



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109307775 A

(43)申请公布日 2019.02.05

(21)申请号 201811328067.2

(22)申请日 2018.11.09

(71)申请人 郑州安图生物工程股份有限公司

地址 450016 河南省郑州市经济技术开发区
经开第十五大街199号

(72)发明人 付清山 于林 李静辉 李奎

刘功成 付光宇 吴学炜 苗拥军

(74)专利代理机构 郑州异开专利事务所(普通
合伙) 41114

代理人 王霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

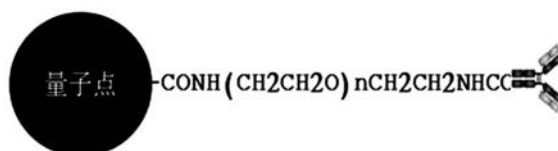
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种量子点标记免疫球蛋白的方法

(57)摘要

本发明公开了一种量子点标记免疫球蛋白的方法,首先将量子点活化、清洗备用;将连接臂加入到量子点溶液中,加入双氨基聚乙二醇在20~25℃条件下持续震荡3~5h;得到的反应物清洗后保存在pH7.4的0.05MPB溶液中备用;活化免疫球蛋白后,将得到的反应物溶液加入其中并超声1~3min后,置于20~25℃条件下持续震荡3~5h;反应液中加入封闭剂,20~25℃条件下持续震荡1~2h,离心,弃上清,得到量子点-连接臂-免疫球蛋白偶联物,保存在4℃备用。本发明利用连接臂将免疫球蛋白和量子点进行偶联,通过连接臂的长度可以有效的避免量子点和免疫球蛋白的位阻效应,大大提高免疫球蛋白的反应活性;利用本发明的偶联物进行免疫检测时可以大大提高产品的敏感性和稳定性。



1. 一种量子点标记免疫球蛋白的方法,其特征在于:所述量子点和免疫球蛋白之间通过连接臂进行偶联,其具体步骤为:

第一步,将量子点活化、清洗,保存于pH7.4的0.05MPB溶液中备用;

第二步,将连接臂加入到第一步的量子点溶液中,并按照量子点:双氨基聚乙二醇=1:1之比例加入双氨基聚乙二醇在20~25℃条件下持续震荡3~5h,进行反应;

第三步,将第二步得到的反应物清洗后保存在pH7.4的0.05MPB溶液中备用;

第四步,活化免疫球蛋白后,将第三步得到的溶液加入其中并超声1~3min后,置于20~25℃条件下持续震荡3~5h,进行反应;

第五步,将第四步的反应液中加入封闭剂,20~25℃条件下持续震荡1~2h,离心,弃上清,得到量子点-连接臂-免疫球蛋白偶联物,保存在4℃备用。

2. 根据权利要求1所述的量子点标记免疫球蛋白的方法,其特征在于:所述第四步活化免疫球蛋白时,需要将EDC、NHS、免疫球蛋白按2~4: 2~4:1~5之比例同时溶解在pH5.5的0.05M MES中,2~8℃条件下持续震荡1~2h。

3. 根据权利要求2所述的量子点标记免疫球蛋白的方法,其特征在于:所述EDC、NHS、免疫球蛋白之间的比例为2: 4:1。

4. 根据权利要求1所述的量子点标记免疫球蛋白的方法,其特征在于:所述连接臂为两端修饰有氨基的聚合物。

5. 根据权利要求4所述的量子点标记免疫球蛋白的方法,其特征在于:所述聚合物为双氨基聚乙二醇,Mw为400,600,800,1000,2000,3400,5000,10000,20000。

6. 根据权利要求4所述的量子点标记免疫球蛋白的方法,其特征在于:所述第五步中所用的封闭剂为浓度5mg/ml的 BSA溶液和浓度1mg/ml的精氨酸溶液,所用溶剂为pH5.5的0.05M MES。

7. 根据权利要求1所述的量子点标记免疫球蛋白的方法,其特征在于:所述量子点为表面带有羧基的核壳量子点。

8. 根据权利要求7所述的量子点标记免疫球蛋白的方法,其特征在于:所述核壳量子点为CdTe/CdS、CdSe/CdS、CdSe/ZnSe 或CdSe/ZnS。

一种量子点标记免疫球蛋白的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米生物技术,尤其是涉及一种量子点标记免疫球蛋白的方法。

