



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110221059 A

(43)申请公布日 2019.09.10

(21)申请号 201910649147.6

(22)申请日 2019.07.18

(71)申请人 大连理工大学

地址 116024 辽宁省大连市高新园区凌工
路2号

(72)发明人 何炜 刘文豪 程昉 祝传磊

(74)专利代理机构 大连东方专利代理有限责任
公司 21212

代理人 房艳萍 李馨

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

一种调控硅纳米材料表面HCG抗体取向的方法

(57)摘要

本发明公开了一种调控硅纳米材料表面HCG抗体取向的方法。具体通过硅烷偶联剂、酸酐类试剂使硅纳米粒子的表面改性,改变硅纳米粒子的表面电性,进一步调控纳米材料表面物理吸附的HCG抗体的取向。本发明的方法抗体取向可调控,结合量可调控,反应条件温和,操作简单,成本低,可以应用于酶联免疫法中抗原抗体的检测。

1. 一种调控硅纳米材料表面HCG抗体取向的方法,其特征在于,所述的方法是通过硅烷偶联剂、酸酐类试剂对硅纳米材料进行表面改性,制备表面改性的硅纳米材料,再将HCG抗体通过物理吸附固定在经过表面改性的硅纳米材料表面。

2. 根据权利要求1所述的调控硅纳米材料表面HCG抗体取向的方法,所述的制备表面改性的硅纳米材料的方法为:在硅纳米材料的醇类溶液中,加入硅烷偶联剂,在10-50℃条件下反应1-24h,制备氨基表面改性的硅纳米材料;再将氨基表面改性的硅纳米材料溶于非质子性溶剂中,加入酸酐类试剂,在10-50℃条件下反应1-24h,制备羧基表面改性的硅纳米材料。

3. 根据权利要求1或2所述的调控硅纳米材料表面HCG抗体取向的方法,其特征在于,所述的硅烷偶联剂为氨基硅烷偶联剂选自3-氨丙基三乙氧基硅烷、 γ -氨丙基二乙氧基甲基硅烷、3-(二甲基乙氧基硅基)正丙烷。

4. 根据权利要求1或2所述的调控硅纳米材料表面HCG抗体取向的方法,其特征在于,所述酸酐类试剂选自丁二酸酐、马来酸酐。

5. 根据权利要求1所述的调控硅纳米材料表面HCG抗体取向的方法,其特征在于,所述的硅纳米材料的粒径为50~500nm。

6. 根据权利要求1所述的调控硅纳米材料表面HCG抗体取向的方法,其特征在于,所述硅烷偶联剂的浓度为0.1-1mg/mL。

7. 根据权利要求1所述的调控硅纳米材料表面HCG抗体取向的方法,其特征在于,所述非质子性溶剂选自N,N-二甲基甲酰胺、乙醇、乙腈、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、四氢呋喃、二噁烷、二氯甲烷和氯仿。

8. 根据权利要求1所述的调控硅纳米材料表面HCG抗体取向的方法,其特征在于,所述的将HCG抗体通过物理吸附固定在经过表面改性的硅纳米材料表面的方法为:将经过表面改性的硅纳米材料在缓冲溶液中10-50℃条件下孵育HCG抗体1-20h。

9. 根据权利要求1或8所述的调控硅纳米材料表面HCG抗体取向的方法,其特征在于,孵育HCG抗体的缓冲溶液为MES缓冲溶液,pH为4-8。

10. 根据权利要求1或8所述的调控硅纳米材料表面HCG抗体取向的方法,其特征在于,所述HCG抗体的浓度为0.1-1mg/ml。

一种调控硅纳米材料表面HCG抗体取向的方法

技术领域

[0001] 本发明属于纳米材料及免疫学检测领域,涉及一种调控硅纳米材料表面HCG抗体取向的方法。

背景技术

[0002] 人绒毛膜促性腺激素 (Human chorionic gonadotropin, HCG) 是妊娠特异性标志物,通过检测其浓度高低可以判断是否妊娠以及妊娠时期。目前对HCG浓度的检测通常是检测尿液HCG浓度,常见的检测方法包括酶联免疫吸附检测 (ELISA) 和单克隆抗体胶体金试验。

