



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105353131 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 24

(21) 申请号 201510698254. X

(22) 申请日 2015. 10. 23

(71) 申请人 山东大学

地址 250061 山东省济南市历下区文化西路
44 号

(72) 发明人 王磊 姜玮 李伟

(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 曹丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书2页 说明书6页

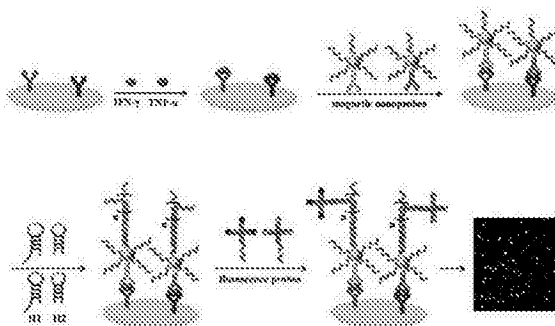
序列表5页 附图1页

(54) 发明名称

基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测
方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测的方法，将一抗固定在同一个玻璃基底上，通过抗原抗体的相互作用，分别固定目标物。同时，在磁纳米颗粒上修饰二抗和一级编码链，得到磁纳米探针。接着，利用二抗和抗原间的特异性结合作用，将磁纳米探针固定在基底上，形成三明治结构的免疫复合物。磁纳米探针上的一级条码链作为扩增单元触发多分枝的杂交链反应，生成带有多重分支的双链结构。该分支链即为二级编码链。最后，二级编码链与一种多分子标记的荧光探针结合，产生增强的荧光信号，通过清点荧光点的数目对目标物进行定量。该方法实现了细胞因子的多重、灵敏检测，两种目标物的检测限均为 5fM。



1. 一种基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法,其特征是:步骤如下:(1)将目标物的抗体固定在硅烷化的玻璃基底上;(2)将目标物和磁纳米探针依次加入到步骤(1)的玻璃基底上形成三明治式的免疫复合物,所述磁纳米探针通过将二抗和寡核苷酸修饰到 streptavidin-MNBs 上制得,所述的寡核苷酸链作为一级条码链;(3)步骤(2)的一级条码链作为扩增原件触发多分枝的杂交链反应,产生带有多条分支的长双链结构;(4)步骤(3)的长双链结构作为二级条码链与多分子标记的荧光探针结合,产生荧光;(5)通过数点进行计数。

2. 一种基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法,其特征是:步骤如下:

(1)首先将待测样品加入相应抗体包被的基底上,37℃孵育 2h;(2)利用 PBS-T 和 PBS 分别清洗后,加入磁纳米探针,37℃孵育 2h 后,形成三明治式的免疫复合物,除去未反应的磁纳米探针,所述磁纳米探针具有相应二抗和寡核苷酸的修饰;(3)加入发夹结构混合物和 HCR 缓冲液,37℃孵育 4h,所述发夹结构与磁纳米探针上的寡核苷酸配对形成带有多条分支的长双链结构;(4)利用 PBS-T 和 PBS 分别清洗后,加入荧光探针,37℃孵育 4h,所述荧光探针是由四条单链 DNA 杂交产生的十字形结构,其一端是伸出的悬垂序列,另外三端都标记了荧光基团,所述悬垂序列与带有多条分支的长双链结构结合;(5)利用 PBS-T 和 PBS 分别清洗,加入 PBS,通过倒置显微镜数点进行计数。

3. 如权利要求 2 所述的检测方法,其特征是:所述待测样品为血清样品。

4. 如权利要求 2 所述的检测方法,其特征是:所述荧光探针是将三条荧光标记的单链 DNA 和一条长的单链 DNA 分别用 TE 缓冲液稀释,然后分别将各单链 DNA 加入 TM 缓冲液中,混匀,接着将混合物放入 95℃的金属浴中,退火或淬火制得。

5. 如权利要求 4 所述的检测方法,其特征是:所述三条荧光标记的单链序列为:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:14 和一条长的单链 DNA 的序列为:SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:14。

6. 如权利要求 2 所述的检测方法,其特征是:所述步骤(1)中抗体包被基体的制备方法如下:向硅烷化的玻璃基底加入抗体 37℃下过夜孵育;接着,加入质量浓度为 5%的 BSA 溶液在 37℃下封闭 5-8h。

