

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/552 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910032135.5

[43] 公开日 2009年11月25日

[11] 公开号 CN 101587071A

[22] 申请日 2009.7.1

[21] 申请号 200910032135.5

[71] 申请人 东南大学

地址 211109 江苏省南京市江宁开发区东南
大学路2号

[72] 发明人 谷保祥 徐春祥 刘松琴 王明亮
朱光平

[74] 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

代理人 叶连生

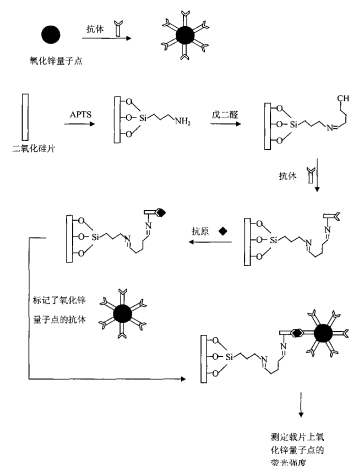
权利要求书2页 说明书4页 附图2页

[54] 发明名称

氧化锌量子点标记抗体的荧光免疫测定方法

[57] 摘要

氧化锌量子点标记抗体的荧光免疫测定方法是将用氧化锌量子点标记的抗体与固定在载片上的抗体通过抗原的特异性反应结合在一起，利用氧化锌量子点的荧光特性测定被固定于载片上的氧化锌的荧光强度，建立氧化锌量子点的荧光强度与抗原浓度之间的关系的标准曲线，从而定量的确定实测样品抗原浓度的方法。本发明方法制备的氧化锌量子点粒径均一，分散性好，与抗体结合稳定，检测结果稳定可靠，重现性好，为医学临床早期检测疾病抗原提供了一条快速可靠的检测途径。在临床早期诊断方法应用有着巨大的应用潜力。



1、一种氧化锌量子点标记抗体的荧光免疫测定方法，其特征在于利用液相反应制备氧化锌量子点，得到粒径均一、分散性好的氧化锌量子点，把该量子点标记到抗体上；同时在电解池中的载片上固定化一层抗体，在一系列已知浓度的待测抗原溶液中，使标记了氧化锌量子点的抗体和载片上的抗体均与抗原进行特异性结合，把标记在抗体上的氧化锌量子点连接到载片上；然后测定载片上氧化锌量子点的荧光强度，建立氧化锌荧光强度与与抗原浓度之间的标准对应关系，用实际样品检测时得到的氧化荧光强度与此标准对应关系相对照即可确定实际样品的抗原浓度。

2、根据权利要求1所述的氧化锌量子点标记抗体的荧光免疫测定方法，其特征在于具体测定方法为：

第一步：二水合乙酸锌与乙醇按 2 : 1 ~ 25 : 1 克/升混合，60~80℃回流 2.5~4 小时，溶解，冷至室温；

第二步：一水合氢氧化锂与乙醇按 0.6 : 1 ~ 6 : 1 克/升混合，超声溶解；

第三步：将第一步和第二步所得溶液混合，置于高压釜中，密封，使其能承受压力不小于 2×10^5 Pa，加热至 60~100℃，保持 0.5~3 小时，自然冷却至室温，取出，离心，用去离子水清洗三次，得到氧化锌量子点；

第四步：将氧化锌量子点分散到抗体溶液中，氧化锌量子点质量与抗体溶液体积比为 2.5 : 1 ~ 25 : 1 克/升，33~37℃震荡 1~3 小时，离心，用 pH6.8~7.5 磷酸盐缓冲溶液清洗三次；最终分散于 pH6.8~7.5 磷酸盐缓冲溶液中，不用时保存于冰箱保温层；

第五步：载片修饰，分两类载片，①金片，浸于等摩尔浓度的 5~15 毫摩尔/升的 11-巯基-十一烷酸 (MUA) 和 11-巯基-十一烷醇 (MU) 的乙醇溶液中，0~8℃保持 18 小时，取出用去离子水清洗；②二氧化硅片或玻璃片，浸于 5~15 毫摩尔/毫升 3-胺基-三乙氧基硅丙烷 (APTS) 的乙醇溶液中，35~45℃保持 2~5 小时，用去乙醇清洗，再浸于 5~15 毫摩尔/毫升戊二醛水溶液中 1~3 小时，取出，用去离子水清洗；

