



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106908598 B

(45)授权公告日 2018.11.06

(21)申请号 201710168299.5

(22)申请日 2017.03.21

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106908598 A

(43)申请公布日 2017.06.30

(73)专利权人 南方医科大学南海医院
地址 528244 广东省佛山市南海区里水镇
里官路得胜路段28号

(72)发明人 刘楠

(74)专利代理机构 成都方圆聿联专利代理事务
所(普通合伙) 51241

代理人 曹少华

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

(56)对比文件

CN 104034712 A,2014.09.10,

CN 103926407 A,2014.07.16,

CN 101198707 A,2008.06.11,

KR 20090038597 A,2009.04.21,

EP 1981994 A2,2008.10.22,

Kenzo Maehashi et al.Label-Free Protein Biosensor Based on Aptamer-Modified Carbon Nanotube Field-Effect Transistors.《Analytical Chemistry》.2006,第79卷(第2期),

Bo He et al.Suspension Array with Shape-Code Silica Nanotubes for Multiplexed Immunoassay.《Analytical Chemistry》.2007,第79卷(第14期),

审查员 李进进

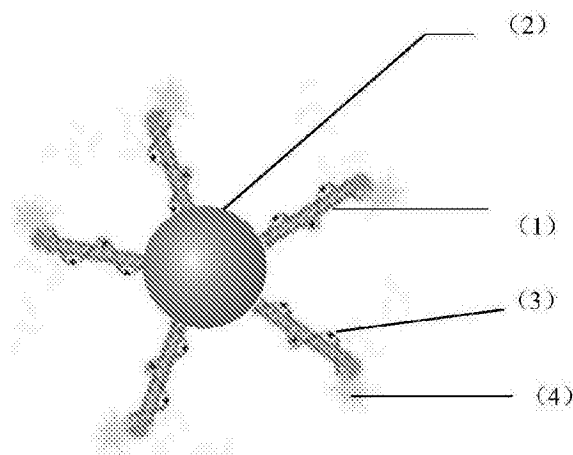
权利要求书2页 说明书7页
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

一种基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球及其制备和检测方法

(57)摘要

本发明属于纳米生物技术领域,具体公开了一种基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片,及其制备方法和检测方法。使用本发明单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片对目标物进行检测,检测得到的中位荧光信号强度与待测物浓度呈负相关,通过建立待测物浓度与荧光信号的标准曲线,可得到待检样品中的待测物浓度。本发明公开的检测方法具有较宽的检测范围、较高的检测灵敏度和特异性,与其他检测技术相比具有较大优势。



1. 一种基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球,包括:

表面氨基化修饰的单壁碳纳米管(1),具有羧基位点的悬浮芯片磁性微球(2),生物素化核酸适配体(3)偶联荧光素标记的链霉亲和素(4);

其中所述单壁碳纳米管(1)通过酰胺键与悬浮芯片磁性微球(2)偶联,分布于悬浮芯片磁性微球(2)的表面;

所述生物素化核酸适配体(3)与单壁碳纳米管(1)物理吸附连接。

2. 根据权利要求1所述的基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球,其特征在于,所述生物素化核酸适配体(3)中的核酸适配体为单链DNA寡核苷酸。

3. 根据权利要求2所述的基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球,其特征在于所述荧光素标记的链霉亲和素(4)中的荧光素为藻红蛋白。

4. 根据权利要求3所述的基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球,其特征在于,所述生物素化核酸适配体(3)中的核酸适配体为双酚A的核酸适配体,其核苷酸序列为:

5'-CCGGTGGGTGGTCAGGTGGGATAGCGTTCGCGTATGGCCCAGCGCATCACGGGTTGCGACCA-3';

或者所述生物素化核酸适配体(3)中的核酸适配体为雌二醇的核酸适配体,其核苷酸序列为:

5'-GCTTCCAGCTTATTGAATTACACGCAGAGGGTAGCGGCTCTGCGCATTCAATTGCTGCGCGCTGAAGCGCAAG-3';

或者所述生物素化核酸适配体(3)中的核酸适配体为多氯联苯的核酸适配体,其核苷酸序列为:

5'-AGCAGCACAGAGGTCAGATGCACTCGGACCCCATCTCCTTCCATCCCTCATCCGTCCACCCTATGCGTGCTACCGTGAA-3'。

5. 权利要求1-4任一项所述的基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球,其特征在于,由以下步骤制备,包括:

1) 单壁碳纳米管表面氨基化基团修饰改造:

两步酸化法处理单壁碳纳米管表面,使其表面产生了羧基后,再进行氨基化改造,使氨基化的单壁碳纳米管重新被氨基化;

2) 氨基修饰的单壁碳纳米管与悬浮芯片磁性微球的羧基位点进行偶联:

将步骤1)制备的氨基化修饰的单壁碳纳米管与悬浮芯片磁性微球的羧基位点通过氨基缩合反应进行偶联;

