

1. 一种用于时间分辨荧光免疫分析的稀土纳米材料标记生物分子,所述生物分子包括生物素、亲和素、抗体或核酸适配体。

优选地,所述稀土纳米材料通过化学配位法或物理吸附法标记所述生物分子。

2. 根据权利要求1所述的稀土纳米材料标记生物分子,其特征在于,所述稀土纳米材料含有铈、钆、铽、镱四种元素中的一种或多种;优选地,所述稀土纳米材料为 XYF_4 纳米晶,所述X选自锂、钠、钾等中的一种或多种,所述Y选自铈、钆、铽、镱四种元素中的一种或多种。

3. 一种权利要求1或2所述的用于时间分辨荧光免疫分析的稀土纳米材料标记生物分子的标记方法,其通过化学配位法或物理吸附法用所述稀土纳米材料标记所述生物分子,所述生物分子包括生物素、亲和素、抗体或核酸适配体。

4. 一种稀土纳米材料溶解增强时间分辨荧光免疫分析方法,所述方法中采用权利要求1或2所述的用于时间分辨荧光免疫分析的稀土纳米材料标记生物分子。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述方法包括:加入上述用于时间分辨荧光免疫分析的稀土纳米材料标记生物分子,形成免疫复合物后,加入增强液,使稀土纳米材料溶解成稀土离子,并与增强液中的螯合物形成具有强荧光信号的分子,采用时间分辨检测荧光信号。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述方法的具体步骤如下:

1) 将捕获抗体或抗原以物理吸附或共价偶联的方式固定在微孔板上;

2) 封闭液封闭;

3) 加入含有待测抗原或待测抗体的样品;

4) 加入上述用于时间分辨荧光免疫分析的稀土纳米材料标记生物分子,形成免疫复合物;

5) 加入增强液,采用时间分辨检测荧光信号。

优选地,当加入待测抗原时,所述生物分子选自生物素、亲和素、抗体或核酸适配体。

优选地,当加入待测抗体时,所述生物分子选自生物素、亲和素或核酸适配体。

7. 根据权利要求6所述的方法,所述的步骤4)为:

加入上述用于时间分辨荧光免疫分析的稀土纳米材料标记抗体,形成免疫复合物。

8. 根据权利要求6所述的方法,所述的步骤4)还可以分解为以下步骤:

(a) 加入生物素标记的抗体;

(b) 加入上述的用于时间分辨荧光免疫分析的稀土纳米材料标记亲和素,形成免疫复合物。

更优选地,所述的步骤4)还可以分解为以下步骤:

(a') 加入生物素标记的抗体;

(b') 加入亲和素;

(c') 加入上述的用于时间分辨荧光免疫分析的稀土纳米材料标记生物素,形成免疫复合物。

9. 根据权利要求5至8中任一项所述的方法,所述的增强液主要由缓冲液、 β -二酮体,非离子表面活性剂和协同剂组成。

10. 根据权利要求4至9中任一项所述的方法,其检测模式包括夹心法检测、直接法检

测或竞争法检测。

一种稀土纳米材料溶解增强时间分辨荧光免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种可用于标记生物分子的稀土纳米材料、其标记方法及其介导的荧光免疫分析方法,具体地说,涉及一种可用于标记生物分子的稀土纳米材料、其标记方法及通过稀土纳米材料溶解增强实现时间分辨荧光免疫分析的方法。

背景技术

[0002] 放射免疫分析法(RIA)这一分析技术由于存在放射污染、半衰期短、有效期短等缺陷而即将被淘汰。酶联免疫分析法(ELISA)的灵敏度及重复性均不及放射免疫分析法,其酶活性和显色底物的稳定性有待提高。化学发光免疫分析法(CLIA)因发光时间短而不能重复检测,易受环境物质干扰,且试剂价格昂贵,无法广泛使用。

[0003] 相比之下,时间分辨免疫分析(TRFIA)的灵敏度高,本底低,稳定性好,线性范围宽,是目前公认的最有发展前途的非放射性免疫标记技术,近年来开发出的分析系统如下:

[0004] 解离增强镧系时间分辨免疫分析法(DELFIA)——应用最广,由示踪剂、双功能螯合剂和增强剂组成。荧光增强是其具有极高灵敏度的重要因素之一。镧系离子通过与增强液形成微囊,可有效防止水分子淬灭,从而极大增强体系荧光。此外,双功能螯合剂也是关键因素之一,镧离子作为首选标记物与蛋白质的标记比率在 10 到 20 之间。但双功能螯合物作为标记物易受外界物质如:外源性稀土离子,以及乙二胺四乙酸、肝素等抗凝剂的干扰,检测的标本必须为血清,操作要求十分严格,且价格不菲。

[0005] 固相时间分辨免疫分析(FIAgen)——以双功能稀土螯合物作为标记物进行时间分辨免疫分析。其优点是不需要加入增强液就可直接检测荧光,但检测灵敏度远不及 DELFIA。

[0006] 此外,包覆有稀土螯合物的荧光纳米颗粒也被应用于时间分辨免疫分析中,每个纳米颗粒中含有数千个稀土螯合物,极大地提高了检测灵敏度,但存在稀土螯合物易泄漏、易受光漂白等不稳定因素影响。

