

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810243016. X

[43] 公开日 2009 年 8 月 12 日

[11] 公开号 CN 101503734A

[22] 申请日 2008.11.27

[21] 申请号 200810243016. X

[71] 申请人 苏州纳米技术与纳米仿生研究所

地址 215125 江苏省苏州市工业园区独墅湖
高教区若水路 398 号

[72] 发明人 李 炯 杜兴利

[74] 专利代理机构 南京苏科专利代理有限责任公
司

代理人 陈忠辉

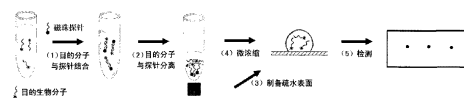
权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 1 页

[54] 发明名称

生物分子高灵敏度检测方法

[57] 摘要

本发明提供一种生物分子高灵敏度检测方法，首先使目的生物分子与磁珠探针结合，实现目的生物分子的初步富集，然后选择 DNA/RNA 变性溶液或免疫分离溶液，使目的生物分子与磁珠探针分离，再将目的生物分子溶液滴于疏水表面上，通过微浓缩作用，使目的生物分子液滴自然蒸发形成直径为 50 ~ 500 μm 的斑点，使目标分子的最终浓度较初始浓度提高 $10^3 \sim 10^5$ 倍，用荧光显微镜或芯片扫描仪对斑点进行灵敏度检测，显著提高检测灵敏度。该方法不仅适用于 DNA、RNA 等核酸分子的检测，而且适用于抗原 - 抗体免疫检测及酶 - 底物反应等相关检测，操作简便，易于推广应用。



1. 生物分子高灵敏度检测方法，其特征在于：首先使目的生物分子与磁珠探针结合，实现目的生物分子的初步富集，然后选择 DNA/RNA 变性溶液或免疫分离溶液，使目的生物分子与磁珠探针分离，再将目的生物分子溶液滴于疏水表面上，通过微浓缩作用，使目的生物分子液滴自然蒸发形成直径为 50~500 μm 的斑点，用荧光显微镜或芯片扫描仪对斑点进行检测，具体包括以下步骤——

①先使磁珠与探针生物分子结合，形成磁珠探针；将一端共价结合有荧光分子的生物分子溶液与磁珠探针混合，使目的生物分子与磁珠探针结合；

②分离磁珠，梯度洗涤，磁分离，加 DNA/RNA 变性溶液或免疫分离溶液使目的生物分子与磁珠探针分离；

③用磁分离器处理步骤 2) 得到的目的生物分子溶液，取上清液 1~10 μL 滴于疏水表面上进行浓缩，使液滴自然蒸发，蒸干后浓缩斑点直径在 50~500 μm 之间；

④采用荧光显微镜或芯片扫描仪对浓缩斑点进行检测。

2. 根据权利要求 1 所述的生物分子高灵敏度检测方法，其特征在于：所述磁珠探针是指通过 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐、戊二醛、二硫键或链霉亲和素-生物素将探针生物分子与磁珠共价结合，形成可与目的生物分子结合的磁珠探针；所述磁珠颗粒直径在 0.5~10 μm ，磁珠表面有羧基、氨基、羟基、巯基、甲苯磺酰基、链霉亲和素或生物素包被。

3. 根据权利要求 1 所述的生物分子高灵敏度检测方法，其特征在于：所述疏水表面是指经十七氟癸基三甲氧基硅烷、十八烷基三甲氧基硅烷、碳氟聚合物或聚四氟乙烯修饰的玻片、硅片、石英或聚合物膜。

生物分子高灵敏度检测方法

技术领域

本发明涉及一种生物分子高灵敏度检测方法，属于生物分子检测技术领域。

背景技术

作为生命活动的基本分子和遗传信息的载体，生物分子的检测一直是人们关注的重要课题之一，如何实现生物分子简单、快速、高灵敏度和特异性检测，对于疾病的诊断与治疗、环境监测、公共安全甚至反恐等都具有非常重要的意义。

