



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112300779 A

(43)申请公布日 2021.02.02

(21)申请号 201910702023.X

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2019.07.31

(71)申请人 华南师范大学

地址 510631 广东省广州市天河区中山大学西55号华南师范大学生命科学学院

(72)发明人 周小明 程猛

(74)专利代理机构 广州骏思知识产权代理有限公司 44425

代理人 吴静芝

(51)Int.Cl.

C09K 11/02(2006.01)

C09K 11/06(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

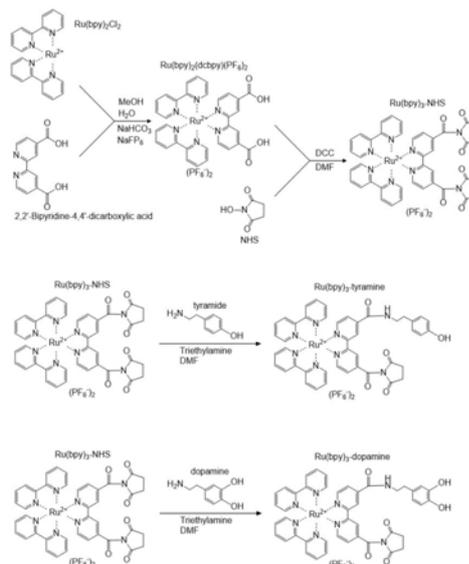
权利要求书1页 说明书7页
序列表1页 附图5页

(54)发明名称

一种聚合增强电化学发光探针及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种聚合增强电化学发光探针及其制备方法和应用。所述的聚合增强电化学发光探针由聚合活性基团和电化学发光基团共价连接构成。本发明所述的聚合增强电化学发光探针,在过氧化物酶的催化下,能够高效聚合到过氧化物酶及邻近的蛋白分子上,起到信号放大的作用,具有简单、信号增强效率高、与现有分子及免疫检测体系兼容性强等优点,可用于核酸及蛋白的高灵敏检测。



1. 一种聚合增强电化学发光探针,其特征在于,所述聚合增强电化学发光探针由聚合活性基团和电化学发光基团共价连接构成。

2. 根据权利要求1所述的聚合增强电化学发光探针,其特征在于,所述聚合活性基团为酞胺或多巴胺。

3. 根据权利要求2所述的聚合增强电化学发光探针,其特征在于,所述电化学发光基团为三联吡啶钌基团。

4. 权利要求3所述的聚合增强电化学发光探针的制备方法,其特征在于,具体方法为:先制备三联吡啶钌-NHS活化酯,然后将三联吡啶钌-NHS活化酯与聚合活性基团共价连接,得到所述的聚合增强电化学发光探针;或者聚合活性基团与三联吡啶钌反应,以NHS和DCC为催化剂,得到所述的聚合增强电化学发光探针;或者聚合活性基团与三联吡啶钌反应,以NHS和EDC为催化剂,得到所述的聚合增强电化学发光探针。

5. 权利要求3所述的聚合增强电化学发光探针在蛋白分子检测中的应用,其特征在于,所述聚合增强电化学发光探针与标记有功能基团的捕获探针、偶联有过氧化物酶的检测探针共同构成检测体系。

6. 根据权利要求5所述的聚合增强电化学发光探针在蛋白分子检测中的应用,其特征在于,所述捕获探针为生物素修饰的抗体或核酸适配体分子,所述检测探针为过氧化物酶修饰的检测抗体或适配体-抗体组合物,所述适配体-抗体组合物由地高辛修饰的核酸适配体分子及过氧化物酶修饰的抗地高辛抗体组成。

7. 根据权利要求5所述的聚合增强电化学发光探针在蛋白分子检测中的应用,其特征在于,所述过氧化物酶为辣根过氧化物酶HRP或抗坏血酸过氧化物酶APEX。

8. 根据权利要求5所述的聚合增强电化学发光探针在蛋白分子检测中的应用,其特征在于,检测蛋白分子的具体过程为:捕获探针、靶蛋白分子、检测探针结合形成三明治结构,用链霉亲和素或亲和素包被的微球/粒捕获后,洗去未结合的抗体及杂质分子,然后在体系中加入聚合增强电化学发光探针和过氧化氢进行聚合反应,将微球/粒-捕获抗体-靶蛋白分子-检测抗体复合物加入电化学发光反应池,检测电化学发光信号值,通过对电化学发光强度的分析实现对目标蛋白分子的检测。

9. 权利要求3所述的聚合增强电化学发光探针在核酸检测中的应用,其特征在于,所述聚合增强电化学发光探针与标记有功能基团的捕获探针DNA、抗原标记的检测探针DNA、偶联有过氧化物酶的抗体共同构成检测体系,所述抗原和抗体能够特异性结合。

10. 根据权利要求9所述的聚合增强电化学发光探针在核酸检测中的应用,其特征在于,检测核酸分子的具体过程为:捕获探针DNA、靶单链核酸、检测探针DNA结合形成三明治结构,用链霉亲和素或亲和素包被的微球/粒捕获后,洗去未结合的探针及杂质分子,然后在体系中加入所述抗体,使其结合到微球/粒复合物上的抗原上,洗去未结合的抗体,最后在体系中加入聚合增强电化学发光探针和过氧化氢进行聚合反应,将微球/粒-捕获探针-靶核酸分子-检测探针复合物加入电化学发光反应池,检测电化学发光信号值,通过对电化学发光强度的分析实现对目标核酸分子的检测。

