



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107238710 A

(43)申请公布日 2017. 10. 10

(21)申请号 201710489337.7

(22)申请日 2017.06.24

(71)申请人 安徽师范大学

地址 241000 安徽省芜湖市弋江区花津南路安徽师范大学

(72)发明人 张明翠 夏濛

(74)专利代理机构 芜湖安汇知识产权代理有限公司 34107

代理人 任晨晨

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

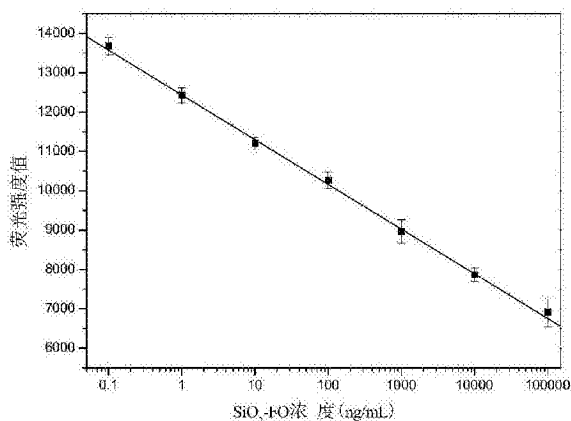
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种基于直接竞争荧光免疫法定量检测叶酸功能化二氧化硅靶向纳米药物载体的方法

(57)摘要

本发明涉及一种基于直接竞争荧光免疫法定量检测叶酸功能化二氧化硅靶向纳米药物载体的方法,结合抗原、抗体反应的特异性与荧光的敏感性对SiO₂-FO纳米粒子进行了定量检测分析。步骤包括:制备SiO₂-FO包被抗原和免疫原,将免疫原注射到动物体内得到高特异性抗体,再将FITC标记上抗体制成荧光抗体,然后建立直接竞争荧光免疫法准确测定了SiO₂-FO的含量。本发明检测方法操作简单、灵敏度高、特异性强、可实现高通量检测。



1. 一种基于直接竞争荧光免疫法定量检测叶酸功能化二氧化硅 ($\text{SiO}_2\text{-FO}$) 靶向纳米药物载体的方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:

a、 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 包被抗原和免疫原的制备;

b、抗 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 抗体的制备;

c、荧光抗体的制备;

d、将 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 包被抗原经包被液稀释后包被于酶标板中, 封闭、加入不同浓度的 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 标准品, 以FITC标记的抗 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 抗体作为一抗, 建立直接竞争荧光免疫分析定量检测 $\text{SiO}_2\text{-FO}$;

e、以 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 标准品浓度的对数为横坐标, 荧光强度值为纵坐标绘制标准曲线, 从而定量检测出 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 的浓度。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述标准曲线的线性方程为 $A = 12434.4 - 1136.7 \log C$, 其中A为荧光强度值, C为 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 浓度。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述步骤a具体包括以下步骤:

a-1、将 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 溶于PBS溶液中, 得到水溶性的 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 溶液;

a-2、将OVA溶于PBS溶液中, 然后加入步骤a-1得到的 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 溶液和戊二醛溶液, $25 \sim 28^\circ\text{C}$ 下避光搅拌 $2 \sim 5\text{h}$; 将反应液置于透析袋中透析 24h 即可得到 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 包被抗原;

a-3、将BSA溶于PBS溶液中, 然后加入步骤a-1得到的 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 溶液和戊二醛溶液, $25 \sim 28^\circ\text{C}$ 下避光搅拌 $2 \sim 5\text{h}$; 将反应液置于透析袋中透析 24h 即可得到 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 免疫原。

