



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104034881 B

(45) 授权公告日 2016.07.06

(21) 申请号 201410213233.X

CN 103531707 A, 2014.01.22,

(22) 申请日 2014.05.20

CN 103025314 A, 2013.04.03,

(73) 专利权人 南京益得冠电子科技有限公司  
地址 210009 江苏省南京市江宁开发区胜太  
路68号

WO 2012/023840 A2, 2012.02.23,  
赵紫来等. 氧化铁磁性纳米粒子的制备、  
表面修饰及在分离和分析中的应用. 《化学进  
展》. 2006, 第18卷(第10期),

(72) 发明人 章伟 胡雪峰

廉洁等. 多靶标生物标志物检测的微流体磁  
敏生物传感器研制. 《分析化学研究报告》. 2013,  
第41卷(第9期),

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限  
公司 32200

审查员 舒霏霏

代理人 邓唯

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 27/72(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101964393 A, 2011.02.02,

CN 102937651 A, 2013.02.20,

CN 101755210 A, 2010.06.23,

CN 1480729 A, 2004.03.10,

CN 102270736 A, 2011.12.07,

CN 101158697 A, 2008.04.09,

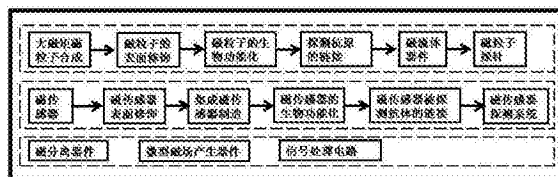
权利要求书2页 说明书10页 附图5页

(54) 发明名称

高通量多通道低丰度生物分子的磁传感识别  
方法

(57) 摘要

本发明涉及一种高通量多通道低丰度生物分子  
的磁传感识别方法,属于生物分子识别技术领  
域。本发明主要针对基于抗原-抗体、细胞因子-  
细胞因子受体、生物活性肽-受体、生物素-亲和  
素、手性分子等系统构成的免疫标记生物分子检  
测、监测和识别方法。以超顺磁的磁性粒子和高性  
能磁传感器构成生物分子探针和探测系统。其可  
以应用于生物、医药和食品安全等应用领域,可以  
进行生物分子识别、检测和监测;临床疾病诊断;  
食品安全检测;病毒和细菌检测。



高通量、多通道、低丰度生物分子的磁传感识别和检测系统

1. 一种高通量多通道低丰度生物分子的磁传感识别方法,其特征在于,包括如下步骤:

第1步、磁纳米粒子的表面修饰:在磁纳米粒子上包覆壳层,所述的壳层的材料是惰性金属、高分子聚合物或者二氧化硅,得到表面修饰的磁纳米粒子;

第2步、磁粒子的表面生物功能化:在第1步所得的表面修饰的磁纳米粒子上包覆上链霉亲和素,得到探测探针;

第3步、磁传感器薄膜的沉积:利用薄膜真空沉积方法制作磁传感器薄膜;

第4步、磁传感器微纳米制造:将磁传感器薄膜制造成传感器阵列,并在传感器的两端安装钉扎层器件结构;

第5步、标定磁传感器的磁电阻:对第4步制得的传感器进行磁电阻的测定;

第6步、磁量子传感器的表面修饰:在磁传感器上依次进行金属氧化物和高分子多层表面层的修饰,再在高分子多层表面层上键合要检测的生物分子抗原对应的抗体,得到键合抗体的磁量子传感器;

第7步、生物分子与传感器的偶联:将设定浓度的需要检测的生物分子作为抗原偶联在第6步所得的磁量子传感器的抗体上;

第8步、分析抗体与生物素的偶联:将要检测的生物分子抗原对应的抗体与生物素偶联;

第9步、将第8步得到的偶联生物素的抗体与第7步所得的磁量子传感器通过抗原-抗体结合,得到有抗体-抗原-生物素偶联抗体的磁量子传感器;

第10步、探测探针的偶联:将第2步得到的探测探针偶联至第9步中得到有生物素偶联的抗体上;

第11步、偶联和非偶联磁性探针的磁分离:开启磁场,将没有和有生物素偶联的磁量子传感器偶联的探测探针从传感器表面分离;

第12步、标准曲线的绘制以及生物分子的测定:测定第11步所得的磁量子传感器的磁电阻,与事先在第5步标定的磁电阻进行比较,得到来自磁探针的响应;

第13步、改变抗原的浓度,重复第7步-第12步,得到抗原的浓度与磁电阻值之间关系的标准曲线;

第14步、对待测样本进行测定,通过标准曲线计算得到待测样本中抗原的浓度;

所述的生物分子是可以通过免疫学方法连接的生物大分子、生物标记物、细菌、激素或者农药。

2. 根据权利要求1所述的高通量多通道低丰度生物分子的磁传感识别方法,其特征在于:所述的磁纳米粒子是指:超顺磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 或者 $\text{MFe}_2\text{O}_4$ ,所述的M是指Mn、Mg、Fe、Co、Ni或者Zn中的一种;或者是铁磁性的金属元素或者其合金,所述的合金是指: $\text{FeCo}$ 、 $\text{FeNi}$ 、 $\text{CoNi}$ 或者 $\text{FeCoNi}$ 。

3. 根据权利要求1所述的高通量多通道低丰度生物分子的磁传感识别方法,其特征在于,所述的第2步中,是通过AEAPS磁性纳米粒子表面偶联方法进行链霉亲和素的包覆。

4. 根据权利要求1所述的高通量多通道低丰度生物分子的磁传感识别方法,其特征在于:所述的磁传感器是各向异性磁电阻传感器、线圈感应传感器、巨磁阻传感器或者自旋电子隧穿传感器中的一种。

5. 根据权利要求1所述的高通量多通道低丰度生物分子的磁传感识别方法,其特征在

于:第3步中,通过等离子化学气相沉积法在磁传感器上修饰金属氧化物层;通过聚烯丙基胺溶液化学反应方法沉积高分子层。

## 高通量多通道低丰度生物分子的磁传感识别方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种高通量多通道低丰度生物分子的磁传感识别方法,属于生物分子识别技术领域。其可以应用于生物、医药和食品安全等应用领域,可以进行生物分子识别、检测和监测;临床疾病诊断;食品安全检测;病毒和细菌检测。

### 背景技术

[0002] 生物分子识别在RNA链识别,基因检测,细菌诊断,新的药物发现,DNA缺陷及生物战中致命毒剂,食品安全和以恶性肿瘤为代表的重大疾病的早期诊断检测等方面有着广泛的应用。随着人类基因图的完成,对过去大量未知基因链信息的了解已成为可能。生物分子识别和检测已从科学研究的领域扩展至我们现代人类社会的每一个角落。

[0003] 无标记和免疫标记是生物分子检测的两种主要的方法。无标记技术直接测量生物分子的质量和介电性能,从而避免了生物分子的修饰。电荷、折射率、电化学氧化和质谱是无标记生物分子检测常用的测量手段,其中生物质谱技术是最具有广泛应用前景的无标志物生物分子检测技术。然而,生物质谱技术在多种生物标志物的分子量非常接近的情况,通过质谱仪直接测量全段标志物分子的质量并不能实现可靠的分子识别。根据需要,质谱还常将某个肽离子经过诱导碰撞碎裂成为更小的碎片离子,通过测量这些碎片离子的质荷比和强度,获得二级或串联质谱。此外质谱检测出来的蛋白质还需要传统方法鉴定,小分子量标志物分子的检测难度大,影响因素较多和敏感度相对较低。

[0004] 标记免疫分析是另一种高灵敏度、高特异性生物分子检测技术。因其具有许多独特优点,已成为生物分子检验的重要技术手段。目前生物分子标记技术主要有抗原-抗体、细胞因子-细胞因子受体、生物活性肽-受体、生物素-亲和素系统等靶向系统。通过不同的靶向途径,可以将示踪剂精确地导向生物分子,从而提高生物分子检测灵敏度。由于大多数生物分子的含量甚微,标记生物分子检测的最大挑战和关键在于能否拥有探测到极小浓度甚至单生物分子的超高灵敏度的诊断科学和技术。