7. 如权利要求 6 所述的检测方法,其特征是:加入质量浓度为 5%的 BSA 溶液在 37℃下封闭 6h。

8. 如权利要求 2 所述的检测方法,其特征是:所述步骤(2)中磁纳米探针的制备方法:首先,在外加磁场的作用下,将 streptavidin-MNBs 加入到 TTL 缓冲液中清洗,清洗完成后加入 PBS 使其悬浮,取 streptavidin-MNBs 溶液并加入生物素化的条码链,37℃下反应,将得到的悬浮液在外加磁场的作用下,用 PBS 清洗后最终产物即为磁纳米探针。

9. 如权利要求 8 所述的检测方法,其特征是:所述生物素化的条码链的序列为:SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2。

10. 一种基于双编码和单分子计数的细胞因子检测试剂盒,其特征是:包括被检测细胞因子相应的一抗,硅烷化的玻璃基底,磁纳米探针,所述磁纳米探针被检测细胞因子相应的二抗和寡核苷酸修饰,发夹结构 DNA,所述发夹结构 DNA 具有与所述磁纳米探针的寡核苷酸配对的碱基序列,并且配对形成带有多条分支的长双链结构,荧光探针,所述荧光探针是由四条单链 DNA 杂交产生的十字形结构,其一端是伸出的悬垂序列,另外三端都标记了荧

光基团,所述悬垂序列与带有多条分支的长双链结构结合。

基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法。

背景技术

[0002] 细胞因子是由免疫细胞分泌的一类低分子蛋白,通常在免疫反应中发挥着信号转导的作用。最近,研究发现一些细胞因子介导的信号通路与肿瘤细胞的生存、入侵和转移有关,因此这些细胞因子已被当做癌症诊断和治疗的生物标志物。然而,由于一种癌症可能有多个标志物或者一种标志物可能对应多种癌症,因此利用多种生物标志物对癌症进行检测更加准确可行。

[0003] 常用的细胞因子检测方法是酶联免疫吸附测试 (ELISA),该方法需要首先将细胞因子固定在特异性抗体上,然后利用酶或荧光团标记的二抗对其进行检测。但是由于该方法中目标物与信号的比例是 1:1,其灵敏度仍然受到限制。另外,对于多重检测来说,这种方法也具有易产生假阳性信号、光谱重叠、淬灭效率不均一和仪器要求复杂等缺点。为了解决这些问题,多分子标记的微球、纳米线、条码策略和杂交链反应等被用于提高细胞因子检测的灵敏度。其中,条码策略具有很高的扩增效率,已被广泛用于生物标志物的灵敏检测。

[0004] 条码分析作为一种灵敏的分析策略,是一种将短的寡核苷酸序列作为替代目标物的生物分析方法。传统的条码分析通常包括磁纳米颗粒和金属纳米颗粒,它们都修饰了识别单元,因此都能够识别目标物并形成三明治结构。另外,金属纳米颗粒上还修饰了大量的寡核苷酸序列,即条码链。由于纳米颗粒的富集作用,少量目标物序列即可被转化为大量条码链,因此这种方法通常具有很高的灵敏度。基于条码扩增策略, Mirkin 课题组构建了一个蛋白类癌症标志物的多重检测方法,检测限达 170pM。但是由于此类癌症标志物在血清中的含量极低,其灵敏度仍然无法满足实际检测的需要。此外,该方法需要将条码链从纳米颗粒上释放,增加了检测的复杂性。

发明内容

[0005] 本发明的目的就是为了解决上述问题,提供一种基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 一种基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法,步骤如下:(1) 将目标物的抗体固定在硅烷化的玻璃基底上;(2) 将目标物和磁纳米探针依次加入到上述的玻璃基底上形成三明治式的免疫复合物,所述磁纳米探针通过将二抗和寡核苷酸修饰到 streptavidin-MNBs 上制得,所述的寡核苷酸链作为一级条码链;(3) 上述的一级条码链作为扩增原件触发多分枝的杂交链反应,产生带有多条分支的长双链结构;(4) 所述的长双链结构作为二级条码链与多分子标记的荧光探针结合,产生荧光;(5) 通过数点进行计数。

[0008] 具体的:一种基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法,步骤如下:

[0009] 首先将待测样品(优选血清)加入相应抗体包被的基底上,37℃ 孵育 1-3h(优选

2h), 利用 PBS-T 和 PBS 分别清洗后, 加入磁纳米探针, 37°C 孵育 1-3h (优选 2h) 后, 除去未反应的磁纳米探针; 接着, 加入发夹结构混合物, 和 HCR 缓冲液, 37°C 孵育 2-4h (优选 3h), 利用 PBS-T 和 PBS 分别清洗后, 加入荧光探针, 37°C 孵育 3-5h (优选 4h), 最后利用 PBS-T 和 PBS 分别清洗, 加入 PBS, 在倒置显微镜下进行成像。

[0010] 优选: 抗体被基体的制备: 向硅烷化的玻璃基底加入抗体 37°C 下过夜孵育; 接着, 加入质量浓度 (w/v) 5% (取 5 μ g BSA 粉末加入到 100 μ L PBS 缓冲液中即得。) 的 BSA (牛血清蛋白) 溶液在 37°C 下封闭 5-8h (优选 6h)。

[0011] 优选: 磁纳米探针的制备: 首先, 在外加磁场的作用下, 将 streptavidin-MNBs 加入到 TTL 缓冲液中清洗, 清洗完成后加入 PBS 使其悬浮, 取 streptavidin-MNBs 溶液并加入生物素化的条码链 (1-bio-strand 和 2-bio-strand, 序列见表 1), 37°C 下反应, 将得到的悬浮液在外加磁场的作用下, 用 PBS 清洗后最终产物即为磁纳米探针, 加入 PBS 备用;

[0012] 优选: 多分子标记荧光探针的组装: 首先将三条荧光标记的单链 DNA (1-Ca, 1-Cb, 1-Cc 或 2-Ca, 2-Cb, 2-Cc 序列见表 1) 和一条长的单链 DNA (1-Cd 或 2-Cd 序列见表 1) 分别用 TE 缓冲液稀释; 然后分别将各单链 DNA 加入 TM 缓冲液中, 混匀; 接着将混合物放入 95°C 的金属浴中, 退火或淬火, 制得荧光探针。

[0013] 上述的方法应用于非诊断目的体外检测样品。

[0014] 一种基于双编码和单分子计数的细胞因子检测试剂盒, 其特征是: 包括被检测细胞因子相应的一抗, 硅烷化的玻璃基底, 磁纳米探针, 所述磁纳米探针被检测细胞因子相应的二抗和寡核苷酸修饰, 发夹结构 DNA, 所述发夹结构 DNA 具有与所述磁纳米探针的寡核苷酸配对的碱基序列, 并且配对形成带有多条分支的长双链结构, 荧光探针, 所述荧光探针是由四条单链 DNA 杂交产生的十字形结构, 其一端是伸出的悬垂序列, 另外三端都标记了荧光基团, 所述悬垂序列与带有多条分支的长双链结构结合。

[0015] 本发明的有益效果:

[0016] 本发明的方法首次将条码分析和单分子计数相结合用于蛋白质的检测, 方法的灵敏度为 5fM, 且能够实现复杂样本中两种以及两种以上目标物的同时检测。此外, 我们对人血清样本进行了分析, 说明这种方法是可靠的, 在临床检测中具有很大的应用潜力。

[0017] 该方法不需要将条码链从纳米颗粒上释放, 步骤简单。

附图说明

[0018] 图 1 为本发明方法的原理图;

[0019] 图 2 为荧光探针的凝胶电泳分析, 1-5 条带是淬火产物的电泳图像, 6-10 是由退火产物的电泳图像, 分别是 1-Cd、1-Cd+1-Cc、1-Cd+1-Cc+1-Cb、1-Cd+1-Cc+1-Ca 和 1-Cd+1-Cc+1-Cb+1-Ca, M 是 marker;

[0020] 图 3 为荧光点数与目标物浓度的线性关系图;

[0021] 图 4 为不同目标物的荧光响应, 1 是牛血清白蛋白, 2 是凝血酶, 3 是 IgG, 4 是甲胎蛋白, 5 是癌胚抗原, 6 是 IFN- γ 和 TNF- α 。

具体实施方式

[0022] 试剂和材料人肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、重组人干扰素 γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因

