



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102033125 B

(45) 授权公告日 2013.08.14

(21) 申请号 201010524183.9

(22) 申请日 2010.10.29

(73) 专利权人 济南大学

地址 250022 山东省济南市济微路 106 号济南大学

(72) 发明人 于京华 葛磊 王寿梅 颜梅
杨萍 黄加栋 王珊 张丛丛

(51) Int. Cl.

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101446555 A, 2009.06.03,

CN 101393201 A, 2009.03.25,

EP 2059810 B1, 2011.04.13,

Jacob A. Hansen 等. Quantum-Dot/

Aptamer-Based Ultrasensitive Multi-Analyte Electrochemical Biosensor. 《Journal of the

American Chemical Society》. 2006, 第 128 卷 (第 7 期), 第 2228-2229 页.

杨海朋等. 纳米电化学生物传感器. 《化学进展》. 2009, 第 21 卷 (第 1 期), 第 210-216 页.

审查员 黄晓丽

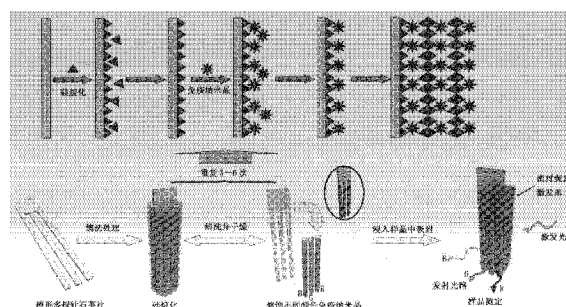
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

基于免疫纳米晶的现场快速体外即时多疾病同时诊断石英荧光传感器的研究与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种现场快速体外即时多疾病同时诊断监测的免疫纳米晶石英荧光传感器及其诊断监测传染类疾病的方法。免疫纳米晶梳形多探针石英片制备方法, 如图所示, 包括以下步骤: 选择传染病的病原相关蛋白质或其标志物作为抗原; 制备纳米晶及按照文献制备免疫纳米晶; 利用层层累积表面修饰技术, 将不同抗体的免疫纳米晶修饰到梳形石英片不同探针的表面上。一种多疾病同时诊断监测的方法, 包括如下步骤: 将修饰好的石英片侵入到环境样品溶液、体液、血液或分泌物样品中, 置于密封石英激发皿发射光路中, 对传染疾病进行诊断监测。本发明的特异性强, 灵敏度高; 诊断监测时间短; 成本低。



1. 一种现场快速体外即时多疾病同时诊断监测的免疫纳米晶石英荧光传感器制备方法,其特征是包括以下步骤:

(1) 制备高量子产率的不同粒径的油相 CdTe/CdS 或 CdSe/CdS 纳米晶,然后利用巯基乙酸、巯基丙酸或 L- 半胱氨酸对其表面进行改性,将其转成水相纳米晶,并将其分别进行纯化处理,配制成单分散溶液;

(2) 选择甲、乙、丙类传染病的病原相关蛋白质或其标志物作为抗原,并制备与抗原特异性一一对应的抗体;

(3) 按一定摩尔比将制备的不同抗体分别修饰到不同粒径的纳米晶表面上制成免疫纳米晶;

(4) 设计制作探针数为 1-10 个的梳形多探针结构的石英片和密封的石英荧光激发皿,皿内装有短波发射的饱和荧光试剂;

(5) 利用层层自组装表面修饰技术,将不同粒径的免疫纳米晶分别修饰到梳形多探针石英片的不同探针表面上,制作修饰有多层免疫纳米晶的梳型多探针石英片。

(6) 诊断监测时,将修饰有多层免疫纳米晶的梳形多探针石英片浸入到环境样品溶液、体液、血液或分泌物样品中 3-5 分钟,然后取出清洗,并置于密封石英激发皿发射光路中,制得多探针免疫纳米晶石英荧光传感器。

2. 根据权利要求 1 所述的现场快速体外即时多疾病同时诊断检测的免疫纳米晶石英荧光传感器的制备方法,其特征是:所述抗体与纳米晶的摩尔比为 10 ~ 50 : 1。

3. 根据权利要求 1 所述现场快速体外即时多疾病同时诊断监测的免疫纳米晶石英荧光传感器制备方法,其特征是:所述的梳形多探针石英片为长方形,探针数为 1 ~ 10 个;所述的密封的石英荧光激发皿为长方体形石英皿,内装有饱和的短波发射荧光试剂:7-氨基-4-甲基香豆素、羟基香豆素、粒蓝相似物、4,4' - 二异硫氰酸基-2,2' - 二苯乙烯磺酸二钠、荧光增白剂 134、甲基绿焦宁二苯乙烯或芘。

4. 根据权利要求 1 所述现场快速体外即时多疾病同时诊断监测的免疫纳米晶石英荧光传感器制备方法,其特征是:所述修饰有多层免疫纳米晶的梳形多探针石英片包括以下步骤:

(a) 将所用石英片用 0.1mol/L H_2O_2/H_2SO_4 溶液清洗,然后用超纯水彻底清洗数次,吹干;

(b) 将清洗并干燥的梳形多探针石英片用硅烷偶联剂处理 10min;

(c) 将制备的免疫纳米晶溶液超声处理 10-40min,得到分散的免疫纳米晶溶液;

(d) 将步骤 (b) 中处理好的梳形多探针石英片浸入经步骤 (c) 处理过的免疫纳米晶溶液中;每一根探针进入到一种抗体的免疫纳米晶溶液中,将按上述方法制备的免疫纳米晶分别修饰至三探针梳形石英片的探针表面上,

(e) 将步骤 (d) 中制备的修饰梳形多探针石英片用超纯水彻底清洗数次,吹干;

(f) 重复步骤 (b) 至步骤 (e) 过程 3-6 次,制得修饰有多层免疫纳米晶的梳型多探针石英片。

5. 根据权利要求 4 所述现场快速体外即时多疾病同时诊断监测的免疫纳米晶石英荧光传感器制备方法,其特征是:所述硅烷偶联剂为十八烷基三氯硅烷、甲基三甲氧基硅烷、辛基三甲氧基硅烷、正辛基三乙氧基硅烷、巯丙基三甲氧基硅烷、正癸基三甲氧基硅烷、正