[0007] 应该说,稀土纳米材料具有性质稳定,比表面积大,可修饰性强,合成成本低廉等优点,是目前普遍看好的新一代荧光生物标记材料。但稀土纳米材料的发光是通过稀土离子 4f 组态电子间跃迁吸收敏化发光,摩尔消光系数小,发光弱。以稀土纳米材料作为标记物的直接检测,灵敏度较低而限制了其应用。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于克服上述现有技术的不足,提供一种可用于时间分辨荧光免疫分析、高灵敏度的稀土纳米材料标记生物分子方法。

[0009] 本发明的另一个目的在于提供一种通过稀土纳米材料溶解增强的时间分辨荧光免疫分析方法。

[0010] 本发明提供如下的技术方案:

[0011] 一种用于时间分辨荧光免疫分析方法(TRFIA)的稀土纳米材料标记生物分子,所述生物分子包括生物素、亲和素、抗体或核酸适配体;所述稀土纳米材料含有铈、钆、铽、镝中的一种或多种。

[0012] 根据本发明,通过化学配位法或物理吸附法标记所述生物分子。

[0013] 根据本发明,所述稀土纳米材料选自稀土氟化物、氧化物、氟氧化物、氯氧化物、稀土磷酸盐、硼酸盐、硅酸盐、钼酸盐、钨酸盐、碳酸盐纳米晶。

[0014] 优选所述稀土纳米材料为 XYF_4 纳米晶,所述X选自锂、钠、钾等中的一种或多种,所述Y选自铈、钆、铽、镝中的一种或多种。

[0015] 本发明还提供如下技术方案:

[0016] 一种用于时间分辨荧光免疫分析的稀土纳米材料标记生物分子的标记方法,所述稀土纳米材料通过化学配位法或物理吸附法标记生物分子,所述生物分子包括生物素、亲和素、抗体或核酸适配体。

[0017] 根据本发明,所述稀土纳米材料含有铈、钆、铽、镝中的一种或多种。

[0018] 根据本发明,所述稀土纳米材料优选为 XYF_4 纳米晶,所述X选自锂、钠、钾等中的一种或多种,所述Y选自铈、钆、铽、镝中的一种或多种。

[0019] 本发明还提供如下技术方案:

[0020] 一种稀土纳米材料通过溶解增强的时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于,所述方法采用了上述用于时间分辨荧光免疫分析的稀土纳米材料标记生物分子。

[0021] 根据本发明,所述方法包括:加入上述用于时间分辨荧光免疫分析的稀土纳米材料标记生物分子,形成免疫复合物后,加入增强液,使稀土纳米材料溶解并以稀土离子形式存在,与增强液中的螯合物形成具有强荧光信号的分子(稀土纳米胶束),采用时间分辨检测荧光信号。

[0022] 根据本发明,所述方法的具体步骤如下:

[0023] 1) 将捕获抗体或抗原以物理吸附或共价偶联的方式固定在微孔板上;

[0024] 2) 封闭液封闭;

[0025] 3) 加入含有待测抗原或待测抗体的样品;

[0026] 4) 加入上述用于时间分辨荧光免疫分析的稀土纳米材料标记生物分子,形成免疫复合物;

[0027] 5) 加入增强液,采用时间分辨检测荧光信号。

[0028] 根据本发明,当加入待测抗原时,所述生物分子选自生物素、亲和素、抗体或核酸适配体。

[0029] 根据本发明,当加入待测抗体时,所述生物分子选自生物素、亲和素或核酸适配体。

[0030] 根据本发明,所述的步骤4)可以是:

[0031] 加入上述用于时间分辨荧光免疫分析的稀土纳米材料标记抗体,形成免疫复合物。

[0032] 根据本发明,所述的步骤4)还可以分解为以下步骤:

[0033] (a) 加入生物素标记的抗体;

[0034] (b) 加入上述的用于时间分辨荧光免疫分析的稀土纳米材料标记亲和素,形成免

疫复合物。

[0035] 根据本发明,所述的步骤 4) 还可以分解为以下步骤:

[0036] (a') 加入生物素标记的抗体;

[0037] (b') 加入亲和素;

[0038] (c') 加入上述的用于时间分辨荧光免疫分析的稀土纳米材料标记生物素,形成免疫复合物。

[0039] 根据本发明,所述的稀土纳米材料含有铈、钆、铽、镝中的一种或多种。

[0040] 根据本发明,所述稀土纳米材料优选为 XYF_4 纳米晶,所述 X 选自锂、钠、钾中的一种或多种,所述 Y 选自铈、钆、铽、镝四种元素中的一种或多种。

[0041] 根据本发明,所述的稀土纳米材料与生物素、亲和素或抗体的标记方法为:化学配位或物理吸附。

[0042] 根据本发明,所述封闭液为本领域的常规溶液,可以通过商购或自行合成。所述封闭液可以为牛血清蛋白(BSA)封闭液或乙醇胺封闭液。

[0043] 根据本发明,所述的增强液可以为本领域常规的增强液,但优选主要由缓冲液、 β -二酮体,非离子表面活性剂和协同剂组成。

[0044] 根据本发明,所述缓冲液选自 Triton X-100;所述 β -二酮体选自萘甲酸三氟丙酮,所述非离子表面活性剂选自三正辛基氧膦,所述协同剂选自水。

