

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710163431.X

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/546 (2006.01)

[43] 公开日 2008年3月19日

[11] 公开号 CN 101144814A

[22] 申请日 2007.10.22

[21] 申请号 200710163431.X

[71] 申请人 中国人民解放军第三军医大学第一附属医院

地址 400041 重庆市沙坪坝区高滩岩30号

[72] 发明人 姚春艳 府伟灵 齐永志 黄君富

[74] 专利代理机构 北京瑞盟知识产权代理有限公司

代理人 孙民兴 顾小曼

权利要求书3页 说明书9页

[54] 发明名称

应用适配子型试剂检测、鉴定和/或定量化合物的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种应用适配子型试剂检测、鉴定和/或定量化合物的方法，其特征在于，利用 SELEX 技术，以具有诊断价值的各种生物分子，包括核苷酸序列、蛋白质、氨基酸、肽链、糖类或完整的菌体为靶物质，筛选获得这些靶物质相应的高特异性适配子。本发明有益效果为：能显著提高检测结果的重复性、稳定性，减少检测的批间差异，充分保证测定结果的可靠性。可用于临床靶分子的快速、简便诊断，可以为实验室诊断提供有利依据，本方法还具有测试时间短、试剂成本低、研发周期短、质量稳定等优点。

1、一种应用适配子型试剂检测、鉴定和/或定量化合物的方法，其特征在于，利用 SELEX 技术，以具有诊断价值的各种生物分子，包括核苷酸序列、蛋白质、氨基酸、肽链、糖类或完整的菌体为靶物质，筛选获得这些靶物质相应的高特异性适配子，包括以下步骤：

1) 从具临床诊断意义的各种物质中寻找、制备可用于 SELEX 技术筛选的靶物质，包括：

(1) 具诊断意义的蛋白质、肽链，如 hTSH、hLH、hCG、hFSH 激素；人免疫球蛋白分子；

(2) 具诊断意义的核苷酸序列，如乙型肝炎病毒核酸片段、HIV 病毒核酸片段；

(3) 具诊断意义的细菌或病毒颗粒，如结核分枝杆菌、炭疽芽孢杆菌；

2) 利用 SELEX 技术筛选获得各种靶物质的适配子，包括：

(1) 构建合适的随机单链寡核苷酸文库，包括单链 DNA 和/或 RNA 文库，其两端为固定序列用于设计引物，中间为随机序列用于提供与各种靶物质结合丰富的核酸配基；

(2) 优化 PCR 扩增条件；

(3) 不对称 PCR 法或生物素链亲合素磁珠法制备单链 DNA 文库；

(4) 以硝酸纤维素膜、亲和树脂或微孔板为分离介质的靶物质筛选过程；

3) 建立适配子技术检测临床待测标本，包括：

(1) 提供靶物质的高亲和性适配子，并对其进行修饰；

(2) 对适配子分子进行单侧延长臂修饰；

(3) 采用连接基团将检测标记物在延长臂末端对获得的适配子进行标记；

(4) 混合含适配子的检测试剂和待检测、鉴定和/或定量的样品；

(5) 检测结合物的信号变化。

2、根据权利要求 1 所述的应用适配子型试剂检测、鉴定和/或定量化合物的方法，其特征在于，所述单侧延长臂为核苷酸片段，其序列长度为 5 至 50 个碱基。

3、根据权利要求1所述的应用适配子型试剂检测、鉴定和/或定量化合物的方法，其特征在于，所述适配子是微生物、病毒的适配子或者蛋白质、肽类激素的适配子或核酸分子的适配子。

4、根据权利要求1所述的应用适配子型试剂检测、鉴定和/或定量化合物的方法，其特征在于，所述检测标记物是放射性同位素、化学发光基团、化学荧光基团、乳胶颗粒、荧光蛋白、酶、抗原、抗体、配体或受体中的一种或多种组合，优选是乳胶颗粒。