己基三乙氧基硅烷 3- 氯丙基三甲氧基硅烷 3- 巯丙基三乙氧基硅烷、3- 脲丙基三甲氧基硅烷、十二烷基三甲氧基硅烷、十八烷基三甲氧基硅烷、十六烷基三甲氧基硅烷、十二烷基三乙氧基硅烷、3- 氨基丙基三乙氧基硅烷、gamma- 脲丙基三乙氧基硅烷、N- 氨乙基 -3- 氨丙基三乙氧基硅烷、二乙烯三胺基丙基三甲氧基硅烷、3- 氨丙基三羟基硅烷、3- 氨基丙基三甲氧基硅烷、十八烷基三乙氧基硅烷、3- 脲基丙基三乙氧基硅烷、巯丙基甲基二甲氧基硅烷、N-(3- 三甲氧基硅基) 甲基)-1,6- 己二胺、N-(3- 三甲氧基甲硅基) 丙基)-1,6- 己二胺。

6. 根据权利要求 1 所述现场快速体外即时多疾病同时诊断监测的免疫纳米晶石英荧光传感器制备方法,其特征是:所述甲类传染病抗原为鼠疫抗原、霍乱抗原;所述乙类传染病抗原为传染性非典型肺炎抗原,艾滋病抗原,病毒性肝炎抗原,脊髓灰质炎抗原,人感染高致病性禽流感抗原,麻疹抗原,流行性出血热抗原,狂犬病抗原,流行性乙型脑炎抗原,登革热抗原,炭疽抗原,细菌性和阿米巴性痢疾抗原,肺结核抗原,伤寒与副伤寒抗原,流行性脑脊髓膜炎抗原,百日咳抗原,白喉抗原,新生儿破伤风抗原,猩红热抗原,布鲁氏菌病抗原,淋病抗原,梅毒抗原,钩端螺旋体病抗原,血吸虫病抗原,疟疾抗原;所述丙类传染病抗原为流行性感冒抗原、流行性腮腺炎抗原、风疹抗原、急性出血性结膜炎抗原、麻风病抗原、流行性和地方性斑疹伤寒抗原、黑热病抗原、丝虫病抗原、包虫病抗原。

7. 根据权利要求 1 所述现场快速体外即时多疾病同时诊断监测的免疫纳米晶石英荧光传感器制备方法,其特征是:抗体为权利要求 6 所述抗原特异性对应的抗体。

基于免疫纳米晶的现场快速体外即时多疾病同时诊断石英 荧光传感器的研究与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及现场快速体外即时多疾病同时诊断和监测技术领域,更具体地说是一种现场快速体外即时多疾病同时诊断和监测的免疫纳米晶石英荧光传感器的制备,本发明还涉及采用所述的免疫纳米晶石英荧光传感器现场快速体外即时诊断和监测甲、乙、丙类传染病的方法。

背景技术

[0002] 传染病 (Infectious Diseases) 是由各种病原体引起的能在人与人、动物与动物或人与动物之间相互传播的一类疾病。病原体中大部分是微生物,小部分为寄生虫,寄生虫引起者又称寄生虫病。传染病的特点是有病原体,有传染性和流行性,感染后常有免疫性。有些传染病还有季节性或地方性。传染病的分类尚未统一,有人按病原体分类,有人按传播途径分类。传染病的预防应采取以切断主要传播环节为主导的综合措施。传染病的传播和流行必须具备 3 个环节,即传染源 (能排出病原体的人或动物)、传播途径 (病原体传染他人的途径) 及易感者 (对该种传染病无免疫力者)。若能完全切断其中的一个环节,即可防止该种传染病的发生和流行。

[0003] 中国目前的法定传染病有甲、乙、丙 3 类,共 38 种。甲类传染病也称为强制管理传染病,包括:鼠疫、霍乱。乙类传染病也称为严格管理传染病,包括:传染性非典型肺炎、艾滋病、病毒性肝炎、脊髓灰质炎、人感染高致病性禽流感、麻疹、流行性出血热、狂犬病、流行性乙型脑炎、登革热、炭疽、细菌性和阿米巴性痢疾、肺结核、伤寒和副伤寒、流行性脑脊髓膜炎、百日咳、白喉、新生儿破伤风、猩红热、布鲁氏菌病、淋病、梅毒、钩端螺旋体病、血吸虫病、疟疾、甲型 H1N1 流感 (原称人感染猪流感)。对此类传染病要严格按照有关规定和防治方案进行预防和控制。其中,传染性非典型肺炎、炭疽中的肺炭疽、人感染高致病性禽流感和甲型 H1N1 流感这四种传染病虽被纳入乙类,但可直接采取甲类传染病的预防、控制措施。丙类传染病也称为监测管理传染病,包括:流行性感冒、流行性腮腺炎、风疹、急性出血性结膜炎、麻风病、流行性和地方性斑疹伤寒、黑热病、包虫病、丝虫病,除霍乱、细菌性和阿米巴性痢疾、伤寒和副伤寒以外的感染性腹泻病。对此类传染病要按国务院卫生行政部门规定的监测管理方法进行管理。

[0004] 除以上传染病并外,国内近几年多发新型传染病。新型传染病是指在通常情况下,有些微生物和宿主和谐共生共存或互不侵犯,常见于热带地区发源之病毒、某些昆虫、猿、猴或其它物种,由于两方在平衡中共同演化,通常宿主已具备相当程度之抵抗力,同时这些微生物也演化出更有力的致病能力,但当这些微生物由长期共同演化的物种传染至其它毫无抵抗能力之物种时,可能会产生疾病,却对原先共存之物种不造成实质影响,尤其当转移的物种之间基因表现相似度越高,生物体内的辨识能力也较相似,此时受感染的机会也会大幅提升。换句话说,对于新接触微生物的物种若因此染病,则这个微生物对新的宿主而言是一种病原,对于原先共存之物种,这种微生物不造成疾病,则不为其病原。多数人类新兴

