



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108918854 A

(43)申请公布日 2018.11.30

(21)申请号 201810459487.8

(22)申请日 2018.05.15

(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 李磊

(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 33/531(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

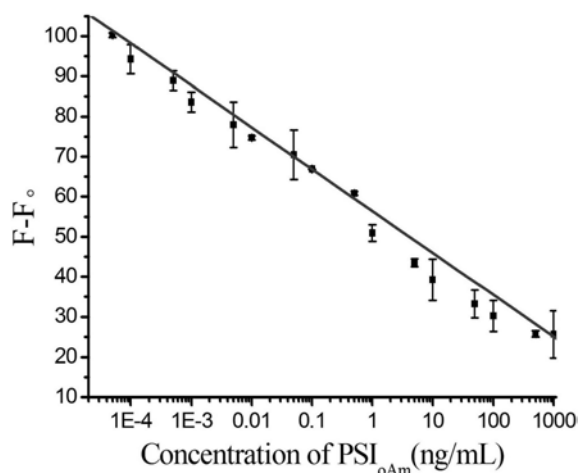
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种基于磁性荧光探针标记的荧光免疫吸附测定超痕量高分子纳米药物载体的方法

(57)摘要

本发明提供了一种基于磁性荧光探针标记的荧光免疫吸附测定超痕量高分子纳米药物载体的方法,基于磁性荧光探针易于分离及其优越的荧光性能,此方法提高了检测的灵敏度。即通过制备PSI_{0Am}包被抗原、磁性荧光探针标记的抗PSI_{0Am}抗体,结合抗原抗体反应的特异性对油胺枝接聚琥珀酰亚胺(PSI_{0Am})高分子纳米粒子进行了超痕量检测分析。与现有技术相比,本发明提供的方法具有操作简单、低背景、灵敏度高、特异性强、可实现高通量,精准靶向及无损检测等特点。



1. 一种基于磁性荧光探针标记的荧光免疫吸附测定超痕量高分子纳米药物载体的方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:

- a、制备PSI_{0Am}水解溶液;
- b、制备PSI_{0Am}包被抗原和免疫原;
- c、抗PSI_{0Am}抗体的制备;
- d、磁性荧光探针的制备;
- e、磁性荧光探针标记的抗PSI_{0Am}抗体的制备;

f、将PSI_{0Am}包被抗原经包被液稀释后包被于96孔板中,封闭、加入不同浓度的PSI_{0Am}标准品,用功能化磁性荧光探针标记抗PSI_{0Am}抗体,建立直接竞争荧光免疫吸附测定PSI_{0Am};

g、以PSI_{0Am}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PSI_{0Am}的浓度。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤d具体包括以下步骤:

d-1、首先将10.8g的FeCl₃·6H₂O和36.5g的油酸钠溶于80mL乙醇中,依次加入60mL去离子水和140mL环己烷,然后于70℃加热4h,待冷却到室温时有机层用去离子水萃取3次,萃取所得溶液混合,在70℃下加热4h蒸发掉环己烷,冷却至室温,即得油酸铁,备用;

d-2、将步骤d-1制备的油酸铁9g加入到50g的十八碳烯中,搅拌均匀后再加入1.4g的油酸,混合溶液加热到100℃保持30min后抽真空,混合物在氮气氛围下加热到320℃保持3h,待反应将到室温时加入20mL的无水乙醇使四氧化三铁纳米晶沉淀,反复洗涤3次后晾干,即得四氧化三铁纳米晶;

d-3、将步骤d-2制备四氧化三铁纳米晶用环己烷溶解,得100mg/mL四氧化三铁纳米晶溶液,将14.4mL环己烷、3.3mLTX-100、0.5mLCO-520、3.3mL正己醇、1.5mL去离子水和0.25mL氨水搅拌均匀,随后加入1mL 100mg/mL的四氧化三铁纳米晶溶液,再加入50μL的硅酸四乙酯搅拌反应2小时,反应完后离心,用无水乙醇洗涤3次,冷冻干燥,即得二氧化硅功能化的四氧化三铁纳米晶,备用;

d-4、称取6.7mg的步骤d-3制备的二氧化硅功能化的四氧化三铁纳米晶分散于50mL的去离子水中,用2M的氢氧化钠调节溶液的pH=9.0,将体系加热到70℃,然后依次加入0.5mL的硅酸四乙酯、0.05mL的罗丹明异硫氰酸酯标记的3-氨基三乙氧基硅烷和3mL的乙酸乙酯,避光搅拌10min后,再加入0.05mL的3-氨基三乙氧基硅烷,搅拌3h,冷却至室温后乙醇洗涤3次,冷冻干燥,即得磁性荧光探针,备用。

3. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,步骤e具体包括以下步骤:

e-1、取纯化后的抗PSI_{0Am}抗体0.4mg加入0.07mL的醋酸缓冲液之后,加入0.14mL的过碘酸钠溶液,室温避光搅拌2h;

e-2、取2mg步骤d-4制备的磁性荧光探针,用PBS洗3次,充分悬浮于0.6mL的PBS中,缓慢加入步骤e-1处理后的氧化后的抗体,4℃下搅拌20h;再加入2mg/mL 0.02mL的硼氢化钠溶液,避光反应2h,用PBS洗涤3次后,即得磁性荧光探针标记的抗PSI_{0Am}抗体,备用。

4. 根据权利要求1或2所述的制备方法,其特征在于,步骤f具体包括以下步骤:

f-1、包被:用包被缓冲液将PSI_{0Am}包被抗原稀释至25μg/mL,包被96孔板,每孔100μL,4℃冰箱过夜;

f-2、封闭:PBST溶液洗涤3次,甩干,每次3~5min,洗去未结合的PSI_{0Am}包被抗原,加入

1wt%酪蛋白,每孔200 μ L进行封闭,37 $^{\circ}$ C烘箱温育1~2h;

f-3、加样竞争:PBST溶液洗涤3次,甩干,每次3~5min,洗去多余的封闭液,然后将优化后的50 μ L磁性荧光探针标记的抗PSI_{0Am}抗体和50 μ L不同浓度的PSI_{0Am}标准品分梯度加入各孔中,使之发生竞争反应,37 $^{\circ}$ C烘箱温育1~2h;

f-4、检测:PBST溶液洗涤3次,甩干,每次3~5min,除去游离态的PSI_{0Am}标准品或抗体结合物,用多功能酶标仪测定各孔在激发波长为530nm,发射波长为585nm处的荧光强度值。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的制备方法,其特征在于,步骤g中所述标准曲线的线性方程为 $F=11477.59-1537.631gC$,其中F为荧光强度值,C为PSI_{0Am}的浓度。

6. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,其相关系数 $R^2=0.994$,线性范围为 5×10^{-5} - 5×10^3 ng/mL,检出限为 3×10^{-7} ng/mL。

一种基于磁性荧光探针标记的荧光免疫吸附测定超痕量高分子纳米药物载体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及磁性荧光探针的功能化和纳米材料的定量检测,具体涉及一种基于磁性荧光探针标记的荧光免疫吸附测定超痕量高分子纳米药物载体的方法。

背景技术

[0002] 中国产业调研网发布的2017年中国肿瘤医院市场调查研究报告认为,目前,我国肿瘤发病率每年以3%-5%的速度提高,年均肿瘤医疗费用都在1500亿元以上,恶性肿瘤发病率及死亡率的不不断上升,必然带来对肿瘤治疗的服务需求,因此研究出高效的抗肿瘤药物的发展及供需情况也显得越来越必要。

[0003] 目前临床中对于癌症的治疗主要采用药物配合化学疗法,放射疗法,但目前的化疗药物水溶性差,不具有靶向性,在杀死癌细胞的同时也会杀死正常细胞,从而引起严重的毒副作用,阻碍了化疗药物的发展和应用。

[0004] 实现靶向性给药,研究者提出了抗体药物载体系统,抗体药物载体系统就是将抗肿瘤药物与单克隆抗体通过化学键进行偶联起来的系统,利用抗原抗体的特异性反应将抗肿瘤药物携带到指定的位置。抗体药物载体系统虽然在一定程度上提高了部分易修饰抗癌药物的靶向性和水溶性,但由于其载药数量少,抗肿瘤药物的高毒性严重影响了抗原抗体间的特异性反应,即使到达肿瘤部位也不足以杀死肿瘤。因此,提高药物治疗效率,降低药物毒副作用、改善药物体内分布等已经成为生物医学领域一大挑战。

[0005] 纳米药物载体是一类新型载体,通常由天然或合成高分子材料制成,其主要优点是提高药物的吸收度和稳定性,改善药物性质和靶向性,药物作用时间延长,疗效增加,毒副反应小,减小了对正常细胞的毒害性等,因此,越来越多的研究者们将目光投向了纳米药物载体。目前主要有金属有机框架类、无机非金属类、高分子聚合物类、磁流体和脂质体等。纳米载体粒径大小约10~500nm,可将药物分子包裹其中或吸附在其表面,通过靶向分子与细胞表面特异性受体结合或磁靶向,在细胞摄取作用下进入细胞内,实现安全有效的靶向药物输送,因此在药物传递中具有特殊的价值和意义。

