



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103868897 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 18

(21) 申请号 201410036560. 2

(22) 申请日 2014. 01. 26

(71) 申请人 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所

地址 130033 吉林省长春市东南湖大路
3888 号

(72) 发明人 孔祥贵 张友林 涂浪平 刘晓敏
常钰磊 赵慧颖

(74) 专利代理机构 长春菁华专利商标代理事务
所 22210

代理人 王丹阳

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

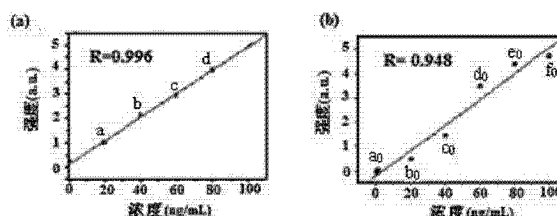
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

荧光生物标记多微孔板自参考量化检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种荧光生物标记多微孔板自参考量化检测方法,属于荧光标记生物检测技术领域。解决了现有荧光标记生物量化检测需要另设参考信号源且标准样易变,导致量化精度低,易受环境影响且检测成本高的技术问题。本发明的荧光生物标记多微孔板自参考量化检测方法是在多微孔板中掺杂稀土铥离子,并以稀土铥离子在685nm处的荧光发射光谱的荧光信号强度作为待测物的荧光信号强度的标准参考信号强度。本发明将多微孔板与仪器系统结合,无需另外设计标准信号参考源和相应的光路,简化仪器结构,降低成本,使用掺杂的稀土铥离子的荧光信号强度为标准参考信号强度,提高了荧光生物标记多微孔板量化分析检测的稳定性、精确度和准确性。



1. 荧光生物标记多微孔板自参考量化检测方法,其特征在于,该检测方法是在多微孔板中掺杂稀土铥离子,并以稀土铥离子在 685nm 处的荧光发射光谱的荧光信号强度作为待测物的荧光信号强度的标准参考信号强度。

2. 根据权利要求 1 所述的荧光生物标记多微孔板自参考量化检测方法,其特征在于,还包括,以稀土铥离子在 685nm 处的荧光信号强度与待测物的荧光信号强度之比 / 差作为量化光学分析检测值,通过绘制标准曲线,进而完成待测物的量化检测。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的荧光生物标记多微孔板自参考量化检测方法,其特征在于,所述在多微孔板中掺杂稀土铥离子的方法是:在多微孔板的前驱材料中掺杂稀土铥离子后再制备多微孔板。

4. 根据权利要求 3 所述的荧光生物标记多微孔板自参考量化检测方法,其特征在于,所述多微孔板的前驱材料为高分子或玻璃。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的荧光生物标记多微孔板自参考量化检测方法,其特征在于,所述待测物为生化细菌战剂分子、DNA 分子或蛋白质分子。

荧光生物标记多微孔板自参考量化检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种荧光生物标记多微孔板自参考量化检测方法,属于荧光标记生物检测技术领域。

背景技术

[0002] 应用多微孔板(包括 96 孔板等)进行荧光标记生物分子的检测是当前普遍应用的技术和方法之一,许多基于不同材质和不同规格的多微孔板已商品化多年,并被普遍应用。但是,基于各种荧光生物探针的生物分子的量化检测和检验都需要采用已知量的标准样品作为量化参考标准进行分析检测,通过绘制标准曲线进行量化分析。但是,这些量化检测用的标准样品易受时间和环境影响,从而影响量化检测和检验的稳定性、精度和准确性。除此之外,所有基于多微孔板的荧光生物标记量化检测和检验的仪器设备均需要外设量化检测标准信号参考源,这将增加生化分析仪器设计和结构的复杂性和成本。现有技术中,还没有一种稳定性好、精度高、准确性好且成本低的荧光生物标记多微孔板量化检测方法。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于解决现有荧光标记生物分子的量化检测需要另设参考信号源且标准样易变,导致量化精度低,易受环境影响且检测成本高的技术问题,提供一种荧光生物标记多微孔板自参考量化检测方法。

[0004] 本发明的荧光生物标记多微孔板自参考量化检测方法是在多微孔板中掺杂稀土铕离子,并以稀土铕离子在 685nm 处的荧光发射光谱的荧光信号强度作为待测物的荧光信号强度的标准参考信号强度。

[0005] 进一步的,还包括,以稀土铕离子在 685nm 处的荧光信号强度与待测物的荧光信号强度之比/差为量化光学分析检测值,通过绘制标准曲线,进而完成待测物的量化检测。

