



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107860910 B

(45)授权公告日 2018.12.18

(21)申请号 201711075159.X

(22)申请日 2017.11.06

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107860910 A

(43)申请公布日 2018.03.30

(73)专利权人 南京诺唯赞医疗科技有限公司
地址 210038 江苏省南京市经济技术开发区
区科创路红枫科技园C2栋诺唯赞
专利权人 江苏康科斯医疗科技有限公司

(72)发明人 曹林 唐波 朱婷婷 许雯

(74)专利代理机构 南京天华专利代理有限责任
公司 32218
代理人 徐冬涛 杜静

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

(56)对比文件

CN 106526159 A,2017.03.22,
CN 106680509 A,2017.05.17,
CN 106153606 A,2016.11.23,
CN 105712970 A,2016.06.29,
CN 104297484 A,2015.01.21,
CN 105548059 A,2016.05.04,
CN 105929155 A,2016.09.07,
CN 106596945 A,2017.04.26,
CN 101059508 A,2007.10.24,
CN 101937000 A,2011.01.05,

审查员 张绚

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

一种活化量子点的封闭方法

(57)摘要

本发明提供了一种活化量子点的封闭方法,通过多聚体惰性蛋白,采用1-乙基-3-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC)与惰性蛋白交联反应形成的多聚体惰性蛋白对活化量子点进行封闭。本发明所述方法能够保证活化量子点表面的有效封闭,又能使得封闭过程中的蛋白连接更为牢固,从而提高试剂的灵敏度和稳定性,提高量子点免疫层析试剂的基本性能;本发明的另一目的是提供这种方法在量子点免疫荧光检测试剂盒中的应用。

1. 一种活化量子点的封闭方法,其特征在于,具体包括如下步骤:

(1) 向惰性蛋白溶液中添加EDC,惰性蛋白与EDC的质量比为5:1~20:1,1℃~10℃搅拌反应1.5~2.5 小时形成多聚体惰性蛋白溶液;

(2) 将活化量子点加入到步骤(1)中形成的多聚体惰性蛋白配成的溶液中,20~30℃封闭反应0.5~1.5 小时,离心清洗;

步骤(2)中在EDC完全水解之前进行所述的加入步骤,通过残余EDC将多聚体惰性蛋白通过化学偶联的方式连接到活化量子点表面。

2. 根据权利要求1 所述的活化量子点的封闭方法,其特征在于,所述惰性蛋白为牛血清蛋白或者酪蛋白中的一种或两种。

3. 根据权利要求1 所述的活化量子点的封闭方法,其特征在于,交联反应中惰性蛋白与EDC的质量比为8:1~15:1。

4. 根据权利要求3 所述的活化量子点的封闭方法,其特征在于,交联反应中惰性蛋白与EDC的质量比为10:1。

5. 根据权利要求1 所述的活化量子点的封闭方法,其特征在于,交联反应的反应时间为2 小时。

6. 根据权利要求1 所述的活化量子点的封闭方法,其特征在于,交联反应的反应温度为4℃。

7. 根据权利要求1 所述的活化量子点的封闭方法,其特征在于,封闭时间为1 小时。

8. 根据权利要求1 所述的活化量子点的封闭方法,其特征在于,述步骤(2)中多聚体惰性蛋白配成的溶液的质量浓度为8%~15%。

9. 根据权利要求8 所述的活化量子点的封闭方法,其特征在于,述步骤(2)中多聚体惰性蛋白配成的溶液的质量浓度为10%。

10. 根据权利要求1 所述的活化量子点的封闭方法,其特征在于,步骤(2)中活化量子点的制备方法为:向量子点稀释液中加入EDC水溶液与N-羟基琥珀酰亚胺水溶液,室温搅拌反应0.5~1 小时;反应完成后离心清洗,加入抗体稀释液中,室温搅拌反应1~2 小时。

11. 根据权利要求10所述的活化量子点的封闭方法,其特征在于,EDC的用量为量子点表面羧基含量的0.2~10 倍;N-羟基琥珀酰亚胺与EDC的摩尔比为0.5~2。

