



(21)申请号 201710616843.8

(22)申请日 2017.07.26

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107462705 A

(43)申请公布日 2017.12.12

(73)专利权人 广东省生态环境技术研究所

地址 510650 广东省广州市天源路808号

(72)发明人 温俊林 周顺桂 余震 陈俊华

汤佳 杨贵芹

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有

限公司 44205

代理人 胡辉

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

(56)对比文件

CN 101622340 A,2010.01.06,

CN 106520927 A,2017.03.22,

CN 105256037 A,2016.01.20,

CN 106290280 A,2017.01.04,

Wei Li et al.Highly selective and

sensitive detection of miRNA based on

toehold-mediated strand displacement

reaction and DNA tetrahedron substrate.

《Biosensors and Bioelectronics》.2015,第71

卷

Ai-Li Sun et al.Sensitive

voltammetric determination of DNA via a

target-induced strand-displacement

reaction using quantum dot-labeled probe

DNA.《Microchim Acta》.2015,第182卷(第7-8

期),

审查员 王在竹

权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

一种灵敏度强、可分解的量子点纳米球探针
及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种灵敏度强、可分解的量子点纳米球探针及其制备方法。通过支点介导的链置换反应,将3种脱硫生物素修饰的DNA发夹探针自组装成Y-型DNA纳米结构;Y-型DNA结构与链霉亲和素偶联的量子点自组装形成量子点纳米球探针。本发明将制备的量子点纳米球探针与免疫磁珠分离技术相结合应用于快速检测目标分析物,由于生物素与链霉亲和素结合力强于脱硫生物素,使得量子点纳米球探针分解,从而释放出量子点,通过检测量子点溶液的荧光值,来确定目标分析物浓度,克服了免疫磁珠对量子点的遮蔽作用。本方法灵敏度高,对微生物的检测限为1.37cfu/mL。本方法特异性好,常见的其他微生物对检测不产生影响。

1. 一种量子点纳米球探针, 其特征在于, 包括链霉亲和素偶联的量子点和下述核酸序列:

特异性单链DNA: 从5' 到3' 分别为y*区域、b*区域、x*区域、a*区域;

DNA发夹探针1: 从5' 到3' 分别为z区域、a区域、x区域、b区域、y区域、z*区域、c*区域、y*区域、b*区域、x*区域; 其中x*区域通过间隔臂连接有脱硫生物素基团;

DNA发夹探针2: 从5' 到3' 分别为x区域、b区域、y区域、c区域、z区域、x*区域、a*区域、z*区域、c*区域、y*区域; 其中y*区域通过间隔臂连接有脱硫生物素基团;

DNA发夹探针3: 从5' 到3' 分别为y区域、c区域、z区域、a区域、x区域、y*区域、b*区域、x*区域、a*区域、z*区域; 其中z*区域通过间隔臂连接有脱硫生物素基团;

上述的a、b、c、x、y、z区域分别与a*、b*、c*、x*、y*、z*区域互补配对。

2. 根据权利要求1所述的量子点纳米球探针, 其特征在于: 上述的各个区域的碱基数为4-8个碱基。

3. 根据权利要求1所述的量子点纳米球探针, 其特征在于: 间隔臂包含5-20个腺嘌呤核苷酸碱基。

4. 根据权利要求1所述的量子点纳米球探针, 其特征在于: 链霉亲和素偶联的量子点为紫外或蓝光激发, 荧光最大发射波长为 $525 \pm 5\text{nm}$ 。

5. 权利要求1所述量子点纳米球探针的制备方法, 其特征在于, 包括下列步骤: 将DNA发夹探针1、DNA发夹探针2、DNA发夹探针3充分混合; 然后加入特异性单链DNA, 室温反应, 组装形成Y-型DNA;

将链霉亲和素修饰的量子点与Y-型DNA以摩尔比为 $(0.8-1.5) : (0.8-1.5)$ 充分混合反应, 制备得到量子点纳米球探针。

6. 根据权利要求5所述的制备方法, 其特征在于: 所加入的DNA发夹探针1、DNA发夹探针2、DNA发夹探针3和特异性单链DNA的摩尔比为1:1:1:1。

7. 一种量子点纳米球探针试剂盒, 其特征在于: 包括权利要求1-4任一项所述的量子点纳米球探针, 特异性生物识别探针A修饰的磁性微球, 脱硫生物素修饰的特异性生物识别探针B, 以及生物素; 其中特异性生物识别探针A和特异性生物识别探针B识别并结合待测样品中的目标分析物。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒, 其特征在于: 目标分析物包括细菌、蛋白或核酸。

9. 根据权利要求7所述的试剂盒, 其特征在于: 特异性生物识别探针A或B包括抗体或核酸片段。

10. 根据权利要求9所述的试剂盒, 其特征在于: 所述核酸片段包括核酸适体。

11. 一种检测方法, 其特征在于: 是利用权利要求7-10任一项所述的量子点纳米球探针试剂盒检测目标分析物。

一种灵敏度强、可分解的量子点纳米球探针及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物荧光探针技术领域,具体涉及一种灵敏度强、可分解的量子点纳米球探针及其制备方法。

背景技术

[0002] 量子点是一种半导体纳米材料,具有荧光寿命长、发射波长可调和抗光漂白等优点。量子点与抗体、核酸等生物分子偶联制备成的生物荧光探针,在医学诊断、食品安全和环境监测等领域有广泛的应用。传统量子点探针,一个生物识别分子只能偶联一个量子点颗粒,信号放大作用有限,检测灵敏度较低。提高生物识别分子偶联量子点的数量是制备高效荧光探针的关键。通过杂交反应可以将量子点标记的DNA序列组装形成多量子点的荧光探针。

