



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106680496 A

(43)申请公布日 2017.05.17

(21)申请号 201611194048.6

B82Y 40/00(2011.01)

(22)申请日 2016.12.21

(71)申请人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山
武汉大学

(72)发明人 庞代文 胡姣 张志凌

(74)专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 42222

代理人 常海涛

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/52(2006.01)

B82Y 20/00(2011.01)

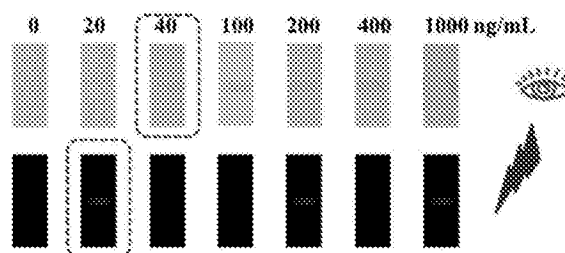
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种比色荧光双信号纳米球的制备及其在
免疫层析定量检测中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种比色荧光双信号纳米球的制备及其在免疫层析定量检测中的应用,属于医学检验领域。以纳米球为主体,通过超声溶胀的方法或者组装法将的荧光量子点包埋到纳米球的内部或者组装到纳米球的表面构建表面富含羧基、粒径为100~500 nm的荧光纳米球;再用组装法将纳米金组装到荧光纳米球表面得到比色荧光双信号纳米球。将比色荧光双信号纳米球结合免疫层析技术,可实现目标物同时目视定性和荧光定量检测。该双信号纳米球具有荧光信号、比色信号放大作用。采用该双信号纳米球作为标记物的免疫层析法,简便快速,相比传统的胶体金免疫层析试纸条,具有灵敏度高、重现性好、可准确定量等优势。



1. 一种比色荧光双信号纳米球的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 以表面富含羧基的纳米球为主体,通过超声溶胀的方法将疏水的荧光量子点包埋到纳米球的内部构建表面富含羧基的荧光纳米球;

或者通过层层组装法将聚乙烯亚胺和疏水的荧光量子点依次组装到纳米球的表面,然后在表面包裹硅壳得到氨基的荧光纳米球,最后通过与丁二酸酐反应得到表面富含羧基的荧光纳米球;

所述的荧光纳米球的粒径为100~500 nm;

(2) 用组装法将纳米金组装到荧光纳米球表面得到比色荧光双信号纳米球。

2. 根据权利要求1所述的比色荧光双信号纳米球的制备方法,其特征在于:步骤(1)中所述的纳米球包括聚合物纳米球、硅球。

3. 根据权利要求1所述的比色荧光双信号纳米球的制备方法,其特征在于:步骤(1)中所述的量子点包括CdSe、CdS、CdTe。

4. 根据权利要求1所述的比色荧光双信号纳米球的制备方法,其特征在于:步骤(2)中所述的纳米金的粒径为13~40 nm。

5. 根据权利要求1所述的比色荧光双信号纳米球的制备方法,其特征在于:步骤(2)中荧光纳米球与纳米金的摩尔比为1:20。

6. 一种比色荧光双信号纳米球,其特征在于:通过权利要求1-5任一项所述的方法制备得到。

7. 权利要求6所述的比色荧光双信号纳米球在免疫层析检测中的应用。

8. 一种基于权利要求6所述的比色荧光双信号纳米球的免疫层析试纸条,其特征在于:包括样品垫、硝酸纤维素膜、吸水纸和底板,底板上顺次搭接样品垫、硝酸纤维素膜和吸水纸;所述的硝酸纤维素膜上设定有定量线和质控线,定量线固定有能与待检目标物结合的抗体、抗原或者其他特异性结合物质;质控线固定有比色荧光双信号纳米球上所标记的物质的抗体。

9. 一种免疫层析检测方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 用化学交联剂将待检目标物对应的抗体或者识别分子偶联至权利要求6所述的比色荧光双信号纳米球表面,得到免疫双信号纳米球;

(2) 将待检样品、免疫双信号纳米球和层析液混匀,混合液体滴加到权利要求8所述的免疫层析试纸条的样品垫上,静置15~20分钟;

