



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101936945 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 05

(21) 申请号 201010270997. 4

(22) 申请日 2010. 09. 03

(71) 申请人 中国科学院长春应用化学研究所  
地址 130000 吉林省长春市人民大街 5625  
号

(72) 发明人 徐国宝 刘中原

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227  
代理人 魏晓波 逯长明

(51) Int. Cl.

G01N 27/48(2006. 01)

G01N 27/327(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 序列表 2 页  
附图 0 页

### (54) 发明名称

ATP 含量的检测方法及 ATP 适配体传感器

### (57) 摘要

本发明实施例公开了一种 ATP 含量的检测方法  
及 ATP 适配体传感器, ATP 含量的检测方法包  
括:提供表面固定有 DNA 单链的金电极, DNA 单链  
序列如 SEQ ID No. 1 所示;提供部分 DNA 双链,部  
分 DNA 双链中第一链 3' 末端如 SEQ ID No. 2 所  
示,其 5' 末端与第二链互补;金电极浸入所述部  
分 DNA 双链与待测样品的混合液;以  $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 、  
 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$  或  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$  作为电  
化学发光探针针对金电极进行 ECL 检测。本发明利  
用钌化合物配体较大的芳香环具有嵌入 DNA 双链  
结构的性能,实现了对 ATP 的检测,本发明提供的  
检测方法无需使用化学标记,方法简单。

1. 一种 ATP 含量的检测方法,包括以下步骤:  
提供表面固定有 DNA 单链的金电极,所述 DNA 单链序列如 SEQ ID No. 1 所示;  
提供部分 DNA 双链,所述部分 DNA 双链中第一链 3' 末端如 SEQ ID No. 2 所示,其 5' 末端与第二链互补;  
所述金电极浸入所述部分 DNA 双链与待测样品的混合液;  
以  $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 、 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$  或  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$  作为电化学发光探针对所述金电极进行 ECL 检测。
2. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其特征在于,所述第一链 5' 末端与其 3' 末端以及所述 DNA 单链不相同且不互补。
3. 根据权利要求 2 所述的检测方法,其特征在于,所述第二链含有 20 ~ 23 个碱基。
4. 根据权利要求 3 所述的检测方法,其特征在于,所述第二链序列如 SEQID No. 3 所示。
5. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其特征在于,所述固定通过 DNA 单链 5' 末端修饰巯基固定。
6. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其特征在于,所述金电极与混合液反应前用巯基己醇封闭金电极表面的非特异性吸附位点。
7. 根据权利要求 1 所述的检测方法,其特征在于,所述对金电极进行检测以草酸盐或胺类化合物作为共反应剂。
8. 根据权利要求 7 所述的检测方法,其特征在于,所述胺类化合物为三丙胺或 2-二丁基乙醇胺。
9. 一种 ATP 适配体传感器,包括:  
电化学发光探针,所述电化学发光探针为  $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 、 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$  或  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ ;  
表面固定有 DNA 单链的金电极,所述 DNA 单链序列如 SEQ ID No. 1 所示;  
部分 DNA 双链,所述部分 DNA 双链中第一链 3' 末端如 SEQ ID No. 2 所示,其 5' 末端与第二链互补。
10. 根据权利要求 9 所述的 ATP 适配体传感器,其特征在于,所述 DNA 单链通过其 5' 末端修饰巯基固定于金电极。
11. 根据权利要求 9 所述的 ATP 适配体传感器,其特征在于,还包括草酸盐或胺类化合物作为共反应剂。
12. 根据权利要求 11 所述的 ATP 适配体传感器,其特征在于,所述胺类化合物为三丙胺或 2-二丁基乙醇胺。

## ATP 含量的检测方法及 ATP 适配体传感器

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,更具体地说,涉及 ATP 含量的检测方法及 ATP 适配体传感器。

### 背景技术

[0002] 三磷酸腺苷 (ATP) 存在于从微生物到高等动植物等生物体的细胞中,主要作用是提供能量,参与体内脂肪、蛋白质、糖和核酸的代谢,是机体能量的重要来源,在维持生物体的正常机能上有着无可替代的作用。ATP 的快速高效测定,对于研究细胞乃至机体的生理活性和代谢过程、进行药物敏感实验以及食品卫生监控都有非常重要的意义。

