



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108761061 A

(43)申请公布日 2018.11.06

(21)申请号 201810577449.2

(22)申请日 2018.06.07

(71)申请人 福建医科大学

地址 350004 福建省福州市台江区交通路
88号

(72)发明人 韩志钟 陈丽 陈敬华 李春艳

(74)专利代理机构 福州智理专利代理有限公司
35208

代理人 王义星

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

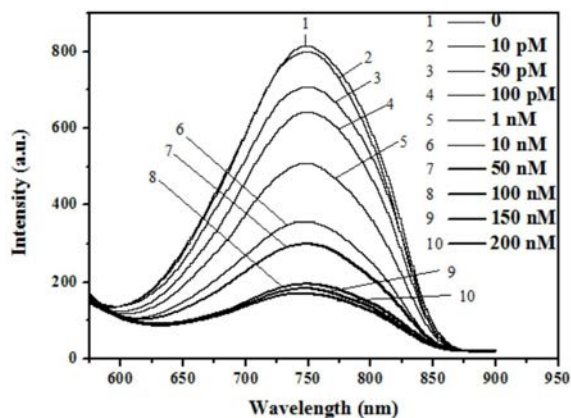
权利要求书3页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种基于多巴胺修饰的三元量子点的间接
免疫荧光检测疾病标志物的方法

(57)摘要

本发明公开一种基于多巴胺修饰的三元量子点的间接免疫荧光检测疾病标志物的方法,首先,酪氨酸酶(TYR)通过无铜点击反应与疾病生物标志物的检测抗体结合。另外,将生物素修饰的相应适配体与亲和素包被的96孔板结合,依次加入疾病生物标志物和TYR-检测抗体。在将过量的TYR-检测抗体洗涤后加入CuInS₂/ZnS QDs-DA。在疾病生物标志物存在下,TYR能催化氧化CuInS₂/ZnS QDs-DA中的多巴胺部分使其转化为多巴胺醌导致荧光猝灭。通过检测TYR催化氧化CuInS₂/ZnS QDs-DA反应引起的电子转移导致的荧光信号的变化,实现对疾病生物标志物的高灵敏检测。



1. 一种多巴胺功能化的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 的制备方法, 包括如下步骤:

1) 三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 的制备

(1) 储备液的制备: 将 0.0034 g 氯化铜溶解于 20 mL 去离子水中获得 0.01 M 铜储备溶液; 将 1.106 g 三氯化铟溶解在 5 mL 乙醇中制备 1 M 铟储备溶液; 将 2.3528 g 柠檬酸钠溶解于 20 mL 去离子水中获得 0.4 M 柠檬酸钠储备溶液; 将 2.408 g 硫化钠溶解于 10 mL 去离子水中制备 1 M Na_2S 储备溶液; 将 0.176 g 醋酸锌, 0.061 g 硫脲和 0.368 g L-谷胱甘肽溶解于 20 mL 去离子水中, 用 1 M NaOH 水溶液将 pH 值调节至 5.5~6.6, 获得 0.04 M ZnS 壳储备溶液; 将上述所有制备的储备溶液在室温中储存并在两周内使用;

(2) 三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 的制备: 将 1 mL 步骤(1)获得的铜储备溶液, 0.04 mL 步骤(1)获得的铟储备溶液, 0.40 mL 步骤(1)获得的柠檬酸钠储备溶液, 0.0061 g L-谷胱甘肽和 20 mL 去离子水置于 50 mL 三颈烧瓶中; 随后, 在磁力搅拌下将 0.062 mL 步骤(1)获得的 Na_2S 储备液加入上述的 50 mL 三颈烧瓶中, 调节其 pH 为 5.5, 在 100 °C 下反应 40 min 获得三元量子点 CuInS_2 反应溶液; 将 1 mL 步骤(1)获得的 ZnS 壳储备溶液加入三元量子点 CuInS_2 反应溶液中反应 45 min, 再重复加入 3 次, 最后得到三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$;

2) 多巴胺功能化的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 的制备

首先将 10 mL 0.2 M 步骤1)获得的 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 量子点溶液放入烧瓶中, 加入 0.1 mL 3-巯基丙酸, 将其 pH 值调节至 10.8 获得混合物, 其中三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 在 500 nm 的激发光激发下的最大发射波长为 750 nm, 随后, 将该混合物加热至 100 °C, 并在该温度下反应 1.5 h, 获得羧基修饰的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$; 然后, 在搅拌下加入 2 mL 浓度为 0.1 M 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐, 反应 35 min 后, 在搅拌下注入 2 mL 浓度为 0.1 M 的 N-羟基琥珀酰亚胺反应 1 h, 随后将所制备的溶液用异丙醇洗涤并分散在 10 mL 浓度为 0.05 M, pH = 6.5 磷酸钾缓冲溶液 (KBS) 中, 获得三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$; 将不同量的多巴胺加入到上述的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 中, 将 pH 保持在 6.5, 通氮气除去溶解的氧气, 将此反应混合物放置 2 h, 获得多巴胺功能化的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ ($\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ QDs-DA), 然后于 4 °C 下储存直至使用。

2. 一种酪氨酸酶-Tau 抗体的制备方法, 包括如下步骤:

1) 将酪氨酸酶 (TYR) 和 Tau 蛋白检测抗体分别溶解在浓度为 0.05 M, pH = 6.5 的 KBS 中获得酪氨酸酶的 KBS 溶液和 Tau 抗体的 KBS 溶液; 2) 通过将 N-羟基琥珀酰亚胺-叠氮化物 (NHS-叠氮化物) 和 N-羟基琥珀酰亚胺-二苯并环辛基 (NHS-DBCO) 分别溶解在二甲基亚砜中获得 NHS-叠氮化物的二甲基亚砜溶液和 NHS-DBCO 的二甲基亚砜溶液; 3) 将 100 μL 浓度为 100 nM 酪氨酸酶的 KBS 溶液与 5 μL 浓度为 100 μM 的 NHS-叠氮化物的二甲基亚砜溶液混合, 同时, 将 100 μL 浓度为 100 nM 的 Tau 蛋白检测抗体的 KBS 溶液和 5 μL 浓度为 100 μM 的 NHS-DBCO 的二甲基亚砜溶液混合, 将此反应溶液在室温下温育 30 min 直至缀合反应完成, 随后, 将 5 μL 浓度为 1 M, pH = 8 的 Tris-HCl 加入到上述反应溶液中反应 5 min, 使反应终止, 获得 Tau 抗体-DBCO 和 TYR-叠氮化物缀合物; 4) 采用分子量为 30 K 的超滤离心管分别纯化 Tau 抗体-DBCO 和 TYR-叠氮化物缀合物, 之后, 通过将 50 μL 浓度为 100 nM 的 Tau 抗体-DBCO 溶液与 50 μL 浓度为 100 nM 的 TYR-叠氮溶液混合, 在室温下反应 2 h, 获

得TYR-Tau 抗体。

3.一种基于多巴胺修饰的三元量子点的间接免疫荧光检测疾病标志物的方法,包括如下步骤:1)酪氨酸酶(TYR)通过无铜点击反应与疾病生物标志物的检测抗体结合;2)将生物素修饰的相应适配体与亲和素包被的 96 孔板结合,依次加入疾病生物标志物和 TYR-检测抗体;3)在将过量的 TYR-检测抗体洗涤后加入权利要求1所述的CuInS₂/ZnS QDs-DA中;4)在疾病生物标志物存在下,TYR 能催化氧化 CuInS₂/ZnS QDs-DA 中的多巴胺部分使其转化为多巴胺醌导致荧光猝灭,通过检测 TYR 催化氧化 CuInS₂/ZnS QDs-DA 反应引起的电子转移导致的荧光信号的变化,实现对疾病生物标志物的高灵敏检测。

4.根据权利要求3所述的基于多巴胺修饰的三元量子点的间接免疫荧光检测疾病标志物的方法,其特征在于:步骤1)的酪氨酸酶(TYR)通过无铜点击反应与疾病生物标志物的检测抗体结合获得TYR-Tau 抗体,其制备方法如下:1)将酪氨酸酶(TYR)和 Tau 蛋白检测抗体分别溶解在浓度为0.05 M,pH = 6.5的 KPS中获得酪氨酸酶的KPS溶液和 Tau 抗体的KPS溶液;2)通过将 N-羟基琥珀酰亚胺-叠氮化物(NHS-叠氮化物)和 N-羟基琥珀酰亚胺-二苯并环辛基 (NHS-DBCO)分别溶解在二甲基亚砜中获得 NHS-叠氮化物的二甲基亚砜溶液和 NHS-DBCO的二甲基亚砜溶液;3)将100 μL浓度为100 nM酪氨酸酶的KPS溶液与5 μL浓度为100 μM的 NHS-叠氮化物的二甲基亚砜溶液混合,同时,将 100 μL 浓度为100 nM的Tau 蛋白检测抗体的KPS溶液和 5 μL浓度为100 μM的NHS-DBCO 的二甲基亚砜溶液混合,将此反应溶液在室温下温育 30 min 直至缀合反应完成,随后,将 5 μL浓度为1 M、pH = 8的Tris-HCl加入到上述反应溶液中反应 5 min,使反应终止,获得Tau抗体-DBCO和TYR-叠氮化物缀合物;4)采用分子量为 30 K 的超滤离心管分别纯化Tau抗体-DBCO和TYR-叠氮化物缀合物,之后,通过将50 μL浓度为100 nM的Tau 抗体-DBCO 溶液与 50 μL浓度为100 nM的TYR-叠氮溶液混合,在室温下反应 2 h,获得TYR-Tau 抗体。

5.根据权利要求3或4所述的基于多巴胺修饰的三元量子点的间接免疫荧光检测疾病标志物的方法,其特征在于:步骤2)中的将生物素修饰的相应适配体为Tau 适配体。

6.根据权利要求3或4所述的基于多巴胺修饰的三元量子点的间接免疫荧光检测疾病标志物的方法,其特征在于:所述疾病生物标志物为Tau蛋白。

7.根据权利要求3或4所述的基于多巴胺修饰的三元量子点的间接免疫荧光检测疾病标志物的方法,其特征在于:所述TYR-检测抗体为权利要求2所述的TYR-Tau 抗体。

8.一种基于多巴胺修饰的三元量子点的间接免疫荧光检测疾病标志物的试剂盒,包括权利要求1所述的100 μL浓度为400 μM 的CuInS₂/ZnS QDs-DA、权利要求2所述的100 μL的TYR-Tau 抗体、包被亲和素的 96 孔板、100 μL浓度为1 μM的 Tau 适配体溶液和100 μL的Tau 蛋白。

