



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110068675 A
(43)申请公布日 2019.07.30

(21)申请号 201910391945.3

(22)申请日 2019.05.13

(71)申请人 福州大学

地址 350108 福建省福州市闽侯县上街镇
福州大学城学院路2号福州大学新区

(72)发明人 唐点平 蔡国能 余镇重 张莉佳

(74)专利代理机构 福州元创专利商标代理有限公司 35100

代理人 修斯文 蔡学俊

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 25/48(2006.01)

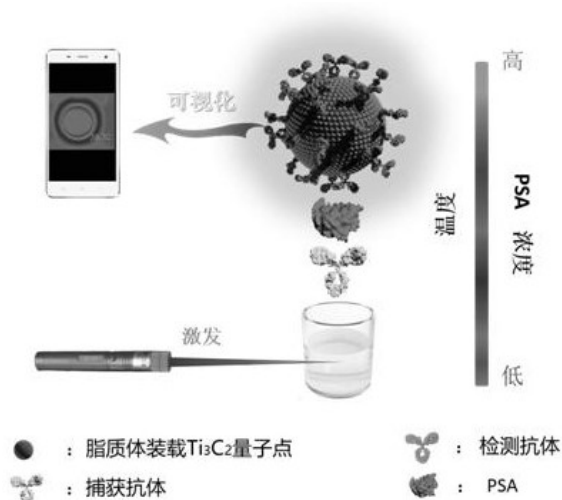
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

一种基于光热及免疫功能化脂质体构建的便携式热成像免疫分析方法

(57)摘要

本发明涉及了一种光热及免疫功能化脂质体构建的便携式热成像免疫分析方法,属于传感仪器构建及生物化学分析技术领域。本发明首先以Ti₃C₂量子点作为光热信标分子,脂质体作为装载容器,制备了光热功能化脂质体,再结合免疫分子,实现光热脂质体的免疫功能化,最后在设计的便携式热成像分析装置中利用免疫反应实现对目标物的特异性识别。在808 nm红外光激发下,免疫探针引入的光热脂质体能够高效转化光能为热能,使得检测系统的温度升高。升高的温度可以通过便携式红外热成像摄像头监测,从而实现对目标物的定量检测。该方法设备简单,便于携带,操作简单,为便携式检测提供了一种简单、灵敏且稳定的方法。



1. 一种基于光热及免疫功能化脂质体构建的便携式热成像免疫分析方法,其特征在于:所述方法包括如下步骤:

步骤S1 Ti_3C_2 量子点的合成;

步骤S2 光热脂质体免疫功能化探针的设计;

步骤S3 便携式热成像免疫分析装置的构建;

步骤S4 免疫反应的构建:在高亲和12孔酶标板上形成抗体-抗原-纳米探针免疫夹心结构;

步骤S5 输出温度信号检测。

2. 根据权利要求1所述的一种基于光热及免疫功能化脂质体构建的便携式热成像免疫分析方法:步骤S1 所述的 Ti_3C_2 量子点的合成是通过氢氟酸刻蚀 Ti_3AlC_2 前驱体,并用四甲基氢氧化铵进行剥离而成;制备的 Ti_3C_2 量子点直径为1-5 nm,厚度为1-2 nm。

3. 根据权利要求1所述的一种基于光热及免疫功能化脂质体构建的便携式热成像免疫分析方法,其特征在于:步骤S2所述的光热脂质体免疫功能化探针是通过薄膜分散法将 Ti_3C_2 量子点装载进入脂质体中,并通过戊二醛交联法将前列腺特异性抗体PSA-173连接在光热脂质体表面制得。

4. 根据权利要求1所述的一种基于光热及免疫功能化脂质体构建的便携式热成像免疫分析方法,其特征在于:步骤S2制备的光热脂质体免疫功能化探针大小为190-210 nm;包裹的量子点数量为400-500;连接的前列腺特异性抗体PSA-173数量为700-800。

