



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106546749 B

(45)授权公告日 2018.03.20

(21)申请号 201610949304.1

审查员 陈伟潘

(22)申请日 2016.10.26

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106546749 A

(43)申请公布日 2017.03.29

(73)专利权人 首都师范大学

地址 100048 北京市海淀区西三环北路105号

(72)发明人 陈郑博 魏祥聪 谭路路

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

基于纳米金-DNA复合材料检测蛋白质的方法

(57)摘要

本发明提供一种基于纳米金-DNA复合材料检测蛋白质的方法,包括纳米金-DNA复合物的制备、纳米金-DNA-蛋白质三元复合物的生成、纳米金催化硝基苯酚和硼氢化钠反应(显色体系)、目测反应液由黄色变成无色的时间(CCT值)、根据不同蛋白质的CCT/CCT₀值绘制LDA图,以及将已知浓度的待测蛋白质加入上述显色体系,计算待测蛋白质的CCT/CCT₀值,结合LDA图从而对待测蛋白质进行识别。本发明建立在线性判别分析技术的基础上,仅需通过肉眼观察,并用计时器记录溶液颜色变化的时间,无需借助任何昂贵的仪器,即可成功识别出不同蛋白质,检测限达到30nM,为蛋白质高通量快速检测提供新的技术手段。

1. 基于纳米金-DNA复合材料检测蛋白质的方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、纳米金颗粒的制备:通过柠檬酸钠还原氯金酸制得,氯金酸溶液浓度为50mM,氯金酸和柠檬酸钠的摩尔比为3.5-3.8:1,所得溶液中纳米金颗粒的平均粒径为13-18nm;

S2、纳米金-DNA复合物的制备:向上述含有纳米金颗粒的溶液50 μ L中加入浓度为1 μ M的一端修饰有巯基的DNA溶液10 μ L,所述DNA为poly (A)₁₅,得到纳米金-poly (A)₁₅复合物;

S3、向上述含有纳米金-DNA复合物的溶液60 μ L中分别加入M1浓度的11种蛋白质溶液各50 μ L,于37℃孵育10min;同时以ddH₂O为空白对照,即向上述含有纳米金-DNA复合物的溶液60 μ L中加入ddH₂O 50 μ L,于37℃孵育30min;

其中,所述11种蛋白质包括胰蛋白酶、牛血红蛋白、牛血清蛋白、人血清蛋白、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、辣根过氧化物酶、软铁蛋白、细胞色素-C、纤维原蛋白和刀豆球蛋白;

S4、纳米金催化硝基苯酚和硼氢化钠反应生成氨基苯酚:向S3所得溶液110 μ L中加入浓度为5mM的硝基苯酚溶液200 μ L和浓度为0.6M的硼氢化钠溶液200 μ L,利用裸露的纳米金表面催化其反应;

S5、目测观察溶液由黄色变成无色的反应时间,即CCT值,分别记下不同蛋白质对应的CCT值,以及空白对照ddH₂O对应的CCT₀值,并分别计算不同蛋白质对应的CCT/CCT₀值,绘制表格;

S6、将所述DNA替换为poly (C)₁₅,重复S1~S5;

S7、将所述DNA替换为poly (T)₁₅,重复S1~S5;

S8、将针对上述三种DNA绘制的反应不同蛋白质CCT/CCT₀值的表格输入软件1BM SPSS Statistics 19,从而得到不同蛋白质对应的LDA图;

S9、按照S1和S2分别制备针对上述三种DNA的纳米金-DNA复合物溶液,分别向三种纳米金-DNA复合物溶液60 μ L中加入M1浓度的待测蛋白质溶液50 μ L,于37℃孵育30min;同时以ddH₂O为空白对照;

S10、向S9所得溶液110 μ L中加入浓度为5mM的硝基苯酚溶液200 μ L和浓度为0.6M的硼氢化钠溶液200 μ L,进行反应;目测观察溶液由黄色变成无色的反应时间,并计算CCT/CCT₀值,代入S8所述软件中,根据LDA图显示结果,对待测蛋白质进行识别;

步骤S3和S9中,300nM $\leq$ M1 $\leq$ 2000 μ M;

所述poly (A)₁₅是由15个碱基A组成的DNA片段,所述poly (C)₁₅是由15个碱基C组成的DNA片段,所述poly (T)₁₅是由15个碱基T组成的DNA片段。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,S3中每种蛋白质做5~6个重复。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,M1为300nM或500nM。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的方法,其特征在于,S9中各反应试剂的用量及反应条件同S3;S10中各反应试剂的浓度、用量及反应条件同S4。

