



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109975540 A

(43)申请公布日 2019.07.05

(21)申请号 201910268840.9

(22)申请日 2019.04.04

(71)申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72)发明人 周昕 袁嘉晟 张天宇

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

代理人 王艳

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

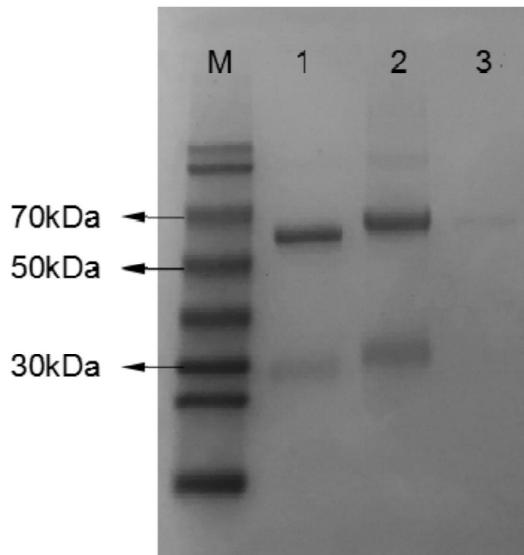
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种核酸抗体修饰的免疫金探针及其制备
方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种核酸抗体修饰的免疫金探针及其制备方法和应用。该方法综合使用了点击化学技术和寡核苷酸标记纳米金颗粒技术等一系列工艺,对抗体与DNA的偶联条件,标记寡核苷酸的纳米金颗粒的制备条件进行优化,最大限度地提高标记在纳米金颗粒上的寡核苷酸的稳定性和密度以及结合在纳米金颗粒上的抗体数量,以该方法制备的新型金纳米探针可以用于具有细胞靶向性的特异性检测,病毒的可视化检测,制备超灵敏的检测试纸条,相较于现有技术,以本发明制备的产品具有特异性高,稳定性好,应用领域广泛等特点,加之工艺简便,成本较低,因此有很好的推广前景。



1. 一种核酸抗体修饰的免疫金探针,其特征在于,所述的免疫金探针包括纳米金颗粒核心和表面修饰的核酸抗体结合物,所述核酸抗体结合物中的核酸为炔基修饰的长链DNA,所述长链DNA的核苷酸序列为:TT TAT ATA GAG GAG TTTTT TTTTT。

2. 根据权利要求1所述的核酸抗体修饰的免疫金探针,其特征在于,所述纳米金颗粒核心为结合了巯基修饰的反义长链DNA和短链DNA的纳米金颗粒,所述反义长链DNA的核苷酸序列为CTC CTCTAT ATA AATTTTTTTT TT,所述短链DNA的核苷酸序列为TTTTT TTTTT。

3. 根据权利要求1所述的核酸抗体修饰的免疫金探针,其特征在于,所述纳米金颗粒的粒径为15~30nm。

4. 权利要求1~3任一项所述的核酸抗体修饰的免疫金探针的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将抗体和叠氮化合物按一定比例混合,在室温环境下,摇晃结合一定时间得到样品;

2) 将步骤1)结合后的样品吸出,加入透析袋放置于PBS中透析过夜得到抗体叠氮结合物;

3) 将透析过夜的抗体叠氮结合物取出,加入炔基修饰的长链DNA和催化剂,室温下摇晃结合得到核酸抗体结合物;

4) 将结合好的核酸抗体结合物再次加入透析袋,放置于PBS中,透析过夜,中间换一次透析液,获得背景较为干净的核酸抗体结合物;

5) 将纳米金颗粒与巯基修饰的反义长链DNA和短链DNA按一定浓度比例混合,在室温下结合;

6) 在巯基修饰的反义长链DNA和短链DNA与纳米金颗粒结合一段时间后,每隔一段时间滴加一定量一定浓度的NaCl溶液获得纳米金颗粒核心;

7) 将步骤4)得到的核酸抗体结合物与纳米金颗粒核心在金属浴中结合;

