



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110244041 A

(43)申请公布日 2019.09.17

(21)申请号 201910559911.0

(22)申请日 2019.06.26

(71)申请人 吉林大学

地址 130012 吉林省长春市前进大街2699
号吉林大学生命科学楼250

(72)发明人 施维 刘杨 黄宜兵

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 瞿晓晶

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图8页

(54)发明名称

一种检测蛋白的试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明提供一种检测蛋白的试剂盒及其应用,涉及生物化学检测技术领域,本发明所述试剂盒包括:1)羊抗兔IgG与PAMAM的偶联物;2)羊抗鼠IgG与量子点的偶联物;3)待测蛋白的鼠抗A和兔抗B;所述鼠抗A与兔抗B需满足检测同一抗原,且没有交叉反应。本发明所述试剂盒适用范围广且可以灵活组合,能够检测大部分蛋白,包括细胞因子,分泌型蛋白,胞内蛋白以及细胞表面蛋白。



1. 一种检测蛋白的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

- 1) 羊抗兔 IgG 与 PAMAM 的偶联物;
- 2) 羊抗鼠 IgG 与量子点的偶联物;
- 3) 待测蛋白的鼠抗 A 和 兔抗 B;

所述鼠抗 A 与 兔抗 B 需满足检测同一抗原,且没有交叉反应。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述待测蛋白包括细胞因子、胞内蛋白、细胞表面蛋白和分泌型蛋白。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述羊抗鼠 IgG 与量子点的偶联物的制备方法,包括以下步骤:

S1、将量子点溶解于活化液中,再依次加入 Sulfo-NHS 和 EDC 溶液,活化 3~8min, 离心弃去上清, 将得到的沉淀用活化液溶解, 得到活化量子点溶液;

所述活化液为含质量浓度 0.01% 吐温 20 的 pH 值为 7.4 的 5mM BS 缓冲液;

S2、将羊抗鼠 IgG 与步骤 S1 得到的活化量子点溶液混合, 4℃ 下避光反应 10~16h, 再加入质量浓度 8~15% 的 BSA, 37℃ 下反应 20~40min, 补加洗液, 离心去上清, 沉淀以洗液溶解, 再次离心去上清, 将沉淀于保存液中溶解, 低速离心, 收集上清, 得到羊抗鼠 IgG 与量子点的偶联物;

所述洗液为含质量浓度 0.01% 吐温 20 的 5mM pH 8.0 的 BS 缓冲液;

所述保存液为含质量浓度 10% 的 BSA 的洗液。

4. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于,所述量子点包括浓度为 5mg/mL 的 CdSe/ZnS 核壳型羧基水溶性量子点; 所述量子点溶解于 5 倍体积活化液; 所述沉淀用 3 倍体积的活化液溶解; 所述量子点与羊抗鼠 IgG 的质量比为 2.25mg:0.1mg; 所述 Sulfo-NHS 和 EDC 的摩尔比为 1:1。

5. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述羊抗兔 IgG 与 PAMAM 的偶联物的制备方法,包括以下步骤:

将 60mg PAMAM 溶解于 2~5mL DMSO 中, 搅拌至完全溶解后加入琥珀酸酐, 避光反应 3~5h, 透析, 冻干, 得到改性后的 PAMAM 冻干粉;

将改性后的 PAMAM 冻干粉用 MES 缓冲液溶解, 加入 NHS 和 EDC, 加入羊抗兔 IgG 抗体, 4℃ 低温反应 12~16h, 以 3500~5000MWCO 的 透析袋 透析, 后再用 8000MWCO 透析袋 透析, 冻干得到羊抗兔 IgG 与 PAMAM 的偶联物。

6. 根据权利要求 5 所述的试剂盒,其特征在于,所述 PAMAM 与琥珀酸酐的电荷比例在 1:(10~50); NHS 和 EDC 的摩尔比为 1:1; 所述 EDC、NHS 和羊抗兔 IgG 抗体的比例为 40umol:40umol:1ug。

7. 权利要求 1~6 任一项所述试剂盒在蛋白的流式细胞术检测中的应用。

8. 根据权利要求 7 所述的应用,其特征在于,所述流式细胞术检测包括以下步骤:

(1) 加入待测蛋白的鼠抗 A 和 兔抗 B 进行第一抗体的孵育, 得到结合第一抗体的待测蛋白;

(2) 将步骤(1)得到的结合第一抗体的待测蛋白和量子点与羊抗鼠 IgG 的偶联物和 PAMAM 与羊抗兔 IgG 的偶联物混合, 在 37℃ 避光条件下进行第二抗孵育, 洗涤;

(3) 上样于流式分析仪进行分析。

9. 权利要求1~6任一项所述试剂盒在蛋白免疫组化检测中的应用。
10. 根据权利要求9所述的应用，其特征在于，所述免疫组化检测包括以下步骤：
 - N1、将待测蛋白与鼠抗A进行第一抗体孵育；
 - N2、加入量子点与羊抗鼠 IgG的偶合物，在37℃避光条件下进行第二抗体孵育，洗涤；
 - N3、进行细胞核染色，洗涤，镜检。

一种检测蛋白的试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物化学检测技术领域,尤其涉及一种检测蛋白的试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 流式细胞术(Flow Cytometry, FCM)是一种对液流中排成单列的细胞或其它生物微粒(如微球、细菌、小型模式生物等)逐个进行快速定量分析和分选的技术。作为应用流式细胞术进行检测的技术平台,现代流式细胞仪产生于上世纪六七十年代。经过近四十年的发展和完善,今天的流式细胞仪已经十分成熟,并被广泛的运用于从基础研究到临床实践的各个方面,涵盖了细胞生物学、免疫学、血液学、肿瘤学、药理学、遗传学及临床检验等领域,在各学科中发挥着重要的作用。

[0003] 结合免疫荧光方法,流式细胞术可辨认和计数带有不同表面特异性抗原的细胞,例如用荧光素标记的免疫球蛋白鉴别T和B淋巴细胞,根据细胞表面抗原的不同,进一步分辨出不同的T和B淋巴细胞亚群,以及测定每个细胞所带抗原的数量、密度及其动力学参数等。也可用流式细胞分选技术将带有「+」和不带有「-」的某种特异抗原的细胞群体分类收集,供研究其功能特性。

[0004] 免疫组化,是应用免疫学基本原理——抗原抗体反应,即抗原与抗体特异性结合的原理,通过化学反应使标记抗体的显色剂(荧光素、酶、金属离子、同位素)显色来确定组织细胞内抗原(多肽和蛋白质),对其进行定位、定性及相对定量的研究,称为免疫组织化学技术(immunohistochemistry)或免疫细胞化学技术(immunocytochemistry)。

[0005] 在临床诊断中,蛋白分子是常见的检测指标。临床中常见的待测蛋白包括细胞因子,胞内蛋白,细胞表面蛋白,分泌型蛋白等多种形式。对于细胞表面蛋白或者胞内蛋白可以用免疫组化的方法进行检测;对于细胞因子,分泌型蛋白以及部分胞内蛋白用免疫组化方式难以检测,因此流式是较好的检测方法。但流式无法直接检测蛋白分子只能检测细胞,为克服这一问题,常规采用CBA法,即利用人工合成的微球替代细胞,在该微球表面包被待测蛋白的抗体,当待测样本含有相应待测蛋白时,人工微球上的抗体能够捕获它,再加入PE染料偶联的抗蛋白抗体,该荧光抗体就可以与蛋白,微球形成三明治夹心结构,最后在流式中进行检测。但常规方法适用范围小,并不能实现多种类型蛋白的检测。

发明内容

[0006] 本发明为了克服现有流式细胞术和免疫组化反应对分泌型蛋白无法直接检测的缺陷,提供了一种检测蛋白的试剂盒及其应用,可用于多种类型蛋白的检测,本发明所述试剂盒适用范围广且可以灵活组合,能够检测大部分细胞因子,分泌型蛋白,胞内蛋白以及细胞表面蛋白。

[0007] 本发明提供了一种检测蛋白的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0008] 1) 羊抗兔IgG与PAMAM的偶联物;

[0009] 2) 羊抗鼠IgG与量子点的偶联物;

