



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106405112 A

(43)申请公布日 2017.02.15

(21)申请号 201610814539.X

G01N 21/64(2006.01)

(22)申请日 2016.09.10

(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 姚颖异 宫晓群 武玉东

(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 33/68(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

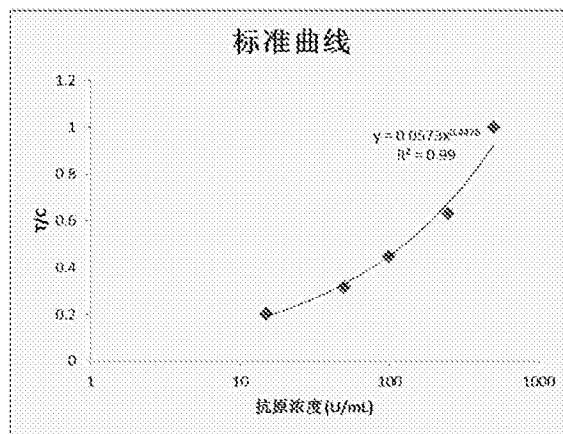
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

基于量子点的CA15-3免疫层析试纸条的制备方法

(57)摘要

本发明涉及基于量子点的CA 15-3免疫层析试纸条的制备方法;将量子点(quantum dots QDs)与CA 15-3抗体偶联制备成荧光探针QDs@Ab1,QDs@Ab1、CA 15-3和包埋在试纸条的另一种CA 15-3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-CA 15-3-Ab1',定性半定量地检测乳腺癌的肿瘤标志物CA 15-3。与现有产品和技术相比,本发明制备过程简单,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CA 15-3;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. 基于量子点的CA 15-3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,离心得到活化的量子点;

(2) 将活化的量子点、CA 15-3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CA 15-3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:CA 15-3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-20 0.1%~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%。

7. 如权利要求1所述的方法,其特征是所述步骤1)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。

基于量子点的CA15-3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CA 15-3免疫层析试纸条的制备方法。

背景技术

[0002] 乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,发病率逐年上升并有年轻化趋势。最新调查显示,乳腺癌已位居全球女性恶性肿瘤死亡率首位,严重威胁女性生命健康安全。女性乳腺癌发病率(粗率)全国合计为42.55/10万,城市为51.91/10万,农村为23.12/10万。乳腺癌的早期发现、早期诊断,是提高疗效的关键。因此研究乳腺癌早期诊断方法有重大意义。

[0003] 血清糖类抗原(Carbohydrate antigen,CA)15-3是目前临床上应用最广泛的乳腺癌诊断和病情监测指标,乳腺癌患者通常伴随着该物质的血清含量升高,正常人血清中CA 15-3的含量尚不到28U/mL。因此CA 15-3血清水平是乳腺癌患者检测的一项关键指标。对乳腺癌的早期诊断,术后监测有重大作用。

[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CA 15-3免疫荧光试纸条,从而实现了对乳腺癌肿瘤标志物进行快速、方便、灵敏检测,建立乳腺癌检测的新方法。

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CA 15-3单克隆抗体(Ab1)的氨基反应,制得量子点荧光探针QDs@Ab1。探针、CA15-3和包埋在试纸条的另一种CA 15-3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-CA 15-3-Ab1'。对CA 15-3——乳腺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、操作简便的乳腺癌诊断方法。

[0006] 本发明的技术方案如下:

[0007] 基于量子点的CA 15-3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,离心得到活化的量子点;

[0009] (2) 将活化的量子点、CA 15-3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CA 15-3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:CA 15-3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-20 0.1%~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] 所述步骤1)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;

[0019] 本发明制备的新型基于量子点的CA 15-3免疫层析试纸条优势在于:

[0020] 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。

[0021] 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。

[0022] 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CA 15-3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0.16U/mL。

附图说明

[0023] 图1:本发明制备的基于量子点的CA 15-3试纸条阴性样品的检测图片。

[0024] 图2:本发明制备的基于量子点的CA 15-3试纸条阳性样品的检测图片。

[0025] 图3:实施案例1制备的基于量子点的CA 15-3试纸条样品定量检测拟合曲线。

[0026] 图4:实施案例2制备的基于量子点的CA 15-3试纸条样品定量检测拟合曲线。

[0027] 图5:实施案例3制备的基于量子点的CA 15-3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CA 15-3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、CA 15-3 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 CA 15-3 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-20 0.1%~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 CA 15-3 (CA 15-3) 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 CA 15-3 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 1, 图 2 所示)

[0045] (2) 定量检测: 定量检测时, 配置一系列浓度梯度的 CA 15-3 标准液, 如: 15U/mL, 50U/mL, 100U/mL, 250U/mL, 500U/mL, 取 50 μ L 滴加到免疫层析试纸条上, 10~30min 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。

