



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106526192 A

(43)申请公布日 2017.03.22

(21)申请号 201610823178.5

(22)申请日 2016.09.13

(71)申请人 江苏量点科技有限公司

地址 225300 江苏省泰州市健康大道801号  
26栋701室

(72)发明人 陈婷 李林松 柴向东 李金洁

(74)专利代理机构 深圳市赛恩倍吉知识产权代  
理有限公司 44334

代理人 谢志为

(51) Int. Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

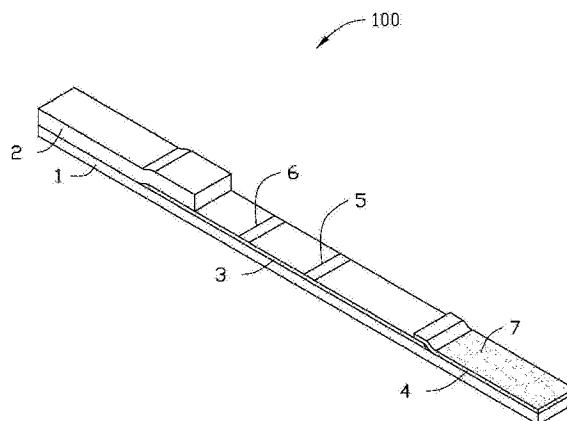
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

## (54)发明名称

量子点-抗体荧光探针的制备方法、探针及  
试纸条

## (57)摘要

本发明提供一种量子点-抗体荧光探针的制备方法、量子点-抗体荧光探针,及免疫层析试纸条及其制备方法,所述量子点-抗体荧光探针的制备方法包括如下步骤:(1)将量子点加入硼酸盐缓冲溶液,制得量子点溶液;(2)将活化剂加入到量子点溶液中进行活化,所述活化剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺或其盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物,所述活化剂与量子点的摩尔比为5~9:1,其中,所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺或其盐酸盐与N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物的摩尔比为2~3:4~5;(3)将抗体加入到活化后的量子点溶液中进行偶联,所述抗体与量子点的摩尔比为4~2:1,得到量子点-抗体荧光探针。



1. 一种量子点-抗体荧光探针的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:
  - (1) 将量子点加入硼酸盐缓冲溶液,制得量子点溶液;
  - (2) 将活化剂加入到量子点溶液中对量子点进行活化,所述活化剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺或其盐酸盐和N-羧基琥珀酰亚胺或其硫代物,所述活化剂与量子点的摩尔比为5~9:1,其中,所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺或其盐酸盐与N-羧基琥珀酰亚胺或其硫代物的摩尔比为2~3:4~5;
  - (3) 将抗体加入到活化后的量子点溶液中进行偶联,所述抗体与量子点的摩尔比为4~2:1,得到量子点-抗体荧光探针。
2. 如权利要求1所述的量子点-抗体荧光探针的制备方法,其特征在于,所述量子点是水溶性表面具有羧基的量子点,能在水相中合成、或者油相合成然后进行水相改性,包括CdSe/ZnS或CdSe/ZnSe核壳量子点。
3. 如权利要求1所述的量子点-抗体荧光探针的制备方法,其特征在于,所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺或其盐酸盐、N-羧基琥珀酰亚胺或其硫代物与量子点的摩尔比为5:2:1。
4. 如权利要求1所述的量子点-抗体荧光探针的制备方法,其特征在于,所述量子点水合半径为25-55nm,所述量子点与水的比重为4~7。
5. 如权利要求1所述的量子点-抗体荧光探针的制备方法,其特征在于,所述抗体为降钙素原单克隆抗体。
6. 如权利要求1所述的量子点-抗体荧光探针的制备方法,其特征在于,还包括:将封闭剂加入到所述量子点-抗体荧光探针,使其对量子点-抗体进行封闭,所述封闭剂为乙醇胺和牛血清蛋白,所述乙醇胺和牛血清蛋白在量子点溶液中的含量为1-3%;将封闭反应结束后的溶液离心,取沉淀溶于硼酸盐缓冲溶液中。
7. 如权利要求6所述的量子点-抗体荧光探针的制备方法,其特征在于,还包括将所述硼酸盐缓冲溶液中,加入牛血清蛋白,所述牛血清蛋白在硼酸盐缓冲溶液中的含量为0.1-0.2%。
8. 一种如权利要求1所述的方法制备的量子点-抗体荧光探针,其特征在于,所述抗体与量子点的摩尔比为4~2:1。
9. 如权利要求8所述的量子点-抗体荧光探针,其特征在于,所述量子点水合半径为25-55nm,所述量子点与水的比重为4~7。
10. 一种免疫层析试纸条,包括样品结合区和检测线,所述样品结合区喷涂有如权利要求8所述的量子点-抗体荧光探针。
11. 一种免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:
  - (1) 将如权利要求8所述的量子点-抗体荧光探针溶于探针稀释液,制得量子点-抗体荧光探针溶液;
  - (2) 将所述量子点-抗体荧光探针溶液均匀喷涂在玻璃纤维素膜;
  - (3) 将喷有所述量子点-抗体荧光探针的玻璃纤维素膜在5~20℃下干燥;
  - (4) 将干燥后的玻璃纤维素膜、设置有质控线和检测线的硝酸纤维素膜、吸水纸依次组装在底衬上,制得免疫层析试纸条。

