



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104215755 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 17

(21) 申请号 201410432604. 3

(22) 申请日 2014. 08. 28

(71) 申请人 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所

地址 130033 吉林省长春市东南湖大路 3888 号

(72) 发明人 曾庆辉

(74) 专利代理机构 长春菁华专利商标代理事务所 22210

代理人 王丹阳

(51) Int. Cl.

G01N 33/532 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

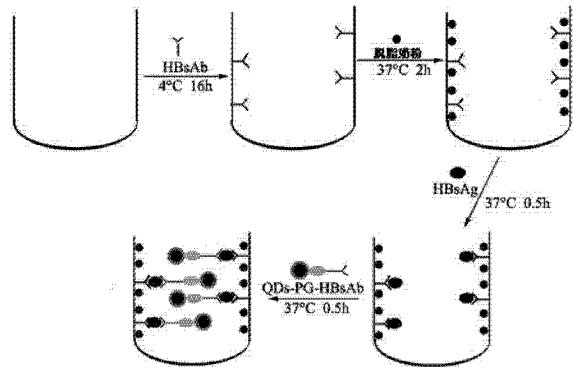
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒及其使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒及其使用方法,属于免疫检测技术领域。解决了现有技术中基于量子点标记的检测试剂盒将量子点与抗体分子通过静电吸附作用、直接共价连接等方式进行生物标记,导致免疫检测的灵敏度低,特异性差的技术问题。本发明的试剂盒包括蛋白、EDC 缩合剂、核壳量子点、能与所述蛋白特异性结合的待测抗原第一抗体和包被待测抗原第二抗体的微孔板。本发明的试剂盒具有高灵敏性和高特异性,检测结果更加清晰,使用简便、灵敏,适用于血样、尿样、唾液等样本的检测,可应用于食品安全、环境监测、医疗诊断、卫生防疫等众多领域。



1. 基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括蛋白、EDC 缩合剂、核壳量子点、能与所述蛋白特异性结合的待测抗原第一抗体和包被待测抗原第二抗体的微孔板;

所述蛋白为蛋白 G 或者蛋白 A,所述核壳量子点为 CdTe/CdS、CdSe/CdS、CdSe/ZnSe 或 CdSe/ZnS。

2. 根据权利要求 1 所述的基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括缓冲液。

3. 根据权利要求 1 所述的基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述包被待测抗原第二抗体的微孔板可以由微孔板和待测抗原的第二抗体替代。

4. 根据权利要求 3 所述的基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括 1% 的脱脂奶粉。

5. 根据权利要求 1 所述的基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述第一抗体为乙肝表面抗体或者乙肝 e 抗体,第二抗体为乙肝表面抗体或者乙肝 e 抗体。

6. 根据权利要求 1 所述的基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述蛋白、EDC 缩合剂、核壳量子点的物质的量比为 1:(100-200):1。

7. 根据权利要求 1 所述的基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述蛋白、能与所述蛋白特异性结合的待测抗原第一抗体的物质的量比为 1:1,所述待测抗原第二抗体的物质的量大于等于蛋白的物质的量。

8. 权利要求 1-2、5-7 任何一项所述的基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒的使用方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将蛋白和核壳量子点在 EDC 缩合剂的作用下进行共价连接,得到核壳量子点标记的蛋白;

(2) 将步骤 (1) 得到的核壳量子点标记的蛋白与能与该蛋白特异性结合的待测抗原第一抗体混合,得到量子点抗体柔性偶联标记产物;

(3) 将含有待测抗原的待测液加入包被待测抗原第二抗体的微孔板中,进行免疫反应,洗涤后,再向微孔板中加入量子点抗体柔性偶联标记产物,进行免疫反应,洗涤后,得到涂有标记产物的微孔板;

(4) 检测涂有标记产物的微孔板中核壳量子点的荧光强度,通过与空白样品的荧光光谱进行对比,得到待测抗原的浓度。

9. 根据权利要求 8 所述的基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒的使用方法,其特征在于,当包被待测抗原第二抗体的微孔板由微孔板和待测抗原的第二抗体替代时,步骤 (3) 前还包括,将待测抗原第二抗体加入微孔板中,反应后,加入 1% 的脱脂奶粉封闭微孔板的位点,洗涤,得到包被待测抗原第二抗体的微孔板。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒,其特征在于,所述步骤 (2) 在 23-25℃ 反应 30-60min;所述步骤 (3) 中免疫反应的温度均为 37℃,时间均为 0.5-1h。

基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测技术领域,具体涉及一种基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒及其使用方法。

