



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102676640 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 19

(21) 申请号 201110057379. 6

(22) 申请日 2011. 03. 10

(71) 申请人 国家纳米科学中心

地址 100190 北京市海淀区中关村北一条  
11 号

(72) 发明人 宋炉胜 朱劲松

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理  
有限公司 11280

代理人 刘丹妮

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

C12Q 1/527(2006. 01)

C12Q 1/30(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

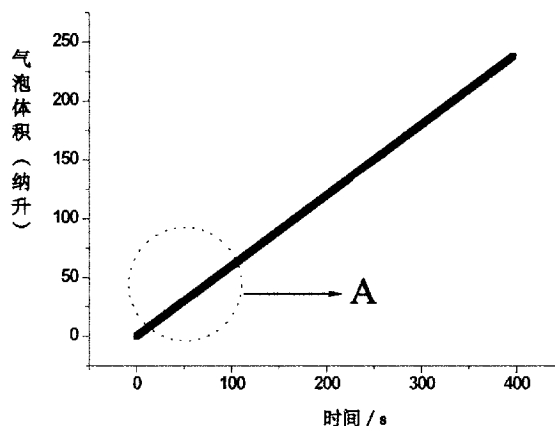
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 1 页

## (54) 发明名称

催化复合物及可视化检测方法

## (57) 摘要

本发明涉及一种可视化检测方法,将传统的目标分子的指示物质变换为可以催化产生气体的纳米颗粒或者酶等催化剂,通过催化剂在目标分子的位置催化底物产生气体进行可视化检测。本方法可以极大的提高检测灵敏度,甚至可以做到单分子检测。产生的气泡被作为可视化的信号进行读取,该方法速度快、易于检测,并且灵敏度极高,该方法便于结果的读取,用于分析的设备大大简化。由此得到一种高通量、高灵敏度、实时检测的技术。由于其方法适应性很强,适用于临床及普通实验室,甚至野外检测也可以使用。



1. 一种复合物,其包括催化区及靶向区,其中:  
所述催化区选自纳米颗粒、过氧化氢酶、脱羧酶、拥有过氧化氢酶活性的肽段及其突变体、拥有脱羧酶活性的肽段及其突变体;  
所述靶向区部分选自蛋白质、核酸以及肽核酸;  
所述核酸选自 DNA、RNA 及 cDNA。
2. 如权利要求 1 所述的复合物,其特征在于,还包括结合于生物分子的探针,及结合探针的基质。
3. 如权利要求 2 所述的复合物,其中所述基质为金属表面、合金表面、无机材料表面、有机材料表面或粗糙表面;  
其中,所述金属表面选自金、银、铂、钛、铜、铁、镍和锡;  
其中,所述合金表面成分为金、银、铂、钛、铜、铁、镍、锡的两种或多种;  
其中,所述无机材料表面选自玻璃和石英;  
其中,所述有机材料选自聚二甲基硅氧烷和聚苯乙烯;  
其中,所述粗糙表面选自微纳处理和修饰的分子表面如不同材料的电纺丝无纺布表面,以及经过物理和化学以及生物方法制备的粘附表面如生物粘连分子 RGD;  
优选地,该介质为金包被芯片。
4. 如权利要求 1 所述的复合物,其中所述催化区包括过氧化氢酶、具有过氧化氢酶活性的肽段、过氧化氢酶突变体、过氧化氢酶的聚合物、微米颗粒或纳米颗粒;进一步地为铂、铂壳、铂合金的微米或纳米颗粒;或者包被有过氧化氢酶、脱羧酶的一种或几种的金、银、铜等金属的微米或纳米颗粒;或者 SiO<sub>2</sub> 等微米或纳米颗粒;或者为聚苯乙烯、聚碳酸酯等微米或纳米颗粒;其中,所述微米或纳米颗粒为直径在 0.1-100000nm 的颗粒;其中,所述微米或纳米颗粒选自修饰有氨基、羧基、巯基、酰基、胺基、生物素、氨基酸、糖、脂、多肽及蛋白质的微米和纳米颗粒;优选地,所述纳米颗粒为 100nm 的金核铂壳的纳米颗粒。
5. 如权利要求 1 所述的复合物,其中所述催化区包括脱羧酶、具有脱羧酶活性的肽段、脱羧酶突变体或脱羧酶聚合物;优选地包括丙酮酸脱羧酶、 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶等;再优选为  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶。
6. 如权利要求 1 所述的复合物,其中所述催化区包括酶的聚合物,所述酶可选自氧化氢酶、脱羧酶;优选地,所述聚合物为酶-戊二醛-免疫球蛋白。
7. 一种生物分子的检测方法,其特征在于包括以下步骤:
  - (1) 将如权利要求 1-6 中任一项所述的复合物与固定于表面的探针相结合;和
  - (2) 将催化剂底物与固定后的催化剂作用。
8. 如权利要求 7 所述的方法,其中目标分子为含有二硫键结构的蛋白质。
9. 如权利要求 8 所述的方法,其中步骤 (1) 中,蛋白质被还原并与金属纳米颗粒或合金纳米颗粒混合。
10. 如权利要求 8 或 9 所述的方法,其中步骤 (2) 中,所述探针为与催化复合物的靶向区可以共价或非共价特异性相互作用的物质;优选为探针为抗体时,靶向区为抗原;再优选为探针为 NHS-生物素,靶向区为含氨基的物质如蛋白质。
11. 如权利要求 7 所述的方法,其中目标分子为核酸。
12. 如权利要求 11 所述的方法,其中步骤 (1) 中,将催化剂溶液与寡核苷酸混合,比例

为 1-100 : 1, 反应获得含有催化剂的寡核苷酸接头; 提取需要标记的 DNA, 通过去磷酸化去除 DNA 的 5' 端的磷酸基团; 在连接酶的作用下, 结合催化剂标记的寡核苷酸接头, 获得催化剂标记的 DNA; 其中, 所述寡聚核苷酸为由 1-2000 个碱基组成的核酸物质, 以及带有巯基、氨基、酰基等基团的衍生物。