[0003] 而在ELISA检测过程中,需要在孔板上固定检测HCG所需一抗,通过一抗结合HCG,再使用二抗进行信号放大实现HCG的检测。固定一抗的方法比较成熟的有物理吸附法和化学偶联法,其中物理吸附法中抗体分子主要通过疏水作用和静电作用非特异性吸附到微球表面。该方法由于操作步骤简便的优点被广泛采用。然而物理吸附法抗体通常是方向随机地吸附或偶联在纳米颗粒载体上,其抗原识别位点容易被占用或受到空间位阻的影响,导致纳米颗粒载体对抗原的特异性结合能力降低。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种普适性强、可调节、操作简单的调控HCG抗体取向的方法,根据材料表面带电性质对物理吸附的抗体的取向产生的影响,表面正电荷有利于抗体与抗原结合位点的暴露,因此,提供了一种基于材料表面带电性质的HCG抗体取向调控方法。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用了以下技术方案:一种调控硅纳米材料表面HCG抗体取向的方法,所述的方法是通过硅烷偶联剂、酸酐类试剂对硅纳米材料进行表面改性制备表面改性的硅纳米材料,改变硅纳米材料的表面电性,再将HCG抗体通过物理吸附固定在经过表面改性的硅纳米材料表面,通过调节硅纳米材料表面带电性质调控纳米材料表面物理吸附的HCG抗体的取向。可以应用于酶联免疫法中抗原抗体的检测。

[0006] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所述的表面改性制备表面改性的硅纳米材料的方法为:在硅纳米材料的醇类溶液中,加入硅烷偶联剂,在10-50℃条件下反应1-24h,对硅纳米材料进行氨基表面改性,制备氨基表面改性的硅纳米材料;再将氨基表面改性的硅纳米材料溶于非质子性溶剂中,加入酸酐类试剂,在10-50℃条件下反应1-24h,对氨基表面改性的硅纳米材料进行羧基表面改性,制备羧基表面改性的硅纳米材料。一般情况下,所述硅烷偶联剂的用量相对于硅纳米材料过量,所述酸酐类试剂的用量相对于氨基表面改性的硅纳米材料过量。

[0007] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所述硅纳米材料的醇类溶液为:将硅纳米材料分散于醇类溶剂中形成硅纳米材料的醇类溶液,可根据实际需要配置不同浓度的硅纳米材料的醇类溶液,如1-30mg/mL。

[0008] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所述醇类溶剂选自甲醇、乙醇、丙醇、乙二醇、丙三醇等中的一种或几种的混合。

[0009] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所述非质子性溶剂选自N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、乙醇、乙腈、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、四氢呋喃、二噁烷、二氯甲烷和氯仿等中的一种或几种的混合。

[0010] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所述非质子性溶剂的用量无特别严格的要求,能将原料(氨基表面改性的硅纳米材料)分散完全即可。

[0011] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所述的硅烷偶联剂为氨基硅烷偶联剂,选自3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTEs)、 γ -氨丙基二乙氧基甲基硅烷(APDES)、3-(二甲基乙氧基硅基)正丙烷(APEs)等同类型试剂。

[0012] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所述酸酐类试剂选自丁二酸酐、马来酸酐等同类型试剂。

[0013] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所述硅烷偶联剂的浓度为0.1-1mg/mL。

[0014] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所述氨基表面改性的硅纳米材料与酸酐类试剂的质量比为1:1-5,优选为1:1。

[0015] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所述的硅纳米材料为二氧化硅纳米粒子(SiNPs)。

[0016] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所述的硅纳米材料的粒径为50~500nm。

[0017] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所述的氨基表面改性的温度优选为10-40℃。

[0018] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所述的氨基表面改性的时间优选为5-15h。

[0019] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所述的羧基表面改性的温度优选为10-40℃

[0020] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所述羧基表面改性的时间优选为5-24h。

[0021] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所述的将HCG抗体通过物理吸附固定在经过表面改性的硅纳米材料表面的方法为:将经过硅烷偶联、酸酐类试剂表面改性的硅纳米材料在缓冲溶液中10-50℃条件下孵育HCG抗体1-20h,得到不同取向的抗体结合的硅纳米材料。

