



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108918858 B

(45) 授权公告日 2021.06.11

(21) 申请号 201810472435.4

G01N 21/64 (2006.01)

(22) 申请日 2018.05.17

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 103149360 A, 2013.06.12

申请公布号 CN 108918858 A

CN 104119540 A, 2014.10.29

(43) 申请公布日 2018.11.30

CN 103048460 A, 2013.04.17

(73) 专利权人 西安交通大学苏州研究院

WO 2007011660 A2, 2007.01.25

地址 215000 江苏省苏州市工业园区仁爱路99号C110

CN 103665159 B, 2016.05.04

CN 106526192 A, 2017.03.22

(72) 发明人 李嫚莉 李超 胡延祯

Ruili Wu等. Quantitative and rapid detection of C-reactive protein using quantum dot-based lateral flow test strip.《Analytica Chimica Acta》.2018, 第1008卷第1-7页.

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务有限公司 32103

代理人 汪青 向亚兰

审查员 郭雅文

(51) Int. Cl.

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/536 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种量子点-抗体免疫复合物的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种量子点-抗体免疫复合物的制备方法,制备方法包括如下步骤:1)使羧基修饰的量子点与激活剂在0-10℃下、在pH值为5-6的缓冲液中反应,生成活化量子点;其中,激活剂包括1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物;2)使步骤1)制备的活化量子点与抗体在0-10℃下、在pH值为6-9的缓冲液中反应,制成量子点-抗体免疫复合物;本发明能够实现量子点-抗体免疫复合物具有较强的荧光强度和生物活性等特性,而且还能实现偶联率可达90%左右,进而大大地提升了原料的利用率,有利于大规模的应用。

1. 一种量子点-抗体免疫复合物的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括如下步骤:

1) 使羧基修饰的量子点与激活剂在0-5℃下、在pH值为5-6的缓冲液中反应,生成活化量子点;其中,所述激活剂由1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物构成;

所述1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐、所述N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物、所述羧基修饰的量子点的投料摩尔比为1000~10000:1000~10000:1;

2) 使步骤1)制备的所述活化量子点与抗体在0-5℃下、在pH值为6-9的缓冲液中反应,制成所述量子点-抗体免疫复合物。

2. 根据权利要求1所述的量子点-抗体免疫复合物的制备方法,其特征在于,所述制备方法中,分别控制所述步骤1)和所述步骤2)的反应在超声条件下进行。

3. 根据权利要求1所述的量子点-抗体免疫复合物的制备方法,其特征在于,步骤2)中,所述活化量子点与所述抗体的投料摩尔比为1:5-15。

4. 根据权利要求1所述的量子点-抗体免疫复合物的制备方法,其特征在于,所述制备方法中,所述步骤1)和所述步骤2)中pH值分别通过硼酸-硼砂缓冲溶液来调节。

5. 根据权利要求1所述的量子点-抗体免疫复合物的制备方法,其特征在于,所述抗体为小鼠抗人C反应蛋白单克隆抗体anti-CRP-C6。

6. 根据权利要求1所述的量子点-抗体免疫复合物的制备方法,其特征在于,所述步骤2)的具体实施方式为:将步骤1)反应后得到的含有活化量子点的反应液置于超滤管中,在0-10℃下离心,然后加入硼酸-硼砂缓冲溶液调节pH值,再次离心,制得pH值为6-9的含有活化量子点的粗提溶液,然后将抗体加入所述粗提溶液中,在0-5℃下反应,制成所述量子点-抗体免疫复合物。

7. 根据权利要求1所述的量子点-抗体免疫复合物的制备方法,其特征在于,所述制备方法还包括:

步骤3)将步骤2)反应后得到的反应混合液置于透析袋内透析,浓缩,即可得纯化的量子点-抗体免疫复合物。

一种量子点-抗体免疫复合物的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物标记领域,具体涉及一种量子点-抗体免疫复合物的制备方法。

背景技术

[0002] 量子点(Quantum dots, QDs)是主要由ⅡB族~ⅥA族元素(如CdSe、CdTe、CdS、ZnSe等)或ⅢA族~ⅤA族元素(如InP、InAs等)构成的半导体纳米颗粒。自80年代发现合成以来,由于其特殊的荧光特性等,具体诸如:1)尺寸控制发射光谱,颜色可调,可实现同种量子点多色标记;2)激发光谱宽,发射光谱窄而对称;3)较大的斯托克斯位移;4)光化学稳定性高,耐光漂白;5)荧光效率高;6)生物相容性好;7)荧光寿命长等等,因此可扩展应用于生物标记。

