



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104165996 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 26

(21) 申请号 201310186357. 9

(22) 申请日 2013. 05. 17

(71) 申请人 中国科学院海洋研究所  
地址 266071 山东省青岛市南海路 7 号

(72) 发明人 万逸 张盾

(74) 专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限  
公司 21002

代理人 周秀梅 李颖

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

### (54) 发明名称

一种基于多巴胺的生物激发信号放大系统和应用

### (57) 摘要

本发明涉及生物化学的检测和分析领域,具体的说是一种基于多巴胺的生物激发信号放大系统和应用。将结合有特异性的功能分子的多巴胺,即为生物激发信号放大系统。所述多巴胺的生物激发信号放大系统应用于生物分析领域用于检测生物分子。本发明利用特异性分子标记的多巴胺放大信号系统来快速检测和分析生物分子,比如蛋白因子、核酸、微生物、病毒等,用其检测检测控制生物分子浓度的变化,能够快速检测对生物分子、微生物和细胞。相对于传统的酶联免疫反应吸附的测量,本发明的快速检测和分析生物分子具有显著的特异性,同时准确性高。利用多巴胺放大信号系统来快速检测和分析生物分子,具有稳定性好、灵敏度高,不容易失活,价格便宜等优势。

1. 一种基于多巴胺的生物激发信号放大系统,其特征在于:将结合有特异性的功能分子的多巴胺,即为生物激发信号放大系统。

2. 按权利要求1所述的基于多巴胺的生物激发信号放大系统,其特征在于:所述特异性的功能分子可为生物素、主客体分子、重氮盐、适配体、抗体或组氨酸标签。

3. 一种权利要求1所述的基于多巴胺的生物激发信号放大系统的应用,其特征在于:所述多巴胺的生物激发信号放大系统应用于生物分析领域用于检测生物分子。

4. 按权利要求3所述的基于多巴胺的生物激发信号放大系统的应用,其特征在于:所述多巴胺的生物激发信号放大系统应用于免疫吸附测定、电化学生物传感器、荧光显微镜技术或激光扫描共聚焦显微镜技术中进行生物分子的检测。

5. 按权利要求3或4所述的基于多巴胺的生物激发信号放大系统的应用,其特征在于:所述多巴胺的生物激发信号放大系统在过氧化物酶的催化作用下,功能化的多巴胺分子聚合沉淀到生物靶点分子表面,聚合的特异性的功能分子同时提供大量的活性功能位点。

6. 按权利要求5所述的基于多巴胺的生物激发信号放大系统的应用,其特征在于:所述过氧化物酶为辣根过氧化物酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶或氢化酶。

## 一种基于多巴胺的生物激发信号放大系统和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物化学的检测和分析领域,具体的说是一种基于多巴胺的生物激发信号放大系统和应用。

### 背景技术

[0002] 在环境安全检测和人体健康的监控中,许多生物靶点分子的含量非常低。很多生物信号分子、有害微生物或肿瘤细胞在初期浓度非常低,需要对靶点物质进行信号放大才可以检测分析。目前,研究者们已经发现了几种信号放大的技术来检测低丰度靶点,包括银增强反应、酪氨酸信号放大、酶金属矿化和滚环放大报告系统。银增强反应基于纳米金催化沉淀银,从而来检测核酸、蛋白质和微生物等有害物质(Wan, Y., Wang, Y., Wu, J., Zhang, D., 2011b. *Analytical Chemistry*83(3), 648-653 ;Taton, T. A., Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., 2000. *Science*289(5485), 1757-1760. )。相对银增强的技术来说,替代的方案用过氧化物酶来催化银的沉淀,这种方法叫酶矿化技术(Möller, R., Powell, R. D., Hainfeld, J. F., Fritzsche, W., 2005. *Nano Letters*5(7), 1475-1482)。最近出现一种超灵敏的技术,结合氢化酶标记的酶联免疫反应来控制纳米金生成过程,产生肉眼可见的信号(de la Rica, R., Stevens, M. M., 2012. *Nature Nanotechnology* doi:10.1038/nnano.2012.186),来分析生物靶点物质。酪氨酸信号放大系统结合生物沉淀和荧光标记来增强标准免疫反应的灵敏度(Clutter, M. R., Heffner, G. C., Krutzik, P. O., Sachen, K. L., Nolan, G. P., 2010. *Cytometry Part A*77A(11), 1020-1031)。滚环放大技术是一种恒温核酸扩增方法,在 RCA 反应中, DNA 目标链可沿环形探针顶替扩增,实现高灵敏度的检测;同时环形探针的链接成环对 DNA 单碱基错配有很高的特异性,适合单核苷酸突变的分析检测。

