



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110568184 A

(43)申请公布日 2019.12.13

(21)申请号 201910773247.X

(22)申请日 2019.08.21

(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 连中宇

(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 33/58(2006.01)

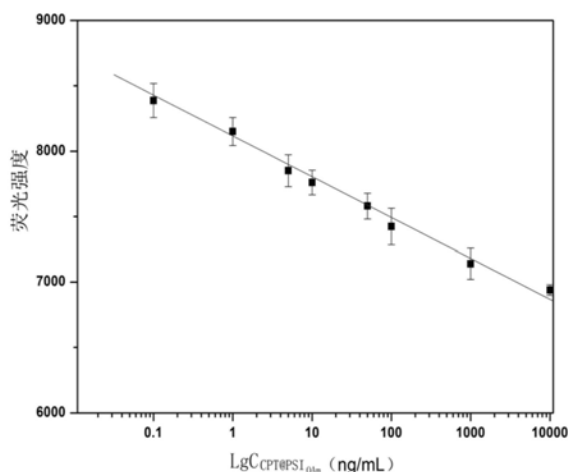
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

### (54)发明名称

一种负载抗癌药物喜树碱的纳米药物载体的荧光免疫定量检测方法

### (57)摘要

本发明公开了一种负载抗癌药物喜树碱的纳米药物载体荧光免疫定量检测方法,将CPT@PSI<sub>0Am</sub>包被抗原包被于酶标板中,封闭、加入不同浓度的CPT@PSI<sub>0Am</sub>标准品和FITC标记的抗PSI<sub>0Am</sub>抗体,建立直接竞争荧光免疫分析法定量检测CPT@PSI<sub>0Am</sub>;通过检测CPT@PSI<sub>0Am</sub>包被抗原、FITC标记抗体复合物荧光信号达到定量检测CPT@PSI<sub>0Am</sub>的目的,基于抗原抗体特异性,与荧光标记物相结合,使免疫反应信号进一步提高,可进行高通量测定,此检测方法的线性范围为0.12-1638.7ng/mL,检出限为0.04ng/mL,本发明为负载抗癌药物的纳米药物载体提供了更加灵敏的检测方案。



1. 一种负载抗癌药物喜树碱的纳米药物载体的荧光免疫定量检测方法, 其特征在于, 所述检测方法包括以下步骤:

(1) 制备CPT@PSI<sub>0Am</sub> (负载喜树碱的油胺枝接聚琥珀酰亚胺) 的包被抗原;

(2) 制备FITC标记的抗PSI<sub>0Am</sub>抗体;

(3) 将CPT@PSI<sub>0Am</sub>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CPT@PSI<sub>0Am</sub>标准品和FITC标记的抗PSI<sub>0Am</sub>抗体, 建立直接竞争荧光免疫分析法定量检测CPT@PSI<sub>0Am</sub>;

(4) 以CPT@PSI<sub>0Am</sub>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得出线性方程, 从而定量检测出CPT@PSI<sub>0Am</sub>的浓度。

2. 根据权利要求1所述的检测方法, 其特征在于, 所述步骤(1)具体包括以下步骤:

(1-1) 将PSI<sub>0Am</sub> (油胺枝接聚琥珀酰亚胺)、喜树碱(CPT)、聚乙烯-b-聚乙二醇溶解于三氯甲烷中, 然后加入到氢氧化钠溶液中, 超声反应之后, 蒸发除去三氯甲烷, 离心, 将沉淀分散在PBS缓冲溶液中, 得到水解后的CPT@PSI<sub>0Am</sub>-COO<sup>-</sup>半抗原溶液;

(1-2) 向CPT@PSI<sub>0Am</sub>-COO<sup>-</sup>半抗原溶液中加入含有N-羟基琥珀酰亚胺和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐的PBS缓冲溶液反应10~20min, 然后加入鸡卵清白蛋白, 温育后, 离心, 所得沉淀分散于PBS缓冲液中, 即可得到所述CPT@PSI<sub>0Am</sub>的包被抗原。

3. 根据权利要求2所述的检测方法, 其特征在于, 步骤(1-1)中, 所述PSI<sub>0Am</sub>、喜树碱、聚乙烯-b-聚乙二醇、三氯甲烷、氢氧化钠的用量之比为(10~60) mg:(0.5~2) mg:(0.5~2) mL:(2~16) mL; 所述超声反应的条件为200~400W超声5~10min。

4. 根据权利要求2所述的检测方法, 其特征在于, 所述步骤(1-2)具体包括以下步骤: 向1mL CPT@PSI<sub>0Am</sub>-COO<sup>-</sup>半抗原溶液中加入1mL含有0.1~1mg的N-羟基琥珀酰亚胺和0.1~1mg的1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐的PBS缓冲溶液, 反应10~20min后, 加入1~10mg鸡卵清白蛋白, 于25℃下温育2~4h, 离心10~15min, 取沉淀分散到3mL中性PBS缓冲液中, 即可制得CPT@PSI<sub>0Am</sub>的包被抗原。

5. 根据权利要求1所述的检测方法, 其特征在于, 所述步骤(2)具体包括以下步骤: 将PSI<sub>0Am</sub>抗体溶液与异硫氰酸荧光素溶液混合, 避光搅拌反应3~6h, 反应结束后经透析、凝胶过滤法纯化, 得到FITC标记的抗PSI<sub>0Am</sub>抗体。

