

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C12N 9/02 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610057413.9

[43] 公开日 2007年9月19日

[11] 公开号 CN 101037676A

[22] 申请日 2006.3.13

[21] 申请号 200610057413.9

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路 15 号

[72] 发明人 阎锡蕴 高利增 聂 棱 王太宏

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司  
代理人 陈 平

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 7 页

### [54] 发明名称

磁性纳米材料的新功能及新用途

### [57] 摘要

本发明发现磁性纳米材料具有蛋白酶的催化活性。磁性纳米材料在  $H_2O_2$  存在下, 能够与 DAB, TMB 等辣根过氧化物酶的底物反应, 生成与过氧化物酶相同的反应产物, 从而产生与过氧化物酶相类似的催化作用。与蛋白酶比较, 磁性纳米的酶活性具有更多的优越性, 因为磁性纳米材料可以大批量制备, 成本低廉, 而且室温保存更稳定, 易于修饰和标记。磁性纳米材料的酶催化活性不仅可以直接应用于过氧化物酶所应用的范围, 如作为标记分子应用于各种检测系统中分子识别和信号放大, 而且还可以将磁性纳米材料的磁性与酶学活性相结合, 实现分离与检测一体化。这一新功能的发现, 赋予磁性纳米材料更多的新用途。

1. 磁性纳米材料作为过氧化物酶的应用。

2. 根据权利要求 1 所述的应用，其中将磁性纳米材料用于直接分离和鉴定细胞、核酸和蛋白质；工业催化和发酵；监测环境中有害物质；净化污水；或预防和控制与自由基相关的疾病。

3. 根据权利要求 2 所述的应用，包括以下步骤：

在  $H_2O_2$  水溶液的存在下，磁性纳米材料催化过氧化物酶的底物，生成相应的产物，其中磁性纳米材料中包含的铁在  $H_2O_2$  存在下，催化  $H_2O_2$  产生的自由基，所述的自由基与氢供体底物反应，导致氢供体生成有色或发光产物。

4. 根据权利要求 1-3 中任何一项所述的应用，其中所述的磁性纳米材料为  $Fe_3O_4$  磁性纳米颗粒。

5. 根据权利要求 3 所述的应用，其中  $H_2O_2$  在反应混合物中的浓度为  $0.2 \mu M$  至  $1.3 \mu M$ ，并且磁性纳米材料催化过氧化物酶的底物的反应是在 pH 3-6、 $25-55^\circ C$  的温度下进行的。

6. 根据权利要求 1 所述的应用，其中所述的磁性纳米材料的粒径为 1-3000nm。

7. 根据权利要求 1 所述的应用，其中所述的磁性纳米材料是被聚乙二醇、葡聚糖、二氧化硅、羟基和氨基修饰的。

8. 根据权利要求 1 所述的应用，其中所述的过氧化物酶为辣根过氧化物酶。

9. 一种将磁性纳米材料用于检测和分离蛋白的方法，该方法包括以下步骤：

磁性纳米材料标记蛋白；

标记蛋白后的磁性纳米材料与其它蛋白结合；

在  $H_2O_2$  水溶液的存在下，其中磁性纳米材料中包含的铁在  $H_2O_2$  存在下，催化  $H_2O_2$  产生自由基与过氧化物酶底物反应，导致显色反应，从而检测蛋白的结合。

10. 一种将磁性纳米材料用于检测和分离核酸的方法，该方法包括以下步骤：

磁性纳米材料标记抗生物素蛋白；和

标记抗生物素蛋白后的磁性纳米材料在  $H_2O_2$  水溶液的存在下，与生物素化的 DNA 探针分子结合，

其中磁性纳米材料中包含的铁在  $H_2O_2$  存在下，催化  $H_2O_2$  产生自由基与底物反应，导致显色，从而检测核酸的结合。

## 磁性纳米材料的新功能及新用途

### 技术领域

本发明属于纳米材料学、纳米生物学和纳米医学研究领域。更具体而言，本发明涉及磁性纳米材料作为过氧化物酶的应用。

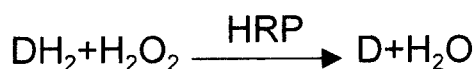
### 背景技术

磁性纳米材料指具有磁响应性的纳米材料，在外加磁场的作用下这些纳米材料具有强的磁响应信号。常用的磁性纳米材料为三氧化二铁、四氧化三铁、铁钴合金等。磁性材料可通过不同的方法制备出不同尺度(1-1000 nm)和不同形貌的纳米结构，如零维的纳米颗粒，一维的纳米线、纳米棒，二维的纳米薄膜，三维的纳米锥等，还可利用有机高分子包埋技术在磁性纳米颗粒的基础上制备微米级的磁性微球。

磁性纳米材料具有较好的磁响应性，在生物医学和电子等方面应用前景广泛，尤其是生物医药领域。(1)通过DNA或蛋白质分子偶联到磁性纳米材料表面，结合纳米材料的磁性可以制备亲和层析用于生物样品的快速分离和高效纯化(参见，J. M. Nam, C. S. Thaxton, C. A. Mirkin, *Science* **301**, 1884 (2003); Q. A. Pankhurst<sup>1</sup>, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36**, R167 (2003); 和I. Safarik, M. Safarikova, *Biomagn Res Technol.* **2**, 7 (2004)); (2)通过磁性纳米材料表面进行合适的化学修饰，使材料表面的电荷发生改变，或者特定的化学基团，可以将药物分子或基因结合在材料表面，利用外加磁场的导向，可以将药物或外源基因向特定的部位进行输送，从而实现药物或基因的靶向运输(参见，J. Panyam, V. Labhasetwar, *Adv Drug Del Rev* **55**, 329 (2003); 和S. N. Morishita, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* **334**, 1121 (2005)); (3)磁性纳米颗粒可以用于活体或细胞水平的磁共振成像，建立高空间分辨率的活体实时成像技术，已经进入临床用于活体成像诊断(参见，M. G.

Harishngani, *et al.*, *N. Engl. J. Med.* **348**, 2491 (2003); A. S. Arbab, *et al.*, *Radiology* **229**, 838 (2003); 和I. J. de Vries, *et al.*, *Nat Biotechnol.* **23**, 1407 (2005)); (4)磁性纳米材料可以用于肿瘤的治疗, 通过药物靶向和磁靶向把磁性纳米颗粒集中在肿瘤部位, 在外加磁场的作用下, 磁性纳米颗粒可以产生高热, 杀死肿瘤部位的细胞, 实现肿瘤治疗的目的(参见, A. Ito, *et al.*, *Cancer Lett.* 212, 167 (2004); 和F. Sonvico, *et al.*, *Bioconjug Chem.* **16**, 1181 (2005))。上述磁性纳米材料的应用都是利用了纳米材料的磁性特征。

辣根过氧化物酶(HRP)是免疫酶标技术中最为常用的工具酶之一, 常用于标记抗体, 在酶联免疫分析、免疫印迹和免疫组化等技术。这种酶含有正铁原卟啉(血红素), 能利用过氧化氢( $H_2O_2$ )氧化供氢体( $DH_2$ , 多为无色的还原型染料), 通过反应可生成有色的氧化型染料(D)。酶促反应的过程如下:



HRP的这种催化功能主要是借助正铁原卟啉中的铁实现其催化功能的(参见洪伟杰等, *生命的化学*, 25, 33 (2005)), 而磁性纳米颗粒中含有丰富的铁, 所以具备过氧化物酶催化功能的物质基础。

