

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/551 (2006.01)

G01N 27/26 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910029912.0

[43] 公开日 2009年9月9日

[11] 公开号 CN 101526523A

[22] 申请日 2009.3.27

[21] 申请号 200910029912.0

[71] 申请人 东南大学

地址 210096 江苏省南京市四牌楼2号

[72] 发明人 刘松琴 陈丽媛 陈成良

[74] 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

代理人 冯 慧

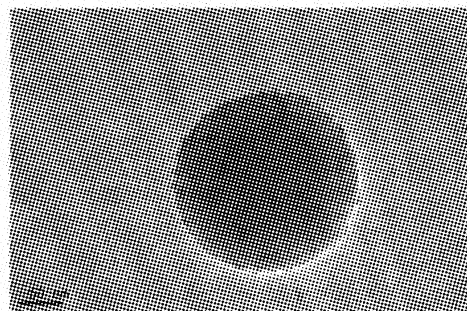
权利要求书3页 说明书6页 附图3页

### [54] 发明名称

铈化镉量子点免疫标记物的制备及电化学夹心免疫检测方法

### [57] 摘要

本发明涉及一种铈化镉量子点免疫标记物的制备及电化学夹心免疫检测方法，具有信号放大功能，通过与 ATPS 反应，室温下在二氧化硅粒子表面修饰上活性氨基基团，然后与量子点表面的羧基反应，使其成为表面修饰有量子点的二氧化硅微球。修饰后的二氧化硅微球在 EDC 和 NHS 的作用下，进一步在量子点表面修饰第二抗体，得到铈化镉量子点免疫标记物。电化学夹心免疫检测方法是在利用 anti - AFP 修饰  $Fe_3O_4$  磁性纳米微球将 Si/QD/Ab2 修饰到磁性颗粒上，然后电化学测定，由于该标记物表面富含量子点，使得单个夹心免疫过程负载的量子点数量大大增加，使得阳极溶出伏安检测信号得到放大，大大提高低浓度生物分子检测



1. 一种铈化镉量子点免疫标记物的制备方法，其特征在于，步骤为：

第一步，二氧化硅微球表面硅烷化：将粒径为  $200\pm 3$  nm 的纳米二氧化硅微球与 3-氨基丙基三乙氧基硅烷室温下进行氨基硅烷化反应，得到氨基修饰的二氧化硅微球；

第二步，铈化镉量子点包裹二氧化硅微球的制备：将第一步处理得到的氨基修饰的二氧化硅微球和巯基丙酸修饰的铈化镉量子点以及 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐反应，得到铈化镉量子点包裹二氧化硅微球悬浮液；

第三步，制备铈化镉量子点免疫标记物：将第二步得到的铈化镉量子点包裹二氧化硅微球悬浮液与  $\alpha$ -甲胎蛋白抗体溶液混合，在 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐和 N-羧基琥珀酰亚胺的作用下，进一步在铈化镉量子点表面修饰  $\alpha$ -甲胎蛋白抗体，得到  $\alpha$ -甲胎蛋白第二抗体与铈化镉量子点共修饰的二氧化硅微球，即铈化镉量子点免疫标记物。

2. 如权利要求 1 所述的铈化镉量子点免疫标记物的制备方法，其特征在于，第一步中，将 0.022 g 的纳米二氧化硅微球超声分散于 2mL 乙醇中，然后滴加 0.4mL 的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷，搅拌下反应 6 小时，离心分离、沉淀用乙醇洗涤得到氨基修饰的二氧化硅微球。

3. 如权利要求 1 所述的铈化镉量子点免疫标记物的制备方法，其特征在于，第二步中，将第一步的氨基修饰的二氧化硅微球加入 2 mL 浓度为 5 mg/mL 的巯基丙酸覆盖的铈化镉量子点溶液中和 1 mL 浓度为 20 mg/mL 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐溶液混合，在  $4^{\circ}\text{C}$  下搅拌 12 小时，离心后蒸馏水洗涤稀释为 2mL 的铈化镉量子点包裹二氧化硅微球悬浮液。