(3) 对检测结果进行定性或定量判断。

10. 根据权利要求9所述的免疫层析检测方法,其特征在于:

步骤(1)中偶联的方法为EDC/NHS活化法,偶联后得到的免疫双信号纳米球再用BSA进行封闭;

步骤(2)中所述的层析液为包含1%牛血清白蛋白和1%吐温-20的pH 7.4的PBS;

步骤(3)中,定性判断的方法为:层析结束后,通过目视观察纳米金的比色信号,或者在紫外灯下观察纳米球的荧光信号进行定性检测;定量判断的方法为:层析结束后,通过荧光显微镜对试纸条进行检测,获取定量线的荧光信号强度,并根据标准曲线实现对待检目标物的定量检测。

一种比色荧光双信号纳米球的制备及其在免疫层析定量检测中的应用

[0001]

技术领域

[0002] 本发明涉及医学检验领域,具体是涉及一种比色荧光双信号纳米球的制备及其在免疫层析定量检测中的应用。

背景技术

[0003] 免疫层析法快速检测因简单、快速引起人们的广泛关注。免疫层析法在免疫分析、食品安全、环境监测等领域得到了广泛的应用。它通常是以硝酸纤维素膜作为层析膜,在毛细作用下使样品溶液在层析膜上流动,样品中的目标物会与层析膜上检测区域的待测物的受体(抗体或者抗原)发生特异性的免疫反应。传统的免疫层析法利用胶体金作为标记物,可使检测区域聚集纳米金从而显色,通过判断胶体金的比色信号来进行定性或者半定量检测。当检测低浓度的目标物时,胶体金的信号较弱导致误判结果,因此传统的胶体金层析法灵敏度较低。而且检测时基于纳米金的颜色进行定性分析,存在不能定量的缺点,限制了免疫层析的应用范围。

[0004] 近年来,出现了很多替代胶体金的荧光标记材料,如染料、上转换材料、量子点等荧光材料。荧光材料因具有更高的信噪比,而且荧光强度在一定范围内与材料的浓度呈线性,被广泛用于生物检测领域。它们很好的解决了金标免疫层析系统中灵敏度低、无法定量检测的问题。然而基于荧光信号的检测需要紫外光激发,对于医疗条件差的地区或者是家庭使用则十分不方便,从而应用范围在很大程度上受到了限制。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种比色荧光双信号纳米球的制备方法,以及该比色荧光双信号纳米球在免疫层析检测中的应用。使用本发明的比色荧光双信号纳米球能够在实现待检目标物可视化检测的同时实现定量检测。

[0006] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

一种比色荧光双信号纳米球的制备方法,包括如下步骤:

(1)以表面富含羧基官能团的纳米球为主体,通过超声溶胀的方法将疏水的荧光量子点包埋到纳米球的内部构建表面富含羧基的荧光纳米球;

或者通过层层组装法将聚乙烯亚胺和疏水的荧光量子点依次组装到纳米球的表面,然后在表面包裹硅壳得到氨基的荧光纳米球,最后通过与丁二酸酐反应得到表面富含羧基的荧光纳米球。

[0007] 所述的荧光纳米球的粒径为100~500 nm。

[0008] (2)用组装法将纳米金组装到荧光纳米球表面得到同时具备比色信号和荧光信号的比色荧光双信号纳米球。

[0009] 步骤(1)中所述的纳米球包括聚合物纳米球、硅球,如聚苯乙烯-丙烯酰胺共聚纳米球;所述的量子点包括CdSe、CdS、CdTe等各种可见波段量子产率较高的量子点。

[0010] 步骤(2)中所述的纳米金的粒径优选为13~40 nm;荧光纳米球与纳米金的摩尔比优选为1:20。

[0011] 一种比色荧光双信号纳米球,通过上述方法制备得到。

[0012] 所述的比色荧光双信号纳米球标记抗体、抗原或者其他特异性结合物质后,可用于免疫层析检测。

[0013] 一种基于比色荧光双信号纳米球的免疫层析试纸条,其组装示意图如图1所示,包括样品垫、硝酸纤维素膜、吸水纸和底板,底板上顺次搭接样品垫、硝酸纤维素膜和吸水纸。所述的硝酸纤维素膜上设定有定量线和质控线,定量线固定有能与待检目标物结合的抗体、抗原或者其他特异性结合物质;质控线固定有比色荧光双信号纳米球上所标记的物质(抗体、抗原或者其他特异性结合物质)的抗体。

