



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108956588 A

(43)申请公布日 2018.12.07

(21)申请号 201810745154.1

G01N 33/569(2006.01)

(22)申请日 2018.07.09

(71)申请人 东南大学

地址 210088 江苏省南京市江宁区东南大学路2号

(72)发明人 丁收年 梁秀丽 刘金霞 左家莹 赵春芹 徐来弟 朱凯迪 陆天

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所 (普通合伙) 32204

代理人 吴飞

(51)Int.Cl.

G01N 21/76(2006.01)

G01N 27/30(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

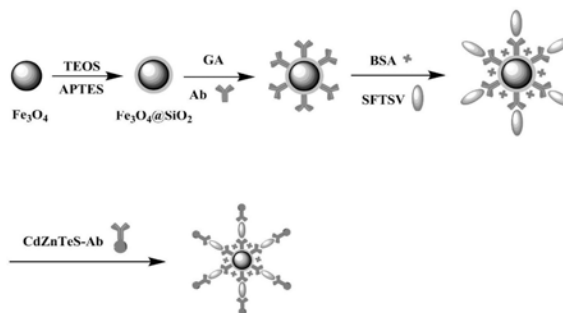
权利要求书2页 说明书8页 附图4页

(54)发明名称

电化学发光免疫传感器用于制备严重发热伴血小板减少综合症病毒检测试剂盒的应用

(57)摘要

本发明公开一种电化学发光免疫传感器用于制备严重发热伴血小板减少综合症病毒检测试剂盒的应用, SFTSV检测试剂盒包括SFTSV的电化学发光免疫传感器, 该应用具体为: 以SFTSV为抗原, 制备CdZnTeS量子点标记的SFTSV的电化学发光免疫传感器。该SFTSV的电化学发光免疫传感器为以Fe₃O₄@SiO₂为磁性载体的三明治型夹心免疫传感器, 包括表面修饰有SFTSV一抗的Fe₃O₄@SiO₂、CdZnTeS量子点标记的SFTSV二抗、以及通过抗原-抗体间相互作用与两者分别连接的抗原SFTSV; 表面修饰有SFTSV一抗的Fe₃O₄@SiO₂的非特异性结合位点被封闭; 该免疫传感器灵敏度高, 且具有优异的稳定性、重现性和特异性。将该SFTSV电化学发光免疫传感用于SFTSV浓度的检测, 简便、快速, 且具有检测限低、灵敏度高、特异性好等优点。



1. 基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器用于制备SFTSV检测试剂盒的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,以SFTSV为抗原,制备CdZnTeS量子点标记的SFTSV的电化学发光免疫传感器。
3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於,所述SFTSV的电化学发光免疫传感器为以 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 为磁性载体的三明治型夹心免疫传感器,包括表面修饰有SFTSV一抗的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 、CdZnTeS量子点标记的SFTSV二抗、以及通过抗原-抗体间相互作用与两者分别连接的SFTSV抗原;所述表面修饰有SFTSV一抗的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 的非特异性结合位点被封闭。
4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在於,所述SFTSV抗原为SFTSV核蛋白抗原,SFTSV一抗、SFTSV二抗为单克隆抗体,该单克隆抗体为Mab 0005、Mab 0004、Mab 0003、Mab 0007中的一种。
5. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於,所述SFTSV的电化学发光免疫传感器的制备方法包括如下步骤:
 - 1) 制备表面修饰有SFTSV一抗的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$,封闭其非特异性结合位点;
 - 2) 制备CdZnTeS量子点标记的SFTSV二抗;
 - 3) 将表面修饰有SFTSV一抗的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 与CdZnTeS量子点标记的SFTSV二抗与SFTSV抗原连接。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在於,步骤1)中,先将戊二醛与表面氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 反应,得到戊二醛功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$;然后使SFTSV一抗与戊二醛功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 反应,通过交联作用获得表面修饰有SFTSV一抗的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$;最后用牛血清白蛋白封闭其非特异性结合位点。
7. 根据权利要求5所述应用,其特征在於,步骤2)中,先将CdZnTeS量子点表面的羧基活化,然后将SFTSV的二抗与表面羧基被活化的CdZnTeS量子点反应,制得CdZnTeS量子点标记的SFTSV二抗。
8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在於,采用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐活化CdZnTeS量子点表面的羧基。
9. 根据权利要求5所述的应用,其特征在於,所述CdZnTeS量子点的制备步骤包括:
 - (1) 将0.8~1.5g $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 和1.0~1.5g L-半胱氨酸溶于150mL超纯水中,pH调节至10~11,得Cd前驱体溶液;
 - (2) 将0.1~0.2g碲粉加入30mL超纯水中并通 N_2 10min,加入0.1~0.2g NaHB_4 ,80℃下冷凝回流30~40min,得NaHTe前驱体;
 - (3) 将20mL NaHTe前驱体溶液用注射器注入 N_2 氛围下的Cd前驱体溶液中,于110℃下加热30min;
 - (4) 将0.1~0.15g ZnCl_2 和0.15~0.25g L-半胱氨酸溶于30mL超纯水中,制得ZnS前驱体溶液,将ZnS前驱体溶液全部加入到(3)中的混合液中,继续于110℃下冷凝回流6~7h,得到CdZnTeS量子点。
10. 根据权利要求5所述的应用,其特征在於,步骤3)中,先将步骤1)制得的非特异性结合位点被封闭的表面修饰有SFTSV一抗的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 与含有SFTSV抗原的PBS缓冲液于35~37℃振荡1~2h,洗涤除去未特异性结合的SFTSV;然后将获得的产物与步骤2)制得的CdZnTeS量子点标记的SFTSV二抗混合,并于35~37℃孵育1~2h,洗涤,得到SFTSV电化学发

光免疫传感器。

电化学发光免疫传感器用于制备严重发热伴血小板减少综合症病毒检测试剂盒的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器的新应用,特别涉及一种基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器用于制备严重发热伴血小板减少综合症病毒检测试剂盒的应用。

