

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 21/76 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710040475.3

[43] 公开日 2007年10月24日

[11] 公开号 CN 101059508A

[22] 申请日 2007.5.10

[21] 申请号 200710040475.3

[71] 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路800号

[72] 发明人 任吉存 黄香宜

[74] 专利代理机构 上海交大专利事务所
代理人 毛翠莹

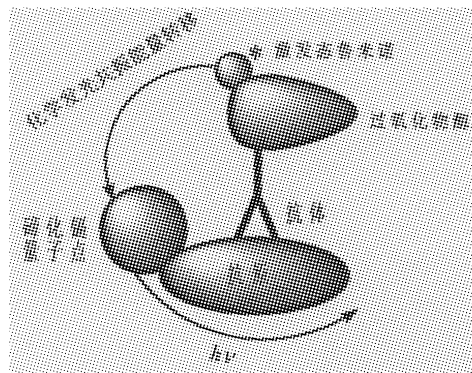
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

[54] 发明名称

均相免疫分析纳米器件的构建方法

[57] 摘要

本发明涉及一种均相免疫分析纳米器件的构建方法，这种纳米器件由过氧化物酶、免疫复合物和能量受体纳米粒子碲化镉量子点组成，是以一种基于化学发光共振能量转移原理发光的碲化镉量子点为核心，经碲化镉荧光量子点与抗原或抗体以静电或共价作用连接，过氧化物酶与抗体共价连接，基于抗原-抗体免疫反应的生物纳米器件。这种免疫分析纳米器件具有良好的水溶性和稳定性，发射波长可调，不需要外加激光光源，背景干扰小，通过化学发光共振能量转移产生强的光信号，可用于均相免疫分析。



1、一种均相免疫分析纳米器件的构建方法，其特征在于包括如下步骤：

(1) 碲氢化钠制备

将摩尔比为 1:4 至 4:1 的硼氢化钠和碲粉置于水中，在 0-50℃下反应，生成碲氢化钠溶液；

(2) 水溶性碲化镉量子点的合成

将 0.00001-0.1 摩尔/升氯化镉和水溶性巯基化合物混合配成溶液，用氢氧化钠溶液调节 pH 值至 8.0-10.0，通氮气除氧三十分钟后，搅拌并在氮气保护下，注入碲氢化钠溶液，形成碲化镉单体溶液；碲化镉单体溶液中二价镉离子：碲氢化钠：水溶性巯基化合物的摩尔比为 2:1:4 至 2:1:8；控制碲化镉单体溶液的反应温度为 70-140℃，反应时间 0.5-20 小时，得到发光范围在 500 到 750 纳米的碲化镉量子点水溶液；

(3) 水溶性碲化镉量子点-抗原或抗体生物标记物溶液的制备

将 0.001-5 毫克/毫升碲化镉量子点、乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐、抗原或抗体，置于 0.01 摩尔/升、pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液中混合均匀，碲化镉量子点、乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐、抗原或抗体的摩尔比为 1:100:0.2 至 1:1000:6，将混合溶液于常温下避光反应 2-4 小时，采用超滤法纯化得到碲化镉量子点-抗原或抗体生物标记物溶液，置于 4℃冰箱保存备用；

(4) 过氧化物酶、抗体或抗原的共价连接

将 0.001-4 毫克/毫升过氧化物酶、乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐、N-羟基丁二酰亚胺置于 0.01 摩尔/升 pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液中，混合反应 15 分钟，采用超滤法纯化此反应溶液，然后在此纯化了的溶液中加入 0.001-3 毫克/毫升抗体或抗原，过氧化物酶、乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐、抗体或抗原的摩尔比为 1:100:0.2 至 1:200:5，将混合溶液于常温下避光反应 1-2 小时，采用超滤法纯化得到过氧化物酶-抗体或抗原生物标记物溶液，置于 4 摄氏度冰箱保存备用；

(5) 基于抗原—抗体免疫反应，构建过氧化物酶—免疫复合物—碲化镉量子点生物纳米器件：

分别取 5-50 微升碲化镉量子点—抗原或抗体生物标记物溶液和过氧化物酶—抗体或抗原生物标记物溶液置于微型管中，然后用 0.01 摩尔/升、pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释至 500 微升，漩涡混合均匀，最后至 37 摄氏度恒温 2-3 小时，得到碲化镉量子点—抗原—抗体—过氧化物酶免疫纳米器件，或碲化镉量子点—抗体—抗原—过氧化物酶免疫纳米器件。

