



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104316684 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 28

(21) 申请号 201410538564. 0

(22) 申请日 2014. 10. 14

(71) 申请人 南昌大学

地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学府大道 999 号

(72) 发明人 许恒毅 傅芬 叶称连 聂丽菊
张婉怡

(74) 专利代理机构 南昌新天下专利商标代理有限公司 36115

代理人 施秀瑾

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

一种用于检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种用于检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒。试剂盒中的主要成分包括能够特异性识别宫颈癌细胞上 p¹⁶ 抗原的单克隆抗体 p^{16INK4A}, 生物素化兔抗鼠 IgG, 及量子点标记的链霉亲和素复合物, 以及连接试剂等。量子点标记的链霉亲和素复合物, 可以很好地识别生物素-p¹⁶ 抗原抗体复合物从而形成能够靶向结合宫颈癌细胞的特异性探针, 而不与不表达 P¹⁶ 抗原的细胞结合。未连接单克隆抗体 p^{16INK4A} 的量子点与宫颈癌细胞不结合或结合很少。本发明提供的这种试剂盒, 在宫颈癌诊断中有应用前景。

1. 一种用于检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒,其特征在于:该试剂盒包括 a)固定液, b) 渗透液, c) 洗涤液, d) 封闭液, e) 单克隆抗体 P^{16INK4A}, f) 生物素-兔抗鼠 IgG 复合物, g) 量子点(QDs) 标记的链霉亲和素(SA) 复合物探针即 QD-SA。

2. 根据权利要求 1 所述的用于检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒,其特征在于:所述的固定液是 0.01M pH 7.6 三羟基氨基甲烷-盐酸(TBS)缓冲液,与多聚甲醛溶液按体积百分比 100:4 配制。

3. 根据权利要求 1 所述的用于检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒,其特征在于:所述的渗透液是 0.01M pH 7.6 TBS 缓冲液,与吐温-20 按体积百分比 100:0.1 配制。

4. 根据权利要求 1 所述的用于检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒,其特征在于:所述的洗涤液是 0.01M pH 7.6 TBS 缓冲液,与牛血清白蛋白 BSA 按质量百分比 100:1 配制。

5. 根据权利要求 1 所述的用于检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒,其特征在于:所述的封闭液是 0.02M pH 7.6 TBS 缓冲液,与正常兔血清按体积百分比 100:10,并与牛血清白蛋白 BSA 按质量百分比 100:5 配制。

6. 根据权利要求 1 所述的用于检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒,其特征在于:所述的量子点为 CdSe、CdTe、CdSe/ZnS、CdTe/ZnS、CdTe/CdSe、InP、InAs、InGaAs、InGaP、InGaP/ZnS 中的一种或任意几种纳米粒子的组合。

7. 根据权利要求 1 所述的用于检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒,其特征在于:所述的生物素-兔抗鼠 IgG 复合物制备方法如下:

(1)取 15 mg 生物素,3.6 mg N-羟基丁二酰亚胺(NHSS),2.4 mg 乙基 3-(3-二甲氨基)碳二亚胺盐酸盐(EDC) 溶解于 2 mL 0.02 M pH 6.5 PBS 缓冲液中;

(2)将 5.3 mg 兔抗鼠 IgG 抗体加入到上述溶液中,室温置于混匀仪上搅拌 30 min;

(3)将上述溶液减压旋干溶剂,去离子水溶解,在 PBS 和去离子水中透析 1 d;透析结束将得到的溶液置于 -20°C 储存。

8. 根据权利要求 1 所述的用于检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒,其特征在于:所述的 QD-SA 复合物制备方法如下:

(1)取 200 μ L 8.3 μ M 量子点,采用活泼酯法,按照摩尔比 1:500 分别加入 0.166mgEDC 及 0.166mgNHS,溶于 300 μ L pH 5.5 的硼酸盐缓冲液,室温反应 5-10min;

(2)调整溶液 pH 到 8-8.5,按摩尔比 40:1 加入 4.38mg SA,持续混匀 2h 后,加入终浓度为 2% 的氨基葡萄糖反应 45min 终止反应;

(3)偶联所得量子点标记的 SA 复合物 10000r \cdot min⁻¹,离心 5min,除去少量沉淀后,用 pH 7 硼酸盐缓冲液在 100K 超滤管中洗涤,最后重悬于 0.2mL pH 7 的硼酸盐缓冲液中。

一种用于检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,涉及一种用于检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒,适用于宫颈癌细胞与组织抗原的准确、定量检测以及 QD-SA 复合物应用中的质量控制,还涉及该试剂盒在定量检测宫颈癌细胞与组织中抗原中的用途。

背景技术

[0002] 宫颈癌是目前严重威胁女性健康的妇科恶性肿瘤,其发病呈日益年轻化且发病率有逐年上升趋势。有数据统计,全世界每年约有宫颈癌新发病例 50 万,约有 2313 万妇女死于该病,其中 80% 的新发病例是发生在发展中国家,而我国每年宫颈癌新发病例约占全世界发病人数的 1/3。因此,提高宫颈癌的早期诊断水平对于宫颈癌的预后具有重要意义。传统的宫颈癌诊断方法包括影像学检查(如阴道镜检查)、实验室检查(如肿瘤标志物测定、细胞学检查及 HPV 检测等)和病理组织活检(如宫颈锥切及宫颈组织活检等)。传统检查方法固然有其实用性,但也存在弊端,因此,建立新的诊断和筛查技术对降低宫颈癌的死亡率至关重要。