[0006] 进一步的,所述在多微孔板中掺杂稀土铕离子的方法是:在多微孔板的前驱材料中掺杂稀土铕离子后再制备多微孔板。

[0007] 进一步的,所述多微孔板的前驱材料为高分子或玻璃。

[0008] 进一步的,所述待测物为生化细菌战剂分子、DNA 分子或蛋白质分子。

[0009] 本发明的有益效果:

[0010] (1) 本发明采用多微孔板中稀土铕离子的荧光信号强度作为待测物荧光信号强度的标准参考信号强度,将自参考多微孔板与仪器系统结合,无需另外设计标准信号参考源和相应的光路,简化仪器结构,降低检测成本,提高了荧光标记生物分子量化分析检测的稳定性、精确度和准确性;

[0011] (2) 本发明的检测方法适用于各种直径和形状的多微孔板,能够应用在整个光谱范围内,适合化学发光生物探针、酶标记生物探针、生物荧光标记生物探针、染料荧光标记生物探针和纳米标记生物探针等方法的生物检测与检验。

附图说明

[0012] 图 1 中, (a) 为实施例 1 标记二抗体 anti-CA-153 的 QD₆₅₀ 量子点的荧光发射光谱与多微孔板中稀土铥离子的荧光发射光谱, (b) 为对比例 1 中标记二抗体 anti-CA-153 的 QD₆₅₀ 量子点的荧光发射光谱;

[0013] 图 2 中, (a) 为实施例 1 中 $(I_{685}-I_x)/I_{685}$ 与待测物浓度的标准曲线; (b) 为对比例 1 中的标准曲线。

具体实施方式

[0014] 为了进一步了解本发明, 下面结合具体实施方式对本发明的优选实施方案进行描述, 但是应当理解, 这些描述只是为进一步说明本发明的特征和优点而不是对本发明权利要求的限制。

[0015] 本发明的荧光生物标记多微孔板自参考量化检测方法是在多微孔板中掺杂稀土铥离子, 并以稀土铥离子在 685nm 处的荧光发射光谱的荧光信号强度作为待测物的荧光信号强度的标准参考信号强度, 所述待测物的荧光信号强度通常采用荧光生物探针标记待测物的方式显示, 所以待测物的荧光信号强度也可以说是待测物荧光生物探针标记的荧光信号强度, 该检测方法通常包括以下步骤:

[0016] (1) 在多微孔板的前驱材料中掺杂稀土铥离子后, 制备多微孔板, 多微孔板的前驱材料为高分子或玻璃, 多微孔板的制备与现有技术相同;

[0017] (2) 将待测物 (如抗原) 的配对分子 (如抗体分子) 植被于步骤 (1) 制备的多微孔板的表面;

[0018] (3) 再将含有待测物的缓冲液加入步骤 (2) 的多微孔板中, 清洗;

[0019] (4) 将用荧光生物探针标记的能与待测物发生反应的另一生物分子 (如二抗体分子) 的缓冲液加入步骤 (3) 已结合待测物的多微孔板中, 经反应后, 清洗;

[0020] (5) 利用荧光分析系统进行荧光分析, 获得荧光发射光谱, 荧光发射光谱显示多微孔板中稀土铥离子在 685nm 处荧光信号强度和待测物荧光生物探针标记的荧光信号强度;

[0021] (6) 对稀土铥离子在 685nm 处的荧光信号与待测物荧光生物探针标记的荧光信号的相对强度进行分析, 进而完成待测物浓度的检测; 分析通常采用将稀土铥离子在 685nm 处的荧光信号强度与待测物荧光生物探针标记的荧光信号强度的比值或者差值作为量化光学分析检测值, 如以稀土铥离子在 685nm 处荧光信号强度 I_{685} 与荧光生物标记的荧光信号强度 I_x 的差值与 I_{685} 的比值, 即 $(I_{685}-I_x)/I_{685}$, 作为量化光学分析检测值, 并以此检测值与待测物浓度 x 的函数关系绘制标准曲线, $(I_{685}-I_x)/I_{685}=a+bx$, 其中, a 、 b 为常数, 检测时, 再将检测得到的 $(I_{685}-I_x)/I_{685}$ 代入标准曲线, 进而得到待测物浓度 x 。

[0022] 本实施方式所指待测物适用于现有技术中所有以荧光标记多微孔板分析检测的生物分子, 常见的有生化细菌战剂分子、DNA 分子、蛋白质分子, 分析时通常采用待测物的 buffer 缓冲液。