9.一种权利要求8所述的基于多巴胺修饰的三元量子点的间接免疫荧光检测疾病标志物的试剂盒的使用方法,包括如下步骤:在包被亲和素的 96 孔板中加入100 μL浓度为1 μM的 Tau 适配体溶液,在室温下孵育 1.5 h;每孔用 PBS加入含有 0.05 wt% Tween-20的pH = 7.4的 PBST洗涤三次,洗涤后,每孔加入 100 μL含有 1 wt% BSA 的 PBST,然后在室温下孵育 1 h,再次洗涤,每孔加入100 μL的Tau 蛋白,并将 PBS 作为对照,然后在室温下孵育 2 h,用 PBST 洗涤三次后,每孔加入100 μL TYR-Tau 抗体,然后在室温下孵育 1 h,然后,再次洗涤孔,并在 37 °C 下将 100 μL 400 μM的CuInS₂/ZnS QDs-DA 加入各

孔,反应 5 min,在 500 nm 激发光下记录荧光强度。

一种基于多巴胺修饰的三元量子点的间接免疫荧光检测疾病标志物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及光学和生化工程领域,特别涉及一种基于多巴胺修饰的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 用于检测疾病生物标志物的间接荧光免疫传感技术的构建及应用。

背景技术

[0002] 疾病生物标志物是指可以标记系统、器官、组织、细胞及亚细胞结构或功能因疾病而发生改变或可能发生改变的生化指标,可用于作为疾病的诊断、鉴别诊断、疗效评价、疾病分期、疾病风险评估、预后估计以及健康评价等的辅助性指标。近年来,疾病生物标志物的常规检测方法主要包括仪器分析法和酶联免疫吸附法(ELISA)。其中,仪器分析法由于设备昂贵、操作复杂等缺点无法大面积推广使用。而常规的 ELISA 检测方法操作流程简单,现阶段已成为实验室诊断的常规手段,但其灵敏度和稳定性容易受到众多因素的干扰,影响结果的均一性和准确性。因此间接的荧光免疫传感技术因其高灵敏性,高选择性和高效性,在检测疾病标志物中引起了越来越多的关注。

[0003] 半导体量子点(QDs)具有独特的光学性质,如高亮度、高量子产率、抗漂白性、稳定性、长荧光寿命、宽的吸收光谱及窄的光致发光(PL)发射光谱,使其成为生物分子诊断及医学诊断的有力工具。近年来,三元量子点因其荧光发射光谱不仅具有尺寸可调性,同时具有组分可调性,这使其在医学领域中具有更广阔的应用前景。

[0004] 常规的荧光免疫检测通过量子点与相应的抗体结合检测荧光信号变化,但是量子点与抗体结合所需的复杂修饰过程是其关键的障碍,对疾病标志物的检测的灵敏度有待提高。通过将氧化还原物质多巴胺(DA)修饰的三元量子点应用于荧光传感技术中,用酪氨酸酶代替量子点与抗体缀合来实现免疫识别,催化多巴胺氧化为多巴胺醌改变量子点的荧光信号。本发明避免了量子点与抗体结合的复杂修饰过程,提高了检测的灵敏度。

[0005] 通过间接荧光免疫传感技术,使用高荧光的多巴胺官能化的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 可实现对特定疾病生物标志物的高灵敏度和高效的检测,并有望推广应用于疾病的诊断及新药的筛选工作中,因而本发明具有巨大的潜在应用价值和深远的意义。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种基于多巴胺修饰的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 的间接荧光免疫传感技术的构建方法,用于疾病生物标志物的高灵敏、高特异性检测。

[0007] 本发明的目的是这样实现的,一种多巴胺功能化的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 的制备方法,包括如下步骤:

1)三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 的制备

(1)储备液的制备:将 0.0034 g 氯化铜溶解于 20 mL 去离子水中获得 0.01 M 铜储备溶液;将 1.106 g 三氯化铟溶解在 5 mL 乙醇中制备 1 M 铟储备溶液;将 2.3528 g 柠檬酸钠溶解于 20 mL 去离子水中获得 0.4 M 柠檬酸钠储备溶液;将 2.408 g 硫化钠溶

解于 10 mL 去离子水中制备 1 M Na_2S 储备溶液;将 0.176 g 醋酸锌,0.061 g 硫脲和 0.368 g L-谷胱甘肽溶解于 20 mL 去离子水中,用 1 M NaOH 水溶液将 pH 值调节至 5.5~6.6,获得 0.04 M ZnS 壳储备溶液;将上述所有制备的储备溶液在室温中储存并在两周内使用;

(2)三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 的制备:将 1 mL 步骤(1)获得的铜储备溶液,0.04 mL 步骤(1)获得的铜储备溶液,0.40 mL 步骤(1)获得的柠檬酸钠储备溶液,0.0061 g L-谷胱甘肽和 20 mL 去离子水置于 50 mL 三颈烧瓶中;随后,在磁力搅拌下将 0.062 mL 步骤(1)获得的 Na_2S 储备液加入上述的 50 mL 三颈烧瓶中,调节其 pH 为 5.5,在 100 °C 下反应 40 min 获得三元量子点 CuInS_2 反应溶液;将 1 mL 步骤(1)获得的 ZnS 壳储备溶液加入三元量子点 CuInS_2 反应溶液中反应 45 min,再重复加入 3 次,最后得到三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$;

