(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107817340 A
(43)申请公布日 2018.03.20

(21)申请号 201710977792.1

(22)申请日 2017.10.17

(66)本国优先权数据
201710646926.1 2017.08.01 CN

(71)申请人 东南大学
地址 210096 江苏省南京市四牌楼2号

(72)发明人 王著元 王玉洁 王飞 陈宝安 崔一平

(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 陆涛

(51)Int.Cl.
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)

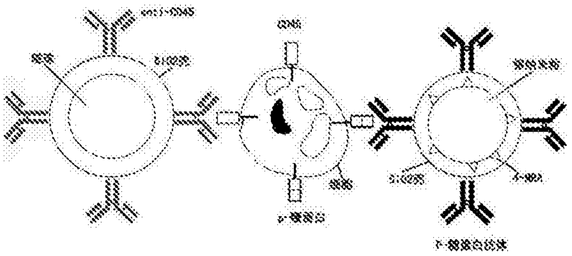
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒及其应用，以鉴别细胞耐药性。该试剂盒中采用的检测试剂包括硅包银胶的SERS探针、硅包裹Fe_3O_4的捕获磁珠，并提供了检测试剂的制备方法。同时，本发明公开了该试剂盒在多药耐药蛋白检测中的应用，硅包银胶的SERS探针、硅包裹Fe_3O_4的捕获磁珠与靶细胞一起组成SERS探针-细胞-磁珠“三明治”结构，重新悬浮于去离子水后制备载玻片样品进行SERS检测。相比现有技术，本发明提供一种快速、简便、高灵敏的SERS免疫探针检测多药耐药蛋白的试剂盒及其应用，该试剂盒具有高度敏感性及特异性，能有效检测P-糖蛋白含量的高低。



1.一种SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒，其特征在于：该试剂盒中采用的检测试剂包括硅包银胶的SERS探针与硅包裹Fe_3O_4的捕获磁珠。

2.根据权利要求1所述的一种SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒，其特征在于：所述的SERS探针上连接P-糖蛋白抗体试剂用以检测耐药蛋白；所述的捕获磁珠上连接白细胞的抗体anti-CD45用以捕获靶细胞。

3.根据权利要求1所述的一种SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒，其特征在于：所述的硅包银胶的SERS探针Ag@SiO_2的制备方法为：$AgNO_3$与柠檬酸钠溶液相互作用形成银胶，加入拉曼分子4-巯基苯甲酸、正硅酸乙酯TEOS并搅拌混匀，离心后收集底部沉淀重悬于去离子水中，形成Ag@4-MBA@SiO_2纳米粒；再加入戊二醛GA并搅拌混匀，形成GA修饰的银纳米粒；最后加入P-糖蛋白抗体并搅拌混匀，离心后收集底部沉淀重新悬浮于PBS，即得SERS免疫探针并置于冰箱保存待用；所述的硅包裹的Fe_3O_4捕获磁珠MB@SiO_2的制备方法为：取Fe_3O_4磁珠，加入TEOS混合产生硅壳，磁铁沉淀后重悬于乙醇；再加入戊二醛GA并搅拌混匀，形成GA修饰的银磁珠；最后加入CD45抗体形成连接，磁铁收集底部沉淀重新悬浮于PBS溶液，即得捕获磁珠并置于冰箱保存待用。

4.根据权利要求3所述的一种SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒，其特征在于：所述的硅包银胶的SERS探针Ag@SiO_2和硅包裹的Fe_3O_4捕获磁珠MB@SiO_2的制备中重新悬浮于的PBS中含0.5%BSA。

5.根据权利要求1所述的一种SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒在多药耐药蛋白检测中的应用。

6.根据权利要求5所述的一种SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒在多药耐药蛋白检测中的应用，其特征在于：硅包银胶的SERS探针、硅包裹Fe_3O_4的捕获磁珠与靶细胞一起组成SERS探针-细胞-磁珠“三明治”结构。

7.根据权利要求5或6所述的一种SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒在多药耐药蛋白检测中的应用，其特征在于：SERS检测方法为：取SERS探针和捕获磁珠，与含有P-糖蛋白表达的靶细胞样品或血液样本混合，磁铁分离沉淀出SERS探针-细胞-磁珠“三明治”复合物，重新悬浮于PBS后制备载玻片样品进行SERS检测。