## 量子点-抗体荧光探针的制备方法、探针及试纸条

### 技术领域

[0001] 本发明涉及检测领域,具体涉及一种量子点-抗体荧光探针的制备方法、量子点-抗体荧光探针,以及含有该探针的免疫层析试纸条。

### 背景技术

[0002] 量子点 (quantum dots, QDs) 又被称为半导体纳米晶,通常由II-VI族及III-V族元素组成,具有尺寸可调、激发光谱宽、发射光谱窄、斯托克位移较大等特点。量子点摩尔吸光系数和荧光量子产率较高,可以产生较强的荧光信号,提高了检测的灵敏度。同时,量子点光化学稳定性好、耐光漂白性能佳,提高了检测结果的稳定性。综上所述,量子点是一种理想的荧光探针材料,在基于免疫层析技术的检测领域具有独特的优势和广泛的应用前景。

[0003] 现阶段,用作荧光探针的量子点主要有单核量子点 (CdSe, CdTe, CdS) 和核壳式量子点 (CdSe/ZnS, CdSe/ZnSe), 可以基于有机物与无机金属化合物或有机金属化合物之间的高温裂解反应在非极性有机溶剂中制备。在有机体系中合成得到的量子点具有几乎完美的晶体结构、良好的单分散性、较强的光稳定性和较高的荧光产率,但是常规合成方法中使用的三丁基膦、三辛基膦等有机膦化合物剧毒、易燃、不稳定、易爆炸、价格昂贵,并且对操作环境有较高的要求,限制了量子点产品的大规模生产及应用。此外,在制备量子点荧光探针的过程中,量子点与相应的抗体分子的偶联产物存在均一性和分散性较差、易于发生团聚、发光效率较低、发射光谱半峰宽过宽等问题,影响了相关产品的检测性能。

### 发明内容

[0004] 鉴于以上内容,本发明提供了一种能够精确控制原料用量、降低生产成本的量子点-抗体荧光探针的制备方法、量子点-抗体荧光探针,以及含有该探针的免疫层析试纸条。

[0005] 本发明一方面提供一种量子点-抗体荧光探针的制备方法,包括如下步骤:

[0006] (1) 将量子点加入硼酸盐缓冲溶液,制得量子点溶液;

[0007] (2) 将活化剂加入到量子点溶液中对量子点进行活化,所述活化剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺或其盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物,所述活化剂与量子点的摩尔比为5~9:1,其中,所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺或其盐酸盐与N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物的摩尔比为2~3:4~5;

[0008] (3) 将抗体加入到活化后的量子点溶液中进行偶联,所述抗体与量子点的摩尔比为4~2:1,得到量子点-抗体荧光探针。

[0009] 本发明另一方面还提供采用上述方法制备的量子点-抗体荧光探针,所述抗体与量子点的摩尔比为4~2:1。

[0010] 本发明又一方面还提供一种免疫层析试纸条,包括样品结合区和检测线,所述样品结合区喷涂有采用上述方法制备的量子点-抗体荧光探针。

[0011] 本发明再一方面还提供上述免疫层析试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0012] (1) 将采用上述方法制备的量子点-抗体荧光探针溶于探针稀释液,制得量子点-

