



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111103429 B

(45) 授权公告日 2021.05.28

(21) 申请号 201911384467.X

CN 110240704 A, 2019.09.17

(22) 申请日 2019.12.28

CN 107024459 A, 2017.08.08

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 109239045 A, 2019.01.18

申请公布号 CN 111103429 A

Zhong Zhang等.Quantum dots based mesoporous structured imprinting

(43) 申请公布日 2020.05.05

microspheres for the sensitive

(73) 专利权人 西安交通大学

fluorescent detection of phycocyanin.《ACS Appl Mater Interfaces》.2015,第7卷

地址 710049 陕西省西安市咸宁西路28号

Ruixia Gao等.Combination of surface imprinting and immobilized template

(72) 发明人 傅强 陈国宁 舒花 王璐 崔霞

胡倩倩 常春

techniques for preparation of core-shell molecularly imprinted polymers based on

(74) 专利代理机构 西安通大专利代理有限责任

公司 61200

directly amino-modified Fe3O4

代理人 范巍

nanoparticles for specific recognition of bovine hemoglobin.《J Mater Chem B》.2014,第2卷

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

Guoming Chen等.Facile one-step targeted immobilization of an enzyme

(56) 对比文件

CN 101463105 A, 2009.06.24

CN 109517170 A, 2019.03.26

CN 101463105 A, 2009.06.24

CN 106179261 A, 2016.12.07

based on silane emulsion self-assembled molecularly imprinted polymers for visual

sensors.《Analyst》.2019,第145卷

审查员 毕秀华

权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

人血清白蛋白磁性仿生免疫分析试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种人血清白蛋白磁性仿生免疫分析试剂盒,试剂盒包括HSA磁性分子印迹聚合物、HRP-HSA和HSA标准品。HSA磁性分子印迹聚合物是采用溶胶-凝胶表面聚合法合成的对HSA具有识别功能的仿生抗体,具体通过制备磁性纳米微球、氨基修饰磁性纳米微球、溶胶-凝胶聚合形成分子印迹聚合物层、除去结合于分子印迹聚合物层上的模板分子HSA等步骤而得到。该试剂盒可用于尿液中人血清白蛋白的含量分析和测定,具有成本低廉、操作方便、稳定性好、准确度高的优点。

CN 111103429 B

1. 一种人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物仿生抗体,其特征在于:该仿生抗体包括人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物微球,所述磁性分子印迹聚合物微球包括磁性纳米微球、包覆在所述磁性纳米微球表面的氨基功能层以及包覆在所述氨基功能层上的人血清白蛋白分子印迹聚合物层;

所述人血清白蛋白分子印迹聚合物层是以通过氨基二氧化硅吸附在磁性纳米微球表面的人血清白蛋白为模板分子,以能够在含有表面活性剂的水相体系中快速水解的硅烷试剂为单体,通过一种基于酸碱催化的溶胶-凝胶法合成分子印迹聚合物并在合成后去除其所含模板分子而形成的;

所述水相体系为体积分数0.01%~0.5%的吐温溶液,硅烷试剂为3-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷。

2. 根据权利要求1所述一种人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物仿生抗体,其特征在于:所述人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物微球的粒径为500~700nm,磁性纳米微球的粒径为400~600nm。

3. 如权利要求1所述的人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物仿生抗体的制备方法,其特征在于:该仿生抗体的制备方法包括以下步骤:

1) 制备磁性纳米微球;

2) 在磁性纳米微球表面包覆氨基二氧化硅,得到氨基修饰磁性纳米微球复合物;

3) 以人血清白蛋白作为模板分子,将氨基修饰磁性纳米微球复合物和人血清白蛋白混合后通过震荡使氨基修饰磁性纳米微球复合物吸附人血清白蛋白,得到载有人血清白蛋白的氨基磁性纳米微球复合物;

4) 将载有人血清白蛋白的氨基磁性纳米微球复合物与硅烷试剂于含有表面活性剂的水相体系中混合,通过震荡使所得混合体系中的硅烷试剂水解后调节体系pH值,然后通过震荡并于碱性催化条件下在模板分子所附着的磁性纳米微球上形成分子印迹聚合物,得到结合有模板分子的磁性分子印迹聚合物微球;

5) 除去步骤4)得到的磁性分子印迹聚合物微球表面的分子印迹聚合物上结合的模板分子,得到人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物微球。

4. 根据权利要求3所述的仿生抗体的制备方法,其特征在于:所述步骤5)中,采用洗脱溶剂除去所述模板分子,所述洗脱溶剂为SDS-醋酸溶液混合物,其中醋酸和SDS的含量均为2%~5%。

5. 根据权利要求3所述的仿生抗体的制备方法,其特征在于:所述仿生抗体的制备方法还包括以下步骤:经过步骤5)后,封闭所述人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物微球表面的非特异性吸附残基。