[0003] 目前,量子点作为新型的纳米材料,其生物荧光标记的制备方法分为非共价连接和共价连接。其中非共价连接主要有静电吸附、特异性生物靶标连接、链霉素-生物素连接等;共价连接包括量子点表面功能基团羧基、氨基、羟基等,在不同激活剂的活化下分别与生物分子的氨基、巯基等共价连接。其中量子点表面羧基与生物分子氨基共价连接(即量子点-抗体免疫复合物)应用最为广泛。

[0004] 现有技术中制备量子点-抗体免疫复合物的方法不一,导致了偶联效率差别较大,制备成本增加。目前主流的制备方法为:先与激活剂反应,再与特定抗体结合进而制备得到量子点-抗体免疫复合物;然而按照目前的具体制备方法中制得的量子点-抗体免疫复合物,其偶联率普遍偏低,较为浪费原料,不利于大规模的生产,进而限制了其在生物荧光标记中的应用。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种改进的量子点-抗体免疫复合物的制备方法,其能够实现量子点-抗体免疫复合物具有较强的荧光强度和生物活性等特性,而且还能实现偶联率可达90%左右,进而大大地提升了原料的利用率,有利于大规模的应用。

[0006] 为解决以上技术问题,本发明采取的技术方案如下:

[0007] 一种量子点-抗体免疫复合物的制备方法,所述制备方法包括如下步骤:

[0008] 1)使羧基修饰的量子点与激活剂在0-10℃下、在pH值为5-6的缓冲液中反应,生成活化量子点;其中,所述激活剂包括1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物;

[0009] 2)使步骤1)制备的所述活化量子点与抗体在0-10℃下、在pH值为6-9的缓冲液中反应,制成所述量子点-抗体免疫复合物。

[0010] 根据本发明的一些优选方面,步骤1)中,所述1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐、所述N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物、所述羧基修饰的量子点的投料摩尔比为1000~10000:1000~10000:1。

[0011] 根据本发明,所述羧基修饰的量子点可为核壳型或非核壳型量子点。

[0012] 根据本发明的一些优选方面,所述1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物的添加方式以溶液形式加入,即先将1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物通过硼酸-硼砂缓冲溶液配制成pH值为5-6的溶液,再根据配方量加入。

[0013] 根据本发明的一些优选方面,步骤1)中,控制所述反应在0-5℃下进行。

[0014] 根据本发明的一些优选方面,步骤2)中,所述反应在0-5℃下进行。

[0015] 根据本发明的一些优选方面,所述制备方法中,分别控制所述步骤1)和所述步骤2)的反应在超声条件下进行。

[0016] 根据本发明的一些优选方面,步骤2)中,所述活化量子点与所述抗体的投料摩尔比为1:5-15。

[0017] 根据本发明的一些优选方面,所述制备方法中,所述步骤1)和所述步骤2)中pH值分别通过硼酸-硼砂缓冲溶液来调节。实际过程中,可根据需要调节的pH值灵活调整硼酸与硼砂的加入量,进而可以控制调节酸性还是碱性等。

[0018] 根据本发明的一些优选方面,所述抗体为小鼠抗人C反应蛋白单克隆抗体(anti-CRP-C6)。

[0019] 根据本发明的一些优选方面,所述步骤2)的具体实施方式为:将步骤1)反应后得到的含有活化量子点的反应液置于超滤管中,在0-10℃下离心,然后加入硼酸-硼砂缓冲溶液调节pH值,再次离心,制得pH值为6-9的含有活化量子点的粗提溶液,然后将抗体加入所述粗提溶液中,在0-10℃下反应,制成所述量子点-抗体免疫复合物。

[0020] 根据本发明的一些优选方面,所述超滤管的截留分子量为100kd。

[0021] 根据本发明的一些优选方面,所述制备方法还包括:步骤3)将步骤2)反应后得到的反应混合液置于透析袋内透析,浓缩,即可得纯化的量子点-抗体免疫复合物。实际过程中,量子点以溶液形式存在,因此,提纯浓缩后制得的为含有量子点-抗体免疫复合物的溶液。

[0022] 根据本发明的一些优选方面,所述透析袋的截留分子量为300kd。

[0023] 由于以上技术方案的采用,本发明与现有技术相比具有如下优点:

[0024] 本发明通过使量子点与激活剂,以及活化后的量子点与抗体在特定的反应温度以及pH值环境下反应,避免了现有技术中在制备过程中发生的量子点荧光淬灭,和/或,生成的复合物发生聚集而分散不均匀进而易粘附在反应容器的器壁上,从而导致失活失效,本发明特定方法制备的量子点-抗体免疫复合物则具有较强的荧光强度、抗体特异性的生物活性、分子量增加、表面电位降低,而且偶联率得到了极大地提升,有利于大规模生产。

[0025] 同时通过本发明特定的纯化方法,可简单地分离出与抗体反应后的量子点溶液与未反应的抗体溶液,且可避免现有技术中使用大型昂贵的仪器才能完成的弊端。

附图说明

[0026] 图1为量子点对照与实施例1中的量子点-抗体免疫复合物的琼脂糖凝胶电泳图;

[0027] 图2为量子点对照与实施例1中的量子点-抗体免疫复合物斑点杂交验证图;

[0028] 图3为量子点对照与实施例1中的量子点-抗体免疫复合物荧光光谱图。

具体实施方式

[0029] 目前,现有技术中,基于量子点特殊的荧光特性等优异性能,其被应用于生物荧光标记的实例越来越多,其中尤以量子点表面羧基与生物分子氨基共价连接应用(量子点-抗体免疫复合物)最为广泛,目前量子点-抗体免疫复合物的制备方法中主要的方法为:量子点先与激活剂反应,再与抗体结合进而制备得到量子点-抗体免疫复合物,然而,以目前具体制备条件下制成的复合物,其不仅偶联率较低,而且存在荧光淬灭,或分散不均匀进而易粘附在反应容器的器壁上的问题,从而导致失活失效,因此,不利于节约成本以及大规模生产,进而限制了量子点-抗体免疫复合物在荧光标记中的大规模应用。

[0030] 经研究发现,当控制活化的反应在低温尤其是0-10℃下、pH值为5-6,以及控制与抗体的结合反应同样在0-10℃下时进行反应时,可以极大地提升偶联率,并且可避免荧光淬灭、生成物粘附器壁等现象的发生,从而可最大化地利用原料,降低生产成本,有利于工业化大规模的应用。

[0031] 基于此,本申请提供了一种量子点-抗体免疫复合物的制备方法,所述制备方法包括如下步骤:1)使羧基修饰的量子点与激活剂在0-10℃下、在pH值为5-6的缓冲液中反应,生成活化量子点;其中,所述激活剂包括1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺或其硫代物;2)使步骤1)制备的所述活化量子点与抗体在0-10℃下、在pH值为6-9的缓冲液中反应,制成所述量子点-抗体免疫复合物。上述通过使量子点与激活剂,以及活化后的量子点与抗体在特定的反应温度以及pH值环境下反应,避免了现有技术中在制备过程中发生的量子点荧光性淬灭,和/或,生成的复合物发生聚集而分散不均匀进而易粘附在反应容器的器壁上,从而导致失活失效,同时上述特定方法制备的量子点-抗体免疫复合物则具有较强的荧光强度、抗体特异性的生物活性、分子量增加、表面电位降低,而且偶联率得到了极大地提升,有利于大规模生产。

[0032] 以下结合具体实施例对上述方案做进一步说明;应理解,这些实施例是用于说明本发明的基本原理、主要特征和优点,而本发明不受以下实施例的范围限制;实施例中采用的实施条件可以根据具体要求做进一步调整,未注明的实施条件通常为常规实验中的条件。

[0033] 下述中,如无特殊说明,所有的原料均来自于商购或者通过本领域的常规方法制备而得。

[0034] 实施例1

[0035] 将5 μ L量子点(发射峰为625nm \pm 5nm,浓度为8 μ M,购自于武汉珈源量子点技术开发有限责任公司)溶于500 μ L,pH=5.5,0.01M硼酸-硼砂缓冲溶液中,涡旋混匀30s。现配制0.01M 1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDC)和0.01M N-羟基硫代琥珀酰亚胺(suLfo-NHS),溶剂为pH=5.5,0.01M硼酸-硼砂缓冲溶液。在量子点溶液中加入8 μ L,0.01M EDC,涡旋混匀,5min后加入40 μ L,0.01M suLfo-NHS。在1 \pm 1℃下超声30min。活化完成后,取出活化反应液,置于超滤管(100kd)中,在低温离心机中离心,转速3500rpm,5min,完成后,在反应液中加入1ml,pH=8.5,0.01M硼酸-硼砂缓冲溶液,重复离心一次,取出反应液。向反应液中加入7.2 μ L小鼠CRP单克隆抗体(anti-CRP-C6,5.8mg/ml),涡旋混匀,在1 \pm 1℃下超声3h,即得量子点-抗体免疫复合物。