[0014] 一种使用比色荧光双信号纳米球的免疫层析检测方法,包括如下步骤:

(1)用化学交联剂将待检目标物对应的抗体或者识别分子偶联至比色荧光双信号纳米球表面,得到免疫双信号纳米球。

[0015] (2)将待检样品、免疫双信号纳米球和层析液混匀,混合液体滴加到上述免疫层析试纸条的样品垫上,静置15~20分钟。

[0016] (3)对检测结果进行定性或定量判断。

[0017] 步骤(1)中偶联的方法优选为EDC(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐)/NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)活化法,偶联后得到的免疫双信号纳米球再用BSA(牛血清白蛋白)进行封闭。

[0018] 步骤(2)中所述的层析液优选为包含1%(质量百分比浓度)牛血清白蛋白和1%(质量百分比浓度)吐温-20的pH 7.4的PBS。

[0019] 步骤(3)中定性判断的方法为:层析结束后,通过目视观察纳米金的比色信号,或者在紫外灯下观察纳米球的荧光信号进行定性检测;定量判断的方法为:层析结束后,通过荧光显微镜对试纸条进行检测,获取定量线的荧光信号强度,并根据标准曲线实现对待检目标物的定量检测。

[0020] 本发明充分利用量子点的超强的荧光信号及纳米金优异的比色信号制备比色荧光双信号纳米球,将其结合免疫层析技术,实现目标物同时目视定性和荧光定量检测。该双信号纳米球具有信号放大作用,通过将大量量子点包埋于共聚纳米球的内部放大了量子点的荧光信号;同时,一颗纳米球表面组装有多颗纳米金,实现了纳米金比色信号的放大。本发明的主要优点如下:

(1)本发明以苯乙烯-丙烯酰胺共聚纳米球为主体,通过包埋法将量子点包埋到其内部,然后将纳米金组装到其表面,从而构建比色荧光双信号纳米球。同时具备比色信号和荧光信号。

[0021] (2)本发明采用量子点作为荧光信号放大的指示物质包埋于共聚纳米球的内部,相较于有机荧光染料,具有发光强度高、激发光谱宽、发射光谱窄等优势。而且荧光纳米球放大了量子点的荧光信号。

