



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101290319 B

(45) 授权公告日 2013.05.08

(21) 申请号 200710065554. X

(22) 申请日 2007.04.16

(73) 专利权人 北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心

地址 100026 北京市朝阳区甜水园北里 6 号

专利权人 天津大学

(72) 发明人 马贵平 常津 刘旭辉 张兵波
李冰玲 史喜菊 李炎鑫 刘全国

(74) 专利代理机构 北京北新智诚知识产权代理有限公司 11100

代理人 李超

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1403379 A, 2003.03.19, 全文.

CN 1547238 A, 2004.11.17, 全文.

CN 1515909 A, 2004.07.28, 全文.

吕蔡,等. 量子点荧光技术标记肿瘤细胞中 HSP 的应用研究. 《中国组织化学与细胞化学杂志》. 2006, 第 15 卷(第 5 期), 513-516.

梅芳,等. 水溶性 CdSe/CdS 核壳纳米粒子制备的影响因素及其对 CdSe/CdS 光谱特性的影响. 《化学学报》. 2006, 第 64 卷 2265-2270.

邵君,等. 量子点标记链霉亲和素及其生物活性检测. 《分析化学(FENXIHUAXUE) 研究简报》. 2006, 第 34 卷(第 11 期), 第 1625-1628 页.

陈军霞,等. 量子点荧光探针在生物学中的应用. 《动物医学进展》. 2005, 第 26 卷(第 6 期), 108-111.

审查员 高宇

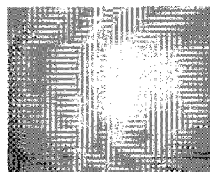
权利要求书2页 说明书15页 附图7页

(54) 发明名称

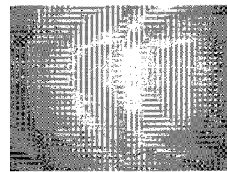
H5N1 型高致病性禽流感的纳米量子点检测方法

(57) 摘要

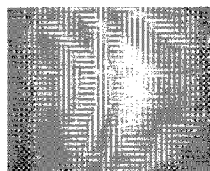
本发明公开了一种 H5N1 型高致病性禽流感的纳米量子点检测方法,属于属于检验检疫领域。该方法包括如下步骤:(1) 制备和纯化 H5N1 型禽流感单克隆抗体或多克隆抗体;(2) 制备水溶性羧基化纳米量子点;(3) 纳米量子点标记 H5N1 型禽流感单克隆抗体或多克隆抗体;(4) 样品测定。本发明的优点是:纳米量子点应用于 H5N1 型高致病性禽流感检测的诊断方法,该方法快速、稳定、便于高通量检测、条件要求低、操作简便,易于推广,具有操作简单、快速和灵敏度高等特点。该方法的建立将为我国高致病性禽流感的监测和诊断提供了一种有效的手段,在进出口检疫上具有良好的推广和应用前景。



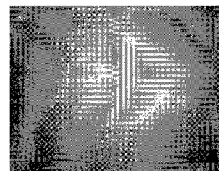
(a)



(b)



(c)



(d)

1. 用于检测 H5N1 型高致病性禽流感病毒的纳米量子点标记抗体的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

(1) 制备和纯化 H5N1 型禽流感单克隆抗体或多克隆抗体;

(2) 制备水溶性羧基化纳米量子点;

(3) 纳米量子点标记 H5N1 型禽流感单克隆抗体或多克隆抗体;所得单克隆抗体或多克隆抗体即可应用于样品中 H5N1 型高致病性禽流感病毒的测定;

所述(2)制备水溶性羧基化纳米量子点,是采用如下方法制备的:

a. 制备 CdSe 核壳量子点;

b. 制备 CdSe/CdS 核壳量子点;

c. 巯基乙酸修饰 CdSe/CdS 量子点;

d. 双亲性高分子疏水自组装改性量子点;

e. 超声乳化改性量子点;

所述 d. 双亲性高分子疏水自组装改性量子点的方法为:取量子点粉末和双亲性三嵌段高分子溶解在 3:1 的氯仿/乙醇溶液中,搅拌以除去氯仿有机溶剂,当氯仿被除去后加入 PBS 缓冲溶液,再超声分散 3 分钟,所得到的溶液再过 0.22 μ m 膜以除去未结合的高分子,过膜后溶液再用超滤管浓缩后再过凝胶色谱柱,进一步除去未结合的高分子;

所述(3)纳米量子点标记 H5N1 型禽流感单克隆抗体或多克隆抗体的方法为:制备醛基化玻片;利用交联剂 EDC 和 sulfo-NHS 采用共价键连接的方法进行抗体的量子点标记。

2. 根据权利要求 1 所述的用于检测 H5N1 型高致病性禽流感病毒的纳米量子点标记抗体的制备方法,其特征在于:所述(1)制备和纯化 H5N1 型禽流感单克隆抗体的方法为:用纯化浓缩的 H5N1 型禽流感病毒作为免疫抗原免疫 8 周龄 Balb/c 小鼠;获得免疫脾细胞与 SP2/0 细胞融合得到杂交瘤细胞;筛选阳性杂交瘤细胞的克隆进行培养获得稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株;将杂交瘤细胞株注射入 Balb/c 小鼠腹腔以体外诱生腹水法获得含单克隆抗体的腹水;采用辛酸-饱和硫酸铵法浓缩和纯化腹水获得单克隆抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的用于检测 H5N1 型高致病性禽流感病毒的纳米量子点标记抗体的制备方法,其特征在于:所述(1)制备和纯化 H5N1 型禽流感多克隆抗体的方法为:用纯化浓缩的 H5N1 型禽流感病毒作为免疫抗原,免疫新西兰大白兔;10 天后心脏采血,分离血清;饱和硫酸铵粗提多抗;DEAE-纤维素层析过柱后纯化的 IgG 置透析袋中,用固体聚乙二醇包埋进行浓缩获得多克隆抗体。

4. 根据权利要求 1 所述的用于检测 H5N1 型高致病性禽流感病毒的纳米量子点标记抗体的制备方法,其特征在于:所述(3)纳米量子点标记 H5N1 型禽流感单克隆抗体或多克隆抗体的方法为:制备醛基化玻片;利用交联剂 EDC 和 sulfo-NHS 采用共价键连接的方法进行抗体的量子点标记。

5. 根据权利要求 4 所述的用于检测 H5N1 型高致病性禽流感病毒的纳米量子点标记抗体的制备方法,其特征在于:所述制备醛基化玻片是指:将玻片用洗液浸泡过夜,然后用大量的去离子水冲洗,60 $^{\circ}$ C 烘干 2h 后,将玻片浸入 5% APTES 的乙醇溶液中作用 60min 进行玻片表面的氨基化,取出水洗,晾干后,将玻片浸入含 5% 戊二醛的 PBS 溶液中进行玻片的醛基化,PBS 溶液清洗晾干后备用;

所述玻片用洗液为 K_2CrO_7 20g+ 浓 H_2SO_4 350ml+ H_2O 40ml;所述 PBS 溶液为 0.2mol/L,

pH8.0。

6. 根据权利要求4所述的用于检测H5N1型高致病性禽流感病毒的纳米量子点标记抗体的制备方法,其特征在于:所述利用交联剂EDC和sulfo-NHS采用共价键连接的方法进行抗体的量子点标记是指:在1.5ml的eppendorf中加入1ml的活化缓冲液,然后加入加入适量的EDC和sulfo-NHS溶液;再在溶液中加入20u1量子点溶液,不停地混合溶液,室温下反应20min;加入1.4u1 20mM的2-巯基乙醇在室温下反应10min,得到活化的量子点溶液;在活化的量子点溶液中,加入1ml含适量H5N1型禽流感抗体的PBS溶液,并用NaOH溶液调节PH至7.5,室温下搅拌反应2小时;4000rpm离心分离1分钟,除去小分子和未反应完全的抗体;用5ml去离子水溶解沉淀,重复对量子点标记的禽流感单克隆抗体溶液进行溶解/沉淀2次,最后用2ml去离子水溶解沉淀,4℃保存;

所述活化缓冲液为0.1M MES,0.5M NaCl,PH6.0;所述PBS溶液为0.01M, pH7.5。

7. 一种制备水溶性羧基化纳米量子点的方法,其特征在于采用如下方法制备得到:

- (1) 制备 CdSe 核壳量子点;
- (2) 制备 CdSe/CdS 核壳量子点;
- (3) 巯基乙酸修饰 CdSe/CdS 量子点;
- (4) 双亲性高分子疏水自组装改性量子点;
- (5) 超声乳化改性量子点;

所述(4)双亲性高分子疏水自组装改性量子点的方法为:取量子点粉末和双亲性三嵌段高分子溶解在3:1的氯仿/乙醇溶液中,搅拌以除去氯仿有机溶剂,当氯仿被除去后加入PBS缓冲溶液,再超声分散3分钟,所得到的溶液再过0.22um膜以除去未结合的高分子,过膜后溶液再用超滤管浓缩后再过凝胶色谱柱,进一步除去未结合的高分子。

8. 一种由权利要求7所述方法制备的水溶性羧基化纳米量子点。

H5N1 型高致病性禽流感的纳米量子点检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉 H5N1 型高致病性禽流感的纳米量子点检测方法,更具体说是一种采用超声乳化改性制备的量子点标记禽流感病毒单抗或多抗进行检测的方法,属于检验检疫领域。

背景技术

[0002] 禽流行性感冒(简称禽流感,avian influenza,A I)是由 A 型流感病毒引起的禽类烈性传染病,被国际兽疫局定为 A 类传染病,其中 H5N1 亚型禽流感是近年来爆发的最为频繁一种高致病性禽流感,给家禽业带来了巨大的经济损失,也威胁着人类的生命健康。随着我国也发现了人感染禽流感的病例,高致病性禽流感的防控工作尤为重要。禽流感的控制关键在于建立快速诊断禽流感病毒的方法,而现有的禽流感诊断技术不能满足我国高致病性禽流感的快速诊断的需要,因此,建立快速诊断禽流感技术已成为我国预防和控制高致病性禽流感的当务之急。

[0003] 对禽流感的快速检测是控制该病的根本前提。由于禽流感的临床症状和病理变化因感染禽的种类、龄期、病程长短、并发感染情况及感染毒株力等的不同而有所不同,因此,禽流感的症状一直依赖于病原的分离鉴定。目前禽流感的诊断的主要是通过病毒分离和血清学试验检测病毒或是检测感染鸡的抗体进行鉴定。其中血清学诊断包括琼脂扩散试验(AGP)、血凝(HA)和血凝抑制试验(HI)、神经氨酸酶抑制试验(NI)、中和试验(NT)、免疫荧光技术(IFT)、酶联免疫吸附试验(ELISA)等六种检测方法。近年来,随着分子生物学技术的发展,RT-PCR 方法也逐渐应用于禽流感的检测。

[0004] 现有技术的不足之处在于:

[0005] 1. 病毒的分离鉴定是诊断 AI 的一种可靠方法,但病毒分离培养耗时长,至少需 7d,不利于快速诊断和免疫程序的合理制定,难以胜任对高致病性 AI 快速诊断的需要。

