



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109682967 A

(43)申请公布日 2019.04.26

(21)申请号 201811539516.8

(22)申请日 2018.12.17

(71)申请人 暨南大学

地址 510632 广东省广州市天河区黄埔大道西601号

(72)发明人 陈填烽 刘宏星

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245

代理人 苏运贞

(51)Int.Cl.

G01N 33/545(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

C08G 73/02(2006.01)

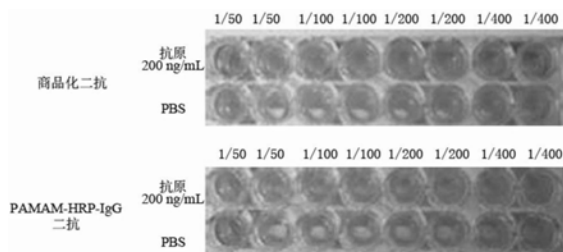
权利要求书2页 说明书6页 附图4页

(54)发明名称

PAMAM在制备用于免疫检测的试剂中的应用

(57)摘要

本发明公开了PAMAM在制备用于免疫检测的制剂中的应用。本发明是基于本发明发明人发现PAMAM改性后,分别与活化的酶和特异性抗体共价连接,得到的酶标试剂用于免疫检测,具有灵敏度高,且能够保留酶和抗体活性的优点,所作出的发明创造。本发明提供的高灵敏度的酶标试剂是基于前述应用得到的,可实现信号放大的目的,且制备方法简单,稳定,将其应用于免疫检测,生物素-亲和素系统不受内源性生物素等影响,检测灵敏度更高,但不会降低检测的特异性,且可以最大限度的保留抗体和酶的活性,将其应用于免疫检测试剂盒,可以为临床检测提供可靠手段。



1. PAMAM在制备用于免疫检测的试剂中的应用,其特征包括以下步骤:将PAMAM的部分氨基羧基化改性,将PAMAM的氨基与活化后的酶通过羟基连接,然后将特异性抗体通过氨基与PAMAM上改性得到的羧基缩合连接,得到用于免疫检测的试剂。

2. 根据权利要求1所述的PAMAM在制备用于免疫检测的试剂中的应用,其特征包括:

所述的酶为过氧化物酶、碱性磷酸酯酶、 β -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、碳酸酐酶、乙酰胆碱酯酶和6-磷酸葡萄糖脱氢酶中的一种或至少两种;

所述的特异性抗体为抗人IgG或抗鼠IgG;

所述的免疫检测包括酶联免疫吸附、免疫组化和免疫印迹。

3. 根据权利要求1或2所述的PAMAM在制备用于免疫检测的试剂中的应用,其特征包括:

所述的将PAMAM的部分氨基羧基化改性的具体步骤如下:将PAMAM分散在有机溶剂中,加入丁二酸酐,反应,得到部分氨基羧基化改性的PAMAM;

所述的PAMAM的用量按其与所述的丁二酸酐=质量比1:0.05~10配比计算;

所述的活化通过如下步骤进行:将酶、 NaIO_4 和水混匀,得到反应体系;反应,得到活化后的酶;

所述的 NaIO_4 的用量相当于所述的酶摩尔量的8~100倍;

所述的 NaIO_4 在所述的反应体系中的浓度为4.8mg/mL。

4. 一种高灵敏度的酶标试剂,其特征包括,是通过权利要求1~3任一项所述的PAMAM在制备用于免疫检测的试剂中的应用制备得到。

5. 权利要求4所述的高灵敏度的酶标试剂的制备方法,其特征包括如下步骤:

(1) 将PAMAM分散在有机溶剂中,加入丁二酸酐,加热,反应,冷却,透析,得到部分氨基羧基化改性的PAMAM;

(2) 将原料酶、水和 NaIO_4 混匀,得到反应体系;反应,脱盐,得到活化的酶;

(3) 将步骤(2)得到的活化的酶和步骤(1)得到的部分氨基羧基化改性的PAMAM分散在缓冲液中,反应,纯化,得到PAMAM-酶;

(4) 将步骤(3)得到的PAMAM-酶和催化剂分散在缓冲液中,反应,加入特异性抗体,继续反应,纯化,得到酶标试剂PAMAM-酶-特异性抗体;

步骤(1)中所述的PAMAM的用量为按其与所述的丁二酸酐=质量比1:0.05~10配比计算;

步骤(3)中所述的部分氨基羧基化改性的PAMAM的用量按其与所述的原料酶=质量比3~5:1配比计算;

步骤(4)中所述的特异性抗体的用量按特异性抗体:部分氨基羧基化改性的PAMAM=质量比4~6:1.5配比计算。

6. 根据权利要求5所述的高灵敏度的酶标试剂的制备方法,其特征包括,

步骤(2)中所述的原料酶为过氧化物酶、碱性磷酸酯酶、 β -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、碳酸酐酶、乙酰胆碱酯酶和6-磷酸葡萄糖脱氢酶中的一种或至少两种;

步骤(4)中所述的催化剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺;

所述的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的用量按1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐:部分氨基羧基化改性的PAMAM=质量比10~50:1.5配比计算;

所述的N-羟基琥珀酰亚胺的用量按N-羟基琥珀酰亚胺:部分氨基羧基化改性的PAMAM =质量比10~50:1.5配比计算;

步骤(4)中所述的特异性抗体为抗人IgG或抗鼠IgG。

7. 根据权利要求5所述的高灵敏度的酶标试剂的制备方法,其特征在于,

步骤(1)中所述的加热的温度为50~70℃;

步骤(1)中所述的反应的时间为5~7h;

