



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103529197 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 22

(21) 申请号 201310517588. 3

(22) 申请日 2013. 10. 28

(71) 申请人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市汉口路 22 号

(72) 发明人 许丹科 胡红婷 李慧 李伟

赵亚菊 董诗羽 羌维兵

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

代理人 肖明芳

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 21/78 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页

序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

适配体修饰的纳米金探针及其试剂盒与在检测 PDGF-BB 中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种适配体修饰的纳米金探针,它以直径为 20-30nm 的纳米金球为内核,金球外表面键合有适配体链和寡核苷酸链。本发明还公开了包含上述探针的试剂盒及其在检测 PDGF-BB 中的应用。本发明的纳米金探针与显色剂联用能提高显色可视化检测的灵敏度,检测 PDGF-BB 的线性范围为 6.25ng/mL-100ng/mL,检测限低,特异性好。纳米金探针的合成及修饰方法成熟,显色剂性能好,两者的联合可以使检测 PDGF-BB 的灵敏度大大提高,检测过程大大简化。

1. 一种适配体修饰的纳米金探针,其特征在于,它以直径为 20-30nm 的纳米金球为内核,金球外表面键合有适配体链和寡核苷酸链;

其中,所述的适配体链为:

5'-SH-(CH₂)₆-TTTTTTCAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG;

其中,所述的寡核苷酸链为:

5'-SH-(CH₂)₆-TTTTTTTTTTTTTTT-3'。

2. 权利要求 1 所述的适配体修饰的纳米金探针的制备方法,其特征在于,它包括如下步骤:

(1) 将 150mL, 2.2mM 的柠檬酸钠溶液煮沸,然后迅速加入 1mL, 25mM 的 HAuCl₄ 溶液,溶液颜色先从黄色变为蓝灰色最终形成粉红色的金种,反应 10min 后将温度下降到 85 ~ 95℃,加入 1mL 25mM 的 HAuCl₄ 溶液反应 25 ~ 40min;重复加入 1mL 25mM 的 HAuCl₄ 溶液反应 25 ~ 40min 的步骤 1 ~ 4 次,最后搅拌使其自然冷却至室温,4℃ 保存;

(2) 将适配体链和寡核苷酸链按摩尔比 (1 ~ 99):(1 ~ 9) 加入步骤 (1) 得到的纳米金溶液中,静置 10 ~ 24 小时,适配体链和寡核苷酸链的总摩尔量与纳米金摩尔量之比为 (100-1000):1;

所述的适配体链为:

5'-SH-(CH₂)₆-TTTTTTCAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG;

所述的寡核苷酸链为:

5'-SH-(CH₂)₆-TTTTTTTTTTTTTTT-3';

(3) 向步骤 (2) 得到的混合体系中加入 PBS 缓冲溶液,使得混合体系中的 PBS 缓冲溶液的浓度为 0.1×PBS,静置 3 ~ 10 小时;

(4) 向步骤 (3) 得到的混合体系中加入 1 ~ 5mol/L 氯化钠溶液,静置 2 ~ 4 小时,重复加入氯化钠溶液与静置的步骤 1 ~ 4 次,使得氯化钠的终浓度为 0.1 ~ 0.3mol/L;

(5) 将步骤 (4) 得到的混合体系静置 24 ~ 72 小时;

(6) 将步骤 (5) 得到的溶液经离心去除上清,取沉淀加入 1×PBS 缓冲溶液重悬,重复离心与重悬的步骤 2 ~ 4 次,1×PBS 缓冲溶液每次的加入体积为待加入的混合体系体积的 0.1 ~ 5 倍;最后离心得到的沉淀用 1×PBSM 缓冲溶液重悬即得备用探针。

3. 根据权利要求 2 所述的适配体修饰的纳米金探针的制备方法,其特征在于,步骤 (6) 中,所述的离心条件为 10000 ~ 20000rpm 条件下离心 10 ~ 30 分钟。

4. 权利要求 1 所述的适配体修饰的纳米金探针在制备检测 PDGF-BB 的试剂中的应用。

5. 一种用于检测 PDGF-BB 的试剂盒,其特征在于,该试剂盒包含如下试剂:适配体修饰的纳米金探针、磷酸盐缓冲液、Tween-20、anti-PDGF-BB 抗体、PDGF-BB 蛋白、氯金酸、盐酸羟胺、牛血清白蛋白、醛基片基。

