



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108623643 A

(43)申请公布日 2018.10.09

(21)申请号 201710172721.4

(22)申请日 2017.03.22

(71)申请人 中国科学院微生物研究所

地址 100101 北京市朝阳区北辰西路2号1
号院3号

(72)发明人 李学兵 郑隆堂 张振兴 吕迅

(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理
有限责任公司 11290

代理人 朱学珺 董世豪

(51) Int. Cl.

C07H 15/26(2006.01)

C07H 1/00(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

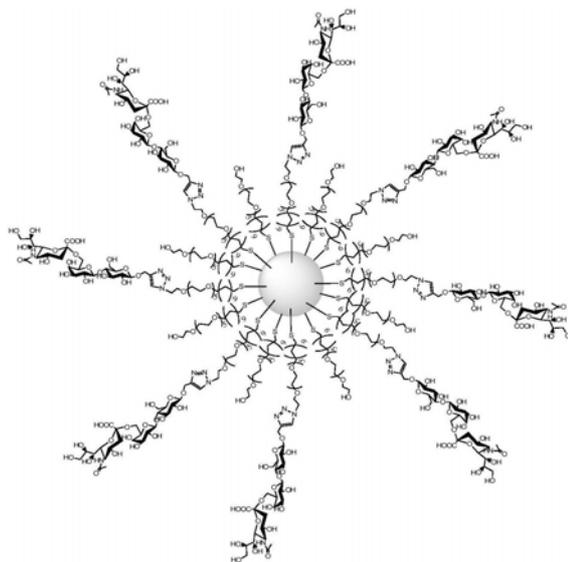
权利要求书2页 说明书20页 附图4页

(54)发明名称

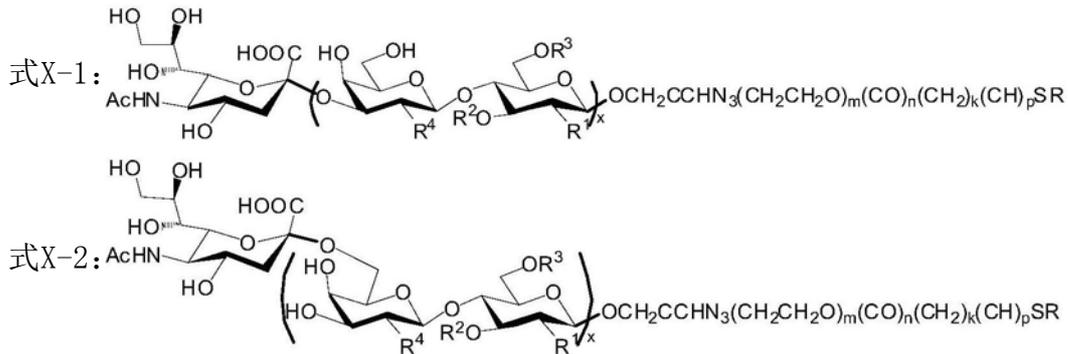
唾液酸寡糖-铂纳米粒子、制备方法及其在
流感病毒免疫检测方面的用途

(57)摘要

本发明涉及一种唾液酸寡糖-铂纳米粒子、
制备方法及其在对流感病毒进行免疫检测方面
的用途。所述唾液酸寡糖-铂纳米粒子为在铂纳
米粒子的表面通过S-Pt共价键连接有带有连接
臂的唾液酸寡糖。本发明的免疫检测方法完全避
免了抗体和酶的使用,具有高稳定性、易于制备
和获取等优点。



1. 一种唾液酸寡糖-铂纳米粒子,其中,在铂纳米粒子的表面通过S-Pt共价键连接有式XI所示的化合物以及式X-1或X-2所示的化合物:



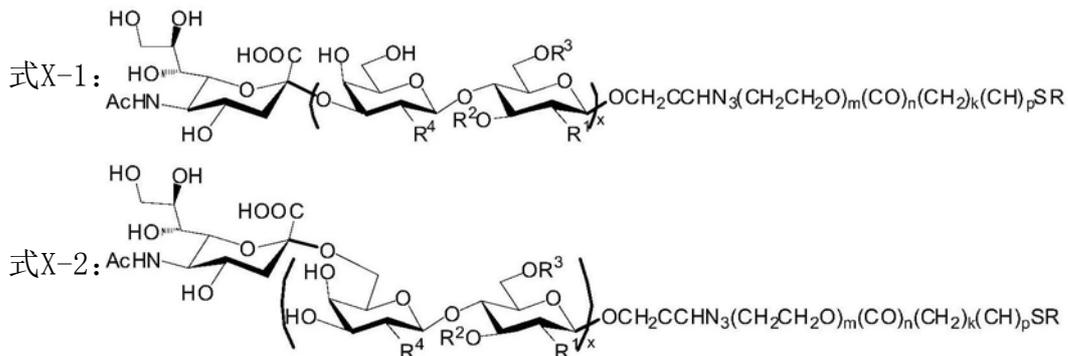
式XI: $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m(\text{CO})_n(\text{CH}_2)_k(\text{CH})_p\text{SR}$;

其中,所述式X-1、式X-2和式XI中,所述x为1-3的整数,所述m为0-6的整数,所述n为0-1的整数,所述k为0-11的整数,所述p为0或2,所述R为S或H;所述Ac为乙酰基,所述R¹为羟基或乙酰胺基,所述R²为氢或L-岩藻糖,所述R³为氢或硫酸酯,所述R⁴为羟基或乙酰胺基。

2. 制备如权利要求1所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子的方法,所述方法包括:将式X-1或式X-2所示化合物以及式XI所示化合物与含有铂纳米粒子的溶液混合,获得所述唾液酸寡糖-铂纳米粒子。

3. 一种试剂盒,所述试剂盒包含独立包装的一种或多种如权利要求1所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子,以及辣根过氧化物酶显色底物。

4. 一种试剂盒,所述试剂盒包含独立包装的A试剂、B试剂、C试剂以及辣根过氧化物酶显色底物;其中,所述A试剂包含独立包装的式X-1和/或式X-2所示化合物,所述B试剂包含式XI所示化合物,所述C试剂为含有铂纳米粒子的溶液,其中,所述式X-1、式X-2和式XI具有如下的结构:



式XI: $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m(\text{CO})_n(\text{CH}_2)_k(\text{CH})_p\text{SR}$;

其中,所述式X-1、式X-2和式XI中,所述x为1-3的整数,所述m为0-6的整数,所述n为0-1的整数,所述k为0-11的整数,所述p为0或2,所述R为S或H;所述Ac为乙酰基,所述R¹为羟基或乙酰胺基,所述R²为氢或L-岩藻糖,所述R³为氢或硫酸酯,所述R⁴为羟基或乙酰胺基。

5. 如权利要求1所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子或如段落3或4所述的试剂盒在对流感病毒进行免疫检测方面的用途。

6. 如权利要求1所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子或如权利要求3或4所述的试剂盒在区分侵染分泌唾液酸α₂,6寡糖的宿主细胞的流感病毒和侵染分泌唾液酸α₂,3寡糖的宿主细

胞的流感病毒方面的用途。

7. 一种对样品中的流感病毒进行检测的方法,所述方法包括如下步骤:

- a) 提供固相表面;
- b) 使所述样品与所述固相表面相接触,从而将流感病毒固定至所述固相表面,得到待测固相表面;
- c) 向步骤b)的所述待测固相表面添加第一方面所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子,或者添加第四方面所述试剂盒中的试剂A、试剂B和试剂C,得到测定混合物;
- d) 对步骤c)的所述测定混合物进行洗涤,去除未结合的物质,从而得到洗涤后的混合物;以及
- e) 向步骤d)的所述洗涤后的混合物中加入辣根过氧化物酶显色底物,进行检测。

唾液酸寡糖-铂纳米粒子、制备方法及其在流感病毒免疫检测方面的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种唾液酸寡糖-铂纳米粒子及其制备方法,以及该唾液酸寡糖-铂纳米粒子在对流感病毒进行免疫检测方面的用途。

背景技术

[0002] 流行性感(流感)是由流感病毒引起的人畜共患传染病,它的宿主涉及人、猪、鸟、马和海豚等多种动物。研究证实,流感病毒表面的糖蛋白血凝素(hemagglutinin,HA)能够特异识别宿主细胞表面的糖链受体,这是流感病毒感染宿主、进而复制并继续传播的生物学基础。对多种宿主而言,某些流感病毒变体具有高致病性和/或高死亡率,严重威胁动物和人类的健康。因此,本领域存在对流感病毒进行快速准确的检测的需求。

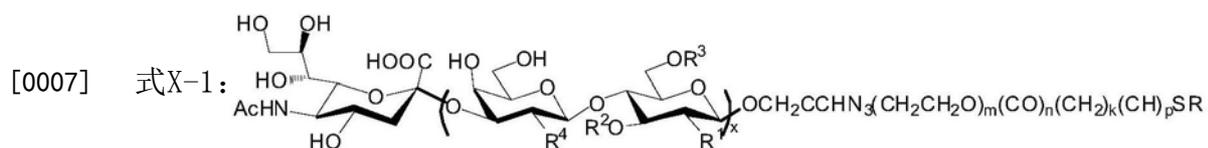
[0003] 随着生物技术的发展,酶被广泛应用于包括生化反应、生物识别在内的各种生物化学实验中。其中,辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase,HRP)具有催化过氧化氢氧化发色底物(即,发生显色反应)的活性,且在一定范围内颜色深浅与酶的浓度线性相关。因此,通常利用辣根过氧化物酶来标记抗体,实施多种免疫检测。

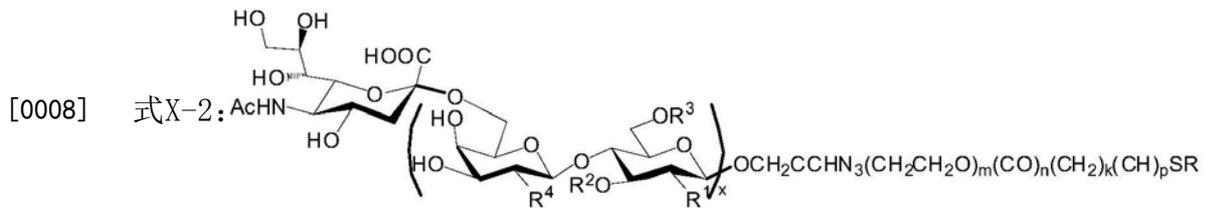
[0004] 常用于流感病毒检测的夹心酶联免疫吸附测定(Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay,Sandwich ELISA)即可利用辣根过氧化物酶标记的二抗进行最后的显色。在该方法中,先由捕获抗体将流感病毒固定,再通过酶标记的抗体进行显色,实现定性和定量测量。作为改进,本领域通过对抗体进行优化,或采用竞争ELISA、Dot ELISA等方法提高测量的稳定性或降低样品中其它成分造成的假阳性。然而,上述方法均依赖于抗体和/或酶的使用。抗体和酶均为蛋白,其获取和优化相对复杂,且这些反应的灵敏度和结果稳定性极大依赖于反应温度和pH。此外,这些方法操作繁琐,对操作人员的技术和熟练程度要求较高,费时费力。

