



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107462704 A

(43)申请公布日 2017. 12. 12

(21)申请号 201710860617.4

(22)申请日 2017.09.21

(71)申请人 清华大学深圳研究生院

地址 518055 广东省深圳市南山区西丽大
学城清华校区

(72)发明人 孙树清 杨瑞 吴振杰

(74)专利代理机构 深圳新创友知识产权代理有
限公司 44223

代理人 余敏

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

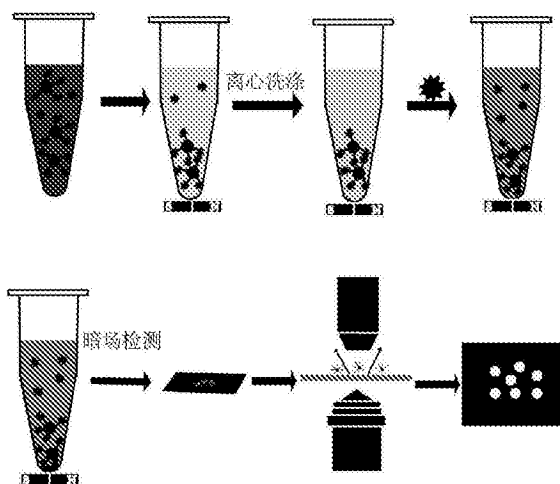
权利要求书1页 说明书5页
序列表1页 附图5页

(54)发明名称

一种生物传感器及其制备方法、靶分子浓度
检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种生物传感器及其制备方法、靶分子浓度检测方法。生物传感器的制备方法包括以下步骤：S1，将链霉亲和素、羧基、氨基、巯基中的一种或者多种修饰到磁珠上，将生物素修饰到待检测的靶分子的核酸适配体上；S2，在反应液中加入所述核酸适配体和所述磁珠，将所述核酸适配体偶联到所述磁珠的部分位点上；所述反应液为浓度在100mM以上的盐缓冲液；S3，将能与所述核酸适配体互补配对的DNA序列偶联到贵金属纳米粒子上；S4，将步骤S2得到的磁珠和步骤S3得到的贵金属纳米粒子置于杂交液中反应5~60min，通过碱基互补配对，形成由磁珠、核酸适配体、贵金属纳米粒子构成的生物传感器。本发明可实现高灵敏度地浓度检测，且成本低，效率高。



1. 一种生物传感器的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:S1,将链霉亲和素、羧基、氨基、巯基中的一种或者多种修饰到磁珠上,将生物素修饰到待检测的靶分子的核酸适配体上;S2,在反应液中加入所述核酸适配体和所述磁珠,将所述核酸适配体偶联到所述磁珠的部分位点上;所述反应液为浓度在100mM以上的盐缓冲液;S3,将能与所述核酸适配体互补配对的DNA序列偶联到贵金属纳米粒子上;S4,将步骤S2得到的磁珠和步骤S3得到的贵金属纳米粒子置于杂交液中反应5~60min,通过碱基互补配对,形成由磁珠、核酸适配体、贵金属纳米粒子构成的生物传感器。

2. 根据权利要求1所述的生物传感器的制备方法,其特征在于:步骤S2中将所述核酸适配体序列偶联到所述磁珠上后还包括:在所述反应液中加入游离的生物素,将所述生物素偶联到所述磁珠的另外部分位点上;磁分离洗涤后,再将封闭剂连接到所述磁珠上进行封闭。

3. 根据权利要求2所述的生物传感器的制备方法,其特征在于:所述封闭剂为牛血清蛋白、脱脂奶粉或者无交叉反应的血清。

4. 根据权利要求1所述的生物传感器的制备方法,其特征在于:步骤S2中,所述盐缓冲液为Tris的盐缓冲液。

5. 根据权利要求1所述的生物传感器的制备方法,其特征在于:步骤S3中,所述贵金属纳米粒子为金纳米球颗粒、金纳米棒颗粒、金/银复合纳米颗粒、金纳米星颗粒、金纳米立方体颗粒、金纳米双锥颗粒。

6. 根据权利要求1所述的生物传感器的制备方法,其特征在于:步骤S4中,所述杂交液包括PBS缓冲液、NaCl溶液和SDS。

7. 根据权利要求6所述的生物传感器的制备方法,其特征在于:所述杂交液包括10mM、pH值为7.4的PBS缓冲溶液,0.3m的NaCl,0.01% SDS。

8. 一种根据权利要求1~7任一项所述的制备方法制得的生物传感器。

9. 一种靶分子浓度检测方法,其特征在于:包括以下步骤:A1,根据权利要求1~7任一项所述的制备方法制得生物传感器;A2,在检测用反应液中加入所述生物传感器和待测定浓度的靶分子溶液,充分反应,使得所述生物传感器中的所述贵金属纳米粒子游离到反应液中;A3,通过包含氨基、羧基、巯基、羟基中的一种或者多种的硅烷溶液对载玻片进行表面修饰,使所述载玻片的表面形成一层自组装膜;A4,通过磁分离技术,吸取步骤A2中反应液中的上清液,置于步骤A3的载玻片上制成样本,利用暗场显微镜对样本中的贵金属纳米粒子进行计数;A5,根据步骤A4的计数以及暗场显微镜分析下所述贵金属纳米粒子的个数与靶分子溶液浓度之间的定标曲线,计算得到当前靶分子溶液的浓度。