8) 将步骤7)结合后的样品离心,重悬,获得浓缩后的核酸抗体修饰的免疫金探针。

5. 根据权利要求4所述的核酸抗体修饰的免疫金探针的制备方法,其特征在于,所述步骤1)的抗体和叠氮化合物摩尔比为1:30,结合时间为4~6小时。

6. 根据权利要求4所述的核酸抗体修饰的免疫金探针的制备方法,其特征在于,所述步骤3)中的催化剂为硫酸铜,异抗坏血酸钠,THPTA和盐酸氨基胍混合溶液。

7. 根据权利要求6所述的核酸抗体修饰的免疫金探针的制备方法,其特征在于,所述硫酸铜浓度为0.5mM,异抗坏血酸钠浓度为0.05mM,THPTA浓度为0.002mM、盐酸氨基胍浓度为0.05mM。

8. 根据权利要求4所述的核酸抗体修饰的免疫金探针的制备方法,其特征在于,所述步骤5)的纳米金颗粒与巯基修饰的反义长链DNA和短链DNA摩尔比为1:400:800。

9. 根据权利要求4所述的核酸抗体修饰的免疫金探针的制备方法,其特征在于,所述步骤6)NaCl溶液终浓度为5.0M。

10. 权利要求1~3任一项所述的核酸抗体修饰的免疫金探针在制备检测试纸条中的应用。

一种核酸抗体修饰的免疫金探针及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫金探针制备技术领域,具体涉及一种核酸抗体修饰的免疫金探针及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 早在很久以前,人们就对金溶胶开始研究,18世纪后,Faraday利用科学的方式对其进行研究,从此之后,人们对金溶胶的合成的研究方向开始转移到对其合成的方式和其应用方向等,随着纳米技术的不断发展,纳米材料和纳米结构获得了引人瞩目的成就,为生物医学的发展提供了新的契机。

[0003] 1996年,Mirkin团队发现了一种能将多价核酸与纳米金颗粒结合的方式,核酸与球形金颗粒表面共价连接,形成具有高密度富集和高度定向核酸的功能化纳米结构,这是第一个具有优良性质的球形核酸结构,由金芯和核酸外壳构成。该结构表现出纳米金颗粒和核酸两种物质的性能,因此,球形核酸相对于一些其他病毒载体和许多其他合成系统具有一定优势,包括低毒性、低免疫原性、抗酶降解、更稳定的基因敲除等等。这种结构能够在外壳核酸周围制造高盐浓度区,保护核酸不会被酶分解,并且能在细胞外环境中在表面富集清除蛋白,从而促进细胞内吞。这种球形核酸的功能,适用于各种类型的细胞,包括原代细胞,所以在后期研究中发现其不能区分健康细胞与癌细胞,无法特异性治疗,进而研究具有特异性的球形核酸,仍然是一个具有重要意义的课题。

[0004] 近年来,点击化学以其应用范围广,反应条件简单,速度快,产率高,环境友好,选择性强等诸多优点收到现在许多科学家的青睐,它是由化学家Sharpless在2001年引入的一个有机合成概念,通过小单元的拼接,尤其强调在温和的反应条件下高选择性的形成碳—杂原子键,快速可靠地完成形形色色的分子合成,在绿色合成和原子经济时代的背景下,点击化学的提出为构建功能性分子系统开拓出一条高通量,高产率,高选择性的合成路线。

[0005] 点击化学的典型代表反应为铜催化的叠氮-炔基Husigen环加成反应,通过该反应可以将Fc端修饰有叠氮的抗体与核酸相结合,进而将抗体结合到球形核酸上形成新型抗体结合的金纳米探针,传统的金纳米探针是通过静电吸附和表面修饰的A蛋白去结合抗体,但缺点在于探针不够稳定,极其容易聚团,这对一些病原检测和试纸条的制备造成很大的弊端,用本发明提及的核酸抗体修饰的办法可以有效提高探针的稳定性以及特异性,为今后金探针研究提供了新的思路拓宽了应用领域。

发明内容

[0006] 发明目的:本发明所要解决的技术问题是提供了一种核酸抗体修饰的免疫金探针。本发明旨在利用点击化学和球形核酸制备技术,制备一种核酸抗体修饰的新型金纳米探针,以解决现有金探针结构不稳定,易聚团,特异性较差的问题。

