



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110082521 A

(43)申请公布日 2019.08.02

(21)申请号 201910292989.0

(22)申请日 2019.04.12

(71)申请人 西安交通大学苏州研究院

地址 215123 江苏省苏州市工业园区仁爱
路99号C110

(72)发明人 胡延祯 李超

(74)专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有
限公司 32103

代理人 周敏

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复
合物的制备方法及试纸条的制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种量子点-肌酸激酶同工酶MB
抗体免疫复合物的制备方法,使量子点与1-乙
基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐和N-
羟基琥珀酰亚胺或其硫代物反应,控制量子点、
1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸
盐、N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物的投料摩尔比
为1:4000~10000:5000~10000;调整反应液的pH
为6~8;向反应液中加入肌酸激酶同工酶MB抗体,
控制量子点和肌酸激酶同工酶MB抗体的投料摩
尔比为1:10~18。本发明偶联效果好,制备方法简
单,成本低廉。本发明制得的试纸条的标准曲线
好,检测灵敏度高,能够实现肌酸激酶同工酶MB
抗原的准确定量检测。

1. 一种量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1)、使量子点与1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物进行反应,控制所述的量子点、所述的1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐、所述的N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物的投料摩尔比为1:4000~10000:5000~10000;

(2)、调整步骤(1)处理后的反应液的pH为6~8;

(3)、向步骤(2)处理后的反应液中加入肌酸激酶同工酶MB抗体制得所述的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物,控制所述的量子点和所述的肌酸激酶同工酶MB抗体的投料摩尔比为1:10~18。

2. 根据权利要求1所述的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的制备方法,其特征在于:步骤(1)中,所述的量子点的平均粒径为10~30nm,发射波长范围为560nm~650nm。

3. 根据权利要求1所述的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的制备方法,其特征在于:步骤(1)中,所述的量子点、所述的1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐、所述的N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物的投料摩尔比为1:4000~6000:8000~10000。

4. 根据权利要求1所述的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的制备方法,其特征在于:步骤(1)的反应条件为冰浴超声,反应时间为20~40min。

5. 根据权利要求1所述的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的制备方法,其特征在于:步骤(1)反应完成后,采用超滤法除去过量的1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物,然后通过添加pH为6~8的硼酸缓冲液调整反应液的pH。

6. 根据权利要求1所述的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的制备方法,其特征在于:步骤(3)中,所述的量子点和所述的肌酸激酶同工酶MB抗体的投料摩尔比为1:13~16。

7. 根据权利要求1所述的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的制备方法,其特征在于:步骤(3)的反应条件为冰浴超声,反应时间为2~5h。

8. 一种试纸条的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1)采用处理液处理样品垫和结合垫;

(2)采用如权利要求1至7中任一项所述的制备方法制得的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物处理步骤(1)处理后的结合垫;

(3)采用肌酸激酶同工酶MB抗体和羊抗鼠IgG多克隆抗体在硝酸纤维素膜上包被检测线和质控线,然后使用封闭液封闭包被后的硝酸纤维素膜;

(4)将步骤(1)处理后的样品垫,步骤(2)处理后的结合垫,步骤(3)处理后的硝酸纤维素膜、吸水垫和载体依次层叠,制成所述的试纸条。

9. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于:步骤(1)中,以质量分数计,所述的处理液为含有1~5%的牛血清白蛋白、1~3%的吐温20、0.5~1.5%的NaCl、1~5%的蔗糖和1~3%的聚乙二醇2000的pH为7~9的硼酸缓冲液;步骤(3)中,以质量分数计,所述的封闭液为含有质量分数为0.5~2%的牛血清白蛋白的pH值为7~9的硼酸缓冲溶液。

10. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于:步骤(3)中,采用浓度为0.5~2mg/ml的肌酸激酶同工酶MB抗体溶液以0.5~1μl/cm的划线速度在所述的硝酸纤维素膜上制得检

测线,采用浓度为0.5~1 mg/ml的羊抗鼠IgG多克隆抗体溶液以0.5~1 μ l/cm的划线速度在硝酸纤维素膜上制得质控线。

一种量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的制备方法 及试纸条的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物标记领域,具体涉及一种量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的制备方法及试纸条的制备方法。