步骤(1)中所述的透析使用的透析袋为1000~3000kDa。

8. 根据权利要求5所述的高灵敏度的酶标试剂的制备方法,其特征在于,

步骤(1)中所述的有机溶剂为乙酸;

步骤(1)中所述的有机溶剂的用量按有机溶剂:PAMAM=50~100mL:1g配比计算;

步骤(2)中所述的水为蒸馏水;

步骤(2)中所述的NaIO₄的用量相当于所述的原料酶摩尔量的8~100倍;

步骤(2)中所述的NaIO₄在所述的反应体系中的浓度为4.8mg/mL;

步骤(2)所述的脱盐是使用G25脱盐纯化柱进行脱盐;

步骤(2)中所述的反应的时间为10~20min;

步骤(3)中所述的缓冲液为pH值为9~10的缓冲液;

步骤(3)中所述的反应的时间为8~16h;

步骤(4)中所述的缓冲液为MES缓冲液;

步骤(4)中所述的反应的时间为1~3h;

步骤(4)中所述的继续反应的时间为20~28h;

步骤(3)和(4)中所述的纯化是使用GE 200凝胶过滤柱进行纯化。

9. 权利要求4所述的高灵敏度酶标试剂在制备免疫检测试剂盒中的应用。

10. 根据权利要求9所述的高灵敏度酶标试剂在制备免疫检测试剂盒中的应用,其特征在于,所述的免疫检测包括酶联免疫吸附、免疫组化和免疫印迹。

PAMAM在制备用于免疫检测的试剂中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫领域,特别涉及PAMAM在制备用于免疫检测的试剂中的应用。

背景技术

[0002] 酶联免疫吸附测定enzyme linked immunosorbent assay (简写ELISA)是一种常用的免疫分析方法,它是指将可溶性的抗原或抗体结合到聚苯乙烯等固相载体上,利用抗原抗体结合专一性进行免疫反应的定性和定量检测方法。这一方法的基本原理是:①使抗原或抗体结合到某种固相载体表面,并保持其免疫活性。②使抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体,这种酶标抗原或抗体既保留其免疫活性,又保留酶的活性。在测定时,把受检标本(测定其中的抗体或抗原)和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开,最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例。加入酶反应的底物后,底物被酶催化变为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据颜色反应的深浅判定定性或定量分析。由于酶的催化效率很高,故可极大地放大反应效果,从而使测定方法达到很高的敏感度。然而,ELISA的检测灵敏度与相应的抗原和抗体有着密切的联系,而且随着检验检疫的要求越来越严格,对方法灵敏度的要求也越来越高,而传统的基于ELISA的方法,在灵敏度方面提升空间有限,往往只能通过提高抗原抗体的亲和力间接提高其检测灵敏度。

[0003] 随着科技水平的不断提高,有研究人员发现了一种生物素-亲和素系统(BAS),这一亲和作用被结合应用到ELISA技术上,大大提高了后者反应的灵敏性与专一性。生物素极易与蛋白质(如抗体等)以共价键结合。这样,结合了酶的亲和素分子与结合有特异性抗体的生物素分子产生反应,既起到了多级放大作用,又由于酶在遇到相应底物时的催化作用而呈色,达到检测未知抗原(或抗体)分子的目的。但是,这种生物素-亲和素系统容易受到内源性生物素的影响,并且信号放大效果有限,因为亲和素仅有4个位点可以与生物素结合,且酶与亲和素的结合还需要特殊的处理过程,此外,该系统还需要linker将两个或者多个生物素连接起来作为酶-亲和素的桥联剂,试剂制备复杂,试剂盒价格昂贵。

[0004] 为了克服这些挑战,必须开发出一种信号放大的,制备方法简便,同时不改变检测特异性的酶标试剂。

发明内容

[0005] 本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供PAMAM在制备用于免疫检测的试剂中的应用。

[0006] 本发明的另一目的在于提供通过一种高灵敏度的酶标试剂。

[0007] 本发明的再一目的在于提供上述高灵敏度的酶标试剂的制备方法及应用。

[0008] 本发明的目的通过下述技术方案实现:PAMAM在制备用于免疫检测的试剂中的应用,是基于本发明发明人发现PAMAM改性后,分别与活化的酶和特异性抗体连接,得到的酶

标试剂用于免疫检测,具有灵敏度高,且能够保留酶和抗体活性的优点。

[0009] 所述的连接为共价连接。

[0010] 所述的PAMAM在制备用于免疫检测的试剂中的应用,包括以下步骤:将PAMAM的部分氨基羧基化改性,将PAMAM的氨基与活化后的酶通过羟基连接,然后将特异性抗体通过氨基与PAMAM上改性得到的羧基缩合连接,得到用于免疫检测的试剂。

[0011] 所述的将PAMAM的部分氨基羧基化改性的具体步骤如下:将PAMAM分散在有机溶剂中,加入丁二酸酐,反应,得到部分氨基羧基化改性的PAMAM。

[0012] 所述的PAMAM为树枝状聚合物,名称为树聚酰胺-胺(polyamidoamine)。

[0013] 所述的PAMAM的用量优选为按其与所述的丁二酸酐=质量比1:0.05~10配比计算;更优选为按其与所述的丁二酸酐=质量比1:0.2配比计算。

[0014] 所述的酶优选为过氧化物酶、碱性磷酸酯酶、 β -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、碳酸酐酶、乙酰胆碱酯酶和6-磷酸葡萄糖脱氢酶中的一种或至少两种。

