

[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 200810034363.1

[51] Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2008年9月3日

[11] 公开号 CN 101256191A

[22] 申请日 2008.3.7

[21] 申请号 200810034363.1

[71] 申请人 中国科学院上海微系统与信息技术研究所

地址 200050 上海市长宁区长宁路 865 号

[72] 发明人 贾春平 赵建龙 金庆辉

[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

代理人 潘振甦

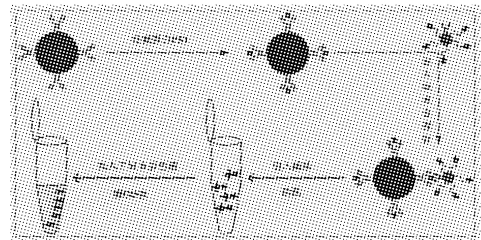
权利要求书 3 页 说明书 6 页 附图 2 页

[54] 发明名称

基于磁珠和纳米金探针的微量蛋白质的测定方法

[57] 摘要

本发明涉及一种基于磁珠及纳米金探针的高灵敏度微量蛋白质的测定方法，其特征在于：首先用待测蛋白的单克隆抗体标记磁珠，在纳米金上标记待测蛋白的多克隆抗体，在纳米金上同时还标记一种带有生物素标记的 DNA 探针，纳米金上的 DNA 探针通过生物素-链亲和素反应，又标记上了辣根过氧化物酶 (HRP)，组成纳米金探针，将标记好抗体的磁珠及纳米金探针与待测蛋白样品混合，37℃ 孵育一段时间，然后再洗去没有反应的纳米金探针，用 TMB 显色系统进行显色，从而达到对待测蛋白进行定量检测的目的。本发明检测时间可缩至 1-1.5 小时，灵敏度达 pg/ml。



1、基于磁珠和纳米金探针的微量蛋白质的测定方法，其特征在于首先用待测蛋白质的单克隆抗体标记磁珠，在纳米金上标记上待测蛋白质的多克隆抗体，在纳米金上同时标记一种带有生物素标记的 DNA 探针，纳米金上的 DNA 探针通过生物素-链亲和素反应，又标记上了辣根过氧化物酶，组成纳米金探针；将标记好待测蛋白质单克隆抗体的磁珠及纳米金探针与待测蛋白质样品混合，37°C 温度下孵育，然后再洗去没有反应的纳米金探针，用四甲基联苯胺显色系统进行显色，从而达到对待测蛋白质进行定量测定的目的。

2、按权利要求 1 所述的基于磁珠和纳米金探针的微量蛋白质的测定方法，其特征在于测定步骤是：

A 待测蛋白质的单克隆抗体标记磁珠

a) 活化磁珠：选用羧基修饰的磁珠，用 300 -500 $\mu$ l 25mM pH6 的 MES 溶液清洗 300-500 $\mu$ l 磁珠两次，加冰浴的 50mg/ml 碳二亚胺溶液 40-60 $\mu$ l、50 mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺溶液 40-60 $\mu$ l，室温孵育 30min；再用 300 $\mu$ l 25mM pH6 的 MES 溶液洗两次；

b) 标记磁珠：用 60-100 $\mu$ l 25mM pH6 的 MES 溶液溶解 150-250 $\mu$ g 的待测蛋白质的单克隆抗体，充分混匀，加入到已活化的抗体里，再加 40 $\mu$ l 25mM pH6 的 MES 溶液，使终体积为 100-140 $\mu$ l；室温放置半小时或 4°C 放置 2 小时；再用 300-500 $\mu$ l PBS 洗 4 次，按所需浓度重悬磁珠，2-8°C 储存备用。

