



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101738480 A

(43) 申请公布日 2010.06.16

(21) 申请号 200910176721.7

(22) 申请日 2009.09.18

(71) 申请人 中国计量科学研究院

地址 100013 北京市北三环东路 18 号

(72) 发明人 全灿 刘军 李红梅

(74) 专利代理机构 北京思创毕升专利事务所

11218

代理人 韦庆文

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/553(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 3 页

(54) 发明名称

用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针及其制法和用途

(57) 摘要

本发明为一种用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针及其制法和用途。本发明采用具有生物亲和效应的纳米颗粒作为基体,经表面修饰后能够与目标蛋白抗体结合,并排除物理吸附的干扰;同时采用鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体作为捕捉抗体,通过抗体-抗原间的特异性作用力,用于对目标核糖体失活蛋白偶联。本发明涉及的用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针将纳米颗粒大比表面积的高富集能力与单抗对抗原的高选择性结合起来,大大提高了检测核糖体失活蛋白的灵敏度和特异性。本发明是综合利用纳米技术、免疫技术,应用于食品安全、生物反恐等领域中目标核糖体失活蛋白分子的检测。具有快速便携、特异、痕量检测等优点。

1. 一种用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针,包括基体纳米颗粒和核糖体失活蛋白抗体,其特征在于:

①采用具有生物亲和效应的纳米颗粒作为基体纳米颗粒,经表面修饰后能够与目标蛋白抗体特异性结合,并排除物理吸附的干扰;

②采用鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体作为捕捉抗体,通过抗体-抗原间的特异性作用力,用于对目标核糖体失活蛋白的偶联及检测。

2. 如权利要求 1 所述的用于核糖体失活蛋白检测的探针,其特征在于:

①所述的基体纳米颗粒,包括聚苯乙烯纳米颗粒、纳米磁珠颗粒或纳米金颗粒;

②所述的基体纳米颗粒为颗粒均匀的单分散纳米颗粒;

③所述的基体纳米颗粒经聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烷嵌段共聚物修饰剂进行过表面修饰。

3. 如权利要求 1 所述的用于核糖体失活蛋白检测的探针,其特征在于:

①所述的捕捉抗体分子量在 25-35kDa 之间;

②所述的捕捉抗体经 3-(2-吡啶二巯基)丙酸 n-羟基琥珀酰亚胺酯进行过位点化学修饰。

4. 如权利要求 1~3 之一所述的用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针,其特征在于,所述的纳米颗粒探针通过下述步骤制得:

①用聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烷嵌段共聚物修饰剂对基体纳米颗粒进行表面修饰;

②用 3-(2-吡啶二巯基)丙酸 n-羟基琥珀酰亚胺酯对鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体进行位点化学修饰;

③将经结合位点修饰后的鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体与经表面修饰后的基体纳米颗粒,通过恒温反应制得纳米颗粒探针悬浮液粗品;

④采用沉降场流分离技术,分离流体中范围为 20nm-1 μ m 的悬浮物颗粒,分离出基体纳米颗粒基体,得到具有特异性的纳米颗粒探针,即偶联了抗体且能够用于目标蛋白检测的纳米颗粒探针。

5. 一种如权利要求 1~4 之一的用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针的制备方法,包括如下步骤:

①基体纳米颗粒表面修饰:利用表面修饰剂对选自聚苯乙烯纳米颗粒、纳米磁珠颗粒或者纳米金的基体纳米颗粒表面进行修饰,减少表面非特异性物理吸附;

②鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体位点的化学修饰:加入 3-(2-吡啶二巯基)丙酸 n-羟基琥珀酰亚胺酯至鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体中进行位点的化学修饰;

③纳米颗粒探针悬浮液粗品的制备:将步骤①经表面修饰后的基体纳米颗粒与步骤②经位点化学修饰后的免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体进行恒温反应,反应温度为 20-50 $^{\circ}$ C, pH 值至 7.0-8.5 之间,反应时间为 0.5-5h,即得到纳米颗粒探针悬浮液粗品;

④纳米颗粒探针的分离:将步骤③得到的恒温反应产物采用沉降场流分离技术,在离心力场的作用下,采用含有浓度 0.01-5% 的 FL-70 表面活性剂作为流动相,根据颗粒尺寸、质量的差异,从纳米颗粒探针悬浮液粗品中分离出没有完成反应的反应原料或基体纳米颗粒,得到偶联有特异性抗体的纳米颗粒探针产品。

