

(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 103308690 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 18

(21) 申请号 201310186289. 6

(22) 申请日 2013. 05. 20

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 乐加昌 王佩荣 张旭

(74) 专利代理机构 北京市汉信律师事务所
11373

代理人 王文生

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54) 发明名称

一种基于分子马达、磁富集和双探针杂交技术的生物传感器构建及检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种生物大分子的检测方法。尤其涉及利用 ATP 分子马达在时间上和空间上的信号放大特性及其耐高温特性, 双抗体杂交和双探针杂交的高度特异性, 磁富集、磁分离的高灵敏和快速特性, 单链核酸酶降解错配双链减少非特异杂交, 以及化学发光检测技术的高灵敏性检测生物大分子的方法。本发明建立了一种新型的超灵敏, 快速, 高度特异, 免扩增, 并且可将信号分子与反应体系分离并保存信号分子分多次进行测定利于不同批次样本进行比较的生物大分子传感器构建及检测方法。

1. 一种检测生物大分子的方法,所述方法包括以下步骤:
 - a. 将捕获探针与磁珠连接;
 - b. 将检测探针与 ATP 分子马达连接;
 - c. 将通过步骤 a 得到的连接有捕获探针的磁珠和通过步骤 b 得到的连接有检测探针的 ATP 分子马达与待测生物样品混合杂交;
 - d. 在步骤 c 后对磁珠进行磁分离,将分离的磁珠加入到含有 ADP 的反应混合液中进行 ATP 合成反应;以及
 - e. 在 ATP 合成反应结束后,取不含磁珠的反应上清在化学发光仪上进行读数;其中所述捕获探针和所述检测探针分别与所检测的生物大分子的不同部位特异性结合。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述生物大分子是蛋白质,并且所述捕获探针和所述检测探针分别是针对所述蛋白质的两个不同表位的特异性抗体。
3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述蛋白质是 C 反应蛋白 (CRP),所述捕获探针和所述检测探针分别是 CRP 的单克隆抗体 M86842M 和 M86284M。
4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述生物大分子是 DNA,并且所述捕获探针和所述检测探针分别是与所述 DNA 正义链序列的 5' 端和 3' 端分别互补的一对核酸分子。
5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述生物大分子是 RNA,并且所述捕获探针和所述检测探针分别是与所述 RNA 序列的 5' 端和 3' 端分别互补的一对核酸分子。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法,其中在所述步骤 a 中,所述捕获探针标记有生物素,所述磁珠包被有链霉抗生物素,所述捕获探针与所述磁珠通过生物素与链霉抗生物素的相互作用而连接在一起。
7. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法,其中在所述步骤 b 中,所述检测探针标记有生物素,所述 ATP 分子马达标记有 NeutrAvidin-PE-cap-biotin,所述检测探针与所述 ATP 分子马达通过生物素-NeutrAvidin-生物素系统连接在一起。
8. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法,其中在所述步骤 d 中,所述 ATP 合成反应在 42°C 进行。
9. 根据权利要求 2 或 3 中任一项所述的方法,其中在所述步骤 c 中,在进行混合杂交之前,对所述通过步骤 a 得到的连接有捕获探针的磁珠进行封闭处理。
10. 根据权利要求 2 或 3 中任一项所述的方法,其中在所述步骤 c 中,所述杂交在 37°C 进行。
11. 根据权利要求 4 或 5 中任一项所述的方法,其中在所述步骤 c 中,所述杂交在 25-45°C 进行。
12. 一种用于检测生物大分子的试剂盒,所述试剂盒包括:
 - 捕获探针;
 - 磁珠;
 - 检测探针;
 - ATP 分子马达;和
 - 含有 ADP 的反应混合液;其中所述捕获探针和所述检测探针分别与所检测的生物大分子的不同部位特异性结合。

一种基于分子马达、磁富集和双探针杂交技术的生物传感器构建及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物大分子的检测方法。尤其涉及利用 ATP 分子马达、双探针杂交、磁富集和分离以及化学发光检测技术高灵敏性地检测生物大分子的方法。

背景技术

[0002] 生物传感器是利用生物要素与物理化学检测要素组合在一起对被分析物进行检测的装置。双抗体夹心法是传统生物大分子检测方法的一种,其基本原理是利用一对可以识别同一分子不同表位的特异探针(抗体或者核酸),通过不同的信号输出系统进行检测。对于蛋白类的大分子检测,常用的方法为基于抗原抗体结合的酶联免疫吸附实验,对于核酸类大分子(包括 DNA, RNA, microRNA 等),常用 northern blot, southern blot, PCR 等技术。常用的信号输出系统包括荧光、化学发光、同位素以及分子的聚集状态等。也有一些新的检测方法,如依赖量子点,纳米金颗粒作为检测信号进行检测。但这些信号输出系统均为瞬时信号输出,信号分子与反应体系无法分离,并且检测信号必须在反应之后立即检测,无法对同样的信号本进行多次检测,因此其检测灵敏度受到限制,且不利于不同时间样本间的比较。

发明内容

[0003] 为了提高蛋白质、核酸等生物大分子检测的灵敏度、特异性和缩短检测时间,避免核酸扩增,降低假阳性率,降低检测费用,实现高通量检测,本发明提供一种可在空间上和时间内放大检测信号的生物大分子检测方法。该方法将分子马达与磁分离技术和双探针杂交技术相结合,在液相环境中进行检测,不仅可以快速检测出微量的目标生物分子,还可以区分目标分子与杂蛋白或单点突变的核酸分子。并在一定范围内可对目的分子进行定量分析,提高了检测的灵敏度,特异性,以及便于进行高通量检测。