4. 如权利要求 1 所述的铈化镉量子点免疫标记物的制备方法，其特征在于，第三步，制备铈化镉量子点免疫标记物的具体步骤为：将 1mL 铈化镉量子点包裹的二氧化硅微球悬浮液与 1mL 浓度为 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的  $\alpha$ -甲胎蛋白抗体溶液混合，加入 100 $\mu\text{L}$  浓度为 20 mg/mL 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐溶液和 100 $\mu\text{L}$  浓度为 10 mg/mL 的 N-羧基琥珀酰亚胺溶液中， $4^{\circ}\text{C}$  下静置 24 小时，离心分离，离心所得沉淀用二次蒸馏水配成 1mL 的悬浮液。

5. 一种基于权利要求 1 制备的铈化镉量子点免疫标记物的电化学夹心免疫检测方法，其特征在于，步骤为：

第一步， $\alpha$ -甲胎蛋白第一抗体修饰四氧化三铁磁性纳米微球的制备方法：利

用 3-氨基丙基三乙氧基硅烷与粒径为  $10\pm 1$  nm 的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米颗粒表面的羟基反应,得到表面嫁接氨基基团的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米颗粒,然后将表面嫁接氨基基团的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米颗粒加入到戊二醛溶液中反应,反应结束后,利用外加磁场分离产物,清洗产物,然后将其加入到  $\alpha$ -甲胎蛋白抗体中,得到  $\alpha$ -甲胎蛋白第一抗体修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球;

第二步,夹心免疫方法:将制得的  $\alpha$ -甲胎蛋白第一抗体修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球悬浮在一组含有不同浓度的  $\alpha$ -甲胎蛋白抗原的待测溶液中,通过免疫反应捕获  $\alpha$ -甲胎蛋白抗原,利用外加磁场将修饰有结合态  $\alpha$ -甲胎蛋白抗原的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球分离、清洗后,加入到镧化镉量子点免疫标记物悬浮液中反应,得到镧化镉量子点免疫标记物修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球,利用外加磁场分离、清洗得到镧化镉量子点免疫标记物修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球;

第三步,镧化镉量子点免疫标记物的电化学测定:将第二步处理好的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球用质量浓度为 0.05 M 的硫酸溶解后转入 pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液中,利用阳极溶出伏安方法和铋膜修饰玻碳电极,检测溶解的  $\text{Cd}^{2+}$  浓度,根据  $\text{Cd}^{2+}$  阳极溶出峰电流与  $\alpha$ -甲胎蛋白抗原浓度的关系,得到一条标准曲线,实现  $\alpha$ -甲胎蛋白抗原的免疫检测。

6. 如权利要求 5 所述的基于权利要求 1 制备的镧化镉量子点免疫标记物的电化学夹心免疫检测方法,其特征在于,第一步,  $\alpha$ -甲胎蛋白抗体修饰四氧化三铁磁性纳米微球的制备方法具体步骤为:按体积比为 0.4: 150 的比例将 0.4mL 的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷加入到 150 mL 浓度为 5 g/L 的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球在乙醇的悬浮液中,机械搅拌并升温至  $37^\circ\text{C}$ ,恒温搅拌 7 小时,反应结束后,利用外加磁力,将  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球从反应液中分离出来,并用乙醇清洗后用乙醇稀释至 50mL,得到氨基修饰  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球悬浮液;然后在上述氨基修饰  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球悬浮液中加入 100  $\mu\text{L}$  质量浓度为 3% 的戊二醛溶液,恒温  $37^\circ\text{C}$  搅拌 3 小时,利用外加磁场,将磁性纳米微球分离,并用二次蒸馏水清洗,用蒸馏水分散至最终体积为 2mL,得到戊二醛修饰  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球悬浮液,再将上述修饰了醛基官能团的磁性纳米微球加入到 2 mL 浓度为 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的  $\alpha$ -甲胎蛋白抗体中, $4^\circ\text{C}$  下放置 24 小时,利用外加磁场,将磁性纳米微球分离,并用二次蒸馏水清洗三次,最终用蒸馏水分散为 2mL 的  $\alpha$ -甲胎蛋白抗体修饰的磁性纳米微球悬浮液,将制得的修饰有  $\alpha$ -甲胎蛋白抗体的磁性纳米微球在 2 mL 质量分数为 1% 的牛血清白蛋白溶液中温浴 30 分钟以封闭未反应的活性基团,利用外加磁力,将磁性纳米微球从溶液中分离出来,加二次蒸馏水分散为 4mL 的

