



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110261359 B

(45) 授权公告日 2022.01.28

(21) 申请号 201910565325.7

(22) 申请日 2019.06.27

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110261359 A

(43) 申请公布日 2019.09.20

(73) 专利权人 复旦大学

地址 200433 上海市杨浦区邯郸路220号

(72) 发明人 朱丽娜 刘芸 乔亮 刘宝红

(74) 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

31200

代理人 张磊

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

审查员 顾竹君

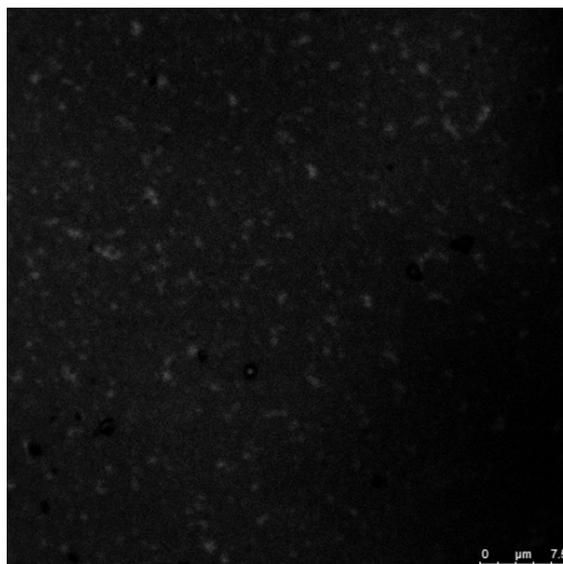
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

一种基于激光共聚焦显微镜的癌症标志物
成像方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于激光共聚焦显微镜的癌症标志物成像方法。该方法是由核酸适配体特异性地识别癌症标志物,在结合量子点后,可以用于成像的研究。利用这种方法,以循环肿瘤细胞表面的上皮细胞黏附分子为目标物,实现了激光共聚焦显微镜下的成像。这种方法快速,灵敏,特异性优良,成像清晰准确,是一种具有潜在应用前景的方法。



1. 一种基于激光共聚焦显微镜的癌症标志物成像方法,其特征在于:具体步骤如下:

(1) 在核酸适配体序列的末端修饰生物素,得到核酸适配体-生物素aptamer-biotin;

(2) 在量子点CdSe上修饰链霉亲和素SA,得到QDs-SA;

(3) 在清洗干净的ITO玻璃上修饰13nm的纳米金颗粒,滴加核酸适体,室温孵育14小时,再加入巯基乙醇封闭30分钟,最后加入癌症标志物,每一步结合后均用50mM Tris-HCl缓冲溶液清洗,氮气吹干;所述癌症标志物为上皮细胞黏附分子EpCAM;所述上皮细胞黏附分子的浓度为10aM-500nM,体积为5 μ L-10 μ L;

(4) 向步骤(3)的基底中加入步骤(1)得到的aptamer-biotin,室温孵育1小时,用50mM Tris-HCl缓冲溶液清洗,氮气吹干;

(5) 向步骤(4)中加入步骤(2)得到的QDs-SA,室温孵育1小时,用50mM Tris-HCl缓冲溶液清洗,氮气吹干;

(6) 在激光共聚焦显微镜下,设置波长458nm激发,在500-600nm范围内采集图像数据。

2. 根据权利要求1所述的基于激光共聚焦显微镜的癌症标志物成像方法,其特征在于:步骤(3)所述的aptamer-biotin的体积为1 μ L至5 μ L,浓度5 μ M-10 μ M。

3. 根据权利要求1所述的基于激光共聚焦显微镜的癌症标志物成像方法,其特征在于:步骤(3)所述的QDs-SA体积为1 μ L至5 μ L,浓度5 μ M-10 μ M。