B 多克隆抗体及 DNA 探针标记纳米金

a) 确定抗体的用量 取 100 $\mu$ l 不同浓度的抗体加到 1ml 纳米金溶液里，室温静置 5 分钟，再向上述不同浓度的各管中加入 100 $\mu$ l 的 1N NaCl 溶液，室温静置 1 小时，稳定 1ml 纳米金溶液红色不变的最低蛋白质用量，即为该标记蛋白质的用量；

b) 抗体标记 按照步骤 a) 确定的抗体用量，标记 1ml 纳米金，室温放置 30 分钟-1 小时；

c) DNA 探针标记 向经过抗体标记的纳米金溶液里, 加入巯基(5' 端)及生物素标记(3' 端)的 DNA 探针, 使 DNA 探针的终浓度为 3-5 $\mu$ M, 室温静置标记, 加入稳定剂稳定 48-72 小时, 离心清洗 3-4 次, 洗去未标记上的抗体及 DNA 探针;

d) HRP 标记 将 2-3 $\mu$ l 链亲和素-HRP 与标记了抗体及 DNA 探针的纳米金溶液混合, 在室温下放置 1 小时, 用 PH7.0 的 0.1M 磷酸盐缓冲液 PBS 清洗 3-4 次, 洗去未标记上的链亲和素-HRP, 再加 100 $\mu$ l 10mM PB 重悬, 4 $^{\circ}$ C 保存备用;

#### C 免疫反应

取标记好抗体的磁珠 0.5-1 $\mu$ l, 先与待测样品 10-20 $\mu$ l 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟-1 小时, 引入磁场, 用洗液清洗 3-4 次, 再加入 1-2 $\mu$ l 标记好的纳米金探针, 继续杂交 30 分钟, 杂交体积为 20 $\mu$ l, 杂交液为含 0.05%Tween20 及 0.5% BSA 组成的 0.1MPBS, 形成磁珠-待测蛋白-纳米金探针复合体, 引入磁场, 清洗 4 次, 洗去未反应的纳米金探针;

#### D 显色反应

向上述形成的磁珠-待测 DNA-纳米金探针复合体中加入 20-30 $\mu$ l HRP 酶底物-TMB 显色液, 避光孵育 10-15 分钟, 加入 0.2M 浓硫酸终止液 10-15 $\mu$ l, 90 分钟内, 450nm 测 OD 值;

上述步骤 B 中 a) 内, 不同浓度分别为 0 $\mu$ g/ml、0.5 $\mu$ g/ml、1 $\mu$ g/ml、2 $\mu$ g/ml、3 $\mu$ g/ml 和 5 $\mu$ g/ml;

上述步骤 B 中 c) 内稳定剂为含 0.5-1%BSA、0.1NNaCl、10mN 的 PB 溶液;

上述步骤 C 中的洗液为含体积百分数 0.05%TWEEN20 和质量百分数为 0.1%BSA 的 PBS。

3、按权利要求 2 所述的基于磁珠和纳米金探针的微量蛋白质的测定方法, 其特征在于选用羟基修饰的磁珠直径为 1-3 $\mu$ m。

4、按权利要求 2 或 3 所述的基于磁珠和纳米金探针的微量蛋白质的测定方法, 其特征在于选用羟基修饰的磁珠系 Dynal 公司生产的。

5、按权利要求 2 所述的基于磁珠和纳米金探针的微量蛋白质的测定方法，其特征在于步骤 B 中 c) 的室温静置标记 17 小时。

6、按权利要求 2 所述的基于磁珠和纳米金探针的微量蛋白质的测定方法，其特征在于步骤 B 中 PH7.2 的 0.1M 磷酸盐缓冲液 PBS 组成为：137mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, 4.3mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.4 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>。

7、按权利要求 2 所述的基于磁珠和纳米金探针的微量蛋白质的测定方法，其特征在于步骤 B 中 d) 所述的 HRP 浓度为 1mg/ml。

8、按权利要求 2 所述的基于磁珠和纳米金探针的微量蛋白质的测定方法，其特征在于所述的 TMB 显色液由上海科华生物有限公司提供。

9、按权利要求 2 所述的基于磁珠和纳米金探针的微量蛋白质的测定方法，其特征在于所述的测定方法所测定的蛋白质的灵敏度为 pg/ml。

## 基于磁珠和纳米金探针的微量蛋白质的测定方法

### 技术领域

本发明涉及一种蛋白质的测定，特别是一种基于磁珠及纳米金探针的高灵敏度微量蛋白质的测定方法，可应用于医学领域。

### 背景技术

酶联免疫反应（ELISA）在临床实验室已得到普遍的应用，可用于检测各种肿瘤标志物、细胞因子、病毒标志物等各种蛋白质，目前也已有多种市售的 ELISA 试剂盒。但是，ELISA 法操作程序复杂，步骤多，尤其是时间较长，需要 5、6 个小时，给临床应用带来一些不便。如果缩短检测的时间，则会降低检测的灵敏度，达不到临床所需要的检测要求。因此，为满足临床快速检测的需要，研发快速、高灵敏度的蛋白质检测方法是近几年的研究热点。

