



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107238709 A

(43)申请公布日 2017.10.10

(21)申请号 201710399835.2

(22)申请日 2017.05.31

(71)申请人 重庆高圣生物医药有限责任公司
地址 400039 重庆市九龙坡区二郎创业路
101-109单号高科创业园D2

(72)发明人 周勇 吴秀兰

(51)Int. Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

基于荧光共振能量转移的AFP检测法

(57)摘要

本发明公开了一种基于荧光共振能量转移的AFP检测法,属于纳米免疫分析技术领域。主要利用量子点与染料之间的荧光共振能量转移检测AFP,包括以下步骤: CdS量子点、罗丹明B或红色荧光微球分别标记AFP配对抗体,即探针1和探针2的制备;探针1-AFP-探针2荧光共振能量转移体系制备;AFP工作曲线绘制;样本中AFP的检测。该方法具有操作简单、快速、灵敏、高选择性等特点,可应用于临床医学中肿瘤标记物的检测。

1. 一种基于荧光共振能量转移的AFP检测法,其特征在于,利用荧光配对染料之间荧光共振能量转移快速均相检测广谱肿瘤标记物AFP,包括以下步骤:探针1和探针2的制备;探针1-AFP-探针2荧光共振能量转移体系制备;AFP的工作曲线绘制;待测样本测试。

2. 权利要求1所述的基于荧光共振能量转移的AFP检测法,其特征在于,荧光配对染料为CdS QDs-罗丹明B配对染料、CdS QDs-红色荧光微球配对染料。

3. 权利要求2所述的基于荧光共振能量转移的AFP检测法,其特征在于,CdS QDs的最大发射光谱与罗丹明B、红色荧光微球的最大吸收光谱有较好的重叠。

4. 权利要求1所述的基于荧光共振能量转移的AFP检测法,其特征在于,探针1为CdS QDs标记的AFP抗体,探针2为罗丹明B或红色荧光微球标记的AFP抗体。

5. 权利要求4所述的基于荧光共振能量转移的AFP检测法,其特征在于,探针1和探针2所标记的AFP抗体为配对抗体。

6. 权利要求1所述的基于荧光共振能量转移的AFP检测法,其特征在于,探针1-AFP-探针2荧光共振能量转移体系为:

样本(标准品或待测样本)	2 μ L
0.05mg/mL探针1	20 μ L
0.05mg/mL探针2	10 μ L
PBS缓冲液	50 μ L
ddH ₂ O补足至	100 μ L。

7. 权利要求6所述的基于荧光共振能量转移的AFP检测法,其特征在于,荧光共振能量体系检测AFP的工作曲线步骤为:先将不同浓度标准品样本分别与探针1、PBS缓冲液接触混匀后,分别加入探针2,超纯水定容到100 μ L;然后常温旋转30~60 min后,将该体系置于多功能酶标仪上检测荧光强度;记录混合液在探针2最大发射波长(580 nm或600 nm处)的荧光强度,存在AFP时F,不存在AFP时F₀,以(F-F₀)对AFP浓度绘制标准曲线。

8. 权利要求7所述的基于荧光共振能量转移的AFP检测法,其特征在于,待测样品检测方法是通过探针1-AFP-探针2荧光共振能量转移体系检测待测样本的荧光信号,将待测样品的荧光信号变化值代入AFP标准曲线,得出待测样品中AFP的含量。

基于荧光共振能量转移的AFP检测法

技术领域

[0001] 本发明公开了一种基于荧光共振能量转移的AFP检测法,属于纳米免疫分析技术领域。

背景技术

[0002] 荧光共振能量转移(FRET)是指在两个不同的荧光基团中,若一个荧光基团(供体Donor)的发射光谱与另一个基团(受体Acceptor)的吸收光谱有一定的重叠,两个荧光基团间的距离合适时(一般小于10 nm),即可观察到荧光能量由供体向受体转移的现象。

[0003] 量子点(QDs)是直径约为2~20nm,能够接受激发光产生荧光的半导体纳米颗粒。传统的FRET研究的主要集中于有机荧光分子,作为一种新型FRET试剂,QDs具有许多有机荧光分子不具备的优点,如有可调谐的激发波、抗漂白性、多个染料分子同时连接、狭窄的发射波长和远离发射峰激发等优良的光学性质。因此,QDs可以成为比有机荧光分子更好的FRET的供体或受体。

