



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107727844 A

(43)申请公布日 2018.02.23

(21)申请号 201711150950.2

(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 闫希

(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 任晨晨

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

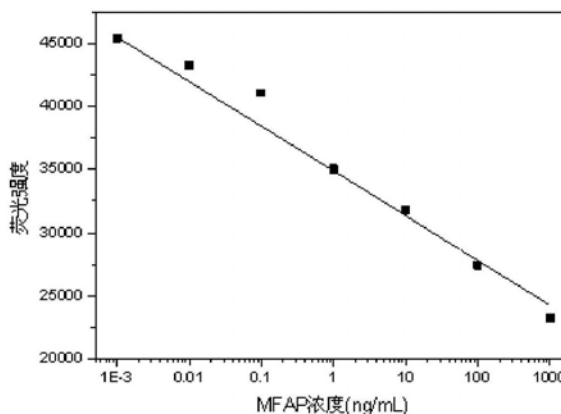
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

一种荧光免疫定量检测MFAP纳米药物载体的方法

(57)摘要

本发明提供了一种荧光免疫定量检测MFAP纳米药物载体的方法,本发明以介孔二氧化硅纳米颗粒为基体,二氧化硅纳米粒子比表面积大,稳定性好,荧光染料负载率高;以荧光染料氟硼吡咯(BODIPY)和罗丹明B共掺杂,两种荧光染料之间能够发生荧光共振能量转移,提高了荧光强度,减少了猝灭;采用过碘酸钠法偶联抗体提高了偶联效率,消除了交联剂对抗体活性的影响。充分利用了免疫学反应中抗原抗体的高特异性,并且与荧光的敏感性相结合,使免疫反应的信号进一步提高,实现了对纳米药物载体的超灵敏检测。



1. 一种荧光免疫定量检测MFAP纳米药物载体的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

- a、MFAP全抗原的制备;
- b、抗MFAP高特异性多克隆抗体的制备;
- c、二氧化硅荧光纳米标记探针的制备;
- d、二氧化硅荧光纳米标记探针采用过碘酸钠法偶联抗体;
- e、荧光免疫定量检测MFAP纳米药物载体的方法建立;以MFAP标准品浓度的对数为横坐标,荧光强度值为纵坐标绘制标准曲线,构建浓度与荧光强度线性关系,从而定量检测出MFAP的浓度;

步骤c包括以下步骤:

- c-1、将十六烷基三甲基溴化铵CTAB溶于去离子水;
- c-2、加入乙二醇和浓氨水,反应;
- c-3、之后加入正硅酸乙酯TEOS反应;
- c-4、然后,再加入混合好的BODIPY溶液和罗丹明B溶液,再加入三甲氧基甲基硅烷MTMS,反应;
- c-5、最后,加入3-氨丙基三乙氧基硅烷APTES继续反应,完成反应后,搅拌冷却至室温并离心洗涤,冷冻干燥,得二氧化硅荧光纳米标记探针。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,从步骤c-1开始,全程均在60-70℃条件下反应。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,步骤c-3中加入乙二醇和浓氨水后的3-6min内加入正硅酸乙酯。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,步骤c-4)所述反应时间为2-4h;步骤c-5所述反应时间为1-2h。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤d包括以下步骤:

d-1、抗体的氧化:取步骤b制备的抗MFAP高特异性多克隆抗体溶解到醋酸缓冲液中,再加入过碘酸钠溶液,于4℃避光搅拌,超滤除去未反应的过碘酸钠,得到氧化抗体;

d-2、荧光纳米粒子与抗体的偶联:将步骤c制备的二氧化硅荧光纳米标记探针分散到缓冲溶液中,在搅拌下加入步骤d-1制备的氧化抗体,于4℃下避光搅拌,之后加入硼氢化钠溶液继续4℃避光搅拌,将反应后的溶液离心,洗涤分散到缓冲溶液中,4℃储存备用。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,步骤d-1中,所述搅拌时间为2-4h。

7. 根据权利要求5或6所述的方法,其特征在于,步骤d-2中第一步搅拌时间为12-36h,第二步搅拌时间为2-4h。

8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤e包括以下步骤:

e-1、包被:用碳酸盐缓冲液稀释将包被抗原溶液稀释,包被96孔酶标板,4℃温育过夜后,用PBST洗涤液洗涤,甩干;

e-2、封闭:每孔加入封闭液,恒温培养箱温育后,用PBST洗涤液洗涤,甩干;

e-3、加样竞争:每孔加入不同浓度的MFAP标准液和与二氧化硅荧光纳米标记探针偶联的抗体,温育后,用PBST洗涤,甩干;

e-4、在酶标仪上测定各孔在激发波长为485nm,发射波长为590nm时的荧光强度,以

MFAP标准品浓度的对数为横坐标,荧光强度值为纵坐标绘制标准曲线,构建浓度与荧光强度线性关系,从而定量检测出MFAP的浓度。

9.根据权利要求8所述的方法,其特征在于,步骤e-2所述温育是指37℃恒温培养箱温育0.5-2h;步骤e-3所述温育是指37℃温育1.5-3.5h。

10.根据权利要求8所述的方法,其特征在于,步骤e-4中所述线性关系为:标准曲线的线性方程为 $A=34877.2-13538.71gC$,A为荧光强度,C为MFAP的浓度;相关系数 $R=-0.997$,线性范围为 $0.036-10^4\text{ng/mL}$,检出限为 1.4pg/mL 。

