



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107328929 B

(45)授权公告日 2019.06.04

(21)申请号 201710489336.2

G01N 21/31(2006.01)

(22)申请日 2017.06.24

审查员 张婷

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107328929 A

(43)申请公布日 2017.11.07

(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 闫希

(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 尹婷婷

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/541(2006.01)

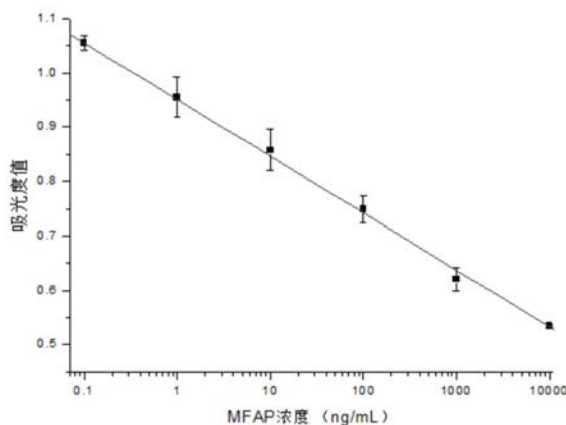
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种PSI-0Am-NAPI两亲聚合纳米材料的定量检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种PSI-0Am-NAPI两亲聚合纳米材料的定量检测方法,该法通过在抗原抗体(一抗)特异性结合的基础上加入酶标二抗使其与抗原一抗的复合物结合,使特异性进一步加强,并将免疫学反应中抗原抗体的高特异性和酶催化反应的专一性相结合,并通过酶促反应的放大作用来提高免疫反应的信号,提高了实验分析的灵敏度,该方法特异性强、灵敏度高,是一种快速、简便的高通量测定方法。



1. 一种PSI-OAm-NAPI两亲聚合纳米材料的定量检测方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

a、水解PSI-OAm-NAPI,得到水解后的PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料溶液;

b、制备PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料的免疫抗原和包被抗原;

c、制备PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料抗体;所述抗体的效价为1:64000;

d、将PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料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-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料标准液,以PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料抗体作为一抗,辣根过氧化物酶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;

e、以PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料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-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料的浓度;

所述步骤a具体包括以下步骤:将40~80mg PSI-OAm-NAPI纳米粒子与0.4~0.8mg聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物溶解于1~6mL三氯甲烷溶液中,加入8~16mL浓度为0.002~0.008mg/mL新配置的氢氧化钠溶液超声,50~60℃蒸发除去三氯甲烷;最后经过离心取沉淀分散于PBS溶液中得到水解后的PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料溶液。

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: $A=0.951-0.1041gC$,相关系数 $R=-0.999$,线性范围为 $0.82\sim 6.31\times 10^4\text{ng/mL}$,检出限为 0.057ng/mL ;其中,A为490nm处吸光度值,C为PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料的浓度。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述水解后的PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料溶液的浓度为2~10mg/mL。

4. 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、将N-羟基琥珀酰亚胺、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐和牛血清白蛋白加入到水解后的PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料溶液中,18~29℃温育2~6小时后离心分离,将沉淀分散到中性PBS缓冲液中得到免疫抗原溶液,将溶液装入透析袋中,放入PBS缓冲溶液中透析过夜,即可制得PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料的免疫抗原;

b-2、将步骤b-1中的牛血清白蛋白替换为鸡卵清白蛋白,其他条件保持不变,即可制得PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料的包被抗原。

5. 根据权利要求4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、向2mL步骤a得到的水解后的PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料溶液中加入包含有0.2~2 mg的N-羟基琥珀酰亚胺和0.2~2mg的1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐的2mLPBS缓冲溶液,震荡反应20~30min后加入2~10mg牛血清白蛋白,于25℃下反应2~4 h,之后于离心机12000~20000r/min离心10~15min,取沉淀分散到PBS缓冲液中,得到免疫抗原溶液,将溶液装入透析袋中,放入PBS缓冲溶液中透析过夜,即可制得PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料的免疫抗原,其浓度为1~5mg/mL;

b-2、将步骤b-1中的牛血清白蛋白替换为鸡卵清白蛋白,其他条件保持不变,即可制得PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料的包被抗原,其浓度为1~5mg/mL。

6. 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、首次免疫:将PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料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0.5~1.0mg/kg/次;首次免疫

三周后进行加强免疫；

c-2、加强免疫：将PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料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0.5~1.0mg/kg/次；此后每两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1:64000，一周后采血，纯化得到PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料抗体。

