(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110618264 A

(43)申请公布日 2019.12.27

(21)申请号 201910854812.5

(22)申请日 2019.09.10

(71)申请人 南方医科大学

地址 510515 广东省广州市白云区沙太南路1023号-1063号南方医科大学

(72)发明人 刘天才 李鹏 陈振华

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务所(普通合伙) 11350

代理人 赵蕊红

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

G01N 15/14(2006.01)

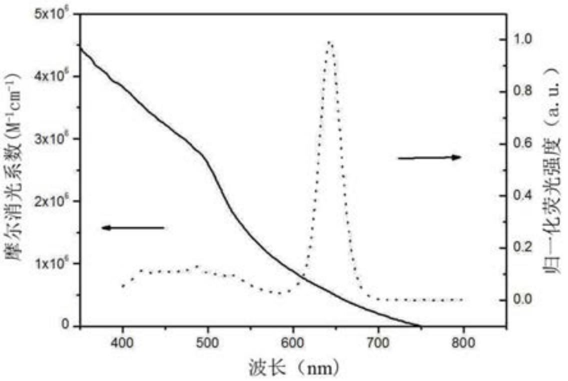
权利要求书2页 说明书14页 附图2页

(54)发明名称

基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法

(57)摘要

一种基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法，将新型的量子点纳米探针与流式细胞分析技术相结合的免疫方法用于检测自身抗AQP4抗体，突破了传统的以有机荧光染料为检测工具的瓶颈。同时利用了流式细胞分析技术具有快速检测易于标准化和自动化等优点，弥补了现有AQP4抗体检测技术的不足。能够简单快速、可重复检测AQP4抗体。



1.一种基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法,包括以下步骤:

(1)制备量子点聚苯乙烯QPs微球;

(2)获取AQP4蛋白的功能性片段目的基因进行表达;

(3)利用EDC-NHS活化QPs微球表面的羧基,并将活化后的QPs微球表面的羧基与AQP4蛋白的氨基进行偶联制成功能化的QPs微球;

(4)通过荧光发射峰为600nm至650nm的油溶性CdSe量子点与FITC标记的羊抗人IgG的红绿色双重荧光定位系统进行流式检测,并对已功能化后的QPs微球的检测结果进行判读。

2.根据权利要求1所述的基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法,所述步骤(1)采用化学渗透法制备QPs微球,具体过程包括:

(1.1)取1mg至10mg的PS微球分散悬浮于0.5mL至1mL的浓度为99.99%的饱和正丁醇溶液中,制成PS微球悬液;

(1.2)取0.1mg至1mg的量子点QD溶解于50μL至100μL的的浓度为99.99%的饱和二氯甲烷溶剂中并进行震荡混合,制成QD-二氯甲烷溶液;

(1.3)将QD-二氯甲烷溶液以2.5μL/秒至3.5μL/秒的滴速滴加至PS微球悬液中,在室温下震荡4至5小时;

(1.4)将震荡后的混合物置于45℃至55℃水温中进行水浴加热20至25小时;

(1.5)用体积分数为20%至80%的乙醇溶液对水浴后的混合物进行离心洗涤,收集沉淀物得到QPs微球。

3.根据权利要求2所述的基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法,所述步骤(2)具体包括:

(2.1)人工合成AQP4蛋白功能性片段目的基因,并将合成后的目的基因插入到pET32a质粒载体中,获得AQP4-pET32a的重组质粒;

(2.2)将AQP4-pET32a的重组质粒转化至BL21菌株中,并加入IPTG诱导剂进行诱导表达;

(2.3)将诱导表达后得到的蛋白产物进行离心操作,分别取离心后的离心上清液和沉淀物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定;

(2.4)将诱导表达后得到的蛋白产物通过镍柱进行纯化,并采用蛋白质印迹法western-bloting再次鉴定。

4.根据权利要求3所述的基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法,所述步骤(2.2)具体包括以下步骤:

将0.1μg至0.5μg AQP4-pET32a的重组质粒与50μL至100μL体积分数为50%的BL21菌株混匀冰浴至少30分钟,随后将混合菌液置于40℃至45℃的水中进行水浴85秒至95秒,接着再置于0℃环境下冰浴2至3分钟,在35℃至40℃下、以220转每分的转速转动培养混合菌液45分钟以上,将菌液接种涂布含氨苄青霉素的琼脂平板,将琼脂平板置于35℃至40℃环境中孵育24小时以上。

5.根据权利要求说明4所述的基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法,其特征在于,所述步骤(2.3)具体包括以下步骤:挑阳性克隆,具体是在35℃至40℃环境下、以220转每分的转速转动培养基,孵育至培养基轻微混浊,将单克隆菌液分为六管且每管放置1mL菌液,按照诱导时间和IPTG稀释比例的不同进行分组,其中诱导时间分为4小时和6小

时,IPTG稀释比例分为0,1:1000,1:100三种,具体分组情况如下:

1)诱导时间为4小时,IPTG稀释比例为0为一组;

2)诱导时间为4小时,IPTG稀释比例为1:1000为一组;

3)诱导时间为4小时,IPTG稀释比例为1:100为一组;

4)诱导时间为6小时,IPTG稀释比例为0为一组;

5)诱导时间为6小时,IPTG稀释比例为1:1000为一组;

6)诱导时间为6小时,IPTG稀释比例为1:100为一组。

6.根据权利要求说明5所述的基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法,其特征在于,所述步骤(3)具体包括以下步骤:

(3.1)QPs微球的预处理:取0.1mg至1mg的QPs微球加入到0.5mL至1mL的PH值为6.1,浓度为50mmol/L的MES buffer缓冲液中混合,将得到的混合物置于18000转每分的转速环境中转动5分钟以上,进行离心操作;

(3.2)活化QPs微球:将离心后的产物重置于100μL至500μL的PH值为6.1,浓度为50mmol/L的MES buffer缓冲液中,并分别加入5μg/μL至20μg/μL的EDC试剂和5μg/μL至20μg/μL的NHS试剂混合,在室温环境下对混合后的产物震荡30分钟以上;

(3.3)终止活化:将震荡后的混合产物置于18000转每分的环境中转动5分钟以上,进行离心操作,并在离心后的产物中加入0.5mL至1mL的PBS试剂进行洗涤操作2次到3次;

所述PBS试剂的PH值范围为7.2至7.4,浓度为0.01mol/L;

(3.4)QPs微球偶联AQP4蛋白:将AQP4蛋白与QPs微球置于0.5mL至1mL的PBS试剂中混合,并将混合后的产物置于3℃至45℃的温度中过夜或者在室温的条件下震荡2小时至4小时,完成QPs微球偶联AQP4蛋白的操作;

所述PBS试剂的PH值范围为7.2至7.4,浓度为0.01mol/L;

(3.5)封闭:在震荡后的混合产物中加入质量浓度3%至5%的BSA试剂,在室温的条件下将混合物震荡30分钟以上;

(3.6)终止反应:将加入质量浓度3%至5%的BSA试剂震荡后得到的产物置于18000转每分的转速中转动5分钟以上进行离心操作,并在离心后的产物中加入0.5mL至1mL的PBS试剂进行洗涤操作2次到3次,最后加入100μL至500μL的PBST试剂进行对功能化的QPs微球的重悬;

所述PBS试剂的PH值范围为7.2至7.4,浓度为0.01mol/L;

所述PBST试剂的PH值范围为7.2至7.4,浓度为0.01mol/L。

基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法

技术领域

[0001]　本发明涉及生物分析化学、纳米生物技术领域，特别是涉及一种基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法。

背景技术

[0002]　人体自身抗体作为自身免疫性疾病的重要血清学标志物，其快速检测对于自身免疫性疾病的诊断、治疗措施和预后评估有重要的应用价值。随着自身抗体检测方法的灵敏度和特异性的提高，相关自身免疫性疾病的诊断标准也在相应更新调整。

