



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105353136 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 24

(21) 申请号 201510860833. X

(22) 申请日 2015. 12. 01

(71) 申请人 北京健平九星生物医药科技有限公司

地址 100085 北京市海淀区开拓路 5 号中关村生物医药园 A 区 2 层 204 室

(72) 发明人 邹检平

(74) 专利代理机构 北京中企鸿阳知识产权代理
事务所(普通合伙) 11487

代理人 刘葛 郭鸿雁

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书2页 说明书10页

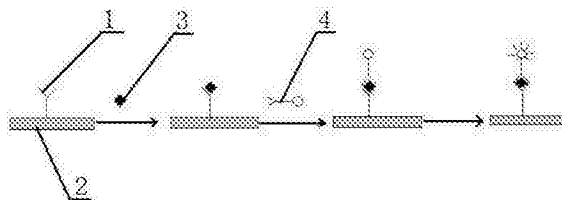
序列表1页 附图4页

(54) 发明名称

基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的
试剂盒及其使用方法

(57) 摘要

本发明基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒及其使用方法,涉及一种利用生物特有的结合方法的测定试剂盒及其使用方法,特别是涉及一种用于检测人血清中 VEGF 浓度的利用生物特有的结合方法的测定试剂盒及其使用方法。其目的是为了提供一种操作简单、灵敏度高、特异性强的基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒及其使用方法。本发明的试剂盒包括 VEGF 受体和量子点 CdSe 标记的多抗;本发明的使用方法,包括以下步骤:受体包被;加样;加量子点 CdSe 标记的多抗;检测。本发明的试剂盒具有特异性好、灵敏度高、准确、稳定方便的特点。本发明用于体外免疫检测领域。



1. 一种基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒,其特征在于:包括 VEGF 受体和量子点 CdSe 标记的多抗;

其中,所述 VEGF 受体是 VEGFR-1mRNA 的部分序列利用宿主细胞表达系统制备得到;

所述量子点 CdSe 标记的多抗是利用抗体上的氧化醛基与带有酰肼基团的量子点 CdSe 直接位点定向性结合制备得到;

所述多抗为利用纯化浓缩的 VEGF 作为免疫原,免疫家兔得到的。

2. 根据权利要求 1 所述的基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒,其特征在于:所述 VEGFR-1mRNA 的部分序列为从人 VEGFR-1mRNA 序列全长中选取的人 VEGFR-1siRNA 靶向序列,如 SEQ ID NO. 1 所示;

所述 VEGF 受体的制备中,引物 1 如 SEQ ID NO. 2 所示,引物 2 如 SEQ ID NO. 2 所示;

所述宿主细胞为 Sf9 昆虫细胞。

3. 根据权利要求 1 所述的基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒,其特征在于:所述多抗按以下步骤制备:先用卡介苗注射刺激动物后,用 VEGF 进行两次免疫;然后采集家兔全血,离心取血清;利用正辛酸-硫酸铵沉淀法和 DEAE 离子交换树脂纯化,即制得多抗。

4. 根据权利要求 1 或 3 所述的基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒,其特征在于,所述量子点 CdSe 标记的多抗的制备步骤如下:

一、向 1mL 活化缓冲液中,加入 12.5μL 的纳米量子点 CdSe 溶液、4μL 5mM 的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐和 5.1μL 己二酸二酰肼溶液,充分混合后,室温反应 4h;

二、将步骤一中的混合液体装入透析袋中,在 PBS 中透析,除去过剩的 ADH 和 EDC,即制得带有酰肼基团的量子点 CdSe;

三、将抗体溶解于 0.01M 的磷酸钠溶液中,调节 NaCl 浓度为 0.15M, pH 值为 7.2,抗体终浓度为 10mg/ml;

四、制备 0.1M 的高碘酸钠水溶液,避光保存;

五、将步骤三制得的抗体溶液稀释至 1.5mg/mL,取 1mL 稀释后的抗体溶液迅速加入 100μL 步骤四制得的高碘酸钠溶液,混匀,并避光室温反应 30 分钟;

六、将步骤五中的混合液装入透析袋中,在 PBS 中透析,即制得高碘酸氧化的抗体;

七、将步骤二制得的带有酰肼基团的量子点 CdSe 和步骤六制得的高碘酸氧化的抗体按摩尔比为 1:30 混合,室温反应 2h;然后将反应溶液浓缩十倍;利用 Superdex 200 凝胶过滤分离得到量子点 CdSe-抗体结合物,即为量子点 CdSe 标记的多抗;

其中,所述步骤一中纳米量子点 CdSe 溶液为羧酸化的 CdSe 溶液,溶液中 CdSe 的浓度为 8μM;

所述步骤一中己二酸二酰肼溶液为己二酸二酰肼溶解于 PBS 中,浓度为 3.2μg/μl;

所述步骤二中透析袋的截留分子量为 50kDa。

5. 根据权利要求 1 所述的基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒,其特征在于:还包括标准品、封闭保护液、洗涤液、样品稀释液、终止液和酶联反应板。

6. 一种基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒的使用方法,其特征在于,包括以下步骤:

一、受体包被 :以酶联反应板为固体支持物,将 VEGF 受体包被于酶联反应板上,并用封闭液进行封闭 ;

二、加样 :将待测样品中的 VEGF 与酶联反应板上的 VEGF 受体进行充分接触和结合后,洗板,除去未结合的 VEGF ;

三、加量子点 CdSe 标记的多抗 :将量子点 CdSe 标记的多抗加入加样后的酶联反应板中,保温一段时间使抗原抗体充分结合 ;洗板,除去未结合的量子点 CdSe 标记的多抗 ;

四、检测 :利用荧光酶标仪检测荧光强度,并根据标准品的荧光强度计算样品中 VEGF 的浓度。

7. 根据权利要求 6 所述的基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒的使用方法,其特征在于,所述受体包被的操作步骤如下 :将受体按 200uL/ 孔加入到反应孔中,4℃ 放置保存 20h ;然后用 PBST 洗板一次,200uL/ 孔加入封闭保护液进行封闭,避光室温放置,风干后即制得包被受体的酶联反应板。

8. 根据权利要求 6 所述的基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒的使用方法,其特征在于,所述加样的操作步骤如下 :以 VEGF 冻干品为标准品,分别用样品稀释液稀释至浓度为 :60. 4ng/mL、30. 2ng/mL、15. 1ng/mL、7. 55ng/mL、3. 77ng/mL、1. 89ng/mL ;以样品稀释液为阴性对照 ;将待测样品、标准品稀释液及样品稀释液均以 200uL/ 孔加入到酶联反应板的反应孔中,37℃ 温育 1h ;用 PBST 洗板五次。

9. 根据权利要求 6 所述的基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒的使用方法,其特征在于,所述加量子点 CdSe 标记的多抗的操作步骤如下 :将 CdSe 标记的多抗按 200uL/ 孔加入到反应孔内,37℃ 温育 30min ;用 PBST 洗板五次。