[0003] 多巴胺是一种包含有苯酚结构和氨基官能团用来帮助细胞传送脉冲的化学物质。它广泛存在于动物体内,特别是在贝壳类粘附蛋白中已经发现高浓度的多巴胺。多巴胺是一种很神奇的分子,这种脑内分泌物质主要负责大脑的情欲,感觉,传递兴奋及开心等信息,也与上瘾有关。

[0004] 当 pH 为 8.5 时,多巴胺能够发生聚合形成聚多巴胺。聚合膜与贝壳类粘附蛋白的结构很相似。聚多巴胺膜这种特殊的结构,能够用于化学反应吸附和沉积生物或者化学分子。它能够与很多种类的无机材料形成强的化学键结构,这种键的作用力比生物素-亲和素作用交联还要强(Ryu, J., Ku, S. H., Lee, H., Park, C. B., 2010. *Advanced Functional Materials*20(13), 2132-2139)。因此,多巴胺的自聚合被用作一种多功能的强力复合膜覆盖在金属材料、陶瓷、金属氧化物以及聚合物表面。聚多巴胺不仅能够作为固定的检测平台,而且可以作为交联试剂来固定生物化学分子。首先,生物传感器的固定平台对传感器的选择性、检测限以及稳定性有重要影响。许多不同的检测平台,如自组装膜、有机聚合材料、纳米材料掺杂的聚合膜,已经用于抗体以及其他蛋白的固定。这些材料具有良好的生物相容性和有序的结构,使其能够在微生物检测以及细胞行为研究方面发挥重要的作用。其次,对于研究危害人体健康的微生物检测以及环境体系中生物安全和污染而言,抗体及

其它蛋白的固定扮演很重要的角色。抗体及其他生物分子在表面的固定分为非共价交联和共价交联反应。非共价交联是通过物理吸附、蛋白相互作用、氢键、范德华力作用以及疏水相互作用使生物或者化学分子能够在长时间内(>12h)固定在固体物质表面。共价交联是在自组装膜的表面通过 EDC/NHS 在短时间内激活,使生物或化学分子修饰到自组装膜的表面形成稳定的、可重复的、可靠的生物功能膜(Kang, S. M., You, I., Cho, W. K., Shon, H. K., Lee, T. G., Choi, I. S., Karp, J. M., Lee, H., 2010. *Angewandte Chemie-International Edition* 49(49), 9401-9404)。最近的研究表明,蛋白分子可以通过聚多巴胺的结构直接修饰到固定的表面形成功能膜。

## 发明内容

[0005] 本发明目的在于提供一种基于多巴胺的生物激发信号放大系统和应用。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案为:

[0007] 一种基于多巴胺的生物激发信号放大系统,将结合有特异性的功能分子的多巴胺,即为生物激发信号放大系统。

[0008] 所述特异性的功能分子可为生物素、主客体分子、重氮盐、适配体、抗体或组氨酸标签。

[0009] 基于多巴胺的生物激发信号放大系统的应用,所述多巴胺的生物激发信号放大系统应用于生物分析领域用于检测生物分子。

[0010] 所述多巴胺的生物激发信号放大系统应用于免疫吸附测定、电化学生物传感器、荧光显微镜技术或激光扫描共聚焦显微镜技术中进行生物分子的检测。

[0011] 所述多巴胺的生物激发信号放大系统在过氧化物酶的催化作用下,功能化的多巴胺分子聚合沉淀到生物靶点分子表面,聚合的特异性的功能分子同时提供大量的活性功能位点。

[0012] 所述过氧化物酶为辣根过氧化物酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶或氢化酶。

[0013] 本发明所具有的优点:

[0014] 本发明利用特异性分子标记的多巴胺放大信号系统来快速检测和分析生物分子,比如蛋白因子、核酸、微生物、病毒等,用其检测检测控制生物分子浓度的变化,能够快速检测对生物分子、微生物和细胞。相对于传统的酶联免疫反应吸附的测量,利用多巴胺放大信号系统来快速检测和分析生物分子具有显著的特异性,同时准确性高。利用多巴胺放大信号系统来快速检测和分析生物分子,具有稳定性好、灵敏度高,不容易失活,价格便宜等优势。

