无机合成、胶体化学等方面, 涉及材料和生物分析等领域。本实验还可进行后续癌症标志物免疫分析的拓展实验研究, 可作为8学时的仪器分析综合实验, 给大学三年级的学生开设。

关键词: 综合实验; 纳米金; 辣根过氧化物酶; 化学发光; 纸芯片

中图分类号: G64; O657.3

Synthesis and Characterization of Antibody and Multienzyme Loaded Gold Nanoparticles and Their Chemiluminescence Properties on Paper: An Instrumental Analysis Comprehensive Experiment

LIU Wei* CHU Wei-Ru CHEN Ying LI Hui-Fang

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, P. R. China)

Abstract: The antibody and multienzyme loaded gold nanoparticles were synthesized and characterized. Also, their chemiluminescence properties on paper-based chip were studied. The experimental contents covered the field of materials chemistry, instrumental analysis, inorganic synthesis and colloidal chemistry. What's more, the experiment can be developed for further immunoassay of biomarker detection. The content of this experiment can be used as an instrumental analysis comprehensive experiment for the junior college students.

Key Words: Comprehensive experiment; Gold nanoparticle; Horseradish peroxidase; Chemiluminescence; Paper-based chip

化学是一门实验科学, 在我校的化学类专业学生中, 除了基础的实验教学以外, 越来越注重培养学生的创新意识和创新能力, 因此全面提升大学生的综合素质成为高等教育改革的一个重要目标^[1]。笔者所在的学校从2000年就开始参加全国大学生化学实验邀请赛、全国高师大学生化学实验竞赛以及陕西省大学生化学实验竞赛等各种比赛。笔者作为竞赛的辅导和带队教师已有十余年, 观察到了实验竞赛的一些改革新动向, 同时发现实验竞赛的考查内容越来越多元化, 竞赛对知识的拓展要求也不断提高, 对学生的能动性及动手能力要求越来越高。竞赛除了需要大学生将化学中各学科的知识灵活掌握以外, 还对大学生的综合实验能力提出了更高的要求。

*通讯作者, Email: weiliu@126.com

目前, 在我校的仪器分析实验中, 主要内容集中在光、电及色谱实验上, 虽然也涉及到一些简单的综合实验, 但涉及微米/纳米材料合成及表征的综合实验相对较少。陕西师范大学分析化学的化学发光方向^[1]是最早发展起来的研究方向之一, 章竹君先生等^[2]也对固体表面化学发光现象进行了研究, 很多学生对这一领域表现出浓厚兴趣。鉴于此, 笔者结合以往的科研工作^[4], 设计了抗体和多酶负载纳米金复合物(Ab2-AuNPs-HRP)的合成、制备及相应表征实验, 并研究了该复合物的纸上化学发光现象。通过该实验, 学生不仅可以了解微米/纳米材料以及化学发光的相关基础知识, 还能掌握无机金属纳米颗粒复合物的常见合成方法和常用表征手段, 同时结合相应的化学发光体系, 掌握该复合物的纸上化学发光现象。同时, 本实验还具有后续癌症标志物免疫检测的拓展实验能力, 可为能力强的学生提供进一步研究的空间。此实验可作为大学仪器分析综合化学实验课的内容。

1 实验目的

- (1) 了解金属纳米材料和化学发光的基本知识, 了解化学发光的仪器组成及构造。
- (2) 掌握纳米金粒子及抗体和多酶负载纳米金的制备方案。
- (3) 了解金属纳米材料的常用表征手段, 如透射电子显微镜、动态光散射和紫外-可见吸收光谱, 掌握纳米金上负载多酶的量的计算方法; 了解多酶负载纳米金复合物的纸上化学发光现象。

2 试剂仪器

2.1 试剂

氯金酸(国药集团化学试剂有限公司), 柠檬酸三钠、盐酸、硝酸(西安化学试剂厂), 鲁米诺、辣根过氧化物酶(Sigma 试剂有限公司)、羊抗人 IgG、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗人 IgG(北京索宝科技有限公司)、过氧化氢(上海化学试剂公司), 实验室用水均为二次去离子水。

