

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810204008.4

[43] 公开日 2009年5月27日

[11] 公开号 CN 101441212A

[22] 申请日 2008.12.4

[21] 申请号 200810204008.4

[71] 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路800号

[72] 发明人 崔大祥 潘碧峰 高峰 贺蓉

[74] 专利代理机构 上海交大专利事务所
代理人 王锡麟 王桂忠

权利要求书2页 说明书8页

[54] 发明名称

量子点标记荧光免疫多种抗原同步检测方法

[57] 摘要

本发明涉及一种检测技术领域的量子点标记荧光免疫多种抗原同步检测方法，利用量子点多波长激发、高强度荧光发射、发射峰窄、峰形对称、发光稳定性好的荧光特性，将目标物即被测物抗原的抗体连接在量子点及磁性纳米粒子等纳米粒子上，加入被测样品，再加入过量量子点标记的抗体，通过免疫反应，样品中的目标物与固定在量子点与磁性纳米粒子等纳米粒子上的抗体结合，使量子点与磁性纳米粒子等纳米粒子组装在一起形成抗原抗体的复合物即结合物，分离结合物与未反应的量子点标记物即游离物，检测游离物的荧光信号强度，对被测物进行定量检测。本发明检测灵敏度高，定量范围广，可实现多种抗原的同步检测，方法简单，成本低。

1、一种量子点标记荧光免疫多种抗原同步检测方法，其特征在于，包括如下步骤：

第一步，将被测抗原的一对相匹配的抗体，其中一种抗体与量子点连接，制备成量子点纳米探针；另一抗体与磁性纳米粒子连接，制备成磁性纳米粒子探针；

第二步，将量子点标记抗体探针与磁性纳米粒子标记的抗体探针按照 2-5:1 比例一起加到含被测抗原的样品管中，经免疫反应，形成量子点探针-抗原-磁性纳米探针复合物，磁性纳米粒子淬灭量子点荧光信号，通过分离，上清液包含未反应的量子点标记探针，检测上清液荧光信号强度，一种波长的荧光信号代表一种待测抗原，利用荧光强度与待测抗原量之间的对应关系，从而对不同的被测抗原获得定量测量结果。

2、根据权利要求 1 所述的量子点标记荧光免疫多种抗原同步检测方法，其特征是，所述量子点，其粒径在 10 纳米以下，用不同类型的量子点标记不同抗原的抗体，产生多色荧光量子点探针，用于多组份的检测。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的量子点标记荧光免疫多种抗原同步检测方法，其特征是，所述的量子点选用以下粒子：

①单一化合物的量子点，具体为：

第 III 族和第 V 族组成的化合物，包括 GaAs, GaSb, InAs, InP, InGaAs, AlGaAs, InAlAs 任意一种；

第 II 族和第 VI 族组成的化合物，包括如 MgSe, MgTe, CaS, CaSe, CaTe, SrS, SrSe, SrTe, BaS, BaSe, BaTe, ZnS, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe 任意一种；

第 IV 族和第 IV 族组成的化合物中的一种，包括 SiC, SiGe 中的任意一种；

第 IV 族和第 VI 族组成的化合物中的一种；

②量子点与量子点化合物组装而成的核壳结构的量子点，包括 ZnS 包覆 CdSe, ZnS 包覆 CdTe 中的任意一种。

4、根据权利要求 1 所述的量子点标记荧光免疫多种抗原同步检测方法，其特征是，所述磁性纳米粒子选用磁性颗粒、碳纳米管、聚丙烯酰胺颗粒、聚苯乙烯颗粒、玻璃颗粒、聚丙烯颗粒、硅橡胶颗粒、纤维素颗粒、交联葡聚糖颗粒中

的任意一种。

5、根据权利要求1或4所述的量子点标记荧光免疫多种抗原同步检测方法，其特征是，所述磁性纳米粒子大小是10纳米至100纳米，粒子上分别标记不同被测抗原的抗体。

6、根据权利要求1所述的量子点标记荧光免疫多种抗原同步检测方法，其特征是，所述的分离是指外加磁场分离或使用离心机离心分离，若一种粒子使用磁性粒子，则用外加磁场分离；除磁性粒子外的其它粒子，则用离心机离心的方法分离。

