



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112798779 A

(43)申请公布日 2021.05.14

(21)申请号 201911104833.1

(22)申请日 2019.11.13

(71)申请人 中粮集团有限公司

地址 100020 北京市朝阳区朝阳门南大街8号

申请人 中粮营养健康研究院有限公司

(72)发明人 翟晨 李梦瑶 王书雅 杨悠悠
谢云峰

(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理
有限责任公司 11290

代理人 孙雪 张淑珍

(51)Int.Cl.

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

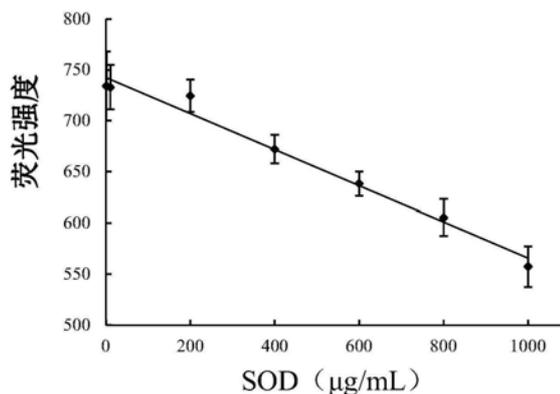
权利要求书3页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

一种量子点标记的直接竞争荧光免疫检测超氧化物歧化酶的方法

(57)摘要

本发明涉及一种量子点标记的直接竞争荧光免疫检测超氧化物歧化酶的方法,该方法使用CdSe/ZnS量子点标记超氧化物歧化酶,形成了超氧化物歧化酶-量子点荧光探针(QDs-SOD)复合物,通过QDs-SOD复合物和待测样品液中的超氧化物歧化酶与包被的超氧化物歧化酶多克隆抗体进行直接竞争性地结合,来检测待测样品液中的超氧化物歧化酶的浓度。本发明的方法具有高灵敏度、高特异性和操作简单等特点,可用于超氧化物歧化酶的快速检测。



1. 一种量子点标记的直接竞争荧光免疫检测超氧化物歧化酶的方法,所述方法包括以下步骤:

(1) 用偶联剂对量子点进行活化,得到活化后的量子点;

(2) 将所述活化后的量子点与超氧化物歧化酶进行偶联,得到超氧化物歧化酶-量子点荧光探针(QDs-SOD)复合物;

(3) 用磷酸盐缓冲液稀释所述QDs-SOD复合物,得到QDs-SOD复合物稀释液;

(4) 在酶标板中对超氧化物歧化酶多克隆抗体进行包被,得到包被在所述酶标板中的超氧化物歧化酶多克隆抗体;

(5) 将所述QDs-SOD复合物稀释液和超氧化物歧化酶标准品溶液加入到所述酶标板中,通过与包被在所述酶标板中的超氧化物歧化酶多克隆抗体进行竞争性地结合,形成抗体-抗原发光免疫复合物;

(6) 用荧光酶标仪激发并检测所形成的抗体-抗原发光免疫复合物的荧光强度,以所述超氧化物歧化酶标准溶液中的超氧化物歧化酶的浓度为横坐标,所获得的荧光强度为纵坐标,绘制得到标准曲线;

(7) 将步骤(5)中的所述超氧化物歧化酶标准品溶液替换为待测样品液,以与步骤(5)和(6)相同的操作,获得所述待测样品液对应的荧光强度,通过与所述标准曲线对比求出所述待测样品液中超氧化物歧化酶的浓度。

2. 根据权利要求1所述的方法,在所述步骤(1)中,所述量子点的活化包括:向所述量子点中加入偶联剂和磷酸盐缓冲液,超声分散后,恒温反应预定时间,离心去掉上清,得到所述活化后的量子点;

其中,所述偶联剂为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液和1-乙基-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述步骤(1)进一步满足如下条件中的一项或多项:

所述量子点为CdSe/ZnS量子点;

所述NHS溶液的浓度为1mg/mL-10mg/mL、优选3mg/mL-6mg/mL;

所述EDC溶液的浓度为1mg/mL-8mg/mL、优选2mg/mL-4mg/mL;

对于100 μ L的所述量子点,使用100 μ L-300 μ L的所述NHS溶液和100 μ L-300 μ L的所述EDC溶液以及700 μ L-1000 μ L的所述磷酸盐缓冲液进行溶解;

所述恒温反应在18 $^{\circ}$ C-40 $^{\circ}$ C、优选25 $^{\circ}$ C-37 $^{\circ}$ C下的恒温培养箱中在200rpm-250rpm下进行15min-30min;

所述离心在8000rpm-12000rpm、优选8000rpm-10000rpm下进行5min-10min。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,在所述步骤(2)中,所述活化后的量子点与所述超氧化物歧化酶的偶联包括:用超氧化物歧化酶溶液对所述活化后的量子点进行复溶,超声分散后,恒温下避光反应预定时间,离心去掉游离的超氧化物歧化酶,得到所述QDs-SOD复合物;

优选地,所述步骤(2)进一步满足如下条件中的一项或多项:

所述超氧化物歧化酶溶液的浓度为0.1mg/mL-5mg/mL、优选1mg/mL-3mg/mL;

所述避光反应在18 $^{\circ}$ C-40 $^{\circ}$ C、优选25 $^{\circ}$ C-37 $^{\circ}$ C下的恒温培养箱中在100rpm-400rpm、优选

200rpm-250rpm下进行1h-3h、优选1.5h-2h;

所述离心在6000rpm-12000rpm、优选8000rpm-10000rpm下进行3min-20min、优选5min-10min。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,在所述步骤(3)中,所述QDs-SOD复合物的稀释包括:用复溶液对所述QDs-SOD复合物进行复溶,超声震荡混匀后,用磷酸盐缓冲液进行稀释,得到所述QDs-SOD复合物稀释液;

优选地,所述步骤(3)进一步满足如下条件中的一项或多项:

所述复溶液是1mL的含有1%BSA和0.5%吐温-20的磷酸盐缓冲液;

所述超声震荡在18°C-40°C、优选25°C-37°C下的摇床中在100rpm-400rpm、优选200rpm-250rpm下进行1h-2h;

所述稀释的倍数为10-500倍、优选50-200、进一步优选50-100倍。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,在所述步骤(4)中,所述超氧化物歧化酶多克隆抗体的包被包括:使用磷酸盐缓冲液对超氧化物歧化酶多克隆抗体进行稀释100-2000倍、优选500-1000倍,获得抗体稀释液;将所述抗体稀释液加入到所述酶标板中,包被过夜后,用含0.5%吐温-20的磷酸盐缓冲液洗涤并甩干,然后用1%BSA封闭溶液对空白位点进行封闭;

优选地,所述步骤(4)进一步满足如下条件中的一项或多项:

所述酶标板中每孔加入的所述抗体稀释液的量为100 μ L;

所述包被在2°C-4°C下进行;

所述酶标板中每孔加入的所述1%BSA封闭溶液的量为250 μ L-300 μ L;

所述封闭在37°C下进行0.5h-3h、优选1h-2h、进一步优选1.5h-2h。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中,所述步骤(5)满足如下条件中的一项或多项:

所述超氧化物歧化酶标准溶液的浓度依次为1 μ g/mL、100 μ g/mL、200 μ g/mL、400 μ g/mL、600 μ g/mL、800 μ g/mL和1000 μ g/mL;

所述竞争性结合在37°C下进行0.2h-3h、优选0.5h-2h、进一步优选1h-2h;

在所述竞争性结合后,用含0.5%吐温-20的0.01M pH7.4的磷酸盐缓冲液洗涤三次。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,在所述步骤(6)中,所述荧光酶标仪的激发波长为275nm-425nm、优选375nm-425nm;发射波长为500nm-550nm、优选520nm-530nm。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,所述方法包括如下步骤:

(1) 向100 μ L的量子点中加入100 μ L-300 μ L 3mg/mL的NHS溶液、100 μ L-300 μ L 2mg/mL的EDC溶液和700 μ L 25mM pH 6.0的磷酸盐缓冲液中进行溶解,超声分散均匀后,在25°C-37°C、200rpm-250rpm的恒温培养箱中反应15min-30min,10000rpm下离心5min-10min,去掉上清,得到活化后的量子点;

(2) 用0.01M pH7.4的磷酸盐缓冲液为溶剂,配制0.1mg/mL-2mg/mL的所述超氧化物歧化酶溶液,取1mL的所述超氧化物歧化酶溶液对所述活化后的量子点进行复溶,超声分散混匀,在25°C-37°C、200rpm-250rpm的恒温培养箱中避光反应1.5h-2h;在8000rpm-10000rpm的转速下离心5-10min,去除游离的超氧化物歧化酶,得到所述QDs-SOD复合物;

(3) 用1mL含有1%BSA和0.5%吐温-20的磷酸盐缓冲液作为复溶液对所述QDs-SOD复合

物进行复溶后,在200rpm-250rpm、25℃-37℃下的摇床中超声震荡1h-2h,用含有吐温-20的0.01M pH7.4的磷酸盐缓冲液稀释50-100倍,得到所述QDs-SOD复合物稀释液;

(4) 使用pH=7.4、0.01M的磷酸盐缓冲液对超氧化物歧化酶多克隆抗体按照1:(500-1000)进行稀释,将所获得的抗体稀释液以100μL/孔加入到所述酶标板中,2℃-4℃下包被过夜后,用含0.5%吐温-20的0.01M pH7.4的磷酸盐缓冲液洗涤三次并甩干以除去多余的抗体,然后每孔加入250μL-300μL的1%BSA封闭溶液,在37℃下对所述空白位点进行封闭1.5-2h,得到包被在所述酶标板中的超氧化物歧化酶多克隆抗体;

(5) 在封闭后的酶标板中每孔分别加入50μL的所述超氧化物歧化酶标准品溶液和50μL的所述QDs-SOD复合物稀释液,在37℃下与包被在所述酶标板中的超氧化物歧化酶多克隆抗体进行竞争性地结合1h-2h,然后用含0.5%吐温-20的0.01M pH7.4磷酸盐缓冲液洗涤三次,去掉非特异性吸附,在所述酶标板中形成抗体-抗原发光免疫复合物;

(6) 在所述酶标板中每孔加入100μL 0.01M pH7.4磷酸盐缓冲液,用荧光酶标仪激发并检测所形成的抗体-抗原发光免疫复合物的荧光强度,以所述超氧化物歧化酶标准溶液中的超氧化物歧化酶的浓度为横坐标,所获得的荧光强度为纵坐标,绘制得到标准曲线;其中所述荧光酶标仪的激发波长为375nm,发射波长为526nm;

(7) 将步骤(5)中的所述超氧化物歧化酶标准品溶液替换为待测样品液,以与所述步骤(5)和(6)相同的操作,获得所述待测样品液对应的荧光强度,通过与所述标准曲线对比求出所述待测样品液中超氧化物歧化酶的浓度。

10. 一种超氧化物歧化酶检测试剂盒,所述试剂盒包含(a)超氧化物歧化酶-量子点荧光探针复合物;(b)包被的超氧化物歧化酶多克隆抗体;(c)任选的超氧化物歧化酶标准品;以及(d)用于检测超氧化物歧化酶的说明书。

一种量子点标记的直接竞争荧光免疫检测超氧化物歧化酶的方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测方法技术领域,具体而言,本发明涉及量子点标记的直接竞争荧光免疫检测超氧化物歧化酶的方法以及一种超氧化物歧化酶检测试剂盒。

背景技术

[0002] 超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase,SOD),广泛存在于动植物的细胞与组织中,是生物防御体系的关键酶之一。SOD可以消除动植物在新陈代谢过程中产生的活性氧等有害物质,维持其正常的生命活动、增强植物防御能力和延缓衰老等作用。在动植物的生长过程中和番茄等农副产品的贮藏期间,由于细胞新陈代谢的影响,SOD的含量不断发生变化。因此,超氧化物歧化酶的含量可以间接反映农副产品在在贮藏过程中的变化,所以SOD的含量是评判番茄等农副产品新鲜度的一个重要指标。

[0003] 目前,国内外常用的超氧化物歧化酶检测方法主要有:滴定法、氧化还原法、分光光度法和化学发光法等。然而,通过实际应用,发现这些现有的方法操作繁琐、费时费力,准确度低,不是理想的检测方法。国外已开展的对蛋白及酶类的分析方法的研究,常用的方法为酶联免疫分析法(ELISA)。这类方法将抗体包被酶标板,加入蛋白及酶类进行特异性结合,再加入酶标抗体(即检测抗体),最后加入底物显色,一定时间后,用酶标仪检测某一特定波长的吸光度值,根据一直标准品含量计算样品中待测药物的浓度,此操作繁琐,费时。

[0004] 因此,目前仍需要一种检测超氧化物歧化酶的方法,以实现超氧化物歧化酶的快速准确的检测。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供量子点标记的直接竞争荧光免疫检测超氧化物歧化酶的方法,该方法具有高灵敏度、高特异性和操作简单等特点,可用于超氧化物歧化酶的快速检测。

[0006] 具体而言,本发明提供了一种量子点标记的直接竞争荧光免疫检测超氧化物歧化酶的方法,所述方法包括以下步骤:

[0007] (1)用偶联剂对量子点进行活化,得到活化后的量子点;

[0008] (2)将所述活化后的量子点与超氧化物歧化酶进行偶联,得到超氧化物歧化酶-量子点荧光探针(QDs-SOD)复合物;

[0009] (3)用磷酸盐缓冲液稀释所述QDs-SOD复合物,得到QDs-SOD复合物稀释液;

[0010] (4)在酶标板中对超氧化物歧化酶多克隆抗体进行包被,得到包被在所述酶标板中的超氧化物歧化酶多克隆抗体;

[0011] (5)将所述QDs-SOD复合物稀释液和超氧化物歧化酶标准品溶液加入到所述酶标板中,通过与包被在所述酶标板中的超氧化物歧化酶多克隆抗体进行竞争性地结合,形成抗体-抗原发光免疫复合物;

