



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102411050 A

(43) 申请公布日 2012.04.11

(21) 申请号 201110211584.3

(22) 申请日 2011.07.27

(71) 申请人 中国检验检疫科学研究院

地址 100123 北京市朝阳区高碑店北路甲3号

(72) 发明人 邹明强 王燕飞 郭浩 徐世玮

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

多种小分子化合物的同步量子点荧光免疫检测法及试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种同步检测多种小分子化合物的间接竞争量子点荧光免疫检测法及检测试剂盒,是以编码微球作为固相载体,以量子点作为荧光标记物,基于小分子化合物竞争特异性反应的一种液相芯片免疫检测法。首先,将捕获抗原共价结合在编码微球表面,在滤膜板反应孔中,捕获抗原、检测抗体、二抗特异性结合形成微球-捕获抗原-检测抗体-二抗-量子点间接竞争荧光免疫复合体,然后,形成的荧光免疫复合体在鞘液约束下逐一流经悬液芯片或流式分析系统的检测区,经识别不同编码微球并检测量子点荧光强度(或计算平均荧光强度比率)完成检测。用以同步检测同一样本中多种小分子化合物,或不同样本中的单/多个小分子化合物,具有快速、高通量的优点。

1. 一种基于荧光编码微球的用于小分子化合物多残留同步检测的量子点荧光间接竞争免疫检测方法,其特征在于:将不具备免疫原性的小分子化合物与大分子载体蛋白反应形成捕获抗原,以具有表面功能基团的聚苯乙烯荧光编码微球作为固相载体,将捕获抗原以共价键方式包被到聚苯乙烯微球上,形成微球-捕获抗原偶联物,可与待测小分子化合物抗原竞争与检测抗体的特异性反应,用悬液芯片或流式分析系统对逐一流过检测区的微球上所负载的荧光信号进行检测,通过与标准溶液对比,计算出待测抗原的浓度。

2. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于:微球-捕获抗原偶联物的形成过程是,在96孔滤膜板的反应孔内的微球-捕获抗原偶联物的体系中加入待测样品与检测抗体,捕获抗原和待测样品中的小分子化合物抗原竞争与检测抗体发生的特异性反应,再通过二抗与检测抗体的特异性结合形成基于微球的间接竞争荧光免疫复合体。

3. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于:基于微球的间接竞争荧光免疫复合体的形成是以量子点作为荧光标记物,用量子点标记二抗,在加入的微球-捕获抗原偶联物、待测样品中小分子化合物抗原与检测抗体竞争反应完后,加入量子点标记的二抗形成微球-捕获抗原-检测抗体-二抗-量子点的间接竞争荧光免疫复合体。

4. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于:根据内部包埋荧光染料比例的不同,对微球进行编码,不同的编码微球连接不同的捕获抗原,加入对应的特异性检测抗体,可同步检测同一样品中多种待测小分子化合物,或多个样品中不同种待测小分子化合物。

5. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于:所说的用悬液芯片或流式系统对逐一流过检测区的微球上所负载的荧光信号进行检测,是指检测系统的两束激光光源发射波长为488nm(或532nm)和635nm,一束通过判定微球内包埋的染料比例从而对待测物进行定性分析,另一束通过测定微球上反应连接的量子点荧光强度从而对待测物进行定量分析。

6. 根据权利要求1或2、3所述的检测方法,其特征在于:上述待测物中的小分子化合物抗原可以是农药、兽药、真菌毒素、激素、有害添加物、食品添加剂等;相应的检测抗体应为特异性抗每种待测抗原的单或多克隆抗体,使用不同的抗体,就可检测不同的相应的待测小分子化合物抗原。

7. 一种在权利要求1所述的免疫检测法诊断试剂盒,其特征在于组成包括:(1)包被有捕获抗原的荧光微球偶联物;(2)量子点标记的二抗;(3)检测抗体;(4)阳性对照;(5)阴性对照;(6)PH 7.2-7.8的磷酸盐缓冲液。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于:包被有捕获抗原的荧光微球偶联物是几种小分子化合物的合成抗原对应连接在不同荧光编码微球上的混合物,检测抗体是抗几种抗原的抗体混合物。