7、根据权利要求6所述的量子点标记荧光免疫多种抗原同步检测方法，其特征是，所述离心分离，其离心力为1500g/分—2000g/分钟。

量子点标记荧光免疫多种抗原同步检测方法

技术领域

本发明涉及的是一种检测技术领域的荧光免疫检测方法，具体是一种量子点标记荧光免疫多种抗原同步检测方法。

背景技术

量子点（半导体纳米粒子）也叫人造原子，是由一定数量的实际原子组成的聚集体，尺寸小于 10nm 的半导体化合物，是一类理想的荧光指示剂。利用量子点所具有的超快速的光学非线性响应，（室温）光致发光，及量子点根据原料不同和同一原料粒子大小的不同，可产生不同颜色和不同波长的发射光，可以实现多组分的检测。

经对现有技术的文献检索发现，2004 年 Goldman E R 等在《Analytical Chemistry》(Vol. 76, No. 3, P 684-688) 发表了用四种发出不同颜色荧光的量子点分别标记抗霍乱毒素、蓖麻毒素、志贺菌毒素 1 和葡萄球菌肠毒素 B 的抗体，在同一个微孔板上进行四种毒素的同时分析检测；中国专利“半导体纳米粒子标记的夹心免疫检测法及其诊断试剂盒”（申请号为 03127115.4），用量子点标记代替酶标记，建立了新颖的免疫分析方法。该专利将目标物抗体直接或间接固定在微孔中，用量子点标记目标物的另一抗体，通过免疫反应，形成微孔板抗体-抗原-量子点标记抗体的荧光复合物，通过对复合物的荧光强度检测，实现对目标物的定量测定。由于微孔板的壁表面积小连接抗体的容量少，而且需要专门仪器，因此，这种微孔板检测方法在检测灵敏度方面以及野外现场检测方面具有局限性。

现有技术研究已经发现碳纳米管对量子点荧光特性具有一定的影响，在 10nm 距离范围内碳纳米管能够淬灭量子点荧光信号，淬灭程度与两者之间距离有关。

崔大祥等人在 Analytical Chemistry (《分析化学》) 2008; 80(21) 7996-8001 上发表的文章“Self-assembly of CNTs and Quantum dots for ultrasensitive

DNA and antigen detection”上报道了一种新的基于碳纳米管与量子点自组装的一个抗原定量检测的原理与方法，显著提高了检测的灵敏度。但是，这个方法是基于碳纳米管对量子点的荧光淬灭基础上的，对多种抗原同步定量检测无报道。

发明内容

本发明针对现有技术的不足和缺陷，提供一种量子点标记荧光免疫多种抗原同步检测方法，很好地解决了多种抗原同步荧光免疫检测的问题。本发明可用于在同一管中的多组份抗原同步检测，简单快速，不需要贵重的仪器，成本低，具有检测灵敏度高，定量范围广特点。

本发明是通过以下技术方案实现的：利用改变量子点的粒径，得到不同波长的荧光量子点，用不同粒径的量子点标记不同的抗体，产生多色荧光量子点探针，可实现对多组分抗原抗体的标记；利用磁性纳米粒子标记针对同一抗原的抗体，制备成磁性纳米粒子探针；在抗原存在情况下，磁性纳米粒子探针会与量子点探针形成磁性纳米粒子探针-抗原-量子点探针复合物，采用外加磁场方法，可快速分离出未被结合的量子点探针，测定量子点探针荧光信号强度，可计算出待测抗原的量。

本发明包括如下步骤：

第一步，将被测抗原的一对相匹配的抗体，其中一种抗体与量子点连接，制备成量子点纳米探针；另一抗体与磁性纳米粒子连接，制备成磁性纳米粒子探针；

所述连接，其方法是常用方法，利用磁性纳米粒子表面氨基、量子点表面氨基与抗体中羧基反应，形成肽键而连接成探针。

所述量子点，其粒径在10纳米以下，根据量子点的荧光性质，选择不同粒径的量子点或不同种类的量子点，就可得到不同波长的荧光，用不同类型的量子点标记不同抗原的抗体，可产生多色荧光量子点探针，可用于多组份的检测。根据待测抗原的数量决定量子点的种类，如果要在样品中检测两种物质，那么选择两种发出不同波长的量子点分别标记两种被测物的抗体；如果检测三种物质就是选择三种发出不同波长的量子点，如此类推。