[0003] 免疫磁珠分离技术是一种快速高效的样品富集方法。将免疫磁珠技术与多量子点探针联合使用具有快速超灵敏的优点。然而,在实际应用中,免疫磁珠(1-2 μ m)对量子点探针(2-100nm)的荧光信号具有遮蔽作用,从而降低了探针的检测灵敏度。此外,常用的量子点-DNA标记采用共价偶联或生物素-链霉亲和素作用,制备的量子点复合探针非常稳定,在温和生理条件下无法分解释放出量子点颗粒,这也限制了它的使用范围。

[0004] 因此,研究灵敏度强,能克服免疫磁珠的遮蔽作用,可分解的多量子点探针具有重大意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种量子点纳米球探针及其制备方法;

[0006] 本发明的另一目的在于提供一种量子点纳米球探针试剂盒;

[0007] 本发明的再一目的在于提供一种检测方法。

[0008] 本发明所采取的技术方案是:

[0009] 一种量子点纳米球探针,包括链霉亲和素偶联的量子点和下述核酸序列:

[0010] 特异性单链DNA:从5'到3'分别为y*区域、b*区域、x*区域、a*区域;

[0011] DNA发夹探针1:从5'到3'分别为z区域、a区域、x区域、b区域、y区域、z*区域、c*区域、y*区域、b*区域、x*区域;其中x*区域通过间隔臂连接有脱硫生物素基团;

[0012] 其中x-b-y与y*-b*-x*互补形成颈结构,z*-c*为环结构;

[0013] DNA发夹探针2:从5'到3'分别为x区域、b区域、y区域、c区域、z区域、x*区域、a*区域、z*区域、c*区域、y*区域;其中y*区域通过间隔臂连接有脱硫生物素基团;

[0014] 其中,y-c-z与z*-c*-y*互补形成颈结构,x*-a*为环结构;

[0015] DNA发夹探针3:从5'到3'分别为y区域、c区域、z区域、a区域、x区域、y*区域、b*区域、x*区域、a*区域、z*区域;其中z*区域通过间隔臂连接有脱硫生物素基团;

[0016] 其中,z-a-x与x*-a*-z*互补形成颈结构,y*-b*为环结构;

[0017] 上述的a、b、c、x、y、z区域分别与a*、b*、c*、x*、y*、z*区域互补配对。

- [0018] 优选的,上述的各个区域的碱基数为4-8个碱基。
- [0019] 优选的,间隔臂包含5-20个腺嘌呤核苷酸碱基。
- [0020] 优选的,链霉亲和素偶联的量子点为紫外或蓝光激发,荧光最大发射波长为525±5nm。
- [0021] 优选的,该量子点纳米球探针包括下列核酸序列:
- [0022] 特异性单链DNA:5'-GCACTA (y*) CTCCT (b*) AACATC (x*) TCAAGC (a*) -3' ;
- [0023] DNA发夹探针1:5'-AGGTTA (z) GCTTGA (a) GATGTT (x) AGGGAG (b) TAGTGC (y) TCCAAT (z*) CACAAC (c*) GCACTA (y*) CTCCT (b*) AACATC (x*) AAAAAAAAAAAAAAAAAA-desthiobiotin-3' ;
- [0024] DNA发夹探针2:5'-GATGTT (x) AGGGAG (b) TAGTGC (y) GTTGTG (c) ATTGGA (z) AACATC (x*) TCAAGC (a*) TCCAAT (z*) CACAAC (c*) GCACTA (y*) AAAAAAAAAAAAAAAAAA-desthiobiotin-3' ;
- [0025] DNA发夹探针3:5'-TAGTGC (y) GTTGTG (c) ATTGGA (z) GCTTGA (a) GATGTT (x) GCACTA (y*) CTCCT (b*) AACATC (x*) TCAAGC (a*) TAACCT (z*) AAAAAAAAAAAAAAAAAA-desthiobiotin-3' 。
- [0026] 本发明通过支点介导的链置换反应,将3种脱硫生物素修饰的DNA发夹探针通过单链DNA催化的链置换反应组装形成Y-型DNA纳米结构;该Y-型DNA结构与链霉亲和素偶联的量子点通过可逆的脱硫生物素-链霉亲和素作用结合,其中一个量子点上可以偶联多个链霉亲和素基团,通过链霉亲和素基团结合多个Y-型DNA纳米结构。而Y-型DNA纳米结构中存在3处脱硫生物素基团,因此,Y-型DNA纳米结构的另外2处脱硫生物素基团可以继续结合量子点,通过自组装,形成含有大量量子点颗粒的纳米球探针。
- [0027] 一种量子点纳米球探针的制备方法,包括下列步骤:
- [0028] 将DNA发夹探针1、DNA发夹探针2、DNA发夹探针3充分混合;然后加入特异性单链DNA,室温反应,组装形成Y-型DNA;
- [0029] 将链霉亲和素修饰的量子点与Y-型DNA以摩尔比为(0.8-1.5):(0.8-1.5)充分混合,于4℃反应过夜,制备得到量子点纳米球探针。
- [0030] Y-型DNA上有3处脱硫生物素基团,而链霉亲和素修饰的量子点上一一般有3~8个链霉亲和素蛋白,而每个链霉亲和素蛋白可以结合4个脱硫生物素基团,但是经过实验,发现只有链霉亲和素修饰的量子点与Y-型DNA以摩尔比为(0.8-1.5):(0.8-1.5)混合,进行自组装所获得量子点纳米球探针才是符合本技术的量子点纳米球探针。
- [0031] 相对的,当链霉亲和素修饰的量子点与Y-型DNA的摩尔比为1:0时,只含有量子点颗粒,单个量子点颗粒信号放大作用有限,检测灵敏度低;而链霉亲和素修饰的量子点与Y-型DNA的摩尔比为1:3时得到的是量子点纳米块状探针,块状结构容易影响空间位阻,会影响相关试剂盒的效果以及在检测领域的应用。
- [0032] 更优选的,链霉亲和素修饰的量子点与Y-型DNA以摩尔比为1:1充分混合。
- [0033] 本发明实施例1制备得到量子点纳米球探针呈现分散状的球形(也即一个一个球形分散开来),平均粒径是53.5nm,平均每个纳米球探针含有约82个量子点颗粒。
- [0034] 优选的,所加入的DNA发夹探针1、DNA发夹探针2、DNA和特异性单链DNA的摩尔比为1:1:1:1。
- [0035] 如果DNA发夹探针1、DNA发夹探针2、DNA发夹探针3任何一个探针过量时,在后续量子点纳米球组装过程中,Y-型DNA产物溶液中含有的游离DNA发夹探针会与链霉亲和素修饰的量子点纳米颗粒结合,形成了粒径更小的纳米球产物。此外,过量的DNA发夹探针与量子

