



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106093391 A

(43)申请公布日 2016. 11. 09

(21)申请号 201610383089.3

(22)申请日 2016.05.31

(71)申请人 南方医科大学

地址 510515 广东省广州市白云区广州大道北1838号

(72)发明人 刘天才 陈振华

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 单香杰

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

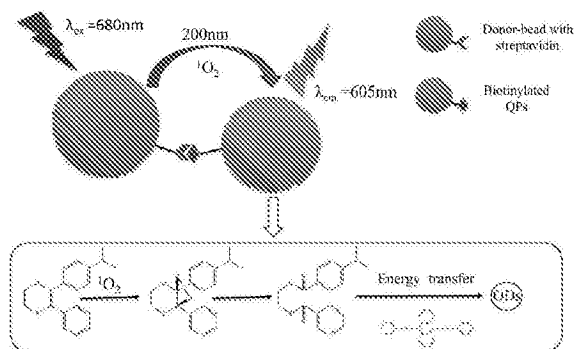
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种基于单线态氧通道发光量子点传感器

(57)摘要

本发明公开了一种基于单线态氧通道发光量子点传感器,包括量子点纳米水溶胶与功能化感光微球;量子点纳米水溶胶是将发射波长在520~620 nm之间的脂溶性量子点改性成水溶性量子点;水溶性量子点和噻嗪化合物包被入羧基、氨基、羟基、醛基或磺酸基修饰的纳米乳胶球中制备出量子点纳米乳胶球;将量子点纳米乳胶球表面修饰葡聚糖凝胶得到量子点纳米水溶胶;功能化感光微球是将感光材料酞菁化合物包被入羧基、氨基、羟基、醛基或磺酸基修饰的纳米乳胶球中,得到功能化感光微球。本发明的传感器是基于单线态氧传递的新型均相荧光免疫分析传感器,改变了传统能量配体一对一的方式,并且突破20nm的空间检测距离。



1. 一种基于单线态氧通道发光量子点传感器,其特征在于,包括量子点纳米水溶胶与功能化感光微球;所述量子点纳米水溶胶的制备步骤如下:将发射波长在520~620 nm之间的脂溶性量子点改性成水溶性量子点;将制备的水溶性量子点、噻嗪化合物包被入羧基、氨基、羟基、醛基或磺酸基修饰的纳米乳胶球中制备出量子点纳米乳胶球;对量子点纳米乳胶球进行水溶胶非特异性处理,将量子点纳米乳胶球表面修饰葡聚糖凝胶得到量子点纳米水溶胶;所述功能化感光微球的制备方法为:将感光材料酞菁化合物包被入羧基、氨基、羟基、醛基或磺酸基修饰的纳米乳胶球中,得到功能化感光微球。

2. 根据权利要求1所述的传感器,其特征在于,所述脂溶性量子点为硒化镉、硫化镉或碲化镉为核的各种半导体纳米晶体。

3. 根据权利要求1所述的传感器,其特征在于,所述脂溶性量子点改性成水溶性量子点的方法为:将稳定剂加入到溶解于三氯甲烷的脂溶性量子点中,混合均匀;加入0.1M的氢氧化钠溶液振荡孵育,室温下保存1~3小时;加入去离子水和丙酮,沉淀、离心、溶解即可得到水溶性量子点。

4. 根据权利要求3所述的传感器,其特征在于,所述稳定剂为巯基丁二酸、谷胱甘肽或巯基乙酸。

5. 根据权利要求1所述的传感器,其特征在于,所述量子点纳米乳胶球的制备方法具体为:向水溶性量子点中加入三辛基膦,加热,搅拌均匀,然后与溶胀剂、噻嗪化合物和羧基、氨基、羟基、醛基或磺酸基修饰的纳米乳胶球混合均匀,在110~120℃高温热溶胀5~30min,冷却到室温,高速离心沉淀洗涤,得到量子点纳米乳胶球。

6. 根据权利要求1或5所述的传感器,其特征在于,所述噻嗪化合物的制备方法为:将对溴苯胺溶解于二甲基亚砷溶液中,分别加入1-溴正十四烷和N,N'-二异丙基乙胺,在氮气保护下,加热到90℃,反应16 小时后冷却至室温;往反应液再次加入1-溴正十四烷和N,N'-二异丙基乙胺,再次加热到90℃反应15 小时;反应液冷却至室温,真空干燥并将残留液用二氯甲烷稀释,分别使用NaOH (2×)水溶液,水和盐水萃取洗涤,最后使用Na₂SO₄干燥;反应液浓缩得到棕黑色油,使用HPLC制备液相分离,流动相为正己烷,得到黄色油,减压蒸馏除去杂质,即得棕色油状产物。

7. 根据权利要求1所述的传感器,其特征在于,所述量子点纳米水溶胶的具体制备方法为:将氨基葡聚糖溶解于MES缓冲液中,调节pH为6.0后逐滴加入量子点纳米乳胶球中;搅拌加入EDAC溶液和MES缓冲液,室温下持续搅拌2小时;加入乙醇胺孵育30min,17000rpm离心弃掉上清液;将沉淀物溶于去离子水中,超声处理,重复该步骤三次,即得。

8. 根据权利要求1所述的传感器,其特征在于,所述功能化感光微球的制备方法为:将羧基、氨基、羟基、醛基或磺酸基修饰的纳米乳胶球加入到乙二醇中,取酞菁化合物溶于苯甲醇中,二者混合后加入去离子水,混匀后110℃反应10分钟,冷却至室温后添加乙醇,尺寸选择性离心。