[0022] (3)本发明只需改变量子点的粒径或者种类,即可得到不同发射波长的荧光,得到

不同类型的比色荧光双信号纳米球,可通过荧光信号实现多组分的定性、定量检测。方法简单快速,灵敏度高。

[0023] 本发明既可目视定性分析又可实现对目标物的定量检测。本发明方法与传统胶体金免疫层析法相比,具有灵敏度高、重现性好、可准确定量等优势。

附图说明

[0024] 图1是免疫层析试纸条的组装示意图,其中1为样品垫,2为硝酸纤维素膜,3为吸水纸,4为定量线,5为质控线,6为底板。

[0025] 图2是比色荧光双信号纳米球的透射电镜、扫描电镜和紫外吸收光谱图,其中A为透射电镜图,B为扫描电镜图,C为紫外吸收光谱图。

[0026] 图3是比色荧光双信号纳米球的荧光显微镜图。

[0027] 图4是可视化检测埃博拉病毒表面糖蛋白的结果图,上层为直接目视图、下层为紫外灯下目视图。

[0028] 图5是定量检测埃博拉病毒表面糖蛋白的结果图。

具体实施方式

[0029] 以下实施例仅用于进一步说明本发明,但不应理解为对本发明的限制。

[0030] 实施例1 埃博拉病毒表面糖蛋白的定量检测

下面以埃博拉病毒表面糖蛋白为例,对比色荧光双信号纳米球免疫夹心法定量检测的方法进行详细的说明。在本实施例中,所用的免疫层析试纸条仅设置了定量线。

[0031] 一、方法

1. 比色荧光双信号纳米球的制备

以表面羧基化的苯乙烯-丙烯酰胺共聚纳米球(Pst-AAm-COOH)为载体,通过超声溶胀的方法,利用疏水相互作用,将疏水的量子点包埋到纳米球的内部。具体步骤如下:首先通过无皂乳液聚合法制备苯乙烯-丙烯酰胺共聚纳米球(100 mL超纯水中加热通入氮气除氧后依次加入10 mL苯乙烯、2.5 g丙烯酰胺、0.25 g过硫酸钾,70℃,700 rpm搅拌反应12 h);然后将苯乙烯-丙烯酰胺共聚纳米球与水合肼反应(体积比为4:1,55℃反应12 h),得到表面有酰胺基的共聚纳米球;最后将表面有酰胺基的共聚纳米球与丁二酸酐在 pH为4的条件下反应(质量比为1:1)12 h,最终得到表面含有丰富羧基粒径约为260 nm的苯乙烯-丙烯酰胺共聚纳米球(Pst-AAm-COOH)。将0.5 mg发射波长为608nm的疏水的量子点(CdSe/ZnS QDs)分散于氯仿/正丁醇(体积比为95:5),然后将量子点的溶液加入到20 mg共聚纳米球中,超声30 min后用己烷离心洗涤(6000 rpm×1 min)除去多余的量子点,然后用乙醇洗涤(12000 rpm×5 min)三次,最后用1 mL超纯水超声分散,从而得到表面带有羧基、粒径约为270 nm的红色荧光纳米球(RNs)。

[0032] 利用柠檬酸钠还原法制备粒径为20 nm的纳米金。将20 nm的纳米金与红色荧光纳米球以20:1的摩尔比混合孵育30 min后用超纯水离心洗涤(12000 rpm×5 min)三次,最后将其用1 mL超纯水分散,得到比色荧光双信号纳米球。

[0033] 2. 免疫比色荧光双信号纳米球的制备

取大约2 mg比色荧光双信号纳米球分散到300 μ L 0.01 M pH 6.8的PBS中,并加入100

μL 50 mM EDC/NHS,活化20 min,用0.01 M pH 7.2的PBS离心洗涤一次,然后分散到400 μL 0.01 M pH 7.2的PBS中,加入10 μg 的埃博拉病毒表面糖蛋白的抗体,反应4 h,用0.01 M pH 7.2的PBS离心洗涤五次,即得到了对糖蛋白靶向的免疫比色荧光双信号纳米球。最后用BSA封闭后置于4°C冰箱中待用。

[0034] 3. 埃博拉病毒表面糖蛋白样品的检测

将4 μL 免疫比色荧光双信号纳米球(1.89 nM)、1 μL 不同浓度的埃博拉病毒表面糖蛋白样品与45 μL 层析液(包含1% BSA和1%吐温-20的0.01 M 7.4 PBS)混合均匀,得到一系列埃博拉病毒表面糖蛋白终浓度为20 ng/mL、40 ng/mL、100 ng/mL、400 ng/mL、1000 ng/mL的混合溶液。将混合液体加到免疫层析试纸条的样品垫上。20 min后用倒置荧光显微镜拍定量线区域的图片,并测定定量线的平均荧光强度。

[0035] 所用免疫层析试纸条包括品垫、硝酸纤维素膜、吸水纸和底板,硝酸纤维素膜上设定有定量线,定量线固定有埃博拉病毒表面糖蛋白的抗体;底板上顺次搭接样品垫、硝酸纤维素膜和吸水纸。

[0036] 4. 定量检测曲线

将不同浓度的埃博拉病毒表面糖蛋白,按照3描述的步骤进行检测,并测定每个样品检测区域(定量线)的平均荧光强度,绘制埃博拉病毒表面糖蛋白浓度与荧光强度关系曲线并拟合。