2、根据权利要求 1 的均相免疫分析纳米器件的构建方法，其特征在于所述抗原为牛血清白蛋白、癌胚抗原、 α -胎甲球蛋白、降钙素、甲状腺蛋白、癌抗原 CA 125、癌抗原 CA 15-3 或癌抗原 CA19-9。

3、根据权利要求 1 或 2 的方法构建的均相免疫分析纳米器件，其特征在于该生物纳米器件由过氧化物酶、抗体或抗原、能量受体荧光纳米粒子组成。

4、根据权利要求 3 的均相免疫分析纳米器件，其特征在于所述能量受体荧光纳米粒子为水相合成不同尺寸的巯基丙酸修饰的碲化镉量子点，其发射波长为 500-750 纳米，量子产率为 20-60%，其表面修饰有多个羧基 (-COOH)，用于与蛋白质上的氨基 (-NH₂)共价连接。

均相免疫分析纳米器件的构建方法

技术领域

本发明涉及一种均相免疫分析纳米器件的构建方法，基于化学发光共振能量转移原理，构建用于均相免疫分析的纳米器件，属于生物分子纳米器件制备和生物分析技术领域。

背景技术

免疫分析是基于抗体和抗原特异性结合反应而建立的一种高选择性的分析方法，它被广泛地用于临床分析，食品分析，环境分析等领域。目前免疫分析主要采用荧光，化学发光和放射等检测手段。其中化学发光检测具有检测仪器简单，灵敏度高等特点，但选择性差，本体溶液自发光干扰较大。另外，目前免疫分析主要采用非均相模式，需要多步繁琐的操作如涂板，分离，清洗，分析时间长。

液相法（或称为均相法）的免疫反应和信号测定在溶液中一步完成，没有固相的参与，因此反应速度较快，操作也相应简单，其中均相荧光免疫测定应用最为广泛。目前均相荧光免疫分析是基于荧光共振能量转移原理。

荧光量子点(quantum dots, QDs)是一种由II族-VI族或III族-V族元素组成的无机纳米颗粒，与传统荧光探针相比，它具有激发光谱宽，发射光谱窄并且呈对称分布，通过调节组成和大小可以使其发射出不同颜色的光等特点，量子点作为荧光探针标记生物分子的研究已经用于细胞成像，免疫分析，DNA杂交等方面。传统有机荧光染料吸收光谱窄，发射光谱常常伴有拖尾，这样会影响供体发射光谱与受体吸收光谱的重叠程度，而且供体和受体发射光谱产生相互干扰，限制了荧光共振能量转移在均相免疫分析中的应用。最新的一些报道将发光量子点用于荧光共振能量转移免疫分析中，克服了有机荧光染料的不足之处。Goldman等人(Goldman, E. R.; Clapp, A. R.; Anderson, G. P.; Uyeda, H. T.; Mauro, J. M.; Medintz, I. L.; Mattoussi, H. Multiplexed Toxin Analysis Using Four Colors of

Quantum Dot Fluororeagents, Anal. Chem. 2004, 76, 684-688) 基于免疫反应, 通过荧光共振能量转移, 采用四种不同发射波长的荧光量子点实现了对四种毒素的同时检测。

但是荧光共振能量转移分析系统结构复杂, 仪器价格昂贵。另外, 生物体内自身荧光会增加背景的干扰, 其应用受到一定的限制。

发明内容

本发明的目的在于针对现有技术的不足, 提供一种均相免疫分析纳米器件的构建方法, 构建的免疫分析纳米器件不需要外加激光光源, 发射波长可调, 具有良好的水溶性和稳定性, 通过化学发光共振能量转移产生强的光信号, 可用于均相免疫分析。

为实现这一目的, 本发明基于化学发光共振能量转移(chemiluminescence resonance energy transfer, CRET) 原理构建免疫分析纳米器件, 这种纳米器件由过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)、免疫复合物和能量受体纳米粒子碲化镉量子点组成, 是以一种基于化学发光共振能量转移原理发光的碲化镉量子点为核心, 经碲化镉荧光量子点与抗原或抗体以静电或共价作用连接, 过氧化物酶与抗体共价连接, 基于抗原-抗体免疫反应的生物纳米器件。