5. 根据权利要求1所述的一种基于光热及免疫功能化脂质体构建的便携式热成像免疫分析方法,其特征在于:步骤S3所述的便携式热成像免疫分析装置由808 nm的红外光源、便携式测试箱、检测池以及便携式红外热成像摄像头FLIR one组装而成;便携式测试箱由3D打印机制得。

6. 根据权利要求1所述的一种基于光热及免疫功能化脂质体构建的便携式热成像免疫分析方法,其特征在于:步骤S4 中酶标板为分析装置中的检测池;检测识别过程依靠形成抗体-抗原-纳米探针夹心型免疫复合物实现。

7. 根据权利要求1所述的基于光热及免疫功能化脂质体构建的便携式热成像免疫分析方法,其特征在于:步骤S4 过程具体为:在12孔高亲和板中加入捕获抗体20-80 μ L过夜封闭,再依次加入目标检测物20-80 μ L、纳米探针20-80 μ L来形成抗体-抗原-抗体夹心型免疫复合物孵化30 min。

8. 根据权利要求1所述的一种基于光热及免疫功能化脂质体构建的便携式热成像免疫分析方法,其特征在于:步骤S5具体为:通过脂质体外层修饰的免疫分子特异性识别目标物,并将探针固定于酶标板中,在808纳米的红外光激发下,脂质体内装载的 Ti_3C_2 量子点将光能转化为热能,使得检测系统内的温度上升,并使用便携式红外热成像摄像头读取温度信号变化来定量目标物浓度,最后实现便携式热成像免疫分析。

9. 根据权利要求8所述的一种基于光热及免疫功能化脂质体构建的便携式热成像免疫分析方法,其特征在于:所述的808纳米的红外光输出功率为 1.5 W/cm^2 , 光照时间为300 s。

一种基于光热及免疫功能化脂质体构建的便携式热成像免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及了一种光热及免疫功能化脂质体构建的便携式热成像免疫分析方法，属于传感仪器构建及生物化学分析技术领域。

背景技术

[0002] 随着社会的发展，环境监测，食品安全和疾病诊断越来越受到人们的重视，已经建立了许多基于光学、色谱、质谱以及电化学的检测方法，这些检测方法具有准确、灵敏、稳定等优点。但是，设备昂贵和操作复杂等原因限制其在快速检测及日常生活检测等方面的进一步应用，尤其是在偏远地区。因此，设计一种设备简单、易于操作、稳定实用的检测方法是具有重要意义。

[0003] 光热转换作为一种常见的物理现象，在生活的许多方面都有应用。在光照过程中，有许多材料都可以将光能转化为热能。而在这些材料中， Ti_3C_2 量子点在808 nm红外光激发下有着高效的光热转换率以及无毒无害等性质。同时，该量子点具有微小的尺寸和良好的耐盐性，是一种十分适合应用于生物分析领域的材料。在许多现有的以温度作为传感的检测信号的便携式生物分析中，纳米金和四氧化三铁纳米粒子等作为传统的作为光热信标分子通常被用来作为产生光热信号的信标分子，但生物相容性差以及光热转换效率不高的问题限制了温度式传感在便携式生物分析领域的进一步应用。近些年来，通过将信标分子装载进脂质体中形成一种具备良好生物相容性的材料，并实现信标分子的释放与富集，提高信标分子的利用效率，在生物医药，生物成像以及生物分析等方面有许多研究。为了提高便携式传感器的灵敏度，信号生成来源和信号检测装置是其中最重要的两点。基于以上内容，构建一种基于光热及免疫功能化脂质体应用于温度式的便携式热成像免疫生物分析方法能够有效得提高检测的灵敏度和准确性。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种光热及免疫功能化脂质体的制备方法，并结合抗原抗体免疫反应来构建便携式热成像免疫传感器。其技术原理是通过在免疫探针上引入 Ti_3C_2 量子点将808 nm的红外光转变为热，提高的温度能够被便携式红外热成像摄像头监测。当没有目标物时，检测系统内光热信标分子少，温度增加较小；当目标物存在时，检测系统内光热信标分子增加，温度增加变大；温度的变化与目标物浓度在一定范围内成正相关，且可以通过便携式红外热成像摄像头来实现快速便携的定量检测。