6. 根据权利要求5所述的检测方法, 其特征在于, 所述PSI<sub>0Am</sub>抗体溶液为PSI<sub>0Am</sub>抗体溶解在0.01M pH7.1的PBS缓冲液中得到, 其蛋白浓度为10~20mg/mL; 所述异硫氰酸荧光素溶液为异硫氰酸荧光素溶于pH=9.6碳酸盐缓冲液中得到, 其浓度为2mg/mL。

7. 根据权利要求5或6所述的检测方法, 其特征在于, 所述PSI<sub>0Am</sub>抗体溶液与异硫氰酸荧光素溶液的体积之比为10:1; 所述凝胶过滤纯化的洗脱液为0.01M的pH 7.1的PBS缓冲溶液, 流速为0.1~0.5mL/min。

8. 根据权利要求1所述的检测方法, 其特征在于, 所述步骤(3)具体包括以下步骤:

(3-1) 包被: 用包被缓冲液将CPT@PSI<sub>0Am</sub>包被抗原稀释80倍, 包被96孔酶标板, 每孔100μL, 4℃冰箱过夜;

(3-2) 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CPT@PSI<sub>0Am</sub>包被抗原;

(3-3) 加样竞争: PBST溶液洗涤96孔酶标板3次, 每次3~5min, 然后将50 $\mu$ L不同浓度的CPT@PSI<sub>0Am</sub>标准液和50 $\mu$ L FITC标记PSI<sub>0Am</sub>抗体提前混匀分梯度加入各孔中, 37℃温育1~2h, 之后用洗涤液洗涤2~4次, 每次3~5分钟并甩干;

(3-4) 在酶标仪上测定各孔在激发波长为485nm、发射波长为525nm时的荧光强度。

9. 根据权利要求1所述的检测方法, 其特征在于, 步骤(4)中, 所述标准曲线的线性方程为 $F=8116.6-311.71\lg C$ ,  $F$ 为荧光强度,  $C$ 为CPT@PSI<sub>0Am</sub>的浓度; 相关系数 $R^2=0.991$ , 线性范围为0.12-1638.7ng/mL, 检出限为0.04ng/mL。

## 一种负载抗癌药物喜树碱的纳米药物载体的荧光免疫定量检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及负载药物的纳米药物载体的定量检测方法,具体涉及一种负载抗癌药物喜树碱的纳米药物载体的荧光免疫定量检测方法。

### 背景技术

[0002] 现如今,癌症已经成为人类健康的最大杀手之一,也是世界医学上难以解决的重大挑战,据调查,在过去十年里,全球癌症发病率升高了33%,仅2018年,就有1810万人被诊断为癌症,并有980万人因此死亡。如今已批准上市的抗癌药物仅有近百种,然而许多抗癌药物由于低水溶性,生物相容性差,血液清除率低,肿瘤靶向性差和对正常组织毒副作用严重等影响了在癌症治疗的发展,纳米药物载体可大大提高药物其水溶性和稳定性,延长血液循环时间,增强肿瘤被动积累的渗透性和滞留(EPR)效应,高分子纳米药物载体油胺枝接聚琥珀酰亚胺PSI<sub>0Am</sub>是近年来新兴的一类药物载体,可以负载抗癌药物,在癌症治疗方面展现出广阔的应用前景,这为我们对抗癌药物的定量检测、输送、示踪、药物释放等动力学过程研究提供更具可行的实验方案。

[0003] 尽管很多脂质体药物载体已进入临床使用阶段,但高分子药物载体作为纳米材料,其复杂的化学结构产生的生物学效应及药物载体负载药物定量分析方法在国际上还没有统一的评价标准和评价方法。目前已有研究者提出纳米药物载体面临的诸多挑战,同时负载药物的纳米药物载体进入人体后在血液中循环,运输到癌细胞表面富集,渗透进入癌细胞,药物载体释放药物等过程的实时动态监控及其定量分析研究甚少,因此建立对负载抗癌药物喜树碱的纳米药物载体的高灵敏定量检测已经迫在眉睫。

[0004] 目前对于抗癌药物的检测主要以HPLC和紫外检测为主,若通过建立免疫分析方法,对负载抗癌药物的纳米药物载体定量检测,更灵敏地量化抗癌药物更具有优势。

### 发明内容

[0005] 本发明提供了一种负载抗癌药物喜树碱的纳米药物载体的荧光免疫定量检测方法,采用直接竞争荧光免疫分析法对纳米药物载体负载药物进行定量检测,简单快速,不需要复杂的样品前处理过程,结合抗原抗体的高特异性,灵敏度高。

[0006] 本发明采取的技术方案为:

[0007] 一种负载抗癌药物喜树碱的纳米药物载体的荧光免疫定量检测方法,所述检测方法包括以下步骤:

[0008] (1) 制备CPT@PSI<sub>0Am</sub>(负载喜树碱的油胺枝接聚琥珀酰亚胺)的包被抗原;

[0009] (2) 制备FITC标记的抗PSI<sub>0Am</sub>抗体;