[0022] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,孵育HCG抗体缓冲溶液为MES缓冲溶液,pH=4-8,优选为pH=5-7,更优选为pH=6.1。

[0023] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所述HCG抗体孵育的反应温度优选为20-40℃,更优选为25℃。

[0024] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所述的HCG抗体孵育的反应时间优选为5-15h,更优选为12h。

[0025] 对于上文所述的技术方案中,优选的情况下,所用HCG抗体的浓度为0.1-1mg/ml,

优选为0.2-0.7mg/ml。

[0026] 有益效果:

[0027] (1) 抗体取向可调控:利用本发明上文所述的调控硅纳米材料表面HCG抗体取向的方法,优选的情况下,在pH 6.1的MES缓冲液中,25℃反应12h,通过硅烷偶联剂对硅纳米粒子进行氨基表面改性,再通过酸酐类试剂对硅纳米粒子进行羧基表面改性,不同电性的硅纳米粒子表面会有不同取向的抗体结合状态。

[0028] (2) 结合量可调控:利用本发明上文所述的调控硅纳米材料表面HCG抗体取向,在羧基和氨基对硅纳米粒子表面改性,其抗体的结合量不同。

[0029] (3) 反应条件温和:利用本发明上文所述的调控硅纳米材料表面HCG抗体取向,优选的情况下,在pH为5-7的缓冲液中20-40℃条件下即可以实现抗体取向的调控。

[0030] (4) 操作简单,成本低:利用本发明上文所述的调控硅纳米材料表面HCG抗体取向,实验步骤少,操作简单;所用的试剂均为常规试剂。

附图说明

[0031] 本发明附图幅,用以对本发明的进一步说明,并且构成说明书的一部分,与以下面的具体实施例方式一起用于来解释本发明,并不构成对本发明的限制。

[0032] 图1为实施例1和2中使用DLS检测的SiNPs、NH₂-NPs和COOH-NPs的粒径。

[0033] 图2为实施例1和2中使用DLS检测的SiNPs、NH₂-NPs和COOH-NPs表面Zeta电位。

[0034] 图3为实施例3中使用BCA试剂盒检测的氨基和羧基修饰的硅纳米粒子在0.5mg/ml的抗体中孵育后的结合量。

[0035] 图4为实施例4中游离的HCG抗体和HCG结合的等温吸附曲线。

[0036] 图5为实施例4中固定抗体的氨基和羧基两种表面修饰的硅纳米粒子与HCG结合的等温吸附曲线,其中a为固定抗体的氨基硅烷偶联剂修饰的硅纳米粒子与HCG结合的等温吸附曲线,其中b为固定抗体的羧基表面修饰的硅纳米粒子与HCG结合的等温吸附曲线。

具体实施方式

[0037] 下述非限定性实施例可以使本领域的普通技术人员更全面地理解本发明,但不以任何方式限制本发明。

[0038] 实施例1:氨基表面改性的硅纳米粒子

[0039] 取1mL 100nm二氧化硅纳米粒子(SiNPs)原液(Alfa Aesar,二氧化硅纳米粒子原液为30%二氧化硅纳米粒子分散于乙二醇中),用甲醇稀释至30mL,即10mg/mL,用HNO₃调节pH至3~4,在40℃下搅拌2h,得到反应液;向反应液中滴加300μL APTes,继续反应4h;离心,用水洗涤,得氨基硅烷偶联剂修饰的硅纳米粒子,并将其保存在30mL水中。DLS测试(图1)中氨基修饰后硅纳米粒子水力学直径增大了20nm,表面Zeta电位测试(图2)表明表面带正电(+31mV),该结果表明了氨基硅烷偶联剂修饰制备了表面带正电的硅纳米粒子(NH₂-NPs)。

[0040] 实施例2:羧基表面改性的硅纳米粒子

[0041] 取实施例1产物10mL,离心25min,除去上清液;将各底物(氨基硅烷偶联剂修饰的硅纳米粒子)以10mL DMF超声分散,转移至小反应瓶中;计算氨基硅烷偶联剂修饰的硅纳米粒子质量,称取与氨基硅烷偶联剂修饰的硅纳米粒子等质量的丁二酸酐,加入小反应瓶中,