背景技术

[0002] 目前利用酶催化底物显色的酶联免疫检测试剂盒已被大量应用,其基本原理是在试剂盒微孔板上首先包被检测物中抗原的相应抗体,加入待测样本后,使样本中检测物抗原与微孔板上包被的抗体免疫反应后结合,再加入酶标的另一抗体分子形成三明治夹心结构,最终加入底物分子通过酶的高效催化性能使得底物显示,从而判定检测结果。该技术是加入能够作用于底物引起颜色变化的酶标抗体,然后加入相应酶的底物,反应一定时间后,用酶标仪测定反应产物在某一特定波长的吸光度值,再与标准样品进行对比确定样品中待测抗原的浓度。操作繁琐、费时、检测周期长、显色不稳定。

[0003] 量子点具有激发谱线宽、发射谱线窄、量子尺寸效应、高荧光效率、强光化学稳定性等特性,可以替代酶进行生物标记,用高灵敏的荧光信号代替吸收显色进行检测,制备基于量子点的免疫检测试剂盒。

[0004] 现有技术中,中国专利公开了一种基于量子点标记的夹心免疫检测法及其诊断试剂盒(公开号 1515909),该试剂盒首先将量子点与抗体分子进行标记,再将量子点标记的抗体连接在抗原上,通过荧光信号进行抗原的检测,该方法简单快速,成本低。然而量子点是一种纳米材料,具有极大的表面效应,现有的利用量子点检测的试剂盒都是将量子点与抗体分子通过静电吸附作用、直接共价连接等方式进行生物标记,在标记抗体的过程中,很容易标记到抗体的具有抗原决定簇部位的 Fab 端,标记后的抗体不能与抗原分子进行免疫反应,因而是一种无效的标记,这种直接连接技术对于最终的免疫检测的灵敏度,尤其是特异性会有很大程度的影响,降低检测效果,定量检测灵敏度和特异性都无法达到满意结果。

发明内容

[0005] 本发明的目的是解决现有技术中基于量子点标记的免疫诊断试剂盒免疫检测灵敏度低、特异性差的技术问题,提供一种基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒及其使用方法。

[0006] 本发明的基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒,所述试剂盒包括蛋白、EDC((1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺)) 缩合剂、核壳量子点、能与蛋白特异性结合的待测抗原第一抗体和包被待测抗原第二抗体的微孔板;所述蛋白为蛋白 G 或者蛋白 A,所述核壳量子点为 CdTe/CdS、CdSe/CdS、CdSe/ZnSe 或 CdSe/ZnS。

[0007] 优选的是,所述试剂盒还包括缓冲液。

[0008] 优选的是,所述包被待测抗原第二抗体的微孔板可以由微孔板和待测抗原的第二抗体替代,更进一步的,此时,所述试剂盒还包括 1% 的脱脂奶粉。

[0009] 优选的是,所述第一抗体为乙肝表面抗体或者乙肝 e 抗体,第二抗体为乙肝表面抗体或者乙肝 e 抗体。

[0010] 优选的是,所述蛋白、EDC 缩合剂、核壳量子点的物质的量比为 1:(100-200):1。

[0011] 优选的是,所述蛋白、能与蛋白特异性结合的待测抗原第一抗体的物质的量比为 1:1,所述待测抗原第二抗体的物质的量大于等于蛋白的物质的量。

[0012] 本发明还提供上述基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0013] (1) 将蛋白和核壳量子点在 EDC 缩合剂的作用下进行共价连接,得到核壳量子点标记的蛋白;

[0014] (2) 将步骤 (1) 得到的核壳量子点标记的蛋白与能与所述蛋白特异性结合的待测抗原第一抗体混合,得到量子点抗体柔性偶联标记产物;

[0015] (3) 将含有待测抗原的待测液加入包被待测抗原第二抗体的微孔板中,进行免疫反应,洗涤后,再向微孔板中加入量子点抗体柔性偶联标记产物,进行免疫反应,洗涤后,得到涂有标记产物的微孔板;

[0016] (4) 检测涂有标记产物的微孔板中核壳量子点的荧光强度,通过与空白样品的荧光光谱进行对比,得到待测抗原的浓度。

[0017] 优选的是,当包被待测抗原第二抗体的微孔板可以由微孔板和待测抗原的第二抗体替代时,步骤 (3) 前还包括,将待测抗原第二抗体加入微孔板中,反应后,加入 1% 的脱脂奶粉封闭微孔板的位点,洗涤,得到包被待测抗原第二抗体的微孔板。

[0018] 优选的是,所述步骤 (2) 在 23-25℃ 反应 30-60min;所述步骤 (3) 中免疫反应的温度均为 37℃,时间均为 0.5-1h。

[0019] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0020] (1) 本发明的基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒利用核壳量子点具有激发谱线宽、发射谱线窄、量子尺寸效应、荧光量子效率高、光化学稳定性强的特性的基础上,采用 EDC 缩合的方式将量子点与蛋白 G 或蛋白 A 分子进行共价连接,利用蛋白 G 或蛋白 A 分子做桥,依靠其与多数哺乳动物(包括人、羊、兔、鼠、马、猪、猴等)的抗体 Fc 端的特异性,实现量子点与抗体分子的柔性偶联,不占据抗体的抗原决定簇部位,大大提高了抗体的抗原免疫活性;