[0010] (3) 将CPT@PSI<sub>0Am</sub>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CPT@PSI<sub>0Am</sub>标准品和FITC标记的抗PSI<sub>0Am</sub>抗体,建立直接竞争荧光免疫分析法定量检测CPT@PSI<sub>0Am</sub>;

[0011] (4) 以CPT@PSI<sub>0Am</sub>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得出线性方程, 从而定量检测出CPT@PSI<sub>0Am</sub>的浓度。

[0012] 进一步地, 所述步骤(1)具体包括以下步骤:

[0013] (1-1) 将PSI<sub>0Am</sub> (油胺枝接聚琥珀酰亚胺)、喜树碱(CPT)、聚乙烯-b-聚乙二醇溶解于三氯甲烷中, 然后加入到氢氧化钠溶液中, 超声反应之后, 蒸发除去三氯甲烷, 离心, 将沉淀分散在PBS缓冲溶液中, 得到水解后的CPT@PSI<sub>0Am</sub>-COO<sup>-</sup>半抗原溶液;

[0014] (1-2) 向CPT@PSI<sub>0Am</sub>-COO<sup>-</sup>半抗原溶液中加入含有N-羟基琥珀酰亚胺和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐的PBS缓冲溶液反应10~20min, 然后加入鸡卵清白蛋白, 温育后, 离心, 所得沉淀分散于PBS缓冲液中, 即可得到所述CPT@PSI<sub>0Am</sub>的包被抗原。

[0015] 步骤(1-1)中, 所述PSI<sub>0Am</sub>、喜树碱、聚乙烯-b-聚乙二醇(PE-b-PEG)、三氯甲烷、氢氧化钠的用量之比为(10~60)mg:(0.5~2)mg:(0.5~2)mL:(2~16)mL; 所述超声反应的条件为200~400W超声5~10min。所述PSI<sub>0Am</sub>的平均粒径为200nm。

[0016] 所述步骤(1-2)具体包括以下步骤: 向1mL CPT@PSI<sub>0Am</sub>-COO<sup>-</sup>半抗原溶液中加入1mL含有0.1~1mg的N-羟基琥珀酰亚胺和0.1~1mg的1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐的PBS缓冲溶液, 反应10~20min后, 加入1~10mg鸡卵清白蛋白, 于25℃下温育2~4h, 离心10~15min, 取沉淀分散到3mL中性PBS缓冲液中, 即可制得CPT@PSI<sub>0Am</sub>的包被抗原。

[0017] 所述步骤(2)具体包括以下步骤: 将PSI<sub>0Am</sub>抗体溶液与异硫氰酸荧光素溶液混合, 避光搅拌反应3~6h, 反应结束后经透析、凝胶过滤法纯化, 得到FITC标记的抗PSI<sub>0Am</sub>抗体。

[0018] 所述PSI<sub>0Am</sub>抗体溶液为PSI<sub>0Am</sub>抗体溶解在0.01M pH7.1的PBS缓冲液中得到, 其蛋白浓度为10~20mg/mL; 所述异硫氰酸荧光素溶液为异硫氰酸荧光素溶于pH=9.6碳酸盐缓冲液中得到, 其浓度为2mg/mL。

[0019] 所述PSI<sub>0Am</sub>抗体溶液与异硫氰酸荧光素溶液的体积之比为10:1; 所述凝胶过滤纯化的洗脱液为0.01M的pH 7.1的PBS缓冲溶液, 流速为0.1~0.5mL/min。

[0020] 所述步骤(3)具体包括以下步骤:

[0021] (3-1) 包被: 用包被缓冲液将CPT@PSI<sub>0Am</sub>包被抗原稀释80倍, 包被96孔酶标板, 每孔100μL, 4℃冰箱过夜;

[0022] (3-2) 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CPT@PSI<sub>0Am</sub>包被抗原;

[0023] (3-3) 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CPT@PSI<sub>0Am</sub>标准液和50μL FITC标记PSI<sub>0Am</sub>抗体提前混匀分梯度加入各孔中, 37℃温育1~2h, 之后用洗涤液洗涤2~4次, 每次3~5分钟并甩干;

[0024] (3-4) 在酶标仪上测定各孔在激发波长为485nm、发射波长为525nm时的荧光强度。

[0025] 步骤(4)中, 所述标准曲线的线性方程为 $F = 8116.6 - 311.71 \lg C$ ,  $F$ 为荧光强度,  $C$ 为CPT@PSI<sub>0Am</sub>的浓度; 相关系数 $R^2 = 0.991$ , 线性范围为0.12~1638.7ng/mL, 检出限为0.04ng/mL。

[0026] 本发明提供的制备方法中, 以粒径为200nm的PSI<sub>0Am</sub>纳米粒子作为免疫原免疫大白兔获得高效价的PSI<sub>0Am</sub>抗体。通过将CPT、PSI<sub>0Am</sub>聚合物、聚乙烯-b-聚乙二醇溶解于三氯甲烷中, 然后加入到氢氧化钠溶液中超声反应, 实现药物负载、PSI<sub>0Am</sub>水解一步完成, 得到CPT@