6. 根据权利要求3或5所述的仿生抗体的制备方法,其特征在于:所述步骤3)具体包括以下步骤:将10~40mg氨基修饰磁性纳米微球复合物与1~3mL 125~2000 μ g/mL人血清白蛋白PBS溶液混合后于20~40 $^{\circ}$ C震荡0.5~2h,然后依次经固液分离、洗涤,得到载有人血清白蛋白的氨基磁性纳米微球复合物;所述步骤4)具体包括以下步骤:将步骤3)制备得到的载有人血清白蛋白的氨基磁性纳米微球复合物及1.25~30 μ L硅烷试剂加入5~10mL 0.01%~0.5%的吐温溶液中后于20~40 $^{\circ}$ C震荡2~4h,然后通过氨水调节pH值为8.0~9.5,然后于20~40 $^{\circ}$ C震荡10~16h,然后经固液分离得到结合有模板分子的磁性分子印迹

聚合物微球。

7. 一种人血清白蛋白仿生免疫分析试剂盒,其特征在於:该试剂盒包括对人血清白蛋白具有识别功能的仿生抗体,以及可以与人血清白蛋白竞争性结合该仿生抗体的检测标记物,所述仿生抗体包括人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物微球,所述磁性分子印迹聚合物微球包括磁性纳米微球、包覆在所述磁性纳米微球表面的氨基功能层以及包覆在所述氨基功能层上的人血清白蛋白分子印迹聚合物层;

所述人血清白蛋白分子印迹聚合物层是以通过氨基二氧化硅吸附在磁性纳米微球表面的人血清白蛋白为模板分子,以能够在含有表面活性剂的水相体系中快速水解的硅烷试剂为单体,通过一种基于酸碱催化的溶胶-凝胶法合成分子印迹聚合物并在合成后去除其所含模板分子而形成的;

所述水相体系为体积分数0.01%~0.5%的吐温溶液,硅烷试剂为3-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷。

8. 根据权利要求7所述的人血清白蛋白仿生免疫分析试剂盒,其特征在於:所述检测标记物为辣根过氧化物酶标记人血清白蛋白。

9. 如权利要求7所述的人血清白蛋白仿生免疫分析试剂盒在尿液中人血清白蛋白的含量分析中的应用。

人血清白蛋白磁性仿生免疫分析试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析检测领域,具体涉及一种利用人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物人工抗体进行人血清白蛋白含量分析的试剂盒。

背景技术

[0002] 人血清白蛋白(Human Serum Albumin,HSA)是人血浆中含量最丰富的蛋白质,它可以结合和运输内源性与外源性物质,具有维持血液渗透压、清除自由基、抑制血小板聚集和抗凝血等生理功能,在生命活动中有着重要的意义。白蛋白是一种血液中的正常蛋白质,生理条件下仅有少量白蛋白随尿液排出,肾脏代谢异常情况下尿液中的白蛋白含量会增高,因此,常用尿液中微量白蛋白含量检测早期肾病、肾损伤情况。尿白蛋白常用的检测方法为免疫分析法,传统的免疫分析是基于生物抗体作为识别元件的,生物抗体制备过程繁琐、周期长且对外界环境耐受能力差,因此,开发一种具有抗体识别特性的人工抗体具有十分重要的意义。

[0003] 分子印迹聚合物是一种人工合成的对目标分子具有高度选择识别作用的高聚物,与生物抗体相比具有制备过程简便、稳定性好、耐极端环境能力强、成本低廉等优点,因此将分子印迹聚合物作为仿生抗体用于待测物质的识别和检测具有一定的优势。常用的分子印迹聚合物(如本体法、原位法和沉淀法等)是在有机相中完成制备,所得分子印迹聚合物往往需要在有机相中实现识别,而蛋白质在有机相中会发生变性,这限制了分子印迹聚合物代替生物抗体应用于免疫分析。

[0004] 中国专利“牛血清白蛋白磁性仿生免疫分析试剂盒及其应用”(CN109517170A)发明了一种在水相中通过多巴胺单体自聚形成分子印迹聚合物层的方法,并以制备的磁性分子印迹聚合物代替生物抗体,构建用于检测牛血清白蛋白的磁性仿生免疫试剂盒。但人血清白蛋白(HSA)与牛血清白蛋白(BSA)相比,是结构不同的两种物质,与分子印迹聚合物的复合特性不同,以上专利的通过多巴胺单体自聚形成含有模板分子的分子印迹聚合物层的方法并不适用于人血清白蛋白作为模板分子的情形。中国专利“基于磁性分子印迹技术的靶向酶固定化载体的制备方法及应用”(CN110240704A)同样在水相体系下,以3-氨丙基三乙氧基硅烷为功能单体、正硅酸乙酯为交联单体,采用溶胶-凝胶法制备得到包覆在硼酸修饰 Fe_3O_4 磁性纳米粒上的分子印迹聚合物层,但该专利未用于制备仿生抗体。尽管硅烷水解聚合形成的聚合物性能较好,然而大部分硅烷试剂水溶性差,仅在有机溶剂中溶解性能较好,由于蛋白质在有机溶剂中会变性,因此对开发(筛选)可以制备蛋白质分子印迹聚合物的硅烷试剂单体提出了更高要求。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种人血清白蛋白磁性仿生免疫分析试剂盒,并将其应用于尿液中人血清白蛋白的检测中。

[0006] 为了达到上述目的,本发明采用了以下技术方案:

[0007] 一种人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物仿生抗体,该仿生抗体包括人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物微球,所述磁性分子印迹聚合物微球包括磁性纳米微球(内核)、包覆在所述磁性纳米微球表面的功能基团层(氨基二氧化硅)以及包覆在所述功能基团层上的人血清白蛋白分子印迹聚合物层。

