



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103940989 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 23

(21) 申请号 201410171532. 1

(22) 申请日 2014. 04. 25

(71) 申请人 山东大学

地址 250012 山东省济南市历下区文化西路
44 号

(72) 发明人 王磊 姜玮 代爽

(74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限
公司 37221

代理人 杨琪

(51) Int. Cl.

G01N 33/552(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

权利要求书2页 说明书8页

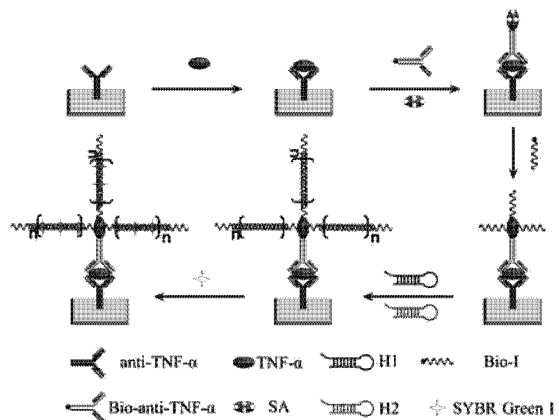
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器
及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器,由捕获抗体、检测抗体、链霉亲和素、生物素化的引物和发卡探针组成;其中,捕获抗体为 anti-TNF- α ;检测抗体为 Bio-anti-TNF- α ;生物素化的引物(Bio-I)的碱基序列为 5'-AGT CTA GGA TTC GGC GTG GGT TAA TTT TTT TTT-biotin-3';发卡探针由发卡探针 H1 和发卡探针 H2 组成,其中发卡探针 H1 的碱基序列为 5'-TTA ACC CAC GCC GAA TCC TAG ACT CAA AGT AGT CTA GGA TTC GGC GTG-3';发卡探针 H2 的碱基序列为 5'-AGT CTA GGA TTC GGC GTG GGT TAA CAC GCC GAA TCC TAG ACT ACT TTG-3'。本发明还公开了该免疫传感器的制备方法和在 TNF- α 检测中的应用。本发明的免疫传感器具有检测灵敏度高,样品使用量小,无需酶放大等优势,可实现对低浓度 TNF- α 的定量检测。



1. 一种基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器,其特征在于,由捕获抗体、检测抗体、链霉亲和素、生物素化的引物和发卡探针组成;

所述捕获抗体为 anti-TNF- α ;

所述检测抗体为 Bio-anti-TNF- α ;

所述生物素化的引物的碱基序列为 5'-AGT CTA GGA TTC GGC GTG GGT TAA TTT TTT TTT-biotin-3';

所述发卡探针由发卡探针 H1 和发卡探针 H2 组成,其中发卡探针 H1 的碱基序列为 5'-TTA ACC CAC GCC GAA TCC TAG ACT CAA AGT AGT CTA GGA TTC GGC GTG-3';

发卡探针 H2 的碱基序列为 5'-AGT CTA GGA TTC GGC GTG GGT TAA CAC GCC GAA TCC TAG ACT ACT TTG-3'。

2. 权利要求 1 所述的一种基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 夹心免疫反应过程的构建:将捕获抗体 anti-TNF- α 滴到硅烷化处理的玻璃基底上,在 37°C 的保湿条件下孵育 8-14h;加入封闭剂,在保湿条件下反应 3-8h,封闭暴露的位点,以减少非特异性吸附;再加入检测抗体 Bio-anti-TNF- α ,在 37°C 孵育 1-3h;在每一步反应之后,均用 PBS-T 和纯水冲洗多次,除去未结合的试剂;

(2) 基于杂交链反应的免疫传感器的构建:免疫杂交反应之后,向玻璃基底上加入链霉亲和素,孵育 1-3h;PBS-T 和纯水冲洗多次之后,加入 Bio-I,孵育 1-3h;PBS-T 和纯水冲洗多次之后,加入发卡探针 H1、H2 的混合物,孵育 2-6h;玻璃基底再次用 PBS-T 和纯水冲洗多次,除去未反应的发卡探针,即得;

步骤 (1) 中,anti-TNF- α 的浓度为 10-30pM,封闭剂的浓度为 20-60mM, Bio-anti-TNF- α 的浓度为 20-40pM;

所述封闭剂为乙醇胺或牛血清蛋白;

步骤 (2) 中,链霉亲和素的浓度为 10-80pM, Bio-I 的浓度为 0.1-0.5nM,发卡探针 H1、H2 的混合物中,H1 和 H2 浓度相同,均为 5-15nM;

anti-TNF- α 、封闭剂、Bio-anti-TNF- α 、链霉亲和素、Bio-I、发卡探针 H1、H2 的混合物加入量的体积比为 (1~2):(1~2):(1~2):(1~2):(1~2)。

3. 如权利要求 2 所述的一种基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器的制备方法,其特征在于,步骤 (1) 中,玻璃基底的硅烷化处理包括以下步骤:

a: 清洗,将玻璃基底在质量浓度为 5%~8% 的铬酸溶液中浸泡 8-16h,用大量清水冲洗,再用纯水冲洗;之后,将玻璃基底依次在丙酮、乙醇和纯水中超声清洗,每次 10min,每种溶液清洗多次,每次清洗后更换新的溶液;之后,将清洗干净的玻璃基底加入盐酸、纯水、双氧水体积比为 1:1:1 的混合溶液中超声 30min;再用纯水超声清洗多次,每次 10min;最后,将活化好的盖玻片放入 120°C 的恒温干燥箱中,除去上面残留的水分;

b: 硅烷化,将步骤 a 处理好的玻璃基底放入体积分数为 6% 的 GOPS-无水甲苯溶液中进行硅烷化处理,该反应在 95°C 下反应 6h;反应结束后,将玻璃基底取出,依次在甲苯、乙醇和纯水中超声清洗 15min;经氮气流吹干后,制备好的硅烷化的盖玻片贮存在干燥器中备用。