10. 根据权利要求9所述的靶分子浓度检测方法,其特征在于:步骤A3中,所述硅烷溶液为3-氨丙基三乙氧基硅烷溶液。

一种生物传感器及其制备方法、靶分子浓度检测方法

【技术领域】

[0001] 本发明涉及生物检测技术,特别是涉及一种生物传感器及其制备方法、靶分子浓度检测方法。

【背景技术】

[0002] 生物标志物是一种疾病的生物学状态的指示器,其可以是蛋白质、DNA或RNA的片段,具有特异性,因此可以作为靶向疾病的标志物。特别是癌症生物标记物,是癌症的征兆。通过检测它们,可以对癌症进行诊断。随着生物技术的发展,许多癌症的生物标志物已经被发现。通过对这些生物标记物的检测,可以在预期的时间对疾病进行诊断和治疗。其中蛋白质的显著变化可以揭示生物体作为一种生物标记物的生理和病理过程,指示疾病的生物学状态。这些蛋白质在生命科学的基础研究,疾病诊断,药物研究,人体健康分析和生物安全监测具有重要意义。蛋白质识别是基于抗原特异性和免疫应答抗体的一种广泛应用的技术。但也有一些不足,例如,时间花费多,成本高,所产生的抗体的免疫原性、化学改性可能导致活性降低甚至失活,限制抗体抗原在蛋白质分析中的应用。因此,开展更为方便、高灵敏高特异性的蛋白质识别研究对生物系统具有重要意义。

[0003] 以上背景技术内容的公开仅用于辅助理解本发明的发明构思及技术方案,其并不必然属于本专利申请的现有技术,在没有明确的证据表明上述内容在本专利申请的申请日已经公开的情况下,上述背景技术不应当用于评价本申请的新颖性和创造性。

【发明内容】

[0004] 本发明所要解决的技术问题是:弥补上述现有技术的不足,提出一种生物传感器及其制备方法、靶分子浓度检测方法,可实现高灵敏度地浓度检测,且成本低,效率高。

[0005] 本发明的技术问题通过以下的技术方案予以解决:

[0006] 一种生物传感器的制备方法,包括以下步骤:S1,将链霉亲和素、羧基、氨基、巯基中的一种或者多种修饰到磁珠上,将生物素修饰到待检测的靶分子的核酸适配体上;S2,在反应液中加入所述核酸适配体和所述磁珠,将所述核酸适配体偶联到所述磁珠的部分位点上;所述反应液为浓度在100mM以上的盐缓冲液;S3,将能与所述核酸适配体互补配对的DNA序列偶联到贵金属纳米粒子上;S4,将步骤S2得到的磁珠和步骤S3得到的贵金属纳米粒子置于杂交液中反应5~60min,通过碱基互补配对,形成由磁珠、核酸适配体、贵金属纳米粒子构成的生物传感器。

[0007] 本发明的生物传感器,通过链霉亲和素或者羧基、氨基、巯基中的一种或者多种修饰磁珠,通过生物素修饰核酸适配体,从而使得核酸适配体可通过链霉亲和素(或者羧基、氨基、巯基)与生物素之间的结合而偶联到磁珠上。通过可实现互补配对的DNA序列偶联到贵金属纳米粒子上,从而实现后续贵金属纳米粒子偶联连接到核酸适配体上,最终制得磁珠偶联核酸适配体,核酸适配体碱基配对后连接上贵金属纳米粒子,得到具有稳定结构的生物传感器。该生物传感器能发挥核酸适配体可以直接化学合成的、靶分子分布范围广、能

与靶分子特异性结合且亲和力高的优点,也能发挥贵金属纳米颗粒的强散射特性,从而可用于高对比度暗场成像,进而实现高灵敏检测。

[0008] 优选的技术方案中,步骤S2中将所述核酸适配体序列偶联到所述磁珠上后还包括:在所述反应液中加入游离的生物素,将所述生物素偶联到所述磁珠的另外部分位点上;磁分离洗涤后,再将封闭剂连接到所述磁珠上进行封闭。

[0009] 该优选方案中,通过生物素和封闭剂对磁珠上的空余位点进行封闭处理,从而有利于减少在检测过程中反应靶标的非特异性吸附,降低计数工作量,提高检测效率。

[0010] 进一步地,所述封闭剂为牛血清蛋白、脱脂奶粉或者无交叉反应的血清。

[0011] 进一步地,步骤S2中,所述盐缓冲液为Tris的盐缓冲液。具体地,Tris的盐缓冲液可包括10mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA和2M NaCl。

[0012] 进一步地,步骤S3中,所述贵金属纳米粒子为金纳米球颗粒、金纳米棒颗粒、金/银复合纳米颗粒、金纳米星颗粒、金纳米立方体颗粒、金纳米双锥颗粒。

[0013] 进一步地,步骤S4中,所述杂交液包括PBS缓冲液、NaCl溶液和SDS。

[0014] 进一步地,所述杂交液包括10mM、pH值为7.4的PBS缓冲溶液,0.3m的NaCl,0.01% SDS。

[0015] 一种根据如上所述的制备方法制得的生物传感器。

[0016] 本发明的技术问题通过以下进一步的技术方案予以解决:

[0017] 一种靶分子浓度检测方法,包括以下步骤:A1,根据权利要求1~6任一项所述的制备方法制得生物传感器;A2,在检测用反应液中加入所述生物传感器和待测定浓度的靶分子溶液,充分反应,使得所述生物传感器中的所述贵金属纳米粒子游离到反应液中;A3,通过包含氨基、羧基、巯基、羟基中的一种或者多种的硅烷溶液对载玻片进行表面修饰,使所述载玻片的表面形成一层自组装膜;A4,通过磁分离技术,吸取步骤A2中反应液中的上清液,置于步骤A3的载玻片上制成样本,利用暗场显微镜对样本中的贵金属纳米粒子进行计数;A5,根据步骤A4的计数以及暗场显微镜分析下所述贵金属纳米粒子的个数与靶分子溶液浓度之间的定标曲线,计算得到当前靶分子溶液的浓度

