

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 20120051403145

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

新型体外诊断技术的建立及其应用

Establishment and Application of Novel In-vitro Diagnostics
Technologies

许 晔

指导教师姓名: 李 庆 阁 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2009 年 6 月 29 日

论文答辩时间: 2009 年 7 月 19 日

学位授予日期: 2009 年 月 日

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(李庆阁教授)课题(组)的研究成果,获得(李庆阁教授)课题(组)经费或实验室的资助,在(李庆阁教授)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文,并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版),允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索,将学位论文的标题和摘要汇编出版,采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于:

() 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文,于
年 月 日解密,解密后适用上述授权。

() 2. 不保密,适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文,未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的,默认为公开学位论文,均适用上述授权。)

声明人(签名):

年 月 日

目 录

摘 要	1
Abstract.....	3
第一章 绪 论	5
1.1 纳米颗粒在荧光免疫分析技术中的应用情况	5
1.1.1 免疫分析方法简介.....	5
1.1.2 荧光免疫分析中的标记物.....	5
1.1.2.1 荧光纳米微乳颗粒.....	7
1.1.2.1 发光量子点.....	7
1.1.2.3 荧光团杂化纳米二氧化硅颗粒.....	8
1.2 纳米颗粒在免疫层析试纸条中的应用	9
1.3 Aptamer 及其在癌细胞生物学研究中的应用简介	11
1.4 本论文的设想与研究内容	13
参 考 文 献	14
第二章 新型 Eu(III)-BHHCT 修饰的二氧化硅荧光纳米颗粒的合成及其在 时间分辨荧光免疫分析中的应用	23
2.1 前 言	23
2.2 材料与方 法	25
2.2.1 仪器与实验材料.....	25
2.2.2 实验步骤.....	25
2.2.2.1 Eu(III)-BHHCT 修饰的荧光二氧化硅纳米颗粒的制备.....	25
2.2.2.2 颗粒表面氨基的验证.....	26
2.2.2.3 荧光纳米颗粒的表征.....	26
2.2.2.4 单个荧光纳米颗粒上修饰的稀土络合物的表观个数的计算.....	27
2.2.2.5 抗体的定向标记.....	27
2.2.2.6 抗体包被.....	27
2.2.2.7 时间分辨荧光免疫分析.....	28
2.2.2.8 非特异性吸附实验.....	28
2.3 实验结果	28
2.3.1 荧光纳米颗粒的制备和表征.....	28
2.3.2 荧光纳米颗粒与抗体的偶联.....	30
2.3.3 非特异性吸附实验.....	31
2.3.4 HBsAg 时间分辨荧光免疫分析:	32
2.4 讨 论	34

2.5 结论	36
参 考 文 献	36
第三章 新型 Tb(III)-BPTA 修饰的二氧化硅荧光纳米颗粒的合成及其在时	
间分辨荧光免疫分析中的应用	40
3.1 前言	40
3.2 材料与方法	41
3.2.1 仪器与实验材料	41
3.2.2 实验步骤	42
3.2.2.1 Tb(III)-BPTA 修饰的二氧化硅荧光纳米颗粒的制备	42
3.2.2.2 颗粒表面氨基的验证	43
3.2.2.3 荧光纳米颗粒的表征	43
3.2.2.4 单个荧光纳米颗粒修饰的稀土络合物的表观个数的计算	44
3.2.2.5 抗体的生物素化	44
3.2.2.6 醛基化葡聚糖的制备	44
3.2.2.7 链霉亲和素的标记	44
3.2.2.8 抗体包被	45
3.2.2.9 时间分辨荧光免疫分析	45
3.3 实验结果	45
3.3.1 荧光纳米颗粒的制备和表征	45
3.3.2 抗体的生物素化	47
3.3.3 醛基化葡聚糖的制备	47
3.3.4 Tb(III)-BPTA 荧光纳米颗粒与链霉亲和素的偶联	47
3.3.5 HBeAg 时间分辨荧光免疫分析:	48
3.4 讨论	51
3.5 结论	53
参 考 文 献	53
第四章 基于稀土络合物修饰的荧光纳米颗粒的双重时间分辨荧光免疫分	
析体系的建立	56
4.1 前言	56
4.2 材料与方法	58
4.2.1 仪器与实验材料	58
4.2.2 实验步骤	59
4.2.2.1 Eu(III)-BHHCT 荧光纳米颗粒及其抗体偶联物的制备	59
4.2.2.2 Tb(III)-BPTA 荧光纳米颗粒及其链霉亲和素偶联物的制备	59
4.2.2.3 抗体的生物素化	60
4.2.2.4 抗体包被	60
4.2.2.5 时间分辨荧光免疫分析	60
4.3 实验结果	60