背景技术

[0002] 量子点(Quantum dots, QDs)是主要由ⅡB族~VIA族元素(如CdSe、CdTe、CdS、ZnSe等)或ⅢA族~VA族元素(如InP、InAs等)构成的半导体纳米颗粒,三个维度尺寸均在100nm以下,外观恰似一个点状物。水相合成的量子点生物相容性好,容易引入功能性基团。量子点与传统有机常规荧光材料相比,具有特殊的荧光特性:1)发射光谱可通过改变尺寸大小和组成来控制,颜色可调,可实现同种量子点多色标记;2)有机染料荧光分子激发光单一,发射光谱宽,有拖尾,而量子点由于其特殊的量子限域效应,激发光谱宽,发射光谱窄而对称,无长波拖尾;3)较大的斯托克斯位移,避免激发光谱与发射光谱的重叠,利于荧光光谱的检测;4)光化学稳定性高,耐光漂白,可经受反复多次的激发;5)荧光效率高;6)生物相容性好,经过各种化学修饰之后,可进行特异性连接;7)荧光寿命长,当激发光关闭数纳秒以后,量子点荧光仍然存在,可获得无背景干扰的荧光信号。

[0003] 而量子点作为新型的纳米材料,其生物荧光标记的制备方法分为非共价连接和共价连接。其中非共价连接主要有静电吸附,特异性生物靶标连接,链霉素-生物素连接等;共价连接包括量子点表面功能基团羧基、氨基、羟基等,在不同激活剂的活化下分别与生物分子的氨基、巯基等共价连接。其中量子点表面羧基与生物分子氨基共价连接应用最为广泛。

[0004] 但目前制备量子点-捕获抗体复合物的方法不一,纯化方法需要大型昂贵的仪器完成,限制了量子点-捕获抗体复合物的研究条件,无法计算偶联效率,限制了量子点在生物标记方面的应用。其次,没有实用经济的验证方法,影响了相关产品的检测性能。

[0005] 含有肌酸激酶同工酶MB(CK-MB)较多的器官是心肌,CK-MB是心肌类疾病早期诊断的重要指标,尤其在诊断透壁型心肌梗死时,具有极高的敏感性及特异性。健康人血清中CK-MB的含量在5%以下,若血清中CK-MB含量显著增高,说明心肌受损。在心梗检测方面的临床意义为:在心梗发病后4 h其含量增高,在16-24 h达到高峰,3-4 d恢复正常。若CK-MB在急性心肌梗死后仍保持高水平,表明心肌坏死还在进行;若恢复正常后再次升高,说明原梗死部位扩展或者新的梗死部位出现,因此CK-MB可以作为AMI的早期诊断标志物。免疫试纸条的检测属于即时检测,可以在很短的时间内完成对肌钙蛋白I的定量检测,以满足临床检测肌酸激酶同工酶MB的要求。

[0006] CN104280545A公开了一种同步定量心肌标志物多指标的量子点标记试纸条及其方法,但是,发明人经过研究发现,仅采用该专利公开的内容无法得到相应心肌标志物的标准曲线,从而无法实现相应心肌标志物的检测。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是提供一种标准曲线相关系数好的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的制备方法及试纸条的制备方法。

[0008] 为解决以上技术问题,本发明采取如下技术方案:

本发明的一个目的是提供一种量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1)、使量子点与1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物进行反应,控制所述的量子点、所述的1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐、所述的N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物的投料摩尔比为1:4000~10000:5000~10000;

(2)、调整步骤(1)处理后的反应液的pH为6~8;

(3)、向步骤(2)处理后的反应液中加入肌酸激酶同工酶MB抗体制得所述的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物,控制所述的量子点和所述的肌酸激酶同工酶MB抗体的投料摩尔比为1:10~18。

[0009] 本发明中,所述的量子点的表面为羧基修饰,所述的量子点可以为核壳型或非核壳型量子点。

[0010] 优选地,步骤(1)中,所述的量子点的平均粒径为10~30nm,发射波长范围为560nm~650nm。

[0011] 优选地,步骤(1)中,所述的量子点、所述的1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐、所述的N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物的投料摩尔比为1:4000~6000:8000~10000。

[0012] 优选地,步骤(1)的反应条件为冰浴超声,反应时间为20~40min。

[0013] 根据一个具体且优选方式,步骤(1)的具体实施方式为:将量子点溶于pH为5~6,0.005~0.015M的硼酸盐缓冲液中,然后加入所述的1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐和所述的N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物进行活化反应。

[0014] 优选地,步骤(1)反应完成后,采用超滤法除去过量的1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物,然后通过添加pH为6~8的硼酸缓冲液调整反应液的pH。