[0003]　视神经性脊髓炎(neuromyelitis optica,NMO)是视神经与脊髓同时或相继受累的急性或亚急性炎性脱髓鞘病变。2004年Lennon等首次在NMO患者血清中发现NMO-IgG抗体，即抗水通道蛋白4(AQP4)抗体。AQP4是中枢神经系统主要的水通道蛋白，位于星形胶质细胞的足突上，是NMO-IgG的主要目标。AQP4抗体通过血脑屏障中可通过的部分进入中枢神经系统，遇到星形胶质细胞并导致细胞依赖的细胞毒性反应，星形胶质细胞足突被NMO-IgG和补体降解，继而活化巨噬细胞、嗜酸性粒细胞及中性粒细胞产生一系列细胞因子、氧自由基等造成血管和实质损伤，最终导致包括轴索和少突胶质细胞在内的白质和灰质的受损。2015年已将血清抗AQP4抗体作为支持条件纳入NMO诊断标准。

[0004]　目前临床上检测AQP4常用的检测方法主要包括以下两种：(1)以高表达AQP4蛋白的鼠脑组织切片为基质的间接免疫荧光分析法(Indirect immunofluorescence assay,IIF)，该方法虽然灵敏度高，但其操作复杂，对组织切片的制作要求较高，难以质控，并且要求检验人员具有丰富的神经生理学知识才能准确判定检测结果。(2)以成功表达AQP4蛋白的细胞为基质的细胞免疫分析技术(cell-based assay,CBA)，该方法特异性相对较高，但在实际检测过程中尽管设置了阴性对照，也可能由于蛋白表达量低影响检测结果的判读，而且由于转染效率的不一致，难以建立统一的质量控制标准，从而难以实现大规模商品化生产。

[0005]　因此，针对现有技术不足，提供一种基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法以克服现有技术不足甚为必要。

发明内容

[0006]　本发明的目的在于避免现有技术的不足之处而提供一种基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法，具有制备过程简单快速、可重复检测AQP4抗体的特点。

[0007]　本发明的目的通过以下技术措施实现。

[0008]　提供一种基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法，包括以下步骤：

[0009]　(1)制备量子点聚苯乙烯QPs微球；

[0010]　(2)获取AQP4蛋白的功能性片段目的基因进行表达；

[0011]　(3)利用EDC-NHS活化QPs微球表面的羧基，并将活化后的QPs微球表面的羧基与AQP4蛋白的氨基进行偶联制成功能化的QPs微球；

[0012] (4)通过荧光发射峰为600nm至650nm的油溶性CdSe量子点与FITC标记的羊抗人IgG的红绿色双重荧光定位系统进行流式检测，并对已功能化后的QPs微球的检测结果进行判读。

[0013] 优选的，上述步骤(1)采用化学渗透法制备QPs微球，具体过程包括：

[0014] (1.1)取1mg至10mg的PS微球分散悬浮于0.5mL至1mL的浓度为99.99％的饱和正丁醇溶液中，制成PS微球悬液；

[0015] (1.2)取0.1mg至1mg的量子点QD溶解于50μL至100μL的的浓度为99.99％的饱和二氯甲烷溶剂中并进行震荡混合，制成QD-二氯甲烷溶液；

[0016] (1.3)将QD-二氯甲烷溶液以2.5μL/秒至3.5μL/秒的滴速滴加至PS微球悬液中，在室温下震荡4至5小时；

[0017] (1.4)将震荡后的混合物置于45℃至55℃水温中进行水浴加热20至25小时；

[0018] (1.5)用体积分数为20％至80％的乙醇溶液对水浴后的混合物进行离心洗涤，收集沉淀物得到QPs微球。

[0019] 优选的，上述步骤(2)具体包括：

[0020] (2.1)人工合成AQP4蛋白功能性片段目的基因，并将合成后的目的基因插入到pET32a质粒载体中，获得AQP4-pET32a的重组质粒；

[0021] (2.2)将AQP4-pET32a的重组质粒转化至BL21菌株中，并加入IPTG诱导剂进行诱导表达；

[0022] (2.3)将诱导表达后得到的蛋白产物进行离心操作，分别取离心后的离心上清液和沉淀物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定；

[0023] (2.4)将诱导表达后得到的蛋白产物通过镍柱进行纯化，并采用蛋白质印迹法western-bloting再次鉴定。

[0024] 优选的，上述步骤(2.2)具体包括以下步骤：

[0025] 将0.1μg至0.5μg AQP4-pET32a的重组质粒与50μL至100μL体积分数为50％的BL21菌株混匀冰浴30分钟以上，随后将混合菌液置于40℃至45℃的水中进行水浴85秒至95秒，接着再置于0℃环境下冰浴2至3分钟，在35℃至40℃下、以220转每分的转速转动培养混合菌液45分钟以上，将菌液接种涂布含氨苄青霉素的琼脂平板，将琼脂平板置于35℃至40℃环境中孵育24小时以上。

[0026] 优选的，上述步骤(2.3)具体包括以下步骤：挑阳性克隆，在35℃至40℃环境下、以220转每分的转速转动培养基，孵育至培养基轻微混浊，将单克隆菌液分为六管且每管放置1mL菌液，按照诱导时间和IPTG稀释比例的不同进行分组，其中诱导时间分为4小时和6小时，IPTG稀释比例分为0，1:1000，1:100三种，具体分组情况如下：

[0027] 1)诱导时间为4小时，IPTG稀释比例为0为一组；

[0028] 2)诱导时间为4小时，IPTG稀释比例为1:1000为一组；

[0029] 3)诱导时间为4小时，IPTG稀释比例为1:100为一组；

[0030] 4)诱导时间为6小时，IPTG稀释比例为0为一组；

[0031] 5)诱导时间为6小时，IPTG稀释比例为1:1000为一组；

[0032] 6)诱导时间为6小时，IPTG稀释比例为1:100为一组。

[0033] 优选的，上述步骤(3)具体包括以下步骤：

[0034] (3.1)QPs微球的预处理:取0.1mg至1mg的QPs微球加入到0.5mL至1mL的PH值为6.1,浓度为50mmol/L的MES buffer缓冲液中混合,将得到的混合物置于18000转每分的转速环境中转动5分钟以上,进行离心操作;

[0035] (3.2)活化QPs微球:将离心后的产物重置于100μL至500μL的PH值为6.1,浓度为50mmol/L的MES buffer缓冲液中,并分别加入5μg/μL至20μg/μL的EDC试剂和5μg/μL至20μg/μL的NHS试剂混合,在室温环境下对混合后的产物震荡30分钟以上;

[0036] (3.3)终止活化:将震荡后的混合产物置于18000转每分的环境中转动5分钟以上,进行离心操作,并在离心后的产物中加入0.5mL至1mL的PBS试剂进行洗涤操作2次到3次;

[0037] 具体的,PBS试剂的PH值范围为7.2至7.4,浓度为0.01mol/L;

[0038] (3.4)QPs微球偶联AQP4蛋白:将AQP4蛋白与QPs微球置于0.5mL至1mL的PBS试剂中混合,并将混合后的产物置于3℃至45℃的温度中过夜或者在室温的条件下震荡2小时至4小时,完成QPs微球偶联AQP4蛋白的操作;

[0039] 具体的,PBS试剂的PH值范围为7.2至7.4,浓度为0.01mol/L;

[0040] (3.5)封闭:在震荡后的混合产物中加入质量浓度3%至5%的BSA试剂,在室温的条件下将混合物震荡30分钟以上;

