



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104991068 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 21

(21) 申请号 201510382641. 2

G01N 33/52(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 07. 02

(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 张健 宫晓群 武玉东 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 33/577(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

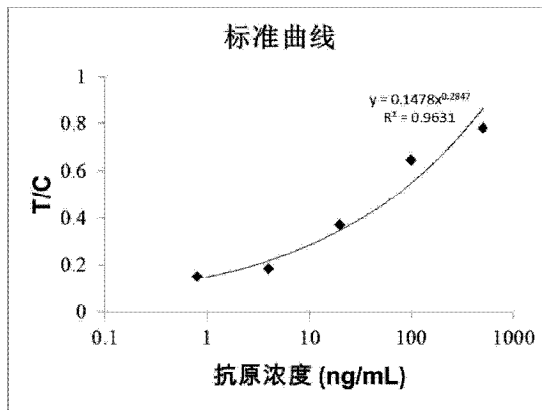
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

一种基于量子点的甲胎蛋白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甲胎蛋白免疫层析试纸条的制备方法;将量子点 (quantum dots QDs) 与甲胎蛋白抗体偶联制备成荧光探针 QDs@Ab1, QDs@Ab1、甲胎蛋白 (alpha fetoprotein AFP) 和包埋在试纸条的另一种甲胎蛋白抗体 (Ab1') 通过抗体抗原之间的作用, 形成一种类似夹心的结构 QDs@Ab1-AFP-Ab1', 定性半定量地检测原发性肝癌的肿瘤标志物 AFP。与现有产品和技术相比, 整个制备过程简单, 适合于产业化生产; 抗原浓度与探针荧光强度正相关, 可定性定量检测甲胎蛋白; 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. 基于量子点的甲胎蛋白免疫层析试纸条的制备方法 ;其特征是步骤如下 :

(1) 将水溶性量子点与 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐加入到反应器,然后向反应器中加入 PBS 缓冲液,在旋转混合架上活化量子点的羧基 30min,离心得到活化的量子点 ;

(2) 将活化的量子点、甲胎蛋白单克隆抗体按照摩尔比为 1:20 ~ 100 比例混合于 PBS 缓冲液中,将混合溶液置于旋转混合架上,室温下反应 2 ~ 3 小时 ;

(3) 反应结束后,采用离心分离进行纯化,用 PBS 缓冲液清洗除去游离的抗体和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,得到荧光探针 QDs@Ab1,然后将产物分散在含有 1 ~ 5% 牛血清白蛋白的 PBS 缓冲液中,4℃ 静置过夜 ;

(4) 将另一种甲胎蛋白抗体以及羊抗鼠 IgG 用 PBS 缓冲液稀释到 1 ~ 2mg/mL,用点样仪喷于硝酸纤维素膜上以形成 T 线和 C 线 ;

(5) 将样品垫,结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫按顺序固定于单面塑胶板上,各个垫和膜之间相互重叠 1 ~ 3mm,完成试纸条的组装。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征是所述量子点与 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐质量分数比为 1 :4000 ~ 10000。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征是所述原料摩尔比量子点 :甲胎蛋白单克隆抗体 = 1 :10 ~ 100。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征是所述样品垫处理方法,样品垫浸入含 Tween-200. 1%~2% 的 Tris-HCl 缓冲液中静置 5-10min,然后放入 37℃ 恒温干燥箱中干燥 2 ~ 4 小时,封袋置于 4℃ 保存备用。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征是所述结合垫处理方法,结合垫浸入含 BSA、亲水聚合物、表面活性剂、蔗糖的 PBS 缓冲液的处理液中,静置 5 ~ 10min,然后置于 37℃ 恒温干燥箱中干燥 2 ~ 4 小时,封袋置于 4℃ 保存备用。

6. 如权利要求 5 所述的方法,其特征是所述处理液配方中 BSA 浓度为 1%~4%,亲水聚合物浓度为 0.5%~5%,表面活性剂浓度为 0.1%~2%,蔗糖浓度为 1%~10%。

一种基于量子点的甲胎蛋白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的基于量子点的甲胎蛋白免疫层析试纸条的制备方法。

背景技术

[0002] 原发性肝癌 (Primary Hepatic Carcinoma PHC) 是临床上最常见的恶性肿瘤之一。当下,肝癌在全球的发病率都呈上升趋势。据世界卫生组织发表的《全球癌症报告 2014》报道,中国新增癌症病例高居世界第一位,其中肝癌的新增病例和死亡人数均居世界首位。目前,我国肝癌的发病率约为 25.7/10 万,成为死亡率仅次于胃癌、肺癌的第三大恶性肿瘤。因此,原发性肝癌的诊断,治疗意义重大。