[0045] 根据本发明,所述增强液主要由 Triton X-100、萘甲酸三氟丙酮、三正辛基氧膦和蒸馏水组成。

[0046] 根据本发明,其检测模式包括夹心法检测、直接法检测或竞争法检测。

[0047] 本发明中,所述 $NaEuF_4$ 纳米晶可以用本领域技术人员已知的方法制备,例如,可通过如下方法制备:

[0048] 1) 称取 $Eu(Ac)_3$, 加入到油酸和十八烯的混合溶剂中,在氮气气氛中 $160^\circ C$ 搅拌溶解,为 A 液;

[0049] 2) 称取 NH_4F 和 $NaOH$, 加入甲醇溶解,为 B 液;

[0050] 3) A 液降至室温后,用滴管将 B 液缓慢滴加入 A 液中,排净空气,在氮气气氛中升温至 $60^\circ C$, 搅拌,除去甲醇;

[0051] 4) 升温至 $120^\circ C$, 搅拌反应,除去残留水分;

[0052] 5) 升温至 $300^\circ C$, 搅拌反应;

[0053] 6) 冷却至室温后,加入无水乙醇,析出纳米晶;

[0054] 7) 任选地,离心,用无水乙醇洗涤;优选地,洗涤三次。

[0055] 其他 $NaYF_4$ 纳米晶的制备方法可以参考上述方法进行。

[0056] 根据本发明,可以用化学配位法标记所述生物分子,所述化学配位法为本领域技术人员已知的方法,以 $NaEuF_4$ 纳米晶化学配位法标记生物素为例,方法如下:

[0057] 1) 称取油性 $NaEuF_4$ 纳米晶溶于盐酸乙醇溶液中,超声,离心收集纳米颗粒,再用无水乙醇洗涤,除去纳米晶表面的油酸,加入去离子水溶解,得水溶性纳米晶;

[0058] 2) 取步骤 1) 合成的水溶性纳米晶,加入生物素和氨水,超声,用去离子水离心洗涤,最后溶于去离子水中即可。

[0059] 根据本发明,可以用物理吸附法标记所述生物分子,所述物理吸附法为本领域技

术人员已知的方法,以 NaEuF_4 纳米晶物理吸附法标记抗体为例,方法如下:

[0060] 1)称取油溶性 NaEuF_4 纳米晶溶于盐酸乙醇溶液中,超声,离心收集纳米颗粒,再用无水乙醇洗涤,除去纳米晶表面的油酸,加入去离子水溶解,得水溶性纳米晶;

[0061] 2)取步骤 1)合成的水溶性纳米晶,加入抗体,加入磷酸盐缓冲液,室温震荡,离心收集纳米颗粒,水洗涤,溶于缓冲液中即可。

[0062] 本发明的有益效果在于:

[0063] 1)采用稀土纳米材料作为标记物标记生物分子,由于所述稀土纳米材料的性质稳定、比表面积大、可修饰性强、成本低廉且每个纳米颗粒含有数千个稀土离子,极大提高了稀土离子的标记比率,受外源稀土离子的影响小,且不受抗凝剂的影响,适用性更广。

[0064] 2)在含有稀土纳米材料标记生物分子形成免疫复合物后,加入增强液,使稀土纳米材料溶解成稀土离子,并与增强液中的螯合物形成新的信号分子,产生分子内和分子间能量传递,荧光增强近百万倍,极大地提高了检测灵敏度,

[0065] 具体地,本发明的检测灵敏度比市售时间分辨癌胚抗原检测试剂盒高 900 倍。

[0066] 3)如图 1 的对比所示,通过本发明的方法,由于单个稀土纳米颗粒含有数千个稀土离子,极大地提高了稀土离子的标记比率,从而显著增强荧光信号与检测灵敏度。

附图说明

[0067] 图 1:(a)传统的解离增强镧系时间分辨免疫分析法(DELFI A)与(b)本发明稀土纳米材料溶解增强荧光免疫分析法生物检测(DELBA)原理示意图。

[0068] 其中显示,采用双抗夹心法用(a)稀土螯合物或(b)稀土纳米材料对待测抗原或待测抗体进行标记,待形成免疫复合物后加入增强液,利用时间分辨检测荧光信号。

[0069] 由图 1 可见,单个稀土纳米颗粒含有数千个稀土离子,极大地提高了稀土离子的标记比率,加入增强液后形成大量强荧光信号分子,从而显著增强荧光信号与检测灵敏度。

[0070] 图 2: NaEuF_4 纳米晶透射电镜图,仪器型号为 JEM-2010,厂家为 JEOL。

[0071] 图 3: NaEuF_4 纳米晶粉末衍射图,仪器型号为 MiniFlex2,厂家为 Rigaku,铜靶辐射波长为 $\lambda = 0.154187\text{nm}$ 。