随着纳米科学技术的不断发展，纳米材料和纳米结构取得了引人瞩目的成就，为生物医学的发展提供了新的契机。纳米材料具有传统材料所不具备的特有的三大效应：表面效应、小尺寸效应和宏观量子隧道效应。对于小尺寸的磁珠来说，当外加磁场时，磁珠会被磁化并吸附在磁极上，而撤去外加磁场时，磁珠的磁性消失，磁珠重新分散在溶液中，而不是聚集在一起。由于纳米磁珠对外磁场具有良好的响应性，因此可以通过外磁场作用，利用纳米磁珠进行生物样品的分离和定位等操作，从而实现生物传感器系统的集成化和自动化。作为标记材料而广泛应用于免疫检测中的纳米胶体金颗粒对生物分子有很强的吸附功能，可以与蛋白质、核酸等非共价结合，因而在生物医学基础研究和临床实验中成为非常有用的工具。纳米金颗粒标记技术具有简单、快速、准确和无污染等优点，且检测不依赖昂贵的激光检测仪器，只需普通光学仪器，甚至肉眼即可辨别。鉴于以上优点，开发基于磁珠和纳米

金粒子的检测技术已成为当今研究的热点,特别适合于广大基层单位、医院、及大批量时间紧的检测和面积普查等,因此该技术具有巨大的发展潜力和应用前景。

## 发明内容

本发明的目的在于提供一种基于磁珠和纳米金探针的微量蛋白质的测定方法,也即本发明要解决的技术问题主要是开发一种微量蛋白质的高灵敏度的快速测定方法。

本发明主要内容包括:首先用待测蛋白质的单克隆抗体标记磁珠,在纳米金上标记上待测蛋白质的多克隆抗体,在纳米金上同时还标记一种带有生物素标记的 DNA 探针,纳米金上的 DNA 探针通过生物素-链亲和素反应,又标记上了辣根过氧化酶 Horseradish Peroxidase (HRP),组成纳米金探针,将标记好待测蛋白质单克隆抗体的磁珠及纳米金探针与待测蛋白质样品混合,37℃ 孵育一段时间,然后再洗去没有反应的纳米金探针,用四甲基联苯胺 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) 显色系统进行显色,从而达到对待测蛋白质进行定量测定的目的,具体测定流程见图 1。

主要包括以下具体内容:

### 一、所用试剂及材料:

1. 羧基修饰的磁珠:购自 Dynal 公司,直径 1-3 $\mu\text{m}$ 。
2. 0.1M 磷酸盐缓冲液 PBS(PH7.2)组成为:137mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, 4.3mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.4 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 。
3. 0.1M 磷酸缓冲液 PB (PH7.2) : 0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
4. 杂交缓冲液: 0.1MPBS、0.5%牛血清白蛋白 BSA (质量%)、0.05%Tween20 (体积%)。
5. 洗液: 0.1MPBS、0.1%BSA (质量%)、0.05%Tween20 (体积%)。
6. TMB 显色液, 购自上海科华生物有限公司。

### 二、具体的实施方式:

#### 1 待测蛋白质的单克隆抗体标记磁珠

- 1.1 活化磁珠: 选用羧基修饰的磁珠, 用 300 -500 $\mu\text{l}$  25mM

2-[N-morpholino]ethane sulfonic acid (MES) 溶液 (pH6) 清洗 300-500 $\mu$ l 磁珠 (相当于 3-5mg 磁珠) 两次, 加冰浴的 50mg/ml 碳二亚胺 (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride EDC) 溶液 40-60 $\mu$ l、50 mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide NHS) 溶液 40-60 $\mu$ l, 室温孵育 30min; 再用 300 $\mu$ l 25mM MES 溶液 (pH6) 洗两次。