[0005] 常见的标记生物分子识别方法是光或电生物信号探测。电生物分子识别技术是转换生物识别过程到一个电信号的探测,通常电流、电阻、电抗及电容的变化。大多数电生物敏感器利用电化学反应来实施信号传递。酶分子标识是最常见的用于电化学生物传感器方法。当用酶标识的分子连接被探测生物分子时,由于氧化还原反应产生一个电流,借助于可探测的电流及电流的大小来识别生物分子与生物分子的量。电生物探测的一个巨大优势是它能利用现有的集成电路,特别是场效应晶体管(FET)来测量电信号,然而至今的实验表明,即使运用高灵敏纳米FET或碳纳米管,仍不能探测发源于 $10^{-10}$ 以下生物分子的信号,所以生物分子探测需要更高灵敏度及准确的识别方法。

[0006] 用荧光分子或荧光纳米晶体标识生物分子和半导体量子点,其探测过程是可见的。直接、简单和可见的探测过程是生物分子光标识及探测的最大优点。通过探测光的波长及强度来确定被探测的生物分子是否存在及量的大小。然而光标识方法探测生物分子有着固有的缺点,即光致脱色及串活干扰。若励激激光太强,光对荧光分子的损伤引起荧光特性

的丢失,从而检测失效。同样光对荧光分子的励激,由于杂质及背景的存在,可能产生一个宽的光谱,引起串活干扰。最后,用于荧光探测的激光扫描系统通常体积大、速度慢而且价格昂贵,不能满足针对社区医疗、农村基层医疗与家庭对重大疾病快速早期诊断和食品安全大规模筛查的需求。

### 发明内容

[0007] 本发明在思路、材料、器件、技术途径等多个方面均具有明显的独创性。首先在思路上,充分发挥磁技术的优势。磁分子探针、磁传感探测器、标识分子的磁分离、磁流体器件采用全新的“磁”技术。在材料采用方面,大磁矩超顺磁纳米粒子材料,磁传感器包括量子隧穿传感材料,新的磁粒子和磁传感表面的包裹和生物功能化材料都是全新和系统的引入。在生物分子识别和检测模式上,提出以磁传感器为核心的单分子高灵敏检测技术,将突破以光、声、影为主要生物分子识别和检测技术的局限性,开辟全新的磁生物分子识别和检测技术。本发明主要针对基于抗原-抗体、细胞因子-细胞因子受体、生物活性肽-受体、生物素-亲和素、手性分子等系统构成的免疫标记生物分子检测、监测和识别方法。以超顺磁的磁性粒子和高性能磁传感器构成生物分子探针和探测系统。

[0008] 本发明的目的是提供了一种高通量多通道低丰度多通道生物分子的磁传感识别方法,包括如下步骤:

[0009] 第1步、磁纳米粒子的表面修饰:在磁纳米粒子上包覆壳层,所述的壳层的材料是惰性金属、高分子聚合物或者二氧化硅,得到表面修饰的磁纳米粒子;

[0010] 第2步、磁粒子的表面生物功能化:在第1步所得的表面修饰的磁纳米粒子上包覆上链霉亲和素,得到探测探针;

[0011] 第3步、磁传感器薄膜的沉积:利用薄膜真空沉积方法制作磁传感器薄膜;

[0012] 第4步、磁传感器微纳米制造:将磁传感器薄膜制造成传感器阵列,并在传感器的两端安装钉扎层器件结构;

[0013] 第5步、标定磁传感器的磁电阻:对第4步制得的传感器进行磁电阻的测定;

[0014] 第6步、磁量子传感器的表面修饰:在磁传感器上依次进行金属氧化物和高分子多表面层的修饰,再在多层表面层上键合要检测的生物分子抗原对应的抗体,得到键合抗体的磁量子传感器;

[0015] 第7步、生物分子与传感器的偶联:将设定浓度的需要检测的生物分子作为抗原偶联在第6步所得的磁量子传感器的抗体上;

[0016] 第8步、分析抗体与生物素的偶联:将要检测的生物分子抗原对应的抗体与生物素偶联;

[0017] 第9步、将第8步得到的偶联生物素的抗体与第7步所得的磁量子传感器通过抗原-抗体结合,得到有抗体-抗原-生物素偶联抗体的磁量子传感器;

[0018] 第10步、探测探针的偶联:将第2步得到的探测探针偶联至第9步中得到有生物素偶联的抗体上;

[0019] 第11步、偶联和非偶联磁性探针的磁分离:开启磁场,将没有和有生物素偶联的磁量子传感器偶联的探测探针从传感器表面分离;

[0020] 第12步、标准曲线的绘制以及生物分子的测定:测定第11步所得的磁量子传感器

的磁电阻,与事先在第5步标定的磁电阻进行比较,得到来自磁探针的响应;

[0021] 第13步、改变抗原的浓度,重复第7步-第12步,得到抗原的浓度与磁电阻值之间关系的标准曲线;

[0022] 第14步、对待测样本进行测定,通过标准曲线计算得到待测样本中抗原的浓度。

[0023] 本发明所述的生物分子包括:抗原-抗体、细胞因子-细胞因子受体、生物活性肽-受体、生物素-亲和素、手性分子等生物分子。

[0024] 生物素-亲和素系统(BAS),是七十年代后期发展起来的一种生物反应放大系统。二者具有高度的特异的亲和性。生物素为小分子物质;亲和素有卵白素(又称亲和素)和链亲和素。生物素与亲和素/链亲和素之间的亲和性,至少是抗原(Ag)抗体(Ab)间的一万倍以,且不易受外界干扰,复合物稳定。二者均可偶联蛋白质、核、多糖和酶等生物活性物质,同时还能与固相材料结合,通过这些特性可将它们偶联起来。

[0025] 生物素-亲和素/链亲和素既可偶联生物大分子,又可连接标记材料。因此,该方法的应用范围是具有抗原及其对应抗体的广泛标本的检测中,例如:可以用于对蛋白质、核酸、多糖、HBsAg、TP、HCV、HIV等生物大分子,也可将其应用于生物标记物的检测,例如:对肿瘤标志物如前列腺癌(PSA, PAP),乳腺癌(CA15-3, CA125, CA27.29, CEABRCA1, BRCA2, MUC-1, CEA, NY-BR-1, 1NG-1),白血病(Chromosomal abnormalities),睾丸癌( $\alpha$ -Fetoprotein(AFP),  $\beta$ -human chorionic gonadatropin, CAGE-1, ESO-1),卵巢癌(CA125, AFP, hCG, p51, CEA),其他固体肿瘤(Circulating tumour cells in biological fluids, expression of targeted growth factor receptors),结肠癌和胰腺癌(CEA, CA19-9, CA24-2, p53),肺癌(NY-ESO-1, CEA, CA19-9, SCC, CYFRA21-1, NSE),黑素瘤(Tyrosinase, NY-ESO-1),肝癌甲胎蛋白(AFP), CEA, 胃癌(CA72-4, CEA, CA19-9),食道癌(SCC),滋养层肿瘤(SCC, hCG),膀胱癌(BAT, FDP, NMP22, HA-Hase, BLCA-4, CYFRA21-1)、前列腺特异性抗原(PSA)等的检测,和对雌二醇、雌三醇、T3、T4、人促甲状腺激素等激素类分子的检测。该方法也可以应用于样本中的细菌、农药、激素等的检测。在食品安全检测中,可以对肉制品、水产品、乳制品、蜂蜜等动物源性食品中氯霉素,水产品、乳制品中蓖麻毒素 B,鱼、虾等水产品中孔雀石绿,肉、食品中的胶质纤维蛋白,牛奶中的葡萄球菌, C<sub>2</sub>型肠毒素,蔬菜、水果中的氨基甲酸甲酯,肉或肉制品中的肉毒毒素 B, 畜禽、水产品、组织中的盐酸克伦特罗,食糖、饼干、自制葡萄酒中的罂粟碱,哺乳动物口腔唾液、胃液、反流呕吐等中的幽门螺杆菌,转基因玉米、大豆中的Cry1(Ab)和CP4-EPSPS 蛋白,火锅汤料,调料,凉皮中的阿片生物碱,米、面包、和饼干中的葡萄球菌等。

[0026] 本发明中所述的磁纳米粒子是指:超顺磁性Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>或者MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M是指Mn、Mg、Fe、Co、Ni或者Zn中的一种),或者是铁磁性的金属元素(例如Fe、Co、Ni)或者其合金(例如:FeCo、FeNi、CoNi和三元系(FeCoNi)),本发明采用的磁量子颗粒具有小尺寸、单分散、窄尺寸分布、粒径和形貌可控的其磁化强度和磁化率可调可控。目前已知和在商业上很容易获得多种形式的磁纳米粒子。示例包括在US-A-4554088和US-A-3917538中所述的氧化铁颗粒、如在Biotec.和Bioengr.X1X:101-124(1977)中所述的氧化镍颗粒、如在US-A-4732811中所述的包含磁颗粒的琼脂糖-聚醛小球、DYNAL小球(商业上可获得的、磁性聚苯乙烯涂覆的小球)、Magogel144(磁性聚丙烯酰胺-琼脂糖小球)、如在Clin.Chim.Acta.69:387-396(1976)中所述的ENZACRY(聚M苯二胺/氧化铁)。包含氧化铁颗粒的纤维素在Clin.Chem.26:

1281-1284(1980)中介绍,且白蛋白磁微球在J. IMMUNOL. Methods 53:109-122(1982)中介绍。磁多孔玻璃颗粒在WO-A-93/10162中介绍。 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 是已知的和在商业上很容易获得的磁纳米粒子。 $\text{MFe}_2\text{O}_4$ 磁纳米粒子需要通过化学合成获得。

[0027] 本发明的超顺磁性是指在不外加磁场时,超顺磁性粒子无任何磁性是单相分离的纳米粒子,不会产生粒子集聚。当超顺磁性粒子暴露在磁场时,超顺磁性粒子发生磁化,产生磁偶极子。本领域的技术人员公知,一般情况下,在饱和磁化时,一克5纳米超顺磁性粒子具有45emu的磁动量和每一5纳米超顺磁性粒子在饱和磁化下能在1微米的距离处产生 $3\sim 4 \text{ Oe}$ 的边缘场。

[0028] 在第1步中,在磁纳米粒子上包覆壳层的目的是为了实现在稳定的磁性纳米粒子的磁学特性、避免后续的化学和生物过程对磁粒子修饰和容易实现链酶亲和素和磁性纳米粒子的偶联。所述的壳层的材料是可以选自惰性金属、高分子聚合物或者二氧化硅等。这些包覆方法可以采用常规的化学方法实现。例如:将Triton X-100均匀混合,形成透明稳定的微乳液体系。再向其中加入 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,用超声处理后取出上层液,搅拌使之均匀。加入浓氨水和正硅酸乙酯搅拌10 小时。静置沉淀,用乙醇清洗,将清洗后的粒子在高温下煅烧1-4小时,收集粒子,得到 $\text{SiO}_2$ 壳修饰的磁纳米粒子。

[0029] 第2步中,包覆链酶亲和素的方法可以采用常规的生物分子偶联方法。具体方法分为二个步骤:首先实现磁性粒子的氨基胶链,然后实现链霉亲和素的偶联。在惰性金属、高分子或者氧化硅材料上的氨基胶链包覆的方法可采用共性的[N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷](AEAPS)磁性纳米粒子表面偶联方法。具体方法为:取一定量的 $\text{SiO}_2$ 表面修饰的磁性纳米粒子加入到一定量的甲醇和丙三醇的混合溶液中,超声处理;取一定量的AEAPS加入到混合溶液中,超声处理使溶液混合均匀;在一定温度下,反应2-3个小时,然后取出粒子用甲醇清洗和一定温度下真空干燥两小时,收集粒子。链霉亲和素的偶联的具体方法为:用去Rnase酶水配置PB缓冲液(磷酸盐缓冲溶液),然后进行高压灭菌。将链霉亲和素溶于PB溶液中,取一定量装在EP管中。将修饰好氨基的粒子放入灭菌水中浸泡,用PB缓冲液清洗后,再加入PB和超声分散。以后将修饰好氨基的粒子PB悬浊液加入上述链酶亲和素溶液,室温下振荡反应一定时间。反应完全后,向其中加入戊二醛培养。然后用PB缓冲液洗涤多次,最后将粒子分散在PB 溶液中, $40^\circ\text{C}$ 下保存待用。

[0030] 本发明中所述的磁传感器是指以下传感器:各向异性磁电阻传感器(Anisotropic magnetic resistance, AMR)、线圈感应传感器(Coil inducted sensor)、巨磁阻传感器(Giant Magnetoresistance, GMR)和自旋电子隧穿传感器(Tunneling Magneto Resistance, TMR);从原理上来看,这些传感器都能用于本发明的生物分子检测。传感器的选择取决于实际生物分子检测量对传感器灵敏度的要求。在巨磁阻传感器和自旋电子隧穿传感器的器件结构设计中,为提高灵敏度、信号输出和抑制传感器噪声,本发明在巨磁阻和自旋电子隧穿传感器结构设计中在传感器的两端引入超晶格反铁磁钉扎层。超晶格反铁磁钉扎层由硬磁CoPt/Ru/CoPt材料构成,在退火磁化后,超晶格反铁磁钉扎层提供强的磁钉场,其能够钉着传感器自由层中边缘磁畴的旋转、抑制薄膜磁噪声从而增强传感器信号,这些传感器经优化后能提供足够的供生物分子检测的灵敏度。

[0031] 第3步中,在磁传感器上依次修饰上金属氧化物和高分子材料的方法,是用等离子化学气相沉积和化学方法形成。例如:首先用等离子化学气相沉积方法在传感器表面沉积

金属氧化物( $\text{TiO}_2$ 、 $\text{RuO}_2$ 、 $\text{Ta}_3\text{O}_5$ 等),然后用聚烯丙基胺溶液化学反应方法沉积高分子1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺层。在磁传感器上修饰抗体的方法可以采用常规的生物滴入、冲洗和偶联。首先用移液器在传感器表面滴入被测量抗原的抗体,在 $4^\circ\text{C}$ 温度下停放12小时最后用封闭缓冲液冲洗两次,并进一步在同一缓冲液中和在室温下阻断60分钟。

[0032] 第5步中,探测抗体与生物素偶联的方法是采用常规的生物和化学反应方法:用无水DMSO配制生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液。探测抗体用硼酸盐缓冲液配制适当浓度的抗体溶液,按比率将生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液加入抗体中,混合均匀并在室温下孵育。将抗体溶液用PBS或其他所需的缓冲液透析,以除去未结合的生物素。

[0033] 作为本方法的改进,可以在同一个检测系统中设置针对多种目标分子的磁纳米粒子探针以及修改的磁感应器,可以实现多种目标分子的同时检测。

[0034] 有益效果

[0035] 本发明能极大的提高生物分子识别、检测和监测的灵敏度同时实现高通量和多通道的即时、在位的检测和监测。在检测灵敏度上,本发明可以实现单生物分子的检测;本发明构建高性能微纳磁传感器阵列(在标准化验薄片上集成10000个器件,可参见图8)可对多种生物分子同时进行多通道检测;由于采用磁传感检测、磁分离器件、磁微流体器件、新的生物分子包裹和功能化和微弱电信号的检测和处理器件,本发明极大的提高了检测的效率,对100个标志物同时测量的时间 $<10$ 分钟,实现高通量的生物分子识别、检测和监测。

## 附图说明

[0036] 图1是磁传感生物分子检测原理的示意图;

[0037] 图2是生物分子识别和探测的磁传感系统的总体结构;

[0038] 图3(a)和图3(b)是磁纳米粒子表面修饰的示意图,其中图3(a)是指:磁纳米粒子的表面用金属、高分子聚合物或者二氧化硅的修饰,产生了修饰层,图3(b)是指:在磁纳米粒子的修饰层上再进行表面生物功能化;

[0039] 图4是磁纳米粒子和探测分子(抗体)的生物偶联;

[0040] 图5是磁传感器和超晶格反铁磁钉扎层器件结构;

[0041] 图6是磁传感器多层超薄金属氧化物膜和高分子聚合物表面改性;

[0042] 图7是捕获分子和传感器表面的生物偶联;

[0043] 图8是磁流体器件的系统结构;

[0044] 图9a是磁场开启前的微型磁分离系统;

[0045] 图9b是磁场开启后的微型磁分离系统

[0046] 图10超晶格反铁磁钉扎层的传感器系统

[0047] 图11实施例1中利用这种传感器检测乳腺癌生物标志物分子的结果(可检测Femto M ( $10^{-15}$ )浓度的分子)。

[0048] 图12实施例2中使用传感器检测大米中黄曲霉毒素(AFB1)的结果(可检测NanoM ( $10^{-9}$ )浓度的分子)。

## 具体实施方式

[0049] 实施例1:医学应用:乳腺癌标志物分子CEA的检测

[0050] 整个的识别方法的原理示意图可以如图1,其显示了各个无器件、抗体、抗原之前的连接修饰方式;整个步骤过程,如图2所示;

[0051] 第1步磁纳米粒子的合成和表面修饰:

[0052] 为改善磁粒子的化学稳定性和生物相容性,考虑三维空间结构、氢键、静电力、疏水作用,本发明在磁纳米粒子表面采用包裹惰性金属、高分子聚合物以及二氧化硅壳层直接表面改性技术,使磁纳米粒子表面具有化学稳定性和优异的生物相容性。本实施例中以 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性粒子为例,具体方法为称取氯化亚铁 $1.2 \text{ gFeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于  $60 \text{ mL}$  超声脱气蒸馏水中,加入 $15 \text{ mL} 0.6 \text{ mol/L}$ 的氯化铁 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液。在 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 、搅拌与超声作用下,用喷雾器向溶液中喷入 $2 \text{ mol/L}$ 的氢氧化钠 $\text{NaOH}$ 溶液使 $\text{pH}$ 值达到 $11\sim 12$ ,反应 $60 \text{ min}$ ,使所得 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微粒充分熟化。磁分离 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微粒并用蒸馏水清洗5次,搅拌,分散 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 微粒于 $120 \text{ mL}$ 水中,超声震荡 $15 \text{ min}$ ,加入油酸钠水溶液,搅拌,于 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 $30 \text{ min}$ ,降温至 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,再加入十二烷基苯磺酸(SDBS)钠水溶液,调节溶液 $\text{pH}$ 值为7,再反应 $15 \text{ min}$ 后稀释到 $250 \text{ mL}$ ,超声 $1 \text{ min}$ ,冷却,即得稳定的水基 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性粒子。

[0053] 接下来,将Triton X-100(聚乙二醇辛基苯基醚)、正己醇、环己烷按体积比 $1:2:5$ 的比例均匀混合,形成透明稳定的微乳液体系。再向其中加入 $0.5 \text{ g}$ 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性粒子,用超声处理6分钟后取出上层液倒入三颈瓶中,搅拌30分钟使之均匀。加入 $1 \text{ mL}$ 浓氨水和 $3 \text{ mL}$ 正硅酸乙酯 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 搅拌10小时。静置沉淀,用乙醇清洗,将清洗后的粒子在 $400\sim 700 \text{ }^\circ\text{C}$ 的条件下煅烧1-4小时,收集粒子,得到 $\text{SiO}_2$ 壳修饰的磁纳米粒子,如图3(a)所示。

[0054] 第2步、磁粒子的表面生物功能化:在第1步所得的 $\text{SiO}_2$ 壳修饰的磁纳米粒子上包覆上链霉亲和素,得到探测探针,首先实现磁性粒子的氨基胶链。包覆的方法采用[N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基硅烷](AEAPS)磁性纳米粒子表面。

[0055] 取 $20 \text{ mg SiO}_2$ 表面修饰的磁性纳米粒子加入到 $500 \text{ mL}$ 的甲醇和丙三醇的混合溶液中,超声30分钟。用超声波处理20-60分钟;取 $50 \mu\text{L}$ 的AEAPS加入到混合溶液中,超声处理10-60分钟,使溶液混合均匀;在 $15\sim 90 \text{ }^\circ\text{C}$ 的反应条件下,反应2-3个小时,然后取出粒子用甲醇清洗2-3次,一定温度下真空干燥两小时,收集粒子。

[0056] 然后在磁性纳米粒子上连接链霉亲和素。具体方法为用去Rnase酶水配置PB缓冲液(磷酸盐缓冲溶液)( $0.1 \text{ mol/L}$ ,  $\text{pH}=7.0$ ),进行高压灭菌。将 $0.5 \text{ mg}$ 的链霉亲和素(上海生工)溶于 $0.5 \text{ mL}$ 的PB溶液中,取 $50 \mu\text{L}$ 装在EP管中。将 $5 \text{ mg}$ 修饰好氨基的粒子放入灭菌水中浸泡,用PB缓冲液清洗3次后,再加入 $1 \text{ mL}$  PB,超声分散 $10 \text{ min}$ 。将修饰好氨基的粒子PB悬浊液 $500 \mu\text{L}$ ,加入 $50 \mu\text{L}$ 的上述链霉亲和素溶液,室温下振荡反应 $24 \text{ h}$ 。反应完全后,向其中加入 $1 \text{ mL}$ 的戊二醛培养两小时。用PB缓冲液洗涤清洗4次,每次用量为 $1 \text{ mL}$ ,最后将粒子分散在 $1 \text{ mL}$ 的PB溶液中, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存待用。

[0057] 整个修饰完成后的结构如图3(b)所示。

[0058] 第3步、磁量子传感器阵列的制造:在磁传感器上依次进行金属氧化物和高分子多层表面层的修饰,再在高分子多层表面层上键合需要检测的生物分子对应的抗体,得到修饰后的磁量子传感器;金属氧化物的表面修饰薄膜和磁传感器多层膜的沉积是用同一PVD(物理气相沉积)连续沉积的。金属氧化物层可以是 $\text{TiO}_2$ 、 $\text{Ta}_2\text{O}_5$ 、 $\text{RuO}$ 等。

[0059] 具体的磁各向异性磁电阻传感器、电线圈感应传感器、巨磁阻传感器(GMR)和自旋

电子隧穿传感器(TMR)和金属氧化物薄膜的具体制作过程是:(1)磁各向异性电阻传感器:利用磁控溅射在清洗过的热氧化二氧化硅单晶硅片上沉积100纳米磁性材料(Ni、Co、Fe、Mn、NiFe、CoFe、NiMn、CoMn、NiFeCo、和 NiCoMn),以后用化学气相沉积方法沉积TiO<sub>2</sub>(30nm)层,做后利用半导体工艺将磁各向异性薄膜微制造成120X120微米的微传感器阵列;(2)电线圈感应传感器:利用电镀的方法在化学清洗过的热氧化二氧化硅单晶硅片上沉积1微米的非磁性的金属薄膜(Cu、Au、Ag、Al等),然后在利用半导体工艺将非磁性的金属薄膜微制造成直径为100微米的微线圈后,用化学气相沉积方法在微线圈上沉积TiO<sub>2</sub>(30nm)层。最后用半导体工艺制作120X120微米的微传感器阵列;(3)巨磁阻传感器(GMR)和金属氧化物薄膜:在清洗过的热氧化二氧化硅单晶硅片上,通过磁控溅射(Veeco,CMY PVD)依次沉积CoFe(5nm)/IrMn(7nm)/CoFe(2.5nm)/Ru(8.4nm)/NiFe(3.5nm)/Ta(5nm)/Ru(10nm)/Ta(20nm),以后用化学气相沉积方法沉积TiO<sub>2</sub>(30nm)层;然后利用利用半导体工艺技术同步形成几十或几百微米尺寸的微传感器阵列和在每个微传感器两侧导入超晶格反铁磁钉扎层器件结构,其结构如图5所示,最终将GMR薄膜微制造成微传感器阵列。(4)自旋电子隧穿传感器(TMR)和金属氧化物薄膜:利用Ane1va磁控溅射设备依次沉积作NiFe(1μm)/CoFe(2.5nm)/IrMn(5nm)/CoFe(2.1nm)/Ru(0.84nm)/CoFe(2.3nm)/Mg(0.2nm)/MgO(2.5nm)/MgO(0.3nm)/CoFe(2.1nm)/NiFe(2.5nm)/Ta(4.5nm)/Ru(12nm)/Ta(6nm)/TiO<sub>2</sub>(30nm)超晶格TMR结构和金属氧化物层,TiO<sub>2</sub>层是专为生物功能化的金属氧化物层;然后利用利用半导体工艺技术同步形成几十或几百微米尺寸的微传感器阵列和在每个微传感器两侧导入超晶格反铁磁钉扎层器件结构,最终将TMR薄膜微制造成120X120微米的微传感器阵列。

[0060] 120X120微米尺寸的AMR传感器具有250欧姆的电阻和在100 Oe磁场下产生1.5%的磁电阻变化;相同尺寸的 GMR微传感器具有700欧姆的电阻和在100 Oe磁场下产生7%的磁电阻变化。TMR微传感器具有30K欧姆的电阻和在100 Oe磁场下产生45%的磁电阻变化。最后在传感器的电极引线被电子束蒸发的三层(SiO<sub>2</sub> 20nm/Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 50nm/SiO<sub>2</sub> 20nm)钝化膜所保护后,微传感器被移至进一步的表面化学和生物功能化处理。

[0061] 金属氧化物层和高分子层修饰的目的是消除其他化学生物环境对靶分子与目标分子相互作用的干扰,实现对靶分子的特异性相互作用,实现捕获抗体分子和感应器表面的直接键合。

