

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/48 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710056386.8

[43] 公开日 2008年6月18日

[11] 公开号 CN 101201346A

[22] 申请日 2007.12.6

[21] 申请号 200710056386.8

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街 5625 号

[72] 发明人 王振新 李 桃 刘殿骏

[74] 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公司

代理人 马守忠

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 4 页

[54] 发明名称

一种生物芯片标记和检测方法

[57] 摘要

一种新型生物芯片标记与检测方法。本发明提供了金纳米粒子标记生物芯片和表面增强拉曼检测生物芯片的方法具有一定的通用性，并具有灵敏度高(100ng/mL)，选择性好以及样品消耗量少的特点。应用本方法可实现对多肽，蛋白质检测以及抗原抗体如蛋白 A 与免疫球蛋白 G，酶与底物如激酶 PKA 与底物的相互作用研究。利用这一方法所获得的多肽检测限为：10fg，线性范围为：3 个数量级。这一方法所获得的蛋白 A 检测限为：100fg，免疫球蛋白(IgG)的检测限为 0.1 μg/mL；二者的线性范围均为：3 个数量级。利用这一方法成功检测到 PKA 与底物相互作用。

1,一种生物芯片的标记与检测方法,其特征在于,其步骤和条件为:

(1) **多肽修饰金纳米粒子的合成**,将柠檬酸钠修饰的金纳米粒子与多肽混合溶液以摩尔比 1: 50000 混合,常温反应 1 小时后,在转速为 13000 转/分钟条件下通过 3 次离心提纯反应产物,获得多肽修饰的金纳米粒子;

所述的多肽混合溶液为胱氨酰丙氨酰亮氨酰天门冬氨酰天门冬氨酸与胱氨酰丙氨酰亮氨酰天门冬氨酰天门冬氨酰甘氨酰赖氨酰-生物素甘氨酸的混合溶液;

将多肽修饰的金纳米粒子分散在中性磷酸盐缓冲溶液中,4°C 下保存;

(2) **标记生物芯片**,将以美国斯坦福大学布朗实验室所制定的标准方法所制作的生物芯片与200 μL 的浓度为100 ng/mL-100 $\mu\text{g/mL}$ 的拉曼活性染料标记的亲合素和浓度为 5.0×10^{-9} M的多肽修饰的金纳米粒子,在37 °C 反应 1 小时,得到标记生物芯片;得到的标记生物芯片清洗并用 N_2 吹干;

所述的生物芯片包括:多肽浓度为1 ng/mL-1mg/mL的点阵的多肽芯片,含蛋白A 浓度为10 ng/mL-1 mg/mL的点阵的蛋白质芯片,多肽底物浓度为1 ng/mL-1mg/mL的点阵的多肽底物芯片;

(3) **银增强反应**,为了进一步提高检测灵敏度,将标记的生物芯片与1 mL银增强试剂反应 10 分钟 ;

(4) **以表面增强拉曼检测上述生物芯片**,具体条件和步骤如下:将上述生物芯片放置于Renishaw 2000 型激光共聚焦拉曼光谱仪的显微镜样品台上,以氩离子激光器产生的能量为10毫瓦,波长为514 纳米的激光为激发波长,使用CCD检测器采集拉曼光谱,每条拉曼光谱的采集时间为10秒。

一种生物芯片标记和检测方法

技术领域

本发明涉及一种生物芯片标记和检测方法。

技术背景

由于无机纳米粒子(金,银,量子点等)具有特殊的物理和化学性质,近十年来被广泛应用于各种纳米技术,生物纳米技术和生物医学检测技术等领域(化学综述, *Chem. Rev.*, 2004, 104, 293-346; *Chem. Rev.*, 2005, 105, 1547-1562)。表面增强拉曼(SERS)是一种非常灵敏的光学检测手段,其理论检测限可以达到单分子,并且能定量与定性同时进行(化学物理 B, *J. Phys. Chem. B*, 1997, 101, 1338; 拉曼光谱杂志, *J. Raman Spectrosc.*, 2005, 36, 485)。生物芯片是目前基因组学,蛋白质组学研究的重要工具,具有高通量,并对检测样品消耗量少等优点(基因生物学, *Genome Biol.* 2001, 2, research 0004.1~0004.13)。但目前,生物芯片主要以荧光为检测手段,因而在检测灵敏度,选择性等方面尚具有一定的缺点;拓展生物芯片的检测手段对其发展有重要意义(*Nature*, 2007, 4, 437-444)。将金纳米粒子标记生物芯片和表面增强拉曼检测生物芯片方法相结合,有助于提高生物芯片的灵敏度,重现性和选择性。