一种基于单线态氧通道发光量子点传感器

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,具体地,涉及一种基于单线态氧通道发光量子点传感器。

背景技术

[0002] 癌胚抗原(Carcinoembryonic antigen,CEA)是一种糖蛋白复合物,分子量约为220KDa左右,它是由加拿大科学家Samuel O.Freedman和Phil Gold于1965年在结肠癌组织提取物当中首次发现。通常而言,癌胚抗原是在胎儿时期,由胃肠道组织、胰和肝脏细胞合成,并在出生后基本停止合成。因此正常健康个体的血清当中癌胚抗原的含量维持在很低的水平,约为2.5 μ g/mL。通常认为,血清中CEA水平的升高在胃癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、甲状腺髓样癌患者当中较为常见,也常见于一些非肿瘤性疾病当中,比如溃疡性结肠炎、胰腺炎、肝硬化、慢性阻塞性肺病、克罗恩病等。因此,血清当中CEA含量的检测对上述疾病的诊断与治疗具有重要的价值。

[0003] 目前国内对癌胚抗原的检测主要采用传统的非均相分析(如ELISA,DIPSTICK等)以及新型的高端定量免疫学检测技术(如时间分辨荧光免疫分析TRFIA,微阵列等)。许多相关技术都用到微球,也能做到很高灵敏度的定性定量分析,但大多数微球使用的是有机染料,而且多为固相的或非均相分析,整个操作过程步骤多,需要洗涤来分离结合标记与游离标记,耗费时间长,不易自动化等缺点。而均相荧光共振能量转移分析就可以克服这些缺点,分析操作简单,不需要洗涤分离游离标记物,分析速度快,易实现自动化等优点,在生物分析领域其应用越来越广泛。

[0004] 现有的均相时间分辨荧光能量共振转移分析(HTRFA)技术体系中,能量供体与受体是一对一的分子相互作用形成能量转移,从而实现定性定量分析。其技术瓶颈在于:一对一的分子能量共振能量转移(FRET)效率很低,供体的能量不能充分利用,其灵敏度受到一定的限制;其次,目前这些分析方法用到的能量受体是荧光素(fluorescein)、青色素(cyanine,cy),亚历克撒染料(Alexa),藻红蛋白(phycoerythrin,PE)或别藻红蛋白(allophycocyanin,APC)等有机染料。尽管有机染料已使用数十载,然而,众所周知,有机染料致命的缺点就是光谱的Stock位移比较短,荧光发射峰不对称且有明显拖尾,抗光漂白性极差,使得基于荧光值分析测试方法的生物分析,尤其是HTRFA很不稳定,效率低下,间内和间外分析偏差较大。因此,有机染料并非HTRFA能量受体的最佳选择。而且,FRET传递距离限制较大,一般不能超过10nm的空间距离。另一方面,由于大多数有机染料荧光发射光谱宽而且有明显拖尾,现有HTRFA技术仅适合在长波长或近红外波段进行分析,对昂贵的近红外敏感检测器要求依然存在。

发明内容

[0005] 本发明为了克服现有技术的上述不足,提供了一种基于单线态氧通道发光量子点传感器。

[0006] 为了实现上述目的,本发明是通过以下方案予以实现的:

[0007] 一种基于单线态氧通道发光量子点传感器,包括量子点纳米水溶胶与功能化感光微球;所述量子点纳米水溶胶的制备步骤如下:将发射波长在520~620nm之间的脂溶性量子点改性成水溶性量子点;将制备的水溶性量子点、噻嗪化合物包被入羧基、氨基、羟基、醛基或磺酸基修饰的纳米乳胶球中制备出量子点纳米乳胶球;对量子点纳米乳胶球进行水溶胶非特异性处理,将量子点纳米乳胶球表面修饰葡聚糖凝胶得到量子点纳米水溶胶;所述功能化感光微球的制备方法为:将感光材料酞菁化合物包被入羧基、氨基、羟基、醛基或磺酸基修饰的纳米乳胶球中,得到功能化感光微球。

[0008] 本发明的传感器不同于传统的荧光共振能量转移而发光,主要是基于单线态活性氧而发光。本发明的传感器是基于单线态氧通道能量传递技术与量子点纳米水溶胶(TQPS)内部的荧光共振能量转移的联合应用。

[0009] 优选地,制备量子点纳米水溶胶时用的纳米乳胶球为聚苯乙烯-二乙烯基苯羧酸改性胶乳,制备功能化感光微球时用的纳米乳胶球为表面羧基化的聚苯乙烯微球。纳米乳胶球具有以下特性:表面具有多孔性、表面含有羧基化合物、光学通透性、粒径分布均匀。

[0010] 脂溶性量子点是指量子点能溶解于癸烷、己烷、三氯甲烷等有机溶剂内。优选地,所述脂溶性量子点为硒化镉、硫化镉或碲化镉为核的各种半导体纳米晶体。根据具体情况选择所需波长的量子点,只要其发射波长在520~620nm之间,均适合本发明。量子点的生物应用层出不穷,因其抗光漂白性极强,亮度高,一束激光光源可同时激发不同颜色的量子点,而且能经受激光的多次激发照射而荧光强度无明显变化;此外,量子点的光谱Stock位移比较宽,荧光发射峰窄而对称,无拖尾,该特性使得量子点纳米乳胶球能满足该免疫分析方法灵敏度和精密度要求,不需要昂贵的红敏检测器件。量子点荧光发射波谱最大半峰宽窄,不同波长的量子点可以使用同一激发光激发等特性,因此,具有发射峰在525、565或605nm的其荧光发射波谱与噻嗪化合物荧光发射重叠较少,而这些量子点的摩尔激发光谱与噻嗪化合物荧光发射重叠较多,最适合与噻嗪化物之间实现均相荧光共振能量转移分析。

[0011] 由于直接从水溶液制备的量子点的最大半峰宽一般较大,接近60nm,不适合本发明CEA分析。因此,本发明采用脂溶性量子点,然后改性成为水溶性量子点。由于只是进行量子点表面改性,不存在对发光核心材料的影响,改性后得到的荧光发射峰位置和粒径等与油溶性相比无明显差异;改性方法简单易行,可操作性强;