[0062] 在对传感器阵列上进行高分子修饰之前,需要测量表面修饰前的传感器的磁电阻。

[0063] 第4步、磁量子传感器的表面修饰:在在分子层上键合检测生物分子抗原对应的抗体的方法是:本实施例中采用GMR传感器,在该传感器TiO<sub>2</sub>表面先用丙酮、甲醇、异丙醇清洗,并随后暴露于氧等离子体3分钟。在Milli-Q纯净水(经0.22μm孔隙的滤膜过滤,电阻率~18.2 MΩ·cm,25℃)加入2%(重量/体积)聚烯丙基胺溶液。传感器阵列浸泡在溶液里5分钟后用Milli-Q水漂洗三次和150℃烘烤45分钟。然后在传感器表面用移液器滴入10%(重量/体积)1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和10%(重量/体积)N-羟基琥珀酰亚胺溶液,在室温下放置1小时后,该传感器阵列在40℃温度下干燥和形成制备好的高分子生物功能化的表面,整个修饰完成的传感器及表面结构如图6所示。

[0064] 第5步、捕获抗体与传感器表面键合的化学方法:用移液器在传感器表面分三次(每次360pL)滴入总数 1nL的CEA抗原的抗体,(从美国R&D system Inc. 或中国上海生物

化学购买)用移液器在传感器表面分三次(每次360pL)滴入总数 1nL的CEA捕获抗体。在控制传感器部分(没有捕获抗体的传感器)用移液器滴入50mL牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)。传感器芯片然后在4℃温度下停放12小时最后用封闭缓冲液(1%BSA和0.2%Tween 20 加入PBS)冲洗两次,并进一步在同一缓冲液中和在室温下阻断60分钟。传感器表面的偶联方式一般是放上抗原或抗体、细胞因子或细胞因子受体、生物活性肽或受体、生物素或亲和素,抗原-抗体、细胞因子-细胞因子受体、生物活性肽-受体、生物素-亲和素。

[0065] 第6步、检测分子的生物偶联:将需要检测的生物分子的抗原偶联在第5步所得的抗体上;具体步骤为:被测试生物分子乳腺癌抗原(CEA)分子(从美国R&D system Inc. 或中国上海生物化学购买)首先以PBS缓冲液中稀释到所需浓度。用移液器滴入20μL该分子溶液至传感器芯片表面并在室温下孵育1小时,接着,芯片用封闭缓冲液(1%BSA和0.2% Tween 20 加入PBS)漂洗两次。

[0066] 第7步、探测分子的生物偶联:先将探测分子的抗体与生物素偶联:以后与检测生物分子的抗原偶联,形成抗体-抗原-抗体(含有生物素)的三明治结构。首先制备生物素和抗体连接:用无水DMSO配制10mg/ml生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液。乳腺癌CEA抗原对应的抗体(上海卡努生物科技有限公司)用硼酸盐缓冲(0.1mol/L, pH8.8)配制浓度至少为1~3mg/ml的抗体溶液,若抗体储存时加入了叠氮钠,则标记前须先在硼酸盐缓冲液中充分透析以除去叠氮钠。按25~100μg/mg的比率将生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液加入抗体中,混合均匀并在室温下孵育4小时。在完成结合反应之前DMSO的终浓度不能低于5%,否则生物素酯会出现沉淀。高浓度的生物素酯会导致多个生物素分子结合在抗体上,因此可能会使所有抗体都被标记。较低的比率则会使得生物素化保持在最低限度(25μg生物素酯/mg抗体的最初摩尔比为10:1)。每250μg生物素酯内加入20μmol/L的氯化铵,室温孵育10分钟。将抗体溶液用PBS或其他所需的缓冲液透析,以除去未结合的生物素。由于生物素分子较大,故透析比预料中的要慢,或者用蛋白A或蛋白G层析柱再次纯化抗体。按纯化抗体的储存方法保存标记抗体。

[0067] 再将生物素偶联抗体与磁感应器上的抗原连接。具体的方法是:将生物素偶联抗体首先以PBS缓冲液中稀释到所需浓度。用移液器滴入10μL该分子溶液至感应器表面并在室温下孵育1小时,接着,芯片用封闭缓冲液(1%BSA和0.2%Tween 20 加入PBS)漂洗三次。

[0068] 第8步、探针分子的生物偶联:第2步产生的带有链霉亲和素的磁性探针和第7步中带有生物素的抗体偶联,形成抗体-抗原-抗体(生物素)-磁性针(链霉亲和素)结构,如图4所示。具体过程为:链霉亲和素连接的磁性纳米粒子(50/μL)放入磁和水混合的流体系统。磁流体系统循环速率约100ml/min。10分钟后,磁流体系统停止运行,磁纳米粒子在室温下和无搅拌下孵育20分钟。这样完成了在磁量子传感器上抗体-抗原-抗体=生物素-链霉亲和素=探测磁性粒子的生物偶联,如图7所示。

[0069] 第9步、偶联和非偶联磁性探针的磁分离:开启磁场,加电流200mA,产生1000e的磁场,没有和抗体(生物素)偶联-的磁性针(链霉亲和素)从磁量子传感器表面分离出去。在磁量子传感器表面只留下实现了抗体-抗原-抗体(生物素)-磁性针(链霉亲和素)偶联的磁性粒子。应用外加磁场进行未偶联和偶联磁探针的分离是一种简易的物理方法,其优势是避

免传统化学飘洗带来的对磁性粒子的化学腐蚀和磁学性能的损伤。

[0070] 第10步、传感器检测:开启扫描磁场,测试拥有抗体-抗原-抗体(生物素)-磁性针(链霉亲和素)偶联的传感器和控制传感器的磁电阻。通过比较得出传感器的信号强度和生物分子量的大小。

[0071] 利用这种方法,可实现fL ( $10^{-15}$  molar)量级的CEA检测,在5个不同的传感器芯片上和连续5次的测量,获得小于1% 精确性。利用这种方法检测的结果如图11所示。

[0072] 在图11中,横坐标是CEA抗原的浓度,单位是Log(摩尔分数),纵坐标是GMR传感器的输出电压,单位是Log(电压(毫伏)),从图中可以看出,在该浓度范围内,抗原浓度与输出电压的对数值,呈一定的线性关系,可以通过该方法对该CEA抗原进行识别以及定量分析。

[0073] 实施例2:食品安全应用:大米中黄曲霉毒素(AFB1)含量的检测

[0074] 第1步磁纳米粒子的合成和表面修饰:与实施例1第1步相同。

[0075] 第2步、磁粒子的表面生物功能化:与实施例1第2步相同。

[0076] 第3步、磁量子传感器阵列的制造:与实施例1第3步相同,但传感器阵列的尺寸为50x50微米( $\mu\text{m}$ )。

[0077] 第4步、磁量子传感器的表面修饰:与实施例1第4步相同。

[0078] 第5步、捕获抗体与传感器表面键合的化学方法:用移液器在传感器表面滴入50nL的AFB1抗原的抗体,(美国,Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 购买),在控制传感器部分用移液器滴入50mL牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)。传感器芯片然后在4°C温度下停放12小时最后用封闭缓冲液(1%BSA和0.2%Tween 20 加入PBS)冲洗两次,并进一步在同一缓冲液中和在室温下阻断60分钟。

[0079] 第6步、检测分子的生物偶联:用将黄曲霉毒素AFB1的标准品(美国,Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 购买)配置成不同浓度的溶液,样品通过摇动45分钟,再并用PBS稀释(溶液:PBS=1:5,V / V, 体积比)。用移液器滴入20 $\mu\text{L}$ 该样品溶液至传感器芯片表面并在室温下孵育1小时,接着,芯片用封闭缓冲液(1%BSA和0.2%Tween 20 加入PBS)漂洗两次。