10. 根据权利要求 6 所述的基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒的使用方法,其特征在于 :所述检测中激发波长为 450nm,发射波长为 530nm。

基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用生物特有的结合方法的测定试剂盒及其使用方法,特别是涉及一种用于检测人血清中 VEGF 浓度的利用生物特有的结合方法的测定试剂盒及其使用方法。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤是威胁全球包括我国人民健康生活的一大主要疾病。卫生部资料显示,2008 年癌症首次成为我国城镇和乡村死亡原因的首位。早发现、早诊断、早治疗是我国肿瘤的防治方针,为更好的贯彻该方针,科学界一直在努力寻找新的肿瘤标志物,包括广谱肿瘤标志物和组织器官特异性肿瘤标志物。其中,VEGF 就是近年来肿瘤学界较为公认的最具应用前景的肿瘤筛查、辅助诊断、预后和疗效评价的标志物。

[0003] 肿瘤的生长和转移依赖于新血管的生成,而肿瘤新血管的生成是在肿瘤血管生成刺激因子和抑制因子的共同调控下进行的。血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 是肿瘤血管新生中最重要的刺激因子。1971 年由 Folkman 首次提出,快速生长的肿瘤组织如果没有新血管生成 (Angiogenesis) 以供应营养和养分,其直径不会超过 $1-3\text{mm}^3$ 。后来由其本人总结了 Folkman 理论,它揭示了肿瘤的生长和转移依赖与血管生成 (Angiogenesis) 的原理:一方面,肿瘤在原位生长时必须依赖血管生成;另一方面,肿瘤的转移同样需要血管生成来提供足够的氧气和营养成分 (Folkman J. Natl Cancer Inst. 1990 ;82:4-6)。1994 年, Kondo 等人首次报道了癌症病人血清 VEGF 水平高于正常对照组,并提出 VEGF 可能是肿瘤的一种广谱血液学标志物 (Kondo S et al. Biochim Biophys Acta, 1994, 1221 (2) :211-214), 目前已得到科学界的认同。

[0004] 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是一个分子量为 45kDa 的高度糖基化的碱性蛋白,是由两条相同的肽链组成的同型二聚体,等电点为 8.5,具有很强的促进血管内皮细胞 (Vascular endothelial cells) 分裂繁殖以及增强毛细血管通透性的能力,可由肾脏细胞、肌肉细胞等正常组织细胞产生和分泌,也可由多种肿瘤细胞产生。它最早是在牛垂体滤泡星状细胞体外培养液中纯化出来的,由于能够有效地刺激内皮细胞有丝分裂和极强地诱导血管生成而得名 (Ferrara N. European Journal of Cancer, 1996, 32 (14) :2413-2422)。

[0005] 人类 VEGF 基因定位于人类基因组 6p21.3 位,全长 14Kb,由 8 个外显子和 7 个内含子构成,通过基因转录的 mRNA 不同剪接方式 (Alternative splicing), 编码 4 种主要异构体,它们为 VEGF121、VEGF165、VEGF189 和 VEGF206。VEGF121、VEGF145 和 VEGF165 为分泌型血管内皮生长因子,而 VEGF183、VEGF189 和 VEGF206 为基质结合型蛋白。血液中检测到的主要是 VEGF165 和 VEGF121,而 VEGF206、VEGF189 的含量很低。VEGF165 是最主要的异构体,也是生理活性最强的 VEGF 异构体 (Houck KA et al. Mol Endocrinol. 1991 ;5:1806-1814)。

[0006] VEGF 受体主要有 VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk/KDR) 和 VEGFR-3 (Flt-3) 三

种。目前已知, VEGFR-2 是 VEGF 发挥生物学功能的主要受体, 亦即 VEGF 家族的大部分成员均与 VEGFR-2 结合发挥其血管生成的生物学功能。这三种受体主要分布于血管内皮细胞表面, 由含 7 个免疫球蛋白样结构的细胞外区、膜区及酪氨酸激酶区组成, 均是跨膜受体, 属于 RTK (receptor tyrosine kinase) III 型, 其共同特点是催化域内有酪氨酸激酶插入区, 该酪氨酸激酶的活性通过受体和配体结合而激活, 由受体磷酸化而引起细胞内相关反应, 在细胞的生长和分化中其重要作用。研究表明, VEGF 受体在体外与 VEGF 有高度的亲和力和 (Kendall et al. PNAS USA, 1993, 90:10705-9)。

[0007] 量子点由于粒径很小, 电子和空穴被量子点限域, 连续能带变为具有分子结构的分立能级结构。因此光学行为与一些大分子很相似, 可以发射荧光。与传统的荧光染料相比, 量子点有很多优点: 1) 光稳定性好, 无机微晶能够承受多次的激发和光发射, 而有机分子却会分解, 持久的稳定性可以让研究人员有更长的观察时间。2) 激发光谱范围宽、发射光谱范围窄而对称, 从紫外线到红光, 量子点具有广泛的激发光谱范围, 可以同时使用不同光谱特性的量子点, 而发射光谱不出现重叠。3) 量子点具有丰富的颜色。4) Stokes 位移大, 背景噪声小。因此, 纳米量子点作为一种新型的荧光标记材料, 在生物领域中的应用越来越受到了广泛的关注, 特别是在临床诊断方法取得了长足的进展。

[0008] 现有技术中 VEGF 的检测方法均为采用单克隆抗体包被与抗体标记做夹心法实验, 检测范围较窄, 检测 VEGF 浓度较低, 均为 pg 级, 仅适用于人体血清学检验。

发明内容

[0009] 本发明要解决的技术问题是提供一种操作简单、灵敏度高、特异性强的基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒及其使用方法, 本发明的试剂盒检测浓度高, 可达 ng 级, 适用于腹水收集、细胞培养中高浓度 VEGF 检测。

[0010] 本发明基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒, 其特征在于: 包括 VEGF 受体和量子点 CdSe 标记的多抗;

[0011] 其中, 所述 VEGF 受体是 VEGFR-1 mRNA 的部分序列利用宿主细胞表达系统制备得到;

[0012] 所述量子点 CdSe 标记的多抗是利用抗体上的氧化醛基与带有酰肼基团的量子点 CdSe 直接位点定向性结合制备得到;

[0013] 所述多抗为利用纯化浓缩的 VEGF 作为免疫原, 免疫家兔得到的。

[0014] 进一步, 本发明基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒, 所述 VEGFR-1 mRNA 的部分序列为从 VEGFR-1 mRNA 序列全长中选取的 VEGFR-1 siRNA 靶序列, 如 SEQ ID NO. 1 所示;

[0015] 所述 VEGF 受体的制备中, 引物 1 如 SEQ ID NO. 2 所示, 引物 2 如 SEQ ID NO. 2 所示;

