



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109387499 A

(43)申请公布日 2019.02.26

(21)申请号 201710671215.X

(22)申请日 2017.08.08

(71)申请人 华东师范大学

地址 200062 上海市普陀区中山北路3663号

(72)发明人 冯恩铎 田阳 郑婷婷

(74)专利代理机构 上海麦其知识产权代理事务所(普通合伙) 31257

代理人 董红曼

(51)Int.Cl.

G01N 21/65(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

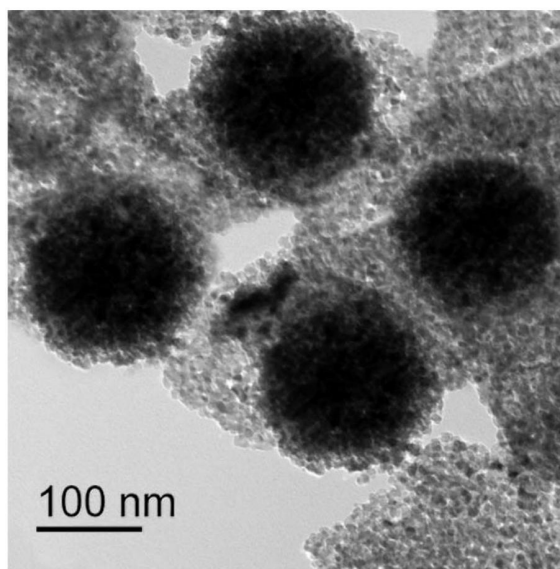
权利要求书3页 说明书10页
序列表1页 附图6页

(54)发明名称

一种PD-L1探针及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种将石墨烯-金属氧化物复合材料PD-L1探针及其制备方法,利用化学合成以及物理吸附等方法制备了该探针。本发明还公开了将所述PD-L1探针用于表面增强拉曼光谱灵敏检测细胞膜表面程序性死亡受体配体1(PD-L1)的应用。本发明PD-L1探针具有良好的SERS活性和灵敏度。本发明所述PD-L1探针不仅能够应用于PD-L1的检测,对于细胞内其他的一些生物标识物也同样适用。



1. 一种PD-L1探针的制备方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1) 四氧化三铁纳米粒子的制备

在有机溶剂中, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、还原剂、碱进行水热反应,得到所述四氧化三铁纳米粒子;

(2) 氧化石墨烯的制备

在浓硫酸与发烟硝酸中,石墨和氯酸钾进行氧化反应,得到所述氧化石墨烯;

(3) 四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料的制备

在溶液中,四氧化三铁纳米粒子、PDDA、氧化石墨烯进行超声,得到所述四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料;

(4) 四氧化三铁/石墨烯/二氧化钛复合材料的制备

将步骤(3)制备的四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料分散在有机溶剂中,并向其中加入氨水;将该混合物进行超声;将钛酸四丁酯(TBOT)加入体系中进行反应,搅拌,然后经烘干,煅烧得到所述四氧化三铁/石墨烯/二氧化钛复合材料;

(5) 四氧化三铁/石墨烯/二氧化钛复合材料SERS性能表征

将拉曼光谱信号分子溶液与二氧化钛包裹的四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料混合振荡;将得到的混合物离心分离,然后重新分散在超纯水中;将上述溶液滴加至硅片上干燥,在激光激发下,测试拉曼光谱信号;

(6) PD-L1探针的制备

(6-1) 向拉曼光谱信号分子溶液中加入四氧化三铁/石墨烯/二氧化钛复合材料,进行孵育,离心分离,将固体样品真空干燥,得到蓝色固体粉末;

(6-2) 然后将得到的蓝色固体粉末与PD-L1抗体进行恒温孵育,得到所述PD-L1探针。

2. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,所述有机溶剂选自乙二醇、丙三醇、水中的一种或多种;和/或,所述还原剂选自柠檬酸钠、硼氢化钠、抗坏血酸中的一种或多种;和/或,所述碱为弱碱,选自醋酸钠、氨水、碳酸氢钠中的一种或多种;和/或,所述水热反应的温度为150-250℃;和/或,所述 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、还原剂和碱的质量比为(2-4):(0.8-1.5):(4-8)。

3. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中,所述氧化反应的温度为0-30℃;和/或,所述氧化反应的时间为48h-120h;和/或,所述浓硫酸、发烟硝酸、石墨、氯酸钾的用量比为(50ml-100ml):(30ml-50ml):(3g-8g):(40g-60g)。

4. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(3)中,所述溶液选自水、乙醇、甲醇中的一种或多种;和/或,所述PDDA的浓度为1%;和/或,所述超声的条件为120kW;和/或,所述超声的温度为0℃-50℃;和/或,所述超声的时间为15min-60min;和/或,所述四氧化三铁纳米粒子、PDDA、氧化石墨烯的用量比为(5ml-20ml):(1ml-10ml):(3ml-10ml)。

5. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(4)中,所述有机溶剂选自无水乙醇、甲醇中的一种或多种;和/或,所述氨水的浓度为28%;和/或,加入钛酸四丁酯(TBOT)后,进行反应的温度为30℃-60℃;和/或,加入钛酸四丁酯(TBOT)后,进行反应的时间为12h-36h;和/或,所述超声的条件为120kW;和/或,所述超声的温度为15℃-30℃;和/或,所述超声的时间为5min-30min;和/或,所述反应的温度为30℃-60℃;和/或,所述烘干的条件为60℃-120℃;和/或,所述煅烧的温度为400℃-600℃;所述煅烧的时间为1h-3h;和/或,所述四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料、无水乙醇、氨水、钛酸四丁酯(TBOT)的用量比为(1ml-

3ml): (10ml-30ml): (40μL-80μL): (0.05ml-0.2ml)。

6. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(5)中,所述拉曼光谱信号分子选自酞菁铜、结晶紫、R6G;和/或,所述拉曼光谱信号分子溶液的浓度为5mM-20mM;和/或,所述拉曼光谱信号分子溶液与所述二氧化钛包裹的四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料、超纯水的体积比为0.5ml-2ml:2ml-8ml:1ml-3ml;和/或,混合物振摇时间为30min-90min;和/或,所述激光的波长为532nm、633nm、780nm。

7. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(6-1)中,所述拉曼光谱信号分子选自酞菁铜、结晶紫、R6G;和/或,所述拉曼光谱信号分子溶液的浓度为5mM-20mM;和/或,所述孵育的温度为25℃-45℃;和/或,所述孵育的时间为1h-5h;和/或,所述真空干燥的温度为40℃-80℃;和/或,所述真空干燥的时间为1h-5h。

8. 如权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(6-2)中,所述恒温孵育的温度为20℃-45℃;和/或,所述恒温孵育的时间为2h-5h;和/或,所述PD-L1抗体的浓度为20μM-200μM;和/或,所述蓝色固体粉末与PD-L1抗体的用量比为1ml-3ml:10μL-30μL;和/或,步骤(6)中,所述拉曼光谱信号分子、二氧化钛包裹的四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料、PD-L1的用量比为(100μL-300μL):(1ml-3ml):(10μL-30μL)。

9. 一种由权利要求1~8之任一项所述制备方法制备得到的PD-L1探针。

10. 一种SYL3C适配体修饰的硅片的制备方法,其特征在于,所述方法包括:

(i) 将APTES (3-氨丙基三乙氧基硅烷) 与溶剂混合后,将硅片浸入在上述溶液中,得到氨基修饰的硅片;

(ii) 将上述硅片重新浸入适配体溶液中,然后将SYL3C适配体滴加在上述硅片上,恒温孵育,在偶联剂的作用下,对硅基底进行修饰,以得到SYL3C适配体修饰的硅片。

11. 如权利要求10所述的制备方法,其特征在于,步骤(i)中,所述溶剂选自乙醇、甲醇、水中的一种或多种;和/或,所述APTES与溶剂的体积比为1-10:1-20;和/或,所述浸入的温度为25℃-45℃;和/或,所述浸入的时间为1h-6h。

12. 如权利要求10所述的制备方法,其特征在于,步骤(ii)中,所述偶联剂为与氨基反应偶联的相关偶联分子,选自戊二醛、丙二醛、丁二醛;和/或,所述SYL3C适配体的序列为5'-NH₂-CACTACAGAGGTTGCGTCTGTCCACGTTGTCATGGGGGTTGGCCTG-3';和/或,所述偶联剂的浓度1%-5%;和/或,所述SYL3C的浓度为10μM;和/或,当硅片为50mm*50mm大小时,所述SYL3C适配体的体积为5-20μL;和/或,所述浸入的温度为10℃-30℃;和/或,所述浸入的时间为1h-3h;和/或,所述恒温孵育的温度为25℃-45℃;和/或,所述恒温孵育的时间为1h-3h。