$\alpha$ -甲胎蛋白抗体修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球悬浮液保存在  $4^\circ\text{C}$  下备用。

7. 如权利要求 5 所述的基于权利要求 1 制备的铈化镉量子点免疫标记物的电化学夹心免疫检测方法, 其特征在于, 第二步, 夹心免疫方法: 取第一步得到的第一抗体修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球悬浮液  $40\ \mu\text{L}$ , 加入一组不同浓度的  $40\ \mu\text{L}$  含有  $\alpha$ -甲胎蛋白抗原的待测溶液中, 并在  $37^\circ\text{C}$  下温浴 30 分钟, 通过免疫反应捕获溶液中游离的  $\alpha$ -甲胎蛋白抗原, 反应完成后, 用外加磁力将磁性纳米微球分离, 并清洗三次后加入  $40\ \mu\text{L}$  铈化镉量子点免疫标记物悬浮液, 温浴 30 分钟, 再次通过抗原抗体的免疫反应, 得到铈化镉量子点免疫标记物修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球, 利用外加磁场分离、清洗得到铈化镉量子点免疫标记物修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球。

8. 如权利要求 5 所述的基于权利要求 1 制备的铈化镉量子点免疫标记物的电化学夹心免疫检测方法, 其特征在于, 第三步, 铈化镉量子点免疫标记物的电化学测定: 将第二步处理好的铈化镉量子点免疫标记物修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球加入  $20\ \mu\text{L}$  浓度为  $0.05\ \text{M}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液中, 反应 2 分钟后转移到  $3\ \text{mL}$  的  $\text{pH}\ 7.0$  磷酸盐缓冲溶液中, 以铋膜电极作为工作电极, 铂丝电极为对电极, 饱和甘汞电极为参比电极, 对溶出的  $\text{Cd}^{2+}$ , 进行阳极溶出伏安测定, 根据  $\text{Cd}^{2+}$  阳极溶出峰电流与  $\alpha$ -甲胎蛋白抗原浓度的关系, 得到一个标准曲线, 实现  $\alpha$ -甲胎蛋白抗原的免疫检测。

## 铽化镉量子点免疫标记物的制备及电化学夹心免疫检测方法

### 技术领域

本发明涉及一种铽化镉量子点 CdTe 免疫标记物的制备技术，尤其是具有信号放大功能的由 CdTe 和第二抗体 Ab<sub>2</sub> 共修饰的二氧化硅小球 SiO<sub>2</sub> 免疫标记物的制备方法及其在生物分子检测中的应用。

### 背景技术

在肿瘤患者的治疗过程中，血清中肿瘤相关性蛋白质因子的灵敏、准确检测对于肿瘤治疗和愈后具有十分重要的意义。 $\alpha$ -甲胎蛋白 AFP 是一种分子量约为 70 kDa 的糖蛋白，通常在胎儿和新生儿的生长过程中由肝脏、卵黄囊和消化道排泄。AFP 在健康的成人體內，其值低于 25 ng/mL。血清中 AFP 水平的增加被视为一些癌变的早期迹象，其中包括肝癌，卵黄囊肿瘤，由肝组织转移的胃癌，睾丸癌和鼻咽癌等。目前，通过酶联免疫吸附检测 ELISA，表面等离子体共振，荧光免疫，化学发光，原子吸收光谱等检测手段在 AFP 抗原的检测中已有了一定的发展。但这些方法普遍存在灵敏度不高，且在疾病发展初期这些蛋白质的含量很低，用传统的方法难以检出等问题。因此，发展新的免疫检测方法，提高检测的灵敏度是目前临床诊断和疗效观察的迫切要求。

量子点，又称纳米晶，是一种由 II-VI 族或 III-V 族元素组成的纳米颗粒，其粒径一般介于 1~10nm 之间。基于量子效应，量子点在受激后可以发射荧光。与传统有机染料相比，量子点的优点在于荧光发射波长可控，激发光谱宽而连续，荧光发射峰窄而对称，光稳定性好、耐光漂白、能实现一元激发多元发射，单一材料可以发射不同波段的荧光，因而在太阳能电池，发光器件，光学生物标记等领域具有广泛的应用前景。而单一量子点的元素含量及荧光强度受其本身颗粒大小和分散状态的制约并不利于观察。