5. 一种用于检测蛋白质的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒可检测并区分出11种蛋白质:胰蛋白酶、牛血红蛋白、牛血清蛋白、人血清蛋白、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、辣根过氧化物酶、软铁蛋白、细胞色素-C、纤维原蛋白和刀豆球蛋白;

所述试剂盒包括以下试剂:纳米金-poly (A)₁₅复合物溶液、纳米金-poly (C)₁₅复合物溶液、纳米金-poly (T)₁₅复合物溶液、硝基苯酚、硼氢化钠和ddH₂O;

其中,所述纳米金-poly (A)₁₅复合物的制备方法如下:通过柠檬酸钠还原氯金酸制得,

氯金酸溶液浓度为50mM,氯金酸和柠檬酸钠的摩尔比为3.5-3.8:1,所得溶液中纳米金颗粒的平均粒径为13-18nm;向上述含有纳米金颗粒的溶液50 μ L中加入浓度为1 μ M的一端修饰有巯基的DNA溶液10 μ L,所述DNA为poly (A)₁₅,得到纳米金-poly (A)₁₅复合物;

按照上述方法,将所述DNA替换为poly (C)₁₅或poly (T)₁₅,分别得到纳米金-poly (C)₁₅复合物、纳米金-poly (T)₁₅复合物;

其中所述poly (A)₁₅是由15个碱基A组成的DNA片段,所述poly (C)₁₅是由15个碱基C组成的DNA片段,所述poly (T)₁₅是由15个碱基T组成的DNA片段。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述纳米金-poly (A)₁₅复合物溶液的制备方法如下:

①纳米金颗粒的制备:通过柠檬酸钠还原氯金酸制得,氯金酸溶液浓度为50mM,氯金酸和柠檬酸钠的摩尔比为3.5-3.8:1,所得溶液中纳米金颗粒的平均粒径为13-18nm;

②纳米金-poly (A)₁₅复合物溶液的制备:向上述含有纳米金颗粒的溶液50 μ L中加入浓度为1 μ M的一端修饰有巯基的DNA溶液10 μ L,所述DNA为poly (A)₁₅,得到纳米金-poly (A)₁₅复合物溶液;

所述纳米金-poly (C)₁₅复合物溶液和纳米金-poly (T)₁₅复合物溶液的制备方法同上。

7. 权利要求5或6所述试剂盒在蛋白质高通量快速检测中的应用。

8. 权利要求5或6所述试剂盒在不同组分的蛋白质混合物检测中的应用。

基于纳米金-DNA复合材料检测蛋白质的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于纳米金-DNA复合材料检测蛋白质的方法。

背景技术

[0002] 蛋白质的检测为多种疾病的早期诊断提供了非常有价值的信息,如低白蛋白血症,老年痴呆症、癌症、前列腺炎症、艾滋病等(U.Andreasson;E.Portelius;M.E.Andersson,et al.,Biomarker Med.2007,1,59-78;V.U.Bai;A.Kaseb;S.Tejwani,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.2007,104,2343-2348;J.Hardy;D.J.Selkoe,Science 2002,297,353-356)。目前针对蛋白质的检测方法主要包括两大类:一种是高效液相色谱质谱联用法和二维凝胶电泳法。该方法存在需要专业人员操作、仪器昂贵、耗时长缺点。另一种是基于抗原-抗体特异性识别生物标记物的免疫方法。该方法不仅操作复杂、工作量大、抗原和抗体必须来自于生物活体,导致经济成本极高,而且它们的种类有限。这两种方法均难以实现蛋白质高通量的快速检测。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种基于纳米金-DNA复合材料检测蛋白质的方法。

[0004] 为了实现本发明目的,本发明的基于纳米金-DNA复合材料检测蛋白质的方法,包括以下步骤:

[0005] S1、纳米金颗粒的制备:通过柠檬酸钠还原氯金酸制得,氯金酸溶液浓度为50mM,氯金酸和柠檬酸钠的摩尔比为3.5-3.8:1(优选3.5:1),所得溶液中纳米金颗粒的平均粒径约为13-18nm(优选13nm);