[0016] 所述宿主细胞为 fF9 昆虫细胞。

[0017] 进一步, 本发明基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒, 所述多抗按以下步骤制备: 先用卡介苗注射刺激动物后, 用 VEGF 进行两次免疫; 然后采集家兔全血, 离心取血清; 利用正辛酸-硫酸铵沉淀法和 DEAE 离子交换树脂纯化, 即制得多抗。

[0018] 进一步, 本发明基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒, 所述量子点

CdSe 标记的多抗的制备步骤如下：

[0019] 一、向 1mL 活化缓冲液中，加入 12.5 μ L 的纳米量子点 CdSe 溶液、4 μ L 5mM 的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 5.1 μ L 己二酸二酰肼 (ADH) 溶液，充分混合后，室温反应 4h；

[0020] 二、将步骤一中的混合液体装入透析袋中，在 PBS 中透析，除去过剩的 ADH 和 EDC，即制得带有酰肼基团的量子点 CdSe；

[0021] 三、将抗体溶解于 0.01M 的磷酸钠溶液中，调节 NaCl 浓度为 0.15M，pH 值为 7.2，抗体终浓度为 10mg/ml；

[0022] 四、制备 0.1M 的高碘酸钠水溶液，避光保存；

[0023] 五、将步骤三制得的抗体溶液稀释至 1.5mg/mL，取 1mL 稀释后的抗体溶液迅速加入 100 μ L 步骤四制得的高碘酸钠溶液，混匀，并避光室温反应 30 分钟；

[0024] 六、将步骤五中的混合液装入透析袋中，在 PBS 中透析，无机盐等小分子物质通过半透膜扩散到缓冲液中，以获得较为纯化的氧化抗体，即制得高碘酸氧化的抗体；

[0025] 七、将步骤二制得的带有酰肼基团的量子点 CdSe 和步骤六制得的高碘酸氧化的抗体按摩尔比为 1:30 混合，室温反应 2h；然后将反应溶液浓缩 10 倍（得到 20 μ L）；利用 Superdex 200 凝胶过滤分离得到量子点 CdSe-抗体结合物 (QD-Ab conjugates)，即为量子点 CdSe 标记的多抗；

[0026] 其中，所述步骤一中纳米量子点 CdSe 溶液为羧酸化的 CdSe 溶液，加入时溶液中 CdSe 的浓度为 8 μ M，反应终浓度为 100nM；

[0027] 所述步骤一中己二酸二酰肼溶液为己二酸二酰肼溶解于 PBS 中，浓度为 3.2 μ g/ μ L；

[0028] 所述步骤二中透析袋的截留分子量为 50kDa。

[0029] 进一步，本发明基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒，还包括标准品、封闭保护液、洗涤液、样品稀释液、终止液和酶联反应板。

[0030] 本发明基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒的使用方法，包括以下步骤：

[0031] 一、受体包被：以酶联反应板为固体支持物，将 VEGF 受体包被于酶联反应板上，并用封闭液进行封闭；

[0032] 二、加样：将待测样品中的 VEGF 与酶联反应板上的 VEGF 受体进行充分接触和结合后，洗板，除去未结合的 VEGF；

[0033] 三、加量子点 CdSe 标记的多抗：将量子点 CdSe 标记的多抗加入加样后的酶联反应板中，保温一段时间使抗原抗体充分结合；洗板，除去未结合的量子点 CdSe 标记的多抗；

[0034] 四、检测：利用荧光酶标仪检测荧光强度，并根据标准品的荧光强度计算样品中 VEGF 的浓度。

[0035] 进一步，本发明基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒的使用方法，所述受体包被的操作步骤如下：根据预实验确定的受体包被浓度（根据棋盘滴定法确定抗体浓度），将受体用包被液稀释至 2 μ g/mL；200 μ L/孔加入到反应孔中，4 $^{\circ}$ C 放置保存 20h；然后用 PBST 洗板一次，200 μ L/孔加入封闭保护液进行封闭，避光室温放置，风干后即制得包被受体的酶联反应板。

[0036] 进一步,本发明基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒的使用方法,所述加样的操作步骤如下:以 VEGF 冻干品为标准品,分别用样品稀释液稀释至浓度为:60.4ng/mL、30.2ng/mL、15.1ng/mL、7.55ng/mL、3.77ng/mL、1.89ng/mL;以样品稀释液为阴性对照;将待测样品、标准品稀释液及样品稀释液均以 200uL/孔加入到酶联反应板的反应孔中,37℃温育 1h,VEGF 与包被单抗结合形成抗体-抗原复合物;用 PBST 洗板五次。

[0037] 进一步,本发明基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒的使用方法,所述加量子点 CdSe 标记的多抗的操作步骤如下:根据预实验确定的量子点 CdSe 标记的多抗的稀释度进行稀释;200uL/孔加入到反应孔内,37℃温育 30min,量子点标记的多抗与 VEGF 结合,形成抗体-抗原-抗体夹心复合物;用 PBST 洗板五次。

[0038] 进一步,本发明基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒的使用方法,所述检测中激发波长为 450nm,发射波长为 530nm

[0039] 本发明基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒及其使用方法与现有技术不同之处在于:

[0040] 1、本发明的基于荧光量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒,是以荧光量子点 CdSe 作为抗体标记物,根据双抗体夹心免疫吸附测定原理,定量检测人血清中 VEGF 的试剂盒。本发明的试剂盒具有特异性好、灵敏度高、准确、稳定、方便的优点。

[0041] 2、本发明的试剂盒检测浓度高,可达 ng 级,因此检测结果更为准确,适用于腹水收集、细胞培养中高浓度 VEGF 检测。

[0042] 下面结合附图对本发明的基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒及其使用方法作进一步说明。

附图说明

[0043] 图 1 为本发明的量子点双抗体夹心荧光免疫吸附测定原理示意图;

[0044] 图 2 为制备 CdSe 量子点的反应过程图;

[0045] 图 3 为多克隆抗体的量子点标记原理示意图;

[0046] 图 4 为量子点粒径分布图;

[0047] 图 5 为羧基 CdSe 量子点的紫外-可见吸收光谱图;

[0048] 图 6 为 CdSe 量子点的荧光光谱图;

[0049] 图 7 为 CdSe 量子点与异硫氰酸荧光素的荧光稳定性对比图;

[0050] 图 8 为实施例 2 中 VEGF 的标准曲线。

具体实施方式

[0051] 实施例 1

[0052] 本实施例基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒按以下步骤制备:

[0053] 一、VEGF 受体的制备与纯化

[0054] 1) 转移载体 pFastBac-1 的构建

[0055] 首先在美国国立生物技术信息中心 NCBI 数据库中获取人 VEGFR-1 mRNA 的序列全长(序列号:NM_002019),从中选取人 VEGFR-1 siRNA 靶向序列,M1-H687。VEGFR-1 siRNA 靶序列:ATGGTCAGCTACTGGGACACC,引物:

[0056] 正义链序列为 5' -AUGGUCAGCUACUGGGACACC-3' ;

[0057] 反义链序列为 5' -CAAAGUAAUGUAAAACAUA-3' ;

[0058] PCR 反应条件 :94℃变性 40s, 52℃退火 1min, 72℃延伸 2min, 30 个循环后 72℃保温 10min。

[0059] 反应体系 :

[0060]

ddH ₂ O	20.0ul
10× Buffer	2.5ul
dNTP (10mM)	0.5ul
3' primer(100ng/ul)	0.5ul
5' primer (100ng/ul)	0.5ul
Taq 酶 (5U/ul)	0.5ul
模板 DNA	0.5ul
总体积	25ul

[0061] 凝胶电泳回收 PCR 扩增的片段, 克隆到载体 pMT18-T 中, 转化大肠杆菌 DH5a, 提取重组质粒进行酶切鉴定, 并命名为 pMT18-1。

[0062] 利用 Bam HI、Hind III 双酶切 pMT18-1, 凝胶回收得到的 VEGF 受体基因。同时用 Bam HI、Hind III 双酶切 pFastBac-HT, 回收 4.7kb 片段, 将 VEGF 受体基因与 4.7kb 片段连接, 构建得到转移载体 pFastBac-1, 并经酶切检验和部分序列测序确认。

[0063] 2) 重组杆状病毒的获得

[0064] 利用 Bac-to-Bac 系统进行病毒构建, 根据 Life Technologies 公司提供的实验指导手册进行。

[0065] 将 pFastBac-1 质粒 DNA 转化大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞, 在含有合适的抗生素和 X-gal 的培养基上培养, 选择白色的转化子, 提取其中的重组 Bacmid DNA, 用 PCR 验证转移载体上的 VEGF 受体基因已经转座到 Bacmid DNA 中。重组 Bacmid DNA 转染 Sf9 细胞, 72h 后收获培养液上清, 得到重组的杆状病毒作为原代病毒液, 4℃保存备用。感染 Sf9 细胞扩增病毒。

[0066] 3) Sf9 细胞的悬浮培养与 VEGF 受体表达

[0067] 在 1L 三角瓶中加入 30ml SFX 昆虫培养基和昆虫细胞, 细胞密度为 1×10^5 个 /ml。培养 3-4 天细胞密度高于 30×10^5 个 /ml 后, 接入上述扩增的病毒上清液, MOI 值为 4。培养 48h 后, 离心收集细胞上清。

[0068] 4) 浓缩与透析: 将细胞上清用 10k 膜包浓缩至小于 50ml, 将浓缩液在 0.02M PBS (0.9% NaCl, pH7.3-7.4) 中透析过夜。

[0069] 5) VEGF 受体 Ni 柱纯化

[0070] 装柱: 将层析柱用去离子水冲洗干净, 连接好管子后固定柱子; 取出填料, 根据需要用移液器取出 3-5ml 的填料进行装柱, 防止产生气泡; 用去离子水冲洗填料 5 个柱体积后备用。

[0071] 挂镍 :50mM NiSO₄ 溶液洗 5 个柱体积,去离子水冲洗至中性。

[0072] 柱子平衡与上样 :亲和平衡液洗柱 (0.02M PBS, 1.36g/L 咪唑, pH7.3-7.4) 后上样,流速为 1ml/min。用紫外检测仪和记录仪记录蛋白峰。

[0073] 平衡、冲洗和洗脱 :亲和平衡液洗柱后,用亲和冲洗液 (0.02M PBS, 3.4g/L 咪唑, pH7.3-7.4) 洗柱 ;再用亲和平衡液洗柱后,用亲和洗脱液 (0.02M PBS, 34.05g/L 咪唑, pH7.3-7.4) 洗柱,收集洗脱液。

[0074] Ni 柱处理与回收 :亲和碱 (1M NaOH, 0.5NaCl) 洗柱后,水洗至中性,EDTA 卸落缓冲液 (0.02M PBS, 0.5M NaCl, 0.05M EDTA) 洗柱,最后,用去离子水洗至中性。用 20%乙醇洗柱后,将填料保存于 20%乙醇中于 4℃ 保存。

[0075] 6) 用 SDS-PAGE 电泳检验所纯化蛋白纯度,ELISA 检测蛋白效价。

[0076] 二、VEGF 多克隆抗体的制备和纯化

[0077] 用家兔作为免疫动物,先用 5-10mg 卡介苗注射刺激动物。一周后,将 VEGF 蛋白制成福氏安全佐剂,采用皮下注射进行第一次免疫。2 周后,进行第二次免疫。2 周后,抽血测效价,若效价偏低,则进行加强免疫。采集家兔全血,离心取血清。利用正辛酸-硫酸铵沉淀法和 DEAE 离子交换纯化,所得抗体溶液浓度达 98% 以上。

[0078] 三、羧基化量子点 CdSe 的制备

[0079] 量子点制备 :将一定量的 NaBH₄ 加入装有少量水的小圆底烧瓶中,振荡小瓶,完全溶解后加入 Se 粉。磁力振荡,于 4℃ 恒温反应 2h 制备 NaHSe。称取 2.2835g CdCl₂·2.5H₂O 固体溶于适量水中,定溶至 100mL,配得 0.1mol/L CdCl₂ 标准溶液。往 200mL 圆底烧瓶中加入 60mL 去离子水,通氮气除氧后加入 100mL 的 CdCl₂ 标准溶液,再加入 1.68mL 的巯基乙酸,用氨水、氢氧化钠 (1mol/L) 与稀盐酸 (1mol/L) 调节反应体系的 pH 值,继续通入氮气保护,加入 24mL 的 NaHSe 溶液,加热回流 2h,得到 CdSe 量子点溶液。反应过程如图 2 所示。

[0080] 粒径测定 :采用激光粒度仪测定纳米 CdSe 量子点的粒径。具体步骤是 :将纳米 CdSe 量子点加入装有去离子水的杯中,混合均匀,超声 10min 后进行检测,所得结果为分散前样品的粒粒径分布,结果见图 4。

[0081] 由图 4 可知,回流反应 2h 时,制备的羧基 CdSe 量子点的粒径分布在 2.88 ~ 10.00nm 范围内,其中 80% 以上的量子点粒径约为 5.75nm 且分布较窄,能均匀分散于水中。CdSe 量子点表面含羧基,具有强亲水性,使纳米粒子在水中得以均匀分散,说明 CdSe 量子点表面含羧基,具有强亲水性,使纳米粒子在水中得以均匀分散,激发后产生绿色的荧光。

[0082] 紫外和荧光光谱测定 :采用紫外分光光度计测定 CdSe 量子点的最大吸收光谱,确定激发波长 ;采用荧光分光光度计测定 CdSe 量子点的发射光谱和荧光强度,结果如图 5、图 6 所示。

