



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102495204 A

(43) 申请公布日 2012.06.13

(21) 申请号 201110399382.6

(22) 申请日 2011.12.06

(71) 申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路 88 号

(72) 发明人 刘曙照 冯大和

(74) 专利代理机构 扬州市锦江专利事务所

32106

代理人 江平

(51) Int. Cl.

G01N 33/536 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 3 页

(54) 发明名称

小分子有机物的量子点标记半抗原直接竞争免疫分析方法

(57) 摘要

小分子有机物的量子点标记半抗原直接竞争免疫分析方法,涉及快速检测小分子有机物的纳米荧光探针标记直接竞争免疫分析技术领域。以高效水溶性量子点作为纳米荧光探针标记目标分析物半抗原,将抗目标分析物抗体固定于水分散性聚苯乙烯磁性微球表面,封闭微球表面未结合抗体的位点后分散于水相中,加入含目标分析物的标样或待测样品及对应量子点标记目标分析物半抗原,待竞争性免疫反应平衡后在磁场中将聚苯乙烯磁性微球与液相迅速分离,对液相进行荧光检测,依据液相中量子点标记半抗原的荧光强度与对应目标分析物的浓度在一定范围内成正比的规律,建立高灵敏度快速检测目标小分子有机物的量子点标记半抗原直接竞争免疫分析技术。

1. 小分子有机物的量子点标记半抗原直接竞争免疫分析方法,其特征在于:

采用混合酸酐法或碳二亚胺法,将激发波长宽、发射波长窄、荧光量子效率高、稳定性好、表面具有活性氨基的核壳结构水溶性量子点与含活性羧基末端的目标分析小分子有机物半抗原共价偶联制备量子点标记半抗原;将对目标分析小分子有机物具特异性亲和力的抗体固定在水分散性聚苯乙烯磁性微球表面,并封闭水分散性聚苯乙烯磁性微球表面未结合所述抗体的位点;将固定有抗目标分析物抗体并经过封闭处理的聚苯乙烯磁性微球、目标分析物的量子点标记半抗原及目标分析物标样在水相中混匀,室温下进行竞争性免疫反应至平衡,同样条件下以待测样品和目标分析物空白代替标样,设置样品和空白对照反应体系;将平衡后的反应体系在磁场中使聚苯乙烯磁性微球与液相快速分离,对液相进行荧光检测,依据标样体系的荧光强度 F_s 与空白对照的荧光强度 F_0 之比 F_s/F_0 与目标分析物浓度在一定范围内成正比的规律以及待测样品的 F_s/F_0 , 计算待测样品中小分子有机物的含量,建立高灵敏度快速检测目标分析小分子有机物的量子点标记半抗原直接竞争免疫分析方法。

小分子有机物的量子点标记半抗原直接竞争免疫分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及小分子有机物(农药、药物、环境内分泌干扰物)的纳米荧光探针标记半抗原直接竞争免疫分析新技术领域。

背景技术

[0002] 环境和农畜产品中农药、药物、环境内分泌干扰物的残留超标,对环境和环境生物构成一定威胁,影响食品安全和人类健康。加强环境和食品安全监测,需要高效快速的分析技术。

[0003] 目前已报道的农药、药物、环境内分泌干扰物残留的检测方法主要有色谱法和色谱联用法。采用这些方法需要昂贵的仪器设备、专业化的实验室和训练有素的专门人才,样品前处理要求高、过程复杂、速度慢,检测成本高,特异性不强,难以适应大量样品和现场快速检测的要求。现有小分子有机物的酶联免疫吸附分析(ELISA),通常采用聚苯乙烯微孔板固定抗体或抗原,免疫反应在固相和液相界面进行,需要通过洗涤方式将固、液两相分离,加入酶的底物进行显色反应后检测,步骤多,操作复杂;放射性同位素标记免疫分析方法趋向于淘汰;以有机荧光分子作标记物的荧光免疫分析存在稳定性差、易发生光漂白等问题,与化学发光免疫分析类似,经典的荧光免疫分析容易受背景的干扰。

发明内容

[0004] 本发明的目的是以高效水溶性量子点作为纳米荧光探针,建立一种特异性强、灵敏度高、简便高效、用于小分子有机物(农药、药物、环境内分泌干扰物)快速检测的量子点标记半抗原直接竞争免疫分析新技术。