[0015] 所述的活化是采用 NaIO_4 进行活化;优选通过如下步骤进行:将酶、 NaIO_4 和水混匀,得到反应体系;反应,得到活化后的酶。

[0016] 所述的 NaIO_4 的用量相当于所述的酶摩尔量的8~100倍;更优选为相当于所述的酶摩尔量的75倍。

[0017] 所述的 NaIO_4 在所述的反应体系中的浓度优选为4.8mg/mL。

[0018] 所述的特异性抗体优选为抗人IgG或抗鼠IgG。

[0019] 所述的免疫检测包括酶联免疫吸附(ELISA)、免疫组化(IHC)和免疫印迹(Western Bolt)。

[0020] 一种高灵敏度的酶标试剂,是实现上述应用得到的。

[0021] 上述高灵敏度的酶标试剂的制备方法,包括如下步骤:通过将PAMAM的部分氨基羧基化改性,将活化后的酶通过羟基与PAMAM的氨基连接,然后将特异性抗体通过氨基与PAMAM上改性得到的羧基缩合连接,得到高灵敏度的酶标试剂;更优选包括如下步骤:

[0022] (1) 将PAMAM分散在有机溶剂中,加入丁二酸酐,加热,反应,冷却,透析,得到部分氨基羧基化改性的PAMAM;

[0023] (2) 将原料酶、水和 NaIO_4 混匀,得到反应体系;反应,脱盐,得到活化的酶;

[0024] (3) 将步骤(2)得到的活化的酶和步骤(1)得到的部分氨基羧基化改性的PAMAM分散在缓冲液中,反应,纯化,得到PAMAM-酶;

[0025] (4) 将步骤(3)得到的PAMAM-酶和催化剂分散在缓冲液中,反应,加入特异性抗体,继续反应,纯化,得到酶标试剂PAMAM-酶-特异性抗体。

[0026] 步骤(1)中所述的PAMAM为树枝状聚合物,名称为树聚酰胺-胺(polyamidoamine)。

[0027] 步骤(1)中所述的有机溶剂优选为乙酸。

[0028] 步骤(1)中所述的有机溶剂仅作为反应介质,不参与反应,其用量优选按有机溶剂:PAMAM=50~100mL:1g计算;更优选按有机溶剂:PAMAM=80mL:1g计算。

[0029] 步骤(1)中所述的PAMAM的用量优选为按其与所述的丁二酸酐=质量比1:0.05~10配比计算;更优选为按其与所述的丁二酸酐=质量比1:0.2配比计算。

[0030] 步骤(1)中所述的加热的温度优选为50~70℃;更优选为60℃。

[0031] 步骤(1)中所述的反应的时间优选为5~7h;更优选为6h。

- [0032] 步骤(1)中所述的透析使用的透析袋优选为1000~3000kDa;更优选为2000kDa。
- [0033] 步骤(2)中所述的原料酶优选为过氧化物酶、碱性磷酸酯酶、 β -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、碳酸酐酶、乙酰胆碱酯酶和6-磷酸葡萄糖脱氢酶中的一种或至少两种。
- [0034] 所述的过氧化物酶优选为辣根过氧化物酶(HRP)。
- [0035] 步骤(2)中所述的水优选为蒸馏水。
- [0036] 步骤(2)中所述的水的用量优选为按水:原料酶=1mL:12mg配比计算。
- [0037] 步骤(2)中所述的 NaIO_4 在所述的反应体系中的浓度优选为4.8mg/mL。
- [0038] 步骤(2)中所述的 NaIO_4 的用量相当于所述的原料酶摩尔量的8~100倍;更优选为相当于所述的原料酶摩尔量的75倍。
- [0039] 步骤(2)中所述的反应的时间优选为10~20min;更优选为15min。
- [0040] 步骤(2)所述的脱盐是使用G25脱盐纯化柱进行脱盐。
- [0041] 所述的使用G25脱盐纯化柱进行脱盐是将G25凝胶加入过滤柱,离心去除凝胶中的水分,将反应结束后的酶加入过滤柱,离心,重复一次以上操作,完成脱盐。
- [0042] 所述的离心优选为3000rpm离心5min。
- [0043] 步骤(3)中所述的部分氨基羧基化改性的PAMAM的用量优选为按其与所述的原料酶=质量比1:3~5配比计算;更优选为按其与所述的原料酶=质量比1:4配比计算。
- [0044] 步骤(3)中所述的缓冲液优选为pH值为9~10的缓冲液;更优选为pH为9.5的缓冲液。
- [0045] 所述的缓冲液优选为碳酸盐缓冲液;更优选为浓度为1M的碳酸盐缓冲液。
- [0046] 步骤(3)中所述的反应的时间优选为8~16h。
- [0047] 步骤(4)中所述的催化剂优选为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)。
- [0048] 所述的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的用量优选为按EDC:部分氨基羧基化改性的PAMAM=质量比10~50:1.5配比;更优选为按EDC:部分氨基羧基化改性的PAMAM=质量比20:1.5配比计算。
- [0049] 所述的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的用量优选为按NHS:部分氨基羧基化改性的PAMAM=质量比10~50:1.5配比;更优选为按NHS:部分氨基羧基化改性的PAMAM=质量比20:1.5配比计算。
- [0050] 步骤(4)中所述的缓冲液优选为MES缓冲液。
- [0051] 所述的MES缓冲液优选为pH为6.0、浓度为30mM的MES缓冲液。
- [0052] 步骤(4)中所述的反应的时间优选为1~3h;更优选为2h。
- [0053] 步骤(4)中所述的特异性抗体优选为抗人IgG或抗鼠IgG。
- [0054] 步骤(4)中所述的特异性抗体的用量优选为按特异性抗体:部分氨基羧基化改性的PAMAM=质量比4~6:1.5配比计算;更优选为按特异性抗:部分氨基羧基化改性的PAMAM=质量比5.56:1.5配比计算。
- [0055] 步骤(4)中所述的继续反应的时间优选为20~28h;更优选为24h。
- [0056] 步骤(3)和(4)中所述的纯化是使用GE 200凝胶过滤柱进行纯化。
- [0057] 上述高灵敏度酶标试剂在制备免疫检测试剂盒中的应用。
- [0058] 所述的免疫检测包括酶联免疫吸附(ELISA)、免疫组化(IHC)和免疫印迹(Western

