



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109613245 A

(43)申请公布日 2019.04.12

(21)申请号 201910020677.4

(22)申请日 2019.01.09

(71)申请人 新疆医科大学

地址 830001 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐
市新医路393号

(72)发明人 李新霞 李心雨 李贝贝 李久彤

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 代芳

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

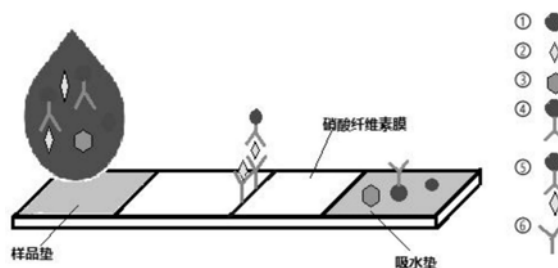
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种检测蛋白-蒜酶偶联物的靶向性的方法

(57)摘要

本发明提供了一种检测蛋白-蒜酶偶联物的靶向性的方法,属于免疫层析技术领域,所述方法包括以下步骤:将蛋白特异性抗体固定于纤维素膜上,经层析后蛋白抗体捕获具有荧光的蛋白-蒜酶偶联物,最后检测试纸条荧光强度;当最大荧光强度 ≥ 350 时,说明蛋白-蒜酶偶联物具有靶向性;当最大荧光强度 < 350 时,说明蛋白-蒜酶偶联物不具有靶向性。本发明的方法利用免疫层析技术对蛋白-蒜酶偶联物的靶向性进行检测,具有耗时短,成本低且操作简单等优点。



1. 一种检测蛋白-蒜酶偶联物的靶向性的方法,包括以下步骤:

1) 将蛋白-蒜酶偶联物中蛋白的特异性抗体固定于硝酸纤维素膜上,得到免疫层析试纸条;

2) 将蛋白-蒜酶偶联物作为待测样品在步骤1)所述免疫层析试纸条上加样,进行免疫层析,测定试纸条荧光强度,当最大荧光强度 ≥ 350 时,说明蛋白-蒜酶偶联物具有靶向性;当荧光强度 < 350 时,说明蛋白-蒜酶偶联物不具有靶向性。

2. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述蛋白为牛血清白蛋白。

3. 根据权利要求1或2所述的检测方法,其特征在于,所述蛋白-蒜酶偶联物的制备方法,包括以下步骤:

a) 将蒜酶和碳酸盐缓冲液混合,离心,得到蒜酶上清液;

b) 将异硫氰酸荧光素和碳酸盐缓冲液混合,得到异硫氰酸荧光素溶液;

c) 将步骤a)中所述蒜酶上清液与步骤b)中所述异硫氰酸荧光素溶液混合,进行蒜酶的荧光标记反应,得到蒜酶荧光标记物;

d) 将蛋白和磷酸盐缓冲液混合,得到蛋白溶液;

e) 将步骤d)所述蛋白溶液、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺混合,超滤离心,得到超滤溶液;

f) 将步骤e)所述超滤溶液与步骤c)所述蒜酶荧光标记物混合,进行偶联反应,得到蛋白-蒜酶偶联物;

所述步骤a)与b)之间无时间顺序限定。

4. 根据权利要求3所述的检测方法,其特征在于,步骤c)中所述荧光标记反应避光进行。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,步骤c)中所述荧光标记反应的温度为 $1\sim 5^{\circ}\text{C}$;所述荧光标记反应的时间为 $10\sim 14\text{h}$ 。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,步骤c)中所述蒜酶上清液与异硫氰酸荧光素溶液的体积比为 $3\sim 5:0.5\sim 1.5$ 。

7. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,步骤e)中所述蛋白溶液、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和异硫氰酸荧光素溶液的比例为 $0.5\sim 1.5\text{mL}:190\sim 210\text{mg}:14\sim 16\text{mg}$ 。

8. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,步骤f)中所述超滤溶液与蒜酶荧光标记物的体积比为 $0.5\sim 1.5:0.5\sim 1.5$ 。

9. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,步骤e)中所述超滤离心的截留分子量为 $9\sim 11\text{KDa}$;所述超滤离心的转速为 $4000\sim 6000\text{rpm}$,所述超滤离心的时间为 $15\sim 25\text{min}$ 。

10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于,步骤f)中所述偶联反应的温度为 $16\sim 25^{\circ}\text{C}$;所述偶联反应的时间为 $2\sim 4\text{h}$ 。

一种检测蛋白-蒜酶偶联物的靶向性的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫层析技术领域,尤其涉及一种检测蛋白-蒜酶偶联物的靶向性的方法。