[0047] 所述的制备方法, 其特征在于所述原料摩尔比量子点:CA 15-3 单克隆抗体 Ab1 = 1:10~100。

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 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%。

[0051] 实施案例1:

[0052] 1.量子点偶联CA 15-3抗体(QDs@Ab1)

[0053] (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。

[0054] (2)将活化的量子点、CA 15-3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;

[0055] (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。

[0056] 2.抗体的固定

[0057] 将CA 15-3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。

[0058] 3.样品垫、结合物释放垫的预处理以及荧光探针的固化

[0059] (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。

[0060] (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。

[0061] (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。

[0062] 4.试纸条的组装

[0063] (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。

[0064] (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。

[0065] 5.样品的测试和结果判读

[0066] (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CA 15-3时,复合物将同时被T线和C线捕获,T线生成复合物QDs@Ab1-CA 15-3-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CA 15-3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CA 15-3含量越高。

[0067] (2) 定量检测:配置一系列浓度梯度的CA 15-3标准液,如:15U/mL,50U/mL,100U/mL,250U/mL,500U/mL,取50 μ L滴加到免疫层析试纸条上,10min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3。

[0068] 实施案例2:

[0069] 1. 量子点偶联CA 15-3抗体(QDs@Ab1)

[0070] (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。

[0071] (2) 将活化的量子点、CA 15-3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;

[0072] (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。

[0073] 2. 抗体的固定

[0074] 将CA 15-3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。

[0075] 3. 样品垫、结合物释放垫的预处理以及荧光探针的固化

[0076] (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。

[0077] (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。

[0078] (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。

[0079] 4. 试纸条的组装

[0080] (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。

[0081] (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。

[0082] 5. 样品的测试和结果判读

[0083] (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CA 15-3时,复合物将同时被T线和C线捕获,T线生成复合物QDs@Ab1-CA 15-3-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CA 15-3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CA 15-3含量越高。

[0084] (2) 定量检测:配置一系列浓度梯度的CA 15-3标准液,如:15U/mL,50U/mL,100U/mL,250U/mL,500U/mL,取50uL滴加到免疫层析试纸条上,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。

[0085] 实施案例3:

[0086] 1. 量子点偶联CA 15-3抗体(QDs@Ab1)

[0087] (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。

[0088] (2) 将活化的量子点、CA 15-3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;

[0089] (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。

[0090] 2. 抗体的固定

[0091] 将CA 15-3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。

[0092] 3. 样品垫、结合物释放垫的预处理以及荧光探针的固化

[0093] (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。

[0094] (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。

[0095] (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。

[0096] 4. 试纸条的组装

[0097] (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。

[0098] (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。

[0099] 5. 样品的测试和结果判读

[0100] (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CA 15-3时,复合物将同时被T线和C线捕获,T线生成复合物QDs@Ab1-CA 15-3-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CA 15-3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CA 15-3含量越高。

[0101] (2) 定量检测:配置一系列浓度梯度的CA 15-3标准液,如:15U/mL,50U/mL,100U/

mL, 250U/mL, 500U/mL, 取50uL滴加到免疫层析试纸条上, 30min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。