[0041] (3.6)终止反应:将加入质量浓度3%至5%的BSA试剂震荡后得到的产物置于18000转每分的转速中转动5分钟以上进行离心操作,并在离心后的产物中加入0.5mL至1mL的PBS试剂进行洗涤操作2次到3次,最后加入100μL至500μL的PBST试剂进行对功能化的QPs微球的重悬;

[0042] 具体的,PBS试剂的PH值范围为7.2至7.4,浓度为0.01mol/L;

[0043] 具体的,PBST试剂的PH值范围为7.2至7.4,浓度为0.01mol/L。

[0044] 优选的,上述结果判读的根据有:

[0045] (4.1)QPs微球的大小均一且其红色荧光强度大,并且无任何掺杂荧光出现,作为检测探针的性能优异。

[0046] (4.2)本发明采用间接法,形成由功能化的QPs微球-抗AQP4抗体-FITC标记的羊抗人IgG组成的免疫复合物,并借助红绿色双重荧光定位系统有助于检测结果的判读。

[0047] 本发明的基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的流式免疫方法,利用量子点(Quantum dot,QD)纳米材料具有量子产率高、荧光强度大和激发光谱范围宽以及发射光谱窄、荧光寿命长等的优点,将新型的量子点纳米探针与流式细胞分析技术(Flow Cytometry/on AQP4-QPs)相结合的方法用于检测自身抗AQP4抗体,突破了传统的以有机荧光染料为检测工具的瓶颈;同时也利用了流式细胞分析技术具有快速检测易于标准化和自动化等优点,弥补了现有AQP4抗体检测技术的不足。具有能够简单快速和可重复检测AQP4抗体。

附图说明

[0048] 利用附图对本发明作进一步的说明,但附图中的内容不构成对本发明的任何限制。

[0049] 图1是本发明一种基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法的QPs微球的摩尔激发光谱与荧光发射波谱图。

[0050] 图2是本发明一种基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法的IPTG诱导AQP4蛋白表达的western-bloting电泳鉴定图。

[0051] 图3是流式细胞仪检测血清样本中抗AQP4抗体的结果示意图。

具体实施方式

[0052] 结合以下实施例对本发明作进一步说明。

[0053] 实施例1。

[0054] 一种基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法，如图1至图3所示，包括以下步骤：

[0055] (1)制备量子点聚苯乙烯QPs微球；

[0056] (2)获取AQP4蛋白的功能性片段目的基因进行表达；

[0057] (3)利用EDC-NHS活化QPs微球表面的羧基，并将活化后的QPs微球表面的羧基与AQP4蛋白的氨基进行偶联制成功能化的QPs微球；

[0058] (4)通过荧光发射峰为600nm至650nm的油溶性CdSe量子点与FITC标记的羊抗人IgG的红绿色双重荧光定位系统进行流式检测，并对已功能化后的QPs微球的检测结果进行判读。

[0059] 具体的，步骤(1)采用化学渗透法制备QPs微球，具体过程包括：

[0060] (1.1)取1mg至10mg的PS微球分散悬浮于0.5mL至1mL的浓度为99.99％的饱和正丁醇溶液中，制成PS微球悬液；

[0061] (1.2)取0.1mg至1mg的量子点QD溶解于50μL至100μL的的浓度为99.99％的饱和二氯甲烷溶剂中并进行震荡混合，制成QD-二氯甲烷溶液；

[0062] (1.3)将QD-二氯甲烷溶液以2.5μL/秒至3.5μL/秒的滴速滴加至PS微球悬液中，在室温下震荡4至5小时；

[0063] (1.4)将震荡后的混合物置于45℃至55℃水温中进行水浴加热20至25小时；

[0064] (1.5)用体积分数为20％至80％的乙醇溶液对水浴后的混合物进行离心洗涤，收集沉淀物得到QPs微球。

[0065] 步骤(2)具体包括：

[0066] (2.1)人工合成AQP4蛋白功能性片段目的基因，并将合成后的目的基因插入到pET32a质粒载体中，获得AQP4-pET32a的重组质粒；

[0067] (2.2)将AQP4-pET32a的重组质粒转化至BL21菌株中，并加入IPTG诱导剂进行诱导表达；

[0068] (2.3)将诱导表达后得到的蛋白产物进行离心操作，分别取离心后的离心上清液和沉淀物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定；

[0069] (2.4)将诱导表达后得到的蛋白产物通过镍柱进行纯化，并采用蛋白质印迹法western-bloting再次鉴定。

[0070] 其中，步骤(2.2)具体包括以下步骤：

[0071] 将0.1μg至0.5μg AQP4-pET32a的重组质粒与50μL至100μL体积分数为50％的BL21菌株混匀冰浴30分钟以上，随后将混合菌液置于40℃至45℃的水中进行水浴85秒至95秒，接着再置于0℃环境下冰浴2至3分钟，在35℃至40℃下、以220转每分的转速转动培养混合

菌液45分钟以上，将菌液接种涂布含氨苄青霉素的琼脂平板，将琼脂平板置于35℃至40℃环境中孵育24小时以上。

[0072] 其中，步骤(2.3)具体包括以下步骤：挑阳性克隆，具体是在35℃至40℃环境下、以220转每分的转速转动培养基，孵育至培养基轻微混浊，将单克隆菌液分为六管且每管放置1mL菌液，按照诱导时间和IPTG稀释比例的不同进行分组，其中诱导时间分为4小时和6小时，IPTG稀释比例分为0，1:1000，1:100三种，具体分组情况如下：

[0073] 1)诱导时间为4小时，IPTG稀释比例为0为一组；

[0074] 2)诱导时间为4小时，IPTG稀释比例为1:1000为一组；

[0075] 3)诱导时间为4小时，IPTG稀释比例为1:100为一组；

[0076] 4)诱导时间为6小时，IPTG稀释比例为0为一组；

[0077] 5)诱导时间为6小时，IPTG稀释比例为1:1000为一组；

[0078] 6)诱导时间为6小时，IPTG稀释比例为1:100为一组。

[0079] 其中，步骤(3)具体包括以下步骤：

[0080] (3.1)QPs微球的预处理：取0.1mg至1mg的QPs微球加入到0.5mL至1mL的PH值为6.1，浓度为50mmol/L的MES buffer缓冲液中混合，将得到的混合物置于18000转每分的转速环境中转动5分钟以上，进行离心操作；

[0081] (3.2)活化QPs微球：将离心后的产物重置于100μL至500μL的PH值为6.1，浓度为50mmol/L的MES buffer缓冲液中，并分别加入5μg/μL至20μg/μL的EDC试剂和5μg/μL至20μg/μL的NHS试剂混合，在室温环境下对混合后的产物震荡30分钟以上；

[0082] (3.3)终止活化：将震荡后的混合产物置于18000转每分的环境中转动5分钟以上，进行离心操作，并在离心后的产物中加入0.5mL至1mL的PBS试剂进行洗涤操作2次到3次；

[0083] 具体的，PBS试剂的PH值范围为7.2至7.4，浓度为0.01mol/L；

[0084] (3.4)QPs微球偶联AQP4蛋白：将AQP4蛋白与QPs微球置于0.5mL至1mL的PBS试剂中混合，并将混合后的产物置于3℃至45℃的温度中过夜或者在室温的条件下震荡2小时至4小时，完成QPs微球偶联AQP4蛋白的操作；

[0085] 具体的，PBS试剂的PH值范围为7.2至7.4，浓度为0.01mol/L；

[0086] (3.5)封闭：在震荡后的混合产物中加入质量浓度3％至5％的BSA试剂，在室温的条件下将混合物震荡30分钟以上；

[0087] (3.6)终止反应：将加入质量浓度3％至5％的BSA试剂震荡后得到的产物置于18000转每分的转速中转动5分钟以上进行离心操作，并在离心后的产物中加入0.5mL至1mL的PBS试剂进行洗涤操作2次到3次，最后加入100μL至500μL的PBST试剂进行对功能化的QPs微球的重悬；