本发明的方法具体包括如下步骤:

1. 碲氢化钠制备:

将摩尔比为 1:4 至 4:1 的硼氢化钠和碲粉置于水中, 在 0-50℃下反应, 生成碲氢化钠溶液。

2. 水溶性碲化镉量子点的合成:

将 0.00001-0.1 摩尔/升氯化镉和水溶性巯基化合物混合配成溶液, 用氢氧化钠溶液调节 pH 值至 8.0-10.0, 通氮气除氧三十分钟后, 在剧烈的搅拌并在氮气保护下, 注入碲氢化钠溶液, 形成碲化镉单体溶液。碲化镉单体溶液中二价镉离子: 碲氢化钠: 水溶性巯基化合物的摩尔比为 2:1:4 至 2:1:8, 控制碲化镉单体溶液的反应温度为 70-140℃, 反应时间 0.5-20 小时, 得到发光范围在 500 到 750 纳米的一系列碲化镉量子点水溶液。

3. 水溶性碲化镉量子点-抗原（或抗体）生物标记物溶液的制备

将 0.001-5 毫克/毫升碲化镉量子点，乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐（EDC）、抗原（或抗体），置于 0.01 摩尔/升、pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液中混合均匀，碲化镉量子点、乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐、抗原（或抗体）的摩尔比为 1:100:0.2 至 1:1000:6，将混合溶液于常温下避光反应 2-4 小时。采用超滤法纯化得到碲化镉量子点-抗原（或抗体）生物标记物溶液。最后置于 4 摄氏度冰箱处保存备用。

4. 过氧化物酶和抗体（或抗原）的共价连接。

将 0.001-4 毫克/毫升过氧化物酶、EDC 和 N-羟基丁二酰亚胺置于 0.01 摩尔/升 pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液中，混合反应约 15 分钟，采用超滤法纯化此反应溶液。然后在此纯化了了的溶液中加入 0.001-3 毫克/毫升抗体（或抗原）。过氧化物酶、EDC、抗体或抗原的摩尔比为 1:100:0.2 至 1:200:5，将混合溶液于常温下避光反应 1-2 小时。采用超滤法纯化得到过氧化物酶-抗体（或抗原）生物标记物溶液。最后置于 4 摄氏度冰箱处保存备用。

5. 基于抗原-抗体免疫反应，构建过氧化物酶-免疫复合物-碲化镉量子点生物纳米器件。

分别取 5-50 微升碲化镉量子点-抗原（或抗体）生物标记物溶液和过氧化物酶-抗体（抗原）生物标记物溶液置于微型管中，然后用 0.01 摩尔/升 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释至 500 微升，漩涡混合均匀，最后至 37 摄氏度恒温 2-3 小时，得到碲化镉量子点-抗原-抗体-过氧化物酶免疫纳米器件，或碲化镉量子点-抗体-抗原-过氧化物酶免疫纳米器件。

取出纳米器件，即可用于化学发光共振能量转移分析。

本发明的生物纳米器件由过氧化物酶、免疫复合物、能量受体荧光纳米粒子组成。

本发明所述的免疫复合物由抗原和抗体发生特异性结合得到（如牛血清白蛋白和牛血清白蛋白抗体结合得到的免疫复合物）。所述的免疫复合物中抗原包括牛血清白蛋白，癌胚抗原， α -胎甲球蛋白，降钙素，甲状腺蛋白，癌抗原 CA 125，

癌抗原 CA 15-3 和癌抗原 CA19-9 等。

本发明所述的能量受体荧光纳米粒子为水相合成不同尺寸的巯基丙酸修饰的碲化镉量子点，其发射波长为 500-750 纳米，量子产率为 20-60%，其表面修饰有多个羧基 (-COOH)，用于与蛋白质(如抗原)上的氨基(-NH₂) 共价连接。