3) 制备生物素化核酸适配体偶联荧光标记的链霉亲和素:

分别将生物素标记于目标物核酸适配体,将荧光素标记于链霉亲和素,然后使生物素化核酸适配体与荧光标记的链霉亲和素偶联;

4) 制备基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球:

将步骤3)制备的生物素化核酸适配体-荧光标记的链霉亲和素,与步骤2)制备的单壁碳纳米管-悬浮芯片磁性微球进行偶联,得到基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球;

其中偶联单壁碳纳米管的磁性微球于涡旋仪上涡旋混匀,超声分散至均匀后,避光条件将其加入生物素化核酸适配体-荧光标记的链霉亲和素,室温下水浴缓慢震荡,制备得到

基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球。

6. 根据权利要求5所述的基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球,其特征在于,

步骤1)所述的氨基化改造为:以乙二胺作供氨物质,二环己基碳二亚胺作为缩合剂,120℃下加热回流,使羧基化的单壁碳纳米管重新被氨基化;所述单壁碳纳米管的投料量为0.01mg;

步骤2)所述的氨基缩合反应温度为120℃,反应时间为24小时;所述磁性微球的投料量为 1.25×10^5 个;

步骤3)所述的荧光标记所使用的荧光标记物为藻红蛋白;

步骤4)所述生物素化核酸适配体偶联藻红蛋白-链霉亲和素的投料量为0.2nmol,反应时间为1.5小时,反应温度为28℃。

7. 一种基于单壁碳纳米管的多元核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球,其特征在于,将权利要求4或权利要求6所述的三种基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球混合得到。

8. 根据权利要求7所述的单壁碳纳米管的多元核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球,其特征在于,所述三种基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球的物质的量比为1:1:1。

9. 权利要求1-8任一项所述的基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球的检测方法,包括以下步骤,将所述核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球与待测目标物混合,检测中位荧光信号强度,建立检测标准曲线,得到待测物浓度;其中待测物浓度与中位荧光信号强度呈负相关关系。

10. 权利要求1-8任一项所述的基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球检测化学污染物的用途;其中对所述化学污染物的检测范围为 1×10^{-13} g/mL $\sim 1 \times 10^{-7}$ g/mL,检测灵敏度 $\geq 1 \times 10^{-15}$ g/mL。

一种基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球及其制备和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米生物技术领域,具体涉及一种单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片检测方法。

背景技术

[0002] 悬浮芯片以直径为 $5.6\mu\text{m}$ 的聚苯乙烯或掺杂有磁性的荧光微球为固相载体,可在检测体系中呈悬浮游离状态存在,并随液压的施压方向在流体管路中流动通行;每一种微球因其包被不同比例的特殊荧光染料,使其被定义为唯一的编码地址,使得众多的编码微球被排列成类似于“阵列”的图谱。在微球的固相表面修饰有不同的基团分子,例如羧基、羟基、生物素、链霉亲和素等,并通过化学反应与特定的生物分子形成微球探针,这些生物分子可以是捕获抗体、核苷酸探针、多肽或受体。从而进行抗原-抗体、酶-底物、配体-受体的结合反应或核酸杂交反应。该技术采用2种不同波长的激光进行检测,其中:红色激光激发的是微球上的红色分类染料,根据微球的不同荧光编码,可以将微球进行分类,从而将各个不同的分析反应区别出来;绿色激光激发的是报告荧光分子,目的是确定微球上结合的报告荧光分子的数量,其量化的值即中位荧光强度值(Median Fluorescent Intensity, MFI),理论上在一个反应孔内可以完成多达500种不同的生物学反应。该技术是以荧光编码微球为基础的检测手段,快速灵敏、背景信号低、可实现多个样品的高通量检测,在生物和医学分析领域表现出很多优势。目前,传统的悬浮芯片技术是基于免疫学反应的,如:大分子检测,通常采用夹心法;对于小分子,则采用竞争法来检测。

[0003] 核酸适配体是一类具有特异性识别功能的单链核酸分子,具有与单克隆抗体相媲美的亲和力与特异性。与单抗相比核酸适配体还具有以下优点:可在体外筛选,靶分子范围广,分子量较低,没有免疫源性和毒性,可通过化学合成制备、改造与标记,化学稳定性好,能可逆变性与复性,可通过酶扩增、剪切等。这些优点使其在生物医学领域具有广阔的应用前景,基于适配体的生物分析方法得到了快速发展。通过核酸适配体取代单克隆抗体,能够有效改善受抗原免疫源性限制、耗时长及制备过程复杂、单克隆抗体价格昂贵、不易获得等问题。另外,传统的抗原抗体对小分子的特征性基团结合力不强,在识别小分子化学物方面存在一定的局限性。所以采用核酸适配体对小分子靶标物进行检测,成为一种新型高效的检测方式。