2)多巴胺功能化的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 的制备

首先将 10 mL 0.2 M 步骤1)获得的 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 量子点溶液放入烧瓶中,加入 0.1 mL 3-巯基丙酸,将其 pH 值调节至 10.8 获得混合物,其中三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 在 500 nm 的激发光激发下的最大发射波长为 750 nm,随后,将该混合物加热至 100 °C,并在该温度下反应 1.5 h,获得羧基修饰的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$;然后,在搅拌下加入 2 mL 浓度为 0.1 M 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,反应 35 min 后,在搅拌下注入 2 mL 浓度为 0.1 M 的 N-羟基琥珀酰亚胺反应 1 h,随后将所制备的溶液用异丙醇洗涤并分散在 10 mL 浓度为 0.05 M, pH = 6.5 磷酸钾缓冲溶液(KBS)中,获得三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$;将不同量的多巴胺加入到上述的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 中,将 pH 保持在 6.5,通氮气除去溶解的氧气,将此反应混合物放置 2 h,获得多巴胺功能化的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ ($\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ QDs-DA),然后于 4 °C 下储存直至使用。

[0008] 本发明的目的是这样实现的,一种酪氨酸酶- Tau 抗体的制备方法,包括如下步骤:

1)将酪氨酸酶(TYR)和 Tau 蛋白检测抗体分别溶解在浓度为 0.05 M, pH = 6.5 的 KBS 中获得酪氨酸酶的 KBS 溶液和 Tau 抗体的 KBS 溶液;2)通过将 N-羟基琥珀酰亚胺-叠氮化物(NHS-叠氮化物)和 N-羟基琥珀酰亚胺-二苯并环辛基(NHS-DBCO)分别溶解在二甲基亚砜中获得 NHS-叠氮化物的二甲基亚砜溶液和 NHS-DBCO 的二甲基亚砜溶液;3)将 100 μL 浓度为 100 nM 酪氨酸酶的 KBS 溶液与 5 μL 浓度为 100 μM 的 NHS-叠氮化物的二甲基亚砜溶液混合,同时,将 100 μL 浓度为 100 nM 的 Tau 蛋白检测抗体的 KBS 溶液和 5 μL 浓度为 100 μM 的 NHS-DBCO 的二甲基亚砜溶液混合,将此反应溶液在室温下温育 30 min 直至缀合反应完成,随后,将 5 μL 浓度为 1 M, pH = 8 的 Tris-HCl 加入到上述反应溶液中反应 5 min,使反应终止,获得 Tau 抗体-DBCO 和 TYR-叠氮化物缀合物;4)采用分子量为 30 K 的超滤离心管分别纯化 Tau 抗体-DBCO 和 TYR-叠氮化物缀合物,之后,通过将 50 μL 浓度为 100 nM 的 Tau 抗体-DBCO 溶液与 50 μL 浓度为 100 nM 的 TYR-叠氮溶液混合,在室温下反应 2 h,获得 TYR-Tau 抗体。

[0009] 本发明的目的是这样实现的,一种基于多巴胺修饰的三元量子点的间接免疫荧光检测疾病标志物的方法,包括如下步骤:1)酪氨酸酶(TYR)通过无铜点击反应与疾病生物标志物的检测抗体结合;2)将生物素修饰的相应适配体与亲和素包被的 96 孔板结合,依次

加入疾病生物标志物和 TYR-检测抗体;3)在将过量的 TYR-检测抗体洗涤后加入CuInS₂/ZnS QDs-DA中;4)在疾病生物标志物存在下,TYR 能催化氧化 CuInS₂/ZnS QDs-DA 中的多巴胺部分使其转化为多巴胺醌导致荧光猝灭,通过检测 TYR 催化氧化 CuInS₂/ZnS QDs-DA 反应引起的电子转移导致的荧光信号的变化,实现对疾病生物标志物的高灵敏检测。

[0010] 步骤1)的酪氨酸酶(TYR)通过无铜点击反应与疾病生物标志物的检测抗体结合获得TYR-Tau 抗体,其制备方法如下:1)将酪氨酸酶(TYR)和 Tau 蛋白检测抗体分别溶解在浓度为0.05 M,pH = 6.5的 KBS中获得酪氨酸酶的KBS溶液和 Tau 抗体的KBS溶液;2)通过将 N-羟基琥珀酰亚胺-叠氮化物(NHS-叠氮化物)和 N-羟基琥珀酰亚胺-二苯并环辛基(NHS-DBCO)分别溶解在二甲基亚砷中获得 NHS-叠氮化物的二甲基亚砷溶液和 NHS-DBCO的二甲基亚砷溶液;3)将100 μL浓度为100 nM酪氨酸酶的KBS溶液与5 μL 浓度为100 μM的NHS-叠氮化物的二甲基亚砷溶液混合,同时,将 100 μL 浓度为100 nM 的Tau 蛋白检测抗体的KBS溶液和 5 μL浓度为100 μM的NHS-DBCO 的二甲基亚砷溶液混合,将此反应溶液在室温下温育 30 min 直至缀合反应完成,随后,将 5 μL浓度为1 M、pH = 8的Tris-HCl加入到上述反应溶液中反应 5 min,使反应终止,获得Tau抗体-DBCO和 TYR-叠氮化物缀合物;4)采用分子量为 30 K 的超滤离心管分别纯化Tau抗体-DBCO和 TYR-叠氮化物缀合物,之后,通过将50 μL浓度为100 nM的Tau 抗体-DBCO 溶液与 50 μL浓度为100 nM的TYR-叠氮溶液混合,在室温下反应 2 h,获得TYR-Tau 抗体。

