



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102749452 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 24

(21) 申请号 201210262285. 7

(22) 申请日 2012. 07. 26

(71) 申请人 山东大学

地址 250100 山东省济南市历城区山大南路
27 号

(72) 发明人 邹桂征 刘淑风 梁国栋

(74) 专利代理机构 济南金迪知识产权代理有限
公司 37219

代理人 王绪银

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 7 页

(54) 发明名称

一种近红外的电致化学发光免疫检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种近红外的电致化学发光免疫检测方法,属于电致化学发光免疫检测技术领域;包括步骤(1)近红外量子点与二抗的连接、步骤(2)夹心免疫反应并制得电致化学发光免疫传感器和步骤(3)用电致化学发光免疫传感器进行免疫检测三个步骤;本发明步骤简单,操作性好,能够有效地避免潜在的电化学过程干扰和生物组织背景光干扰,具有较高的灵敏度和精确性,重复性好。

1. 一种近红外的电致化学发光免疫检测方法,包括步骤(1)近红外量子点与二抗的连接、步骤(2)夹心免疫反应并制得电致化学发光免疫传感器和步骤(3)用电致化学发光免疫传感器进行免疫检测:

(1)近红外量子点与二抗的连接:

将表面带有羧基的量子点作为标记物并分散到含有 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺、N-羧基琥珀酰亚胺的缓冲溶液中,加入二抗,漩涡混合震荡均匀,在室温下反应,对反应溶液进行离心,并用上述缓冲溶液洗涤 2-5 次,得量子点标记的二抗;

(2)夹心免疫反应:

首先,将表面枝接有羧基的固体电极在含有 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺和 N-羧基琥珀酰亚胺的缓冲溶液中活化后,取含有一抗的缓冲溶液滴加到电极表面,在 30-50℃下孵育 1-6h,将一抗固定在电极上,并采用 3% 体积浓度的牛血清白蛋白滴加到电极封闭非特异性吸附的活性位点;其次,取含有不同浓度待测抗原的缓冲溶液或处理过的病人血清样品滴涂到电极上,在 35-45℃下孵育 1-6h,清洗电极;最后,取量子点标记的二抗溶液滴加到上述电极上,在 35-45℃下孵育 1-6h,制得近红外电致化学发光免疫传感器;

(3)用电致化学发光免疫传感器进行免疫检测:

将上述近红外电致化学发光免疫传感器清洗后,在含有 10-100mmol/L 2-N-二丁氨基乙醇或三丙胺的缓冲溶液中进行电致化学发光测试;先利用夹心免疫分析方法,测定一系列标准浓度抗原的电致化学发光信号,然后确定抗原标准工作曲线,最后利用标准曲线法测定待测样品中抗原的浓度。

2. 如权利要求 1 所述的一种近红外的电致化学发光免疫检测方法,其特征在于:步骤(1)和(2)中的量子点为荧光辐射在 700-1100nm 的量子点。

3. 如权利要求 2 所述的一种近红外的电致化学发光免疫检测方法,其特征在于:步骤(1)和(2)中的量子点为荧光辐射在 780nm 的碲化镉量子点。

4. 如权利要求 1 所述的一种近红外的电致化学发光免疫检测方法,其特征在于:步骤(1)、(2)和(3)中所述的缓冲溶液为磷酸缓冲液、Tris-HCl 缓冲溶液或 B_R 缓冲溶液中的一种。

5. 如权利要求 1 所述的一种近红外的电致化学发光免疫检测方法,其特征在于:步骤(2)中固体电极为金电极、铂电极或玻碳电极中的一种。

6. 如权利要求 1 所述的一种近红外的电致化学发光免疫检测方法,其特征在于:步骤(2)和(3)中所述的抗原为甲胎蛋白抗原、癌胚抗原、糖类抗原 125、糖类抗原 15-3、糖类抗原 72-4、糖类抗原 19-9、前列腺特异性抗原、游离前列腺特异抗原、爱滋病抗原、乙肝表面抗原、乙肝 e 抗原、甲状腺球蛋白、肌钙蛋白 T 抗原和肌红蛋白抗原中的一种;步骤(2)中所述的一抗为与抗原对应的单克隆抗体;步骤(1)和(2)中所述二抗为所述抗原与一抗对应的单克隆二抗。

7. 如权利要求 6 所述的一种近红外的电致化学发光免疫检测方法,其特征在于:步骤(2)和(3)中所述的抗原为甲胎蛋白抗原,步骤(2)中所述一抗为甲胎蛋白单克隆抗体,步骤(1)和(2)中所述二抗为甲胎蛋白二抗。

一种近红外的电致化学发光免疫检测方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种近红外的电致化学发光免疫检测方法，特别涉及一种以近红外碲化镉(CdTe)量子点为标记物的电致化学发光免疫检测方法，属于电致化学发光免疫检测技术领域。

背景技术：

[0002] 近红外光具有组织穿透性好、背景干扰低以及光学损伤小等优点，因此近红外分析技术在生命分析科学领域具有广阔的应用前景，新型近红外发光体和相关传感策略的构建也随之变得意义深远；电致化学发光(Electrochemiluminescence, ECL)分析无需激发光源、信噪比高而且具有比常规荧光分析法更高的灵敏度，是一种已在多个研究领域获得广泛应用的分析技术；但是由于传统ECL物质的电致化学发光辐射都在可见光区域，如鲁米诺和 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (bpy=2, 2'-bipyridine)等，因此ECL分析技术的传感应用一直局限在可见光区域。

[0003] 伴随着纳米制备技术的进步，近红外量子点在开发新型近红外ECL发光体显出巨大潜力；然而，目前近红外量子点ECL的研究主要在阴极进行，在阳极却难有突破，而且其ECL激发电位较高并且在实际应用中难以克服复杂电化学反应和生物组织中溶解氧的干扰；同时，现有技术中采用的量子点近红外ECL辐射集中在700nm附近，无法有效消除生物组织的背景干扰(Jing Wang, Heyou Han, Xiaochun Jiang, Liang Huang, Lina Chen, and Na Li Anal. Chem., 2012, 84(11), 4893 - 4899)；因此，寻求能够克服复杂电化学反应和生物组织背景干扰的电致化学发光免疫检测方法已成为业界不断追求的目标。