[0072] 图 4:本发明双抗夹心法检测癌胚抗原标准曲线。

[0073] 图 5:市售时间分辨癌胚抗原检测试剂盒检测癌胚抗原标准曲线。

具体实施方式

[0074] 以下结合附图和实施例对本发明作进一步的详细说明,但本发明的保护范围不仅限于以下实施例。根据本发明公开的内容,本领域技术人员将认识到在不脱离本发明技术方案所给出的技术特征和范围的情况下,对以上所述实施例做出许多变化和修改都属于本发明的保护范围。

[0075] 实施例

[0076] 实施例 1:

[0077] 一种稀土纳米材料溶解增强时间分辨荧光免疫分析方法,具体步骤如下:

[0078] 1. 合成 NaEuF_4 纳米晶

[0079] 1)称取 $1\text{mmol Eu}(\text{Ac})_3$,加入到 6ml 油酸和 15ml 十八烯混合溶剂中,排净空气,在

氮气氛中 160℃ 搅拌 30min 溶解, 为 A 液;

[0080] 2) 称取 150mg NH_4F +100mg NaOH, 加入 10ml 甲醇溶解, 为 B 液;

[0081] 3) A 液降至室温后, 用滴管将 B 液缓慢滴加入 A 液中, 排净空气, 在氮气氛中升温至 60℃, 搅拌 30min, 除去甲醇;

[0082] 4) 升温至 120℃, 搅拌反应 10min, 除去残留水分;

[0083] 5) 升温至 300℃, 搅拌反应 0.5h;

[0084] 6) 冷却至室温后, 加入 2 倍体积的无水乙醇, 析出纳米晶;

[0085] 7) 离心, 用无水乙醇洗涤纳米晶三次, 备用。

[0086] 图 2 和图 3 分别给出了合成的 NaEuF_4 纳米晶的透射电镜图和粉末衍射图。

[0087] 2. NaEuF_4 纳米晶标记生物素或抗体

[0088] A、 NaEuF_4 纳米晶化学配位法标记生物素

[0089] 1) 称取步骤 1 合成的 NaEuF_4 纳米晶 20mg 溶于 15ml, pH1.0 的盐酸乙醇溶液中, 超声 30min, 离心收集纳米颗粒, 再用无水乙醇洗涤三次, 除去纳米晶表面的油酸, 加入 2ml 去离子水溶解, 为 10mg/ml 水溶性纳米晶;

[0090] 2) 在步骤 1) 中加入 1mmol 的生物素和 2 滴氨水, 超声 20min, 用去离子水离心洗涤三次, 最后溶于 1ml 去离子水中备用。

[0091] B、 NaEuF_4 纳米晶物理吸附法标记抗体: 取步骤 A-1) 合成的水溶性纳米晶 1ml, 加入 100 μg 抗体, 加入 100 μl , pH8.0 磷酸盐缓冲液, 室温震荡 1h, 离心收集纳米颗粒, 水洗涤三次, 溶于 pH8.0 的缓冲液中备用。

[0092] 3. 配制增强液

[0093] 称取 1g Triton X-100, 26.6mg 萘甲酰三氟丙酮, 193mg 三正辛基氧磷, 加入蒸馏水定容至 1L, 用稀 HCl 调节 pH2.0, 备用。

[0094] 4. NaEuF_4 纳米晶双抗夹心法检测癌胚抗原

[0095] 1) 包被: 用 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液将癌胚抗原的抗体稀释至 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 在 96 孔聚苯乙烯板中, 每孔加入 100 μl , 37℃ 孵育 1 小时, 弃去孔内液体, 用 PBST 洗涤缓冲液洗 3 次。

[0096] 2) 封闭: 用 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液配制 2% 的牛血清白蛋白, 每孔加入 300 μl , 37℃ 孵育 1 小时, 去孔内液体, 用 PBST 洗涤缓冲液洗 3 次。

[0097] 3) 加样: 用 PBS 缓冲液配制 0.00256-1000ng/ml 的癌胚抗原系列标准溶液, 使其浓度分别为: 0ng/ml、0.00256ng/ml、0.064ng/ml、0.0128ng/ml、0.32ng/ml、1.6ng/ml、8ng/ml 的标准品, 37℃ 孵育 1 小时, 弃去孔内液体, 用 PBST 洗涤缓冲液洗 3 次。

[0098] 4) 加 NaEuF_4 纳米晶标记的抗体: 用 PBS 缓冲液配制 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 NaEuF_4 纳米晶标记的抗体, 每孔加入 100 μl , 37℃ 孵育 1 小时, 弃去孔内液体, 用 PBST 洗涤缓冲液洗 6 次。

[0099] 5) 加增强液: 每孔加入 200 μl 增强液, 采用时间分辨检测荧光信号, 具体参数为: 激发波长 340nm, 发射波长 615nm, 延迟时间 250 μs 。

[0100] 6) 绘制标准曲线: 以癌胚抗原标准溶液浓度为横坐标, 以每一浓度标准溶液对应的荧光强度为纵坐标, 绘制标准曲线, 见图 4, 在 0.00256-8ng/ml 范围内, 癌胚抗原的浓度与荧光强度成线性相关, $y=480.87x+425$, $R=0.9987$, 以空白平均值加 3 倍 SD 计, 最低检测限为 0.1pg/ml。