一种活化量子点的封闭方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,尤其涉及一种活化量子点的封闭方法。

背景技术

[0002] 免疫层析技术是近十年来兴起的一种快速诊断技术,其原理是利用液体的毛细作用,让待测物通过这一作用在检测线发生免疫反应,并能通过肉眼或者相应仪器检测获得测试结果。免疫层析试剂具有检测快速、操作简单等优点,且不需要复杂的检测设备,符合即时检测(POCT)的需求。

[0003] 目前常用的免疫层析试剂的方法学主要有胶体金法和荧光法。其中胶体金免疫层析技术已经在临床检验中得到了广泛应用,其通过肉眼观察检测结果,灵敏度低,只能用于定性或者半定量的检测,对于一些高灵敏度项目无法满足临床检测的具体要求。因此,随着精准医疗的需求逐渐加大,免疫荧光技术因其检测准确、灵敏度高等优点正在逐步替代胶体金免疫层析技术,其中又以量子点免疫荧光技术的发展最为迅速。

[0004] 量子点又叫半导体纳米晶,是一种纳米荧光材料,通常是由II~VI族或III~V族元素组成的稳定的、尺寸介于1~20nm之间的纳米微晶体,具有激发谱线宽、发射谱线窄、量子尺寸效应、荧光效率高、光稳定性好等特点,可用于对分析物进行荧光定量检测,我国现有诸多专利已就这一应用进行了描述。众所周知,在量子点免疫层析试剂制备过程中,将抗体等生物活性物质偶联到量子点表面后即可获得活化量子点,但活化量子点表面仍有部分区域没有结合抗体,从而暴露在溶液环境中,需要进一步用封闭剂处理活化量子点遮盖住裸露区域,降低样本检测过程中的非特异性反应。因此封闭效果对于降低量子点免疫层析诊断试剂的非特异性反应、提高试剂灵敏度具有非常重要的意义。

[0005] 目前应用最为广泛的封闭方法是以天然的牛血清白蛋白(BSA)等惰性蛋白作为封闭材料,通过物理吸附的方式使惰性蛋白粘附到活化量子点的裸露区域,阻止非特异性反应的发生。但天然BSA主要由单体BSA组成,难以完全遮盖住活化量子点表面的全部裸露区域,因此无法完全避免非特异性反应。另外惰性蛋白与量子点之间的连接方式均为物理吸附,在量子点标记物的长期存放过程中,惰性蛋白极易发生脱落降低试剂稳定性及灵敏度等性能。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种活化量子点的封闭方法,该方法能够保证活化量子点表面的有效封闭,又能使得封闭过程中的蛋白连接更为牢固,从而提高试剂的灵敏度和稳定性,提高量子点免疫层析试剂的基本性能;本发明的另一目的是提供这种方法在量子点免疫荧光检测试剂盒中的应用。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供了一种活化量子点的封闭方法,通过多聚体惰性蛋白,采用1-乙基-3-(3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺(EDC)与惰性蛋白交联反应形成的多聚体惰性蛋白对活化量子点进行封闭。

[0008] 进一步的,本发明所述的惰性蛋白为牛血清蛋白(BSA)或者酪蛋白(Casein)中的一种或两种。

[0009] 进一步的,本发明所述的交联反应中惰性蛋白与1-乙基-3-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺的质量比为5:1~20:1,优选8:1~15:1,更优选10:1。发明人发现,当惰性蛋白与EDC 质量比在此范围时,可以形成不同程度的交联,多聚惰性蛋白的分子大小会分布在一定区间,而完成偶联反应后的量子点抗体复合物表面的空隙也是呈现一定大小封闭的,此时在此区间大小的多聚惰性蛋白就能够最大限度的填补量子点抗体复合物中的空隙,提高封闭效率。