6. 权利要求 5 所述的用于检测 PDGF-BB 的试剂盒在检测 PDGF-BB 中的应用。

7. 根据权利要求 6 所述的应用,其特征在于,利用检测 PDGF-BB 的试剂盒检测 PDGF-BB 含量的具体方法,依次顺序包括如下步骤:

(1) 配制溶液:

稀释液:将 20×PBS 用二次水稀释 20 倍至 1×PBS;

洗涤液:1×PBS 溶液按 0.05% 的体积比加入吐温-20 溶液;

阴性对照 :将 0.1g 牛血清白蛋白溶解于 100mL 1×PBS 溶液中,得 1mg/mL BSA 溶液 ;

封闭液 :将 1g 牛血清白蛋白溶解于 100mL 1×PBS 溶液中即得 10mg/mL BSA 封闭液 ;

底物 :用 1mg/mL BSA 配制所需浓度的 anti-PDGF-BB 标准样品溶液 ;

显色剂 :10mmol/L 氯金酸和 2mmol/L 盐酸羟胺等体积混合 ;

探针 :用 1×PBSM 溶液配制 0.31nmol/L 的适配体修饰的纳米金探针 ;

(2) 将不同浓度的 anti-PDGF-BB 溶液、待测样品和阴性对照在醛基片上点样,37℃ 条件下固定 2h ;

(3) 每孔加入 10 ~ 50 μ L 封闭液,在 37℃ 条件下封闭 1 ~ 3 小时,用洗涤液荡洗 5 ~ 15min,洗涤 3 ~ 4 次,拍干 ;

(4) 在不同的孔中加入不同浓度的 PDGF-BB 标准样品溶液 30 μ L,在 37℃ 条件下反应 1 小时,用洗涤液荡洗 5min,洗涤 3 ~ 4 次,拍干 ;在其余的孔中加入 30 μ L 样品溶液,在 37℃ 条件下反应 1 小时,用洗涤液荡洗 5min,洗涤 3 ~ 4 次,拍干 ;

(5) 每孔加入 0.31nmol/L 适配体修饰的纳米金探针 30 μ L,在 37℃ 条件下反应 1 ~ 3 小时,用洗涤液荡洗 5 ~ 15min,洗涤 3 ~ 4 次,拍干 ;

(6) 每孔加入 30 μ L 显色剂,避光反应 1 ~ 8min,去离子水冲洗 3 ~ 4 次,拍干 ;

(7) 用扫描仪扫描, LuxScan3.0 芯片图像分析软件对图像进行处理,不同浓度的 PDGF-BB 标准样品溶液对应不同的灰度值,得到 PDGF-BB 标准曲线,由标准曲线计算得到样品中 PDGF-BB 的浓度。

适配体修饰的纳米金探针及其试剂盒与在检测 PDGF-BB 中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,具体涉及一种适配体修饰的纳米金探针及其试剂盒在检测 PDGF-BB 中的应用。

背景技术

[0002] 血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor,PDGF)是一种强效的丝裂原和重要的促肿瘤血管生成生长因子,可由多种血细胞、组织细胞和一些肿瘤细胞产生。目前对肿瘤细胞中 PDGF 表达与检测的研究已成为生物医学研究领域的热点之一。适配体是具有三维空间结构能特异性识别目标蛋白质的 DNA 或 RNA 分子,合成容易,易于修饰且稳定。我们利用适配体功能化的纳米金可以实现对血小板衍生生长因子-BB(即 PDGF-BB)的特异识别。

[0003] 纳米金具有优良的表面催化特性,当金属离子和还原剂分子吸附到其表面时,纳米金催化氧化还原反应并在其表面形成一层金属膜。基于此原理,我们合成了适配体修饰的纳米金探针,通过其催化金属沉积实现对 PDGF-BB 的高灵敏,特异性可视化分析检测。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种适配体修饰的纳米金探针,用于 PDGF-BB 的检测。

[0005] 本发明还要解决的技术问题,是提供包含上述功能化纳米金材料的试剂盒,用于 PDGF-BB 的检测。

[0006] 本发明最后要解决的技术问题,是提供上述试剂盒在检测 PDGF-BB 中的应用。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案如下:

[0008] 一种适配体修饰的纳米金探针,它以直径为 20-30nm 的纳米金球为内核,金球外表面键合有适配体链和寡核苷酸链;

[0009] 其中,所述的适配体链为:

[0010] 5'-SH-(CH₂)₆-TTTTTTCAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG;

[0011] 其中,所述的寡核苷酸链为:

[0012] 5'-SH-(CH₂)₆-TTTTTTTTTTTTTTT-3'。

[0013] 上述适配体修饰的纳米金探针的制备方法,它包括如下步骤:

[0014] (1) 将 150mL, 2.2mM 的柠檬酸钠溶液煮沸,然后迅速加入 1mL, 25mM 的 HAuCl₄ 溶液,溶液颜色先从黄色变为蓝灰色最终形成粉红色的金种,反应 10min 后将温度下降到 85 ~ 95℃,加入 1mL 25mM 的 HAuCl₄ 溶液反应 25 ~ 40min;重复加入 1mL 25mM 的 HAuCl₄ 溶液反应 25 ~ 40min 的步骤 1 ~ 4 次,最后搅拌使其自然冷却至室温,4℃ 保存;

[0015] (2) 将适配体链和寡核苷酸链按摩尔比 (1 ~ 99):(1 ~ 9) 加入步骤 (1) 得到的纳米金溶液中,静置 10 ~ 24 小时,适配体链和寡核苷酸链的总摩尔量与纳米金摩尔量之比为

(100-1000):1;

[0016] 所述的适配体链为:

[0017] 5'-SH-(CH₂)₆-TTTTTTCAGGCTACGGCAGCTAGAGCATCACCATGATCCTG;

[0018] 所述的寡核苷酸链为:

[0019] 5'-SH-(CH₂)₆-TTTTTTTTTTTTTTT-3';

[0020] (3) 向步骤(2)得到的混合体系中加入PBS缓冲溶液,使得混合体系中的PBS缓冲溶液的浓度为0.1×PBS,静置3~10小时;

[0021] (4) 向步骤(3)得到的混合体系中加入1~5mol/L氯化钠溶液,静置2~4小时,重复加入氯化钠溶液与静置的步骤1~4次,使得氯化钠的终浓度为0.1~0.3mol/L;

[0022] (5) 将步骤(4)得到的混合体系静置24~72小时;

[0023] (6) 将步骤(5)得到的溶液经离心去除上清,取沉淀加入1×PBS缓冲溶液重悬,重复离心与重悬的步骤2~4次,1×PBS缓冲溶液每次的加入体积为待加入的混合体系体积的0.1~5倍;最后离心得到的沉淀用1×PBSM缓冲溶液重悬即得备用探针。

[0024] 步骤(2)中,适配体链和寡核苷酸链摩尔比优选为(1~10):(1~1:10),最优选为1:1;静置时间优选为15~20h,最优选为18h;适配体链和寡核苷酸链的总摩尔量与纳米金摩尔量之比优选为(200~300):1,最优选为288:1。

[0025] 步骤(3)中,PBS缓冲溶液优选为1×PBS,即包含如下物质的水溶液:137mM NaCl,2.7mM KCl,10mM Na₂HPO₄·12H₂O,2mM KH₂PO₄;静置时间优选为6h。

[0026] 步骤(4)中,氯化钠溶液的浓度优选为2mol/L;氯化钠的终浓度优选为0.2mol/L;静置时间优选为3h。

[0027] 步骤(5)中,静置时间优选为48h。

[0028] 步骤(6)中,所述的离心条件为10000~20000rpm条件下离心10~30分钟,优选15000条件下离心15分钟。所述的1×PBSM配方为1×PBS和1mmol/L MgCl₂。

[0029] 上述适配体修饰的纳米金探针在制备检测PDGF-BB的试剂中的应用。

[0030] 一种用于检测PDGF-BB的试剂盒,该试剂盒包含如下试剂:适配体修饰的纳米金探针、磷酸盐缓冲液、Tween-20、anti-PDGF-BB抗体、PDGF-BB蛋白、氯金酸、盐酸羟胺、牛血清白蛋白、醛基片基。

[0031] 上述用于检测PDGF-BB的试剂盒在检测PDGF-BB中的应用。

[0032] 利用检测PDGF-BB的试剂盒检测PDGF-BB含量的具体方法,依次顺序包括如下步骤:

[0033] (1) 配制溶液:

[0034] 稀释液:将20×PBS用二次水稀释20倍至1×PBS;

[0035] 洗涤液:1×PBS溶液按0.05%的体积比加入吐温-20溶液;

[0036] 阴性对照:将0.1g牛血清白蛋白溶解于100mL1×PBS溶液中,得1mg/mL BSA溶液;

[0037] 封闭液:将1g牛血清白蛋白溶解于100mL1×PBS溶液中即得10mg/mL BSA封闭液;

[0038] 底物:用1mg/mL BSA配制所需浓度的anti-PDGF-BB标准样品溶液;