所述磁性纳米粒子可以选用磁性颗粒、碳纳米管、聚丙烯酰胺颗粒、聚苯乙烯颗粒、玻璃颗粒、聚丙烯颗粒、硅橡胶颗粒、纤维素颗粒、交联葡聚糖颗粒中

的任意一种，粒子大小根据原料和制备方法的不同可以是 10 纳米至 100 纳米，粒子上分别标记不同被测抗原的抗体。

所述的量子点可选用以下种类：单一化合物的量子点，这些量子点可以是第 III 族和第 V 族组成的化合物，如 GaAs, GaSb, InAs, InP, InGaAs, AlGaAs, InAlAs 等任意一种；第 II 族和第 VI 族组成的化合物，如 MgSe, MgTe, CaS, CaSe, CaTe, SrS, SrSe, SrTe, BaS, BaSe, BaTe, ZnS, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe 等任意一种；第 IV 族和第 IV 族组成的化合物，如 SiC, SiGe 中的任意一种；第 IV 族和第 VI 族组成的化合物。也可以是无机分子与量子点化合物组装而成的核壳结构的量子点，如 ZnS 包覆 CdSe。

第二步，将量子点标记抗体探针与磁性纳米粒子标记的抗体探针按照 2-5:1 比例一起加到含被测抗原的样品管中，经免疫反应，形成量子点探针-抗原-磁性纳米探针复合物，磁性纳米粒子淬灭量子点荧光信号，通过分离，上清液包含未反应的量子点标记探针，检测上清液荧光信号强度，一种波长的荧光信号代表一种待测抗原，利用荧光强度与待测抗原量之间的对应关系，从而对不同的被测抗原获得定量测量结果。

所述的分离是指外加磁场分离或使用离心机离心分离，若一种粒子使用磁性粒子，则用外加磁场分离；除磁性粒子外的其它粒子，则用离心机离心的方法分离，离心力 1500g/分钟—2000g/分钟。

本发明将磁性纳米粒子等纳米抗体探针加入被测抗原管中，把 2-5 倍的量子点标记的抗体探针，加入含待测抗原的样品管中，经过抗原抗体的结合反应，使纳米粒子与量子点组装在一起，形成纳米复合物，通过分离，检测未反应的量子点标记的探针的荧光信号，实现对被测抗原定量检测。本发明利用量子点多波长激发、高强度荧光发射、发射峰窄、峰形对称、发光稳定性好的荧光特性，只需改变量子点的粒径或种类，就可得到不同波长的荧光，可实现 3 种以上的抗原的同步检测。

本发明将夹心法免疫反应的高特异性与量子点的荧光性能结合起来，建立高效、特异、定量的荧光免疫检测方法，根据信号减弱的强度对被测抗原进行定量检测，检测灵敏度高，定量范围广，方法简单，成本低，适用于血样、尿样、唾

液等样本，可应用于激素、蛋白质、病毒、毒品、细菌、环境污染等检测，常规的生化实验室都具备实验条件，便于推广。

具体实施方式

下面对本发明的实施例作详细说明：本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施，给出了详细的实施方式和具体的操作过程，但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

实施例一

选用一种荧光波长的 CdSe 量子点标记抗体，制备成量子点探针，检测一种抗原。对于纳米粒子，以碳纳米管为例，建立量子点标记的荧光免疫测量方法，采取如下步骤：

1、碳纳米管标记抗体的纳米探针制备：市场上购买 100 毫克的碳纳米管加入 10 毫升 60%的硝酸溶液中超声 30 分钟后，在 100°C 下搅拌回流反应 24 小时，用孔径为 0.22 微米的滤膜过滤，用水洗涤除去硝酸，过滤后的固体在 60°C 真空干燥 12 小时，得到羧基修饰的碳纳米管。取 2 毫克羧基修饰的碳纳米管，在连接剂碳二亚胺的作用下与 1 毫克抗乳腺癌相关抗原(BRCA1)的单克隆抗体连接，制得碳纳米管标记的抗 BRCA1 单抗的纳米探针。