溶解,加入磁子搅拌,反应过夜,反应温度为37℃;将反应后的产物离心,用水洗涤,得羧基修饰的硅纳米粒子。DLS测试(图1)中羧基修饰后硅纳米粒子水力学直径增大了8nm,表面Zeta电位测试(图2)表明表面带正电(-38mV),该结果表明了羧基表面修饰制备了表面带负电的硅纳米粒子(COOH-NPs)。

[0042] 实施例3:抗体结合量的测定

[0043] 取5mg实施例1产物氨基硅烷偶联剂修饰的硅纳米粒子和5mg实施例2中产物羧基修饰的硅纳米粒子分别放入0.5mg/ml的HCG抗体溶液(HCG抗体溶液中的缓冲溶液为pH 6.1的MES缓冲溶液)中25℃震荡12h。离心,用MES洗涤。用BCA试剂盒(上海翊圣)测得硅纳米粒子的抗体的结合量(图3)。氨基硅烷偶联剂修饰的硅纳米粒子结合抗体量为26μg/mg NPs,羧基表面修饰的硅纳米粒子结合抗体量为140μg/mg NPs。该结果表明了不同电性影响了硅纳米粒子表面的抗体的结合量。

[0044] 实施例4:HCG检测的应用

[0045] 96孔板中分别加入10IU/ml的HCG,每孔100μL,4℃过夜,MES(pH=6.1)洗5次。3%BSA封闭,每孔加入150μL,4℃过夜,MES洗5次。配置浓度梯度的实施例3中产物(已结合HCG抗体的硅纳米粒子)的溶液(浓度分别为5mg/ml、2.5mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml、0.1mg/ml、0.02mg/ml)(已结合HCG抗体的硅纳米粒子的溶液中的缓冲溶液为pH 6.1的MES缓冲溶液)和配置的游离的HCG抗体溶液(浓度分别为0.25mg/ml、0.1mg/ml、0.025mg/ml、0.01mg/ml、0.0025mg/ml、0.001mg/ml)(游离的HCG抗体溶液中的缓冲溶液为pH6.1的MES缓冲溶液),物理(化学)吸附抗体,加入孔板,每孔100μL。37℃孵育1h,0.1%吐温20的MES洗3次,MES洗2次。加入1.25μg/mL HRP-Protein L(辣根过氧化物酶偶联的蛋白L)(金斯瑞生物科技有限公司),每孔100μL,37℃孵育1h,MES洗5次。加入3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)(北京索莱宝科技有限公司)25℃避光反应10min,1M硫酸终止反应,测450nm处的吸光度。

[0046] 通过对结果进行统计得到了固定了抗体的NH₂-SiNPs和COOH-SiNPs与HCG之间的等温吸附曲线(图4)。结果显示,游离的HCG抗体抗原结合的K_d(平衡解离常数)为5.67μg/ml,氨基修饰的纳米粒子K_d(平衡解离常数)为0.44μg/ml,羧基修饰的纳米粒子K_d(平衡解离常数)为3.84μg/ml,该结果表明了氨基硅烷偶联剂和羧基硅烷偶联剂修饰的硅纳米粒子,因电性不同而使抗体结合取向的不同,从而使抗原抗体的结合位点暴露数量不同,则在检测HCG过程中有着不同的结合强度。其中,平衡解离常数的计算公式,如下:

[0047]
$$y = V_{\max} \frac{x^n}{K_d^n + x^n}$$

[0048] 式中,y为吸光度(nm),V_{max}为最大吸附量(μg),x为抗体浓度(μg/mL),n为希尔系数,K_d为平衡解离常数(μg/mL)。

[0049] 对于任何熟悉本领域的技术人员而言,在不脱离本发明技术方案范围情况下,都可利用上述揭示的技术内容对本发明技术方案作出许多可能的变动和修饰,或修改为等同变化的等效实施例。因此,凡是未脱离本发明技术方案的内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所做的任何简单修改、等同变化及修饰,均应仍属于本发明技术方案保护的范围。

