



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107091826 B

(45)授权公告日 2019.11.05

(21)申请号 201710489326.9

审查员 任华

(22)申请日 2017.06.24

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107091826 A

(43)申请公布日 2017.08.25

(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 任晨晨

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

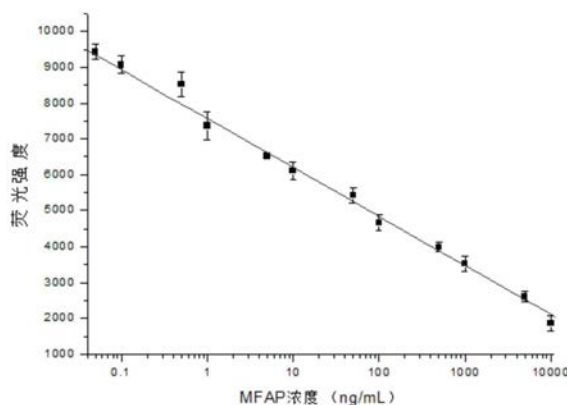
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种基于痕量荧光免疫定量检测PSI-0Am-NAPI两亲聚合纳米药物载体的方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于痕量荧光免疫定量检测PSI-0Am-NAPI两亲聚合纳米药物载体的方法,通过将PSI-0Am-NAPI水解后制备得到MFAP的免疫抗原和包被抗原,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标准品,以FITC标记的MFAP抗体作为一抗,建立直接竞争荧光免疫分析定量检测MFAP;该法不仅充分利用了免疫学反应中抗原抗体的高特异性还与荧光的敏感性相结合,使免疫反应的信号进一步提高,利用所发出荧光的强弱,来进行定量分析。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。



1. 一种基于痕量荧光免疫定量检测PSI-0Am-NAPI两亲聚合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、水解PSI-0Am-NAPI,得到水解后的MFAP溶液;

b、制备MFAP的免疫抗原和包被抗原;

c、MFAP纳米药物载体高特异性抗体的制备,所述抗体的效价为1:64000;

d、FITC标记的MFAP荧光抗体的制备;

e、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标准品,以FITC标记的MFAP抗体作为一抗,建立直接竞争荧光免疫分析定量检测MFAP;

f、以MFAP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MFAP的浓度;

所述步骤a具体包括以下步骤:将PSI-0Am-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。

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 $A = 7558.72 - 1365.501gC$,A为荧光强度,C为MFAP的浓度;相关系数 $R = -0.997$,线性范围为 $0.48 \sim 1.19 \times 10^4 \text{ng/mL}$,检出限为 0.090ng/mL 。

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:

将 $20 \sim 60 \text{mg}$ 的PSI-0Am-NAPI纳米粒子和 $0.2 \sim 0.6 \text{mg}$ 的聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物(PEG-PLGA)溶解到 $0.5 \sim 5 \text{mL}$ 三氯甲烷溶液中,溶解后将上述溶液加入到 $8 \sim 16 \text{mL}$ 浓度为 $0.003 \sim 0.008 \text{mg/mL}$ 的氢氧化钠溶液中,超声 $5 \sim 15 \text{min}$,功率 $200 \sim 600 \text{W}$,之后磁力搅拌 $5 \sim 10 \text{min}$,将溶液于 $45 \sim 65^\circ\text{C}$ 下蒸发除去三氯甲烷,于 $12000 \sim 20000 \text{r/min}$ 离心 $10 \sim 15 \text{min}$,取沉淀分散在 $0.5 \sim 2 \text{mL}$ $\text{pH} = 7.4$ 的PBS缓冲液中,得到水解后的MFAP溶液。

