



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110763834 A

(43)申请公布日 2020.02.07

(21)申请号 201810826421.8

(22)申请日 2018.07.25

(71)申请人 福建广生堂药业股份有限公司

地址 355399 福建省宁德市柘荣县东源乡
富源工业区

(72)发明人 刘婕 张芳 温莹 黄志宁
吴文强

(74)专利代理机构 北京易捷胜知识产权代理事
务所(普通合伙) 11613

代理人 齐胜杰

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页

(54)发明名称

一种检测免疫标志物含量的方法、试剂和试
剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种检测免疫标志物含量的
方法及试剂盒,其中所述方法其包括以下步骤:
步骤a):表面修饰免疫标志物抗原的磁性纳米颗
粒制备;步骤b):表面修饰免疫标志物抗体的荧
光量子点制备;步骤c):免疫标志物含量的检测:
将含有免疫标志物的待检样本与步骤a)经修饰
免疫标志物抗原的磁性纳米颗粒混合均匀,加入
修饰免疫标志物抗体的量子点孵育;步骤d):磁
性分离去除磁性纳米颗粒—量子点免疫复合物
及剩余未结合的抗原修饰的磁性纳米颗粒;步骤
e):测定上清液荧光强度或复溶的磁性纳米免疫
复合物得到待检样本中免疫标志物的含量。利用
本发明的方法能够显著提高血清标志物的检测
灵敏度和检测效率,实现了对标志物灵敏高效、
快速便捷的检测要求。

A
CN 110763834

CN

1. 一种检测免疫标志物含量的方法,其包括以下步骤:

步骤a) :表面修饰免疫标志物抗原的磁性纳米颗粒制备;

步骤b) :表面修饰免疫标志物抗体的荧光量子点制备;

步骤c) :免疫标志物含量的检测:将含有免疫标志物的待检样本与步骤a) 经修饰免疫标志物抗原的磁性纳米颗粒混合均匀,加入修饰免疫标志物抗体的量子点孵育;

步骤d) :磁性分离去除磁性纳米颗粒—量子点免疫复合物及剩余未结合的抗原修饰的磁性纳米颗粒;

步骤e) :测定上清液荧光强度或复溶的磁性纳米免疫复合物得到待检样本中免疫标志物的含量。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤c) 中所加入的修饰免疫标志物抗体的量子点优先与待检样本中游离的免疫标志物结合,形成量子点—抗体抗原的免疫复合物。

3. 根据权利要求1-2任一项所述的方法,其特征在于:步骤a) 所制备得到的磁性纳米颗粒表面修饰免疫标志物抗原作为免疫传感探针;步骤b) 所制备得到的荧光量子点修饰能够特异性识别免疫标志物蛋白的抗体作为识别元件和信号产生元件。

4. 如权利要求1-3任一项所述的方法,其中步骤d) 中通过外加磁场分离出去除磁性纳米颗粒—量子点免疫复合物。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于包括如下步骤:

a) 表面修饰免疫标志物抗原的磁性纳米颗粒和修饰免疫标志物抗体的荧光量子点采用生物素-链霉亲和素(Biotin-Streptavidin) 和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 体系催化化学交联方法进行修饰。

6. 如权利要求5所述的方法,其中所述表面修饰免疫标志物抗原的磁性纳米颗粒制备方法如下:①将磁性纳米颗粒(MPs) 制备成磁微粒悬浮液,加入链霉亲和素(SA) 混合均匀,再迅速加入一定比例的EDC、NHS和缓冲液,然后混匀、过膜、离心,得到所需的修饰链霉亲和素的磁珠,即MPs-SA;②将预先离心、吹吸混匀的免疫标志物抗原与生物素按一定比例混合均匀,然后用脱盐柱去除多余的游离生物素,经洗脱、离心后得到所需的生物素化抗原,即Biotin-Ag;③将MPs-SA溶液与Biotin-Ag溶液混合孵育后磁性分离并移除上清,用缓冲液重悬、洗涤、稀释后储存于4℃以构建免疫传感探针,即所述表面修饰免疫标志物抗原的磁性纳米颗粒。

7. 如权利要求1所述的方法,其中步骤b) 中所述表面修饰免疫标志物抗体的荧光量子点制备方法如下:①将量子点加入链霉亲和素混合均匀,再迅速加入一定比例的EDC、NHS和缓冲液,然后混匀、过膜、离心,得到所需的修饰链霉亲和素的量子点,即QDs-SA;②将预先离心、吹吸混匀的免疫标志物抗原与生物素按一定比例混合均匀,然后做脱盐处理,分离纯化后得到所需的生物素化抗原,即Biotin-Ab;③将QDs-SA与Biotin-Ab结合形成识别原件,即所述表面修饰免疫标志物抗体的荧光量子点。

8. 根据权利要求1-7任一项所述的方法,其特征在于:所述的免疫标志物包括肿瘤标志物、血清标志物、接触(暴露)标志物、效应标志物、敏感性标志物以及对于疾病的鉴定、早期诊断及预防、治疗过程中的监控起到帮助作用的生物信号指标或生理活性物质,选自蛋白、酶类、多肽类、激素类、细胞因子、化学分子、黏附分子、可溶性受体。

9. 根据权利要求8所述的肿瘤标志物,选自肝癌标志物、肺癌标志物、胃癌标志物、结直

肠癌标志物、乳腺癌标志物、前列腺癌标志物。

10. 根据权利要求9所述的肿瘤标志物,选自AFP、f-PSA、t-PSA、CA242、CA125、CA153、CA724、SCCA、NSE、CYFRA21-1、Hsp90 α 、GP73、AFP-L3、DCP。

11. 一种试剂盒,包括:表面修饰免疫标志物抗原的磁微粒,表面修饰免疫标志物抗体的荧光量子点,免疫标志物抗原标准品、抗免疫标志物抗体、链霉亲和素、生物素、缓冲液。

一种检测免疫标志物含量的方法、试剂和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种医学检测方法,特别涉及一种免疫标志物量子点荧光检测方法、以及免疫标志物量子点荧光检测试剂和检测试剂盒。