一种聚合增强电化学发光探针及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生化分析技术领域,尤其涉及一种聚合增强电化学发光探针及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 随着现代科学和医学技术水平的不断提升,人们已经意识到,人体的核酸和蛋白分子的水平与疾病的发生和发展具有重大关联,对这些疾病标志物的早期监测对于疾病的预防和早期治疗具有重要意义,因此,精确和高灵敏的检测蛋白、核酸等功能生物分子对于疾病早期诊断意义重大。蛋白分子作为疾病标志物已经被广泛应用于肿瘤、心脏病、传染病等的临床诊断。microRNA可作为调控因子参与到体内复杂的生物过程,已经被确认与疾病发病机制相关(癌症、神经病变等),是一种有潜力的肿瘤早期筛查标志物。此外,近年来,循环肿瘤DNA的发现也打开了肿瘤体外早期诊断的新途径。因此,发展一种灵敏、高效的检测生物分子的方法具有重要的应用价值。

[0003] 电化学发光免疫检测是现有的商业化的蛋白分子体外检测的方法,该方法基于一对抗体和靶蛋白分子形成三明治结构,检测抗体上标记有三联吡啶钌,因此能通过电化学发光信号来判断靶分子的水平,该技术已经能够提供十几类生物指标分子的检测,协助疾病的筛查和确诊。然而,该方法的限制之处在于,抗体上所标记的三联吡啶钌数量有限,对于目前已确认及潜在待发现的有重要生理意义的低丰度靶标的检测能力有限。现有的核酸检测技术多数依赖于前期的核酸扩增手段,如聚合酶链式反应(PCR)、环介导等温扩增(LAMP)、依赖核酸序列的扩增(NASBA)等,最终实现高灵敏的核酸检测,但这些方法存在核酸扩增过程存在污染、扩增错误的风险,准确性不如直接检测方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的是为了解决上述现有技术的缺点和不足,本发明的首要目的是提供一种聚合增强电化学发光探针,本发明的第二个目的是提供所述的聚合增强电化学发光探针的制备方法,本发明的另一目的是提供所述的聚合增强电化学发光探针在分子检测中的应用。

[0005] 为了实现第一个目的,本发明是通过以下技术方案来实现的:

[0006] 一种聚合增强电化学发光探针,由聚合活性基团和电化学发光基团共价连接构成。

[0007] 进一步地,所述聚合活性基团为酪胺或多巴胺。

[0008] 更进一步地,所述电化学发光基团为三联吡啶钌基团。

[0009] 为了实现第二个目的,本发明是通过以下技术方案来实现的:

[0010] 本发明所述的聚合增强电化学发光探针的制备方法,包括以下三种方法:先制备三联吡啶钌-NHS活化酯,然后将三联吡啶钌-NHS活化酯与聚合活性基团共价连接,得到所述的聚合增强电化学发光探针;或者聚合活性基团与三联吡啶钌反应,以NHS和DCC为催化

剂,得到所述的聚合增强电化学发光探针;或者聚合活性基团与三联吡啶钌反应,以NHS和EDC为催化剂,得到所述的聚合增强电化学发光探针。

[0011] 对于第一种制备方法,具体步骤如下:

[0012] (1) 制备三联吡啶钌-NHS活化酯 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{-NHS}$);

[0013] (2) 三联吡啶钌-NHS活化酯 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{-NHS}$) 共价连接到聚合活性基团,得到本发明所述的聚合增强电化学发光探针。

[0014] 所述步骤(1)具体包括:将顺-双(2,2'-二吡啶)二氯化钌(II)水合物(*cis*-Dichlorobis(2,2'-bipyridine)ruthenium(II))与2,2'-联吡啶-4,4'-二羧酸(2,2'-Bipyridine-4,4'-dicarboxylic acid)在甲醇/水的混合溶液中加热反应,合成出羧基化的三联吡啶钌,随后在反应混合物中加入六氟磷酸钠溶液,得到析出的固体三联吡啶钌固体($\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})(\text{PF}_6)_2$,即钌-二(2,2'-联吡啶)(2,2'-联吡啶-4,4'-二羧酸)双(六氟磷酸盐));然后,在无水的N,N-二甲基甲酰胺(N,N-Dimethylformamide)中加入固体三联吡啶钌、二环己基碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺,制备得到三联吡啶钌-NHS活化酯 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{-NHS}$)。

[0015] 所述步骤(2)具体包括:在无水的N,N-二甲基甲酰胺(N,N-Dimethylformamide)中加入步骤1)制得的三联吡啶钌-NHS活化酯 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{-NHS}$) 及三乙胺(Triethylamine)和聚合活性分子,室温震荡反应,共价连接得到聚合增强电化学发光探针。

[0016] 在所述步骤(2)中,将三联吡啶钌-NHS活化酯共价连接到聚合活性分子的氨基上。三联吡啶钌-NHS活化酯的NHS基团能够用与聚合活性分子上的氨基发生缩合反应,因此,聚合活性基团与邻近的蛋白聚合,实现电化学发光基团的积聚,实现电化学发光信号的放大。

[0017] 对于第二种制备方法,具体步骤如下:

[0018] (1) 制备三联吡啶钌固体 ($\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})(\text{PF}_6)_2$);

[0019] (2) 三联吡啶钌固体 ($\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})(\text{PF}_6)_2$) 共价连接到聚合活性基团,得到本发明所述的聚合增强电化学发光探针。