传染病及其传播都与人为活动有关,由于环境受到改变,某些区域性的微生物可藉此取得新的生态平衡,甚至引发大流行。病原毒力和传染之间的关系相当复杂,而且也深深影响着病原的长期演化,由于微生物和宿主之间的共同演化出新病原需要时间,在一般情况下,病原要找上先锋的攻击目标并非易事,通常需要直接地破坏环境平衡,或是藉生态变化,引发物种迁徙,甚至人为消灭之病原,可由实验室演化后释出。通常首次流行时,由于医疗、公共卫生经验不足,死亡率将最为严重,但若是快速致死的疾病,宿主很可能在病原开始蔓延之前死亡,而毒力对宿主生理运作的改变,也将影响传播的结果,例如呼吸道感染可促使患者将病原咳至空气散布。

[0005] 再者,近几年来,我国各地灾情频发,地震和洪涝灾害极易导致各种传染病大流行,因此,发展能现场及时的发现、预防、快速诊断传染性疾病的方法对于控制其发生与流行、减少经济损失具有重要意义。传统的传染病诊断和监测方法主要是通过流行病学和临床诊断来实现。最主要的诊断监测工具是微生物培养,但是有些传染病的不同病原种群之间的毒力变化差异较大,或在不同地区、不同人群中的临床症状表现不一样,严重程度和病程也不同。尤其是近几年来爆发的新型传染病,如甲流、禽流感、手足口病、H1N1 猪流感等。此外有些传染病之间存在极为相似的临床症状,同时有些传染病还会伴发多种病原的混合感染和继发感染,因此,仅仅根据流行病学和临床症状很难对患者进行确诊,必须通过实验室诊断监测才能做出客观、准确的诊断和监测结果。

[0006] 目前最新的实验室诊断监测技术就是直接诊断监测环境样品、血液、体液或分泌物中所含病毒或病原相关蛋白质的免疫诊断技术。免疫诊断是应用免疫学的理论、技术和方法诊断监测各种疾病和测定免疫状态。在医学上,它是确定疾病的病因和病变部位,或是确定机体免疫状态是否正常的重要方法。可在体内和体外进行。从免疫学的角度免疫诊断可应用于①检查免疫器官和功能发生改变的疾病:如免疫缺陷病、自身免疫病;②由免疫机制引起的疾病:如输血反应、移植排斥反应;③一些内分泌性的疾病:从临床学的角度来说,免疫诊断可应用于检查传染性疾病、免疫性疾病、肿瘤和其他临床各科疾病。免疫诊断具有特异性强、敏度高、简便、快速、安全等特点。但是以往的免疫诊断技术还是在实验室中进行,依托于实验室的重型设备,无法满足疫情现场快速诊断监测的要求。在疾病的控制预防环节更显薄弱。因此建立一种能随到随用的高灵敏度和高特异性的现场快速同时诊断监测多种传染疾病的方法,便成为当前传染病发现、控制、预防、诊断领域亟需解决的问题之一。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是提供了一种无需特殊样品前处理、诊断监测速度快、灵敏度高、特异性强,现场体外即时多疾病同时诊断监测的免疫纳米晶石英荧光传感器的制备及现场快速体外即时多疾病同时诊断监测的方法。

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明是通过以下措施来实现的:

[0009] 一种现场快速体外即时多疾病同时诊断监测的免疫纳米晶石英荧光传感器制备方法,其特征是包括以下步骤:

[0010] (1) 制备高量子产率的不同粒径的油相纳米晶,然后利用亲水配基对其表面进行改性,将其转成水相纳米晶,并将其分别进行纯化处理,配制成单分散溶液;

[0011] (2) 选择甲、乙、丙类传染病的病原相关蛋白质或其标志物作为抗原,并制备与抗原特异性一一对应的抗体;

[0012] (3) 按一定摩尔比将制备的(一种)抗体修饰到(一种粒径的)纳米晶表面上制成免疫纳米晶;

[0013] (4) 如图所示设计制作梳形多探针结构的石英片(探针数为1-10个)和密封的石英荧光激发皿,皿内装有短波发射的饱和荧光试剂;

[0014] (5) 利用层层自组装表面修饰技术,将(一种粒径的)免疫纳米晶修饰到梳形多探针石英片的(一个)探针表面上,制作多探针免疫纳米晶石英荧光感受器。

[0015] (6) 诊断监测时,将修饰有多层免疫纳米晶梳形多探针石英片浸入到环境样品溶液、体液、血液或分泌物样品中3-5分钟,然后取出清洗,并置于密封石英激发皿发射光路中,制得所述多探针免疫纳米晶石英荧光传感器。

[0016] 本发明所述油相纳米晶转水相的改性试剂为巯基乙酸,巯基丙酸,L-半胱氨酸;

[0017] 本发明所述抗体与纳米晶的摩尔比为10~50:1;

[0018] 本发明所述多层免疫纳米晶修饰到梳形多探针石英片探针表面包括以下步骤:

[0019] (1) 将所用石英片用0.1mol/L H_2O_2/H_2SO_4 溶液清洗,然后用超纯水彻底清洗数次,吹干;

[0020] (2) 将清洗并干燥的梳形多探针石英片用硅烷偶联剂处理10min;

[0021] (3) 将制备的免疫纳米晶溶液超声处理10-40min,得到分散的免疫纳米晶溶液;

[0022] (4) 将步骤(2)中处理好的梳形多探针石英片浸入经步骤(3)处理过的免疫纳米晶溶液中;每一根探针进入到一种抗体的免疫纳米晶溶液中,将按上述方法制备的免疫纳米晶分别修饰至三探针梳形石英片的探针表面上,

[0023] (5) 将步骤(4)中制备的修饰梳形多探针石英片用超纯水彻底清洗数次,吹干;

[0024] (6) 重复步骤(2)至步骤(5)过程3-6次,制得所述多层免疫纳米晶修饰的石英片;

[0025] 本发明还包括以下步骤:

[0026] 将修饰有多层免疫纳米晶的梳形多探针石英片放置48h后使用;

[0027] 本发明所述为CdSe/CdS纳米晶溶液、CdTe/CdS纳米晶溶液;