子 α 抗体 (anti-TNF- α)、生物素化肿瘤坏死因子 α 抗体 (bio-anti-TNF- α)、干扰素 γ 抗体 (anti-IFN- γ)、生物素化的干扰素 γ 抗体 (bio-anti-IFN- γ) 和人 Ig G 购自 Abcam 公司。链霉亲和素化的磁球 (streptavidin-MNBs, 350nm) 购自 Bangs Laboratories 公司。牛血清白蛋白 (BSA) 购自上海生工生物工程有限公司 (上海)。实验中用到的所有溶液都是由超纯水配制, 所有核酸序列由英潍捷基有限公司合成 (北京)。

[0023] 仪器落射荧光显微镜系统 (Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan), 主要包括倒置显微镜 (Olympus IX 81), 卤素灯 (Olympus LG-PS2), 倒置荧光显微镜控制单元 (Olympus IX2-UCB), 电子多级放大电感耦合器 (Electron Multiplying Charge Coupled Device, EMCCD, Cascade 512B, Roper Scientific, Tuscon, AZ, USA), MetaMorph 软件系统 (Universal Imaging, Downingtown, PA, USA); 精密光学隔振平台 (上海亿奥信息光学科技有限公司, 上海); 超声清洗机 (Branson-200 型, 中美合资必能信超有限公司, 上海); DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司, 上海); DNP-9052 型电热恒温培养箱 (上海精宏实验设备有限公司, 上海)。

[0024] 抗体包被基底的制备首先制备硅烷化的玻璃基底, 然后向基底加入 50 μ L 相应抗体 (anti-IFN- γ and anti-TNF- α , 0.01nM) 过夜孵育。接着, 加入 5% 的 BSA 溶液在 37 $^{\circ}$ C 下封闭 6h。每一步完成后都要分别用 PBS-T (0.15M NaCl, 7.6mM Na₂HPO₄, 2.4mM NaH₂PO₄, 0.05% 吐温-20, PH 7.4) 和 PBS (0.15M NaCl, 7.6mM Na₂HPO₄, 2.4mM NaH₂PO₄, pH 7.4) 缓冲液清洗三次, 以出去未反应的试剂。

[0025] 磁纳米探针的制备首先, 在外加磁场的作用下, 将 2 μ L streptavidin-MNBs 加入到 200 μ L TTL 缓冲液 (100mM Tris, 1M LiCl, 0.1% Tween-20, pH 8.0) 中清洗 5 次。清洗完成后加入 60 μ L PBS 使其悬浮。然后, 取 30 μ L streptavidin-MNBs 溶液并加入 10 μ L 生物素化的条码链 (1-bio-strand 和 2-bio-strand, 核苷酸序列见表 1), 37 $^{\circ}$ C 下反应 5h。接着, 将得到的悬浮液在外加磁场的作用下, 用 PBS 清洗三次。最终产物即为磁纳米探针, 加入 50 μ L PBS 备用。

[0026] 多分子标记荧光探针的组装和电泳验证首先将三条荧光标记的单链 DNA (1-Ca, 1-Cb, 1-Cc or 2-Ca, 2-Cb, 2-Cc, 核苷酸序列见表 1) 和一条长的单链 DNA (1-Cd 或 2-Cd, 核苷酸序列见表 1) 分别用 TE 缓冲液 (10mM Tris, 1mM Na₂EDTA, pH 8.0) 稀释至 10 μ M。然后分别取 10 μ L 各单链 DNA 加入 60 μ L TM 缓冲液 (20mM Tris, 50mM MgCl₂, pH 8.0) 中, 混匀。接着将混合物放入 95 $^{\circ}$ C 的金属浴中, 2min 中降至 30 $^{\circ}$ C (退火) 或立刻放入 4 $^{\circ}$ C 的冰水中 (淬火), 继而得到两种方法产生的荧光探针, 其浓度为 0.1 μ M。

[0027] 为了验证该荧光纳米探针的形成和选择最优的合成方法, 我们利用 12% 的聚丙烯酰胺 (native-PAGE) 对其进行了电泳实验。

[0028] 基于双条码策略和单分子计数的多重分析方法的构建首先将 50 μ L 目标物 (IFN- γ 和 TNF- α) 加入抗体包被的基底上, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h。利用 PBS-T 和 PBS 分别清洗三次后, 加入 50 μ L 磁纳米探针。37 $^{\circ}$ C 孵育 2h 后, 利用磁分离技术将未反应的磁纳米探针洗去。接着, 加入 50 μ L 发夹结构混合物 (各发夹结构的核苷酸序列见表 1), 包括 10 μ L H1 (1-H1 和 2-H1, 0.2 μ M)、10 μ L H2 (1-H2 和 2-H2, 0.22 μ M) 和 30 μ L HCR 缓冲液 (50mM Na₂HPO₄, 0.5NaCl, pH 6.8), 37 $^{\circ}$ C 下孵育 4h。利用 PBS-T 和 PBS 分别清洗三次后, 加入 50 μ L 荧光探针, 37 $^{\circ}$ C 下孵育 4h。最后利用 PBS-T 和 PBS 分别清洗三次, 加入 50PBS, 在倒置显微