[0101] 7) 样品的测定 :在步骤 3) 加入 $100\ \mu\text{L}$ 待测样品,其他步骤同上,将待测样品的荧光强度带入标准曲线方程,求得相应的浓度值。

[0102] 8) 所述的步骤 4) 还可以这样实现 :

[0103] (1) 加生物素标记的抗体 :用 PBS 缓冲液配制 $1\ \mu\text{g/ml}$ 的生物素标记的抗体,每孔加入 $100\ \mu\text{L}$, 37°C 孵育 1 小时,弃去孔内液体,用 PBST 洗涤缓冲液洗 3 次 ;

[0104] (2) 加亲和素 :用 PBS 缓冲液配制 $5\ \mu\text{g/ml}$ 的亲和素,每孔加入 $100\ \mu\text{L}$,

[0105] 37°C 孵育 0.5 小时,弃去孔内液体,用 PBST 洗涤缓冲液洗 3 次 ;

[0106] (3) 加 NaEuF_4 纳米晶标记的生物素 :用 PBS 缓冲液配制 $10\ \mu\text{g/ml}$ 的 NaEuF_4 纳米晶标记的生物素,每孔加入 $100\ \mu\text{L}$, 37°C 孵育 0.5 小时,弃去孔内液体,用 PBST 洗涤缓冲液洗 6 次。

[0107] 实施例 2 :本发明与市售时间分辨癌胚抗原检测试剂盒比较

[0108] 1) 包被 :用 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液将癌胚抗原的抗体稀释至 10ug/ml ,在 96 孔聚苯乙烯板中,每孔加入 $100\ \mu\text{L}$, 37°C 孵育 1 小时,弃去孔内液体,用 PBST 洗涤缓冲液洗 3 次。

[0109] 2) 封闭 :用 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液配制 2% 的牛血清白蛋白,每孔加入 $300\ \mu\text{L}$, 37°C 孵育 1 小时,去孔内液体,用 PBST 洗涤缓冲液洗 3 次。

[0110] 3) 加样 :用 PBS 缓冲液配制 $0.00256\text{--}1000\text{ng/ml}$ 的癌胚抗原系列标准溶液,使其浓度分别为 : 0ng/ml 、 0.00256ng/ml 、 0.064ng/ml 、 0.0128ng/ml 、 0.32ng/ml 、 1.6ng/ml 、 8ng/ml 的标准溶液, 37°C 孵育 1 小时,弃去孔内液体,用 PBST 洗涤缓冲液洗 3 次。

[0111] 4) 加生物素标记的抗体 :用 PBS 缓冲液配制 $1\ \mu\text{g/ml}$ 的生物素标记的抗体,每孔加入 $100\ \mu\text{L}$, 37°C 孵育 1 小时,弃去孔内液体,用 PBST 洗涤缓冲液洗 3 次。

[0112] 5) 加亲和素 :用 PBS 缓冲液配制 $5\ \mu\text{g/ml}$ 的亲和素,每孔加入 $100\ \mu\text{L}$, 37°C 孵育 0.5 小时,弃去孔内液体,用 PBST 洗涤缓冲液洗 3 次。

[0113] 6) 加 NaEuF_4 纳米晶标记的生物素 :用 PBS 缓冲液配制 $10\ \mu\text{g/ml}$ 的 NaEuF_4 纳米晶标记的生物素,每孔加入 $100\ \mu\text{L}$, 37°C 孵育 0.5 小时,弃去孔内液体,用 PBST 洗涤缓冲液洗 6 次。

[0114] 7) 加增强液 :每孔加入 $200\ \mu\text{L}$ 增强液,采用时间分辨检测荧光信号,具体参数为 :激发波长 340nm ,发射波长 615nm ,延迟时间 $250\ \mu\text{s}$ 。

[0115] 8) 绘制标准曲线 :以癌胚抗原标准溶液浓度为横坐标,以每一浓度标准溶液对应的荧光强度为纵坐标,绘制标准曲线,见图 4,在 $0.00256\text{--}8\text{ng/ml}$ 范围内,癌胚抗原的浓度与荧光强度成线性相关, $y=480.87x+425$, $R=0.9987$,以空白平均值加 3 倍标准差计,最低检测限为 0.1pg/ml 。

[0116] 9) 时间分辨癌胚抗原检测试剂盒测定癌胚抗原 :按说明书操作,绘制标准曲线,见图 5,在 $0.1\text{--}800\text{ng/ml}$ 范围内,癌胚抗原的浓度与荧光强度成线性相关, $y=12.732x+223.98$, $R=0.9989$,以空白平均值加 3 倍标准差计,最低检测限为 90pg/ml ,本发明的检测灵敏度比市售时间分辨癌胚抗原检测试剂盒高 900 倍。

[0117] 实施例 3 :

[0118] 本发明与市售时间分辨癌胚抗原检测试剂盒测定不同标本的回收率比较

[0119] 1) 包被 :用 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液将癌胚抗原的抗体稀释至 10ug/ml ,在 96

孔聚苯乙烯板中,每孔加入 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时,弃去孔内液体,用 PBST 洗涤缓冲液洗 3 次。

