

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810041133.8

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

[43] 公开日 2009年1月7日

[11] 公开号 CN 101339196A

[22] 申请日 2008.7.29

[21] 申请号 200810041133.8

[71] 申请人 上海师范大学

地址 200234 上海市徐汇区桂林路100号

[72] 发明人 沈鹤柏 方菲

[74] 专利代理机构 上海伯瑞杰知识产权代理有限公司

代理人 季申清

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

[54] 发明名称

量子点标记免疫层析试纸快速检测膀胱癌方法

[57] 摘要

本发明公开了一种量子点标记免疫层析试纸快速检测膀胱癌方法。现在膀胱癌检测的方法是膀胱镜、超声波、CT等，但是这些方法检测程序烦琐、病人痛苦。本发明利用量子点标记免疫层析试纸，快速检测膀胱癌患者的尿液中所含纤维连接蛋白量，确诊和判断膀胱癌。本发明检测方法成本低、方法简单；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；可在医院、海关、机场、家庭等场所使用。

1、一种量子点标记免疫层析试纸快速检测膀胱癌方法，包括以下步骤：

(1) 取 0.01M PBS 缓冲液 100~200 $\mu$ L 与 5~20 $\mu$ L 表面连有羧基的量子点，用 1~20mgN-羟基琥珀酸亚胺和 1~20mg1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二胺盐酸盐作为偶联试剂，加入单克隆抗人纤维连接蛋白 150~200 $\mu$ L 摇床反应 1~4 小时，层析柱过滤，离心纯化，1%~5%的牛血清白蛋白封闭，4 $^{\circ}$ C 保存；

(2) 将量子点标记单克隆抗人纤维连接蛋白均匀喷覆于玻璃纤维膜上，室温干燥，4 $^{\circ}$ C 保存；用 0.05~0.15M 的包被缓冲液稀释纤维连接蛋白多克隆抗体、兔抗鼠二抗分别喷覆于硝酸纤维素膜上，室温晾干，将膜放入 PBS 缓冲液中，37 $^{\circ}$ C 封闭，干燥后 4 $^{\circ}$ C 保存；

(3) 在塑料板上粘贴玻璃纤维膜、量子点标记单克隆抗人纤维连接蛋白的玻璃纤维膜和分别包被纤维连接蛋白多克隆抗体、兔抗鼠二抗的硝酸纤维素膜、吸水纸，将粘贴好的塑料板切成 3~5mm 的试纸条；

(4) 将量子点与单克隆抗人纤维连接蛋白混合，离心分离，得样品 4 $^{\circ}$ C 保存；取 50 $\mu$ l 所制的样品用 PBS 稀释至 3ml 在荧光分光光度计下观测到定量的结果。

2、根据权利要求 1 所述的量子点标记免疫层析试纸快速检测膀胱癌方法：PBS 缓冲液为含有牛血清白蛋白和蔗糖的磷酸盐溶液，PH7.4。

## 量子点标记免疫层析试纸快速检测膀胱癌方法

### 技术领域

本发明属于医学检验技术，具体地说是一种量子点标记免疫层析试纸快速检测膀胱癌方法。

### 背景技术

膀胱癌是一种恶性肿瘤疾病，死亡率高，全球每年约有几十万个新膀胱癌病例发生，患病率越来越高，已经成为导致死亡的重要原因之一。早期发现，及时诊断是挽救膀胱癌患者的有效手段。现代医学对膀胱癌检测最常用的方法是膀胱镜、超声波、CT等。但是膀胱镜检查病人很痛苦，很多患者因此不愿检测，延误了病情；而超声波、CT检测除了检查费高外，程序也较烦琐。所以发明一种能够简便灵敏的检测膀胱癌的方法，对于提早发现和诊断膀胱癌疾病，减轻膀胱癌患者痛苦，挽救膀胱癌患者的生命是十分有意义的。

现代医学研究证明：人的尿液中有一种纤维连接蛋白（即Fn），膀胱癌患者排放的尿液中所含的纤维连接蛋白的量比正常人尿中Fn的量明显升高，而且随着病理分级的增高而增高。检测病人尿中纤维连接蛋白的浓度，就可以确诊和判断膀胱癌，准确率85%以上。