[0004] 本发明设计了针对靶分子的两个特异性探针。对于抗原,探针为针对同一抗原不同表位的特异抗体;对于 DNA 分子,探针为与正义链序列的 5' 端和 3' 端分别互补的一对核酸探针;对于 RNA 序列,探针为与 RNA 序列 5' 端和 3' 端分别互补的一对核酸探针。将其中一个探针作为捕获探针连接到磁珠上,将另一个探针作为检测探针连接到 ATP 分子马达上,通过优化的杂交条件进行杂交,将结合有分子马达的磁珠通过磁分离技术与未结合的游离分子马达分离,经过在高温下进行 ATP 合成反应,将合成的 ATP 经过磁分离与反应体系分离,此时的 ATP 作为信号分子可以分装冻存于 -80°C 保存,选择合适的时间进行测量,也可直接通过荧光素/荧光素酶系统检测 ATP 的浓度来反映靶分子的存在状态。若存在靶分子,则会有分子马达活性存在,经过空间上的信号磁富集以及时间上的合成 ATP 信号放大,可检测到低浓度的靶分子。对于核酸,避免了扩增带来的假阳性以及复杂的操作过程和昂贵的仪器设备。ATP 分子与反应体系的可分离以及可保存,使同一样本的检测信号可以在不同时间进行检测,并且可以将不同批次的样本检测信号同时进行测定以利于样本间的比

较。本发明将连接有捕获探针的磁性微球和连接有检测探针的 ATP 分子马达作为敏感生物元件捕获靶分子,ATP 分子马达和荧光素 / 荧光素酶系统作为换能装置,将靶分子浓度信号转换成 ATP 分子浓度信号和化学发光信号,最后通过化学发光光强度作为检测信号来反应靶分子浓度。本发明在空间上通过二次换能(靶分子浓度-ATP 浓度-化学发光强度)放大检测信号的基础上,增加了时间累积放大效应(相同浓度靶分子产生的 ATP 合成反应,随时间延长合成 ATP 浓度增加),并且通过双探针的高特异性,降低了非特异分子的干扰。通过磁分离技术实现了将信号分子与反应体系分离,将同一样本的信号在不同时间分次测定以及不同样本的信号同时测定进行比较。

[0005] 更具体地,本发明提供以下各项:

[0006] 1. 一种检测生物大分子的方法,所述方法包括以下步骤:

[0007] a. 将捕获探针与磁珠连接;

[0008] b. 将检测探针与 ATP 分子马达连接;

[0009] c. 将通过步骤 a 得到的连接有捕获探针的磁珠和通过步骤 b 得到的连接有检测探针的 ATP 分子马达与待测生物样品混合杂交;

[0010] d. 在步骤 c 后对磁珠进行磁分离,将分离的磁珠加入到含有 ADP 的反应混合液中进行 ATP 合成反应;以及

[0011] e. 在 ATP 合成反应结束后,取不含磁珠的反应上清在化学发光仪上进行读数;

[0012] 其中所述捕获探针和所述检测探针分别与所检测的生物大分子的不同部位特异性结合。

[0013] 2. 根据第 1 项所述的方法,其中所述生物大分子是蛋白质,并且所述捕获探针和所述检测探针分别是针对所述蛋白质的两个不同表位的特异性抗体。

[0014] 3. 根据第 2 项所述的方法,其中所述蛋白质是 C 反应蛋白(CRP),所述捕获探针和所述检测探针分别是 CRP 的单克隆抗体 M86842M 和 M86284M。

[0015] 4. 根据第 1 项所述的方法,其中所述生物大分子是 DNA,并且所述捕获探针和所述检测探针分别是与所述 DNA 正义链序列的 5' 端和 3' 端分别互补的一对核酸分子。

[0016] 5. 根据第 1 项所述的方法,其中所述生物大分子是 RNA,并且所述捕获探针和所述检测探针分别是与所述 RNA 序列的 5' 端和 3' 端分别互补的一对核酸分子。

[0017] 6. 根据第 1-5 项中任一项所述的方法,其中在所述步骤 a 中,所述捕获探针标记有生物素,所述磁珠包被有链霉抗生物素,所述捕获探针与所述磁珠通过生物素与链霉抗生物素的相互作用而连接在一起。

[0018] 7. 根据第 1-5 项中任一项所述的方法,其中在所述步骤 b 中,所述检测探针标记有生物素,所述 ATP 分子马达标记有 NeutrAvidin-PE-cap-biotin,所述检测探针与所述 ATP 分子马达通过生物素-NeutrAvidin-生物素系统连接在一起。

[0019] 8. 根据第 1-5 项中任一项所述的方法,其中在所述步骤 d 中,所述 ATP 合成反应在 42°C 进行。

[0020] 9. 根据第 2 项或第 3 项中任一项所述的方法,其中在所述步骤 c 中,在进行混合杂交之前,对所述通过步骤 a 得到的连接有捕获探针的磁珠进行封闭处理。

[0021] 10. 根据第 2 项或第 3 项中任一项所述的方法,其中在所述步骤 c 中,所述杂交在 37°C 进行。

[0022] 11. 根据第 4 项或第 5 项中任一项所述的方法,其中在所述步骤 c 中,所述杂交在 25-45℃进行。

[0023] 12. 一种用于检测生物大分子的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0024] 捕获探针;

[0025] 磁珠;

[0026] 检测探针;

[0027] ATP 分子马达;和

[0028] 含有 ADP 的反应混合液;

[0029] 其中所述捕获探针和所述检测探针分别与所检测的生物大分子的不同部位特异性结合。

[0030] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明。

附图说明

[0031] 图 1. 基于分子马达、磁分离和双探针杂交技术的生物大分子检测方法的示意图,其中用捕获探针标记磁珠,用检测探针标记分子马达,根据检测靶分子的类型不同,对于抗原检测,探针可以是针对同一抗原不同表位的一对抗体,而对于核酸检测,探针可以是一对针对同一序列不同位置的寡核苷酸探针。

[0032] 图 2. 以 C 反应蛋白 (CRP) 为例进行抗原检测:在 33fg/ml 到 3.3ug/ml 范围内,样品的 CRP 的浓度与荧光值具有线性关系。

[0033] 图 3. 不同浓度 CRP 介导的磁珠聚集电镜观察。

[0034] 图 4. 以 miR141 为例进行小 RNA 的检测,用合成的 microRNA141 序列 (miR141) 为标准序列,将其稀释成不同浓度,分别为 0、1nM、5nM、10nM、20nM、40nM,按照本发明的核酸检测方法对其进行检测,结果显示样品的核酸浓度与荧光值在 1-40nM 范围内线性关系良好。