背景技术

[0002] 1、免疫标志物

[0003] 免疫标志物是指可以发生抗原抗体结合反应的生物标志物,是可以标记系统、器官、组织、细胞及亚细胞结构或功能的改变或可能发生的改变的生物指标,可反应机体的炎性反应状态或者免疫应答状态,帮助判断机体是否存在感染、免疫反应的状况以及机体炎症反应的水平、组织损伤的程度(即病情的严重程度)。通过对其测定有助于对疾病的早期辅助诊断、严重程度的评估及预后做出判断,选择适当的治疗,改善预后。

[0004] 免疫标志物包括肿瘤标志物、血清标志物、接触(暴露)标志物、效应标志物、敏感性标志物等对于疾病的鉴定、早期诊断及预防、治疗过程中的监控可能起到帮助作用的生物信号指标或生理活性物质,作为具体例子,可举出蛋白、酶类、多肽类、激素类、细胞因子、化学分子、黏附分子、可溶性受体等,但并不限于这些。

[0005] 2、肿瘤标志物

[0006] 肿瘤标志物又称肿瘤标记物,是指特征性存在于恶性肿瘤细胞,或由恶性肿瘤细胞异常产生的物质,或是宿主对肿瘤的刺激反应而产生的物质,并能反映肿瘤发生、发展,监测肿瘤对治疗反应的一类物质。肿瘤标志物存在于肿瘤患者的组织、体液和排泄物中,能够用免疫学、生物学及化学的方法检测到,肿瘤患者的免疫系统可以识别癌细胞中某些蛋白的改变,并对参与细胞癌变的某些细胞内蛋白作出免疫应答。作为具体例子,可举出肝癌标志物、肺癌标志物、胃癌标志物、结直肠癌标志物、乳腺癌标志物、前列腺癌标志物等,但并不限于这些。

[0007] 目前肿瘤标志物检测已广泛应用于包括肝癌、肺癌、胃癌、结直肠癌、乳腺癌等在内的多个癌种,如CEA作为广谱肿瘤标志物可提示肿瘤的发生率,甲胎蛋白AFP用于肝癌早期辅助诊断,CA19-9、CA72-4、胃蛋白酶原用作胃癌的参考指标,CYFRA21-1是非小细胞肺癌的首选标志物。近年来随着分子生物学、免疫学诊断技术的迅速发展,涌现了许多高灵敏度、高特异性的标志物,如HSP90 α 、GP73、AFP-L3、DCP等,为肿瘤筛查和早期诊断带来了新的发展机遇。

[0008] 3、磁微粒

[0009] 磁微粒(Magnetic Particles, MPs)是具有超顺磁性的纳米颗粒,在其外周包绕大分子,表面修饰成带不同活性集团的微球,其显著特点是在外加磁场条件下迅速向磁性运动而聚集,当撤掉外磁场颗粒失去磁性而能够完全分散。免疫磁性微球(Immunomagnetic Microspheres, IMMS),或称免疫磁珠(Immunomagnetic Beads, IMB),是免疫学和超顺磁性磁珠结合而发展起来的一类新型材料。免疫磁珠是修饰有抗体或具有抗体结合功能的超顺磁性微球,当它与含有靶物质的样品混合孵育时,可与靶物质特异性地结合而形成具有磁

响应性的复合物,此复合物可被磁场滞留,从而与样品中其他杂质分离。免疫磁性分离简便易行,分离纯度高,保留靶物质活性,且高效、快速、低毒,可广泛应用于细胞分离和提纯、免疫检测、免疫纯化、免疫沉淀、体外诊断等领域。

[0010] 在免疫检测中,免疫磁珠替代传统酶标板作为固相载体,修饰在磁珠表面的抗体(或抗原)可与环境中特异性抗原(或抗体)结合,形成抗原—抗体复合物,在外加磁场作用下,使特异性抗原(或抗体)与其它物质分离,这种分离方法使整个反应在液相中进行,克服了放射免疫测定和传统酶联免疫测定方法中抗原抗体反应发生在固/液相之间等的缺点,具有灵敏度高、检测速度快、特异性高、重复性好等优点,因而免疫磁珠法可广泛应用于生物医学检测,如检测体内/外各种抗原或抗体,癌细胞、环境、生物样品及食品中的微生物。更重要的是,该方法能够将待检测物质分离出来,可用于微生物的富集培养及细胞(如癌细胞,巨核细胞及T细胞等)分选等的研究。免疫磁珠还可与化学发光、荧光免疫等技术相结合,从而极大地提高检测灵敏度,对于极微量物质的检出及定量测定等都是一项具有很好应用前景的检测方法。

[0011] 应用抗体与目标抗原之间的特异性亲和吸附作用,表面修饰抗体的免疫磁珠可用于高纯度抗原蛋白的纯化。与传统的金属离子螯合亲和层析、离子交换、疏水层析相结合的蛋白多步层析纯化步骤相比,由于抗体对特定抗原的结合具有极高的特异性,因此一步纯化即可得到纯度大于95%的抗原蛋白产品,大大简化了纯化周期,可为临床免疫检测提供高品质的抗原标准品。

[0012] 4、量子点

[0013] 量子点是零维(Zero-dimensional)的纳米半导体材料,由II-VI族或III-V族元素组成能够接受激发光产生荧光的纳米颗粒,和传统有机常规荧光材料相比,具有特殊的光学特性和很好的光稳定性:

[0014] ①量子点具有其荧光发射波长可通过改变本身的尺寸和组成进行调节的特点。其激发光谱宽而连续,吸光系数大,荧光强度高,荧光发射峰窄而对称,无长波拖尾;

[0015] ②量子点具有较大的斯托克斯位移。激发光的波长和发射光波长的峰值之间差异大,故能避免发射谱与激发谱的重叠;

[0016] ③量子点光稳定性好,耐光漂白。它可以经受反复多次的激发,而不像有机荧光染料那样容易发生光漂白,这为研究细胞中生物分子之间长时间相互作用提供了有力工具。在光激发情况下,大多数的自发荧光已经衰变,而量子点的荧光仍然存在,此时即可得到无背景干扰的荧光信号;