[0006] 油胺枝接聚琥珀酰亚胺纳米材料作为高分子载体材料的重要成员之一,由于其制备简便、性质稳定、载药量种类和数量多、生物相容性好和表面易修饰,在生物医学领域发挥了重要作用。将靶向多肽RGD修饰到聚琥珀酰亚胺纳米材料上作为一种新型靶向药物载体,是一种更为理想的具有智能效果的纳米药物载体,为癌症的治疗提供了新的思路与手段,在解决人类重大疾病的诊断、治疗和预防等方面有更大突破。例如,汪乐余已经开发出油胺枝接聚琥珀酰亚胺聚合物纳米胶束用来作为阿霉素、喜树碱等抗癌药物的输送载体,在一定的基础上提高了载药的效率和种类。

[0007] 目前,聚合物胶束作为药物载体已有大量研究报道,但在充分安全、有效进入临床应用前,如何实现纳米载体的实时动态靶向,更准确的靶向物质,更有效的治疗药物,更灵敏、操作性更方便的传感器,生物相容性和可降解性,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。从现有研究结果来看,对于纳米材料应用于医学领域通常局限于考察其在体内的分布、降解、药物释放效率等方面。由于纳米材料具有较高的比表面能,其在人体内运送时会与血液中各种复杂的成分相互作用形成一层蛋白衣,并且对纳米药物载体的靶向性有一定的影响,此外,不同的剂量可能对机体产生不同的功效或毒副作用。因此,纳米药物载体的剂量检测对于考察该材料是否可以应用于临床显得尤为重要。而目前对于纳米药物载体的定位表征方法主要是荧光光谱法。通常是选用荧光试剂作为纳米药物载体的显像剂,但由于药物载体内包封的各种荧光试剂抗光漂白性差,甚至有些荧光显像剂会与药物之间发生作用导致药效改变。因此,检测单一化的用荧光显像剂标记纳米药物载体是无法达到长时间的实时动态检测。

[0008] 然而,目前常用的纳米材料的定量分析方法主要是借助于昂贵的分析仪器。而且测试所用的试剂有一定的毒性、对样品的破坏性大,稳定性和灵敏度往往都达不到要求,检测技术仍不够成熟。因此,这些方法都无法很好的实现对纳米材料的实时精准定量检测分析。

发明内容

[0009] 为解决上述技术问题,本发明提供一种基于磁性荧光探针标记的荧光免疫吸附测定超痕量高分子纳米药物载体的方法,基于磁性荧光探针易于分离及其优越的荧光性能,此方法提高了检测的灵敏度。即通过制备PSI_{0Am}包被抗原、磁性荧光探针标记的抗PSI_{0dm}抗体,结合抗原抗体反应的特异性对油胺枝接聚琥珀酰亚胺(PSI_{0Am})高分子纳米粒子进行了超痕量检测分析。该方法具有操作简单、低背景、灵敏度高、特异性强、可实现高通量,精准靶向及无损检测等特点。

[0010] 本发明具体技术方案如下:

[0011] 本发明提供的一种基于磁性荧光探针标记的荧光免疫吸附测定超痕量高分子纳米药物载体的方法,包括以下步骤:

[0012] a、制备PSI_{0Am}水解溶液;

[0013] b、制备PSI_{0Am}包被抗原和免疫原;

[0014] c、抗PSI_{0Am}抗体的制备;

[0015] d、磁性荧光探针的制备;

[0016] e、磁性荧光探针标记的抗PSI_{0Am}抗体的制备;

[0017] f、将PSI_{0dm}包被抗原经包被液稀释后包被于96孔板中,封闭、加入不同浓度的PSI_{0Am}标准品,用功能化磁性荧光探针标记抗PSI_{0Am}抗体,建立直接竞争荧光免疫吸附测定PSI_{0Am};

[0018] g、以PSI_{0Am}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PSI_{0Am}的浓度。

[0019] 具体的,步骤a具体包括以下步骤:将20~60mg的PSI_{0Am}溶解到1~5mL三氯甲烷溶液中,溶解后将上述溶液加入到10~16mL浓度为0.001~0.008mg/mL的氢氧化钠溶液中,超声10~30min,功率300~600W,然后磁力搅拌20~50min,将溶液于40~60℃下蒸发除去三氯甲烷,于12000~20000r/min离心10~15min,用pH=7.4的PBS洗涤3次,取沉淀分散在0.5