[0020] 所述步骤(1)具体包括:将顺-双(2,2'-二吡啶)二氯化钌(II)水合物(*cis*-Dichlorobis(2,2'-bipyridine)ruthenium(II))与2,2'-联吡啶-4,4'-二羧酸(2,2'-Bipyridine-4,4'-dicarboxylic acid)在甲醇/水的混合溶液中加热反应,合成出羧基化的三联吡啶钌,随后在反应混合物中加入六氟磷酸钠溶液,得到析出的固体三联吡啶钌固体($\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})(\text{PF}_6)_2$,即钌-二(2,2'-联吡啶)(2,2'-联吡啶-4,4'-二羧酸)双(六氟磷酸盐))。

[0021] 然后,在无水的N,N-二甲基甲酰胺(N,N-Dimethylformamide)中加入固体三联吡啶钌、二环己基碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺,制备得到三联吡啶钌-NHS活化酯 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{-NHS}$)。

[0022] 所述步骤(2)具体包括:在无水的N,N-二甲基甲酰胺(N,N-Dimethylformamide)中加入步骤1)制得的三联吡啶钌固体 ($\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})(\text{PF}_6)_2$) 及、NHS、DCC、三乙胺(Triethylamine)和聚合活性分子,室温震荡反应,共价连接得到聚合增强电化学发光探针。

[0023] 对于第三种制备方法,具体步骤如下:

[0024] (1) 制备三联吡啶钌固体 ($\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})(\text{PF}_6)_2$);

[0025] (2) 三联吡啶钌固体 $(\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})(\text{PF}_6)_2)$ 共价连接到聚合活性基团, 得到本发明所述的聚合增强电化学发光探针。

[0026] 所述步骤(1)具体包括: 将顺-双(2,2'-二吡啶)二氯化钌(II)水合物(*cis*-Dichlorobis(2,2'-bipyridine)ruthenium(II))与2,2'-联吡啶-4,4'-二羧酸(2,2'-Bipyridine-4,4'-dicarboxylic acid)在甲醇/水的混合溶液中加热反应, 合成出羧基化的三联吡啶钌, 随后在反应混合物中加入六氟磷酸钠溶液, 得到析出的固体三联吡啶钌固体 $(\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})(\text{PF}_6)_2)$, 即钌-二(2,2'-联吡啶)(2,2'-联吡啶-4,4'-二羧酸)双(六氟磷酸盐)。

[0027] 在无水的N,N-二甲基甲酰胺(N,N-Dimethylformamide)中加入固体三联吡啶钌、二环己基碳二亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺, 制备得到三联吡啶钌-NHS活化酯 $(\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{-NHS})$ 。

[0028] 所述步骤(2)具体包括: 在无水的N,N-二甲基甲酰胺(N,N-Dimethylformamide)中加入步骤(1)制得的三联吡啶钌固体 $(\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})(\text{PF}_6)_2)$ 及、NHS、EDC、三乙胺(Triethylamine)和聚合活性分子, 室温震荡反应, 共价连接得到聚合增强电化学发光探针。

[0029] 为了实现第三个目的, 本发明是通过以下技术方案来实现的:

[0030] 聚合增强电化学发光探针在蛋白分子检测中的应用, 由本发明所述的聚合增强电化学发光探针与标记有功能基团的捕获探针、偶联有过氧化物酶的检测探针共同构成检测体系。

[0031] 进一步地, 所述捕获探针为生物素修饰的抗体或核酸适配体分子, 所述检测探针为过氧化物酶修饰的检测抗体或适配体-抗体组合物, 所述适配体-抗体组合物由地高辛修饰的核酸适配体分子及过氧化物酶修饰的抗地高辛抗体组成。

[0032] 进一步地, 所述过氧化物酶为辣根过氧化物酶HRP或抗坏血酸过氧化物酶APEX。

[0033] 进一步地, 检测蛋白分子的具体过程为: 捕获探针、靶蛋白分子、检测探针结合形成三明治结构, 用链霉亲和素或亲和素包被的微球/粒捕获后, 洗去未结合的抗体及杂质分子, 然后在体系中加入聚合增强电化学发光探针和过氧化氢进行聚合反应, 将微球/粒-捕获抗体-靶蛋白分子-检测抗体复合物加入电化学发光反应池, 检测电化学发光信号值, 通过对电化学发光强度的分析实现对目标蛋白分子的检测。

[0034] 聚合增强电化学发光探针在核酸分子检测中的应用, 由本发明所述的聚合增强电化学发光探针与标记有功能基团的捕获探针DNA、抗原标记的检测探针DNA、偶联有过氧化物酶的抗体共同构成检测体系, 所述抗原和抗体能够特异性结合。

[0035] 进一步地, 检测核酸分子的具体过程为: 捕获探针DNA、靶单链核酸、检测探针DNA结合形成三明治结构, 用能够与所述捕获探针的功能基团牢固结合的微球/粒捕获后, 洗去未结合的探针及杂质分子, 然后在体系中加入所述抗体, 使其结合到微球/粒复合物上的抗原上, 洗去未结合的抗体, 最后在体系中加入聚合增强电化学发光探针和过氧化氢进行聚合反应, 将微球/粒-捕获探针-靶核酸分子-检测探针复合物加入电化学发光反应池, 检测电化学发光信号值, 通过对电化学发光强度的分析实现对目标核酸分子的检测。

[0036] 本发明所述探针的聚合基本原理如图1所示, 在过氧化氢存在的情况下, 过氧化酶能够将三联吡啶钌-酪胺(或多巴胺)转化为具有短暂活性的中间状态, 然后被激活的底物

