



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107957492 A

(43)申请公布日 2018.04.24

(21)申请号 201711150938.1

(22)申请日 2017.11.18

(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 尹婷婷

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

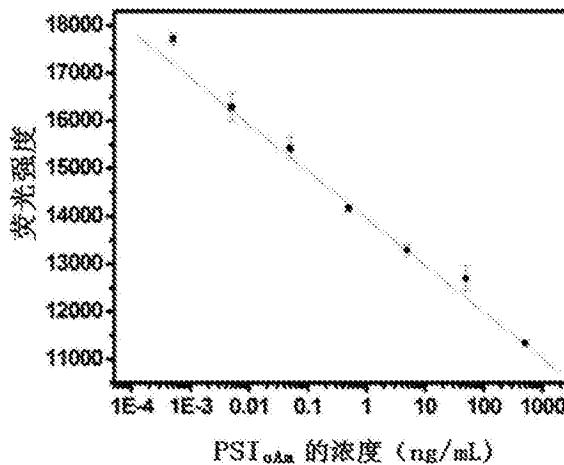
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种基于碳点标记的荧光免疫吸附测定超痕量油胺枝接聚琥珀酰亚胺的方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于碳点标记的荧光免疫吸附测定超痕量油胺枝接聚琥珀酰亚胺的方法。步骤包括：制备PSI_{0Am}包被抗原和免疫原，将免疫原注射到动物体内得到高特异性抗体，再将C-dots标记的PSI_{0Am}抗体，制成荧光抗体，然后建立碳点荧光免疫吸附准确测定了PSI_{0Am}的含量。结合抗原、抗体反应的特异性与高荧光量子产率的碳点对油胺枝接聚琥珀酰亚胺(PSI_{0Am})纳米粒子进行了定量检测分析。此检测方法的线性范围为 $5 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^2$ ng/mL，检出限可达0.15pg/mL。



1. 一种基于碳点标记的荧光免疫吸附测定超痕量油胺枝接聚琥珀酰亚胺的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

a、制备PSI_{0Am}包被抗原和PSI_{0Am}免疫原;

b、制备抗PSI_{0Am}抗体;

c、制备氨基功能化荧光碳点C-dots;

d、制备碳点标记的抗PSI_{0Am}抗体;

e、将油胺枝接聚琥珀酰亚胺(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,以碳点标记的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};

f、以PSI_{0Am}标准液浓度的对数为横坐标,吸光度值为纵坐标建立标准曲线,从而定量检测出PSI_{0Am}的浓度。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述标准曲线的线性方程为F=13955.82-981.93lgC,其中F为荧光强度值,C为PSI_{0Am}浓度;其相关系数R=-0.997,线性范围为5×10⁻⁴~5×10²ng/mL,检出限为0.15pg/mL。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤c具体包括以下步骤:将无水柠檬酸和乙二胺溶解在超纯水中,180℃水热反应4~5小时,所得产物经纯化后即可得到所述氨基功能化碳点C-dots。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述无水柠檬酸的质量与乙二胺的体积之比为0.42g:530μL。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤d具体包括以下步骤:

d-1、向C-dots溶液中加入质量浓度为25%的戊二醛,两者的体积之比为9~15:1,室温搅拌1h,以超纯水为透析液用100~500Da的透析袋进行透析;

d-2、向步骤d-1中加入与透析后的溶液等体积的抗PSI_{0Am}抗体溶液,搅拌反应1h,然后加入浓度20mg/mL的新制的硼氢化钠溶液,于4℃冰箱中过夜;

d-3、将步骤d-2得到的溶液以去离子水为透析液,用25000~30000Da的透析袋透析纯化,得到碳点标记的PSI_{0Am}抗体。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述C-dots溶液的浓度为162mg/mL,是将C-dots溶于10mM,pH=9.6的碳酸盐缓冲液中制备得到的。

7. 根据权利要求5或6所述的方法,其特征在于,所述抗PSI_{0Am}抗体溶液的制备方法为:经抗PSI_{0Am}抗体,用pH=7.4的磷酸盐缓冲液稀释至每毫升内含抗体2~3mg。

8. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述硼氢化钠溶液与C-dots溶液的体积之比为1:2~4。

9. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤e具体包括以下步骤:

e-1、用包被缓冲液将PSI_{0Am}包被抗原稀释60倍,包被96孔板中,每孔100μL,4℃冰箱过夜;

e-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;

e-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50μL碳点标记的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;

e-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360nm,发射波长为475nm处的荧光强度值。

10. 根据权利要求1或9所述的方法,其特征在于,所述PSI_{0Am}包被抗原的浓度为1~3mg/mL。

一种基于碳点标记的荧光免疫吸附测定超痕量油胺枝接聚琥珀酰亚胺的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米材料的定量检测,具体涉及一种基于碳点标记的荧光免疫吸附测定超痕量油胺枝接聚琥珀酰亚胺的方法。

背景技术

[0002] 据统计,全球每年约800万人死于癌症,接近1400万人面临癌症死亡的威胁。癌症也已经成为死亡的第一大原因,而且是很多人心中的“不治之症”。由于早期的癌症通常没有症状,发现肿瘤时往往已经是晚期,因此预防癌症的发生及其重要。目前临床中对于癌症的治疗主要采用化疗法,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,对患者身心造成极大地伤害。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,但由于其载药数量少,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。

[0003] 随着纳米技术的蓬勃发展,基于纳米材料的药物载体研究受到越来越多的关注。越来越多的研究者们将目光投向了纳米药物载体。为了克服传统药物亲水性差、治疗效果不显著等缺点,研究者们已开发出多种类别的纳米药物载体,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、磁流体和脂质体纳米材料作为药物载体。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。

[0004] 纳米药物载体具有如下优势:制备相对简单,易于对其进行多功能修饰;具有良好的生物相容性,一般不会引起强烈的机体免疫反应;粒径普遍很小,容易穿过人体的组织间隙而被细胞吸收,载药效率较高;可以较有效保护其所携带抗肿瘤药物,利于癌症的治疗。因此,功能化纳米材料在实现靶向性给药、缓释药物、降低药物的毒副作用等方面表现出良好的应用前景,已成为近年来新型药物输送系统研究的热点。

[0005] 纳米聚合物胶束是一种自组装纳米化胶体分散体,粒径通常小于100nm,具有疏水性内核与亲水性外壳。纳米胶束作为一种新型药物载体,其显著优点在于:利用胶束增溶作用可以提高难溶性抗肿瘤药物的溶解度及口服生物利用度,而且可使药物逃避单核巨噬细胞的吞噬,使其具有隐形性,目前已成功用于难溶性药物的传递,并展示出良好的应用前景。依据构成载体材料相对分子质量的不同,纳米胶束可分为低分子胶束和高分子聚合物胶束。低分子胶束采用小分子的表面活性基团作载体材料,其增溶量、载药数量、种类及促进药物被机体利用的程度均有限;聚合物胶束采用两亲性的大分子作载体材料,因两亲性聚合物遇水后亲油部分通过疏水作用成为内核,亲水部分则环绕在外构成外壳,这样的核壳结构不仅使聚合物可以很好地分散于水,同时,由于相对分子质量较大,可以为难溶性药物提供较大的疏水微环境,因而,与低分子胶束相比,聚合物胶束的载药量及稳定性明显提

高。

[0006] 油胺枝接聚琥珀酰亚胺(PSI_{0Am})纳米材料作为高分子纳米药物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,研究者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] 纳米生物技术是生物技术领域的前沿和热点问题,但在充分安全、有效进入临床应用前,如何得到更可靠的纳米载体,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、药物释放效率以及毒性研究等方面。由于纳米材料因其特殊的效应在人体内运送时,会受到血液中各种蛋白的缠绕形成一层蛋白冠,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。

[0008] 而目前对于纳米材料的表征方法主要集中在其结构、成分、粒度、形貌以及界面等分析。目前常用的纳米材料的定量分析方法有电感耦合等离子体质谱法、高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法、气相色谱-电感耦合等离子体质谱法,然而这些方法不仅对样品处理繁琐,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精准定量检测和无损分析。

发明内容

[0009] 为解决上述技术问题,本发明提供了一种基于碳点标记的荧光免疫吸附测定超痕量油胺枝接聚琥珀酰亚胺的方法。基于碳点优越的荧光性能,此方法提高了检测的灵敏度。即通过制备PSI_{0Am}包被抗原、碳点标记的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。该方法具有操作简单、快速、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] 本发明采取的技术方案为:

[0011] 一种基于碳点标记的荧光免疫吸附测定超痕量油胺枝接聚琥珀酰亚胺的方法,所述方法包括以下步骤:

[0012] a、制备PSI_{0Am}包被抗原和PSI_{0Am}免疫原;

[0013] b、制备抗PSI_{0Am}抗体;

[0014] c、制备氨基功能化荧光碳点C-dots;