~2mL pH=7.4的PBS缓冲液中,得到水解后的PSI_{0Am}-COO⁻溶液。

[0020] 步骤b具体包括以下步骤:

[0021] b-1、将1mgOVA溶于1mLPBS溶液中,然后加入步骤a水解后的PSI_{0Am}-COO⁻溶液1mL,最后加入1mLPBS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,混旋反应10~30min,静置30~60min后离心分离,用pH=7.4的PBS洗涤3次,然后加入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1mLPBS(pH=7.4)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PSI_{0Am}-OVA的包被抗原;

[0022] b-2、向水解后的PSI_{0Am}溶液中,加入羟基琥珀酰亚胺、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,20~30℃温育3~6h后,离心分离,取沉淀分散于pH=7.4的PBS缓冲液中即得到PSI_{0Am}免疫原溶液;

[0023] 所述步骤b-1中,透析袋的截留分子量为8000~25000Da;

[0024] 步骤c具体包括以下步骤:

[0025] c-1、首次免疫:将PSI_{0Am}免疫原与弗氏完全佐剂等体积比混合后,采用背部皮下多点注射的方式注射到大白兔体内,注射8~10个点,注射量为1~2mL/只;首次免疫三周后进行加强免疫;

[0026] c-2、加强免疫:将PSI_{0Am}免疫原与弗氏不完全佐剂等体积比混合后,采取同样的方式注射到大白兔体内,注射8~10个点,注射量为1~2mL/只;此后每两周进行再次加强免疫,中间周进行耳静脉采血测血清效价,直到效价达到1:64000,再进行最后一次加强免疫,并在免疫一周后从动物颈动脉采血,静置析出抗血清并进行纯化,得到抗PSI_{0Am}抗体。

[0027] 步骤d具体包括以下步骤:

[0028] d-1、首先将10.8g的FeCl₃·6H₂O和36.5g的油酸钠溶于80mL乙醇中,依次加入60mL去离子水和140mL环己烷,然后于70℃加热4h,待冷却到室温时有机层用去离子水萃取3次,萃取所得溶液混合,在70℃下加热4h蒸发掉环己烷,冷却至室温,即得油酸铁,备用;

[0029] d-2、将步骤d-1制备的油酸铁9g加入到50g的十八碳烯中,搅拌均匀后再加入1.4g的油酸,混合溶液加热到100℃保持30min后抽真空,混合物在氮气氛围下加热到320℃保持3h,待反应将到室温时加入20mL的无水乙醇使四氧化三铁纳米晶沉淀,反复洗涤3次后晾干,即得四氧化三铁纳米晶;

[0030] d-3、将步骤d-2制备四氧化三铁纳米晶用环己烷溶解,得100mg/mL四氧化三铁纳米晶溶液,将14.4mL环己烷、3.3mLTX-100、0.5mLCO-520、3.3mL正己醇、1.5mL去离子水和0.25mL氨水搅拌混匀,随后加入1mL 100mg/mL的四氧化三铁纳米晶溶液,再加入50μL的硅酸四乙酯搅拌反应2小时,反应完后离心,用无水乙醇洗涤3次,冷冻干燥,即得二氧化硅功能化的四氧化三铁纳米晶,备用;

[0031] d-4、称取6.7mg的步骤d-3制备的二氧化硅功能化的四氧化三铁纳米晶分散于50mL的去离子水中,用2M的氢氧化钠调节溶液的pH=9.0,将体系加热到70℃,然后依次加入0.5mL的硅酸四乙酯、0.05mL的罗丹明异硫氰酸酯标记的3-氨基丙基三乙氧基硅烷和3mL的乙酸乙酯,避光搅拌10min后,再加入0.05mL的3-氨基丙基三乙氧基硅烷,搅拌3h,冷却至室温后乙醇洗涤3次,冷冻干燥,即得磁性荧光探针,备用。

[0032] 所述步骤d中首先根据高温共沉淀法合成了正方形四氧化三铁纳米晶,尺寸分布均匀,用反向微乳法对四氧化三铁纳米晶的表面包裹了一层二氧化硅,在温和的条件下分散的四氧化三铁纳米晶组装成高结晶度的球形结构且具有非常清晰的晶格条纹,充分说明了该磁性荧光复合探针是由相同的四氧化三铁单晶纳米颗粒聚集而成的;相比于传统的磁性荧光复合探针,该磁性荧光探针在负载同样量的罗丹明异硫氰酸酯的情况下仍然组装成高结晶度的球形结构,这充分扩展了磁性复合材料在生物标记的应用。

