



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110007073 A

(43)申请公布日 2019.07.12

(21)申请号 201910255947.X

(22)申请日 2019.04.01

(71)申请人 南京迪格诺斯生物技术有限公司

地址 210000 江苏省南京市经济技术开发区
红枫科技园A6栋三层

(72)发明人 金晶 王西龙 张誉严

(74)专利代理机构 南京瑞弘专利商标事务所
(普通合伙) 32249

代理人 吴旭

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

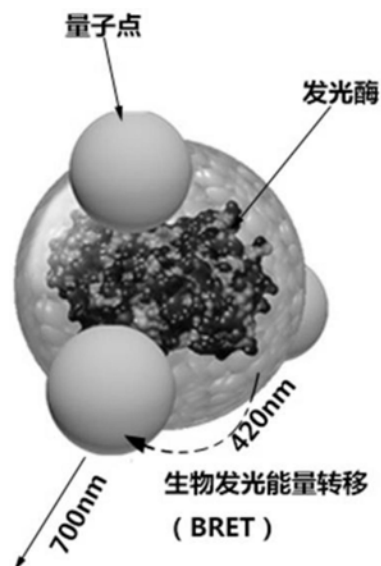
权利要求书3页 说明书10页 附图6页

(54)发明名称

一种多指标联检化学发光试剂盒及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了基于量子点标记酶形成量子点-酶复合物的多指标联检化学发光免疫分析法。本发明基于量子点标记酶形成量子点-酶复合物的多指标联检化学发光免疫分析法,在酶表面或距酶5-10 nm的聚合物层表面分别标记不同粒径或种类的量子点,形成不同的量子点-酶复合物,利用不同粒径或种类量子点的吸收光谱与酶催化其发光底物所产生的发射光谱充分重叠且量子点具有较大斯托克斯位移的特点,可以高效地将酶催化底物产生的400-600 nm波长的发射光转化为波长在500-750 nm之间的发射光,并在不同滤光片的作用下进行检测,实现了化学发光平台上以少量样本进行快速高效的多指标联检。



1. 一种化学发光免疫分析试剂盒, 其特征在于, 包括不同的量子点-酶-标记分子复合物、直接或间接包被了不同捕获分子的固相载体和化学发光底物液, 其中:

将不同的量子点连接到酶表面形成不同的量子点-酶复合物或将不同的量子点连接到包覆于酶表面的聚合物层表面形成不同的量子点-酶复合物, 标记分子连接到不同的量子点-酶复合物上形成不同的量子点-酶-标记分子复合物;

所述标记分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合, 所述捕获分子能够与标记分子配对, 并且能够与待测样本中的目标分析物特异性结合;

或所述捕获分子能够与待测样本中的目标分析物相结合, 所述捕获分子能够与标记分子特异性结合。

2. 根据权利要求1所述的化学发光免疫分析试剂盒, 其特征在于: 所述量子点包括一元量子点、二元量子点、三元量子点中的任意一种或任意几种纳米粒子的组合, 或由上述任意一种量子点为核、二氧化硅为壳的核-壳型纳米复合粒子; 所述量子点的粒径大小为1-100 nm。

3. 根据权利要求1所述的化学发光免疫分析试剂盒, 其特征在于: 所述酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶在内的和底物作用产生化学发光的物质; 当采用辣根过氧化物酶时, 底物为含有鲁米诺、异鲁米诺及其衍生物的溶液; 当采用碱性磷酸酶时, 底物为含有(金刚烷)-1,2-二氧乙烷或其衍生物的溶液。

4. 根据权利要求1所述的化学发光免疫分析试剂盒, 其特征在于: 所述固相载体为免疫分析固相载体, 所述固相载体为磁性微粒、酶标板、微孔板、金电极或尼龙; 所述目标分析物为样本中的待测物; 所述试剂盒还包括清洗液。

5. 根据权利要求1所述的化学发光免疫分析试剂盒, 其特征在于: 在夹心法中, 所述标记分子为与目标分析物特异性结合的抗体、或其活性片段、抗原或半抗原、或它们的活性片段, 所述抗体或其活性片段为单克隆抗体、多克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、Fab、(Fab')₂、抗体重链或抗体轻链; 所述捕获分子为与标记分子配对, 并且能够与目标分析物特异性结合的抗体、或其活性片段、抗原或半抗原、或它们的活性片段, 所述抗体或其活性片段为单克隆抗体、多克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、Fab、(Fab')₂、抗体重链或抗体轻链;

或在竞争法中, 所述标记分子为与目标分析物具有相同或相似结构、或相同或相似结合结构域的物质且能与捕获分子结合的物质, 所述标记分子为小分子、半抗原、大分子或抗原; 所述捕获分子为能与标记分子特异性结合的物质;

或在竞争法中, 所述捕获分子为与目标分析物具有相同或相似结构、或相同或相似结合结构域的物质且能与捕获分子结合的物质, 所述捕获分子为小分子、半抗原、大分子或抗原; 所述标记分子为能与捕获分子特异性结合的物质。

6. 根据权利要求1-5任一所述的化学发光免疫分析试剂盒的制备方法, 其特征在于: 包含以下步骤:

S1、制备量子点-酶复合物: 使用无机材料制备量子点, 并在量子点表面引入巯基、氨基或羧基, 将量子点连接到酶表面, 反应完成后对反应物通过层析或者电泳的方式进行纯化, 除去没有连接上的量子点, 得到纯净的量子点-酶复合物; 或使用无机材料或有机分子包覆在酶表面形成聚合物层, 纯化后将量子点连接到聚合物层表面, 反应完成后再次对反应物

通过层析或者电泳进行纯化,除去没有连接上的量子点,得到纯净的量子点-酶复合物;

S2、制备量子点-酶-标记分子复合物:标记分子通过共价偶联方式或物理吸附方式连接到步骤S1中制备好的量子点-酶复合物,反应完成后对反应物进行纯化,得到纯净的量子点-酶-标记分子复合物;所述共价偶联方式为活化酶表面的巯基、氨基或羧基共价偶联至抗体的氨基;

S3、制备直接或间接包被了捕获分子的固相载体:捕获分子通过共价偶联、结合对、物理吸附方式直接或间接包被到固相载体;

S4、配制化学发光底物液:底物液为含有鲁米诺、异鲁米诺或其衍生物的溶液,或含有(金刚烷)-1,2-二氧化乙烷或其衍生物的溶液。

7. 根据权利要求1-5任一所述的化学发光免疫分析试剂盒应用于化学发光免疫分析法,其特征在于,包括夹心法:

将带有配位基团的不同粒径或种类量子点分别标记在酶表面,或利用有机大分子或无机材料在酶表面形成聚合物层,将带有配位基团的不同粒径或种类量子点分别标记在聚合物层表面,形成不同的量子点-酶复合物;将能够与待测样本中的不同目标分析物特异性结合的相对对应标记分子标记不同的量子点-酶复合物,形成不同的量子点-酶-标记分子复合物;将能够与待测样本中的不同目标分析物特异性结合的相对对应捕获分子直接或间接包被在固相载体上;将不同的量子点-酶-标记分子复合物、固相载体以及待测样本混合,形成不同类型的量子点-酶-标记分子-目标分析物-捕获分子-固相载体复合物;经清洗分离出各类固相载体复合物的混合物,加入底物,经催化产生的相同波长的发射光被不同粒径或种类的量子点吸收后转化为不同波长的发射光,然后用化学发光测定仪测定不同目标分析物发光强度并带入预置的工作标准曲线计算转化为相对对应分析物浓度。

8. 根据权利要求7所述的化学发光免疫分析试剂盒应用于化学发光免疫分析法,其特征在于,所述夹心法中,量子点通过共价偶联方式或物理吸附方式连接到酶或其聚合物层表面;所述共价偶联方式为量子点表面修饰的巯基、氨基或羧基共价偶联至酶或聚合物层表面的氨基;

所述夹心法中,捕获分子通过共价偶联、结合对、物理吸附方式直接或间接包被到固相载体;所述共价偶联方式为固相载体表面修饰的巯基、氨基或羧基共价偶联至捕获分子的氨基;所述结合对方式为生物素-链霉亲和素、生物素-亲和素、生物素-中性亲和素、凝集素与糖类、葡萄球菌A 蛋白与IgG、抗原与抗体、阳离子与阴离子、激素维生素和脂质与受体;