PSI<sub>0Am</sub>-COO<sup>-</sup>半抗原,进而制备得到CPT@PSI<sub>0Am</sub>的包被抗原。聚乙烯-b-聚乙二醇作为两亲性嵌段聚合物可起到修饰和保护作用,可以延长纳米药物载体在体内的循环时间,促进积累靶组织。此外,聚乙醇嵌段部分可以提供良好的亲水性,疏水的聚乙烯嵌段部分可以促进对疏水性药物的包封,使形成均匀稳定的纳米药物载体。

[0027] 油胺枝接聚琥珀酰亚胺是一种pH响应纳米药物载体,其内核具有疏水性,抗癌药物喜树碱(CPT)可以与PSI<sub>0Am</sub>的疏水部分形成氢键,成功将疏水性药物包裹在纳米药物载体疏水腔内;同时外壳具有亲水性,可以提供良好的生物相容性,将抗癌药物输送到靶向部位。由于癌细胞环境pH显酸性,喜树碱(CPT)与PSI<sub>0Am</sub>的氢键易断裂,使药物释放达到治疗癌症的目的。

[0028] 将PSI<sub>0Am</sub>负载抗癌药物喜树碱后,CPT@PSI<sub>0Am</sub>纳米粒子具有比PSI<sub>0Am</sub>纳米颗粒更小的尺寸(~100nm),表明药物的负载使得纳米颗粒具有了更为紧凑的外观。同时,经实验结果证明,纳米药物载体PSI<sub>0Am</sub>不仅与抗PSI<sub>0Am</sub>抗体有高特异性结合,而且其负载抗癌药物喜树碱后的纳米药物载体与抗PSI<sub>0Am</sub>抗体也有高特异性结合。基于此,建立了对负载抗癌药物喜树碱的纳米药物载体(CPT@PSI<sub>0Am</sub>)检测,这为负载抗癌药物的纳米药物载体提供更佳的定量检测方案及更广的实际应用价值。

[0029] 本发明建立了一种负载抗癌药物喜树碱的纳米药物载体(CPT@PSI<sub>0Am</sub>)的荧光免疫定量检测方法,与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0030] (1) 本发明首次利用直接竞争荧光免疫分析法实现了负载了抗癌药物喜树碱的纳米药物载体的定量检测,为今后抗癌药物检测提供了更加有效的检测手段。

[0031] (2) 该发明以负载抗癌药物喜树碱的纳米药物载体(CPT@PSI<sub>0Am</sub>)作为包被抗原、探究包裹药物后是否可以与抗PSI<sub>0Am</sub>抗体特异性结合,并利用荧光免疫分析进一步验证了PSI<sub>0Am</sub>包裹药物后与PSI<sub>0Am</sub>抗体仍具有特异性,满足定量检测CPT@PSI<sub>0Am</sub>目的。

[0032] (3) 目前对于抗癌药物的检测主要以HPLC和紫外检测为主,通过建立免疫分析方法,对负载抗癌药物喜树碱的纳米药物载体定量检测,高灵敏地量化抗癌药物更具有优势,这将为纳米药物载体及药物检测提供了更加灵敏的检测方案。

[0033] (4) 该方法建立直接竞争荧光免疫定量检测CPT@PSI<sub>0Am</sub>,通过检测CPT@PSI<sub>0Am</sub>包被抗原、FITC标记PSI<sub>0Am</sub>抗体复合物荧光信号达到定量检测CPT@PSI<sub>0Am</sub>的目的,基于抗原抗体特异性,与荧光标记物相结合,使免疫反应信号进一步提高,可进行高通量测定。

[0034] (5) 纳米药物载体PSI<sub>0Am</sub>还可进一步应用于包裹其他抗癌药物,利用一种抗体可以特异性识别其他抗癌药物负载的纳米药物载体,应用范围较广,具有实际应用价值。

## 附图说明

[0035] 图1中(a)为PSI<sub>0Am</sub>半抗原TEM图,(b)为CPT@PSI<sub>0Am</sub>半抗原TEM图;

[0036] 图2中CPT@PSI<sub>0Am</sub>-COO<sup>-</sup>半抗原的(a)为红外表征图,(b)为XRD表征图;

[0037] 图3为以CPT@PSI<sub>0Am</sub>标准品浓度的对数为横坐标,525nm波长处的荧光强度值为纵坐标建立标准曲线图。

## 具体实施方式

[0038] 下面结合实施例对本发明进行详细说明。

[0039] 本发明所使用的各原料来源如下：

[0040] 聚琥珀酰亚胺 ( $M_w=6000$ ) 购买自石家庄德赛化工有限公司；

[0041] 喜树碱购买自上海麦克林生化科技有限公司；

[0042] FITC购买自阿拉丁公司；

[0043] 聚乙烯-b-聚乙二醇 (PE-b-PEG,  $M_n=1400$ ) 购买自ALDRICH公司；

[0044] 鸡卵清白蛋白购买自生工生物工程(上海)股份有限公司；

[0045] 其他试剂均可从市场上的销售厂家购买得到。

[0046] 高分子聚合物PSI<sub>0Am</sub>的制备方法为：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℃加热反应5小时，最后加入360mL甲醇使其沉淀，离心分离，取沉淀称重得到高分子聚合物PSI<sub>0Am</sub>。

[0047] 抗PSI<sub>0Am</sub>抗体的制备方法参照CN201810459487.8中公开的方法制备得到，所述抗PSI<sub>0Am</sub>抗体的效价为1:64000。