[0033] 步骤e具体包括以下步骤:

[0034] e-1、取纯化后的抗PSI_{0Am}抗体0.4mg加入0.07mL的醋酸缓冲液之后,加入0.14mL的过碘酸钠溶液,室温避光搅拌2h;

[0035] e-2、取2mg步骤d-4制备的磁性荧光探针,用PBS洗3次,充分悬浮于0.6mL的PBS中,缓慢加入步骤e-1处理后的氧化后的抗体,4℃下搅拌20h;再加入2mg/mL 0.02mL的硼氢化钠溶液,避光反应2h,用PBS洗涤3次后,即得磁性荧光探针标记的抗PSI_{0Am}抗体,备用。

[0036] 步骤f具体包括以下步骤:

[0037] f-1、包被:用包被缓冲液将PSI_{0Am}包被抗原稀释至25μg/mL,包被96孔板,每孔100μL,4℃冰箱过夜;

[0038] f-2、封闭:PBST溶液洗涤3次,甩干,每次3~5min,洗去未结合的PSI_{0Am}包被抗原,加入1wt%酪蛋白,每孔200μL进行封闭,37℃烘箱温育1~2h;

[0039] f-3、加样竞争:PBST溶液洗涤3次,甩干,每次3~5min,洗去多余的封闭液,然后将优化后的50μL磁性荧光探针标记的抗PSI_{0Am}抗体和50μL不同浓度的PSI_{0Am}标准品分梯度加入各孔中,使之发生竞争反应,37℃烘箱温育1~2h;

[0040] f-4、检测:PBST溶液洗涤3次,甩干,每次3~5min,除去游离态的PSI_{0Am}标准品或抗体结合物,用多功能酶标仪测定各孔在激发波长为530nm,发射波长为585nm处的荧光强度值。

[0041] 步骤g中所述标准曲线的线性方程为 $F = 11477.59 - 1537.631gC$,其中F为荧光强度值,C为PSI_{0Am}的浓度。其相关系数 $R^2 = 0.994$,线性范围为 $5 \times 10^{-5} - 5 \times 10^3$ ng/mL,检出限为 3×10^{-7} ng/mL。

[0042] 本发明提供了一种基于磁性荧光探针标记的荧光免疫吸附测定油胺枝接聚琥珀酰亚胺(PSI_{0Am})高分子纳米药物载体的方法,结合抗原、抗体反应的特异性与多功能磁性荧光探针作为标记物实现了该免疫方法对PSI_{0Am}的超痕量检测。

[0043] 与现有技术相比,本发明具有以下几个特点:

[0044] (1) 利用简单、绿色的方法制备出了磁性荧光探针作为荧光信号分子,为建立高灵敏的免疫分析定量检测PSI_{0Am}奠定了基础;

[0045] (2) 利用磁性荧光探针与抗原、抗体反应的特异性建立了一种基于磁性荧光探针标记的荧光免疫吸附测定PSI_{0Am}的新方法,为今后纳米材料提供了一种简单、快速、准确定量检测的方法;

[0046] (3) 利用磁性荧光探针标记纳米药物载体抗体,即增强了磁性荧光探针的水溶液分散性,同时也提高了该材料对纳米材料的靶向性检测。

[0047] (4) 该荧光探针粒径分布均匀,负载染料多,其介孔结构有效的改善有机染料的抗光漂白性,并且包裹多个四氧化三铁纳米晶,进一步增强了磁性分离效果,提高了实验的灵

敏度；

[0048] (6) 该方法操作简单、快速、灵敏度高、特异性强、可实现高通量无损检测。

附图说明

[0049] 图1为以PSI_{0Am}标准品浓度的对数为横坐标, 荧光强度值为纵坐标建立的标准曲线图。

具体实施方式

[0050] 弗氏完全佐剂、牛血清白蛋白(BSA)和鸡卵清白蛋白(OVA)购买于生工生物工程(上海)股份有限公司。罗丹明异硫氰酸酯标记的3-氨丙基三乙氧基硅烷购买于合肥拜尔迪, 其他试剂均可从市场上的销售厂家购买得到。

[0051] 本发明涉及到的各溶液的制备方法为:

[0052] PBS溶液(0.01mol/L pH=7.4): 称取NaCl 8.0g、KCl 0.1g、NaH₂PO₄·2H₂O 0.106g、Na₂HPO₄·12H₂O 3.34g溶解于蒸馏水中并定容至1000mL。