[0008] 优选的,所述人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物微球的粒径为500~700nm,其中磁性纳米微球的粒径为400~600nm。本发明以能够对人血清白蛋白进行高效识别和检测为评价标准,筛选出了磁性分子印迹聚合物微球的最佳粒径范围。

[0009] 优选的,所述仿生抗体还包括用于封闭人血清白蛋白分子印迹聚合物层上的非特异性结合位点的功能蛋白(功能蛋白可以为卵清蛋白)。

[0010] 优选的,所述人血清白蛋白分子印迹聚合物层是以吸附(通过功能基团)在磁性纳米微球表面的人血清白蛋白为模板分子,以能够在含有表面活性剂的水相体系中快速水解的硅烷试剂为单体,通过一种基于酸碱催化的溶胶-凝胶法合成分子印迹聚合物并在合成后去除其所含模板分子而形成的。

[0011] 优选的,所述溶胶-凝胶法中,将作为单体的硅烷试剂,在含有模板分子(吸附在磁性纳米微球表面人血清白蛋白)的0.01%~0.5%的吐温溶液中进行水解,并利用水解产物于pH为8.0~9.5的碱性条件下在所述模板分子所附着的磁性纳米微球上形成分子印迹聚合物。

[0012] 优选的,所述硅烷试剂为三甲氧基类硅烷,例如,3-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷等。

[0013] 上述人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物仿生抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0014] 1) 制备磁性纳米微球;

[0015] 2) 在磁性纳米微球表面包覆氨基二氧化硅,得到氨基修饰磁性纳米微球复合物;

[0016] 3) 以人血清白蛋白作为模板分子,将氨基修饰磁性纳米微球复合物和人血清白蛋白混合后通过震荡使氨基修饰磁性纳米微球复合物充分吸附人血清白蛋白,得到载有人血清白蛋白的氨基磁性纳米微球复合物;

[0017] 4) 将载有人血清白蛋白的氨基磁性纳米微球复合物与硅烷试剂单体于含有表面活性剂的水相体系中混合,通过震荡使所得混合体系中的硅烷试剂单体水解(快速水解并形成均一体系)后调节体系pH值,然后继续通过震荡并于碱性催化条件下在模板分子所附着的磁性纳米微球(即载有人血清白蛋白的氨基磁性纳米微球复合物)上形成分子印迹聚合物,得到结合有模板分子的磁性分子印迹聚合物微球;

[0018] 5) 除去步骤4)得到的磁性分子印迹聚合物微球表面的分子印迹聚合物上结合的模板分子,得到人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物微球。

[0019] 优选的,所述制备方法还包括以下步骤:

[0020] 6) 封闭所述人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物微球表面的非特异性吸附残基。

[0021] 优选的,所述步骤1)中,磁性纳米微球具体采用热溶剂法制备。

[0022] 优选的,所述步骤2)中,氨基修饰磁性纳米微球复合物具体采用基于硅烷水解缩聚的溶胶-凝胶法制备。通过制备包覆于磁性纳米微球表面的功能基团层,使磁性纳米微球能够吸附模板分子,从而将模板分子连接在磁性纳米微球的表面(例如,通过3-氨丙基三乙氧基硅烷引入的氨基功能层,可以更好地吸附蛋白质HSA)。

[0023] 优选的,所述步骤3)具体包括以下步骤:将10~40mg氨基修饰磁性纳米微球复合物与1~3mL 125~2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 人血清白蛋白PBS溶液(溶剂为pH 7.2~7.4的PBS缓冲液)混合,然后于20~40 $^{\circ}\text{C}$ 震荡0.5~2h,分离去除上清液(利用磁性收集微球),然后洗去未吸附在氨基磁性纳米微球复合物表面的人血清白蛋白分子,得到载有人血清白蛋白的氨基磁性纳米微球复合物。

[0024] 优选的,所述步骤4)具体包括以下步骤:将步骤3)制备得到的载有人血清白蛋白的氨基磁性纳米微球复合物及1.25~30 μL 硅烷试剂单体加入5~10mL 0.01%~0.5%(进一步优选为0.01%~0.1%)的吐温溶液中,然后于20~40 $^{\circ}\text{C}$ 震荡2~4h使硅烷试剂单体充分水解,然后通过加入稀氨水溶液(体积分数0.1%~0.5%)调节pH值为8.0~9.5,然后于20~40 $^{\circ}\text{C}$ 继续震荡10~16h,分离去除上清液(利用磁性收集微球),得到结合有模板分子的磁性分子印迹聚合物微球。

[0025] 优选的,所述步骤4)中,硅烷试剂单体为三甲氧基类硅烷,例如,3-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷等。

[0026] 优选的,所述步骤5)具体包括以下步骤:采用模板分子洗脱溶剂洗涤结合有模板分子的磁性分子印迹聚合物微球,从而除去所述模板分子,所述洗脱溶剂为SDS-醋酸溶液混合物,该混合物中醋酸和SDS的浓度为2%~5%(质量分数)。

[0027] 优选的,所述步骤6)具体包括以下步骤:将10~40 μg 人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物微球加入1~5mg/mL卵清蛋白水溶液中后于20~40 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30~60min;即采用卵清蛋白封闭非特异性吸附残基(即上述非特异性结合位点)。