就核酸分子而言，按其检测原理一般可以分为两类：一类是基于聚合酶链式反应（PCR）的各种指数扩增技术；另一类则是基于核酸分子杂交互补原理，通过杂交反应固定靶分子进行检测。PCR 技术能对靶序列进行扩增，提高检测灵敏度，但由于酶的储存运输要求严格，并且通常需要专业人员操作，操作繁琐，耗时较长，价格相对昂贵，自动化存在困难；如果采用杂交的方法，由于对靶序列没有前期的扩增，相对的检测灵敏度远不如 PCR 的检测方法，但操作比较简单，易于满足复杂场地的检测需要。而蛋白质分子与核酸分子不同，它不能通过扩增技术使目的蛋白分子数目增加，只能采用酶联免疫吸附法（ELISA）等方法直接测定，因此，检测灵敏度受到极大限制，且检测过程繁琐，检测时间较长。

磁性高分子微球（磁珠）是指将无机磁性粒子与有机高分子材料结合形成的一种复合微球，是一种新型的功能高分子材料。具有许多优良的特性，如粒径小，表面积大，易于吸附；具有顺磁性，无外加磁场时在溶液

中分散均匀稳定，加磁场则可简单快速分离；具有高分子微球的特性，可通过共聚、表面改性，赋予其表面多种反应性功能基团（ $-\text{NH}_2$ ， $-\text{OH}$ ， $-\text{COOH}$ ， $-\text{SH}$ 等），具有良好的生物相容性。因此，磁性高分子微球在生物大分子分离纯化、细胞分选、固定化酶、靶向药物、免疫测定等生物学领域有着广泛的应用前景。

微浓缩技术是使液滴在一疏水表面自然蒸发，通过液滴收缩作用，提高液滴中溶质分子检测灵敏度的方法。Nordhoff 等（*Ana Chem*, 2000, 72, 3436-3442）通过微加工技术在疏水性聚四氟乙烯表面制备直径 200 μm 、间隔 2.25 mm 的纳米金亲水阵列，然后将待测样品溶液滴在表面上，随着溶剂的蒸发，溶质生物分子将自动浓缩于亲水性纳米金位点，形成直径为 200 μm 的液斑，用免疫沉淀及基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-MS）进行检测，可显著提高检测灵敏度，对于 MALDI-MS 而言，一般情况下，对 80 bp 的 DNA 分子，其检测灵敏度约为 50 fM，而经过微浓缩后其检测灵敏度可提高到 5 fM 左右。

发明内容

本发明的目的是克服现有技术存在的不足，提供一种生物分子高灵敏度检测方法，旨在有效提高检测的灵敏度。

本发明的目的通过以下技术方案来实现：

生物分子高灵敏度检测方法，特点是：首先使目的生物分子与磁珠探针结合，实现目的生物分子的初步富集，然后选择能够使双链 DNA/RNA 变性分离的 DNA/RNA 变性溶液或使抗原-抗体分离的免疫分离溶液，使目的生物分子与磁珠探针分离，再将目的生物分子溶液滴于疏水表面上，通过微浓缩作用，使目的生物分子液滴自然蒸发形成直径为 50~500 μm 的斑点，使目标分子的最终浓度较初始浓度提高 $10^3\sim 10^5$ 倍，用荧光显微镜或芯片扫描仪对斑点进行灵敏度检测，具体包括以下步骤——

①先使磁珠与探针生物分子结合，形成磁珠探针；将一端共价结合有荧光分子的生物分子溶液与磁珠探针混合，使目的生物分子与磁珠探针结合；

②分离磁珠，梯度洗涤，磁分离，加DNA/RNA变性溶液或免疫分离溶液使目的生物分子与磁珠探针分离；

③用磁分离器处理步骤②得到的目的生物分子溶液，取上清液1~10 μ L滴于疏水表面上进行浓缩，使液滴自然蒸发，蒸干后浓缩斑点直径在50~500 μ m之间；

④采用荧光显微镜或芯片扫描仪对浓缩斑点进行检测。

进一步地，上述的生物分子高灵敏度检测方法，所述磁珠探针是指通过1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐、戊二醛、二硫键或链霉亲和素-生物素将探针生物分子与磁珠共价结合，形成可与目的生物分子结合的磁珠探针；所述磁珠颗粒直径在0.5~10 μ m，磁珠表面有羧基、氨基、羟基、巯基、甲苯磺酰基、链霉亲和素或生物素包被。