4. 如权利要求 2 所述的一种基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器的制备方法,

其特征在于,所述步骤(1)中,封闭剂为乙醇胺,浓度为50mM。

5. 如权利要求2所述的一种基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中,链霉亲和素的浓度为30pM。

6. 如权利要求2所述的一种基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器的制备方法,其特征在于,所述步骤(2)中,发卡探针H1和H2在使用之前经过退火步骤,退火过程是在90℃加热5min,然后冷却至室温。

7. 权利要求1所述基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器在TNF- α 检测中的应用。

8. 如权利要求7所述的基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器在TNF- α 检测中的应用,其特征在于,应用方法为:

(1) 将捕获抗体anti-TNF- α 滴到硅烷化处理的玻璃基底上,在37℃的保湿条件下孵育8-14h;加入封闭剂,在保湿条件下反应3-8h,封闭暴露的位点,以减少非特异性吸附;加入待检测的TNF- α ,孵育1-3h,形成了抗体-抗原复合物;再加入检测抗体Bio-anti-TNF- α ,在37℃孵育1-3h;而形成“三明治”型的免疫复合物;

(2) 免疫杂交反应之后,向玻璃基底上加入链霉亲和素,孵育1-3h;PBS-T和纯水冲洗多次之后,加入Bio-I,孵育1-3h;对玻璃基底进行清洗之后,加入发卡探针H1、H2的混合物,孵育2-6h;玻璃基底再次用PBS-T和纯水冲洗多次,除去未反应的发卡探针;

(3) 荧光成像检测:加入SYBR Green I,室温下孵育10min;吸去过量未反应的SYBR Green I,用PBS-T和纯水冲洗多次后,加入相同体积的PBS缓冲溶液,进行荧光成像实验,对获得的荧光图片进行处理,并进行数据分析;

步骤(1)、(2)、(3)中,anti-TNF- α 、封闭剂、待检测的TNF- α 、Bio-anti-TNF- α 、链霉亲和素、Bio-I、发卡探针H1、H2的混合物、SYBR Green I加入量的体积比为(1~2):(1~2):(1~2):(1~2):(1~2):(1~2);

步骤(3)中,SYBR Green I的浓度为5-15 μ M。

9. 如权利要求8所述的应用,其特征在于,应用方法的步骤(3)中,荧光成像检测的实验设置为:选择60 \times 物镜,设置曝光时间为100ms,增益值为2000,将实验后所得的盖玻片固定到载物台上;开启汞灯,调整激发波长滤光片,选择470~490nm之间的激发通道,使荧光染料分子SYBR Green I受到激发而发出荧光;调整焦距,获得荧光图片,用MetaMorph软件对获得的荧光图片进行处理,并进行数据分析。

基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器及其应用。

背景技术

[0002] 单分子检测 (SMD) 是以单个分子的分析为基础构建的一种方法, 到目前为止, 它已经在生命科学的研究中备受关注。该方法被广泛应用于细胞成像、蛋白质相互作用的研究以及 DNA 和蛋白质的定量检测中。在上述提及的应用中, 定量检测是以对目标物分子的一个接一个的计数来实现的, 这种定量检测手段代表了检测的最终极限。传统的平均测定方法是以信号强度和目标物浓度之间的关系来定量的。信号强度越高, 被测定目标物的浓度越高。与平均测定方法所不同的是, 在 SMD 定量方法中, 信号强度不再那么重要, 每个可以产生信号的分子都可以被计数, 更具有可视性和数字性, 保证了较高的重现性。由于 SMD 定量检测方法具有平均测定所无法比拟的优点, 目前, 已经有工作将 SMD 应用到定量分析之中。

[0003] 为了实现 SMD 定量检测, 单一分子的信号强度必须足够强以至于可以被检测到。目前常见的 SMD 定量检测方法之一就是, 使用荧光标记物, 如有机荧光染料和量子点 (QDs)。Tan 等课题组成功地利用染料标记分子信标来监测分子之间的反应动力学。但是, 目前常用的荧光染料主要存在两方面的问题, 一个是, 相对低的荧光强度, 另一个就是光不稳定性。为了解决上述问题, QDs 作为一种全新的纳米标签已经被广泛应用于单分子检测之中。Jin 课题组利用功能化的单个 QDs 实现了对蛋白质的定量检测。实验结果表明, QDs 与传统的荧光染料相比, 表现出出色的光稳定性和灵敏度。尽管 QDs 具有高的量子产率和出色的光稳定性的特性, 然而, QDs 自身的重金属毒性限制了其在蛋白质检测中的应用。为了克服上述问题, 出现的另外一种保证单个分子信号强度的方法就是, 利用寡核苷酸序列作为标记物。Echopf 课题组设计了一种微球为基础的 DNA 检测策略, 在该方法中, 通过 RCA 引入大量的荧光探针, 实现了对单个目标物分子的定量。然而, RCA 为基础构建的放大技术需要蛋白酶的辅助。蛋白酶不仅对反应条件要求苛刻, 而且增加了复杂性和成本, 这些都限制了以蛋白酶辅助为基础的方法在实际检测中的应用。因此, 迫切需要发展一种全新的、无酶的方法来构建 SMD 定量检测平台。

[0004] 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 是一种重要的缩氨酸细胞因子, 同时, 也是癌症的生物标记物。TNF- α 作为一种内源性的介质或是辅助因子, 可以诱导某些肿瘤的出血性坏死。而且, 许多的生理学和病理学过程都伴随 TNF- α 浓度的变化, 例如 HIV 感染、系统性红斑狼疮、内毒素休克和风湿性关节炎等, 因此, TNF- α 的灵敏检测具有重要的实际意义。目前 TNF- α 的检测多采用酶联免疫吸附测定, 但该方法存在重复性不好, 灵敏度不高, 检测限偏高等问题, 并且易出现假阳性, 影响检测的真实性。