4. 根据权利要求1所述的基于激光共聚焦显微镜的癌症标志物成像方法,其特征在于:步骤(6)所述的激光共聚焦显微镜的激发波长在405-488nm范围内。

一种基于激光共聚焦显微镜的癌症标志物成像方法

技术领域

[0001] 本发明属于显微镜研究技术领域,具体涉及一种基于激光共聚焦显微镜的癌症标志物成像方法。

背景技术

[0002] 癌症是危害人类健康的最大杀手(Brindle K. New approaches for imaging tumour responses to treatment[J]. Nature Reviews Cancer, 2008, 8(2): 94-107)。相关数据显示,2007年有13%的人死于癌症,而这一数据在2030年会上升到12亿人次(Scheinberg, D. A.; Villa, C. H.; Escorcia, F. E.; McDevitt, M. R., Conscripts of the infinite armada: systemic cancer therapy using nanomaterials. Nat Rev Clin Oncol 2010,7 (5), 266-276.)。因此,建立有效的癌症早期检测及诊断方法显得尤为重要。据已有文献报道,越来越多的科学家关注低浓度细胞的超灵敏检测,可以将细胞表面的蛋白质作为重要的生物标志物进行检测,这些蛋白质的数量和状态的改变可以提示我们疾病的发生与发展。

[0003] 激光共聚焦显微镜是一种高精度的激光光源显微镜,利用激光作为光源,在传统光学显微镜基础上采用共轭聚焦的原理,并利用计算机对所观察分析对象进行数字图像处理的一套观察和分析系统。它能极大地超越传统显微镜,近年来在多领域研究中凸显优势。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种基于激光共聚焦显微镜的癌症标志物成像方法。

[0005] 本发明以上皮细胞黏附分子(EpCAM)作为目标研究物,采用核酸适配体(aptamer)特异性地识别上皮细胞黏附分子,进而标记量子点探针,从而实现了在激光共聚焦显微镜下成像观察。

[0006] 本发明提出的一种基于激光共聚焦显微镜的癌症标志物成像方法,具体步骤如下:

[0007] (1)在核酸适配体序列的末端修饰生物素,得到核酸适配体-生物素(aptamer-biotin);

[0008] (2)在量子点CdSe上修饰链霉亲和素(SA),得到QDs-SA;

[0009] (3)在清洗干净的ITO玻璃上修饰13nm的纳米金颗粒,滴加核酸适配体,室温孵育14小时,再加入巯基乙醇封闭30分钟,最后加入癌症标志物。每一步结合后均用缓冲溶液(50mM Tris-HCl)清洗,氮气吹干。

[0010] (4)向步骤(3)的基底中加入步骤(1)得到的aptamer-biotin,室温孵育1小时,用缓冲溶液(50mM Tris-HCl)清洗,氮气吹干。