[0005] 为实现上述目的，本发明采用的技术方案如下：

一种光热及免疫功能化脂质体构建的便携式热成像免疫分析方法，包含以下步骤：

步骤S1 Ti_3C_2 量子点的合成：取0.5 g Ti_3AlC_2 粉末作为前驱体加入到质量分数为48%的氢氟酸进行20小时的刻蚀反应，反应后的沉淀用去离子水洗涤至中性。取0.1g上述制备的产物加入到20 mL质量分数为25%的四甲基氢氧化铵水溶液中进行24小时的剥离反应。将

反应产物洗至中性,并以质量比为1:150的比例溶于水中。在氩气氛围的保护下,将混合溶液进行20小时的水浴超声,超声后混合液通过不同转速的离心分离上清液,并将取得的上清液在4℃中保存备用。

[0006] 步骤S2光热脂质体免疫功能化探针的设计:

步骤S21将二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、胆固醇和二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)以10:10:1的摩尔比混合于氯仿(2.0-4.0 mL)中。在通入氮气除氧并超声溶解后,将混合液置于烧瓶底部,在45℃下进行旋转蒸发直至烧瓶底部形成一层薄膜。

[0007] 步骤S22随后,加入1.0-4.0 mL包含5mg/mL Ti_3C_2 量子点的磷酸缓冲盐溶液(10 mM, pH=7.4),并在45℃下快速旋转直至烧瓶底部薄膜剥离;将混合溶液用探头超声法在冰水浴中超声生成单室脂质体,超声时间10min。

[0008] 步骤S23将所得脂质体混合液再进行冰水浴超声,超声时间20min,并利用注射器将脂质体混合液挤压通过孔径为0.44 μ m的聚碳酸酯薄膜以除去大颗粒脂质体。随后使用截留分子量为100 KDa的透析袋进行纯化以去除未被装载的 Ti_3C_2 量子点。

[0009] 步骤S24取纯化后的光热功能化脂质体(2.0 -4.0mL)缓慢滴入3 mL质量分数为2.5%的戊二醛水溶液中,于25℃下进行孵育反应。孵育1小时后,通过截留分子量为100KDa透析袋进行透析纯化除去未连接的戊二醛。

[0010] 步骤S25随后将透析后的混合液加入1.0-3.0 mL包含0.05wt% 吐温-20、检测抗体(PSA-173)的磷酸缓冲盐溶液(10 mM, pH=7.4)中,并在4℃下孵育1 小时,之后再取1.0 mL包含10mg/mL牛血清蛋白的磷酸缓冲盐溶液(10 mM, pH=7.4)进行封闭。最后混合液通过葡聚糖凝胶 G-100层析柱进行分离提纯,所得光热及免疫功能化的脂质体探针置于4℃环境下保存备用。

[0011] 步骤S3便携式热成像免疫分析装置的构建:根据建模软件设计的模型利用3D打印机制备测试用的便携式测试箱,激发光源和检测池支架。在光路入口处安装808 nm的红外光源,并将便携式红外热成像摄像头插入手机中作为检测系统热信号读取装置。移动测试箱侧面的检测池支架使得光源对准测试箱体内部的检测池侧面中部,且检测池圆心位置对准正上方的数据读取窗口位置。

[0012] 步骤S4免疫反应的构建:首先在12孔高亲和板中加入捕获抗体(20-80 μ L)过夜封闭,再依次加入目标检测物(20-80 μ L)、步骤S2获得的功能化脂质体纳米探针(20-80 μ L)来形成抗体-抗原-抗体夹心型免疫复合物孵化30 min,用磷酸缓冲溶液洗涤后,再加入磷酸缓冲溶液(50-100 μ L)洗涤。打开808 nm 的红外光源对检测池进行照射。

