(19)中华人民共和国国家知识产权局



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 109187981 A (43)申请公布日 2019.01.11

(21)申请号 201810865711.3

GO1N 33/532(2006.01)

(22)申请日 2018.08.01

(71)申请人 万东山

地址 471000 河南省洛阳市涧西区高新三山路7号院

(72)发明人 万东山 郭兰英

(74) **专利代理机构** 洛阳公信知识产权事务所 (普通合伙) 41120

代理人 许菲菲

(51) Int.CI.

GO1N 33/68(2006.01)

GO1N 33/558(2006.01)

GO1N 33/577(2006.01)

GO1N 33/543(2006.01)

GO1N 33/58(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

(54)发明名称

一种快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫 层析试纸条与应用

(57)摘要

本发明属于免疫检测技术领域,具体涉及一种快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条与应用。所述的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条,包含设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜、包被量子点微球偶联Aβ40和Aβ42多克隆抗体的玻璃纤维膜、底板、样品垫和吸水垫。本发明提供的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条通过量子点免疫层析技术,可实现一次反应同时检测Aβ40、Aβ42抗原指标,避免了不同蛋白互相产生交叉的问题,检测时间短,灵敏度高于酶联免疫方法10倍以上,特异性强,反应速度快,准确性高,定量准

CN 109187981 A

1.一种快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条,其特征在于包含设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜、包被量子点微球偶联Aβ40和Aβ42多克隆抗体的玻璃纤维膜;

所述的设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜依次设有Aβ40单克隆抗体、Aβ42单克隆抗体和DNP抗体,形成检测区T1、检测区T2和质控区C。

2.根据权利要求1所述的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条,其特征在于:

所述的检测区T1和检测区T2之间的间距为0.5cm;

所述的检测区T2和质控区C之间的间距为0.5cm。

3.根据权利要求1所述的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条,其特征在于:

所述的设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜的制备方法,包含如下步骤:

- (1) 将AB40单克隆抗体、AB42单克隆抗体用含有海藻糖的磷酸盐缓冲液分别稀释至浓度为1.0~2.5mg/mL,DNP抗体稀释至浓度为0.75~2.5mg/mL,得到B40单克隆抗体工作液、AB42单克隆抗体工作液和DNP抗体工作液:
- (2) 将步骤(1) 制得的β40单克隆抗体工作液、Aβ42单克隆抗体工作液和DNP抗体工作液分别在硝酸纤维素膜上划膜,形成检测区T1、检测区T2和质控区C,干燥,得到设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜。
- 4.根据权利要求3所述的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条,其特征在干:
- 步骤(1)中所述的含有海藻糖的磷酸盐缓冲液为含有质量分数为1%海藻糖的0.01M磷酸盐缓冲液,pH7.5~8.5。
- 5.根据权利要求1所述的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条,其特征在于:

所述的包被量子点微球偶联Aβ40和Aβ42多克隆抗体的玻璃纤维膜的制备方法,包含如下步骤:

(1) QD₆₅₅量子点微球标记Aβ40多克隆抗体、QD₅₆₅量子点微球标记Aβ42多克隆抗体

将QD655量子点微球、QD565量子点微球分别用活化缓冲液洗涤并稀释,得到QD655量子点微球溶液、QD565量子点微球溶液;将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与QD655量子点微球溶液、QD565量子点微球溶液分别混合,25℃±0.1℃振荡30~60min,离心,弃上清,然后用偶联液洗涤,得到洗涤后的QD655量子点微球、QD565量子点微球;然后按照每毫克量子点微球加入10μg抗体蛋白的配比,在洗涤后的QD655量子点微球、QD565量子点微球中分别加入Aβ40多克隆抗体、Aβ42多克隆抗体,2~8℃振荡18~24h;加入封闭液25℃±0.1℃振荡60~120min,离心,弃上清,然后用保存液洗涤并稀释,分别得到QD655量子点微球标记的Aβ40多克隆抗体、QD565量子点微球标记的Aβ42多克隆抗体;

(2) QD655 量子点微球或QD565 量子点微球标记DNP-BSA

将QD₆₅₅量子点微球或QD₅₆₅量子点微球用活化缓冲液洗涤并稀释,得到QD₆₅₅量子点微球溶液或QD₅₆₅量子点微球溶液;将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与QD₆₅₅量子点微球溶液或QD₅₆₅量子点微球溶液混合,25℃±0.1℃振荡30~60min,离心,弃上清,然后用偶联液洗涤,得到洗涤后的QD₆₅₅量子点微球或QD₅₆₅量子点微球;然后按照每毫克量子点

微球加入 10μ g蛋白的配比,在洗涤后的QD₆₅₅量子点微球或QD₅₆₅量子点微球中加入DNP-BSA, $2\sim8$ ℃振荡 $18\sim24h$;加入封闭液25℃±0.1℃振荡 $60\sim120$ min,离心,弃上清,然后用保存液洗涤并稀释,得到QD₆₅₅量子点微球标记的DNP-BSA或QD₅₆₅量子点微球标记的DNP-BSA;