一种荧光免疫定量检测MFAP纳米药物载体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米材料的定量检测领域,具体涉及一种荧光免疫定量检测MFAP纳米药物载体的方法,能够超灵敏荧光免疫定量检测聚琥珀酰亚胺(PSI),N-(3-氨基丙基)咪唑(NAPI)和油胺(OAm)共同作用得到的PSI-OAm-NAPI(MFAP)纳米药物载体。

背景技术

[0002] 纳米级抗癌药物已经成为一类有前途的新的癌症治疗剂,该制剂的构成除了抗癌药物本身外还有对药物递送起着决定作用的药物“运输器”。这里所说的“运输器”是指可用于载药的纳米材料,即纳米药物载体。纳米载体由包括聚合物、脂质体、囊泡、多肽的有机材料以及诸如金纳米颗粒和量子点的无机材料组成。其中,有机材料中的聚合物胶束,脂质纳米胶囊,脂质体或脂质微球得到更为广泛的关注。

[0003] 传统化学材料合成的药物,由于其亲水性差且具有较大的分子量从而导致药物的吸收率低。而纳米载药系统之所以能够引起诸多关注,主要在于其在输送药物中所表现出的独特性能,如尺寸小,比表面积大,更有利于药物的输送。麻省理工学院利用纳米技术研制出只攻击癌细胞本身,不会影响到健康组织的抗癌药“纳米细胞”。这项研究的负责人、麻省理工学院生物工程学教授拉姆·萨西斯克哈仁说:“化疗的最大挑战是它对健康细胞的毒性以及癌细胞的抗药性,而‘纳米细胞’可以克服这两个问题。”这种‘纳米细胞’的直径只有200nm,但其内部却含有两种抗癌药。它的外层载有能杀死肿瘤血管的“抗血管生长”药物,内层则有能杀死癌细胞的化疗药物。

[0004] 聚合物乳剂递送系统已广泛用于包封药物。许多聚合物纳米药物递送系统在临床应用中得到批准,或正在用于治疗癌症的临床试验研究中。日本化药公司利用高分子聚合物纳米材料包裹抗癌药,开发出了直径约为50nm内部含有抗癌药的纳米粒子。研究发现,将纳米粒子注入静脉后,因为正常组织周围的血管没有缝隙,而癌组织周围的血管有100nm左右的缝隙,所以纳米粒子会从这些缝隙中渗透出来攻击癌细胞,但不会损害正常细胞。由于抗癌药能够有效地抵达癌细胞,所以有望提高肿瘤治疗效果,并减少副作用。

[0005] 纳米药物载体是纳米生物技术领域的前沿和热点问题,药物被“纳米化”后,其理化性质,纳米药物的药代动力学特征均可能发生改变;然而对于药物纳米制剂的生物安全性评价标准和评价方法,目前来说国际上还没有一个统一、完善的实施办法。纳米粒子的体外评价由于快速简单,故多为研究者首选,而对于纳米药物载体真实进入体内的有关研究如真实分布情况,生物相容性,机体代谢情况等甚少。其中载体在体内的代谢情况与生物体的健康密不可分,过量的药物剂量可能会引起载体代谢缓慢从而对生物体产生毒副作用。因此,药物载体的定量测定对于考察该材料是否适于临床应用尤为重要。

[0006] 免疫分析法是一种利用抗原和抗体特异性结合发生免疫反应的分析方法,其在疾病防治、临床检测、生化分析等方面都有着十分广泛的应用。其中,荧光免疫技术,不仅充分利用了免疫分析的特异性,还与荧光的敏感性相结合,使检测的灵敏度进一步提高。荧光共振能量转移技术比常规荧光技术具有更强的抗干扰能力,能够避免散射光的影响,光学效

率大大提高,从而实现超灵敏测定。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种荧光免疫定量检测MFAP纳米药物载体的方法,以介孔二氧化硅纳米颗粒为基体,以荧光染料氟硼吡咯(BODIPY)和罗丹明B共掺杂,采用过碘酸钠法偶联抗体提高了偶联效率,消除了交联剂对抗体活性的影响。充分利用了免疫学反应中抗原抗体的高特异性,并且与荧光的敏感性相结合,使免疫反应的信号进一步提高,实现了对纳米药物载体的超灵敏检测。

[0008] 本发明提供的一种荧光免疫定量检测MFAP纳米药物载体的方法,包括以下步骤:

[0009] a、MFAP全抗原的制备;

[0010] b、抗MFAP高特异性多克隆抗体的制备;

[0011] c、二氧化硅荧光纳米标记探针的制备;

[0012] d、二氧化硅荧光纳米标记探针采用过碘酸钠法偶联抗体;

[0013] e、荧光免疫定量检测MFAP纳米药物载体的方法建立;以MFAP标准品浓度的对数为横坐标,荧光强度值为纵坐标绘制标准曲线,构建浓度与荧光强度线性关系,从而定量检测出MFAP的浓度。

[0014] 步骤a所述MFAP全抗原的制备,包括以下步骤:

[0015] a-1、聚琥珀酰亚胺PSI,N-(3-氨基丙基)咪唑NAPI和油胺OAm共同反应,得到PSI-OAm-NAPI两亲聚合纳米药物载体MFAP;

[0016] a-2、取制备的MFAP纳米粒子和聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物mPEG-PLGA,共同溶解到三氯甲烷溶液中;

[0017] a-3、再步骤a-2制备的溶液加入到氢氧化钠溶液中,超声;