发明内容

以多肽混合物如胱氨酰丙氨酰亮氨酰天门冬氨酰天门冬氨酸与胱氨酰丙氨酰亮氨酰天门冬氨酰天门冬氨酰甘氨酰赖氨酰-生物素甘氨酸修饰金

纳米粒子具有合成方法简单，快速并且稳定性好，生物相容性好等优点。而亲和素-生物素（avidin-biotin）是目前发现的最稳定的配合物。本发明利用亲和素-生物素反应以多肽如胱氨酰丙氨酰亮氨酰天门冬氨酰天门冬氨酸与胱氨酰丙氨酰亮氨酰天门冬氨酰天门冬氨酰甘氨酰赖氨酰-生物素甘氨酸修饰的金纳米粒子标记物；通过拉曼染料修饰亲和素与生物素反应标记生物芯片，并结合表面银增强技术以 SERS 为检测手段，研制一种生物芯片标记与检测方法；并实现多肽，蛋白质检测和蛋白质之间相互作用和酶与底物之间相互作用的研究。

本发明的目的是提供一种生物芯片标记和检测方法；一种以金纳米粒子标记物，表面增强拉曼为检测手段的生物芯片标记和检测方法。

本发明的方法的具体技术方案如下：

图 1 是本发明的方法的技术路线示意图。其中， a) 是多肽检测； b) 是检测酶与底物相互作用； c 是蛋白质检测。

(1) 多肽修饰金纳米粒子的合成，将柠檬酸钠修饰的金纳米粒子与多肽混合溶液以摩尔比 1：50000 混合，常温反应 1 小时后，在转速为 13000 转/分钟条件下通过 3 次离心提纯反应产物，获得多肽修饰的金纳米粒子；

所述的多肽混合溶液为胱氨酰丙氨酰亮氨酰天门冬氨酰天门冬氨酸与胱氨酰丙氨酰亮氨酰天门冬氨酰天门冬氨酰甘氨酰赖氨酰-生物素甘氨酸的混合溶液；

将多肽修饰的金纳米粒子分散在中性磷酸盐缓冲溶液中，4°C 下保存。

(2) 标记生物芯片，将以美国斯坦福大学布朗实验室所制定的标准方

法制作的多肽或蛋白质生物芯片与200 μL 的浓度为100 ng/mL-100 $\mu\text{g/mL}$ 的拉曼活性染料标记的亲合素 (avidin) 和浓度为 5.0×10^{-9} M的多肽修饰的金纳米粒子, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 小时, 得到标记生物芯片; 得到的标记生物芯片清洗并用 N_2 吹干。

所述的生物芯片包括: 多肽浓度为1 ng/mL-1mg/mL的点阵的多肽芯片, 含蛋白A(protein A) 浓度为10 ng/mL-1 mg/mL的点阵的蛋白质芯片; 多肽底物浓度为1 ng/mL-1mg/mL的点阵的多肽底物芯片。

(3) 银增强反应, 为了进一步提高检测灵敏度, 将标记的生物芯片与1 mL银增强溶液反应 10 分钟 ; 所述银增强试剂为美国西格玛 (Sigma) 产品, 包括溶液A (硝酸银, AgNO_3) 与溶液 B (氢醌)两种溶液, 使用时溶液A与溶液按1:1混合。

(4) 以表面增强拉曼检测上述生物芯片, 具体条件和步骤如下: 将上述生物芯片放置于雷尼绍 (Renishaw) 2000 型激光共聚焦拉曼光谱仪的显微镜样品台上, 以氩离子激光器产生的能量为10毫瓦波长为514 纳米的激光为激发波长, 使用CCD检测器采集拉曼光谱, 每条拉曼光谱的采集时间为10秒。

本发明的有益效果明显:**(1)** 本发明提供一种多肽修饰金纳米粒子标记方法, 与其他金纳米粒子标记方法相比具有, 简单, 稳定, 快速等优点。

(2) 本发明提供了金纳米粒子标记生物芯片和表面增强拉曼检测生物芯片的方法具有一定的通用性, 并具有灵敏度高 (100 ng/mL), 选择性好以及样品消耗量少的特点。应用本方法可实现对多肽, 蛋白质检测以及抗原抗体 (如蛋白 A 与免疫球蛋白 G), 酶与底物 (激酶 PKA 与底物) 相互