4. 根据权利要求1或3所述的方法,其特征在于,所述水解后的MFAP溶液的浓度为 $2 \sim 10 \text{mg/mL}$ 。

5. 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、在 1mL 水解后的MFAP溶液中加入 1mL PBS缓冲溶液,该缓冲液中包含 $0.1 \sim 1 \text{mg}$ 的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和 $0.1 \sim 1 \text{mg}$ 的1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐,反应 $10 \sim 20 \text{min}$ 后加入 $1 \sim 10 \text{mg}$ 牛血清白蛋白,于 25°C 下温育 $2 \sim 4 \text{h}$,之后于离心机 $12000 \sim 20000 \text{r/min}$ 离心 $10 \sim 15 \text{min}$,取沉淀分散到 1mL 中性PBS缓冲液中,将溶液装入透析袋中,放入PBS缓冲溶液中透析12小时以上,即可制得MFAP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MFAP的包被抗原。

6. 根据权利要求1或5所述的方法,其特征在于,MFAP的免疫抗原与MFAP的包被抗原的浓度均为 $1 \sim 5 \text{mg/mL}$ 。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤d具体包括以下步骤:

d-1、将MFAP抗体经 0.01M , $\text{pH} = 7.1$ 的PBS缓冲溶液调整至抗体中蛋白浓度为 $10 \sim 20 \text{mg/mL}$,得到MFAP抗体溶液;

d-2、将异硫氰酸荧光素(FITC)溶于碳酸盐缓冲液中,制成浓度为 2mg/mL 的FITC溶液;

d-3、将步骤d-1和步骤d-2得到的溶液按体积比 $10:1$ 混合,于 $18 \sim 28^\circ\text{C}$ 避光搅拌 $3 \sim 6 \text{h}$;

d-4、将步骤d-3得到的混合液装入透析袋中,于PBS溶液中透析2~4h后,采用凝胶过滤法纯化,即可得到FITC标记的MFAP荧光抗体。

8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤e具体包括以下步骤:

e-1、包被:用碳酸盐缓冲液稀释将MFAP的包被抗原溶液稀释到2~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以每孔70~160 μL 的量包被96孔酶标板,于0~6 $^{\circ}\text{C}$ 温育10~14h;之后用洗涤液洗涤2~4次,每次2~5分钟并甩干;

e-2、封闭:每孔加入160~240 μL 的封闭液,于37 $^{\circ}\text{C}$ 温育1~2h;之后用洗涤液洗涤2~4次,每次2~5分钟并甩干;

e-3、加样竞争:每孔加入30~60 μL 不同浓度的MFAP标准液和30~60 μL FITC标记的MFAP荧光抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育1.5~4h;之后用洗涤液洗涤2~4次,每次2~5分钟并甩干;

e-4、在酶标仪上测定各孔在激发波长为485nm,发射波长为528nm时的荧光强度。

一种基于痕量荧光免疫定量检测PSI-OAm-NAPI两亲聚合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领域,具体涉及一种基于痕量荧光免疫定量检测PSI-OAm-NAPI两亲聚合纳米药物载体的方法。

背景技术

[0002] 纳米材料是近年来新兴的一类材料,纳米技术的发展使纳米材料在众多领域大展拳脚;在纺织业中添加纳米级的二氧化硅可制成杀菌、防霉、除臭和抗紫外线辐射的服装;在家用电器方面,纳米材料制成的纳米多功能塑料,具有抗菌、除味、防腐、抗老化、抗紫外线等作用;在环境科学领域,纳米膜能够探测到由化学和生物制剂造成的污染,并对这些制剂进行过滤,消除污染。由此可见,纳米材料涉及的领域甚广,其在生物医药领域也同样受到广泛关注。

[0003] 传统的药物,如植物来源的中药虽具有高的亲水性但由于其无法穿透脂质膜且具有较大的分子量从而导致药物的吸收率低。另外,一些化学材料合成的西药由于其亲水性差,也同样带来吸收率低的困扰。而纳米载药系统之所以能够引起诸多关注,主要在于其在输送药物中所表现出的独特性能,尺寸小,比表面积大,更有利于药物的输送。