[0003] 甲胎蛋白 (α -fetoprotein 或 AFP) 是一种糖蛋白,正常情况下,这种蛋白主要来自胚胎的肝细胞,胎儿出生后约两周甲胎蛋白从血液中消失,因此正常人血清中甲胎蛋白的含量尚不到 20 微克 / 升。但当肝细胞发生癌变时,却又恢复了产生这种蛋白质的功能,而且随着病情恶化它在血清中的含量会急剧增加,甲胎蛋白就成了诊断原发性肝癌的一个特异性临床指标。因此,将甲胎蛋白作为肝癌的肿瘤标志物,对高危人群进行筛查,对肝癌的早期诊断、病情发展和预后监测等工作也有所帮助。

[0004] 免疫层析技术是将免疫标记技术与层析技术结合的一种新型检测技术,它既有免疫标记的特异性又有层析技术快速、便捷等优势。其中胶体金免疫层析试纸条已广泛地应用于免疫学、组织学、病理学和细胞生物学等领域。但胶体金作为标记物,抗原浓度低的样本检测条带颜色太浅无法用肉眼识别,限制了其在检测血清肿瘤标志物的应用。量子点 (QDs) 是一种半导体纳米晶,它具有宽激发谱、窄发射谱、荧光效率高、光稳定性好等优点,是一种备受关注的新型荧光探针。用量子点取代传统的胶体金作为标记物可以弥补胶体金标记的不足。所以本文拟研制基于量子点的甲胎蛋白免疫荧光试纸条,从而实现对肝癌肿瘤标志物进行快速、方便、灵敏检测,建立原发性肝癌检测的新方法。

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,利用量子点羧基和甲胎蛋白单克隆抗体 (Ab1) 的氨基反应,制得量子点荧光探针 QDs@Ab1。探针、甲胎蛋白和包埋在试纸条的另一种甲胎蛋白抗体 (Ab1') 通过抗体抗原之间的作用,形成一种类似夹心的结构 QDs@Ab1-AFP-Ab1'。对甲胎蛋白——肝癌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、操作简便的原发性肝癌诊断方法。

[0006] 本发明的技术方案如下:

[0007] 基于量子点的甲胎蛋白免疫层析试纸条的制备方法;其步骤如下:

[0008] (1) 将水溶性量子点与 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐加入到反应

器,然后向反应器中加入 PBS 缓冲液,在旋转混合架上活化量子点的羧基 30min,离心得到活化的量子点;

[0009] (2) 将活化的量子点、甲胎蛋白单克隆抗体按照摩尔比为 1:20 ~ 100 比例混合于 PBS 缓冲液中,将混合溶液置于旋转混合架上,室温下反应 2 ~ 3 小时;

[0010] (3) 反应结束后,采用离心分离进行纯化,用 PBS 缓冲液清洗除去游离的抗体和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,得到荧光探针 QDs@Ab1,然后将产物分散在含有 1 ~ 5% 牛血清白蛋白的 PBS 缓冲液中,4℃ 静置过夜;

[0011] (4) 将另一种甲胎蛋白抗体以及羊抗鼠 IgG 用 PBS 缓冲液稀释到 1 ~ 2mg/mL,用点样仪喷于硝酸纤维素膜上以形成 T 线和 C 线;

[0012] (5) 将样品垫,结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫按顺序固定于单面塑胶板上,各个垫和膜之间相互重叠 1 ~ 3mm,完成试纸条的组装。

[0013] 所述量子点与 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐质量分数比为 1:4000 ~ 10000。

[0014] 所述原料摩尔比量子点:甲胎蛋白单克隆抗体 = 1:10 ~ 100。

[0015] 所述样品垫处理方法如下,样品垫浸入含 Tween-200.1% ~ 2% 的 Tris-HCl 缓冲液中静置 5-10min,然后放入 37℃ 恒温干燥箱中干燥 2 ~ 4 小时,封袋置于 4℃ 保存备用。

[0016] 所述结合垫处理方法如下,结合垫浸入含 BSA、亲水聚合物、表面活性剂、蔗糖的 PBS 缓冲液的处理液中,静置 5 ~ 10min,然后置于 37℃ 恒温干燥箱中干燥 2 ~ 4 小时,封袋置于 4℃ 保存备用。

[0017] 所述处理液配方如下:中 BSA 浓度为 1% ~ 4%,亲水聚合物浓度为 0.5% ~ 5%,表面活性剂浓度为 0.1% ~ 2%,蔗糖浓度为 1% ~ 10%。

[0018] 本发明制备的新型基于量子点的甲胎蛋白免疫层析试纸条优势在于:

[0019] 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。

[0020] 2. 采用免疫层析技术作为检测用的基材,免疫层析技术因其简单迅速、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。

[0021] 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,量子点荧光强度和甲胎蛋白浓度之间正相关关系可同时实现定性和定量检测,且灵敏度高,最低可检测出 0.4ng/mL。

附图说明

[0022] 图 1:本发明制备的基于量子点的甲胎蛋白 (AFP) 试纸条的量子点透射电镜照片。

[0023] 图 2:本发明制备的基于量子点的甲胎蛋白 (AFP) 试纸条阴性样品的检测图片。

[0024] 图 3:本发明制备的基于量子点的甲胎蛋白 (AFP) 试纸条阳性样品的检测图片。

[0025] 图 4:实施案例 1:本发明制备的基于量子点的甲胎蛋白 (AFP) 试纸条样品定量检测拟合曲线。

[0026] 图 5:实施案例 2:本发明制备的基于量子点的甲胎蛋白 (AFP) 试纸条样品定量检测拟合曲线。

[0027] 图 6:实施案例 3:本发明制备的基于量子点的甲胎蛋白 (AFP) 试纸条样品定量检

测拟合曲线。

具体实施方式

[0028] 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。

[0029] 具体步骤说明如下:

[0030] 1. 量子点偶联甲胎蛋白抗体 (QDs@Ab1)

[0031] (1) 将水溶性量子点 (QDs) 与 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 加入到反应器,然后向反应器中加入 PBS 缓冲液,在旋转混合架上活化量子点的羧基 30min,离心得到活化的量子点。

[0032] (2) 将活化的量子点、甲胎蛋白单克隆抗体 Ab1 按照摩尔比为 1:20 ~ 100 比例混合于 PBS 缓冲液中,将混合溶液置于旋转混合架上,室温下反应 2 ~ 3 小时;

[0033] (3) 反应结束后,采用离心分离进行纯化,用 PBS 缓冲液清洗三次以除去游离的抗体和 EDC,得到荧光探针 QDs@Ab1,最后将产物分散在含有 1 ~ 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 缓冲液中,4℃ 静置过夜。

[0034] 2. 抗体的固定

[0035] 将另一种甲胎蛋白抗体 (Ab1') 以及羊抗鼠 IgG (二抗,Ab2) 用 PBS 缓冲液稀释到 1 ~ 2mg/mL,用点样仪喷于硝酸纤维素膜上以形成 T 线和 C 线,然后置于 37℃ 恒温干燥箱中干燥 2 ~ 4 小时。

[0036] 3. 样品垫、结合物释放垫的预处理以及荧光探针的固化

[0037] (1) 将样品垫浸入含 Tween-200.1% ~ 2% 的 Tris-HCl 缓冲液中静置 5-10min,然后放入 37℃ 恒温干燥箱中干燥 2 ~ 4 小时,封袋置于 4℃ 保存备用。

[0038] (2) 结合垫浸入含 BSA、亲水聚合物、表面活性剂、蔗糖的 PBS 缓冲液的处理液中,静置 5 ~ 10min,然后置于 37℃ 恒温干燥箱中干燥 2 ~ 4 小时,封袋置于 4℃ 保存备用。

[0039] (3) 将所得荧光探针 QDs@Ab1 用含 BSA、亲水聚合物、表面活性剂、蔗糖的 PBS 缓冲液的处理液稀释 5 ~ 20 倍,均匀涂覆在上述已处理的结合物释放垫上,静置 5 ~ 10min 后于 37℃ 恒温干燥箱中干燥 2 ~ 4 小时,封袋置于 4℃ 保存备用。

[0040] 4. 试纸条的组装

[0041] (1) 将所得样品垫,结合物释放垫、硝酸纤维素膜、吸水垫按顺序固定于单面塑胶板上,各个垫和膜之间相互重叠 1 ~ 3mm,完成试纸条的组装。

[0042] (2) 用自动切膜机将组装好的试纸条进行切割,宽度约为 3mm,并将其装入塑料板中,最后将其与干燥剂一起装入铝箔袋内密封储存。

[0043] 5. 样品的测试和结果判读

[0044] (1) 定性和半定量检测:用于激发量子点的紫外灯波长范围为 320nm ~ 420nm 的普通紫外灯即可;根据夹心免疫的原理,当待测样本中含有甲胎蛋白 (AFP) 时,复合物将同时被 T 线和 C 线捕获,紫外灯照射下出现两条荧光条带,检测结果为阳性;反之,检测样本中不含 AFP 时,则只在 C 线位置出现荧光条带,检测结果为阴性;如果 T 线和 C 线都不出荧光条带则说明检测无效。(如图 2,图 3 所示)