[0039] 显色剂:10mmol/L氯金酸和2mmol/L盐酸羟胺等体积混合;

[0040] 探针：用 1×PBSM 溶液配制 0.31nmol/L 的适配体修饰的纳米金探针；其中，1×PBSM 配方为 1×PBS 和 1mmol/L MgCl_2 ；

[0041] (2) 将不同浓度的 anti-PDGF-BB 溶液、待测样品和阴性对照在醛基片上点样，37℃条件下固定 2h；

[0042] (3) 每孔加入 10 ~ 50 μL 封闭液，在 37℃条件下封闭 1 ~ 3 小时，用洗涤液荡洗 5 ~ 15min，洗涤 3 ~ 4 次，拍干；

[0043] (4) 在不同的孔中加入不同浓度的 PDGF-BB 标准样品溶液 30 μL ，在 37℃条件下反应 1 小时，用洗涤液荡洗 5min，洗涤 3 ~ 4 次，拍干；在其余的孔中加入 30 μL 样品溶液，在 37℃条件下反应 1 小时，用洗涤液荡洗 5min，洗涤 3 ~ 4 次，拍干；

[0044] (5) 每孔加入 0.31nmol/L 适配体修饰的纳米金探针 30 μL ，在 37℃条件下反应 1 ~ 3 小时，用洗涤液荡洗 5 ~ 15min，洗涤 3 ~ 4 次，拍干；

[0045] (6) 每孔加入 30 μL 显色剂，避光反应 1 ~ 8min，去离子水冲洗 3 ~ 4 次，拍干；

[0046] (7) 用扫描仪 (Scanmaker i900) 扫描，LuxScan3.0 芯片图像分析软件对图像进行处理，不同浓度的 PDGF-BB 标准样品溶液对应不同的灰度值，得到 PDGF-BB 标准曲线，由标准曲线计算得到样品中 PDGF-BB 的浓度。

[0047] 有益效果：本发明的纳米金探针耦合显色剂的方法能大大提高显色检测的灵敏度，只需要通过普通的扫描仪采集信号，普适性和实用性高。此种探针的合成及修饰方法成熟，显色剂显色性能好，为蛋白质的显色分析检测提供了一种极好的方法。

[0048] 本发明利用适配体分子对蛋白质的特异性识别作用实现对 PDGF-BB 的高灵敏特异性检测，对 PDGF-BB 的分析范围为 6.25ng/mL-100ng/mL，且特异性好，人免疫球蛋白 IgG、血清 serum 没有干扰。本发明试剂盒中所采用的显色剂可替代商品化的银增强试剂。

附图说明

[0049] 图 1 纳米金探针的紫外 - 可见吸收光谱图。其中，1- 纳米金 (AuNPs, 1.80nmol/L)，2- 未离心的适配体修饰的纳米金探针 (Au-apt)，3- 离心后适配体修饰的纳米金探针 (Au-apt, 0.95nmol/L)。

[0050] 图 2 检测 PDGF-BB 浓度的信号相关性曲线及扫描图。

[0051] 图 3 显色后芯片表面的扫描电子显微镜图

[0052] 图 4 为检测 PDGF-BB 的特异性曲线。

具体实施方式

[0053] 根据下述实施例，可以更好地理解本发明。然而，本领域的技术人员容易理解，实施例所描述的内容仅用于说明本发明，而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

[0054] 实施例 1：纳米金探针的制备。

[0055] (1) 金纳米粒子采用柠檬酸钠与氯金酸的水热反应合成。将 150mL, 2.2mM 的柠檬酸钠溶液煮沸。然后迅速加入 1mL, 25mM 的 HAuCl_4 ，溶液颜色先从黄色变为蓝灰色最终形成粉红色的金种溶液，反应 10min 后将温度下降到 90℃，再加入 1mL, 25mM 的 HAuCl_4 ，30min 后反应完成。重复加入 1mL 25mM 的 HAuCl_4 溶液反应 30min 的步骤 2 次，最后搅拌使其自然冷

却至室温,4℃保存。

[0056] (2) 将适配体链和寡核苷酸链按摩尔比 3:1 加入步骤 (1) 得到的纳米金溶液中,静置 18 小时。适配体链和寡核苷酸链的总摩尔量与纳米金摩尔量之比为 288。

[0057] 所述的适配体链,其核苷酸序列为:

[0058] 5' SH-(CH₂)₆-TTTTTTCAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG,其 5' 端由巯基修饰;

[0059] 所述的寡核苷酸链,其核苷酸序列为:5' SH-(CH₂)₆-TTTTTTTTTTTTTTTT-3',其 5' 端由巯基修饰;

