(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 105044339 A
(43)申请公布日 2015.11.11

(21)申请号 201510359569.1

(22)申请日 2015.06.25

(71)申请人 天津大学

地址 300072 天津市南开区卫津路92号天津大学

(72)发明人 常津　武玉东　宫晓群　张健
姚颖异

(74)专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代理事务所 12201

代理人 王丽

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)
G01N 33/558(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)

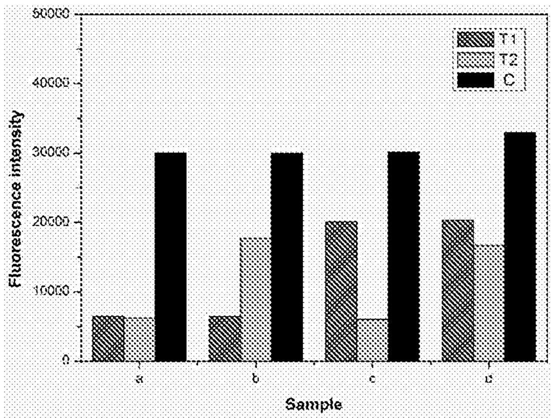
权利要求书1页　说明书7页　附图4页

(54)发明名称

一种新型的乳腺癌量子点免疫层析试纸条的制备方法

(57)摘要

本发明涉及了一种新型的乳腺癌量子点免疫层析试纸条的制备方法。两种量子点荧光探针和其相对应的肿瘤标志物抗原Ag以及包埋在试纸条的另一种肿瘤标志物单抗Ab_2，形成一种类似夹心的结构$QDs-Ab_1-Ag-Ab_2$，通过这种方法量子点试纸条可以同时检测两种及两种以上的肿瘤标志物，建立了一种新型的乳腺癌量子点免疫层析试纸条的制备方法。本发明的特点在于：可同时检测两种肿瘤标志物，大大简化了检测步骤，降低了检测成本，并且提高了肿瘤检测的准确性；选用CA15-3这种乳腺癌最重要的特异性标志物和CEA这种能反应乳腺癌存在的广谱标志物，对乳腺癌的疗效判断、病情发展、监测和预后估计都有重要意义。



CN 105044339 A

1.一种新型的乳腺癌量子点免疫层析试纸条的制备方法，其特征在于步骤如下：

1）将量子点 QDs_{625nm}和 QDs_{560nm}、EDC（1-乙基-（3-二甲基氨基丙基）碳酰二亚胺盐酸盐）加入反应器，反应体系为PBS缓冲液，在旋转混合架上活化量子点的羧基，离心得到免疫量子点；

2）将糖类抗原 15-3 标记抗体（$CA15-3Ab_1$）和免疫量子点 QDs_{625nm}混合，反应体系为PBS 缓冲液，在旋转混合架上偶联抗体 2 ～ 3h，离心得到量子点-糖类抗原 15-3 标记抗体（$QDs-CA15-3Ab_1$）的荧光探针，加入牛血清白蛋白 BSA。

3）将癌胚抗原标记抗体（$CEAAb_1$）和免疫量子点 QDs_{560nm}混合，反应体系为PBS 缓冲液，在旋转混合架上偶联抗体 2 ～ 3h，离心得到量子点-癌胚抗原 CEA 标记抗体（$QDs-CEAAb_1$）的荧光探针，加入牛血清白蛋白 BSA。

4）试纸条制备：用处理液处理样品垫和结合垫并 37℃烘干，然后用上述荧光探针再次处理结合垫并 37℃烘干，将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起，得到乳腺癌量子点免疫层析试纸条。

2.根据权利要求 1 中所述的制备方法，其特征在于量子点：EDC 质量分数配比为1:4000 ～ 10000。

3.根据权利要求 1 中所述的制备方法，其特征在于量子点和标记抗体质量分数比＝1:20 ～ 50。

4.根据权利要求 1 中所述的制备方法，其特征在于选用 PBS 缓冲液用以保持癌胚抗原抗体和糖类抗原 15-3 抗体的活性。

5.根据权利要求 1 中所述的制备方法，其特征在于选用牛血清白蛋白封闭荧光探针上未反应的羧基。

6.根据权利要求 1 中所述的制备方法，其特征在于同时选用不同发射波长的量子点 QDs_{625nm}和 QDs_{560nm}检测不同的肿瘤标志物 CA15-3 和 CEA。

7.根据权利要求 1 中所述的制备方法，其特征在于根据试纸条夹心结构捕获的量子点荧光强度和抗原浓度之间的关系，同时实现对两种肿瘤标志物的定性定量检测。

8.根据权利要求 1 中所述的制备方法，其特征在于 CEA 和 CA15-3 标准抗原浓度为 0 ～1000ng/mL。

一种新型的乳腺癌量子点免疫层析试纸条的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米材料肿瘤诊断技术领域，特别涉及一种新型的乳腺癌量子点免疫层析试纸条的制备方法。

背景技术

[0002] 血清肿瘤标志物的检测已经越来越引起人们的关注，这是因为这种方法具有很多优点，如简便无创，可以重复检测，检测结果直观且可以定量，费用相对较低等等。最重要的一点是对于血清肿瘤标志物可以动态监测，从而可以对恶性肿瘤的诊断、病情发展与疗效等进行判断，在临床上具有很高的应用价值。