[0018] 本发明的靶分子浓度检测方法中,利用前述制得的生物传感器进行检测,检测时加入靶分子后,在有靶分子存在的情况下,核酸适配体发生适应性折叠形成三维结构,与靶分子紧密结合,导致核酸适配体和贵金属纳米粒子的双链碱基配对被破坏,从而使贵金属纳米粒子游离到反应液中。后续通过对贵金属纳米粒子进行暗场分析计数,即可计算得到加入的靶分子的浓度。区别于传统检测方法中的抗原抗体特异性结合,利用核酸适配体的高特异性和高亲和性,可对蛋白类的生物靶分子实现特异性检测。而利用金纳米颗粒的优异特性和暗场显微成像技术的高对比特性,实现单分子的显微成像,真正实现检测的高灵敏特性。

[0019] 进一步地,步骤A3中,所述硅烷溶液为3-氨丙基三乙氧基硅烷溶液。

[0020] 本发明与现有技术对比的有益效果是:

[0021] 本发明的生物传感器的制备方法,实现了核酸适配体偶联到磁珠上,贵金属纳米粒子通过DNA配对连接到核酸适配体上,进而形成由磁珠、核酸适配体序列、贵金属纳米粒子构成的生物传感器。检测过程中,仅需加入靶分子即可实现贵金属纳米粒子的释放进而高灵敏度检测,整个检测过程简单快速,成本低。而且生物传感器中通过核酸适配体和DNA

序列实现连接,无需单独设计探针序列,且核酸适配体易于合成,化学修饰简单,且无免疫原性,相对于以往使用抗原抗体作为探针的方案,也可显著降低生物传感器的成本,提高生物传感器的稳定性。

【附图说明】

- [0022] 图1a是本发明具体实施方式的靶分子浓度检测方法的原理示意图;
[0023] 图1b是本发明具体实施方式的靶分子浓度检测方法的过程示意图;
[0024] 图2是本发明具体实施方式的金纳米颗粒的扫描电镜图及暗场显微镜照片;
[0025] 图3是本发明具体实施方式中反应前后的磁珠的扫描电镜图;
[0026] 图4是本发明具体实施方式中定标时不同浓度下对应得到的暗场照片;
[0027] 图5是本发明具体实施方式中定标出的曲线示意图;
[0028] 图6是本发明具体实施方式中在各种不同靶标下对应的吸光度示意图。

【具体实施方式】

[0029] 本发明的构思是:核酸适配体(Aptamer)是一段具有特异性识别功能的单链核酸分子,可以通过指数富集的配体系统进化技术在体外合成。通过研究发现,在靶标(也即靶分子)存在的情况下,适配体会发生适应性折叠形成三维结构,比如G-四链体、发夹、凸环、假结。通过碱基的互补配对、形状互补、范德华力、静电作用及氢键等与靶标紧密结合。靶标与其核酸适配体一一对应,例如靶标A会让其相应的适配体B发生折叠,形成三维结构;靶标A1会让相应的适配体B1发生折叠,形成三维结构。此外,与抗体相反,核酸适配体很容易合成,化学修饰简单,且无免疫原性。而适配体最重要的特点是广泛的靶分子分布,包括具有核酸适配体的蛋白质、病毒、细胞等。因此,基于靶标引起核酸适配体的适应性折叠,考虑将核酸适配体用作靶标浓度检测中的良好的识别分子。

[0030] 贵金属纳米粒子,例如金纳米颗粒(AuNPs)、金纳米棒颗粒、金/银复合纳米颗粒、金纳米星颗粒、金纳米立方体颗粒、金纳米双锥颗粒等的研究一直是热点,贵金属纳米粒子生物相容性好,比表面积大,便于修饰,具有良好的光学特性。而且其合成方法成熟,改变相应条件,可以合成不同大小,不同形态的贵金属纳米粒子,故广泛用于多个领域。利用贵金属纳米粒子对生物分子进行检测的方法主要有比色法、荧光法、化学发光法、电化学、表面增强拉曼等。但是其中比色法、荧光法、化学发光法其检测灵敏度低,不适合高灵敏的癌症靶标检测。而电化学、表面增强拉曼等方法,操作繁琐,花费时间较长,很难在临床中实际应用。贵金属纳米粒子由于其较好的生物相容性以及较强的散射特性,可用于高对比度的暗场成像,进而实现单分子直接计数的研究。

[0031] 综上,本发明提出了以修饰了核酸适配体的磁珠为基质,与贵金属纳米粒子形成生物传感器的方案,将核酸适配体、金纳米颗粒以及生物化的磁珠自组装形成生物传感器。该生物传感器用于靶分子浓度检测时,利用磁珠作为磁分离的基础,将反应后脱离生物传感器的贵金属纳米粒子分离出反应体系。然后通过暗场显微镜和图像传感器采集图片,并利用图片处理技术对采集的图片进行处理并计数贵金属纳米粒子的数目,进而得出靶分子的浓度,实现对单分子的生物靶分子浓度的高灵敏度检测。

[0032] 下面结合具体实施方式并对照附图对本发明做进一步详细说明。

[0033] 本具体实施方式中以凝血酶为靶分子进行检测,检测原理示意图如图1a所示,检测过程示意图如图1b所示。

[0034] 步骤一:设计两段序列:

[0035] 第一段为核酸适配体的序列,其根据待检测的靶分子(即凝血酶)即可确定得到:

[0036] 5'-biotin-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG-3',使用生物素对其进行修饰,然后将其偶联在链霉亲和素修饰的磁珠上。反应液为10mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA和2M NaCl的混合液。在其余实施方式下,也可通过羧基、氨基、巯基中的一种或者多种来修饰磁珠,这些基团修饰磁珠后,同样可与生物素结合,从而实现核酸适配体与磁珠之间的偶联。

[0037] 第二段为与核酸适配体互补配对的DNA序列,其根据第一段序列设计得到:

[0038] 5'-SH-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCAAC-3',将其偶联在金纳米颗粒上形成纳米探针。

[0039] 本具体实施方式中,为了减少磁珠上的非特异性吸附,使用游离的生物素和牛血清蛋白对其多余位点进行封闭。具体步骤包括:在反应液中核酸适配体偶联到磁珠的反应之后,再加入游离的生物素,反应15min,使游离的生物素偶联到所述磁珠的另外部分位点上。磁分离洗涤之后,再加入反应液,加入BSA在4℃条件下进行封闭1h。

[0040] 图2为本具体实施方式中使用的金纳米颗粒的扫描电镜图(左)及暗场显微镜照片(右)。

[0041] 步骤二:将步骤一所制取的偶联有核酸适配体的磁珠及偶联有DNA序列的金纳米颗粒混合于杂交液(10mM的PBS7.4,0.3mM的NaCl,0.01%SDS(Sodium dodecyl sulfate,十二烷基硫酸钠))中,反应30min后,得到生物传感器,反应结束后,通过外加磁场进行磁分离,离心洗涤,分离出由核酸适配体、磁珠、贵金属纳米粒子形成的生物传感器。

[0042] 图3是反应前后的磁珠的扫描电镜图,其中a是没有连接金纳米颗粒的磁珠,b是磁珠连接上金纳米颗粒后形成的生物传感器的扫描电镜图。

[0043] 步骤三:曲线定标:

[0044] 在检测用的反应液(20mM的Tris-HCl,pH7.4,140mM的NaCl,1mM的MgCl₂,5mM的KCl,1mM的CaCl₂,1mg/mL的BSA)中,加入不同浓度(浓度已知)的凝血酶进行定标检测,反应时间为30min。之后磁分离,用移液枪取3μL的上清液于用3-氨丙基三乙氧基硅烷的玻璃片,用食人鱼洗液洗过的盖玻片压在上面形成检测样本,用暗场显微镜进行观察拍照。不同浓度下对应得到的暗场照片如图4所示,其中,control组示意的是不加入凝血酶时的图片,作为对照组。

[0045] 数据处理过程:通过图像传感器对暗场的图片进行采集,再利用matlab程序进行图片处理并进行计数,按照得到的数据与生物靶分子(凝血酶)的已知浓度制作曲线,得到 $Y = 6.08506 * X + 115.199$, $R\text{-Square} = 0.98593$ 。如图5所示,为定标出的该曲线,可以看出实验结果线性良好,数据可靠。依据 $LOD = 3 \times S_b / S$ 可以计算出本具体实施方式的检测方法的检测下限为2.54fM。

[0046] 图6示意了在各种不同靶标下对应的金纳米颗粒的最高峰的吸光度,图中凝血酶(100nM),细胞色素(1μM),溶菌酶(1μM),免疫球蛋白(1μM),牛血清蛋白(1μM),胰蛋白酶(1μM),空白组下的吸光度各不相同,差异显著,从而也验证了步骤二制得的生物传感器的高特

异性,显示出极高的应用价值。

[0047] 步骤四:实际检测:

[0048] 在检测用的反应液(20mM的Tris-HCl,pH7.4,140mM的NaCl,1mM的MgCl₂,5mM的KCl,1mM的CaCl₂,1mg/mL的BSA)中,加入待测定浓度的凝血酶进行实际检测,充分反应。之后磁分离,用移液枪取3μL的上清液于用3-氨丙基三乙氧基硅烷的玻璃片,用食人鱼洗液洗过的盖玻片压在上面形成检测样本,用暗场显微镜进行观察拍照。通过图像传感器对暗场的图片进行采集,再利用matlab程序进行图片处理并进行计数,统计出计数个数,代入定标曲线中,换算得到当前待测定的凝血酶的浓度。

[0049] 本具体实施方式中实现了对凝血酶浓度的检测,其检测下限可以低至2.54fM,具有高灵敏度。检测过程简便,效率高,成本低。且该检测过程的特异性也高,可广泛适用于其它靶标的浓度检测。

[0050] 以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明,不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下做出若干替代或明显变型,而且性能或用途相同,都应当视为属于本发明的保护范围。