[0012] (6) 用荧光酶标仪激发并检测所形成的抗体-抗原发光免疫复合物的荧光强度,以所述超氧化物歧化酶标准溶液中的超氧化物歧化酶的浓度为横坐标,所获得的荧光强度为纵坐标,绘制得到标准曲线;

[0013] (7) 将步骤(5)中的所述超氧化物歧化酶标准品溶液替换为待测样品液,以与步骤(5)和(6)相同的操作,获得所述待测样品液对应的荧光强度,通过与所述标准曲线对比求出所述待测样品液中超氧化物歧化酶的浓度。

[0014] 本发明还提供了一种超氧化物歧化酶检测试剂盒,所述试剂盒包含(a)超氧化物歧化酶-量子点荧光探针复合物;(b)包被的超氧化物歧化酶多克隆抗体;(c)任选的超氧化物歧化酶标准品;以及(d)用于检测超氧化物歧化酶的说明书。

[0015] 有益效果

[0016] (1) 本方法操作简单,不需添加显色物质就能检测待测样品中超氧化物歧化酶的含量,即通过抗体-抗原免疫复合物的荧光强度,直接检测待测样品中超氧化物歧化酶的浓度值,无论操作还是反应只需一步就可以完成。

[0017] (2) 本方法特定地将量子点用于标记超氧化物歧化酶,与传统的荧光检测方法相比,本发明的量子点标记的超氧化物歧化酶发射的荧光强度更强,且荧光稳定时间长。

附图说明

[0018] 图1代表CdSe/ZnS量子点(QDs)与超氧化物歧化酶(SOD)偶联前后的荧光光谱图,其中,上方曲线代表偶联前(即QDs)的荧光光谱曲线,下方曲线代表偶联后获得的超氧化物歧化酶-量子点荧光探针复合物(即QDs-SOD)的荧光光谱曲线。

[0019] 图2是以不同浓度的超氧化物歧化酶标准溶液中的超氧化物歧化酶浓度为横坐标,以用本发明的方法检测得到的相应的荧光强度为纵坐标,建立获得的标准曲线。

[0020] 图3是相对于空白对照的荧光强度,在各种干扰物质或超氧化物歧化酶磷酸盐溶液的存在下,QDs-SOD荧光探针与包被在酶标板上的固相抗体相结合形成的抗体-抗原发光免疫复合物的相对荧光强度的示意图。

[0021] 图4为CdTe量子点和CdSe/ZnS量子点的光学稳定性的对比图。

[0022] 图5为CdTe量子点和CdSe/ZnS量子点的储存稳定性的对比图。

具体实施方式

[0023] 以下对本发明的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是,此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本发明,并不用于限制本发明。

[0024] 在本文中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或数值,这些范围或数值应当理解为包含接近这些范围或数值的值。对于数值范围来说,各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间,以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围,这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

[0025] 在本发明中,除非特别指明,术语“室温”也可称为常温,是指15°C-30°C的温度。在本发明中,除非特别指明,实验温度均为室温。

[0026] 在本发明中,除非另有说明,术语“溶液”是指以pH=7.4、0.01M的磷酸盐缓冲液为溶剂制备的溶液。

[0027] 在一个实施方式中,本发明提供了一种量子点标记的直接竞争荧光免疫检测超氧化物歧化酶的方法,所述方法包括以下步骤:

[0028] (1) 用偶联剂对量子点进行活化,得到活化后的量子点;

[0029] (2) 将所述活化后的量子点与超氧化物歧化酶进行偶联,得到超氧化物歧化酶-量子点荧光探针(QDs-SOD)复合物;

[0030] (3) 用磷酸盐缓冲液稀释所述QDs-SOD复合物,得到QDs-SOD复合物稀释液;

[0031] (4) 在酶标板中对超氧化物歧化酶多克隆抗体进行包被,得到包被在所述酶标板中的超氧化物歧化酶多克隆抗体;

[0032] (5) 将所述QDs-SOD复合物稀释液和超氧化物歧化酶标准品溶液加入到所述酶标板中,通过与包被在所述酶标板中的超氧化物歧化酶多克隆抗体进行竞争性地结合,形成抗体-抗原发光免疫复合物;

[0033] (6) 用荧光酶标仪激发并检测所形成的抗体-抗原发光免疫复合物的荧光强度,以所述超氧化物歧化酶标准溶液中的超氧化物歧化酶的浓度为横坐标,所获得的荧光强度为纵坐标,绘制得到标准曲线;

[0034] (7) 将步骤(5)中的所述超氧化物歧化酶标准品溶液替换为待测样品液,以与步骤(5)和(6)相同的操作,获得所述待测样品液对应的荧光强度,通过与所述标准曲线对比求出所述待测样品液中超氧化物歧化酶的浓度。

[0035] 在本发明中,术语“超氧化物歧化酶-量子点荧光探针复合物”也称为QDs-SOD复合物,是指将量子点与超氧化物歧化酶偶联形成的物质。通过所述偶联能够将超氧化物歧化酶用量子点标记。

[0036] 在优选的实施方式中,在所述步骤(1)中,所述量子点的活化包括:向所述量子点中加入偶联剂和磷酸盐缓冲液,超声分散后,恒温反应预定时间,离心去掉上清,得到所述活化后的量子点;其中,所述偶联剂为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液和1-乙基-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液。

[0037] 在进一步优选的实施方式中,所述步骤(1)满足如下条件中的一项或多项:

[0038] 所述量子点为CdSe/ZnS量子点;

[0039] 所述NHS溶液的浓度为1mg/mL-10mg/mL、优选3mg/mL-6mg/mL;

[0040] 所述EDC溶液的浓度为1mg/mL-8mg/mL、优选2mg/mL-4mg/mL;

[0041] 对于100 μ L的所述量子点,使用100 μ L-300 μ L的所述NHS溶液和100 μ L-300 μ L的所述EDC溶液以及700 μ L-1000 μ L的所述磷酸盐缓冲液进行溶解;

[0042] 所述恒温反应在18 $^{\circ}$ C-40 $^{\circ}$ C、优选25 $^{\circ}$ C-37 $^{\circ}$ C下的恒温培养箱中在200rpm-250rpm下进行15min-30min;

[0043] 所述离心在8000rpm-12000rpm、优选8000rpm-10000rpm下进行5min-10min。

[0044] 在本发明中,术语“量子点”是指能够发射荧光的纳米粒子。术语“CdSe/ZnS量子点”是指核心部分为CdSe/ZnS的量子点。

[0045] 本发明人首次发现,相较于其它量子点(例如CdTe量子点和ZnSe量子点),CdSe/ZnS量子点稳定性好、毒性小,具有更高的荧光效率。利用CdSe/ZnS量子点能够有效地标记超氧化物歧化酶,与超氧化物歧化酶结合形成的QDs-SOD荧光探针专一性强,在多种常见干扰物质(苏氨酸、丝氨酸、维生素C、氯化钾、氯化钙、氯化钠和葡萄糖等)的存在下,仍能够以