[0004] 荧光能量转移体系发光强度大,灵敏度高,方法简单。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种基于荧光共振能量转移的AFP检测法,利用荧光配对染料之间荧光共振能量转移快速均相检测广谱肿瘤标记物AFP。该方法可以在均相中实现对AFP的检测,且对AFP的检测具有灵敏度高和选择性好的特点。

[0006] 本发明采用以下技术方案:

一种基于荧光共振能量转移的AFP检测法,包括以下步骤:

一、探针1和探针2的制备

A、CdS的制备

在合成过程保持搅拌状态的体系中,将0.1 mol/L的CdCl₂溶液2~8 mL注入到100 mL去离子水中,加入0.2~2.0 mmol的巯基乙酸作为修饰剂,2~5min后用1 mol/L的氢氧化钠溶液调节体系pH值至9~11,溶液体系呈无色透明,随后加入0.5~4 mL浓度为0.1 mol/L的Na₂S水溶液,即得CdS量子点(其激发波长364 nm,发射波长530 nm)。

[0007] B、取CdS量子点分别用0.05 M的MES缓冲溶液稀释后,加入EDC和NHS(QDs: EDC的摩尔比为1:50~1:200;EDC: NHS的摩尔比为1:1~1:5),涡旋振荡均匀,室温活化15~60 min;将活化的量子点用30 KD超滤管在8000 r/min,4℃条件下离心10 min,超滤纯化后,加入PBS7.4稀释,加入相对应单克隆AFP抗体溶液(QDs和抗体的摩尔比为1:1~10:1),4℃反应过夜,即得探针1。

[0008] C、取荧光物质(罗丹明B或红色荧光微球)分别用0.05 M的MES缓冲溶液稀释后,加入EDC和NHS(荧光物质: EDC的质量比为1:50~1:200;EDC:NHS的摩尔比为1:1~1:5),涡旋振荡均匀,室温活化15~60 min;将活化的荧光物质用30KD超滤管在8000 r/min,4℃条件下离心10 min,超滤纯化后,加入PBS7.4稀释,加入相对应单克隆AFP抗体溶液(荧光物质和

抗体的质量比为100:1~10:1),4℃反应过夜,即得探针2。

[0009] 其中,罗丹明激发波长525-550nm,发射波长580 nm;红色荧光微球激发波长520~535 nm,发射波长600 nm。罗丹明B购于sigma;红色荧光微球购于苏州为度生物。

[0010] 二、探针1-AFP-探针2荧光共振能量转移体系制备

探针1-AFP-探针2荧光共振能量转移体系为:

样本(标准品或待测样本)	2 μL
0.05mg/ml探针1	20 μL
0.05mg/ml探针2	10 μL
PBS7.4缓冲液	50 μL
ddH ₂ O补足至100u1。	

[0011] 三、AFP工作曲线

先将浓度为0.075~30 ng/mL的不同浓度的标准品样本分别与探针1、PBS缓冲液接触混匀后,分别加入探针2,超纯水定容到100 μL。然后常温旋转30~60 min后,将该体系置于多功能酶标仪上检测荧光强度。记录混合液在探针2最大发射波长(580 nm或600 nm处)的荧光强度,存在AFP时F,不存在AFP时F₀,以(F-F₀)对AFP浓度绘制标准曲线。

[0012] 通过探针1-AFP-探针2荧光共振能量转移体系检测待测样本的荧光信号,将待测样品的荧光信号值代入AFP标准曲线,得出待测样品中AFP的含量。

[0013] 该方法操作简单,不需要对杂交体系中未连接的抗体进行分离,实现均相检测;由于罗丹明B、红色荧光微球在364 nm光激发下不会直接产生荧光信号,因此背景干扰小,信号强。该方法还具有特异、快速、高选择性和高通量的特点,可用于临床医学中肿瘤的广谱筛查。

附图说明

[0014] 图1 为探针1浓度对FRET体系的影响。

[0015] 图2 为探针2浓度对FRET体系的影响。

[0016] 图3 为不同缓冲液对体系荧光转化率的影响。

[0017] 图4为不同体系的AFP(0,0.075,0.375,3.75,7.5,15,30)对FRET体系荧光强度的影响。

[0018] 图5为 AFP的标准曲线图,以(F-F₀)与AFP的浓度建立标准曲线。

具体实施方式

[0019] 实施例1 荧光共振转移体系设计

1、探针1浓度对体系的影响

将浓度为3.75 ng/mL的AFP样本与1,5,10,15,20 μL浓度为0.05mg/mL探针1、50 μL PBS7.4缓冲液接触混匀后,分别加入10 μL浓度为0.05 mg/mL探针2,超纯水定容到100 μL,然后常温旋转3060 min后,最后将该体系置于多功能酶标仪上检测荧光强度。记录混合液在探针2最大发射波长(580 nm或600 nm处)的荧光强度,结果表明固定探针2浓度不变,逐渐增加探针1的浓度,得到体系荧光光谱。如图1,随着探针1浓度的增加,探针2的荧光逐渐增强。