[0083] 图 5 为以巯基乙酸为稳定剂在 pH = 11、90℃ 条件下回流反应 2h 后合成的 CdSe 量子点的紫外吸收光谱,从图 5 中可以看出, CdSe 量子点的吸收波长范围很宽,在 350-480nm 都有不同程度的吸收,其中在 400nm 与 460nm 处有跃迁吸收峰。因此,制备的 CdSe 量子点在 350-480nm 范围内保持相同的激发波长,通过改变纳米粒子的尺寸便可以得到不同的发射波长,都可以使其发射,产生荧光。

[0084] 图 6 为以巯基乙醇为稳定剂在 pH = 11、90℃ 条件下回流反应 2 小时制备的具有

不同发射波长、不同颜色的 CdSe 量子点的荧光光谱。由图 6 可知,当回流反应 2h 时, CdSe 量子点的荧光发射光谱为 518.1nm。

[0085] 以上结果表明 CdSe 量子点的激发波长范围非常宽,且有一定的峰位置,保持相同的激发波长,改变纳米粒子的尺寸便可以得到不同发射波长的纳米荧光物质,提高检测信号的灵敏度。

[0086] 荧光稳定性比较:取相同量的 CdSe 水溶性量子点与有机荧光染料异硫氰酸荧光素 (FITC ;Ex = 494nm, Em = 525nm),滴到载玻片上,在荧光显微镜下观察不同时间量子点与有机荧光染料的荧光强度与持续时间,比较它们的荧光稳定性,结果见图 7。

[0087] 从图 7 可以看出,激发后随着时间的延长,有机染料异硫氰酸荧光素的信号会很快暗下来,在激发 5min 后,荧光强度减弱,10min 后基本消失;而 CdSe 量子点激发后荧光强度的变化较小,在 20min 后荧光强度只有少量减少。激发后 CdSe 量子点的荧光强度比异硫氰酸荧光素高。由此可见,CdSe 量子点可持续发光,其荧光寿命比有机染料的寿命长,光稳定性高,并且不易被光分解和漂白,是有机荧光染料一种很好的替代品。

[0088] 四、VEGF 多克隆抗体的量子点 CdSe 标记

[0089] 向 1ml 活化缓冲液中,加入 12.5ul 的纳米量子点 CdSe 溶液(上述制备的羧酸化的 CdSe 溶液,8uM,反应终浓度为 100nM),4ul 5mM 的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺 盐酸盐 (EDC) 和 5.1ul 己二酸二酰肼 (ADH) (溶解于 PBS 中,3.2ug/ul),充分混合后,室温反应 4h;反应结束后,在 2L PBS 中透析过夜,除去过剩的 ADH 和 EDC(透析袋截留分子量为 50kDa);

[0090] 将抗体溶解于 0.01M 的磷酸钠溶液中,0.15M NaCl, pH 7.2(抗体终浓度为 10mg/ml);制备 0.1M 的高碘酸钠水溶液,避光保存;将上述抗体溶液稀释至 1.5mg/ml,取 1ml 迅速加入 100ul 上述高碘酸钠溶液,混匀,并避光室温反应 30 分钟;反应结束后,在 PBS 中透析过夜;

[0091] 将上述带有酰肼基团的量子点 CdSe 和高碘酸氧化的抗体按 1:30 的摩尔浓度比例混合,室温反应 2h;反应结束后,将反应溶液浓缩至 20ul;利用 Superdex 200 凝胶过滤分离得到量子点 CdSe-抗体结合物 (QD-Ab conjugates)。

[0092] 实施例 2

[0093] 本实施例的基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒的使用方法,按以下步骤进行:

[0094] 一、受体包被:根据预实验确定的受体包被浓度(根据棋盘滴定法确定抗体浓度),将受体用包被液稀释至 2ug/mL;200uL/孔加入到反应孔中,4℃放置保存 20h。用 PBST 洗板一次,200uL/孔加入封闭保护液进行封闭,避光室温放置 3h,风干后用于样品检测;

[0095] 二、加样:以 VEGF 冻干品为标准品,用样品稀释液进行梯度稀释为:60.4ng/mL、30.2ng/mL、15.1ng/mL、7.55ng/mL、3.77ng/mL、1.89ng/mL;以样品稀释液为阴性对照;将待检样品、标准品稀释液及样品稀释液 200uL/孔加入到反应孔中,37℃温育 1h, VEGF 与包被单抗结合形成抗体-抗原复合物;用 PBST 洗板五次;

[0096] 三、加量子点 CdSe 标记的多抗:根据预实验确定的标记抗体的稀释度为 0.1%,将抗体稀释后按 200uL/孔加入到洗好的反应孔内,37℃温育 30min,标记抗体与 VEGF 结合,形成抗体-抗原-抗体夹心复合物;用 PBST 洗板五次;

[0097] 四、检测：利用荧光酶标仪检测荧光强度，激发波长：450nm；发射波长：530nm，并根据标准品的荧光强度计算样品中 VEGF 的浓度。

[0098] 五、分析性能和稳定性试验

[0099] 采用建立的双抗体夹心 QDs 方法检测 VEGF 标准品，计算不同浓度范围标准曲线线性相关系数 r ，在 $r \geq 0.9900$ 情况下浓度范围最大的一组即为最佳浓度范围。

[0100] 1、外观：微孔板完整、清洁，无异物污染，液体组分应澄清，无沉淀或絮状物。

[0101] 2、最低检出限：VEGF 标准品的最低检出限 $\geq 1.53\text{ng/ml}$ 。

[0102] 3、精密性：批内精密性 $\text{CV}(\%)$ 应不高于 10% ($n \geq 10$)，批间精密性 $\text{CV}(\%)$ 应不高于 15% ($n \geq 10$)。

[0103] 4、准确性：回收率大于 $90\% \sim 110\%$ 之间。

[0104] 5、线性范围：在 $(1.89 \sim 120.80)\text{ng/ml}$ 线性范围内，依据校准品各测量荧光值与浓度拟合双对数直线回归方程， $r \geq 0.9900$ 。

[0105] 6、稳定性： $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 储存，有效期为 12 个月。

[0106] 7、特异性：加入 100ng/ml 胎盘生长因子 (PLGF-1、PLGF-2) 和 100ng/ml 表皮生长因子 (EGF)，测定结果 $\leq 1.89\text{ng/ml}$ 。

[0107] 六、应用示例：

[0108] 1、实验资料

[0109] 1.1 选取由实验室通过昆虫杆状病毒系统表达并利用亲和镍柱纯化得到。

[0110] 1.2 VEGF 标准曲线计算公式： $y = 0.77305x + 3.4593$ ，标准曲线见图 8。

[0111] 1.3 VEGF 标准曲线线性关系良好，相关系数 $r = 0.9976$ 。该实验精密性良好，批内差 $\text{CV} \leq 3.65\%$ ；批间精密性 $\text{CV} \leq 6.78\%$ 。

[0112] 1.4 VEGF 浓度检测值实验统计如下表所示：

[0113]