Bolt)。

[0059] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果：

[0060] 1. 本发明的酶标试剂可实现信号放大的目的，且制备方法简单。将其应用于免疫检测，检测灵敏度更高，但不会降低检测的特异性。

[0061] 2. 本发明的酶标试剂通过控制PAMAM与丁二酸酐的比例来控制PAMAM的羧基化程度，使得酶和抗体的连接达到最优，从而检测灵敏度和特异性可达到很好的效果。

[0062] 3. 本发明的酶标试剂中，酶和抗体均通过化学反应共价连接到PAMAM上，更加稳定。

[0063] 3. 本发明的酶标试剂在免疫组化(IHC)检测中同时具有一抗和二抗的作用，检测更加简便。

[0064] 4. PAMAM是一种亲水材料，检测时反应在亲水相中进行，最大限度的保留了抗体和酶的活性。

[0065] 5. 本发明的酶标试剂用于免疫检测，生物素-亲和素系统不受内源性生物素等影响。

附图说明

[0066] 图1是PAMAM-HRP-IgG的制备流程图。

[0067] 图2是部分羧基化PAMAM的核磁氢谱图。

[0068] 图3是部分羧基化PAMAM的红外光谱图。

[0069] 图4是PAMAM-HRP-IgG的SDS-PAGE电泳照片图。

[0070] 图5是PAMAM-HRP-IgG的ELISA检测结果照片图。

[0071] 图6是PAMAM-HRP-IgG的IHC检测结果照片图。

具体实施例

[0072] 下面结合具体实施例和附图对本发明作进一步详细的描述，但本发明的实施方式不限于此。

[0073] 实施例1高灵敏度酶标试剂的制备，流程如图1所示。

[0074] (1) PAMAM的部分羧基化

[0075] 取0.5mL PAMAM树枝状聚合物，多聚物乙二胺核，5.0代溶液(PAMAM dendrimer, ethylenediamine core, generation 5.0 solution, 5wt%，购于Sigma公司)溶解于2mL乙酸中，随后加入0.005g丁二酸酐，使PAMAM树枝状聚合物与丁二酸酐的比例为质量比1:0.2，加热至60℃并反应6h。反应结束后冷却，溶液转移至透析袋(分子量为2000Da)，使用2L纯水透析，并重复3次，得到部分羧基化的PAMAM(浓度为10mg/mL)，然后采用核磁共振氢谱和红外光谱进行电位和粒径检测，结果如图2和3所示。

[0076] 从图2的核磁氢谱的结果可以看出，1号位和2号位的峰可以归属为羧基端的两个相邻的C原子，而3号位的峰则可以归属为氨基，因此成功合成了部分羧基化的PAMAM。图3的红外光谱结果显示，部分羧基化的PAMAM在 2800cm^{-1} 出现了一个羧基的特征峰，这说明PAMAM上的氨基已经成功被羧基化了。

[0077] (2) HRP的活化与脱盐

[0078] 称取6mg HRP (分子量40000)溶于0.5mL水中,溶解完全后,加入2.4mg NaIO₄ (分子量214,高碘酸钠的摩尔用量为HRP摩尔量的75倍),反应时间15min,完成活化,然后用G25脱盐纯化柱进行脱盐2次。

[0079] 脱盐的具体方法:取3mL已经混合好的G25凝胶溶液加入过滤柱,水平离心机3000rpm离心5min,去掉凝胶溶液里的水分,将过滤柱放入新的15mL离心管,加入活化好的HRP溶液,水平离心机3000rpm离心5min,得到脱盐后的HRP溶液;重复上述脱盐操作两次。

[0080] (3) 部分氨基羧基化改性的PAMAM与活化的HRP连接

[0081] 在步骤(2)得到的活化后的HRP溶液中加入13μL浓度为1M的碳酸盐缓冲液(pH 9.5,碳酸盐缓冲液的使用体积量相当于HRP溶液体积的1/40),然后与150μL步骤(1)制备的部分氨基羧基化的PAMAM(浓度为10mg/mL)混匀,反应过夜,然后用GE 200凝胶过滤柱过滤除掉多余的HRP,得到PAMAM-HRP。

[0082] (4) PAMAM-HRP与IgG连接

[0083] 将500μL MES缓冲液(pH 6.0,浓度30mM)、20mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、20mgN-羟基琥珀酰亚胺(sulfo-NHS)和步骤(3)制备得到的PAMAM-HRP混合,反应2h,然后加入5.56mg IgG(IgG为小鼠腹水中纯化得到的CD151抗体,广州精达生物生产),继续反应24h。用GE 200凝胶过滤柱过滤除掉多余的IgG,得到纯化后的PAMAM-HRP-IgG,为高灵敏度的酶标试剂。

[0084] (5) SDS-PAGE凝胶电泳检测

[0085] 将纯化后的PAMAM-HRP-IgG进行SDS-PAGE电泳检测。SDS-PAGE的配胶(12%的胶)见表1。电泳缓冲液(不用调pH)含有3.03g Tris碱、14.4g甘氨酸和1g SDS,用1L H₂O定容。电泳条件:电压:100V,电流:300mA,时间:100min。电泳结束后,用考马斯亮蓝溶液(配方(1L):1g考马斯亮蓝、450mL甲醇、100mL乙酸)沸水中煮20min,然后用脱色液(配方(1L):50mL甲醇、50mL乙酸)沸水中煮20min。检测结果如图4所示。