背景技术

[0002] 抗体偶联药物(Antibody-Drug Conjugate,ADC)作为一种新型的生物导弹,实现了单抗靶向作用和小分子药物细胞毒性的强强联合,现已成为肿瘤靶向治疗发展最快的领域之一。

[0003] 大蒜是多年生百合科葱属植物蒜(*Allium sativum* L.)的地下鳞茎,是历史悠久的药食两用植物。大蒜含有多种化学成分,而含硫有机化合物是其重要的活性物质,主要包括蒜氨酸和大蒜辣素。大蒜辣素是大蒜被粉碎后生成的一个含氧硫化物,蒜氨酸与蒜酶(蒜氨酸裂解酶,Alliinase)分处大蒜细胞的不同部位,大蒜经粉碎后,蒜氨酸与蒜酶相遇,快速反应产生大蒜辣素。近年来,国内外许多学者致力于大蒜的研究,证实大蒜具有多方面的生物活性。其中大蒜辣素在大蒜的抗菌活性中起着重要作用,大蒜辣素的抗肿瘤活性,其机理在于通过抑制肿瘤细胞的增殖,影响细胞周期,诱导肿瘤细胞凋亡,对抗癌药具有增敏作用等,诱导肿瘤细胞的凋亡和抑制或杀死肿瘤细胞。但由于大蒜辣素不稳定,成药困难,所以现有研究采用蒜氨酸与蒜酶联用,在肿瘤细胞原位释放大蒜辣素,从而产生杀伤肿瘤细胞的作用。

[0004] 对于抗体药物偶联物,一般采用体内动物试验,进行造模,给药后采用活体成像技术或对动物组织进行细胞分子方面的研究对偶联物的靶向性和活性进行研究,此过程不仅耗时长,且成本高,所使用的仪器昂贵,并且存在动物试验伦理学问题;在体外细胞试验筛选抗体药物偶联物时,对试验环境要求高,操作复杂且成本高。所以寻找一种简单快捷方法对偶联物靶向性进行初步确定十分必要。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种检测蛋白-蒜酶偶联物的靶向性的方法,该方法能够快速检测蛋白-蒜酶偶联物的靶向性。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0007] 本发明提供了一种检测蛋白-蒜酶偶联物的靶向性的方法,包括以下步骤:

[0008] 1) 将蛋白-蒜酶偶联物中蛋白的特异性抗体固定于硝酸纤维素膜上,得到免疫层析试纸条;

[0009] 2) 将蛋白-蒜酶偶联物作为待测样品在步骤1)所述免疫层析试纸条上加样,进行免疫层析,测定试纸条荧光强度,当最大荧光强度 ≥ 350 时,说明蛋白-蒜酶偶联物具有靶向性;当最大荧光强度 < 350 时,说明蛋白-蒜酶偶联物不具有靶向性。

[0010] 优选的,所述蛋白为牛血清白蛋白。

[0011] 优选的,所述蛋白-蒜酶偶联物的制备方法包括以下步骤:

- [0012] a) 将蒜酶和碳酸盐缓冲液混合,离心,得到蒜酶上清液;
- [0013] b) 将异硫氰酸荧光素和碳酸盐缓冲液混合,得到异硫氰酸荧光素溶液;
- [0014] c) 将步骤a)中所述蒜酶上清液与步骤b)中所述异硫氰酸荧光素溶液混合,进行蒜酶的荧光标记反应,得到蒜酶荧光标记物;
- [0015] d) 将蛋白和磷酸盐缓冲液混合,得到蛋白溶液;
- [0016] e) 将步骤d)所述蛋白溶液、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羧基琥珀酰亚胺混合,超滤离心,得到超滤溶液;
- [0017] f) 将步骤e)所述超滤溶液与步骤c)所述蒜酶荧光标记物混合,进行偶联反应,得到蛋白-蒜酶偶联物;
- [0018] 所述步骤a)与b)之间无时间顺序限定。
- [0019] 优选的,步骤c)中所述荧光标记反应避光进行。
- [0020] 优选的,步骤c)中所述荧光标记反应的温度为1~5℃;所述荧光标记反应的时间为10~14h。
- [0021] 优选的,步骤c)中所述蒜酶上清液与异硫氰酸荧光素溶液的体积比为3~5:0.5~1.5。
- [0022] 优选的,步骤e)中所述蛋白溶液、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和异硫氰酸荧光素溶液的比例为0.5~1.5mL:190~210mg:14~16mg。
- [0023] 优选的,步骤f)中所述超滤溶液与蒜酶荧光标记物的体积比为0.5~1.5:0.5~1.5。
- [0024] 优选的,步骤e)中所述超滤离心的截留分子量为9~11kDa;所述超滤离心的转速为4000~6000rpm,所述超滤离心的时间为15~25min。
- [0025] 优选的,步骤f)中所述偶联反应的温度为16~25℃;所述偶联反应的时间为2~4h。
- [0026] 本发明的有益效果:本发明提供了一种检测蛋白-蒜酶偶联物的靶向性的方法,该方法将蛋白特异性抗体固定于纤维素膜上,经层析后蛋白抗体捕获具有荧光的蛋白-蒜酶偶联物,最后检测试纸条荧光强度;当最大荧光强度 ≥ 350 时,说明蛋白-蒜酶偶联物具有靶向性;当最大荧光强度 < 350 时,说明蛋白-蒜酶偶联物不具有靶向性。本发明的方法利用免疫层析技术对蛋白-蒜酶偶联物的靶向性进行检测,具有耗时短,成本低且操作简单等优点。