稀释度	1:300x	1:600x	1:1200x	1:2400x	1:4800x	1:9600x
浓度 (ng/mL)	100	50	25	12.5	6.25	3.125
荧光值	95816.58	60254.21	35183.09	20145.32	12315.78	7015.11

[0114] 1.5 结论

[0115] 通过对实验室培养的 VEGF 高浓度上清液不同稀释倍数检验，实验结果符合检验标准，可以对高浓度 VEGF 进行检验。

[0116] 本发明基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒的原理如图 1 所示，首先受体 1 包被于酶联反应板 2 上，加样后抗原 3 与受体 1 结合，量子点标记的多抗 4 与抗原 3 相结合，在荧光酶标仪中荧光量子点发出荧光。本发明基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒中多克隆抗体的量子点标记原理为利用包含酰肼基团的 QDs 和含 CHO 官能团的抗体之间形成 $\text{NH} \cdot \text{OCH}_2$ ，如图 3 所示。

[0117] 虽然以上描述了本发明的具体实施方式，但是本领域的技术人员应当理解，这些仅是举例说明，本发明的保护范围是由所附权利要求书限定的。本领域的技术人员在不背离本发明的原理和实质的前提下，可以对这些实施方式作出多种变更或修改，但这些变更和修改均落入本发明的保护范围。

[0118]

序列表

<110> 申请人名称 北京健平九星生物医药科技有限公司

<120> 基于量子点 CdSe 检测人血清中 VEGF 浓度的试剂盒及其使用方法

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人 VEGFR-1 siRNA 靶向序列

<400> 1

Atggtcagct actgggacac c

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工引物

<400> 2

Auggucagcu acugggacac c

21

<210> 3

	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工引物	
[0119]			。
	<400>	3	
	Caaaguaaug	uaaaacauua a	21

[0001]