## 发明内容

本发明突破了磁性纳米材料的磁性物理特征, 首次发现这种磁性纳米材料具有蛋白酶的催化活性, 能够催化过氧化氢或其它过氧化物, 从而产生与过氧化物酶相类似的催化功能, 这种催化机理遵循的是 Fenton 反应机理(参见 V. Kavitha, *et al.* *Chemosphere* **55**, 1235 (2004)), 即在铁离子存在下, 可以催化  $H_2O_2$  产生自由基。通过对磁性纳米材料酶学行为的研究以及与过氧化物酶的比较, 确定磁性纳米材料具有过氧化物酶的酶

学活性。

因此，本发明提供以下：

(1) 磁性纳米材料作为过氧化物酶的应用。

(2) 根据上面(1)所述的应用，其中将磁性纳米材料用于直接分离和鉴定细胞、核酸和蛋白质；工业催化和发酵；监测环境中有害物质；净化污水；或预防和控制与自由基相关的疾病。

(3) 根据上面(2)所述的应用，包括以下步骤：

在  $H_2O_2$  水溶液的存在下，磁性纳米材料催化过氧化物酶的底物，生成相应的产物，其中磁性纳米材料中包含的铁在  $H_2O_2$  存在下，催化  $H_2O_2$  产生的自由基，所述的自由基与氢供体底物反应，导致氢供体生成有色或发光产物。

(4) 根据上面(1)-(3)中任何一项所述的应用，其中所述的磁性纳米材料为  $Fe_3O_4$  磁性纳米颗粒。

(5) 根据上面(3)所述的应用，其中  $H_2O_2$  在反应混合物中的浓度为 0.2  $\mu M$  至 1.3  $\mu M$ ，并且磁性纳米材料催化过氧化物酶的底物的反应是在 pH 3-6、25-55°C 的温度下进行的。

(6) 根据上面(1)所述的应用，其中所述的磁性纳米材料的粒径为 1-3000nm。

(7) 根据上面(1)所述的应用，其中所述的磁性纳米材料是被聚乙二醇、葡聚糖、二氧化硅、羟基和氨基修饰的。

(8) 根据上面(1)所述的应用，其中所述的过氧化物酶为辣根过氧化物酶。

(9) 一种将磁性纳米材料用于检测和分离蛋白的方法，该方法包括以下步骤：

磁性纳米材料标记蛋白；

标记蛋白后的磁性纳米材料与其它蛋白结合；

在  $H_2O_2$  水溶液的存在下，其中磁性纳米材料中包含的铁在  $H_2O_2$  存在下，催化  $H_2O_2$  产生自由基与过氧化物酶底物反应，导致显色反应，从而检测蛋白的结合。

(10) 一种将磁性纳米材料用于检测和分离核酸的方法，该方法包括以下步骤：

磁性纳米材料标记抗生物素蛋白；和

标记抗生物素蛋白后的磁性纳米材料在  $H_2O_2$  水溶液的存在下，与生物素化的 DNA 探针分子结合，

其中磁性纳米材料中包含的铁在  $H_2O_2$  存在下，催化  $H_2O_2$  产生自由基与底物反应，导致显色，从而检测核酸的结合。

通过对磁性纳米材料酶学行为的研究以及与过氧化物酶的比较，确定磁性纳米材料具有过氧化物酶的酶学活性。这一新功能的发现，使磁性纳米材料集磁性和催化活性为一体，丰富了磁性纳米材料的新用途，将推动磁性纳米颗粒在生物医学等领域的应用。例如(1)利用磁性纳米材料的磁性和催化活性，直接分离和鉴定细胞、核酸和蛋白质等生物样品；(2)利用磁性纳米材料的催化活性，应用于过氧化物酶所应用的工业催化和发酵；(3)利用磁性纳米材料的酶催化活性，监测环境中有害物质，应用于污水净化等；(4)磁性纳米材料应用于与自由基相关的疾病预防和控制。

## 附图说明

图 1. 磁性纳米颗粒催化底物 TMB 反应产生颜色产物，其中 A. 不同尺度和形貌的磁性纳米材料；B. 磁性磁性纳米颗粒在  $H_2O_2$  存在的条件下，催化 TMB 产生颜色反应；C. 磁性磁性纳米颗粒催化反应原理。

图 2.  $Fe_3O_4$  磁性纳米颗粒催化 TMB 的表观酶促动力学曲线，其中  $Fe_3O_4$  NP 指  $Fe_3O_4$  磁性纳米颗粒，HRP 指辣根过氧化物酶作对照。

图 3.  $Fe_3O_4$  磁性纳米颗粒催化 TMB 随  $H_2O_2$  的变化，其中  $Fe_3O_4$  NP 指  $Fe_3O_4$  磁性纳米颗粒，HRP 指辣根过氧化物酶作对照。

图 4.  $Fe_3O_4$  磁性纳米颗粒催化 TMB 在不同 pH 体系中的变化，其中  $Fe_3O_4$  NP 指  $Fe_3O_4$  磁性纳米颗粒，HRP 指辣根过氧化物酶作对照。

图 5.  $Fe_3O_4$  磁性纳米颗粒催化 TMB 随温度的变化，其中  $Fe_3O_4$  NP 指  $Fe_3O_4$  磁性纳米颗粒，HRP 指辣根过氧化物酶作对照。

图 6. 不同尺度的磁性纳米材料都具有过氧化物酶活性，但磁性纳米

颗粒尺度与酶活性成反比，尺度越小，酶活性越高。

图 7. 不同基团修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒均具有过氧化物酶催化活性，然而不同基团修饰后的磁性纳米颗粒显示出不同的酶活性。

图 8. 磁性纳米颗粒作为标记物可直接用于探测蛋白质分子相互识别。

图 9. protein A 标记的磁性纳米颗粒在 ELISA 中的应用。NP-protein A/BSA 作阴性对照，NP-protein A/mIgG 指利用  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒探测 protein A 与 mIgG 的识别，HRP-GAmIgG/biotin-mIgG 作为阳性对照。

图 10. 磁性纳米颗粒作为标记物可直接用于探测核酸分子相互识别。

图 11. avidin 标记的磁性纳米颗粒用于核酸的检测，其中 NP-avidin 指 avidin 偶联的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒，NP-avidin/biotin-DNA 指  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒直接用于检测核酸分子，HRP-avidin/biotin-DNA 作为阳性对照。

图 12 示意  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒用于分离和检测 mIgG。

图 13.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒分离和检测 mIgG，其中 NP-protein A/BSA 作阴性对照，NP-protein A-biotin-mIgG 指  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒先分离 biotin-mIgG 然后再检测，HRP-GAmIgG/biotin-mIgG 作为阳性对照。

图 14.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒分离和检测核酸。

图 15.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒分离和检测核酸分子，其中 NP-avidin 作阴性对照，NP-avidin-biotin-probe 指  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒先分离 biotin-DNA 然后再检测，HRP-avidin/biotin-DNA 作为阳性对照。

## 具体实施方式

### 实施例一、磁性纳米材料具有催化活性

试剂：3,3,5,5-四甲基联苯胺(3,3,5,5-Tetramethylbenzidine, TMB), 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7, >300 units/mg), 购自 Sigma-Aldrich Inc. (USA)。30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 和醋酸钠以及 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米颗粒合成材料均购自北京化学试剂公司。使用的磁性纳米材料是由水热法合成(参见, W. Q. Jiang, H. C. Yang, S. Y. Yang, H. E. Horng, J. C. Hung, Y. C. Chen, C. Y. Hong, *J. Magn. Magn. Mater.* **283**, 210 (2004); 和 H. Deng, X.



