



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106706894 B

(45)授权公告日 2018.04.13

(21)申请号 201710051804.8

(22)申请日 2017.01.20

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106706894 A

(43)申请公布日 2017.05.24

(73)专利权人 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 曹以婷

(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 33/53(2006.01)

(56)对比文件

CN 105181958 A,2015.12.23,

CN 105195736 A,2015.12.30,

CN 104730052 A,2015.06.24,

Sheng Huang et al..General and Facile Surface Functionalization of Hydrophobic Nanocrystals with Poly(amino acid) for Cell Luminescence Imaging.《SCIENTIFIC REPORTS》.2013,

审查员 肖吉

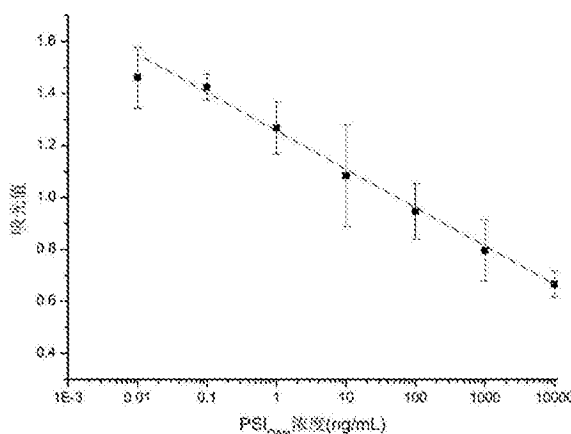
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种基于间接竞争酶联免疫法定量检测油胺枝接聚琥珀酰亚胺高分子纳米药物载体的方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于间接竞争酶联免疫法定量检测油胺枝接聚琥珀酰亚胺(PSI_{0Am})高分子纳米药物载体的方法,利用了二抗放大了检测信号,提高了实验分析的灵敏度,即通过测量PSI_{0Am}包被抗原、PSI_{0Am}抗体即一抗与HRP标记的羊抗兔抗体即二抗,三者复合物的光学性号达到定量检测PSI_{0Am}的目的,该方法操作简单,可行性高,灵敏度高,检出限低,可实现高通量检测。



1. 一种基于间接竞争酶联免疫法定量检测油胺接枝聚琥珀酰亚胺(PSI_{0Am}) 高分子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、制备PSI_{0Am}包被抗原和免疫原;

b、制备PSI_{0Am}抗体:

c、将PSI_{0Am}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PSI_{0Am}标准液,以PSI_{0Am}抗体作为一抗,HRP标记的羊抗兔抗体作为二抗,进行间接竞争酶联免疫分析法;

d、以PSI_{0Am}标准液浓度的对数为横坐标,吸光度值为纵坐标建立标准曲线,从而定量检测出PSI_{0Am}的浓度;

所述步骤a具体包括以下步骤:

a-1、水解PSI_{0Am},得到水解后的PSI_{0Am}溶液;

a-2、向水解后的PSI_{0Am}溶液中,加入羟基琥珀酰亚胺、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺和牛血清白蛋白,20-30℃温育3-6小时后,离心分离,取沉淀分散于pH=7.4的PBS缓冲液中即得到PSI_{0Am}免疫原溶液;

a-3、向水解后的PSI_{0Am}溶液中,加入羟基琥珀酰亚胺、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺和鸡卵清白蛋白,20-30℃温育3-6小时后,离心分离,取沉淀分散于pH=7.4的PBS缓冲液中即得到PSI_{0Am}包被抗原溶液;

a-4、将PSI_{0Am}免疫原溶液和PSI_{0Am}包被抗原溶液分别置于透析袋中,以pH=7.4的PBS缓冲液透析12-16h后收集,即可得到PSI_{0Am}免疫原和PSI_{0Am}包被抗原。