在本发明中，建立了一种基于化学发光物质为能量供体和荧光量子点为能量受体的新型共振能量转移，即化学发光共振能量转移，它与生物发光共振能量转移较为相似。化学发光共振能量转移是指基于反应底物氧化后的化学发光试剂供体和适合的受体间的非辐射共振能量转移。它与荧光共振能量转移之间的区别主要在于荧光共振能量转移过程需要外加的光源而化学发光共振能量转移基于反应底物（如鲁米诺，luminol）氧化而产生，并不需要外加光源。由于减少了背景荧光干扰，它相对于荧光共振能量转移而言具有更高的灵敏度（即信噪比）。

制备的免疫复合物纳米器件可用于均相免疫分析，包括夹心法和竞争法两种。在竞争法中，荧光量子点和过氧化物酶分别标记一对抗原、抗体中的一种，分别形成荧光量子点—抗体和过氧化物酶—抗原，它们因免疫反应而聚集在一起，发生化学发光共振能量转移，当待测样品中存在相应的未标记的抗原或抗体时，就可能与已标记的抗原或抗体竞争，发生取代而生成无化学发光共振能量转移的免疫复合物，使检测信号减少。

本发明的方法成本低，操作简便，条件温和。产物生物纳米器件具有水溶性和稳定性好，荧光量子产率高，发光范围宽等特点，用于化学发光共振能量转移，不需要外加激光光源。制备的免疫复合物纳米器件可用于均相免疫分析。

附图说明

图 1 为基于抗原和抗体免疫反应的免疫分析纳米器件示意图。

图 2 为分别用不同尺寸的碲化镉量子点为能量受体的免疫分析纳米器件化学发光共振能量转移谱图。所用量子点发光波长分别为 557 纳米，587 纳米，622 纳米和 657 纳米。

具体实施方式

以下结合附图并通过几个具体实施例对本发明的技术方案作进一步描述。

本发明制备的生物纳米器件结构如图 1 所示, 由过氧化物酶、免疫复合物和纳米粒子碲化镉量子点构成。在图 1 中, 化学发光物质鲁米诺作为能量供体, 碲化镉量子点作为能量受体。碲化镉量子点与抗原连接, 而过氧化物酶与抗体连接。当碲化镉量子点—抗原与过氧化物酶—抗体标记物发生免疫反应时, 化学发光共振能量转移发生。

实施例 1

(1) 碲氢化钠制备:

将 80 毫克碲粉、80 毫克硼氢化钠和 2 毫升水放在一个 10 毫升的小烧瓶中, 在室温下反应 8 小时, 制备得到碲氢化钠溶液。

(2) 水溶性碲化镉量子点的合成:

将 0.00125 摩尔/升氯化镉和 0.003 摩尔/升巯基丙酸混合配成溶液, 用氢氧化钠溶液调节 pH 值至 8.0-9.0, 通氮气除氧三十分钟后, 在剧烈的搅拌并在氮气保护下, 注入碲氢化钠溶液, 形成碲化镉单体溶液。加入的二价镉离子: 碲氢化钠: 巯基丙酸摩尔比为 2:1:4.8。将已经得到的前驱体溶液放入微波消解罐, 通过微波辐射加热。控制反应时间 0.5-2 小时, 得到水溶性碲化镉量子点量子产率为 20-60%, 发射波长为 500-750 纳米。

(3) 通过静电作用制备碲化镉量子点—牛血清白蛋白生物标记物

含 5 毫克/毫升碲化镉量子点, 6 毫克/毫升牛血清白蛋白于 0.01 摩尔/升 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液混合均匀, 混合溶液于常温下避光反应 1-2 小时。采用超滤法纯化量子点生物标记物。最后至 4 摄氏度冰箱处保存备用。

(4) 兔抗牛血清白蛋白抗体—过氧化物酶标记物的制备

含 4 毫克/毫升过氧化物酶, 2 毫克/毫升 EDC 和 3 毫克/毫升 N-羟基丁二酰亚胺于 0.01 摩尔/升 pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液中混合反应约 15 分钟, 采用超滤法纯化该反应溶液。然后在此纯化的溶液中加入 10 毫克/毫升兔抗牛血清白蛋白抗体溶液。混合溶液于常温下避光反应 1-2 小时。采用超滤法纯化此生物标记物, 最后至 4 摄氏度冰箱处保存备用。

