



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108660138 B

(45) 授权公告日 2021.06.29

(21) 申请号 201810453552.6

(22) 申请日 2018.05.14

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108660138 A

(43) 申请公布日 2018.10.16

(73) 专利权人 重庆医科大学附属第二医院

地址 400010 重庆市渝中区临江路74号

(72) 发明人 李丹丹 陈维贤 丁世家 李新民

莫菲 王玓 李朴

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所(普通

合伙) 31219

代理人 周建军

(51) Int. Cl.

G12N 15/115 (2010.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 107254550 A, 2017.10.17

US 2016327549 A1, 2016.11.10

CN 102735669 A, 2012.10.17

Li, DD等. Aptamer recognition and proximity-induced entropy-driven circuit for enzyme-free and rapid amplified detection of platelet-derived growth factor-BB. 《ANALYTICA CHIMICA ACTA》. 2019, 第1092卷

Wang, K等. for sensitive detection of carcinoembryonic antigen based on target-aptamer complex recycling amplification. 《SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL》. 2017, 第253卷

审查员 李丹阳

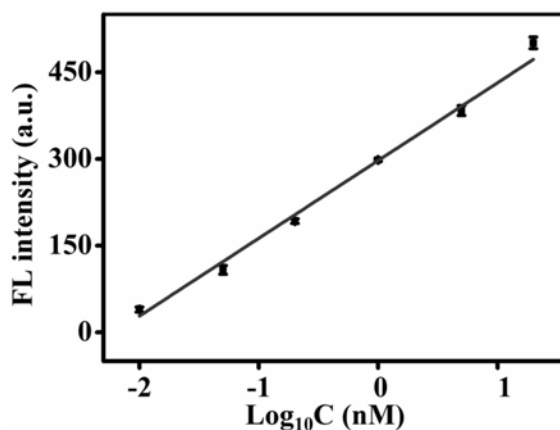
权利要求书1页 说明书8页 附图8页

(54) 发明名称

一种免疫传感器及其制备与应用

(57) 摘要

本发明提供一种免疫传感器及其制备与应用,其中包括一对基于邻位连接的核酸适配体亲和探针Apt-P1和Apt-P2,所述Apt-P1的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,所述Apt-P2的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。本发明的邻位连接探针通过内部碱基转移可以增加反应速度,降低背景信号,在该设计下信噪比最高。核酸适配体替代抗体作为亲和探针,节省了常规抗体所需成本,简化了常规抗体制备及储存所需的苛刻条件。本发明通过改良的邻位连接诱导的熵驱动信号放大策略,实现了对PDGF-BB的高灵敏及高特异性检测。该检测方法简便,无需昂贵仪器,只需常规荧光分光光度计便可检测,降低检测成本。



1. 一种用于检测PDGF-BB蛋白的蛋白免疫传感器,其特征在于:所述蛋白免疫传感器包括邻位连接核酸适配体亲和探针和熵信标复合物,所述邻位连接核酸适配体亲和探针包括Apt-P1和Apt-P2,所述Apt-P1的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示:

5'-CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTTTTTTTTTTTTTTTGTGACC
AATTCCAAC-3',单直下划线标记标记为1域,所述Apt-P1的1域碱基数为5nt;

所述Apt-P2的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示:

5'-GCCCTTACTCCGTCACCTTTTTTTTTTTTTTTTCAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG-3';

所述熵信标复合物包括reporter链、quencher链、byproduct链;所述reporter链的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示,所述quencher链的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示,所述byproduct链的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。

2. 根据权利要求1所述的蛋白免疫传感器,其特征在于:所述熵信标复合物中reporter链、quencher链、byproduct链的摩尔比为1:1:1.2。

3. 根据权利要求1-2任意一项所述蛋白免疫传感器在制备用于检测PDGF-BB蛋白的试剂盒中的应用。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于:用于检测PDGF-BB蛋白,包括以下步骤:

1) 制备熵信标复合物:将Reporter链、Byproduct链与Quencher链混合,变性处理后,缓慢冷却至室温,室温下杂交,制得所述熵信标复合物;

2) 邻位连接:将核酸适配体亲和探针Apt-P1与Apt-P2变性处理,缓慢冷却至室温,加入靶蛋白,在反应体系内孵育,形成邻位连接复合物;

3) 将所述邻位连接复合物、熵信标复合物、燃烧链混合反应,待反应完毕,用荧光分光光度计检测其荧光强度。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于:所述步骤1)中,混合物在 $1 \times \text{TAE}/\text{Mg}^{2+}$ 缓冲液中通过程序控温形成杂交复合物,所述Reporter、Byproduct链、Quencher链在体系中的终浓度为 $10 \mu\text{M}$;

所述步骤2)中,所述核酸适配体亲和探针Apt-P1与Apt-P2的摩尔比为1:1;

所述步骤2)中,孵育温度为 $4-50^{\circ}\text{C}$;

所述步骤3)中,熵信标复合物在体系中的浓度为 $50-500 \text{nM}$;

所述步骤3)中,所述燃烧链的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示;

所述步骤3)中,反应时间为 $10-80 \text{min}$ 。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于:所述步骤2)中,孵育温度为 $25-50^{\circ}\text{C}$;

所述步骤3)中,熵信标复合物在体系中的浓度为 $150-500 \text{nM}$;

所述步骤3)中,反应时间为 $25-80 \text{min}$ 。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于:所述步骤2)中,孵育温度为 $25-40^{\circ}\text{C}$;

所述步骤3)中,熵信标复合物在体系中的浓度为 $250-300 \text{nM}$;

所述步骤3)中,反应时间为 $45-60 \text{min}$ 。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于:所述步骤2)中,孵育温度为 37°C ;

所述步骤3)中,熵信标复合物在体系中的浓度为 250nM ;

所述步骤3)中,反应时间为 45min 。

一种免疫传感器及其制备与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及传感器领域,尤其涉及一种免疫传感器及其制备与应用。

背景技术

[0002] 血小板衍生因子(platelet-derived growth factor,PDGF)是一种多肽生长因子,不仅可以促进血管生成,还可促进多种细胞有丝分裂,主要有3种存在形式(PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB)。其中PDGF-BB可与PDGF受体 α 和 β 高亲和力结合,其促增殖作用相比于其他亚型更强。研究证实,PDGF-BB可以促进多种结缔组织细胞的生长与分化,其与多种疾病相关,如动脉粥样硬化、纤维化病症、恶性肿瘤等。因此,PDGF-BB蛋白作为一类经典的生物标志物,对临床分子诊断、疾病的治疗预后具有极其重要的作用。目前,常规的蛋白检测方法主要基于相应的生物抗体,有酶联免疫法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、Western blot及免疫PCR(Immuno-polymerase chain reaction,ImmunoPCR)。虽然这些方法能在一定程度上满足临床检测及诊断所需,但是它们都存在一定的不足,如均需要抗体易失活、价格昂贵、操作步骤繁琐、耗时长。因此,发展一种简单、快速、实用、灵敏的蛋白检测新技术对于阐明肿瘤发生发展的机制,早期诊断和早期治疗及探寻新的肿瘤治疗靶点具有重要价值。