[0004] 碳材料具备良好的特性,其中碳纳米管具有更高的比表面积,更高的拉伸强度、高弹性、从金属到半导体的电子特性等优良特征。通过单壁碳纳米管表面的改造修饰,能够使改善碳纳米管与其他物质难以相容的缺点。在微球上固定单壁碳纳米管,形成骨架,利用其丰富的比表面积,物理吸附适配体链,使得适配体的高亲和性更进一步放大。

发明内容

[0005] 本发明的目的包括:提供一种的适用于现场快速检测的复合核酸适配体-悬浮芯

片；

[0006] 提供该核酸适配体-悬浮芯片的制备方法、检测方法和用途。

[0007] 本发明所述的基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球,其一种实施方式是,所述基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球包括:

[0008] 表面氨基化修饰的单壁碳纳米管(1),具有羧基位点的悬浮芯片磁性微球(2),生物素化核酸适配体(3)偶联荧光素标记的链霉亲和素(4);

[0009] 其中所述单壁碳纳米管(1)通过酰胺键与悬浮芯片磁性微球(2)通过偶联,分布于悬浮芯片磁性微球(2)的表面;

[0010] 所述生物素化核酸适配体(3)与单壁碳纳米管(1)物理吸附连接。

[0011] 优选的,所述生物素化核酸适配体(3)中的核酸适配体为单链DNA寡核苷酸;

[0012] 优选的,所述荧光素标记的链霉亲和素(4)中的荧光素为藻红蛋白。

[0013] 进一步优选的,所述生物素化核酸适配体(3)中的核酸适配体为双酚A的核酸适配体,其核苷酸序列为:

[0014] 5'-CCGGTGGGTGGTCAGGTGGGATAGCGTTCCGCGTATGGCCCAGCGCATCACGGGTTTCGCACCA-3';

[0015] 或者所述生物素化核酸适配体(3)中的核酸适配体为雌二醇的核酸适配体,其核苷酸序列为:

[0016] 5'-GCTTCCAGCTTATTGAATTACACGCAGAGGGTAGCGGCTCTGCGCATTCAATTGCTGCGCGCTGAA GCGCGAAG-3';

[0017] 或者所述生物素化核酸适配体(3)中的核酸适配体为多氯联苯的核酸适配体,其核苷酸序列为:

[0018] 5'-AGCAGCACAGAGGTCAGATGCACTCGGACCCATTCTCCTTCCATCCCTCATCCGTCCACCCTAT CCGTGCTACCGTGAA-3'。

[0019] 本发明所述的基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球,其另一种实施方式是,所述基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球由以下步骤制备,包括:

[0020] 1) 单壁碳纳米管表面氨基化基团修饰改造:

[0021] 两步酸化法处理单壁碳纳米管表面,使其表面产生了羧基后,再进行氨基化改造,使羧基化的单壁碳纳米管重新被氨基化;

[0022] 2) 氨基修饰的单壁碳纳米管与悬浮芯片磁性微球的羧基位点进行偶联:

[0023] 将步骤1)制备的氨基化修饰的单壁碳纳米管与悬浮芯片磁性微球的羧基位点通过氨基缩合反应进行偶联;

[0024] 3) 制备生物素化核酸适配体偶联荧光标记的链霉亲和素:

[0025] 分别将生物素标记于目标物核酸适配体,将荧光素标记于链霉亲和素,然后使生物素化核酸适配体与荧光标记的链霉亲和素偶联;

[0026] 4) 制备基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球:

[0027] 将步骤3)制备的生物素化核酸适配体-荧光标记的链霉亲和素,与步骤2)制备的单壁碳纳米管-悬浮芯片磁性微球进行偶联,得到基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球;

[0028] 其中偶联单壁碳纳米管的磁性微球于涡旋仪上涡旋混匀,超声分散至均匀后,避光条件将其加入生物素化核酸适配体-荧光标记的链霉亲和素,室温下水浴缓慢震荡,制备得到基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球。

[0029] 优选的,所述步骤1)所述的氨基化改造为:以乙二胺作供氨物质,二环己基碳二亚胺作为缩合剂,120℃下加热回流,使羧基化的单壁碳纳米管重新被氨基化;所述单壁碳纳米管的投料量为0.01mg;

[0030] 优选的,步骤2)所述的氨基缩合反应温度为120℃,反应时间为24小时;所述磁性微球的投料量为 1.25×10^5 个;

[0031] 优选的,步骤3)所述的荧光标记所使用的荧光标记物为藻红蛋白。

[0032] 优选的,步骤4)所述生物素化核酸适配体偶联藻红蛋白-链霉亲和素的投料量为0.2nmol,反应时间为1.5h小时,反应温度为28℃。

[0033] 本发明所述的基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球,其一种可实施的方式是,将三种基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球混合得到;

[0034] 所述三种指:核酸适配体的核苷酸序列为序列表SEQ NO ID.1的单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球,核酸适配体的核苷酸序列为序列表SEQ NO ID.2的单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球,以及核酸适配体的核苷酸序列为序列表SEQ NO ID.3的单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球。

