



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107976538 A

(43)申请公布日 2018.05.01

(21)申请号 201711150942.8

(22)申请日 2017.11.18

(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 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 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

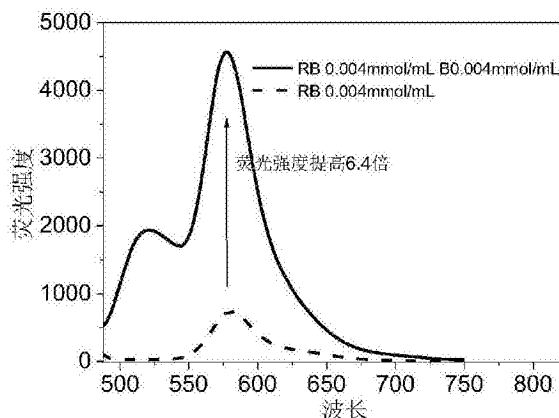
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针、制备方法及应用

(57)摘要

本发明提供了一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针、制备方法及应用,制备方法为:以介孔二氧化硅纳米颗粒为基体,掺杂荧光染料罗丹明B和BODIPY构建荧光共振能量转移体系(RB-BODIPY-FRET)。采用过碘酸钠氧化抗体偶联荧光标记探针;为纳米药物载体的超灵敏检测免疫分析提供了可靠依据。与现有技术相比,本发明以荧光染料BODIPY和罗丹明B共掺杂,两种荧光染料之间能够发生荧光共振能量转移,提高荧光强度,减弱猝灭,采用过碘酸钠氧化抗体偶联荧光标记探针,提高了偶联效率,消除了交联剂对抗体活性的影响。



1. 一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:

1)、将十六烷基三甲基溴化铵CTAB溶于去离子水;

2)、加入乙二醇和氨水;

3)、之后加入正硅酸乙酯TEOS反应;

4)、然后,再加入混合好的BODIPY溶液和罗丹明B溶液,再加入三甲氧基甲基硅烷MTMS,反应;

5)、再加入3-氨丙基三乙氧基硅烷APTES继续反应;离心洗涤,冷冻干燥,得RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子,即为基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,从步骤1)开始,全程均在60-70℃条件下反应。

3. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,步骤3)中加入乙二醇和氨水后3-6min内加入正硅酸乙酯TEOS;反应时间为30-60min。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的制备方法,其特征在于,步骤4)所述反应时间为2-4h。

5. 根据权利要求1-4所述的制备方法,其特征在于,步骤5)所述反应时间为1-2h。

6. 根据权利要求1-4所述的制备方法,其特征在于,步骤4)混合前BODIPY溶液浓度为0.001mmol/mL-0.006mmol/mL;混合前罗丹明B溶液浓度为0.001mmol/mL-0.006mmol/mL;混合后BODIPY和罗丹明B摩尔比为1:1。

7. 根据权利要求1-6所述的制备方法,其特征在于,所述制备方法具体包括以下步骤:

1)、在60-70℃下将十六烷基三甲基溴化铵CTAB 0.03-0.08g在磁力搅拌条件下溶于30-70mL去离子水中;

2)、随后在60-70℃下加入0.4-0.7mL乙二醇和2-3mL氨水;

3)、加入乙二醇和氨水后的3-6min内加入正硅酸乙酯TEOS 100-200μL反应30-60min;

4)、加入1mL BODIPY溶液和罗丹明B的混合溶液及0.02-0.05mL三甲氧基甲基硅烷MTMS,反应2-4h;

5)、再加入0.06-0.1mL的3-氨丙基三乙氧基硅烷APTES继续反应1-2h;

完成反应后搅拌冷却至室温,离心洗涤2-4次,冷冻干燥得RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子,避光密封保存。

8. 一种采用权利要求1-7任一项所述方法制备得到基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针。

9. 一种权利要求8所述的基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针偶联抗体的应用。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,具体应用方法为:

a. 将抗体溶解到醋酸缓冲液中,再加入过碘酸钠溶液,于4℃避光搅拌进行氧化,超滤除去未反应的过碘酸钠,得到氧化抗体;

b. 将上述制备的基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针清洗后分散到PBS缓冲溶液中;在搅拌下加入步骤a制备的氧化抗体,于4℃下避光搅拌;

c. 最后,加入硼氢化钠溶液继续4℃避光搅拌,将反应后的溶液离心洗涤,分散到PBS缓

冲溶液中,4℃储存备用。

一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针、 制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物分析和免疫分析领域,具体涉及一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针、制备方法及应用。