[0012] 优选地,所述脂溶性量子点改性成水溶性量子点的方法为:将稳定剂加入到溶解于三氯甲烷的脂溶性量子点中,混合均匀;加入0.1M的氢氧化钠溶液振荡孵育,室温下保存1~3小时;加入去离子水和丙酮,沉淀、离心、溶解即可得到水溶性量子点。

[0013] 优选地,所述稳定剂为巯基丁二酸、谷胱甘肽或巯基乙酸。

[0014] 更优选地,所述脂溶性量子点改性成水溶性量子点的方法为:将25mg巯基丁二酸稳定剂加入到溶解于三氯甲烷中硒化镉量子点(1~5 μ M)500 μ L,混合均匀,加入0.1M的氢氧化钠溶液10~100 μ L,振荡孵育,室温下保存1~3小时。加入400 μ L去离子水,和1.8mL丙酮,沉淀,离心,溶解于0.5mL的去离子水中,即可得到水溶性量子点。

[0015] 优选地,使用水溶性量子点制备量子点纳米乳胶球之前,可以使用三辛基氧膦、正十六胺或其他碳链大于五的正烷烃修饰水溶性量子点表面,使其表面具有疏水和亲水的双

能性基团。预处理的方法为：将三辛基氧膦加入到水溶性量子点中；加热到60℃，剧烈搅拌，使之完全溶解，冷却至室温；先后加入苯甲醇、乙二醇和浓度为0.1M的氢氧化钠溶液搅拌混合均匀。

[0016] 传感器中量子点纳米水溶胶是能量受体，功能化感光微球是能量供体。供体与受体之间可实现长达200nm的远距离能量转移。

[0017] 量子点纳米乳胶球内包含具有与单线态氧反应的化学试剂、量子点。化学试剂指的是能量受体，其包含噻嗪化合物或其他具有能与单线态氧反应时释放200~400nm荧光的化学试剂，噻嗪化合物等化学试剂与单线态氧发生化学反应后，释放出的荧光能与量子点能发生荧光共振能量转移。

[0018] 优选地，所述量子点纳米乳胶球的制备方法具体为：向水溶性量子点中加入三辛基膦，加热，搅拌均匀，然后与溶胀剂、噻嗪化合物和羧基、氨基、羟基、醛基或磺酸基修饰的纳米乳胶球混合均匀，在110~120℃高温热溶胀5~30min，冷却到室温，高速离心沉淀洗涤，得到量子点纳米乳胶球。

[0019] 更优选地，所述溶胀剂是苯甲醇（或三氯甲烷、丙酮、乙氧基乙醇等其他溶剂）、去离子水与乙二醇的混合物，三者的体积比为1:(0.8~1):(8~8.2)。在热溶胀剂保护下，羧基、氨基、羟基、醛基或磺酸基修饰的纳米乳胶球表面在高温下膨胀，不会被过度撕裂而造成表面官能团分布不均，克服量子点荧光淬灭的问题，保持其包被前应有的量子产率，并有效防止沉淀聚集，大大提高量子点纳米乳胶球的稳定性。

[0020] 优选地，所述水溶性量子点的浓度一般为0.1~10μM/mL。羧基、氨基、羟基、醛基或磺酸基修饰的纳米乳胶球一般为1~200mg/mL，粒径一般为20nm~3μm，更优选，粒径为20nm~300nm。另外，作为优选实施方式，制备功能化感光微球时用的纳米乳胶球的粒径≤制备量子点纳米水溶胶时用的纳米乳胶球的粒径。乳胶球表面含有大量羧基化合物，其羧基密度为每平方纳米含有5~12个，该规格的乳胶球是经过特殊处理，不同于一般的羧基化聚苯乙烯微球，表面有微孔能通过热溶胀包容具有双功能团的纳米颗粒，该乳胶球亲水性较强，具有很强的光学通透性，可以直接用于偶联生物分子或表面处理，适合做临床诊断分析。本发明所述方法，推荐直接使用CPS乳胶球，不必使用表面附有一层羧基的聚苯乙烯微球，也不必将非水溶性聚苯乙烯微球进行羧基化或其他基团的接枝。本发明采用温和的双功能有机试剂，在高于大多数生物分析所要求的温度下，即在110~120℃溶胀乳胶球包埋水溶性量子点。大多数生物分析所要求的温度均低于热溶胀温度，可以避免使用中产生的泄漏问题。虽然包被量子点后纳米乳胶球的尺寸分布稍微变化，但不会影响量子点纳米乳胶球的生物应用。

[0021] 优选地，所述量子点纳米水溶胶的具体制备方法为：将氨基葡聚糖溶解于MES缓冲液中，调节pH为6.0后逐滴加入量子点纳米乳胶球中；搅拌加入EDAC溶液和MES缓冲液，室温下持续搅拌2小时；加入乙醇胺孵育30min，17000rpm离心弃掉上清液；将沉淀物溶于去离子水中，超声处理，重复该步骤三次，即得。

[0022] 葡聚糖是生物领域广泛使用到一种水溶胶。购置的氨基化葡聚糖分子量为100KDa，每7个葡聚糖单元含有1~2个氨基；偶联剂是1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDAC)和N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)，也可以使用其他能将羧基与氨基偶联的偶联剂，对应的缓冲溶液等反应条件也相应变化；通过偶联后，量子点纳米乳胶球所

剩羧基或氨基可继续偶联生物分子;此外,TQPS表层的葡聚糖极大地防止量子点的泄漏,增强其自身的稳定性和生物兼容性。按本发明制得的TQPS作为检测CEA抗原传感器的重要组成部分,其表面含有大量的羟基、羧基和氨基官能团,能单分散于生物用缓冲液中,克服了自身因为羧基的负电荷密度高所导致的沉淀问题,也解决了对生物分子的非特异性吸附问题。