本发明是一种利用量子点标记免疫层析试纸，快速检测膀胱癌患者的尿液中所含纤维连接蛋白量，确诊和判断膀胱癌的方法。

### 发明内容

本发明的目的是为了提供一种检测方法简单，病人痛苦少，膀胱癌诊断准确的医学检测方法。

本发明的目的是这样实现的：

量子点标记免疫层析试纸快速检测膀胱癌方法，包括以下步骤：

(1) 取 0.01M PBS 缓冲液 100~200 $\mu$ L 与 5~20 $\mu$ L 表面连有羧基的量子点, 用 1~20mg N-羟基琥珀酸亚胺和 1~20mg 1-(3-(二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二胺盐酸盐作为偶联试剂, 加入单克隆抗人纤维连接蛋白 150~200 $\mu$ L 摇床反应 1~4 小时, 层析柱过滤, 离心化, 1%~5%的牛血清白蛋白封闭, 4 $^{\circ}$ C 保存;

(2) 将量子点标记单克隆抗人纤维连接蛋白均匀喷覆于玻璃纤维膜上, 室温干燥, 4 $^{\circ}$ C 保存; 用 0.05~0.15M 包被缓冲液稀释纤维连接蛋白多克隆抗体、兔抗鼠二抗分别喷覆于硝酸纤维素膜上, 室温晾干, 将膜放入 PBS 缓冲液中, 37 $^{\circ}$ C 封闭, 干燥后 4 $^{\circ}$ C 保存;

(3) 在塑料板上粘贴玻璃纤维膜、量子点标记单克隆抗人纤维连接蛋白的玻璃纤维膜和分别包被纤维连接蛋白多克隆抗体、兔抗鼠二抗的硝酸纤维素膜、吸水纸, 将粘贴好的塑料板切成 3~5mm 的试纸条;

(4) 将量子点与单克隆抗人纤维连接蛋白混合, 离心分离, 得样品 4 $^{\circ}$ C 保存; 取 50 $\mu$ l 所制的样品用 PBS 稀释至 3ml 在荧光分光光度计下观测。

上述的量子点标记免疫层析试纸快速检测膀胱癌方法中 PBS 缓冲液为含有牛血清白蛋白和蔗糖的磷酸盐溶液, PH7.4; 包被缓冲液为 0.05~0.15M 的含有牛血清白蛋白和蔗糖的磷酸盐溶液。

本发明的要点在于: 将水溶性的量子点与特异性的抗体通过共价偶联, 然后利用双抗夹心原理结合量子点的荧光性质检测样品中是否含有目标物。在紫外灯的照射下, 通过观察免疫层析试纸条上检测带和质控带的荧光线, 判断检测结果。本发明将免疫反应的高特异性和量子点的荧光特性相结合, 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, 建立了快速、特异、简便、灵敏的免疫层析检测方法。通

过观察荧光信号达到了定量检测的目的。该方法的检测灵敏度比目前常用的一种快速检测方法——胶体金的检测灵敏度高约 1000 倍左右。由于金标试纸是通过肉眼观察，存在其自身的缺陷，而量子点标记抗体复合物却能够弥补这一缺陷，所以达到较高的灵敏度。半导体量子点是无机纳米晶体，它的出现，以其独特的优点，例如具有光稳定性好、较宽的激发光谱与较窄的发射光谱、激发与发射光谱分离、可调谐发射光谱的波长等光学特性，解决了有机荧光基团标记物易被光漂白、发射光谱较宽、以及不同荧光基团需不同激发光源的诸多缺陷；随着量子点生物兼容性的发展，使其成为生物科学和医学研究领域极具特色的荧光标记探针。