序列表

<110> 清华大学深圳研究生院

<120> 一种生物传感器及其制备方法、靶分子浓度检测方法

<130> 17A100371JYC

<160> 2

<170> SLP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 1

tttttttttt tttttttttt ggttggtgtg gttgg 35

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 2

tttttttttt tttttttttt ccaac 25

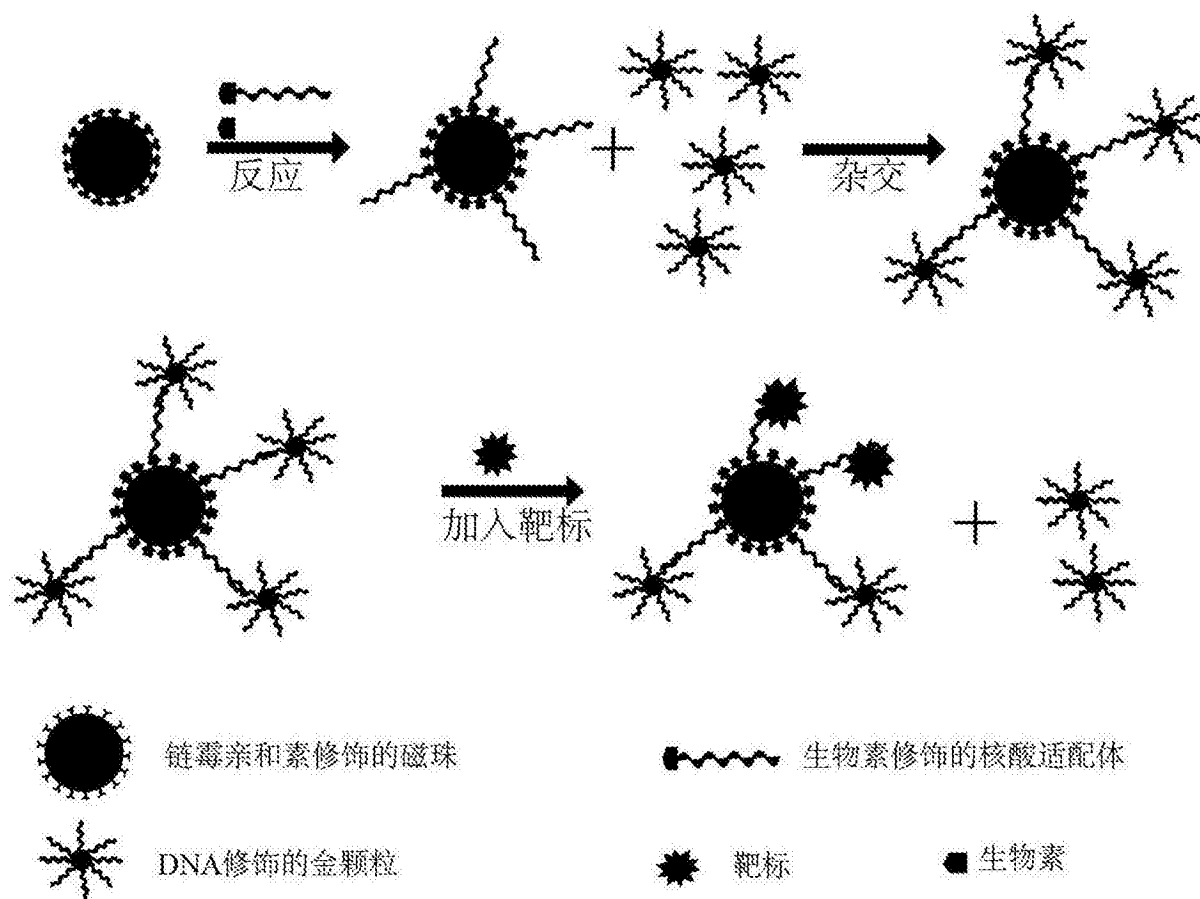