13. 一种由权利要求10~12之任一项所述制备方法制备得到的SYL3C适配体修饰的硅片。

14. 一种由权利要求9所述的PD-L1探针在表面增强拉曼光谱检测细胞膜表面程序性死亡受体配体1 (PD-L1) 中的应用。

15. 一种检测细胞中PD-L1含量的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(a) 细胞捕获

(a-1) 取对数生长期的细胞,离心,然后分散在偶联缓冲液中,得到细胞悬浮液;

(a-2) 将细胞悬浮液滴加到所述SYL3C适配体修饰的硅片上,共同孵育;

(b) PD-L1拉曼免疫检测

将步骤(a)中所述的含有细胞的硅片与PD-L1探针混合,孵育,然后进行拉曼检测。

16.如权利要求15所述的方法,其特征在于,步骤(a-1)中,所述细胞选自MB-MDA-231、MCF-7,所述细胞离心分离的转速可以但不限于是800rpm,时间为3分钟;步骤(a-2)中,当硅片为50mm*50mm大小时,滴加于硅片上的细胞悬浮液的用量为50-200 μ L,所述共同孵育的温度为25 $^{\circ}$ C-45 $^{\circ}$ C,所述共同孵育的时间为30min-90min;步骤(b)中,当硅片为50mm*50mm大小时,所述PD-L1探针的体积为5-20 μ L。

一种PD-L1探针及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种PD-L1探针及其制备方法和应用,具体涉及一种基于化学增强机理的表面增强拉曼技术检测细胞膜表面程序性死亡受体配体1 (PD-L1) 的新方法,属于材料制备及生物传感技术领域。

背景技术

[0002] 程序性死亡受体配体-1(programmed death ligand 1,PD-L1)是一种重要的免疫抑制分子。程序性死亡受体-1 (PD-1) 分别高表达于淋巴细胞和一些体细胞中,是一种与自身免疫反应息息相关的跨膜蛋白。正常情况下,免疫系统会对聚集在淋巴结或者脾脏的外来抗原产生反应,促发具有抗原特异性的细胞毒杀性T细胞(CD^{8+}) 增生。而程序性死亡受体-1 (PD-1) 与其配体结合,可以传导响应的抑制信号,减低淋巴结 CD^{8+} T细胞的增生,进而避免一些不必要的自身免疫反应,控制自体免疫疾病。

[0003] 在癌症治疗领域,近些年来,以PD-L1与PD-1为靶点的单克隆抗体,多克隆抗体药物成为了研究的热门领域。有研究表明,许多癌细胞膜表面(如乳腺癌,非小细胞肺癌,前列腺癌等)都出现PD-L1的高表达活性,通过抑制PD-1的信号通路来增强 CD^{8+} T细胞的活性,达到对于癌细胞的免疫清除效果从而治疗癌症。

[0004] 表面增强拉曼光谱技术是一种利用特定的分子在特定的基底材料表面产生拉曼信号增强的技术。该技术能够非常有效的提供高灵敏度,甚至可以达到痕量检测的水平。同时由于其半峰宽较窄,能够在一定程度上实现多元检测的目的。表面增强拉曼光谱技术(SERS)自从被发现以来得到了迅速的发展,大批量基于金、银、铜等贵金属材料制备的SERS基底材料被广泛的应用于生物复杂样品的分析检测领域,SERS以其独有的多元检测能力以及超高的灵敏度正在逐渐的被应用于生产、生活、科研等各个领域。而对于以石墨烯为代表的二维材料以及四氧化三铁、二氧化钛为代表的金属氧化物近年来被不断地报道应用于SERS领域并且获得了良好的活性。其在分子选择性方面,相较于传统的贵金属材料有着明显的优势。

[0005] 现如今常用的增强拉曼光谱的基底主要为Au,Ag,Cu等贵金属材料,然而,这些金属基底通常情况下在生物相容性,分子选择性等方面具有非常大的弊端。

[0006] 石墨烯作为二维材料的代表,具有非常好的SERS活性,并且在分子选择性方面有着非常突出的表现。同时,二氧化钛,四氧化三铁这一类的金属氧化物近年来也常被用做SERS基底材料。本发明创新性想石墨烯与金属氧化物这两种基于化学增强机理而产生SERS效果的基底材料相结合,获得了更好的SERS增强效果。而能够用于检测细胞膜表面的PD-L1的表达量。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种石墨烯-金属氧化物复合材料,将其应用于表面增强拉曼光谱检测细胞膜表面程序性死亡受体配体1 (PD-L1),具有生物相容好,分子选择性高

和检测灵敏度高的优点。

[0008] 本发明PD-L1探针的制备方法,利用化学合成以及物理吸附等方法制备所述PD-L1探针,包括以下步骤:

[0009] (1) 四氧化三铁纳米粒子的制备

[0010] 在有机溶剂中, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、还原剂、碱进行水热反应,得到所述四氧化三铁纳米粒子。

[0011] 步骤(1)中,所述有机溶剂选自乙二醇、丙三醇、水等中的一种或多种;优选地,为乙二醇。

[0012] 步骤(1)中,所述还原剂选自柠檬酸钠、硼氢化钠、抗坏血酸等中的一种或多种;优选地,为柠檬酸钠。

[0013] 步骤(1)中,所述碱为弱碱,所述碱的作用为调节pH,选自醋酸钠、氨水、碳酸氢钠等中的一种或多种;优选地,为醋酸钠。

[0014] 步骤(1)中,所述水热反应的温度为150–250℃;优选地,为200℃。

[0015] 步骤(1)中,所述水热反应的时间为6–12h;优选地,为10h。

[0016] 步骤(1)中,所述 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、还原剂和碱的质量比为(2–4):(0.8–1.5):(4–8);优选地,为3.25:1.3:6。当 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 用量为2–4g时,所述有机溶剂的用量为50–100ml;优选地,为100ml;如 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 用量为3.25g时,乙二醇体积为100ml。

[0017] 在一具体的实施方式中,所述四氧化三铁纳米粒子的制备包括:将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于乙二醇中,随后在磁力搅拌条件下加入柠檬酸钠以及醋酸钠,继续搅拌30分钟。将得到的黄色溶液转移到100毫升的特氟龙反应釜中反应10小时。最后缓慢降至室温。得到的黑色固体用超纯水洗涤三次得到产品。

[0018] 其中, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 用量为3.25g,柠檬酸钠用量为1.3g,醋酸钠用量为6g,反应釜温度为200℃。

[0019] (2) 氧化石墨烯的制备

[0020] 在浓硫酸与发烟硝酸中,石墨和氯酸钾进行氧化反应,得到所述氧化石墨烯。

[0021] 步骤(2)中,所述浓硫酸的作用为氧化剂;所述发烟硝酸的作用为氧化剂;所述氯酸钾的作用为氧化剂。

[0022] 步骤(2)中,所述氧化反应的温度为0–30℃;优选地,为室温25℃。

[0023] 步骤(2)中,所述氧化反应的时间为48h–120h;优选地,为96h。

[0024] 步骤(2)中,所述浓硫酸、发烟硝酸、石墨、氯酸钾的用量比为(50ml–100ml):(30ml–50ml):(3g–8g):(40g–60g);优选地,为87.5ml:45ml:5g:55g。

[0025] 步骤(2)中,所述反应完全后,还包括加入冷水中的步骤,其目的是猝灭反应,稀释反应体系。

[0026] 在一具体的实施方式中,所述氧化石墨烯的制备包括:将浓硫酸与发烟硝酸置于冰浴中混合均匀,随后向其中加入石墨,不断搅拌混合均匀。在通风橱中,向上述体系非常缓慢加入氯酸钾。在室温下不断搅拌96小时。最后将混合物倒入到4L冷水中,过滤得到氧化石墨烯。

[0027] 其中,浓硫酸的体积为87.5ml,发烟硝酸的体积为45ml,石墨用量为5g,氯酸钾用量为55g。

[0028] (3) 四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料的制备

[0029] 在溶液中,四氧化三铁纳米粒子、PDDA、氧化石墨烯进行超声,得到所述四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料。