[0003] 量子点是近年发展起来的一种新型纳米发光粒子,相对于传统染料,它具有荧光强度高、荧光寿命长、抗光漂白能力强、激发波谱宽、发射波谱窄及可同时激发多重荧光等独特的光学特性。这些特性使其在生物医学领域,尤其是作为一种新型标记物应用于肿瘤的分子病理及体外成像诊断方面,应用十分广泛。QDs 对宫颈癌的检测是通过构建特异性探针来实现的,即 QDs 与单个抗体、多肽或者其他生物小分子结合,制成高品质的荧光 QD 探针,靶向结合单个肿瘤细胞,从而实现宫颈癌的早期诊断。

[0004] p16 基因是一种多肿瘤抑制基因,是人们发现的第一个直接作用于细胞周期,抑制细胞分裂的基因。研究表明,p16 基因的缺失、突变和甲基化存在于多种人肿瘤细胞,提示其与肿瘤的发生、发展有着密切的关系。在对 p16 的进一步研究中,人们用免疫组织化学的方法检测 p16 蛋白后发现,在 90% 以上的宫颈癌病例中存在 p16 蛋白的高表达,且会随着宫颈癌病情的发展而呈现逐渐升高的趋势,但在正常细胞内无表达。因此, P¹⁶ 可作为宫颈癌特异性检测的靶向目标,通过构建量子点-链霉亲和素系统-生物素-抗原抗体复合物特异性靶向探针,进而实现宫颈癌的早期检测。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种用于检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒,并提供上述量子点试剂盒的用途。该试剂盒可与目前用于检测宫颈癌细胞与组织抗原的生物素化抗体相结合,可以达到快速、经济、灵敏、高效而准确地对肿瘤抗原进行检测。

[0006] 本发明解决上述技术问题所采取的技术方案是:一种用于检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒,其特征是:该试剂盒包括 a) 固定液, b) 渗透液, c) 洗涤液, d) 封闭液, e) 单克隆抗体 P^{16INK4A}, f) 生物素-兔抗鼠 IgG 复合物, g) 量子点(QDs)标记的链霉亲和素(SA)复合物探针;采用水溶性 CdSe/ZnS 核壳型量子点标记的链霉亲和素复合物作为荧光探针,与

检测宫颈癌细胞上的生物素化抗原抗体复合物结合,从而间接标记并检测宫颈癌细胞上的 P¹⁶ 抗原。所述的固定液是 0.01M pH 7.6 TBS 缓冲液,与多聚甲醛溶液按体积百分比 100 : 4 配制。渗透液是 0.01M pH 7.6 TBS 缓冲液,与吐温 -20 按体积百分比 100 :0.1 配制。洗涤液是 0.01M pH 7.6 TBS 缓冲液,与牛血清白蛋白 BSA 按质量百分比 100 :1 配制。封闭液是 0.02M pH 7.6 TBS 缓冲液,与正常兔血清按体积百分比 100 :10,并与牛血清白蛋白 BSA 按质量百分比 100 :5 配制。

[0007] 所述的单克隆抗体 P^{16INK4A} 在宫颈癌细胞上对应的受体呈高表达(达 90% 以上),而在其他正常细胞上呈低表达。所述的量子点为 CdSe、CdTe、CdSe/ZnS、CdTe/ZnS、CdTe/CdSe、InP、InAs、InGaAs、InGaP、InGaP/ZnS 中的一种纳米粒子或任意几种纳米粒子的组合。

[0008] 所述的生物素 - 兔抗鼠 IgG 复合物制备方法如下:

(1) 取 15 mg 生物素, 3.6 mg N- 羟基丁二酰亚胺(NHSS), 2.4 mg 乙基 3- (3- 二甲氨基) 碳二亚胺盐酸盐(EDC) 溶解于 2 mL 0.02 M pH 6.5 PBS 缓冲液中;

(2) 将 5.3 mg 兔抗鼠 IgG 抗体加入到上述溶液中, 室温置于混匀仪上搅拌 30 min;

(3) 将上述溶液减压旋干溶剂, 去离子水溶解, 在 PBS 和去离子水中透析 1 d; 透析结束将得到的溶液置于 -20°C 储存。

[0009] 所述的 QD-SA 复合物制备方法如下:

(1) 取 200 μ L 量子点(浓度为 8.3 μ M), 采用活泼酯法, 按照摩尔比 1:500 分别加入 0.166mgEDC 及 0.166mgNHS, 溶于 300 μ L pH 5.5 的硼酸盐缓冲液, 室温反应 5-10min;

(2) 调整溶液 pH 到 8-8.5, 按摩尔比 40:1 加入 4.38mg SA, 持续混匀 2h 后, 加入终浓度为 2% 的氨基葡萄糖反应 45min 终止反应;