较高的专一性结合包被的超氧化物歧化酶多克隆抗体。

[0046] 在本发明中,对所述超声分散的时间不作特别地限定,只要进行所述超声的物质分散均匀即可。

[0047] 在优选的实施方式中,在所述步骤(2)中,所述活化后的量子点与所述超氧化物歧化酶的偶联包括:用超氧化物歧化酶溶液对所述活化后的量子点进行复溶,超声分散后,恒温下避光反应预定时间,离心去掉游离的超氧化物歧化酶,得到所述QDs-SOD复合物。

[0048] 在进一步优选的实施方式中,所述步骤(2)满足如下条件中的一项或多项:

[0049] 所述超氧化物歧化酶溶液的浓度为0.1mg/mL-5mg/mL、优选1mg/mL-3mg/mL;

[0050] 所述避光反应在18°C-40°C、优选25°C-37°C下的恒温培养箱中在100rpm-400rpm、优选200rpm-250rpm下进行1h-3h、优选1.5h-2h;

[0051] 所述离心在6000rpm-12000rpm、优选8000rpm-10000rpm下进行3min-20min、优选5min-10min。

[0052] 在优选的实施方式中,在所述步骤(3)中,所述QDs-SOD复合物的稀释包括:用复溶液对所述QDs-SOD复合物进行复溶,超声震荡混匀后,用磷酸盐缓冲液进行稀释,得到所述QDs-SOD复合物稀释液。

[0053] 在进一步优选的实施方式中,所述步骤(3)满足如下条件中的一项或多项:

[0054] 所述复溶液是1mL的含有1%BSA和0.5%吐温-20的磷酸盐缓冲液;

[0055] 所述超声震荡在18°C-40°C、优选25°C-37°C下的摇床中在100rpm-400rpm、优选200rpm-250rpm下进行1h-2h;

[0056] 所述稀释的倍数为10-500倍、优选50-200、进一步优选50-100倍。

[0057] 在优选的实施方式中,在所述步骤(4)中,所述超氧化物歧化酶多克隆抗体的包被包括:使用磷酸盐缓冲液对超氧化物歧化酶多克隆抗体进行稀释100-2000倍、优选500-1000倍,获得抗体稀释液;将所述抗体稀释液加入到所述酶标板中,包被过夜后,用含0.5%吐温-20的磷酸盐缓冲液洗涤并甩干,然后用1%BSA封闭溶液对空白位点进行封闭。在本发明中,所述包被是利用上述包被的方法将超氧化物歧化酶多克隆抗体直接固定在酶标板的微孔上。

[0058] 在进一步优选的实施方式中,所述步骤(4)满足如下条件中的一项或多项:

[0059] 所述酶标板中每孔加入的所述抗体稀释液的量为100μL;

[0060] 所述包被在2°C-4°C下进行;

[0061] 所述酶标板中每孔加入的所述1%BSA封闭溶液的量为250μL-300μL;

[0062] 所述封闭在37°C下进行0.5h-3h、优选1h-2h、进一步优选1.5h-2h。

[0063] 在优选的实施方式中,所述步骤(5)满足如下条件中的一项或多项:

[0064] 所述超氧化物歧化酶标准溶液的浓度依次为1μg/mL、100μg/mL、200μg/mL、400μg/mL、600μg/mL、800μg/mL和1000μg/mL;

[0065] 所述竞争性结合在37°C下进行0.2h-3h、优选0.5h-2h、进一步优选1h-2h;

[0066] 在所述竞争性结合后,用含0.5%吐温-20的0.01M pH7.4的磷酸盐缓冲液洗涤三次。通过在竞争性结合后用磷酸盐缓冲液洗涤,可以去掉非特异性吸附。

[0067] 在本发明的步骤(5)中,所述抗体-抗原复合物的形成是:在所述酶标孔中,加入超氧化物歧化酶标准品溶液(或待测样品溶液)和稀释后的QDs-SOD复合物稀释液,样品溶液

中的超氧化物歧化酶将与QDs-SOD竞争结合包被在酶标板上的固相抗体,从而通过抗原抗体特异性结合形成抗体-抗原二元免疫复合物。在本发明中,所述“抗体-抗原二元免疫复合物”是指超氧化物歧化酶-量子点荧光探针(QDs-SOD)与包被在酶标板中的超氧化物歧化酶多克隆抗体结合形成的物质。

[0068] 在优选的实施方式中,在所述步骤(6)中,所述荧光酶标仪的激发波长为275nm-425nm、优选375nm-425nm,发射波长为500nm-550nm、优选520nm-530nm。在本发明的步骤(6)中,所述的荧光强度的检测是用荧光酶标仪激发并检测所形成的抗体-抗原发光免疫复合物的荧光强度,通常样品溶液中超氧化物歧化酶的含量越高,与抗体结合的量越多,QDs-SOD与抗体结合的量少,测得的荧光强度值越小。

[0069] 在最为优选的实施方式中,本发明的量子点标记的直接竞争荧光免疫检测超氧化物歧化酶的方法包括如下步骤:

[0070] (1) 向100 μ L的量子点中加入100 μ L-300 μ L 3mg/mL的NHS溶液、100 μ L-300 μ L 2mg/mL的EDC溶液和700 μ L 25mM pH 6.0的磷酸盐缓冲液中进行溶解,超声分散均匀后,在25 $^{\circ}$ C-37 $^{\circ}$ C、200rpm-250rpm的恒温培养箱中反应15min-30min,10000rpm下离心5min-10min,去掉上清,得到活化后的量子点;

[0071] (2) 用0.01M pH7.4的磷酸盐缓冲液为溶剂,配制1mg/mL-3mg/mL的所述超氧化物歧化酶溶液,取1mL的所述超氧化物歧化酶溶液对所述活化后的量子点进行复溶,超声分散混匀,在25 $^{\circ}$ C-37 $^{\circ}$ C、200rpm-250rpm的恒温培养箱中避光反应1.5h-2h;在8000rpm-10000rpm的转速下离心5-10min,去除游离的超氧化物歧化酶,得到所述QDs-SOD复合物;

[0072] (3) 用1mL含有1%BSA和0.5%吐温-20的磷酸盐缓冲液作为复溶液对所述QDs-SOD复合物进行复溶后,在200rpm-250rpm、25 $^{\circ}$ C-37 $^{\circ}$ C下的摇床中超声震荡1h-2h,用含有吐温-20的0.01M pH7.4的磷酸盐缓冲液稀释50-100倍,得到所述QDs-SOD复合物稀释液;

[0073] (4) 使用pH=7.4、0.01M的磷酸盐缓冲液对超氧化物歧化酶多克隆抗体按照1:(500-1000)进行稀释,将所获得的抗体稀释液以100 μ L/孔加入到所述酶标板中,2 $^{\circ}$ C-4 $^{\circ}$ C下包被过夜后,用含0.5%吐温-20的0.01M pH7.4的磷酸盐缓冲液洗涤三次并手动甩干以除去多余的抗体,然后每孔加入250 μ L-300 μ L的1%BSA封闭溶液,在37 $^{\circ}$ C下对所述空白位点进行封闭1.5-2h,得到包被在所述酶标板中的超氧化物歧化酶多克隆抗体;