[0021] (2) 本发明的试剂盒具有高灵敏性和高特异性,由于量子点的高荧光效率,使检测结果更加清晰,使用简便、灵敏,适用于血样、尿样、唾液等样本的检测,可应用于食品安全、环境监测、医疗诊断、卫生防疫等众多领域;

[0022] (3) 本发明的试剂盒通过用不同粒径大小的量子点标记不同的抗体分子,就可得到不同波长的荧光,产生多色荧光,实现多组分的检测,使用方法操作简单快捷。

附图说明

[0023] 图 1 为本发明量子点抗体柔性偶联的标记产物的制备过程示意图;

[0024] 图 2 为本发明的试剂盒使用方法的示意图;

[0025] 图 3 为本发明实施例 1 的标准曲线。

具体实施方式

[0026] 为了进一步了解本发明,下面结合具体实施方式对本发明的优选实施方案进行描述,但是应当理解,这些描述只是为进一步说明本发明的特征和优点而不是对本发明专利要求的限制。

[0027] 本发明的基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒包括:蛋白、EDC 缩合剂、核壳量子点、能与所述蛋白特异性结合的待测抗原第一抗体和包被待测抗原第二抗体的微孔板,其中,蛋白为蛋白 G 或者蛋白 A,核壳量子点为 CdTe/CdS、CdSe/CdS、CdSe/ZnSe 或 CdSe/ZnS。

[0028] 根据使用需求,试剂盒中还可以包括 PBS 缓冲液;该试剂盒中,包被待测抗原第二抗体的微孔板也可以由微孔板和待测抗原的第二抗体替代,在这种情况下,试剂盒中还可以包括 1% 的脱脂奶粉。包被待测抗原第二抗体的微孔板可以通过现有技术制备,过程可以为,将待测抗原第二抗体加入微孔板中,4℃ 放置 12-16h,加入 1% 的脱脂奶粉,37℃ 反应 2-4h,封闭微孔板的位点,再用 PBS 缓冲溶液洗涤微孔板 3-5 次。

[0029] 该试剂盒中,微孔板的材料可以为聚苯乙烯,待测抗原的第一抗体和待测抗原第二抗体可以相同也可以不同,没有特殊限制,具体依据抗原的种类决定,本发明的试剂盒可以应用于所有能够发生免疫反应的抗原,如乙肝表面抗体 (HBsAb) 或者乙肝 e 抗体 (HBeAb)。

[0030] 本发明核壳量子点的制备方法为现有技术,该方法利用连续离子层吸附反应技术 (SILAR) 实现量子点的核壳包覆。采取一锅法原理,在同一反应装置中加入核原料,通过控制核生长的时间获得不同粒径大小的裸核量子点,然后再逐滴加入壳原料,利用 SILAR 技术进行壳层包覆,最后离心纯化处理样品获得核壳量子点,具体方法参见文章 J. Phys. Chem. C2008, 112, 8587 - 8593。通过改变量子点的粒子大小,可以实现荧光颜色的调谐,更优选采用裸核尺寸小于 3nm 的绿光量子点 (荧光发射波段在 500-560nm)、裸核尺寸为 3-4nm (荧光发射波段在 560-590nm) 的黄光量子点、裸核尺寸大于 4nm (荧光发射波段在 590-650nm) 的红光量子点,量子点的荧光量子效率在 30% 以上。

[0031] 上述试剂盒中,核壳量子点、EDC 缩合剂、蛋白的摩尔比为 1:(100-200):1;能与蛋白特异性结合的待测抗原第一抗体、蛋白的物质的量比为 1:1,待测抗原第二抗体的物质的量大于等于蛋白的物质的量,上述组分的实际用量依据检测的抗原的种类确定并优化,具体过程可以是,通过本发明所公开的试剂盒的使用方法,绘制以待测抗原浓度为横坐标,以微孔板中量子点荧光强度为纵坐标的标准曲线,进而通过标准曲线确定待测液中抗原的极限值及试剂盒中各组分的量,在已知本发明试剂盒使用方法的基础上,当检测不同抗原时,确定待测液中抗原的极限值及试剂盒中各组分的量为本领域公知常识,本发明实施例以检测乙肝抗原为例,当蛋白的物质的量为 1pmol 时,待检测抗原溶液中乙肝抗原的量不超过 4ng。

[0032] 如图 1-2 所示,上述基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0033] (1) 将核壳量子点与 EDC 缩合剂混合,活化量子点表面的羧基基团,室温搅拌 20-40min,优选 30min,然后加入蛋白,室温搅拌反应 (转速在 500 转 /min 以下) 90-150min,优选 120min,带有羧基基团的量子点与带有胺基基团的蛋白 G 或蛋白 A 分子在 EDC 缩合剂