[0010] 进一步的,本发明所述的交联反应的反应时间为1.5~2.5小时,优选为2小时。

[0011] 进一步的,本发明所述的交联反应的反应温度为1℃~37℃,优选为1℃~10℃,更优选为4℃。

[0012] 进一步的,本发明封闭方法中封闭时间为0.5~1.5小时,优选为1小时。发明人发现,控制前述封闭时间,可以提高量子点免疫层析试剂的灵敏度和稳定性;当时间超过此范围时,会影响抗体的活性,当时间低于此范围时,会导致惰性蛋白连接不充分,易发生脱落,过短甚至会降低信号值,影响检测结果。

[0013] 本发明还提供一种更为具体的活化量子点的封闭方法,包括如下步骤:

[0014] (1) 向惰性蛋白溶液中添加1-乙基-3-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺,惰性蛋白与1-乙基-3-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺的质量比为5:1~20:1,1℃~37℃搅拌反应1.5~2.5小时形成多聚体惰性蛋白;

[0015] (2) 将活化量子点加入到步骤(1)中形成的多聚体惰性蛋白配成的溶液中,20~30℃封闭反应0.5~1.5小时,离心清洗。

[0016] 进一步的,所述步骤(2)中多聚体惰性蛋白配成的溶液的质量浓度为8%~15%,并优选10%。在此范围内,可以在保证成本的前提下实现最佳的封闭效果。

[0017] 本发明步骤(2)中活化量子点的加入量可根据制备时的固含量进行常规调整,保证生产的需求即可,在封闭过程中,能够保证多聚体惰性蛋白的用量是过量的即可,与量子点的用量无特定的比例要求。

[0018] 进一步的,所述步骤(2)中活化量子点的制备方法可以为:向量子点稀释液中加入1-乙基-3-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺(EDC)水溶液与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)水溶液,室温搅拌反应0.5-1小时;反应完成后离心清洗,去除反应体系中剩余的EDC与NHS;加入抗体稀释液中,室温搅拌反应1-2小时。

[0019] 进一步的,活化量子点的制备方法中,EDC的用量为量子点表面羧基含量的0.2-10倍;NHS的用量与EDC的摩尔比为0.5~2倍。发明人发现,当NHS用量低于此范围时,会导致活化中间体不稳定导致抗体偶联量降低,当NHS用量高于此范围时,会产生过渡交联,从而致使信号值降低,灵敏度下降。

[0020] 本发明所述的活化量子点的制备方法中EDC及NHS水溶液均为反应前5分钟内配制。

[0021] 本发明还提供上述封闭方法在量子点免疫荧光检测试剂盒中的应用。

[0022] 本发明首先用EDC化学偶联试剂处理惰性蛋白,通过控制EDC与惰性蛋白的比例,使惰性蛋白之间发生交联,形成不同大小的多聚体。之后在EDC完全水解之前,将多聚体惰

性蛋白加入到活化量子点中进行封闭,通过残余的EDC将多聚体惰性蛋白通过化学偶联的方式连接到活化量子点表面。由于惰性蛋白形成的多聚体大小不一,能够更好地遮盖住活化量子点表面的裸露区域,降低非特异性反应;同时惰性蛋白与量子点表面之间通过化学键的方式结合,能够极大地提高量子点结合物的稳定性,从而提高量子点免疫层析试剂的灵敏度和稳定性。与现有技术相比,本发明具有如下优势:

[0023] 1、本发明在用惰性蛋白封闭活化量子点之前,首先用高浓度EDC处理BSA,使天然的单体BSA发生不同程度的偶联,形成大小不一的BSA多聚体。这些多聚体能够更好地遮盖活化量子点表面形状、面积不均一的裸露位点,从而比现有技术进一步降低量子点结合物的非特异性反应,增加量子点免疫层析试剂的灵敏度。

[0024] 2、本发明利用了EDC在水溶液中容易分解的特性,用高浓度EDC处理天然BSA并反应较长时间,当溶液中EDC大部分发生水解之后,再将处理过的BSA加入到活化量子点中,残余的少量EDC有利于BSA以化学偶联的方式连接到量子点表面,同时不会发生 BSA与抗体的交联,即提高了封闭蛋白的稳定性,同时不会损害量子点表面抗体的生物活性。