[0003] 近年来,随着DNA碱基互补配对杂交的不断深入研究,DNA纳米技术在多方面都展现出其不可比拟的优势,如逻辑门操作、生物标志物的检测,以及临床疾病的早期诊断。相比于传统的蛋白检测技术,基于DNA纳米技术的蛋白检测新方法具有反应过程可控、易于合成、快速、稳定性好、灵敏度高等优点。邻位连接技术是一种基于DNA邻位自组装的新方法,其通过一对核酸适配体亲和探针特异性识别靶蛋白,将蛋白的检测转换为核酸检测,具有简便、均相、价廉等优点。研究证明,邻位连接技术可级联各种信号放大策略,如:杂交链反应(hybridization chain reaction,HCR)、催化茎环自组装(catalytic hairpin assembly,CHA)、toehold介导的链置换反应(toehold-mediated strand displacement reaction,TSDR)、熵驱动(Entropy-driven amplification circuits,EDC),从而保证了蛋白的高灵敏、高特异性检测。其中,熵驱动是链替代置换反应发展史上的一个里程碑,其不需要设计复杂的茎环探针,具有简便、快速、低背景、高信噪比等特点。但是,目前已发展的邻位连接技术由于存在不可预期的中间反应复合体,因此,其存在不依赖于toehold介导的信号泄露。同时,由于邻位连接的转化速率主要依赖于亲和探针识别靶蛋白形成的缺口引物与信号探针之间的链迁移速度,因此,缺口引物的设计对邻位转化速率至关重要。然而,现有的邻位连接技术大多存在反应速率慢、背景信号大等缺点,亟待发展新方法以弥补现有技术的不足,为蛋白的高灵敏、高特异性检测提供新思路。

发明内容

[0004] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的目的在于提供一种免疫传感器及其制备与应用,用于解决现有技术中PDGF-BB蛋白检测时反应速率慢、背景信号大等问题。

[0005] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明第一方面提供一种用于检测PDGF-BB蛋白的邻位连接核酸适配体亲和探针,包括Apt-P1和Apt-P2,所述Apt-P1的核苷酸序列为5'-CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTTTTTTTTTTTTTTTGTGACCAATTCCAAC-3' (SEQ ID NO.1),所述Apt-P2的核苷酸序列为5'-GCCCTTACTCCGTCACCTTTTTTTTTTTTTTCAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG-3' (SEQ ID NO.2)。

[0006] 在本发明的一些实施例中,所述Apt-P1的1域(单直下划线标记)碱基数为3~6nt。

[0007] 在本发明的一些实施例中,所述Apt-P1的1域碱基数为5nt。

[0008] 在本发明的一些实施例中,所述Apt-P2的3域(双波浪下划线标记)3'端错配或转移碱基1nt至Apt-P2,优选为转移碱基1nt。

[0009] 邻位连接探针通过内部碱基转移可以增加反应速度,降低背景信号,在该设计下信噪比最高。核酸适配体替代抗体作为亲和探针,节省了常规抗体所需成本,简化了常规抗体制备及储存所需的苛刻条件。所述检测方法简便,无需昂贵仪器,只需常规荧光分光光度计便可检测。

[0010] 本发明第二方面提供含有所述核酸适配体亲和探针的蛋白免疫传感器,该传感器通过引入拆分核酸适配体以实现靶蛋白的高特异性的识别,通过邻位连接(PLA)引发的熵驱动信号放大策略实现对痕量蛋白高灵敏的检测。

[0011] 在本发明的一些实施例中,所述蛋白免疫传感器还包括熵信标复合物。

[0012] 在本发明的一些实施例中,所述熵信标复合物包括reporter链、quencher链、byproduct链,所述reporter链的核苷酸序列为5'-FAM-CCTACGTCTCCAATACTTACGG-3' (SEQ ID NO.3),

[0013] 所述quencher链的核苷酸序列为

[0014] 5'-GTTGGAATTGGGAGTAAGGGCAGGGCCGTAAGTTAGTTGGAGACGTAGG-BHQ1-3' (SEQ ID NO.4),

[0015] 所述byproduct链的核苷酸序列为5'-TTTTTTTTTTTTTTTCCCTGCCCTTACTCCC-3' (SEQ ID NO.5)。

[0016] 在本发明的一些实施例中,所述熵信标复合物中reporter链、quencher链、byproduct链的摩尔比为1:1:1.2。

[0017] 在本发明的一些实施例中,所述燃烧链的核苷酸序列为

[0018] 5'-CCTACGTCTCCAATACTTACGGCCCTGCCCTTACTCCCAAT-3' (SEQ ID NO.6)。

[0019] 本发明第三方面提供上述核酸适配体亲和探针或蛋白免疫传感器在检测PDGF-BB蛋白中的应用。

[0020] 本发明第四方面提供一种采用上述核酸适配体亲和探针检测PDGF-BB蛋白的方法,包括以下步骤:

[0021] 1) 制备熵信标复合物:将Reporter链、Byproduct链与Quencher链混合,变性处理后,缓慢冷却至室温,室温下杂交,制得所述熵信标复合物。

[0022] 2) 邻位连接:将核酸适配体亲和探针Apt-P1与Apt-P2变性处理,缓慢冷却至室温,加入靶蛋白,在反应体系内孵育,形成邻位连接复合物;

[0023] 3) 将所述邻位连接复合物、熵信标复合物、燃烧链混合反应,待反应完毕,用荧光

分光光度计检测其荧光强度。

[0024] 其中,步骤1)与步骤2)无先后顺序之分,可同时进行,也可分先后进行。

[0025] 该方法通过核酸适配体亲和探针特异性识别靶目标,通过邻位连接形成有缺口的Trigger,该Trigger通过Toehold识别熵信标复合物(TDC)并启动熵驱动信号放大,从而使荧光信号输出不断增强。

[0026] 在本发明的一些实施例中,所述步骤1)中,所述Reporter链、Byproduct链、Quencher链的摩尔比为1:1:1.2。

[0027] 在本发明的一些实施例中,所述步骤1)中,混合物在 $1 \times \text{TAE}/\text{Mg}^{2+}$ 缓冲液中通过程序控温形成杂交复合物,所述Reporter、Byproduct链、Quencher链在体系中的终浓度为 $10 \mu\text{M}$ 。此处 μM 即指 $\mu\text{mol/L}$ 。