[0003] 传统上,ATP 的检测方法有电泳法、高效液相色谱法和同位素示踪法等。在电泳法测定中,样品需经滤纸电泳分离,再利用紫外分光光度计进行比色,操作复杂;采用高效液相色谱法,仪器、试剂昂贵,操作过程繁琐,检测时间比较长,且灵敏度仅为  $1 \times 10^{-3} \text{M}$ ,推广应用难度较大;同位素示踪法中放射性同位素对人体有危害,某些同位素半衰期长,需要在专门的同位素实验室完成,应用范围受到限制(博士论文,基于核酸适配体化学发光检测新技术的研究,复旦大学,严喜鸾,第 86 页)。

[0004] 核酸适配体是近年来发展起来的一类经体外人工合成而筛选出的单链寡核苷酸,能高效、特异性地结合各种生物目标分子,核酸适配体的出现为化学生物学界和生物医学界提供了一种新的研究平台。核酸适配体具有自身稳定性好、制备合成相对简单、快速、易获得、易功能化修饰与标记等优点,因此,在生物传感器设计中应用灵活广泛。近几年,基于核酸适配体的生物传感器研究受到人们极大的关注。

[0005] 目前,利用基于 ATP 核酸适配体的生物传感器检测 ATP 的相关研究已有报道(J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 6944-6945)。现有技术中,在 ATP 的检测过程中,需要对核酸适配体进行化学标记,再根据识别反应前后标记物本身或其催化底物的变化进行检测,因此操作复杂,成本较高。

### 发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明要解决的技术问题在于提供一种 ATP 含量的检测方法及 ATP 适配体传感器,该检测方法无需化学标记,方法简单。

[0007] 本发明提供一种 ATP 含量的检测方法,包括以下步骤:

[0008] 提供表面固定有 DNA 单链的金电极,所述 DNA 单链序列如 SEQ ID No. 1 所示;

[0009] 提供部分 DNA 双链,所述部分 DNA 双链中第一链 3' 末端如 SEQ ID No. 2 所示,其 5' 末端与第二链互补;

[0010] 所述金电极浸入所述部分 DNA 双链与待测样品的混合液;

[0011] 以  $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 、 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$  或  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$  作为电化学发光探针对所述金电极进行 ECL 检测。

[0012] 优选的,所述第一链 5' 末端与其 3' 末端以及所述 DNA 单链不相同且不互补。

- [0013] 优选的,所述第二链含有 20 ~ 23 个碱基。
- [0014] 优选的,所述第二链序列如 SEQ ID No. 3 所示。
- [0015] 优选的,所述固定通过 DNA 单链 5' 末端修饰巯基固定。
- [0016] 优选的,所述金电极与混合液反应前用巯基乙醇封闭金电极表面的非特异性吸附位点。
- [0017] 优选的,所述对金电极进行检测以草酸盐或胺类化合物作为共反应剂。
- [0018] 优选的,所述胺类化合物为三丙胺或 2-二丁基乙醇胺。
- [0019] 本发明还提供一种 ATP 适配体传感器,包括:
- [0020] 电化学发光探针,所述电化学发光探针为  $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 、 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$  或  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ ;
- [0021] 表面固定有 DNA 单链的金电极,所述 DNA 单链序列如 SEQ ID No. 1 所示;
- [0022] 部分 DNA 双链,所述部分 DNA 双链中第一链 3' 末端如 SEQ ID No. 2 所示,其 5' 末端与第二链互补。
- [0023] 优选的,所述 DNA 单链通过其 5' 末端修饰巯基固定于金电极。
- [0024] 优选的,还包括草酸盐或胺类化合物作为共反应剂。
- [0025] 优选的,所述胺类化合物为三丙胺或 2-二丁基乙醇胺。
- [0026] 从上述的技术方案可以看出,本发明提供一种 ATP 含量的检测方法 & ATP 适配体传感器,ATP 含量的检测方法包括:提供表面固定有 DNA 单链的金电极,所述 DNA 单链序列如 SEQ ID No. 1 所示;提供部分 DNA 双链,所述部分 DNA 双链中第一链 3' 末端如 SEQ ID No. 2 所示,其 5' 末端与第二链互补;所述金电极浸入所述部分 DNA 双链与待测样品的混合液;以  $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 、 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$  或  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$  作为电化学发光探针对所述金电极进行 ECL 检测。由于钌化合物配体较大的芳香环具有嵌入 DNA 双链结构的性能,即不需要化学反应就可以与 DNA 结合。因此,在不存在 ATP 的情况下,DNA 单链与部分 DNA 双链相互间不结合,因此很少有 DNA 双链存在于电极表面,也就很少有钌化合物到达电极表面,因此不产生或产生微弱的 ECL 信号;当有 ATP 存在时,在 ATP 诱导下 DNA 单链与部分 DNA 双链及 ATP 结合,在电极表面形成复合物。作为 ECL 探针,钌化合物通过嵌入 DNA 双链结构到达电极表面,产生较强的 ECL 信号,实现了对 ATP 的检测。本发明提供的检测方法无需使用化学标记,方法简单。