[0045] (2) 定量检测:定量检测时,配置一系列浓度梯度的甲胎蛋白标准液,如:0.8ng/mL,4ng/mL,20ng/mL,100ng/mL,500ng/mL,取 50uL 滴加到免疫层析试纸条上,5 ~ 20min 后

用检测仪读取 T 线和 C 线的荧光强度,分别将 T/C 的荧光强度及对应的抗原浓度做拟合曲线,得到荧光强度与浓度对应的公式。

[0046] 所述的制备方法,其特征在于所述量子点是聚(叔丁基丙烯酸酯-乙基丙烯酸酯-甲基丙烯酸)三嵌段共聚物改性 CdZnSe 量子点得到的水溶性量子点。(如图 1 所示)

[0047] 所述的制备方法,其特征在于所述量子点与 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)质量分数比为 1:4000~10000。

[0048] 所述的制备方法,其特征在于所述原料摩尔比量子点:AFP 单克隆抗体 Ab1 = 1:10~100。

[0049] 所述的制备方法,其特征在于处理液配方中亲水聚合物为 PEG-4000, PVP-10000, PVP-40000 的一种。

[0050] 所述的制备方法,其特征在于处理液配方中表面活性剂为 TritonX-100, Tween-20 的一种。

[0051] 所述的制备方法,其特征在于处理液配方中 BSA 浓度为 1%~4%,亲水聚合物浓度为 0.5%~5%,表面活性剂浓度为 0.1%~2%,蔗糖浓度为 1%~10%。

[0052] 实施案例 1:

[0053] 1. 量子点偶联甲胎蛋白抗体(QDs@Ab1)

[0054] (1) 将水溶性量子点、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)水溶液按照原料质量比为 1:4000 比例混合于磷酸缓冲液(PBS 缓冲液)中,在旋转混合架上活化量子点的羧基 30min,离心得到活化的量子点。

[0055] (2) 将活化的量子点、甲胎蛋白抗体 Ab1 按照摩尔比为 1:20 比例混合于 PBS 缓冲液中,将混合溶液置于旋转混合架上,室温下反应 2 小时;

[0056] (3) 反应结束后,采用离心分离进行纯化,用 PBS 缓冲液清洗三次以除去游离的抗体和 EDC,得到荧光探针 QDs@Ab1,最后将产物分散在含有 1%牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 缓冲液中,4℃静置过夜。

[0057] 2. 抗体的固定

[0058] 将甲胎蛋白另一位点的抗体(Ab1')以及羊抗鼠 IgG(二抗,Ab2)用 PBS 缓冲液稀释到 1mg/mL,用点样仪喷于硝酸纤维素膜上以形成 T 线和 C 线,然后置于 37℃恒温干燥箱中干燥 2 小时。

[0059] 3. 样品垫、结合物释放垫的预处理以及荧光探针的固化

[0060] (1) 将样品垫浸入含 0.1% Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲液中静置 5min,然后放入 37℃恒温干燥箱中干燥 2 小时,封袋置于 4℃保存备用。

[0061] (2) 结合垫浸入含 1%的 BSA、0.5%的 PEG-4000、0.1%的 TritonX-100、1%的蔗糖的 PBS 缓冲液中,静置 5min,然后置于 37℃恒温干燥箱中干燥 2 小时,封袋置于 4℃保存备用。

[0062] (3) 将所得荧光探针 QDs@Ab1 用含 1%的 BSA、0.5%的 PEG-4000、0.1%的 TritonX-100、1%的蔗糖的 PBS 缓冲液稀释 5 倍,均匀涂覆在上述已处理的结合物释放垫上,静置 5min 后于 37℃恒温干燥箱中干燥 2 小时,封袋置于 4℃保存备用。

[0063] 4. 试纸条的组装

[0064] (1) 将所得样品垫,结合物释放垫、硝酸纤维素膜、吸水垫按顺序固定于单面塑胶

板上,各个垫和膜之间相互重叠 1mm,完成试纸条的组装。

[0065] (2) 用自动切膜机将组装好的试纸条进行切割,宽度约为 3mm,并将其装入塑料板中,最后将其与干燥剂一起装入铝箔袋内密封储存。

[0066] 5. 样品的测试和结果判读

[0067] (1) 定性和半定量检测:用于激发量子点的紫外灯波长范围为 320nm ~ 420nm 的普通紫外灯即可;根据夹心免疫的原理,当待测样本中含有甲胎蛋白 (AFP) 时,复合物将同时被 T 线和 C 线捕获, T 线生成复合物 QDs@Ab1-AFP-Ab1', C 线生成复合物 QDs@Ab1-Ab2。紫外灯照射下出现两条荧光条带,检测结果为阳性;反之,检测样本中不含 AFP 时,则只在 C 线位置出现荧光条带,检测结果为阴性;如果 T 线和 C 线都不出荧光条带则说明检测无效。条带颜色越深说明待测样本中含有的甲胎蛋白含量越高。

