



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101706500 A

(43) 申请公布日 2010.05.12

(21) 申请号 200910236972.X

(22) 申请日 2009.11.06

(71) 申请人 中国科学院生态环境研究中心
地址 100085 北京市海淀区双清路 18 号

(72) 发明人 汪海林 王智鑫 吕美玲

(51) Int. Cl.
G01N 33/533 (2006.01)

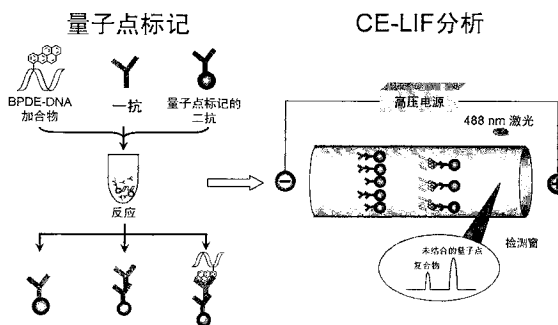
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 4 页

(54) 发明名称

量子点增强的高灵敏 DNA 加合物分析方法

(57) 摘要

本发明涉及一种量子点增强的高灵敏 DNA 加合物分析方法：采用量子点标记的抗体作为荧光探针并与免疫毛细管电泳-激光诱导荧光检测技术相结合，发展了高灵敏的 DNA 加合物分析方法。本发明利用免疫毛细管电泳-激光诱导荧光检测技术，对量子点标记的抗体与 DNA 加合物形成的复合物进行分离和检测，以确定样品中 DNA 加合物的含量。其具有检测灵敏度高、DNA 用量少、分析速度快、特异性强等优点，因此，该方法不仅可以对环境污染暴露下生物体内锁产生的痕量 DNA 加合物进行定量检测，也可应用于低水平暴露下 DNA 损伤的形成与修复机理研究，以及评估潜在环境致癌物的生态风险和对人类的健康危害。



1. 一种量子点增强的高灵敏 DNA 加合物分析方法,其特征在于采用量子点标记的抗体作为荧光探针和免疫毛细管电泳-激光诱导荧光检测技术,从而发展了高灵敏的 DNA 加合物分析方法。

2. 基于权利要求 1 所述,其检测依次包括以下步骤:1) 待测 DNA 样品与特异性抗体混合,使 DNA 加合物与量子点标记的抗体结合形成复合物;2) 毛细管电泳将 DNA 加合物-抗体复合物与游离的抗体进行分离;3) 激光诱导荧光技术检测 DNA 加合物-抗体复合物,并对 DNA 加合物定量分析。

3. 基于权利要求 1、2 所述的方法,其特征在于:量子点标记的抗体可以是直接量子点标记的一抗,也可以是一抗与量子点标记的二抗的混合物。

4. 基于权利要求 1、2 所述的方法,其特征在于:可选用不同发射波长的量子点,如 525nm、585nm、605nm、625nm、655nm 等。

5. 基于权利要求 1、2 所述的方法,其特征在于:可选用不同组成的量子点,如 CdSe、CdTe、ZnSe、InP、InAs 等。

6. 基于权利要求 1、2 所述的方法,其特征在于:本发明可应用于检测不同来源的 DNA 样品,其中包括:人和动物各种组织(如血液、口腔表皮、心、肺、肝、肾、膀胱、消化道、脑、脊髓液和精液等),各种细菌(革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌)及细胞。

7. 基于权利要求 1、2 所述的方法,其特征在于:本发明可应用于检测多种化学物质(如烷化剂、多环芳烃、苯乙烯氧化物、醌类、醛类、抗肿瘤药物、黄曲酶素、N-亚硝基化合物、杂环芳香胺和丙烯酰胺等)与 DNA 作用形成的加合物,以及 DNA 氧化损伤、碱基交联等其他 DNA 损伤形式。

8. 基于权利要求 1、2、3、4、5、6 和 7 所述的方法,其特征在于:本发明不仅可以对 DNA 加合物进行定量检测,还可应用于低水平暴露下 DNA 损伤的形成与修复机理研究、分子流行病学研究,以及阐明和评估潜在环境致癌物的生态风险和健康危害。

量子点增强的高灵敏 DNA 加合物分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种采用量子点标记的抗体作为荧光探针,发展了基于免疫毛细管电泳-激光诱导荧光检测技术的高灵敏 DNA 加合物分析方法。

背景技术

[0002] 量子点是一种由 II-VI 族或者 III-V 族元素组成的半导体纳米晶体(如 CdSe、CdTe、ZnSe、InP、InAs 等)。与传统的有机荧光染料相比,量子点作为一种新型的荧光探针具有许多优良的光学性能:发射波长窄且对称、吸收波长宽且连续、摩尔吸光系数大、量子产率高、荧光寿命长和抗光漂白性能强,还具备很好的生物相容性。因此,量子点已在生物、化学等领域显示了极其广阔的应用前景。