### 发明内容

本发明的目的是为生物分子的超灵敏检测，提供一种工艺简单、成本低、且

稳定性高的铈化镉量子点免疫标记物的制备及其生物分子超灵敏检测,实现低浓度生物分子的超灵敏电化学免疫检测。

本发明的技术方案为:一种铈化镉量子点免疫标记物的制备方法,步骤为:

第一步,二氧化硅微球表面硅烷化:将粒径为  $200\pm 3$  nm 的纳米二氧化硅微球与 3-氨基丙基三乙氧基硅烷室温下进行氨基硅烷化反应,得到氨基修饰的二氧化硅微球;具体就是将 0.022g 的纳米二氧化硅微球超声分散于 2mL 乙醇中,然后滴加 0.4mL 的 3-氨基丙基三乙氧基硅烷,搅拌下反应 6 小时,离心分离、沉淀用乙醇洗涤得到氨基修饰的二氧化硅微球。

第二步,铈化镉量子点包裹二氧化硅微球的制备:将第一步处理得到的氨基修饰的二氧化硅微球和巯基丙酸覆盖的铈化镉量子点以及 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐(EDC)反应,得到铈化镉量子点包裹二氧化硅微球悬浮液;具体做法是第二步中,将第一步的氨基修饰的二氧化硅微球加入 2 mL 浓度为 5 mg/mL 的巯基丙酸覆盖的铈化镉量子点溶液中和 1 mL 浓度为 20 mg/mL 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐溶液混合,在  $4^{\circ}\text{C}$  下搅拌 12 小时,离心后蒸馏水洗涤稀释为 2mL 的铈化镉量子点包裹二氧化硅微球悬浮液。

第三步,制备铈化镉量子点免疫标记物:将第二步得到的铈化镉量子点包裹二氧化硅微球悬浮液与  $\alpha$ -甲胎蛋白抗体溶液混合,在 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的作用下,进一步在铈化镉量子点表面修饰  $\alpha$ -甲胎蛋白抗体,得到  $\alpha$ -甲胎蛋白第二抗体与铈化镉量子点共修饰的二氧化硅微球,即铈化镉量子点免疫标记物 (Si/QD/Ab2)。具体步骤为:将 1mL 铈化镉量子点包裹的二氧化硅微球悬浮液与 1mL 浓度为 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的  $\alpha$ -甲胎蛋白抗体溶液混合,加入 100 $\mu\text{L}$  浓度为 20 mg/mL 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐溶液和 100 $\mu\text{L}$  浓度为 10 mg/mL 的 N-羟基琥珀酰亚胺溶液中,  $4^{\circ}\text{C}$  下静置 24 小时,离心分离,离心所得沉淀用二次蒸馏水配成 1mL 的悬浮液。

一种基于铈化镉量子点免疫标记物的电化学夹心免疫检测方法,步骤为:

第一步,  $\alpha$ -甲胎蛋白第一抗体修饰四氧化三铁磁性纳米微球的制备方法:利用 3-氨基丙基三乙氧基硅烷与粒径为  $10\pm 1$  nm 的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米颗粒表面的羟基反应,得到表面嫁接氨基基团的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米颗粒,然后将表面嫁接氨基基团的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米颗粒加入到戊二醛溶液中反应,反应结束后,利用外加磁场分离产物,清洗产物,然后将其加入到  $\alpha$ -甲胎蛋白抗体中,得到  $\alpha$ -甲胎蛋白第一抗体修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球;具体步骤为:  $\alpha$ -甲胎蛋白抗体修饰四氧化三铁磁性纳米微球的制备方法具体步骤为:按体积比为 0.4: 150 的比例将 0.4mL 的 3-氨基丙基三乙氧