[0030] 步骤(3)中,所述溶液选自水、乙醇、甲醇等中的一种或多种;优选地,为水。

[0031] 步骤(3)中,所述PDDA的作用为调节四氧化三铁表面电荷,浓度为1%。

[0032] 步骤(3)中,所述超声的条件为120kW。

[0033] 步骤(3)中,所述超声的温度为0℃-50℃;优选地,为室温25℃。

[0034] 步骤(3)中,所述超声的时间为15min-60min;优选地,为60min。步骤(3)中,优选地,先将四氧化三铁纳米粒子和PDDA混合超声30分钟,然后加入氧化石墨烯,继续超声30分钟。采用层层自组装的方法通过静电吸附将纳米粒子与石墨烯均匀复合。

[0035] 步骤(3)中,所述四氧化三铁纳米粒子、PDDA、氧化石墨烯的用量比为(5ml-20ml):(1ml-10ml):(3ml-10ml);优选地,为15ml:5ml:5ml。

[0036] 步骤(3)中,所述反应完全后,还包括将混合物离心分离,用乙醇与超纯水分别洗涤提纯样品的步骤;其中,洗涤次数优选为3次。

[0037] 在一具体的实施方式中,四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料的制备包括:向15ml含有四氧化三铁的纳米粒子溶液样品中加入PDDA溶液,将混合液超声30分钟。另向其中加入步骤(2)制备的所述氧化石墨烯溶液,继续超声30min分钟。最后将混合物离心分离,用乙醇与超纯水分别洗涤三次得到产物。其中,PDDA的浓度为1%(质量百分比),体积为5ml,氧化石墨烯用量为5ml。

[0038] 其中,PDDA用量为1%,体积为5ml,氧化石墨烯用量为5ml。

[0039] (4) 四氧化三铁/石墨烯/二氧化钛复合材料的制备

[0040] 将步骤(3)制备的四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料分散在有机溶剂中,并向其中加入氨水。将该混合物进行超声。将钛酸四丁酯(TBOT)加入体系中进行反应,搅拌,然后经烘干,煅烧得到二氧化钛包裹的四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料,即四氧化三铁/石墨烯/二氧化钛复合材料。

[0041] 步骤(4)中,所述有机溶剂选自无水乙醇、甲醇等中的一种或多种;优选地,为无水乙醇。

[0042] 步骤(4)中,所述氨水的作用为调节pH,提供氨基的环境;氨水的浓度为28%。

[0043] 步骤(4)中,加入钛酸四丁酯(TBOT)后,进行反应的温度为30℃-60℃;优选地,为45℃。

[0044] 步骤(4)中,加入钛酸四丁酯(TBOT)后,进行反应的时间为12h-36h;优选地,为24h。

[0045] 步骤(4)中,所述超声的条件为120kW。

[0046] 步骤(4)中,所述超声的温度为15℃-30℃;优选地,为25℃。

[0047] 步骤(4)中,所述超声的时间为5min-30min;优选地,为15min。

[0048] 步骤(4)中,所述反应的温度为30℃-60℃;优选地,为45℃。

[0049] 步骤(4)中,所述反应的时间为12h-36h;优选地,为24h。

[0050] 步骤(4)中,所述烘干的条件为60℃-120℃;优选地,为100℃下烘干过夜。

[0051] 步骤(4)中,所述煅烧的温度为400℃-600℃;优选地,为500℃。所述煅烧的时间为

1h-3h;优选地,为2小时。

[0052] 步骤(4)中,所述四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料、无水乙醇、氨水、钛酸四丁酯(TBOT)的用量比为(1ml-3ml):(10ml-30ml):(40 μ L-80 μ L):(0.05ml-0.2ml);优选地,为2ml:20ml:60 μ L:0.15ml。

[0053] 步骤(4)中,优选采用滴加的方式加入所述钛酸四丁酯。

[0054] 步骤(4)中,所述产物的提纯方式可选自离心分离。

[0055] 在一具体的实施方式中,二氧化钛的制备包括:将步骤(3)制备的四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料约2ml重新分散在无水乙醇中,并向其中加入氨水。将该混合物置于超声条件下作用15分钟。得到的溶液置于水浴中恒温,并将TBOT(钛酸四丁酯)在5分钟内逐滴加入到反应体系中。随后,将反应体系搅拌。通过离心分离得到产物并分别用乙醇和水重复洗涤3次。将产物置于100 $^{\circ}$ C下烘干过夜。再转移至马弗炉中煅烧得到产物。

[0056] 其中,无水乙醇的体积为20ml,氨水浓度为28%,体积为60 μ L。反应温度为45 $^{\circ}$ C,TBOT用量为0.15ml。反应时间为24小时。煅烧温度为500 $^{\circ}$ C,时间2小时。

[0057] (5)四氧化三铁/石墨烯/二氧化钛复合材料SERS性能表征

[0058] 将拉曼光谱信号分子溶液与二氧化钛包裹的四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料混合振摇。将得到的混合物离心分离,然后重新分散在超纯水中。将上述溶液滴加至硅片上干燥,在激光激发下,测试拉曼光谱信号。

[0059] 步骤(5)中,所述拉曼光谱信号分子选自酞菁铜、结晶紫、R6G等;优选地,为酞菁铜。

[0060] 步骤(5)中,所述拉曼光谱信号分子溶液的浓度为5mM-20mM;优选地,为10mM。

[0061] 步骤(5)中,所述拉曼光谱信号分子溶液与所述二氧化钛包裹的四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料、超纯水的体积比为0.5ml-2ml:2ml-8ml:1ml-3ml;优选地,为1ml:5ml:2ml。

[0062] 步骤(5)中,混合物振摇时间为30min-90min;优选地,为1小时。

[0063] 步骤(5)中,所述激光的波长为532nm、633nm、780nm;优选地,为633nm。

[0064] 在一具体的实施方式中,所述二氧化钛包裹的四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料SERS性能表征的步骤包括:将酞菁铜溶液与二氧化钛包裹的四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料混合振摇1小时。将得到的混合物离心分离重新分散在2ml超纯水中。将上述溶液滴加至硅片上室温下干燥,在激光激发下,测试拉曼光谱信号。