[0035] 优选的,所述三种基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球的物质的量比为1:1:1。

[0036] 此外,本发明还提供了上述所有基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球的检测方法,步骤包括:将所述核酸适配体-悬浮芯片与待测目标物混合,检测中位荧光信号强度,建立检测标准曲线,得到待测物浓度;其中待测物浓度与中位荧光信号强度呈负相关关系。

[0037] 本发明还提供了上述所有基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球检测核酸、蛋白质、微生物和/或化学污染物的用途;

[0038] 优选的,其中对所述核酸、蛋白质、微生物和/或化学污染物的检测范围为 1×10^{-13} g/mL $\sim 1 \times 10^{-7}$ g/mL,检测灵敏度 $\geq 1 \times 10^{-15}$ g/mL。

[0039] 关于本发明所述的基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球,说明书附图1给出了其结构模型示意图。其中,图1仅示意单壁碳纳米管(1)与磁性检测微球(2)的连接关系,而不限定磁性检测微球(2)所连接的单壁碳纳米管(1)的数量;同时,图1仅示意生物素化核酸适配体(3)与单壁碳纳米管(1)的连接关系,并不对单壁碳纳米管(1)吸附的生物素化核酸适配体(3)数量做出限制。

[0040] 通过结合单壁碳纳米管、悬浮芯片技术构建了超灵敏检测的新型核酸适配体检测技术。充分利用核酸适配体特异性强、亲和力高的优点,使得检测探针操作简便,检测灵敏。磁性聚苯乙烯微球具有大的比表面积,拥有多达 10^7 - 10^8 反应位点,单壁碳纳米管丰富的比表面积和优良的力学特点,将羧基化的微球和氨基修饰的单壁碳纳米管偶联,能结合更多的检测探针,进一步扩大信号反应。首先将氨基化修饰的单壁碳纳米管偶联在微球上,加入经SA-PE荧光标记的探针,也即目标物分子,会在碳纳米管上物理性吸附,添加靶标分子后,

会将荧光标记的探针竞争下来,致使荧光值降低。建立目标物检测的标准曲线方程,该检测平台将为更多的化学污染物的现场快速检测提供技术和理论上的支撑,可用于食品卫生、卫生检验与环境监测等领域,具有很好的理论意义和实用价值。

[0041] 本发明所述的荧光标记的亲合素,所述荧光标记物为藻红蛋白,所得荧光标记的亲合素为链霉亲和素-藻红蛋白,整体也可称荧光报告蛋白;本发明所述的荧光标记的亲合素,也可以采用本领域常用的荧光标记物或标记蛋白进行荧光标记,如:异硫氰酸荧光素、5-羧基荧光、花青染料荧光素3和花青染料荧光素5标记等。

[0042] 本发明所述的基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球的制备步骤:(1)单壁碳纳米管表面氨基化基团修饰改造;(2)氨基修饰的单壁碳纳米管与悬浮芯片磁性编码微球的羧基位点进行偶联;(3)生物素化核酸适配体偶联荧光报告分子-链霉亲和素藻红蛋白;(4)生物素化核酸适配体-链霉亲和素藻红蛋白在单壁碳纳米管-悬浮芯片磁性编码微球上进行偶联,形成核酸适配体特异性探针悬浮芯片微球,可参照Luminex公司网站技术手册

[0043] (<https://www.luminexcorp.com/zh/research/reagents-and-accessories/magplex-microspheres/product-details/>)。

[0044] 本发明所述的悬浮芯片磁性微球购自Luminex公司。

[0045] 有益效果

[0046] 本发明基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球,对于核酸、蛋白质、微生物和/或化学污染物的检测具有较宽的检测范围和较高的检测灵敏度;其检测范围为 $1 \times 10^{-13} \sim 1 \times 10^{-7}$ g/mL,检测灵敏度在fg级(1×10^{-15} g/mL)以上。这与标准悬浮芯片技术和经典ELISA技术相比具有较大优势。经特异性检测实验证明,新型核酸适配体-悬浮芯片技术特异性良好。

附图说明

[0047] 图1单壁碳纳米管的超灵敏核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球的结构模型示意图。

[0048] 其中,(1)指单壁碳纳米管,(2)指磁性检测微球,(3)指生物物素化核酸适配体,(4)指荧光素标记的链霉亲和素藻红蛋白。

[0049] 图2为一种单壁碳纳米管的超灵敏核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球检测方法建立模式图。

[0050] 图3为基于单壁碳纳米管的超灵敏核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球检测方法检测双酚A(BPA)、雌二醇(E₂)和多氯联苯(PCB)的标准曲线图。

具体实施方式

[0051] 下面结合具体附图2对本发明作地进一步的说明。

[0052] 本研究以典型环境内分泌干扰物双酚A(Bisphenol A,BPA)、雌二醇(17-β-Estradiol,E₂)和多氯联苯(PCB)等作为研究对象,基于碳纳米材料的比表面积大、可控物理性吸附生物材料特点,建立多种环境内分泌干扰物检测的新型核酸适配体-悬浮芯片技术。