4. 根据权利要求1或3所述的方法, 其特征在于, 所述步骤a具体包括以下步骤:

a-1、称取 $10 \sim 20\text{mg}$ $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 溶于 $1 \sim 2\text{mL}$ PBS溶液中, 磁力搅拌 $1 \sim 2\text{h}$ 即得到水溶性的 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 溶液;

a-2、称取 $10 \sim 20\text{mg}$ OVA溶于 $2 \sim 4\text{mL}$ PBS溶液中, 并在搅拌下加入步骤a-1得到的 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 溶液, 混合均匀后再滴加 $80 \sim 200\mu\text{L}$ 25%戊二醛溶液, $25 \sim 28^\circ\text{C}$ 下避光搅拌 $2 \sim 5\text{h}$; 将反应液置于透析袋中, 用PBS透析 24h 后收集即可得到 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 包被抗原, 其浓度为 $2 \sim 4\text{mg/mL}$;

a-3、称取 $10 \sim 20\text{mg}$ BSA溶于 $2 \sim 4\text{mL}$ PBS溶液中, 并在搅拌下加入步骤a-1得到的 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 溶液, 混合均匀后再滴加 $80 \sim 200\mu\text{L}$ 25%戊二醛溶液, $25 \sim 28^\circ\text{C}$ 下避光搅拌 $2 \sim 5\text{h}$; 将反应液置于透析袋中, 用PBS透析 24h 后收集即可得到 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 免疫原, 其浓度为 $2 \sim 4\text{mg/mL}$ 。

5. 根据权利要求3或4所述的方法, 其特征在于, 透析袋的截留分子量为 $8000 \sim 14000\text{Da}$ 。

6. 根据权利要求4所述的方法, 其特征在于, 水溶性的 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 溶液浓度为 $5 \sim 15\text{mg/mL}$ 。

7. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述步骤b具体包括以下步骤:

b-1、首次免疫: 将 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 免疫原与弗氏完全佐剂等体积比混合后, 采用背部皮下多点注射的方式注射到大白兔体内, 注射 $8 \sim 10$ 个点, 注射量为 $1 \sim 2\text{mL/只}$; 首次免疫三周后进行加强免疫;

b-2、加强免疫: 将 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 免疫原与弗氏不完全佐剂等体积比混合后, 采取同样的方式注射到大白兔体内, 注射 $8 \sim 10$ 个点, 注射量为 $1 \sim 2\text{mL/只}$; 此后每两周进行再次加强免疫, 中间周进行耳静脉采血测血清效价, 直到效价达到 $1:64000$, 再进行最后一次加强免疫, 并在免疫一周后从动物颈动脉采血, 静置析出抗血清并进行纯化, 得到抗 $\text{SiO}_2\text{-FO}$ 抗体, 其浓度为 $15 \sim 20\text{mg/mL}$ 。

8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤c具体包括以下步骤:
- c-1、取纯化后的抗SiO₂-F0抗体,用碳酸盐缓冲液稀释至每毫升内含蛋白8~15mg,制得抗体溶液;
 - c-2、将异硫氰酸荧光素 (FITC) 溶解在碳酸盐缓冲液中,制成浓度为2mg/mL的FITC溶液;
 - c-3、在25~28°C下将FITC溶液缓慢加入步骤c-1得到的抗体溶液中,磁力搅拌4~6h;磁力搅拌4~6h;
 - c-4、将步骤c-3得到的溶液用葡聚糖凝胶进行过滤纯化,得到FITC标记的抗SiO₂-F0抗体。
9. 根据权利要求7或8所述的方法,其特征在于,所述步骤c-3中,FITC溶液与抗体溶液的体积之比为1:10。
10. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤d具体包括以下步骤:
- d-1、包被:用包被缓冲液将SiO₂-F0包被抗原稀释80倍,包被96孔酶标板,每孔100μL,4°C冰箱过夜;
 - d-2、封闭:甩干,PBST溶液洗涤3次,每次3~5min,洗去未被结合上的SiO₂-F0包被抗原,加入1wt%酪蛋白,每孔200μL进行封闭,37°C烘箱温育1~2h;
 - d-3、加样竞争:甩干,PBST溶液洗涤3次,每次3~5min,洗去多余的封闭液,然后将50μL不同浓度的SiO₂-F0标准品和50μL FITC标记的抗SiO₂-F0抗体分梯度加入各孔中,使之发生竞争反应,37°C烘箱温育2~4h;
 - d-4、检测:甩干,PBST溶液洗涤3次,每次3~5min,除去游离态的SiO₂-F0标准品或抗体结合物,用多功能酶标仪测定各孔在激发波长为485nm,发射波长为528nm处的荧光强度值。