发明内容

[0005] 针对现有技术中存在的不足, 本发明的目的是提供一种基于杂交链反应和单分子

计数的免疫传感器,将该免疫传感器用于 TNF- α 的检测,具有灵敏度高,重现性好等优点,并且具有高的选择性和低的基质效应。

[0006] 本发明的另一目的是提供该免疫传感器在 TNF- α 检测中的应用。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0008] 一种基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器,由捕获抗体、检测抗体、链霉亲和素、生物素化的引物和发卡探针组成;

[0009] 所述捕获抗体为肿瘤坏死因子- α 捕获抗体(anti-TNF- α);

[0010] 所述检测抗体为生物素化的单克隆兔抗人肿瘤坏死因子- α (Bio-anti-TNF- α);

[0011] 所述生物素化的引物(Bio-I)的碱基序列为 5'-AGT CTA GGA TTC GGC GTG GGT TAA TTT TTT TTT-biotin-3',如 SEQ ID NO.1 所示;

[0012] 所述发卡探针由发卡探针 H1 和发卡探针 H2 组成,其中发卡探针 H1 的碱基序列为 5'-TTA ACC CAC GCC GAA TCC TAG ACT CAA AGT AGT CTA GGA TTC GGC GTG-3',如 SEQ ID NO.2 所示;

[0013] 发卡探针 H2 的碱基序列为 5'-AGT CTA GGA TTC GGC GTG GGT TAA CAC GCC GAA TCC TAG ACT ACT TTG-3',如 SEQ ID NO.3 所示。

[0014] 一种基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0015] (1) 夹心免疫反应过程的构建:将肿瘤坏死因子- α 捕获抗体(anti-TNF- α)滴到硅烷化处理的玻璃基底上,在 37°C 的保湿条件下孵育 8-14h;加入封闭剂,在保湿条件下反应 3-8h,封闭暴露的位点,以减少非特异性吸附;再加入可识别抗原的不同位点的检测抗体(Bio-anti-TNF- α),在 37°C 孵育 1-3h;在每一步反应之后,均用 PBS-T 和纯水冲洗三次,除去未结合的试剂;

[0016] (2) 基于杂交链反应的免疫传感器的构建:免疫杂交反应之后,向玻璃基底上加入链霉亲和素(SA),孵育 1-3h;PBS-T 和纯水冲洗三次之后,加入生物素化的引物(Bio-I),孵育 1-3h;对玻璃基底进行清洗之后,加入发卡探针 H1、H2 的混合物,孵育 2-6h;玻璃基底再次用 PBS-T 和纯水冲洗三次,除去未反应的发卡探针,即得;

[0017] 步骤(1)中,anti-TNF- α 的浓度为 10-30pM,封闭剂的浓度为 20-60mM, Bio-anti-TNF- α 的浓度为 20-40pM;

[0018] 所述封闭剂为乙醇胺或牛血清蛋白,优选的为乙醇胺;

[0019] 玻璃基底的硅烷化处理包括以下步骤:

[0020] a: 清洗,将玻璃基底在质量浓度为 5%~8%的铬酸溶液中浸泡 8-16h,用大量清水冲洗,再用纯水冲洗;之后,将玻璃基底依次在丙酮、乙醇和纯水中超声清洗,每次 10min,每种溶液清洗两次,每次清洗后更换新的溶液;之后,将清洗干净的玻璃基底加入盐酸、纯水、双氧水体积比为 1:1:1 的混合溶液中超声 30min;再用纯水超声清洗两次,每次 10min;最后,将活化好的盖玻片放入 120°C 的恒温干燥箱中,以除去上面残留的水分;

[0021] b: 硅烷化,将步骤 a 处理好的玻璃基底放入体积分数为 6%的 GOPS-无水甲苯溶液中进行硅烷化处理,该反应在 95°C 下反应 6h;反应结束后,将玻璃基底取出,依次在甲苯、乙醇和纯水中超声清洗 15min;经氮气流吹干后,制备好的硅烷化的盖玻片贮存在干燥器中备用;

[0022] 步骤 (2) 中,链霉亲和素的浓度为 10-80pM,Bio-I 的浓度为 0.1-0.5nM,发卡探针 H1、H2 的混合物中,H1 和 H2 浓度相同,均为 5-15nM;

[0023] 步骤 (2) 中,所述 Bio-I 的碱基序列为 5'-AGT CTA GGA TTC GGC GTG GGT TAA TTT TTT TTT-biotin-3';

[0024] 发卡探针 H1 的碱基序列为 5'-TTA ACC CAC GCC GAA TCC TAG ACT CAA AGT AGT CTA GGA TTC GGC GTG-3';

[0025] 发卡探针 H2 的碱基序列为 5'-AGT CTA GGA TTC GGC GTG GGT TAA CAC GCC GAA TCC TAG ACT ACT TTG-3';

[0026] 优选的,发卡探针 H1 和 H2 在使用之前经过退火步骤,目的是保证发卡的稳定性,退火过程是在 90℃加热 5min,然后缓慢冷却到室温。

[0027] 步骤 (1)、(2) 中,anti-TNF- α 、封闭剂、Bio-anti-TNF- α 、链霉亲和素、Bio-I、发卡探针 H1、H2 的混合物加入量的体积比为 (1~2):(1~2):(1~2):(1~2):(1~2)。

[0028] 该免疫传感器在 TNF- α 检测中的应用。其应用方法为:

[0029] (1) 将捕获抗体 anti-TNF- α 滴到硅烷化处理的玻璃基底上,在 37℃的保湿条件下孵育 8-14h;加入封闭剂,在保湿条件下反应 3-8h,封闭暴露的位点,以减少非特异性吸附;加入待检测的 TNF- α ,孵育 1-3h,形成了抗体-抗原复合物;再加入可识别抗原的不同位点的检测抗体 (Bio-anti-TNF- α),在 37℃孵育 1-3h;而形成“三明治”型的免疫复合物;

[0030] (2) 免疫杂交反应之后,向玻璃基底上加入链霉亲和素 (SA),孵育 1-3h;PBS-T 和纯水冲洗三次之后,加入 Bio-I,孵育 1-3h;对玻璃基底进行清洗之后,加入发卡探针 H1、H2 的混合物,孵育 2-6h;玻璃基底再次用 PBS-T 和纯水冲洗三次,除去未反应的发卡探针;

[0031] (3) 荧光成像检测:加入 SYBR Green I,室温下孵育 10min;吸去过量未反应的 SYBRGreen I,用 PBS-T 和纯水冲洗三次后,加入相同体积的 PBS 缓冲溶液,进行荧光成像实验,对获得的荧光图片进行处理,并进行数据分析;

[0032] 步骤 (1)、(2)、(3) 中,anti-TNF- α 、封闭剂、待检测的 TNF- α 、Bio-anti-TNF- α 、链霉亲和素、Bio-I、发卡探针 H1、H2 的混合物、SYBR Green I 加入量的体积比为 (1~2):(1~2):(1~2):(1~2):(1~2):(1~2);

[0033] 步骤 (3) 中,SYBR Green I 的浓度为 5-15 μ M;

[0034] 步骤 (3) 中,荧光成像检测的实验设置为:选择 60 \times 物镜,设置曝光时间为 100ms,增益值为 2000,将实验后所得的盖玻片固定到载物台上;开启汞灯,调整激发波长滤光片,选择 470~490nm 之间的激发通道,使荧光染料分子 SYBR Green I 受到激发而发出荧光;调整焦距,获得荧光图片,用 MetaMorph 软件对获得的荧光图片进行处理,并进行数据分析。

[0035] 杂交链反应 (HCR) 是利用一组互补的、动力学受限的发卡探针来实现杂交的链反应,整个反应是由碱基对形成是产生的自由能来驱动的。HCR 反应是在等温、无酶的条件下进行的。与其它以酶为基础构建的放大方法相比,HCR 更稳定,更价廉。因此,我们以 HCR 信号放大技术和 SYBR Green I 内插染料为基础,构建了一种全新的、灵敏的 SMD 定量检测方法。

[0036] 免疫复合物的形成会催化发卡探针 H1 和 H2 的自组装,形成一条长的双螺旋聚合

物, SYBRGreen I 是本设计中使用到的荧光信号标记分子, 这种分子的特性是, 在溶液中或是遇到单链 DNA 时几乎不发荧光, 而当插入到双链 DNA 的股沟中之后, 会产生明显增强的荧光信号。在倒置落射显微镜的辅助之下, 每一个亮点都对应于一个单一的目标物分子, 亮点可以被准确地计数而实现对 TNF- α 的定量。

[0037] 本发明相对于现有技术具有如下有益效果:

[0038] (1) 本发明的免疫传感器具有检测灵敏度高, 样品使用量小, 无需酶放大等优势, 可实现对低浓度 TNF- α 的定量检测。

[0039] (2) 通过加入封闭剂可以减少具有环氧基基团的物质在硅烷化玻璃基底上的结合, 降低了生物分子的非特异性吸附对背景的干扰, 减少了假阳性信号的产生, 提高了实验的灵敏度。

[0040] (3) 本发明的免疫传感器用于 TNF- α 定量检测的检测方法具有较好的重现性和精密度, 对 TNF- α 具有良好的选择性, 可实现在复杂基质中对 TNF- α 的检测。

附图说明

[0041] 图 1 为 HCR- 单分子计数实验原理图;

[0042] 图 2 为亮点数与 TNF- α 浓度之间的线性关系 ($N = 3$);

[0043] 图 3 为免疫传感器对 TNF- α 的选择性考察结果图, 其中 1:BSA; 2:凝血酶; 3:人 IgG; 4:PDGF; 5:TNF- α ; 6:混合样本 (TNF- α , 1pM; BSA、凝血酶、人 IgG 和 PDGF, 10pM);

[0044] 图 4 为基质干扰试验结果, 其中 1 为正常血清; 2 为 Na^+ , 146mM; 3 为 Cl^- , 180 μM ; 4 为 GLU, 6. 11mM; 5 为 UA, 420 μM ; 6 为 DA, 0. 8nM;

[0045] 图 5a 为验证性实验阴性组结果;

[0046] 图 5b 为验证性实验阳性组结果;

[0047] 图 5c 为验证性实验对照组结果。

具体实施方式

[0048] 结合实施例对本发明作进一步的说明, 应该说明的是, 下述说明仅是为了解释本发明, 并不对其内容进行限定。

[0049] 实验中所使用的仪器及试剂为:(1) 仪器:K30 型干式恒温器(奥盛, 杭州); DHG-907A 型电热恒温鼓风干燥器(精宏, 上海); 雷磁 pH5-3C 型酸度计(中国); Branson-200 型超声清洗机(中美合资必能信超有限公司, 上海); H-101 型涡旋混合器(上海康禾光电仪器有限公司, 上海)。落射荧光显微镜系统(Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan), 主要包括倒置荧光显微镜(Olympus IX81), 电子增强型光电耦合器(EMCCD)(Cascade, 512B, America), 倒置荧光显微镜控制单元(Olympus IX2-UCB), 卤素灯(Olympus LG-PSs2); 精密光学隔振平台(上海亿奥信息光学科技有限公司, 上海); 精密净化交流稳压电源(中川电气科技有限公司, 上海); (2) 试剂:人肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、多克隆鼠抗人肿瘤坏死因子- α 抗体(anti-TNF- α)、生物素化的单克隆兔抗人肿瘤坏死因子- α (Bio-anti-TNF- α)、人免疫球蛋白 G(IgG)(Abcam, UK); 尿酸(UA)、牛血清白蛋白(BSA)、葡萄糖(GLU)(上海生工生物有限公司, 上海); 3-环氧基丙氧丙基三甲氧基硅烷($\text{C}_9\text{H}_{20}\text{O}_5\text{Si}$, GOPS)、吐温-20(Tween-20)、凝血酶和血小板生长因