[0048] 本发明用到的各溶液的制备方法为：

[0049] PBS缓冲液：称取NaCl 8.0g、KCl 0.1g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.29g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 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；

[0050] PBST溶液：在1000mL PBS中加入500μL Tween-20，混合均匀；

[0051] 包被缓冲液CB：称取Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.59g、NaHCO<sub>3</sub> 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；

[0052] 1wt%酪蛋白：称取0.3g酪蛋白溶于30mL 0.01mol/L pH=7.4的PBS缓冲液中，搅拌均匀。

[0053] 实施例1

[0054] 一种负载抗癌药物喜树碱的纳米药物载体荧光免疫定量检测方法研究，包括以下步骤：

[0055] (1) 制备CPT@PSI<sub>0Am</sub> (负载喜树碱的油胺枝接聚琥珀酰亚胺) 的包被抗原，具体包括以下步骤：

[0056] (1-1) 将60mg的高分子聚合物PSI<sub>0Am</sub>、1mg喜树碱 (CPT) 和2mg聚乙烯-b-聚乙二醇 (PE-b-PEG) 溶解到1mL三氯甲烷溶液中混匀，混匀后将上述溶液加入到10mL浓度为0.5mmol/L的氢氧化钠溶液中，超声5min，功率200W，之后将溶液于60℃下蒸发除去三氯甲烷，于12000r/min离心10min，取沉淀分散在10mL pH=7.4的PBS缓冲液中，得到水解的CPT@PSI<sub>0Am</sub>-COO<sup>-</sup>半抗原溶液，其TEM图如图1 (b) 所示；相较于PSI<sub>0Am</sub>-COO<sup>-</sup>半抗原溶液的TEM图，负载了喜树碱的CPT@PSI<sub>0Am</sub>-COO<sup>-</sup>半抗原溶液呈核壳结构，粒径在100nm左右，证明喜树碱包裹在PSI<sub>0Am</sub>的内部。

[0057] PSI<sub>0Am</sub>-COO<sup>-</sup>半抗原溶液的TEM图，如图1 (a) 所示，PSI<sub>0Am</sub>-COO<sup>-</sup>半抗原溶液的制备方法为：将60mg的高分子聚合物PSI<sub>0Am</sub>溶解到1mL三氯甲烷溶液中混匀，混匀后将上述溶液加入到2~16mL浓度为0.1~1mmol/L的氢氧化钠溶液中，超声5min，功率200W，之后将溶液于65℃下蒸发除去三氯甲烷，离心10min，取沉淀分散在10mL pH=7.4的PBS缓冲液中，得到水解的PSI<sub>0Am</sub>-COO<sup>-</sup>半抗原。

[0058] CPT@PSI<sub>0Am</sub>-COO<sup>-</sup>半抗原通过傅里叶变换红外 (FTIR) 光谱表征。图2 (a) 是CPT、PSI<sub>0Am</sub>、CPT与PSI<sub>0Am</sub>物理混合、CPT@PSI<sub>0Am</sub>-COO<sup>-</sup>半抗原的红外光谱图，如图所示，对于PSI<sub>0Am</sub>，

在FTIR中也观察到油胺中亚甲基( $-\text{CH}_2$ )的C-H拉伸振动约为 $2920$ 和 $2850\text{cm}^{-1}$ 。 $1724\text{cm}^{-1}$ 的峰值归因于 $\text{PSI}_{0\text{Am}}$ 载体的 $-\text{NH}-\text{COO}-$ 基团。 $\text{CPT@PSI}_{0\text{Am}}-\text{COO}^-$ 半抗原在 $1651$ 、 $1136$ 、 $1076$ 、 $827$ 、 $532\text{cm}^{-1}$ 吸收峰反映了CPT的特征峰值。 $1651\text{cm}^{-1}$ 的吸收峰归因于CPT的 $\text{C}=\text{C}$ 键的伸缩振动。显然,在 $\text{CPT@PSI}_{0\text{Am}}-\text{COO}^-$ 半抗原中随着CPT的负载,在 $1136$ 、 $1076$ 、 $827$ 、 $532\text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰强度显著增加。FTIR证明了CPT被成功包裹。

[0059] 通过XRD分析 $\text{PSI}_{0\text{Am}}$ 中CPT的物理状态。图2(b)为CPT、 $\text{PSI}_{0\text{Am}}$ 、CPT与 $\text{PSI}_{0\text{Am}}$ 物理混合、 $\text{CPT@PSI}_{0\text{Am}}-\text{COO}^-$ 半抗原的XRD光谱,从图中可以看出,纯CPT显示出许多尖锐的衍射峰,表明该药物具有较大的晶体度;在纯 $\text{PSI}_{0\text{Am}}$ 中出现一个宽峰和很弱的结晶峰,表明 $\text{PSI}_{0\text{Am}}$ 是无定形蓬松状态。 $\text{CPT@PSI}_{0\text{Am}}-\text{COO}^-$ 半抗原的红外图中可以检测到CPT药物的衍射峰,同时与纯 $\text{PSI}_{0\text{Am}}$ 相比, $\text{CPT@PSI}_{0\text{Am}}-\text{COO}^-$ 半抗原有许多衍射峰( $26$ 、 $31$ 、 $46$ 、 $56$ 、 $67$ 、 $76$ )存在,其中衍射信号 $31$ 和 $46$ 显著增强,但没有检测到纯的药物信号,这种现象可以解释为药物通过氢键和疏水相互作用嵌入,并没有出现新的官能团,因此导致 $\text{PSI}_{0\text{Am}}$ 负载的CPT的半抗原呈现高结晶状态。