[0088] 具体的，PBS试剂的PH值范围为7.2至7.4，浓度为0.01mol/L；

[0089] 具体的，PBST试剂的PH值范围为7.2至7.4，浓度为0.01mol/L。

[0090] 结果判读的根据有：

[0091] (4.1)QPs微球的大小均一且其红色荧光强度大，并且无任何掺杂荧光出现，作为检测探针的性能优异。

[0092] (4.2)本发明采用间接法，形成由功能化的QPs微球-抗AQP4抗体-FITC标记的羊抗人IgG组成的免疫复合物，并借助红绿色双重荧光定位系统有助于检测结果的判读。

[0093] 本发明采用将新型量子点探针与流式细胞分析技术相结合的技术，突破了传统的借助有机荧光染料为检测工具的瓶颈。一方面利用QD纳米材料作为检测工具克服了有机荧光染料荧光强度弱、荧光寿命短易淬灭等缺陷，同时借助QPs微球作为检测载体可以有效的避免批间差异带来的检测结果的不一致性；另一方面分析AQP4蛋白的分子结构，利用原核表达系统可以实现大规模生产，有利于商品化；最后结合快速灵敏的流式细胞分析技术可以迅速准确地实现对单个QPs-AQP4微球探针的检测，大大提高了检测的灵敏度和准确性，有益于检测自身抗AQP4抗体的自动化与标准化。

[0094] 本发明引用荧光微球制备的常用方法化学渗透对油溶性QD进行改进，通过在QD表面包裹PS微球从而增加QD的水溶性，因此本发明以正丁醇作分散体系，以二氯甲烷作溶胀剂，操作简单、制备的荧光微球性质稳定且荧光强度大。

[0095] 本发明构建了稳定的AQP4蛋白表达系统，克服了依赖高表达蛋白的组织或细胞作基质的方法的局限性。同时本发明采用EDC-NHS将量子点聚苯乙烯微球QPs与AQP4蛋白进行偶联，生成稳定的功能化的QPs微球；借助QPs的比表面积大与AQP4蛋白共价结合可以大大提高检测方法的灵敏度和检测范围。此外应用QPs微球探针与流式细胞术相结合使检测过程易于质控和自动化，有效的规避了各种误差的产生，有助于临床辅助诊断NMO的发生发展和预后评估。

[0096] 本发明的基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的流式免疫方法，利用量子点(Quantum dot,QD)纳米材料具有量子产率高、荧光强度大和激发光谱范围宽以及发射光谱窄、荧光寿命长等的优点，将新型的量子点纳米探针与流式细胞分析技术(Flow Cytometry/on AQP4-QPs)相结合的方法用于检测自身抗AQP4抗体，突破了传统的以有机荧光染料为检测工具的瓶颈；同时也利用了流式细胞分析技术具有快速检测易于标准化和自动化等优点，弥补了现有AQP4抗体检测技术的不足。能够简单快速和可重复检测AQP4抗体。

[0097] 实施例2。

[0098] 一种基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法，其它特征与实施例1相同，不同之处在于：检测样本的具体检测步骤如下：

[0099] (1)取10μL血清样本，用PBS溶液按照血清：PBS溶液＝1:10的比例稀释，将稀释后的血清与80μg的QPs-AQP4复合物充分混合，在37℃的环境下孵育一个小时。

[0100] (2)用PBS溶液对孵育后的产物进行3次洗涤，每次5分钟，甩干。

[0101] (3)用PBS溶液按照FITC标记的羊抗人IgG：PBS溶液＝1:50的比例稀释FITC标记的羊抗人IgG，每100μL的血清混合物样本加入100μL稀释后的FITC标记的羊抗人IgG，避光条件下，将混合物置于37℃环境下孵育一小时。

[0102] (4)用PBS溶液对孵育后的功能化的QPs微球-抗AQP4抗体-羊抗人IgG免疫复合物进行3次洗涤，洗涤结束后重新用100至500μL的PBS溶液进行重悬。

[0103] (5)流式检测。

[0104] 需要说明的是本实施例中使用的PBS溶液的PH值范围为7.2至7.4，浓度为0.01mol/L。

[0105] 本发明的一种基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法中对抗AQP4抗体的检测满足临床检测抗AQP4抗体的标准，灵敏度高特异性强，其关键的在于本发明可重复检测易于质控，克服了目前临床检测抗AQP4抗体无法将灵敏度高特异性强与可重复性相兼

容的矛盾;另外本发明使检测结果判断更加容易准确判断,对检验人员的要求相对降低,检测探针性质稳定,更易自动化、微量化和高通量化,为临床辅助诊断NMO提供有力依据,从而提高病人的生活质量。

[0106] 实施例3。

[0107] 一种基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法,包括以下步骤:

[0108] (1)制备量子点聚苯乙烯QPs微球;

[0109] (2)获取AQP4蛋白的功能性片段目的基因进行表达;

[0110] (3)利用EDC-NHS活化QPs微球表面的羧基,并将活化后的QPs微球表面的羧基与AQP4蛋白的氨基进行偶联制成功能化的QPs微球;

[0111] (4)通过荧光发射峰为600nm油溶性CdSe量子点与FITC标记的羊抗人IgG的红绿色双重荧光定位系统进行流式检测,并对已功能化后的QPs微球的检测结果进行判读。

[0112] 具体的,步骤(1)采用化学渗透法制备QPs微球,具体过程包括:

[0113] (1.1)取1mg的PS微球分散悬浮于0.5mL的浓度为99.99%的饱和正丁醇溶液中,制成PS微球悬液;

[0114] (1.2)取0.1mg的量子点QD溶解于50μL的的浓度为99.99%的饱和二氯甲烷溶剂中并进行震荡混合,制成QD-二氯甲烷溶液;

[0115] (1.3)将QD-二氯甲烷溶液以2.5μL/秒的滴速滴加至PS微球悬液中,在室温下震荡4至5小时;

[0116] (1.4)将震荡后的混合物置于45℃水温中进行水浴加热20小时;

[0117] (1.5)用体积分数为20%的乙醇溶液对水浴后的混合物进行离心洗涤,收集沉淀物得到QPs微球。

[0118] 步骤(2)具体包括:

[0119] (2.1)人工合成AQP4蛋白功能性片段目的基因,并将合成后的目的基因插入到pET32a质粒载体中,获得AQP4-pET32a的重组质粒;

[0120] (2.2)将AQP4-pET32a的重组质粒转化至BL21菌株中,并加入IPTG诱导剂进行诱导表达;

[0121] (2.3)将诱导表达后得到的蛋白产物进行离心操作,分别取离心后的离心上清液和沉淀物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定;

[0122] (2.4)将诱导表达后得到的蛋白产物通过镍柱进行纯化,并采用蛋白质印迹法western-bloting再次鉴定。

[0123] 其中,步骤(2.2)具体包括以下步骤:

[0124] 将0.1μg AQP4-pET32a的重组质粒与50μL体积分数为50%的BL21菌株混匀冰浴30分钟以上,随后将混合菌液置于40℃的水中进行水浴85秒,接着再置于0℃环境下冰浴2分钟,在35℃的温度环境下,以220转每分的转速转动培养混合菌液45分钟以上,将菌液接种涂布含氨苄青霉素的琼脂平板,将琼脂平板置于35℃环境中孵育24小时以上。

[0125] 其中,步骤(2.3)具体包括以下步骤:挑阳性克隆,具体是在35℃环境下、以220转每分的转速转动培养基,孵育至培养基轻微混浊,将单克隆菌液分为六管且每管放置1mL菌液,按照诱导时间和IPTG稀释比例的不同进行分组,其中诱导时间分为4小时和6小时,IPTG稀释比例分为0,1:1000,1:100三种,具体分组情况如下:

[0126] 1)诱导时间为4小时,IPTG稀释比例为0为一组;

[0127] 2)诱导时间为4小时,IPTG稀释比例为1:1000为一组;

[0128] 3)诱导时间为4小时,IPTG稀释比例为1:100为一组;

[0129] 4)诱导时间为6小时,IPTG稀释比例为0为一组;

[0130] 5)诱导时间为6小时,IPTG稀释比例为1:1000为一组;

[0131] 6)诱导时间为6小时,IPTG稀释比例为1:100为一组。

[0132] 其中,步骤(3)具体包括以下步骤:

[0133] (3.1)QPs微球的预处理:取0.1mg的QPs微球加入到0.5mL的PH值为6.1,浓度为50mmol/L的MES buffer缓冲液中混合,将得到的混合物置于18000转每分的转速环境中转动5分钟以上,进行离心操作;

[0134] (3.2)活化QPs微球:将离心后的产物重置于100μL的、PH值为6.1,浓度为50mmol/L的MES buffer缓冲液中,并分别加入5μg/μL的EDC试剂和5μg/μL的NHS试剂混合,在室温环境下对混合后的产物震荡30分钟以上;

[0135] (3.3)终止活化:将震荡后的混合产物置于18000转每分的环境中转动5分钟以上,进行离心操作,并在离心后的产物中加入0.5mL的PBS试剂进行洗涤操作2次到3次;

[0136] 具体的,PBS试剂的PH值范围为7.2,浓度为0.01mol/L;

[0137] (3.4)QPs微球偶联AQP4蛋白:将AQP4蛋白与QPs微球置于0.5mL的PBS试剂中混合,并将混合后的产物置于3℃至45℃的温度中过夜或者在室温的条件下震荡2小时,完成QPs微球偶联AQP4蛋白的操作;

[0138] 具体的,PBS试剂的PH值范围为7.2,浓度为0.01mol/L;

[0139] (3.5)封闭:在震荡后的混合产物中加入质量浓度3%的BSA试剂,在室温的条件下将混合物震荡30分钟以上;

[0140] (3.6)终止反应:将加入质量浓度3%的BSA试剂震荡后得到的产物置于18000转每分的转速中转动5分钟以上进行离心操作,并在离心后的产物中加入0.5mL的PBS试剂进行洗涤操作2次到3次,最后加入100μL的PBST试剂进行对功能化的QPs微球的重悬;

[0141] 具体的,PBS试剂的PH值范围为7.2,浓度为0.01mol/L;

[0142] 具体的,PBST试剂的PH值范围为7.2,浓度为0.01mol/L。

[0143] 结果判读的根据有:

[0144] (4.1)QPs微球的大小均一且其红色荧光强度大,并且无任何掺杂荧光出现,作为检测探针的性能优异。

[0145] (4.2)本发明采用间接法,形成由功能化的QPs微球-抗AQP4抗体-FITC标记的羊抗人IgG组成的免疫复合物,并借助红绿色双重荧光定位系统有助于检测结果的判读。

[0146] 本发明采用将新型量子点探针与流式细胞分析技术相结合的技术,突破了传统的借助有机荧光染料为检测工具的瓶颈。一方面利用QD纳米材料作为检测工具克服了有机荧光染料荧光强度弱、荧光寿命短易淬灭等缺陷,同时借助QPs微球作为检测载体可以有效的避免批间差异带来的检测结果的不一致性;另一方面分析AQP4蛋白的分子结构,利用原核表达系统可以实现大规模生产,有利于商品化;最后结合快速灵敏的流式细胞分析技术可以迅速准确地实现对单个QPs-AQP4微球探针的检测,大大提高了检测的灵敏度和准确性,有益于检测自身抗AQP4抗体的自动化与标准化。

[0147] 本发明引用荧光微球制备的常用方法化学渗透对油溶性QD进行改进，通过在QD表面包裹PS微球从而增加QD的水溶性，因此本发明以正丁醇作分散体系，以二氯甲烷作溶胀剂，操作简单、制备的荧光微球性质稳定且荧光强度大。

[0148] 本发明构建了稳定的AQP4蛋白表达系统，克服了依赖高表达蛋白的组织或细胞作基质的方法的局限性。同时本发明采用EDC-NHS将量子点聚苯乙烯微球QPs与AQP4蛋白进行偶联，生成稳定的功能化的QPs微球；借助QPs的比表面积大与AQP4蛋白共价结合可以大大提高检测方法的灵敏度和检测范围。此外应用QPs微球探针与流式细胞术相结合使检测过程易于质控和自动化，有效的规避了各种误差的产生，有助于临床辅助诊断NMO的发生发展和预后评估。

[0149] 本发明的基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的流式免疫方法，利用量子点(Quantum dot,QD)纳米材料具有量子产率高、荧光强度大和激发光谱范围宽以及发射光谱窄、荧光寿命长等的优点，将新型的量子点纳米探针与流式细胞分析技术(Flow Cytometry/on AQP4-QPs)相结合的方法用于检测自身抗AQP4抗体，突破了传统的以有机荧光染料为检测工具的瓶颈；同时也利用了流式细胞分析技术具有快速检测易于标准化和自动化等优点，弥补了现有AQP4抗体检测技术的不足。能够简单快速和可重复检测AQP4抗体。

[0150] 实施例4。

[0151] 一种基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法，包括以下步骤：

[0152] (1)制备量子点聚苯乙烯QPs微球；

[0153] (2)获取AQP4蛋白的功能性片段目的基因进行表达；

[0154] (3)利用EDC-NHS活化QPs微球表面的羧基，并将活化后的QPs微球表面的羧基与AQP4蛋白的氨基进行偶联制成功能化的QPs微球；

[0155] (4)通过荧光发射峰为650nm的油溶性CdSe量子点与FITC标记的羊抗人IgG的红绿色双重荧光定位系统进行流式检测，并对已功能化后的QPs微球的检测结果进行判读。

[0156] 具体的，步骤(1)采用化学渗透法制备QPs微球，具体过程包括：

[0157] (1.1)取10mg的PS微球分散悬浮于1mL的浓度为99.99％的饱和正丁醇溶液中，制成PS微球悬液；

[0158] (1.2)取1mg的量子点QD溶解于100μL的的浓度为99.99％的饱和二氯甲烷溶剂中并进行震荡混合，制成QD-二氯甲烷溶液；

[0159] (1.3)将QD-二氯甲烷溶液以2.5μL/秒至3.5μL/秒的滴速滴加至PS微球悬液中，在室温下震荡4至5小时；

[0160] (1.4)将震荡后的混合物置于55℃水温中进行水浴加热25小时；

[0161] (1.5)用体积分数为80％的乙醇溶液对水浴后的混合物进行离心洗涤，收集沉淀物得到QPs微球。

[0162] 步骤(2)具体包括：

[0163] (2.1)人工合成AQP4蛋白功能性片段目的基因，并将合成后的目的基因插入到pET32a质粒载体中，获得AQP4-pET32a的重组质粒；

[0164] (2.2)将AQP4-pET32a的重组质粒转化至BL21菌株中，并加入IPTG诱导剂进行诱导表达；

[0165] (2.3)将诱导表达后得到的蛋白产物进行离心操作，分别取离心后的离心上清液

和沉淀物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定；

[0166] (2.4)将诱导表达后得到的蛋白产物通过镍柱进行纯化，并采用蛋白质印迹法western-bloting再次鉴定。

[0167] 其中，步骤(2.2)具体包括以下步骤：

[0168] 将0.5μg AQP4-pET32a的重组质粒与100μL体积分数为50％的BL21菌株混匀冰浴30分钟以上，随后将混合菌液置于45℃的水中进行水浴95秒，接着再置于0℃环境下冰浴2至3分钟，在35℃至40℃下、以220转每分的转速转动培养混合菌液45分钟以上，将菌液接种涂布含氨苄青霉素的琼脂平板，将琼脂平板置于35℃至40℃环境中孵育24小时以上。