## 附图说明

[0015] 图 1 为本发明实施例提供生物激发的多巴胺信号放大系统示意图(a)和多巴胺介导的酶联免疫反应吸附测定(b),传统的酶联免疫反应吸附测定作为控制对照试验。

[0016] 图 2 为本发明实施例提供的生物激发的多巴胺信号放大系统介导的酶联免疫吸附测定和传统的酶联免疫吸附测定分析肿瘤坏死因子- $\alpha$  的标准对照曲线。

[0017] 图 3 为本发明实施例提供生物激发的多巴胺信号放大系统介导的酶联免疫吸附测定和传统的酶联免疫吸附测定分析肿瘤坏死因子- $\alpha$  和其他非特异性蛋白因子的信号

强度,所有蛋白因子的浓度为  $1.0 \times 10^{-8} \text{mol L}^{-1}$ 。

### 具体实施方式

[0018] 下面通过实施例对本发明做进一步说明。

[0019] 实施例 1 :

[0020] 传统的酶联免疫吸附测定和多巴胺介导的免疫反应检测人体肿瘤坏死因子 - $\alpha$  。

[0021] 100  $\mu\text{L}$  鼠抗肿瘤坏死因子 - $\alpha$  抗体滴加在 96 孔板表面 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜,用缓冲液清洗三次;加入 200  $\mu\text{L}$  封闭液,室温下反应 30min,再用缓冲液清洗三次;再加入重组的人体肿瘤坏死因子 - $\alpha$  ( $10^{-14}$  到  $10^{-5} \text{mol L}^{-1}$ ), 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 1h。接着加入 100  $\mu\text{L}$  辣根过氧化物酶标记的兔抗人体肿瘤坏死因子 - $\alpha$  抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 1h。

[0022] 对于传统的酶联免疫吸附测定来说,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 显色液,室温下 20min,再在每孔加入 50  $\mu\text{L}$   $1 \text{mol L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ , 终止反应进行。用酶标板分析仪分析相关数据(参见图 3),其检测范围为  $1.0 \times 10^{-11}$  -  $1.0 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$ 。检测限为  $1.9 \times 10^{-11} \text{mol L}^{-1}$ ,分析灵敏度  $7.9 \times 10^{-11} \text{mol L}^{-1}$ 。

[0023] 对于多巴胺介导的酶联免疫吸附测定来说,100  $\mu\text{L}$  生物素标记多巴胺工作液加入每孔,室温下反应 20min,用缓冲液清洗三次。再每孔加入 100  $\mu\text{L}$  辣根过氧化物酶标记亲和素, 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 1h,用缓冲液清洗三次。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 显色液,室温下 20min,再在每孔加入 50  $\mu\text{L}$   $1 \text{mol L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ , 终止反应进行。用酶标板分析仪分析相关数据。(参见图 3)其检测范围为  $1.0 \times 10^{-13}$  -  $1.0 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$ 。检测限为  $4.1 \times 10^{-13}$ ,分析灵敏度  $1.2 \times 10^{-12} \text{mol L}^{-1}$ 。

[0024] 其中,生物素标记多巴胺步骤为:生物素(200mg, 0.82mmol)和多巴胺(183mg, 0.98mmol)溶解在二甲基甲酰胺(DMF)溶液(3mL)中,然后加入肽键缩合剂(HBTU)(342mg, 0.98mmol)和二异丙基乙胺(400  $\mu\text{L}$ , 2.45mmol),反应 24h。再加入乙醚(30mL),过滤白色固体,用硅胶柱色谱纯化(乙酸乙酯:庚烷 = 1:5)得到 120mg 终产物。

[0025] 实施例 2 :

[0026] 传统的酶联免疫吸附测定和多巴胺介导的免疫反应检测硫酸盐还原菌。100  $\mu\text{L}$  硫酸盐还原菌抗体滴加在 96 孔板表面 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜,用缓冲液清洗三次;加入 200  $\mu\text{L}$  封闭液,室温下反应 30min,再用缓冲液清洗三次;再加入硫酸盐还原菌( $10^1$  到  $10^8 \text{cfu mL}^{-1}$ ), 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 1h。接着加入 100  $\mu\text{L}$  辣根过氧化物酶标记的硫酸盐还原菌抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 1h。