基硅烷加入到 150 mL 浓度为 5 g/L 的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球在乙醇的悬浮液中，机械搅拌并升温至  $37^\circ\text{C}$ ，恒温搅拌 7 小时，反应结束后，利用外加磁力，将  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球从反应液中分离出来，并用乙醇清洗后用乙醇稀释至 50mL，得到氨基修饰  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球悬浮液；然后在上述氨基修饰  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球悬浮液中加入 100  $\mu\text{L}$  质量浓度为 3% 的戊二醛溶液，恒温  $37^\circ\text{C}$  搅拌 3 小时，利用外加磁场，将磁性纳米微球分离，并用二次蒸馏水清洗，用蒸馏水分散至最终体积为 2mL，得到戊二醛修饰  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球悬浮液，再将上述修饰了醛基官能团的磁性纳米微球加入到 2 mL 浓度为 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的  $\alpha$ -甲胎蛋白抗体 (anti-AFP) 中， $4^\circ\text{C}$  下放置 24 小时，利用外加磁场，将磁性纳米微球分离，并用二次蒸馏水清洗三次，最终用蒸馏水分散为 2mL 的  $\alpha$ -甲胎蛋白抗体修饰的磁性纳米微球悬浮液，将制得的修饰有  $\alpha$ -甲胎蛋白抗体的磁性纳米微球在 2 mL 质量分数为 1% 的牛血清白蛋白溶液中温浴 30 分钟以封闭未反应的活性基团，利用外加磁力，将磁性纳米微球从溶液中分离出来，加二次蒸馏水分散为 4mL 的  $\alpha$ -甲胎蛋白抗体修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球 (MB/Ab1) 悬浮液保存在  $4^\circ\text{C}$  下备用。

第二步，夹心免疫方法：将制得的  $\alpha$ -甲胎蛋白第一抗体修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球悬浮在一组含有不同浓度的  $\alpha$ -甲胎蛋白抗原的待测溶液中，通过免疫反应捕获  $\alpha$ -甲胎蛋白抗原，利用外加磁场将修饰有结合态  $\alpha$ -甲胎蛋白抗原的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球分离、清洗后，加入到镉化镉量子点免疫标记物悬浮液中反应，得到镉化镉量子点免疫标记物修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球，利用外加磁场分离、清洗得到镉化镉量子点免疫标记物修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球；具体做法是：取第一步得到的第一抗体修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球悬浮液 40  $\mu\text{L}$ ，加入一组具有不同浓度的 40  $\mu\text{L}$  的含有  $\alpha$ -甲胎蛋白抗原的待测溶液中，并在  $37^\circ\text{C}$  下温浴 30 分钟，通过免疫反应捕获溶液中游离的  $\alpha$ -甲胎蛋白抗原，反应完成后，用外加磁力将磁性纳米微球分离，并清洗三次后加入 40  $\mu\text{L}$  镉化镉量子点免疫标记物悬浮液，温浴 30 分钟，再次通过抗原抗体的免疫反应，得到镉化镉量子点免疫标记物修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球，利用外加磁场分离、清洗得到镉化镉量子点免疫标记物修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球；

第三步，镉化镉量子点免疫标记物的电化学测定：将第二步处理好的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球用质量浓度为 0.05 M 的硫酸溶解后转入 pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液中，利用阳极溶出伏安方法和铋膜修饰玻碳电极，检测溶解的  $\text{Cd}^{2+}$  浓度，根据  $\text{Cd}^{2+}$  阳极溶出峰电流与  $\alpha$ -甲胎蛋白抗原浓度的关系，得到标准曲线，实现  $\alpha$ -甲胎蛋白抗原的免疫检测。具体做法是：将第二步处理好的镉化镉量子点免疫标记物

修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米微球加入 20  $\mu\text{L}$  浓度为 0.05 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液中, 反应 2 分钟后转移到 3mL 的 pH 7.0 磷酸盐缓冲溶液中, 以铂膜电极作为工作电极, 铂丝电极为对电极, 饱和甘汞电极为参比电极, 对溶出的  $\text{Cd}^{2+}$ , 进行阳极溶出伏安测定, 根据  $\text{Cd}^{2+}$  阳极溶出峰电流与  $\alpha$ -甲胎蛋白抗原浓度的关系, 得到一个标准曲线, 实现  $\alpha$ -甲胎蛋白抗原的免疫检测。