更进一步地，上述的生物分子高灵敏度检测方法，所述疏水表面是指经十七氟癸基三甲氧基硅烷、十八烷基三甲氧基硅烷、碳氟聚合物或聚四氟乙烯修饰的玻片、硅片、石英或聚合物膜。

本发明技术方案突出的实质性特点和显著的进步主要体现在：

(1)本发明通过磁珠富集和微浓缩效应使检测灵敏度提高到1.6~160aM（而通常情况下荧光分析的检测灵敏度为1~10 fM），大大提高了检测灵敏度；

(2)适用范围广，不仅适用于DNA、RNA等核酸分子的检测，而且还适用于抗原-抗体免疫检测及酶-底物反应等相关检测；

(3)磁珠探针和疏水表面制备简单，易于存储，且可批量制备，使检测成本显著降低；检测迅速，整个检测过程可在1小时内完成；

(4)该检测方法简单易行，操作简便，特异性和灵敏度高，且易于自动

化，应用前景极为看好。

附图说明

下面结合附图对本发明技术方案作进一步说明：

图 1：本发明的流程示意图。

具体实施方式

本发明提供一种用于提高生物分子（DNA、RNA、酶、抗原及抗体等）检测灵敏度的方法，首先使磁珠与探针生物分子（单链 DNA、酶、抗原或抗体等）结合，形成磁珠探针，再与溶液中标记有荧光基团的目的生物分子进行杂交，利用磁珠实现目的分子的初步富集；然后通过 DNA/RNA 变性溶液或免疫分离溶液使磁珠探针与目的分子分离，再将目的分子溶液滴于疏水表面上，通过微浓缩作用，目的生物分子溶液蒸发形成直径 50~500 μm 的斑点，使目标分子的最终浓度较初始浓度提高 $10^3\sim 10^5$ 倍，用荧光显微镜或芯片扫描仪对斑点进行检测，显著提高检测灵敏度。

具体的工艺过程是：①先通过 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐（EDC）、戊二醛、二硫键或链霉亲和素-生物素等将探针生物分子与磁珠共价结合，形成可与目的生物分子特异结合的磁珠探针；磁珠颗粒直径在 0.5~1.5 μm ，磁珠表面有羧基、氨基、羟基、巯基、链霉亲和素或生物素等包被；将一端共价结合有荧光分子的生物分子溶液与磁珠探针混合，使目的生物分子与磁珠探针结合；②分离磁珠，梯度洗涤，应尽可能除去与磁珠探针不能结合的生物分子，并减少磁珠探针与目的生物分子发生分离，以提高检测的特异性；为保证随后的微浓缩过程浓缩斑点足够小，选择适宜浓度的 DNA、RNA 变性溶液或免疫分离溶液使目的生物分子与磁珠探针分离；③用磁分离器处理上述得到的目的生物分子溶液，取经磁分离器处理的含目的生物分子上清液 1~10 μL 滴于疏水表面上进行浓缩，疏水表面是指经十七氟癸基三甲氧基硅烷（FAS）、十八烷基三甲氧基硅烷、

碳氟聚合物 (FCP) 或聚四氟乙烯 (PTFE) 等修饰的玻片、硅片、石英或聚合物膜等; 继而使液滴自然蒸发, 蒸干后浓缩斑点直径在 50~500 μm 之间; ④采用荧光显微镜或芯片扫描仪对浓缩斑点进行检测。

实施例 1:

如图 1 所示, 微浓缩技术用于 DNA 分子高灵敏度检测:

1) 磁珠探针的制备, 将待测溶液与磁珠探针混合, 使目的 DNA 分子与磁珠探针结合;