附图说明:

- [0027] 图1为荧光免疫层析检测示意图,其中①为异硫氰酸荧光素,②为蛋白,③为非目标物,④为蒜酶荧光标记物,⑤为蛋白-蒜酶偶联物,⑥为蛋白的特异性抗体;
- [0028] 图2为试纸条的荧光检测示意图,其中1表示无荧光底板,2表示硝酸纤维素膜,3表示光源,4表示检测器,5表示荧光比色皿;
- [0029] 图3为实施例1中异硫氰酸荧光素的荧光光谱扫描图;
- [0030] 图4为实施例1中免疫层析试纸条的荧光光谱扫描图,其中1表示偶联物,2表示异硫氰酸荧光素;
- [0031] 图5为实施例1中空白纸板和空白硝酸纤维素膜条的荧光光谱扫描图,其中1表示

空白无荧光纸板,2表示空白硝酸纤维素膜。

具体实施方式

[0032] 本发明提供了一种检测蛋白-蒜酶偶联物的靶向性的方法,包括以下步骤:

[0033] 1) 将蛋白-蒜酶偶联物中蛋白的特异性抗体固定于硝酸纤维素膜上,得到免疫层析试纸条;

[0034] 2) 将蛋白-蒜酶偶联物作为待测样品在步骤1)所述免疫层析试纸条上加样,进行免疫层析,测定试纸条荧光强度,当最大荧光强度 ≥ 350 时,说明蛋白-蒜酶偶联物具有靶向性;当最大荧光强度 < 350 时,说明蛋白-蒜酶偶联物不具有靶向性。

[0035] 本发明的检测原理:具有荧光的待测样品加至试纸条的样品垫上,溶液经样品垫的毛细作用,层析至硝酸纤维素膜。待测样品中目标物与硝酸纤维素膜上抗体结合,使固定有抗体的纤维膜上的部位具有荧光,本发明的荧光免疫层析检测示意图参见图1,其中①为异硫氰酸荧光素,②为蛋白,③为非目标物,④为蒜酶荧光标记物,⑤为蛋白-蒜酶偶联物,⑥为蛋白的特异性抗体。

[0036] 在本发明中,将蛋白-蒜酶偶联物中蛋白的特异性抗体固定于硝酸纤维素膜上,得到免疫层析试纸条;本发明对免疫层析试纸条的样品垫和吸水垫没有特殊限制,本领域常规设置即可;所述蛋白优选为牛血清白蛋白;所述牛血清白蛋白购自于上海源叶生物科技有限公司,批号L16M6S2;所述牛血清白蛋白的特异性抗体为牛血清白蛋白抗体;所述牛血清白蛋白抗体购自于北京博奥森生物技术有限公司,批号AG03031588。

[0037] 本发明中,所述固定的方式优选为喷涂固定或点样划线固定;所述蛋白的特异性抗体的浓度优选为 1mg/mL ;所述蛋白的特异性抗体的固定量优选为 $0.5\mu\text{L}$ 。

[0038] 在本发明中,将所述蛋白-蒜酶偶联物作为待测样品在所述免疫层析试纸条上加样,进行免疫层析,测定试纸条荧光强度,当最大荧光强度 ≥ 350 时,说明蛋白-蒜酶偶联物具有靶向性;当最大荧光强度 < 350 时,说明蛋白-蒜酶偶联物不具有靶向性;其中350是空白异硫氰酸荧光素最大荧光强度。

[0039] 本发明中,所述点样的工具优选为移液枪;所述蛋白-蒜酶偶联物的点样量优选为 $60\mu\text{L}$;所述层析液为蛋白-蒜酶偶联物溶液。

[0040] 本发明在进行免疫层析后,优选的还包括利用碳酸盐缓冲液洗去试纸条上多余游离未合成的异硫氰酸荧光素;所述碳酸盐缓冲液的pH优选为9~10,更优选为9.5;本发明的具体实施过程中,所述碳酸盐缓冲液优选的包括碳酸氢钠、碳酸钠和水;所述碳酸氢钠、碳酸钠和水的比例优选为 $3.5\sim 3.9\text{g}:0.4\sim 0.8\text{g}:500\sim 700\text{mL}$,更优选为 $3.7\text{g}:0.6\text{g}:600\text{mL}$ 。