[0120] 2) 封闭:用 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液配制 2% 的牛血清白蛋白,每孔加入 300 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时,去孔内液体,用 PBST 洗涤缓冲液洗 3 次。

[0121] 3) 加样:用 PBS 缓冲液配制 0.00256-1000ng/ml 的癌胚抗原系列标准溶液,使其浓度分别为:0ng/ml、0.00256ng/ml、0.064ng/ml、0.0128ng/ml、0.32ng/ml、1.6ng/ml、8ng/ml 的标准品,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时,弃去孔内液体,用 PBST 洗涤缓冲液洗 3 次。

[0122] 4) 加 NaEuF₄ 纳米晶标记的抗体:用 PBS 缓冲液配制 1 μ g/ml 的生 NaEuF₄ 纳米晶标记的抗体,每孔加入 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时,弃去孔内液体,用 PBST 洗涤缓冲液洗 6 次。

[0123] 5) 加增强液:每孔加入 200 μ l 增强液,采用时间分辨检测荧光信号,具体参数为:激发波长 340nm,发射波长 615nm,延迟时间 250 μ s。

[0124] 6) 绘制标准曲线:以癌胚抗原标准溶液浓度为横坐标,以每一浓度标准溶液对应的荧光强度为纵坐标,绘制标准曲线,在 0.00256-8ng/ml 范围内,癌胚抗原的浓度与荧光强度成线性相关, $y=480.87x+425$, $R=0.9987$ 。

[0125] 7) 本发明对血清和血浆基质的回收率测定:将同一份血清和含有 EDTA 抗凝剂的血浆分别分成两份,其中一份加入 2ng/ml 的癌胚抗原标准溶液,在步骤 3) 加入 100 μ l 待测标本,其他步骤同上,每个标本分别测定 3 次,将待测样品的荧光强度带入标准曲线方程,求得相应的浓度值。

[0126] 8) 市售时间分辨癌胚抗原检测试剂盒对血清和血浆基质的回收率测定:按说明书操作,绘制标准曲线,在 0.1-800ng/ml 范围内,癌胚抗原的浓度与荧光强度成线性相关, $y=12.732x+223.98$, $R=0.9989$,血清和血浆基质的回收率测定同步步骤 7)。

[0127] 9) 结论:由表 1 可知,本发明和市售时间分辨癌胚抗原检测试剂盒对血清基质的回收率都在 95% 以上,而对含 EDTA 抗凝剂的血浆基质,回收率分别为 95.2% 和 85%,说明以螯合物标记的市售时间分辨癌胚抗原检测试剂盒对含 EDTA 抗凝剂的标本存在负干扰,而本发明无干扰,适用性更广。

[0128] 表 1 本发明与市售时间分辨癌胚抗原检测试剂盒测定不同标本回收率的比较

[0129]

方法	标本	本底值 (ng/ml)	加标值 (ng/ml)	理论值 (ng/ml)	实测值 (ng/ml)	平均回收率 (%)
本发明	血清	5.8	2	7.8	7.6 \pm 0.2	97.4
	血浆	7.7	2	9.7	14.0 \pm 0.3	95.2
市售试剂盒	血清	6.9	2	8.9	8.6 \pm 0.2	96.2
	血浆	8.9	2	10.9	9.3 \pm 0.4	85.0