[0028] 一种人血清白蛋白仿生免疫分析试剂盒,该试剂盒包括人血清白蛋白(HSA)标准品、磁铁、96孔板、显色液、稀释液、洗涤液、终止液、对人血清白蛋白具有识别功能的仿生抗体(该仿生抗体包括上述人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物微球),以及可以与样品中的人血清白蛋白在所述仿生抗体上进行竞争吸附的辣根过氧化物酶标记人血清白蛋白(HRP-HSA)。

[0029] 优选的,所述辣根过氧化物酶标记人血清白蛋白的制备方法包括以下步骤:①将辣根过氧化物酶进行氧化反应(例如,过碘酸钠氧化法),得到带有醛基的辣根过氧化物酶(记为中间物);②将中间物在碱性条件下(pH 9.0~9.5)与人血清白蛋白搅拌混合,使中间物表面醛基与人血清白蛋白表面的氨基结合,然后在2~8 $^{\circ}\text{C}$ 下进行还原反应2~4h(例如以硼氢化钠为还原剂),得到结构稳定的辣根过氧化物酶标记人血清白蛋白。

[0030] 优选的,所述显色液包括显色底物溶液A和显色底物溶液B,显色底物溶液A为含过氧化氢的溶液,显色底物溶液B为含四甲基联苯胺(TMB)的溶液;所述终止液为2mol L^{-1} 硫酸溶液;所述洗涤液为含吐温-20的PBS缓冲液(pH 7.2~7.4);所述样品稀释液为PBS缓冲液(pH 7.2~7.4)。

[0031] 上述人血清白蛋白仿生免疫分析试剂盒在尿液中人血清白蛋白的含量分析中的应用,所述分析中,对尿液进行的预处理包括以下步骤:将尿液超滤(截留分子量10KD),将滤液稀释5~20倍,得到样品。

[0032] 本发明的有益效果体现在:

[0033] 本发明所述试剂盒采用的仿生抗体识别元件为磁性分子印迹聚合物,磁性分子印迹聚合物能够利用磁场实现快速的固定,分离简便;与生物抗体相比,具有制备过程简便、

稳定性好和耐极端能力强的优点,可以作为人血清白蛋白生物抗体的替代品应用于免疫分析。该试剂盒可用于人血清白蛋白的含量分析和测定,具有成本低廉、操作方便、稳定性好、准确度高和适应性强的优点。

[0034] 进一步的,本发明以硅烷试剂为单体,在水相环境中合成对人血清白蛋白具有识别功能的人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物,克服了传统有机相中无法制备蛋白质分子印迹聚合物的缺陷;本发明制备得到的磁性分子印迹聚合物仿生抗体的特异性高、识别能力强。

附图说明

[0035] 图1为 Fe_3O_4 磁性纳米微球、MIPs的扫描(a、b)和透射(c、d)电镜图。

[0036] 图2为 Fe_3O_4 磁性纳米微球(a)和MIPs(b)的磁滞回线图。

[0037] 图3为 Fe_3O_4 磁性纳米微球(a)和MIPs(b)的能谱分析图。

[0038] 图4为MIPs和NIPs在封闭前、后(Non-blocking、Blocking)对HRP-HSA吸附结果图。

[0039] 图5为试剂盒对人血清白蛋白响应的典型对照曲线图。

[0040] 图6为试剂盒对人血清白蛋白和其他蛋白质的特异选择性考察结果;其中:1为人血清白蛋白;2为辣根过氧化物酶;3为细胞色素C;4为溶菌酶;5为血红蛋白;6为菠萝蛋白酶;7为葡萄糖氧化酶;8为卵清蛋白。

具体实施方式

[0041] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细说明。

[0042] (一)辣根过氧化物酶标记人血清白蛋白(HRP-HSA)的合成

[0043] 称取5mg辣根过氧化物酶溶解于1mL蒸馏水中,加新配的0.1M NaIO_4 0.2mL,室温避光搅拌20min,将搅拌后的溶液转入透析袋,用1mM pH 4.4的醋酸盐缓冲液透析(4℃)过夜,加0.2M pH 9.5的碳酸盐缓冲液20 μL ,使pH升高至9.0~9.5,然后立即加入5mg人血清白蛋白(溶于0.01M碳酸盐缓冲液中),室温避光轻轻搅拌2h(使氧化辣根过氧化物酶与人血清白蛋白结合),加新配的4mg/mL硼氢化钠溶液0.1mL,混匀,在4℃下反应2h,转入透析袋,用10mM pH 7.2~7.4的PBS缓冲液透析(4℃)24h,加等体积甘油并于-20℃下保存备用(使用时直接稀释即可)。若不保存,则无需加入甘油。

[0044] (二)HSA磁性分子印迹聚合物的制备

[0045] 在实验中发现某些硅烷试剂可以在吐温-20存在的条件下快速水解,加入少量氨水后,即可聚合,本发明基于这个发现制备了人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物,以替代人血清白蛋白生物抗体。