背景技术

[0002] 严重发热伴血小板减少综合症病毒,(severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus,简称SFTSV),它能够引起发热和血小板减少等症状,早期致死率高达30%左右。因此,对于SFTSV的检测具有重要意义。目前,有关SFTSV的检测方法非常少;而电化学发光由于背景信号低、灵敏度高、仪器操作简单等优点而成为一种备受青睐的检测手段。

发明内容

[0003] 发明目的:针对现有技术中缺乏有效的严重发热伴血小板减少综合症病毒(以下简称为SFTSV)检测方法的问题,本发明提供一种基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器用于制备SFTSV检测试剂盒的应用,该SFTSV检测试剂盒可用于SFTSV检测。

[0004] 技术方案:本发明所述的基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器用于制备SFTSV检测试剂盒的应用;SFTSV检测试剂盒包括SFTSV的电化学发光免疫传感器,上述应用具体为:以SFTSV为抗原,制备CdZnTeS量子点标记的SFTSV的电化学发光免疫传感器。

[0005] 其中,SFTSV的电化学发光免疫传感器是以 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 为磁性载体的三明治型夹心免疫传感器,包括表面修饰有SFTSV一抗的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 、CdZnTeS量子点标记的SFTSV二抗、以及通过抗原-抗体间相互作用与两者分别连接的SFTSV抗原;其中,表面修饰有SFTSV一抗的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 的非特异性结合位点被封闭。 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 为 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 。

[0006] 其中,SFTSV抗原为SFTSV核蛋白抗原(NP),SFTSV一抗、SFTSV二抗为单克隆抗体,该单克隆抗体为Mab 0005、Mab 0004、Mab 0003、Mab 0007中的一种。

[0007] 该SFTSV的电化学发光免疫传感器的制备方法包括如下步骤:

[0008] 1) 制备表面修饰有SFTSV一抗的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$,封闭其非特异性结合位点;

[0009] 2) 制备CdZnTeS量子点标记的SFTSV二抗;

[0010] 3) 将表面修饰有SFTSV一抗的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 与CdZnTeS量子点标记的SFTSV二抗与SFTSV抗原连接。

[0011] 具体的,步骤1)中,先将戊二醛与表面氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 反应,得到戊二醛功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$;然后使SFTSV一抗与戊二醛功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 反应,通过交联作用获得表面修饰有SFTSV一抗的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$;最后用牛血清白蛋白封闭其非特异性结合位点。

[0012] 其中,表面氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 的制备方法为:

[0013] 0.5~0.8g FeCl_3 和0.2~0.3g柠檬酸三钠溶于20~30mL乙二醇,在机械搅拌下加

入1.5~1.8g NaAc,剧烈搅拌30min。随后,将混合物密封在高压反应釜中,于200℃下加热10h。将所得黑色产品用水和乙醇的混合液洗涤数次,干燥,得 Fe_3O_4 。将0.05~0.07g Fe_3O_4 超声分散于40mL乙醇和5mL水的混合液中,用稀氨水调pH至9.0,搅拌下加入0.3~0.5mL原硅酸四乙酯(TEOS)。反应3h后,加入0.15~0.2mL (3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(APTES),继续搅拌8h。最后,产物洗涤并干燥,得表面氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 。

[0014] 上述步骤2)中,可先将CdZnTeS量子点表面的羧基活化,然后将SFTSV的二抗与表面羧基被活化的CdZnTeS量子点反应,制得CdZnTeS量子点标记的SFTSV二抗。优选的,可采用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐活化CdZnTeS量子点表面的羧基。

[0015] 其中,CdZnTeS量子点的制备步骤包括:

[0016] (1)将0.8~1.5g $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 和1.0~1.5g L-半胱氨酸溶于150mL超纯水中,pH调节至10~11,得Cd前驱体溶液;

[0017] (2)将0.1~0.2g碲粉加入30mL超纯水中并通 N_2 10min,加入0.1~0.2g NaHB_4 ,80℃下冷凝回流30~40min,得NaHTe前驱体;

[0018] (3)将20mL NaHTe前驱体溶液用注射器注入 N_2 氛围下的Cd前驱体溶液中,于110℃下加热30min;

[0019] (4)将0.1~0.15g ZnCl_2 和0.15~0.25g L-半胱氨酸溶于30mL超纯水中,制得ZnS前驱体溶液,将ZnS前驱体溶液全部加入到(3)中的混合液中,继续于110℃下冷凝回流6~7h,得到CdZnTeS量子点。

[0020] 作为优选的,上述步骤3)中,先将步骤1)制得的非特异性结合位点被封闭的表面修饰有SFTSV一抗的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 与含有SFTSV的PBS缓冲液于35~37℃振荡1~2h,洗涤除去未特异性结合的SFTSV;然后将获得的产物与步骤2)制得的CdZnTeS量子点标记的SFTSV二抗混合,并于35~37℃孵育1~2h,洗涤,得到SFTSV电化学发光免疫传感器。

[0021] 利用该SFTSV的电化学发光免疫传感器检测SFTSV浓度的方法为:构建含已知浓度SFTSV的电化学发光免疫传感器,在以SFTSV的电化学发光免疫传感器修饰的玻碳电极为工作电极的三电极体系中,以 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 为共反应试剂,借助电化学发光分析仪记录电化学发光信号,构建电化学发光强度与SFTSV浓度的线性关系,拟合线性方程;构建含待测浓度SFTSV的电化学发光免疫传感器,在同样条件下采集电化学发光信号,由线性方程获得SFTSV的待测浓度。上述三电极体系中,铂丝电极为对电极,饱和甘汞电极为参比电极。检测条件优选为:光电倍增管的高压设为800V,电位窗口设置为-1.6~0V,扫描速度为 100mV s^{-1} 。