6. 如权利要求 5 所述的用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针的制备方法,其特征
在于:

所述的步骤①中,基体纳米颗粒的表面修饰剂为聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段
共聚物,修饰剂的浓度为 0.01-10g/L。

7. 如权利要求 5 所述的用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针的制备方法,其特征
在于:

所述的步骤②中,鼠抗人免疫球蛋白免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体位点进行化学修
饰,修饰剂 3-(2-吡啶二巯基)丙酸 n-羟基琥珀酰亚胺酯的浓度为 0.01-5g/L, pH 值为
7.0-8.5;在鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体蛋白上引入吡啶二硫化物基团,然后利用特
异性分离纯化柱分离除去过量的修饰剂。

8. 如权利要求 5 所述的用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针的制备方法,其特征
在于:

所述步骤④的纳米颗粒探针的分离:采用沉降场流分离技术,含有浓度为 0.01-5%的
FL-70 表面活性剂的流动相,在离心力场 500-3000rpm 的作用下,从纳米颗粒探针悬浮液
粗品中分离出过剩的反应原料或基体纳米颗粒,得到偶联有特异性抗体的纳米颗粒探针产
品。

9. 如权利要求 5 所述的用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针的制备方法,其特征
在于:

所述的步骤①中,基体纳米颗粒的表面修饰剂为聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段
共聚物,修饰剂的浓度为 0.01-10g/L;

所述的步骤②中,鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体位点进行化学修饰,修饰剂
3-(2-吡啶二巯基)丙酸 n-羟基琥珀酰亚胺酯的浓度为 0.01-5g/L, pH 值为 7.0-8.5;在鼠
抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体蛋白上引入吡啶二硫化物基团,然后利用特异性分离纯
化柱分离除去过量的修饰剂;

所述步骤④的纳米颗粒探针的分离:采用沉降场流分离技术,利用浓度为 0.01-5%的
FL-70 表面活性剂的流动相,在离心力场 500-3000rpm 的作用下,从纳米颗粒探针悬浮液
粗品中分离出过剩的反应原料或基体纳米颗粒,得到偶联有特异性抗体的纳米颗粒探针产
品。

10. 一种如权利要求 1~4 之一的用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针在痕量目
标核糖体失活蛋白的检测中的应用。

用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针及其制法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及对用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针及其制备方法,属于纳米科技领域与食品安全、生物技术应用等领域。

背景技术

[0002] 核糖体失活蛋白 (Ribosome-inactivating Protein, RIP) 存在于许多植物中,植物核糖体失活蛋白的生理功能是起防御作用,即抵抗病虫害或者恶劣的环境。根据核糖体失活蛋白的一级结构, RIP 可以分成以下两种: I 型,即由一条多肽链组成; II 型,即双链蛋白,由两条肽链组成。在双链蛋白中,其中一条是 A(active) 链,具有 N-糖苷酶活性;另一条是 B(binding) 链,为对半乳糖特异的凝集素,这两条多肽链通过二硫键和它的非共价键连接。

[0003] 目前常用的检测核糖体失活蛋白的方法主要为免疫分析法和生物质谱法。免疫分析法可以应用于测定各种抗原、半抗原或抗体,具有很高的选择性和很低的检出限,主要分为非放射免疫法和放射免疫法两种。其中,非放射免疫法又包括荧光免疫法、发光免疫法、酶免疫法及电化学免疫法等。酶联免疫分析法,是基于抗体与抗原或半抗原之间的高选择性反应而建立起来的一种生物化学分析法。另一种常用的方法是生物质谱法,基质辅助激光解吸质谱技术 (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) 所产生的质谱图多为单电荷离子,且质谱图中的离子与多肽和蛋白质的质量有一一对应关系。MALDI-TOF (基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱) 质谱非常适合于蛋白、多肽、核酸及多糖等生物大分子的研究。生物质谱法需要使用昂贵的基质辅助激光解吸电离质谱或电喷雾质谱,目前普及还较困难;而免疫分析法具有操作方便、便于检测生物样品等优点,应用广泛。