- (3) 将步骤(1) 制得的QD₆₅₅量子点微球标记的AB40多克隆抗体、QD₅₆₅量子点微球标记的AB42多克隆抗体和步骤(2) 制得的QD₆₅₅量子点微球标记的DNP-BSA或QD₅₆₅量子点微球标记的DNP-BSA等体积混合,得到混合物;将混合物涂覆在玻璃纤维膜上,干燥,得到包被量子点微球偶联AB40和AB42多克隆抗体的玻璃纤维膜。
- 6.根据权利要求5所述的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条,其特征在于:
- 步骤(1)中所述的QD₆₅₅量子点微球标记的AB40多克隆抗体或QD₅₆₅量子点微球标记的AB42多克隆抗体中量子点微球的浓度为1mg/mL;
- 步骤(2)中所述的QD₆₅₅量子点微球标记的DNP-BSA或QD₅₆₅量子点微球标记的DNP-BSA中量子点微球的浓度为1mg/mL。
- 7.根据权利要求5所述的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条,其特征在于:
- 步骤(3)中所述的QD₆₅₅量子点微球标记的AB40多克隆抗体、QD₅₆₅量子点微球标记的AB42多克隆抗体和QD₆₅₅量子点微球标记的DNP-BSA等体积混合。
- 8.根据权利要求1所述的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条,其特征在于还包含底板、样品垫和吸水垫。
- 9.根据权利要求8所述的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条,其特征在于:

所述的样品垫、包被量子点微球偶联AB40和AB42多克隆抗体的玻璃纤维膜、设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜和吸水垫依次粘贴在底板上。

10.权利要求1~9所述的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条在检测β-淀粉样蛋白中的应用。

一种快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条与应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测技术领域,具体涉及一种快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条与应用。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD),由巴伐利亚的神经病理学家阿尔茨海默于1907年首先发现,并以其名字命名,是一种中枢神经系统变性病,起病隐袭,病程呈慢性进行性,主要表现为渐进性记忆障碍、认知功能障碍、人格改变及语言障碍等神经精神症状,严重影响社交、职业与生活功能。阿尔茨海默病是老年痴呆最常见的一种类型,约占所有痴呆的50~60%,据统计在西方国家,大于或等于85岁年龄组的患病率在24~33%之间,虽然发展中国家缺少权威性和代表性数字统计,但是估计世界上60%的痴呆患者存在于发展中国家。AD的病因及发病机制尚未阐明,特征性病理改变为β-淀粉样蛋白沉积形成的细胞外老年斑和tau蛋白过度磷酸化形成的神经细胞内神经原纤维缠结,以及神经元丢失伴胶质细胞增生等。因此β-淀粉样蛋白可以作为阿尔茨海默病为代表的以血管增生为特点的疾病诊断指标。

[0003] 1930年,Divry用刚果红对AD病人脑中的损害区域进行能够染色,成功地使沉积在细胞外的老年斑着色,进而发现老年斑的主要成分是一种嗜刚果红的淀粉样蛋白,1984年Glenner等分别成功地完成了对这种蛋白的分离和测序工作,发现此蛋白是由39~43个氨基酸残基组成,因其具有一个β片层的二级结构,遂命名β—淀粉样蛋白,简称Aβ。脑内Aβ来源于其前体物质β淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein,APP)。APP是一种跨膜蛋白质,在体内各种组织广泛存在,而在脑组织的表达最高,在生理条件下,多数APP由A2分泌酶裂解成可溶性的App肽,App肽在进一步由C2分泌酶裂解产生P3极少部分APP在胞质溶酶体经β2分泌酶和C2分泌酶作用裂解为Aβ,从App代谢为β淀粉样蛋白过程分为两步:首先β2分泌酶在Aβ的N末端裂解APP,产生可溶的分泌性的APP衍生物APPS2β和贯穿膜成分的C末端片断,C末端片断进一步由C2分泌酶裂解为Aβ,Aβ有40个氨基酸和42个氨基酸2种形式,其中Aβ42容易引起聚集,具有较强的细胞毒性,在某些病理条件下,APP主要经β2分泌酶和C2分泌酶顺序剪切产生过多的Aβ导致AD病,C2分泌酶在Aβ产生中起非常重要的作用,决定了产生的Aβ42在其中所占的比例。

[0004] β-淀粉样蛋白 (amyloidβ-protein,Aβ) 分子量约4KDa,由β淀粉样前体蛋白 (β-amyloid precursor protein,APP) 水解而来,循环于血液、脑脊液和脑间质液中,大多与伴侣蛋白分子结合,少数以游离状态存在。人体内Aβ最常见的亚型是Aβ40和Aβ42。在人脑脊液和血中,Aβ40分别比Aβ42的含量水平高10倍和1.5倍,Aβ42具有更强的毒性,且更容易聚集,从而形成Aβ沉淀的核心,引发神经毒性作用。Aβ的沉积不仅与神经元的退行性病变有关,而且可以激活一系列病理事件,包括星型胶质细胞和小胶质细胞的激活、血脑屏障的破环和微循环的变化等,是AD病人脑内老年斑周边神经元变性和死亡的主要原因。研究人员认为,β-淀粉样蛋白在脑神经细胞内部的早期蓄积表明,在脑神经细胞外还未出现β-淀粉样蛋白

蓄积时,阿尔茨海默氏症就已经出现。这一发现或有助于提早诊断、治疗阿尔茨海默氏症, 从而尽可能延缓病情恶化。

[0005] 量子点作为一种新型的无机纳米荧光材料被广泛应用于生物和医学领域,在细胞标记、生物分子检测、免疫分析等方面都取得了许多重要成果。与传统有机荧光染料相比,量子点具有激发光谱宽而连续、发射光谱窄而对称、抗光漂白性强、荧光强度高等显著优点。为满足临床快速检测的需要,近年来发展了多种简便、快速的免疫学检测方法,量子点层析技术即为其中一种,近两年新发展的量子点快速测定试纸条主要适用于急诊检验、小型化验室或家中自测,传统的检测手段存在操作繁琐,时间长,需要昂贵的仪器设备等缺陷,量子点由于其优良的荧光性能,近年来在生物化学、细胞生物学、分子生物学等研究领域都显示了极其广阔的应用前景。