图1a

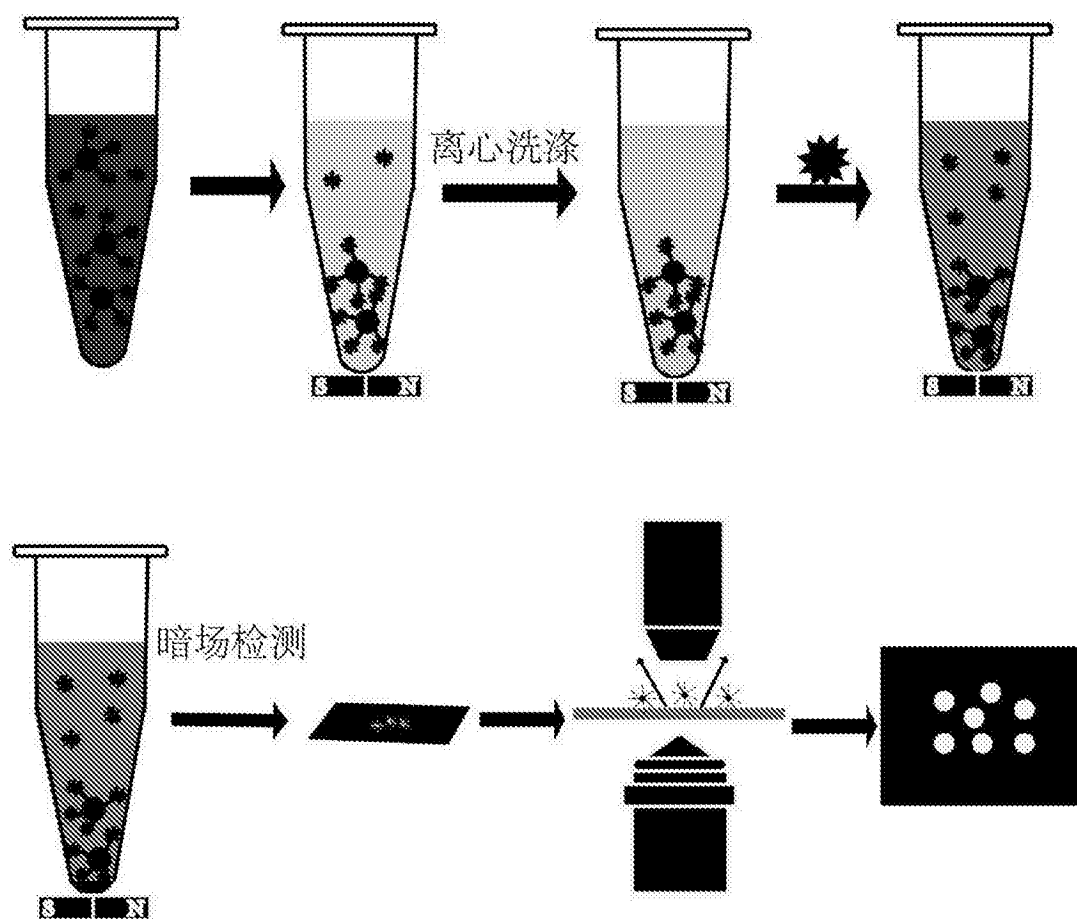


图1b

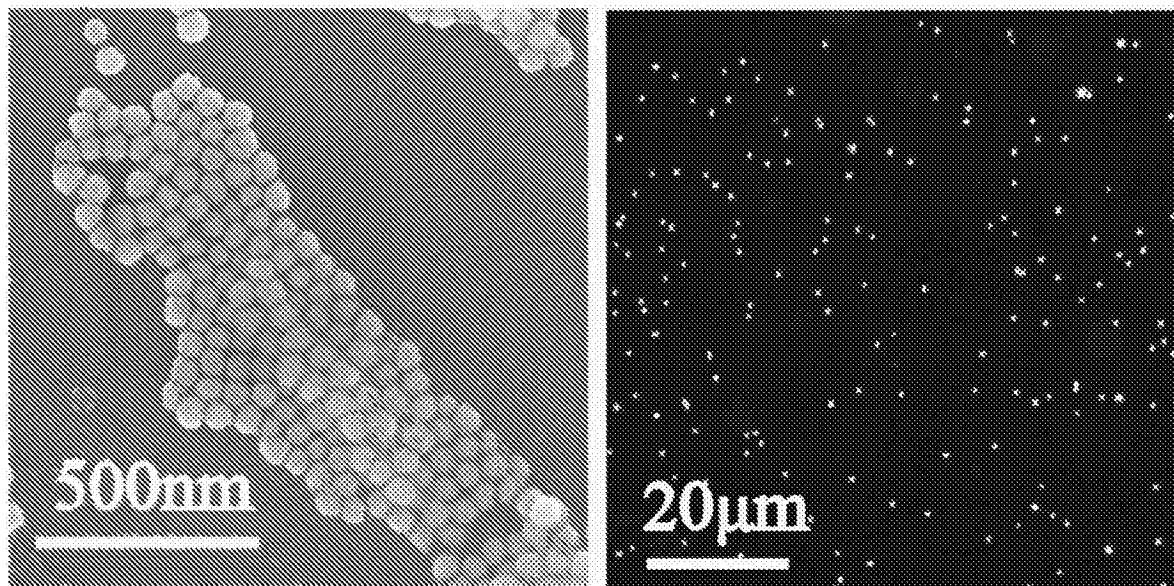


图2

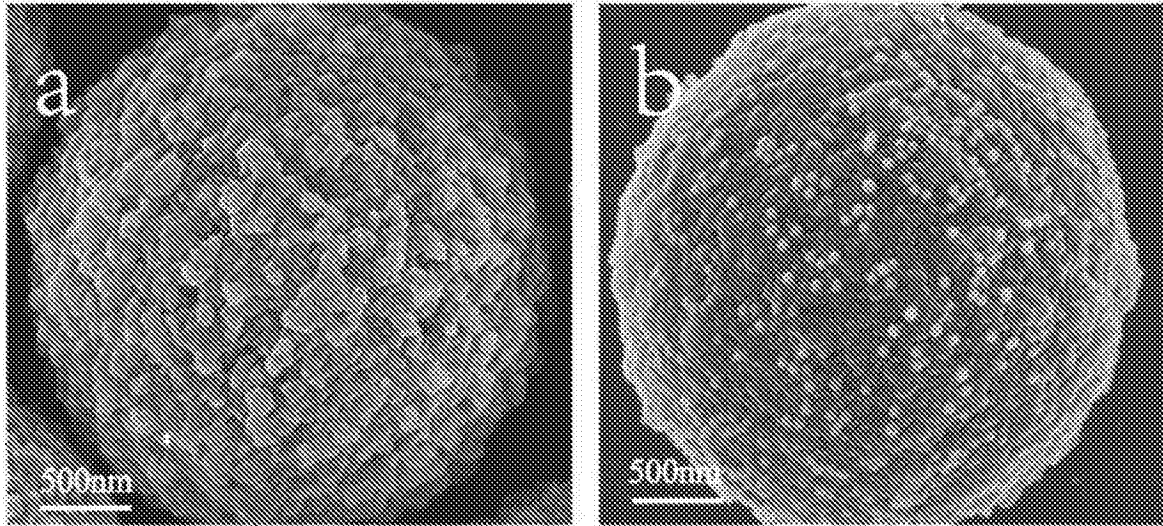


图3

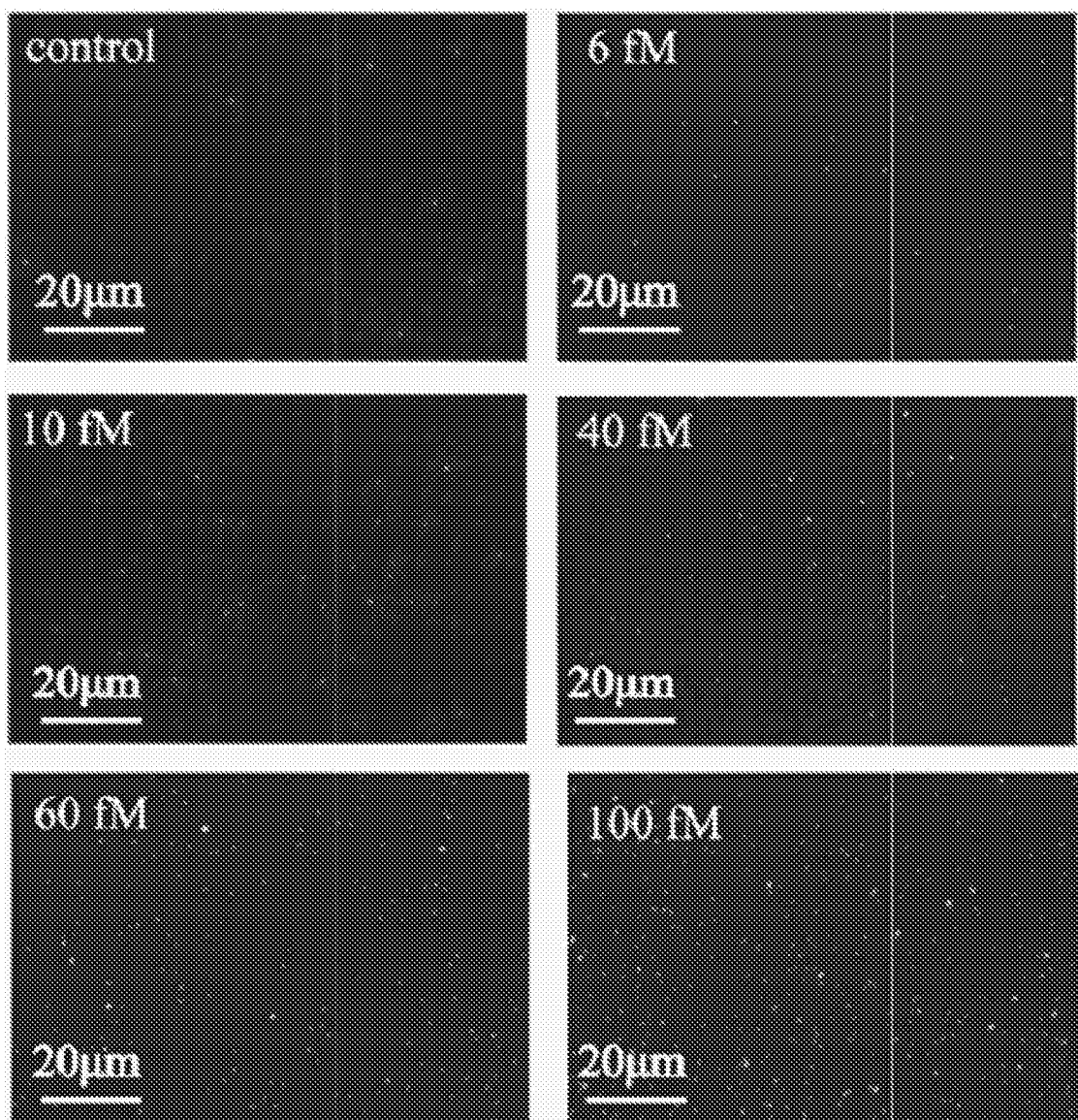


图4

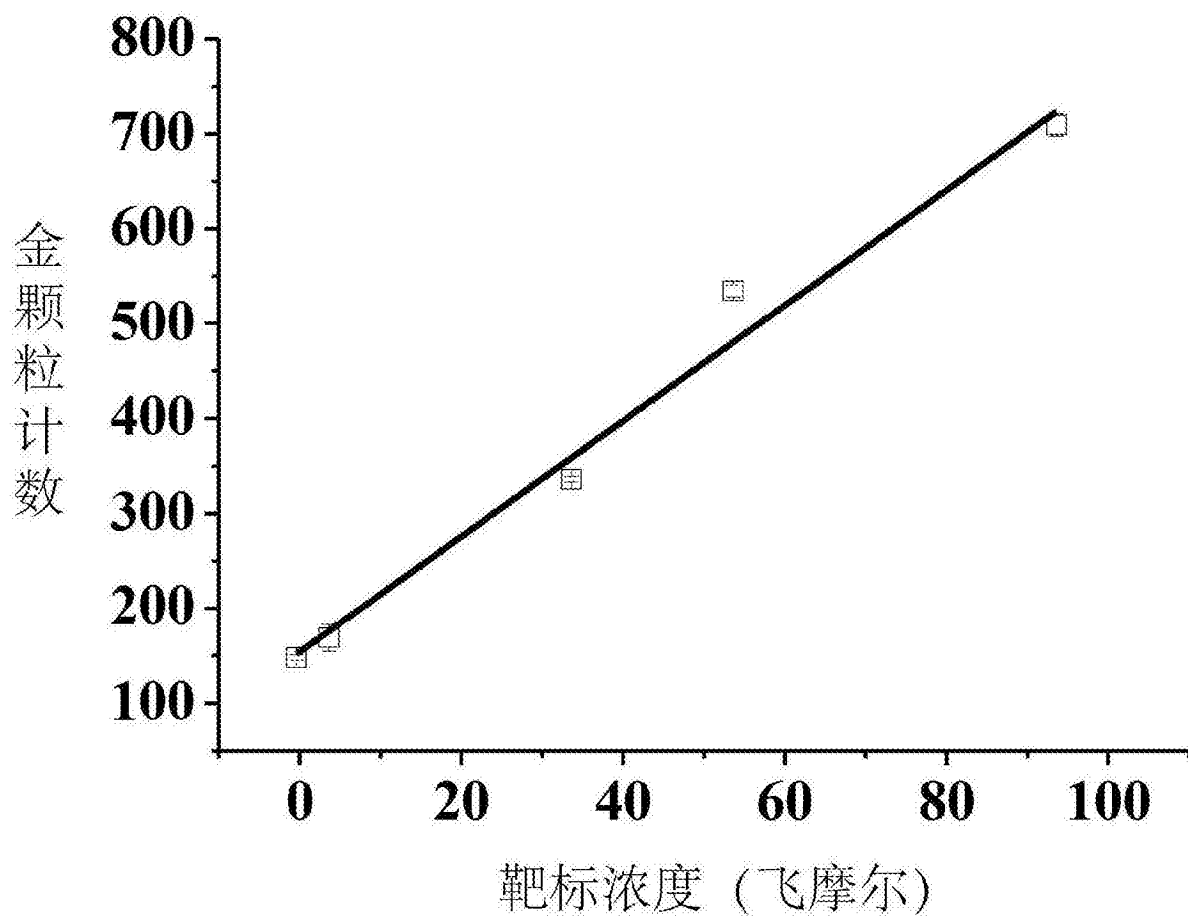


图5

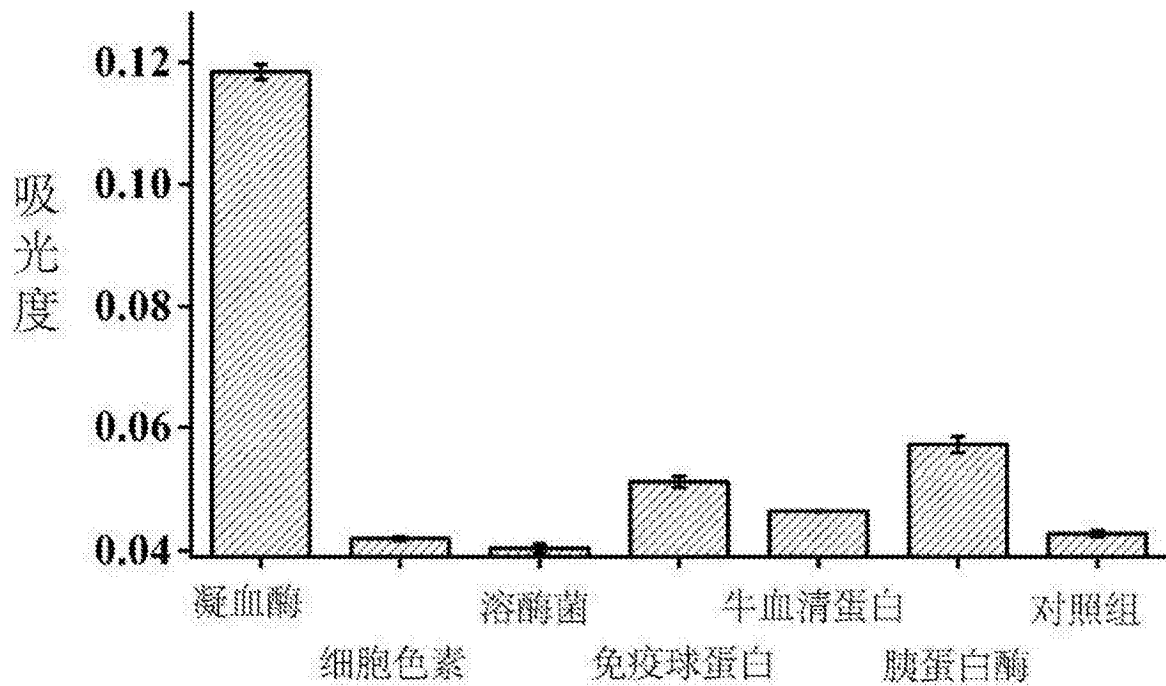


图6

专利名称(译)	一种生物传感器及其制备方法、靶分子浓度检测方法		