[0013] 步骤S5输出温度信号检测:通过脂质体外层修饰的免疫分子特异性识别目标物,并将探针固定于酶标板中,在808纳米的红外光激发下,脂质体内装载的 Ti_3C_2 量子点将光能转化为热能,使得检测系统内的温度上升,并使用便携式红外热成像摄像头读取温度信号变化来定量目标物浓度,最后实现便携式热成像免疫分析。

[0014] 更具体的,

步骤S1中所述的制备的 Ti_3C_2 量子点的横向尺寸大小为1-5 nm,厚度为1-2 nm。

[0015] 步骤S2中所述的光热脂质体免疫功能化探针的制备过程如图2所示。步骤S2制备的光热脂质体免疫功能化探针大小为190-210 nm;包裹的量子点数量为400-500;连接的前列腺特异性抗体PSA-173数量为700-800。

[0016] 步骤S3中所述的便携式热成像免疫分析装置的实物图如图3所示;检测箱内部结构与尺寸如图4所示。

[0017] 步骤S3中所述的808 nm红外光源输出功率密度为 $1.5\text{W}/\text{cm}^{-2}$,照射时间为5分钟。

[0018] 步骤S5中所述的温度变化为 ΔT (最终温度减去初始温度以及溶剂升高的温度), $\Delta T=T_{Max}-T_{Surr}-T_{H2O}$;便携式红外成像摄像头拍摄照片如图5所示。热成像模式为颜色对比度;所测得的便携式热成像免疫分析装置的成像颜色随目标物浓度增大逐渐红移,温度变化数值随目标物浓度增大而增大。

[0019] 本发明的显著优点在于:

本发明制备的光热及免疫功能化脂质体对808 nm红外光响应灵敏,能将光能高效转化为热能,并将其用于监测生物免疫反应,实现对多种抗体的灵敏便携检测。该方法设备简单,便于携带,操作简单,为便携式检测提供了一种简单、灵敏且稳定的方法。

附图说明

[0020] 图1为一种基于光热及免疫功能化脂质体构建的便携式热成像免疫分析方法示意图;

图2为光热脂质体免疫功能化探针的制备过程;

图3为便携式热成像免疫分析装置实物图;1-手机,2-FLIR one 便携式红外热成像摄像头,3-808 nm 红外光源,4-便携式测试箱,5-测试池支架;

图4为便携式检测箱透视图;A为内部结构顶视图,B为前视图,C为左视图;

图5为便携式热成像免疫传感对温度响应的红外成像图;

图6为实施例1中对前列腺特异性抗原所做的标准工作曲线。

具体实施方式

[0021] 下面通过具体实施示例对本发明的技术方案做进一步说明,但是不能以此限制本发明的范围。

[0022] 实施例1

1. Ti_3C_2 量子点的合成:

将0.5 g Ti_3AlC_2 粉末缓慢加入到10 mL质量分数为48%的氢氟酸中,并在 60°C 下搅拌20小时,所得悬浮液在3500 rpm 的转速下离心10分钟,并用去离子水洗涤沉淀直至洗涤溶液呈中性。随后,取0.1 g 上述洗涤产物加入到20 mL 质量分数为25%的四甲基氢氧化铵水溶液中,并在室温下搅拌24小时,所得悬浮液在3500 rpm 的转速下离心15分钟,得到的沉淀用100 mL去离子水洗涤,得到的中性产物以质量比1:150的比例溶于水中,并在氩气氛围的保护下,将混合溶液进行20小时的水浴超声(超声功率为200W)。最后,所得悬浮液在5000 rpm的转速下离心30分钟,所得上清液再在12000 rpm转速下离心10分钟,最终的上清液在 4°C 下保存备用。