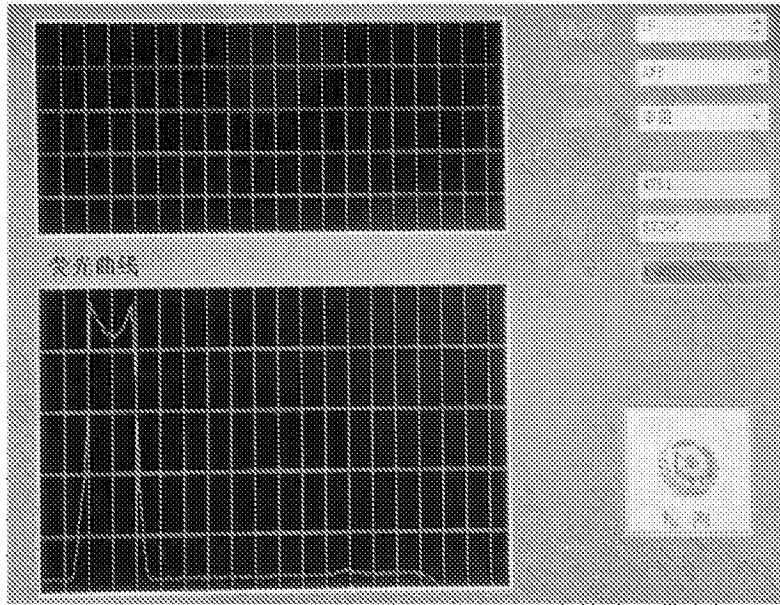


图1

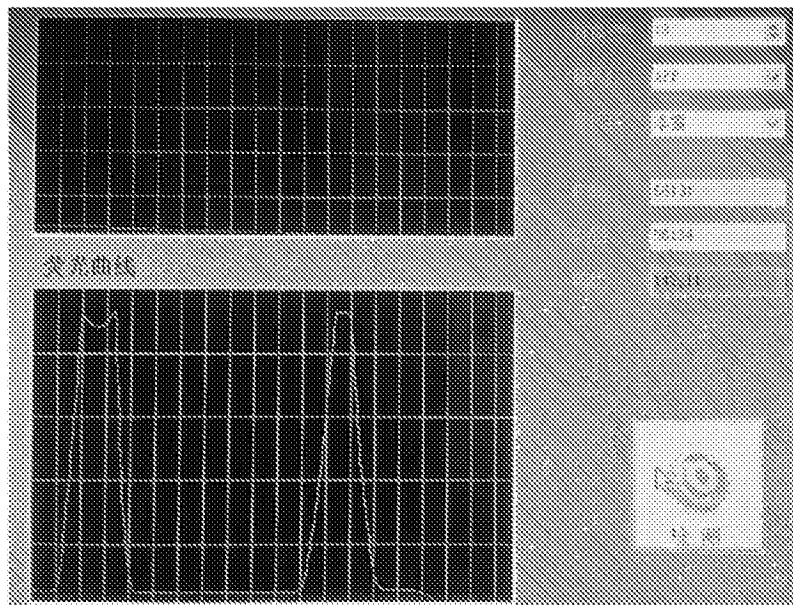


图2

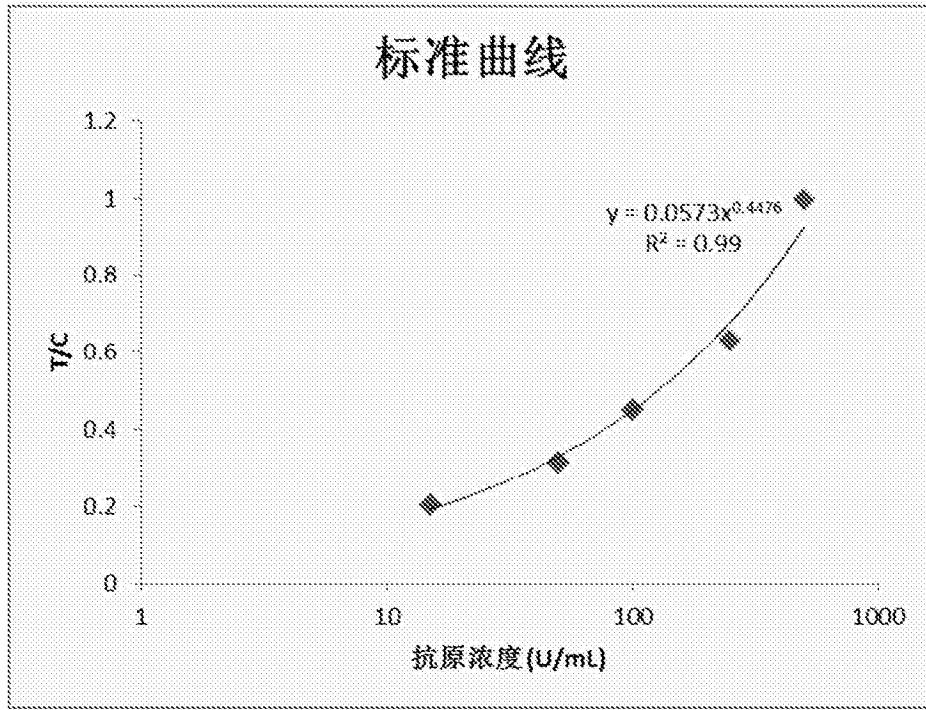


图3

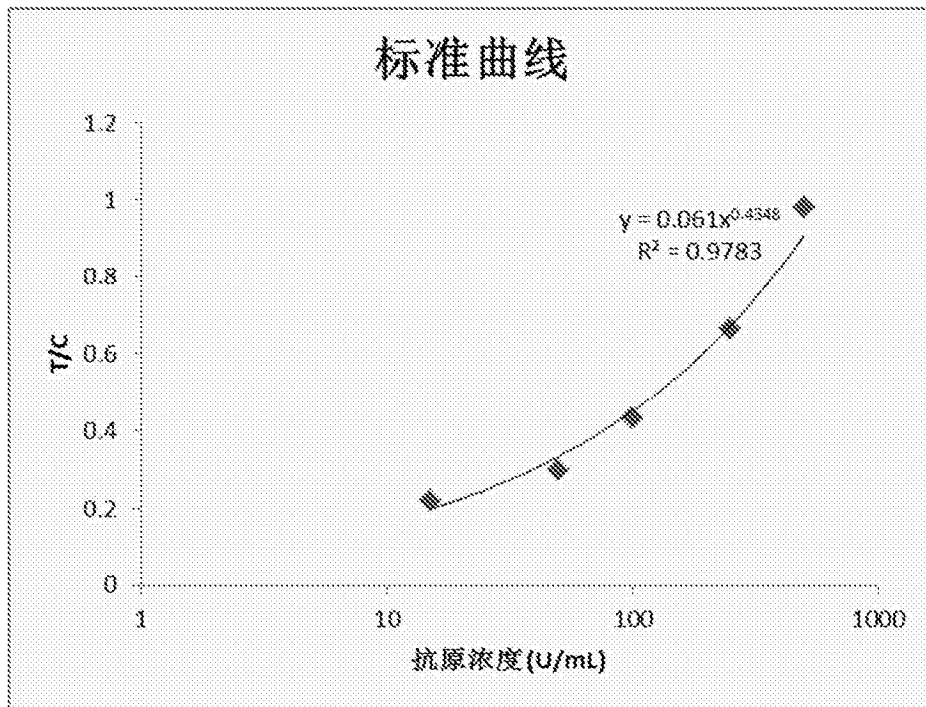


图4

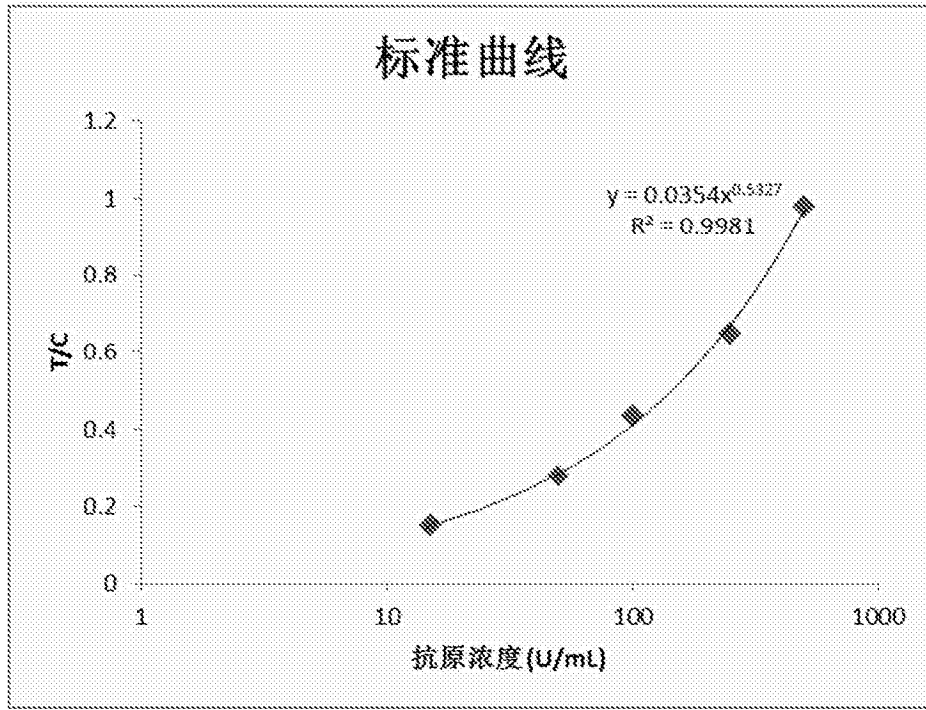


图5

专利名称(译)	基于量子点的CA15-3免疫层析试纸条的制备方法		
公开(公告)号	CN106405112A	公开(公告)日	2017-02-15
申请号	CN201610814539.X	申请日	2016-09-10
[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 姚颖异 宫晓群 武玉东		
发明人	常津 张健 姚颖异 宫晓群 武玉东		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/574 G01N33/558 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/68 G01N21/6486 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/57415 G01N33/57484 G01N2333/47		
代理人(译)	王丽		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及基于量子点的CA 15-3免疫层析试纸条的制备方法；将量子点 (quantum dots QDs)与CA 15-3抗体偶联制备成荧光探针QDs@Ab1，QDs@Ab1、CA 15-3和包埋在试纸条的另一种CA 15-3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-CA 15-3-Ab1'，定性半定量地检测乳腺癌的肿瘤标志物CA 15-3。与现有产品和技术相比，本发明制备过程简单，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CA 15-3；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。