[0046] 1) Fe_3O_4 磁性纳米微球的制备

[0047] 称取 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5.328g,搅拌溶解于160mL乙二醇中,得到深棕色溶液。向该溶液中加入5.328g聚乙二醇(具体为PEG4000),于60℃下搅拌溶解后,加入14.4g醋酸钠,继续搅拌1h,得混合溶液。将混合溶液平均分装到两个容量为200mL的反应釜中,在真空干燥箱中于200℃反应12h,待冷却至室温,用磁铁收集产物并用无水乙醇洗涤4~6次,真空干燥,得到 Fe_3O_4 磁性纳米微球。

[0048] 2) 氨基修饰磁性纳米微球(简称 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$)的制备

[0049] 称取500mg的 Fe_3O_4 磁性纳米微球,加入至160mL的乙醇-水(3:1, v/v)混合液中,超声使 Fe_3O_4 磁性纳米微球分散。然后分别向所得分散体系中加入1mL氨水(25wt%)、1.6mL正硅酸乙酯(TEOS)和0.8mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES),室温下机械搅拌反应12h。用磁铁收集产物,将得到的产物依次用水、乙醇洗涤后,真空干燥,得到氨基修饰磁性纳米微球($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$)。

[0050] 3) HSA磁性分子印迹聚合物微球的制备

[0051] 取上述氨基修饰磁性纳米微球20mg,加入至2mL分散有浓度为 $1000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 人血清白蛋白(HSA)的PBS缓冲液(pH 7.2~7.4)中,室温下振摇吸附1h,用磁铁收集并用PBS缓冲液洗去未吸附的HSA分子,用体积分数0.05%吐温(吐温-20)水溶液6mL重新分散,在所得分散体系中加入2.5 μL 3-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷,室温震荡反应2h充分水解,加体积分数0.1%氨水60 μL (pH值在8~9),室温振摇反应12h,用磁铁收集产物,用SDS-醋酸溶液(分别含醋酸和SDS 5wt%)洗涤24h,以洗脱模板分子,得到人血清白蛋白磁性分子印迹聚合物微球(记为MIPs)。

[0052] 除不加入模板分子(人血清白蛋白),非分子印迹聚合物微球(记为NIPs)的制备方法与上述MIPs的制备方法相同。

[0053] 参见图1,从图1中可以看出,所制备的 Fe_3O_4 磁性纳米微球为直径400~600nm的球形颗粒,经过表面改性及聚合后,所制备的MIPs仍保持球形,直径为500~700nm。

[0054] 参见图2,从 Fe_3O_4 磁性纳米微球(图2a)及MIPs(图2b)的磁滞回线可以看出,两种物质均具有较高的饱和磁强度和超顺磁性,说明 Fe_3O_4 表面包裹的分子印迹聚合物层并没有造成 Fe_3O_4 磁性纳米微球的饱和磁强度大幅下降,所制备的MIPs仍有较高的饱和磁强度,从而保证所制备的MIPs能够在外加磁场作用下快速分离以及能够固定于载体表面并应用于免疫分析。

[0055] 参见图3,从 Fe_3O_4 磁性纳米微球(图3a)及MIPs(图3b)的能谱(EDS)分析结果中可以看出, Fe_3O_4 磁性纳米微球的EDS谱图分别显示了对应于C、O和Fe的三个峰,MIPs的EDS谱图分别显示了对应于C、O、Si和Fe的四个峰。与 Fe_3O_4 磁性纳米微球相比,MIPs中Si特征峰的出现表明 Fe_3O_4 表面分子印迹聚合物层成功制备。

[0056] (三) HAS磁性分子印迹聚合物印迹效果评价

[0057] 参见图4,从分子印迹聚合物(MIPs)和非分子印迹聚合物(NIPs)对HRP-HSA吸附后的显色效果可以看出,MIPs对HRP-HSA的吸附能力明显强于NIPs对HRP-HSA的吸附能力,表明本发明制备的MIPs印迹效果较好。这是由于模板分子的加入和洗脱,使分子印迹聚合物层具有与模板分子在尺寸大小、空间结构和作用位点等方面高度匹配的三维孔穴。

[0058] 另外,经卵清蛋白封闭非特异性吸附残基后,MIPs和NIPs对HRP-HSA的吸附能力均有所下降,而且NIPs基本对HRP-HSA无明显吸附能力,表明经封闭后的HAS磁性分子印迹聚合物的特异性相对于NIPs明显增加。

[0059] (四) 分子印迹仿生免疫分析试剂盒的制备

[0060] 1. 分子印迹仿生免疫分析试剂盒的组成:该试剂盒包含磁铁、96孔板、可识别HSA的仿生抗体(HSA磁性分子印迹聚合物)、HRP-HSA、HSA标准品、显色液、样品/标准品稀释液、洗涤液和终止液。

[0061] 2. 所用试剂配制

[0062] 1) 样品/标准品稀释液 (PBS, pH 7.4) 的配制 (终浓度): NaCl 137mM、KCl 2.7mM、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10mM, 及 KH_2PO_4 2mM, 用三蒸水定容至1L, 室温保存。

[0063] 2) 洗涤液 (PBST, pH 7.4) 的配制 (终浓度): NaCl 137mM、KCl 2.7mM、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10mM、 KH_2PO_4 2mM, 及0.5mL吐温-20, 用三蒸水定容至1L, 充分混匀后室温保存。

