



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109490526 A

(43)申请公布日 2019.03.19

(21)申请号 201710848982.3

(22)申请日 2017.09.13

(71)申请人 南京东纳生物科技有限公司

地址 211112 江苏省南京市江宁区龙眠大道568号南京生命科技创新园2号楼北区6-7层

(72)发明人 张宇 娄豆豆 韩国志

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

C09K 11/06(2006.01)

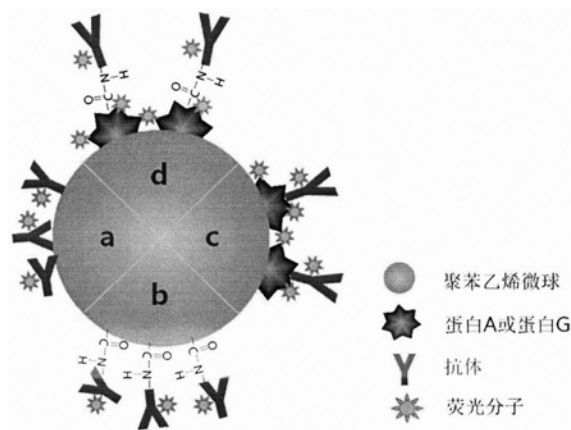
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种抗体取向修饰的荧光微球探针的制备方法及其在免疫层析中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种抗体取向修饰的荧光微球探针的制备方法,可实现抗体在微球表面高效、取向、牢固地固定,使Fab端充分暴露且保持生物活性。该荧光微球探针的制备方法包括:活化羧基微球表面的羧基基团,化学偶联固定蛋白A或蛋白G,特异性结合抗体的Fc端,进而通过化学键将抗体不可逆地固定在蛋白A或蛋白G基底上,最后偶联荧光分子。本发明还提供了上述荧光微球探针在免疫层析中的应用,可显著提高检测的灵敏度和试纸条的稳定性。



1. 一种抗体取向修饰的荧光微球探针的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 用交联剂活化羧基微球表面的羧基基团,再将能够与IgG Fc端特异性结合的蛋白质偶联到微球上,得到Fc端特异的微球;

2) 将Fc端特异的微球与抗体孵育,使抗体取向修饰在微球表面,进而通过交联剂将抗体通过化学偶联的方式固定在微球上,得到抗体取向修饰的微球;

3) 将抗体取向修饰的微球与带有活性基团的荧光分子偶联,得到抗体取向修饰的荧光微球探针。

2. 如权利要求1所述的抗体取向修饰的荧光微球探针的制备方法,其特征在于:所述的微球的种类为聚苯乙烯微球,微球的粒径为50~500nm。

3. 如权利要求1所述的抗体取向修饰的荧光微球探针的制备方法,其特征在于:在步骤1)中,所述交联剂可为单独的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)联用或1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)与N-羟基硫代琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)联用;所述能够与IgG Fc端特异性结合的蛋白质可为天然蛋白G、天然蛋白A、重组蛋白G或重组蛋白A。

4. 如权利要求1所述的抗体取向修饰的荧光微球探针的制备方法,其特征在于:在步骤2)中,所述孵育的条件可为pH4~7,温度4~37℃,时间1h~12h;所述交联剂为EDC;所述偶联条件可为pH4~7,温度25~37℃,时间1~4h。

5. 如权利要求1所述的抗体取向修饰的荧光微球探针的制备方法,其特征在于:在步骤3)中,所述活性基团可为异硫氰酸根、NHS酯、Sulfo-NHS酯等能够与蛋白质上的氨基化学偶联的基团;所述荧光分子可选自cy5、cy7、罗丹明、荧光素、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 633和Alexa Fluor 647中的一种;所述偶联条件可为pH6~9,温度25~37℃,时间1h~12h。

6. 权利要求1~5中任一项所述的方法所制备得到的抗体取向修饰的荧光微球探针在免疫层析中的应用,其特征在于:包括以下步骤:

1) 将取向修饰的荧光微球探针均匀地喷涂在处理过的聚酯或玻璃纤维垫上,常温干燥24h,得到结合垫;

2) 将硝酸纤维素膜粘贴在PVC底板上,将包被抗体和质控抗体划在硝酸纤维素膜上,得到检测线和质控线;

3) 将样品垫、结合垫、吸水纸按层析方向依次搭接并粘贴在底板上,用斩切机切成宽2~6mm的试纸条,然后将试纸条放置于卡壳内;