[0005] 近年来发展的纳米技术为生物检测提供了新的可能。已经发现包括金纳米材料、铂纳米材料、磁性纳米材料和量子点等在内的各种新材料各自具有独特的理化性质。其中,铂纳米粒子因具有极高的催化活性被广泛应用于汽车尾气处理、电化学和癌症治疗等领域。最近的研究发现,铂纳米粒子具有类似于辣根过氧化物酶的活性,可利用铂纳米粒子来标记抗体,替代ELISA中的辣根过氧化物酶。然而,该检测中铂纳米粒子仍需借助蛋白抗体与靶分子结合,难以解决实验条件要求比较苛刻和结果稳定性较差的问题。

发明内容

[0006] 在第一方面,本发明提供了一种唾液酸寡糖-铂纳米粒子,其中,在铂纳米粒子的表面通过S-Pt共价键连接有式XI所示的化合物以及式X-1或X-2所示的化合物:





[0009] 式XI: $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m(\text{CO})_n(\text{CH}_2)_k(\text{CH})_p\text{SR}$;

[0010] 其中,所述式X-1、式X-2和式XI中,所述x为1-3的整数,所述m为0-6的整数,所述n为0-1的整数,所述k为0-11的整数,所述p为0或2,所述R为S或H;所述Ac为乙酰基,所述R¹为羟基或乙酰胺基,所述R²为氢或L-岩藻糖,所述R³为氢或硫酸酯(硫酸与糖环上的羟基成酯,SO₃H),所述R⁴为羟基或乙酰胺基。

[0011] 在第二方面,本发明提供了制备如第一方面所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子的方法,所述方法包括:将式X-1或式X-2所示化合物以及式XI所示化合物与含有铂纳米粒子的溶液混合,获得所述唾液酸寡糖-铂纳米粒子。

[0012] 在第三方面,本发明提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含一种或多种独立包装的第一方面所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子,以及辣根过氧化物酶显色底物。

[0013] 在第四方面,本发明提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含独立包装的A试剂、B试剂、C试剂以及辣根过氧化物酶显色底物;其中,所述A试剂包含独立包装的式X-1和/或式X-2所示化合物,所述B试剂包含式XI所示化合物,所述C试剂为含有铂纳米粒子的溶液。

[0014] 在第五方面,本发明提供第一方面所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子以及第三方面或第四方面所述的试剂盒在对流感病毒进行免疫检测方面的用途。

[0015] 在第六方面,本发明提供了一种对样品中的流感病毒进行检测的方法,所述方法包括如下步骤:

[0016] a) 提供固相表面;

[0017] b) 使所述样品与所述固相表面相接触,从而将流感病毒固定至所述固相表面,得到待测固相表面;

[0018] c) 向步骤b)的所述待测固相表面添加第一方面所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子,或者添加第四方面所述试剂盒中的试剂A、试剂B和试剂C,得到测定混合物;

[0019] d) 对步骤c)的所述测定混合物进行洗涤,去除未结合的物质,从而得到洗涤后的混合物;以及

[0020] e) 向步骤d)的所述洗涤后的混合物中加入辣根过氧化物酶显色底物,进行检测。

附图说明

[0021] 图1为根据本发明的一个实施方式,利用本发明的方法(左)与利用夹心ELISA方法(右)检测流感病毒原理的比较。

[0022] 图2为本发明实施例3制备的唾液酸寡糖-铂纳米粒子的结构示意图。在所示出的结构中,唾液酸寡糖具有如式X-2所示的结构,其中,x为1,m为6,n为0,k为11,p为0,R、R²和R³为H,R¹和R⁴为OH。

[0023] 图3为实施例2制备的铂纳米粒子的电镜照片。

[0024] 图4为实施例2制备的铂纳米粒子的XRD表征。

[0025] 图5为实施例3制备的唾液酸寡糖-铂纳米粒子3' SL1-Pt NPs与相应的带有连接臂的唾液酸寡糖的NMR表征。

[0026] 图6为根据实验例1,利用3' SL1-Pt NP和6' SL1-Pt NP检测Ca04H1N1流感病毒的结果图。Lac-Pt为作为对照的乳糖-铂纳米粒子的结果。

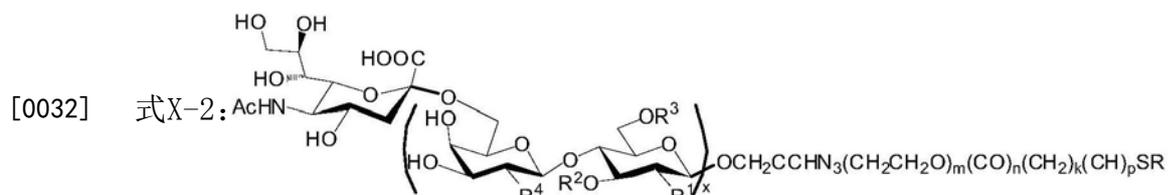
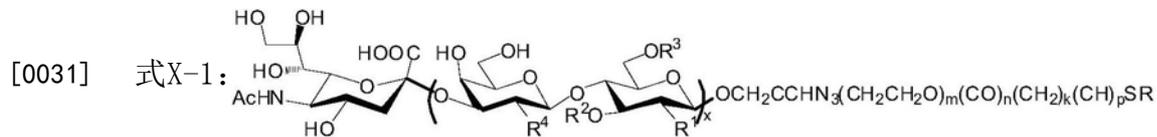
[0027] 图7为根据实验例2,利用3' SL1-Pt NP和6' SL1-Pt NP检测VieH5N1流感病毒的结果图。Lac-Pt为作为对照的乳糖-铂纳米粒子的结果。

[0028] 图8为根据实验例3,利用3' SL1-Pt NP和6' SL1-Pt NP检测ShaH7N9流感病毒结果图。Lac-Pt为作为对照的乳糖-铂纳米粒子的结果。

具体实施方式

[0029] 本发明通过连接臂将流感病毒受体(唾液酸寡糖)连接到铂纳米粒子上,获得了同时具有流感病毒宿主特异性识别性能和化学-光检测信号转换性能的唾液酸寡糖-铂纳米粒子。其中,使用特定的唾液酸寡糖使得不仅能够检测流感病毒(包括A型和B型流感病毒)是否存在,还能够区分所检测的流感病毒的受体特异性,甚至可以通过构建和分析不同唾液酸寡糖与不同流感病毒毒株之间相互作用强弱的指纹图谱确定病毒的亚型。另一方面,利用铂纳米粒子的辣根过氧化物酶性质,取代传统夹心ELISA检测中的捕获抗体、一抗和二抗,简化了ELISA的操作步骤,降低了实验成本,提高了结果的稳定性。本发明的方法完全避免了抗体和酶的使用,具有高稳定性、易于制备和获取等优点。此外,本领域之前未报道过构建带有功能化糖基的铂纳米颗粒,本发明的方法为铂纳米粒子提供了新的应用前景。

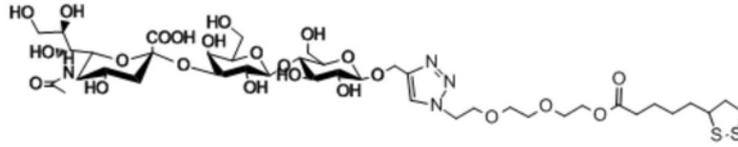
[0030] 在第一方面,本发明提供了一种唾液酸寡糖-铂纳米粒子,其中,在铂纳米粒子的表面通过S-Pt共价键连接有式XI所示的化合物以及式X-1或X-2所示的化合物:



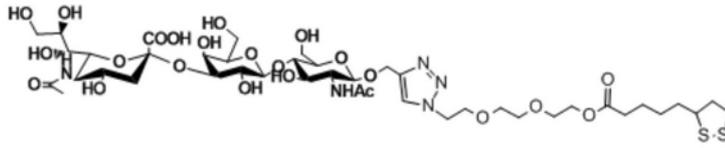
[0033] 式XI: $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m(\text{CO})_n(\text{CH}_2)_k(\text{CH})_p\text{SR}$;

[0034] 其中,所述式X-1、式X-2和式XI中,所述x为1-3的整数,所述m为0-6的整数,所述n为0-1的整数,所述k为0-11的整数,所述p为0或2,所述R为S或H;所述Ac为乙酰基,所述R¹为羟基或乙酰胺基,所述R²为氢或L-岩藻糖,所述R³为氢或硫酸酯(硫酸与糖环上的羟基成酯,SO₃H),所述R⁴为羟基或乙酰胺基。优选地,所述m为3-6的整数;所述k为5-11的整数。更优选地,所述m为3或6,所述k为5或11。

[0035] 在优选的实施方式中,所述式X-1所示的化合物可具有由式X-1-1、X-1-2、X-1-3、X-1-4或X-1-5所示的结构所组成的组中的任一种结构:

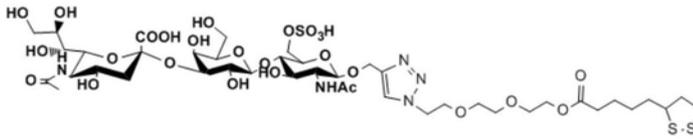


式 X-1-1

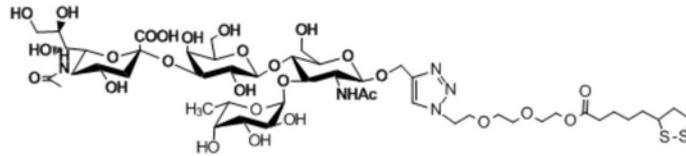


式 X-1-2

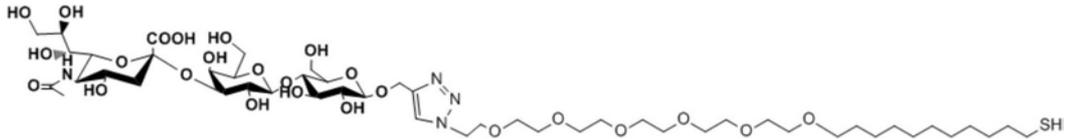
[0036]