[0028] 在本发明的一些实施例中,所述步骤2)中,所述核酸适配体亲和探针Apt-P1与Apt-P2的摩尔比为1:1。

[0029] 在本发明的一些实施例中,所述步骤2)中,孵育温度为 $4-50^{\circ}\text{C}$ 。

[0030] 在本发明的一些实施例中,所述步骤2)中,孵育温度为 $25-50^{\circ}\text{C}$ 。

[0031] 在本发明的一些实施例中,所述步骤2)中,孵育温度为 $25-40^{\circ}\text{C}$ 。

[0032] 在本发明的一些实施例中,所述步骤2)中,孵育温度为 37°C 。

[0033] 在本发明的一些实施例中,所述步骤3)中,熵信标复合物在体系中的浓度为 $50-500\text{nM}$ 。

[0034] 在本发明的一些实施例中,所述步骤3)中,熵信标复合物在体系中的浓度为 $150-500\text{nM}$ 。

[0035] 在本发明的一些实施例中,所述步骤3)中,熵信标复合物在体系中的浓度为 $150-300\text{nM}$ 。

[0036] 在本发明的一些实施例中,所述步骤3)中,熵信标复合物在体系中的浓度为 $250-300\text{nM}$ 。

[0037] 在本发明的一些实施例中,所述步骤3)中,熵信标复合物在体系中的浓度为 250nM 。

[0038] 在本发明的一些实施例中,所述步骤3)中,反应时间为 $10-80\text{min}$ 。

[0039] 在本发明的一些实施例中,所述步骤3)中,反应时间为 $25-80\text{min}$ 。

[0040] 在本发明的一些实施例中,所述步骤3)中,反应时间为 $45-80\text{min}$ 。

[0041] 在本发明的一些实施例中,所述步骤3)中,反应时间为 $45-60\text{min}$ 。

[0042] 在本发明的一些实施例中,所述步骤3)中,反应时间为 45min 。

[0043] 上述数值范围均包括端点值。

[0044] 如上所述,本发明的免疫传感器及其制备与应用,具有以下有益效果:(1)本发明研制了一种基于邻位连接的蛋白免疫传感器,可以用于灵敏地检测PDGF-BB。该蛋白免疫传感器的线性范围为 $10\text{pM}-20\text{nM}$,线性方程式为 $Y=297.2+134.5\text{Log}(C)$,检测限为 9.6pM ,线性相关系数为 0.992 。

[0045] (2)本发明研制了一种基于邻位连接的蛋白免疫传感器,可以用于特异地检测PDGF-BB。首先制得邻位连接核酸适配体亲和探针,亲和探针的引入可以增加PDGF-BB的识别特异性,该蛋白免疫传感器能特异性地识别BSA、Thrombin、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB。

[0046] (3)与此同时,本发明研制了一种基于邻位连接的蛋白免疫传感器,整个检测过程不超过2h。

[0047] 本发明成功构建了可用于检测PDGF-BB的免疫传感器,应用本发明的传感器,对PDGF-BB的测定显示了灵敏度高、稳定、重现性好的能力。与现有技术比较,本发明的传感器成本低,操作简单方便,检测周期短,特异性好,假阳性率和假阴性率低。适用于实际样品的测定等,有望成为具有实际应用价值的传感器。而对于免标记的生物传感器,因其无需再引入信号分子,可直接检测核酸杂交反应所引起的光学性质的改变,从而避免繁琐的实验过程,极大地简化了实验操作、缩短分析时间、降低了检测成本。

附图说明

[0048] 图1为本发明实施例1优化设计后的信号泄露图,其中

[0049] 曲线a为F-Q;

[0050] 曲线b为F-Q+L1-D1+L2-D1;

[0051] 曲线c为F-Q+L1-D2+L2-D2;

[0052] 曲线d为F-Q+L1+L2。

[0053] 图2为本发明实施例1优化设计后的信号图,其中

[0054] 曲线a为F-Q+L1-D2+L2-D2+ST;

[0055] 曲线b为F-Q+L1+L2+ST;

[0056] 曲线c为F-Q+L1-D1+L2-D1+ST;

[0057] 曲线d为F-Q。

[0058] 图3为本发明实施例1亲和探针L1的1域碱基数优化图。

[0059] 图4为反应体系中加入不同TDC浓度优化图。

[0060] 图5为不同反应温度下的信噪比。

[0061] 图6为不同反应时间所产生的信噪比。

[0062] 图7为不同浓度的PDGF-BB所引发的信号强度。

[0063] 图8为不同蛋白所产生的信号强度,即本发明制备的PDGF-BB免疫传感器的特异性分析实验结果。

具体实施方式

[0064] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0065] 须知,下列实施例中未具体注明的工艺设备或装置均采用本领域内的常规设备或装置;所有压力值和范围都是指绝对压力。

[0066] 此外应理解,本发明中提到的一个或多个方法步骤并不排斥在所述组合步骤前后还可以存在其他方法步骤或在这些明确提到的步骤之间还可以插入其他方法步骤,除非另有说明;还应理解,本发明中提到的一个或多个设备/装置之间的组合连接关系并不排斥在所述组合设备/装置前后还可以存在其他设备/装置或在这些明确提到的两个设备/装置之

间还可以插入其他设备/装置,除非另有说明。而且,除非另有说明,各方法步骤的编号仅为鉴别各方法步骤的便利工具,而非为限制各方法步骤的排列次序或限定本发明可实施的范围,其相对关系的改变或调整,在无实质变更技术内容的前提下,当亦视为本发明可实施的范畴。

[0067] 为适应临床诊断治疗的需要,特别是个体化诊断治疗的需求,本发明旨在建立一种免疫传感器,用于PDGF-BB蛋白的快速、灵敏、特异检测。

[0068] 实施例1制备PDGF-BB免疫传感器

[0069] 1.材料与方法

[0070] 1.1材料

[0071] BSA、thrombin、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB购于SangonBiotechnology Co.Ltd.(中国,上海)。HPLC纯化的DNA由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

[0072] 1.2检测仪器

[0073] 荧光分光光度计Agilent(美国,加州)。

[0074] 1.3检测原理

[0075] FAM-DNA和BHQ1-DNA互补时,由于荧光共振能量转移作用,FAM荧光信号被淬灭,此时无或仅有微弱荧光信号产生;当两者分离后,通过荧光分光光度计测得其在518nm处的荧光强度变化,实现对PDGF-BB的检测。

[0076] 2.免疫传感器的制备

[0077] 2.1邻位亲和探针优化设计与制备

[0078] 邻位亲和探针包括L1和L2,对探针的优化设计分别为:设计1进行碱基错配,L1-D1序列为GCGTTCCAAAGGGTTTTTTTTTTTTTTTGTGACCAATTCCAAC (SEQ ID NO.7); L2-D1序列为GCCCTTACTCCGGGTCACCTTTTTTTTTTTTTTTTCAGGATCATTGA (SEQ ID NO.8),双波浪线与单波浪线之间的加粗下划线碱基为错配碱基;设计2进行碱基转移,L1-D2序列为GCGTTCCAAAGGGTTTTTTTTTTTTTTTGTGACCCAATTCCAAC (SEQ ID NO.9),L2-D2序列为GCCCTTACTCC_GGTCACCTTTTTTTTTTTTTTTTCAGGATCATTGA (SEQ ID NO.10),双波浪线与单波浪线之间的单下划线处为转移碱基。ST为验证邻位探针的序列,其序列为GAGTGGATGGTGAAGGTGAAGGTA (SEQ ID NO.11)。信标分子F-Q的组成成分F序列为GTTGGAATTGGGAGTAAGGGC-FAM (SEQ ID NO.12),Q序列为BHQ1-GCCCTTACTCCC (SEQ ID NO.13)。信标分子F-Q制备过程中,F和Q以1:1.2(摩尔比)混合,在1×TAE/Mg²⁺缓冲液(1mM EDTA,40mM Tris-Acetate,12.5mM MgCl₂,pH 8.0)中通过程序控温(95℃-20℃)形成杂交复合物,待反应完成,4℃保存备用。