[0005] 本发明的技术方案是:采用混合酸酐法或碳二亚胺法,将激发波长宽、发射波长窄、荧光量子效率高、稳定性好、表面具有活性氨基的核壳结构水溶性量子点与含活性羧基末端的目标分析小分子有机物(农药、药物、环境内分泌干扰物)半抗原共价偶联制备量子点标记半抗原;将对目标分析小分子有机物具特异性亲和力的抗体固定在水分散性聚苯乙烯磁性微球表面,并封闭水分散性聚苯乙烯磁性微球表面未结合所述抗体的位点;将适量固定有抗目标分析物抗体并经过封闭处理的聚苯乙烯磁性微球、目标分析物的量子点标记半抗原和目标分析物标样在水相中混匀,室温下进行竞争性免疫反应至平衡,同样条件下以待测样品和目标分析物空白代替标样设置样品和空白对照反应体系;将平衡后的反应体系在磁场中使聚苯乙烯磁性微球与液相分离,对液相进行荧光检测;在条件优化的基础上,依据标样体系的荧光强度 F_s 与空白对照的荧光强度 F_0 之比 F_s/F_0 与目标分析物浓度在一定范围内成正比(聚苯乙烯磁性微球上结合的量子点标记半抗原的量与目标分析物浓度在一定范围内成反比)的规律以及待测样品的 F_s/F_0 ,计算待测样品中小分子有机物的含量,建立高灵敏度快速检测目标分析小分子有机物的量子点标记半抗原直接竞争免疫分析方法。

[0006] 本发明综合利用免疫分析特异性强,量子点荧光性能优异、聚苯乙烯磁性微球可在水相中分散且可在磁场中与液相迅速分离等优势,免疫反应在水分散体系中进行,平衡

时间短,省去了洗涤和显色反应步骤,分析时间约为常规 ELISA 的 $1/2 \sim 1/4$ 。与常规免疫分析技术相比,本发明所建立的量子点标记小分子有机物(农药、药物、环境内分泌干扰物)半抗原直接竞争免疫分析技术特异性强、灵敏度高,方法简便高效,是对现有小分子有机物免疫分析技术的发展和 innovation,具有很高的开发应用价值。

附图说明

[0007] 图 1 为不同氰戊菊酯浓度时液相中的量子点标记半抗原荧光光谱。

[0008] 图 2 为不同诺氟沙星浓度时液相中的量子点标记半抗原荧光光谱。

[0009] 图 3 为不同双酚 A 浓度时液相中的量子点标记半抗原荧光光谱。

具体实施方式

[0010] 一、量子点标记氰戊菊酯半抗原直接竞争免疫分析技术实施例一：

将氰戊菊酯半抗原  (n=1-5) 采用经典的混合酸酐法或

碳二亚胺法与表面修饰有活性氨基、荧光发射波长为 705nm 的水溶性量子点共价偶联制备量子点标记氰戊菊酯半抗原,以 pH8.3、含 0.5g/L 叠氮化钠和 1mol/L 甜菜碱的 0.05mol/L 硼酸盐缓冲液定容至 1 μ mol/L (按量子点计),4 $^{\circ}$ C 储存备用。

[0011] 用 0.02mol/L、pH7.2 PB 将对氰戊菊酯具特异性亲和力的抗体溶解成 10 μ g/mL,加入等体积浓度为 10 mg/mL 的水分散性聚苯乙烯磁性微球,4 $^{\circ}$ C 吸附 8 ~ 12 小时。用磁性微球分离器将包被有抗氰戊菊酯抗体的聚苯乙烯磁性微球与液相快速分离,固相加原体积 2 倍的 0.02mol/L、pH7.2 PB 分散后,再用磁性微球分离器进行固液分离,如此重复 2 次,然后在固相中加入含 NaN₃ 0.5g/L、浓度为 5g/L 的明胶溶液,使聚苯乙烯磁性微球在混合体中的含量为 1mg/mL,室温放置 2 小时,封闭微球表面未吸附抗体的位点,4 $^{\circ}$ C 储存备用。