一种基于直接竞争荧光免疫法定量检测叶酸功能化二氧化硅 靶向纳米药物载体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米材料的定量检测,具体涉及一种基于直接竞争荧光免疫法定量检测叶酸功能化二氧化硅($\text{SiO}_2\text{-FO}$)靶向纳米药物载体的方法。

背景技术

[0002] 本发明涉及纳米材料的定量检测,特别涉及一种基于直接竞争荧光免疫法定量检测叶酸功能化二氧化硅($\text{SiO}_2\text{-FO}$)靶向纳米药物载体的方法。

背景技术

[0003]

[0004] 癌症是严重危害人类健康的疾病之一,癌症治疗对于提高患者的生存质量、减轻患者的痛苦、降低死亡率具有十分重要的意义。目前临床中对于癌症的治疗主要采用化疗法,但目前的化疗药物不具有靶向性,在杀死癌细胞的同时也会杀死正常细胞,从而引起严重的毒副作用,阻碍了化疗药物的发展和应用,对患者身心造成极大地损伤。因此,降低药物毒副作用、改善药物体内分布与代谢、提高药物治疗效率等已经成为生物医学领域的研究热点之一。

[0005] 随着纳米材料的快速发展与应用,越来越多的研究者们将目光投向了纳米药物载体。纳米载体粒径大小在 $10\sim 500\text{nm}$,可将药物分子包裹其中或吸附在其表面,通过靶向分子与细胞表面特异性受体结合或磁靶向,在细胞摄取作用下进入细胞内,实现安全有效的靶向药物输送,因此在药物传递中具有特殊的价值和意义。

[0006] 功能化纳米材料在实现靶向性给药、缓释药物、降低药物的毒副作用等方面表现出良好的应用前景,已成为近年来新型药物输送系统研究的热点。二氧化硅纳米材料作为无机纳米颗粒材料的重要成员之一,由于其制备简便、性质稳定、生物相容性好和表面易修饰,在生物医学领域发挥了重要作用。将靶向配体叶酸修饰到二氧化硅纳米材料上作为一种新型靶向药物载体,为癌症的治疗注入了新的活力,为改善抗肿瘤药物载药体系提供了新的思路与手段,在生物医学领域发挥了重要作用。

[0007] 纳米生物技术是生物技术领域的前沿和热点问题,从现有研究结果来看,对于纳米材料应用于医学领域通常局限于考察其在体内的分布、降解、药物释放效率以及毒性研究等方面。众所周知,纳米材料因其特殊的效应对人体可能有一定的影响,不同的剂量可能对机体产生不同的功效或副作用。因此,纳米药物载体的剂量检测对于考察该材料是否可以应用于临床显得尤为重要。而目前对于纳米材料的表征方法主要集中在其结构、成分、粒度、形貌以及界面等分析。而对于纳米材料的定量分析还不是很多,目前常用的方法有电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)、高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(HPLC-ICP-MS)以及气相色谱-电感耦合等离子体质谱法(GC-ICP-MS),然而这些方法不仅操作繁琐,仪器昂贵,而且稳定性和灵敏度都不高,检测技术仍不够成熟。因此,对于纳米载体本身在生物体

内的定量检测仍是一项十分必要且具有挑战性的工作。

发明内容

[0008] 为解决上述技术问题,本发明提供一种基于直接竞争荧光免疫法定量检测叶酸功能化二氧化硅(SiO₂-FO)靶向纳米药物载体的方法。结合抗原、抗体反应的特异性与荧光的敏感性对SiO₂-FO纳米粒子进行了定量检测分析。该方法具有操作简单、灵敏度高、特异性强、可实现高通量检测等特点。

[0009] 本发明采取的技术方案为:

[0010] 一种基于直接竞争荧光免疫法定量检测叶酸功能化二氧化硅(SiO₂-FO)靶向纳米药物载体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0011] a、SiO₂-FO包被抗原和免疫原的制备;