[0006] 2. 琼脂扩散(AGP)试验进行病毒抗原性特异性试验,此法虽然简单易行,但敏感性较差,易出现假阳性。在进行 HA 实验时,应先出去非特异性非凝集抑制因子。血凝实验(HA)和血凝抑制实验(HI)特异性好,但其过程繁琐费时,但其操作相对繁琐,同时必须具备一定血凝效价的标准病毒和新鲜制备的红细胞。血清学检查对最后确诊有回顾性的诊断价值,一般只能在发病 23 周甚至更长时间才能有抗体阳性出现。神经氨酸酶试验(NI)试验比 HI 试验复杂得多,一般的诊断实验室不能完成,应由专门从事禽流感检测的参比实验室完成。中和试验(NT)是一种比较敏感而特异的血清学方法,但是其操作繁琐、耗时费料,临床几乎不用。

[0007] 3. ELISA 是近年来发展得较为成熟的一种方法,敏感性较高,缺点是试验的敏感性受样本质量的影响很大。阴性结果并不表明未感染禽流感病毒,只能解释为未检出。免疫荧光技术(IF)即荧光抗体(fluorescent antibody, FA)技术,是鉴定和定位流感病毒感染细胞中特异性的抗原,主要是流感病毒的核蛋白(NP)或基质蛋白(MP 抗原)。禽流感病毒的检测通常采用的是直接荧光法,这种方法用于诊断具有快速、简便和敏感等特点,但是有

时会出现假阳性（非特异性荧光），间接免疫荧光技术也可以用来检测 NP 及 MP 抗原与抗体的反应，其敏感性很高。但对抗原制备要求较高，需用非离子型去污剂对纯化的病毒粒子进行裂解。

[0008] 4. RT-PCR 方法是一种敏感特异的方法，灵敏度要高于 ELISA，由于该技术条件要求高，且田间样本复杂多变，干扰大，样本处理难，因此大规模检测比较困难。

[0009] 纳米量子点 (quantum dot, QD) 又可称为半导体纳米微晶体 (semiconductor nanocrystal)，是一种由 II-VI 族或 III-V 族元素组成的稳定的、溶于水的、尺寸在 2 ~ 20nm 之间的纳米晶粒。目前研究较多的是 CdS、CdSe、CdTe、ZnS 等。近年来，半导体量子点由于其独特的性质越来越受到人们的重视，其研究内容涉及物理、化学、材料、生物等多学科，已成为一门新兴的交叉学科。

[0010] 量子点由于粒径很小，电子和孔穴被量子限域，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：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更长时间地观测细胞和组织，并毫无困难地进行界面修饰连接。量子点最大的好处是有丰富的颜色。生物体系的复杂性经常需要同时观察几种组分，如果用染料分子染色，则需要不同波长的光来激发，而量子点则不存在这个问题，使用不同大小（进而不同色彩）的纳米晶体来标记不同的生物分子。使用单一光源就可以使不同的颗粒能够被即时监控。并且从紫外线到红光，量子点有广泛的激发光谱范围，能够用量子点的大小和成分来调节激发光谱。同时量子点具有狭窄对称的荧光发射谱峰，这样就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。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。

发明内容

[0011] 本发明要解决的第一个技术问题是提供一种 H5N1 型高致病性禽流感的纳米量子点检测方法。

[0012] 本发明要解决的第二个技术问题是提供一种可用于标记抗体进行生物检测的新型水溶性羧基化纳米量子点。

[0013] 本发明要解决的第三个技术问题是提供超声乳化改性制备量子点的方法。

[0014] 为实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

[0015] H5N1 型高致病性禽流感的纳米量子点检测方法，包括如下步骤：

[0016] (1) 制备和纯化 H5N1 型禽流感单克隆抗体或多克隆抗体；

[0017] (2) 制备水溶性羧基化纳米量子点；

[0018] (3) 纳米量子点标记 H5N1 型禽流感单克隆抗体或多克隆抗体；

[0019] (4) 样品测定。

[0020] 所述 (1) 制备和纯化 H5N1 型禽流感单克隆抗体的方法为：用纯化浓缩的 H5N1 型禽流感病毒作为免疫抗原免疫 8 周龄 Balb/c 小鼠；获得免疫脾细胞与 SP2/0 细胞融合得到杂交瘤细胞；筛选阳性杂交瘤细胞的克隆进行培养获得稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株；将杂交瘤细胞株注射入 Balb/c 小鼠腹腔以体外诱生腹水法获得含单克隆抗体的腹水；采用

辛酸-饱和硫酸胺法浓缩和纯化腹水获得单克隆抗体。

[0021] 所述(1)制备和纯化H5N1型禽流感多克隆抗体的方法为:用纯化浓缩的H5N1型禽流感病毒作为免疫抗原,免疫新西兰大白兔;10天后心脏采血,分离血清;饱和硫酸铵粗提多抗;DEAE-纤维素层析过柱后纯化的IgG置透析袋中,用固体聚乙二醇包埋进行浓缩获得多克隆抗体。

[0022] 所述(3)纳米量子点标记H5N1型禽流感单克隆抗体或多克隆抗体的方法为:制备醛基化玻片;利用交联剂EDC和sulfo-NHS采用共价键连接的方法进行抗体的量子点标记。

[0023] 玻片由于样品不易在其表面渗透和扩散以及它的疏水性,特别是荧光背景低便于荧光观察等特点,因而被我们作为此课题研究中实验反应的载体。将玻片表面进行醛基化是在玻片表面固定蛋白最常用的途径。采用氨基硅烷和戊二醛先后进行氨基化和醛基化反应,在玻片表面形成活化的醛基,活化的醛基与蛋白质的氨基缩合反应,形成共价键的方法从而在玻片表面固定蛋白质。

[0024] 所述制备醛基化玻片是指:将玻片用洗液(K₂CrO₇ 20g+浓H₂SO₄350ml+H₂O40ml)浸泡过夜,然后用大量的去离子水冲洗,60℃烘干2h后,将玻片浸入5%APTES的乙醇溶液中作用60min进行玻片表面的氨基化,取出水洗,晾干后,将玻片浸入含5%戊二醛的PBS(0.2mol/L, pH8.0)溶液中进行玻片的醛基化,PBS溶液清洗晾干后备用。

[0025] EDC和量子点表面的羧基反应生成酰基异脲,但酰基异脲在水溶液中容易水解,又生成羧基产物。如果在溶液中加入sulfo-NHS,酰基异脲就极易和sulfo-NHS反应,生成具有胺反应活性的sulfo-NHS酯,sulfo-NHS酯与抗体表面的氨基反应生成稳定的酰胺,从而进行抗体的量子点标记。根据条件试验,我们最后确定的量子点标记抗体的实验条件为偶联剂EDC和sulfo-NHS的最佳使用浓度为2.0mM和5.0mM,量子点的浓度为3.0mM,抗体与量子点最佳的比例为3:1,抗体标记的最佳pH值为7.5,最佳的反应时间为2h。

[0026] 所述利用交联剂EDC和sulfo-NHS采用共价键连接的方法进行抗体的量子点标记是指:在1.5ml的eppendorf中加入1ml的活化缓冲液(0.1M MES, 0.5M NaCl, pH6.0),然后加入适量的EDC和sulfo-NHS溶液;再在溶液中加入20ul量子点溶液,不停地混合溶液,室温下反应20min;加入1.4ul(20mM)2-巯基乙醇在室温下反应10min,得到活化的量子点溶液;在活化的量子点溶液中,加入1ml含适量H5N1型禽流感抗体的PBS溶液(0.01M, pH7.5),并用NaOH溶液调节PH至7.5,室温下搅拌反应2小时;4000rpm离心分离1分钟,除去小分子和未反应完全的抗体;用5ml去离子水溶解沉淀,重复对量子点标记的禽流感单克隆抗体溶液进行溶解/沉淀2次,最后用2ml去离子水溶解沉淀,4℃保存。

[0027] 所述(4)样品测定的方法为:在醛基化的玻片表面滴加待检样品尿囊液,37℃孵育2h;用洗涤玻片3次,每次5min;然后在玻片表面滴加含5%BSA的PBS-Tween溶液,37℃孵育45min;用0.01M, pH7.2的PBS洗涤玻片3次,每次5min后,加入量子点标记的禽流感抗体,37℃孵育45min,用0.01M, pH7.2的PBS洗涤玻片3次,每次5min;室温下晾干后在荧光显微镜下观察,判断样品的阴阳性。

[0028] 一种可用于标记抗体进行生物检测的新型水溶性羧基化纳米量子点,采用如下方法制备得到。

[0029] 制备水溶性羧基化纳米量子点的方法,包括如下步骤:

[0030] (1)制备CdSe核壳量子点;

- [0031] (2) 制备 CdSe/CdS 核壳量子点；
[0032] (3) 巯基乙酸修饰 CdSe/CdS 量子点；
[0033] (4) 双亲性高分子疏水自组装改性量子点；
[0034] (5) 超声乳化改性量子点。

[0035] 现在通常使用的量子点表面都被大量有机溶剂分子包覆而呈疏水性，而生物大分子或者药物一般是溶解或分散在水溶液中的，所以量子点与它们既不能充分接近更不能直接有效的结合，因此要得到稳定的荧光探针，大多先要将量子点表面进行修饰。

[0036] 利用 Zn、Cd 等 IIB 族原子与硫原子之间有效的键合作用，用带巯基的双功能分子，如巯基羧酸类、二巯苏糖醇 (DTT)、硫代胆碱等取代 QDs 表面的有机分子，以使其从疏水性转变为亲水性，然后通过另一端的功能基团可以与生物大分子连接，这种方法简单、重复性好。但由于使用的是小分子作为连接物，修饰以后原有的有机分子对量子点的保护和稳定作用得不到有效的替代，所以稳定性不好。

[0037] 用双亲性高分子疏水自组装改性量子点虽然所得的量子点粒径较小，但是此种方法纯化比较困难，且环境不友好。

[0038] 乳化有利于形成微胶囊的形成，然而，假如只是简单的机械搅拌，所形成的微胶囊体系不够稳定。超声作用有助于乳化且可以形成气穴，维持乳液稳定。所以我们采用超声乳化的方法来实现水溶性改性。

[0039] 采用的超声乳化改性制备的量子点具有方法创新性，高分子层较厚且严实致密，能更好的保护量子点，避免环境介质渗入而造成量子点的发光性能的破坏如光降解，光漂白，以及 Cd 离子的渗出而产生毒性；该方法纯化简单，只需离心，而一般水溶性改性（通过疏水作用自组装改性）需要过膜—浓缩—凝胶过滤—再浓缩等步骤；采用 O/W 法，有机溶剂用量少，省时节能，环境友好；疏水作用自组装修饰的纳米粒子表面不光滑，而超声乳化制备的纳米粒子表面光滑，不容易引起非特异性吸附，能更好的应用在生物检测方面。