[0060] (1-2)取 $1\text{mL}$ 水解后的 $\text{CPT@PSI}_{0\text{Am}}-\text{COO}^-$ 溶液中加入 $1\text{mL}$  PBS缓冲溶液,该缓冲液中包含 $0.1\text{mg}$ 的NHS和 $0.7\text{mg}$ 的EDAC,反应 $20\text{min}$ 后加入 $2\text{mg}$ 鸡卵清白蛋白,于 $25^\circ\text{C}$ 下温育 $4\text{h}$ ,离心 $10\text{min}$ ,取沉淀分散到 $3\text{mL}$ 中性PBS缓冲液中,即可制得 $\text{CPT@PSI}_{0\text{Am}}$ 包被抗原。

[0061] (2)制备FITC标记的抗 $\text{PSI}_{0\text{Am}}$ 抗体,具体包括以下步骤:

[0062] (2-1)称取纯化的 $15\text{mg}$   $\text{PSI}_{0\text{Am}}$ 抗体经 $0.01\text{M}$ , $\text{pH}=7.1$ 的PBS缓冲溶液溶解得到浓度为 $15\text{mg/mL}$   $\text{PSI}_{0\text{Am}}$ 抗体溶液;

[0063] (2-2)将 $2\text{mg}$ 异硫氰酸荧光素(FITC)溶于 $1\text{mL}$ 、 $\text{pH}=9.6$ 碳酸盐缓冲液中,制成浓度为 $2\text{mg/mL}$ 的FITC溶液;

[0064] (2-3)将步骤d-1和步骤d-2得到的溶液按体积比 $10:1$ 混合,于室温下避光搅拌 $5\text{h}$ ;

[0065] (2-4)将步骤d-3得到的混合液装入透析袋中,于PBS溶液中透析 $2\text{h}$ 后,采用凝胶过滤法纯化,即可得到FITC标记的 $\text{PSI}_{0\text{Am}}$ 荧光抗体;所述凝胶过滤法纯化的方法为:

[0066] 凝胶过滤层析柱: $2\times 30\text{cm}$ 玻璃层析柱,内装充分溶胀和排气的葡聚糖凝胶G-50;洗脱液: $0.01\text{M}$ , $\text{pH}=7.1$ 的PBS缓冲溶液;流速: $0.1\sim 0.5\text{mL/min}$ ;加样量:凝胶柱床体积的 $10\%\sim 15\%$ 加样。

[0067] (3)将 $\text{CPT@PSI}_{0\text{Am}}$ 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 $\text{CPT@PSI}_{0\text{Am}}$ 标准品和FITC标记的抗 $\text{PSI}_{0\text{Am}}$ 抗体,建立直接竞争荧光免疫分析法定量检测 $\text{CPT@PSI}_{0\text{Am}}$ ;具体包括以下步骤:

[0068] (3-1)包被:用包被缓冲液将 $\text{CPT@PSI}_{0\text{Am}}$ 包被抗原稀释 $80$ 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 $100\mu\text{L}$ ,冰箱 $4^\circ\text{C}$ 过夜;

[0069] (3-2)封闭:取出酶标板,PBST洗涤 $3$ 次,每次 $3\text{min}$ ,加入 $1\text{wt}\%$ 酪蛋白进行封闭,每孔 $200\mu\text{L}$ , $37^\circ\text{C}$ 封闭 $1\text{h}$ ;

[0070] (3-3)加样竞争:PBST洗涤 $3$ 次,每次 $3\text{min}$ ,将 $50\mu\text{L}$ 浓度分别为 $10^4\text{ng/mL}$ 、 $10^3\text{ng/mL}$ 、 $10^2\text{ng/mL}$ 、 $5\times 10^2\text{ng/mL}$ 、 $10^1\text{ng/mL}$ 、 $5\text{ng/mL}$ 、 $10^{-1}\text{ng/mL}$ 的 $\text{CPT@PSI}_{0\text{Am}}$ 标准液和 $50\mu\text{L}$ 抗 $\text{PSI}_{0\text{Am}}$ 抗体依次加入到酶标板的各行中,即每个浓度梯度重复三次, $37^\circ\text{C}$ 竞争 $2\text{h}$ ;

[0071] (3-4)在酶标仪上测定各孔在激发波长 $485\text{nm}$ ,发射波长 $525\text{nm}$ 处的荧光强度值,同一浓度梯度取平均值;



[0072] (4) 以CPT@PSI<sub>0Am</sub>标准品浓度的对数为横坐标, 荧光强度值为纵坐标建立标准曲线, 制得的标准曲线如图2所示, 标准曲线的线性方程为:  $F = 8116.6 - 311.71 \lg C$ ,  $F$ 为荧光强度,  $C$ 为CPT@PSI<sub>0Am</sub>的浓度, 单位为ng/mL; 相关系数 $R^2 = 0.991$ , 线性范围为0.12-1638.7ng/mL, 检出限为0.04ng/mL。