13. 如权利要求 11 所述的方法, 其中步骤 (1) 中, 将催化剂溶液与 PCR 引物混合, 比例为 1-100 : 1, 反应获得含有催化剂的 PCR 引物; 利用该标记的引物进行 PCR 反应, 获得催化剂标记的 DNA。

14. 如权利要求 11 所述的方法, 其中步骤 (1) 中, 催化剂溶液与 RT-PCR 引物混合, 比例为 1-100 : 1, 反应获得含有催化剂的 RT-PCR 引物; 利用该标记的引物进行 RT-PCR 反应, 获得催化剂标记的 DNA。

15. 如权利要求 11 所述的方法, 其中步骤 (1) 中, 包括将核酸末端修饰以含氨基, 羧基, 含硫的或者含二酰亚胺类等的化合物。

16. 如权利要求 7-15 所述的方法, 其中所述催化区具有过氧化氢分解反应的催化活性, 所述催化剂底物含有过氧化氢, 优选地选自过氧化氢的水溶液和过氧化氢的有机溶剂溶液, 再优选为含有过氧化氢的磷酸盐缓冲液、含有过氧化氢的碳酸盐缓冲液, 过氧化氢的甲醇溶液、过氧化氢的乙醇溶液、过氧化氢的二甲基咪唑溶液及其混合物, 最优选为 0.01M PBS pH7.0 的缓冲液中的过氧化氢。

17. 如权利要求 7-15 所述的方法, 其中所述催化区具有碳酸分解反应的催化活性, 所述催化剂底物含有碳酸, 优选地选自碳酸的水溶液和碳酸的有机溶剂溶液, 再优选为含有碳酸的磷酸盐缓冲液、含有碳酸的碳酸盐缓冲液, 碳酸的甲醇溶液、碳酸的乙醇溶液、碳酸的二甲基咪唑溶液及其混合物。

## 催化复合物及可视化检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物分子的催化复合物及可视化检测方法。

### 背景技术

[0002] 灵敏的生物检测方法一直是不同领域的研究热点,从防治传染病、遗传疾病,癌症以及常见疾病,到环境污染、健康卫生等领域,科研人员仍在不断的向着更灵敏、更简单易行的检测方向努力。其中可视化信号读取是一个诱人的领域,例如怀孕检测试纸条,由于其简单易行成为了目前应用最广泛的怀孕自测手段,其基于的原理是,目标分子的存在会引起金纳米颗粒的聚集,从而产生颜色的变化。目前基于类似原理的检测方法已经广泛地应用于多个领域,例如近几年,关于使用金纳米颗粒之间距离的控制产生的颜色变化已经用于检测核酸、蛋白质、重金属离子、小分子等,它是目前研究最为广泛的可视化读取方法。其次应用较为广泛的一种可视化读取方法是基于金标银染的灵敏方法,起源于现代的照相技术、组织化学、免疫金标等。通过将金纳米颗粒连接到目标分子上,之后将目标分子与探针分子结合,借助于金纳米颗粒可以催化还原银并导致银沉积的原理,从而产生可视化的信号,一般用肉眼或者光学显微镜进行观察。还有基于高发光和高稳定性的量子点标记技术,通过目标分子可以改变不同层的量子点的发光性质,经过混合产生不同的颜色信号进行检测。

[0003] 目前的读取方法已经趋向于高灵敏和高稳定性的方向发展。然而到目前为止,其检测灵敏度还是不足以满足疾病分子的检测要求。以纳米粒子聚集产生颜色变化的可视化检测为例,其目前只能用于一种或几种物质的检测,无法进行大规模的使用或者与其余的机器和设备进行集成。而基于金标银染的灵敏方法,其在不断创新中,灵敏度在提高,但是其操作繁杂,重复性不高,尤其在于其产生的是沉淀性质的信号,因此还存在无法对芯片表面进行重生等问题。而对于基于量子点的荧光值来计算,其灵敏度是有限的,虽然相对简单易行,但是制备量子点的阵列是重复性不高的,而且保存时间有限。

### 发明内容

[0004] 本发明针对目前可视化检测的方法灵敏度尚待提高,基于颜色变化的现象不适合所有实验人员,操作复杂的实验手段和方法仍然需要进步的问题。

[0005] 本发明提供了一种具有催化性能的复合物,以及通过产生气体进行可视化检测的方法。

[0006] 本发明所使用的学术用语“寡核苷酸接头”是指由 1-2000 个碱基组成的一段核酸物质,及其带有巯基、氨基、酰基等基团的衍生物。

[0007] 本发明所用的学术用语“引物”“PCR”“RT-PCR”的定义参考:《PCR 技术实验指南》,C. W,迪芬巴赫,G. S. 得维克斯勒。科学出版社,1998 年 8 月第一版。

[0008] 本发明所使用的学术用语“产物核酸”是指由 PCR 或 RT-PCR 反应生成的核酸物质,如 DNA, cDNA。

[0009] 在一个方面,本发明提供一种复合物,其包括催化区及靶向区,其中所述催化区选自纳米颗粒、酶、拥有过氧化氢酶活性的肽段及其突变体、拥有脱羧酶活性的肽段及其突变体;

[0010] 所述靶向区部分选自蛋白质、核酸以及肽核酸;

[0011] 所述核酸选自 DNA、RNA 及 cDNA。

[0012] 在本发明的一个方面,所述复合物还包括结合于生物分子的探针,及结合探针的基质。

[0013] 其中,所述酶选自催化产生气体的酶,例如选自过氧化氢酶、脱羧酶及其聚合物。其中过氧化氢酶可以通过催化过氧化氢产生氧气,脱羧酶可以催化碳酸产生二氧化碳。所述酶的聚合物可以按照 Macromol. Rapid Commun. 2008, 29, 1287-1292 中的方法制备,或者直接通过类似于常规辣根过氧化物酶的标记方法将不同的酶通过共价键的方法修饰在一起形成聚合物。标记方法之一原理是:通过戊二醛的醛基分别与酶和免疫球蛋白上的氨基共价结合,形成酶-戊二醛-免疫球蛋白结合物。标记方法之一原理是:以  $\text{NaIO}_4$  先将酶表面的糖分子氧化成醛基,然后再与蛋白质上的氨基相结合。