[0006] S2、纳米金-DNA复合物的制备:向上述含有纳米金颗粒的溶液50 μ L中加入浓度为1 μ M的一端修饰有巯基的DNA溶液10 μ L,所述DNA为poly(A)₁₅,得到纳米金-poly(A)₁₅复合物;

[0007] S3、纳米金-DNA-蛋白质三元复合物的生成:向上述含有纳米金-DNA复合物的溶液60 μ L中分别加入M1浓度的11种蛋白质溶液各50 μ L,于37℃孵育30min;同时以ddH₂O为空白对照,即向上述含有纳米金-DNA复合物的溶液60 μ L中加入ddH₂O 50 μ L,于37℃孵育30min;

[0008] 其中,所述11种蛋白质包括胰蛋白酶(Try)、牛血红蛋白(Hem)、牛血清蛋白(BSA)、人血清蛋白(HSA)、胃蛋白酶(Pep)、木瓜蛋白酶(Pap)、辣根过氧化物酶(HRP)、软铁蛋白(TRF)、细胞色素-C(Cyt-C)、纤维原蛋白(Fib)和刀豆球蛋白(Con);

[0009] S4、纳米金催化硝基苯酚和硼氢化钠反应生成氨基苯酚:向S3所得溶液110 μ L中加入浓度为5mM的硝基苯酚溶液200 μ L和浓度为0.6M的硼氢化钠溶液200 μ L,利用裸露的纳米金表面催化其反应;

[0010] S5、目测观察溶液由黄色变成无色的反应时间,即CCT值(Color Change Time),分别记下不同蛋白质对应的CCT值,以及空白对照ddH₂O对应的CCT₀值,并分别计算不同蛋白质对应的CCT/CCT₀值,绘制表格;

[0011] S6、将所述DNA替换为poly(C)₁₅,重复S1~S5;

- [0012] S7、将所述DNA替换为poly (T)₁₅,重复S1~S5;
- [0013] S8、将针对上述三种DNA绘制的反应不同蛋白质CCT/CCT₀值的表格输入软件IBM SPSS Statistics 19(参数设置为默认),从而得到不同蛋白质对应的LDA图;
- [0014] S9、按照S1和S2分别制备针对上述三种DNA的纳米金-DNA复合物溶液,分别向三种纳米金-DNA复合物溶液60μL中加入M1浓度的待测蛋白质溶液50μL,于37℃孵育30min;同时以ddH₂O为空白对照;
- [0015] S10、向S9所得溶液110μL中加入浓度为5mM的硝基苯酚溶液200μL和浓度为0.6M的硼氢化钠溶液200μL,进行反应;目测观察溶液由黄色变成无色的反应时间,并计算CCT/CCT₀值,代入S8所述软件中,根据LDA图显示结果,对待测蛋白质进行识别。
- [0016] 前述的方法,S3中每种蛋白质做5~6个重复。
- [0017] 前述的方法,S3和S9中,300nM≤M1≤2000μM。优选的,M1为300nM或500nM(即三元复合物溶液中蛋白质的终浓度为30nM或50nM)。
- [0018] 前述的方法,S9中各反应试剂的用量及反应条件同S3;S10中各反应试剂的浓度、用量及反应条件同S4。
- [0019] 上述检测方法的原理示意图见图1。
- [0020] 本发明还提供一种用于检测蛋白质的试剂盒,所述试剂盒可检测并区分出11种蛋白质Try、Hem、BSA、HSA、Pep、Pap、HRP、TRP、CytC、Fib和Con;
- [0021] 所述试剂盒包括以下试剂:纳米金-poly (A)₁₅复合物溶液、纳米金-poly (C)₁₅复合物溶液、纳米金-poly (T)₁₅复合物溶液、硝基苯酚、硼氢化钠和ddH₂O等。
- [0022] 所述纳米金-poly (A)₁₅复合物溶液的制备方法如下:
- [0023] ①纳米金颗粒的制备:通过柠檬酸钠还原氯金酸制得,氯金酸溶液浓度为50mM,氯金酸和柠檬酸钠的摩尔比为3.5-3.8:1(优选3.5:1),所得溶液中纳米金颗粒的平均粒径为13-18nm(优选13nm);
- [0024] ②纳米金-poly (A)₁₅复合物溶液的制备:向上述含有纳米金颗粒的溶液50μL中加入浓度为1μM的一端修饰有巯基的DNA溶液10μL,所述DNA为poly (A)₁₅,得到纳米金-poly (A)₁₅复合物溶液;
- [0025] 所述纳米金-poly (C)₁₅复合物溶液和纳米金-poly (T)₁₅复合物溶液的制备方法同上。
- [0026] 本发明还提供所述试剂盒在蛋白质高通量快速检测中的应用。
- [0027] 本发明进一步提供所述试剂盒在不同组分的蛋白质混合物检测中的应用。
- [0028] 本发明建立在线性判别分析(Linear Discriminant Analysis)技术的基础上,可有效解决传统传感器在识别元素和目标物之间存在着的“锁钥模式”,即一对一特异结合,以及对复杂混合物中的每种成分均设计具有专一选择性的特定传感单元,费时且不切实际的问题。与此前的多维阵列传感器相比,本发明避免了它们存在的不足:要么制备过程繁琐、操作复杂;要么使用荧光分子标记DNA增加了实验成本费用;要么需要大型仪器和专业操作人员。本发明仅需通过肉眼观察,并用计时器记录溶液颜色变化的时间,无需借助任何昂贵的仪器,即可成功识别出11种蛋白质,检测限达到30nM。该方法能对不同组分的蛋白质混合物进行识别(区分率为100%),还可用于血清样品中的蛋白质识别。