取 50 μL 的羧基修饰的磁珠 (直径 0.5 μm , 10 mg/mL) 置于微量离心管中, 用磁分离器处理 5 分钟, 弃去上清液, 再用 100 μL PBS 缓冲液 (pH 7.0) 清洗 3 次; 取 1 OD 的探针 DNA (5'-NH₂-TTT TTT ATC CTT ATC AAT ATT TAA CAA TAA TCC CTC), 用 150 μL PBS 缓冲液 (pH 7.0) 溶解, 制成 20 μM 的贮存液, 取贮存液 45 μL 加入含磁珠的微量离心管中, 室温下孵化 30 分钟; 精密称取 19.2 mg 的 EDC, 用 100 μL 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 缓冲液 (pH 7.0) 溶解, 制成含 1 M EDC 的 PBS 缓冲液; 取 30 μL EDC 溶液加入含磁珠和探针 DNA 的溶液中, 混合均匀, 室温反应 2 小时; 用磁分离器处理已捕获探针 DNA 的磁珠, 弃去反应液, 用 50 μL PBS 缓冲液 (pH 7.0) 清洗磁珠 3 次; 再用 50 μL 的缓冲液 A (含 0.5M NaCl 的 20mM Tris-HCl 缓冲液 pH 8.0) 清洗磁珠 2 次, 再用 1 mL 缓冲液 A 悬浮磁珠。

取 1 OD 的目的 DNA (5'-FAM-GAG GGA TTA TTG TTA AAT ATT GAT AAG GAT), 用缓冲液 A 溶解, 配制成适宜浓度的溶液; 另取上述结合有探针 DNA 的磁珠悬浮液 50 μL , 加入到 1mL 含有适宜目的 DNA 浓度缓冲液 A 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化 30 min, 使目的 DNA 与探针 DNA 完全杂交。

2) 分离磁珠, 梯度洗涤, 磁分离, 加 DNA 变性溶液使目的 DNA 分子与磁珠探针变性分离;

用磁分离器分离上述结合有目的 DNA 的磁珠，弃去上清液，37℃ 用 100 μ L 缓冲液 B (7mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2M NaCl, 0.1M SDS) 清洗磁珠 2 次；再用 100 μ L 缓冲液 C (7mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2M NaCl) 清洗磁珠 2 次；室温条件下用 5 μ L 0.2 mM 的 PB 溶液悬浮磁珠。

3) 疏水表面的制备；

将硅片浸入浓度比为 3:1 的 H₂SO₄:30%H₂O₂ 溶液里约 30 分钟，取出后用 Milli-Q 水冲洗干净，用氮气吹干；

将硅片浸入 2% FAS 的乙醇溶液中反应 2 小时，用 Milli-Q 水清洗干净，用氮气吹干。

4) 用磁分离器处理步骤 2) 中的含目的 DNA 的 PB 溶液，取上清液 5 μ L 滴于步骤 3) 制得的疏水表面上，使液滴自然蒸发实现微浓缩过程。

5) 采用芯片扫描仪对浓缩斑点进行检测，浓缩斑点直径约为 200 μ m，检测灵敏度约为 1.6aM。

实施例 2:

微浓缩技术用于 RNA 分子高灵敏度检测：

1) 磁珠探针的制备，将待测溶液与磁珠探针混合，使目的 RNA 分子与磁珠探针结合；

取 100 μ L 的链酶亲和素修饰磁珠 (直径 5 μ m, 10 mg/mL) 置于微量离心管中，用磁分离器处理 5 分钟，弃去上清液，再用 100 μ L PBS 缓冲液 (pH 7.0) 清洗 3 次；取 1 OD 的探针 DNA (5'-biotin-TTT TTT TTT ACG GAA CAG CTT TGA GGT GCT ACG ACA)，用 PBS 缓冲液 (0.3M NaCl/10 mM PB, pH 8.5) 溶解，制成 10 μ M 的贮存液，取贮存液 50 μ L 加入含磁珠的微量离心管中，室温下孵化 30 分钟；精密称取 19.2 mg 的 EDC，用 100 μ L 4℃的 PBS 缓冲液 (pH 8.5) 溶解，制成含 1 M EDC 的 PBS 缓冲液；取 10 μ L EDC 溶液加入含磁珠和探针 DNA 的溶液中，混

合均匀，室温反应 2 小时；用磁分离器处理已捕获探针 DNA 的磁珠，弃去反应液，用 50 μ L PBS 缓冲液 (pH 8.5) 清洗磁珠 3 次；再用 50 μ L 的缓冲液 A (5 \times SSC / 0.2% SDS) 清洗磁珠 2 次，再用 1 mL 缓冲液 A 悬浮磁珠。