[0028] 本发明所述荧光试剂为7-氨基-4-甲基香豆素、羟基香豆素、粒蓝相似物、4,4'-二异硫氰酸基-2,2'-二苯乙烯磺酸二钠、荧光增白剂134、甲基绿焦宁二苯乙烯或茈。

[0029] 本发明所述硅烷偶联剂为十八烷基三氯硅烷、甲基三甲氧基硅烷、辛基三甲氧基硅烷、正辛基三乙氧基硅烷、巯丙基三甲氧基硅烷、正癸基三甲氧基硅烷、正己基三乙氧基硅烷、3-氯丙基三甲氧基硅烷、3-巯丙基三乙氧基硅烷、3-脲丙基三甲氧基硅烷、十二烷基三甲氧基硅烷、十八烷基三甲氧基硅烷、十六烷基三甲氧基硅烷、十二烷基三乙氧基硅烷、3-氨基丙基三乙氧基硅烷、gamma-脲丙基三乙氧基硅烷、N-氨乙基-3-氨丙基三乙氧基硅烷、二乙烯三胺基丙基三甲氧基硅烷、3-氨丙基三羟基硅烷、3-氨基丙基三甲氧基硅烷、十八烷基三乙氧基硅烷、3-脲基丙基三乙氧基硅烷、巯丙基甲基二甲氧基硅烷、N-(3-三甲氧基硅基)甲基)-1,6-己二胺、N-(3-三甲氧基甲硅基)丙基)-1,6-己二胺;

[0030] 本发明所述甲类传染病抗原为鼠疫抗原、霍乱抗原;

[0031] 本发明所述乙类传染病抗原为传染性非典型肺炎抗原, 艾滋病抗原, 病毒性肝炎抗原, 脊髓灰质炎抗原, 人感染高致病性禽流感抗原, 麻疹抗原, 流行性出血热抗原, 狂犬病抗原, 流行性乙型脑炎抗原, 登革热抗原, 炭疽抗原, 细菌性和阿米巴性痢疾抗原, 肺结核抗原, 伤寒与副伤寒抗原, 流行性脑脊髓膜炎抗原, 百日咳抗原, 白喉抗原, 新生儿破伤风抗原, 猩红热抗原, 布鲁氏菌病抗原, 淋病抗原, 梅毒抗原, 钩端螺旋体病抗原, 血吸虫病抗原, 疟疾抗原;

[0032] 本发明所述丙类传染病抗原为流行性感冒抗原、流行性腮腺炎抗原、风疹抗原、急性出血性结膜炎抗原、麻风病抗原、流行性和地方性斑疹伤寒抗原、黑热病抗原、丝虫病抗原、包虫病抗原。

[0033] 本发明所述抗体为上述抗原特异性对应的抗体。

[0034] 一种现场快速体外即时多疾病同时诊断监测的方法, 其特征是包括如下步骤: 将按上述任意一种方法制得的多层免疫纳米晶修饰的梳形多探针石英片浸入到环境样品溶液、体液、血液或分泌物样品中 3-5 分钟, 然后取出清洗, 置于密封石英荧光激发皿的发射光路中, 并配合手提式荧光分光光度计, 对多种甲、乙、丙类传染病同时进行诊断监测。

[0035] 本发明的有益效果:

[0036] 1. 免疫纳米晶的制备方法, 将抗体的高选择性与纳米晶的高灵敏度结合, 使得所制备的免疫纳米晶具有更高的灵敏度、选择性和诊断监测范围。

[0037] 2. 本发明的梳形多探针石英片是具有多探针结构的石英片, 可以同时用于诊断监测多种疾病抗原。利用纳米晶的颜色多样性可将多种疾病抗原同时区分。修饰后的梳形多探针石英可直接浸入到未经任何处理的环境样品溶液、体液、血液或分泌物样品进行识别, 无需任何其他特殊试剂, 使得诊断监测步骤更加简单, 更易于非专业人士操作。且该传感器可以多次反复使用, 大大降低了诊断监测成本。

[0038] 2. 将表面层层修饰技术应用到免疫纳米晶石英荧光传感器的制备当中, 使得纳米晶增效的现场快速体外即时多疾病同时诊断监测免疫纳米晶石英荧光传感器的制备具有可控性, 提高了免疫纳米晶石英荧光传感器的灵敏度、选择性和准确性。

[0039] 3. 本发明所的石英荧光激发皿内密封有特定的饱和荧光试剂, 利用纳米晶的宽带激发特性, 激发皿可同时激发所有免疫纳米晶, 并且光源是一均匀的面光源, 进一步提高了该免疫石英荧光传感器的准确性和灵敏度。

[0040] 4. 本发明所得到的现场快速体外即时多疾病同时诊断监测免疫纳米晶石英荧光传感器, 可以实现样本中多种疾病抗原的高特异性、高灵敏度、同时快速诊断监测。

[0041] 5. 本发明的现场快速体外即时多疾病同时诊断监测免疫纳米晶石英荧光传感器的特异性强, 样品中其它非特异性物质对诊断监测结果无影响; 灵敏度高, 可以达到 ng 级; 诊断监测速度快, 完成一个基本诊断监测过程仅需 1-2 分钟的时间, 可在短时间内实现大量样本的高通量筛选, 无需任何试剂, 成本低。

[0042] 6. 本发明的现场快速体外即时多疾病同时诊断监测免疫纳米晶石英荧光传感器诊断监测疾病抗原的方法, 操作快速简单, 反应及结果均由仪器自动完成和记录, 避免了主观因素的影响, 并保证有很好的重复性, 便于现场诊断监测。

[0043] 7. 本发明的现场快速体外即时多疾病同时诊断监测免疫纳米晶石英荧光传感器可以用于环境样品溶液、体液、血液或分泌物样品等多种样品的诊断监测, 这就是使得该免

疫纳米晶石英荧光传感器可用于传染病的传播和流行 3 个重要环节的诊断和监测,并能现场及时的发现、预防、快速诊断传染性疾病。

附图说明

[0044] 下面结合附图和具体实施例对本发明做进一步详细描述。

[0045] 附图为梳形石英片表面修饰过程及现场快速体外即时多疾病同时诊断监测免疫纳米晶石英荧光传感器原理示意图。

具体实施方式

[0046] 实施例 1 (甲类传染病,如鼠疫、霍乱)