[0036] 纯化量子点-小鼠C反应蛋白单克隆抗体:将复合物置于透析袋(MwCO:300000)中,

使用透析夹夹紧,放入烧杯中,在外部加入pH=8.5,0.01M硼酸-硼砂缓冲溶液,加入转子,将烧杯置于磁力搅拌器上搅拌,每3h更换一次缓冲液,重复3次。收集透析内液与外液。

[0037] 计算偶联率:使用超滤管(100kd)浓缩内外液至500 μ L左右,用BCA法测定内外液蛋白含量,

[0038]
$$R = \frac{C_{内} \times V_{内}}{C_{内} \times V_{内} + C_{外} \times V_{外}} \times 100\%$$
 式中:R——偶联率/%;C内——内液蛋白浓度/mg \cdot ml⁻¹;V内——内液体积/ml;C外——外液蛋白浓度/mg \cdot ml⁻¹;V外——外液体积/ml。测得偶联率为85.14%。

[0039] 同时对本实施例制备的量子点-抗体免疫复合物作了琼脂糖凝胶电泳图、斑点杂交验证图、荧光光谱图,并分别与量子点的相对照,具体如图1-3所示,说明按照本发明的制备方法制得的量子点-抗体免疫复合物,其性能符合标准。

[0040] 实施例2

[0041] 将5 μ L量子点(发射峰为625nm \pm 5nm,浓度为8 μ M,购自于武汉珈源量子点技术开发有限责任公司)溶于500 μ L,pH=5.5,0.01M硼酸-硼砂缓冲溶液中,涡旋混匀30s。现配制0.01M 1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDC)和0.01M N-羟基琥珀酰亚胺(suLfo-NHS),溶剂为pH=5.5,0.01M硼酸-硼砂缓冲溶液。在量子点溶液中加入16 μ L,0.01M EDC,涡旋混匀,5min后加入40 μ L,0.01M suLfo-NHS,涡旋混匀。在1 \pm 0.5 $^{\circ}$ C下超声30min。活化完成后,取出活化反应液,置于超滤管(100kd)中,在低温离心机中离心,转速3500rpm,5min,完成后,在反应液中加入1ml,pH=8.5,0.01M硼酸-硼砂缓冲溶液,重复离心一次,取出反应液。向反应液中加入7.2 μ L小鼠CRP单克隆抗体(anti-CRP-C6,5.8mg/ml),涡旋混匀,在2 \pm 0.5 $^{\circ}$ C下超声3h,即得量子点-抗体免疫复合物。

[0042] 纯化量子点-小鼠C反应蛋白单克隆抗体:将复合物置于透析袋(MwCO:300000)中,使用透析夹夹紧,放入烧杯中,在外部加入pH=8.5,0.01M硼酸-硼砂缓冲溶液,加入转子,将烧杯置于磁力搅拌器上搅拌,每3h更换一次缓冲液,重复3次。收集内液与外液。

[0043] 计算偶联率:使用超滤管(100kd)浓缩内外液至500 μ L左右,用BCA法测定内外液蛋白含量,

[0044]
$$R = \frac{C_{内} \times V_{内}}{C_{内} \times V_{内} + C_{外} \times V_{外}} \times 100\%$$
 式中:R——偶联率/%;C内——内液蛋白浓度/mg \cdot ml⁻¹;V内——内液体积/ml;C外——外液蛋白浓度/mg \cdot ml⁻¹;V外——外液体积/ml。测得偶联率为88.48%。