与传统有机荧光染料相比,量子点作为荧光探针有不可比拟的优越性:①激发光 谱宽而连续,传统有机荧光试剂激发光谱较窄,不同的有机荧光染料需要不同波长激发光 激发。而量子点能吸收所有比它第一发射波长更短波长的光,因此不同颜色的量子点能用 同一光同时激发,大大简化了实际检测过程,降低了对激发光源的要求。②发射峰窄而对 称,量子点的荧光发射光谱峰形狭窄而对称,半高峰宽(fwhm)通常只有40nm甚至更小,且在 长波方向没有明显的拖尾现象,可以同时使用不同发射峰的量子点,而发射峰不出现重叠。 这种性质使得量子点有可能用作多彩编码应用于生物荧光标记中。③光稳定性强,在持续 光激发下,有机荧光染料的荧光衰减迅速,容易被漂白,这在很大程度上限制了它们在生物 荧光标记上的应用。而量子点由于属于无机纳米颗粒,因此是一种非常稳定的荧光物质,其 抗光漂白性要远远好于有机染料。④发射波长可"调谐",有机荧光染料试剂中,只有极少数 的化合物发射波长可达700nm以上(如菁类荧光染料),而量子点通过改变其尺寸和化学组 成可以使其发射光谱覆盖远紫外到近红外的波长区域,从而弥补了普通荧光分子在近红外 光谱区品种少的不足,量子点发光性质的可控性以及延续性,对于其在各个领域的应用十 分重要。⑤荧光强度高,量子点具有非常高的激发重叠区(excitation cross-sections), 这就意味着他们能吸收大量的激发光;量子点还具有很高的量子产率,因此他们能发射大 量他们所吸收的光。这两个因素都导致量子点的亮度很高,单个量子点也能很容易地被检 测到,相对有机染料提高了检测的灵敏度,这为考察单个生物分子的活动情况以及他们之 间的相互作用提供了有利的工具。

发明内容

[0007] 为了克服现有技术的不足和缺点,本发明的首要目的在于提供一种快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条,该试纸条基于不同粒径的量子点的发光波长不同的特点,采用量子点方法检测β-淀粉样蛋白,一次实验,可同时测定β-淀粉样蛋白40 (Aβ40) 和β-淀粉样蛋白42 (Aβ42) 两个亚基,该试纸条具有灵敏度高,特异性强,反应速度快,可作为家庭快速检测产品,具有广阔的应用前景。

[0008] 本发明的另一目的在于提供上述快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条的制备方法。

[0009] 本发明的再一目的在于提供上述快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条的应用。

[0010] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0011] 一种快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条,包含设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜、包被量子点微球偶联Aβ40和Aβ42多克隆抗体的玻璃纤维膜;

[0012] 所述的设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜依次设有Aβ40单克隆抗体、Aβ42单克隆抗体和DNP抗体,形成检测区T1、检测区T2和质控区C;

[0013] 所述的检测区T1和检测区T2之间的间距优选为0.5cm;

[0014] 所述的检测区T2和质控区C之间的间距优选为0.5cm;

[0015] 所述的设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜的制备方法,包含如下步骤:

[0016] (1) 将Aβ40单克隆抗体、Aβ42单克隆抗体用含有海藻糖的磷酸盐缓冲液分别稀释 至浓度为1.0~2.5mg/mL,DNP抗体稀释至浓度为0.75~2.5mg/mL,得到Aβ40单克隆抗体工 作液、Aβ42单克隆抗体工作液和DNP抗体工作液;

[0017] (2) 将步骤 (1) 制得的Aβ40单克隆抗体工作液、Aβ42单克隆抗体工作液和DNP抗体工作液分别在硝酸纤维素 (NC) 膜上划膜,形成检测区T1、检测区T2和质控区C,干燥,得到设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜;

[0018] 步骤 (1) 中所述的含有海藻糖的磷酸盐缓冲液优选为含有质量分数为1%海藻糖的0.01M磷酸盐缓冲液,pH $7.5\sim8.5$;pH优选为8.0;

[0019] 步骤(1)中所述的AB40单克隆抗体、AB42单克隆抗体优选用含有海藻糖的磷酸盐缓冲液分别稀释至1.5mg/mL;

[0020] 步骤(1)中所述的DNP抗体优选稀释至浓度为1.0mg/mL;

[0021] 步骤 (2) 中所述的硝酸纤维素膜优选为CN 140NC膜 (Sartorius (赛多利斯));

[0022] 步骤(2)中所述的硝酸纤维素膜的孔径优选为8µm,爬行速度110S/4cm;

[0023] 步骤(2)中所述的划膜速度优选为1µL/cm;

[0024] 步骤 (2) 中所述的干燥的条件优选为37℃干燥3~4h;

[0025] 所述的设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜的保存条件优选为1~30℃:

[0026] 所述的包被量子点微球偶联Aβ40和Aβ42多克隆抗体的玻璃纤维膜的制备方法,包含如下步骤:

[0027] (1) QD₆₅₅量子点微球标记Aβ40多克隆抗体、QD₅₆₅量子点微球标记Aβ42多克隆抗体

[0028] 将QD₆₅₅量子点微球、QD₅₆₅量子点微球分别用活化缓冲液洗涤并稀释,得到QD₆₅₅量子点微球溶液、QD₅₆₅量子点微球溶液;将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC)与QD₆₅₅量子点微球溶液、QD₅₆₅量子点微球溶液分别混合,25℃±0.1℃振荡30~60min,离心,弃上清,然后用偶联液洗涤,得到洗涤后的QD₆₅₅量子点微球、QD₅₆₅量子点微球、QD₅₆₅量子点微球、QD₅₆₅量子点微球、QD₅₆₅量子点微球中分别加入AB40多克隆抗体(标记QD₆₅₅)、AB42多克隆抗体(标记QD₅₆₅),2~8℃振荡18~24h;加入封闭液25℃±0.1℃振荡60~120min,离心,弃上清,然后用保存液洗涤并稀释,分别得到QD₆₅₅量子点微球标记的AB40多克隆抗体、QD₅₆₅量子点微球标记的AB42多克隆抗体;