8.根据权利要求7所述的一种SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒在多药耐药蛋白检测中的应用，其特征在于：该应用方法使用P-糖蛋白抗体试剂检测不同浓度耐药细胞和不同比例耐药细胞与敏感细胞混合，以及人外周血样本中P-糖蛋白的含量。

9.根据权利要求7所述的一种SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒在多药耐药蛋白检测中的应用，其特征在于：该应用方法线性检测范围为$5x10^5$-50per/mL，检出限为50per/mL。

10.根据权利要求7所述的一种SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒在多药耐药蛋白检测中的应用，其特征在于：该应用方法中SERS技术检测结果为$1078cm^{-1}$和$1580cm^{-1}$波段时的峰值。

一种SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物分析技术和体外检测试剂技术领域，尤其涉及一种SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 白血病是造血系统的一种恶性疾病，已成为严重威胁人民健康和生命的疾病。因此，早发现、早诊断、早治疗是提高急性白血病患者存活率的重要措施。然而，尽管多数急性白血病患者经化疗或造血干细胞移植后可以获得完全缓解，但是仍有许多患者在完全缓解后复发。白血病细胞经多次化疗产生耐药性是目前白血病治疗失败的主要原因之一。许多肿瘤在治疗过程中会对抗肿瘤药物产生耐性，使得抗肿瘤药物对肿瘤细胞失去了杀伤作用。

[0003] 多药耐药性(MDR)是指肿瘤细胞接触一种抗肿瘤药物并产生耐药后，同时对结构和作用机理不同的多种来源的抗肿瘤药物具有交叉耐药性。约90％的白血病化疗失败和复发与多药耐药相关，所以MDR被认为是白血病化疗中的重要障碍，是引起白血病治疗失败的主要原因。多药耐药发生与多种因素有关，涉及白血病细胞的多药耐药基因(MDR1)及其编码的糖蛋白(P-gp)等。P-gp位于细胞膜表面，当细胞产生耐药性时，细胞表面的P-gp会过量表达。有资料报道，复发和耐药的白血病患者其P-gp表达明显增加。因此，快速检测出白血病细胞耐药性对于及时、准确的临床治疗及个体化用药等具有重大意义，对患者体内白血病细胞耐药性的准确测定对于临床追踪病情、判断预后、复发预测及至制定治疗方案等具有极其重要的意义。目前常用的检测方法为:流式细胞术(FCM)，实时荧光定量聚合酶链式反应(RQ-PCR)，蛋白质印迹法(Western Blot)等。然而，这些方法均存在一定的局限性:例如阳性率低、适用范围小、操作繁琐、成本高、灵敏度低、检测周期长、价格昂贵、检测方法复杂，加之耐药机制、肿瘤分型、体内或体外、个体差异等，实验室检查结果常常与临床存在巨大的差异，故在临床上应用受到一定的限制。因此寻求具有灵敏度高、特异性强、检测限低、稳定性好、经济适用、操作方便简单、准确可靠等特点的方法检测肿瘤多药耐药发生、发展中复杂变化，在其早期诊断和临床化疗中意义重大。

[0004] 综上，发展高灵敏度、高特异性的耐药性白血病细胞检测及鉴别方法，以实施及时、有效的治疗，对于提高患者治愈率和生存率至关重要。而通过研究更先进的手段或者仪器设备，来实现准确、快速识别耐药细胞，为药物筛选、治疗方案制定提供相应的依据，同时为早期诊断提供相关数据，对医生用药的指导意思在临床治疗过程中具有重要意义。与以上方法相比，表面增强拉曼散射(Surface enhanced Raman scattering,SERS)技术具有信号强、灵敏度高、光谱窄、可多重检测的优势，可以实现样本的定性和定量测定检测及临床应用，对有效解决耐药蛋白检测有十分重要的意义。

[0005] SERS技术用通常的拉曼光谱法测定吸附在胶质金属颗粒表面的样品，或吸附在这些金属片的粗糙表面上的样品。被吸附的样品其拉曼光谱的强度可提高10^3-10^6倍，实现超灵敏检测。相比于传统检测技术，SERS具有光谱窄，能有效避免光谱重叠，在高通量检测