子 (PDGF) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA);多巴胺 (DA) (阿拉丁试剂有限公司, 上海);链霉亲和素 (SA) 和 SYBR Green I (北京百泰科生物技术有限公司, 北京);乙醇 (分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司, 天津);丙酮 (分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司, 天津);无水甲苯是分析纯的甲苯经过二次减压蒸馏制备而获得; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (分析纯, 天津市广成化学试剂厂, 天津); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (分析纯, 天津市广成化学试剂厂, 天津); NaCl (分析纯, 天津市塘沽化学试剂厂, 天津);混合纤维素酯微孔滤膜 (孔径 $0.22 \mu\text{m}$, 上海兴亚净化材料厂, 上海);盖玻片 ($22 \times 22\text{mm}$, 厚度 0.17mm , Cole-parmer, Vernon Hills, Ill., USA)。

[0050] 实验中使用到的各种缓冲溶液的配方如下:

[0051] PBS 缓冲溶液: 0.15mol/L NaCl , $7.6 \times 10^{-3}\text{mol/L Na}_2\text{HPO}_4$, $2.4 \times 10^{-3}\text{mol/L NaH}_2\text{PO}_4$, pH7.4。

[0052] PBS-T 缓冲溶液: 0.15mol/L NaCl , $7.6 \times 10^{-3}\text{mol/L Na}_2\text{HPO}_4$, $2.4 \times 10^{-3}\text{mol/L NaH}_2\text{PO}_4$, 0.05% Tween-20, pH7.4。

[0053] TE 缓冲溶液: 10mmol/L Tris-HCl , $1\text{mmol/L Na}_2\text{EDTA}$, pH8.0。

[0054] HCR 反应缓冲液: $50\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$, 0.5M NaCl , pH6.8。

[0055] 实施例 1

[0056] 一种基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器,由肿瘤坏死因子- α 捕获抗体 (anti-TNF- α)、单克隆兔抗人肿瘤坏死因子- α 检测抗体 (Bio-anti-TNF- α)、链霉亲和素、生物素化的引物和发卡探针组成;

[0057] 所述生物素化的引物 (Bio-I) 的碱基序列为 $5' -\text{AGT CTA GGA TTC GGC GTG GGT TAA TTT TTT TTT-biotin}-3'$;

[0058] 所述发卡探针由发卡探针 H1 和发卡探针 H2 组成,其中发卡探针 H1 的碱基序列为 $5' -\text{TTA ACC CAC GCC GAA TCC TAG ACT CAA AGT AGT CTA GGA TTC GGC GTG}-3'$;

[0059] 发卡探针 H2 的碱基序列为 $5' -\text{AGT CTA GGA TTC GGC GTG GGT TAA CAC GCC GAA TCC TAG ACT ACT TTG}-3'$ 。

[0060] 该免疫传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0061] (1) 夹心免疫反应过程的构建:将 $50 \mu\text{L}$ 的肿瘤坏死因子- α 捕获抗体 (anti-TNF- α) (20pM) 滴到硅烷化处理的玻璃基底上,在 37°C 的保湿条件下孵育 12h ;加入 $50 \mu\text{l}$ 的封闭剂 (50mM , 乙醇胺),在保湿条件下反应 5h 来封闭暴露的位点,以减少非特异性吸附。再加入 $50 \mu\text{l}$ 的检测抗体 (Bio-anti-TNF- α) (30pM) 在 37°C 孵育 2h ;在每一步反应之后,都是用 PBS-T 和纯水冲洗三次来除去未结合的试剂;

[0062] (2) 基于杂交链反应的免疫传感器的构建:免疫杂交反应之后,向玻璃基底上加入 $50 \mu\text{l}$ 的链霉亲和素 (SA),孵育 2h 。使用 PBS-T 和纯水冲洗三次之后,加入 $50 \mu\text{l}$ 的生物素化的引物 (Bio-I) (0.1nM),孵育 2h 。对基底进行清洗之后,加入发卡探针的混合物 (H1, 10nM 、H2, 10nM),孵育 4h 。H1 和 H2 在使用之前经过退火步骤,目的是保证发卡的稳定性,退火过程是在 90°C 加热 5min ,然后缓慢冷却到室温。最后,整个基底再次用 PBS-T 和纯水冲洗三次来除去未反应的发卡探针,即得。

[0063] 步骤 (1) 中,玻璃基底的硅烷化处理包括清洗和硅烷化两步,首先将玻璃基底在质量浓度为 6% 的铬酸溶液中浸泡 12h ,用大量清水冲洗,再用纯水冲洗;之后,将玻璃