[0018] a-4、然后,蒸发除去溶液中的三氯甲烷,高速离心后,将沉淀分散到的磷酸盐缓冲液中,得水解后的MFAP溶液;

[0019] a-5、将水解后的MFAP溶液加入到N-羟基琥珀酰亚胺和1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐的磷酸盐缓冲液中,震荡后,加入牛血清白蛋白BSA,培养后离心,将得到的沉淀分散到磷酸盐缓冲液中,透析得免疫原。

[0020] a-6、重复步骤a-5,将牛血清白蛋白BSA替换为鸡卵清蛋白OVA,制得包被抗原。

[0021] 步骤a-3中所述氢氧化钠溶液为现配现用,浓度约0.003-0.008mg/mL。

[0022] 步骤a-4中所述水解后的MFAP溶液浓度为1-8mg/mL。

[0023] 进一步的,制得的免疫原与包被抗原的浓度均为1-4mg/mL。

[0024] 具体的,所述MFAP全抗原的制备,包括以下步骤:

[0025] a-1、聚琥珀酰亚胺PSI,N-(3-氨基丙基)咪唑NAPI和油胺OAm共同反应,得到PSI-OAm-NAPI两亲聚合纳米药物载体MFAP;

[0026] a-2、取步骤a-1制备的MFAP纳米粒子1-10mg和聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物mPEG-PLGA 0.1-0.5mg,共同溶解到0.2-3mL三氯甲烷溶液中;

[0027] a-3、然后,加入4-20mL的新鲜配制氢氧化钠溶液中,于200-500W功率下,超声4-10min;

[0028] a-4、然后,在45-65℃下蒸发除去溶液中的三氯甲烷,并于10000-13000r/min下高

速离心,将沉淀分散到0.5-2mL的磷酸盐缓冲液中,得水解后的MFAP溶液。

[0029] a-5、取1mL水解后的MFAP溶液,加入1mL包含0.5-2mg的N-羟基琥珀酰亚胺和0.05-1mg的1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐的磷酸盐缓冲液,震荡15-30min后加入1-8mg牛血清白蛋白BSA,于25℃温育2-5h后离心10-20min,转速12000-20000r/min。将得到的沉淀分散到磷酸盐缓冲液中,装入截留分子量为8000-14000Da的透析袋,用磷酸盐缓冲溶液透析6-24小时,得免疫原,并于4℃低温保存。

[0030] a-6、取1mL水解后的MFAP溶液,加入1mL包含0.5-2mg的N-羟基琥珀酰亚胺和0.05-1mg的1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐的磷酸盐缓冲液,震荡15-30min后加入1-8mg鸡卵清蛋白OVA,于25℃温育2-5h后离心10-20min,转速12000-20000r/min。将得到的沉淀分散到磷酸盐缓冲液中,装入截留分子量为8000-14000Da的透析袋,用磷酸盐缓冲溶液透析6-24小时,得包被抗原,并于4℃低温保存。

[0031] 所述步骤b具体包括以下步骤:

[0032] b-1、首次免疫:将免疫原与弗氏完全佐剂等体积比混合,用注射器乳化好后采用背部皮下注射方式免疫新西兰大白兔,剪去背部毛发,并用医用酒精消毒,皮下注射7-11个点,总剂量1.0-2.0mg/kg/次,三周后进行加强免疫;所述新西兰大白兔为8只体重约2.5kg,月龄2个月以上的雄性新西兰大白兔,其中6只兔子为实验兔,进行免疫注射;2只兔为空白对照组,不做任何处理。

[0033] b-2、加强免疫:采取同样的背部皮下注射方式和注射计量进行注射免疫,不同的为加强免疫所用佐剂为弗氏不完全佐剂,此后每两周进行一次加强免疫,中间周于兔耳缘采血测效价,直到抗体效价达到1:64000后最终加强免疫一次,一周后于颈动脉采血,纯化得到抗MFAP高特异性多克隆抗体。

[0034] 步骤c包括以下步骤:

[0035] c-1、将十六烷基三甲基溴化铵CTAB溶于去离子水;

[0036] c-2、加入乙二醇和浓氨水;

[0037] c-3、之后加入正硅酸乙酯TEOS反应;

[0038] c-4、然后,再加入混合好的BODIPY溶液和罗丹明B溶液,再加入三甲氧基甲基硅烷MTMS,反应;

[0039] c-5、最后,加入3-氨丙基三乙氧基硅烷APTES继续反应,完成反应后,搅拌冷却至室温并离心洗涤,冷冻干燥,得二氧化硅荧光纳米标记探针。

[0040] 优选的,所述步骤c需全程回流冷凝。从步骤c-1开始,全程均在60-70℃条件下反应。

[0041] 步骤c-1中十六烷基三甲基溴化铵CTAB在60-70℃搅拌条件下溶于去离子水中。

[0042] 步骤c-3中加入乙二醇和浓氨水后的3-6min内加入正硅酸乙酯反应30-60min。

[0043] 步骤c-4所述反应时间为2-4h。

[0044] 步骤c-4所述BODIPY溶液制备方法为称取摩尔质量为0.001-0.006mmol的BODIPY溶于1mLDMF,所述罗丹明B溶液制备方法为0.001-0.006mmol的罗丹明B溶于1mL去离子水;混合好的BODIPY溶液和罗丹明B溶液事先混合好保证反应过程中介孔二氧化硅吸附两种染料到介孔中的能力相同,避免一种染料先加入占据大多数介孔。