附图说明

[0029] 图1为本发明基于纳米金-DNA复合材料检测蛋白质方法的原理图。

[0030] 图2为本发明实施例1中对不同种蛋白质检测区分的结果；其中，A：以11种蛋白质（终浓度30nM）的CCT/CCT₀的比值为纵坐标所做的柱状图；B、C和D分别为终浓度10nM、30nM和50nM蛋白质的识别得分图；CCT表示含有蛋白质的溶液颜色变化时间。CCT₀表示没有蛋白质存在的溶液变色时间。

[0031] 图3为本发明实施例2中对混合不同种蛋白质的检测区分结果；其中，A：混合终浓度为30nM牛血清蛋白（BSA）和人血清蛋白（HSA）的识别得分图；B：混合终浓度为30nM牛血清蛋白（BSA）和刀豆球蛋白（Con）的识别得分图。

[0032] 图4为本发明实施例3中对血清样品中混合不同种蛋白质的检测识别结果；其中，A、B分别为基于CCT/CCT₀的指纹图和蛋白质识别得分图。

[0033] 图2-图4中，factor 1和factor 2分别表示典型判别式函数1和典型判别式函数2。

具体实施方式

[0034] 以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。若未特别指明，实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段，所用原料均为市售商品。

[0035] 实施例1 基于纳米金-DNA复合材料检测蛋白质的方法

[0036] 本实施例提供的基于纳米金-DNA复合材料检测蛋白质的方法，包括以下步骤：

[0037] 1、纳米金颗粒的制备：通过柠檬酸钠还原氯金酸制得，氯金酸溶液浓度为50mM，氯金酸和柠檬酸钠的摩尔比为3.5:1，所得溶液中纳米金颗粒的平均粒径约为13nm；

[0038] 2、纳米金-DNA复合物的制备：向上述含有纳米金颗粒的溶液50μL中加入浓度为1μM的一端修饰有巯基的DNA溶液10μL，所述DNA为poly (A)₁₅，得到纳米金-poly (A)₁₅复合物；

[0039] 3、向上述含有纳米金-DNA复合物的溶液60μL中分别加入300nM（100nM或500nM）浓度的11种蛋白质溶液各50μL，于37℃孵育30min；每种蛋白质至少做5个重复；同时以ddH₂O为空白对照，即向上述含有纳米金-DNA复合物的溶液60μL中加入ddH₂O 50μL，于37℃孵育30min；

[0040] 其中，所述11种蛋白质包括Try、Hem、BSA、HSA、Pep、Pap、HRP、TRP、CytC、Fib和Con；

[0041] 4、纳米金催化硝基苯酚和硼氢化钠反应生成氨基苯酚：向S3所得溶液110μL中加入浓度为5mM的硝基苯酚溶液200μL和浓度为0.6M的硼氢化钠溶液200μL，利用裸露的纳米金表面催化其反应；

[0042] 5、目测观察溶液由黄色变成无色的反应时间，即CCT值，分别记下不同蛋白质对应的CCT值，以及空白对照ddH₂O对应的CCT₀值，并分别计算不同蛋白质对应的CCT/CCT₀值，绘制表格；