基底依次在丙酮、乙醇和纯水中超声清洗,每次 10min,每种溶液清洗两次,每次清洗后更换新的溶液;之后,将清洗干净的玻璃基底加入盐酸、纯水、双氧水体积比为 1:1:1 的混合溶液中超声 30min;再用纯水超声清洗两次,每次 10min;最后,将活化好的盖玻片放入 120℃ 的恒温干燥箱中,以除去上面残留的水分;然后将处理好的玻璃基底放入体积分数为 6% 的 GOPS-无水甲苯溶液中进行硅烷化处理,该反应在 95℃ 下反应 6h;反应结束后,将玻璃基底取出,依次在甲苯、乙醇和纯水中超声清洗 15min;经氮气流吹干后,制备好的硅烷化的盖玻片贮存在干燥器中备用。

[0064] 步骤 (2) 中, Bio-I 的碱基序列为 5'-AGT CTA GGA TTC GGC GTG GGT TAA TTT TTT TTT-biotin-3';

[0065] 发卡探针 H1 的碱基序列为 5'-TTA ACC CAC GCC GAA TCC TAG ACT CAA AGT AGT CTA GGA TTC GGC GTG-3';

[0066] 发卡探针 H2 的碱基序列为 5'-AGT CTA GGA TTC GGC GTG GGT TAA CAC GCC GAA TCC TAG ACT ACT TTG-3'。

[0067] 该免疫传感器在 TNF- α 检测中的应用方法为:

[0068] (1) 将 50 μ L 的肿瘤坏死因子- α 捕获抗体 (anti-TNF- α) (20pM) 滴到新鲜制备的玻璃基底上,在 37℃ 的保湿条件下孵育 12h。加入 50 μ L 的封闭剂 (50mM, 乙醇胺),在保湿条件下反应 5h 来封闭暴露的位点,以减少非特异性吸附。加入 50 μ L 的 TNF- α 孵育 2h,形成了抗体-抗原复合物,再加入 50 μ L 的检测抗体 (Bio-anti-TNF- α) (30pM) 在 37℃ 孵育 2h。此抗体识别抗原的不同位点,而形成“三明治”型的免疫复合物;在每一步反应之后,都是用 PBS-T 和纯水冲洗三次来除去未结合的试剂;

[0069] (2) 免疫杂交反应之后,向玻璃基底上加入 50 μ L 的链霉亲和素 (SA),孵育 2h。使用 PBS-T 和纯水冲洗三次之后,加入 50 μ L 的生物素化的引物 (Bio-I) (0.1nM),孵育 2h。对基底进行清洗之后,加入发卡探针的混合物 (H1, 10nM, H2, 10nM),孵育 4h。H1 和 H2 在使用之前经过退火步骤,目的是保证发卡的稳定性,退火过程是在 90℃ 加热 5min,然后缓慢冷却到室温。最后,整个基底再次用 PBS-T 和纯水冲洗三次来除去未反应的发卡探针;

[0070] (3) 加入 50 μ L 的 SYBR Green I (10 μ M),室温下孵育 10min。吸去过量未反应的 SYBR Green I,清洗三次之后,加入相同体积的 PBS 缓冲溶液,进行荧光成像实验。选择 60 \times 物镜,设置曝光时间为 100ms,增益值为 2000,将实验后所得的盖玻片固定到载物台上。开启汞灯,调整激发波长滤光片,选择 470 ~ 490nm 之间的激发通道,使荧光染料分子 SYBRGreen I 受到激发而发出荧光。调整焦距,获得荧光图片,用 MetaMorph 软件对获得的荧光图片进行处理,并进行数据分析。

[0071] 实施例 2

[0072] 一种基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器,其制备方法中,anti-TNF- α 的浓度为 10pM;封闭剂为牛血清蛋白,浓度为 60mM;Bio-anti-TNF- α 的浓度为 20pM,链霉亲和素的浓度为 10pM, Bio-I 的浓度为 0.5nM,发卡探针 H1、H2 的混合物中, H1 和 H2 浓度相同,均为 5nM;

[0073] anti-TNF- α 、封闭剂、Bio-anti-TNF- α 、链霉亲和素、Bio-I、发卡探针 H1、H2 的混合物加入量的体积比为 1:2:1:2:1;其余同实施例 1。

[0074] 实施例 3

[0075] 一种基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器,其制备方法中,anti-TNF- α 的浓度为 30pM;封闭剂为牛血清蛋白,浓度为 20mM;Bio-anti-TNF- α 的浓度为 40pM,链霉亲和素的浓度为 80pM, Bio-I 的浓度为 0.1nM,发卡探针 H1、H2 的混合物中, H1 和 H2 浓度相同,均为 15nM;

[0076] anti-TNF- α 、封闭剂、Bio-anti-TNF- α 、链霉亲和素、Bio-I、发卡探针 H1、H2 的混合物加入量的体积比为 2:1:2:1:2;其余同实施例 1。

[0077] 实施例 4

[0078] 线性和检测限考察:

[0079] 配制不同浓度的 TNF- α 溶液,检测方法同实施例 1,考察荧光亮点数与 TNF- α 浓度之间的关系。结果表明:荧光亮点数和 TNF- α 在 50fM 到 1pM 的浓度范围之间呈现良好的线性关系,线性回归方程为 $Y = 1.237 + 9.505C$,相关系数为 0.998,线性关系图见图 2。

[0080] 实施例 5

[0081] 精密度、重现性、选择性和回收率考察:

[0082] 为了验证该免疫传感器的精密度和重现性,进行了日内实验和日间实验的相对标准偏差 (RSD) 的考察 ($N = 5$)。实验结果表明,一次实验中,在 1pM 和 0.1pM 两个不同浓度下的五个样本的变动系数分别为 3.6% 和 3.2%。同样在上述两个浓度下,连续五次实验之间的变动系数分别为 4.2% 和 3.8%。