用于形成聚合物层的有机大分子为牛血清白蛋白、酪蛋白或超支化聚合物;用于形成聚合物层的无机材料为聚氯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚酰胺、聚甲醛、聚碳酸酯或由硼、硅、磷、硫、锗、砷、硒、锡、锑、碲、铋元素组成的聚合物。

9. 根据权利要求1-5任一所述的化学发光免疫分析试剂盒应用于化学发光免疫分析法,其特征在于,包括两种竞争法:

一种竞争法,将带有配位基团的不同粒径或种类量子点分别标记在酶表面,或利用有机大分子或无机材料在酶表面形成聚合物层,将带有配位基团的不同粒径或种类量子点分别标记在聚合物层表面,形成不同的量子点-酶复合物;将能够与待测样本中的不同目标分析物特异性结合的相对对应标记分子标记不同的量子点-酶复合物,形成不同的量子点-酶-标记分子复合物;将能够与待测样本中的不同目标分析物竞争性结合相对对应标记分子的各

类捕获分子直接或间接包被在固相载体上;将不同的量子点-酶-标记分子复合物、固相载体以及待测样本混合,固相载体上的捕获分子与目标分析物竞争结合量子点-酶-标记分子复合物上的标记分子,形成不同类型的量子点-酶-标记分子-捕获分子-固相载体复合物或不同类型的量子点-酶-标记分子-目标分析物复合物;经清洗分离出各类固相载体复合物的混合物,加入底物,经催化产生的相同波长的发射光被不同粒径或种类的量子点吸收后转化为不同波长的发射光,然后用化学发光测定仪测定不同目标分析物发光强度并带入预置的工作标准曲线计算转化为相对应分析物浓度;

另一种竞争法,将带有配位基团的不同粒径或种类量子点分别标记在酶表面,或利用有机大分子或无机材料在酶表面形成聚合物层,将带有配位基团的不同粒径或种类量子点分别标记在聚合物层表面,形成不同的量子点-酶复合物;将能够与待测样本中的不同目标分析物特异性结合的相对应捕获分子直接或间接包被在固相载体上;将能够与待测样本中的不同目标分析物竞争性结合相对应捕获分子各类标记分子标记不同的量子点-酶复合物,形成不同的量子点-酶-标记分子复合物;将不同的量子点-酶-标记分子复合物、固相载体以及待测样本混合,量子点-酶-标记分子复合物上的标记分子与目标分析物竞争结合固相载体上的捕获分子,形成不同类型的量子点-酶-标记分子-捕获分子-固相载体复合物或固相载体-捕获分子-目标分析物复合物;经清洗分离出各类固相载体复合物的混合物,加入底物,经催化产生的相同波长的发射光被不同粒径或种类的量子点吸收后转化为不同波长的发射光,然后用化学发光测定仪测定不同目标分析物发光强度并带入预置的工作标准曲线计算转化为相对应分析物浓度。

10. 根据权利要求9所述的化学发光免疫分析试剂盒应用于化学发光免疫分析法,其特征在于,所述竞争法中,捕获分子通过共价偶联、结合对、物理吸附方式直接或间接包被到固相载体;所述共价偶联方式为固相载体表面修饰的巯基、氨基或羧基共价偶联至捕获分子的氨基;所述结合对方式为生物素-链霉亲和素、生物素-亲和素、生物素-中性亲和素、凝集素与糖类、葡萄球菌A 蛋白与IgG、抗原与抗体、阳离子与阴离子、激素维生素和脂质与受体。

一种多指标联检化学发光试剂盒及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于化学发光免疫技术领域,特别涉及一种基于量子点标记酶形成量子点-酶复合物的多指标联检化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 化学发光免疫分析(Chemiluminescence immunoassay, CLIA)是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合,用于各种抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素和药物等的检测分析技术。是继放射分析、酶免分析、荧光免疫分析和时间分辨荧光免疫分析之后发展起来的一项最新免疫测定技术。比起传统的酶免分析法,CLIA 具有灵敏度更高、检测时间更短、标记方法更简单以及原料成本更低的特点。尽管如此,随着分析检验技术的逐渐普及,我们迫切需要能在CLIA 基础上系统性进一步提升样本检测通量以及便捷性来适应临床。

[0003] 样本多种组分联合同步检测具有非常重要意义。传统上测定混合体系中样本多种组分含量,多采用平行单组分分析法,即每个分析流程只测定其中一种组分含量,多次平行执行该流程,最后得到所有所需组分含量。分析所需时间长,消耗试剂多,分析通量低,劳动量大。已有文献报道,量子点具有较大的斯托克斯位移,不同粒径和种类的量子点偶联在酶表面后,可吸收酶催化其底物产生的同一波长的发射光,并分别转化为不同波长的发射光,非常适用于样本多组分分析。

[0004] 研究者发现,量子点的发射光相比酶底物的发射光具有更窄的光谱半高宽(大约为60-80nm),是一种更为纯净的检测信号,降低了杂光对检测的干扰。而该种光信号的转换存在临界距离,即仅当量子点和酶表面之间的距离在10 nm以内时,量子点才能对酶底物的发射光进行转换,由于10 nm以内的距离可存在的杂质很少,因此这种限制条件反过来又在一定程度上提高了检测的信噪比。

发明内容

[0005] 为了解决现有技术中的问题,本发明提供了一种化学发光免疫分析试剂盒,实现化学发光试剂盒以少量样本进行高速高效多指标的联检;本发明还提供了该化学发光免疫分析试剂盒的制备方法;本发明还提供了该化学发光免疫分析试剂盒在化学发光免疫分析中的应用。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案为:

一种化学发光免疫分析试剂盒,包括不同的量子点-酶-标记分子复合物、直接或间接包被了不同捕获分子的固相载体和化学发光底物液,其中:

将不同的量子点连接到酶表面形成不同的量子点-酶复合物或将不同的量子点连接到包覆于酶表面的聚合物层表面形成不同的量子点-酶复合物,标记分子连接到不同的量子点-酶复合物上形成不同的量子点-酶-标记分子复合物;

所述标记分子能够与待测样本中的目标分析物特异性结合,所述捕获分子能够与标记

分子配对,并且能够与待测样本中的目标分析物特异性结合;

或所述捕获分子能够与待测样本中的目标分析物相结合,所述捕获分子能够与标记分子特异性结合。

[0007] 所述量子点分为三类,包括一元量子点例如C量子点、Si量子点等;二元量子点例如不含重金属的ZnO、SiO₂等和含有重金属CdS、PbS等;三元量子点例如CdSe_xTe_{1-x}、CuInS₂等;所述量子点为上述类型中的任意一种或任意几种纳米粒子的组合,或由上述任意一种量子点为核、二氧化硅为壳的核-壳型纳米复合粒子;所述量子点的粒径大小为1-100 nm;

优选地,所述量子点为ZnS、CdS、HgS、ZnSe、CdSe、HgSe、CdTe、ZnTe、ZnO、PbSe、HgTe、CaAs、InP、InAs、InCaAs、CdS/ZnS、CdS/Ag₂S、CdS/PbS、CdS/Cd(OH)₂、CdS/HgS、CdS/HgS/CdS、ZnS/CdS、ZnS/CdS/ZnS、ZnS/HgS/ZnS/CdS、CdSe/CdS、CdSe/ZnS、CdSe/ZnSe、CdSe/CuSe、CdSe/HgTe、CdSe/HgSe、CdSe/HgSe/CdSe、CdTe/HgS、CdTe/HgTe、InAs/InP、InAs/CdSe、InAs/ZnSe、MgS、MgSe、MgTe、CaS、CaSe、CaTe、SrS、SrSe、SeTe、BaS、BaSe、BaTe、CdS:Mn、ZnS:Mn、CdS:Cu、ZnS:Cu、CdS:Tb、ZnS:Tb中的任意一种或任意几种纳米粒子的组合,或由上述任意一种量子点为核、二氧化硅为壳的核-壳型纳米复合粒子;所述量子点的粒径大小为1-100 nm;

所述酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶在内的和底物作用产生化学发光的物质;当采用辣根过氧化物酶时,底物为含有鲁米诺、异鲁米诺及其衍生物的溶液;当采用碱性磷酸酶时,底物为含有(金刚烷)-1,2-二氧乙烷或其衍生物的溶液。