[0004] 脱嘌呤分析法经常也被用来分析检测新的核糖体失活蛋白,检测由酸性苯胺催化在核糖体失活蛋白脱嘌呤位点断裂产生的核糖体 rRNA 片段,但核糖体失活蛋白脱嘌呤分析法的灵敏度取决于核糖体失活蛋白催化核糖体脱嘌呤反应的速度常数,核糖体失活蛋白脱嘌呤分析法可能出现较高的假阳性和假阴性结果。

[0005] 纳米颗粒被广泛应用于蛋白、酶的固定、信号的检测和放大、待测物的富集和浓缩。由于纳米结构有着优异的化学和物理性能,有着极高的比表面,有利于提高目标分子的吸附能力,并能提高反应的速度,因此被广泛用于纳米颗粒探针表面吸附层的制作。纳米颗粒探针的化学和物理性质及其对生物分子或细胞检测的灵敏度大幅提高,检测的反应时间也得以缩短,且能实现高通量的实时检测分析。

[0006] Nam 【Nature Protocols, 2007, 2(6) :1438-1444】等报道了一种基于磁性纳米颗粒的生物条码 (Bio-Bar-Code) 方法来检验 DNA (脱氧核糖核酸)。他们首先将磁性纳米颗粒表面修饰上单克隆抗体并杂交上目标 DNA,将金纳米颗粒修饰上 DNA 和多克隆抗体,其中金纳米颗粒表面修饰的 DNA 标记物含量要远高于多克隆抗体含量,将两种颗粒混合,利用抗体和前列腺特异性抗原 (prostate-specific antigen, PSA) 的特异性识别作用,将金纳

米颗粒富集到磁性纳米颗粒表面,通过磁分离并用二硫苏糖醇去杂交分离得到 DNA 标记物,进一步利用金标银染技术对信号量的放大,最后对 DNA 标记物进行定量检测,也可实现对目标蛋白 PSA 的检测。

[0007] Fan 【Anal. Chem., 2005, 77 (10) :3238 ~ 324】等固定原始抗体在磁珠上,固定目标抗体在金上,分别处理后两者结合使 Au 变为 Au^{3+} 离子,在发光胺处理后发光,从而运用化学发光免疫测定方法测定人类免疫球蛋白 G,利用这一方法也可直接制造出测定人类免疫球蛋白 G 的纳米探针。

[0008] 美国加州大学【Angewandte Chemie International Edition, 2008, 47 (35), 6661-6665】利用了一段具有放射性的 RNA (核糖核酸) 寡链,与核糖体中去嘌呤化的茎环结构互补配对,配对后的结构具有很强的荧光效应。毒素介导的去嘌呤化过程就被转化为荧光增强的信号,可有效的检测毒素的酶活性,该检测方法也可应用于毒素的抑制剂和抗体研究。

[0009] 杨运云等【分析化学, 2007, 35 (3), 439-442】建立了蓖麻毒素的多抗-毒素-单抗双夹心 ELISA 检测 (酶联接免疫吸附剂测定) 技术,将多抗对抗原的高富集能力与单抗的高选择性结合起来,以提高检测方法的灵敏度和特异性。

发明内容

[0010] 本发明要解决的首要问题就是传统的核糖体失活蛋白检测方法灵敏度低、步骤繁冗的问题。本发明通过研制核糖体失活蛋白的纳米颗粒探针,将纳米颗粒大比表面积的高富集能力与单抗对抗原的高选择性结合起来,以提高检测核糖体失活蛋白的灵敏度和特异性。

[0011] 本发明之一的用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针采用如下技术方案:

[0012] 一种用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针,包括基体纳米颗粒和核糖体失活蛋白抗体,其特征在于:

[0013] ①采用具有生物亲和效应的纳米颗粒作为基体纳米颗粒,经表面修饰后能够与目标蛋白抗体特异性结合,并排除物理吸附的干扰;

[0014] ②采用鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体作为捕捉抗体,通过抗体-抗原间的特异性作用力,用于对目标核糖体失活蛋白的偶联及检测。

[0015] 其中,

[0016] 所述的基体纳米颗粒,包括聚苯乙烯纳米颗粒、纳米磁珠颗粒或纳米金颗粒;

[0017] 所述的基体纳米颗粒为颗粒均匀的单分散纳米颗粒;所述的基体纳米颗粒经聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烷嵌段共聚物修饰剂 (即 F108-PDS) 进行过表面修饰。

