



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104991063 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 21

(21) 申请号 201510359722. 0

G01N 33/52(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 06. 25

(71) 申请人 天津大学

地址 300072 天津市南开区卫津路 92 号天津大学

(72) 发明人 常津 武玉东 宫晓群 张健 姚颖异

(74) 专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代理事务所 12201

代理人 王丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

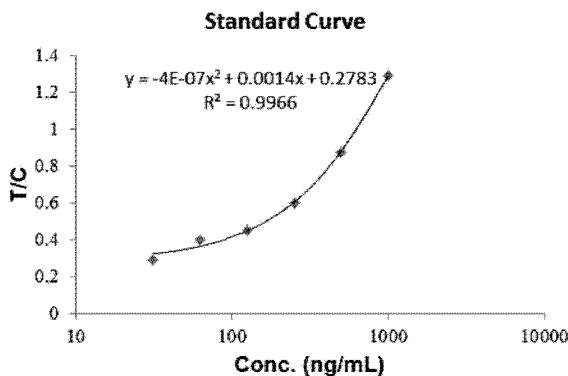
权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54) 发明名称

基于量子点的癌胚抗原免疫层析试纸条的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种基于量子点的癌胚抗原免疫层析试纸条的制备方法;通过 EDC(1- 乙基-(3- 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐) 活化作用,量子点的羧基和癌胚抗原抗体的氨基生成牢固的化学键,探针、癌胚抗原 (carcino embryonic antigen CEA) 和包埋在试纸条的另一种癌胚抗原抗体通过抗体抗原之间的作用,形成一种类似夹心的结构,定性定量的检测 CEA 癌胚抗原肿瘤标志物。本发明的特点在于:整个制备过程简单,适合于产业化生产;根据量子点的荧光特性,可定性定量检测癌胚抗原,且特异性良好;整个检测过程,成本低廉且操作非常简便,适合高危人群的社区肿瘤筛选,建立了一种肿瘤检测的新方法。



1. 一种基于量子点的癌胚抗原免疫层析试纸条的制备方法 ;其特征是步骤如下 :

1) 将量子点 QDs、EDC(1- 乙基 -(3- 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐) 和 PBS 缓冲液加入反应器,在旋转混合架上活化量子点的羧基,离心得到免疫量子点 ;

2) 将癌胚抗原抗体和上述免疫量子点混合,加入 PBS 缓冲液,在旋转混合架上偶联抗体 2 ~ 3h,离心得到量子点 - 癌胚抗原标记抗体荧光探针,然后用牛血清白蛋白 (BSA) 封闭量子点 - 癌胚抗原标记抗体荧光探针上未反应的羧基,同时用处理液处理样品垫和结合垫并 37℃ 烘干,然后用上述荧光探针处理结合垫并 37℃ 烘干 ;

3) 试纸条制备 :将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起,得到癌胚抗原量子点免疫层析试纸条。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征是将量子点 :EDC 质量份数配比为 1:4000 ~ 10000。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征是量子点 :癌胚抗原抗体质量分数比 = 1:10 ~ 50。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征是选用 PBS 缓冲液用以保持癌胚抗原抗体的活性。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征是处理液是蔗糖、牛血清白蛋白 BSA、聚乙二醇 PEG、聚氧乙烯山梨醇单月桂酸酯 Tween-20 的混合溶液。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征是根据试纸条夹心结构捕获的量子点荧光强度和癌胚抗原浓度之间的关系,定性定量检测癌胚抗原 CEA。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其特征是在样品垫上滴加不同浓度的标准癌胚抗原 CEA,不同浓度优选 0 ~ 1000ng/mL,建立标准曲线。

基于量子点的癌胚抗原免疫层析试纸条的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医药诊断技术领域,更具体的是涉及一种新型基于量子点的癌胚抗原免疫层析试纸条的制备方法。

背景技术

[0002] 近年来恶性肿瘤的发病率以及死亡率逐年上升,在我国的数据统计中显示,城市人口中恶性肿瘤导致的年死亡人数约占 22%,农村人口中恶性肿瘤导致的年死亡人数约占 17.25%,并且发病率和死亡率每年都在以很高的速率增长。随着医学的进步和不断发展,对于恶性肿瘤的诊断方法也越来越多样化,世界卫生组织已经作出最新的权威性的结论,恶性肿瘤患者如果能在发病早期发现,治愈率可以达到 80%以上,肿瘤的早期诊断与治疗已经成为近年来研究的热点。