[0003] 这些物质在正常人的体内不存在，或者在正常人体内出现的水平显著低于肿瘤患者体内的水平。一般来说，一种理想的肿瘤标志物需要满足以下条件：特异性强，灵敏度高，能够对肿瘤进行定位，与肿瘤的大小或分期相关，能够对肿瘤的疗效和预后进行判断，具有相当高的预测价值等。但是，目前所应用的肿瘤标志物并不能同时满足上述所有要求，因此需要人们合理使用，并且正确评价其对临床上进行肿瘤检测的意义与价值。由于目前临床上常用的肿瘤标志物没有足够高的灵敏度，且特异性不够强，因此在对恶性肿瘤进行诊断时，不能排除假阴性的结果，所以肿瘤标志物并不能够确诊，即不能作为肿瘤诊断的主要依据，而只是作为恶性肿瘤检测时的一种辅助手段，需要结合其他检测方法进行确诊。肿瘤标志物对正常人群普查时必须要考虑到该肿瘤的发病率以及检测方法的灵敏度、特异性以及对检测结果的重复性问题。除此之外，还应该考虑到实际条件的制约，如普查的费用是否合理，能否被大多数人接受，或者说该肿瘤的早期治疗比晚期治疗更经济有效。由于绝大多数肿瘤标志物并不具有器官特异性，只有前列腺特异性抗原 PSA、甲胎蛋白 AFP 和甲状腺球蛋白等极少数的肿瘤标志物有一定的器官定位作用，但这也不是肿瘤特异性，因此肿瘤标志物阳性不能对肿瘤进行绝对定位。肿瘤标志物的浓度与肿瘤的大小相关，且大多与肿瘤的分期存在关联，因此对判断肿瘤临床分期具有一定的意义。但是每个个体来说，各期肿瘤的肿瘤标志物的浓度范围很大，并且彼此之间会互相发生重叠，因此肿瘤标志物的个体测得值并不能直接判断出肿瘤大小，也不能用来确定肿瘤分期，只具有一定的指示作用。肿瘤标志物对肿瘤的治疗疗效和复发监测具有一定的临床价值。临床上，通过检测肿瘤患者治疗前后肿瘤标志物的浓度变化可以判断对肿瘤的治疗是否有效。如果治疗后患者的肿瘤标志物的浓度下降到正常值 范围内，则表明对肿瘤的治疗有效；如果治疗后患者的肿瘤标志物的浓度虽然有所下降，但仍然高于正常值范围，则表明肿瘤还有残留，或者肿瘤已经发生转移；如果治疗后患者的肿瘤标志物的浓度下降到正常值范围内，但是经过一段时间，肿瘤标志物的浓度再次上升并高于正常值，这表明肿瘤复发或者肿瘤转移。根据上述几种判断标准，可以判断肿瘤预后，为进一步治疗提供参考依据。

[0004] 基于上述几种考虑，目前医务工作者们大多采用几种肿瘤标志物联合检测的原则，这是因为患有一种肿瘤时可能有一种或几种肿瘤标志物异常，并且同一种肿瘤标志物异常可以出现在不同的肿瘤中。但是联合检测的指标必须经过科学分析以及严格筛选，综

合考虑各种肿瘤标志物的灵敏度和特异性等因素作出合理选择。目前临床上常用的肿瘤标志物有 AFP、CEA、PSA、HCG、NSE、CA199、CA12-5 以及 CA15-3 等。CA15-3 是乳腺癌的最重要的特异性标志物，30％ -50％的乳腺癌患者的 CA15-3 明显升高，其含量的变化与治疗效果密切相关，是乳腺癌患者诊断和监测术后复发、观察疗效的最佳指标，CA15-3 动态测定有助于 II 期和 III 期乳腺癌病人治疗后复发的早期发现。CEA 是一个广谱性肿瘤标志物，它能向人们反映出多种肿瘤的存在，其特异性不强，灵敏度不高，对肿瘤早期诊断作用不明显，但对大肠癌、乳腺癌和肺癌的疗效判断、病情发展、监测和预后估计是一个较好的肿瘤标志物。

[0005] 对生物体内的肿瘤标志物实现高灵敏度的检测是生命科学领域研究的一项重要课题，发展一种新的灵敏度高的检测方法也成为研究者们努力的目标。在众多的检测方法中，利用荧光分析检测受到了人们的广泛关注，而荧光分子检测中的检测限主要取决于所选用的荧光标记物的发光强度。目前，量子点因具有优异的光学性质已经被广泛应用于示踪、成像以及标记等方面。而免疫层析试纸条检测则因为它的简单迅速、价格低廉、可以随时随地等优点在检测领域处于特殊重要的地位。因此我们拟在已有量子点试纸条检测肿瘤标志物的基础上，同时检测两种或两种以上的肿瘤标志物，实现量子点试纸条检测肿瘤标志物的多元检测。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种新型的乳腺癌量子点免疫层析试纸条的制备方法，通过不同发射波长量子点进行编码，根据量子点的荧光性质和肿瘤标志物浓度之间的关系，在试纸条上同时检测两种或两种以上的肿瘤标志物，实现量子点试纸条检测肿瘤标志物的多元定量检测。选定 CA15-3 和 CEA 这两种肿瘤标志物，建立一种乳腺癌量子点试纸条检测的新方法，对乳腺癌的疗效判断、病情发展、监测和预后估计都有重要意义。

[0007] 本发明的技术方案如下：

[0008] 1) 将量子点 QDs_{625nm}和 QDs_{560nm}、EDC(1- 乙基 -(3- 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐) 加入反应器，反应体系为 PBS 缓冲液，在旋转混合架上活化量子点的羧基，离心得到免疫量子点；

[0009] 2) 将糖类抗原 15-3 标记抗体 ($CA15\text{-}3Ab_1$) 和免疫量子点 QDs_{625nm}混合，反应体系为 PBS 缓冲液，在旋转混合架上偶联抗体 2 ～ 3h，离心得到量子点 - 糖类抗原 15-3 标记抗体 ($QDs\text{-}CA15\text{-}3Ab_1$) 的荧光探针，加入牛血清白蛋白 BSA。

[0010] 3) 将癌胚抗原标记抗体 ($CEAAb_1$) 和免疫量子点 QDs_{560nm}混合，反应体系为 PBS 缓冲液，在旋转混合架上偶联抗体 2 ～ 3h，离心得到量子点 - 癌胚抗原 CEA 标记抗体 ($QDs\text{-}CEAAb_1$) 的荧光探针，加入牛血清白蛋白 BSA。

[0011] 4) 试纸条制备：用处理液处理样品垫和结合垫并 37℃烘干，然后用上述荧光探针再次处理结合垫并 37℃烘干，将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起，得到乳腺癌量子点免疫层析试纸条。

[0012] 量子点：EDC 质量分数配比为 1:4000 ～ 10000。

[0013] 量子点和标记抗体质量分数比＝ 1:20 ～ 50。

[0014] 所述 PBS 缓冲液用以保持癌胚抗原抗体和糖类抗原 15-3 抗体的活性。

[0015] 所述牛血清白蛋白(BSA)用以封闭荧光探针上未反应的羧基。

[0016] 所述处理液是蔗糖、牛血清白蛋白 BSA、聚乙二醇 PEG、聚氧乙烯山梨醇单月桂酸酯 Tween-20 的混合溶液。

[0017] 所述制备方法，其特征在于同时选用不同发射波长的量子点 QDs_{625nm}和 QDs_{560nm}检测不同的肿瘤标志物 CA15-3 和 CEA，如说明书附图 5 所示。

