



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101907625 A

(43) 申请公布日 2010.12.08

(21) 申请号 201010220275.8

(22) 申请日 2010.07.08

(71) 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市浙江大学玉泉校
区周亦卿科技大楼 307

(72) 发明人 牛婉婷 张路遥 潘敏 陈裕泉

(74) 专利代理机构 杭州之江专利事务所 33216
代理人 连寿金

(51) Int. Cl.

G01N 33/536 (2006.01)

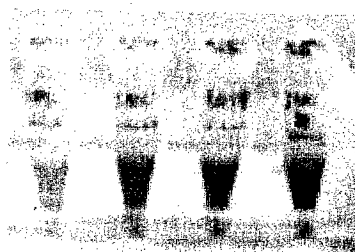
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种量子点免疫荧光探针的制备方法

(57) 摘要

本发明提供一种量子点免疫荧光探针的制备方法,水溶性量子点标记的单克隆抗体荧光探针是在羧基化修饰的量子点末端共价连接单克隆抗体,通常每个量子点可以连接一个或者一个以上的抗体分子,其制备方法是先在水溶液中利用水热法制得巯基丙酸修饰的量子点,再通过共价偶联的方法使羧基修饰的量子点连接抗体蛋白,得到既有良好的荧光特性又有优异的生物活性的量子点免疫荧光探针。同现有技术比较,本发明的优点是:该探针分散性好、特异性强、荧光强度大且耐光漂白,可应用于与免疫检测、细胞信号转导、生物细胞或组织的荧光成像技术等相关生物医学研究领域。该方法简单易行,可在一般的生物、化学实验室完成。



1. 一种量子点免疫荧光探针的制备方法,其特征在于采用如下步骤:

A) 用浓度为 0.2mol/L, pH 值为 7.2-7.6 的磷酸盐缓冲液溶解 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和 N-羧基琥珀酸亚胺,配制成羧基活化剂,活化剂中 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和 N-羧基琥珀酸亚胺的浓度均为 50mg/mL,将该活化剂按体积比 1 : 8 加入至浓度为 1mg/mL 市售羧基化量子点中,在室温下轻微振荡使羧基活化形成活泼酯,经高速离心机分离使量子点沉降,弃去上清液;

B) 往步骤 A) 的量子点沉淀中加入 A) 中使用的磷酸盐缓冲液,在涡旋振荡器上轻微振荡使量子点重新悬浮至 A) 加入活化剂后的体积,再高速离心机分离及重悬,照此重复 2 次,再次高速离心使量子点沉降;

C) 加入浓度为 1mg/mL 的抗体溶液,轻微振荡使量子点在抗体溶液中重新悬浮至步骤 A) 中加入活化剂后的体积,并使抗体与羧基活化的量子点充分接触,发生共价偶联反应,在室温下放置 1h,每隔 20min 轻微振荡一次,1h 后经低速离心机分离使形成的量子点团块沉降,所得上清液即为量子点免疫荧光探针。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:抗体是针对不同蛋白,或者蛋白的一个结构域,或者一段多肽的单克隆抗体,或者是针对来自不同物种蛋白的多克隆抗体。

一种量子点免疫荧光探针的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种量子点免疫荧光探针的制备方法,属于纳米材料学、生物分析化学、纳米生物学领域。

背景技术

[0002] 量子点 (quantum dots, QDs), 又称半导体纳米晶, 其半径小于或接近激子波尔半径, 主要由 II-VI 族元素 (如 CdTe、CdSe) 或 III-V 族元素 (如 GaAs、InP) 构成。量子点因具有独特的光学与电学特性近年来引起了科学界的广泛关注, 其在紫外-可见光范围内广泛而连续的吸收光谱, 窄且对称的荧光发射光谱使之具有单激发、多发射的多色标记功能。量子点还具有光稳定性好、耐光漂白的独特性质, 使其有望取代传统的有机荧光染料, 获得在生物学荧光标记领域的广泛应用。

