

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510048477.8

[51] Int. Cl.

G01N 21/78 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07H 19/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007年5月9日

[11] 公开号 CN 1959384A

[22] 申请日 2005.11.1

[21] 申请号 200510048477.8

[71] 申请人 河南省生物工程技术研究中心

地址 450002 河南省郑州市金水区东风路5号

[72] 发明人 李智涛 王云龙 陈小科 李晨阳
李玉林

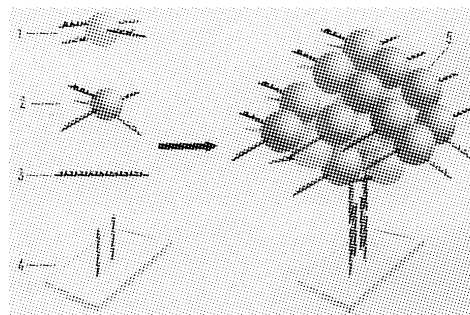
权利要求书2页 说明书11页 附图4页

[54] 发明名称

一种三维网格检测技术

[57] 摘要

本发明涉及一种三维网格检测技术，属于生物检测技术领域。该技术可在生物芯片、免疫检验和免疫组化、转膜杂交等方法中应用，检测目标核酸或目标蛋白。通过合成两种不互补的核苷酸序列，以及两种与之配对的核苷酸序列，分别以纳米级颗粒为核心形成网格组件。当两种网格组件处于同一体系中时，在满足其反应条件的情况下，其核苷酸序列将互补配对，形成三维网格，实现信号放大，可被肉眼识别。在检测目标核酸或目标蛋白时，需要在其中一种网格组件上加上杂交蛋白或杂交探针，配合固相化的捕获蛋白或捕获探针，以实现目标核酸或目标蛋白的特异性捕获。该技术灵敏度高，成本低廉，方便快捷。



1. 一种三维网格(2)检测技术,其特征是采用了两种网格组件(3)以形成三维网格。通过合成两种不互补的核苷酸序列,以及两种与之配对的核苷酸序列(4),对其末端进行修饰后(5),分别以纳米级颗粒(6)为核心形成网格组件。在检测目标蛋白或目标核酸时,需要在其中一种网格组件上加上杂交蛋白或杂交探针(7),配合固相化(8)的捕获蛋白(7)或捕获探针(7),以实现目标核酸或目标蛋白的特异性捕获。当两种网格组件处于同一体系(9)中时,在满足其反应条件的情况下,其核苷酸序列将互补配对,形成三维网格,实现信号放大,可被肉眼识别。这种检测技术可应用于多种生物检测的方法(10)中。
2. 根据权利要求1所述的一种三维网格检测技术,其特征在于,三维网格是立体的,在检测实验中形成。形成的时间,可以是在目标核酸或目标蛋白被捕获前,也可以是在目标核酸或目标蛋白被捕获后。
3. 根据权利要求1所述的一种三维网格检测技术,其特征在于,网格组件可以有两个或两个以上,检测时,不同的网格组件间通过互补配对的核苷酸序列杂交连接。
4. 根据权利要求1所述的一种三维网格检测技术,其特征在于,组成网格组件的核苷酸序列均为人工合成,组成同一个网格组件的核苷酸序列可以有两种或两种以上,它们之间是不互补的。设计了A序列、B序列、A'序列和B'序列。其中A序列与A'序列互补,但与B序列和B'序列不互补;B序列与B'序列互补,但与A序列和A'序列不互补。设计的序列为:
A序列: 5' -aca caa cca cac act cta ctc a-3' ;
B序列: 5' -tct ctt ctc ctc tca tca act c-3' ;
A'序列: 5' -tga gta gag tgt gtg gtt gtg t-3' ;
B'序列: 5' -gag ttg atg aga gga gaa gag a-3' 。
其中A序列与B序列用于组成一个网格组件,A'序列B'序列用于组成另一个网格组件。
5. 根据权利要求1所述的一种三维网格检测技术,其特征在于,所用的核苷酸序列,无论是应用于组件的核苷酸序列,还是应用于检测的核苷酸序列,均对其某一个末端进行修饰。应用于组件的核苷酸序列,无论是修饰3'端,还是修饰5'端,均采用烷巯基修饰,试剂可以是巯基丙烷、巯基己烷、巯基丁烷等。对核苷酸序列末端进行修饰的目的是使其利用修饰基团“站立”在纳米颗粒或固相支持物上,而不是整体“躺倒”在纳米颗粒或固相支持物上。应用于检测的核苷酸序列,选择在其3'末端,或5'末端加入10-50个碱基的臂,也可以不加入碱基臂。末端加入碱基臂的目的是避免可能存在的空间位阻。

6. 根据权利要求1所述的一种三维网格检测技术，其特征在于，纳米级颗粒可以是金、银等金属材料，也可以是硒、硅、碳、塑料等非金属材料，直径在1nm—100nm之间，在可见光区具有一定的色泽。
7. 根据权利要求1所述的一种三维网格检测技术，其特征在于，固相化的捕获探针和检测网格组件上的杂交探针与被检测的目标核酸之间存在互补配对关系，互补的位置不能重叠，但是相邻。固相化的捕获蛋白和检测网格组件上的杂交蛋白与被检测的目标蛋白之间存在免疫学配对关系，并且捕获蛋白与杂交蛋白间不能竞争目标蛋白的同一位点。
8. 根据权利要求1所述的一种三维网格检测技术，其特征在于，捕获探针的固相化和免疫学材料的固相化，是指将其与固相支持物的结合的处理过程，采用的固相支持物可以是玻璃片，也可以是硅片、塑料片、纤维素膜等其他材料。
9. 根据权利要求1所述的一种三维网格检测技术，其特征在于，检测实验应在同一体系中完成，这是一个共同进行反应的实验体系，这个体系包括液—液和固—液等状态，而在此前，各种试剂成分是彼此孤立的。
10. 根据权利要求1所述的一种三维网格检测技术，其特征在于，在实验中形成三维网格结构，可在生物芯片、免疫检验和免疫组化、转膜杂交等方法中应用，检测目标核酸或目标蛋白。

一种三维网格检测技术

技术领域

本发明涉及一种三维网格检测技术，该技术可在生物芯片、免疫检验和免疫组化、转膜杂交等方法中应用，检测目标核酸或目标蛋白，属于生物检测技术领域。

背景技术

为了诊断疾病、筛查新药、科学研究等目的，需要对目标核酸或目标蛋白进行测定分析。在目前的检测技术中，有的直接以标示物的强度或浓度显示所获得的结果（如生物芯片的荧光强度、放射免疫中的放射强度、免疫检验中的胶体金浓度等），有的则间接以其它方式显示所获得的结果（如免疫检验和免疫组化中的被酶催化转变的底物颜色等）。从实验手段来看，有的需要昂贵的设备（如生物芯片检测等），有的则基本不需要设备（如免疫胶体金检测等）。

所有的实验，检验结果的敏感性等指标与检验方法和检验成本有密切的关系，是一对客观存在的矛盾。一般来说，敏感性等指标要求越高的分析检验方法，需要的技术条件较高，仪器设备和试剂成本昂贵，步骤繁琐，耗时冗长；而检验成本低廉、检验方法简单的分析检验方法往往又存在敏感性不足等缺陷。