2.2 仪器

RFL-1 型超微化学发光/生物发光检测仪(西安瑞迈分析仪器有限公司)、透射电子显微镜(日立公司, 规格型号: H-600)、TU-1901 紫外-可见分析仪(岛津公司, 型号: UV-1800)、激光粒度仪(美国贝克曼公司, 型号: BI-90Plus), 电子分析天平(AL104, 上海梅特勒-托利多有限公司)、恒温磁力搅拌器(GL-32593 型, 江苏其林贝尔仪器制造有限公司)、台式冷冻高速离心机(D3024R 型, 西安西浩生物科技有限公司)、纸切割机(CE5000-40-CRP 型, 日本图王公司)。

3 实验原理

作为负载多酶的纳米材料, 纳米金(AuNPs)是首选的信号载体, 由于纳米金容易合成、化学特性稳定, 并且具有高比表面积、小尺寸效应及良好的生物相容性, 可以标记大量的抗体^[5]、酶^[6]、蛋白或其他生物分子, 而被广泛用作酶标信号载体。本实验采用柠檬酸钠还原法合成 13 nm 的纳米金, 然后利用静电吸附作用将辣根过氧化物酶(HRP)和抗体(Ab)负载在纳米金粒子的表面; 再利用 HRP 和纳米金对鲁米诺-过氧化氢化学发光体系的催化作用, 结合笔者的纸芯片研究领域^[7], 考查抗体及 HRP 负载纳米金复合物的纸上化学发光性质。

利用透射电子显微镜(TEM)和激光粒度仪的动态光散射实验(DLS)对合成的 Ab2-AuNPs-HRP 进行表征; 利用紫外-可见吸收光度计对 AuNPs 上吸附的 HRP 的量进行表征和计算; 利用化学发光仪记录纸上的化学发光信号。

4 实验步骤

4.1 纳米金的制备

将合成用的烧杯和磁子在新配制的王水($V(\text{HNO}_3):V(\text{HCl})=1:3$)中充分浸润24 h后,用二次去离子水彻底清洗干净,烘干备用。根据文献报道,AuNPs (13 nm)的合成采用柠檬酸钠还原法^[8]。首先,在烧杯中加入50 mL H_2O ,为了使试剂混合均匀,设置搅拌速度为 $600\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,加入氯金酸溶液(质量浓度为10%, 0.167 mL),加热到煮沸时,将搅拌速度调到最大,立即注入柠檬酸钠溶液($0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 1.94 mL),待混合溶液颜色由淡黄色变为深紫红色最后变为稳定的酒红色后,计时保持此状态8 min后脱离加热器,室温搅拌13 min。冷却后保存在冰箱中($4\text{ }^\circ\text{C}$)备用。

4.2 Ab2-AuNPs-HRP 复合物的合成

取2 mL AuNPs溶液于小烧杯中,用 K_2CO_3 ($1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)微调溶液呈碱性,将其pH最终调为9,羊抗人IgG和HRP混合液共0.1 mL,按体积比1:8加入到纳米金溶液中,均匀搅拌,室温反应2 h。然后 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心30 min ($12000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),目的是除去未标记的羊抗人IgG和HRP。保存冰箱中($4\text{ }^\circ\text{C}$),以备使用。

4.3 Ab2-AuNPs-HRP 复合物的表征及纳米金上吸附的 HRP 的量的计算

取少量产物进行TEM、DLS表征和紫外吸收测定,观察AuNPs和Ab2-AuNPs-HRP复合物的形貌、测定两者的水合半径及紫外吸收峰的位置。

分别取浓度为0.001、0.005、0.01、0.02、0.03、0.05、0.07、0.09、0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的HRP在紫外-可见吸收光度仪上选择403 nm^[9]进行吸光度的测定并做出校准曲线,然后取少量Ab2-AuNPs-HRP复合物进行紫外吸收测定,通过吸光度值计算纳米金上吸附的HRP的量。

4.4 纸芯片的制作及纸上化学发光信号的测定

按照图1的实物图,用Coreldraw X6画图软件画出通道构型,设置切割机切割原点位置后,在whatman 1号滤纸上切割出相应构型的纸上芯片,芯片的左右2个圆形区域分别为直径为6 mm的试剂加样区和检测区域,中间的通道长为18 mm,宽为3 mm。分别吸取5 μL Ab2-HRP和Ab2-AuNPs-HRP复合物滴涂于纸芯片的右边圆形检测区域,然后在进样区域加20 μL 体积比为1:1的 $1.0\times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 鲁米诺和 $1.0\times 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 过氧化氢的混合溶液,溶液沿着进样通道进入到检测区域上,在检测区域上记录相应的化学发光信号。

