



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110208547 A

(43)申请公布日 2019.09.06

(21)申请号 201910569114.0

(22)申请日 2019.06.27

(71)申请人 北京柏海达科技有限公司

地址 100000 北京市朝阳区利泽中园106号
楼4层408A

(72)发明人 王瑛琦 李想 黄洋 鞠文东

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

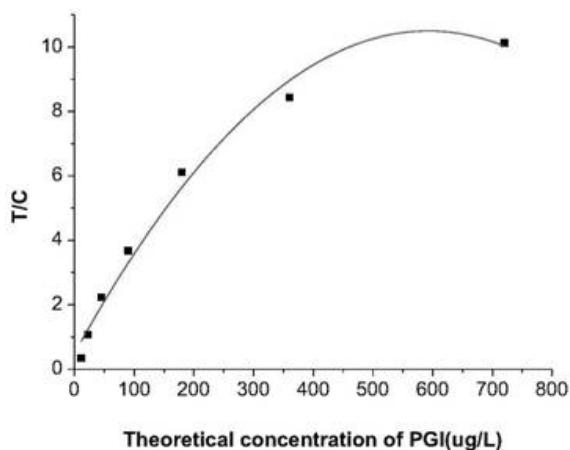
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒及其制备方法。所述试剂盒包括塑料板和固定在塑料板上的吸附层,所述吸附层从测试端开始依次为互相搭接的样品垫、玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜和吸水垫。所述玻璃纤维素膜上包被有碳量子点标记的胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II;所述硝酸纤维素膜上设置有检测线1、检测线2和控制线,所述检测线1上包被有胃蛋白酶原I二抗,所述检测线2上包被有胃蛋白酶原II二抗,所述控制线上包被有羊抗鼠IgG;所述碳量子点分别被乙二胺和N-羟基琥珀酰亚胺修饰。本发明的试剂盒可用于胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的联合检测,其具有高效、低毒地检测出血清中胃蛋白酶原的优点。



1. 一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒的制备方法, 所述试剂盒包括塑料板和固定在塑料板上的吸附层, 所述吸附层从测试端开始依次为互相搭接的样品垫、玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜和吸水垫, 其特征在于: 所述玻璃纤维素膜上包被有碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II; 所述硝酸纤维素膜上设置有检测线1、检测线2和控制线, 所述检测线1上包被有胃蛋白酶原I二抗, 所述检测线2上包被有胃蛋白酶原II二抗, 所述控制线上包被有羊抗鼠IgG;

具体制备方法包括以下步骤:

(1): 原材料的制备:

A: 制备玻璃纤维素膜: 将碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II混合包被在玻璃纤维素膜上, 干燥, 备用;

B: 制备硝酸纤维素膜: 取硝酸纤维素膜, 间隔划分出检测线1、检测线2、和控制线, 然后将胃蛋白酶原I二抗、胃蛋白酶原II二抗和羊抗鼠IgG分别包被在硝酸纤维素膜的检测线1、检测线2和控制线上, 之后将包被后的硝酸纤维素膜放入封闭液中封闭, 干燥, 备用;

(2): 组装: 在塑料板上放置吸附层, 所述吸附层的组装步骤为: 依次放置样品垫、步骤(1)制备的玻璃纤维素膜、步骤(1)制备的硝酸纤维素膜和吸水垫, 干燥, 即完成;

其中, 步骤A中首先包括首先制备碳量子点, 具体方法包括以下操作步骤:

a: 称取4-5 重量份的柠檬酸于30-50 重量份的超纯水中, 搅拌至柠檬酸完全溶解;

b: 称取5-6重量份的乙二胺, 加入到步骤a制备得到的溶液中, 搅拌均匀后加入35-65重量份的超纯水, 以300-400 rpm的转速搅拌20-30 min, 于4 °C储存备用;

c: 取步骤b制备得到的溶液于微波反应器中, 称取1-3重量份的芳香胺于微波反应器中, 在400-600 W的功率、150-250 °C的条件下反应4-10 min, 得到碳量子点产品; 当溶液温度下降至80 °C以下后, 得到含有碳量子点的透明褐黄色溶液;

d: 所得碳量子点溶液经旋蒸、透析后, 即得所需要的碳量子点。

2. 根据权利要求1所述的一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述步骤A中还包括制备碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II, 具体方法包括以下操作步骤:

e: 将1重量份的二氯乙烷和3重量份的N-羟基琥珀酰亚胺, 在室温下加入100重量份的超纯水, 搅拌均匀;

f: 将3重量份的胃蛋白酶原I和3重量份的胃蛋白酶原II加入到步骤e所得的溶液中, 室温反应30-40 min;

g: 向步骤f中制备得到的溶液里加入含巯基有机物, 搅拌混合;

h: 将步骤d中纯化得到的碳量子点溶液, 加入到步骤g制备得到的胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的混合溶液中, 室温反应4-5 h后得到碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II混合溶液;

i: 向步骤h中制备得到的碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II混合溶液中加入磷酸缓冲盐溶液后透析, 去除未被标记的胃蛋白酶原I、胃蛋白酶原II以及未参加反应的N-羟基琥珀酰亚胺。

3. 根据权利要求2所述的一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述步骤h中, 步骤g制备得到的胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的混合溶

液与步骤d中纯化得到的碳量子点溶液的质量比为1:1。

4. 根据权利要求1所述的一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤A中将碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II的混合包被在玻璃纤维素膜上的具体步骤为:将胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II的混合物均匀喷涂于玻璃纤维素膜上。

