



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109813887 A

(43)申请公布日 2019.05.28

(21)申请号 201910121280.4

G01N 33/558(2006.01)

(22)申请日 2019.02.19

(71)申请人 吉林省爱诺德生物工程有限公司

地址 130000 吉林省长春市高新开发区畅
达路177号2号楼310A室

(72)发明人 王志新 侯淑霞 许文革 单亚明
杨琨

(74)专利代理机构 北京壹川鸣知识产权代理事
务所(特殊普通合伙) 11765

代理人 高小改

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种免疫学反应实时检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种免疫学反应实时检测方法,属于免疫学检测技术领域,解决了现有检测方法不能实现实时检测,难以将所有待检样品反应的结果真实表现出来,步骤如下:取量子点溶液100uL加入到1.5mL离心管内,加入纯净水700uL,加入磷酸二氢钠100uL,加入碳二亚胺100uL,然后将混合溶液混合均匀,搅拌后超声处理30-60分钟,放入离心机中,离心10分钟;吸取上清液A,保留沉淀物B,然后上清液A放入离心机内继续离心;本发明将“量子点荧光共振能量转移”的特点应用到抗原-抗体的免疫学反应中,能够做到不分离、免漂洗,反应灵敏、操作简单。

1. 一种免疫学反应实时检测方法,其特征在于,步骤如下:

S1、取量子点溶液100uL加入到1.5mL离心管内,加入纯净水700uL,加入磷酸二氢钠100uL,加入碳二亚胺100uL,然后将混合溶液混合均匀,搅拌后超声处理30-60分钟,放入离心机中,离心10分钟;

S2、吸取上清液A,保留沉淀物B,然后上清液A放入离心机内继续离心;

S3、将上清液A放入离心机内离心10分钟,吸取上清液C,保留沉淀物D,上清液C放入离心机内继续离心,离心机的速率为12000转/分;

S4、弃去上清液E,保留沉淀F;

S5、用纯净水溶解B、D和F,合并B、D和F,定容于1.0mL容量瓶内,得到混合组分甲;

S6、将混合组分甲分装至1.5mL离心管内,离心管数量共5只,每支离心管内混合组份甲的体积为200uL,分别编号为1、2、3、4和5号,每支离心管内加入纯净水,每支离心管内加入磷酸氢二钠200uL,分别向每支离心管内加入1.0mg/mL的待连接蛋白5uL、10uL、20uL、40uL、80uL,然后震荡120min,加入浓度为0.5%牛血清白蛋白封闭30分钟,按比例稀释后分别对1、2、3、4和5样品进行活性鉴定,确定定量量子点的最佳蛋白使用量。

2. 根据权利要求1所述的免疫学反应实时检测方法,其特征在于,步骤S1中,量子点溶液的浓度约为1umol/L。

3. 根据权利要求2所述的免疫学反应实时检测方法,其特征在于,步骤S1中,磷酸二氢钠的浓度为100mmol/L,碳二亚胺的浓度为10mg/mL。

4. 根据权利要求3所述的免疫学反应实时检测方法,其特征在于,步骤S1中,离心机的速率为4000转/分。

5. 根据权利要求1所述的免疫学反应实时检测方法,其特征在于,步骤S2中,离心机的速率为8000转/分。

6. 根据权利要求1所述的免疫学反应实时检测方法,其特征在于,步骤S3中,离心机离心时间为20分钟。

7. 根据权利要求1所述的免疫学反应实时检测方法,其特征在于,步骤S6中,纯净水的体积为600uL。

一种免疫学反应实时检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学检测技术领域,具体是一种免疫学反应实时检测方法。

背景技术

[0002] 抗原-抗体反应是免疫学反应的基本类型之一,体外免疫诊断试剂是利用抗原-抗体高度特异性结合的特点建立起来的对疾病进行检测、分析、诊断的一类检测试剂,免疫诊断试剂种类繁多,方法学上也是多种多样,从反应模式大体可分为两类,一类是均相免疫反应,另一类是非均相免疫反应,免疫反应过程中抗原-抗体结合是一个动态的、可逆的、平衡反应过程,其检测结果受样品含量、反应温度、反应体积、反应时间以及检测时间等条件的制约,任何一个条件的变化都会对反应结果造成影响;一个待检样品形成抗原-抗体复合物的过程中,反应系统内一定还存在着过剩的、游离的抗原,分离这些过剩的、游离的抗原,测量免疫复合物浓度的反应模式称之为非均相免疫反应,不用分离这些过剩的、游离的抗原,既可测量免疫复合物浓度的反应模式称之为均相免疫反应,两种方法各有各的不足:非均相免疫反应灵敏度高、检测范围宽,但操作复杂、反应时间长、检测仪器设备昂贵;均相免疫反应灵敏度低、检测范围窄,但操作简便、反应时间短、检测仪器设备相对低廉。