[0027] 对于传统的酶联免疫吸附测定来说,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 显色液,室温下 20min,再在每孔加入 50  $\mu\text{L}$   $1 \text{mol L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ , 终止反应进行。用酶标板分析仪分析相关数据。其检测范围为  $1.0 \times 10^2$  -  $1.0 \times 10^6 \text{cfu mL}^{-1}$ 。检测限为  $200 \text{cfu mL}^{-1}$ ,分析灵敏度  $100 \text{cfu mL}^{-1}$ 。

[0028] 对于多巴胺介导的酶联免疫吸附测定来说,100  $\mu\text{L}$  生物素标记多巴胺工作液加入每孔,室温下反应 20min,用缓冲液清洗三次。再每孔加入 100  $\mu\text{L}$  辣根过氧化物酶标记亲和素, 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 1h,用缓冲液清洗三次。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 显色液,室温下 20min,再在每孔加入 50  $\mu\text{L}$   $1 \text{mol L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ , 终止反应进行。用酶标板分析仪分析相关数据。用酶标板分析仪分析相关数据。其检测范围为  $1.0 \times 10^1$  -  $1.0 \times 10^7 \text{cfu mL}^{-1}$ 。检测限为  $50 \text{cfu mL}^{-1}$ ,分析灵敏度  $10 \text{cfu mL}^{-1}$ 。

[0029] 其中,生物素标记多巴胺步骤为:生物素(200mg, 0.82mmol)和多巴胺

(183mg, 0.98mmol)溶解在二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液 (3mL) 中, 然后加入肽键缩合剂(HBTU) (342mg, 0.98mmol)和二异丙基乙胺 (400  $\mu$  L, 2.45mmol), 反应 24h。再加入乙醚(30mL), 过滤白色固体, 用硅胶柱色谱纯化(乙酸乙酯:庚烷 =1:5)得到 120mg 终产物。

[0030] 实施例 3:

[0031] 传统的酶联免疫吸附测定和多巴胺介导的免疫反应检测黄曲霉素。100  $\mu$  L 黄曲霉素抗体滴加在 96 孔板表面 4 $^{\circ}$ C 过夜, 用缓冲液清洗三次; 加入 200  $\mu$  L 封闭液, 室温下反应 30min, 再用缓冲液清洗三次; 再加入黄曲霉素 ( $10^{-14}$  到  $10^{-5}$ mol L $^{-1}$ ), 37 $^{\circ}$ C 反应 1h。接着加入 100  $\mu$  L 辣根过氧化物酶标记的黄曲霉素抗体, 37 $^{\circ}$ C 反应 1h。

[0032] 对于传统的酶联免疫吸附测定来说, 每孔加入 100  $\mu$  L TMB 显色液, 室温下 20min, 再在每孔加入 50  $\mu$  L 1mol L $^{-1}$ H $_2$ SO $_4$ , 终止反应进行。用酶标板分析仪分析相关数据。其检测范围为  $2.1 \times 10^{-10}$ - $2.1 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ , 检测限为  $5.0 \times 10^{-11}$ mol L $^{-1}$ , 分析灵敏度  $7.9 \times 10^{-11}$ mol L $^{-1}$ 。

[0033] 对于多巴胺介导的酶联免疫吸附测定来说, 100  $\mu$  L 生物素标记多巴胺工作液加入每孔, 室温下反应 20min, 用缓冲液清洗三次。再每孔加入 100  $\mu$  L 辣根过氧化物酶标记亲和素, 37 $^{\circ}$ C 反应 1h, 用缓冲液清洗三次。每孔加入 100  $\mu$  L TMB 显色液, 室温下 20min, 再在每孔加入 50  $\mu$  L 1mol L $^{-1}$ H $_2$ SO $_4$ , 终止反应进行。用酶标板分析仪分析相关数据, 其检测范围为  $2.1 \times 10^{-12}$ - $2.1 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ , 检测限为  $2.1 \times 10^{-12}$ mol L $^{-1}$ , 分析灵敏度  $1.0 \times 10^{-12}$ mol L $^{-1}$ 。

[0034] 其中, 生物素标记多巴胺步骤为: 生物素(200mg, 0.82mmol) 和多巴胺 (183mg, 0.98mmol)溶解在二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液 (3mL) 中, 然后加入肽键缩合剂(HBTU) (342mg, 0.98mmol)和二异丙基乙胺 (400  $\mu$  L, 2.45mmol), 反应 24h。再加入乙醚(30mL), 过滤白色固体, 用硅胶柱色谱纯化(乙酸乙酯:庚烷 =1:5)得到 120mg 终产物。