分子迅速与临近蛋白分子的富含电子区域(酪氨酸残基)发生稳定的共价反应,由于邻近的蛋白,如辣根过氧化物酶、抗体、抗原等都含有大量的酪氨酸结合位点,所以会富集大量的三联吡啶钌-多巴胺,最终使得电化学发光信号被高效放大。对于多巴胺-三联吡啶钌探针,其信号放大原理与酪胺-钌探针类似,不同的是,多巴胺可以与包括酚羟基、氨基、巯基在内的基团发生聚合反应。

[0037] 本发明所述探针的检测原理如图2所示,包被有链霉亲和素的磁珠可以特异性捕获和分离标记有生物素的辣根过氧化物酶,形成链霉亲和素包被的磁珠-生物素-辣根过氧化物酶复合物,复合物中的链霉亲和素包被的磁珠和辣根过氧化物酶都是蛋白分子,均可以作为三联吡啶钌-酪胺探针发生聚合反应的基质,在过氧化氢存在的情况下,辣根过氧化物酶催化三联吡啶钌-酪胺探针发生聚合到辣根过氧化物酶分子本身及邻近的链霉亲和素分子上。

[0038] 本发明所述的聚合增强电化学发光探针,在过氧化物酶的催化下,能够高效聚合到过氧化物酶及邻近的蛋白分子上,起到信号放大的作用,具有简单、信号增强效率高、与现有分子及免疫检测体系兼容性强等优点,可用于核酸及蛋白的高灵敏检测。

[0039] 为了更好地理解和实施,下面结合附图详细说明本发明。

附图说明

[0040] 图1聚合增强电化学发光探针的聚合反应原理示意图。

[0041] 图2聚合增强电化学发光探针体系的功能验证原理图。

[0042] 图3是实施例1中聚合增强电化学发光探针的合成路线图。

[0043] 图4是实施例1中聚合增强电化学发光探针的光谱表征图。

[0044] 图5是实施例2中聚合活性三联吡啶钌探针体系的功能验证。

[0045] 图6是实施例3中聚合增强电化学发光探针用于检测蛋白分子的检测方法示意图。

[0046] 图7是实施例4中聚合增强电化学发光探针用于检测核酸分子的检测方法示意图。

具体实施方式

[0047] 本发明中选用的所有材料、试剂和仪器都为本领域熟知的,但不限制本发明的实施,其他本领域熟知的一些试剂和设备都可适用于本发明以下实施方式的实施。

[0048] 实施例1

[0049] 聚合增强电化学发光探针的合成

[0050] 1、合成三联吡啶钌固体 $(\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})(\text{PF}_6)_2$

[0051] 参阅图3。将200mg顺-双(2,2'-二吡啶)二氯化钌(II)水合物、150mg 2,2'-联吡啶-4,4'-二羧酸和200mg碳酸氢钠加入到装有32mL甲醇和8mL水的三颈烧瓶中,加热至80℃回流反应10小时,反应溶液最终由褐色变为橙红色。反应完毕后冷却至室温,用浓硫酸调节反应液的pH至4.4,避光冰浴2小时,使未反应的2,2'-联吡啶-4,4'-二羧酸沉淀析出,用滤纸过滤,收集滤液,得到羧基化的三联吡啶钌溶液。向上述羧基化三联吡啶钌溶液中加入12.5mL浓度为200mg/mL的六氟磷酸钠溶液,搅拌5分钟后,转移至冰浴条件下2个小时,出现栗色结晶。将混合物转移至离心管中,于4℃离心机中5000g离心5分钟,弃去上清,将沉淀物冷冻干燥,得到三联吡啶钌固体 $(\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})(\text{PF}_6)_2$ 。

[0052] 2、制备三联吡啶钌-NHS活化酯(Ru(bpy)₃²⁺-NHS)

[0053] 参阅图3。将230mg二环己基碳二亚胺、120mgN-羟基琥珀酰亚胺溶解于2mL无水的N,N-二甲基甲酰胺(N,N-Dimethylformamide)中,在搅拌及冰浴条件下溶解,再加入190mg三联吡啶钌固体,在0℃冰浴条件下搅拌反应30分钟后,在室温下搅拌反应5小时。反应完毕后,在4℃条件下5000g离心5分钟后,收集上清,分装冻存于-80℃冰箱备用。

[0054] 3、制备聚合活性三联吡啶钌探针

[0055] 参阅图3。用无水N,N-二甲基甲酰胺稀释三联吡啶钌-NHS活化酯至终浓度为10mM;向984.363μL无水DMF中加入15.63mg酪胺(或13.786mg多巴胺)及15.637μL三乙胺,酪胺(或多巴胺)及三乙胺的浓度分别为90mM及112.5mM;向45μL无水DMF中加入50μL浓度为10mM的三联吡啶钌-NHS活化酯和5μL酪胺(或多巴胺)/三乙胺混合液,至体系中三联吡啶钌-NHS活化酯、酪胺(或多巴胺)、三乙胺终浓度分别为5mM、4.5mM、5.625mM,室温震荡反应3.5小时后,得到聚合活性三联吡啶钌探针,分装后冻存于-20℃,探针浓度为4.5mM。

[0056] 聚合活性三联吡啶钌的荧光光谱如图4所示,其中,图A为Ru(byp)₃²⁺-酪胺的荧光光谱;图B为Ru(byp)₃²⁺-多巴胺的荧光光谱。结果表明,与Ru(byp)₃²⁺的荧光光谱相比较,Ru(byp)₃²⁺-酪胺及Ru(byp)₃²⁺-多巴胺的荧光发射峰均产生了约20nm的红移,说明酪胺或多巴胺分子共价连接到了Ru(byp)₃²⁺分子上。