5. 根据权利要求1所述的一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤B中将胃蛋白酶原I二抗、胃蛋白酶原II二抗和羊抗鼠IgG分别喷涂在硝酸纤维素膜的检测线1、检测线2和控制线上的具体方法为:分别取浓度均为1 mg/ml的胃蛋白酶原I二抗、胃蛋白酶原II二抗和羊抗鼠IgG,以1 μ l/cm、10 cm/s的速度分别喷涂到硝酸纤维的检测线1、检测线2和控制线上。

6. 根据权利要求1所述的一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤c中所述的芳香胺选自4-氨基苯甲酸乙酯、对苯二胺、间苯二胺和邻甲苯胺中的一种。

7. 根据权利要求2所述的一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤g中所述的含巯基有机物选自巯基乙醇、巯基乙酸、聚乙二醇中的一种。

8. 一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒由权利要求书1~7任意一项所述的制备方法制备得到。

9. 根据权利要求8所述的一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒,其特征在于,所述硝酸纤维素膜上设置的检测线1与检测线2之间、检测线1与控制线之间的间隔为5-8 mm。

一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及碳量子点的免疫层析检测试剂盒领域,更具体地说,它涉及一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 胃蛋白酶原(Pepsinogen,胃蛋白酶原)由泌酸腺的主细胞合成,是分子质量为42KDa的单链多肽,在胃腔内经盐酸(HCL)或已有活性的胃蛋白酶(pepsin)作用变成胃蛋白酶,是胃液中胃蛋白酶(Pepsin)的无活性前体,将蛋白质分解成胨、肽及少量多肽。人类胃蛋白酶原依其电泳迁移率可以分为7个组,根据其生化性质和免疫原性将其分成2个亚群,1-5组分的免疫原性相同,称为胃蛋白酶原I(胃蛋白酶原I),主要由胃腺的主细胞和黏液颈细胞分泌;组分6-7被称为胃蛋白酶原II(胃蛋白酶原II)。由胃主细胞和黏液细胞分泌,大部分分泌到胃腔,通常情况下约有1%的胃蛋白酶原通过胃黏膜进入血液循环。

[0003] 血清的胃蛋白酶原水平是反映胃黏膜形态和功能的良好指标。当胃粘膜发生病变时,血清中胃蛋白酶原的含量也随之发生改变。血清和血浆中胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II比值的降低与胃体萎缩的严重程度呈正相关,中、重度萎缩性胃炎时,其比值为 <0.3 ,其胃癌的发病率显著增加,因此,联合测定胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II比值可起到早期胃癌风险提示的作用。

[0004] 目前对于胃蛋白酶原的主要检测的方法有酶联免疫吸附法、化学发光免疫测定、免疫比浊法和荧光免疫层析法。其中荧光免疫层析法与酶联免疫吸附法、化学发光免疫测定法和免疫比浊法相比,其检测灵敏度高、准确度高、操作简便、成本低的优势使其在胃蛋白酶原的检测方面具有更大的产业价值。

[0005] 而半导体量子点近年来由于其在电学以及光学方面表现出的优势而受到广泛关注,常常与免疫层析法相结合进行相关的免疫检测研究。

[0006] 目前研究较多的是金属类半导体量子点,其中,II-VI族的CdAs、ZnS,III-V族的GaAs、InP以及IV-VI族的PbS、PbSe,这三个系列的半导体量子点在生物医学领域,尤其是在活细胞、活体的动态示踪和成像、显色的应用中已经显示出较大的潜力。但同时,由于其重金属的毒性,限制了金属半导体量子点在生物医学领域,尤其是在活细胞、活体研究中的应用。

[0007] 而碳量子点(Carbon Quantum Dots,碳量子点),是由分散的类球状碳颗粒组成,碳量子点最早是在2004年由美国克莱蒙森大学的科学家制备得到的。作为一种新型的荧光碳纳米材料(粒径小于10nm),碳量子点表面上的许多羧基等亲水性官能团使之在水中具有优异的溶解性,和半导体量子点类似,碳量子点也有光致荧光性和电致荧光性:具有良好水溶性的碳量子点在光照下其自身会有荧光现象。而且与半导体量子点相比,它对活细胞无毒无害,能够通过细胞的吞噬作用进入癌细胞的细胞膜和细胞质而不影响细胞核。同时可以与DNA这种生物大分子相互作用,因此用来进行DNA的识别与检测。除此之外,同一份碳

量子点用不同频率的激光激发可以发出不同颜色的荧光,即碳量子点的激发波长和发射波长可调控,这使得碳量子点有可能成为新的绿色光源。

[0008] 目前碳量子点的合成方法主要有两种:一种是自上而下 (Top-Down) 合成法,这种方法是将较大的碳骨架分解,例如将石墨、碳纳米管、炭黑、活性炭和氧化石墨作为碳源制得碳量子点。这种方法主要包括电弧放电法、激光刻蚀法、电化学合成法等,但这些方法难以将碳骨架完全分离,因此产率很低。而另一种方法自下而上 (Bottom-Up) 合成法则更加直接有效,以柠檬酸、糖类以及硅聚合物纳米复合材料作为分子前驱体,即直接以小分子的含碳物质,利用水热氧化法、模板法或微波加热法来缩合成碳量子点。在利用水热法、以石墨烯为原料制备碳量子点时,通过对碳量子点的芳基化修饰可以增强其荧光强度,但是此方法制备碳量子点时耗时较长而且能耗较大,因此微波法制备碳量子点的快速及低能耗的优势就凸显出来。