[0045] 进一步的,步骤c-4中BODIPY和罗丹明B摩尔比为1:1,并控制混合前BODIPY溶液和

罗丹明B溶液浓度为0.001mmol/mL,0.002mmol/mL,0.003mmol/mL,0.004mmol/mL,0.005mmol/mL,0.006mmol/mL;一系列加入量考察择优选择。优选的,为0.004mmol/mL,0.005mmol/mL的浓度,所制备的荧光纳米标记探针荧光强度高,稳定性好。

[0046] 步骤c-4混合前BODIPY溶液浓度为0.001mmol/mL-0.006mmol/mL;混合前罗丹明B溶液浓度为0.001mmol/mL-0.006mmol/mL。

[0047] 所述BODIPY制备方法为:

[0048] A、20-25℃下在含有40-60mL水的圆底烧瓶中边搅拌边加入1-3mL吡咯,1-3mL均三苯甲醛,充分搅拌均匀;

[0049] B、加入0.2-1mL浓HCl,并于20-25℃反应12-24h,有大量黑色沉淀生成,抽滤后用石油醚洗涤,得到粗产品粉末1;

[0050] C、取200-600mg粗产品粉末1溶于40-60mL无水四氢呋喃中,在磁力搅拌下加入N-氯代丁二酰亚胺NCS 300-700mg,20-25℃反应1-3h。

[0051] D、反应完毕后将混合物加入到100-300mL水中,用20-60mL二氯甲烷萃取三次,10-30g无水硫酸钠干燥,减压旋干。

[0052] E、在旋干后的产品中加入20-60mL二氯甲烷充分溶解,在磁力搅拌下加入2,3-二氯-5,6-二氰对苯醌DDQ 400-600mg反应5-20min,之后加入1-2mL三乙胺反应0.5-2h,

[0053] F、最后加入三氟化硼乙醚1-3mL反应1-3h,反应完毕后用30-60mL二氯甲烷萃取三次,无水硫酸钠干燥,减压旋干,经硅胶柱层析分离提纯(300-400目硅胶粉,石油醚/二氯甲烷=10/1,V/V)得纯BODIPY。

[0054] 步骤c-5所述反应时间为1-2h。

[0055] 进一步的,步骤c-5制备得到的二氧化硅荧光纳米标记探针后避光密封保存。

[0056] 步骤c下具体为:

[0057] c-1、取30-80mg十六烷基三甲基溴化铵CTAB,在60-70℃磁力搅拌下溶于含有40-60mL超纯水的三口烧瓶中;

[0058] c-2、加入乙二醇500-800μL和浓氨水1-3mL;

[0059] c-3、加入乙二醇和浓氨水后3-6min内加入100-400μL正硅酸乙酯TEOS反应30-60min;

[0060] c-4、浓度为0.001-0.006mmol/mL的0.5mL BODIPY溶液和浓度为0.001-0.006mmol/mL 0.5mL罗丹明B溶液,混匀,加入步骤c-3制备溶液中,并加入三甲氧基甲基硅烷MTMS 20-50μL,反应2-4h。

[0061] c-5、加入60-100μL的3-氨丙基三乙氧基硅烷APTES继续反应1-2h,完成反应后搅拌冷却至室温并离心洗涤2-4次,冷冻干燥,得二氧化硅荧光纳米粒子,即二氧化硅荧光纳米标记探针,避光密封保存。

[0062] 步骤d包括以下步骤:

[0063] d-1、抗体的氧化:取步骤b制备的抗MFAP高特异性多克隆抗体溶解到醋酸缓冲液中,再加入过碘酸钠溶液,于4℃避光搅拌,超滤除去未反应的过碘酸钠,得到氧化抗体;

[0064] d-2、荧光纳米粒子与抗体的偶联:将步骤c制备的二氧化硅荧光纳米标记探针分散到缓冲溶液中,在搅拌下加入步骤d-1制备的氧化抗体,于4℃下避光搅拌,之后加入硼氢化钠溶液继续4℃避光搅拌,将反应后的溶液离心,洗涤分散到缓冲溶液中,4℃储存备用。

[0065] 优选的,步骤d-1中,所述醋酸缓冲液0.05M,pH=4.6;所述过碘酸钠2mg/mL,pH=4.6;所述超滤用滤膜为0.45 μ m滤膜。步骤d-1中,所述搅拌时间为2-4h。

[0066] 优选的,步骤d-2中第一步搅拌时间为12-36h,第二步搅拌时间为2-4h。所述硼氢化钠溶液为现配现用,浓度为2mg/mL,pH=7.1。

[0067] 具体为,步骤d包括以下步骤:

[0068] d-1、抗体的氧化:取多克隆抗体1-4mg溶解到醋酸缓冲液中,加入100-300 μ L过碘酸钠溶液,于4 $^{\circ}$ C避光搅拌2-4h,超滤除去未反应的过碘酸钠,得到氧化抗体;

[0069] d-2、荧光纳米粒子与抗体的偶联:将2-10mg荧光二氧化硅纳米粒子用PBS清洗2-4次后分散到3-6mL PBS中,在磁力搅拌下加入d-1中的氧化抗体,于4 $^{\circ}$ C下避光搅拌12-36h,之后加入100-300 μ L硼氢化钠溶液继续4 $^{\circ}$ C避光搅拌2-4h,将反应后的溶液离心洗涤分散到PBS中,4 $^{\circ}$ C储存备用。