[0079] 2.2核酸适配体亲和探针(Apt-P1和Apt-P2)的制备

[0080] 将Apt-P1

[0081] (5'-CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTTTTTTTTTTTTTTTGTGACCAATTCCAAC-3',单直下划线标记为1域,双直下划线标记为2域)和Apt-P2

[0082] (5'-GCCCTTACTCCGGTCACTTTTTTTTTTTTTTTTCAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG-3',单波浪下划线标记为1*域,双波浪下划线标记为3域)95℃变性,缓慢恢复至室温,4℃冻存备用。

[0083] 2.3TDC复合物的制备

[0084] reporter链(5'-FAM-CCTACGTCTCCAATACTTACGG-3')、quencher链(5'-GTTGGAA TTGGGAGTAAGGGCAGGGCCGTAAGTTAGTTGGAGACGTAGG-BHQ1-3')及byproduct链(5'-TTTTTTTT TTTTTTCCCTGCCCTTACTCCC-3') 10 μ M (终浓度) 在1 $\times$ TAE/Mg²⁺缓冲液(1mM EDTA, 40mM Tris-Acetate, 12.5mM MgCl₂, pH 8.0) 中通过程序控温(95 $^{\circ}$ C-20 $^{\circ}$ C) 形成杂交复合物, 待反应完成, 4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0085] 3.PDGF免疫传感器的使用

[0086] 反应体系: 在100 μ L含有下列成分的反应缓冲体系中进行

[0087] PDGF-BB2 μ L

[0088] Apt-P10.25 μ M

[0089] Apt-P2 0.25 μ M

[0090] TDC0.25 μ M

[0091] 燃烧链0.25 μ M。

[0092] 实施例2PDGF-BB免疫传感器的验证

[0093] 对邻位连接优化设计的验证

[0094] 对实施例1中所得亲和探针通过分别设计碱基错配(D1)和碱基转移(D2), 用单链DNA靶序列对信号泄露进行验证, 如图1显示, 无单链DNA靶序列时, 亲和探针通过碱基转移可以获得最低背景信号; 如图2显示, 当单链DNA靶序列存在时, 邻位连接反应顺利进行, 从而引发后续的反应, 产生不断增强的荧光信号。

[0095] 如图1所示为本发明实施例1优化设计后的信号泄露图, 其中

[0096] 曲线a为F-Q;

[0097] 曲线b为F-Q+L1-D1+L2-D1;

[0098] 曲线c为F-Q+L1-D2+L2-D2;

[0099] 曲线d为F-Q+L1+L2。

[0100] 如图2所示为本发明实施例1优化设计后的信号图, 其中

[0101] 曲线a为F-Q+L1-D2+L2-D2+ST;

[0102] 曲线b为F-Q+L1+L2+ST;

[0103] 曲线c为F-Q+L1-D1+L2-D1+ST;

[0104] 曲线d为F-Q。

[0105] 实施例3PDGF-BB免疫传感器及其使用条件的优化

[0106] 我们还对实验过程中几个重要的条件即亲和探针L1的1域碱基数、TDC浓度、反应体系的温度、体系的反应时间进行了进一步的优化。对每一个条件都由低到高分别选取至少五个点进行一系列实验。以下四个因素是相对重要的影响因素, 特别是第一因素(即亲和探针L1的1域碱基数), 该因素相对于传统邻位连接方法具有显著提升, 可以明显提高反应速率, 总反应时间不足2h, 并降低背景信号。传统连接具体方法与本发明相同, 区别在与序列设计上。

[0107] 1、为考察亲和探针L1的1域碱基数对PDGF-BB免疫传感器的影响, 本实验采用了不同1域碱基数构建免疫传感器, 然后进行荧光分光光度检测。如图3可见, 信噪比随着1域碱基数的不同而不同, 当1域碱基数为5时, 信噪比达到最大值, 说明这个碱基数为最佳。此时,

TDC浓度为250nM、扩增体系反应温度为室温(25℃)、反应时间为1小时。

[0108] 2、同理,为考察1条件中TDC的浓度对使用PDGF-BB免疫传感器的影响,本实验采用了不同浓度的TDC(50,150,250,300,500nM),然后进行荧光分光光度检测。如图4可见,信噪比最佳浓度为250nM。此时,亲和探针L1的1域碱基数为5nt、扩增体系反应温度为室温(25℃)、反应时间为1小时。

[0109] 3、同理,为考察扩增体系中反应温度对使用传感器的影响,本实验采用了不同温度(4,25,37,40,50℃)的反应缓冲体系,然后进行荧光分光光度检测。如图5可见,反应的最佳反应温度为37℃。此时,亲和探针L1的1域碱基数为5nt、TDC浓度为250nM、反应时间为1小时。

[0110] 4、同理,为考察扩增体系中反应时间对使用传感器的影响,本实验采用了含不同反应时间(10,25,45,60,80min)的免疫反应缓冲体系,然后进行荧光分光光度检测。如图6可见,扩增体系的最佳反应时间为45min。此时,亲和探针L1的1域碱基数为5nt、TDC浓度为250nM、扩增体系反应温度为37℃。

[0111] 实施例4制备的免疫化学传感器的性能分析

[0112] 为了评估PDGF-BB免疫传感器的性能,对以PBS(pH 7.4)缓冲液配备的不同浓度的PDGF-BB标准品进行分析。具体的,在最优实验条件(亲和探针L1的1域碱基数为5,TDC浓度为250nM,反应缓冲体系的温度为37℃,扩增体系的反应时间为45min)下,将6个不同浓度的PDGF-BB(0nmol/mL,0.05nmol/mL,0.2nmol/mL,1nmol/mL,5nmol/mL,20nmol/mL)加入连接反应体系中,37℃温育60min。(2)然后再加入信号扩增反应体系室温孵育45min。检测荧光强度的变化(如图7所示),绘制标准曲线,如图7所示。实验结果显示,当PDGF-BB浓度在 $0\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 到 $20\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间时,得到的信号与PDGF-BB浓度的对数呈线性相关,线性方程式为 $Y=297.2+134.5\text{Log}(C)$,相关系数为0.992。将传感器在空白溶液(空白溶液是指没有PDGF-BB标准品加入扩增体系的溶液)中连续扫描10次,根据空白信号加上3倍标准差所对应的信号值估计检出限,计算得 $9.6\text{pmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

[0113] 实施例5制备的免疫传感器的特异性分析

[0114] PDGF-BB免疫传感器的特异性,在分析不分离的生物样本中的生物标志物时具有重要的作用,主要取决于设计的核酸适配体亲和探针的特异性。为了评价本传感器的特异性,我们对在检测PDGF-BB时可能会出现其他的几种蛋白进行了检测。具体的,将牛血清白蛋白(BSA)、凝血酶(thrombin)、PDGF-AA、PDGF-AB各 $20\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$,蛋白混合物 $20\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$,以及 $5\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ PDGF-BB分别采用同实施例4所构建的PDGF-BB免疫传感器进行测定。结果如图8所示,其它蛋白的信号强度接近于空白样,而混合物蛋白中由于PDGF-BB的存在,所有荧光信号强度接近于单独PDGF-BB所产生的荧光信号强度。这些结果说明制备的PDGF-BB免疫传感器能够有效地分辨其他种类的蛋白,具有良好的特异性。