[0004] 聚合物胶束是两亲性聚合物分子在水溶液中最容易形成的组装形态,疏水链段通过疏水作用形成内核,亲水链段则形成亲水的外壳,达到稳定胶束的目的。由于大多抗癌药物都是脂溶性的,恰好可以通过疏水相互作用包裹在胶束疏水的内核中使聚合物胶束颗粒成为纳米载药系统。目前,很多由聚合物胶束制作的纳米药物载体已进入不同层次的临床实验阶段。例如,由日本科学家开发的NK911聚合物纳米胶束已经作为抗癌药物阿霉素的输送载体在进行临床实验用于癌症的治疗,它的主要组成成分是聚乙二醇与聚天冬氨酸嵌段共聚物所自组装形成的聚合物胶束;又如,聚乙二醇和修饰后的聚天冬酰胺嵌段聚合物胶束包载的紫杉醇,已用于临床试验治疗胰腺癌、结肠癌与胃癌等。

[0005] 纳米药物载体是纳米生物技术领域的前沿和热点问题,但在充分安全有效进入临床应用前,纳米材料的生物相容性和降解性,包封率和释放时间,携带生物大分子的稳定性和完整性以及体内载体作用机制动态测试与分析方法等一系列问题仍待进一步研究解决。药物被“纳米化”后,其理化性质(溶出度、饱和溶解度、亲水亲脂性),纳米药物的药代动力学特征均可能发生改变(生物粘附性、生物利用度和靶向性);比如二氧化钛微粒被认为是难溶的低毒性颗粒,而暴露于纳米级二氧化钛的小鼠却会观察到肝功能和免疫系统的损伤。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,对于纳米药物载体定量检测的报道更是甚少。纳米粒子的体外评价由于快速简单,故多为研究者首选,但此种方式不能真实反映纳米药物在体内的情况,并且不同纳米材料毒性不同。因此,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] 目前,纳米材料的检测方法有电化学分析法、质谱法和粒子计数技术等。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;质谱法应用比较广泛且高效快速,但对纳米粒子的尺寸要求太过严格;粒子计数法通过紫外光谱图和计算的方法,得到的是粒子的个数,定量分析的准确度低;这些方法都无法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,本发明提供了一种基于痕量荧光免疫定量检测PSI-0Am-NAPI两亲聚合纳米药物载体的方法,该法以聚琥珀酰亚胺(PSI),N-(3-氨基丙基)咪唑(NAPI)和油胺(OAm)共同作用,得到两亲聚合物PSI-0Am-NAPI两亲聚合纳米药物载体(MFAP),以该聚合物作为纳米药物载体。该法中使用异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗体,不仅充分利用了免疫学反应中抗原抗体的高特异性还与荧光的敏感性相结合,使免疫反应的信号进一步提高,利用所发出荧光的强弱,来进行定量分析。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。

[0008] 本发明采取的技术方案为:

[0009] 一种基于痕量荧光免疫定量检测PSI-0Am-NAPI两亲聚合纳米药物载体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0010] a、水解PSI-0Am-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、MFAP纳米药物载体高特异性抗体的制备;

[0013] d、FITC标记的MFAP荧光抗体的制备;

[0014] e、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标准品,以FITC标记的MFAP抗体作为一抗,建立直接竞争荧光免疫分析定量检测MFAP;

[0015] f、以MFAP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MFAP的浓度。

[0016] 所述标准曲线的线性方程为 $A=7558.72-1365.501gC$,A为荧光强度,C为MFAP的浓度;相关系数 $R=-0.997$,线性范围为 $0.48\sim 1.19\times 10^4\text{ng/mL}$,检出限为 0.090ng/mL 。

[0017] 所述步骤a具体包括以下步骤:将PSI-0Am-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。