[0070] 步骤e包括以下步骤:

[0071] e-1、包被:用碳酸盐缓冲液稀释将包被抗原溶液稀释,包被96孔酶标板,4 $^{\circ}$ C温育过夜后,用PBST洗涤液洗涤,甩干;

[0072] e-2、封闭:每孔加入封闭液,恒温培养箱温育后,用PBST洗涤液洗涤,甩干;

[0073] e-3、加样竞争:每孔加入不同浓度的MFAP标准液和与二氧化硅荧光纳米标记探针偶联的抗体,温育后,用PBST洗涤,甩干;

[0074] e-4、在酶标仪上测定各孔在激发波长为485nm,发射波长为590nm时的荧光强度,以MFAP标准品浓度的对数为横坐标,荧光强度值为纵坐标绘制标准曲线,构建浓度与荧光强度线性关系,从而定量检测出MFAP的浓度。

[0075] 步骤e-2所述温育是指37 $^{\circ}$ C恒温培养箱温育0.5-2h;

[0076] 步骤e-3所述温育是指37 $^{\circ}$ C温育1.5-3.5h。

[0077] 步骤e-3中所述不同浓度的MFAP标准液的制备方法为:用0.01M,pH=7.4的PBS缓冲溶液将PSI-OAm-NAPI (MFAP) 纳米药物载体稀释到指定的浓度;

[0078] 步骤e-4中所述线性关系为:标准曲线的线性方程为 $A=34877.2-13538.71\lg C$,A为荧光强度,C为MFAP的浓度;相关系数 $R=-0.997$,线性范围为 $0.036-10^4$ ng/mL;检出限为1.4pg/mL。

[0079] 所述步骤e具体包括以下步骤:

[0080] e-1、包被:用碳酸盐缓冲液稀释将包被抗原溶液稀释到3-40 μ g/mL,每孔70-200 μ L包被96孔酶标板,4 $^{\circ}$ C温育过夜后用PBST洗涤液洗涤2-4次,每次3-5min,甩干;

[0081] e-2、封闭:每孔加入100-250 μ L的封闭液,37 $^{\circ}$ C恒温培养箱温育0.5-2h后用PBST洗涤液洗涤2-4次,每次3-5min,甩干;

[0082] e-3、加样竞争:每孔加入40-100 μ L不同浓度的MFAP标准液和40-100 μ L荧光二氧化硅纳米粒子标记的多克隆抗体,37 $^{\circ}$ C温育1.5-3.5h后用PBST洗涤液洗涤2-4次,每次3-5min,甩干;

[0083] e-4、在酶标仪上测定各孔在激发波长为485nm,发射波长为590nm时的荧光强度,以MFAP标准品浓度的对数为横坐标,荧光强度值为纵坐标绘制标准曲线,构建浓度与荧光强度线性关系,从而定量检测出MFAP的浓度。

[0084] 本发明建立了一种超灵敏荧光免疫定量检测MFAP纳米药物载体的方法,与现有技

术相比,本发明具有以下优点:

[0085] (1) 以介孔二氧化硅纳米颗粒为基体,网状的介孔结构能够固定荧光染料并将其分隔开减少内滤作用,并且比表面积大,荧光染料负载率大幅度高,保持好的光稳定性;

[0086] (2) 以荧光染料BODIPY和罗丹明B共掺杂,两种荧光染料之间能够发生荧光共振能量转移,提高荧光强度,减弱猝灭;

[0087] (3) 采用过碘酸钠法氧化抗体偶联荧光标记物,提高了偶联效率,消除了交联剂对抗体活性的影响;

[0088] (4) 充分利用了免疫学反应中抗原抗体的高特异性,并且与荧光的敏感性相结合,使免疫反应的信号进一步提高,该方法方便快捷、检测成本低、专一性强、可进行高通量测定,实现对纳米药物载体的超灵敏检测。

附图说明

[0089] 图1为实施例1得到的标准曲线;

[0090] 图2为以470nm激发浓度为0.004mmol/mL的罗丹明B二氧化硅纳米粒子和制备的混合前各染料浓度为0.004mmol/mL的RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子的荧光发射谱图;

[0091] 图3为以470nm激发二氧化硅荧光纳米标记探针和实施例1制备的二氧化硅荧光纳米标记探针偶联抗MFAP抗体后的荧光发射谱图;

[0092] 图4为所用BODIPY制备方法。

具体实施方式

[0093] 本发明使用的各原料的来源如下:

[0094] 弗氏完全佐剂、牛血清白蛋白和鸡卵清白蛋白购买自生工生物工程(上海)股份有限公司。

[0095] 聚琥珀酰亚胺购买自石家庄德赛化工有限公司。

[0096] 聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物(mPEG-PLGA)购买自山东岱罡生物有限公司。

[0097] 本发明中所有的透析袋,如无特殊说明,均指截留分子量为8000-14000Da的透析袋。

[0098] 其他试剂均可从市场上的销售厂家购买得到。

[0099] 本发明涉及到的各溶液如无特殊说明均指以下溶液,各溶液的制备方法为:

[0100] 磷酸盐缓冲溶液PBS (0.01M, pH=7.4): 称取NaCl 8.0g、KCl 0.1g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.29g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.96g溶解于蒸馏水中并定容到1000mL;

[0101] 洗涤液(PBST溶液): 于1000mL, 0.01M, pH=7.4磷酸盐缓冲溶液中加入500 μL Tween-20,混合均匀;