[0040] 本文研制出了 CdSe/CdS 核壳量子点，并采用超声乳化的方法对量子点进行了水溶性改性，建立了纳米量子点用于 H5N1 型禽流感病毒的检测方法。此检测方法检测速度快，从样品的处理到出结果只需 4 个小时。检测结果稳定，荧光不易发生淬灭，检测过的样本在数十天后仍可观察结果。并且量子点标记禽流感抗体的方法十分简单，只需简单离心就可对标记产物进行纯化。而传统的抗体的荧光素标记方法需要反应过夜，标记产物还需要透析法或层析法进行纯化，整个过程耗时，且操作繁琐。该方法对鸡胚尿囊液检测最高稀释度为 10^6 ，与鸡胚病毒分离的灵敏度基本相当，高于 RT-PCR 的检测灵敏度。

[0041] 本发明的优点是：纳米量子点应用于 H5N1 型高致病性禽流感检测的诊断方法，该方法快速、稳定、便于高通量检测、条件要求低、操作简便，易于推广，具有操作简单、快速和灵敏度高等特点。该方法的建立将为我国高致病性禽流感的监测和诊断提供了一种有效的手段，在进出口检疫上具有良好的推广和应用前景。

[0042] 下面结合附图和具体实施方式对本发明做进一步说明，并非对本发明的限制。凡是依照本发明公开内容所做的任何本领域的等同替换，均属于本发明的保护范围。

附图说明

[0043] 图 1 为三种不同粒径大小的 CdSe/CdS QDs 的吸收光谱 (a) 和荧光光谱 (b)。

- [0044] 图 2 为巯基乙酸修饰 CdSe/CdS 油溶性量子点的紫外吸收光谱。
- [0045] 图 3 为双亲性高分子材料自组装改性量子点的 TEM 照片 190,000×。
- [0046] 图 4(a) 是双亲性高分子疏水自组装改性量子点的紫外吸收光谱。图 4(b) 是改性后的荧光光谱。
- [0047] 图 5 为超声乳化改性量子点后的 TEM 照片。
- [0048] 图 6 是超声乳化改性量子点的紫外吸收光谱。
- [0049] 图 7 为醛基化玻片结果验证结果图 (a) 加入羊抗兔 IgG ;(b) 加入羊抗鸡 IgG。
- [0050] 图 8 为量子点标记抗体的反应原理图。
- [0051] 图 9 为沉淀离心量子点标记多抗后过柱的峰形图。
- [0052] 图 10 为沉淀离心量子点标记的产物反应荧光图片。
- [0053] 图 11 为过柱纯化量子点标记的禽流感多抗产物图。
- [0054] 图 12 为过柱纯化各组分与抗原反应荧光图片。
- [0055] 图 13 为过柱纯化量子点标记的禽流感单抗图。
- [0056] 图 14 为沉淀离心纯化量子点标记单抗产物后过柱的峰形图。
- [0057] 图 15a、b、c 和 d 分别表示量子点标记的 H5N1 型禽流感单抗检测新城疫 F48E9、IBDV、鸭瘟病毒和鸭肝炎病毒结果图。
- [0058] 图 16 为本发明方法和间接荧光免疫法对未感染禽流感病毒的尿囊液进行检测的结果图。

具体实施方式

[0059] 主要材料和仪器

[0060] 1. HT 培养基 (Sigma 公司), HATA 选择培养基 (Sigma 公司), DMEM 高糖培养基 (CIBCOBRL 公司), 细胞融合剂 (Sigma 公司), 青霉素钠 (华北制药), 硫酸链霉素 (华北制药); 十二烷基磺酸钠 (SDS) (Sigma 公司), 正辛酸 (北京化学试剂公司), HRP 标记的羊抗鼠 IgG (欣经科生物制品有限公司), 聚乙二醇 (PEG, 分子量 6000) (欣经科生物制品有限公司), 凝胶过滤填料 SephadexG-200 (Amersham bioscience), 禽流感 H5N1 病毒、鸡新城疫病毒 (NDV)、产蛋下降综合症病毒 (EDS76V) 为本实验室保存, SPF 鸡胚购自梅里亚动物保健品有限公司, BALB 小鼠购自北京市实验动物研究所, SP2/0 细胞为本实验室保存, 新西兰大白兔购自北京实验动物中心。

[0061] 自动纯水机 (美国 PALI. CO), 二氧化碳培养箱 (日本三洋), 倒置显微镜 (日本 Olympus), 高速离心机 (美国 Optime), 酶联检测仪 (美国 Thermo Labsystems), 台式电子天平 (德国 SATORIOVS), 恒温水浴箱 (芬兰 HETO), 微孔细胞培养板 (), 电泳成套设备 (美国 Invitrogen), 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus), centrifuge5810R 台式冷冻离心机 (德国 eppendorf 公司); AKTA Basic 蛋白纯化仪 (AmershamBiosciences)。

[0062] 2. 量子点的制备

[0063] 三正辛基氧化磷 (TOPO, 90%, Aldrich), 三正丁基磷 (TBP, 90%, TCI, Japan)、十八胺 (ODA, 90%, ACROS)、十八烯 (ODE, 90%, ACROS), 单质硫 (S, 99.9% Aldrich)、油酸 (OA, 90%, Aldrich), 氧化镉 (CdO, 99.5%, Aldrich) 以及 Se 粉 (100mesh, 99.99%, Aldrich)、甲苯、乙醇、甲醇、正己烷, 氯仿, 二氯甲烷和丙酮均为分析纯, 购自天津大学科威

试剂公司。

[0064] UV-2450 紫外可见分光光度计(日本岛津公司),P JEM-100CX II 型透射电子显微镜(erklin Elmer Inc.),F-4500 荧光分光光度计(日立),G2F20 透射电子显微镜(Tecnai),SHJM-1 型数显恒温搅拌电热套(山东省鄄城福利科研仪器厂),Hettich Mikro22R 型冷冻离心机(JEOL 公司),电子天平 ALC-100.4(北京赛多利斯天平有限公司)

[0065] 3. 抗体的量子点标记

[0066] EDC(1-乙基-3-(3-二甲氨基)碳二亚胺盐酸盐,Pierce),sulfo-NHS(sulfo-N-羧基琥珀酰亚胺,Acrose),(3-氨基甲基)三乙氧基硅烷(APTES,((3-Aminopropyl),triethoxysilane,Alfa Acesar),凝胶过滤填料 Superdex200(Amersham bioscience),凝胶过滤填料 sepharose6Fast Flow(Amersham bioscience)。

[0067] UV-2450 紫外可见分光光度计(日本岛津公司),centrifuge5810R 台式冷冻离心机(德国 eppendorf 公司),BX51 正置荧光显微镜(日本 Olympus),AKTA Basic 蛋白纯化仪(Amersham Biosciences),wd-9403f 紫外透射仪(北京六一仪器厂)。

[0068] 4. 样品的检测

[0069] 牛血清蛋白(BSA,北京化学试剂公司),Tween-20(北京化学试剂公司),新城疫 F48E9、IBDV、鸭瘟病毒和鸭肝炎病毒由本实验室留存(本发明的实施也可选取其他的同类病毒,不影响效果)。

[0070] BE500 恒温培养箱(德国 MEMMERT),BX51 正置荧光显微镜(日本 Olympus)。

[0071] 实施例 1:病毒的繁殖、纯化及浓缩

[0072] 1. 病毒的繁殖

[0073] 取 AIV H5N1 病毒,作 1×10^4 倍稀释,尿囊腔接种 10 日龄鸡胚,0.2ml/枚,37℃ 培养,每日照蛋 3 次,淘汰 24 小时内死亡的死胚,收集 24-96 小时仍未死亡的鸡胚。放 4℃ 冷却,无菌收集尿囊液。

[0074] 2. 病毒的灭活及纯化

[0075] (1) 灭活:在收集的尿囊液中加入甲醛使其终浓度为 0.1%,置于 37℃ 生化培养箱中灭活。

[0076] (2) 差速离心 4000rpm,4℃ 离心 45 分钟,弃去沉淀。上清液于 $100,000 \times g$,4℃ 超速离心 2 小时,收集沉淀,以原尿囊液 1/20 体积的 PBS(pH7.4) 重悬病毒,-80℃ 保存。

[0077] (3) 凝胶过滤用 0.01M,pH7.4 的 PBS 作为平衡液和洗脱液。取 1g SephadexG-200,以蒸馏水煮沸 30min,充分溶胀后装柱,用平衡液充分平衡柱床。将粗提病毒装入柱内,待病毒液全部进入层析柱后,关闭下口完成上样,然后加入洗脱液进行洗脱,控制流速为 0.3ml/min,2ml/管,根据各管的 OD_{280} 值和 HA 价,收集符合要求的个管洗脱液。

[0078] (4) 洗脱液的浓缩将收集的各管洗脱液装入透析袋,用固体聚乙二醇(PEG,分子量 6000)包埋 10h 进行浓缩。取出病毒浓缩液,用紫外分光光度计测定其 OD_{260} 和 OD_{280} ,根据公式:蛋白质浓度(mg/ml) = $1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}$,计算病毒蛋白的浓度,并测定浓缩蛋白的 HA 价。

[0079] 3. 结果

[0080] 取 200ml 尿囊液进行纯化,差速离心,以初体积的 1/20 的 PBS 虫悬沉淀,紫外分光光度计测定其 OD_{280} 和 OD_{260} ,并根据公式:病毒蛋白浓度(mg/ml) =

$(1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}) \times \text{稀释倍数}$, 计算得到病毒蛋白的含量为 1.3564mg/ml。

[0081] 凝胶过滤后, 共收集洗脱液 20 管 (1.0ml/管), 根据 ATAK BASIC 蛋白纯化仪显示的各收集组分的 OD_{280} , 合并 OD_{280} 处于第一个缝的各管, 共得到 10ml, 用固定乙二醇 (PEG, 分子量 6000) 包埋, 10h 后体积为 1.5ml。用紫外分光光度计测得浓缩病毒蛋白浓度为 2.6859mg/ml。

[0082] 血凝试验结果表明, 所获得的病毒浓缩液的 HA 价为 1:2¹¹。

[0083] 实施例 2: 制备和纯化 H5N1 型禽流感单克隆抗体

[0084] 1. 小鼠免疫程序

[0085] 用实施例 1 纯化浓缩的病毒作为免疫抗原免疫 8 周龄 Balb/c 小鼠。共免疫四次, 第一次免疫用等量氟氏佐剂完全乳化, 第二次和第三次免疫加等量的氟氏不完全佐剂, 第四次不加佐剂。每次免疫间隔 2 周。每次免疫的病毒剂量为每只小鼠 150 μ g, 免疫途径为颈背部下多点注射。第四次免疫 2 周后尾吻采血测定血清的 HA 价, 若血清效价合理, 融合前三天进行一次加强免疫, 用不加佐剂的病毒抗原经腹腔注射。

[0086] 2. 杂交瘤细胞的建立

[0087] (1) SP2/0 细胞的准备: 融合前 24-48h 将 SP2/0 细胞分瓶扩大培养, 融合前 6h, 弃去瓶中培养液, 换上新液。融合时, 选择形态良好、呈对数生长的 SP2/0 细胞, 将其从瓶壁上轻轻吹下, 收集于 50ml 离心管内, 1500rpm 离心 3min, 用 5ml DMEM 基础培养液悬浮沉淀, 再离心一次, 然后用 DEME 重新悬浮后计数备用。