作用研究。

利用这一方法所获得的多肽检测限为：10 fg，线性范围为：3 个数量级。

这一方法所获得的蛋白 A 检测限为：100 fg，免疫球蛋白 (IgG) 的检测限为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ；二者的线性范围均为：3 个数量级。

利用这一方法成功检测到 PKA 与底物相互作用。

附图说明

图 1 本发明的方法的示意图。其中，a)是多肽检测；b 是检测酶与底物相互作用；c 是蛋白质检测。

图 2 是所获得的多肽点阵与 a)以银增强试剂反应前和 b)银增强试剂反应后的光学照片。

图 3 用本发明的方法所获得的检测的标准曲线图。其中 a)是多肽检测的标准曲线图，b)蛋白 A (protein A)的检测的标准曲线图，c) 是免疫蛋白 G(biotin-IgG)的检测的标准曲线图。

图 4 本发明的方法所检测获得的激酶 PKA 与底物多肽 LRRASLG 线相互作用的拉曼光谱图。

具体实施方式

实施例 1：多肽检测

应用美国斯坦福大学布朗实验室所制定的标准方法制作含有 7 种不同多肽浓度：1 ng/mL，10 ng/mL，100 ng/mL，1 $\mu\text{g/mL}$ ，10 $\mu\text{g/mL}$ ，100 $\mu\text{g/mL}$ ，1mg/mL 的点阵的多肽芯片，通过 1% (w/v) 牛血清蛋白 (BSA) 封闭芯片。并依次与 200 μL 的：(1) 1 $\mu\text{g/mL}$ 荧光素标记的亲合素

(avidin-fluorescein) 和 (2) 5.0×10^{-9} M 多肽修饰的金纳米粒子各反应 1 h, 再进一步与 1 mL 银增强溶液反应 10 分钟后应用 Renishaw 2000 型拉曼光谱仪检测在激发波长为 514 nm 的拉曼响应。利用这一方法所获得的多肽检测限为: 10 fg, 线性范围为: 3 个数量级。

实施例 2: 蛋白质检测

应用美国斯坦福大学布朗实验室所制定的标准方法制作含 6 种有不同蛋白 A (protein A) 浓度: 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL, 1mg/mL 的点阵的生物芯片, 通过 1% (w/v) 牛血清蛋白 (BSA) 封闭芯片。并依次与 200 μ L 的: (1) 10 ng/mL-1mg/mL 生物素标记的免疫蛋白 G (biotin-IgG), (2) 1 μ g/mL 荧光素标记的亲合素 (avidin-fluorescein) 和 (3) 5.0×10^{-9} M 多肽修饰的金纳米粒子各反应 1 h, 再进一步与 1 mL 银增强溶液反应 10 分钟后应用 Renishaw 2000 型拉曼光谱仪检测在激发波长为 514 nm 的拉曼响应。利用这一方法所获得的 protein A 检测限为: 100 fg, IgG 的检测限为 0.1 μ g/mL; 二者的线性范围均为: 3 个数量级。

实施例 3: 检测酶与底物相互作用

应用美国斯坦福大学布朗实验室所制定的标准方法制作含有 7 不同多肽底物浓度: 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL, 1mg/mL 的点阵的多肽底物芯片, 通过 1% (w/v) 牛血清蛋白 (BSA) 封闭芯片。并依次与 200 μ L 的: (1) 100 μ M 三磷酸腺苷 (ATP) 和 100 单位激酶 PKA, (2) 20 μ g/mL 生物素修饰磷酸化丝氨酸抗体 (anti-phosphoserine-biotin), (3) 1 μ g/mL 荧光素标记的亲合素 (avidin-fluorescein) 和 (4) 5.0×10^{-9} M 多肽修饰的金纳米粒子各反应 1 h,

再进一步与 1 mL 银增强溶液反应 10 分钟后应用 Renishaw 2000 型拉曼光谱仪检测在激发波长为 514 nm 的拉曼响应。利用这一方法成功检测到 PKA 与底物相互作用。