[0018] 所述步骤a具体包括以下步骤:将 $20\sim 60\text{mg}$ 的PSI-0Am-NAPI纳米粒子和 $0.2\sim 0.6\text{mg}$ 的聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物(PEG-PLGA)溶解到 $0.5\sim 5\text{mL}$ 三氯甲烷溶液中,溶解后将上述溶液加入到 $8\sim 16\text{mL}$ 浓度为 $0.003\sim 0.008\text{mg/mL}$ 的氢氧化钠溶液中,超声 $5\sim 15\text{min}$,功率 $200\sim 600\text{W}$,之后磁力搅拌 $5\sim 10\text{min}$,将溶液于 $45\sim 65^\circ\text{C}$ 下蒸发除去三氯甲烷,于 $12000\sim 20000\text{r/min}$ 离心 $10\sim 15\text{min}$,取沉淀分散在 $0.5\sim 2\text{mL}$ $\text{pH}=7.4$ 的PBS缓冲液中,得到水解后的MFAP溶液。

[0019] 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。

- [0020] 所述水解后的MFAP溶液的浓度为2~10mg/mL。
- [0021] 所述步骤b具体包括以下步骤：
- [0022] b-1、在1mL水解后的MFAP溶液中加入1mL PBS缓冲溶液，该缓冲液中包含0.1~1mg的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和0.1~1mg的1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐，反应10~20min后加入1~10mg牛血清白蛋白，于25℃下温育2~4h，之后于离心机12000~20000r/min离心10~15min，取沉淀分散到1mL中性PBS缓冲液中，将溶液装入透析袋中，放入PBS缓冲溶液中透析12小时以上，即可制得MFAP的免疫抗原；
- [0023] 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。
- [0024] MFAP的免疫抗原与MFAP的包被抗原的浓度均为1~5mg/mL。
- [0025] 所述步骤c具体包括以下步骤：
- [0026] 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8~12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；
- [0027] 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1:64000，一周后从颈动脉采血，纯化得到MFAP抗体。
- [0028] 所述弗氏不完全佐剂制备方法为：将无水羊毛脂与液体石蜡以体积比1:2的比例混合，超声混合均匀后取少量乳化剂滴入盛有冷水的烧杯中，若不能以油滴状态完整的停留在水面上则需要继续超声；若能够以油滴状态停留在水面上不扩散则是稳定的，此油包水乳化剂则是弗氏不完全佐剂。
- [0029] 所述动物应为健壮、适龄、无感染动物，包括鼠、兔、羊、马，优选为雄性新西兰大白兔，兔龄约为2~5个月，体重为2~3kg。
- [0030] 所述步骤d具体包括以下步骤：
- [0031] d-1、将MFAP抗体经0.01M，pH=7.1的PBS缓冲溶液调整至抗体中蛋白浓度为10~20mg/mL，得到MFAP抗体溶液；
- [0032] d-2、将异硫氰酸荧光素(FITC)溶于碳酸盐缓冲液中，制成浓度为2mg/mL的FITC溶液；
- [0033] d-3、将步骤d-1和步骤d-2得到的溶液按体积比10:1混合，于18~28℃避光搅拌3~6h；
- [0034] d-4、将步骤d-3得到的混合液装入透析袋中，于PBS溶液中透析2~4h后，采用凝胶过滤法纯化，即可得到FITC标记的MFAP荧光抗体。
- [0035] 所述凝胶过滤法纯化的方法为：
- [0036] 凝胶过滤层析柱：2×30cm玻璃层析柱，内装充分溶胀和排气的葡聚糖凝胶G-50；
- [0037] 洗脱液：0.01M，pH=7.1的PBS缓冲溶液；
- [0038] 流速：0.1~1mL/min。
- [0039] 加样量：凝胶柱床体积的10%~15%加样。
- [0040] 所述步骤e具体包括以下步骤：
- [0041] e-1、包被：用碳酸盐缓冲液稀释将MFAP的包被抗原溶液稀释到2~20μg/mL，以每

孔70~160 μ L的量包被96孔酶标板,于0~6 $^{\circ}$ C温育10~14h;之后用洗涤液洗涤2~4次,每次2~5分钟并甩干;