[0022] 有益效果:与现有技术相比,本发明的优点在于:(1)本发明基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器用于制备SFTSV检测试剂盒,为SFTSV检测提供了新思路,该SFTSV检测试剂盒可简便、快速地检测出SFTSV的浓度,且检测限低、灵敏度高,对SFTSV的浓度检测范围为0.01fg/mL~1ng/mL,检测限为0.003fg/mL;(2)本发明制备的SFTSV检测试剂盒包括以SFTSV为抗原制得的CdZnTeS量子点标记的电化学发光免疫传感器,一方面,借助磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 为载体能够实现快速的分离,消除非特异性吸附,另一方面,CdZnTeS量子点纳米材料具有较高的电化学发光效率,可大幅度地提高传感器的灵敏度;而且,该SFTSV的电化学发光免疫传感器具备优异的稳定性、重现性和特异性,能够较好地对SFTSV进行检测评估。

附图说明

- [0023] 图1为本发明中制备三明治型SFTSV电化学发光免疫传感器的构建机理图；
- [0024] 图2为实施例1制备的CdZnTeS量子点的透射电镜图；
- [0025] 图3为实施例1制备的CdZnTeS量子点的紫外吸收光谱和荧光发射光谱，插图图为CdZnTeS量子点在紫外灯下的荧光照片；
- [0026] 图4为实施例1制备的Fe₃O₄@SiO₂的透射电镜图；
- [0027] 图5A为实施例1中采用不同浓度SFTSV制备的电化学发光免疫传感器的电化学发光响应，反应溶液为含50mM K₂S₂O₈的0.1M PBS (pH 7.4)；
- [0028] 图5B为实施例1中制备的不同浓度的SFTSV电化学发光免疫传感器电化学发光强度和对应浓度之间的线性关系；
- [0029] 图6为实施例2中SFTSV电化学发光免疫传感器存放不同时间后修饰到玻碳电极上的电化学发光强度；
- [0030] 图7为实施例3中将SFTSV电化学发光免疫传感器修饰到不同玻碳电极上的电化学发光强度；
- [0031] 图8为实施例4中加入10000倍浓度的不同干扰物后制得的SFTSV电化学发光免疫传感器的电化学发光强度。

具体实施方式

- [0032] 下面结合附图对本发明的技术方案作进一步说明。
- [0033] 本发明的基于CdZnTeS量子点的电化学发光免疫传感器用于制备SFTSV检测试剂盒的应用，SFTSV检测试剂盒包括SFTSV的电化学发光免疫传感器，上述应用具体为：以SFTSV为抗原，制备CdZnTeS量子点标记的SFTSV的电化学发光免疫传感器。
- [0034] 该SFTSV的电化学发光免疫传感器，是以Fe₃O₄@SiO₂为磁性载体的三明治型夹心免疫传感器，如图1，包括表面修饰有SFTSV一抗的Fe₃O₄@SiO₂（其非特异性结合位点被封闭）、CdZnTeS量子点标记的SFTSV二抗，两者分别通过抗原-抗体间相互作用与抗原SFTSV连接。其中，Fe₃O₄@SiO₂为SiO₂包覆的Fe₃O₄。
- [0035] SFTSV抗原包括SFTSV核蛋白抗原（NP）、SFTSV X蛋白抗原（GC）和SFTSV X蛋白抗原（GN）三种，本发明中，SFTSV的电化学发光免疫传感器中的SFTSV抗原为SFTSV核蛋白抗原（NP）。SFTSV的一抗和二抗均为单克隆抗体，其可为Mab 0005、Mab 0004、Mab 0003、Mab 0007等，实施例中以单克隆抗体Mab 0005为例，对本发明的技术方案进行说明。
- [0036] 试剂和仪器：CdCl₂·2.5H₂O，FeCl₃·6H₂O，Te粉，NaBH₄，乙二醇，柠檬酸三钠和醋酸钠（NaAc）购买于国药集团化学试剂有限公司；L-半胱氨酸，APTES，TEOS和戊二醛（GA）购买于上海阿拉丁生化科技股份有限公司；EDC购买于萨恩化学技术有限公司，ZnCl₂购买于西龙化工有限公司，BSA购自于生工生物工程股份有限公司，SFTSV核蛋白抗原（NP）及其单克隆抗体Mab 0005由江苏省疾病预防控制中心提供，MPI-M型电化学发光分析仪购自于西安瑞迈分析仪器有限公司。
- [0037] 实施例1
- [0038] 制备SFTSV的电化学发光免疫传感器，并使用该免疫传感器对SFTSV进行检测，验证本发明的技术方案的可实现性。
- [0039] 步骤如下：

[0040] (1) 合成CdZnTeS量子点

[0041] (a) 0.8g $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 和1.0g L-半胱氨酸溶于150mL超纯水中,用1M NaOH调节pH至10,得Cd前驱体溶液;

[0042] (b) 将0.1g碲粉加入30mL超纯水中,通 N_2 10min后,快速加入0.1g NaHB_4 ,80℃下回流30min,得NaHTe前驱体;

[0043] (c) 将20mL NaHTe前驱体溶液用注射器注入 N_2 氛围下的Cd前驱体溶液中,于110℃下加热30min;

[0044] (d) 将0.1g ZnCl_2 和0.15g L-半胱氨酸溶于30mL超纯水中,制得ZnS前驱体溶液,将ZnS前驱体溶液全部加入到(c)中的混合液中,继续于110℃下冷凝回流7h,得到CdZnTeS量子点,其TEM表征图如图2,紫外吸收光谱和荧光发射光谱如图3。

[0045] (2) CdZnTeS-Mab 0005溶液的制备

[0046] 将75 μL 新制的EDC水溶液(浓度为4.2mg/mL)加入到步骤(1)制得的CdZnTeS量子点溶液(500 μL ,5mg/mL)中活化量子点表面的羧基。然后,加入1mLMab 0005溶液(浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$),室温下暗处振荡反应2小时。50KD超滤管用于除去未连接的量子点和副产物。最后,于4℃储存,备用。