背景技术

[0002] 量子点(QDs)是一种零维半导体纳米晶体,近似球形,直径1-12nm。量子点具有灵敏度高,稳定性好,激发光谱宽,发射峰窄,荧光寿命长和较大的斯托克斯位移等优势,是新一代荧光标记探针的最佳选择。

[0003] 目前在蛋白质上偶联量子点应用于免疫检测的实用技术已达到广泛应用。2009年张国华等在《食品科学》(2009,vol.30.No.12P254-257)发表了用水溶性量子点标记莱克多巴胺抗体的方法。2010年胡华军等在《分析化学》(2010,vol.38.No.12P1727-1731)发表了量子点标记克伦特罗抗体的方法。申请号为201210431798.6的中国专利“一种量子点标记蛋白的方法”描述了在蛋白上表达一个组氨酸标签序列(Histag),然后将带组氨酸标签的蛋白与量子点混合,得到量子点标记的复合物。申请号为201310485455.2的中国专利“一种量子点标记免疫球蛋白的方法”描述的是将免疫球蛋白通过量子点的羧基经过EDC缩合直接偶联在量子点表面。

[0004] 上述几种量子点偶联蛋白质的方法中有一个共性,就是通过EDC活化量子点表面羧基后直接偶联免疫球蛋白,这种偶联方法是通过缩合反应将免疫球蛋白直接连接在量子点表面上,二者之间几乎没有物理距离。由于空间位阻作用,很多免疫球蛋白的反应活性由于没有物理距离而无法发挥,使得偶联物量子点-免疫球蛋白利用率不高。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种能提高偶联物活性的量子点标记免疫球蛋白的方法。

[0006] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

本发明所述的量子点标记免疫球蛋白的方法,是利用连接臂对所述量子点和免疫球蛋白进行偶联,其具体步骤为:

第一步,将量子点活化、清洗,保存于pH7.4的0.05M PB(磷酸盐)溶液中备用;

第二步,将连接臂加入到第一步的量子点溶液中,并按照量子点:双氨基聚乙二醇=1:1之比例加入双氨基聚乙二醇在20~25℃条件下持续震荡3~5h,进行反应;

第三步,将第二步得到的反应物清洗后保存在pH7.4的0.05MPB(磷酸盐)溶液中备用;

第四步,活化免疫球蛋白后,将第三步得到的溶液加入其中并超声1~3min后,置于20~25℃条件下持续震荡3~5h,进行反应;

第五步,将第四步的反应液中加入封闭剂,20~25℃条件下持续震荡1~2h,离心,弃上清,得到量子点-连接臂-免疫球蛋白偶联物,保存在4℃备用。

[0007] 所述第四步活化免疫球蛋白时,需要将EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺)、NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)、免疫球蛋白按2~4: 2~4:1~5(质量比)之比例同时溶解在pH5.5的0.05M MES(2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物)中,2~8℃条件下持续震荡1~2h。

- [0008] 所述EDC、NHS、免疫球蛋白之间的比例为2: 4:1。
- [0009] 所述连接臂为两端修饰有氨基的聚合物。
- [0010] 所述聚合物为双氨基聚乙二醇,Mw(分子量)为400,600,800,1000,2000,3400,5000,10000,20000。
- [0011] 所述第五步中所用的封闭剂为浓度5mg/ml的 BSA(牛血清白蛋白)溶液和浓度1mg/ml的精氨酸溶液,所用配制溶剂为pH5.5的0.05M MES。
- [0012] 所述量子点为表面带有羧基的核壳量子点。
- [0013] 所述核壳量子点为CdTe/CdS(碲化镉-硫化镉)、CdSe/CdS(硒化镉-硫化镉)、CdSe/ZnSe(硒化镉-硒化锌) 或CdSe/ZnS(硒化镉壳-硫化锌)。
- [0014] 本发明利用连接臂将免疫球蛋白和量子点进行偶联,通过连接臂的长度可以有效的避免量子点和免疫球蛋白的位阻效应,大大提高免疫球蛋白的反应活性;利用本发明的偶联物进行免疫检测时可以大大提高产品的敏感性和稳定性。

附图说明

- [0015] 图1是采用本发明方法得到的偶联物的结构示意图。
- [0016] 图2是常规EDC缩合反应得到的偶联物的结构示意图。
- [0017] 图3是偶联物的荧光强度变化对比图。

具体实施方式

[0018] 下面通过具体实施例的对比对本发明方法做更加详细的说明,以便于本领域技术人员的理解。如无特殊说明,本发明所用的试剂和仪器为本领域的市售产品,本发明采用的试验方法为本领域常规方法。