[0042] e-2、封闭:每孔加入160~240 μ L的封闭液,于37 $^{\circ}$ C温育1~2h;之后用洗涤液洗涤2~4次,每次2~5分钟并甩干;

[0043] e-3、加样竞争:每孔加入30~60 μ L不同浓度的MFAP标准液和30~60 μ L FITC标记的MFAP荧光抗体,37 $^{\circ}$ C温育1.5~4h;之后用洗涤液洗涤2~4次,每次2~5分钟并甩干;

[0044] e-4、在酶标仪上测定各孔在激发波长为485nm,发射波长为528nm时的荧光强度。

[0045] 本发明建立了一种基于痕量荧光免疫定量检测PSI-0Am-NAPI两亲聚合纳米药物载体的方法,与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0046] (1) 利用了免疫学反应中抗原抗体的高特异性并与荧光的敏感性相结合,使免疫反应的信号进一步提高;

[0047] (2) 所制备的多克隆抗体特异性好,通过荧光免疫分析方法能够实现痕量测定;

[0048] (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

[0049] 图1为实施例1得到的标准曲线;

具体实施方式

[0050] 福氏完全佐剂、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。

[0051] 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。

[0052] 本发明中所有的透析袋,如无特殊说明,均指截留分子量为8000~14000Da的透析袋。

[0053] 其他试剂均可从市场上的销售厂家购买得到。

[0054] 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:

[0055] PBS缓冲溶液(0.01M,pH=7.4):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;

[0056] 洗涤液:为PBST溶液,在1000mL磷酸盐缓冲溶液(0.01M,pH=7.4,PBS)中加入500 μ L Tween-20,混合均匀;

[0057] 稀释液(0.01M,pH=7.1,PBS):称取NaCl 4.0g、KCl 0.1g、NaH₂PO₄·2H₂O 0.26g、Na₂HPO₄·12H₂O 1.20g溶解于蒸馏水中并定容至500mL;

[0058] 碳酸盐缓冲液(0.5M,pH=9.6):称取Na₂CO₃ 1.59g、NaHCO₃ 2.94g溶解于蒸馏水中并定容至100mL;

[0059] 包被缓冲液CB(0.05M,pH=9.6):称取Na₂CO₃ 1.59g、NaHCO₃ 2.94g溶解于蒸馏水中并定容至1000mL;

[0060] 封闭液:称取1mg酪蛋白溶于1mL 0.01M,pH=7.4的PBS缓冲液中,混合均匀。

[0061] 实施例1

[0062] 一种基于痕量荧光免疫定量检测PSI-0Am-NAPI两亲聚合纳米药物载体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0063] a、水解PSI-OAm-NAPI,得到水解后的MFAP溶液;

[0064] 取32mL N,N-二甲基甲酰胺并加热至60℃,之后加入1.6g聚琥珀酰亚胺 (PSI) 和1.63mL油胺 (OAm),反应10min后加入0.83mLN-(3-氨基丙基)咪唑 (NAPI),并将温度升至100℃反应5小时后冷却至室温,加入160mL甲醇在磁力搅拌下使其均匀沉淀,离心分离后取沉淀干燥,即可制得PSI-OAm-NAPI (MFAP);

[0065] 将质量为60mg的MFAP纳米粒子和0.6mg的 (MPEG-PLGA) 溶解到1mL三氯甲烷溶液中,溶解后将上述溶液加入到10mL浓度为0.006mg/mL的氢氧化钠溶液中,超声5min,功率约300W;之后磁力搅拌5min,在50℃下蒸发除去三氯甲烷,之后于12000r/min离心15min,取沉淀分散在2mL 0.01M, pH=7.4的PBS缓冲液中,得水解后的MFAP溶液,其浓度为5mg/mL

[0066] b、制备MFAP的免疫抗原和包被抗原;