[0043] 6、将所述DNA替换为poly (C)₁₅，重复S1～S5；

[0044] 7、将所述DNA替换为poly (T)₁₅，重复S1～S5；

[0045] 8、将针对上述三种DNA绘制的反应不同蛋白质CCT/CCT₀值的表格输入软件IBM SPSS Statistics 19（参数设置为默认），从而得到不同蛋白质对应的LDA图；

[0046] 9、按照步骤1和2分别制备针对上述三种DNA的纳米金-DNA复合物溶液，分别向三

种纳米金-DNA复合物溶液60 μ L中加入300nM(100nM或500nM)浓度的待测蛋白质溶液各50 μ L,于37 $^{\circ}$ C孵育30min;同时以ddH₂O为空白对照;

[0047] 10、向步骤9所得溶液110 μ L中加入浓度为5mM的硝基苯酚溶液200 μ L和浓度为0.6M的硼氢化钠溶液200 μ L,进行反应;目测观察溶液由黄色变成无色的反应时间,并计算CCT/CCT₀值,代入步骤8所述软件中,根据LDA图显示结果,对待测蛋白质进行识别。

[0048] 不同种蛋白质检测区分的结果见图2。

[0049] 实施例2 基于纳米金-DNA复合材料检测不同组分的蛋白质混合物

[0050] 包括以下步骤:

[0051] 1、纳米金颗粒的制备:通过柠檬酸钠还原氯金酸制得,氯金酸溶液浓度为50mM,氯金酸和柠檬酸钠的摩尔比为3.5:1,所得溶液中纳米金颗粒的平均粒径约为13;

[0052] 2、纳米金-DNA复合物的制备:向上述含有纳米金颗粒的溶液50 μ L中加入浓度为1 μ M的一端修饰有巯基的DNA溶液10 μ L,所述DNA为poly(A)₁₅,得到纳米金-poly(A)₁₅复合物;

[0053] 3、向上述含有纳米金-DNA复合物的溶液60 μ L中分别加入300nM浓度的两种蛋白质混合的溶液(BSA与HSA混合溶液或者BSA与Con混合溶液)各50 μ L,于37 $^{\circ}$ C孵育30min;每种蛋白质至少做5个重复;同时以ddH₂O为空白对照,即向上述含有纳米金-DNA复合物的溶液60 μ L中加入ddH₂O 50 μ L,于37 $^{\circ}$ C孵育30min;

[0054] 4、纳米金催化硝基苯酚和硼氢化钠反应生成氨基苯酚:向S3所得溶液110 μ L中加入浓度为5mM的硝基苯酚溶液200 μ L和浓度为0.6M的硼氢化钠溶液200 μ L,利用裸露的纳米金表面催化其反应;

[0055] 5、目测观察溶液由黄色变成无色的反应时间,即CCT值,分别记下不同蛋白质对应的CCT值,以及空白对照ddH₂O对应的CCT₀值,并分别计算不同蛋白质对应的CCT/CCT₀值,绘制表格;

[0056] 6、将所述DNA替换为poly(C)₁₅,重复S1~S5;

[0057] 7、将所述DNA替换为poly(T)₁₅,重复S1~S5;

[0058] 8、将针对上述三种DNA绘制的反应不同蛋白质CCT/CCT₀值的表格输入软件IBM SPSS Statistics 19(参数设置为默认),从而得到不同蛋白质对应的LDA图;

[0059] 9、按照步骤1和2分别制备针对上述三种DNA的纳米金-DNA复合物溶液,分别向三种纳米金-DNA复合物溶液60 μ L中加入300nM浓度的待测蛋白质溶液50 μ L,于37 $^{\circ}$ C孵育30min;同时以ddH₂O为空白对照;

[0060] 10、向步骤9所得溶液110 μ L中加入浓度为5mM的硝基苯酚溶液200 μ L和浓度为0.6M的硼氢化钠溶液200 μ L,进行反应;目测观察溶液由黄色变成无色的反应时间,并计算CCT/CCT₀值,代入步骤8所述软件中,根据LDA图显示结果,对待测蛋白质进行识别。

[0061] 混合不同种蛋白质的检测区分结果见图3。

[0062] 此外,对于其他种类蛋白质(包括Try、Hem、BSA、HSA、Pep、Pap、HRP、TRF、Cyt-C、Fib和Con)的混合情况以及300nM以上浓度的蛋白混合情况,需要实验者对于待测蛋白溶液种类的数目,按照上述步骤1-8重新绘制标准LDA图,将待测溶液重复上述步骤9-10。