[0023] 2. 光热及免疫功能化脂质体探针的设计

将二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、胆固醇和二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)以10:10:1的摩尔比混合(总质量为2.38 mg)后加入到2.0 mL氯仿中,并在氮气气氛下超声10分钟溶解。将混合液置于50 mL的梨形烧瓶中,并在 45°C 下使用旋转蒸发器进行减压(0.09 MPa)干燥,

使烧瓶内壁形成一层薄膜。随后，加入2.0 mL包含10 mg/mL Ti_3C_2 量子点的磷酸缓冲盐溶液(10 mM, pH=7.4),并在45°C下快速旋转直至烧瓶底部薄膜剥离。将混合溶液用探头超声法在冰水浴中进行10分钟超声(功率为20W;脉冲模式为5秒开,1秒关)。所得混合液再进行20分钟的水浴超声,并利用注射器将脂质体混合液挤压通过孔径为0.44 μm 的聚碳酸酯薄膜,随后使用截留分子量为100 KDa的透析袋进行纯化。取2.0 mL纯化后的光热功能化脂质体缓慢滴入3.0 mL质量分数2.5%的戊二醛水溶液中,并在25°C下孵育1小时。将孵育后的混合液通过截留分子量为100KDa透析袋进行透析24小时。随后将透析后的混合液加入包含1.0 mg/mL检测抗体(PSA-173)的磷酸缓冲盐溶液(10 mM, pH=7.4)中,并在4°C下孵育1小时,之后再取1.0 mL包含10mg/mL牛血清蛋白的磷酸缓冲盐溶液(10 mM, pH=7.4)加入到前一步骤的混合液中,并再在4°C下孵育1小时。最后混合液通过葡聚糖凝胶 G-100层析柱进行分离提纯,所得光热及免疫功能化的脂质体探针置于4°C环境下保存备用。

[0024] 3. 便携式热成像免疫分析装置构建:

根据建模软件设计的模型利用3D打印机制备测试用的便携式测试箱,激发光源和检测池支架。在光路入口处安装808 nm的红外光源,并将便携式红外热成像摄像头插入手机中作为检测系统热信号读取装置。移动测试箱侧面的检测池支架使得光源对准测试箱体内部的检测池侧面中部,且检测池圆心位置对准正上方的数据读取窗口位置。

[0025] 4. 对目标物前列腺特异性抗原PSA的检测(本实施例癌胚抗原作为模型目标分析物)

首先在12孔高亲和板中加入50 μL 包含质量分数为0.05%的吐温-20和10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 捕获抗体(PSA-021)的磷酸缓冲盐溶液,并在4°C下过夜封闭。再加入300 μL 质量浓度为1.0 wt%的BSA封闭1小时。用PBS溶液洗涤后,依次加入50 μL 的PSA标准样品和100 μL 的光热及免疫功能化纳米探针,分别反应30分钟。除去上清液后加入100 μL 磷酸缓冲盐溶液(10 mM, pH=7.4),并将12孔高亲和板放置于检测池支架上,在调整好检测池位置后,打开808 nm的红外光源,照射时间为5分钟,输出功率为1.5W/cm²。读取便携式红外热成像摄像头的温度变化来定量。其结果所得的温度变化对PSA的标准工作曲线如图6所示,线性范围为1.0-50 ng/mL,检测限为0.4 ng/mL。

[0026] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,凡依本发明申请专利范围所做的均等变化与修饰,皆应属本发明的涵盖范围。

