

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910050299.0

C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

[43] 公开日 2009年9月30日

[11] 公开号 CN 101545007A

[22] 申请日 2009.4.30

[21] 申请号 200910050299.0

[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 刘美英 贾春平 金庆辉 赵建龙

[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司
代理人 潘振魁

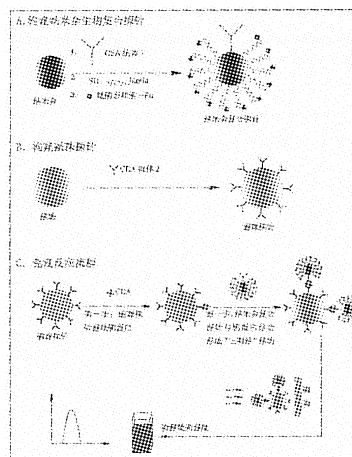
权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 6 页

[54] 发明名称

一种纳米金生物复合探针、检测方法及其应用

[57] 摘要

本发明是一种纳米金生物复合探针、检测方法及其应用，其特征在于首先用待测蛋白质的单克隆抗体标记磁珠，再在纳米金上标记待测蛋白的多克隆抗体的同时还标记一种带有生物素标记的 DNA 探针，纳米金上的 DNA 探针再通过生物素-链霉亲和素反应，使镧系元素接到胶体金上构建成纳米金生物复合探针，将标记好待测蛋白质单克隆抗体的磁珠及纳米金生物复合探针与待测蛋白质样品混合，37℃ 孵育一段时间，洗去没有反应的纳米金探针，加入增强液，测定荧光强度，从而达到对待测蛋白质进行定量测定的目的。使用本发明的方法，可显著提高生物分子的检测灵敏度，且可同时检测多种生物分子。可广泛应用于临床诊断、抗原、抗体、核酸的检测、卫生检疫、环境检测等领域。



1、一种纳米金生物复合探针，其特征在于所述的纳米金生物复合探针是一种基于纳米金与镧系元素组成的纳米金生物复合探针，纳米金标记待测蛋白的检测抗体，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-链霉亲和素反应，使镧系元素接到纳米金上构建而成。

2、按权利要求 1 所述的纳米金生物复合探针，其特征在于所述的 DNA 探针中 5' 端为巯基修饰，使 DNA 探针连接在纳米金上；3' 端为生物素修饰，可通过链亲和素-生物素反应将镧素标记在纳米金生物复合探针上。

3、按权利要求 1 所述的纳米金生物复合探针，其特征在于所述的镧系元素为 Eu、Tb、Sm 或 Dy；它们的荧光的发射波长和检测波长差异明显，构建多种针对不同生物分子的纳米金生物复合探针。

4、按权利要求 1、2 或 3 所述的纳米金生物复合探针，其特征在于所述的纳米金生物复合探针测定蛋白质的灵敏度为 Pg/ml。

5、使用权利要求 1、2 或 3 任一项所述的纳米金生物复合探针的检测方法，其特征在于首先用待测蛋白质的单克隆捕捉抗体标记磁珠，然后在纳米金上标记上待测蛋白的单克隆或多克隆待检测抗体，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-链霉亲和素反应，使镧系元素接到胶体金上，构建成纳米金生物复合探针，最后将标记好待测蛋白质单克隆捕捉抗体的磁珠及纳米金生物复合探针与待测蛋白质样品混合，37℃ 孵育，洗去没有反应的纳米金探针，加入增强液，测定荧光强度，从而达到对待测蛋白质进行定量测定。

6、按权利要求 5 所述的纳米金生物复合探针的检测方法，其特征在于具体步骤是：

①用待测蛋白质的单克隆抗体标记磁珠制成磁珠探针

选用羧基修饰的磁珠，活化磁珠，加入待测蛋白质的单克隆捕捉抗体，抗体浓度为 10~100 μ g/mg 磁珠，混匀，室温放置半小时；再用含质量百分数为 0.1-0.5%BSA 和 0.01-0.1%Tween-20 的 PBS 溶液洗数次，按所需浓度重悬磁珠，2-8℃ 储存备用；

②制备纳米金生物复合探针

a. 确定抗体的最佳用量 用 K_2CO_3 溶液将纳米金溶液的 pH 值调到 8.5~9, 取不同量的抗体加到 1 ml 纳米金溶液里, 室温静置 5 分钟, 再加入 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;

b. 抗体标记 用无菌双蒸水溶解检测抗体, 并加入到纳米金中, 室温放置 30 分钟;

c. DNA 探针标记 向经过抗体标记的纳米金溶液里, 加入 5' 端的巯基及 3' 端的生物素标记的 DNA 探针, 使探针的终浓度为 3-5 μ M, 室温静置标记 17 小时, 加入终浓度为 1% BSA、0.1N NaCl 及 10mM 的 PB 溶液作为稳定剂稳定 48 小时, 离心清洗, 洗去未标记上的抗体及 DNA 探针;

d. 镧系元素标记 加入链霉亲和素-镧素与标记了抗体及 DNA 探针的纳米金溶液混合, 在室温下放置 1 小时, 用 Tris-HCL 缓冲液清洗 3-4 次, 洗去未标记上的链霉亲和素-Eu, 再用 Tris-HCL 缓冲液重悬, 4 $^{\circ}$ C 保存备用;

③免疫反应

将步骤①制成的标记好待测蛋白质单克隆捕捉抗体的磁珠, 37 $^{\circ}$ C 孵育一段时间, 引入磁场, 用洗液清洗 3-4 次, 再加入步骤②标记好的纳米金生物复合探针, 继续杂交形成磁珠-待测蛋白-纳米金探针的复合体, 引入磁场、清洗, 然后再洗去没有反应的纳米金探针;

④检测

加入增强液后, 室温摇动 5~10min, 测定荧光强度, 从而达到对待测蛋白质进行定量测定的目的。

7、按权利要求 6 所述的纳米金生物复合探针的检测方法, 其特征在于步骤①中活化磁珠的方法为用 PH=6 的 MES 清洗磁珠两次, 加冰溶的 EDC 溶液、NHS 溶液, 室温孵育 30min, 再用 PH=6 的 MES 清洗两次。

8、按权利要求 1 所述的纳米金生物复合探针的应用, 其特征在于:

① 用于一个蛋白的检测或用于多个蛋白的同时检测;

② 用于蛋白质、DNA 及其他生物分子的微量检测。

9、按权利要求 8 所述的纳米金生物复合探针的应用, 其特征在于用于检测人 CEA 阳性血清, 用于检测含 CEA、P₅₃ 的血清或用于检测人含 CEA、P₅₃ 和 NSE 的血清。