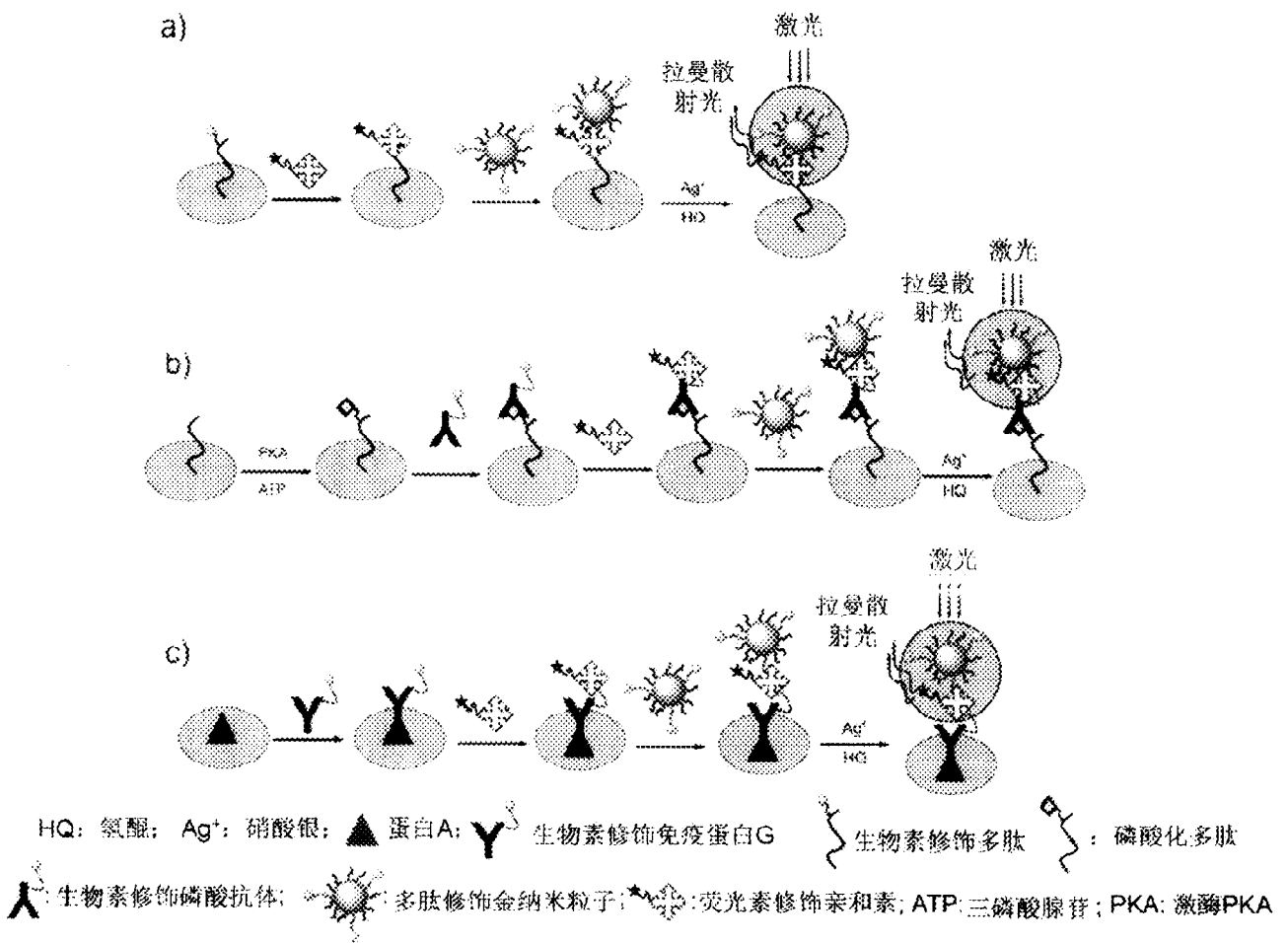


图 1