[0018] 所述的捕捉抗体即鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体分子量在 25-35kDa 之间;

[0019] 所述的捕捉抗体即鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体经 3-(2-吡啶二硫基) 丙酸 n-羟基琥珀酰亚胺酯进行过位点化学修饰;

[0020] 所述的鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体通过抗原-抗体的特异性作用力,能够作为捕捉抗体作用于偶联目标核糖体失活蛋白分子。

[0021] 所述的纳米颗粒探针可以通过下述步骤制得:

[0022] ①用聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烷嵌段共聚物修饰剂对基体纳米颗粒进行表面修饰；

[0023] ②用 3-(2-吡啶二巯基)丙酸 n-羟基琥珀酰亚胺酯对鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体进行位点化学修饰；

[0024] ③将经结合位点修饰后的鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体与经表面修饰后的基体纳米颗粒,通过恒温反应制得纳米颗粒探针悬浮液粗品；

[0025] ④采用沉降场流分离技术,分离流体中范围为 20nm-1 μm 的悬浮物颗粒,分离出基体纳米颗粒基体,得到具有特异性的纳米颗粒探针,即偶联了抗体且能够用于目标蛋白检测的纳米颗粒探针。

[0026] 本发明之二的用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针的制备方法是：

[0027] 本发明的用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针的制备方法包括如下步骤：

[0028] ①基体纳米颗粒表面修饰：利用表面修饰剂对选自聚苯乙烯纳米颗粒、纳米磁珠颗粒或者纳米金的基体纳米颗粒表面进行修饰,减少表面非特异性物理吸附；

[0029] ②鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体位点的化学修饰：加入 3-(2-吡啶二巯基)丙酸 n-羟基琥珀酰亚胺酯至鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体中进行位点的化学修饰；

[0030] ③纳米颗粒探针悬浮液粗品的制备：将步骤①经表面修饰后的基体纳米颗粒与步骤②经位点化学修饰后的免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体进行恒温反应,反应温度为 20-50℃,pH 值至 7.0-8.5 之间,反应时间为 0.5-5h,即得到纳米颗粒探针悬浮液粗品；

[0031] ④纳米颗粒探针的分离：将步骤③得到的恒温反应产物采用沉降场流分离技术,在离心力场的作用下,采用含有浓度 0.01-5% 的 FL-70 表面活性剂作为流动相,根据颗粒尺寸、质量的差异,从纳米颗粒探针悬浮液粗品中分离出没有完成反应的反应原料或基体纳米颗粒,得到偶联有特异性抗体的纳米颗粒探针产品。

[0032] 在具体实施中,

[0033] 所述的步骤①中,基体纳米颗粒的表面修饰剂为聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烷嵌段共聚物,修饰剂的浓度为 0.01-10g/L；

[0034] 所述的步骤②中,鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体位点进行化学修饰,修饰剂 3-(2-吡啶二巯基)丙酸 n-羟基琥珀酰亚胺酯的浓度为 0.01-5g/L,pH 值为 7.0-8.5；在鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体蛋白上引入吡啶二硫化物基团,然后利用特异性分离纯化柱分离除去过量的修饰剂；

[0035] 所述步骤④的纳米颗粒探针的分离：采用沉降场流分离技术,利用浓度为 0.01-5% 的 FL-70 表面活性剂的流动相,在离心力场 500-3000rpm 的作用下,从纳米颗粒探针悬浮液粗品中分离出过剩的反应原料或基体纳米颗粒,得到偶联有特异性抗体的纳米颗粒探针产品。

[0036] 本发明之三的用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针的用途是：

[0037] 本发明的用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针可以应用于痕量目标核糖体失活蛋白的检测；如应用于痕量目标蓖麻毒蛋白的检测。

[0038] 本发明是综合利用纳米技术、免疫技术,应用于食品安全、生物反恐等领域中目标核糖体失活蛋白分子的检测,具有快速便携、特异、痕量检测等优点。

[0039] ①本发明首次建立了利用纳米技术应用核糖体失活蛋白分子痕量检测的方法。

[0040] ②本发明研制出的纳米颗粒探针与核糖体失活蛋白的其它常规检测方法,如脱嘌呤分析法相比,具有操作简单易行的特点,便于推广应用,能以如纳米探针试纸、纳米磁珠等多种形式应用于核糖体失活蛋白现场阳性样品的快速筛查。