[0115] 经过优化后的检测方法包括以下步骤:

[0116] a) 制备熵信标复合物:Reporter链、Byproduct链与Quencher链按1:1:1.2的比例进行混合,然后在95℃下变性,缓慢冷却至室温,室温下杂交30min;

[0117] b) 邻位连接:适配体亲和探针Apt-P1与Apt-P2在95℃变性,缓慢冷却至室温,加入靶蛋白,在反应体系为20μL内37℃孵育1h,形成邻位连接复合物;

[0118] c) 反应体系的建立:邻位连接复合物20μL、TDC0.25μM、燃烧链0.25μM在总反应体

系为100 μ L内反应30-50min,待反应完毕,用荧光分光光度计检测其荧光强度。

[0119] 综上所述,本发明的邻位连接探针通过内部碱基转移可以增加反应速度,降低背景信号,在该设计下信噪比最高。核酸适配体替代抗体作为亲和探针,节省了常规抗体所需成本,简化了常规抗体制备及储存所需的苛刻条件。本发明通过改良的邻位连接诱导的熵驱动信号放大策略,实现了对PDGF-BB的高灵敏及高特异性检测。该检测方法简便,无需昂贵仪器,只需常规荧光分光光度计便可检测,降低检测成本。

[0120] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

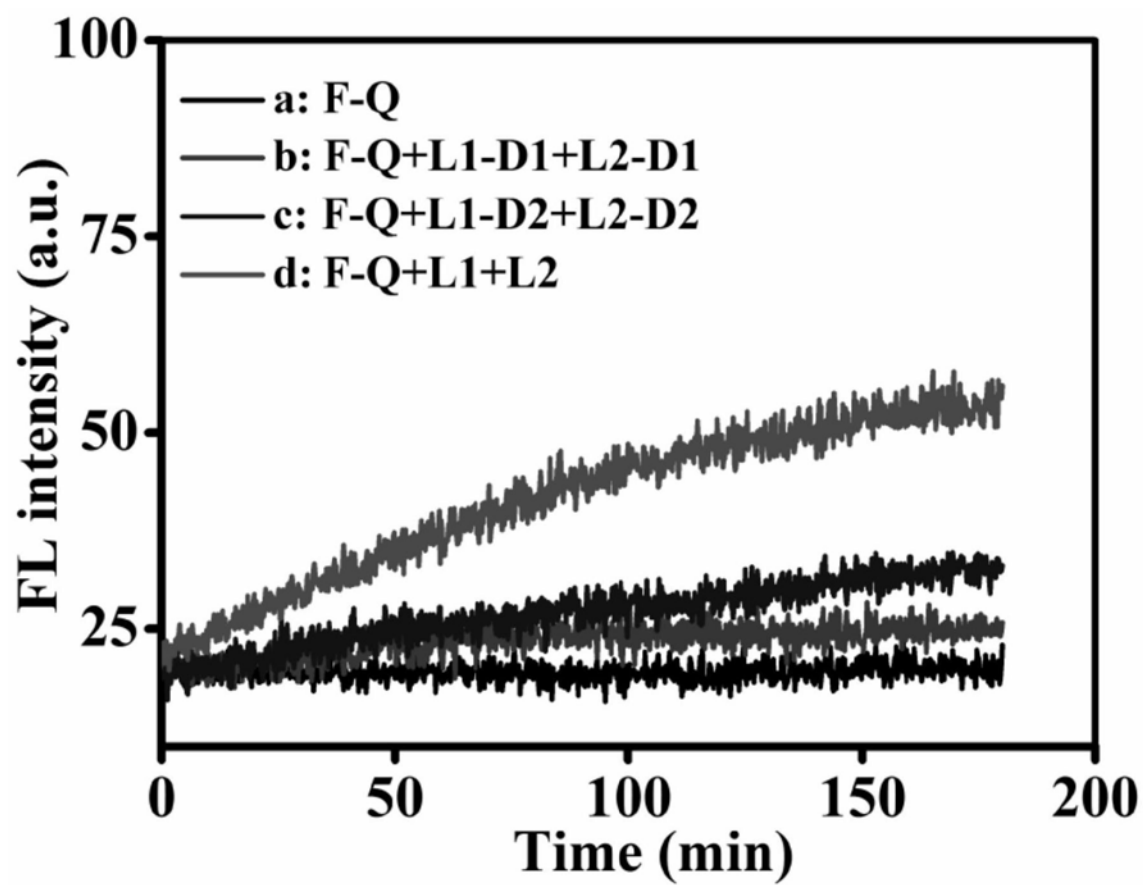


图1

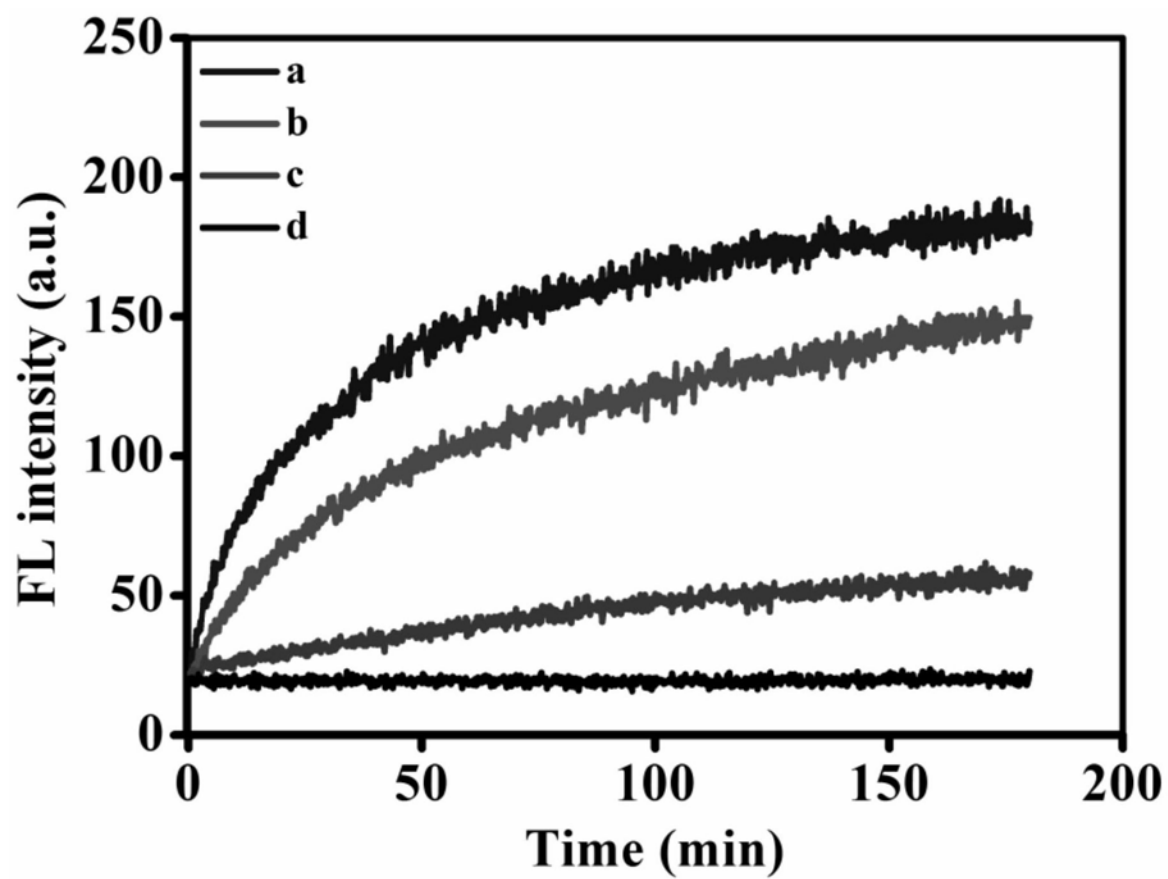


图2

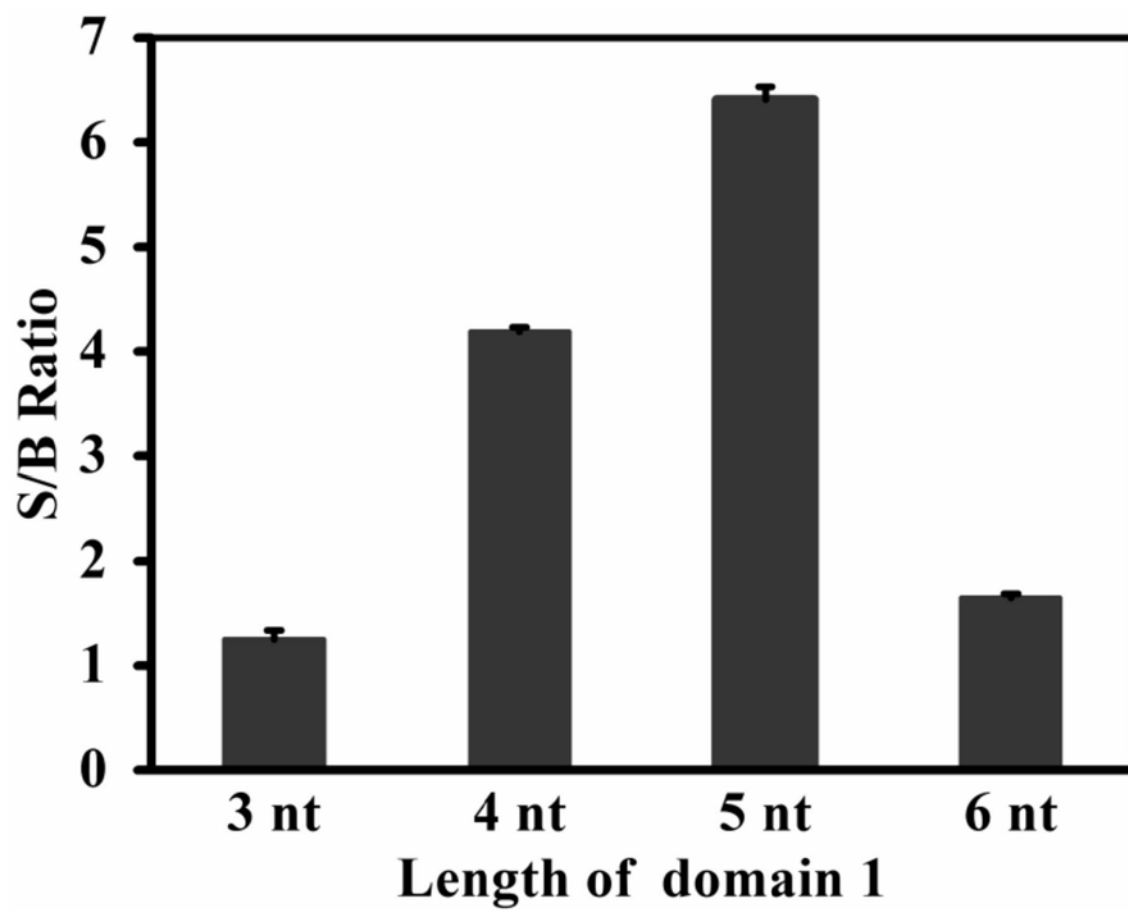


图3