镜下进行成像。

[0029] 原理如图 1,首先,通过环氧基-羟基反应,将目标物 IFN- γ 和 TNF- α 的抗体固定在硅烷化的玻璃基底上,同时,通过将二抗和寡核苷酸修饰到 streptavidin-MNBs 上制备磁纳米探针。其中,二抗发挥分子识别的作用,寡核苷酸链即为一级条码链。接着,将目标物和磁纳米探针依次加入到基底上,通过抗原抗体间的免疫反应形成三明治式的免疫复合物。接下来,一级条码链作为扩增原件触发多分枝的杂交链反应 (mHCR),产生带有多条分支的长双链结构。该分支作为二级条码链能够与多分子标记的荧光探针结合,产生荧光。最后通过倒置显微镜数点进行计数。

[0030] 多分子荧光探针的组装和表征

[0031] 发明人设计了一个标记有三个荧光分子的新型荧光探针,成为多分子标记的荧光探针。该探针是由四条单链 DNA 杂交产生的十字形结构,其一端是伸出的悬垂序列,另外三段都标记了荧光基团。

[0032] 发明人选择了两种方法,即退火和淬火分别对该探针进行合成,为了表征探针的成功合成并选择最佳方法,我们进行了电泳实验。如图 2,5 和 10 条带分别是由退火和淬火得到的荧光探针,从图中可以看出,退火的方法得到的探针条带更亮,说明产率更高。

[0033] 条件优化

[0034] 发明人分别对 BSA 封闭时间、一级编码链浓度、H1 浓度、H2 与 H1 的比例以及荧光探针孵育时间进行了优化。最终选择 BSA 封闭时间为 6h,一级编码链浓度为 $0.2 \mu\text{M}$,H1 浓度为 $0.2 \mu\text{M}$,H2/H1 为 1.1,荧光探针孵育时间为 4h。

[0035] 方法学验证

[0036] 在最优条件下,发明人首先对方法的灵敏度进行了考察,如图 3,在 5fM-100fM 范围内,荧光点数与目标物的线性关系良好,线性方程分别为 $Y_1 = 6.207 + 7.541C_1$ 和 $Y_2 = 5.034 + 7.555C_2$,对两种目标物的检测限均为 5fM。

[0037] 接着,发明人对方法的特异性进行了考察,如图 4,该方法仅对目标物具有较强的荧光响应,对其它目标物的荧光响应较小,说明这个方法具有很好的特异性。

[0038] 最后,发明人利用这种方法对人血清进行了分析,如表 2,得到人血清中 IFN- γ 和 TNF- α 的量分别是 $1.04-1.07 \times 10^{-13} \text{mol/L}$ 和 $3.29-5.26 \times 10^{-13} \text{mol/L}$,实现了对血清中两种目标物的定量。

[0039] 表 1 所用到的核酸序列

[0040]