发明内容：

[0004] 针对现有技术的不足，本发明提供一种近红外的电致化学发光免疫检测方法。

[0005] 术语说明：

[0006] 表面带有羧基的碲化镉量子点：根据已公开专利文献中描述的方法得到，该专利文献的公开号为CN101870459A；

[0007] 抗原：本发明所述的抗原指：甲胎蛋白抗原，癌胚抗原，糖类抗原125，糖类抗原15-3，糖类抗原72-4，糖类抗原19-9，前列腺特异性抗原，游离前列腺特异抗原，爱滋病抗原，乙肝表面抗原，乙肝e抗原，甲状腺球蛋白，肌钙蛋白T抗原，肌红蛋白抗原等常规的抗原。

[0008] 一抗：本发明所述的一抗指：对上述抗原对应产生的抗体，本发明对于上述抗原对应的单克隆抗体效果更好。

[0009] 二抗：本发明所述的二抗指：对上述抗原和一抗对应产生的二抗。

[0010] 处理过的病人血清样品：指按照医学领域通用的血清处理标准处理后的病人血清样品；

[0011] 本发明的技术方案如下：

[0012] 一种近红外的电致化学发光免疫检测方法,包括步骤(1)近红外量子点与二抗的连接、步骤(2)夹心免疫反应并制得电致化学发光免疫传感器和步骤(3)用电致化学发光免疫传感器进行免疫检测:

[0013] (1)近红外量子点与二抗的连接:

[0014] 将表面带有羧基的量子点作为标记物并分散到含有 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺、N-羧基琥珀酰亚胺的缓冲溶液中,加入二抗,漩涡混合震荡均匀,在室温下反应,对反应溶液进行离心,并用上述缓冲溶液洗涤 2-5 次,得量子点标记的二抗;

[0015] (2)夹心免疫反应:

[0016] 首先,将表面枝接有羧基的固体电极在含有 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺和 N-羧基琥珀酰亚胺的缓冲溶液中活化后,取含有一抗的缓冲溶液滴加到电极表面,在 30-50℃下孵育 1-6h,将一抗固定在电极上,并采用 3% 体积浓度的牛血清白蛋白滴加到电极封闭非特异性吸附的活性位点;其次,取含有不同浓度待测抗原 (antigen, Ag) 的缓冲溶液或处理过的病人血清样品滴涂到电极上,在 35-45℃下孵育 1-6h,清洗电极;最后,取量子点标记的二抗溶液滴加到上述电极上,在 35-45℃下孵育 1-6h,制得近红外电致化学发光免疫传感器,所选缓冲溶液因抗原、抗体种类而异,标准是使免疫反应的活性最大,电致化学发光辐射最强;

[0017] (3)用电致化学发光免疫传感器进行免疫检测:

[0018] 将上述近红外电致化学发光免疫传感器清洗后,在含有 10-100mmol/L 2-N-二丁氨基乙醇或三丙胺的缓冲溶液中进行电致化学发光测试;先利用夹心免疫分析方法,测定一系列标准浓度抗原的电致化学发光信号,然后确定抗原标准工作曲线,最后利用标准曲线法测定待测样品中抗原的浓度。

[0019] 上述的电致化学发光测试是基于碲化镉 (CdTe) 标记的近红外电致化学发光免疫传感器为工作电极、铂 (Pt) 为对电极和银 / 氯化银 (Ag/AgCl) 饱和参比电极的三电极体系实现的。

[0020] 根据本发明,步骤(1)和(2)中优选的量子点为荧光辐射在 700-1100nm 的量子点,特别优选荧光辐射在 780nm 的碲化镉 (CdTe) 量子点。

[0021] 根据本发明,步骤(2)中优选的固体电极为金电极、铂电极或玻碳电极中的一种。

[0022] 根据本发明,步骤(1)、(2)和(3)中优选的缓冲溶液为磷酸缓冲液、Tris-HCl 缓冲溶液或 B⁻R 缓冲溶液中的一种。

[0023] 根据本发明,步骤(2)和(3)中优选的抗原为:甲胎蛋白抗原、癌胚抗原、糖类抗原 125、糖类抗原 15-3、糖类抗原 72-4、糖类抗原 19-9、前列腺特异性抗原、游离前列腺特异性抗原、爱滋病抗原、乙肝表面抗原、乙肝 e 抗原、甲状腺球蛋白、肌钙蛋白 T 抗原和肌红蛋白抗原中的一种,特别优选的抗原为甲胎蛋白抗原;步骤(2)中优选的一抗为:与甲胎蛋白抗原、癌胚抗原、糖类抗原 125、糖类抗原 15-3、糖类抗原 72-4、糖类抗原 19-9、前列腺特异性抗原、游离前列腺特异抗原、爱滋病抗原、乙肝表面抗原、乙肝 e 抗原、甲状腺球蛋白、肌钙蛋白 T 抗原和肌红蛋白抗原对应的单克隆抗体,特别优选的一抗为甲胎蛋白单克隆抗体;步骤(1)和(2)中优选的二抗为上述抗原和一抗对应产生的二抗,特别优选的二抗为甲胎蛋白抗原和甲胎蛋白单克隆抗体产生的二抗。

[0024] 本发明具有以下有益效果:

- [0025] 1、本发明步骤简单,操作性好;
- [0026] 2、本发明能够有效地避免潜在的电化学过程干扰和生物组织背景光干扰;
- [0027] 3、本发明具有较高的灵敏度和精确性,重复性好。
- [0028] 附图说明:
- [0029] 图1为本发明实施例1中所采用碲化镉(CdTe)量子点的紫外吸收光谱(a)、荧光光谱(b)和量子点标记的免疫复合物的电致化学发光光谱(c)。
- [0030] 图2为本发明实施例1中量子点标记的免疫复合物的电致化学发光曲线。
- [0031] 图3为本发明实施例2中量子点标记的免疫复合物的电致化学发光曲线。
- [0032] 图4为本发明实施例3中量子点标记的免疫复合物的电致化学发光曲线。
- [0033] 图5为本发明实施例4中量子点标记的免疫复合物的电致化学发光曲线。
- [0034] 图6为本发明实施例5中量子点标记的免疫复合物的电致化学发光曲线。
- [0035] 图7为本发明实施例6中量子点标记的免疫复合物的电致化学发光曲线。
- [0036] 图8为本发明实施例7中量子点标记的免疫复合物的电致化学发光曲线。
- [0037] 图9为本发明实施例8中量子点标记的免疫复合物的电致化学发光曲线。
- [0038] 图10为本发明实施例9中量子点标记的免疫复合物的电致化学发光曲线。
- [0039] 图11为本发明实施例10中量子点标记的免疫复合物的电致化学发光曲线。
- [0040] 图12为本发明实施例11中量子点标记的免疫复合物的电致化学发光曲线。
- [0041] 图13为本发明实施例12的甲胎蛋白抗原浓度测定标准曲线。

具体实施方式:

[0042] 下面通过具体实施例并结合附图对本发明做进一步说明;实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,但是本发明的保护范围不限于此。

[0043] 实施例以甲胎蛋白抗原为检测对象,但如前所述以癌胚抗原,糖类抗原125,糖类抗原15-3,糖类抗原72-4,糖类抗原19-9,前列腺特异性抗原,游离前列腺特异抗原,爱滋病抗原,乙肝表面抗原,乙肝e抗原,甲状腺球蛋白,肌钙蛋白T抗原,肌红蛋白抗原等常规的抗原为检测对象,用本发明的近红外的电致化学发光免疫检测方法进行检测同样能够达到较好的效果。

[0044] 实施例1-11中,所用的表面带有羧基的量子点,由申请人根据已公开的专利文献(公开号CN101870459A)实验室制的,所用的甲胎蛋白单克隆抗体、抗原及二抗均购自上海领潮生物科技有限公司,所用电致化学发光信号由西安瑞迈公司生产的MPI-A型电致化学发光分析系统采集,电致化学发光光谱由普林斯顿公司生产的光学多道分析系统采集。

[0045] 实施例1:

[0046] 一种近红外的电致化学发光免疫检测方法,步骤如下:

[0047] 选择直径为5.0mm的金电极作为载体材料,以甲胎蛋白抗原为检测对象:

[0048] 步骤1,用近红外量子点作为标记物标记二抗:

[0049] 将表面带有羧基的碲化镉(CdTe)量子点(荧光辐射波长为780nm)分散于含有100mg/mL1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺和100mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺的磷酸缓冲液中,加入二抗,漩涡混合震荡均匀,在室温下反应,对反应溶液进行离心,并用磷酸缓冲液洗涤3次,得到量子点标记的二抗;

[0050] 步骤 2, 金电极的表面处理 :

[0051] 将金电极用 α -氧化铝抛光粉 (0.5-0.7 μm) 抛光处理后, 浸入电极清洗液中 10min, 然后分别用二次蒸馏水和乙醇冲洗 ; 将电极用氮气吹干后浸入 5mL0.02mol/L 的巯基乙酸溶液中过夜反应, 通过金硫键将巯基乙酸自组装到电极上, 末端羧基裸露在电极表面 ; 然后分别用乙醇和二次蒸馏水轻轻洗去未接在电极上的巯基乙酸, 并用氮气吹干 ;

[0052] 步骤 3, 夹心免疫反应 :

[0053] 首先, 将表面枝接有巯基乙酸的金电极浸入含有 100mg/mL1-乙基-3-3-二甲基氨基丙基碳化二亚胺和 100mg/mLN-羟基琥珀酰亚胺 pH 为 7.4 的磷酸缓冲溶液中活化 30 分钟, 取 10 μL 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 含有甲胎蛋白单克隆一抗 (Ab1) 的磷酸缓冲溶液滴加到电极表面, 在 37°C 下孵育 3h, 将甲胎蛋白单克隆一抗固定在电极上, 并采用 3% 体积浓度的牛血清白蛋白滴加到电极封闭非特异性吸附的活性位点, 清洗电极 ; 其次, 取 10 μL 含有 80.0ng/mL 甲胎蛋白抗原 (Ag) 的磷酸缓冲溶液滴涂到电极上, 在 37°C 下孵育 3h, 清洗电极 ; 最后, 取 10 μL 量子点标记的单克隆二抗溶液滴加到接好甲胎蛋白抗原 (Ag) 的电极上, 在 37°C 下孵育 3h, 制得近红外的电致化学发光甲胎蛋白免疫传感器 ;

[0054] 步骤 4, 用电致化学发光免疫传感器进行免疫检测 :

[0055] 将上述制得的近红外电致化学发光甲胎蛋白免疫传感器清洗后, 浸入含有 20mmol/L2-N-丁氨基乙醇的 pH 为 9.2 的磷酸缓冲溶液中进行电致化学发光测试, 电化学扫描范围为 0-1.0V, 扫描速度为 100mV/s, 光电倍增管高压为 -800V, 在优化实验条件下, 通过测定由不同标准浓度甲胎蛋白抗原形成的免疫复合物的电致化学发光信号, 确定甲胎蛋白抗原标准工作曲线, 再利用标准曲线法测定样品中甲胎蛋白抗原的浓度。

[0056] 实施例 2 :

[0057] 一种近红外的电致化学发光免疫检测方法, 步骤如下 :

[0058] 选择直径为 5.0mm 的金电极作为载体材料, 以甲胎蛋白抗原为检测对象 :

