



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107942045 A

(43)申请公布日 2018.04.20

(21)申请号 201711069134.9

(22)申请日 2017.11.03

(71)申请人 江苏师范大学

地址 221000 江苏省徐州市铜山区上海路  
101号

(72)发明人 盖宏伟 刘晓君 黄聪慧

(51)Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

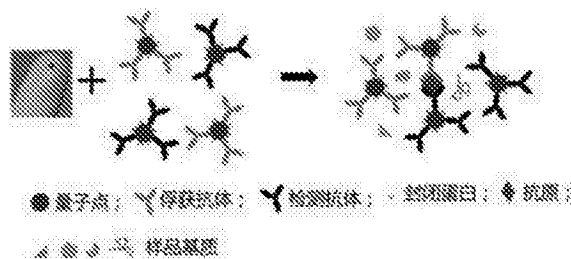
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

## (54)发明名称

一种单个纳米颗粒水平上的夹心式均相免疫分析方法

## (57)摘要

发明公开了一种单个纳米颗粒水平上的夹心式均相免疫分析方法,包括如下步骤:1)根据待测物性质,分别将量子点表面修饰相应的俘获抗体C-QD和检测抗体D-QD;2)将C-QD和D-QD加入样品中孵育10-100分钟,形成C-QD-抗原-D-QD二聚体夹心结构;3)取溶液5微升滴于载玻片上,置于荧光显微镜下成像;4)以量子点的激发波长照射载玻片5-30min,在照射过程中记录量子点的成像及光谱蓝移和漂白过程;5)在过程中发生一次光谱分裂的光斑为量子点二聚体,不发生光谱分裂的为单个量子点;6)记算量子点二聚体占光斑总数的比例;本发明以量子点二聚体比例为定量基础,从而快速、灵敏、准确检测血液中抗原浓度。



1. 一种单个纳米颗粒水平上的夹心式均相免疫分析方法,其特征在于:包括如下步骤:
  - 1) 根据待测物(抗原)性质,分别将量子点表面修饰相应的俘获抗体C-QD和检测抗体D-QD;
  - 2) 将C-QD和D-QD加入样品中孵育10-100分钟,形成C-QD-抗原-D-QD二聚体夹心结构;
  - 3) 取上述体系中溶液5微升滴于载玻片上,置于荧光显微镜下成像;
  - 4) 以量子点的激发波长照射载玻片5-30min,在照射过程中记录量子点的成像及其光谱蓝移和漂白过程;
  - 5) 在光谱蓝移和漂白的过程中发生一次光谱分裂的光斑为量子点二聚体,不发生光谱分裂的为单个量子点;
  - 6) 记量子点二聚体占光斑总数的比例,将此比例作为定量依据。
2. 根据权利要求1所述的一种单个纳米颗粒水平上的夹心式均相免疫分析方法,其特征在于,本分析方法在均相溶液中一步一次性完成,无需抗体包埋固定、游离抗体分离。
3. 根据权利要求1所述的一种单个纳米颗粒水平上的夹心式均相免疫分析方法,其特征在于,步骤2)中的二聚体夹心结构进行抗原检测,检测限摩尔浓度达到飞摩级别(fM)。
4. 根据权利要求1所述的一种单个纳米颗粒水平上的夹心式均相免疫分析方法,其特征在于,所述的量子点为能发生光谱蓝移的量子点,包括但不限于半导体核壳量子点。
5. 根据权利要求1所述的一种单个纳米颗粒水平上的夹心式均相免疫分析方法,其特征在于,所述的量子点二聚体通过量子点光谱蓝移过程中其光谱是否发生分裂进行判断。
6. 根据权利要求1所述的一种单个纳米颗粒水平上的夹心式均相免疫分析方法,其特征在于,所述的荧光显微镜配备光谱成像装置。