的作用下形成酰胺键,实现带有羧基的量子点与带有胺基的蛋白质的共价连接,用 NAP-5 柱子分离纯化,得到核壳量子点标记的蛋白;

[0034] 其中,核壳量子点、EDC 缩合剂、蛋白的摩尔比为 1:(100-200):1;

[0035] (2) 将核壳量子点标记的蛋白与待测抗原第一抗体混合,在 23-25 °C 反应 30-60min,得到量子点抗体柔性偶联标记产物;

[0036] 其中,待测抗原第一抗体、核壳量子点标记的蛋白的物质的量比为 1:1;

[0037] (3) 向包被待测抗原第二抗体的微孔板中加入待检测抗原溶液,进行免疫反应 0.5-1h,洗涤后,再加入步骤(2)得到的量子点抗体柔性偶联的标记产物,继续反应 0.5-1h,形成三明治夹心发光免疫复合体结构,洗涤后,得到涂有标记产物的微孔板;

[0038] 其中,洗涤液采用 PBS 缓冲液,洗涤液的用量没有限制,一般清洗干净即可,待检测抗原溶液为血浆、唾液或者尿液,量子点抗体柔性偶联的标记产物的物质的量可以等于待测抗原第二抗体的物质的量,也可以根据待测抗原的量进行优化,保证待测抗原上均标记有量子点抗体柔性偶联标记产物即可;

[0039] (4) 用荧光光谱仪检测涂有标记产物的微孔板,通过将微孔板中核壳量子点的荧光光谱与空白样品的光谱进行对比,得到检测结果;

[0040] 其中,荧光检测光谱仪是目前市场上常见的海洋光谱仪即可;空白样品即为待测抗原溶液为 PBS 缓冲液时,其他条件不变下,采用上述方法得到的微孔板试剂盒。

[0041] 如果试剂盒中包被待测抗原第二抗体的微孔板由待测抗原第二抗体和微孔板替代,那么上述步骤(3)之前还包括包被待测抗原第二抗体的微孔板的制备,具体过程为:将待测抗原第二抗体加入微孔板中,4 °C 放置 12-16h,加入 1% 的脱脂奶粉,37 °C 反应 2-4h,封闭微孔板的位点,再用 PBS 缓冲溶液洗涤微孔板 3-5 次,得到包被待测抗原第二抗体的微孔板。

[0042] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细的描述。

[0043] 实施例 1

[0044] 标准曲线的绘制:

[0045] (1) 将 1nmol 裸核尺寸小于 3nm 的 CdTe/CdS 核壳量子点与 100nmol EDC 缩合剂混合,活化量子点表面的羧基基团,室温搅拌 30min,然后加入 1nmol 蛋白 G,室温搅拌反应 2h,用 NAP-5 柱子分离纯化,得到量子点-蛋白 G 的共价连接产物;

[0046] (2) 将 8pmol 量子点-蛋白 G 的共价连接产物与 8pmol 乙肝表面抗体混合,室温搅拌 1h,得到量子点-蛋白 G-HBsAb 的柔性偶联标记产物;

[0047] (3) 分别取 8 个包被 1pmol 乙肝表面抗体的微孔板,分别加入 200 μ L 含有 HBsAg 的缓冲液,HBsAg 的浓度分别为 0、0.3、0.6、1.25、2.5、5、10、20ng/mL,分别在 37 °C 免疫反应 0.5h,洗涤后,再分别向其中加入 0.1pmol 的量子点-蛋白 G-HBsAb 的柔性偶联标记产物,在 37 °C 进行免疫反应 0.5h,洗涤后,形成三明治夹心发光免疫复合体结构,最终得到涂有标记产物的微孔板;

[0048] (4) 在荧光光谱仪下检测上述 8 个微孔板的荧光光谱曲线,并以 HBsAg 的浓度为横坐标,荧光强度为纵坐标,绘制标准曲线。

[0049] 实施例 2

[0050] 基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒:包括 1pmol 的裸核尺寸小于

3nm 的 CdTe/CdS 核壳量子点, 100pmol 的 EDC 缩合剂, 1pmol 蛋白 G, 1pmol 乙肝表面抗体和包被 1pmol 乙肝表面抗体的微孔板;

[0051] 该试剂盒的使用方法为:

[0052] (1) 将 1pmol CdTe/CdS 核壳量子点与 100pmol EDC 缩合剂混合, 活化量子点表面的羧基基团, 室温搅拌 30min, 然后加入 1pmol 蛋白 G, 室温搅拌反应 2h, 用 NAP-5 柱子分离纯化, 得到量子点-蛋白 G 的共价连接产物;

[0053] (2) 将 1pmol 量子点-蛋白 G 的共价连接产物与 1pmol 乙肝表面抗体混合, 室温搅拌 1h, 得到量子点-蛋白 G-HBsAb 的柔性偶联标记产物;