[0086] 从图4中SDS-PAGE凝胶电泳的结果可以看出,活化后的PAMMER与HRP结合后形成了较大分子量的产物,而与分子量较大的IgG结合以后,IgG的条带也变弱了,此外在胶孔处也形成了分子量较大的PAMAM-HRP-IgG产物,这表明HRP和IgG都成功连接到了PAMAM上了。

[0087] 表1

	试剂	分离胶(2块)	浓缩胶
	30% 丙烯酰胺(Acrylamide Mix)	4mL	0.67mL
	1.5M Tris-HClpH8.8	2.5mL	-
	1M Tris-HCl pH6.8	-	0.5
[0088]	H ₂ O	3.4 mL	2.4 mL
	10% SDS	100 μL	40 μL
	10% APS (100mg/mL)	80μL	30 μL
	TEMED	10μL	3μL

[0089] 实施例2 ELISA检测

[0090] 将实施例1制备的PAMAM-HRP-IgG用GE 200凝胶过滤柱过滤,将滤液稀释至1/50,接着等比稀释2、4、8倍,每管0.8-0.9mL。然后进行ELISA检测,具体ELISA操作如下:首先用

3% (w/v) 脱脂奶粉溶液封闭IgG包被的ELISA酶标板(Thermo公司),接着用PBST(1×, pH7.5)清洗酶标板四次,IgG包被浓度为2μg/mL,每次洗板后应进行拍板。加入100μL浓度为200ng/mL的IgG抗原(IgG为小鼠腹水中纯化得到的CD151抗体,广州精达生物生产)于孔板中,抗原与IgG抗体的室温孵育时间为45min,之后PBST(1×, pH7.5)清洗四次,每次洗板后进行拍板处理。将实施例1制备的酶标试剂(PAMAM-HRP-IgG)和标准商业化二抗(HRP-IgG, IgG为小鼠腹水中纯化得到的CD151抗体,由广州精达生物生产)分别稀释1/50、1/100、1/200、1/400倍。分别取100μL稀释后的PAMAM-HRP-IgG和商业化二抗加入孔板中,室温孵育45min,之后PBST(1×, pH7.5)清洗四次,每次洗板后进行拍板处理,清洗完毕后,加入100μL TMB显色液,反应3.5min后加入50μL浓度为2M的H₂SO₄终止反应,拍照,结果如图5所示。结果显示,PAMAM-HRP-IgG显色效果高于商品化二抗4倍(肉眼分辨)到8倍(检测)。

[0091] 实施例3免疫组化(IHC)检测

[0092] 将实施例1制备的PAMAM-HRP-IgG进行IHC检测的步骤如下:

[0093] (1) 将肾组织石蜡切片浸入以下溶液依次脱蜡至水:二甲苯I 10min,二甲苯II 5min,无水乙醇I 10min,无水乙醇II 5min,95%乙醇I 5min,95%乙醇II 5min,90%乙醇I 5min,90%乙醇II 5min,80%乙醇5min,蒸馏水水洗2min。

[0094] (2) 甩干多余水分,加入浓度为质量百分比3%的H₂O₂室温孵育10min,PBS缓冲液(pH 7.4)洗3次,每次5min。

[0095] (3) 切片浸没在PBS缓冲液(pH 7.4)中,采用微波炉加热(格兰仕,P70D20P-TD(W0)),高档5min,中档10min。PBS缓冲液(pH 7.4)洗3次,每次5min。

[0096] (4) 甩干多余液体,加入浓度为质量百分比5%的BSA(溶剂为0.01M, pH=7.4的PBS缓冲液),室温封闭30min,甩干多余液体,不用以PBS洗。

[0097] (5) 分别滴加以PBS缓冲液按照1:50和1:100稀释的PAMAM-HRP-IgG,4℃孵育过夜。以PBS缓冲液(pH 7.4)作为对照。

[0098] (6) 次日,室温放置30min,PBS(pH 7.4)洗3次,每次5min。

[0099] (7) 滴加二氨基联苯胺DAB染色液使显色,镜下控制反应5min,待有阳性着色后蒸馏水水洗终止反应。

[0100] (8) 切片拍照前可用苏木素溶液轻度复染:苏木素染色10min(4-5min),蒸馏水水洗2min,质量百分比为1%的盐酸乙醇(质量百分比为75%的乙醇配制)分化3-5s,流水冲洗10min或PBS缓冲液(pH 7.4)返蓝2-3min,镜检。

[0101] (9) (有阳性表达)切片脱水:80%乙醇3-5s,90%乙醇I 3-5s,90%乙醇II 5min,95%乙醇I 5min,95%乙醇II 5min,无水乙醇I 5min,无水乙醇II 10min,二甲苯I 5min,二甲苯II 10min。

[0102] (10) 中性树胶封片,过夜后拍照,观察。

[0103] 结果如图6所示,PAMAM-HRP-IgG能够特异性的用于IHC检测,PAMAM-HRP-IgG同时具有一抗和二抗的作用,而常规的IHC需要在一抗上结合带有HRP的二抗才可以显色。

[0104] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他任何未背离本发明的精神实质与原理下所做的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