- [0010] 3) 待测蛋白的鼠抗A和兔抗B;
- [0011] 所述鼠抗A与兔抗B需满足检测同一抗原,且没有交叉反应。
- [0012] 优选的是,所述待测蛋白包括细胞因子、胞内蛋白、细胞表面蛋白和分泌型蛋白。
- [0013] 优选的是,所述羊抗鼠 IgG与量子点的偶联物的制备方法,包括以下步骤:
- [0014] S1、将量子点溶解于活化液中,再依次加入Sulfo-NHS和EDC溶液,活化3~8min,离心弃去上清,将得到的沉淀用活化液溶解,得到活化量子点溶液;
- [0015] 所述活化液为含质量浓度0.01%吐温20的pH值为7.4的5mM BS缓冲液;
- [0016] S2、将羊抗鼠 IgG与步骤S1得到的活化量子点溶液混合,4℃下避光反应10~16h,再加入质量浓度8~15%的BSA,37℃下反应20~40min,补加洗液,离心去上清,沉淀以洗液溶解,再次离心去上清,将沉淀于保存液中溶解,低速离心,收集上清,得到羊抗鼠 IgG与量子点的偶联物;
- [0017] 所述洗液为含质量浓度0.01%吐温20的5mM pH 8.0的BS缓冲液;
- [0018] 所述保存液为含质量浓度10%的BSA的洗液。
- [0019] 优选的是,所述量子点包括浓度为5mg/mL的CdSe/ZnS核壳型羧基水溶性量子点;所述量子点溶解于5倍体积活化液;所述沉淀用3倍体积的活化液溶解;所述量子点与羊抗鼠 IgG的质量比为2.25mg:0.1mg;所述Sulfo-NHS和EDC的摩尔比为1:1。
- [0020] 优选的是,所述羊抗兔 IgG与PAMAM的偶联物的制备方法,包括以下步骤:
- [0021] 将60mg PAMAM溶解于2~5mL DMSO中,搅拌至完全溶解后加入琥珀酸酐,避光反应3~5h,透析,冻干,得到改性后的PAMAM冻干粉;
- [0022] 将改性后的PAMAM冻干粉用MES缓冲液溶解,加入NHS和EDC,加入羊抗兔 IgG抗体,4℃低温反应12~16h,以3500~5000MWCO的透析袋透析,后再用8000MWCO透析袋透析,冻干得到羊抗兔 IgG与PAMAM的偶联物。
- [0023] 优选的是,所述PAMAM与琥珀酸酐的电荷比例在1:(10~50);NHS和EDC的摩尔比为1:1;所述EDC、NHS和羊抗兔 IgG抗体的比例为40umol:40umol:1ug。
- [0024] 本发明还提供了上述技术方案所述试剂盒在蛋白的流式细胞术检测中的应用。
- [0025] 优选的是,所述流式细胞术检测包括以下步骤:
- [0026] (1) 加入待测蛋白的鼠抗A和兔抗B进行第一抗体的孵育,得到结合第一抗体的待测蛋白;
- [0027] (2) 将步骤(1)得到的结合第一抗体的待测蛋白和量子点与羊抗鼠 IgG的偶合物和PAMAM与羊抗兔 IgG的偶联物混合,在37℃避光条件下进行第二抗孵育,洗涤;
- [0028] (3) 上样于流式分析仪进行分析。
- [0029] 本发明还提供了上述技术方案所述试剂盒在蛋白免疫组化检测中的应用。
- [0030] 优选的是,所述免疫组化检测包括以下步骤:
- [0031] N1、将待测蛋白与鼠抗A进行第一抗体孵育;
- [0032] N2、加入量子点与羊抗鼠 IgG的偶合物,在37℃避光条件下进行第二抗体孵育,洗涤;
- [0033] N3、进行细胞核染色,洗涤,镜检。
- [0034] 本发明提供了一种检测蛋白的试剂盒,包括:1) 羊抗兔 IgG与PAMAM的偶联物;2) 羊抗鼠 IgG与量子点的偶联物;3) 待测蛋白的鼠抗A和兔抗B;所述鼠抗A与兔抗B需满足检测同

一抗原,且没有交叉反应。本发明所述试剂盒的羊抗兔IgG与PAMAM的偶联物和羊抗鼠IgG与量子点的偶联物组合使用时,加入跟羊抗鼠IgG与量子点的偶联物结合的鼠抗A,以及跟羊抗兔IgG与PAMAM的偶联物结合的兔抗B后,在待测蛋白存在的情况下,能够形成‘PAMAM偶联羊抗兔IgG-兔抗待测蛋白-待测蛋白-鼠抗待测蛋白-量子点偶联羊抗鼠IgG’的复合物,只要有与待测蛋白相应的兔抗B跟鼠抗A,就可以检测相应的待测蛋白,应用范围非常广。在用于免疫组化实验或者细胞表面蛋白的流式检测时,本发明试剂盒可以灵活拆分,仅需使用羊抗鼠IgG与量子点的偶联物以及鼠抗A这两部分捕获相应的蛋白,而不使用PAMAM与抗体偶联的部分。本发明所述试剂盒能够用于多种类型蛋白的检测,包括细胞因子,胞内蛋白,细胞表面蛋白,分泌型蛋白等多种形式;且本发明所述试剂盒应用范围很广,只要有相应的鼠抗A跟兔抗B就可以检测相应的待测蛋白。

附图说明

- [0035] 图1为本发明试剂盒检测蛋白形成的复合结构图;
- [0036] 图2-A为PAMAM(G5代)的电位图;
- [0037] 图2-B为cPAMAM(即改性后的PAMAM)的电位图;
- [0038] 图3为PAMAM与羊抗兔IgG的偶联体的荧光图谱;
- [0039] 图4为PAMAM与羊抗兔IgG的偶联体的ELISA抗性检测结果;
- [0040] 图5为ELISA法检测的羊抗鼠IgG与量子点偶联物的荧光观测结果;
- [0041] 图6-A为量子点的粒径图;
- [0042] 图6-B为羊抗鼠IgG与量子点的偶联物的粒径图;
- [0043] 图7为羊抗鼠IgG与量子点的偶联物的荧光图谱;
- [0044] 图8为改良BCA法检测的标准曲线;
- [0045] 图9-A为L02细胞的流式图,左图是散点图右图是单峰图;
- [0046] 图9-B为MCF-7细胞的流式图,左图是散点图右图是单峰图;
- [0047] 图10-A为自然光视野下的heLa细胞玻片;
- [0048] 图10-B为紫外光视野下的heLa细胞玻片(蓝色为细胞核,红色为 β -actin);
- [0049] 图10-C为A,B的merge图即混合视野图。

具体实施方式

- [0050] 本发明提供了一种检测蛋白的试剂盒,所述试剂盒包括:
- [0051] 1) 羊抗兔IgG与PAMAM的偶联物;
- [0052] 2) 羊抗鼠IgG与量子点的偶联物;
- [0053] 3) 待测蛋白的鼠抗A和兔抗B;
- [0054] 所述鼠抗A与兔抗B需满足检测同一抗原,且没有交叉反应。在本发明中,所述鼠抗A和兔抗B不会发生交叉连接,在待测蛋白的存在下能够形成“鼠抗A-蛋白-兔抗B”的三明治夹心结构,而不是跳过待测蛋白自连接。在本发明中,所述鼠抗A和兔抗B优选保持天然构象,满足FCM或IHC等实验要求,以便应用于流式。
- [0055] 在本发明中,所述待测蛋白包括细胞因子、胞内蛋白、细胞表面蛋白和分泌型蛋白。具体的,本发明所述试剂盒能够检测的蛋白包括Caspase3,caspase8,caspase9,hsp27,

AKT、hsp70等。本发明所述试剂盒能够高效检测细胞因子、胞内蛋白、细胞表面蛋白和分泌型蛋白，而这些蛋白在常规流式检测法中很难被直接检出。

[0056] 在本发明中，所述羊抗兔IgG与PAMAM的偶联物能够与兔抗B特异性结合，所述羊抗鼠IgG与量子点的偶联物能够与鼠抗A特异性结合，两者共同捕获待测蛋白，形成“PAMAM-羊抗兔IgG-兔抗B-待测蛋白-鼠抗A-羊抗鼠IgG-量子点”的复合物，如图1所示。量子点在本发明的作用为发光剂，本领域已知的量子点均可实现本发明的方案，例如本发明具体实施方案采用的CdSe/ZnS壳核型羧基水溶性量子点。PAMAM的作用类似于‘人工细胞’，以便使组合在流式中检出。本发明所述“羊抗鼠IgG与量子点的偶联物”也可单独用于免疫组化反应中。

