



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110441525 A

(43)申请公布日 2019. 11. 12

(21)申请号 201810429351.2

(22)申请日 2018.05.02

(71)申请人 南京大学

地址 210023 江苏省南京市栖霞区仙林大道163号

(72)发明人 吴洁 鞠焜先 肖庆

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

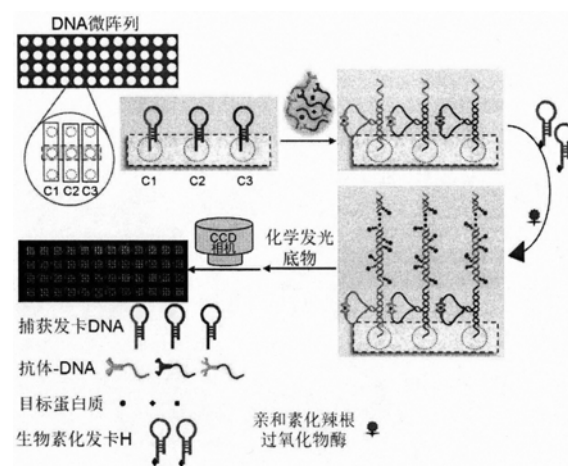
### (54)发明名称

基于DNA微阵列的蛋白质化学发光成像分析方法

### (57)摘要

本发明涉及一种基于DNA微阵列的蛋白质化学发光成像分析方法。基于不同的目标蛋白质设计其对应的捕获发卡DNA和抗体-DNA。通过自动点样仪将不同的捕获发卡DNA分别点样到玻璃基片上,构建DNA微阵列。以针对不同目标蛋白质的抗体-DNA的混合溶液为检测液,在目标蛋白质存在时,目标蛋白质可以被其相对应的一对抗体-DNA同时夹心识别,使得这对抗体-DNA上的DNA相互靠近进行邻位杂交形成复合物,进而与相对应的捕获发卡DNA杂交,打开其发卡结构。打开的捕获发卡DNA可引发生物素化发卡DNA(H1和H2)发生杂交链反应,在DNA微阵列点上生成长链DNA串联物。最后通过生物素-亲和素特异性反应,将辣根过氧化物酶固定到DNA微阵列上,催化 $H_2O_2$ -鲁米诺反应,产生化学发光信号,通过CCD扫描,实现目标蛋白质的图像分析。该蛋白质分析方法具有多组分、通量高、高灵敏、普适性好等优势,有

很好的临床应用价值。



1. 一种基于DNA微阵列的蛋白质化学发光成像分析方法,其特征在于根据不同的目标蛋白质设计其对应的捕获发卡DNA和抗体-DNA;通过自动点样仪将不同的捕获发卡DNA分别点样到玻璃基片上,构建DNA微阵列;以抗体-DNA的混合溶液为检测液,在目标蛋白质存在时,目标蛋白质可以被其相对应的一对抗体-DNA同时夹心识别形成复合物,进而与相对应的捕获发卡DNA杂交,打开其发卡结构,引发生物素化发卡H1和生物素化发卡H2发生杂交链反应,在DNA微阵列界面上生成长链DNA串联物;通过生物素-亲和素特异性反应,进一步将辣根过氧化物酶固定到DNA微阵列上,催化 $H_2O_2$ -鲁米诺反应,产生化学发光信号,通过CCD采集图像信号进行图像分析。

2. 根据权利要求1所述的分析方法,其特征在于所述的DNA微阵列先通过疏水贴膜在醛基化玻片上构建 $4 \times 12$ 个传感孔,再通过自动点样仪在每个传感孔中按 $3 \times 3$ 模式点制捕获发卡DNA而制得。

3. 根据权利要求1所述的分析方法,其特征在于所述的抗体-DNA在与其相对应的目标蛋白质夹心识别后,这对抗体-DNA上的DNA能进行邻位杂交形成复合物,并进一步与相对应的捕获发卡DNA杂交,打开其发卡结构。

4. 根据权利要求1所述的分析方法,其特征在于所述的捕获发卡DNA被打开后释放出发卡茎部的一段序列,该序列可以引发生物素化发卡H1和生物素化发卡H2发生杂交链反应,在被打开的捕获发卡DNA上生成长链DNA串联物。