[0088] (2) 饲养细胞的制备: 将未经免疫的 ICR 小鼠眼球放血处死; 将处死的小鼠置 75% 酒精中浸泡 5min, 转入超净台, 置于无菌腰盘中; 剥离小鼠皮肤, 无菌取出脾脏, 放入盛有 10ml DMEM 基础培养液的平皿中, 剔出结缔组织, 并轻轻漂洗; 将脾脏移入另一盛有 10ml DMEM 基础培养液的平面皿中, 用灭菌的钝头反复夹取积压脾脏, 充分释放其中的脾细胞; 将含有脾细胞的 DMEM 移入离心管内, 1500rpm 离心 3min, 弃上清; 用 10ml DMEM 基础培养液重悬沉淀, 吸吹均匀, 1500rpm, 离心 3min, 弃上清。此步骤重复 2-3 次; 沉淀用 10ml HAT 选择培养基悬浮备用。

[0089] (3) 免疫脾细胞的制备: 在强化免疫 72h 后, 将免疫小鼠摘除眼球放血并分离血清作为抗体阳性对照; 免疫脾细胞的制备同上述饲养细胞的制备过程; 最后, 沉淀用 DMEM 基础培养液悬浮计数备用。

[0090] (4) 细胞融合: 分别取 2.4×10^8 个脾细胞和含有 6.0×10^7 个 SP2/0 细胞的悬液, 加入到一只 50ml 离心管内, 轻轻混匀; 1500rpm 离心 3min, 将上清尽量弃去; 用手掌轻轻震动管底, 使沉淀细胞松散均匀成糊状; 用移液管吸取 1ml 细胞融合剂, 使移液管尖部接触细胞, 缓缓加入融合剂, 使细胞与融合剂充分接触, 控制在 60s 加完; 加入 25ml DMEM 液终止细胞融合剂的作用, 方法如下: 第 1 分钟缓缓加入 1ml DMEM 液, 第 2 分钟加入 4ml DMEM 液, 然后在 3 分钟内加入 20ml DMEM 液; 将离心管置于 37°C CO₂ 培养箱静置 5min; 1500rpm/min 离心 3min, 弃上清, 用 105ml HAT 选择培养基融合细胞, 将制备好的 10ml 饲养细胞悬液全部加入, 轻轻将细胞混合均匀; 将悬浮细胞液滴入到 6 块 96 孔板中, 每孔 200 μ l, 置于 37°C CO₂ 培养箱中培养; 融合第二天, 用 HAT 选择培养基半量换液, 融合后第四天, 再用 HAT 选择培养基半量换液一次, 第八天改用 HT 选择培养基半量换液。每天记录细胞生长情况。

[0091] (5) 获得阳性杂交瘤细胞: 用血凝试验 (HI) 进行检测。先用 4 单位 AIV H5 亚型

血凝抗原检测,对于阳性孔,再用 8 单位血凝抗原检测一次,筛选强阳性孔。所用的血球为 0.5% (V/V) 浓度的鸡红血球,直接对上清液原液进行 HI 检测;筛选:待融合后的细胞克隆生长到覆盖细胞孔底部面积的 1/10 时,用确立好的 HI 方法对其培养上清进行检测。对于用 8 单位血凝抗原检测呈阳性的细胞孔,及时进行克隆;4 单位血凝抗原检测呈阳性,而 8 单位抗原检测呈阴性的细胞,换上细胞冻存液,放入 -80℃ 冰箱保存。

[0092] (6) 阳性杂交瘤细胞的克隆(采用有限稀释法):克隆的当天制备饲养细胞,制备过程如前所述,将制备好的饲料细胞悬液加入到 96 孔板中,100 μ l/孔;将检测为强阳性的细胞孔用吸管轻轻吸使细胞分散均匀,吸至 1ml 含 20% 胎牛血清的 DMEM 液中,取少量悬液进行细胞计数;用 HT 选择培养液稀释阳性杂交瘤至 20 个/ml、10 个/ml、5 个/ml;将稀释好的细胞悬液加到有饲养细胞的 96 孔板中,100 μ l/孔,每一种稀释度加到 32 孔;每天观察细胞的生长情况。第四天用 HT 选择细胞培养液半量换液;待孔中细胞液变黄进行检测;选择仅有一个克隆上生长的阳性孔再次进行克隆化,直至阳性克隆达到 100%;获得稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株后,及时扩大培养并冻存。

[0093] 3. 细胞的冻存与复苏

[0094] (1) 细胞的冻存:选择处于对数生长期的细胞,轻轻将细胞从瓶壁上吹下;1500rpm 离心 3min,弃上清;用冻存液将细胞沉淀悬浮,分装于细胞冻存管内,1.5ml/管,加盖封严,注明细胞代号;将冻存管置于无水乙醇的小烧杯内,于 4℃ 冰箱静置 2h 后转入 -80℃ 冰箱过夜,再将之移入液氮罐内长期保存。

[0095] (2) 细胞的复苏:从液氮管中取出冻存管,迅速放入 37℃ 水浴中,轻轻晃动使其尽快融化;1500rpm 离心 3min,弃上清;用含 20% 血清的 DMEM 液将沉淀悬浮,移入细胞瓶,置 CO₂ 培养箱内培养。

[0096] 4. 单克隆抗体的制备(采用体外诱生腹水法)

[0097] 挑选经产 Balb/c 小鼠,腹腔注射灭菌石蜡油 0.5ml/只;10-14 天后,将杂交瘤细胞吹打下来,1500rpm 离心 3min,弃上清,用 5ml DMEM 重新悬浮,计数备用;每只小鼠腹腔接种杂交瘤细胞 10⁶ 个;7-10 天后,可见小鼠腹部明显增大,采集腹水;将腹水 3000rpm 离心 10min,收集上清,-20℃ 保存备用。

[0098] 5. 单克隆抗体的浓缩及纯化(采用辛酸-饱和硫酸铵法)

[0099] 取腹水 10ml,加入 0.06M 醋酸钠-醋酸缓冲液(pH4.0) 20ml(边加边搅拌);用 1M 氢氧化钠将腹水 pH 调至 4.8 后,边搅拌边加入正辛酸 0.33ml,室温搅拌 30min;腹水经 6000rpm 离心 30min,弃沉淀,上清用 1M 氢氧化钠将 pH 调至 7.2,边加边搅拌,缓慢加入等体积的饱和硫酸铵,搅拌 30min 后,经 6000rpm/min 离心 30min 后,弃去上清,沉淀溶于 6ml PBS 中;缓慢加入 4ml 饱和硫酸铵,并不断搅拌,30min 后,6000rpm/min 离心 30min,将沉淀溶于适量 PBS 中,移至透析袋中进行透析。

[0100] 6. 单克隆抗体的鉴定

[0101] (1) HI 价测定:将收集的腹水 3000rpm,10min 离心处理,弃掉杂质,测定 HI 价。

[0102] (2) ELISA 效价的测定:包被:以差速离心提纯的 H5 病毒作为包被抗原,用包被液稀释,100 μ l/孔,4℃ 过夜;洗涤:甩干包被液,以洗涤液洗涤 3 次,3min/次;加入封闭液,100 μ l/孔,37℃ 2h. 甩干,同上洗涤;加二抗:用 PBS 将 HRP 标记羊抗鼠 IgG 按工作浓度稀释,100 μ l/孔,37℃ 60min. 甩干,同上洗涤;加底物:每孔加入新鲜配制的底物溶液,

100 μ l/孔, 37°C, 15min。

[0103] g: 终止液: 每孔加入 100 μ l 1M H_2SO_4 终止反应; 读数: 自动酶联检测仪检测各孔的 OD_{280} 。

[0104] 抗原包被浓度和抗体稀释度的测定: 将包被抗原作 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560 稀释, 小鼠阳性和阴性血清作 1:2500、1:5000、1:10000、1:20000、1:40000、1:80000 稀释, 间接 ELISA 法测定各孔 OD_{655} , 方阵法确定抗原最佳稀释度。

[0105] (3) 单克隆抗体 ELISA 效价测定: 将腹水从 1:10 起作倍比稀释, 按确定的间接 ELISA 方法测定其效价。

[0106] (4) 交叉试验: 分别用 H7、H9、NDV、EDS76V 的血凝抗原对腹水做 HI 交叉反应。有 HI 反应的判为有交叉反应, 无 HI 反应的判为无交叉反应。

[0107] (5) 单抗重链、轻链分子量的测定: 采用 SDS-PAGE 检测单抗分子量, 腹水的辛酸-饱和硫酸铵纯化产物作电泳样品。浓缩胶和分离胶浓度分别为 5% 和 12%。

[0108] 7. 单抗的鉴定结果

[0109] 经测定, 做制备的禽流感 H5 亚型单克隆抗体的 HI 效价为 1:211, ELISA 效价为 106。针对 H7 和 H9 的血凝抑制活性, 只对 H5 具有血抑活性, 说明所制备的抗体为抗 H5 亚型禽流感血凝素的特异性单抗。用辛酸-饱和硫酸铵法纯化单抗, 然后进行 SDS-PAGE 电泳, 在约 50KD 和 27KD 处各有一条明显的条带, 重链约为 50KD, 轻链约为 27KD。

[0110] 实施例 3: 制备和纯化 H5N1 型禽流感多克隆抗体

[0111] 1. 用纯化浓缩的 H5N1 型禽流感病毒作为免疫抗原, 免疫 3 只健康的体重在 2kg 左右成年雄性新西兰大白兔, 免疫程序如表 1。前三次免疫每次间隔 2 周, 第三次免疫后 10d 耳缘静脉采血, 分离血清, 用琼脂免疫扩散试验 (AGID) 检测兔血清的效价, 若琼扩效价达 1:16 以上, 用不加佐剂的浓缩的重组蛋白自耳静脉缓慢注射加强免疫 1 次, 10d 后心脏采血, 分离血清, 用于兔抗 AIV H5 亚型的重组蛋白的 IgG 的提取。

[0112] 表 1 兔免疫程序

[0113]

免疫程序	免疫途径	抗原剂量	佐剂
首免	颈背部多点皮下及腿部肌肉注射	1mg/kg 体重	等量完全佐剂
二免	颈背部多点皮下及腿部肌肉注射	2mg/kg 体重	等量不完全佐剂
三免	颈背部多点皮下及腿部肌肉注射	3mg/kg 体重	蛋白不加佐剂
加强免疫	静脉注射	5mg/kg 体重	蛋白不加佐剂

[0114] 2. 多克隆抗体的提纯

[0115] (1) 饱和硫酸铵粗提: 取 20ml 血清, 加生理盐水 20ml, 再加入饱和硫酸铵溶液 10ml, 使成 20% 的硫酸铵溶液, 边加边搅拌, 充分混匀后, 静置 30min。3000rpm 离心 20min, 弃沉淀。在上清液中加入再加入饱和硫酸铵 30ml, 使成 50% 硫酸铵溶液, 充分混匀, 静置 30min。3000rpm 离心 20min, 泣上清。于沉淀中加入 20ml 生理盐水, 使之溶解, 再加饱和的硫酸铵溶液 10ml, 充分混匀后, 静置 30in。3000rpm 离心 20min, 弃上清, 重复溶解 / 沉淀