[0015] d、制备碳点标记的抗PSI_{0Am}抗体;

[0016] e、将油胺枝接聚琥珀酰亚胺(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,以碳点标记的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}；

[0017] f、以PSI_{0Am}标准液浓度的对数为横坐标,吸光度值为纵坐标建立标准曲线,从而定量检测出PSI_{0Am}的浓度。

[0018] 所述标准曲线的线性方程为F=13955.82-981.93lgC,其中F为荧光强度值,C为PSI_{0Am}浓度;其相关系数R=-0.997,线性范围为5×10⁻⁴~5×10²ng/mL,检出限为0.15pg/mL。

[0019] 所述步骤c具体包括以下步骤:将无水柠檬酸和乙二胺溶解在超纯水中,180℃水热反应4~5小时,所得产物经纯化后即可得到所述氨基功能化碳点C-dots。

[0020] 所述纯化的方法为:将水热反应后的产物在10000r/min下离心30min,除去大颗粒物质,加入一定量的丙酮溶液,除去未反应的有机物,将粗碳点以去离子水为透析液,用100~500Da的透析袋透析4~5天,最后冷冻干燥制备出较纯的C-dots。

[0021] 所述无水柠檬酸的质量与乙二胺的体积之比为0.42g:530μL。

[0022] 所述步骤d具体包括以下步骤:

[0023] d-1、向C-dots溶液中加入质量浓度为25%的戊二醛,两者的体积之比为9~15:1,室温搅拌1h,以超纯水为透析液用100~500Da的透析袋进行透析;

[0024] d-2、向步骤d-1中加入与透析后的溶液等体积的抗PSI_{0Am}抗体溶液,搅拌反应1h,然后加入浓度20mg/mL的新制的硼氢化钠溶液,于4℃冰箱中过夜;

[0025] d-3、将步骤d-2得到的溶液以去离子水为透析液,用25000~30000Da的透析袋透析纯化,得到碳点标记的PSI_{0Am}抗体。

[0026] 所述C-dots溶液的浓度为162mg/mL,是将C-dots溶于10mM,pH=9.6的碳酸盐缓冲液中制备得到的。

[0027] 所述抗PSI_{0Am}抗体溶液的制备方法为:将抗PSI_{0Am}抗体,用pH=7.4的磷酸盐缓冲液稀释至每毫升内含抗体2~3mg。

[0028] 所述硼氢化钠溶液与C-dots溶液的体积之比为1:2~4,优选为1:2.5。

[0029] 所述步骤e具体包括以下步骤:

[0030] e-1、用包被缓冲液将PSI_{0Am}包被抗原稀释60倍,包被96孔板中,每孔100μL,4℃冰箱过夜;

[0031] e-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;

[0032] e-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50μL碳点标记的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;

[0033] e-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360nm,发射波长为475nm处的荧光强度值。

[0034] 所述PSI_{0Am}包被抗原的浓度为1~3mg/mL。

[0035] 本发明提供了一种基于碳点标记的荧光免疫吸附测定超痕量油胺枝接聚琥珀酰亚胺的方法,结合抗原、抗体反应的特异性与高量子产率的碳点作为标记物实现了该免疫方法对PSI_{0Am}的超痕量检测。

- [0036] 与现有技术相比,本发明具有以下几个特点:
- [0037] (1) 利用机体的免疫应答效应,成功制备并且筛选出了高效价的抗PSI_{0Am}抗体,为建立高特异性的免疫分析定量检测PSI_{0Am}奠定了基础;
- [0038] (2) 利用简单、绿色的方法制备出了高量子产率的碳点($QY=99\%$)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,碳点相比其他的荧光染料,其抗光漂白性强,相比于量子点没有对生物体有毒的重金属离子,而且制备方法简单绿色;
- [0039] (3) 利用高量子产率的碳点与抗原、抗体反应的特异性建立了一种基于碳点荧光免疫吸附测定PSI_{0Am}的新方法,为今后纳米材料提供了一种快速、准确定量检测的方法;
- [0040] (4) 检测线性范围宽为 $5\times 10^{-4}\sim 5\times 10^2\text{ng/mL}$,检测限可达 0.15pg/mL ,实现了对PSI_{0Am}的超痕量检测;
- [0041] (5) 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