式 X-1-3

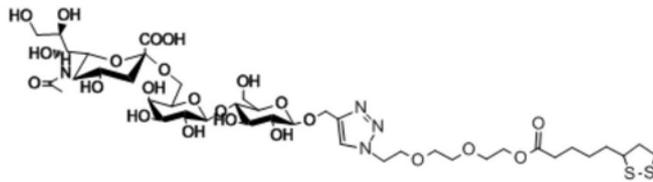


式 X-1-4



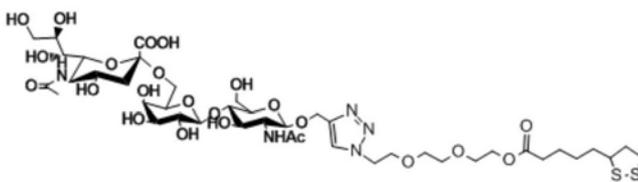
式 X-1-5。

[0037] 在优选的实施方式中,所述式X-2所示的化合物可具有由式X-2-1、X-2-2、X-2-3或X-2-5所示的结构所组成的组中的任一种结构:

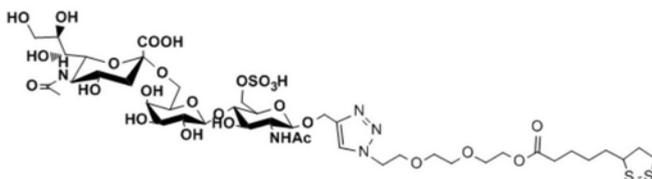


式 X-2-1

[0038]

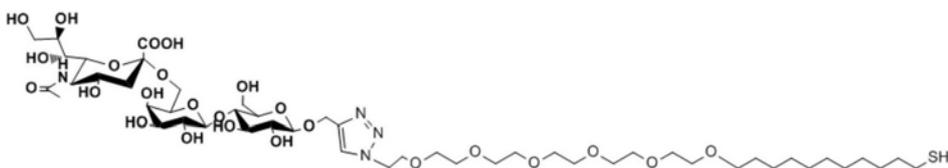


式 X-2-2



式 X-2-3

[0039]



式 X-2-5。

[0040] 在一些实施方式中,所述式X-1或式X-2所示的化合物与式XI所示的化合物的摩尔比为(2-10):1、优选(3-4):1。优选地,所述式X-1或式X-2所示的化合物与所述铂纳米粒子的摩尔比为(50-500):1、优选(100-120):1。

[0041] 在一些实施方式中,所述铂纳米粒子的平均直径为1.5nm-10nm,优选2.5nm。不希望被理论所限地,该平均直径范围的铂纳米粒子具有更高的过氧化氢酶活性。铂纳米粒子可具有任何形状,包括但不限于球状、棒状、椭球状、圆柱状、盘状、壳状、棱柱状、立方体状,且这些形状可作为网络的一部分。铂纳米粒子可为单分散或多分散的,并且粒子的分散度可随直径而变化。

[0042] 在第二方面,本发明提供了制备如第一方面所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子的方法,所述方法包括:将式X-1或式X-2所示化合物以及式XI所示化合物与含有铂纳米粒子的溶液混合,获得所述唾液酸寡糖-铂纳米粒子。

[0043] 本领域已经知晓式X-1或式X-2所示的带有连接臂的唾液酸寡糖、式XI所示的连接臂以及铂纳米粒子的制备方法。例如,可按照CN103551562A和CN103554198A中公开的方法制备式X-1、式X-2以及式XI所示的化合物。根据例如Ma M.等,Colloids and Surfaces A: Physicochem.Eng.Aspects 373 (2011) 6-10的方法,制备铂纳米粒子。

[0044] 本发明的发明人发现,通过直接将式X-1、式X-2或式XI所示的化合物与铂纳米粒子混合,即可使得上述化合物经由S-Pt共价键直接附着于铂纳米粒子的表面。在优选的实施方式中,将所述式X-1或式X-2所示化合物与所述式XI所示化合物按照(2-10):1、优选为5:1的摩尔比进行混合。在优选的实施方式中,将所述式X-1或式X-2所示化合物与所述铂纳米粒子按照(50-500):1、优选(100-150):1、更优选110:1的摩尔比进行混合。

[0045] 在一些实施方式中,含有铂纳米粒子的溶液的溶剂为水。优选地,含有铂纳米粒子的溶液中所述铂纳米粒子的浓度为0.5 μ M-5 μ M。

[0046] 在第三方面,本发明提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含独立包装的一种或多种第一方面所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子以及辣根过氧化物酶显色底物。

[0047] 不希望被理论所限地,本发明的包含式X-1所示化合物的唾液酸寡糖-铂纳米粒子能够特异性识别侵染分泌唾液酸 α 2,3寡糖的宿主细胞的流感病毒;本发明的包含式X-2所示化合物的唾液酸寡糖-铂纳米粒子能够特异性识别侵染分泌唾液酸 α 2,6寡糖的宿主细胞的流感病毒。可将本发明的多种唾液酸寡糖-铂纳米粒子各自独立包装于同一试剂盒,实现对流感病毒宿主特异性的并行检测。

[0048] 本发明的独立包装的唾液酸寡糖-铂纳米粒子可以固体或液体形式提供,优选以水溶液形式提供。

[0049] 本领域知晓辣根过氧化物酶的显色底物。例如,当采用肉眼观测或吸光度测量时,可采用3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、2,2'-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐(ABTS)、邻苯二胺(OPD)、4-氯乙萘酚(CN)作为显色底物。当检测荧光时,可采用10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪(ADHP)、试卤灵等作为显色底物。上述底物均可作为本发明的显色底物。

[0050] 在第四方面,本发明提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含独立包装的A试剂、B试剂、C试剂以及辣根过氧化物酶显色底物;其中,所述A试剂包含独立包装的式X-1和/或式X-2所示化合物,所述B试剂包含式XI所示化合物,所述C试剂为含有铂纳米粒子的溶液。

[0051] 如上所述,当A试剂和/或B试剂与C试剂直接混合时,式X-1、式X-2或式XI所示化合

物可自发组装至铂纳米粒子。因此,可单独提供上述组分,由用户自行组装。其中,A试剂和B试剂均可以固体或液体的形式提供,优选以固体形式提供。C试剂优选以水溶液形式提供。

[0052] 在第五方面,本发明提供第一方面所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子以及第三方面或第四方面所述的试剂盒在对流感病毒进行免疫检测方面的用途。

[0053] 本发明的纳米粒子和试剂盒可用于对流感病毒是否存在、特别是宿主特异性和亚型进行检测。本发明的纳米粒子和试剂盒能够检测的流感病毒可为A型流感病毒和/或B型流感病毒,特别地可为H1(如H1N1)、H3(如H3N2)、H5(如H5N1)和H7(如H7N9)等A型流感病毒以及B/Victoria、B/Yamagata、B/Lee/40等B型流感病毒。本发明的纳米粒子和试剂盒能够对侵染分泌唾液酸 α 2,6寡糖的宿主细胞的流感病毒和侵染分泌唾液酸 α 2,3寡糖的宿主细胞的流感病毒进行区分。就这一点而言,本发明所涉及的宿主可为人、猪、鸟、马和海豚等。

[0054] 免疫检测方法可为借助辣根过氧化物酶进行标记抗体的常规免疫检测方法,例如ELISA(包括但不限于间接ELISA、夹心ELISA、竞争ELISA、多功能便携式ELISA)、Western印迹、免疫沉淀检测、免疫扩散检测、荧光免疫测定等。

[0055] 在第六方面,本发明提供了一种对样品中的流感病毒进行检测的方法,所述方法包括如下步骤:

[0056] a) 提供固相表面;

[0057] b) 使所述样品与所述固相表面相接触,从而将流感病毒固定至所述固相表面,得到待测固相表面;

[0058] c) 向步骤b)的所述待测固相表面添加第一方面所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子,或者添加第四方面所述试剂盒中的试剂A、试剂B和试剂C,得到测定混合物;

[0059] d) 对步骤c)的所述测定混合物进行洗涤,去除未结合的物质,从而得到洗涤后的混合物;以及

[0060] e) 向步骤d)的所述洗涤后的混合物中加入辣根过氧化物酶显色底物,进行检测。

[0061] 所述固相表面可为任何材料的表面,所述材料例如玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙烯、硝酸纤维素。所述固相表面可为商购的培养皿、96孔板或硝酸纤维素膜等的表面。所述固相表面修饰有扎那米韦或者唾液酸寡糖,从而实现对流感病毒的捕获。具体而言,所述固相表面可修饰有生物素-亲和素配偶体对的一个成员(例如亲和素),而生物素-亲和素配偶体对的另一成员(例如生物素)与扎那米韦或唾液酸寡糖缀合,从而通过生物素-亲和素配偶体对相互作用,在固相表面修饰扎那米韦或唾液酸寡糖。所述亲和素例如为链霉亲和素、卵亲和素或rhizavidin。

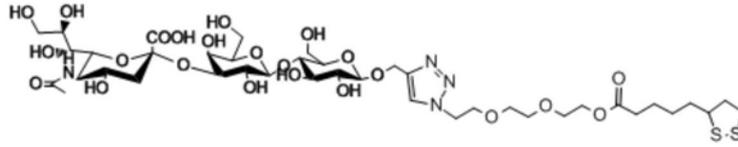
[0062] 在优选的实施方式中,可通过如下方法对流感病毒的亚型和/或宿主特异性进行分析:

[0063] i) 将缀合有生物素的扎那米韦、唾液酸 α 2,3寡糖或唾液酸 α 2,6寡糖溶解于磷酸盐缓冲液(PBS)并加入到铺有链霉亲和素的96孔板中进行孵育;去除PBS后,向所述96孔板中加入牛血清白蛋白(BSA)进行封闭;

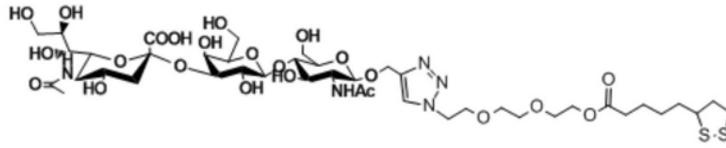
[0064] ii) 在所述96孔板中加入待测样品,4℃孵育;

[0065] iii) 去除步骤ii)中孵育后的所述96孔板中含有未结合流感病毒的溶液;

[0066] iv) 向经过步骤iii)的处理的96孔板中加入第一方面所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子,或者加入第四方面所述试剂盒中的试剂A、试剂B和试剂C;随后,4℃孵育;

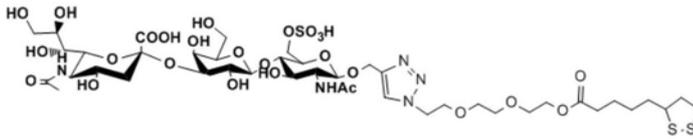


式 X-1-1

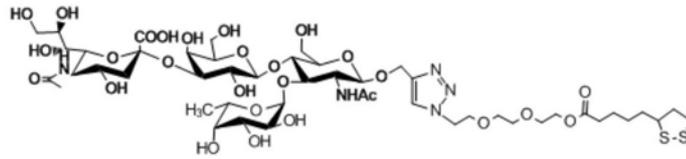


式 X-1-2

[0080]