[0003] 近些年来,随着科学的进步和发展,人们发现物质在纳米级别时表现出过去没有发现的一些物理现象,当物质的尺寸小到纳米时会产生量子效应,量子效应在一维上叫量子线,二维叫量子面,三维上叫量子点,量子点有许多种如碳量子点、金量子点、半导体量子点,量子点经被紫外照射后能释放出荧光,但材料不同、制作工艺不同、粒径大小不同所释放的荧光波长也是不相同的;量子点与荧光染料的区别是激发光谱宽、发射光谱窄而且对称、光稳定性好、光强度高,可反复激发、可实时、可长时间测量,随着材料制作工艺的发展,不同用途、不同种类、不同发射波长的量子点实现了商品化,量子点做为发光示踪物在免疫诊断试剂领域中也得到了一些应用,但是这种应用也只是把量子点作为单一示踪物使用,没有把量子点的特性充分发挥出来。

[0004] 荧光共振能量转移是两个荧光基团在1-10nm距离、发射光谱有50%左右重叠时会产生共振现象,共振的能量以光的形式释放出来,目前已有的“荧光共振能量转移”免疫试剂中荧光能量基团采用的是荧光素染料,但染料荧光素有明显的不足:荧光释放后能量衰减明显、光漂白严重,不能多次、长时间连续测量,不能实施实时检测,难以将所有待检样品反应的结果真实表现出来,我们选择两个量子点作为共振能量基团来实现荧光共振能量转移,弥补了荧光素染料的不足,比起用荧光染料做示踪有明显的优势。

[0005] 因此,我们提出一种免疫学反应实时检测方法,将“量子点荧光共振能量转移”的特点应用到抗原-抗体的免疫学反应中。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种免疫学反应实时检测方法,以解决上述背景技术中提出的问题。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0008] 一种免疫学反应实时检测方法,步骤如下:

[0009] S1、取量子点溶液100uL加入到1.5mL离心管内,加入纯净水700uL,加入磷酸二氢钠100uL,加入碳二亚胺100uL,然后将混合溶液混合均匀,搅拌后超声处理30-60分钟,放入离心机中,离心10分钟;

[0010] S2、吸取上清液A,保留沉淀物B,然后上清液A放入离心机内继续离心;

[0011] S3、将上清液A放入离心机内离心10分钟,速率为8000转/分,吸取上清液C,保留沉淀物D,上清液C放入离心机内继续离心,离心机的速率为12000转/分,离心20分钟;

[0012] S4、弃去上清液E,保留沉淀F;

[0013] S5、用纯净水溶解B、D和F,合并B、D和F,定容于1.0mL容量瓶内,得到混合组分甲;

[0014] S6、将混合组分甲分装至1.5mL离心管内,离心管数量共5只,每支离心管内混合组分甲的体积为200uL,分别编号为1、2、3、4和5号,每支离心管内加入纯净水600uL,每支离心管内加入磷酸氢二钠200uL,分别向每支离心管内加入1.0mg/mL的待连接蛋白5uL、10uL、20uL、40uL、80uL,然后震荡120min,加入浓度为0.5%牛血清白蛋白封闭30分钟,按比例稀释后分别对1、2、3、4和5样品进行活性鉴定,确定定量量子点的最佳蛋白使用量。

[0015] 作为本发明进一步的方案:步骤S1中,量子点溶液的浓度约为1umol/L,磷酸二氢钠的浓度为100mmol/L,碳二亚胺的浓度为10mg/mL。

[0016] 作为本发明再进一步的方案:步骤S2中,离心机的速率为4000转/分。

[0017] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:本发明将“量子点荧光共振能量转移”的特点应用到抗原-抗体的免疫学反应中,能够做到不分离、免漂洗,反应灵敏、操作简单。

具体实施方式

[0018] 下面结合具体实施方式对本发明的技术方案作进一步详细地说明,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0019] 实施例1

[0020] 一种免疫学反应实时检测方法,步骤如下:

[0021] S1、取量子点溶液100uL加入到1.5mL离心管内,加入纯净水700uL,加入磷酸二氢钠100uL,加入碳二亚胺100uL,然后将混合溶液混合均匀,搅拌后超声处理30分钟,放入离心机中,离心10分钟;

[0022] S2、吸取上清液A,保留沉淀物B,然后上清液A放入离心机内继续离心;

[0023] S3、将上清液A放入离心机内离心10分钟,速率为8000转/分,吸取上清液C,保留沉淀物D,上清液C放入离心机内继续离心,离心机的速率为12000转/分,离心20分钟;