[0102] 包被缓冲液CB (0.05M, pH=9.6): 称取 Na_2CO_3 1.59g、 NaHCO_3 2.94g溶解于蒸馏水中并定容到1000mL;

[0103] 封闭液: 1mg酪蛋白溶于1mL 0.01M, pH=7.4的磷酸盐缓冲液中,混合均匀。

[0104] 实施例1

[0105] 一种荧光免疫定量检测MFAP纳米药物载体的方法,包括以下步骤:

[0106] a、MFAP全抗原的制备;

[0107] a-1、取32mL N,N-二甲基甲酰胺并加热至60℃,之后加入1.6g聚琥珀酰亚胺PSI和1.63mL油胺OAm,反应10min后加入0.83mL N-(3-氨基丙基)咪唑NAPI,并将温度升至100℃反应5小时后,冷却至室温,加入160mL甲醇在磁力搅拌下使其均匀沉淀,离心分离后取沉淀干燥,即可制得PSI-OAm-NAPI (MFAP);

[0108] a-2、取该纳米粒子10mg,聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物mPEG-PLGA 0.1mg,共同溶解到1mL三氯甲烷溶液中;

[0109] a-3、加入到10mL浓度0.006mg/mL的新配制氢氧化钠溶液中,于300W功率下,超声6min;

[0110] a-4、55℃下蒸发除去溶液中的三氯甲烷,并于13000r/min下高速离心15min,取沉淀分散到2mL的磷酸盐缓冲液中,得水解后的MFAP溶液,其浓度为5mg/mL。

[0111] a-5、纳米材料通过与大分子蛋白质的偶联得到全抗原。通过共价偶联牛血清白蛋白BSA制成免疫抗原,偶联鸡卵清蛋白OVA制成包被抗原。

[0112] 取1mL水解后的MFAP溶液,加入1mL包含0.7mg的N-羟基琥珀酰亚胺和0.1mg的1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐的磷酸盐缓冲液,震荡30min后加入2mg牛血清白蛋白BSA,25℃下温育3h后离心,转速为12000r/min,离心10min。将得到的沉淀分散到磷酸盐缓冲液中,装入截留分子量为8000-14000Da的透析袋,用磷酸盐缓冲溶液透析12小时,得免疫抗原,并于4℃低温保存,浓度为2mg/mL;

[0113] a-6、用鸡卵清蛋白OVA替换步骤a-2中的牛血清白蛋白BSA,其他条件保持不变,即可制得包被抗原,浓度为2mg/mL。

[0114] b、抗MFAP纳米药物载体高特异性多克隆抗体的制备;

[0115] b-1、首次免疫:将免疫原与弗氏完全佐剂等体积比混合,用注射器乳化好后采用背部皮下注射方式免疫新西兰大白兔。剪去背部毛发,并用医用酒精消毒,皮下注射7-11个点,总剂量1.0mg/kg/次。三周后进行加强免疫;

[0116] 所述新西兰大白兔为8只体重约2.5kg,月龄2个月以上的雄性新西兰大白兔。其中6只兔子为实验兔,进行免疫注射;2只兔子空白对照组,不做任何处理。

[0117] b-2、加强免疫:采取同样的背部皮下注射方式注射,注射量为1.0mg/kg/次;不同的为加强免疫所用佐剂为弗氏不完全佐剂。此后每两周再进行一次加强免疫,中间周于兔耳缘采血测效价,直到抗体效价达到1:64000;之后最终加强免疫一次,一周后于颈动脉采血,纯化得到多克隆抗体。

[0118] c、二氧化硅荧光纳米标记探针的制备;

[0119] c-1、先取50mg十六烷基三甲基溴化铵CTAB,在65℃磁力搅拌下溶于含有50mL超纯水的三口烧瓶中。

[0120] c-2、在65℃条件下,加入乙二醇650μL,浓氨水2.4mL。

[0121] c-3、在加入乙二醇和浓氨水后的5min内加入200μL正硅酸乙酯(TEOS)反应30min。

[0122] c-4、将浓度为0.004mmol/mL的BODIPY溶液0.5mL和浓度为0.004mmol/mL罗丹明B溶液0.5mL混合均匀后加入三口烧瓶中,并加入三甲氧基甲基硅烷MTMS 30μL,反应2h。

[0123] c-5、加入90μL的3-氨基丙基三乙氧基硅烷APTES继续反应1.5h。完成反应后搅拌冷却至室温并离心洗涤2次,冷冻干燥得荧光二氧化硅纳米粒子,避光密封保存。

[0124] 步骤c制备过程中,全称回流冷凝。

[0125] 所用BODIPY具体结构为图4产物,具体制备过程如下:

[0126] a、25℃下在含有50mL水的圆底烧瓶中边搅拌边加入2mL吡咯,1.5mL均三苯甲醛,充分搅拌均匀;

[0127] b、加入0.5mL浓HCl,并于25℃反应24h,有大量黑色沉淀生成,抽滤后用石油醚洗涤,得到粗产品粉末1;

[0128] c、取500mg粗产品粉末1溶于50mL无水四氢呋喃中,在磁力搅拌下加入N-氯代丁二酰亚胺NCS 507mg,25℃反应2h。

[0129] d、反应完毕后将混合物加入到200mL水中,用50mL二氯甲烷萃取三次,15g无水硫酸钠干燥,减压旋干。

[0130] e、在旋干后的产物中加入50mL二氯甲烷充分溶解,在磁力搅拌下加入2,3-二氯-5,6-二氰对苯醌DDQ 517mg反应10min,之后加入1.5mL三乙胺反应1h,