**有益效果:** (1) 选用单分散性的二氧化硅微球作为修饰抗体的载体, 因其在水、酸溶液中的良好稳定性, 很好的提高了检测的灵敏度、可重复性以及分析性能。

(2) 由于纳米二氧化硅粒子的比表面大, 而且表面有着丰富的羟基。因此, 通过与 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (ATPS) 反应, 室温下就可在其表面修饰上活性氨基基团。利用微球覆盖的氨基基团与量子点上的羧基基团反应, 再利用量子点上的剩余羧基基团与 anti-AFP 抗体分子中的胺基反应实现抗体在二氧化硅微球表面的固定, 然后, 用质量分数为 1% 的牛血清白蛋白 (BSA) 处理修饰后的二氧化硅微球, 封闭微球表面残留的活性环氧基团和非特异性的结合位置, 可得到大量量子点和 anti-AFP 抗体共修饰的纳米免疫标志物。可以达到单位面积上量子点数量的增加, 从而达到电化学信号和荧光信号增强的目的。

(3) 在修饰了 anti-AFP 抗体后, 包裹了量子点的二氧化硅微球表面富含 anti-AFP 抗体, 并能有效保持其免疫活性, 能被  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米颗粒表面捕捉的 AFP 抗原识别, 从而使 Si/QD/Ab2 负载在  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米颗粒表面。

(4) 由于使用二氧化硅小球作为载体, 使得通过第二次免疫反应结合到  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米颗粒表面的量子点标记物大大增加, 从而放大电化学阳极溶出伏安法检测信号, 大大提高了对低浓度抗原检测的灵敏度。

(5) 利用制得的 Si/QD/Ab2 标记物, 并结合夹心免疫原理和阳极溶出伏安法, 可检测抗原最小浓度为 5  $\text{pg mL}^{-1}$ , 一定浓度范围内该检测方法的线性相关系数为 0.9902。

## 附图说明

图 1 铈化镉量子点免疫标记物修饰方法及原理示意图;

图 2  $\alpha$ -甲胎蛋白抗体修饰四氧化三铁磁性纳米微球制备原理示意图;

图 3 夹心免疫方法原理及步骤示意图;

图 4 纳米标志物对 AFP 抗原信号放大的溶出伏安法电化学检测。a 为工作电

极对空白溶液的电化学响应；b 为未用 SiO<sub>2</sub> 小球负载的量子点修饰 anti-AFP 抗体所得电化学响应；c 为使用 SiO<sub>2</sub> 小球负载后所得到的电信号放大现象，此时免疫反应中的 AFP 抗原浓度为 1 ng/mL；

图 5 单分散量子点包裹二氧化硅微球电镜照片。

## 具体实施方式

具体实施实例，以  $\alpha$ -甲胎蛋白的相关实验为例：

### 1) 铈化镉量子点免疫标记物制备：

(1) 二氧化硅微球表面硅烷化：将 0.022 g 粒径为 200±3 nm 的纳米二氧化硅微球加入到 2 mL 乙醇中，超声分散 30 分钟后缓慢滴加 0.4 mL 3-氨基丙基三乙氧基硅烷，搅拌 6 小时后，10000 转/分钟离心分离 30 分钟后，将沉淀用乙醇溶液清洗 4 次，得到氨基修饰二氧化硅微球。

(2) 量子点包裹二氧化硅微球制备：将上述氨基修饰二氧化硅微球加入到含 2 mL 5 mg/mL 市售巯基丙酸修饰的 CdTe 量子点(过量)和 1 mL 20 mg/mL 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐混合溶液中，在 4℃ 下搅拌 12 小时。10000 转/分钟离心分离 30 分钟后，用二次蒸馏水清洗 4 次，最终用蒸馏水稀释为 2 mL 的量子点包裹二氧化硅微球的悬浮液。

(3) anti-AFP 第二抗体修饰量子点包裹二氧化硅小球制备：将 1 mL 上述量子点包裹二氧化硅微球的悬浮液与 1 mL 12  $\mu$ g/mL anti-AFP 抗体溶液混合，加入 100  $\mu$ L 20 mg/mL EDC 和 100  $\mu$ L 10 mg/mL N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)，4℃ 下静置 24 小时，离心分离，将多余抗体除去，离心所得用二次蒸馏水配成 1 mL 的悬浮液备用。