[0023] 下面结合实施例及附图进一步说明本发明。

[0024] 实施例 1

[0025] 结合图 1 和图 2 说明实施例 1

[0026] (1) 在玻璃中掺杂稀土铥离子后, 制备 6×6 的多微孔板, 将 2 组铥离子掺杂制备

的多微孔板表面氨基功能化后,将体积为 500 μ L,浓度为 1mg/mL 的抗原 CA-153 分子的 buffer 缓冲液中的抗原 CA-153 分子固定于第一组多微孔板表面,将体积为 500 μ L,浓度为 1mg/mL 的抗体 anti-CA-153 分子的 buffer 缓冲液中的抗体 anti-CA-153 分子固定于第二组多微孔板表面,备用;

[0027] (2) 向第 1 组多微孔板的 2 个孔中分别加入体积为 500 μ L,浓度分别为 20,100ng/mL 的已用 QD₆₅₀ 量子点(荧光发射峰在 650nm 处)标记的二抗体 anti-CA-153 分子的 buffer 缓冲液,经过 1 小时的免疫结合反应后,形成了抗原 CA-153/二抗体 anti-CA-153 分子+QD₆₅₀ 量子荧光探针结构,对这两个孔进行水冲清洗后,利用荧光分析系统进行荧光分析,检测获得两个孔中稀土铕离子在 685nm 处的荧光信号强度 I_{685} 和标记浓度分别为 20,100ng/mL 的标记二抗体 anti-CA-153 分子的 QD₆₅₀ 量子点的荧光信号强度 $I_{650/20}$ 和 $I_{650/100}$,以稀土铕离子在 685nm 处的荧光信号强度 I_{685} 与标记二抗体 anti-CA-153 分子的 QD₆₅₀ 量子点的荧光信号强度 $I_{650/20}$ 和 $I_{650/100}$ 的差值分别与 I_{685} 的比值,即 $(I_{685}-I_{650/20})/I_{685}$ 和 $(I_{685}-I_{650/100})/I_{685}$ 为量化光学分析检测值,并将这两个值代入公式 $y=a+bx$,确定 $y=a+bx$ 公式中的 a 和 b 值,并得到标准线性公式 $y=0.01+0.5x$,即 $(I_{685}-I_x)/I_{685}=0.01+0.5x$,其中 I_x 为标记待测物的荧光信号强度, x 为待测物浓度;应用浓度分别为 20 和 100ng/mL 的 QD₆₅₀ 量子点标记二抗体 anti-CA-153 分子的检测值代入公式并绘制标准曲线,得到如图 2(a) 所示的标准曲线;

[0028] (3) 向第 2 组多微孔板的四个孔中分别加入体积为 500 μ L,浓度分别为 20、40、60、80ng/mL 的抗原 CA-153 分子的 buffer 缓冲液,经 1 小时免疫结合反应后,进行水冲清洗,再向这四个孔中分别加入体积为 500 μ L,浓度为 300ng/mL 的已用 QD₆₅₀ 量子点标记的二抗体 anti-CA-153 分子的 buffer 缓冲液,经过 1 小时免疫反应后,形成了抗体 anti-CA-153 分子/抗原 CA-153 分子/二抗体 anti-CA-153 分子+QD₆₅₀ 量子荧光探针的三明治结构,水冲清洗第 2 组多微孔板,在与步骤 (2) 同样条件下,利用荧光分析系统进行荧光分析,检测四个孔中稀土铕离子在 685nm 处的荧光信号强度 I_{685} 和标记二抗体 anti-CA-153 分子的 QD₆₅₀ 量子点的荧光信号强度 $I_{650/20}$ 、 $I_{650/40}$ 、 $I_{650/60}$ 和 $I_{650/80}$,得到稀土铕离子在 685nm 处的荧光信号强度 I_{685} 与标记二抗体 anti-CA-153 分子的 QD₆₅₀ 量子点的荧光信号强度 I_x 的差值与 I_{685} 的比值,分别为 $(I_{685}-I_{650/20})/I_{685}$ 、 $(I_{685}-I_{650/40})/I_{685}$ 、 $(I_{685}-I_{650/60})/I_{685}$ 和 $(I_{685}-I_{650/80})/I_{685}$,将这四个值分别代入步骤 (2) 的标准线性公式,得到相应的浓度值,经计算,四个孔中抗原 CA-153 分子(即待测物)的浓度值分别接近 20、40、60、80ng/mL,说明本发明能够用于荧光生物标记多微孔板自参考量化检测;再将得到的 $(I_{685}-I_x)/I_{685}$ 与相应浓度 20、40、60、80ng/mL 分别作为纵横坐标,在图 2(a) 中标示出对应的点,如 a、b、c、d 所示,从图 2(a) 可以看出,实施例 1 的标准曲线与检测值的拟合值 $R=0.996$,说明本发明的方法具有较高的准确度和精确度。