[0017] ④量子点荧光寿命较长。有机荧光染料的荧光寿命一般仅为几纳秒,而具有直接带隙的量子点的荧光寿命可持续数十纳秒(20~50ns),硅量子点的荧光寿命则可持续超过100微秒。染料荧光分子的激发和发射周期一般只有几分钟,而量子点通常可持续几个小时;

[0018] ⑤量子点荧光强度较高。其荧光强度比最常用的有机荧光材料“罗丹明6G”高20倍,稳定性更是“罗丹明6G”的100倍以上;

[0019] ⑥量子点具有单光源多信号检测特性,可实现多组分的同时检测;

[0020] ⑦量子点生物安全性好。经过各种化学修饰之后,可以进行特异性连接,其细胞毒性低,对生物体危害小,可进行生物活体标记和检测。在各种量子点中,硅量子点目前具有

最佳的生物相容性；

[0021] ⑧量子点检测灵敏度极高。硒化镉量子点(CdSe量子点)对紫外可见光具有光敏特性,从而可有效地提高有机分子链霉亲和素检测的灵敏度与信号强度。

[0022] 量子点标记技术具有当前体外和体内标记所没有的独特优势,根据特定的检测对象,可选择合适的生物分子进行修饰,也可修饰抗体检测抗原,或修饰配体定位受体,或修饰探针DNA检测目标DNA等,在生物医学的超痕量分析中具有非常重要的应用价值。生物学与医学研究领域中,探索和发展高灵敏度的非同位素标记检测方法一直是研究者十分关注的课题。量子点(QDs)荧光标记技术作为一种新型的标记方法,在很大程度上克服了传统方法的缺陷,尤其在光稳定性和灵敏度方面有了很大提高,在生物化学、分子生物学和药物筛选生物大分子相互作用等研究中有极大的应用前景,适合开发兼具小仪器快速简便易操作和大仪器高灵敏度和高准确性双重优势的新一代临床诊断技术。

[0023] 5、现有免疫标志物检测方法

[0024] 目前临幊上用于检测免疫标志物的诊断法通常为酶联免疫法、化学发光法、胶体金法、放射免疫法及磁微粒免疫法等。酶联免疫法是一种用酶标记抗原抗体的固相免疫分析技术,其应用较早,成本低廉,广泛运用于各项检测,但该方法分析灵敏度不高,操作复杂耗时长且影响因素多,易造成假阳性和假阴性。化学发光免疫法结合了化学发光法的高灵敏度和免疫分析法的高特异性,具有可全自动化,检测高效的优势,但存在化学反应发光时间短、强度低,本底较高且结果不稳定(重复性和稳定性较差)等缺陷。胶体金标记法,实质上是蛋白质等高分子被吸附到胶体金颗粒表面的修饰过程,其具有方便快捷、稳定性强、结果判断直观等优点,但特异性差,假阳性率高,通常仅用作定性或半定量检测,无法进行准确定量。放射免疫技术是利用放射性核素分析的高灵敏性、精确性与抗原抗体反应的高特异性相结合而创建的一类标记免疫技术,具有灵敏度高、特异性强、重复性好、微量简便等特点,但同时存在放射性污染、同位素衰变和放射性物质半衰期短等缺陷。磁微粒化学发光法便于目标物的提取、分离,检测效率高,但结果不稳定,不易自动化。

[0025] 本发明所述方法规避了上述方法的缺点,在实验验证下证实能够显著提高血清标志物的检测灵敏度和检测效率,实现了对标志物灵敏高效、快速便捷的检测要求。

发明内容

[0026] 本发明基于竞争型免疫检测,提供了一种检测免疫标志物含量的方法,所述方法包括以下步骤:

[0027] 步骤a):表面修饰免疫标志物抗原的磁性纳米颗粒制备;

[0028] 步骤b):表面修饰免疫标志物抗体的荧光量子点制备;

[0029] 步骤c):免疫标志物含量的检测:将含有免疫标志物的待检样本与步骤a)经修饰免疫标志物抗原的磁性纳米颗粒混合均匀,加入修饰免疫标志物抗体的量子点孵育;

[0030] 步骤d):磁性分离去除磁性纳米颗粒—量子点免疫复合物及剩余未结合的抗原修饰的磁性纳米颗粒;

[0031] 步骤e):测定上清液荧光强度或复溶的磁性纳米免疫复合物得到待检样本中免疫标志物的含量。

[0032] 在本发明的方法中,基于竞争型免疫检测,步骤c)中所加入的修饰免疫标志物抗

体的量子点优先与待检样本中游离的免疫标志物结合,形成量子点—抗体抗原的免疫复合物。

[0033] 在本发明的方法中,其中:步骤a)所制备得到的磁性纳米颗粒表面修饰免疫标志物抗原作为免疫传感探针;步骤b)所制备得到的荧光量子点修饰能够特异性识别免疫标志物蛋白的抗体作为识别元件和信号产生元件。

[0034] 在本发明的方法中,其中步骤d)中通过外加磁场分离出去除磁性纳米颗粒—量子点免疫复合物。

[0035] 在本发明的方法中,其包括如下步骤:a)表面修饰免疫标志物抗原的磁性纳米颗粒和修饰免疫标志物抗体的荧光量子点采用生物素-链霉亲和素(Biotin-Streptavidin)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)体系催化化学交联方法进行修饰。

[0036] 在本发明的方法中,其中所述表面修饰免疫标志物抗原的磁性纳米颗粒制备方法如下:①将磁性纳米颗粒(MPs)制备成磁微粒悬浮液,加入链霉亲和素(SA)混合均匀,再迅速加入一定比例的EDC、NHS(质量比为1:10~10:1,优选为1:5~5:1)和PBS缓冲液,然后混匀、过膜、离心,得到所需的修饰链霉亲和素的磁珠,即MPs-SA;②将预先离心、吹吸混匀的免疫标志物抗原与生物素按一定比例(浓度比为1:10~10:1,优选为1:5~5:1)混合均匀,然后用脱盐柱去除多余的游离生物素,经洗脱、离心后得到所需的生物素化抗原,即Biotin-Ag;③将MPs-SA溶液与Biotin-Ag溶液混合孵育后磁性分离并移除上清,用缓冲液重悬、洗涤、稀释后储存于4℃以构建免疫传感探针,即所述表面修饰免疫标志物抗原的磁性纳米颗粒。