[0053] 碳酸盐缓冲液CD(0.5mol/L pH=9.6): 称取Na₂CO₃ 1.59g、NaHCO₃ 2.94g溶解于蒸馏水中并定容至100mL。

[0054] PBST溶液(0.01mol/L pH=7.4): 在1000mL PBS中加入500μL Tween-20, 混合均匀。

[0055] 包被缓冲液fe(0.05mol/L pH=9.6): 称取Na₂CO₃ 1.59g、NaHCO₃ 2.94g溶解于蒸馏水中并定容至1000mL。

[0056] 醋酸缓冲液: 称取84.25g醋酸钠, 用水溶解, 加入100ml醋酸, 用水稀释至2500ml即得到(PH=4.2)醋酸醋酸钠缓冲溶液。

[0057] 1wt% 酪蛋白溶液: 其为封闭液, 称取0.01g酪蛋白溶解于1mL PBS中, 混合均匀。

[0058] 实施例1

[0059] 一种基于磁性荧光探针标记的荧光免疫吸附测定超痕量高分子纳米药物载体的方法, 包括以下步骤:

[0060] a、制备PSI_{0Am}水解溶液:

[0061] 将20~60mg的PSI_{0Am}溶解到1~5mL三氯甲烷溶液中, 溶解后将上述溶液加入到10~16mL浓度为0.001~0.008mg/mL的氢氧化钠溶液中, 超声10~30min, 功率300~600W, 然后磁力搅拌20~50min, 将溶液于40~60℃下蒸发除去三氯甲烷, 于12000~20000r/min离心10~15min, 用pH=7.4的PBS洗涤3次, 取沉淀分散在0.5~2mL pH=7.4的PBS缓冲液中, 得到水解后的PSI_{0Am}-COO⁻溶液。

[0062] b、制备PSI_{0Am}包被抗原和免疫原:

[0063] b-1、将1mgOVA溶于1mLPBS溶液中, 然后加入步骤a水解后的PSI_{0Am}-COO⁻溶液1mL, 最后加入1mLPBS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, 混旋反应10~30min, 静置30~60min后离心分离, 用pH=7.4的PBS洗涤3次, 然后加入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1mLPBS(pH=7.4)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

PSI_{0Am}-OVA的包被抗原;

[0064] b-2、向水解后的PSI_{0Am}溶液中,加入羟基琥珀酰亚胺、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,20-30℃温育3~6h后,离心分离,取沉淀分散于pH=7.4的PBS缓冲液中即得到PSI_{0Am}免疫原溶液;

[0065] 所述步骤b-1中透析袋的截留分子量为8000~25000Da;

[0066] c、抗PSI_{0Am}抗体的制备:

[0067] c-1、首次免疫:将PSI_{0Am}免疫原与弗氏完全佐剂等体积比混合后,采用背部皮下多点注射的方式注射到大白兔体内,注射8~10个点,注射量为1~2mL/只;首次免疫三周后进行加强免疫;

[0068] c-2、加强免疫:将PSI_{0Am}免疫原与弗氏不完全佐剂等体积比混合后,采取同样的方式注射到大白兔体内,注射8~10个点,注射量为1~2mL/只;此后每两周进行再次加强免疫,中间周进行耳静脉采血测血清效价,直到效价达到1:64000,再进行最后一次加强免疫,并在免疫一周后从动物颈动脉采血,静置析出抗血清并进行纯化,得到抗PSI_{0Am}抗体。

[0069] d、磁性荧光探针的制备:

[0070] d-1、首先将10.8g的FeCl₃·6H₂O和36.5g的油酸钠溶于80mL乙醇中,依次加入60mL去离子水和140mL环己烷,70℃加热4h。待冷却到室温时,有机层用去离子水萃取3次,萃取的溶液混合,在70℃下加热4h蒸发掉环己烷,冷却至室温时出现红褐色的粘稠状物质,即成功的合成了油酸铁;

[0071] d-2、将9g步骤d-1制备的油酸铁加入到50g的十八碳烯中,搅拌均匀后再加入1.4g的油酸,混合溶液加热到100℃保持30min后抽真空,混合物在氮气氛围下加热到320℃保持3h,待反应将到室温时加入20mL无水乙醇使铁纳米晶沉淀,反复洗涤3次后晾干,即得四氧化三铁纳米晶,备用;

[0072] d-3、将步骤d-2制备四氧化三铁纳米晶用环己烷溶解,得100mg/mL四氧化三铁纳米晶溶液,分别取14.4mL环己烷、3.3mL TX-100、0.5mL CO-520、3.3mL正己醇、1.5mL去离子水、0.25mL氨水于100mL烧杯中搅拌均匀,随后加入1mL 100mg/mL的四氧化三铁纳米晶溶液,再加入50μL的硅酸四乙酯搅拌2小时,反应完之后离心,用无水乙醇洗涤3次,冷冻干燥,即得二氧化硅功能化的四氧化三铁纳米晶,备用;