本发明采用免疫层析原理的双抗夹心方法，首先是基于将已修饰了羧基的荧光纳米量子点与生物分子上的氨基通过一系列交联剂，使量子点上的羧基与生物体上的氨基形成共价键（酰胺键），从而达到将量子点稳定结合在抗体上的目的，并且除去未结合的抗体，使之成为标记特异性抗体的前提保证。本实验利用免疫层析法原理将一抗-量子点复合物先固定在待测样品的玻璃纤维膜上，当干燥后的玻璃纤维膜一端浸入样品尿液后，由于毛细管作用，样品沿着玻璃纤维膜向前移动，当移动至固定有一抗-量子点复合物的区域时，样品中相应的抗原即与该一抗-量子点复合物发生特异性结合，形成了一个“量子点 - 一抗-抗原”复合物，该复合物继续移动至硝酸纤维膜上的固定有多抗的检测线区域时，由于特异的抗原抗体免疫结合，多抗会通过与抗原反应固定、富集“量子点- 一抗-抗原”复合物，该区域在紫外照射下会显示荧光，从而达到检测目的，实现免疫诊断。

本发明用共价偶联方法连接量子点-抗体复合物效果明显，并且用牛血清白蛋白封闭消除了非特异性吸附的存在，利用双抗夹心法检测待测液样品达到检测膀胱癌的目的，检测限低，灵敏度高，具有比同类检测手段更大的

优势。

本发明的优点是：1、检测方法简单、成本低；2、灵敏度高，检测结果准确；3、适用样本多，适用于尿样、也适用于血样、唾液等样本；4、应用广，可应用于激素、蛋白质、病毒、毒品、细菌、环境污染等检测；5、使用范围大，除了在医院使用，也可在海关、机场、家庭等场所使用。

附图说明

图 1 为样品和游离的量子点荧光图。

红线为样品荧光图，绿线为游离的量子点荧光图，该量子点的发射波长为 650nm。图 1 说明了量子点已成功的连接到抗体上。

具体实施方式

下面通过实施例对本发明做进一步说明。

一、样品制备和试纸条的制作：

1. 量子点标记抗体

取 PH 7.4 的含有牛血清白蛋白和蔗糖的磷酸盐溶液 150uL 与 10uL 表面连有羧基的量子点，用 10mg N-羟基琥珀酸亚胺 和 10mg 1-(3-二甲基氨丙基)-3-乙基碳二胺盐酸盐作为偶联试剂，加入单克隆抗人纤维连接蛋白 150uL 在摇床上反应 2 小时，反应产品通过 sephadex-G-100(1×35cm) 层析柱过滤，去除未参加反应的抗体，离心纯化，用 4%的牛血清白蛋白封闭，4℃保存备用。

2. 玻璃纤维膜和硝酸纤维素膜处理

将量子点标记单克隆抗人纤维连接蛋白均匀喷覆于玻璃纤维膜上，室温干燥后封袋，4℃保存备用。用 0.05~0.15M 含有牛血清白蛋白和蔗糖的磷酸盐包被缓冲液稀释到设定浓度 0.03~0.05mg/ml，纤维连接蛋白多克隆抗体、兔抗鼠二抗分别喷覆于硝酸纤维素膜上，形成 T 线和 C 线，室温晾干，

将硝酸纤维素膜放入含有牛血清白蛋白和蔗糖的磷酸盐缓冲液中，37℃封闭，干燥后封袋，4℃保存。

### 3. 免疫层析试纸条的制备

在塑料板上依次粘贴上玻璃纤维膜、量子点标记单克隆抗人纤维连接蛋白的玻璃纤维膜和分别包被纤维连接蛋白多克隆抗体、兔抗鼠二抗的硝酸纤维素膜、吸水纸，将粘贴好的塑料板切成3~5mm宽的试纸条，装袋待用。

4. 按上述样品制备的方法，将量子点与单克隆抗人纤维连接蛋白混合反应，最后反应产物通过离心分离，除去未反应的量子点，得样品保存在4℃备用。取50ul所制的样品用PBS稀释至3ml在荧光分光光度计下观测。结果见图1。

## 二、病例检测

5. 将准备好的免疫试纸条插入待测样品尿液中，全部试验过程10分钟，取出试纸条在紫外灯下观察结果。膜上的检测线和质控线处都有红色的荧光，说明患者尿液样品中含有纤维连接蛋白的量达到检测限并得到定量的结果。检验结果：阳性。