[0054] (3) 将包被 1pmol 乙肝表面抗体的微孔板中加入 200 μ L 含有待测抗原的待测液, 37 $^{\circ}$ C 免疫反应 0.5h, 洗涤后, 再加入 0.1pmol 的量子点-蛋白 G-HBsAb 的柔性偶联标记产物, 在 37 $^{\circ}$ C 进行免疫反应 0.5h, 洗涤后, 形成三明治夹心发光免疫复合体结构, 最终得到涂有标记产物的微孔板;

[0055] (4) 在荧光光谱仪下测试量子点的荧光光谱, 通过与空白样品进行对比, 测定 HBsAg 强阳性、弱阳性和阴性标本皆可以 1min 报结果。测试结果显示的绿光荧光强度越大则证明样品中 HBsAg 含量越少。通过标准曲线, 可以得到含有待测抗原的待测液中的抗原浓度。该检测方法灵敏度为 0.3ng/ml, 特异性为 90% 以上, 批内与批间重复性小于 20%。

[0056] 实施例 3

[0057] 基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒: 包括 1pmol 的裸核尺寸小于 3nm 的 CdTe/CdS 核壳量子点, 100pmol 的 EDC 缩合剂, 1pmol 蛋白 A, 1pmol 乙肝表面抗体、1pmol 乙肝表面抗体、微孔板、1% 的脱脂奶粉和 PBS 缓冲液;

[0058] 该试剂盒的使用方法:

[0059] (1) 将 1pmol CdTe/CdS 核壳量子点与在 100pmol EDC 缩合剂混合活化量子点表面的羧基基团, 室温搅拌 30min, 然后加入 1pmol 蛋白 A, 室温搅拌反应 2h, 用 NAP-5 柱子分离纯化, 得到量子点-蛋白 A 的共价连接产物;

[0060] (2) 取 1pmol 量子点-蛋白 A 的共价连接产物与 1pmol 乙肝表面抗体混合, 室温搅拌 1h, 得到量子点-蛋白 A-HBsAb 的柔性偶联标记产物;

[0061] (3) 将 1pmol HBsAb 的 PBS 溶液加入到微孔板中 4 $^{\circ}$ C 过夜, 进行抗体的包被, 用 1% 的脱脂奶粉的 PBS 溶液封闭微孔板的位点, 37 $^{\circ}$ C 封闭 3h; 再用 PBS 缓冲溶液洗涤微孔板 5 次, 然后加入 200 μ L 含有待测抗原的待测液, 37 $^{\circ}$ C 免疫反应 0.5h, 洗涤后, 再加入 0.1pmol 量子点-蛋白 A-HBsAb 的柔性偶联标记产物, 37 $^{\circ}$ C 进行免疫反应 0.5h, 形成三明治夹心发光免疫复合体结构, 洗涤后, 最终得到涂有标记产物的微孔板;

[0062] (4) 在荧光光谱仪下测试量子点的荧光光谱, 通过与空白样品的光谱曲线进行对比, 测定 HBsAg 强阳性、弱阳性和阴性标本皆可以 1min 报结果。如果测试结果显示绿光荧光强度越大则证明样品中 HBsAg 含量越少。该检测方法灵敏度为 0.3ng/ml, 特异性为 90% 以上, 批内与批间重复性小于 20%。

[0063] 实施例 4

[0064] 基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒: 包括 1pmol 的裸核尺寸大于 4nm 的 CdTe/CdS 核壳量子点, 100pmol 的 EDC 缩合剂, 1pmol 蛋白 A, 1pmol 乙肝表面抗体和包被 1pmol 乙肝表面抗体的微孔板;

[0065] 该试剂盒的使用方法：

[0066] (1) 将 1pmol CdTe/CdS 核壳量子点与在 100pmol EDC 缩合剂混合，活化量子点表面的羧基基团，室温搅拌 30min，然后加入 1pmol 蛋白 A，室温搅拌反应 2h，用 NAP-5 柱子分离纯化得到量子点 - 蛋白 A 的共价连接产物；

[0067] (2) 将 1pmol 量子点 - 蛋白 A 的共价连接产物与 1pmol 乙肝表面抗体混合，室温搅拌 1h，得到量子点 - 蛋白 A-HBsAb 的柔性偶联标记产物；

[0068] (3) 向包被 1pmol 乙肝表面抗体的微孔板中加入 200 μ L 含有待测抗原的待测液，37 $^{\circ}$ C 免疫反应 0.5h，PBS 缓冲液洗涤后，再加入 0.1pmol 量子点 - 蛋白 A-HBsAb 的柔性偶联标记产物，37 $^{\circ}$ C 免疫反应 0.5h，形成三明治夹心发光免疫复合体结构，洗涤后，最终得到涂有标记产物的微孔板；