[0047] (3) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -Mab 0005溶液的制备

[0048] 氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 合成:

[0049] 0.5g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和0.2g柠檬酸三钠溶于20mL乙二醇,在机械搅拌下加入1.5g NaAc,剧烈搅拌30min。将混合物密封在高压反应釜中,在200℃下加热10h。所得黑色产品用去离子水和乙醇清洗,干燥,得 Fe_3O_4 。将0.05g上述制备的 Fe_3O_4 超声分散于40mL乙醇和5mL超纯水的混合液中,用稀氨水调pH至9.0,搅拌下加入0.3mL TEOS。反应3h后,加入0.15mL APTES,继续搅拌8h。最后的产物洗涤并干燥,得表面氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$,其TEM表征如图4。

[0050] 随后,将10mg上述氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 溶于7.5mL超纯水中,加入2.5mL戊二醛(2.5wt%)溶液,室温下搅拌6小时。通过磁性分离,用10mM PBS (pH 7.4)洗涤以除去过量的戊二醛,即得戊二醛功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 。将500 μL Mab 0005溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)加入到500 μL 戊二醛功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 分散液中,震荡反应1小时,用10mM PBS (pH 7.4)洗涤以除去多余的Mab 0005。然后,将 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -Mab 0005在含BSA的PBS溶液(150 μL ,1.0wt%)中温育30min以封闭非特异性结合位点。洗涤,即得BSA封闭的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -Mab 0005,简称为 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -Mab 0005/BSA。将 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -Mab 0005/BSA重新分散于500 μL PBS中,4℃保存,备用。

[0051] (4) 电化学发光免疫传感器的构建

[0052] 将50 μL 步骤(3)制得的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -Mab 0005/BSA溶液分别加入到含不同浓度SFTSV核蛋白抗原的50 μL PBS溶液中,SFTSV核蛋白抗原的浓度分别为0.01fg/mL、0.1fg/mL、1fg/mL、10fg/mL、100fg/mL、1pg/mL、10pg/mL、100pg/mL和1ng/mL,在37℃振荡反应1小时。用10mM PBS (pH 7.4)洗涤抗原-抗体复合物以除去物理吸附的SFTSV核蛋白抗原。然后,将步骤(2)制得的CdZnTeS-Mab 0005与上述抗原-抗体复合物混合,于37℃孵育1h以构建免疫传感器。最后,洗涤得到的免疫传感器以除去未结合的CdZnTeS-Mab 0005,再分散在100 μL PBS (10mM,pH 7.4)溶液中,4℃下储存备用。

[0053] (5) 不同浓度的SFTSV的检测

[0054] 将10 μL 步骤(4)构建的SFTSV的免疫传感器滴加至玻碳电极表面,室温干燥。在含

50mM $K_2S_2O_8$ 的PBS溶液中,使用电化学发光分析仪在三电极体系中采集电化学发光信号,结果如图5A~5B,其中,图5A为不同浓度的SFTSV电化学发光免疫传感器的ECL响应,图5B为电化学发光强度与SFTSV对数浓度之间的线性关系图,a-i浓度分别为:0.01fg/mL,0.1fg/mL,1fg/mL,10fg/mL,100fg/mL,1pg/mL,10pg/mL,100pg/mL,1ng/mL;由图5B可知,电化学发光强度与SFTSV浓度的对数值之间存在良好的线性关系,线性回归方程为 $I=1876.871\lg C_{SFTSV}+15528.27$,相关系数为0.989;可检测的线性范围为0.01fg/mL~1ng/mL,检测限为0.003fg/mL。

[0055] 在此基础上,可通过本发明的方法构建未知浓度的三明治型SFTSV电化学发光免疫传感器,采集待测SFTSV免疫传感器的电化学发光信号,通过上述线性关系分析得出待测SFTSV的浓度,从而实现未知SFTSV浓度的检测。

[0056] 实施例2

[0057] 本实施例评估SFTSV电化学发光免疫传感器的稳定性,良好的稳定性是免疫传感器性能的评判指标之一。

[0058] 步骤如下:

[0059] (1) 合成CdZnTeS量子点:

[0060] (a) 1g $CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$ 和1g L-半胱氨酸溶于150mL超纯水中,用1M NaOH调节pH至10,得Cd前驱体溶液;

[0061] (b) 将0.15g碲粉加入30mL超纯水中,通 N_2 10min后,快速加入0.2g $NaHB_4$,80°C下回流30min,得NaHTe前驱体;

[0062] (c) 将20mL NaHTe前驱体溶液用注射器注入 N_2 氛围下的Cd前驱体溶液中,于110°C下加热30min;

[0063] (d) 将0.15g $ZnCl_2$ 和0.15g L-半胱氨酸溶于30mL超纯水中,制得ZnS前驱体溶液,将ZnS前驱体溶液全部加入到(c)中的混合液中,继续于110°C下冷凝回流7h,得到CdZnTeS量子点。其形貌及电化学发光性能与实施例1中相近。

[0064] (2) CdZnTeS-Mab 0005溶液的制备

[0065] 将75 μ L新制的EDC水溶液(浓度为4.2mg/mL)加入到步骤(1)制得的CdZnTeS量子点溶液(500 μ L,5mg/mL)中活化量子点表面的羧基。然后,加入1mL Mab 0005溶液(浓度为10 μ g/mL),室温下暗处振荡反应2小时。50KD超滤管用于除去未连接的量子点和副产物。最后,于4°C储存,备用。

[0066] (3) $Fe_3O_4@SiO_2$ -Mab 0005溶液的制备

[0067] 氨基化的 $Fe_3O_4@SiO_2$ 合成:

[0068] 0.5g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 和0.2g柠檬酸三钠溶于20mL乙二醇,在机械搅拌下加入1.5gNaAc,剧烈搅拌30min。将混合物密封在高压反应釜中,在200°C下加热10h。所得黑色产品用去离子水和乙醇清洗,干燥,得 Fe_3O_4 。将0.05g上述制备的 Fe_3O_4 超声分散于40mL乙醇和5mL超纯水的混合液中,用稀氨水调pH至9.0,搅拌下加入0.3mL TEOS。反应3h后,加入0.2mL APTES,继续搅拌8h。最后的产物洗涤并干燥,得表面氨基化的 $Fe_3O_4@SiO_2$,其形貌与实施例1中相近。

[0069] 将10mg上述氨基化的 $Fe_3O_4@SiO_2$ 溶于7.5mL超纯水中,加入2.5mL戊二醛(2.5wt%)溶液,室温下搅拌6小时。通过磁性分离,用10mM PBS (pH 7.4)洗涤以除去过量的戊二醛,即

得戊二醛功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 。将500 μL Mab 0005溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)加入到500 μL 戊二醛功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 分散液中,震荡反应1h,用10mM PBS(pH 7.4)洗涤以除去多余的Mab 0005。然后,将 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -Mab 0005在含BSA的PBS溶液(150 μL ,1.0wt%)中温育30min以封闭非特异性结合位点。洗涤,即得BSA封闭的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -Mab 0005,简称为 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -Mab 0005/BSA。将 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -Mab 0005/BSA重新分散于500 μL PBS中,4 $^\circ\text{C}$ 保存,备用。

[0070] (4) 电化学发光免疫传感器的构建

[0071] 将50 μL 步骤(3)制得的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -Mab 0005/BSA溶液加入到含100fg/mL SFTSV核蛋白抗原的50 μL PBS溶液中,在37 $^\circ\text{C}$ 振荡反应1小时。用10mM PBS(pH 7.4)洗涤抗原-抗体复合物以除去物理吸附的SFTSV核蛋白抗原。然后,将步骤(2)制得的CdZnTeS-Mab 0005与上述抗原-抗体复合物混合,于37 $^\circ\text{C}$ 孵育1h以构建免疫传感器。最后,洗涤得到的免疫传感器以除去未结合的CdZnTeS-Mab 0005,再分散在100 μL PBS(10mM,pH 7.4)溶液中,4 $^\circ\text{C}$ 下储存备用。

[0072] (5) 电化学发光免疫传感器的稳定性评估

[0073] 将步骤(4)中制得的SFTSV的电化学发光免疫传感器在PBS(10mM,pH 7.4)溶液中存放,每天使用电化学发光分析仪对SFTSV的电化学发光免疫传感器测试一次,一周后,可检测到的信号仍旧能够达到最初响应值的89.2%,如图6;说明本发明所构建的SFTSV的电化学发光免疫传感器具有优越的稳定性。

[0074] 实施例3

[0075] 本实施例对SFTSV电化学发光免疫传感器进行重现性评估,结果能够得到重现才能表明得到的数据具有一定的可靠性。

[0076] 步骤如下:

[0077] (1) 合成CdZnTeS量子点:

[0078] (a) 1.2g $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 和1.2g L-半胱氨酸溶于150mL超纯水中,用1M NaOH调节pH至10,得Cd前驱体溶液;

[0079] (b) 将0.18g碲粉加入30mL超纯水中,通 N_2 10min后,快速加入0.2g NaHB_4 ,80 $^\circ\text{C}$ 下回流30min,得NaHTe前驱体;

[0080] (c) 将20mL NaHTe前驱体溶液用注射器注入 N_2 氛围下的Cd前驱体溶液中,于110 $^\circ\text{C}$ 下加热30min;

[0081] (d) 将0.18g ZnCl_2 和0.22g L-半胱氨酸溶于30mL超纯水中,制得ZnS前驱体溶液,将ZnS前驱体溶液全部加入到(c)中的混合液中,继续于110 $^\circ\text{C}$ 下冷凝回流7h,得到CdZnTeS量子点。其形貌及电化学发光性能与实施例1中相近。

[0082] (2) CdZnTeS-Mab 0005溶液的制备

[0083] 将75 μL 新制的EDC水溶液(浓度为4.2mg/mL)加入到步骤(1)制得的CdZnTeS量子点溶液(500 μL ,5mg/mL)中活化量子点表面的羧基。然后,加入1mL Mab 0005溶液(浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$),室温下暗处振荡反应2小时。50KD超滤管用于除去未连接的量子点和副产物。最后,于4 $^\circ\text{C}$ 储存,备用。

[0084] (3) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -Mab 0005溶液的制备

[0085] 氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 合成:

[0086] 0.5g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和0.2g柠檬酸三钠溶于20mL乙二醇,在机械搅拌下加入

1.5gNaAc,剧烈搅拌30min。将混合物密封在高压反应釜中,在200℃下加热10h。所得黑色产品用去离子水和乙醇清洗,干燥,得 Fe_3O_4 。将0.05g上述制备的 Fe_3O_4 超声分散于40mL乙醇和5mL超纯水的混合液中,用稀氨水调pH至9.0,搅拌下加入0.3mLTEOS。反应3h后,加入0.2mL APTES,继续搅拌8h。最后的产物洗涤并干燥,得表面氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$,其形貌与实施例1中相近。

[0087] 将10mg上述氨基化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 溶于7.5mL超纯水中,加入2.5mL戊二醛(2.5wt%)溶液,室温下搅拌6小时。通过磁性分离,用10mM PBS (pH 7.4) 洗涤以除去过量的戊二醛,即得戊二醛功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 。将500 μL Mab 0005溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)加入到500 μL 戊二醛功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 分散液中,震荡反应1h,用10mM PBS (pH 7.4) 洗涤以除去多余的Mab 0005。然后,将 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ -Mab 0005在含BSA的PBS溶液(150 μL ,1.0wt%)中温育30min以封闭非特异性结合位点。洗涤,即得BSA封闭的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ -Mab 0005,简写为 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ -Mab 0005/BSA。将 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ -Mab 0005/BSA重新分散于500 μL PBS中,4℃保存,备用。