[0018] 根据试纸条夹心结构捕获的量子点荧光强度和抗原浓度之间的关系，实现对两种肿瘤标志物的定性定量检测，如说明书附图 3、4、5 所示。不同 CEA 和 CA15-3 标准抗原浓度优选 0 ～ 1000ng/mL(其中 0ng/mL 对应胎牛血清 FBS，作为阴性对照)。

[0019] CA15-3 包被抗体 Ab_2均匀喷在硝酸纤维素膜上作为检测线 T_1，将 CEA 包被抗体 Ab_2均匀喷在硝酸纤维素膜上作为检测线 T_2，而将羊抗鼠抗体 Ab_3硝酸纤维素膜上作为质控线 C。两种量子点荧光探针和其相对应的肿瘤标志物抗原 Ag 以及包埋在试纸条的另一种肿瘤标志物单抗 Ab2，形成一种类似夹心的结构 QDs-Ab_1-Ag-Ab_2，或者形成 QDs-Ab_1-Ab_3结构。如果检测样品仅有 CA15-3 抗原存在，则 T_1线和 C 线亮而 T_2线不亮；如果检测样品仅有 CEA 存在，则 T_2线和 C 线亮而 T_1线不亮；如果检测样品同时含有 CA15-3 和 CEA，则 T_1线、T_2线和 C 线均亮；如果检测样品既没有 CA15-3 也没有 CEA，则 T_1线和 T_2线均不亮而 C 线亮。

[0020] 本发明涉及了一种新型的乳腺癌量子点免疫层析试纸条的制备方法。EDC(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐)活化羧基下采用发射波长在 625nm 左右的 CdSe/ZnS 红色量子点和发射波长在 560nm 左右的 CdSe/ZnS 绿色量子点分别偶联 CA15-3(carbohydrate antigen15-3)和 CEA(carcino-embryonic antigen)肿瘤标志物的单抗 Ab_1，形成两种量子点荧光探针 QDs_{625nm}-CA15-3Ab_1和 QDs_{560nm}-CEAAb_1。两种量子点荧光探针和其相对应的肿瘤标志物抗原 Ag 以及包埋在试纸条的另一种肿瘤标志物单抗 Ab_2，形成一种类似夹心的结构 QDs-Ab_1-Ag-Ab_2，通过这种方法量子点试纸条可以同时检测两种及两种以上的肿瘤标志物，建立了一种新型的乳腺癌量子点免疫层析试纸条的制备方法。与现有产品和技术相比，本发明的特点在于：可同时检测两种肿瘤标志物，大大简化了检测步骤，降低了检测成本，并且提高了肿瘤检测的准确性；选用 CA15-3 这种乳腺癌最重要的特异性标志物和 CEA 这种能反应乳腺癌存在的广谱标志物，对乳腺癌的疗效判断、病情发展、监测和预后估计都有重要意义。

附图说明

[0021] 图 1 本发明制备的发射波长为 560nm 量子点的透射电镜照片。

[0022] 图 2 本发明制备的发射波长为 620nm 量子点的透射电镜照片。

[0023] 图 3 本发明制备的乳腺癌量子点免疫层析试纸条的 CA15-3 标准曲线。

[0024] 图 4 本发明制备的乳腺癌量子点免疫层析试纸条的 CEA 标准曲线。

[0025] 图 5 本发明制备的乳腺癌量子点免疫层析试纸条的紫外照片。

[0026] 图 6 本发明制备的乳腺癌量子点免疫层析试纸条的不同抗原浓度荧光值。

具体实施方式

[0027] 下面的实施案例中将对本发明作进一步的阐述，但本发明不限于此。

[0028] 实施案例 1：

[0029] 1) 将量子点 QDs_{625nm}和 QDs_{560nm}、EDC(1- 乙基 -(3- 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐) 加入反应器,量子点和 EDC 质量分数配比为 1:4000,反应体系为 PBS 缓冲液,在旋转混合架上活化量子点的羧基,离心得到免疫量子点 ;

[0030] 2) 将糖类抗原 15-3 标记抗体 ($CA15-3Ab_1$) 和免疫量子点 QDs_{625nm}混合 (QDs_{625nm}和 $CA15-3Ab_1$质量分数配比为 1:20),反应体系为 PBS 缓冲液,在旋转混合架上偶联抗体 2h,离心得到量子点 - 糖类抗原 15-3 标记抗体 ($QDs-CA15-3Ab_1$) 的荧光探针,加入牛血清白蛋白 BSA。

[0031] 3) 将癌胚抗原标记抗体 ($CEAAb_1$) 和免疫量子点 QDs_{560nm}混合 (QDs_{560nm}和 $CEAAb_1$质量分数配比为 1:20),反应体系为 PBS 缓冲液,在旋转混合架上偶联抗体 2h,离心得到量子点 - 癌胚抗原 CEA 标记抗体 ($QDs-CEAAb_1$) 的荧光探针,加入牛血清白蛋白 BSA。

[0032] 4) 试纸条制备 :用处理液处理样品垫和结合垫并 37℃烘干,然后用上述荧光探针再次处理结合垫并 37℃烘干,将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起,得到乳腺癌量子点免疫层析试纸条。在样品垫上滴加 1000ng/mL 的标准 CEA 抗原和 CA15-3 抗原。

[0033] 如图 3 所示,试纸条 C 线、T_1线以及 T_2线均亮 ;如图 5 CEA+CA153 所示,量子点免疫荧光检测仪检测得出,试纸条 T_1线荧光强度为 20333,T2 线荧光强度为 16692,C 线荧光强度 32924,T1/C 值为 0.617,T2/C 值为 0.507。

[0034] 实施案例 2 :

[0035] 1) 将量子点 QDs_{625nm}和 QDs_{560nm}、EDC(1- 乙基 -(3- 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐) 加入反应器,量子点和 EDC 质量分数配比为 1:4000,反应体系为 PBS 缓冲液,在旋转混合架上活化量子点的羧基,离心得到免疫量子点 ;