5、一种应用适配子型试剂检测、鉴定和/或定量化合物的试剂盒，其特征在于，包括通过以下步骤获得的适配子：

1) 从具临床诊断意义的各种物质中寻找、制备可用于 SELEX 技术筛选的靶物质，包括：

(1) 具诊断意义的蛋白质、肽链，如 hTSH、hLH、hCG、hFSH 激素；人免疫球蛋白分子；

(2) 具诊断意义的核苷酸序列，如乙型肝炎病毒核酸片段、HIV 病毒核酸片段；

(3) 具诊断意义的细菌或病毒颗粒，如结核分枝杆菌、炭疽芽孢杆菌；

2) 利用 SELEX 技术筛选获得各种靶物质的适配子，包括：

(1) 构建合适的随机单链寡核苷酸文库，包括单链 DNA 和/或 RNA 文库，其两端为固定序列用于设计引物，中间为随机序列用于提供与各种靶物质结合的丰富核酸配基；

(2) 优化 PCR 扩增条件；

(3) 不对称 PCR 法或生物素链亲合素磁珠法制备单链 DNA 文库；

(4) 以硝酸纤维素膜、亲和树脂或微孔板为分离介质的靶物质筛选过程；

3) 建立适配子技术检测临床待测标本，包括：

(1) 提供靶物质的高亲和性适配子，并对其进行修饰；

(2) 对适配子分子进行单侧延长臂修饰；

(3) 采用连接基团将检测标记物连接在延长臂末端对获得的适配子进行标记;

(4) 混合含适配子的检测试剂和待检测、鉴定和/或定量的样品;

(5) 检测结合物的信号变化。

6、根据权利要求5所述的试剂盒，其特征在于，所述单侧延长臂为核苷酸片段，其序列长度为5至50个碱基。

7、根据权利要求5所述的试剂盒，其特征在于，所述适配子是微生物、病毒的适配子或者蛋白质、肽类激素的适配子或核酸分子的适配子。

8、根据权利要求5所述的试剂盒，其特征在于，所述的连接基团是抗原或抗体、配体或受体，生物素或亲合素中的一种或多种组合，优选是生物素-亲合素基团。

9、根据权利要求5所述的试剂盒，其特征在于，所述检测标记物是放射性同位素、化学发光基团、化学荧光基团、乳胶颗粒、荧光蛋白、酶、抗原、抗体、配体或受体中的一种或多种组合，优选是乳胶颗粒。

10、权利要求5-9任一项所述的试剂盒或权利要求1-4任一项所述的方法应用在临床检测、毒品检测、食品安全检测中。

## 应用适配子型试剂检测、鉴定和/或定量化合物的方法

### 技术领域

本发明属生物学检验领域，本发明涉及应用适配子型试剂检测、鉴定和/或定量化合物的方法，该发明还涉及用于该方法的适配子型检测试剂盒的制备方法。

### 背景技术

目前应用于临床检测的试剂大多为抗体类，且多数为进口试剂。由于抗体制备过程中的差异及稳定性问题，决定了定量测定时每批试剂必须做标准曲线，这使得操作过程复杂烦琐，且对一部分免疫原性较小或无免疫原性的物质无法进行检测。本发明针对以上问题，采用适配子技术，通过 SELEX 技术的筛选过程，获得各种具临床诊断意义的靶物质的高亲和性特异适配子，用于快速、准确检测相应的靶物质，以改善现有临床检测试剂存在的问题，降低检测成本，研发自主创新的化学诊断试剂。

