

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

G01N 24/08 (2006.01)

G01N 33/551 (2006.01)

G01N 33/536 (2006.01)

[21] 申请号 200910027067.3

[43] 公开日 2009年10月28日

[11] 公开号 CN 101566592A

[22] 申请日 2009.5.26

[21] 申请号 200910027067.3

[71] 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道1800号

江南大学食品学院

[72] 发明人 胥传来 马伟 陈伟 徐丽广

李灼坤 彭池方

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所

代理人 时旭丹 刘品超

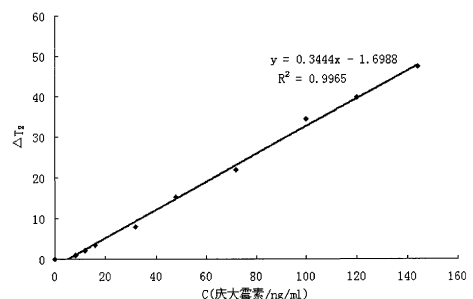
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

[54] 发明名称

一种临床磁共振成像检测庆大霉素的方法

[57] 摘要

一种临床磁共振成像检测庆大霉素的方法，属于免疫检测技术领域。本发明将庆大霉素修饰磁性纳米粒子，庆大霉素标准或待测上清液，庆大霉素抗体，羊抗兔二抗，抗体与庆大霉素修饰磁性纳米粒子免疫聚合物的形成，由此产生磁共振信号，进行磁共振检测。磁共振信号检测是利用抗体与庆大霉素修饰磁性纳米粒子形成免疫聚合物，有效的缩短水中质子横向弛豫时间 T_2 值而产生信号。通常样品中庆大霉素浓度越大，被抗体捕获的庆大霉素量越多，则与磁性纳米粒子表面的庆大霉素结合的抗体越少，测得的 T_2 数值越大。本法不需复杂的样品前处理；操作简便，只需加待测样品孵育后直接测定 T_2 值，一步就可完成；用于标记超顺磁性纳米粒子的粒径约为 10nm，水溶性高，分散性稳定性好。



1、一种临床磁共振成像检测庆大霉素的方法，其特征是首先将庆大霉素修饰磁性纳米粒子，加庆大霉素标准或待测上清液，庆大霉素抗体，羊抗兔二抗，抗体与庆大霉素修饰磁性纳米粒子形成免疫聚合物，由此产生磁共振信号，进行磁共振检测；步骤为：

(1) 庆大霉素与磁性纳米粒子的藕联：

1 μ L 碳二亚胺 EDC 和 2.4mg N-羟基琥珀酰亚胺 sulfo-NHS 加入到 0.5mL、1.3 mg/mL 的 Fe₃O₄ 水溶液中，反应 15 min 活化，活化后的 Fe₃O₄ 加入 1mg 庆大霉素，室温反应 4 小时，于 0.01M、pH 7.4 的 PBS 中透析 24 小时，除去未反应的庆大霉素小分子，制得庆大霉素修饰的 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子；

(2) 磁共振检测，绘制弛豫时间 T₂~C 庆大霉素浓度标准曲线：

20 μ L、150 μ g/mL 的庆大霉素修饰的 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子中加入 20 μ L 不同浓度的庆大霉素标准品，加入 1 μ L、5mg/mL 庆大霉素抗体，再加入 1 μ L 羊抗兔二抗，孵育 2 小时后，稀释到体积为 250 μ L，加入到微孔板中，测磁共振，以横向弛豫时间 T₂ 绘制 T₂~C 庆大霉素浓度标准曲线；

对照组设置：庆大霉素抗体用地塞米松抗体代替，其它操作同上；

所用的溶液皆为 0.01M、pH7.4 的 PBS 缓冲液；庆大霉素标准品浓度分别为 0、8、12、16、32、48、72、100、120、144ng/mL；

用德国西门子临床磁共振成像设备 MAGNETOM Avanto 1.5T MRI 测磁共振，扫描时间参数为：回波时间 TE 为 20-120ms，共 6 个回波，脉冲重复间隔时间 TR 为 2000ms，所用线圈为头线圈；