[0068] (2) 定量检测:配置一系列浓度梯度的甲胎蛋白标准液,如:0.8ng/mL,4ng/mL,20ng/mL,100ng/mL,500ng/mL,取 50 μ L 滴加到免疫层析试纸条上,5 ~ 20min 后用检测仪读取 T 线和 C 线的荧光强度,分别将 T/C 的荧光强度及对应的抗原浓度做拟合曲线,得到荧光强度与浓度对应的公式。拟合曲线见说明书附图 4。

[0069] 实施案例 2:

[0070] 1. 量子点偶联甲胎蛋白抗体 (QDs@Ab1)

[0071] (1) 将水溶性量子点、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 水溶液按照原料质量比为 1:6000 比例混合于磷酸缓冲液 (PBS 缓冲液) 中,在旋转混合架上活化量子点的羧基 30min,离心得到活化的量子点。

[0072] (2) 将活化的量子点、甲胎蛋白抗体 Ab1 按照摩尔比为 1:60 比例混合于 PBS 缓冲液中,将混合溶液置于旋转混合架上,室温下反应 2.5 小时;

[0073] (3) 反应结束后,采用离心分离进行纯化,用 PBS 缓冲液清洗三次以除去游离的抗体和 EDC,得到荧光探针 QDs@Ab1,最后将产物分散在含有 2% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 缓冲液中,4 $^{\circ}$ C 静置过夜。

[0074] 2. 抗体的固定

[0075] 将甲胎蛋白另一位点的抗体 (Ab1') 以及羊抗鼠 IgG (二抗, Ab2) 用 PBS 缓冲液稀释到 2mg/mL,用点样仪喷于硝酸纤维素膜上以形成 T 线和 C 线,然后置于 37 $^{\circ}$ C 恒温干燥箱中干燥 3 小时。

[0076] 3. 样品垫、结合物释放垫的预处理以及荧光探针的固化

[0077] (1) 将样品垫浸入含 1% Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲液中静置 5min,然后放入 37 $^{\circ}$ C 恒温干燥箱中干燥 2 小时,封袋置于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0078] (2) 结合垫浸入含 2% 的 BSA、3% 的 PVP-10000、1% 的 Tween-20、7% 的蔗糖的 PBS 缓冲液中,静置 5min,然后置于 37 $^{\circ}$ C 恒温干燥箱中干燥 3 小时,封袋置于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0079] (3) 将所得荧光探针 QDs@Ab1 用含 2% 的 BSA、3% 的 PVP-10000、1% 的 Tween-20、7% 的蔗糖的 PBS 缓冲液稀释 10 倍,均匀涂覆在上述已处理的结合物释放垫上,静置 5min 后于 37 $^{\circ}$ C 恒温干燥箱中干燥 3 小时,封袋置于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0080] 4. 试纸条的组装

[0081] (1) 将所得样品垫,结合物释放垫、硝酸纤维素膜、吸水垫按顺序固定于单面塑胶板上,各个垫和膜之间相互重叠 2mm,完成试纸条的组装。

[0082] (2) 用自动切膜机将组装好的试纸条进行切割,宽度约为 3mm,并将其装入塑料板中,最后将其与干燥剂一起装入铝箔袋内密封储存。

[0083] 5. 样品的测试和结果判读

[0084] (1) 定性和半定量检测:用于激发量子点的紫外灯波长范围为 320nm ~ 420nm 的普通紫外灯即可;根据夹心免疫的原理,当待测样本中含有甲胎蛋白 (AFP) 时,复合物将同时被 T 线和 C 线捕获, T 线生成复合物 QDs@Ab1-AFP-Ab1', C 线生成复合物 QDs@Ab1-Ab2。紫外灯照射下出现两条荧光条带,检测结果为阳性;反之,检测样本中不含 AFP 时,则只在 C 线位置出现荧光条带,检测结果为阴性;如果 T 线和 C 线都不出荧光条带则说明检测无效。条带颜色越深说明待测样本中含有的甲胎蛋白含量越高。

[0085] (2) 定量检测:配置一系列浓度梯度的甲胎蛋白标准液,如:0.8ng/mL,4ng/mL,20ng/mL,100ng/mL,500ng/mL,取 50uL 滴加到免疫层析试纸条上,5 ~ 20min 后用检测仪读取 T 线和 C 线的荧光强度,分别将 T/C 的荧光强度及对应的抗原浓度做拟合曲线,得到荧光强度与浓度对应的公式。拟合曲线见说明书附图 5。