[0057] 实施例2

[0058] 聚合活性三联吡啶钌探针体系的功能验证

[0059] 1、磁珠-辣根过氧化物酶体系的构建

[0060] 用PBS稀释标记有生物素的辣根过氧化物酶至不同浓度(40ng/mL,20ng/mL,5ng/mL,2.5ng/mL,1ng/mL,0.5ng/mL),取100μL链霉亲和素包被的磁珠,弃去上清,用50μL生物素-辣根过氧化物酶溶液重悬磁珠,在37℃孵育15分钟后,用PBS缓冲液洗涤一次。

[0061] 2、电化学发光探针的聚合

[0062] 用PBS稀释聚合活性三联吡啶钌探针至浓度为3μM,向磁珠捕获物复合体中加入100μL聚合活性三联吡啶钌探针溶液,重悬起磁珠复合物后,再加入100μL浓度为10mM的过氧化氢PBS溶液,迅速混匀,于37℃反应5分钟后,富集磁珠复合物至离心管底,弃去上清,再用100μLPBS洗涤一次,最后用100μLPBS缓冲液重悬磁珠复合物,取其中的20μL加入电化学发光池,然后加入三丙胺缓冲液进行电化学发光检测,读取电化学发光信号值。

[0063] 结果如图5所示,电化学发光强度与生物素-辣根过氧化物酶浓度成正比,表明聚合活性电化学发光探针能够被催化聚合,且聚合程度与辣根过氧化物酶活性成正比。

[0064] 实施例3

[0065] 聚合增强电化学发光探针在检测蛋白分子中的应用

[0066] 本实施例利用本发明所述的聚合增强电化学发光探针检测前列腺特异性抗原,其检测方法如图6所示。

[0067] 1、捕获抗体-靶蛋白分子-检测抗体“三明治”样抗原-抗体复合物的形成

[0068] 取20μL浓度为2mg/mL的生物素标记的PSA单克隆抗体、20μLPSA(前列腺特异抗原)样品、20μL浓度为1mg/mL的HRP标记的PSA单克隆抗体,混合后于37℃孵育15分钟后,加入100μL浓度为0.72mg/mL的链霉亲和素包被的磁珠,37℃孵育15分钟后,洗去未结合的抗体及蛋白分子杂质。

[0069] 2、电化学发光探针的聚合

[0070] 用PBS稀释聚合活性三联吡啶钌探针至浓度为3 μ M,向磁珠捕获物复合体中加入100 μ L聚合活性三联吡啶钌探针溶液,重悬起磁珠复合物后,再加入100 μ L浓度为10mM的过氧化氢PBS溶液,迅速混匀,于37 $^{\circ}$ C反应5分钟后,富集磁珠复合物至离心管底,弃去上清,再用100 μ L PBS洗涤一次,最后用100 μ L PBS缓冲液重悬磁珠复合物,取其中的20 μ L加入电化学发光池,然后加入三丙胺缓冲液进行电化学发光检测,读取电化学发光信号值。

[0071] 实施例4

[0072] 聚合增强电化学发光探针在检测核酸分子中的应用

[0073] 本实施例利用本发明所述的聚合增强电化学发光探针检测单增李斯特菌16sRNA的核酸序列,其检测方法如图7所示。

[0074] 1、构建检测核酸的捕获及检测探针

[0075] 根据单增李斯特菌16sRNA的核酸序列,设计捕获探针5'-生物素-AAAAAAGTCCGTG GTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3' (SEQ ID NO:1);设计检测探针5'-GGTTGGTGTGGTTGGAAAAA (SEQ ID NO:2)-地高辛-3';分别用PBS稀释两种探针至终浓度为100nM。

[0076] 2、靶核酸分子的捕获

[0077] 分别取10 μ L捕获探针、10 μ L检测探针和10 μ L单增李斯特菌16sRNA样品,加入到20 μ L PBS缓冲液中,于70 $^{\circ}$ C杂交30分钟后,恢复至30 $^{\circ}$ C,向反应体系中加入100 μ L链霉亲和素包被的磁珠,于37 $^{\circ}$ C孵育15分钟后,洗去未结合的探针及核酸分子杂质。

[0078] 3、电化学发光探针的聚合

[0079] 用PBS稀释聚合活性三联吡啶钌探针至浓度为3 μ M,向磁珠捕获物复合体中加入100 μ L聚合活性三联吡啶钌探针溶液,重悬起磁珠复合物后,再加入100 μ L浓度为10mM的过氧化氢PBS溶液,迅速混匀,于37 $^{\circ}$ C反应5分钟后,富集磁珠复合物至离心管底,弃去上清,再用100 μ L PBS洗涤一次,最后用100 μ L PBS缓冲液重悬磁珠复合物,取其中的20 μ L加入电化学发光池,然后加入三丙胺缓冲液进行电化学发光检测,读取电化学发光信号值。

[0080] 本发明所述的聚合增强电化学发光探针,在辣根过氧化物酶的催化下,能够高效聚合到辣根过氧化物酶及邻近的蛋白分子上,起到信号放大的作用,具有简单、信号增强效率高、与现有分子及免疫检测体系兼容性强等优点,可用于核酸及蛋白的高灵敏检测。

[0081] 本发明并不局限于上述实施方式,如果对本发明的各种改动或变形不脱离本发明的精神和范围,倘若这些改动和变形属于本发明的权利要求和等同技术范围之内,则本发明也意图包含这些改动和变动。

序列表

SEQUENCE LISTING

<110>华南师范大学

<120>一种聚合增强电化学发光探针及其制备方法和应用

<160> 13

<170>PatentIn version 3.1

<210>1

<211>34

<212> DNA

[0082]