抗体荧光探针溶液；

[0013] (2) 将所述量子点-抗体荧光探针溶液均匀喷涂在玻璃纤维素膜；

[0014] (3) 将喷有所述量子点-抗体荧光探针的玻璃纤维素膜在5~20℃下干燥；

[0015] (4) 将干燥后的玻璃纤维素膜、设置有质控线和检测线的硝酸纤维素膜、吸水纸依次组装在底衬上，制得免疫层析试纸条。

[0016] 本发明提供的量子点-抗体荧光探针制备方法，制备得到的荧光探针的荧光回收率高，回收率 $\geq 80\%$ ；检测精度高，可检测到pg/mL级别的检测物。本发明所提供的免疫层析试纸，检测灵敏度高，灵敏度可达0.01ng/mL，操作方便，检测时间短，检测范围广。

## 附图说明

[0017] 图1为本发明实施例制备的免疫层析试纸条。

[0018] 主要元件符号说明

[0019]

免疫层析试纸条	100
底衬	1
吸水纸	2
硝酸纤维素膜	3
玻璃纤维素膜	4
检测线	5
质控线	6
量子点-抗体荧光探针	7

[0020] 如下具体实施方式将结合上述附图进一步说明本发明。

## 具体实施方式

[0021] 本发明一方面提供一种量子点-抗体荧光探针的制备方法，包括如下步骤：

[0022] (1) 将量子点加入硼酸盐缓冲溶液，制得量子点溶液；

[0023] (2) 将活化剂加入到量子点溶液中对量子点进行活化，所述活化剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺或其盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物，所述活化剂与量子点的摩尔比为5~9:1，其中，所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺或其盐酸盐与N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物的摩尔比为2~3:4~5；

[0024] (3) 将抗体加入到活化后的量子点溶液中进行偶联，所述抗体与量子点的摩尔比为4~2:1，得到量子点-抗体荧光探针。

[0025] 本方法制备的量子点-抗体荧光探针，荧光回收率高，回收率 $\geq 80\%$ ；检测精度高，可检测到pg/mL级别的检测物。

[0026] 根据本发明的一个实施例，上述量子点-抗体荧光探针的制备方法进一步包括如下步骤：

[0027] (1) 将量子点加入pH为7~8的硼酸盐缓冲溶液，混匀，制得浓度为0.5~1mg/mL的量子点溶液；

[0028] (2) 将活化剂加入到量子点溶液中进行活化，0~5℃超声活化5~10min，所述活化

剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)或其盐酸盐(EDC·HCl)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)或其硫代物(SuIfo-NHS),所述活化剂与量子点的摩尔比为5~9:1,其中,所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)或其盐酸盐(EDC·HCl)与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)或其硫代物(SuIfo-NHS)的摩尔比为2~3:4~5;

[0029] (3)将抗体加入到活化后的量子点溶液中进行偶联,在35~40℃的温度条件下反应1~3小时,所述抗体与量子点的摩尔比为4~2:1,得到量子点-抗体荧光探针。

[0030] 在本发明的一个实施方式中,所述量子点是水溶性表面具有羧基的量子点,能在水相中合成、或者油相合成然后进行水相改性,包括CdSe/ZnS或CdSe/ZnSe核壳量子点。

[0031] 优选的,所述量子点是通过油相合成然后进行水相改性。

[0032] 在本发明的一个实施方式中,所述量子点水合半径为25-55nm,所述量子点与水的比重为4~7。

[0033] 所述水合半径是指量子点溶于水后采用粒度测试仪测定的半径。所述比重是指量子点与水之间的比值。

[0034] 在本发明的一个实施方式中,步骤(2)中采用冰浴超声的方法进行所述活化。

[0035] 在本发明的一个实施方式中,所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺或其盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物与量子点的摩尔比为2:5:1。

[0036] 发明人发现,在此活化剂与量子点的摩尔比浓度下制备的量子点-抗体荧光探针灵敏度更高,含有该量子点-抗体荧光探针的免疫层析试纸条得到的检测线性关系更好。例如如下表1所示,

[0037] 表1含有不同浓度配比的活化剂与量子点制备的量子点-抗体荧光探针的免疫层析试纸条的线性系数表

	线性系数
2:5:1 条件的试纸条	0.9812
3:5:1 条件的试纸条	0.9328
1:5:1 条件的试纸条	0.9537

[0039] 本领域技术人员可以理解的,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺与N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物添加的先后循序并不限制,优选的,可以先添加N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物,再添加1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺。

[0040] 在本发明的一个实施方式中,所述抗体是针对不同蛋白或者蛋白的一个结构域、或者一段多肽的单克隆抗体,或多克隆抗体。

[0041] 优选的加入的抗体与量子点的摩尔比为4:1。

[0042] 发明人经过多次实验发现,在此摩尔比浓度下制备的量子点-抗体荧光探针灵敏度更高,含有该量子点-抗体荧光探针的免疫层析试纸条得到的检测线性关系更好。如下表2所示:

[0043] 表2含有不同摩尔比的量子点与抗体反应制备的量子点-抗体荧光探针的免疫层

析试纸条的线性系数表

	线性系数
[0044] 2:1 条件的试纸条	0.9462
[0044] 4:1 条件的试纸条	0.9775
[0044] 5:1 条件的试纸条	0.9267

[0045] 在本发明的一个实施方式中,所述抗体为降钙素原单克隆抗体。

[0046] 根据本发明的一个实施例,所述的量子点-抗体荧光探针的制备方法,还包括:将封闭剂加入到所述量子点-抗体荧光探针,使其对量子点-抗体进行封闭,所述封闭剂为乙醇胺和牛血清蛋白,所述乙醇胺和牛血清蛋白在量子点溶液中的含量为1-3%;将封闭反应结束后的溶液离心,取沉淀溶于硼酸盐缓冲溶液中。

[0047] 根据本发明的一个实施例,所述封闭反应进一步包括:将封闭剂加入到所述量子点-抗体荧光探针中,在35~40℃的温度条件下反应20~40min,所述封闭剂在量子点溶液中的含量为1-3%;将封闭反应结束后的溶液离心,弃上清液,重复两次,合并沉淀,将沉淀溶于pH为7~8的硼酸盐缓冲溶液中。

[0048] 本发明采用封闭剂对偶联后的量子点进行封闭,所述封闭剂是含有氨基的优良生物相容性分子,在量子点与抗体共价偶联后,将量子点表面的空余位点使用封闭剂封闭,保持了偶联在量子点表面的抗体分子的自由空间构象,克服了量子点偶联抗体后颗粒的团聚,易于沉淀,免疫检测易于出现假阳性等问题。

[0049] 在本发明的一个实施方式中,所述离心的速率为22000rpm,时间为15min。

[0050] 在本发明的一个实施方式中,将所述硼酸盐缓冲溶液(BS溶液)中,加入牛血清蛋白(BSA),所述牛血清蛋白在硼酸盐缓冲溶液中的质量百分数为比0.1~0.2%。

[0051] 本发明在硼酸盐缓冲液中加入牛血清蛋白,可以保护抗体活性及维持探针稳定性。在此种保护液的保护下,探针可以低温储藏长达3个多月。

[0052] 本发明采用乙醇胺和牛血清蛋白联合进行封闭,并通过反复实验发现,乙醇胺作为有机小分子,反应活性较高,能有效与量子点的活化位进行反应,达到终止反应位点的效果,而牛血清蛋白可以封闭量子点和抗体引起非特异性的位点,特别的,采用乙醇胺和牛血清蛋白联合封闭的量子点,所制备的免疫试纸条灵敏度比单纯使用乙醇胺或牛血清蛋白效果要更好。

[0053] 在本发明的一个实施方式中,本发明所述混匀优选为涡旋混匀,本领域人员可以理解的,涡旋混匀包括搅拌、涡旋混匀器等。

[0054] 本发明另一方面还提供一种采用上述方法制备的量子点-抗体荧光探针,所述抗体与量子点的摩尔比为4~2:1。

[0055] 根据本发明的一个实施例,所述量子点水合半径为25-55nm,所述量子点与水的比重为4~7。

[0056] 本发明所提供的量子点-抗体荧光探针,量子点比重大,易离心回收,回收率高,回

收率可达到80%以上,刚性好,不易损坏。

[0057] 本发明另一方面还提供一种免疫层析试纸条,包括样品结合区和检测线,所述样品结合区喷涂有上述量子点-抗体荧光探针。

[0058] 参见图1,所述免疫层析试纸条100包括底衬1,吸水纸2,硝酸纤维素膜3和玻璃纤维素膜4依次黏贴在底衬1上。所述底衬1为PVC底板。所述吸水纸2的一端与所述底衬1的一端对齐,所述吸水纸2的另一端与所述硝酸纤维素膜3一端相连,所述硝酸纤维素膜3上设置有带状的检测线5和质控线6,所述检测线5和质控线6平行于所述免疫层析试纸条100的两条短边。所述检测线5包被有抗原/半抗原-载体蛋白偶联物,所述检测线5位于硝酸纤维素膜3上远离于吸水纸2的一端。所述质控线6位于检测线5和吸水纸2的中间,所述质控线包被有抗体。所述硝酸纤维素膜3的另一端与所述玻璃纤维素膜4的一端相连,所述玻璃纤维素膜4的另一端与所述底衬1的另一端对齐。所述玻璃纤维素膜4上喷涂有上述量子点-抗体荧光探针7。