[0041] 本发明在进行免疫层析后,测定试纸条荧光强度,所述测定试纸条荧光强度的设备优选为荧光分光光度计;所述荧光分光光度计优选为LS-55荧光分光光度计;所述LS-55荧光分光光度计购自于美国Perkin Elmer公司。

[0042] 本发明中所述测定试纸条荧光强度的方法,具体步骤如下:取不具有荧光的纸板裁成适合于荧光比色皿大小,于对角线置于荧光比色皿中,再将层析后的硝酸纤维素试纸条固定于无荧光纸板上,使用荧光分光光度计对试纸条进行荧光光谱扫描测定试纸条荧光强度,当最大荧光强度 ≥ 350 (空白异硫氰酸荧光素最大荧光强度)时,说明蛋白-蒜酶偶联

物具有靶向性；当最大荧光强度 <350 （空白异硫氰酸荧光素最大荧光强度）时，说明蛋白-蒜酶偶联物不具有靶向性。本发明中，所述荧光分光光度计的激发波长优选为 490nm ；所述荧光分光光度计的发射波长优选为 $505\sim 600\text{nm}$ ；所述发射波长的狭缝宽度优选为 $(2.5, 2.5)$ ；所述试纸条的荧光检测示意图参见图2，其中1表示无荧光底板，2表示硝酸纤维素膜，3表示光源，4表示检测器，5表示荧光比色皿。

[0043] 本发明中所述蛋白-蒜酶偶联物的制备方法，包括以下步骤：

[0044] a) 将蒜酶和碳酸盐缓冲液混合，离心，得到蒜酶上清液；

[0045] b) 将异硫氰酸荧光素和碳酸盐缓冲液混合，得到异硫氰酸荧光素溶液；

[0046] c) 将步骤a) 中所述蒜酶上清液与步骤b) 中所述异硫氰酸荧光素溶液混合，进行蒜酶的荧光标记反应，得到蒜酶荧光标记物；

[0047] d) 将蛋白和磷酸盐缓冲液混合，得到蛋白溶液；

[0048] e) 将步骤d) 所述蛋白溶液、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羧基琥珀酰亚胺混合，超滤离心，得到超滤溶液；

[0049] f) 将步骤e) 所述超滤溶液与步骤c) 所述蒜酶荧光标记物混合，进行偶联反应，得到蛋白-蒜酶偶联物；

[0050] 所述步骤a) 与b) 之间无时间顺序限定。

[0051] 本发明中，将蒜酶和碳酸盐缓冲液混合，离心，得到蒜酶上清液；所述碳酸盐缓冲液的pH优选为 $9\sim 10$ ，更优选为 9.5 ；所述蒜酶与碳酸盐的质量体积比优选为 $30\sim 50\text{mg}:0.5\sim 1.5\text{mL}$ ，更优选为 $40\text{mg}:1\text{L}$ ；所述混合的温度优选为 $18\sim 26^\circ\text{C}$ ，优选为 20°C ；本发明对混合的时间没有特殊限制，以混合均匀为准。本发明的具体实施过程中，所述蒜酶购自于新疆埃乐欣药业有限公司；所述碳酸盐缓冲液优选的包括碳酸氢钠、碳酸钠和水；所述碳酸氢钠、碳酸钠和水的比例优选为 $3.5\sim 3.9\text{g}:0.4\sim 0.8\text{g}:500\sim 700\text{mL}$ ，更优选为 $3.7\text{g}:0.6\text{g}:600\text{mL}$ ；所述离心的转速优选 $4000\sim 6000\text{rpm}$ ，更优选为 5000rpm ；所述离心的时间优选为 $8\sim 12\text{min}$ ，更优选为 10min 。

[0052] 在本发明中，将异硫氰酸荧光素和碳酸盐缓冲液混合，得到异硫氰酸荧光素溶液；所述碳酸盐缓冲液的pH优选为 $9\sim 10$ ，更优选为 9.5 ；所述异硫氰酸荧光素与碳酸盐的质量体积比优选为 $0.5\sim 1.5\text{mg}:0.5\sim 1.5\text{mL}$ ，更优选为 $1\text{mg}:1\text{L}$ ；所述混合的温度优选为 $18\sim 26^\circ\text{C}$ ，优选为 20°C ；本发明对混合的时间没有特殊限制，以混合均匀为准。本发明的具体实施过程中，所述异硫氰酸荧光素购自于索莱宝生物科技有限公司，批号No.915C011；所述碳酸盐缓冲液优选的包括碳酸氢钠、碳酸钠和水；所述碳酸氢钠、碳酸钠和水的比例优选为 $3.5\sim 3.9\text{g}:0.4\sim 0.8\text{g}:500\sim 700\text{mL}$ ，更优选为 $3.7\text{g}:0.6\text{g}:600\text{mL}$ 。