[0063] 实施例3 基于纳米金-DNA复合材料识别血清样品中的蛋白质

[0064] 包括以下步骤:

[0065] 1、纳米金颗粒的制备:通过柠檬酸钠还原氯金酸制得,氯金酸溶液浓度为50mM,氯

金酸和柠檬酸钠的摩尔比为3.5:1,所得溶液中纳米金颗粒的平均粒径约为13;

[0066] 2、纳米金-DNA复合物的制备:向上述含有纳米金颗粒的溶液50 μ L中加入浓度为1 μ M的一端修饰有巯基的DNA溶液10 μ L,所述DNA为poly (A)₁₅,得到纳米金-poly (A)₁₅复合物;

[0067] 3、向上述含有纳米金-DNA复合物的溶液60 μ L中分别加入3 μ M浓度的11种蛋白质溶液各50 μ L,于37 $^{\circ}$ C孵育30min;每种蛋白质至少做5个重复;同时以ddH₂O为空白对照,即向上述含有纳米金-DNA复合物的溶液60 μ L中加入ddH₂O 50 μ L,于37 $^{\circ}$ C孵育30min;

[0068] 其中,所述11种蛋白质包括Try、Hem、BSA、HSA、Pep、Pap、HRP、TRP、CytC、Fib和Con;

[0069] 4、纳米金催化硝基苯酚和硼氢化钠反应生成氨基苯酚:向S3所得溶液110 μ L中加入浓度为5mM的硝基苯酚溶液200 μ L和浓度为0.6M的硼氢化钠溶液200 μ L,利用裸露的纳米金表面催化其反应;

[0070] 5、目测观察溶液由黄色变成无色的反应时间,即CCT值,分别记下不同蛋白质对应的CCT值,以及空白对照ddH₂O对应的CCT₀值,并分别计算不同蛋白质对应的CCT/CCT₀值,绘制表格;

[0071] 6、将所述DNA替换为poly (C)₁₅,重复S1~S5;

[0072] 7、将所述DNA替换为poly (T)₁₅,重复S1~S5;

[0073] 8、将针对上述三种DNA绘制的反应不同蛋白质CCT/CCT₀值的表格输入软件1BM SPSS Statistics 19(参数设置为默认),从而得到不同蛋白质对应的LDA图;

[0074] 9、按照步骤1和2分别制备针对上述三种DNA的纳米金-DNA复合物溶液,分别向三种纳米金-DNA复合物溶液60 μ L中加入30nM浓度的待测蛋白质溶液50 μ L,于37 $^{\circ}$ C孵育30min;同时以ddH₂O为空白对照;

[0075] 10、向步骤9所得溶液110 μ L中加入浓度为5mM的硝基苯酚溶液200 μ L和浓度为0.6M的硼氢化钠溶液200 μ L,进行反应;目测观察溶液由黄色变成无色的反应时间,并计算CCT/CCT₀值,代入步骤8所述软件中,根据LDA图显示结果,对待测蛋白质进行识别。

[0076] 血清样品中混合不同种蛋白质的检测识别结果见图4。

[0077] 此外,对于其他浓度蛋白质在血清样品中的情况,需要实验者根据待测蛋白溶液的浓度,按照上述步骤1-8重新绘制标准LDA图,将待测溶液重复上述步骤9-10。

[0078] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 首都师范大学
- [0003] <120> 基于纳米金-DNA复合材料检测蛋白质的方法
- [0004] <130> KHP161116743.4
- [0005] <160> 3
- [0006] <170> Patentln version 3.3
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 15
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <400> 1
- [0012] aaaaaaaaaa aaaaa 15
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 15
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列
- [0017] <400> 2
- [0018] cccccccccc ccccc 15
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 15
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列
- [0023] <400> 3
- [0024] tttttttttt ttttt 15