[0035] 实施例 4:

[0036] 传统的电化学免疫吸附测定和多巴胺介导的电化学免疫反应检测人体肿瘤坏死因子- $\alpha$ 。100  $\mu$  L 鼠抗肿瘤坏死因子- $\alpha$  抗体修饰在金电极表面 4 $^{\circ}$ C 过夜, 用缓冲液清洗三次; 加入 200  $\mu$  L 封闭液, 室温下反应 30min, 再用缓冲液清洗三次; 再加入重组的人体肿瘤坏死因子- $\alpha$  ( $10^{-14}$  到  $10^{-5}$ mol L $^{-1}$ ), 37 $^{\circ}$ C 反应 1h。接着加入 100  $\mu$  L 辣根过氧化物酶标记的兔抗人体肿瘤坏死因子- $\alpha$  抗体, 37 $^{\circ}$ C 反应 1h。

[0037] 对于传统的电化学免疫吸附测定来说, 每孔加入 100  $\mu$  L TMB 显色液, 室温下 20min, 再在每孔加入 50  $\mu$  L 1mol L $^{-1}$ H $_2$ SO $_4$ , 终止反应进行。用电化学分析仪分析相关数据。其检测范围为  $2.0 \times 10^{-11}$ - $2.0 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ 。检测限为  $0.9 \times 10^{-11}$ mol L $^{-1}$ , 分析灵敏度  $7.9 \times 10^{-13}$ mol L $^{-1}$ 。

[0038] 对于多巴胺介导的电化学免疫吸附测定来说, 100  $\mu$  L 生物素标记多巴胺工作液加入每孔, 室温下反应 20min, 用缓冲液清洗三次。再每孔加入 100  $\mu$  L 辣根过氧化物酶标记亲和素, 37 $^{\circ}$ C 反应 1h, 用缓冲液清洗三次。每孔加入 100  $\mu$  L TMB 显色液, 室温下 20min, 再在每孔加入 50  $\mu$  L 1mol L $^{-1}$ H $_2$ SO $_4$ , 终止反应进行。用电化学分析仪分析相关数据。其检测范围为  $1.0 \times 10^{-12}$ - $1.0 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$ 。检测限为  $1.9 \times 10^{-13}$ mol L $^{-1}$ , 分析灵敏度  $8.9 \times 10^{-14}$ mol L $^{-1}$ 。

[0039] 其中, 生物素标记多巴胺步骤为: 生物素(200mg, 0.82mmol) 和多巴胺 (183mg, 0.98mmol)溶解在二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液 (3mL) 中, 然后加入肽键缩合剂(HBTU)

(342mg, 0.98mmol)和二异丙基乙胺(400  $\mu$  L, 2.45mmol),反应 24h。再加入乙醚(30mL),过滤白色固体,用硅胶柱色谱纯化(乙酸乙酯:庚烷=1:5)得到 120mg 终产物。

[0040] 实施例 5:

[0041] 传统的电化学免疫吸附测定和多巴胺介导的电化学免疫反应检测硫酸盐还原菌。100  $\mu$  L 硫酸盐还原菌抗体滴加在金电极表面 4 $^{\circ}$ C 过夜,用缓冲液清洗三次;加入 200  $\mu$  L 封闭液,室温下反应 30min,再用缓冲液清洗三次;再加入硫酸盐还原菌( $10^1$  到  $10^8$ cfu mL $^{-1}$ ),37 $^{\circ}$ C 反应 1h。接着加入 100  $\mu$  L 辣根过氧化物酶标记的硫酸盐还原菌抗体,37 $^{\circ}$ C 反应 1h。

[0042] 对于传统的电化学免疫吸附测定来说,每孔加入 100  $\mu$  L TMB 显色液,室温下 20min,再在每孔加入 50  $\mu$  L 1mol L $^{-1}$ H $_2$ SO $_4$ ,终止反应进行。用酶标板分析仪分析相关数据。用酶标板分析仪分析相关数据,其检测范围为  $2.0 \times 10^2$ - $2.0 \times 10^6$ cfu mL $^{-1}$ 。检测限为 300cfu mL $^{-1}$ ,分析灵敏度 100cfu mL $^{-1}$ 。