7. 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、将PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料包被抗原溶液用碳酸盐缓冲液稀释到2~10 μ g/mL包被96孔酶标板，以80~150 μ L/孔的量包被并于4 $^{\circ}$ C冰箱内培养过夜；之后用PBST洗涤液洗涤酶标板2~5次，每次3~6min最后一次需拍干；

d-2、加入质量分数1%~5%酪蛋白封闭液，200~250 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C温育1.5~2h；之后用PBST洗涤液洗涤酶标板2~5次，每次3~6min最后一次需拍干；

d-3、每孔加入40~60 μ L不同浓度的PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料标准液和40~60 μ L1~5 μ g/mL的PSI-OAM-NAPI两亲聚合纳米材料抗体，37 $^{\circ}$ C温育2~4h；之后用PBST洗涤液洗涤酶标板2~5次，每次3~6min最后一次需拍干；

d-4、加酶：每孔加入80~150 μ L经PBS稀释后的稀释比为1:5000的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体，37 $^{\circ}$ C温育2~4h；之后用PBST洗涤液洗涤酶标板2~5次，每次3~6min最后一次需拍干；

d-5、显色：每孔加入50~100 μ L邻苯二胺底物液进行显色反应，37 $^{\circ}$ C显色15~45min；

d-6、终止：每孔加入50~100 μ L H₂SO₄终止反应，在酶标仪上测定各孔在490nm处的吸光值。

一种PSI-OAm-NAPI两亲聚合纳米材料的定量检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种PSI-OAm-NAPI两亲聚合纳米材料的定量检测方法,具体涉及一种基于二抗的放大作用检测PSI-OAm-NAPI两亲聚合纳米材料的免疫分析方法。

背景技术

[0002] 癌症、心血管疾病、糖尿病已成为威胁人类生命安全的三大杀手。面对庞大的癌症数量和死亡人数,现阶段治疗癌症的主要手段是外科手术治疗、放射疗法和化学疗法等。对于化学疗法而言,这些手段过程痛苦,难以达到预期效果,并且具有很强的依赖性。像放射疗法,在杀死癌细胞的同时不可避免的破坏了正常组织细胞,使免疫力降低。而使用纳米载药系统用于肿瘤的治疗时,其纳米尺度的特征在肿瘤治疗中产生了重大意义。

[0003] 聚合物胶体这是近几年正在发展的一类新型的纳米载体。有目标地合成水溶性嵌段共聚物使之同时具有亲水性基因和疏水性基因,在水中溶解后自发形成高分子胶束,从而完成对药物的增溶和包裹。因其具有亲水性外壳及疏水性内核,适合于携带不同性质的药物,因优良的生物降解特性,聚合物胶体受到密切关注。

[0004] 与传统的药物制剂相比,纳米药物载体具有诸多优势:可经过血液循环进入毛细血管,透过内皮细胞间隙进入病灶,被细胞以胞饮的方式吸收,提高药物利用率;纳米药物载体粒径较小,拥有较高的比表面积,可以包埋疏水性药物,提高其溶解性,减少常规用药中助溶剂的副作用;纳米药物载体经靶向基团修饰后可实现靶向给药,减少药剂量使用,降低副作用;可延长药物的消除半衰期,提高药效,降低用药频率。

[0005] 这些载体材料经纳米化处理后是否会产生毒性作用直接影响到最终纳米制剂的生物安全性,也是纳米材料工作者研究的重要内容之一。然而对于药物纳米制剂的生物安全性评价标准和评价方法,目前来说国际上还没有一个统一、完善的实施办法,对于纳米粒子定量检测的报道更是甚少。全面深入的研究纳米材料,对其进行定量检测是评价纳米材料的安全性,制备纳米制剂的重要前提。

[0006] 常用的定量表征手段如质谱法应用比较广泛且高效快速,但它对纳米粒子的尺寸要求太过严格;电感耦合等离子体质谱法将ICP的高温电离的特性和质谱仪的快速灵敏扫描的优势结合,可以同时测定很多种元素,分析速度快且灵敏度高、检测限低,被广泛用于环境检测、食品药品分析等诸多领域,但存在质谱干扰、基体效应等问题;气相色谱-电感耦合等离子体质谱法的样品传输率非常高,在不消除溶剂效应的情况下仍可获得很低的检出限和较高的回收率,不过此方法适用于易挥发的样品,使用范围较窄;电化学分析法的仪器设备简单,价格低廉,操作简单,但其稳定性差,灵敏度低,试剂有一定的毒性;这些传统的方法对未能很好的实现定量检测纳米材料的目的。