[0042] 图1为以PSI_{0Am}标准品浓度的对数为横坐标,475nm波长处的荧光强度值为纵坐标建立的标准曲线图。

具体实施方式

[0043] 弗氏完全佐剂、牛血清白蛋白(BSA) 和鸡卵清白蛋白(OVA) 购买自生工生物工程(上海)股份有限公司。

[0044] 其他试剂均可从市场上的销售厂家购买得到。

[0045] 本发明涉及到的各溶液的制备方法为:

[0046] PBS溶液($0.01\text{mol/L pH}=7.4$):称取NaCl 8.0g、KCl 0.1g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.106g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.34g溶解于蒸馏水中并定容至1000mL。

[0047] 碳酸盐缓冲液CB($0.5\text{mol/L pH}=9.6$):称取 Na_2CO_3 1.59g、 NaHCO_3 2.94g溶解于蒸馏水中并定容至100mL。

[0048] PBST溶液($0.01\text{mol/L pH}=7.4$):在1000mL PBS中加入500 μL Tween-20,混合均匀。

[0049] 包被缓冲液CB($0.05\text{mol/L pH}=9.6$):称取 Na_2CO_3 1.59g、 NaHCO_3 2.94g溶解于蒸馏水中并定容至1000mL。

[0050] 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。

【0051】实施例1

[0052] 一种基于碳点标记的荧光免疫吸附测定超痕量油胺接聚琥珀酰亚胺的方法,所述方法包括以下步骤:

[0053] a、制备PSI_{0Am}包被抗原和PSI_{0Am}免疫原,具体包括以下步骤:

[0054] a-1、水解PSI_{0Am},得到水解后的PSI_{0Am}溶液;

[0055] 参照Nano Research,2015,8 (6):1932-1943文献中的方法制备得到了油胺接枝聚琥珀酰亚胺的三氯甲烷溶液,其步骤如下:取32mL N,N-二甲基甲酰胺加热至90℃,加入1.6g聚琥珀酰亚胺及2.17mL油胺,保持100℃加热5小时,最后加入80mL甲醇使其沉淀,离心分离,取沉淀称重后分散于2-10mL氯仿中,使溶液浓度调节为60mg/mL,得到油胺接枝聚琥

珀酰亚胺的三氯甲烷溶液。

[0056] 取该溶液0.5mL分散在10mL 0.5mmol/L NaOH中,350W功率下超声6min,得到的乳状溶液,58℃下加热10min,反应结束后离心分离,将沉淀分散在6mL pH=7.4的PBS中,得到水解后的PSI_{0Am}溶液,其浓度为5mg/mL。

[0057] a-2、取2mL水解后的PSI_{0Am}溶液,加入0.1mg羟基琥珀酰亚胺(NHS)、0.7mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDAC.HCl)室温下孵育30min,离心分离,用pH=7.4的PBS洗涤,加入2mg/mL的牛血清白蛋白(BSA)2mL,25℃温育4小时,离心分离,取沉淀分散于1mL pH=7.4的PBS中即得到了PSI_{0Am}免疫原溶液,将所得溶液置于8000~25000Da透析袋中,PBS透析12h,收集,即得到了PSI_{0Am}免疫原,4℃储存待用;

[0058] a-3、取2mL水解后的PSI_{0Am}溶液,加入0.1mg羟基琥珀酰亚胺(NHS)、0.7mg 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDAC.HCl)室温下孵育30min,离心分离,用pH=7.4的PBS洗涤,加入2mg/mL的鸡卵清白蛋白(OVA)2mL,25℃温育4小时,离心分离,取沉淀分散于2mL pH=7.4的PBS中即得到了PSI_{0Am}包被抗原溶液,将所得溶液置于8000~25000Da透析袋中,PBS透析12h,收集,即得到了PSI_{0Am}包被抗原,4℃储存待用。

[0059] 上述步骤a-2、a-3中是先将水解后的PSI_{0Am}溶液与NHS、EDAC·HCl自室温孵育30min之后,再分别加入的BSA、OVA温育4小时,分别得到PSI_{0Am}免疫原和PSI_{0Am}包被抗原。此种方法相较直接将所有原料混合得到的免疫原和包被抗原的偶联效率更高,减少了载体蛋白的自缩合反应。

[0060] b、制备抗PSI_{0Am}抗体:

[0061] 取4只体重为2kg左右的健康雄性新西兰大白兔作为实验动物,实验之前首先饲养两周左右的时间,保持其健康的生活状态,其中3只作为免疫对象,第4只作为空白对照,空白对照组不进行任何免疫。