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 $A=1.256-0.148IgC$,其中A为490nm处吸光度值,C为PSI_{0Am}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-1具体包括以下步骤:将浓度为60mg/mL的油胺接枝聚琥珀酰亚胺的三氯甲烷溶液0.1-0.5mL,分散在1-6mL 0.1-1mmol/L NaOH中,超声5-10min,得到的乳状溶液在50-65℃下搅拌5-15min,反应结束后离心分离,沉淀分散在1-5mL pH=7.4的PBS缓冲液中,得到水解后的PSI_{0Am}。

4. 根据权利要求1或3所述的方法,其特征在于,水解后的PSI_{0Am}的浓度为1~10mg/mL。

5. 根据权利要求1或3所述的方法,其特征在于,所述步骤a-2中,水解后的PSI_{0Am}溶液、羟基琥珀酰亚胺、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺与牛血清白蛋白的比值为2mL:0.1mg:0.7mg:1mg;所述步骤a-3中,水解后的PSI_{0Am}溶液、羟基琥珀酰亚胺、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺与鸡卵清白蛋白的比值为2mL:0.1mg:0.7mg:1mg。

6. 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PSI_{0Am}免疫原与福氏完全佐剂等体积比混合后,背部皮下多点注射到动物体内,注射8~10个点,注射量为1mL/只;首次免疫三周后进行加强免疫;

b-2、加强免疫:将PSI_{0Am}免疫原与福氏不完全佐剂等体积比混合后,采取同样的方式注射到动物体内,注射量为1mL/只;此后每隔一周再进行一次加强免疫,期间采血测效价,直到抗体效价达到1:32000,进行最后一次加强免疫,从动物颈动脉采血,取血清部分制得PSI_{0Am}抗体。

7. 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、包被:用包被缓冲液将PSI_{0Am}包被抗原稀释100倍,包被96孔酶标板,每孔100μL,4

℃冰箱过夜；

c-2、封闭：PBST溶液洗涤96孔酶标板3次，每次3~5min，然后加入1wt%酪蛋白封闭，每孔200 μ L，37℃温育1~2h；

c-3、加样竞争：PBST溶液洗涤96孔酶标板3次，每次3~5min，然后将50 μ L 不同浓度的PSI_{0Am}标准液和50 μ L PSI_{0Am}抗体分梯度加入各孔中，37℃温育1~2h；

c-4、加酶：PBST溶液洗涤96孔酶标板3次，每次3~5min，然后每孔加入100 μ L PBS稀释的稀释比为1/1000的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体，37℃温育2~4h；

c-5：显色：PBST溶液洗涤96孔酶标板3次，每次3~5min，然后每孔加入100 μ L邻苯二胺底物液进行显色反应，37℃温育0.5~1h；

c-6、终止：每孔加入50 μ L 2moI/L的H₂SO₄终止反应，在酶标仪上测定各孔在490nm处的吸光值。

一种基于间接竞争酶联免疫法定量检测油胺枝接聚琥珀酰亚胺高分子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,特别涉及一种基于间接竞争酶联免疫法定量检测油胺枝接聚琥珀酰亚胺(PSI_{0Am})高分子纳米药物载体的方法。

背景技术

[0002] 上世纪60年代,化学家们提出,可以将高分子材料应用于生物医药领域,合成一种高分子药物载体,用来改善药物结构,提高药效。高分子药物载体本身并不具备药理作用,也不与药物发生化学反应,而是以适当的方式(氢键、离子键或络合形式,主要为前者)与低分子药物结合。高分子化合物仅作为低分子药物的传递系统,真正发挥药理作用的仍是低分子药物。

[0003] 高分子纳米药物载体是指具有纳米尺度的高分子载体,实现对多肽分子、寡核苷酸、DNA、RNA和小分子化疗药物等多种药物的携载。药物分子通过物理或化学的方式包载在纳米材料载体上,形成药物-载体的复合体系。从20世纪末开始,越来越多的研究人员开始关注和构建用于药物输送的纳米载体,并且这些纳米药物载体在肿瘤治疗中展现出广阔的应用前景。纳米材料作为基因和药物载体的纳米学的出现,给癌症治疗注入了新的希望。