[0088] (4) 电化学发光免疫传感器的构建

[0089] 将50 μL 步骤(3)制得的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ -Mab 0005/BSA溶液加入到含100fg/mL SFTSV核蛋白抗原的50 μL PBS溶液中,在37℃振荡反应1小时。用10mM PBS (pH 7.4) 洗涤抗原-抗体复合物以除去物理吸附的SFTSV核蛋白抗原。然后,将步骤(2)制得的CdZnTeS-Mab 0005与上述抗原-抗体复合物混合,于37℃孵育1h以构建免疫传感器。最后,洗涤得到的免疫传感器以除去未结合的CdZnTeS-Mab 0005,再分散在100 μL PBS(10mM,pH 7.4)溶液中,4℃下储存备用。

[0090] (5) 电化学发光免疫传感器的重现性评估

[0091] 将步骤(4)中制得的SFTSV电化学发光免疫传感器修饰到不同的玻碳电极上进行电化学发光分析,如图7,经计算,各组数据中电化学发光强度的相对标准偏差为2.36%,表明所构建的SFTSV电化学发光免疫传感器重现性良好。

[0092] 实施例4

[0093] 本实施例对SFTSV电化学发光免疫传感器进行特异性评估,只有当免疫传感器对特定抗原响应而其他干扰物无响应时,所构建的免疫传感器才具有应用价值。

[0094] 步骤如下:

[0095] (1) 合成CdZnTeS量子点:

[0096] (a) 1.5g $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 和1.5g L-半胱氨酸溶于150mL超纯水中,用1M NaOH调节pH至10,得Cd前驱体溶液;

[0097] (b) 将0.2g碲粉加入30mL超纯水中,通 N_2 10min后,快速加入0.2g NaHB_4 ,80℃下回流30min,得NaHTe前驱体;

[0098] (c) 将20mL NaHTe前驱体溶液用注射器注入 N_2 氛围下的Cd前驱体溶液中,于110℃下加热30min;

[0099] (d) 将0.15g ZnCl_2 和0.25g L-半胱氨酸溶于30mL超纯水中,制得ZnS前驱体溶液,将ZnS前驱体溶液全部加入到(c)中的混合液中,继续于110℃下冷凝回流7h,得到CdZnTeS量子点。其形貌及电化学发光性能与实施例1中相近。

[0100] (2) CdZnTeS-Mab 0005溶液的制备

[0101] 将75 μL 新制的EDC水溶液(浓度为4.2mg/mL)加入到步骤(1)制得的CdZnTeS量子点

溶液(500 μ L, 5mg/mL)中活化量子点表面的羧基。然后,加入1mL Mab 0005溶液(浓度为10 μ g/mL),室温下暗处振荡反应2小时。50KD超滤管用于除去未连接的量子点和副产物。最后,于4 $^{\circ}$ C储存,备用。

[0102] (3) Fe₃O₄@SiO₂-Mab 0005溶液的制备

[0103] 氨基化的Fe₃O₄@SiO₂合成:

[0104] 0.5g FeCl₃·6H₂O和0.2g柠檬酸三钠溶于20mL乙二醇,在机械搅拌下加入1.5g NaAc,剧烈搅拌30min。将混合物密封在高压反应釜中,在200 $^{\circ}$ C下加热10h。所得黑色产品用去离子水和乙醇清洗,干燥,得Fe₃O₄。将0.05g上述制备的Fe₃O₄超声分散于40mL乙醇和5mL超纯水的混合液中,用稀氨水调pH至9.0,搅拌下加入0.3mL TEOS。反应3h后,加入0.2mL APTES,继续搅拌8h。最后的产物洗涤并干燥,得表面氨基化的Fe₃O₄@SiO₂,其形貌与实施例1中相近。

[0105] 将10mg上述氨基化的Fe₃O₄@SiO₂溶于7.5mL超纯水中,加入2.5mL戊二醛(2.5wt%)溶液,室温下搅拌6小时。通过磁性分离,用10mM PBS (pH 7.4)洗涤以除去过量的戊二醛,即得戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂。将500 μ L Mab 0005溶液(10 μ g/mL)加入到500 μ L戊二醛功能化的Fe₃O₄@SiO₂分散液中,震荡反应1h,用10mM PBS (pH 7.4)洗涤以除去多余的Mab 0005。然后,将Fe₃O₄@SiO₂-Mab 0005在含BSA的PBS溶液(150 μ L, 1.0wt%)中温育30min以封闭非特异性结合位点。洗涤,即得BSA封闭的Fe₃O₄@SiO₂-Mab 0005,简写为Fe₃O₄@SiO₂-Mab 0005/BSA。将Fe₃O₄@SiO₂-Mab 0005/BSA重新分散于500 μ L PBS中,4 $^{\circ}$ C保存,备用。

[0106] (4) 电化学发光免疫传感器的构建

[0107] 将50 μ L步骤(3)制得的Fe₃O₄@SiO₂-Mab 0005/BSA溶液加入到含100fg/mL SFTSV核蛋白抗原的50 μ L PBS溶液中,在37 $^{\circ}$ C振荡反应1小时。用10mM PBS (pH 7.4)洗涤抗原-抗体复合物以除去物理吸附的SFTSV核蛋白抗原。然后,将步骤(2)制得的CdZnTeS-Mab 0005与上述抗原-抗体复合物混合,于37 $^{\circ}$ C孵育1h以构建免疫传感器。最后,洗涤得到的免疫传感器以除去未结合的CdZnTeS-Mab 0005,再分散在100 μ L PBS (10mM, pH 7.4)溶液中,4 $^{\circ}$ C下储存备用。

[0108] (5) 电化学发光免疫传感器的特异性评估

[0109] 在上述步骤(4)中,将100fg/mL SFTSV核蛋白抗原和1ng/mL葡萄糖(Glu)、AFP、CEA和BSA一起加入到Fe₃O₄@SiO₂-Mab 0005/BSA溶液中进行孵育。使用电化学发光分析仪检测各传感器的电化学发光强度,如图8,可以看出,10000倍浓度的干扰物对SFTSV免疫传感器的干扰较小,相对标准偏差仅为3.09%,可忽略不计,表明本发明制备的SFTSV电化学发光免疫传感器具有优越的特异性。