[0014] 其中,所述过氧化氢酶为牛肝过氧化氢酶。所述靶向区可选自蛋白质、核酸、肽核酸、肽段、糖、脂类、氨基酸和生物素;其中,所述核酸可选自 DNA、RNA 及 cDNA。

[0015] 在本发明的一个方面,其中所述催化区包括过氧化氢酶、具有过氧化氢酶活性的肽段、过氧化氢酶突变体、过氧化氢酶的聚合物、微米颗粒或纳米颗粒;进一步地为铂、铂壳、铂合金的微米或纳米颗粒;或者包被有过氧化氢酶、脱羧酶的一种或几种的金、银、铜等金属的微米或纳米颗粒;或者  $\text{SiO}_2$  等微米或纳米颗粒;或者为聚苯乙烯、聚碳酸酯等微米或纳米颗粒;其中,所述微米或纳米颗粒为直径在 0.1-100000nm 的颗粒;其中,所述微米或纳米颗粒选自修饰有氨基、羧基、巯基、酰基、胺基、生物素、氨基酸、糖、脂、多肽及蛋白质的微米和纳米颗粒;优选地,所述纳米颗粒为 100nm 的金核铂壳的纳米颗粒。所述催化剂底物含有过氧化氢,优选地选自过氧化氢的水溶液和过氧化氢的有机溶剂溶液,再优选为含有过氧化氢的磷酸盐缓冲液、含有过氧化氢的碳酸盐缓冲液,过氧化氢的甲醇溶液、过氧化氢的乙醇溶液、过氧化氢的二甲基咪唑溶液及其混合物,最优选为 0.01M PBS pH 7.0 的缓冲液中的过氧化氢。

[0016] 在本发明的另一个方面,所述催化区包括脱羧酶、具有脱羧酶活性的肽段、脱羧酶突变体或脱羧酶聚合物;优选地包括丙酮酸脱羧酶、 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶等,再优选为  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶。所述催化剂底物含有碳酸,优选地选自碳酸的水溶液和碳酸的有机溶剂溶液,再优选为含有碳酸的磷酸盐缓冲液、含有碳酸的碳酸盐缓冲液,含有碳酸的甲醇溶液、含有碳酸的乙醇溶液、含有碳酸的二甲基咪唑溶液及其混合物,最优选为含有碳酸的碳酸盐缓冲液。

[0017] 在本发明的另一个方面,其中所述催化区包括酶的聚合物,所述酶选自过氧化氢酶、脱羧酶;优选地,所述聚合物为酶-戊二醛-免疫球蛋白。

[0018] 在本发明的另一个方面,该复合物还可选地包括结合于生物分子的探针,及结合探针的基质。

[0019] 其中所述基质为金属表面、合金表面、无机材料表面、有机材料表面或粗糙表面;

[0020] 其中,所述金属表面选自金、银、铂、钛、铜、铁、镍和锡;

- [0021] 其中,所述合金表面成分为金、银、铂、钛、铜、铁、镍、锡的两种或多种;
- [0022] 其中,所述无机材料表面选自玻璃和石英;
- [0023] 其中,所述有机材料选自聚二甲基硅氧烷和聚苯乙烯;
- [0024] 其中,所述粗糙表面选自微纳处理和修饰的分子表面如不同材料的电纺丝无纺布表面,以及经过物理和化学以及生物方法制备的粘附表面如生物粘连分子 RGD(存在于纤连蛋白和某些细胞外基质蛋白肽链中的“精氨酸(R)-甘氨酸(G)-天冬氨酸(D)”三肽序列。可被一些整联蛋白所识别,并与之结合。)及含有 RGD 序列的多肽修饰的表面;
- [0025] 优选地,该介质为金包被芯片。
- [0026] 其中探针结合基质的方式可选自物理吸附,化学共价作用,非共价相互作用,以及氢键等弱作用力。
- [0027] 在另一个方面,本发明还提供生物分子的检测方法。
- [0028] 生物分子的检测方法,其包括以下步骤:
- [0029] (1) 将前述的复合物与固定于表面的探针相结合;
- [0030] (2) 将催化剂底物与固定后的催化剂作用。
- [0031] 当待测目标分子为蛋白质时,步骤(1)中,将催化剂溶液与将催化剂溶液与还原处理的蛋白质混合,摩尔比例不低于 5 : 1,反应获得含有催化剂的蛋白质。在步骤(2)中,所述探针为与催化复合物的靶向区可以共价或非共价特异性相互作用的物质,如探针为抗体时,靶向区为抗原,它们之间是非共价的相互作用。如探针为 NHS-biotin(生物素),靶向区为含氨基的物质如蛋白质时,他们之间的存在共价相互作用。
- [0032] 当待测目标分子为核酸时,步骤(1)中,将催化剂溶液与寡核苷酸混合,比例为 1-100 : 1,反应获得含有催化剂的寡核苷酸接头;提取需要标记的 DNA,通过去磷酸化去除 DNA 的 5' 端的磷酸基团,防止其自身连接;在连接酶的作用下,结合催化剂标记的寡核苷酸接头,获得催化剂标记的 DNA。
- [0033] 当待测目标分子为核酸时,步骤(1)中,将催化剂溶液与 PCR 引物混合,比例为 1-100 : 1,反应获得含有催化剂的 PCR 引物;利用该标记的引物进行 PCR 反应,获得催化剂标记的 DNA。
- [0034] 当待测目标分子为核酸时,步骤(1)中,催化剂溶液与 RT-PCR 引物混合,比例为 1-100 : 1,反应获得含有催化剂的 RT-PCR 引物;利用该标记的引物进行 RT-PCR 反应,获得催化剂标记的 DNA。
- [0035] 上述步骤 1 中采用直接对核酸实现标记的方法为:通过与核酸末端基团反应,从而使核酸末端修饰有氨基,羧基,含硫或者含二酰亚胺类等化合物,该类化合物可以和催化剂中的酶,或者微米或纳米颗粒作用,从而实现了对催化剂的标记。在上述步骤(2)中将标记的核酸与表面固定的探针结合的方法步骤为:
- [0036] 2.1 对催化剂修饰的核酸进行变性处理;
- [0037] 2.2 将变性处理的催化剂修饰的 DNA 加到芯片的表面,进行杂交反应;
- [0038] 2.3 清洗除去未杂交结合的催化剂标记的 DNA;
- [0039] 2.4 干燥处理备用。
- [0040] 目标分子为含有二硫键结构的蛋白质时,上述步骤(2)中将标记的蛋白质与表面固定的探针结合的方法步骤为:

- [0041] 2.1 磷酸缓冲液 (PBS) 处理生物芯片；
- [0042] 2.2 将催化剂修饰的蛋白质加到芯片的表面,进行结合反应；
- [0043] 2.3 清洗除去未结合的催化剂标记的蛋白质；
- [0044] 2.4 干燥处理备用。
- [0045] 目标分子为含有二硫键结构的蛋白质时,步骤 (1) 中,蛋白质被还原并与金属纳米颗粒或合金纳米颗粒混合。
- [0046] 上述步骤 3 中将利用相应的催化剂的底物与标记的催化剂作用产生气体,产生的气泡用于放大信号。其方法步骤为：
- [0047] 2.1 加入催化剂的底物溶液到芯片的表面,进行孵育,产生气泡；
- [0048] 2.2 对产生气泡的位置进行取样观察。
- [0049] 本技术方案的优点与效果如下：
- [0050] 1. 本发明所使用的放大的方法是基于催化剂：诸如酶和具有催化活性的微米或纳米颗粒的,根据以上催化剂的活性特点,该方法具有很高的特异性及灵敏度。
- [0051] 2. 根据以上催化剂的活性特点,检测步骤的反应速度很快,因此很适合进行快速检测。
- [0052] 3. 由于在反应中,芯片部分仅催化产生气体,相对于传统的产生沉淀的方法,其芯片可以重生使用,大大提高了芯片的使用效率。
- [0053] 4. 根据本发明所述的方法和复合物可以很方便地制成集成式的高通量筛选芯片,可用于药物筛选,药物和大分子间相互作用研究等技术领域。
- [0054] 5. 本发明所述的方法和复合物实现的条件简单,以及产生气泡的灵敏度极高,因此也很适合普通实验室和野外的快速测试使用。
- [0055] 附图简要说明
- [0056] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中：
- [0057] 图 1 描述了在实例 10 中按照实施例中所述模型估算的氧气的体积与反应时间的关系。
- [0058] 图 2 为图 1 中 A 部分的局部放大图。

### 具体实施方式

[0059] 以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解,这些实施例仅用于说明本发明,其不以任何方式限制本发明的范围。

[0060] 实施例 1 铂金纳米颗粒通过寡核苷酸接头修饰 DNA

[0061] 步骤如下：

[0062] 1. 质量分数为 1ppm 的 100nm 合成的铂壳金核纳米颗粒 (按照以下专利文献中的方法合成：一种制备树枝状金核 / 铂壳结构的双金属纳米棒的方法,申请号：200710178616) 与含有巯基的寡核苷酸磷酸钠 (序列 1 :TCGGTACACG) 缓冲液混合 (0.01M 的 PBS),两者的混合体积比是 50 : 1,在常温下共同温育 12 小时。制备成含铂金纳米颗粒的寡核苷酸接头。

[0063] 2. 将金黄色葡萄球菌标本 DNA 长链超声断裂,在 500 微升离心管中分别加入下面的液体：配置 2 微升 10pM 的 DNA 片段的 0.01M TE 缓冲液,0.1M 碱性磷酸缓冲液 (sigma 产

品)5 微升,牛小肠碱性磷酸酶(sigma 产品)(20U/ml)2 微升,加入灭菌水至混合液体积为 50 微升,在常温保温 60 分钟。以苯酚/氯仿(1:1 体积比)抽提 2 次,取水相。添加 3M 的 NaCl 1950 微升至终浓度为 150mM。添加 125 微升冷乙醇,在零下 20 度保持 45 分钟。离心回收沉淀,用 200 微升 70%冷乙醇洗净后,减压干燥。用 20 微升 0.01M TE 缓冲液溶解沉淀。

[0064] 3. 标本 DNA 加热至 100 度,10 分钟后迅速冷却至 4 度。

[0065] 4. 将上述 3 中得到的 DNA 样品取出 2 微升,加入新的小管内,同时加入铂金纳米颗粒标记的寡核苷酸接头 10 微升,(0.1M)T4 RNA 连接酶(sigma 产品)缓冲液 10 微升,0.1% BSA(sigma 产品)3 微升,3 微升 T4 RNA 连接酶(sigma 产品)60U,加入 12.5 微升的 PEG2000,灭菌水加至 50 微升在 4 摄氏度反应 24 小时。加入 2 微升 0.5M EDTA 终止反应。从而得到了铂金纳米颗粒标记的 DNA。

[0066] 实施例 2 铂金纳米颗粒通过 PCR 修饰 DNA

[0067] 步骤如下:

[0068] 1. 质量分数为 1ppm 的铂金纳米颗粒与待测痢疾杆菌 DNA 特异的 PCR 引物 1 和 2 的磷酸缓冲液混合(0.01M 的 PBS),两者的混合体积比例是 50:1,在常温共育 12 小时。制备成含铂金纳米颗粒的待检测 DNA 特异的 PCR 引物 1(序列 2:CTCAGTGCCTCTGCGGAGCTTCG)和引物 2(序列 3:GAGAGTTCTGACTTTATCCCG)。(购买自宝生物工程大连有限公司)

[0069] 2. 在反应的小管内进行反应(反应体积为 100 微升):Tag DNA 聚合酶(5U/ $\mu$ l)0.5 $\mu$ l,0.1M Tag 酶缓冲液 10 $\mu$ l,MgCl<sub>2</sub>(25mM)8 $\mu$ l,dNTP(各 2.5mM)8 $\mu$ l,样品 DNA 1 $\mu$ g,铂金纳米颗粒标记的引物 -1 和 -2(20 $\mu$ M)各 2 微升,灭菌水加至 100 微升。

[0070] 3. 在放到预热好的 PCR 仪中,95 $^{\circ}$ C 30 秒,50 $^{\circ}$ C 30 秒,72 $^{\circ}$ C 50 秒。进行 36 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。

[0071] 实施例 3 铂金纳米颗粒直接修饰 RNA

[0072] 步骤如下:

[0073] 1. 质量分数为 1ppm 的铂金纳米颗粒与 1mM 合成的(购买自宝生物工程大连有限公司)5'端含有 HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>- 的 RNA 序列(序列 4:CTCAGTGCCTCTGCGGAGCTTCG)(根据痢疾杆菌 DNA 设计)与缓冲液混合(0.01M 的 PBS),两者的混合体积比例是 1:1,在常温共育 12 小时。

[0074] 2. 经过在 1.5ml 离心管内 14,000rpm 离心后以沉淀的形式得到铂金纳米颗粒修饰的 RNA,使用 0.01M PBS 进行重新悬浮得到含铂金纳米颗粒的 RNA。

[0075] 实施例 4 通过铂金纳米颗粒修饰蛋白质进行的可视化检测

[0076] 步骤如下:

[0077] 1. 在蒸镀了 50nm 金的玻璃芯片(使用英国 Edwards 薄膜蒸镀仪制备,具体制备方法参照生产厂家提供的说明书进行)位置 -1 表面物理吸附固定 1mg/ml 的人免疫球蛋白 G(protein G 亲和纯化,得自博奥森公司),在参考位置 -2 物理吸附固定 1mg/ml 的兔血清白蛋白(sigma 公司产品)作为参考。分别在相应的位置做好标记。

[0078] 2. 制备铂金纳米颗粒溶液;

[0079] 将质量分数为 1ppm 的铂金纳米颗粒水溶液与 1mg/ml 蛋白质 G 混合,体积比为 2:1,常温反应 12 小时获得含有铂金纳米颗粒标记的蛋白质;

[0080] 3. 在人免疫球蛋白 G 和兔血清白蛋白所固定位置滴加标记有铂金纳米颗粒的蛋白质 G, 蛋白质 G 可以和人免疫球蛋白 G, 而不和兔血清白蛋白作用。常温孵育 30 分钟后用 0.01M pH7.4 的磷酸缓冲液进行清洗。

[0081] 4. 在上述滴加了铂金纳米颗粒的位置滴加 1%  $H_2O_2$  溶液, 5 分钟后, 观测人免疫球蛋白 G 和兔血清白蛋白所在位置的变化。由此, 可以看到在兔血清白蛋白的位置基本上没有任何变化, 但是在人免疫球蛋白 G 所在的位置有逐渐出现的气泡, 气泡越来越大, 由于表面张力和水溶液的压力作用, 气泡会先附着在表面, 之后上升破裂。

[0082] 实施例 5 通过铂金纳米颗粒修饰核酸进行可视化检测

[0083] 步骤如下:

[0084] 1. 在玻璃表面芯片表面, 通过维克光谱公司生产的等离子清洗仪, 在常温下, 利用最大功率氧化处理玻璃表面两分钟, 之后加入购买自 sigma 公司的含有 1% 的 3-[(2, 3)-环氧丙氧]丙基甲基二甲氧基硅烷的丙酮溶液修饰, 可在玻璃芯片表面形成有环氧基团的自组装单分子层。之后在芯片的不同位置分别固定  $1 \mu M$  的 DNA-1 (序列 5: CGAAGCTCCGCAGAGGCACTGAG) 和 DNA-2 (序列 6: GAGAGTTCTGACTTTATCCCG), DNA-1 和 DNA-2 是不相同和没有匹配关系的序列。这两个序列的 5' 末端都含有巯基, 巯基可以与在玻璃芯片表面的环氧基团反应形成共价键, 从而将这两个 DNA 片段固定在玻璃芯片的表面。(上述 DNA 样品购买自宝生物工程大连有限公司)。

[0085] 2. 按照实例 3 进行标记序列 7 (序列 7: CTCAGTGCCTCTGCGGAGCTTCG), 该序列是可以与在表面固定的序列 5 可以互补的序列。

[0086] 所有核酸购买自宝生物工程大连有限公司

[0087] 3. 在 DNA-1 和 DNA-2 的位置滴加铂金纳米颗粒修饰的 0.1mM DNA DNA-1 的互补序列, 在常温下进行孵育。半个小时后使用 0.01M TE 缓冲液进行清洗。

[0088] 4. 在上述的 DNA-1 和 DNA-2 的位置滴加 100 微升 0.1%  $H_2O_2$  溶液, 5 分钟后观测 DNA-1 和 DNA-2 所在位置的变化。可以得到在 DNA-2 的位置基本上没有任何变化, 但是在 DNA-1 所在的位置有非常大变化, 在 DNA-1 的位置有逐渐出现的气泡, 气泡越来越大, 由于表面张力和水溶液的压力作用, 气泡会先附着在表面, 之后上升破裂。