序列表

<110> 申请人名称 北京健平九星生物医药科技有限公司

<120> 基于量子点CdSe检测人血清中VEGF浓度的试剂盒及其使用方法

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人VEGFR-1 siRNA靶向序列

<400> 1

Atggtcagct actgggacac c

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工引物

<400> 2

Auggucagcu acugggacac c

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工引物

<400> 3

Caaaguaaug uaaaacauua a

21

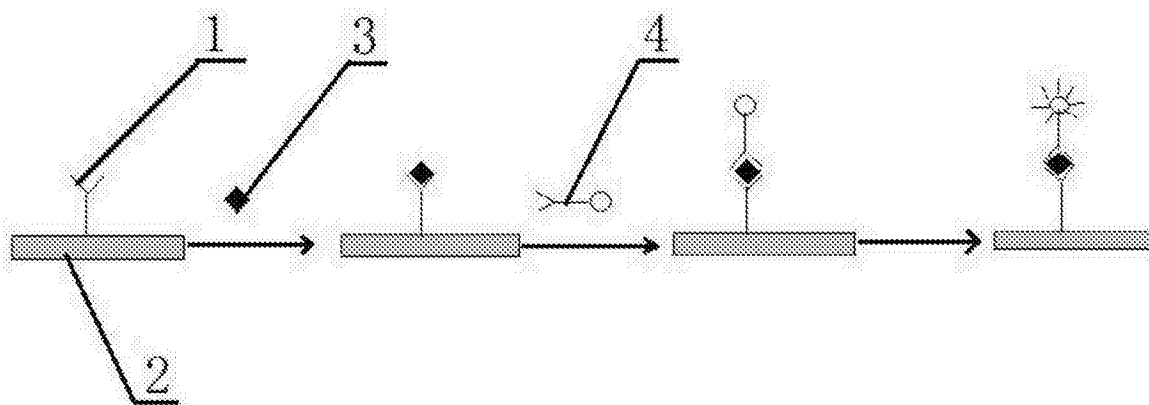


图 1

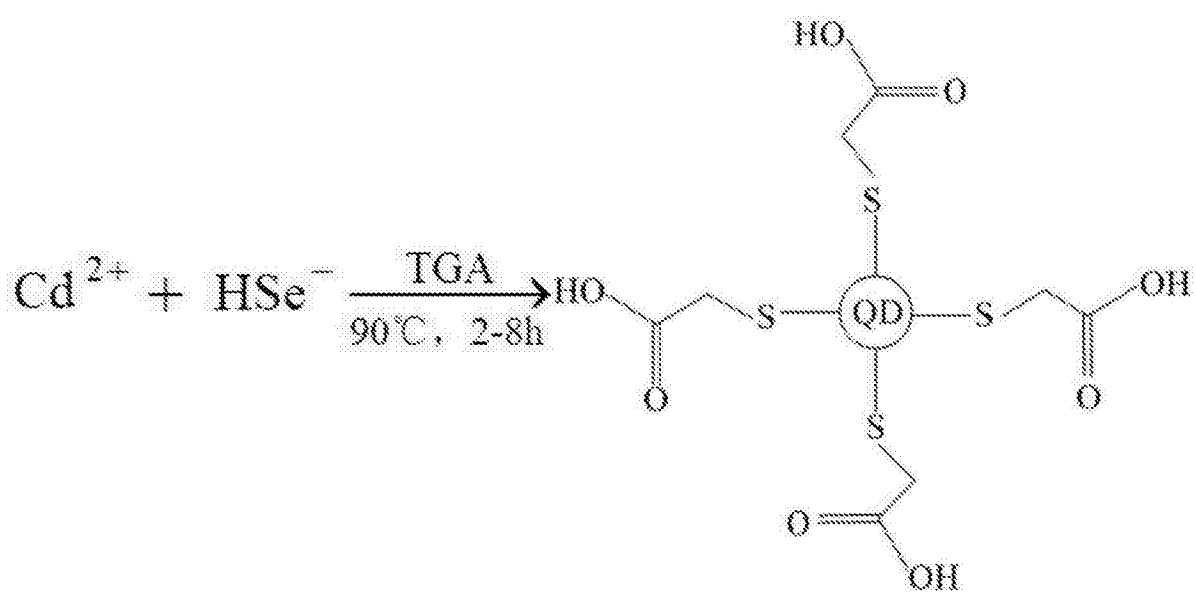


图 2

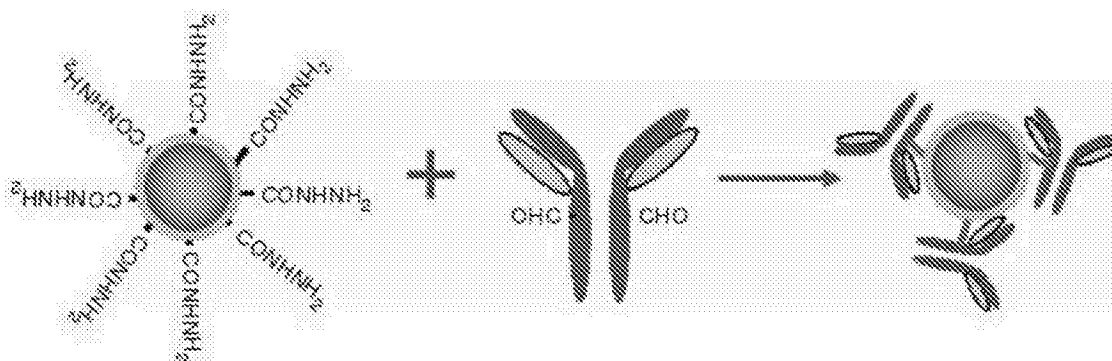


图 3

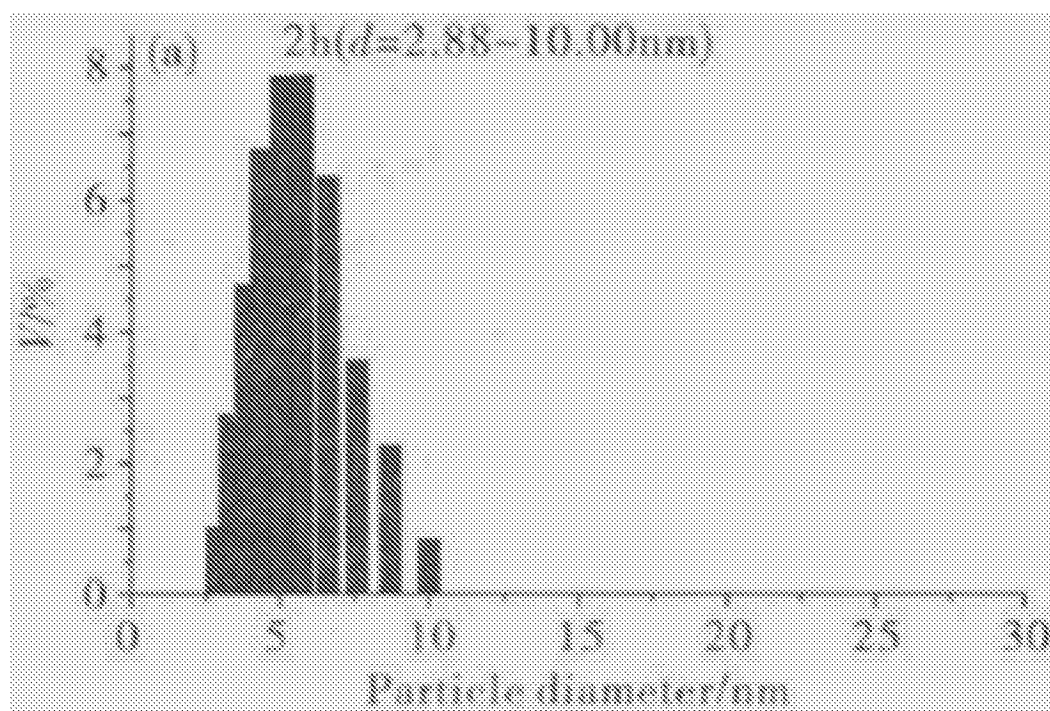


图 4

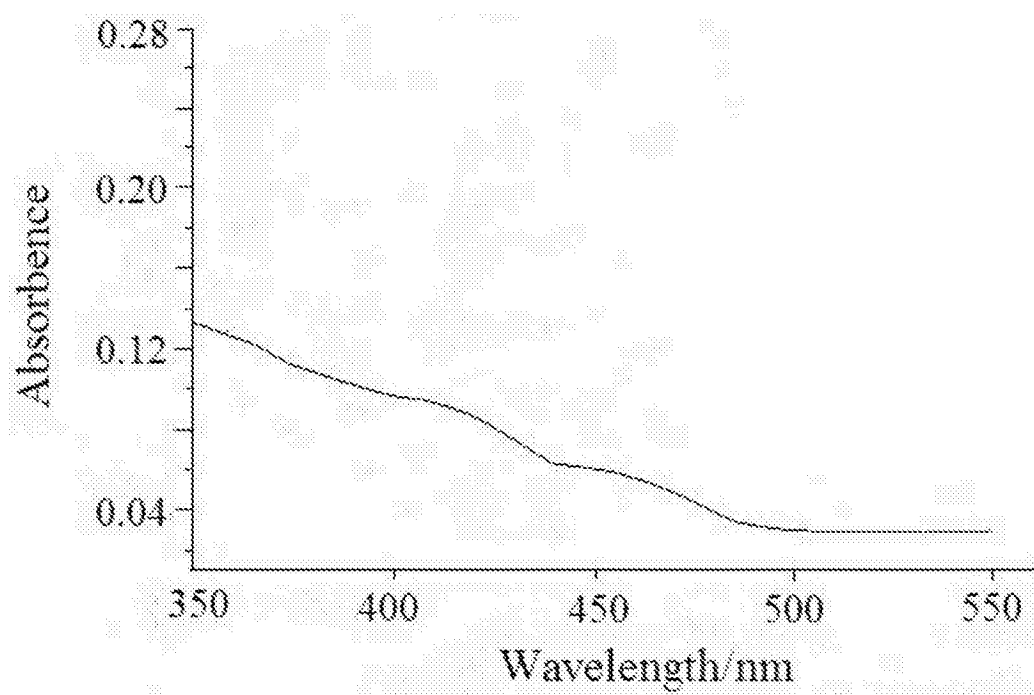


图 5

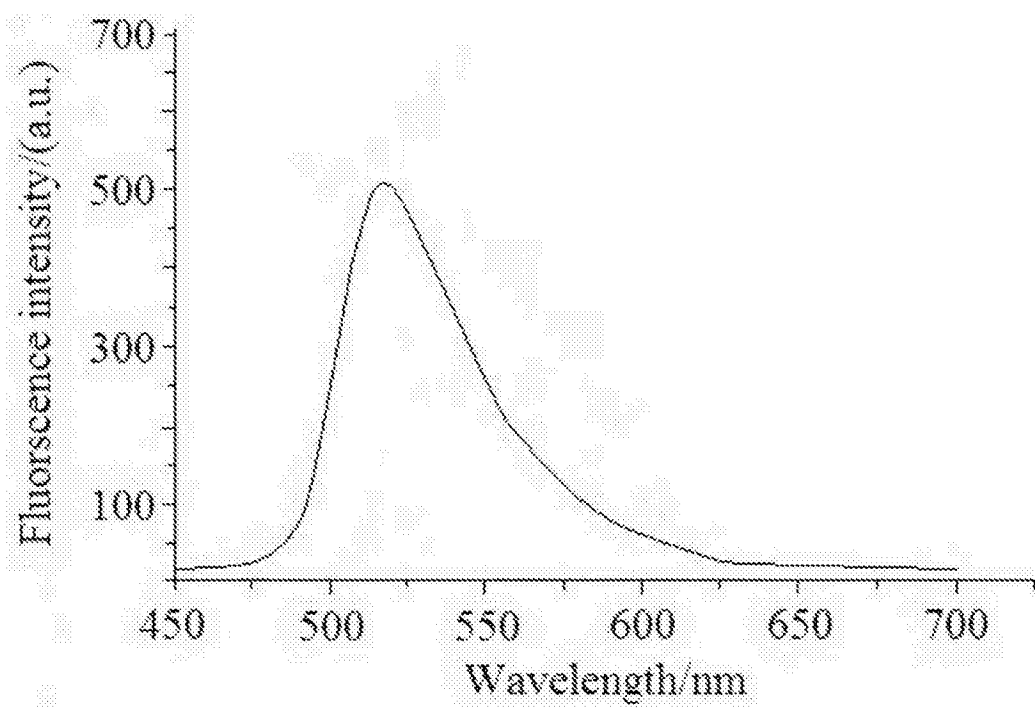


图 6

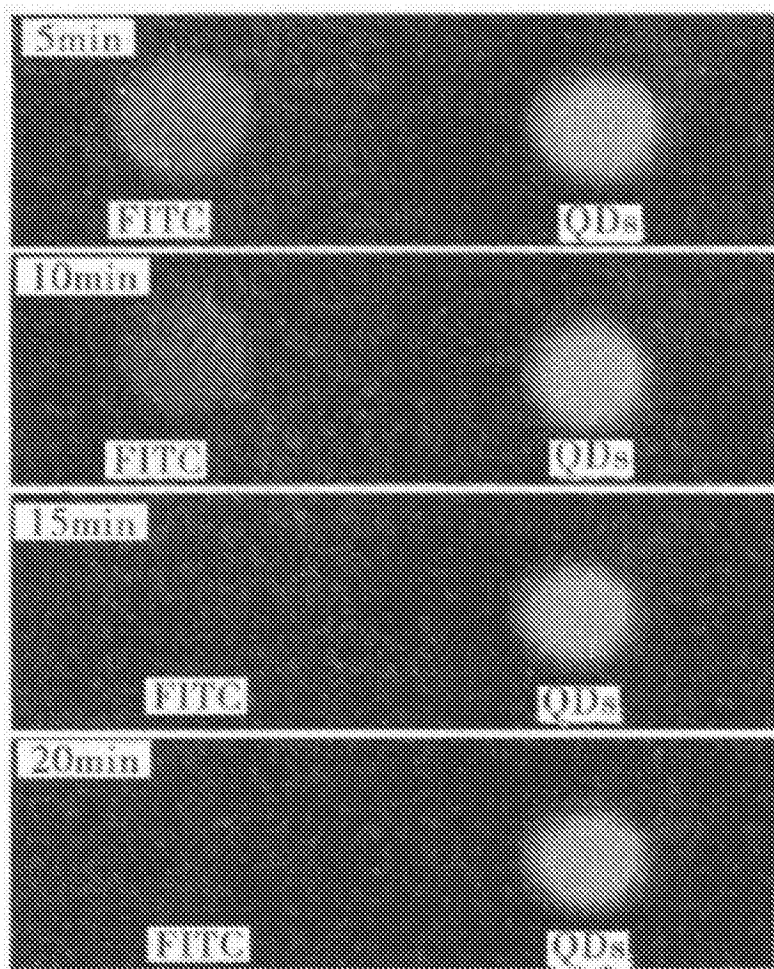


图 7

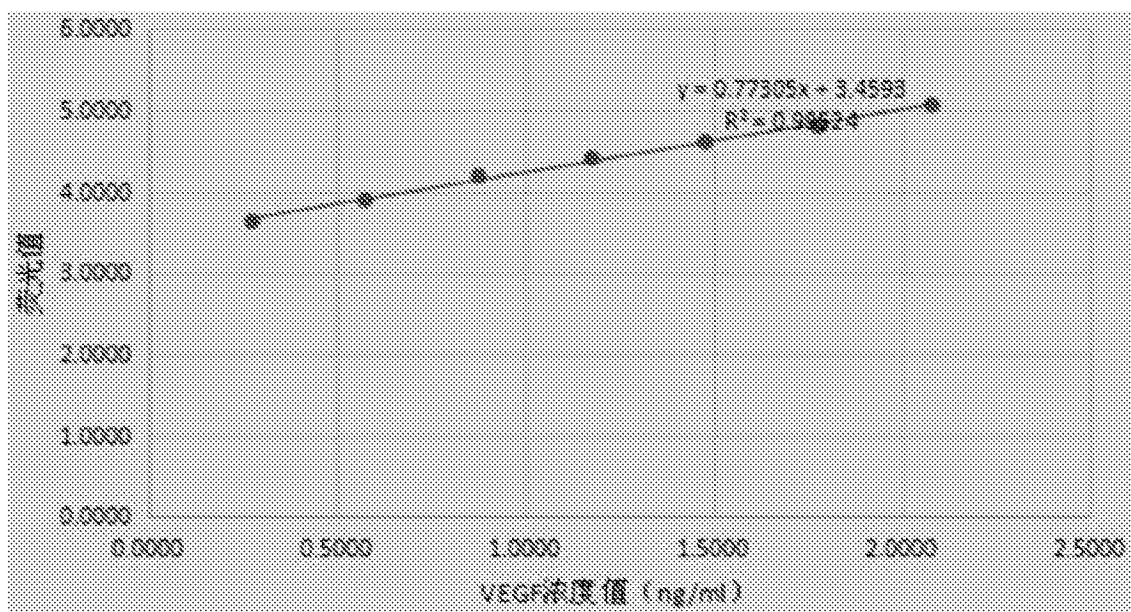


图 8

专利名称(译)	基于量子点CdSe检测人血清中VEGF浓度的试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN105353136A	公开(公告)日	2016-02-24
申请号	CN201510860833.X	申请日	2015-12-01
[标]申请(专利权)人(译)	北京健平九星生物医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京健平九星生物医药科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京健平九星生物医药科技有限公司		
[标]发明人	邹检平		
发明人	邹检平		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N2333/485		
代理人(译)	郭鸿雁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明基于量子点CdSe检测人血清中VEGF浓度的试剂盒及其使用方法，涉及一种利用生物特有的结合方法的测定试剂盒及其使用方法，特别是涉及一种用于检测人血清中VEGF浓度的利用生物特有的结合方法的测定试剂盒及其使用方法。其目的是为了提供一种操作简单、灵敏度高、特异性强的基于量子点CdSe检测人血清中VEGF浓度的试剂盒及其使用方法。本发明的试剂盒包括VEGF受体和量子点CdSe标记的多抗；本发明的使用方法，包括以下步骤：受体包被；加样；加量子点CdSe标记的多抗；检测。本发明的试剂盒具有特异性好、灵敏度高、准确、稳定方便的特点。本发明用于体外免疫检测领域。