[0007] 本发明还要解决的技术问题是提供了核酸抗体修饰的免疫金探针的制备方法。

[0008] 本发明最后要解决的技术问题是提供了该核酸抗体修饰的免疫金探针的应用。

[0009] 技术方案:为解决上述技术问题,本发明采用如下技术方案:所述的免疫金探针包括纳米金颗粒核心和表面修饰的核酸抗体结合物,所述核酸抗体结合物中的核酸为炔基修饰的长链DNA,所述长链DNA的核苷酸序列为:TT TAT ATA GAG GAG TTTTT TTTTT。

[0010] 其中,所述纳米金颗粒核心为结合了巯基修饰的反义长链DNA和短链DNA的纳米金颗粒,所述反义长链DNA的核苷酸序列为CTC CTCTAT ATA AATTTTTTTT TT,所述短链DNA的核苷酸序列为TTTTT TTTTT。

[0011] 其中,所述纳米金颗粒的粒径为15nm。本发明所使用的核酸分为两种,一种长链DNA,用于结合抗体,一种为短链DNA,用于降低长链DNA的分布密度,减少表面抗体的修饰量,防止探针粘连,提高探针的分散性。

[0012] 本发明内容还包括所述的核酸抗体修饰的免疫金探针的制备方法,包括以下步骤:

[0013] 1) 将抗体和叠氮化合物按一定比例混合,在室温环境下,摇晃结合一定时间得到样品;

[0014] 2) 将步骤1)结合后的样品吸出,加入透析袋放置于PBS中透析过夜得到抗体叠氮结合物;

[0015] 3) 将透析过夜的抗体叠氮结合物取出,加入炔基修饰的长链DNA和催化剂,室温下摇晃结合得到核酸抗体结合物;

[0016] 4) 将结合好的核酸抗体结合物再次加入透析袋,放置于PBS中,透析过夜,中间换一次透析液,获得背景较为干净的核酸抗体结合物;

[0017] 5) 将纳米金颗粒与巯基修饰的反义长链DNA和短链DNA按一定浓度比例混合,在室温下结合;

[0018] 6) 在巯基修饰的反义长链DNA和短链DNA与纳米金颗粒结合一段时间后,每隔一段时间滴加一定量一定浓度的NaCl溶液获得纳米金颗粒核心;

[0019] 7) 将步骤4)得到的核酸抗体结合物与纳米金颗粒核心在金属浴中结合;

[0020] 8) 将步骤7)结合后的样品离心,重悬,获得浓缩后的核酸抗体修饰的免疫金探针。

[0021] 其中,所述步骤1)的抗体和叠氮化合物摩尔比为1:30,结合时间为4小时。

[0022] 其中,所述步骤3)中的催化剂为硫酸铜,异抗坏血酸钠,THPTA和盐酸氨基胍混合溶液。

[0023] 其中,所述硫酸铜浓度为0.5mM,异抗坏血酸钠终浓度为0.05mM,THPTA终浓度为0.002mM、氨基胍盐酸盐终浓度为0.05mM。

[0024] 其中,所述步骤5)的纳米金颗粒与巯基修饰的反义长链DNA和短链DNA摩尔比为1:400:800。

[0025] 其中,所述步骤6)NaCl溶液终浓度为5.0M。

[0026] 本发明内容还包括所述的核酸抗体修饰的免疫金探针在制备检测试纸条中的应用。

[0027] 有益效果:相对于现有技术,本发明具备以下优点:

[0028] 1) 本发明的制备方法综合使用了点击化学技术和寡核苷酸标记纳米金颗粒技术等一系列工艺,对抗体与DNA的偶联条件,标记寡核苷酸的纳米金颗粒的制备条件进行优

化,最大限度地提高标记在纳米金颗粒上的寡核苷酸的稳定性,以该方法制备的新型金纳米探针可以用于具有细胞靶向性的特异性检测,病毒的可视化检测,制备超灵敏的检测试纸条,相较于现有技术,以本发明制备的产品具有特异性高,稳定性好,应用领域广泛等特点,加之工艺简便,成本较低,因此有很好的推广前景。