[0003] 量子点在生物学标记领域的应用, 通常先需要与生物素 / 亲和素、抗体、寡核苷酸等生物分子结合, 形成生物荧光探针, 再加入样品中结合欲标记的相应配体、抗原或者核酸。量子点与抗体的结合可通过静电吸附法直接与抗体结合, 这种方法虽然简单易行, 但结合不够可靠, pH、温度、离子强度等环境因素改变可使量子点-抗体复合物解偶联。直接在水相中制备的水溶性量子点在制备过程中在其表面引入了大量的氨基或者羧基, 因此可以通过这些功能基团与抗体蛋白分子中的氨基或者羧基形成化学共价偶联, 得到稳定的量子点-抗体荧光探针

发明内容

[0004] 为拓展量子点在生物学领域内应用, 本发明提供了一种将水溶性羧基化量子点用于标记具有生物活性的抗体蛋白进而制备免疫荧光探针的方法, 该方法可将羧基化量子点有效地与抗体蛋白连接, 并很好地保持抗体的生物活性, 可应用于基于抗原抗体特异性结合的生物标记分析领域, 例如基于测量荧光强度的抗原 / 抗体定量分析、酶联免疫吸附分析、标记细胞中特定蛋白的胞内定位、研究核酸杂交等。

[0005] 本发明的量子点免疫荧光探针是在羧基化量子点末端连接特异性的抗体, 通常可连接一个或者一个以上抗体分子, 数目可以通过控制量子点和抗体的比例进行调整。

[0006] 其中羧基化量子点的核心为 CdTe、CdSe、CdTe/ZnS、CdSe/ZnS 中的任意一种, 且为水相中直接制备的, 以巯基丙酸或者其他含羧基的巯基化合物修饰的水溶性量子点。所用的抗体可以是针对一种蛋白或者某蛋白的一个结构域, 或者一段多肽的单克隆抗体, 也可以是针对来自不同物种蛋白的多克隆抗体。

[0007] 一种量子点免疫荧光探针的制备方法, 其特征在于采用如下步骤:

[0008] A) 用浓度为 0.2mol/L, pH 值为 7.2-7.6 的磷酸盐缓冲液溶解 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺和 N-羧基琥珀酸亚胺, 配制成羧基活化剂, 活化剂中 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺和 N-羧基琥珀酸亚胺的浓度均为 50mg/mL, 将该活化剂按体积比 1 : 8 加入至浓度为 1mg/mL 市售羧基化量子点中, 在室温下轻微振荡使羧基活化形成活泼酯, 经

高速离心机分离使量子点沉降,弃去上清液;

[0009] B) 往步骤 A) 的量子点沉淀中加入 A) 中使用的磷酸盐缓冲液,在涡旋振荡器上轻微振荡使量子点重新悬浮至 A) 加入活化剂后的体积,再高速离心机分离及重悬,照此重复 2 次,再次高速离心使量子点沉降;

[0010] C) 加入浓度为 1mg/mL 的抗体溶液,轻微振荡使量子点在抗体溶液中重新悬浮至步骤 A) 中加入活化剂后的体积,并使抗体与羧基活化的量子点充分接触,发生共价偶联反应,在室温下放置 1h,每隔 20min 轻微振荡一次,1h 后经低速离心机分离使形成的量子点团块沉降,得上清液即为量子点免疫荧光探针。

[0011] 本发明是在近年来发展起来的水热法直接制备水溶性量子点技术的基础上,用巯基丙酸作为稳定剂修饰量子点表面,使之带有大量的羧基功能基团,利用 EDC 和 NHS 或者其中之一作为羧基与氨基的偶联剂,将抗体可靠地连接在量子点表面。该方法简单易行、安全可靠,无需特殊仪器试剂,在大多数生物、化学实验室均可完成,适合推广应用用于生物医学标记分析领域。

附图说明

[0012] 图 1 为量子点免疫荧光探针的照片。

[0013] 图 2 为量子点免疫荧光探针的 TEM 图像。

[0014] 图 3 为量子点免疫荧光探针结合了 ELISA 板底部的抗原后的荧光显微镜照片。

具体实施方式

[0015] 实施例 1:

[0016] 将 0.4g 的 NaBH₄ 和 0.08g 碲粉加入 50mL 锥形瓶中,加入 5mL 去离子水,通氮气 20min,立即塞紧软胶塞,插入一个注射器针头,磁力搅拌 2h,得到乳白色新鲜制备的 NaHTe 溶液。取 0.5mL 浓度为 200mmol/L 的 CdCl₂ 水溶液,0.5mL 浓度为 200mmol/L 新鲜配制的巯基丙酸水溶液,加入另一个 50mL 锥形瓶中,加入 14ml 去离子水,滴加浓度为 1mol/L 的 NaOH 溶液,调整 pH 为 12.0,向上述溶液中通氮气 20min,立即塞紧软胶塞,插入一个注射器针头,用 1mL 注射器抽取新鲜制备的 NaHTe 溶液 0.2mL,快速注入装有 Cd 前驱液的锥形瓶中,将锥形瓶放入 96℃ 水浴锅中加热 1h,取出自然冷却至室温;打开装有反应混合物的锥形瓶的软胶塞,将溶液等分于两只 15mL 离心管中,再分别向两只离心管中加入与上清液等体积的无水乙醇,待有絮状物产生时,用 3000rpm/min 的速度离心分离 10min,吸出上清液,重复无水乙醇洗涤、离心分离步骤 2 次,最后一次将上清液除去后将离心管放置于恒温恒湿柜中过夜,得到 CdTe 量子点干粉。

[0017] 按如下方法取用水溶性量子点:将用 PBS 复溶的量子点干粉用 2% 的优级纯硝酸稀释 100,000 倍,根据卫生部标准 WS-T 174-1999 所述方法,用石墨炉原子吸收光谱法定量量子点中 Cd 的浓度,并换算成 CdTe 的浓度。用 pH 值为 7.2-7.6,0.2M 的 PBS 稀释量子点溶液至 1.0mg/mL,在涡旋振荡器上振荡分散 20s,取 1mL 备用。

[0018] 若抗体为自行纯化得到,则应避免添加叠氮钠作为防腐剂,可使用 proclin300 作为防腐剂,终质量百分浓度为 0.02%;若抗体为商品化的产品,则应在 4℃ 条件下对 PBS 透析过夜后使用,防止叠氮钠与活化的羧基结合,进而将其灭活,阻碍抗体的结合。抗体的浓

度可根据需要调整,优选 0.1-5mg/mL,更优选 0.5-2mg/mL 用于与量子点的偶联。

[0019] 将 EDC 和 NHS 分别配制成浓度为 50mg/mL 的溶液,为保证偶联的效率,偶联剂溶液应新鲜配制。

[0020] 取 2 个 1.5mL 离心管,向每个离心管中依次加入 100 μ L 分散好的量子点、540 μ L 去离子水,240 μ L PBS 以及 60 μ L EDC 和 60 μ L NHS 溶液。将离心管以锡纸包裹,放在摇床上室温下避光反应 30min。

[0021] 取出离心管,置于高速离心机中,室温下 12000rpm 离心分离 5min,使量子点沉降,弃去上清液。加入 1.0mL PBS,涡旋振荡 20s 重悬量子点,之后再次高速离心分离,重复 2 次,除去溶液中剩余的偶联剂。

[0022] 加入 200 μ L 浓度为 1.0mg/mL 不含叠氮钠的抗体溶液,加入装有量子点的离心管中,在涡旋振荡器上轻轻振荡使量子点在抗体溶液中均匀分散。用锡箔纸包裹离心管,放置在摇床上室温下振荡反应 1h。

[0023] 取出离心管,置于低速离心机中,3000rpm 离心 5min,去除可能形成的沉淀,所得上清即为水溶性量子点-抗体免疫荧光探针。

[0024] 将量子点免疫荧光探针通过透射电子显微镜 (TEM) 观察,可以看到所制备的探针中量子点具有良好的单分散性 (图 2)。用相应的抗原包被 ELISA 板,加入量子点免疫荧光探针与之结合,再分别用含有 Tween-20 的洗涤液以及 PBS 洗板 3 次,之后在荧光显微镜下观察,可清楚地看到探针的荧光 (图 3),表明探针具有良好的生物活性。进一步采用 ELISA 法测定探针中抗体的效价,结果可达 106,证明抗体的生物活性在探针制备的偶联反应中得到了很好的维持。