[0057] 在本发明中，所述羊抗鼠IgG与量子点的偶联物的制备方法，包括以下步骤：

[0058] S1、将量子点溶解于活化液中，再依次加入Sulfo-NHS和EDC溶液，活化3~8min，离心弃去上清，将得到的沉淀用活化液溶解，得到活化量子点溶液；

[0059] 所述活化液为含质量浓度0.01%吐温20的pH值为7.4的5mM BS缓冲液；

[0060] S2、将羊抗鼠IgG与步骤S1得到的活化量子点溶液混合，4℃下避光反应10~16h，再加入质量浓度8~15%的BSA，37℃下反应20~40min，补加洗液，离心去上清，沉淀以洗液溶解，再次离心去上清，将沉淀于保存液中溶解，低速离心，收集上清，得到羊抗鼠IgG与量子点的偶联物；

[0061] 所述洗液为含质量浓度0.01%吐温20的5mM pH 8.0的BS缓冲液；

[0062] 所述保存液为含质量浓度10%的BSA的洗液。

[0063] 本发明将量子点溶解于活化液中，再依次加入Sulfo-NHS和EDC溶液，活化3~8min，离心弃去上清，将得到的沉淀用活化液溶解，得到活化量子点溶液；所述活化液为含质量浓度0.01%吐温20的pH值为7.4的5mM的BS缓冲液。在本发明中，所述活化液作为缓冲液，能够为Sulfo-NHS和EDC的活化提供反应环境，也具有洗涤的作用。在本发明中，所述量子点与活化液优选的按照0.5~0.6:2~3的体积比混合，更优选为0.45:2.25。在本发明中，所述活化时优选的进行超声搅拌。在本发明中，超声的时间优选为5min。在本发明中，超声反应后补加部分活化液，优选的按照量子点初始体积与活化液40~60:8~15的体积比，向超声后的体系添加活化液。在本发明中，所述离心的转速优选为10000~15000rpm，更优选为12000rpm。在本发明中，所述离心的时间优选为1~4min，更优选为2min。在本发明中，所述Sulfo-NHS和EDC加入的间隔时间优选的不少于3min。在本发明中，所述Sulfo-NHS与量子点的体积比优选为40~60:10~25，更优选为45:15。在本发明中，所述EDC与量子点的体积比优选为40~60:10~25，更优选为45:15。在本发明中，所述Sulfo-NHS用来活化氨基，EDC用来活化羧基。本发明对所述量子点的类型没有特殊限定，采用本领域技术人员熟知的常规市售量子点均可。本发明优选使用CdSe/ZnS核壳型羧基水溶性量子点，EDC能够对量子点起到活化作用，使得量子点表面的羧基被活化从而与氨基被活化的抗体发生偶联。

[0064] 得到活化量子点溶液后，本发明将羊抗鼠IgG与活化量子点溶液混合，4℃下避光反应10~16h，再加入质量浓度8~15%的BSA，37℃下反应20~40min，补加洗液，离心去上清，沉淀以洗液溶解，再次离心去上清，将沉淀于保存液中溶解，低速离心，收集上清，得到羊抗鼠IgG与量子点的偶联物；所述洗液为含质量浓度0.01%吐温20的5mM pH 8.0的BS缓冲液；所述保存液为含质量浓度10%的BSA的洗液。在本发明中，所述保存液能起到长久保存的作用。在本发明中，所述羊抗鼠IgG与量子点溶液的质量体积之比优选为60~150μg：

400~600 μ L, 将羊抗鼠 IgG 与所述量子点溶液混合; 所述质量与体积之比更优选为 100 μ g: 450 μ L。在本发明中, 所述避光反应的时间优选为 12~14h。在本发明中, 所述避光反应时优选的伴随振荡且温度控制在 4℃, 以保持抗体的活性。在本发明中, 避光反应后, 优选加入质量浓度 10% 的 BSA。本发明添加 BSA 的目的是螯合掉未偶联抗体的量子点。在本发明中, 加入 BSA 孵育的时间优选为 30min。在本发明中, 所述离心的转速优选为 10000~15000rpm, 更优选为 12000rpm。在本发明中, 所述离心的时间优选为 1~4min, 更优选为 2min。本发明得到羊抗鼠 IgG 与量子点的偶联物后, 优选将羊抗鼠 IgG 与量子点的偶联物于冰箱避光冷藏保存, 稳定性可保持 3 个月左右。

[0065] 为了获得浓度最高的“羊抗鼠 IgG 与量子点的偶联物”, 本发明将加入 BSA 孵育反应后所得液离心 3 次, 舍弃前两次离心的上清, 取最后一次低速离心的上清, 避光低温保存。本发明实验表明, 前两次离心得到的上清液也含有抗性, 但以第三次离心时收集的上清抗性最强, 浓度最高, 在 4℃ 下冰箱保存可保证 3 个月内均有效, 是一种更为理想的“羊抗鼠 IgG 与量子点的偶联物”制备方式。在本发明中, 量子点浓度优选为 5mg/ml, 优选为 CdSe/ZnS 核壳型羧基水溶性量子点, 本发明所述量子点与活化液第一次加入体积比优选为 1:5 (450 μ l: 2.25ml), 之后清洗步骤活化液加入量优选均为量子点体积 3 倍 (1.35ml)。IgG 加入量为 100 μ g, 即量子点与 IgG 质量比优选为 2.25mg: 0.1mg, EDC 与 NHS 遵循等摩尔比例加入, EDC: NHS = 1:1mol。

[0066] 在本发明中, 所述羊抗兔 IgG 与 PAMAM 的偶联物的制备方法, 包括以下步骤:

[0067] 将 60mg PAMAM 溶解于 2~5mLDMSO 中, 搅拌至完全溶解后加入琥珀酸酐, 避光反应 3~5h, 透析, 冻干, 得到改性后的 PAMAM 冻干粉;

[0068] 将改性后的 PAMAM 冻干粉用 MES 缓冲液溶解, 加入 NHS 和 EDC, 加入羊抗兔 IgG 抗体, 4℃ 低温反应 12~16h, 以 3500~5000MWCO 的透析袋透析, 后再用 8000MWCO 透析袋透析, 冻干得到羊抗兔 IgG 与 PAMAM 的偶联物。

[0069] 本发明将 60mg PAMAM 溶解于 2~5mLDMSO 中, 搅拌至完全溶解后加入琥珀酸酐, 避光反应 3~5h, 透析, 冻干, 得到改性后的 PAMAM 冻干粉。在本发明中, 所述改性为将 PAMAM 表面的氨基螯合掉以减少其生物毒性。在本发明中, 若采用的 PAMAM 非电中性, 则优选的预先对 PAMAM 进行校正, 以降低其细胞毒性。如本发明具体实施方式中采用 G5 代 PAMAM 且表面含有大量氨基, 本发明通过琥珀酸酐与 G5 代 PAMAM 进行螯合反应, 中和氨基带来的强正电荷, 从而防止强电性的 PAMAM 细胞毒性。在本发明中, 所述 PAMAM 与琥珀酸酐的加入比例应保证电荷比例在 1:10~1:50, 因本发明实施例中使用的 PAMAM 为 G5 代, 每摩尔含氨基 64 摩尔, 因此本发明实施例中加入 PAMAM 0.96 微摩, 加入的琥珀酸酐为 2.456 毫摩, 使体系中氨基羧基比在 1:40。