## 多种小分子化合物的同步量子点荧光免疫检测法及试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于微球的小分子多残留荧光免疫检测方法,特别是涉及一种以量子点为荧光标记物、聚苯乙烯荧光编码微球为固相载体的间接竞争免疫检测法及使用的试剂盒。

### 背景技术

[0002] 食品监控工作越来越引起世界各国和公众的高度关注,残留检测技术也一直是国际农产品质量安全领域的一个重要热点。常见的分析方法多为实验室应用的仪器分析法,如气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱法(TLC)、质谱(MS)、串联质谱(MS-MS)以及各方法之间的联用技术等;将免疫化学技术应用在农兽药的残留检测,是近些年发展起来的基于抗原抗体特异性识别的检测技术,如酶免疫分析法(EIA)、荧光免疫分析法(FIA)等。

[0003] 目前,小分子化合物残留的检测方法一是经典的微生物检测方法,二是现代仪器分析方法,三是免疫分析法。其中,微生物法测定时间长且结果误差较大,仪器分析方法敏感性和自动化程度较高,可定量分析,但操作复杂、费时,还须配备昂贵的仪器,检测成本高,只适合在实验室精确测定,免疫分析法较仪器分析法简单,但目前主要的免疫分析法鲜有能同步检测多种靶标物,这无形中提高了检测费用并拉长了检测周期。因此,开发出准确、快速、高通量的免疫分析方法具有迫切的现实意义和巨大的市场需求。

[0004] 悬液芯片技术,是基于激光激发荧光的发光类技术之一,又称流式荧光技术、悬浮芯片、液态芯片等,是一个高通量、高速度以及多功能生物技术平台,是20世纪90年代兴起的,它有机地整合了编码微球(encoded beads)、流式细胞技术、激光技术、应用流体学、最新的高速数字信号处理器和计算机运算法则,可广泛应用于免疫分析、核酸研究、酶学分析、受体和配体识别分析等研究,得到各权威机构和医学界高度认可,是临床诊断领域以及生命科学研究中的一大热点。该技术最初在免疫分析方面的应用,主要集中在检测抗体、病毒等大分子。以悬液芯片系统或流式系统作为检测平台的荧光微球量子点免疫分析技术是小分子药物分析领域的一种比较新的检测技术。悬液芯片技术的开发为药物残留分析提供了高效、快速、灵敏的检测方法,对于提高分析效率和未知样品的分析具有非常重要的价值。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种基于流式技术的编码微球量子点荧光免疫检测法,实现用不同的编码微球和同一种量子点荧光探针可同步检测同一样品中多种小分子化合物抗原成分或者同步检测多个样品中的不同种小分子化合物抗原成分。

[0006] 本发明的进一步目的是提供了一种在此检测方法过程中使用的检测试剂盒。

[0007] 本发明是以量子点进行荧光标记,应用于抗原抗体特异性竞争反应的一种荧光免疫检测法,聚苯乙烯微球根据内部包埋荧光染料的比例不同进行编码,选用不同编码的微

球作为固相载体,连接不同的捕获抗原,在 96 孔滤模板的反应孔中进行反应,同步检测不同样品中的单种或多种小分子化合物,可以克服 ELISA 只能检测单一靶标物的缺点,旨在提高检测通量,提高检测速度。

[0008] 本发明的技术解决方案如下:

[0009] 首先,将合成的蛋白偶联抗原作为捕获抗原共价连接在聚苯乙烯微球上,形成微球-捕获抗原偶联物,在 96 孔滤模板上反应孔内,微球-捕获抗原偶联物与待测物中小分子抗原竞争与检测抗体发生特异性反应,其中,与小分子抗原结合的特异性检测抗体经洗涤抽滤而被从反应体系中去除,而与微球-捕获抗原偶联物反应的检测抗体与后续加入的荧光探针(如量子点标记的二抗)进行特异性结合形成微球-捕获抗原-检测抗体-二抗-量子点荧光免疫复合物,经仪器检测荧光信号便可完成检测过程。