[0074] (5) 在封闭后的酶标板中每孔分别加入50 μ L的所述超氧化物歧化酶标准品溶液和50 μ L的所述QDs-SOD复合物稀释液,在37 $^{\circ}$ C下与包被在所述酶标板中的超氧化物歧化酶多克隆抗体进行竞争性地结合1h-2h,然后用含0.5%吐温-20的0.01M pH7.4磷酸盐缓冲液洗涤三次,去掉非特异性吸附,在所述酶标板中形成抗体-抗原发光免疫复合物;

[0075] (6) 在所述酶标板中每孔加入100 μ L 0.01M pH7.4磷酸盐缓冲液,用荧光酶标仪激发并检测所形成的抗体-抗原发光免疫复合物的荧光强度,以所述超氧化物歧化酶标准溶液中的超氧化物歧化酶的浓度为横坐标,所获得的荧光强度为纵坐标,绘制得到标准曲线;其中所述荧光酶标仪的激发波长为375nm,发射波长为526nm;

[0076] (7) 将步骤(5)中的所述超氧化物歧化酶标准品溶液替换为待测样品液,以与步骤(5)和(6)相同的操作,获得所述待测样品液对应的荧光强度,通过与所述标准曲线对比求出所述待测样品液中超氧化物歧化酶的浓度。

[0077] 在另一个实施方式中,本发明提供了一种超氧化物歧化酶检测试剂盒,所述试剂

盒包含 (a) 超氧化物歧化酶-量子点荧光探针复合物; (b) 包被的超氧化物歧化酶多克隆抗体; (c) 任选的超氧化物歧化酶标准品; 以及 (d) 用于检测超氧化物歧化酶的说明书。

[0078] 本发明的技术方案将抗体直接包被在酶标板的微孔中, 加入超氧化物歧化酶-量子点荧光探针和含有超氧化物歧化酶的待测样品液, 竞争结合酶标板上的抗体, 形成抗体-抗原发光免疫复合物, 用荧光酶标仪激发并检测所形成的抗体-抗原发光复合物的荧光强度, 通过与标准溶液对比求出待测样品中超氧化物歧化酶的浓度。本发明的方法具有高灵敏度、高特异性和操作简单等特点, 可用于超氧化物歧化酶的快速检测。

[0079] 实施例

[0080] 接下来, 通过实施例对本发明进行进一步详细地说明, 但本发明不仅限于这些实施例。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明, 均为常规方法; 下述实施例中所用的试剂、材料和装置等, 如无特殊说明, 均可从商业途径得到或可由本领域技术人员根据本领域的普通技术知识而制备得到。下述实施例中使用的超氧化物歧化酶购自士锋生物科技有限公司; 下述实施例中使用的量子点为CdSe/ZnS量子点, 购自上海昆道生物科技有限公司。

[0081] 实施例1

[0082] 本发明的量子点标记的直接竞争荧光免疫检测超氧化物歧化酶的方法包括如下步骤:

[0083] (1) 量子点的活化

[0084] 量取100 μ L CdSe/ZnS量子点, 加入100 μ L 3mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 磷酸盐溶液、100 μ L 2mg/mL 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 磷酸盐溶液和700 μ L 25mM pH 6.0磷酸盐缓冲液进行溶解, 超声分散均匀后, 在37 $^{\circ}$ C、250rpm的恒温培养箱中反应30min, 10000rpm离心10min, 去掉上清, 得到活化后的量子点。

[0085] (2) 活化后的量子点与超氧化物歧化酶的偶联

[0086] 用0.01M pH7.4的磷酸盐缓冲液为溶剂, 配制1mg/mL的超氧化物歧化酶的磷酸盐溶液, 取1mL的超氧化物歧化酶的磷酸盐溶液对活化后的量子点进行复溶, 超声分散混匀, 在37 $^{\circ}$ C、250rpm的恒温培养箱中避光反应1.5h; 在10000rpm的转速下离心10min, 去除游离的超氧化物歧化酶, 作为离心沉淀得到超氧化物歧化酶-量子点荧光探针 (QDs-SOD) 复合物。

[0087] (3) QDs-SOD复合物的稀释

[0088] 将离心沉淀 (即QDs-SOD复合物) 用1mL复溶液 (PBS缓冲液, pH 7.4, 含1% BSA 0.5% 吐温-20) 复溶, 超声震荡混匀, 将包含QDs-SOD复合物的复溶液在250rpm、30 $^{\circ}$ C下的摇床中震荡1h后, 从摇床中取出, 用含有吐温-20的0.01M pH7.4的磷酸盐缓冲液作为QDs-SOD稀释液稀释100倍, 得到QDs-SOD复合物稀释液待用。

[0089] 偶联前后的CdSe/ZnS量子点的荧光信号的对比

[0090] 对偶联前后的CdSe/ZnS量子点用磷酸盐缓冲液进行1:10000稀释, 用F-7000荧光分光光度计仪器, 在室温测试条件下测定其荧光强度 (图1), 测试结果显示CdSe/ZnS量子点与超氧化物歧化酶的偶联前后的发射波长的峰位置没有明显变化, 且对量子点的荧光信号影响较小, 说明CdSe/ZnS量子点能够有效地适用于超氧化物歧化酶的标记。

[0091] (4) 抗体的包被

[0092] 使用pH=7.4、0.01M的磷酸盐缓冲液对超氧化物歧化酶多克隆抗体按照1:1000进行稀释, 在酶标板上每孔加入100 μ L所获得的抗体稀释液, 在4 $^{\circ}$ C的冰箱中包被过夜后取出,

在室温条件下用含0.5%吐温-20的0.01M pH7.4磷酸盐缓冲液洗涤三次并甩干以除去多余的抗体,然后每孔加入300 μ L 1%BSA封闭溶液,在37 $^{\circ}$ C下对空白位点进行封闭1.5h,得到包被在酶标板中的超氧化物歧化酶多克隆抗体。

[0093] (5) 发光免疫复合体的形成

[0094] 在封闭后的酶标板孔(其中包被有超氧化物歧化酶多克隆抗体)中,每孔分别加入50 μ L的一系列不同浓度的超氧化物歧化酶的标准溶液(浓度依次为1 μ g/mL、100 μ g/mL、200 μ g/mL、400 μ g/mL、600 μ g/mL、800 μ g/mL和1000 μ g/mL)和50 μ L的QDs-SOD复合物稀释液。

[0095] 在此步骤中,超氧化物歧化酶将与QDs-SOD竞争结合包被在酶标板上的固相抗体,竞争反应在37 $^{\circ}$ C下持续1h。用含0.5%吐温-20的0.01M pH7.4磷酸盐缓冲液洗涤三次,去掉非特异性吸附,在酶标板中形成抗体-抗原发光免疫复合物。

[0096] (6) 标准曲线的绘制(定量荧光检测)

[0097] 在酶标板中每孔加入100 μ L 0.01M pH7.4磷酸盐缓冲液,用荧光酶标仪激发并检测所形成的抗体-抗原发光免疫复合物的荧光强度,其中荧光酶标仪的激发波长为375nm,发射波长为526nm。以一系列不同浓度的超氧化物歧化酶标准溶液中的超氧化物歧化酶的浓度为横坐标,所获得的荧光强度为纵坐标,绘制得到标准曲线(见图2)。该研究得到的标准曲线的线性相关系数为0.9819。