(5) 通过免疫反应制备免疫分析纳米器件

分别取 5 微升纯化的量子点-牛血清白蛋白标记溶液和兔抗牛血清白蛋白抗体-过氧化物酶标记溶液置于微型管中，然后用 0.01 摩尔/升 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释至 500 微升，漩涡混合均匀，最后至 37°C 恒温 2-3 小时，得到量子点-牛血清白蛋白-兔抗牛血清白蛋白抗体-过氧化物酶纳米器件。取出反应溶液用于化学发光共振能量转移分析，分析结果如图 2 所示。在图 2 中，采用四种不同尺寸发射波长为 557, 587, 622 和 657 纳米的碲化镉量子点分别用作能量受体。实验结果显示当抗原牛血清白蛋白-碲化镉量子点标记物与过氧化物酶-牛血清白蛋白抗体标记物发生免疫反应时，产生了化学发光共振能量转移。图 2 中第一个峰为鲁米诺发光峰（左），后面四个的峰为碲化镉量子点发光峰。

实施例 2

(1) 碲氢化钠制备同实施例 1。

(2) 水溶性碲化镉量子点的合成同实施例 1。

(3) 碲化镉量子点-癌抗原 125 (CA125) 生物标记物的制备

将含 0.3 毫克/毫升碲化镉量子点，0.6 毫克/毫升 EDC 和 0.3 毫克/毫升 CA 125 于 0.01 摩尔/升 pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液中混合均匀，混合溶液于常温下避光反应 2-4 小时。采用超滤法纯化量子点生物标记物。最后至 4 摄氏度冰箱处保存备用。

(4) CA 125 抗体-过氧化物酶标记物的制备

取 0.2 毫克/毫升过氧化物酶溶液，0.2 毫克/毫升 EDC 溶液和 0.3 毫克/毫升 N-羟基丁二酰亚胺于 0.01 摩尔/升 pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液混合反应约 15 分钟，采用超滤法纯化该反应溶液。然后在此纯化了的溶液中加入 CA 125 抗体溶液，混合溶液于常温下避光反应 1-2 小时。标记溶液置于磁力搅拌器上匀速搅拌，使其反应均匀。采用超滤法纯化此生物标记物，最后至 4 摄氏度冰箱处保存备用。

(5) 通过免疫反应制备免疫分析纳米器件

分别取 50 微升纯化的量子点-CA 125 标记溶液和 CA 125 抗体-过氧化物酶

标记溶液置于微型管中，然后用 0.01 摩尔/升 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液稀释至 500 微升，漩涡混合均匀，最后至 37 摄氏度恒温 2-3 小时，得到量子点—CA 125—CA 125 抗体-过氧化物酶纳米器件。取出反应溶液，用于化学发光共振能量转移分析。

实施例 3

(1) 碲氢化钠制备同实施例 1。

(2) 水溶性碲化镉量子点的合成同实施例 1。

(3) 碲化镉量子点—癌抗原 19-9 (CA 19-9)生物标记物的制备

将含 0.05 毫克/毫升碲化镉量子点,0.1 毫克/毫升 EDC 和 0.05 毫克/毫升 CA 19-9 于 0.01 摩尔/升 pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液中混合均匀，混合溶液于常温下避光反应 2-4 小时。采用超滤法纯化量子点生物标记物。最后至 4 摄氏度冰箱处保存备用。

(4) CA19-9 抗体—过氧化物酶标记物的制备

将含 0.04 毫克/毫升过氧化物酶溶液，0.04 毫克/毫升 EDC 溶液和 0.06 毫克/毫升 N-羟基丁二酰亚胺于 0.01 摩尔/升, pH 值为 7.0 的磷酸盐缓冲液中混合反应约 15 分钟,采用超滤法纯化该反应溶液。然后在此纯化的溶液中加入 0.1 毫克/毫升 CA 19-9 抗体溶液，混合溶液于常温下避光反应 1-2 小时。标记溶液置于磁力搅拌器上匀速搅拌，使其反应均匀。采用超滤法纯化此生物标记物，最后至 4 摄氏度冰箱处保存备用。