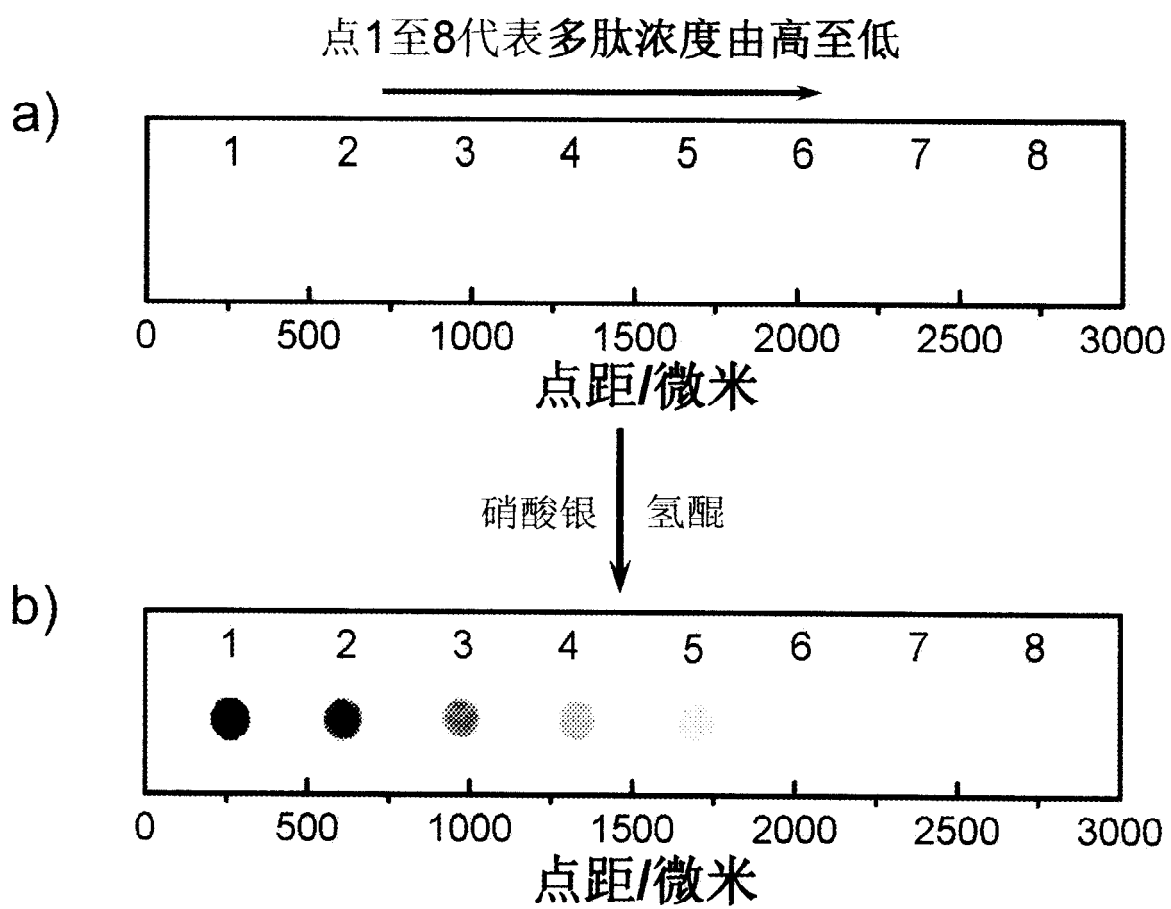


图 2

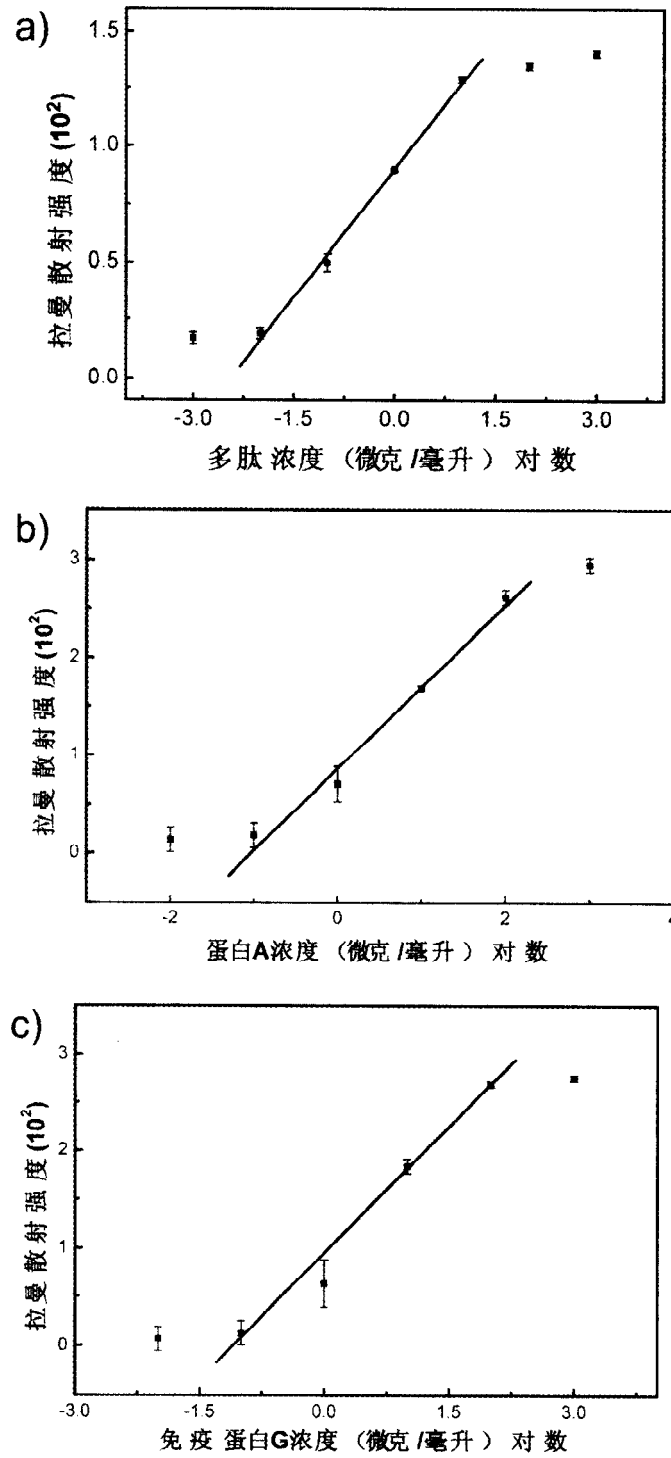