取 1 OD 的目的 RNA (5'-GCA CCU CAA AGC UGU UCC GUC CCA GUA GAU UAC CACU-3')，用缓冲液 A 溶解加入适量的异硫氰酸胍溶液，配制成适宜浓度的溶液；取 1 OD 的报告探针 DNA (5'-HEX-TGT CGTA -3') 用缓冲液 A 溶解，制成 1 μ M 的报告探针 DNA 贮存液。

取 50 μ L 磁珠探针 DNA 溶液及 25 μ L 报告探针 DNA 贮存液，分别加入到 1mL 含有适宜目的 DNA 浓度缓冲液 A 中，37 $^{\circ}$ C 下孵化 30 min，使目的 RNA 分子与探针 DNA 完全杂交，并使结合有目的 RNA 的探针 DNA 与报告探针 DNA 通过碱基堆积力结合，而未结合目的 RNA 的探针 DNA 不与报告探针结合。

2) 分离磁珠，梯度洗涤，磁分离，加 RMA 变性溶液使目的 RNA 及报告探针 DNA 与磁珠探针变性分离；

用磁分离器分离上述结合有目的 RNA 的磁珠，弃去上清液，37 $^{\circ}$ C 用 100 μ L 缓冲液 B (1 \times SSC/0.2% SDS) 清洗磁珠 2 次；再用 100 μ L 缓冲液 C (0.1 \times SSC) 清洗磁珠 2 次；室温条件下用 5 μ L 0.2 mM 的 PB 溶液悬浮磁珠。

3) 疏水表面的制备；

取聚四氟乙烯修饰的硅片用丙酮浸泡清洗 30 分钟，再用乙醇清洗 2 次，用 Milli-Q 水冲洗干净，用氮气吹干。

4) 用磁分离器处理步骤 2) 中的含目的 DNA 的 PB 溶液，取上清液 1 μ L 滴于步骤 3) 制得的疏水表面上，使液滴自然蒸发实现微浓缩过程。

5) 采用芯片扫描仪对浓缩斑点进行检测，浓缩斑点直径约为 50 μ m，

检测灵敏度约为 16aM。

实施例 3:

微浓缩技术用于人类巨细胞病毒 PP150 蛋白分子高灵敏度检测:

1) 磁珠探针的制备, 将待测溶液与磁珠探针混合, 使目的蛋白分子与磁珠探针结合;

取 30 μL 的甲苯磺酰基修饰的磁珠 (直径 10 μm , 4×10^8 个/mL) 置于微量离心管中, 用磁分离器处理 5 分钟, 弃去上清液, 再用 100 μL 包被缓冲液 (0.1 mol/L 磷酸, pH 9.5) 清洗 3 次, 加入 10 μL 1 mg/mL 的 PP150-8MAPs 抗原肽混合均匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 24h, 用磁分离器处理 5 分钟, 弃去反应液。4 $^{\circ}\text{C}$ 用缓冲液 A (2g/L BSA 的 PBS, pH 7.4) 洗涤磁珠 3 次, 并用 1 mL 缓冲液 A 悬浮磁珠。

将用 PP150-8MAPs 免疫的 Balb/c 小鼠抗血清用考马斯亮蓝染色后, 用缓冲液 A 稀释 10^5 倍, 取 1mL 与 10 μL 的磁珠溶液混合, 室温轻轻振荡 60 min, 用磁分离器处理 5 分钟, 弃去反应液, 用缓冲液 A 洗涤 3 次。

2) 分离磁珠, 加免疫分离溶液使目的蛋白分子与磁珠探针分离;

用磁体富集上述结合有目的 DNA 的磁珠, 弃去上清液, 用 15 μL Milli-Q 水悬浮磁珠, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 10 min 使目的分子与磁珠探针分离。

3) 疏水表面的制备;

将玻片置于表面皿中, 用丙酮浸泡清洗 30 分钟, 用乙醇清洗 2 次, 用 Milli-Q 水冲洗干净; 玻片浸入浓度比为 1:1 的 HCl:C₂H₅OH 溶液中, 清洗 30 分钟, 用 Milli-Q 水冲洗干净; 玻片浸入浓度比为 3:1 的 H₂SO₄:30%H₂O₂ 溶液约 30 分钟, 用 Milli-Q 水冲洗干净, 用氮气吹干;