[0080] 第7步、探测分子的生物偶联:先将探测分子的抗体与生物素偶联:以后与检测生物分子的抗原偶联,形成抗体-抗原-抗体(含有生物素)的三明治结构。首先制备生物素和抗体连接:用无水DMSO配制10mg/ml生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液。AFB1抗原的抗体,(美国,Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 购买)用硼酸盐缓冲(0.2mol/L,pH8.6)配制浓度至少为1~3mg/ml的抗体溶液。按25~100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 的比率将生物素N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液加入抗体中,混合均匀并在室温下孵育4小时。在完成结合反应之前DMSO的终浓度不能低于5%,否则生物素酯会出现沉淀。高浓度的生物素酯会导致多个生物素分子结合在抗体上,因此可能会使所有抗体都被标记。较低的比率则会使得生物素化保持在最低限度(25 $\mu\text{g}$ 生物素酯/mg抗体的最初摩尔比为10:1)。每250 $\mu\text{g}$ 生物素酯内加入20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的氯化铵,室温孵育10分钟。将抗体溶液用PBS或其他所需的缓冲液透析,以除去未结合的生物素。由于生物素分子较大,故透析比预料中的要慢,或者用蛋白A或蛋白G层析柱再次纯化抗体。按纯化抗体的储存方法保存标记抗体。

[0081] 再将生物素偶联抗体与磁感应器上的抗原连接。具体的方法是:将生物素偶联抗体首先以PBS缓冲液中稀释到所需浓度。用移液器滴入10 $\mu\text{L}$ 该样品溶液至感应器表面并在

室温下孵育1小时,接着,芯片用封闭缓冲液(1%BSA和0.2%Tween 20 加入PBS)漂洗三次。

[0082] 第8步、探针分子的生物偶联:第2步产生的带有链霉亲和素的磁性探针和第7步中带有生物素的抗体偶联,形成抗体-抗原-抗体(生物素)-磁性针(链霉亲和素)结构。具体过程为:链霉亲和素连接的磁性纳米粒子(50/ $\mu$ L)放入磁和水混合的流体系统。磁流体系统循环速率约100ml/min。10分钟后,磁流体系统停止运行,磁纳米粒子在室温下和无搅拌下孵育20分钟。这样完成了在磁量子传感器上抗体-抗原-抗体=生物素-链霉亲和素=探测磁性粒子的生物偶联。

[0083] 第9步、偶联和非偶联磁性探针的磁分离:开启磁场,加电流200mA,产生1000e的磁场,没有和抗体(生物素)偶联-的磁性针(链霉亲和素)从磁量子传感器表面分离出去。在磁量子传感器表面只留下实现了抗体-抗原-抗体(生物素)-磁性针(链霉亲和素)偶联的磁性粒子。应用外加磁场进行未偶联和偶联磁探针的分离是一种简易的物理方法,其优势是避免传统化学漂洗带来的对磁性粒子的化学腐蚀和磁学性能的损伤,磁场开启前后的磁传感器的表面形式图,如图9a和图9b所示,开启磁场之后,未与磁传感器结合的探针器件在流场中被分离。

[0084] 第10步、传感器检测:开启扫描磁场,测试拥有抗体-抗原-抗体(生物素)-磁性针(链霉亲和素)偶联的传感器和控制传感器的磁电阻。通过比较得出传感器的信号强度和生物分子量的大小。

[0085] 利用这种方法,可实现年nL ( $10^{-9}$  molar)量级的AFB1检测,在5个不同的传感器芯片上和连续5次的测量,获得小于2% 精确性。利用这种方法检测的结果如图12所示。

[0086] 在图12中,横坐标是AFB1抗原的浓度,单位是Log(摩尔分数),纵坐标是GMR传感器的输出电压,单位是Log(电压(毫伏)),从图中可以看出,在该浓度范围内,抗原浓度与输出电压的对数值,呈一定的线性关系和大的测量范围。

[0087] 样品检测:无污染的大米(从本地市场)研磨后,在涡旋混合器上混合后,加入5ml的溶剂(80%甲醇),并分别掺入了10nM、100nM、1000nM浓度的黄曲霉毒素AFB1(美国, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 购买),样品通过摇动45分钟,混合,然后以5000rpm的速率离心10分钟。将上清液小心地取出并用PBS稀释(1:5, V / V, 体积比)。用移液器滴入20 $\mu$ L该样品溶液至第6步中的传感器芯片表面并在室温下孵育1小时,接着,芯片用封闭缓冲液(1%BSA和0.2%Tween 20 加入PBS)漂洗两次。再依同法进行检测,代入标准曲线中计算加样回收率,结果如表1所示。

[0088] 表1 不同标准品加入量条件下的检测回收率

[0089]

	10nM	100nM	1000nM
回收率	115%	96%	106%

[0090] 从表中可以看出,本发明涉及的磁传感器检测的加样回收率在100%附近,具有良好的检测准确性。

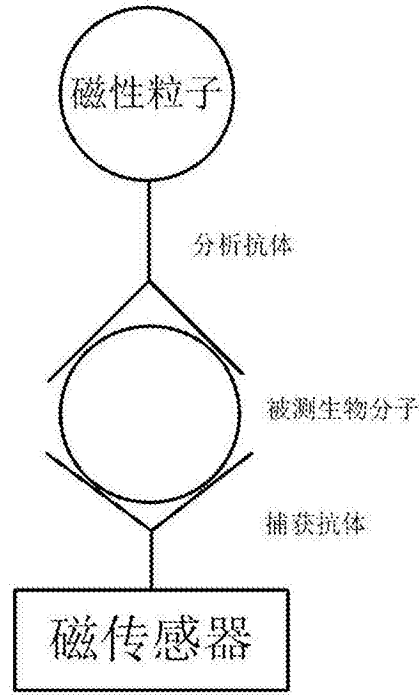
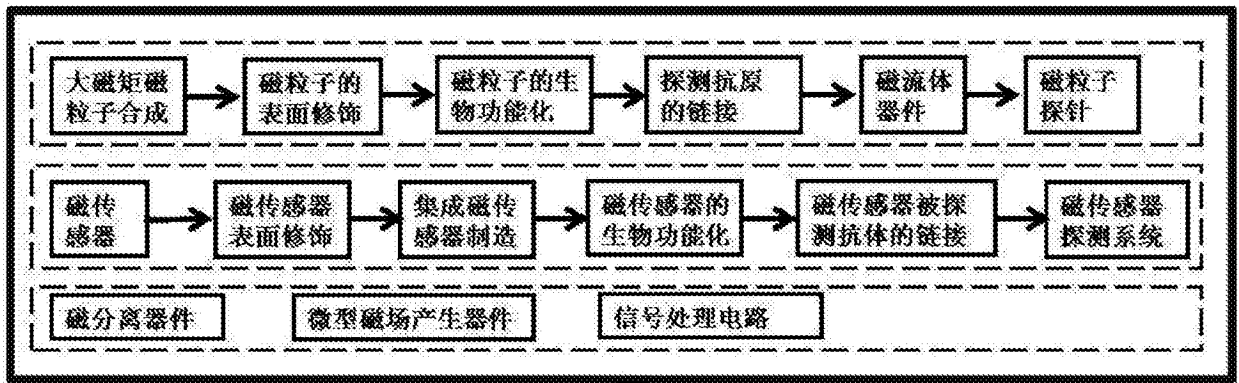


图1



高通量、多通道、低丰度生物分子的磁传感识别和检测系统

图2

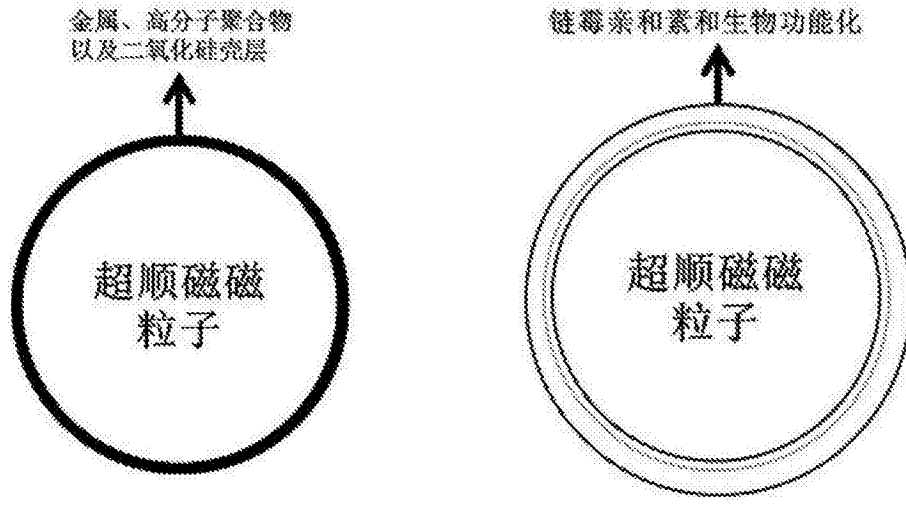


图3(a)

图3(b)