[0029] 图 1 中,(a) 为实施例 1 标记二抗体 anti-CA-153 分子的 QD₆₅₀ 量子点的荧光发射光谱与多微孔板中稀土铕离子位于 685nm 处的荧光发射光谱,图 2 中,(a) 为实施例 1 中 $(I_{685}-I_x)/I_{685}$ 与待测物浓度的标准曲线。

[0030] 对比例 1

[0031] 结合图 1 和图 2 说明对比例 1

[0032] 应用医学临床常用免疫检测方法:

[0033] (1) 将 2 组市售 96 孔多微孔板表面氨基功能化后,将体积为 500 μ L,浓度为 1mg/

mL 的抗原 CA-153 分子的 buffer 缓冲液中的抗原 CA-153 分子固定于第一组市售 96 孔多微孔板表面,将体积为 500 μ L,浓度为 1mg/mL 的抗体 anti-CA-153 分子的 buffer 缓冲液中的抗体 anti-CA-153 分子固定于第二组市售 96 孔多微孔板表面,备用;

[0034] (2) 将体积为 500 μ L,浓度分别为 20,100ng/mL 的 QD₆₅₀ 量子点标记的二抗体 anti-CA-153 分子的 buffer 缓冲液分别加入第一组 96 孔多微孔板的 2 个孔中,经过 1 小时的免疫结合反应后,采用荧光免疫分析仪对 QD₆₅₀ 量子点进行荧光检测,分别检测 2 个孔中浓度分别为 20,100ng/mL 的标记二抗体 anti-CA-153 分子的 QD₆₅₀ 量子点的荧光信号强度值 $I_{650/20}$ 和 $I_{650/100}$,并以这 2 个值代入标准线性公式 $y=a+bx$,即可得到 $a=0.01$ 和 $b=0.5$,进而得到标准线性公式: $y=0.01+0.5x$,即 $I_x=0.01+0.5x$, I_x 为标记待测物的荧光信号强度, x 为待测物浓度,并以浓度为 20,100ng/mL 的两个检测值分别代入公式绘制出以 QD₆₅₀ 量子点的荧光强度和标记二抗体 anti-CA-153 分子浓度的函数曲线,作为标准曲线,如图 2(b);

[0035] (3) 分别将体积为 500 μ L,浓度分别为 0、20、40、60、80、100ng/mL 的抗原 CA-153 分子的 buffer 缓冲液分别加入第二组市售 96 孔多微孔板中的 6 个孔中进行免疫结合反应 1 小时,反应后,用水冲清洗;将体积为 500 μ L,浓度为 1mg/mL 的 QD₆₅₀ 量子点标记的二抗体 anti-CA-153 分子的 buffer 缓冲液分别加入上述 6 个孔中进行免疫结合反应后,反应后再次水冲清洗,在与步骤 (2) 同样条件下,对获得 6 个孔内的标记二抗体 anti-CA-153 分子的 QD₆₅₀ 量子点进行荧光分析,分别得到标记二抗体 anti-CA-153 分子的 QD₆₅₀ 量子点的荧光强度值,将这 6 个值分别代入步骤 (2) 获得的标准线性公式,经计算得到相应的浓度值,结果与实际浓度值差异较大,并将这 6 个值结合相应浓度填充在标准曲线中,在图 2(b) 上绘制其对应的点, a_0 、 b_0 、 c_0 、 d_0 、 e_0 、 f_0 ,从图 2(b) 可以看出,对比例 1 的标准曲线与检测值的拟合值 $R=0.948$,说明本发明的方法较现有技术的检测方法准确度和精确度更高。

[0036] 图 1 中,(b) 为对比例 1 中标记二抗体 anti-CA-153 分子的 QD₆₅₀ 量子点的荧光发射光谱,图 2 中,(b) 为对比例 1 中的标准曲线。

[0037] 显然,以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想。应当指出,对于所述技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。