4.3.1 Eu(III)和 Tb(III)双色同时检测体系	61
4.3.2 Eu(III)和 Tb(III)双色同时检测的干扰	61
4.3.3 Eu(III)和 Tb(III)双色同时检测的干扰校正	62
4.3.4 矫正方法验证模型	63
4.3.5 HBsAg 在双色严重干扰情况下的检测灵敏度	65
4.3.6 Eu(III)和 Tb(III)双色同时检测 HBsAg 和 HBeAg 免疫分析	66
4.4 讨论	67
4.5 结论	69
参 考 文 献	69
第五章 基于稀土络合物荧光纳米颗粒的免疫层析方法	72
5.1 前言	72
5.2 材料和方法	73
5.2.1 仪器与实验材料	73
5.2.2 实验步骤	74
5.2.2.1 Eu(III)-BHHCT 荧光纳米颗粒及其抗体偶联物的制备	74
5.2.2.2 HBsAg 检测试纸条的装配	74
5.2.2.3 样品免疫层析检测	75
5.2.2.4 自制暗箱及数码相机拍照设定	75
5.2.2.5 检测结果的定量分析	76
5.3 实验结果	76
5.3.1 Eu(III)-BHHCT 荧光纳米颗粒与抗体的偶联	77
5.3.2 实验材料选择	77
5.3.3 HBsAg 免疫层析检测	78
5.4 讨论	82
5.5 结论	84
参 考 文 献	85
第六章 稀土荧光纳米颗粒免疫层析技术在鼠伤寒沙门氏菌快速检测中的	
应用	88
6.1 前言	88
6.2 材料和方法	90
6.2.1 仪器与实验材料	90
6.2.2 实验步骤	90
6.2.2.1 Eu(III)-BHHCT 荧光纳米颗粒及其抗体偶联物的制备	90
6.2.2.2 检测试纸条的装配	91
6.2.2.3 样品免疫层析检测	92
6.2.2.4 其它实验条件设定	92
6.3 实验结果	92
6.3.1 实验条件优化	92
6.3.2 鼠伤寒沙门氏菌的免疫层析实验	93

6.3.2.1 灵敏度实验.....	93
6.3.2.2 特异性实验.....	93
6.3.2.3 选择性实验.....	94
6.3.3 模拟样品检测以及与商品化胶体金试纸条的比较.....	95
6.4 讨论	95
6.5 结论	97
参 考 文 献	97
第七章 基于 aptamer 的多重细胞富集和分选的微流控芯片技术 ...	99
7.1 前言	99
7.2 材料与方 法	101
7.2.1 实验材料与仪器.....	101
7.2.2 实验步骤.....	101
7.2.2.1 细胞培养及处理.....	101
7.2.2.2 微流控芯片的制作.....	102
7.2.2.3 细胞捕获实验.....	102
7.2.2.4 捕获细胞的释放.....	103
7.2.2.5 显微观察及照片分析.....	103
7.2.2.6 流式细胞术分析.....	104
7.2.2.7 DNA 合成.....	104
7.3 实验结果及讨论	105
7.3.1 芯片设计以及操作.....	105
7.3.2 混合细胞的分离和检测.....	105
7.3.3 细胞释放及培养.....	107
7.3.4 稀有细胞的富集.....	109
7.4 结论	110
参 考 文 献	111
第八章 论文的创新性和研究工作的展望	116
8.1 论文的创新性	116
8.2 研究工作的展望	117
附 录	119
在学期间论文发表情况	119
致 谢	120