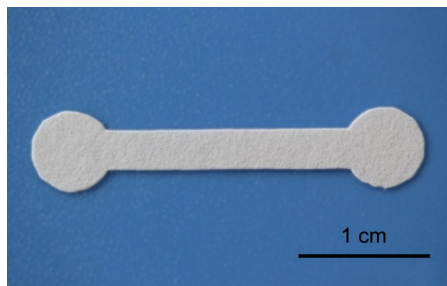


图1 纸芯片构型实物图

5 结果与讨论

5.1 Ab2-AuNPs-HRP 复合物的表征

将合成好的纳米金及Ab2-AuNPs-HRP复合物进行TEM表征,同时用DLS测定水合半径,结果如图2所示。从图上可以看出,13 nm的AuNPs及Ab2-AuNPs-HRP复合物均分散均匀,DLS结果显示Ab2-AuNPs-HRP复合物的水合半径(40.26 nm)比AuNPs的水合半径(32.43 nm)有所增大。

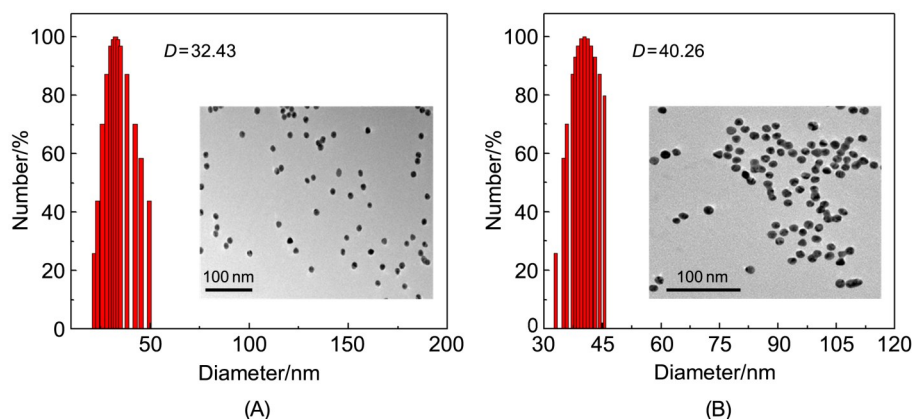


图2 纳米金(A)及Ab2-AuNPs-HRP复合物(B)的TEM和DLS

5.2 Ab2-AuNPs-HRP复合物的紫外吸收性质表征

将纳米金和合成的Ab2-AuNPs-HRP复合物进行了UV-Vis吸收光谱分析。如图3所示，与裸露的纳米金相比，Ab2-AuNPs-HRP的紫外-可见吸收光谱的吸收强度增大，吸收峰变宽，并且最大吸收波长发生了红移，从514.5 nm红移到517.0 nm，这表明HRP和Ab2均已结合在纳米金上。同样，可以看到另一吸收峰在278.0 nm，这是蛋白的特征吸收峰，说明蛋白与纳米金发生了有效结合。

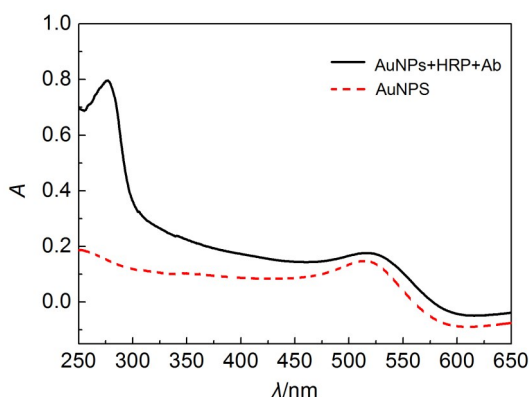


图3 AuNPs和Ab2-AuNPs-HRP的复合物的紫外-可见吸收光谱图

5.3 标记在纳米金上的HRP浓度计算

HRP标记在纳米金上的浓度可以通过HRP的标准曲线计算得出(图4)。图4是HRP浓度在0.001、0.005、0.01、0.02、0.03、0.05、0.07、0.09、0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时的线性关系图，当HRP/Ab2的体积比为8:1时，测得复合物的紫外吸收强度为0.909，代入标准曲线方程可得，标记在纳米金上的HRP的浓度为 $8.07 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，而合成的13 nm的纳米金的浓度为 $1.7 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，通过计算，纳米金上标记的HRP的个数为4.7，即每个13 nm的纳米金上大约标记4-5个HRP分子^[4]。