[0169] 其中，步骤(2.3)具体包括以下步骤：挑阳性克隆，具体是在40℃环境下、以220转每分的转速转动培养基，孵育至培养基轻微混浊，将单克隆菌液分为六管且每管放置1mL菌液，按照诱导时间和IPTG稀释比例的不同进行分组，其中诱导时间分为4小时和6小时，IPTG稀释比例分为0，1:1000，1:100三种，具体分组情况如下：

[0170] 1)诱导时间为4小时，IPTG稀释比例为0为一组；

[0171] 2)诱导时间为4小时，IPTG稀释比例为1:1000为一组；

[0172] 3)诱导时间为4小时，IPTG稀释比例为1:100为一组；

[0173] 4)诱导时间为6小时，IPTG稀释比例为0为一组；

[0174] 5)诱导时间为6小时，IPTG稀释比例为1:1000为一组；

[0175] 6)诱导时间为6小时，IPTG稀释比例为1:100为一组。

[0176] 其中，步骤(3)具体包括以下步骤：

[0177] (3.1)QPs微球的预处理：取1mg的QPs微球加入到1mL的PH值为6.1，浓度为50mmol/L的MES buffer缓冲液中混合，将得到的混合物置于18000转每分的转速环境中转动5分钟以上，进行离心操作；

[0178] (3.2)活化QPs微球：将离心后的产物重置于500μL的PH值为6.1，浓度为50mmol/L的MES buffer缓冲液中，并分别加入20μg/μL的EDC试剂和20μg/μL的NHS试剂混合，在室温环境下对混合后的产物震荡30分钟以上；

[0179] (3.3)终止活化：将震荡后的混合产物置于18000转每分的环境中转动5分钟以上，进行离心操作，并在离心后的产物中加入1mL的PBS试剂进行洗涤操作2次到3次；

[0180] 具体的，PBS试剂的PH值范围为7.4，浓度为0.01mol/L；

[0181] (3.4)QPs微球偶联AQP4蛋白：将AQP4蛋白与QPs微球置于1mL的PBS试剂中混合，并将混合后的产物置于45℃的温度中过夜或者在室温的条件下震荡2小时至4小时，完成QPs微球偶联AQP4蛋白的操作；

[0182] 具体的，PBS试剂的PH值范围为7.4，浓度为0.01mol/L；

[0183] (3.5)封闭：在震荡后的混合产物中加入质量浓度5％的BSA试剂，在室温的条件下将混合物震荡30分钟以上；

[0184] (3.6)终止反应：将加入质量浓度5％的BSA试剂震荡后得到的产物置于18000转每分的转速中转动5分钟以上进行离心操作，并在离心后的产物中加入1mL的PBS试剂进行洗涤操作2次到3次，最后加入500μL的PBST试剂进行对功能化的QPs微球的重悬；

[0185] 具体的，PBS试剂的PH值范围为7.4，浓度为0.01mol/L；

[0186] 具体的，PBST试剂的PH值范围为7.4，浓度为0.01mol/L。

[0187] 结果判读的根据有：

[0188] (4.1)QPs微球的大小均一且其红色荧光强度大，并且无任何掺杂荧光出现，作为检测探针的性能优异。

[0189] (4.2)本发明采用间接法，形成由功能化的QPs微球-抗AQP4抗体-FITC标记的羊抗人IgG组成的免疫复合物，并借助红绿色双重荧光定位系统有助于检测结果的判读。

[0190] 本发明采用将新型量子点探针与流式细胞分析技术相结合的技术，突破了传统的借助有机荧光染料为检测工具的瓶颈。一方面利用QD纳米材料作为检测工具克服了有机荧光染料荧光强度弱、荧光寿命短易淬灭等缺陷，同时借助QPs微球作为检测载体可以有效的避免批间差异带来的检测结果的不一致性；另一方面分析AQP4蛋白的分子结构，利用原核表达系统可以实现大规模生产，有利于商品化；最后结合快速灵敏的流式细胞分析技术可以迅速准确地实现对单个QPs-AQP4微球探针的检测，大大提高了检测的灵敏度和准确性，有益于检测自身抗AQP4抗体的自动化与标准化。

[0191] 本发明引用荧光微球制备的常用方法化学渗透对油溶性QD进行改进，通过在QD表面包裹PS微球从而增加QD的水溶性，因此本发明以正丁醇作分散体系，以二氯甲烷作溶胀剂，操作简单、制备的荧光微球性质稳定且荧光强度大。

[0192] 本发明构建了稳定的AQP4蛋白表达系统，克服了依赖高表达蛋白的组织或细胞作基质的方法的局限性。同时本发明采用EDC-NHS将量子点聚苯乙烯微球QPs与AQP4蛋白进行偶联，生成稳定的功能化的QPs微球；借助QPs的比表面积大与AQP4蛋白共价结合可以大大提高检测方法的灵敏度和检测范围。此外应用QPs微球探针与流式细胞术相结合使检测过程易于质控和自动化，有效的规避了各种误差的产生，有助于临床辅助诊断NMO的发生发展和预后评估。

[0193] 本发明的基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的流式免疫方法，利用量子点(Quantum dot,QD)纳米材料具有量子产率高、荧光强度大和激发光谱范围宽以及发射光谱窄、荧光寿命长等的优点，将新型的量子点纳米探针与流式细胞分析技术(Flow Cytometry/on AQP4-QPs)相结合的方法用于检测自身抗AQP4抗体，突破了传统的以有机荧光染料为检测工具的瓶颈；同时也利用了流式细胞分析技术具有快速检测易于标准化和自动化等优点，弥补了现有AQP4抗体检测技术的不足。能够简单快速和可重复检测AQP4抗体。

[0194] 实施例5。

[0195] 一种基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法，包括以下步骤：

[0196] (1)制备量子点聚苯乙烯QPs微球；

[0197] (2)获取AQP4蛋白的功能性片段目的基因进行表达；

[0198] (3)利用EDC-NHS活化QPs微球表面的羧基，并将活化后的QPs微球表面的羧基与AQP4蛋白的氨基进行偶联制成功能化的QPs微球；

[0199] (4)通过荧光发射峰为645nm的油溶性CdSe量子点与FITC标记的羊抗人IgG的红绿色双重荧光定位系统进行流式检测，并对已功能化后的QPs微球的检测结果进行判读。

[0200] 具体的，步骤(1)采用化学渗透法制备QPs微球，具体过程包括：

[0201] (1.1)取10mg的PS微球分散悬浮于1mL的浓度为99.99%的饱和正丁醇溶液中，制成PS微球悬液；

[0202] (1.2)取1mg的量子点QD溶解于50μL的浓度为99.99%的饱和二氯甲烷溶剂中并进

行震荡混合，制成QD-二氯甲烷溶液；

[0203] (1.3)将QD-二氯甲烷溶液以3.0μL/秒的滴速滴加至PS微球悬液中，在室温下震荡4小时；

[0204] (1.4)将震荡后的混合物置于50℃水温中进行水浴加热20小时；

[0205] (1.5)用体积分数为50％的乙醇溶液对水浴后的混合物进行离心洗涤，收集沉淀物得到QPs微球。

[0206] 步骤(2)具体包括：

[0207] (2.1)人工合成AQP4蛋白功能性片段目的基因，并将合成后的目的基因插入到pET32a质粒载体中，获得AQP4-pET32a的重组质粒；

[0208] (2.2)将AQP4-pET32a的重组质粒转化至BL21菌株中，并加入IPTG诱导剂进行诱导表达；

[0209] (2.3)将诱导表达后得到的蛋白产物进行离心操作，分别取离心后的离心上清液和沉淀物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定；