[0065] 其中,酞菁铜溶液的浓度为10mM,体积为1ml。纳米材料的体积为5ml。激光波长为633nm。

[0066] (6)PD-L1探针的制备

[0067] (6-1)向拉曼光谱信号分子溶液中加入四氧化三铁/石墨烯/二氧化钛复合材料,进行孵育,离心分离,将固体样品真空干燥,得到蓝色固体粉末。

[0068] (6-2)然后将得到的蓝色固体粉末与PD-L1抗体进行恒温孵育,得到所述PD-L1探针。

[0069] 步骤(6-1)中,所述拉曼光谱信号分子选自酞菁铜、结晶紫、R6G等;优选地,为酞菁铜。

[0070] 步骤(6-1)中,所述拉曼光谱信号分子溶液的浓度为5mM-20mM;优选地,为10mM。

- [0071] 步骤(6-1)中,所述孵育的温度为25℃-45℃;优选地,为37℃。
- [0072] 步骤(6-1)中,所述孵育的时间为1h-5h;优选地,为3h。
- [0073] 步骤(6-1)中,所述真空干燥的温度为40℃-80℃;优选地,为60℃。
- [0074] 步骤(6-1)中,所述真空干燥的时间为1h-5h;优选地,为2h。
- [0075] 步骤(6-2)中,所述恒温孵育的温度为20℃-45℃;优选地,为37℃。
- [0076] 步骤(6-2)中,所述恒温孵育的时间为2h-5h;优选地,为3h。
- [0077] 步骤(6-2)中,所述PD-L1抗体的浓度为20μM-200μM;优选地,为100μM。
- [0078] 步骤(6-2)中,所述蓝色固体粉末与PD-L1抗体的用量比为1ml-3ml:10μL-30μL;优选地,为1.5ml:20μL。
- [0079] 步骤(6)中,所述拉曼光谱信号分子、二氧化钛包裹的四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料、PD-L1的用量比为(100μL-300μL):(1ml-3ml):(10μL-30μL);优选地,为200μL:2ml:20μL。
- [0080] 在一具体的实施方式中,PD-L1探针的制备步骤包括:向酞菁铜溶液中加入5ml纳米粒子孵育。将产物离心分离,得到的固体样品真空干燥。再将得到的蓝色固体粉末与1ml的PD-L1抗体进行恒温孵育。
- [0081] 其中,酞菁铜的浓度为10mM,体积为1ml,孵育温度为37℃,时间为1小时。真空干燥温度为60℃。抗体浓度为100μM,孵育温度为37摄氏度,时间为3小时。
- [0082] 本发明还提出了一种由上述制备方法制备得到的PD-L1探针。
- [0083] 本发明还提出了一种SYL3C适配体修饰的硅片的制备方法,所述方法包括:
- [0084] (i) 将APTES (3-氨丙基三乙氧基硅烷) 与溶剂混合后,将硅片浸入在上述溶液中,得到氨基修饰的硅片;
- [0085] (ii) 将上述硅片重新浸入适配体溶液中,然后将SYL3C适配体滴加在上述硅片上,恒温孵育,在偶联剂的作用下,对硅基底进行修饰,以得到SYL3C适配体修饰的硅片。
- [0086] 步骤(i)中,所述APTES (3-氨丙基三乙氧基硅烷) 的作用为硅基底片修饰NH₂。
- [0087] 步骤(i)中,所述溶剂选自乙醇、甲醇、水等中的一种或多种;优选地,为乙醇。
- [0088] 步骤(i)中,所述APTES与溶剂的体积比为1-10:1-20;优选地,为1:15。
- [0089] 步骤(i)中,所述浸入的温度为25℃-45℃;优选地,为37℃。
- [0090] 步骤(i)中,所述浸入的时间为1h-6h;优选地,为4h。
- [0091] 步骤(ii)中,所述偶联剂为与氨基反应偶联分子,选自戊二醛、丙二醛、丁二醛;优选地,为戊二醛。
- [0092] 步骤(ii)中,所述SYL3C的序列为
- [0093] 5'-NH₂-CACTACAGAGGTTGCGTCTGTCCACGTTGTCATGGGGGTTGGCCTG-3'。
- [0094] 步骤(ii)中,所述SYL3C适配体的作用为特异性捕获细胞。
- [0095] 步骤(ii)中,所述偶联剂的浓度1%-5%;优选地,为2.5%。
- [0096] 步骤(ii)中,所述SYL3C的浓度为10μM。
- [0097] 步骤(ii)中,当硅片为50mm*50mm大小时,所述SYL3C适配体的体积为5-20μL。
- [0098] 步骤(ii)中,所述浸入的温度为10℃-30℃;优选地,为25℃。
- [0099] 步骤(ii)中,所述浸入的时间为1h-3h;优选地,为2h。
- [0100] 步骤(ii)中,所述恒温孵育的温度为25℃-45℃;优选地,为37℃。

[0101] 步骤(ii)中,所述恒温孵育的时间为1h-3h;优选地,为2h。

[0102] 在一具体的实施方式中,所述SYL3C适配体修饰的硅片的制备步骤包括:将APTES(3-氨丙基三乙氧基硅烷)与15ml乙醇混合后,将硅片浸入在上述溶液中恒温振摇,随后将硅片用超纯水、乙醇洗涤两次除去残留溶液,得到氨基修饰的硅片,将上述硅片重新浸没在戊二醛溶液中。通过超纯水洗涤除去残留戊二醛溶液。最终取含有的SYL3C适配体的溶液滴加在上述硅片上,恒温孵育,得到SYL3C适配体修饰的硅片。

[0103] 其中,APTES的体积为1ml,与硅片孵育恒温时间为4小时,温度为37℃。戊二醛浓度为2.5%,孵育时间为2小时。SYL3C的序列为5'-NH₂-CACTACAGAGGTTGCGTCTGTCCACGTTGTCATGGGGGGTTGGCCTG-3'浓度为10μM,体积为10μL,与硅片的孵育时间为2小时温度为37℃。

[0104] 本发明还提出了一种由上述制备方法制备得到的SYL3C适配体修饰的硅片。

[0105] 本发明还提出了一种由所述PD-L1探针在表面增强拉曼光谱检测细胞膜表面程序性死亡受体配体1(PD-L1)中的应用。

[0106] 本发明还提供了一种检测细胞中PD-L1含量的方法,所述方法包括以下步骤

[0107] (a) 细胞捕获

[0108] (a-1) 取对数生长期的细胞,离心,然后分散在偶联缓冲液中,得到细胞悬浮液;

[0109] (a-2) 将细胞悬浮液滴加到所述SYL3C适配体修饰的硅片上,共同孵育。

[0110] (b) PD-L1拉曼免疫检测

[0111] 将步骤(a)中所述的含有细胞的硅片与PD-L1探针混合,孵育,然后进行拉曼检测。

[0112] 步骤(a-1)中,所述细胞选自MB-MDA-231、MCF-7;优选地,为MB-MDA-231。

[0113] 步骤(a-1)中,所述细胞离心分离的转速可以但不限于是800rpm,时间为3分钟。

[0114] 步骤(a-1)中,所述偶联缓冲液的组成包括4.5g L⁻¹glucose,5mM MgCl₂,0.1mg mL⁻¹tRNA,1mg mL⁻¹BSA,氯化钙,氯化镁,PBS,其余为水。

[0115] 步骤(a-2)中,当硅片为50mm*50mm大小时,滴加于硅片上的细胞悬浮液的用量为50-200μL。

[0116] 步骤(a-2)中,所述共同孵育的温度为25℃-45℃;优选地,为37℃。

[0117] 步骤(a-2)中,所述共同孵育的时间为30min-90min;优选地,为1h。

[0118] 步骤(b)中,当硅片为50mm*50mm大小时,所述PD-L1探针的体积为5-20μL。

[0119] 在一具体的实施方式中,所述检测细胞中PD-L1含量的方法包括以下步骤:

[0120] (a) 细胞捕获:取对数生长期的细胞离心,离心的转速为800rpm,时间为3分钟;将细胞分散在偶联缓冲液中,得到细胞悬浮液;将细胞悬浮液滴加到SYL3C适配体修饰的硅片上,共同孵育。

[0121] 其中,所述偶联缓冲液的配方为4.5g L⁻¹glucose,5mM MgCl₂,0.1mg mL⁻¹tRNA,and 1mg mL⁻¹BSA溶解在含有氯化钙与氯化镁的PBS缓冲液。

[0122] 细胞悬浮液的用量为100μL,共同孵育时间为1小时,温度为37℃。

[0123] (b) PD-L1拉曼免疫检测

[0124] 将(a)中制备的含有细胞的硅片与上文制备的PD-L1探针混合,孵育。随后用PBS清洗硅片表面除去未特异性结合的探针。最后进行拉曼检测。

[0125] PD-L1探针的体积为10μL。孵育的温度为37℃,时间为1小时。

[0126] 本发明中,对不同浓度的细胞进行捕获,并进行拉曼线性检测,可以得到细胞检测线性关系。

[0127] 本发明中,分别取同种,同批次,同浓度的细胞,分别将不同量的 γ IFN加入培养基中,孵育24小时,按上述方法进行拉曼检测,可进行细胞刺激响应实验。

[0128] 在本发明的一个具体实施方式中,所述利用基于化学增强机理的表面增强拉曼光谱基底材料进行干细胞内端粒酶活性检测的方法,包括以下步骤:

[0129] (1) 四氧化三铁纳米粒子的制备:将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于100ml的乙二醇中,随后在磁力搅拌条件下加入柠檬酸钠以及的醋酸钠,继续搅拌30分钟。将得到的黄色溶液转移到100毫升的特氟龙反应釜中反应10小时。最后缓慢降至室温。得到的黑色固体用超纯水洗涤三次得到产品。

[0130] 其中, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 用量为3.25g,柠檬酸钠用量为1.3g,醋酸钠用量为6g,反应釜温度为200℃。

[0131] (2) 氧化石墨烯的制备:将浓硫酸与发烟硝酸置于冰浴中混合均匀,随后向其中加入石墨,不断搅拌混合均匀。在通风橱中,向上述体系非常缓慢加入氯酸钾。在室温下不断搅拌96小时。最后将混合物倒入到4L冷水中,过滤得到氧化石墨烯。

[0132] 其中,浓硫酸的体积为87.5ml,发烟硝酸的体积为45ml,石墨用量为5g,氯酸钾用量为55g。

[0133] (3) 四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料的制备:向15ml含有四氧化三铁的纳米粒子溶液样品中加入PDDA溶液,将混合液超声30分钟。另向其中加入(2)所述的氧化石墨烯溶液,继续超声30min分钟。最后将混合物离心分离,用乙醇与超纯水分别洗涤三次得到产物。