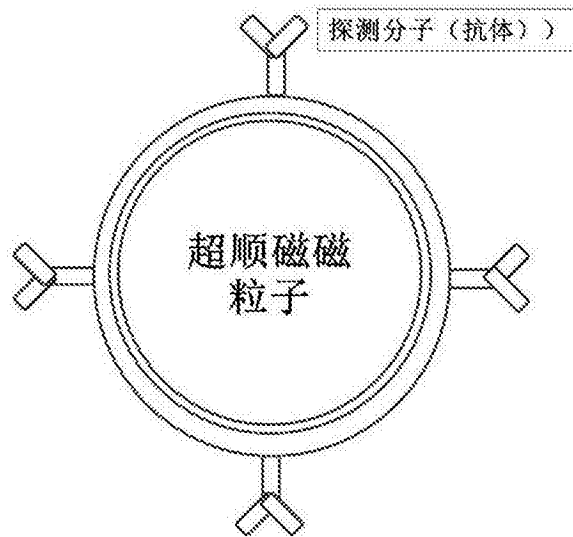


图4

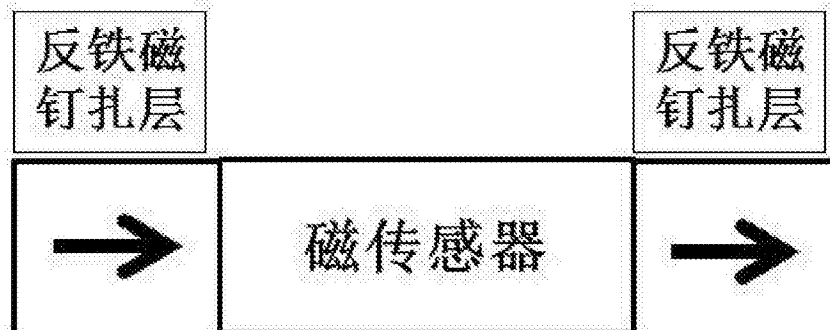


图5

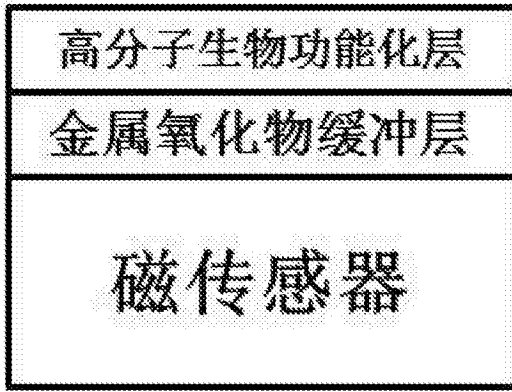


图6

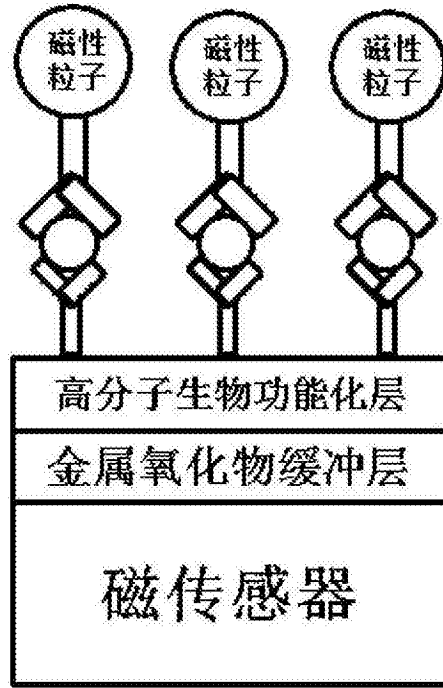


图7

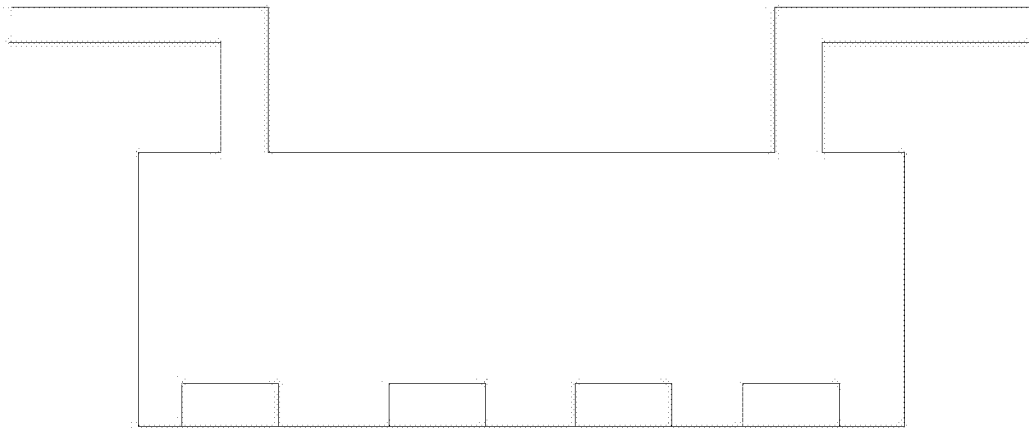


图8

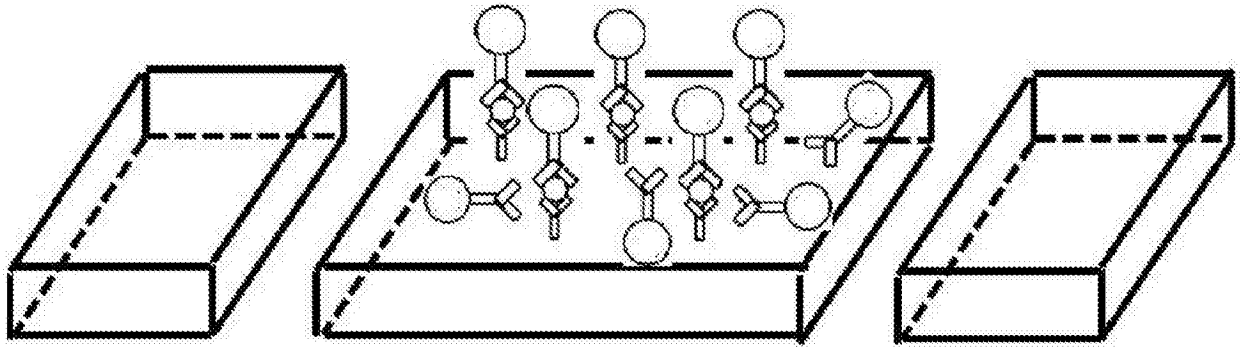


图9a

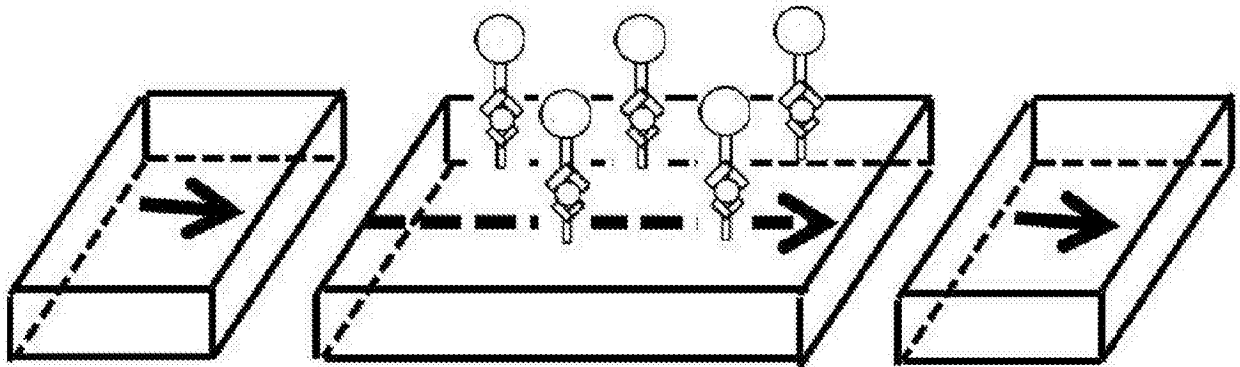


图9b

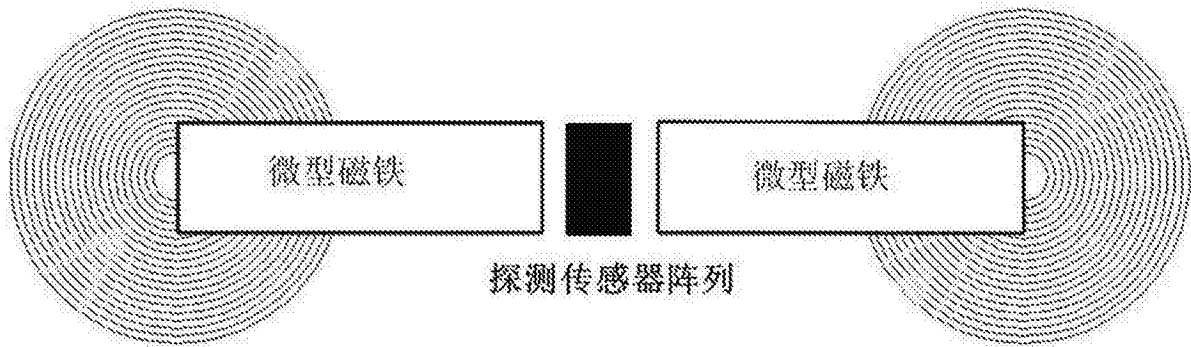


图10

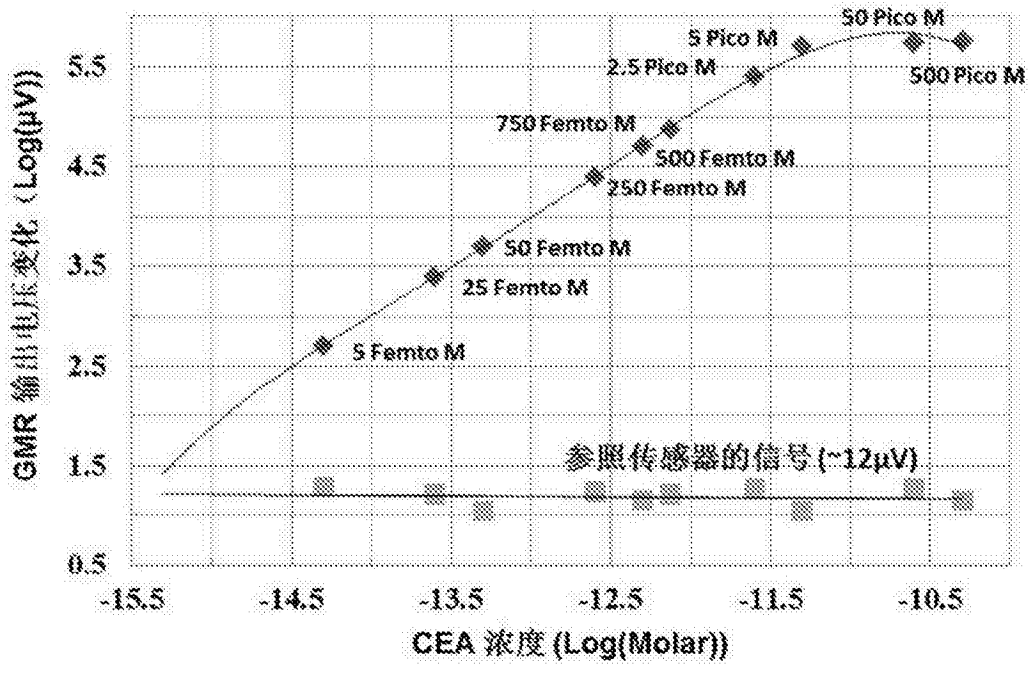


图11

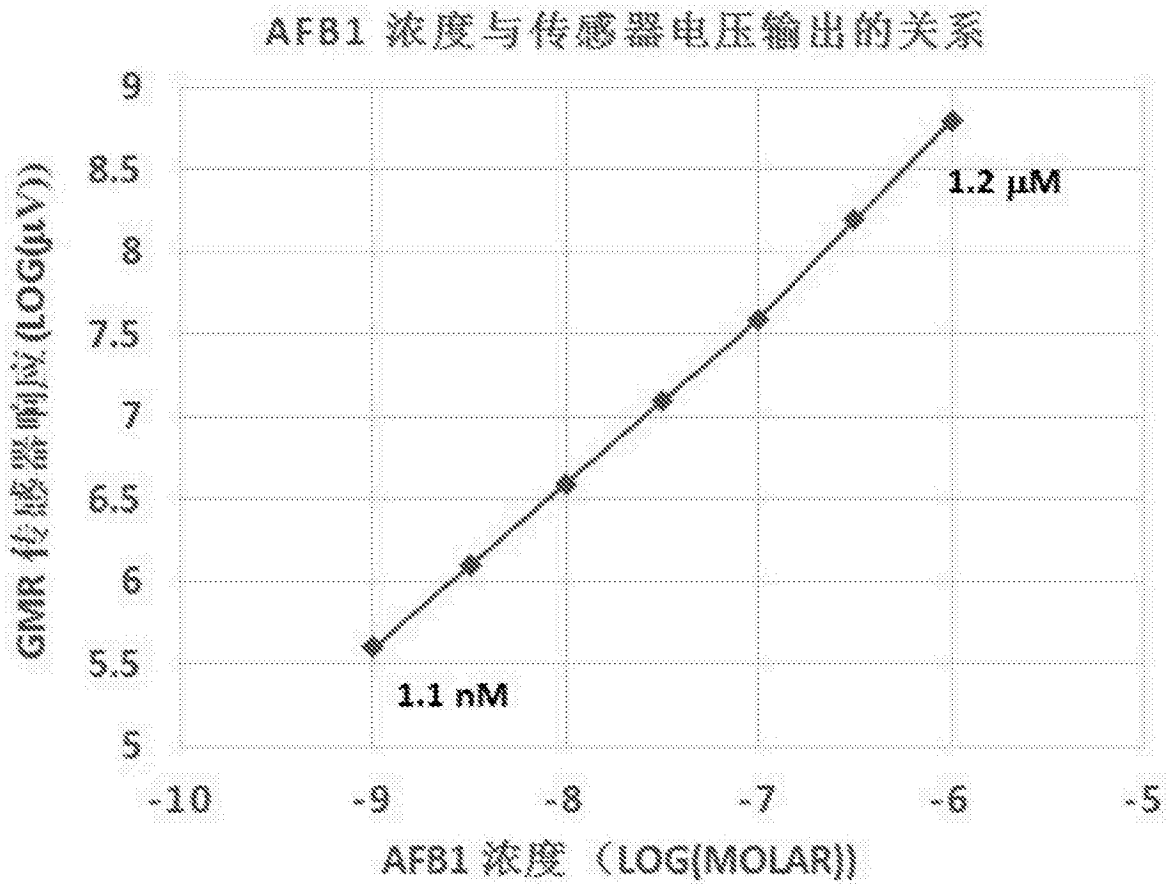
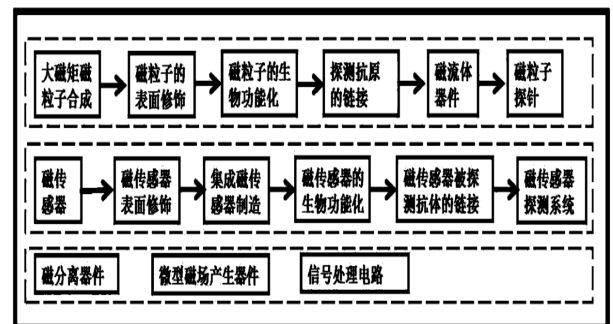


图12

专利名称(译)	高通量多通道低丰度生物分子的磁传感识别方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104034881B</a>	公开(公告)日	2016-07-06
申请号	CN201410213233.X	申请日	2014-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	南京益得冠电子科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京益得冠电子科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京益得冠电子科技有限公司		
[标]发明人	章伟 胡雪峰		
发明人	章伟 胡雪峰		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/72		
CPC分类号	G01N27/72 G01N33/53 G01N33/54346		
代理人(译)	邓唯		
其他公开文献	CN104034881A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种高通量多通道低丰度生物分子的磁传感识别方法，属于生物分子识别技术领域。本发明主要针对基于抗原 - 抗体、细胞因子 - 细胞因子受体、生物活性肽 - 受体、生物素 - 亲和素、手性分子等系统构成的免疫标记生物分子检测、监测和识别方法。以超顺磁的磁性粒子和高性能磁传感器构成生物分子探针和探测系统。其可以应用于生物、医药和食品安全等应用领域，可以进行生物分子识别、检测和监测；临床疾病诊断；食品安全检测；病毒和细菌检测。



高通量、多通道、低丰度生物分子的磁传感识别和检测系统