[0037] 在本发明的方法中,其中步骤b)中所述表面修饰免疫标志物抗体的荧光量子点制备方法如下:①将量子点加入链霉亲和素混合均匀,再迅速加入一定比例的EDC、NHS和缓冲液,然后混匀、过膜、离心,得到所需的修饰链霉亲和素的量子点,即QDs-SA;②将预先离心、吹吸混匀的免疫标志物抗原与生物素按一定比例混合均匀,然后做脱盐处理,分离纯化后得到所需的生物素化抗原,即Biotin-Ab;③将QDs-SA与Biotin-Ab结合形成识别原件,即所述表面修饰免疫标志物抗体的荧光量子点。

[0038] 在本发明的方法中,其中免疫标志物包括肿瘤标志物、血清标志物、接触(暴露)标志物、效应标志物、敏感性标志物以及对于疾病的鉴定、早期诊断及预防、治疗过程中的监控起到帮助作用的生物信号指标或生理活性物质,优选为蛋白、酶类、多肽类、激素类、细胞因子、化学分子、黏附分子、可溶性受体。其中,肿瘤标志物选自肝癌标志物、肺癌标志物、胃癌标志物、结直肠癌标志物、乳腺癌标志物、前列腺癌标志物,优选为AFP、f-PSA、t-PSA、CA242、CA125、CA153、CA724、SCCA、NSE、CYFRA21-1、Hsp90 α 、GP73、AFP-L3、DCP。

[0039] 本发明所述的方法,其中,缓冲液选自PBS、Borate、EDC、NHS或其他无胺缓冲液的一种或多种的组合,浓度为1~100mM,pH为7.0~10.0;

[0040] 保存液选自:BST缓冲液、Tween-20、NaN₃、BSA的一种或多种的组合,浓度为1~50mM,pH为7.0~10.0。

[0041] 本发明所述方法区别于已有方法的技术特征,能够对广泛的免疫标志物进行快速准确的定量,大大降低了假阳性率。本发明所述方法特征在于:

[0042] a)修饰免疫标志物抗体的荧光量子点优先与待检样本中游离态的免疫标志物结

合,形成量子点—抗体—抗原的免疫复合物;

[0043] b) 过量的修饰免疫标志物抗体的荧光量子点将与修饰了免疫标志物抗原的磁性纳米颗粒,形成磁纳米颗粒抗体—抗原量子点免疫复合物,并通过外加磁场分离出该复合物;

[0044] 特别地:①本发明利用链霉亲和素和生物素的亲和力修饰磁微粒和抗原,能够为分离后磁微粒的释放和切割提供位点,从而保护待测抗原的完整性;②本发明利用量子点作为检测信号,其激发光谱宽而连续稳定,吸光系数大,荧光强度高,安全性好,检测灵敏度高,不易受背景信号的干扰,具有常规荧光材料无法比拟的特性;③本发明利用磁微粒在磁场的富集特性可迅速对目标物进行捕获、沉降、洗脱、分离,易于实现自动化;④同时利用抗原抗体特异性反应、生物素-亲和素系统(BAS)、磁微粒的富集特性以及量子点连接生物活性基团的特征,检测稳定性好、专一性强,不受试剂浓度、pH环境、抑或蛋白变性剂等有机溶剂影响,同时可以构建一个多层次信号放大系统,不依赖特殊仪器扩增标本而放大信号,从而在短时间内高敏感度检出目标抗原。

[0045] 本发明还提供一种采用本发明方法检测免疫标志物的试剂盒,包括:表面修饰免疫标志物抗原的磁微粒,表面修饰免疫标志物抗体的荧光量子点,免疫标志物抗原标准品、抗免疫标志物抗体、链霉亲和素、生物素、缓冲液。

[0046] 优选的采用本发明方法检测免疫标志物的试剂盒,包括:

[0047] 表面修饰免疫标志物抗原的磁微粒,

[0048] 表面修饰免疫标志物抗体的荧光量子点,

[0049] 以及任选的以下组分:免疫标志物抗原标准品、抗免疫标志物抗体、链霉亲和素、生物素、缓冲液、保存液、磁力架等。

[0050] 本发明所述的试剂盒,包括:盒体、盒体内的试剂,试剂槽,说明书,所述试剂放置在试剂槽中。

[0051] 本发明的目的在于提供:与以往的方法相比,简便快速,高灵敏度,高准确性,安全无毒,可回收的免疫标志物磁微粒量子点免疫荧光检测方法,以及其检测试剂和检测试剂盒。

[0052] 本发明人对于免疫标志物的检测方法进行了深入的研究,结果发现:通过磁微粒分离荧光量子点免疫分析技术,与以往的方法相比,具有简便快速,灵敏度高,准确性高,安全无毒,可回收等优点,从而完成了本发明。

具体实施方式

[0053] 在描述具体实施例之前,应当理解本发明不限于所述的具体方法和实验条件,因为这些具体描述的各技术条件特征可根据需要进行调整和变化,从而构成新的或优选的技术方案。

[0054] 检测的方法学指标:

[0055] ①检测范围:0~1000ng/ml;

[0056] ②灵敏度:最小检出限为0.1ng/ml;

[0057] ③精密度:批内变异系数小于5%,批间变异系数小于5%;

[0058] ④准确性:回收率测定在95~99%之间;