方面具有独特优势。同时,SERS光谱的“指纹”特性使人们可以在复杂的生物环境中跟踪检测目标物。因其这些优势,SERS技术在药物分析、快速检测、物质测定及生物科学等领域得到广泛应用,成长为一种非常强大的分析工具。国内外已有报道SERS技术于肿瘤标志物检测的应用。然而,目前并未有将SERS技术用于鉴别耐药样本的统计数据,因此,对SERS检测技术进行优化,使其满足细胞株样本检测的高灵敏、高通量和快速可靠的需求,是一个迫在眉睫的任务。

发明内容

[0006] 发明目的:为了克服现有技术中操作复杂耗时、样本及抗体需求量多、适用性低等的不足与缺陷,为了提高耐药患者检出率,本发明提供一种快速、简便、高灵敏的SERS免疫探针检测多药耐药蛋白的试剂盒及其应用,该试剂盒具有高度敏感性及特异性,能有效检测P-糖蛋白含量的高低。

[0007] 技术方案:一种SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒,其特征在于:该试剂盒中采用的检测试剂包括硅包银胶的SERS探针与硅包裹Fe_3O_4的捕获磁珠。

[0008] 其中,所述的SERS探针上连接P-糖蛋白抗体试剂用以检测耐药蛋白;所述的捕获磁珠上连接白细胞的抗体anti-CD45用以捕获靶细胞。

[0009] 其中,所述的硅包银胶的SERS探针Ag@SiO_2的制备方法为:$AgNO_3$与柠檬酸钠溶液相互作用形成银胶,加入拉曼分子4-巯基苯甲酸、正硅酸乙酯TEOS并搅拌混匀,离心后收集底部沉淀重悬于去离子水中,形成Ag@4-MBA@SiO_2纳米粒;再加入戊二醛GA并搅拌混匀,形成GA修饰的银纳米粒;最后加入P-糖蛋白抗体并搅拌混匀,离心后收集底部沉淀重新悬浮于PBS,即得SERS免疫探针并置于冰箱保存待用;所述的硅包裹的Fe_3O_4捕获磁珠MB@SiO_2的制备方法为:取Fe_3O_4磁珠,加入TEOS混合产生硅壳,磁铁沉淀后重悬于乙醇;再加入戊二醛GA并搅拌混匀,形成GA修饰的银磁珠;最后加入CD45抗体形成连接,磁铁收集底部沉淀重新悬浮于PBS溶液,即得捕获磁珠并置于冰箱保存待用。

[0010] 其中,所述的硅包银胶的SERS探针Ag@SiO_2和硅包裹的Fe_3O_4捕获磁珠MB@SiO_2的制备中重新悬浮于的PBS中含0.5%BSA。

[0011] 一种SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒在多药耐药蛋白检测中的应用。

[0012] 其中,硅包银胶的SERS探针、硅包裹Fe_3O_4的捕获磁珠与靶细胞一起组成SERS探针-细胞-磁珠“三明治”结构。

[0013] 其中,SERS检测方法为:取SERS探针和捕获磁珠,与含有P-糖蛋白表达的靶细胞样品或血液样本混合,磁铁分离沉淀出SERS探针-细胞-磁珠“三明治”复合物,重新悬浮于PBS后制备载玻片样品进行SERS检测。

[0014] 其中,该应用方法使用P-糖蛋白抗体试剂检测不同浓度耐药细胞和不同比例耐药细胞与敏感细胞混合,以及人外周血样本中P-糖蛋白的含量。

[0015] 其中,该应用方法线性检测范围为$5x10^5$-50per/mL,检出限为50per/mL。

[0016] 其中,该应用方法中SERS技术检测结果为$1078cm^{-1}$和$1580cm^{-1}$波段时的峰值。

[0017] 有益效果:与现有技术相比,本发明具有以下显著优点:本发明提供了一种新的SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒及其应用,利用该试剂盒,能够快速检测出P-糖蛋白含量,该试剂盒使用稳定性良好,特异性强,灵敏度极高,且适用广泛。