Contents

Abstract (in Chinese)	1
Abstract (in English)	3
Chapter 1 Introduction	5
1.1 Applications of Nanoparticles in Fluorescent Immunoassay	5
1.1.1 Introduction of Immunoassay Methods	5
1.1.2 The Labels in Fluorescent Immunoassay	5
1.1.2.1 Fluorescent Latex Particles	7
1.1.2.1 Quantum Dots	7
1.1.2.3 Fluorophore Doped Silica Nanoparticles.....	8
1.2 Applications of Nanoparticles in Lateral Flow Immunoassay	9
1.3 Aptamer and Its Application in Cancer Cell Biology	11
1.4 The Ideals of This Dissertation	13
Reference	14
Chapter 2 Synthesis of Novel Eu(III)-BHHCT Chelate Coated	
Silica Nanoparticles and Its Application in TrFIA	23
2.1 Introduction	23
2.2 Materials and Methods	25
2.2.1 Instruments and Materials:	25
2.2.2 Methods.....	25
2.2.2.1 Synthesis of Eu(III)-BHHCT Chelates Coated Silica	
Nanoparticles	25
2.2.2.2 Validation of The Amina Group on The Particle Surface	26
2.2.2.3 Characteristics of The Fluorescent Nanoparticle	26
2.2.2.4 Calculation of The Apparent Number of Lanthanide Chelate on a	
Single Particle	27
2.2.2.5 Oriented Antibody Immobilization.....	27
2.2.2.6 Coating of Antibody	27
2.2.2.7 TrFIA of HBsAg.....	28
2.2.2.8 Nonspecific Binding of Nanoparticle Conjugates	28
2.3 Results	28
2.3.1 Synthesis and Characteristics of The Fluorescent Nanoparticle	28
2.3.2 Conjugation of Lanthanide Chelate Coated Silica Nanoparticle	30
2.3.3 Nonspecific Binding of Nanoparticle Conjugates	31
2.3.4 TrFIA of HBsAg	32
2.4 Discussion	34

2.5 Conclusion	36
Reference	36
Chapter 3 Synthesis of Novel Tb(III)-BPTA Chelate Coated Silica Nanopartilces and Its Application in TrFIA	40
3.1 Introduction	40
3.2 Materials and Methods	41
3.2.1 Instruments and Materials	41
3.2.2 Methods	42
3.2.2.1 Synthesis of Tb(III)-BPTA Chelate Coated Silica Nanopartilce	42
3.2.2.2 Validation of The Amina Group on The Particle Surface	43
3.2.2.3 Characteristics of The Fluorescent Nanoparticle	43
3.2.2.4 Calculation of The Apparent Number of Lanthanide Chelate on a Single Particle	44
3.2.2.5 Biotinylation of Antibody	44
3.2.2.6 Preparation of Aldyhided Dextran	44
3.2.2.7 Streptavidin Conjugation	44
3.2.2.8 Coating of Antibody	45
3.2.2.9 TrFIA of HBeAg	45
3.3 Results	45
3.3.1 Synthesis and Characteristics of The Fluorescent Nanoparticle	45
3.3.2 Biotinylation of Antibody	47
3.3.3 Preparation of Aldyhided Dextran	47
3.3.4 Streptavidin Conjugation	47
3.3.5 TrFIA of HBeAg	48
3.4 Discussion	51
3.5 Conclusion	53
Reference	53
Chapter 4 Lanthanide Chelates Coated Nanopartilces based dual-labeled TrFIA	56
4.1 Introduction	56
4.2 Materials and Methods	58
4.2.1 Instruments and Materilas	58
4.2.2 Methods	59
4.2.2.1 Synthesis of Eu(III)-BHHCT Coated Nanopaticle and Preparation of Its Conjugates	59
4.2.2.2 Synthesis of Tb(III)-BPTA Coated Nanoparticle and Preparation of Its Conjugates	59
4.2.2.3 Biotinylation of Antibody	60
4.2.2.4 Coating of Antibody	60
4.2.2.5 Simultaneous TrFIA of HBsAg and HBeAg	60