[0059] ⑤特异性：与血清肌酸酐的交叉反应率小于0.1%；

[0060] ⑥稳定性：各试剂组分于37℃放置60天后，各组分仍稳定。

[0061] 实施例1. 热休克蛋白90 α (Hsp90 α) 功能化量子点-磁微粒竞争型免疫检测试剂的制备及操作步骤

[0062] 1、表面修饰Hsp90 α 抗体的荧光量子点制备方法：

[0063] (1) 量子点—链霉亲和素 (QDs-SA) 共轭物的形成和纯化

[0064] 在PBS缓冲液 (pH=8.5) 中，将100 μ L QDs溶液 (20 μ M) 与500 μ L SA溶液 (80 μ M) 混合均匀。然后将100 μ L新鲜制备的EDC溶液 (20mg/mL) 和20 μ L新鲜制备的NHS溶液 (20mg/mL) 快速加入到混合物中，25℃下在黑暗中连续摇动孵育90min；将其转移至干净的离心超滤单元 (50,000MW) 中，在4℃以10000rpm离心25分钟，然后上层析柱，过膜，离心，用PBS (20mM, pH=8.5) 洗涤5次，通过超滤去除游离非共轭SA以及共轭反应的异脲副产物。将含有QDs-SA缀合物的上层取出并稀释到2.0mL PBS (20mM, pH=8.5) 中即可得到所需的QDs-SA结合物溶液，于4℃储存。

[0065] (2) 生物素—Hsp90 α 抗体 (Biotin-Ab) 偶联物的形成和纯化

[0066] 将50 μ g Hsp90 α 抗体溶解于2.0mL PBS缓冲液 (0.1mol/L, pH=7.2~10.0) 并充分离心，吹打混匀，将1mg生物素溶解于2.0mL PBS缓冲液 (0.1mol/L, pH=7.2~10.0) 并充分离心，吹打混匀，然后取200 μ L Hsp90 α 抗体溶液 (0.25g/L) 与2.0 μ L生物素溶液 (10mM) 混合，25℃下在黑暗中连续摇动孵育90min。标记后，将混合溶液转移至Zeba Spin脱盐柱以10000 $\times g$ (20min) 离心，分装并于-20℃储存。

[0067] (3) 量子点链霉亲和素—生物素化Hsp90 α 抗体 (QDs-SA-Biotin-Ab) 共轭物的形成

[0068] 将上述步骤获得的修饰了链霉亲和素的量子点充分震荡重悬后除去上清液，取20 μ L QDs-SA溶液 (1.0 μ M) 与50 μ L Biotin-Ab溶液 (2.0 μ M) 混合，25℃下在黑暗中连续摇动孵育90min，然后加入PBS缓冲液 (20mM, pH=8.5)，移至离心管中去除多余抗体和溶液，重复洗涤3~5次，加入PBS缓冲液稀释到1000 μ L，得到所需的链霉亲和素量子点—生物素化Hsp90 α 抗体共轭物，于4℃储存。

[0069] 2、表面修饰Hsp90 α 抗原的磁微粒制备方法：

[0070] (1) 磁微粒—链霉亲和素 (MPs-SA) 共轭物的形成

[0071] 在PBS缓冲液 (pH=8.5) 中，将100 μ L MPs溶液 (20 μ M) 与500 μ L SA溶液 (80 μ M) 混合均匀。然后将100 μ L新鲜制备的EDC溶液 (20mg/mL) 和20 μ L新鲜制备的NHS溶液 (20mg/mL) 快速加入到混合物中，25℃下在黑暗中连续摇动孵育90min，转移至干净的离心超滤单元 (50,000MW) 中，在4℃以10000rpm离心25分钟，然后上层析柱，过膜，离心，用PBS (20mM, pH=8.5) 洗涤5次，通过超滤去除游离非共轭SA以及共轭反应的异脲副产物。将含有MPs-SA缀合物的上层取出并稀释到2.0mL PBS (20mM, pH=8.5) 中即可得到所需的MPs-SA结合物溶液，于4℃储存。

[0072] (2) 生物素—Hsp90 α 抗原 (Biotin-Ag) 偶联物的形成和纯化

[0073] 将50 μ g Hsp90 α 抗原溶解于2.0mL PBS缓冲液 (0.1mol/L, pH=7.2~10.0) 并充分离心，吹打混匀，将1mg生物素溶解于2.0mL PBS缓冲液 (0.1mol/L, pH=7.2~10.0) 并充分离心，吹打混匀，然后取200 μ L Hsp90 α 抗原溶液 (0.25g/L) 与2.0 μ L生物素溶液 (10mM) 混合，25℃下在黑暗中连续摇动孵育90min。标记后，将混合溶液转移至Zeba Spin脱盐柱以10000 $\times g$ (20min) 离心，分装并于-20℃储存。

×g (20min) 离心, 分装并于-20℃储存。

[0074] (3) 磁微粒链霉亲和素—生物素化Hsp90 α 抗原 (MPs-SA-Biotin-Ag) 共轭物的形成

[0075] 将上述步骤获得的修饰了链霉亲和素的磁微粒充分震荡重悬后移去上清液, 取200 μ L MPs-SA溶液 (10mg/ml) 与50 μ L Biotin-Ag溶液 (2.0 μ M) 混合, 25℃下在黑暗中连续摇动孵育90min, 然后在磁场作用下加入PBS缓冲液 (20mM, pH=8.5), 将磁微粒缀合物移至离心管中去除多余抗原和溶液, 重复洗涤3~5次, 用PBS缓冲液溶于含有0.1% BSA的PBS缓冲液中, 得到所需的磁微粒链霉亲和素—生物素化Hsp90 α 抗原的共轭物, 于4℃储存。

[0076] 3、热休克蛋白90 α (Hsp90 α) 含量的检测

[0077] 具体操作步骤如下:

[0078] 在96孔酶标板中测量荧光强度。取10份人血清样品100 μ L与100 μ L修饰了Hsp90 α 抗原的磁性纳米颗粒 (MPs-SA-Biotin-Ag) 混合均匀, 然后加入修饰抗Hsp90 α 抗体的荧光量子点 (QDs-SA-Biotin-Ab) 70 μ L, 37℃振摇温育30min, 其优先与待检样本中游离的Hsp90 α 结合。然后磁性分离取上清液, 去除MPs-Ag-Ab-QDs复合物及剩余未结合的MPs-Ag, 在250nm的激发波长下记录600nm处的荧光发射。捕获颗粒再悬浮于100 μ L的PBS (20mM, pH=8.5) 中, 重复洗涤3次, 然后悬浮于100 μ L的PBS (20mM, pH=8.5) 中, 在500nm的激发波长下记录580nm处的荧光发射, 计算样本中Hsp90 α 的含量。