2、量子点标记抗体的纳米探针制备：氯化镉溶解在含有巯基乙酸的碱性 (pH 10) 水溶液中，加入离子型系 Na_2SeSO_3 溶液（由硒粉和亚硫酸钠制备而成），磁力搅拌下，100°C 回流 3h，反应时间不同得到量子点的粒径不同 (1.2-2.2nm)，合成表面带有羧基的 CdSe 量子点。选用粒径为 1.5 纳米的量子点，在连接剂碳二亚胺的作用下与抗乳腺癌相关抗原 (BRCA1) 的多克隆抗体连接，室温搅拌反应 2 小时，用 Sephadex G-200 层析柱分离纯化，得到 CdSe 量子点标记的抗 BRCA1 多抗的纳米探针。

3、建立测量方法：在试管中加入 100 μL 乳腺癌抗原 (BRCA1) 的标准品 (浓度从 0 到 10nM) 或待测样品，50 μL 制备的碳纳米管标记的抗 BRCA1 单抗探针，在室温反应 30 分钟后，加入 200 μL 上面制备的量子点标记多抗探针，室温反应 2 小时，形成碳纳米管与量子点组装的抗原抗体复合物，在 2000 转/分离心分离复合物，上清液是未反应的量子点标记物即游离物，用荧光分光光度计检测上清液

中游离物的荧光强度（激发波长为 360nm 的普通紫外光），通过检测发射波长 510nm 的荧光强度值对 BRCA1 浓度作标准曲线，根据标准曲线求得待测样品中 BRCA1 的含量。该检测方法的灵敏度为 0.1pM，平均回收率 98.6%，批内误差小于 7%，批间误差小于 10%。

实施例二

选用发出二种荧光波长的量子点标记抗体，检测两种抗原。对于纳米粒子，以磁性颗粒为例，建立量子点标记的荧光免疫测量方法，采取如下步骤：

1、磁性粒子标记抗体的纳米探针制备：首先用硫酸亚铁和三氯化铁在碱性条件下制备纳米四氧化三铁（ Fe_3O_4 ）粒子，再采用有机分子处理纳米 Fe_3O_4 粒子使其表面带有功能基团（羧基、氨基、醛基、巯基等）。这里选用表面带有羧基的磁粒子（粒径为 50 纳米左右），取 1 毫克羧基修饰的磁粒子，在连接剂碳二亚胺的作用下与 2 毫克抗癌胚抗原（CEA）的单抗连接，制得磁粒子标记的抗 CEA 单抗探针；再取 1 毫克羧基修饰的磁粒子，在连接剂碳二亚胺的作用下与 2 毫克抗甲胎蛋白（AFP）单抗连接，制备成磁性粒子标记的抗 AFP 单抗探针。

2、量子点标记抗体的探针制备：氯化镉溶解在含有巯基乙酸的碱性（pH 10）水溶液中，加入离子型碲源 NaHTe （由碲粉和硼氢化钠制备成）， 100°C 反应 5-240 分钟，反应时间不同得到量子点的粒径不同（1.8-4.2nm），溶液颜色由绿色到橙色最终为红色，合成表面带有羧基的 CdTe 量子点。这里选用粒径为 2.5 纳米和 4 纳米的 CdTe 量子点，同样用实施例一中的方法分别制备 2.5 纳米的量子点标记抗 CEA 多抗及 4 纳米的量子点标记抗 AFP 多抗探针。