发明内容

[0007] 为解决上述问题,本发明提供了一种PSI-OAm-NAPI两亲聚合纳米材料的定量检测方法,即基于二抗的放大作用检测PSI-OAm-NAPI两亲聚合纳米材料的免疫分析方法。PSI-

OAm-NAPI两亲聚合纳米材料(MFAP)通过聚琥珀酰亚胺(PSI)、N-(3-氨基丙基)咪唑(NAPI)和油胺(OAm)共同作用得到,并使用间接竞争酶联免疫分析法实现对PSI-OAm-NAPI两亲聚合纳米材料的定量检测,该法通过在抗原抗体(一抗)特异性结合的基础上加入酶标二抗使其与抗原一抗的复合物结合,特异性进一步加强,并将免疫学反应中抗原抗体的高特异性和酶催化反应的专一性相结合,并通过酶促反应的放大作用来提高免疫反应的信号,提高了实验分析的灵敏度,该方法特异性强、灵敏度高,是一种快速、简便的高通量测定方法。

[0008] 本发明采取的技术方案为:

[0009] 一种PSI-OAm-NAPI两亲聚合纳米材料的定量检测方法,所述方法包括以下步骤:

[0010] a、水解PSI-OAm-NAPI,得到水解后的MFAP溶液;

[0011] b、制备MFAP的免疫抗原和包被抗原;

[0012] c、制备MFAP抗体;

[0013] d、将MFAP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MFAP标准液,以MFAP抗体作为一抗,辣根过氧化物酶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;

[0014] e、以MFAP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MFAP的浓度。

[0015] 所述标准曲线的线性方程为: $A=0.951-0.1041gC$,相关系数 $R=-0.999$,线性范围为 $0.82\sim 6.31\times 10^4\text{ng/mL}$,检出限为 0.057ng/mL ;其中,A为490nm处吸光度值,C为MFAP的浓度。

[0016] 所述步骤a具体包括以下步骤:将PSI-OAm-NAPI纳米粒子与聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物(PEG-PLGA)溶解于三氯甲烷溶液中,加入新配置的氢氧化钠溶液超声,蒸发除去三氯甲烷;最后经过离心取沉淀分散于PBS中得到水解后的MFAP溶液。

[0017] 进一步地,所述步骤a具体包括以下步骤:将 $40\sim 80\text{mg}$ PSI-OAm-NAPI纳米粒子与 $0.4\sim 0.8\text{mg}$ 聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物(PEG-PLGA)溶解于 $1\sim 6\text{mL}$ 三氯甲烷溶液中,加入 $8\sim 16\text{mL}$ 浓度为 $0.002\sim 0.008\text{mg/mL}$ 新配置的氢氧化钠溶液超声, $50\sim 60^\circ\text{C}$ 蒸发除去三氯甲烷;最后经过离心取沉淀分散于PBS溶液中得到水解后的MFAP溶液。

[0018] 纳米材料不具有免疫原性,仅具有反应原性,通过与大分子蛋白质的结合形成既具有反应原性又具有免疫原性的全抗原。水解暴露出MFAP中的羧基,通过共价偶联的方式连接大分子蛋白质牛血清白蛋白(BSA)制备成免疫抗原,连接卵清蛋白(OVA)制备成包被抗原。

[0019] 所述水解后的MFAP溶液的浓度为 $2\sim 10\text{mg/mL}$

[0020] 所述步骤b具体包括以下步骤:

[0021] b-1、将N-羟基琥珀酰亚胺、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐和牛血清白蛋白加入到水解后的MFAP溶液中, $18\sim 29^\circ\text{C}$ 温育 $2\sim 6$ 小时后离心分离,将沉淀分散到中性PBS缓冲液中得到免疫抗原溶液,将溶液装入透析袋中,放入PBS缓冲溶液中透析过夜,即可制得MFAP的免疫抗原;

[0022] b-2、将步骤b-1中的牛血清白蛋白替换为鸡卵清白蛋白,其他条件保持不变,即可制得MFAP的包被抗原。

[0023] 所述步骤b具体包括以下步骤:

[0024] b-1、向2mL步骤a得到的水解后的MFAP溶液中加入包含有0.2~2mg的N-羟基琥珀酰亚胺和0.2~2mg的1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐的2mLPBS缓冲溶液,震荡反应20~30min后加入2~10mg牛血清白蛋白,于25℃下反应2~4h,之后于离心机12000~20000r/min离心10~15min,取沉淀分散到PBS缓冲液中,得到免疫抗原溶液,将溶液装入透析袋中,放入PBS缓冲溶液中透析过夜,即可制得MFAP的免疫抗原,其浓度为1~5mg/mL

[0025] b-2、将步骤b-1中的牛血清白蛋白替换为鸡卵清白蛋白,其他条件保持不变,即可制得MFAP的包被抗原,其浓度为1~5mg/mL

[0026] 所述步骤c具体包括以下步骤:

[0027] c-1、首次免疫:将MFAP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0.5~1.0mg/kg/次;首次免疫三周后进行加强免疫;

[0028] c-2、加强免疫:将MFAP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0.5~1.0mg/kg/次;此后每两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1:64000,一周后心脏采血,纯化得到MFAP抗体。

[0029] 所述步骤d具体包括以下步骤:

[0030] d-1、将MFAP包被抗原溶液用碳酸盐缓冲液稀释到2~10μg/mL包被96孔酶标板,以80~150μL/孔的量包被并于4℃冰箱内培养过夜;之后用PBST洗涤液洗涤酶标板2~5次,每次3~6min最后一次需拍干;

[0031] d-2、加入质量分数1%~5%酪蛋白封闭液,200~250μL/孔,37℃温育1.5~2h;之后用PBST洗涤液洗涤酶标板2~5次,每次3~6min最后一次需拍干;

[0032] d-3、每孔加入40~60μL不同浓度的MFAP标准液和40~60μL1~5μg/mL的MFAP抗体,37℃温育2~4h;之后用PBST洗涤液洗涤酶标板2~5次,每次3~6min最后一次需拍干;

[0033] d-4、加酶:每孔加入80~150μL经PBS稀释后的稀释比为1:5000的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体,37℃温育2~4h;之后用PBST洗涤液洗涤酶标板2~5次,每次3~6min最后一次需拍干;

[0034] d-5:显色:每孔加入50~100μL邻苯二胺底物液进行显色反应,37℃显色15~45min;

[0035] d-6、终止:每孔加入50~100μL H₂SO₄终止反应,在酶标仪上测定各孔在490nm处的吸光值。

[0036] 本发明建立了一种PSI-OAm-NAPI两亲聚合纳米材料的定量检测方法,基于二抗的放大作用检测以聚琥珀酰亚胺为先导的纳米材料的方法。利用免疫分析方法抗原和抗体的特异性反应达到检测抗原或抗体的目的。

[0037] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0038] (1) 首次制备了MFAP多克隆抗体,为建立间接竞争酶联免疫分析法提供了核心试剂;

[0039] (2) 该方法将免疫学反应中抗原抗体的高特异性和酶催化反应的专一性相结合,并通过酶促反应的放大作用来提高免疫反应的信号,提高了实验分析的灵敏度

[0040] (3) 该方法方便快捷、检测成本低、专一性强、灵敏度高,可进行高通量测定。

附图说明

[0041] 图1为实施例1得到的标准曲线；

具体实施方式

[0042] 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。

[0043] 聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物(MPEG-PLGA)购买自山东岱罡生物有限公司。

[0044] 其他试剂均可从市场上的销售厂家购买得到。

[0045] 本发明涉及到的各溶液如无特殊说明均指以下溶液,各溶液的制备方法为:

[0046] 碳酸盐缓冲溶液(0.05M, pH=9.6, CB):其作为包被缓冲溶液,称取1.59gNa₂CO₃, 2.94gNaHCO₃,用蒸馏水溶解并定容至1000mL,主要用于包被抗原的稀释;

[0047] PBS溶液(0.01M, pH=7.4):称取8.0g NaCl, 0.1g KCl, 0.29g NaH₂PO₄·2H₂O, 2.96g Na₂HPO₄·12H₂O用蒸馏水溶解并定容至1000mL。

[0048] PBST溶液(0.01M, pH=7.4):1000mL PBS缓冲液中加入500μL吐温-20。

[0049] 1wt%酪蛋白溶液:其作为封闭液,称取100mg酪蛋白溶解于10mL 0.01M, pH=7.4的PBS中。

[0050] 底物液:称取1.02g柠檬酸, 3.68g磷酸氢二钠,用蒸馏水溶解并定容到100mL。

[0051] 显色剂:称取0.0032g邻苯二胺溶于8mL上述底物液中,临用前再加入12μL30%的H₂O₂。

[0052] 终止液(2M硫酸溶液):量取21.7mL浓硫酸加入到200mL二次水中,边加入边搅拌使其混合均匀。

[0053] 实施例1

[0054] 一种PSI-OAm-NAPI两亲聚合纳米材料的定量检测方法,包括以下步骤:

[0055] a、水解PSI-OAm-NAPI,将产物记为MFAP,得到水解后的MFAP溶液;

[0056] 将32mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)加入到三口烧瓶并加热至60℃,加入1.6g聚琥珀酰亚胺(PSI)和1.63mL的油胺(OAm),反应10min后加入0.83mL的N-(3-氨基丙基)咪唑(NAPI),之后于100℃加热反应5小时,冷却至室温后加入180mL甲醇使其均匀沉淀,离心分离,取沉淀干燥。

[0057] 将质量为80mg的MFAP纳米粒子和0.8mg的聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物(MPEG-PLGA)溶解到1mL三氯甲烷溶液中,溶解后加入10mL浓度为0.006mg/mL氢氧化钠溶液,超声5min,功率约300W,将得到的溶液在55℃下蒸发除去三氯甲烷,之后于离心机20000r/min离心10min,取沉淀分散在2mL PBS缓冲液中,得到水解后的MFAP溶液,其浓度为5mg/mL

[0058] b、制备MFAP包被抗原和免疫抗原,具体包括以下步骤:

[0059] b-1、在2mL水解后的MFAP溶液,加入包含0.2mg的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和1.4mg的1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDAC.HCl)的2mLPBS缓冲溶液,震荡反应20min后加入2mg牛血清白蛋白,于25℃下反应4h,之后于离心机12000r/min离心10min,取沉淀分散到1mLPBS缓冲液中,装入截留分子量为8000~140000Da的透析袋中,并用PBS缓冲液透析过夜,即可得到MFAP免疫抗原,其浓度为2mg/mL,收集保存于4℃冰箱待用。

[0060] b-2、与免疫抗原不同的为将所加牛血清白蛋白 (BSA) 替换为鸡卵清白蛋白 (OVA)，其他试剂及剂量不变，所得产物即为MFAP包被抗原，其浓度为2mg/mL。

[0061] c、制备MFAP抗体

[0062] c-1、首次免疫：将步骤b得到的MFAP免疫抗原与弗氏佐剂1:1混匀，用注射器乳化1h后将乳化好的抗原通过背部皮下注射方式免疫新西兰大白兔。选取8只体重2kg左右，月龄2个月左右的健康雄性新西兰大白兔，其中1到6号兔子为实验兔，13、14号兔子空白对照组。用剪刀剪去兔子背部毛发，医用酒精消毒，背部皮下注射8到10个点，总剂量1.0mg/kg/次。三周后进行加强免疫；

[0063] c-2、加强免疫：将MFAP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1.0mg/kg/次；此后每两周再进行一次加强免疫，在加强免疫中间周于兔耳缘静脉取血0.5mL，测效价，直到抗体效价达到1:64000，一周后心脏采血，纯化得到MFAP抗体，于-25℃保存待用。

[0064] 弗氏不完全佐剂的制备方法为：取50g无水羊毛脂和100mL液体石蜡进行超声混合，超声3h多次进行，每次20min，3小时后滴一滴乳化剂于冰水混合液中，若能够停留在水面上半分钟且不扩散则表示成功制备弗氏不完全佐剂。

[0065] d、间接竞争酶联免疫分析法定量测定MFAP

[0066] d-1、包被：将MFAP包被抗原用碳酸盐缓冲液稀释成5μg/mL，包被96孔酶标板，以100μL/孔的量包被并于4℃冰箱内过夜；之后用PBST洗涤液洗涤酶标板3次，每次3min最后一次需拍干；

[0067] d-2、封闭：加入质量分数1%的酪蛋白封闭液，200μL/孔，37℃温育1.5h；之后用PBST洗涤液洗涤酶标板3次，每次3min最后一次需拍干；

[0068] d-3、加样竞争：每孔加入50μL浓度分别为0.01ng/mL、0.1ng/mL、1ng/mL、10ng/mL、10²ng/mL、10³ng/mL、10⁴ng/mL的MFAP标准液和50μL浓度为3μg/mL的MFAP抗体，37℃温育2.5h；之后用PBST洗涤液洗涤酶标板3次，每次3min最后一次需拍干；