1.2 标记磁珠: 用 60-100 $\mu$ l 25mM MES 溶液 (pH6) 溶解 150-250 $\mu$ g 的待测蛋白质的单克隆抗体, 充分混匀, 加入到已活化的抗体里, 再加 40 $\mu$ l 25mM MES (pH6), 使终体积为 100-140 $\mu$ l; 室温放置半小时或 4 $^{\circ}$ C 放置 2 小时; 再用 300-500 $\mu$ l PBS (含 0.1-0.5%BSA 及 0.01-0.1%Tween-20) 洗 4 次, 按所需浓度重悬磁珠, 2-8 $^{\circ}$ C 储存备用。

## 2 多克隆抗体及 DNA 探针标记纳米金

2.1 确定抗体的最佳用量 取 100 $\mu$ l 不同浓度的抗体 (浓度分别为 0 $\mu$ g/ml、0.5 $\mu$ g/ml、1 $\mu$ g/ml、2 $\mu$ g/ml、3 $\mu$ g/ml、5 $\mu$ g/ml) 加到 1ml 纳米金溶液里, 室温静置 5 分钟, 再向上述各管中加入 100 $\mu$ l 的 1N NaCl 溶液, 室温静置 1 小时, 稳定 1ml 纳米金溶液红色不变的最低蛋白质用量, 即为该标记蛋白质的最佳用量。

2.2 抗体标记 按照前面确定的抗体用量标记 1ml 纳米金, 室温放置 30 分钟-1 小时。

2.3 DNA 探针标记 向经过抗体标记的纳米金溶液里, 加入巯基 (5' 端) 及生物素标记 (3' 端) 的 DNA 探针, 使 DNA 探针的终浓度为 3-5 $\mu$ M, 室温静置标记 17 小时, 加入稳定剂 (终浓度为含 0.5-1%BSA、0.1N NaCl、10mM 的 PB 溶液) 稳定 48-72 小时, 离心清洗 3-4 次, 洗去未标记上的抗体及 DNA 探针。

2.4 HRP 标记 将 2-3 $\mu$ l 链亲和素-HRP (浓度为 1mg/ml) 与标记了抗体及 DNA 探针的纳米金溶液混合, 在室温下放置 1 小时, 用 PH7.2 的 0.1M 磷酸盐缓冲液 PBS 清洗 3-4 次, 洗去未标记上的链亲和素-HRP, 再加 100 $\mu$ l 10mM PB (含 1%BSA) 重悬, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

## 3 免疫反应

取标记好抗体的磁珠 0.5-1 $\mu$ l, 先与待测样品 10-20 $\mu$ l 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟-1 小时, 引入磁场, 用洗液 (含 0.05%Tween20 及 0.1% BSA 的 PBS) 清洗 3-4 次, 再加入 1-2 $\mu$ l 标记好的纳米金探针, 继续杂交 30 分钟, 杂交体积为 20 $\mu$ l, 杂交液为含 0.05%Tween20 及 0.5% BSA 组成的 0.1M PBS, 形成磁珠-待测蛋白-纳米金探针复合体, 引入磁场, 清洗 4 次, 洗去未反应的纳米金探针。

#### 4 显色反应

向上述形成的磁珠-待测 DNA-纳米金探针复合体中加入 20-30 $\mu$ l HRP 酶底物-TMB 显色液, 避光孵育 10-15 分钟, 加入终止液 (0.2M 浓硫酸) 10-15 $\mu$ l, 90 分钟内, 450nm 测 OD 值。

#### 本技术的优点及特点:

本技术最大的特点及优点是灵敏度高, 检测方便, 耗时短。

##### 1 灵敏度高

本技术主要采用基于纳米颗粒的、利用信号探针放大信号及链亲和素-生物素反应放大系统的蛋白质检测技术, 在纳米金颗粒上同时标记抗体及起信号放大作用的信号 DNA 探针, 信号 DNA 探针同时还标记有生物素分子, 生物素分子通过与链亲和素反应将 HRP 引入纳米金颗粒上, 用来作显色反应。通过信号的逐级放大, 达到对微量蛋白质的检测, 测定蛋白质的灵敏度为 pg/ml。