[0010] 所述的蛋白偶联抗原,即捕获抗原,是指将不具备免疫原性的小分子化合物与大分子载体蛋白进行合成,其中大分子载体蛋白可以是牛血清白蛋白(BSA),也可以是卵清白蛋白(OVA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)。

[0011] 所述微球-捕获抗原偶联物是指使用碳二亚胺法,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化微球表面的官能团,然后与捕获抗原上的对应基团反应,从而以共价键方式形成微球-捕获抗原偶联物。

[0012] 所述检测抗体是指抗待测小分子抗原的单克隆抗体或多克隆抗体,检测抗体可与微球-捕获抗原偶联物发生特异性反应,如果体系中有待测抗原存在则待测抗原也会竞争性地与检测抗体发生特异性结合。

[0013] 所述量子点标记的二抗是指用量子点作为荧光探针标记的二抗。

[0014] 所述微球-捕获抗原-检测抗体-二抗-量子点荧光免疫复合物,是指在待测抗原与捕获抗原竞争与检测抗体发生反应结束后,加入的量子点标记的二抗与微球-捕获抗原-检测抗体复合物进行继续特异性反应生成的复合物,而待测抗原-检测抗体复合物与量子点标记的二抗如果发生反应生成的复合物则会通过洗涤而用 96 孔滤模板的抽滤离开反应体系。

[0015] 所述 96 孔滤模板是指框架与常规酶标板一致,板底使用亲水性滤膜进行替代的反应板,使用的滤膜孔径小于微球粒径,未与微球-捕获抗原结合的荧光免疫复合物则可以透过滤膜,经真空抽滤后从反应体系中被去除。

[0016] 所述荧光检测是指用悬液芯片或流式分析系统中的两束荧光,定性区分不同的编码微球从而确定存在何种抗原,定量确定荧光免疫复合物的荧光强度。通常样品中小分子待测抗原浓度越大,则测得的荧光强度值越低。

[0017] 本发明的同步免疫检测法,所说的悬液芯片或流式分析系统激光光源发射波长为 488nm 或 532nm 和 635nm。目前,美国 Luminex 公司、Bio-Rad 公司、Beckman 公司可提供满足测试要求的检测仪器及编码微球。

[0018] 上述的小分子待测抗原可以是任何一种农药、兽药、激素、食品添加剂等。使用不同的单克隆抗体或多克隆抗体就可以检测不同的相应待测抗原。

[0019] 一种量子点为荧光标记物、聚苯乙烯微球为固相载体的间接竞争免疫检测法诊断试剂盒,包括以下试剂:

[0020] (1) 基于荧光编码微球包被有捕获抗原的微球-捕获抗原偶联物;

- [0021] (2) 量子点标记的抗鼠（或抗兔或抗鸡等）二抗；
- [0022] (3) 检测抗体；
- [0023] (4) 阳性对照；
- [0024] (5) 阴性对照；
- [0025] (6) PH 7.2-7.8 的磷酸盐缓冲液。
- [0026] 包被有捕获抗原的聚苯乙烯荧光微球是几种捕获抗原结合在不同编码微球的混合物，检测抗体是抗几种抗原的抗体的混合物。
- [0027] 使用方法：将试剂按说明书稀释后按以下流程操作。
- [0028] 1、制备荧光免疫复合体：在 96 孔滤模板的反应孔中同时加入包被有捕获抗原的聚苯乙烯荧光编码微球、待测样品和检测抗体，37℃避光振摇反应 0.5-1 小时后抽滤掉孔内分析液，加入量子点标记的二抗，37℃避光振摇反应 0.5-1 小时，形成微球-捕获抗原-检测抗体-二抗-量子点荧光免疫复合体；
- [0029] 2、荧光强度检测：用悬液芯片或流式分析系统进行激光激发并检测荧光免疫复合体的量子点探针荧光强度。
- [0030] 本发明针对生物样品检测通量大、灵敏度高，可以根据预期用量大小，选用一定量的某些微球标记好相应的捕获抗原然后混合分装即可。