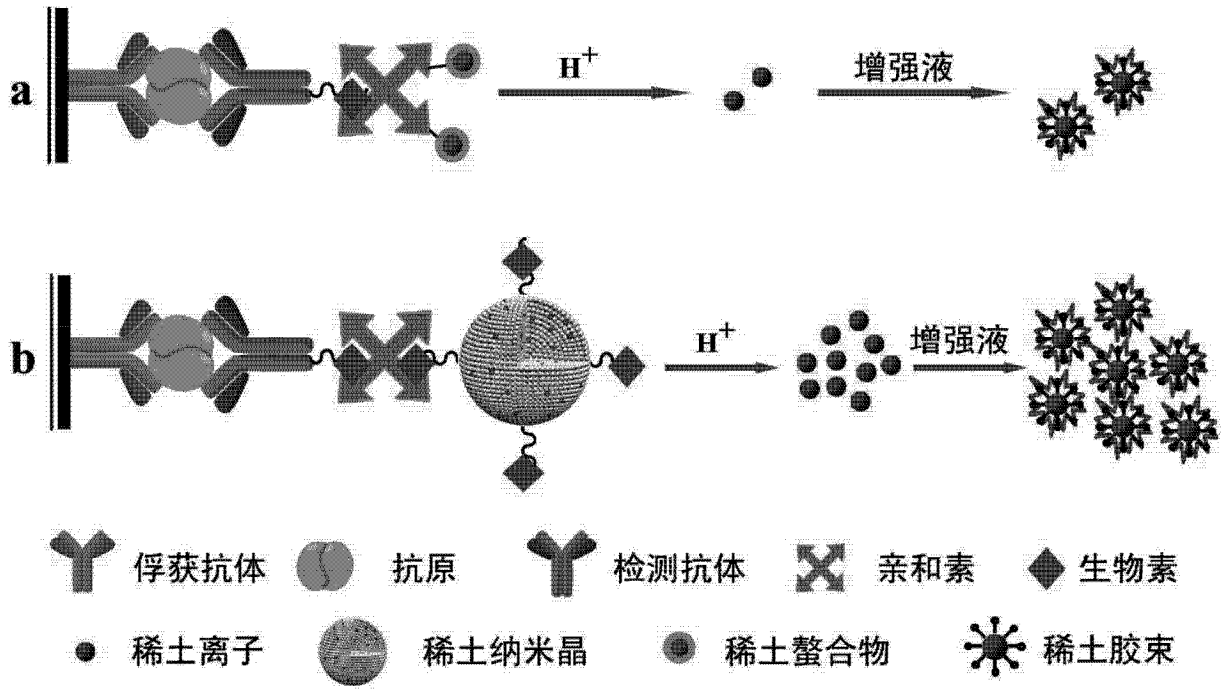


图 1

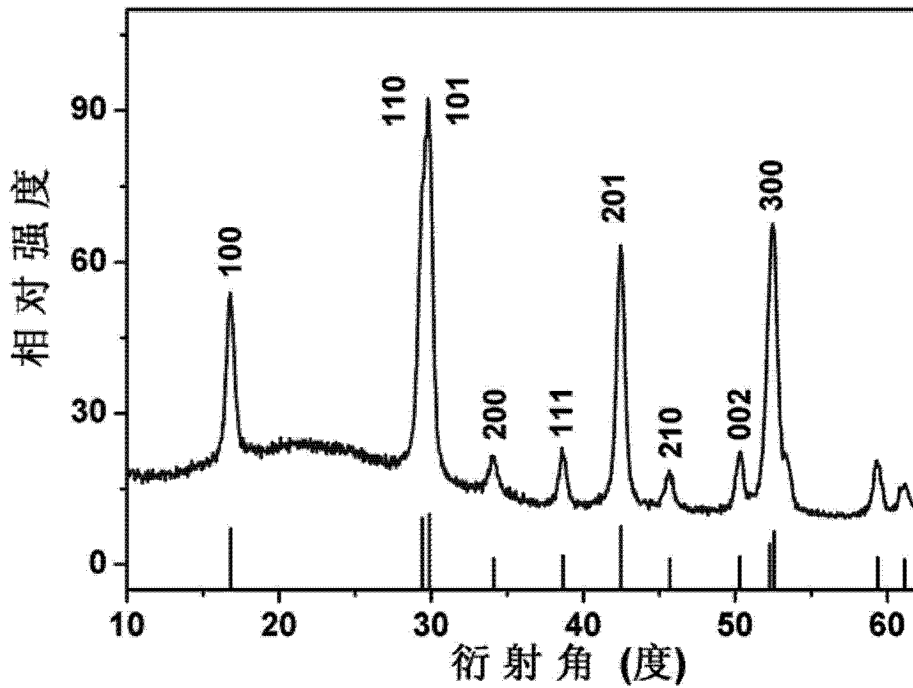


图 2

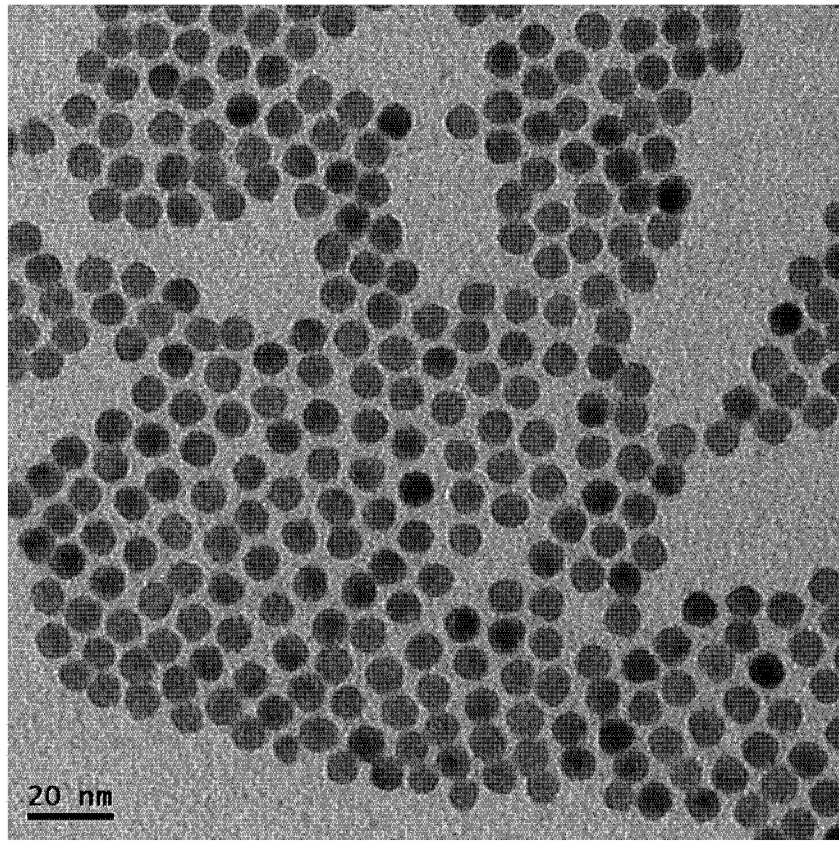


图 3

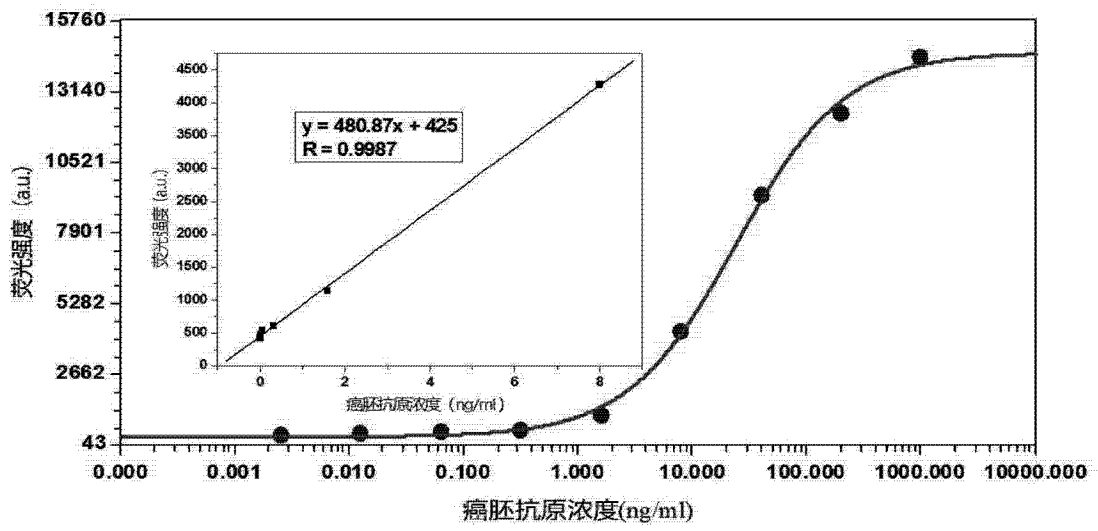


图 4

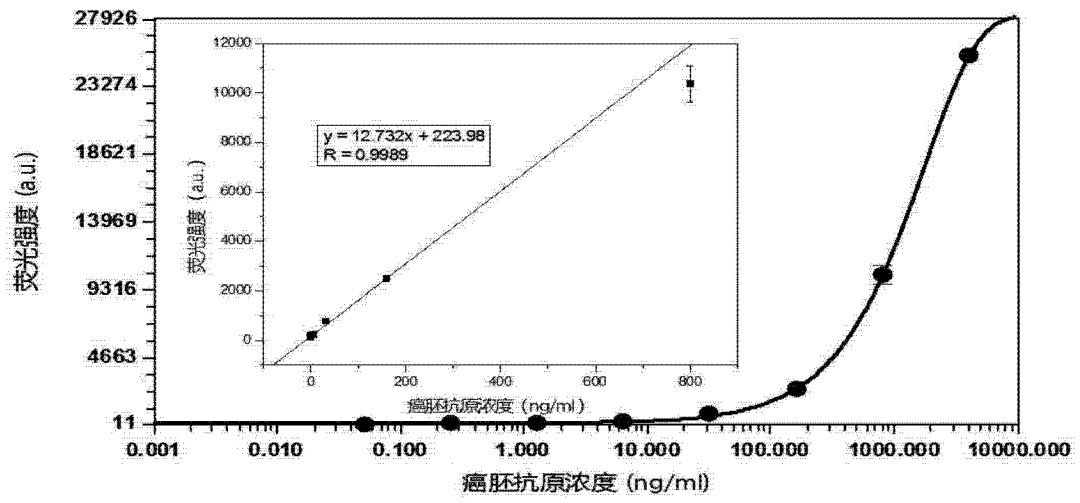


图 5

专利名称(译)	一种稀土纳米材料溶解增强时间分辨荧光免疫分析方法		
公开(公告)号	CN103969432A	公开(公告)日	2014-08-06
申请号	CN201410118864.3	申请日	2014-03-27
申请(专利权)人(译)	中国科学院福建物质结构研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院福建物质结构研究所		
[标]发明人	陈学元 周山勇 郑伟 马恩 黄明东 陈卓 涂大涛		
发明人	陈学元 周山勇 郑伟 马恩 黄明东 陈卓 涂大涛		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/542 G01N33/587 G01N33/533 G01N33/588 G01N2458/40		
代理人(译)	刘元霞 谢蓉		
其他公开文献	CN103969432B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种稀土纳米材料标记生物分子、其标记方法及稀土纳米材料溶解增强时间分辨荧光免疫分析方法，采用稀土纳米材料作为标记物，其性质稳定，比表面积大，可修饰性强，成本低廉，且每个纳米晶含有数千个镧系离子，极大地提高了稀土离子的标记比率，受外源稀土离子的影响小，且不受抗凝剂的影响，适用性广；在稀土纳米材料作为标记物的免疫复合物形成后，加入增强液，使稀土纳米材料溶解成稀土离子，并与增强液中的螯合物形成新的信号分子，产生分子内和分子间能量传递，荧光增强近百万倍，采用时间分辨检测荧光信号，极大提高了检测灵敏度。