背景技术

[0002] 聚琥珀酰亚胺 (PSI), N-(3-氨基丙基) 咪唑 (NAPI) 和油胺 (OAm) 共同反应,得到的 PSI-OAm-NAPI 两亲聚合纳米颗粒 (MFAP) 是一种聚合物纳米药物载体。聚合物乳剂递送系统已广泛用于包封药物,许多聚合物纳米药物递送系统在临床应用中得到批准,或正在用于治疗癌症的临床试验研究中。进入生物体后的代谢情况与生物体的健康密不可分,过量的药物剂量可能会引起载体代谢缓慢从而对生物体产生毒副作用。因此,药物载体的定量测定对于考察该材料是否适于临床应用尤为重要。

[0003] 荧光免疫技术不仅充分利用了免疫分析的特异性还与荧光的敏感性相结合,在疾病防治、临床检测、药物筛选、食品安全等方面都有着十分广泛的应用。其中抗体的特异性和活性对免疫分析的准确性起决定作用;标记物的荧光强度和稳定性则是灵敏度高,重现性好的关键因素。因此,荧光标记技术及标记物的筛选对高灵敏的荧光免疫分析方法建立起举足轻重的作用。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针及其制备方法,为建立特异性好、重现性好、高灵敏的免疫分析程序提供了新的标记探针;该法以介孔二氧化硅纳米颗粒为基体,掺杂荧光染料罗丹明B和BODIPY构建荧光共振能量转移体系(RB-BODIPY-FRET)。

[0005] 本发明的另一目的在于提供一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针的应用,采用新的标记方法偶联抗体进一步提高了偶联效率并保证了抗体活性,消除交联剂对抗体活性的影响;为纳米药物载体的超灵敏检测免疫分析提供了可靠依据。

[0006] 本发明提供的一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针的制备方法,包括以下步骤:

[0007] 1)、将十六烷基三甲基溴化铵CTAB溶于去离子水;

[0008] 2)、加入乙二醇和氨水;

[0009] 3)、之后加入正硅酸乙酯TEOS反应;

[0010] 4)、然后,再加入混合好的BODIPY溶液和罗丹明B溶液,再加入三甲氧基甲基硅烷MTMS,反应;

[0011] 5)、再加入3-氨丙基三乙氧基硅烷APTES继续反应;离心洗涤,冷冻干燥,得RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子,即为基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针。

[0012] 上述制备过程中全程回流冷凝。从步骤1)开始,全程均在60-70℃条件下反应。

[0013] 步骤1)中十六烷基三甲基溴化铵CTAB在60-70℃搅拌条件下溶于去离子水中。

[0014] 步骤3)中加入乙二醇和氨水后3-6min内加入正硅酸乙酯TEOS;反应时间为30-60min。

[0015] 步骤4)所述反应时间为2-4h。

[0016] 所述BODIPY溶液制备方法为称取摩尔质量为0.001-0.006mmol的BODIPY溶于1mLDMF,所述罗丹明B溶液制备方法为0.001-0.006mmol的罗丹明B溶于1mL去离子水;混合好的BODIPY溶液和罗丹明B溶液事先混合好保证反应过程中介孔二氧化硅吸附两种染料到介孔中的能力相同,避免一种染料先加入占据大多数介孔。

[0017] 进一步的,步骤4)中BODIPY和罗丹明B摩尔比为1:1,并控制混合前BODIPY溶液和罗丹明B溶液浓度相同,分别为0.001mmol/mL,0.002mmol/mL,0.003mmol/mL,0.004mmol/mL,0.005mmol/mL,0.006mmol/mL;一系列加入量考察择优选择。优选的,为0.004mmol/mL,0.005mmol/mL的浓度,所制备的荧光纳米标记探针荧光强度高,稳定性好。

[0018] 步骤4)混合前BODIPY溶液浓度为0.001mmol/mL-0.006mmol/mL;混合前罗丹明B溶液浓度为0.001mmol/mL-0.006mmol/mL。

[0019] 所述BODIPY制备方法为:

[0020] A、20-25℃下在含有40-60mL水的圆底烧瓶中边搅拌边加入1-3mL吡咯,1-3mL均三甲苯甲醛,充分搅拌均匀;