[0008] 所述固相载体为免疫分析固相载体,所述固相载体为磁性微粒、酶标板、微孔板、金电极或尼龙;所述目标分析物为样本中的待测物;所述试剂盒还包括清洗液。

[0009] 在夹心法中,所述标记分子为与目标分析物特异性结合的抗体、或其活性片段、抗原或半抗原、或它们的活性片段,所述抗体或其活性片段为单克隆抗体、多克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、Fab、(Fab')₂、抗体重链或抗体轻链;所述捕获分子为与标记分子配对,并且能够与目标分析物特异性结合的抗体、或其活性片段、抗原或半抗原、或它们的活性片段,所述抗体或其活性片段为单克隆抗体、多克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、Fab、(Fab')₂、抗体重链或抗体轻链;

或在竞争法中,所述标记分子为与目标分析物具有相同或相似结构、或相同或相似结合结构域的物质且能与捕获分子结合的物质,所述标记分子为小分子、半抗原、大分子或抗原;所述捕获分子为能与标记分子特异性结合的物质;

或在竞争法中,所述捕获分子为与目标分析物具有相同或相似结构、或相同或相似结合结构域的物质且能与捕获分子结合的物质,所述捕获分子为小分子、半抗原、大分子或抗原;所述标记分子为能与捕获分子特异性结合的物质。

[0010] 一种化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,包含以下步骤:

S1、制备量子点-酶复合物:使用无机材料制备量子点,并在量子点表面引入巯基、氨基或羧基,将量子点连接到酶表面,反应完成后对反应物通过层析或者电泳的方式进行纯化,除去没有连接上的量子点,得到纯净的量子点-酶复合物;或使用无机材料或有机分子包覆在酶表面形成聚合物层,纯化后将量子点连接到聚合物层表面,反应完成后再次对反应物通过层析或者电泳进行纯化,除去没有连接上的量子点,得到纯净的量子点-酶复合物;

S2、制备量子点-酶-标记分子复合物:标记分子通过共价偶联方式或物理吸附方式连

接到步骤S1中制备好的量子点-酶复合物,反应完成后对反应物进行纯化,得到纯净的量子点-酶-标记分子复合物;所述共价偶联方式为活化酶表面的巯基、氨基或羧基共价偶联至抗体的氨基;

S3、制备直接或间接包被了捕获分子的固相载体:捕获分子通过共价偶联、结合对、物理吸附方式直接或间接包被到固相载体;

S4、配制化学发光底物液:底物液为含有鲁米诺、异鲁米诺或其衍生物的溶液,或含有(金刚烷)-1,2-二氧乙烷或其衍生物的溶液。

[0011] 一种化学发光免疫分析试剂盒应用于化学发光免疫分析法,包括夹心法:

将带有配位基团的不同粒径或种类量子点分别标记在酶表面,或利用有机大分子或无机材料在酶表面形成聚合物层,将带有配位基团的不同粒径或种类量子点分别标记在聚合物层表面,形成不同的量子点-酶复合物;将能够与待测样本中的不同目标分析物特异性结合的相对应标记分子标记不同的量子点-酶复合物,形成不同的量子点-酶-标记分子复合物;将能够与待测样本中的不同目标分析物特异性结合的相对应捕获分子直接或间接包被在固相载体上;将不同的量子点-酶-标记分子复合物、固相载体以及待测样本混合,形成不同类型的量子点-酶-标记分子-目标分析物-捕获分子-固相载体复合物;经清洗分离出各类固相载体复合物的混合物,加入底物,经催化产生的相同波长的发射光被不同粒径或种类的量子点吸收后转化为不同波长的发射光,然后用化学发光测定仪测定不同目标分析物发光强度并带入预置的工作标准曲线计算转化为相对应分析物浓度。

[0012] 所述夹心法中,量子点通过共价偶联方式或物理吸附方式连接到酶或其聚合物层表面;所述共价偶联方式为量子点表面修饰的巯基、氨基或羧基共价偶联至酶或聚合物层表面的氨基;

所述夹心法中,捕获分子通过共价偶联、结合对、物理吸附方式直接或间接包被到固相载体;所述共价偶联方式为固相载体表面修饰的巯基、氨基或羧基共价偶联至捕获分子的氨基;所述结合对方式为生物素-链霉亲和素、生物素-亲和素、生物素-中性亲和素、凝集素与糖类、葡萄球菌A 蛋白与IgG、抗原与抗体、阳离子与阴离子、激素维生素和脂质与受体;

用于形成聚合物层的有机大分子为牛血清白蛋白、酪蛋白或超支化聚合物;用于形成聚合物层的无机材料为聚氯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚酰胺、聚甲醛、聚碳酸酯或由硼、硅、磷、硫、锗、砷、硒、锡、锑、碲、铋元素组成的聚合物。

[0013] 一种化学发光免疫分析试剂盒应用于化学发光免疫分析法,包括两种竞争法:

一种竞争法,将带有配位基团的不同粒径或种类量子点分别标记在酶表面,或利用有机大分子或无机材料在酶表面形成厚度为5-10 nm的聚合物层,将带有配位基团的不同粒径或种类量子点分别标记在聚合物层表面,形成不同的量子点-酶复合物;将能够与待测样本中的不同目标分析物特异性结合的相对应标记分子标记不同的量子点-酶复合物,形成不同的量子点-酶-标记分子复合物;将能够与待测样本中的不同目标分析物竞争性结合相对应标记分子各类捕获分子直接或间接包被在固相载体上;将不同的量子点-酶-标记分子复合物、固相载体以及待测样本混合,固相载体上的捕获分子与目标分析物竞争结合量子点-酶-标记分子复合物上的标记分子,形成不同类型的量子点-酶-标记分子-捕获分子-固相载体复合物或不同类型的量子点-酶-标记分子-目标分析物复合物;经清洗分离出各类固相载体复合物的混合物,加入底物,经催化产生的相同波长的发射光被不同粒径或种

类的量子点吸收后转化为不同波长的发射光,然后用化学发光测定仪测定不同目标分析物发光强度并带入预置的工作标准曲线计算转化为相对应分析物浓度;

另一种竞争法,将带有配位基团的不同粒径或种类量子点分别标记在酶表面,或利用有机大分子或无机材料在酶表面形成厚度为5-10 nm的聚合物层,将带有配位基团的不同粒径或种类量子点分别标记在聚合物层表面,形成不同的量子点-酶复合物;将能够与待测样本中的不同目标分析物特异性结合的相对应捕获分子直接或间接包被在固相载体上;将能够与待测样本中的不同目标分析物竞争性结合相对应捕获分子的各类标记分子标记不同的量子点-酶复合物,形成不同的量子点-酶-标记分子复合物;将不同的量子点-酶-标记分子复合物、固相载体以及待测样本混合,量子点-酶-标记分子复合物上的标记分子与目标分析物竞争结合固相载体上的捕获分子,形成不同类型的量子点-酶-标记分子-捕获分子-固相载体复合物或固相载体-捕获分子-目标分析物复合物;经清洗分离出各类固相载体复合物的混合物,加入底物,经催化产生的相同波长的发射光被不同粒径或种类的量子点吸收后转化为不同波长的发射光,然后用化学发光测定仪测定不同目标分析物发光强度并带入预置的工作标准曲线计算转化为相对应分析物浓度。

[0014] 所述竞争法中,捕获分子通过共价偶联、结合对、物理吸附方式直接或间接包被到固相载体;所述共价偶联方式为固相载体表面修饰的巯基、氨基或羧基共价偶联至捕获分子的氨基;所述结合对方式为生物素-链霉亲和素、生物素-亲和素、生物素-中性亲和素、凝集素与糖类、葡萄球菌A 蛋白与IgG、抗原与抗体、阳离子与阴离子、激素维生素和脂质与受体。

[0015] 用于形成聚合物层的有机大分子为牛血清白蛋白、酪蛋白或超支化聚合物;用于形成聚合物层的无机材料为聚氯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚酰胺、聚甲醛、聚碳酸酯或由硼、硅、磷、硫、锆、砷、硒、锡、锑、碲、铋元素组成的聚合物。