[0070] 将改性后的 PAMAM 冻干粉用 MES 缓冲液溶解, 加入 NHS 和 EDC, 加入羊抗兔 IgG 抗体, 4℃ 低温反应 12~16h, 以 3500~5000MWCO 的透析袋透析, 后再用 8000MWCO 透析袋透析, 冻干得到羊抗兔 IgG 与 PAMAM 的偶联物。在本发明中, NHS 和 EDC 优化的摩尔比为 1:1, MES 缓冲液的配方优选为 4.26g 的 MES 溶解于 200ml 水中。在本发明中, 优选的, EDC:NHS:羊抗兔 IgG 抗体 = 40umol:40umol:1ug。在本发明实施例中, 优选将改性后的 PAMAM 冻干粉 0.019g 以 4mL MES 缓冲液溶解, 之后加入 NHS 0.023g 和 EDC 0.385g。在本发明中, 所述 4℃ 下低温反应优选为避光反应。在本发明中, 所述避光反应优选的伴随振荡, 振荡的转速优选为 150~250rpm, 更优选

为180rpm。在本发明中，PAMAM在EDC、NHS存在的情况下，氨基羧基被活化与抗体自主装。在本发明中，所述透析袋在使用前优选的在含有质量体积浓度2%的碳酸氢钠、1mmol/L EDTA二钠的溶液中煮沸10min，双蒸水洗净后再使用。使用透析袋的目的是为了将分子大小低于拦阻孔径的小分子化合物去除。在本发明中，所述透析的时间优选为1~3d，更优选为2d；所述再透析的时间优选为1.5~2.5d，更优选为2d。在本发明中，所述干燥优选为真空冷冻干燥。

[0071] 在本发明中，所述试剂盒优选还包括洗涤液、稀释液、封闭液、固定液和细胞核染色液中的一种或多种。根据流式细胞术检测或免疫组化检测所需的试剂进行选择即可。

[0072] 本发明还提供了上述技术方案所述试剂盒在蛋白的流式细胞术检测中的应用。

[0073] 在本发明中，所述流式细胞术检测包括以下步骤：

[0074] (1)加入待测蛋白的鼠抗A和兔抗B进行第一抗体的孵育，得到结合第一抗体的待测蛋白；

[0075] (2)将步骤(1)得到的结合第一抗体的待测蛋白和量子点与羊抗鼠IgG的偶合物和PAMAM与羊抗兔IgG的偶联物混合，在37℃避光条件下进行第二抗孵育，洗涤；

[0076] (3)上样于流式分析仪进行分析。

[0077] 对待测蛋白的预处理，优选包括以下步骤：

[0078] 对于分泌型蛋白需要收集细胞培养基上清，进行离心过滤等处理。

[0079] 对于胞内蛋白以及细胞表面蛋白，则需要进行细胞裂解获得。具体方法是：1) 将10cm皿培养的细胞去培养基，以冷的PBS 2ml冲洗细胞表面，去洗液，加入适量胰酶溶液消化适当时间，然后将细胞冲洗下来，2000转离心3分钟去上清

[0080] 2) 以1ml PBS缓冲液溶解细胞沉淀，计数细胞密度

[0081] 3) 根据细胞密度在上述细胞PBS溶液中加入适量T-PER组织蛋白提取试剂于冰上裂解、提取蛋白30min，每10分钟混匀一次。

[0082] 4) 将上述裂解后溶液14000rpm离心10min，收集上清。上清即为所得蛋白混合物。

[0083] 本发明还提供了上述技术方案所述试剂盒在蛋白免疫组化检测中的应用。

[0084] 在本发明中，所述免疫组化检测包括以下步骤：

[0085] N1、将待测蛋白与鼠抗A进行第一抗体孵育；

[0086] N2、加入量子点与羊抗鼠IgG的偶合物，在37℃避光条件下进行第二抗体孵育，洗涤；

[0087] N3、进行细胞核染色，洗涤，镜检。

[0088] 对待测蛋白的预处理，优选为：对细胞进行固定和封闭。在本发明中，细胞的固定优选为：胞内蛋白需要进行甲醇透膜过程，细胞表面蛋白则直接固定即可。封闭优选为用10%BSA孵育封闭细胞1小时。具体地，所述固定和封闭的过程优选包括以下步骤：在10cm的细胞培养皿中加入一个玻片，让细胞爬片(玻片提前以乙醇反复擦拭并紫外照射4h风干)；将细胞玻片取出放入空皿中，加入100~200ul的95%乙醇+5%冰醋酸，室温孵育5min固定细胞，后以PBS洗三次；以1%BSA, 22.52mg/ml甘氨酸的PBST (0.1%Tween20) 孵育细胞30min；之后以含1%BSA的PBST稀释抗体至合适浓度，孵育细胞。

[0089] 在本发明中，所述染色优选为加入细胞核染色剂染色，在本发明中，所述细胞核染色剂优选包括DAPI、Hoechst33342或吖啶橙。

[0090] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0091] 本发明下述的实施例中,均采用下述来源的材料:

[0092] PAMAM:晨源分子品牌G5(氨基型),货号CYD-150A;

[0093] 羊抗兔IgG:abcam品牌,货号ab6702;

[0094] 量子点:CdSe/ZnS核壳型羧基水溶性量子点,量点科技,011406-1;

[0095] 羊抗鼠IgG:bioss品牌,货号bs0296G;

[0096] 电位检测:英国马尔文公司NANO ZS90纳米粒度和ZETA电位仪;

[0097] 荧光检测:RF-5301PC型荧光分光光度计;

[0098] 实施例1

[0099] 1、PAMAM与羊抗兔IgG的偶联:

[0100] (1) 耦合PAMAM G5的氨基末端的强正电荷

[0101] 将60mg PAMAM溶解于2ml的DMSO中,室温搅拌至溶解,加入0.246g的琥珀酸酐,摇床180转4h,全程避光操作,得到PAMAM改性后溶液。

[0102] (2) 准备3500MWCO的透析袋,以1L浓度为2%的碳酸氢钠,1mmol/LEDTA.Na₂溶液煮沸10分钟,后以双蒸水滤洗干净。

[0103] (3) 将上述PAMAM改性后溶液转移至3500MWCO透析袋中,透析24h,后将透析液冻干,称重(为0.057g),将冻干产物记为cPAMAM。

[0104] (4) 配置MES缓冲液,取4.26gMES溶于200ml水中;

[0105] 配置NHS的MES溶液,取0.023gNHS溶于4ml的MES缓冲液中;

[0106] 配置EDC的MES溶液,取0.385gEDC溶于4ml的MES缓冲液中;

[0107] 在2ml MES缓冲液中各加入100ul上述NHS和EDC的MES溶液,再加入35.7μL的IgG,反应15分钟后加入cPAMAM 0.019g,4℃摇床过夜,反应16h,得到cPAMAM与IgG的偶联产物。

[0108] (5) 产物透析冻干:

[0109] 将上述偶联产物转移至3500MWCO的透析袋中,透析2天,后转移至8000MWCO透析袋中再透析2天,将再透析液冻干,得到PAMAM与羊抗兔IgG的偶联体。

[0110] A、电位变化

[0111] 分别取PAMAM和制备得到的cPAMAM各1ml加入到粒径电位杯中,用电位仪检测,判读,结果如图2-A和图2-B所示。

[0112] 图2-A为PAMAM的电位图,电位为-3.02mV;图2-B为cPAMAM的电位图,经过琥珀酸酐耦合后的cPAMAM的电位为-0.465mV。可以看出耦合后得到的cPAMAM耦合成功,细胞毒性降低,可用于与羊抗鼠IgG抗体的连接。G5代PAMAM表面修饰有大量的氨基,其强大的正电荷会导致较高的细胞毒性,影响后续试验且易导致抗体活性下降乃至失活。

[0113] B、荧光检测

[0114] 分别取改性后的cPAMAM、cPAMAM偶联羊抗兔IgG以及羊抗兔IgG,以PBS缓冲液溶解,各取1ml,加入到比色皿中,用RF-5301PC型荧光分光光度计检测,判读,结果如图3所示。

[0115] 图3为548nm发射光下的荧光图谱,图上3条曲线,从上到下分别是羊抗兔IgG、cPAMAM、cPAMAM与羊抗兔IgG的偶联体。由图3可以看出,将cPAMAM与羊抗鼠IgG偶联后,荧光位置没有明显偏移,但是荧光强度降低。

[0116] C、ELISA测抗性

[0117] S1、将合成的PAMAM与羊抗兔IgG的偶联体分别以2mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.125mg/ml和0.0625mg/ml的浓度,以100ul铺在ELISA板中,每孔2个对照,同时在下排加入10%BSA,100ul铺板,2个对照。密封平板,4℃过夜孵育