L. Li, Q. Peng, X. Wang, J. P. Chen, Y. D. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 2782 (2005))。

**方法:** 取 20  $\mu\text{g}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米材料(25nm, 150nm, 300nm, 2300nm), 溶于 500  $\mu\text{l}$  的 0.2 M 醋酸钠缓冲液(pH 4.5), 加入 32  $\mu\text{l}$  的 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 10 $\mu\text{l}$  TMB(10 mg/ml, 溶于二甲亚砜), 观察颜色反应。

**结果:** 在  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米材料、 $\text{H}_2\text{O}_2$  和 TMB 三者都存在时, 溶液出现蓝色反应(图 1B), 只有  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米材料和  $\text{H}_2\text{O}_2$  时没有颜色反应, 只有  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米材料和 TMB 时没有颜色反应, 只有  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 TMB 时没有颜色反应。磁性纳米材料包括不同尺度大小, 也包括不同形貌(图 1A), 表明磁性纳米材料在  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在下催化 TMB 产生蓝色反应, 遵循 Fenton 催化反应机理(图 1C)。

#### 实施例二、磁性纳米材料具有过氧化物酶的催化活性

**试剂:** 3,3,5,5-四甲基联苯胺(3,3,5,5-Tetramethylbenzidine, TMB), 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7, >300 units/mg), 购自 Sigma-Aldrich Inc. (USA)。30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 和醋酸钠以及 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米材料合成材料均购自北京化学试剂公司。使用的磁性纳米材料是 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米颗粒由水热法合成(参见, W. Q. Jiang, H. C. Yang, S. Y. Yang, H. E. Horng, J. C. Hung, Y. C. Chen, C. Y. Hong, *J. Magn. Magn. Mater.* **283**, 210 (2004); 和 H. Deng, X. L. Li, Q. Peng, X. Wang, J. P. Chen, Y. D. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 2782 (2005)), 纳米粒子直径300 nm。

**方法:** 在每个反应体系中, 取 20  $\mu\text{g}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒, 溶于 500  $\mu\text{l}$  的 0.2 M 醋酸钠缓冲液(pH 4.5), 加入 32  $\mu\text{l}$  的 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 分别加入不同容量(0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{l}$ )的 TMB 溶液(10 mg/ml, 溶于 DMSO), 日立 UV2010 紫外可见分光光度计检测 652 nm 下的光吸收值, 时间扫描 600 s, 反应温度 25  $^\circ\text{C}$ 。辣根过氧化物酶(0.2 ng)也在同样条件下监测催化 TMB 的过程。

**结果:** 以反应最初 20 秒内 652nm 光吸收值的变化作图, 计算其斜率, 即可得到反应初速度  $v$ , 然后以 TMB 摩尔浓度为横坐标, 以  $v$  为纵坐标作图, 经 origin 处理得到酶促反应动力学曲线。米氏方程

$$v=V_{\max} \times [S]/(K_m+[S])$$

分析发现,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒表观酶促催化动力学曲线与 HRP 酶促动力学一致, 计算得到的表观米氏常数  $K_m$  ( $111.3 \pm 0.154 \mu\text{M}$ ) 要小于 HRP 的  $K_m$  ( $492.8 \pm 3.91 \mu\text{M}$ ), 表明底物与  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒的结合要优于 HRP (图 2)。表明  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒具有与 HRP 相似的活性, 表明  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒具有过氧化物酶活性, 分析表明一个  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒的催化能力相当于约 45 个 HRP 分子。

### 实施例三、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 调节 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米颗粒催化酶学反应

**试剂:** 3,3,5,5-四甲基联苯胺(3,3,5,5-Tetramethylbenzidine, TMB), 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7, >300 units/mg), 购自 Sigma-Aldrich Inc. (USA)。30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  和醋酸钠以及  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒合成材料均购自北京化学试剂公司。 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒大小直径为 300 nm。

**方法:** 取 20  $\mu\text{g}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒, 溶于 500  $\mu\text{l}$  的 0.2 M 醋酸钠缓冲液(pH 4.5), 加入适量的 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 然后加入 10  $\mu\text{l}$  的 10 mg/ml 的 TMB(溶于二甲亚砜), 日立 UV2010 紫外可见分光光度计检测 652 nm 下的光吸收值, 时间扫描 600s, 反应温度 25  $^\circ\text{C}$ 。 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒催化, 加入 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\mu\text{l}$ ) 浓度梯度: 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128。辣根过氧化物酶(0.2 ng)也在同样条件下监测催化 TMB 的过程, 加入 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\mu\text{l}$ ) 浓度梯度: 0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4。

**结果:** 以反应最初 20 秒内 652 nm 光吸收值的变化作图, 计算其斜率, 即可得到反应初速度  $v$ , 然后加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  量换算成的摩尔浓度为横坐标, 以  $v$  为纵坐标作图,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的最适浓度在 0.2-1.3  $\mu\text{M}$  之间, 在  $\text{H}_2\text{O}_2$  低于 0.2  $\mu\text{M}$  时催化反应速度较低, 当  $\text{H}_2\text{O}_2$  高于 1.3  $\mu\text{M}$  时催化反应受到抑制。而对于 HRP, 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的最适浓度在 2.0-9.0 nM 之间。 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒与 HRP 在催化反应中对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的反应基本一致, 但前者在催化反应中需要的  $\text{H}_2\text{O}_2$  要远高于后者(图 3), 同时表明  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒清除  $\text{H}_2\text{O}_2$  的能力要高于 HRP。

#### 实施例四、反应溶液 pH 调节 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒催化酶学反应

试剂：3,3,5,5-四甲基联苯胺(3,3,5,5-Tetramethylbenzidine, TMB), 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7, >300 units/mg), 购自 Sigma-Aldrich Inc. (USA)。30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和醋酸钠以及 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒合成材料均购自北京化学试剂公司。Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒大小直径为 300 nm。

方法：取 20 μg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒，溶于 500 μl 的 0.2 M 醋酸钠缓冲液，加入 0.5 μl 的 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，然后加入的 10 μl 的 10 mg/ml 的 TMB(溶于 DMSO)，日立 UV2010 紫外可见分光光度计检测 652 nm 下的光吸收值，时间扫描 600 s，反应温度 25 °C。0.2 M 醋酸钠缓冲液(pH): 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5, 10.5。辣根过氧化物酶(0.2 ng)也在同样条件下监测催化 TMB 的过程。

结果：以反应最初 20 秒内 652 nm 光吸收值的变化作图，计算其斜率，即可得到反应初速度 v，然后以 pH 为横坐标，以 v 为纵坐标作图，发现 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒催化反应缓冲液最适 pH 在 3.5-5.5 之间，当 pH 低于 3 或高于 6 时，反应受到抑制，HRP 催化反应缓冲液最适 pH 在 3.5-5.5 之间。这表明 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒与 HRP 的最适 pH 值范围一致(图 4)，进一步表明 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒具有过氧化物酶活性。

#### 实施例五、温度调节 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒催化酶学反应

试剂：3,3,5,5-四甲基联苯胺(3,3,5,5-Tetramethylbenzidine, TMB), 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7, >300 units/mg), 购自 Sigma-Aldrich Inc. (USA)。30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和醋酸钠以及 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒合成材料均购自北京化学试剂公司。Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒大小直径为 300 nm。

