



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104849446 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201510004601. 4

(22) 申请日 2015. 01. 07

(71) 申请人 青岛科技大学

地址 266000 山东省青岛市崂山区松岭路
99 号青岛科技大学

(72) 发明人 丁彩凤 王威 李小倩 陈瑶瑶
张伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 5/02(2006. 01)

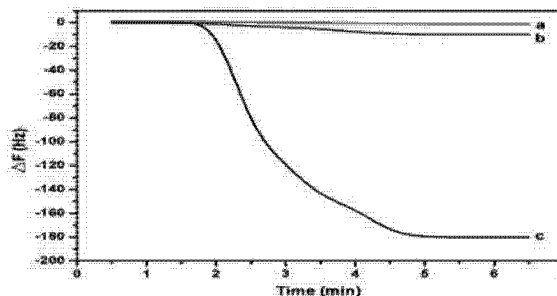
权利要求书2页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

基于纳米粒子放大技术检测 P53 蛋白生物传感器的制备方法

(57) 摘要

本发明提出了一种基于纳米金粒子质量放大 QCM 频移信号, 检测肿瘤标记物 P53 蛋白的新方法, 该方法通过 QCM 频移信号的强弱来实现野生型以及混合型 P53 蛋白的检测, 利用抗体与抗原的特异性免疫反应及共识双联 DNA 对野生型 P53 蛋白的特异性识别, 将能放大 QCM 频移信号的金纳米粒子固定在 QCM 芯片上, 实现对野生型和混合型 p53 蛋白的检测, 进而可以得到野生型 P53 蛋白同变异性 P53 蛋白的比例, 判断是否是癌细胞, 故能为临床医学和生物分析提供了一种新的分析方法。此方法具有较高的灵敏度和良好的选择性且成本较低, 操作简便, 能够检测肿瘤标志物 P53 蛋白, 具有广泛的应用前景。在最佳实验条件下, 对 P53 蛋白的检测限为 0. 1pg/mL。



1. 基于纳米粒子放大技术检测 P53 蛋白生物传感器的制备方法, 步骤包括:

(a) 双链 DNA 修饰的金纳米粒子生物探针的制备: 首先制备还原性金纳米粒子, 然后将所制备的金纳米粒子与捕获 DNA 混合, 二者通过金-硫键固定结合, 然后将此复合物与捕获 DNA 互补链混合, 两条 DNA 链完全互补结合形成稳定结构的纳米生物探针;

(b) 经 P53 蛋白第二抗体修饰过的金纳米粒子生物探针的制备: 用试剂氢氧化钠将步骤 (a) 中制备的金纳米粒子溶液调节至碱性, 然后与 P53 蛋白第二抗体溶液混合温育反应;

(c) 金制传感器表面的处理: 将在石英晶体微天平仪器测试过程中使用的金片浸入双氧水, 氨水和去离子水的混合溶液中处理, 然后用去离子水冲洗干净之后放置在仪器当中, 持续不断的通入巯基乙胺溶液, 然后用磷酸缓冲溶液冲洗金片表面, 再持续不断的通入 P53 蛋白第一抗体溶液, 最后用磷酸缓冲溶液冲洗金片;

(d) 将野生型 P53 蛋白缓慢持续通入步骤 (c) 中制备的金制传感器表面, P53 蛋白会固定在其表面, 然后用磷酸缓冲溶液冲洗掉未固载在金制传感器表面的 P53 蛋白, 再将步骤 (a) 中的生物探针持续缓慢通过金制传感器表面, 记录数据;

(e) 将野生型与突变型 P53 蛋白混合液持续缓慢通过步骤 (c) 中的金制传感器的表面, 两种 P53 蛋白会固定在其表面, 然后用磷酸缓冲溶液冲洗掉未固载在金制传感器表面的 P53 蛋白, 再将步骤 (b) 中产物持续缓慢通过金制传感器表面, 记录数据。

2. 根据权利要求 1 所述的基于纳米粒子放大技术检测 P53 蛋白生物传感器的制备方法, 其特征在于: 步骤 (a) 中还原性金纳米粒子的制备还原剂可采用柠檬酸三钠等。

3. 根据权利要求 1 所述的基于纳米粒子放大技术检测 P53 蛋白生物传感器的制备方法, 其特征在于: 步骤 (a) 中金纳米粒子形状为球型, 粒径约为 24 纳米。