5. 根据权利要求1所述的分析方法,其特征在于所述的抗体-DNA混合溶液与含有待测目标蛋白质的样品溶液混合后滴加到传感孔中,温育1.5小时后冲洗,随后在传感孔中依次滴加生物素化发卡H1和H2温育1.5小时、亲和素化辣根过氧化物酶温育45分钟,冲洗后,在传感孔中加入 $H_2O_2$ -鲁米诺溶液,通过CCD采集每个DNA微阵列点上的化学发光图像信号,最后通过标准曲线法求出样品中各种目标蛋白质的浓度。

## 基于DNA微阵列的蛋白质化学发光成像分析方法

### 一、技术领域

[0001] 本发明为一种基于DNA微阵列的蛋白质化学发光成像分析方法,用于对多种目标蛋白质的同时、高通量、灵敏检测。通过构建DNA微阵列,利用抗体-DNA与目标蛋白质的夹心免疫反应,产生邻位效应促使DNA杂交,进一步打开DNA微阵列上的捕获发卡DNA并引发杂交链反应,通过生物素-亲和素反应,使得大量辣根过氧化物酶在DNA微阵列上结合,产生化学发光信号放大,实现多种蛋白质的同时、高灵敏图像检测。

### 二、背景技术

[0002] 免疫分析是依赖于抗原-抗体间的特异性免疫结合反应而实现对目标抗原检测的分析方法,具有优越的特异性,结合比色、荧光、电化学、化学发光等高效快速的检测手段,已发展出酶联免疫分析、荧光免疫分析、电化学免疫分析和化学发光免疫分析等多种免疫分析方法。根据操作步骤的不同,免疫分析又可分为均相免疫分析和异相免疫分析,前者因操作相对简单,无需多步温育与清洗,因而应用广泛。相对于均相免疫分析的直接混合反应,异相免疫分析虽因多步清洗分离而操作趋繁琐,但通常能获得更高的灵敏度,因而在免疫分析中同样占有重要地位。此外,同时高效测定复杂样品中多个组分的含量已成为现代分析检测的迫切需要,而均相免疫分析通常需要消耗大量的检测样本及分析试剂才能实现这一目标,异相免疫分析在该方面则具有天然的优势。

[0003] 化学发光免疫分析,即采用化学发光作为免疫反应的信号读出,具有设备简单、背景干扰小、检测灵敏度高等优点。结合空间分辨模式,化学发光免疫分析在多组分免疫分析领域获得广泛关注,此模式是通过在免疫反应载体的不同空间区域分别独立平行发生多个免疫反应,再由检测器同时或类同时采集各区域信号,实现对多个目标蛋白质的同时检测。由此发展来的蛋白质阵列技术,在蛋白质组学中具有重大意义,然而,蛋白质阵列由于直接使用蛋白质作为固定基质,在制作成本、技术要求方面均存较大挑战。相对于蛋白质而言,DNA则因合成技术成熟、环境耐受度高、序列多样性而具有突出优势,在基因组学研究及商业应用上都成果显著。以DNA微阵列为技术平台进行蛋白质相关研究将极大地弥补蛋白质阵列发展中所受到的限制。

[0004] 邻位诱导效应,即通过夹心免疫反应,促使偶联在抗体上的一对DNA因距离拉近、局域浓度升高而发生部分杂交,随后触发级联DNA组装。该方法是将免疫反应转化为DNA反应后进行信号检测,可方便嫁接各种DNA信号放大技术,实现对目标蛋白质的灵敏检测。

### 三、发明内容

[0005] 本发明的内容是:基于免疫邻位效应和DNA组装设计,在DNA微阵列上发生目标蛋白质诱发式杂交链反应,发展了一种基于DNA微阵列的蛋白质化学发光成像分析方法。

[0006] 本发明提出的基于DNA微阵列的蛋白质化学发光成像分析方法是通过以下技术方案来实现:

[0007] 首先根据不同的目标蛋白质设计其对应的捕获发卡DNA和抗体-DNA;其次依据空

间分辨模式,在醛基化玻璃片上贴膜构建 $4 \times 12$ 的传感孔阵列,再在每个传感孔中点制氨基修饰的捕获发卡DNA构建 $3 \times 3$ 式的DNA微阵列,基于氨基与醛基反应,捕获发卡DNA共价结合在玻璃基片上,进一步在传感孔中滴加BSA溶液进行封闭,冲洗吹干后制得可检测3种目标蛋白质的DNA微阵列;以抗体-DNA的混合溶液为检测液,与含有目标蛋白质的样品溶液混合后加入传感孔,目标蛋白质同时被其对应的一对抗体-DNA识别,基于邻位效应,这对抗体-DNA上的DNA进行杂交形成复合物,进而与相对应的捕获发卡DNA杂交,打开其发卡结构,从而引发生物素化发卡H1和生物素化发卡H2发生杂交链反应,在DNA微阵列界面上生成长链DNA串联物;通过生物素-亲和素特异性反应,进一步将辣根过氧化物酶固定到DNA微阵列上,催化 $H_2O_2$ -鲁米诺反应,产生化学发光信号,通过CCD采集图像信号进行图像分析。