[0016] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

(1)、量子点相比酶底物的发射光具有更窄的光谱半高宽(大约为60-80 nm),是一种更为纯净的检测信号,降低了杂光对检测的干扰。而该种光信号的转换存在临界距离,即仅当量子点和酶表面之间的距离在10 nm以内时,量子点才能对酶底物的发射光进行转换,由于10 nm以内的距离可存在的杂质很少,因此这种限制条件反过来又在一定程度上提高了检测的信噪比。本发明将量子点的这一特性应用到化学发光检测中,大幅提高了化学发光平台的灵敏度。

[0017] (2)、传统上测定混合体系中样本多种组分含量,多采用平行单组分分析法,即每个分析流程只测定其中一种组分含量,多次平行执行该流程,最后得到所有所需组分含量。分析所需时间长,消耗试剂多,分析通量低,劳动量大。已有文献报道,不同粒径或种类的量子点偶联在酶表面后,由于量子点具有较大的斯托克斯位移,可吸收酶催化其底物产生的同一波长的发射光,并分别转化为不同波长的发射光,本发明将量子点的这一特性应用到化学发光检测中,实现了以少量样本进行多组分同步检测的技术。

附图说明

[0018] 图1是本发明检测cTnT血清样本与罗氏试剂检测cTnT血清样本相关性图;

图2是本发明检测Myo血清样本与罗氏试剂检测Myo血清样本相关性图;

图3是本发明检测CK-MB血清样本与罗氏试剂检测CK-MB血清样本相关性图。

[0019] 图4是本发明检测TSH血清样本与罗氏试剂检测TSH血清样本相关性图；

图5是本发明检测FT3血清样本与罗氏试剂检测FT3血清样本相关性图；

图6是本发明检测FT4血清样本与罗氏试剂检测FT4血清样本相关性图；

图7是本发明检测三聚氰胺牛奶样本与深圳芬德检测三聚氰胺牛奶样本相关性图；

图8是本发明检测庆大霉素牛奶样本与广州健仑检测庆大霉素牛奶样本相关性图；

图9是本发明检测卡那霉素牛奶样本与江苏维赛科技检测卡那霉素牛奶样本相关性图；

图10是本发明的原理图。

具体实施方式

[0020] 下面结合实施例对本发明作更进一步的说明。

[0021] 实施例1

同步定量联检心梗多项指标(cTnT、Myo、CK-MB)

一、亲和素包被的磁性微粒

1. 取磁性微粒原液,取反应缓冲溶液清洗磁性微粒,然后重悬于该缓冲溶液中。向其中加入一定浓度的EDC现配溶液,在37℃条件下活化0.5h。活化完成后用磁性微粒清洗液清洗三次,然后重悬于反应缓冲溶液中。

[0022] 2. 加入亲和素,在37℃条件下反应3h。反应完成后用磁性微粒清洗液清洗三次,最后重悬于磁性微粒储存液中。

[0023] 二、分析步骤

用PBS缓冲溶液配制样本1~11;样本1~11中分别含有cTnT:1.0、3.0、9.0、15.0、40.0、100.0、500.0、1000.0、2000.0、5000.0、10000.0 ng/L,Myo:15.0、21.0、42.0、100.0、200.0、400.0、600.0、1000.0、1500.0、2000.0、3000.0 ng/mL,CK-MB:0.15、0.3、0.6、2.0、5.0、10.0、20.0、40.0、100.0、200.0、300 ng/mL。在反应杯中,加入20 μL亲和素包被的磁性微粒、20 μL样本、50 μL生物素标记的一株cTnT多克隆抗体、生物素标记的一株Myo单克隆抗体和生物素标记的CK-MB 抗体(Fab')₂段混合物、50 μL Si-辣根过氧化物酶(包裹聚乙烯)标记的另一株cTnT多克隆抗体、ZnO-辣根过氧化物酶标记的另一株Myo单克隆抗体和CdTe-辣根过氧化物酶标记的一株CK-MB抗体重链混合物。在37℃条件下温育10min30s后,用PBS清洗液清洗分离出固相载体复合物,加入含有过氧化氢的底物A和含有鲁米诺的底物B,然后用带有特定波长选择功能的化学发光测定仪测定不同目标分析物发光强度,用log-log曲线拟合后计算三项指标的回收率。

[0024] 三、传统检测方法

用PBS缓冲溶液配制样本1~11;样本1~11中分别含有cTnT:1.0、3.0、9.0、15.0、40.0、100.0、500.0、1000、2000、5000、10000 ng/L,Myo:21.0、42.0、80.0、100.0、200.0、400.0、600.0、1000、1500、2000、3000 ng/mL,CK-MB:0.15、0.3、0.6、2.0、5.0、10.0、20.0、40.0、100.0、200.0、300 ng/mL。在反应杯中,加入20 μL亲和素包被的磁性微粒、20 μL样本、50 μL生物素标记的一株cTnT多克隆抗体、50 μL辣根过氧化物酶标记的另一株cTnT多克隆抗体,在37℃条件下温育10 min30s后,用PBS清洗液清洗分离出固相载体复合物,加入含有过

氧化氢的底物A和含有鲁米诺的底物B,然后用化学发光仪测定样本发光强度,用log-log曲线拟合后计算cTnT回收率;在反应杯中,加入20 μ L亲和素包被的磁性微粒、20 μ L样本、50 μ L生物素标记的一株Myo单克隆抗体、50 μ L辣根过氧化物酶标记的另一株Myo单克隆抗体,在37℃条件下温育10min30s后,用PBS清洗液清洗分离出固相载体复合物,加入含有过氧化氢的底物A和含有鲁米诺的底物B,然后用化学发光仪测定样本发光强度,用log-log曲线拟合后计算Myo回收率;在反应杯中,加入20 μ L亲和素包被的磁性微粒、20 μ L样本、50 μ L生物素标记的一株CK-MB抗体(Fab')₂段、50 μ L辣根过氧化物酶标记的一株CK-MB抗体重链,在37℃条件下温育10min30s后,用PBS清洗液清洗分离出固相载体复合物,加入含有过氧化氢的底物A和含有鲁米诺的底物B,然后用化学发光仪测定样本发光强度,用log-log曲线拟合后计算CK-MB回收率。

[0025] 以上体系所用的标准品浓度一致。如表1所示,回收率在85%-115%的范围内,传统方法检测cTnT、CK-MB对应的范围下限为9.0 ng/L、0.6 ng/mL。利用本发明后,检测范围下限分别达到3.0 ng/L、0.3 ng/mL,相比传统检测方法,灵敏度分别提高了3、2倍。

[0026] 另外,使用本发明测定血清标本中cTnT、Myo、CK-MB浓度和罗氏测定值的相关性对比。如图1、图2、图3所示,有良好的回收率及血清相关性,其中R²分别可达到0.993、0.9982、0.9912。实验证明基于量子点标记酶形成量子点-酶复合物的多指标联检化学发光免疫分析法提高了反应的灵敏度。

[0027] 更重要的一点是,本发明同步检测心肌三项,样本需求量少,便捷性更强,相比传统检测方法,只需进行一次检测流程就可得到三种分析物的结果,缩短了出具检测报告的时间,降低了检测成本。

[0028] 表1:不同体系对心肌三项标准品检测回收率的影响

检测项目	不同体系对检测回收率的影响					
	传统方法检测			本发明检测		
	cTnT	Myo	CK-MB	cTnT	Myo	CK-MB
样本 1	-	96%	-	116%	103%	128%
样本 2	125%	81%	122%	101%	100%	94%
样本 3	102%	111%	138%	95%	92%	103%
样本 4	98%	83%	82%	100%	90%	109%
样本 5	110%	88%	107%	101%	89%	97%
样本 6	91%	104%	105%	107%	113%	88%
样本 7	108%	94%	102%	103%	92%	94%
样本 8	95%	106%	94%	95%	90%	105%
样本 9	104%	109%	92%	98%	103%	101%
样本 10	102%	93%	101%	104%	102%	98%
样本 11	104%	97%	105%	90%	92%	110%

实施例2

同步定量联检甲功三项指标(TSH、FT3、FT4)

一、链霉亲和素包被的微孔板

1. 取一块微孔板,加入含有链霉亲和素的包被液,在37℃条件下孵育12h。

[0029] 2. 孵育完成后在洗板机上使用包被专用清洗液清洗三遍,然后加入含有BSA的封闭液,在37℃孵育30min。

[0030] 3、孵育完成后在洗板机上使用包被专用清洗液清洗三遍,在25℃恒温环境下将微孔板倒置1h,沥干微孔板中的水分,然后转入密闭容器中在25℃恒温环境下老化36h。