## 一种单个纳米颗粒水平上的夹心式均相免疫分析方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种单个纳米颗粒水平上的夹心式均相免疫分析方法,属于生物化学和医学检测技术领域。

### 背景技术

[0002] 免疫分析是生化分析、临床检测中使用最广泛的技术之一。它是利用抗原、抗体特异性结合后定性、定量检测抗原或抗体(可以是药物、激素、蛋白质、微生物等物质)的一种分析方法;一般通过测量抗原抗体复合体或游离抗体的含量进行待测物的定量分析。

[0003] 免疫分析按照操作步骤可以分为异相(heterogeneous)免疫分析和均相(homogeneous)免疫分析两类。前者需要分离手段将待测物与反应体系分离后再进行检测,是现在免疫分析中的主流方法,具有灵敏度高,检测限低的优点;但其操作时间长,处理过程复杂,费时、费力。后者则一步完成,不需要分离,具有操作简单,时间短,可实现自动化等优点,但相对于非均相法灵敏度较差。

[0004] 夹心式免疫分析是常用的一种免疫分析形式,其主要特征是捕获抗体、检测抗体、抗原三者形成三明治状的夹心结构。

[0005] 均相免疫分析的核心要求是能利用光电磁等信号定量识别区分出反应体系中的抗原抗体复合体和游离抗体;信号识别的准确性和抗干扰性决定了检测方法的灵敏度和在复杂体系中的应用可行性。

[0006] 最近几年文献中报道了一些均相免疫分析方法,包括共振能量转移法、动态散射法、共振散射相关光谱、磁弛豫、化学发光法等。这些方法的问题在于检测限不够低,复杂体系中可靠性不够高、样品使用量较大。因此,发展一种微量血液中高灵敏均相免疫分析方法具有十分重要的意义。

[0007] 我们在2015年开发了利用量子点团聚程度进行生物素化蛋白质的定量方法【1】,2017年开发了利用阳离子胶束形成量子点团聚体进行肝素的定量方法【2】。这两篇文献与本发明存在较大不同:文献1提出了利用量子点团聚度进行蛋白定量的概念,利用生物素与链霉亲和素之间的相互作用形成团聚程度不同的量子点团聚体,生物素化的蛋白含量越高则量子点团聚程度越高;以团聚程度与生物素化蛋白之间的关系进行定量,仅能用于生物素化的蛋白定量。

[0008] 文献2中量子点修饰了肝素酶,与肝素特异结合,再通过肝素与阳离子胶束静电吸引形成量子点团聚体,通过计量团聚体的比例定量肝素。这个检测策略只适用于检测带有强电荷的生物大分子,不适用于蛋白。

[0009] 参考文献:

[0010] 【1】Xingbo Shi,Suli Dong,Minmin Li,Xiaojun Liu,Qingquan Zhang,Wenfeng Zhao,Chenghua Zong,Yewang Zhang,Hongwei Gai\*,Counting quantum dot aggregates for the detection of biotinylated proteins,Chemical Communications,2015,51,2353-2356.

[0011] 【2】Suli Dong, Xiaojun Liu, Qingquan Zhang, Wenfeng Zhao, Chenghua Zong, Aiye Liang, Hongwei Gai\*, Sensing active heparin by counting aggregated quantum dots at single-particle level, ACS Sensors, 2017, 2, 80-86.

### 发明内容

[0012] 本发明的目的在于提供一种单个纳米颗粒水平上的夹心式均相免疫分析方法,以量子点二聚体比例为定量基础,避免使用光、电、磁、力等信号的强度变化进行定量分析,降低信号波动带来的误差,从而快速、灵敏、准确检测血液中抗原浓度。

[0013] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:一种单个纳米颗粒水平上的夹心式均相免疫分析方法,包括如下步骤:

[0014] 1) 根据待测物(抗原)性质,分别将量子点表面修饰相应的俘获抗体C-QD和检测抗体D-QD;

[0015] 2) 将C-QD和D-QD加入样品中孵育10-100分钟,形成C-QD-抗原-D-QD二聚体夹心结构;

[0016] 3) 取上述体系中溶液5微升滴于载玻片上,置于荧光显微镜下成像;