10、按权利要求 9 所述的纳米金生物复合探针的应用, 其特征在于 CEA 检测抗体的最佳用量为 6 μ g/ml, P₅₃ 检测抗体的最佳用量为 7 μ g/ml, NSE 检测抗体的最佳用量为 7 μ g/ml。

一种纳米金生物复合探针、检测方法及其应用

技术领域

本发明涉及一种纳米金生物复合探针、检测方法及其应用，特别是一种基于纳米金与镧系元素组成的纳米生物复合探针、高灵敏检测的方法，及其在同时检测多种生物分子方面的应用。属于生物检测技术领域。

背景技术

能够对生物分子简便、快捷、高选择性、高灵敏度地检测，始终是人们努力的方向，在疾病的早期诊断、快速诊断、卫生检测、环境监测等领域都具有重要意义。根据不同的标记手段，人们开发了一系列有效的检测方法，如放射性标记、荧光标记、酶标记等。不同标记方法有不同的优点和缺点，受示踪剂性状的限制，酶标记灵敏度不高，检测范围受限，而放射性标记虽然比较灵敏，但存在一定放射性污染的问题，荧光标记是目前的一种主导的检测方法。20世纪80年代初Pettersson等和Eskola等创立的一种非放射性标记免疫分析技术，与传统的荧光素标记不同，它是以镧系元素，如铕(Eu)、铽(Tb)、钐(Sm)、镝(Dy)等的螯合物为标记物。镧系元素螯合物与普通荧光素相比具有许多独特的荧光特性：激发光谱带宽；发射光谱带窄；激发光与发射光之间的Stoke's 位移大，可达290nm，而普通荧光素的Stoke's 位移仅28nm；镧系元素螯合物的发射光能持续数百个微秒，而普通荧光素只能维持数个纳秒；镧系元素螯合物荧光寿命长，没有自发猝灭现象，不受光漂白的影晌等。在时间分辨荧光仪上测量时，脉冲光源激发后，可适当延迟一段时间，待其他短半衰期(1~10ns)的非特异荧光完全衰变后再测量，从而极大的降低了本底荧光，提高检测灵敏度。并且铕(Eu)、铽(Tb)、钐(Sm)、镝(Dy)这四种荧光的发射波长差异非常明显，适用于同时多种标定的实验。

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。尤其是纳米金由于具有容易制备、良好的生物相容性和相对较大的比表面积等特点，

在生物体系中的应用引起了广大研究者的关注。纳米金可通过物理吸附、静电吸附、特异识别、共价结合等方式与蛋白质、核酸、糖等结合构建的纳米金生物复合探针，本发明拟利用纳米金的这一特性以及与生物分子具有高选择催化性与自我识别的性质，可广泛用于蛋白质、核酸、糖以及金属离子等各方面的检测。

发明内容

本发明的目的在于提供一种基于纳米金与镧系元素螯合物构建的纳米生物复合探针的检测方法以及在同时检测多种生物分子方法的应用。

本发明提供的纳米金生物复合探针的特征在于所述的纳米金生物复合探针是一种基于纳米金与镧系元素组成的纳米金生物复合探针，纳米金标记待测蛋白的检测抗体，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-链霉亲和素反应，使镧系元素接到纳米金上构建而成。

本发明提供的检测方法主要包括：首先用待测蛋白质的单克隆捕捉抗体标记磁珠，然后在纳米金上标记上待测蛋白的单克隆或多克隆待测抗体，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-链霉亲和素反应，使镧系元素接到胶体金上，构建成纳米金生物复合探针，最后将标记好待测蛋白质单克隆捕捉抗体的磁珠及纳米金生物复合探针与待测蛋白质样品混合，37℃孵育一段时间，洗去没有反应的纳米金探针，加入增强液，测荧光强度，从而达到对待测蛋白质进行定量测定的目的。

本发明提供的检测方法具体步骤为：

1. 用待测蛋白质的单克隆抗体标记磁珠制成磁珠探针

选用羧基修饰的磁珠，按常规方法活化磁珠，加入待测蛋白质的单克隆捕捉抗体，抗体浓度为 10~100 μ g/mg 磁珠，混匀，室温放置半小时。再用 PBS（含质量百分数为 0.1-0.5%BSA 和质量百分数为 0.01-0.1%Tween-20）洗数次，按所需浓度重悬磁珠，2-8℃储存备用。

2. 制备纳米金生物复合探针

a. 确定抗体的最佳用量 用 K_2CO_3 溶液将纳米金溶液的 pH 值调到 8.5~9，取不同量的抗体加到 1 ml 纳米金溶液里，室温静置 5 分钟，再加入 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。

b. 抗体标记 用无菌双蒸水溶解检测抗体，并加入到纳米金中，室温放置 30 分钟。

c. DNA 探针标记 向经过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- (CH₂)₃-(T)₁₀- AGC TAC GAG TTG AGA ATC CTG AAT GCG ACG-(T)₁₀-(CH₂)₃-Biotin 3'），使探针的终浓度为 3-5 μ 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。

d. 镧系元素标记 加入链霉亲和素-镧素与标记了抗体及 DNA 探针的纳米金溶液混合，在室温下放置 1 小时，用 Tris-HCL 缓冲液清洗 3-4 次，洗去未标记上的链霉亲和素-Eu，再用 Tris-HCL 缓冲液重悬，4 $^{\circ}$ C 保存备用。

3. 免疫反应

将步骤 1 制成的标记好待测蛋白质单克隆捕捉抗体的磁珠，37 $^{\circ}$ C 孵育一段时间，引入磁场，用洗液清洗 3-4 次，再加入步骤 2 标记好的纳米金生物复合探针，继续杂交形成磁珠-待测蛋白-纳米金探针的复合体，引入磁场清洗，然后再洗去没有反应的纳米金探针；

4. 检测

加入增强液后，室温轻摇 5~10min，测定荧光强度，从而达到对待测蛋白质进行定量测定的目的。

由此可见，本发明最大的特点及优点是灵敏度高，检测方便，耗时短，且能同时检测多种生物分子。

(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霉亲和素-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霉亲和素反应将镧系元素引入纳米金颗粒上。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) 同时检测多种生物分子

本发明利用铕(Eu)、铽(Tb)、钐(Sm)、镝(Dy)这四种荧光的发射波长差异

明显，检测波长不一样的优点，分别在胶体金颗粒上接上不同的镧系元素，从而构建层多种针对不同生物分子的纳米金复合探针实现既可检测一种生物分子也可同时检测多种生物分子。

(3) 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 1-1.5h 的时间，就可以得到检测结果；另外，本技术操作步骤少，操作方便、简单，适于临床大批量标本的快速检测。可广泛应用于临床诊断、抗原、抗体、核酸的检测、卫生检疫、环境检测等领域，具有十分广泛的应用前景和开发价值。