[0012] b、抗SiO₂-FO抗体的制备;

[0013] c、荧光抗体的制备;

[0014] d、将SiO₂-FO包被抗原经包被液稀释后包被于酶标板中,封闭、加入不同浓度的SiO₂-FO标准品,以FITC标记的抗SiO₂-FO抗体作为一抗,建立直接竞争荧光免疫分析定量检测SiO₂-FO;

[0015] e、以SiO₂-FO标准品浓度的对数为横坐标,荧光强度值为纵坐标绘制标准曲线,从而定量检测出SiO₂-FO的浓度。

[0016] 所述标准曲线的线性方程为 $A=12434.4-1136.7\log C$,其中A为荧光强度值,C为SiO₂-FO浓度。其相关系数 $R=-0.9992$,线性范围为 10^{-1} - 10^5 ng/mL,检出限为0.035ng/mL。

[0017] 所述步骤a具体包括以下步骤:

[0018] a-1、将SiO₂-FO溶于PBS溶液中,得到水溶性的SiO₂-FO溶液;

[0019] a-2、将OVA溶于PBS溶液中,然后加入步骤a-1得到的SiO₂-FO溶液和戊二醛溶液,25~28℃下避光搅拌2~5h;将反应液置于透析袋中透析24h即可得到SiO₂-FO包被抗原;

[0020] a-3、将BSA溶于PBS溶液中,然后加入步骤a-1得到的SiO₂-FO溶液和戊二醛溶液,25~28℃下避光搅拌2~5h;将反应液置于透析袋中透析24h即可得到SiO₂-FO免疫原。

[0021] 进一步地,所述步骤a具体包括以下步骤:

[0022] a-1、称取10~20mg SiO₂-FO溶于1~2mL PBS溶液中,磁力搅拌1~2h即得到水溶性的SiO₂-FO溶液;

[0023] a-2、称取10~20mg OVA溶于2~4mL PBS溶液中,并在搅拌下加入步骤a-1得到的SiO₂-FO溶液,混合均匀后再滴加80~200μL 25%戊二醛溶液,25~28℃下避光搅拌2~5h;将反应液置于透析袋中,用PBS透析24h后收集即可得到SiO₂-FO包被抗原,其浓度为2~4mg/mL;

[0024] a-3、称取10~20mg BSA溶于2~4mL PBS溶液中,并在搅拌下加入步骤a-1得到的SiO₂-FO溶液,混合均匀后再滴加80~200μL 25%戊二醛溶液,25~28℃下避光搅拌2~5h;将反应液置于透析袋中,用PBS透析24h后收集即可得到SiO₂-FO免疫原,其浓度为2~4mg/mL。

[0025] 所述步骤a-2和a-3中,透析袋的截留分子量为8000~14000Da。

[0026] 所述水溶性的SiO₂-FO溶液浓度为5~15mg/mL。

[0027] 所述步骤b具体包括以下步骤:

[0028] b-1、首次免疫:将SiO₂-F0免疫原与弗氏完全佐剂等体积比混合后,采用背部皮下多点注射的方式注射到大白兔体内,注射8~10个点,注射量为1~2mL/只;首次免疫三周后进行加强免疫;

[0029] b-2、加强免疫:将SiO₂-F0免疫原与弗氏不完全佐剂等体积比混合后,采取同样的方式注射到大白兔体内,注射8~10个点,注射量为1~2mL/只;此后每两周进行再次加强免疫,中间周进行耳静脉采血测血清效价,直到效价达到1:64000,再进行最后一次加强免疫,并在免疫一周后从动物颈动脉采血,静置析出抗血清并进行纯化,得到抗SiO₂-F0抗体,其浓度为15~20mg/mL。

[0030] 所述步骤c具体包括以下步骤:

[0031] c-1、取纯化后的抗SiO₂-F0抗体,用碳酸盐缓冲液稀释至每毫升内含蛋白8~15mg,制得抗体溶液;