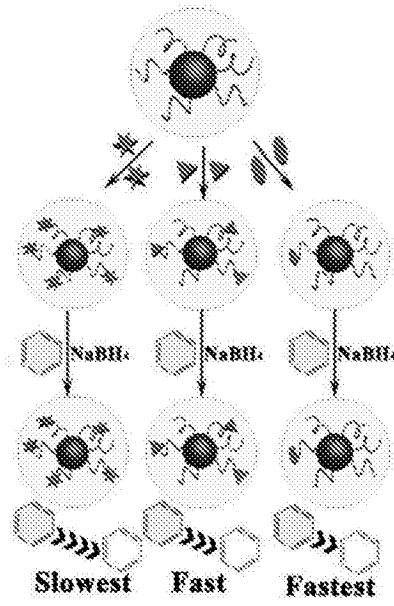


图1

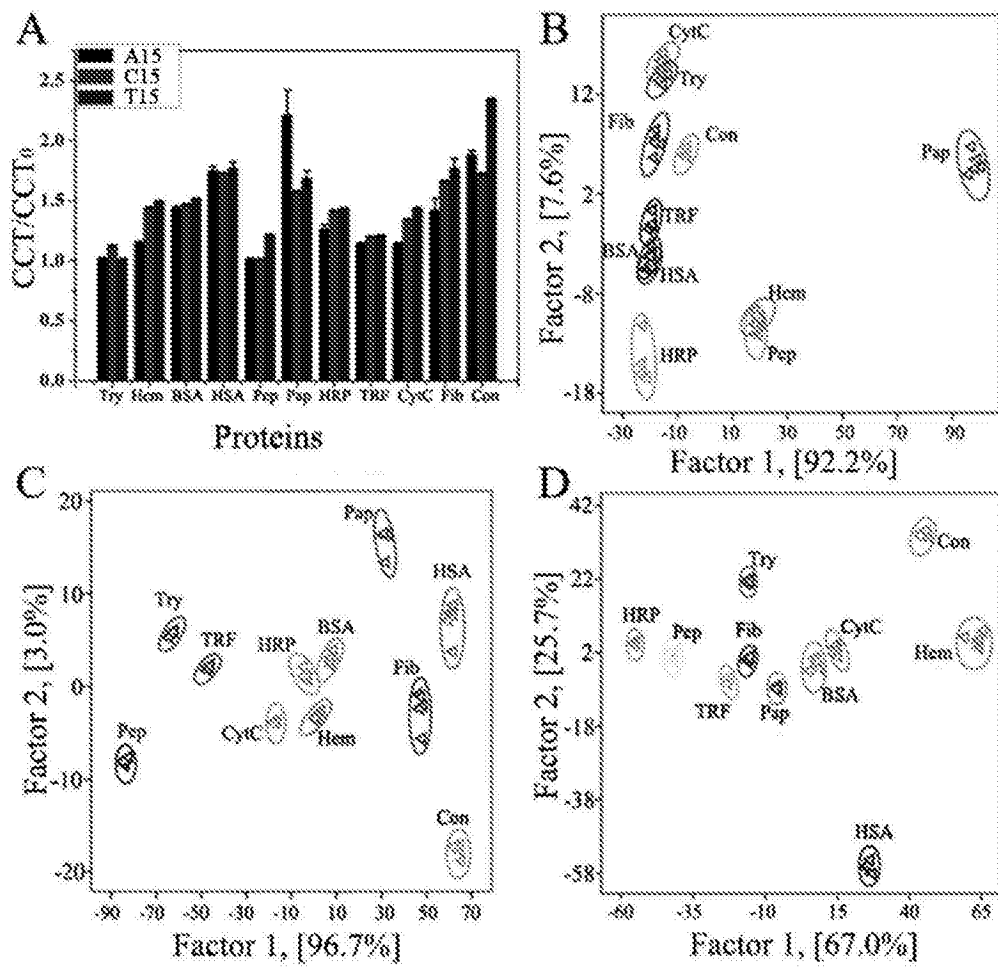


图2

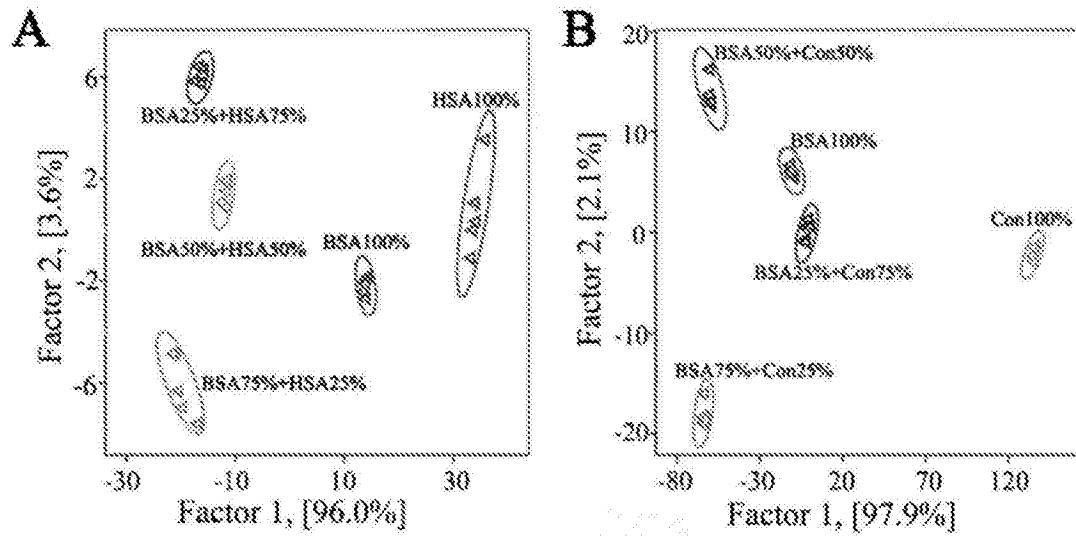


图3

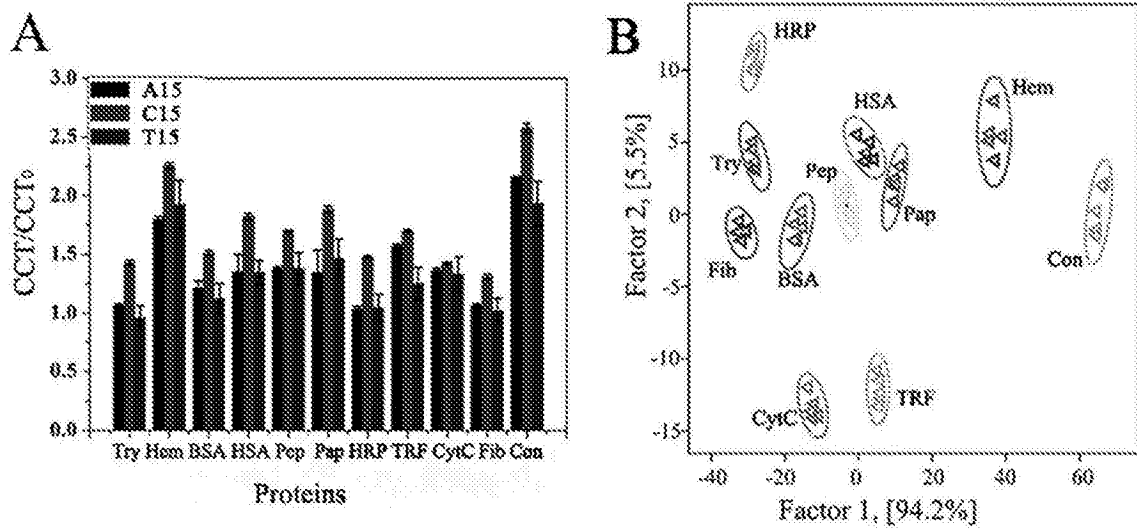


图4

专利名称(译)	基于纳米金-DNA复合材料检测蛋白质的方法		
公开(公告)号	CN106546749B	公开(公告)日	2018-03-20
申请号	CN201610949304.1	申请日	2016-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	首都师范大学		
申请(专利权)人(译)	首都师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	首都师范大学		
[标]发明人	陈郑博 魏祥聪 谭路路		
发明人	陈郑博 魏祥聪 谭路路		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/6803		
代理人(译)	王文君		
其他公开文献	CN106546749A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种基于纳米金-DNA复合材料检测蛋白质的方法，包括纳米金-DNA复合物的制备、纳米金-DNA-蛋白质三元复合物的生成、纳米金催化硝基苯酚和硼氢化钠反应(显色体系)、目测反应液由黄色变成无色的时间(CCT值)、根据不同蛋白质的CCT/CCT0值绘制LDA图，以及将已知浓度的待测蛋白质加入上述显色体系，计算待测蛋白质的CCT/CCT0值，结合LDA图从而对待测蛋白质进行识别。本发明建立在线性判别分析技术的基础上，仅需通过肉眼观察，并用计时器记录溶液颜色变化的时间，无需借助任何昂贵的仪器，即可成功识别出不同蛋白质，检测限达到30nM，为蛋白质高通量快速检测提供新的技术手段。