[0047] 一种现场快速体外即时诊断监测鼠疫、霍乱的免疫纳米晶石英荧光传感器制备方法,包括以下步骤:

[0048] (1) 在体液、血液或分泌物样品中提取鼠疫病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗原;在体液、血液或分泌物样品中提取霍乱病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗原;然后通过动物体内注射方法制备上述抗原对应的抗体。

[0049] (2) 制备两种不同粒径 CdSe/CdS 纳米晶溶液:在 N_2 保护下,将 Se 粉溶于三辛基膦中制备 Se 前驱体,将 S 粉溶于三辛基膦中制备 S 前驱体,然后与制得的 $Cd(OA)_2$ 反应,油酸作为稳定剂的条件下,制得油性两种不同粒径的 CdSe/CdS 纳米晶溶液;然后将制得的纳米晶用巯基乙酸进行表面改性,制备水溶性的 CdSe/CdS 纳米晶溶液。

[0050] (3) 分别取两种不同粒径的 CdSe/CdS 纳米晶水溶液 $20\mu L$,超声分散 20min。然后将一种粒径的纳米晶对应一种抗体分子,按照摩尔比合成制备不同抗体分子修饰的免疫纳米晶。鼠疫抗体分子,对应粒径的 CdSe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 14 : 1 混合均匀,得到鼠疫免疫纳米晶;霍乱抗体分子,对应粒径的 CdSe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 21 : 1 混合均匀,得到霍乱免疫纳米晶;然后对所有的免疫纳米晶进行必要的分离提纯。

[0051] (4) 如图所示,设计制作二探针梳形石英片。将所用石英片用 $0.1mol/L H_2O_2/H_2SO_4$ 溶液清洗,然后用超纯水彻底清洗数次,吹干;将清洗并干燥的梳形二探针石英片用 3-氨基丙基三乙氧基硅烷处理 10min;将处理好的梳形多探针石英片浸入经步骤 (3) 提纯过的免疫纳米晶溶液中;每一根探针浸入到一种疾病抗体的免疫纳米晶溶液中,将按上述方法制备的免疫纳米晶分别修饰至二探针梳形石英片的探针表面上;将修饰有免疫纳米晶梳形二探针石英片用超纯水彻底清洗数次,吹干;重复上述过程 5 次,制得所述多层免疫纳米晶修饰的二探针石英片。

[0052] (6) 将修饰好的梳形二探针石英片用 $80\mu L$ 超纯水清洗石英片及其修饰层 4 遍,将石英片及修饰层中的残留溶液完全清洗干净。

[0053] (7) 如图所示,将修饰有鼠疫、霍乱免疫纳米晶的梳形二探针石英片在未经任何处理的环境样品溶液、体液、血液或分泌物样品中浸泡 4min 后,用超纯水清洗干净,置于石英荧光激发皿发射光路中,构成体外即时同时诊断监测甲类传染病鼠疫、霍乱的免疫纳米晶石英荧光传感器。将制得体外即时同时诊断监测甲类传染病鼠疫、霍乱的免疫纳米晶石英荧光传感器配合手提式荧光仪,根据二个不同粒径免疫纳米晶发射峰位置的荧光强度对甲类传染病鼠疫、霍乱进行准确诊断监测。

[0054] 实施例 2(乙类传染病,如传染性非典型肺炎,艾滋病,病毒性肝炎)

[0055] 一种现场快速体外即时同时诊断监测传染性非典型肺炎,艾滋病,病毒性肝炎的免疫纳米晶石英荧光传感器制备方法,包括以下步骤:

[0056] (1) 在体液、血液或分泌物样品中提取传染性非典型肺炎病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗原。在体液、血液或分泌物样品中提取艾滋病病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗原。在体液、血液或分泌物样品中提取病毒性肝炎病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗原。然后通过动物体内注射方法制备上述抗原对应的抗体。

[0057] (2) 制备三种不同粒径 CdTe/CdS 纳米晶溶液:在 N_2 保护下,将 Te 粉溶于三辛基膦中制备 Te 前驱体,将 S 粉溶于三辛基膦中制备 S 前驱体,然后与制得的 $Cd(OA)_2$ 反应,油酸作为稳定剂的条件下,制得油溶性三种不同粒径的 CdTe/CdS 纳米晶溶液;然后将制得的纳米晶用巯基丙酸进行表面改性,制备水溶性的 CdTe/CdS 纳米晶溶液。

[0058] (3) 分别取三种不同粒径的 CdTe/CdS 纳米晶水溶液 20 μ L,超声分散 20min。然后将一种粒径的纳米晶对应一种抗体分子,按照摩尔比合成制备不同抗体分子修饰的免疫纳米晶。传染性非典型肺炎抗体分子,对应粒径的 CdTe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 15 : 1 混合均匀,得到传染性非典型肺炎免疫纳米晶;艾滋病抗体分子,对应粒径的 CdTe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 17 : 1 混合均匀,得到艾滋病免疫纳米晶;病毒性肝炎抗体分子,对应粒径的 CdTe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 12 : 1 混合均匀,得到病毒性肝炎免疫纳米晶,然后对所有的免疫纳米晶进行必要的分离提纯。

[0059] (4) 如图所示,设计制作三探针梳形石英片。将所用石英片用 0.1mol/L H_2O_2/H_2SO_4 溶液清洗,然后用超纯水彻底清洗数次,吹干;将清洗并干燥的梳形多探针石英片用 3- 氨基丙基三羟基硅烷处理 10min。将处理好的梳形三探针石英片浸入经步骤 (3) 处理过的免疫纳米晶溶液中; ,每一根探针浸入到一种疾病抗体的免疫纳米晶溶液中,将按上述方法制备的免疫纳米晶分别修饰至三探针梳形石英片的探针表面上,将修饰有免疫纳米晶梳形三探针石英片用超纯水彻底清洗数次,吹干;重复上述过程 5 次,制得所述多层免疫纳米晶修饰的三探针石英片。