[0035] 图 5. 比较 miR141 与其点突变体的特异性检测。

具体实施方式

[0036] 术语“ATP 分子马达”当用于本文中时指的是来源于嗜热菌的含有 ATP 合酶的载色体。ATP 合酶 (ATP synthase) 广泛分布于线粒体内膜、叶绿体类囊体、异养菌和光合菌的质膜上,参与氧化磷酸化和光合磷酸化,在跨膜质子动力势的推动下合成 ATP。分子结构由突出于膜外的 F1 亲水头部和嵌入膜内的 F₀ 疏水尾部组成。光合细菌的光合作用是在含有光合色素的细胞内膜进行的。这种内膜呈小泡状或扁囊状,分布于细胞周围,称为载色体。

[0037] 本发明使用的磁珠是经过链霉亲和素 (streptavidin) 或具有等效作用的衍生物包被的微米到纳米尺度的四氧化三铁顺磁磁珠与生物素化的探针连接,但不仅限于此标准,通过分子间相互作用或者化学偶联方式将探针连接到磁珠表面的方法均适合于本发明。磁珠表面电荷对不同分子的检测会产生影响,磁珠直径大小会影响磁珠表面积,从而影响单位质量磁珠的结合能力。

[0038] 实施例 1、检测生物大分子的一般方法

[0039] 1. ATP 分子马达制备:

[0040] 将嗜热菌 *Thermomicrobium roseum* 菌种 (ATCC27502, 购于美国 ATCC 物种库)

按比例 1 : 100 接种到液体培养基 (见表 1) 中, 60℃、150rpm 培养 24h。然后 4000rpm, 30min, 4℃ 离心收集菌体。用提取缓冲液 (20mM Tris-Cl pH8.0, 100mM NaCl, 2mM MgCl₂, 1mM DTT) 重悬菌体, 离心去上清 (6000rpm, 10min, 4℃)。加入提取缓冲液重悬菌体 (约 1g 菌体加入 10ml 缓冲液), 再加入终浓度为 1mM 的 PMSF, 冰上超声破碎 30min (超声 5s, 停 8s, 功率 300W)。将破碎菌体离心 (25,000g, 30min, 4℃), 去沉淀取上清。将上清超速离心 (145,000g, 1h, 4℃), 取沉淀即为载色体 (Chromatophore) (其是细菌质膜内陷形成的外翻囊泡, 载色体膜上含有 ATP 合酶, 是研究质子转运性质和 ATP 合成与水解的重要工具)。最后用提取缓冲液重悬沉淀得到载色体溶液, 如果不立即使用则加入终浓度 50% 的甘油 -80℃ 保存。

[0041] 表 1. Thermobacterium 培养基

[0042]

酵母抽提物	1g
胰蛋白胨	1g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.3g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.247g
KH ₂ PO ₄	0.28g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.074g
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.019g
盐溶液*	1ml
琼脂	20g (当 配制固 体培养 基时加 入)
蒸馏水	1L

[0043]

[0044] 注: 培养基配制好后用 NaOH 调节 pH = 8.5, 120℃ 灭菌 20min

[0045] *: 盐溶液的配制方法: 向 1L 蒸馏水中加入 1.8g MnCl₂ · 4H₂O、4.4g Na₂B₄O₇ · 10H₂O、0.22g ZnSO₄ · 7H₂O、0.05g CuCl₂ · H₂O、0.03g Na₂MoO₄ · 2H₂O、0.03g VOSO₄ · 2H₂O, 之后用 H₂SO₄ 调节 pH = 2.0。

[0046] 进行蔗糖密度梯度离心: 配制不同浓度的蔗糖 (20-60%) 水溶液, 在密度梯度离心管中自下到上分别加入 60% 蔗糖 1ml、50% 蔗糖 2ml、40% 蔗糖 2ml、30% 蔗糖 2ml 和 20% 蔗糖 2ml, 注意每加一层都应尽量小心, 不要让其混溶以免影响分离效果。再将所制备的不含甘油的 2ml 载色体溶液轻轻的沿着管壁加入到蔗糖梯度上, 38000rpm 离心 1.5h 后收集第二层的载色体, 用酶偶联法进行 ATP 水解活性测定, 用动态光散射检测颗粒大小。收集后 4℃ 40000rpm 离心 90min, 取沉淀用含 30% 甘油的 PBS 重悬后放于 -70℃ 冰箱备用。

[0047] 测定载色体的 ATP 水解活性: ATP 酶水解活性测定方法是利用分光光度法, 偶联丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶的反应, 测定 NADH 在 340nm 处光密度的减少, 求出 ATP 的水解量。首先在比色杯中加入 400ul 的水解缓冲液 (50mM Tris-Cl pH8.0, 10mM KCl, 2mM MgCl₂) 并调零, 然后加入 1ul NADH (100mM) 使 OD_{340nm} = 0.8-1。再分别加入 4ul PEP (50mM), 4ul ATP (200mM), 2ul PK (1U/ul), 2ul LDH (1U/ul), 待 OD_{340nm} 吸收值稳定后, 加入 5ul 的载色体在 37℃ 进行活性测定, 直至 OD_{340nm} 吸收值 不变。记录吸收值变化及酶反应时间计算酶

活。1U ATP 酶水解活性定义为酶每分钟在 37℃水解 ATP 的量。

[0048] 2. 双探针设计及制备：

[0049] 2.1 当靶分子为蛋白质时，本发明的检测需要设计针对同一抗原（蛋白分子）不同表位的单克隆抗体作为捕获探针和检测探针。抗体可购买商品化的针对同一抗原不同表位的一对抗体。捕获抗体和检测抗体生物素（biotin）化过程如下：将 2 μ l (+)-Biotin N-hydroxysuccinimide ester (10mM) (sigma, 货号 H1759) 分别加到 500 μ l 捕获抗体 (20 μ M) 和检测抗体 (20 μ M) 中，室温孵育 4h，游离的 (+)-Biotin N-hydroxysuccinimide ester 通过 PBS 透析除去，更换三次透析液 (PBS)，每次透析 8 小时。收集透析好的生物素化抗体加 50% 甘油置于 -20℃ 冻存储用。

[0050] 2.2 当靶分子为核酸时，本发明的检测需要设计针对同一核酸序列不同位置的两个核酸探针作为核酸的捕获探针和检测探针。核酸探针的合成以及生物素（biotin）修饰可通过生物公司进行。