[0073] 重复以上各步骤, 只是将步骤(3-3)中的不同浓度的CPT@PSI<sub>0Am</sub>标准液替换为未知浓度的CPT@PSI<sub>0Am</sub>待测液, 然后在酶标仪上测定各孔在在激发波长485nm, 发射波长525nm处的荧光强度值, 求取平均值, 即可计算出CPT@PSI<sub>0Am</sub>待测液的浓度。

[0074] 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, 检测限最低。

[0075] 上述参照实施例对一种负载抗癌药物喜树碱的纳米药物载体的荧光免疫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。

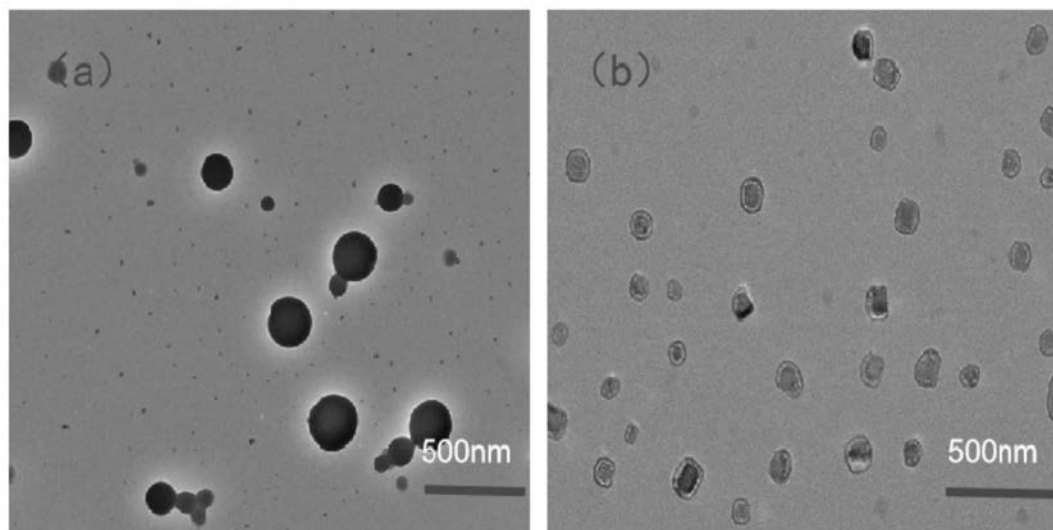
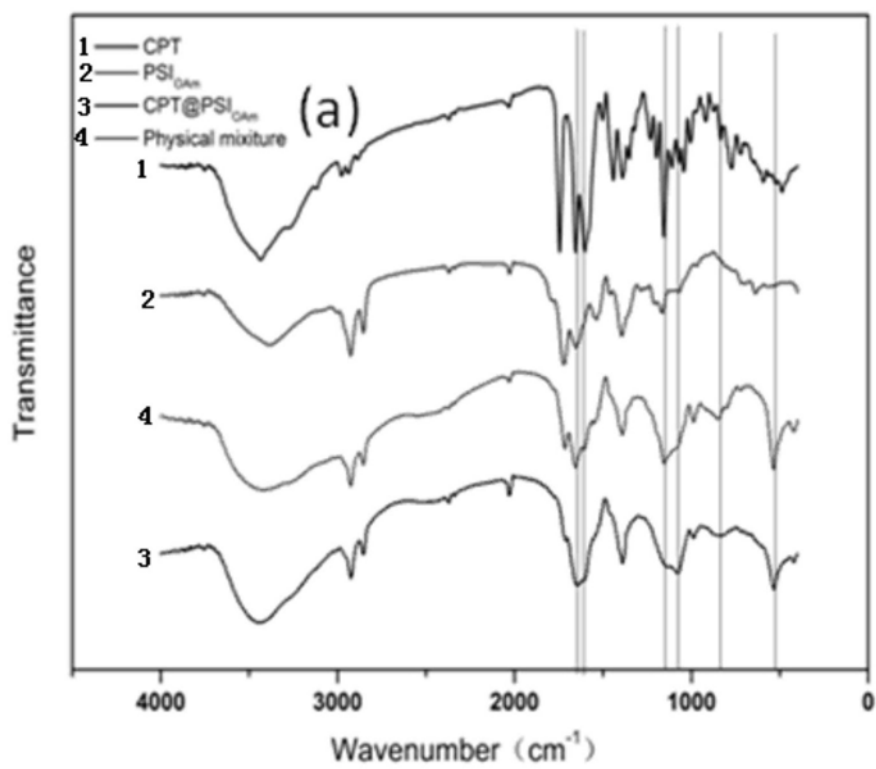