[0003] 在检验诊断学方法中,血清肿瘤标志物的检测已经越来越引起人们的关注,这是因为这种方法具有很多优点,如简便无创,可以重复检测,检测结果直观且可以定量,费用相对较低等等,最重要的一点是对于血清肿瘤标志物可以动态监测,从而可以对恶性肿瘤的诊断、病情发展与疗效等进行判断,在临床上具有很高的应用价值。肿瘤标志物可以是在恶性肿瘤发生和增殖过程中,由肿瘤细胞的基因表达而合成分泌的,存在于细胞、组织或体液中,能够用一定方法来定量且能证实肿瘤存在的物质;也可以是由于机体对肿瘤产生反应,导致体内异常产生或升高的,可以反映肿瘤存在和生长的、能够监测肿瘤治疗和预后的一类物质,它包括蛋白质、激素、多胺及癌基因产物等,这些物质在正常人的体内不存在,或者在正常人体内出现的水平显著低于肿瘤患者体内的水平。

[0004] 癌胚抗原 (carcino embryonic antigen CEA) 是大肠癌组织产生的一种糖蛋白,可广泛存在于内胚叶起源的消化系统癌,也存在于正常胚胎的消化管组织中,在正常人血清中也可有微量存在。癌胚抗原是一个广谱性肿瘤标志物,它能向人们反映出多种肿瘤的存在,对大肠癌、乳腺癌和肺癌的疗效判断、病情发展、监测和预后估计是一个较好的肿瘤标志物。肿瘤标志物可以对高危人群进行筛查,通过检测肿瘤患者治疗前后肿瘤标志物的浓度变化可以判断对肿瘤的治疗是否有效。对生物体内的肿瘤标志物实现高灵敏度的检测是生命科学领域研究的一项重要课题,发展一种新的灵敏度高的检测方法也成为研究者们努力的目标。目前量子点因具有优异的光学性质已经被广泛应用于示踪、成像以及标记等方面,而免疫层析试纸条检测则因为它的简单迅速、价格低廉、可以随时随地等优点在检测领域处于特殊重要的地位。所以本文拟研制癌胚抗原量子点免疫荧光试纸条,对癌胚抗原肿瘤标志物进行检测,建立癌胚抗原肿瘤标志物检测的新方法。

发明内容

[0005] 鉴于肿瘤标志物在肿瘤检测中的重要地位、量子点这种纳米粒子独特的光学性质以及层析技术简便和价格方面的优势。我们将结合量子点和免疫层析试纸条两种技术,利用量子点羧基和肿瘤标志物相应抗体的氨基反应,制得量子点荧光探针。探针、肿瘤标志物

和包埋在试纸条的另一种肿瘤标志物抗体通过抗体抗原之间的作用,形成一种类似夹心的结构。对癌胚抗原 (carcino-embryonic antigen CEA),这种广泛存在于内胚叶起源的消化系统癌中的肿瘤标志物进行定性定量的检测,建立肿瘤标志物检测的新方法,致力于简单迅速、价格低廉、定性定量、操作简便的消化系统肿瘤早期诊断方法。

[0006] 本发明的技术方案如下:

[0007] 一种基于量子点的癌胚抗原免疫层析试纸条的制备方法;其步骤如下:

[0008] 1) 将量子点 QDs、EDC(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐)和 PBS 缓冲液加入反应器,在旋转混合架上活化量子点的羧基,离心得到免疫量子点;

[0009] 2) 将癌胚抗原抗体和上述免疫量子点混合,加入 PBS 缓冲液,在旋转混合架上偶联抗体 2~3h,离心得到量子点-癌胚抗原标记抗体荧光探针,然后用牛血清白蛋白 (BSA) 封闭量子点-癌胚抗原标记抗体荧光探针上未反应的羧基,同时用处理液处理样品垫和结合垫并 37℃ 烘干,然后用上述荧光探针处理结合垫并 37℃ 烘干;

[0010] 3) 试纸条制备:将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起,得到癌胚抗原量子点免疫层析试纸条。