### 具体实施方式

[0027] 下面对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0028] 本发明公开了一种 ATP 含量的检测方法,包括以下步骤:

[0029] 提供表面固定有 DNA 单链的金电极,所述 DNA 单链序列如 SEQ ID No. 1 所示;

[0030] 提供部分 DNA 双链,所述部分 DNA 双链中第一链 3' 末端如 SEQ ID No. 2 所示,其 5' 末端与第二链互补;

[0031] 所述金电极浸入所述部分 DNA 双链与待测样品的混合液;

[0032] 以  $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 、 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$  或  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$  作为电化学发光探针对所述金电极进行 ECL 检测。

[0033] 本发明中,所述表面固定有 DNA 单链的金电极优选按如下方法制备:将直径为 2~5mm 金电极浸入 DNA 单链溶液中,反应 0.5~2 小时,得到表面固定有 DNA 单链的金电极。所述 DNA 单链与所述部分 DNA 双链中第一链 3' 末端如 SEQ ID No. 2 所示的序列构成 ATP 适配体,所述 ATP 适配体序列为 5'-ACC TGG GGG AGT ATT GCG GAG GAA GGT-3',如 SEQ ID No. 4 所示。所述固定通过 DNA 单链 5' 末端修饰巯基固定。DNA 单链 5' 末端修饰巯基后为:5' HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-ACCTGGGGGAGTAT-3'。

[0034] 所述部分 DNA 双链优选按照如下方法制备:

[0035] 将 ATP 适配体分成两个序列,分别如 SEQ ID No. 1 和 SEQ ID No. 2 所示。以 SEQ ID No. 2 作为部分 DNA 双链中第一链 3' 末端,部分 DNA 双链中第一链的 5' 末端与第二链互补,所述第一链 5' 末端与其 3' 末端以及所述 DNA 单链不相同且不互补。所述部分 DNA 双链中第一链序列优选为 3'-TGG AAGGAG GCG TCA AGT TTT TCT AGT CTA TTA TTC-5'。所述第二链优选含有 20~23 个碱基,更优选其序列为 5'-CA AAA AGA TCA GAT AAT AAG-3',如 SEQ ID No. 3 所示。

[0036] 按照本发明,还包括:将所述金电极浸入所述部分 DNA 双链与待测样品的混合液。所述金电极浸入所述混合液中时间优选为 0.5~3 小时,更优选为 0.5~1 小时。在不存在 ATP 的情况下,所述 DNA 单链与所述部分 DNA 双链相互间不结合,因此很少有 DNA 双链存在于电极表面;当有 ATP 存在时,在 ATP 诱导下 DNA 单链和 DNA 双链及 ATP 结合,在电极表面形成复合物。

[0037] 将金电极浸入混合液中后,以  $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 、 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$  或  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$  作为电化学发光探针对所述金电极进行 ECL 检测。所述用电化学发光探针对所述在待检测液中浸过的金电极的检测时间优选为 0.5~3 小时,更优选为 1~2 小时。由于钌化合物配体较大的芳香环具有嵌入 DNA 双链结构的性能,即不需要化学反应就可以与 DNA 结合,因此,在不存在 ATP 的情况下,所述 DNA 单链与所述部分 DNA 双链相互间不结合,因此很少有 DNA 双链存在于电极表面,也就很少有钌化合物到达电极表面,因此不产生或产生微弱的 ECL 信号;当有 ATP 存在时,在 ATP 诱导下 DNA 单链和部分 DNA 双链及 ATP 结合,在电极表面形成复合物。作为 ECL 探针,钌化合物通过嵌入 DNA 双链结构到达电极表面,产生较强的 ECL 信号,实现了对 ATP 的检测。本发明不需要采用将探针分子标记在 DNA 上的方法,方法简单,实现了对 ATP 的检测。

[0038] 所述对金电极进行检测以草酸盐或胺类化合物作为共反应剂,所述胺类化合物优选为三丙胺 (TPA) 或 2-二丁基乙醇胺。所述共反应剂具有增强检测信号的作用。