[0009] 随着对实际样品及生物复杂样品高灵敏、高特异性的检测需求不断提高,碳量子点应用于生化检测方面同样面临着一些问题,如:相比于荧光染料,大多数碳量子点的荧光量子产率普遍较低,不利于生物成像应用及传感检测灵敏度的提高;一些碳量子点表面缺乏有效的识别基团,导致其与目标物特异性结合能力有限,选择性有待提高;碳量子点的探针自身浓度及环境因素对荧光强度造成的干扰不可避免,限制了检测准确性的提高。而以柠檬酸为原料、微波法制备得到的碳量子点同样存在上述技术缺陷。

[0010] 碳量子点的表面对所处环境有较高灵敏度,其表面性质很容易被溶液中微量的物质影响。为了解决这个问题,研究发现通过对碳量子点进行表面钝化可以有效降低溶液环境对碳量子点光学性质的有害影响。表面钝化通常通过薄绝缘层的形成得到,通常情况下是将酸处理的碳量子点用PEG1500N类的聚乙二醇 (PEG) 聚合物修饰其表面。

[0011] 申请号为CN201811612977.3的发明专利公开了一种基于碳量子点的荧光免疫分析方法,此发明提供了基于碳量子点的荧光免疫分析方法,将所述碳量子点应用于酶联免疫分析方法中,建立一种基于碳量子点的高灵敏度的荧光免疫分析新方法,利用碳量子点与酶催化的显色底物间产生高效的荧光内滤效应,成功地将酶联免疫分析中辣根过氧化物酶/碱性磷酸酶催化底物反应形成的吸光度信号有效地转化为荧光信号。

[0012] 因此提供一种基于碳量子点的荧光特性与免疫层析相结合,进而高灵敏度、快速以及环境友好地联合检测血清中胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的试剂盒及其制备方法是很有必要的。

发明内容

[0013] 针对现有技术存在的不足,本发明的目的之一在于提供一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒,其具有高灵敏度、环境友好地联合检测出血清中胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的技术优势。

[0014] 本发明的目的还在于提供一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒的制备方法。

[0015] 为实现以上目的,本发明提供了如下技术方案:一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒的制备方法,所述试剂盒包括塑料板和固定在塑料板上的吸附层,所述吸附层从测试端开始依次为互相搭接的样品垫、玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜和吸水垫,

其特征在于:所述玻璃纤维素膜上包被有碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II;所述硝酸纤维素膜上设置有检测线1、检测线2和控制线,所述检测线1上包被有胃蛋白酶原I二抗,所述检测线2上包被有胃蛋白酶原II二抗,所述控制线上包被有羊抗鼠IgG。

[0016] 具体制备方法包括以下步骤:

S1:原材料的制备:

A:制备玻璃纤维素膜:将碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II混合包被在玻璃纤维素膜上,干燥,备用;

B:制备硝酸纤维素膜:取硝酸纤维素膜,间隔划分出检测线1、检测线2、和控制线,然后将胃蛋白酶原I二抗、胃蛋白酶原II二抗和羊抗鼠IgG分别包被在硝酸纤维素膜的检测线1、检测线2和控制线上,之后将包被后的硝酸纤维素膜放入封闭液中封闭,干燥,备用;

S2:组装:在塑料板上放置吸附层,所述吸附层的组装步骤为:依次放置样品垫、步骤(1)制备的玻璃纤维素膜、步骤(1)制备的硝酸纤维素膜和吸水垫,干燥,即完成;

其中,步骤A中首先包括首先制备碳量子点,具体方法包括以下操作步骤:

a:称取4-5重量份的柠檬酸于30-50重量份的超纯水中,搅拌至柠檬酸完全溶解;

b:称取5-6重量份的乙二胺,加入到步骤a制备得到的溶液中,搅拌均匀后加入35-65重量份的超纯水,以300-400rpm的转速搅拌20-30min,于4℃储存备用;

c:取步骤b制备得到的溶液于微波反应器中,称取1-3重量份的4-氨基苯甲酸乙酯于微波反应器中,在400-600W的功率、150-250℃的条件下反应4-10min,得到碳量子点产品;当溶液温度下降至80℃以下后,得到含有碳量子点的透明褐黄色溶液;

d:所得碳量子点溶液经旋蒸、透析后,即得所需要的碳量子点。

[0017] 通过采用上述技术方案,由于采用的是基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒,而荧光的碳量子点在制备的过程中与包含重金属的半导体量子点相比,对环境以及人体的危害较小,因此具有环境友好的技术效果;同时,对碳量子点进行氮掺杂和芳基化修饰,可以获得更高的荧光强度的碳量子点,使得试剂盒的检测灵敏度更高。

[0018] 作为一种优选的实施方案,所述步骤A中还包括制备碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II,具体方法包括以下操作步骤:

e:将1重量份的二氯乙烷和3重量份的N-羟基琥珀酰亚胺,在室温下加入100重量份的超纯水,搅拌均匀;

f:将3重量份的胃蛋白酶原I和3重量份的胃蛋白酶原II加入到步骤e所得的溶液中,室温反应30-40min;

g:向步骤f中制备得到的溶液里加入包含巯基的有机物,搅拌混合;

h:将步骤d中纯化得到的碳量子点溶液,等质量份的加入到步骤g制备得到的胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II中,室温反应4-5h后得到碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II混合溶液;

i:向步骤h中制备得到的碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II混合溶液中加入磷酸缓冲盐溶液后透析,去除未被标记的胃蛋白酶原I、胃蛋白酶原II以及未参加反应的N-羟基琥珀酰亚胺。