[0069] (4) 在荧光光谱仪下测试量子点的荧光光谱，通过与空白样品的光谱曲线进行对比，测定 HBsAg 强阳性、弱阳性和阴性标本皆可以 1min 报结果。如果测试结果显示红光荧光强度越大则证明样品中 HBsAg 含量越少。该检测方法灵敏度为 0.3ng/ml，特异性为 90% 以上，批内与批间重复性小于 20%。

[0070] 实施例 5

[0071] 基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒：1pmol 的裸核尺寸小于 3nm 的 CdTe/CdS 核壳量子点，1pmol 的裸核尺寸大于 4nm 的 CdTe/CdS 核壳量子点，2pmol 蛋白 G，200pmol 的 EDC 缩合剂，1pmol 乙肝表面抗体和 1pmol 乙肝 e 抗体，以及包被 1pmol 乙肝表面抗体和 1pmol 乙肝 e 抗体的微孔板；

[0072] 试剂盒的使用方法：

[0073] (1) 分别将 1pmol 裸核尺寸小于 3nm 的 CdTe/CdS 核壳量子点和 1pmol 裸核尺寸大于 4nm 的 CdTe/CdS 核壳量子点分别与在 100pmol EDC 缩合剂混合，活化量子点表面的羧基基团，室温搅拌 30min，然后分别加入 1pmol 蛋白 G，室温搅拌反应 2h，分别用 NAP-5 柱子分离纯化后，洗涤后，得到绿光量子点 - 蛋白 G 的共价连接产物和红光量子点 - 蛋白 G 的共价连接产物；

[0074] (2) 将 1pmol 绿光量子点 - 蛋白 G 的共价连接产物与 1pmol 乙肝表面抗体混合，1pmol 红光量子点 - 蛋白 G 的共价连接产物与 1pmol 乙肝 e 抗体混合，分别在室温搅拌 1h，得到绿光量子点 - 蛋白 G-HBsAb 的柔性偶联标记产物和红光量子点 - 蛋白 G-HBeAb 的柔性偶联标记产物；

[0075] (3) 向包被 1pmol 乙肝表面抗体和 1pmol 乙肝 e 抗体的微孔板中加入 200 μ L 含有待测抗原的待测液，在 37 $^{\circ}$ C 免疫反应 0.5h，PBS 缓冲液洗涤后，再加入 0.1pmol 的绿光量子点 - 蛋白 G-HBsAb 的柔性偶联标记产物和 0.1pmol 红光量子点 - 蛋白 G-HBeAb 的柔性偶联标记产物，37 $^{\circ}$ C 免疫反应 0.5h，形成三明治夹心发光免疫复合体结构，洗涤后，最终得到涂有标记产物的微孔板试剂盒。

[0076] (4) 在荧光光谱仪下检测试剂盒中量子点的荧光光谱，通过与空白样品的光谱曲线进行对比，测定 HBsAg 和 HBeAg 强阳性、弱阳性和阴性标本皆可以 1min 报结果。如果测试结果显示绿光荧光强度越大则证明样品中 HBsAg 含量越少，红光荧光强度越大则证明样品中 HBeAg 含量越少。该检测方法灵敏度为 0.3ng/ml，特异性为 90% 以上，批内与批间重复性小于 20%。

[0077] 实施例 6

[0078] 基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒：包括 1pmol 的裸核尺寸小于 3nm 的 CdTe/CdS 核壳量子点，1pmol 的蛋白 G，100pmol 的 EDC 缩合剂，1pmol 乙肝表面抗体和包被 1pmol 乙肝表面抗体的微孔板；

[0079] 该试剂盒的使用方法：

[0080] (1) 向反应装置中加入 1pmol 裸核尺寸小于 3nm 的 CdTe/CdS 核壳量子点，100pmol 的 EDC 缩合剂，室温搅拌 30min，然后加入 1pmol 蛋白 G，室温搅拌反应 2h，用 NAP-5 柱子分离纯化，得到核壳量子点标记的蛋白 G，记作绿量子点-蛋白 G；

[0081] (2) 将 1pmol 绿量子点-蛋白 G 与 1pmol 乙肝表面抗体混合，室温搅拌 1h，得到绿量子点-蛋白 G-HBsAb 的柔性偶联标记产物；

[0082] (3) 向包被 1pmol 乙肝表面抗体的微孔板中加入 200 μ L 的人血清溶液，37 $^{\circ}$ C 免疫反应 0.5h，PBS 缓冲液洗涤后；再加入 0.1pmol 的绿量子点-蛋白 G-HBsAb 的柔性偶联标记产物，37 $^{\circ}$ C 免疫反应 0.5h，形成三明治夹心发光免疫复合体结构，PBS 缓冲液洗涤后，最终得到涂有标记产物的微孔板；