<213>人工序列

<220>

<223>实施例 4 中捕获探针序列

<400>1

aaaaaagtcc gtgtagggc aggttgggt gact 34

<210>2

<211>21

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>实施例 4 中检测探针序列

<400>2

ggttgggtg gttgaaaaa a 21

序列表

SEQUENCE LISTING

<110>华南师范大学

<120>一种聚合增强电化学发光探针及其制备方法和应用

<160> 13

<170>PatentIn version 3.1

<210>1

<211>34

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>实施例4中捕获探针序列

<400>1

aaaaaagtcc gtggtagggc aggttggggt gact 34

<210>2

<211>21

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223>实施例4中检测探针序列

<400>2

ggttggtgtg gttggaaaaa a 21

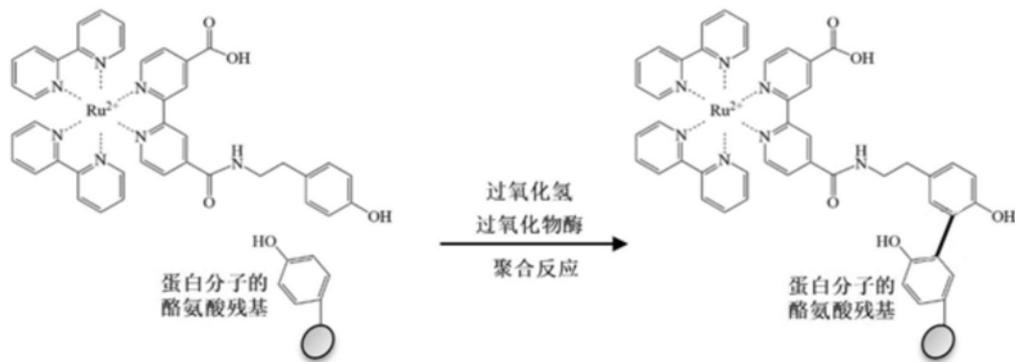