[0025] 3、本发明所述方法有效解决了EDC活化后的中间物质十分不稳定,活化后的羧基被降解,不能完全有效的以共价偶联的形式与封闭剂反应的问题。

具体实施方式

[0026] 下面通过具体实施方式的详细描述来进一步阐明本发明,以使本发明的优点和特征能更易于被本领域技术人员理解,从而对本发明的保护范围做出更为清楚明确的界定,但并不是对本发明的限制,仅作示例说明。下述实施例中未注明具体条件的实验方法,均按照常规条件,或者按照制造厂商所建议的条件执行。

[0027] 实施例1量子点抗体复合物的制备及偶联量测试

[0028] 1、量子点(QDs)活化及偶联

[0029] 取50 μ l固含量为10%的QDs原液,用50mM硼酸-硼砂缓冲液(pH 9.0)稀释至500 μ l,混匀后加入50 μ l EDC溶液(5mg/ml),5 μ l NHS溶液(75mg/ml),混匀后室温(25 $^{\circ}$ C)搅拌反应30分钟,孵育完成离心清洗1次,并用500 μ l的20mM HEPES缓冲液(pH 7.0)重悬,取75 μ g的L-1#抗体,添加至QDs重悬液中,混匀后室温搅拌反应1小时;

[0030] 2、BSA的处理

[0031] 用封闭缓冲液(20mM HEPES缓冲液,pH 7.0)分别配制浓度为20%的BSA溶液和浓度为2%的EDC溶液,将两种溶液1:1混合后在4 $^{\circ}$ C搅拌2小时。

[0032] 3、封闭

[0033] 向步骤1反应完成后的体系中加入500 μ l的多聚BSA溶液重悬,混匀后室温搅拌反应1小时,反应完成后离心清洗1次;

[0034] 实施例2脂蛋白磷脂酶A2(Lp-PLA2)量子点免疫荧光检测试剂盒的制备及特异性检测

[0035] 1、QDs-L-1#标记复合物制备

[0036] 按照实施例1中步骤1-4制备QDs-L-1#标记复合物;

[0037] 2、结合垫的处理及标记复合物的固定

[0038] 将结合垫裁成8mm的宽度浸泡于含有5%海藻糖、1%吐温20的柠檬酸-柠檬酸钠缓

冲液中 (pH8.0, 20mM) 5分钟, 室温晾干, 将晾干后的结合垫置于恒温鼓风干燥箱中, 37℃烘干16小时;

[0039] 取出烘干后的结合垫使用喷金仪以5 μ l/cm的喷量将步骤1中制备完成的标记复合物固定于结合垫, 置于恒温鼓风干燥箱中, 37℃烘干16小时。

[0040] 3、硝酸纤维素膜上T线与C线的固定

[0041] 用含有5%蔗糖的50mM HEPES (pH 7.5) 缓冲液将L-2#抗体及Lp-PLA2抗原分别稀释至1mg/ml, 用Bio Dot喷膜机在硝酸纤维素膜上分别包被不同的抗体作为T线和C线。T线上喷膜1mg/ml的L-2#抗体, C线上喷膜1mg/ml的Lp-PLA2抗原, C线和T线间隔8mm, 喷膜完成后将硝酸纤维素膜置于恒温鼓风干燥箱中, 37℃烘干16小时。

[0042] 4、样品垫的处理

[0043] 将样品垫浸泡在含有5%海藻糖、1%吐温20、0.5%BSA的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中 (pH8.0, 20mM) 5分钟, 室温晾干, 并将晾干后的结合物垫置于恒温鼓风干燥箱中, 37℃烘干16小时;

[0044] 5、试纸条的组装

[0045] 在背衬板上依次粘贴硝酸纤维素膜, 在背衬板上依次粘贴硝酸纤维素膜、吸收垫、结合垫及样品垫, 各相邻垫之间相互重叠, 重叠宽度约为1.5mm; 其中硝酸纤维素膜最靠近背衬板, 结合垫与吸收垫分别搭接在硝酸纤维素膜的两端, 样品垫搭接在结合垫的另一端。