[0086] 实施案例 3:

[0087] 1. 量子点偶联甲胎蛋白抗体 (QDs@Ab1)

[0088] (1) 将水溶性量子点、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 水溶液按照原料质量比为 1:10000 比例混合于磷酸缓冲液 (PBS 缓冲液) 中,在旋转混合架上活化量子点的羧基 30min,离心得到活化的量子点。

[0089] (2) 将活化的量子点、甲胎蛋白抗体 Ab1 按照摩尔比为 1:100 比例混合于 PBS 缓冲液中,将混合溶液置于旋转混合架上,室温下反应 3 小时;

[0090] (3) 反应结束后,采用离心分离进行纯化,用 PBS 缓冲液清洗三次以除去游离的抗体和 EDC,得到荧光探针 QDs@Ab1,最后将产物分散在含有 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 缓冲液中,4℃ 静置过夜。

[0091] 2. 抗体的固定

[0092] 将甲胎蛋白另一位点的抗体 (Ab1') 以及羊抗鼠 IgG (二抗, Ab2) 用 PBS 缓冲液稀释到 2mg/mL,用点样仪喷于硝酸纤维素膜上以形成 T 线和 C 线,然后置于 37℃ 恒温干燥箱中干燥 4 小时。

[0093] 3. 样品垫、结合物释放垫的预处理以及荧光探针的固化

[0094] (1) 将样品垫浸入含 2% Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲液中静置 10min,然后放入 37℃ 恒温干燥箱中干燥 4 小时,封袋置于 4℃ 保存备用。

[0095] (2) 结合垫浸入含 4% 的 BSA、5% 的 PVP-40000、2% 的 Tween-20、10% 的蔗糖的 PBS 缓冲液中,静置 10min,然后置于 37℃ 恒温干燥箱中干燥 4 小时,封袋置于 4℃ 保存备用。

[0096] (3) 将所得荧光探针 QDs@Ab1 用含 4% 的 BSA、5% 的 PVP-40000、2% 的 Tween-20、10% 的蔗糖的 PBS 缓冲液稀释 20 倍,均匀涂覆在上述已处理的结合物释放垫上,静置 10min 后于 37℃ 恒温干燥箱中干燥 4 小时,封袋置于 4℃ 保存备用。

[0097] 4. 试纸条的组装

[0098] (1) 将所得样品垫,结合物释放垫、硝酸纤维素膜、吸水垫按顺序固定于单面塑胶板上,各个垫和膜之间相互重叠 3mm,完成试纸条的组装。

[0099] (2) 用自动切膜机将组装好的试纸条进行切割,宽度约为 3mm,并将其装入塑料板中,最后将其与干燥剂一起装入铝箔袋内密封储存。

[0100] 5. 样品的测试和结果判读

[0101] (1) 定性和半定量检测:用于激发量子点的紫外灯波长范围为 320nm ~ 420nm 的普通紫外灯即可;根据夹心免疫的原理,当待测样本中含有甲胎蛋白 (AFP) 时,复合物将同时被 T 线和 C 线捕获, T 线生成复合物 QDs@Ab1-AFP-Ab1', C 线生成复合物 QDs@Ab1-Ab2。紫外灯照射下出现两条荧光条带,检测结果为阳性;反之,检测样本中不含 AFP 时,则只在 C 线位置出现荧光条带,检测结果为阴性;如果 T 线和 C 线都不出荧光条带则说明检测无效。条带颜色越深说明待测样本中含有的甲胎蛋白含量越高。

[0102] (2) 定量检测:配置一系列浓度梯度的甲胎蛋白标准液,如:0.8ng/mL,4ng/mL,20ng/mL,100ng/mL,500ng/mL,取 50 μ L 滴加到免疫层析试纸条上,5 ~ 20min 后用检测仪读取 T 线和 C 线的荧光强度,分别将 T/C 的荧光强度及对应的抗原浓度做拟合曲线,得到荧光强度与浓度对应的公式。拟合曲线见说明书附图 6。