[0019] 通过采用上述技术方案,首先将得到的由于胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II通过二

氯乙烷和N-羧基琥珀酰亚胺进行活化,以便进行下一步骤中蛋白质的蛋白修饰。

[0020] 作为一种优选的实施方案,步骤c中所述的芳香胺选自4-氨基苯甲酸乙酯、对苯二胺和邻甲苯胺中的一种,优选地,步骤c中所述的芳香胺为4-氨基苯甲酸乙酯。

[0021] 作为一种优选的实施方案,所述包含巯基的有机物选自巯基乙醇、巯基乙酸或聚乙二醇中的一种,优选地,包含巯基的有机物选择为巯基乙醇。

[0022] 作为一种优选的实施方案,步骤h中,所述步骤g制备得到的胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的混合溶液与步骤d中纯化得到的碳量子点溶液的质量比为1:1。

[0023] 作为一种优选的实施方案,所述步骤A中将碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II的混合包被在玻璃纤维素膜上的具体步骤为:将胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II的混合物均匀喷涂于玻璃纤维素膜上。

[0024] 通过采用上述技术方案,使得本发明所述的试剂盒的检测更加精准,减小误差。

[0025] 作为一种优选的实施方案,所述步骤B中将胃蛋白酶原I二抗、胃蛋白酶原II二抗和羊抗鼠IgG分别包被在硝酸纤维素膜的检测线1、检测线2和控制线上的具体方法为:分别取浓度均为1mg/ml的胃蛋白酶原I二抗、胃蛋白酶原II二抗和羊抗鼠IgG,以1 μ l/cm、10cm/秒的速度分别喷涂到硝酸纤维的检测线1、检测线2和控制线上。

[0026] 一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒,所述试剂盒由权利要求书1~7任意一项所述的制备方法制备得到。

[0027] 作为一种优选的实施方案,所述硝酸纤维素膜上设置的检测线1与检测线2之间、检测线1与控制线之间的间隔均为5-8mm;优选地,所述硝酸纤维素膜上设置的检测线1与检测线2之间、检测线1与控制线之间的间隔为5mm。

[0028] 通过采用上述技术方案,使得检测线1与检测线2之间、检测线1与控制线之间的检测结果相互独立,不受到彼此的影响。

[0029] 综上所述,本发明具有以下有益效果:

第一、由于本发明采用基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒的制备,由于碳量子点的激发后的良好荧光特性、环境友好及生物相容性,得到一种制备过程快速、能耗低、高灵敏度、环境友好地联合检测出血清中胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的试剂盒。

[0030] 第二、本发明中优选采用乙二醇和4-氨基苯甲酸乙酯对碳量子点进行修饰,由于碳量子点的含氮参杂和芳基化修饰,增大了荧光碳量子点的产率,进而得到了高效、快速检测胃蛋白酶原的基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒。

附图说明

[0031] 图1是具体实施例1制备的试剂盒检测胃蛋白酶原I的标准样品发光值与实际浓度间对应关系的标准曲线;

图2是具体实施例1制备的试剂盒检测胃蛋白酶原II的标准样品发光值与实际浓度间对应关系的标准曲线;

图3是对比例1制备的试剂盒检测胃蛋白酶原I的标准样品发光值与实际浓度间对应关系的标准曲线;

图4是对比例1制备的试剂盒检测胃蛋白酶原II的标准样品发光值与实际浓度间对应关系的标准曲线。

具体实施方式

[0032] 以下结合附图和实施例对本发明作进一步详细说明。

[0033] 本发明所述的一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒及其制备方法,试剂盒包括塑料板和固定在塑料板上的吸附层,吸附层从测试端开始依次为互相搭接的样品垫、玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜和吸水垫,玻璃纤维素膜上包被有质量比为1:1的碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II;硝酸纤维素膜上设置有检测线1、检测线2和控制线,检测线1上包被有胃蛋白酶原I二抗,检测线2上包被有胃蛋白酶原II二抗,控制线上包被有羊抗鼠IgG。

[0034] 实施例1

一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒的制备方法包括以下步骤:

S1:碳量子点的制备:

a:称取4g的柠檬酸于30g的超纯水中,室温搅拌至柠檬酸完全溶解;

b:称取5g的乙二胺,加入到步骤a制备得到的溶液中,室温下用玻璃棒搅拌15-20min后,溶液均匀,然后加入35g的超纯水,以400rpm的转速室温搅拌30min,于4℃储存备用;

c:取步骤b制备得到的溶液于微波反应器中,称取2.5g的4-氨基苯甲酸乙酯于微波反应器中,在500W的功率、300℃的条件下反应10min,得到碳量子点产品,得到的碳量子点为被乙二胺钝化并后并被4-氨基苯甲酸乙酯芳基化修饰,同时在乙二胺和4-氨基苯甲酸乙酯作用下成为含N掺杂的荧光碳量子点溶液;当溶液温度下降至80℃以下后,得到含有碳量子点溶液为透明褐黄色;

d:采用旋转蒸发仪在65℃下将步骤c制备得到的溶液浓缩后,并用500Da截留分子量的透析袋透析2天,收集透析袋中的碳量子点,得到分子量大于500Da水溶性的荧光碳量子点溶液备用。