[0046] 将组装好的试纸条用自动斩切机进行切割, 每条宽度为3.5mm, 并将切割完成的试纸条与干燥剂仪器装入铝箔袋内密封保存。

[0047] 6、特异性测试

[0048] 收集100例已测试Lp-PLA2项目的患者血清, 诊断方法学为酶法试剂盒, 来源为南京鼓楼医院;

[0049] 用Lp-PLA2质量法检测试剂盒 (购自Diazyme, 酶联免疫吸附法, 本试验中称试剂盒A) 及步骤5制得的试纸条同时对这100例样本进行检测比对。用四格表统计结果如表1所示:

[0050] 特异性 = 真阴性 / 阴性总数 \times 100%

[0051] 表1四格表统计结果

		试剂盒 A		
		阴性	阳性	总计
[0052] 本试剂盒	阴性	52	0	52
	阳性	1	47	48
	总计	53	47	100

[0053] 表1结果表明, 试剂盒的特异性为100%, 阴阳符合率达到99%, 测试准确度高, 特异性好。

[0054] 实施例3心型脂肪酸结合蛋白 (H-FABP) 量子点免疫荧光检测试剂盒的制备及灵敏度、稳定性检测

[0055] 1、现有技术制备QDs-FP1#标记复合物

[0056] 取50 μ l固含量为10%的QDs原液, 用50mM硼酸-硼砂缓冲液 (pH 9.0) 稀释至500 μ l, 混匀后加入5 μ l EDC溶液 (50mg/ml), 5 μ l NHS溶液 (75mg/ml), 混匀后室温 (25℃) 搅拌反应

30分钟,孵育完成离心清洗1次,并用500 μ l的20mM MOPS缓冲液 (pH 6.5) 重悬;

[0057] 取75 μ g的FP1#抗体,添加至步骤(1)中的QDs重悬液中,混匀后室温搅拌反应1小时,反应完成离心清洗1次,并加入500 μ l的封闭液(20%BSA)重悬,混匀后室温搅拌反应1小时,反应完成后离心清洗1次,用500 μ l的标记物储存液(50mM MOPS,10%蔗糖,1%吐温20,pH 8.0)重悬保存于2~8 $^{\circ}$ C,下称标记复合物A。

[0058] 2、使用实施例1中的方法制备QDs-FP1#标记复合物,下称标记复合物B。

[0059] 3、结合垫的处理及标记复合物的固定

[0060] 将结合垫裁成8mm的宽度浸泡于含有5%海藻糖、1%吐温20的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中(pH8.0,20mM)5分钟,室温晾干,将晾干后的结合垫置于恒温鼓风干燥箱中,37 $^{\circ}$ C烘干16小时;取出烘干后的结合垫使用喷金仪以5 μ l/cm的喷量将标记复合物A、B分别固定于不同的结合垫上,按不同批次标记为A、B,并置于恒温鼓风干燥箱中,37 $^{\circ}$ C烘干16小时。

[0061] 4、硝酸纤维素膜上T线与C线的固定

[0062] 用含有5%蔗糖的50mM HEPES (pH 7.5) 缓冲液将FP2#抗体及H-FABP抗原分别稀释至1mg/ml,用Bio Dot喷膜机在硝酸纤维素膜上分别包被不同的抗体作为T线和C线。T线上喷膜1mg/ml的FP2#抗体,C线上喷膜1mg/ml的H-FABP抗原,C线和T线间隔8mm,喷膜完成后将硝酸纤维素膜置于恒温鼓风干燥箱中,37 $^{\circ}$ C烘干16小时。

[0063] 5、样品垫的处理

[0064] 将样品垫浸泡在含有10%海藻糖、1%吐温20、0.5%BSA的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中(pH 8.0,20mM)5分钟,室温晾干,并将晾干后的结合物垫置于恒温鼓风干燥箱中,37 $^{\circ}$ C烘干16小时;