(5) 通过免疫反应制备免疫分析纳米器件

分别取 50 微升纯化的量子点—CA 19-9 标记溶液和 CA 19-9 抗体—过氧化物酶标记溶液置于微型管中，然后用 0.01 摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稀释至 500 微升，漩涡混合均匀，最后至 37 摄氏度恒温 2-3 小时，得到量子点—CA 19-9—CA 19-9 抗体—过氧化物酶纳米器件。取出反应溶液，用于化学发光共振能量转移分析。

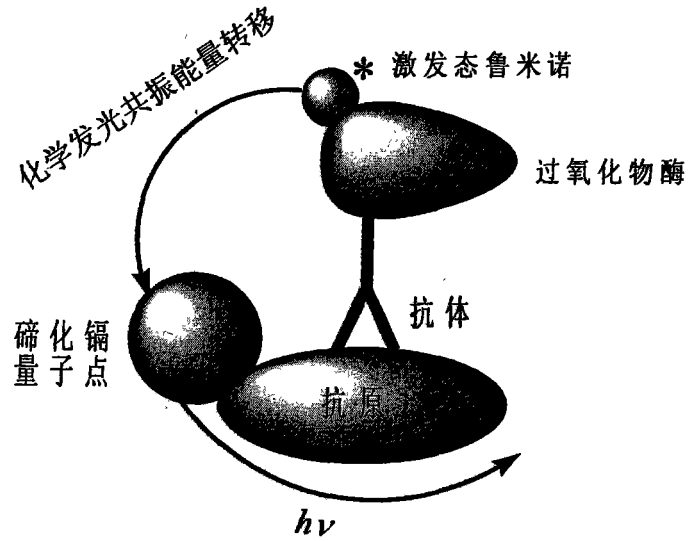


图 1

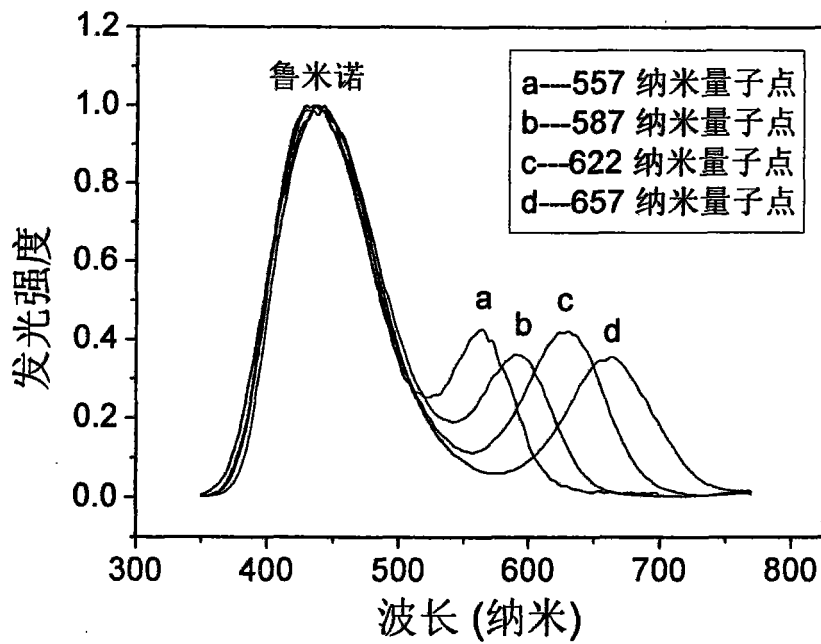


图 2

专利名称(译)	均相免疫分析纳米器件的构建方法		
公开(公告)号	CN101059508A	公开(公告)日	2007-10-24
申请号	CN200710040475.3	申请日	2007-05-10
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	任吉存 黄香宜		
发明人	任吉存 黄香宜		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/76		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种均相免疫分析纳米器件的构建方法，这种纳米器件由过氧化物酶、免疫复合物和能量受体纳米粒子碲化镉量子点组成，是以一种基于化学发光共振能量转移原理发光的碲化镉量子点为核心，经碲化镉荧光量子点与抗原或抗体以静电或共价作用连接，过氧化物酶与抗体共价连接，基于抗原—抗体免疫反应的生物纳米器件。这种免疫分析纳米器件具有良好的水溶性和稳定性，发射波长可调，不需要外加激光光源，背景干扰小，通过化学发光共振能量转移产生强的光信号，可用于均相免疫分析。