[0032] c-2、将异硫氰酸荧光素(FITC)溶解在碳酸盐缓冲液中,制成浓度为2mg/mL的FITC溶液;

[0033] c-3、在25~28℃下将FITC溶液缓慢加入步骤c-1得到的抗体溶液中,磁力搅拌4~6h;

[0034] c-4、将步骤c-3得到的溶液用葡聚糖凝胶进行过滤纯化,得到FITC标记的抗SiO₂-F0抗体。

[0035] 所述步骤c-3中,FITC溶液与抗体溶液的体积之比为1:10。

[0036] 所述步骤d具体包括以下步骤:

[0037] d-1、包被:用包被缓冲液将SiO₂-F0包被抗原稀释80倍,包被96孔酶标板,每孔100μL,4℃冰箱过夜;

[0038] d-2、封闭:甩干,PBST溶液洗涤3次,每次3~5min,洗去未被结合上的SiO₂-F0包被抗原,加入1wt%酪蛋白,每孔200μL进行封闭,37℃烘箱温育1~2h;

[0039] d-3、加样竞争:甩干,PBST溶液洗涤3次,每次3~5min,洗去多余的封闭液,然后将50μL不同浓度的SiO₂-F0标准品和50μL FITC标记的抗SiO₂-F0抗体分梯度加入各孔中,使之发生竞争反应,37℃烘箱温育2~4h;

[0040] d-4、检测:甩干,PBST溶液洗涤3次,每次3~5min,除去游离态的SiO₂-F0标准品或抗体结合物,用多功能酶标仪测定各孔在激发波长为485nm,发射波长为528nm处的荧光强度值。

[0041] 本发明提供了一种基于直接竞争荧光免疫法定量检测叶酸功能化二氧化硅(SiO₂-F0)靶向纳米药物载体的方法,结合抗原、抗体反应的特异性与荧光的敏感性实现了该免疫方法对SiO₂-F0的定量检测。

[0042] 与现有技术相比,本发明具有以下几个特点:

[0043] (1) 利用机体的免疫应答效应,成功制备且筛选出了高效价的抗SiO₂-F0抗体,为建立高特异性的免疫分析定量检测SiO₂-F0奠定了基础;

[0044] (2) 利用抗原、抗体反应的特异性与荧光的敏感性建立了一种基于直接竞争荧光免疫分析法定量检测SiO₂-F0的新方法,为今后纳米材料提供了一种快速、准确定量检测的方法;

[0045] (3) 该方法操作简单、灵敏度高、特异性强、可实现高通量检测。

附图说明

[0046] 图1为以SiO₂-F0标准品浓度的对数为横坐标,荧光强度值为纵坐标建立的标准曲线图。

具体实施方式

[0047] 弗氏完全佐剂、牛血清白蛋白(BSA)和鸡卵清白蛋白(OVA)购买自生工生物工程(上海)股份有限公司。

[0048] 其他试剂均可从市场上的销售厂家购买得到。

[0049] 本发明涉及到的各溶液的制备方法为:

[0050] PBS溶液(0.01mol/L pH=8.0):称取NaCl 8.0g、KCl 0.1g、NaH₂PO₄·2H₂O 0.106g、Na₂HPO₄·12H₂O 3.34g溶解于蒸馏水中并定容至1000mL。

[0051] 碳酸盐缓冲液CB(0.5mol/L pH=9.6):称取Na₂CO₃ 1.59g、NaHCO₃ 2.94g溶解于蒸馏水中并定容至100mL。

[0052] PBST溶液(0.01mol/L pH=8.0):在1000mL PBS中加入500μL Tween-20,混合均匀。

[0053] 包被缓冲液CB(0.05mol/L pH=9.6):称取Na₂CO₃ 1.59g、NaHCO₃ 2.94g溶解于蒸馏水中并定容至1000mL。

[0054] 1wt%酪蛋白溶液:其为封闭液,称取0.01g酪蛋白溶解于1mL PBS中,混合均匀。

[0055] MES缓冲液(0.1M, pH=5.5):称0.1921g MES溶解于10mL蒸馏水中,用NaOH溶液调节其pH至5.5。

[0056] 实施例1

[0057] 一种基于直接竞争荧光免疫法定量检测叶酸功能化二氧化硅(SiO₂-F0)靶向纳米药物载体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0058] a、SiO₂-F0包被抗原和免疫原的制备