附图说明

[0018]　图1为本发明方法的检测示意图；

[0019]　图2为本发明方法检测不同浓度的耐药细胞株时得到的拉曼强度示意图；

[0020]　图3为本发明方法检测不同比例的敏感/耐药细胞株混合的样本得到的SERS信号强度示意图；

[0021]　图4为本发明实施例中SERS技术在人外周血样本中检测的结果。

具体实施方式

[0022]　下面结合附图及具体实施方式对本发明的技术方案做进一步的描述，其中涉及的未说明部份与现有技术相同或采用现有技术加以实现。

[0023]　图2为本发明方法检测不同浓度的耐药细胞株时得到的拉曼强度示意图，细胞浓度在图中是从上至下依次为：$5x10^5$个/mL、$5x10^4$个/mL、$5x10^3$个/mL、$5x10^2$个/mL、5x10个/mL；相应的SERS信号依次减弱。图3为本发明方法检测不同比例的敏感/耐药细胞株混合的样本得到的SERS信号强度示意图，K562细胞：K562/ADM细胞的体积比例在图中是从上至下依次为，0:1、0.25:0.75、0.5:0.5、0.75:0.25、1:0，相应的SERS信号依次减弱，表明该技术方法特异性强。图4为本发明实施例中SERS技术在人外周血样本中检测的结果。上面信号为P-糖蛋白耐药白血病患者外周血样本检测的SERS强度；下面信号为非耐药的白血病患者外周血样本检测的SERS强度。

[0024]　实施例1：

[0025]　1.1、样本准备

[0026]　本实施例中，SERS强度高的样本为耐药的K562/ADM白血病细胞株或P-糖蛋白耐药白血病患者外周血，SERS强度低的为对照样本即敏感的K562白血病细胞株或非耐药的白血病患者外周血。

[0027]　1.2、样本检测流程

[0028]　(1)SERS免疫探针和免疫磁珠的制备：银胶是10mM的AgNO3和1％的柠檬酸钠溶液相互作用形成；所述的拉曼分子是4-巯基苯甲酸(4-MBA)；1mL银胶加入1μL拉曼分子，加入2μLTEOS，搅拌混匀，6000r/min离心15min后收集底部沉淀重悬于1mL去离子水。加入10％的戊二醛(GA)100μL，搅拌混匀，6000r/min离心15min后收集底部沉淀重悬于1mL去离子水。加入10μg的抗体，搅拌混匀2小时，5000r/min离心10min后收集底部沉淀，重新悬浮于1mLPBS(含0.5％BSA)，4℃冰箱保存待用。

[0029]　取Fe_3O_4磁珠600μL(5mg/mL)加入20ulTEOS混合摇晃产生硅壳，磁铁沉淀后重悬于2mL乙醇，4℃冰箱保存待用。取360μL已制备的MB@SiO_2溶液加入10％的戊二醛(GA)100μL，搅拌混匀，6000r/min离心15min后收集底部沉淀重悬于1mL去离子水。然后加入10μg的抗体(anti-CD45)，搅拌混匀3小时，磁铁收集底部沉淀，重新悬浮于360μL的PBS溶液(含0.5％BSA)，4℃冰箱保存待用。

[0030]　(2)样本制备：取100μL制备好的SERS免疫探针和60μL制备好的免疫磁珠，加入100μL的细胞悬液或外周血样本至1mL小离心管中混合，室温摇晃1小时。磁铁分离沉淀出SERS探针-细胞-磁珠“三明治”复合物，重新悬浮于10μLPBS。

[0031] (3)玻片制备:取2μL上述所制备的样本滴在载玻片上,晾干后再取2μL滴在同样位置覆盖,一共5次。

[0032] (4)检测结果读取:使用拉曼光谱仪在玻片上所滴样本位置检测SERS信号,检测被测样本的SERS强度和拉曼位移,比较不同组样本的异同,并根据检测信号判断结果。沿玻片上所滴样本位置选取均匀分布的3个点进行信号采集,并将1078cm^{-1}和1580cm^{-1}位移处的峰高的平均值视为代表真实水平的有效数据。

[0033] 1.3、检测方法灵敏度及标准曲线的建立

[0034] 配置耐药细胞株(K562/ADM)浓度为:5x10^{5}个/mL、5x10^{4}个/mL、5x10^{3}个/mL、5x10^{2}个/mL、50个/mL的溶液进行标准耐药分析过程,可通过检测拉曼信号的强度确定待测物的耐药细胞含量。

[0035] 1.4、特异性的确立

[0036] 配置耐药模型,选取不同比例的耐药/敏感细胞株混合,K562细胞:K562/ADM细胞的浓度比例依次为0:1、0.25:0.75、0.5:0.5、0.75:0.25、1:0。可通过检测拉曼信号的强度确定待模型中耐药细胞的含量。