[0029] 2) 本发明反应条件十分温和,不会影响核酸与蛋白质活性,该探针在溶液中的分散度也很好,利用“盐老化”的办法,在球形核酸周围形成高盐浓度区,屏蔽了探针之间的静电吸附力。该技术可拓展到许多其他抗体和靶向物质,对癌症等一些疾病的治疗以及病原的特异性检测提供了新的技术路线和研究思路。

附图说明

[0030] 图1是实施例1制备的探针的SDS-PAGE佐证图,其中M是Marker,1是2 μ g抗体,2是20 μ g新型金纳米探针,3是金探针样品离心后的上清悬液;

[0031] 图2是实施例1制备的探针的TEM表征图;

[0032] 图3是实施例1制备的探针结合EV71病毒颗粒的TEM表征图;

[0033] 图4是裸金颗粒制备的免疫金探针的TEM表征图。

具体实施方式

[0034] 以下为本发明的优选实施方式,仅用于解释本发明,而非用于限制本发明,且由该说明所作出的相关改进都属于本发明所附权利要求所保护的范围。

[0035] 实施例1

[0036] 1、材料与设备

[0037] 1) 15nm纳米金颗粒采购自东纳生物材料有限公司

[0038] 2) 烷基修饰的长链DNA、短链DNA、巯基修饰的反义长链DNA采购自Takara公司,其序列为:—CHCH:TT TAT ATA GAG GAG TTTTT TTTTT,TTTTT TTTTT,—SH:CTC CTC TAT ATA AA TTTTT TTTTT TT

[0039] 3) 71型肠道病毒抗体(ab36367)采购自Abcam公司;

[0040] 4) 硫酸铜(C112396),异抗坏血酸钠(S105024),THPTA(762342-100MG)(三(3-羟丙基三唑甲基)胺),氨基胍盐酸盐(A111225)采购自阿拉丁生化科技股份有限公司,叠氮化合物(R-M-3042)采购自国药集团化学试剂有限公司;

[0041] 5) 透析袋采购自Spectrum公司;

[0042] 6) PBS(10X)采购自江苏碧云天生物技术有限公司;

[0043] 7) 离心机购自eppendorf公司,超净台,混匀仪均购自Thermo Fisher公司。

[0044] 2、实验方法

[0045] 如前所述,为制备一种可用于抗原或病原体检测用的稳定的新型免疫金探针,解决传统胶体金探针不稳定,易聚团,特异性弱的缺点,我们运用了球形核酸制备技术和点击化学方法,使得抗体的修饰方向可控,提高了检测特异性,具体的实施步骤如下:

[0046] 1) 将71型肠道病毒抗体和叠氮化合物按照1:30的摩尔比加入至1.5ml离心管中,室温环境放置在混匀仪上,以每分钟三十转的速度摇晃混合4小时;

[0047] 2) 由于反应中使用的叠氮浓度过量,为获得背景较为干净的可用于结合核酸的抗

体,我们将1)中样品加入至膜孔径大小为14K的透析袋中,以PBS为透析液透析过夜;

[0048] 3)将透析过夜的抗体叠氮结合物取出,加入炔基修饰的长链DNA (—CHCH:TT TAT ATA GAG GAG TTTTT TTTTT),并在终浓度为0.5mM硫酸铜,终浓度为0.002mM的THPTA (三(3-羟丙基三唑甲基)胺),终浓度为0.05mM的氨基胍盐酸盐,终浓度为0.05mM的异抗坏血酸钠,起到催化作用,将混匀的样品在室温下摇晃结合2小时。

[0049] 4)将结合好的核酸抗体结合物再次加入透析袋,放置于PBS中,透析过夜,中间换一次透析液,以求反应背景更为干净;

[0050] 5)将纳米金颗粒与巯基修饰的反义长链DNA (—SH:CTC CTC TAT ATA AA TTTTT TTTTT TT) 和短链DNA (TTTTT TTTTT) 按1:400:800的比例混合,放置于混匀仪上,在室温下混合结合5小时;