[0060] (3) 向步骤 (2) 得到的混合体系中加入 1×PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM, Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2mM KH₂PO₄) 溶液,使 PBS 的浓度为 0.1×,静置 6 小时。

[0061] (4) 向步骤 (3) 得到的混合体系中加入 2mol/L 氯化钠溶液,每隔 3 小时加一次氯化钠,静置,使氯化钠的终浓度为 0.2mol/L。

[0062] (5) 将步骤 (4) 得到的混合体系静置 48 小时。

[0063] (6) 将步骤 (5) 得到的溶液经离心去除上清,沉淀加入 1×PBS 溶液重悬,重复离心与重悬的步骤 3 次,PBS 缓冲溶液每次的加入体积为待加入的混合体系体积的 1 倍;最后离心得到的沉淀经 1×PBSM 重悬即得适配体修饰的纳米金探针。图 1 为紫外-可见吸收光谱图。

[0064] 实施例 2:纳米金探针的制备。

[0065] (1) 金纳米粒子采用柠檬酸钠与氯金酸的水热反应合成。将 150mL,2.2mM 的柠檬酸钠溶液煮沸。然后迅速加入 1mL,25mM 的 HAuCl₄,溶液颜色先从黄色变为蓝灰色最终形成粉红色的金种溶液,反应 10min 后将温度下降到 90℃,再加入 1mL,25mM 的 HAuCl₄,30min 后反应完成。重复加入 1mL25mM 的 HAuCl₄ 溶液反应 30min 的步骤 2 次,最后搅拌使其自然冷却至室温,4℃保存。

[0066] (2) 将适配体链和寡核苷酸链按摩尔比 1:1 加入步骤 (1) 得到的纳米金溶液中,静置 10 小时。适配体链和寡核苷酸链的总摩尔量与纳米金摩尔量之比为 100。

[0067] 所述的适配体链,其核苷酸序列为:

[0068] 5' SH-(CH₂)₆-TTTTTTCAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG,其 5' 端由巯基修饰,且末端为碱基 T;

[0069] 所述的寡核苷酸链,其核苷酸序列为:5' SH-(CH₂)₆-TTTTTTTTTTTTTTTT-3',其 5' 端由巯基修饰;

[0070] (3) 向步骤 (2) 得到的混合体系中加入 1×PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM, Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2mM KH₂PO₄) 溶液,使 PBS 的浓度为 0.1×,静置 3 小时。

[0071] (4) 向步骤 (3) 得到的混合体系中加入 1mol/L 氯化钠溶液,静置 2 小时,重复加入氯化钠溶液与静置的步骤 1 次,使氯化钠的终浓度为 0.1mol/L。

[0072] (5) 将步骤 (4) 得到的混合体系静置 24 小时。

[0073] (6) 将步骤 (5) 得到的溶液经离心去除上清,沉淀加入 1×PBS 溶液重悬,重复离心与重悬的步骤 2 次,PBS 缓冲溶液每次的加入体积为待加入的混合体系体积的 0.1 倍;最后离心得到的沉淀经 1×PBSM 重悬即得适配体修饰的纳米金探针。

[0074] 实施例 3:纳米金探针的制备。

[0075] (1) 金纳米粒子采用柠檬酸钠与氯金酸的水热反应合成。将 150mL, 2.2mM 的柠檬酸钠溶液煮沸。然后迅速加入 1mL, 25mM 的 HAuCl_4 , 溶液颜色先从黄色变为蓝灰色最终形成粉红色的金种溶液, 反应 10min 后将温度下降到 90℃, 再加入 1mL, 25mM 的 HAuCl_4 , 30min 后反应完成。重复加入 1mL 25mM 的 HAuCl_4 溶液反应 30min 的步骤 2 次, 最后搅拌使其自然冷却至室温, 4℃ 保存。

[0076] (2) 将适配体链和寡核苷酸链按摩尔比 99:9 加入步骤 (1) 得到的纳米金溶液中, 静置 24 小时。适配体链和寡核苷酸链的总摩尔量与纳米金摩尔量之比为 1000。

[0077] 所述的适配体链, 其核苷酸序列为:

[0078] 5' SH-(CH₂)₆-TTTTTTCAGGCTACGGCAGTAGAGCATCACCATGATCCTG, 其 5' 端由巯基修饰, 且末端为碱基 T;

[0079] 所述的寡核苷酸链, 其核苷酸序列为: 5' SH-(CH₂)₆-TTTTTTTTTTTTTTT-3', 其 5' 端由巯基修饰;