[0035] S2:碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II混合液的制备:

e:将1g的二氯乙烷和3g的N-羟基琥珀酰亚胺,在室温下加入100g份的超纯水,用玻璃棒搅拌5-10min后溶液均匀;

f:将3g的胃蛋白酶原I和3g的胃蛋白酶原II加入到步骤e所得的溶液中,室温反应30min;

g:向步骤f中制备得到的溶液里加入巯基乙醇,搅拌混合;

h:将步骤d中纯化得到的碳量子点溶液,等质量份的加入到步骤g制备得到的胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II中,室温反应4-5h后得到碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II混合溶液;

i:向步骤h中制备得到的碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II混合溶液中加入磷酸缓冲盐溶液后透析,去除未被标记的胃蛋白酶原I、胃蛋白酶原II以及未参加反应的N-羟基琥珀酰亚胺。

[0036] S3:玻璃纤维素膜的制备:

将步骤i中制备得到的碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II的溶液均匀喷涂在玻璃纤维素膜上,使得碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II包被在玻璃纤维素膜上,干燥5-6h后,备用;

S4:硝酸纤维素膜的制备:

取硝酸纤维素膜,间隔划分出检测线1、检测线2和控制线,然后将胃蛋白酶原I二抗、胃蛋白酶原II二抗和羊抗鼠IgG分别以1 μ L/cm、10cm/s的速度喷涂到硝酸纤维素膜的检测线1、检测线2和控制线上,检测线1和检测线2、检测线2和控制线之间的距离为5mm;之后将包被后的硝酸纤维素膜放入封闭液中封闭,干燥,备用;

S5:一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒的制备:

在塑料板上放置吸附层,所述吸附层的组装步骤为:依次放置样品垫、步骤S3制备得到的玻璃纤维素膜、步骤S4制备的得到的硝酸纤维素膜和吸水垫,所述样品垫与玻璃纤维素膜、玻璃纤维素膜与硝酸纤维素膜、硝酸纤维素膜与吸水垫之间有5mm的重叠,随后干燥,制得本发明所需要的试剂盒。

[0037] 实施例2

本实施例与实施例1的不同之处在于,碳量子点的制备过程中,各原料用量及制备条件的参数取值不同,具体步骤如下:

碳量子点的制备:

a:称取5g的柠檬酸于50g的超纯水中,室温搅拌至柠檬酸完全溶解;

b:称取6g的乙二胺,加入到步骤a制备得到的溶液中,搅拌均匀后加入65g的超纯水,以400rpm的转速搅拌30min,于4 $^{\circ}$ C储存备用;

c:取步骤b制备得到的溶液于微波反应器中,将3g的4-氨基苯甲酸乙酯于微波反应器中,在600W的功率、250 $^{\circ}$ C的条件下反应10min,得到碳量子点产品,得到的碳量子点为被乙二胺钝化并后被4-氨基苯甲酸乙酯芳基化修饰,同时在乙二胺和4-氨基苯甲酸乙酯作用下成为含N掺杂的荧光碳量子点溶液;当溶液温度下降至80 $^{\circ}$ C以下后,得到含有碳量子点溶液为透明褐黄色;

d:采用旋转蒸发仪在65 $^{\circ}$ C下将步骤c制备得到的溶液浓缩后,并用500Da截留分子量的透析袋透析2天,收集透析袋中的碳量子点,得到分子量大于500Da水溶性的荧光碳量子点溶液备用。

[0038] 其他的步骤包括碳量子点标记的胃蛋白酶原I和碳量子点标记的胃蛋白酶原II混合液的制备、玻璃纤维素膜的制备、硝酸纤维素膜的制备以及一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒的制备步骤如实施例1所述。

[0039] 实施例3

本实施例与实施例1的不同之处在于,步骤g中向步骤f中制备得到的溶液里加入的含巯基有机物为巯基乙酸,其他的步骤和实施例1相同。

[0040] 实施例4

本实施例与实施例1的不同之处在于,步骤g中向步骤f中制备得到的溶液里加入的含巯基有机物为聚乙二醇(PEG),其他的步骤和实施例1相同。

[0041] 实施例5

本实施例与实施例1的不同之处在于,步骤c中芳香胺为对苯二胺,其他的步骤和实施例1相同。

[0042] 实施例6

本实施例与实施例1的不同之处在于,步骤c中芳香胺为邻甲苯胺,其他的步骤和实施例1相同。

[0043] 实施例6

本实施例与实施例1的不同之处在于,步骤c中芳香胺为间苯二胺,其他的步骤和实施例1相同。

[0044] 对比例

对比例与实施例1的不同之处之处在于,碳量子点的制备步骤不同,具体的制备过程如下:碳量子点的制备:

a:称取4g的柠檬酸于30g的超纯水中,室温搅拌至柠檬酸完全溶解;

b:称取5g的乙二醇,加入到步骤a制备得到的溶液中,搅拌均匀后加入35g的超纯水,以400rpm的转速搅拌30min,于4℃储存备用;

c:取步骤b制备得到的溶液于微波反应器中,在500W的功率、200℃的条件下反应4min,得到碳量子点产品,得到的碳量子点为被乙二醇钝化制备得到的含N掺杂的荧光碳量子点溶液;当溶液温度下降至80℃以下后,得到含有碳量子点溶液为透明褐黄色;

d:采用旋转蒸发仪在65℃下将步骤c制备得到的溶液浓缩后,并用500Da截留分子量的透析袋透析2天,收集透析袋中的碳量子点,得到分子量大于500Da水溶性的荧光碳量子点溶液备用。

[0045] 试验例

试验例1

将胃蛋白酶原I稀释为11.27ug/L、22.54ug/L、45ug/L、90ug/L、180ug/L、360ug/L、720ug/L;将胃蛋白酶原II稀释为5.635ug/L、11.27ug/L、22.54ug/L、45ug/L、90ug/L、180ug/L、360ug/L作为标准溶液,同时配置空白溶液。