[0036] 2) 将糖类抗原 15-3 标记抗体 ($CA15-3Ab_1$) 和免疫量子点 QDs_{625nm}混合 (QDs_{625nm}和 $CA15-3Ab_1$质量分数配比为 1:30),反应体系为 PBS 缓冲液,在旋转混合架上偶联抗体 2h,离心得到量子点 - 糖类抗原 15-3 标记抗体 ($QDs-CA15-3Ab_1$) 的荧光探针,加入牛血清白蛋白 BSA。

[0037] 3) 将癌胚抗原标记抗体 ($CEAAb_1$) 和免疫量子点 QDs_{560nm}混合 (QDs_{560nm}和 $CEAAb_1$质量分数配比为 1:30),反应体系为 PBS 缓冲液,在旋转混合架上偶联抗体 2h,离心得到量子点 - 癌胚抗原 CEA 标记抗体 ($QDs-CEAAb_1$) 的荧光探针,加入牛血清白蛋白 BSA。

[0038] 4) 试纸条制备 :用处理液处理样品垫和结合垫并 37℃烘干,然后用上述荧光探针再次处理结合垫并 37℃烘干,将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起,得到乳腺癌量子点免疫层析试纸条。在样品垫上滴加 500ng/mL 的标准 CEA 抗原和 CA15-3 抗原。

[0039] 实验结果显示试纸条 C 线、T_1线以及 T_2线均亮,量子点免疫荧光检测仪检测得出,试纸条 T_1线荧光强度为 14831,T2 线荧光强度为 13119,C 线荧光强度 32020,T1/C 值为 0.449,T2/C 值为 0.410。

[0040] 实施案例 3 :

[0041] 1) 将量子点 QDs_{625nm}和 QDs_{560nm}、EDC(1- 乙基 -(3- 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐) 加入反应器,量子点和 EDC 质量分数配比为 1:4000,反应体系为 PBS 缓冲液,在旋转混合架上活化量子点的羧基,离心得到免疫量子点 ;

[0042] 2) 将糖类抗原 15-3 标记抗体 ($CA15-3Ab_1$) 和免疫量子点 QDs_{625nm}混合 (QDs_{625nm}和 $CA15-3Ab_1$质量分数配比为 1:50)，反应体系为 PBS 缓冲液，在旋转混合架上偶联抗体 2h，离心得到量子点 - 糖类抗原 15-3 标记抗体 ($QDs-CA15-3Ab_1$) 的荧光探针，加入牛血清白蛋白 BSA。

[0043] 3) 将癌胚抗原标记抗体 ($CEAAb_1$) 和免疫量子点 QDs_{560nm}混合 (QDs_{560nm}和 $CEAAb_1$质量分数配比为 1:50)，反应体系为 PBS 缓冲液，在旋转混合架上偶联抗体 2h，离心得到量子点 - 癌胚抗原 CEA 标记抗体 ($QDs-CEAAb_1$) 的荧光探针，加入牛血清白蛋白 BSA。

[0044] 4) 试纸条制备：用处理液处理样品垫和结合垫并 37℃烘干，然后用上述荧光探针再次处理结合垫并 37℃烘干，将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起，得到乳腺癌量子点免疫层析试纸条。在样品垫上滴加 250ng/mL 的标准 CEA 抗原和 CA15-3 抗原。

[0045] 实验结果显示试纸条 C 线、T_1线以及 T_2线均亮，量子点免疫荧光检测仪检测得出，试纸条 T_1线荧光强度为 13420，T2 线荧光强度为 9651，C 线荧光强度 30602，T1/C 值为 0.438，T2/C 值为 0.315。

[0046] 实施案例 4：

[0047] 1) 将量子点 QDs_{625nm}和 QDs_{560nm}、EDC(1- 乙基 -(3- 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐) 加入反应器，量子点和 EDC 质量分数配比为 1:7000，反应体系为 PBS 缓冲液，在旋转混合架上活化量子点的羧基，离心得到免疫量子点；

[0048] 2) 将糖类抗原 15-3 标记抗体 ($CA15-3Ab_1$) 和免疫量子点 QDs_{625nm}混合 (QDs_{625nm}和 $CA15-3Ab_1$质量分数配比为 1:30)，反应体系为 PBS 缓冲液，在旋转混合架上偶联抗体 2.5h，离心得到量子点 - 糖类抗原 15-3 标记抗体 ($QDs-CA15-3Ab_1$) 的荧光探针，加入牛血清白蛋白 BSA。

[0049] 3) 将癌胚抗原标记抗体 ($CEAAb_1$) 和免疫量子点 QDs_{560nm}混合 (QDs_{560nm}和 $CEAAb_1$质量分数配比为 1:30)，反应体系为 PBS 缓冲液，在旋转混合架上偶联抗体 2.5h，离心得到量子点 - 癌胚抗原 CEA 标记抗体 ($QDs-CEAAb_1$) 的荧光探针，加入牛血清白蛋白 BSA。

[0050] 4) 试纸条制备：用处理液处理样品垫和结合垫并 37℃烘干，然后用上述荧光探针再次处理结合垫并 37℃烘干，将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起，得到乳腺癌量子点免疫层析试纸条。在样品垫上滴加 125ng/mL 的标准 CEA 抗原和 CA15-3 抗原。

[0051] 实验结果显示试纸条 C 线、T_1线以及 T_2线均亮，量子点免疫荧光检测仪检测得出，试纸条 T_1线荧光强度为 12142，T2 线荧光强度为 8872，C 线荧光强度 35079，T1/C 值为 0.346，T2/C 值为 0.253。

[0052] 实施案例 5：

[0053] 1) 将量子点 QDs_{625nm}和 QDs_{560nm}、EDC(1- 乙基 -(3- 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐) 加入反应器，量子点和 EDC 质量分数配比为 1:10000，反应体系为 PBS 缓冲液，在旋转混合架上活化量子点的羧基，离心得到免疫量子点；

[0054] 2) 将糖类抗原 15-3 标记抗体 ($CA15-3Ab_1$) 和免疫量子点 QDs_{625nm}混合 (QDs_{625nm}和 $CA15-3Ab_1$质量分数配比为 1:30)，反应体系为 PBS 缓冲液，在旋转混合架上偶联抗体 2.5h，离心得到量子点 - 糖类抗原 15-3 标记抗体 ($QDs-CA15-3Ab_1$) 的荧光探针，加入牛血清白蛋