[0062] 首次免疫:首次免疫时,取等体积的PSI_{0Am}免疫原和弗氏完全佐剂乳化均匀,背部皮下多点注射到3只雄兔的背部,每只雄兔的背部注射8~10个点,注射量为1mL/只。免疫接种的方式有注射免疫、口服免疫、气雾免疫等,其中注射免疫又有皮下注射、皮内注射、肌肉注射静脉注射等方式,背部皮下注射操作方便,药物扩散较慢,有利于刺激机体产生免疫应答,继而产生抗体;而雄兔作为免疫对象可以避免其生理周期对实验产生影响。

[0063] 弗氏佐剂的制备方法为:称取50g的无水羊毛脂,量取100mL的液体石蜡混合,超声仪多次超声,每次不超过20min,防止超声过程中温度过高,不能及时散热,超声使之混合均匀,直到将该混合液体滴到水中并且半分钟内不扩散为止,得到的油状液体即为弗氏不完全佐剂,4℃冰箱储存待用。

[0064] 加强免疫:3周后进行第一次加强免疫,加强免疫时用等体积比的PSI_{0Am}免疫原和福氏不完全佐剂的混合物,注射方法同第一次免疫,以后每隔一周进行一次加强免疫,注射量为1mL/只,中间周静脉采血,用间接竞争酶联免疫分析法测定抗血清的效价,直到抗血清效价达到1:32000,进行最后一次加强免疫,取血清纯化得PSI_{0Am}抗体。

[0065] 抗血清效价的测定方法为:用包被缓冲液CB将PSI_{0Am}包被抗原稀释60倍,包被在96孔板上,4℃冰箱过夜;次日早晨,用PBST溶液洗3次,每次3min,除去未包被上的包被抗原,每孔加200μL 1wt%酪蛋白封闭,37℃封闭1h;PBST洗3次,每次3min,加入用PBS稀释的抗血清,其稀释比为1/1000~1/64000,每孔100μL,37℃温育2h;PBST洗3次,每次3min,加入用

PBS稀释1000倍的HRP标记的羊抗兔IgG,每孔100 μ L,37℃温育2h;PBST洗3次,每次3min,加入邻苯二胺底物液显色,每孔100 μ L,37℃温育显色0.5h;加入50 μ L 2moI/LH₂SO₄终止反应。用多功能酶标仪测490nm处吸光值A。比较实验组与空白对照组在同一抗血清稀释倍数下的吸光值A,当A_{实验组} \geqslant 2倍A_{对照组}时对应的最大稀释倍数即抗血清的效价。

[0066] c、制备氨基功能化荧光碳点C-dots:

[0067] c-1、首先将无水柠檬酸(0.42g)和乙二胺(530 μ L)溶解在10mL超纯水中,超声5min,将混合溶液转移到50mL特氟隆内衬高压反应釜中,180℃反应4~5小时。

[0068] c-2、待反应降到室温,将反应液于10000r/min离心30min,除去大颗粒物质,加入一定量的丙酮溶液,除去未反应的有机物,最后以去离子水为透析液,用100~500Da的透析袋透析4~5天,最后冷冻干燥制备出氨基功能化荧光碳点C-dots。

[0069] d、制备碳点标记的抗PSI_{0Am}抗体:

[0070] d-1、取纯化后的抗PSI_{0Am}抗体,用pH=7.4的磷酸盐缓冲液稀释至每毫升内含抗体2~3mg,制得抗体储备液;

[0071] d-2、将C-dots用碳酸盐缓冲液(10mM,pH=9.6)制成浓度为162mg/mL的C-dots溶液;

[0072] d-3、向2mLC-dots溶液中加入质量浓度为25%的戊二醛水溶液200 μ L,室温下搅拌1h,然后用100~500Da的透析袋透析,以超纯水为透析液,除去过量的戊二醛;

[0073] d-4、将等体积的抗体溶液缓慢加入步骤e-3,室温下磁力搅拌1h,之后加入800 μ L浓度为20mg/mL的新制的硼氢化钠溶液,4℃冰箱中过夜;

[0074] d-5、将步骤d-4得到的溶液以去离子水为透析液,用25000~30000Da的透析袋透析纯化,得到C-dots标记的抗PSI_{0Am}抗体。

[0075] e、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C-dots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C-dots标记的PSI_{0Am}抗体和PSI_{0Am}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。

[0076] 所述步骤e具体包括以下步骤:

[0077] e-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 μ g/mL,包被于96孔板中,每孔100 μ L,冰箱4℃过夜;