4. 根据权利要求 1 所述的基于纳米粒子放大技术检测 P53 蛋白生物传感器的制备方法, 其特征在于: 步骤 (b) 中所采用碱性金纳米粒子溶液的 pH 值为 9.2。

5. 根据权利要求 1 所述的基于纳米粒子放大技术检测 P53 蛋白生物传感器的制备方法, 其特征在于: 步骤 (c) 中双氧水, 氨水和去离子水混合液的体积比为 1:1:5。

6. 根据权利要求 1 所述的基于纳米粒子放大技术检测 P53 蛋白生物传感器的制备方法, 其特征在于: 利用步骤 (c) 中巯基乙胺中的活性基团巯基的作用与金片表面作用形成化学键, 再由巯基乙胺去连接 P53 蛋白, 以便达到更好的效果, 巯基乙胺的浓度为 0.15M/L。

7. 根据权利要求 1 所述的基于纳米粒子放大技术检测 P53 蛋白生物传感器的制备方法, 其特征在于: 利用步骤 (d) 中 P53 蛋白第一抗体、P53 蛋白、互补双链 DNA、金纳米粒子对金片载体表面层层修饰, 形成的复合结构会逐步增大石英晶体微天平信号值, 据此实现对目标检测物的检测。

8. 根据权利要求 1 所述的基于纳米粒子放大技术检测 P53 蛋白生物传感器的制备方法, 其特征在于: 利用步骤 (e) 中 P53 蛋白第一抗体、P53 蛋白、P53 蛋白第二抗体、金纳米粒子对金片载体表面层层修饰, 形成的复合结构会逐步增大石英晶体微天平信号值, 据此实现对目标检测物的检测。

9. 根据权利要求 1 所述的基于纳米粒子放大技术检测 P53 蛋白生物传感器的制备方法, 其特征在于: 利用步骤 (d) 和 (e) 中分别测取野生型 P53 蛋白和混合型 P53 蛋白标准样品所得线性关系, 据此实现对突变型 P53 蛋白目标检测物的检测。

10. 根据权利要求 1 所述的传感器载体为金制薄片,厚度约为 100nm。

基于纳米粒子放大技术检测 P53 蛋白生物传感器的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物传感器的研制领域,具体涉及一种基于纳米粒子放大技术检测 P53 蛋白生物传感器的制备方法。

背景技术

[0002] 石英晶体微天平技术,是 20 世纪 60 年代建立起来的一种新型传感器测量技术,主要是利用了石英晶振对质量的敏感性,通过监测石英晶振表面吸附待测物质后谐振频率的变化来检测待测物。QCM 最大的特点是能够对实验所用的芯片进行适合随意的特异性修饰,它自上世纪六七十年代诞生以来已被广泛应用于分子生物学、免疫学、遗传学、环境科学以及其他一些涉及到质量、密度、浓度等检测领域。QCM 这类传感器具有响应灵敏、选择性良好、便于实现自动化等优点,并且仪器简单、操作方便,因此引起了各国家科学家的浓厚兴趣,成为当今传感器领域的研究热点之一。

[0003] 纳米材料是纳米技术的一个重要的方面,它是指在大约 0.1-100nm 范围内,物质的性能发生突变,表现出新的特殊性质。若其没有特殊性质,也不是纳米材料。纳米材料具有量子尺寸效应、表面与界面效应、小尺寸效应、宏观量子隧道效应,使其具有不同于常规粗晶材料所没有的一系列独特的性能。同时,纳米材料的组成成分对其适用性也具有重要的影响,它能够影响被检测物质的范围及检测的灵敏性等方面。随着纳米技术及生物技术的不断发展,纳米金粒子引起了科学界的广泛关注,在诊断和修复以及治疗等方面都可以看到金纳米粒子的应用,这是由纳米金粒子良好的生物相容性以及无毒性所决定的。目前,纳米金粒子可以与蛋白质, DNA, 酶, 以及生物素等生物体相结合,纳米金粒子在生物传感器, DNA 识别与检测, 基因治疗, 免疫分析检测等方面具有巨大的应用前景。