白 BSA。

[0055] 3) 将癌胚抗原标记抗体 ($CEAAb_1$) 和免疫量子点 QDs_{560nm}混合 (QDs_{560nm}和 $CEAAb_1$质量分数配比为 1:30)，反应体系为 PBS 缓冲液，在旋转混合架上偶联抗体 2.5h，离心得到量子点 - 癌胚抗原 CEA 标记抗体 ($QDs-CEAAb_1$) 的荧光探针，加入牛血清白蛋白 BSA。

[0056] 4) 试纸条制备 :用处理液处理样品垫和结合垫并 37℃烘干，然后用上述荧光探针再次处理结合垫并 37℃烘干，将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起，得到乳腺癌量子点免疫层析试纸条。在样品垫上滴加 62.5ng/mL 的标准 CEA 抗原和 CA15-3 抗原。

[0057] 实验结果显示试纸条 C 线、T_1线以及 T_2线均亮，量子点免疫荧光检测仪检测得出，试纸条 T_1线荧光强度为 10425，T2 线荧光强度为 8649，C 线荧光强度 34159，T1/C 值为 0.305，T2/C 值为 0.232。

[0058] 实施案例 6 :

[0059] 1) 将量子点 QDs_{625nm}和 QDs_{560nm}、EDC(1- 乙基 -(3- 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐) 加入反应器，量子点和 EDC 质量分数配比为 1:4000，反应体系为 PBS 缓冲液，在旋转混合架上活化量子点的羧基，离心得到免疫量子点 ;

[0060] 2) 将糖类抗原 15-3 标记抗体 ($CA15-3Ab_1$) 和免疫量子点 QDs_{625nm}混合 (QDs_{625nm}和 $CA15-3Ab_1$质量分数配比为 1:30)，反应体系为 PBS 缓冲液，在旋转混合架上偶联抗体 3h，离心得到量子点 - 糖类抗原 15-3 标记抗体 ($QDs-CA15-3Ab_1$) 的荧光探针，加入牛血清白蛋白 BSA。

[0061] 3) 将癌胚抗原标记抗体 ($CEAAb_1$) 和免疫量子点 QDs_{560nm}混合 (QDs_{560nm}和 $CEAAb_1$质量分数配比为 1:30)，反应体系为 PBS 缓冲液，在旋转混合架上偶联抗体 3h，离心得到量子点 - 癌胚抗原 CEA 标记抗体 ($QDs-CEAAb_1$) 的荧光探针，加入牛血清白蛋白 BSA。

[0062] 4) 试纸条制备 :用处理液处理样品垫和结合垫并 37℃烘干，然后用上述荧光探针再次 处理结合垫并 37℃烘干，将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起，得到乳腺癌量子点免疫层析试纸条。在样品垫上滴加 1000ng/mL 的标准 CEA 抗原和 0ng/mLCA15-3 抗原 (即胎牛血清)。

[0063] 如图 3 所示，试纸条 C 线、T_2线均亮而 T_1线不亮 ;如图 5 FBS+CEA 所示，量子点免疫荧光检测仪检测得出，试纸条 T_1线荧光强度为 6434，T2 线荧光强度为 17721，C 线荧光强度 29952，T1/C 值为 0.215，T2/C 值为 0.592。

[0064] 实施案例 7 :

[0065] 1) 将量子点 QDs_{625nm}和 QDs_{560nm}、EDC(1- 乙基 -(3- 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐) 加入反应器，量子点和 EDC 质量分数配比为 1:10000，反应体系为 PBS 缓冲液，在旋转混合架上活化量子点的羧基，离心得到免疫量子点 ;

[0066] 2) 将糖类抗原 15-3 标记抗体 ($CA15-3Ab_1$) 和免疫量子点 QDs_{625nm}混合 (QDs_{625nm}和 $CA15-3Ab_1$质量分数配比为 1:30)，反应体系为 PBS 缓冲液，在旋转混合架上偶联抗体 3h，离心得到量子点 - 糖类抗原 15-3 标记抗体 ($QDs-CA15-3Ab_1$) 的荧光探针，加入牛血清白蛋白 BSA。

[0067] 3) 将癌胚抗原标记抗体 ($CEAAb_1$) 和免疫量子点 QDs_{560nm}混合 (QDs_{560nm}和 $CEAAb_1$质量分数配比为 1:30)，反应体系为 PBS 缓冲液，在旋转混合架上偶联抗体 3h，离心得到量子

点－癌胚抗原CEA标记抗体（$QDs-CEAAb_1$）的荧光探针，加入牛血清白蛋白BSA。

[0068] 4）试纸条制备：用处理液处理样品垫和结合垫并37℃烘干，然后用上述荧光探针再次处理结合垫并37℃烘干，将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起，得到乳腺癌量子点免疫层析试纸条。在样品垫上滴加0ng/mL的标准CEA抗原（即胎牛血清）和1000ng/mLCA15-3抗原。

[0069] 如图3所示，试纸条C线、T_1线均亮而T_2线不亮；如图5FBS+CA153所示，量子点免疫荧光检测仪检测得出，试纸条T_1线荧光强度为20121，T2线荧光强度为6025，C线荧光强度30147，T1/C值为0.667，T2/C值为0.200。

[0070] 实施案例8：

[0071] 1）将量子点QDs_{625nm}和QDs_{560nm}、EDC（1-乙基-（3-二甲基氨基丙基）碳酰二亚胺盐酸盐）加入反应器，量子点和EDC质量分数配比为1:10000，反应体系为PBS缓冲液，在旋转混合架上活化量子点的羧基，离心得到免疫量子点；

[0072] 2）将糖类抗原15-3标记抗体（$CA15-3Ab_1$）和免疫量子点QDs_{625nm}混合（QDs_{625nm}和$CA15-3Ab_1$质量分数配比为1:50），反应体系为PBS缓冲液，在旋转混合架上偶联抗体3h，离心得到量子点－糖类抗原15-3标记抗体（$QDs-CA15-3Ab_1$）的荧光探针，加入牛血清白蛋白BSA。

[0073] 3）将癌胚抗原标记抗体（$CEAAb_1$）和免疫量子点QDs_{560nm}混合（QDs_{560nm}和$CEAAb_1$质量分数配比为1:50），反应体系为PBS缓冲液，在旋转混合架上偶联抗体3h，离心得到量子点－癌胚抗原CEA标记抗体（$QDs-CEAAb_1$）的荧光探针，加入牛血清白蛋白BSA。