为了达到用低成本、方法简单的分析检验方法实现高指标的检验目的，许多人进行了积极的探索研究，包括各种新的标记技术、新材料的使用和新的实验方法等。

采用纳米金属（如金纳米颗粒）、彩色微球和染料标记微球等作为直接标示物的分析检验方法简单，反应时间短，成本较低，可以肉眼观察结果，已被许多实验采用，是目前主要的快速分析检验方法之一。但是，敏感性不足等缺陷限制了其应用。因此，许多研究由此出发，探索实现高敏感性等指标的目的，取得一定的进展。

以对纳米金作为标示物的研究为例：纳米级金颗粒具有稳定的化学性质，可标记特定的蛋白和核酸等生物材料，用于分析检验中的示踪技术已有较长的历史。在以前和目前的应用中，多采用胶体金作标示物。胶体金颗粒是单一分子，结构不固定，由于其分子表面在生理 pH 下带有正电荷，因此，无需特别处理就可以与带负电荷的生物材料形成离子结合。为了提高这一方法的敏感性，有的采用了渗滤富集技术，有的采用了层析富集技术，有的采用了金—银放大显色技术。近年来，发展了一种不具备吸附能力离散的纳米金颗粒作为生物检测中的信号报告分子，这种由不同数量的金原子通过卤化物离子形成的立体构型的大分子复合体，表面不带电荷，对其进行修饰后，可与特定的生物材料形

成共价结合，作为信号报告分子使用。1996年，Nature杂志发表了两篇将DNA作为连接分子使纳米金自组装成纳米结晶的报道；1997年，Zehbe报道了用纳米金作为信号报告分子的原位杂交技术，在结合银显影的情况下，对组织中核酸的检测灵敏度已达到1个拷贝。同年，Mirica等人利用纳米金在DNA片段作为组装分子的引导下可形成超分子结构的特点，建立了用巯基化寡核苷酸探针标记纳米金并检测特定多核苷酸序列的新方法，为特定DNA序列检测的研究和应用开辟了一个新领域，在DNA芯片乃至DNA传感器的制作方面都有广阔的应用前景。

但是，这些研究基本上还未达到理想指标，有的敏感性不够，有的信噪比过高，还有的技术问题还没有解决，或者过于复杂，尚未达到实际应用，等等。

发明内容

本发明的目的是提供一种三维网格检测技术，该技术可在生物芯片、免疫检验和免疫组化、转膜杂交等方法中应用，检测目标核酸或目标蛋白，敏感性高，成本低廉，方便快捷。

一种三维网格检测的技术，其技术方案是：合成两种不互补的核苷酸序列，以及两种与之配对的核苷酸序列，分别以纳米级颗粒为核心形成网格组件。当两种网格组件处于同一体系中时，在满足其反应条件的情况下，其核苷酸序列将互补配对，形成三维网格，实现信号放大，可被肉眼识别。在检测目标核酸或目标蛋白时，需要在其中一种网格组件上加上杂交蛋白或杂交探针，配合固相化的捕获蛋白或捕获探针，以实现目标核酸或目标蛋白的特异性捕获。

本发明是这样实现的：合成两种不互补的核苷酸序列，以纳米级颗粒为核心，形成基础网格组件；再合成两种与基础网格组件的核苷酸序列配对的核苷酸序列，与纳米级颗粒形成扩展网格组件。当两种网格组件处于同一体系中，并满足其反应条件的情况下，其核苷酸序列将互补配对，形成三维网格，实现信号放大，可用肉眼识别。

当需要检测核酸时，合成两条与目标核酸互补的核苷酸序列，称为捕获探针和杂交探针，捕获探针和杂交探针与目标核酸的互补位置不同，但是相邻。将捕获探针固相化，将杂交探针与基础网格组件交联，形成检测网格组件。实际检测时，先将待测标本加入预先已固定有捕获探针的固相支持物中，再顺序加入检测网格组件和扩展网格组件，待反应完成，洗涤后，即可被肉眼识别，有色斑者为阳性，无色斑者为阴性。

当需要检测蛋白时，应事先取得针对目标蛋白的免疫学材料，如果目标蛋白是抗原，应取得两种相应抗体；如果目标蛋白是抗体，应取得相应抗原，必要时还应取得相应抗抗体。检测抗原用的两种相应抗体，或者检测抗体用的相应抗原以及相应抗抗体，其中一种固相化，另一种与基础网格组件交联，形成

检测网格组件。实际检测时，先将待测标本加入预先已固定有抗体（或抗原）的固相支持物中，再顺序加入检测网格组件和扩展网格组件，待反应完成，洗涤后，即可被肉眼识别，有色斑者为阳性，无色斑者为阴性。

在本发明中，目标核酸或目标蛋白是指需要对其进行检测的核酸或蛋白质；组成网格组件的核苷酸序列是人工合成的不互补以及互补的核苷酸序列，其目的是在形成三维网格结构的组成、装配过程中，自身不发生结合，而与另一网格组件发生特异性结合；纳米级颗粒是指在可见光区具有一定色泽的纳米级金属和纳米级非金属，包括金、银、硒、硅、碳、塑料等材料；捕获探针和杂交探针是指与目标核酸互补的核苷酸序列；针对目标蛋白的免疫学材料，是与目标蛋白相对应的抗原或抗体；捕获探针的固相化和免疫学材料的固相化，是指将其与固相支持物的结合的处理过程，常用的固相支持物包括玻璃片、硅片、塑料片、纤维素膜等材料；同一体系是指共同进行反应的实验体系，这个体系包括液—液和固—液等状态；反应条件是指满足核苷酸序列发生互补结合的实验条件。

本发明中使用的组成网格组件的核苷酸序列均为人工合成，包括A序列、B序列、A'序列和B'序列。所使用的A序列与A'序列互补，但与B序列和B'序列不互补；B序列与B'序列互补，但与A序列和A'序列不互补。优选地，本发明中使用①A序列：5' -aca caa cca cac act cta ctc a-3'；②B序列：5' -tct ctt ctc ctc tca tca act c-3'；③A'序列：5' -tga gta gag tgt gtg gtt gtg t-3'；④B'序列：5' -gag ttg atg aga gga gaa gag a-3'。上述核苷酸序列的末端（3'端或5'端）均用巯基丙烷、巯基己烷、巯基丁烷等修饰，优选地，本发明中使用巯基丙烷。

本发明按以下步骤进行：

①人工合成组成网格组件的核苷酸序列，包括A序列、B序列、A'序列和B'序列，并对其末端进行修饰。将核苷酸序列末端进行修饰的目的，是使其末端与纳米级颗粒结合，“站立”在纳米颗粒上，而不是整体“躺”在纳米颗粒上。

采用巯基丙烷修饰3'端的方法是：

合成和修饰均在DNA合成仪上完成，3'端烷巯基化核苷酸序列采用1-巯基丙烷修饰的C3 S-S CPG固相合成柱，用标准的亚磷酰胺化学合成法合成，为了纯化，不要脱去DMT保护基团。合成结束后，将反应柱置55℃浓氨水中孵育16h，用量按每 μmol 合成物加入1ml浓氨水，以从反应柱上切割核苷酸序列，同时除去碱基上的保护基团。通过琥珀酰乙酯的作用可得到修饰有巯基丙烷的核苷酸序列和巯基丙烷连接臂的混合物，蒸发除去氨水后，采用反向HPLC进行纯化，最后在80%的乙酸中溶解30min除去DMT，测定浓度后备用。