第六步：将第五步得到的载片安装到自制的电解池中，向电解池中注入抗体溶液，使注入的抗体溶液体积至少能全部浸没反应液腔内的载片面积且至多不溢出反应

液腔，33~37℃保持 1~3 小时，用 pH6.8~7.5 磷酸盐缓冲溶液注入清洗；

第七步：向电解池中注入的抗原溶液，使注入的抗原溶液体积至少能全部浸没反应液腔内的载片面积且至多不溢出反应液腔，33~37℃保持 1~3 小时，用 pH6.8~7.5 磷酸盐缓冲溶液注入清洗；

第八步：将第四步制得的标记了氧化锌量子点的抗体溶液注入电解池中，使注入的溶液体积至少能全部浸没反应液腔内的载片面积且至多不溢出反应液腔，33~37℃保持 1~3 小时，用 pH6.8~7.5 磷酸盐缓冲溶液注入清洗，取出载片，室温真空干燥 2 小时；

第九步：测定载片上氧化锌量子点的荧光强度；

第十步：改变第七步的抗原溶液浓度，重复第七、八、九步，测定一系列抗原浓度相对应的氧化锌量子点的荧光强度，建立荧光强度与抗原浓度之间的关系。

3、根据权利要求 2 所述的氧化锌量子点标记抗体的荧光免疫测定方法，其特征在于所述载片为金片、二氧化硅片或玻璃片。

氧化锌量子点标记抗体的荧光免疫测定方法

技术领域

本发明属于免疫测定技术领域，涉及一种利用氧化锌量子点进行免疫测定的方法。

背景技术

纳米结构氧化锌除了独特的半导体光电特性之外，还具有对生物安全无毒、能与蛋白质等生物分子以氢键或其他方式螯合并能很好的保持其生物活性、具有较高等电点等优异的性能，这使其在生物/化学传感器方面具有重要的应用。

目前，低浓度抗原的检测是临床医学和诊断学面临的重要课题。能成功检测低浓度的抗原，可以为相应的疾病早期诊断和治疗提供科学的依据。抗原浓度检测的传统手段是先进行病毒培养以提高疾病抗原的浓度，然后辅以光化学检测法或其他检测方法确定抗原浓度并推算出原始浓度。这种方法的局限性在于其周期长，精确度差等，可能延误疾病的发现和最佳治疗时机。利用纳米材料构建生物/化学传感器进行电化学检测抗原的方法因其检测限低、检测快速、选择性好等优点正逐渐受到越来越多的重视，但由于早期疾病期相应抗原的浓度极低，因此如何使低浓度的抗原产生明显的检测信号是这种方法亟待解决的重要问题之一。

发明内容

技术问题：本发明针对上述技术缺陷，提供一种氧化锌量子点标记抗体的荧光免疫测定方法，该方法利用氧化锌标记抗体检测低浓度抗原，对相应抗原的检测限低、选择性好、灵敏度高、稳定性好。

技术方案：在本发明中，利用简单的液相反应制备氧化锌量子点，得到了粒径均一，分散性好的氧化锌量子点，把量子点标记到抗体上。同时在自制的电解池中，在载片上固定化一层抗体，在特定浓度的待测抗原溶液中，使标记了氧化锌量子点的抗体和载片上的抗体均与抗原进行特异性结合，把标记在抗体上的氧化锌量子点连接到载