3、建立测量方法：在试管中加入 100 μL 甲胎蛋白（AFP）的标准品（浓度梯度为 0, 15, 30, 100, 200, 400ng/mL）或待测样品；再加入 100 μL 癌胚抗原（CEA）的标准品（浓度梯度为 0, 10, 20, 40, 80, 120ng/mL）或待测样品，混合均匀后，加入 100 μL 磁粒子标记抗体（由等体积的磁粒子标记的抗 CEA 单抗和磁粒子标记的抗 AFP 单抗组成），以及 500 μL 量子点标记多抗（由等体积的量子点标记抗 CEA 多抗和量子点标记抗 AFP 多抗组成），室温反应 4 小时，形成磁粒子与量子点组装的抗原抗体复合物即结合物，在外加磁场下分离结合物，上

清液是未反应的量子点标记物即游离物,用荧光分光光度计检测上清液中游离物的荧光强度(激发波长为360nm的普通紫外光),通过检测发射光波长550nm的荧光强度值对CEA浓度作标准曲线,根据标准曲线求得待测样品中CEA的含量;通过检测发射光波长610nm的荧光强度值对AFP浓度作标准曲线,根据标准曲线求得待测样品中AFP的含量。该方法检测CEA的灵敏度为0.32ng/ml,平均回收率101.2%,批内误差小于10%,批间误差小于10%;检测AFP的灵敏度为0.56ng/ml,平均回收率99.4%,批内误差小于10%,批间误差小于10%。

实施例三

选用发出三种荧光波长的量子点标记,检测三种抗原。对于纳米粒子,选用磁性颗粒和碳纳米管,建立量子点标记的荧光免疫测量方法。

在试管中加入10 μ L甲胎蛋白的标准品或待测样品、10 μ L癌胚抗原的标准品或待测样品、10 μ L乳腺癌抗原(BRCA1)的标准品或待测样品,混合后,加入100 μ L由采用实施例一中制备的碳纳米管标记抗BRCA1单抗和100 μ L实施例二中制备的磁粒子标记抗CEA单抗及100 μ L磁粒子标记抗AFP单抗组成的混合物,在室温反应30分钟后,加入200 μ L由实施例一中制备的CdSe量子点标记抗BRCA1多抗和200 μ L实施例二中制备的CdTe量子点标记抗CEA多抗及200 μ L CdTe量子点标记抗AFP多抗组成的混合物,室温反应3小时,形成磁性粒子与量子点组装的抗原抗体复合物即结合物,以及碳纳米管与量子点组装的抗原抗体复合物即结合物,在2000转/分离心分离结合物,上清液是未反应的量子点标记物即游离物,用荧光分光光度计检测上清液中游离物的荧光强度(激发波长为360nm的普通紫外光),通过检测发射波长510nm的荧光强度值对BRCA1浓度作标准曲线,根据标准曲线求得待测样品中BRCA1的含量;通过检测发射光波长550nm的荧光强度值对CEA浓度作标准曲线,根据标准曲线求得待测样品中CEA的含量;通过检测发射光波长610nm的荧光强度值对AFP浓度作标准曲线,根据标准曲线求得待测样品中AFP的含量。该方法检测BRCA1的灵敏度为0.12pM;检测CEA的灵敏度为0.27ng/ml;检测AFP的灵敏度为0.61ng/ml。

实施例四

选用发出四种不同荧光波长的量子点标记抗体，检测沙门氏菌、志贺氏菌、出血性大肠杆菌 0157:H7、金黄色葡萄球菌四种细菌。选用磁性纳米颗粒分别标记四种细菌抗原的单克隆抗体，建立量子点标记的四种细菌荧光免疫测量方法。

1、量子点标记抗体的探针制备：购买或制备不同体积大小的 ZnS 包裹的 CdSe 量子点，量子点表面进行羧基修饰。各取不同粒径的 1 毫克羧基修饰的量子点，在连接剂碳二亚胺的作用下分别与 2 毫克抗沙门氏菌、志贺氏菌、出血性大肠杆菌 0157:H7、金黄色葡萄球菌的单克隆抗体连接，制备成磁性粒子标记的抗沙门氏菌、志贺氏菌、出血性大肠杆菌 0157:H7、金黄色葡萄球菌的纳米探针。