[0067] b-1、取1mL水解后的MFAP溶液中加入1mL PBS缓冲溶液中,该缓冲液包含0.1mg的N-羧基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶液和0.7mg的1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐 (EDAC.HCl),之后加入2mg牛血清白蛋白 (BSA),25℃温育3h,之后于12000r/min离心15min,将得到的沉淀分散到1mL 0.01M, pH=7.4的PBS缓冲液中得MFAP免疫抗原溶液,装入透析袋中,用PBS缓冲溶液透析12小时以上,之后收集并于4℃低温保存,得到MFAP的免疫抗原,其浓度为2mg/mL;

[0068] b-2、包被抗原的制备与所述免疫抗原的制备基本相同,不同处在于将所用的大分子蛋白质牛血清白蛋白 (BSA) 改为鸡卵清白蛋白 (OVA),其他条件均相同,其浓度为2mg/mL

[0069] c、MFAP纳米药物载体高特异性抗体的制备;

[0070] c-1、首次免疫:选取8只体重2.5kg左右,月龄3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,将MFAP的免疫抗原与福氏完全佐剂等体积比混合后,背部皮下多点注射到大白兔体内,注射8~12个点,注射量为1.0mg/kg/次;首次免疫三周后进行加强免疫;

[0071] c-2、加强免疫:将MFAP的免疫抗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,在加强免疫中间周从兔耳静脉取血1mL,测效价,直到抗体效价达到1:64000,一周后从颈动脉采血,室温静置1h,4℃静置3h后取上层澄清血清得到MFAP抗体,其浓度为13.5mg/mL。

[0072] 所述福氏不完全佐剂的制备方法为:将无水羊毛脂与液体石蜡以体积比1:2混合超声,即取50g无水羊毛脂和100mL液体石蜡,超声需多次进行,每次不超过20min,防止超声过程中温度过高,总超声3小时后取少量乳化剂滴入盛有冷水的烧杯中,若能够以油滴状态停留在水面上且半分钟不扩散则是稳定的,即成功制备弗氏不完全佐剂。

[0073] d、FITC标记的MFAP荧光抗体的制备;

[0074] d-1、将1mL MFAP抗体经0.01M, pH=7.1的PBS缓冲溶液调整至抗体中蛋白浓度为20mg/mL,得到MFAP抗体溶液;

[0075] d-2、将异硫氰酸荧光素 (FITC) 溶于碳酸盐缓冲液中,制成浓度为2mg/mL的FITC溶液;

[0076] d-3、将步骤d-1和步骤d-2得到的溶液按体积比10:1混合,于25℃避光搅拌3~6h;

[0077] d-4、将步骤d-3得到的混合液装入透析袋中,于PBS溶液中透析4h后,采用凝胶过滤法纯化,即可得到FITC标记的MFAP荧光抗体。

[0078] d-4、将步骤d-3得到的混合液装入透析袋中,于0.01M, pH=7.4的PBS溶液中透析2~4h后,采用凝胶过滤法纯化,即可得到FITC标记的MFAP荧光抗体。

[0079] e、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标准品,以FITC标记的MFAP抗体作为一抗,建立直接竞争荧光免疫分析定量检测MFAP,具体为:

[0080] e-1、包被:用0.05M, pH=9.6的碳酸盐缓冲液稀释将MFAP包被抗原溶液稀释到33.3 μ g/mL,以每孔100 μ L的量包被96孔酶标板,于4 $^{\circ}$ C温育12h;之后用洗涤液洗涤3次,每次3分钟并甩干;

[0081] e-2、封闭:每孔加入200 μ L浓度为1%的酪蛋白封闭液,于37 $^{\circ}$ C温育1h;之后用洗涤液洗涤3次,每次3分钟并甩干;

[0082] e-3、加样竞争:每孔加入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MFAP标准液和50 μ L荧光标记的MFAP抗体,37 $^{\circ}$ C温育3h;之后用洗涤液洗涤3次,每次3分钟并甩干;

[0083] 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;