(3) 偶联所得量子点标记的 SA 复合物 10000r \cdot min⁻¹, 离心 5min, 除去少量沉淀后, 用 pH 7 硼酸盐缓冲液在 100K 超滤管中洗涤(10 倍体积交换), 最后重悬于 0.2mL pH 7 的硼酸盐缓冲液中。步骤 2 中的氨基葡萄糖, 分子式为 C₆H₁₃O₅N, 可通过其上的氨基封闭偶联产物中量子点表面残留的羧基, 减少偶联产物对肿瘤组织及细胞的非特异性吸附。

[0010] 针对上述的量子点试剂盒的用途, 用于检测宫颈癌细胞, 具体步骤如下:

(1) 获取对数期生长的 HeLa 细胞, 种植于 96 孔板内, 约 1x10⁴ 个 / 孔细胞, 于 37°C、5% CO₂ 培养箱内孵育 24h, 保证 90% 以上细胞贴壁;

(2) 洗涤液冲洗 3 次, 采用固定液在常温下固定细胞 15min, 立即用洗涤液冲洗 3 次;

(3) 用渗透液常温下渗透细胞 20min, 洗涤液冲洗 3 次后用封闭液封闭细胞上的非特异性结合位点 1h;

(4) 除去封闭液, 加入适量单克隆抗体 P^{16INK4A} 与细胞在常温下共孵育 2h;

(5) 洗涤液冲洗 3 次(每次 5min) 后, 加入生物素化 - 兔抗鼠 IgG 复合物与细胞在常温下共孵育 1h, 用洗涤液冲洗 3 次(每次 5min);

(6) 加入适量 QD-SA 复合物反应 30min, 冲洗 3 次脱去背景色, 后立即在倒置荧光显微镜下观察荧光信号并通过荧光信号采集系统进行定量分析。

[0011] 针对上述的量子点试剂盒的用途, 用于检测宫颈癌石蜡包埋组织, 具体步骤如下:

(1) 临床常规宫颈癌石蜡包埋组织, 按常规免疫组化要求切片, 并将切片脱蜡水化, 按照待测抗原的要求进行抗原修复;

(2) 清洗液冲洗 3 次, 蒸馏水冲洗。用含 3% H_2O_2 的渗透液常温下渗透细胞 20min, 洗涤液冲洗 3 次后用封闭液封闭组织切片上非特异性结合位点 1h;

(3) 除去封闭液, 加入适量单克隆抗体 P^{16INK4A} 与细胞在常温下共孵育 2h;

(4) 洗涤液冲洗 3 次(每次 5min) 后, 加入生物素化 - 兔抗鼠 IgG 复合物与细胞在常温下共孵育 1h, 用洗涤液冲洗 3 次(每次 5min);

(5) 加入适量 QD-SA 复合物反应 30min, 冲洗 3 次脱去背景色, 后立即在倒置荧光显微镜下观察荧光信号并通过荧光信号采集系统进行定量分析, 之后用树脂封片保存。

[0012] 本发明技术原理见图 1, 采用本发明技术方案具有如下有益效果:

1、本发明借助了生物素 - 链霉亲和素系统的信号放大效应, 将量子点荧光信号成倍放大, 在较低的肿瘤抗原表达量下也能实现肿瘤细胞的检测;

2、本方案为将抗体分子与生物素偶联, 避免了常规方法中将抗体分子偶联于量子点表面导致抗体活性降低和空间位阻大的缺点;

3、相对于传统肿瘤细胞组织免疫染色的方法, 量子点因其自身独特的光学性质, 使得免疫荧光信号强度高、持续时间长, 且结果容易保存及反复观察;

4、本发明在制备 QD-SA 过程中, 引入氨基葡萄糖, 通过其上的氨基封闭偶联产物中量子点表面残留的羧基, 一方面, 中和了偶联产物表面所带电荷, 另一方面, 封闭羧基转变为中性的羟基, 降低了 QD-SA 偶联物的表面 ζ 电位, 可提高偶联产物的回收效率, 同时减少偶联产物对肿瘤组织及细胞的非特异性吸附, 降低背景效应;

5、本发明操作简单, 易于标准化, 外界影响因素相对较小, 重复性好, 结果判断便利, 且可通过采集荧光信号来达到荧光强度定量分析, 间接反映肿瘤组织或细胞上抗原的表达情况。

附图说明

[0013] 图 1 常规量子点免疫荧光检测肿瘤原理(A), 本发明所涉及量子点免疫荧光检测肿瘤原理(B);

图 2 量子点试剂盒体外检测宫颈癌 HeLa 细胞图;(A)使用生物素 - 链霉亲和素信号放大系统的 HeLa 细胞量子点成像图;(B)不使用生物素 - 链霉亲和素系统, 传统 HeLa 细胞量子点成像图;(C)不加一抗处理, 使用未处理(即不与氨基葡萄糖反应)量子点染色的 HeLa 细胞非特异性成像图;(D)不加一抗处理, 使用氨基葡萄糖处理量子点后的 HeLa 细胞非特异性染色图;(E)量子点试剂盒体外染色肺癌 A549 细胞图;标尺:20 μm ;

图 3 量子点试剂盒体外检测宫颈癌石蜡组织切片图及 IHC、HE 染色图;(A)使用生物素 - 链霉亲和素信号放大系统的宫颈癌量子点组织成像图及 IHC、HE 染色图,(B)不使用生物素 - 链霉亲和素系统, 传统宫颈癌量子点组织成像图及 IHC、HE 染色图;(C)对照组, 不加一抗后的量子点、IHC 及 HE 染色图,(D)对照组, 量子点试剂盒体外检测健康宫颈石蜡组织切片图及 IHC、HE 染色图。标尺:100 μm 。