6. 将准备好的免疫试纸条插入待测样品尿液中，全部试验过程10分钟，取出试纸条在紫外灯下观察结果。膜上只有质控线上出现红色的荧光，说明患者尿液中所含纤维连接蛋白的量在检测限以下并得到定量的结果。检测结果：阴性。

以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，对于本领域的技术人员来说，本发明可以有更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包括在本发明的保护范围之内。

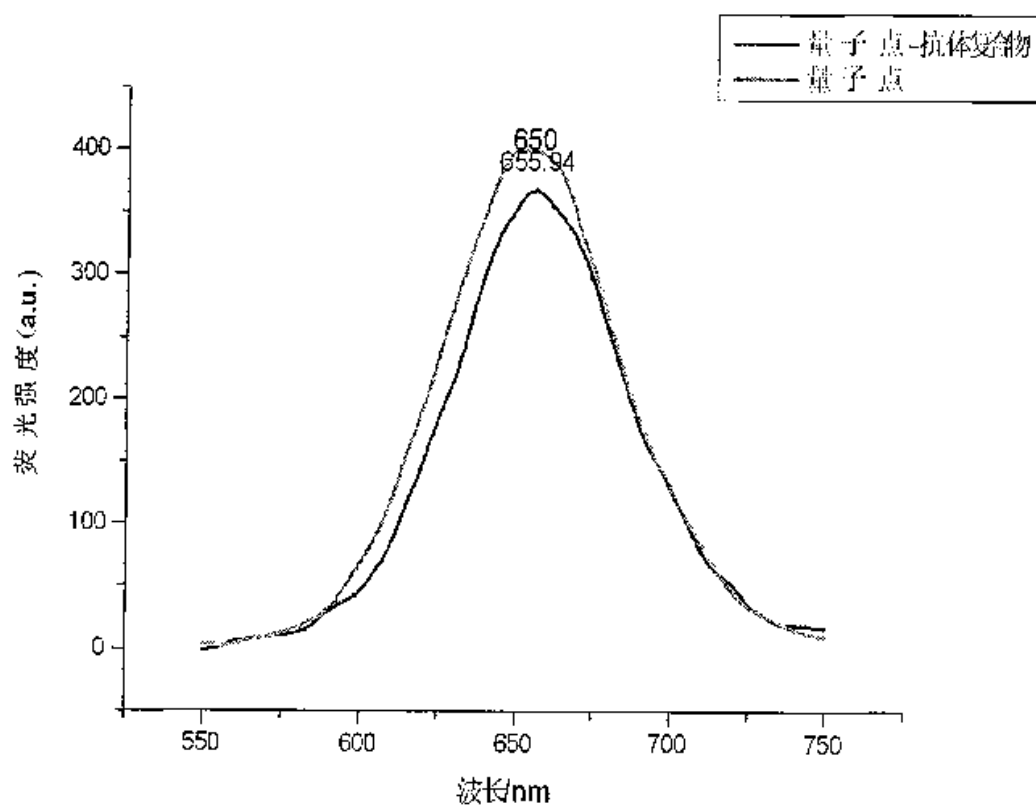


图 1

专利名称(译)	量子点标记免疫层析试纸快速检测膀胱癌方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101339196A</a>	公开(公告)日	2009-01-07
申请号	CN200810041133.8	申请日	2008-07-29
[标]申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海师范大学		
[标]发明人	沈鹤柏 方菲		
发明人	沈鹤柏 方菲		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/574 G01N33/533		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种量子点标记免疫层析试纸快速检测膀胱癌方法。现在膀胱癌检测的方法是膀胱镜、超声波、CT等，但是这些方法检测程序烦琐、病人痛苦。本发明利用量子点标记免疫层析试纸，快速检测膀胱癌患者的尿液中所含纤维连接蛋白量，确诊和判断膀胱癌。本发明检测方法成本低、方法简单；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；可在医院、海关、机场、家庭等场所使用。