(3) 磁共振定量检测：

20 μ L、150 μ g/mL 的庆大霉素修饰的 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子中加入 20 μ L 的待测上清液，加入 1 μ L、5mg/mL 庆大霉素抗体，再加入 1 μ L 羊抗兔二抗，孵育 2 小时后，稀释到体积为 250 μ L，加入到微孔板中，测磁共振，以横向弛豫时间 T₂ 与绘制的 T₂~C 庆大霉素浓度标准曲线对照，求出样品中庆大霉素的浓度。

一种临床磁共振成像检测庆大霉素的方法

技术领域

本发明涉及一种磁性纳米粒子标记抗体定量检测庆大霉素的方法，属于免疫检测技术领域。

背景技术

庆大霉素是由小单孢菌产生的多组分抗生素，含 C₁、C₂、C_{1a} 等组分，结构见附图 1。硫酸庆大霉素是白色粉末，有吸湿性，易溶于水，难溶于一般有机溶剂，对温度和酸、碱都稳定，抗菌谱和卡那霉素基本相同。特点是对绿脓杆菌、变形杆菌和耐青霉素金葡萄都具抑制作用。与新霉素、卡那霉素有交叉耐药现象。主要用于上述敏感菌的严重感染如败血症、呼吸道感染、肺炎、肠道感染、胆道感染、尿路感染、软组织感染等的治疗。庆大霉素的毒理作用同氨基糖苷类其它药物类似，具有很强的肾毒性和肝毒性，毒害很大。

当今国际上常用的庆大霉素残留检测的方法有：微生物法、液相色谱(LC)、气相色谱(GC)、气-质联用法(GC-MS)、液-质联用法(LC-MS)等。微生物检测不准确且检测灵敏度不高，而仪器分析方法不仅需要昂贵的仪器设备，对操作人员的要求也比较高，需要经过复杂的样品前处理才能进行。国外早已经开展了对氨基糖苷类抗生素免疫分析方法的研究，常用的方法为酶联免疫分析法(ELISA)或称为免疫酶定量分析法(IEMA)，这类方法是将包被原包被酶标板，加入药物及抗药物抗体，再加入酶标二抗，即检测抗体，最后加入底物显色，一定时间后，用酶标仪检测某一特定波长的吸光度值，根据已知标准品含量计算样品中待测药物的浓度，此操作繁琐，费时。

磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)技术由于可以用来对生物内脏器官和软组织进行无损的快速检测，已经成为诊断软组织病变尤其是检测肿瘤的最为有效的临床诊断方法之一。对于超顺磁性纳米颗粒而言，其主要作用是缩短横向弛豫时间(T₂)，而对纵向弛豫时间(T₁)影响不大。国内目前为止尚未见有利用超顺磁性纳米粒子的磁共振信号达到对体外目标物检测的报道，本发明弥补了这一空白。

发明内容

本发明的目的是提供一种具有灵敏性、特异性、准确度、操作方法简单的磁性纳米粒子标记抗体的免疫检测方法，用于庆大霉素残留的快速检测。

本发明的技术方案：一种临床磁共振成像检测庆大霉素的方法，首先将庆大霉素修饰磁性纳米粒子，加庆大霉素标准或待测上清液，庆大霉素抗体，羊

抗兔二抗，抗体与庆大霉素修饰磁性纳米粒子形成免疫聚合物，由此产生磁共振信号，进行磁共振检测；步骤为：

(1) 庆大霉素与磁性纳米粒子的藕联：

1 μ L 碳二亚胺 EDC 和 2.4mg N-羟基琥珀酰亚胺 sulfo-NHS 加入到 0.5mL、1.3 mg/mL 的 Fe₃O₄ 水溶液中，反应 15 min 活化，活化后的 Fe₃O₄ 加入 1mg 庆大霉素 (GM 药品)，室温反应 4 小时，于 0.01M、pH 7.4 的 PBS 中透析 24 小时，除去未反应的庆大霉素小分子，制得庆大霉素修饰的 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子；

(2) 磁共振检测，绘制弛豫时间 T₂~C 庆大霉素浓度标准曲线：

20 μ L、150 μ g/mL 的庆大霉素修饰的 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子中加入 20 μ L 不同浓度的庆大霉素标准品，加入 1 μ L、5mg/mL 庆大霉素抗体，再加入 1 μ L 羊抗兔二抗，孵育 2 小时后，稀释到体积为 250 μ L，加入到微孔板中，测磁共振，以横向弛豫时间 T₂ 绘制 T₂~C 庆大霉素浓度标准曲线；