[0021] B、加入0.2-1mL浓HCl,并于20-25℃反应12-24h,有大量黑色沉淀生成,抽滤后用石油醚洗涤,得到粗产品粉末1;

[0022] C、取200-600mg粗产品粉末1溶于40-60mL无水四氢呋喃中,在磁力搅拌下加入N-氯代丁二酰亚胺NCS 300-700mg,20-25℃反应1-3h。

[0023] D、反应完毕后将混合物加入到100-300mL水中,用20-60mL二氯甲烷萃取三次,10-30g无水硫酸钠干燥,减压旋干。

[0024] E、在旋干后的产品中加入20-60mL二氯甲烷充分溶解,在磁力搅拌下加入2,3-二氯-5,6-二氰对苯醌DDQ 400-600mg反应5-20min,之后加入1-2mL三乙胺反应0.5-2h,

[0025] F、最后加入三氟化硼乙醚1-3mL反应1-3h,反应完毕后用30-60mL二氯甲烷萃取三次,无水硫酸钠干燥,减压旋干,经硅胶柱层析分离提纯(300-400目硅胶粉,石油醚/二氯甲烷=10/1,V/V)得纯BODIPY。

[0026] 步骤5)所述反应时间为1-2h。

[0027] 进一步的,步骤5)制备得到的RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子后避光密封保存。

[0028] 进一步的,一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针的制备方法,具体包括以下步骤:

[0029] 1)、在60-70℃下将十六烷基三甲基溴化铵CTAB 0.03-0.08g在磁力搅拌条件下溶于30-70mL去离子水中;

[0030] 2)、随后在60-70℃下加入0.4-0.7mL乙二醇和2-3mL氨水;

[0031] 3)、加入乙二醇和氨水后的3-6min内加入正硅酸乙酯TEOS 100-200μL反应30-60min;

[0032] 4)、加入1mL BODIPY溶液和罗丹明B的混合溶液及0.02-0.05mL三甲氧基甲基硅烷MTMS,反应2-4h;

[0033] 5)、再加入0.06-0.1mL的3-氨丙基三乙氧基硅烷APTES继续反应1-2h;

[0034] 完成反应后搅拌冷却至室温,离心洗涤2-4次,冷冻干燥得RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子,避光密封保存。

[0035] 一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针,采用上述方法制备得到。

[0036] 本发明还提供了一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针偶联抗体的应用。

[0037] 具体应用方法为:

[0038] a、将抗体溶解到醋酸缓冲液中,再加入过碘酸钠溶液,于4℃避光搅拌进行氧化,超滤除去未反应的过碘酸钠,得到氧化抗体;

[0039] b、将上述制备的基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针清洗后分散到PBS缓冲溶液中;在搅拌下加入步骤a制备的氧化抗体,于4℃下避光搅拌;

[0040] c、最后,加入硼氢化钠溶液继续4℃避光搅拌,将反应后的溶液离心洗涤,分散到PBS缓冲溶液中,4℃储存备用。

[0041] 步骤a中所述醋酸缓冲液0.05M,pH=4.6;所述过碘酸钠溶液2mg/mL,pH=4.6;所述超滤用的滤膜为0.45μm滤膜;

[0042] 步骤a中所述搅拌时间为2-4h;

[0043] 步骤a中所述抗体的制备方法为:

[0044] a-1、首次免疫:将免疫原与弗氏完全佐剂等体积比混合,用注射器乳化好后采用背部皮下注射方式免疫新西兰大白兔,皮下注射7-11个点,总剂量1.0-2.0mg/kg/次,三周后进行加强免疫;

[0045] a-2、加强免疫:采取同样的背部皮下注射方式和注射计量进行注射免疫,不同的为加强免疫所用佐剂为弗氏不完全佐剂,此后每两周进行一次加强免疫,中间周于兔耳缘采血测效价,效价达到1:64000后最终加强免疫一次,一周后于颈动脉采血,纯化得到多克隆抗体。

[0046] 步骤a中所述抗体选自但不限于抗MFAP高特异性多克隆抗体或羊抗兔抗体。

[0047] 所述b中PBS缓冲溶液0.01M,pH=7.4。

[0048] 步骤a中所述搅拌时间为2-4h。

[0049] 步骤b中所述搅拌时间为12-36h。

[0050] 步骤c中所述硼氢化钠溶液为现配现用,浓度为2mg/mL,pH=7.1。

[0051] 步骤c中所述搅拌时间为2-4h。

[0052] 进一步的,优选的方法为:

[0053] a、将抗体1-4mg溶解到100-300μL醋酸缓冲液中,再加入300-900μL过碘酸钠溶液,于4℃避光搅拌2-4h,超滤除去未反应的过碘酸钠,得到氧化抗体;

[0054] b、将2-10mg上述制备的基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针用PBS缓冲溶液清洗后分散到3-6mL PBS缓冲溶液中;在磁力搅拌下加入步骤a制备的氧化抗体,于4℃下避光搅拌12-36h;

[0055] c、加入100-300 μ L硼氢化钠溶液继续4 $^{\circ}$ C避光搅拌2-4h,将反应后的溶液离心洗涤分散到PBS缓冲溶液中,4 $^{\circ}$ C储存备用。

[0056] 本发明提供一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针用于检测纳米药物载体的应用。

[0057] RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米标记探针体系中能量的转移表征:

[0058] 罗丹明B的激发为530nm发射为576nm,BODIPY的激发为470nm发射为530nm,由于BODIPY的发射峰与罗丹明B的激发峰重叠,两种染料之间能够发生能量转移,以BODIPY的激发波长激发时,其自身的荧光强度会减弱,而罗丹明B的荧光强度会增强。未发生荧光共振能量转移的罗丹明B用470nm所产生的荧光极弱,同浓度下发生能量转移的罗丹明B荧光强度则会增强很多。因此用470nm激发罗丹明B二氧化硅纳米粒子和同浓度的RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米标记探针,做荧光谱图观察其荧光强度的变化则可证明是否发生能量转移。

[0059] RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米标记探针成功偶联抗体表征:

[0060] 用470nm激发做荧光谱图观察RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子和RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子偶联抗体后的发射峰位置的变化。

[0061] 本发明采用氟硼吡咯类和罗丹明B,因其具有良好的光化学物理性能,如较高的摩尔消光系数,较高的荧光量子产率,光谱性质非常稳定等;因此在分析化学、分子生物学等领域受到更多青睐。荧光共振能量转移技术比常规荧光技术具有更强的抗干扰能力,能够避免散射光的影响,光学效率大大提高,从而实现超灵敏测定。但随着研究的进展,要求检测灵敏度进一步的提高,荧光染料直接用来标记,标记效率低、光稳定性差,相对低的荧光强度等缺点限制了其发展和应用。荧光纳米粒子恰恰能够克服荧光染料的缺点被研究者所看重,成为新的最有发展前景的标记探针。本发明采用二氧化硅荧光纳米粒子无毒,水溶性好,易修饰,具有良好的生物相容性;且介孔二氧化硅纳米颗粒制备方法简单,比表面积大,荧光染料负载率高;纳米粒子中染料的荧光性质保持不变具有良好的光稳定性好。

[0062] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0063] (1) 荧光纳米粒子克服了荧光染料直接用来标记,标记效率低、光稳定性差,相对低的荧光强度等缺点;

[0064] (2) 二氧化硅纳米粒子无毒,水溶性好,易修饰,具有良好的生物相容性;且介孔二氧化硅纳米颗粒制备方法简单,比表面积大,荧光染料负载率高;纳米粒子中染料的荧光性质保持不变具有良好的光稳定性好;

[0065] (3) 以荧光染料BODIPY和罗丹明B共掺杂,两种荧光染料之间能够发生荧光共振能量转移,提高荧光强度,减弱猝灭;BODIPY为共振体系中的能量供体,罗丹明B为能量受体,激发BODIPY,处于激发态的BODIPY能够将能量转移给罗丹明B促使其发光,宽化了罗丹明B的激发范围,与直接激发罗丹明B相比,这种能量转移形式能够有效减弱荧光猝灭,提高荧光强度。

[0066] (4) 采用过碘酸钠氧化抗体偶联荧光标记探针,提高了偶联效率,消除了交联剂对抗体活性的影响。使用过碘酸钠法将抗体糖基二羟基氧化为醛基,与纳米探针上的氨基结合,没有使用碳化二亚胺、戊二醛等交联剂,避免了交联剂对抗体活性的影响,且偶联率高。两种方法均加入2mg抗体,8mg标记探针,紫外表征为两种方法反应完毕后离心所得上清液紫外吸收图,从图5中可以看出使用戊二醛法上清液中抗体的含量比使用过碘酸钠法多,