[0080] (3) 向步骤 (2) 得到的混合体系中加入 1×PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM, Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2mM KH₂PO₄) 溶液, 使 PBS 的浓度为 0.1×, 静置 10 小时。

[0081] (4) 向步骤 (3) 得到的混合体系中加入 5mol/L 氯化钠溶液, 静置 4 小时, 重复加入氯化钠溶液与静置的步骤 4 次, 使氯化钠的终浓度为 0.3mol/L。

[0082] (5) 将步骤 (4) 得到的混合体系静置 72 小时。

[0083] (6) 将步骤 (5) 得到的溶液经离心去除上清, 沉淀加入 1×PBS 溶液重悬, 重复离心与重悬的步骤 4 次, PBS 缓冲溶液每次的加入体积为待加入的混合体系体积的 5 倍; 最后离心得到的沉淀经 1×PBSM 重悬即得适配体修饰的纳米金探针。

[0084] 实施例 4: 用于检测 PDGF-BB 的试剂盒。

[0085] 适配体修饰的纳米金探针实施例 1 ~ 3 的方法合成;

[0086] PBS (购自上海生工生物工程有限公司) 及 Tween-20 (购自天津科美有限公司) 用于配制洗涤液;

[0087] 牛血清白蛋白购自北京博奥森生物技术有限公司;

[0088] anti-PDGF-BB 购自 Abcam, USA;

[0089] PDGF-BB 蛋白购自于 R&D Systems, Minneapolis, USA;

[0090] 氯金酸购自于(上海试剂一厂);

[0091] 盐酸羟胺购自于(江苏强盛功能化学股份有限公司);

[0092] 醛基片基购自于(上海百傲科技有限公司)。

[0093] 所有溶液均用高纯水配制(除特殊说明)。

[0094] 实施例 5: 检测 PDGF-BB 含量的方法。

[0095] 利用实施例 4 的试剂盒检测 PDGF-BB 含量的具体方法, 依次顺序包括如下步骤:

[0096] (1) 配制溶液:

[0097] 稀释液: 将 20×PBS 用二次水稀释 20 倍至 1×PBS;

[0098] 洗涤液: 1×PBS 溶液按 0.05% 的体积比加入吐温-20 溶液;

[0099] 阴性对照: 将 0.1g 牛血清白蛋白溶解于 100mL 1×PBS 溶液中, 得 1mg/mL BSA 溶液;

[0100] 封闭液: 将 1g 牛血清白蛋白溶解于 100mL 1×PBS 溶液中即得 10mg/mL BSA 封闭

液；

[0101] 底物：用 1mg/mL BSA 配制所需浓度的 anti-PDGF-BB 标准样品溶液；

[0102] 显色剂：10mmol/L 氯金酸和 2mmol/L 盐酸羟胺等体积混合；

[0103] 探针：用 1×PBSM 溶液配制 0.31nmol/L 的适配体修饰的纳米金探针；

[0104] (2) 将 anti-PDGF-BB 和阴性对照物 BSA 在醛基片上点样，37℃ 条件下固定 2h；

[0105] (3) 每孔加入 30 μL 封闭液，在 37℃ 条件下封闭 1 小时，用洗涤液荡洗 5min，洗涤 3 次，拍干；

[0106] (4) 在不同的孔中加入 1.56ng/mL-100ng/mL 的 PDGF-BB 标准样品溶液 30 μL，在其余的孔中加入 30 μL 样品溶液，在 37℃ 条件下反应 1 小时，用洗涤液荡洗 5min，洗涤 3～4 次，拍干；

[0107] (5) 每孔加入 0.31nmol/L 适配体修饰的纳米金探针 30 μL，在 37℃ 条件下反应 1 小时，用洗涤液荡洗 5min，洗涤 3 次，拍干；

[0108] (6) 每孔加入 30 μL 显色剂，避光反应 7min，去离子水冲洗 3 次，拍干；

[0109] (7) 用扫描仪 (Scanmaker i900) 扫描，LuxScan3.0 芯片图像分析软件对图像进行处理，不同浓度的 PDGF-BB 标准样品溶液对应不同的灰度值，得到 PDGF-BB 标准曲线，由标准曲线计算得到样品中 PDGF-BB 的浓度。结果见图 2。