[0017] 4) 以量子点的激发波长照射载玻片5-30min,在照射过程中记录量子点的成像及其光谱蓝移和漂白过程;

[0018] 5) 在光谱蓝移和漂白的过程中发生一次光谱分裂的光斑为量子点二聚体,不发生光谱分裂的为单个量子点;

[0019] 6) 计算量子点二聚体占光斑总数的比例,将此比例作为定量依据。

[0020] 本分析方法在均相溶液中一步一次性完成,无需抗体包埋固定、游离抗体分离。

[0021] 步骤2)中的二聚体夹心结构进行抗原检测,检测限摩尔浓度达到飞摩级别(fM)。

[0022] 所述的量子点为能发生光谱蓝移的量子点。

[0023] 所述的量子点二聚体通过量子点光谱蓝移过程中光谱分裂与否进行判断。

[0024] 所述的荧光显微镜配备光谱成像装置。

[0025] 与现有的方法相比:本方法将C-QD和D-QD加入到待测含有抗原的样品溶液中,随后以装配了光谱成像装置的荧光显微镜为检测平台,取样观察量子点二聚体比例,以二聚体比例与抗原浓度的关系作标准曲线,然后对未知样品中的抗原定量。本方法以二聚体比例而非荧光强度为定量基础,避免了荧光强度波动带来的误差,具有检测灵敏度高的优点,可达到fM级别。

[0026] 本方法为均相免疫分析,无需固定、分离、清洗等步骤;使用样品量少,只需几微升;并且避免使用光、电、磁、力等信号的强度变化进行定量分析,降低了信号波动带来的误差;在单颗粒水平上成像定量,检测限低、检测灵敏度高。

### 附图说明

[0027] 图1为本发明分析方法原理示意图;

[0028] 图2为本发明单个量子点的漂白过程;

[0029] 图3为本发明量子点二聚体的光谱分裂过程;

[0030] 图4水溶液中不同浓度甲胎蛋白和癌胚抗原与量子点二聚体比例的相关性;

[0031] 图5标准加入法测量血清中甲胎蛋白和癌胚抗原含量。

### 具体实施方式

[0032] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0033] 如图1、图2、图3和图4所示,为一种单个纳米颗粒水平上的夹心式均相免疫分析方法,一种单个纳米颗粒水平上的夹心式均相免疫分析方法,包括如下步骤:

[0034] 1) 根据待测物(抗原)性质,分别将量子点表面修饰相应的俘获抗体C-QD和检测抗体D-QD,这里的量子点为能发生光谱蓝移的量子点,包括但不限于半导体核壳量子点;

[0035] 2) 将C-QD和D-QD加入样品中孵育10-100分钟,形成C-QD-抗原-D-QD

[0036] 二聚体夹心结构;

[0037] 3) 取上述体系中溶液5微升滴于载玻片上,置于荧光显微镜下成像,所述的荧光显微镜配备光谱成像装置;

[0038] 4) 以量子点的激发波长照射载玻片5-30min,在照射过程中记录量子点的成像及其光谱蓝移和漂白过程,如图2和图3所示;图2,图3中左部分圆形光斑为量子点的零级光谱,右部分条纹状为量子点的一级光谱;

[0039] 一级光谱对应着该量子点的荧光光谱;在激发光的持续照射下,量子点发生氧化,光谱发生蓝移,表现为一级光谱向零级光斑移动(图2);

[0040] 如果该光斑里的量子点是二聚体,这两个量子点的蓝移过程是不同步的,表现为本来重叠的一级光谱发生分裂(图3);

[0041] 5) 通过观察一级光谱的蓝移过程判断该光斑是否是二聚体:在光谱蓝移和漂白的过程中发生一次光谱分裂的光斑为量子点二聚体,不发生光谱分裂的为单个量子点;