##### 2 操作方便, 耗时短

本发明提供的测定方法从检测标本开始, 只需要 1-1.5 小时的时间, 就可以得到检测结果; 另外, 本技术操作步骤少: 加样品-加纳米金探针-显色反应, 操作方便、简单, 适于临床大批量标本的快速检测。

#### 附图说明

图 1 基于磁珠与纳米金探针的蛋白质测定流程示意图 A. 探针标记 B. 检测过程

图 2 不同浓度 p53 蛋白质的测定结果

#### 具体实施方式

利用本技术分析人 p53 阳性血清，p53 蛋白质含量为 160pg/ml。

## 1 P53 单克隆抗体标记磁珠

1.1 活化磁珠：用 300 $\mu$ l 25mM MES (pH6) 清洗 300 $\mu$ l 磁珠（相当于 3mg 磁珠）两次，加冰浴的 50mg/ml EDC 溶液 50 $\mu$ l、50 mg/ml NHS 溶液 50 $\mu$ l，室温孵育 30min；再用 300 $\mu$ l 25mM MES (pH6) 洗两次。

1.2 标记：加入 p53 抗体 60 $\mu$ l，再加 40 $\mu$ l 25mM MES (pH6)，使终体积为 100 $\mu$ l；4 $^{\circ}$ C 放置 2 小时；再用 300 $\mu$ l PBS (含 0.1%BSA 及 0.01%Tween-20) 洗 4 次，再用 300 $\mu$ l 洗液重悬磁珠，2-8 $^{\circ}$ C 储存备用。

## 2 p53 多克隆抗体及 DNA 探针标记纳米金

2.1 确定抗体的最佳用量 用 0.1M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液将纳米金溶液的 PH 值调到 9，取 100 $\mu$ l 不同浓度的抗体（浓度分别为 0 $\mu$ g/ml、0.5 $\mu$ g/ml、1 $\mu$ g/ml、2 $\mu$ g/ml、3 $\mu$ g/ml、5 $\mu$ g/ml）加到 1ml 纳米金溶液里，室温静置 5 分钟，再加入 100 $\mu$ l 的 1N NaCl 溶液，确定蛋白的最佳用量。稳定 1ml 纳米金溶液红色不变的最低蛋白质用量，即为该标记蛋白质的最佳用量。蛋白质标记纳米金时，蛋白质（抗体）的用量是一个非常重要的因素，抗体用量少了会使纳米金聚集沉淀，用量多了会浪费昂贵的抗体，还会影响到 DNA 探针的标记。在本研究中，p53 多克隆抗体的最佳用量为 2 $\mu$ g/ml 纳米金。

2.2 抗体标记 用 100 $\mu$ l 无菌双蒸水溶解 2 $\mu$ g p53 多克隆抗体，并加入到 1ml 纳米金中，室温放置 30 分钟。

2.3 DNA 探针标记 向经过 p53 抗体标记的纳米金溶液里，加入一定量的巯基（5' 端）及生物素标记（3' 端）的 DNA 探针（探针序列：5' SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(T)<sub>10</sub>-AGC TAC GAG TTG AGA ATC CTG AAT GCG ACG-(T)<sub>10</sub>-(CH<sub>2</sub>)-Biotin 3'），使探针的终浓度为 3 $\mu$ M，室温静置标记 17 小时，加入稳定剂（终浓度为 1% BSA、0.1N NaCl 及 10mM 的 PB 溶液）稳定 48 小时，离心清洗 3-4 次，洗去未标记上的抗体及 DNA 探针。

2.4 HRP 标记 取 2 $\mu$ l 1mg/ml 链亲和素-HRP 与标记了抗体及 DNA 探针的纳米金溶液混合，在室温下放置 1 小时，用 0.1MPBS 清洗 3-4 次，洗去未标记上的链亲和素-HRP，再加 100 $\mu$ l 10mM PB (含 1%BSA) 重悬，4 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 3 免疫反应