[0043] 对于多巴胺介导的电化学免疫吸附测定来说,100  $\mu$  L 生物素标记多巴胺工作液加入每孔,室温下反应 20min,用缓冲液清洗三次。再每孔加入 100  $\mu$  L 辣根过氧化物酶标记亲和素,37 $^{\circ}$ C 反应 1h,用缓冲液清洗三次。每孔加入 100  $\mu$  L TMB 显色液,室温下 20min,再在每孔加入 50  $\mu$  L 1mol L $^{-1}$ H $_2$ SO $_4$ ,终止反应进行。用酶标板分析仪分析相关数据。用酶标板分析仪分析相关数据,其检测范围为  $2.0 \times 10^1$ - $2.0 \times 10^7$ cfu mL $^{-1}$ 。检测限为 20cfu mL $^{-1}$ ,分析灵敏度 10cfu mL $^{-1}$ 。

[0044] 其中,生物素标记多巴胺步骤为:生物素(200mg, 0.82mmol)和多巴胺(183mg, 0.98mmol)溶解在二甲基甲酰胺(DMF)溶液(3mL)中,然后加入肽键缩合剂(HBTU)(342mg, 0.98mmol)和二异丙基乙胺(400  $\mu$  L, 2.45mmol),反应 24h。再加入乙醚(30mL),过滤白色固体,用硅胶柱色谱纯化(乙酸乙酯:庚烷=1:5)得到 120mg 终产物。

[0045] 实施例 6:

[0046] 传统的免疫荧光测定和多巴胺介导的免疫荧光检测人体肿瘤坏死因子- $\alpha$ 。100  $\mu$  L 鼠抗肿瘤坏死因子- $\alpha$  抗体滴加在玻璃片表面 4 $^{\circ}$ C 过夜,用缓冲液清洗三次;加入 200  $\mu$  L 封闭液,室温下反应 30min,再用缓冲液清洗三次;再加入重组的人体肿瘤坏死因子- $\alpha$  ( $10^{-14}$  到  $10^{-5}$ mol L $^{-1}$ ),37 $^{\circ}$ C 反应 1h。接着加入 100  $\mu$  L 辣根过氧化物酶标记的兔抗人体肿瘤坏死因子- $\alpha$  抗体,37 $^{\circ}$ C 反应 1h。

[0047] 对于传统的免疫荧光测定来说,每孔加入 100  $\mu$  L 荧光显色液,室温下 20min,终止反应进行。用激光扫描共聚焦显微镜分析相关数据。其检测范围为  $2.0 \times 10^{-11}$ - $2.0 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ 。检测限为  $0.9 \times 10^{-11}$ mol L $^{-1}$ ,分析灵敏度  $7.9 \times 10^{-13}$ mol L $^{-1}$ 。

[0048] 对于多巴胺介导的免疫荧光测定来说,100  $\mu$  L 生物素标记多巴胺工作液加入每孔,室温下反应 20min,用缓冲液清洗三次。再每孔加入 100  $\mu$  L 荧光素标记亲和素,37 $^{\circ}$ C 反应 1h,用缓冲液清洗三次。用激光扫描共聚焦显微镜分析相关数据。其检测范围为  $1.0 \times 10^{-12}$ - $1.0 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$ 。检测限为  $1.9 \times 10^{-13}$ mol L $^{-1}$ ,分析灵敏度  $8.9 \times 10^{-14}$ mol L $^{-1}$ 。

[0049] 其中,生物素标记多巴胺步骤为:生物素(200mg, 0.82mmol)和多巴胺(183mg, 0.98mmol)溶解在二甲基甲酰胺(DMF)溶液(3mL)中,然后加入肽键缩合剂(HBTU)(342mg, 0.98mmol)和二异丙基乙胺(400  $\mu$  L, 2.45mmol),反应 24h。再加入乙醚(30mL),过滤白色固体,用硅胶柱色谱纯化(乙酸乙酯:庚烷=1:5)得到 120mg 终产物。