[0110] 实施例 6：PDGF-BB 的特异性。

[0111] 试验方法：

[0112] (1) 配制溶液：

[0113] 稀释液：将 20×PBS 用二次水稀释 20 倍至 1×PBS；

[0114] 洗涤液：1×PBS 溶液按 0.05% 的体积比加入吐温-20 溶液；

[0115] 阴性对照：将 0.1g 牛血清白蛋白溶解于 100mL 1×PBS 溶液中，得 1mg/mL BSA 溶液；

[0116] 封闭液：将 1g 牛血清白蛋白溶解于 100mL 1×PBS 溶液中即得 10mg/mL BSA 封闭液；

[0117] 底物：用 1mg/mL BSA 配制所需浓度的 anti-PDGF-BB 标准样品溶液；

[0118] 显色剂：10mmol/L 氯金酸和 2mmol/L 盐酸羟胺等体积混合；

[0119] 探针：用 1×PBS 溶液配制 0.31nmol/L 的适配体修饰的纳米金探针；

[0120] (2) 将 anti-PDGF-BB 和阴性对照物 BSA 在醛基片上点样，37℃ 条件下固定 2h；

[0121] (3) 每孔加入 30 μL BSA (10mg/mL)，在 37℃ 条件下封闭 1 小时，用洗涤液荡洗 5min，洗涤 3 次，拍干；

[0122] (4) 在不同的孔中分别加入 10%serum+PDGF-BB (50ng/mL)、50ng/mL PDGF-BB、10%serum、50 μg/mL 人免疫球蛋白 IgG、1mg/mL BSA 各 30 μL，在 37℃ 条件下反应 1 小时，用洗涤液荡洗 5min，洗涤 3 次，拍干；

[0123] (5) 每孔加入 0.31nmol/L 适配体修饰的纳米金探针 30 μL，在 37℃ 条件下反应 1 小时，用洗涤液荡洗 5min，洗涤 3 次，拍干；

[0124] (6) 每孔加入 30 μL 显色剂，避光反应 15min，去离子水冲洗 3 次，拍干；

[0125] (7) 用扫描仪 (Scanmaker i900) 扫描，得到 PDGF-BB 特异性的数据。结果见图 4。

[0126] 本发明将纳米金探针应用于 PDGF-BB 的分析检测中，当 PDGF-BB 的浓度在 6.25ng/

mL-100ng/mL 之间, 荧光信号强度与浓度具有很好的相关性, 相关系数为 0.9855。纳米金探针与我们自制的显色剂耦合能显著增强显色信号。在同等的条件下, 我们将商品化的银增强试剂与纳米金探针联用, 其线性范围也在 6.25ng/mL-100ng/mL 之间, 说明我们自制的显色剂可以替代商品化的银增强试剂。而且此显色体系在复杂生物样本中也具有很好的特异性, 不受复杂体系(如人血清)中其它因素的干扰。

[0001]

核苷酸或氨基酸序列表

SEQUENCE LISTING

<110> 南京大学

<120> 适配体修饰的纳米金探针及其试剂盒与在检测 PDGF-BB 中的应用

<130> SG131023002

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 适配体链，5'端修饰有巯基

<400> 1

ttttttcagg ctacggcacg tagagcatca ccatgacct g

41

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

[0002]