[0003] DNA 加合物是指外源性或内源性的亲电性化合物与 DNA 大分子上的亲核位点形成的共价结合物,是 DNA 损伤的最重要和最普遍的形式之一。DNA 加合物一旦不能被修复或被错误修复,就有可能造成基因突变,从而引发癌症。因此, DNA 加合物作为一种重要的生物标志物,对于开展环境致癌物的暴露检测、致癌机理研究以及健康风险评价都有着十分重要的意义。通常人体内形成的 DNA 加合物水平很低(每 $10^8 \sim 10^9$ 个正常碱基中含有 1 个加合物),因此, DNA 加合物检测的灵敏度问题一直是制约相关研究开展的一个瓶颈。现有的 DNA 加合物检测方法存在灵敏度不高、DNA 用量大、操作繁琐、耗时耗力等缺点,较少地应用于环境生物样品中 DNA 加合物的检测。

[0004] 本发明以高荧光强度的量子点标记的抗体作为荧光探针,发展了免疫毛细管电泳-激光诱导荧光检测技术用于检测环境暴露下产生的痕量 DNA 加合物。该方法在具有灵敏度高和 DNA 样品用量少的同时,还结合了毛细管电泳的高效、快速分离和免疫学方法的高特异性的特点。量子点增强的高灵敏 DNA 加合物分析方法,不仅可以对 DNA 加合物进行定量检测,还为开展低水平暴露下 DNA 损伤的形成与修复机理研究,以及阐明和评估潜在环境致癌物的生态风险和健康危害提供了重要的分析测试手段。

发明内容

[0005] 本发明涉及一种量子点增强的高灵敏 DNA 加合物分析方法,该方法以量子点标记的抗体作为荧光探针,并与高效、快速的毛细管电泳,高灵敏的激光诱导荧光检测,高特异性的免疫学方法相结合,应用于环境污染物暴露所产生的痕量 DNA 加合物的检测分析。

[0006] 本发明涉及的高灵敏的 DNA 加合物检测方法原理如图 1 所示,该分析方法主要包括以下三个具体步骤:

[0007] 1) 将待测的 DNA 样品与特异性的抗 DNA 加合物抗体混合。该抗体可以是直接量子点荧光标记的一抗,或是一抗与量子点荧光标记的二抗的混合物。

[0008] 2) 采用高效的毛细管电泳分离手段,将 DNA 加合物-抗体免疫复合物与未结合 DNA 加合物的抗体有效地分离开。

[0009] 3) 在毛细管电泳分离的同时,采用高灵敏的柱上激光诱导荧光技术检测 DNA 加合

物-抗体免疫复合物的荧光信号并进行定量分析,最终确定待测 DNA 中加合物的含量。

[0010] 采用免疫毛细管电泳-激光诱导荧光分析技术进行量子点增强的 DNA 加合物的检测方法为:待测 DNA 样品与抗体(直接量子点标记的一抗,或是一抗与量子点标记的二抗的混合物)混合反应,然后将反应液以气动或电动方式进样,由于在毛细管中的电泳迁移速度不同, DNA 加合物-抗体复合物与游离的抗体可以有效的分离。量子点标记的免疫复合物经过毛细管柱上检测窗口时被激发光激发,产生的荧光信号经过荧光检测系统,消除激发光及杂散光的干扰,最终由光电倍增管(PMT)或电荷耦合数字成像器件(CCD)等荧光探测元器件将光信号转换为电信号,并传输到色谱工作站中进行记录和处理,得到毛细管电泳图。在数据分析和处理时,通过对毛细管电泳图中 DNA 加合物-抗体复合物的峰面积的积分,可以确定待测 DNA 样品中 DNA 加合物含量。

[0011] 本发明中采用的荧光标记为量子点,可选用不同发射波长(如 525nm、585nm、605nm、625nm、655nm 等)的量子点,而且不同发射波长的量子点可以使用同一激发波长所激发。

[0012] 本发明中采用的荧光标记为量子点,可选用不同组成的量子点,如 CdSe、CdTe、ZnSe、InP、InAs 等。

[0013] 本发明采用特异性的抗体可用于识别和检测多种类型的 DNA 加合物:如烷化剂、多环芳烃、苯乙烯氧化物、醌类、醛类、抗肿瘤药物、黄曲霉素、N-亚硝基化合物、杂环芳香胺和丙烯酰胺等化学物质与 DNA 作用形成的加合物,以及 DNA 氧化损伤、碱基交联等其他 DNA 损伤形式。

[0014] 本发明可用于检测不同来源的 DNA 样品,其中包括:人和动物各种组织(如血液、口腔表皮、心、肺、肝、肾、膀胱、消化道、脑、脊髓液和精液等),各种细菌(革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌)以及细胞线。

[0015] 本发明所涉及的量子点增强的高灵敏 DNA 加合物检测方法,具有检测灵敏度高、DNA 用量少、分析速度快、特异性强等优点,克服了传统 DNA 加合物检测方法中操作繁琐、DNA 用量大、检测时间长等缺陷,具有十分广泛的应用前景。