[0015] 优选地,步骤(3)中,所述的量子点和所述的肌酸激酶同工酶MB抗体的投料摩尔比为1:13~16。本发明通过严格控制抗体和量子点的用量,保证了量子点与抗体的结合效率。

[0016] 优选地,步骤(3)的反应条件为冰浴超声,反应时间为2~5h。

[0017] 本发明的另一个目的是提供一种试纸条的制备方法,包括如下步骤:

(1)采用处理液处理样品垫和结合垫;

(2)采用上述制备方法制得的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物处理步骤(1)处理后的结合垫;

(3)采用肌酸激酶同工酶MB抗体和羊抗鼠IgG多克隆抗体在硝酸纤维素膜上包被检测线和质控线,然后使用封闭液封闭包被后的硝酸纤维素膜;

(4)将步骤(1)处理后的样品垫,步骤(2)处理后的结合垫,步骤(3)处理后的硝酸纤维素膜、吸水垫和载体依次层叠,制成所述的试纸条。

[0018] 优选地,步骤(1)中,以质量分数计,所述的处理液为含有1~5%的牛血清白蛋白、1~

3%的吐温20、0.5~1.5%的NaCl、1~5%的蔗糖和1~3%的聚乙二醇2000的pH为7~9的硼酸缓冲液；步骤(3)中，以质量分数计，所述的封闭液为含有质量分数为0.5~2%的牛血清白蛋白的pH值为7~9的硼酸缓冲溶液。

[0019] 优选地，步骤(3)中，采用浓度为0.5~2mg/ml的肌酸激酶同工酶MB抗体溶液以0.5~1μl/cm的划线速度在所述的硝酸纤维素膜上制得检测线，采用浓度为0.5~1 mg/ml的羊抗鼠IgG多克隆抗体溶液以0.5~1μl/cm的划线速度在硝酸纤维素膜上制得质控线。

[0020] 进一步优选地，所述的肌酸激酶同工酶MB抗体溶液和所述的羊抗鼠IgG多克隆抗体溶液采用硼酸缓冲液稀释得到。

[0021] 更为优选地，稀释所述的肌酸激酶同工酶MB抗体的硼酸缓冲液为pH6.5、离子强度：0.05M的硼酸缓冲液。

[0022] 更为优选地，稀释所述的羊抗鼠IgG多克隆抗体的硼酸缓冲液为pH5.5、离子强度：0.01M的硼酸缓冲液。

[0023] 进一步地，所述划膜时检测线在质控线的免疫层析方向的前方。

[0024] 进一步地，所述划膜时检测线和质控线均靠近吸水垫一侧，目的为预留足够的时间让抗体抗原进行特异性反应。

[0025] 由于以上技术方案的实施，本发明与现有技术相比具有如下优点：

本发明的量子点与肌酸激酶同工酶MB抗体的偶联效果好，制备方法简单，成本低廉。本发明制得的试纸条的标准曲线好，相关系数大于0.99，检测灵敏度高，能够实现肌酸激酶同工酶MB抗原的准确定量检测。

附图说明

[0026] 图1是量子点对照(左侧条带)与本发明实施例1的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物(右侧条带)的琼脂糖凝胶电泳图；

图2是偶联反应中采用不同pH值制得的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的凝胶电泳图；

图3是偶联反应中采用不同活化剂用量制得的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的凝胶电泳图；

图4是偶联反应中采用不同抗体用量制得的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的凝胶电泳图；

图5是量子点对照与本发明实施例1的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物粒径大小检测图；

其中，图1至图5中的对照为直接购买得到的量子点进行检测的结果；

图6是量子点对照与本发明实施例1的试纸条在上样梯度肌酸激酶同工酶MB抗原浓度后的紫外图；

图7是量子点对照与本发明实施例1的试纸条在上样梯度肌酸激酶同工酶MB抗原浓度时得到的标准曲线图。

具体实施方式

[0027] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细的说明，但本发明并不限于以下实施

例。实施例中采用的实施条件可以根据具体使用的不同要求做进一步调整,未注明的实施条件为本行业中的常规条件,本发明中的试剂均可市购获得。下述中,如无特殊说明,“%”均为质量百分含量。

[0028] 实施例1

一种量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的制备:

将5ul量子点(平均粒径为18 nm,发射峰为625nm±5nm,浓度为8uM,购自武汉珈源)溶于500ul,pH 5.5,0.01M硼酸盐缓冲液中,涡旋混匀30s。现配制0.01M 1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐和0.01M N-羟基硫代琥珀酰亚胺,溶剂为pH 5.5,0.01M硼酸盐缓冲液。在量子点溶液中加入20 ul,0.01M 1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐,涡旋混匀,5min后加入40ul,0.01M N-羟基硫代琥珀酰亚胺,涡旋混匀。冰浴超声30min。活化完成后,取出活化反应液,置于超滤管(100kd)中,在低温离心机中离心,转速3500rpm,7min,完成后,在反应液中加入1ml,pH 6.5,0.01M硼酸盐缓冲液,重复离心一次,取出反应液。向反应液中加入7ul肌酸激酶同工酶MB捕获抗体(anti-CK-MB-1363, 7.3mg/ml),涡旋混匀,冰浴超声3h,即得量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物。

[0029] 该量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的琼脂糖凝胶电泳图如图1所示,粒径大小检测图如图5所示,其中,量子点的平均粒径为18nm,量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的平均粒径为86nm,从图1和图5可见,实施例1成功得到了量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物。

[0030] 试纸条的制备:

(1) 将样品垫和结合垫分别置于处理液(含有1%的牛血清白蛋白、1%的吐温20、0.85%的NaCl、1%的蔗糖和2%的聚乙二醇2000的pH8.5的硼酸缓冲液)中,浸泡2小时,然后在37℃恒温培养箱中干燥后取出备用。

[0031] (2) 在步骤(1)处理后的结合垫上喷涂上述方法制得的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物并干燥,控制喷涂速率为0.8μL/cm。

[0032] (3) 将肌酸激酶同工酶MB抗体(HyTest公司)溶于pH6.5、离子强度:0.05M的硼酸缓冲液中配制成浓度为1mg/ml的肌酸激酶同工酶MB抗体溶液,然后以0.5μL/cm的划线速度在硝酸纤维素膜上划线干燥制得检测线;将羊抗鼠IgG多克隆抗体(HyTest)溶于pH5.5、离子强度:0.01M的硼酸缓冲液中配制成浓度为0.5 mg/ml的鼠抗多抗溶液,然后以0.5μl/cm的划线速度在硝酸纤维素膜上划线干燥制得质控线。

[0033] (4) 采用含有质量分数为1%的牛血清白蛋白、pH值为8.5的硼酸缓冲液对划有检测线和质控线的硝酸纤维素膜浸泡两小时,后在37℃恒温培养箱中干燥取出。

[0034] (5) 将步骤(1)处理后的样品垫,步骤(2)处理后的结合垫,步骤(4)处理后的硝酸纤维素膜、吸水垫和载体依次层叠,制成试纸条。

[0035] (6) 将含有不同浓度的肌酸激酶同工酶MB抗原溶液滴加到试纸条的样品垫表面,得到的紫外图见图6,标准曲线图见图7。

[0036] 实施例2

基本与实施例1相同,不同之处在于:在制备量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物时,分别采用不同pH的硼酸盐缓冲液调节活化后反应液的pH,琼脂糖凝胶电泳图见图2,其中,1为对照的条带。2为pH5.5的硼酸盐缓冲液制得的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免

疫复合物的条带,3为pH6.5的硼酸盐缓冲液制得的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的条带,4为pH7.5的硼酸盐缓冲液制得的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的条带,5为pH8.5的硼酸盐缓冲液制得的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的条带,6为pH9.5的硼酸盐缓冲液制得的量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的条带。

[0037] 分析由于不同的抗体的等电点不同,在不同的pH中,抗体的带电不同,影响了抗体与量子点的偶联效果,量子点与不同抗体进行偶联,即有不同的最佳偶联pH。

[0038] 在条件为pH6.5和7.5时的硼酸盐缓冲液制得的试纸条外,其他pH条件下制得的试纸条均无法得到标准曲线,并且,pH7.5条件下制得的试纸条的标准曲线的相关系数劣于pH6.5条件下制得的试纸条的标准曲线的相关系数。

[0039] 实施例3

基本与实施例1相同,不同之处在于:在制备量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物时,分别添加不同摩尔比例的量子点(QDs)与1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDC),琼脂糖凝胶电泳图见图3,其中,1为量子点与1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐的摩尔比例为1:200的条带,2为量子点与1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐的摩尔比例为1:1000的条带,3为量子点与1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐的摩尔比例为1:5000的条带,4为量子点与1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐的摩尔比例为1:25000的条带,5为量子点与1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐的摩尔比例为1:50000的条带。