[0046] 分别取各浓度的标准品100uL分别加入到实施例1或制备得到的试剂盒的样品垫上,3min后将显色完成的试剂盒放入荧光免疫层析读数仪内,读取相应检测线的发光值并记录数据,绘制标准曲线,如图1和图2所示,胃蛋白酶原I的标准曲线回归方程为: $y = -0.000028x^2 + 0.0337x + 0.4896$, $R^2 = 0.99981$;胃蛋白酶原II的标准曲线回归方程为: $y = -0.000011x^2 + 0.0675x + 0.4888$, $R^2 = 0.99973$ 。从上述标准曲线中得到本发明制备得到的试剂盒对胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的最低检测限分别为:3ug/L和1.5ug/L。

[0047] 分别取各浓度的标准品100uL分别加入到对比例制备得到的试剂盒的样品垫上,5min后将显色完成的试剂盒放入荧光免疫层析读数仪内,读取相应检测线的发光值并记录数据,绘制标准曲线,如图3和图4所示,胃蛋白酶原I的标准曲线回归方程为: $y = -0.000047x^2 + 0.0501x + 0.4611$, $R^2 = 0.99981$;胃蛋白酶原II的标准曲线回归方程为: $y = -0.000019x^2 + 0.1x + 0.46$, $R^2 = 0.99941$ 。从上述标准曲线中得到本发明制备得到的试剂盒对胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的最低检测限分别为:10.5ug/L和8.5ug/L。

[0048] 由上述的实验结果表明,本发明制备得到的试剂盒的最底检测限低于对比例中制备得到的试剂盒的最底检测限。说明在制备碳量子点的过程中,4-氨基苯甲酸乙酯对碳量子点的修饰使得碳量子点的检测灵敏度更高。这样的结果可能出于一下原因:4-氨基苯甲酸乙酯的修饰,使得碳量子点与胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的交联更加紧密,碳量子点对胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的包被效果更好;4-氨基苯甲酸乙酯的修饰,使得碳量子点的荧光效应增强,从而提高了碳量子点对胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的最低检测限。

[0049] 试验例2

分别配制同试验例1中所述的胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的标准溶液。

[0050] 分别取各浓度的标准品100uL分别加入到实施例1、实施例5和实施例6制备得到的试剂盒的样品垫上,3min后将显色完成的试剂盒放入荧光免疫层析读数仪内,读取相应检测线的发光值并记录数据,绘制标准曲线。

[0051] 实施例1、实施例5和实施例6制备得到的试剂盒的区别在于:制备是试剂盒的步骤中,关于碳量子点的制备过程中对于芳香胺的选择不同。

[0052] 从上述标准曲线中得到实施例1、实施例5、实施例6和实施例7分别制备得到的试剂盒对胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的最低检测限如表1所示。

[0053] 表1实施例1、实施例5、实施例6和实施例7制备得到的试剂盒对胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的最低检测限 (ug/L)

芳香胺	4-氨基苯甲酸乙酯	对苯二胺	邻甲苯胺	间苯二胺	对比例
胃蛋白酶原 I	3	7	4.5	6.5	10.5
胃蛋白酶原 II	1.5	5	4.5	3.5	8.5

从表1中看出,虽然采用芳香胺掺杂的碳量子点制备得到的试剂盒对对胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的最低检测限低于没有芳香胺掺杂的碳量子点制备得到的试剂盒对胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的最低检测限,但是不同的芳香胺掺杂后制备得到的试剂盒对于胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的最低检测限有所不同,其中4-氨基苯甲酸乙酯掺杂后制备得到的试剂盒对于胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的最低检测限最低。

[0054] 试验例3

随机取50例的临床样品,分别采用实施例1和对比例制备得到的试剂盒对胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的浓度进行检测。检测的具体步骤包括:

取100uL的待测样品滴加到试剂盒的样品垫上,3-5min后将显色结束的标准品与待测样品的试纸条放入荧光免疫层析读数仪中,读取相应检测线的发光值(T/C)并记录数据,将得到的T/C值输入到试验例1或试验例2对应的标准曲线中,计算得到胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的浓度,具体的结果如表2所示。

[0055] 采用实施例1制备得到的试剂盒对胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的浓度进行检测的显色时间为3min;采用对比例制备得到的试剂盒对胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的浓度进行检测的显色时间为5min;结果表明,实施例1制备得到的试剂盒对胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的浓度检测更加快速、检测更加高效。

[0056] 表2实施1和对比例中的方案制备得到的试剂盒对50例临床样品的胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的浓度检测结果