序列(5'-3')	
1-bio-strand:	AGT CTA GGA TTC GGC GTG GGT TAA TTT TTT TTT-biotin (SEQ ID NO:1)
2-bio-strand:	CGT CGG CAT CTG ATC ACG CGC TTA TTT TTT TTT-biotin (SEQ ID NO:2)
1-H1:	TTA ACC CAC GCC GAA TCC TAG ACT CAA AGT AGT CTA GGA TTC GGC GTG TAT ATA TAA TAA CCC ACC CGA CCG (SEQ ID NO:3)
1-H2:	AGT CTA GGA TTC GGC GTG GGT TAA CAC GCC GAA TCC TAG ACT ACT TTG (SEQ ID NO:4)
2-H1:	TAA GCG CGT GAT CAG ATG CCG ACG TGC TGG CGT CGG CAT CTG ATC ACG AAA AAA TGT CTG GCC TCT CTA CCT GAT (SEQ ID NO:5)
2-H2:	CGT CGG CAT CTG ATC ACG CGC TTA CGT GAT CAG ATG CCG ACG CCA GCA (SEQ ID NO:6)
1-Ca:	AA ATG AAT AGC GGT CAG ATC CGT ACC TAC TCG-Cy5 (SEQ ID NO:7)
1-Cb:	AA CAT ACG TAC AGC ACC GCT ATT CAT- Cy5 (SEQ ID NO:8)
1-Cc:	AA GTT CGC AAT ACG GCT GTA CGT ATG-Cy5 (SEQ ID NO:9)
1-Cd:	CGA GTA GGT ACG GAT CTG CGT ATT GCG AAC TTT TTT CGG TCG GGT GGG TTA TTA T (SEQ ID NO:10)
2-Ca:	AA ATG AAT AGC GGT CAG ATC CGT ACC TAC TCG-FAM (SEQ ID NO:11)
2-Cb:	AA CAT ACG TAC AGC ACC GCT ATT CAT-FAM (SEQ ID NO:12)
2-Cc:	AA GTT CGC AAT ACG GCT GTA CGT ATG-FAM (SEQ ID NO:13)
2-Cd:	CGA GTA GGT ACG GAT CTG CGT ATT GCG AAC TTT TTT ATC AGG TAG AGA GGC CAG AC (SEQ ID NO:14)

[0041]

[0042] 表 2 人血清定量检测

[0043]

样本	目标物	浓度 (mol/L)	RSD (n=3)
1	IFN- γ	1.06×10^{-13}	6.2%
	TNF- α	5.26×10^{-13}	3.2%
2	IFN- γ	1.04×10^{-13}	7.5%
	TNF- α	3.29×10^{-13}	2.7%
3	IFN- γ	1.07×10^{-13}	4.7%
	TNF- α	4.32×10^{-13}	5.6%

[0044] 上述虽然结合附图对本发明的具体实施方式进行了描述,但并非对本发明保护范围的限制,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> 基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法

<130> 2015

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> 1-bio-strand

<400> 1

agtctaggat tcggcgtggg ttaattttt ttt-biotin 33

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> 2-bio-strand

<400> 2

cgtcggcacc tgatcacggc cttattttt ttt-biotin 33

[0002]

<210> 3

<211> 72

<212> DNA

<213> 1-H1

<400> 3

ttaacccaag ccgaatccta gactcaaagt agtctaggat tcggcgtgta tatataataa 60

cccacccgac cg 72

<210> 4

<211> 48

<212> DNA

<213> 1-H2

<400> 4

agtctaggat tcggcgtggg ttaacacgcc gaatcctaga ctactttg 48

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> 2-H1

<400> 5

catctgatca cgaaaaatg tctggcctct ctacctgat 39

[0003]

<210> 6

<211> 48

<212> DNA

<213> 2-H2

<400> 6

cgtcggcattc tgaacacggc cttacgtgat cagatgccga cgccagca 48

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> 1-Ca

<400> 7

aaatgaatag cggtcagatc cgtacctact cg-Cy5 32

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> 1-Cb

<400> 8

aacatagta cagcaccgct attcat-Cy5 26

<210> 9

[0004]

<211> 26

<212> DNA

<213> 1-Cc

<400> 9

aagttcgcaa tacggctgta cgtatg -Cy5 26

<210> 10

<211> 55

<212> DNA

<213> 1-Cd

<400> 10

cgagtaggta cggatctgcg tattgcgaac tttttcggg cgggtgggtt attat 55

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> 2-Ca

<400> 11

aaatgaatag cggtcagatc cgtacctact cg-FAM 32

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

[0005]