具体实施方式

[0014] 为了使本发明更加清楚明白, 以下结合实施例, 对本发明进行进一步详细说明。应当理解, 此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明, 并不用于限定本发明。

[0015] 实施例 1 用检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒在体外检测宫颈癌 HeLa 细胞上的应用运用本发明的技术方案,分别制备生物素化的抗体复合物及量子点标记的链霉亲和素复合物,用于特异性靶向结合肿瘤组织或细胞上的抗原。

[0016] 长链生物素为购买于美国 Thermo Fisher Scientific 公司羧基化长链生物素(产品号:21327)。

[0017] 羧基功能化的量子点 QD550 (绿色荧光,9nm) 购买于美国 Ocean 公司。

[0018] 所述的固定液是 0.01M pH 7.6 TBS 缓冲液,与多聚甲醛溶液按体积百分比 100 :4 配制。

[0019] 渗透液是 0.01M pH 7.6 TBS 缓冲液,与吐温 -20 按体积百分比 100 :0.1 配制。

[0020] 洗涤液是 0.01M pH 7.6 TBS 缓冲液,与牛血清白蛋白 BSA (BIOSHARP 公司)按质量百分比 100 :1 配制。

[0021] 封闭液是 0.02M pH 7.6 TBS 缓冲液,与正常兔血清(武汉 BOSTER 公司)按体积百分比 100 :10,并与牛血清白蛋白 BSA 按质量百分比 100 :5 配制。

[0022] 1、按照如下步骤制备生物素 - 兔抗鼠 IgG 复合物 :

(1)取 15 mg 生物素(华蓝化学公司),3.6 mg N-羟基丁二酰亚胺(NHSS),2.4 mg 乙基 3-(3-二甲氨基)碳二亚胺盐酸盐(EDC) (美国 Sigma-Aldrich 公司)溶解于 2 mL 0.02 M pH 6.5 PBS 缓冲液中 ;

(2)将 5.3 mg 兔抗鼠 IgG 抗体(武汉 BOSTER 公司)加入到上述溶液中,室温置于混匀仪上搅拌 30 min ;

(3)将上述溶液减压旋干溶剂,去离子水溶解,在 PBS 和去离子水中透析 1 d ;透析结束将得到的溶液置于 -20℃ 储存。

[0023] 2、按照如下步骤制备 QD-SA 复合物 :

(1)取 200 μ L 8.3 μ M 量子点,采用活泼酯法,按照摩尔比 1:500 分别加入 0.166mgEDC 及 0.166mgNHS,溶于 300 μ L pH 5.5 的硼酸盐缓冲液,室温反应 5-10min ;

(2)调整溶液 pH 到 8-8.5,按摩尔比 40:1 加入 4.38mg SA (华蓝化学公司),持续混匀 2h 后,加入终浓度为 2% 的氨基葡萄糖反应 45min 终止反应 ;

(3)偶联所得量子点标记的 SA 复合物 10000r \cdot min⁻¹,离心 5min,除去少量沉淀后,用 pH 7 硼酸盐缓冲液在 100K 超滤管中洗涤(10 倍体积交换),最后重悬于 0.2mL pH 7 的硼酸盐缓冲液中。

[0024] 3、实验组 :获取对数期生长的 HeLa 细胞(江西省南昌大学第一附属医院实验中心馈赠),种植于 96 孔板内,约 1×10^4 个 / 孔细胞,于 37℃、5% CO₂ 培养箱内孵育 24h,保证 90% 以上细胞贴壁。洗涤液冲洗 3 次,采用固定液在常温下固定细胞 15min,立即用洗涤液冲洗 3 次。用渗透液常温下渗透细胞 20min,洗涤液冲洗 3 次后用封闭液封闭细胞上的非特异性结合位点 1h。除去封闭液,加入适量单克隆抗体 P^{161NK4A} (中杉金桥公司)与细胞在常温下共孵育 2h。洗涤液冲洗 3 次(每次 5min)后,加入生物素化 - 兔抗鼠 IgG 复合物与细胞在常温下共孵育 1h,用洗涤液冲洗 3 次(每次 5min)。加入适量 QD-SA 复合物反应 30min,冲洗 3 次脱去背景色,后在倒置荧光显微镜(Nikon 公司)下观察荧光信号并通过荧光信号采集系统进行定量分析。每组重复 3 次。

[0025] 4、对照组 :做四组对照组,取相同量的 HeLa 细胞种植于 96 孔板内,前期处理同实

验组,第一组为不使用生物素-链霉亲和素系统,直接用 QD-IgG 对孵育了一抗的 HeLa 细胞进行染色;第二组为细胞内不加入单克隆抗体 P^{16INK4A},而使用相同体积相同浓度的 1XPBS 液替代,同时使用未用氨基葡萄糖处理的 QD-SA 对 HeLa 细胞进行染色,余处理同实验组;第三组为细胞内不加入单克隆抗体 P^{16INK4A},而使用相同体积相同浓度的 1XPBS 液替代,同时使用氨基葡萄糖处理过的 QD-SA 对 HeLa 细胞进行染色,余处理同实验组;第四组则另取相同数量的肺癌 A549 细胞作为另一组对照,所有处理都与实验组相同。