片上。然后测定载片上氧化锌量子点的荧光强度，建立氧化锌荧光强度与与抗原浓度之间的关系，从而确定待测抗原浓度。

利用液相反应制备氧化锌量子点，得到粒径均一、分散性好的氧化锌量子点，把该量子点标记到抗体上；同时在电解池中的载片上固定化一层抗体，在一系列已知浓度的待测抗原溶液中，使标记了氧化锌量子点的抗体和载片上的抗体均与抗原进行特异性结合，把标记在抗体上的氧化锌量子点连接到载片上；然后测定载片上氧化锌量子点的荧光强度，建立氧化锌荧光强度与与抗原浓度之间的标准对应关系，用实际样品检测时得到的氧化荧光强度与此标准对应关系相对照即可确定实际样品的抗原浓度。

本发明的技术方案具体为：

第一步：二水合乙酸锌与乙醇按 2 : 1 ~ 25 : 1 克/升混合，60~80℃回流 2.5~4 小时，溶解，冷至室温；

第二步：一水合氢氧化锂与乙醇按 0.6 : 1 ~ 6 : 1 克/升混合，超声溶解；

第三步：将第一步和第二步所得溶液混合，置于高压釜中，密封，使其能承受压力不小于 2×10^5 Pa，加热至 60~100℃，保持 0.5~3 小时，自然冷却至室温，取出，离心，用去离子水清洗三次，得到氧化锌量子点；

第四步：将氧化锌量子点分散到抗体溶液中，氧化锌量子点质量与抗体溶液体积比为 2.5 : 1 ~ 25 : 1 克/升，33~37℃震荡 1~3 小时，离心，用 pH6.8~7.5 磷酸盐缓冲溶液清洗三次；最终分散于 pH6.8~7.5 磷酸盐缓冲溶液中，不用时保存于冰箱保温层；

第五步：载片修饰，分两类载片，①金片，浸于等摩尔浓度的 5~15 毫摩尔/升的 11-巯基-十一烷酸 (MUA) 和 11-巯基-十一烷醇 (MU) 的乙醇溶液中，0~8℃保持 18 小时，取出用去离子水清洗；②二氧化硅片或玻璃片，浸于 5~15 毫摩尔/毫升 3-氨基-三乙氧基硅丙烷 (APTS) 的乙醇溶液中，35~45℃保持 2~5 小时，用去乙醇清洗，再浸于 5~15 毫摩尔/毫升戊二醛水溶液中 1~3 小时，取出，用去离子水清洗；

第六步：将第五步得到的载片安装到自制的电解池中，向电解池中注入抗体溶液，使注入的抗体溶液体积至少能全部浸没反应液腔内的载片面积且至多不溢出反应液腔，33~37℃保持 1~3 小时，用 pH6.8~7.5 磷酸盐缓冲溶液注入清洗；

第七步：向电解池中注入的抗原溶液，使注入的抗原溶液体积至少能全部浸没反应液腔内的载片面积且至多不溢出反应液腔，33~37℃保持 1~3 小时，用 pH6.8~7.5 磷

酸盐缓冲溶液注入清洗；

第八步：将第四步制得的标记了氧化锌量子点的抗体溶液注入电解池中，使注入的溶液体积至少能全部浸没反应液腔内的载片面积且至多不溢出反应液腔，33~37℃保持 1~3 小时，用 pH6.8~7.5 磷酸盐缓冲溶液注入清洗，取出载片，室温真空干燥 2 小时；

第九步：测定载片上氧化锌量子点的荧光强度；

第十步：改变第七步的抗原溶液浓度，重复第七、八、九步，测定一系列抗原浓度相对应的氧化锌量子点的荧光强度，建立荧光强度与抗原浓度之间的关系。

以上过程测得的氧化锌量子点荧光强度与抗原浓度之间的关系是本发明方法中的重要基础数据，为用此发明方法进行临床检测提供浓度判定的参考依据，对利用本发明方法进行快速、准确的临床检测有着极其重要的意义。

上述抗体与抗原为肝癌首选标志物 α -胎蛋白(AFP)及其对应抗体，肺癌结肠癌首选标志物(CEA)及其对应抗体，胰腺癌首选标志物(CA19-9)及其对应抗体，卵巢癌首选标志物(CA125)及其对应抗体。