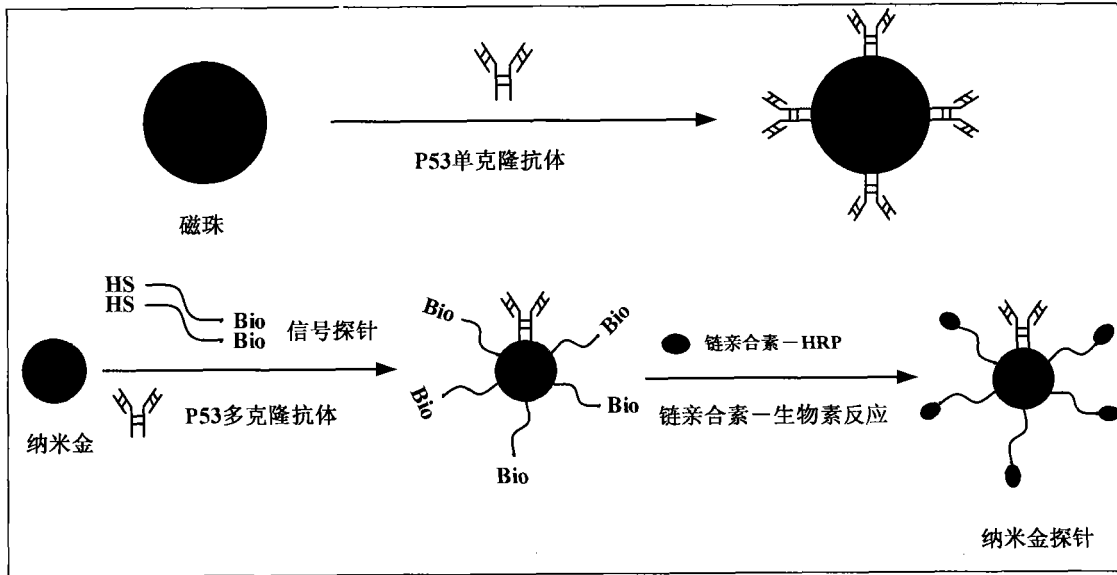
取标记好抗体的磁珠 1 $\mu$ l, 先与待测样品 20 $\mu$ l 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟, 引入磁场, 用洗液 (含 0.05%Tween20 及 0.1% BSA 的 PBS) 清洗 3-4 次, 再加入 2 $\mu$ l 标记好的纳米金探针, 继续杂交 30 分钟, 杂交体积为 20 $\mu$ l, 杂交液为含 0.05%Tween20 及 0.5% BSA 的 PBS, 形成磁珠-待测蛋白-纳米金探针复合体, 引入磁场, 清洗 4 次, 洗去未反应的纳米金探针。

### 4 显色反应

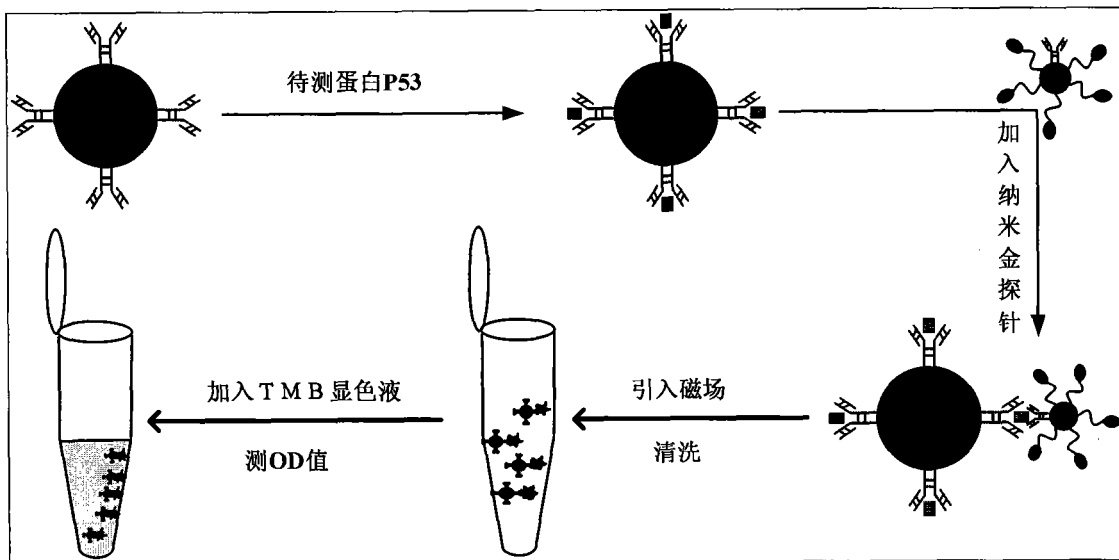
向上述形成的磁珠-待测蛋白质-纳米金探针复合体中加入 20 $\mu$ l HRP 酶底物-TMB 显色液, 避光孵育 15 分钟, 加入终止液 (0.2M 浓硫酸) 10 $\mu$ l, 90 分钟内, 450nm 测 OD 值。