附图说明

图 1 基于纳米复合探针的时间分辨荧光免疫分析方法

图 2 基于纳米复合探针的两种蛋白质检测方法

图 3 基于纳米复合探针的三种蛋白质检测方法

图 4. 不同浓度 CEA 蛋白质的测定结果

图 5. 双重检测中不同浓度 CEA 蛋白质的测定结果

图 6. 双重检测中不同浓度 P₅₃蛋白质的测定结果

图 7. 三重检测中不同浓度 CEA 蛋白质的测定结果

图 8. 三重检测中不同浓度 P₅₃蛋白质的测定结果

图 9. 三重检测中不同浓度 NSE 蛋白质的测定结果

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明。

实施例 1：检测人 CEA 阳性血清（原理图见图 1）

1 CEA 单克隆捕获抗体标记磁珠

1.1 活化磁珠：用 MES (pH6) 清洗磁珠两次，加冰浴的 EDC 溶液、NHS 溶液，室温孵育 30min；再用 MES (pH6) 洗两次。

1.2 标记：加入 CEA 抗体，抗体浓度为 50 μ g/mg 磁珠，室温放置 30min；再用 PBS 缓冲液洗 4 次并重悬磁珠，2-8 $^{\circ}$ C 储存备用。

2 制备纳米金生物复合探针

2.1 确定抗体的最佳用量 用 K₂CO₃ 溶液将纳米金溶液的 pH 值调到 8.5~9，取不同量的抗体（分别为 0 μ g、0.5 μ g、1 μ g、2 μ g、3 μ g、5 μ g、6 μ g、7 μ g、8 μ g）加到 1 ml 纳米金溶液里，室温静置 5 分钟，再加入 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。在本实施例中，CEA 检测抗体的最佳用量为 6 μ g/ml 纳米金。

2.2 抗体标记 用无菌双蒸水溶解 CEA 检测抗体，并加入到纳米金中，室温放置 30 分钟。

2.3 DNA 探针标记 向经过 CEA 抗体标记的纳米金溶液中，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-(CH₂)₃-(T)₁₀-AGC TAC GAG TTG AGA ATC CTG AAT GCG ACG-(T)₁₀-(CH₂)₃-Biotin 3'），使探针的终浓度为 3 μ 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 铕元素标记 加入链霉亲和素-Eu 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 Tris-HCL 缓冲液清洗 3-4 次，洗去未标记上的链霉亲和素-Eu，再用 Tris-HCL 缓冲液重悬，4 $^{\circ}$ C 保存备用。

3 免疫反应

取标记好抗体的磁珠，先与待测血清在 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 Tris-HCL）清洗 3-4 次，再加入标记好的纳米金生物复合探针，继续杂交 30 分钟，杂交体积为 20 μ l，杂交液为含 0.05%Tween20 及 0.5% BSA 的 Tris-HCL 缓冲液，形成磁珠-待测蛋白-纳米金探针复合体，引入磁场，清洗 6 次，洗去未反应的纳米金探针。

4 检测结果

加入增强液后，室温静置 5~10min，615nm 测荧光强度。用上述方法测定按浓度梯度（CEA 蛋白质浓度分别为 57pg/ml、28.5pg/ml、14.25pg/ml、7.13pg/ml、3.56pg/ml）稀释的 CEA 阳性血清及阴性对照血清，测定结果如图 3 所示，为 615nm 荧光强度与 CEA 蛋白质浓度的相关性的柱状图；由图 4 可看出该套体系测定蛋白质的灵敏度为 pg/ml。

实施例 2：检测人含 CEA、P₅₃ 的血清（原理图见图 2）

1 捕获抗体标记磁珠

1.1 活化磁珠：用 MES (pH6) 清洗磁珠两次，加冰浴的 EDC 溶液、NHS 溶液，室温孵育 30min；再用 MES (pH6) 洗两次。

1.2 标记：CEA 抗体、P₅₃ 抗体按一定的比例混合，加入抗体混合液，抗体浓度为 50μg/mg 磁珠，室温放置 30min；再用 PBS 缓冲液洗 4 次并重悬磁珠，2-8℃ 储存备用。

2 CEA 检测抗体及 DNA 探针标记纳米金

2.1 确定抗体的最佳用量 用 K₂CO₃ 溶液将纳米金溶液的 pH 值调到 8.5~9，取不同量的抗体（分别为 0μg、0.5μg、1μg、2μg、3μg、5μg、6μg、7μg、8μg）加到 1 ml 纳米金溶液里，室温静置 5 分钟，再加入 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。在本实施例中，CEA 抗体的最佳用量为 6μg/ml 纳米金。

2.2 抗体标记 用无菌双蒸水溶解 CEA 检测抗体，并加入到纳米金中，室温放置 30 分钟。

2.3 DNA 探针标记 向经过 CEA 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-(CH₂)₃-(T)₁₀-AGC TAC GAG TTG AGA ATC CTG AAT GCG ACG-(T)₁₀-(CH₂)-Biotin 3'），使探针的终浓度为 3μM，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 镧系元素标记 加入链霉亲和素-Eu 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 Tris-HCL 缓冲液清洗 3-4 次，洗去未标记上的链霉亲和素-Eu，再用 Tris-HCL 缓冲液重悬，4℃ 保存备用。

3 P₅₃ 检测抗体及 DNA 探针标记纳米金

3.1 确定抗体的最佳用量 用 K₂CO₃ 溶液将纳米金溶液的 pH 值调到 8.5~9，取不同量的抗体（分别为 0μg、0.5μg、1μg、2μg、3μg、5μg、6μg、7μg、8μg）加到 1 ml 纳米金溶液里，室温静置 5 分钟，再加入 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。在本实施例中，P₅₃ 检测抗体的最佳用量为 7μg/ml 纳米金。

3.2 抗体标记 用无菌双蒸水溶解 P₅₃ 检测抗体，并加入到纳米金中，室温放置 30 分钟。

3.3 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-(CH₂)₃-(T)₁₀-AGC TAC GAG TTG AGA ATC CTG AAT GCG ACG-(T)₁₀-(CH₂)₃-Biotin 3'），使探针的终浓度为 3μM，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。

3.4 镧系元素标记 加入链霉亲和素-Tb 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 Tris-HCL 缓冲液清洗 3-4 次，洗去未标记上的链霉亲和素-Tb，再用 Tris-HCL 缓冲液重悬，4℃ 保存备用。