[0023] 所述传感器的TQPS与偶联抗体,是通过共价键作用,在偶联剂EDAC和Sulfo-NHS的作用下,将癌胚抗原CEA的单克隆抗体S001与TQPS表面羧基相偶联,制备出用于均相免疫分析的功能性TQPS。根据待分析物的不同,与TQPS偶联的抗体也可以使用别的蛋白,或者末端带有氨基或者羧基的核酸或者肽链。

[0024] 所述的605nm处荧光信号来自于TQPS。当近红外激光激发检测样品时,SA-PS内的BTHS因吸收感光能量释放出单线态活性氧。该活性氧即可扩散并渗透到200nm范围内的TQPS,于是与TQPS所含噻嗪化合物反应释放短波长荧光(320~400nm),并与周围的量子点发生荧光共振能量转移,从而使得TQPS释放出605nm的荧光检测信号。

[0025] 本发明所述传感器还需要制备能被近红外光激发产生单线态氧的功能化感光微球,其制备方法为:将羧基、氨基、羟基、醛基或磺酸基修饰的纳米乳胶球加入到乙二醇中,取酞菁化合物溶于苯甲醇中,二者混合后加入去离子水,混匀后110℃反应10分钟,冷却至室温后添加乙醇,尺寸选择性离心。

[0026] 所述感光材料酞菁化合物为本领域常用的酞菁化合物,如二氢氧化硅2,9,16,23-四叔丁基-29H,31H-酞菁,CAS号:85214-70-6。

[0027] 感光材料酞菁化合物(BTHS)受到近红外激光照射,释放出大量的单线态活性氧。有文献报道(Macromolecules 25,3399-3405),这些单线态活性氧可以在一般水溶性介质中扩散,其距离大约200nm,并能渗透入其周围的聚苯乙烯微球,其效率达到20%。新型传感器基于该单线态氧通道传递技术,结合量子点的抗光漂白性及其特异性光学性质,大大提高了能转移效率,克服了水溶胶表面基团对能量转移的空间障碍;同时,因为表面有多个结合位点可以同时向光激化学发光量子点进行单线态氧传递,大大提高了检测的灵敏度。

[0028] 所述的基于单线态氧通道发光量子点传感器的均相荧光分析应用,指的是利用单线态氧接收端噻嗪化合物与量子点之间荧光共振能量转移原理进行的免疫分析血清中的癌胚抗原含量。在该分析方法中,采用双抗体夹心一步法,将能量受体与供体偶联到抗原的两个单克隆抗体上,借助抗体与抗原的免疫反应,将能量受体TQPS与供体SA-PS靠近,当感光微球SA-PS和量子点纳米水溶胶TQPS距离小于200nm时,即可发生氧信号传递,继而激发TQPS内QDS和噻嗪化合物之间的荧光共振能量转移(如图2所示)。

[0029] 在TQPS内,根据荧光共振能量转移原理,需要实现发光天线材料噻嗪化合物与量子点之间的荧光共振能量转移,而要实现共振能量转移需要天线材料的发射波谱与量子点的激发波长匹配(如图3所示)。根据选用的发光材料噻嗪化合物发光光谱及量子点的摩尔消光光谱,理论计算光谱重叠为:

$$[0030] \quad J(\lambda) = \frac{\int_0^{\infty} \varepsilon_A(\lambda) \cdot I_D(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot d\lambda}{\int_0^{\infty} I_D(\lambda) \cdot d\lambda}$$

[0031] 这里A表示量子点能量受体,D表示发光天线材料。 ε_A 为量子点的激发光谱函数, λ 为波长, I_D 为能量供体的荧光发射光谱函数。计算得 $J(\lambda) = 2.86 \times 10^{16}$ 。

[0032] 发光天线材料与量子点相接近需要Föster距离理论公式:

$$[0033] \quad R_0 = (8.79 \times 10^{-5} \cdot \kappa^2 \cdot \Phi_D \cdot n^{-4} \cdot J(\lambda))^{1/6}$$

[0034] 其中, Φ_D 为发光天线材料的量子产率(2.5%), κ^2 为动力学参数一般为2/3, n 为溶液折射率。由该公式计算得到发光天线材料与量子点发生荧光共振能量转移的Föster距离为2.3nm,此距离是发光天线材料与量子点之间发生50%能量转移效率的平均距离。

[0035] 而荧光共振能量转移效率:

$$[0036] \quad E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

[0037] 其中 r 为能量供体与受体的空间距离;实际应用中,能量转移效率 E 一般为1.5%~98.5%为有效转移范围,即可得到发光天线材料与量子点距离为 $1.6\text{nm} < R < 4.6\text{nm}$ 。因此,在空间结构上,本发明所用到的噻嗪化合物与量子点通过简单包埋在聚苯乙烯微球,在理论上满足荧光能量转移的条件。

[0038] 因为红色量子点(荧光发射峰605nm,量子产率为48%)的摩尔激发光谱与噻嗪化合物的发射光谱有较大重叠,感光微球与TQPS分别标记上链霉亲和素和CEA的单克隆抗体S001组成基于单线态氧通道发光的量子点传感器,并且CEA的另一株单克隆抗体6F11进行了生物素标记。因此,当基于单线态氧通道发光量子点传感器、生物素化6F11与CEA抗原发生免疫反应后,感光微球与TQPS被拉近,此时在激发光源的照射下,感光微球使周边的氧变成高能态的单线态氧,单线态氧传递到量子点纳米水溶胶内部,继而激发噻嗪化合物与量子点之间的荧光共振能量转移,量子点发出信号荧光(如图3所示)。当两单克隆抗体较抗原CEA大大过量时,检测到的荧光共振能量转移信号将与抗原的量成比例关系(如图4所示)。