[0074] 4）试纸条制备：用处理液处理样品垫和结合垫并37℃烘干，然后用上述荧光探针再次处理结合垫并37℃烘干，将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起，得到乳腺癌量子点免疫层析试纸条。在样品垫上滴加0ng/mL的标准CEA和CA15-3抗原（即胎牛血清）。

[0075] 如图3所示，试纸条C线亮而T_1线以及T_2线均不亮；如图5FBS+FBS所示，量子点免疫荧光检测仪检测得出，试纸条T_1线荧光强度为6459，T2线荧光强度为6222，C线荧光强度30021，T1/C值为0.215，T2/C值为0.207。

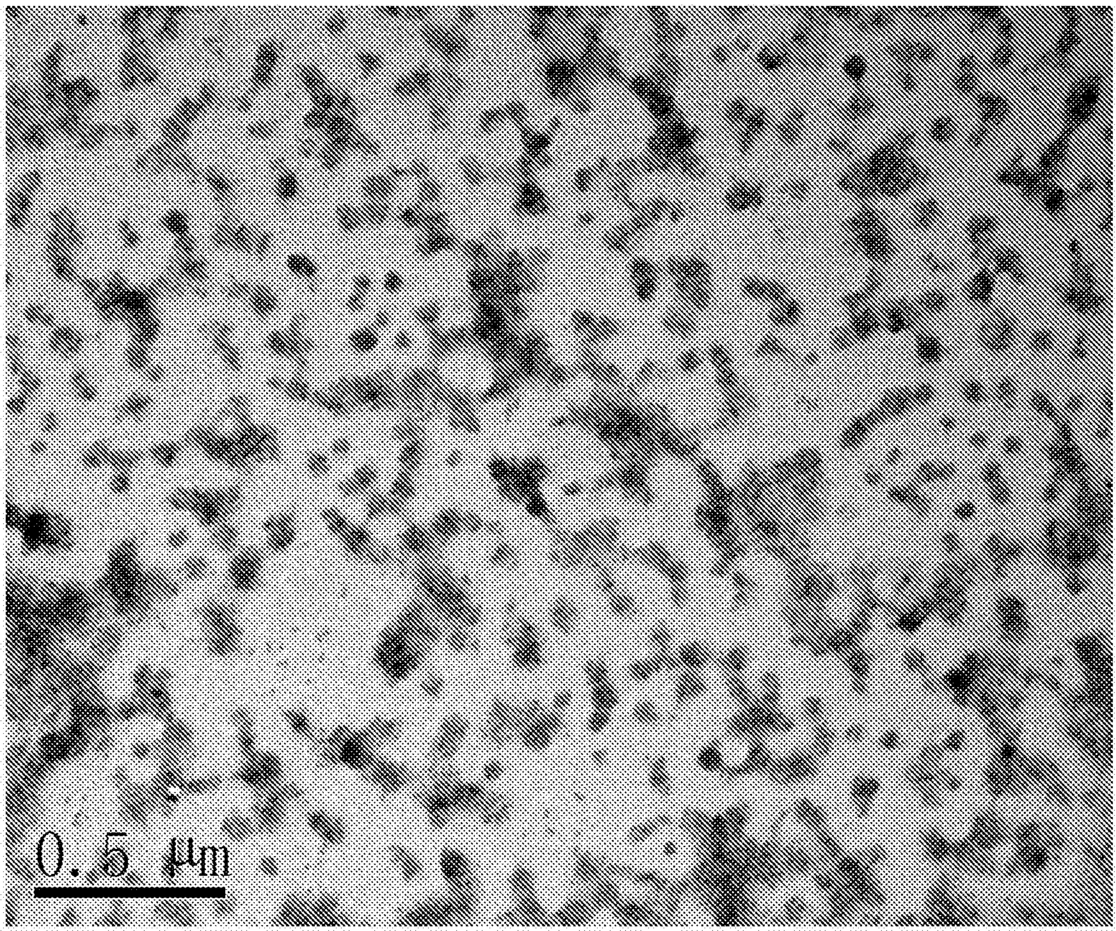


图 1

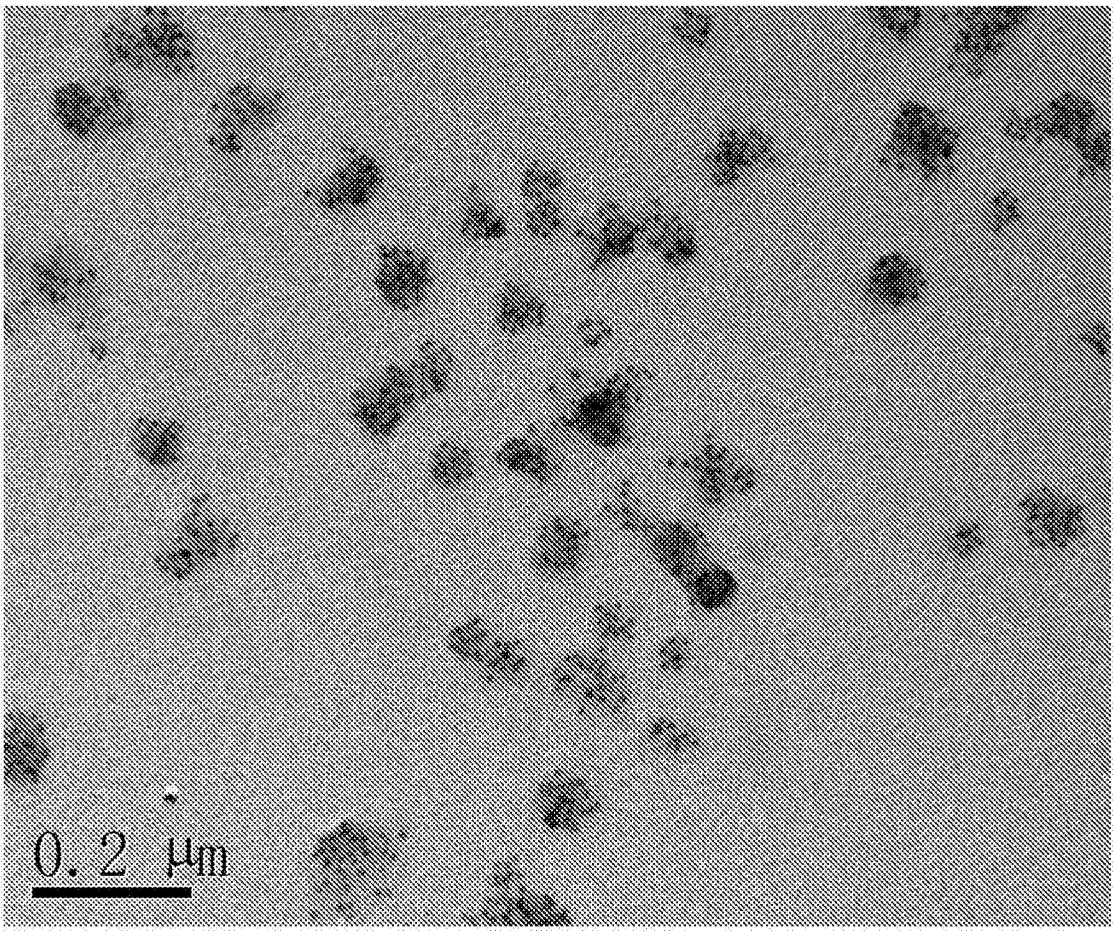