[0029] (2) QD₆₅₅量子点微球或QD₅₆₅量子点微球标记DNP-BSA(半抗原)

[0030] 将QD₆₅₅量子点微球或QD₅₆₅量子点微球用活化缓冲液洗涤并稀释,得到QD₆₅₅量子点微球溶液或QD₅₆₅量子点微球溶液;将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)与

QD655量子点微球溶液或QD565量子点微球溶液混合,25 °C ±0.1° C振荡30~60min,离心,弃上清,然后用偶联液洗涤,得到洗涤后的QD655量子点微球或QD565量子点微球;然后按照每毫克量子点微球加入10µg蛋白的配比,在洗涤后的QD655量子点微球或QD565量子点微球中加入DNP-BSA,2~8° C振荡18~24h;加入封闭液25° C ±0.1° C振荡60~120min,离心,弃上清,然后用保存液洗涤并稀释,得到QD655量子点微球标记的DNP-BSA (半抗原)或QD565量子点微球标记的DNP-BSA (半抗原);

[0031] (3) 将步骤(1) 制得的QD₆₅₅量子点微球标记的Aβ40多克隆抗体、QD₅₆₅量子点微球标记的Aβ42多克隆抗体和步骤(2) 制得的QD₆₅₅量子点微球标记的DNP-BSA(半抗原)或QD₅₆₅量子点微球标记的DNP-BSA(半抗原)等体积混合,得到混合物;将混合物涂覆在玻璃纤维膜上,干燥,得到包被量子点微球偶联Aβ40和Aβ42多克隆抗体的玻璃纤维膜;

[0032] 步骤 (1) 中所述的QD₆₅₅量子点微球溶液和QD₅₆₅量子点微球溶液的浓度优选为1 mg/mL;

[0033] 步骤(1)中所述的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与QD₆₅₅量子点微球溶液或QD₅₆₅量子点微球溶液的质量比优选为<math>1:30;

[0034] 步骤 (1) 中所述的QD₆₅₅量子点微球标记的AB40多克隆抗体或QD₅₆₅量子点微球标记的AB42多克隆抗体中量子点微球的浓度优选为1 mg/mL;

[0035] 步骤 (2) 中所述的QD655量子点微球溶液或QD565量子点微球溶液的浓度优选为1 mg/mL;

[0036] 步骤(2)中所述的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与QD₆₅₅量子点微球溶液或QD₅₆₅量子点微球溶液的质量比优选为<math>1:30:

[0037] 步骤(2)中所述的QD₆₅₅量子点微球标记的DNP-BSA(半抗原)或QD₅₆₅量子点微球标记的DNP-BSA(半抗原)中量子点微球的浓度优选为1mg/mL;

[0038] 步骤(3)中所述的QD₆₅₅量子点微球标记的Aβ40多克隆抗体、QD₅₆₅量子点微球标记的Aβ42多克隆抗体优选和QD₆₅₅量子点微球标记的DNP-BSA等体积混合;

[0039] 步骤(1)和(2)中所述的活化缓冲液优选为0.05M MES;

[0040] 步骤 (1) 和 (2) 中所述的偶联液优选为0.01M PBS,pH7.2~7.4;

[0041] 步骤 (1) 和 (2) 中所述的封闭液优选为含40mM甘氨酸、1wt % B SA的0.01M P B S, pH7. $2\sim7.4$;

[0042] 步骤(1)和(2)中所述的保存液优选为含0.5wt%casine,1wt%P300(ProClin300)的0.01M PBS,pH7.2~7.4;

[0043] 步骤(1)和(2)中所述的用活化缓冲液洗涤、用偶联液洗涤或用保存液洗涤的具体操作优选为用活化缓冲液、偶联液或保存液重悬微球后,离心,弃上清;重复上述操作2~3次;所述的离心条件优选为10000转离心30min;

[0044] 步骤(1)中所述的AB40多克隆抗体标记的QD₆₅₅量子点微球、AB42多克隆抗体标记的QD₅₆₅量子点微球的保存温度优选为2 \sim 8 $^{\circ}$ 0;

[0045] 步骤 (2) 中所述的QD₆₅₅量子点微球标记的DNP-BSA (半抗原) 或QD₅₆₅量子点微球标记的DNP-BSA (半抗原) 的保存温度优选为 $2\sim8\%$:

[0046] 步骤(3)中所述的混合物优选每毫升涂覆8平方厘米的玻璃纤维垫;

[0047] 步骤 (3) 中所述的干燥的温度优选为37℃干燥3~4h;

[0048] 所述的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条,优选还包含底板、样品垫和吸水垫:

[0049] 所述的样品垫、包被量子点微球偶联AB40和AB42多克隆抗体的玻璃纤维膜、设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜和吸水垫依次粘贴在底板上;

[0050] 所述的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条的制备方法,包含如下步骤:

[0051] 将设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜粘贴于底板中部(质控区作为末端),包被量子点微球偶联Aβ40和Aβ42多克隆抗体的玻璃纤维膜紧贴硝酸纤维素膜前端,样品垫置于玻璃纤维膜前端;吸水垫置于硝酸纤维素膜末端;

[0052] 所述的样品垫、包被量子点微球偶联Aβ40和Aβ42多克隆抗体的玻璃纤维膜、设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜和吸水垫之间相互重叠:

[0053] 所述的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条在检测β-淀粉样蛋白中的应用;