4 免疫反应

取标记好抗体的磁珠，先与待测血清在 37℃ 下孵育 30 分钟，引入磁场，用洗液（含 0.05%Tween20 及 0.1% BSA 的 Tris-HCL）清洗 3-4 次，加入标记好的纳米金 CEA 抗体复合探针与纳米金 P₅₃ 抗体复合探针混合液，继续杂交 30 分钟，杂交体积为 20μl，杂交液为含 0.05%Tween20 及 0.5% BSA 的 Tris-HCL 缓冲液，形成磁珠-待测蛋白-纳米金探针复合体，引入磁场，清洗 6 次，洗去未反应的纳米金探针。

5 检测结果

加入增强液后，室温轻摇 5~10min，在 615nm 及 545nm 处测荧光强度。用上述方法测定按浓度梯度（CEA 蛋白质浓度分别为 125pg/ml、62.5pg/ml、31.25pg/ml、15.63pg/ml、7.81pg/ml；P₅₃ 浓度分别为 528pg/ml、264pg/ml、132pg/ml、66pg/ml、33pg/ml）稀释的阳性血清及阴性对照血清，测定结果如图 5、6 所示，为荧光强度与蛋白质浓度的相关性的柱状图。

实施例 3：检测人含 CEA、P53、NSE 的血清

1 捕获抗体标记磁珠

1.1 活化磁珠：用 MES（pH6）清洗磁珠两次，加冰浴的 EDC 溶液、NHS 溶液，室温孵育 30min；再用 MES（pH6）洗两次。

1.2 标记：CEA 抗体、P53 抗体、NSE 抗体按一定的比例混合，加入抗体混合液，抗体浓度为 50μg/mg 磁珠，室温放置 30min；再用 PBS 缓冲液洗

4次并重悬磁珠，2-8℃储存备用。

2 CEA 检测抗体及 DNA 探针标记纳米金

2.1 确定抗体的最佳用量 用 K_2CO_3 溶液将纳米金溶液的 pH 值调到 8.5~9，取不同量的抗体（分别为 0 μ g、0.5 μ g、1 μ g、2 μ g、3 μ g、5 μ g、6 μ g、7 μ g、8 μ g）加到 1 ml 纳米金溶液里，室温静置 5 分钟，再加入 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。在本实施例中，CEA 抗体的最佳用量为 6 μ g/ml 纳米金。

2.2 抗体标记 用无菌双蒸水溶解 CEA 检测抗体，并加入到纳米金中，室温放置 30 分钟。

2.3 DNA 探针标记 向经过 CEA 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-（CH₂）₃-（T）₁₀-AGC TAC GAG TTG AGA ATC CTG AAT GCG ACG-（T）₁₀-（CH₂）-Biotin 3'），使探针的终浓度为 3 μ 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 镧系元素标记 加入链霉亲和素-Eu 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 Tris-HCL 缓冲液清洗 3-4 次，洗去未标记上的链霉亲和素-Eu，再用 Tris-HCL 缓冲液重悬，4℃保存备用。

3 P₅₃ 检测抗体及 DNA 探针标记纳米金

3.1 确定抗体的最佳用量 用 K_2CO_3 溶液将纳米金溶液的 pH 值调到 8.5~9，取不同量的抗体（分别为 0 μ g、0.5 μ g、1 μ g、2 μ g、3 μ g、5 μ g、6 μ g、7 μ g、8 μ g）加到 1 ml 纳米金溶液里，室温静置 5 分钟，再加入 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。在本实施例中，P₅₃ 检测抗体的最佳用量为 7 μ g/ml 纳米金。

3.2 抗体标记 用无菌双蒸水溶解 P₅₃ 检测抗体，并加入到纳米金中，室温放置 30 分钟。

3.3 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-（CH₂）

3-(T)10-AGC TAC GAG TTG AGA ATC CTG AAT GCG ACG-(T)10-(CH₂)-Biotin 3'), 使探针的终浓度为 3 μ 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。

3.4 镧系元素标记 加入链霉亲和素-Tb 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 Tris-HCL 缓冲液清洗 3-4 次, 洗去未标记上的链霉亲和素-Tb, 再用 Tris-HCL 缓冲液重悬, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

4 NSE 检测抗体及 DNA 探针标记纳米金

4.1 确定抗体的最佳用量 用 K₂CO₃ 溶液将纳米金溶液的 pH 值调到 8.5~9, 取不同量的抗体(分别为 0 μ g、0.5 μ g、1 μ g、2 μ g、3 μ g、5 μ g、6 μ g、7 μ g、8 μ g) 加到 1 ml 纳米金溶液里, 室温静置 5 分钟, 再加入 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, 即为该标记蛋白的最佳用量。在本实施例中, NSE 检测抗体的最佳用量为 7 μ g/ml 纳米金。

4.2 抗体标记 用无菌双蒸水溶解 NSE 检测抗体, 并加入到纳米金中, 室温放置 30 分钟。

4.3 DNA 探针标记 向经过 NSE 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-(CH₂)3-(T)10-AGC TAC GAG TTG AGA ATC CTG AAT GCG ACG-(T)10-(CH₂)-Biotin 3'), 使探针的终浓度为 3 μ 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。

4.4 镧系元素标记 加入链霉亲和素-Dy 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 Tris-HCL 缓冲液清洗 3-4 次, 洗去未标记上的链霉亲和素-Dy, 再用 Tris-HCL 缓冲液重悬, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

5 免疫反应

取标记好抗体的磁珠, 先与待测血清在 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 Tris-HCL)清洗 3-4 次, 加入标记好的纳米金 CEA 抗体复合探针、纳米金 P₅₃ 抗体复合探针、纳米金 NSE 抗体复合探针混合液, 继续杂交 30 分钟, 杂交体积为 20 μ l, 杂交液为含

0.05%Tween20 及 0.5% BSA 的 Tris-HCL 缓冲液，形成磁珠-待测蛋白-纳米金探针复合体，引入磁场，清洗 6 次，洗去未反应的纳米金探针。

6 检测结果

加入增强液后，室温轻摇 5~10min，在 615nm、545nm 及 573nm 处测荧光强度。用上述方法测定按浓度梯度（CEA 蛋白质浓度分别为 125pg/ml、62.5pg/ml、31.25pg/ml、15.63pg/ml、7.81pg/ml；P₅₃ 浓度分别为 528pg/ml、264pg/ml、132pg/ml、66pg/ml、33pg/ml；NSE 浓度分别为 200 pg/ml、100 pg/ml、50 pg/ml、25 pg/ml、12.5 pg/ml）稀释的阳性血清及阴性对照血清，测定结果如图 7~9 所示，为荧光强度与蛋白质浓度的相关性的柱状图。