[0039] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0040] 本发明提供的传感器是基于单线态氧传递的新型均相荧光免疫分析传感器,它改变了现有技术能量配体一对一的方式,并且突破20nm的空间检测距离。另外,单线态氧通道发光量子点是一种具有新奇的光学特性的能量受体:其光谱的Stock位移比较宽,荧光发射峰对称且无明显拖尾,更重要的是抗光漂白性极强,而且该能量受体不依赖于昂贵的红敏检测器。这类传感器,无需冲洗过量标记物,在均相中反应和检测,适合大分子免疫球蛋白或小分子半抗原等生物分子的检测,在体外免疫诊断领域具有潜在的巨大优势。

[0041] 本发明独创性地制备多功能基于单线态氧通道发光量子点传感器。该传感器用到TQPS具有水溶性好、尺寸分布均匀、量子产率高等优点,提高了分析的稳定性和灵敏度,也克服了非特异性吸附等问题,创新性地在将量子点与氧传递技术相结合。使用多功能基于单线态氧通道发光量子点传感器的新型均相氧传递荧光共振能量转移分析方法,不仅可提高能量转移效率从而提高了分析灵敏度,还可以减少对昂贵红敏光子探测器的依赖,在临

床分子诊断和食品检测等生物化学分析中具有非常重要的意义。

附图说明

[0042] 图1为纳米水溶胶功能化前(CPS)后(QPS)的粒径分布图。

[0043] 图2为基于单线态氧通道发光量子点传感器均相分析原理图。

[0044] 图3为水溶性量子点的摩尔激发光谱与噻嗪化合物荧光发射波谱图。

[0045] 图4为基于单线态氧通道发光量子点传感器均相免疫夹心法分析CEA的初步应用。

具体实施方式

[0046] 下面结合说明书附图和具体实施例对本发明作进一步地详细阐述,所述实施例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。下述实施例中所使用的聚苯乙烯-二乙烯基苯羧酸改性胶乳购自Thermo Fisher Scientific公司(货号8300-0520100390),脂溶性量子点(货号Q21701MP)购自Invitrogen公司,偶联剂EDAC、Sulfo-NHS以及三辛基氧膦等化学试剂均购自美国Sigma-Aldrich公司,所用到的癌胚抗原单克隆抗体S001及6F11和癌胚抗原抗原标准品购自中山大学达安基因公司,其他化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司

[0047] 实施例1

[0048] 该步骤的核心技术是,得到量子产率高、荧光发射峰最大半峰宽窄而对称的水溶性量子点。本发明具体实施用到的是从美国Invitrogen公司购得的核/壳型硒化镉/硫化锌量子点,其溶剂为癸烷,其波谱Stock位移长度从592nm往短波长之间的较宽范围内,因此波长短于592nm均可激发该量子点;荧光发射峰为 605 ± 0.5 nm,最大半峰宽为 27 ± 1.5 nm,量子产率76%;这样的光学特性的量子点,与单线态氧接收“天线”噻嗪化合物荧光发射谱较匹配,从各方面均克服了有机染料的不足,适合取代之,以减少测量误差,提高荧光能量共振转移(FRET)效率,从而提高分析灵敏度。

[0049] 一种基于单线态氧通道发光量子点传感器,包括量子点纳米水溶胶与功能化感光微球;量子点纳米水溶胶与功能化感光微球的制备方法如下:

[0050] 一、高性能水溶性量子点的制备:将50 μ L购得的脂溶性量子点置于离心管中,加入200 μ L的无水甲醇;混合均匀,密封离心管,在3000rpm、4 $^{\circ}$ C离心5min;弃掉上清液,加入50 μ L三氯甲烷,充分溶解;加入25mg巯基丁二酸稳定剂和0.1M的氢氧化钠水溶液20 μ L,混合均匀,在摇床上振荡孵育,室温下保存3小时;加入100 μ L去离子水和1.8mL丙酮,沉淀,6000rpm离心5min;溶解于0.2mL的去离子水中,得到水溶性量子点待用。得到的水溶性量子点使用荧光分光光度计分析其发射波谱,其荧光发射峰605nm。

[0051] 二、基于单线态氧通道发光量子点纳米乳胶球(TQPS)的制备:

[0052] 1、纳米乳胶球(CPS)的预处理:将100 μ L聚苯乙烯-二乙烯基苯羧酸改性胶乳(粒径 205 ± 3 nm,质量浓度为100mg/mL,固体浓度为10%)于14000rpm,4 $^{\circ}$ C离心;弃去上清液,并重悬于100 μ L去离子水中;

[0053] 2、水溶性量子点的预处理:将2mg的三辛基氧膦加入到上述步骤一制得的水溶性量子点中;加热到60 $^{\circ}$ C,剧烈搅拌,使之完全溶解,冷却至室温;先后加入2mL苯甲醇、2.8mL乙二醇和100 μ L浓度为0.1M的氢氧化钠溶液搅拌混合均匀;

[0054] 3、然后将步骤2中的量子点水溶液和噻嗪化合物(4mg溶解于100 μ L的苯甲醇中)滴

加入步骤1的纳米乳胶球中,在105℃下剧烈搅拌15分钟;冷却至室温,以12000rpm的速度沉淀离心25分钟;溶解于200μL的2-(N-咪)乙磺酸缓冲液(MES,50mM,pH6);得到的高性能水溶性量子点纳米乳胶球(QPS),其尺寸分布如图1所示,四方形和三角形实线分别表示包被量子点前后的纳米乳胶球尺寸分布情况。所述噻嗪化合物的制备方法如下:将10~15g对溴苯胺溶解于100mL二甲基亚砷溶液中,分别加入40mL的1-溴正十四烷和30mL N,N'-二异丙基乙胺。在氮气保护下,反应液持续加热到90℃,反应16小时后冷却至室温。往反应液再次加入20mL 1-溴正十四烷和15mL N,N'-二异丙基乙胺。反应混合液再次加热到90℃反应15小时。反应液冷却至室温,真空干燥并将残留液用200mL二氯甲烷稀释。分别使用1N的NaOH(2×)水溶液,水和盐水萃取洗涤,最后使用Na₂SO₄干燥。反应液浓缩得到棕黑色油约为55g。使用Agilent 1200HPLC制备液相分离,流动相为正己烷,得到黄色油,其中大多数为产品4-溴-N,N'-二甲基-对苯胺以及少量的1-溴甲烷。后者通过减压蒸馏(bp 105~110℃,0.6mmH)即可除去,最终得到目标产物棕色油。