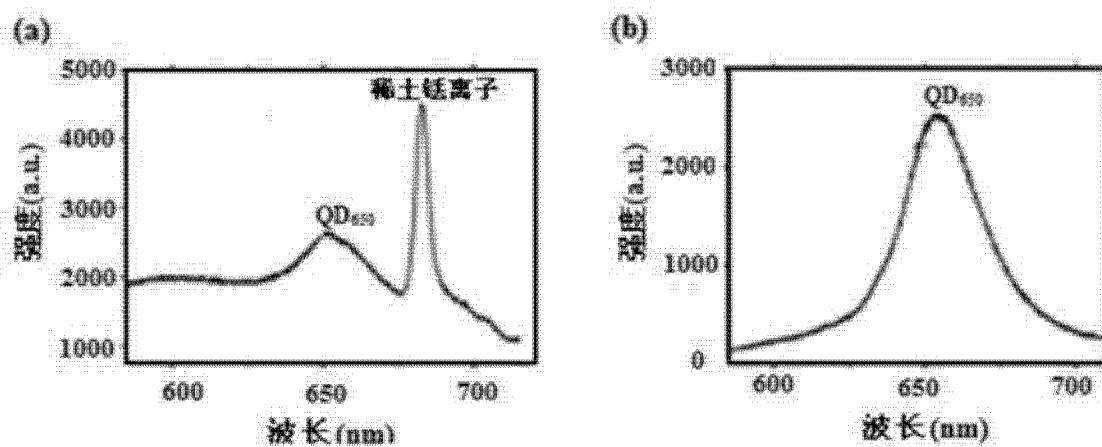


图 1

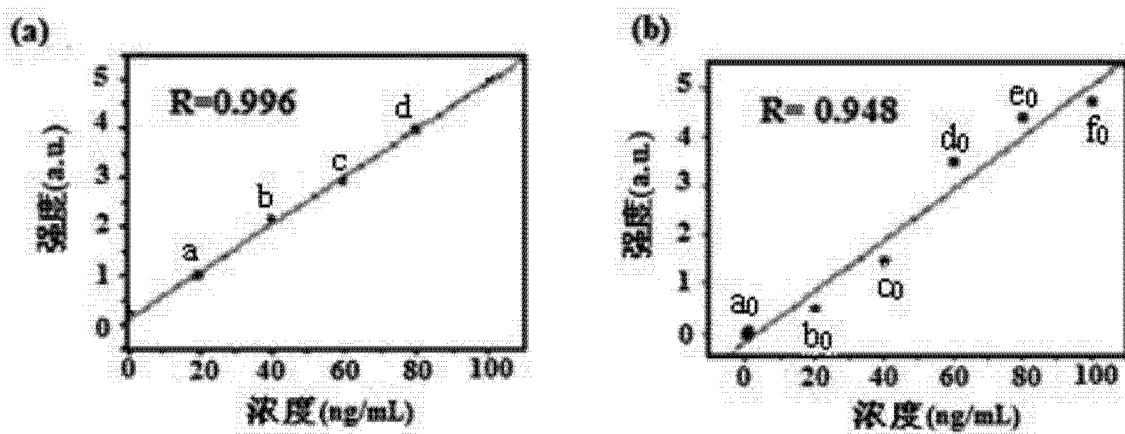


图 2

专利名称(译)	荧光生物标记多微孔板自参考量化检测方法		
公开(公告)号	CN103868897A	公开(公告)日	2014-06-18
申请号	CN201410036560.2	申请日	2014-01-26
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院长春光学精密机械与物理研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院长春光学精密机械与物理研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院长春光学精密机械与物理研究所		
[标]发明人	孔祥贵 张友林 涂浪平 刘晓敏 常钰磊 赵慧颖		
发明人	孔祥贵 张友林 涂浪平 刘晓敏 常钰磊 赵慧颖		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/533		
代理人(译)	王丹阳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种荧光生物标记多微孔板自参考量化检测方法，属于荧光标记生物检测技术领域。解决了现有荧光标记生物量化检测需要另设参考信号源且标准样易变，导致量化精度低，易受环境影响且检测成本高的技术问题。本发明的荧光生物标记多微孔板自参考量化检测方法是在多微孔板中掺杂稀土铥离子，并以稀土铥离子在685nm处的荧光发射光谱的荧光信号强度作为待测物的荧光信号强度的标准参考信号强度。本发明将多微孔板与仪器系统结合，无需另外设计标准信号参考源和相应的光路，简化仪器结构，降低成本，使用掺杂的稀土铥离子的荧光信号强度为标准参考信号强度，提高了荧光生物标记多微孔板量化分析检测的稳定性、精确度和准确性。