[0041] ③本发明研制出的纳米颗粒探针与核糖体失活蛋白的其它常规检测方法,如脱嘌呤分析法相比,利用了抗原抗体的特异性结合特点,具有特异性高的优点,研制出的纳米课题探针只对目标核糖体失活蛋白分子响应,能够规避其它分子的干扰,解决了同类产品中特异性不高的问题。

[0042] ④本发明研制出的纳米颗粒探针与核糖体失活蛋白的其它常规检测方法,如脱嘌呤分析法相比,本发明利用了纳米颗粒的表面效应,即使样品中痕量的目标分子也可以经过纳米颗粒的表面富集起来,可有效实现痕量检测的目标,检测下限可达 $1.0 \mu\text{g/L}$ 。

[0043] ⑤本发明为研制核糖体失活蛋白纳米探针奠定了技术基础。

[0044] ⑥本发明为其它类似痕量目标蛋白的检测,起到了良好的借鉴作用。

[0045] 综上所述,本发明研制的纳米颗粒探针具有高灵敏度、特异性、操作简便,研制工艺简单、结果稳定等优点,解决了目前核糖体失活蛋白检测技术中的局限。

附图说明

[0046] 图1 本发明原理示意图,

[0047] 其中,1:核糖体失活蛋白(RIP);2:鼠抗人免疫球蛋白(IgG);3:聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段共聚物(F108-PDS);4:聚苯乙烯基体纳米颗粒(PS bareparticle)

[0048] 图2 沉降场流分离技术流程图,

[0049] 其中,1:泵(Pump);2:进样(Injection);3:通道(Channel);4:检测器(Detector)

[0050] 图3 典型纳米颗粒探针分离谱图。

[0051] 其中,F108表示聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段共聚物;IgG表示鼠抗人免疫球蛋白;RIP表示核糖体失活蛋白。

具体实施方式

[0052] 本发明主要内容:

[0053] ①基体纳米颗粒表面修饰技术

[0054] 按比例分别称取一定体积的修饰剂F108-PDS($0.01-10\text{g/L}$)加入到基体纳米颗粒悬浮液中,室温下振荡后使颗粒表面物理吸附足够量的修饰剂,再在一定条件下离心分离没有结合或结合不紧密的修饰剂,弃去上清液后用磷酸缓冲液重新稀释纳米颗粒。

[0055] ②鼠抗人免疫球蛋白IgG单克隆抗体位点进行化学修饰

[0056] 利用的3-(2-吡啶二巯基)丙酸n-羟基琥珀酰亚胺酯(浓度为 $0.01-5\text{g/L}$),对抗体活性位点进行修饰,按两者比例(0.1-1.5)分别称取一定体积($1-20 \mu\text{L}$)的修饰剂加入到抗体溶液中。在 $20-50^\circ\text{C}$ 温度下反应后,利用特异性色谱柱柱分离除去过量的修饰剂及一些小分子反应。

[0057] ③纳米颗粒探针的制备

[0058] 将经结合位点修饰后的抗体与经表面修饰后的基体纳米颗粒恒温反应,反应温度

为 20–50℃, 反应时间为 0.5–5h, pH 值至 7.0–8.5 之间, 即得到具有特异性的纳米颗粒探针。

[0059] ④纳米颗粒探针的分离

[0060] 采用沉降场流分离技术, 可分离流体中范围为 20nm–1 μm 的悬浮物颗粒, 采用含有 FL-70 表面活性剂的流动相, 在离心力场等外场的作用下, 根据颗粒尺寸、质量等差异, 不同粒径的纳米颗粒在通道厚度内呈一定的分布, 在通道壁附近的流体会比在中心处流得慢; 不同粒径的纳米颗粒在通道中的流速差别会导致其相应的保留时间较大的差异, 从而实现基体纳米颗粒与偶联抗体的纳米颗粒探针的分离。

[0061] 下面结合附图对本发明作进一步详细描述: 用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针及其制备过程。

[0062] ①利用修饰剂 F108–PDS 对聚苯乙烯表面进行修饰

[0063] (1) 配制 F108–PDS 溶液, 浓度为 0.01–10g/L;

[0064] (2) 配制浓度为 1–10% (w/v)、粒径为 20–1000nm 的聚苯乙烯纳米颗粒基体悬浮液;