[0054] 所述的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条在检测β-淀粉样蛋白中的应用,优选具体包含如下步骤:

[0055] 将待测样品加入样品垫,放置7~10min后,用量子点测定仪测定量子点的荧光;

[0056] 所述的待测样品的体积优选为75µL;

[0057] 所述的放置的时间优选为8min:

[0058] 所述的应用不包含疾病的治疗与诊断目的;

[0059] 本发明的原理:

[0060] 本发明将AB40、AB42多克隆抗体分别偶联在不同粒径的量子点微球上,用偶联后的AB40、AB42单克隆抗体在NC膜划线,组装成量子点荧光试纸条,通过建立AB40、AB42的标准曲线,定量检测AB40、AB42。具体过程如下:在样品纤维上加入待测样本,通过量子点免疫层析反应,样本中含有AB40、AB42蛋白与量子点标记的AB40、AB42多克隆抗体结合形成免疫复合物,由于层析作用反应复合物沿硝酸纤维膜向前移动,被NC膜上检测线上的划膜AB40、AB42单克隆抗体捕获,样本中的AB40、AB42蛋白量与量子点信号强度成正比,通过量子点检测仪的检测,可分别检测出AB40、AB42的浓度。

[0061] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0062] (1) 本发明提供的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条通过量子点免疫层析技术,可实现一次反应同时检测Aβ40、Aβ42抗原指标。

[0063] (2) 本发明提供的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条避免了不同蛋白互相产生交叉的问题,检测时间短,灵敏度高于酶联免疫方法10倍以上,特异性强,反应速度快,准确性高,定量准确。

[0064] (3) 本发明采用含有海藻糖的的磷酸盐缓冲液配制AB40单克隆抗体、AB42单克隆抗体,划膜后仍旧保持效价高、特异性好的优势。

[0065] (4) 本发明中AB40和AB42多克隆抗体采用EDC方法共价偶联量子点微球,连接效果好,仍旧保持效价高、特异性好的优势。

[0066] (5) 本发明提供的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条,无须大型仪器,使用简便,在一般的小型诊所或者家庭均可轻松使用,对阿尔茨海默病患者的诊断提供

一种方法,为人类预防老年痴呆症提供了有力的检测工具,具有广阔的应用前景。

具体实施方式

[0067] 下面结合实施例对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0068] 实施例中硝酸纤维素膜 (NC膜,型号sartorugs CN 140,孔径为8μm,爬行速度 110S/4cm) 购自Sartorius, QD_{655} 量子点微球、 QD_{565} 量子点微球、 QD_{565} 量子点微球购自武汉珈源量子点技术开发有限公司, β -淀粉样蛋白40 ($A\beta$ 40) 单克隆抗体、 β -淀粉样蛋白42 ($A\beta$ 42) 单克隆抗体、 β -淀粉样蛋白40 ($A\beta$ 40) 多克隆抗体和 β -淀粉样蛋白42 ($A\beta$ 42) 多克隆抗体购自Invitrogen, β -淀粉样蛋白40 ($A\beta$ 40) 抗原、 β -淀粉样蛋白42 ($A\beta$ 42) 抗原、DNP-BSA购自Sigma,化学试剂等购自Sigma。

[0069] 实施例1

[0070] (1) 设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜的制备

[0071] ①将Aβ40单克隆抗体、Aβ42单克隆抗体用含有质量分数为1%海藻糖的0.01M磷酸盐缓冲液 (pH=8,使用前采用0.22μm进行过滤)分别稀释至浓度为1.5mg/mL,DNP抗体稀释至浓度为1mg/mL,得到Aβ40单克隆抗体工作液、Aβ42单克隆抗体工作液和DNP抗体工作液;

[0072] ②将步骤(1)制得的AB40单克隆抗体工作液、AB42单克隆抗体工作液和DNP抗体工作液用划膜仪分别在NC膜上划膜,划膜速度为1 μ L/cm,其中,AB40单克隆抗体在0.8cm处划膜,AB42单克隆抗体在1.3cm处划膜,DNP抗体在1.8cm处划膜,形成检测区T1、检测区T2和质控区C,然后37℃干燥3.5h,得到设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜,该硝酸纤维素膜保存条件为20℃;

[0073] (2) 包被量子点微球偶联Aβ40和Aβ42多克隆抗体的玻璃纤维膜的制备

[0074] ①QD655量子点微球标记AB40多克隆抗体、QD565量子点微球标记AB42多克隆抗体

[0075] 将QD₆₅₅量子点微球、QD₅₆₅量子点微球分别用活化缓冲液 (0.05M MES) 洗涤 (用活化缓冲液重悬微球后,10000转离心30min,弃上清;重复上述操作2次) 并稀释至1mg/mL,得到QD₆₅₅量子点微球溶液、QD₅₆₅量子点微球溶液;将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 与QD₆₅₅量子点微球溶液、QD₅₆₅量子点微球溶液分别按照质量比1:30混合,25℃振荡30min,离心,弃上清,然后用偶联液 (0.01M PBS,pH7.4) 洗涤2次 (方法同上),得到洗涤后的QD₆₅₅量子点微球、QD₅₆₅量子点微球;然后按照每毫克量子点微球加入10μg抗体蛋白的配比,在洗涤后的QD₆₅₅量子点微球、QD₅₆₅量子点微球中分别加入Aβ40多克隆抗体 (标记QD₆₅₅)、Aβ42多克隆抗体 (标记QD₅₆₅),4℃振荡18h;加入封闭液 (含40mM甘氨酸、1wt%BSA的0.01MPBS,pH7.4) 25℃振荡60min,离心,弃上清,然后用保存液 (含0.5wt%casine,1wt%P300的0.01MPBS,pH7.4) 洗涤2次 (方法同上) 并稀释至微球浓度为1mg/mL,分别得到QD₆₅₅量子点微球标记的Aβ40多克隆抗体、QD₅₆₅量子点微球标记的Aβ42多克隆抗体,保存温度为4℃;