[0037] 二、结果

1. 比色荧光双信号纳米球的表征

透射电镜可以看到量子点很好地分散在共聚纳米球里,而纳米金则在纳米球的表面(图2A)。扫描电镜则可以更加清楚地看到纳米金在共聚纳米球表面(图2B)。而且紫外吸收光谱(图2C)可以看到,该比色荧光双信号纳米球具有纳米金的特征吸收峰,而且峰位置由520nm处红移至527 nm处。这是由于纳米金固定到纳米球表面后,纳米金之间的距离减小。

[0038] 2. 比色荧光双信号纳米球的荧光信号

由显微镜图(图3)可以看出,比色荧光双信号纳米球表现出很强的荧光。

[0039] 3. 埃博拉病毒表面糖蛋白的检测

检测埃博拉病毒表面糖蛋白的可视化结果见图4所示。在没有任何仪器的条件下,目测可以看到40 ng/mL的糖蛋白的信号;在手持式紫外灯照射下,可以看到20 ng/mL的糖蛋白的信号。通过测量检测区的荧光强度,建立了埃博拉病毒表面糖蛋白检测的定量关系。如图5所示,埃博拉病毒表面糖蛋白浓度在20~1000 ng/mL浓度范围内该方法呈现很好的定量关系($R^2=0.995$)最低检出限为3.3 ng/mL。

[0040] 通过以上各项检测,证明本发明方法可以应用于埃博拉病毒表面糖蛋白的超灵敏定量的检测,操作简单快速,灵敏度高。直接目视检测限可达到40 ng/mL,紫外灯下目视可达20 ng/mL;定量检出限低至3.3 ng/mL,且批内差与批间差精密度均较好,相关系数 $R^2>0.99$,对埃博拉病毒的快速检测具有一定的意义。