[0065] (3) 称取 5–20 μL 的 F108–PDS 溶液加入到基体纳米颗粒悬浮液中, 反应后使基体纳米颗粒表面偶联;

[0066] (4) 离心分离没有结合或结合不紧密的 F108–PDS 溶液;

[0067] (5) 弃去上清液后用 1.0–5.0mL 磷酸缓冲液 (pH = 7.4) 重新稀释。

[0068] ②鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体位点进行化学修饰

[0069] (1) 配制浓度为 0.01–5g/L 的 3-(2-吡啶二巯基) 丙酸 n-羟基琥珀酰亚胺酯溶液;

[0070] (2) 配制鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体溶液, 浓度为 0.2–2.5mg/mL;

[0071] (3) 称取 1–20 μL 的 3-(2-吡啶二巯基) 丙酸 n-羟基琥珀酰亚胺酯溶液加入到抗体溶液中, 在 20–50℃ 温度下反应;

[0072] (4) 利用 NAP 色谱柱分离除去过量的修饰剂及一些小分子。

[0073] ③纳米颗粒探针的制备

[0074] (1) 将经结合位点修饰后的抗体加入经表面修饰后的纳米颗粒, 涡旋混合;

[0075] (2) 在 20–50℃ 温度下恒温反应 0.5–5h, pH 值至 7.0–8.5 之间;

[0076] (3) 离心分离没有结合或结合不紧密的反应溶液;

[0077] (4) 弃去上清液后用 1.0–5.0mL 磷酸缓冲液 (pH = 7.4) 重新稀释, 即得到具有特异性的纳米颗粒探针。

[0078] ④纳米颗粒探针的分离

[0079] ①配制浓度为 0.01–5% 的 FL-70 表面活性剂的流动相;

[0080] ②开启流动相泵, 调节流量至 0.5–2.5mL/min, 打开检测器, 调节检测波长至 200–300nm;

[0081] ③用微量进样器进样 5–50 μL;

[0082] ④开启沉降场流分离仪;

[0083] ⑤在设定波长下, 收集整个峰的流出液, 实现纳米颗粒探针与纳米颗粒基体的分离。

[0084] 实施例 1

[0085] 用于蓖麻毒蛋白检测的纳米颗粒探针及其制备

[0086] ①利用修饰剂 F108-PDS 对聚苯乙烯基体纳米颗粒进行表面修饰

[0087] 按比例分别称取一定体积的修饰剂 F108-PDS (0.01-10g/L) 加入到粒径为 290nm 的聚苯乙烯纳米颗粒悬浮液中, 室温下振荡足够时间后使颗粒表面物理吸附足够量的修饰剂, 再在一定条件下离心分离没有结合或结合不紧密的修饰剂, 弃去上清液后用磷酸缓冲液重新稀释纳米颗粒。

[0088] ②鼠抗人免疫球蛋白 IgG 单克隆抗体位点进行化学修饰

[0089] 利用的 3-(2-吡啶二巯基) 丙酸 n- 羟基琥珀酰亚胺酯 (浓度为 0.01-5g/L), 对抗体活性位点进行修饰, 按两者比例 (0.1-1.5) 分别称取一定体积 (1-20 μ L) 的修饰剂加入到抗体溶液中。在 20-50 $^{\circ}$ C 温度下反应后, 利用特异性色谱柱分离除去过量的修饰剂及一些小分子反应。加入二巯苏糖醇 (DTT) 通过双硫键将两个蛋白连接在一起, 其决定了连接后的蛋白复合体具有很大的不稳定性。DTT 的用途之一是作为巯基化 DNA 的还原剂和去保护剂。巯基化 DNA 末端硫原子在溶液中趋向于形成二聚体, 特别是在氧气存在的情况下。这种二聚化大大降低了一些偶联反应实验。

[0090] ③纳米颗粒探针的制备

[0091] 将经结合位点修饰后的抗体与经表面修饰后的基体纳米颗粒恒温反应, 反应温度为 20-50 $^{\circ}$ C, 反应时间为 0.5-5h, pH 值至 7.0-8.5 之间, 即得到具有特异性的纳米颗粒探针。