[0060] (6) 将修饰好的梳形三探针石英片用 80 μ L 超纯水清洗石英片及其修饰层 4 遍,将石英片及修饰层中的残留溶液完全清洗干净。

[0061] (7) 如图所示,将修饰有传染性非典型肺炎、艾滋病、病毒性肝炎免疫纳米晶的梳形三探针石英片在未经任何处理的环境样品溶液、体液、血液或分泌物样品溶液中浸泡 4min 后,用超纯水清洗干净,置于石英荧光激发皿发射光路中,构成体外即时同时诊断监测乙类传染病传染性非典型肺炎、艾滋病、病毒性肝炎的免疫纳米晶石英荧光传感器。将制得的体外即时同时诊断监测乙类传染病传染性非典型肺炎、艾滋病、病毒性肝炎的免疫纳米晶石英荧光传感器配合手提式荧光仪,根据三个不同粒径免疫纳米晶发射峰位置的荧光强度对乙类传染病传染性非典型肺炎、艾滋病、病毒性肝炎进行准确诊断监测。

[0062] 实施例 3(乙类传染病,如脊髓灰质炎、人感染高致病性禽流感、麻疹、流行性出血热)

[0063] 一种现场快速体外即时诊断监测脊髓灰质炎、人感染高致病性禽流感、麻疹、流行性出血热的免疫纳米晶石英荧光传感器制备方法,包括以下步骤:

[0064] (1) 在体液、血液或分泌物样品溶液中提取脊髓灰质炎病原相关蛋白质或特异性

标志物作为抗原。在体液、血液或分泌物中提取人感染高致病性禽流感病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗原。在体液、血液或分泌物中提取麻疹病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗原。在体液、血液或分泌物中提取流行性出血热病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗原。然后通过动物体内注射方法制备上述抗原对应的抗体。

[0065] (2) 制备四种不同粒径 CdSe/CdS 纳米晶溶液：在 N_2 保护下，将 Se 粉溶于三辛基膦中制备 Se 前驱体，将 S 粉溶于三辛基膦中制备 S 前驱体，然后与制得的 $Cd(OA)_2$ 反应，油酸作为稳定剂的条件下，制得油溶性四种不同粒径的 CdSe/CdS 纳米晶溶液；然后将制得的纳米晶用 L-半胱氨酸进行表面改性，制备水溶性的 CdSe/CdS 纳米晶溶液。

[0066] (3) 分别取四种不同粒径的 CdSe/CdS 纳米晶水溶液 20 μ L，超声分散 20min。然后将一种粒径的纳米晶对应一种抗体分子，按照摩尔比合成制备不同抗体分子修饰的免疫纳米晶。脊髓灰质炎抗体分子，对应粒径的 CdSe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 23 : 1 混合均匀，得到脊髓灰质炎免疫纳米晶；人感染高致病性禽流感抗体分子，对应粒径的 CdSe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 37 : 1 混合均匀，得到人感染高致病性禽流感免疫纳米晶；麻疹抗体分子，对应粒径的 CdSe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 34 : 1 混合均匀，得到麻疹免疫纳米晶；流行性出血热抗体分子，对应粒径的 CdSe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 25 : 1 混合均匀，得到流行性出血热免疫纳米晶；然后对所有的免疫纳米晶进行必要的分离提纯。

[0067] (4) 如图所示，设计制作四探针梳形石英片。将所用石英片用 0.1mol/L H_2O_2/H_2SO_4 溶液清洗，然后用超纯水彻底清洗数次，吹干；将清洗并干燥的梳形多探针石英片用疏丙基三甲氧基硅烷处理 10min。将处理好的梳形四探针石英片浸入经步骤 (3) 处理过的免疫纳米晶溶液中；，每一根探针进入到一种疾病抗体的免疫纳米晶溶液中，将按上述方法将制备的免疫纳米晶分别修饰至四探针梳形石英片的探针表面上，将修饰有免疫纳米晶梳形多探针石英片用超纯水彻底清洗数次，吹干；重复上述过程 6 次，制得所述多层免疫纳米晶修饰的四探针石英片。

[0068] (6) 将修饰好的梳形四探针石英片用 80 μ L 超纯水清洗石英片及其修饰层 5 遍，将石英片及修饰层中的残留溶液完全清洗干净。

[0069] (7) 如图所示，将修饰有脊髓灰质炎、人感染高致病性禽流感、麻疹、流行性出血热免疫纳米晶的梳形四探针石英片在未经任何处理的环境样品溶液、体液、血液或分泌物样品溶液中浸泡 5min 后，用超纯水清洗干净，置于石英荧光激发皿发射光路中，构成体外即时同时诊断监测乙类传染病脊髓灰质炎、人感染高致病性禽流感、麻疹、流行性出血热的免疫纳米晶石英荧光传感器。将制得体外即时同时诊断监测乙类传染病脊髓灰质炎、人感染高致病性禽流感、麻疹、流行性出血热的免疫纳米晶石英荧光传感器配合手提式荧光仪，根据四个不同粒径免疫纳米晶发射峰位置的荧光强度对乙类传染病脊髓灰质炎、人感染高致病性禽流感、麻疹、流行性出血热进行准确诊断监测。

[0070] 实施例 4 (乙类传染病，如狂犬病、流行性乙型脑炎、登革热、炭疽、细菌性和阿米巴性痢疾)

[0071] 一种现场快速体外即时诊断监测狂犬病、流行性乙型脑炎、登革热、炭疽、细菌性和阿米巴性痢疾的免疫纳米晶石英荧光传感器制备方法，包括以下步骤：

[0072] (1) 在体液、血液或分泌物中提取狂犬病病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗原。在体液、血液或分泌物中提取流行性乙型脑炎病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗

原。在体液、血液或分泌物中提取登革热病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗原。在体液、血液或分泌物中提取炭疽病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗原。在体液、血液或分泌物中提取细菌性和阿米巴性痢疾病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗原。然后通过动物体内注射方法制备上述抗原对应的抗体。