采用巯基丙烷修饰5'端的方法是：

采用CPG固相支持柱，在DNA合成仪上合成设计的碱基序列后，取下反应

柱,在反应柱的两端分别固定一个注射器,其中一个注射器中灌注一定浓度的5' 巯基修饰磷酸亚酰胺的无水乙氰溶液和一定量标准“四唑激活剂”溶液的混合液,将两个注射器来回推压混合溶液约 10 min,最后用无水乙氰清洗反应柱,脱去所有的保护基团,并用反向 HPLC 进行纯化,测定浓度后备用。

②纳米级颗粒的制备:

采用的彩色微球等纳米级颗粒可以从市售材料中选取(如 15.0 μ m DIA 彩色微球,1 千万/ml,美国 E-Z Trac 公司)。自行制作时,现在运用较多的是由 Sutherland 发展,经 Natan 改良的化学合成法制作金纳米微粒。以下叙述采用柠檬酸三钠还原法的合成过程:

取 0.01% 氯金酸水溶液 100ml 在圆底烧瓶中剧烈搅拌,加热至微沸腾时,搅动下快速将 1% 柠檬酸三钠水溶液 0.7ml 加入溶液的漩涡处,金黄色的溶液在 2 分钟内变为紫红色,继续煮沸 10 分钟,移除加热器之后再搅拌 15 分钟。冷却后以重蒸水恢复至原体积,0.4 μ m 滤纸过滤,制备的金溶胶可见光区最高吸收峰在 535nm, $A_{1cm}/535=1.12$ 。由于这些纳米微粒均带有负电荷,相互间的斥力可使其稳定地悬浮于溶液中。

调整金离子与还原剂的比例可以获得不同粒径的纳米微粒。金离子比例愈高,得到的纳米微粒粒径愈大。

③当需要检测核酸时,人工合成两条与目标核酸互补的核苷酸序列,分别称为捕获探针和杂交探针,捕获探针和杂交探针在目标核酸上的互补位置不同,但是相邻。

④当需要检测蛋白时,应事先取得针对目标蛋白的免疫学材料,如果目标蛋白是抗原,应取得两种相应抗体;如果目标蛋白是抗体,应取得相应抗原,必要时还应取得相应的抗抗体。

⑤捕获探针和杂交探针的末端修饰:在合成捕获探针和杂交探针时,在其末端(3' 末端或者 5' 末端)加入 10-50 个碱基的臂,也可以不加入碱基臂,其目的是克服可能存在的空间位阻。

⑥扩展网格组件和检测网格组件的制备:

对合成的核苷酸序列的末端进行修饰后,以 A 序列和 B 序列为一组,A' 序列和 B' 序列为另一组,分别与纳米级颗粒反应,可制备扩展网格组件和检测网格组件。两组网格组件中,增加了杂交探针或针对目标蛋白的免疫学材料连接的称为检测网格组件,另一组则称为扩展网格组件。

以 3' 端烷巯基化核苷酸序列、末端修饰后杂交探针与金纳米颗粒形成检测网格组件的反应为例,叙述如下:

取末端修饰后杂交探针: 5' -aga acc aac aag aag atg agg cat ttt ttt ttt ttt ttt t-3', 以及 3' 端烷巯基化核苷酸序列 A: 5' -aca caa cca cac act cta ctc a -3'、序列 B: 5' -tct ctt ctc ctc tca tca act c-3' 共 3

OD (终浓度均为 1.5 μ M), 与 5ml 纳米金溶液混合, 孵育 16h 左右, 然后将混合溶液置 0.1mol/L NaCl, 10mM 磷酸盐缓冲液中, 保持 40 h 后, 1400 r/min 离心 30min。除去上清液, 剩余红色油状沉淀再用缓冲液清洗, 1400 r/min 离心 30min 后保存于 0.3mol/L NaCl, 10mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7) 中, 探针终浓度为 10 p mol/ μ l。

以 3' 端烷巯基化核苷酸序列、羊抗人 IgM 抗体与金纳米颗粒形成检测网格组件的反应为例, 叙述如下:

取纳米金溶液 10ml, 以 0.1Mol/L K_2CO_3 调整 pH 值至 9, 搅拌下加入羊抗人 IgM 抗体 100 μ g 左右, 调整终浓度至 10 μ g/ml。继续搅拌 10min, 加入 1% 聚乙二醇 (20KD) 至总溶液的 1/10。1400 r/min 离心 30 min。除去上清液, 剩余的红色油状沉淀用 PBS 缓冲液重悬至 5ml, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。将已经标上羊抗人 IgM 抗体的纳米金溶液 5ml 加入 3' 端烷巯基化核苷酸序列 A: 5' -aca caa cca cac act cta ctc a-3'、序列 B: 5' -tct ctt ctc ctc tca tca act c-3' 共 3 OD (终浓度均为 1.5 μ M), 混合, 孵育 16h 左右, 然后将混合溶液置 0.1mol/L NaCl, 10mM 磷酸盐缓冲液中, 保持 40 h 后, 1400 r/min 离心 30min。除去上清液, 剩余的红色油状沉淀再用缓冲液清洗, 1400 r/min 离心 30min 后保存于 0.3mol/L NaCl, 10mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7) 中, 探针终浓度为 10 p mol/ μ l。

以 3' 端烷巯基化核苷酸序列与金纳米颗粒形成扩展网格组件的反应为例, 叙述如下:

取 3' 端烷巯基化核苷酸序列 A' : 5' -tga gta gag tgt gtg gtt gtg t-3'、序列 B' : 5' -gag ttg atg aga gga gaa gag a-3' 共 3 OD (终浓度均为 2.0 μ M), 与 5ml 纳米金溶液混合, 孵育 16h 左右, 然后将混合溶液置 0.1mol/L NaCl, 10 mM 磷酸盐缓冲液中, 保持 40 h 后, 1400 r/min 离心 30min。除去上清液, 剩余的红色油状沉淀再用缓冲液清洗, 1400 r/min 离心 30min 后保存于 0.3mol/L NaCl, 10mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7) 中, 探针终浓度为 10 p mol/ μ l。

这一步骤利用偶联臂或硫原子与金颗粒之间的有很强作用力的特点, 取代金颗粒原来吸附的阴离子, 调整溶液的 pH 和离子强度后, 以离心方式纯化连接了核苷酸的金纳米颗粒。金纳米颗粒在溶液中的浓度的估算如下: 先以 TEM (transmission electron microscope) 测量粒径的平均大小, 假设金原子的堆积方式与单晶相同, 估算出每颗纳米微粒所含的金原子数目, 再使用 ICP-AES (inductively coupled plasma coupled with atomic emission spectroscopy) 测得溶液中金元素的浓度, 换算后可得纳米粒子的浓度。

⑦ 固相支持物和固相化: 固相支持物可以选用玻璃片、硅片、塑料片、纤维素膜等材料, 以玻璃片的醛基化为例, 说明其处理和固相化过程:

取载玻片, 用铬酸洗液浸泡过夜, 蒸馏水洗, 浸入 25% 氨水中过夜, Milli-Q 水洗。玻璃片浸入 5% 氨丙基三甲氧基硅烷 (Aldrich) 的 95% 乙醇溶液 (用冰醋

酸调节 pH 至 4.5) 中, 室温处理 20 分钟, 95%乙醇超声清洗, Milli-Q 水超声清洗, 160°C烘干 4 小时。将玻片浸入 5%戊二醛溶液中 50 分钟, Milli-Q 水超声清洗两次, 干燥后备用。

捕获探针的固相化: 取末端加入修饰基团的捕获探针, 以 15 μ M 的浓度溶解于 3 \times SSC 溶液中, 设定适当的点间距, 用 PixySys 5500 芯片制备仪将溶液喷到醛基化的玻片上, 室温放置过夜。使用前 0.2% SDS 和 Milli-Q 水各洗两次, 空气干燥后, 1% NaBH₄ 溶液还原 10min, 0.2% SDS 和 Milli-Q 水各洗一次, 空气干燥后用待用。

基因工程病毒分型抗原的固相化: 取基因工程病毒分型抗原, 用 0.5 \times SSC 溶液稀释至终浓度 1mg/ml, 设定适当的点间距, 用 PixySys 5500 芯片制备仪将溶液喷到醛基化的玻片上, 37°C孵育 2h, PBS-T(0.01mol/L pH7.2, 0.05% Tween 20) 洗 4 次。使用含有 10%小牛血清的 PBS(0.01mol/L pH7.2) 37°C封闭 1h, 双蒸水清洗两次, 空气干燥后待用。

⑧检测和结果判断

在所有的材料都准备好后, 可以进行检测工作。检测步骤是: 取已固相化捕获探针或针对目标蛋白的免疫学材料的固相支持物, 加入待测标本, 42°C孵育 15min, 0.01mol pH 7.4 PBS-T 洗涤 3 次, 顺序加入 5 \times SSC 和检测网格组件, 42°C孵育 5min, 再加入扩展网格组件, 42°C孵育 10min, 0.01mol pH 7.4 PBS-T 洗涤 3 次, 目测或镜下判断结果, 有色斑者为阳性, 无色斑者为阴性。

本发明的基本原理是: 首先在固相支持物上通过捕获探针或针对目标蛋白的免疫学材料捕获目标, 让同时携带有基础网格组件并与目标核酸或目标蛋白能够特异性结合的检测网格组件与目标核酸或目标蛋白结合, 形成类似“夹心”的结构, 再将扩展网格组件覆盖于其上, 检测网格组件与扩展网格组件的反复结合, 形成肉眼可见的三维网格。如果被检测标本不含有目标核酸或目标蛋白, 就不能形成类似“夹心”的结构, 无“根”的三维网格将通过洗涤除去, 没有颜色。相反, 如果被检测标本含有目标核酸或目标蛋白, 形成了类似“夹心”的结构, 三维网格就有“根”, 洗涤后, 仍然存在肉眼可见的目标。

本发明的积极效果:

本发明提供的三维网格检测技术除了具有一般胶体金标记检测的快速、简单的优点外, 除商品试剂外不需任何仪器设备, 可用肉眼观察结果等特点。检测灵敏度可达几个核酸拷贝或蛋白分子。由于网格组件可以方便地连接各种捕获探针或针对目标蛋白的免疫学材料, 因此可以适用于多种检测方法, 如生物芯片、免疫检验和免疫组化、转膜杂交等方法。由于网格组件可以方便地连接多种捕获探针或针对目标蛋白的免疫学材料, 在固相化过程中设定适当的点间距, 譬如 0.5 mm/个, 就可以对多个检测目标同时检测。这对于检测某些具有联检意义的检测目标具有很大的应用价值, 如国家规定对献血员的必检项目包括

HbsAg、抗 HCV 抗体、HIV I / II 病毒和抗体、梅毒抗体等，联合检测较为方便。

本发明与现有方法相比，具有以下优点：

1. 简便快捷：蛋白样品不需处理，核酸样品经过一般裂解、提取处理，无需标记和扩增等过程，耗时 30-40min；
2. 灵敏度高：灵敏度可达几个核酸拷贝或蛋白分子；
3. 特异性强：对于核酸检测，可以免除检测前的扩增，避免了扩增带来的产物污染问题，消除了可能存在的假阳性。
4. 信噪比好：显示的结果以“全”或“无”的形式出现；
5. 结果判断容易：直接读取放大的网格信号；
6. 适应面广：广泛适用于生物芯片、免疫检验和免疫组化、转膜杂交等多种检测方法，既可以检测蛋白（抗原/抗体）也可以检测核酸（DNA/RNA）；
7. 组合性好：根据需求可以对多个检测目标进行同时检测；
8. 对设备和检测技术要求低：不需昂贵的设备，普通实验室技术人员即可操作；
9. 成本低廉：试剂成本低。

以下面结合附图和实例详细解释本发明的实施。

附图说明

图 1. 在对目标核酸的检测中形成的三维网格结构（图解）

- | | |
|-------------|------------|
| 1 扩展网格组件 | 2 核酸检测网格组件 |
| 3 目标核酸 | 4 固相化捕获探针 |
| 5 形成的三维网格结构 | |

图 2. 扩展网格组件的形成（图解）

- | | |
|-------------------|-------------------|
| 6 纳米级颗粒 | 7 一末端烷巯基化核苷酸序列 A' |
| 8 一末端烷巯基化核苷酸序列 B' | 9 扩展网格组件 |

图 3. 核酸检测网格组件的形成（图解）

- | | |
|-------------------|-------------------|
| 10 一末端修饰后杂交探针 | 11 一末端烷巯基化核苷酸序列 A |
| 12 一末端烷巯基化核苷酸序列 B | 13 纳米级颗粒 |
| 14 核酸检测网格组件 | |

图 4. 固相化捕获探针的形成（图解）

- | | |
|------------|----------|
| 15 捕获探针 | 16 固相支持物 |
| 17 固相化捕获探针 | |

图 5. 在对目标蛋白的检测中形成的三维网格结构（图解）

- | | |
|--------------|--------------|
| 18 扩展网格组件 | 19 蛋白检测网格组件 |
| 20 目标蛋白 | 21 固相化捕获蛋白 2 |
| 22 形成的三维网格结构 | |

图 6. 蛋白检测网络组件的形成 (图解)

- | | |
|-------------------|-------------------|
| 23 杂交蛋白 | 24 一末端烷巯基化核苷酸序列 A |
| 25 一末端烷巯基化核苷酸序列 B | 26 纳米级颗粒 |
| 27 蛋白检测网络组件 | |

图 7. 固相化捕获蛋白 2 的形成 (图解)

- | | |
|--------------|----------|
| 28 捕获蛋白 | 29 固相支持物 |
| 30 固相化捕获蛋白 2 | |

实施例一 乙型肝炎病毒基因分型

1. 合成组成网络组件的核苷酸序列

人工合成组成网络组件的核苷酸序列, 包括 A 序列 (5' -aca caa cca cac act cta ctc a-3')、B 序列 (5' -tct ctt ctc ctc tca tca act c-3')、A' 序列 (5' - tga gta gag tgt gtg gtt gtg t-3') 和 B' 序列 (5' - gag ttg atg aga gga gaa gag a-3'), 并对其 3' 末端进行巯基丙烷修饰, 方法是:

合成和修饰均在 DNA 合成仪上完成, 3' 端烷巯基化核苷酸序列采用 1-巯基丙烷修饰的 C3 S-S CPG 固相合成柱, 用标准的亚磷酰胺化学合成法合成, 为了纯化, 不要脱去 DMT 保护基团。合成结束后, 将反应柱置 55°C 浓氨水中孵育 16h, 用量按每 μmol 合成物加入 1ml 浓氨水, 以从反应柱上切割核苷酸序列, 同时除去碱基上的保护基团。通过琥珀酰乙酯的作用可得到修饰有巯基丙烷的核苷酸序列和巯基丙烷连接臂的混合物, 蒸发除去氨水后, 采用反向 HPLC 进行纯化, 最后在 80% 的乙酸中溶解 30min 除去 DMT, 测定浓度后备用。

2. 合成杂交探针

设计的杂交探针序列为: 5' - aga acc aac aag aag atg agg cat ttt ttt ttt ttt ttt t-3' , 其 3' 端烷巯基化修饰。方法是:

合成和修饰均在 DNA 合成仪上完成, 3' 端烷巯基化核苷酸序列采用 1-巯基丙烷修饰的 C3 S-S CPG 固相合成柱, 用标准的亚磷酰胺化学合成法合成, 为了纯化, 不要脱去 DMT 保护基团。合成结束后, 将反应柱置 55°C 浓氨水中孵育 16h, 用量按每 μmol 合成物加入 1ml 浓氨水, 以从反应柱上切割核苷酸序列, 同时除去碱基上的保护基团。通过琥珀酰乙酯的作用可得到修饰有巯基丙烷的核苷酸序列和巯基丙烷连接臂的混合物, 蒸发除去氨水后, 采用反向 HPLC 进行纯化, 最后在 80% 的乙酸中溶解 30min 除去 DMT, 测定浓度后备用。

3. 纳米金的制备 (柠檬酸三钠还原法)

取 0.01% 氯金酸水溶液 100ml 加热至沸, 搅动下准确加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 0.7ml, 金黄色的氯金酸水溶液在 2 分钟内变为紫红色, 继续煮沸 10 分钟, 移除加热器之后再搅拌 15 分钟。冷却后以重蒸水恢复至原体积, 0.4 μm 滤纸过滤, 如此制备的金溶胶其可见光区最高吸收峰在 535nm, $A_{1\text{cm}/535}=1.12$ 。

4. 检测网络组件的制备

取 3' 端烷巯基化修饰杂交探针, 以及 3' 端烷巯基化核苷酸序列 A 和序列 B 共 3 OD (终浓度均为 1.5 μ M), 与 5ml 纳米金溶液混合, 孵育 16h 左右, 然后将混合溶液置 0.1mol/L NaCl, 10mM 磷酸盐缓冲液中, 保持 40 h 后, 1400 r/min 离心 30min。除去上清液, 剩余红色油状沉淀再用缓冲液清洗, 1400 r/min 离心 30min 后保存于 0.3mol/L NaCl, 10mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7) 中, 探针终浓度为 10 pmol/ μ l。

5. 扩展网络组件的制备

取 3' 端烷巯基化核苷酸序列 A' 和序列 B' 共 3 OD (终浓度均为 2.0 μ M), 与 5ml 纳米金溶液混合, 孵育 16h 左右, 然后将混合溶液置 0.1mol/L NaCl, 10 mM 磷酸盐缓冲液中, 保持 40 h 后, 1400 r/min 离心 30min。除去上清液, 剩余的红色油状沉淀再用缓冲液清洗, 1400 r/min 离心 30min 后保存于 0.3mol/L NaCl, 10mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7) 中, 探针终浓度为 10 pmol/ μ l。

6. 捕获探针的设计和合成

乙肝病毒各型捕获探针的设计:

A: 5' -acc act ggc cag cag cca act ttt ttt ttt ttt ttt -3'

B: 5' -aac tgg ccg gac gcc (c/a)ac aag ttt ttt ttt ttt ttt -3'

C: 5' -tcc tac ctg att tgc ctc tgg cct ttt ttt ttt ttt ttt -3'

D: 5' -tcc caa caa gga cac ctg gcc agt ttt ttt ttt ttt ttt -3'

E: 5' -acc aca atc cca aca aag acc act gtt ttt ttt ttt ttt tt-3'

G: 5' -acc cgg gtc cat agg ctc caa ctc ttt ttt ttt ttt ttt tt-3'

F: 5' -tcc agc agt ccc gac tgg gac tct ttt ttt ttt ttt ttt t-3'

ttt ttt ttt ttt 部分为偶联臂, 3' 端连接上氨基。

探针的合成:

用 DNA 合成仪自动合成, 3' 端引入相应的氨基修饰基团, 探针用反向 HPLC 纯化后, 测定浓度, 备用。

7. 醛基化玻片的制备

取载玻片, 用铬酸洗液浸泡过夜, 蒸馏水洗, 浸入 25% 氨水中过夜, Milli-Q 水洗。载玻片浸入 5% 氨丙基三甲氧基硅烷 (Aldrich) 的 95% 乙醇溶液 (用冰醋酸调节 pH 至 4.5) 中, 室温处理 20 分钟, 95% 乙醇超声清洗, Milli-Q 水超声清洗, 160 $^{\circ}$ C 烘干 4 小时。将玻片浸入 5% 戊二醛溶液中 50 分钟, Milli-Q 水超声清洗两次, 干燥后备用。

8. 点样

乙肝病毒各型捕获探针均以 15 μ M 的浓度溶解在 3 \times SSC 溶液中, 用 PixySys5500 芯片制备仪将捕获探针喷到醛基化的玻片上, 点间距为 0.5mm。点样完毕后, 室温放置过夜。使用前 0.2% SDS 和清水各洗两次, 空气干燥后 1% NaBH₄

溶液还原 10min, 0.2%SDS 洗一次, 水洗一次, 空气干燥后用待用。

9. 杂交检测

按常规的水饱和酚/氯仿/异戊醇法提取样本核酸。适量水复溶后, 取 12ul 样本 DNA/RNA 与等量的 0.1N 氢氧化钠溶液混合, 再与 100ul 杂交缓冲液 (5×SSC) 混合后, 与已固相化乙肝病毒各型捕获探针的载玻片在 42℃ 杂交 15min 后, 分别用 1×SSC、0.2%SDS, 0.2×SSC, 0.1×SSC 清洗, 甩干。加入 100ul 杂交缓冲液 (5×SSC) 和检测网格组件 5ul 在 42℃ 杂交 5min, 再加入扩展网格组件 5ul 在 42℃ 孵育 10min, 用 0.01mol pH 7.4 PBS-T 洗涤 3 次, 目测或镜下判断结果, 有色斑者为阳性, 无色斑者为阴性。

实施例二 柯萨奇 B 组病毒分型蛋白芯片

1. 合成组成网格组件的核苷酸序列

人工合成组成网格组件的核苷酸序列, 包括 A 序列 (5' -aca caa cca cac act cta ctc a-3')、B 序列 (5' -tct ctt ctc ctc tca tca act c-3')、A' 序列 (5' - tga gta gag tgt gtg gtt gtg t-3') 和 B' 序列 (5' - gag ttg atg aga gga gaa gag a-3'), 并对其 3' 末端进行巯基丙烷修饰, 方法是:

合成和修饰均在 DNA 合成仪上完成, 3' 端烷巯基化核苷酸序列采用 1-巯基丙烷修饰的 C3 S-S CPG 固相合成柱, 用标准的亚磷酰胺化学合成法合成, 为了纯化, 不要脱去 DMT 保护基团。合成结束后, 将反应柱置 55℃ 浓氨水中孵育 16h, 用量按每 μmol 合成物加入 1ml 浓氨水, 以从反应柱上切割核苷酸序列, 同时除去碱基上的保护基团。通过琥珀酰乙酯的作用可得到修饰有巯基丙烷的核苷酸序列和巯基丙烷连接臂的混合物, 蒸发除去氨水后, 采用反向 HPLC 进行纯化, 最后在 80% 的乙酸中溶解 30min 除去 DMT, 测定浓度后备用。

2. 纳米金的制备(柠檬酸三钠还原法)

取 0.01% 氯金酸水溶液 100ml 加热至沸, 搅动下准确加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 0.7ml, 金黄色的氯金酸水溶液在 2 分钟内变为紫红色, 继续煮沸 10 分钟, 移除加热器之后再搅拌 15 分钟。冷却后以重蒸水恢复至原体积, 0.4 μm 滤纸过滤, 如此制备的金溶胶其可见光区最高吸收峰在 535nm, $A_{1\text{cm}}/535=1.12$ 。

3. 检测网格组件的制备

取纳米金溶液 10ml, 以 0.1mol/L K_2CO_3 调整 pH 值至 9, 搅拌下加入成品羊抗人 IgM 抗体 100ug 左右, 调整终浓度至 10ug/ml。继续搅拌 10min, 加入 1% 聚乙二醇 (20KD) 至总溶液的 1/10 (V/V)。1400 r/min 离心 30 min。除去上清液, 剩余的红色油状沉淀用 PBS 缓冲液重悬至 5ml, 4℃ 保存备用。将已经标上羊抗人 IgM 抗体的纳米金溶液 5ml 加入 3' 端烷巯基化核苷酸序列 Ah 和序列 B 共 3 OD (终浓度均为 1.5uM), 混合, 孵育 16h 左右, 然后将混合溶液置 0.1mol/L NaCl, 10mM 磷酸盐缓冲液中, 保持 40 h 后, 1400 r/min 离心 30min。除去

上清液，剩余的红色油状沉淀再用缓冲液清洗，1400 r/min 离心后保存于 0.3mol/L NaCl, 10mM 磷酸盐缓冲液(pH 7)中，探针终浓度为 10 p mol/ μ l。

4. 扩展网格组件的制备

取 3' 端烷巯基化核苷酸序列 A' 和序列 B' 共 3 OD (终浓度均为 2.0uM)，与 5ml 纳米金溶液混合，孵育 16h 左右，然后将混合溶液置 0.1mol/L NaCl, 10 mM 磷酸盐缓冲液中，保持 40 h 后, 1400 r/min 离心 30min。除去上清液，剩余的红色油状沉淀再用缓冲液清洗，1400 r/min 离心 30min 后保存于 0.3mol/L NaCl, 10mM 磷酸盐缓冲液(pH 7)中，探针终浓度为 10 p mol/ μ l。

5. 分型抗原制备

以基因工程方法制得的柯萨奇 B 组病毒 1-6 型 VP1 蛋白作为分型抗原。

6. 醛基化玻片的制备

取载玻片，用铬酸洗液浸泡过夜，蒸馏水洗，浸入 25%氨水中过夜，Milli-Q 水洗。玻片浸入 5%氨丙基三甲氧基硅烷(Aldrich)的 95%乙醇溶液（用冰醋酸调节 pH 至 4.5）中，室温处理 20 分钟，95%乙醇超声清洗，Milli-Q 水超声清洗，160℃烘干 4 小时。将玻片浸入 5%戊二醛溶液中 50 分钟，Milli-Q 水超声清洗两次，干燥后备用。

7. 点样

将 1-6 型 VP1 蛋白稀释到终浓度为 1mg/ml，用 PixySys5500 芯片制备仪将其喷到醛基化的玻片上，点间距为 0.5mm。点样完毕后，37℃孵育 2h，PBS-T(0.01mol/L pH 7.2, 0.05% Tween 20) 洗 4 次。用含有 10%小牛血清的 PBS(0.01mol/L pH7.2) 37℃封闭 1h。双蒸水清洗两次，干燥后待用。

8. 杂交检测

取 50ul 待测血清，与等量的 PBS (0.01mol/L pH7.2) 混合，加入至已固相化 1-6 型 VP1 蛋白的载玻片上，37℃孵育 30min 后，分别用 1×SSC、0.2%SDS, 0.2×SSC, 0.1×SSC 清洗，甩干。加入 100ul 杂交缓冲液 (5×SSC) 和检测网格组件 5ul 在 42℃杂交 5min，再加入扩展网格组件 5ul，42℃孵育 10min，用 0.01mol pH 7.4 PBS-T 洗涤 3 次，目测或镜下判断结果，有色斑者为阳性，无色斑者为阴性。