[0083] (4) 在荧光光谱仪下测试微孔板中量子点的荧光光谱，通过与空白样品的光谱曲线进行对比，测定 HBsAg 强阳性、弱阳性和阴性标本皆可以 1min 报结果。通过与标准曲线对比分析得到该待检测血清溶液中含有的 HBsAg 的量为 12ng/ml，与市场上常用的 ELISA 法检测的阳性结果相符。

[0084] 实施例 7

[0085] 基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒：包括 1pmol 的裸核尺寸小于 3nm 的 CdTe/CdS 核壳量子点，1pmol 的蛋白 G，100pmol 的 EDC 缩合剂，1pmol 乙肝表面抗体和包被 1pmol 乙肝表面抗体的微孔板；

[0086] 该试剂盒的使用方法：

[0087] (1) 向反应装置中加入 1pmol 裸核尺寸小于 3nm 的 CdTe/CdS 核壳量子点，100pmol 的 EDC 缩合剂，室温搅拌 30min，然后加入 1pmol 蛋白 G，室温搅拌反应 2h，用 NAP-5 柱子分离纯化，得到核壳量子点标记的蛋白 G，记作绿量子点-蛋白 G；

[0088] (2) 将 1pmol 绿量子点-蛋白 G 与 1pmol 乙肝表面抗体混合，室温搅拌 1h，得到绿量子点-蛋白 G-HBsAb 的柔性偶联标记产物；

[0089] (3) 向包被 1pmol 乙肝表面抗体的微孔板中加入 200 μ L 人唾液，37 $^{\circ}$ C 免疫反应 0.5h，PBS 缓冲液洗涤后；再加入 0.1pmol 绿量子点-蛋白 G-HBsAb 的柔性偶联标记产物，37 $^{\circ}$ C 免疫反应 0.5h，形成三明治夹心发光免疫复合体结构，PBS 缓冲液洗涤后，最终得到涂有标记产物的微孔板试剂盒；

[0090] (3) 在荧光光谱仪下测试量子点的荧光光谱，通过与空白样品的光谱曲线进行对比，测定 HBsAg 强阳性、弱阳性和阴性标本皆可以 1min 报结果。通过与标准曲线对比分析得到该待检测血清溶液中含有的 HBsAg 量为 0.3ng/ml，与市场上常用的 ELISA 法检测的阴性结果相符。

[0091] 显然，以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想。应当指出，对于所述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，还可以对本发明进行若干改进和修饰，这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。