方法：取 20 μg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒，溶于 500 μl 的 0.2 M 醋酸钠缓冲液(pH4.5)，加入 32 μl 的 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，然后加入 10 μl 的 10 mg/ml 的 TMB，日立 UV2010 紫外可见分光光度计检测 652 nm 下的光吸收值，时间扫描 600 s。温度处理(°C): 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55。辣根过氧化物酶(0.2

ng)也在同样条件下监测催化 TMB 的过程。

**结果:** 以反应最初 20 秒内 652 nm 光吸收值的变化作图, 计算其斜率, 即可得到反应初速度  $v$ , 然后以温度浓度为横坐标, 以  $v$  为纵坐标作图, 发现  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒和 HRP 对反应温度的敏感性一致, 其最适温度基本一致 (图 5), 进一步表明  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒具有过氧化物酶活性。

#### 实施例六、不同尺度的磁性纳米材料具有过氧化物酶的催化活性

**试剂:** 3,3,5,5-四甲基联苯胺(3,3,5,5-Tetramethylbenzidine, TMB), 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7, >300 units/mg), 购自 Sigma-Aldrich Inc. (USA)。30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 和醋酸钠以及 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米颗粒合成材料均购自北京化学试剂公司。

使用的磁性纳米材料 150 nm 和 300 nm 的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒由水热法合成, 25nm 的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒由共沉淀法合成(参见, W. Q. Jiang, H. C. Yang, S. Y. Yang, H. E. Horng, J. C. Hung, Y. C. Chen, C. Y. Hong, *J. Magn. Magn. Mater.* **283**, 210 (2004); 和 H. Deng, X. L. Li, Q. Peng, X. Wang, J. P. Chen, Y. D. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 2782 (2005))。

**方法:** 取 300 nm 大小的 20  $\mu\text{g}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒, 溶于 500  $\mu\text{l}$  的 0.2 M 醋酸钠缓冲液(pH 4.5), 加入 32 $\mu\text{l}$  的 30% $\text{H}_2\text{O}_2$ , 然后加入 10  $\mu\text{l}$  的 10 mg/ml 的 TMB(溶于二甲亚砜), 日立 UV2010 紫外可见分光光度计检测 652 nm 下的光吸收值, 时间扫描 400 s, 反应温度 25  $^\circ\text{C}$ 。150 nm 和 25 nm 的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒进行相同的操作

**结果:** 25 nm、150 nm 和 300 nm 的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒均具有过氧化物酶催化活性, 在相同质量时, 催化活力 25 nm>150 nm>300 nm(图 6)

#### 实施例七、不同修饰的磁性纳米材料具有过氧化物酶活性

**试剂:** 葡聚糖(Dextran-40), 聚乙二醇(polyethylene glycol 8000, PEG-8000), 3,3,5,5-四甲基联苯胺(3,3,5,5-Tetramethylbenzidine, TMB), 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7, >300 units/mg), 购自 Sigma-Aldrich Inc. (USA)。30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 和醋酸钠以及 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米颗粒合

成材料及修饰均购自北京化学试剂公司。

**方法:**  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒 PEG 和 Dextran 修饰参见文献[11],  $\text{SiO}_2$  和  $\text{NH}_2$  修饰参见文献(P.Tartaj, T. Gonzalez-Carreno, C. J. Serna, *Adv Mater* **13**, 1620 (2001))。取不同修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒各 20  $\mu\text{g}$ , 分别溶于 500  $\mu\text{l}$  的 0.2 M 醋酸钠缓冲液(pH 4.5), 加入 32 $\mu\text{l}$  的 30% $\text{H}_2\text{O}_2$ , 然后加入 10  $\mu\text{l}$  的 10 mg/ml 的 TMB(溶于二甲亚砜), 日立 UV2010 紫外可见分光光度计检测 652 nm 下的光吸收值, 时间扫描 400 s, 反应温度 25  $^\circ\text{C}$ 。

**结果:** 不同基团修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒均具有过氧化物酶催化活性(图 7)。然而, 不同的修饰材料影响其酶活性。无修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒酶活性最高, 其次是葡聚糖修饰高于聚乙二醇修饰, 二氧化硅和氨基修饰的磁性纳米颗粒酶活力最低。

#### 实施例八、磁性纳米颗粒标记用于蛋白检测

由于  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒具备了 HRP 的酶催化功能, 所以可以应用于 HRP 所应用的领域, 取代 HRP 用来标记生物分子, 实现放大信号的检测功能。如图 8 示意。

**试剂:** 葡聚糖(Dextran-40), 羧基二咪唑(carboxyl diimidazole, CDI), 鼠 IgG (mouse immunoglobulin G, mIgG), 金黄色葡萄球菌蛋白 A (protein A), 生物素(NHS-biotin), 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (HRP labeled goat anti-mouse IgG, HRP-GAmIgG), 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB), 购自 Sigma-Aldrich Inc. (USA)

**方法:**  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒的葡聚糖(Dextran)修饰参见参考文献(W. Q. Jiang, H. C. Yang, S. Y. Yang, H. E. Horng, J. C. Hung, Y. C.)。我们使用的葡聚糖 Dextran-40。利用 carboxyl diimidazole (CDI)将  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒上 Dextran-40 中的羟基活化, 然后加入 protein A 使活化的羟基与蛋白中的氨基反应, 通过这种共价偶联使 protein A 固定在  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒表面, 形成复合物 NP-protein A。后者与酶标二抗类似, 能够通过一抗的结合, 直接发生显色反应。这种 protein A 修饰的磁性纳米颗粒可应用于 ELISA、western blot 和免疫组织化学等免疫反应。例如, 在 ELISA 实验中, 将鼠 IgG (mIgG)包被在 ELISA 免疫 96 孔中, 经 3% BSA 封闭

1 小时, 加入 NP-protein A 在 37 °C 作用 1 小时, 然后加入 100  $\mu$ l 显色液(配方: 500  $\mu$ l 的 0.2 M 醋酸钠缓冲液(pH 4.5), 加入 32  $\mu$ l 的 30%  $H_2O_2$  和 10  $\mu$ l 的 10 mg/ml 的 TMB)室温显色 10 min, 加入 50  $\mu$ l 2 M  $H_2SO_4$  终止反应, 450 nm 下检测光吸收值。HRP 标记的羊抗鼠(HRP-GAmIgG)在本实验中作为阳性对照。牛血清白蛋白(BSA)包被的孔作阴性对照。

**结果:**  $Fe_3O_4$  磁性纳米颗粒标记 protein A (NP-protein A)后, 能够与鼠抗体结合并发生显色反应, 其 OD450 吸收值与 HRP-羊抗鼠二抗显色的光吸收值相当 (图 9), 表明  $Fe_3O_4$  磁性纳米颗粒可以用于的 HRP 所应用的 ELISA 等各种免疫检测和临床诊断。

#### 实施例九、 $Fe_3O_4$ 磁性纳米颗粒标记用于核酸检测

由于 $Fe_3O_4$ 磁性纳米颗粒具备HRP的酶催化功能, 所以可以应用于HRP所应用的领域, 取代HRP用来标记生物分子, 实现放大信号的检测功能。图10示意磁性纳米颗粒标记用于核酸检测。

**试剂:** 葡聚糖(Dextran-40), 羧基二咪唑 (carboxyl diimidazole, CDI), 鼠IgG (mouse immunoglobulin G, mIgG), 亲和素(avidin), 生物素(NHS-biotin), 辣根过氧化物酶标记的亲和素 (HRP-avidin), 3,3,5,5-四甲基联苯胺(3,3,5,5-Tetramethylbenzidine, TMB), 购自 Sigma-Aldrich (USA). Biotin-probe DNA (biotin-5'-ATCCTTATCAATATT-3') 由赛泰克公司(中国)合成。