[0004] 近10多年,各种聚合物纳米载体被开发用于运载抗癌药物和蛋白质,实现对肿瘤的高效低毒治疗。尽管这些高分子纳米药物载体已步入临床试验阶段,但对这些物质的定量检测却鲜有报道,大部分已发表的期刊杂志关于高分子纳米药物载体的研究主要集中在以下几个方面:纳米载体的制备及表征、纳米载体与抗癌药物的偶联、抗癌药物在病灶部位的缓释效率及药效、纳米载体及其药物在生物体内的分布、体外细胞毒性测试等。可见对于纳米载体本身在生物体内的定量检测研究甚少。

发明内容

[0005] 为解决上述问题,本发明提供一种基于间接竞争酶联免疫法定量检测油胺枝接聚琥珀酰亚胺(PSI_{0Am})高分子纳米药物载体的方法,利用了二抗放大了检测信号,提高了实验分析的灵敏度,即通过测量PSI_{0Am}包被抗原、PSI_{0Am}抗体即一抗与HRP标记的羊抗兔抗体即二抗,三者复合物的光学性号达到定量检测PSI_{0Am}的目的,该方法快速、简洁、检测限低,可进行高通量测定。

[0006] 本发明采取的技术方案为:

[0007] 一种基于间接竞争酶联免疫法定量检测油胺枝接聚琥珀酰亚胺(PSI_{0Am})高分子纳米药物载体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0008] a、制备PSI_{0Am}包被抗原和免疫原;

[0009] b、制备PSI_{0Am}抗体;

[0010] c、将PSI_{0Am}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PSI_{0Am}标准液,以PSI_{0Am}抗体作为一抗,HRP标记的羊抗兔抗体作为二抗,进行间接竞争酶联

免疫分析法；

[0011] d、以PSI_{0Am}标准液浓度的对数为横坐标，吸光度值为纵坐标建立标准曲线，从而定量检测出PSI_{0Am}的浓度。

[0012] 所述标准曲线的线性方程为 $A=1.256-0.148IgC$ ，其中A为490nm处吸光度值，C为PSI_{0Am}浓度。其相关系数 $R^2=0.993$ ，线性范围为 $10^{-2}-10^4$ ，检出限为0.03ng/mL

[0013] 所述步骤a具体包括以下步骤：

[0014] a-1、水解PSI_{0Am}，得到水解后的PSI_{0Am}溶液；水解以使PSI_{0Am}中的羧基暴露出来，更好的连接大分子蛋白以制备PSI_{0Am}免疫原和PSI_{0Am}包被抗原；

[0015] a-2、向水解后的PSI_{0Am}溶液中，加入羟基琥珀酰亚胺、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺和牛血清白蛋白，20-30℃温育3-6小时后，离心分离，取沉淀分散于pH=7.4的PBS缓冲液中即得到PSI_{0Am}免疫原溶液；

[0016] a-3、向水解后的PSI_{0Am}溶液中，加入羟基琥珀酰亚胺、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺和鸡卵清白蛋白，20-30℃温育3-6小时后，离心分离，取沉淀分散于pH=7.4的PBS缓冲液中即得到PSI_{0Am}包被抗原溶液；

[0017] a-4、将PSI_{0Am}免疫原溶液和PSI_{0Am}包被抗原溶液分别置于透析袋中，以pH=7.4的PBS缓冲液透析12-16h后收集，即可得到PSI_{0Am}免疫原和PSI_{0Am}包被抗原。

[0018] 所述步骤a-1具体包括以下步骤：将浓度为60mg/mL的油胺接枝聚琥珀酰亚胺的三氯甲烷溶液0.1-0.5mL，分散在1-6mL 0.1-1mmol/L NaOH中，超声5-10min，得到的乳状溶液在50-65℃下搅拌5-15min，反应结束后离心分离，沉淀分散在1-5mL pH=7.4的PBS缓冲液中，得到水解后的PSI_{0Am}溶液。