[0051] 6)在反义长链DNA和短链DNA与金颗粒反应结合6小时后,每隔10分钟滴加10ul浓度为10M的NaCl溶液,每隔10分钟加入2M浓度的NaCl溶液,直到最后NaCl在样品中的浓度为5.0M;

[0052] 7)将步骤4)结合好的核酸抗体与步骤6)结合巯基修饰的反义长链DNA和短链DNA的金颗粒在50摄氏度的振荡器中结合5小时,一般结合时间为4~6小时,结合时间过长探针容易团聚;

[0053] 8)将步骤7)结合后的样品,3000rpm离心15分钟,用PBST重悬,获得浓缩后的新型金纳米探针即核酸抗体修饰的金纳米探针。

[0054] 为验证核酸抗体已成功修饰到纳米金颗粒上,我们取少量样品做了SDS-PAGE蛋白电泳,如图1:M为Marker,1为2 μ g抗体条带,2为浓缩后的新型金纳米探针条带,3为探针样品离心后的上清悬液。

[0055] 我们还将制备好的核酸抗体修饰的金纳米探针放置30天后通过透射电镜来进行表征观察,如图2所示,探针在溶液中游离性非常好,没有产生聚团现象,我们又用马尔文粒径分析仪分别对未经过修饰的裸金颗粒、核酸抗体修饰的金纳米探针、静电吸附制备的免疫胶体金探针的三种情况进行粒径和多分散系数的检测,同样看出核酸抗体修饰的方法可使探针具有较好的分散性和游离度,具体数据参见表1。

[0056] 表1

[0057]

	平均粒径	PDI
未经过修饰的裸金颗粒	79.73	0.244
核酸抗体修饰的金纳米探针	213.37	0.484
抗体静电吸附制备的免疫胶体金探针	1101.2	0.907

[0058] 实施例2

[0059] 将实施例1中制备的核酸抗体修饰的金纳米探针用于捕获样品中71型肠道病毒颗粒的实验,当制备好的核酸抗体修饰的金纳米探针与病毒样品混合在一起的时候,金探针

能够特异性吸附病毒,通过探针表面修饰的抗体与病毒结合,再经离心重悬的方法获得检测样品,如图3所示的透射电镜表征图,每一个EV71病毒颗粒表面几乎都有金探针的结合,可见该核酸抗体修饰的金纳米探针的特异性十分好,该探针与病毒的数量比为5:1,探针与病毒的数量比范围也可以为10:1-1:1,主要是因为探针数量过大,会造成假阳性的结果,而病毒数量过少,电镜下比较难找到表征图像。

[0060] 实施例3

[0061] 将实施例1中制备的核酸抗体修饰的金纳米探针做了间接酶联免疫吸附实验,验证其特异性,以胎牛血清白蛋白(Bsa)作为对照组,首先在96孔板滴加100 μ lEV71病毒液样品和2%的Bsa稀释液,在37℃的培育箱中结合2个小时,再在每孔滴加200 μ l4%的脱脂奶粉液进行封闭,在37℃培育箱静置1小时,使用TBST溶液清洗4遍后,每孔滴加50 μ l金探针溶液,37℃结合1小时,用TBST洗板4次后,每孔加入100 μ l二抗(采购自博奥森生物技术有限公司),37℃结合1小时,使用TBST洗板4次后,加入TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)底物溶液,37℃放置10min,加入每孔30 μ l终止液,颜色变黄后,用酶标仪测定450nm的吸光值,吸光值数据参见表2,可见病毒液孔和BSA对照孔的吸光值有着明显的差异,从中可以看出制备的核酸抗体修饰的金纳米探针有着很好的特异性。

[0062] 表2

[0063]

	20 μ l金探针	50 μ l金探针	100 μ l金探针
BSA	0.0281	0.1364	0.0536
EV71	0.5569	0.9367	0.5597

[0064] 对比例1

[0065] 为了证明使用该方法制备的免疫金探针分散性与稳定性较好,我们使用裸金颗粒直接与抗体结合,金颗粒与抗体的数量比与实施例1相同,混合后在混匀仪上室温结合5小时,发现离心后探针贴壁严重难以重悬,透射电镜表征如图4所示,团聚情况十分严重,效果不佳。