[0092] ④纳米颗粒探针的分离

[0093] 采用沉降场流分离技术, 可分离流体中范围为 20nm-1 μ m 的悬浮物颗粒, 采用含有 FL-70 表面活性剂的流动相, 在离心力场的作用下, 根据颗粒尺寸、质量等差异, 不同粒径的纳米颗粒在通道厚度内呈一定的分布, 在通道壁附近的流体会比在中心处流得慢; 不同粒径的纳米颗粒在通道中的流速差别会导致其相应的保留时间较大的差异, 能够实现基体纳米颗粒与偶联抗体的纳米颗粒探针的分离, 得到具有特异性的纳米探针颗粒。

[0094] ⑤蓖麻毒蛋白的检测

[0095] 配制一系列浓度 (0.5-10.0 μ g/L) 的水样、土壤、奶粉和血液蓖麻毒素加标样品, 用研制的测定蓖麻毒蛋白的纳米颗粒探针测定样品, 结果均为阳性; 未受污染的水样、土壤、奶粉和血液均未能检出蓖麻毒素, 显示为阴性。

[0096] 对比例

[0097] 实验对比了脱嘌呤分析法测定蓖麻毒蛋白, 该方法出现较高的假阴性和假阳性结果。实验表明现有的脱嘌呤分析法过程复杂, 为了使核糖体底物产生的核糖体核糖核酸的片段谱带成像显现出来, 需要首先将核糖体核糖核酸用含核糖体失活蛋白的样品进行脱嘌呤反应, 然后经过两次萃取, 两次沉淀和干燥, 两次再溶解, 最后用苯胺化学裂解, 且每一步萃取, 干燥, 溶解和化学裂解的产率都可能很低。