[0051] 3. 探针的标记

[0052] 将生物素化的捕获探针连接到链霉抗生物素（streptavidin）包被的磁珠表面。对于检测探针，首先将 PE-cap-biotin（购自 avanti 公司，870277P）标记到载色体表面，继而包被 NeutrAvidin（购自 Thermo fisher 公司，货号 31050），接着用生物素（biotin）标记检测探针，最后将生物素化的检测探针通过 biotin-NeutrAvidin-biotin 系统连接到载色体表面。具体制备过程如下：

[0053] 3.1 捕获探针标记磁珠：

[0054] 3.1.1 若标记核酸探针，取 100 μ l 10mg/ml 直径为 1 μ m 的链霉抗生物素包被磁珠（购自 life technology 公司，货号 650.02，直径 1 μ m，10mg/ml），用洗脱缓冲液（5mM Tris-HCL，1M NaCl，0.5mM EDTA）洗三遍，通过磁分离去掉保存液成分。用 200 μ l 结合缓冲液（10mM Tris-HCL，2M NaCl，1mM EDTA）重悬。将适合浓度的生物素化的核酸探针（捕获探针）加入上述处理好的磁珠，室温反应 15 分钟，期间摇晃保证磁珠不沉淀，通过磁分离将游离的探针去掉，用 100 μ l 杂交缓冲液（5X SSC (20X SSC 稀释四倍得到 5X SSC，20X SSC 配方如下：0.3mol/L 柠檬酸钠，3.0mol/L 氯化钠)，5X denhardtts 液 (50X denhardtts 液为：1% (m/V) 聚糖体 400 (Ficoll400)、1% (m/V) 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)，1% (m/V) 牛血清白蛋白 (组分 V)，将其稀释 10 倍得到 5X denhardtts 液)) 重悬待用。

[0055] 3.1.2 若标记抗体，取 100 μ l 10mg/ml 直径为 2.8 μ m 的链霉抗生物素包被磁珠（购自 life technology 公司，货号 112.06D，直径 2.8 μ m，10mg/ml），用 PBS 洗三遍，通过磁分离去掉保存液成分。用 200 μ l PBS 重悬。将 200 μ l 适合浓度的生物素化的抗体探针（捕获探针）（根据具体的探针需要优化浓度），加入上述处理好的磁珠，室温反应 15 分钟，期间摇晃保证磁珠不沉淀，通过磁分离将游离的探针去掉，用 PBS 洗三遍。用 100 μ l PBS 重悬待用。

[0056] 3.2 检测探针 - 载色体制备：

[0057] 3.2.1 NeutrAvidin-PE-cap-biotin-载色体制备：将 1 μ l 5mg/ml 的 PE-cap-biotin（甲醇溶解）加入 1ml 蔗糖梯度离心后得到的载色体中，加入 9ml PBS 缓冲液 (pH7.4)，4℃ 标记 30 分钟，同时缓慢摇动使反应均匀。反应结束后分装到 10 个 EP 管中，每管 1ml，在 40000 转速下 4℃ 离心 20 分钟，去上清，重复三次，去掉游离 PE-cap-biotin，每

管用 1ml PBS 重悬沉淀, 分别加入 50ul 10mg/ml NeutrAvidin (购自 Thermo fisher 公司, 货号 31050), 室温反应 15 分钟, 然后在转速 40000rpm 下, 4℃ 离心 10 分钟, 去掉上清, 重复三次洗去游离的 NeutrAvidin。每管用 200ul 含 30% 甘油的 PBS 重悬, 包存于 -20℃ 备用。

[0058] 3.2.2 取 50ul 所制备的 NeutrAvidin-PE-cap-biotin- 载色体, 加入 1ml PBS, 40000rpm, 4℃, 离心 10 分钟去掉甘油, 用 1ml PBS 重悬。

[0059] 3.2.3 加入适合浓度的生物素标记的检测探针 (根据不同探针需要优化反应条件), 室温反应 15 分钟, 反应结束后在 40000rpm 离心力下 4℃ 离心 10 分钟, 去除未结合的探针, 重复三次。最后用 100ul PBS 重悬检测抗体-载色体或者用 100ul 杂交缓冲液重悬核酸检测探针-载色体备用。

[0060] 4. 靶分子杂交方法:

[0061] 4.1 当待测生物分子是蛋白质时的检测体系

[0062] 首先封闭标记有捕获探针的磁珠: 用含 2% 明胶, 0.01% Tween20 的封闭液进行封闭, 室温一小时, 之后用磁分离方法用 PBST (含 0.01% Tween20 的 PBS 溶液) 洗涤磁珠一次。将抗原 (蛋白) 样品用 PBST 稀释到合适浓度, 按照以下体系进行蛋白杂交:

[0063]

	1X 体系	体积(ul)
标记有捕获探针的磁珠	100ug	10
标记有检测探针的载色体	10ug	10
待检测分子	80ul(不同稀释度)	80
总计		100ul

[0064] 抗原抗体在 37 度结合反应 1 小时, 之后用 PBST 洗涤三次, 再用 PBS 洗涤三次。

[0065] 4.2 当待测生物分子是核酸时的检测体系

[0066] 按照以下体系进行核酸杂交:

[0067]

	1X 体系	体积(ul)
20 X SSC	5 X SSC	25
50 X denhardtts 液	5 X denhardtts 液	10
标记有捕获探针的磁珠	100ug	10
标记有检测探针的载色体	100ug	5
待检测分子	50ul(不同浓度)	50
总计		100ul

[0068] 杂交温度为 25-45 摄氏度, 根据不同靶分子优化条件。杂交时间为 10 分钟。杂交结束后迅速放于冰上, 并通过磁分离方法将未结合的游离分子和载色体去除, 之后用 PBST 洗涤三次, 再用 PBS 洗涤三次。

[0069] 5. ATP 合成反应

[0070] 将上述杂交结束的磁珠,用磁铁分离磁珠,去掉上清,加入 50ul 启动缓冲液 (50mM Tricine-NaOH,5mM MgCl₂,5mM NaH₂PO₄,10%甘油,0.3uMADP),在 42 度进行 ATP 合成反应,反应时间为 30 分钟。

[0071] 6. ATP 化学发光检测:

[0072] ATP 合成反应结束后将各反应管置于冰上,用磁分离方法,将磁珠吸附到管壁,取上清 20ul 加入到 96 空白板中,每孔做两个复孔,再加入 ATP 检测试剂盒 (ENLITEN® ATP Assay System,货号:FF2021, Promega) 工作液 40ul,混匀后立即在化学发光仪上进行读数。