即使用戊二醛法未与标记探针结合的抗体的量比用过碘酸钠法多,表明使用过碘酸钠法偶联率高。

附图说明

[0067] 图1为以470nm激发浓度为0.004mmol/mL的罗丹明B二氧化硅纳米粒子和实施例1制备的混合前各染料浓度为0.004mmol/mL的RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子的荧光发射谱图;

[0068] 图2为以470nm激发RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子和实施例2制备的RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子偶联抗MFAP抗体后的荧光发射谱图;

[0069] 图3为以470nm激发浓度为0.005mmol/mL的罗丹明B二氧化硅纳米粒子和是实施例3制备的混合前各染料浓度为0.005mmol/mL的RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子的荧光发射谱图;

[0070] 图4为以470nm激发RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子和实施例4制备的RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子偶联羊抗兔抗体后的荧光发射谱图;

[0071] 图5为碘酸钠法和戊二醛法偶联的比较;

[0072] 图6为所用BODIPY制备方法。

具体实施方式

[0073] 实施例1

[0074] 一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针的制备方法,法包括以下步骤:

[0075] 1)、在65℃下将十六烷基三甲基溴化铵CTAB 50mg在磁力搅拌下,溶于含有50mL去离子水中;

[0076] 2)、随后在65℃下加入650μL乙二醇和2.1mL氨水;

[0077] 3)、在加入乙二醇和氨水后的5min内加入正硅酸乙酯TEOS 200μL反应30min;

[0078] 4)、将0.5mL 0.004mmol/mL BODIPY溶液和0.5mL 0.004mmol/mL罗丹明B溶液混合,向步骤3)中加入混合好的1mL BODIPY和罗丹明B的混合溶液,之后加入三甲氧基甲基硅烷MTMS 30μL,反应2h;

[0079] 5)、加入90μL mL的3-氨丙基三乙氧基硅烷APTES继续反应1.5h;

[0080] 完成反应后搅拌冷却至室温并离心洗涤3次,冷冻干燥得RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子,即基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针,避光密封保存。

[0081] RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米标记探针体系中能量的转移表征:

[0082] 以470nm激发浓度为0.004mmol/mL的罗丹明B二氧化硅纳米粒子和混合前各染料浓度为0.004mmol/mL的RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子。从图1中可以看出,同浓度下加入了BODIPY后罗丹明B所发出的荧光明显增强。

[0083] 所用BODIPY具体结构为图6产物,具体制备过程如下:

[0084] a、25℃下在含有50mL水的圆底烧瓶中边搅拌边加入2mL吡咯,1.5mL均三苯甲醛,充分搅拌均匀;

[0085] b、加入0.5mL浓HCl,并于25℃反应24h,有大量黑色沉淀生成,抽滤后用石油醚洗

涤,得到粗产品粉末1;

[0086] c、取500mg粗产品粉末1溶于50mL无水四氢呋喃中,在磁力搅拌下加入N-氯代丁二酰亚胺NCS 507mg,25℃反应2h。

[0087] d、反应完毕后将混合物加入到200mL水中,用50mL二氯甲烷萃取三次,15g无水硫酸钠干燥,减压旋干。

[0088] e、在旋干后的产物中加入50mL二氯甲烷充分溶解,在磁力搅拌下加入2,3-二氯-5,6-二氰对苯醌DDQ 517mg反应10min,之后加入1.5mL三乙胺反应1h,

[0089] f、最后加入三氟化硼乙醚2.5mL反应2h,反应完毕后用50mL二氯甲烷萃取三次,15g无水硫酸钠干燥,减压旋干,经硅胶柱层析分离提纯(300-400目硅胶粉,石油醚/二氯甲烷=10/1,V/V)得BODIPY。

[0090] 实施例2

[0091] 一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针偶联抗体的应用,具体方法为:

[0092] 1、先制备抗MFAP高特异性多克隆抗体:

[0093] 1-1、首次免疫:将免疫原与弗氏完全佐剂等体积比混合,用注射器乳化好后采用背部皮下注射方式免疫新西兰大白兔。皮下注射10个点,总剂量1.0mg/kg/次。三周后进行加强免疫;

[0094] 1-2、加强免疫:采取同样的背部皮下注射方式和注射计量进行注射免疫,不同的为加强免疫所用佐剂为弗氏不完全佐剂。此后每两周进行一次加强免疫,中间周于兔耳缘采血测效价,效价达到1:64000后最终加强免疫一次,一周后于颈动脉采血,纯化得到抗MFAP高特异性多克隆抗体。