[0073] (2) 制备五种不同粒径 CdTe/CdS 纳米晶溶液：在 N_2 保护下，将 Te 粉溶于三辛基膦中制备 Te 前驱体，将 S 粉溶于三辛基膦中制备 S 前驱体，然后与制得的 $Cd(OA)_2$ 反应，油酸作为稳定剂的条件下，制得油溶性五种不同粒径的 CdTe/CdS 纳米晶溶液；然后将制得的纳米晶用 L-半胱氨酸进行表面改性，制备水溶性的 CdTe/CdS 纳米晶溶液。

[0074] (3) 分别取五种不同粒径的 CdTe/CdS 纳米晶水溶液 $20\ \mu\text{L}$ ，超声分散 20min。然后将一种粒径的纳米晶对应一种抗体分子，按照摩尔比合成制备不同抗体分子修饰的免疫纳米晶。狂犬病抗体分子，对应粒径的 CdTe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 22 : 1 混合均匀，得到狂犬病免疫纳米晶；流行性乙型脑炎抗体分子，对应粒径的 CdTe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 29 : 1 混合均匀，得到流行性乙型脑炎免疫纳米晶；登革热抗体分子，对应粒径的 CdTe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 12 : 1 混合均匀，得到登革热免疫纳米晶；炭疽抗体分子，对应粒径的 CdTe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 17 : 1 混合均匀，得到炭疽免疫纳米晶；细菌性和阿米巴性痢疾抗体分子，对应粒径的 CdTe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 45 : 1 混合均匀，得到细菌性和阿米巴性痢疾免疫纳米晶；然后对所有的免疫纳米晶进行必要的分离提纯。

[0075] (4) 如图所示，设计制作五探针梳形石英片。将所用石英片用 $0.1\text{mol/L}\ H_2O_2/H_2SO_4$ 溶液清洗，然后用超纯水彻底清洗数次，吹干；将清洗并干燥的梳形多探针石英片用 N-氨乙基-3-氨丙基三乙氧基硅烷处理 10min。将处理好的梳形五探针石英片浸入经步骤 (3) 处理过的免疫纳米晶溶液中；，每一根探针进入到一种疾病抗体的免疫纳米晶溶液中，将按上述方法制备的免疫纳米晶分别修饰至五探针梳形石英片的探针表面上；将修饰有免疫纳米晶梳形多探针石英片用超纯水彻底清洗数次，吹干；重复上述过程 5 次，制得所述多层免疫纳米晶修饰的多探针石英片。

[0076] (6) 将修饰好的梳形五探针石英片用 $60\ \mu\text{L}$ 超纯水清洗石英片及其修饰层 4 遍，将石英片及修饰层中的残留溶液完全清洗干净。

[0077] (7) 如图所示，将修饰有狂犬病、流行性乙型脑炎、登革热、炭疽、细菌性和阿米巴性痢疾免疫纳米晶的梳形五探针石英片在未经任何处理的体液、血液或分泌物样品中浸泡 8min 后，用超纯水清洗干净，置于石英荧光激发皿发射光路中，构成体外即时同时诊断监测乙类传染病狂犬病、流行性乙型脑炎、登革热、炭疽、细菌性和阿米巴性痢疾的免疫纳米晶石英荧光传感器。将制得体外即时同时诊断监测乙类传染病狂犬病、流行性乙型脑炎、登革热、炭疽、细菌性和阿米巴性痢疾的免疫纳米晶石英荧光传感器配合手提式荧光仪，根据五个不同粒径免疫纳米晶发射峰位置的荧光强度对乙类传染病狂犬病、流行性乙型脑炎、登革热、炭疽、细菌性和阿米巴性痢疾进行准确诊断监测。

[0078] 实施例 5 (丙类传染病，如，流行性腮腺炎、风疹、急性出血性结膜炎、麻风病抗原黑热病、丝虫病、包虫病)

[0079] 一种现场快速体外即时诊断监测流行性腮腺炎、风疹、急性出血性结膜炎、麻风病、丝虫病、包虫病的免疫纳米晶石英荧光传感器制备方法，包括以下步骤：

[0080] (1) 在体液、血液或分泌物中提取流行性腮腺炎病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗原。在体液、血液或分泌物中提取风疹病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗原。在体液、血液或分泌物中提取急性出血性结膜炎病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗原。在体液、血液或分泌物中提取麻风病病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗原。在体液、血液或分泌物中提取丝虫病病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗原。在体液、血液或分泌物中提取包虫病病原相关蛋白质或特异性标志物作为抗原。然后通过动物体内注射方法制备上述抗原对应的抗体。

[0081] (2) 制备六种不同粒径 CdTe/CdS 纳米晶溶液：在 N_2 保护下，将 Te 粉溶于三辛基膦中制备 Te 前驱体，将 S 粉溶于三辛基膦中制备 S 前驱体，然后与制得的 $Cd(OA)_2$ 反应，油酸作为稳定剂的条件下，制的油溶性六种不同粒径的 CdTe/CdS 纳米晶溶液；然后将制得的纳米晶用巯基丙酸进行表面改性，制备水溶性的 CdTe/CdS 纳米晶溶液。