[0089] 实施例 6 通过过氧化氢酶修饰蛋白质进行的可视化检测

[0090] 步骤如下:

[0091] 1. 在蒸镀了 50nm 金的玻璃芯片 (使用英国 Edwards 薄膜蒸镀仪制备) 位置 -1 表面物理吸附固定 1mg/ml 的人免疫球蛋白 G (protein G 亲和纯化, 博奥森产品), 在参考位置 -2 物理吸附固定 1mg/ml 的兔血清白蛋白 (sigma 公司产品) 作为参考信号。分别在相应的位置做好标记。

[0092] 2. 制备过氧化氢酶修饰蛋白质 G 的溶液;

[0093] 将 10mg/ml 的牛肝过氧化氢酶水溶液 (Sigma 公司产品) 与 1mg/ml 蛋白质 G 混合, 加入 2.5% 戊二醛 (体积分数), 体积比为 2 : 1 : 3, 常温反应 12 小时; 使用 100KD 超滤膜 (北京欣经科生物技术有限公司产品) 进行 14,000g 超滤三次, 获得过氧化氢酶的蛋白质 G。

[0094] 3. 在人免疫球蛋白 G 和兔血清白蛋白所固定位置滴加标记有过氧化氢酶的蛋白质 G, 蛋白质 G 可以和人免疫球蛋白 G, 而不和兔血清白蛋白作用。孵育 30 分钟后用磷酸缓

冲液进行清洗。

[0095] 4. 在上述滴加了铂金纳米颗粒的位置滴加 1%  $H_2O_2$  溶液, 5 分钟后, 观测人免疫球蛋白 G 和兔血清白蛋白所在位置的变化。由此, 可以看到在兔血清白蛋白的位置基本上没有任何变化, 但是在人免疫球蛋白 G 所在的位置有逐渐出现的气泡, 气泡越来越大, 由于表面张力和水溶液的压力作用, 气泡会先附着在表面, 之后上升破裂。

[0096] 实施例 7 通过铂金纳米颗粒修饰蛋白质进行阵列的可视化检测

[0097] 步骤如下:

[0098] 1. 在蒸镀了 50nm 金的玻璃芯片 (使用英国 Edwards 薄膜蒸镀仪制备) 位置 -1 的玻璃芯片表面通过固定七种 HIV 相关抗原 (得自中国疾控中心): p24, p31, p41, p51, p55, gp41, gp120, 手动在芯片的表面点样, 抗原的浓度均为 1mg/ml, 点样的体积均为 100nL, 每种抗原点 6 个点, 共形成 60 个点, 每个点的大小约为 1000 微米。

[0099] 2. 点样好的芯片常温孵育一个小时后, 使用 5% 牛血清白蛋白 (sigma 公司产品) 进行常温封闭一个小时后使用 0.01M pH7.4 的磷酸缓冲液进行清洗。

[0100] 3. 制备铂金纳米颗粒溶液;

[0101] 将 1ppm 的铂金纳米颗粒溶液与 1mg/ml p24 的抗体 (购买自 sigma 公司) 混合, 比例为 200  $\mu$ l : 100  $\mu$ l, 常温反应 12 小时后在 1.5ml 离心管内经过 14,000rpm 离心获得含有铂金纳米颗粒标记的 p24 的抗体沉淀, 使用 100  $\mu$ l 0.01M pH 7.4 PBS 重新溶解沉淀。

[0102] 4. 将含有铂金纳米颗粒标记的 p24 的抗体的溶液稀释 1000 倍滴加到芯片上七种抗原点上, 共滴加 200 微升的稀释溶液, 保证所有的抗原点都被覆盖 (其中抗原点之间的间距控制在 500-1000 微米以内), 并进行常温孵育 10 分钟, 使用磷酸缓冲液进行清洗。

[0103] 5. 在上述各抗原点滴加 200  $\mu$ l 0.1%  $H_2O_2$  溶液, 观测所有点样的位置的变化。使用 CCD 摄像机 (韩国 ini-tech 公司) 对点样位置进行实时成像, 发现在 p24 的位置逐渐产生气泡, 而在其他点的位置基本没有变化。

[0104] 实施例 8 过氧化氢酶的不同底物溶液的选择

[0105] 步骤如下:

[0106] 1. 在蒸镀了 50nm 金的玻璃芯片 (使用英国 Edwards 薄膜蒸镀仪制备) 位置 -1 表面物理吸附固定 1mg/ml 的人免疫球蛋白 G, 在常温下孵育 30 分钟后使用 0.01M pH 7.4 的 PBS 清洗未吸附的蛋白质。(protein G 亲和纯化, 博奥森产品), 在参考位置 -2 物理吸附固定 1mg/ml 的兔血清白蛋白, 在常温下孵育 30 分钟后使用 0.01M pH 7.4 的 PBS 清洗未吸附的蛋白质。(sigma 公司产品) 作为参考信号。分别在相应的位置做好标记。

[0107] 2. 制备过氧化氢酶修饰蛋白质 G 的溶液;

[0108] 将 10mg/ml 的牛肝过氧化氢酶水溶液 (Sigma 公司产品) 与 1mg/ml 蛋白质 G 混合, 加入 2.5% 戊二醛 (体积分数), 体积比为 2 : 1 : 3, 常温反应 12 小时; 使用 100KD 超滤膜在 14,000g 的离心加速度下超滤三次, 获得过氧化氢酶的蛋白质 G;

[0109] 3. 在人免疫球蛋白 G 和兔血清白蛋白所固定位置滴加标记有过氧化氢酶的蛋白质 G, 蛋白质 G 可以和人免疫球蛋白 G, 而不和兔血清白蛋白作用。孵育 30 分钟后用 0.01M pH7.4 的磷酸缓冲液进行清洗。

[0110] 4. 在上述滴加了铂金纳米颗粒的位置滴加 0.1%  $H_2O_2$  溶液, 该溶液分别由浓双氧水溶解在纯水, 1M, 0.1M, 0.01M, 0.001M 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 分别为 4.0, 5.0, 6.0, 7.0,