**方法:**  $Fe_3O_4$  磁性纳米颗粒的葡聚糖(Dextran)修饰参见参考文献(W. Q. Jiang, H. C. Yang, S. Y. Yang, H. E. Horng, J. C. Hung, Y. C.). 我们使用的葡聚糖 Dextran-40。利用羧基二咪唑(carboxyl diimidazole, CDI)将  $Fe_3O_4$  磁性纳米颗粒上 Dextran-40 中的羟基活化, 然后加入亲和素 avidin 使活化的羟基与 avidin 中的氨基反应, 通过这种共价偶联使 avidin 固定在  $Fe_3O_4$  磁性纳米颗粒表面, 得到 NP-avidin 复合物。在 ELISA 实验中, 将生物素化的 DNA 探针分子(biotin-DNA)包被在 ELISA 免疫 96 孔中, 经 3% BSA 封闭 1 小时, 加入 NP-avidin 在 37 °C 作用 1 小时, 然后加入 100  $\mu$ l 显色液(配方: 500  $\mu$ l 的 0.2 M 醋酸钠缓冲液(pH4.5), 加入 32  $\mu$ l 的 30%  $H_2O_2$  和 10  $\mu$ l 的 10 mg/ml 的 TMB)室温显色 10 min, 加入 50  $\mu$ l 2 M  $H_2SO_4$  终

止反应，450 nm 下检测光吸收值。HRP-avidin 在本实验中作为阳性对照。BSA 包被的孔作阴性对照。

**结果：**Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒标记 avidin 后，能够与生物素化的 DNA 探针分子(biotin-DNA)结合并产生显色反应，其 OD450 吸收值与 HRP-avidin 显色的光吸收值相当 (图 11)，表明 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒可以用于核酸的检测。

### 实施例十、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒分离—检测蛋白

由于 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒具备磁性和催化双重功能，而磁性使它具备了分离 DNA、蛋白质、细胞等功能，所以将磁性与酶催化活性相结合可以实现分离与检测的一体化，即分离—检测“separation-detection”。如图 12 示意 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒用于分离和检测 mIgG。

**试剂：**葡聚糖(Dextran-40)，羧基二咪唑(carboxyl diimidazole, CDI)，鼠 IgG (mouse immunoglobulin G, mIgG)，protein A，生物素(NHS-biotin)，辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (HRP labeled goat anti-mouse IgG, HRP-GAmIgG)，3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB)，购自 Sigma-Aldrich Inc. (USA)

**方法：**Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒的葡聚糖(Dextran)修饰参见参考文献(W. Q. Jiang, H. C. Yang, S. Y. Yang, H. E. Horng, J. C. Hung, Y. C.)。我们使用的葡聚糖 Dextran-40。利用 carboxyl diimidazole (CDI)将 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒上 Dextran-40 中的羟基活化，然后加入 protein A 使活化的羟基与蛋白中的氨基反应，通过这种共价偶联使 protein A 固定在 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒表面，形成复合物 NP-protein A。将 biotin-mIgG 与 BSA 混合，加入 NP-protein A，37 °C 作用 1 小时，然后收集 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒，PBS 洗涤三次，得到 NP-protein A-biotin-mIgG 复合物，然后将复合物加入到 avidin 包被的免疫 96 孔中，在 37 °C 作用 1 小时，然后加入 100 μl 显色液(配方：500 μl 的 0.2 M 醋酸钠缓冲液 (pH 4.5)，加入 32 μl 的 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 10 μl 的 10 mg/ml 的 TMB)室温显色 10 min。加入 50 μl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应，450 nm 下检测光吸收值。NP-protein A 与 BSA 混合的样品作阴性对照。HRP-GAmIgG 作阳性对照，操作是先加入同样量的 biotin-mIgG

然后加入 HRP-GAmIgG 检测。

**结果:** 同时将  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒的分离(separation)与检测(detection)功能相结合, 实现了  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒分离物质的直接检测, 结果显示  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒“separation-detection”得到的光吸收值与在直接显色的实验相当 (图 13), 表明  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒的分离和检测功能可以同时得到应用。

### 实施例十一、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米颗粒的分离—检测核酸

由于  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒还具备独特的磁学性能, 而磁性使它具有了分离提出 DNA、蛋白质、细胞等功能, 所以将磁性与酶催化相结合可以实验分离与检测的一体化, 即“separation-detection”。如图 14 示意。下述实施例给出了  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒用于分离和检测核酸识别的例证。

**试剂:** 葡聚糖(Dextran-40), 羰基二咪唑(carboxyl diimidazole, CDI), 鼠 IgG (mouse immunoglobulin G, mIgG), 亲和素(avidin), 生物素(NHS-biotin), 辣根过氧化物酶标记的亲和素 (HRP-avidin), 3,3,5,5-四甲基联苯胺(3,3,5,5-Tetramethylbenzidine, TMB), 购自 Sigma-Aldrich Inc. (USA). Biotin-probe DNA (biotin-5'-ATCCTTATCAATATT-3') and target DNA (5'-GGATTATTGTTAAATATTGATAAGGAT-3') 由赛泰克公司(中国)合成。

**方法:**  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒的葡聚糖(Dextran)修饰参见参考文献(W. Q. Jiang, H. C. Yang, S. Y. Yang, H. E. Horng, J. C. Hung, Y. C.)。我们使用的葡聚糖 Dextran-40。利用羰基二咪唑(carboxyl diimidazole, CDI)将  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒上 Dextran-40 中的羟基活化, 然后加入亲和素 avidin (图 14) 使活化的羟基与 avidin 中的氨基反应, 通过这种共价偶联使 avidin 固定在  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒表面, 得到 NP-avidin 复合物。将生物素化 DNA 探针(biotin-DNA)与无关 DNA 混合, 加入 NP-avidin, 37 °C 作用 1 小时, 然后收集  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒, PBS 洗涤三次, 得到 NP-avidin-biotin-DNA 复合物, 然后将复合物加入到目标 DNA(target DNA, 可以与 biotin-DNA 配对识别杂交)包被的 ELISA 免疫 96 孔中(图 14), 在 37 °C 作用 1 小时, 然后加入 100  $\mu\text{l}$  显色液(配方: 500  $\mu\text{l}$  的 0.2 M 醋酸钠缓冲液(pH4.5), 加



入 32  $\mu\text{l}$  的 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 10  $\mu\text{l}$  的 10 mg/ml 的 TMB) 室温显色 10 min。加入 50  $\mu\text{l}$  2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应, 450 nm 下检测光吸收值。NP-avidin 与无关 DNA 混合检测作阴性对照。HRP-avidin 作阳性对照, 操作是先加入同样量的 biotin-DNA 然后加入 HRP-avidin 检测。

**结果:** 同时将  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒的分离(separation)与检测(detection)功能相结合, 实现了  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒分离物质的直接检测, 结果显示  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒“separation-detection”得到的光吸收值与在直接显色的实验相当(图 15), 表明  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米颗粒的分离和检测功能可以同时得到应用。