上述载片为金片、二氧化硅片或玻璃片。

有益效果：与现有技术相比，本发明具有以下优点：

1. 本发明液相法制备氧化锌量子点设备和工艺简单，制得的氧化锌量子点粒径均一，条件可控，重复性好。
2. 本发明氧化锌量子点对抗体的标记过程与溶出过程在自主设计的电解池中进行，操作简单，条件温和，量子点与抗体的结合稳定牢固。非常有利于保持抗体的生物活性。
3. 本发明运用氧化锌量子点的荧光特性进行测试，测试快速方便，灵敏度高，选择性好。

附图说明

图 1 是本发明测定方法的流程图。

图 2 是本发明实例测定方法的流程图。

具体实施方式

(如图 2)

第一步：0.55 克二水合乙酸锌加 25 毫升乙醇，80℃回流 3 小时，乙酸锌溶解，冷至室温。

第二步：将 0.148 克一水合氢氧化锂加 25 毫升乙醇，超声 10 分钟溶解。

第三步：将第一步和第二步所得溶液混合，加乙醇稀释 10 倍，置于高压釜中，密封，使其能承受压力不小于 2×10^5 Pa，加热至 70℃，保持 1 小时，自然冷却至室温，取出，离心，用去离子水清洗三次，得到氧化锌量子点。

第四步：将 5 毫克氧化锌量子点分散到 100 微升 5 微克/毫升的 CA19-9 抗体溶液中，35℃震荡 1 小时，离心，用 pH7.4 磷酸盐缓冲溶液清洗三次。最终分散于 1 毫升 pH7.4 磷酸盐缓冲溶液中，不用时保存于冰箱保温层。

第五步：1×1 厘米二氧化硅片浸于 10 毫摩尔/毫升 APTS 的乙醇溶液中，40℃保持 3 小时，用乙醇清洗，再浸于 10 毫摩尔/毫升戊二醛水溶液中 40℃保持 3 小时，取出，用去离子水清洗。

第六步：将第五步得到的二氧化硅片安装到自制的电解池中，向电解池中注入 100 微升 5 微克/毫升的 CA19-9 抗体溶液，35℃保持 1 小时，用 pH7.4 磷酸盐缓冲溶液注入清洗。

第七步：向电解池中注入 50 微升 10U 的 CA19-9 抗原溶液，35℃保持 1 小时，用 pH7.4 磷酸盐缓冲溶液注入清洗。

第八步：取 100 微升第四步制得的标记了氧化锌量子点的 CA19-9 抗体溶液注入电解池中，35℃保持 1 小时，用 pH7.4 磷酸盐缓冲溶液注入清洗，取出二氧化硅片，常温真空干燥 2 小时。

第九步：测定二氧化硅片上氧化锌量子点的荧光强度。

第十步：改变第七步的抗原溶液浓度，每一次增加 20U，重复第七、八、九步，测定一系列抗原浓度相对应的氧化锌量子点的荧光强度，建立荧光强度与抗原浓度之间的关系。绘制量子点荧光强度与抗原浓度之间的关系曲线，为样品实测提供标准依据。