寡核苷酸适配子技术是近年来发展起来的一种新型的分子生物学技术，是采用指数级富集配体的系统进化技术 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 筛选获得的。SELEX 技术是上世纪 90 年代初创立的一项筛选技术，是一种研究核酸结构与功能的有效方法，其基本原理是体外化学合成一个单链寡核苷酸文库，用它与靶物质混合，形成靶物质核酸复合物，洗掉未与靶物质结合的核酸，分离与靶物质结合的核酸分子，以此核酸分子为模板进行 PCR 扩增，再进行下一轮的筛选过程。通过重复的筛选与扩增，一些与靶物质不结合或与靶物质低亲和力、中亲和力的 DNA 或 RNA 分子被洗去，而称之为“适配子”(aptamer) 的与靶物质有高亲和力的 DNA 或 RNA 分子从随机库中被分离出来，且纯度随 SELEX 过程的进行而增高，从 pmol 到 nmol，甚至到  $\mu\text{mol}$ ，最后占据库的大多数。通过多轮的体外筛选和扩增，能够从随机寡核苷酸文库中筛选出特异性适配子。一个典型的 SELEX 过程可能在几个星期至几个月中筛选出适配子，而运用“自动 SELEX 技术”，不仅降低了人为因素

的干扰，更可在数天内完成一个 SELEX 过程。该技术具有库容量大、靶分子范围广、亲和力高、特异性强等优点，已成功应用于多种靶物质的筛选，除用于核苷酸序列、蛋白质、氨基酸外，还可用于染料、药物小分子（如茶碱）、生长分子、肽链、类固醇、糖类，甚至可用于完整的细胞、病毒、孢子和朊病毒等。适配子具有高度特异性，通过反向 SELEX 技术，甚至可以在不知靶目标性质的情况下筛选出其相应的适配子。在临床检测方面，特别是对一些未知的致病性细菌或病毒的研究，虽然不知道其内部结构、功能以及这些物质的表位，但将其作为靶物质，通过 SELEX 技术筛选到其相应的适配子，以检测靶物质，已成为该领域的研究热点。

适配子对靶分子的识别具有高亲和力，并能高特异性地结合靶分子。目前已筛出的适配子解离常数(kd)一般在 0.05~50pmol/L，高于其他类型的配基。适配子能够分辨出靶分子结构上细微的差别，可以区分一个甲基或一个羟基的差别。适配子可用于单克隆抗体难以区分的结构类似物或交叉抗原的鉴别诊断。比如 hTSH、hLH、hCG 以及 hFSH 这 4 种激素，有相同的  $\alpha$  链， $\beta$  链的结构也十分相似，因而要制备与其他三种激素无交叉反应的特异单克隆抗体十分困难。而适配子在这四种激素间无交叉反应。因此，适配子可应用于对特定靶分子的检测。现有的应用适配子检测靶分子的技术中需要将检测标记物直接连接到适配子上，不但影响了检测方法本身的灵活性，而且由于检测标记物对适配子立体构象的影响，尤其是当检测标记物相对较大时，会直接造成适配子的识别、结合靶分子的亲和力、特异性的改变，从而影响检测的准确性和精度。

为此本发明的发明人经过长期研究，提出了含有单侧延长臂的适配子片段，并将其包被在乳胶颗粒上，当血清标本加入试剂时，血清中的待测靶分子和包含适配子片段的乳胶颗粒形成凝集，使入射光散射，散射光的强度与血清中的靶物质成正比，通过比浊法可直接检测出相应靶分子的浓度。该方法不但提供可供选择的运用适配子的测试方法，而且可以避免检测标记物直接与适配子连接对适配子识别、结合能力的影响。采用适配子型分子做试剂分子可使检测的重复性更好，减少批间差异，充分保证测定结果的可靠性。将该检测试剂应用于全自动生化分析仪，即可实现检测的自动化和批量化。另外本方法还具有测