[0026] 5、结果:结果发现使用了本发明生物素-链霉亲和素信号放大系统的 HeLa 细胞每一个都有高强度的绿色荧光(图 2A),而未使用生物素-链霉亲和素信号放大系统的 HeLa 细胞荧光强度明显更暗(图 2B),未加单克隆抗体 P^{16INK4A} 处理的 HeLa 细胞见明显更少或者无绿色荧光(图 2C、2D),但是使用了氨基葡萄糖处理组非特异性染色明显较弱(图 2D),肺癌 A549 细胞只有比较少且暗的绿色荧光,多数没有绿色荧光(图 2E)。可见本发明提供的量子点试剂盒能够很好地识别表达 p¹⁶ 的宫颈癌细胞,在宫颈癌检测上具有很高的应用价值。

[0027] 实施例 2 用检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒在体外检测宫颈癌石蜡包埋组织的应用

1、按照如下步骤制备生物素-兔抗鼠 IgG 复合物:

(1)取 15 mg 生物素,3.6 mg N-羟基丁二酰亚胺(NHSS),2.4 mg 乙基 3-(3-二甲氨基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶解于 2 mL 0.02 M pH 6.5 PBS 缓冲液中;

(2)将 5.3 mg 兔抗鼠 IgG 抗体加入到上述溶液中,室温置于混匀仪上搅拌 30 min;

(3)将上述溶液减压旋干溶剂,去离子水溶解,在 PBS 和去离子水中透析 1 d;透析结束将得到的溶液置于 -20°C 储存。

[0028] 2、按照如下步骤制备 QD-SA 复合物:

(1)取 200 μ L 8.3 μ M 量子点,采用活泼酯法,按照摩尔比 1:500 分别加入 0.166mgEDC 及 0.166mgNHS,溶于 300 μ L pH 5.5 的硼酸盐缓冲液,室温反应 5-10min;

(2)调整溶液 pH 到 8-8.5,按摩尔比 40:1 加入 4.38mg SA,持续混匀 2h 后,加入终浓度为 2% 的氨基葡萄糖反应 45min 终止反应;

(3)偶联所得量子点标记的 SA 复合物 10000r·min⁻¹,离心 5min,除去少量沉淀后,用 pH 7 硼酸盐缓冲液在 100K 超滤管中洗涤(10 倍体积交换),最后重悬于 0.2mL pH 7 的硼酸盐缓冲液中。

[0029] 3、实验组:临床常规宫颈癌石蜡包埋组织,按常规免疫组化要求切片,并将切片脱蜡水化,按照待测抗原的要求进行抗原修复。清洗液冲洗 3 次,蒸馏水冲洗。用含 3%H₂O₂ 的渗透液常温下渗透细胞 20min,洗涤液冲洗 3 次后用封闭液封闭组织切片上非特异性结合位点 1h。除去封闭液,加入适量单克隆抗体 P^{16INK4A} 与组织在常温下共孵育 2h。洗涤液冲洗 3 次(每次 5min)后,加入生物素化-兔抗鼠 IgG 复合物与组织在常温下共孵育 1h,用洗涤液冲洗 3 次(每次 5min)。加入适量 QD-SA 复合物反应 30min,冲洗 3 次脱去背景色,后即在倒置荧光显微镜下观察荧光信号并通过荧光信号采集系统进行定量分析,之后用树脂封片保存。每组重复 3 次。

[0030] 4、对照组:做三组对照组,临床常规宫颈癌石蜡包埋组织,前期处理同实验组,第一组为不使用生物素-链霉亲和素系统,直接用 QD-IgG 对孵育了一抗的宫颈癌组织进行染色;第二组为不加入单克隆抗体 P^{16INK4A},而使用相同体积相同浓度的 1XPBS 液替代,余处理

同实验组。第三组则另取临床常规处理正常宫颈组织石蜡包埋组织作为另一组对照,所有处理都与实验组相同。

[0031] 5、结果:通过荧光显微镜成像,可观察到宫颈癌 P¹⁶ 抗原的体外标记成像,宫颈癌组织结构和抗原分布清晰,与原始 IHC 和 HE 染色对比可看到量子点对 P¹⁶ 的识别部位一致(图 3A);而不使用生物素-链霉亲和素系统组其荧光强度明显更弱(图 3B);对照组中不加单克隆抗体 P^{16INK4A} 组,可见视野内没有出现明显的 QDs 绿色荧光(图 3C),且对照组中正常宫颈组织也未见明显绿色荧光(图 3D),证实量子点试剂盒对宫颈癌组织成像的高度特异性及有效性。

[0032] 实施例 3 利用本发明试剂盒检测实际患者是否为宫颈癌患者的具体实施过程

本发明用于检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒,包括 a) 固定液, b) 渗透液, c) 洗涤液, d) 封闭液, e) 单克隆抗体 P^{16INK4A}, f) 生物素-兔抗鼠 IgG 复合物, g) 量子点(QDs) 标记的链霉亲和素(SA) 复合物探针即 QD-SA;