[0076] ②QD₆₅₅量子点微球标记DNP-BSA(半抗原)

[0077] 将QD₆₅₅量子点微球用活化缓冲液 (0.05M MES) 洗涤2次 (用活化缓冲液重悬微球后,10000转离心30min,弃上清;重复上述操作2次) 并稀释至1mg/mL,得到QD₆₅₅量子点微球溶液;将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 与QD₆₅₅量子点微球溶液按照质量比1:30混合,25℃振荡30min,离心,弃上清,然后用偶联液 (0.01M PBS,pH7.4) 洗涤2次 (方法同上),得到洗涤后的QD₆₅₅量子点微球;然后按照每毫克量子点微球加入10 μ g蛋白的

配比,在洗涤后的QD655量子点微球中加入DNP-BSA,4℃振荡18h;加入封闭液(含40mM甘氨酸、1wt%BSA的0.01MPBS,pH7.4)25℃振荡60min,离心,弃上清,然后用保存液(含0.5wt%casine,1wt%P300的0.01MPBS,pH7.4)洗涤2次(方法同上)并稀释至微球浓度为1mg/mL,得到QD655量子点微球标记的DNP-BSA(半抗原),保存温度为4℃;

[0078] ③将步骤(1)制得的QD₆₅₅量子点微球标记的Aβ40多克隆抗体、QD₅₆₅量子点微球标记的Aβ42多克隆抗体和步骤(2)制得的QD₆₅₅量子点微球标记的DNP-BSA(半抗原)等体积混合,得到混合物;将混合物涂覆在玻璃纤维膜上,每毫升混合物涂覆8平方厘米的玻璃纤维垫,37℃干燥3.5h,得到包被量子点微球偶联Aβ40和Aβ42多克隆抗体的玻璃纤维膜;

[0079] (3) 将设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜粘贴于底板中部(质控区作为末端),将包被量子点微球偶联AB40和AB42多克隆抗体的玻璃纤维膜紧贴硝酸纤维素膜前端,样品垫置于玻璃纤维膜前端,吸水垫置于硝酸纤维素膜末端;样品垫、包被量子点微球偶联AB40和AB42多克隆抗体的玻璃纤维膜、设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜和吸水垫之间相互重叠,得到快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条。

[0080] 实施例2

[0081] (1) 设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜的制备

[0082] ①将Aβ40单克隆抗体、Aβ42单克隆抗体用含有质量分数为1%海藻糖的0.01M磷酸盐缓冲液 (pH=7.5,使用前采用0.22μm进行过滤)分别稀释至浓度为1.0mg/mL,DNP抗体稀释至浓度为0.75mg/mL,得到Aβ40单克隆抗体工作液、Aβ42单克隆抗体工作液和DNP抗体工作液;

[0083] ②将步骤(1)制得的AB40单克隆抗体工作液、AB42单克隆抗体工作液和DNP抗体工作液用划膜仪分别在NC膜上划膜,划膜速度为1 μ L/cm,其中,AB40单克隆抗体在0.8cm处划膜,AB42单克隆抗体在1.3cm处划膜,DNP抗体在1.8cm处划膜,形成检测区T1、检测区T2和质控区C,然后37℃干燥3h,得到设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜,该硝酸纤维素膜保存条件为4℃:

[0084] (2) 包被量子点微球偶联Aβ40和Aβ42多克隆抗体的玻璃纤维膜的制备

[0085] ①QD655量子点微球标记AB40多克隆抗体、QD565量子点微球标记AB42多克隆抗体

[0086] 将QD₆₅₅量子点微球、QD₅₆₅量子点微球分别用活化缓冲液 (0.05M MES) 洗涤 (用活化缓冲液重悬微球后,10000转离心30min,弃上清;重复上述操作2次) 并稀释至1mg/mL,得到QD₆₅₅量子点微球溶液、QD₅₆₅量子点微球溶液;将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 与QD₆₅₅量子点微球溶液、QD₅₆₅量子点微球溶液分别按照质量比1:30混合,25℃振荡45min,离心,弃上清,然后用偶联液 (0.01M PBS,pH7.2) 洗涤2次 (方法同上),得到洗涤后的QD₆₅₅量子点微球、QD₅₆₅量子点微球;然后按照每毫克量子点微球加入10μg抗体蛋白的配比,在洗涤后的QD₆₅₅量子点微球、QD₅₆₅量子点微球中分别加入AB40多克隆抗体(标记QD₆₅₅)、AB42多克隆抗体(标记QD₅₆₅),2℃振荡24h;加入封闭液(含40mM甘氨酸、1wt%BSA的0.01MPBS,pH7.2)25℃振荡90min,离心,弃上清,然后用保存液(含0.5wt%casine,1wt%P300的0.01MPBS,pH7.2)洗涤2次(方法同上)并稀释至微球浓度为1mg/mL,分别得到QD₆₅₅量子点微球标记的AB40多克隆抗体、QD₅₆₅量子点微球标记的AB42多克隆抗体,保存温度为2℃;

[0087] ②QD₆₅₅量子点微球标记DNP-BSA(半抗原)