图 3

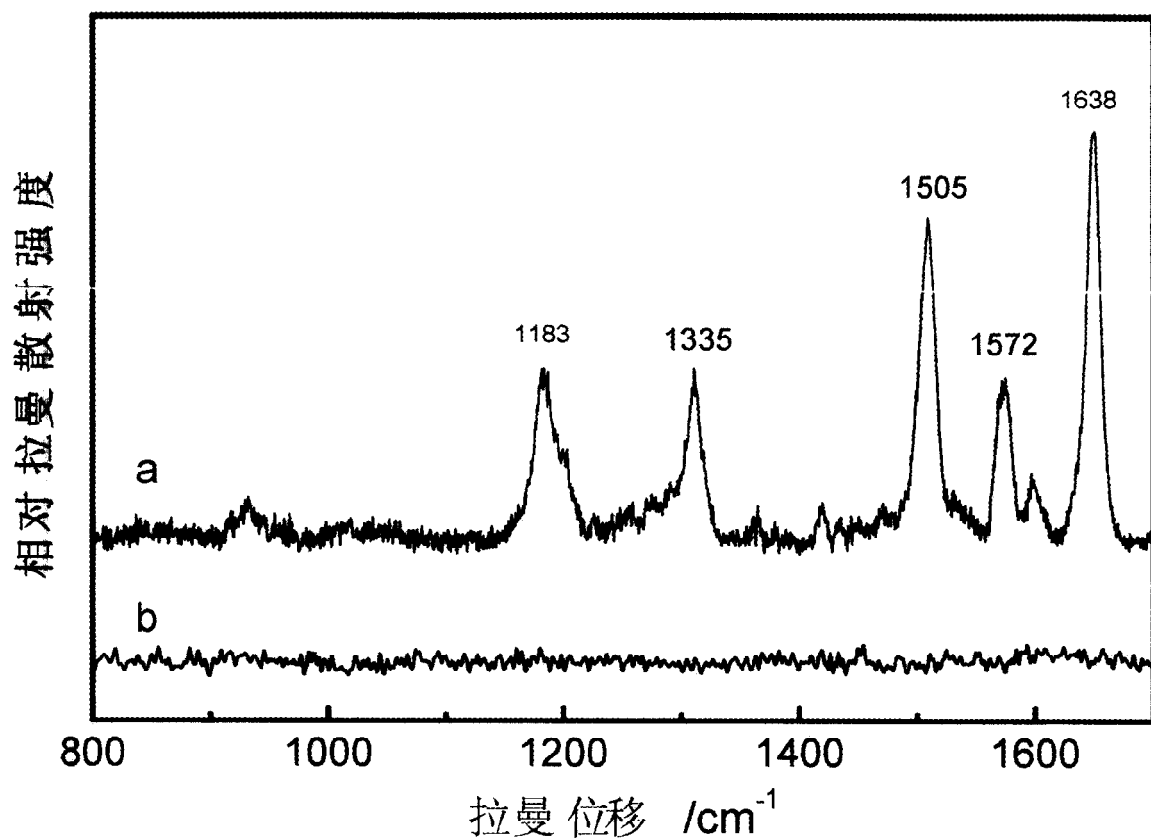


图 4