[0059] a-1、称取10mg SiO₂-F0溶于1mL PBS溶液中,磁力搅拌1h即得到浓度为10mg/mL的SiO₂-F0溶液;

[0060] a-2、称取10mg OVA溶于2mL PBS中,并在搅拌加入步骤a-1得到的SiO₂-F0溶液,混合均匀后再滴加90μL 25%戊二醛溶液,25℃下避光搅拌4h;将反应液置于截留分子量为8000-12000Da的透析袋中,用PBS透析24h后收集即可得到SiO₂-F0包被抗原,其浓度为3.33mg/mL,4℃储存待用;

[0061] a-3、称取10mg BSA溶于2mL PBS中,并在搅拌加入步骤a-1得到的SiO₂-F0溶液,混合均匀后再滴加90μL 25%戊二醛溶液,25℃下避光搅拌4h;将反应液置于截留分子量为8000-12000Da透析袋中,用PBS透析24h后收集即可得到SiO₂-F0免疫原,其浓度为3.33mg/mL,4℃储存待用。

[0062] 所述步骤a-1中的SiO₂-F0(叶酸功能化二氧化硅)的制备方法为:

[0063] a-1-1、氨基功能化二氧化硅(SiO₂-NH₂)的制备

[0064] 将380μL正硅酸乙酯和12mL无水乙醇混合搅拌0.5h;加入570μL 26%氨水,25℃下

搅拌24h;再加入400 μ L 3-氨丙基三乙氧基硅烷,25 $^{\circ}$ C下持续搅拌24h;将反应液10000rpm/min离心分离20min,取沉淀用无水乙醇洗涤,并在25 $^{\circ}$ C下干燥24h即可得到氨基功能化二氧化硅;

[0065] a-1-2、叶酸功能化二氧化硅(SiO₂-FO)的制备

[0066] 称取57.5mg叶酸溶于2mL MES缓冲液,再加入40.3mg 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC)和17.25mg N-羟基琥珀酰亚胺,室温下搅拌1h;

[0067] 称取100mg SiO₂-NH₂溶于5mL MES缓冲液后加入到上述混合液中,25 $^{\circ}$ C下避光搅拌24h;将反应液10000rpm/min离心分离10min,取沉淀用蒸馏水和无水乙醇洗涤,并在25 $^{\circ}$ C下干燥24h即可得到叶酸功能化二氧化硅。

[0068] b、抗SiO₂-FO抗体的制备

[0069] 选用4只体重为2~2.5kg的雄性新西兰大白兔为免疫对象,实验之前首先将购买的新西兰大白兔饲养2周左右,维持其健康状态,其中3只作为免疫对象,第4只作为空白对照,空白对照组不进行任何免疫。

[0070] b-1、首次免疫:将SiO₂-FO免疫原与弗氏完全佐剂等体积比混合后,采用背部皮下多点注射的方式注射到3只实验兔体内,注射8~10个点,注射量为1mL/只;免疫接种的方式有注射免疫、口服免疫、气雾免疫等,其中注射免疫又有皮下注射、皮内注射、肌肉注射静脉注射等方式,背部皮下注射操作方便,药物扩散较慢,有利于刺激机体产生免疫应答,继而产生抗体;而雄兔作为免疫对象可以避免其生理周期对实验产生影响。

[0071] b-2、加强免疫:首次免疫三周后进行加强免疫。将SiO₂-FO免疫原与弗氏不完全佐剂等体积比混合后,采取同样的方式注射到3只实验兔体内,注射8~10个点,注射量为1mL/只;此后每两周进行再次加强免疫,中间周进行耳静脉采血测血清效价,直到效价达到1:64000,再进行最后一次加强免疫,并在免疫一周后从动物颈动脉采血,静置析出抗血清并进行纯化,得到抗SiO₂-FO抗体,其浓度为16.55mg/mL。