2-3 次,用 10ml 生理盐水溶解沉淀。在生理盐水中 4℃ 透析过夜,中间换液数次(用 1% 的 BaCl 检查透析液中的 SO_4^{2-} ,直到无 SO_4^{2-} 为止)。离心去沉淀,上清液即为粗提的 IgG,将粗提的 IgG 溶解于 PBS(0.01M, pH7.2) 中用于过柱。

[0116] (2)DEAE-纤维素层析过柱:用 0.0175M, pH6.7 的 PBS 作为平衡液和洗脱液。取适量的 DEAE-纤维素于 0.5M 的氢氧化钠溶液中,浸泡 1h,不时搅拌,用布氏漏斗抽滤,用蒸馏水洗涤,再抽滤,直至滤液接近中性为止。再将纤维素浸泡于 0.5M 的 HCl 中,同样抽滤至中型,再将纤维素浸泡于 0.5M 的 NaOH 中,同样处理,洗至中型。然后进行平衡、装柱、上样后进行洗脱。连接洗脱瓶,打开柱下口开始洗脱,用 20% 的磺基硫酸钠检查,开始产生白色沉淀时收集洗脱液,直到收集液中无蛋白质为止,即为纯化的 IgG。

[0117] 将提纯的 IgG 置透析袋中,用固体聚乙二醇(PEG,分子量 6000)包埋 10h 进行浓缩;测定蛋白的浓度。

[0118] 3. 多克隆抗体测定

[0119] 经紫外分光光度计测定其浓度为 2.8345mg/ml。

[0120] 实施例 4:水溶性羧基化量子点的制备

[0121] 1. CdSe 核壳量子点的制备

[0122] 取 0.1429g 硒粉,溶于 1ml 十八烯和 1.2ml TBP(三辛基磷),密封保存备用。在三口瓶中称取 0.3mmol 氧化镉,0.4ml 油酸和 4ml 十八烯,在氩气氛围中保持 30min 后加热至氧化镉完全溶解。称取 0.5g TOPO(三辛基氧化磷),于室温下加入上述混合溶液中。再通氩气 45min 后,混合溶液加热至 260℃,快速加入已经制备好的硒溶液,反应 2min 后,继续搅拌冷却至室温。制备好的 CdSe 量子点用丙酮沉淀、洗涤两遍后,溶于三氯甲烷中备用。

[0123] 2. CdSe/CdS 核壳量子点的制备

[0124] 称取 51.9mg 氧化镉,溶于 0.4ml 油酸和 10ml 十八烯中。通氩气 30min 后,混合溶液加热至 270℃,此时溶液呈淡黄透明状,冷却到室温备用。称取硫粉 12.8mg,溶于 10ml 十八烯中,通氩气 30min 后,混合溶液加热至 170℃,溶液呈黄色透明状,冷却到室温备用。

[0125] 取 2ml CdSe 核量子点,加 5ml 十八烯,十八胺、TOPO 各 0.5g 于烧瓶中,通氩气 40min 后,加热至 100℃,保持 10min 以除去多余的三氯甲烷,再加热到 220℃,此时保持系统稳定。按照文献数据,计算出制备每层量子点所需要 Cd^{2+} 、 S^{2-} 的量。先逐滴加入第一层所需的镉溶液,待 8min 后,加入第一层所需的硫溶液,25min 后,再加入第二层所需的镉溶液,同样待 8min 后,加入第二层所需的硫溶液。制备好的 CdSe/CdS 量子点用丙酮沉淀、洗涤两遍后,避光密封保存在冰箱中待用。

[0126] 3. 纳米量子点的表面修饰

[0127] (1) 巯基乙酸修饰 CdSe/CdS 量子点: CdSe/CdS 油溶性量子点先用丙酮洗涤三次,离心分离取沉淀,再用氯仿溶解分散 CdSe/CdS 油溶性量子点。取过量巯基乙酸加入到 CdSe/CdS 油溶性量子点氯仿溶液中,避光搅拌 6 小时,油溶性量子点表面的 TOPO/TOP 有机小分子大都就被水溶性的巯基乙酸分子所替代,从而实现油溶性量子点的水溶化。反应 6 小时后,离心取沉淀,再用 PBS 溶解分散,再离心,反复三次以除去过量的巯基乙酸和其他有机分子。

[0128] (2) 双亲性高分子疏水自组装改性量子点:取适量的油溶性量子点粉末和双亲性三嵌段高分子溶解在 3:1 的氯仿/乙醇溶液中。搅拌数小时以除去氯仿有机溶剂。当氯仿

被除去后（闻不到氯仿气味时），加入适量的 PBS 缓冲溶液，再超声分散 3 分钟。所得到的溶液再过 0.22 μ m 膜以除去大量未结合的高分子，过膜后溶液变得光学透明。所得到的过膜溶液再用超滤管浓缩到一定浓度后再过凝胶色谱柱，进一步除去未结合的高分子。收集组分再用超滤管浓缩到适当浓度以备用。

[0129] (3) 超声乳化改性：取合适摩尔比的油溶性量子点 / 三嵌段高分子，溶解在二氯甲烷中。溶解完全后，用洁净干燥的 1ml 注射器移取量子点 / 高分子溶液。称取 6.0mg 的 F-68 乳化剂溶解在去离子水中，剧烈搅拌得到均匀的乳液后放入超声探头下，超声探头伸入液面 0.5cm 以下，注射器针头与超声探头底部平行。开动超声，功率 50 瓦，工作时间设置为 5 秒，间歇时间为 3 秒。在超声进行时，缓慢注入量子点 / 高分子溶液，此时溶液变为乳白色且在手提紫外灯照射下发出明亮的荧光。注射完毕，迅速将乳液放在磁搅拌仪上搅拌以维持稳定乳液状态，且进一步除去二氯甲烷有机溶剂。半小时后离心分离取沉淀，反复 3 次以除去没有结合的高分子和 F-68 乳化剂分子。

[0130] 4. 测定

[0131] 制得的 CdSe 量子点的紫外吸收和发射光谱如图 1 所示，其吸收光谱宽且连续分布，在吸收光谱上有 4 个激子吸收峰，表明所得产物的强量子效应。第一激子吸收峰尖锐，且随着粒径变大而红移。发射谱窄而对称，而且没有长波拖尾现象，半峰宽只有 23nm。随着产物的粒径大小不同，其发射光谱也不同，粒径变大，其发射光谱也随之红移。如此狭窄的谱峰说明产物的粒径分布非常狭窄（可以从 HRTEM 照片中看出其单分散性质）。

[0132] 图 2 是巯基乙酸修饰 CdSe/CdS 油溶性量子点的紫外吸收光谱。从图上可以看出，修饰后第一激子吸收峰变得平坦，第一激子吸收峰几乎没有偏移，说明改性后光谱特性变动甚少。

[0133] 跟踪巯基乙酸修饰后产物的稳定性，修饰后的量子点在一周后出现少许沉淀物，且出现沉淀现象的程度与量子点溶液的浓度相关，浓度越大，出现沉淀现象越明显。油溶性量子点表面的有机物层被亲水性的巯基乙酸取代，Cd-S 键结合的牢固程度决定了量子点的聚集程度。巯基乙酸修饰后，由于破坏了原有量子点表面化学结构，且在空气水溶液介质中，巯基乙酸小分子也会由于量子点表面光氧化，光降解而脱离量子点，量子点浓度越大，其相互之间聚集的机会越大，从而加大沉淀的形成。

[0134] 双亲性高分子自组装核心是通过疏水作用结合。油溶性量子点表面的 TOPO/TOP 均是含有 8 个碳原子的烷基疏水链，我们所采用的三嵌段高分子含有丰富的亲水性羧基基团，经过部分羧基烷基化改性，使之连接上具有 8 个碳原子的辛胺。这样通过高分子上的 8 碳原子与量子点表面的 8 碳原子疏水作用结合，在量子点表面进行自组装，且高分子上的羧基提供亲水性，使得油溶性量子点水溶性化。

[0135] 图 3 为双亲性高分子材料自组装改性量子点的 TEM 照片 190,000 \times 。

[0136] 图 4a 是双亲性高分子疏水自组装改性量子点的紫外吸收光谱。高分子材料由于对光也有吸收和折射，水溶改性后第一激子吸收峰变得平坦，且最大吸收峰红移少许，表明量子点表面有高分子包裹。图 4b 是改性后的荧光光谱。其半峰宽基本没有变化，但最大发射波长有红移（585-596nm），进一步说明了量子点表面有被高分子包裹。

[0137] 图 5 是超声乳化改性量子点后的 TEM 照片。从图上可以看出粒径均匀，纳米颗粒表面光滑，呈球形。且实现了量子点的单个包裹。每个颗粒里面的小黑点是油溶性 CdSe/CdS

QDs。超声乳化改性,可以在量子点表面形成比较致密严实的高分子层,能更好的保护量子点,避免环境介质渗入而造成量子点的发光性能的破坏(如光降解,光漂白,以及Cd离子的渗出而产生毒性);纯化简单,只需离心,而一般水溶性改性(通过疏水作用自组装改性)需要过膜—浓缩—凝胶过滤—再浓缩等步骤。采用O/W,有机溶剂用量少,省时节能,环境友好;疏水作用自组装修饰的纳米粒子表面不光滑,而超声乳化制备的纳米粒子表面光洁,不容易引起非特异性吸附,能更好的应用在生物检测方面。

[0138] 图6是超声乳化改性量子点的紫外吸收光谱。高分子材料由于对光也有吸收和折射,水溶改性后第一激子吸收峰变得平坦,表明量子点表面有高分子包裹且最大吸收峰几乎没有变化,说明量子点原有的光谱特性得以保留。从改性后的荧光光谱看最大发射波长有红移(612-619nm),进一步说明了量子点表面有被高分子包裹。

[0139] 实施例5:抗体的量子点标记

[0140] 1. 醛基化玻片的制备

[0141] 将玻片用洗液(K₂CrO₇20g+浓H₂SO₄350ml+H₂O40ml)浸泡过夜,然后用大量的去离子水冲洗,60℃烘干2h后,将玻片浸入5%APTES的乙醇溶液中作用60min进行玻片表面的氨基化,取出水洗,晾干后,将玻片浸入含5%戊二醛的PBS(0.2mol/L, pH8.0)溶液中进行玻片的醛基化,PBS溶液清洗晾干后备用。

[0142] 为了验证醛基化玻片的效果,用PAPpen在玻片上画圈,标记出溶液反应的位置。在圆圈内加入兔IgG,37℃温孵2h,PBS-T(0.01mol/L, pH7.2, 0.05% Tween20)洗涤4次,10s/次;同等条件下,再以含1%BSA的0.02mol/L PBS溶液封闭1h。双蒸水清洗,晾干后,加入量子点标记的羊抗兔IgG和量子点标记的羊抗鸡的IgG(如图7所示),孵育30min,PBS-T洗涤4次,每次10min,最后用双蒸水冲洗,荧光显微镜下观察。如图7所示,加入羊抗兔IgG可以看见橙黄色的荧光,而加入羊抗鸡的IgG没有荧光,从而证明我们制作的醛基化玻片表面能固定蛋白,并能保持所固定蛋白的活性。