[0053] 首先采用乙二胺缩合剂法对碳纳米材料即单壁碳纳米管 (Single-walled nanotubes, SWNTs) 进行氨基化基团修饰改造, 制备出氨基化修饰的碳纳米管, 并利用红外和XPS进行表征, 测得氨基修饰率为2.46%。

[0054] 经修饰的SWNTs与悬浮芯片磁性编码微球的羧基位点进行偶联, 增加了微球的比表面积, 同时起到信号放大作用;

[0055] 基于链霉亲和素-生物素反应机理, 将荧光报告蛋白链霉亲和素-藻红蛋白 (Streptavidin-phycoerythrin, SA-PE) 连接到生物素化的BPA、PCB和E₂核酸适配体上,

[0056] 利用核酸适配体单链DNA与SWNTs可控物理吸附的性质, 制备出相应的特异性探针微球;

[0057] 如果待测样中存在BPA、PCB和E₂, 则被探针微球捕获, 并与报告分子 (即BPA和E₂的核酸适配体) 特异性结合, 从而改变了适配体的三维空间构型, 使得形成的复合物从微球上脱落, 悬浮芯片系统测得的中位荧光强度值 (Median Fluorescence Intensity, MFI) 也相应降低。

[0058] 本实验通过优化反应条件, 获得了最佳SWNT、SA-PE加入量以及孵育时间和孵育温度等。在此条件下, 建立了BPA、E₂和PCB的检测标准曲线。说明该方法具有较宽的检测范围 (5-6个数量级) 和较高的检测灵敏度 (亚pg级), 与标准悬浮芯片技术和经典ELISA技术等其他检测技术相比具有较大优势。经特异性检测实验证明, 新型核酸适配体-悬浮芯片技术特异性良好。

[0059] 实施例

[0060] 实施例一、制备表面氨基化修饰的单壁碳纳米管

[0061] 采用两步酸化法处理碳纳米管: 100mL 98%的浓H₂SO₄与68%的浓HNO₃按照3:1的体积比混合, 在混合酸中加入200mg SWNT, 38℃超声波振荡条件下回流反应4h。冷却至室温后, 加入去离子水稀释, 纤维素滤膜过滤, 用去离子水清洗直到滤液的pH呈中性。反应产物置于电热鼓风干燥箱中, 60℃下真空干燥过夜。

[0062] 100mL 98%的浓H₂SO₄与30%的H₂O₂按照4:1的体积比混合, 将1中的混酸酸化产物置于H₂SO₄与H₂O₂的混合溶液中, 70℃下回流2h。冷却至室温后, 加入去离子水稀释, 用滤膜过滤, 清洗至洗至滤液pH呈中性。产物置于电热鼓风干燥箱中, 60℃下干燥过夜。

[0063] 实施例二、氨基修饰的单壁碳纳米管与悬浮芯片磁性编码微球的偶联

[0064] 取3mg氨基化修饰过的SWNT, 加入3mL dH₂O中, 超声5min, 重复6次累计时间达到30min, 中途用冰水消热。取800μL, 分散至1.5mL的蒸馏水中。避光环境取出空白羧基化荧光编码磁性微球悬液的棕色瓶 (52#), 晾至室温, 水浴超声30s, 涡旋混匀1min。取出120μL悬液至用铝箔包覆好的1.5mL离心管中, 磁分离器上放置5min, 贴壁吸去上清。120μL 0.1M MES (pH=4.5) 加至微球中充分混匀, 清洗微球。磁分离, 弃去上清, 加100μL MES重悬微球, 锡箔纸包住离心管避光放至4℃, 备用。

[0065] 取20μL SWNT加入离心管, 迅速震荡混匀, 再分别加入10μL浓度为10mg/mL NHS和30μL浓度为10mg/mL EDC, MES补足至120μL体系, 室温避光孵育4h, 800r。磁分离弃上清, 加200μL封闭缓冲液封闭未反应的羧基位点30min, 室温, 800rpm。

[0066] 分别用1mL清洗缓冲液I和II清洗微球, 磁分离后加入100μL TE缓冲液重悬微球, 水浴超声30s, 涡旋混匀后, 用血球计数板在光学显微镜下计数。将探针微球稀释至2000个/

μL 避光保存于 4°C 。

[0067] 实施例三、制备生物素化核酸适配体偶联荧光报告分子-链霉亲和素藻红蛋白

[0068] 取生物素化的核酸适配体,开盖前于离心机 12000rpm ,离心 60s ,慢慢打开管盖,加入 $34\mu\text{L}$ 的PBS(含 0.1M 的 MgCl_2)缓冲液,配制成 $100\mu\text{M}$ 的贮存液,盖上盖充分震荡混匀,分装($2\mu\text{L}/\text{PCR}$ 管,10管)备用,其余 -20°C 冻存;取1管 $2\mu\text{L}$ 生物素化的核酸适配体, 95°C 水浴处理 5min ,冷却至室温。再作100倍稀释得到 $1\mu\text{M}$,即加入 $198\mu\text{L}$ Tris-HCl(20mM Tris-HCl, $\text{pH}=7.4$, 100mM NaCl, 2mM MgCl_2)偶联缓冲液,共 $200\mu\text{L}$ 备用;避光取 $2\mu\text{L}$ 的SA-PE,用PBS缓冲液稀释100倍至 $200\mu\text{L}$,备用;