[0098] 量子点标记的直接竞争荧光免疫检测法的测定原理是通过检测结合到酶标板微孔上的抗体-抗原二元免疫复合物的荧光强度来实现对超氧化物歧化酶的检测。可与标准曲线对比求出样品中超氧化物歧化酶的浓度。结合到酶标板微孔上的超氧化物歧化酶-量子点荧光探针数量不同产生的荧光强度不同,通常样品中超氧化物歧化酶含量越高,与抗体结合的量越多,与超氧化物歧化酶-量子点荧光探针结合的就越少,测得的荧光强度值越小。

[0099] 实施例2

[0100] 除了如下步骤(4)之外,采用与实施例1相同的操作获得荧光强度,并制备标准曲线。该研究得到的标准曲线的线性相关系数为0.921。

[0101] (4) 抗体包被:使用pH=7.4、0.01M的磷酸盐缓冲液对超氧化物歧化酶多克隆抗体按照1:500进行稀释,在酶标板上每孔加入100 μ L所获得的抗体稀释液,在4 $^{\circ}$ C的冰箱中包被过夜后取出,在室温条件下用含0.5%吐温-20的0.01M pH7.4磷酸盐缓冲液洗涤三次并甩干以除去多余的抗体,然后每孔加入300 μ L 1%BSA封闭溶液,在37 $^{\circ}$ C下对封闭空白位点进行封闭1.5h,得到包被的超氧化物歧化酶多克隆抗体。

[0102] 实施例3

[0103] 除了如下步骤(5)之外,采用与实施例1相同的操作获得荧光强度,并制备标准曲线。该研究得到的标准曲线的线性相关系数为0.969。

[0104] (5) 发光免疫复合体的形成:在封闭后的酶标板孔(包含包被的超氧化物歧化酶多克隆抗体)中,每孔加入50 μ L的含有超氧化物歧化酶的标准溶液和50 μ L的QDs-SOD复合物稀释液。在此步骤中,超氧化物歧化酶将与QDs-SOD竞争结合包被在酶标板上的固相抗体,竞争反应在37 $^{\circ}$ C下持续0.5h。用含0.5%吐温-20的0.01M pH7.4磷酸盐缓冲液洗涤三次,去掉非特异性吸附,形成抗体-抗原发光免疫复合物。

[0105] 实施例4

[0106] 除了如下步骤(4)之外,采用与实施例1相同的操作获得荧光强度,并制备标准曲线。该研究得到的标准曲线的线性相关系数为0.872。

[0107] (4) 抗体包被:使用pH=7.4、0.01M的磷酸盐缓冲液对超氧化物歧化酶多克隆抗体按照1:2000进行稀释,在酶标板上每孔加入100 μ L所获得的抗体稀释液,在4 $^{\circ}$ C的冰箱中包被过夜后取出,在室温条件下用含0.5%吐温-20的0.01M pH7.4磷酸盐缓冲液洗涤三次并甩干以除去多余的抗体,然后每孔加入300 μ L 1%BSA封闭溶液,在37 $^{\circ}$ C下对封闭空白位点进行封闭1.5h,得到包被的超氧化物歧化酶多克隆抗体。

[0108] 实施例5

[0109] 除了如下步骤(5)之外,采用与实施例1相同的操作获得荧光强度,并制备标准曲线。该研究得到的标准曲线的线性相关系数为0.697。

[0110] (5) 发光免疫复合体的形成:在封闭后的酶标板孔(包含包被的超氧化物歧化酶多克隆抗体)中,每孔加入50 μ L的含有超氧化物歧化酶的标准溶液和50 μ L的QDs-SOD复合物稀释液。在此步骤中,超氧化物歧化酶将与QDs-SOD竞争结合包被在酶标板上的固相抗体,竞争反应在37 $^{\circ}$ C下持续0.2h。用含0.5%吐温-20的0.01M pH7.4磷酸盐缓冲液洗涤三次,去掉非特异性吸附,形成抗体-抗原发光免疫复合物。

[0111] 实施例6荧光探针与其他离子的反应情况

[0112] 以下测定了各种常见干扰物质是否对QDs-SOD荧光探针与包被的超氧化物歧化酶多克隆抗体的结合产生影响。以与实施例1的步骤(1)-(3)相同的操作获得QDs-SOD复合物稀释液。

[0113] (4) 抗体的包被

[0114] 使用pH=7.4、0.01M的磷酸盐缓冲液对超氧化物歧化酶多克隆抗体按照1:1000进行稀释,在酶标板上每孔加入100 μ L所获得的抗体稀释液,在4 $^{\circ}$ C的冰箱中包被过夜后取出,在室温条件下用含0.5%吐温-20的0.01M pH7.4磷酸盐缓冲液洗涤三次并甩干以除去多余的抗体,然后每孔加入250 μ L 1%BSA封闭溶液,在37 $^{\circ}$ C下对空白位点进行封闭1.5h,得到包被在酶标板中的超氧化物歧化酶多克隆抗体。

[0115] (5) 发光免疫复合体的形成

[0116] 分别量取30 μ M的苏氨酸、丝氨酸、维生素E、葡萄糖、氯化钠、氯化钾、氯化钙溶液各50 μ L,作为七个干扰组;量取50 μ L磷酸盐缓冲液作为空白对照组;并量取50 μ L 200 μ g/mL的超氧化物歧化酶溶液作为实验对照组。将上述干扰组、空白对照组和实验对照组溶液分别加入到封闭后的酶标板孔(其中包被有超氧化物歧化酶多克隆抗体)中,然后,再向封闭后的酶标板孔中各自加入50 μ L的QDs-SOD复合物稀释液(即QDs-SOD荧光探针)。

[0117] 在此步骤中,超氧化物歧化酶将与QDs-SOD竞争结合包被在酶标板上的固相抗体,竞争反应在37 $^{\circ}$ C下持续1h。用含0.5%吐温-20的0.01M pH7.4磷酸盐缓冲液洗涤三次,去掉非特异性吸附。

[0118] (6) 荧光检测

[0119] 使用荧光酶标仪分别测量上述各酶标板孔中形成的抗体-抗原发光免疫复合物的荧光发射光谱。在该实施例中,将测得的空白对照孔(50 μ L的稀释缓冲液替代样品溶液)的荧光强度表示为 F_0 (由于不含超氧化物歧化酶磷酸盐溶液,QDs-SOD荧光探针与固体抗体的结合量最大,荧光强度 F_0 最强),将含有不同种类干扰离子或含有超氧化物歧化酶(SOD蛋