本发明适用于通过任何方法将抗体及镧系元素标记在纳米金或其它纳米颗粒上组成纳米复合探针，并适用于 CEA、p53 及其他所有蛋白及 DNA 的微量检测。

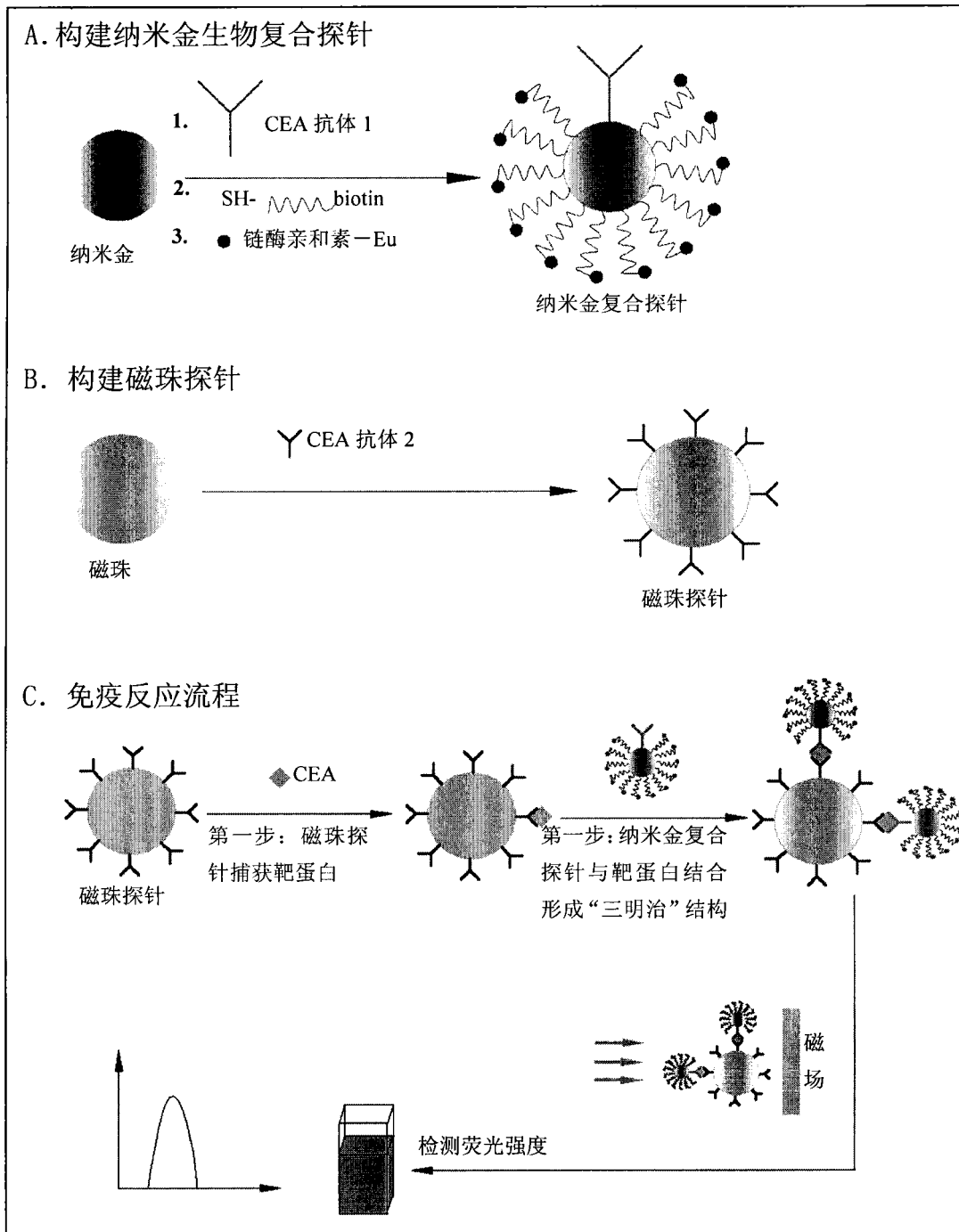


图 1

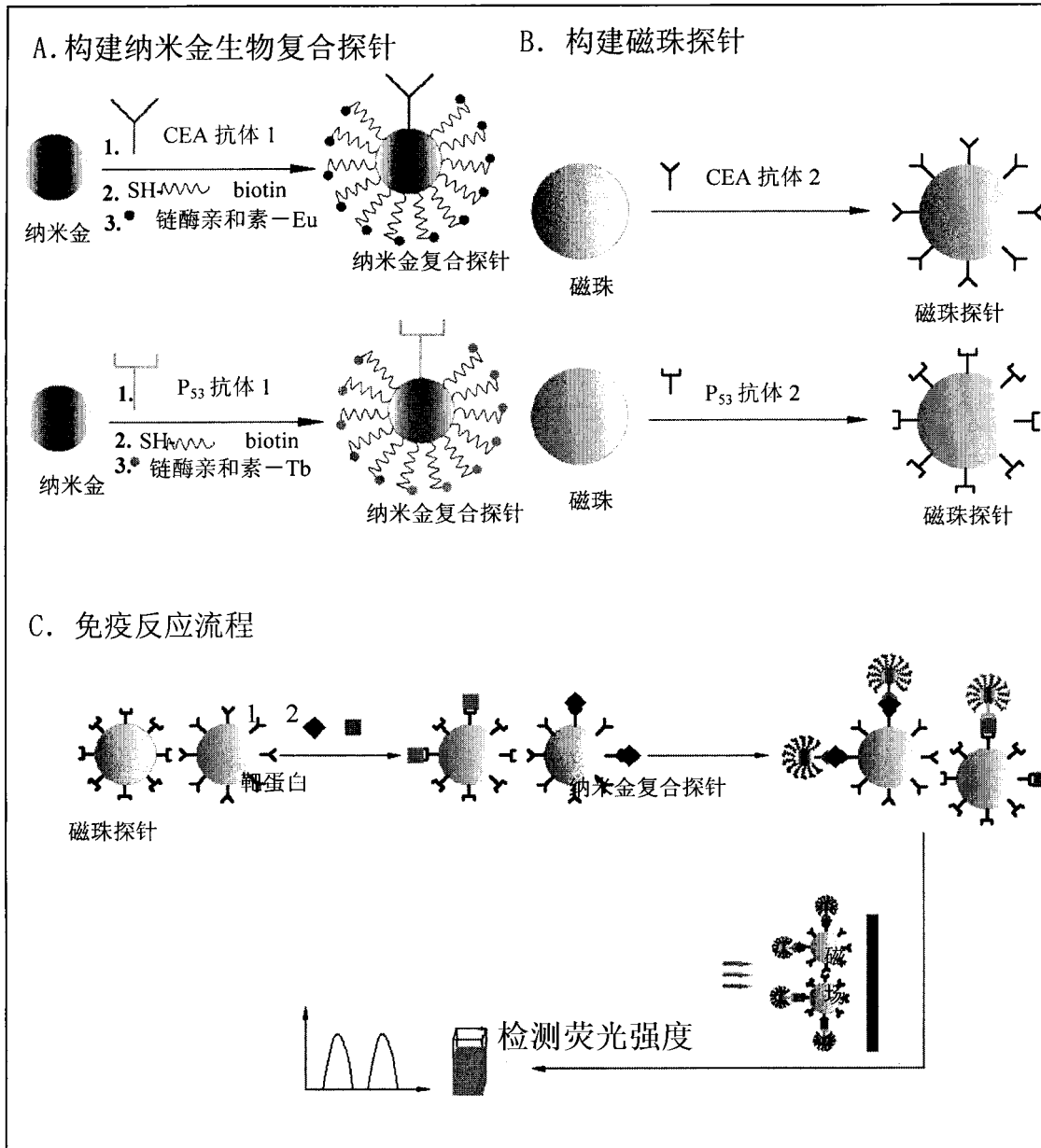


图 2

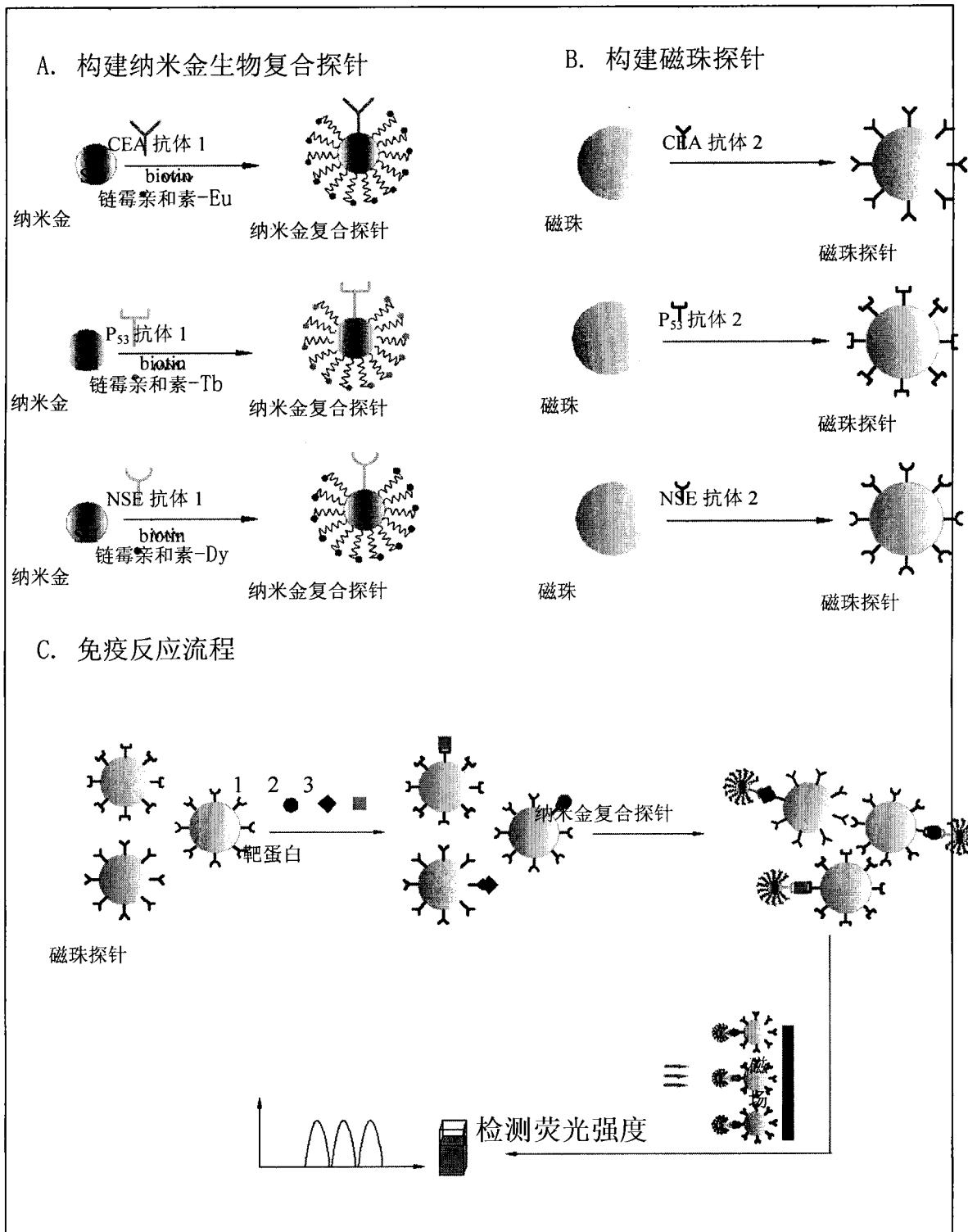


图 3

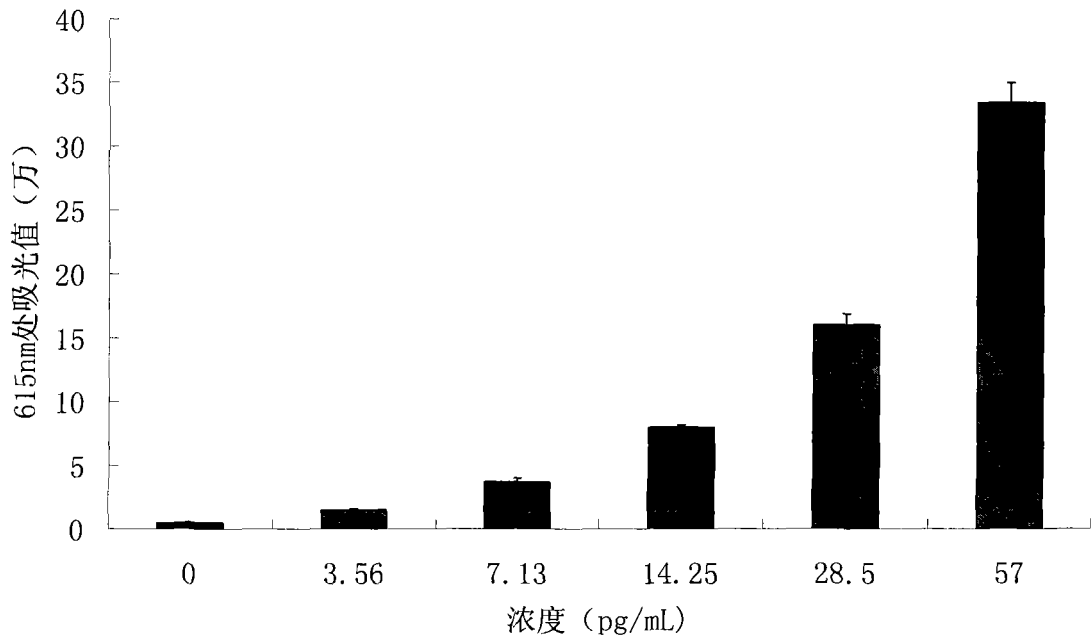


图 4

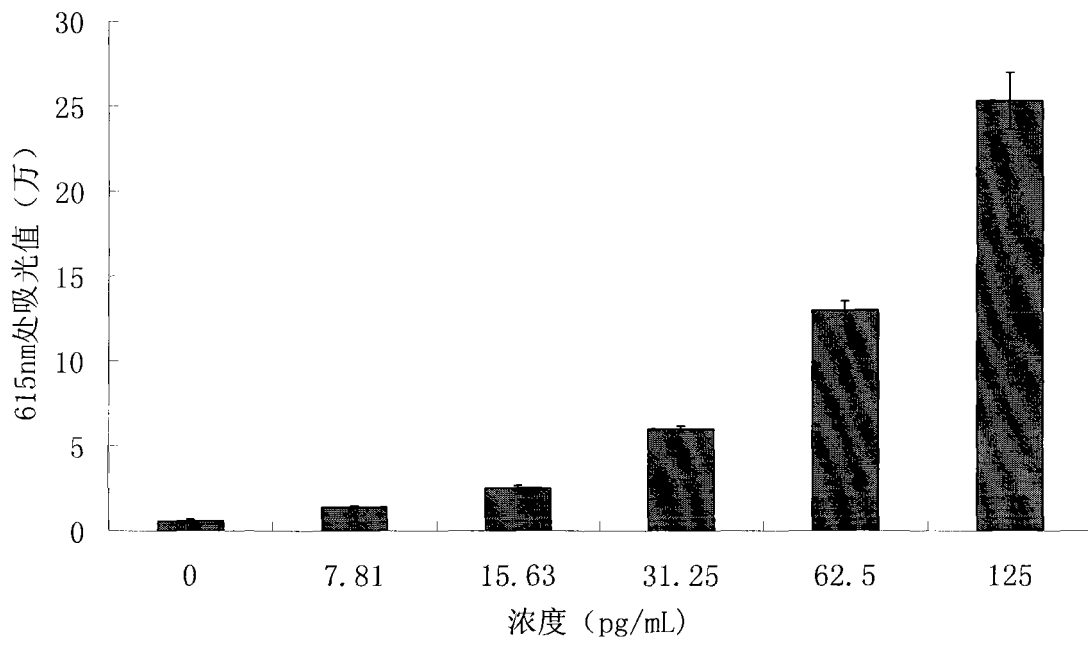