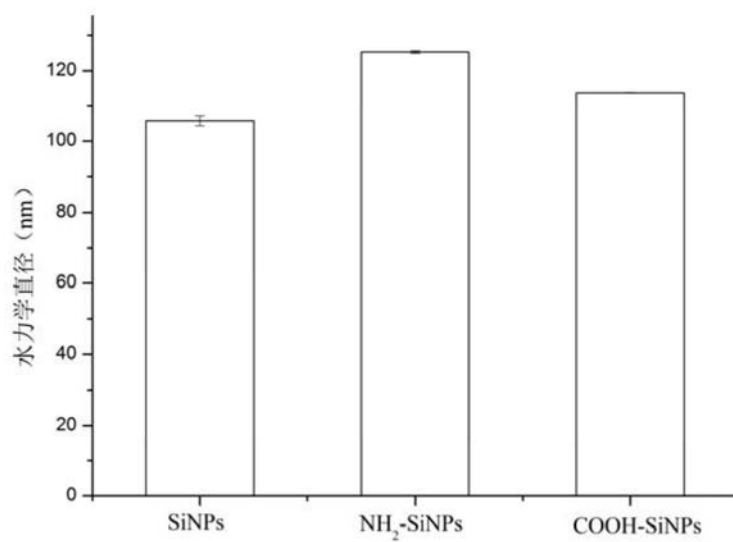


图1

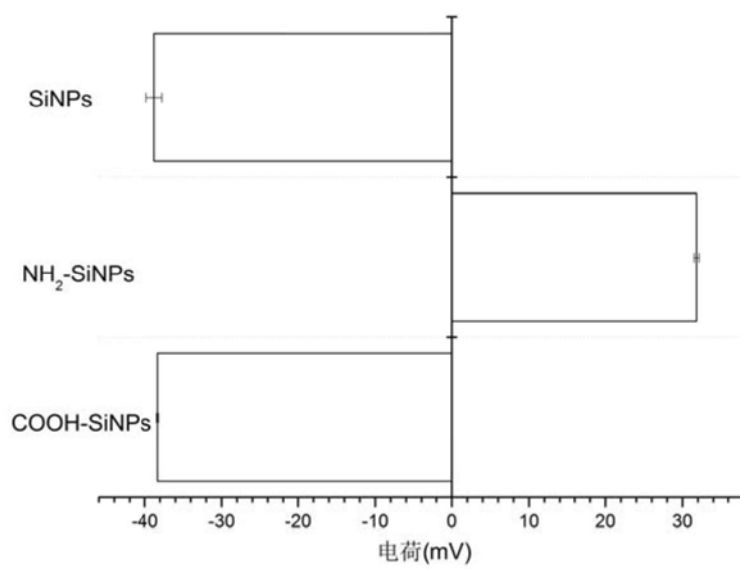


图2

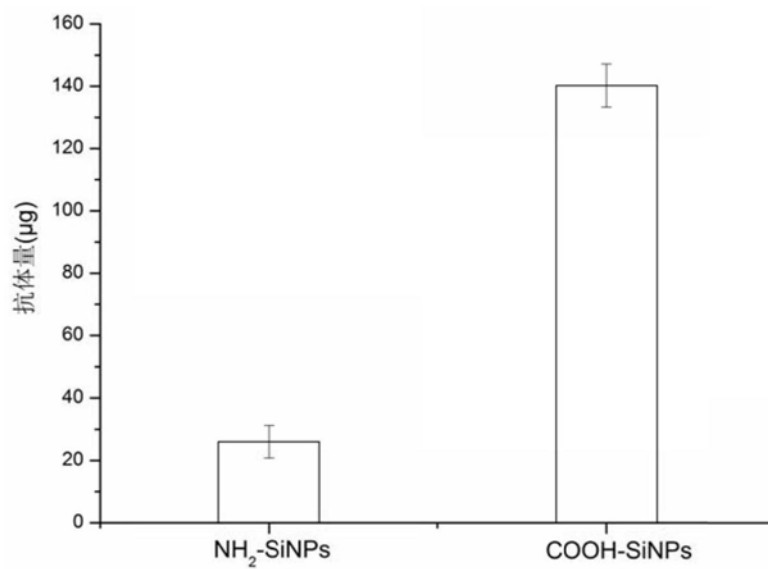


图3

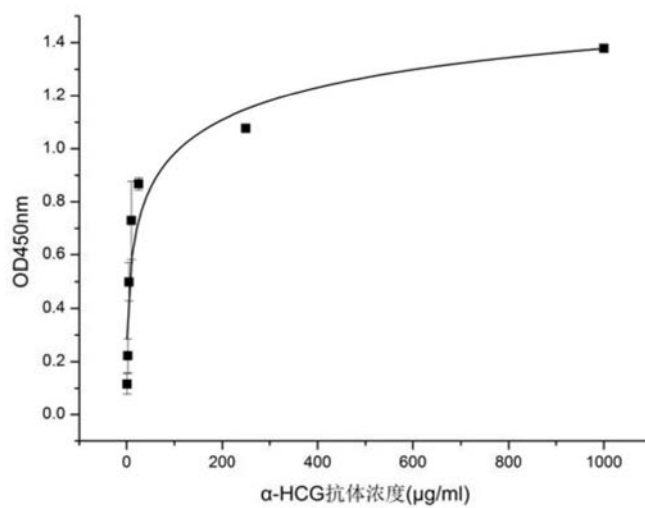


图4

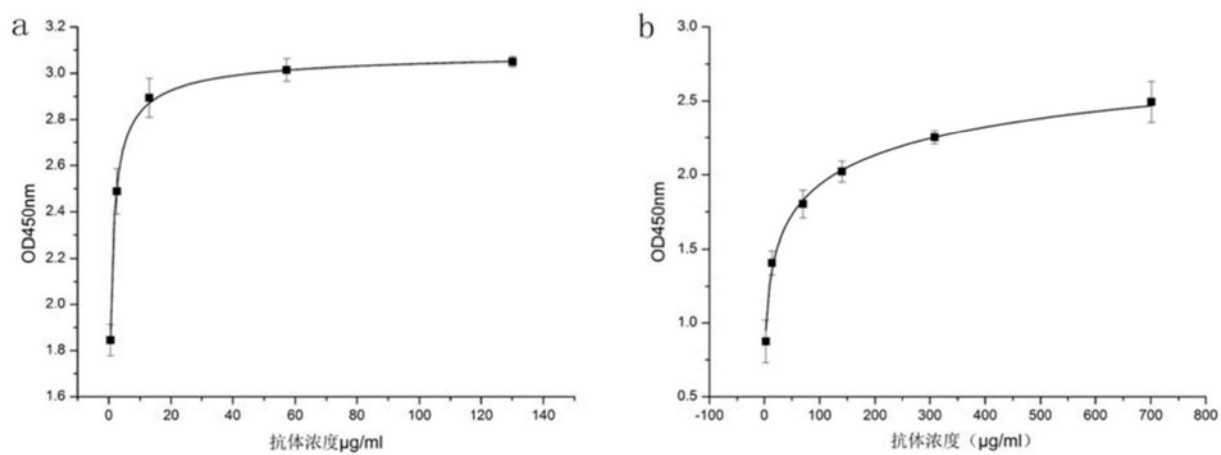


图5

专利名称(译)	一种调控硅纳米材料表面HCG抗体取向的方法		
公开(公告)号	CN110221059A	公开(公告)日	2019-09-10
申请号	CN201910649147.6	申请日	2019-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	大连理工大学		
申请(专利权)人(译)	大连理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	大连理工大学		
[标]发明人	何伟 刘文豪 程昉 祝传磊		
发明人	何伟 刘文豪 程昉 祝传磊		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54346		
代理人(译)	李馨		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种调控硅纳米材料表面HCG抗体取向的方法。具体通过硅烷偶联剂、酸酐类试剂使硅纳米粒子的表面改性，改变硅纳米粒子的表面电性，进一步调控纳米材料表面物理吸附的HCG抗体的取向。本发明的方法抗体取向可调控，结合量可调控，反应条件温和，操作简单，成本低，可以应用于酶联免疫法中抗原抗体的检测。

$$y = V_{\max} \frac{x^n}{K_d^n + x^n}$$