[0069] 取 $1\mu\text{M}$ 的生物素化核酸适配体和 $100\times$ 稀释的SA-PE按照体积比 $3:2$ 混合, 37°C 800rpm 振荡孵育 30min 。

[0070] 实施例四、制备双酚A的生物素化核酸适配体-链霉亲和素藻红蛋白-单壁碳纳米管悬浮芯片检测磁性微球。

[0071] 用移液器取出偶联SWNT的荧光编码磁性微球 $10\mu\text{L}$ (2000 个/ μL)与96孔板中,每孔加入 $1\mu\text{L}$,将96孔板于涡旋仪上涡旋混匀 30s ,超声 1min ,至分散均匀。避光条件各孔加入 $2\mu\text{L}$ 生物素化核酸适配体偶联荧光报告分子-链霉亲和素藻红蛋白(所述核酸适配体为:双酚A核酸适配体,其核苷酸序列如序列表SEQ ID NO.1所示),用偶联缓冲液补足 $50\mu\text{L}$ 体系,孵育温度 28°C ,孵育时间 1.5 小时,获得检测双酚A的生物素化核酸适配体-链霉亲和素藻红蛋白-单壁碳纳米管悬浮芯片检测磁性微球。

[0072] 实施例五、制备雌二醇的生物素化核酸适配体-链霉亲和素藻红蛋白-单壁碳纳米管悬浮芯片检测磁性微球。

[0073] 参照实施例四的制备方法,仅是将双酚A核酸适配体替换为雌二醇核酸适配体;所述雌二醇核酸适配体的核苷酸序列如序列表SEQ ID NO.2所示。

[0074] 实施例六、制备多氯联苯的生物素化核酸适配体-链霉亲和素藻红蛋白-单壁碳纳米管悬浮芯片检测磁性微球。

[0075] 参照实施例四的制备方法,仅是将双酚A核酸适配体替换为多氯联苯核酸适配体;所述多氯联苯核酸适配体的核苷酸序列如序列表SEQ ID NO.3所示。

[0076] 实施例七、制备三联环境内分泌干扰物(双酚A、雌二醇和多氯联苯)的生物素化核酸适配体-链霉亲和素藻红蛋白-单壁碳纳米管悬浮芯片磁性检测微球。

[0077] 将实施例四、五、六制备的生物素化核酸适配体-链霉亲和素藻红蛋白-单壁碳纳米管悬浮芯片检测磁性微球进行等摩尔的量混合,制成三联环境内分泌干扰物的生物素化核酸适配体-链霉亲和素藻红蛋白-单壁碳纳米管悬浮芯片检测磁性微球。

[0078] 所述三联环境内分泌干扰物(双酚A、雌二醇和多氯联苯)的生物素化核酸适配体-链霉亲和素藻红蛋白-单壁碳纳米管悬浮芯片磁性检测微球,也称基于单壁碳纳米管的多元核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球。

[0079] 测试例

[0080] 测试例一、双酚A(Bisphenol A,BPA)的检测。

[0081] 采用条件优化后最佳的方案,在 25°C 600rpm 条件下孵育 2 小时,测定不同浓度BPA(0 、 0.256 、 1.28 、 6.4 、 32 、 160 、 800 和 $4000\text{pg}/\text{mL}$)下的MFI值,平行测定三次取平均值。以没有加入BPA检测时的MFI值作为阳性 MFI_0 ,建立浓度与 MFI/MFI_0 的标准曲线(所述标准曲线见说

说明书附图3)。检测时取10 μ L/孔样品加入到96孔微滴定板的反应孔中;用移液器分别吸取pH=7.4的PBS缓冲液37 μ L,对每孔加入的样品进行吹打混匀;

[0082] 测试例二、雌二醇 (17- β -Estradiol, E₂) 的检测。

[0083] 参照测试例一的制备方法,仅是将BPA替换为E₂,测定不同浓度E₂ (0、0.5、2、8、32、128、512和2048pg/mL) 下的MFI值,建立标准曲线(所述标准曲线见说明书附图3)。

[0084] 测试例三、多氯联苯 (PCB) 的检测。

[0085] 参照测试例一的制备方法,仅是将BPA替换为PCB,测定不同浓度PCB (0、0.064、0.32、1.6、8、40、200和1000pg/mL) 下的MFI值,建立标准曲线(所述标准曲线见说明书附图3)。