[0073] d-4、准确称取6.7mg的d-3中制备的样品分散于50mL的去离子水中,用2M的氢氧化钠调节溶液的pH=9.0,将体系加热到70℃,依次加入0.5mL的硅酸四乙酯,0.05mL的罗丹明异硫氰酸酯标记的3-氨丙基三乙氧基硅烷,3mL的乙酸乙酯,避光搅拌10min后,加入0.05mL的3-氨丙基三乙氧基硅烷,搅拌3h,冷却至室温后乙醇洗涤3次,冷冻干燥,即得磁性荧光探针,备用。

[0074] e、磁性荧光探针标记的抗PSI_{0Am}抗体的制备:

[0075] e-1、取纯化后的抗PSI_{0Am}抗体0.4mg加入0.07mL的醋酸缓冲液(0.05mol/L, pH=4.2)之后加入0.14mL的过碘酸钠溶液(1.5mg/mL, pH=4.2)避光搅拌2h;

[0076] e-2、取2mg多功能磁性荧光探针用PBS洗3次,充分悬浮于0.6mL的PBS中,缓慢加入氧化后的抗体,4℃下搅拌20h;加入0.02mL 2mg/mL的硼氢化钠溶液,避光反应2h,用PBS洗涤3次后备用。

[0077] f、将PSI_{0dm}包被抗原经包被液稀释后包被于96孔板中,封闭、加入不同浓度的

PSI_{0Am}标准品,用功能化磁性荧光探针标记抗PSI_{0Am}抗体,建立直接竞争荧光免疫吸附测定PSI_{0Am}:

[0078] f-1、包被:用0.05M,pH=9.6的碳酸盐缓冲液稀释将PSI_{0Am}包被抗原溶液稀释到25 μg/mL,包被于96孔板中,每孔100μL,冰箱4℃过夜;

[0079] f-2、封闭:取出96孔板,PBST洗涤3次,每次3min,洗去未结合的PSI_{0Am}包被抗原,加入1wt%酪蛋白进行封闭,每孔200μL,37℃封闭1.5h;

[0080] f-3、加样竞争:PBST洗涤3次,甩干,每次3min,将50μL浓度分别为 5×10^{-5} ng/mL、 1×10^{-4} ng/mL、 5×10^{-4} ng/mL、 10^{-3} ng/mL、 5×10^{-3} ng/mL、 10^{-2} ng/mL、 5×10^{-2} ng/mL、 10^{-1} ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、50ng/mL、 1×10^2 ng/mL、 5×10^2 ng/mL、 10^3 ng/mL的PSI_{0Am}标准液依次加入到96孔板的各行中,即每个浓度梯度重复三次,然后向各孔中加入50μL功能化磁性荧光探针标记的抗PSI_{0Am}抗体,37℃竞争1.5h;

[0081] f-4、之后用洗涤液洗涤3次,每次3分钟,甩干;不同浓度的PSI_{0Am}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}稀释到规定的标准浓度;在酶标仪上测定各孔在激发波长为530nm,发射波长为585nm时的荧光强度。

[0082] 将PSI_{0Am}包被抗原经包被液稀释后包被于96孔板中,封闭、加入不同浓度的PSI_{0Am}标准品,以功能化磁性荧光探针标记的PSI_{0Am}抗体作为一抗,建立直接竞争荧光免疫分析定量检测PSI_{0Am}。利用功能化磁性荧光探针标记的PSI_{0Am}抗体和PSI_{0dm}包被抗原进行直接竞争荧光免疫分析法,由于直接竞争荧光免疫分析法是利用抗PSI_{0Am}抗体与PSI_{0Am}包被抗原特异性结合,通过检测抗原抗体的复合物的荧光信号达到定量检测抗原的目的,该方法比直接竞争酶联免疫法的光信号检测抗原具有更低的检出限,更高的灵敏度。

[0083] g、以PSI_{0Am}标准液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1所示,标准曲线的线性方程为: $F = 11477.59 - 1537.631gC$,其中F为荧光强度值,f为PSI_{0Am}的浓度,其相关系数 $R^2 = 0.994$,线性范围为 $5 \times 10^{-5} - 1 \times 10^3$ ng/mL,检出限为 3×10^{-7} ng/mL。