点纳米球探针表面的链霉亲和素结合,导致量子点纳米球探针无法连接脱硫生物素修饰的特异性生物识别探针B,影响最终的检测灵敏度。

[0036] 特异性单链DNA可以触发支点介导的DNA链置换反应,使得DNA发夹探针1、DNA发夹探针2、DNA发夹探针3自组装为Y-型DNA,而置换下来的特异性单链DNA可以继续触发其他的支点介导的DNA链置换反应,形成更多的Y-型DNA。如果特异性单链DNA浓度太低时,在固定反应时间内3种DNA发夹探针自组装形成的Y-型DNA产物浓度较低,影响后续组装量子点纳米球探针的质量。如果特异性单链DNA浓度太高时又会造成浪费。

[0037] 一种量子点纳米球探针的试剂盒,包括上述任一项所述的量子点纳米球探针,特异性生物识别探针A修饰的磁性微球,脱硫生物素修饰的特异性生物识别探针B,以及生物素;其中特异性生物识别探针A和特异性生物识别探针B识别并结合待测样品中的目标分析物。

[0038] 优选的,目标分析物包括细菌、蛋白、核酸。

[0039] 优选的,特异性生物识别探针A或B包括抗体、核酸适体、核酸片段。

[0040] 优选的,特异性生物识别探针A和特异性生物识别探针B可以相同也可以不同。通常情况下,由于目标分析物与特异性生物识别探针的结合位点不止一处,所以即便是特异性生物识别探针A和特异性生物识别探针B相同,特异性生物识别探针A与待测目标分析物的结合也不影响后续特异性生物识别探针B与待测目标分析物的继续结合。

[0041] 其中,特异生物识别探针A修饰的磁性微球,用于捕捉样品中的目标分析物;脱硫生物素修饰的特异性生物识别探针B,与磁珠捕捉的目标分析物结合并且提供脱硫生物素(链霉亲和素识别分子);链霉亲和素偶联的量子点纳米球探针,通过链霉亲和素-脱硫生物素的亲和作用与之结合,从而放大了目标分析物的检测信号。

[0042] 此外,由于生物素与链霉亲和素结合力强于脱硫生物素,因此加入生物素溶液后,生物素能够竞争性地与量子点表面的链霉亲和素结合,使得量子点纳米球探针分解,从而释放出量子点。通过检测量子点溶液的荧光值,来确定目标分析物浓度,克服了免疫磁珠对量子点的遮蔽作用。

[0043] 一种检测方法,是利用上述任一项所述的量子点纳米球探针的试剂盒检测目标分析物。

[0044] 具体方法是:

[0045] 1) 利用特异生物识别探针A修饰的磁性微球去捕捉样品中的目标分析物;利用磁力将特异生物识别探针A修饰的磁性微球-目标分析物复合体与样品基质分开,去除样品基质,得到特异生物识别探针A修饰的磁性微球-目标分析物复合体。

[0046] 2) 再加入脱硫生物素修饰的特异性生物识别探针B,利用探针B与磁珠捕捉的目标分析物结合并且提供脱硫生物素,得到探针A修饰的磁性微球-目标分析物-脱硫生物素修饰的探针B复合体。

[0047] 3) 加入链霉亲和素偶联的量子点纳米球探针,通过链霉亲和素-脱硫生物素的亲和作用与上述复合体结合,从而放大了目标分析物的检测信号。利用磁力将上述复合体与未结合的量子点纳米球探针分离。

[0048] 4) 加入生物素溶液后,使得量子点纳米球探针分解,从而释放出量子点。通过检测量子点溶液的荧光值,来确定目标分析物浓度。

[0049] 本发明的量子点纳米球探针试剂盒以及检测方法可用于医学诊断、食品安全和环境保护等领域。

[0050] 本发明的有益效果是：

[0051] 本发明通过支点介导的链置换反应，将3种脱硫生物素修饰的DNA发夹探针通过单链DNA催化的链置换反应组装形成Y-型DNA纳米结构；该Y-型DNA结构与链霉亲和素偶联的量子点通过可逆的脱硫生物素-链霉亲和素作用，进行自组装形成含有大量量子点颗粒的纳米球探针。由于一个生物识别分子可以连接大量的量子点，因此制备的探针能够极大的放大检测信号。

[0052] Y-型DNA上有3处脱硫生物素基团，而链霉亲和素修饰的量子点上一般有3~8个链霉亲和素蛋白，每个链霉亲和素蛋白可以结合4个脱硫生物素基团。本发明通过优化量子点纳米球探针的制备方法，限定链霉亲和素修饰的量子点与Y-型DNA以摩尔比为(0.8-1.5) : (0.8-1.5)混合，进行自组装所获得量子点纳米球探针才是符合本技术的量子点纳米球探针。所获得量子点纳米球探针分散性和悬浮性好，平均粒径是53.5nm，平均每个纳米球探针含有约82个量子点颗粒。