[0086] 测试例四、BPA、E₂和PCB的同时检测。

[0087] 由于悬浮芯片是一个高通量的检测平台,可以多通道的检测目标分子。在已经建立的单通道BPA的高亲和力适配体-悬浮芯片检测技术基础上,增加了E₂,PCB共三种指标进行了共同检测。用移液器分别于每孔中加入3 μ L三联环境内分泌干扰物的生物素化核酸适配体-链霉亲和素藻红蛋白-单壁碳纳米管悬浮芯片检测磁性微球,在漩涡振荡器上28 $^{\circ}$ C中速振荡1.5小时;悬浮芯片系统读取100个微球/孔,获得中位荧光强度值;以三种靶标物的浓度为X轴,获得中位荧光强度值与阳性中位荧光强度值的比值为Y轴,代入获得的标准曲线中,计算3个水质样品中BPA、E₂和PCB的检测值,具体检测结果如表1所示。

[0088] 表1 3个水质样品中BPA, E₂ and PCB的检测结果 (n=5)

Sample	BPA (pg/mL)	E ₂ (pg/mL)	PCB (pg/mL)
1	1586.64 \pm 167.32	10.51 \pm 0.93	6254.75 \pm 688.56
2	533.65 \pm 67.66	17.26 \pm 2.08	2621.38 \pm 279.49
3	250.63 \pm 28.67	-	282.12 \pm 30.14

[0090] 本发明通过优化反应条件,获得了最佳SWNT、SA-PE加入量以及孵育时间和孵育温度等。在此条件下,建立了BPA、E₂和PCB的检测标准曲线。说明该方法具有较宽的检测范围 ($1 \times 10^{-13} \sim 1 \times 10^{-7}$ g/mL) 和较高的检测灵敏度 (1×10^{-15} g/mL) 以上,与标准悬浮芯片技术和经典ELISA技术相比具有较大优势。经特异性检测实验证明,新型核酸适配体-悬浮芯片技术特异性良好。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 广州医科大学
- [0003] <120> 一种基于单壁碳纳米管的核酸适配体-悬浮芯片磁性检测微球及其制备和检测方法
- [0004] <130> 2017
- [0005] <160> 3
- [0006] <170> PatentIn version 3.3
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 63
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <400> 1
- [0012] ccggtgggtg gtcaggtggg atagcgttcc gcgtatggcc cagcgcattca cgggttcgca 60
- [0013] cca 63
- [0014] <210> 2
- [0015] <211> 74
- [0016] <212> DNA
- [0017] <213> 人工序列
- [0018] <400> 2
- [0019] gcttcagct tattgaatta cacgcagagg gtageggctc tgcgcattca attgctgcgc 60
- [0020] gctgaagcgc gaag 74
- [0021] <210> 3
- [0022] <211> 80
- [0023] <212> DNA
- [0024] <213> 人工序列
- [0025] <400> 3
- [0026] agcagcacag aggtcagatg cactcggacc ccattctect tccatccctc atccgtccac 60
- [0027] cctatgcgtg ctaccgtgaa 80