[0079] 4、热休克蛋白90 α (Hsp90 α) 检测方法的稳定性比较

[0080] 将上述检测结果与ELISA法进行对照, 结果显示二者具有良好的相关性:采用功能化量子点-磁微粒竞争型免疫法检测Hsp90 α 的线性范围为0.5~50.0ng/mL, 检测限为0.1ng/mL, 标准曲线的线性回归方程为 $y=1.2148+0.6843x$, $R^2=0.9997$, (其中x为Hsp90 α 浓度, y为吸光度值), 其检测下限比ELISA法低10倍。血清样品Hsp90 α 含量检测结果如下:

样品	功能化量子点-磁微粒	ELISA
	竞争型免疫检测法	酶联免疫法
[0081]	1 0.65	-
	2 3.04	2.15
	3 5.24	3.68
	4 23.62	18.94
	5 34.68	35.92
	6 0.89	-
	7 48.18	49.72
	8 13.22	12.37
	9 31.65	32.84
	10 9.18	10.32

[0082] 注:-表示不能检出。

[0083] 实施例2.癌胚抗原(CEA)功能化量子点-磁微粒竞争型免疫检测试剂的制备及稳定性比较

[0084] 1、表面修饰CEA抗体的荧光量子点制备方法：

[0085] (1) 量子点—链霉亲和素(QDs-SA)共轭物的形成和纯化

[0086] 在Borate缓冲液(pH=8.5)中,将100μL QDs溶液(20μM)与500μL SA溶液(80μM)混合均匀。然后将100μL新鲜制备的EDC溶液(20mg/mL)和20μL新鲜制备的NHS溶液(20mg/mL)快速加入到混合物中,25℃下在黑暗中连续摇动孵育90min;将其转移至干净的离心超滤单元(50,000MW)中,在4℃以10000rpm离心25分钟,然后上层析柱,过膜,离心,用Borate(20mM,pH=7.5)洗涤5次,通过超滤去除游离非共轭SA以及共轭反应的异脲副产物。将含有QDs-SA缀合物的上层取出并稀释到2.0mL Borate(20mM,pH=7.5)中即可得到所需的QDs-SA结合物溶液,于4℃储存。

[0087] (2)生物素—CEA抗体(Biotin-Ab)偶联物的形成和纯化

[0088] 将50μg CEA抗体溶解于2.0mL Borate缓冲液(0.1mol/L,pH=7.2~10.0)并充分离心,吹打混匀,将1mg生物素溶解于2.0mL Borate缓冲液(0.1mol/L,pH=7.2~10.0)并充分离心,吹打混匀,然后取200μL CEA抗体溶液(0.25g/L)与2.0μL生物素溶液(10mM)混合,25℃下在黑暗中连续摇动孵育90min。标记后,将混合溶液转移至Zeba Spin脱盐柱以10000

×g (20min) 离心, 分装并于-20℃储存。

[0089] (3) 量子点链霉亲和素—生物素化CEA抗体 (QDs-SA-Biotin-Ab) 共轭物的形成

[0090] 将上述步骤获得的修饰了链霉亲和素的量子点充分震荡重悬后除去上清液, 取20 μL QDs-SA溶液 (1.0μM) 与50μL Biotin-Ab溶液 (2.0μM) 混合, 25℃下在黑暗中连续摇动孵育90min, 然后加入Borate缓冲液 (20mM, pH=8.5), 移至离心管中去除多余抗体和溶液, 重复洗涤3~5次, 加入PBS缓冲液稀释到1000μL, 得到所需的链霉亲和素量子点—生物素化CEA抗体共轭物, 于4℃储存。

[0091] 2、表面修饰CEA抗原的磁微粒制备方法:

[0092] (1) 磁微粒—链霉亲和素 (MPs-SA) 共轭物的形成

[0093] 在Borate缓冲液 (pH=8.5) 中, 将100μL MPs溶液 (20μM) 与500μL SA溶液 (80μM) 混合均匀。然后将100μL新鲜制备的EDC溶液 (20mg/mL) 和20μL新鲜制备的NHS溶液 (20mg/mL) 快速加入到混合物中, 25℃下在黑暗中连续摇动孵育90min, 转移至干净的离心超滤单元 (50,000MW) 中, 在4℃以10000rpm离心25分钟, 然后上层析柱, 过膜, 离心, 用Borate (20mM, pH=8.5) 洗涤5次, 通过超滤去除游离非共轭SA以及共轭反应的异脲副产物。将含有MPs-SA缀合物的上层取出并稀释到2.0mL Borate (20mM, pH=8.5) 中即可得到所需的MPs-SA结合物溶液, 于4℃储存。

[0094] (2) 生物素—CEA抗原 (Biotin-Ag) 偶联物的形成和纯化

[0095] 将50μg CEA抗原溶解于2.0mL Borate缓冲液 (0.1mol/L, pH=7.2~10.0) 并充分离心, 吹打混匀, 将1mg生物素溶解于2.0mL Borate缓冲液 (0.1mol/L, pH=7.2~10.0) 并充分离心, 吹打混匀, 然后取200μL CEA抗原溶液 (0.25g/L) 与2.0μL生物素溶液 (10mM) 混合, 25℃下在黑暗中连续摇动孵育90min。标记后, 将混合溶液转移至Zeba Spin脱盐柱以10000 ×g (20min) 离心, 分装并于-20℃储存。

[0096] (3) 磁微粒链霉亲和素—生物素化CEA抗原 (MPs-SA-Biotin-Ag) 共轭物的形成

[0097] 将上述步骤获得的修饰了链霉亲和素的磁微粒充分震荡重悬后移去上清液, 取200μL MPs-SA溶液 (10mg/ml) 与50μL Biotin-Ag溶液 (2.0μM) 混合, 25℃下在黑暗中连续摇动孵育90min, 然后在磁场作用下加入Borate缓冲液 (20mM, pH=8.5), 将磁微粒缀合物移至离心管中去除多余抗原和溶液, 重复洗涤3~5次, 用Borate缓冲液溶于含有0.1% BSA的Borate缓冲液中, 得到所需的磁微粒链霉亲和素—生物素化CEA抗原的共轭物, 于4℃储存。