附图说明

[0016] 图 1 为量子点增强的免疫毛细管电泳-激光诱导荧光分析技术检测 DNA 加合物的原理图;

[0017] 图 2 为量子点增强的免疫毛细管电泳-激光诱导荧光分析技术对 BPDE-DNA 加合物标准品分析的毛细管电泳图;

[0018] 图 3 为 BPDE-DNA 加合物与复合物荧光信号的线性关系;

[0019] 图 4 为 A549 细胞经 0.1nM BPDE 暴露后基因组 DNA 中 BPDE-DNA 加合物检测的毛细管电泳图;

[0020] 图 5 为 A549 细胞经 1nM B(a)P 暴露后基因组 DNA 中 BPDE-DNA 加合物检测的毛细管电泳图;

[0021] 图 6 为 A549 细胞经不同浓度 BPDE 和 B(a)P 暴露后基因组 DNA 中 BPDE-DNA 加合物检测结果;

[0022] 图 7 为 A549 细胞经不同剂量的香烟烟气提取物暴露后基因组 DNA 中 BPDE-DNA 加

合物检测的毛细管电泳图。

具体实施方式

[0023] 本发明的具体实施方式包括以下几个步骤：

[0024] 1) 待测 DNA 与抗体混合反应

[0025] 从所需要检测的人或动物的血液、组织样品中,提取出待分析 DNA 样品,尽量减少 DNA 样品中蛋白质和 RNA 的干扰。待测 DNA 样品与量子点荧光标记的抗 DNA 加合物的抗体混合,使 DNA 加合物与量子点标记的抗体形成 DNA 加合物-抗体免疫复合物。该抗体可以是直接量子点荧光标记的一抗,或是特异性抗 DNA 加合物的一抗与量子点荧光标记的二抗的混合物。

[0026] 2) 毛细管电泳分离 DNA 加合物-抗体复合物与游离的抗体

[0027] 反应混合物可采用气动或电动进样方式进入毛细管中,通过毛细管电泳-激光诱导荧光装置进行毛细管电泳分离。DNA 与抗体反应混合物中包含有:DNA 加合物-抗体复合物、游离的抗体和正常的 DNA 分子。该反应混合物中的不同物质,由于其自身的质量/电荷比不同,在毛细管中的电泳迁移速率不一样,因此在电泳缓冲液中可以有效地得到分离。

[0028] 3) 柱上激光诱导荧光技术检测及定量分析

[0029] 量子点标记的 DNA 加合物-抗体免疫复合物和游离的抗体经过毛细管柱上检测窗口时被激发光激发,产生的荧光信号经过荧光检测系统,最终传输到色谱工作站中进行记录和处理,得到毛细管电泳图。在毛细管电泳图中,可以得到游离的抗体和 DNA 加合物-抗体复合物两个信号峰。而正常 DNA 分子上没有 DNA 加合物,不能被特异性抗体所识别,因此也没有标记上量子点,不能产生荧光信号。在数据分析和处理时,通过对电泳图中复合物峰的峰面积进行积分,可以确定待测 DNA 样品中 DNA 加合物含量。

[0030] 实施例 1、量子点增强的免疫毛细管电泳-激光诱导荧光分析技术对 BPDE-DNA 加合物标准品的检测分析。

[0031] 本实施例中以 BPDE-DNA 加合物为分析目标。BPDE-DNA 加合物是由高致癌性的环境污染物苯并(a)芘(B(a)P)在体内活化的最终代谢产物邻二醇环氧苯并(a)芘(BPDE)与 DNA 共价结合所形成的。所采用的一抗为鼠来源的抗 BPDE-dG 加合物的单克隆抗体,可特异性识别单链 DNA 中的 BPDE-dG 加合物并与之结合;二抗为以量子点 Qdot 625 标记的抗鼠 IgG。

[0032] 待测 DNA 样品经过 95℃加热 10 分钟,使双链 DNA 变性为单链,在冰上放置 10 分钟以防止单链 DNA 复性。将淬灭后的 DNA 样品与一抗和量子点标记的二抗混合,在室温反应 30 分钟使 DNA 加合物与抗体结合形成复合物。其中一抗和二抗浓度分别为 1.5nM 和 5nM。

[0033] 毛细管电泳实验条件为:反应混合物通过在毛细管电泳-激光诱导荧光装置中进行分离检测,激光波长为 488nm,检测波长为 625nm。本实例采用聚丙烯酰胺涂层的方形熔融石英毛细管,内径为 50 μm,外径为 365 μm,有效长度 20cm,总长 26cm。电泳缓冲液为 1×TG(Tris30mM,甘氨酸 160mM, pH = 8.5),样品缓冲液为 2×TA(Tris 20mM,醋酸 4mM, pH = 7.8)。反应混合物采用电动进样方式进入毛细管中,进样电压和时间分别为 -20kV、10s。电泳分离电压为 -20kV。