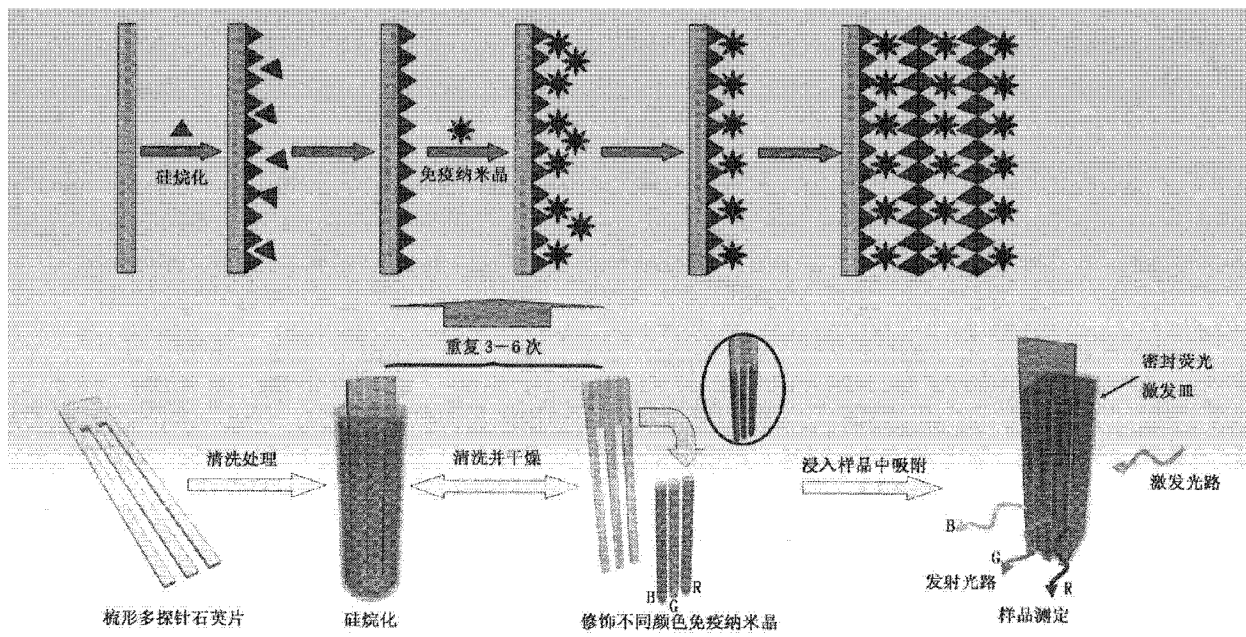
[0082] (3) 分别取六种不同粒径的 CdTe/CdS 纳米晶水溶液 $20\ \mu L$ ，超声分散 20min。然后将一种粒径的纳米晶对应一种抗体分子，按照摩尔比合成制备不同抗体分子修饰的免疫纳米晶。流行性腮腺炎抗体分子，对应粒径的 CdTe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 43 : 1 混合均匀，得到流行性腮腺炎免疫纳米晶；风疹抗体分子，对应粒径的 CdTe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 28 : 1 混合均匀，得到风疹免疫纳米晶；急性出血性结膜炎抗体分子，对应粒径的 CdTe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 33 : 1 混合均匀，得到急性出血性结膜炎免疫纳米晶；麻风病抗体分子，对应粒径的 CdTe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 39 : 1 混合均匀，得到麻风病免疫纳米晶；丝虫病抗体分子，对应粒径的 CdTe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 31 : 1 混合均匀，得到丝虫病免疫纳米晶；包虫病抗体分子，对应粒径的 CdTe/CdS 纳米晶水溶液按摩尔比为 42 : 1 混合均匀，得到包虫病免疫纳米晶；然后对所有的免疫纳米晶进行必要的分离提纯。

[0083] (4) 如图所示，设计制作六探针梳形石英片。将所用石英片用 $0.1\text{mol/LH}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ 溶液清洗，然后用超纯水彻底清洗数次，吹干；将清洗并干燥的梳形多探针石英片用 3-氨基丙基三甲氧基硅烷处理 10min。将处理好的梳形多探针石英片浸入经步骤 (3) 纯化过的免疫纳米晶溶液中；，每一根探针进入到一种疾病抗体的免疫纳米晶溶液中，将按上述方法制备的免疫纳米晶分别修饰至六探针梳形石英片的探针表面上；将修饰有免疫纳米晶梳形多探针石英片用超纯水彻底清洗数次，吹干；重复上述过程 5 次，制得所述多层免疫纳米晶修饰的六探针石英片。

[0084] (6) 将修饰好的梳形六探针石英片用 $50\ \mu L$ 超纯水清洗石英片及其修饰层 6 遍，将石英片及修饰层中的残留溶液完全清洗干净。

[0085] (7) 如图所示，将修饰有流行性腮腺炎、风疹、急性出血性结膜炎、麻风病抗原黑热病、丝虫病、包虫病免疫纳米晶的梳形六探针石英片在未经任何处理的体液、血液或分泌物样品中浸泡 7min 后，用超纯水清洗干净，置于石英荧光激发皿发射光路中，构成体外即时同时诊断监测丙类传染病流行性腮腺炎、风疹、急性出血性结膜炎、麻风病抗原黑热病、丝虫病、包虫病的免疫纳米晶石英荧光传感器。将制得体外即时同时诊断监测丙类传染病流行性腮腺炎、风疹、急性出血性结膜炎、麻风病抗原黑热病、丝虫病、包虫病的免疫纳米晶石英荧光传感器配合手提式荧光仪，根据六种不同粒径免疫纳米晶发射峰位置的荧光强度对丙类传染病进行流行性腮腺炎、风疹、急性出血性结膜炎、麻风病抗原黑热病、丝虫病、包虫

病诊断监测。



专利名称(译)	基于免疫纳米晶的现场快速体外即时多疾病同时诊断石英荧光传感器的研究与应用		
公开(公告)号	CN102033125B	公开(公告)日	2013-08-14
申请号	CN201010524183.9	申请日	2010-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	济南大学		
申请(专利权)人(译)	济南大学		
当前申请(专利权)人(译)	济南大学		
[标]发明人	于京华 葛磊 王寿梅 颜梅 杨萍 黄加栋 王珊 张丛丛		
发明人	于京华 葛磊 王寿梅 颜梅 杨萍 黄加栋 王珊 张丛丛		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	Y02A50/53 Y02A50/59		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN102033125A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种现场快速体外即时多疾病同时诊断监测的免疫纳米晶石英荧光传感器及其诊断监测传染类疾病的方法。免疫纳米晶梳形多探针石英片制备方法，如图所示，包括以下步骤：选择传染病的病原相关蛋白质或其标志物作为抗原；制备纳米晶及按照文献制备免疫纳米晶；利用层层累积表面修饰技术，将不同抗体的免疫纳米晶修饰到梳形石英片不同探针的表面上。一种多疾病同时诊断监测的方法，包括如下步骤：将修饰好的石英片侵入到环境样品溶液、体液、血液或分泌物样品中，置于密封石英激发皿发射光路中，对传染疾病进行诊断监测。本发明的特异性强，灵敏度高；诊断监测时间短；成本低。