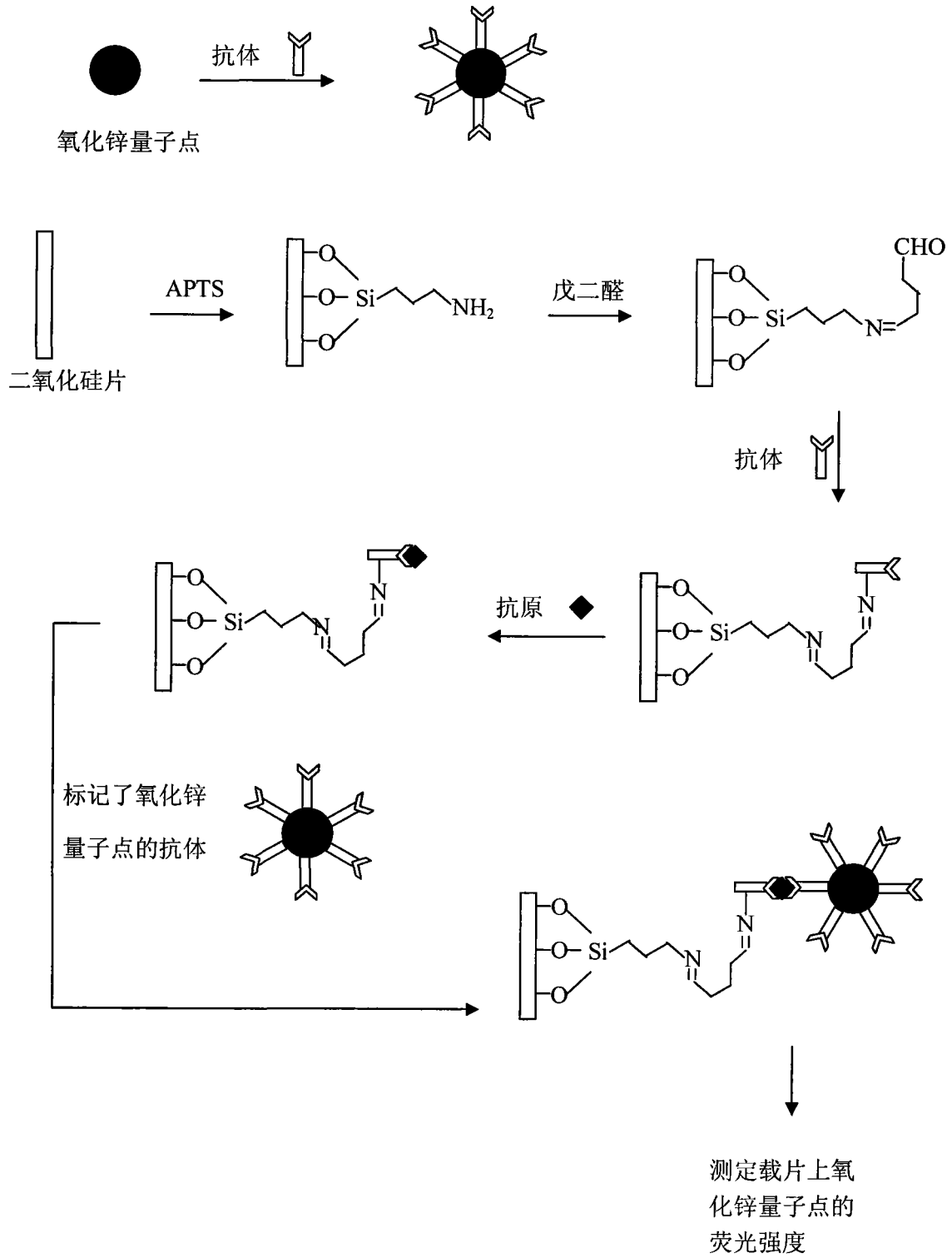


图 1

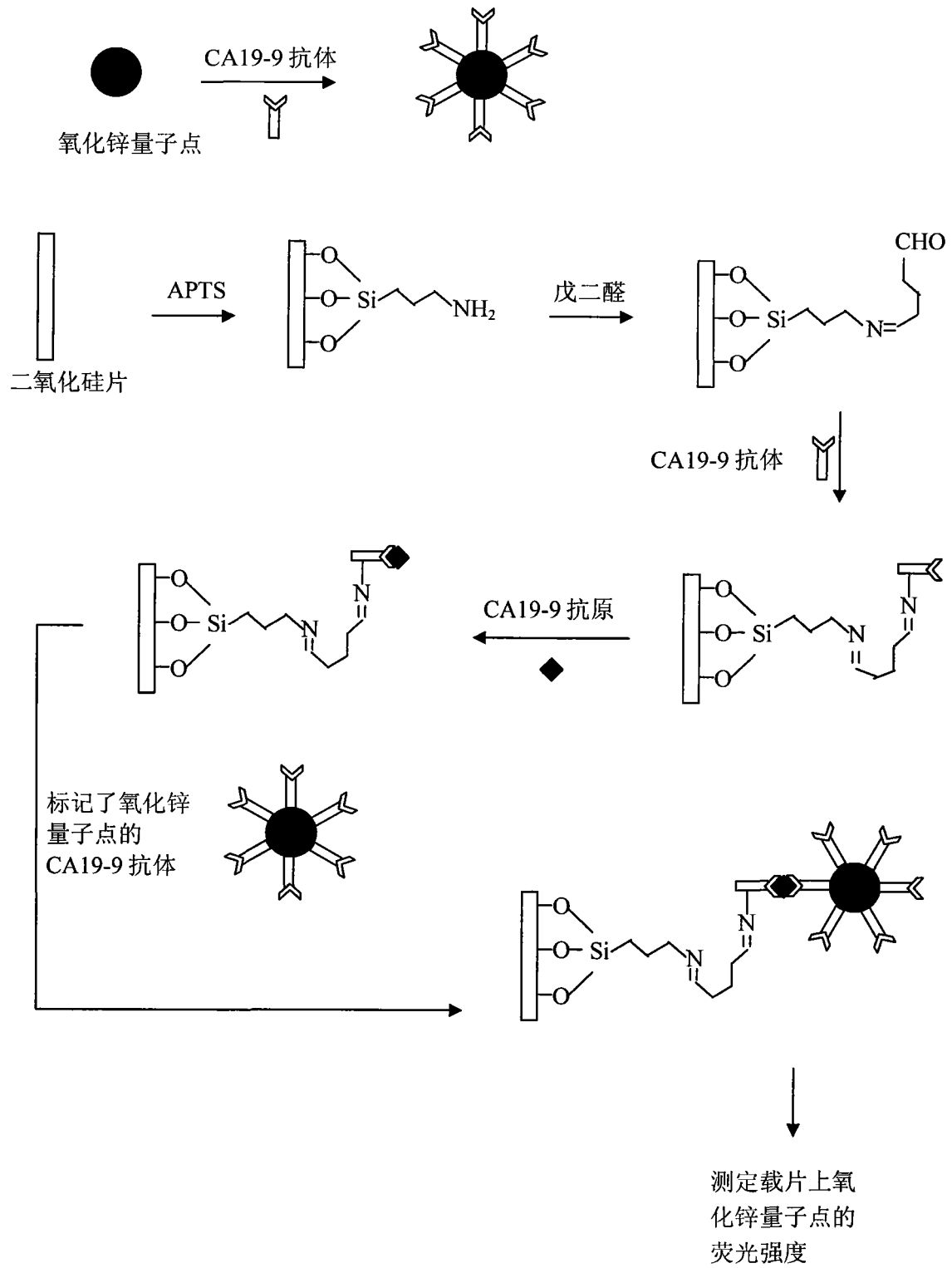


图 2

专利名称(译)	氧化锌量子点标记抗体的荧光免疫测定方法		
公开(公告)号	CN101587071A	公开(公告)日	2009-11-25
申请号	CN200910032135.5	申请日	2009-07-01
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	南通市京山锦纶有限公司 东南大学		
[标]发明人	谷保祥 徐春祥 刘松琴 王明亮 朱光平		
发明人	谷保祥 徐春祥 刘松琴 王明亮 朱光平		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/53 G01N33/552 G01N1/28		
代理人(译)	叶连生		
其他公开文献	CN101587071B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

氧化锌量子点标记抗体的荧光免疫测定方法是将用氧化锌量子点标记的抗体与固定在载片上的抗体通过抗原的特异性反应结合在一起，利用氧化锌量子点的荧光特性测定被固定于载片上的氧化锌的荧光强度，建立氧化锌量子点的荧光强度与抗原浓度之间的关系的标准曲线，从而定量的确定实测样品抗原浓度的方法。本发明方法制备的氧化锌量子点粒径均一，分散性好，与抗体结合稳定，检测结果稳定可靠，重现性好，为医学临床早期检测疾病抗原提供了一条快速可靠的检测途径。在临床早期诊断方法应用有着巨大的应用潜力。