白)的样本溶液的荧光强度表示为F,以相对荧光强度 ΔF ($\Delta F=F_0-F$)考察不同抗原对免疫检测荧光强度的影响。

[0120] 如图3所示,由于含有SOD蛋白的实验对照组试样中的SOD与QDs-SOD荧光探针产生竞争性结合,荧光强度最低,其相应的相对荧光响应信号值最高;干扰组中的干扰物质的相对荧光强度都低于50,与不含干扰物质时的空白对照组的 F_0 相差较小,表明干扰组中的干扰物质对QDs-SOD荧光探针与固体抗体的结合影响较小。因此,本发明的QDs-SOD荧光探针与固体抗体之前有较强的选择专一性。

[0121] 对比例1 CdTe/ZnS量子点光学稳定性的研究

[0122] 量子点荧光强度稳定性直接影响到量子点的应用,因此对相同浓度的CdTe量子点和CdTe/ZnS量子点的光学稳定性进行测定。用荧光分光光度计F-7000,采用时间扫描法,在375nm激发波长光照射2000s后,如图4所示,CdTe量子点荧光强度下降1.9%,CdTe/ZnS量子点荧光强度下降0.8%,说明CdTe/ZnS量子点光学稳定性较好。

[0123] 对比例2 CdTe/ZnS量子点贮存稳定性的研究

[0124] 量子点荧光强度稳定性直接影响到量子点的应用,因此对不同选择的量子点的储存稳定性分别进行测定。30天之内用荧光分光光度计F-7000进行荧光测定,在相同条件下对相同浓度的CdTe量子点和CdTe/ZnS量子点的荧光性能进行测试。如图5所示,与CdTe量子点相比,CdTe/ZnS量子点荧光强度没有明显的下降,储存稳定性好。

[0125] 对比例1和对比例2说明,相对于其它量子点(例如CdTe量子点),CdTe/ZnS量子点具有更好的光学稳定性和储存稳定性,能够更有效地用于超氧化物歧化酶的标记和检测。

[0126] 对比例3其它参数范围对标准曲线的线性相关系数的影响

[0127] (1)量子点的活化

[0128] 量取100 μ L CdSe/ZnS量子点,加入100 μ L 0.3mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)磷酸盐溶液、100 μ L 0.2mg/mL 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)磷酸盐溶液和700 μ L 25mM pH 6.0磷酸盐缓冲液进行溶解,超声分散均匀后,在37 $^{\circ}$ C、250rpm的恒温培养箱中反应30min,10000rpm离心10min,去掉上清,得到活化后的量子点。

[0129] (2)活化后的量子点与超氧化物歧化酶的偶联

[0130] 用0.01M pH7.4的磷酸盐缓冲液为溶剂,配制0.01mg/mL的超氧化物歧化酶的磷酸盐溶液,取1mL的超氧化物歧化酶的磷酸盐溶液对活化后的量子点进行复溶,超声分散混匀,在37 $^{\circ}$ C、250rpm的恒温培养箱中避光反应2h;在10000rpm的转速下离心10min,去除游离的超氧化物歧化酶,作为离心沉淀得到QDs-SOD复合物。

[0131] (3)QDs-SOD复合物的稀释

[0132] 离心沉淀(即QDs-SOD复合物)用1mL复溶液(PBS缓冲液,pH 7.4,含1%BSA 0.5%吐温-20)复溶,超声震荡混匀,将包含QDs-SOD复合物的复溶液在250rpm、30 $^{\circ}$ C下的摇床中震荡1h后,从摇床中取出,用含有吐温-20的0.01M pH7.4的磷酸盐缓冲液作为QDs-SOD稀释液稀释800倍,得到QDs-SOD复合物稀释液待用。

[0133] (4)抗体的包被

[0134] 使用pH=7.4、0.01M的磷酸盐缓冲液对超氧化物歧化酶多克隆抗体按照1:5000进行稀释,在酶标板上每孔加入100 μ L所获得的抗体稀释液,4 $^{\circ}$ C下包被过夜后取出,用含0.5%吐温-20的0.01M pH7.4磷酸盐缓冲液洗涤三次并甩干以除去多余的抗体,然后每孔

加入300 μ L 1%BSA封闭溶液,在37 $^{\circ}$ C下对空白位点进行封闭1h,得到包被的超氧化物歧化酶多克隆抗体。

[0135] 以与实施例1的步骤(5)–(6)相同的操作获得荧光强度,并制备标准曲线。该研究得到的标准曲线的线性相关系数为0.593。

[0136] 实验例添加回收实验

[0137] (1) 样品溶液制备:取新鲜的番茄,洗净晾干,于搅拌机中打碎10min,在冰浴状态下用研钵研磨至泥状。料液比按1:2的比例称取一定量的番茄泥,加入样品提取液(0.05mol/L PBS缓冲液)在4 $^{\circ}$ C高速离心机中以5000r/min的转速进行离心30min,取上清液作为样本溶液进行分析。

[0138] (2) 通过上述前处理方法提取获得超氧化物歧化酶富集的番茄样本溶液,然后在120 $^{\circ}$ C下对样本溶液进行超高温加热处理,致使样本溶液中的超氧化物歧化酶失活,待其冷却至室温。在120 $^{\circ}$ C下高温处理过的样品溶液中添加超氧化物歧化酶标准品液,使其浓度为1.0 μ g/mL、50 μ g/mL、200 μ g/mL、400 μ g/mL,各浓度分别制备样品五份作为样本溶液。

[0139] 除了如下步骤之外,采用与实施例1建立的相同的方法对样本溶液进行分析:将实施例1步骤(5)中的超氧化物歧化酶标准品溶液替换为上述样本溶液,以与实施例1中的步骤(5)和(6)相同的操作,获得所述样本溶液对应的荧光强度,将该荧光强度代入实施例1获得的标准曲线,对比求出所述样本溶液中超氧化物歧化酶的浓度。结果见表2。可以看出,番茄样品中超氧化物歧化酶的添加回收率在99.56~107.00%之间。

[0140] 表2超氧化物歧化酶添加回收率的测定

	样品号	添加值 (μ g/mL)	检测值 (μ g/mL)	回收率 (%)
	1	1	1.07	107%
[0141]	2	50	49.78	99.56%
	3	200	205.47	102.74%
	4	400	412.58	103.14%

[0142] 由此可见,本发明的方法具有高灵敏度、高特异性和操作简单等特点,能够与高的添加回收率实现超氧化物歧化酶的快速检测。

[0143] 以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明,不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换,都应当视为属于本发明的保护范围。