[0020] 2、探针2浓度对体系的影响

将浓度为3.75ng/mL的AFP样本与20 μ L浓度为0.05 mg/ml探针1、50 μ L PBS7.4缓冲液接触混匀后,分别加入2,4,6,8,10 μ L浓度为0.05 mg/mL探针2,超纯水定容到100 μ L,然后常温旋转30~60 min后,最后将该体系置于多功能酶标仪上检测荧光强度。记录混合液在探针2最大发射波长(580 nm或600 nm处)的荧光强度,结果表明固定探针1浓度不变,逐渐增加RhB的浓度,得到体系荧光光谱。如图2,随着探针2浓度的增加,探针1的荧光淬灭。进一步说明CdS-RhB发生了有效的能量转移。

[0021] 3、不同缓冲液对体系的影响

将浓度为3.75 ng/mL的AFP样本、20 μ L浓度为0.05mg/mL探针1分别与50 μ L MEA、PBS7.4、Tris-HCl缓冲液接触混匀后,分别加入10 μ L浓度为0.05 mg/mL探针2,超纯水定容到100 μ L,然后常温旋转30~60 min后,最后将该体系置于多功能酶标仪上检测荧光强度。记录混合液在探针2最大发射波长(580 nm或600 nm处)的荧光强度,结果表明PBS7.4缓冲液对体系反应最佳。见图3。

[0022] 根据实验结果,将探针1-AFP-探针2荧光共振能量转移体系为:

样本(标准品或待测样本)	2 μ L
0.05mg/mL探针1	20 μ L
0.05mg/mL探针2	10 μ L
PBS缓冲液	50 μ L
ddH ₂ O补足至100 μ L。	

[0023]

实施例2 均相检测AFP的免疫荧光法

以CdS和RhB为配对染料,分别标记CEA配对抗体,制备探针1和探针2,用于AFP检测。

[0024] 一种基于荧光共振能量转移的AFP检测法,包括以下步骤:

一、探针1和探针2的制备

A、CdS的制备

在合成过程保持搅拌状态的体系中,将0.1mol/L的CdCl₂溶液5 mL注入到100 mL去离子水中,加入1.0 mmol的巯基乙酸作为修饰剂,2~5 min后用1 mol/L的氢氧化钠溶液调节体系pH值至9~11,溶液体系呈无色透明,随后加入1 mL浓度为0.1 mol/L的Na₂S水溶液,即得CdS量子点(其激发波长364 nm,发射波长530 nm)。

[0025] B、取CdS量子点分别用0.05M的MES缓冲溶液稀释后,加入EDC和NHS(QDs: EDC的摩尔比为1:50~1:200;EDC: NHS的摩尔比为1:1~1:5),涡旋振荡均匀,室温活化15~60 min;将活化的量子点用30KD超滤管在8000 r/min,4℃条件下离心10 min,超滤纯化后,加入PBS7.4稀释,加入相对应单克隆AFP抗体溶液(QDs和抗体的摩尔比为1:1~10:1),4℃反应过夜,即得探针1。

[0026] C、取罗丹明B分别用0.05M的MES缓冲溶液稀释后,加入EDC和NHS(罗丹明B: EDC的质量比为1:50~1:200;EDC:NHS的摩尔比为1:1~1:5),涡旋振荡均匀,室温活化15~60 min;将活化的罗丹明B用30KD超滤管在8000 r/min,4℃条件下离心10 min,超滤纯化后,加入PBS7.4稀释,加入相对应单克隆AFP抗体溶液(罗丹明B和抗体的质量比为100:1~10:1),4℃反应过夜,即得探针2。