[0042] 6) 计算量子点二聚体占光斑总数的比例,将此比例作为定量依据,图4分别是癌胚抗原(CEA)和甲胎蛋白(AFP)的定量标准曲线,通过计算可知在信噪比为3时,CEA的检测限达到6.7fM;AFP检测限达到3.4fM。

[0043] 本分析方法在均相溶液中一步一次性完成,无需抗体包埋固定、游离抗

[0044] 体分离。

[0045] 步骤2)中的二聚体夹心结构进行抗原检测,检测限摩尔浓度达到飞摩级别(fM)。

[0046] 本发明通过计数量子点二聚体比例进夹心式均相免疫分析,能够用于全血中CEA的定量检测;也能够用于全血中AFP的定量检测,具体检测数据如下:

[0047] 实验1水溶液中CEA的检测

[0048] a. 取5 $\mu$ L, 8 $\mu$ M 羧基化的量子点(QD655)储备液和35 $\mu$ L 50mM NaHCO<sub>3</sub>储备液混合,加入用冷50mM NaHCO<sub>3</sub>现配的1mg/mL EDC 10 $\mu$ L,室温孵育25min;

[0049] b. 取40 $\mu$ L的CEA Capture Antibody (1.8mg/mL)与15 $\mu$ L上述活化后的量子点混合;取21.5 $\mu$ L的CEA Detection Antibody (3.9mg/mL)与35 $\mu$ L上述活化后的量子点混合,室温孵育4小时。得到分别以1:40和1:20的比例标记的QD-Capture和QD-Detection CEA抗体;

[0050] c. 将标记的QD-Capture和QD-Detection复合物浓度按1:1混合后,加入不同浓度

的CEA抗原,室温孵育30分钟,形成QD-Capture@Antigen@QD-Detection复合物;

[0051] d.取上述溶液1.8 $\mu$ L,滴于载玻片,上荧光显微镜成像,观察,拍摄。

[0052] e.定量实验:将d得到的不同浓度抗原的复合物荧光成像,对拍摄得到的数据用imageJ进行处理,计算不同浓度下QD-Capture@Antigen@QD-Detection的聚合比例。以抗原浓度的对数值为横坐标,二聚体比例为纵坐标作图(图4),在0.014-43.892和43.892-1365.521pM范围内呈线性关系,线性相关系数分别为0.9696和0.9905。

[0053] 实验2水溶液中AFP的检测

[0054] a.取5 $\mu$ L,8 $\mu$ M羧基化的量子点(QD655)储备液和35 $\mu$ L50mM NaHCO<sub>3</sub>储备液混合,加入用冷50mM NaHCO<sub>3</sub>现配的1mg/mL EDC 10 $\mu$ L,室温孵育25min;

[0055] b.取22.4 $\mu$ L的AFP Capture Antibody (2.5mg/mL)与25 $\mu$ L上述活化后的量子点混合;取17 $\mu$ L的AFP Detection Antibody (3.3mg/mL)与25 $\mu$ L上述活化后的量子点混合,室温孵育4小时;得到分别以1:40和1:20的比例标记的QD-Capture和QD-Detection AFP抗体;

[0056] c.将标记的QD-Capture和QD-Detection复合物浓度按1:1混合后,加入不同浓度的AFP抗原,室温孵育30分钟,形成QD-Capture@Antigen@QD-Detection复合物;

[0057] d.取上述溶液1.8 $\mu$ L,滴于载玻片,上荧光显微镜成像,观察,拍摄;

[0058] e.定量实验:将e得到的不同浓度抗原的复合物荧光成像,对拍摄得到的数据用imageJ进行处理,计算不同浓度下QD-Capture@Antigen@QD-Detection的聚合比例;以抗原浓度的对数值为横坐标,二聚体比例为纵坐标作图(如图4),在0.018-51.376和51.376-1644.047pM范围内呈线性关系,线性相关系数分别为0.972和0.9771。

[0059] 实验3血清中CEA的检测

[0060] a.将标记的CEA蛋白的QD-Capture和QD-Detection复合物浓度按1:1混合后,加入血清原液和不同浓度的抗原,使复合物的终浓度均为50pM,血清最终稀释6倍,抗原浓度为0,0.24,0.504,0.89,1.27,1.67pM,室温孵育30分钟;