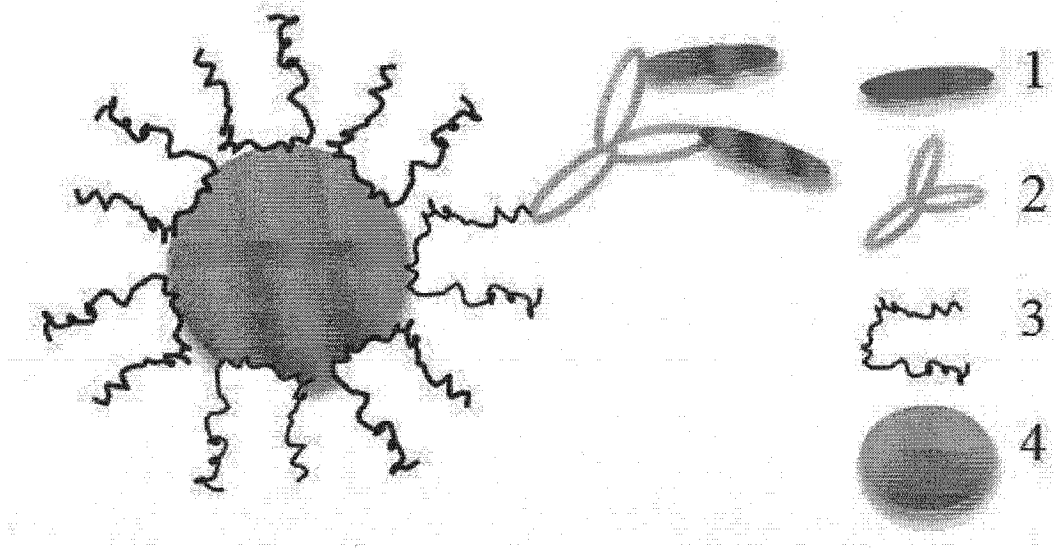


图 1

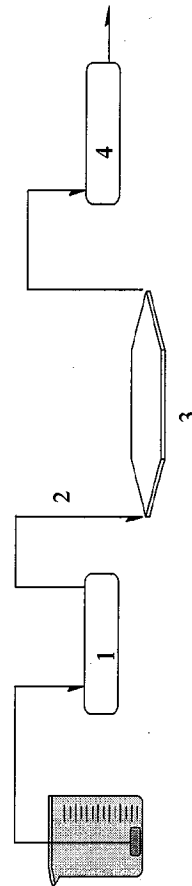
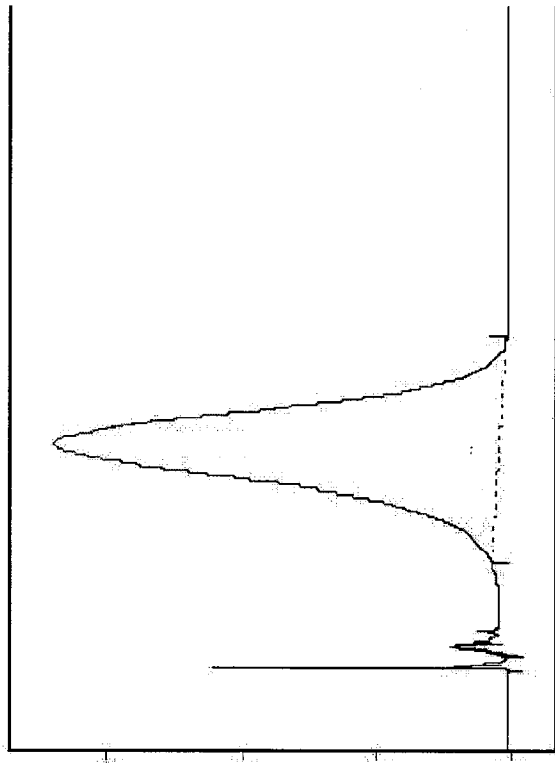


图 2

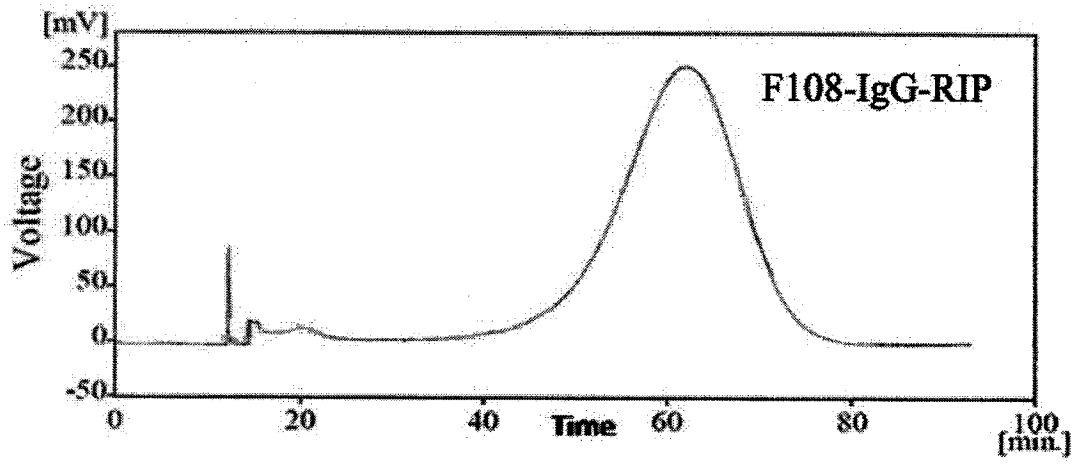


图 3

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针及其制法和用途 | | |
| 公开(公告)号 | CN101738480A | 公开(公告)日 | 2010-06-16 |
| 申请号 | CN200910176721.7 | 申请日 | 2009-09-18 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中国计量科学研究院 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 中国计量科学研究院 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 中国计量科学研究院 | | |
| [标]发明人 | 全灿 刘军 李红梅 | | |
| 发明人 | 全灿 刘军 李红梅 | | |
| IPC分类号 | G01N33/68 G01N33/577 G01N33/553 G01N33/531 | | |
| 其他公开文献 | CN101738480B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明为一种用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针及其制法和用途。本发明采用具有生物亲和效应的纳米颗粒作为基体，经表面修饰后能够与目标蛋白抗体结合，并排除物理吸附的干扰；同时采用鼠抗人免疫球蛋白IgG单克隆抗体作为捕捉抗体，通过抗体-抗原间的特异性作用力，用于对目标核糖体失活蛋白偶联。本发明涉及的用于核糖体失活蛋白检测的纳米颗粒探针将纳米颗粒大比表面积的高富集能力与单抗对抗原的高选择性结合起来，大大提高了检测核糖体失活蛋白的灵敏度和特异性。本发明是综合利用纳米技术、免疫技术，应用于食品安全、生物反恐等领域中目标核糖体失活蛋白分子的检测。具有快速便携、特异、痕量检测等优点。