[0011] 量子点:EDC 质量分数配比为 1:4000~10000。

[0012] 所述癌胚抗原抗体质量份数比=1:10~50。

[0013] 所述 PBS 缓冲液用以充当反应溶剂和保持癌胚抗原抗体的活性。

[0014] 所述处理液是蔗糖、牛血清白蛋白 BSA、聚乙二醇 PEG、聚氧乙烯山梨醇单月桂酸酯 Tween-20 的混合溶液。

[0015] 在样品垫上滴加不同浓度的标准癌胚抗原 CEA,建立标准曲线,定性定量检测癌胚抗原 CEA,说明书附图 2 是定量检测结果,说明书附图 3 是定性检测结果。不同浓度优选 0~1000ng/mL(其中 0ng/mL 对应胎牛血清 FBS,作为阴性对照)。

[0016] 通过 EDC(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐)的活化作用,量子点的羧基和癌胚抗原标记抗体 Ab_1 (分子量 150000~200000)的氨基生成牢固的化学键,离心纯化后分散在含牛血清白蛋白的 PBS 缓冲液中,得到 QDs- Ab_1 的荧光探针。将癌胚抗原包被抗体 Ab_2 均匀喷在硝酸纤维素膜上作为检测线 T,而将羊抗鼠抗体 Ab_3 硝酸纤维素膜上作为质控线 C。将试纸条的四个部分样品垫、结合垫、吸水垫以及硝酸纤维素膜组装的一起,最后得到癌胚抗原量子点免疫层析试纸条。滴加检测样品到样品垫上,检测样品会在吸水垫的层析作用下向前移动;如果检测样品有癌胚抗原 Ag(carcino-embryonic antigen CEA)存在,探针 QDs- Ab_1 、癌胚抗原和包埋在硝酸纤维素膜上的癌胚抗原包被抗体 Ab_2 通过抗体抗原之间的作用,在 T 线上形成一种类似夹心的结构 QDs- Ab_1 -Ag- Ab_2 ,而在 C 线上形成 QDs- Ab_1 - Ab_3 的结构,此时 T 线和 C 线同时亮;如果检测样品没有癌胚抗原 Ag 存在,则探针 QDs- Ab_1 仅仅和包埋在硝酸纤维素膜上的羊抗鼠抗体,形成 QDs- Ab_1 - Ab_3 的结构,此时 C 线亮而 T 线不亮。

[0017] 本发明制备的新型基于量子点的免疫层析试纸条优势在于:

[0018] 1. 采用量子点这种具有优异的光学性质,已经被广泛应用于示踪、成像以及标记等方面的纳米材料作为探针荧光来源,将纳米技术应用到肿瘤检测领域。

[0019] 2. 采用免疫层析技术作为检测用的基材,免疫层析技术因为它的简单迅速、价格低廉、可以随时随地等优点在检测领域处于特殊重要的地位。

[0020] 3. 采用量子点的羧基和抗体的氨基之间的反应形成的牢固的化学键,而非传统的静电吸附作用,提高了试纸条抵抗非特异性吸附的能力,量子点荧光强度和癌胚抗原浓度之间的线性关系可同时实现定性定量检测。

附图说明

[0021] 图 1 本发明制备的基于量子点的癌胚抗原 (CEA) 试纸条的量子点透射电镜照片。

[0022] 图 2 本发明制备的基于量子点的癌胚抗原 (CEA) 试纸条的标准曲线。

[0023] 图 3 本发明制备的基于量子点的癌胚抗原 (CEA) 试纸条的紫外照片。

[0024] 图 4 本发明制备的基于量子点的癌胚抗原 (CEA) 试纸条的不同抗原浓度荧光值。

具体实施方式

[0025] 下面的实施案例中将对本发明作进一步的阐述,但本发明不限于此。

[0026] 实施案例 1 :

[0027] 1) 将质量分数配比为 1 :4000 的量子点 QDs 和 EDC(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐)加入反应器,加入 PBS 缓冲液,在旋转混合架上活化量子点的羧基,离心得到免疫量子点;

[0028] 2) 将癌胚抗原抗体和上述免疫量子点混合(量子点和癌胚抗原抗体质量分数配比为 1 :10),加入 PBS 缓冲液,在旋转混合架上偶联抗体 2h,离心得到量子点-癌胚抗原标记抗体荧光探针,然后用牛血清白蛋白(BSA)封闭量子点-癌胚抗原标记抗体荧光探针上未反应的羧基,同时用处理液处理样品垫和结合垫并 37℃烘干,然后用上述荧光探针处理结合垫并 37℃烘干;