对照组设置：庆大霉素抗体用地塞米松抗体代替，其它操作同上；

所用的溶液皆为 0.01M、pH7.4 的 PBS 缓冲液；庆大霉素标准品浓度分别为 0、8、12、16、32、48、72、100、120、144ng/mL；

用德国西门子临床磁共振成像设备 (MAGNETOM Avanto 1.5T MRI) 测磁共振，回波时间(echo time)TE 为 20-120ms，脉冲重复间隔时间 (repetition time)TR 为 2000ms，所用线圈为头线圈；

(3) 磁共振定量检测：

20 μ L、150 μ g/mL 的庆大霉素修饰的 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子中加入 20 μ L 的待测上清液，加入 1 μ L、5mg/mL 庆大霉素抗体，再加入 1 μ L 羊抗兔二抗，孵育 2 小时后，稀释到体积为 250 μ L，加入到微孔板中，测磁共振，以横向弛豫时间 T₂ 与绘制的 T₂~C 庆大霉素浓度标准曲线对照，求出样品中庆大霉素的浓度。

所述的庆大霉素修饰的磁性纳米粒子是将庆大霉素用藕联方法藕联到羧基修饰的磁性纳米粒子的表面；磁性纳米粒子是双羧基修饰的磁性纳米粒子，其核心部分是 Fe₃O₄。

所述的抗体是抗庆大霉素的多克隆抗体，经硫酸铵沉淀法纯化的特异性抗体。

所述的抗体与庆大霉素修饰的磁性纳米粒子形成免疫聚合物：于庆大霉素修饰的磁性纳米粒子中加入庆大霉素抗体后，磁性纳米粒子表面的庆大霉素与溶液中游离的庆大霉素竞争抗体，通过抗原与抗体的特异性结合形成抗原-抗体免疫聚合物。

所述的磁共振信号检测是利用抗体与庆大霉素修饰磁性纳米粒子形成免疫聚合物，有效的缩短水中质子横向弛豫时间 T₂ 值而产生信号。通常样品中庆大

霉素浓度越大，被抗体捕获的庆大霉素量越多，则与磁性纳米粒子表面的庆大霉素结合的抗体越少，则测得的 T_2 数值越大。

本发明的有益效果：

(1) 本法不需复杂的样品前处理，即使对于全血，尿液，组织液。

(2) 本法操作简便，只需加待测样品孵育后进行直接测定 T_2 值，只需一步就可完成。

(3) 本法用于标记超顺磁性纳米粒子，粒径为 10nm，水溶性高，分散性稳定性好。饱和磁化强度为 65 emu g^{-1} 。

附图说明

图1 庆大霉素结构式。

图2 磁共振成像图(左)与微彩图(右)。

图3 磁共振检测标准曲线。

具体实施方式

实施例 1 庆大霉素与磁性纳米粒子的藕联：

1 μL 碳二亚胺 EDC 和 2.4mg N-羟基琥珀酰亚胺 sulfo-NHS 加入到 0.5mL、1.3 mg/mL 的 Fe_3O_4 水溶液中，反应 15 min 左右活化。活化后的 Fe_3O_4 加入 1mg 庆大霉素 (GM 药品)，室温反应 4 小时，于 0.01M、pH 7.4 的 PBS 中透析 24 小时，除去未反应的药物小分子。

实施例 2 磁共振：

20 μL 、150 $\mu\text{g/mL}$ 的庆大霉素修饰的 Fe_3O_4 中加入 20 μL 不同浓度的庆大霉素标准品，加入 1 μL 庆大霉素抗体 (5mg/mL)，再加入 1 μL 羊抗兔二抗，孵育 2 小时后，稀释到体积为 250 μL ，加入到微孔板中，测磁共振。

对照组设置：庆大霉素抗体用地塞米松抗体代替，其它操作同上。

所用的溶液皆为 0.01M、pH7.4 的 PBS 缓冲液。庆大霉素标准品浓度分别为 0、8、12、16、32、48、72、100、120、144ng/mL。

实施例 3 磁共振定量检测

磁共振设备为 MAGNETOM Avanto 1.5T MRI，德国西门子临床磁共振成像设备。

本实验所用扫描时间参数为：回波时间(echo time)TE 为 20-120ms，脉冲重复间隔时间 (repetition time)TR 为 2000ms，所用线圈为头线圈。