8.0, 9.0, 10.0), 1M, 0.1M, 0.01M, 0.001M 碳酸盐缓冲液 (碳酸钠和碳酸氢钠的 0.01M 缓冲液) (pH 分别为 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0) 等中制得。在不同的时间观测气泡产生的情况, 可以看到在 1 分钟后 -5 分钟结束实验, 0.1M PBS 和 0.1M 碳酸盐缓冲液稀释的  $H_2O_2$  均是在 pH 6.0-8.0 的时候产生较大气泡, 其余产生的气泡为明显小。因此最佳的缓冲液为 pH 6.0-8.0 的 0.1M PBS 或 0.1M 碳酸盐缓冲液。

[0111] 实施例 9 过氧化氢酶修饰的羊抗鼠 IgG 对 p24 抗体的灵敏检测

[0112] 步骤如下:

[0113] 1. 在蒸镀了 50nm 金的玻璃芯片 (使用英国 Edwards 薄膜蒸镀仪制备) 位置 -1, 将芯片分为 10 个区域, 每个区域有两个位置: 位置 -1 和参考位置 -2, 分别在位置 -1 表面物理吸附固定 1mg/ml 的 p24 (sigma 公司产品), 在常温下孵育 30 分钟后使用 0.01M pH 7.4 的 PBS 清洗未吸附的蛋白质。在参考位置 -2 物理吸附固定 1mg/ml 的兔血清白蛋白 (sigma 公司产品), 在常温下孵育 30 分钟后使用 0.01M pH 7.4 的 PBS 清洗未吸附的蛋白质。作为参考信号。分别在相应的位置做好标记。孵育 60 分钟后使用 0.01M pH7.4 的 PBS 清洗, 之后使用 2% 脱脂奶粉水溶液 (质量分数) (南方乳业) 进行表面封闭十分钟后使用 PBS 清洗。

[0114] 2. 制备过氧化氢酶修饰羊抗人 IgG 的溶液;

[0115] 将 10mg/ml 的牛肝过氧化氢酶水溶液 (Sigma 公司产品) 与 1mg/ml 羊抗鼠 IgG (sigma 公司产品) 混合, 加入 2.5% 戊二醛 (体积分数), 体积比为 2 : 1 : 3, 常温反应 12 小时; 使用 100KD 超滤膜在 14,000g 的离心加速度下超滤三次, 获得结合过氧化氢酶的羊抗鼠 IgG 作为原液;

[0116] 3. 在芯片的十个区域的 p24 和兔血清白蛋白所固定位置分别滴加 100 微升浓度为 0, 1fM, 10fM, 100fM, 1pM, 10pM, 100pM, 1nM, 10nM, 100nM 的鼠抗 -p24 单克隆抗体 (sigma 产品)。在常温下反应 10 分钟。使用 PBS 清洗。

[0117] 4. 在上述十个区域同样地滴加浓度为 0.01M pH 7.4 的 PBS 稀释一万倍的结合过氧化氢酶的羊抗鼠 IgG。常温孵育 30 分钟后用磷酸缓冲液进行清洗。

[0118] 5. 在上述十个区域滴加 0.1%  $H_2O_2$  溶液, 5 分钟后, 观测人 p24 和兔血清白蛋白所在位置的变化。由此, 在浓度等于和大于 100fM 鼠抗 -p24 单克隆抗体孵育的区域, 可以看到在兔血清白蛋白的位置基本上没有任何变化, 但是在 p24 所在的位置有逐渐出现的气泡, 气泡越来越大, 由于表面张力和水溶液的压力作用, 气泡会先附着在表面, 之后上升破裂。由此可以得到该催化的可视化检测方法是非常灵敏的。

[0119] 实施例 10 过氧化氢酶修饰的羊抗鼠 IgG 检测 p24 抗体的速度

[0120] 步骤如下:

[0121] 1. 在蒸镀了 50nm 金的玻璃芯片 (使用英国 Edwards 薄膜蒸镀仪制备) 位置 -1, 将芯片分为 10 个区域, 每个区域有两个位置: 位置 -1 和参考位置 -2, 分别在位置 -1 表面物理吸附固定 1mg/ml 的 p24 (sigma 公司产品), 在常温下孵育 30 分钟后使用 0.01M pH 7.4 的 PBS 清洗未吸附的蛋白质。在参考位置 -2 物理吸附固定 1mg/ml 的兔血清白蛋白 (sigma 公司产品), 在常温下孵育 30 分钟后使用 0.01M pH 7.4 的 PBS 清洗未吸附的蛋白质。作为参考信号。分别在相应的位置做好标记。孵育 60 分钟后使用 PBS 清洗, 之后使用 2% 脱脂奶粉 (南方乳业) 进行表面封闭十分钟后使用 PBS 清洗。

[0122] 2. 制备过氧化氢酶修饰羊抗鼠 IgG 的溶液;

[0123] 将 10mg/ml 的牛肝过氧化氢酶水溶液 (Sigma 公司产品) 与 1mg/ml 羊抗鼠 IgG (sigma 公司产品) 混合, 加入体积分数为 2.5% 的戊二醛, 体积比为 2 : 1 : 3, 常温反应 12 小时; 使用 100KD 超滤膜进行在 14,000g 的速度下超滤三次, 获得过氧化氢酶的羊抗鼠 IgG 作为原液;

[0124] 3. 在芯片的十个区域的 p24 和兔血清白蛋白所固定位置均滴加 100 微升浓度为 10nM 的鼠抗 -p24 单克隆抗体 (sigma 产品)。在常温下反应 10 分钟。使用 0.01M PBS 清洗。