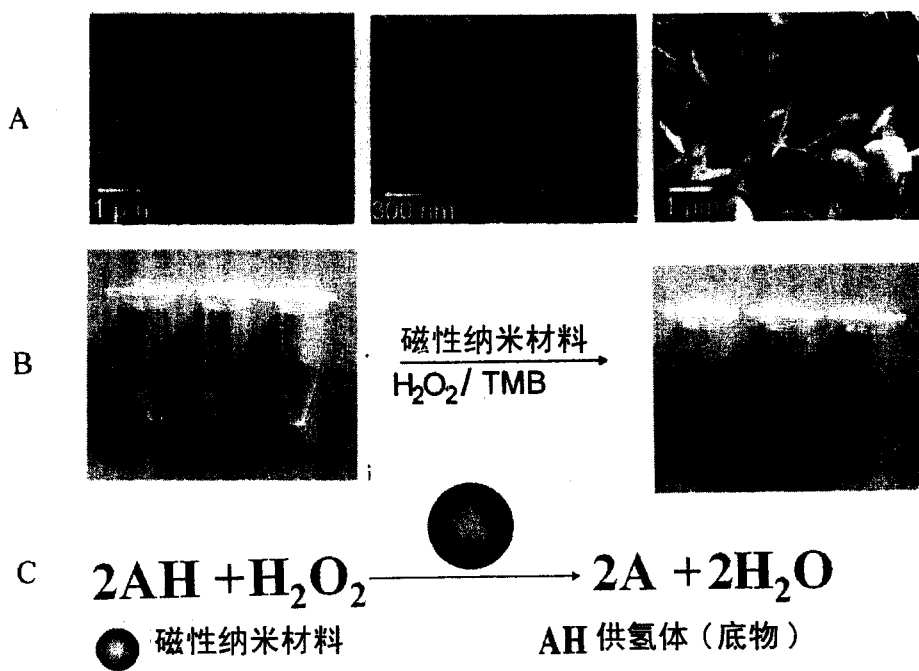


图 1

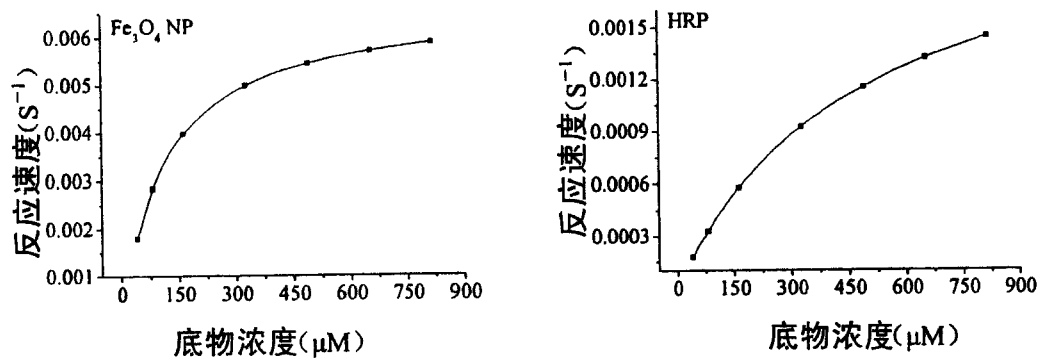


图 2

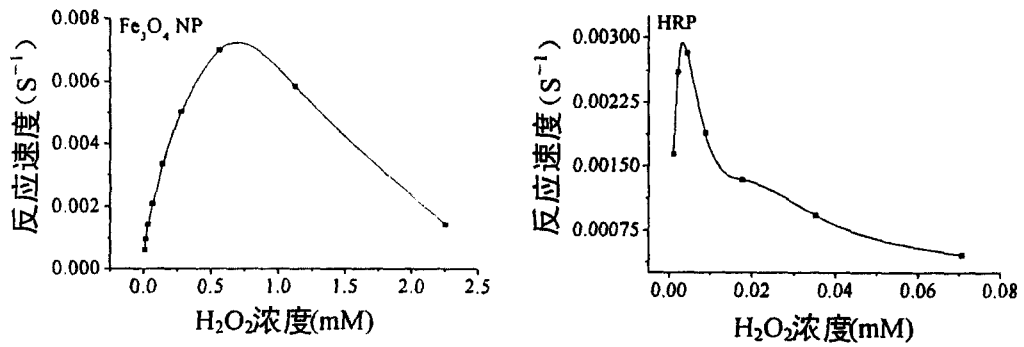


图 3

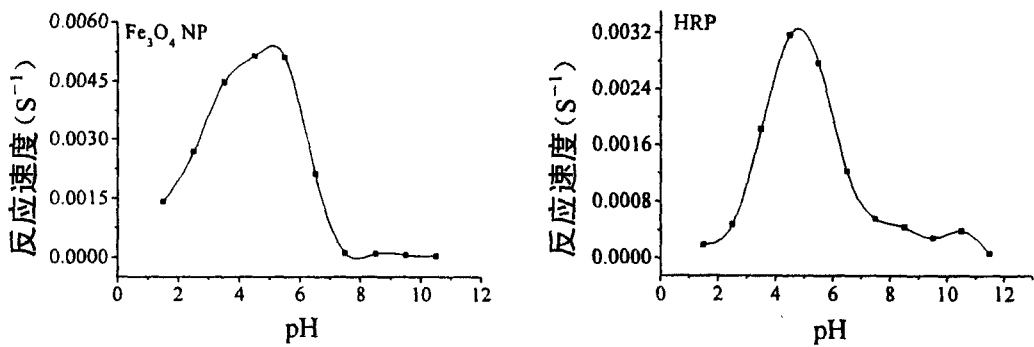


图 4

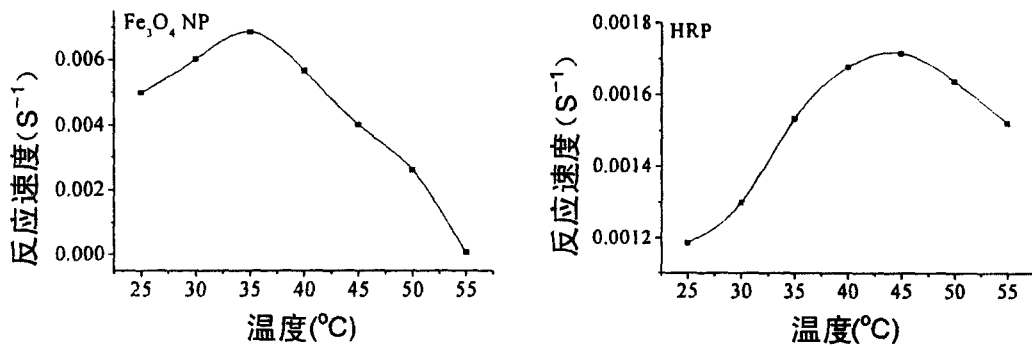


图 5