[0011] 步骤2)中的将生物素修饰的相应适配体为Tau 适配体。

[0012] 所述疾病生物标志物为Tau蛋白。

[0013] 所述TYR-检测抗体为TYR-Tau 抗体。

[0014] 本发明的目的是这样实现的,一种基于多巴胺修饰的三元量子点的间接免疫荧光检测疾病标志物的试剂盒,包括100 μL浓度为400 μM 的CuInS₂/ZnS QDs-DA、100 μL 的TYR-Tau 抗体、包被亲和素的 96 孔板、100 μL浓度为1 μM的 Tau 适配体溶液和100 μL的Tau 蛋白。

[0015] 所述的基于多巴胺修饰的三元量子点的间接免疫荧光检测疾病标志物的试剂盒的使用方法,包括如下步骤:在包被亲和素的 96 孔板中加入100 μL浓度为1 μM的 Tau 适配体溶液,在室温下孵育 1.5 h;每孔用 PBS加入含有 0.05 wt% Tween-20 的pH = 7.4 的 PBST洗涤三次,洗涤后,每孔加入 100 μL含有 1 wt% BSA 的 PBST,然后在室温下孵育 1 h,再次洗涤,每孔加入100 μL的Tau 蛋白,并将 PBS 作为对照,然后在室温下孵育 2 h,用 PBST 洗涤三次后,每孔加入100 μL TYR-Tau 抗体,然后在室温下孵育 1 h,然后,再次洗涤孔,并在 37 °C 下将 100 μL 400 μM的CuInS₂/ZnS QDs-DA 加入各孔,反应 5 min,在 500 nm 激发光下记录荧光强度。

[0016] 所述三元量子点 CuInS₂/ZnS 的激发波长为 500 nm,发射波长为 737 nm。粒径约为 5 nm。

[0017] 所述多巴胺功能化的三元量子点 CuInS₂/ZnS,量子点上的羧基与多巴胺上的氨基形成酰胺键,进而使所述量子点与多巴胺连接。

[0018] 本发明检测的原理:首先,TYR 通过点击反应与 Tau 蛋白的检测抗体结合。另外,将生物素修饰的 Tau 适配体与亲和素包被的 96 孔板结合,依次加入 Tau 蛋白和 TYR-Tau 抗体。在将过量的 TYR-Tau 抗体洗涤后加入 多巴胺功能化的三元量子点 CuInS₂/

ZnS。在 Tau 蛋白存在下, TYR 能催化氧化多巴胺功能化的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 中的多巴胺部分使其转化为多巴胺醌导致荧光猝灭。通过检测 TYR 催化氧化多巴胺功能化的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 反应引起的电子转移导致的荧光信号的变化, 实现对 Tau 蛋白的测定。

[0019] 本发明所采用的具体技术方案为:

(1) 多巴胺功能化的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 的制备

首先将 10 mL 0.2 M $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 量子点溶液放入烧瓶中, 加入 0.1 mL 巯基丙酸, 将其 pH 值调节至 10.8。随后, 将该混合物加热至 100 °C, 并在该温度下反应 1.5 h, 获得羧基修饰的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 。然后, 在搅拌下加入 EDC · HCl (0.1 M, 2 mL), 反应 35 min 后, 在搅拌下注入 NHS (0.1 M, 2 mL) 反应 1 h。随后将所制备的溶液用异丙醇洗涤并分散在 10 mL KBS (0.05 M, pH = 6.5) 中。将不同量的多巴胺 (DA) 加入到量子点溶液中, 将 pH 保持在 6.5, 通氮气除去溶解的氧气。将反应混合物放置 2 h, 然后将所制备的多巴胺功能化的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 于 4 °C 下储存直至使用。

[0020] (2) 酪氨酸酶-检测抗体的制备

通过将 TYR 和检测抗体分别溶解在 KBS (0.05 M, pH = 6.5) 中获得酪氨酸酶溶液和检测抗体溶液。通过将 NHS-叠氮化物和 NHS-DBCO 分别溶解在 DMSO 中获得 NHS-叠氮化物溶液和 NHS-DBCO 溶液。将酪氨酸酶溶液 (100 nM, 100 μL) 与 NHS-叠氮化物溶液 (100 μM , 5 μL) 混合。同时, 将检测抗体溶液 (100 nM, 100 μL) 和 NHS-DBCO 溶液 (100 μM , 5 μL) 混合。将反应溶液在室温下温育 30 min 直至缀合反应完成。随后, 将 5 μL 1 M Tris-HCl (pH = 8) 加入到反应溶液中反应 5 min, 使反应终止。采用分子量为 30 K 的超滤离心管纯化检测抗体-DBCO 和 TYR-叠氮化物缀合物。之后, 通过将检测抗体-DBCO 溶液 (100 nM, 50 μL) 与 TYR-叠氮溶液 (100 nM, 50 μL) 混合, 在室温下反应 2 h。