[0037] 1.5、方法重复性

[0038] 为检测本发明检测方法的重复性情况,选取同一样本独立检测3次。

[0039] 2.1、灵敏性检测

[0040] 本发明检测不同浓度的耐药细胞株时得到标准曲线,从标准曲线显示线性检测范围约在5x10^5-50per/mL之间,R^2>0.9,检出限约为50per/mL,灵敏度极高。具体见图2。

[0041] 2.2、特异性确立

[0042] 本耐药模型中测检结果显示,随着敏感的K562细胞浓度的降低、耐药的K562/ADM细胞浓度的增加,在1078cm^{-1}和1580cm^{-1}峰值处相应的SERS信号依次增强,表明该技术方法特异性好。具体见图3。

[0043] 2.3方法重复性

[0044] 经检测,同一样本重复检测3次,试验峰值基本重合,稳定性良好。

[0045] 2.4、方法适用性

[0046] 为检测本发明检测方法的可适用性情况,选取P-糖蛋白耐药的白血病患者血液样本和非耐药的白血病患者血液样本各100μL代替细胞悬液与SERS免疫探针和免疫磁珠混合。磁铁分离沉淀出SERS探针-血液中靶细胞-磁珠“三明治”复合物,按上述方法检测。测检测结果如图4显示:P-糖蛋白耐药的白血病患者血液样本检测显示SERS强度高(黑色),非耐药的白血病患者血液样本检测显示其SERS强度低(灰色)。显示本发明样本实施性良好,可推广适用。

[0047] 实施例2:

[0048] 实施例2为SERS技术在人外周血样本中检测,比较P-糖蛋白含量高低。

[0049] 本实施例中测检测结果显示:P-糖蛋白耐药的白血病患者血液样本检测显示SERS强度高,非耐药的白血病患者血液样本检测显示其SERS强度低。

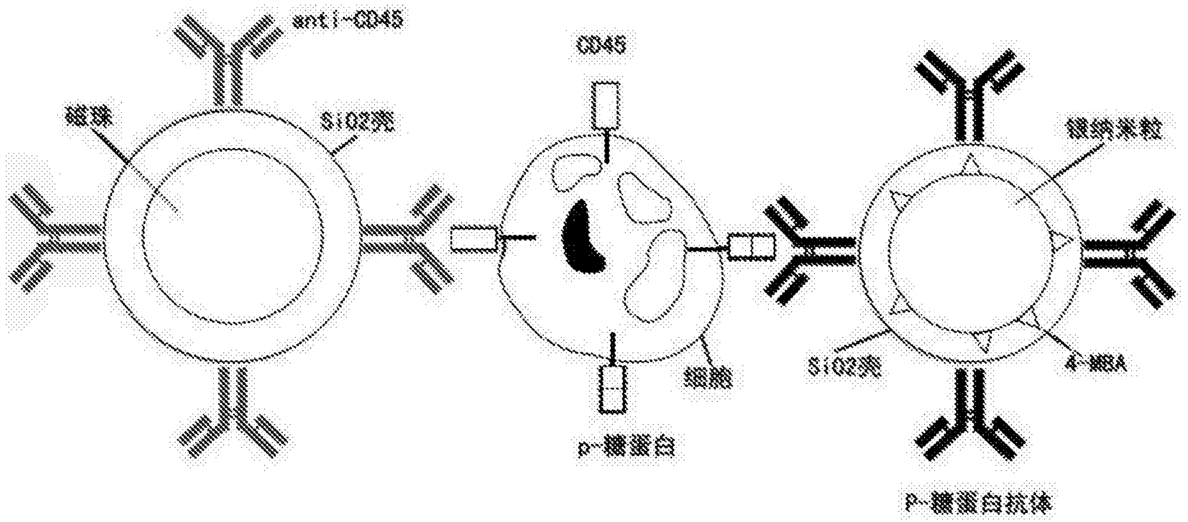

anti-CD45
磁珠
SiO2壳
CD45
银纳米粒
细胞
p-糖蛋白
SiO2壳
4-MBA
P-糖蛋白抗体

图1

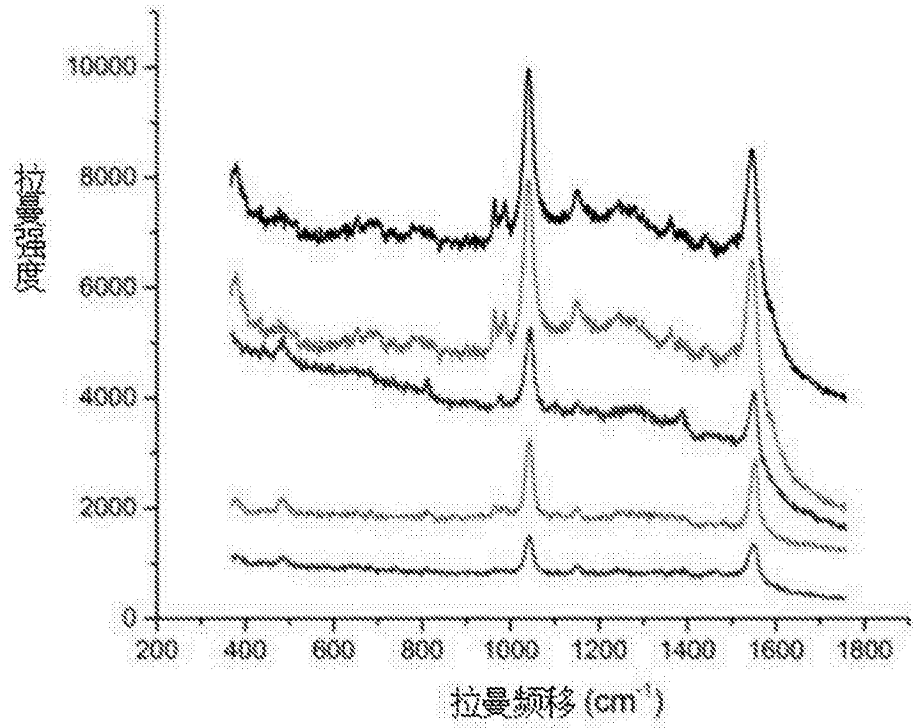

10000
8000
6000
4000
2000
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
拉曼频移 (cm-1)