图1



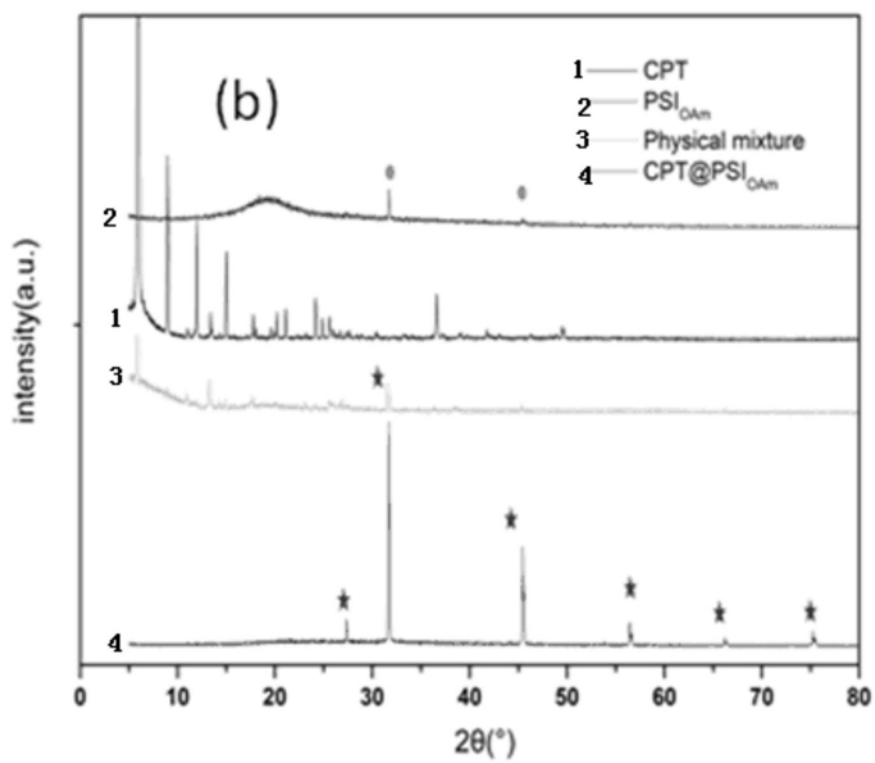


图2

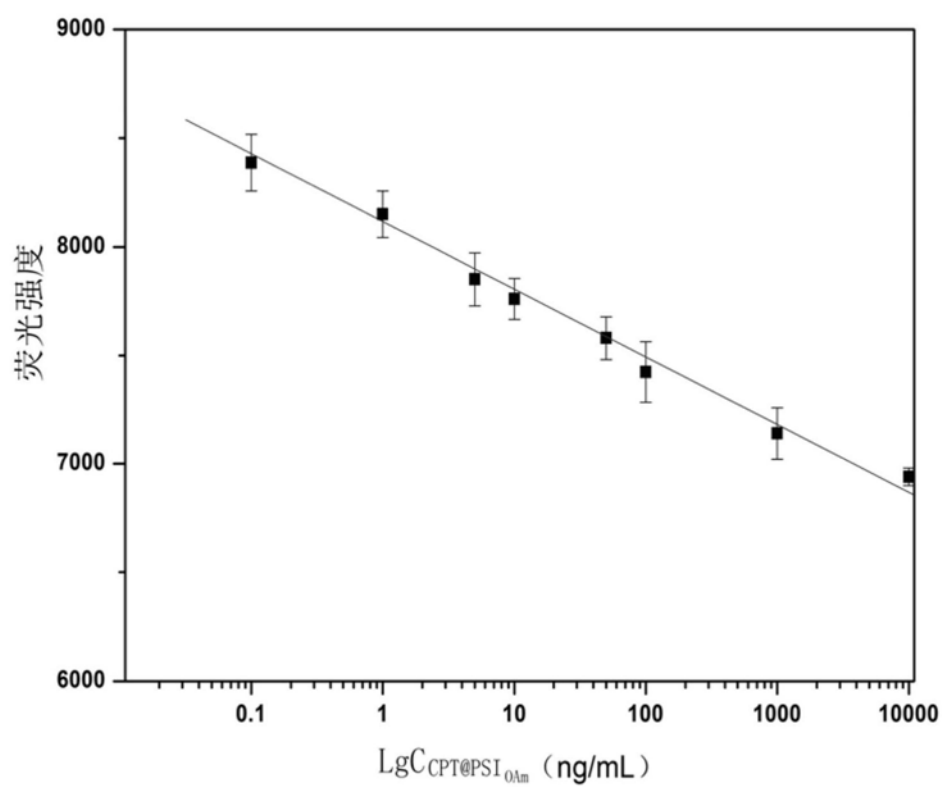


图3

专利名称(译)	一种负载抗癌药物喜树碱的纳米药物载体的荧光免疫定量检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110568184A</a>	公开(公告)日	2019-12-13
申请号	CN201910773247.X	申请日	2019-08-21
[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		
发明人	张明翠 连中宇		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/582		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种负载抗癌药物喜树碱的纳米药物载体荧光免疫定量检测方法，将CPT@PSIOAm包被抗原包被于酶标板中，封闭、加入不同浓度的CPT@PSIOAm标准品和FITC标记的抗PSIOAm抗体，建立直接竞争荧光免疫分析法定量检测CPT@PSIOAm；通过检测CPT@PSIOAm包被抗原、FITC标记抗体复合物荧光信号达到定量检测CPT@PSIOAm的目的，基于抗原抗体特异性，与荧光标记物相结合，使免疫反应信号进一步提高，可进行高通量测定，此检测方法的线性范围为0.12-1638.7 ng/mL，检出限为0.04ng/mL，本发明为负载抗癌药物的纳米药物载体提供了更加灵敏的检测方案。