[0040] 分析由于QDs与EDC的摩尔比例不同,QDs表面羧基的激活程度不同,遂与抗体中氨基反应的情况不同,导致偶联成功率不同。

[0041] 实施例4

基本与实施例1相同,不同之处在于:在制备量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物时,分别添加不同摩尔比例的量子点与肌酸激酶同工酶MB捕获抗体,琼脂糖凝胶电泳图见图4,其中,1为量子点与肌酸激酶同工酶MB捕获抗体的摩尔比例为1:2的条带,2为量子点与肌酸激酶同工酶MB捕获抗体的摩尔比例为1:6的条带,3为量子点与肌酸激酶同工酶MB捕获抗体的摩尔比例为1:10的条带,4为量子点与肌酸激酶同工酶MB捕获抗体的摩尔比例为1:14的条带,5为量子点与肌酸激酶同工酶MB捕获抗体的摩尔比例为1:18的条带。

[0042] 以上对本发明做了详尽的描述,其目的在于让熟悉此领域技术的人士能够了解本发明的内容并加以实施,并不能以此限制本发明的保护范围,凡根据本发明的精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围内。

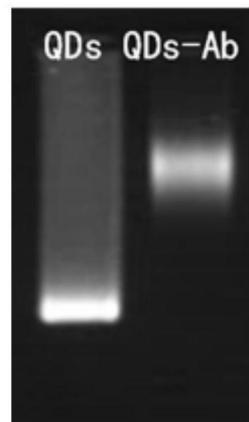


图1

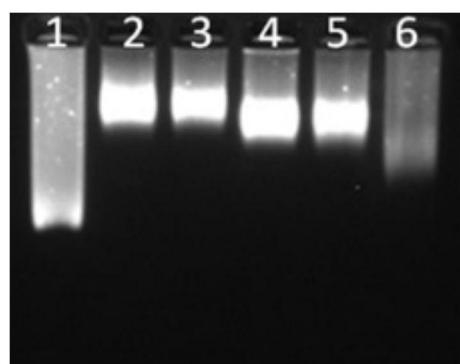


图2

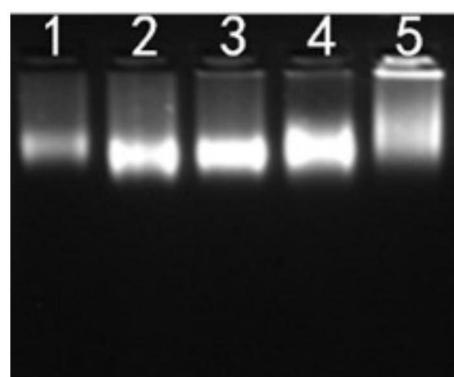


图3

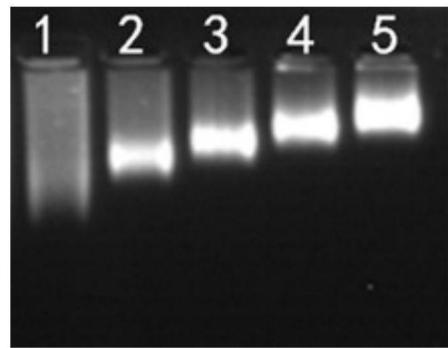


图4

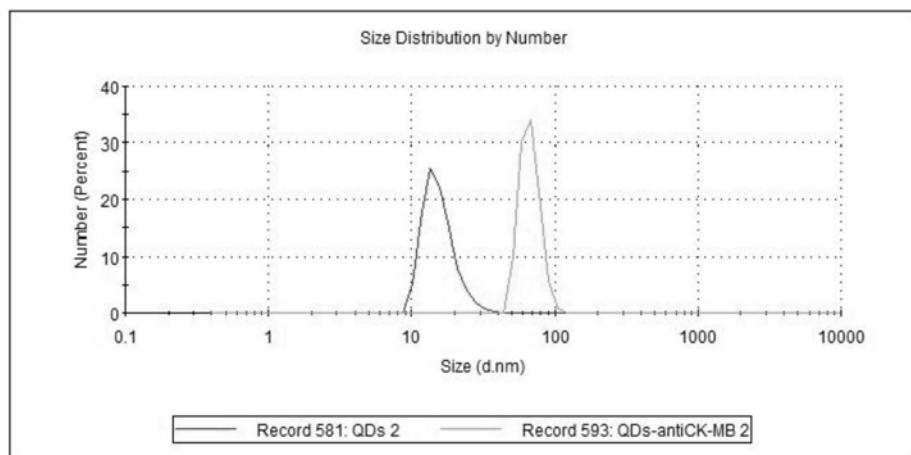


图5

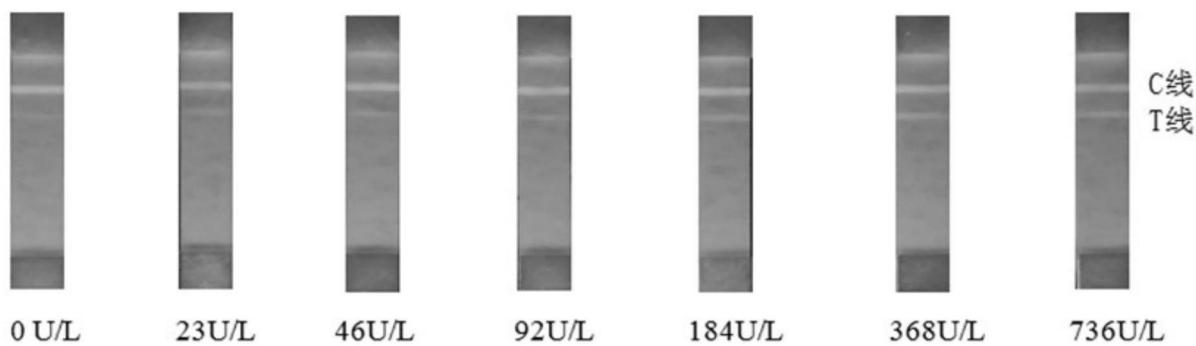