[0041] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

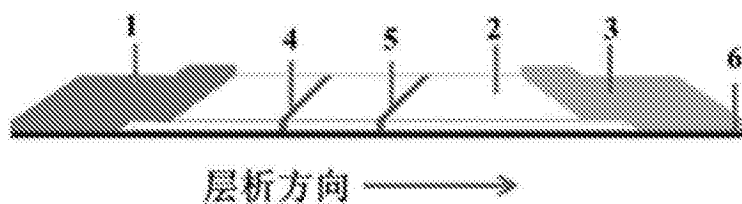


图1

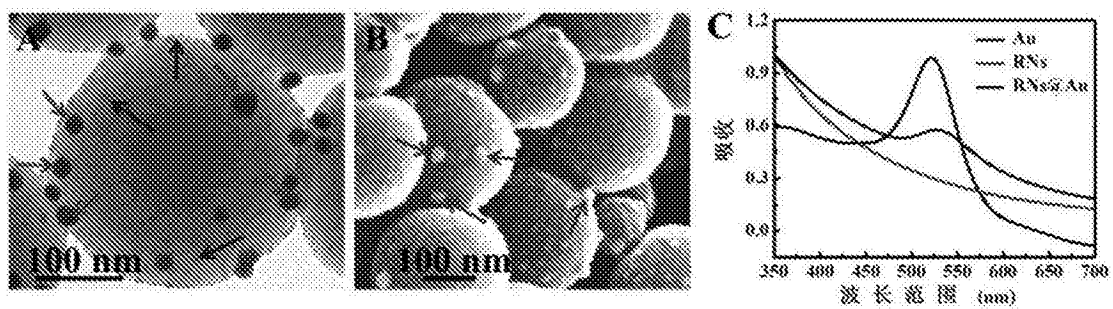


图2

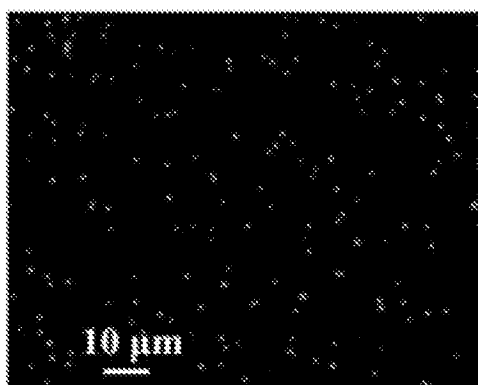


图3

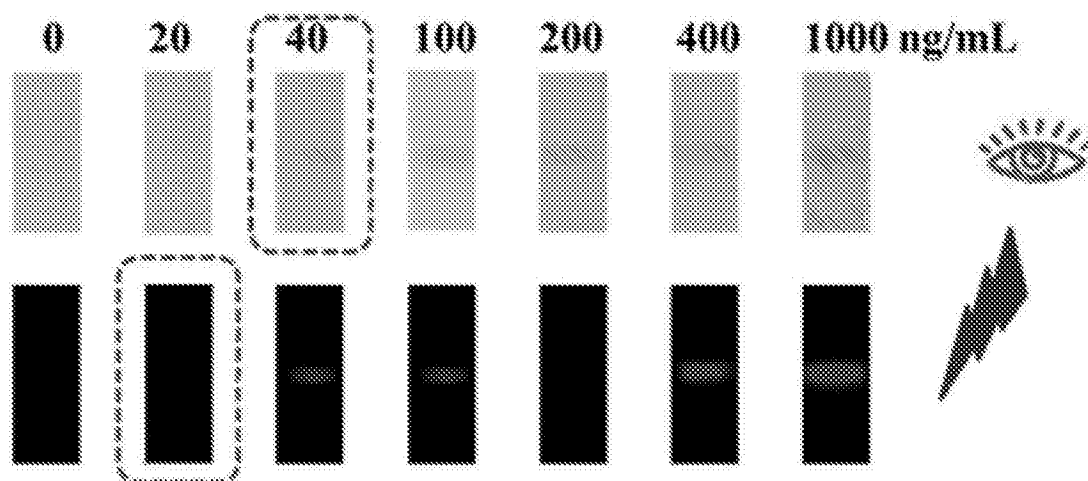


图4

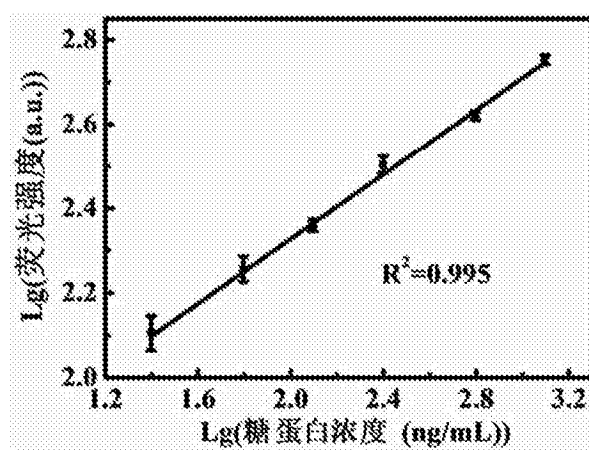


图5

专利名称(译)	一种比色荧光双信号纳米球的制备及其在免疫层析定量检测中的应用		
公开(公告)号	CN106680496A	公开(公告)日	2017-05-17
申请号	CN201611194048.6	申请日	2016-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	武汉大学		
申请(专利权)人(译)	武汉大学		
当前申请(专利权)人(译)	武汉大学		
[标]发明人	庞代文 胡姣 张志凌		
发明人	庞代文 胡姣 张志凌		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/533 G01N33/52 B82Y20/00 B82Y40/00		
CPC分类号	B82Y20/00 B82Y40/00 G01N33/52 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/56983 G01N2333/08		
代理人(译)	常海涛		
其他公开文献	CN106680496B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种比色荧光双信号纳米球的制备及其在免疫层析定量检测中的应用，属于医学检验领域。以纳米球为主体，通过超声溶胀的方法或者组装法将的荧光量子点包埋到纳米球的内部或者组装到纳米球的表面构建表面富含羧基、粒径为100~500 nm的荧光纳米球；再用组装法将纳米金组装到荧光纳米球表面得到比色荧光双信号纳米球。将比色荧光双信号纳米球结合免疫层析技术，可实现目标物同时目视定性和荧光定量检测。该双信号纳米球具有荧光信号、比色信号放大作用。采用该双信号纳米球作为标记物的免疫层析法，简便快速，相比传统的胶体金免疫层析试纸条，具有灵敏度高、重现性好、可准确定量等优势。