[0073] 7. 结果分析

[0074] 检测设置空白对照 (仅有磁珠,没有载色体),阴性对照 (水作为阴性对照),阳性对照 (阳性标准样品,其含有不同浓度的待检测分子) 和待测样品。样品若含靶分子,则会显示较高的化学发光读数,若不含有靶分子,则化学发光读数与阴性对照无显著差异。

[0075] 实施例 2、以 C 反应蛋白 (CRP) 为例进行蛋白分子检测

[0076] 1. 按照实施例 1 中所述的方法制备载色体。

[0077] 2. 捕获抗体和检测抗体的制备:所用 C 反应蛋白 (CRP) 购买自 meridianlifescience(A97201H)。所用捕获抗体为 CRP 单克隆抗体 M86842M(meridianlifescience),所用检测抗体为 CRP 单克隆抗体 M86284M(meridianlifescience)。其生物素化过程为:将 2μl(+)-BiotinN-hydroxysuccinimide ester(10mM)(sigma,货号 H1759) 分别加到 200μlCRP 捕获抗体 M86842M(5mg/ml) 和 CRP 检测抗体 M86284M(7.5mg/ml) 中,室温孵育 4h,游离的 (+)-Biotin N-hydroxysuccinimide ester 通过 PBS 透析除去,更换三次透析液 (PBS),每次透析 8 小时。收集透析好的生物素化抗体加 50%甘油置于 -20℃冻存备用。

[0078] 3. 按照实施例 1 中所述的方法制备 NeutrAvidin-PE-cap-biotin- 载色体。

[0079] 4. CRP 检测抗体 M86284M 标记 NeutrAvidin-PE-cap-biotin- 载色体:向 50ul 所制备的 NeutrAvidin-PE-cap-biotin- 载色体中加入 30ul 生物素化的 CRP 检测抗体 M86284M,用 PBS 稀释到 200ul,室温反应 15 分钟,反应结束后在 40000rpm 离心力下 4℃离心 10 分钟,去除游离的检测抗体,重复三次。最后用 100ulPBS 重悬备用。

[0080] 5. CRP 捕获抗体 M86842M 标记链霉抗生物素包被的磁珠:取 100ul10mg/ml 直径为 2.8um 的链霉抗生物素包被磁珠 (购自 life technology 公司,货号 112.06D,直径 2.8um,10mg/ml),用洗脱缓冲液 (5mM Tris-HCL,1MNaCl,0.5mM EDTA) 洗三遍,通过磁分离去掉保存液的成分。用 200ul PBS 重悬。取 10ug 生物素化的 CRP 捕获抗体 M86842M 与处理后的磁珠混合,用 PBS 稀释到 200ul,反应 15 分钟,通过磁分离洗三次去掉游离的捕获抗体,用 100ulPBS 重悬沉淀获得 CRP 捕获抗体 M86842M 标记的磁珠。

[0081] 6. 封闭标记有捕获探针的磁珠:用含 2%明胶,0.01% Tween20 的封闭液进行封闭,室温一小时,之后用磁分离方法用 PBST 洗涤磁珠一次。

[0082] 7. 抗原检测:将 CRP 样品用 PBST (含 0.01% Tween20PBS) 稀释到合适浓度,分别为 33fg/ml,3.3pg/ml,330pg/ml,33ng/ml,按照以下体系进行蛋白杂交:

[0083]

	1X 体系	体积(ul)
标记有捕获探针的磁珠	100ug	10
标记有检测探针的载色体	10ug	10
待检测分子	80ul(不同稀释度)	80
总计		100ul

[0084] 将不同浓度的 CPR 样品与标记有捕获探针的磁珠和标记有检测探针的载色体在 37 度结合反应 1 小时,之后用 PBST(含 0.02% Tween20PBS) 洗涤三次,再用 PBS 洗涤三次。

[0085] 8. ATP 合成反应

[0086] 将上述杂交结束的磁珠,用磁铁分离磁珠,去掉上清,加入 50ul 启动缓冲液 (50mM Tricine-NaOH, 5mM MgCl₂, 5mM NaH₂PO₄, 10% 甘油, 0.3uMADP), 在 42 度进行 ATP 合成反应, 反应时间为 30 分钟。

[0087] 9. ATP 化学发光检测

[0088] ATP 合成反应结束后将各管置于冰上,用磁分离方法,将磁珠吸附到管壁,取上清 20ul 加入到 96 孔白板中,每个孔做两个复孔,再加入荧光素 / 荧光素酶工作液 (ATP 检测试剂盒 (ENLITEN® ATP Assay System, 货号 :FF2021, Promega) 40ul, 混匀后立即在化学发光仪上进行读数。

[0089] 10. 结果分析

[0090] 检测设置空白对照 (仅有磁珠,没有载色体), 阴性对照 (水作为阴性对照), 阳性对照 (阳性标准样品) 和待测样品。样品若含靶分子,则会显示较高的化学发光读数,若不含有靶分子,则化学发光读数与阴性对照无显著差异。结果如图 2 所示,随 CRP 浓度升高, ATP 合成活性降低,为了研究其机理,我们对结合有不同浓度 CRP 的磁珠形态进行了电镜观察,结果如图 3 所示,当没有 CRP 存在时 (对照),没有分子马达结合到磁珠上,磁珠呈较分散状态分布,当有 0.0003pg/L 的 CRP 存在时,磁珠呈轻微聚集状态,而当 CRP 以较高浓度 (30ng/L)CRP 存在时,磁珠的聚集程度最大,反而阻碍了分子马达的活性。该方法呈现反向敏感特性,即靶分子浓度越低,检测信号越高,而传统检测方法,检测信号随靶分子浓度增高而增加,当靶分子浓度低到一定程度,受到检测低限的影响,检测灵敏度不会进一步提高,而本发明针对 CRP 检测时呈现的反向灵敏的特性可大大提高检测的灵敏度。

[0091] 实施例 3、以 miR141 为例进行不同浓度核酸检测

[0092] 以一种 microRNA(miR141) 作为靶核酸分子进行检测。

[0093] 1. 按照实施例 1 中所述的方法制备载色体。

[0094] 2. miR141 捕获探针和检测探针的制备:

[0095] miR141(miR141 的序列为 :UAACACUGUCUGGUAAGAUGG) 在上海吉玛生物有限公司合成为标准序列,用焦碳酸二乙酯 (DEPC 水 0.1%) 将其稀释到 20uM 作为储存液,实验前将储存液用 DEPC 水稀释成不同浓度 (分别为 0、1nM、5nM、10nM、20nM、40nM)。

[0096] 合成生物素化的捕获探针和检测探针 (上海吉玛生物有限公司):

[0097] 捕获探针 miRNA141-1 :biotin-AAAAAAAAAACCATCTTTACC

[0098] 检测探针 miRNA141-2 :AGACAGTGTTAAAAAAAAAA-biotin

[0099] 为了减少空间位阻效应,在捕获探针 miRNA141-1 的 5' 端和检测探针 miRNA141-2 的 3' 端设计了多聚腺苷酸延长探针长度,增加杂交机率。

[0100] 3. 按照实施例 1 中所述的方法制备 NeutrAvidin-PE-cap-biotin- 载色体制备。

[0101] 4. 检测探针 miRNA141-2 标记 NeutrAvidin-PE-cap-biotin- 载色体:向 50ul NeutrAvidin-PE-cap-biotin- 载色体中加入 30ul 生物素化的检测探针 miRNA141-1,用 PBS 稀释到 200ul,室温反应 15 分钟,反应结束后在 40000rpm 离心力下 4℃ 离心 10 分钟,去除游离的检测抗体,重复三次。最后用 100ul 杂交缓冲液 (5X SSC(20XSSC 稀释四倍得到 5XSSC, 20XSSC 配方如下:0.3mol/L 柠檬酸钠,3.0mol/L 氯化钠),5X denhardts 液 (50Xdenhardts 液为:1% (m/V) 聚糖体 400(Ficoll400)、1% (m/V) 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP),1% (m/V) 牛血清白蛋白 (组分 V),稀释 10 倍得到 5X denhardts 液)) 重悬备用。

[0102] 5. 捕获探针 miRNA141-1 标记链霉抗生物素包被的磁珠:取 100ul10mg/ml 直径为 1um 的链霉抗生物素包被磁珠 (购自 life technology 公司,货号 650.02,直径 1um,10mg/ml),用洗脱缓冲液 (5mM Tris-HCL,1MNaCl,0.5mM EDTA) 洗三遍,通过磁分离去掉保存液的成分。用 200ul 结合缓冲液 (10mM Tris-HCL,2M NaCl,1mM EDTA) 重悬。将适合浓度的捕获探针 miRNA141-1 加入上述处理好的磁珠,室温反应 15 分钟,期间摇晃保证磁珠不沉淀,通过磁分离将游离的探针去掉,用杂交缓冲液 5X SSC(20XSSC 稀释四倍得到 5XSSC,20XSSC 配方如下:0.3mol/L 柠檬酸钠,3.0mol/L 氯化钠),5X denhardts 液 (50X denhardts 液为:1% (m/V) 聚糖体 400(Ficoll400)、1% (m/V) 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP),1% (m/V) 牛血清白蛋白 (组分 V),稀释 10 倍得到 5X denhardts 液)100ul 重悬待用。

[0103] 6. 按照以下体系进行核酸杂交

[0104]

	1X 体系	体积(ul)
20 X SSC	5 X SSC	25
50 X denhardts 液	5 X denhardts 液	10
标记有捕获探针的磁珠	100ug	10
标记有检测探针的载色体	100ug	5
待检测分子	50ul(不同浓度)	50
总计		100ul

[0105] 杂交温度为 25-45 度均可,杂交时间为 10 分钟。杂交结束后迅速放于冰上,并通过磁分离方法将未结合的游离分子和载色体去除,之后用 PBST(含 0.02% Tween20 的 PBS) 洗涤三次,再用 PBS 洗涤三次。

[0106] 7. ATP 合成反应:将上述杂交结束的磁珠,用磁铁分离磁珠,去掉上清,加入 50ul 启动缓冲液 (50mM Tricine-NaOH,5mM MgCl₂,5mMNaH₂PO₄,10% 甘油,0.3uM ADP),在 42 度进行 ATP 合成反应,反应时间为 30 分钟。

[0107] 8. ATP 化学发光检测:ATP 合成反应结束后将各管置于冰上,用磁分离方法,将磁珠吸附到管壁,取上清 20ul 加入到 96 空白板中,每个空做两个复孔,再加入 40ul 荧光素 / 荧光素酶工作液 (ATP 检测试剂盒: ENLITEN® ATP Assay System,货号:FF2021,

Promega), 混匀后立即在化学发光仪上进行读数。

[0108] 9. 结果分析:检测设置空白对照(仅有磁珠,没有载色体),阴性对照(水作为阴性对照),阳性对照(合成 miR141 标准样品)和待测样品。样品中若含 miR141,则会显示较高的化学发光读数,若不含有靶分子,则化学发光读数与阴性对照无显著差异。结果如图 4 所示, miR141 在 1-40nM 范围内与化学发光强度呈线性相关,可进行定量检测。整个检测过程不超过 2 小时,而传统的 micro RNA 检测方法是需要进行反转录,real time PCR 进行定量分析,耗时长,所需试剂设备昂贵,操作要求严格,而本发明所需试剂仪器常见,只需要用到传统的化学发光仪进行检测,价格便宜,操作简单,检测时间短,96 孔板可进行高通量检测,也可进行定量分析,经过优化可进一步提高检测灵敏度,有利于大范围推广使用。