[0061] b.分别取上述溶液1.8 $\mu$ L,滴于载玻片,上荧光显微镜成像,观察,拍摄;

[0062] c.定量实验:将b得到不同浓度抗原的荧光成像图数据用image J进行处理,计算不同浓度下QD-Capture@Antigen@QD-Detection的聚合比例;

[0063] d.测得血清中CEA浓度为6.7pM(如图5),与医院测得数据1.4pM相仿。

[0064] 实验4血清中AFP的检测

[0065] a.将标记的AFP蛋白的QD-Capture和QD-Detection复合物浓度按1:1混合后,加入血清原液和不同浓度的抗原,使复合物的终浓度均为50pM,血清最终稀释90倍,抗原浓度为0,0.33,0.67,1,1.33,1.67pM,室温孵育30分钟;

[0066] b.分别取上述溶液1.8 $\mu$ L,滴于载玻片,上荧光显微镜成像,观察,拍摄;

[0067] c.定量实验:将b得到不同浓度抗原的荧光成像图数据用image J进行处理,计算不同浓度下QD-Capture@Antigen@QD-Detection的聚合比例;

[0068] d.测得血清中AFP浓度为69.8pM与医院测量数值29.7pM相仿(如图5)。

[0069] 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其它的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有

变化囊括在本发明内。不应将权利要求中的任何附图标记视为限制所涉及的权利要求。

[0070] 以上所述,仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡是依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何细微修改、等同替换和改进,均应包含在本发明技术方案的保护范围之内。