[0072] 弗氏不完全佐剂的制备方法为:称取50g的无水羊毛脂,量取100mL的液体石蜡混合,超声仪多次超声,每次不超过20min,防止超声过程中温度过高,不能及时散热,超声使之混合均匀,直到将该混合液体滴到水中并且半分钟内不扩散为止,得到的油状液体即为弗氏不完全佐剂,4 $^{\circ}$ C冰箱储存待用。

[0073] 抗体效价鉴定的具体方法为:用包被缓冲液CB将包被抗原稀释400倍,包被在96孔酶标板上,4 $^{\circ}$ C冰箱过夜;甩干,用PBST溶液洗3次,每次3min,每孔加200 μ L 1wt%酪蛋白封闭液,37 $^{\circ}$ C封闭1h;甩干,PBST洗3次,每次3min,每孔加入100 μ L用PBS稀释成不同浓度的抗血清,其稀释比为1/1000~1/128000,37 $^{\circ}$ C温育2h;甩干,PBST洗3次,每次3min,每孔加入100 μ L用PBS稀释的稀释比为1/5000的HRP标记的羊抗兔IgG,37 $^{\circ}$ C温育2h;甩干,PBST洗3次,每次3min,每孔加入100 μ L邻苯二胺底物液进行显色反应,37 $^{\circ}$ C温育0.5h;每孔再加入50 μ L 2moI/L H₂SO₄终止反应;最后用多功能酶标仪测定各孔在490nm处的吸光度值A。比较实验组与空白对照组在同一抗血清稀释倍数下的吸光值A,当A_{实验组} \geq 2倍A_{空白组}时对应的最大稀释倍数即抗血清的效价。

[0074] c、荧光抗体的制备

[0075] c-1、取纯化后的抗SiO₂-FO抗体1mL,用碳酸盐缓冲液稀释至每毫升内含蛋白8.5mg,制得抗体溶液;

[0076] c-2、称取2mg异硫氰酸荧光素 (FITC) 溶解在1mL碳酸盐缓冲液中,制成FITC溶液;

[0077] c-3、在25℃下将0.1mLFITC溶液缓慢加入1mL抗体溶液中,磁力搅拌5h;

[0078] c-4、将上述标记好的溶液用葡聚糖凝胶进行过滤纯化,收集柱下端溶液,得到FITC标记的抗SiO₂-F0抗体,-20℃储存待用。

[0079] d、利用标记好的荧光抗SiO₂-F0抗体和SiO₂-F0包被抗原进行直接竞争荧光免疫分析实验,在最优条件下建立标准曲线从而达到定量检测SiO₂-F0的目的

[0080] d-1、包被:用包被缓冲液将SiO₂-F0包被抗原稀释80倍,包被96孔酶标板。每孔100μL,4℃冰箱过夜;

[0081] d-2、封闭:甩干,PBST溶液洗涤3次,每次3min,洗去未被结合上的SiO₂-F0包被抗原。加入1wt%酪蛋白,每孔200μL进行封闭(减少非特异性吸附),37℃烘箱温育1h;

[0082] d-3、加样竞争:甩干,PBST溶液洗涤3次,每次3min,洗去多余的封闭液。将50μL浓度分别为0.1ng/mL、1ng/mL、10ng/mL、10²ng/mL、10³ng/mL、10⁴ng/mL、10⁵ng/mL的SiO₂-F0标准品依次加入到酶标板的各行中,即每个浓度梯度重复三次,然后向各孔中加入50μL FITC标记的抗SiO₂-F0抗体,使之发生竞争反应,37℃烘箱温育3h;

[0083] 不同浓度的SiO₂-F0标准品的制备方法为:用0.01mol/L pH=8.0的PBS缓冲溶液将SiO₂-F0稀释到指定的浓度。

[0084] d-4、检测:甩干,PBST溶液洗涤3次,每次3min,除去游离态的SiO₂-F0标准品或抗体结合物。用多功能酶标仪测定各孔在激发波长为485nm,发射波长为528nm处的荧光强度值,同一浓度梯度的取平均值计算荧光强度值。