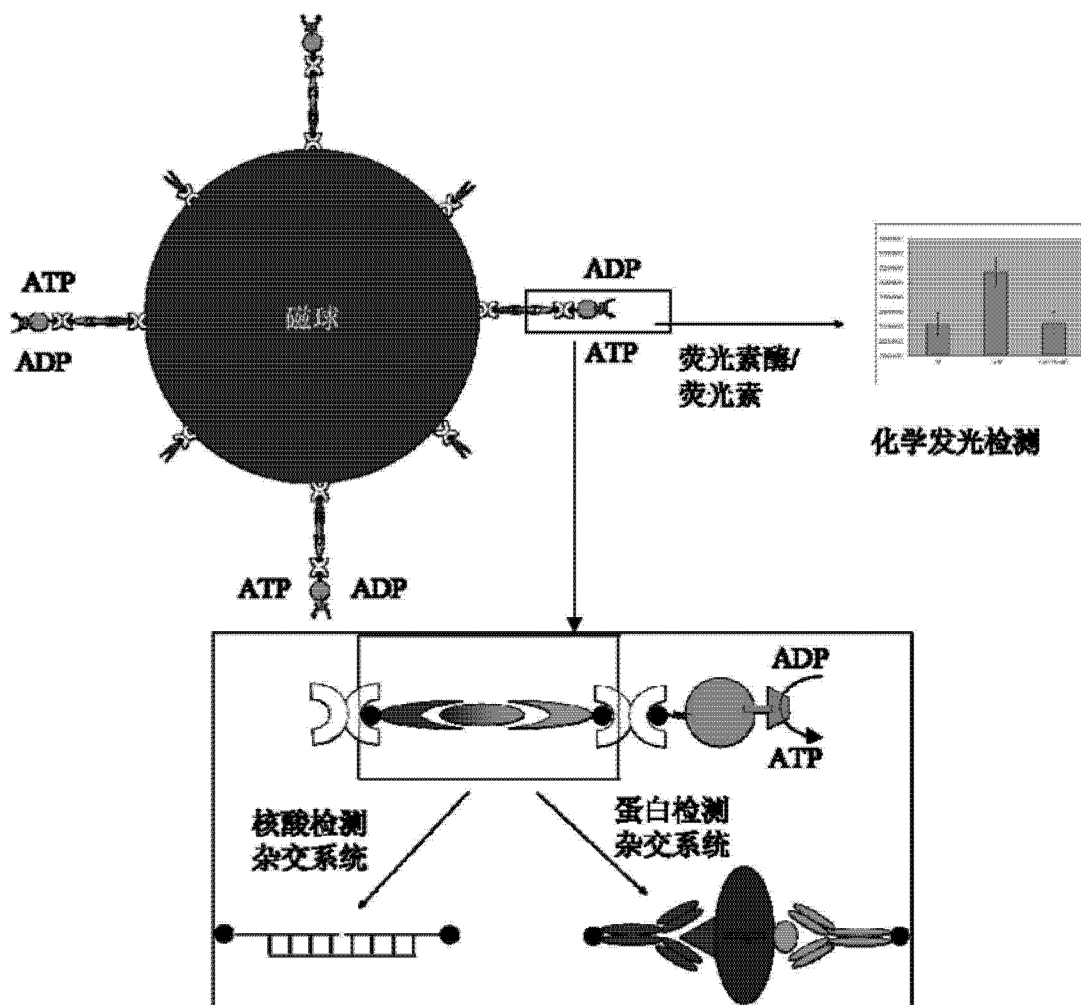
[0109] 实施例 4、以 miR141 为例进行双探针杂交特异性检测

[0110] 以 miR141 为阳性标准,以两个点突变 miR141m-1 和 miR141m-2 为单点突变序列进行特异性检测。突变序列分别是:

[0111] miR141m-1 :UAACUCUGUCUGGUAAGAUGG ;

[0112] miR141m-2 :UAACACUGUCUGGUAACAUGG。

[0113] 具体检测方法同实施例 3,所用探针同实施例 3,样品包括阴性对照,10nM 阳性标准 miR141,10nM miR141m-1,miR141m-2,结果如图 5 所示,与探针完全互补的 miR141 可产生较高的化学发光信号,而含有点突变的序列 miR141m-1 和 miR141m-2 所产生的化学发光信号与阴性对照无明显差异,这说明本发明所述方法可以很好的区别单点突变 micro RNA 序列,该方法所需时间少于 2 小时,操作简单,所需试剂和仪器并不昂贵,而传统的反转录 PCR 以及 real time PCR 方法耗时长,所需试剂设备昂贵,操作要求严格,不利于大量开展。