图2

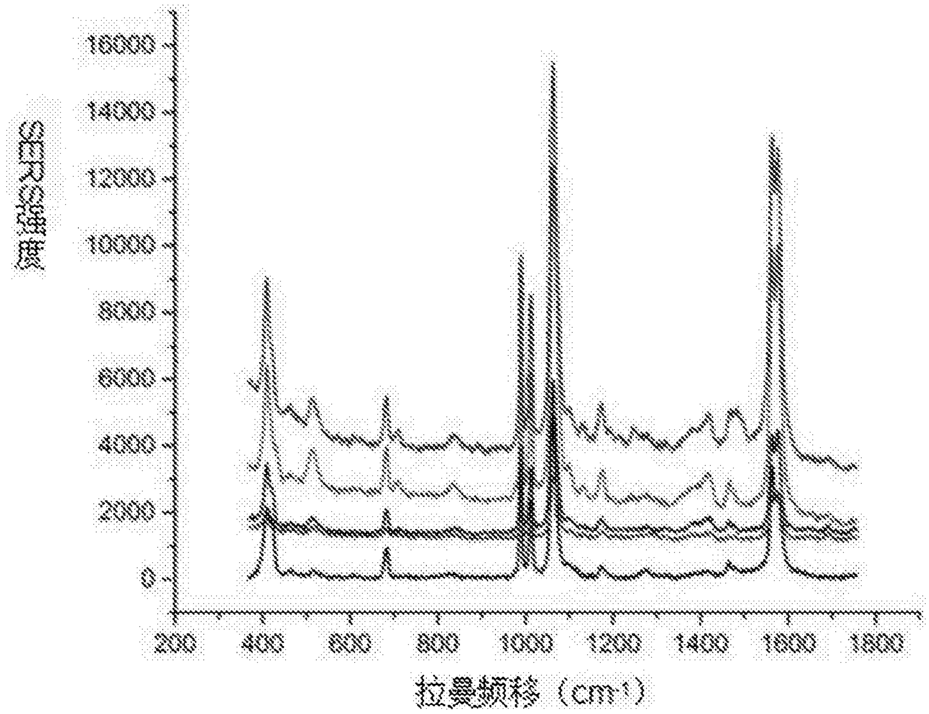

SERS强度
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
拉曼频移（cm-1）

图3

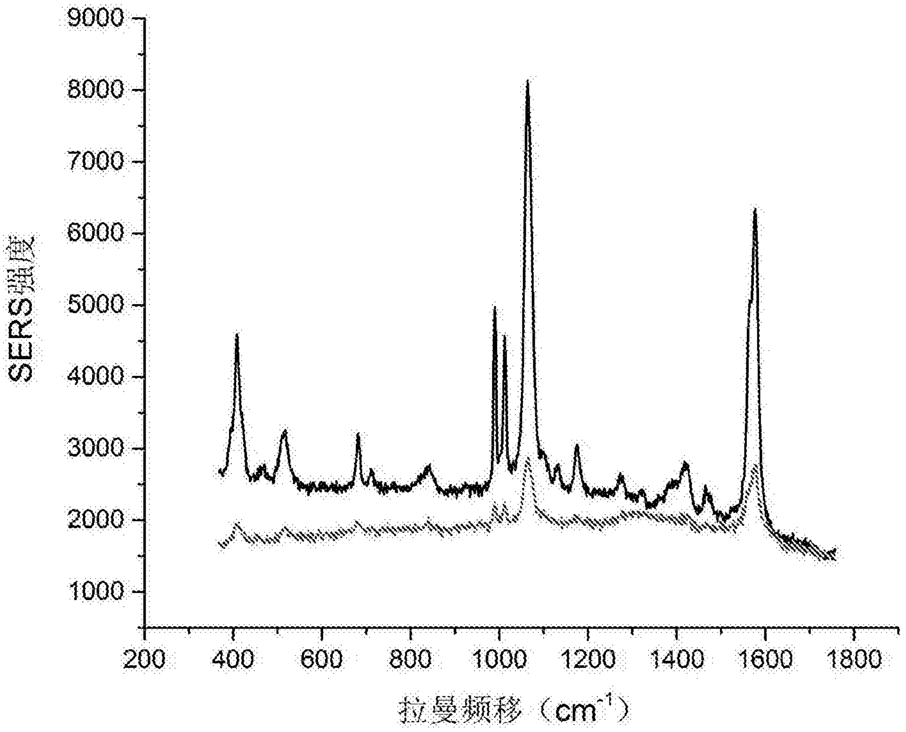
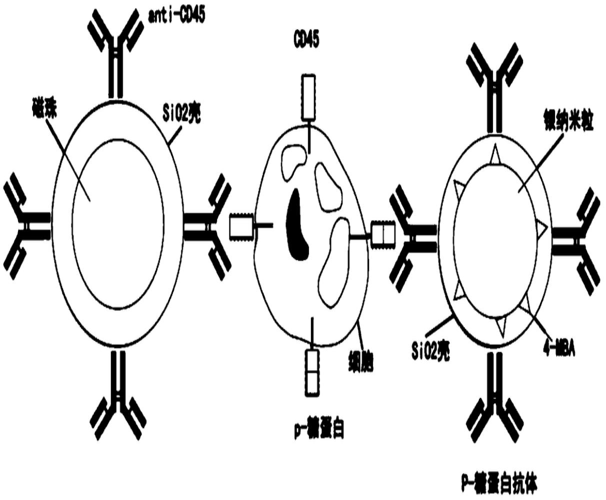

SERS强度
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
拉曼频移（cm-1）

图4

patsnap

专利名称(译)	一种SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN107817340A	公开(公告)日	2018-03-20
申请号	CN201710977792.1	申请日	2017-10-17
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	东南大学		
[标]发明人	王著元 王玉洁 王飞 陈宝安 崔一平		
发明人	王著元 王玉洁 王飞 陈宝安 崔一平		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/531 G01N33/68		
代理人(译)	陆涛		
优先权	201710646926.1 2017-08-01 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种SERS技术检测多药耐药蛋白的试剂盒及其应用，以鉴别细胞耐药性。该试剂盒中采用的检测试剂包括硅包银胶的SERS探针、硅包裹Fe3O4的捕获磁珠，并提供了检测试剂的制备方法。同时，本发明公开了该试剂盒在多药耐药蛋白检测中的应用，硅包银胶的SERS探针、硅包裹Fe3O4的捕获磁珠与靶细胞一起组成SERS探针-细胞-磁珠“三明治”结构，重新悬浮于去离子水后制备载玻片样品进行SERS检测。相比现有技术，本发明提供一种快速、简便、高灵敏的SERS免疫探针检测多药耐药蛋白的试剂盒及其应用，该试剂盒具有高度敏感性及特异性，能有效检测P-糖蛋白含量的高低。