[0143] 2. 用交联剂EDC和sulfo-NHS,采用共价键连接的方法进行抗体的量子点标记

[0144] 参见图8所示,EDC和量子点表面的羧基反应生成酰基异脲,但酰基异脲在水溶液中容易水解,又生成羧基产物。如果在溶液中加入sulfo-NHS,酰基异脲就极易和sulfo-NHS反应,生成具有胺反应活性的sulfo-NHS酯,sulfo-NHS酯与抗体表面的氨基反应生成稳定的酰胺,从而进行抗体的量子点标记。

[0145] 具体的反应条件如下:

[0146] (1) 在1ml的活化缓冲液(0.1M MES, 0.5M NaCl, pH6.0)中加入0.4mg(2.0mM)EDC和1.1mg(5.0mM)sulfo-NHS。

[0147] (2) 在溶液中加入20ul量子点溶液(3.0mM),不停地混合溶液,在室温下反应20min。

[0148] (3) 加入1.4ul(20mM)2-巯基乙醇在室温下反应10min,得到活化的量子点溶液。

[0149] (4) 在1ml连接缓冲液(PBS, pH7.5)中加入禽流感所需标记的(抗体与量子点分子数比例为3:1)。并用NaOH溶液调节PH至7.5,在室温下搅拌反应2小时。

[0150] (5) 4000rpm离心分离1分钟,除去小分子和未反应完全的抗体。

[0151] (6) 吸去并弃置上清液。

[0152] (7) 用2ml去离子水溶解沉淀,用反复离心或凝胶填料Sephacrose6FF过滤方法纯

化量子点标记产物。

[0153] 3. 量子点标记产物的纯化

[0154] (1) 沉淀离心纯化:把反应后的溶液 14000rpm 离心 30min。取其沉淀,用去离子水洗涤后,用适量的 PBS (PH7.4, 0.01M) 溶解沉淀得到量子点标记的抗体复合物。

[0155] (2) 凝胶过滤纯化和浓缩(在 AKTA Basic 蛋白纯化仪上进行):取适量的 Sepharose6FF 填料,用抽滤器进行抽滤,并用蒸馏水洗涤 2-3 次。在滤过的填料中按 1:1 的体积比加入蒸馏水,混匀;把填料连续地倒如柱中,打开泵装置,并用蒸馏水进行洗涤,直至填料的液面位置不再下降为止,标记此时填料的液面位置;松开柱头,调整柱头的位置为填料液面以下 2-3mm;用 0.01M, pH7.4 的 PBS 作用平衡液,流速为 2ml/min,观察测定的实时的 OD₂₈₀ 值曲线,到 OD₂₈₀ 值曲线稳定为一条直线时停止平衡;用自动加样器加入量子点标记的抗体溶液,用 0.01M, pH7.4 的 PBS 作为洗脱液,流速为 2ml/min;收集洗脱液,每管 1ml,直到显示的 OD₂₈₀ 值曲线为一条平直的直线时停止收集;按照 OD₂₈₀ 值曲线显示的各峰的 OD₂₈₀ 值,合并各峰的洗脱液,其中峰 1 的洗脱液为量子点标记的抗体溶液;将提纯的量子点标记的抗体溶液装入透析袋中。用固体聚乙二醇 (PEG, 分子量 6000) 包埋 10h 进行浓缩。

[0156] 4. 结果测定

[0157] (1) 量子点标记禽流感多抗

[0158] 我们把最后 PBS 溶解沉淀得到的溶液用凝胶过滤填料 sepharose6FF 过柱。用 PBS (0.1M, pH7.4) 作为平衡液和洗脱液,得到一个尖峰,峰形如图 9 所示。由此看出,沉淀离心后得到的量子点标记多抗的产物为量子点标记多抗的复合物,并通过离心去除了未连接的游离的抗体、未反应的小分子偶联剂以及其他的中间产物等。

[0159] 合并该峰的收集组分,在表面固定有禽流感抗原的玻璃片上进行封闭和洗涤后,滴加该峰的收集组分,洗涤后,在荧光显微镜下观察,可以观察到橙黄色的荧光(如图 10)。

[0160] 由此看出,沉淀离心后得到的量子点标记多抗的产物为量子点标记多抗的复合物,并通过离心去除了未连接的游离的抗体、未反应的小分子偶联剂以及其他的中间产物等。合并沉淀洗涤过程中的上清液,测定 D280、D260,计算上清液中游离抗体浓度,根据反应前加入的抗体的量,由此我们计算得到抗体的量子点标记效率为 41.83%。

[0161] 取量子点标记后的抗体溶液,不经过离心,直接用凝胶过滤填料 sepharose6FF 进行纯化,用 PBS (0.1M, pH7.4) 作为平衡液和洗脱液,得到的谱图如图 11。

[0162] 合并峰 1、峰 2 和峰 3 的收集组分,在紫外透射仪下观察,收集的峰 1 组分发出橙黄色的荧光,而峰 2 和峰 3 的组分没有发出荧光。在表面固定有禽流感 H5NI 抗原的玻璃片上进行封闭和洗涤后,滴加各峰的收集组分,洗涤后,在荧光显微镜下观察,可以观察到加入峰 1 组分的玻璃片发出橙黄色的荧光,可以证明峰 1 为量子点标记的禽流感多抗(如图 12a),而加入峰 2 和峰 3 的组分的玻璃片在荧光显微镜下没有观察到荧光(如图 12b、12c),从而证明峰 1 组分为我们的目标产物即量子点标记禽流感多抗复合物。

[0163] 分别测定峰 1、峰 2、峰 3 组分的吸光度,按照各峰收集的体积和浓度可以算出禽流感多抗的量子点标记效率为 42.64%。

[0164] 由此,我们可以看出,可以用沉淀离心和过柱的方法对量子点标记禽流感多抗的反应产物进行纯化,两种方法得到量子点标记禽流感多抗的效率分别为 41.83% 和 42.64%。

[0165] (2) 量子点标记禽流感单抗

[0166] 我们采用了同样的方法用制备的量子点标记禽流感单抗,并分别用沉淀离心和过柱的方法对标记的产物进行了纯化:

[0167] 取峰 1 的组分加到表面固定有禽流感抗原的玻片上进行封闭和洗涤后,滴加该峰的组分,洗涤后,在荧光显微镜下观察,可以观察到滴加峰 1 组分的玻片发出橙黄色的荧光,可以证明峰 1 为量子点标记的禽流感单抗。

[0168] 通过沉淀离心方法得到的量子点标记物,过柱以后得到一个尖峰(如图 14):通过计算,沉淀离心和凝胶过滤的方法对量子点标记的多抗产物进行纯化,最后得到量子点标记的禽流感多抗复合物的产率 45.38%和 46.18%。

[0169] 从上述实验中可以看出,通过沉淀离心和凝胶过滤的方法都可以对标量点标记禽流感的单抗和多抗进行纯化,沉淀离心得到的目标产物的产率略低于凝胶过滤,但是凝胶过滤其操作费时,凝胶过滤后还需要浓缩,故我们采用沉淀离心的方法对量子点标记产物进行纯化。

[0170] 实施例 6:样品的检测

[0171] 1. 检测方法:在醛基化的玻片表面滴加待检样品尿囊液,37℃ 孵育 2h。用 PBS(0.01M, pH7.2) 洗涤玻片 3 次,每次 5min。然后在玻片表面滴加含 5% BSA 的 PBS-Tween 溶液,37℃ 孵育 45min。用 PBS(0.01M, pH7.2) 洗涤玻片 3 次,每次 5min 后,加入量子点标记的禽流感抗体,37℃ 孵育 45min,用 PBS(0.01M, pH7.2) 洗涤玻片 3 次,每次 5min,室温下晾干后在荧光显微镜下观察,判断样品的阴阳性。

[0172] 2. 降低方法的非特异性研究

[0173] 在玻片上孵育阴性样品后,进行封闭和洗涤,然后加入量子点标记的禽流感多抗和禽流感标记的单抗,进行以下的方法非特异性研究:

[0174] (1) 分别加入浓度为 0.5%、0.8%、1.0%和 1.5%的 BSA 进行封闭,研究不同浓度 BSA 封闭的效果。

[0175] (2) 实验浓度为 0.1、0.05、0.02、0.01、0.005 缓冲体系中,样品检测出现的非特异性,确定缓冲溶液的离子强度。

[0176] (3) 中 Tween-20 浓度的确定在 PBS 缓冲液中分别加入浓度为 0.01%、0.05%、0.1%、0.2%和 0.5%的 Tween-20,试验洗涤液中 Tween-20 的浓度。

[0177] 结果:通过在阴性样品上加入不同浓度 BSA 的封闭效果研究,我们选定浓度为 1% BSA 作为封闭液。由于量子点表面修饰羧基,带负电,所以离子强度过高,会引起静电吸附,我们适当降低了缓冲溶液的离子强度,以降低非特异性吸附。经过实验,我们采用了 0.01M、pH7.4 的 PBS 为缓冲溶液。为了减少非特异性吸附,我们在洗涤液 PBS 中加入不同浓度的 Tween。通过实验确定,我们选用 0.1%的 PBS-T 作为洗涤缓冲液。通过实验验证,本方法中,用量子点标记的单抗其特异性要略优于量子点标记的禽流感多抗。

[0178] 3. 方法的特异性研究

[0179] (1) 标记选择的禽流感单抗或多抗,用量子点标记的抗体分别检测常见的禽类病毒:新城疫 F48E9、IBDV、鸭瘟病毒和鸭肝炎病毒进行检测,观察是否出现假阳性结果,验证方法的特异性。