将玻片浸入 2% 十八烷基三甲氧基硅烷的甲苯溶液中反应 2 小时, 用 Milli-Q 水清洗干净, 用氮气吹干。

4) 用磁分离器处理步骤 2) 中的含目的蛋白的溶液, 取上清液 10 μL 滴于步骤 3) 制得的疏水表面上, 使液滴自然蒸发实现微浓缩过程。

5) 采用荧光显微镜对浓缩斑点进行检测, 浓缩斑点直径约为 500 μm , 检测灵敏度约为 160aM。

综上所述, 本发明通过磁珠富集和微浓缩效应使检测灵敏度提高到 1.6~160aM ($10^3\sim 10^5$ 个分子/mL), 显著提高了检测灵敏度; 适用范围广, 不仅适用于 DNA、RNA 等核酸分子的检测, 而且适用于抗原-抗体免疫检测及酶-底物反应等相关检测; 磁珠探针和疏水表面制备简单, 易于存储, 且可批量制备, 使检测成本显著降低; 检测迅速, 整个检测过程可在 1 小时内完成; 与现有技术相比, 该检测方法简单易行, 操作简便, 特异性和灵敏度高, 且易于自动化, 有广泛的应用前景。

需要理解到的是: 上述说明并非是对本发明的限制, 在本发明构思范围内, 所进行的添加、变换、替换等, 也应属于本发明的保护范围。

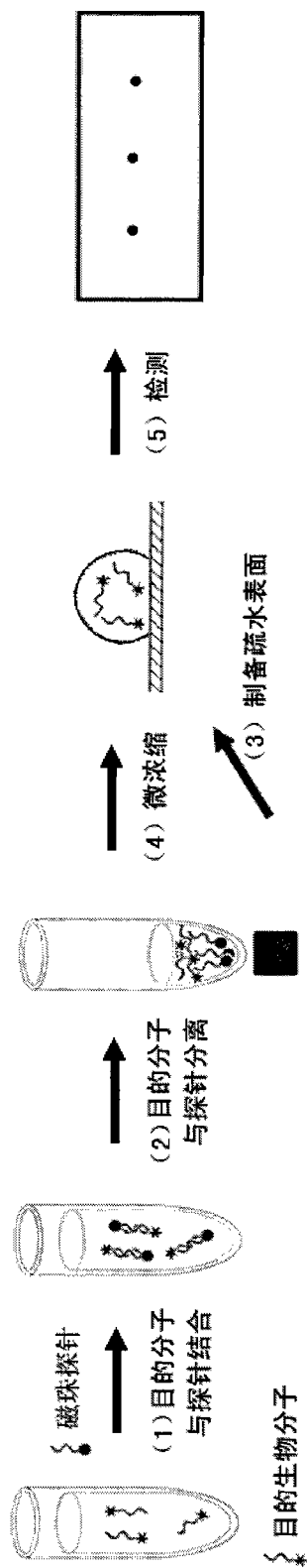


图 1

专利名称(译)	生物分子高灵敏度检测方法		
公开(公告)号	CN101503734A	公开(公告)日	2009-08-12
申请号	CN200810243016.X	申请日	2008-11-27
[标]申请(专利权)人(译)	苏州纳米技术与纳米仿生研究所		
申请(专利权)人(译)	苏州纳米技术与纳米仿生研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所		
[标]发明人	李炯 杜兴利		
发明人	李炯 杜兴利		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N21/64		
代理人(译)	陈忠辉		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种生物分子高灵敏度检测方法，首先使目的生物分子与磁珠探针结合，实现目的生物分子的初步富集，然后选择DNA/RNA变性溶液或免疫分离溶液，使目的生物分子与磁珠探针分离，再将目的生物分子溶液滴于疏水表面上，通过微浓缩作用，使目的生物分子液滴自然蒸发形成直径为50~500μm的斑点，使目标分子的最终浓度较初始浓度提高103~105倍，用荧光显微镜或芯片扫描仪对斑点进行灵敏度检测，显著提高检测灵敏度。该方法不仅适用于DNA、RNA等核酸分子的检测，而且适用于抗原-抗体免疫检测及酶-底物反应等相关检测，操作简便，易于广泛应用。