[0069] 不同浓度的MFAP标准液标准液的制备方法为：用0.01mol/L pH=7.4的PBS缓冲溶液将PSI-0Am-NAPI两亲聚合纳米材料稀释到指定的浓度；

[0070] d-4、加酶：每孔加入100μL稀释比为1:5000辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体，37℃温育2h；之后用PBST洗涤液洗涤酶标板3次，每次3min最后一次需拍干；

[0071] d-5、显色：每孔加入100μL显色剂，于37℃显色30min；

[0072] d-6、终止：每孔加入50μL H₂SO₄终止反应，在酶标仪上测定各孔在490nm处的吸光值。

[0073] e、以MFAP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，所得标准曲线的线性方程为： $A=0.951-0.1041gC$ ，相关系数 $R=-0.999$ ，线性范围为 $0.82\sim 6.31\times 10^4$ ng/mL，检出限为0.057ng/mL。

[0074] f、重复以上各步骤，只是将步骤c-3中的不同浓度的MFAP标准液替换为未知浓度的MFAP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 $A=0.951-0.1041gC$ ，A为490nm处的吸光度值，C为MFAP的浓度，即可计算出待测MFAP的浓度。

[0075] 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。

[0076] 上述参照实施例对一种PSI-0Am-NAPI两亲聚合纳米材料的定量检测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。

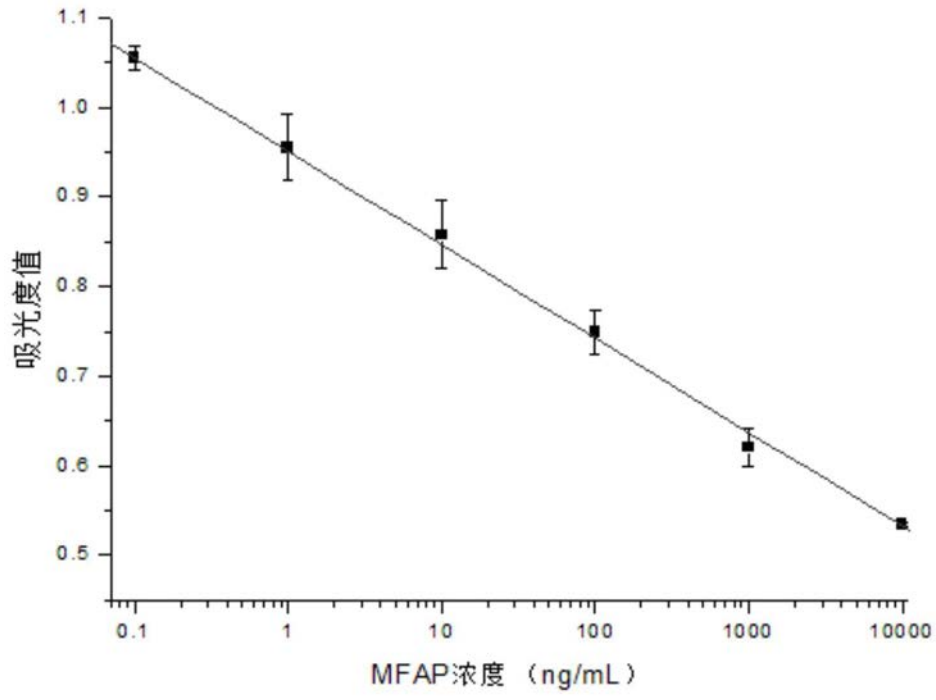


图1

专利名称(译)	一种PSI-OAm-NAPI两亲聚合纳米材料的定量检测方法		
公开(公告)号	CN107328929B	公开(公告)日	2019-06-04
申请号	CN2017110489336.2	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 闫希		
发明人	张明翠 闫希		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/541 G01N21/31		
CPC分类号	G01N21/31 G01N33/535 G01N33/541		
代理人(译)	尹婷婷		
审查员(译)	张婷		
其他公开文献	CN107328929A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种PSI-OAm-NAPI两亲聚合纳米材料的定量检测方法，该法通过在抗原抗体(一抗)特异性结合的基础上加入酶标二抗使其与抗原一抗的复合物结合，使特异性进一步加强，并将免疫学反应中抗原抗体的高特异性和酶催化反应的专一性相结合，并通过酶促反应的放大作用来提高免疫反应的信号，提高了实验分析的灵敏度，该方法特异性强、灵敏度高，是一种快速、简便的高通量测定方法。