[0180] (2) 取一份未感染禽流感病毒的鸡胚尿囊液,分别按本研究所建立的方法和间接

免疫荧光法进行检测,在荧光显微镜下观察,比较两种方法的非特异性。

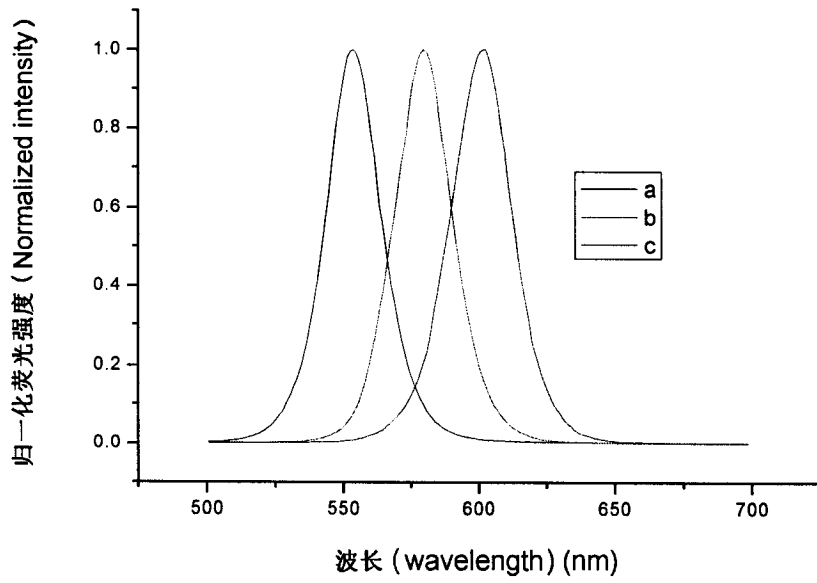
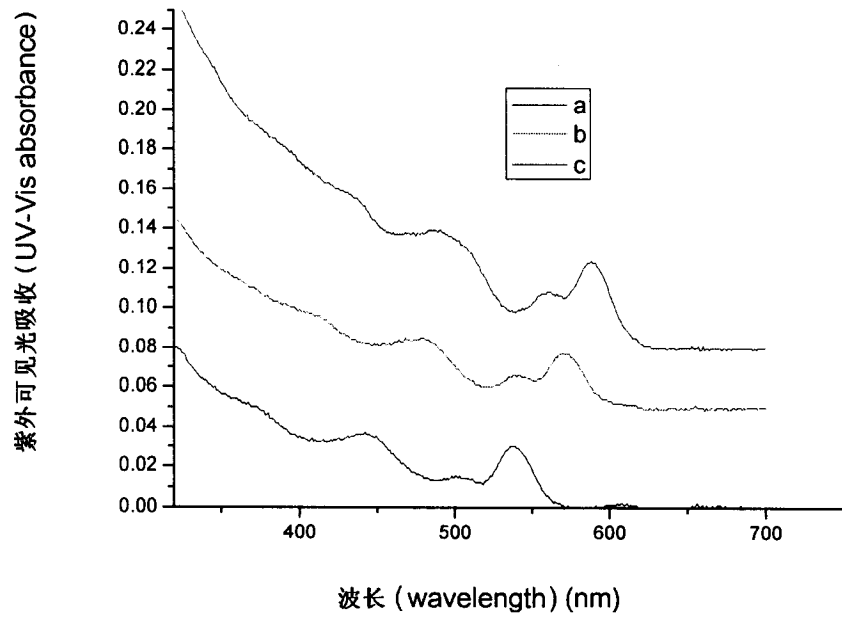
[0181] 结果:(1)图 15a、b、c 和 d 分别表示量子点标记的 H5N1 型禽流感单抗检测新城疫 F48E9、IBDV、鸭瘟病毒和鸭肝炎病毒,实验结果证明,没有出现假阳性结果。证明方法的特异性较好。(2)分别按本研究建立的方法和间接荧光免疫法对未感染禽流感病毒的尿囊液进行检测,两种方法检测的结果如图 16, a 为本研究建立方法的检测结果, b 为免疫荧光检测的结果。从图 16 可以看出,本研究所建立的检测方法,其非特异性较好,没有观察到非特异性的荧光,而用免疫荧光方法出现了少量的非特异性荧光。证明此方法的特异性要优于免疫荧光的方法。

[0182] 4. 方法的灵敏度研究

[0183] 取感染的尿囊液作 10 倍梯度稀释,然后用本研究所建立的方法进行检测,确定方法的灵敏度。结果:通过实验验证,我们在检测尿囊液时,本研究所建立的方法能检测鸡胚尿囊液的最高稀释倍数为 10^{-6} 。

[0184] 5. 检测结果的稳定性研究

[0185] 用本研究所建立的方法对阳性样本进行检测,然后在室温下放置 1 天、3 天、5 天、10 天、15 和 30 天后再观察检测结果。结果:通过实验证明,检测过的样本在室温下放置 30 天后仍能观察到明亮的荧光。