### 2) 电化学夹心免疫检测：

(1) anti-AFP 抗体修饰 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性小球制备：①在 250 mL 三口烧瓶中依次加入 150 mL 5 g/L 的粒径为 10±1 nm 的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性小球在乙醇中的悬浮液，1 mL 二次蒸馏水和 0.4 mL APTS，机械搅拌并升温至 37℃，恒温搅拌 7 小时。反应结束后，利用外加磁力，将 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米微球从反应液中分离出来，并用乙醇清洗 4 次后用乙醇稀释至 50 mL，得到氨基修饰 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米微球悬浮液。②进一步在上述氨基修饰 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米微球悬浮液中加入 100  $\mu$ L 3% 的戊二醛溶液，恒温 37℃ 搅拌 3 小时，利用外加磁场，将磁性纳米微球分离，并用二次蒸馏水清洗三次，最终用蒸馏水分散为 2 mL 戊二醛修饰 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性小球悬浮液。

再将上述修饰了醛基官能团的磁性颗粒加入到 2 mL 12  $\mu\text{g/mL}$  anti-AFP 抗体中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 24 小时, 利用外加磁场, 将磁性纳米微球分离, 并用二次蒸馏水清洗三次, 最终用蒸馏水分散为 2 mL anti-AFP 抗体修饰的磁性小球悬浮液。③将制得的修饰有 anti-AFP 抗体的磁性小球在 2 mL 质量分数为 1%的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液中温浴 30 分钟以封闭未反应的活性基团, 利用外加磁力, 将磁性颗粒从溶液中分离出来, 加二次蒸馏水分散为 4 mL 的悬浮液保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下备用。

(2) 夹心免疫反应: 取 40  $\mu\text{L}$  上述悬浮液, 加入到一组 40  $\mu\text{L}$  含有不同浓度的 AFP 抗原的溶液, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温浴 30 分钟, 通过免疫反应捕获溶液中游离的 AFP 抗原。反应完成后, 用外加磁力将磁性颗粒分离, 并清洗三次后加入 40  $\mu\text{L}$  镉化镉量子点免疫标记物悬浮液, 温浴 30 分钟。由于标志物表面含有 anti-AFP 抗体, 因此, 可再次通过抗原抗体的免疫反应, 将该标志物修饰到磁性小球上。将上述反应液磁性分离并清洗三次后加入 20  $\mu\text{L}$  0.05 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液中, 反应数分钟后转移到 3 mL pH 7.0 磷酸盐缓冲溶液中, 以铋膜电极作为工作电极, 铂丝电极为对电极, 饱和甘汞电极为参比电极, 对溶出的  $\text{Cd}^{2+}$ , 进行阳极溶出伏安测定, 并与量子点直接标记的量子点/anti-AFP 标记物比较 (图 4a 和 b)。结果显示, 由于采用二氧化硅小球作为载体大大提高了单个免疫反应量子点的数量, 从而使检测信号放大, 并能用于低浓度生物分子的检测 (约 5  $\text{pg/mL}$ )。