[0055] 三、TQPS的制备:TQPS可以通过量子点纳米水溶胶表面修饰而制得,其步骤如下:称取10mg氨基葡聚糖溶解于100μL的MES缓冲液中,用1M盐酸将pH再次调到6.0;逐滴加入到上述步骤二中的量子点纳米乳胶球(QPS)中,以300rpm速度搅拌;加入300μL的EDAC溶液(80mg/mL)和1.4mL的MES缓冲液,室温下持续搅拌2小时;加1mM的乙醇胺700μL,孵育30min;在17000rpm转速下离心,弃掉上清液,将沉淀物溶解于20μL去离子水中,超声处理;重复以上步骤三次,最后得到量子点纳米水溶胶感光乳胶球(TQPS)。

[0056] 四、功能性感光微球的制备:

[0057] 将0.1mL表面羧基化的聚苯乙烯微球加入到0.7mL乙二醇中,取5mg BTHS酞菁化合物溶于0.1mL苯甲醇中,两者混合后再加入0.1mL去离子水,充分混匀后升温到110℃,反应10分钟,冷却到室温后添加乙醇,尺寸选择性离心。将收集到的感光性供体微球(0.1g)以10%乙醇保存待用。

[0058] 实施例2

[0059] 一种基于单线态氧通道发光量子点传感器,包括量子点纳米水溶胶与功能化感光微球;量子点纳米水溶胶与功能化感光微球的制备方法如下:

[0060] 一、高性能水溶性量子点的制备:将50μL脂溶性量子点量置于离心管中,加入200μL的无水甲醇;混合均匀,密封离心管,在3000rpm、4℃离心5min;弃掉上清液,加入40μL三氯甲烷,充分溶解;加入21mg谷胱甘肽稳定剂和0.1M的氢氧化钠水溶液10μL,混合均匀,在摇床上振荡孵育,室温下保存2小时;加入100μL去离子水和1.8mL丙酮,沉淀,6000rpm离心5min;溶解于0.5mL的去离子水中,得到水溶性量子点。制得的水溶性量子点用荧光分光光度计分析其发射波谱,其荧光发射峰605nm。

[0061] 二、基于单线态氧通道发光量子点纳米乳胶球(TQPS)的制备:

[0062] 三、TQPS的制备:

[0063] 四、功能性感光微球的制备:

[0064] 应用例

[0065] 基于单线态氧通道发光量子点传感器在均相氧传递荧光共振能量转移分析中的应用,单线态氧通道发光量子点传感器均相分析原理如图3所示,应用的步骤如下:

[0066] 一、TQPS与抗癌胚抗原单克隆抗体偶联,步骤如下:配制0.5M的MES缓冲液,pH调制

6.1,取100 μ L待用;用去离子水配制50mg/mL的Sulfo-NHS溶液,取230 μ L待用;用去离子水配制50mg/mL的EDAC溶液,取240 μ L待用;将以上待用溶液混合,用去离子水定容至1mL,加入上述步骤三制备的TQPS中,重悬;混合物室温下震荡反应30分钟;16000rpm转速离心,除去未反应的Sulfo-NHS和EDAC,使用去离子水洗涤,重悬,离心,重复三次;去离子水重悬活化后的TQPS,最终质量浓度为1%,体积为1mL;取500 μ L加入500 μ L的单克隆抗体S001(1mg/mL);轻轻震荡孵育2小时,加入1.5 μ L乙胺醇,室温震荡孵育30分钟;离心洗涤除去未偶联的蛋白质和乙胺醇;加入1mL的50mM的磷酸缓冲液(其中含有0.05%Proclin-300),得到偶联有单克隆抗体S001的量子点纳米水溶胶感光乳胶球,并将其浓度调整为100 μ g/mL,其摩尔激发光谱如图2左侧红曲线所示。

[0067] 二、感光微球与链霉亲和素的偶联,通过EDAC和Sulfo-NHS,把制备得的供体微球表面偶联上链霉亲和素,并将其浓度调整至16 μ g/mL。

[0068] 三、抗癌胚抗原单克隆抗体6F11的生物素化标记:按照sigma公司说明书将抗体溶液与生物素溶液体积比为10:1充分混匀,室温振荡孵育4小时后,采用美国Millipore公司的带有滤膜的离心管去除多余的生物素,并将抗体浓度调整为5 μ g/mL。

[0069] 四、将CEA抗原配制成0ng/mL、2ng/mL、5ng/mL、20ng/mL、100ng/mL、500ng/mL系列浓度;微孔条中依次加入25 μ L待测样品,25 μ L生物素化抗体、25 μ L量子点纳米水溶胶,加贴封片;微孔反应条在37 $^{\circ}$ C恒温振荡仪内振荡孵育15分钟;在避光条件下加入链霉亲和素化的供体微球175 μ L;微孔反应条在37 $^{\circ}$ C恒温振荡仪内振荡孵育15分钟;在PerkinElmer公司2300EnSpireTM检测仪上检测信号值。参考标准品浓度的对数为横坐标,信号值计数的对数为纵坐标,由双对数数学模型Log-Log函数处理,测得CEA试剂盒剂量-反应曲线线性相关系数为 $r=0.9918$,如图3所示。