4.3 Results	60
4.3.1 Eu(III) and Tb(III) Dual-labeled Immunoassay System	61
4.3.2 Interference in Eu(III) and Tb(III) Dual-labeled Immunoassay System	61
4.3.3 Correction of The Interference in Dual-labeled Immunoassay System	62
4.3.4 Validation of The Correction Method	63
4.3.5 The Detection Limit of HBsAg Under Serious Interference	65
4.3.6 Simultaneous TrFIA of HBsAg and HBeAg	66
4.4 Discussion	67
4.5 Conclusion	69
Reference	69
Chapter 5 Lanthanide Chelate Coated Nanoparticle based Latetal	
Flow Immunoassay	72
5.1 Introduction	72
5.2 Materials and Methods	73
5.2.1 Instruments and Methods	73
5.2.2 Methods	74
5.2.2.1 Synthesis of Eu(III)-BHHCT Coated Nanoparticle and Preparation of Its Conjugates	74
5.2.2.2 Assemble of HBsAg Test Strip	74
5.2.2.3 Lateral Flow Immunoassay of HBsAg	75
5.2.2.4 Manufacture of The Signal Acquisition Device and The Setup of Camera	75
5.2.2.5 Quantity Assay of The Results	76
5.3 Results	76
5.3.1 Synthesis of Eu(III)-BHHCT Coated Nanoparticle and Preparation of Its Conjugates	77
5.3.2 Selection of Material	77
5.3.3 Lateral Flow Immunoassay of HBsAg	78
5.4 Discussion	82
5.5 Conclusion	84
Reference	85
Chapter 6 Application of Fluorescent Silica Nanoparticle based	
Lateral Flow Immunoassay in <i>Salmonella Typhimurium</i> detetion	88
6.1 Introduction	88
6.2 Materials and Methods	90
6.2.1 Instruments and Materials	90
6.2.2 Methods	90
6.2.2.1 Synthesis of Eu(III)-BHHCT Coated Nanoparticle and Preparation of Its Conjugates	90

6.2.2.2 Assemble of Test Strip.....	91
6.2.2.3 Lateral Flow Immunoassay.....	92
6.2.2.4 Experiments Setup	92
6.3 Results	92
6.3.1 Optimization of The Experiments.....	92
6.3.2 Lateral Flow Immunoassay of <i>Salmonella Typhimurium</i>	93
6.3.2.1 Sensitivity	93
6.3.2.2 Specificity	93
6.3.2.3 Selectivity	94
6.3.3 Simulated Sample Test and Comparision to Commercial Colloid Gold Test Strip.....	95
6.4 Discussion	95
6.5 Conclusion	97
Reference	97
Chapter 7 Aptamer-based Microfluidic Device for Enrichment, Sorting and Detecion of Multiple Cancer Cells	99
7.1 Introduction	99
7.2 Materials and Methods	101
7.2.1 Instruments and Materials.....	101
7.2.2 Methodd.....	101
7.2.2.1 Cell Culture and Buffer.....	101
7.2.2.2 Device Fabrication and Operation	102
7.2.2.3 Cell Capture Assay	102
7.2.2.4 Cell Release	103
7.2.2.5 Microscopy and Image Analysis.....	103
7.2.2.6 Flow Cytometry	104
7.2.2.7 DNA Systhesis	104
7.3 Results and Discussion	105
7.3.1 Device Design and Operating Procedure.....	105
7.3.2 Multiplexed Cell Isolation and Detection.....	105
7.3.3 Cell Release and Culture.....	107
7.3.4 Rare Cell Enrichment.....	109
7.4 Conclusion	110
Reference	111
Chapter 8 The Innovation of the Dissertation and the Prospect of This Research Field	116
8.1 The Innovation of The Dissertation	116
8.2 The Prospect of This Research Field	117
Appendix.....	119