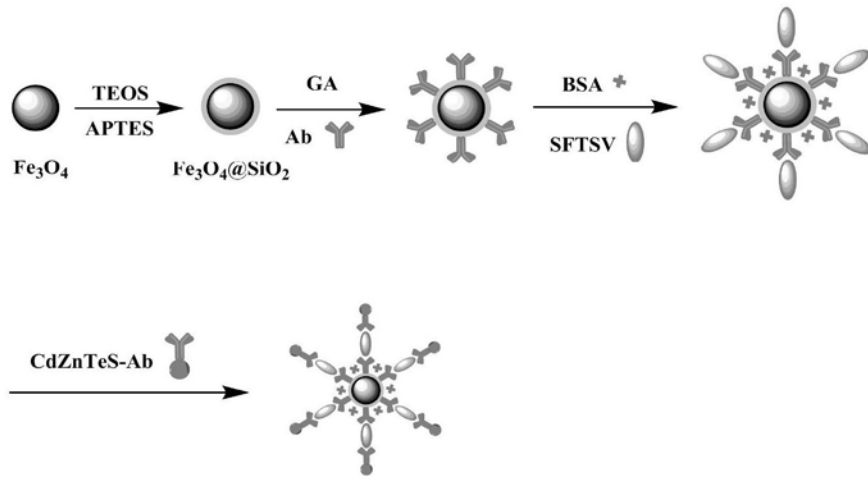


图1

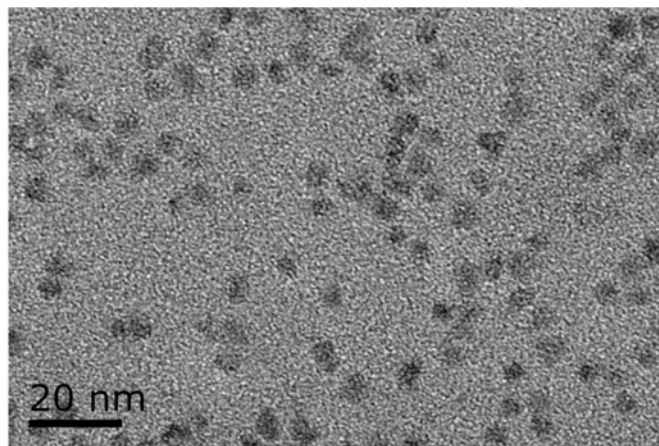


图2

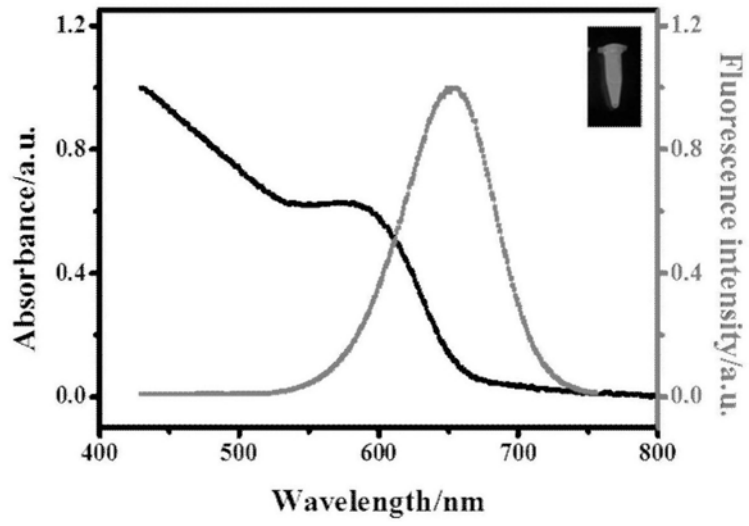


图3

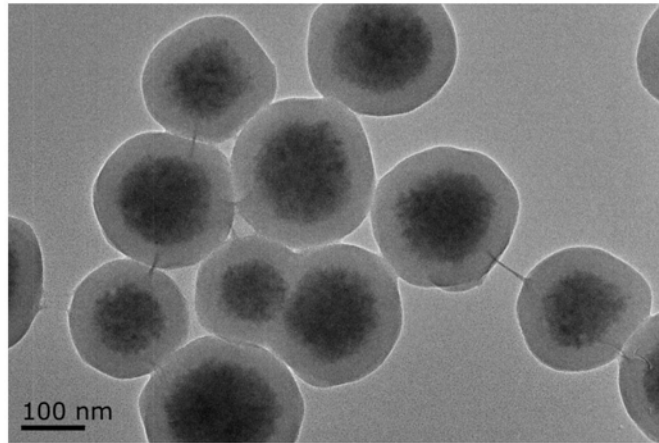


图4

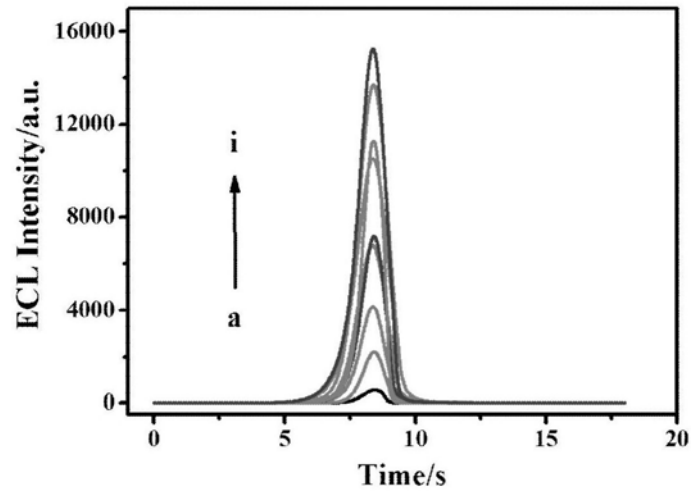


图5A

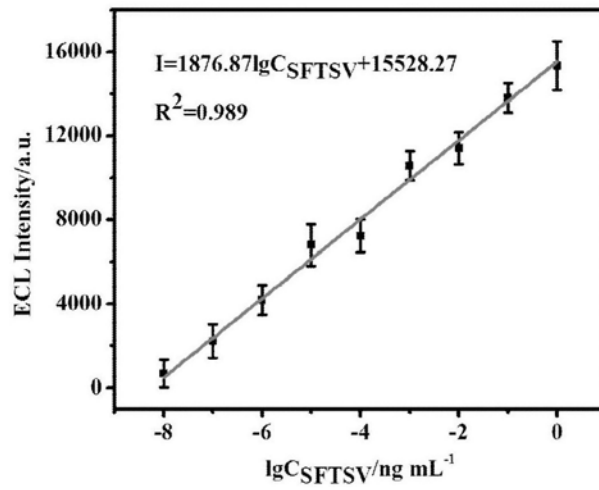


图5B

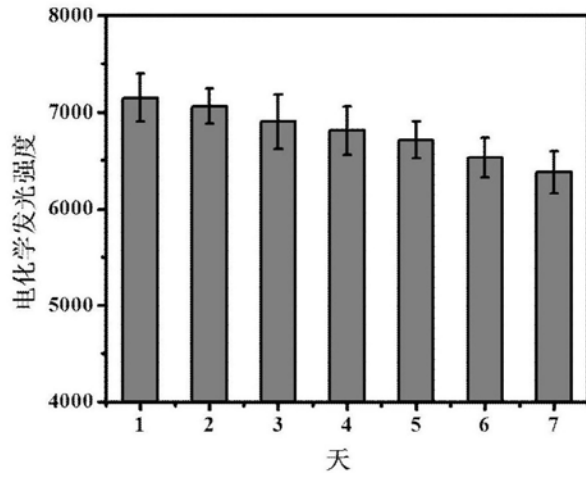


图6

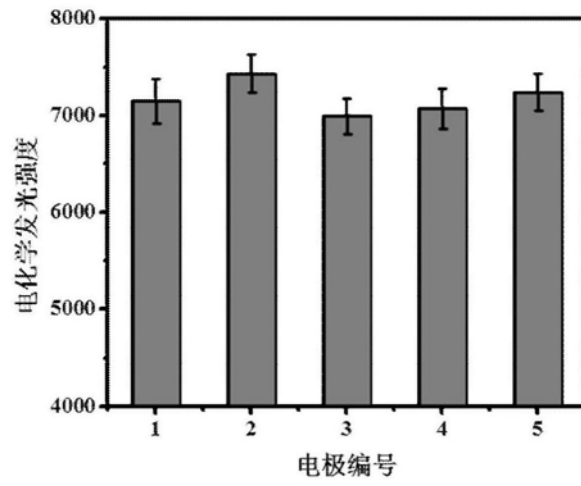


图7

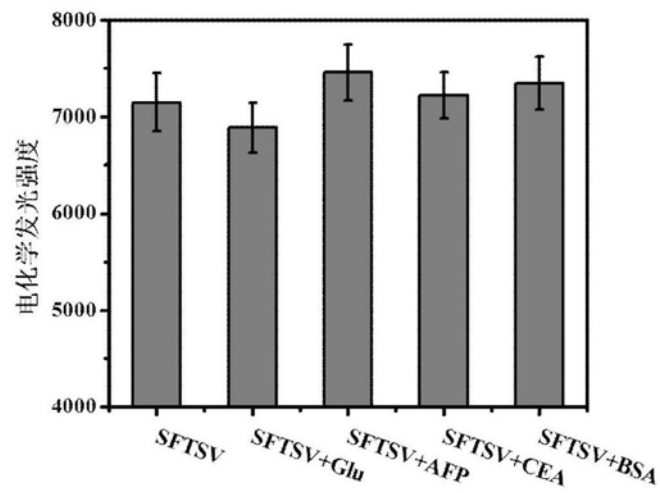


图8

专利名称(译)	电化学发光免疫传感器用于制备严重发热伴血小板减少综合症病毒检测试剂盒的应用		
公开(公告)号	CN108956588A	公开(公告)日	2018-12-07
申请号	CN201810745154.1	申请日	2018-07-09
[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	丁收年 梁秀丽 刘金霞 左家莹 赵春芹 徐来弟 朱凯迪 陆天		