试时间短、试剂成本低、研发周期短、质量稳定等优点。

## 发明内容

本发明的目的是应用适配子型试剂检测、鉴定和/或定量化合物的方法，该发明还涉及用于该方法的适配子型检测试剂盒的制备方法和应用。

本发明方法利用指数级富集配体的系统进化技术（SELEX 技术），以具有诊断价值的各种生物分子，包括核苷酸序列、蛋白质、氨基酸、肽链、糖类，或完整的菌体为靶物质，筛选获得这些靶物质相应的高特异性适配子，为进一步利用适配子技术进行临床诊断提供依据。所述的适配子是筛选获得的单链寡核苷酸，其来自一种随机单链文库，所述随机单链文库可以是 DNA 也可以是 RNA 分子，其两端为固定序列用于设计引物，中间为随机序列用于提供与各种靶物质结合的丰富核酸配基。

本发明利用 SELEX 技术通过反复的筛选过程，获得各种待测靶物质的高亲和性特异适配子，然后通过对适配子进行修饰增强其稳定性，再通过单侧延长臂的设计及连接基团将荧光素、生物素、放射性同位素、胶体金或乳胶颗粒等标记分子连接在适配子分子上，用于从血、尿、组织标本及各种临床标本中检测相应的靶物质，达到快速、准确诊断的目的，包括以下步骤：

1) 从具临床诊断意义的各种物质中寻找、制备可用于 SELEX 技术筛选的靶物质，包括：

(1) 具诊断意义的蛋白质、肽链，如 hTSH、hLH、hCG、hFSH 激素；人免疫球蛋白分子等；

(2) 具诊断意义的核苷酸序列，如乙型肝炎病毒核酸片段、HIV 病毒核酸片段等；

(3) 具诊断意义的细菌或病毒颗粒，如结核分枝杆菌、炭疽芽孢杆菌等。

2) 利用 SELEX 技术筛选获得各种靶物质的适配子，包括：

(1) 构建合适的随机单链寡核苷酸文库，包括单链 DNA 和/或 RNA 文库，其两端为固定序列用于设计引物，中间为随机序列用于提供与各种靶物质结合的丰富核酸配基；

(2) 优化 PCR 扩增条件；

(3) 不对称 PCR 法或生物素链亲合素磁珠法制备单链 DNA 文库；

(4) 以硝酸纤维素膜、亲和树脂或微孔板为分离介质的靶物质筛选过程；

3) 建立适配子技术检测临床待测标本，包括：

(1) 提供靶物质的高亲和性适配子，并对其进行修饰，主要针对 RNA 适配子进行修饰；

(2) 对适配子分子进行单侧延长臂修饰；

(3) 采用连接基团将荧光素、生物素、放射性同位素、胶体金或乳胶颗粒等标记物标记在延长臂末端对获得的适配子进行标记；

(4) 混合含适配子的试剂分子和待检测、鉴定和/或定量的样品；

(5) 检测结合物的信号变化。

其中单侧延长臂为核苷酸片段；适配子可以是微生物、病毒的适配子，蛋白质、肽类激素的适配子或核酸分子的适配子，优选是各类蛋白质、肽类激素的适配子；检测标记物是放射性同位素、化学发光基团、化学荧光基团、乳胶颗粒、荧光蛋白、酶、抗原、抗体、配体或受体中的一种或多种组合，优选是乳胶颗粒；本发明提供的适配子型检测分子的制备方法包括单侧延长臂和标记物的结合过程。

本发明提供了本发明方法所述的试剂盒或本发明所述适配子型检测分子在临床检测、毒品检测、食品安全检测中的应用。

本发明提供的人免疫球蛋白 E 的适配子，其序列为 5'-GGGGACGTTTATCCGTCCCTCCTAGTGGCGTGCCCC-3'。

在适配子序列部分核酸片段为单链，可以通过修饰进行延长。而单侧延长臂是与适配子序列相连接的单链核酸序列，而且其核酸序列末端连接有检测标记物，因此能通过单侧延长臂带有的检测标记物对被测物进行检测。在本文中，核酸用本领域技术人员所熟知的符号来表示其序列，如无特别说明序列表示的是从 5'端至 3'端方向的序列顺序。