[0021] (3) 间接荧光免疫传感器的构建及其对疾病生物标志物的检测

在 96 孔板中加入一定浓度的疾病生物标志物的适配体 (100 μL) 包被, 在室温下孵育 1.5 h。每孔用 PBS (137 mM NaCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1 mM KH_2PO_4 和 3 mM KCl) 加入 0.05 % Tween-20 的 PBST (pH = 7.4) 洗涤三次。洗涤后, 每孔加入 100 μL 含有 1 % BSA 的 PBST, 然后在室温下孵育 1 h, 再次洗涤。每孔加入总量为 100 μL 的疾病生物标志物, 并将 PBS 作为对照, 然后在室温下孵育 2 h。用 PBST 洗涤三次后, 每孔加入 100 μL TYR-检测抗体, 然后在室温下孵育 1 h。然后, 再次洗涤孔, 并在 37 °C 下将 100 μL $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ QDs-DA 加入各孔中一段时间, 记录荧光强度。

[0022] 本发明的有益效果, 1) 本发明利用酪氨酸酶代替量子点与抗体缀合来构建间接荧光免疫传感技术, 提高疾病生物标志物检测的灵敏性和稳定性。

[0023] 1) 本发明中使用的三元量子点合成方便, 无毒且成本低。

[0024] 2) 本发明所述的间接荧光免疫传感技术在疾病生物标志物的存在下有明显的荧光信号变化, 检测灵敏度可以达到皮摩尔水平, 可以实现各种疾病生物标志物的高灵敏性检测。

附图说明

[0025] 图1是本发明的间接荧光免疫传感技术的原理示意图。

[0026] 图2A是本发明的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 与多巴胺修饰的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 的紫外-可见吸收光谱图。

[0027] 图2B是本发明的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 与多巴胺修饰的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 的荧光光谱图。

[0028] 图3是多巴胺修饰的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 对不同浓度的疾病生物标志物的荧光响应图。

具体实施方式

[0029] 下列结合附图和实施例对本发明进行详细描述：

发明原理介绍：

基于多巴胺功能化的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ ($\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ QDs-DA) 间接荧光免疫传感技术的反应机理如图 1 所示。首先，酪氨酸酶(TYR)通过无铜点击反应与疾病生物标志物的检测抗体结合。另外，将生物素修饰的相应适配体与亲和素包被的 96 孔板结合，依次加入疾病生物标志物和 TYR-检测抗体。在将过量的 TYR-检测抗体洗涤后加入 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ QDs-DA。在疾病生物标志物存在下，TYR 能催化氧化 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ QDs-DA 中的多巴胺部分使其转化为多巴胺醌导致荧光猝灭。通过检测 TYR 催化氧化 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ QDs-DA 反应引起的电子转移导致的荧光信号的变化，实现对疾病生物标志物的高灵敏检测。

[0030] 本发明基于多巴胺修饰的三元量子点的间接免疫荧光检测疾病标志物的方法，具体包括以下步骤：

(1) 三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 的制备

储备液的制备：将 0.0034 g 氯化铜(CuCl_2 ，购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司)溶解于 20 mL 去离子水中获得 0.01 M 铜储备溶液。将 1.106 g 三氯化铟(InCl_3 ，购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司)溶解在 5 mL 乙醇中制备 1 M 铟储备溶液。将 2.3528 g 柠檬酸钠(购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司)溶解于 20 mL 去离子水中获得 0.4 M 柠檬酸钠储备溶液。将 2.408 g 硫化钠($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ，购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司)溶解于 10 mL 去离子水中制备 1 M Na_2S 储备溶液。将 0.176 g 醋酸锌($\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司)，0.061 g 硫脲(购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司)和 0.368 g L-谷胱甘肽(购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司)溶解于 20 mL 去离子水中，用 1 M NaOH 水溶液将 pH 值调节至 5.5~6.6，获得 0.04 M ZnS 壳储备溶液。将所有制备的储备溶液在室温中储存并在两周内使用。

[0031] 三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 的制备：采用不同的 Cu/In 比为 1/4 来制备三元量子点 CuInS_2 。将 1 mL 铜储备溶液，0.04 mL 铟储备溶液，0.40 mL 柠檬酸钠储备溶液，0.0061 g L-谷胱甘肽和 20 mL 去离子水置于 50 mL 三颈烧瓶中。随后，在磁力搅拌下将 0.062 mL Na_2S 储备液入烧瓶中，调节其 pH 为 5.5，在 100 °C 下反应 40 min 获得三元量子点 CuInS_2 。将 1 mL ZnS 壳储备溶液加入反应溶液中反应 45 min，再重复加入 3 次，最后得到三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 。

[0032] (2) 多巴胺功能化的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 的制备

首先将 10 mL 0.2 M $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 量子点溶液放入烧瓶中，加入 0.1 mL 3-巯基丙酸(MPA，购自上海西格玛奥德里奇贸易有限公司)，将其 pH 值调节至 10.8。其中三元量子点

CuInS₂/ZnS 在 500 nm 的激发光激发下的最大发射波长为 750 nm。随后,将该混合物加热至 100 °C,并在该温度下反应 1.5 h,获得羧基修饰的三元量子点 CuInS₂/ZnS。然后,在搅拌下加入 2 mL 0.1 M 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl,购自BBI生命科学有限公司),反应 35 min 后,在搅拌下注入 2 mL 0.1 M N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司)反应 1 h。随后将所制备的溶液用异丙醇洗涤并分散在 10 mL 磷酸钾缓冲溶液(KBS)(0.05M,pH = 6.5)中,获得三元量子点 CuInS₂/ZnS。将不同量的多巴胺(DA,购自大连美伦生物科技有限公司)加入到上述的三元量子点 CuInS₂/ZnS 中,将 pH 保持在 6.5,通氮气除去溶解的氧气。将反应混合物放置 2 h,然后将所制备的多巴胺功能化的三元量子点 CuInS₂/ZnS(简称CuInS₂/ZnS QDs-DA)于 4 °C 下储存直至使用。