[0004] 生物传感器是一种将酶、抗体等对生物体功能有响应的最小单体引入电极,以此来对目标检测物进行分析检测的检测器,具有专一、快速、灵敏、准确等优点,已广泛应用于临床检测、环境检测和生化分析等领域。其中电流型酶传感器研究最多的一种类型。Arnold 等将谷氨酸氧化酶固载于 Nafion 修饰的铂电极上,制成了对谷氨酸敏感的生物传感器,检测限为 $0.3 \mu\text{mol/L}$,线性范围高达 $800 \mu\text{mol/L}$ 。选择性明显提高,有效消除了来自抗坏血酸、尿酸和乙酰氨基酚等杂质的干扰。

发明内容

[0005] 本发明研制了一种新颖的基于纳米金粒子质量放大石英晶体微天平 (QCM) 的频移信号,检测肿瘤标记物 P53 蛋白的新方法。该方法将 P53 蛋白第一抗体先固定在芯片上,对金纳米粒子分别修饰共识双链 DNA 和 P53 蛋白第二抗体,通过共识双链 DNA 以及抗体抗原特异性免疫反应分别对野生型 P53 蛋白以及混合型 P53 蛋白进行识别检测,将能放大 QCM 频移信号的金纳米粒子固定在 QCM 芯片上,实现对 P53 蛋白的检测,具有较高的灵敏度和良好的选择性。在最佳实验条件下,对 P53 蛋白的检测限为 $0.1 \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。此方法灵敏度高,选

择性好,就有广泛的应用前景。

[0006] 本发明所提供的方法包括以下步骤:

[0007] (1) 制备还原性金纳米粒子,

[0008] 所述的方法,其所述的还原剂为柠檬酸三纳。

[0009] 所述的方法,其所述的金纳米粒子形状为球型,粒径约为 24 纳米。

[0010] (2) 将所制备的金纳米粒子与捕获 DNA 混合,二者通过金-硫键固定结合,然后将此复合物与捕获 DNA 互补链混合,两条 DNA 链完全互补结合形成稳定结构的纳米生物探针,最后产物用磷酸缓冲溶液清洗干净。

[0011] (3) 用试剂氢氧化钠将制备的金纳米粒子溶液调节至碱性,然后与 P53 蛋白第二抗体溶液混合温育反应,反应产物用磷酸缓冲溶液清洗干净。

[0012] 所述的方法,其所述的碱性金纳米粒子溶液 pH 值为 9.2。

[0013] (4) 将在石英晶体微天平仪器测试过程中使用的金片浸入双氧水,氨水和去离子水的混合溶液中处理,然后用去离子水冲洗干净之后放置在仪器当中,持续不断的通入巯基乙胺溶液,然后用磷酸缓冲溶液冲洗掉没有接在金表面的的巯基乙胺,再持续不断的通入 P53 蛋白第一抗体溶液,最后用磷酸缓冲溶液冲洗掉没有固定在金制传感器表面的 P53 蛋白第一抗体。

[0014] 所述的方法,其所述的双氧水,氨水和去离子水混合液的体积比为 1:1:5。

[0015] 所述的方法,其所述的巯基乙胺中的活性基团巯基的作用与金片表面作用形成化学键,再由巯基乙胺去连接 P53 蛋白,以便达到更好的效果,巯基乙胺的浓度为 0.15M/L。

[0016] (5) 将野生型 P53 蛋白缓慢持续通入制备的金制传感器表面,P53 蛋白会固定在其表面,然后用磷酸缓冲溶液冲洗掉未固载在金制传感器表面的 P53 蛋白,再将步骤 (2) 中的生物探针持续缓慢通过金制传感器表面,记录数据。

[0017] 所述的方法,其所述的 P53 蛋白第一抗体、P53 蛋白、互补双链 DNA、金纳米粒子对金片载体表面层层修饰,形成的复合结构会逐步增大石英晶体微天平信号值,据此实现对目标检测物的检测。

[0018] (6) 将野生型与突变型 P53 蛋白混合液持续缓慢通过金制传感器的表面,两种 P53 蛋白会固定在其表面,然后用磷酸缓冲溶液冲洗掉未固载在金制传感器表面的 P53 蛋白,再将步骤 (3) 中产物持续缓慢通过金制传感器表面,记录数据。

[0019] 所述的方法,其所述的 P53 蛋白第一抗体、P53 蛋白、P53 蛋白第二抗体、金纳米粒子对金片载体表面层层修饰,形成的复合结构会逐步增大石英晶体微天平信号值,据此实现对目标检测物的检测。