[0053] 本发明将制备的量子点纳米球探针与免疫磁珠分离技术相结合应用于快速检测，由于生物素与链霉亲和素结合力强于脱硫生物素，因此生物素能够竞争性地与量子点表面的链霉亲和素结合，使得量子点纳米球探针分解，从而释放出量子点，通过检测量子点溶液的荧光值，来确定目标分析物浓度，克服了免疫磁珠对量子点的遮蔽作用。

[0054] 本发明方法具有特异性灵敏度高，操作简单，检测迅速的优点。

[0055] 本发明所述的检测方法具有超高的灵敏度，对环境微生物的检测限为1.37cfu/mL。

[0056] 本发明所述的检测方法具有很好的特异性，常见的其他微生物对检测不产生影响。

附图说明

[0057] 图1为量子点纳米球探针制备示意图；

[0058] 图2为量子点纳米球扫描电镜图；

[0059] 图3为利用量子点纳米球探针快速检测环境微生物示意图；

[0060] 图4为量子点纳米球探针浓度优化；

[0061] 图5为抗原抗体反应时间的优化；

[0062] 图6为检测方法的灵敏度分析和回归曲线；

[0063] 图7为特异性实验结果图。

具体实施方式

[0064] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明，但并不局限于此。

[0065] 实施例1量子点纳米球探针

[0066] 量子点纳米球探针包括链霉亲和素偶联的量子点，特异性单链DNA，以及DNA发夹探针1、DNA发夹探针2和DNA发夹探针3。

[0067] 特异性单链DNA包含24个碱基，具体序列如下所示：5'-GCACTA(y*)CTCCCT(b*)

AACATC (x*) TCAAGC (a*) -3'。

[0068] DNA发夹探针1包含75个碱基,具体序列如下所示:5' -AGGTTA (z) GCTTGA (a) GATGTT (x) AGGGAG (b) TAGTGC (y) TCCAAT (z*) CACAAC (c*) GCACTA (y*) CTCCCT (b*) AACATC (x*) AAAAAAAAAAAAAAAAAA-desthiobiotin-3'。其中z-a为单链,x-b-y与y*-b*-x*形成颈结构,z*-c*为环结构,A15为间隔臂,desthiobiotin为脱硫生物素基团。

[0069] DNA发夹探针2包含75个碱基,具体序列如下所示:5' -GATGTT (x) AGGGAG (b) TAGTGC (y) GTTGTG (c) ATTGGA (z) AACATC (x*) TCAAGC (a*) TCCAAT (z*) CACAAC (c*) GCACTA (y*) AAAAAAAAAAAAAAAAAA-desthiobiotin-3'。其中x-b为单链,y-c-z与z*-c*-y*形成颈结构,x*-a*为环结构,A15为间隔臂,desthiobiotin为脱硫生物素基团。

[0070] DNA发夹探针3包含75个碱基,具体序列如下所示:5' -TAGTGC (y) GTTGTG (c) ATTGGA (z) GCTTGA (a) GATGTT (x) GCACTA (y*) CTCCCT (b*) AACATC (x*) TCAAGC (a*) TAACCT (z*) AAAAAAAAAAAAAAAAAA-desthiobiotin-3'。其中y-c为单链,z-a-x与x*-a*-z*形成颈结构,y*-b*为环结构,A15为间隔臂,desthiobiotin为脱硫生物素基团。

[0071] 其中,a与a*、b与b*、c与c*、x与x*、y与y*、z与z*区域互补配对。

[0072] 当三种DNA发夹探针1、2、3与特异性单链DNA反应时,特异性单链DNA (5' -y*-b*-x*-a*-3') 的a*区与探针1 (5' -z-a-x-b-y-z*-c*-y*-b*-x*-A15-3') 的a区结合,从而触发了支点介导的DNA链置换反应,打开了探针1的发夹结构,并且暴露了b*区和x*区;探针1暴露的b*区和x*区与探针2 (5' -x-b-y-c-z-x*-a*-z*-c*-y*-A15-3') 的b区和x区结合,打开了探针2的发夹结构,并且暴露了c*区和y*区;探针2暴露的c*区和y*区与探针3 (5' -y-c-z-a-x-y*-b*-x*-a*-z*-A15-3') 的c区和y区结合,打开了探针3的发夹结构,暴露了y*区、b*区、x*区、a*区、z*区。探针3暴露的y*区、b*区、x*区、a*区、z*区与探针1的y区、b区、x区、a区、z区结合,从而将特异性单链DNA (5' -y*-b*-x*-a*-3') 置换下来,最终形成Y-型的DNA纳米结构。该结构的3个末端均含1个脱硫生物素基团,而且每个脱硫生物基团能够与1个链霉亲和素特异性结合。因此,该Y-型DNA结构能够将表面修饰有链霉亲和素的量子点结合。由于一个量子点上可以偶联3~8个链霉亲和素基团,而每个链霉亲和素蛋白可以结合4个脱硫生物素基团,量子点通过链霉亲和素基团结合多个Y-型DNA纳米结构。而Y-型DNA纳米结构中存在3处脱硫生物素基团,因此,Y-型DNA纳米结构的另外2处脱硫生物素基团可以继续结合量子点,通过自组装,最终形成含有大量量子点颗粒的纳米球探针。量子点纳米球探针制备示意图见图1。

[0073] 一种量子点纳米球探针的试剂盒,包括下列组分:上述任一项所述的量子点纳米球探针,特异性生物识别探针A (包括抗体、核酸适体、核酸片段等) 修饰的磁性微球,脱硫生物素修饰的特异性生物识别探针B (包括抗体、核酸适体、核酸片段等),生物素溶液以及含有5% (v/v) 吐温20的PBS洗涤液。