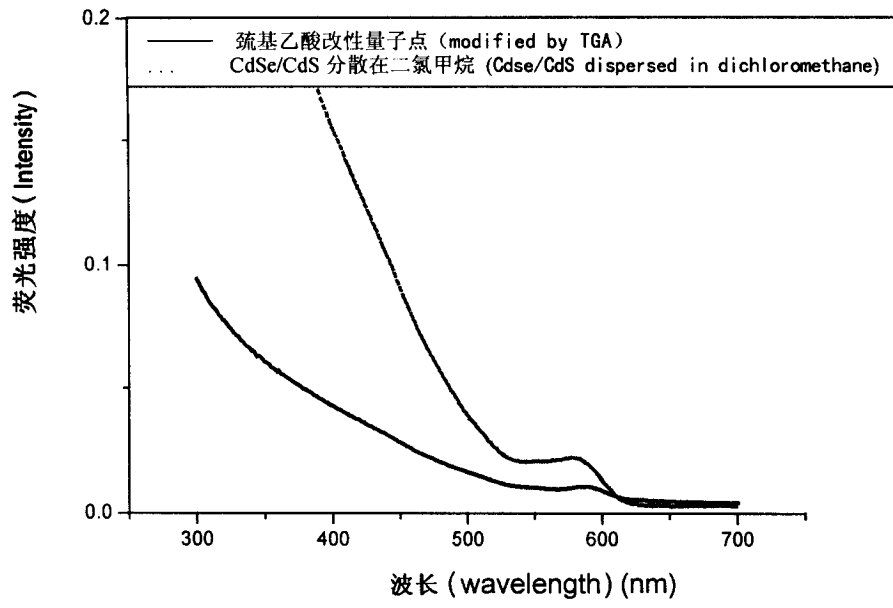


图 2

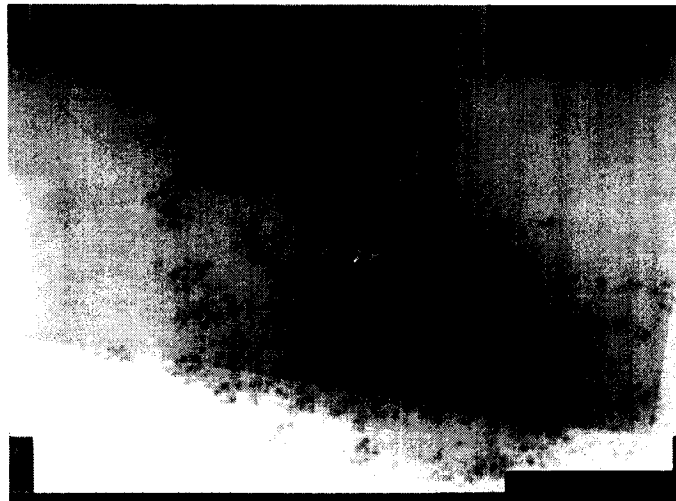


图 3

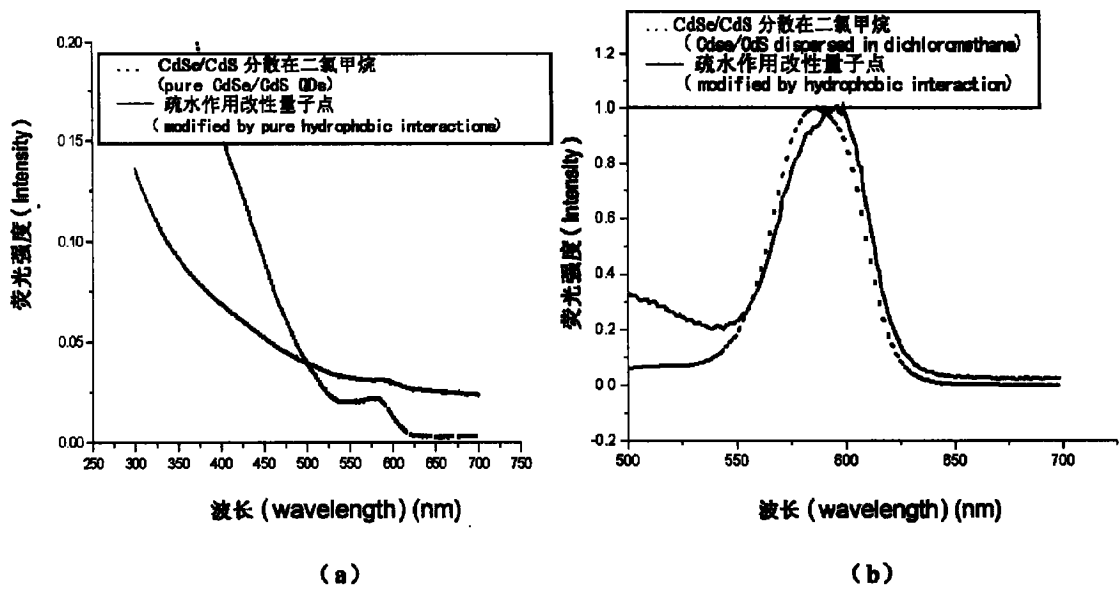


图 4

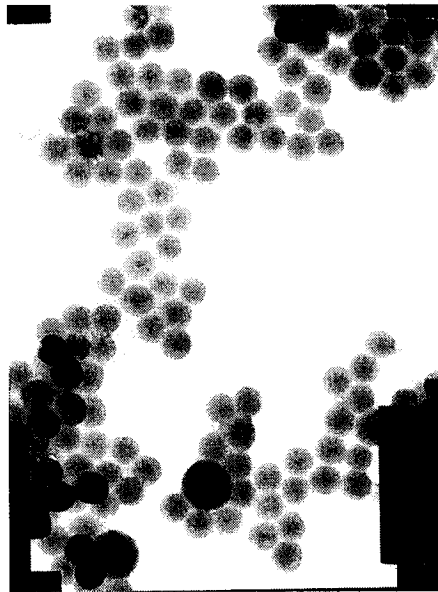


图 5

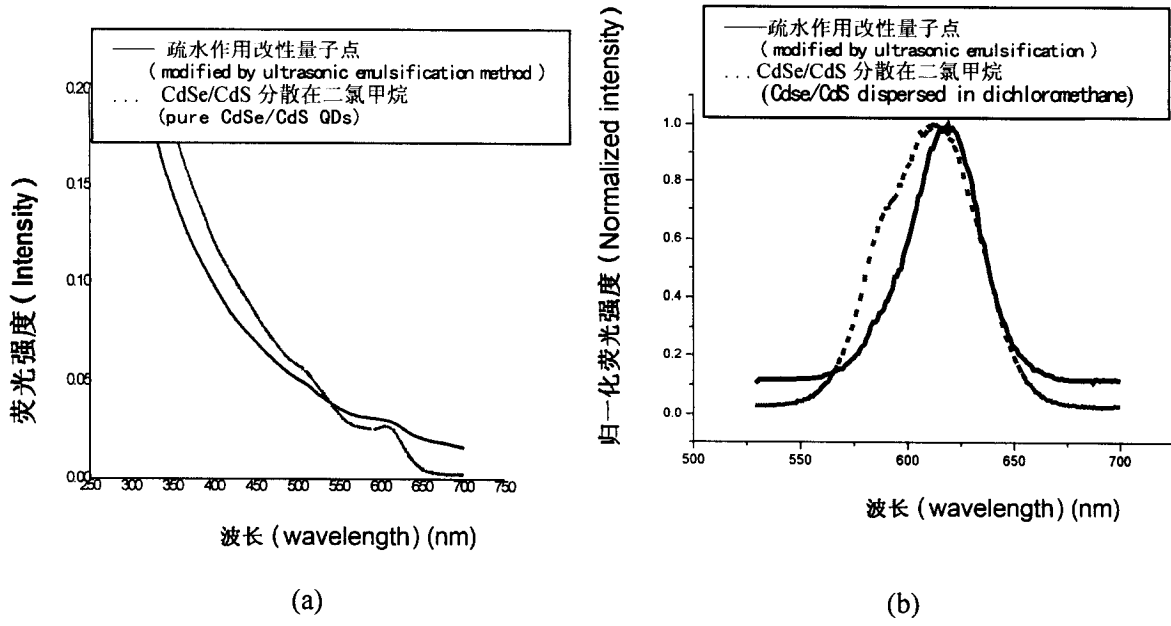


图 6



图 7

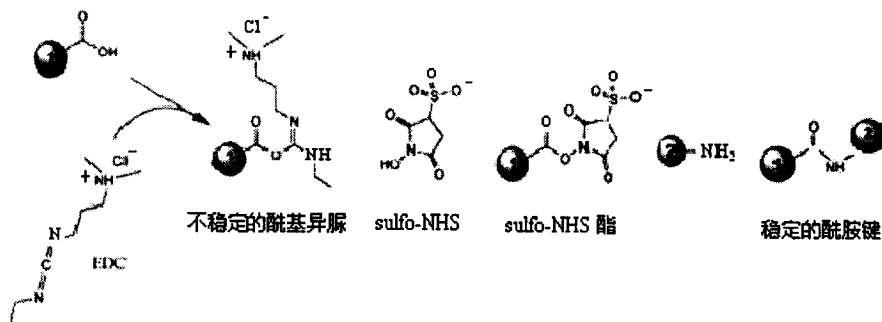


图 8

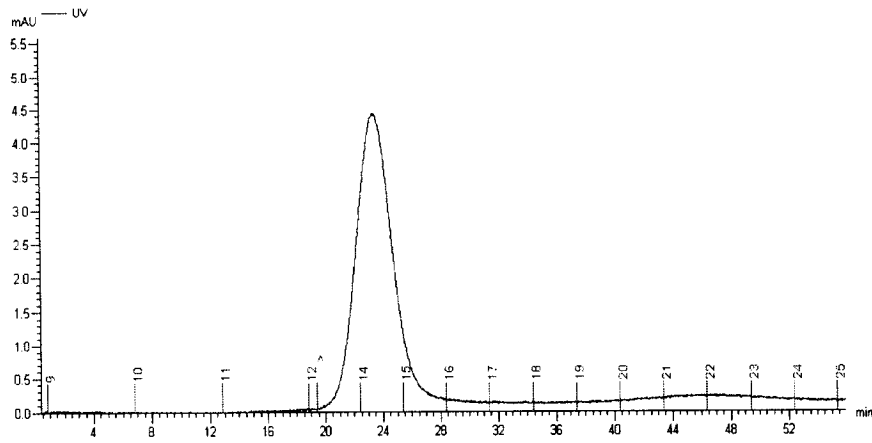


图 9

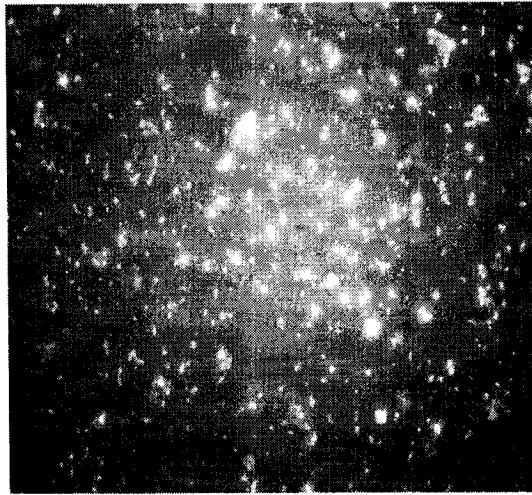


图 10

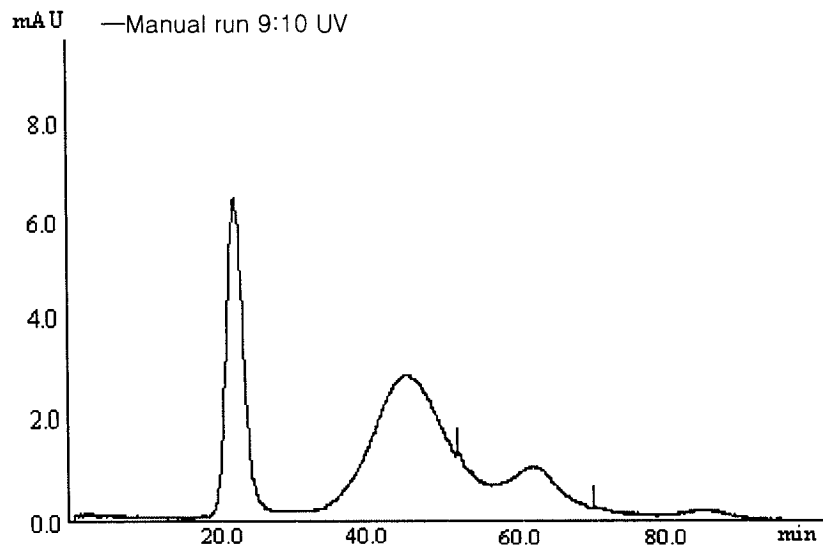


图 11

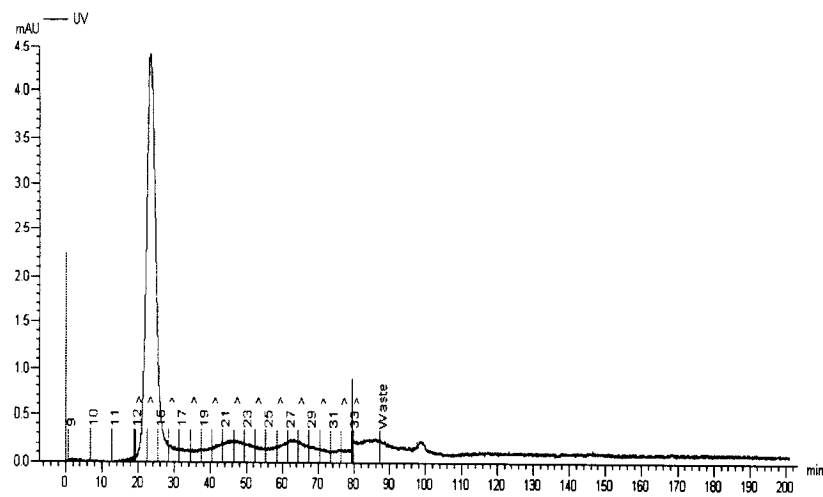
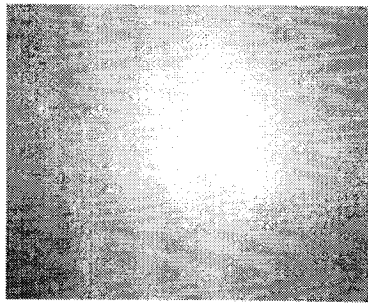
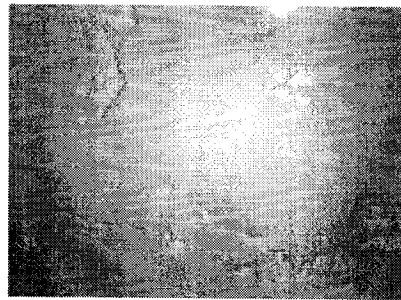


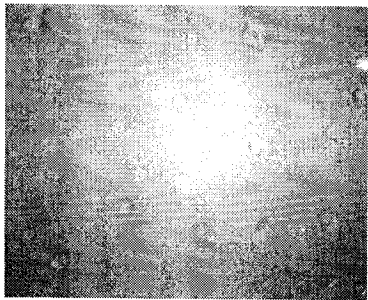
图 14



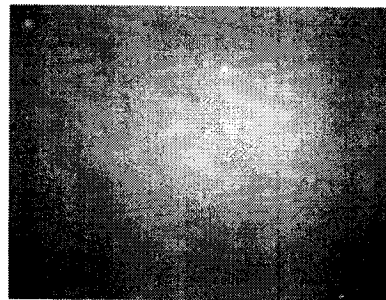
(a)



(b)

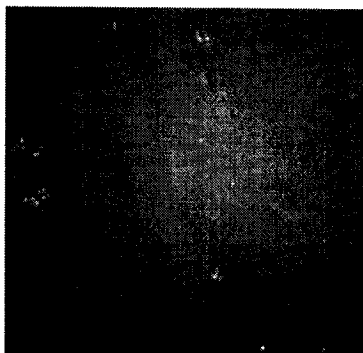


(c)

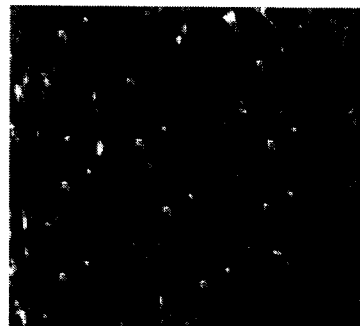


(d)

图 15



(a)



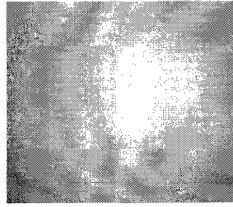
(b)

图 16

专利名称(译)	H5N1型高致病性禽流感的纳米量子点检测方法		
公开(公告)号	CN101290319B	公开(公告)日	2013-05-08
申请号	CN200710065554.X	申请日	2007-04-16
[标]申请(专利权)人(译)	北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心 天津大学		
申请(专利权)人(译)	北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心 天津大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心 天津大学		
[标]发明人	马贵平 常津 刘旭辉 张兵波 李冰玲 史喜菊 李炎鑫 刘全国		
发明人	马贵平 常津 刘旭辉 张兵波 李冰玲 史喜菊 李炎鑫 刘全国		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533 G01N33/569		
代理人(译)	李超		
审查员(译)	高宇		
其他公开文献	CN101290319A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

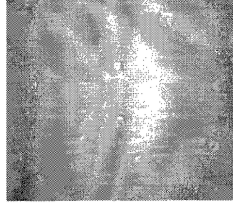
本发明公开了一种H5N1型高致病性禽流感的纳米量子点检测方法，属于属于检验检疫领域。该方法包括如下步骤：(1)制备和纯化H5N1型禽流感单克隆抗体或多克隆抗体；(2)制备水溶性羧基化纳米量子点；(3)纳米量子点标记H5N1型禽流感单克隆抗体或多克隆抗体；(4)样品测定。本发明的优点是：纳米量子点应用于H5N1型高致病性禽流感检测的诊断方法，该方法快速、稳定、便于高通量检测、条件要求低、操作简便，易于推广，具有操作简单、快速和灵敏度高等特点。该方法的建立将为我国高致病性禽流感的监测和诊断提供了一种有效的手段，在进出口检疫上具有良好的推广和应用前景。



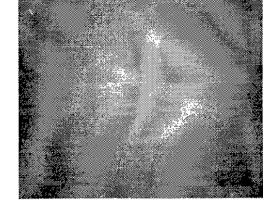
(a)



(b)



(c)



(d)