[0019] 进一步地，水解后的PSI_{0Am}的浓度为1~10mg/mL。

[0020] 水解后的PSI_{0Am}溶液、羟基琥珀酰亚胺、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺、牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白的比值为(1-10)mL:(0.1-1)g:(0.1-1)g:(1-10)mg:(1-10)mg。

[0021] 所述步骤b具体包括以下步骤：

[0022] b-1、首次免疫：将PSI_{0Am}免疫原与福氏完全佐剂等体积比混合后，背部皮下多点注射到动物体内，注射8~10个点，注射量为1mL/只；

[0023] b-2、加强免疫：将PSI_{0Am}免疫原与福氏不完全佐剂等体积比混合后，采取同样的方式注射到动物体内，注射量为1mL/只；此后每隔一周再进行一次加强免疫，期间采血测效价，直到抗体效价达到1:32000，进行最后一次加强免疫，从动物颈动脉采血，取血清部分制得PSI_{0Am}抗体。

[0024] 所述步骤c具体包括以下步骤：

[0025] c-1、包被：用包被缓冲液将PSI_{0Am}包被抗原稀释100倍，包被96孔酶标板，每孔100μL，4℃冰箱过夜；

[0026] c-2、封闭：PBST溶液洗涤96孔酶标板3次，每次3~5min，然后加入1wt%酪蛋白封闭，每孔200μL，37℃温育1~2h；PBST溶液洗涤的目的是洗去未被结合上的PSI_{0Am}包被抗原；

[0027] c-3、加样竞争：PBST溶液洗涤96孔酶标板3次，每次3~5min，然后将50μL不同浓度的PSI_{0Am}标准液和50μL PSI_{0Am}抗体分梯度加入各孔中，37℃温育1~2h，PBST溶液洗涤的目的是洗去多余的封闭液；

[0028] c-4、加酶:PBST溶液洗涤96孔酶标板3次,每次3~5min,然后每孔加入100 μ L PBS稀释的稀释比为1/1000的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体,37 $^{\circ}$ C温育2~4h;PBST溶液洗涤的目的是洗去未被结合的游离态的PSI_{0Am}标准液或PSI_{0Am}抗体;

[0029] c-5:显色:PBST溶液洗涤96孔酶标板3次,每次3~5min,然后每孔加入100 μ L邻苯二胺底物液进行显色反应,37 $^{\circ}$ C温育0.5~1h;PBST溶液洗涤的目的是洗去未被酶标板结合的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体;

[0030] c-6、终止:每孔加入50 μ L 2mol/L的H₂SO₄终止反应,在酶标仪上测定各孔在490nm处的吸光值。

[0031] 本发明提供了一种基于间接竞争酶联免疫法定量检测油胺枝接聚琥珀酰亚胺(PSI_{0Am})高分子纳米药物载体的方法,利用酶联免疫分析技术中的间接竞争酶联免疫法,通过PSI_{0Am}抗体的制备,利用抗原抗体的特异性结合定量地检测了PSI_{0Am}的浓度。

[0032] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0033] (1) 利用机体的免疫应答效应,成功的制备出特异性高的PSI_{0Am}多克隆抗体,抗体的保质期较长,因此,可行性高。

[0034] (2) 利用酶联免疫分析技术中的间接竞争酶联免疫法对PSI_{0Am}的浓度进行了定量检测,该方法的发明为今后纳米药物载体的定量检测提供了一种可行性较高的方法。

[0035] (3) 该方法操作简单,可行性高,灵敏度高,检出限低。

附图说明

[0036] 图1为以PSI_{0Am}标准液浓度的对数为横坐标,490nm波长处的吸光度值为纵坐标建立标准曲线图。

具体实施方式

[0037] 福氏完全佐剂、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体、牛血清白蛋白和鸡卵清白蛋白购买自生工生物工程(上海)股份有限公司。