[0131] f、最后加入三氟化硼乙醚2.5mL反应2h,反应完毕后用50mL二氯甲烷萃取三次,15g无水硫酸钠干燥,减压旋干,经硅胶柱层析分离提纯(300-400目硅胶粉,石油醚/二氯甲烷=10/1,V/V)得BODIPY。

[0132] 荧光二氧化硅纳米粒子能量的转移表征:

[0133] 以470nm激发浓度为0.004mmol/mL的罗丹明B二氧化硅纳米粒子和实施制备的混合前各染料浓度为0.004mmol/mL的RB-BODIPY-FRET二氧化硅纳米粒子的荧光发射谱图;。从图2中可以看出,同浓度下加入了BODIPY后罗丹明B所发出的荧光明显增强。

[0134] d、二氧化硅荧光纳米标记探针采用过碘酸钠法偶联抗体;

[0135] d-1、抗体的氧化:取多克隆抗体4mg溶解到300μL醋酸缓冲液(0.05M,pH=4.6)中。加入700μL浓度为2mg/mL,pH=4.6的过碘酸钠溶液,于4℃避光搅拌2h,用滤膜为0.45μm滤膜超滤除去未反应的过碘酸钠,得氧化抗体。

[0136] d-2、荧光纳米探针与抗体的偶联:将8mg步骤c制备的荧光二氧化硅纳米粒子用PBS清洗3次后分散到3mLPBS中。在磁力搅拌下加入步骤d-1制备的氧化抗体,于4℃下避光搅拌20h,之后加入100μL,浓度为2mg/mL,pH=7.1的硼氢化钠溶液继续4℃避光搅拌2h。将反应后的溶液离心洗涤分散到PBS中,4℃储存备用。

[0137] 荧光二氧化硅纳米粒子成功偶联抗体表征:

[0138] 以470nm激发荧光二氧化硅纳米粒子和荧光二氧化硅纳米粒子偶联抗MFAP抗体后的荧光发射谱图。从图3中可以看出荧光二氧化硅纳米粒子发射峰在576nm,荧光二氧化硅纳米粒子偶联抗MFAP抗体后发射峰在582nm,偶联抗MFAP抗体后罗丹明B的发射峰位置向长波方向移动了6nm,表明成功偶联抗体。

[0139] e、超灵敏荧光免疫方法的建立;

[0140] e-1、包被:用0.05M,pH=9.6的碳酸盐缓冲液将包被抗原溶液稀释到18μg/mL,每孔100μL包被96孔酶标板,于4℃温育过夜后用PBST洗涤液洗涤3次,每次3min,甩干;

[0141] e-2、封闭:每孔加入200μL浓度为1%的酪蛋白封闭液,于37℃温育1.5h后用PBST洗涤液洗涤3次,每次3min,甩干;

[0142] e-3、加样竞争:每孔加入50μL浓度分别为0.001ng/mL、0.01ng/mL、0.1ng/mL、1ng/mL、10ng/mL、10²ng/mL、10³ng/mL的MFAP标准液和50μL二氧化硅荧光纳米标记探针偶联的抗体10μg/mL,37℃温育2h后,用PBST洗涤液洗涤3次,每次3min,甩干;

[0143] e-4、在酶标仪上测定各孔在激发波长为485nm,发射波长为590nm时的荧光强度。以MFAP标准品浓度的对数为横坐标,荧光强度值为纵坐标绘制标准曲线,从而定量检测出MFAP的浓度。如图1所得标准曲线的线性方程为: $A=34877.2-13538.71\lg C$,A为荧光强度,C为MFAP的浓度;相关系数 $R=-0.997$,线性范围为0.036-104ng/mL,检出限为1.4pg/mL。

[0144] 实施例2

[0145] 检测未知浓度的未知浓度的MFAP待测液浓度。

[0146] 充实实施例1,只是将步骤e-3中的不同浓度的MFAP标准液替换为未知浓度的MFAP待测液,然后在在酶标仪上测定各孔在激发波长为485nm,发射波长为590nm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MFAP待测液的浓度。

[0147]

样品	待测样品检出量 (ng/mL)	加标浓度 (ng/mL)	加标测定值 (ng/mL)	回收率 (%)	相对标准偏差 (n=5, %)
1	1.1	1	2.12	103	1.3
		5	6.07	99.4	2.1
		10	11.39	102.9	2.4
2	10.07	1	11.1	103	1.9
		5	15.06	99.9	2.2
		10	20.22	101.5	1.6

[0148] 加标回收测定时只需把每孔加入50μL待测样品改成加入25μL待测样品和25μL加标浓度,其他条件不变。回收率=(加标测定值-待测样品检出量)/加标浓度×100%

[0149] 本实验中的加标回收率为99.4%-103%,测定5次相对标准偏差均很小。

[0150] 上述参照实施例对一种超灵敏荧光免疫定量检测MFAP纳米药物载体的方法进行详细描述,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。