### 具体实施方式

- [0031] 本发明的检测步骤如下：
- [0032] 1、微球-捕获抗原偶联：
- [0033] 取  $1.25 \times 10^6$  个微球为一批次，在 1.5mL 离心管中，使用 EDC、sulfo-NHS 溶液在 pH 6.2 条件下对微球表面羧基进行常温活化 20 分钟，然后将微球置换到磷酸盐缓冲液（PBS，0.01M，PH7.4）中，加入优化量的小分子半抗原-BSA 偶联的捕获抗原，避光振摇常温反应 2 小时，离心洗掉未结合的捕获抗原，用含 1% BSA 的 PBS 重悬，避光振摇常温反应 0.5 小时，封闭微球表面未与捕获抗原结合的剩余位点，最后，用含 0.1% BSA 的 PBS 储存微球-捕获抗原偶联物。
- [0034] 2、量子点-二抗标记：
- [0035] 取 1mM 量子点，加入 EDC 溶液（溶剂为 PBS），混合涡旋反应 30min；加入优化量的二抗，室温避光反应 3 小时，用 Sephadex G100 层析介质去除游离的量子点，然后用含 0.05% 叠氮化钠的 PBS 保存。
- [0036] 3、微球-捕获抗原-检测抗体-二抗-量子点复合体形成：
- [0037] 在 96 孔滤模板的反应孔中，同时加入不同编码微球-小分子捕获抗原偶联物、小分子待测物、特异性单克隆抗体，37℃避光振摇反应 0.5-1 小时，抽滤掉板上孔中分析液，其中与小分子待测物结合的单克隆抗体随反应液被抽滤掉，与微球-小分子捕获抗原偶联物结合的特异性单克隆抗体留在孔中；然后加入量子点标记的二抗，37℃避光振摇反应 0.5-1 小时，二抗与孔中单克隆抗体特异性结合，形成不同编码微球-捕获抗原-检测抗体-二抗-量子点复合体。
- [0038] 4、定量荧光检测：
- [0039] 该检测方法的测定原理是通过检测 96 孔滤模板上反应孔内结合到不同编码微球

上的捕获抗原-检测抗体-二抗-量子点免疫复合体的量子点荧光强度实现对待测物的检测。可与标准曲线对比求出样品中的不同待测小分子浓度。结合到不同编码微球上的检测抗体量不同,检测到的量子点探针荧光强度不同。绘制标准曲线:将已知小分子化合物含量的标准溶液配制成由低到高7种不同浓度,重复步骤3的操作,用与待测样本相同的方法可以测定每种浓度的标准溶液对应的荧光强度,以小分子化合物浓度的对数为横坐标,设空白对照时的平均荧光强度(MFI)为 $MFI_0$ ,  $MFI/MFI_0$ 的比值为纵坐标,绘制标准曲线。

专利名称(译)	多种小分子化合物的同步量子点荧光免疫检测法及试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN102411050A</a>	公开(公告)日	2012-04-11
申请号	CN201110211584.3	申请日	2011-07-27
申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
[标]发明人	邹明强 王燕飞 郭浩 徐世玮		
发明人	邹明强 王燕飞 郭浩 徐世玮		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供一种同步检测多种小分子化合物的间接竞争量子点荧光免疫检测法及检测试剂盒，是以编码微球作为固相载体，以量子点作为荧光标记物，基于小分子化合物竞争特异性反应的一种液相芯片免疫检测法。首先，将捕获抗原共价结合在编码微球表面，在滤膜板反应孔中，捕获抗原、检测抗体、二抗特异性结合形成微球-捕获抗原-检测抗体-二抗-量子点间接竞争荧光免疫复合体，然后，形成的荧光免疫复合体在鞘液约束下逐一流经悬液芯片或流式分析系统的检测区，经识别不同编码微球并检测量子点荧光强度(或计算平均荧光强度比率)完成检测。用以同步检测同一样本中多种小分子化合物，或不同样本中的单/多个小分子化合物，具有快速、高通量的优点。