[0020] 所述的方法,其所述的利用步骤 (5) 和 (6) 中分别测取野生型 P53 蛋白和混合型蛋白标准样品所得线性关系,据此实现对突变型 P53 蛋白目标检测物的检测。

[0021] 所述的方法,其所述的传感器载体为金制薄片,厚度约为 100nm。

附图说明

[0022] 附图 1 为发明设计过程原理图。图 1(a):1、传感器金片修饰 P53 蛋白第一抗体;2、在传感器金片上 P53 蛋白第一抗体与野生型 P53 蛋白结合,P53 蛋白固载至传感器金片上;3、经互补双链 DNA 修饰过的金纳米粒子被 P53 蛋白捕获结合在传感器金片表面。图 1(b):

1、传感器金片修饰 P53 蛋白第一抗体；2、在传感器金片上 P53 蛋白第一抗体与混合型 P53 蛋白结合，P53 蛋白固载至传感器金片上；3、经 P53 蛋白第二抗体修饰过的金纳米粒子被 P53 蛋白捕获结合在传感器金片表面。

[0023] 附图 2 为金纳米粒子对本发明所带来的信号放大效果图。a、QCM 信号基线；b、单纯的野生型 P53 蛋白在 QCM 上产生的信号；c、经金纳米粒子信号放大之后在 QCM 上产生的信号。

[0024] 附图 3 为不同浓度野生型 P53 蛋白检测物在 QCM 上产生的信号以及其线性工作曲线。线性回归方程为 $\Delta F = 677.8 - 50.141gC(\text{pg mL}^{-1})$ ($R = 0.9979$)，使用 3σ 法得到的检测限为 0.1pg/mL 。附图 4 为不同浓度混合型 P53 蛋白检测物在 QCM 上产生的信号以及其线性工作曲线。线性回归方程为 $\Delta F = 710.1 - 52.851gC(\text{pg mL}^{-1})$ ($R = 0.9991$)，使用 3σ 法得到的检测限为 0.1pg/mL 。

[0025] 附图 5 为该发明方法对于实际样品的检测效果图。普通细胞匀浆液中野生型 P53 蛋白与混合型 P53 蛋白相比数量变化不大，而人类乳腺癌细胞匀浆液中野生型 P53 蛋白与混合型 P53 蛋白相比数量变化很大，说明癌细胞中含有大量突变型 P53 蛋白。

具体实施方式

[0026] 以下实施例将有助于本领域的普通技术人员进一步理解本发明，但不以任何形式限制本发明。实施例 1

[0027] 纳米多孔金片电极电化学免疫传感器检测巯基乙酸（见图 1）

[0028] 一、经互补双链 DNA 修饰的金纳米粒子生物探针的制备。

[0029] (1) 金纳米粒子的制备

[0030] 纳米金粒子的合成是通过柠檬酸三钠还原四氯金酸制备而成。具体制备方法如下：首先配制 0.01% 的三水合氯化金溶液和 1% 的柠檬酸三钠溶液，并用 $0.22\ \mu\text{m}$ 的多孔滤膜分别过滤除去杂质。取过滤后的 5mL 0.2% HAuCl_4 至 250mL 容量瓶，加二次水稀释至 100mL，搅拌加热至沸，然后快速加入 2.5mL 1% 柠檬酸三钠。反应十五分钟后停止加热，继续搅拌溶液冷却至室温。将制备好的金胶溶液保存于 4°C 备用。

[0031] (2) 金纳米粒子 - 互补双链 DNA 复合物的制备。

[0032] 首先，取 $25\ \mu\text{L}$ 浓度为 $1.0 \times 10^{-7}\text{M}$ 的捕获 DNA 于 $1000\ \mu\text{L}$ 已经制备的金纳米粒子溶液中，混合均匀，然后在 37°C 荡床条件下反应 24 小时，捕获 DNA 会以金 - 硫键的形式逐渐结合到金纳米粒子表面，再加入 $25\ \mu\text{L}$ 浓度为 $1.0 \times 10^{-7}\text{M}$ 的捕获 DNA 互补链，然后在 37°C 荡床条件下反应 2 小时，由于两条链完全互补，则互补链也会结合到金纳米粒子表面，然后将此混合液 10000r/min 条件下离心半小时，去除上清液，产物保存于 4°C 备用。