[0033] (3) 酪氨酸酶- Tau 抗体的制备

通过将酪氨酸酶(TYR,上海西格玛奥德里奇贸易有限公司)和 Tau 蛋白检测抗体(北京博奥森生物技术有限公司)分别溶解在 KBS(0.05 M,pH = 6.5)中获得酪氨酸酶的KBS溶液和 Tau 抗体的KBS溶液。通过将 N-羟基琥珀酰亚胺-叠氮化物(NHS-叠氮化物,上海拜力生物科技有限公司)和 N-羟基琥珀酰亚胺-二苯并环辛基(NHS-DBCO,上海拜力生物科技有限公司)分别溶解在二甲基亚砷(DMSO,国药集团化学试剂有限公司)中获得 NHS-叠氮化物的二甲基亚砷溶液和 NHS-DBCO 的二甲基亚砷溶液。将酪氨酸酶的KBS溶液(100 nM,100 μL)与 NHS-叠氮化物的二甲基亚砷溶液(100 μM,5 μL)混合。同时,将 Tau 抗体的KBS溶液(100 nM,100 μL)和 NHS-DBCO 的二甲基亚砷溶液(100 μM,5 μL)混合。将反应溶液在室温下温育 30 min 直至缀合反应完成。随后,将 5 μL 1 M Tris-HCl(pH = 8)加入到上述反应溶液中反应 5 min,使反应终止,获得Tau抗体-DBCO和 TYR-叠氮化物缀合物。采用分子量为 30 K 的超滤离心管分别纯化Tau抗体-DBCO和 TYR-叠氮化物缀合物。之后,通过将 Tau 抗体-DBCO 溶液(100 nM,50 μL)与 TYR-叠氮溶液(100 nM,50 μL)混合,在室温下反应 2 h,获得TYR-Tau 抗体。

[0034] (4) Tau 适配体:

Tau 适配体的序列为5'-/Biotin -/AAAAAAAAAAAAAAAAAGCGGAGCGTGGCAGG/-3'(由上海生工生物工程技术有限公司合成),将 Tau 适配体溶于去离子水中制成 1 μM 的Tau 适配体溶液。

[0035] (5) 间接荧光免疫传感器的构建及其对阿尔茨海默病的生物标志物 Tau 蛋白的检测

在包被亲和素的 96 孔板(苏州海狸纳米技术有限公司)中加入步骤(4)获得的100 μL 1 μM 的 Tau 适配体溶液,在室温下孵育 1.5 h。每孔用 PBS (137 mM NaCl,10 mM Na₂HPO₄·12H₂O,1 mM KH₂PO₄和3 mM KCl)加入含有 0.05 wt% Tween-20 的 PBST(pH = 7.4)洗涤三次。洗涤后,每孔加入 100 μL 含有 1 % BSA 的 PBST,然后在室温下孵育 1 h,再次用PBST洗涤。每孔加入100 μL的Tau 蛋白,并将 PBS 作为对照,然后在室温下孵育 2 h。用 PBST 洗涤三次后,每孔加入100 μL 步骤(3)制得的TYR-Tau 抗体,然后在室温下孵育 1 h。然后,再次用PBST洗涤孔,并在 37 °C 下将 100 μL 400 μM 步骤(2)制得的 CuInS₂/ZnS QDs-DA 加入各孔,反应 5 min,在 500 nm 激发光下记录荧光强度。

[0036] 上述基于多巴胺修饰的三元量子点 CuInS₂/ZnS 用于检测阿尔兹海默症的生物

标志物 Tau 蛋白的间接荧光免疫传感技术,具体检测方法为:将多巴胺修饰的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ (简称 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ QDs-DA)加入 Tau 适配体-Tau 蛋白-Tau 蛋白抗体检测荧光信号变化。

[0037] 本发明运用荧光检测技术观察多巴胺修饰的三元量子点 $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ 的荧光信号变化。实验结果见附图3,由图可知,一定范围内,随着 Tau 蛋白浓度增加,酪氨酸酶浓度越高,荧光信号越弱。激发波长为 500 nm。

[0038] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,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。