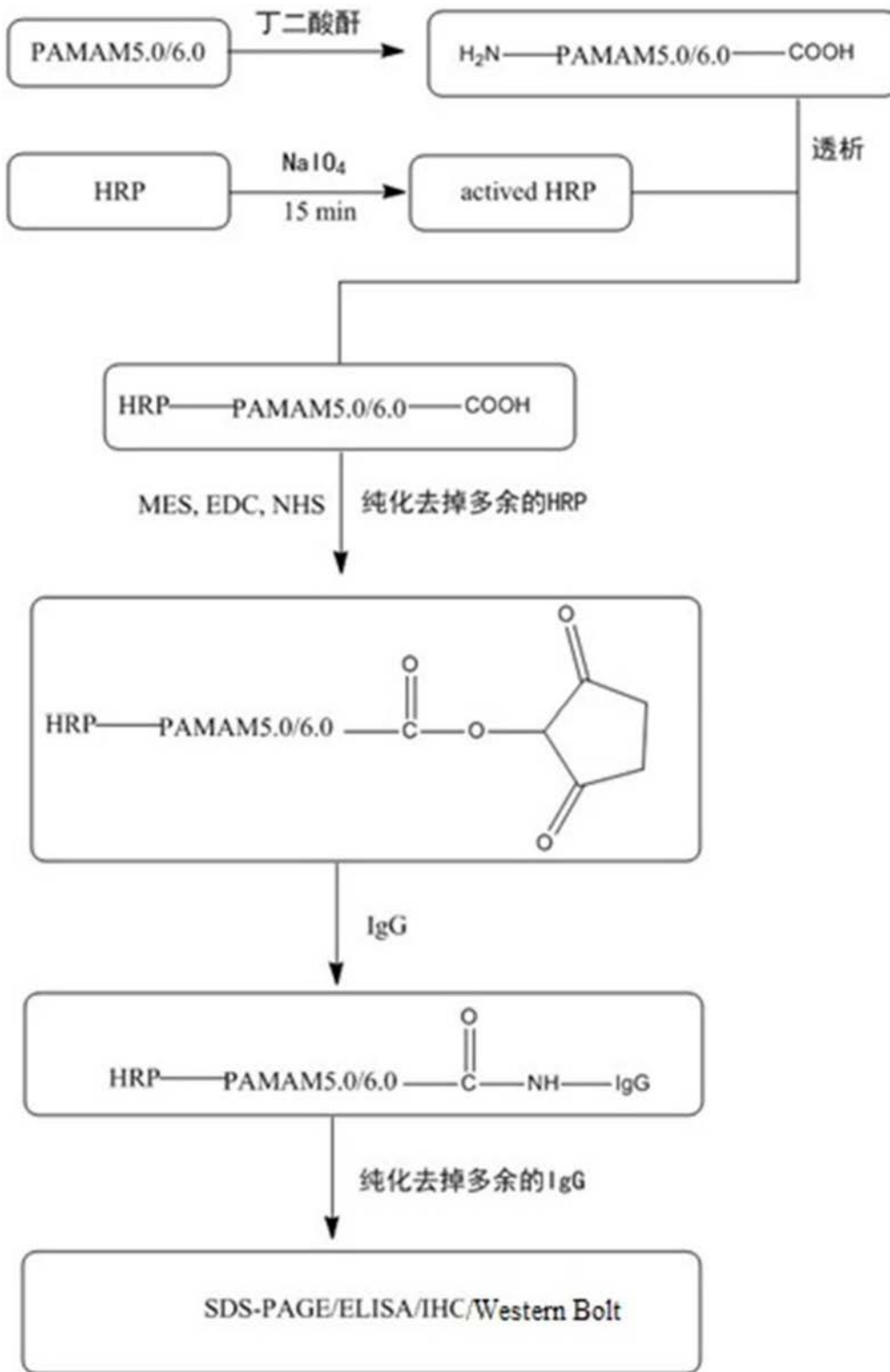


图1

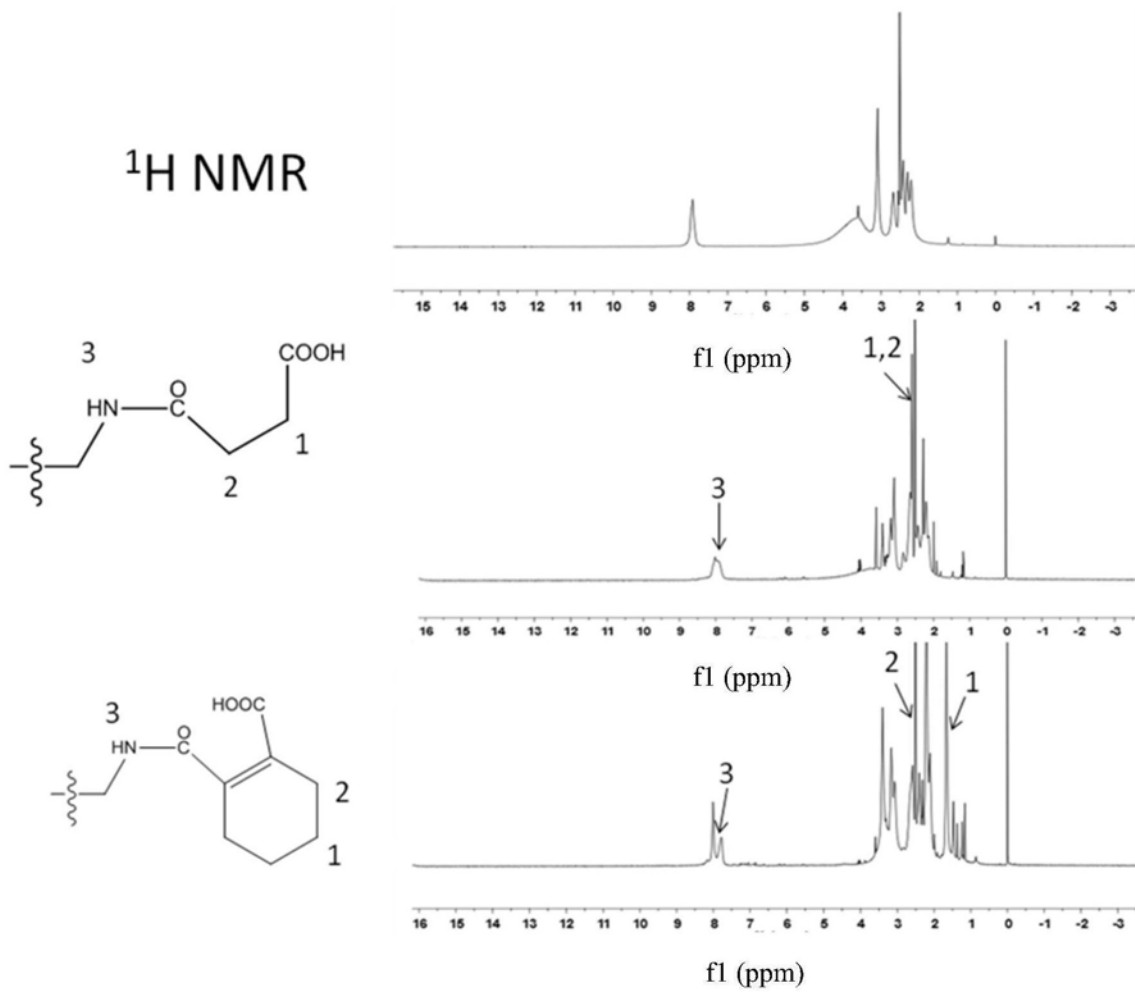


图2

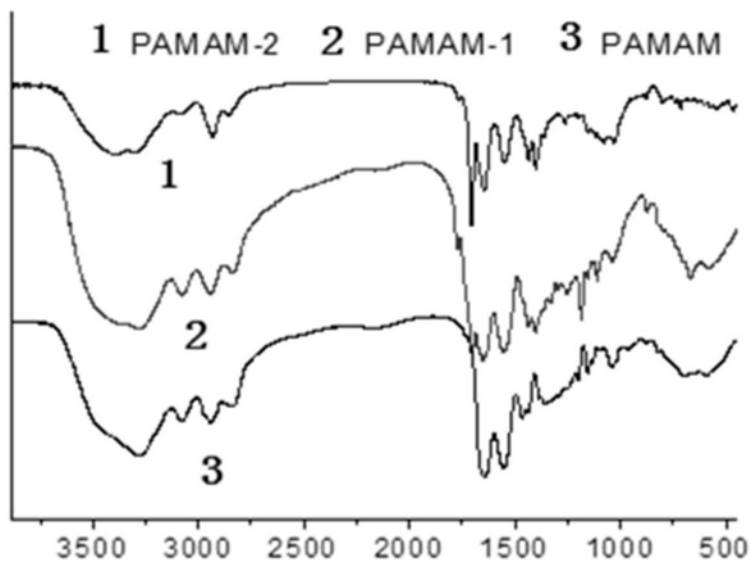


图3

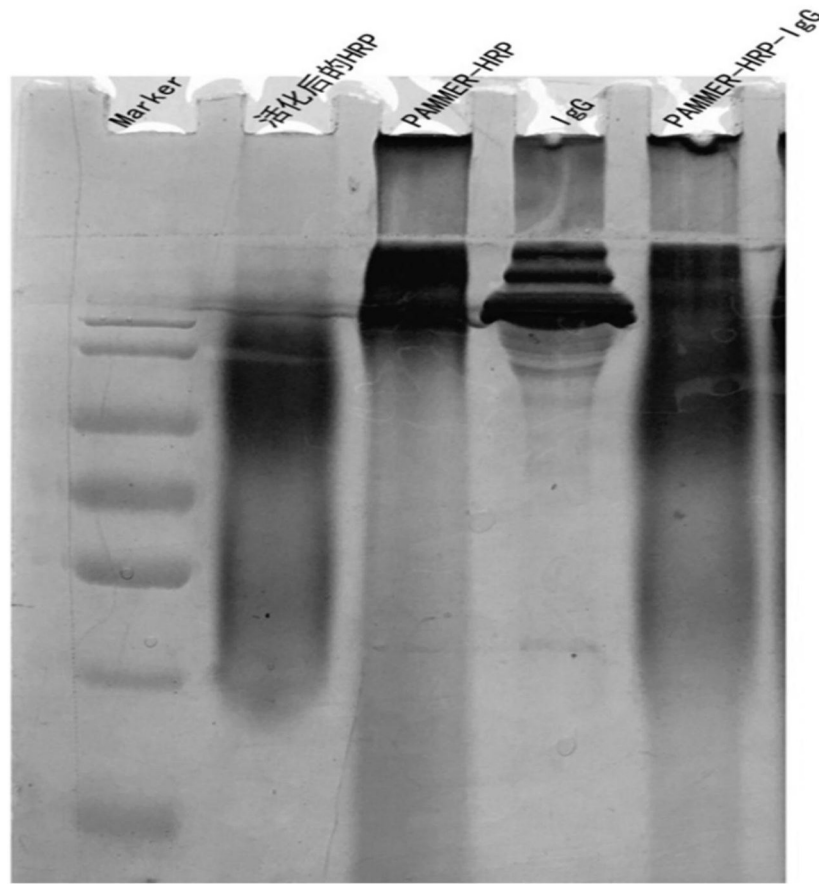


图4

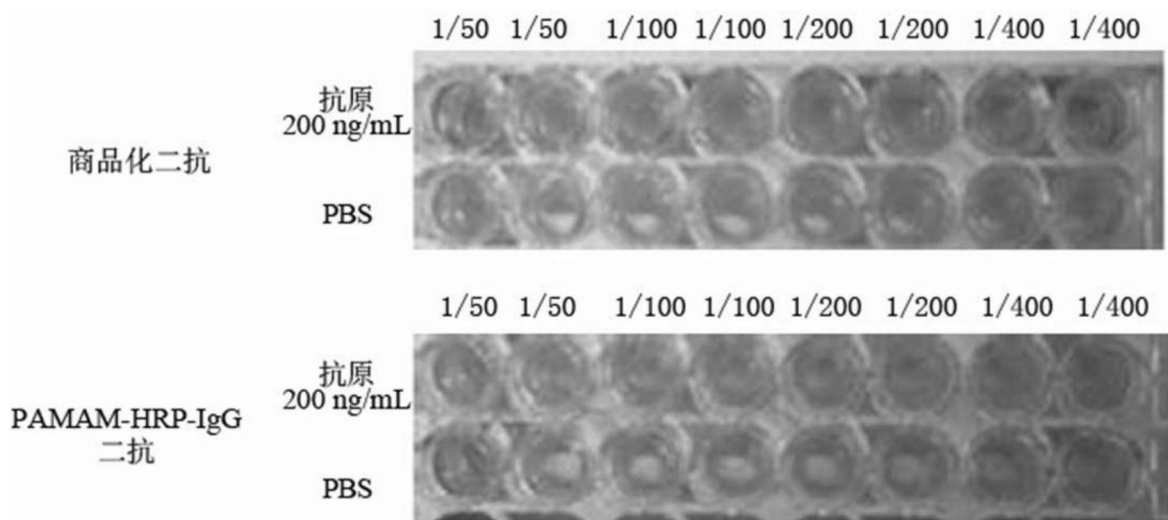


图5

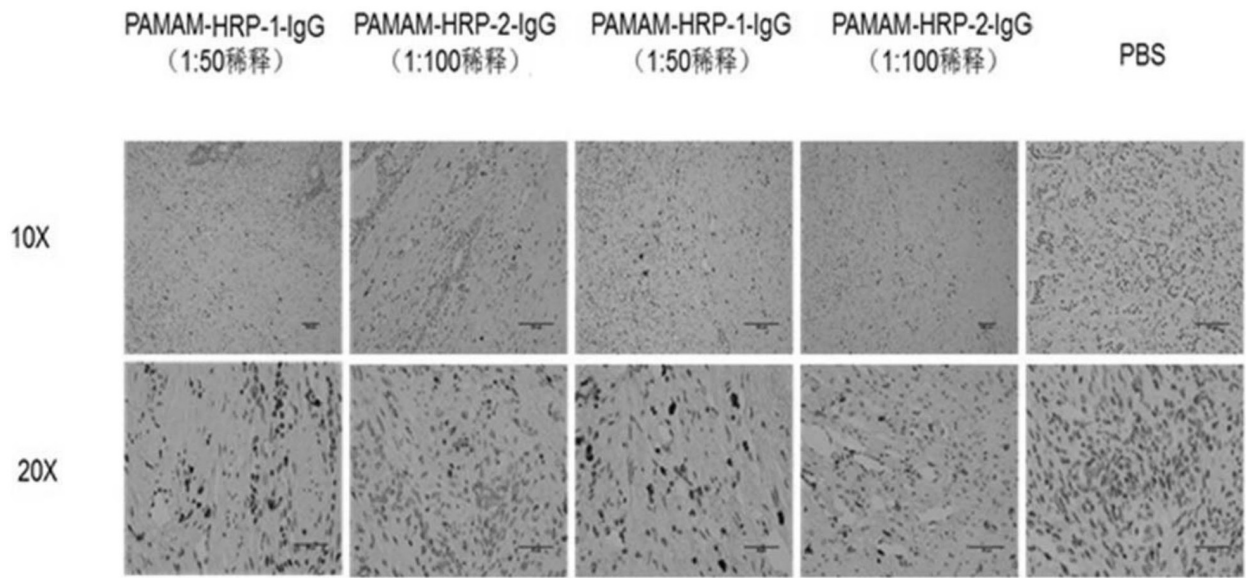


图6