[0098] 3、癌胚抗原 (CEA) 含量的检测

[0099] 具体操作步骤如下:

[0100] 在96孔酶标板中测量荧光强度。取10份人血清样品100μL与100μL修饰了CEA抗原的磁性纳米颗粒 (MPs-SA-Biotin-Ag) 混合均匀, 然后加入修饰抗CEA抗体的荧光量子点 (QDs-SA-Biotin-Ab) 70μL, 37℃振摇温育30min, 其优先与待检样本中游离的CEA结合。然后磁性分离取上清液, 去除MPs-Ag-Ab-QDs复合物及剩余未结合的MPs-Ag, 在250nm的激发波长下记录600nm处的荧光发射。捕获颗粒再悬浮于100μL的Borate (20mM, pH=8.5) 中, 重复洗涤3次, 然后悬浮于100μL的Borate (20mM, pH=8.5) 中, 在500nm的激发波长下记录580nm处的荧光发射, 计算样本中CEA的含量。

[0101] 4、癌胚抗原 (CEA) 检测方法的稳定性比较

[0102] 选择浓度为5ng/ml的CEA标准品, 采用本发明检测试剂盒按照上述步骤与市售癌

胚抗原(CEA)测定试剂盒(磁微粒化学发光法)进行对比检测,每个试剂盒对该标准品重复测定10次,分别计算均值(M)、标准差(S)、变异系数(CV)和相对偏差(Bias),以评估本发明试剂盒的稳定性。检测结果如下:

序号	功能化量子点-磁微 粒竞争型免疫检测法	磁微粒 化学发光法
	5.21	5.42
[0103]	4.93	5.01
	4.98	5.32
	4.85	5.27
	5.16	4.98
	5.09	5.45
	5.12	5.33
	5.08	4.75
	5.16	4.85
	5.13	5.11
	5.071	5.149
[0104]	0.1088	0.2320
	2.145%	4.505%
	1.42%	2.98%
	单位:ng/ml	

[0106] 实施例3. 糖链抗原72-4(CA72-4)功能化量子点-磁微粒竞争型免疫检测试剂的制备及回收率分析

[0107] 1、表面修饰CA72-4抗体的荧光量子点制备方法:

[0108] (1) 量子点—链霉亲和素(QDs-SA)共轭物的形成和纯化

[0109] 在PBS缓冲液(pH=7.4)中,将80μL QDs溶液(20μM)与200μL SA溶液(80μM)混合均

匀。然后将40 μ L新鲜制备的EDC溶液(20mg/mL)和20 μ L新鲜制备的NHS溶液(20mg/mL)快速加入到混合物中,25℃下在黑暗中连续摇动孵育90min;将其转移至干净的离心超滤单元(50,000MW)中,在4℃以10000rpm离心25分钟,然后上层析柱,过膜,离心,用PBS(20mM,pH=7.4)洗涤5次,通过超滤去除游离非共轭SA以及共轭反应的异脲副产物。将含有QDs-SA缀合物的上层取出并稀释到2.0mL PBS(20mM,pH=7.4)中即可得到所需的QDs-SA结合物溶液,于4℃储存。

[0110] (2) 生物素—CA72-4抗体(Biotin-Ab)偶联物的形成和纯化

[0111] 将50 μ g CA72-4抗体溶解于2.0mL PBS缓冲液(0.1mol/L,pH=7.4)并充分离心,吹打混匀,将1mg生物素溶解于2.0mL PBS缓冲液(0.1mol/L,pH=7.4)并充分离心,吹打混匀,然后取200 μ L CA72-4抗体溶液(0.25g/L)与2.0 μ L生物素溶液(10mM)混合,25℃下在黑暗中连续摇动孵育90min。标记后,将混合溶液转移至Zeba Spin脱盐柱以10000×g(20min)离心,分装并于-20℃储存。

[0112] (3) 量子点链霉亲和素—生物素化CA72-4抗体(QDs-SA-Biotin-Ab)共轭物的形成

[0113] 将上述步骤获得的修饰了链霉亲和素的量子点充分震荡重悬后除去上清液,取20 μ L QDs-SA溶液(1.0 μ M)与40 μ L Biotin-Ab溶液(2.0 μ M)混合,25℃下在黑暗中连续摇动孵育90min,然后加入PBS缓冲液(20mM,pH=7.4),移至离心管中去除多余抗体和溶液,重复洗涤3~5次,加入PBS缓冲液稀释到1000 μ L,得到所需的链霉亲和素量子点—生物素化CA72-4抗体共轭物,于4℃储存。

[0114] 2、表面修饰CA72-4抗原的磁微粒制备方法:

[0115] (1) 磁微粒—链霉亲和素(MPs-SA)共轭物的形成

[0116] 在PBS缓冲液(pH=7.4)中,将80 μ L MPs溶液(20 μ M)与200 μ L SA溶液(80 μ M)混合均匀。然后将40 μ L新鲜制备的EDC溶液(20mg/mL)和20 μ L新鲜制备的NHS溶液(20mg/mL)快速加入到混合物中,25℃下在黑暗中连续摇动孵育90min,转移至干净的离心超滤单元(50,000MW)中,在4℃以10000rpm离心25分钟,然后上层析柱,过膜,离心,用PBS(20mM,pH=7.4)洗涤5次,通过超滤去除游离非共轭SA以及共轭反应的异脲副产物。将含有MPs-SA缀合物的上层取出并稀释到2.0mL PBS(20mM,pH=7.4)中即可得到所需的MPs-SA结合物溶液,于4℃储存。

[0117] (2) 生物素—CA72-4抗原(Biotin-Ag)偶联物的形成和纯化

[0118] 将50 μ g CA72-4抗原溶解于2.0mL PBS缓冲液(0.1mol/L,pH=7.4)并充分离心,吹打混匀,将1mg生物素溶解于2.0mL PBS缓冲液(0.1mol/L,pH=7.4)并充分离心,吹打混匀,然后取200 μ L CA72-4抗原溶液(0.25g/L)与2.0 μ L生物素溶液(10mM)混合,25℃下在黑暗中连续摇动孵育90min。标记后,将混合溶液转移至Zeba Spin脱盐柱以10000×g(20min)离心,分装并于-20℃储存。