公开(公告)号	CN107462704A	公开(公告)日	2017-12-12
申请号	CN2017110860617.4	申请日	2017-09-21
[标]申请(专利权)人(译)	清华大学深圳研究生院		
申请(专利权)人(译)	清华大学深圳研究生院		
当前申请(专利权)人(译)	清华大学深圳研究生院		
[标]发明人	孙树清 杨瑞 吴振杰		
发明人	孙树清 杨瑞 吴振杰		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/68		
代理人(译)	余敏		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种生物传感器及其制备方法、靶分子浓度检测方法。生物传感器的制备方法包括以下步骤：S1，将链霉亲和素、羧基、氨基、巯基中的一种或者多种修饰到磁珠上，将生物素修饰到待检测的靶分子的核酸适配体上；S2，在反应液中加入所述核酸适配体和所述磁珠，将所述核酸适配体偶联到所述磁珠的部分位点上；所述反应液为浓度在100mM以上的盐缓冲液；S3，将能与所述核酸适配体互补配对的DNA序列偶联到贵金属纳米粒子上；S4，将步骤S2得到的磁珠和步骤S3得到的贵金属纳米粒子置于杂交液中反应5~60min，通过碱基互补配对，形成由磁珠、核酸适配体、贵金属纳米粒子构成的生物传感器。本发明可实现高灵敏度地浓度检测，且成本低，效率高。