图例：

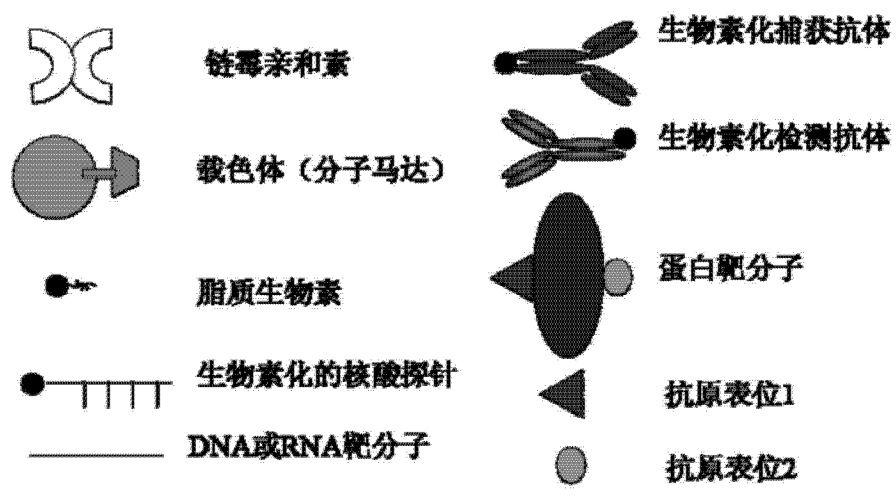


图 1

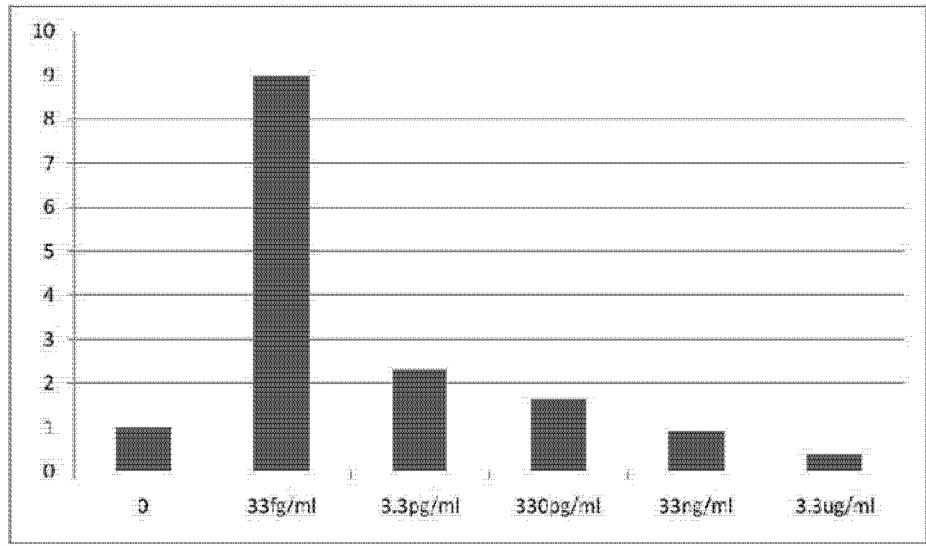


图 2

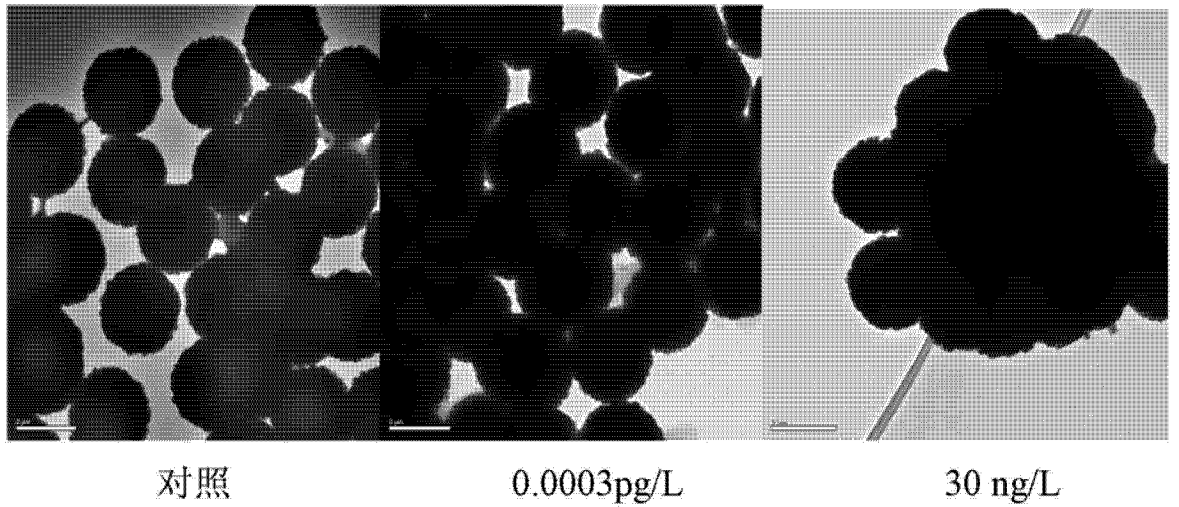


图 3

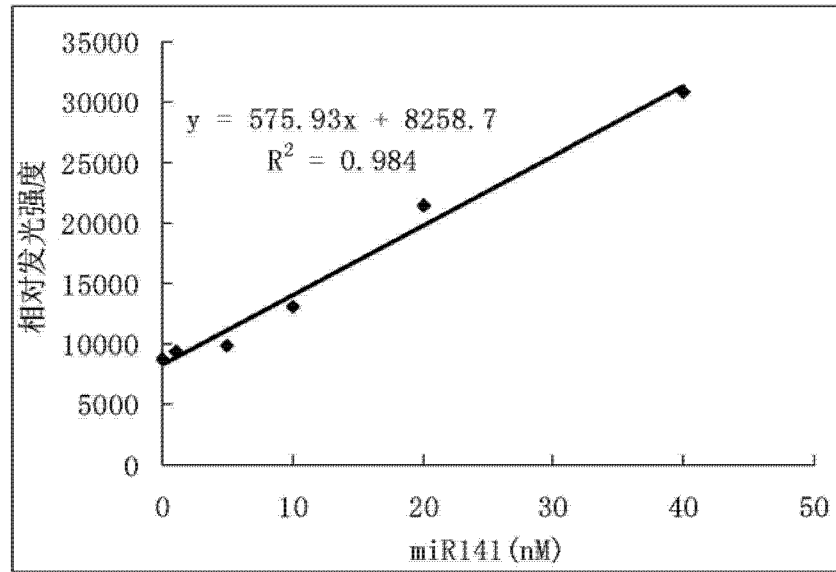


图 4

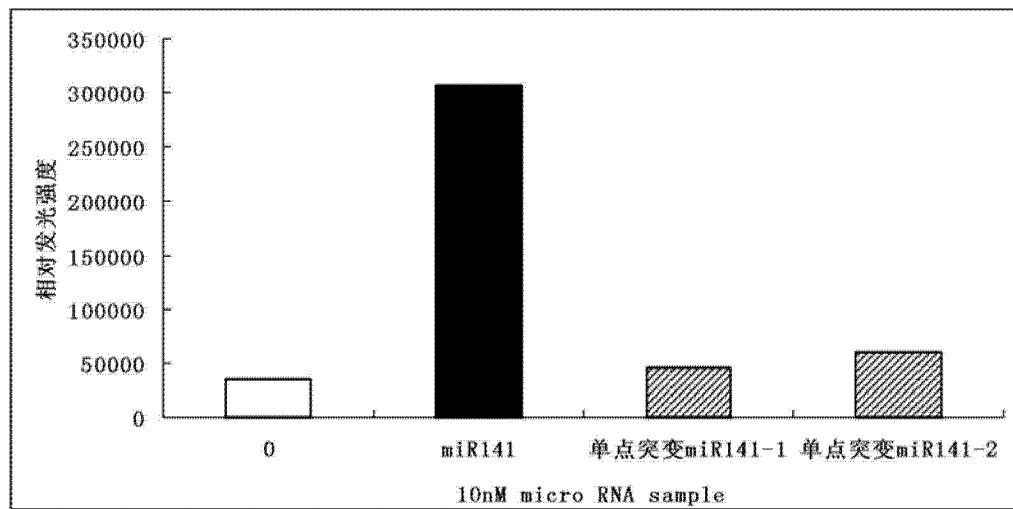


图 5