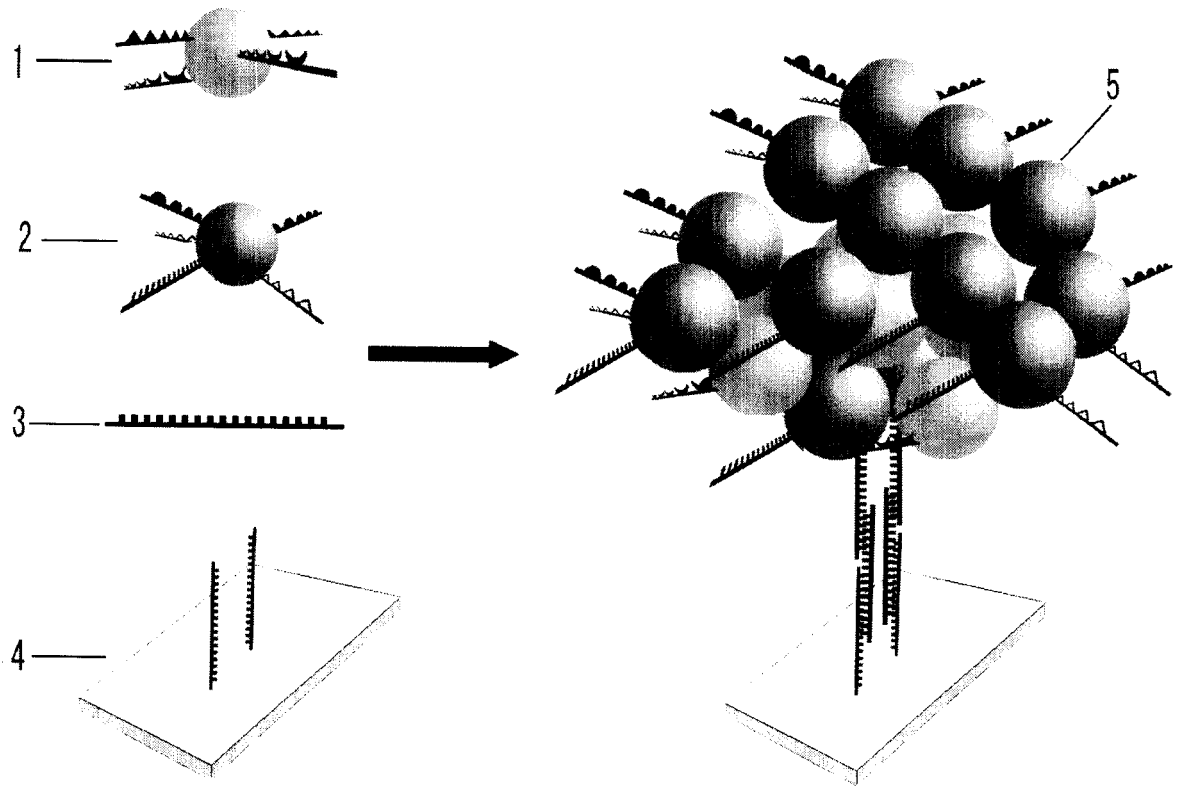


图 1.

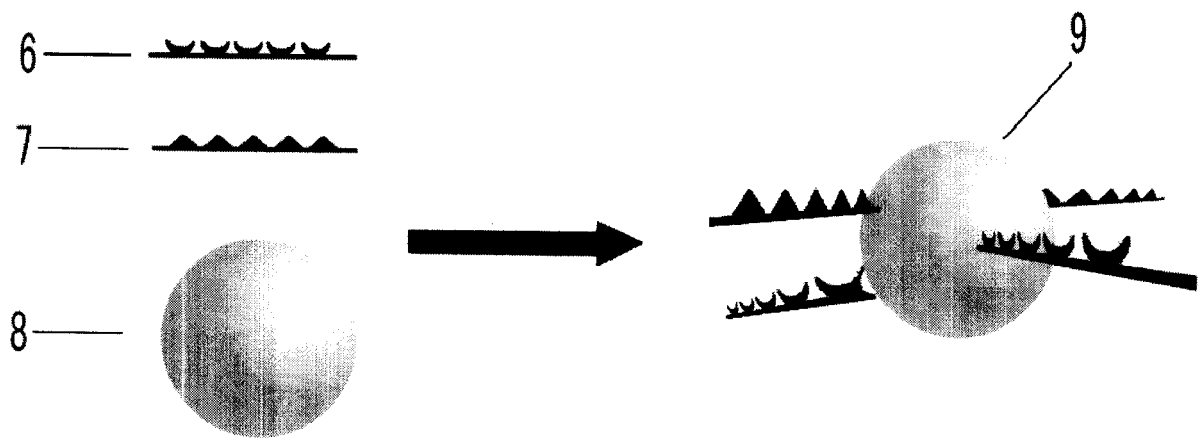


图 2.

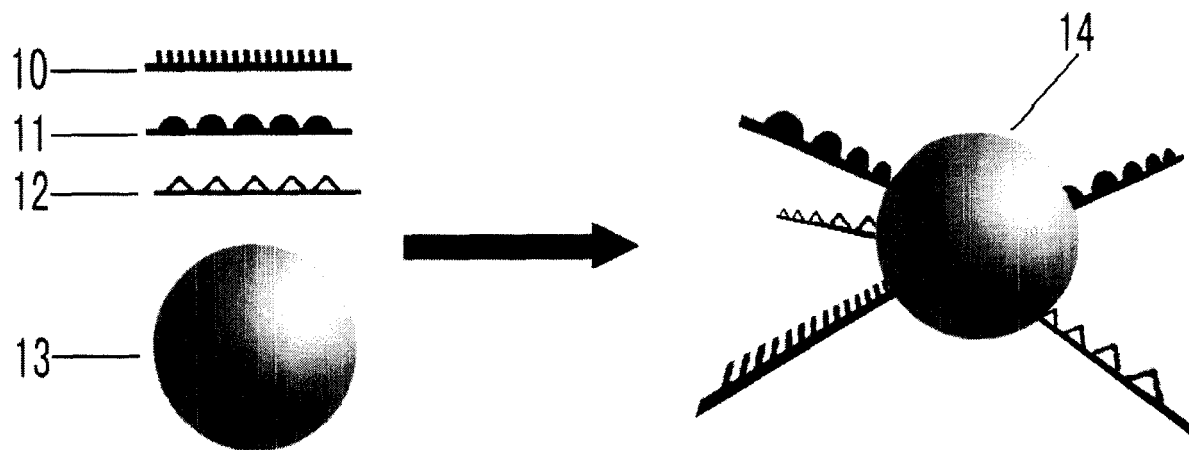


图 3.

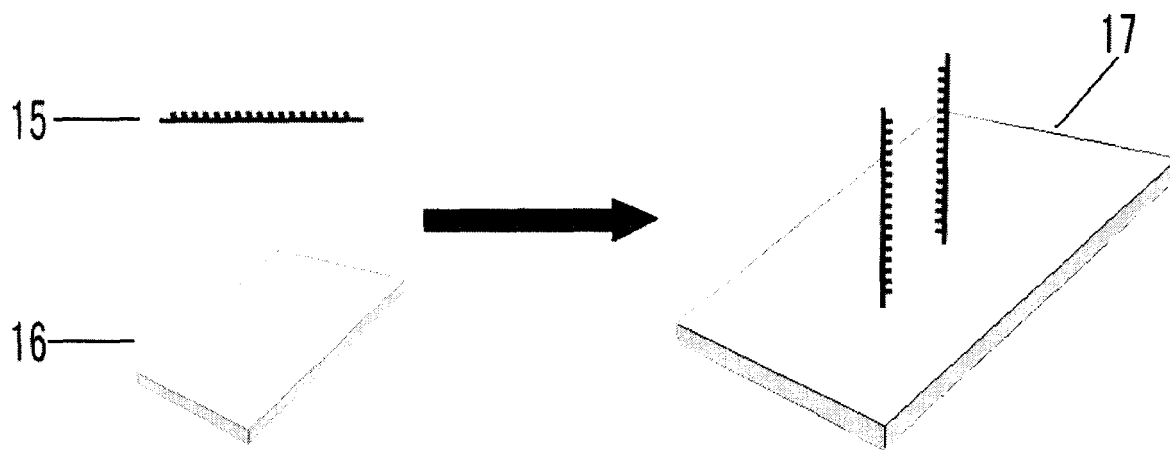


图 4.