[0095] 2、RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米标记探针采用过碘酸钠法偶联抗MFAP高特异性多克隆抗体:

[0096] 2-1、将步骤1-2制备的抗MFAP高特异性多克隆抗体2mg溶解到300 μ L醋酸缓冲液(0.05M,pH=4.6)中,再加入700 μ L浓度为2mg/mL,pH=4.6过碘酸钠溶液,于4℃避光搅拌2h,用滤膜为0.45 μ m滤膜超滤除去未反应的过碘酸钠,得到氧化抗体;

[0097] 2-2、将8mg实施例1制备的RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子用PBS(0.01M,pH=7.4)清洗3次后分散到3mL PBS缓冲溶液中(0.01M,pH=7.4)中。在磁力搅拌下加入步骤2-1制备的氧化抗体,于4℃下避光搅拌20h;

[0098] 2-3、然后,加入100 μ L浓度为2mg/mL,pH=7.1硼氢化钠溶液继续4℃避光搅拌2h,将反应后的溶液离心洗涤分散到PBS缓冲溶液中,即可,4℃储存备用。

[0099] RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米标记探针成功偶联抗体表征:

[0100] 以470nm激发RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子和RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子偶联抗MFAP抗体后的荧光发射谱图。从图2中可以看出RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子发射峰在576nm,RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子偶联抗MFAP抗体后发射峰在582nm,偶联抗MFAP抗体后罗丹明B的发生峰位置向长波方向移动了6nm,表明成功偶联抗体。

[0101] 实施例3

[0102] 一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针的制备方法,包括以下

步骤:

[0103] 1)、在65℃下将十六烷基三甲基溴化铵CTAB 50mg溶于含有50mL去离子水中;

[0104] 2)、随后在65℃下加入650μL乙二醇和2.1mL氨水;

[0105] 3)、在加入乙二醇和氨水后的5min内加入正硅酸乙酯TEOS 200μL反应30min;

[0106] 4)、将0.5mL 0.005mmol/mL BODIPY溶液和0.5mL 0.005mmol/mL罗丹明B溶液混合,向步骤3)中加入混合好的1mL BODIPY和罗丹明B的混合溶液,之后加入三甲氧基甲基硅烷MTMS30μL,反应2h;

[0107] 5)、加入90μL mL的3-氨丙基三乙氧基硅烷APTES继续反应1.5h;

[0108] 完成反应后搅拌冷却至室温并离心洗涤3次,冷冻干燥得RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子,即基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针,避光密封保存。

[0109] RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米标记探针体系中能量的转移表征:

[0110] 以470nm激发浓度为0.005mmol/mL的罗丹明B二氧化硅纳米粒子和混合前各染料浓度为0.005mmol/mL的RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子。从图3中可以看出,同浓度下加入了BODIPY后罗丹明B所发出的荧光明显增强。

[0111] 实施例4

[0112] 一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针偶联抗体的应用,具体方法为:

[0113] 本实例中所用羊抗兔抗体为上海生工生物工程有限公司直接购买得到。

[0114] 1、将羊抗兔抗体2mg溶解到300μL醋酸缓冲液(0.05M, pH=4.6)中,再加入700μL浓度为2mg/mL, pH=4.6过碘酸钠溶液,于4℃避光搅拌2h,用滤膜为0.45μm滤膜超滤除去未反应的过碘酸钠,得到氧化抗体;

[0115] 2、将8mg 实施例3制备的RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子用PBS缓冲溶液(0.01M, pH=7.4)清洗3次后分散到3mL PBS缓冲溶液(0.01M, pH=7.4)中;在磁力搅拌下加入氧化后的羊抗兔抗体,于4℃下避光搅拌20h,

[0116] 3、加入100μL浓度为2mg/mL, pH=7.1硼氢化钠溶液继续4℃避光搅拌2h,将反应后的溶液离心洗涤分散到PBS中,4℃储存备用。

[0117] RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米标记探针成功偶联抗体表征:

[0118] 以470nm激发RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子和RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子偶联羊抗兔抗体后的荧光发射谱图。从图4中可以看出RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子发射峰在576nm, RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子偶联抗MFAP抗体后发射峰在584nm,偶联羊抗兔抗体后罗丹明B的发射峰位置向长波方向移动了8nm,表明成功偶联抗体。