[0064] 3) 显色底物溶液A的配制: 无水醋酸钠2.72g、柠檬酸0.32g, 及30%双氧水60 μL , 用三蒸水定容至100mL, 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

[0065] 4) 显色底物溶液B的配制: 乙二胺四乙酸二钠40mg、柠檬酸0.19g、甘油10mL, 及10mg/mL 3,3',5,5'-四甲基联苯胺4mL (二甲基亚砷溶解), 用三蒸水定容至100mL, 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

[0066] 5) 终止液 (2mol/L H_2SO_4 溶液) 的配制: 三蒸水400mL, 浓硫酸55.6mL (缓慢滴加并不断搅拌), 加三蒸水定容至500mL。

[0067] 3. 分子印迹仿生免疫分析试剂盒的识别检测步骤

[0068] 1) 取HSA磁性分子印迹聚合物20 μg 加入96孔板中, 用磁铁吸附固定, 即可进行后续操作;

[0069] 2) 每孔加2mg/mL卵清蛋白溶液200 μL , 室温孵育30min后去除卵清蛋白溶液, 以封闭聚合物表面的非特异性吸附残基;

[0070] 3) 每孔分别加标准工作溶液或样品溶液75 μL 和HRP-BSA稀释溶液75 μL , 室温竞争反应60min后用200 μL PBST洗3次;

[0071] 4) 取等体积溶液A和B混合得显色底物混合液; 分别将150 μL 显色底物混合液加入孔中, 室温显色30min后加入终止液50 μL ;

[0072] 5) 取160 μL 显色反应溶液, 在450nm下用酶标仪读取吸光度值。

[0073] (五) 分子印迹仿生识别分析方法的建立

[0074] 1. MIPs和HRP-HSA的用量确定: 采用棋盘滴定法选择MIPs和HRP-HSA的用量, HRP-HSA分别稀释10000、20000、40000、80000倍, MIPs用量分别为40、20、10、5 μg , 测定吸光度值 (结果见表1), 选择最佳工作浓度。

[0075] 表1. MIPs用量和HRP-HSA稀释度优化

MIP(μg)	HRP-HSA 稀释倍数			
	1:10000	1:20000	1:40000	1:80000
[0076] 40	—	—	2.410	1.205
20	—	2.319	1.130	0.552
10	1.550	0.876	0.289	0.159
5	0.449	0.243	0.115	0.043

[0077] 方阵试验结果 (表1) 表明最佳的HRP-HSA稀释度为1:40000, 最佳MIPs用量为20 μg 。

[0078] 2. 标准曲线的建立: 取HSA标准品分别配成浓度为100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、6.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、3.125 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1.5625 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准工作溶液, 每个浓度3个重复, 所获得的标准品吸光度值除以空白吸光度值, 再乘以100, 即为

抑制率(Inhibition)。以抑制率为纵坐标,标准品浓度的对数值为横坐标绘制标准曲线。根据标准曲线即可计算出待测样品中的HSA的含量。

[0079] (六) 试剂盒性能指标考察

[0080] 1. 试剂盒检测特异性考察:选择辣根过氧化物酶、细胞色素C、溶菌酶、血红蛋白、菠萝蛋白酶、葡萄糖氧化酶和卵清蛋白作为吸附选择性实验的蛋白质对照物,分别计算出各对照物对信号强度的抑制率,结果(见图6)显示,MIPs对HSA的特异性较强,对其他蛋白质的选择性较差。

[0081] 2. 准确度实验和精密度实验:分别配制高、中、低($50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)三个浓度的人血清白蛋白加标尿液,尿液在使用之前进行超滤处理,根据建立的典型标准曲线(图5),样品在检测之前稀释10倍,每个浓度均设6个平行实验($n=6$),按照试剂盒的实验操作步骤(即上述识别检测步骤),得到不同浓度的加标人血清白蛋白尿液的吸光度值,分别计算不同浓度的加标尿液的抑制率,并结合所绘制的标准曲线,计算回收率和相对标准偏差,以此来考察分析的准确度和精密度。结果(表2)显示,本发明建立的分子印迹仿生识别分析方法在上述加标浓度下,回收率均在85.4%~104.5%之间,精密度RSD值均在13.3%以下。

[0082] 表2. 分子印迹仿生免疫分析试剂盒对尿液中HSA的准确度和精密度实验

	加入量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	检测值 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率(%)	RSD (%)
	0	1.20±0.16	—	13.3
[0083]	5	5.47±0.43	85.4	7.9
	25	23.39±0.84	88.8	3.6
	50	53.47±4.33	104.5	8.1