[0024] S4、弃去上清液E,保留沉淀F;

[0025] S5、用纯净水溶解B、D和F,合并B、D和F,定容于1.0mL容量瓶内,得到混合组分甲;

[0026] S6、将混合组分甲分装至1.5mL离心管内,离心管数量共5只,每支离心管内混合组分甲的体积为200uL,分别编号为1、2、3、4和5号,每支离心管内加入纯净水600uL,每支离心管内加入磷酸氢二钠200uL,分别向每支离心管内加入1.0mg/mL的待连接蛋白5uL、10uL、

20uL、40uL、80uL,然后震荡120min,加入浓度为0.5%牛血清白蛋白封闭30分钟,按比例稀释后分别对1、2、3、4和5样品进行活性鉴定,确定定量量子点的最佳蛋白使用量。

[0027] 步骤S1中,量子点溶液的浓度约为1umol/L,磷酸二氢钠的浓度为100mmol/L,碳二亚胺的浓度为10mg/mL。

[0028] 步骤S2中,离心机的速率为4000转/分。

[0029] 实施例2

[0030] 一种免疫学反应实时检测方法,步骤如下:

[0031] S1、取量子点溶液100uL加入到1.5mL离心管内,加入纯净水700uL,加入磷酸二氢钠100uL,加入碳二亚胺100uL,然后将混合溶液混合均匀,搅拌后超声处理60分钟,放入离心机中,离心10分钟;

[0032] S2、吸取上清液A,保留沉淀物B,然后上清液A放入离心机内继续离心;

[0033] S3、将上清液A放入离心机内离心10分钟,速率为8000转/分,吸取上清液C,保留沉淀物D,上清液C放入离心机内继续离心,离心机的速率为12000转/分,离心20分钟;

[0034] S4、弃去上清液E,保留沉淀F;

[0035] S5、用纯净水溶解B、D和F,合并B、D和F,定容于1.0mL容量瓶内,得到混合组分甲;

[0036] S6、将混合组分甲分装至1.5mL离心管内,离心管数量共5只,每支离心管内混合组分甲的体积为200uL,分别编号为1、2、3、4和5号,每支离心管内加入纯净水600uL,每支离心管内加入磷酸氢二钠200uL,分别向每支离心管内加入1.0mg/mL的待连接蛋白5uL、10uL、20uL、40uL、80uL,然后震荡120min,加入浓度为0.5%牛血清白蛋白封闭30分钟,按比例稀释后分别对1、2、3、4和5样品进行活性鉴定,确定定量量子点的最佳蛋白使用量。

[0037] 步骤S1中,量子点溶液的浓度约为1umol/L,磷酸二氢钠的浓度为100mmol/L,碳二亚胺的浓度为10mg/mL。

[0038] 步骤S2中,离心机的速率为4000转/分。

[0039] 实施例3

[0040] 一种免疫学反应实时检测方法,步骤如下:

[0041] S1、取量子点溶液100uL加入到1.5mL离心管内,加入纯净水700uL,加入磷酸二氢钠100uL,加入碳二亚胺100uL,然后将混合溶液混合均匀,搅拌后超声处理40分钟,放入离心机中,离心10分钟;

[0042] S2、吸取上清液A,保留沉淀物B,然后上清液A放入离心机内继续离心;

[0043] S3、将上清液A放入离心机内离心10分钟,速率为8000转/分,吸取上清液C,保留沉淀物D,上清液C放入离心机内继续离心,离心机的速率为12000转/分,离心20分钟;

[0044] S4、弃去上清液E,保留沉淀F;

[0045] S5、用纯净水溶解B、D和F,合并B、D和F,定容于1.0mL容量瓶内,得到混合组分甲;

[0046] S6、将混合组分甲分装至1.5mL离心管内,离心管数量共5只,每支离心管内混合组分甲的体积为200uL,分别编号为1、2、3、4和5号,每支离心管内加入纯净水600uL,每支离心管内加入磷酸氢二钠200uL,分别向每支离心管内加入1.0mg/mL的待连接蛋白5uL、10uL、20uL、40uL、80uL,然后震荡120min,加入浓度为0.5%牛血清白蛋白封闭30分钟,按比例稀释后分别对1、2、3、4和5样品进行活性鉴定,确定定量量子点的最佳蛋白使用量。

[0047] 步骤S1中,量子点溶液的浓度约为1umol/L,磷酸二氢钠的浓度为100mmol/L,碳二

亚胺的浓度为10mg/mL。

[0048] 步骤S2中,离心机的速率为4000转/分。

[0049] 实施例4

[0050] 一种免疫学反应实时检测方法,步骤如下:

[0051] S1、取量子点溶液100uL加入到1.5mL离心管内,加入纯净水700uL,加入磷酸二氢钠100uL,加入碳二亚胺100uL,然后将混合溶液混合均匀,搅拌后超声处理45分钟,放入离心机中,离心10分钟;

[0052] S2、吸取上清液A,保留沉淀物B,然后上清液A放入离心机内继续离心;

[0053] S3、将上清液A放入离心机内离心10分钟,速率为8000转/分,吸取上清液C,保留沉淀物D,上清液C放入离心机内继续离心,离心机的速率为12000转/分,离心20分钟;

[0054] S4、弃去上清液E,保留沉淀F;

[0055] S5、用纯净水溶解B、D和F,合并B、D和F,定容于1.0mL容量瓶内,得到混合组分甲;

[0056] S6、将混合组分甲分装至1.5mL离心管内,离心管数量共5只,每支离心管内混合组分甲的体积为200uL,分别编号为1、2、3、4和5号,每支离心管内加入纯净水600uL,每支离心管内加入磷酸氢二钠200uL,分别向每支离心管内加入1.0mg/mL的待连接蛋白5uL、10uL、20uL、40uL、80uL,然后震荡120min,加入浓度为0.5%牛血清白蛋白封闭30分钟,按比例稀释后分别对1、2、3、4和5样品进行活性鉴定,确定定量量子点的最佳蛋白使用量。

[0057] 步骤S1中,量子点溶液的浓度约为1umol/L,磷酸二氢钠的浓度为100mmol/L,碳二亚胺的浓度为10mg/mL。

[0058] 步骤S2中,离心机的速率为4000转/分。

[0059] 实施例5

[0060] 一种免疫学反应实时检测方法,步骤如下:

[0061] S1、取量子点溶液100uL加入到1.5mL离心管内,加入纯净水700uL,加入磷酸二氢钠100uL,加入碳二亚胺100uL,然后将混合溶液混合均匀,搅拌后超声处理50分钟,放入离心机中,离心10分钟;

[0062] S2、吸取上清液A,保留沉淀物B,然后上清液A放入离心机内继续离心;

[0063] S3、将上清液A放入离心机内离心10分钟,速率为8000转/分,吸取上清液C,保留沉淀物D,上清液C放入离心机内继续离心,离心机的速率为12000转/分,离心20分钟;

[0064] S4、弃去上清液E,保留沉淀F;

[0065] S5、用纯净水溶解B、D和F,合并B、D和F,定容于1.0mL容量瓶内,得到混合组分甲;

[0066] S6、将混合组分甲分装至1.5mL离心管内,离心管数量共5只,每支离心管内混合组分甲的体积为200uL,分别编号为1、2、3、4和5号,每支离心管内加入纯净水600uL,每支离心管内加入磷酸氢二钠200uL,分别向每支离心管内加入1.0mg/mL的待连接蛋白5uL、10uL、20uL、40uL、80uL,然后震荡120min,加入浓度为0.5%牛血清白蛋白封闭30分钟,按比例稀释后分别对1、2、3、4和5样品进行活性鉴定,确定定量量子点的最佳蛋白使用量。

[0067] 步骤S1中,量子点溶液的浓度约为1umol/L,磷酸二氢钠的浓度为100mmol/L,碳二亚胺的浓度为10mg/mL。

[0068] 步骤S2中,离心机的速率为4000转/分。

[0069] 本发明的有益效果是:本发明将“量子点荧光共振能量转移”的特点应用到抗原-

抗体的免疫学反应中,能够做到不分离、免漂洗,反应灵敏、操作简单。

[0070] 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。

[0071] 此外,应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施例中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

专利名称(译)	一种免疫学反应实时检测方法		
公开(公告)号	CN109813887A	公开(公告)日	2019-05-28
申请号	CN201910121280.4	申请日	2019-02-19
[标]发明人	王志新 侯淑霞 许文革 单亚明 杨琨		
发明人	王志新 侯淑霞 许文革 单亚明 杨琨		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53 G01N33/532 G01N33/536 G01N33/558		
代理人(译)	高小改		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种免疫学反应实时检测方法，属于免疫学检测技术领域，解决了现有检测方法不能实现实时检测，难以将所有待检样品反应的结果真实表现出来，步骤如下：取量子点溶液100uL加入到1.5mL离心管内，加入纯净水700uL，加入磷酸二氢钠100uL，加入碳二亚胺100uL，然后将混合溶液混合均匀，搅拌后超声处理30-60分钟，放入离心机中，离心10分钟；吸取上清液A，保留沉淀物B，然后上清液A放入离心机内继续离心；本发明将“量子点荧光共振能量转移”的特点应用到抗原-抗体的免疫学反应中，能够做到不分离、免漂洗，反应灵敏、操作简单。