[0074] 在有目标分析物存在时,磁性微球表面修饰的特异性生物识别探针A与样品中的目标分析物特异性结合,在外磁场如磁铁作用下,可将磁珠捕捉的分析物与样品基质分离;脱硫生物素修饰的特异性生物识别探针B与磁珠捕捉的分析物结合,形成复合物;链霉亲和素偶联的量子点纳米球探针与上述复合物上的脱硫生物素结合,形成了磁珠-分析物-量子点纳米球复合物,从而放大了目标分析物的检测信号。

[0075] 实施例2量子点纳米球探针的制备方法

[0076] 1) 制备DNA发夹探针溶液:采用超纯水将合成的3种脱硫生物素修饰的DNA探针干粉分别溶解配制成10 μ M浓缩溶液,于-20℃保存;再以磷酸缓冲液(50mM Na₂HPO₄,500mM NaCl)将探针浓缩液稀释成5 μ M溶液;将配制好的DNA探针溶液分别于95℃水浴加热5min,然后关闭水浴加热器,缓慢降温至室温,形成发夹结构的DNA探针保存于4℃。

[0077] 2) 制备Y-型DNA结构:将10 μ L以上所述3种DNA发夹探针、10 μ L浓度为5 μ M的特异性单链DNA和10 μ L磷酸缓冲液混合,室温反应2h,即可组装形成Y-型DNA结构。

[0078] 3) 制备量子点纳米球探针:将Y-型DNA结构溶液与链霉亲和素修饰的量子点(购买于武汉珈源量子点技术开发有限责任公司)以摩尔比为1:1充分混合,于4℃反应过夜,即可形成量子点纳米球探针。

[0079] 对实施例2制备得到量子点纳米球探针的透视电镜表征,结果如下。

[0080] 将制备的量子点纳米球探针涂布于碳膜包裹的铜网,在室温干燥后,以Jeol JEM-2011型透视电子显微镜在80kV下观察。结果如图2所示,制备的量子点纳米球探针呈现分散状(图2a),粒径分析显示平均粒径是53.5nm(图2b),平均每个纳米球探针含有约82个量子点颗粒(图2c)。

[0081] 当链霉亲和素修饰的量子点和Y-型DNA分子的摩尔比为1:0时,产物只有链霉亲和素修饰的量子点;当链霉亲和素修饰的量子点和Y-型DNA分子的摩尔比为1:3时,产物呈块状,含有多个量子点纳米球。块状结构容易影响空间位阻,会影响相关试剂盒的效果以及检测领域的应用。

[0082] 因此,只有链霉亲和素修饰的量子点和Y-型DNA分子摩尔比为(0.8-1.5):(0.8-1.5)时,最佳的,链霉亲和素修饰的量子点和Y-型DNA分子摩尔比为1:1,制备的量子点纳米球探针是呈分散、球状。

[0083] 实施例3基于纳米球探针的快速超灵敏检测方法

[0084] 1) 将抗体A标记的磁珠加到样品液中,室温(18~27℃)振荡60min,使磁珠上的抗体A与目标分析物充分结合;为了方便阅读,抗体A标记的磁珠记为免疫磁珠;

[0085] 2) 用磁力架将免疫磁珠-目标分析物复合体与样品基质分开,去除样品基质,得到免疫磁珠-目标分析物免疫复合体;

[0086] 3) 向2)中得到的免疫磁珠-目标分析物复合体加入脱硫生物素修饰的特异性抗体B,室温(18~27℃)振荡60min;

[0087] 4) 用磁力架将免疫磁珠-目标分析物-抗体B复合体与未结合的抗体分离,得到免疫磁珠-目标分析物-抗体B免疫复合体;

[0088] 5) 向4)中得到的免疫磁珠-目标分析物-抗体B复合体加入量子点纳米球探针,室温(18~27℃)振荡30min;

[0089] 6) 用磁力架将免疫磁珠-目标分析物-抗体B-量子点纳米球探针免疫复合体与未结合的量子点纳米球探针分离,得到免疫磁珠-目标分析物-抗体B-量子点纳米球探针免疫复合体;

[0090] 7) 向6)得到免疫磁珠-目标分析物-抗体B-量子点纳米球探针免疫复合体加入生物素溶液,室温(18~27℃)振荡30min;

[0091] 8) 用磁力架将免疫磁珠-目标分析物-抗体B复合物与未释放的量子点分离,得到量子点溶液;

[0092] 9) 以日立F7000荧光分光光度计检测量子点溶液在522纳米处荧光信号值,该荧光强度值与目标分析物浓度线性相关。

[0093] 实施例4利用量子点纳米球探针快速检测环境微生物

[0094] 快速检测环境微生物的示意图如图3所示,具体操作步骤为:

[0095] 1) 在1.5ml离心管中加入50 μ L抗体标记的免疫磁珠和500 μ L浓度为 1.0×10^8 cfu/mL的污染物降解菌*Shewanella oneidensis*,室温(18~27 $^{\circ}$ C)振荡60min;

[0096] 2) 将离心管置于磁力架5min,使得磁珠与溶液完全分开,用移液器从离心管底部吸去样品基质,得到免疫磁珠-S.*oneidensis*免疫复合体用含5% (v/v) 吐温20的PBS洗涤液洗涤3次;

[0097] 3) 向2) 种得到的免疫磁珠-S.*oneidensis*免疫复合体加入500 μ L脱疏生物素修饰的抗体,室温(18~27 $^{\circ}$ C)振荡60min;

[0098] 4) 将离心管置于磁力架5min,使得免疫磁珠-S.*oneidensis*-抗体免疫复合体与溶液完全分开,用移液器从离心管底部吸去过量的抗体,得到免疫磁珠-S.*oneidensis*-抗体免疫复合体用含5% (v/v) 吐温20的PBS洗涤液洗涤3次;