[0059] 步骤 3 中 : 其次一步中, 选用 10 μL 含有 40.0ng/mL 甲胎蛋白抗原 (Ag) 的磷酸缓冲溶液滴涂到电极上, 其他步骤与实施例 1 中相同。

[0060] 实施例 3 :

[0061] 一种近红外的电致化学发光免疫检测方法, 步骤如下 :

[0062] 选择直径为 5.0mm 的金电极作为载体材料, 以甲胎蛋白抗原为检测对象 :

[0063] 步骤 3 中 : 其次一步中, 选用 10 μL 含有 10.0ng/mL 甲胎蛋白抗原 (Ag) 的磷酸缓冲溶液或处理过的病人血清样品滴涂到电极上, 其他步骤与实施例 1 中相同。

[0064] 实施例 4 :

[0065] 一种近红外的电致化学发光免疫检测方法, 步骤如下 :

[0066] 选择直径为 5.0mm 的金电极作为载体材料, 以甲胎蛋白抗原为检测对象 :

[0067] 步骤 3 中 : 其次一步中, 选用 10 μL 含有 5.0ng/mL 甲胎蛋白抗原 (Ag) 的磷酸缓冲溶液滴涂到电极上, 其他步骤与实施例 1 中相同。

[0068] 实施例 5 :

[0069] 一种近红外的电致化学发光免疫检测方法, 步骤如下 :

[0070] 选择直径为 5.0mm 的金电极作为载体材料, 以甲胎蛋白抗原为检测对象 :

[0071] 步骤 3 中 : 其次一步中, 选用 10 μL 含有 1.0ng/mL 甲胎蛋白抗原 (Ag) 的磷酸缓冲

溶液滴涂到电极上,其他步骤与实施例 1 中相同。

[0072] 实施例 6 :

[0073] 一种近红外的电致化学发光免疫检测方法,步骤如下 :

[0074] 选择直径为 5.0mm 的金电极作为载体材料,以甲胎蛋白抗原为检测对象 :

[0075] 步骤 3 中:其次一步中,选用 10 μ L 含有 0.50ng/mL 甲胎蛋白抗原(Ag)的磷酸缓冲溶液滴涂到电极上,其他步骤与实施例 1 中相同。

[0076] 实施例 7 :

[0077] 一种近红外的电致化学发光免疫检测方法,步骤如下 :

[0078] 选择直径为 5.0mm 的金电极作为载体材料,以甲胎蛋白抗原为检测对象 :

[0079] 步骤 3 中:其次一步中,选用 10 μ L 含有 0.10ng/mL 甲胎蛋白抗原(Ag)的磷酸缓冲溶液滴涂到电极上,其他步骤与实施例 1 中相同。

[0080] 实施例 8 :

[0081] 一种近红外的电致化学发光免疫检测方法,步骤如下 :

[0082] 选择直径为 5.0mm 的金电极作为载体材料,以甲胎蛋白抗原为检测对象 :

[0083] 步骤 3 中:其次一步中,选用 10 μ L 含有 50.0pg/mL 甲胎蛋白抗原(Ag)的磷酸缓冲溶液滴涂到电极上,其他步骤与实施例 1 中相同。

[0084] 实施例 9 :

[0085] 一种近红外的电致化学发光免疫检测方法,步骤如下 :

[0086] 选择直径为 5.0mm 的金电极作为载体材料,以甲胎蛋白抗原为检测对象 :

[0087] 步骤 3 中:其次一步中,选用 10 μ L 含有 10.0pg/mL 甲胎蛋白抗原(Ag)的磷酸缓冲溶液滴涂到电极上,其他步骤与实施例 1 中相同。

[0088] 实施例 10 :

[0089] 一种近红外的电致化学发光免疫检测方法,步骤如下 :

[0090] 选择直径为 5.0mm 的金电极作为载体材料,以甲胎蛋白抗原为检测对象 :

[0091] 步骤 3 中:其次一步中,选用 10 μ L 含有 5.0pg/mL 甲胎蛋白抗原(Ag)的磷酸缓冲溶液滴涂到电极上,其他步骤与实施例 1 中相同。

[0092] 实施例 11 :

[0093] 一种近红外的电致化学发光免疫检测方法,步骤如下 :

[0094] 选择直径为 5.0mm 的金电极作为载体材料,以甲胎蛋白抗原为检测对象 :

[0095] 步骤 3 中:其次一步中,选用 10 μ L 含有 100.0ng/mL 甲胎蛋白抗原(Ag)的磷酸缓冲溶液滴涂到电极上,其他步骤与实施例 1 中相同。

[0096] 实施例 12 :

[0097] 本实施例对实施例 1-11 中测定样品中甲胎蛋白抗原的浓度与相对应电致化学发光强度绘制曲线,如图 13 所示;由图 13 可知,本发明具有较高的灵敏度和精确性,在 5.0pg/mL 的低浓度下都有较好的检测结果,而且本发明的重复性也比较好。