4) 在卡壳加样孔内滴加样品,经免疫层析后,插入荧光免疫分析仪中检测层析结果。

7. 如权利要求6所述的应用,其特征在于:在步骤4)中,所述样品可为血清、血浆、全血、尿液等体液或经稀释的上述样品。

一种抗体取向修饰的荧光微球探针的制备方法及其在免疫层析中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗体取向修饰的荧光微球探针的制备方法及其在免疫层析中的应用,属于纳米材料及免疫分析领域。

背景技术

[0002] 免疫层析技术是一种新型快速的免疫分析技术,以便捷、快速、准确和无污染等特点被广泛应用于医学诊断、环境监测和食品安全等领域中标志物的识别和检测。荧光法由于灵敏度高、稳定性好、易于量化等优点,已逐步取代传统的胶体金法。其中,荧光探针的构建方式往往决定试纸条的技术水平。将抗体和荧光分子负载到微球载体上是当前的主流构建方式,与荧光分子直接标记抗体的方法相比,该方法能够有效提高探针靶向抗原能力并放大荧光信号。其中,抗体结合到微球上的数量、修饰到纳米载体上之后抗体的取向、抗体Fab端的免疫活性以及抗体与载体结合的牢固程度对免疫层析的灵敏度、特异性和重复性等指标具有关键影响。

[0003] 当前比较成熟的微球负载抗体的方法为物理吸附法和化学偶联法。此外,也有方法通过在抗体和微球之间引入夹层,间接将抗体修饰在微球上。

[0004] 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。该方法步骤简单,但容易受到抗体等电点、疏水基团分布、浓度、反应温度、孵育时间等各种因素影响,针对不同抗体需要摸索不同的反应条件。不同抗体分子吸附微球的能力不同,并且这种吸附是可逆的,不利于探针的质量控制。

[0005] 化学偶联法中,先活化表面携带活性基团(通常是羧基)的微球,再将抗体分子通过共价键偶联到微球表面。该方法能够保证一定的抗体偶联数量,将抗体牢牢固定在微球表面不易脱落。但共价键无选择地占用抗体上的活性基团,如果占用的基团在抗原结合区域或附近,则会削弱抗体活性。

[0006] 不论是物理吸附还是化学偶联,抗体分子的取向都是随机的,导致部分抗体的Fab端暴露不充分,结合抗原的能力减弱或完全失去。

[0007] 间接修饰的方法有很多种,基本思路都是将夹层材料固定在载体微球上,再将抗体固定在夹层材料上。夹层材料可以是亲和素或链霉亲和素,通过生物素-亲和素作用抓取并固定标记了生物素的抗体。该方法不能实现抗体的取向修饰,并且需要事先将抗体生物素化,降低了抗体的免疫活性。夹层也可以是蛋白A(SPA)或蛋白G(SPG),特异性结合多种动物抗体大多数亚型的Fc端,结合速度快、效率高。夹层还可以是定制的具有IgG亲和性的多肽分子,也能特异性结合抗体的Fc端。蛋白质或多肽与Fc端的特异性结合使抗体取向修饰在载体微球上,Fab端充分暴露,且免疫活性不受影响。但这种结合是可逆的,且结合的强度与抗体的来源、亚型相关。蛋白A/G和抗体Fc端易结合又易解离的特质被广泛应用亲和层析法纯化抗体,但如果应用于制备探针和免疫层析,则需要抗体与载体更牢固地结合。否则多次洗涤、喷涂干燥、长期保存等极端条件,易导致抗体脱落,探针活性降低。

发明内容

[0008] 为解决上述现有技术存在的问题,本发明的目的在于提供一种抗体取向修饰的荧光微球探针的制备方法及其在免疫层析中的应用。该制备方法通过将蛋白A(或蛋白G)、抗体逐层修饰在载体微球上,并用交联剂将抗体牢固地固定在蛋白A或蛋白G基底上,可实现抗体的高效结合和取向修饰,使Fab端充分暴露,免疫活性不受影响,且避免抗体脱落。最后修饰荧光分子即得到探针。该探针能够提高侧向免疫层析检测的灵敏度和重复性,以及试纸条保存的稳定性。

[0009] 为实现上述目的,本发明提供了一种抗体取向修饰的荧光微球探针的制备方法,包括以下步骤:

[0010] 1) 用交联剂活化羧基微球表面的羧基基团,再将能够与IgG Fc端特异性结合的蛋白质偶联到微球上,得到Fc端特异的微球;

[0011] 2) 将Fc端特异的微球与抗体孵育,使抗体取向修饰在微球表面,进而通过交联剂将抗体通过化学偶联的方式固定在微球上,得到抗体取向修饰的微球;

[0012] 3) 将抗体取向修饰的微球与带有活性基团的荧光分子偶联,得到抗体取向修饰的荧光微球探针。

[0013] 用于制备上述探针的微球为聚苯乙烯微球,微球的粒径为50~500nm。

[0014] 在步骤1)中,所述的交联剂可为单独的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)联用或1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)与N-羟基硫代琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)联用。所述能够与IgG Fc端特异性结合的蛋白质可为天然蛋白G、天然蛋白A、重组蛋白G或重组蛋白A。

[0015] 在步骤2)中,所述孵育的条件可为pH4~7,温度4~37℃,时间1h~12h;所述交联剂为EDC;所述偶联条件可为pH4~7,温度25~37℃,时间1~4h。

[0016] 在步骤3)中,所述活性基团可为异硫氰酸根、NHS酯、Sulfo-NHS酯等能够与蛋白质上的氨基化学偶联的基团;所述荧光分子可选自cy5-NHS酯、cy7-NHS酯、罗丹明、荧光素、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 633和Alexa Fluor 647中的一种;所述偶联条件可为pH6~9,温度25~37℃,时间1h~12h。

[0017] 抗体取向修饰的荧光微球探针在免疫层析中的应用,包括以下步骤:

[0018] 1) 将取向修饰的荧光微球探针均匀地喷涂在处理过的聚酯或玻璃纤维垫上,常温干燥24h,得到结合垫;

[0019] 2) 将硝酸纤维素膜粘贴在PVC底板上,将包被抗体和质控抗体划在硝酸纤维素膜上,得到检测线和质控线;

[0020] 3) 将样品垫、结合垫、吸水纸按层析方向依次搭接并粘贴在底板上,用斩切机切成宽2~6mm的试纸条,然后将试纸条放置于卡壳内;

[0021] 4) 在卡壳加样孔内滴加样品,经免疫层析后,插入荧光免疫分析仪中检测层析结果。

[0022] 其中,在卡壳加样孔内滴加的样品可为血清、血浆、全血、尿液等体液或经稀释的上述样品。

[0023] 本发明所述的抗体取向修饰的荧光微球探针的制备方法,可实现抗体在微球表面高效、取向、牢固地固定。作为夹层的蛋白A或蛋白G,高效识别并靶向抗体的Fc端,使具有免疫活性的Fab端向外暴露,改善探针结合抗原的效率。随后利用EDC作为交联剂将夹层和抗体通过共价键结合,使抗体不可逆地偶联在载体微球上。此外,这种先取向固定后化学偶联的方式,共价键主要在夹层蛋白和Fc端之间形成,可有效避免传统化学偶联法导致的Fab端位点被占用、免疫活性下降的副作用。上述荧光微球探针应用于免疫层析中,可显著提高检测的灵敏度和试纸条的稳定性。

附图说明

[0024] 图1:不同方法制备的荧光微球探针结构示意图,静电吸附法(a)、化学偶联法(b)、蛋白A/G直接结合抗体法(c)和蛋白A/G取向结合抗体+化学偶联固定的本方法(d);

[0025] 图2:不同方法制备探针时,每1mg微球上抗体的结合效率与脱落程度,静电吸附法(1)、化学偶联法(2)、蛋白G直接结合抗体法(3)和蛋白G取向结合抗体+化学偶联固定的本方法(4);

[0026] 图3:免疫荧光层析试纸条结构图,试纸条由PVC底板1和在底板1上依次搭接的样品垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸水纸5和划在硝酸纤维素膜4上的检测线6和质控线7组成;

[0027] 图4:不同方法制备的探针应用于侧向免疫层析试纸条,检测梯度浓度cTnI样本的结果。化学偶联法(1)、蛋白G直接结合抗体法(2)和蛋白G取向结合抗体+化学偶联固定的本方法(3),R2都可达到0.99,(3)的读值随浓度增长更快;