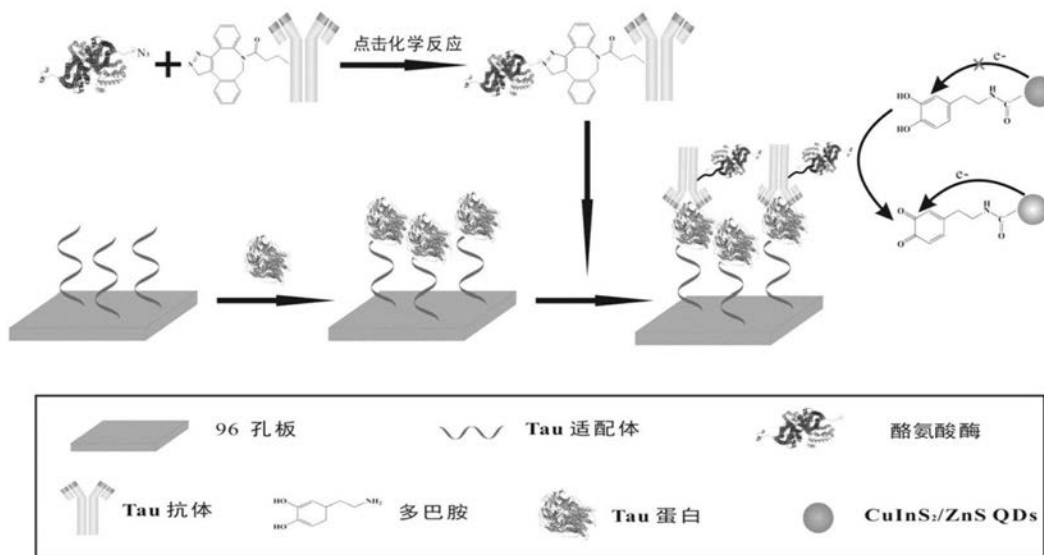


图1

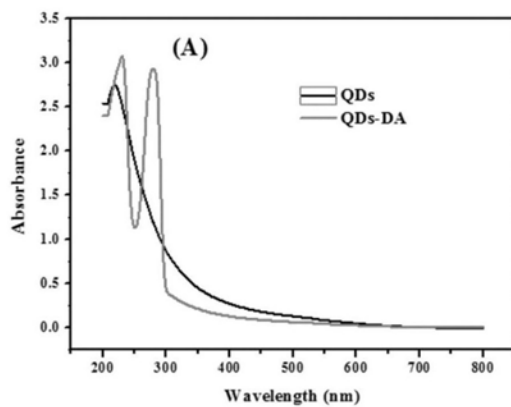


图2A

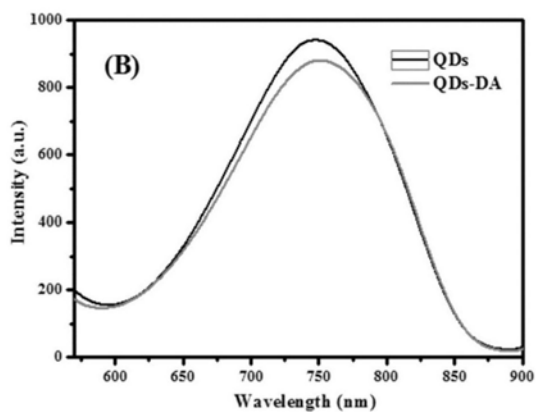


图2B

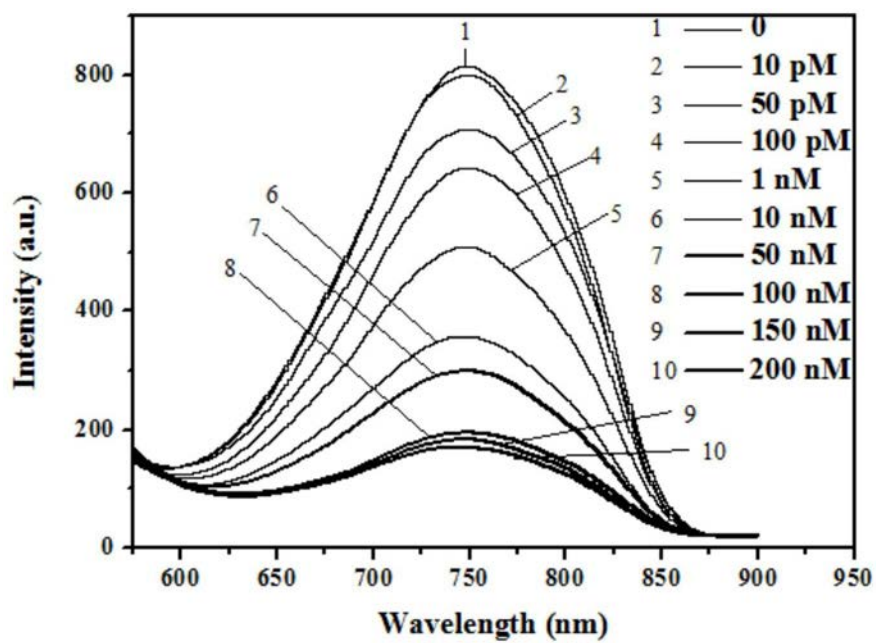


图3

专利名称(译)	一种基于多巴胺修饰的三元量子点的间接免疫荧光检测疾病标志物的方法		
公开(公告)号	CN108761061A	公开(公告)日	2018-11-06
申请号	CN201810577449.2	申请日	2018-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	福建医科大学		
申请(专利权)人(译)	福建医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	福建医科大学		
[标]发明人	韩志钟 陈丽 陈敬华 李春艳		
发明人	韩志钟 陈丽 陈敬华 李春艳		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种基于多巴胺修饰的三元量子点的间接免疫荧光检测疾病标志物的方法，首先，酪氨酸酶（TYR）通过无铜点击反应与疾病生物标志物的检测抗体结合。另外，将生物素修饰的相应适配体与亲和素包被的96孔板结合，依次加入疾病生物标志物和TYR-检测抗体。在将过量的TYR-检测抗体洗涤后加入CuInS₂/ZnS QDs-DA。在疾病生物标志物存在下，TYR能催化氧化CuInS₂/ZnS QDs-DA中的多巴胺部分使其转化为多巴胺醌导致荧光猝灭。通过检测TYR催化氧化CuInS₂/ZnS QDs-DA反应引起的电子转移导致的荧光信号的变化，实现对疾病生物标志物的高灵敏检测。