[0045] 实施例3

[0046] 将5 μ L量子点(发射峰为625nm \pm 5nm,浓度为8 μ M,购自于武汉珈源量子点技术开发有限责任公司)溶于500 μ L,pH=5.5,0.01M硼酸-硼砂缓冲溶液中,涡旋混匀30s。现配制0.01M 1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDC)和0.01M N-羟基琥珀酰亚胺(suLfo-NHS),溶剂为pH=5.5,0.01M硼酸-硼砂缓冲溶液。在量子点溶液中加入16 μ L,0.01M EDC,涡旋混匀,5min后加入40 μ L,0.01M suLfo-NHS,涡旋混匀。在1 \pm 1 $^{\circ}$ C下超声30min。活化完成后,取出活化反应液,置于超滤管(100kd)中,在低温离心机中离心,转速3500rpm,5min,完成后,在反应液中加入1ml,pH=8.5,0.01M硼酸-硼砂缓冲溶液,重复离心

一次,取出反应液。向反应液中加入5.2 μ L小鼠CRP单克隆抗体(anti-CRP-C6,5.8mg/ml),涡旋混匀,在2 \pm 1 $^{\circ}$ C下超声3h,即得量子点-抗体免疫复合物。

[0047] 纯化量子点-小鼠C反应蛋白单克隆抗体:将复合物置于透析袋(MwCO:300000)中,使用透析夹夹紧,放入烧杯中,在外部加入pH=8.5,0.01M硼酸-硼砂缓冲溶液,加入转子,将烧杯置于磁力搅拌器上搅拌,每3h更换一次缓冲液,重复3次。收集内液与外液。

[0048] 计算偶联率:使用超滤管(100kd)浓缩内外液至500 μ L左右,用BCA法测定内外液蛋白含量,

[0049]
$$R = \frac{C_{内} \times V_{内}}{C_{内} \times V_{内} + C_{外} \times V_{外}} \times 100\%$$
 式中:R——偶联率/%;C内——内液蛋白浓

度/mg \cdot ml $^{-1}$;V内——内液体积/ml;C外——外液蛋白浓度/mg \cdot ml $^{-1}$;V外——外液体积/ml。测得偶联率为92.90%。

[0050] 对比例1

[0051] 基本同实施例1,其区别仅在于分别使活化的反应温度、活化量子点与抗体的反应均在室温下条件下进行。

[0052] 测得偶联率为63.77%,其中会出现荧光性淬灭的现象。

[0053] 对比例2

[0054] 基本同实施例1,其区别仅在于使活化的反应在pH为4.5的条件下进行。

[0055] 测得偶联率55.67%,其中部分生成的量子点-抗体免疫复合物会发生聚集难以分散均匀且粘附在反应容器的器壁上,致使失活或无法分离而难以被利用。

[0056] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围,凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