所述的固定液是 0.01M pH 7.6 三羟基氨基甲烷-盐酸(TBS)缓冲液,与多聚甲醛溶液按体积百分比 100:4 配制;

所述的渗透液是 0.01M pH 7.6 TBS 缓冲液,与吐温-20 按体积百分比 100:0.1 配制;

所述的洗涤液是 0.01M pH 7.6 TBS 缓冲液,与牛血清白蛋白 BSA 按质量百分比 100:1 配制;

所述的封闭液是 0.02M pH 7.6 TBS 缓冲液,与正常兔血清按体积百分比 100:10,并与牛血清白蛋白 BSA 按质量百分比 100:5 配制;

羧基功能化的量子点 QD550 (绿色荧光,9nm) 购买于美国 Ocean 公司。

[0033] 1、按照如下步骤制备生物素-兔抗鼠 IgG 复合物:

(1)取 15 mg 生物素,3.6 mg N-羟基丁二酰亚胺(NHSS),2.4 mg 乙基 3-(3-二甲氨基)碳二亚胺盐酸盐(EDC) 溶解于 2 mL 0.02 M pH 6.5 PBS 缓冲液中;

(2)将 5.3 mg 兔抗鼠 IgG 抗体加入到上述溶液中,室温置于混匀仪上搅拌 30 min;

(3)将上述溶液减压旋干溶剂,去离子水溶解,在 PBS 和去离子水中透析 1 d;透析结束将得到的溶液置于 -20℃ 储存。

[0034] 2、按照如下步骤制备 QD-SA 复合物:

(1)取 200 μ L 8.3 μ M 量子点,采用活泼酯法,按照摩尔比 1:500 分别加入 0.166mgEDC 及 0.166mgNHS,溶于 300 μ L pH 5.5 的硼酸盐缓冲液,室温反应 5-10min;

(2)调整溶液 pH 到 8-8.5,按摩尔比 40:1 加入 4.38mg SA,持续混匀 2h 后,加入终浓度为 2% 的氨基葡萄糖反应 45min 终止反应;

(3)偶联所得量子点标记的 SA 复合物 10000r \cdot min⁻¹,离心 5min,除去少量沉淀后,用 pH 7 硼酸盐缓冲液在 100K 超滤管中洗涤(10 倍体积交换),最后重悬于 0.2mL pH 7 的硼酸盐缓冲液中。

[0035] 3、实验组:收集临床上宫颈癌组织 20 例及正常宫颈组织 15 例,都由医院有经验病理科医生证实以后的组织。每个组织由病理科医生分别作成至少 3 张切片,厚度为 4 μ m,分别采用 3 种方式对这些组织进行染色,一种为本发明所涉及的量子点试剂盒对其进行染色,一种为不是使用生物素-链霉亲和素信号放大系统对其进行染色,另一种则是传统的免疫组化染色,具体实施过程同实施例 2。

[0036] 4、结果：显示采用生物素-链霉亲和素信号放大系统对于宫颈癌的检测明显有更高的灵敏度及特异性，且相对于传统的免疫组化，量子点检测试剂盒有简便、快速、灵敏度高等优势。

[0037] 表 1 不同染色方式对宫颈癌检测的效率比较

(a)	病理(+)	病理(-)
QD-SA 染色(+)	20	3
QD-SA 染色(-)	0	12
总数	20	15
灵敏度	100%	
特异度	80%	
(b)	病理(+)	病理(-)
QD-IgG 染色(+)	18	3
QD-IgG 染色(-)	2	12
总数	20	15
灵敏度	90%	
特异度	80%	
(c)	病理(+)	病理(-)
IHC (+)	16	5
IHC (-)	4	10
总数	20	15
灵敏度	80%	
特异度	67%	