5.4 Ab2-AuNPs-HRP复合物的纸上化学发光信号

用图1所示纸芯片记录Ab2-AuNPs-HRP复合物在鲁米诺化学发光体系中的纸上化学发光信号，结果如图5所示。从图上可以看出，由于纸上毛细作用使化学发光试剂缓慢到达检测区域，整个发光反应的时间增长，而同样的体系在传统的液相化学发光体系中发光速度快、时间短。与裸露的AuNPs的纸上化学发光信号和Ab-HRP的纸上化学发光信号相比较，Ab2-AuNPs-HRP复合物的纸上化学发光信号明显增强，并且到达化学发光信号平台的时间短。

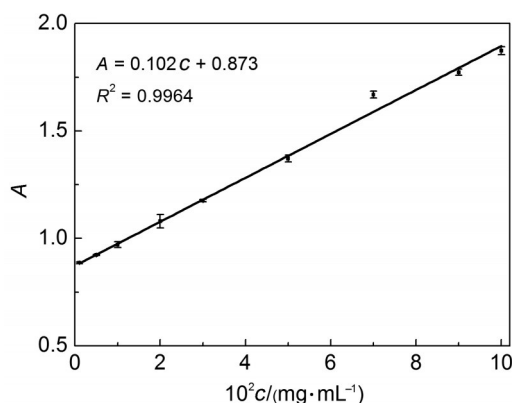


图4 HRP与紫外吸光度值的线性关系图

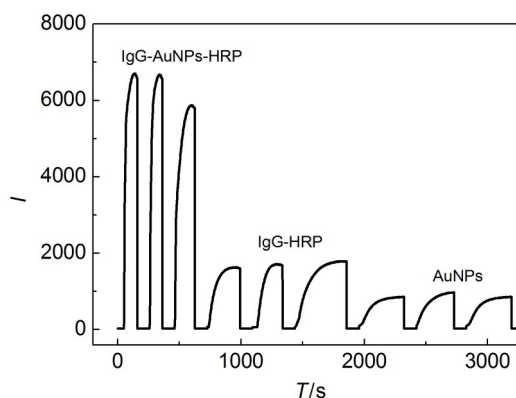


图5 AuNPs、Ab2-HRP和Ab2-AuNPs-HRP复合物的纸上化学发光现象

6 结 语

本文设计了抗体和多酶负载纳米金的合成、表征及纸上化学发光性能研究的仪器分析综合实验。通过该实验,使学生掌握紫外-可见吸收仪、化学发光仪、透射电镜、激光粒度仪的基本构造和使用步骤,可以锻炼学生的综合实验素养和能力;同时,可根据实际学时,让学生自主改变抗体和多酶的比例进行合成探索,也可以进行后续的免疫分析拓展实验研究。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国教育部. 中国大学教学, **2005**, No. 2, 4.
- [2] 章竹君. 化学通报, **1976**, No. 4, 30.
- [3] 杨维平, 章竹君. 陕西师范大学学报(自然科学版), **1993**, 21 (3), 42.
- [4] Li, H. F.; Zhao, M.; Liu, W.; Chu, W. R.; Guo, Y. M. *Talanta* **2016**, 147, 430.
- [5] Sung, Y. J.; Suk, H. J.; Sung, H. Y.; Li, T. H.; Poo, H.; Kim, M. G. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 43, 432.
- [6] Jia, C. P.; Zhong, X. Q.; Hua, B.; Liu, M. Y.; Jing, F. X.; Lou, X. H.; Yao, S. H.; Xiang, J. Q.; Jin, Q. H.; Zhao, J. L. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24 (9), 2836.
- [7] Liu, W.; Cassano, C. L.; Xu, X.; Fan, Z. H. *Anal. Chem.* **2013**, 85 (21), 10270.
- [8] Grabar, K. C.; Freeman, R. G.; Hommer, M. B.; Natan, M. J. *Anal. Chem.* **1995**, 67 (4), 735.
- [9] 曹洪玉, 王 珍, 唐 乾, 郭相金, 郑学仿. 大连大学学报, **2015**, 36 (3), 76.