[0118] S2、以PBS缓冲液200ul/孔洗板,每次3分钟,洗3次后将板子于吸水纸上拍干

[0119] S3、将兔IgG-HRP,稀释至10ug/ml,100ul/孔加入到上述14个孔中;

[0120] S4、配置TMB显色液,配置方法A、B液1:1混合后避光混匀,然后将100ulTMB显色液加入上述14个孔中,37℃孵育30分钟

[0121] S5、加入2M的硫酸50ul于每孔,终止反应。于450nm测荧光强度,结果如图4所示,PAMAM偶联的羊抗兔IgG仍含有羊抗兔IgG的抗性,即PAMAM与羊抗兔IgG抗体的偶联并没有造成抗体抗性的缺失,其仍能捕获兔IgG-HRP完成ELISA反应。

[0122] 2、量子点与羊抗鼠IgG的偶联:

[0123] 反应试剂的配置

[0124] ①50mM硼砂:1.907g硼砂+100ml水

[0125] ②200mM硼酸:1.237g硼酸+100ml水

[0126] ③PH8.0BS溶液:3ml①+7ml②

[0127] ④PH7.4BS溶液:1ml①+9ml②

[0128] ⑤洗液:③稀释40倍+0.01%Tween20

[0129] ⑥活化液:④稀释40倍+0.01%Tween20

[0130] ⑦EDC反应液:⑥5ml+0.27gEDC

[0131] ⑧Sulfo.NHS反应液:⑥5ml+0.378gSulfo.NHS

[0132] 1) 450μL量子点溶解于活化液⑥2.25ml,加入⑧150μL混匀,3分钟后加入⑦150μL,之后超声5min混匀;

[0133] 2) 补加⑥1.5ml,12000rpm离心5min,去上清,以⑤1.2ml溶解沉淀,超声混匀;

[0134] 3) 加入抗体100ug,4℃摇床过夜,全程避光。之后取出超声30s混匀后,加入10%BSA 150μL,37℃反应30min。

[0135] 4) 补加100μL⑤,混匀,12000rpm离心2min,收集上清装入(1)号管中;

[0136] 5) 在步骤4)得到的沉淀中补加1ml⑤,混匀,12000rpm离心2min,收集上清于(2)号管中;

[0137] 6) 在步骤5)得到的沉淀中补加1ml⑤以及10%BSA,超声1h,820g/min离心2分钟,去沉淀,上清收集于(3)管中;

[0138] 按照上述方法对收集的(1)、(2)、(3)号管的上清进行标记,并进行ELISA检测:

[0139] A、PVDF膜以甲醇激活10秒后自然风干,以铅笔标记正面并在上面划分5个区分别标记1-5,鼠源AKT抗体200ug/ml的浓度,取1ul的抗体点在标记的前4区,在5号区以10%BSA 1ul画点。保持PVDF膜平放,4℃过夜孵育。

[0140] 2) 用10%BSA3ml,将整张PVDF膜浸泡2h封闭整张膜,后以PBS缓冲液冲洗膜条2次,每次3分钟。

[0141] 3) 将上述(1)、(2)、(3)号管的上清各50ul加入到1、2、3区,4区加入纯QD作为对照,1,5区加入(3)号管上清液做为对照2.37℃孵育1h,后以PBS洗2次,每次3分钟

[0142] 4) 将上述PVDF膜于紫外灯下照射观察荧光情况。ELISA法检测的羊抗鼠 IgG与量子点偶联物的荧光观测结果如图5所示,由图5可知,1、2、3区均有信号,表明(1)、(2)、(3)号管的上清均有抗性;但是(3)号管最强,(1)号管次之,(2)号管最弱。产物于4℃冰箱保存,可保证3个月内均有较理想的抗性。

[0143] 4区为对照1(鼠抗AKT+QD)因为没有羊抗鼠 IgG的加入,所以经洗涤后几乎不会残留有抗体加入的印记。

[0144] 5区为对照2(BSA+羊抗鼠 IgG&QD)因为BSA与羊抗鼠 IgG&QD不会偶联,所以在清洗2次后,只会留弱光不会像1~3区一样出现范围内的亮度,结果如图5所示。

[0145] A、粒径电位

[0146] 分别取500倍稀释的量子点和制备得到的“羊抗鼠 IgG与量子点的偶联物”各取1ml加入到粒径电位杯中,用电位仪检测,判读,结果如图6-A和图6-B所示。

[0147] 图6-A为500倍稀释的量子点的粒径图,粒径大小79.17;图6-B为羊抗鼠 IgG与量子点的偶联物的粒径图,粒径大小为36.49和268.3,不均一。出现双峰可能是没能完全偶联所致,但268.3的粒径产物证明偶联成功,粒径大小的不均一并不影响所述偶联物的使用效果。

[0148] B、荧光检测

[0149] 分别取500倍稀释的量子点、制备得到的“羊抗鼠 IgG与量子点的偶联物”以及保存液(pH8.0,2.5mM BS,0.1%BSA)各取1ml,加入到比色皿中,用RF-5301PC型荧光分光光度计检测,判读,结果如图7所示。

[0150] 以360nm激发光进行515~628nm荧光强度的扫描,图中三条曲线从上到下分别是羊抗鼠 IgG与量子点的偶联物的峰图,保存液峰图,纯量子点峰图,

[0151] C、BCA法测蛋白浓度

[0152] 因合成的量子点偶联抗体带有量子点,不能完全套用BCA测蛋白法,因此在原BCA法上做了一些改动,具体改动方法则是设置多个对照组,对照1:稀释液孔作为阴性孔,对照2:量子点用稀释液稀释10倍,对照3,0.25mg/ml的BCA蛋白,将稀释液替换为10倍稀释的量子点,待测样本4号孔为稀释了10倍的量子点偶联IgG,最后带入BCA标准曲线测出偶联产物浓度为1.45mg/ml。

[0153] 实施例2

[0154] 用于检测细胞因子Hsp27的试剂盒

[0155] 说明:以MCF-7乳腺癌细胞作为阳性细胞(对应的结果如图9-A,图9-A为L02细胞的流式图,左图是散点图右图是单峰图)。

[0156] 以L02人正常肝细胞作为阴性细胞(对应的结果如图9-B,图9-B为MCF-7细胞的流式图,左图是散点图右图是单峰图)。

[0157] 以Hsp27的鼠抗跟兔抗作为一抗捕获抗原Hsp27。

[0158] 加入PAMAM偶联羊抗兔IgG,37℃孵育30分钟,将孵育的产物一分为二;

[0159] 将上述二等分的产物中,取一份加入量子点偶联羊抗鼠 IgG,37℃孵育30分钟,另一份不作处理,在流式中它作为阴性对照,而加入量子点偶联羊抗鼠 IgG的为待测样本。

[0160] 由图9-A和图9-B可以看到,阴性L02细胞,没有曲线的偏移,但是MCF-7乳腺癌细胞偏移明显,可以证明MCF-7细胞中Hsp27蛋白含量超过L02细胞,与其在肿瘤细胞中分泌增多

的特性是吻合的。因此该组合可用于肿瘤细胞特异蛋白的检测。

[0161] 实施例3

[0162] 用于检测胞内蛋白 β -actin

[0163] 说明：本实验是免疫组化实验，只应用量子点偶联羊抗鼠 IgG这一部分。

[0164] 在培养中的hela细胞皿中加入一个玻片进行细胞爬片(玻片提前以乙醇反复擦拭并紫外照射4h风干)。

[0165] 将玻片取出放入空皿中，加入100~200ul的95%乙醇+5%冰醋酸，室温孵育5min固定细胞，后以PBS洗三次。

[0166] 以1%BSA,22.52mg/ml甘氨酸的PBST (0.1%Tween20) 孵育细胞30min

[0167] 将abcam品牌mouse anti β -actin抗体(ab6276)用1%BSA的PBST溶液稀释至5ug/ml的浓度，于湿皿中室温孵育1h或4℃过夜，之后倒出孵育液，以PBS洗三次，每次加洗液后于摇床上110转5分钟清洗。