[0083] 由于方法的特异性在生物样本分析中占据重要的作用,因此,有必要考察该方法在生物样本中对 TNF- α 的特异性识别能力,实验中选用人 IgG、凝血酶、血小板生长因子 (PDGF) 和 BSA 作为干扰物。从图 3 可知,在相同的抗原浓度下 (1.0pM),干扰物产生的信号强度远远低于 TNF- α 。为了进一步考察该设计在混合样本中,对 TNF- α 的特异选择性,将 1.0pM 的 TNF- α 与 10.0pM 的人 IgG、10.0pM 的凝血酶、10.0pM 的 PDGF 和 10.0pM 的 BSA 同时孵育,该条件下产生的荧光强度与相同条件下、单纯的 TNF- α 的几乎相同。这些结果表明,该荧光免疫传感器对 TNF- α 具有良好的选择性。

[0084] 还进行了 TNF- α 在小牛血清中回收率的考察。两种不同 TNF- α 添加浓度下 (1.0pM 和 0.1pM) 的回收率在 93% -95% 的范围内。

[0085] 实施例 6

[0086] 样本基质组分干扰试验:

[0087] 选择普通人血清中共存的 Na^+ 、 Cl^- 、葡萄糖 (GLU)、尿酸 (UA) 和多巴胺 (DA) 五种组分,组分浓度接近于其在正常人血清中的最高水平,检测在不同干扰组分存在的条件下,对其荧光免疫实验的信号强度与正常样本 (也就是不添加任何干扰成分) 进行比较,结果如图 4 所示,在不同干扰组分存在的条件下,荧光免疫实验的信号强度与正常样本的基本相同。证明复杂基质对该免疫传感器产生的干扰是微乎其微的。

[0088] 实施例 7

[0089] 验证性实验

[0090] 本发明的免疫传感器中的亮点,是由大量的 SYBR Green I 插入到长的双螺旋 DNA 中产生的,为了证明该设计中 HCR 的重要性,我们利用典型的荧光成像实验来给予证实。其中,以加入目标物 TNF- α 的免疫传感器作为阳性组,不含目标物 TNF- α 的免疫传感器作为阴性组,加入目标物 TNF- α ,但不加入发卡探针的免疫传感器作为对照组;实验结果如图 5

所示,当有目标物 TNF- α 存在时,可以观察到大量的荧光亮点存在。反之,即使加入染料后,在视野中也观察不到亮点。结果说明,没有双链 DNA 的生成就不会产生亮点。另外,在对照组中,加入目标物 TNF- α ,但是不加发卡探针,这种情况下不会发生 HCR 的链延伸反应,此时,几乎没有可见的亮点存在。同样地,该结果有力地证明 HCR 反应在 SMD 计数中的重要作用。

[0091] 实施例 8

[0092] 采用本发明实施例 1 制备的免疫传感器,对四份正常人血清样本进行考察。检测结果见表 1,结果表明:在四个血清样本中,检测到的 TNF- α 浓度在 0.39pM 到 0.52pM 的范围内,这与文献报道的 (0.29pM 到 0.58pM) TNF- α 正常范围是相吻合的。

[0093] 表 1 样品测定结果

[0094]

样品	浓度	RSD (%)
1	4.8×10^{-13} M	2.3%
2	5.2×10^{-13} M	3.6%
3	3.9×10^{-13} M	4.8%
4	4.2×10^{-13} M	3.5%

[0095] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,所属领域技术人员应该明白,在本发明的技术方案的基础上,本领域技术人员不需要付出创造性劳动即可做出的各种修改或变形仍在本发明的保护范围以内。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 山东大学