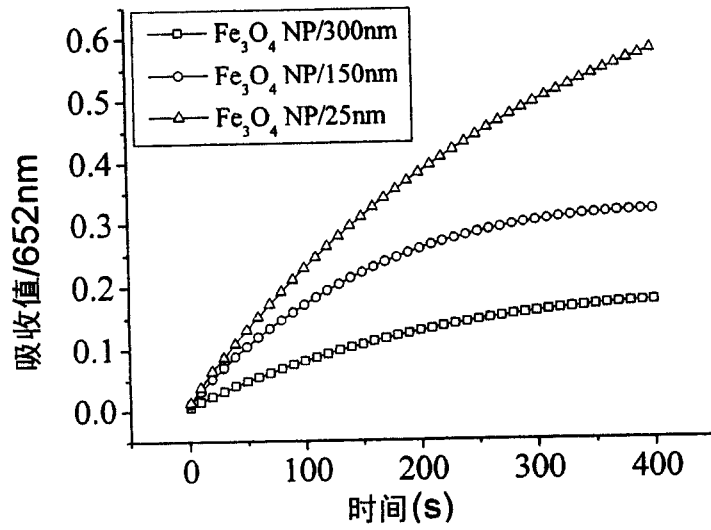


图 6

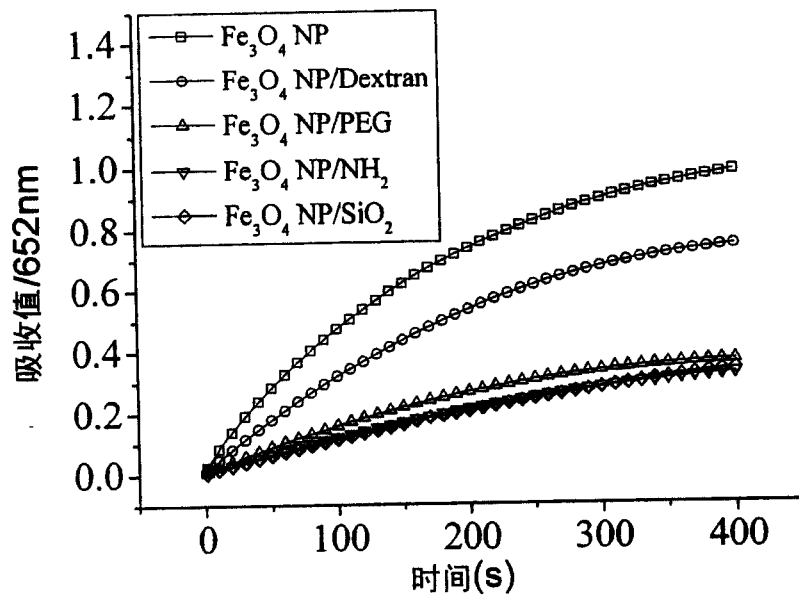


图 7

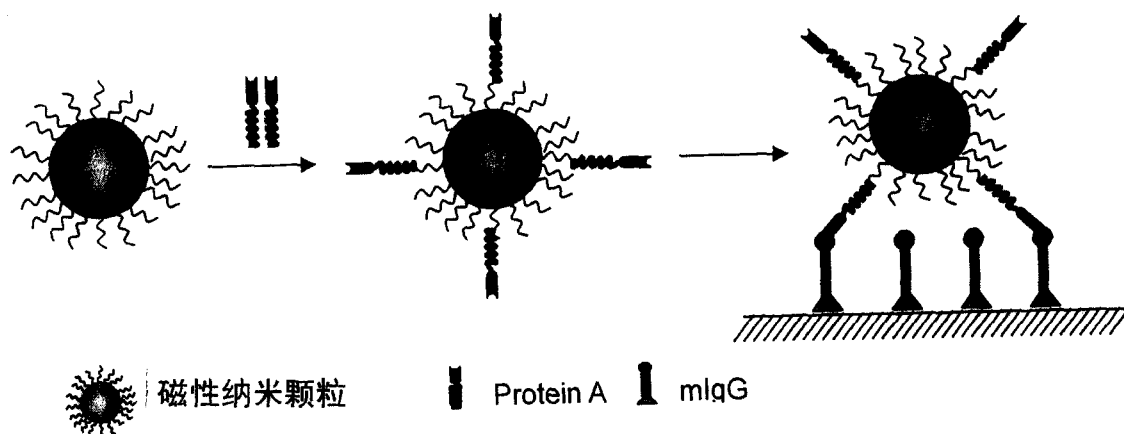


图 8

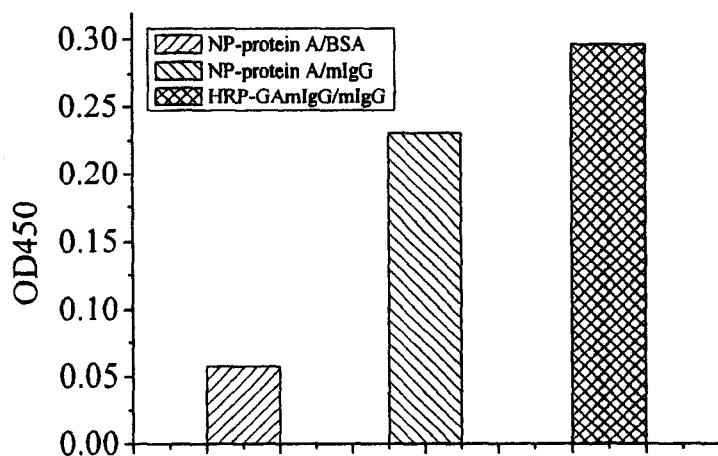


图 9

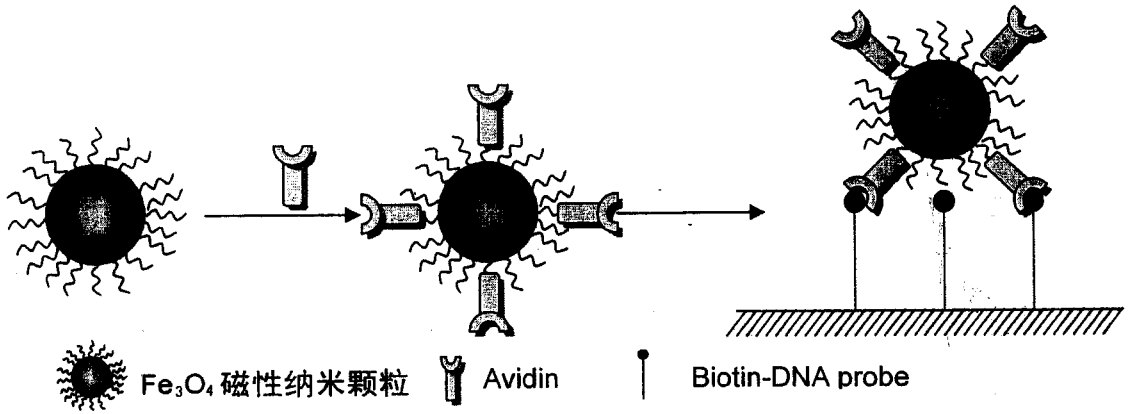


图 10