发明人	丁收年 梁秀丽 刘金霞 左家莹 赵春芹 徐来弟 朱凯迪 陆天		
IPC分类号	G01N21/76 G01N27/30 G01N33/532 G01N33/543 G01N33/569		
CPC分类号	G01N21/76 G01N27/308 G01N33/532 G01N33/543 G01N33/56983		
代理人(译)	吴飞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种电化学发光免疫传感器用于制备严重发热伴血小板减少综合症病毒检测试剂盒的应用，SFTSV检测试剂盒包括SFTSV的电化学发光免疫传感器，该应用具体为：以SFTSV为抗原，制备CdZnTeS量子点标记的SFTSV的电化学发光免疫传感器。该SFTSV的电化学发光免疫传感器为以Fe₃O₄@SiO₂为磁性载体的三明治型夹心免疫传感器，包括表面修饰有SFTSV一抗的Fe₃O₄@SiO₂、CdZnTeS量子点标记的SFTSV二抗、以及通过抗原-抗体间相互作用与两者分别连接的抗原SFTSV；表面修饰有SFTSV一抗的Fe₃O₄@SiO₂的非特异性结合位点被封闭；该免疫传感器灵敏度高，且具有优异的稳定性和重现性和特异性。将该SFTSV电化学发光免疫传感器用于SFTSV浓度的检测，简便、快速，且具有检测限低、灵敏度高、特异性好等优点。