[0029] 3) 试纸条制备:将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起,得到癌胚抗原量子点免疫层析试纸条,在样品垫上滴加 1000ng/mL 标准癌胚抗原 CEA。

[0030] 如图 3-a 所示,在紫外灯下试纸条 C 线和 T 亮同时亮;如图 4-a 所示,量子点免疫荧光检测仪检测得出,试纸条 T 线荧光强度为 35737, C 线荧光强度 27822, T/C 值为 1.29。

[0031] 实施案例 2 :

[0032] 1) 将质量分数配比为 1 :4000 的量子点 QDs 和 EDC(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐)加入反应器,加入 PBS 缓冲液,在旋转混合架上活化量子点的羧基,离心得到免疫量子点;

[0033] 2) 将癌胚抗原抗体和上述免疫量子点混合(量子点和癌胚抗原抗体质量分数配比为 1 :30),加入 PBS 缓冲液,在旋转混合架上偶联抗体 2h,离心得到量子点-癌胚抗原标记抗体荧光探针,然后用牛血清白蛋白(BSA)封闭量子点-癌胚抗原标记抗体荧光探针上未反应的羧基,同时用处理液处理样品垫和结合垫并 37℃烘干,然后用上述荧光探针处理结合垫并 37℃烘干;

[0034] 3) 试纸条制备:将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起,得到癌胚抗原量子点免疫层析试纸条,在样品垫上滴加 500ng/mL 标准癌胚抗原 CEA。

[0035] 如图 3-b 所示,在紫外灯下试纸条 C 线和 T 线同时亮;如图 4-b 所示,量子点免疫荧光检测仪检测得出,试纸条 T 线荧光强度为 24211, C 线荧光强度 27703, T/C 值为 0.87。

[0036] 实施案例 3 :

[0037] 1) 将质量分数配比为 1 :4000 的量子点 QDs 和 EDC(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐)加入反应器,加入 PBS 缓冲液,在旋转混合架上活化量子点的羧基,离心得到免疫量子点;

[0038] 2) 将癌胚抗原抗体和上述免疫量子点混合(量子点和癌胚抗原抗体质量分数配比为 1 :50),加入 PBS 缓冲液,在旋转混合架上偶联抗体 2.5h,离心得到量子点-癌胚抗原标记抗体荧光探针,然后用牛血清白蛋白(BSA)封闭量子点-癌胚抗原标记抗体荧光探针上未反应的羧基,同时用处理液处理样品垫和结合垫并 37℃烘干,然后用上述荧光探针处理结合垫并 37℃烘干;

[0039] 3) 试纸条制备:将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起,得到癌胚抗原量子点免疫层析试纸条,在样品垫上滴加 250ng/mL 标准癌胚抗原 CEA。

[0040] 如图 3-c 所示,在紫外灯下试纸条 C 线和 T 线同时亮;如图 4-c 所示,量子点免疫荧光检测仪检测得出,试纸条 T 线荧光强度为 21763, C 线荧光强度 36234, T/C 值为 0.60。

[0041] 实施案例 4:

[0042] 1) 将质量分数配比为 1 :6000 的量子点 QDs 和 EDC(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐)加入反应器,加入 PBS 缓冲液,在旋转混合架上活化量子点的羧基,离心得到免疫量子点;

[0043] 2) 将癌胚抗原抗体和上述免疫量子点混合(量子点和癌胚抗原抗体质量分数配比为 1 :10),加入 PBS 缓冲液,在旋转混合架上偶联抗体 2.5h,离心得到量子点-癌胚抗原标记抗体荧光探针,然后用牛血清白蛋白(BSA)封闭量子点-癌胚抗原标记抗体荧光探针上未反应的羧基,同时用处理液处理样品垫和结合垫并 37℃烘干,然后用上述荧光探针处理结合垫并 37℃烘干;

[0044] 3) 试纸条制备:将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起,得到癌胚抗原量子点免疫层析试纸条,在样品垫上滴加 125ng/mL 标准癌胚抗原 CEA。

[0045] 如图 3-d 所示,在紫外灯下试纸条 C 线和 T 线同时亮;如图 4-d 所示,量子点免疫荧光检测仪检测得出,试纸条 T 线荧光强度为 17976, C 线荧光强度 39930, T/C 值为 0.45。

[0046] 实施案例 5:

[0047] 1) 将质量分数配比为 1 :8000 的量子点 QDs 和 EDC(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐)加入反应器,加入 PBS 缓冲液,在旋转混合架上活化量子点的羧基,离心得到免疫量子点;

[0048] 2) 将癌胚抗原抗体和上述免疫量子点混合(量子点和癌胚抗原抗体质量分数配比为 1 :10),加入 PBS 缓冲液,在旋转混合架上偶联抗体 2.5h,离心得到量子点-癌胚抗原标记抗体荧光探针,然后用牛血清白蛋白(BSA)封闭量子点-癌胚抗原标记抗体荧光探针上未反应的羧基,同时用处理液处理样品垫和结合垫并 37℃烘干,然后用上述荧光探针处理结合垫并 37℃烘干;

[0049] 3) 试纸条制备:将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起,得到癌胚抗原量子点免疫层析试纸条,在样品垫上滴加 62.5ng/mL 标准癌胚抗原 CEA。

[0050] 如图 3-e 所示,在紫外灯下试纸条 C 线和 T 线同时亮;如图 4-e 所示,量子点免疫荧光检测仪检测得出,试纸条的 T 线荧光强度为 13944, C 线荧光强度 35023, T/C 值为 0.40。

[0051] 实施案例 6:

[0052] 1) 将质量分数配比为 1 :10000 的量子点 QDs 和 EDC(1- 乙基 -(3- 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐) 加入反应器, 加入 PBS 缓冲液, 在旋转混合架上活化量子点的羧基, 离心得到免疫量子点;

[0053] 2) 将癌胚抗原抗体和上述免疫量子点混合 (量子点和癌胚抗原抗体质量分数配比为 1 :10), 加入 PBS 缓冲液, 在旋转混合架上偶联抗体 3h, 离心得到量子点 - 癌胚抗原标记抗体荧光探针, 然后用牛血清白蛋白 (BSA) 封闭量子点 - 癌胚抗原标记抗体荧光探针上未反应的羧基, 同时用处理液处理样品垫和结合垫并 37℃ 烘干, 然后用上述荧光探针处理结合垫并 37℃ 烘干;

[0054] 3) 试纸条制备 :将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起, 得到癌胚抗原量子点免疫层析试纸条, 在样品垫上滴加 31. 25ng/mL 标准癌胚抗原 CEA。

[0055] 如图 3-f 所示, 在紫外灯下试纸条 C 线和 T 线同时亮 ;如图 4-f 所示, 量子点免疫荧光检测仪检测得出, 试纸条的 T 线荧光强度为 9439, C 线荧光强度 32705, T/C 值为 0. 29。

[0056] 实施案例 7 :

[0057] 1) 将质量分数配比为 1 :10000 的量子点 QDs 和 EDC(1- 乙基 -(3- 二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐) 加入反应器, 加入 PBS 缓冲液, 在旋转混合架上活化量子点的羧基, 离心得到免疫量子点;

[0058] 2) 将癌胚抗原抗体和上述免疫量子点混合 (量子点和癌胚抗原抗体质量分数配比为 1 :50), 加入 PBS 缓冲液, 在旋转混合架上偶联抗体 3h, 离心得到量子点 - 癌胚抗原标记抗体荧光探针, 然后用牛血清白蛋白 (BSA) 封闭量子点 - 癌胚抗原标记抗体荧光探针上未反应的羧基, 同时用处理液处理样品垫和结合垫并 37℃ 烘干, 然后用上述荧光探针处理结合垫并 37℃ 烘干;

[0059] 3) 试纸条制备 :将吸水垫、硝酸纤维素膜、样品垫以及结合垫组装在一起, 得到癌胚抗原量子点免疫层析试纸条, 在样品垫上滴加胎牛血清 FBS(0ng/mL 标准癌胚抗原 CEA)。

[0060] 如图 3-g 所示, 在紫外灯下试纸条 C 线亮而 T 线不亮 ;如图 4-g 所示, 量子点免疫荧光检测仪检测得出, 试纸条 T 线荧光强度为 7441, C 线荧光强度 34586, T/C 值为 0. 22。