Publications	119
Acknowledgement.....	120

厦门大学博硕士学位论文摘要库

新型体外诊断技术的建立以及应用

摘要

本论文主要围绕新型体外诊断技术的建立展开研究。整个研究工作大致可以分为两个部分。其中第一部分主要涉及新型的稀土络合物修饰的荧光二氧化硅纳米颗粒的合成以及其在免疫分析中的应用。第二部分主要介绍了基于 aptamer 的多重细胞富集和分选微流控芯片技术平台的建立。

第一章为绪论，主要是对本论文中开展的研究工作所涉及领域进行综述性的介绍。包括：纳米颗粒在荧光免疫分析中的应用；纳米颗粒在免疫层析中的应用；aptamer 及其在癌细胞生物学中的应用。

第二章主要介绍了新型的 Eu(III)-BHHCT 稀土络合物修饰的荧光硅纳米颗粒的合成以及在时间分辨荧光免疫分析中的应用。在本章节中我们首次采用了多重修饰的策略将 Eu(III)-BHHCT 修饰在二氧化硅纳米颗粒的表面，合成了稳定性好、荧光强度高的荧光纳米颗粒。另外，我们以乙肝表面抗原的检测为模型，建立了高灵敏的时间分辨荧光免疫分析体系。

第三章主要介绍了新型的 Tb(III)-BPTA 稀土络合物修饰的荧光二氧化硅纳米颗粒的合成以及在时间分辨荧光免疫分析中的应用。在本章节中我们通过 EDC 将络合物 Tb(III)-BPTA 交联到二氧化硅纳米颗粒表面，首次合成了共价修饰的 Tb(III) 荧光纳米颗粒。并且该纳米颗粒也具有稳定性好、荧光强度高的优点。我们还以乙肝 e 抗原检测为模型，建立了高灵敏的时间分辨荧光免疫分析体系。

第四章主要介绍了基于二氧化硅荧光纳米颗粒的双重时间分辨荧光免疫分析体系的建立。我们用 Eu(III)-BHHCT 荧光纳米颗粒和 Tb(III)-BPTA 荧光纳米颗粒，分别以乙肝表面抗原和乙肝 e 抗原为检测对象，建立了高灵敏的的双重时间分辨荧光免疫分析体系。并且对双色检测中，两个标记物所发出的荧光间的相互干扰进行了详细的研究，首次提出了对干扰的矫正方法，并建立模型对矫正方法进行了验证。

第五章主要介绍了基于稀土荧光二氧化硅纳米颗粒的免疫层析平台的建立。在本章节中，我们选用了 Eu(III)-BHHCT 荧光纳米颗粒，以乙肝表面抗原为检测

对象，对免疫层析的实验原材料，标记方法以及实验条件的进行了优化，建立了高灵敏的免疫层析检测平台。其检测灵敏度比传统的胶体金免疫层析方法提高了10~20倍。并且我们还建立了基于 PhotoShop 软件的检测结果定量分析方法。使我们的免疫层析检测具有定量分析的能力。

第六章主要介绍了稀土荧光纳米颗粒免疫层析技术在鼠伤寒沙门氏菌快速检测中的应用。进一步验证了稀土荧光纳米颗粒在免疫层析中应用的可行性。与商品化的胶体金试纸条进行对比，灵敏度提高了2~3个数量级。