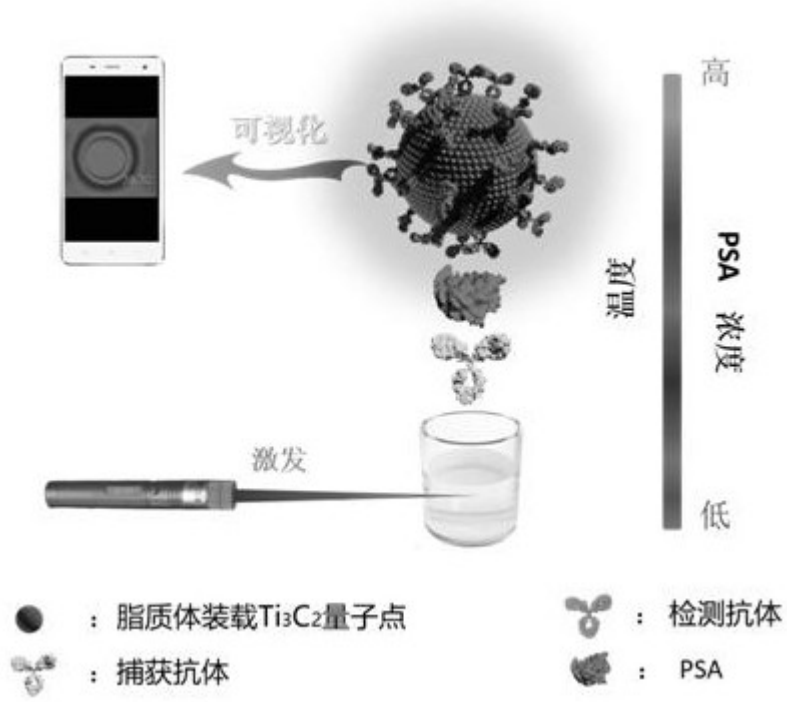


图1

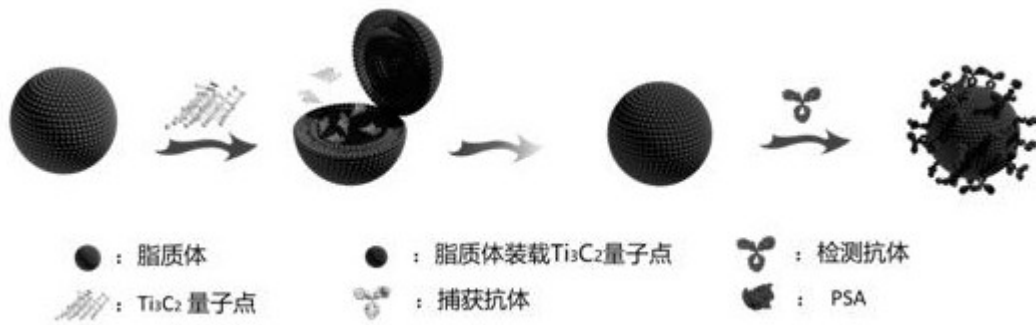


图2

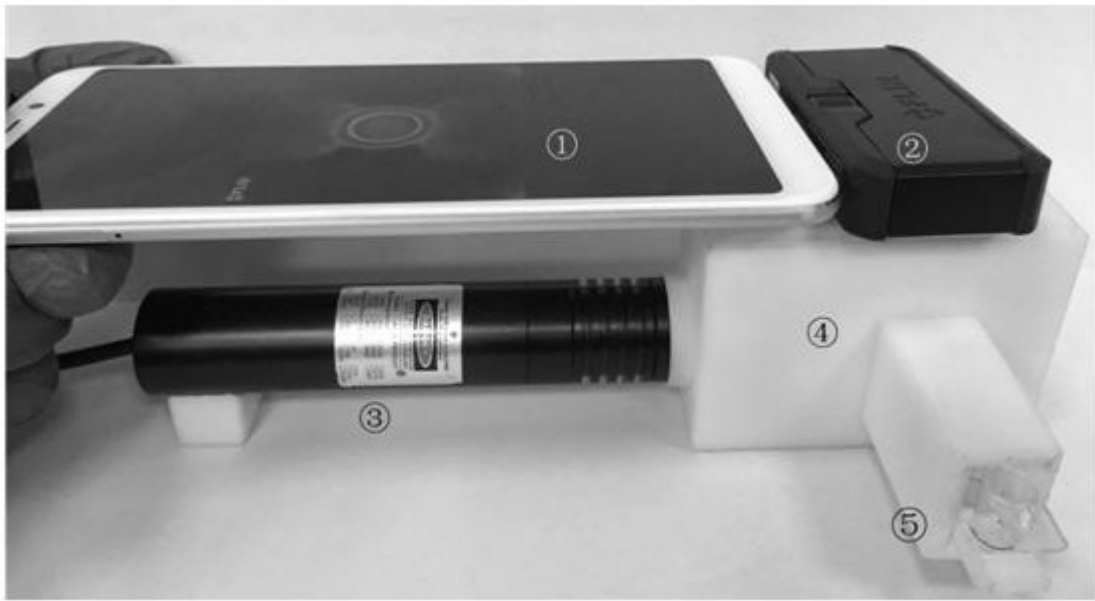


图3

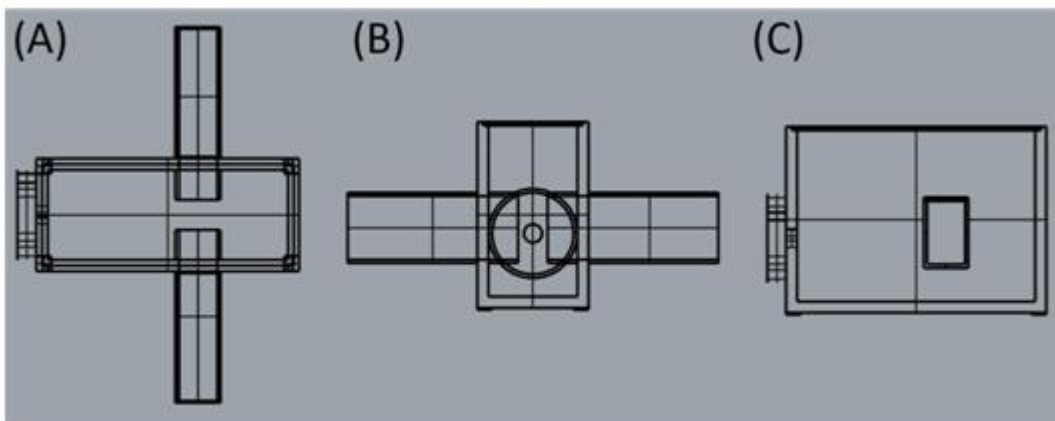


图4

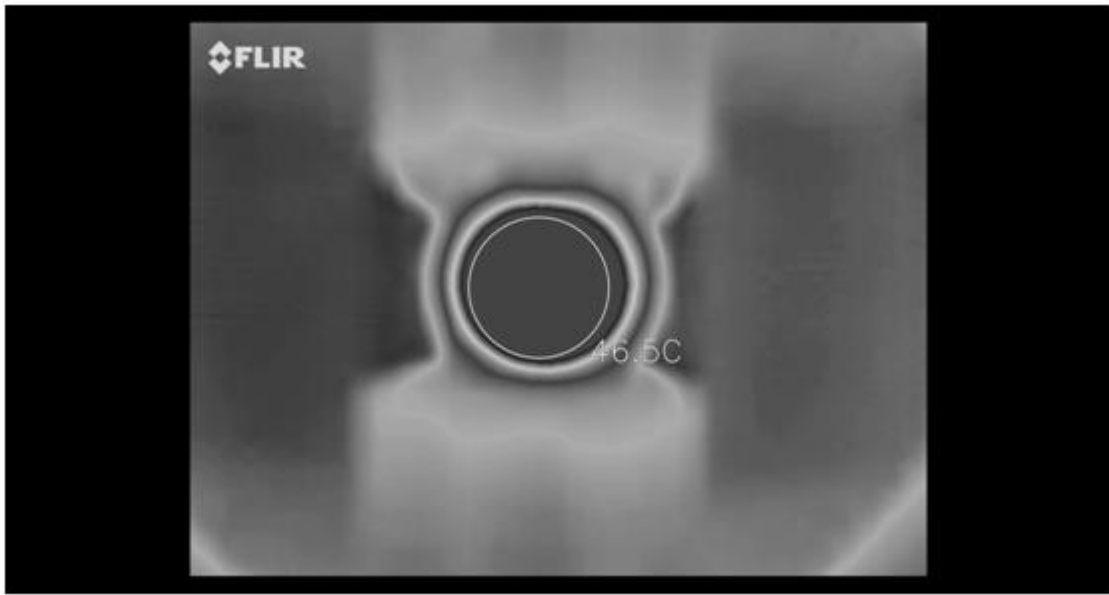


图5

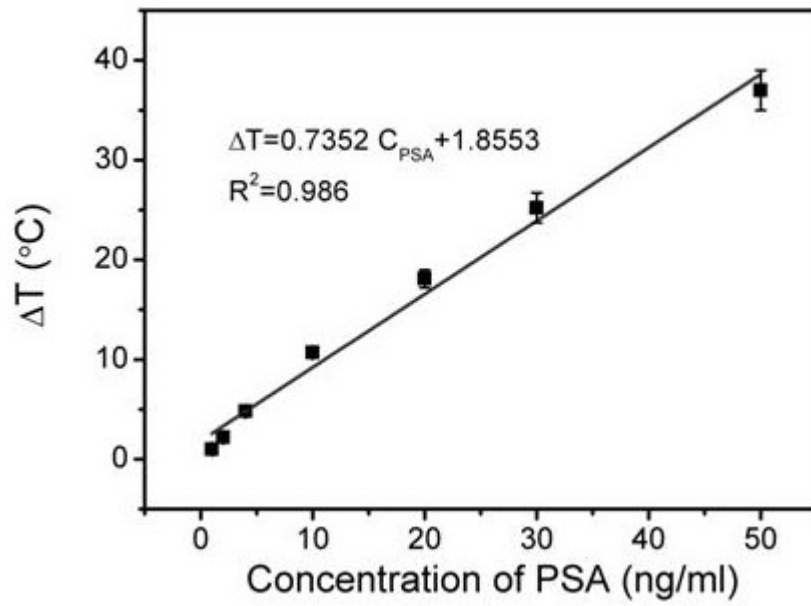


图6

专利名称(译)	一种基于光热及免疫功能化脂质体构建的便携式热成像免疫分析方法		