[0053] 本发明在得到蒜酶上清液和异硫氰酸荧光素溶液后，将所述蒜酶上清液与所述异硫氰酸荧光素溶液混合，进行蒜酶的荧光标记反应，得到蒜酶荧光标记物；所述蒜酶上清液与异硫氰酸荧光素溶液的体积比优选为 $3\sim 5:0.5\sim 1.5$ ，更优选为 $4:1$ ；所述混合的方式优选为搅拌混合，更优选为磁力搅拌混合；所述磁力搅拌混合的转速优选为 $100\sim 150\text{rpm}$ ，更优选为 120rpm ；所述荧光标记反应优选为避光进行；所述荧光标记反应的温度优选为 $1\sim 5^\circ\text{C}$ ，更优选为 4°C ；所述荧光标记反应的时间优选为 $10\sim 14\text{h}$ ，更优选为 12h 。

[0054] 本发明中，采用磁力搅拌的原因是，所述荧光标记反应的时间为 $10\sim 14\text{h}$ ，反应时间较长，且样品总量较小，所以采用磁力搅拌进行混合搅拌反应。

[0055] 本发明中,所述荧光标记反应的温度设置为1~5℃的原因是,在荧光标记反应中,异硫氰酸荧光素的反应温度为1~5℃,且在1~5℃的条件下,蒜酶能够更好的保持酶活力。

[0056] 本发明中,优选的还包括对异硫氰酸荧光素进行荧光光谱扫描;该步骤的目的是确定异硫氰酸荧光素单独的扫描曲线。

[0057] 本发明的具体实施过程中,取异硫氰酸荧光素溶液点样于层析试纸条上,利用荧光分光光度计进行异硫氰酸荧光素的荧光光谱扫描;所述异硫氰酸荧光素溶液的溶剂优选为碳酸盐缓冲液;所述异硫氰酸荧光素溶液的浓度优选为9~11μg/mL,更优选为10μg/mL;所述异硫氰酸荧光素溶液的点样量优选为4~6μL,更优选为5μL;所述荧光分光光度计的激发波长优选为490nm;所述荧光分光光度计的发射波长优选为505~600nm,更优选为525nm;所述狭缝宽度优选为10nm,10nm;所述荧光分光光度计优选为LS-55荧光分光光度计;所述LS-55荧光分光光度计购自于美国Perkin Elmer公司。

[0058] 在本发明中,将蛋白和磷酸盐缓冲液混合,得到蛋白溶液;所述磷酸盐缓冲液的pH值优选为5~7,更优选为6;所述蛋白和磷酸盐缓冲液的质量体积比优选为3~5mg:0.5~1.5mL,更优选为4mg:1mL;所述混合的温度优选为18~26℃,优选为20℃;本发明对混合的时间没有特殊限制,以混合均匀为准。本发明的具体实施过程中,所述磷酸盐缓冲液优选的包括磷酸氢二钠水溶液和磷酸二氢钠水溶液;所述磷酸氢二钠水溶液的浓度优选为0.1~0.3mol/L,更优选为0.2mol/L;所述磷酸氢二钠水溶液的浓度优选为0.1~0.3mol/L,更优选为0.2mol/L;所述磷酸氢二钠水溶液与磷酸二氢钠水溶液的体积比优选为12.1~12.5:87.5~87.9,更优选为12.3:87.7。本发明采用牛血清白蛋白的原因是牛血清蛋白是一种常用的大分子蛋白质,具有代表性且价格低廉。

[0059] 本发明中,牛血清白蛋白-蒜酶偶联物的制备方法是根据牛血清白蛋白上的羧基和蒜酶上的氨基进行合成反应,蛋白质是由氨基酸组成的多肽链经过盘曲折叠形成的具有一定空间结构的物质。氨基酸是含有碱性氨基和酸性羧基的有机化合物,所以,此反应也适用于其他蛋白质。

[0060] 在本发明获得蛋白溶液后,将所述蛋白溶液、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺混合,超滤离心,得到超滤溶液。

[0061] 本发明中,所述蛋白溶液、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和异硫氰酸荧光素溶液的比例优选为0.5~1.5mL:190~210mg:14~16mg,更优选为1mL:200mg:15mg;所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐优选的购自于上海源叶生物科技有限公司,批号Z20J8N40263,规格25g;所述N-羟基琥珀酰亚胺优选的购自于北京索莱宝科技有限公司,批号No.608A031,规格1g。