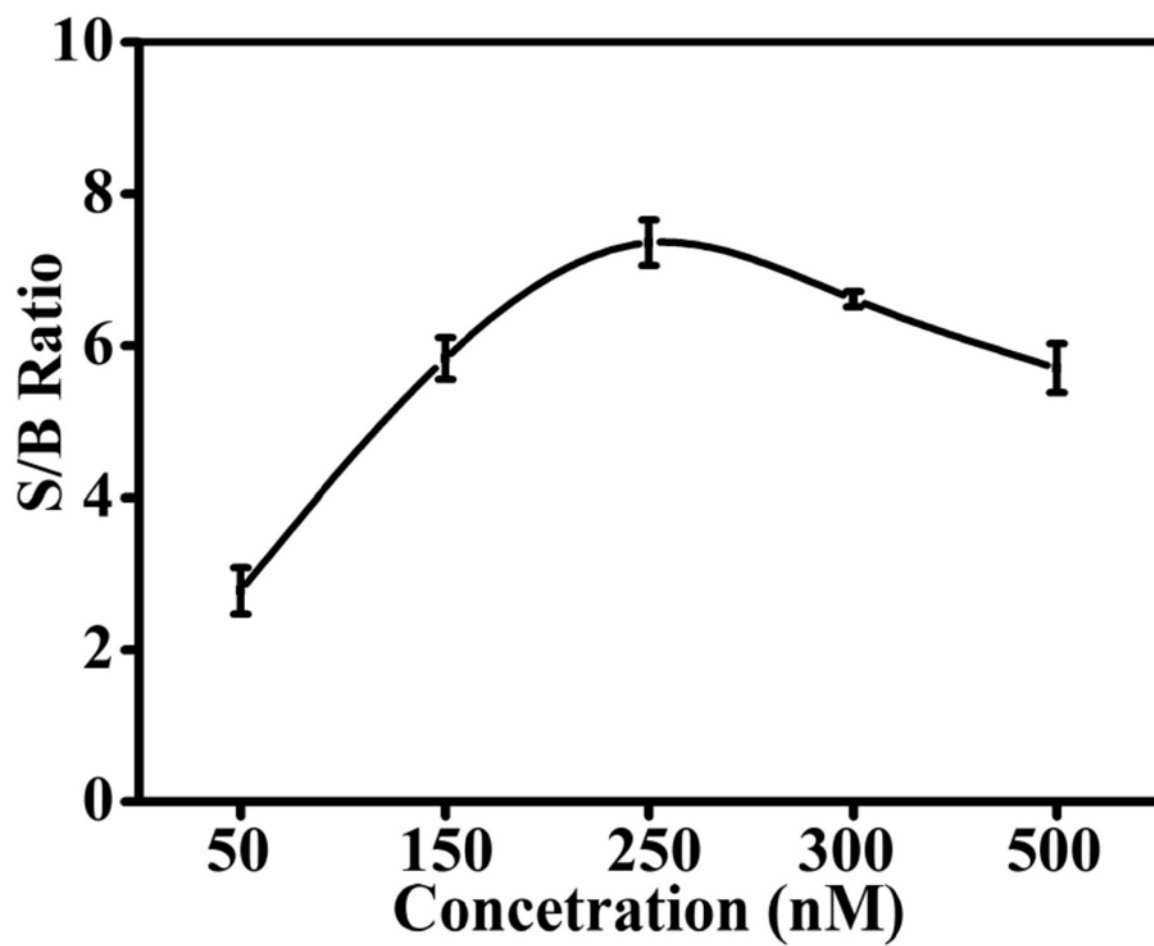


图4

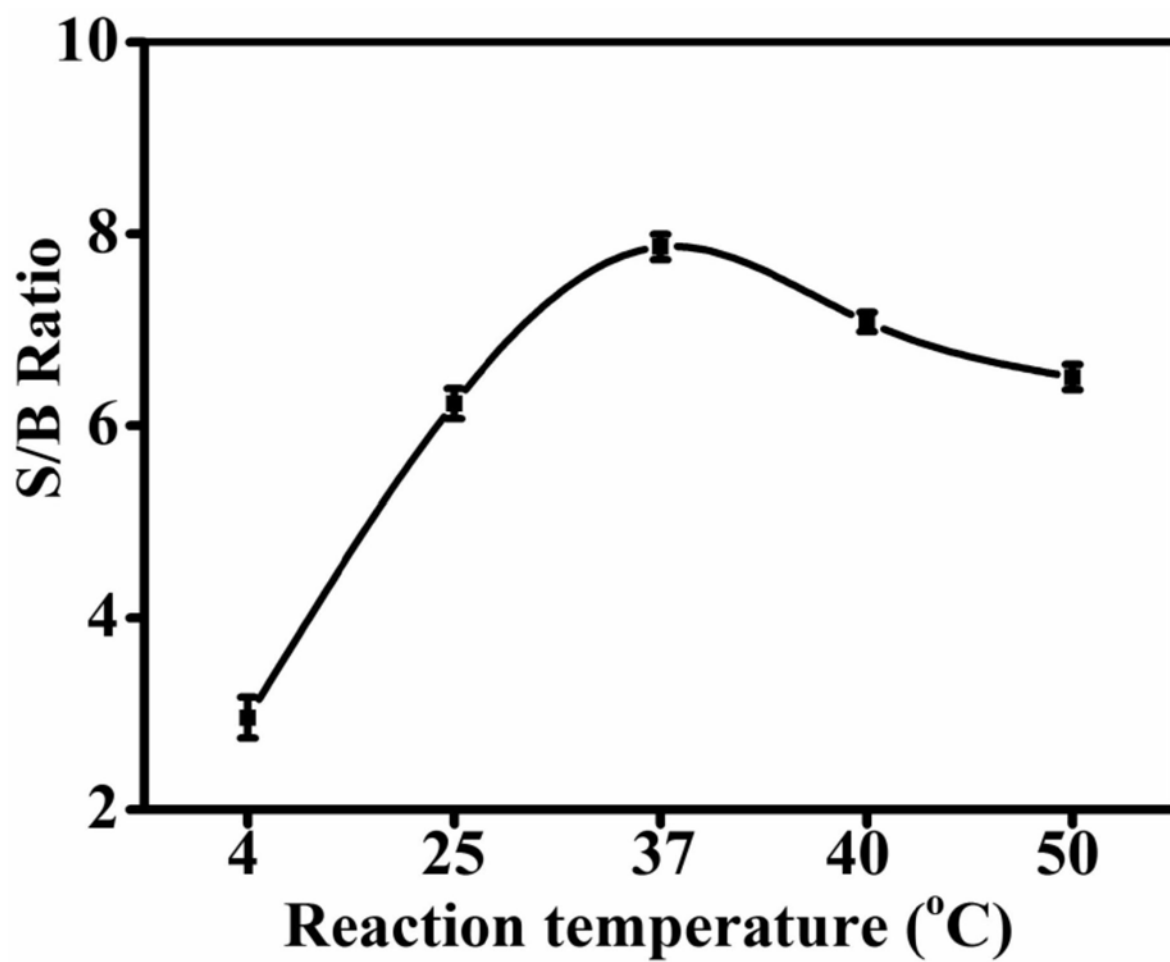


图5

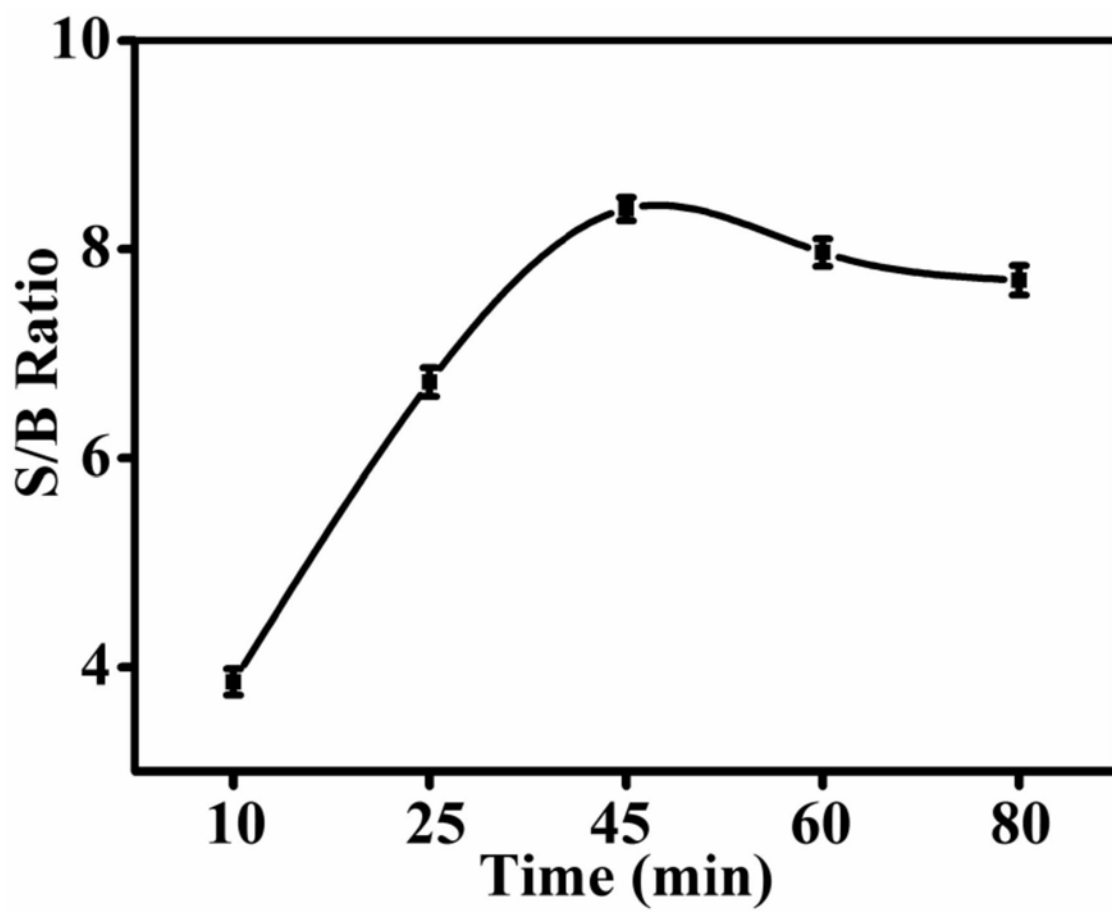


图6

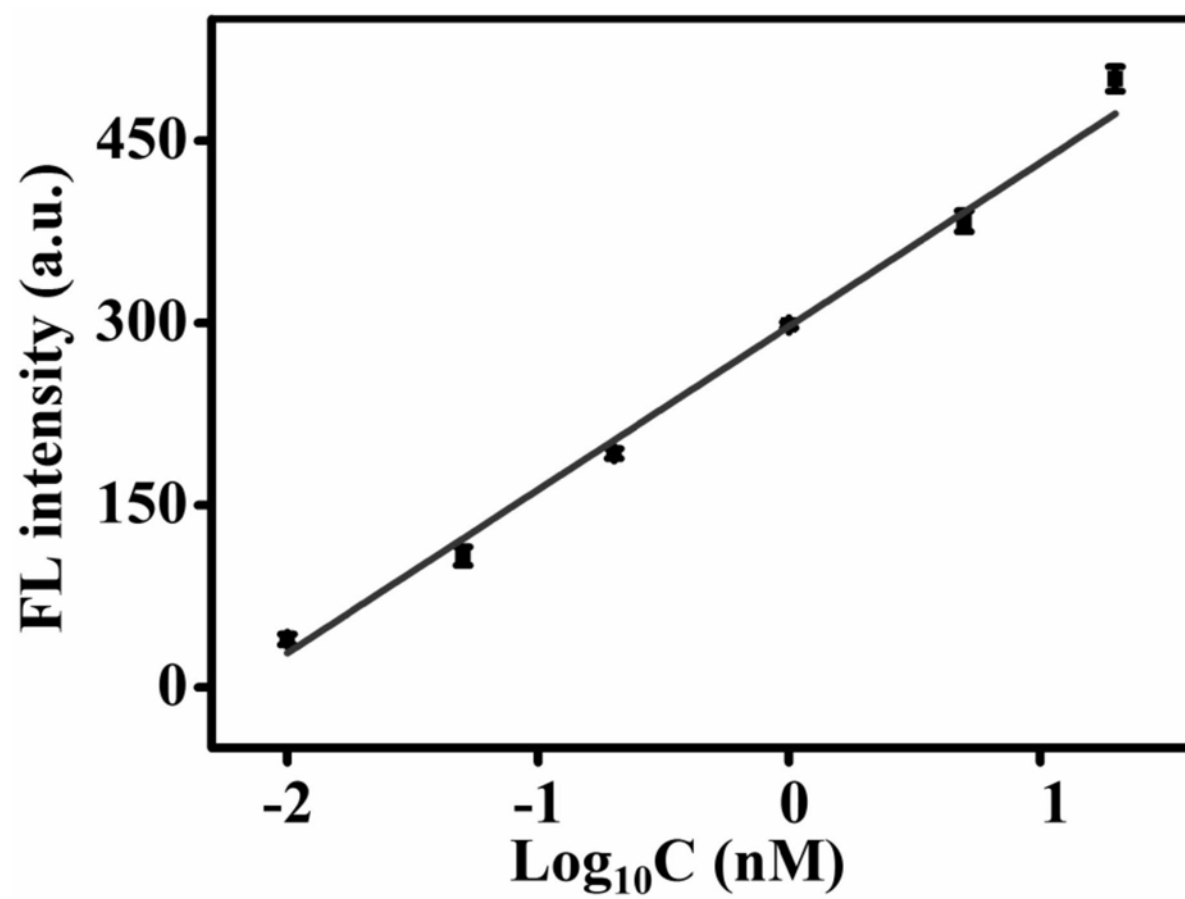


图7

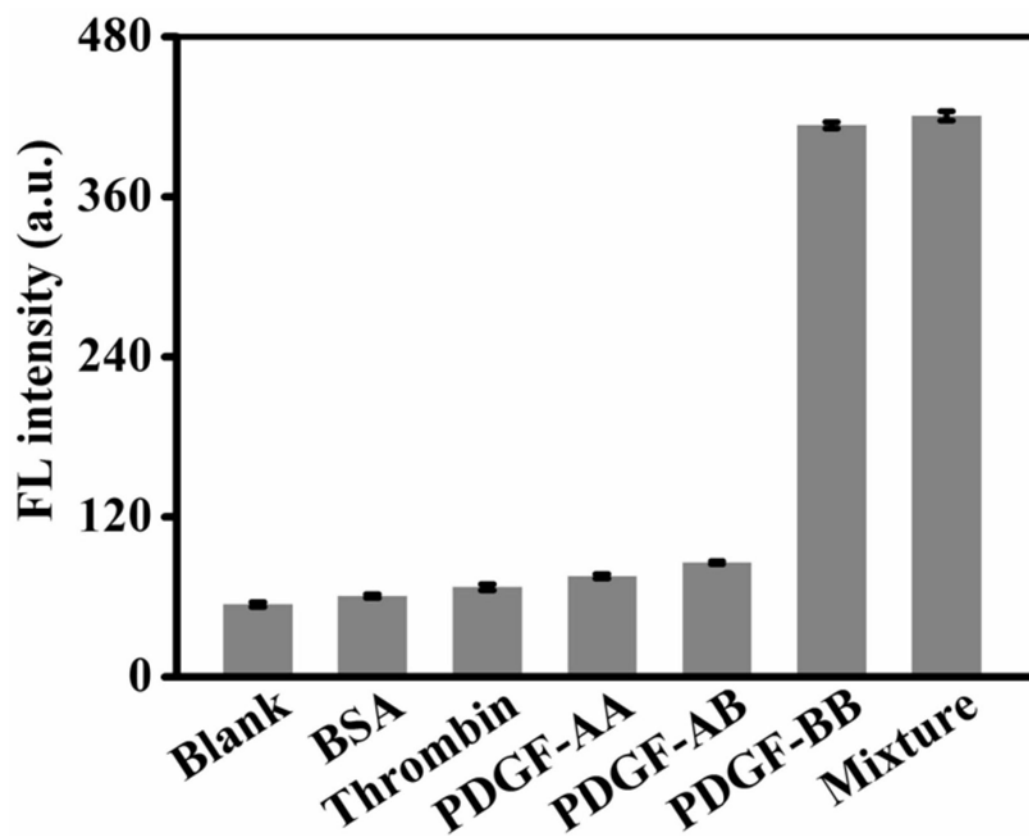


图8