[0034] 附图 2 为不同浓度的 BPDE-DNA 加合物与抗体反应混合物的毛细管电泳谱图,其中

峰 1 为 BPDE-DNA 加合物 - 量子点标记的抗体复合物峰, 峰 2 为过量的游离抗体的峰 (包括一抗与量子点标记二抗的复合物和二抗)。本发明采用高荧光强度的量子点作为荧光标记, 并且与高效分离和高灵敏检测的毛细管电泳 - 激光诱导荧光分析技术相结合, 该方法应用于痕量 BPDE-DNA 加合物的检测 ($2.8 \times 10^{-13} \sim 2.0 \times 10^{-11} \text{mol/L}$) 中, 得到了很好的线性相关性 ($R = 0.997, n = 5$, 如附图 3 所示)。该方法的浓度检测灵敏度可以达到 $1.2 \times 10^{-13} \text{mol/L}$, 质量检测灵敏度可以达到 $6.6 \times 10^{-21} \text{mol}$, 体现了本发明高灵敏检测的特点。

[0035] 实施例 2、量子点增强的免疫毛细管电泳 - 激光诱导荧光分析技术对 A549 细胞经不同浓度 BPDE 暴露后 A549 细胞基因组 DNA 中 BPDE-DNA 加合物的检测分析。

[0036] 不同浓度的 BPDE 对 A549 细胞暴露 2 小时后, 提取其基因组 DNA, 作为待测样品。取 $100 \mu\text{g/mL}$ 的细胞基因组 DNA 经淬火后变性为单链 DNA, 与一抗和量子点标记的二抗混合反应, 按实施例 1 中所述条件进行免疫毛细管电泳 - 激光诱导荧光分析。附图 4 为对 0.1nM BPDE 暴露后 A549 细胞基因组 DNA 中 BPDE-DNA 加合物检测的毛细管电泳谱图, 其中峰 1 为 BPDE-DNA 加合物 - 量子点标记的抗体复合物峰, 峰 2 为过量的游离抗体的峰 (包括一抗与量子点标记二抗的复合物和二抗)。与对照谱图比较可以看出, 经过 0.1nM BPDE 处理后 A549 细胞基因组 DNA 中有明显的 BPDE-DNA 加合物 - 抗体复合物峰生成, 加合物含量为 7.8 ± 0.8 每 10^9 个正常核苷酸。说明该方法具有较高的检测灵敏度, 可检测出痕量 BPDE 暴露后生成的 BPDE-DNA 加合物。附图 6 显示经 $0.1 \sim 10 \text{nM}$ BPDE 暴露后, A549 细胞基因组 DNA 中生成的 BPDE-DNA 加合物与暴露剂量呈线性关系 ($R = 0.99, n = 8$)。此外, 该检测方法所需 DNA 用量很少, 毛细管电泳一次进样量为 50nL , 只需消耗 5ng 的基因组 DNA, 与传统的 ^{32}P 后标记方法相比, 减少了 1000 倍。

[0037] 实施例 3、量子点增强的免疫毛细管电泳 - 激光诱导荧光分析技术对 A549 细胞经不同浓度 B(a)P 暴露后 A549 细胞基因组 DNA 中 BPDE-DNA 加合物的检测分析。

[0038] 不同浓度的 B(a)P 对 A549 细胞暴露 16 小时后, 提取其基因组 DNA, 作为待测样品。取 $100 \mu\text{g/mL}$ 的细胞基因组 DNA 经淬火后变性为单链 DNA, 与一抗和量子点标记的二抗混合反应, 按实施例 1 中所述条件进行免疫毛细管电泳 - 激光诱导荧光分析。附图 5 为对 1nM B(a)P 暴露后 A549 细胞基因组 DNA 中 BPDE-DNA 加合物检测的毛细管电泳 - 激光诱导荧光分析谱图, 其中峰 1 为 BPDE-DNA 加合物 - 量子点标记的抗体复合物峰, 峰 2 为过量的游离抗体的峰 (包括一抗与量子点标记二抗的复合物和二抗)。与对照谱图比较可以看出, 经过 1nM B(a)P 处理后 A549 细胞基因组 DNA 中有明显的 BPDE-DNA 加合物 - 抗体复合物峰生成, 加合物含量为 8.3 ± 1.5 每 10^9 个正常核苷酸。说明该方法具有较高的检测灵敏度, 可检测出痕量 BPDE 暴露后生成的 BPDE-DNA 加合物。附图 6 显示经 $1 \sim 50 \text{nM}$ B(a)P 暴露后, A549 细胞基因组 DNA 中生成的 BPDE-DNA 加合物与暴露剂量有相关性, 但在较高暴露剂量时, 加合物生成达到一个平台。一次毛细管电泳分析只需消耗 5ng 的 DNA 样品。