[0210] (2.4)将诱导表达后得到的蛋白产物通过镍柱进行纯化，并采用蛋白质印迹法western-bloting再次鉴定。

[0211] 其中，步骤(2.2)具体包括以下步骤：

[0212] 将0.2μg AQP4-pET32a的重组质粒与50μL的、体积分数为50％的BL21菌株混匀冰浴30分钟，随后将混合菌液置于42℃的水中进行水浴90秒，接着再置于0℃环境下冰浴2至3分钟，在37℃的温度环境下、以220转每分的转速转动培养混合菌液45分钟，将菌液接种涂布含氨苄青霉素的琼脂平板，将琼脂平板置于37℃温度环境中孵育24小时。

[0213] 其中，步骤(2.3)具体包括以下步骤：挑阳性克隆，具体是在37℃温度环境下、以220转每分的转速转动培养基，孵育至培养基轻微混浊，将单克隆菌液分为六管且每管放置1mL菌液，按照诱导时间和IPTG稀释比例的不同进行分组，其中诱导时间分为4小时和6小时，IPTG稀释比例分为0，1:1000，1:100三种，具体分组情况如下：

[0214] 1)诱导时间为4小时，IPTG稀释比例为0为一组；

[0215] 2)诱导时间为4小时，IPTG稀释比例为1:1000为一组；

[0216] 3)诱导时间为4小时，IPTG稀释比例为1:100为一组；

[0217] 4)诱导时间为6小时，IPTG稀释比例为0为一组；

[0218] 5)诱导时间为6小时，IPTG稀释比例为1:1000为一组；

[0219] 6)诱导时间为6小时，IPTG稀释比例为1:100为一组。

[0220] 其中，步骤(3)具体包括以下步骤：

[0221] (3.1)QPs微球的预处理：取1mg的QPs微球加入到0.5mL的、PH值为6.1，浓度为50mmol/L的MES buffer缓冲液中混合，将得到的混合物置于18000转每分的转速环境中转动5分钟，进行离心操作；

[0222] (3.2)活化QPs微球：将离心后的产物重置于400μL的PH值为6.1，浓度为50mmol/L的MES buffer缓冲液中，并分别加入10μg/μL的EDC试剂和10μg/μL的NHS试剂混合，在室温环境下对混合后的产物震荡30分钟；

[0223] (3.3)终止活化：将震荡后的混合产物置于18000转每分的环境中转动5分钟，进行离心操作，并在离心后的产物中加入0.5mL的PBS试剂进行洗涤操作2次到3次；

[0224] 具体的,PBS试剂的PH值范围为7.4,浓度为0.01mol/L;

[0225] (3.4)QPs微球偶联AQP4蛋白:将AQP4蛋白与QPs微球置于0.5mL的PBS试剂中混合,并将混合后的产物置于4℃的温度中过夜或者在室温的条件下震荡2小时至4小时,完成QPs微球偶联AQP4蛋白的操作;

[0226] 具体的,PBS试剂的PH值范围为7.4,浓度为0.01mol/L;

[0227] (3.5)封闭:在震荡后的混合产物中加入质量浓度为4%的BSA试剂,在室温的条件下将混合物震荡30分钟;

[0228] (3.6)终止反应:将加入质量浓度为4%的BSA试剂震荡后得到的产物置于18000转每分的转速中转动5分钟进行离心操作,并在离心后的产物中加入1mL的PBS试剂进行洗涤操作2次到3次,最后加入400μL的PBST试剂进行对功能化的QPs微球的重悬;

[0229] 具体的,PBS试剂的PH值范围为7.4,浓度为0.01mol/L;

[0230] 具体的,PBST试剂的PH值范围为7.4,浓度为0.01mol/L。

[0231] 结果判读的根据有:

[0232] (4.1)QPs微球的大小均一且其红色荧光强度大,并且无任何掺杂荧光出现,作为检测探针的性能优异。

[0233] (4.2)本发明采用间接法,形成由功能化的QPs微球-抗AQP4抗体-FITC标记的羊抗人IgG组成的免疫复合物,并借助红绿色双重荧光定位系统有助于检测结果的判读。

[0234] 本发明采用将新型量子点探针与流式细胞分析技术相结合的技术,突破了传统的借助有机荧光染料为检测工具的瓶颈。一方面利用QD纳米材料作为检测工具克服了有机荧光染料荧光强度弱、荧光寿命短易淬灭等缺陷,同时借助QPs微球作为检测载体可以有效的避免批间差异带来的检测结果的不一致性;另一方面分析AQP4蛋白的分子结构,利用原核表达系统可以实现大规模生产,有利于商品化;最后结合快速灵敏的流式细胞分析技术可以迅速准确地实现对单个QPs-AQP4微球探针的检测,大大提高了检测的灵敏度和准确性,有益于检测自身抗AQP4抗体的自动化与标准化。

[0235] 本发明引用荧光微球制备的常用方法化学渗透对油溶性QD进行改进,通过在QD表面包裹PS微球从而增加QD的水溶性,因此本发明以正丁醇作分散体系,以二氯甲烷作溶胀剂,操作简单、制备的荧光微球性质稳定且荧光强度大。

[0236] 本发明构建了稳定的AQP4蛋白表达系统,克服了依赖高表达蛋白的组织或细胞作基质的方法的局限性。同时本发明采用EDC-NHS将量子点聚苯乙烯微球QPs与AQP4蛋白进行偶联,生成稳定的功能化的QPs微球;借助QPs的比表面积大与AQP4蛋白共价结合可以大大提高检测方法的灵敏度和检测范围。此外应用QPs微球探针与流式细胞术相结合使检测过程易于质控和自动化,有效的规避了各种误差的产生,有助于临床辅助诊断NMO的发生发展和预后评估。

[0237] 本发明的基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的流式免疫方法,利用量子点(Quantum dot,QD)纳米材料具有量子产率高、荧光强度大和激发光谱范围宽以及发射光谱窄、荧光寿命长等的优点,将新型的量子点纳米探针与流式细胞分析技术(Flow Cytometry/on AQP4-QPs)相结合的方法用于检测自身抗AQP4抗体,突破了传统的以有机荧光染料为检测工具的瓶颈;同时也利用了流式细胞分析技术具有快速检测易于标准化和自动化等优点,弥补了现有AQP4抗体检测技术的不足。能够简单快速和可重复检测AQP4抗体。

[0238] 最后应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

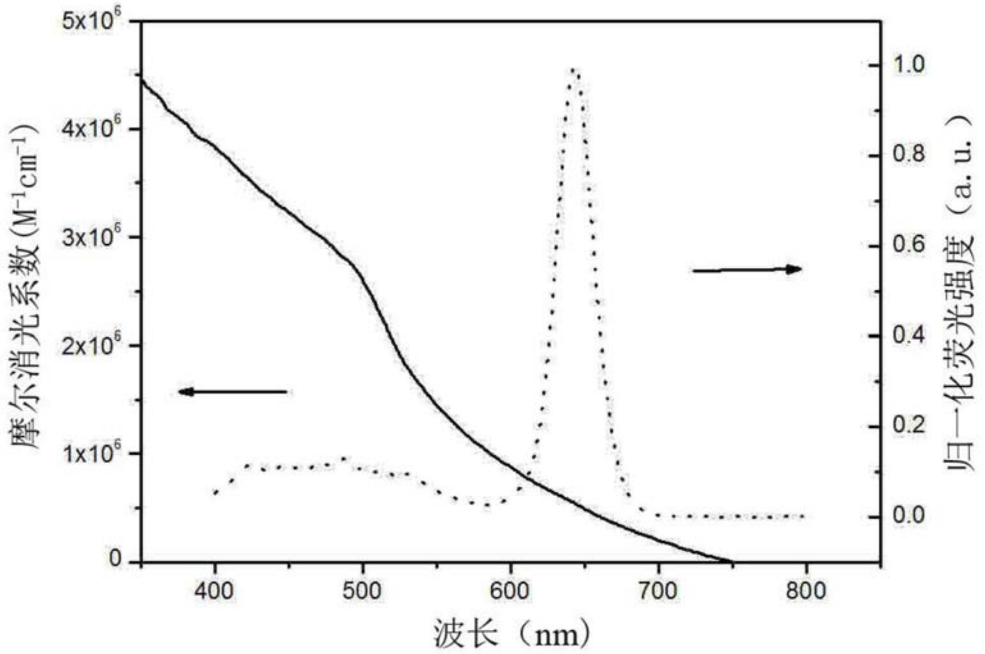

5x10^6
4x10^6
3x10^6
2x10^6
1x10^6
0
摩尔消光系数(M^-1cm^-1)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
归一化荧光强度（a. u.）
400
500
600
700
800
波长（nm）