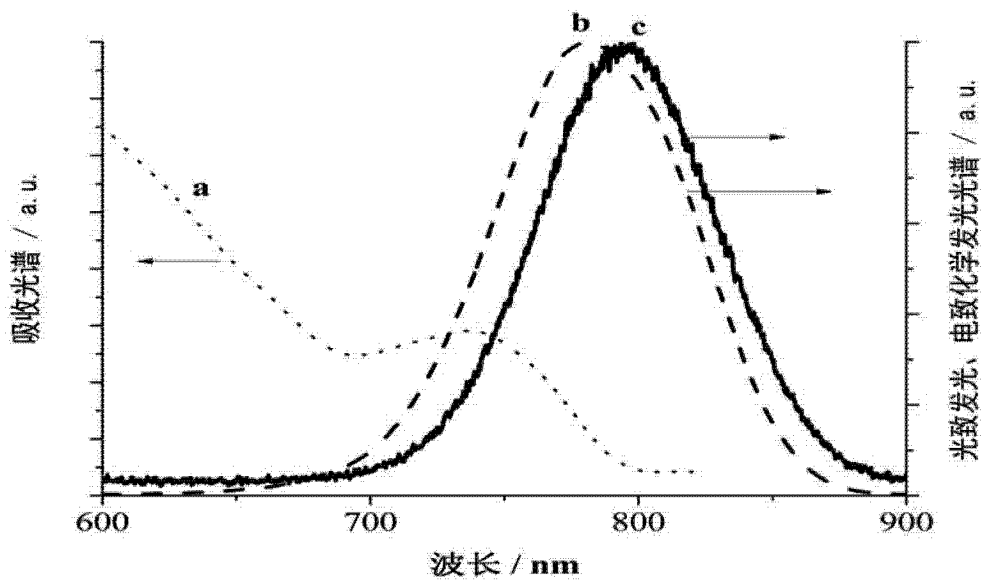


图 1

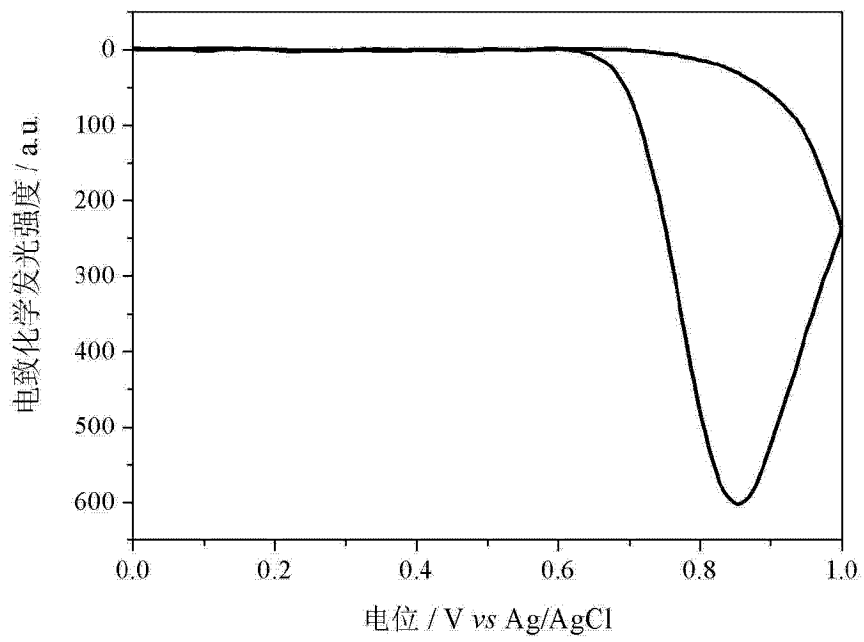


图 2

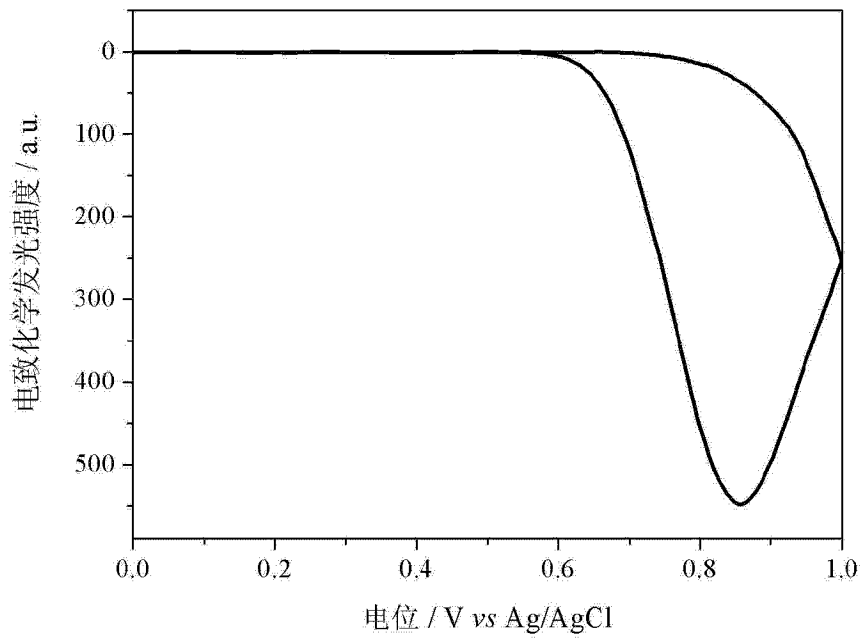


图 3

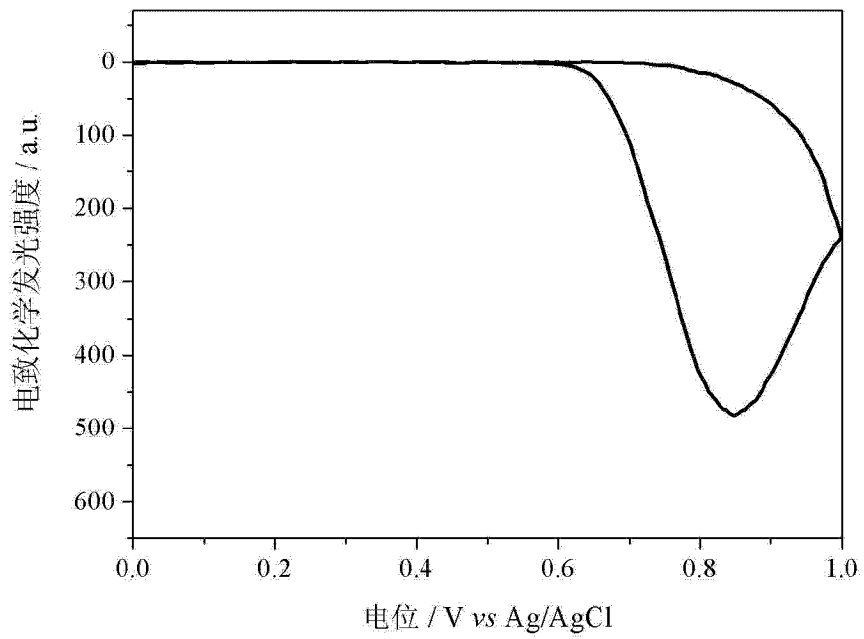


图 4

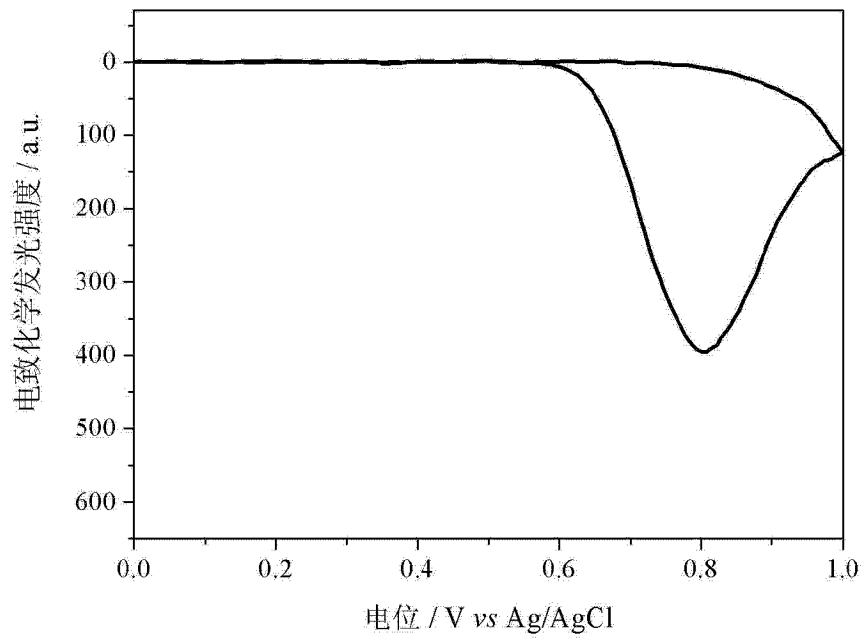


图 5

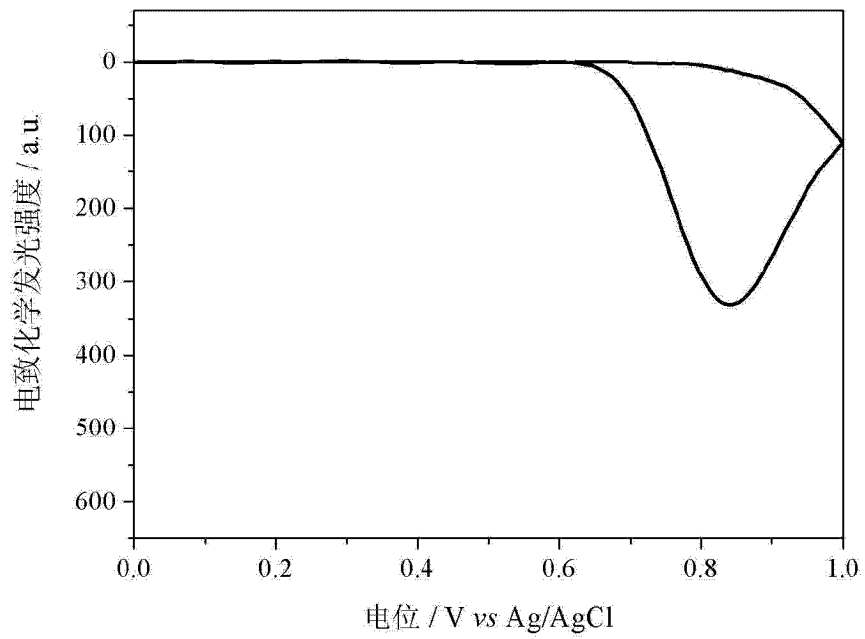


图 6