[0070] 在进行以上检测之后的两小时内,每隔10分钟进行相同的荧光检测。所有样品的结果显示,使用的TQPS抗光漂白性极强,标准品浓度与荧光值双对数关系图几乎重叠。

[0071] 以零参考标准品(A点)作为标本重复测量20次,计算其荧光均值 \bar{x} 及标准差SD, $\bar{x}+2SD$ 所得的荧光值代入标准曲线方程计算得出其灵敏度,即检测CEA的最低检测下限为0.7ng/mL。

[0072] 用血红蛋白、甘油三酯、胆红素做CEA样品交叉反应测,结果均无交叉反应。

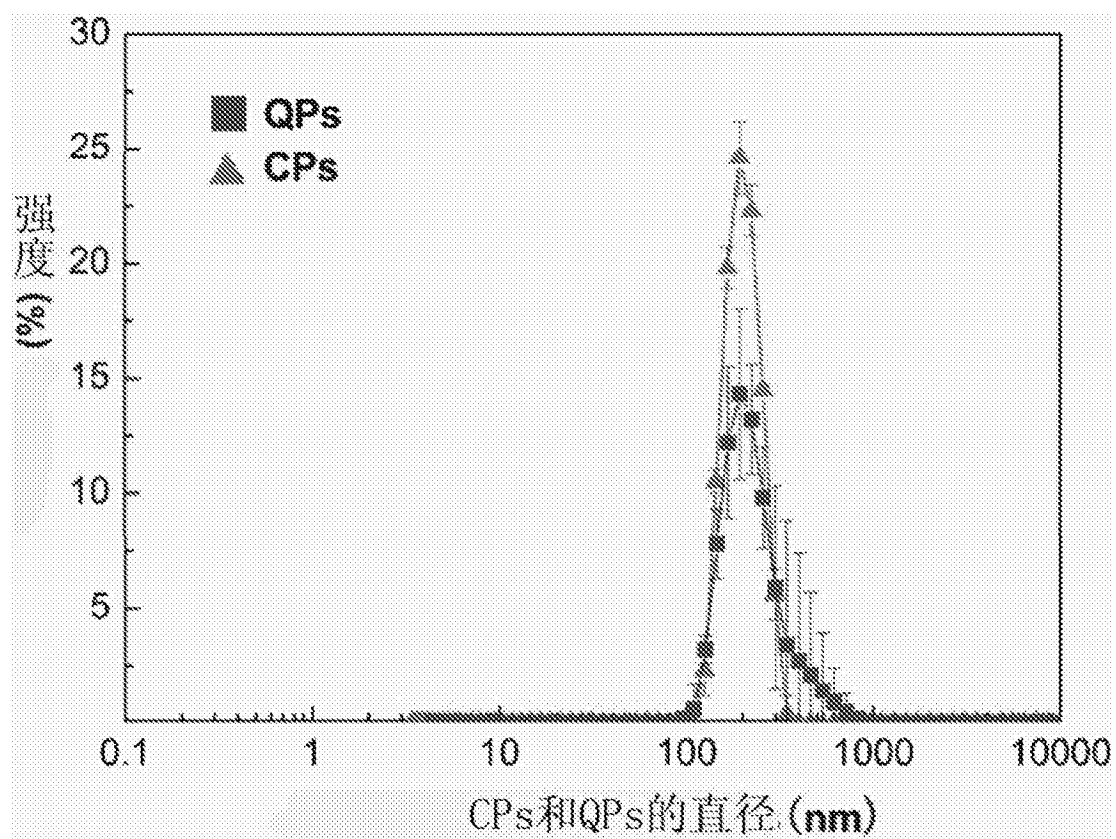


图1

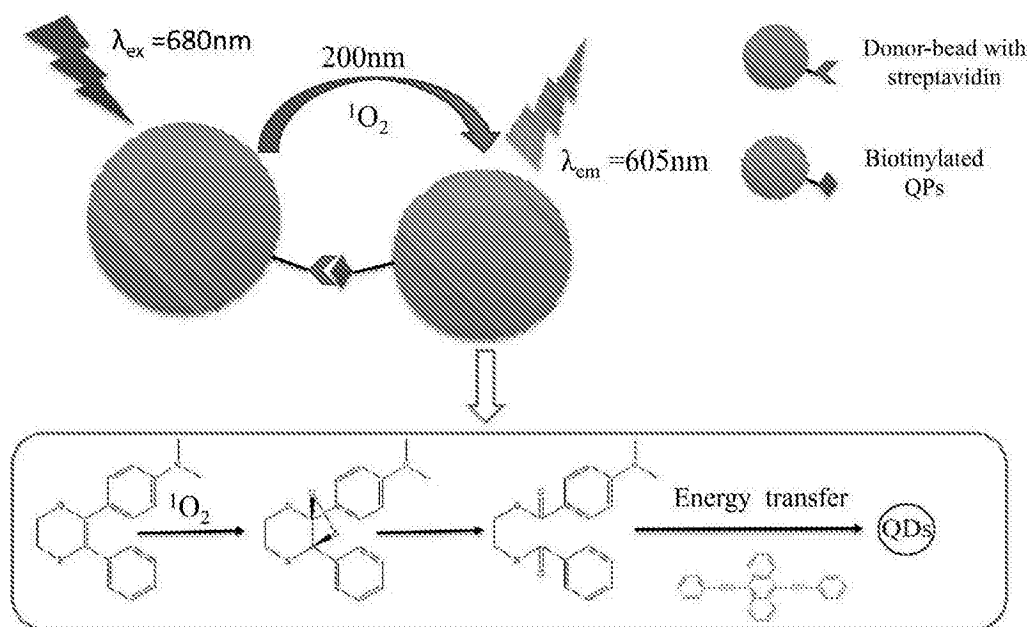


图2

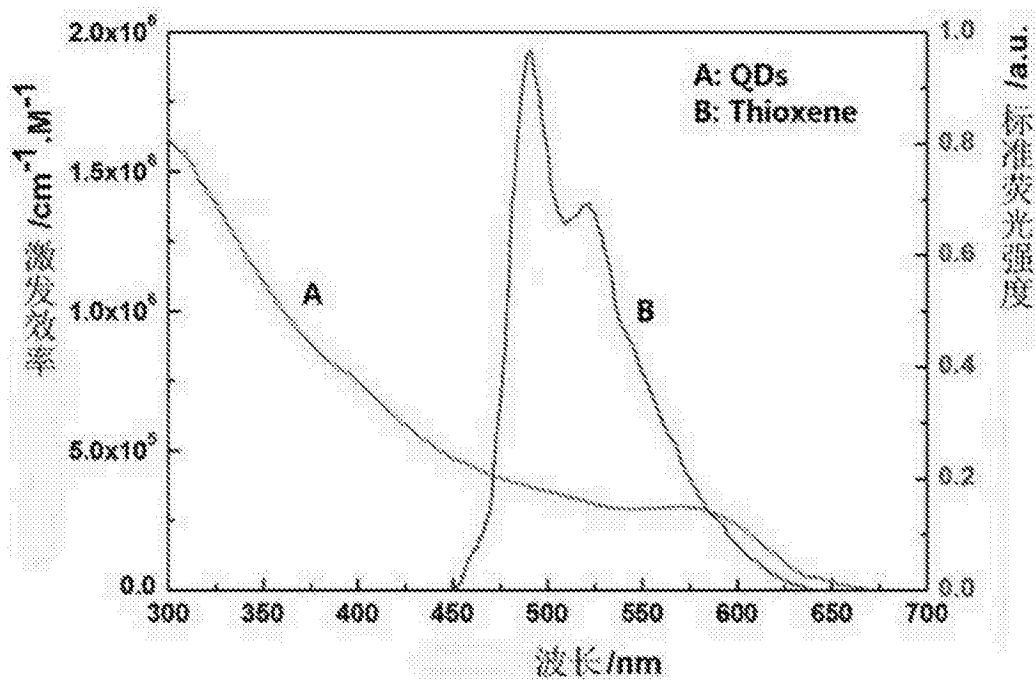


图3

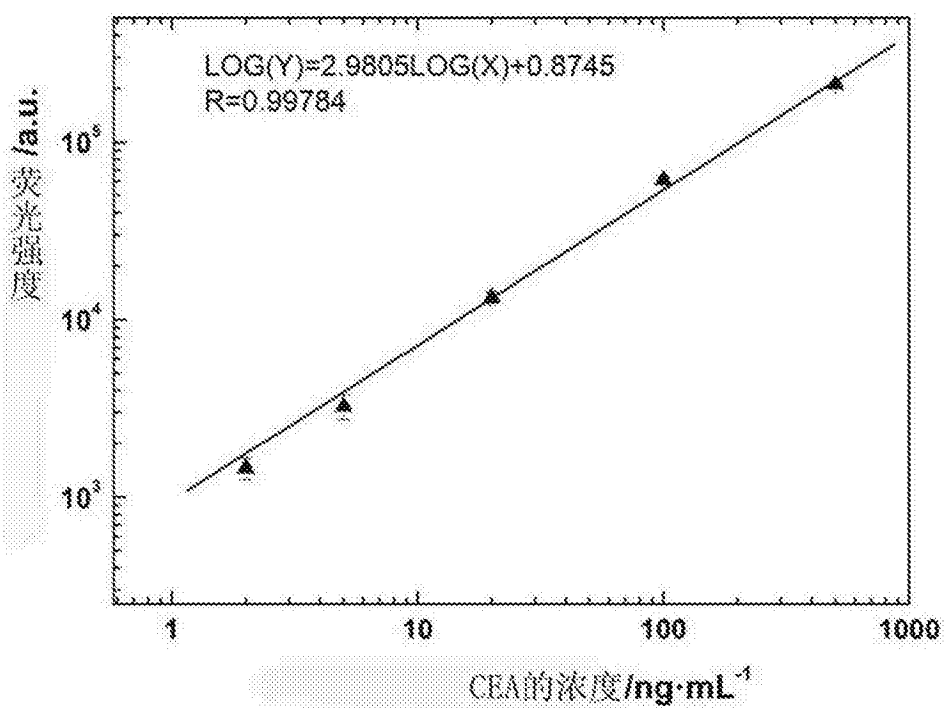


图4

专利名称(译)	一种基于单线态氧通道发光量子点传感器		
公开(公告)号	CN106093391A	公开(公告)日	2016-11-09
申请号	CN201610383089.3	申请日	2016-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
[标]发明人	刘天才 陈振华		
发明人	刘天才 陈振华		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/544 G01N33/543 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/57473 G01N21/64 G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/544		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于单线态氧通道发光量子点传感器，包括量子点纳米水溶胶与功能化感光微球；量子点纳米水溶胶是将发射波长在520～620 nm之间的脂溶性量子点改性成水溶性量子点；水溶性量子点和噻嗪化合物包被入羧基、氨基、羟基、醛基或磺酸基修饰的纳米乳胶球中制备出量子点纳米乳胶球；将量子点纳米乳胶球表面修饰葡聚糖凝胶得到量子点纳米水溶胶；功能化感光微球是将感光材料酞菁化合物包被入羧基、氨基、羟基、醛基或磺酸基修饰的纳米乳胶球中，得到功能化感光微球。本发明的传感器是基于单线态氧传递的新型均相荧光免疫分析传感器，改变了传统能量配体一对一的方式，并且突破20nm的空间检测距离。