[0119] (3) 磁微粒链霉亲和素—生物素化CA72-4抗原(MPs-SA-Biotin-Ag)共轭物的形成

[0120] 将上述步骤获得的修饰了链霉亲和素的磁微粒充分震荡重悬后移去上清液,取100 μ L MPs-SA溶液(10mg/ml)与50 μ L Biotin-Ag溶液(2.0 μ M)混合,25℃下在黑暗中连续摇动孵育90min,然后在磁场作用下加入PBS缓冲液(20mM,pH=8.5),将磁微粒缀合物移至离心管中去除多余抗原和溶液,重复洗涤3~5次,用PBS缓冲液溶于含有0.1%BSA的PBS缓冲液中,得到所需的磁微粒链霉亲和素—生物素化CA72-4抗原的共轭物,于4℃储存。

[0121] 3、糖链抗原72-4 (CA72-4) 含量的检测

[0122] 具体操作步骤如下：

[0123] 在96孔酶标板中测量荧光强度。取10份人血清样品50 μ L与500 μ L修饰了CA72-4抗原的磁性纳米颗粒 (MPs-SA-Biotin-Ag) 混合均匀,然后加入修饰抗CA72-4抗体的荧光量子点 (QDs-SA-Biotin-Ab) 70 μ L,37℃振摇温育30min,其优先与待检样本中游离的CA72-4结合。然后磁性分离取上清液,去除MPs-Ag-Ab-QDs复合物及剩余未结合的MPs-Ag,在250nm的激发波长下记录600nm处的荧光发射。捕获颗粒再悬浮于100 μ L的PBS (20mM, pH=7.4) 中,重复洗涤3次,然后悬浮于100 μ L的PBS (20mM, pH=7.4) 中,在500nm的激发波长下记录580nm处的荧光发射,计算样本中CA72-4的含量。

[0124] 4、糖链抗原72-4 (CA72-4) 功能化量子点-磁微粒竞争型免疫检测的回收率分析

[0125] 选择不含CA72-4的空白血清样品,加入5ng/ml的CEA标准品,采用本发明检测试剂盒按照上述步骤进行检测,每个试剂盒对加标样品重复测定10次,然后计算回收率 (PP),以评估本发明试剂盒的准确性。根据公式计算得本发明检测试剂盒的回收率为98.87% ± 9.75。

[0126] 实施例4. 功能化量子点-磁微粒竞争型免疫检测试剂盒的组成

[0127] 本发明根据本发明所述方法设计了一种试剂盒,该试剂盒可以用于免疫标志物的检测,通过使用该试剂盒,使操作简单,省时省力,避免了现用现配的繁琐,同时使操作标准化。

[0128] 因此本发明提供一种试剂盒。

[0129] 本发明的试剂盒,包括表面修饰免疫标志物抗原的磁微粒,表面修饰免疫标志物抗体的荧光量子点,免疫标志物抗原标准品、抗免疫标志物抗体、链霉亲和素、生物素、缓冲液。

[0130] 其中所述任选为可以不选其中任一组分,也可以选择其中一或多种组分。

[0131] 本发明的试剂盒,是将不同的组分分别盛装,再一同包装在同一包装盒内,使用时根据说明书中描述的方法进行操作。

[0132] 试剂盒中,偶联缓冲液选自:PBS、Borate、EDC、NHS或其他无胺缓冲液的一种或多种的组合,浓度为1~100mM,pH为7.0~10.0;

[0133] 本发明的检测试剂盒,包括:盒体、盒体内的试剂,所述试剂为功能化量子点-磁微粒竞争型免疫检测试剂,所述盒体内部设有若干试剂槽,所述试剂槽中放置盛有磁微粒的EP管,试剂盒中试剂的量可以是一人份,也可以是多人份。

[0134] 综上所述,本发明所提供的免疫标志物磁微粒免疫荧光检测试剂盒具有良好的准确性和特异性且灵敏度高,有效克服了现有技术中的缺点且具高度产业化利用价值。

[0135] 上述实施例仅示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

专利名称(译)	一种检测免疫标志物含量的方法、试剂和试剂盒		
公开(公告)号	CN110763834A	公开(公告)日	2020-02-07
申请号	CN201810826421.8	申请日	2018-07-25
[标]申请(专利权)人(译)	福建广生堂药业股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	福建广生堂药业股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	福建广生堂药业股份有限公司		
[标]发明人	刘婕 张芳 温莹 黄志宁 吴文强		
发明人	刘婕 张芳 温莹 黄志宁 吴文强		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54326 G01N33/54346		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明提供了一种检测免疫标志物含量的方法及试剂盒，其中所述方法其包括以下步骤：步骤a)：表面修饰免疫标志物抗原的磁性纳米颗粒制备；步骤b)：表面修饰免疫标志物抗体的荧光量子点制备；步骤c)：免疫标志物含量的检测：将含有免疫标志物的待检样本与步骤a)经修饰免疫标志物抗原的磁性纳米颗粒混合均匀，加入修饰免疫标志物抗体的量子点孵育；步骤d)：磁性分离去除磁性纳米颗粒—量子点免疫复合物及剩余未结合的抗原修饰的磁性纳米颗粒；步骤e)：测定上清液荧光强度或复溶的磁性纳米免疫复合物得到待检样本中免疫标志物的含量。利用本发明的方法能够显著提高血清标志物的检测灵敏度和检测效率，实现了对标志物灵敏高效、快速便捷的检测要求。

样品	功能化量子点-磁微粒	ELISA
	竞争型免疫检测法	酶联免疫法
1	0.65	-
2	3.04	2.15
3	5.24	3.68
4	23.62	18.94
5	34.68	35.92
6	0.89	-
7	48.18	49.72
8	13.22	12.37
9	31.65	32.84
10	9.18	10.32