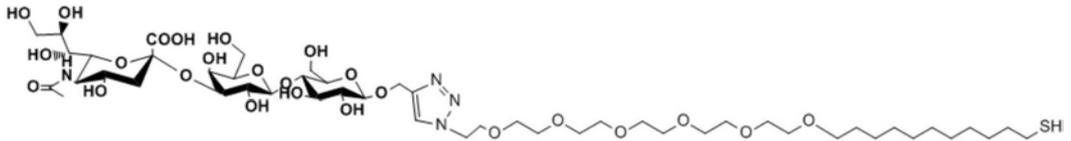


式 X-1-3



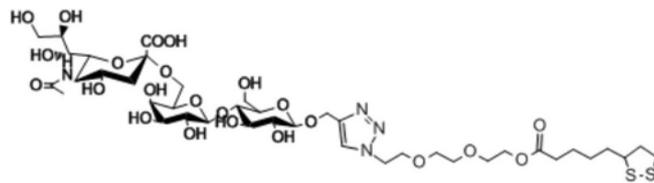
式 X-1-4

[0081]

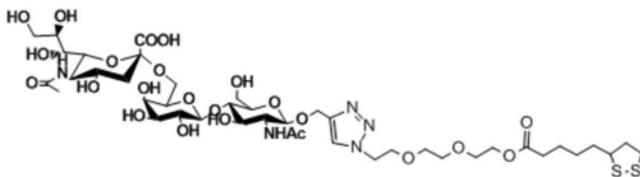


式 X-1-5。

[0082] 5. 如段落1所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子,其中,所述式X-2所示的化合物具有由式X-2-1、X-2-2、X-2-3或X-2-5所示的结构所组成的组中的任一种结构:

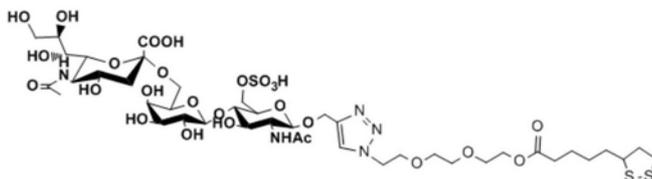


式 X-2-1

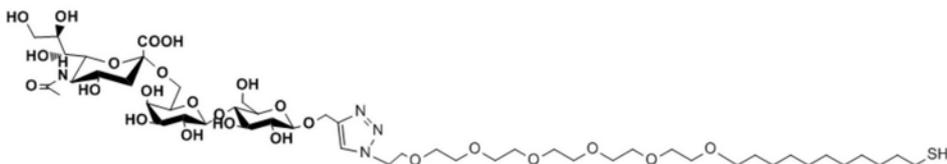


式 X-2-2

[0083]



式 X-2-3



式 X-2-5。

[0084] 6. 如段落1-5中任一项所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子,其中,所述式X-1或式X-2所示的化合物与式XI所示的化合物的摩尔比为(2-10):1。

[0085] 7. 如段落6所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子,其中,所述式X-1或式X-2所示的化合物与式XI所示的化合物的摩尔比为(3-4):1。

[0086] 8. 如段落1-7中任一项所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子,其中,所述式X-1或式X-2所示的化合物与所述铂纳米粒子的摩尔比为(50-500):1。

[0087] 9. 如段落8所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子,其中,所述式X-1或式X-2所示的化合物与所述铂纳米粒子的摩尔比为(100-120):1。

[0088] 10. 如段落1-9中任一项所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子,其中,所述铂纳米粒子的平均直径为1.5nm-10nm。

[0089] 11. 如段落10所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子,其中,所述铂纳米粒子的平均直径为2.5nm。

[0090] 12. 如段落11所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子,其中,所述铂纳米粒子为球状、棒状、椭球状、圆柱状、盘状、壳状、棱柱状或立方体状。

[0091] 13. 制备段落1-12中任一项所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子的方法,所述方法包括:将式X-1或式X-2所示化合物以及式XI所示化合物与含有铂纳米粒子的溶液混合,获得所述唾液酸寡糖-铂纳米粒子。

[0092] 14. 如段落13所述的方法,其中,将所述式X-1或式X-2所示的化合物与式XI所示的化合物按照(2-10):1的摩尔比进行混合。

[0093] 15. 如段落14所述的方法,其中,将所述式X-1或式X-2所示的化合物与式XI所示的化合物按照5:1的摩尔比进行混合。

[0094] 16. 如段落13-15中任一项所述的方法,其中,将所述式X-1或式X-2所示化合物与所述铂纳米粒子按照(50-500):1的摩尔比进行混合。

[0095] 17. 如段落16所述的方法,其中,将所述式X-1或式X-2所示化合物与所述铂纳米粒子按照(100-150):1的摩尔比进行混合。

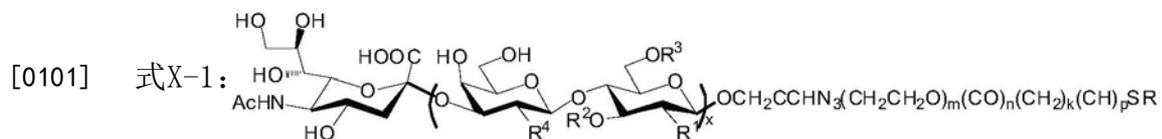
[0096] 18. 如段落17所述的方法,其中,将所述式X-1或式X-2所示化合物与所述铂纳米粒子按照110:1的摩尔比进行混合。

[0097] 19. 如段落18所述的方法,其中,所述含有铂纳米粒子的溶液的溶剂为水。

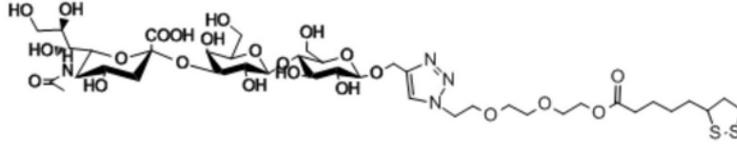
[0098] 20. 如段落19所述的方法,其中,所述含有铂纳米粒子的溶液中所述铂纳米粒子的浓度为0.5 μ M-5 μ M。

[0099] 21. 一种试剂盒,所述试剂盒包含独立包装的一种或多种如段落1-12中任一项所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子,以及辣根过氧化物酶显色底物。

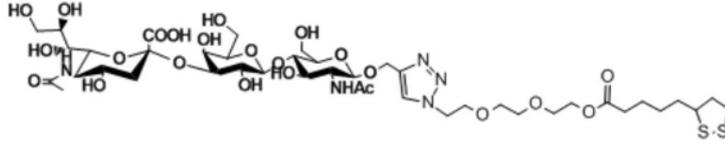
[0100] 22. 如段落21所述的试剂盒,其中,所述如段落1-12中任一项所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子为包含式X-1所示的化合物的唾液酸寡糖-铂纳米粒子,其中,所述包含式X-1所示的化合物的唾液酸寡糖-铂纳米粒子为在铂纳米粒子的表面通过S-Pt共价键连接有式XI所示的化合物以及式X-1所示的化合物:



X-1-1、X-1-2、X-1-3、X-1-4或X-1-5所示的结构所组成的组中的任一种结构：

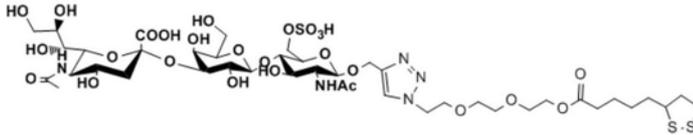


式 X-1-1

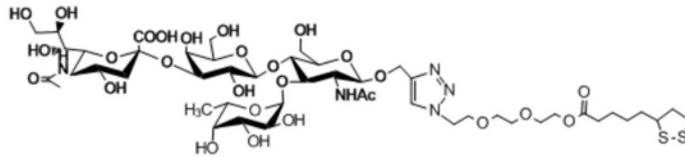


式 X-1-2

[0118]

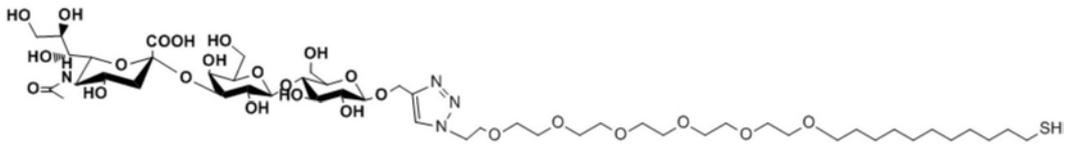


式 X-1-3



式 X-1-4

[0119]



式 X-1-5;

[0120] 其中,所述式X-2所示的化合物具有由式X-2-1、X-2-2、X-2-3或X-2-5所示的结构所组成的组中的任一种结构:

为0-1的整数,所述k为0-11的整数,所述p为0或2,所述R为S或H;所述Ac为乙酰基,所述R¹为羟基或乙酰胺基,所述R²为氢或L-岩藻糖,所述R³为氢或硫酸酯,所述R⁴为羟基或乙酰胺基。

[0131] 32. 如段落31所述的试剂盒,其中,所述A试剂包含式X-1所示的化合物。

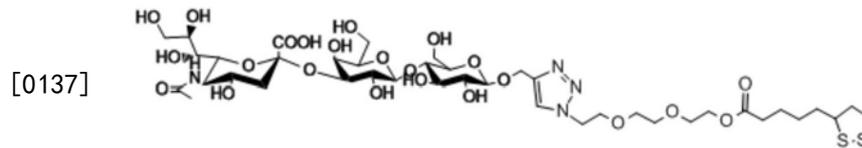
[0132] 33. 如段落31所述的试剂盒,其中,所述A试剂包含式X-2所示的化合物。

[0133] 34. 如段落31所述的试剂盒,其中,所述A试剂包含独立包装的式X-1所示的化合物以及式X-2所示的化合物。

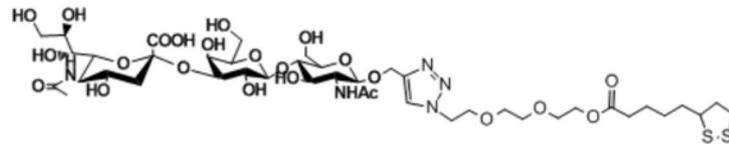
[0134] 35. 如段落31-34中任一项所述的试剂盒,其中,所述m为3-6的整数;所述k为5-11的整数。