图6

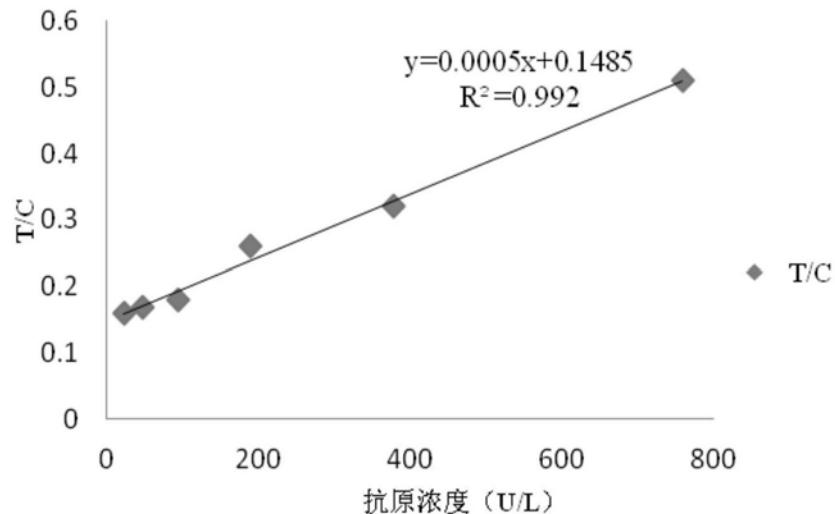


图7

专利名称(译)	一种量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的制备方法及试纸条的制备方法		
公开(公告)号	CN110082521A	公开(公告)日	2019-08-02
申请号	CN201910292989.0	申请日	2019-04-12
[标]申请(专利权)人(译)	西安交通大学苏州研究院		
申请(专利权)人(译)	西安交通大学苏州研究院		
当前申请(专利权)人(译)	西安交通大学苏州研究院		
[标]发明人	胡延祯 李超		
发明人	胡延祯 李超		
IPC分类号	G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532		
代理人(译)	周敏		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及一种量子点-肌酸激酶同工酶MB抗体免疫复合物的制备方法，使量子点与1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物反应，控制量子点、1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物的投料摩尔比为1：4000~10000：5000~10000；调整反应液的pH为6~8；向反应液中加入肌酸激酶同工酶MB抗体，控制量子点和肌酸激酶同工酶MB抗体的投料摩尔比为1：10~18。本发明偶联效果好，制备方法简单，成本低廉。本发明制得的试纸条的标准曲线好，检测灵敏度高，能够实现肌酸激酶同工酶MB抗原的准确定量检测。