[0011] (5)向步骤(4)中加入步骤(2)得到的QDs-SA,室温孵育1小时,用缓冲溶液(50mM Tris-HCl)清洗,氮气吹干。

[0012] (6)在激光共聚焦显微镜下,设置波长458nm激发,在500-600nm范围内采集图像数

据

- [0013] 本发明中,步骤(3)所述癌症标志物为上皮细胞黏附分子(EpCAM)。
- [0014] 本发明中,步骤(3)所述上皮细胞黏附分子的浓度为10aM-500nM,体积为5 μ L-10 μ L。
- [0015] 本发明中,步骤(3)所述的aptamer-biotin的体积为1 μ L至5 μ L,浓度5 μ M-10 μ M。
- [0016] 本发明中,步骤(3)所述的QDs-SA体积为1 μ L至5 μ L,浓度5 μ M-10 μ M。
- [0017] 本发明中,步骤(6)所述的显微镜参数的设置在激发光为405-488nm。
- [0018] 本发明提出的一种所述制备方法得到的用于癌症标志物在激光共聚焦下的成像的应用。
- [0019] 本发明首次采用核酸适配体识别癌症标志物在激光共聚焦显微镜下成像。核酸适配体具有优良的特异性,可以灵敏的捕获癌症标志物。量子点的荧光效率比一般的荧光探针要高,有助于目标物在显微镜下的成像。
- [0020] 核酸适配体(aptamer)是为某个目标分子特殊筛选出来的,因此具有高特异性和高亲和力的特点。Aptamer可以结合多种分子,从小分子到蛋白质,甚至细胞,所以基于aptamer的生物传感器的应用范围是非常广泛的。Aptamer一旦筛选成功,就可以用商品化的原料来进行高重复性,高纯度的合成。而且,与抗体和酶相比,aptamer通常都是非常稳定的,这一点,是其他传感器识别原件可望不可及的。Aptamer在与目标分子的结合后通常都经历了特定的结构改变。这使得基于aptamer的传感器在检测目标分子时,灵敏度高,特异性好。Aptamer易于修饰。由于其本质上是寡聚核苷酸链,因而容易进行化学修饰。而抗原抗体是蛋白质,相比之下,在其上面修饰基团就显得较为困难。Aptamer通常被认为是化学抗体。它是一小段采用体外筛选SELEX技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment,即指数式富集法配体演化技术)而得到的寡核苷酸链,通过能与对应的配体靶分子进行高亲和力和强特异性的结合的寡核苷酸序列在人工合成的DNA或RNA随机库中筛选出来。
- [0021] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:
- [0022] (1)本发明将癌症标志物之一的上皮细胞黏附分子可视化,
- [0023] (2)本发明相比于现有技术,具有制备简单,检测快速的优点。

附图说明

- [0024] 图1为实施例3上皮细胞黏附分子在激光共聚焦显微镜下的成像。

具体实施方式

- [0025] 以下结合附图和实施例对本发明作进一步说明。
- [0026] 本发明的一种基于激光共聚焦显微镜的癌症标志物成像方法,包括以下步骤:
- [0027] 第一步,设计核酸适配体序列,在末端修饰生物素,即aptamer-biotin;
- [0028] 第二步,在CdSe量子点上修饰链霉亲和素,即QDs-SA;
- [0029] 第三步,在清洗干净的ITO玻璃上修饰13nm的纳米金颗粒,滴加核酸适体,室温孵育14小时,再加入巯基乙醇封闭30分钟,最后加入5 μ L 100 fM癌症标志物,室温孵育1小时。每一步结合后均用缓冲溶液(50mM Tris-HCl)清洗,氮气吹干;

[0030] 第四步,向步骤3的基底中加入步骤1得到的aptamer-biotin,室温孵育1小时,用缓冲溶液(50mM Tris-HCl)清洗,氮气吹干。

[0031] 第五步,向步骤4中加入步骤2得到的QDs-SA,室温孵育1小时,用缓冲溶液(50mM Tris-HCl)清洗,氮气吹干。

[0032] 第六步,在激光共聚焦显微镜下,设置波长458nm激发,在500-600nm范围内采集图像数据。

[0033] 实施例1:

[0034] (1)核酸适体和生物素复合物的制备:

[0035] 取20 μ L浓度为10 μ M的核酸适体,加入5 μ L生物素,4度条件下震荡混合4小时,取出,置于4度条件下放置12小时进行结合。可以得到末端修饰生物素的核酸适体。

[0036] (2)观测样品的制备:

[0037] 在清洗干净的ITO玻璃上修饰13nm的纳米金颗粒,滴加核酸适体(5 μ L 5 mM),室温孵育14小时,再加入巯基乙醇(50 μ L 10 mM)封闭30分钟,最后加入5 μ L 100 fM癌症标志物,室温孵育1小时。加入步骤1得到的aptamer-biotin(1 μ L 10 μ M),室温孵育1小时,最后加入步骤2得到的QDs-SA(1 μ L 8 μ M),室温孵育1小时。每一步结合后均用缓冲溶液(50mM Tris-HCl)清洗,氮气吹干。

[0038] (3)激光共聚焦显微镜采集图像数据:

[0039] 将制作好的玻片放置在莱卡sp5激光共聚焦显微镜下,设置458nm激发波长,在500-600nm范围内采集数据。可以清楚地观察到上皮细胞黏附分子呈现明显荧光信号。如图1所示。