[0084] e-4、在酶标仪上测定各孔在激发波长为485nm,发射波长为528nm时的荧光强度。

[0085] f、以MFAP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MFAP的浓度。所得标准曲线的线性方程为: $A=7558.72-1365.50\lg C$,A为荧光强度,C为MFAP的浓度;相关系数 $R=-0.997$,线性范围为 $0.48\sim 1.19\times 10^4$ ng/mL,检出限为0.090ng/mL。

[0086] g、重复以上各步骤,只是将步骤e-3中的不同浓度的MFAP标准液替换为未知浓度的MFAP待测液,然后在在酶标仪上测定各孔在激发波长为485nm,发射波长为528nm时的荧光强度,求取平均荧光强度值,根据上述标准曲线即可计算出MFAP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痕量荧光免疫定量检测PSI-0Am-NAPI两亲聚合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。

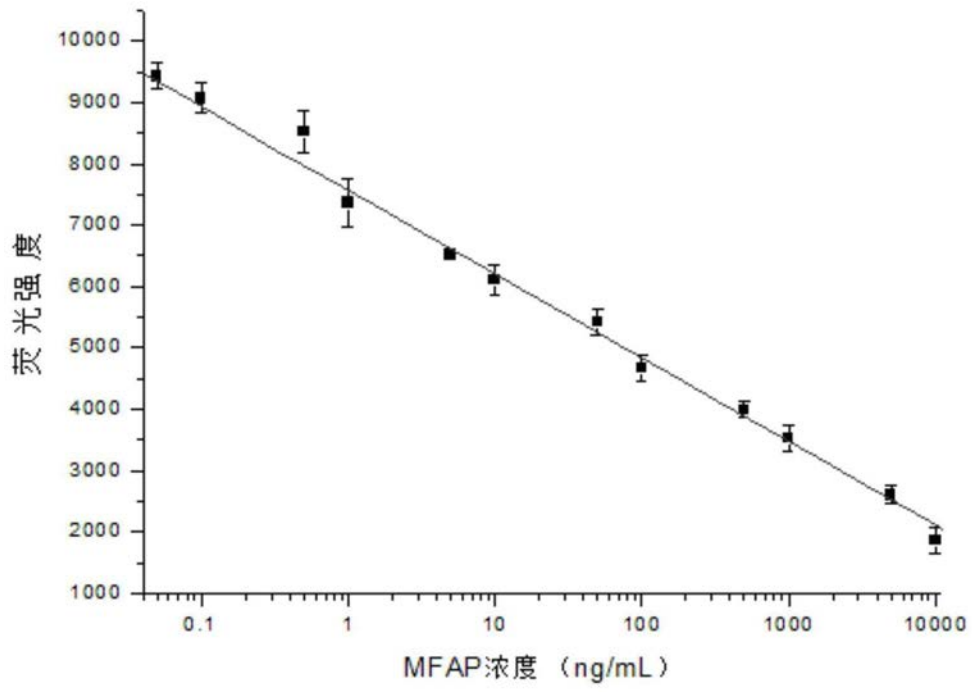


图1

专利名称(译)	一种基于痕量荧光免疫定量检测PSI-OAm-NAPI两亲聚合纳米药物载体的方法		
公开(公告)号	CN107091826B	公开(公告)日	2019-11-05
申请号	CN2017110489326.9	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	G01N21/64 G01N33/533		
CPC分类号	G01N21/6486 G01N33/533		
审查员(译)	任华		
其他公开文献	CN107091826A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于痕量荧光免疫定量检测PSI-OAm-NAPI两亲聚合纳米药物载体的方法，通过将PSI-OAm-NAPI水解后制备得到MFAP的免疫抗原和包被抗原，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标准品，以FITC标记的MFAP抗体作为一抗，建立直接竞争荧光免疫分析定量检测MFAP；该法不仅充分利用了免疫学反应中抗原抗体的高特异性还与荧光的敏感性相结合，使免疫反应的信号进一步提高，利用所发出荧光的强弱，来进行定量分析。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。