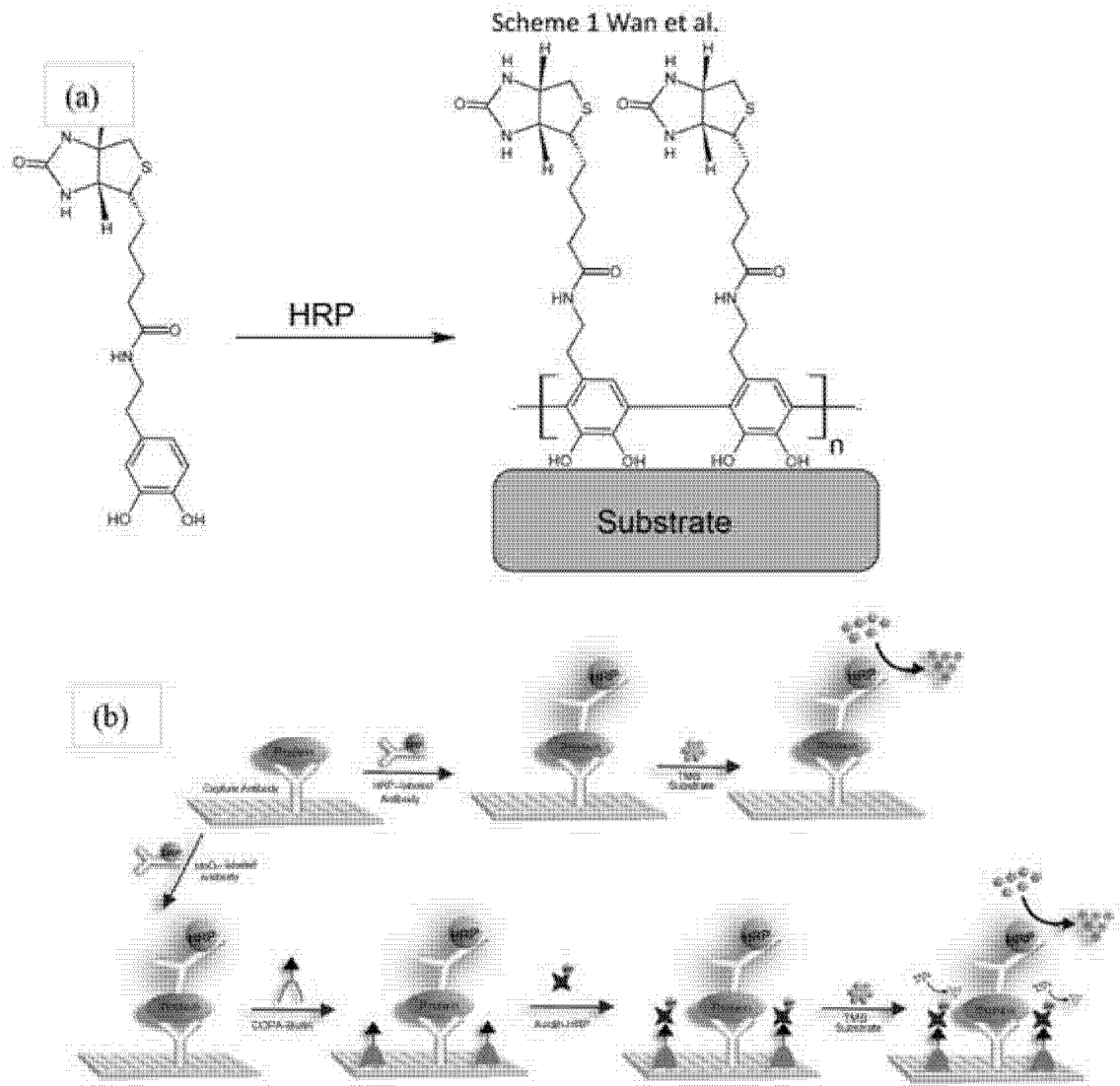


图 1

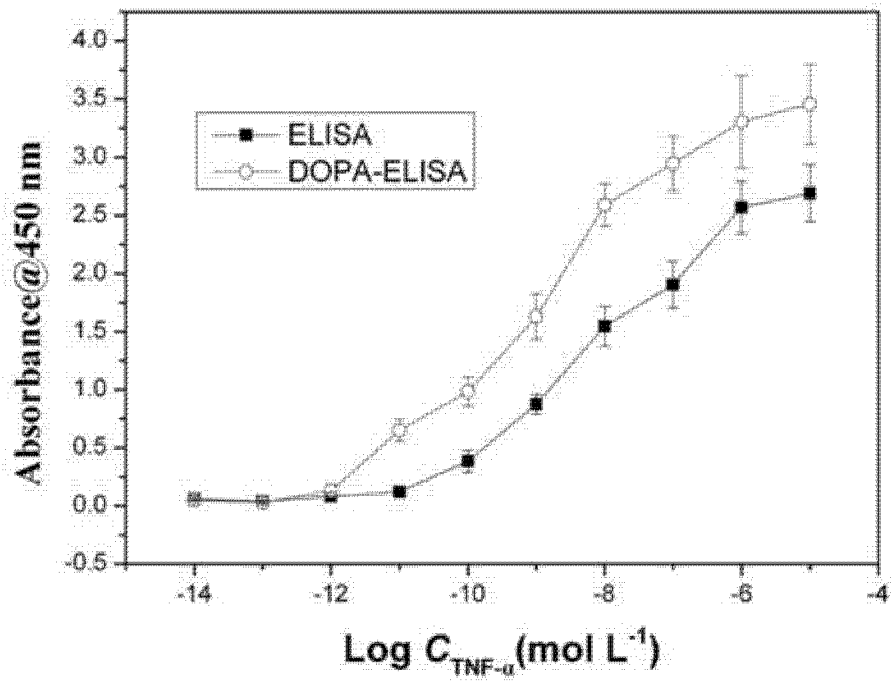


图 2

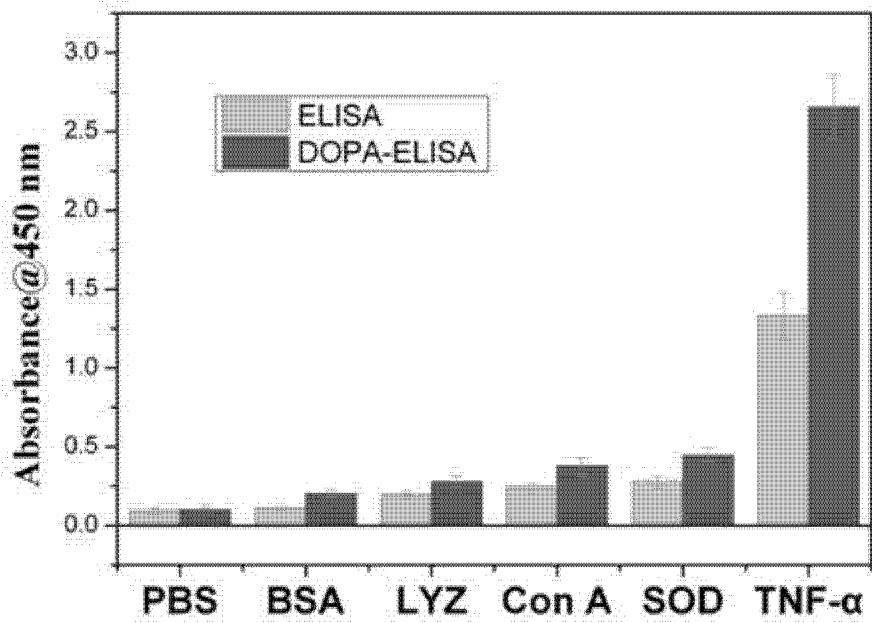


图 3

专利名称(译)	一种基于多巴胺的生物激发信号放大系统和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN104165996A</a>	公开(公告)日	2014-11-26
申请号	CN201310186357.9	申请日	2013-05-17
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院海洋研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院海洋研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院海洋研究所		
[标]发明人	万逸 张盾		
发明人	万逸 张盾		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/569 G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/5058 G01N33/56966		
代理人(译)	周秀梅 李颖		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及生物化学的检测和分析领域，具体的说是一种基于多巴胺的生物激发信号放大系统和应用。将结合有特异性的功能分子的多巴胺，即为生物激发信号放大系统。所述多巴胺的生物激发信号放大系统应用于生物分析领域用于检测生物分子。本发明利用特异性分子标记的多巴胺放大信号系统来快速检测和分析生物分子，比如蛋白因子、核酸、微生物、病毒等，用其检测检测控制生物分子浓度的变化，能够快速检测对生物分子、微生物和细胞。相对于传统的酶联免疫反应吸附的测量，本发明的快速检测和分析生物分子具有显著的特异性，同时准确性高。利用多巴胺放大信号系统来快速检测和分析生物分子，具有稳定性好、灵敏度高，不容易失活，价格便宜等优势。