[0038] 其他试剂均可从市场上的销售厂家购买得到。

[0039] 本发明涉及到的各溶液的制备方法为:

[0040] PBS缓冲液:称取NaCl 8.0g、KCl 0.1g、NaH₂PO₄·2H₂O 0.29g、Na₂HPO₄·12H₂O 2.96g溶解于蒸馏水中并定容至1000mL,即可得到0.01mol/L pH=7.4的PBS缓冲液;

[0041] PBST溶液:在1000mL PBS中加入500 μ L Tween-20,混合均匀;

[0042] 包被缓冲液CB:称取Na₂CO₃ 1.59g、NaHCO₃ 2.94g溶解于蒸馏水中并定容至1000mL;即可得到0.05mol/L pH=9.6的包被缓冲液;

[0043] 邻苯二胺底物液:称取1.85g Na₂HPO₄·12H₂O、0.51g C₆H₈O₇溶解于蒸馏水中并定容至50mL,称取4mg邻苯二胺溶于10mL上述溶液中,临用前加入15 μ L 30% H₂O₂;

[0044] 1wt%酪蛋白:称取1mg酪蛋白溶于1mL 0.01mol/L pH=7.4的PBS缓冲液中,混合均匀。

[0045] 实施例1

[0046] 一种基于间接竞争酶联免疫法定量检测PSI_{0Am}的方法,包括以下步骤:

[0047] a、制备PSI_{0Am}包被抗原和免疫原,具体包括以下步骤:

[0048] a-1、水解PSI_{0Am},得到水解后的PSI_{0Am}溶液;

[0049] 参照Nano Research,2015,8(6):1932-1943文献中的方法制备得到了油胺接枝聚琥珀酰亚胺的三氯甲烷溶液,其步骤如下:取32mL N,N-二甲基甲酰胺加热至90℃,加入1.6g聚琥珀酰亚胺及2.17mL油胺,保持100℃加热5小时,最后加入80mL甲醇使其沉淀,离心分离,取沉淀称重后分散于2-10mL氯仿中,使溶液浓度调节为60mg/mL,得到油胺接枝聚琥珀酰亚胺的三氯甲烷溶液。

[0050] 取该溶液0.3mL分散在3mL 0.5mmol/L NaOH中,150W功率下超声7min,得到的乳状溶液在58℃下搅拌8min,反应结束后离心分离,取沉淀部分分散在6mL pH=7.4的PBS中,得到水解后的PSI_{0Am}溶液,其浓度为3mg/mL。

[0051] a-2、取2mL水解后的PSI_{0Am}溶液,加入0.1mg羟基琥珀酰亚胺(NHS)、0.7mg1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDAC)及1mg牛血清白蛋白(BSA),25℃温育4小时,离心分离,取沉淀分散于1mL pH=7.4的PBS中即得到了PSI_{0Am}免疫原溶液,将所得溶液置于透析袋中,PBS透析12h,收集,即得到了PSI_{0Am}免疫原,4℃储存待用;

[0052] a-3、取2mL水解后的PSI_{0Am}溶液,加入0.1mg羟基琥珀酰亚胺(NHS)、0.7mg1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDAC)及1mg鸡卵清白蛋白(OVA),25℃温育4小时,离心分离,取沉淀分散于1mL pH=7.4的PBS中即得到了PSI_{0Am}包被抗原溶液,将所得溶液置于透析袋中,PBS透析12h,收集,即得到了PSI_{0Am}包被抗原,4℃储存待用;

[0053] b、制备PSI_{0Am}抗体:

[0054] 取4只体重为2kg左右的健康雄性新西兰大白兔作为实验动物,实验之前首先饲养两周左右的时间,保持其健康的生活状态,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。

[0055] 首次免疫时,取等体积的PSI_{0Am}免疫原和福氏完全佐剂乳化均匀,背部皮下多点注射到3只雄兔的背部,每只雄兔的背部注射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。