[0033] 二、经 P53 蛋白第二抗体修饰的金纳米粒子生物探针的制备。

[0034] 将制备的金纳米粒子溶液用浓度为 0.2M 的氢氧化钠溶液将其 pH 值调节为 9.2，然后将一系列不同浓度体积为 $100\ \mu\text{L}$ 的 P53 蛋白第二抗体溶液与碱性金纳米粒子溶液混合，然后在 37°C 荡床条件下反应 2 小时，然后将此混合液 10000r/min 条件下离心半小时，去除上清液，产物保存于 4°C 备用。

[0035] 三、石英晶体微天平金制芯片的处理。

[0036] 本发明所使用的 QCM 芯片的基频为 5MHz。使用前，将芯片放入新配制的 piranha

溶液（注意：piranha 溶液具有腐蚀性、潜在的爆炸等危险；同时，避免皮肤接触）中浸泡 5min，取出后用去离子水漂洗 3 次；然后，再将芯片放入 30% 双氧水，28% 氨水及去离子水体积比为 1:1:5 的洗液中，70℃ 下煮 10min，取出后用去离子水漂洗 3 次；放入检测池前，用氮气吹干，备用。

[0037] 将预处理过的石英芯片用镊子夹住轻轻放入检测池内，组装完毕；打开相应软件，设定温度为 37℃，检测基频；调整流速为 60 μ L/min。连续通入 PBS 缓冲溶液 (0.01M, pH 7.4)，稳定后，再通入 0.15M 巯基乙胺孵化 20min，使其稳固地固定在金制芯片表面；通入 PBS 缓冲溶液清洗未接上的抗体后，剩下的抗体就与巯基乙胺以稳定的化学键结合，固定在芯片表面。

[0038] 四、石英晶体微天平检测 P53 蛋白。

[0039] 将不同浓度活化好的野生型 P53 蛋白通入检测池，通过 P53 蛋白与抗体的特异性结合，P53 蛋白便固定在芯片上；经 PBS 冲洗掉未结合的 P53 蛋白后，通入已修饰有 DNA 的金纳米粒子，根据完全互补双链 DNA 上对野生型 P53 蛋白特殊的识别位点，金纳米粒子便固定在芯片上；通入 PBS 缓冲溶液冲洗，至信号不再变化。根据石英晶体微天平的频率波动情况，判断野生型 p53 蛋白的含量。

[0040] 将不同浓度活化好的混合型 P53 蛋白通入检测池，通过 P53 蛋白与抗体的特异性结合，可以先后将 P53 蛋白及其修饰有第二抗体的金纳米粒子固定在金制芯片上；通入 PBS 缓冲溶液冲洗，至信号不再变化。根据石英晶体微天平的频率波动情况，判断野生型 p53 蛋白的含量。