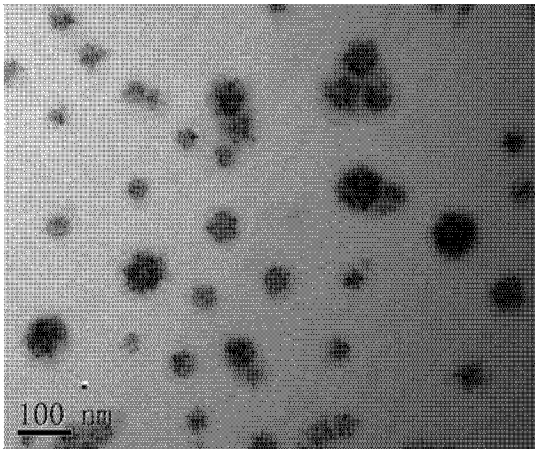


图 1

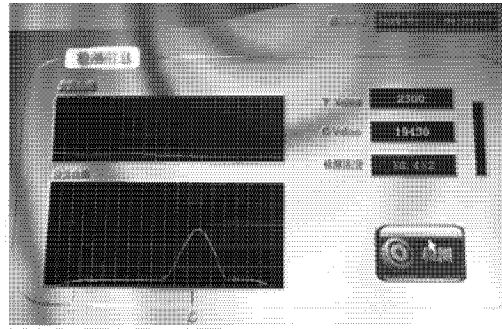


图 2

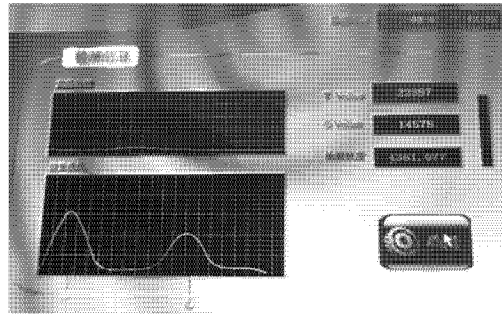


图 3

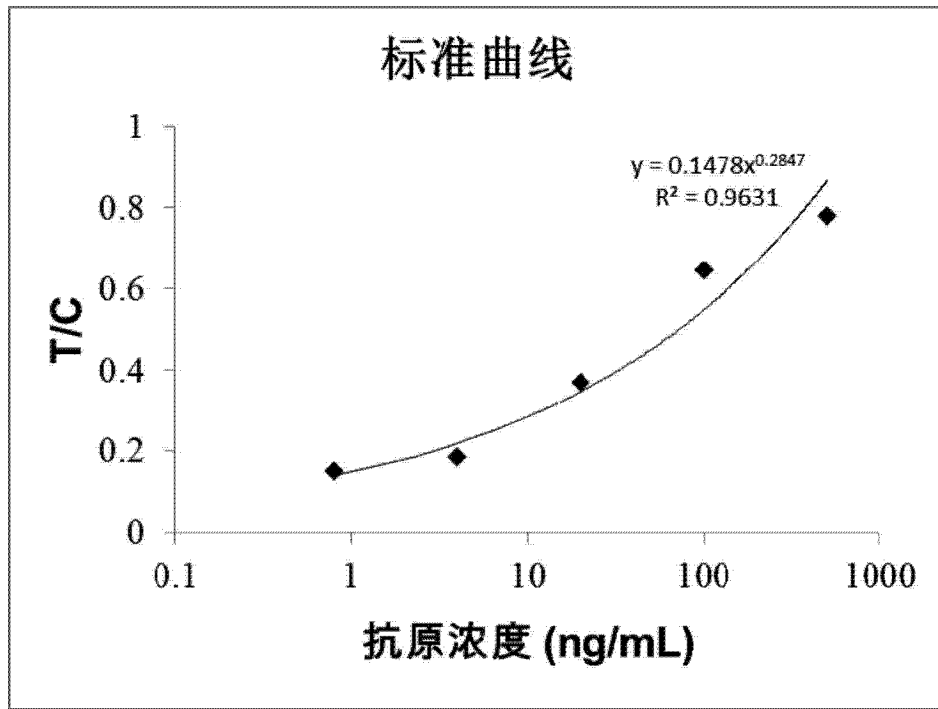


图 4

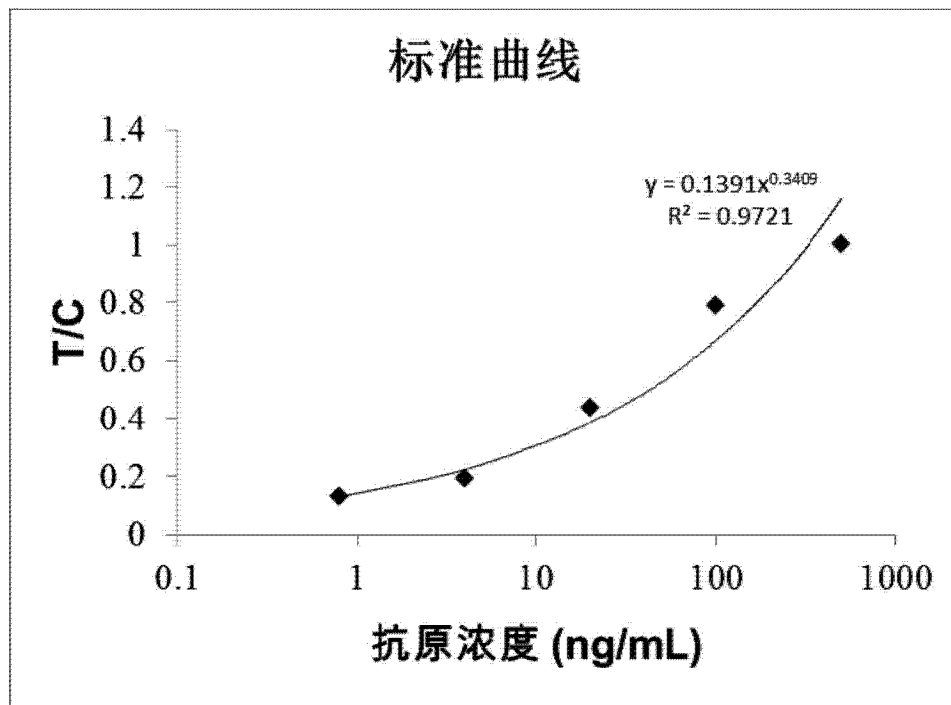


图 5

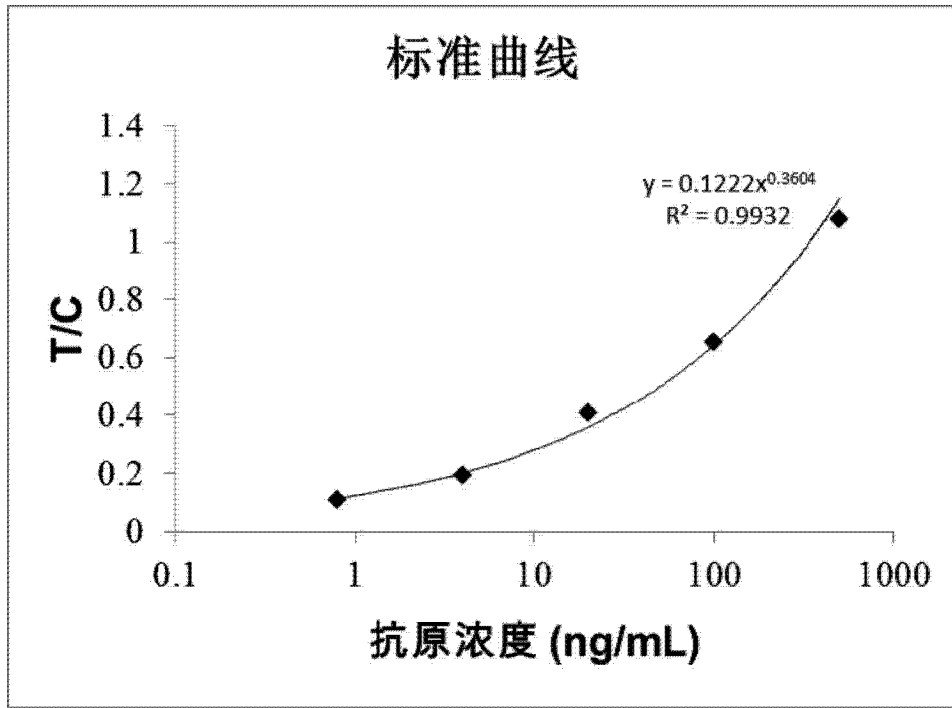


图 6

专利名称(译)	一种基于量子点的甲胎蛋白免疫层析试纸条的制备方法		
公开(公告)号	CN104991068A	公开(公告)日	2015-10-21
申请号	CN201510382641.2	申请日	2015-07-02
[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 张健 宫晓群 武玉东 姚颖异		
发明人	常津 张健 宫晓群 武玉东 姚颖异		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/574 G01N33/558 G01N33/533 G01N33/52		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/523 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/57438 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甲胎蛋白免疫层析试纸条的制备方法；将量子点(quantum dots QDs)与甲胎蛋白抗体偶联制备成荧光探针 QDsAb1，QDsAb1、甲胎蛋白(alpha fetoprotein AFP)和包埋在试纸条的另一种甲胎蛋白抗体(Ab1')通过抗体抗原之间的作用，形成一种类似夹心的结构QDsAb1-AFP-Ab1'，定性半定量地检测原发性肝癌的肿瘤标志物AFP。与现有产品和技术相比，整个制备过程简单，适合于产业化生产；抗原浓度与探针荧光强度正相关，可定性定量检测甲胎蛋白；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。