[0125] 4. 在上述十个区域滴加同样浓度为一万倍稀释的过氧化氢酶的羊抗鼠 IgG。常温孵育 30 分钟后用磷酸缓冲液进行清洗。

[0126] 5. 通过高速相机竖直从上向下对玻璃表面进行拍摄, 滴加 0.1%  $H_2O_2$  溶液 200 微升后, 在上述十个区域中心位置的 1 平方毫米大小的位置进行拍摄, 记录十个区域气泡产生的速度, 将每个从表面产生的气泡的看成一个半球, 记录其直径和数量。之后随时间记录每个区域气体产生的体积。可以看到随着时间变化的气体体积的大小的平均值。得到如下图 -1 所示的气体的体积随时间变化的值, 可以在一百秒钟时看到气泡, 说明此时已经足够肉眼可见 (其对应的体积是 2nL, 对应此时气泡的直径大小为 200 微米, 是人眼的分辨率大小)。

[0127] 本实施例中按照模型估计的氧气的体积与反应时间的关系显示于图 1, 横坐标显示记录的时间, 纵坐标显示通过记录在一个平方毫米的范围内产生气泡的数量、大小记录后计算的体积之和。其中在 100 秒之后, 气泡的大小已经达到了 200 微米的大小, 是可以通过肉眼分辨的。而到了气泡的面积达到了 260 纳升之后, 由于气泡的下表面积已经大于 1 平方毫米, 停止计算得到如图 1 所示图像。

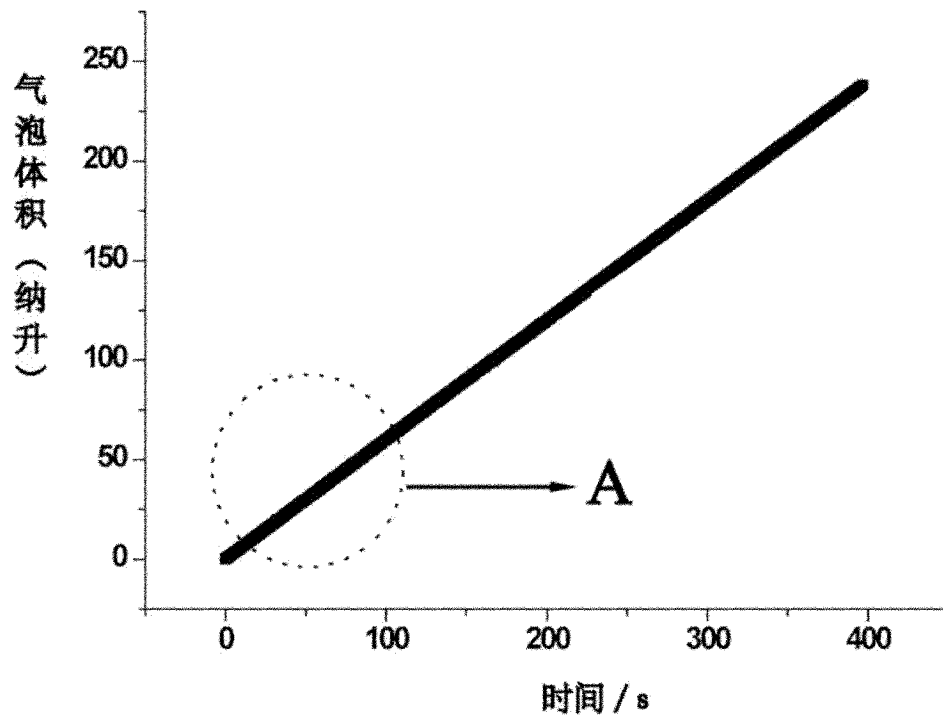


图 1

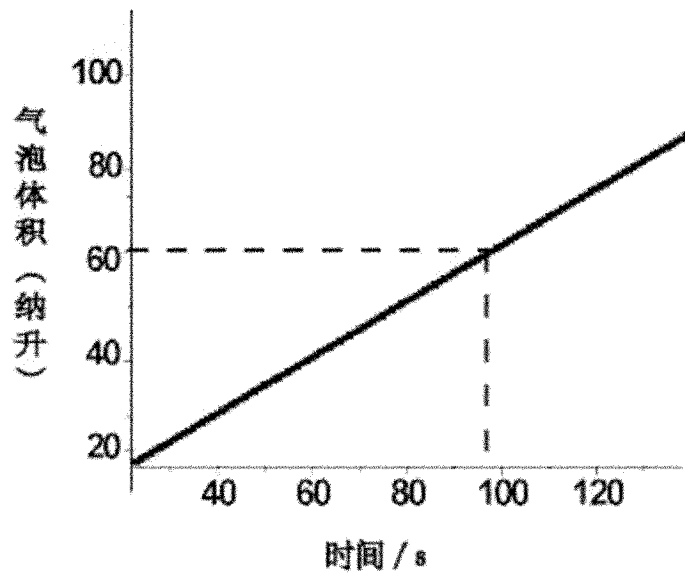


图 2

专利名称(译)	催化复合物及可视化检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102676640A</a>	公开(公告)日	2012-09-19
申请号	CN201110057379.6	申请日	2011-03-10
[标]申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
当前申请(专利权)人(译)	国家纳米科学中心		
[标]发明人	宋炳胜 朱劲松		
发明人	宋炳胜 朱劲松		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/527 C12Q1/30 G01N33/68 G01N33/53		
代理人(译)	刘丹妮		
其他公开文献	CN102676640B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种可视化检测方法，将传统的目标分子的指示物质变换为可以催化产生气体的纳米颗粒或者酶等催化剂，通过催化剂在目标分子的位置催化底物产生气体进行可视化检测。本方法可以极大的提高检测灵敏度，甚至可以做到单分子检测。产生的气泡被作为可视化的信号进行读取，该方法速度快、易于检测，并且灵敏度极高，该方法便于结果的读取，用于分析的设备大大简化。由此得到一种高通量、高灵敏度、实时检测的技术。由于其方法适应性很强，适用于临床及普通实验室，甚至野外检测也可以使用。