本文中的术语“单侧延长臂”指的是在适配子序列的一端加入的一段连续序列，从而使标记分子与含适配子的核酸片段能够结合在一起，同时不影响适配子的立体构像，其序列长度通常视适配子的序列长度而定，上述单侧延长臂适的序列长度优选为 5 至 50 个碱基，更优选为 5 至 30 个碱基，更优选为 8 至 15 个碱基。

本文中的术语“适配子”是为本领域技术人员所熟知的，指的是能够与特定的靶分子特异结合的单链核酸，包括 DNA 或 RNA 片段。通过 SELEX 技术可以在短时间内获得特定靶分子的适配子。目前已经有大量的适配子序列被公开，因此本文中的适配子可以选自微生物、病毒的适配子，蛋白质、肽类激素的适配子或核酸分子的适配子，优选是蛋白质、肽类激素的适配子，如人免疫球蛋白 E 的适配子。由于适配子具有与抗体相似的结合特定靶分子的性质，因此适配子可以代替抗体在检测中的作用，并且本发明人在适配子序列的一侧设计了单链核酸的延长序列，获得了本发明第一个方面的方法，使得适配子序列和延长片段能结合标记分子，然后通过检测标记分子的信号变化来计算靶分子的存在与否及其含量，从而检测、鉴定和/或定量靶分子。

本发明可进一步通过发现适配子的结构，对其进行修饰增加稳定性，以抵抗体内核酸酶的降解；采用标准品进行倍比稀释检测制作待测物的标准曲线。本发明方法将能显著提高检测结果的重复性、稳定性，减少检测的批间差异，充分保证测定结果的可靠性。可用于临床靶分子的快速、简便诊断，可以为实验室诊断提供有利依据，本方法还具有测试时间短、试剂成本低、研发周期短、

质量稳定等优点。本发明方法将为临床诊断开启新的途径，也为开发临床诊断试剂盒提供了新的研究思路。所以本发明较之常规的临床检测方法具有更好的检测特异性和重复性，而且还具有以下优点：1. 检测时间短。混合适配子检测序列和样品后，通常只要反应 5 分钟就可以进行检测。2. 生产成本低。适配子及其延长臂序列只要通过化学合成和修饰就可以得到，目前 DNA 合成技术已经非常成熟，成本极低。而蛋白抗体要通过动物免疫和纯化得到，成本较高。3. 新产品研发周期短。通过 SELEX 技术，可在 1 个月内得到与目标分子高度特异结合的适配子；而蛋白抗体的研发时间起码需要 6 个月以上。4. 产品质量稳定。核酸分子比蛋白抗体更稳定，易于长时间保存，这使产品的有效期大大延长。

在本文中，连接基团是本领域技术人员所知晓的化学基团，它们可以通过共价键将标记分子连接在适配子核酸片段上。这些技术广泛存在于核酸微阵列、核酸芯片的核酸固定技术之中。为了能够更稳定地合成适配子型检测试剂，本发明优选的连接基团是抗原或抗体、配体或受体，更优选为生物素或亲合素。在延长臂序列末端通过生物素——亲合素的结合使标记分子连接到核酸片段上形成完整的适配子型检测试剂。在本发明的一个具体实施方式中，优选单链核酸片段含有人免疫球蛋白 E 的适配子序列和单侧延长臂序列（连接序列优选为 GCGCGCGC）；连接基团为生物素，标记在单侧延长臂序列的 5'端。

在本文中，单侧延长臂序列连接的检测标记物是可以被检测的物质，包括但不限于放射性同位素、化学发光基团、化学荧光基团、荧光蛋白、酶、胶体金颗粒、乳胶颗粒中的一种或多种组合。放射性同位素的合适例子有  $^{32}\text{P}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^3\text{H}$  等。化学发光基团有鲁米诺等；化学荧光基团包括罗丹明、FITC、TRITC 等。通过常规的化学合成方法，可以将辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶标记到适配子核酸序列上。而且已经有大量的商品化的检测标记物及其反应试剂盒可供使用。在本发明中，优选适配子序列连接的检测标记物是乳胶颗粒。