<220>

<223> 寡核苷酸链，5' 端修饰有巯基

<400> 2

tttttttttt ttttt

15

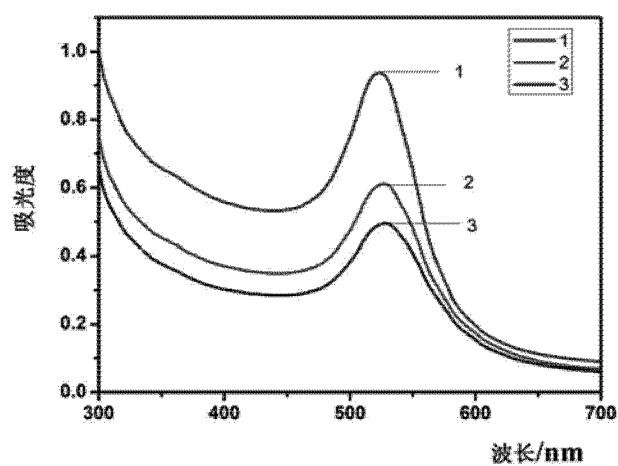


图 1

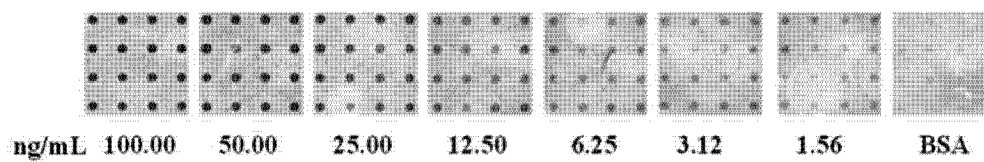
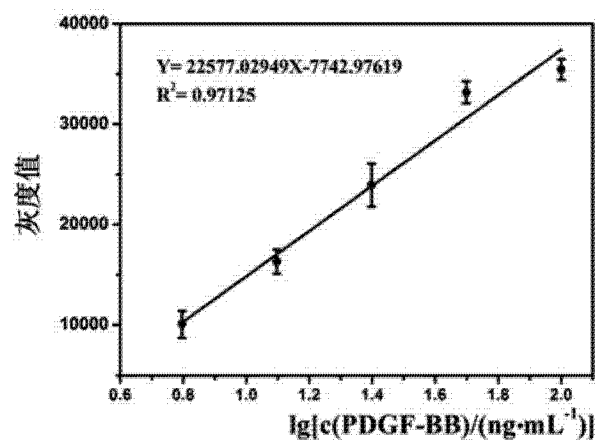


图 2

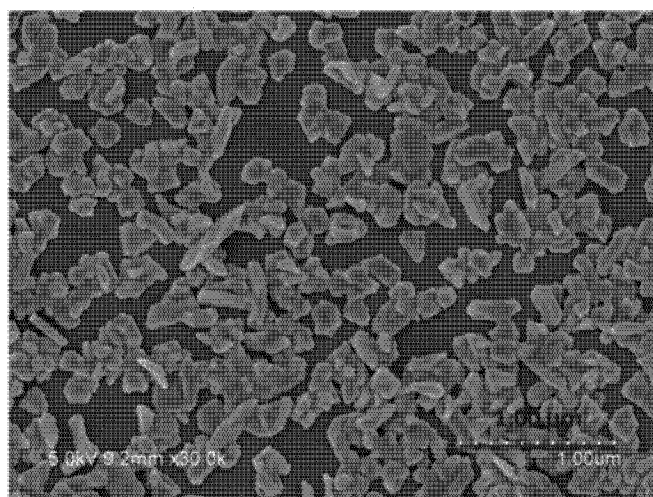


图 3

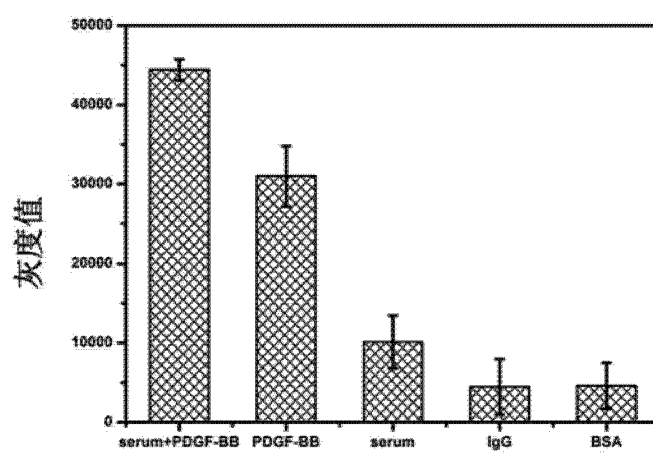


图 4

专利名称(译)	适配体修饰的纳米金探针及其试剂盒与在检测PDGF-BB中的应用		
公开(公告)号	CN103529197A	公开(公告)日	2014-01-22
申请号	CN201310517588.3	申请日	2013-10-28
[标]申请(专利权)人(译)	南京大学		
申请(专利权)人(译)	南京大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京大学		
[标]发明人	许丹科 胡红婷 李慧 李伟 赵亚菊 董诗羽 羌维兵		
发明人	许丹科 胡红婷 李慧 李伟 赵亚菊 董诗羽 羌维兵		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/78		
CPC分类号	G01N33/52 G01N33/6872 G01N2333/49		
其他公开文献	CN103529197B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种适配体修饰的纳米金探针，它以直径为20-30nm的纳米金球为内核，金球外表面键合有适配体链和寡核苷酸链。本发明还公开了包含上述探针的试剂盒及其在检测PDGF-BB中的应用。本发明的纳米金探针与显色剂联用能提高显色可视化检测的灵敏度，检测PDGF-BB的线性范围为6.25ng/mL-100ng/mL,检测限低，特异性好。纳米金探针的合成及修饰方法成熟，显色剂性能好，两者的联合可以使检测PDGF-BB的灵敏度大大提高，检测过程大大简化。