[0008] 本检测系统测定目标蛋白质的原理:

[0009] 本发明设计的基于DNA微阵列的蛋白质化学发光成像分析方法,原理如图1所示:在DNA微阵列基片上的每个传感孔中加入抗体-DNA检测液与含有目标蛋白质的样品溶液的混合溶液, $37^\circ\text{C}$ 下温育1.5小时。温育过程中,目标蛋白质同时被其对应的一对抗体-DNA识别并发生夹心免疫反应,进而产生邻位效应,促使这对抗体-DNA上的DNA距离靠近、局域浓度升高,发生杂交形成复合物,该复合物可以与DNA微阵列点上的捕获发卡DNA发生反应,使发卡打开而释放出发卡茎部的一段序列。在传感孔中加入生物素化发卡H1和H2的混合液后,DNA微阵列上固定的捕获发卡DNA释放的这段序列可以引发H1和H2发生杂交链反应,从而在DNA微阵列界面上生成长链DNA串联物。冲洗后在传感孔中滴加亲和素化辣根过氧化物酶,通过生物素-亲和素特异性反应,将辣根过氧化物酶结合到微阵列传感位点处,冲洗除去游离的酶后,在传感孔中加入化学发光底物,通过CCD进行化学发光图像采集。传感孔中每个微传感位点的化学发光信号强度与其对应的目标蛋白质的浓度成正相关,使用标准溶液获得工作曲线,通过标准曲线法,可以同时测得待测样品中不同蛋白质的浓度,实现多种目标蛋白质的同时高灵敏化学发光图像分析。

[0010] 本发明与现有技术相比,具有以下特点:

[0011] 本发明结合DNA微阵列、邻位诱导效应、杂交链信号放大反应,设计了一种基于DNA微阵列的蛋白质化学发光成像分析新方法。相比于现有的蛋白质免疫分析方法,具有以下特点:

[0012] (1) 本方法以DNA微阵列为平台,操作简单、成本低廉,且由于该阵列具有 $4 \times 12$ 个传感孔,每个传感孔中包含 $3 \times 3$ 个微传感位点,可同时分析48个样品中的3种目标蛋白质,具有极高的通量。

[0013] (2) 该方法通过夹心免疫反应产生邻位效应,进而引发DNA杂交与组装,将免疫反应转化为DNA反应进行检测,可方便与各种DNA组装放大技术结合,实现对低丰度蛋白质的灵敏检测。

[0014] (3) 该方法通过对抗体-DNA上的DNA及微阵列点上的捕获发卡DNA的序列设计实现不同目标蛋白质的区分,更改DNA序列,即可方便实现更多其他蛋白质的分析检测,普适性好。

[0015] (4) 该方法以化学发光作为读出信号,无需外加光源,设备简单,背景干扰小。

#### 四、附图说明

[0016] 图1.基于DNA微阵列的蛋白质化学发光成像分析方法过程示意图

## 五、具体实施方式

[0017] 实施例1:结合附图1,说明基于DNA微阵列的蛋白质化学发光成像分析方法对3种目标蛋白质的检测

[0018] (1) 微阵列制备:在醛基基片上贴上预制疏水膜,分隔出 $4 \times 12$ 的传感孔,通过自动点样仪在每个传感孔中点印针对3种不同目标蛋白质的不同捕获发卡DNA (C1、C2和C3),形成 $3 \times 3$ 的微阵列点,于湿盒中室温过夜反应。捕获发卡DNA上的氨基与基片上的醛基共价结合,反应结束后冲洗吹干,随后在每个传感孔中滴加BSA封闭液,37℃温育30分钟,冲洗吹干,如此重复3次,制的可以同时检测3种目标蛋白质的DNA微阵列。

[0019] (2) 免疫识别:不同浓度的标准抗原或待测血清与50nM的针对3种不同目标蛋白质的抗体-DNA的混合液按1:4混合,取6μL此混合液滴加在DNA微阵列的传感孔中,37℃温育90分钟,抗体与抗原发生夹心免疫反应,促使抗体上的DNA邻位诱导结合形成复合物,并进一步与微阵列点处的捕获发卡DNA杂交,反应结束后冲洗吹干。