图 2

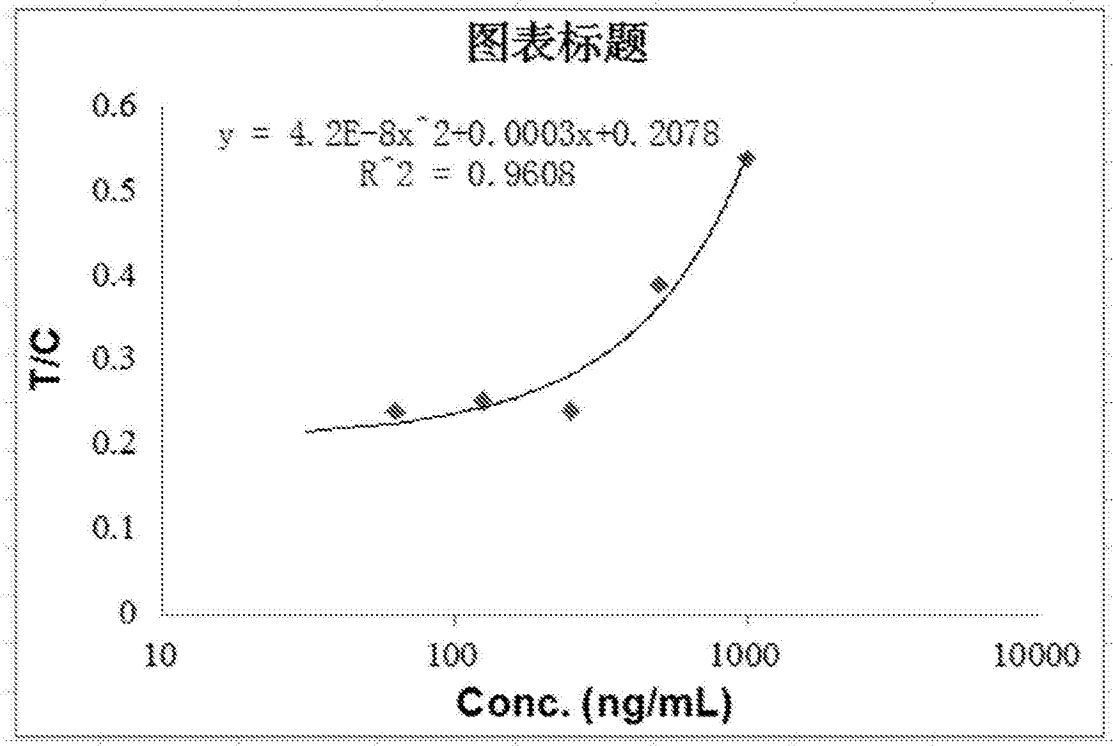

图表标题
y = 4.2E-8x^2+0.0003x+0.2078
R^2 = 0.9608
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
T/C
10
100
1000
10000
Conc. (ng/mL)

图 3

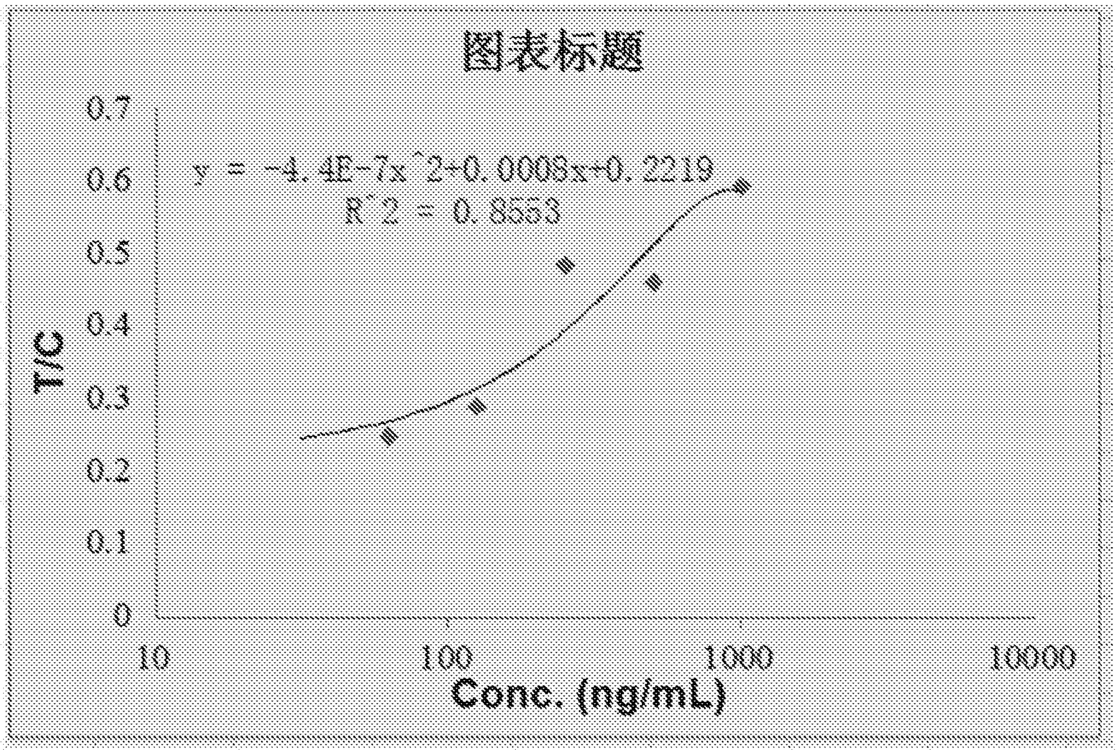

图表标题
y = -4.4E-7x^2+0.0008x+0.2219
R^2 = 0.8553
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
T/C
10
100
1000
10000
Conc. (ng/mL)