磁共振检测目标物的原理是通过抗体与药物修饰磁性纳米粒子免疫聚合物的形成引起水质子 T_2 值的大小，达到检测目标物目的。水中加入的庆大霉素越多则聚合物形成的越少， T_2 值则越大。通过建立的 $T_2 \sim C$ /庆大霉素浓度标准曲线可对比求出样品中庆大霉素的浓度。标准曲线见附图 3。

实施例 4 实际样品测定

实际样品处理：取猪肉组织样品 1g，于 50mL 离心管中，10mL、0.2M 的 PB(磷酸缓冲液)与组织样品混合，混合液在 60℃ 孵育 30min，然后 4000r/min 离心 15min，取上清液待测。

20 μ L、150 μ g/mL 的庆大霉素修饰的 Fe₃O₄ 中加入 20 μ L 待测上清液，加入 1 μ L 庆大霉素抗体 (5mg/mL)，再加入 1 μ L 羊抗兔二抗，孵育 2 小时后，稀释到体积为 250 μ L，加入到微孔板中，用德国西门子临床磁共振成像设备 (MAGNETOM Avanto 1.5T MRI) 测磁共振，回波时间(echo time)TE 为 20-120ms，脉冲重复间隔时间 (repetition time) TR 为 2000ms，所测为水中氢质子的 T₂，故选 TR 为 2000ms 比较合适，所用线圈为头线圈，以 T₂~C/庆大霉素浓度标准曲线对照，求出样品中庆大霉素的浓度。

表 1 实际样品添加回收

样品	添加浓度 (ng g ⁻¹)	检测浓度 (ng g ⁻¹)	回收率 (%) Mean \pm SD
猪肉 组织	1	1.06 \pm 0.14	112.62 \pm 1.4
	10	10.03 \pm 0.17	80.51 \pm 2.3
	50	49.88 \pm 0.36	100.0 \pm 1.4

标准曲线的绘制，以标准品浓度为横坐标，以 ΔT_2 纵坐标，数据见下表，作图，见附图 3。

表 2 磁共振数据

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
庆大霉素浓度 ng/ml	144	120	100	72	48	32	16	12	8
ΔT_2	47.5	39.8	34.4	21.9	15.1	7.8	3.5	2.1	1