图1

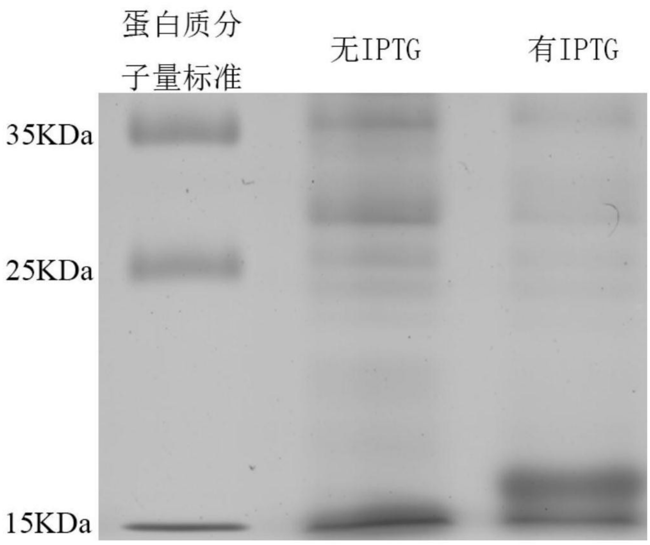

蛋白质分子量标准
无IPTG
有IPTG
35KDa
25KDa
15KDa

图2

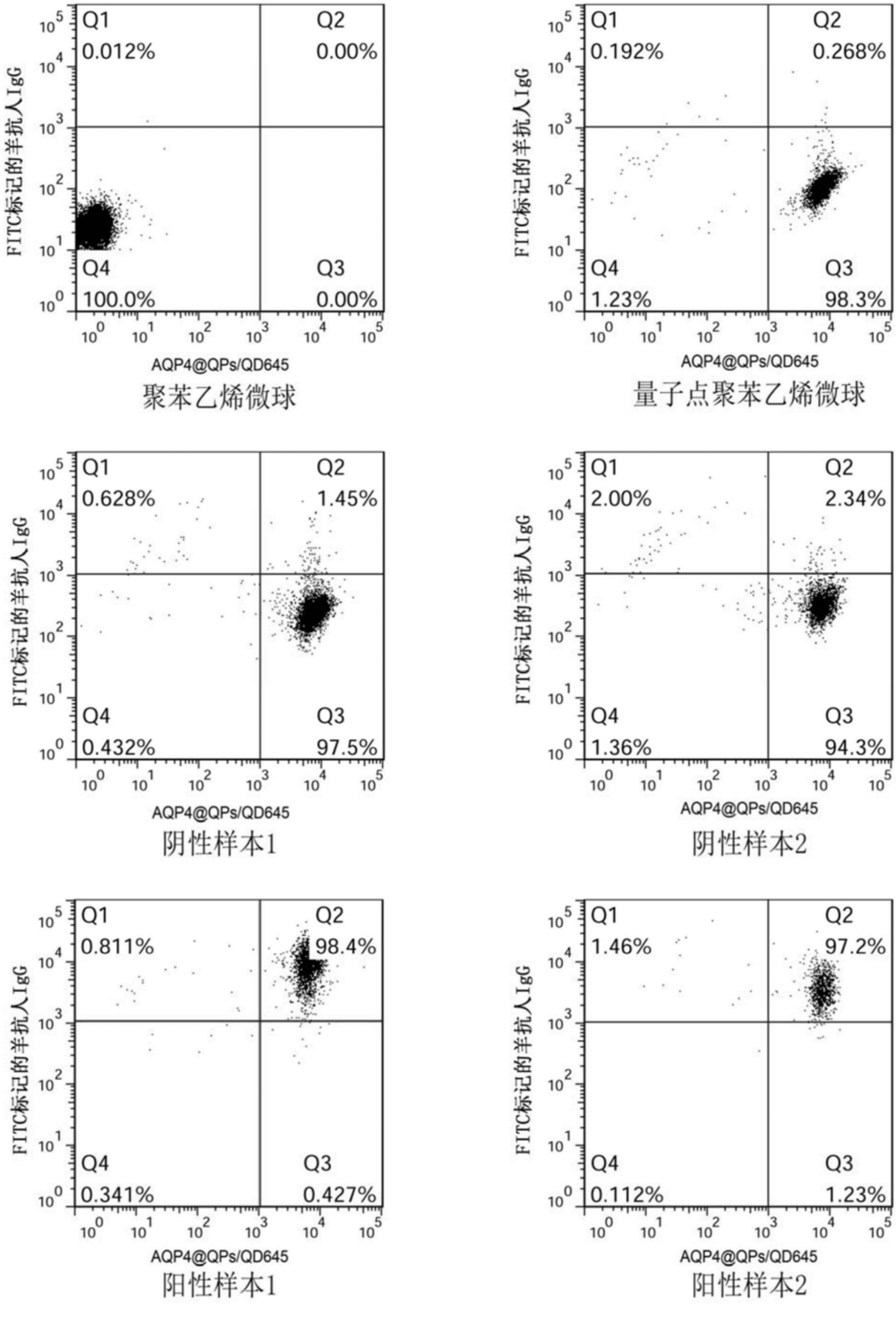

FITC标记的羊抗人IgG
AQP4@QPs/QD645
Q1 0.012%
Q2 0.00%
Q4 100.0%
Q3 0.00%
聚苯乙烯微球
Q1 0.192%
Q2 0.268%
Q4 1.23%
Q3 98.3%
量子点聚苯乙烯微球
Q1 0.628%
Q2 1.45%
Q4 0.432%
Q3 97.5%
阴性样本1
Q1 2.00%
Q2 2.34%
Q4 1.36%
Q3 94.3%
阴性样本2
Q1 0.811%
Q2 98.4%
Q4 0.341%
Q3 0.427%
阳性样本1
Q1 1.46%
Q2 97.2%
Q4 0.112%
Q3 1.23%
阳性样本2

图3

专利名称(译)	基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法		
公开(公告)号	CN110618264A	公开(公告)日	2019-12-27
申请号	CN201910854812.5	申请日	2019-09-10
[标]申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
[标]发明人	刘天才 李鹏 陈振华		
发明人	刘天才 李鹏 陈振华		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/533 G01N21/64 G01N15/14		
CPC分类号	G01N15/14 G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/54346		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种基于量子点聚苯乙烯微球检测抗AQP4抗体的方法，将新型的量子点纳米探针与流式细胞分析技术相结合的免疫方法用于检测自身抗AQP4抗体，突破了传统的以有机荧光染料为检测工具的瓶颈。同时利用了流式细胞分析技术具有快速检测易于标准化和自动化等优点，弥补了现有AQP4抗体检测技术的不足。能够简单快速、可重复检测AQP4抗体。