[0031] 二、分析步骤

用PBS缓冲溶液配制样本1~11;样本1~11中分别含有TSH :0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.2、1.0、5.0、20.0、60.0、100.0 $\mu\text{IU/mL}$, FT3:0.2、0.4、1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0、30.0、40.0、50.0 pmol/L , FT4:0.2、0.3、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、40.0、70.0、100.0 pmol/L 。在微孔板中,加入20 μL 样本、50 μL CdS-碱性磷酸酶标记的TSH抗体轻链、 SiO_2 -碱性磷酸酶标记的T3小分子和 CuInS_2 -碱性磷酸酶标记的FT4单克隆抗体混合物、50 μL 生物素标记的另一株TSH抗体Fab段、生物素标记的FT3单克隆抗体和生物素标记的T4半抗原混合物。在37℃条件下温育10min30s后,用PBS清洗液清洗分离出固相载体复合物,加入含有(金刚烷)-1,2-二氧乙烷的底物液,在37℃条件下温育5min,然后用带有特定波长选择功能的化学发光测定仪测定不同目标分析物发光强度,用log-log曲线拟合后计算三项指标的回收率。

[0032] 三、传统检测方法

用PBS缓冲溶液配制样本1~11;样本1~11中分别含有TSH :0.002、0.005、0.01、0.02、0.05、0.2、1.0、5.0、20.0、60.0、100.0 $\mu\text{IU/mL}$, FT3:0.2、0.4、0.8、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0、30.0、40.0、50.0 pmol/L , FT4:0.2、0.3、0.6、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、40.0、70.0、100.0 pmol/L 。在微孔板中,加入20 μL 样本、50 μL 碱性磷酸酶标记的TSH抗体轻链、50 μL 生物素标记的另一株TSH抗体Fab段,在37℃条件下温育10 min30s后,用PBS清洗液清洗分离出固相载体复合物,加入含有(金刚烷)-1,2-二氧乙烷的底物液,在37℃条件下温育5min,然后用化学发光仪测定样本发光强度,用log-log曲线拟合后计算TSH回收率;在微孔板中,加入20 μL 样本、50 μL 碱性磷酸酶标记的T3小分子、50 μL 生物素标记的FT3单克隆抗体,在37℃条件下温育10 min30s后,用PBS清洗液清洗分离出固相载体复合物,加入含有(金刚烷)-1,2-二氧乙烷的底物液,在37℃条件下温育5min,然后用化学发光仪测定样本发光强度,用log-log曲线拟合后计算FT3回收率;在微孔板中,加入20 μL 样本、50 μL 碱性磷酸酶标记的FT4单克隆抗体、50 μL 生物素标记的T4半抗原,在37℃条件下温育10 min30s后,用PBS清洗液清洗分离出固相载体复合物,加入含有(金刚烷)-1,2-二氧乙烷的底物液,在37℃条件下温育5min,然后用化学发光仪测定样本发光强度,用log-log曲线拟合后计算FT4回收率。

[0033] 以上体系所用的标准品浓度一致。如表2所示,回收率在85%-115%的范围内,传统方法检测TSH、FT3、FT4对应的范围下限为0.01 $\mu\text{IU/mL}$ 、0.8 pmol/L 、0.6 pmol/L 。利用本发明后,检测范围下限分别达到0.005 $\mu\text{IU/mL}$ 、0.4 pmol/L 、0.3 pmol/L ,相比传统检测方法,灵敏度提高了2倍。

[0034] 另外,使用本发明测定血清标本中TSH、FT3、FT4浓度和罗氏测定值的相关性对比。如图4、图5、图6所示,有良好的回收率及血清相关性,其中 R^2 分别可达到0.9919、0.9901、

0.9925。实验证明基于量子点标记酶形成量子点-酶复合物的多指标联检化学发光免疫分析法提高了反应的灵敏度。

[0035] 更重要的一点是,本发明同步检测甲功三项,样本需求量少,便捷性更强,相比传统检测方法,只需进行一次检测流程就可得到三种分析物的结果,缩短了出具检测报告的时间,降低了检测成本。

[0036] 表2:不同体系对甲功三项标准品检测回收率的影响

检测项目	不同体系对检测回收率的影响					
	传统方法检测			本发明检测		
检测项目	TSH	FT3	FT4	TSH	FT3	FT4
样本 1	125%	82%	84%	117%	138%	77%
样本 2	83%	119%	127%	91%	108%	87%
样本 3	101%	114%	92%	98%	88%	101%
样本 4	101%	84%	80%	101%	89%	101%
样本 5	113%	88%	103%	106%	91%	113%
样本 6	91%	104%	101%	112%	113%	91%
样本 7	102%	90%	104%	101%	108%	112%
样本 8	92%	111%	95%	94%	94%	92%
样本 9	102%	90%	96%	97%	103%	102%
样本 10	97%	93%	106%	105%	103%	97%
样本 11	92%	93%	104%	96%	95%	102%

实施例3

同步定量联检兽药残留指标(三聚氰胺、庆大霉素、卡那霉素)

一、异硫氰酸荧光素抗体包被的磁性微粒

1. 取磁性微粒原液,取反应缓冲溶液清洗磁性微粒,然后重悬于该缓冲溶液中。向其中加入一定浓度的EDC现配溶液,在37℃条件下活化0.5h。活化完成后用磁性微粒清洗液清洗三次,然后重悬于反应缓冲溶液中。

[0037] 2. 加入异硫氰酸荧光素抗体,在37℃条件下反应3h。反应完成后用磁性微粒清洗液清洗三次,最后重悬于磁性微粒储存液中。

[0038] 二、分析步骤

用PBS缓冲溶液配制样本1~11;样本1~11中分别含有三聚氰胺:0.0025、0.005、0.01、0.015、0.03、0.09、0.27、0.81、1.25、2.5、5.0 μg/mL,庆大霉素:0.025、0.05、0.1、0.3、0.6、1.8、5.4、10.0、50.0、100.0、200.0 μg/L,卡那霉素:0.01、0.025、0.05、0.15、0.45、1.35、4.05、20.0、50.0、100.0、200.0 μg/L。在反应杯中,加入20 μL异硫氰酸荧光素抗体包被的磁性微粒、20 μL样本、50 μL异硫氰酸荧光素标记的一株三聚氰胺多克隆抗体和异硫氰酸荧光素标记的庆大霉素半抗原/卡那霉素半抗原混合物、50 μL C-碱性磷酸酶(包裹牛血清白蛋白)标记的三聚氰胺半抗原、ZnO-碱性磷酸酶标记的一株庆大霉素单克隆抗体、PbS-碱性磷酸酶标记的一株卡那霉素单克隆抗体混合物。在37℃条件下温育10min30s后,用PBS清

洗液清洗分离出固相载体复合物,加入含有(金刚烷)-1,2-二氧乙烷的底物液,在37℃条件下温育5min,然后用带有特定波长选择功能的化学发光测定仪测定不同目标分析物发光强度,用log-log曲线拟合后计算三项指标的回收率。

[0039] 三、传统检测方法

用PBS缓冲溶液配制样本1~11;样本1~11中分别含有三聚氰胺:0.0025、0.005、0.01、0.015、0.03、0.09、0.27、0.81、1.25、2.5、5.0 $\mu\text{g/mL}$,庆大霉素:0.025、0.05、0.1、0.3、0.6、1.8、5.4、10.0、50.0、100.0、200.0 $\mu\text{g/L}$,卡那霉素:0.01、0.025、0.05、0.15、0.45、1.35、4.05、20.0、50.0、100.0、200.0 $\mu\text{g/L}$ 。在反应杯中,加入20 μL 异硫氰酸荧光素抗体包被的磁性微粒、20 μL 样本、50 μL 异硫氰酸荧光素标记的一株三聚氰胺多克隆抗体、50 μL 碱性磷酸酶标记的三聚氰胺半抗原,在37℃条件下温育10 min30s后,用PBS清洗液清洗分离出固相载体复合物,加入含有(金刚烷)-1,2-二氧乙烷的底物液,在37℃条件下温育5min,然后用化学发光仪测定样本发光强度,用log-log曲线拟合后计算三聚氰胺回收率;在反应杯中,加入20 μL 异硫氰酸荧光素抗体包被的磁性微粒、20 μL 样本、50 μL 异硫氰酸荧光素标记的庆大霉素半抗原、50 μL 碱性磷酸酶标记的一株庆大霉素单克隆抗体,在37℃条件下温育10 min30s后,用PBS清洗液清洗分离出固相载体复合物,加入含有(金刚烷)-1,2-二氧乙烷的底物液,在37℃条件下温育5min,然后用化学发光仪测定样本发光强度,用log-log曲线拟合后计算庆大霉素回收率;在反应杯中,加入20 μL 异硫氰酸荧光素抗体包被的磁性微粒、20 μL 样本、50 μL 异硫氰酸荧光素标记的卡那霉素半抗原、50 μL 碱性磷酸酶标记的一株卡那霉素单克隆抗体,在37℃条件下温育10 min30s后,用PBS清洗液清洗分离出固相载体复合物,加入含有(金刚烷)-1,2-二氧乙烷的底物液,在37℃条件下温育5min,然后用化学发光仪测定样本发光强度,用log-log曲线拟合后计算卡那霉素回收率。