[0088] 将QD₆₅₅量子点微球用活化缓冲液(0.05M MES)洗涤2次(用活化缓冲液重悬微球

后,10000转离心30min,弃上清;重复上述操作2次)并稀释至1mg/mL,得到QD655量子点微球溶液;将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 与QD655量子点微球溶液按照质量比1:30混合,25℃振荡45min,离心,弃上清,然后用偶联液 (0.01M PBS,pH7.2) 洗涤2次 (方法同上),得到洗涤后的QD655量子点微球;然后按照每毫克量子点微球加入10 μ g蛋白的配比,在洗涤后的QD655量子点微球中加入DNP-BSA,2℃振荡24h;加入封闭液(含40mM甘氨酸、1wt%BSA的0.01MPBS,pH7.2)25℃振荡90min,离心,弃上清,然后用保存液(含0.5wt%casine,1wt%P300的0.01MPBS,pH7.2)洗涤2次(方法同上)并稀释至微球浓度为1mg/mL,得到QD655量子点微球标记的DNP-BSA(半抗原),保存温度为2℃;

[0089] ③将步骤(1)制得的QD₆₅₅量子点微球标记的Aβ40多克隆抗体、QD₅₆₅量子点微球标记的Aβ42多克隆抗体和步骤(2)制得的QD₆₅₅量子点微球标记的DNP-BSA(半抗原)等体积混合,得到混合物;将混合物涂覆在玻璃纤维膜上,每毫升混合物涂覆8平方厘米的玻璃纤维垫,37℃干燥3.5h,得到包被量子点微球偶联Aβ40和Aβ42多克隆抗体的玻璃纤维膜;

[0090] (3)将样品垫切成长度30cm、宽度28mm,包被量子点微球偶联Aβ40和Aβ42多克隆抗体的玻璃纤维膜切成长度30cm、宽度10mm,设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜切成长度30cm、宽度25mm,吸水垫剪切成长度30cm、宽度27mm,然后依次将其贴在衬卡上,其中,设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜粘贴于底板中部(质控区作为末端),将包被量子点微球偶联Aβ40和Aβ42多克隆抗体的玻璃纤维膜紧贴硝酸纤维素膜前端,样品垫置于玻璃纤维膜前端,吸水垫置于硝酸纤维素膜末端;样品垫、包被量子点微球偶联Aβ40和Aβ42多克隆抗体的玻璃纤维膜、设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜和吸水垫之间相互重叠,组成大板后,切割成长度8cm和宽度4mm的单个人份试纸条,装入测试卡壳中,得到快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条,将其装有干燥剂的密封袋中,存放于室温。

[0091] 实施例3

[0092] (1) 设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜的制备

[0093] ①将Aβ40单克隆抗体、Aβ42单克隆抗体用含有质量分数为1%海藻糖的0.01M磷酸盐缓冲液 (pH=8.5,使用前采用0.22μm进行过滤)分别稀释至浓度为2.5mg/mL,DNP抗体稀释至浓度为2.5mg/mL,得到β40单克隆抗体工作液、Aβ42单克隆抗体工作液和DNP抗体工作液;

[0094] ②将步骤(1)制得的AB40单克隆抗体工作液、AB42单克隆抗体工作液和DNP抗体工作液用划膜仪分别在NC膜上划膜,划膜速度为1 μ L/cm,其中,AB40单克隆抗体在0.8cm处划膜,AB42单克隆抗体在1.3cm处划膜,DNP抗体在1.8cm处划膜,形成检测区T1、检测区T2和质控区C,然后37℃干燥4h,得到设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜,该硝酸纤维素膜保存条件为30℃;

[0095] (2) 包被量子点微球偶联Aβ40和Aβ42多克隆抗体的玻璃纤维膜的制备

[0096] ①QD655量子点微球标记AB40多克隆抗体、QD565量子点微球标记AB42多克隆抗体

[0097] 将QD₆₅₅量子点微球、QD₅₆₅量子点微球分别用活化缓冲液 (0.05M MES) 洗涤 (用活化缓冲液重悬微球后,10000转离心30min,弃上清;重复上述操作3次) 并稀释至1mg/mL,得到QD₆₅₅量子点微球溶液、QD₅₆₅量子点微球溶液;将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 与QD₆₅₅量子点微球溶液、QD₅₆₅量子点微球溶液分别按照质量比1:30混合,25℃振荡60min,离心,弃上清,然后用偶联液 (0.01M PBS,pH7.3) 洗涤3次 (方法同上),得到洗涤后

的QD₆₅₅量子点微球、QD₅₆₅量子点微球;然后按照每毫克量子点微球加入10µg抗体蛋白的配比,在洗涤后的QD₆₅₅量子点微球、QD₅₆₅量子点微球中分别加入AB40多克隆抗体(标记QD₆₅₅)、AB42多克隆抗体(标记QD₅₆₅),8℃振荡20h;加入封闭液(含40mM甘氨酸、1wt%BSA的0.01MPBS,pH7.3)25℃振荡120min,离心,弃上清,然后用保存液(含0.5wt%casine,1wt%P300的0.01MPBS,pH7.3)洗涤3次(方法同上)并稀释至微球浓度为1mg/mL,分别得到QD₆₅₅量子点微球标记的AB40多克隆抗体、QD₅₆₅量子点微球标记的AB42多克隆抗体,保存温度为8℃;

[0098] ②QD₆₅₅量子点微球标记DNP-BSA(半抗原)

[0099] 将QD₆₅₅量子点微球用活化缓冲液 (0.05M MES) 洗涤2次 (用活化缓冲液重悬微球后,10000转离心30min,弃上清;重复上述操作2次) 并稀释至1mg/mL,得到QD₆₅₅量子点微球溶液;将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 与QD₆₅₅量子点微球溶液按照质量比1:30混合,25℃振荡60min,离心,弃上清,然后用偶联液 (0.01M PBS,pH7.3) 洗涤2次 (方法同上),得到洗涤后的QD₆₅₅量子点微球中加入DNP-BSA,8℃振荡20h;加入封闭液 (含40mM甘氨酸、1wt%BSA的0.01M PBS,pH7.3) 25℃振荡60min,离心,弃上清,然后用保存液 (含0.5wt%casine,1wt%P300的0.01M PBS,pH7.3) 洗涤3次 (方法同上) 并稀释至微球浓度为1mg/mL,得到QD₆₅₅量子点微球标记的DNP-BSA (半抗原),保存温度为8℃;