[0012] 用 0.02mol/L、pH7.2 PB 稀释氰戊菊酯甲醇溶液,配制 10 ~ 10⁻⁴ μ g/mL 的氰戊菊酯标样系列,以 0.02mol/L、pH7.2 PB 作空白对照,。

[0013] 在 100 μ L 不同浓度氰戊菊酯标样、待测样品、氰戊菊酯空白对照溶液中分别加入固定有抗氰戊菊酯抗体的聚苯乙烯磁性微球储备液 50 μ L 和用 0.02mol/L、pH7.2 的 PB 稀释 50 倍的量子点标记氰戊菊酯半抗原 50 μ L,在室温下混合反应约 20min。反应平衡后用磁性微球分离器进行固液分离,各取 150 μ L 液相分别加入荧光微孔板的不同孔内,在 235nm 激发波长下检测各孔 705nm 附近的最大荧光强度。

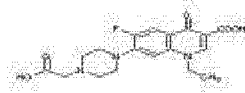
[0014] 优化反应介质、反应物浓度比、反应温度和时间、激发波长与荧光发射波长等相关条件,选择抗体与氰戊菊酯免疫反应速度快、敏感性高、稳定性好、固定有抗体的聚苯乙烯磁性微球和量子点标记半抗原用量少、含氰戊菊酯反应体系的荧光强度 (F_s) / 空白对照荧光强度 (F_0) 比值 (F_s/F_0) 高、背景干扰少的条件组合。

[0015] 在上述基础上,依据标样体系的荧光强度 F_s 与空白对照的荧光强度 F_0 之比 (F_s/F_0) 与氰戊菊酯浓度在一定范围内成正比(聚苯乙烯磁性微球上结合的量子点标记半抗原的量与氰戊菊酯浓度在一定范围内成反比)的规律(见图 1)以及样品的 F_s/F_0 ,计算样品中氰戊菊酯的含量,对待测样品中的氰戊菊酯进行定性定量快速检测,从而建立氰戊菊酯的量子点标记半抗原直接竞争免疫分析技术。

[0016] 图 1 中从 a ~ f 表示氰戊菊酯浓度依次为 $10 \sim 10^{-4} \mu\text{g/mL}$ 。

[0017] 二、量子点标记诺氟沙星半抗原直接竞争免疫分析技术实施例二：

将诺氟沙星半抗原



采用经典混合酸酐法或碳二亚胺法与表面

修饰有活性氨基、荧光发射波长为 585nm 的水溶性量子点共价偶联制备量子点标记诺氟沙星半抗原,用 pH8.3、含 0.5g/L 叠氮化钠和 1mol/L 甜菜碱的 0.05mol/L 硼酸盐缓冲液定容至 $1 \mu\text{mol/L}$ (按量子点计), 4°C 储存备用。

[0018] 用 0.02mol/L pH7.2 PB 将对诺氟沙星具特异性亲和力的抗体溶解成 $10 \mu\text{g/mL}$, 加入等体积浓度为 10 mg/mL 的水分散性聚苯乙烯磁性微球, 4°C 吸附 8 ~ 12 小时。用磁性微球分离器将包被有抗诺氟沙星抗体的聚苯乙烯磁性微球与液相快速分离, 固相加原体积 2 倍的 0.02mol/L、pH7.2 PB 分散后, 再用磁性微球分离器进行固液分离, 如此重复 2 次, 然后在固相中加入含 NaN_3 0.5g/L、浓度为 5g/L 的明胶溶液, 使聚苯乙烯磁性微球在混合体中的含量为 1mg/mL, 室温放置 2 小时, 封闭微球表面未吸附抗体的位点, 4°C 储存备用。

[0019] 用 0.02mol/L、pH7.2 PB 稀释 1g/L 的诺氟沙星甲醇溶液, 配置 $10 \sim 10^{-4} \mu\text{g/mL}$ 的诺氟沙星标样系列, 以 0.02mol/L、pH7.2 PB 作空白对照。

[0020] 在 100 μL 不同浓度诺氟沙星标样、待测样品和诺氟沙星空白对照溶液中分别加入固定有抗诺氟沙星抗体的聚苯乙烯磁性微球储备液 50 μL 和用 0.02mol/L、pH7.2 的 PB 稀释 100 倍的量子点标记诺氟沙星半抗原 50 μL , 在室温下混合反应约 20min。反应平衡后用磁性微球分离器进行固液分离, 各取 150 μL 液相分别加入荧光微孔板的不同孔内, 在 235nm 激发波长下检测各孔 585nm 附近的最大荧光强度。