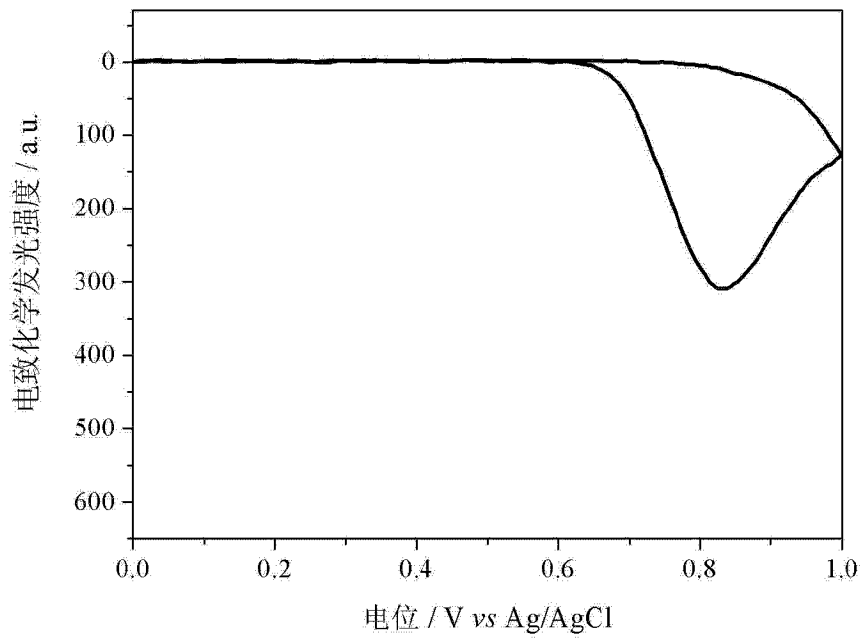


图 7

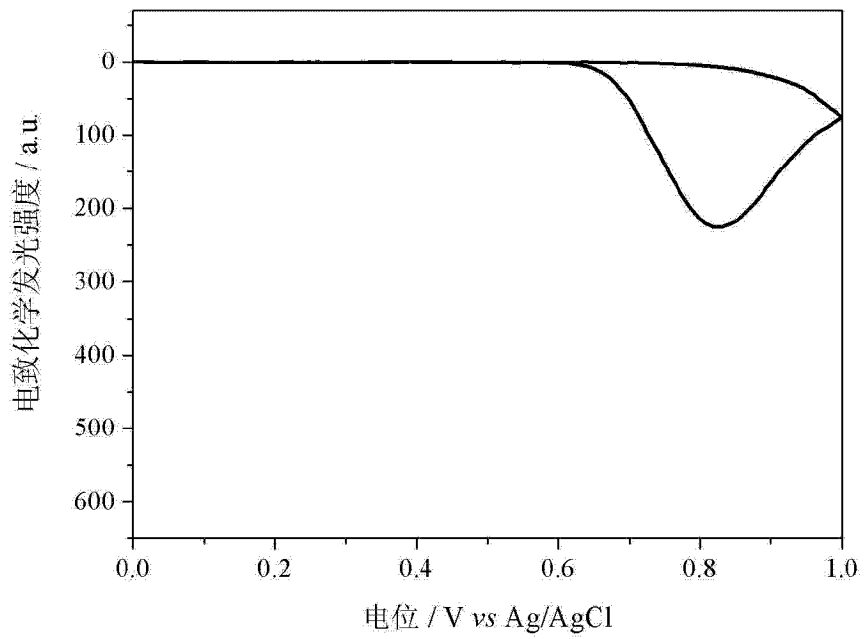


图 8

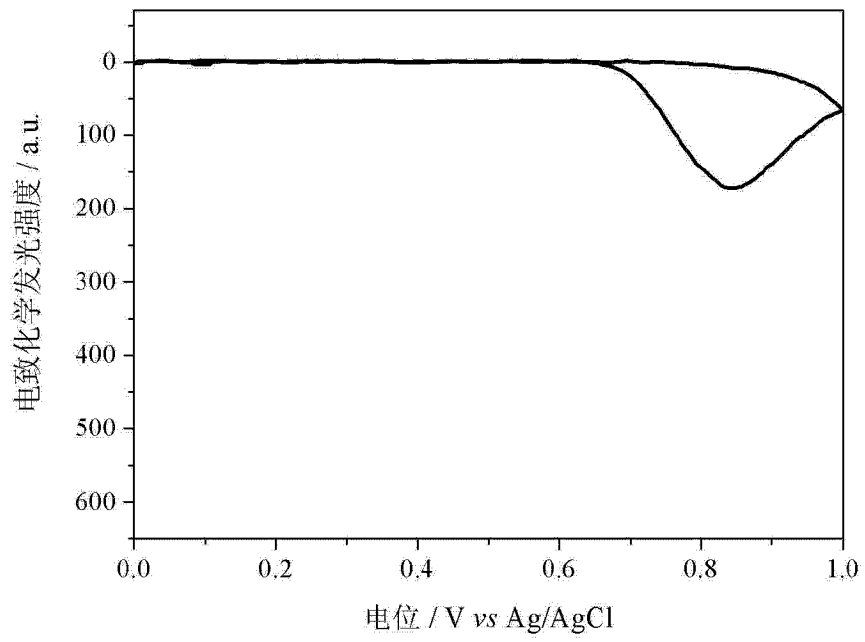


图 9

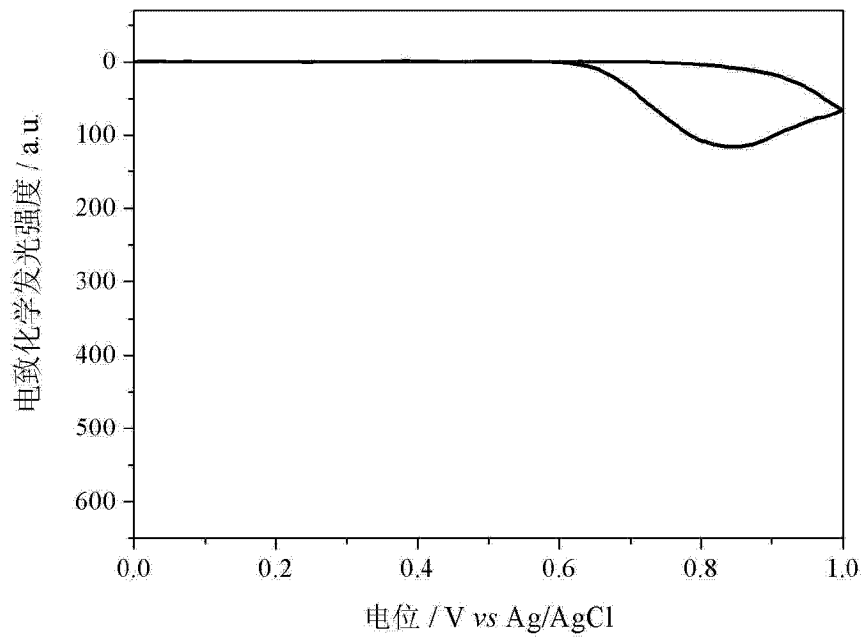


图 10

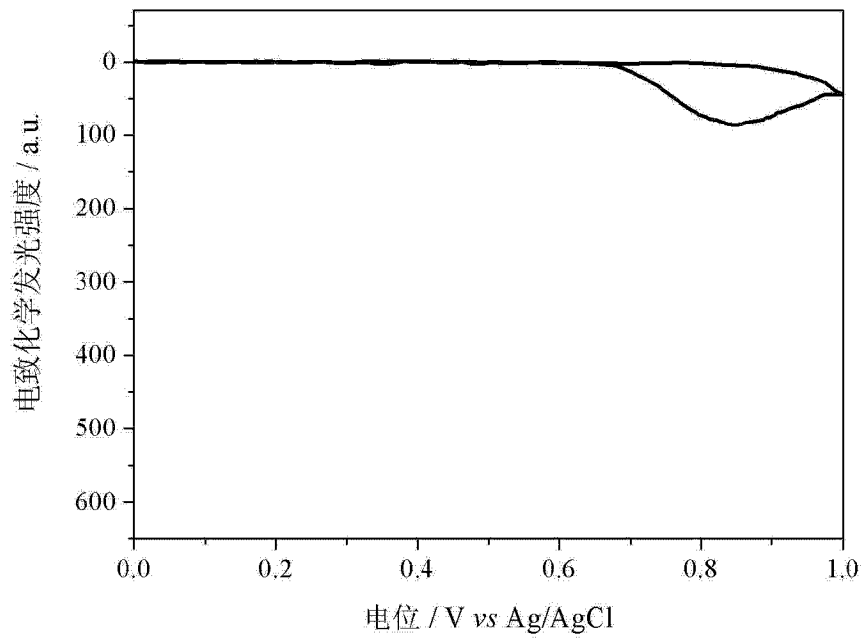


图 11

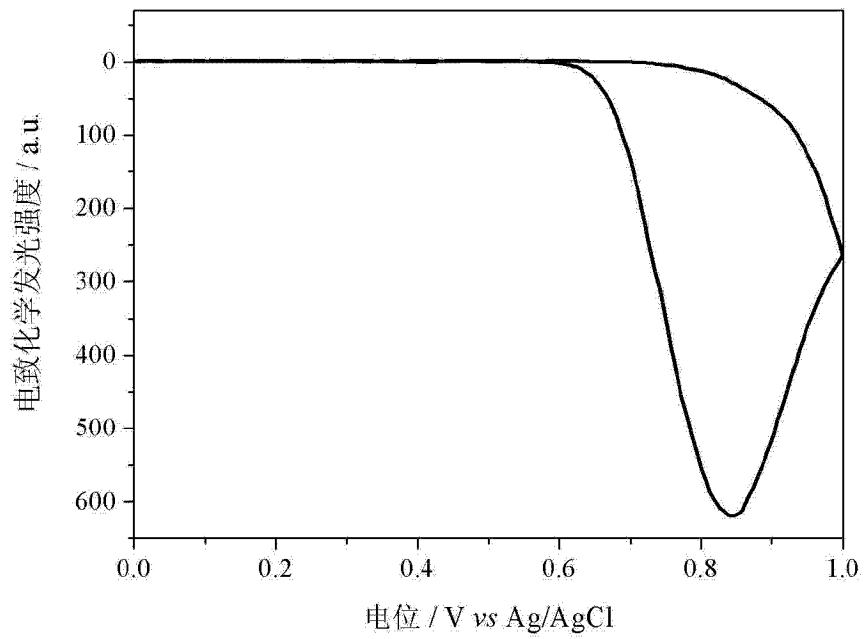


图 12

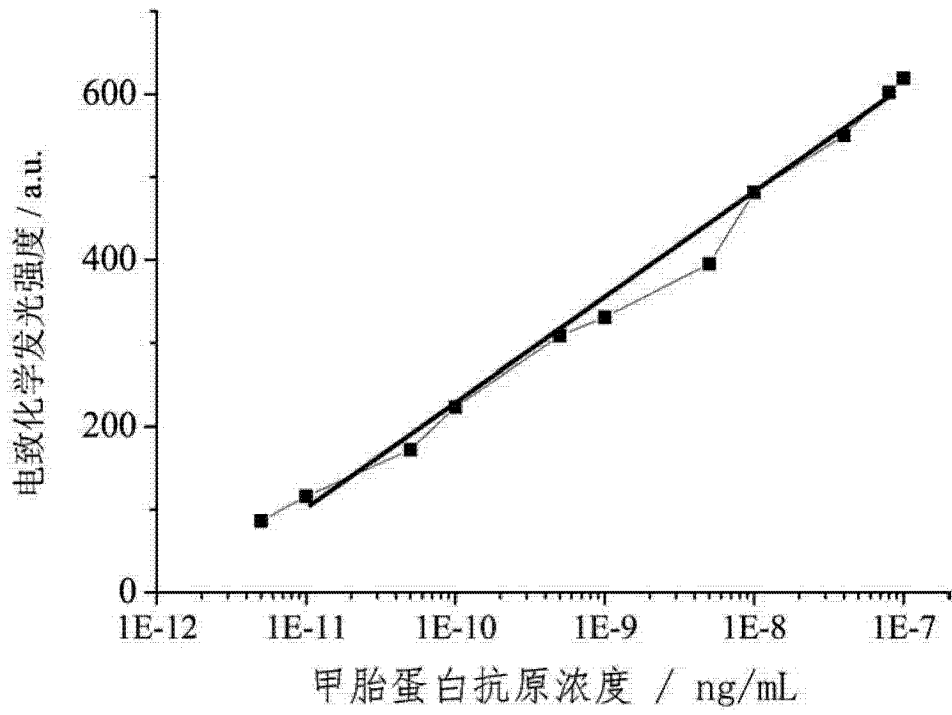


图 13

专利名称(译)	一种近红外的电致化学发光免疫检测方法		
公开(公告)号	CN102749452A	公开(公告)日	2012-10-24
申请号	CN201210262285.7	申请日	2012-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	山东大学		
申请(专利权)人(译)	山东大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东大学		
[标]发明人	邹桂征 刘淑风 梁国栋		
发明人	邹桂征 刘淑风 梁国栋		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N21/76		
其他公开文献	CN102749452B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种近红外的电致化学发光免疫检测方法，属于电致化学发光免疫检测技术领域；包括步骤（1）近红外量子点与二抗的连接、步骤（2）夹心免疫反应并制得电致化学发光免疫传感器和步骤（3）用电致化学发光免疫传感器进行免疫检测三个步骤；本发明步骤简单，操作性好，能够有效地避免潜在的电化学过程干扰和生物组织背景光干扰，具有较高的灵敏度和精确性，重复性好。