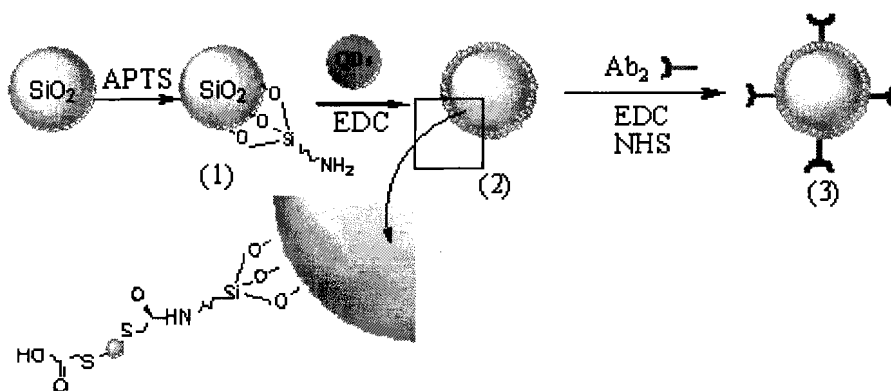


图 1

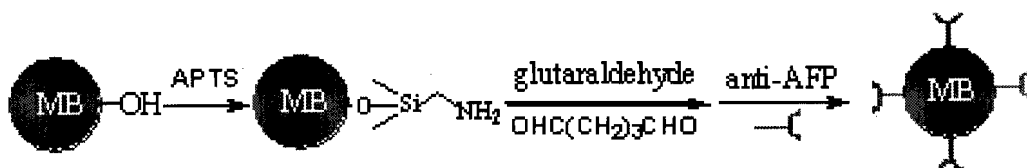


图 2

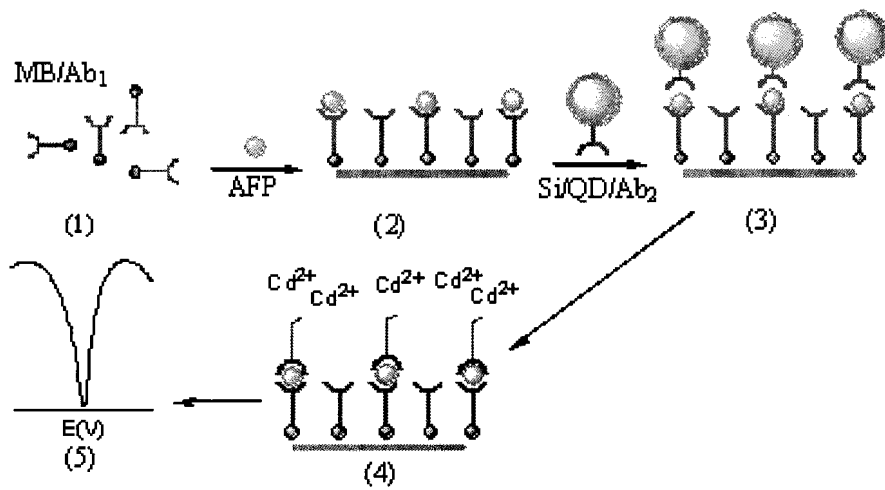


图 3

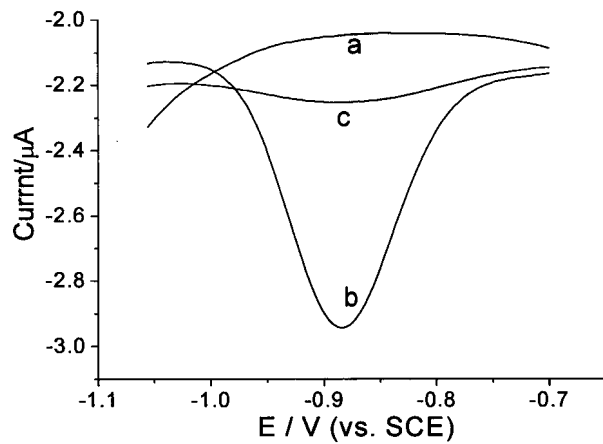


图 4

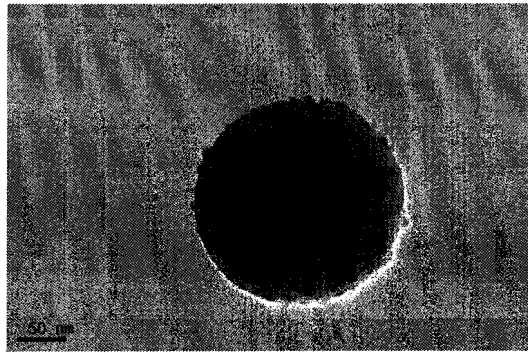


图 5

专利名称(译)	铈化镉量子点免疫标记物的制备及电化学夹心免疫检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101526523A</a>	公开(公告)日	2009-09-09
申请号	CN200910029912.0	申请日	2009-03-27
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	东南大学		
[标]发明人	刘松琴 陈丽媛 陈成良		
发明人	刘松琴 陈丽媛 陈成良		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/551 G01N27/26		
代理人(译)	冯慧		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种铈化镉量子点免疫标记物的制备及电化学夹心免疫检测方法，具有信号放大功能，通过与ATPS反应，室温下在二氧化硅粒子表面修饰上活性氨基基团，然后与量子点表面的羧基反应，使其成为表面修饰有量子点的二氧化硅微球。修饰后的二氧化硅微球在EDC和NHS的作用下，进一步在量子点表面修饰第二抗体，得到铈化镉量子点免疫标记物。电化学夹心免疫检测方法是在利用anti - AFP修饰Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>磁性纳米微球将Si/QD/Ab<sub>2</sub>修饰到磁性颗粒上，然后电化学测定，由于该标记物表面富含量子点，使得单个夹心免疫过程负载的量子点数量大大增加，使得阳极溶出伏安检测信号得到放大，大大提高低浓度生物分子检测的灵敏度。