[0085] e、以SiO₂-F0标准品浓度的对数为横坐标,荧光强度值为纵坐标绘制标准曲线。制得的标准曲线如图1所示,标准曲线的线性方程为 $A = 12434.4 - 1136.7 \log C$,其中A为荧光强度值,C为SiO₂-F0浓度。其相关系数 $R = -0.9992$,线性范围为 $10^{-1} - 10^5$ ng/mL,检出限为0.035ng/mL。

[0086] f、重复以上各步骤,只是将步骤(3)中的不同浓度的SiO₂-F0标准品替换为未知浓度的SiO₂-F0待测液,然后用多功能酶标仪测定各孔在激发波长为485nm,发射波长为528nm处的荧光强度值,求取平均荧光强度值。根据上述标准曲线的线性方程 $A = 12434.4 - 1136.7 \log C$,即可计算出SiO₂-F0待测液的浓度。

[0087] 以上方法为多次实验验证后的最优的实验方法,此方法所得到的标准曲线的线性关系最好,线性范围最宽。

[0088] 上述参照实施例对一种基于直接竞争荧光免疫法定量检测叶酸功能化二氧化硅靶向纳米药物载体的方法进行的详细描述,是说明性的而不是限定性的,可按照所限定范围列举出若干个实施例,因此在不脱离本发明总体构思下的变化和修改,应属本发明的保护范围之内。

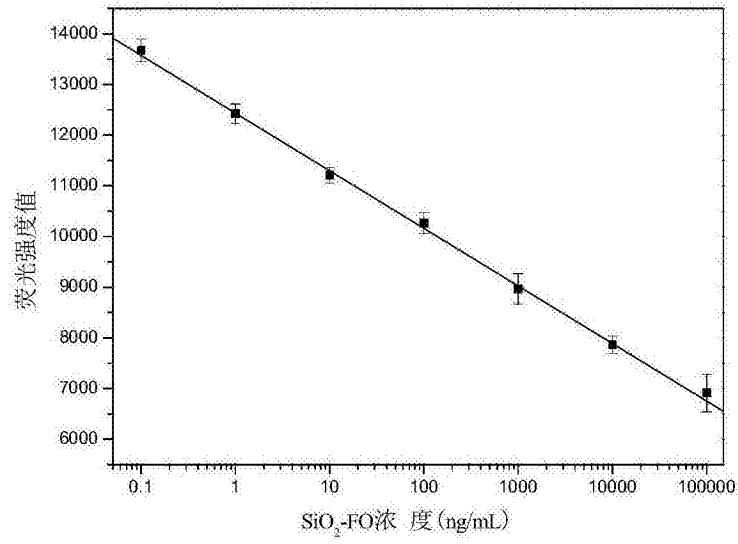


图1

专利名称(译)	一种基于直接竞争荧光免疫法定量检测叶酸功能化二氧化硅靶向纳米药物载体的方法		
公开(公告)号	CN107238710A	公开(公告)日	2017-10-10
申请号	CN201710489337.7	申请日	2017-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	安徽师范大学		
申请(专利权)人(译)	安徽师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	安徽师范大学		
[标]发明人	张明翠 夏濛		
发明人	张明翠 夏濛		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/533 G01N33/535 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6402 G01N21/6428 G01N21/6452 G01N33/533 G01N33/535 G01N33/574 G01N2021/6441		
其他公开文献	CN107238710B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于直接竞争荧光免疫法定量检测叶酸功能化二氧化硅靶向纳米药物载体的方法，结合抗原、抗体反应的特异性与荧光的敏感性对SiO₂-FO纳米粒子进行了定量检测分析。步骤包括：制备SiO₂-FO包被抗原和免疫原，将免疫原注射到动物体内得到高特异性抗体，再将FITC标记上抗体制成荧光抗体，然后建立直接竞争荧光免疫法准确测定了SiO₂-FO的含量。本发明检测方法操作简单、灵敏度高、特异性强、可实现高通量检测。