[0021] 优化反应介质、反应物浓度比、反应温度和时间、激发波长与荧光发射波长等相关条件, 选择抗体与氰戊菊酯免疫反应速度快、敏感性强、稳定性好、固定有抗体的聚苯乙烯磁性微球和量子点标记半抗原用量少、含诺氟沙星反应体系的荧光强度 (F_s) / 空白对照荧光强度 (F_0) 的比值 (F_s/F_0) 高、背景干扰少的条件组合。

[0022] 在上述基础上, 依据诺氟沙星标样体系的荧光强度 F_s 与空白对照的荧光强度 F_0 之比 F_s/F_0 与诺氟沙星浓度在一定范围内成正比 (聚苯乙烯磁性微球上结合的量子点标记半抗原的量与诺氟沙星浓度在一定范围内成反比) 的规律 (见图 2) 以及样品的 F_s/F_0 , 计算样品中诺氟沙星的含量, 对待测样品中的诺氟沙星进行定性定量快速检测, 从而建立诺氟沙星的量子点标记半抗原直接竞争免疫分析技术。

[0023] 图 2 中从 a ~ f 表示诺氟沙星浓度依次为 $10 \sim 10^{-4} \mu\text{g/mL}$ 。

[0024] 三、量子点标记双酚 A 半抗原直接竞争免疫分析技术实施例三：

将双酚 A 半抗原



采用经典的混合酸酐法或碳二亚胺法与表面修

饰有活性氨基、荧光发射波长为 625nm 的水溶性量子点共价偶联制备量子点标记双酚 A 半抗原,用 pH8.3、含 0.5g/L 叠氮化钠和 1mol/L 甜菜碱的 0.05mol/L 硼酸盐缓冲液定容至 $1 \mu\text{mol/L}$ (按量子点计), 4°C 储存备用。

[0025] 将对双酚 A 具特异性亲和力的抗体用 0.02mol/L、pH7.2 的 PB 溶解成 $10 \mu\text{g/mL}$, 加入等体积浓度为 10 mg/mL 的水分散性聚苯乙烯磁性微球, 4°C 吸附 8 ~ 12 小时。然后用磁性

微球分离器使包被有抗双酚 A 抗体的聚苯乙烯磁性微球与液相快速分离,固相用 0.02mol/L、pH7.2 PB 分散后,再用磁性微球分离器进行固液分离,如此重复 2 次,然后在固相中加入含 NaN_3 0.5g/L、浓度为 5g/L 的明胶溶液,使聚苯乙烯磁性微球的含量为 1mg/mL,在 4℃ 环境温度下吸附 8 ~ 12 小时,以封闭微球表面未吸附抗体的位点。

[0026] 用 0.02mol/L、pH7.2 PB 稀释双酚 A 甲醇溶液,配制 $1 \sim 10^{-5}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的双酚 A 标样系列,以 0.02mol/L、pH7.2 PB 作空白对照。

[0027] 在 100 μL 不同浓度双酚 A 标样、待测样品和双酚 A 空白对照溶液中分别加入固定有抗双酚 A 抗体的聚苯乙烯磁性微球储备液 50 μL 和用 0.02mol/L、pH7.2 的 PB 稀释 200 倍的量子点标记双酚 A 半抗原 50 μL ,在室温下混合反应约 20min。反应平衡后用磁性微球分离器进行固液分离,各取 150 μL 液相分别加入荧光微孔板的不同孔内,在 235nm 激发波长下检测各孔 625nm 附近的最大荧光强度。

[0028] 图 3 中从 a ~ f 表示双酚 A 浓度依次为 $1 \sim 10^{-5}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0029] 优化反应介质、反应物浓度比、反应温度和时间、激发波长与荧光发射波长等相关条件,选择抗体与双酚 A 免疫反应速度快、敏感性强、稳定性好、固定有抗体的聚苯乙烯磁性微球和量子点标记半抗原用量少、含双酚 A 反应体系的荧光强度 (F_s) / 空白对照荧光强度 (F_0) 比值高、背景干扰少的条件组合。