[0062] 本发明中,所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺共同用于活化蛋白上的羧基,形成活性中间体;活性中间体再与蒜酶上的氨基进行反应。

[0063] 本发明中,所述混合的方式优选为搅拌混合,更优选为磁力搅拌混合;所述磁力搅拌混合的转速优选为100~150rpm,更优选为120rpm;所述磁力搅拌混合的时间优选为30~40min,更优选为35min;所述磁力搅拌混合的温度优选为18~26℃,更优选为20℃;所述超滤离心的截留分子量优选为9~11kDa,更优选为10kDa;所述超滤离心的转速优选为4000~

6000rpm,更优选为5000rpm,所述超滤离心的时间优选为15~25min,更优选为20min。

[0064] 本发明中,所述超滤离心的作用是除去未反应的小分子物质。

[0065] 本发明在获得超滤溶液和蒜酶荧光标记物后,将所述超滤溶液与所述蒜酶荧光标记物混合,进行偶联反应,得到蛋白-蒜酶偶联物;所述超滤溶液与蒜酶荧光标记物的体积比优选为0.5~1.5:0.5~1.5,更优选为1:1;所述混合的方式优选为搅拌混合,更优选为磁力搅拌混合;所述磁力搅拌混合的转速优选为100~150rpm,更优选为120rpm;所述偶联反应的温度优选为16~25℃,更优选为20℃;所述偶联反应的时间优选为2~4h,更优选为3h。

[0066] 下面结合实施例对本发明提供的一种检测蛋白-蒜酶偶联物的靶向性的方法进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0067] 实施例1

[0068] 1. 仪器与试剂

[0069] 1) 仪器LS-55荧光分光光度计(美国Perkin Elmer公司)

[0070] 2) 试剂蒜酶新疆埃乐欣药业有限公司提供;牛血清白蛋白上海源叶生物科技有限公司提供,批号L16M6S2;异硫氰酸荧光素索莱宝生物科技有限公司提供,批号No.915C011;牛血清白蛋白抗体北京博奥森生物技术有限公司提供,批号AG03031588。

[0071] 2. 溶液配制:

[0072] 1) pH 9.5碳酸盐缓冲液:称取碳酸氢钠3.70g,碳酸钠0.60g溶于600mL蒸馏水中即得。

[0073] 2) pH 6.0磷酸盐缓冲液:0.2mol/L磷酸氢二钠12.3mL,0.2mol/L磷酸二氢钠87.7mL混匀即得。

[0074] 3. 蒜酶的荧光标记

[0075] 蒜酶经pH 9.5的碳酸盐缓冲液溶解配制成40mg/ml蒜酶溶液,经离心(5000rpm,10min)取上清溶液与经pH 9.5的碳酸盐缓冲液溶液溶解的异硫氰酸荧光素(1mg/ml)混匀反应,蒜酶上清溶液与异硫氰酸荧光素的体积比为4:1。在4℃下避光磁力搅拌反应(120rpm/min,12h),得到蒜酶荧光标记物。

[0076] 4. 异硫氰酸荧光素荧光光谱扫描

[0077] 取10μg/mL的异硫氰酸荧光素5μl点样于层析试纸条上,激发波长490nm,发射波长取505~600nm,狭缝宽度10nm,10nm,进行异硫氰酸荧光素的荧光光谱扫描,异硫氰酸荧光素的荧光光谱扫描图参见图3,扫描结果显示以490nm为激发波长,在505-600nm波长范围内进行扫描,最大发射波长为528nm。

[0078] 5. 牛血清蛋白-蒜酶偶联物合成

[0079] 牛血清蛋白经pH 6.0的磷酸盐缓冲液溶解配制成4mg/ml的牛血清蛋白溶液,分别加入200mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl),15mg N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)磁力搅拌(室温,120rpm/min,35min)超滤离心(10KDa,5000rpm,20min),再加入具有荧光的蒜酶溶液1:1(v:v)混匀,三乙胺调节pH 8-9,磁力搅拌(室温,120rpm/min,3h)。

[0080] 6. 牛血清蛋白-蒜酶偶联物靶向性验证

[0081] 在硝酸纤维素膜上固定牛血清蛋白抗体,具有荧光的偶联物点样于纤维素膜的样品垫上,经层析免疫反应后,pH 9.5的碳酸盐缓冲液洗去试纸条上多余异硫氰酸荧光素,将

试纸条置于荧光比色皿中在荧光分光光度计中以激发波长490nm,发射波长取505~600nm,狭缝宽度(2.5nm,2.5nm),对试纸条进行荧光光谱扫描。结果参见图4,其中1表示偶联物,2表示异硫氰酸荧光素。