[0028] 图5:不同方法制备的探针应用于侧向免疫层析试纸条,检测cTnI浓度为0.1ng/mL样本和0ng/mL样本的结果,化学偶联法(1)、蛋白G直接结合抗体法(2)和蛋白G取向结合抗体+化学偶联固定的本方法(3)。

具体实施方式

[0029] 实施例1——靶向cTnI(心肌肌钙蛋白I)的抗体取向修饰的荧光微球探针的制备

[0030] 将蛋白G偶联到EDC/NHS活化的羧基微球上,随后与抗cTnI抗体共孵育并用EDC固定,最后偶联荧光分子。

[0031] 步骤如下:

[0032] 1) 将1mg粒径为150nm的羧基微球分散在1mL pH6的PBS缓冲液中,加入50μg EDC和50μg NHS,25℃活化30min;

[0033] 2) 离心去除多余的交联剂,将沉淀分散在1mL pH7的PBS缓冲液中,加入200μg蛋白G,25℃孵育1h,使蛋白G偶联在微球上;

[0034] 3) 离心洗涤,将沉淀分散在200μL pH7的PBS缓冲液中,加入200μg抗cTnI单克隆抗体(鼠源),25℃孵育1h;

[0035] 4) 在反应体系中加入50μg EDC,25℃继续偶联2h,使抗体通过共价键定向固定在蛋白G上;

[0036] 5) 离心洗涤,将沉淀分散在400μL pH9的CB缓冲液中,加入2μL cy5-NHS酯,37℃孵育1h,使荧光分子偶联在蛋白质的氨基上;

[0037] 6) 离心洗涤,保存在500 μ L含1%BSA和5%蔗糖的PBS溶液中,4℃保存。

[0038] 采用此方法构建的荧光微球探针,抗cTnI抗体取向修饰在微球上,Fab端充分暴露,且抗体在微球上的交联效率可达85%以上。

[0039] 实施例2——检测cTnI的侧向免疫层析荧光试纸条的制备

[0040] 试纸条的基本结构如图1所示。由PVC底板(1)和在底板(1)上依次搭接的样品垫(2)、结合垫(3)、硝酸纤维素膜(4)和吸水纸(5)组成。每个搭接部分的相邻组分需重叠2mm左右,以保证样本在试纸条上顺利进行层析。组装并斩切后的试纸条需装入卡壳,封存在含有干燥剂的锡箔袋中,放入阴凉、干燥环境保存。

[0041] 具体步骤如下:

[0042] 1) 处理样品垫、结合垫:Tris缓冲液中加入0.5%的惰性蛋白(如BSA)、0.05%(如Tween-20)和0.05%的高分子聚合物(如PEG2K),充分混匀后将pH调节为7~8,即得到处理液;每张垫子(规格20cm \times 30cm,可以是聚酯纤维或玻璃纤维材质)用30~40mL处理液浸泡后,25℃干燥24h;

[0043] 2) 喷涂探针:在处理好的结合垫上均匀地喷涂抗体取向修饰的荧光微球探针,25℃干燥24h;

[0044] 3) 处理硝酸纤维素膜:

[0045] a) 将硝酸纤维素膜裁切为2.5cm \times 30cm规格,粘贴在PVC底板的相应位置;

[0046] b) 制备检测线:将另一种抗cTnI的单克隆或多克隆抗体用pH7.4的PBS缓冲液稀释为2mg/mL,按0.8 μ L/cm的速度在硝酸纤维素膜位置(6)处均匀划线;

[0047] c) 制备质控线:将羊抗鼠多克隆抗体用pH7.4的PBS缓冲液稀释为0.5mg/mL,按0.8 μ L/cm的速度在硝酸纤维素膜距离位置(6)3~5mm的位置(7)处均匀划线;

[0048] d) 划有检测线和质控线的硝酸纤维素膜25℃环干燥过夜;

[0049] 4) 裁切样品垫、结合垫和吸水纸:处理过的样品垫裁切为2.5cm \times 30cm规格,喷涂探针的结合垫斩切为1cm \times 30cm规格,吸水纸斩切为2.4cm \times 30cm规格;

[0050] 5) 组装试纸条:将样品垫、结合垫、吸水纸依次搭接粘贴在已经贴有硝酸纤维素膜的PVC底板上,贴好后用斩切机斩切为4~6mm宽的试纸条;