[0168] 将量子点偶联羊抗鼠 IgG以1%BSA的PBST溶液稀释至10ug/ml的浓度，于37℃避光孵育1h，后倒出二抗孵育液，以PBS洗三次，每次加洗液后于摇床上110转5分钟。

[0169] 复染：用1ug/ml的DAPI孵育玻片5分钟，以PBS漂洗细胞2次。

[0170] 以指甲油封闭盖玻片，在显微镜下用紫外光观察玻片。结果如图10所示，其中，图10-A为自然光视野下观察到的hela细胞，图10-B为紫外光照射下观察到的hela细胞，图10-C为A,B两个图的merge，即视野叠加图。以HeLa细胞作为研究对象，以乙醇固定后用鼠抗 β -actin抗体孵育细胞，后用合成的羊抗鼠 IgG-量子点进行孵育，于荧光显微镜下观察 β -actin(即细胞骨架蛋白，见图红色部分)从图中可以看到，仅需在紫外视野下就可以让DAPI染色的细胞核跟量子点偶联物发出的荧光同时发光，克服了其他染料探针需要切换视野观察细胞核跟待测蛋白的缺点。其中红色即为所检测的 β -actin(细胞骨架蛋白)红色圆圈里是较明显的视野，可以看到待测蛋白就在细胞内部围绕着细胞核分布。

[0171] 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。



图1

	Mean (mV):	Area (%)	Width (mV):
Zeta Potential (mV):	-3.02	100.0	3.39
Zeta SD (mV):	3.39	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm):	0.0858	0.0	0.00
Zeta potential out of range	Conductivity is out of range - check cell or sample		

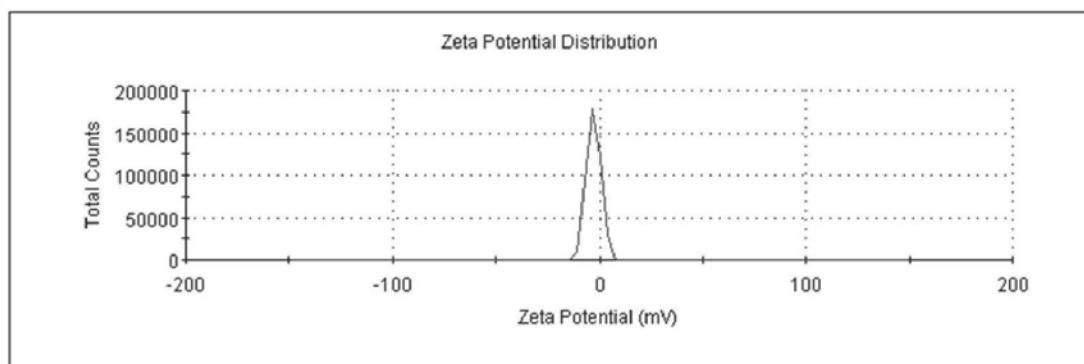


图2-A

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV):	-0.465	Peak 1: -0.465	100.0 3.77
Zeta Deviation (mV):	3.77	Peak 2: 0.00	0.0 0.00
Conductivity (mS/cm):	0.253	Peak 3: 0.00	0.0 0.00