[0134] 其中,PDDA用量为1%,体积为5ml,氧化石墨烯用量为5ml。

[0135] (4) 二氧化钛包裹:将(3)中得到产物约2ml重新分散在无水乙醇中。并向其中加入氨水。将该混合物置于超声条件下作用15分钟。得到的溶液置于水浴中恒温,并将TBOT(钛酸四丁酯)5分钟内逐滴加入到反应体系中。随后,将反应体系搅拌。通过离心分离得到产物并分别用乙醇和水重复洗涤3次。将产物置于100℃下烘干过夜。再转移至马弗炉中煅烧得到产物。

[0136] 其中,无水乙醇的体积为20ml,氨水浓度为28%,体积为60 μL 。反应温度为45℃,TBOT用量为0.15ml。反应时间为24小时。煅烧温度为500℃,时间2小时。

[0137] (5) 材料SERS性能表征:将酞菁铜溶液与纳米材料混合振摇1小时。将得到的混合物离心分离重新分散在2ml超纯水中。将上述溶液滴加至硅片上室温下干燥,在激光激发下,测试拉曼光谱信号。

[0138] 其中,酞菁铜溶液的浓度为10mM,体积为1ml。纳米材料的体积为5ml。激光波长为633nm。

[0139] (6) PD-L1探针的制备:向酞菁铜溶液中加入5ml纳米粒子孵育。将产物离心分离,得到的固体样品真空干燥。再将得到的蓝色固体粉末与1ml的PD-L1抗体进行恒温孵育。

[0140] 其中,酞菁铜的浓度为10mM,体积为1ml,孵育温度为37℃,时间为一小时。真空干燥温度为60℃。抗体浓度为100 μM ,孵育温度为37摄氏度,时间为3小时。

[0141] (7) 硅基底修饰

[0142] 将APTES(3-氨丙基三乙氧基硅烷)与15ml乙醇混合后,将硅片浸入在上述溶液中

恒温振摇,随后将硅片用超纯水、乙醇洗涤两次除去残留溶液,得到氨基修饰的硅片,将上述硅片重新浸没在戊二醛溶液中。通过超纯水洗涤除去残留戊二醛溶液。最终取含有的SYL3C适配体的溶液滴加在上述硅片上,恒温孵育,得到SYL3C适配体修饰的硅片。

[0143] 其中APTES的体积为1ml,与硅片孵育恒温时间为4小时,温度为37℃。戊二醛浓度为2.5%,孵育时间为2小时。SYL3C的序列为5'-NH₂-CACTACAGAGGTTGCGTCTGTCCACGTTGTCATGGGGGTTGGCCTG-3'浓度为10μM,体积为10μL,与硅片的孵育时间为2小时温度为37℃。

[0144] (8) 细胞捕获

[0145] 取对数生长期的细胞,离心,重新分散在偶联缓冲液中,将上述细胞悬浮液滴加到(7)中所述的硅片上,共同孵育后,用PBS洗去未被捕获的细胞。

[0146] 其中,细胞离心的转速为800rpm,时间为3分钟。偶联缓冲液的配方为4.5g L⁻¹glucose,5mM MgCl₂,0.1mg mL⁻¹tRNA,and 1mg mL⁻¹BSA溶解在含有氯化钙与氯化镁的PBS缓冲液。细胞悬浮液的用量为100μL,共同孵育时间为1小时,温度为37℃。

[0147] (9) PD-L1拉曼免疫检测

[0148] 将(8)中所述的含有细胞的硅片与(6)所述的PD-L1探针混合,孵育。随后用PBS清洗硅片表面除去未特异性结合的探针。最后进行拉曼检测。

[0149] 其中,PD-L1探针的体积为10μL。孵育的温度为37℃,时间为1小时。

[0150] (10) 细胞检测线性测试

[0151] 利用(8)中提到的方法对不同浓度的细胞进行捕获,根据(9)所述,对不同浓度细胞进行拉曼线性检测。

[0152] (11) 细胞刺激响应实验

[0153] 分别取同种,同批次,同浓度的细胞,分别将不同量的γ IFN加入培养基中,孵育24小时。将所得细胞按步骤(9)方法进行拉曼检测。

[0154] 本发明的有益效果在于,本发明制备了一种基于化学增强机理的石墨烯-金属氧化物基底材料。相较于单纯石墨烯而言,该复合材料维持了石墨烯与金属氧化物各自对于分子结构的选择性的同时,表现出更好的SERS活性,大大提高了PD-L1探针的灵敏度。通过与拉曼报告分子的结合以及对于PD-L1抗体的应用,成功将该PD-L1探针应用到了检测细胞表面PD-L1受体表达量的应用中。此外,本发明所述PD-L1探针不仅能够应用于PD-L1的检测中,对于细胞内其他的一些生物标识物(HER2,IFN等)的检测也同样适用。

附图说明

[0155] 图1是实施例1中制备的四氧化三铁纳米粒子TEM图。

[0156] 图2是实施例1中制备的四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料TEM图。

[0157] 图3是实施例1中制备的四氧化三铁/石墨烯/二氧化钛复合材料TEM图。

[0158] 图4是实施例1中制备的四氧化三铁/石墨烯/二氧化钛复合材料XRD图。

[0159] 图5是实施例1中提到的酞菁铜,以及将酞菁铜负载至四氧化三铁/石墨烯/二氧化钛复合材料表面所得到的拉曼光谱图对比。

[0160] 图6是实施例2中利用该生物传感器检测不同浓度细胞表面PD-L1表达数量,细胞个数与拉曼峰强度的叠加图与线性关系图。

[0161] 图7是实施例2利用生物传感器检测 γ IFN刺激下,细胞表面PD-L1的表达数量拉曼线性图。

[0162] 图8是实施例2利用生物传感器检测 γ IFN刺激下,细胞表面PD-L1的表达数量拉曼成像图。

具体实施方式

[0163] 结合以下具体实施例和附图,对本发明作进一步的详细说明。实施本发明的过程、条件、实验方法等,除以下专门提及的内容之外,均为本领域的普遍知识和公知常识,本发明没有特别限制。

[0164] 实施例1纳米探针的制备及性能表征

[0165] (1) 四氧化三铁纳米粒子的制备:将3.25g的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于100ml乙二醇中,随后在磁力搅拌条件下加入1.3g柠檬酸钠以及6.0g醋酸钠,继续搅拌30分钟。将得到的黄色溶液转移到100毫升特氟龙反应釜中,维持200℃,10小时。最后缓慢降至室温。得到的黑色固体用超纯水洗涤三次得到所述四氧化三铁纳米粒子。

[0166] 由图1可以看出,所述四氧化三铁纳米粒子粒径大约在100nm左右,粒子之间分散,粒度均一,具有良好的尺寸均一性和分散性。

[0167] (2) 氧化石墨烯的制备:将87.5ml的浓硫酸与45ml的发烟硝酸置于冰浴中混合均匀,随后向其中加入5g石墨,不断搅拌混合均匀。在通风橱中,向上述体系缓慢加入55g氯酸钾。在室温下不断搅拌96小时。最后将混合物倒入到4L冷水中,过滤得到氧化石墨烯。

[0168] (3) 四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料的制备:向15ml含有四氧化三铁的纳米粒子溶液中加入5ml,1%PDDA溶液,将混合液超声30分钟。然后向其中加入5ml步骤(2)制备的氧化石墨烯溶液,继续超声30min。最后将混合物离心分离,用乙醇与超纯水分别洗涤三次得到四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料。

[0169] 由图2可以看到石墨烯的褶皱,证明石墨烯的成功制备,在石墨烯中间,均匀分散着四氧化三铁纳米粒子,证明四氧化三铁/石墨烯的成功制备。石墨烯成功包裹在四氧化三铁的外表面。

[0170] (4) 四氧化三铁/氧化石墨烯/二氧化钛复合材料的制备

[0171] 二氧化钛包裹:将约2ml步骤(3)得到的四氧化三铁/氧化石墨烯复合材料分散在20ml无水乙醇中,并向其中加入60 μL 氨水(28%)。将该混合物置于超声条件下15分钟,得到的溶液置于45℃水浴中恒温,并将0.15mlTBOT(钛酸四丁酯)在5分钟内逐滴加入到反应体系中;随后,将反应体系置于45℃搅拌24小时。离心分离;并分别用乙醇和水重复洗涤3次;将产物置于100℃下烘干过夜,最后转移至马弗炉中,500℃煅烧2小时得到产物。