第七章主要介绍了基于 aptamer 的多重细胞富集和分选的微流控芯片技术平台的建立。在本章节中我们将 aptamer 技术与微流控芯片技术相结合，将针对不同癌细胞的 aptamer 固定于微流控芯片内通道的不同区域，实现了对混合细胞的分离、富集和分选。这个微流控芯片平台在一次实验中可以将稀有细胞富集135倍。并且分选出的细胞具有和正常培养的细胞相当的生长速率，而且细胞纯度也达到了96%。

第八章总结了本论文研究工作的创新性，并对该研究工作的进一步发展提出了设想。

关键词： 纳米颗粒、免疫分析、aptamer、微流控芯片

Establishment and Application of Novel In-vitro Diagnostics Technologies

Abstract

This dissertation focuses on establishment and application of novel in-vitro diagnostics technologies. It consists of two parts. In the first part, the synthesis of novel lanthanide chelates coated silica nanoparticles and their application in immunoassays are described. In the second part, an aptamer based microfluidic device for enrichment and sorting of multiple cancer cells is introduced.

Chapter one is a microreview about our research work related area. It consists of three parts, including the application of nanoparticles in the fluorescent immunoassay; the application of nanoparticles in the lateral flow immunoassay; aptamer and its application in the cancer cell biology.

In chapter two, synthesis of Eu(III)-BHHCT chelate coated fluorescent silica nanoparticle and its application in TrFIA (Time resolved Fluorescent ImmunoAssay) are described. Multi-coating strategy is used to introduce the lanthanide chelates onto the surface of the silica nanoparticle. The fluorescent nanoparticle synthesized is highly bright and stable. Furthermore, we use HBsAg (hepatitis B surface antigen) detection as a model to setup a highly sensitive TrFIA system.

In chapter three, synthesis of Tb(III)-BPTA chelate coated fluorescent silica nanoparticle and its application in TrFIA are described. EDC is used to conjugate the Tb(III)-BPTA chelate onto the surface of silica nanoparticle. This is the first time that fluorescent silica nanoparticle with covalent conjugated Tb(III) chelate is synthesized. This fluorescent nanoparticle is also highly bright and stable. And in this chapter, we use HBeAg (hepatitis B e antigen) detection as a model to setup a highly sensitive TrFIA system.

In chapter four, simultaneous TrFIA of HBsAg and HBeAg are described. In this dual-labeled TrFIA system, Eu(III)-BHHCT coated silica nanoparticle and

Tb(III)-BPTA coated silica nanoparticle are used as label to simultaneously detect HBsAg and HBeAg, respectively. Furthermore, we investigate the interference between the two detection signals. And a correction method is created to eliminate the interference.

In chapter five, a LFIA (lateral flow immunoassay) using Eu(III)-BHHCT chelate coated silica nanoparticle as labels is described. In this system, antibodies are covalently conjugated onto Eu(III)-BHHCT chelate coated silica nanoparticles with dextran as a linker. The resulting conjugates were used as labels in LFIA for HBsAg. We performed quantification with a digital camera and Adobe Photoshop software.

In chapter six, the application of fluorescent silica nanoparticle based LFIA in *Salmonella Typhimurium* detection is described. This chapter further validates the feasibility of our fluorescent silica nanoparticle based LFIA system. The detection system has high sensitivity and specificity. We compare our LFIA system to the commercial colloid gold test strip. The detection limit of our system is 100~1000 times lower than the commercial strip.

In chapter seven, we have developed a microfluidic device that can simultaneously sort, enrich, and then detect multiple types of cancer cells from a complex sample. The device can yield a 135-fold enrichment of rare cell in a single run. The sorted cells grow at the comparable rate as cultured cells and are 96% pure based on flow cytometry determination.

In the final part, chapter eight, the innovation of the dissertation is concluded and the prospect of this research field is given.

Keywords: nanoparticle, immunoassay, aptamer, microfluidic device

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库