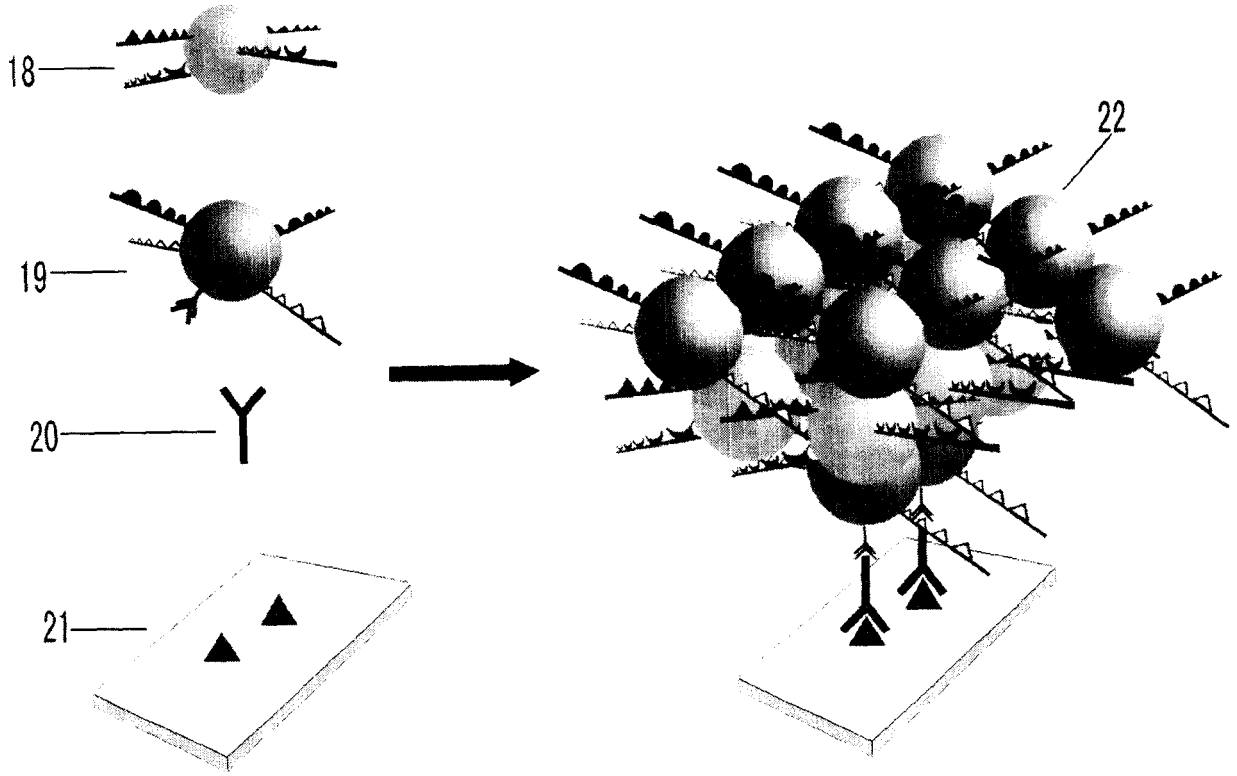


图 5.

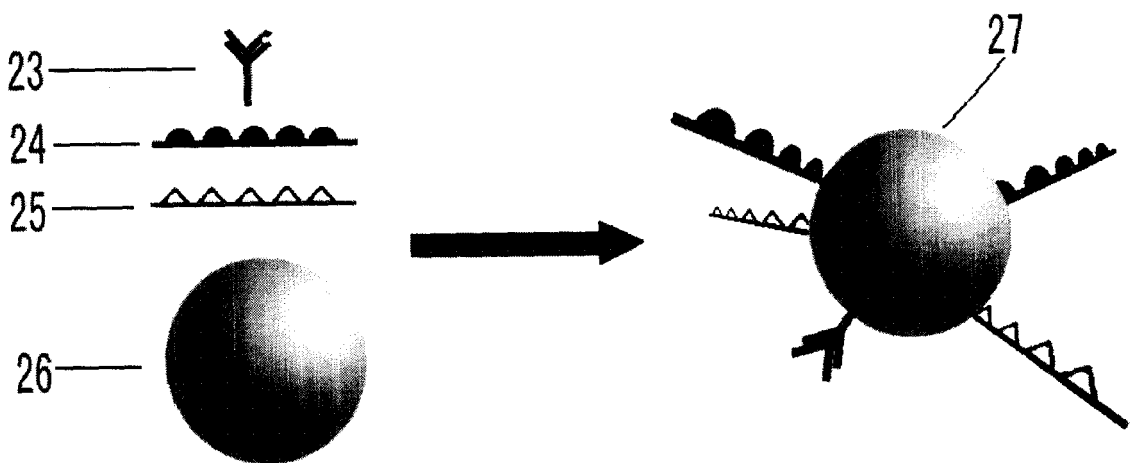


图 6.

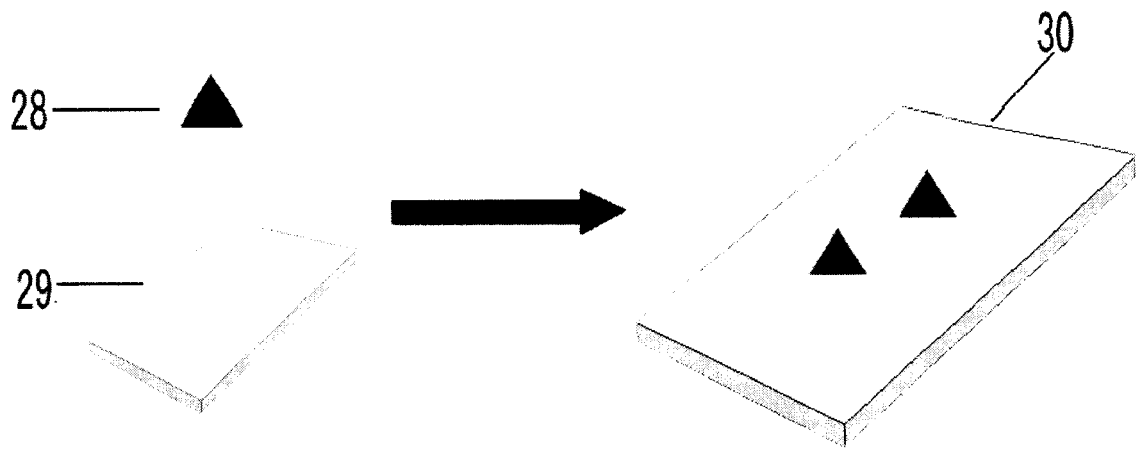


图 7.

专利名称(译)	一种三维网格检测技术		
公开(公告)号	CN1959384A	公开(公告)日	2007-05-09
申请号	CN200510048477.8	申请日	2005-11-01
[标]申请(专利权)人(译)	河南省生物工程技术研究中心		
申请(专利权)人(译)	河南省生物工程技术研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	河南省生物工程技术研究中心		
[标]发明人	李智涛 王云龙 陈小科 李晨阳 李玉林		
发明人	李智涛 王云龙 陈小科 李晨阳 李玉林		
IPC分类号	G01N21/78 C12Q1/68 G01N33/53 C07H19/00		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种三维网格检测技术，属于生物检测技术领域。该技术可在生物芯片、免疫检验和免疫组化、转膜杂交等方法中应用，检测目标核酸或目标蛋白。通过合成两种不互补的核苷酸序列，以及两种与之配对的核苷酸序列，分别以纳米级颗粒为核心形成网格组件。当两种网格组件处于同一体系中时，在满足其反应条件的情况下，其核苷酸序列将互补配对，形成三维网格，实现信号放大，可被肉眼识别。在检测目标核酸或目标蛋白时，需要在其中一种网格组件上加上杂交蛋白或杂交探针，配合固相化的捕获蛋白或捕获探针，以实现目标核酸或目标蛋白的特异性捕获。该技术敏感性高，成本低廉，方便快捷。