[0082] 取不具有荧光的纸板裁成适合于荧光比色皿大小,再将硝酸纤维素膜从试纸条上取下,黏于纸板上,以激发波长490nm,发射波长取505~600nm,狭缝宽度2.5,2.5进行荧光光谱扫描。结果参见图5,其中1表示空白无荧光纸板,2表示空白硝酸纤维素膜,结果显示所选的空白纸板和空白硝酸纤维素膜条均不具有荧光,对后续偶联物的靶向性研究没有空白干扰。

[0083] 上述结果显示,异硫氰酸荧光素的空白膜条经荧光扫描后,采用缓冲液洗至无色后,膜条上仍有荧光,但强度较低;偶联物经免疫层析后,采用缓冲液洗至无色后,与空白异硫氰酸荧光素膜条相比经偶联物层析后的膜条具有较强的荧光,最大发射波长为525nm与异硫氰酸荧光素的荧光光谱扫描图的最大发射波长相同。综上所述,蒜酶-牛血清蛋白偶联物可以与牛血清蛋白抗体特异性结合,并且具有荧光。所以蒜酶-牛血清蛋白偶联物对牛血清蛋白抗体具有靶向性。

[0084] 由以上实施例可知,本发明采用免疫层析技术可以初步筛选抗体-药物偶联物的靶向性。

[0085] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

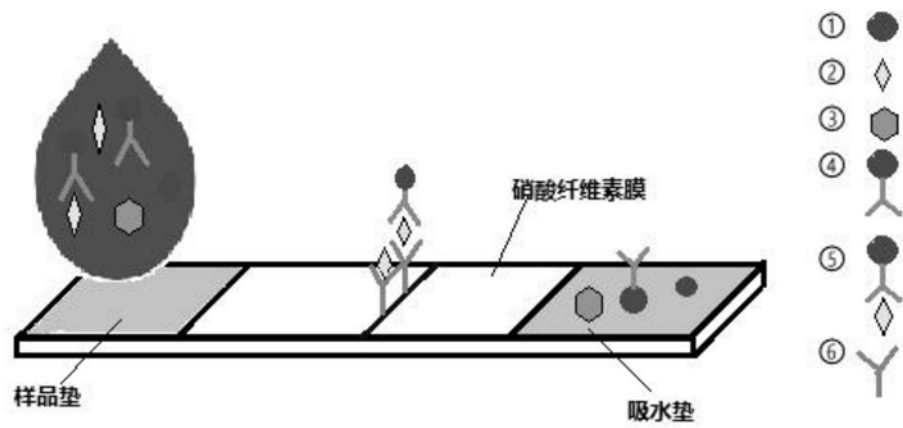


图1

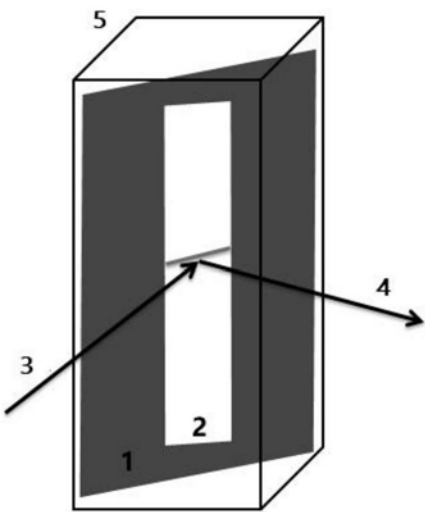


图2

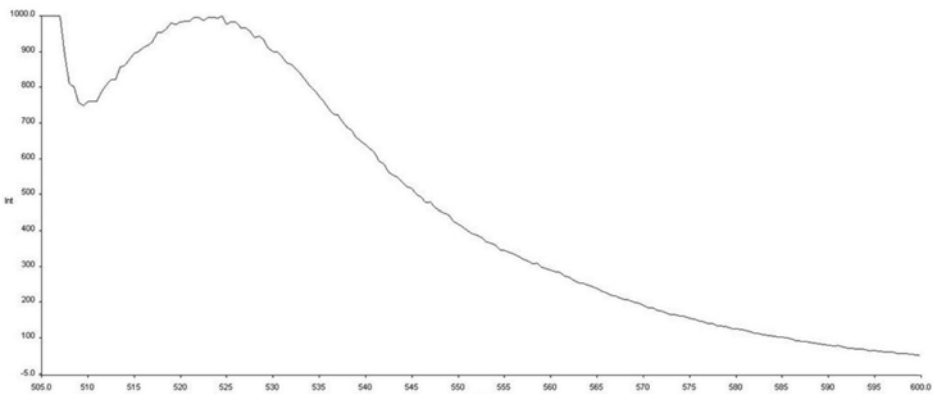


图3

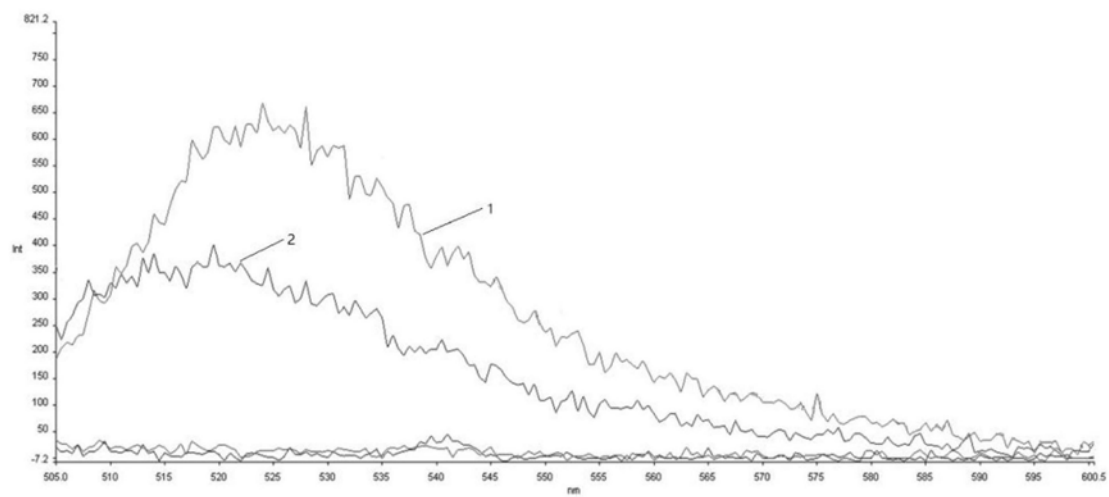