[0019] 实施例1 量子点通过连接臂偶联心肌钙蛋白I(TnI)抗体(本发明方法)
其具体步骤如下:

(1)活化量子点(QDs):使用40ugEDC、80ugNHS、20ugCdSe/ZnS溶解在1ml 0.05M MES (pH5.5)中,2~8℃反应30~60min。

[0020] (2)清洗量子点:上述物质经过30min离心(转速10000rpm)后弃去上清;加入1ml 0.05M PB(pH7.4)混匀后,再次离心弃上清,并保存在1ml0.05MPB(pH7.4)中备用。

[0021] (3)添加连接臂:将连接臂20ug(双氨基聚乙二醇,Mw5000)加入步骤(2)的量子点溶液中。

[0022] (4)偶联连接臂:将步骤3中的溶液置于20~25℃条件下持续震荡3~5h,得到反应液。

[0023] (5)清洗:将步骤4中的反应液离心30min(转速10000rpm)后弃上清,加入1ml0.05MPB(pH7.4)混匀后再次离心30min(转速10000rpm)后弃上清,并保存在1ml0.05MPB(pH7.4)中备用。

[0024] (6)活化免疫蛋白:将40ugEDC、80ugNHS、60ug免疫球蛋白(心肌钙蛋白I(TnI)抗体)溶解在0.05M MES (pH5.5)中,2~8℃反应30~60min。

[0025] (7)偶联:将步骤(5)和步骤(6)的溶液混匀并超声1~3min后,置于20~25℃条件下持续震荡3~5h,得到反应液。

[0026] (8) 封闭: 在步骤(7)中加入封闭剂2ml (BSA10mg, 精氨酸2mg一起溶解在2ml pH5.5的0.05M MES溶液中) 20~25℃下持续震荡1~2h, 得到反应液。

[0027] (9) 分离: 将步骤(8)中的反应液离心30min (转速10000rpm) 后弃上清, 得到量子点-连接臂-免疫球蛋白偶联物, 保存在400u 0.05M PB (pH7.40) 中 (其中含有5mg/ml BSA和1mg/ml 精氨酸)。得到的量子点-连接臂-免疫球蛋白偶联物结构图如图1所示。

[0028] 实施例2 量子点偶联心肌钙蛋白I (TnI) 抗体 (常规方法)

其具体步骤为:

(1) 活化量子点 (QDs): 使用40ug EDC、80ug NHS、20ug CdSe/ZnS 溶解在1ml 0.05M MES (pH5.5) 中, 2~8℃反应30~60min。

[0029] (2) 清洗量子点: 上述物质经过30min离心 (转速10000rpm) 后弃去上清; 加入1ml 0.05M PB (pH7.4) 混匀后, 再次离心弃上清, 并保存在1ml 0.05M PB (pH7.4) 中备用。

[0030] (3) 偶联免疫蛋白: 使用60ug 免疫球蛋白溶解在1ml 的0.05M MES (pH5.5) 中, 混匀超声1~3min后, 置于20~25℃条件下持续震荡3~5h, 得反应液。

[0031] (4) 封闭: 在步骤(3)的反应液中加入封闭剂BSA10mg, 精氨酸2mg, 20~25℃条件下持续震荡1~2h, 得反应液。

[0032] (5) 分离: 将步骤(4)中的反应液离心30min (转速10000rpm) 后弃上清, 得到量子点-免疫球蛋白偶联物, 保存在400ul 0.05M PB (pH7.44) 中 (其中含有5mg/ml BSA和1mg/ml 精氨酸)。得到的量子点-免疫球蛋白偶联物的结构图如图2所示。

[0033] 实施例3 实施例1 (本发明) 和实施例2 (常规方法) 两种偶联方法所得的偶联物对比试验

1、偶联物对免疫检测敏感性的影响

分别将实施例1和实施例2得到的偶联物以3.0ul/cm喷涂在2个玻璃纤维素垫上, 37℃干燥后, 将另一株TnI抗体以1.0mg/ml, 1.2ul/cm的量包被在硝酸纤维素膜上, 37℃干燥备用。在单面塑料板上, 依次粘贴上玻璃纤维素垫、涂有标记产物的玻璃纤维素垫、吸水玻璃纤维素膜、已包被抗体的硝酸纤维素膜, 最后贴上长30 厘米, 宽2 厘米的吸水纸, 吸收层析后多余的溶液, 膜与膜之间都要紧密相连, 制成免疫层析试纸大板, 用切条机将粘贴好的塑料板纵向切成4mm 宽的免疫试纸条, 将4mm 宽的免疫试纸条样品垫一端插入待测血清中, 层析作用15 分钟后, 在荧光仪器上测试不同浓度的TnI血清。测试结果见下表1:

表1

TnI 浓度 ^o	实施例 1 检测信号 ^o	实施例 2 检测信号 ^o
0ng/ml-基质血清 ^o	31 ^o	25 ^o
0.002ng/ml ^o	28 ^o	23 ^o
0.004ng/ml ^o	30 ^o	27 ^o
0.008ng/ml ^o	82 ^o	31 ^o
0.02ng/ml ^o	260 ^o	29 ^o
0.08ng/ml ^o	890 ^o	120 ^o
0.1ng/ml ^o	1540 ^o	276 ^o
0.3ng/ml ^o	4200 ^o	840 ^o
0.5ng/ml ^o	7630 ^o	1620 ^o

结论:表1数据表明,采用本发明偶联方法得到的偶联物对免疫检测的敏感性较传统方法得到的偶联物提升10倍左右,效果非常明显。

[0034] 2、偶联物荧光稳定性的对比

分别将实施例1和实施例2得到的偶联物放到室温条件下(1天,5天,10天,15天,23天,25天),以3.0ul/cm分别喷涂在2个玻璃纤维素垫上,37℃干燥后,将另一株TnI抗体以1.0mg/ml,1.2ul/cm的量包被在硝酸纤维素膜上,37℃干燥备用。在单面塑料板上,依次粘贴上玻璃纤维素垫、涂有标记产物的玻璃纤维素垫、吸水玻璃纤维素膜、已包被抗体的硝酸纤维素膜,最后贴上长30 厘米,宽2 厘米的吸水纸,吸收层析后多余的溶液,膜与膜之间都要紧密相连,制成免疫层析试纸大板,用切条机将粘贴好的塑料板纵向切成4mm 宽的免疫试纸条,将4mm 宽的免疫试纸条样品垫一端插入待测血清中,层析作用15 分钟后,在荧光仪器上测试荧光强度,变化如图3所示。

[0035] 结论:根据图3的变化趋势表明,采用本发明偶联方法得到的偶联物稳定性良好,可以稳定25天,常规的方法可以稳定15天,稳定性得到了提升。

[0036] 3、量子点偶联心肌钙蛋白I (TnI) 抗体批量放大试验

按照实施例1的方法将批量放大10倍和100倍,其检测信号结果见下表2。表2

TnI 浓度 ^o	方案 1 检测信号 ^o	方案 1-10 检测信号 ^o	方案 1-100 检测信号 ^o
0ng/ml-基质血清 ^o	31 ^o	34 ^o	28 ^o
0.002ng/ml ^o	28 ^o	30 ^o	35 ^o
0.004ng/ml ^o	30 ^o	41 ^o	34 ^o
0.008ng/ml ^o	82 ^o	92 ^o	87 ^o
0.02ng/ml ^o	260 ^o	280 ^o	270 ^o
0.08ng/ml ^o	890 ^o	900 ^o	850 ^o
0.1ng/ml ^o	1540 ^o	1620 ^o	1590 ^o
0.3ng/ml ^o	4200 ^o	4100 ^o	4000 ^o
0.5ng/ml ^o	7630 ^o	7500 ^o	7700 ^o