<213> 2-Cb

<400> 12

aacatacgtc cagcaccgct attcat-FAM 26

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> 2-Cc

<400> 13

aagttcgcaa tacggctgta cgtatg-FAM 26

<210> 14

<211> 56

<212> DNA

<213> 2-Cd

<400> 14

cgagtaggta cggatctgcg tattgcgaac tttttatca ggtagagagg ccagac 56

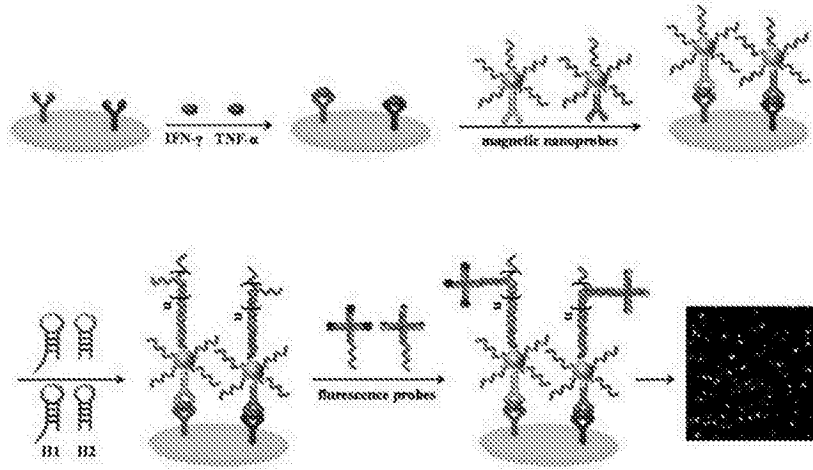


图 1

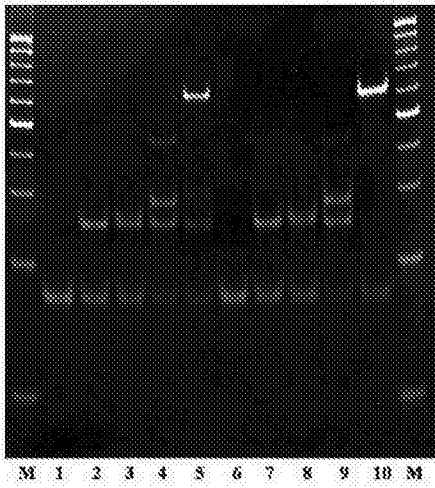


图 2

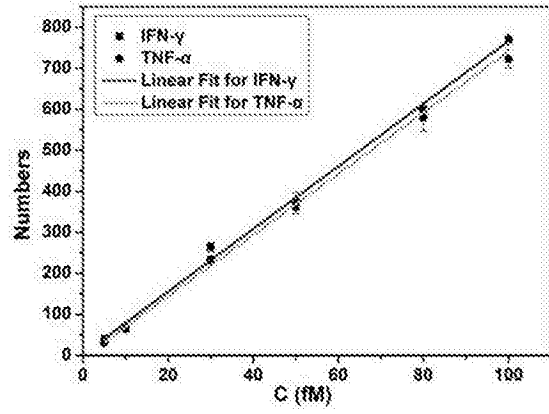


图 3

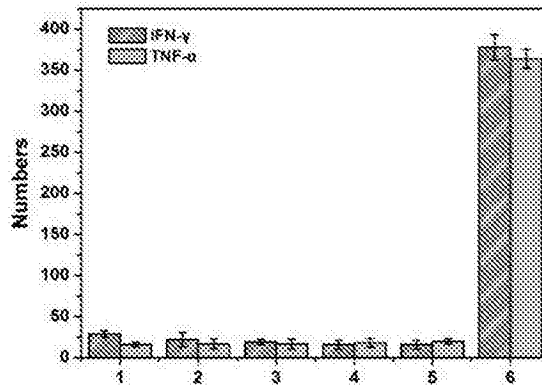


图 4

专利名称(译)	基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法		
公开(公告)号	CN105353131A	公开(公告)日	2016-02-24
申请号	CN201510698254.X	申请日	2015-10-23
[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 李伟		
发明人	王磊 姜玮 李伟		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/68		
代理人(译)	曹丽		
其他公开文献	CN105353131B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于双编码和单分子计数的细胞因子多重检测方法，将一抗固定在一个玻璃基底上，通过抗原抗体的相互作用，分别固定目标物。同时，在磁纳米颗粒上修饰二抗和一级编码链，得到磁纳米探针。接着，利用二抗和抗原间的特异性结合作用，将磁纳米探针固定在基底上，形成三明治结构的免疫复合物。磁纳米探针上的一级条码链作为扩增单元触发多分枝的杂交链反应，生成带有多重分支的双链结构。该分支链即为二级编码链。最后，二级编码链与一种多分子标记的荧光探针结合，产生增强的荧光信号，通过清点荧光点的数目对目标物进行定量。该方法实现了细胞因子的多重、灵敏检测，两种目标物的检测限均为5fM。