公开(公告)号	CN110068675A	公开(公告)日	2019-07-30
申请号	CN201910391945.3	申请日	2019-05-13
[标]申请(专利权)人(译)	福州大学		
申请(专利权)人(译)	福州大学		
当前申请(专利权)人(译)	福州大学		
[标]发明人	唐点平 蔡国能 余镇重 张莉佳		
发明人	唐点平 蔡国能 余镇重 张莉佳		
IPC分类号	G01N33/53 G01N25/48		
CPC分类号	G01N25/4873 G01N33/53		
代理人(译)	蔡学俊		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及了一种光热及免疫功能化脂质体构建的便携式热成像免疫分析方法,属于传感器构建及生物化学分析技术领域。本发明首先以Ti3C2量子点作为光热信标分子,脂质体作为装载容器,制备了光热功能化脂质体,再结合免疫分子,实现光热脂质体的免疫功能化,最后在设计的便携式热成像分析装置中利用免疫反应实现对目标物的特异性识别。在808 nm红外光激发下,免疫探针引入的光热脂质体能够高效转化光能为热能,使得检测系统的温度升高。升高的温度可以通过便携式红外热成像摄像头监测,从而实现对目标物的定量检测。该方法设备简单,便于携带,操作简单,为便携式检测提供了一种简单、灵敏且稳定的方法。