结论:从表2数据可以看出,本发明的标记方法对批量放大后的偶联物没有影响和差异,可以批量的应用于后续生产。

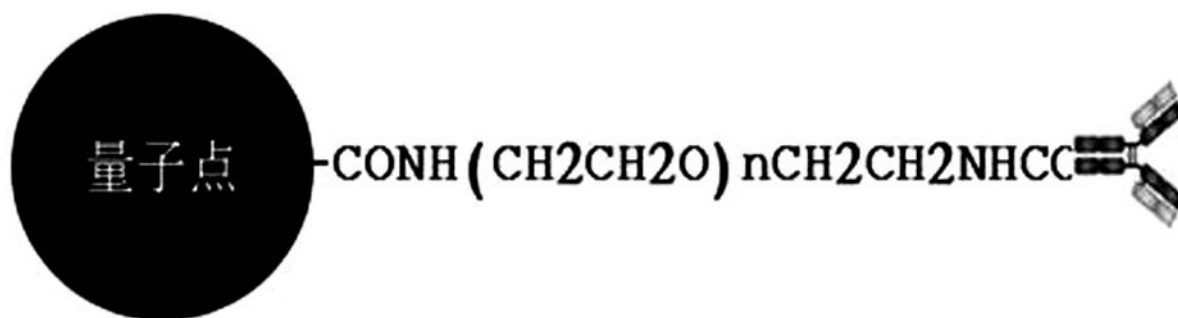


图1



图2

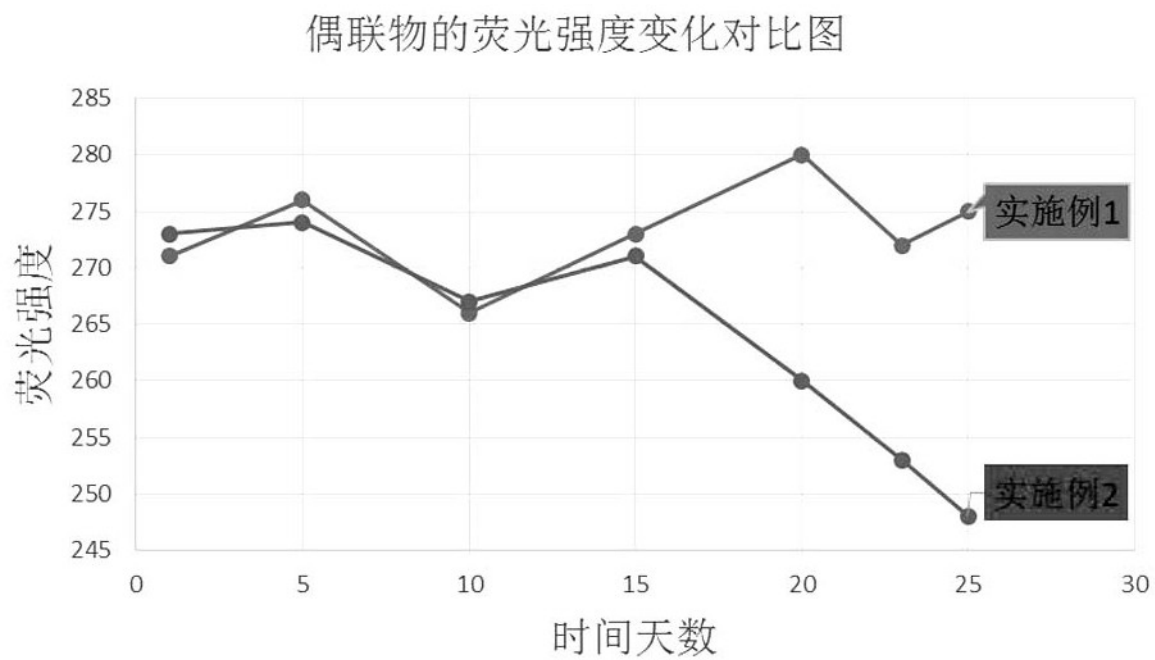


图3

专利名称(译)	一种量子点标记免疫球蛋白的方法		
公开(公告)号	CN109307775A	公开(公告)日	2019-02-05
申请号	CN201811328067.2	申请日	2018-11-09
[标]申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
[标]发明人	付清山 于林 李静辉 李奎 刘功成 付光宇 吴学炜 苗拥军		
发明人	付清山 于林 李静辉 李奎 刘功成 付光宇 吴学炜 苗拥军		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/533		
代理人(译)	王霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种量子点标记免疫球蛋白的方法，首先将量子点活化、清洗备用；将连接臂加入到量子点溶液中，加入双氨基聚乙二醇在20~25℃条件下持续震荡3~5h；得到的反应物清洗后保存在pH7.4的0.05 MPB溶液中备用；活化免疫球蛋白后，将得到的反应物溶液加入其中并超声1~3min后，置于20~25℃条件下持续震荡3~5h；反应液中加入封闭剂，20~25℃条件下持续震荡1~2h，离心，弃上清，得到量子点-连接臂-免疫球蛋白偶联物，保存在4℃备用。本发明利用连接臂将免疫球蛋白和量子点进行偶联，通过连接臂的长度可以有效的避免量子点和免疫球蛋白的位阻效应，大大提高免疫球蛋白的反应活性；利用本发明的偶联物进行免疫检测时可以大大提高产品的敏感性和稳定性。