[0020] (3) 杂交链反应:在DNA微阵列的不同传感孔中滴加6μL 0.5μM生物素化发卡H1和H2的混合液,37℃温育90分钟,微阵列点处被免疫复合物打开的捕获发卡DNA可以引发H1、H2间的杂交链反应,在微传感位点上组装形成长串DNA双链,反应结束后冲洗吹干。

[0021] (4) 化学发光成像分析:在每个传感孔中滴加6μL 10倍稀释的亲素化辣根过氧化物酶,37℃温育45分钟,通过亲素-生物素特异性识别,辣根过氧化物酶结合到微传感位点处,反应结束后冲洗吹干,再在每个传感孔中加入6μL化学发光底物 $H_2O_2$ -鲁米诺,辣根过氧化物酶催化该体系产生化学发光,通过CCD采集化学发光信号,单次曝光3分钟,根据统计的各微传感位点的化学发光强度,制作相应标准曲线并获得待测样品中3种目标蛋白质的浓度。

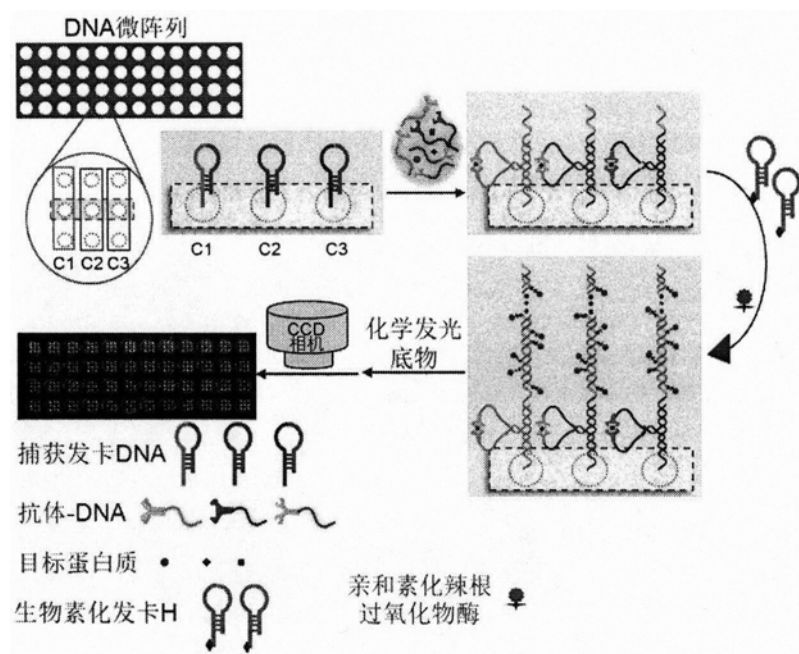


图1

专利名称(译)	基于DNA微阵列的蛋白质化学发光成像分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110441525A</a>	公开(公告)日	2019-11-12
申请号	CN201810429351.2	申请日	2018-05-02
[标]申请(专利权)人(译)	南京大学		
申请(专利权)人(译)	南京大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京大学		
[标]发明人	吴洁 鞠焜先 肖庆		
发明人	吴洁 鞠焜先 肖庆		
IPC分类号	G01N33/68 G01N21/76 G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N21/763 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/6803 G01N2333/47		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种基于DNA微阵列的蛋白质化学发光成像分析方法。基于不同的目标蛋白质设计其对应的捕获发卡DNA和抗体-DNA。通过自动点样仪将不同的捕获发卡DNA分别点样到玻璃基片上，构建DNA微阵列。以针对不同目标蛋白质的抗体-DNA的混合溶液为检测液，在目标蛋白质存在时，目标蛋白质可以被其相对应的一对抗体-DNA同时夹心识别，使得这对抗体-DNA上的DNA相互靠近进行邻位杂交形成复合物，进而与相对应的捕获发卡DNA杂交，打开其发卡结构。打开的捕获发卡DNA可引发生物素化发卡DNA(H1和H2)发生杂交链反应，在DNA微阵列点上生成链DNA串联物。最后通过生物素-亲和素特异性反应，将辣根过氧化物酶固定到DNA微阵列上，催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-鲁米诺反应，产生化学发光信号，通过CCD扫描，实现目标蛋白质的图像分析。该蛋白质分析方法具有多组分、通量高、高灵敏、普适性好等优势，有很好的临床应用价值。