以上所述仅为本发明的较佳实施例，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

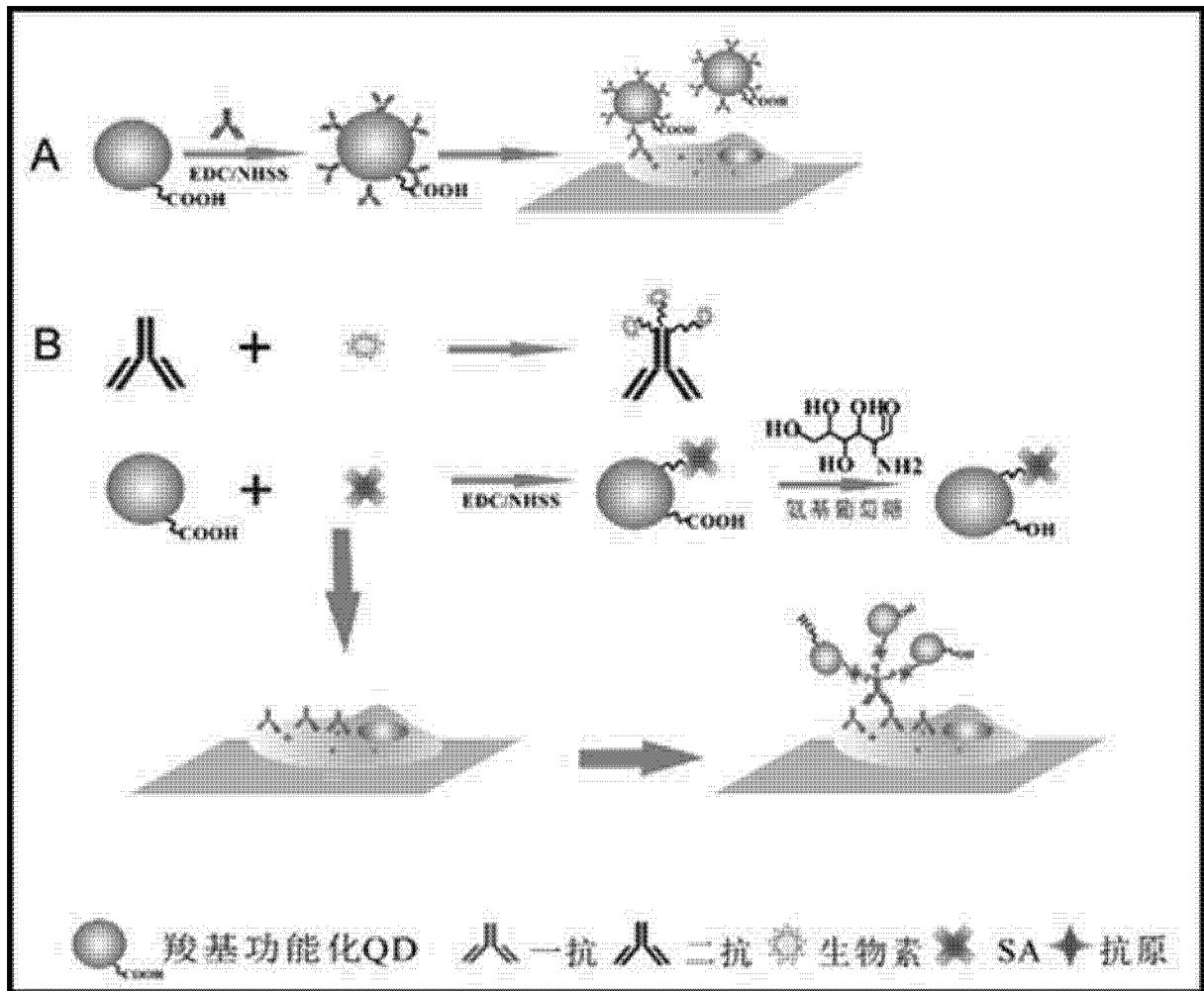


图 1

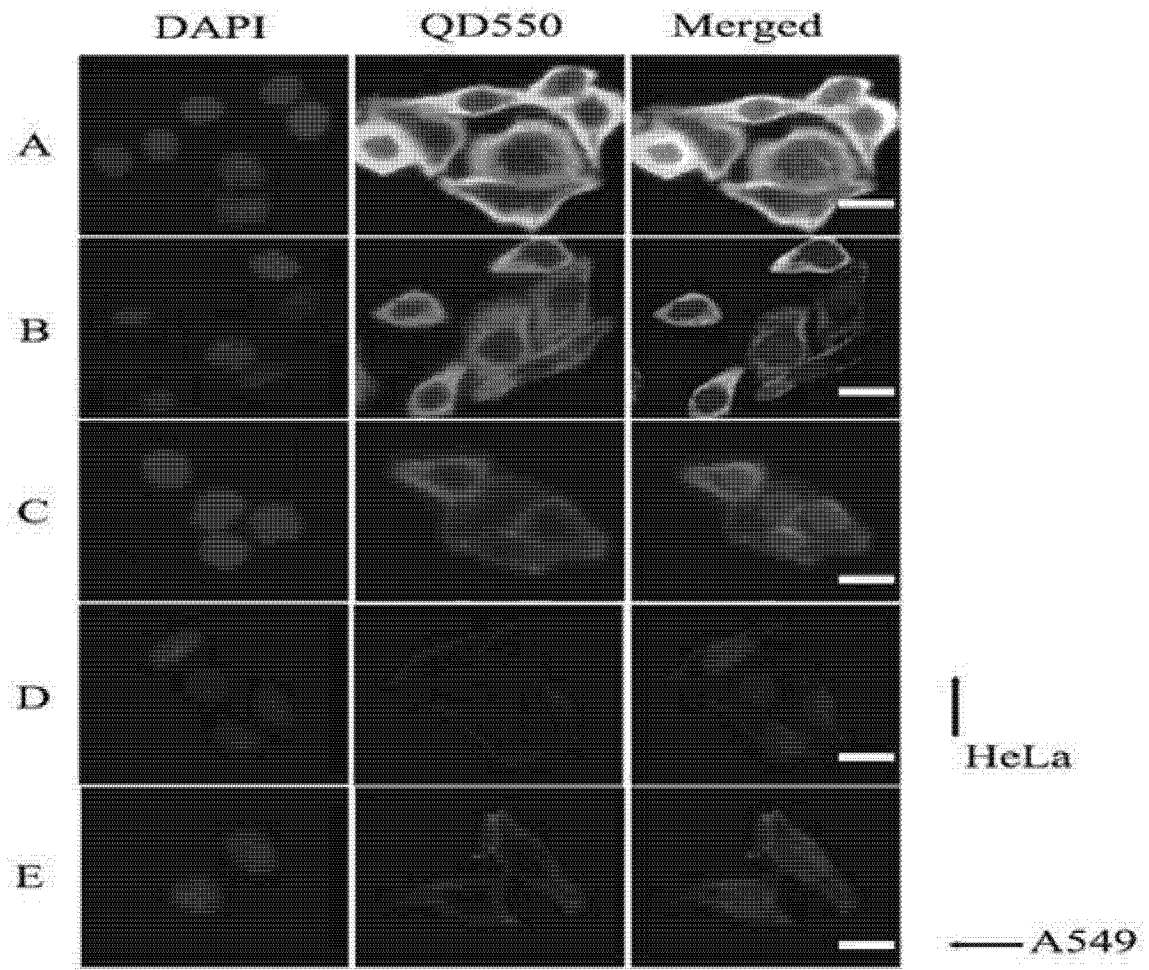


图 2

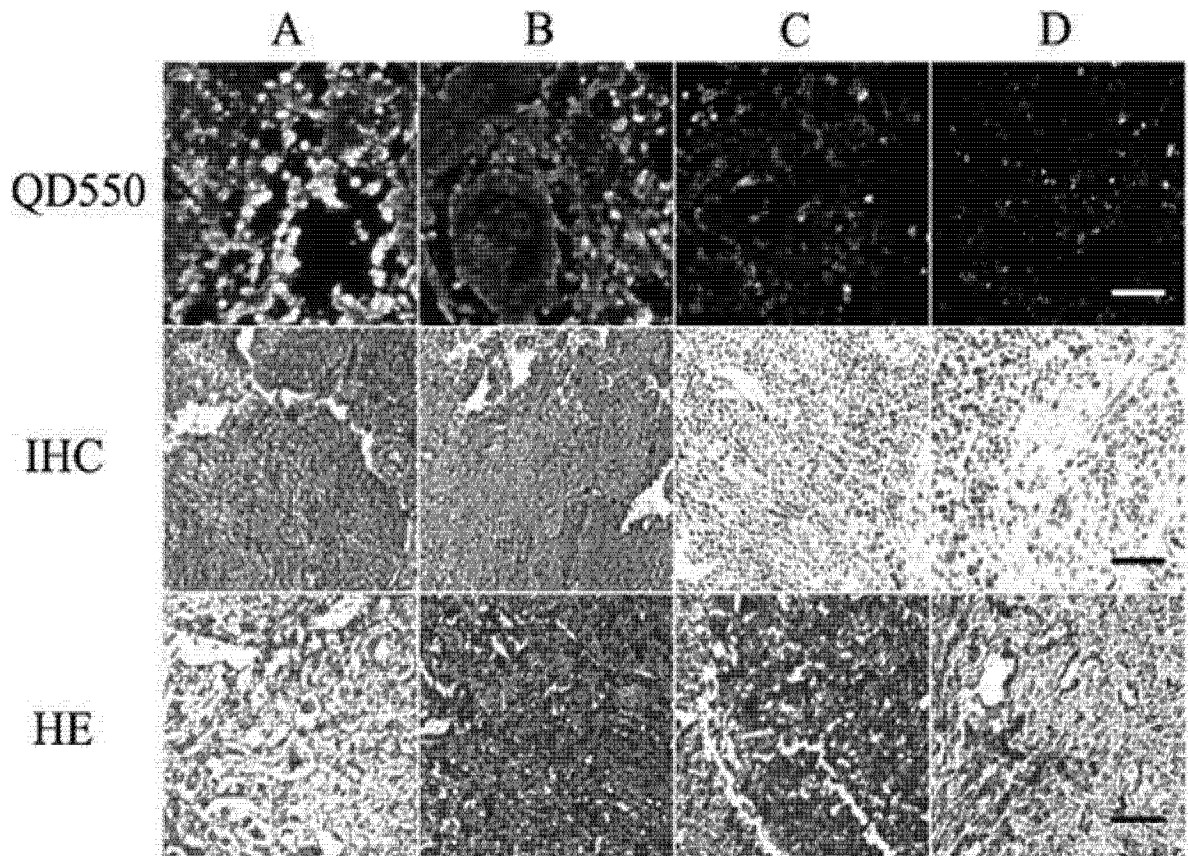


图 3

专利名称(译)	一种用于检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒		
公开(公告)号	CN104316684A	公开(公告)日	2015-01-28
申请号	CN201410538564.0	申请日	2014-10-14
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	许恒毅 傅芬 叶称连 聂丽菊 张婉怡		
发明人	许恒毅 傅芬 叶称连 聂丽菊 张婉怡		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/57411 G01N33/533 G01N33/582		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

本发明提供一种用于检测宫颈癌的量子点免疫荧光试剂盒。试剂盒中的主要成分包括能够特异性识别宫颈癌细胞上p16抗原的单克隆抗体p16INK4A，生物素化兔抗鼠IgG，及量子点标记的链霉亲和素复合物，以及连接试剂等。量子点标记的链霉亲和素复合物，可以很好地识别生物素-p16抗原抗体复合物从而形成能够靶向结合宫颈癌细胞的特异性探针，而不与不表达P16抗原的细胞结合。未连接单克隆抗体p16INK4A的量子点与宫颈癌细胞不结合或结合很少。本发明提供的这种试剂盒，在宫颈癌诊断中有应用前景。