样品号	实施例 1		对比例	
	胃蛋白酶原 I (ug/L)	胃蛋白酶原 II (ug/L)	胃蛋白酶原 I (ug/L)	胃蛋白酶原 II (ug/L)
1	145.23	10.09	143.43	9.18
2	113.79	6.37	115.72	8.53
3	153.2	11.28	150.34	11.3
4	159.62	13.26	162.02	13.52
5	150.17	10.88	147.97	10.3
6	167.34	15.67	168	15.99
7	176.49	26.31	170.11	26.01
8	130.65	6.03	129.91	7.41
9	152.1	12.87	150.93	12.76
10	171.23	19.98	173.45	20.03
11	149.64	11.44	149.89	11.03
12	163.47	10.93	164.81	11.21
13	168.62	14.33	167.09	14.25
14	130.21	8.67	131.09	9.54
15	121.33	6.93	120.18	8.95
16	163.62	12.6	165.09	13.98
17	201.37	20.33	200.01	19.57
18	134.71	10.36	133.36	10.13
19	223.19	22.33	222.79	22.08
20	144.06	12.18	143.26	11.83
21	128.26	11.39	128.26	11.39
22	134.83	9.67	135.09	9.67
23	106.37	8.33	108.31	9.13
24	173.51	17.62	172.81	17.94
25	169.92	16.39	169.99	16.35
26	109.52	6.14	110.36	8.68
27	151.93	13.57	150.02	13.42
28	220.03	22.34	220.91	23.64
29	215.36	21.97	213.99	22.07
30	193.19	18.36	193.23	17.66
31	145.91	10.89	144.96	10.36
32	100.37	7.23	100.44	9.23
33	230.91	24.63	231.88	24.52
34	150.29	15.1	150.24	15.15
35	152.98	13.03	152.59	13.97
36	155.33	13.01	153.33	13.89
37	172.41	16.11	171.06	16.21
38	151.68	11.68	149.07	12.71
39	143.76	9.03	143.76	9.83
40	175.49	18.62	176.39	17.88
41	157.43	15.37	157.31	15.07
42	160.89	15.02	160.81	15.35
43	184.97	19.47	185.91	19.92
44	156.74	11.39	153.99	12.06

45	137.21	6.32	137.21	8.74
46	143.13	8.53	143.93	9.01
47	141.82	7.61	142.18	8.89
48	191.31	23.45	193.01	24.57
49	189.39	22.19	190.13	22.59
50	154.34	13.56	152.06	13.01

实施例1与对比例中的制备试剂盒的步骤的区别在于：实施例1制备一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒的方法为，在制备碳量子点的步骤c中，置于微波反应器中的反应原料包含2.5g的4-氨基苯甲酸乙酯；而对比例制备一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒的方法为，在制备碳量子点的步骤c中，置于微波反应器中的反应原料不包含2.5g的4-氨基苯甲酸乙酯。

[0057] 从表1中可以看出，以实施例1的方法制备得到的试剂盒和以对比例的方法制备得到的试剂盒对于胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的检测结果是类似的，表明本发明所制备得到的试剂盒对胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的检测结果的准确性。采用对比例的方法制备得到的试剂盒在对低浓度(1ug/L-10ug/L)的胃蛋白酶原II的检测中，其检测数据有一定的偏差，采用对比例的方法制备得到的试剂盒对低浓度的胃蛋白酶原II的检测的不准确性，而本发明制备得到的试剂盒在对低浓度胃蛋白酶原II的检测更加的精准，使得其在微量检测方面更具有竞争优势。

[0058] 在制备碳量子点的过程中，相比于荧光染料，大多数碳量子点的荧光量子产率普遍较低，不利于生物成像应用及传感检测灵敏度的提高；一些碳量子点表面缺乏有效的识别基团，导致其与目标物特异性结合能力有限，选择性有待提高；基于碳量子点的生化传感大多以荧光“on-off”或“on-off-on”模式为信号输出单元，导致探针自身浓度及环境因素对荧光强度造成的干扰不可避免，限制了检测准确性的提高。

[0059] 因此往往需要对制备得到的碳量子点进行进一步地修饰以增强碳量子点的荧光强度。而在反应中添加碳量子点纯化与掺杂功能相结合的反应物，如乙二胺，乙二胺既充当钝化剂，同时又包含了所要掺杂的氮原子，通过含氮原子的钝化试剂与碳源反应，氮原子可以有效的交联在生成的碳量子点表面，提高荧光碳量子点的产率。而芳香胺(4-氨基苯甲酸乙酯)的结构在氮上的孤电子对占据的是 sp^2 杂化轨道，和苯环 π 电子轨道重叠，形成氮和苯环在内的共轭 π 分子轨道；当在碳量子点上掺杂4-氨基苯甲酸乙酯的时候，进一步增强了荧光的碳量子点的荧光强度。

[0060] 本具体实施例仅仅是对本发明的解释，其并不是对本发明的限制，本领域技术人员在阅读完本说明书后可以根据需要对本实施例做出没有创造性贡献的修改，但只要在本发明的权利要求范围内都受到专利法的保护。