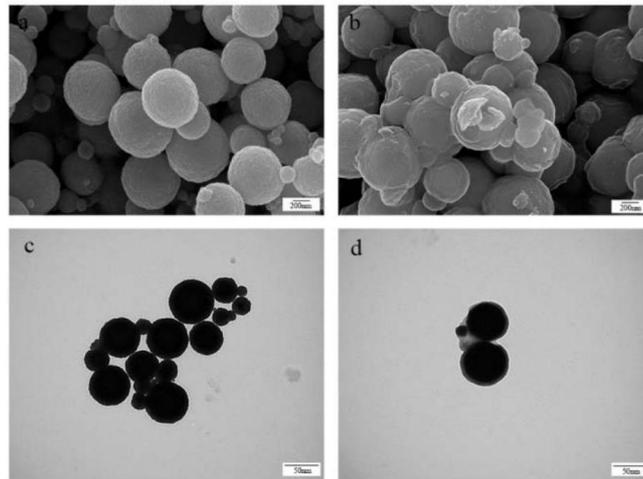


图1

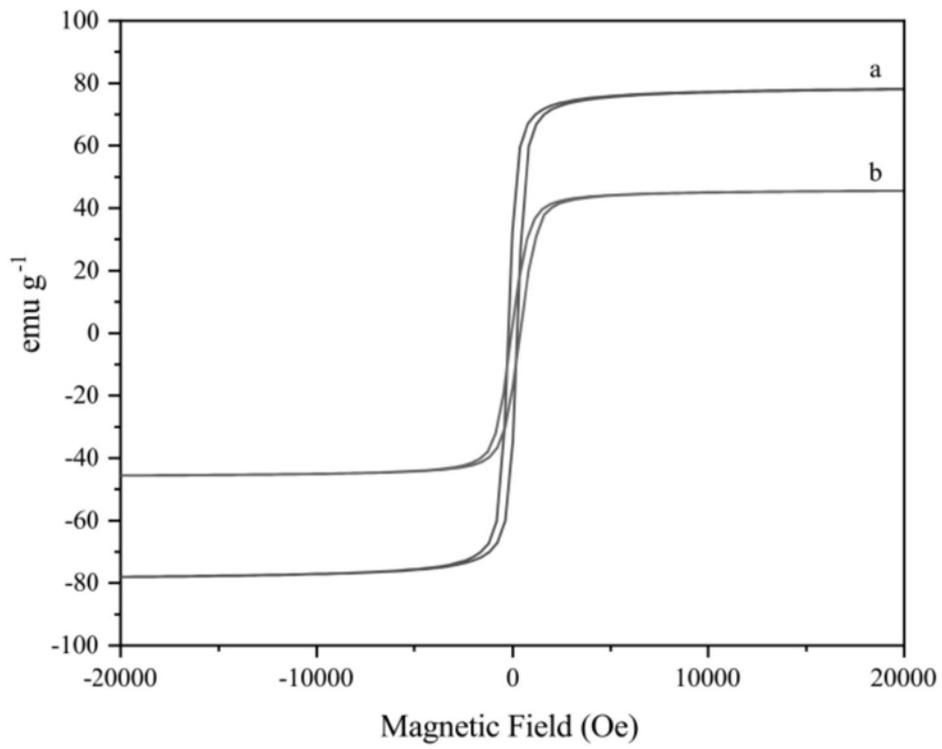


图2

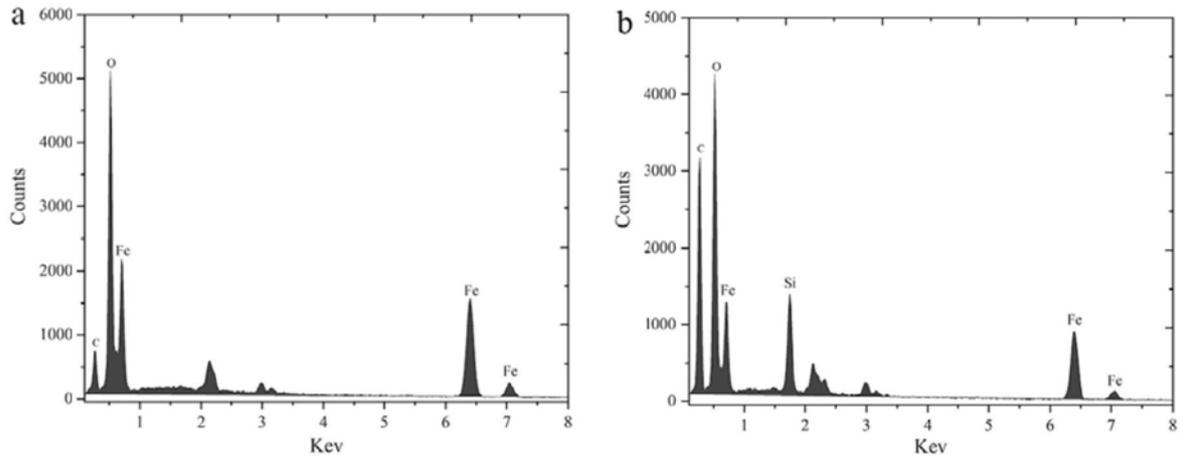


图3