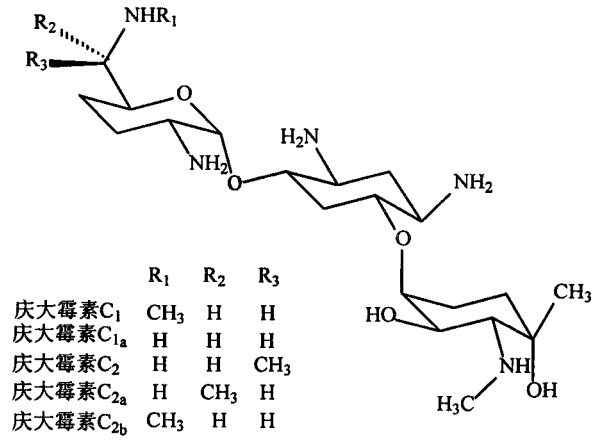


图 1

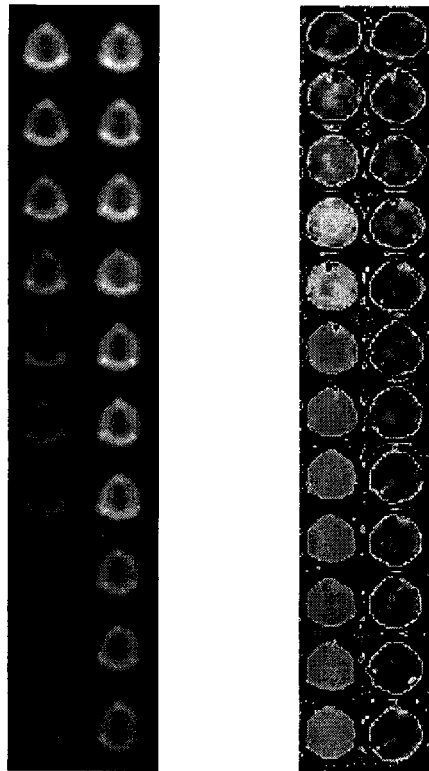


图 2

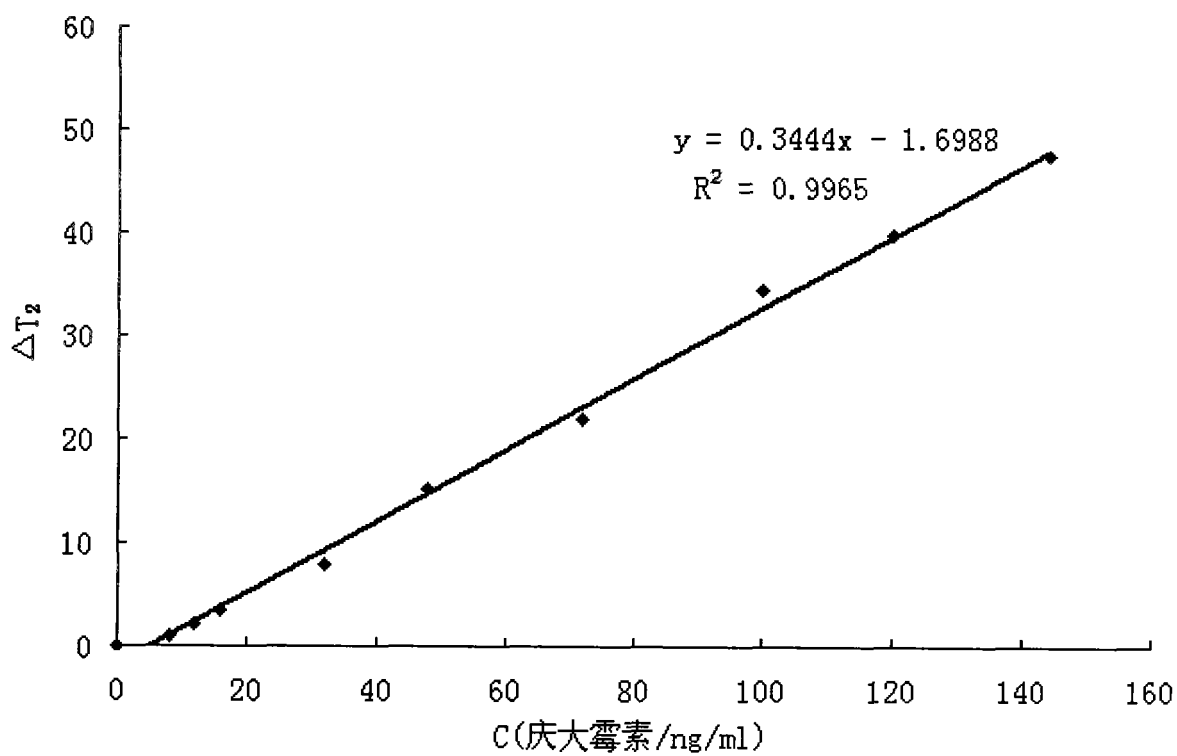


图 3

专利名称(译)	一种临床磁共振成像检测庆大霉素的方法		
公开(公告)号	CN101566592A	公开(公告)日	2009-10-28
申请号	CN200910027067.3	申请日	2009-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	胥传来 马伟 陈伟 徐丽广 李灼坤 彭池方		
发明人	胥传来 马伟 陈伟 徐丽广 李灼坤 彭池方		
IPC分类号	G01N24/08 G01N33/551 G01N33/536		
CPC分类号	Y02A90/344		
其他公开文献	CN101566592B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种临床磁共振成像检测庆大霉素的方法，属于免疫检测技术领域。本发明将庆大霉素修饰磁性纳米粒子，庆大霉素标准或待测上清液，庆大霉素抗体，羊抗兔二抗，抗体与庆大霉素修饰磁性纳米粒子免疫聚合物的形成，由此产生磁共振信号，进行磁共振检测。磁共振信号检测是利用抗体与庆大霉素修饰磁性纳米粒子形成免疫聚合物，有效的缩短水中质子横向弛豫时间T2值而产生信号。通常样品中庆大霉素浓度越大，被抗体捕获的庆大霉素量越多，则与磁性纳米粒子表面的庆大霉素结合的抗体越少，测得的T2数值越大。本法不需复杂的样品前处理；操作简便，只需加待测样品孵育后直接测定T2值，一步就可完成；用于标记超顺磁性纳米粒子的粒径约为10nm，水溶性高，分散性稳定性好。