[0135] 36. 如段落35所述的试剂盒,其中,所述m为3或6,所述k为5或11。

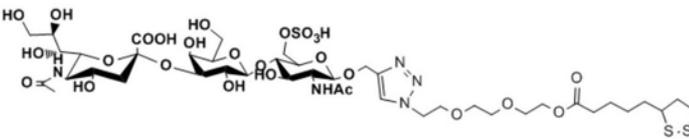
[0136] 37. 如段落31-36中任一项所述的试剂盒,其中,所述式X-1所示的化合物具有由式X-1-1、X-1-2、X-1-3、X-1-4或X-1-5所示的结构所组成的组中的任一种结构:



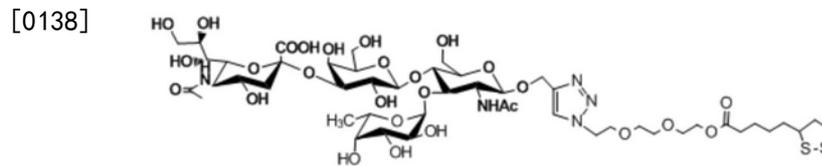
式 X-1-1



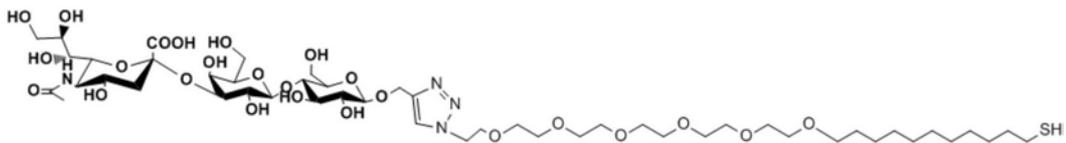
式 X-1-2



式 X-1-3

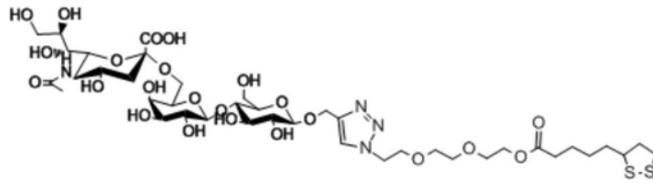


式 X-1-4

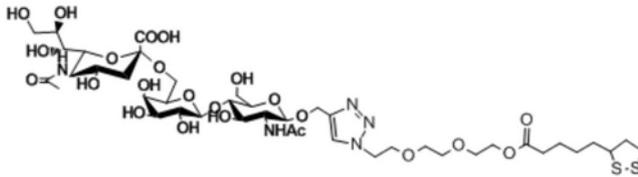


式 X-1-5;

[0139] 其中,所述式X-2所示的化合物具有由式X-2-1、X-2-2、X-2-3或X-2-5所示的结构所组成的组中的任一种结构:

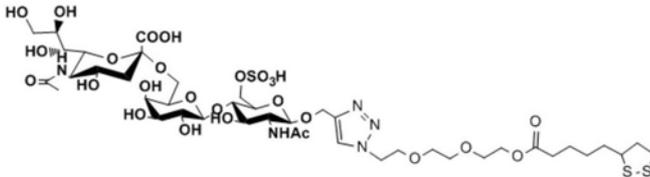


式 X-2-1

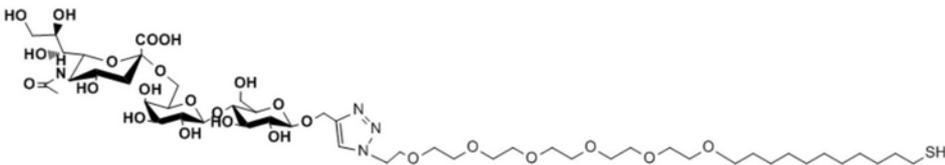


式 X-2-2

[0140]



式 X-2-3



式 X-2-5。

[0141] 38. 如段落31-37中任一项所述的试剂盒,其中,所述唾液酸寡糖-铂纳米粒子以固体或液体形式提供。

[0142] 39. 如段落38所述的试剂盒,其中,所述唾液酸寡糖-铂纳米粒子以水溶液形式提供。

[0143] 40. 如段落31-39中任一项所述的试剂盒,其中,所述显色底物选自于由如下的化合物所组成的组:

[0144] 3,3,5,5-四甲基联苯胺、2,2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐、邻苯二胺、4-氯乙萘酚;10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪或试卤灵。

[0145] 41. 段落1-12中任一项所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子或段落21-40中任一项所述的试剂盒在对流感病毒进行免疫检测方面的用途。

[0146] 42. 如段落41所述的用途,其中,所述流感病毒为A型流感病毒和/或B型流感病毒。

[0147] 43. 如段落42所述的用途,其中,所述A型流感病毒为H1、H3、H5或H7亚型;所述B型流感病毒为B/Victoria、B/Yamagata、B/Lee/40流感病毒。

[0148] 44. 如段落41-43中任一项所述的用途,其中,所述免疫检测选自于如下的任一种方法:ELISA、Western印迹、免疫沉淀检测、免疫扩散检测和荧光免疫测定。

[0149] 45. 如段落44所述的用途,其中,所述ELISA选自于如下的任一种方法:间接ELISA、夹心ELISA、竞争ELISA和多功能便携式ELISA。

[0150] 46. 段落1-12中任一项所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子或段落21-40中任一项所述的试剂盒在区分侵染分泌唾液酸 α 2,6寡糖的宿主细胞的流感病毒和侵染分泌唾液酸 α 2,3寡糖的宿主细胞的流感病毒方面的用途。

[0151] 47. 如段落46所述的用途,其中,所述宿主选自于人、猪、鸟、马和海豚。

[0152] 48. 一种对样品中的流感病毒进行检测的方法,所述方法包括如下步骤:

[0153] a) 提供固相表面；

[0154] b) 使所述样品与所述固相表面相接触，从而将流感病毒固定至所述固相表面，得到待测固相表面；

[0155] c) 向步骤b)的所述待测固相表面添加第一方面所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子，或者添加第四方面所述试剂盒中的试剂A、试剂B和试剂C，得到测定混合物；

[0156] d) 对步骤c)的所述测定混合物进行洗涤，去除未结合的物质，从而得到洗涤后的混合物；以及

[0157] e) 向步骤d)的所述洗涤后的混合物中加入辣根过氧化物酶显色底物，进行检测。

[0158] 49. 如段落48所述的方法，其中，所述固相表面修饰有扎那米韦、唾液酸 α 2,3寡糖和/或唾液酸 α 2,6寡糖。

[0159] 50. 如段落49所述的方法，其中，所述固相表面缀合有生物素-亲和素配偶体对的一个成员，所述扎那米韦、唾液酸 α 2,3寡糖和/或唾液酸 α 2,6寡糖缀合有生物素-亲和素配偶体对的另一成员。

[0160] 51. 如段落50所述的方法，其中，所述固相表面缀合有亲和素，所述扎那米韦、唾液酸 α 2,3寡糖和/或唾液酸 α 2,6寡糖缀合有生物素。

[0161] 52. 如段落51所述的方法，其中，所述亲和素选自于链霉亲和素、卵亲和素或rhizavidin。

[0162] 53. 如段落48-52中任一项所述的方法，其中，所述固相表面的材料选自于玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙烯或硝酸纤维素。

[0163] 54. 如段落48-53中任一项所述的方法，其中，所述固相表面为商购的培养皿、96孔板或硝酸纤维素膜的表面。

[0164] 55. 如段落48-54中任一项所述的方法，其中，所述显色底物选自于由如下的化合物所组成的组：

[0165] 3,3,5,5-四甲基联苯胺、2,2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氨盐、邻苯二胺、4-氯乙萘酚；10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪或试卤灵。

[0166] 56. 如段落48-55中任一项所述的方法，其中，所述方法包括如下步骤：

[0167] i) 将缀合有生物素的扎那米韦、唾液酸 α 2,3寡糖或唾液酸 α 2,6寡糖溶解于磷酸盐缓冲液(PBS)并加入到铺有链霉亲和素的96孔板中进行孵育；去除PBS后，向所述96孔板中加入牛血清白蛋白进行封闭；

[0168] ii) 在所述96孔板中加入待测样品，4℃孵育；

[0169] iii) 去除步骤ii)中孵育后的所述96孔板中含有未结合流感病毒的溶液；

[0170] iv) 向经过步骤iii)的处理的96孔板中加入如段落1-12中任一项所述的唾液酸寡糖-铂纳米粒子；或者，加入如段落31-40中任一项所述的试剂盒中的试剂A、试剂B和试剂C；随后，4℃孵育；

[0171] v) 对步骤iv)的孵育后的96孔板进行洗涤，去除未结合的物质；

[0172] vi) 向经过步骤v)的处理的96孔板中加入辣根过氧化物酶显色底物，进行检测。

[0173] 57. 如段落56所述的方法，其中，步骤i)的孵育进行2-3h；优选封闭进行1-1.5h；进一步优选所述孵育和封闭均在室温下进行。

[0174] 58. 如段落56或57所述的方法，其中，步骤ii)和iv)的孵育时间为8-10h。

[0175] 59.如段落56-58中任一项所述的方法,其中,所述辣根过氧化物酶显色底物为3,3,5,5-四甲基联苯胺;所述检测为测定650nm的光吸值。

[0176] 60.如段落56-59中任一项所述的方法,其中,在步骤iv)中,将包含式X-1所示的化合物的唾液酸寡糖-铂纳米粒子、包含式X-2所示的化合物的唾液酸寡糖-铂纳米粒子以及乳糖修饰的铂纳米粒子分别加入所述96孔板的不同孔;

[0177] 其中,所述包含式X-1所示的化合物的唾液酸寡糖-铂纳米粒子为在铂纳米粒子的表面通过S-Pt共价键连接有式XI所示的化合物以及式X-1所示的化合物;

[0178] 其中,所述包含式X-2所示的化合物的唾液酸寡糖-铂纳米粒子为在铂纳米粒子的表面通过S-Pt共价键连接有式XI所示的化合物以及式X-2所示的化合物。

[0179] 61.如段落60所述的方法,其中,以未加入流感病毒毒株或其HA蛋白的孔作为空白对照。

[0180] 实施例

[0181] 如无特殊说明,本发明实施例中使用的方法均为常规方法。

[0182] 如无特殊说明,本发明实施例中所用的材料、试剂均可从商业途径得到。

[0183] 实施例使用的试剂

[0184] 磷酸盐缓冲液(10mM,pH 7.4): NaH_2PO_4 0.24g/L、 Na_2HPO_4 1.42g/L、KCl 0.2g/L和NaCl 8.0g/L,溶剂为水。

[0185] 实施例1带有连接臂的唾液酸寡糖及连接臂的制备

[0186] 按照发明人的在先申请CN103554198A的实施例1-9制备带有连接臂的唾液酸寡糖、带有连接臂的乳糖和相应的连接臂(如表1所示)。

[0187] 实施例2铂纳米粒子的制备

[0188] 向100mL圆底烧瓶(王水泡30min)内加入17mL去离子水(Millipore膜过滤)、2mL 7.72mM氯铂酸溶液、0.5mL 10mM柠檬酸钠溶液,室温搅拌5min。快速加入0.25mL 100mM硼氢化钠溶液,搅拌15min。停止搅拌,室温静置2小时。过膜,4℃保存,待用。