[0172] 图3可以看出物质表面所包裹的二氧化钛纳米粒子,其均匀地包裹在石墨烯的外表面,证明四氧化三铁/氧化石墨烯/二氧化钛纳米结构的成功制备。

[0173] 图4为制备过程中,四氧化三铁、二氧化钛以及石墨烯三种纳米材料的特征XRD谱峰与标准图谱的XRD对比图。由图可知,四氧化三铁、二氧化钛以及石墨烯三者的特征XRD谱峰,从而进一步证明四氧化三铁/氧化石墨烯/二氧化钛纳米结构的成功制备。

[0174] (5) 四氧化三铁/氧化石墨烯/二氧化钛纳米材料的SERS性能表征

[0175] 将1ml酞菁铜溶液(10mM)与5ml四氧化三铁/氧化石墨烯/二氧化钛纳米材料混合

振摇1小时。将得到的混合物离心分离,然后重新分散在2ml超纯水中。将上述溶液滴加至硅片上室温下干燥,在633nm激光激发下,测试拉曼光谱信号。

[0176] 由图5发现,该四氧化三铁/氧化石墨烯/二氧化钛复合材料作为SERS基底材料,酞菁铜的标准拉曼峰型具有非常明显的提高,说明对于酞菁铜分子具有良好的SERS活性,与其他单独的材料相比,四氧化三铁/氧化石墨烯/二氧化钛复合材料的SERS信号更强,谱峰更加完整。

[0177] (6) PD-L1探针的制备:向1ml酞菁铜溶液(10mM)中加入5ml纳米粒子,在37℃条件下孵育1小时。将混合物离心分离,得到的固体在60℃条件下真空干燥。然后将得到的蓝色固体粉末与1ml约100μM的PD-L1抗体在37℃恒温孵育3小时,得到所述PD-L1探针。

[0178] 实施例2 PD-L1探针用于细胞表面PD-L1表达量的检测

[0179] (1) 硅基底修饰

[0180] 将1mlAPTES(3-氨丙基三乙氧基硅烷)与15ml乙醇混合后,将硅片浸入上述溶液中,37℃恒温振摇4小时;随后将硅片用超纯水、乙醇洗涤两次除去残留溶液,得到氨基修饰的硅片,将上述硅片重新浸入2.5%戊二醛溶液中2h。通过超纯水洗涤除去残留戊二醛溶液。最后,取10μL SYL3C适配体(10μM)滴加在上述硅片上,重新在37℃恒温孵育2小时,得到SYL3C适配体修饰的硅片。

[0181] (2) 细胞捕获

[0182] 取对数生长期的MCF-7细胞,800rpm离心3分钟,然后重新分散在偶联缓冲液中;将上述细胞悬浮液100μL滴加到步骤(1)中所述的SYL3C适配体修饰的硅片上,37℃下共同孵育1小时,用PBS洗去未被捕获的细胞。

[0183] 其中,所述偶联缓冲液的组成为4.5g L⁻¹葡萄糖,5mM MgCl₂,0.1mg mL⁻¹tRNA以及1mg mL⁻¹BSA,氯化钙,氯化镁,PBS。由葡萄糖,MgCl₂,tRNA以及BSA溶解在含有氯化钙与氯化镁的PBS缓冲液中制备而成。

[0184] (3) PD-L1拉曼免疫检测

[0185] 将步骤(2)中所述的含有细胞的硅片与10μL实施例1制备的PD-L1探针混合,37℃孵育1h。随后用PBS清洗硅片表面,除去未特异性结合的探针;最后进行拉曼检测。

[0186] (4) 细胞检测线性测试

[0187] 重复步骤(2)和(3),以对不同浓度的细胞进行捕获,并进行拉曼线性检测。

[0188] 由图6可以看出,在100~10⁶个细胞/ml的范围内,所述PD-L1探针具有良好的线性响应关系。证明该探针可用于细胞表面的PD-L1表达量的检测。

[0189] (5) 细胞刺激响应实验

[0190] 分别取同种,同批次,同浓度的细胞,分别将不同量的20ng/ml γ IFN加入培养基中,孵育24小时。将所得细胞按步骤(3)方法进行拉曼检测。

[0191] 由图7,图8可以看出,细胞在γ IFN的刺激下,PD-L1的表达量逐渐升高。且随着加入γ IFN量的变化,细胞PD-L1的表达量与刺激物γ IFN的浓度成线性关系。

[0192] 本发明的保护内容不局限于以上实施例。在不背离发明构思的精神和范围下,本领域技术人员能够想到的变化和优点都被包括在本发明中,并且以所附的权利要求书为保护范围。