[0078] e-2、封闭:取出96孔板,PBST洗涤3次,每次3min,加入1wt%酪蛋白进行封闭,每孔200 μ L,37℃封闭1.5h;

[0079] e-3、加样竞争:PBST洗涤3次,每次3min,将50 μ L浓度分别为5 \times 10⁻⁴ng/mL、5 \times 10⁻³ng/mL、5 \times 10⁻²ng/mL、0.5ng/mL、5ng/mL、50ng/mL、5 \times 10²ng/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50 μ LC-dots标记的抗PSI_{0Am}抗体,37℃竞争1.5h;之后用洗涤液洗涤3次,每次3分钟并甩干;

[0080] 不同浓度的PSI_{0Am}标准液的制备方法为:用0.01moI/L pH=7.4的PBS缓冲溶液将PSI_{0Am}稀释到规定的标准浓度;

[0081] e-4、在酶标仪上测定各孔在激发波长为360nm,发射波长为475nm时的荧光强度。

[0082] f、以PSI_{0Am}标准液浓度的对数为横坐标,吸光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: $F=13955.08-981.93\lg C$,其中F为荧光强度值,C为PSI_{0Am}的浓度,其相关系数R²=0.997,线性范围为 5×10^{-4} - 5×10^2 ng/mL,检出限为0.15pg/mL;

[0083] 重复以上各步骤,只是将步骤e-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360nm,发射波长为475nm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。

[0084] 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。

[0085] 上述参照实施例对一种基于碳点标记的荧光免疫吸附测定超痕量油胺枝接聚琥珀酰亚胺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。

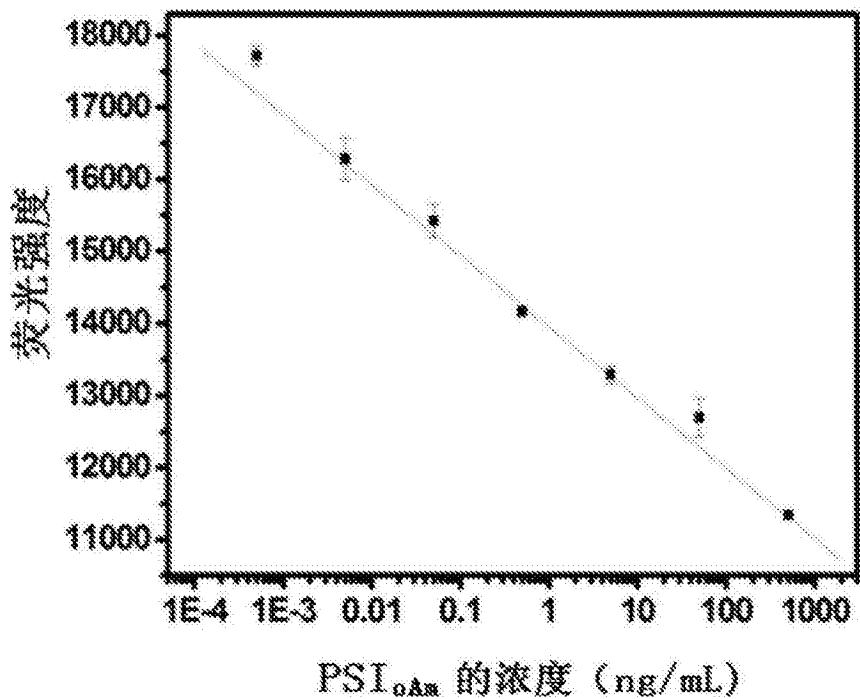


图1

专利名称(译)	一种基于碳点标记的荧光免疫吸附测定超痕量油胺枝接聚琥珀酰亚胺的方法		
公开(公告)号	CN107957492A	公开(公告)日	2018-04-24
申请号	CN201711150938.1	申请日	2017-11-18
[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	G01N33/53 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/533		
代理人(译)	尹婷婷		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明公开了一种基于碳点标记的荧光免疫吸附测定超痕量油胺枝接聚琥珀酰亚胺的方法。步骤包括：制备PSIOAm包被抗原和免疫原，将免疫原注射到动物体内得到高特异性抗体，再将C-dots标记的PSIOAm抗体，制成荧光抗体，然后建立碳点荧光免疫吸附准确测定了PSIOAm的含量。结合抗原、抗体反应的特异性与高荧光量子产率的碳点对油胺枝接聚琥珀酰亚胺(PSIOAm)纳米粒子进行了定量检测分析。此检测方法的线性范围为 $5 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^2$ ng/mL，检出限可达0.15pg/mL。