## 附图说明

图 1 是 SELEX 过程筛选人免疫球蛋白 E 适配子的流程图；

图 2 是未结合人免疫球蛋白 E 的适配子复合物；

图 3 是用本发明制备的人免疫球蛋白 E 检测试剂盒检测人免疫球蛋白 E 的标准曲线。

## 具体实施方式

以能与人免疫球蛋白 E 结合的高亲和性 DNA 适配子的制备方法为例，按照下列步骤进行：

### 1. 制备和纯化蛋白

所涉及的人免疫球蛋白 E 的制备和纯化为本领域已知技术（可市购），将获得人免疫球蛋白 E 纯品作为筛选靶物质。

### 2. 构建随机单链 DNA (ssDNA) 文库和引物

#### (1) 合成随机 ssDNA 文库

人工合成长度为 79bp 的随机 ssDNA 文库，两端为固定序列，中间 35 个碱基为随机序列的单链 DNA 库，其库容为  $10^{14-15}$  [5' -CCC CTG TCA GAA GTG TTT CTC AA-(N35)-AGA GAT GAG CAG GCG GAT ACT-3' ]，其中 N 代表碱基 A, G, C, T 中的任意一个。随机单链 DNA 文库由生物合成公司合成。

#### (2) 引物合成

引物由 Primer Design 5.0 软件设计，上游引物和下游引物分别对应于随机 DNA 文库两端的固定序列，下游引物 5' 端标记生物素。

### 3. 特异性适配子的制备：

通过 SELEX 技术针对待测分子所构建的 ssDNA 文库进行重复选择和扩增，经过数轮严格的选择和扩增，将所获取的适配子进行克隆、测序，并检验其与靶分子的结合力。筛选次数依据每轮洗涤非特异性吸附 DNA 或 RNA 的严格程度以及靶物质的性质而定，将筛选轮数设定为 12 轮。

将  $10\mu\text{g}$  人免疫球蛋白 E 用 pH9.6 的碳酸缓冲液包被于酶联板上， $37^\circ\text{C}$  作用 3 小时，同时设定空白对照孔。样本孔和对照孔用 3% 的 BSA 封闭 2 小时。

将纯化的单链DNA文库 1ng 在 SELEX 结合缓冲液中先与空白对照孔作用 40 分钟，反筛去除与 BSA 结合的单链 DNA，然后转移到人免疫球蛋白 E 包被孔与蛋白结合 40 分钟，用 SELEX 结合缓冲液洗涤 6 次，再加入 SELEX 洗脱液于 80℃ 作用 10 分钟，洗脱下与人免疫球蛋白 E 结合的 ssDNA，经酚氯仿抽提、乙醇沉淀，得到纯化的单链 DNA。重复上述步骤，12 轮后适配子与人免疫球蛋白 E 的亲合力达到饱和，得到可与人免疫球蛋白 E 高亲和性的单链 DNA 适配子。

不经修饰的适配子易被体液中的核苷酸酶降解，如对适配子进行适当的修饰，则可避免降解。用磷硫乙酸 (phosphrothiate) 连接物修饰可增强适配子对核酸酶的抵抗。体液中的核酸酶为嘧啶特异性，取代 2' 位的嘧啶则可避免被降解，用 2' 氨基或 2' 氟基取代嘧啶后再制备适配子，则更适于诊断和治疗。

#### 4. 适配子亲和力测定

每轮 SELEX 筛选产物，以标记生物素的引物进行 PCR 扩增，用酚氯仿抽提、乙醇沉淀纯化后，测定含量，与待测蛋白分子混合并加入辣根过氧化物酶标记亲和素，显色测定亲和力。