[0099] 5) 向4) 种得到的免疫磁珠-S.*oneidensis*-抗体免疫复合体加入500 μ L量子点纳米球探针,室温(18~27 $^{\circ}$ C)振荡60min;

[0100] 6) 将离心管置于磁力架5min,使得免疫磁珠-S.*oneidensis*-抗体-量子点纳米球探针免疫复合体与溶液完全分开,用移液器从离心管底部吸去过量的量子点纳米球探针,得到免疫磁珠-S.*oneidensis*-抗体-量子点纳米球探针免疫复合体用含5% (v/v) 吐温20的PBS洗涤液洗涤3次;

[0101] 7) 向6) 中得到的免疫磁珠-S.*oneidensis*-抗体-量子点纳米球探针免疫复合体加入500 μ L的2mM的生物素溶液,室温(18~27 $^{\circ}$ C)振荡30min;

[0102] 8) 将离心管置于磁力架5min,使得免疫磁珠-S.*oneidensis*-抗体免疫复合体与释放的量子点溶液完全分开,用移液器从离心管底部吸取释放的量子点溶液;得到量子点溶液,用荧光分光光度计检测其在522纳米处的荧光信号值,即可。

[0103] 实施例5量子点纳米球探针浓度优化

[0104] 在*S. oneidensis*菌液浓度为 1.0×10^8 cfu/mL,体积为500 μ L条件下研究最佳的量子点纳米球探针浓度,量子点探针稀释度分别选取为1/10,1/20,1/30,1/40,1/50和1/60,最后检测加入不同稀释度探针的反应液在522nm处的荧光强度值。检测结果如图4所示。

[0105] 从图4中可以看出当探针的稀释度为1/30时,最终反应液在522nm处的信号噪音比值最高,检测效果最灵敏,故最佳的量子点纳米球探针稀释度1/30。

[0106] 实施例6抗原抗体反应时间优化

[0107] 在*S. oneidensis*菌液浓度为 1.0×10^8 cfu/mL,体积为500 μ L,量子点纳米球探针稀释度为1/30的条件下研究最佳抗原抗体反应时间,反应时间分别选为10、20、30、40、50、60、70min,最后检测不同抗原抗体反应时间的反应液在522nm处的荧光强度值。检测结果如图5所示。

[0108] 从图5中可以看出当抗原抗体反应时间为10~60min时,荧光强度值随反应时间的增长而增大,当抗原抗体反应时间为60~70min时,荧光强度值趋于平缓,几乎不再增大,所以最优选的免疫反应时间为60min。

[0109] 实施例7检测方法的灵敏度分析

[0110] 将浓度为 10^9 cfu/mL的*S.oneidensis*菌悬液依次稀释为 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 、 1.0×10^1 cfu/mL的菌悬液。以上述建立的最优检测方法检测这些不同浓度的*S.oneidensis*菌液。以菌体浓度为横坐标,荧光强度值作为纵坐标,绘制曲线,结果见图6。

[0111] 图6中a为不同*S.oneidensis*菌液检测的荧光光谱图,522nm处的荧光强度值随着*S.oneidensis*菌浓度增加而增强。图6中b为522nm处的荧光强度值与*S.oneidensis*菌浓度对数值的相关性分析,分析该曲线可知,其回归方程为 $Y=0.085X+0.272$, ($R^2=0.986$),本发明方法检测限为1.37cfu/mL(根据信号噪音比值等于3倍判断),线性检测范围为 $1.0 \sim 1.0 \times 10^8$ cfu/mL。

[0112] 而现有技术检测*S.oneidensis*菌的最低检测浓度是拉曼光谱法 3.7×10^5 cfu/mL(Preciado-Flores S,Wheeler D A,Tran T M,et al.SERS spectroscopy and SERS imaging of *Shewanella oneidensis* using silver nanoparticles and nanowires[J].Chemical Communications,2011,47(14):4129-4131.);电化学免疫分析法12cfu/mL(Wen J,Zhou S,Yuan Y.Graphene oxide as nanogold carrier for ultrasensitive electrochemical immunoassay of *Shewanella oneidensis* with silver enhancement strategy[J].Biosensors and Bioelectronics,2014,52:44-49.)。

[0113] 通过比较,本发明方法的检测灵敏度优于已有的检测技术。

[0114] 实施例8检测方法的选择性分析

[0115] 分别配制浓度为 1.0×10^8 cfu/mL的*E.coli*,*S.aureus*,*B.subtilis*,*A.hydrophila*,*P.agglomerans*和*S.oneidensis*菌液;采用上述确定的最优检测方法检测这些不同菌种的菌液,其荧光强度值如图7所示。

[0116] 从图7中可以看出,本发明的量子点纳米球探针及其快速检测方法只对目标微生物*S.oneidensis*具有检测效果。说明本发明方法具有优异的特异性和准确性。

[0117] 实施例9检测方法可重复性分析

[0118] 对浓度为 1.0×10^8 cfu/mL的*S.oneidensis*菌液进行5次重复检测,检测结果均显示出类似的吸光值,相对标准偏差为3.84%,说明本发明方法具有很好的可重复性。