[0189] 对所制备的铂纳米粒子进行透射电镜成像,结果如图3所示。所使用的电镜型号为JEOL 1400。

[0190] 对所制备的铂纳米粒子进行XRD测量,结果如图4所示。经计算得到所获得的铂纳米粒子的平均直径为 $2.5 \pm 0.2\text{nm}$ 。

[0191] 实施例3唾液酸寡糖-铂纳米粒子及乳糖铂纳米粒子的制备

[0192] 取2毫升实施例2制备的铂纳米粒子(平均直径为 $2.5 \pm 0.2\text{nm}$,终浓度为 $1.4\mu\text{M}$),加入0.6-0.7毫克任一种实施例1制备的带有连接臂的唾液酸寡糖或带有连接臂的乳糖以及相应的连接臂,使得带有连接臂的唾液酸寡糖或带有连接臂的乳糖与铂纳米粒子的摩尔比为110:1,且带有连接臂的唾液酸寡糖或带有连接臂的乳糖与相应连接臂比例为5:1,室温搅拌24小时,得到9种唾液酸寡糖-铂纳米粒子和2种乳糖铂纳米颗粒。反应结束后,利用超纯水洗涤两次、PBS缓冲液洗涤一次(14000rpm,30min)。将产物溶于1毫升PBS缓冲液中,获得9种含唾液酸寡糖-铂纳米粒子(如表1所示)的溶液以及2种含乳糖-铂纳米粒子(连接臂分别如式XI-1和式XI-5所示)的溶液($2.8\mu\text{M}$),4℃保存。

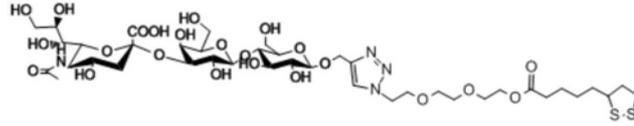
[0193] 经TGA及XPS分析可知,每个铂纳米颗粒表面共有分子数约为106个,其中,带有连接臂的唾液酸寡糖80个,连接臂26个。

[0194] 图5示出实施例3制备的唾液酸寡糖-铂纳米粒子3' SL1-Pt NPs (浅色) 以及相应的带有连接臂的唾液酸寡糖 (深色) 的NMR表征, 所使用的仪器为Avance 500MHz, Bruker。

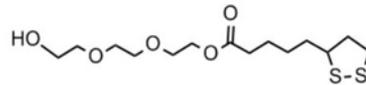
[0195] 表1实施例3获得9种唾液酸寡糖-铂纳米粒子中带有连接臂的唾液酸寡糖以及连接臂的结构

[0196] 3'SLs-Pt NP

带有连接臂的唾液酸寡糖 (式 X-1-1)

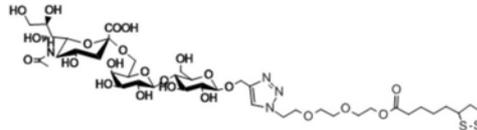


连接臂 (式 XI-1)

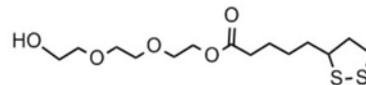


6'SLs-Pt NP

带有连接臂的唾液酸寡糖 (式 X-2-1)



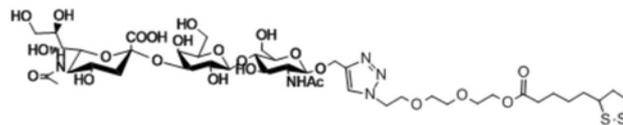
连接臂 (式 XI-1)



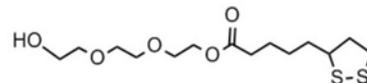
[0197]

3'SLNPs-Pt NP (式 X-1-2)

带有连接臂的唾液酸寡糖

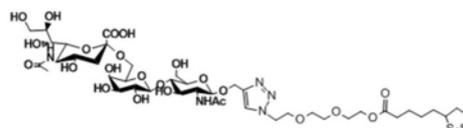


连接臂 (式 XI-1)

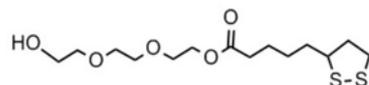


6'SLNPs-Pt NP (式 X-2-2)

带有连接臂的唾液酸寡糖

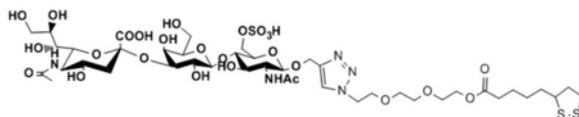


连接臂 (式 XI-1)

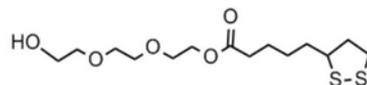


Su-3'SLN-Pt NP (式 X-1-3)

带有连接臂的唾液酸寡糖

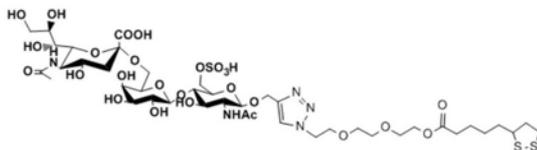


连接臂 (式 XI-1)

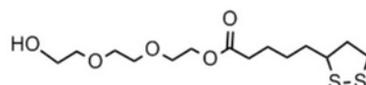


Su-6'SLN-Pt NP

带有连接臂的唾液酸寡糖 (式 X-2-3)



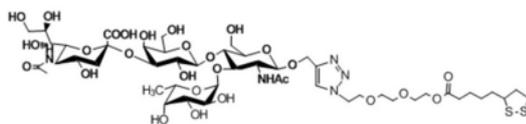
连接臂 (式 XI-1)



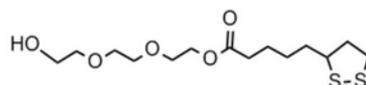
[0198]

SLe^xs-Pt NP

带有连接臂的唾液酸寡糖 (式 X-1-4)

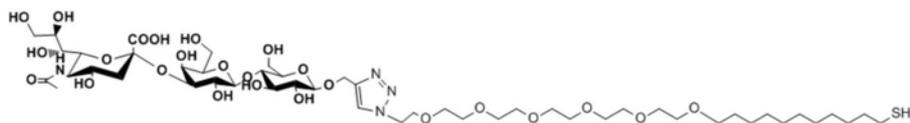


连接臂 (式 XI-1)

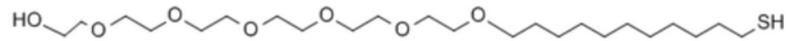


3'SLI-Pt NP

带有连接臂的唾液酸寡糖 (式 X-1-5)



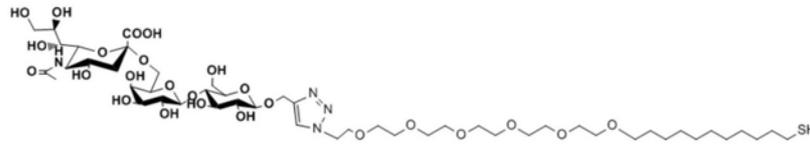
连接臂 (式 XI-5)



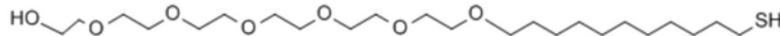
6'SL1-Pt NP

带有连接臂的唾液酸寡糖 (式 X-2-5)

[0199]



连接臂 (式 XI-5)



[0200] 实施例4流感病毒检测和受体特异性分析

[0201] 利用实施例3制备的唾液酸寡糖-铂纳米粒子对流感病毒进行检测和受体特异性分析。

[0202] 本实施例使用的流感病毒的毒株信息如下:

[0203] 毒株A/California/04/2009 (H1N1): 简称Ca04H1N1, 文献:W. Zhang, J. Qi, Y. Shi, Q. Li, F. Gao, Y. Sun, X. Lu, Q. Lu, C. J. Vavricka, D. Liu, J. Yan, G. F. Gao, Protein Cell 2010, 1, 459-467. 已知该病毒HA蛋白识别的受体为宿主细胞分泌的唾液酸 α 2,6寡糖。

[0204] 毒株A/VietNam/1203/2004 (H5N1): 简称VieH5N1, 文献:J. Stevens, O. Blixt, T. M. Tumpey, J. K. Taubenberger, J. C. Paulson, I. A. Wilson, Science 2006, 312, 404-410. 已知该病毒HA蛋白识别的受体为宿主细胞分泌的唾液酸 α 2,3寡糖。

[0205] 毒株A/Shanghai/1/2013 (H7N9): 简称ShaH7N9, 文献:D. Liu, W. Shi, Y. Shi, D. Wang, H. X. Iao, W. Li, Y. Bi, Y. Wu, X. Li, J. Yan, W. Liu, G. Zhao, W. Yang, Y. Wang, J. Ma, Y. Shu, F. Lei, G. F. Gao, The Lancet, 2013, 381, 1926-1932. 已知该病毒HA蛋白识别的受体为宿主细胞分泌的唾液酸 α 2,3寡糖, 毒株识别的受体为宿主细胞分泌的唾液酸 α 2,3或 α 2,6寡糖。

[0206] 实验例一: 具有 α 2,6结合特性的流感病毒的检测 (以Ca04H1N1为例)

[0207] 将缀合有生物素的扎那米韦溶解于PBS, 配制成0.3125 μ M的溶液。向铺有链霉亲和素的96孔板的三列孔中每孔加入50 μ L上述溶液, 震荡孵育2小时; 去除PBS后, 向各孔中加BSA室温封闭1小时; 将不同浓度的流感病毒Ca04H1N1的水溶液50 μ L加入96孔板的上述孔中于4 $^{\circ}$ C孵育8小时; 去除孔中的含有未结合流感病毒的溶液, 随后分别向其中加入6'SL1-Pt NP溶液 (实验组, A列) 和3'SL1-Pt NP溶液 (对照组, B列) 以及乳糖-铂纳米粒子溶液 (对照组, C列), 4 $^{\circ}$ C孵育8小时后去除未结合的铂纳米粒子。加入TMB显色液 (江苏康为世纪生物科技有限公司, 货号: CW0050S 100ml) 显色10min。利用Tecan infinite 200pro酶标仪读取650nm的吸收值。

[0208] 结果: 经肉眼观察, A列显蓝色, 且呈现很好的梯度变化, 表明存在感染人类的流感病毒。B列无色, 表明该病毒不感染禽类。C列和HA滴度为0的各孔均为无色。定量结果如图6所示。其中, HA滴度为 \log_2 (流感病毒浓度)。