[0059] 本发明另一方面还提供上述免疫层析试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0060] (1) 将采用上述方法制备的量子点-抗体荧光探针7溶于探针稀释液,制得量子点-抗体荧光探针溶液,所述量子点-抗体荧光探针溶液的浓度为0.04-0.06mg/mL;

[0061] (2) 将所述量子点-抗体荧光探针7溶液均匀喷涂在玻璃纤维素膜4;

[0062] (3) 将喷有所述量子点-抗体荧光探针7的玻璃纤维素膜4在5~20℃下干燥;

[0063] (4) 将干燥后的玻璃纤维素膜4、设置有质控线6和检测线5的硝酸纤维素膜3、吸水纸2依次组装在底衬1上,制得免疫层析试纸条100。

[0064] 发明人通过反复实验发现,采用5~20℃的低温下干燥,可以有效提高试纸条的灵敏度,达到0.01mg/mL,降低了试纸条的精密度,比常温下干燥的免疫层析试纸条的精密度降低达5.2%。如下表3所示,

[0065] 表3常温37℃及低温下干燥的免疫层析试纸条精密度

[0066]

样 品 浓 度 (ng/mL)	5~20℃低温干燥条件的试 纸精密度	37℃干燥条件的试纸 精密度
0.5	12.3%	17.5%
2	8.3%	12.9%
180	7.7%	10.1%

[0067] 在本发明的一个实施方式中,所述探针稀释液为硼酸盐缓冲溶液、1%聚乙二醇、1%牛血清蛋白、0.5%吐温。

[0068] 本发明的免疫层析试纸,检测灵敏度高,灵敏度可达0.01ng/mL,操作方便,检测时间短,检测范围广。

[0069] 实施例一

[0070] 称取20mg CdSe/ZnS QDs溶于4mL氯仿溶液中,称取20mg马来酸酐-十八(碳)烯共聚物溶于2mL氯仿中,分别超声使其溶解,将两种溶液混合超声5~10min,旋蒸除去氯仿溶剂,量子点呈干燥状态,加入4mL水溶液,超声30min使其溶解,溶液澄清透亮即可。

[0071] 实施例二

[0072] 将150uI实施例一制备的羧基水溶性量子点(浓度是1mg/mL),加入250uI pH为

7.4、20mM硼酸盐缓冲液,涡旋混匀器混匀;加入50mg/ml的EDC 50uI,涡旋混匀器混匀,加入100mg/ml的NHS 50uI,涡旋混匀;冰浴超声活化5min;加入抗体50.3ug,涡旋混匀器混匀;置于旋转培养器上37℃反应2h。加入乙醇胺3uI (浓度是100%) 和20%BSA 50uI,混匀;37℃,置于旋转培养器上反应30min,离心,速率22000rpm,离心15min,弃上清,重复两次;合并沉淀溶于150uI pH为8.0、10mM硼酸盐缓冲液中,即为量子点-抗体荧光探针。

[0073] 实施例三

[0074] 将150uI实施例一制备的羧基水溶性量子点(浓度是5mg/mL),加入250uI pH为8, 10mM硼酸盐缓冲液,搅拌混匀;加入60mg/ml的EDC 50uI,涡旋混匀,加入80mg/ml的SuIfon-NHS 50uI,搅拌混匀;冰浴超声活化10min;加入抗体50.3ug,涡旋混匀;置于旋转培养器上37℃反应2h。加入乙醇胺3uI (浓度是100%) 和20%BSA 50uI,混匀;37℃,置于旋转培养器上反应30min,离心,速率22000rpm,离心15min,弃上清,重复两次;合并沉淀溶于150uI pH为8.0、10mM硼酸盐缓冲液中,加入质量分数为0.1%BSA,放入低温中冷藏。

[0075] 实施例四

[0076] 将偶联后的探针喷涂在玻璃纤维素膜上(浓度为1.5uI/cm),5-20℃低温干燥12-15h;在硝酸纤维素膜上包被检测线抗原偶联物和质控线抗体,37℃干燥12-15h;将制得的玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜和吸水纸依次组装在底衬(PVC底板)上,制得免疫层析试纸条。

[0077] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,以上实施方式仅是用于解释权利要求书。然本发明的保护范围并不局限于说明书。任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内,可轻易想到的变化或者替换,都包含在本发明的保护范围之内。