[0119] 以上仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

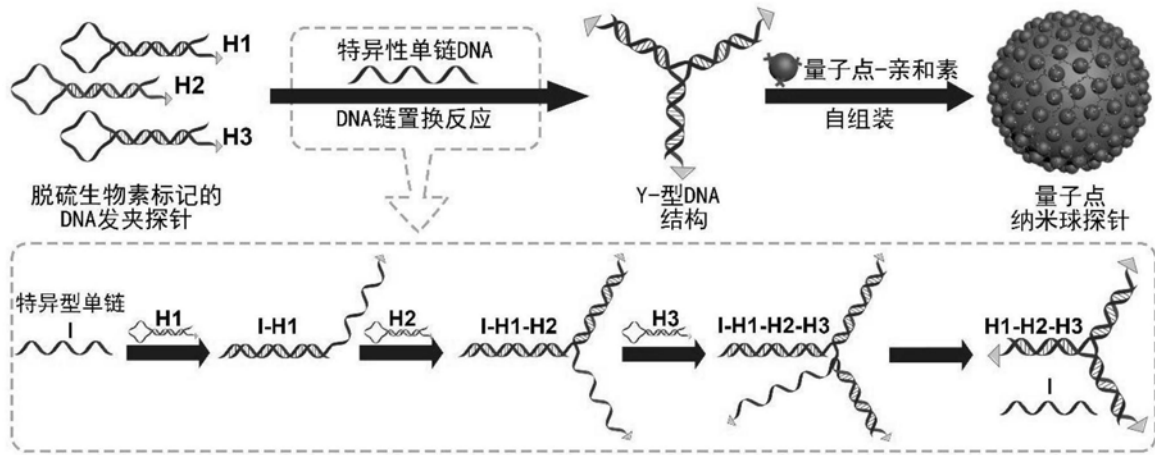


图1

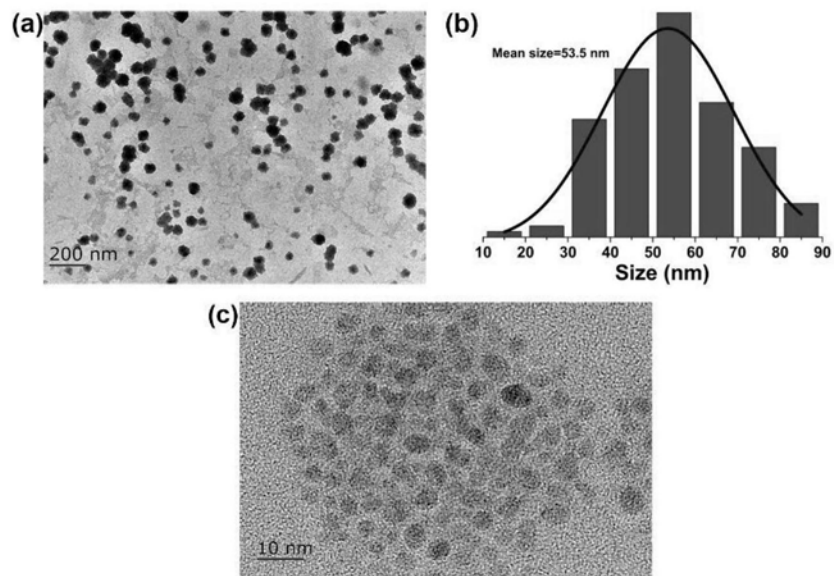


图2

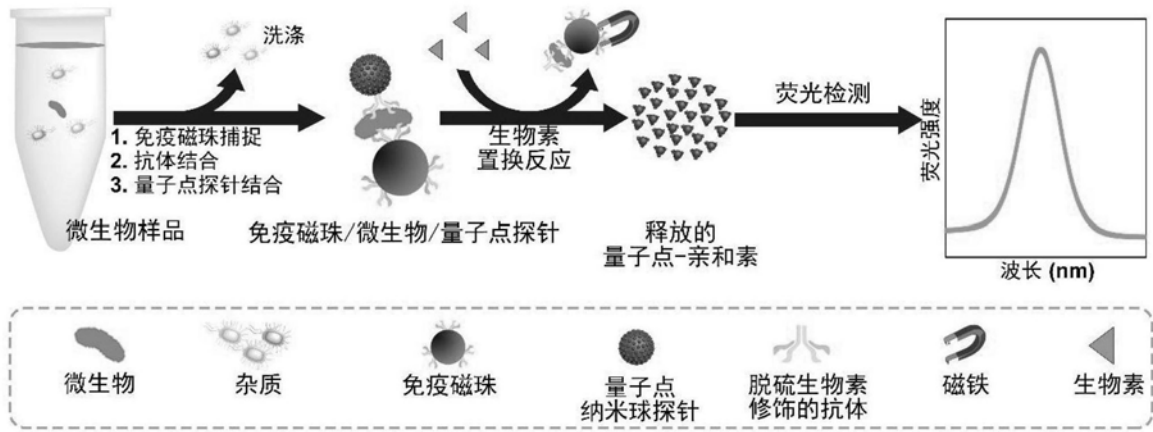


图3

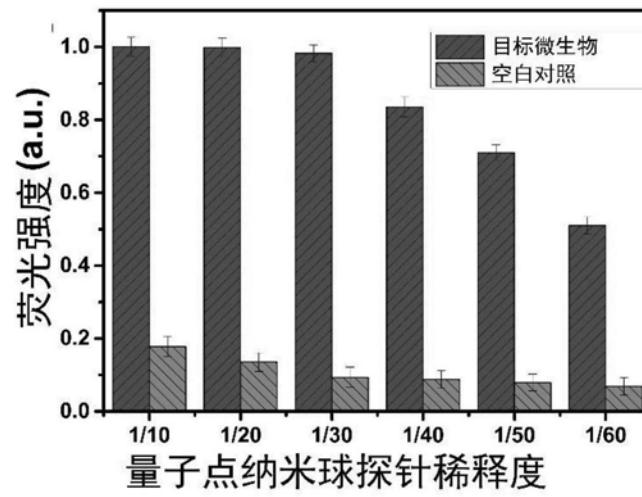


图4

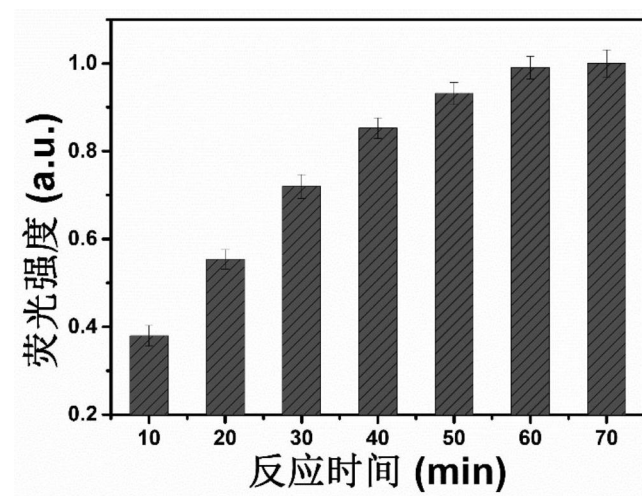


图5

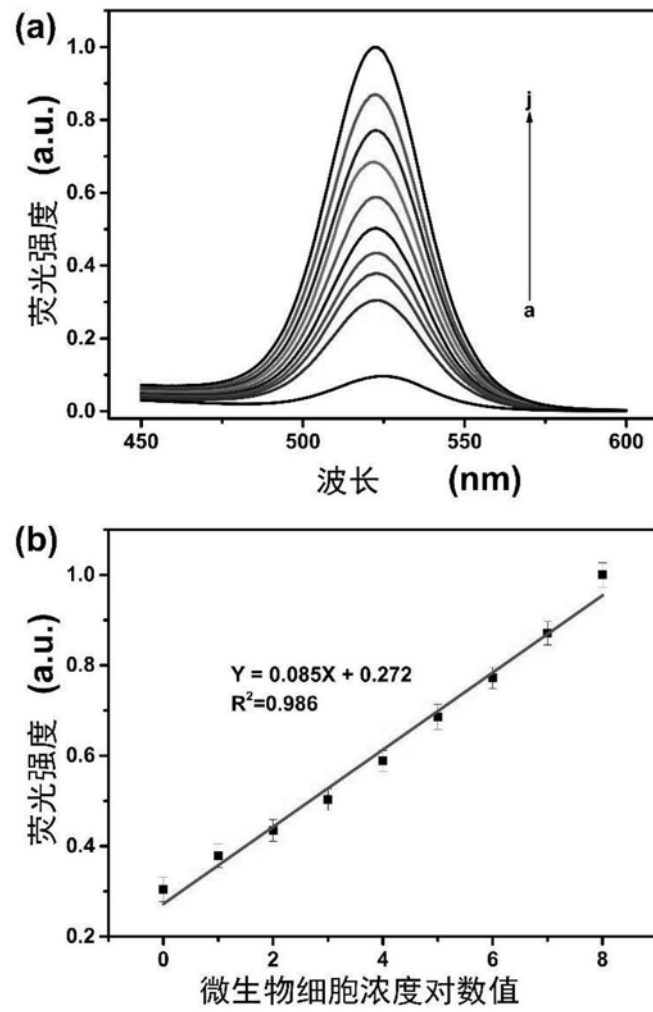


图6

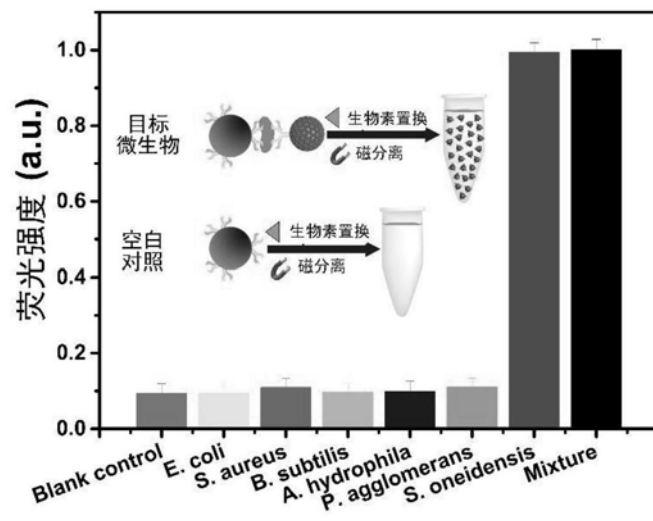


图7

专利名称(译)	一种灵敏度强、可分解的量子点纳米球探针及其制备方法		
公开(公告)号	CN107462705B	公开(公告)日	2019-10-18
申请号	CN2017110616843.8	申请日	2017-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	广东省生态环境技术研究所		
申请(专利权)人(译)	广东省生态环境技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	广东省生态环境技术研究所		
[标]发明人	温俊林 周顺桂 余震 陈俊华 汤佳 杨贵芹		
发明人	温俊林 周顺桂 余震 陈俊华 汤佳 杨贵芹		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543 G01N33/58		
代理人(译)	胡辉		
其他公开文献	CN107462705A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种灵敏度强、可分解的量子点纳米球探针及其制备方法。通过支点介导的链置换反应，将3种脱硫生物素修饰的DNA发夹探针自组装成Y-型DNA纳米结构；Y-型DNA结构与链霉亲和素偶联的量子点自组装形成量子点纳米球探针。本发明将制备的量子点纳米球探针与免疫磁珠分离技术相结合应用于快速检测目标分析物，由于生物素与链霉亲和素结合力强于脱硫生物素，使得量子点纳米球探针分解，从而释放出量子点，通过检测量子点溶液的荧光值，来确定目标分析物浓度，克服了免疫磁珠对量子点的遮蔽作用。本方法灵敏度高，对微生物的检测限为1.37cfu/mL。本方法特异性好，常见的其他微生物对检测不产生影响。