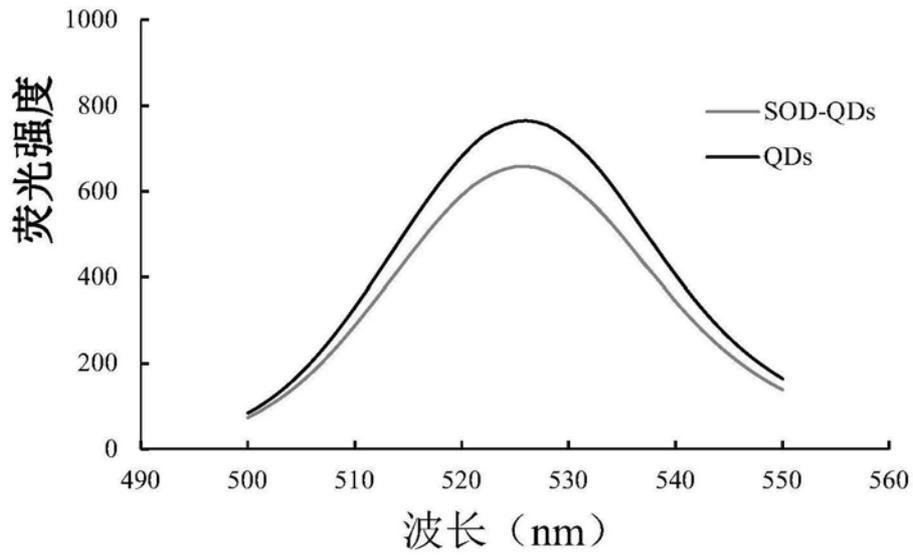


图1

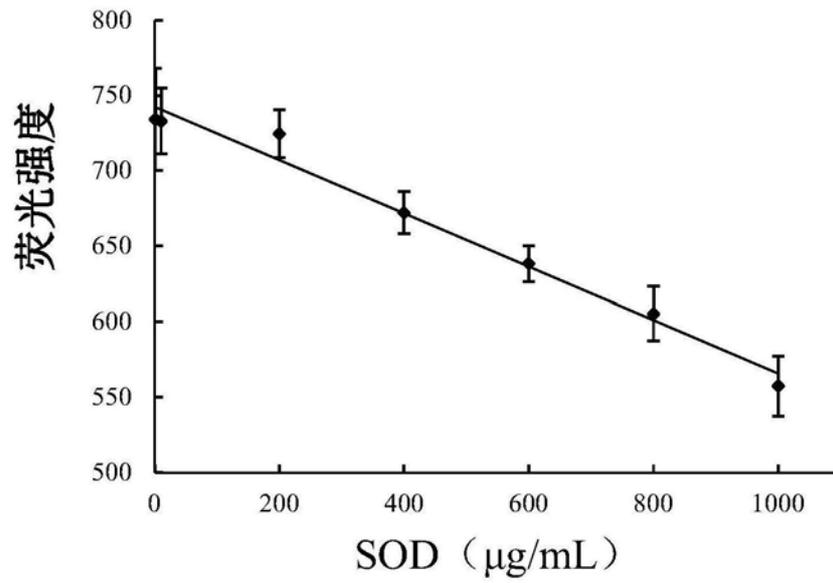


图2

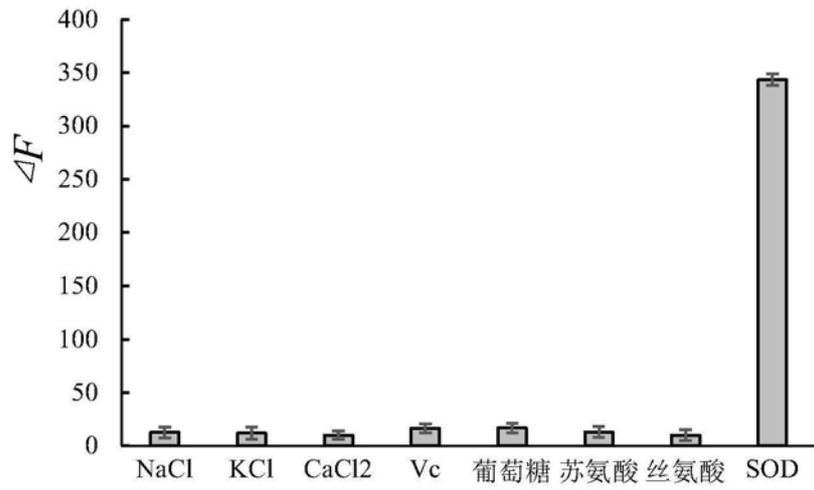


图3

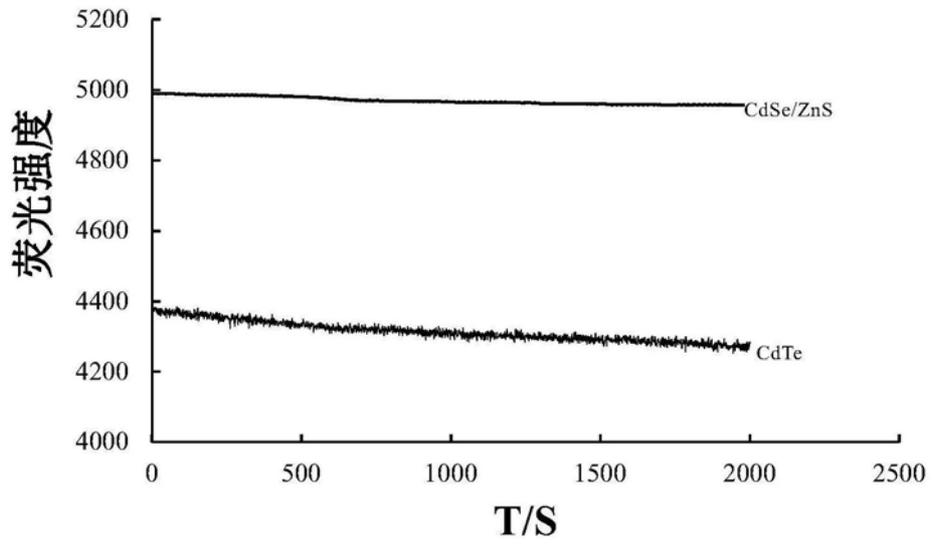


图4

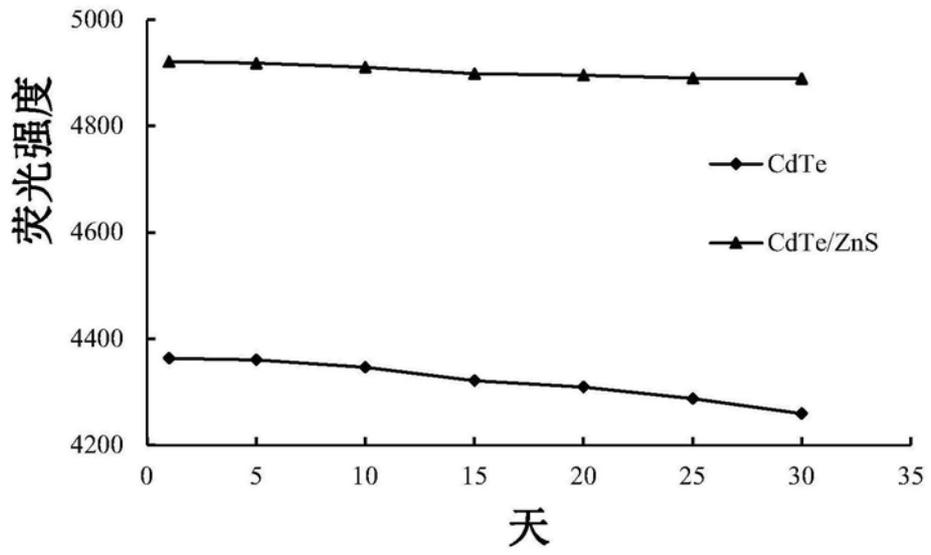


图5