[0084] 重复以上各步骤,只是将步骤f-3中的不同浓度的PSI_{0Am}标准液替换为未知浓度的PSI_{0Am}待测液,然后在在酶标仪上测定各孔在激发波长为530nm,发射波长为585nm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PSI_{0Am}待测液的浓度。

[0085] 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。

[0086] 上述参照实施例对基于功能化磁性荧光探针标记的荧光免疫吸附法定量检测油胺接枝聚琥珀酰亚胺(PSI_{0Am})高分子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。

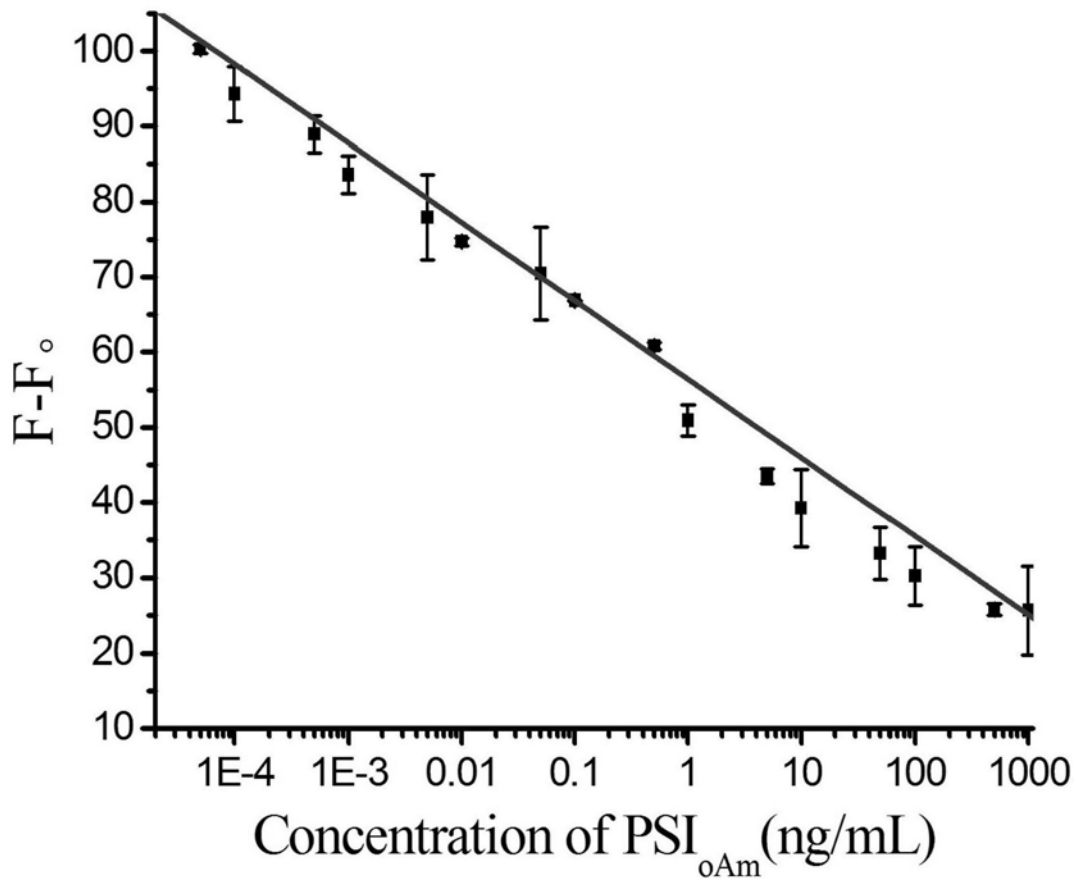


图1

专利名称(译)	一种基于磁性荧光探针标记的荧光免疫吸附测定超痕量高分子纳米药物载体的方法		
公开(公告)号	CN108918854A	公开(公告)日	2018-11-30
申请号	CN201810459487.8	申请日	2018-05-15
[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 李磊		
发明人	张明翠 李磊		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/533 G01N33/543 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/531 G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/54346		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种基于磁性荧光探针标记的荧光免疫吸附测定超痕量高分子纳米药物载体的方法，基于磁性荧光探针易于分离及其优越的荧光性能，此方法提高了检测的灵敏度。即通过制备PSIOAm包被抗原、磁性荧光探针标记的抗PSIOAm抗体，结合抗原抗体反应的特异性对油胺枝接聚琥珀酰亚胺(PSIOAm)高分子纳米粒子进行了超痕量检测分析。与现有技术相比，本发明提供的方法具有操作简单、低背景、灵敏度高、特异性强、可实现高通量，精准靶向及无损检测等特点。