[0039] 实施例 4、量子点增强的免疫毛细管电泳 - 激光诱导荧光分析技术对 A549 细胞经不同剂量的香烟烟气提取物暴露后 A549 细胞基因组 DNA 中 BPDE-DNA 加合物的检测分析。

[0040] 不同剂量的香烟烟气提取物对 A549 细胞暴露 16 小时后, 提取其基因组 DNA, 作为待测样品。取 $100 \mu\text{g/mL}$ 的细胞基因组 DNA 经淬火后变性为单链 DNA, 与一抗和量子点标记的二抗混合反应, 按实施例 1 中所述条件进行毛细管电泳 - 激光诱导荧光分析。附图 7 为对不同剂量的香烟烟气提取物暴露后 A549 细胞基因组 DNA 中 BPDE-DNA 加合物检测的毛

毛细管电泳谱图,其中峰 1 为 BPDE-DNA 加合物 - 量子点标记的抗体复合物峰,峰 2 为过量的游离抗体的峰(包括一抗与量子点标记二抗的复合物和二抗)。经 0、0.1、0.5 支香烟烟气暴露后, A549 细胞基因组 DNA 中生成的 BPDE-DNA 加合物含量分别为 4.8 ± 0.9 、 7.9 ± 0.5 、 21.9 ± 2.9 每 10^9 个正常核苷酸。一次毛细管电泳分析只需消耗 5ng 的 DNA 样品。

[0041] 以上实施实例充分表明,该方法可用于监测生物体在复杂基质的环境污染物暴露下所产生的 DNA 加合物,为开展环境污染物对生物体的健康风险评价以及环境致癌因素筛查等研究,提供了高灵敏的分析检测手段。