图 1

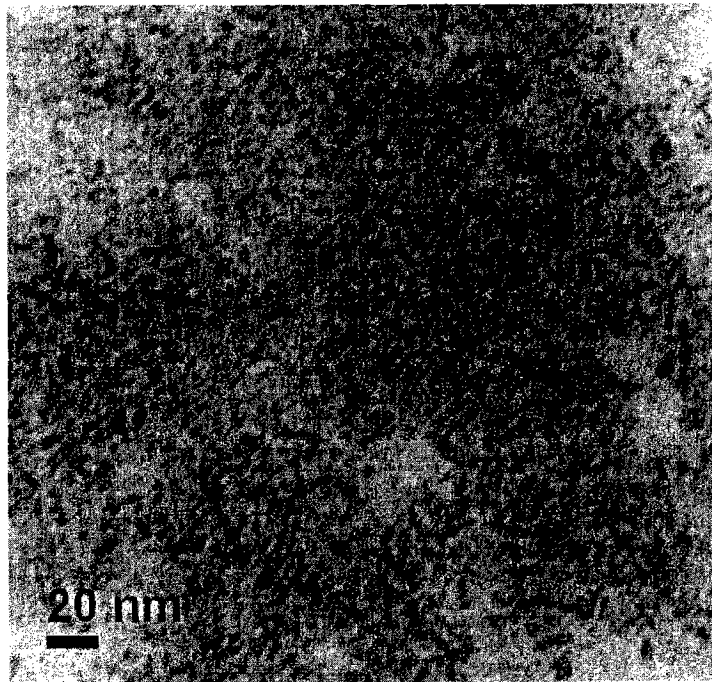


图 2

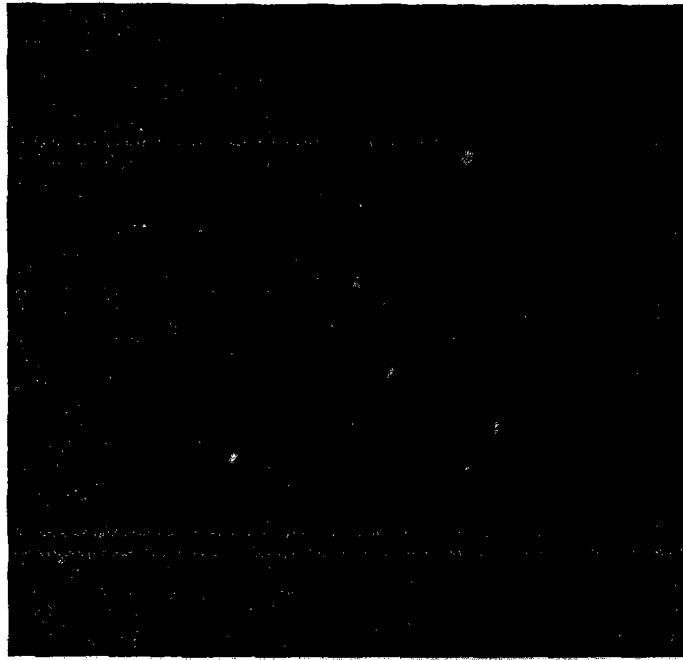


图 3

专利名称(译)	一种量子点免疫荧光探针的制备方法		
公开(公告)号	CN101907625A	公开(公告)日	2010-12-08
申请号	CN201010220275.8	申请日	2010-07-08
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	牛婉婷 张路遥 潘敏 陈裕泉		
发明人	牛婉婷 张路遥 潘敏 陈裕泉		
IPC分类号	G01N33/536		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种量子点免疫荧光探针的制备方法，水溶性量子点标记的单克隆抗体荧光探针是在羧基化修饰的量子点末端共价连接单克隆抗体，通常每个量子点可以连接一个或者一个以上的抗体分子，其制备方法是先在水溶液中利用水热法制得巯基丙酸修饰的量子点，再通过共价偶联的方法使羧基修饰的量子点连接抗体蛋白，得到既有良好的荧光特性又有优异的生物活性的量子点免疫荧光探针。同现有技术比较，本发明的优点是：该探针分散性好、特异性强、荧光强度大且耐光漂白，可应用于与免疫检测、细胞信号转导、生物细胞或组织的荧光成像技术等相关生物医学研究领域。该方法简单易行，可在一般的生物、化学实验室完成。