<120> 基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器及其应用

<130>

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

agtcctaggat tcggcgtggg ttaatttttt ttt

33

<210> 2

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

ttaacccacg ccgaatccta gactcaaagt agtcctaggat tcggcgtg

48

<210> 3

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

agtcctaggat tcggcgtggg ttaacaegcc gaatcctaga ctactttg

48

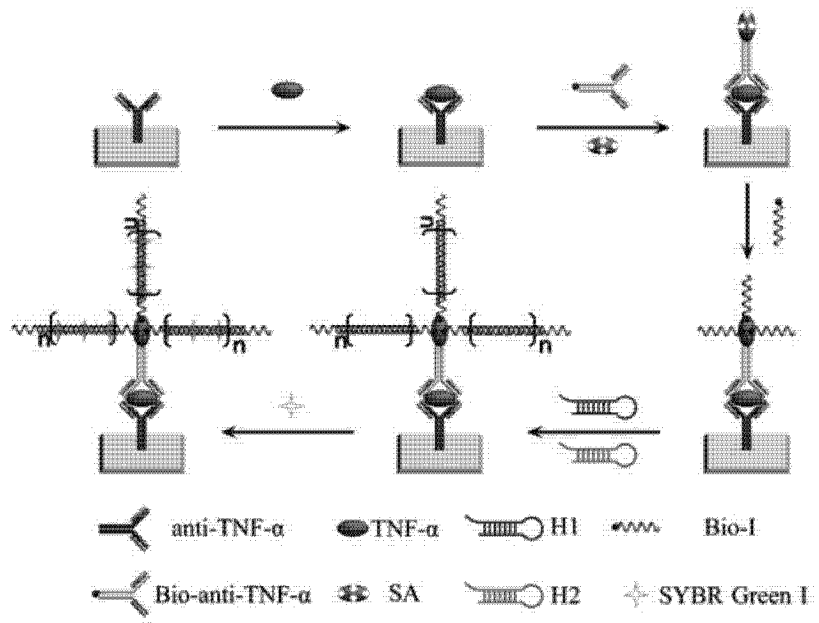


图 1

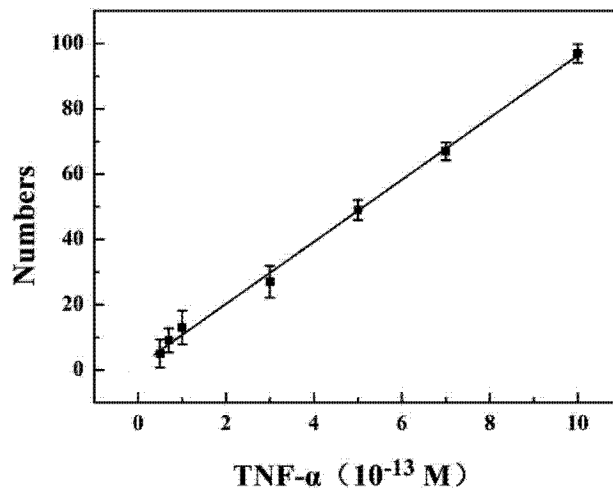


图 2

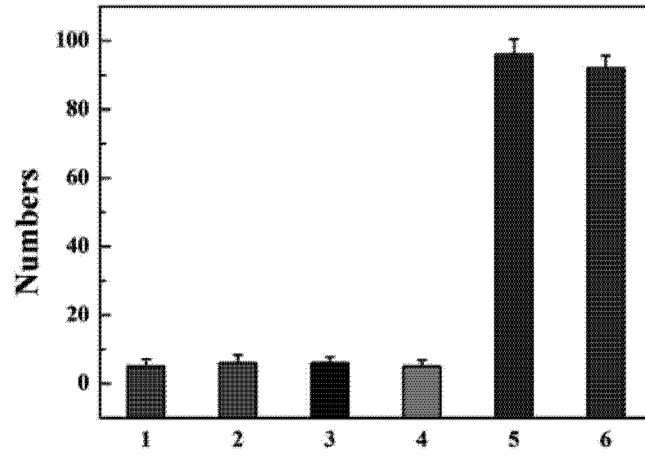


图 3

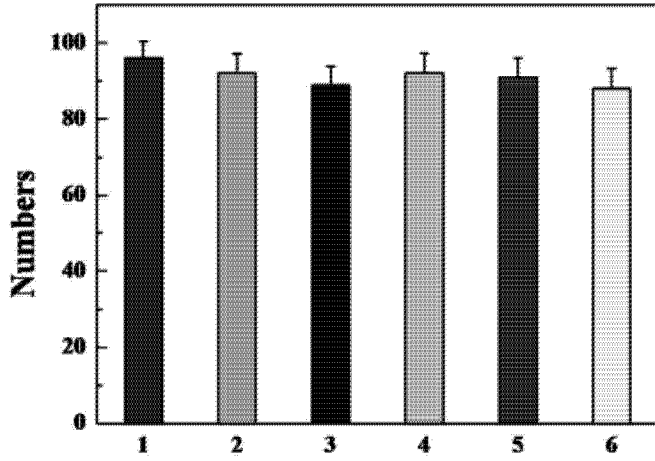


图 4

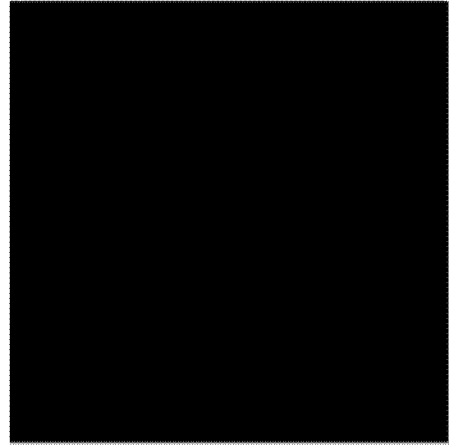


图 5a

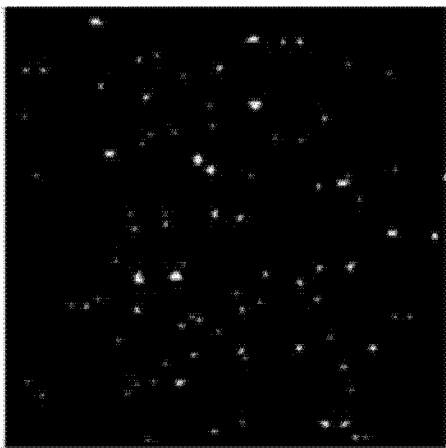


图 5b



图 5c

专利名称(译)	基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器及其应用		
公开(公告)号	CN103940989A	公开(公告)日	2014-07-23
申请号	CN201410171532.1	申请日	2014-04-25
[标]申请(专利权)人(译)	山东大学		
申请(专利权)人(译)	山东大学		
当前申请(专利权)人(译)	山东大学		
[标]发明人	王磊 姜玮 代爽		
发明人	王磊 姜玮 代爽		
IPC分类号	G01N33/552 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/552 G01N2333/525 G01N2333/7151		
代理人(译)	杨琪		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于杂交链反应和单分子计数的免疫传感器，由捕获抗体、检测抗体、链霉亲和素、生物素化的引物和发卡探针组成；其中，捕获抗体为anti-TNF- α ；检测抗体为Bio-anti-TNF- α ；生物素化的引物(Bio-I)的碱基序列为5'-AGT CTA GGA TTC GGC GTG GGT TAA TTT TTT TTT-biotin-3'；发卡探针由发卡探针H1和发卡探针H2组成，其中发卡探针H1的碱基序列为5'-TTA ACC CAC GCC GAA TCC TAG ACT CAA AGT AGT CTA GGA TTC GGC GTG-3'；发卡探针H2的碱基序列为5'-AGT CTA GGA TTC GGC GTG GGT TAA CAC GCC GAA TCC TAG ACT ACT TTG-3'。本发明还公开了该免疫传感器的制备方法和在TNF- α 检测中的应用。本发明的免疫传感器具有检测灵敏度高，样品使用量小，无需酶放大等优势，可实现对低浓度TNF- α 的定量检测。