Result quality : See result quality report

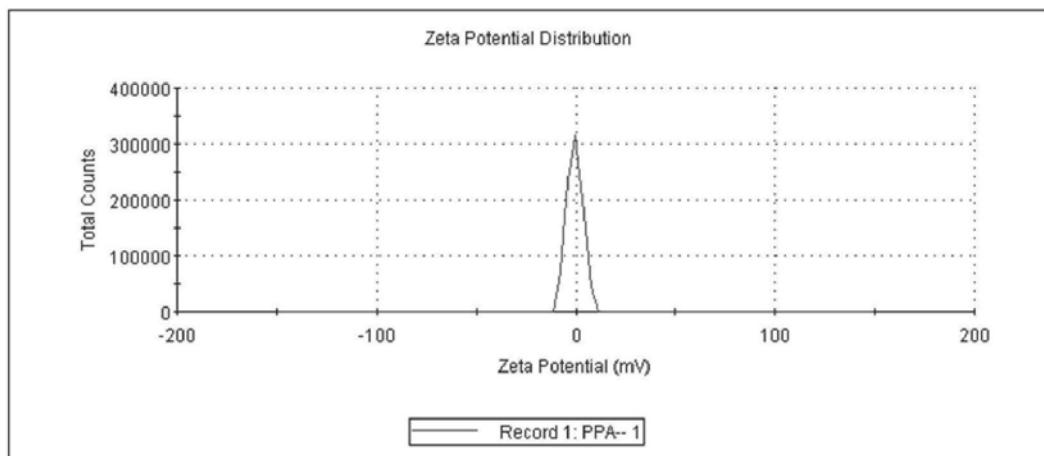


图2-B

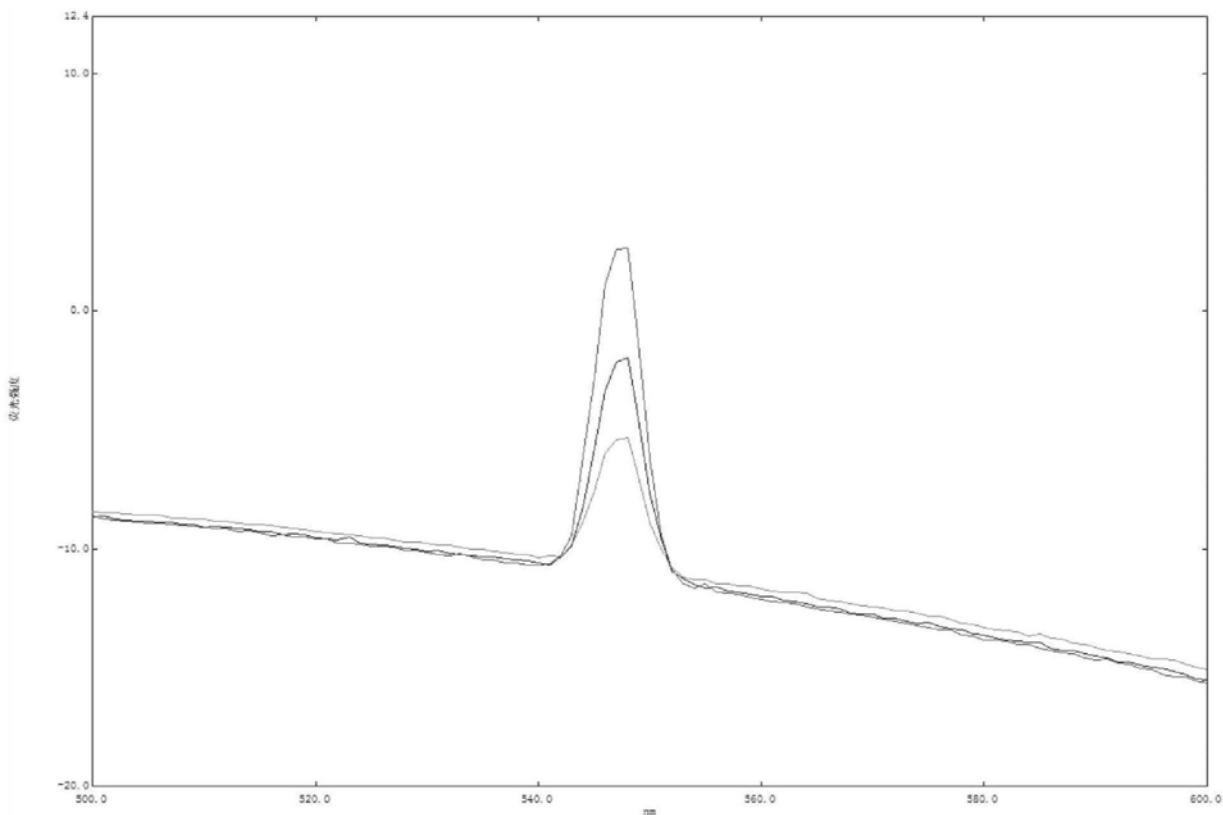


图3

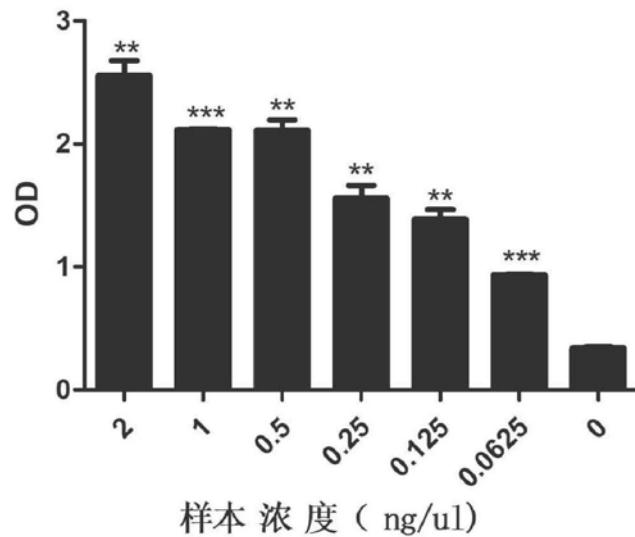


图4

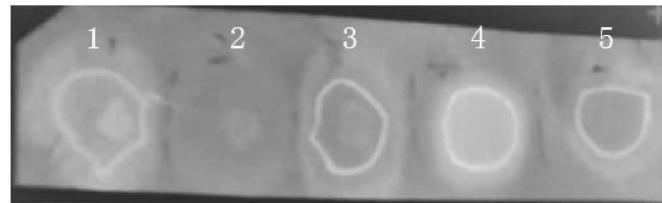
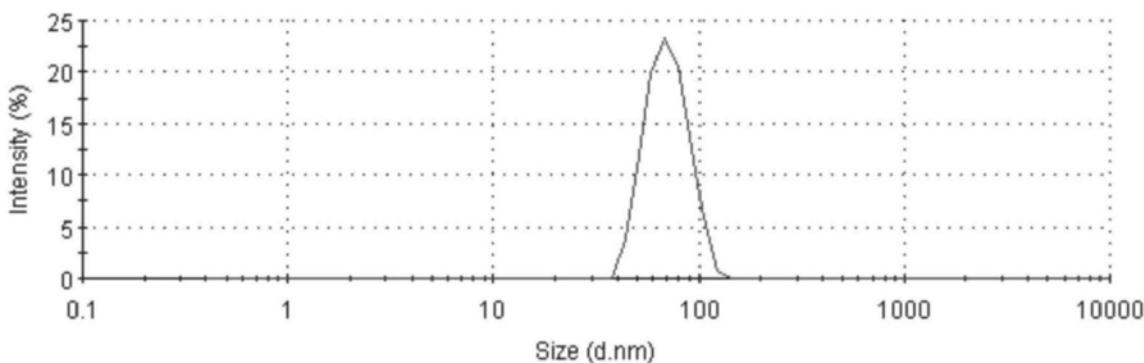


图5

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm):	64.87	Peak 1:	71.21
Pdl:	0.158	Peak 2:	0.000
Intercept:	0.848	Peak 3:	0.000

Result quality : Refer to quality report

Size Distribution by Intensity



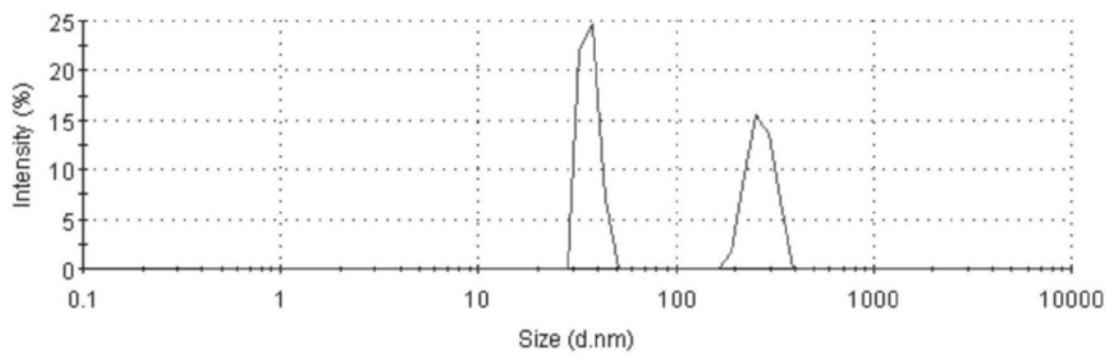
Record 3: 23-2 guomo0.45 1

图6-A

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm):	0.6197	Peak 1:	36.49
Pdl:	1.000	Peak 2:	268.3
Intercept:	0.652	Peak 3:	0.000