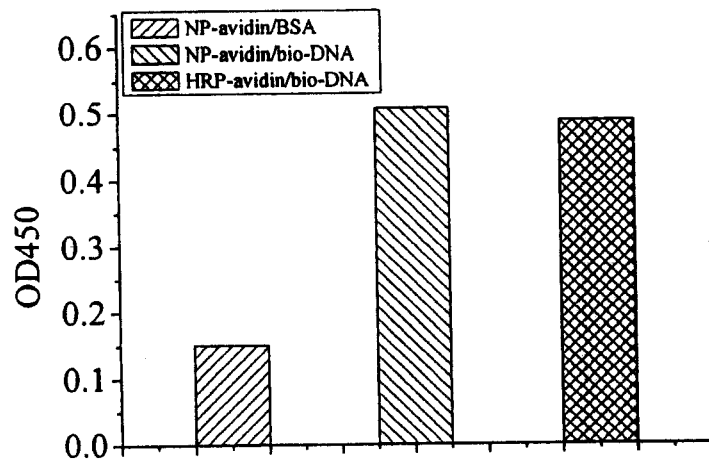


图 11

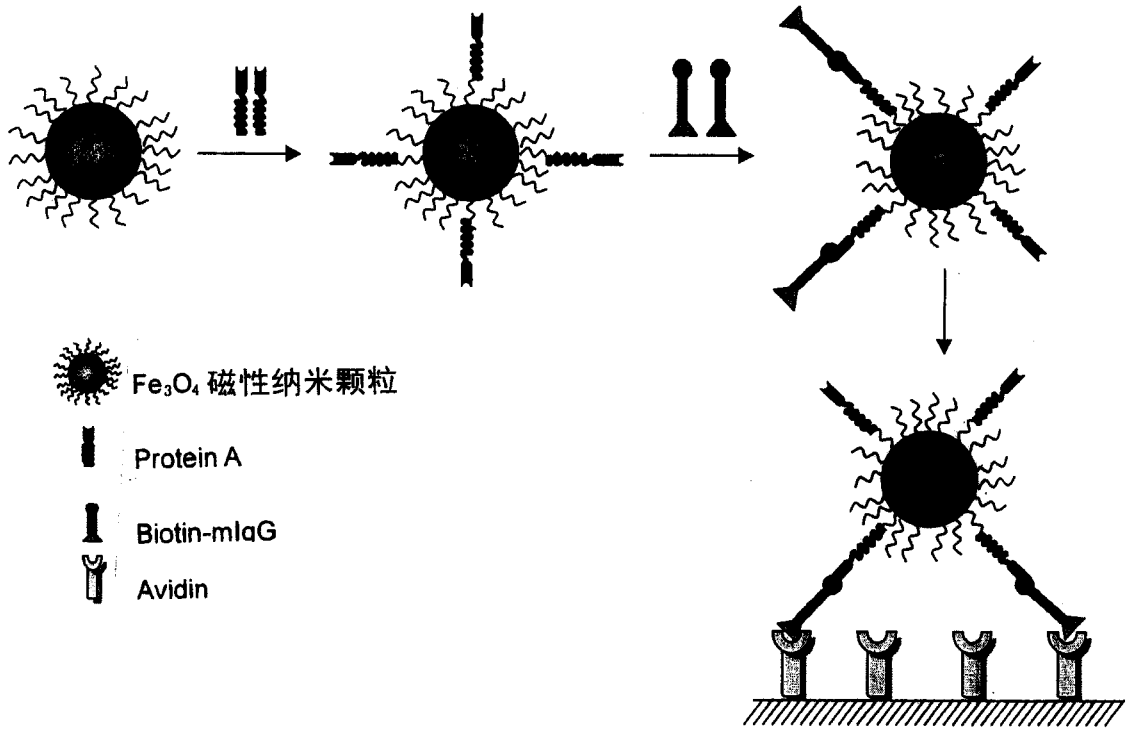


图 12

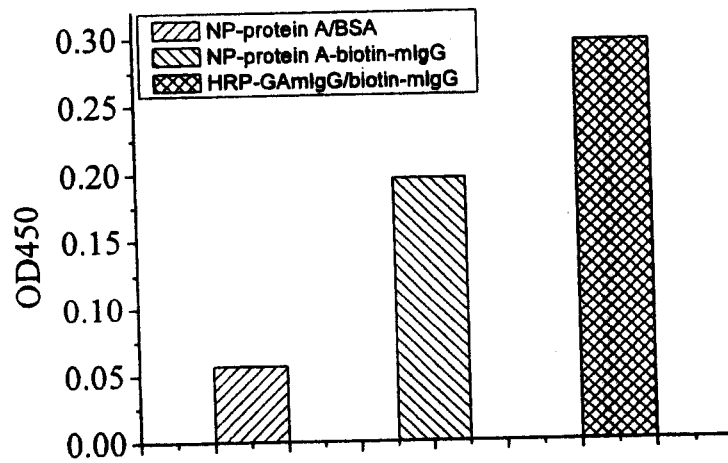


图 13

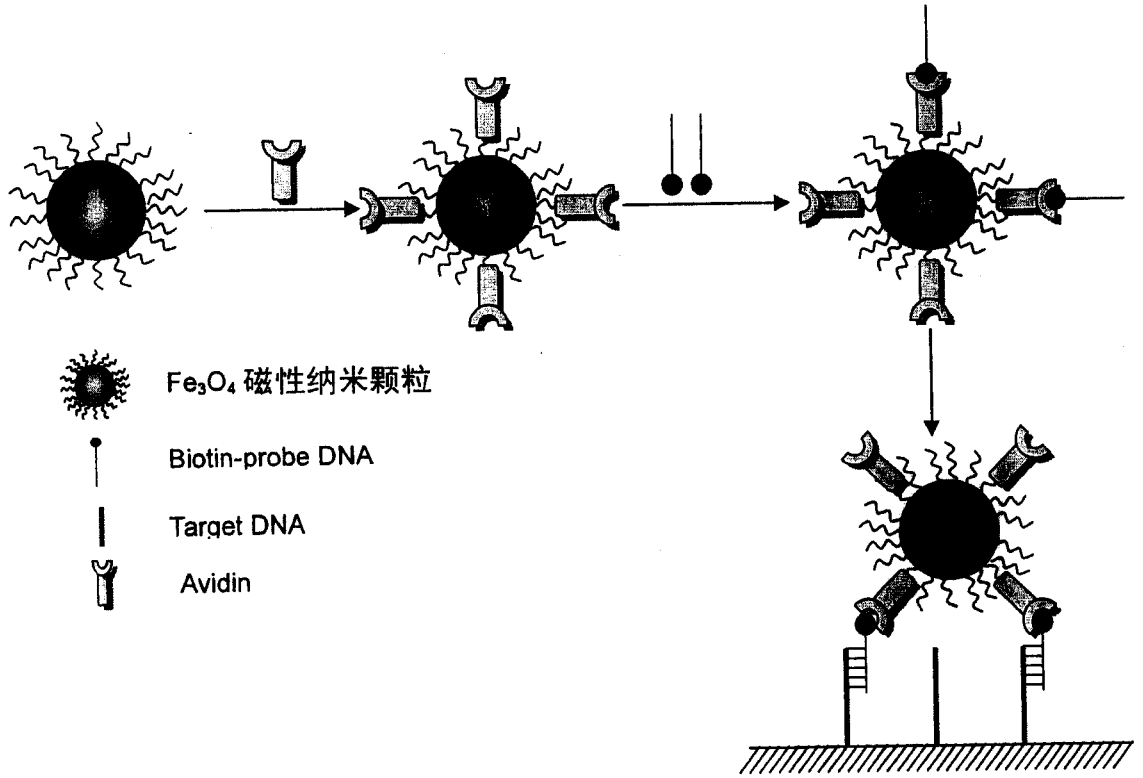


图 14

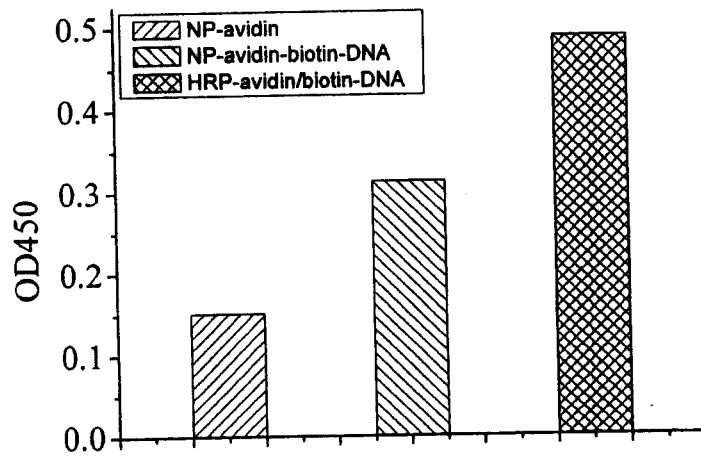


图 15