2、磁性粒子标记抗体的纳米探针制备：首先用硫酸亚铁和三氯化铁在碱性条件下制备纳米四氧化三铁 (Fe_3O_4) 粒子，再采用有机分子处理纳米 Fe_3O_4 粒子使其表面带有功能基团（羧基、氨基、醛基、巯基等）。这里选用表面带有羧基的磁粒子（粒径为 50 纳米左右），各取 1 毫克羧基修饰的磁粒子，在连接剂碳二亚胺的作用下分别与 2 毫克沙门氏菌、志贺氏菌、出血性大肠杆菌 0157:H7、金黄色葡萄球菌单克隆抗体连接，制得磁粒子标记的抗沙门氏菌、志贺氏菌、出血性大肠杆菌 0157:H7、金黄色葡萄球菌单克隆抗体探针。

3、建立测量方法：在试管中各加入 100 μL 沙门氏菌、志贺氏菌、出血性大肠杆菌 0157:H7、金黄色葡萄球菌抗原的标准品（浓度梯度为 0, 15, 30, 100, 200, 400ng/mL）或待测样品；再加入各 100 μL 磁粒子标记抗沙门氏菌、志贺氏菌、出血性大肠杆菌 0157:H7、金黄色葡萄球菌抗体探针，以及各 200 μL 量子点标记的抗沙门氏菌、志贺氏菌、出血性大肠杆菌 0157:H7、金黄色葡萄球菌抗体探针，室温反应 4 小时，形成磁粒子与量子点组装的抗原抗体复合物即结合物，在外加磁场下分离结合物，上清液是未反应的量子点标记物即游离物，用荧光分光光度计检测上清液中游离物的荧光强度（激发波长为 360nm 的普通紫外光），通过检测发射光波长 550nm 的荧光强度值对沙门氏菌浓度作标准曲线，根据标准曲线求得待测样品中沙门氏菌的含量；通过检测发射光波长 610nm 的荧光强度值对志贺氏菌浓度作标准曲线，根据标准曲线求得待测样品中志贺氏菌的含量；通过检测发射光波长 580nm 的荧光强度值对出血性大肠杆菌 0157:H7 浓度作标准曲

线, 根据标准曲线求得待测样品中出血性大肠杆菌 O157:H7 的含量; 通过检测发射光波长 590nm 的荧光强度值对金黄色葡萄球菌浓度作标准曲线, 根据标准曲线求得待测样品中金黄色葡萄球菌的含量。

本实施例检测沙门氏菌灵敏度为 0.59ng/ml, 平均回收率 101.2%, 批内误差小于 10%, 批间误差小于 10%; 检测志贺氏菌的灵敏度为 0.67ng/ml, 平均回收率 99.4%, 批内误差小于 10%, 批间误差小于 10%; 检测出血性大肠杆菌 O157:H7 的灵敏度为 0.67ng/ml, 平均回收率 99.4%, 批内误差小于 10%, 批间误差小于 10%; 检测金黄色葡萄球菌的灵敏度为 0.33ng/ml, 平均回收率 99.4%, 批内误差小于 10%, 批间误差小于 10%。

专利名称(译)	量子点标记荧光免疫多种抗原同步检测方法		
公开(公告)号	CN101441212A	公开(公告)日	2009-05-27
申请号	CN200810204008.4	申请日	2008-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	崔大祥 潘碧峰 高峰 贺蓉		
发明人	崔大祥 潘碧峰 高峰 贺蓉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/64		
代理人(译)	王锡麟 王桂忠		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测技术领域的量子点标记荧光免疫多种抗原同步检测方法，利用量子点多波长激发、高强度荧光发射、发射峰窄、峰形对称、发光稳定性好的荧光特性，将目标物即被测物抗原的抗体连接在量子点及磁性纳米粒子等纳米粒子上，加入被测样品，再加入过量量子点标记的抗体，通过免疫反应，样品中的目标物与固定在量子点与磁性纳米粒子等纳米粒子上的抗体结合，使量子点与磁性纳米粒子等纳米粒子组装在一起形成抗原抗体的复合物即结合物，分离结合物与未反应的量子点标记物即游离物，检测游离物的荧光信号强度，对被测物进行定量检测。本发明检测灵敏度高，定量范围广，可实现多种抗原的同步检测，方法简单，成本低。