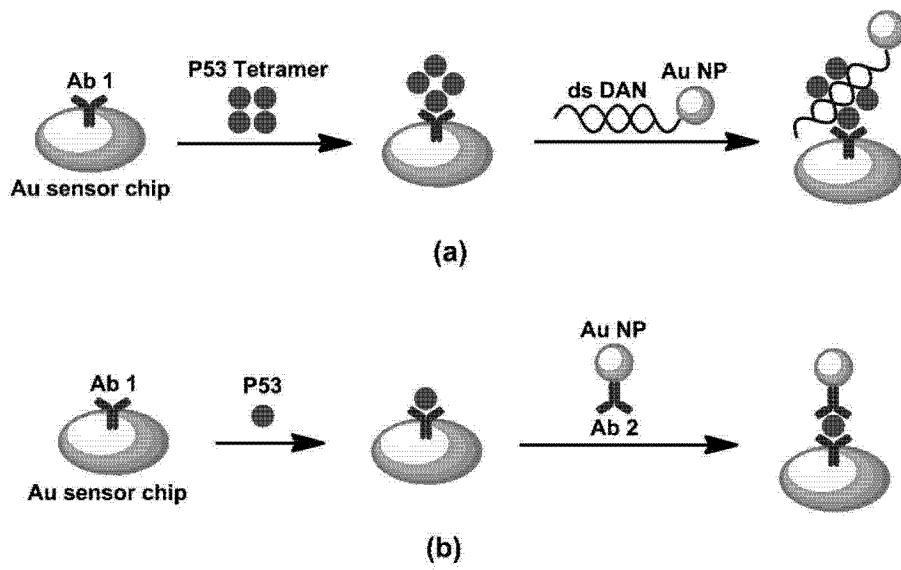


图 1

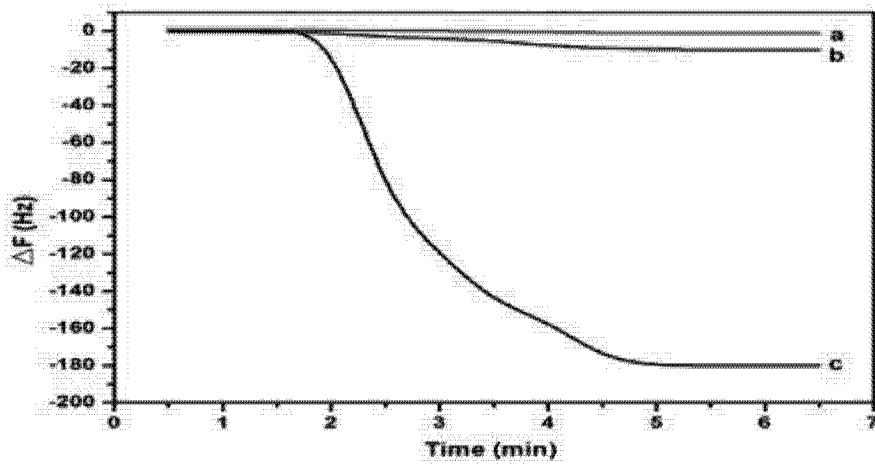


图 2

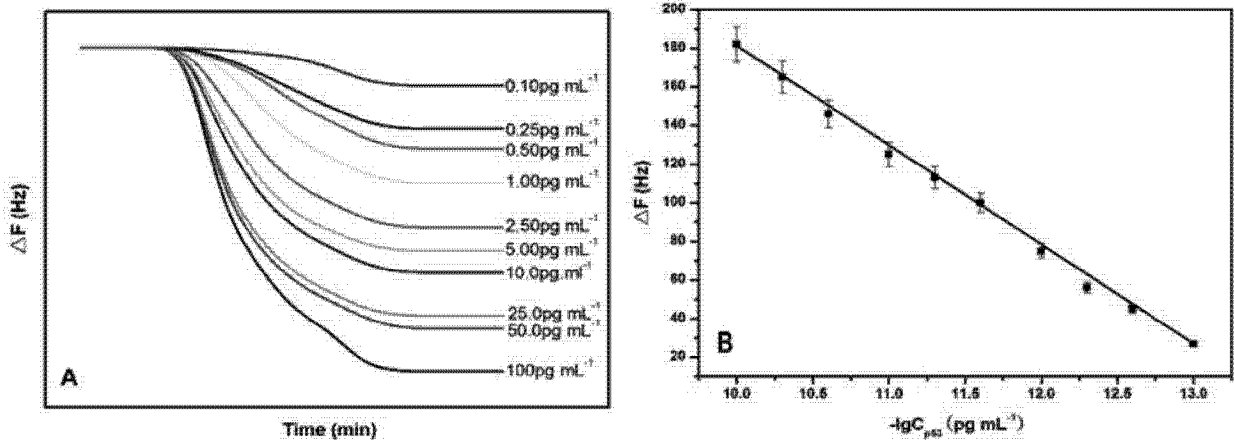


图 3

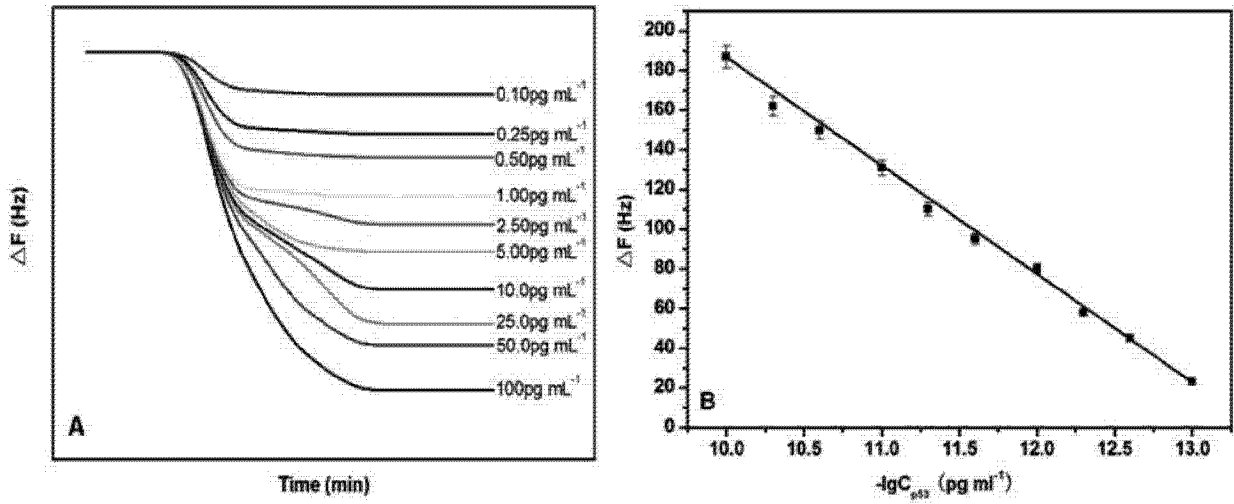


图 4

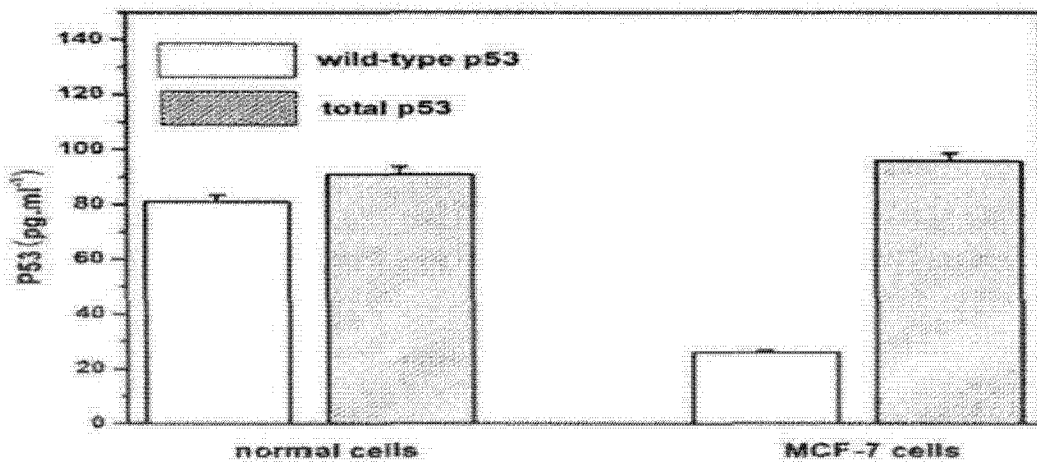


图 5

专利名称(译)	基于纳米粒子放大技术检测P53蛋白生物传感器的制备方法		
公开(公告)号	CN104849446A	公开(公告)日	2015-08-19
申请号	CN201510004601.4	申请日	2015-01-07
[标]申请(专利权)人(译)	青岛科技大学		
申请(专利权)人(译)	青岛科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	青岛科技大学		
[标]发明人	丁彩凤 王威 李小倩 陈瑶瑶 张伟		
发明人	丁彩凤 王威 李小倩 陈瑶瑶 张伟		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/68 G01N5/02		
CPC分类号	G01N33/68 G01N5/02 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提出了一种基于纳米金粒子质量放大QCM频移信号，检测肿瘤标志物P53蛋白的新方法，该方法通过QCM频移信号的强弱来实现野生型以及混合型P53蛋白的检测，利用抗体与抗原的特异性免疫反应及共识双链DNA对野生型P53蛋白的特异性识别，将能放大QCM频移信号的金纳米粒子固定在QCM芯片上，实现对野生型和混合型p53蛋白的检测，进而可以得到野生型P53蛋白同变异型P53蛋白的比例，判断是否是癌细胞，故能为临床医学和生物分析提供了一种新的分析方法。此方法具有较高的灵敏度和良好的选择性且成本较低，操作简便，能够检测肿瘤标志物P53蛋白，具有广泛的应用前景。在最佳实验条件下，对P53蛋白的检测限为0.1pg/mL。