图 4

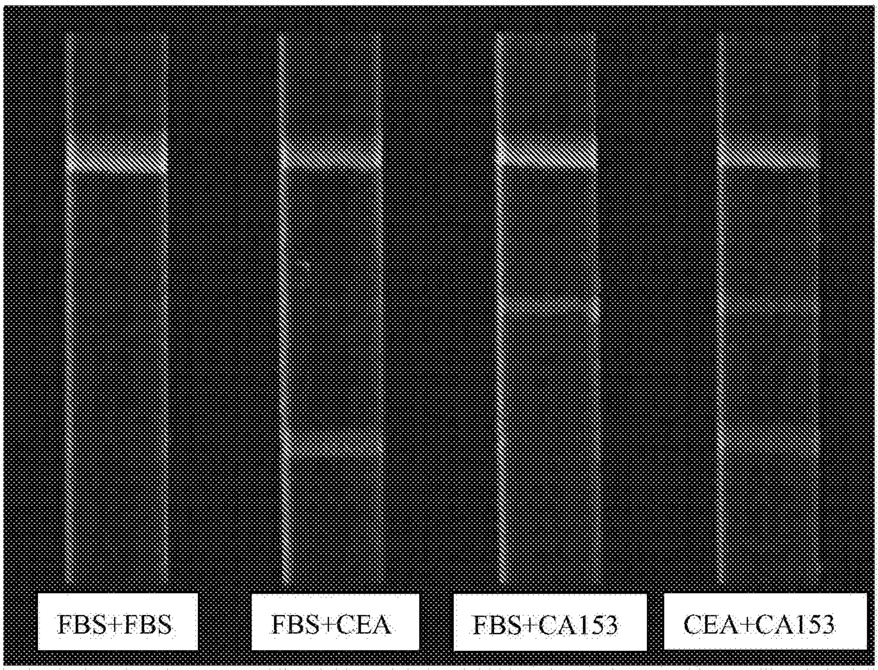

FBS+FBS
FBS+CEA
FBS+CA153
CEA+CA153

图 5

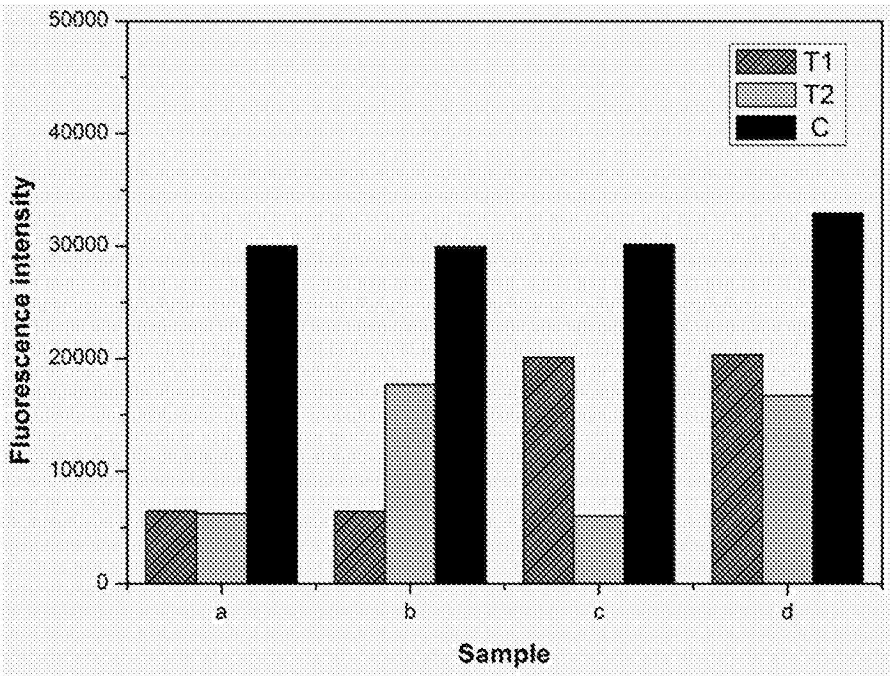

Fluorescence intensity
Sample
T1
T2
C
0
10000
20000
30000
40000
50000
a
b
c
d

图 6

专利名称(译)	一种新型的乳腺癌量子点免疫层析试纸条的制备方法		
公开(公告)号	CN105044339A	公开(公告)日	2015-11-11
申请号	CN201510359569.1	申请日	2015-06-25
[标]申请(专利权)人(译)	天津大学		
申请(专利权)人(译)	天津大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津大学		
[标]发明人	常津 武玉东 宫晓群 张健 姚颖异		
发明人	常津 武玉东 宫晓群 张健 姚颖异		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/57415 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/57473		
代理人(译)	王丽		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及了一种新型的乳腺癌量子点免疫层析试纸条的制备方法。两种量子点荧光探针和其相对应的肿瘤标志物抗原Ag以及包埋在试纸条的另一种肿瘤标志物单抗Ab2，形成一种类似夹心的结构QDs-Ab1-Ag-Ab2，通过这种方法量子点试纸条可以同时检测两种及两种以上的肿瘤标志物，建立了一种新型的乳腺癌量子点免疫层析试纸条的制备方法。本发明的特点在于：可同时检测两种肿瘤标志物，大大简化了检测步骤，降低了检测成本，并且提高了肿瘤检测的准确性；选用CA15-3这种乳腺癌最重要的特异性标志物和CEA这种能反应乳腺癌存在的广谱标志物，对乳腺癌的疗效判断、病情发展、监测和预后估计都有重要意义。