[0056] 福氏佐剂的制备方法为: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福氏不完全佐剂,4℃冰箱储存待用。

[0057] 3周后进行第一次加强免疫,加强免疫时用等体积比的PSI_{0Am}免疫原和福氏不完全佐剂的混合物,注射方法同第一次免疫,以后每隔一周进行一次加强免疫,注射量为1mL/只,中间周静脉采血,用间接竞争酶联免疫分析法测定抗血清的效价,直到抗血清效价达到1:32000,进行最后一次加强免疫,取血清纯化得PSI_{0Am}抗体。

[0058] 抗血清效价的测定方法为:用包被缓冲液CB将PSI_{0Am}包被抗原稀释100倍,包被在96孔酶标板上,4℃冰箱过夜;次日早晨,用PBST溶液洗3次,每次3min,除去未包被上的包被抗原,每孔加200μL 1wt%酪蛋白封闭,37℃封闭1h;PBST洗3次,每次3min,加入用PBS稀释的抗血清,其稀释比为1/1000~1/64000,每孔100μL,37℃温育2h;PBST洗3次,每次3min,加入用PBS稀释1000倍的HRP标记的羊抗兔IgG,每孔100μL,37℃温育2h;PBST洗3次,每次

3min,加入邻苯二胺底物液显色,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C温育显色0.5h;加入50 μ L 2moI/LH₂SO₄终止反应。用多功能酶标仪测490nm处吸光值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_{对照组}时对应的最大稀释倍数即抗血清的效价。

[0059] c、利用PSI_{0Am}抗体和PSI_{0Am}包被抗原进行间接竞争酶联免疫分析法,由于光度酶联免疫分析法中的间接竞争酶联免疫分析法是利用HRP标记的羊抗兔抗体IgG(即二抗)检测与PSI_{0Am}包被抗原结合的PSI_{0Am}抗体(即一抗),最后通过检测抗原一抗二抗的复合物的光信号达到定量检测抗原的目的,该方法比仅利用抗原一抗的复合物即直接竞争酶联免疫法的光信号检测抗原具有更低的检出限,更高的灵敏度,所述步骤c具体包括以下步骤:

[0060] c-1、包被:用包被缓冲液将PSI_{0Am}包被抗原稀释100倍,包被于96孔酶标板中的24个孔中,即每行取3个孔进行实验,每孔100 μ L,冰箱4 $^{\circ}$ C过夜;

[0061] c-2、封闭:取出酶标板,PBST洗涤3次,每次3min,加入1wt%酪蛋白进行封闭,每孔200 μ L,37 $^{\circ}$ C封闭1h;

[0062] c-3、加样竞争:PBST洗涤3次,每次3min,将50 μ L浓度分别为0.01ng/mL、0.1ng/mL、1ng/mL、10ng/mL、10²ng/mL、10³ng/mL、10⁴ng/mL的PSI_{0Am}标准液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50 μ LPSI_{0Am}抗体,37 $^{\circ}$ C竞争2h;

[0063] 不同浓度的PSI_{0Am}标准液的制备方法为:用0.01moI/L pH=7.4的PBS缓冲溶液将PSI_{0Am}稀释到指定的浓度;

[0064] c-4、加酶:PBST洗涤3次,每次3min,每孔加入100 μ LPBS稀释的稀释比为1/1000的HRP标记的羊抗兔抗体IgG,37 $^{\circ}$ C温育2.5h;

[0065] c-5:显色:PBST溶液洗涤96孔酶标板3次,每次3min,然后每孔加入100 μ L邻苯二胺底物液进行显色反应,37 $^{\circ}$ C温育0.5h;

[0066] c-6、终止:每孔加入50 μ L 2moI/L的H₂SO₄终止反应,在酶标仪上测定各孔在490nm处的吸光度值,同一浓度梯度的取平均值计算吸光度值;