[0209] 实验二: 具有 α 2,3结合特性的流感病毒的检测 (以VieH5N1为例)

[0210] 将缀合有生物素的扎那米韦溶解于PBS,配制成0.3125 μ M的溶液。向铺有链霉亲合素的96孔板的三列孔中每孔加入50 μ L上述溶液,震荡孵育2小时;去除PBS后,向各孔中加BSA室温封闭1小时;将不同浓度的流感病毒VieH5N1的水溶液50 μ L加入96孔板的上述孔中于4 $^{\circ}$ C孵育8小时;去除孔中的含有未结合流感病毒的溶液,随后分别向其中加入3' SL1-Pt NP溶液(实验组,A列)和6' SL1-Pt NP溶液(对照组,B列)以及乳糖-铂纳米粒子溶液(对照组,C列),4 $^{\circ}$ C孵育8小时后去除未结合的铂纳米粒子。加入如上所述的TMB显色液显色10min。利用Tecan infinite 200pro酶标仪读取650nm的吸收值。

[0211] 结果:经肉眼观察,A列显蓝色,且呈现很好的梯度变化,表明存在感染禽类的流感病毒。B列无色,表明该病毒不感染人类。C列和HA滴度为0的各孔均为无色。定量结果如图7所示。

[0212] 实验三:同时具有 α 2,3和 α 2,6结合特性的流感病毒的检测(以ShaH7N9为例)

[0213] 将缀合有生物素的扎那米韦或者唾液酸寡糖溶解于PBS,配制成0.3125 μ M的溶液。向铺有链霉亲合素的96孔板的三列孔中每孔加入50 μ L上述溶液,震荡孵育2小时;去除PBS后,向各孔中加BSA室温封闭1小时;将不同浓度的流感病毒ShaH7N9的水溶液50 μ L加入96孔板的上述孔中于4 $^{\circ}$ C孵育8小时;去除孔中的含有未结合流感病毒的溶液,随后分别向其中加入3' SL1-Pt NP溶液(实验组,A列)和6' SL1-Pt NP溶液(实验组,B列)以及乳糖-铂纳米粒子溶液(对照组,C列),4 $^{\circ}$ C孵育8小时后去除未结合的铂纳米粒子。加入如上所述的TMB显色液显色10min。利用Tecan infinite 200pro酶标仪读取650nm的吸收值。

[0214] 结果:经肉眼观察,A、B列显蓝色,且呈现很好的梯度变化,表明存在既感染人类又感染禽类的流感病毒。C列和HA滴度为0的各孔均为无色。定量结果如图8所示。