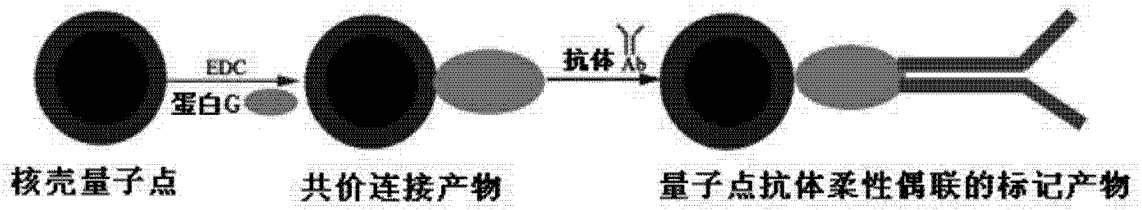


图 1

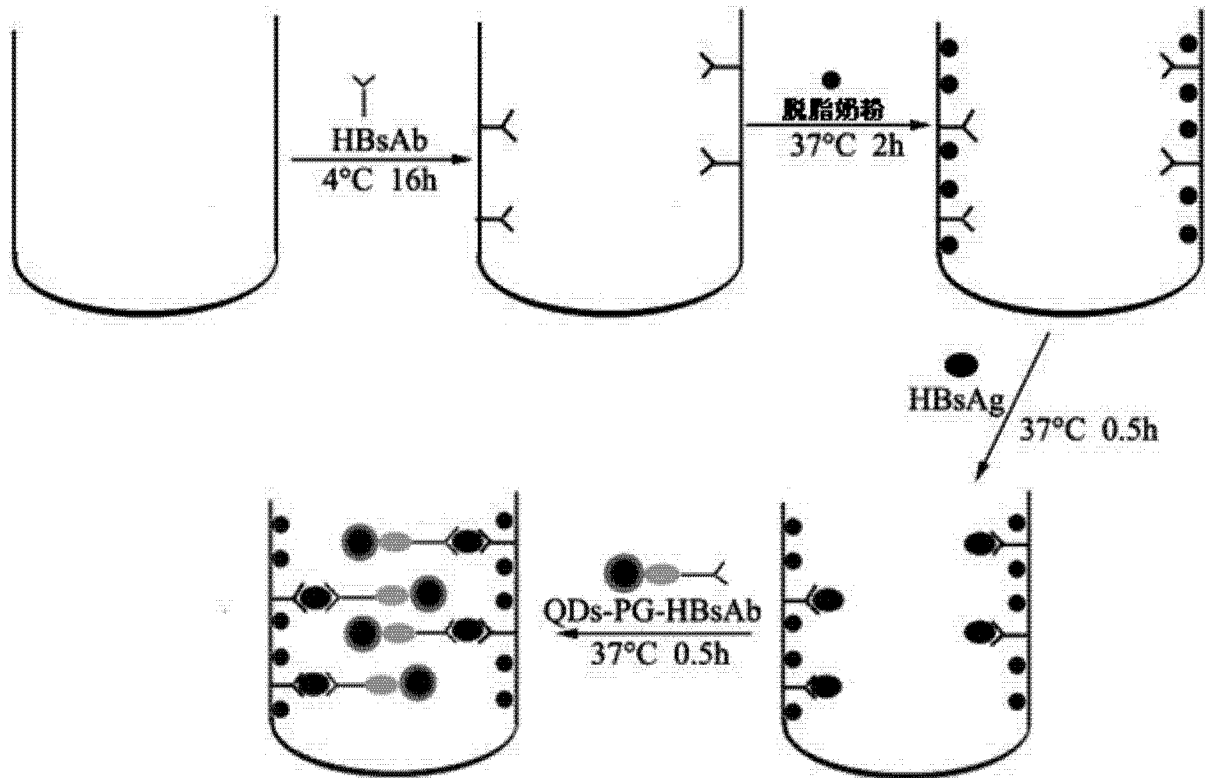


图 2

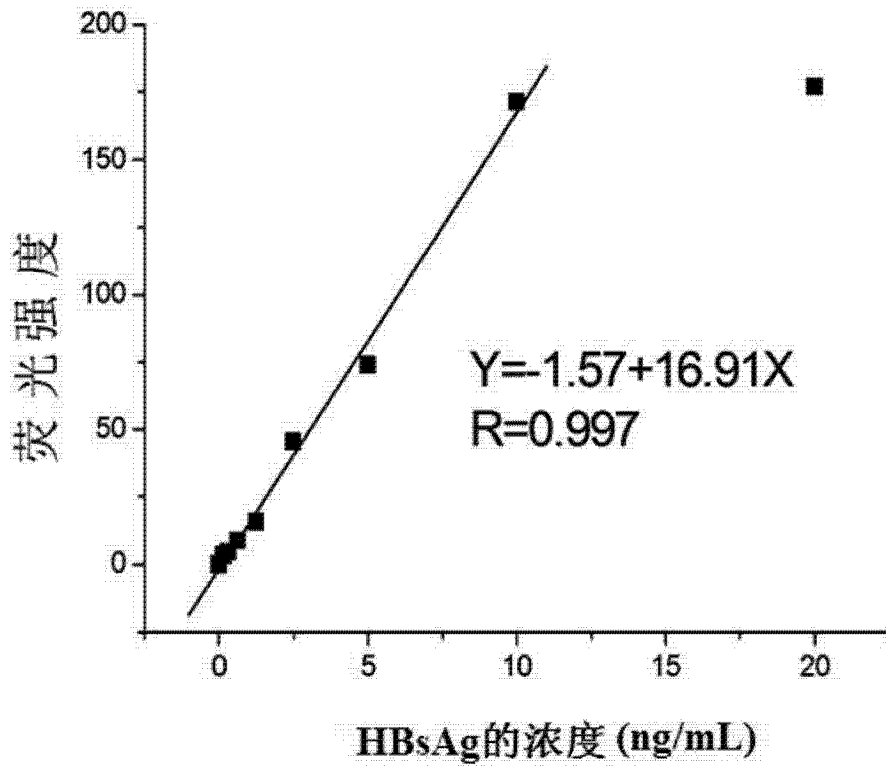


图 3

专利名称(译)	基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN104215755A	公开(公告)日	2014-12-17
申请号	CN201410432604.3	申请日	2014-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院长春光学精密机械与物理研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院长春光学精密机械与物理研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院长春光学精密机械与物理研究所		
[标]发明人	曾庆辉		
发明人	曾庆辉		
IPC分类号	G01N33/532 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/533 G01N21/64 G01N33/5761		
代理人(译)	王丹阳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于核壳量子点柔性偶联标记物的免疫检测试剂盒及其使用方法，属于免疫检测技术领域。解决了现有技术中基于量子点标记的检测试剂盒将量子点与抗体分子通过静电吸附作用、直接共价连接等方式进行生物标记，导致免疫检测的灵敏度低，特异性差的技术问题。本发明的试剂盒包括蛋白、EDC缩合剂、核壳量子点、能与所述蛋白特异性结合的待测抗原第一抗体和包被待测抗原第二抗体的微孔板。本发明的试剂盒具有高灵敏性和高特异性，检测结果更加清晰，使用简便、灵敏，适用于血样、尿样、唾液等样本的检测，可应用于食品安全、环境监测、医疗诊断、卫生防疫等众多领域。