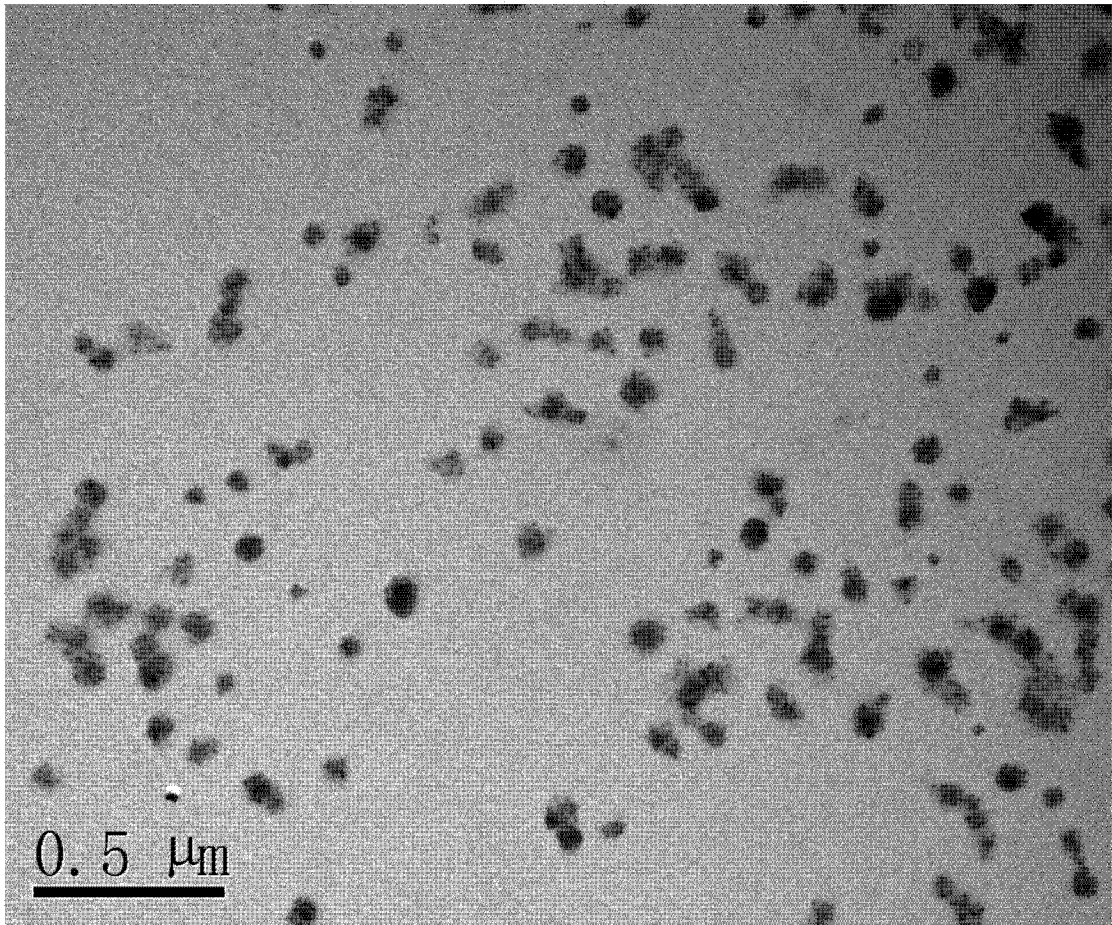


图 1

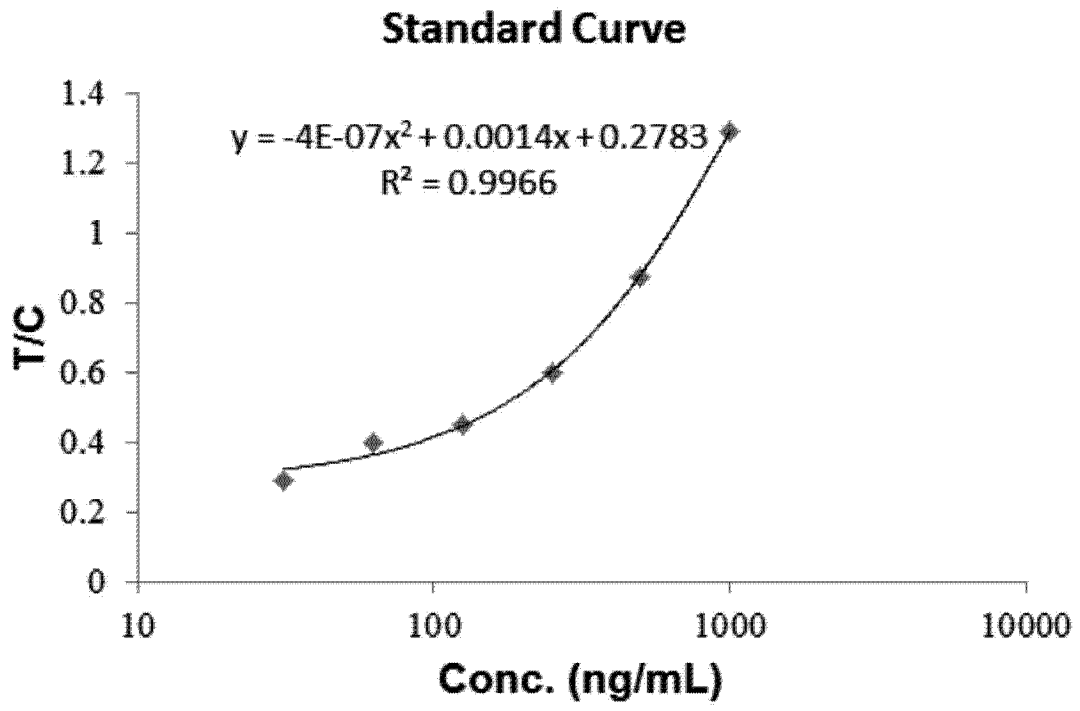


图 2

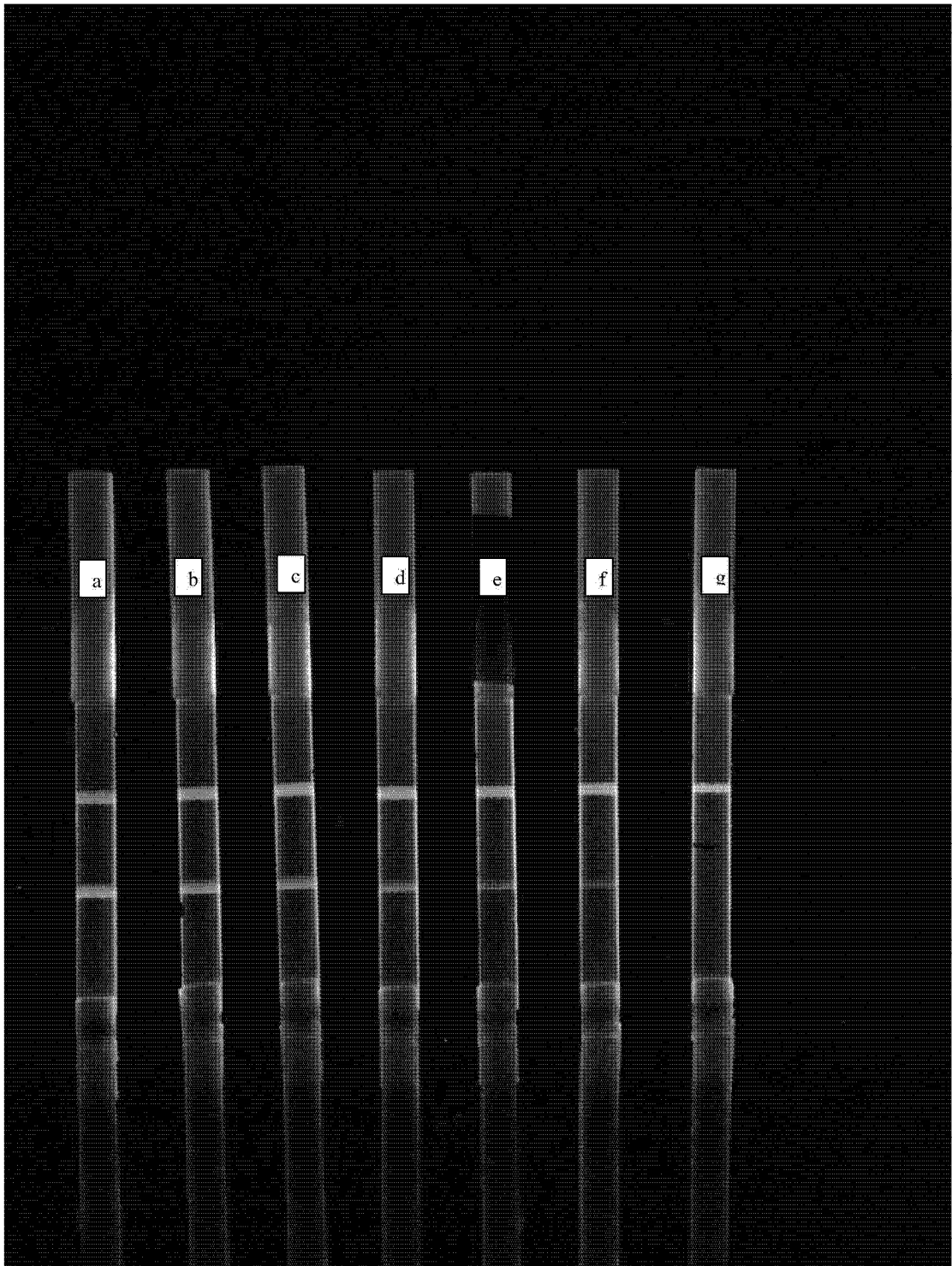


图 3

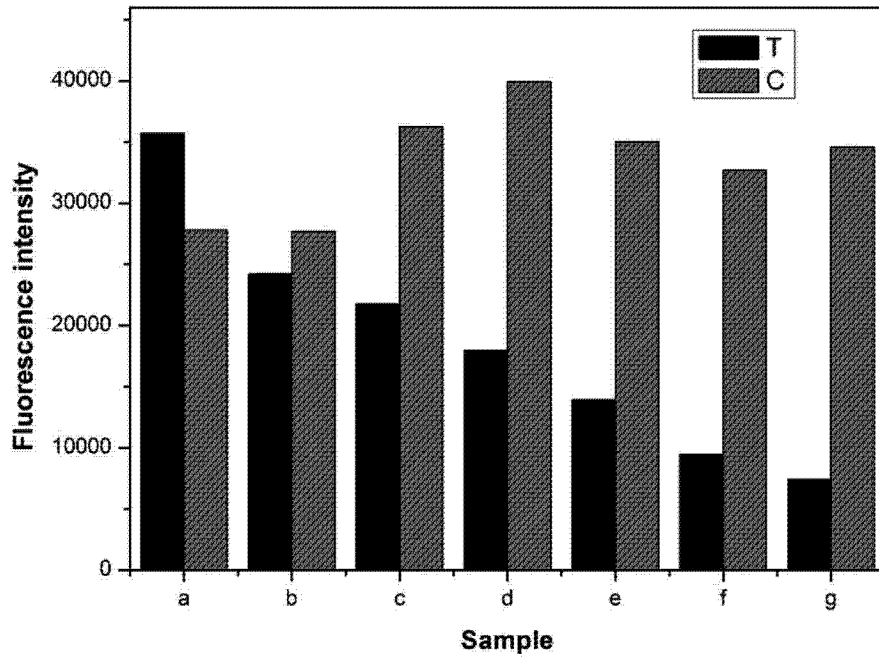


图 4

专利名称(译)	基于量子点的癌胚抗原免疫层析试纸条的制备方法		
公开(公告)号	CN104991063A	公开(公告)日	2015-10-21
申请号	CN201510359722.0	申请日	2015-06-25
[标]申请(专利权)人(译)	天津大学		
申请(专利权)人(译)	天津大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津大学		
[标]发明人	常津 武玉东 宫晓群 张健 姚颖异		
发明人	常津 武玉东 宫晓群 张健 姚颖异		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/558 G01N33/533 G01N33/52		
CPC分类号	G01N33/57473 G01N33/523 G01N33/533 G01N33/558 G01N2333/47		
代理人(译)	王丽		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于量子点的癌胚抗原免疫层析试纸条的制备方法；通过EDC(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐)活化作用，量子点的羧基和癌胚抗原抗体的氨基生成牢固的化学键，探针、癌胚抗原(carcino embryonic antigen CEA)和包埋在试纸条的另一种癌胚抗原抗体通过抗体抗原之间的作用，形成一种类似夹心的结构，定性定量的检测CEA癌胚抗原肿瘤标志物。本发明的特点在于：整个制备过程简单，适合于产业化生产；根据量子点的荧光特性，可定性定量检测癌胚抗原，且特异性良好；整个检测过程，成本低廉且操作非常简便，适合高危人群的社区肿瘤筛选，建立了一种肿瘤检测的新方法。