Result quality : Refer to quality report

Size Distribution by Intensity



Record 2: 23-2 guomo0.45 1

图6-B

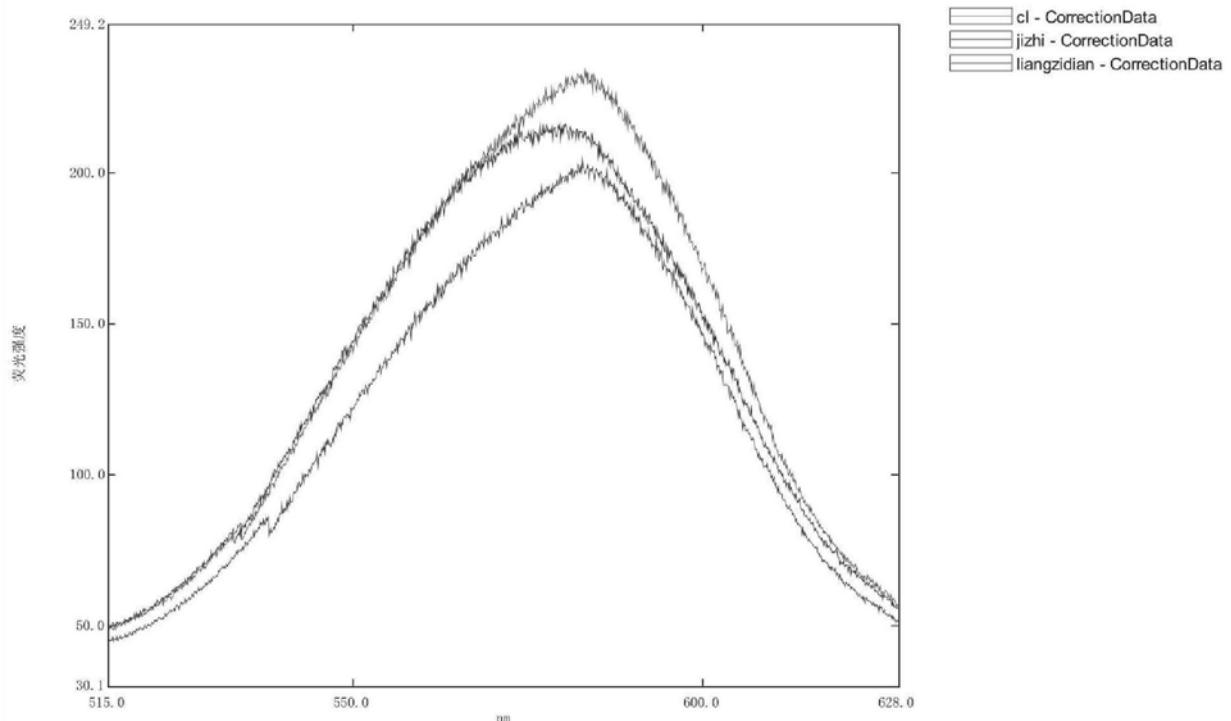


图7

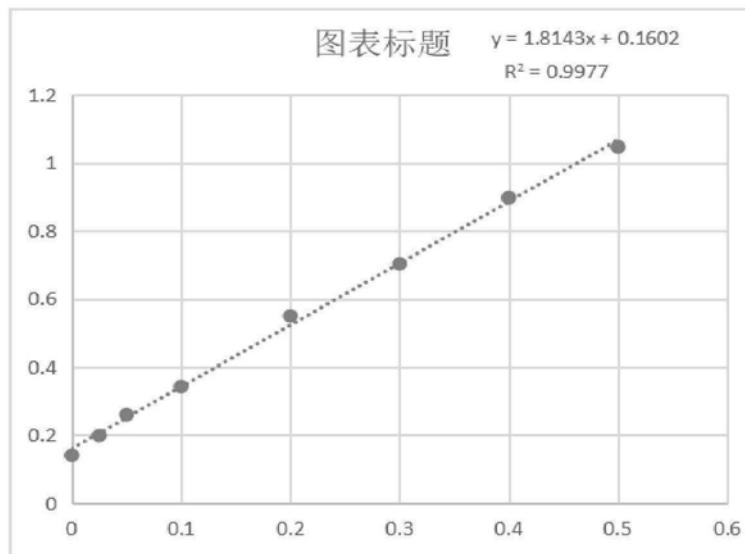


图8

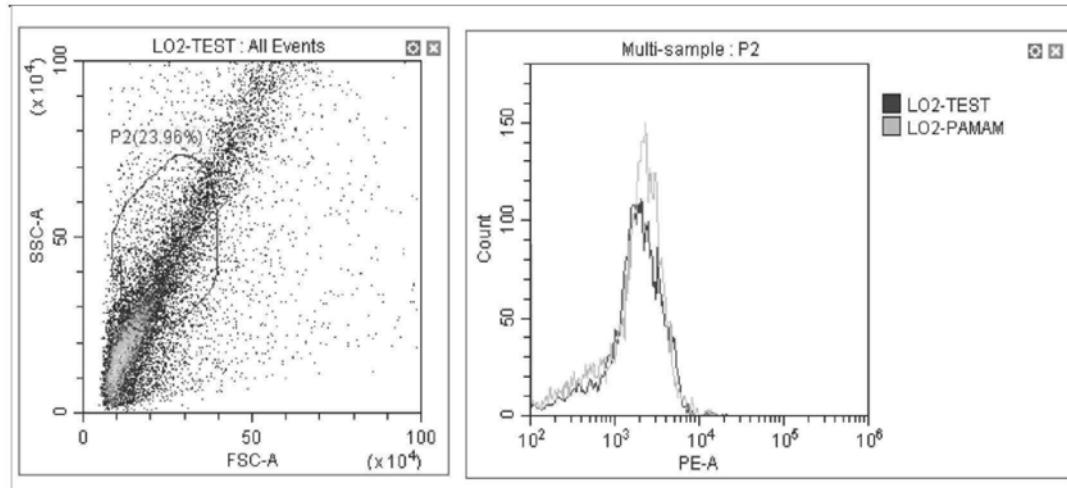


图9-A

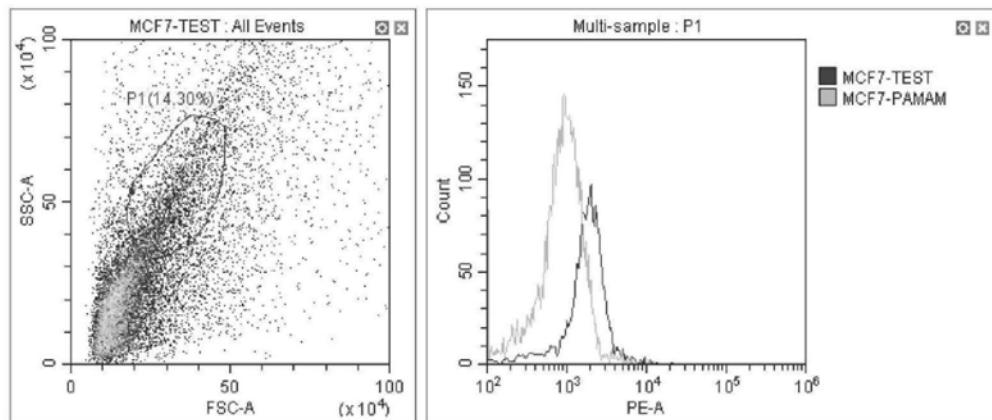


图9-B

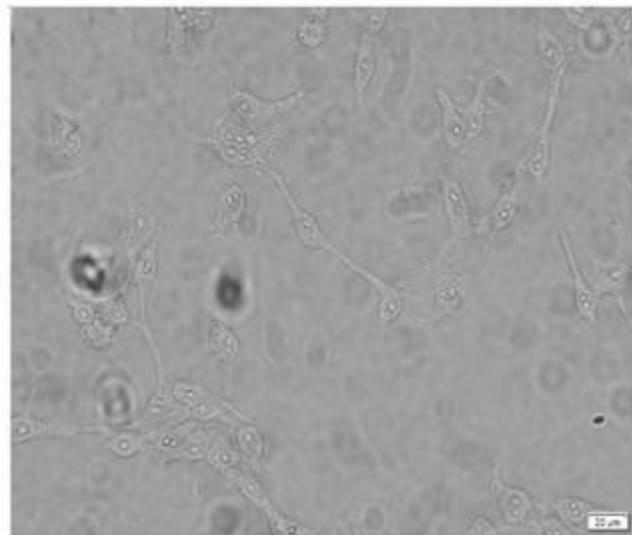


图10-A

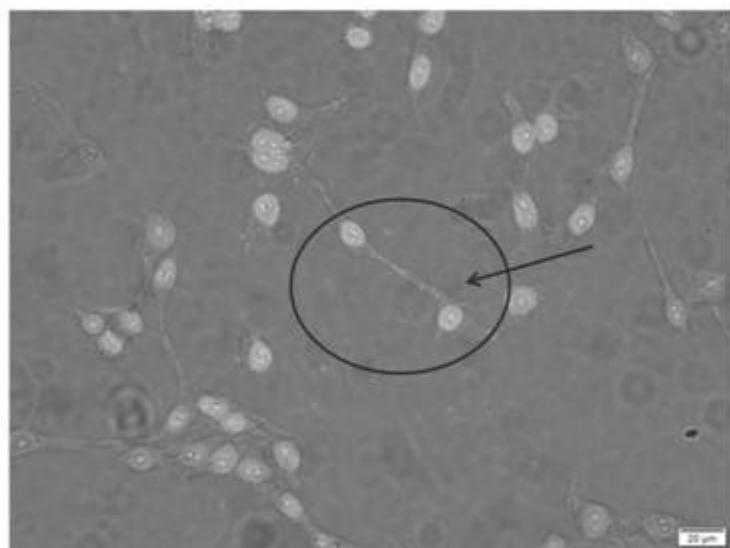


图10-B

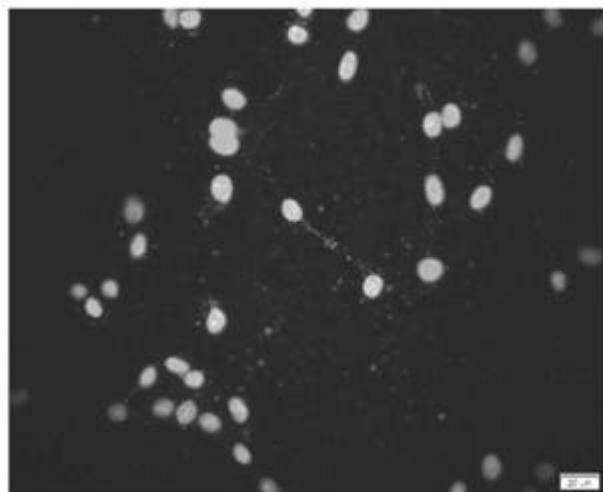


图10-C

专利名称(译)	一种检测蛋白的试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN110244041A	公开(公告)日	2019-09-17
申请号	CN201910559911.0	申请日	2019-06-26
[标]申请(专利权)人(译)	吉林大学		
申请(专利权)人(译)	吉林大学		
当前申请(专利权)人(译)	吉林大学		
[标]发明人	施维 刘杨 黄宜兵		
发明人	施维 刘杨 黄宜兵		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/535 G01N33/54313 G01N33/68 G01N33/6863		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明提供一种检测蛋白的试剂盒及其应用，涉及生物化学检测技术领域，本发明所述试剂盒包括：1)羊抗兔IgG与PAMAM的偶联物；2)羊抗鼠IgG与量子点的偶联物；3)待测蛋白的鼠抗A和兔抗B；所述鼠抗A与兔抗B需满足检测同一抗原，且没有交叉反应。本发明所述试剂盒适用范围广且可以灵活组合，能够检测大部分蛋白，包括细胞因子，分泌型蛋白，胞内蛋白以及细胞表面蛋白。