[0119] 上述参照实施例对一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针的制备及应用进行的详细描述,是说明性的而不是限定性的,并不能因此而理解为对本发明范围的限制,可按照所限定范围列举出若干个实施例,但凡在不脱离本发明总体构思下的同替换或等效变换的变化和修改,均应包括在本发明的保护范围之内。

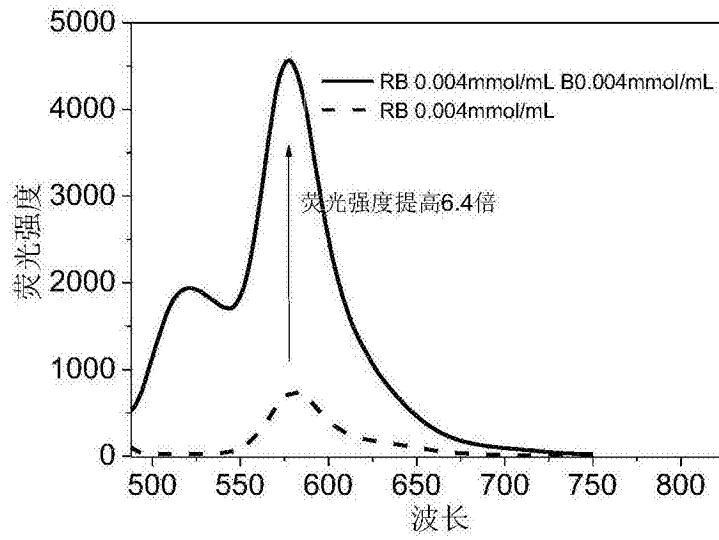


图1

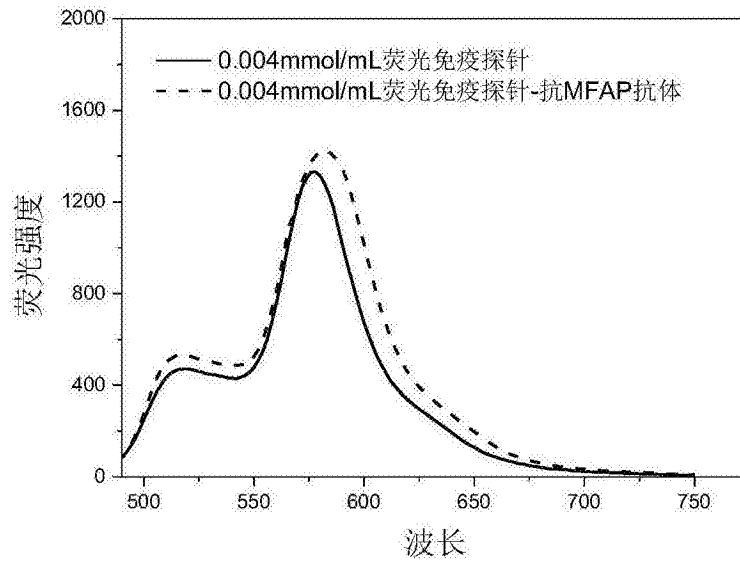


图2

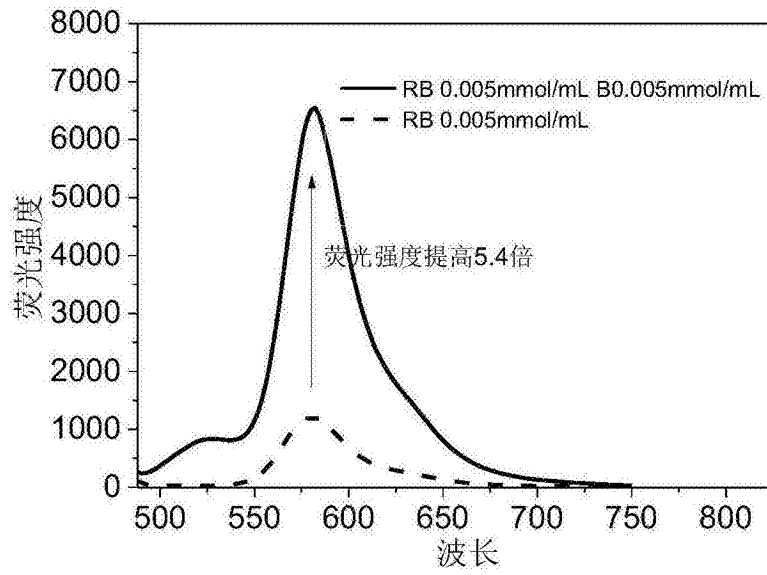


图3

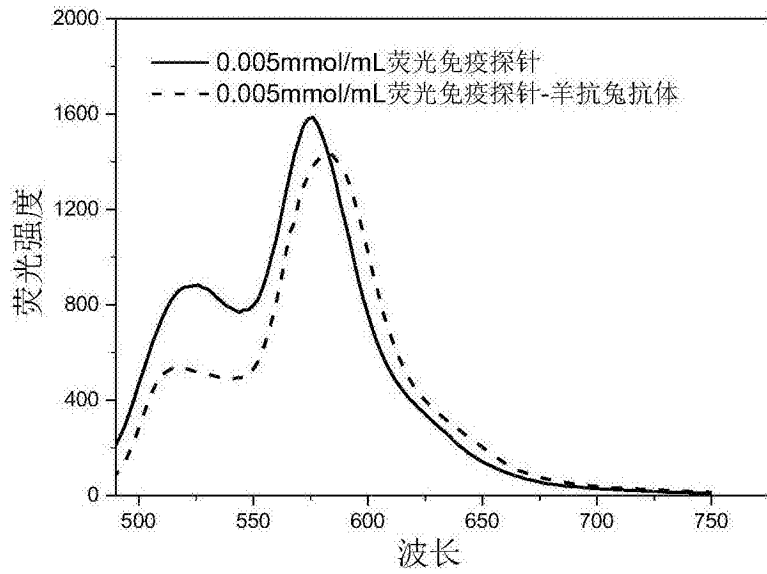


图4

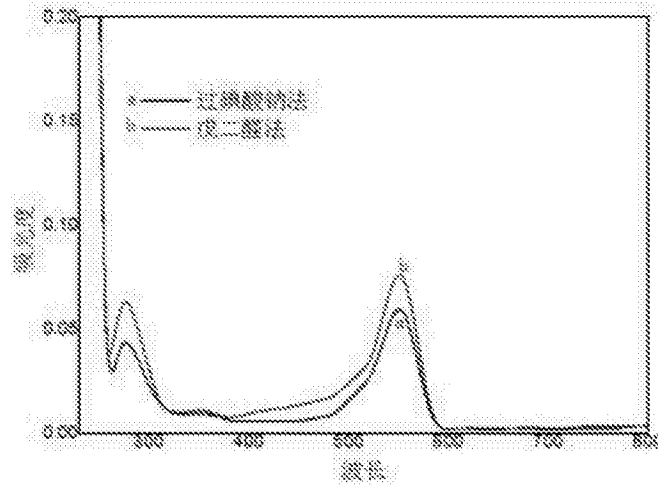


图5

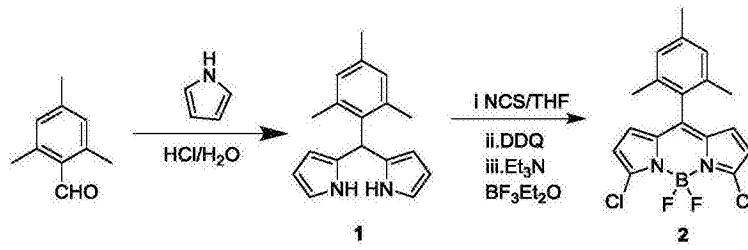


图6

专利名称(译)	一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针、制备方法及应用		
公开(公告)号	CN107976538A	公开(公告)日	2018-05-01
申请号	CN201711150942.8	申请日	2017-11-18
[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	G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N33/533 G01N2021/6439		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种基于荧光共振能量转移的二氧化硅荧光免疫标记探针、制备方法及应用，制备方法为：以介孔二氧化硅纳米颗粒为基体，掺杂荧光染料罗丹明B和BODIPY构建荧光共振能量转移体系(RB-BODIPY-FRET)。采用过碘酸钠氧化抗体偶联荧光标记探针；为纳米药物载体的超灵敏检测免疫分析提供了可靠依据。与现有技术相比，本发明以荧光染料BODIPY和罗丹明B共掺杂，两种荧光染料之间能够发生荧光共振能量转移，提高荧光强度，减弱猝灭，采用过碘酸钠氧化抗体偶联荧光标记探针，提高了偶联效率，消除了交联剂对抗体活性的影响。