图4

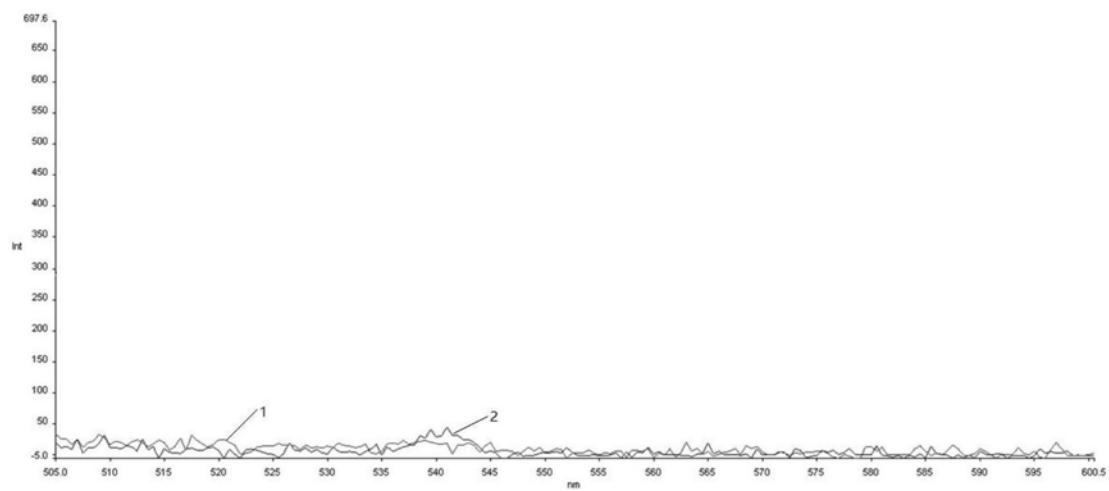


图5

专利名称(译)	一种检测蛋白-蒜酶偶联物的靶向性的方法		
公开(公告)号	CN109613245A	公开(公告)日	2019-04-12
申请号	CN201910020677.4	申请日	2019-01-09
[标]申请(专利权)人(译)	新疆医科大学		
申请(专利权)人(译)	新疆医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	新疆医科大学		
[标]发明人	李新霞 李心雨 李贝贝 李久彤		
发明人	李新霞 李心雨 李贝贝 李久彤		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/574 G01N33/533		
代理人(译)	代芳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测蛋白-蒜酶偶联物的靶向性的方法，属于免疫层析技术领域，所述方法包括以下步骤：将蛋白特异性抗体固定于纤维素膜上，经层析后蛋白抗体捕获具有荧光的蛋白-蒜酶偶联物，最后检测试纸条荧光强度；当最大荧光强度 ≥ 350 时，说明蛋白-蒜酶偶联物具有靶向性；当最大荧光强度 < 350 时，说明蛋白-蒜酶偶联物不具有靶向性。本发明的方法利用免疫层析技术对蛋白-蒜酶偶联物的靶向性进行检测，具有耗时短，成本低且操作简单等优点。