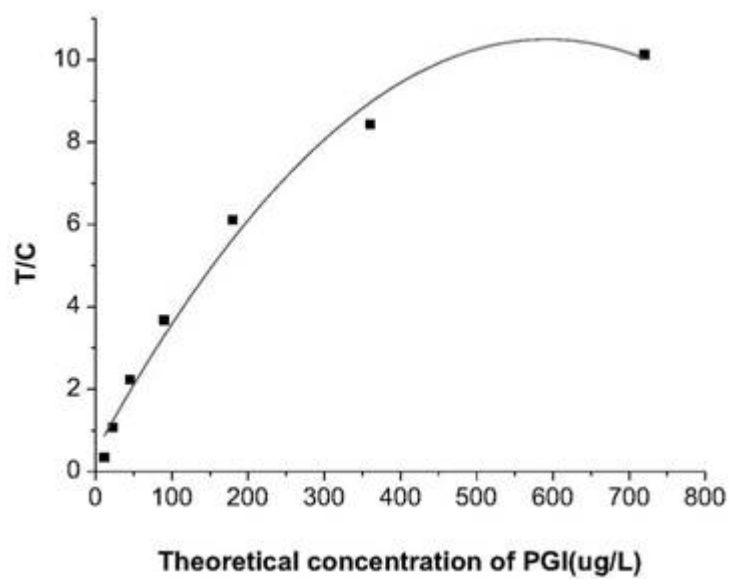


图1

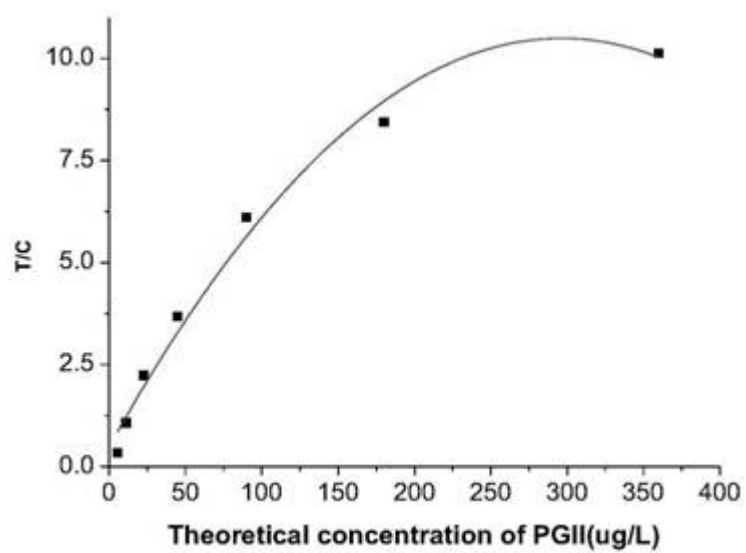


图2

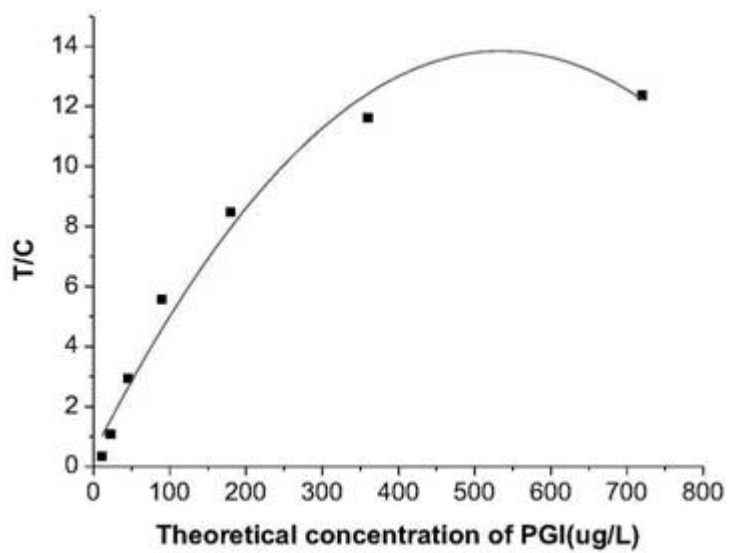


图3

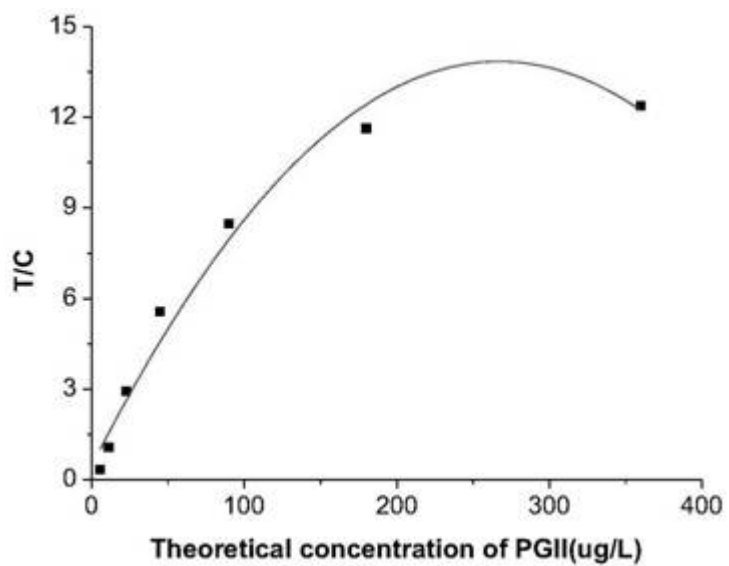


图4

专利名称(译)	一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN110208547A	公开(公告)日	2019-09-06
申请号	CN201910569114.0	申请日	2019-06-27
[标]发明人	王瑛琦 李想 黄洋 鞠文东		
发明人	王瑛琦 李想 黄洋 鞠文东		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/58 G01N33/574 G01N33/558 G01N33/533 G01N33/531 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N33/531 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/57446 G01N33/582 G01N33/6893 G01N2021/6439		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于碳量子点的胃蛋白酶原免疫层析检测试剂盒及其制备方法。所述试剂盒包括塑料板和固定在塑料板上的吸附层，所述吸附层从测试端开始依次为互相搭接的样品垫、玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜和吸水垫。所述玻璃纤维素膜上包被有碳量子点标记的胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II；所述硝酸纤维素膜上设置有检测线1、检测线2和控制线，所述检测线1上包被有胃蛋白酶原I二抗，所述检测线2上包被有胃蛋白酶原II二抗，所述控制线上包被有羊抗鼠IgG；所述碳量子点分别被乙二胺和N-羧基琥珀酰亚胺修饰。本发明的试剂盒可用于胃蛋白酶原I和胃蛋白酶原II的联合检测，其具有高效、低毒地检测出血清中胃蛋白酶原的优点。