专利名称(译)	PAMAM在制备用于免疫检测的试剂中的应用		
公开(公告)号	CN109682967A	公开(公告)日	2019-04-26
申请号	CN201811539516.8	申请日	2018-12-17
[标]申请(专利权)人(译)	暨南大学		
申请(专利权)人(译)	暨南大学		
当前申请(专利权)人(译)	暨南大学		
[标]发明人	陈填烽 刘宏星		
发明人	陈填烽 刘宏星		
IPC分类号	G01N33/545 G01N33/535 G01N33/58 C08G73/02		
CPC分类号	G01N33/535 C08G73/028 G01N33/545 G01N33/581		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了PAMAM在制备用于免疫检测的制剂中的应用。本发明是基于本发明发明人发现PAMAM改性后，分别与活化的酶和特异性抗体共价连接，得到的酶标试剂用于免疫检测，具有灵敏度高，且能够保留酶和抗体活性的优点，所作出的发明创造。本发明提供的高灵敏度的酶标试剂是基于前述应用得到的，可实现信号放大的目的，且制备方法简单，稳定，将其应用于免疫检测，生物素-亲和素系统不受内源性生物素等影响，检测灵敏度更高，但不会降低检测的特异性，且可以最大限度的保留抗体和酶的活性，将其应用于免疫检测试剂盒，可以为临床检测提供可靠手段。