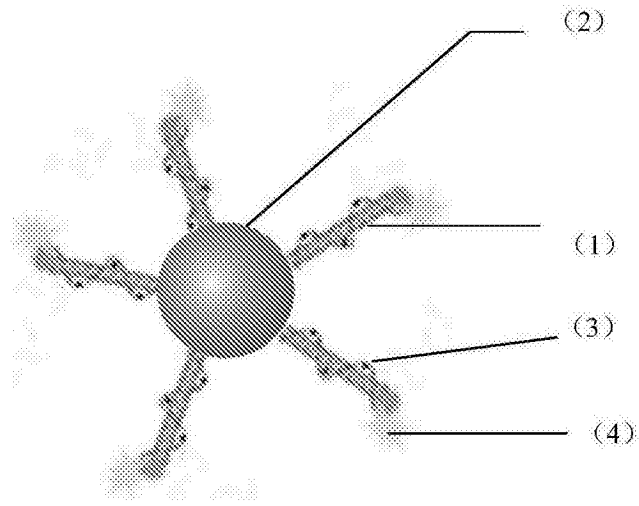
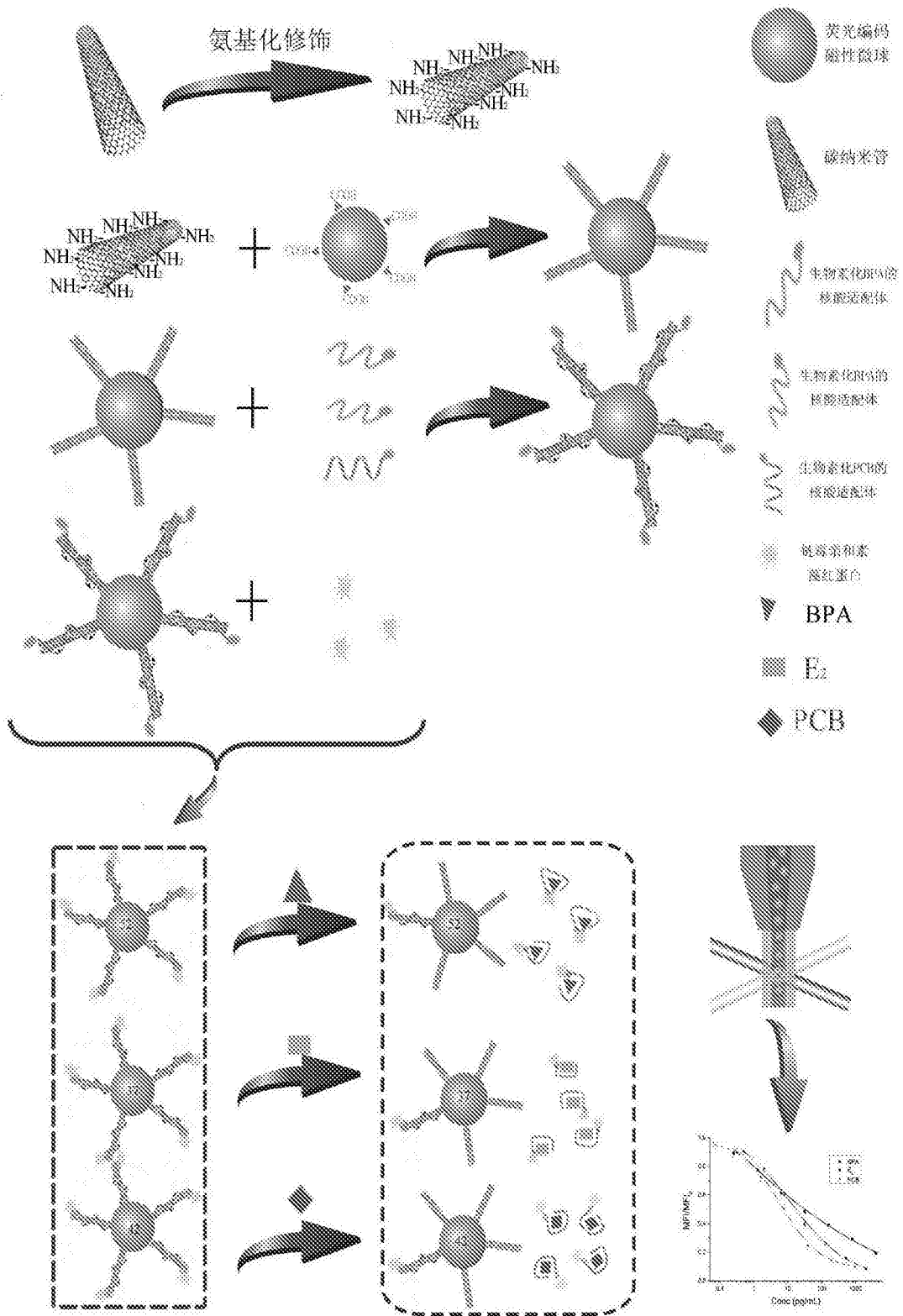


图1



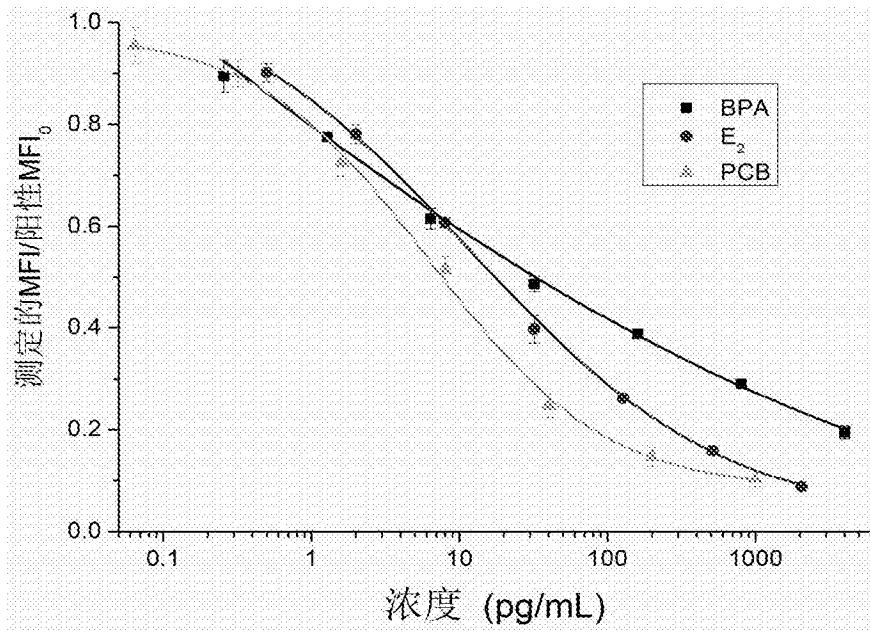


图3