图1

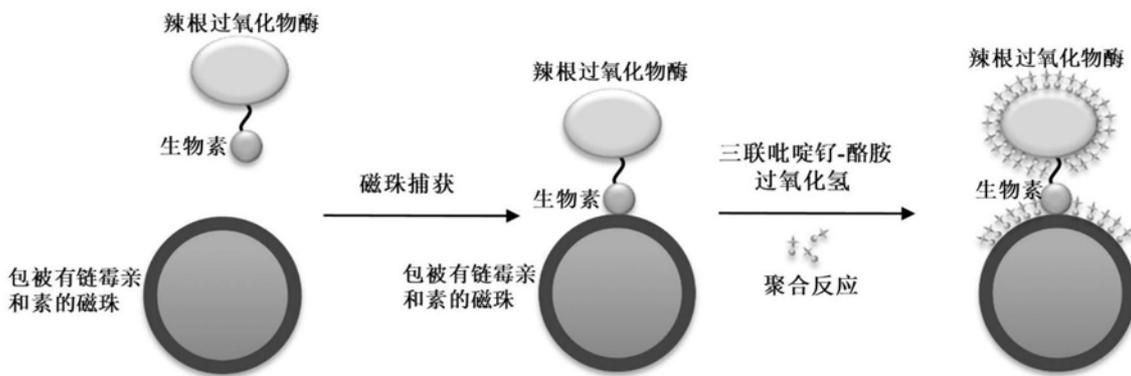


图2

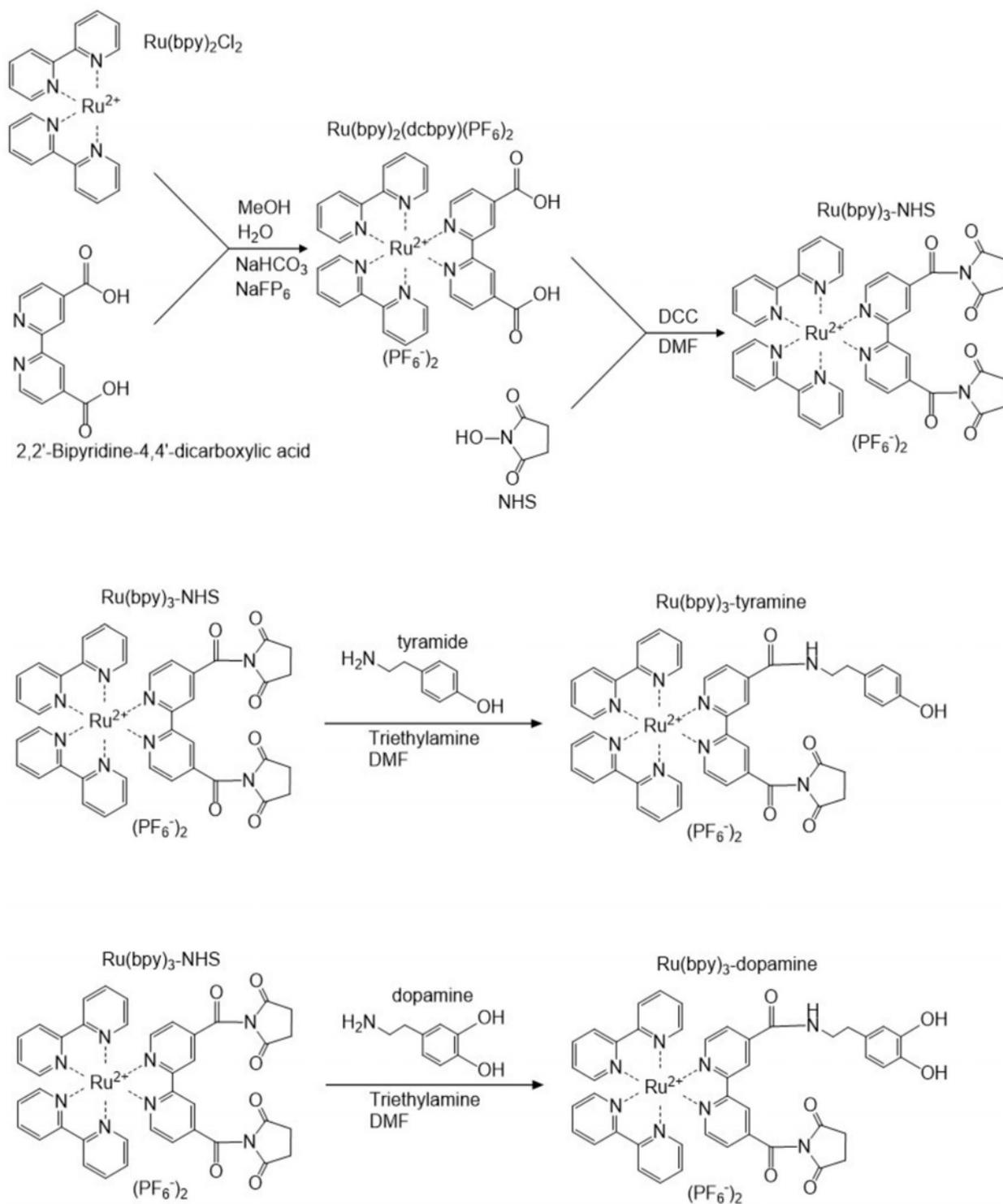


图3

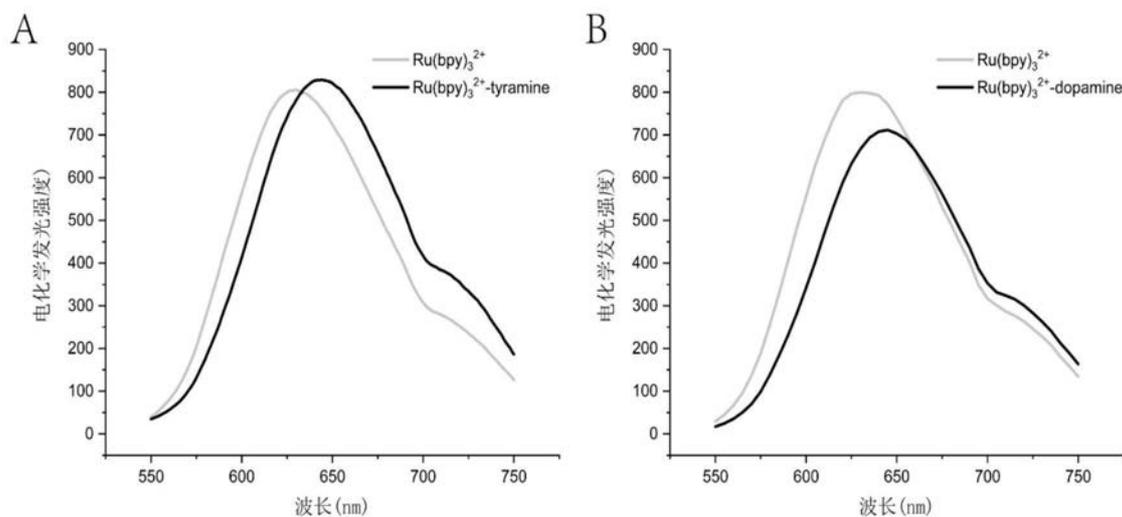


图4

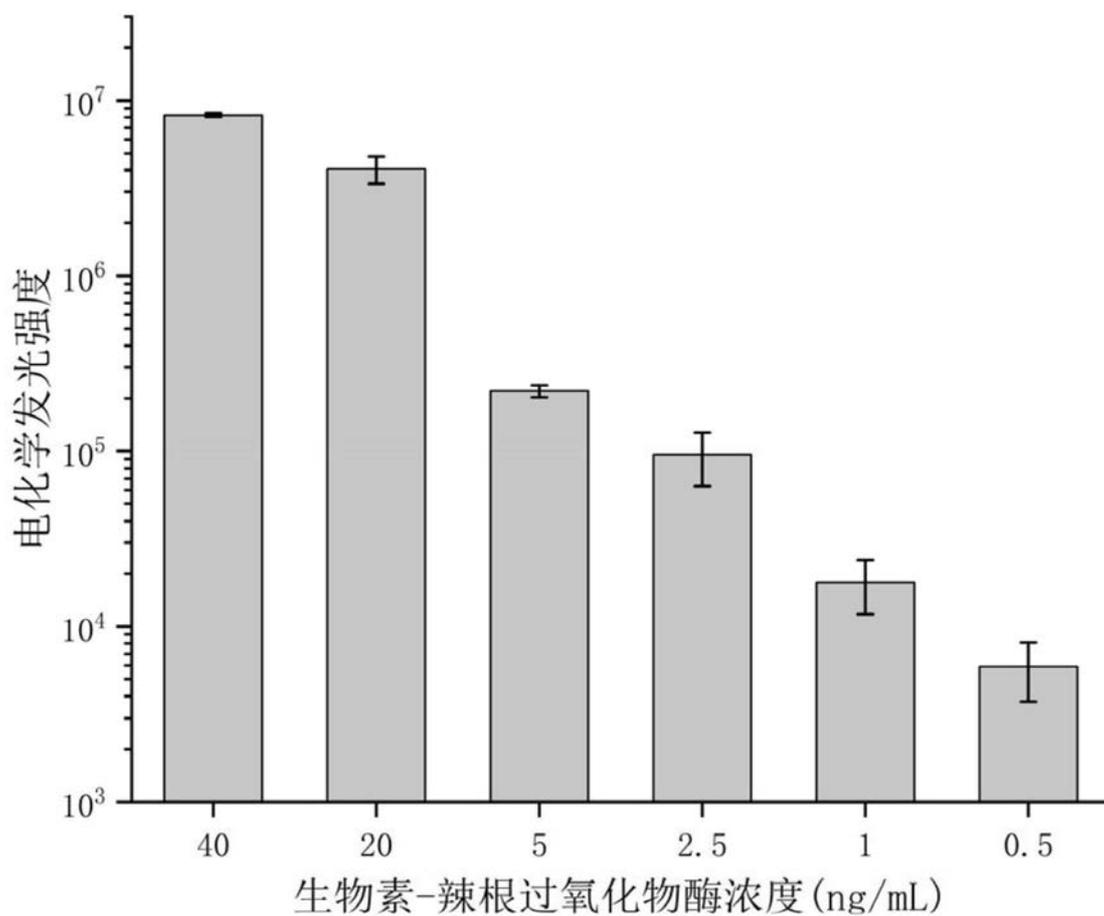


图5

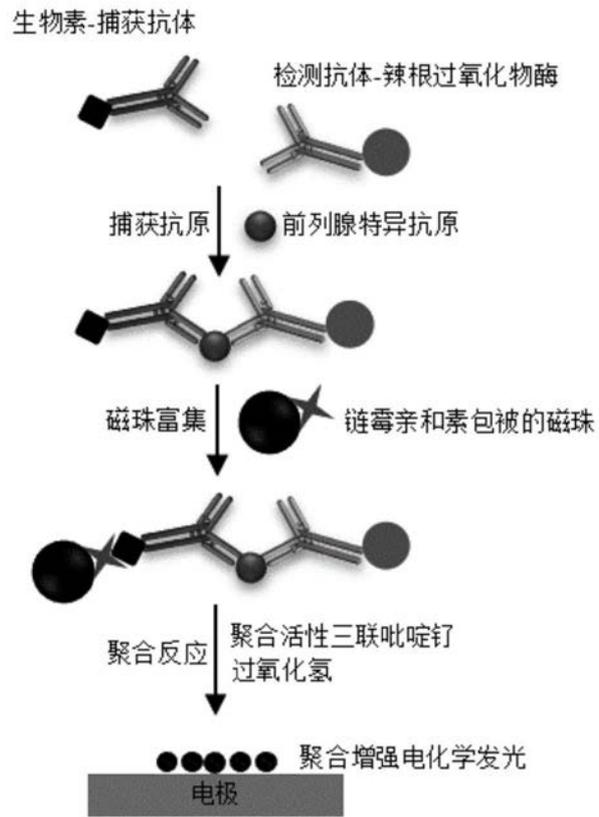


图6

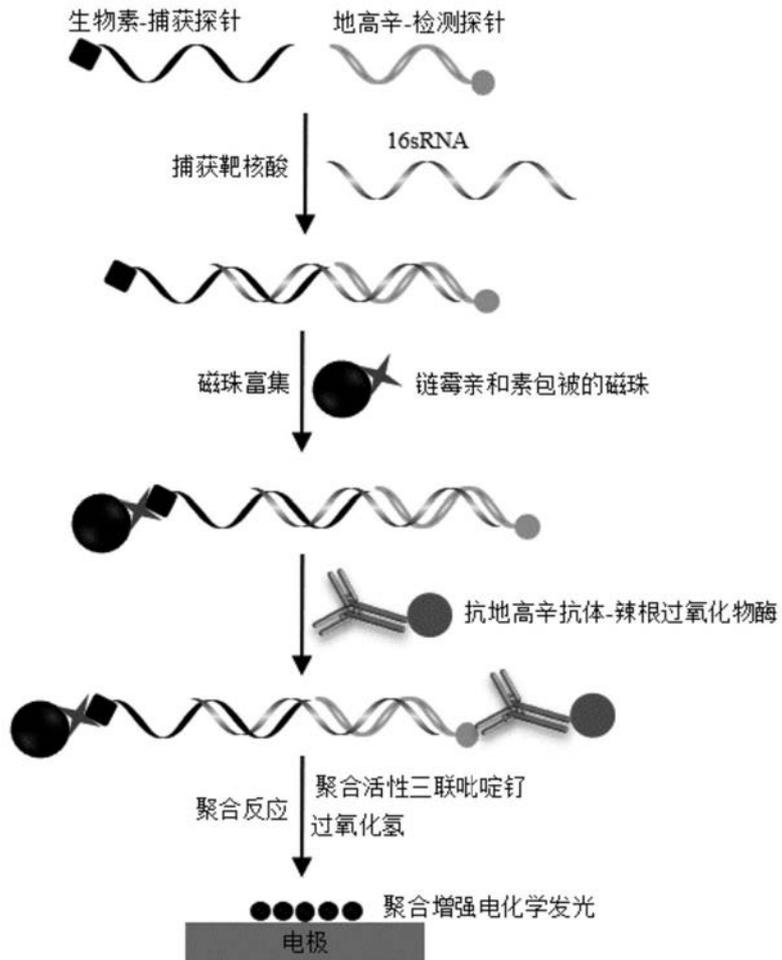


图7