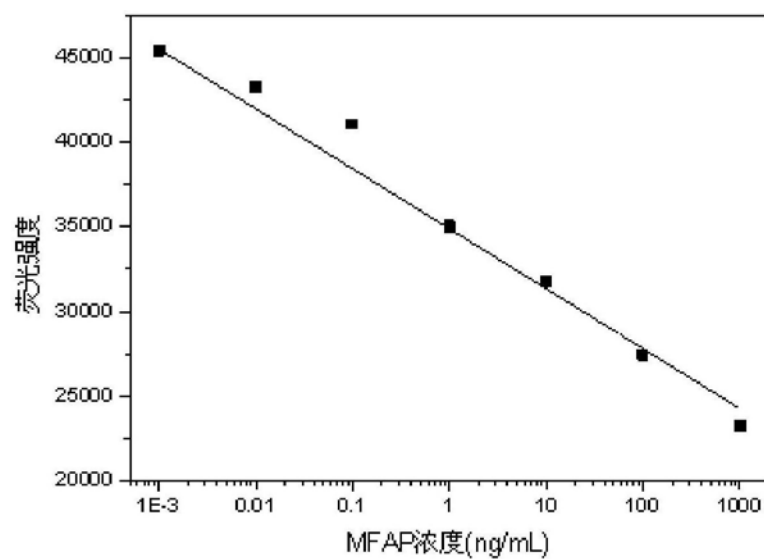


图1

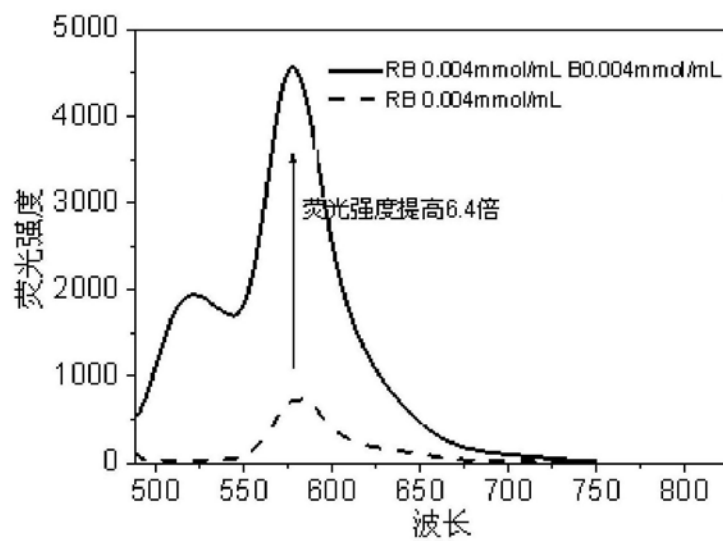


图2

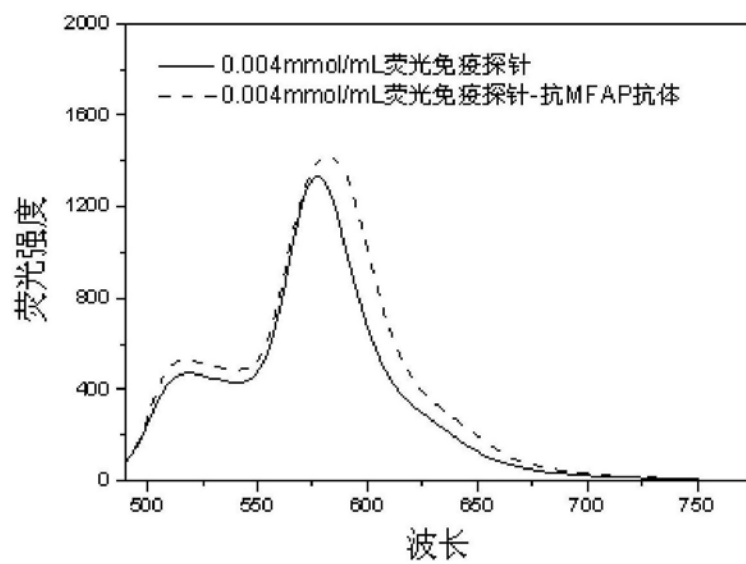


图3

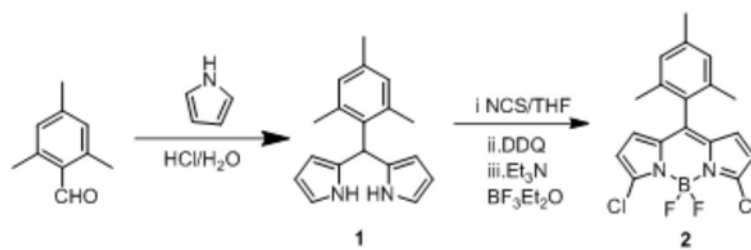


图4

专利名称(译)	一种荧光免疫定量检测MFAP纳米药物载体的方法		
公开(公告)号	CN107727844A	公开(公告)日	2018-02-23
申请号	CN2017111150950.2	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 闫希		
发明人	张明翠 闫希		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N2430/60		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种荧光免疫定量检测MFAP纳米药物载体的方法，本发明以介孔二氧化硅纳米颗粒为基体，二氧化硅纳米粒子比表面积大，稳定性好，荧光染料负载率高；以荧光染料氟硼吡咯(BODIPY)和罗丹明B共掺杂，两种荧光染料之间能够发生荧光共振能量转移，提高了荧光强度，减少了猝灭；采用过碘酸钠法偶联抗体提高了偶联效率，消除了交联剂对抗体活性的影响。充分利用了免疫学反应中抗原抗体的高特异性，并且与荧光的敏感性相结合，使免疫反应的信号进一步提高，实现了对纳米药物载体的超灵敏检测。