#### 5. 适配子的克隆与测序

最后一轮筛选出的 ssDNA 适配子用不带生物素的引物进行 PCR 扩增，产物回收纯化后用 TaKaRa 公司提供的 pMD18-T Simple Vector 试剂盒连接到 pMD18-T 载体上，转化到大肠杆菌 DH5  $\alpha$ ，氨卞抗性筛选，挑取单个生长菌落进行测序。

6. 将各单个生长菌落所对应的适配子用生物素标记，量为 0.1  $\mu$ g，与每孔 10  $\mu$ g 包被的人免疫球蛋白 E 在 SELEX 结合缓冲液中 37℃ 结合 40 分钟，用 SELEX 冲洗缓冲液洗涤 6 次，加入 1: 1000 的辣根过氧化物酶标链霉亲和素，37℃ 作用 30 分钟，用 PBS 缓冲液洗涤 4 次，洗去未与人免疫球蛋白 E 上 DNA 生物素结合的酶标链霉亲和素，然后加入四甲基联苯胺在室温显色作用 20 分钟，加入 2M 浓硫酸终止显色反应，450nm 酶联仪测定 OD 值，选取 OD 值最高的 DNA 适配子，该适配子即为能与人免疫球蛋白 E 特异结合的 DNA 适配子，将该适配子测序获得其序列，并进行结构分析获得该适配子的二级结构图谱（见图 2）。

本发明所用的 SELEX 结合缓冲液为：8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ，1.1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，1 mM

MgCl<sub>2</sub>, 2.7 mM KCl, 138 mM NaCl, pH 7.4; SELEX 冲洗缓冲液为: 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% (v/v) Tween-20, pH 7.4; PBS 缓冲液为 10 μM PBS buffer, 0.2 M NaCl, pH 7.9。

本发明实验所用酚氯仿抽提液为: 25ml 的酚, 24ml 的氯仿, 1ml 的异戊醇混合物。

将由上述过程获得的适配子进行单侧延长臂修饰, 然后通过生物素-亲合素连接基团将荧光素、生物素、放射性同位素、胶体金或乳胶颗粒标记在单侧延长臂的末端, 将获得的适配子转化为报告适配子, 就可从临床血、尿、组织标本及培养上清中检测相应的靶物质, 从而达到快速、准确检测的目的。

用本发明获得的人免疫球蛋白 E 的适配子代替抗体, 进行人免疫球蛋白 E 的检测, 具有许多优越性: 由于适配子与抗原的亲合力要强于抗原抗体之间的亲合力, 因而适配子与结合抗原间的强特异性结合, 几乎可以完全避免非特异性结合, 而且即使是免疫原性较弱的蛋白也同样可以获得其高特异性的适配子; 适配子的筛选比抗体筛选时间更短, 易于制备, 稳定性好, 且容易标记。因此, 利用 SELEX 技术筛选人免疫球蛋白 E 的特异性适配子, 将为人免疫球蛋白 E 的诊断提供一种新的研究思路。

专利名称(译)	应用适配子型试剂检测、鉴定和/或定量化合物的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101144814A</a>	公开(公告)日	2008-03-19
申请号	CN200710163431.X	申请日	2007-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学第一附属医院		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学第一附属医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学第一附属医院		
[标]发明人	姚春艳 府伟灵 齐永志 黄君富		
发明人	姚春艳 府伟灵 齐永志 黄君富		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/546		
代理人(译)	孙民兴		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种应用适配子型试剂检测、鉴定和/或定量化合物的方法，其特征在于，利用SELEX技术，以具有诊断价值的各种生物分子，包括核苷酸序列、蛋白质、氨基酸、肽链、糖类或完整的菌体为靶物质，筛选获得这些靶物质相应的高特异性适配子。本发明有益效果为：能显著提高检测结果的重复性、稳定性，减少检测的批间差异，充分保证测定结果的可靠性。可用于临床靶分子的快速、简便诊断，可以为实验室诊断提供有利依据，本方法还具有测试时间短、试剂成本低、研发周期短、质量稳定等优点。