[0067] d、以PSI_{0Am}标准液浓度的对数为横坐标,吸光度值为纵坐标建立标准曲线,制得的标准曲线如图1所示,标准曲线的线性方程为:A=1.256-0.148IgC,其中A为490nm处的吸光值,C为PSI_{0Am}的浓度,其相关系数R²=0.993,线性范围为10⁻²-10⁴,检出限为0.03ng/mL;

[0068] e、重复以上各步骤,只是将步骤c-3中的不同浓度的PSI_{0Am}标准液替换为未知浓度的PSI_{0Am}待测液,然后在酶标仪上测定各孔在490nm处的吸光度值,求取平均吸光度值,根据上述标准曲线A=1.256-0.148IgC,即可计算出PSI_{0Am}待测液的浓度。

[0069] 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。

[0070] 上述参照实施例对基于间接竞争酶联免疫法定量检测油胺接枝聚琥珀酰亚胺(PSI_{0Am})高分子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。

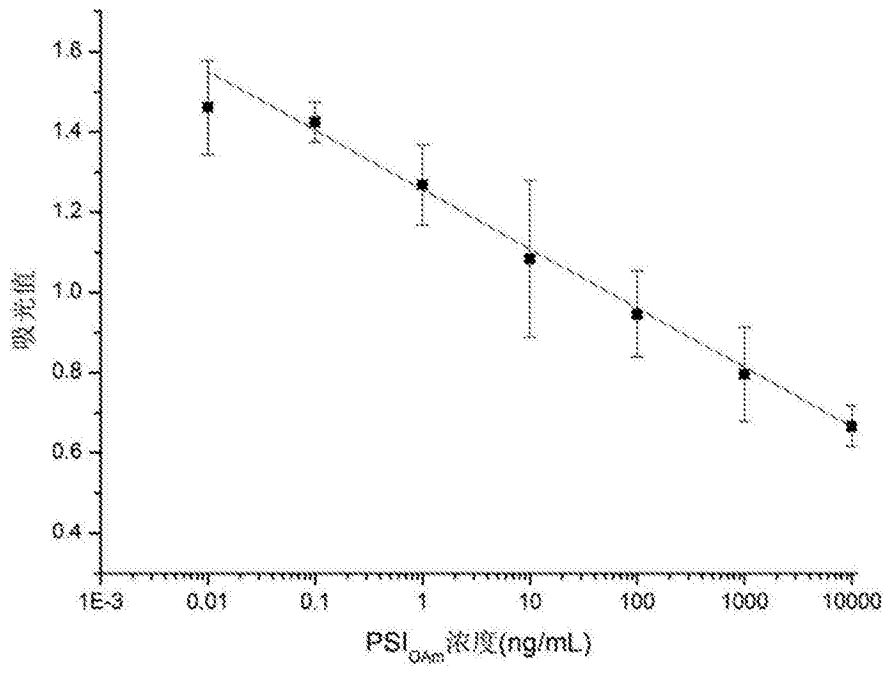


图1

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种基于间接竞争酶联免疫法定量检测油胺枝接聚琥珀酰亚胺高分子纳米药物载体的方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN106706894B | 公开(公告)日 | 2018-04-13 |
| 申请号 | CN2017110051804.8 | 申请日 | 2017-01-20 |
| [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 曹以婷 | | |
| 发明人 | 张明翠 曹以婷 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | G01N33/53 | | |
| 审查员(译) | 肖吉 | | |
| 其他公开文献 | CN106706894A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种基于间接竞争酶联免疫法定量检测油胺枝接聚琥珀酰亚胺(PSIOAm)高分子纳米药物载体的方法，利用了二抗放大了检测信号，提高了实验分析的灵敏度，即通过测量PSIOAm包被抗原、PSIOAm抗体即一抗与HRP标记的羊抗兔抗体即二抗，三者复合物的光学信号达到定量检测PSIOAm的目的，该方法操作简单，可行性高，灵敏度高，检出限低，可实现高通量检测。