图 5

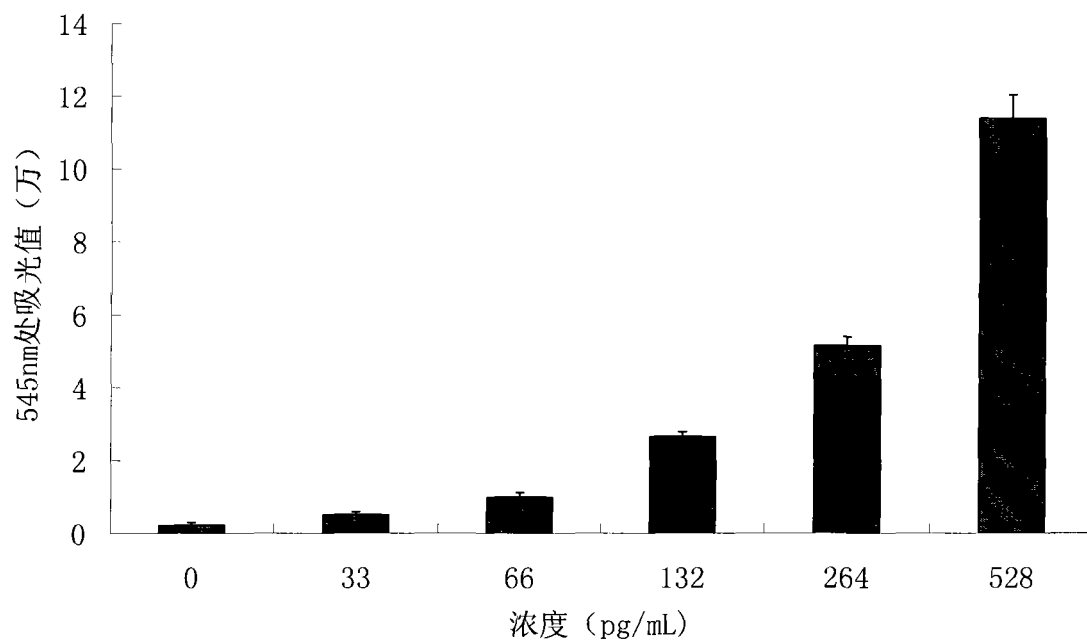


图 6

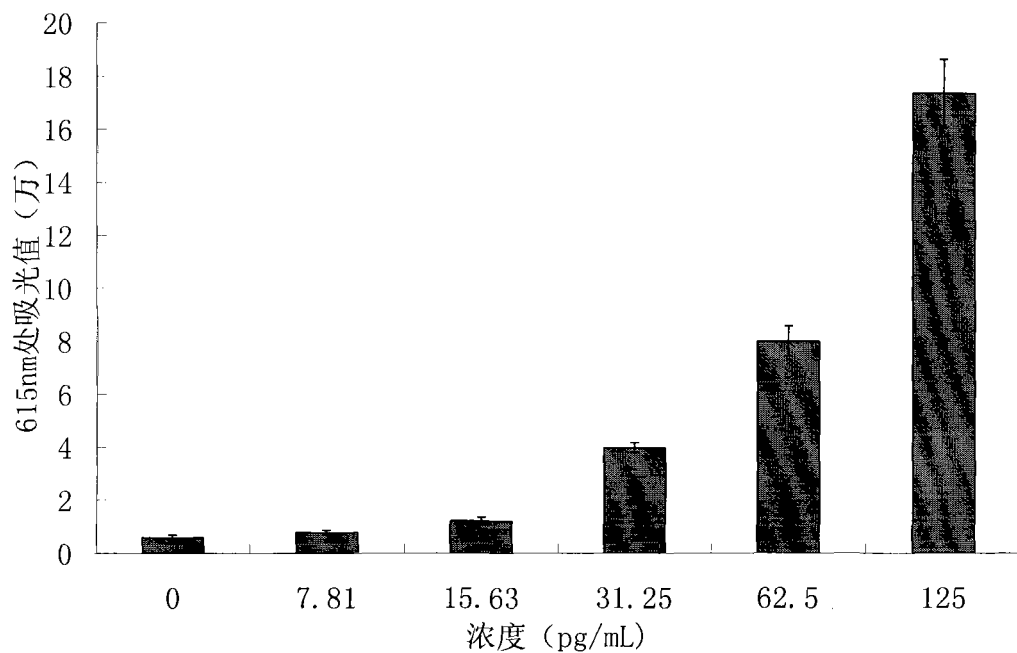


图 7

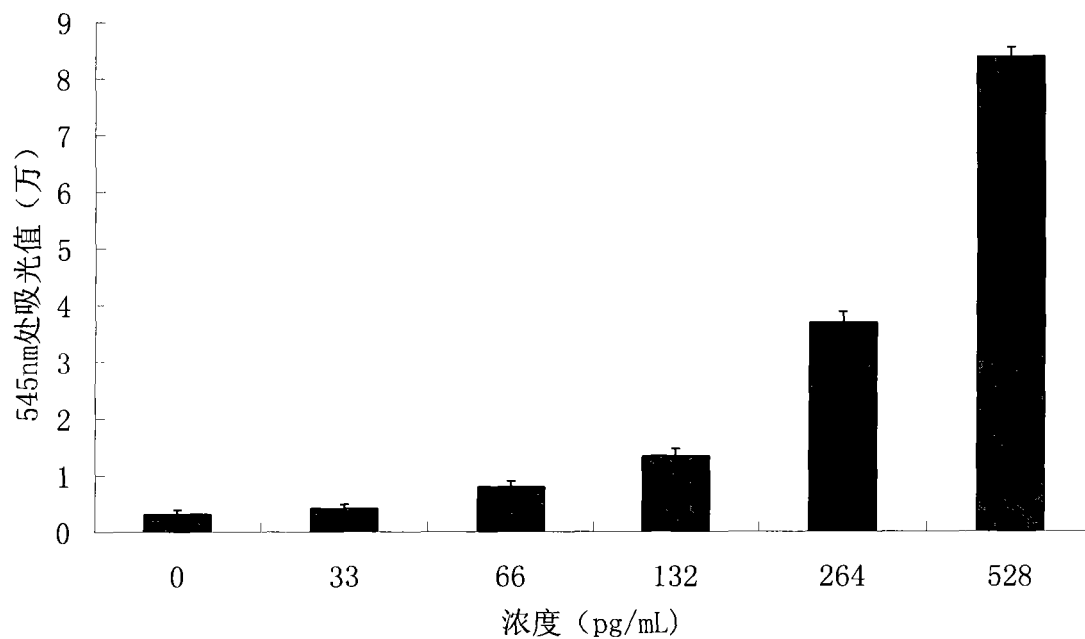


图 8

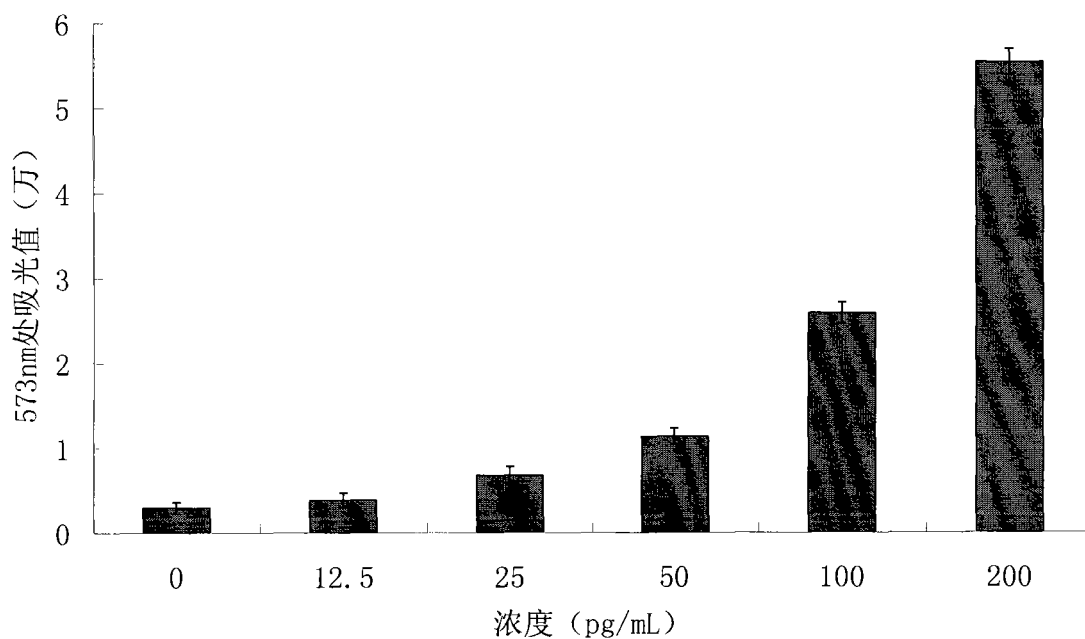


图 9

专利名称(译)	一种纳米金生物复合探针、检测方法及其应用		
公开(公告)号	CN101545007A	公开(公告)日	2009-09-30
申请号	CN200910050299.0	申请日	2009-04-30
[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	刘美英 贾春平 金庆辉 赵建龙		
发明人	刘美英 贾春平 金庆辉 赵建龙		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/11 G01N33/533 G01N33/577 G01N33/543 G01N21/64		
其他公开文献	CN101545007B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是一种纳米金生物复合探针、检测方法及其应用，其特征在于首先用待测蛋白质的单克隆抗体标记磁珠，再在纳米金上标记待测蛋白的多克隆抗体的同时还标记一种带有生物素标记的DNA探针，纳米金上的DNA探针再通过生物素 - 链霉亲和素反应，使镧系元素接到胶体金上构建成纳米金生物复合探针，将标记好待测蛋白质单克隆抗体的磁珠及纳米金生物复合探针与待测蛋白质样品混合，37°C孵育一段时间，洗去没有反应的纳米金探针，加入增强液，测定荧光强度，从而达到对待测蛋白质进行定量测定的目的。使用本发明的方法，可显著提高生物分子的检测灵敏度，且可同时检测多种生物分子。可广泛应用于临床诊断、抗原、抗体、核酸的检测、卫生检疫、环境检测等领域。