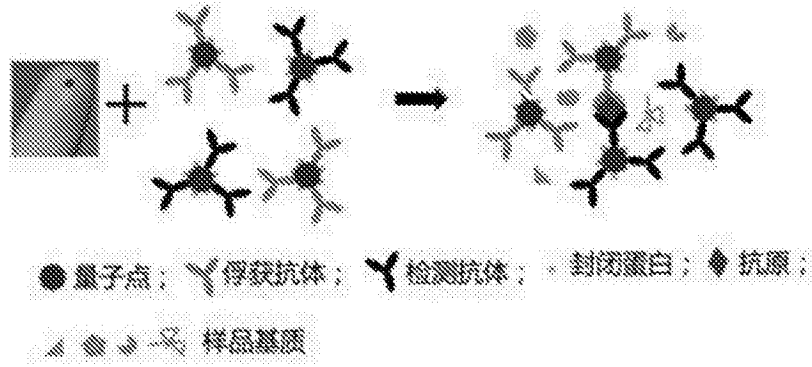


图1

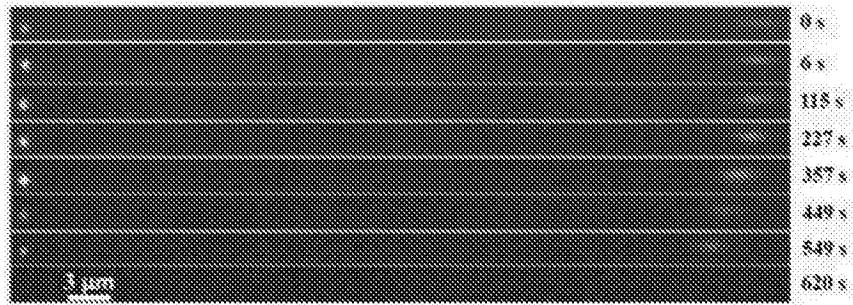


图2

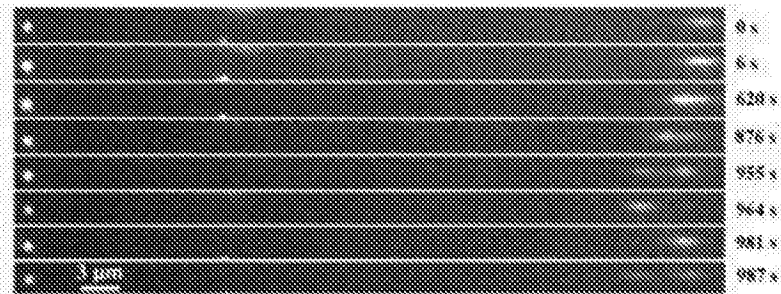


图3

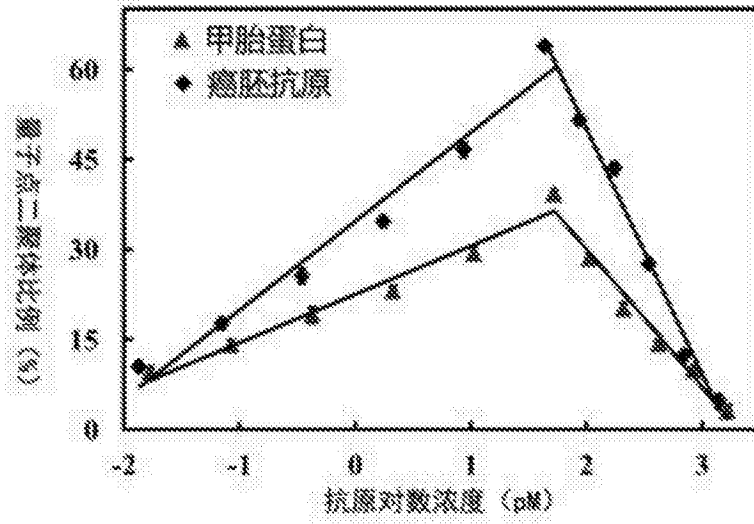


图4

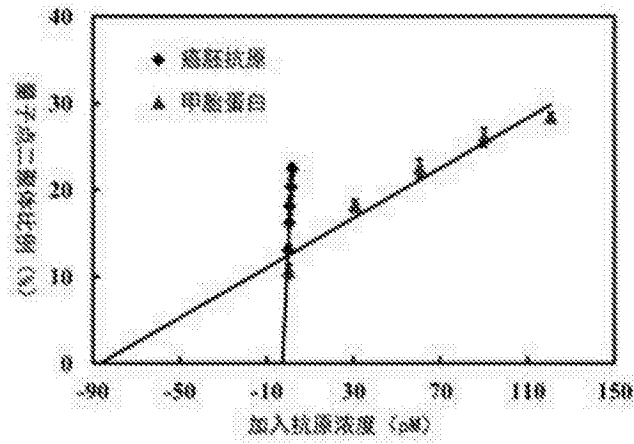


图5

专利名称(译)	一种单个纳米颗粒水平上的夹心式均相免疫分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107942045A</a>	公开(公告)日	2018-04-20
申请号	CN2017111069134.9	申请日	2017-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	江苏师范大学		
申请(专利权)人(译)	江苏师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	江苏师范大学		
[标]发明人	盖宏伟 刘晓君 黄聪慧		
发明人	盖宏伟 刘晓君 黄聪慧		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/53 G01N21/64		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

发明公开了一种单个纳米颗粒水平上的夹心式均相免疫分析方法，包括如下步骤：1)根据待测物性质，分别将量子点表面修饰相应的俘获抗体C-QD和检测抗体D-QD；2)将C-QD和D-QD加入样品中孵育10-100分钟，形成C-QD-抗原-D-QD二聚体夹心结构；3)取溶液5微升滴于载玻片上，置于荧光显微镜下成像；4)以量子点的激发波长照射载玻片5-30min，在照射过程中记录量子点的成像及光谱蓝移和漂白过程；5)在过程中发生一次光谱分裂的光斑为量子点二聚体，不发生光谱分裂的为单个量子点；6)记量子点二聚体占光斑总数的比例；本发明以量子点二聚体比例为定量基础，从而快速、灵敏、准确检测血液中抗原浓度。