[0030] 在上述基础上,依据双酚 A 标样体系的荧光强度 F_s 与空白对照的荧光强度 F_0 之比 F_s/F_0 与双酚 A 浓度在一定范围内成正比(聚苯乙烯磁性微球上结合的量子点标记半抗原的量与双酚 A 浓度在一定范围内成反比)的规律(见图 3)以及样品的 F_s/F_0 ,计算样品中双酚 A 的含量,对待测样品中的双酚 A 进行定性定量快速检测,从而建立双酚 A 的量子点标记半抗原直接竞争免疫分析技术。

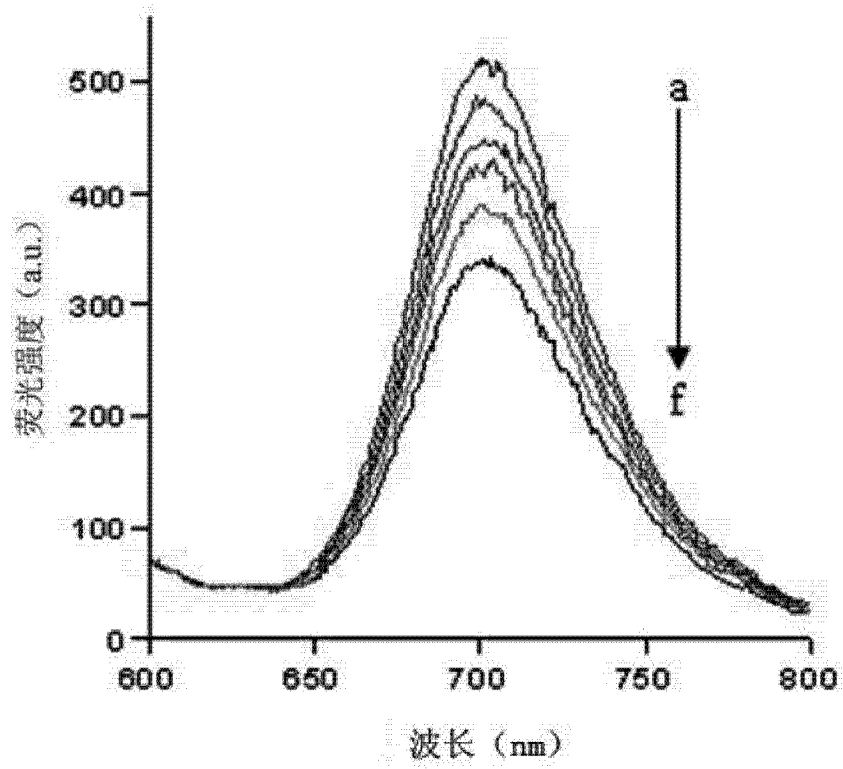


图 1

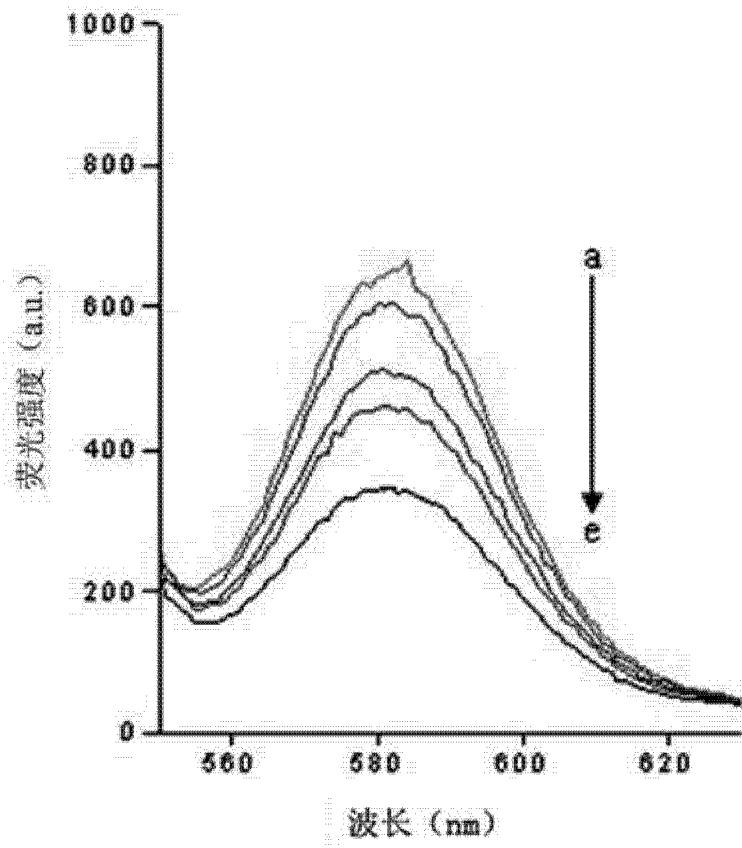


图 2

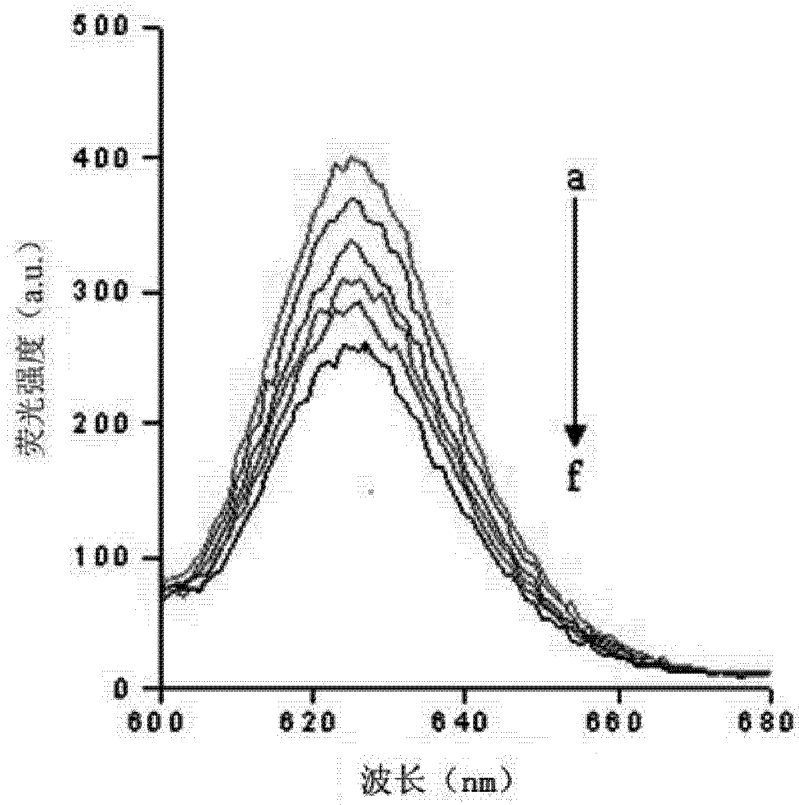


图 3

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 小分子有机物的量子点标记半抗原直接竞争免疫分析方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN102495204A | 公开(公告)日 | 2012-06-13 |
| 申请号 | CN201110399382.6 | 申请日 | 2011-12-06 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 扬州大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 扬州大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 扬州大学 | | |
| [标]发明人 | 刘曙照 冯大和 | | |
| 发明人 | 刘曙照 冯大和 | | |
| IPC分类号 | G01N33/536 G01N21/64 | | |
| 代理人(译) | 江平 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

小分子有机物的量子点标记半抗原直接竞争免疫分析方法，涉及快速检测小分子有机物的纳米荧光探针标记直接竞争免疫分析技术领域。以高效水溶性量子点作为纳米荧光探针标记目标分析物半抗原，将抗目标分析物抗体固定于水分散性聚苯乙烯磁性微球表面，封闭微球表面未结合抗体的位点后分散于水相中，加入含目标分析物的标样或待测样品及对应量子点标记目标分析物半抗原，待竞争性免疫反应平衡后在磁场中将聚苯乙烯磁性微球与液相迅速分离，对液相进行荧光检测，依据液相中量子点标记半抗原的荧光强度与对应目标分析物的浓度在一定范围内成正比的规律，建立高灵敏度快速检测目标小分子有机物的量子点标记半抗原直接竞争免疫分析技术。