[0051] 6) 包装、保存:将试纸条分别装入卡壳中并压紧,封存在含有干燥剂的锡箔袋中,在阴凉、干燥的环境中保存。

[0052] 实施例3——侧向免疫层析试纸条检测样本中的cTnI

[0053] 具体步骤如下:

[0054] 1) 将血清、血浆或全血样本恢复至室温;

[0055] 2) 将试纸条从锡箔袋中取出;

[0056] 3) 取100 μ L样本滴加到加样孔内;

[0057] 层析15min后将试纸条插入荧光定量免疫分析仪中读取检测结果。

[0058] 以上所述的实施实例对本发明的技术方案进行了详细的说明,应理解的是以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用于限制本发明,任何熟悉本专业的技术人员,在不脱离本发明技术方案范围内,当可利用上述揭示的技术内容做出些许改动或修饰为等同变化的等效实施例,但是,凡在本发明的原则范围内所做的任何修改或改进等,均应包含在本发明范围之内。

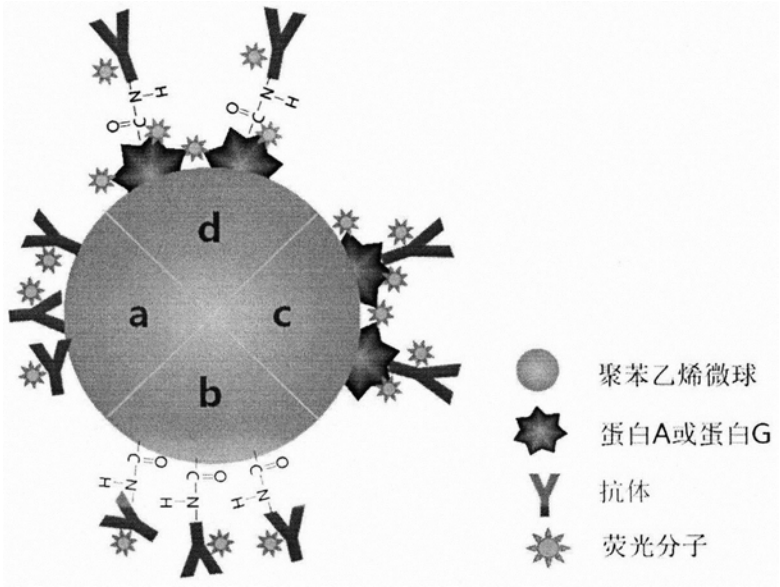


图1

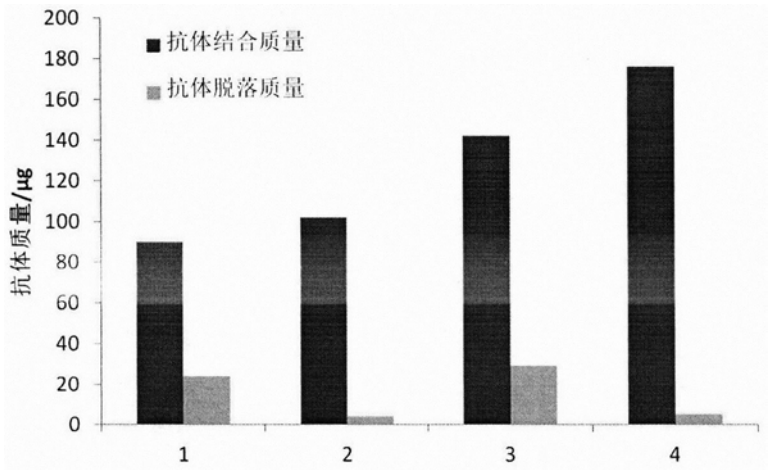


图2

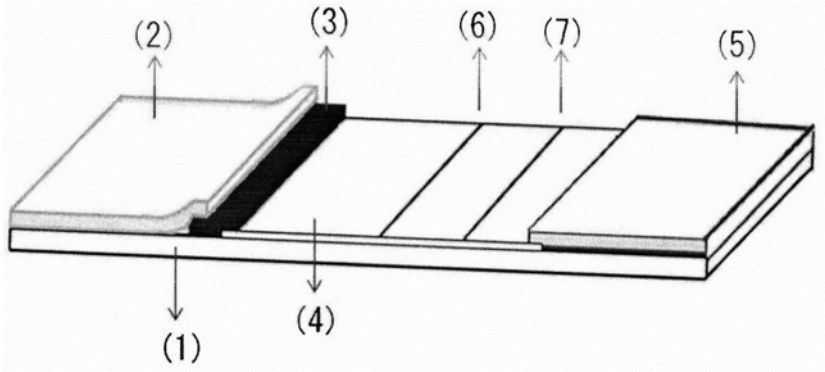


图3

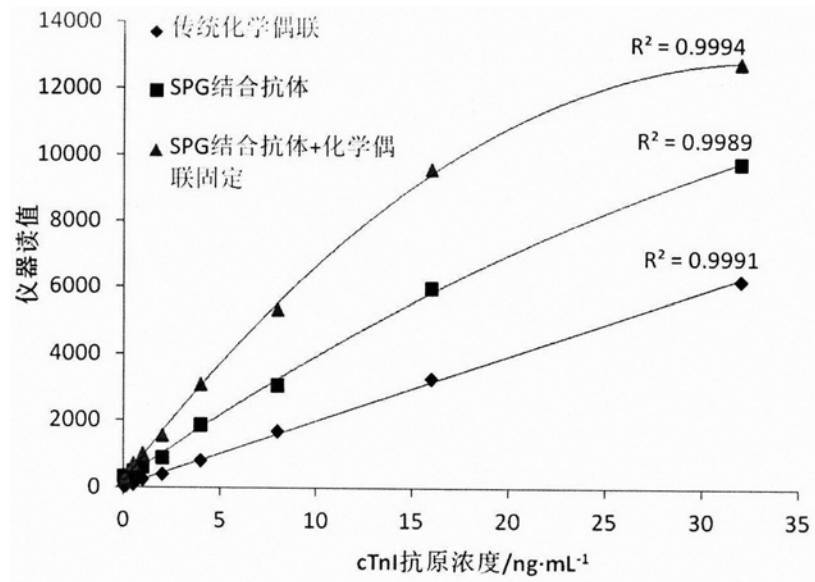


图4

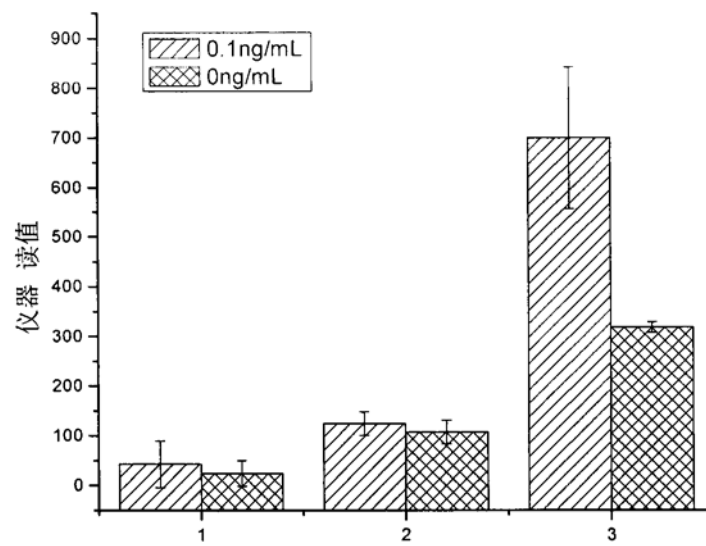


图5

专利名称(译)	一种抗体取向修饰的荧光微球探针的制备方法及其在免疫层析中的应用		
公开(公告)号	CN109490526A	公开(公告)日	2019-03-19
申请号	CN2017110848982.3	申请日	2017-09-13
[标]申请(专利权)人(译)	南京东纳生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京东纳生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京东纳生物科技有限公司		
[标]发明人	张宇 姜豆豆 韩国志		
发明人	张宇 姜豆豆 韩国志		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/58 G01N33/68 C09K11/06		
CPC分类号	G01N33/533 C09K11/06 G01N33/558 G01N33/582 G01N33/585 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种抗体取向修饰的荧光微球探针的制备方法，可实现抗体在微球表面高效、取向、牢固地固定，使Fab端充分暴露且保持生物活性。该荧光微球探针的制备方法包括：活化羧基微球表面的羧基基团，化学偶联固定蛋白A或蛋白G，特异性结合抗体的Fc端，进而通过化学键将抗体不可逆地固定在蛋白A或蛋白G基底上，最后偶联荧光分子。本发明还提供了上述荧光微球探针在免疫层析中的应用，可显著提高检测的灵敏度和试纸条的稳定性。