[0065] 6、试纸条的组装

[0066] 在背衬板上依次粘贴硝酸纤维素膜,在背衬板上依次粘贴硝酸纤维素膜、吸收垫、结合垫及样品垫,各相邻垫之间相互重叠,重叠宽度约为1.5mm;其中硝酸纤维素膜最靠近背衬板,结合垫与吸收垫分别搭接在硝酸纤维素膜的两端,样品垫搭接在结合垫的另一端,试纸条按照结合垫的不同标记为试纸条A和试纸条B。

[0067] 将组装好的试纸条用自动斩切机进行切割,每条宽度为3.5mm,并将切割完成的试纸条与干燥剂仪器装入铝箔袋内密封保存。

[0068] 7、试纸条A、B灵敏度测试比对

[0069] 收集9例H-FABP测试结果为阳性的患者血清(样品编号1~9),来源均为南京鼓楼医院;

[0070] 用试纸条A、B分别检测这9例样本以及5号样本经梯度倍比稀释后的样本(样品编号10~14),每个样本测试3遍,取平均值,连续监测10天,日间CV小于20%的临界浓度即为试剂灵敏度,结果见下表2。

[0071] 表2灵敏度测试比对结果

	样本编号	样本浓度 (ng/ml)	试纸条 A 测试天 间 CV (%)	试纸条 B 测试天 间 CV (%)
[0072] 阳性患者 血清	1	42.39	6.55	4.22
	2	16.55	8.44	3.42
	3	23.64	8.29	5.15
	4	25.18	7.64	6.22
	5	8.59	12.45	4.12
	6	6.22	14.26	6.59
	7	17.85	6.29	4.29
	8	62.79	4.22	2.99
	9	32.44	8.46	4.25
5号样本 梯度稀释 血清	10	4.30	10.28	6.12
	11	2.15	13.24	6.24
	12	1.07	15.95	6.95
	13	0.54	23.65	9.24
	14	0.26	35.74	12.45

[0073] 由表2可知,分别选用两种封闭工艺,本发明提供的技术方案制备的试纸条灵敏度可检测至0.26ng/ml以下,明显优于现有技术方案。

[0074] 8、试纸条A、B稳定性测试比对

[0075] 用步骤(7)中的灵敏度检测方法,用步骤(7)中5号样品的10~14号样本的梯度稀释血清在1、5、10、20、40、60、100天分别检测保存于室温的试纸条A、B的灵敏度,比较试纸条A、B的灵敏度变化情况。

[0076] 表3稳定性测试对比结果

[0077]

测试天数	试纸条A灵敏度	试纸条B灵敏度
1	1.07	0.26
5	1.07	0.26
10	1.07	0.26
20	2.15	0.26
40	2.15	0.26
60	4.30	0.26
100	8.59	0.26

[0078] 由表3结果可知,分别选用两种封闭工艺,本发明提供的技术方案制备的试纸条灵敏度在100天内维持稳定,明显优于未采用EDC封闭的现有技术方案。

专利名称(译)	一种活化量子点的封闭方法		
公开(公告)号	CN107860910B	公开(公告)日	2018-12-18
申请号	CN2017111075159.X	申请日	2017-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	南京诺唯赞医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京诺唯赞医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京诺唯赞医疗科技有限公司		
[标]发明人	曹林 唐波 朱婷婷 许雯		
发明人	曹林 唐波 朱婷婷 许雯		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	杜静		
审查员(译)	张绚		
其他公开文献	CN107860910A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种活化量子点的封闭方法，通过多聚体惰性蛋白，采用1-乙基-3-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC)与惰性蛋白交联反应形成的多聚体惰性蛋白对活化量子点进行封闭。本发明所述方法能够保证活化量子点表面的有效封闭，又能使得封闭过程中的蛋白连接更为牢固，从而提高试剂的灵敏度和稳定性，提高量子点免疫层析试剂的基本性能；本发明的另一目的是提供这种方法在量子点免疫荧光检测试剂盒中的应用。

		试剂盒 A		
		阴性	阳性	总计
本试剂 盒	阴性	52	0	52
	阳性	1	47	48
	总计	53	47	100