[0040] 传统方法检测三聚氰胺、庆大霉素、卡那霉素对应的范围下限为0.01 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/L}$ 、0.05 $\mu\text{g/L}$ 。利用本发明后,检测范围下限分别达到0.005 $\mu\text{g/mL}$ 、0.05 $\mu\text{g/L}$ 、0.025 $\mu\text{g/L}$,相比传统检测方法,灵敏度提高了2倍。

[0041] 另外,使用本发明测定牛奶标本中三聚氰胺、庆大霉素、卡那霉素浓度和市场上已有试剂盒测定值的相关性对比。如图7、图8、图9所示,有良好的回收率及相关性,其中 R^2 分别可达到0.9943、0.9955、0.9927。实验证明基于量子点标记酶形成量子点-酶复合物的多指标联检化学发光免疫分析法提高了反应的灵敏度。

[0042] 表3:不同体系对兽药残留指标标准品检测回收率的影响

	不同体系对检测回收率的影响					
	传统方法检测			本发明检测		
检测项目	三聚氰胺	庆大霉素	卡那霉素	三聚氰胺	庆大霉素	卡那霉素
样本 1	133%	81%	84%	81%	77%	123%
样本 2	80%	116%	120%	101%	97%	111%
样本 3	95%	108%	92%	106%	111%	99%
样本 4	99%	88%	86%	89%	101%	87%
样本 5	102%	91%	86%	97%	97%	97%
样本 6	91%	98%	108%	100%	111%	89%
样本 7	95%	88%	97%	89%	106%	96%
样本 8	88%	107%	105%	108%	94%	104%
样本 9	99%	101%	89%	97%	105%	95%
样本 10	99%	87%	96%	98%	104%	105%
样本 11	94%	92%	96%	105%	95%	101%

以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出:对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