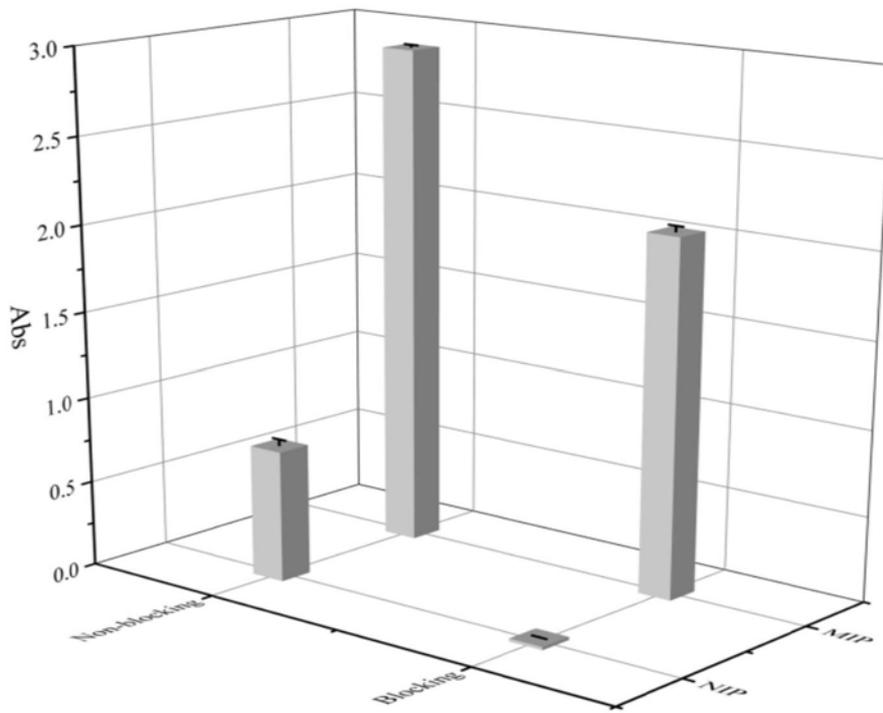


图4

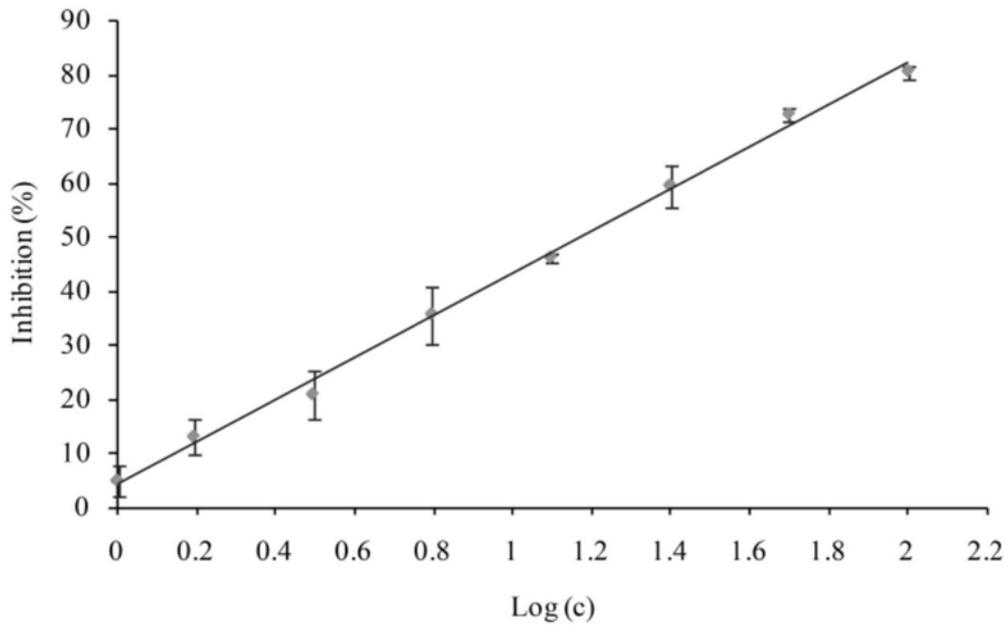


图5

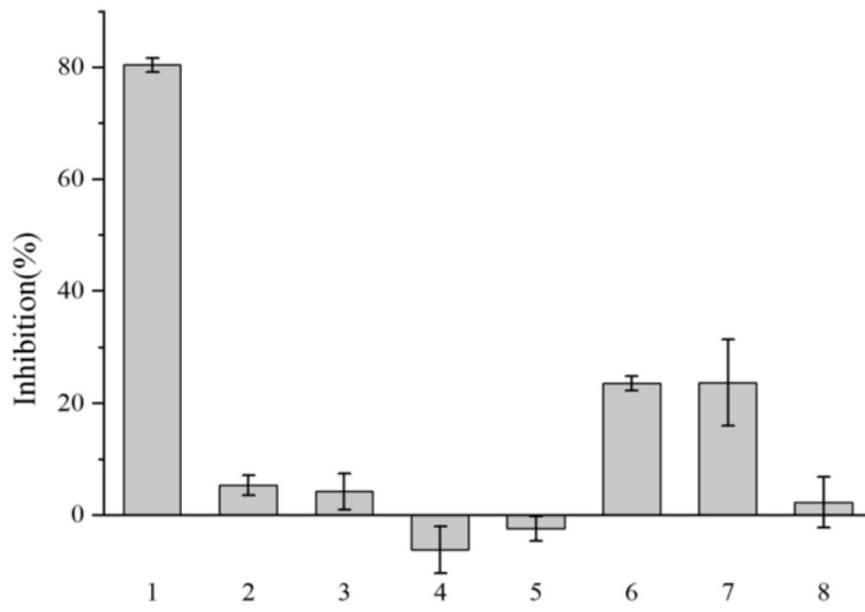


图6