[0066] 综上所述,使用本发明制备的免疫金探针,具有分散性稳定性好,特异性强的优点,后期可用于免疫金试纸条,生物芯片以及病原检测等领域的应用。

序列表

<110> 扬州大学

<120> 一种核酸抗体修饰的免疫金探针及其制备方法和应用

<160> 3

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> 长链DNA(Artificial Sequence)

<400> 1

tttatataga ggagttttt tttt 24

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> 反义长链DNA(Artificial Sequence)

<400> 2

ctcctctata taaattttt tttttt 26

<210> 3

<211> 10

<212> DNA

<213> 短链DNA(Artificial Sequence)

<400> 3

ttttttttt 10

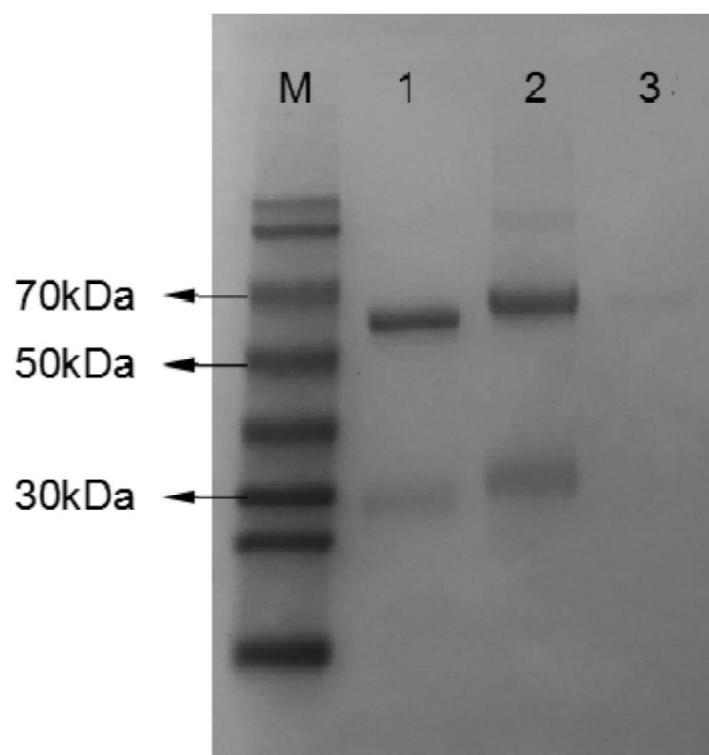


图1

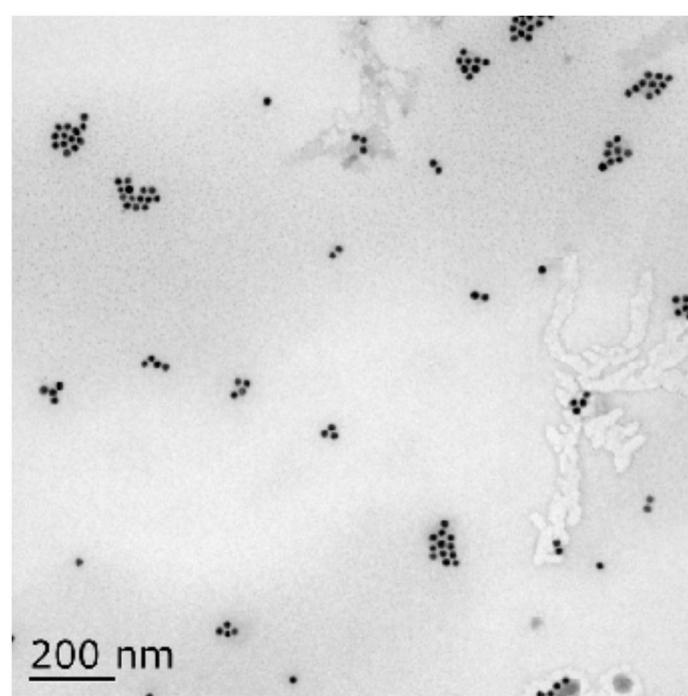


图2

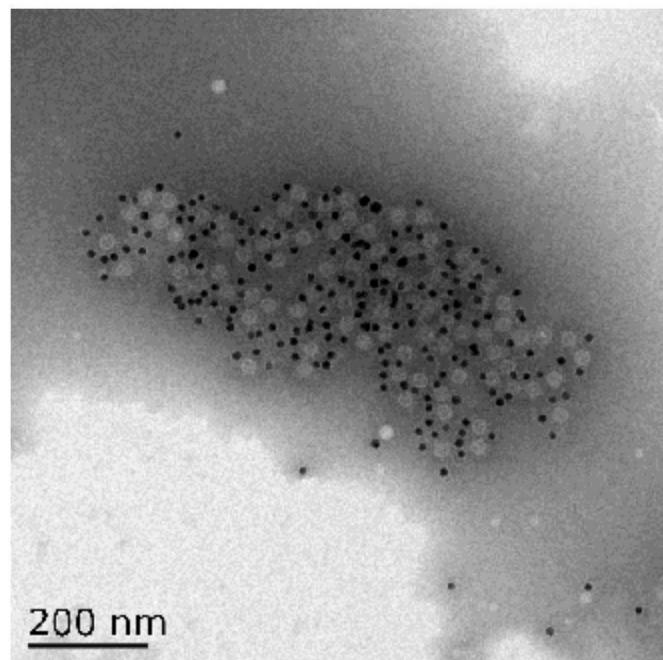


图3

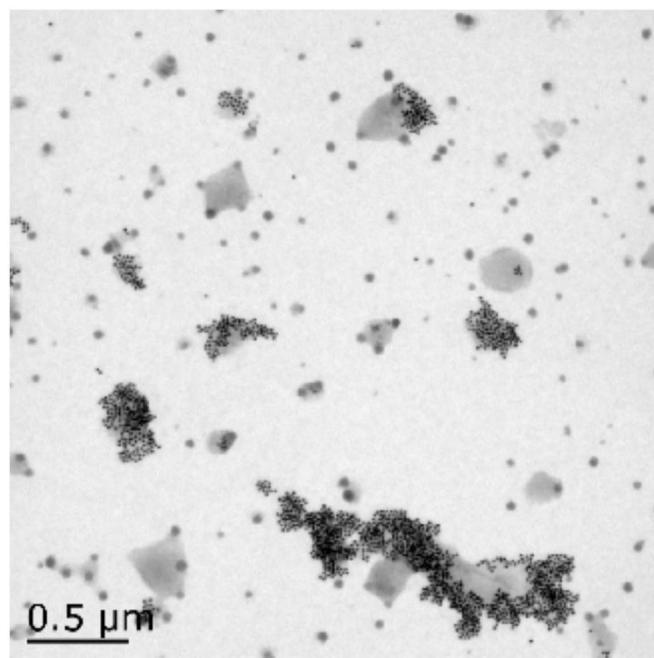


图4

专利名称(译)	一种核酸抗体修饰的免疫金探针及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109975540A	公开(公告)日	2019-07-05
申请号	CN201910268840.9	申请日	2019-04-04
[标]申请(专利权)人(译)	扬州大学		
申请(专利权)人(译)	扬州大学		
当前申请(专利权)人(译)	扬州大学		
[标]发明人	周昕 袁嘉晟 张天宇		
发明人	周昕 袁嘉晟 张天宇		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/54346		
代理人(译)	王艳		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种核酸抗体修饰的免疫金探针及其制备方法和应用。该方法综合使用了点击化学技术和寡核苷酸标记纳米金颗粒技术等一系列工艺，对抗体与DNA的偶联条件，标记寡核苷酸的纳米金颗粒的制备条件进行优化，最大限度地提高标记在纳米金颗粒上的寡核苷酸的稳定性和密度以及结合在纳米金颗粒上的抗体数量，以该方法制备的新型金纳米探针可以用于具有细胞靶向性的特异性检测，病毒的可视化检测，制备超灵敏的检测试纸条，相较于现有技术，以本发明制备的产品具有特异性高，稳定性好，应用领域广泛等特点，加之工艺简便，成本较低，因此有很好的推广前景。