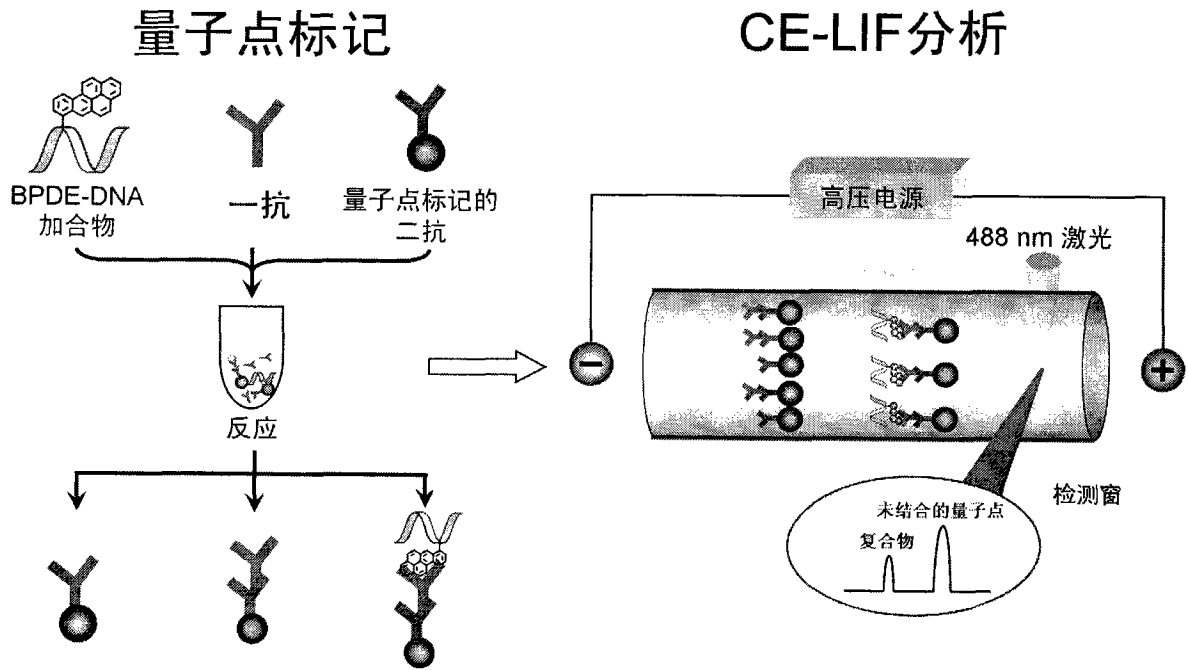


图 1

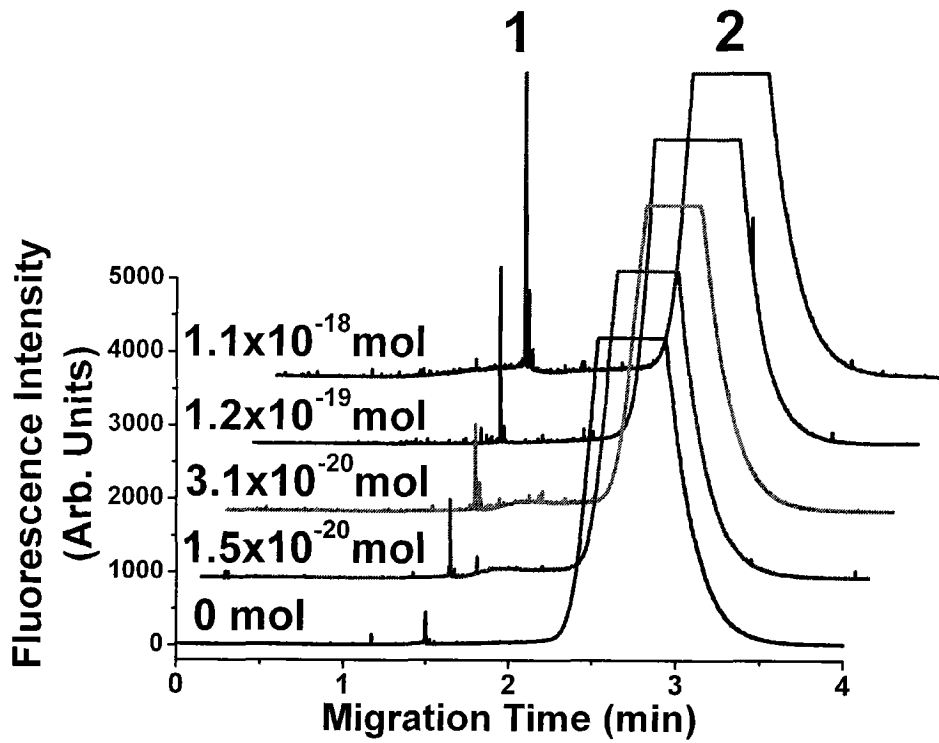


图 2

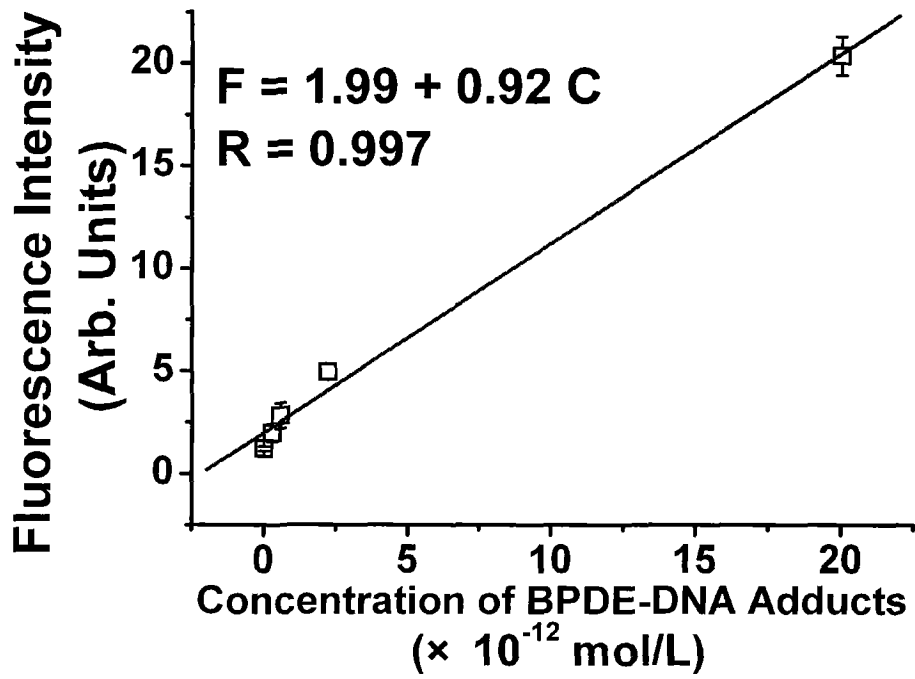


图 3

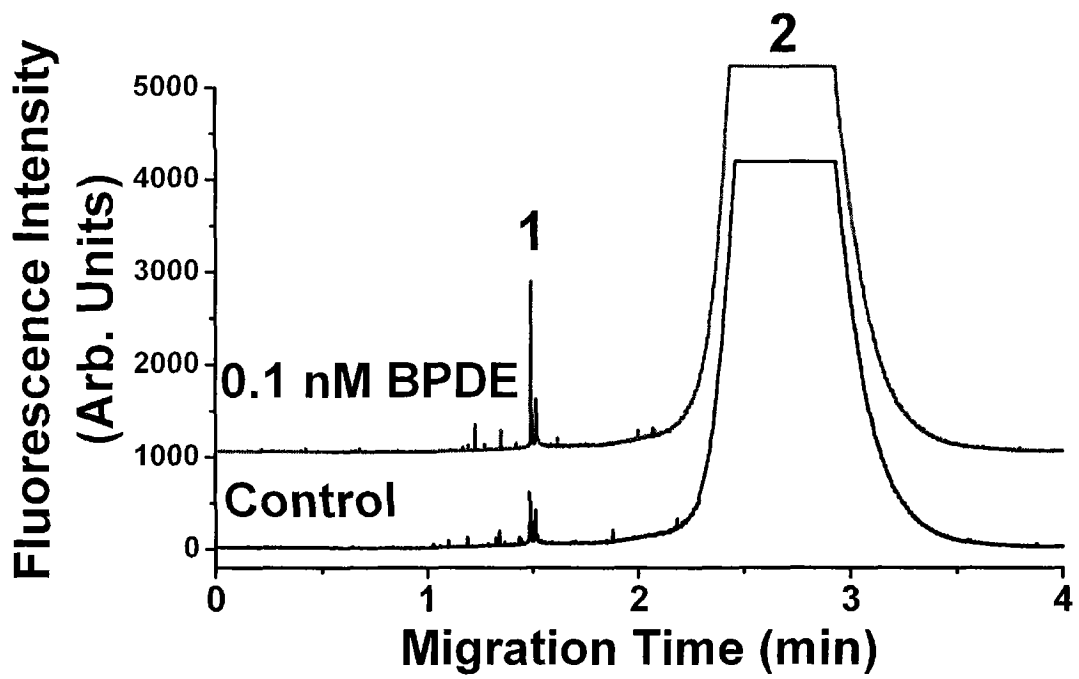


图 4

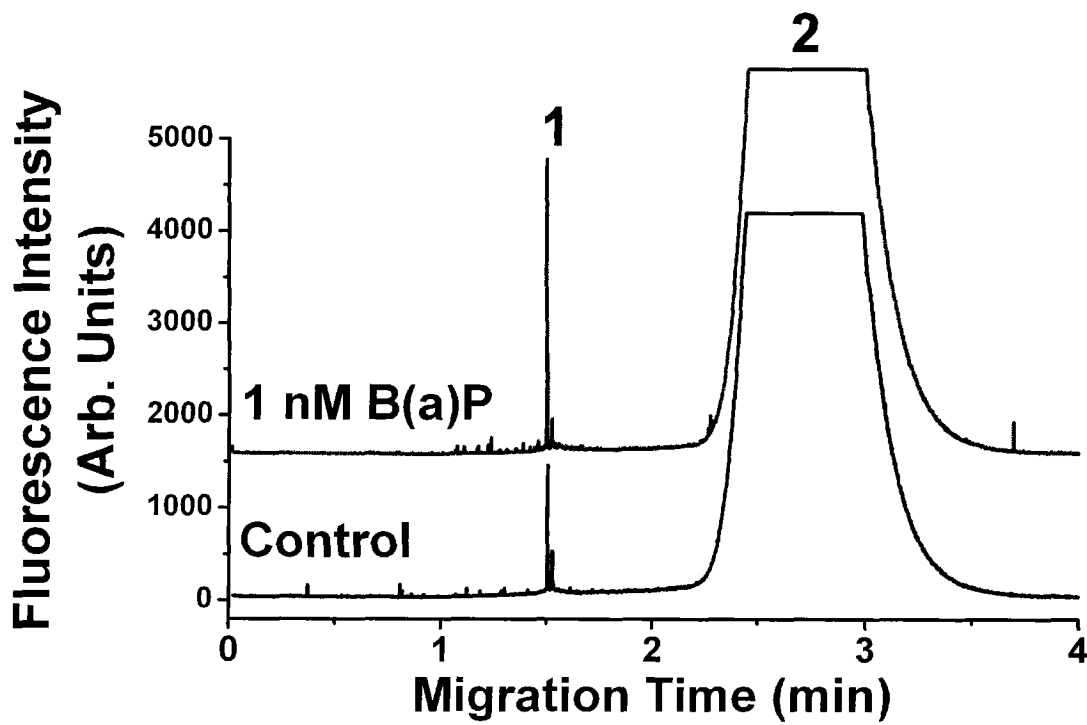


图 5

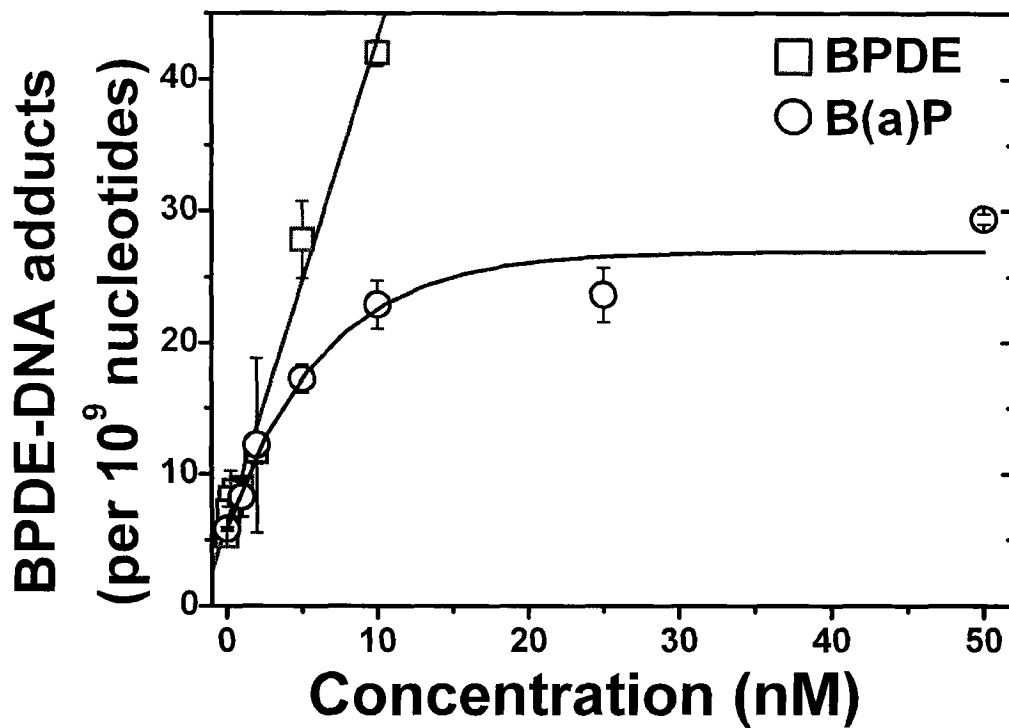


图 6

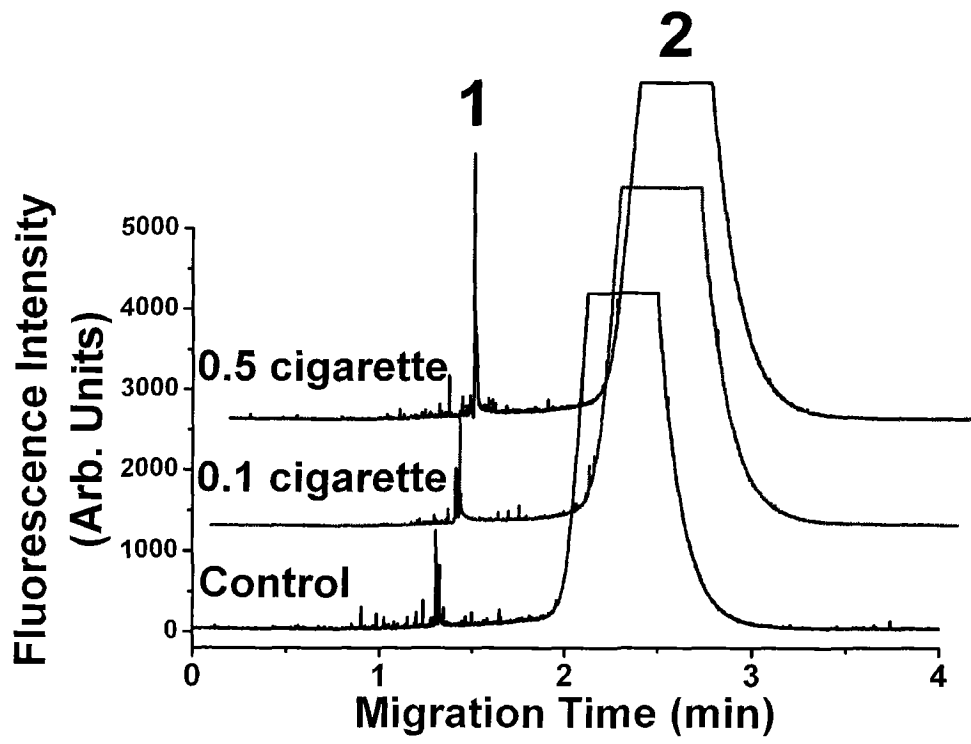


图 7

专利名称(译)	量子点增强的高灵敏DNA加合物分析方法		
公开(公告)号	CN101706500A	公开(公告)日	2010-05-12
申请号	CN200910236972.X	申请日	2009-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院生态环境研究中心		
申请(专利权)人(译)	中国科学院生态环境研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院生态环境研究中心		
[标]发明人	汪海林 王智鑫 吕美玲		
发明人	汪海林 王智鑫 吕美玲		
IPC分类号	G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种量子点增强的高灵敏DNA加合物分析方法：采用量子点标记的抗体作为荧光探针并与免疫毛细管电泳-激光诱导荧光检测技术相结合，发展了高灵敏的DNA加合物分析方法。本发明利用免疫毛细管电泳-激光诱导荧光检测技术，对量子点标记的抗体与DNA加合物形成的复合物进行分离和检测，以确定样品中DNA加合物的含量。其具有检测灵敏度高、DNA用量少、分析速度快、特异性强等优点，因此，该方法不仅可以对环境污染暴露下生物体内锁产生的痕量DNA加合物进行定量检测，也可应用于低水平暴露下DNA损伤的形成与修复机理研究，以及评估潜在环境致癌物的生态风险和对人类的健康危害。