[0215] 可见,本发明的方法能够用于检测是否存在流感病毒,以及并区分流感病毒的宿主特异性。

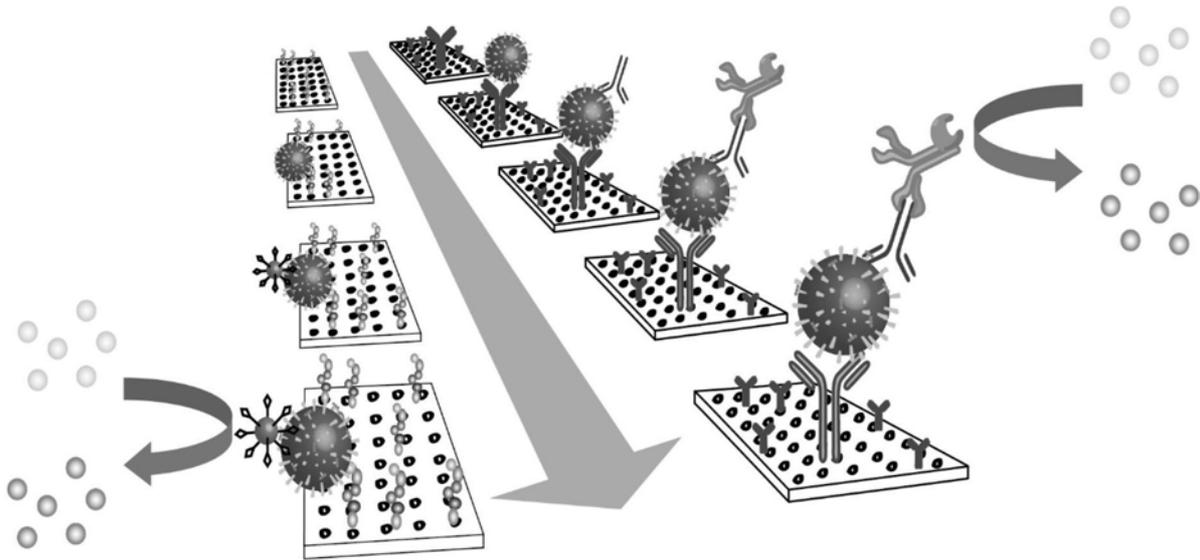


图1

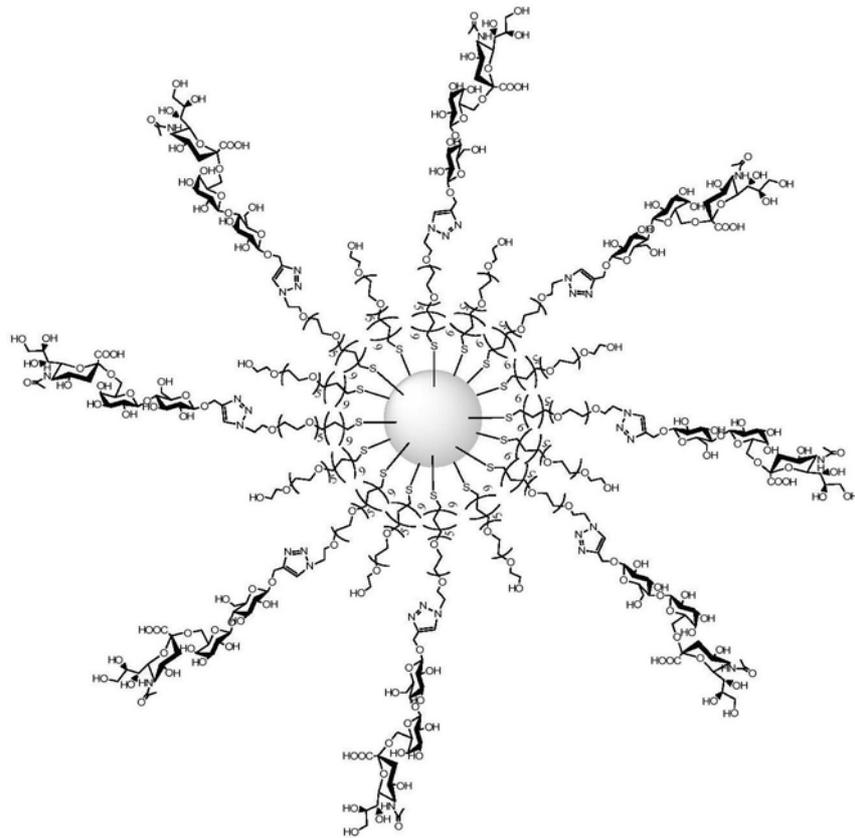


图2

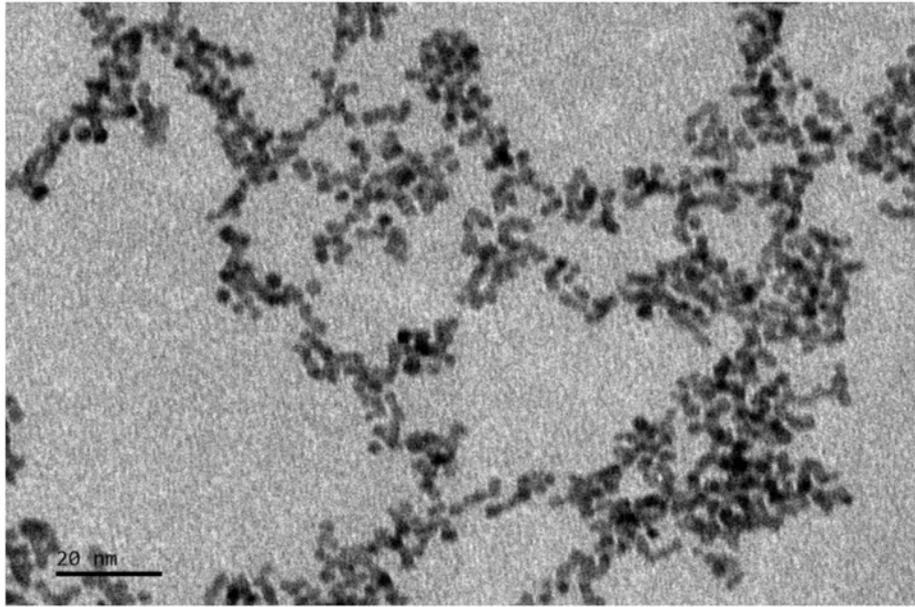


图3

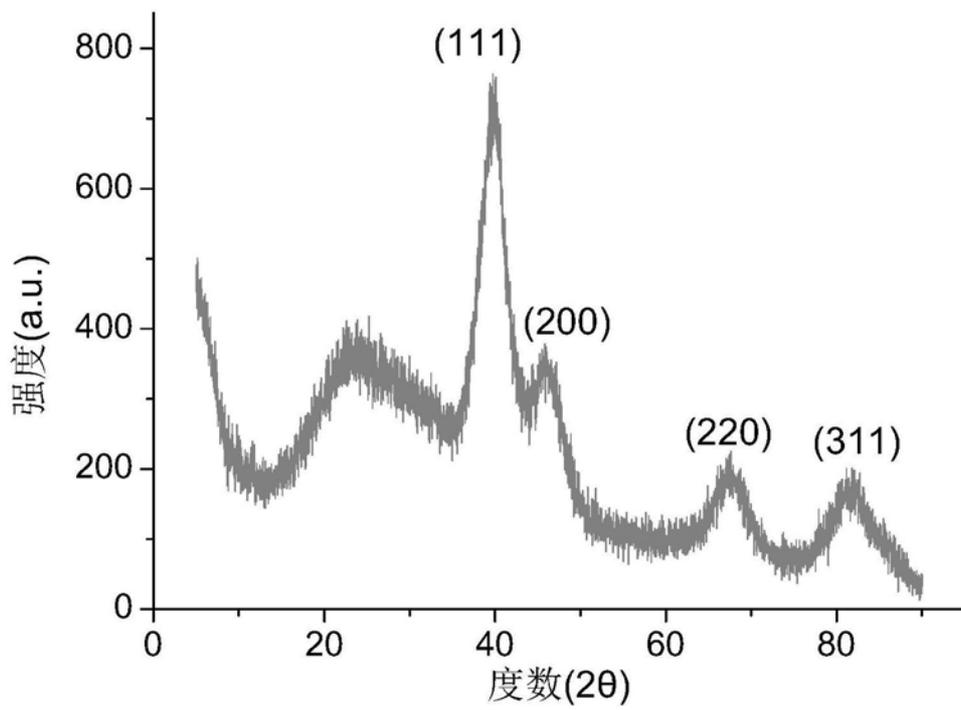


图4

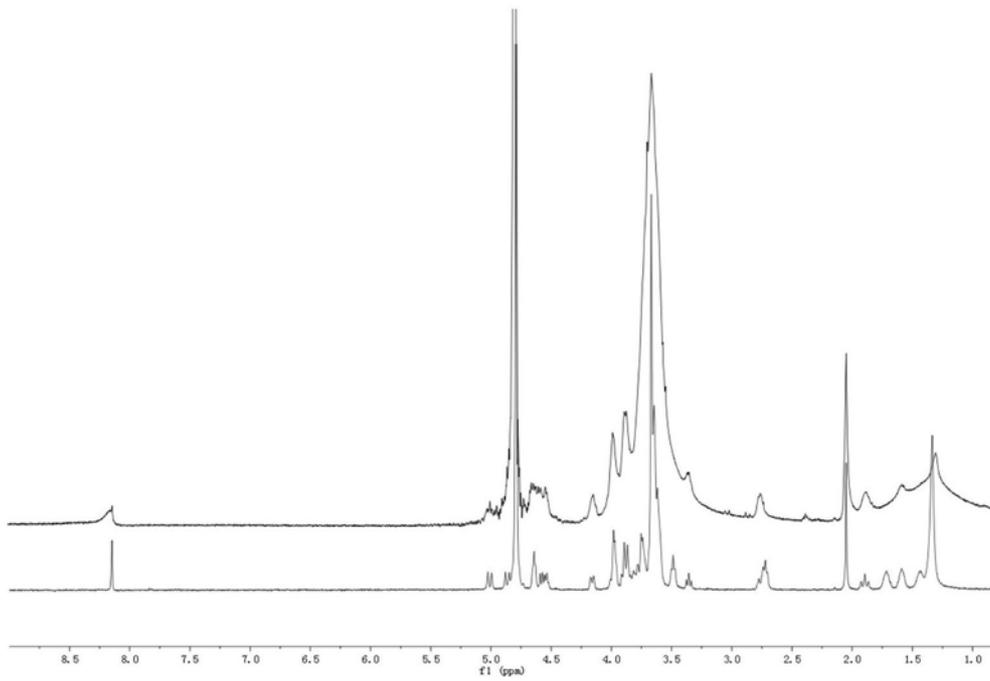


图5

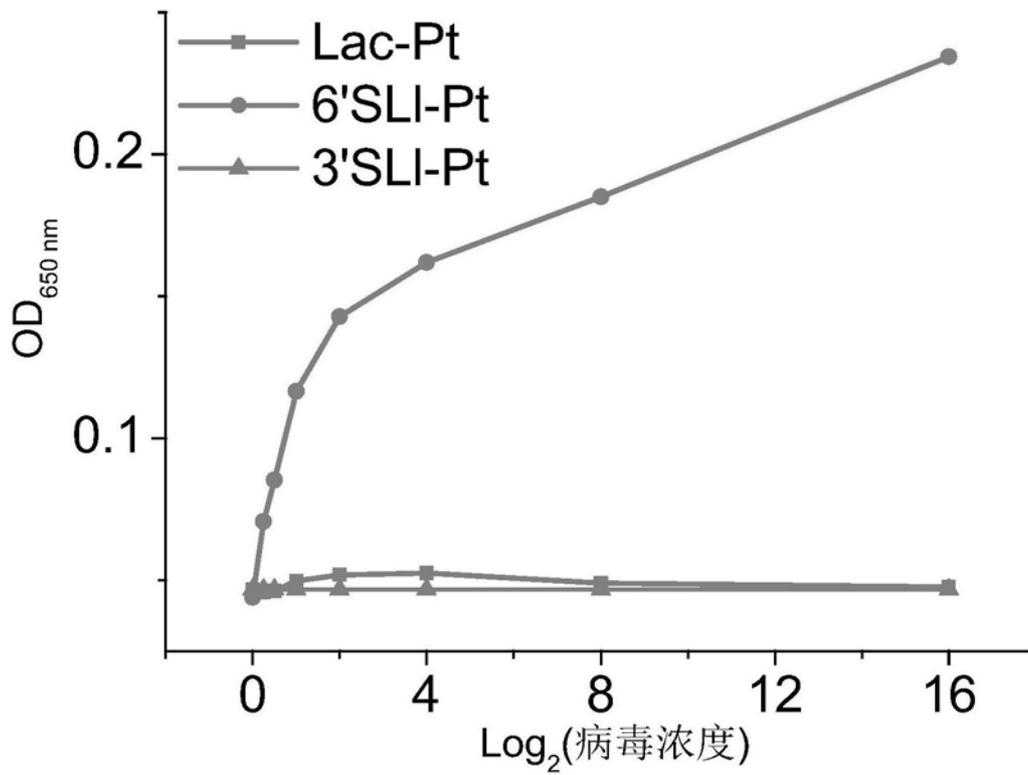


图6

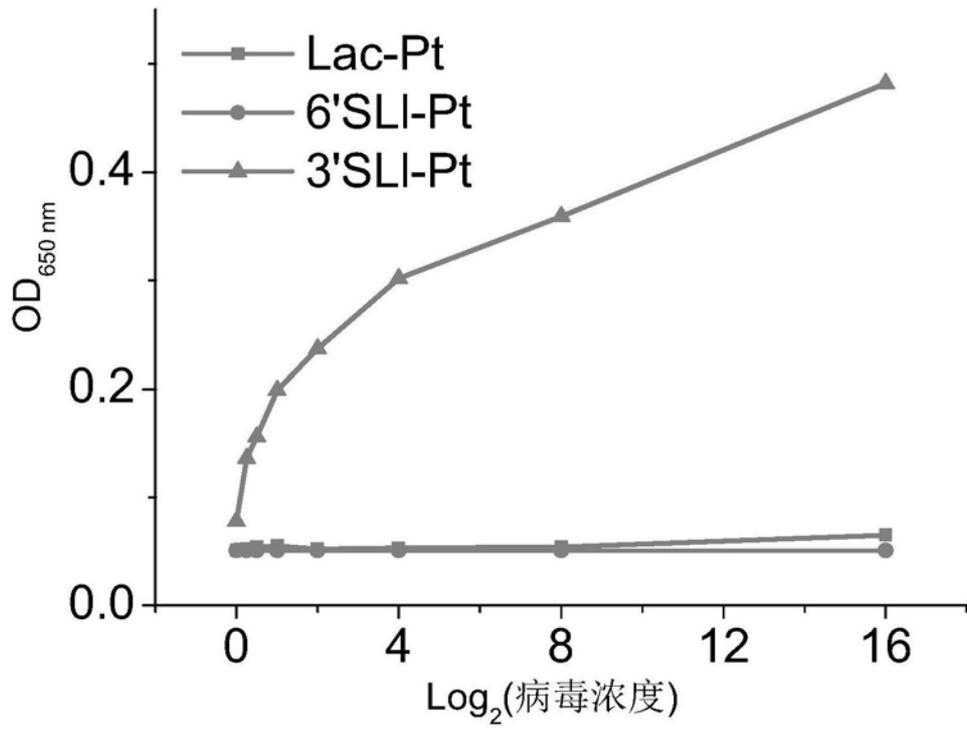


图7

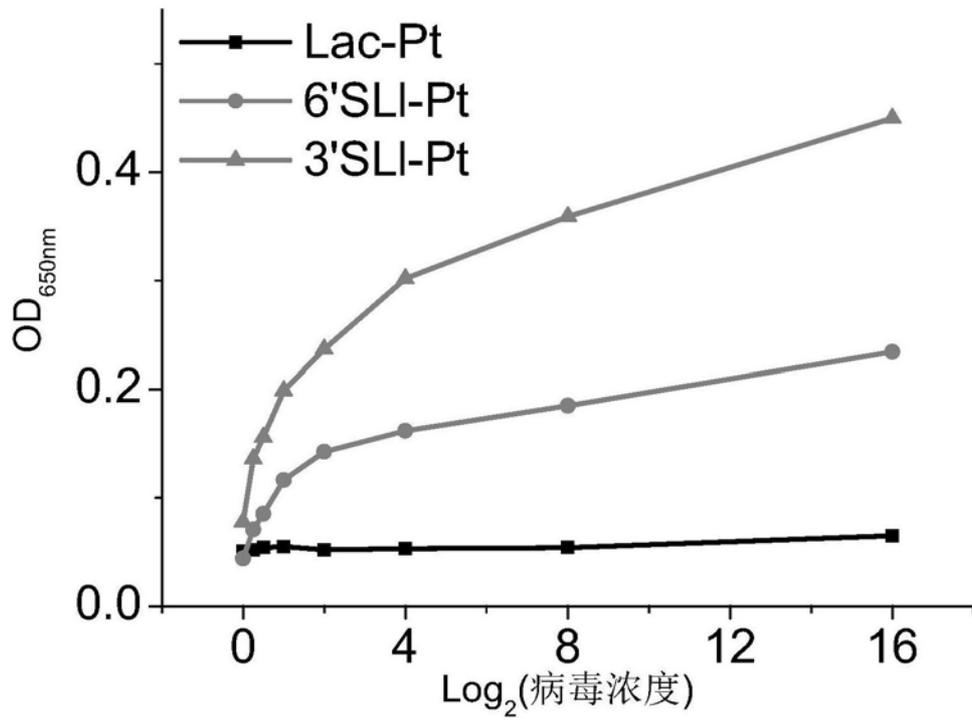


图8

专利名称(译)	唾液酸寡糖-铂纳米粒子、制备方法及其在流感病毒免疫检测方面的用途		
公开(公告)号	CN108623643A	公开(公告)日	2018-10-09
申请号	CN201710172721.4	申请日	2017-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院微生物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院微生物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院微生物研究所		
[标]发明人	李学兵 郑隆堂 张振兴 吕迅		
发明人	李学兵 郑隆堂 张振兴 吕迅		
IPC分类号	C07H15/26 C07H1/00 G01N33/569 G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	C07H1/00 C07H15/26 G01N33/535 G01N33/56983 G01N33/68 G01N2800/26		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种唾液酸寡糖-铂纳米粒子、制备方法及其在对流感病毒进行免疫检测方面的用途。所述唾液酸寡糖-铂纳米粒子为在铂纳米粒子的表面通过S-Pt共价键连接有带有连接臂的唾液酸寡糖。本发明的免疫检测方法完全避免了抗体和酶的使用，具有高稳定性、易于制备和获取等优点。