### 5 检测结果分析

用上述方法测定按浓度梯度 (p53 蛋白质浓度分别为 32pg/ml、16pg/ml、8pg/ml、4pg/ml、2pg/ml) 稀释的 p53 阳性血清及阴性对照血清, 测定结果如图 2 所示, 为 450nm OD 值与 p53 蛋白质浓度的相关性的柱状图; 由图 2 可看出所述的测定方法所测定的蛋白质的灵敏度为 pg/ml。



A



B

图 1

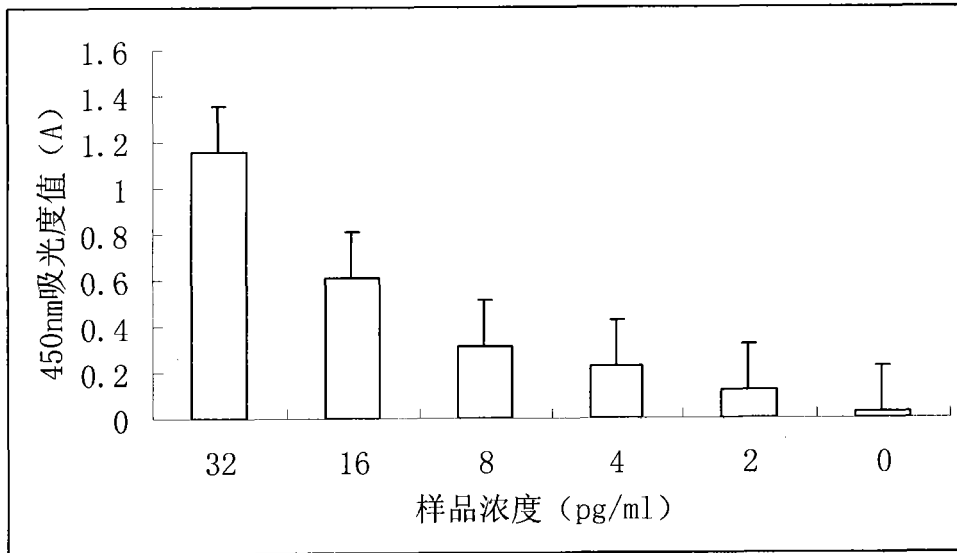


图 2

专利名称(译)	基于磁珠和纳米金探针的微量蛋白质的测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101256191A</a>	公开(公告)日	2008-09-03
申请号	CN200810034363.1	申请日	2008-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海微系统与信息技术研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海微系统与信息技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海微系统与信息技术研究所		
[标]发明人	贾春平 赵建龙 金庆辉		
发明人	贾春平 赵建龙 金庆辉		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/532		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种基于磁珠及纳米金探针的高灵敏度微量蛋白质的测定方法，其特征在于：首先用待测蛋白的单克隆抗体标记磁珠，在纳米金上标记待测蛋白的多克隆抗体，在纳米金上同时还标记一种带有生物素标记的DNA探针，纳米金上的DNA探针通过生物素-链亲和素反应，又标记上了辣根过氧化物酶(HRP)，组成纳米金探针，将标记好抗体的磁珠及纳米金探针与待测蛋白样品混合，37°C孵育一段时间，然后再洗去没有反应的纳米金探针，用TMB显色系统进行显色，从而达到对待测蛋白进行定量检测的目的。本发明检测时间可缩至1 - 1.5小时，灵敏度达pg/ml。