QDs Couple

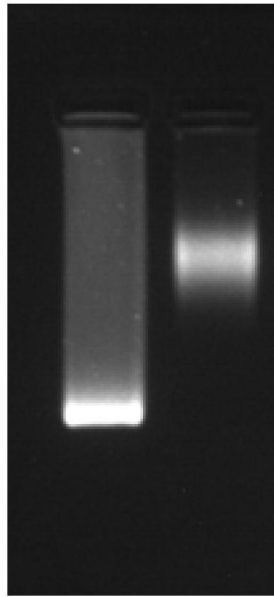


图1

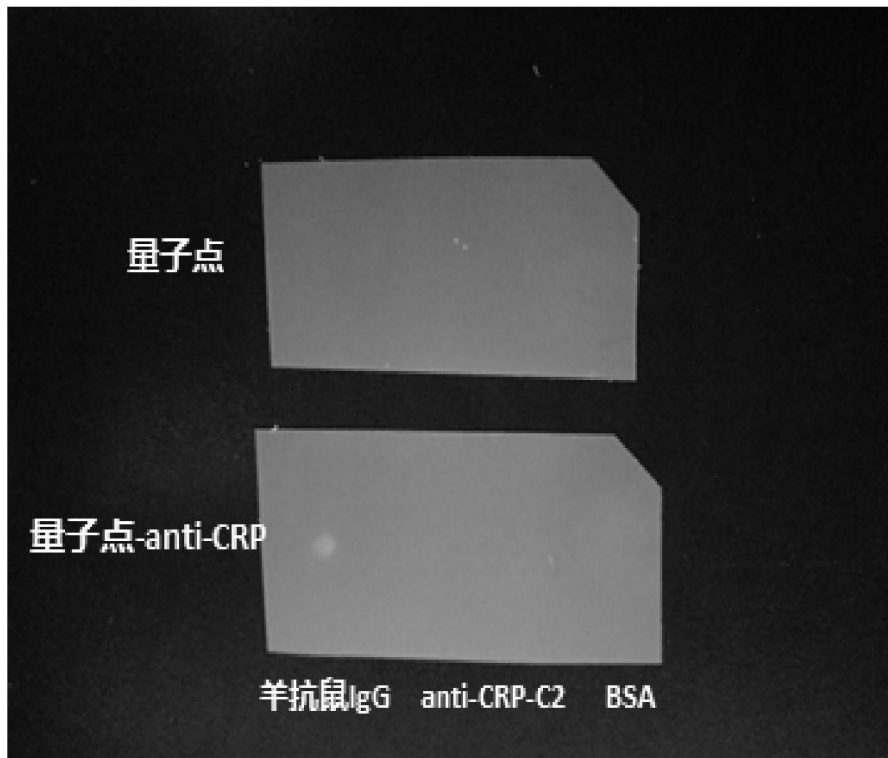


图2

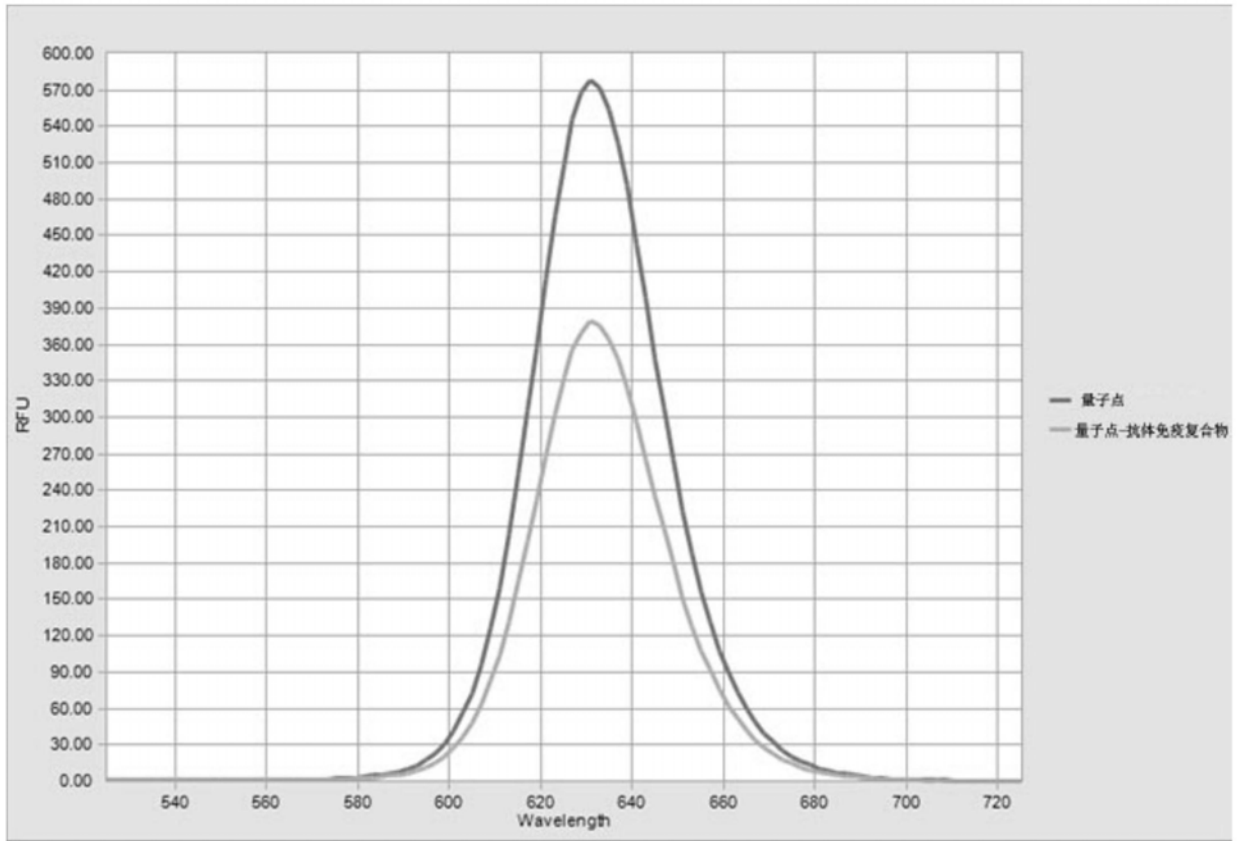


图3