[0100] ③将步骤(1)制得的QD₆₅₅量子点微球标记的Aβ40多克隆抗体、QD₅₆₅量子点微球标记的Aβ42多克隆抗体和步骤(2)制得的QD₆₅₅量子点微球标记的DNP-BSA(半抗原)等体积混合,得到混合物;将混合物涂覆在玻璃纤维膜上,每毫升混合物涂覆8平方厘米的玻璃纤维垫,37℃干燥3.5h,得到包被量子点微球偶联Aβ40和Aβ42多克隆抗体的玻璃纤维膜;

[0101] (3)将样品垫切成长度30cm、宽度28mm,包被量子点微球偶联AB40和AB42多克隆抗体的玻璃纤维膜切成长度30cm、宽度10mm,设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜切成长度30cm、宽度25mm,吸水垫剪切成长度30cm、宽度27mm,然后依次将其贴在衬卡上,其中,设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜粘贴于底板中部(质控区作为末端),将包被量子点微球偶联AB40和AB42多克隆抗体的玻璃纤维膜紧贴硝酸纤维素膜前端,样品垫置于玻璃纤维膜前端,吸水垫置于硝酸纤维素膜末端;样品垫、包被量子点微球偶联AB40和AB42多克隆抗体的玻璃纤维膜、设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜和吸水垫之间相互重叠,组成大板后,切割成长度8cm和宽度4mm的单个人份试纸条,装入测试卡壳中,得到快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条,将其装有干燥剂的密封袋中,存放于室温。

[0102] 效果实施例

[0103] (1)取待测样品75μL(样品分别含有Aβ40、Aβ42抗原的稀释液)加入实施例1制得的试纸中的样品垫,室温25℃放置8分钟,样品经过免疫层析反应,用量子点测定仪测定量子点的荧光。

[0104] (2) 剂量反应关系: 平行测定AB40、AB42校准品,用含2000pg/mL AB40进行稀释为校准品,校准品浓度(0、1.0、10、50、200、1000pg/mL),用含2000pg/mL AB42进行稀释,校准品浓度(0、0.5、5、50、100、500pg/mL),用log(X)-log(Y)数学模型进行拟合曲线作图。计算其线性相关系数,其AB40相关系数为0.995、AB42相关系数为0.997。

[0105] (3)分析灵敏度:平行测定10孔零值校准品的量子点荧光强度,计算量子点荧光强度的标准偏差(SD)和平均值(Mean),计算M=Mean+2×SD,将计算结果M代入公式1og(M/

Mean/(1-M/Mean)),其中Mean为So发光值的平均值,再将log(M/Mean/(1-M/Mean))的计算结果代入线性公式中的Y值,将该值代入线性公式计算X值,再计算Power即(Mean+2SD)时对应的浓度值,为分析灵敏度。该试纸的Aβ40分析灵敏度为0.033pg/mL,Aβ42分析灵敏度为0.048pg/mL。

[0106] (4) 精密性:平行测定10孔A β 40样本(2.5pg/mL、50pg/mL) 质控样本,A β 42样本(2.5pg/mL、50pg/mL),计算测定结果的平均浓度(Mean) 与标准偏差(SD),计算A β 40、A β 42精密度(CV%)=SD/Mean×100%。A β 40变异系数分别为6.34%、6.00%;A β 42变异系数分别为5.05%、4.21%。

[0107] 5) 准确率: 测定A β 40、A β 42已定值校准品, 计算校准品的测定浓度与标示浓度的相对偏差。A β 40、A β 42校准品的标示值与浓度值的平均相对偏差均小于5%, 其线性回归相关系数 (r) \geq 0.99。

[0108] 6) 样本测定:对83份AD患者样本进行比较测定,并与酶联免疫法测定进行比较。测定83例AD样本,与酶联免疫法进行比较,AB淀粉样蛋白(40)符合率95.3%,其中临床灵敏度96.4%,临床特异性94.2%;B淀粉样蛋白(42)符合率94.7%,其中临床灵敏度93.3%,临床特异性96.1%。线性相关系数r分别为0.987,0.958。

[0109] 此外,与QD655量子点微球标记的DNP-BSA(半抗原)相比,采用QD565量子点微球标记的DNP-BSA(半抗原)制得的试纸条在层析过程中,因为有量子点间隔,实际观察更容易。

[0110] 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。



专利名称(译)	一种快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条与应用		
公开(公告)号	CN109187981A	公开(公告)日	2019-01-11
申请号	CN201810865711.3	申请日	2018-08-01
[标]发明人	万东山 郭兰英		
发明人	万东山 郭兰英		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/58 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N33/532 G01N33/54313 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/588		
代理人(译)	许菲菲		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫检测技术领域,具体涉及一种快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条与应用。所述的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条,包含设有检测区和质控区的硝酸纤维素膜、包被量子点微球偶联Aβ40和Aβ42多克隆抗体的玻璃纤维膜、底板、样品垫和吸水垫。本发明提供的快速检测β-淀粉样蛋白的量子点免疫层析试纸条通过量子点免疫层析技术,可实现一次反应同时检测Aβ40、Aβ42抗原指标,避免了不同蛋白互相产生交叉的问题,检测时间短,灵敏度高于酶联免疫方法10倍以上,特异性强,反应速度快,准确性高,定量准确。