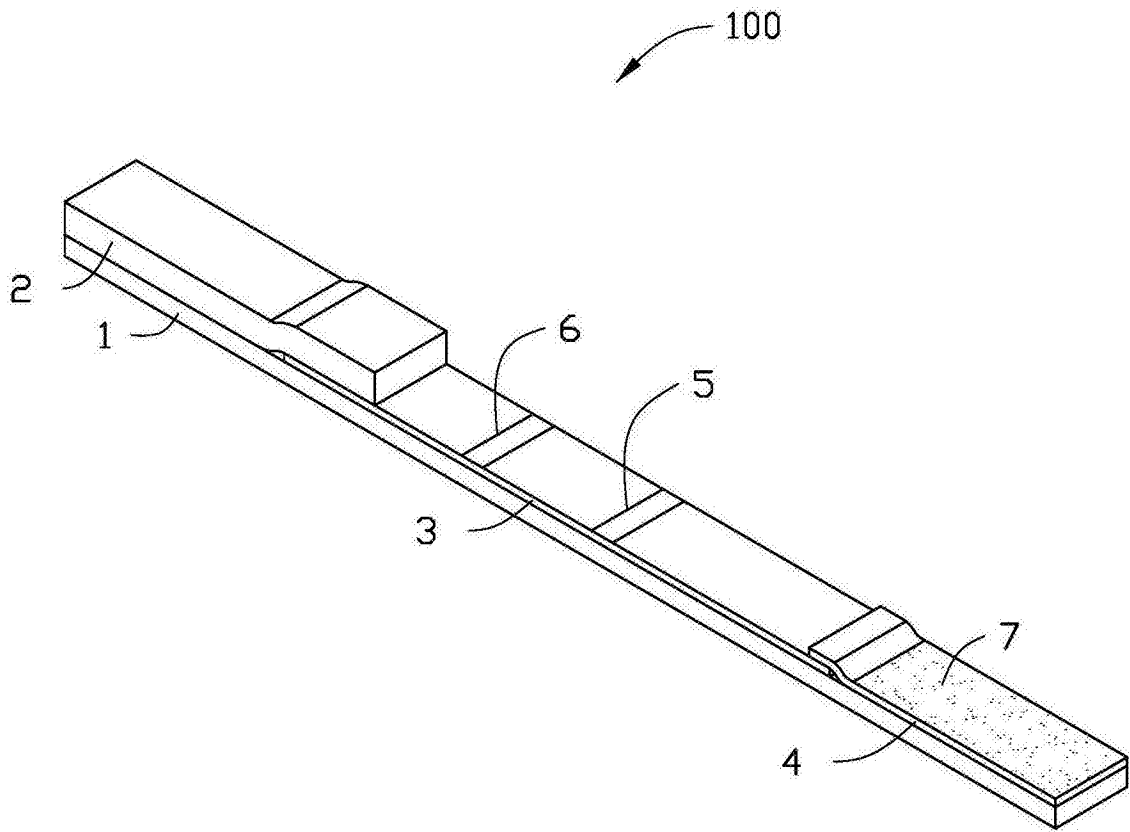


图1

专利名称(译)	量子点-抗体荧光探针的制备方法、探针及试纸条		
公开(公告)号	<a href="#">CN106526192A</a>	公开(公告)日	2017-03-22
申请号	CN201610823178.5	申请日	2016-09-13
[标]申请(专利权)人(译)	江苏量点科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏量点科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏量点科技有限公司		
[标]发明人	陈婷 李林松 柴向东 李金洁		
发明人	陈婷 李林松 柴向东 李金洁		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/582 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/588		
代理人(译)	谢志为		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种量子点-抗体荧光探针的制备方法、量子点-抗体荧光探针，及免疫层析试纸条及其制备方法，所述量子点-抗体荧光探针的制备方法包括如下步骤：(1)将量子点加入硼酸盐缓冲溶液，制得量子点溶液；(2)将活化剂加入到量子点溶液中进行活化，所述活化剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺或其盐酸盐和N-羧基琥珀酰亚胺或其硫代物，所述活化剂与量子点的摩尔比为5~9:1，其中，所述1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺或其盐酸盐和N-羧基琥珀酰亚胺或其硫代物的摩尔比为2~3:4~5；(3)将抗体加入到活化后的量子点溶液中进行偶联，所述抗体与量子点的摩尔比为4~2:1，得到量子点-抗体荧光探针。