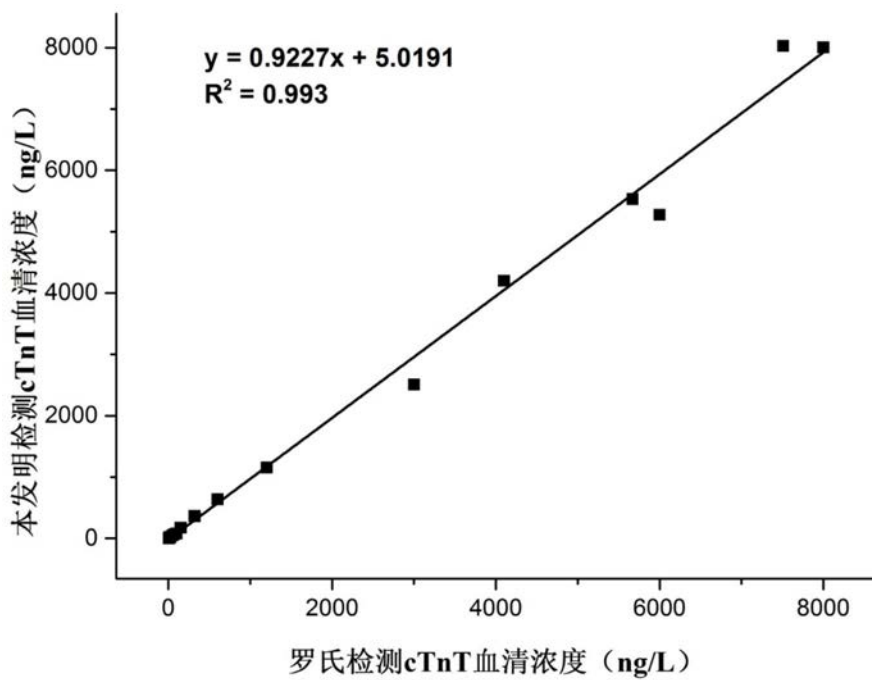


图1

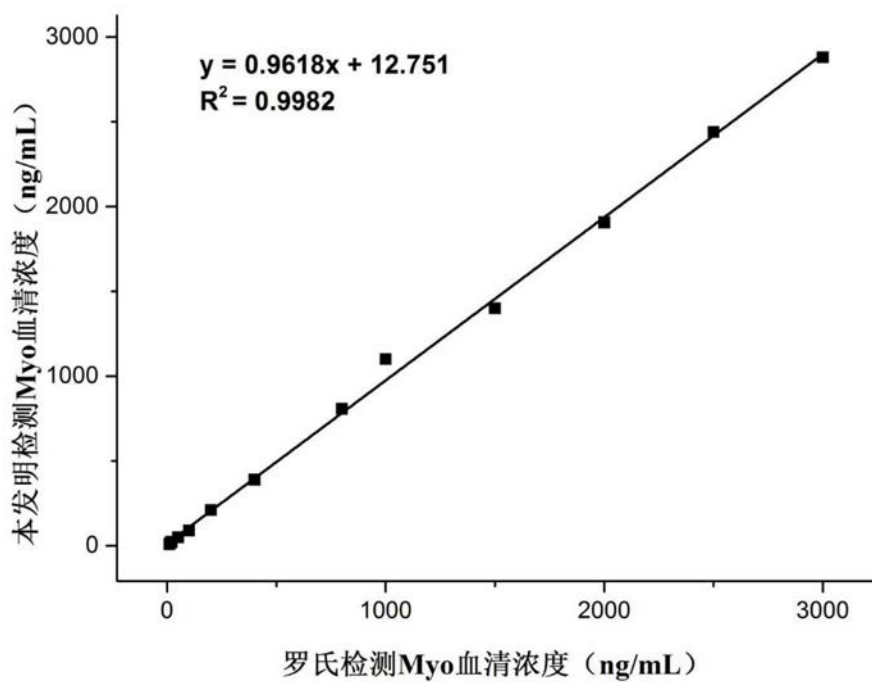


图2

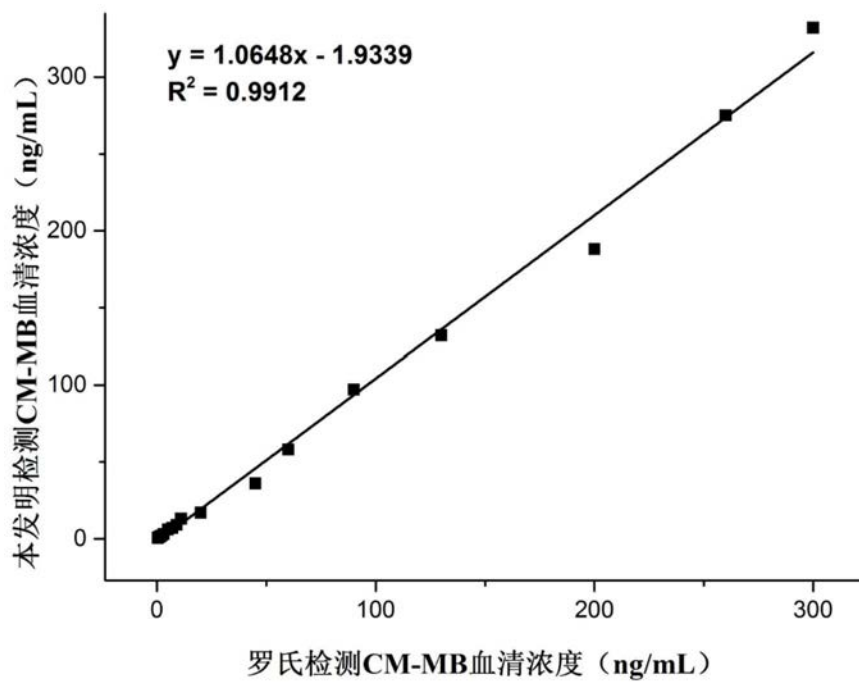


图3

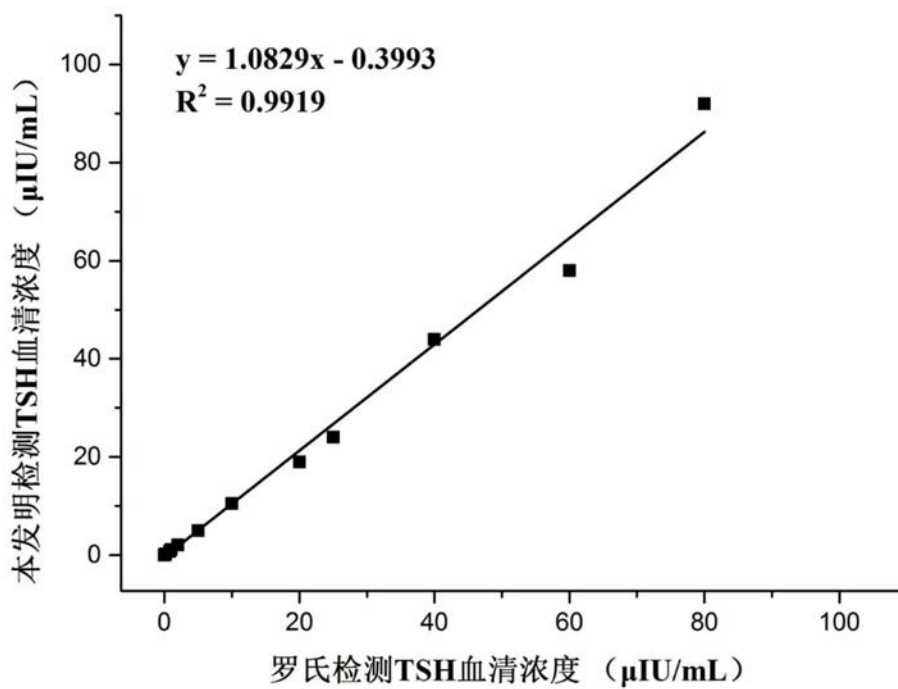


图4

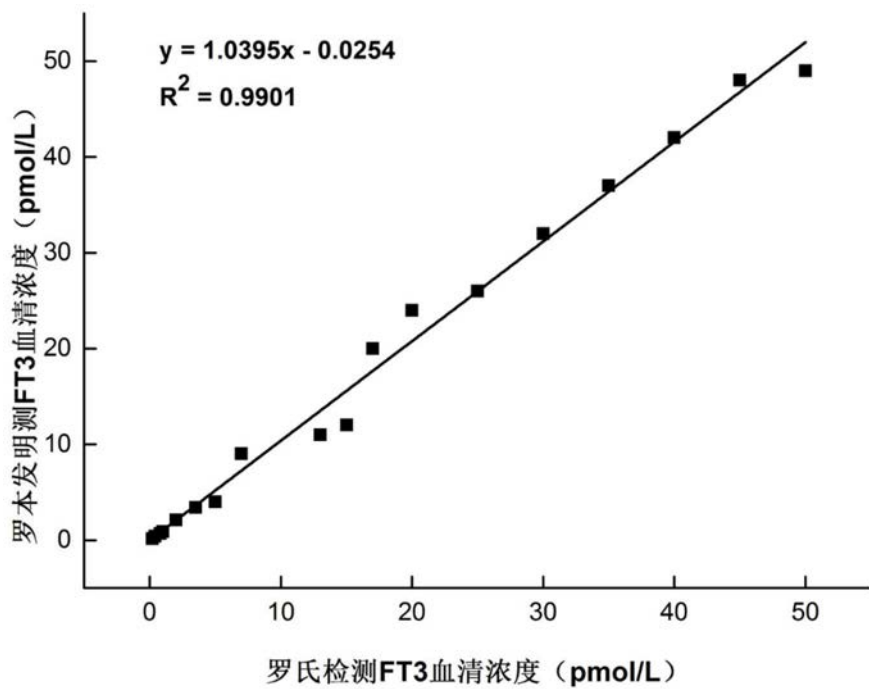


图5

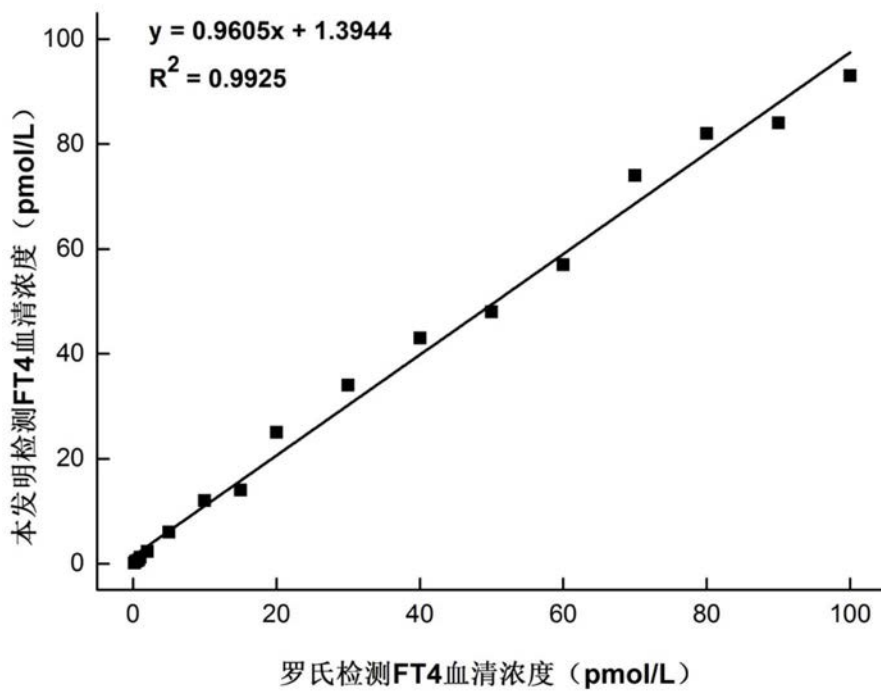


图6

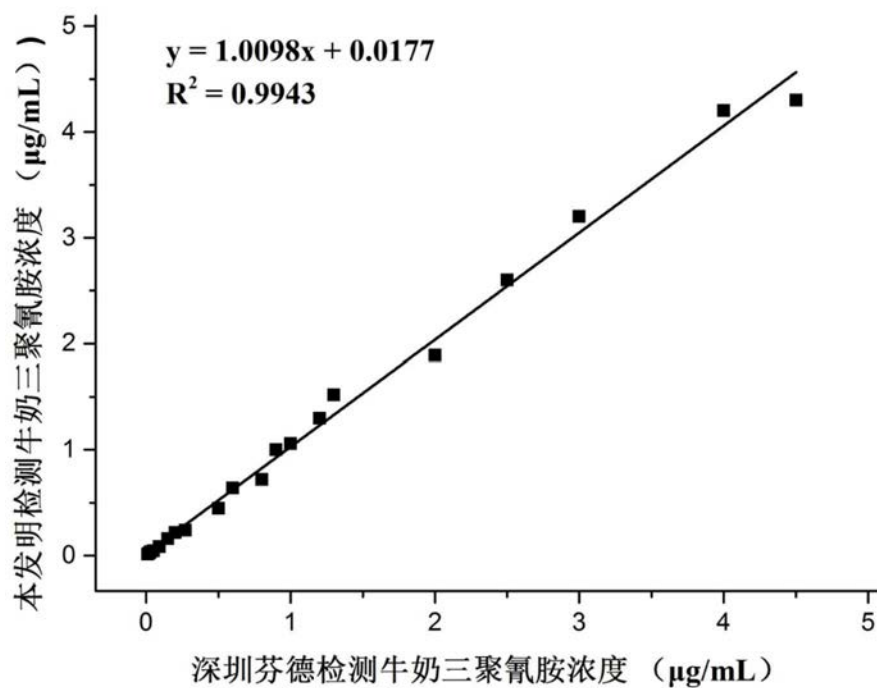


图7

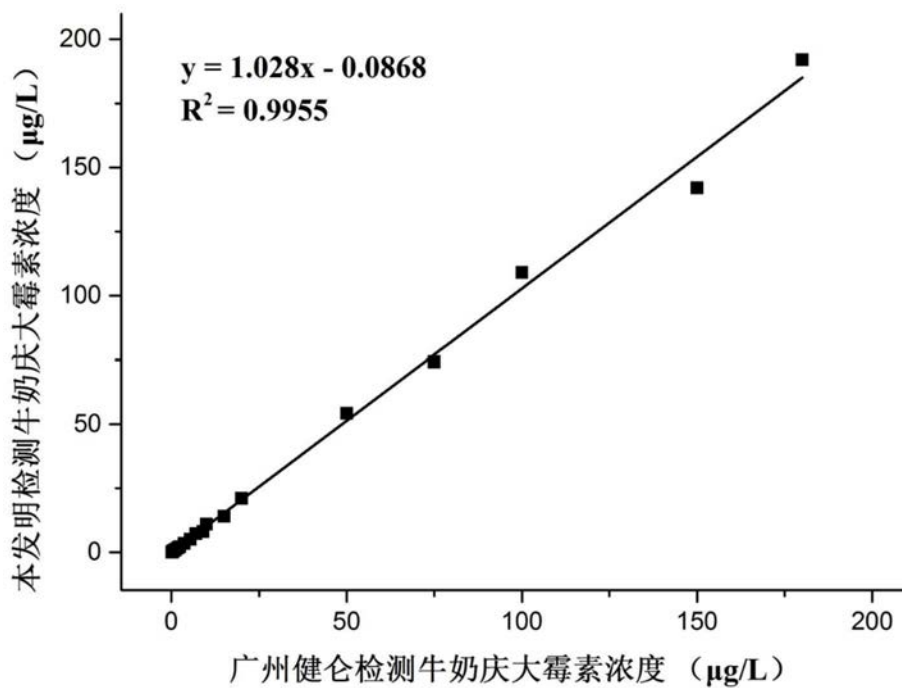


图8

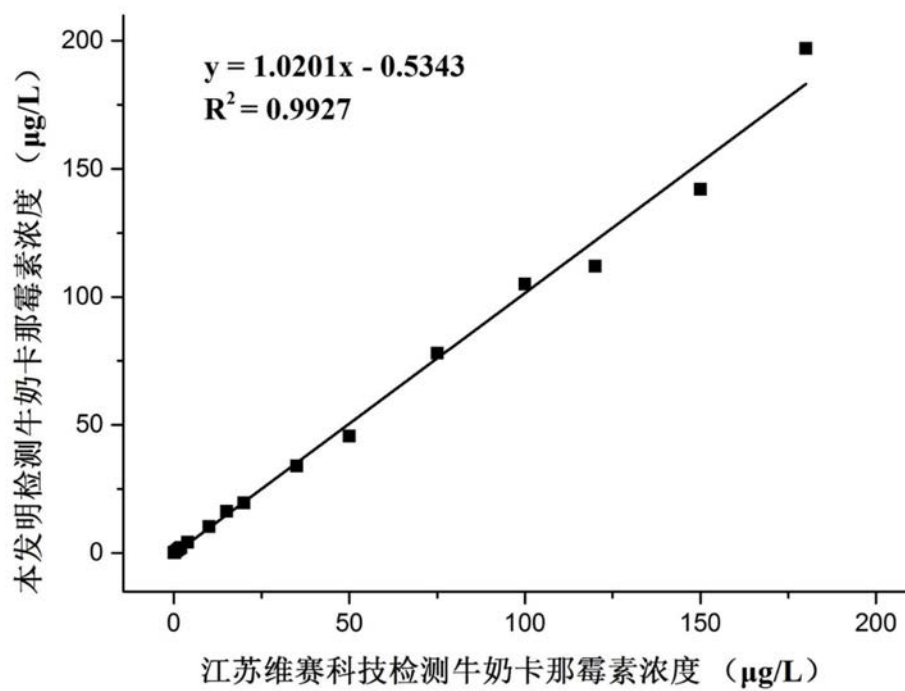


图9

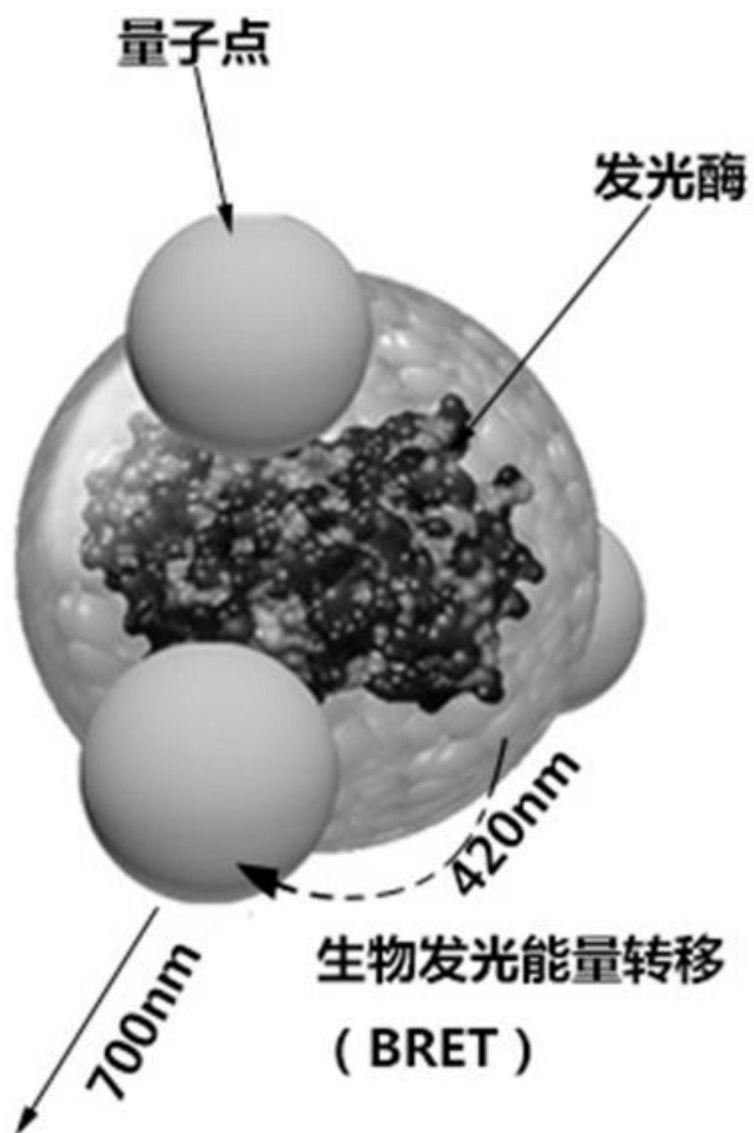


图10

专利名称(译)	一种多指标联检化学发光试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN110007073A	公开(公告)日	2019-07-12
申请号	CN201910255947.X	申请日	2019-04-01
[标]申请(专利权)人(译)	南京迪格诺斯生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京迪格诺斯生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京迪格诺斯生物技术有限公司		
[标]发明人	金晶 王西龙 张誉严		
发明人	金晶 王西龙 张誉严		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
代理人(译)	吴旭		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了基于量子点标记酶形成量子点-酶复合物的多指标联检化学发光免疫分析法。本发明基于量子点标记酶形成量子点-酶复合物的多指标联检化学发光免疫分析法，在酶表面或距酶5-10 nm的聚合物层表面分别标记不同粒径或种类的量子点，形成不同的量子点-酶复合物，利用不同粒径或种类量子点的吸收光谱与酶催化其发光底物所产生的发射光谱充分重叠且量子点具有较大斯托克斯位移的特点，可以高效地将酶催化底物产生的400-600 nm波长的发射光转化为波长在500-750 nm之间的发射光，并在不同滤光片的作用下进行检测，实现了化学发光平台上以少量样本进行快速高效的多指标联检。