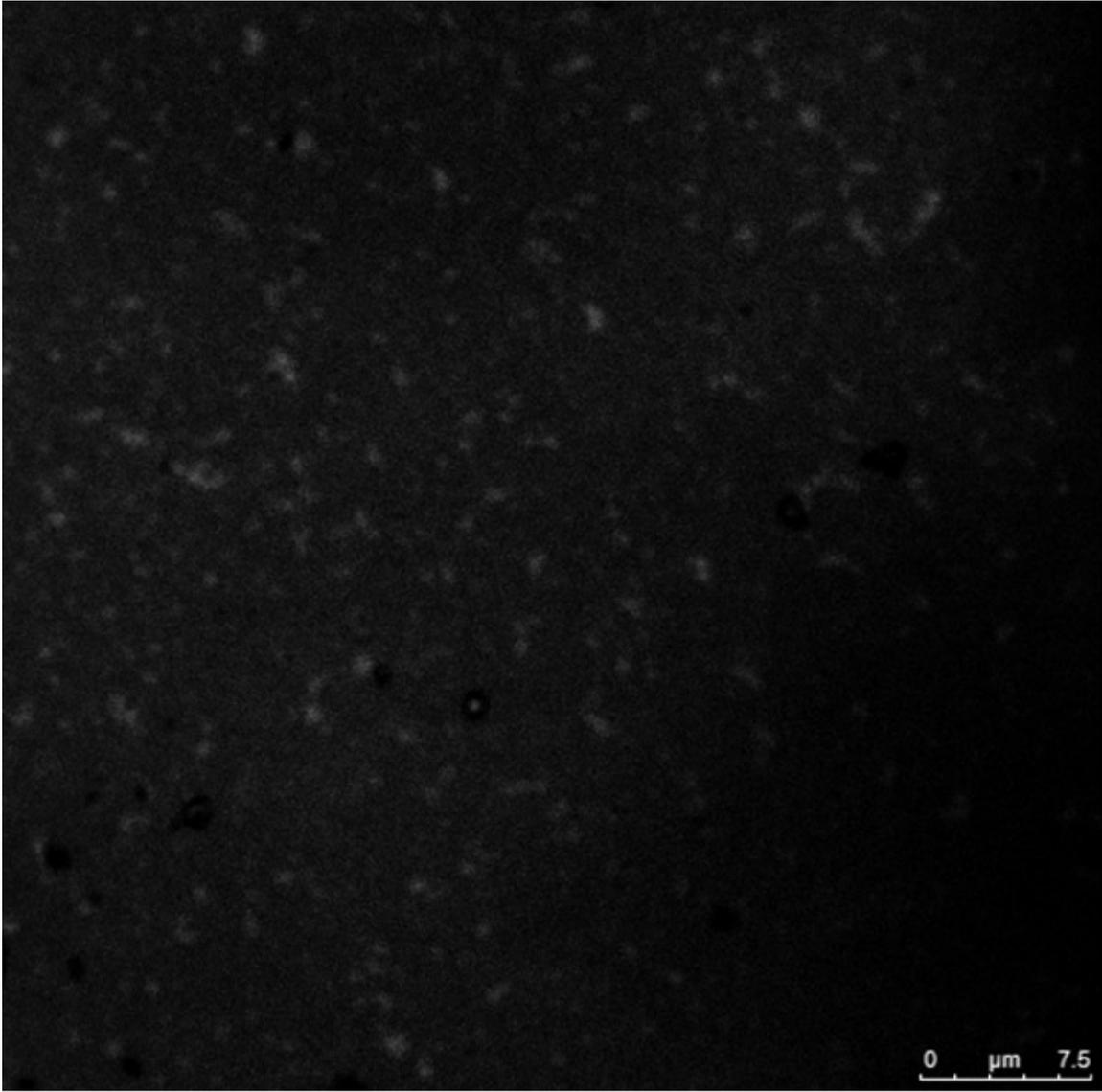


图1