<110> 华东师范大学

<120> 一种PD-L1探针及其制备方法和应用

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

CACTACAGAG GTTGCCTCTG TCCCACGTTG TCATGGGGGG TTGGCCTG 48

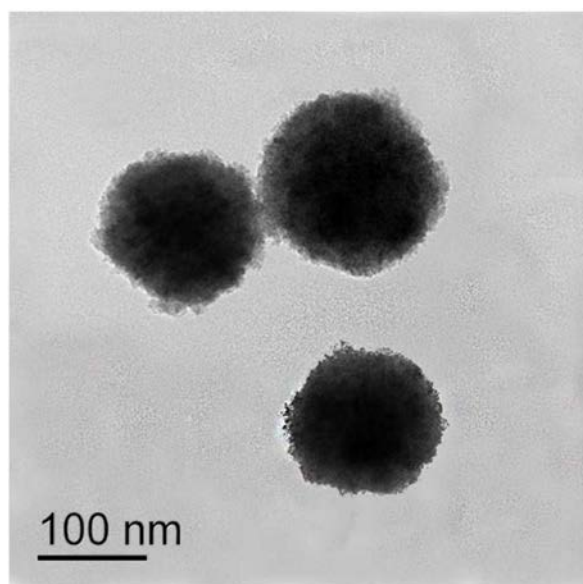


图1

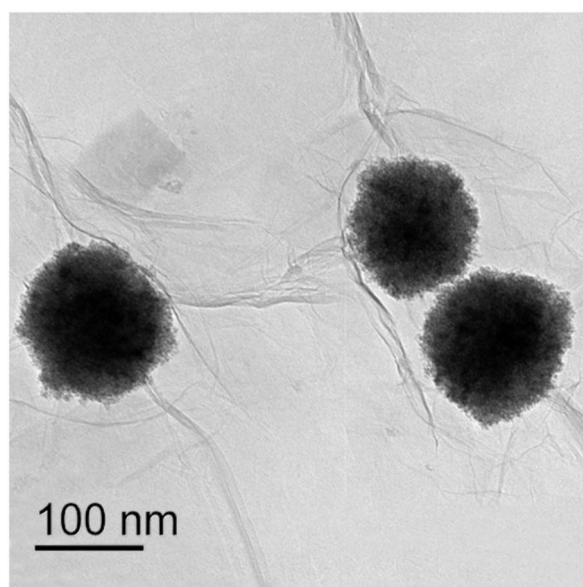


图2

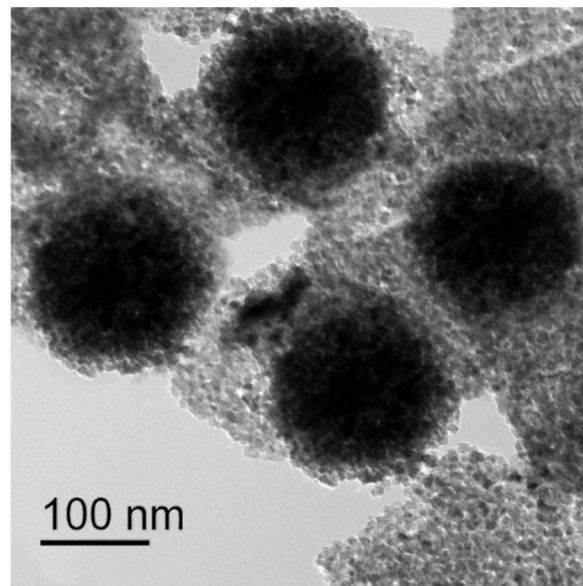


图3

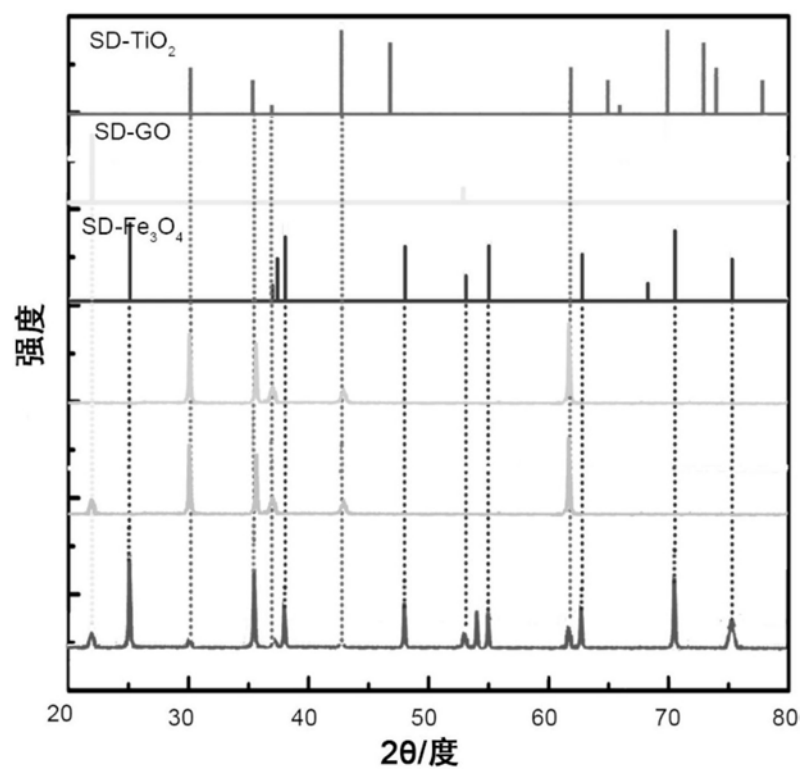


图4

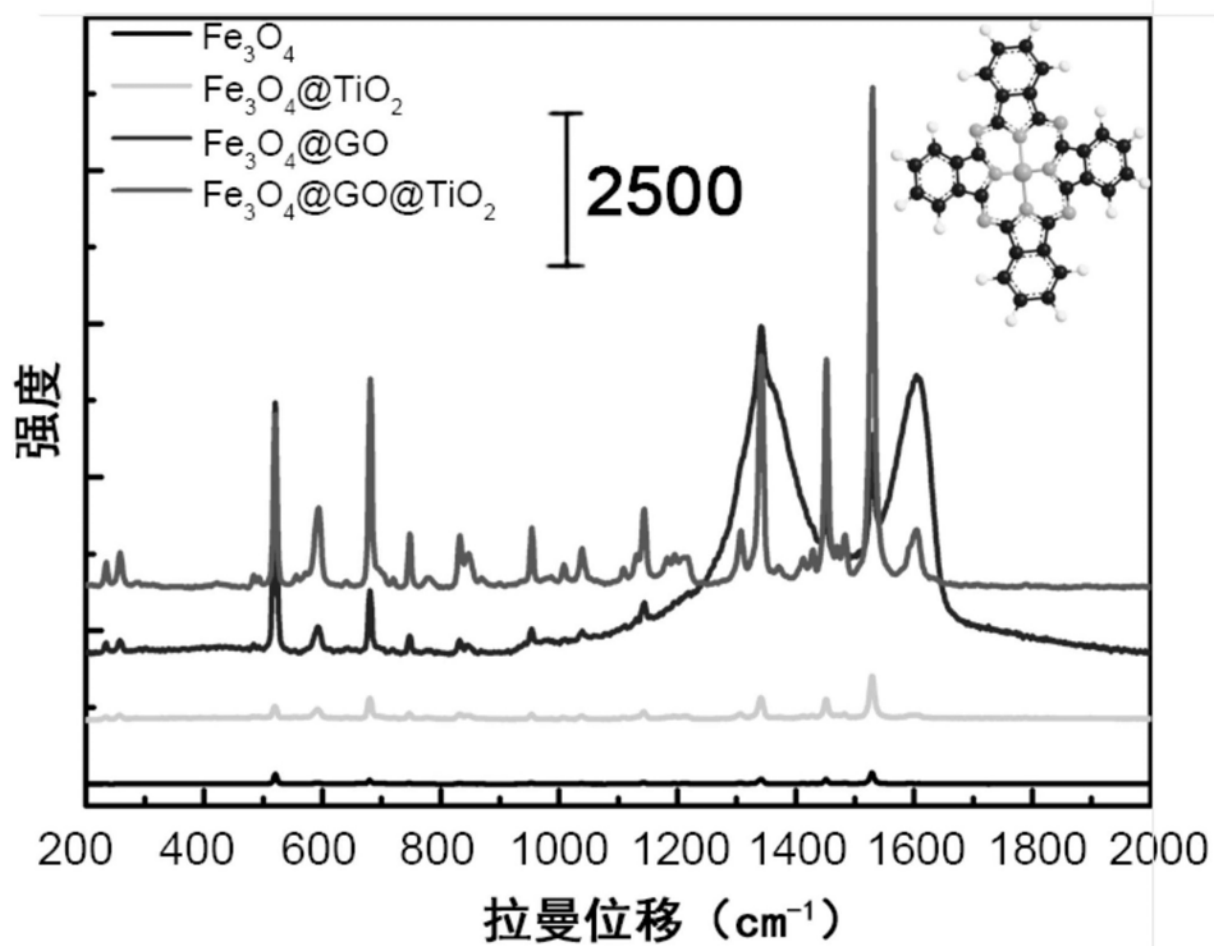


图5

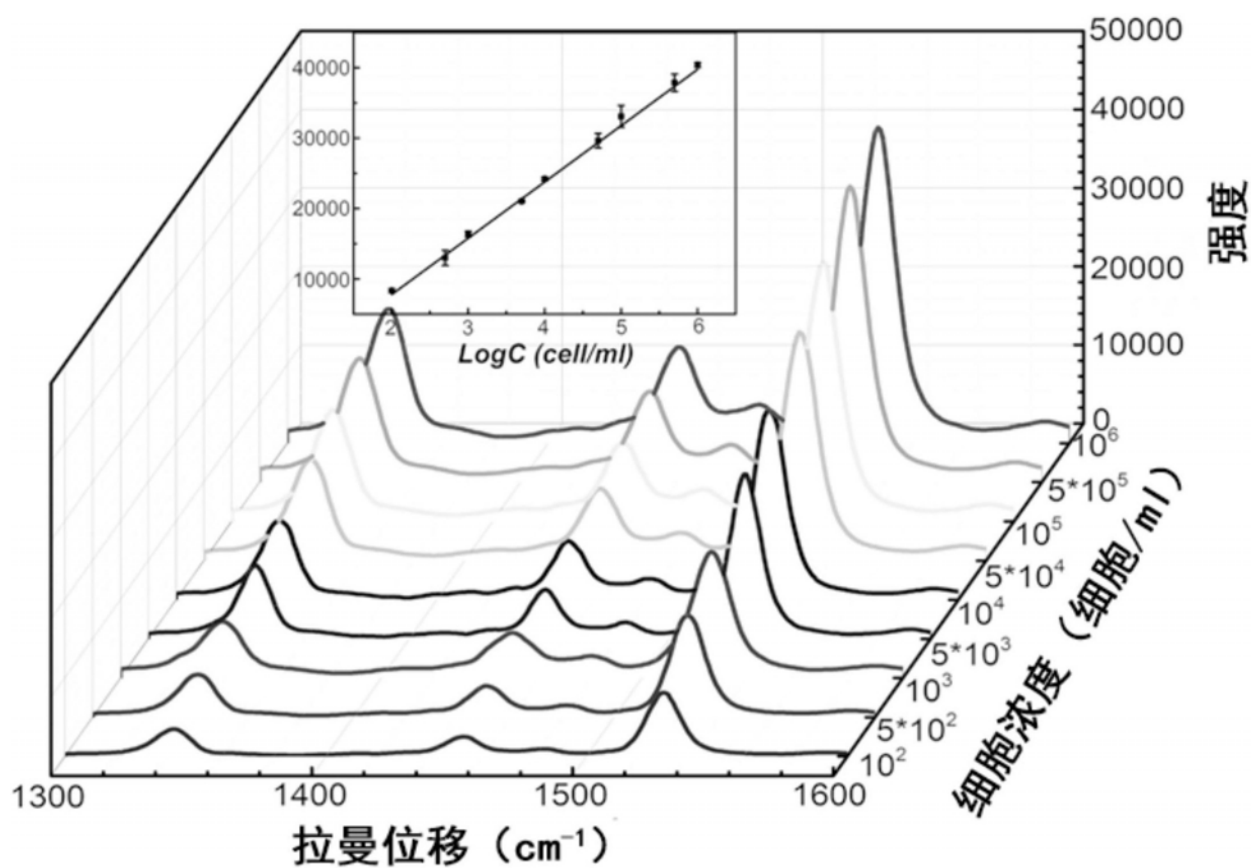


图6

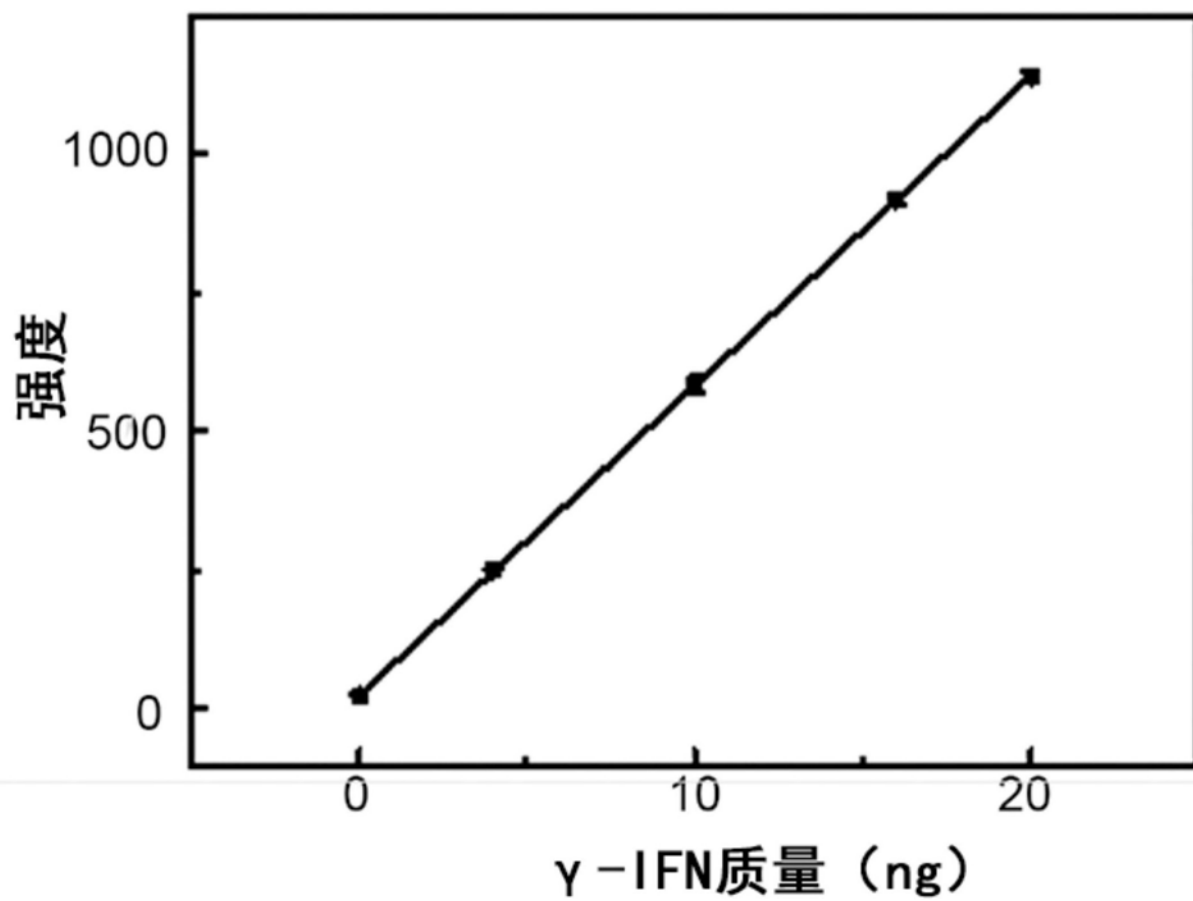


图7

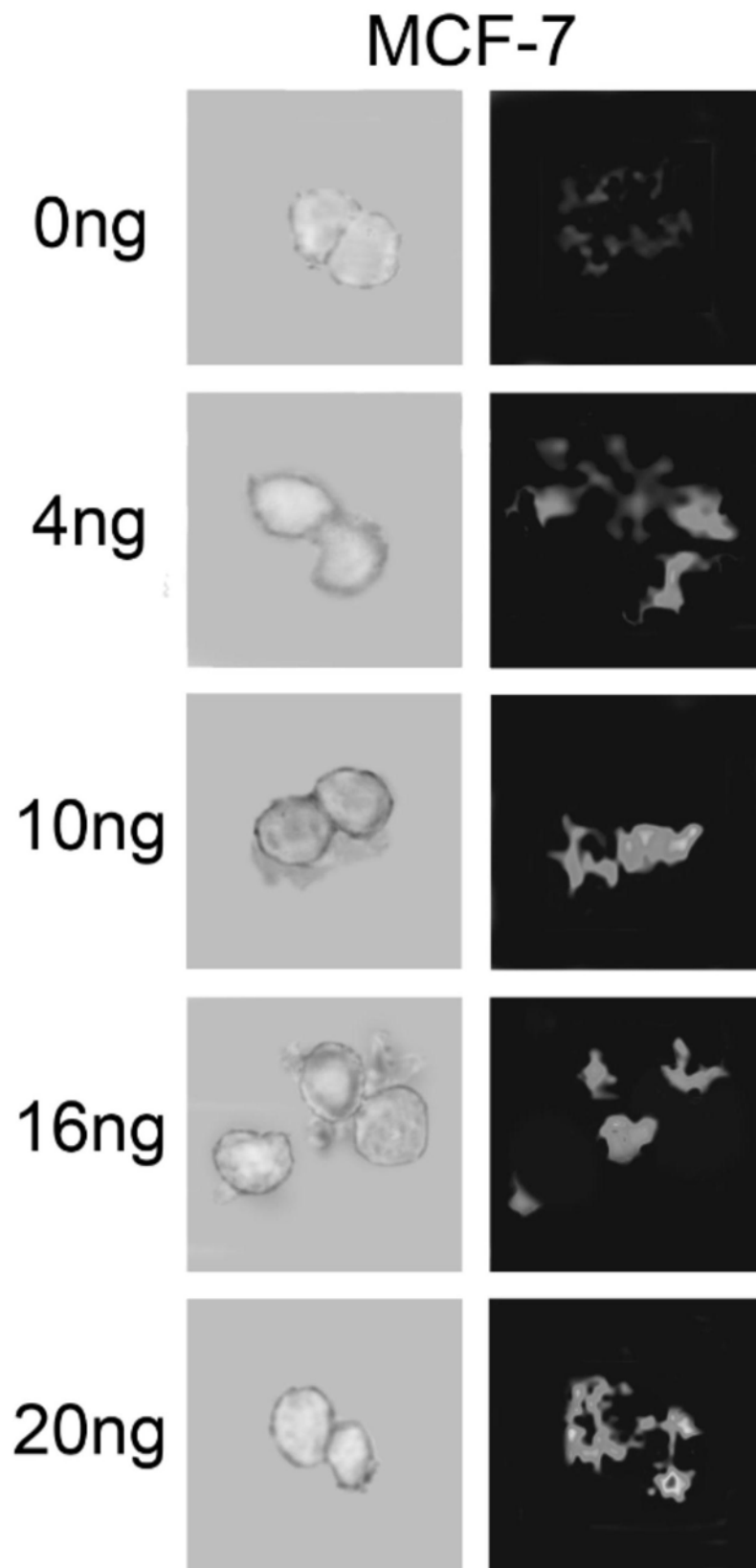


图8

专利名称(译)	一种PD-L1探针及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109387499A	公开(公告)日	2019-02-26
申请号	CN2017110671215.X	申请日	2017-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	华东师范大学		
申请(专利权)人(译)	华东师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	华东师范大学		
[标]发明人	田阳 郑婷婷		
发明人	冯恩铎 田阳 郑婷婷		
IPC分类号	G01N21/65 G01N33/532		
CPC分类号	G01N21/65 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种将石墨烯-金属氧化物复合材料PD-L1探针及其制备方法，利用化学合成以及物理吸附等方法制备了该探针。本发明还公开了将所述PD-L1探针用于表面增强拉曼光谱灵敏检测细胞膜表面程序性死亡受体配体1(PD-L1)的应用。本发明PD-L1探针具有良好的SERS活性和灵敏度。本发明所述PD-L1探针不仅能够应用于PD-L1的检测，对于细胞内其他的一些生物标识物也同样适用。