[0027] 其中,罗丹明激发波长525~550 nm,发射波长580 nm。

[0028] 二、AFP标准曲线

先将浓度为0.075~30 ng/mL的不同浓度的标准品样本各2 μ L分别与20 μ L浓度为0.05mg/mL探针1、50 μ L PBS7.4缓冲液接触混匀后,分别加入10 μ L浓度为0.05 mg/mL探针2,超纯水定容到100 μ L,然后常温旋转30~60 min后,最后将该体系置于多功能酶标仪上检测荧光强度。记录混合液在探针2最大发射波长(580nm或600nm处)的荧光强度,存在AFP时F,不存在AFP时 F_0 ,以 $(F-F_0)$ 对AFP浓度绘制标准曲线(见图4、图5)。

[0029] 通过探针1-AFP-探针2荧光共振能量转移体系检测待测样本的荧光信号,将待测样品的荧光信号值代入AFP标准曲线,得出待测样品中AFP的含量。

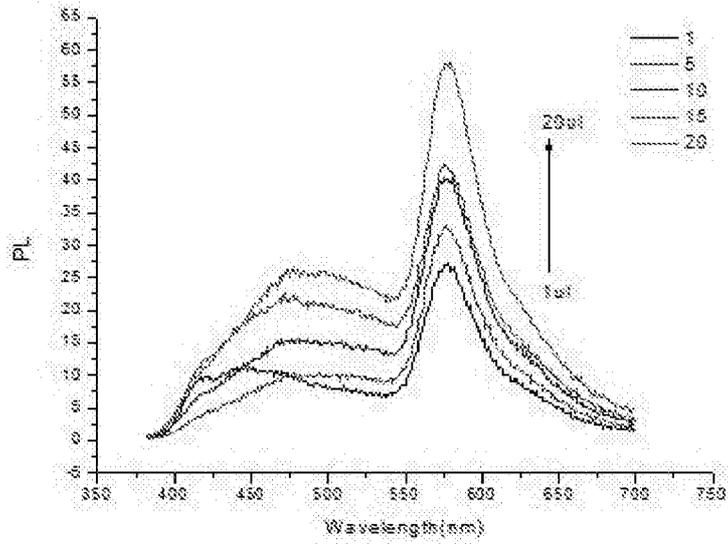


图1

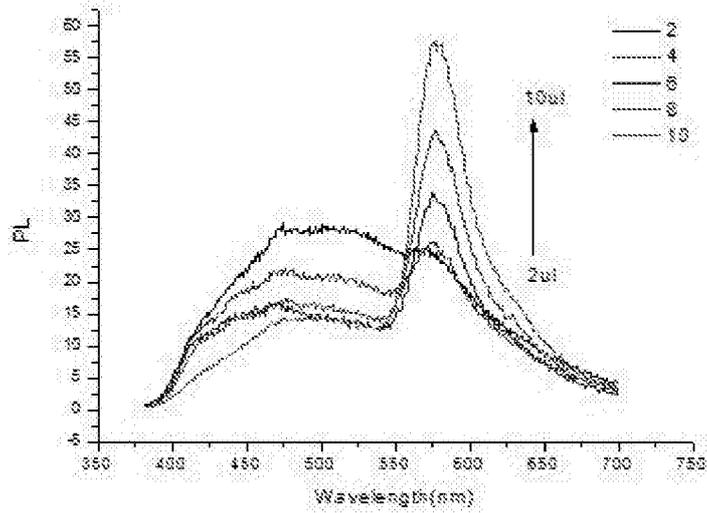


图2

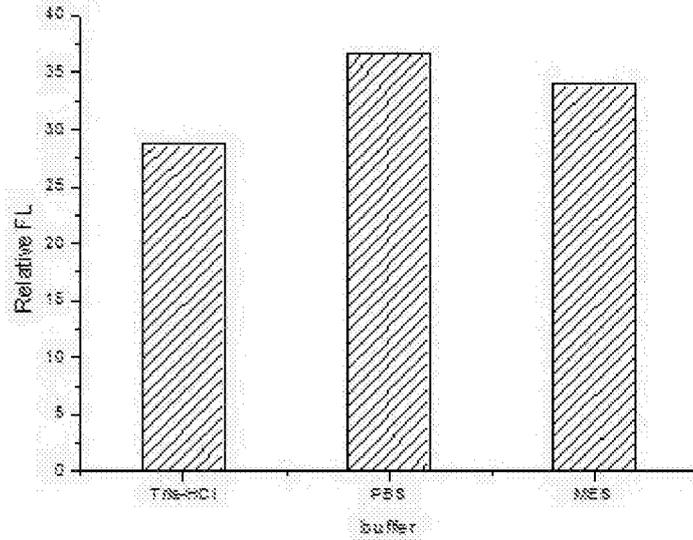


图3

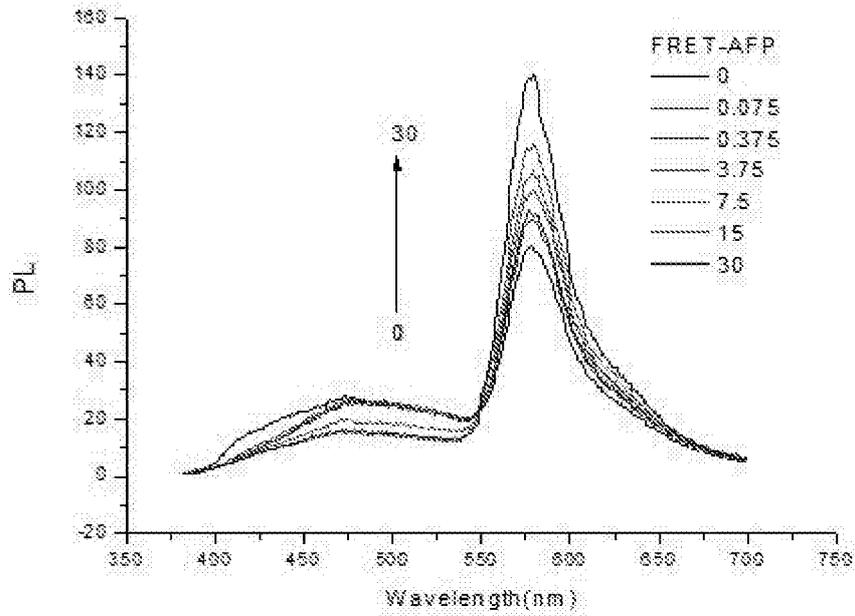


图4

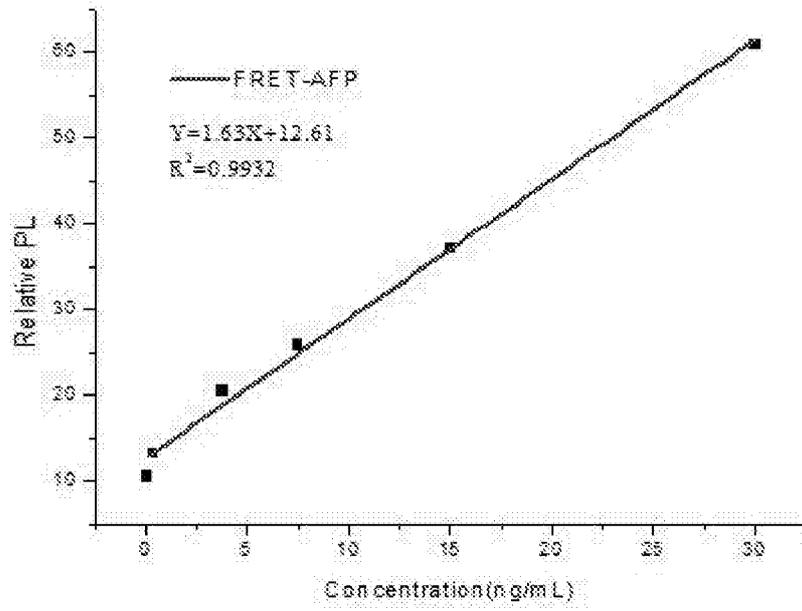


图5

专利名称(译)	基于荧光共振能量转移的AFP检测法		
公开(公告)号	CN107238709A	公开(公告)日	2017-10-10
申请号	CN2017110399835.2	申请日	2017-05-31
[标]申请(专利权)人(译)	重庆高圣生物医药有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	重庆高圣生物医药有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	重庆高圣生物医药有限责任公司		
[标]发明人	周勇 吴秀兰		
发明人	周勇 吴秀兰		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/57484 G01N21/6428 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于荧光共振能量转移的AFP检测法，属于纳米免疫分析技术领域。主要利用量子点与染料之间的荧光共振能量转移检测AFP，包括以下步骤：CdS量子点、罗丹明B或红色荧光微球分别标记AFP配对抗体，即探针1和探针2的制备；探针1-AFP-探针2荧光共振能量转移体系制备；AFP工作曲线绘制；样本中AFP的检测。该方法具有操作简单、快速、灵敏、高选择性等特点，可应用于临床医学中肿瘤标记物的检测。