[0039] 本发明还提供一种 ATP 适配体传感器,包括:

[0040] 电化学发光探针,所述电化学发光探针为  $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ 、 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$  或  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ ;

[0041] 表面固定有 DNA 单链的金电极,所述 DNA 单链序列如 SEQ ID No. 1 所示;

[0042] 部分 DNA 双链,所述部分 DNA 双链中第一链 3' 末端如 SEQ ID No. 2 所示,其 5' 末端与第二链互补。

[0043] 所述 DNA 单链优选通过其 5' 末端修饰巯基固定于金电极。

[0044] 按照本发明,还包括草酸盐或胺类化合物作为共反应剂,所述胺类化合物为二丙胺或 2-二丁基乙醇胺。

[0045] 为了进一步说明本发明的技术方案,下面结合实施例对本发明优选实施方案进行描述,但是应当理解,这些描述只是为进一步说明本发明的特征和优点,而不是对本发明权利要求的限制。

[0046] 实施例 1

[0047] 将含有 ATP 适配体链分成两个序列,如 SEQ ID No. 1 和 SEQ ID No. 2 所示,分别为 DNA 单链和部分 DNA 双链中第一链 3' 末端;

[0048] 提供部分 DNA 双链中第二链,如 SEQ ID No. 3 所示,DNA 双链中第二链与所述部分 DNA 双链中第一链 5' 末端互补,形成部分 DNA 双链 (part ds-DNA)。

[0049] 实施例 2

[0050] 在 DNA 单链的 5' 末端修饰巯基后,得到序列 5' HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-ACCTGGGGGAGTAT-3' ;

[0051] 将金电极 (直径 3mm) 浸入 5 μ M 的实施例 1 制备的 DNA 单链的溶液中,1 小时后取出;

[0052] 将所述金电极经冲洗后置于 10mM 巯基己醇 (MCH) 溶液中,放置 30 分钟;

[0053] 将上述在巯基己醇 (MCH) 溶液中放置的金电极浸入 5 μ M 实施例 1 制备的 part ds-DNA 和 5 μ M ATP 的混合溶液中,反应 30 分钟后取出;

[0054] 最后,将所述金电极置于 20mM Ru(phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 溶液中反应 1h。

[0055] ECL 检测在 0.2M 磷酸缓冲液 (PBS) (pH 7.5, 含 20mM 草酸盐作为共反应剂) 中进行,循环伏安扫描在 0-1.3 伏范围内进行,扫速 0.05 伏 / 秒。

[0056] 实施例 3

[0057] 在 DNA 单链的 5' 末端修饰巯基后,将金电极 (直径 3mm) 浸入 5 μ M 实施例 1 制备的 DNA 单链溶液中,1 小时后取出;

[0058] 将所述金电极经冲洗后置于 10mM 巯基己醇 (MCH) 溶液中,放置 30 分钟;

[0059] 将上述在巯基己醇 (MCH) 溶液中放置的金电极浸入 5 μ M 实施例 1 制备的 part ds-DNA 和 10 μ M ATP 的混合溶液中,反应 30 分钟后取出;

[0060] 最后,将所述金电极置于 20mM Ru(phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 溶液中反应 1h。

[0061] ECL 检测在 0.2M PBS (pH 7.5, 含 20mM 草酸盐作为共反应剂) 中进行,循环伏安扫描在 0-1.3 伏范围内进行,扫速 0.05 伏 / 秒。

[0062] 实施例 4

[0063] 在 DNA 单链的 5' 末端修饰巯基后,将金电极 (直径 3mm) 浸入 5 μ M 实施例 1 制备的 DNA 单链溶液中,1 小时后取出;

[0064] 将所述金电极经冲洗后置于 10mM 巯基己醇 (MCH) 溶液中,放置 30 分钟;

[0065] 将上述在巯基己醇 (MCH) 溶液中放置的金电极浸入 5 μ M 实施例 1 制备的 part ds-DNA 和 100 μ M ATP 的混合溶液中,反应 30 分钟后取出;

[0066] 最后,将所述金电极置于 20mM Ru(phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 溶液中反应 1h。

[0067] ECL 检测在 0.2M PBS (pH 7.5, 含 20mM 草酸盐作为共反应剂) 中进行,循环伏安扫描在 0-1.3 伏范围内进行,扫速 0.05 伏 / 秒。

[0068] 实施例 5

[0069] 在 DNA 单链的 5' 末端修饰巯基后, 将金电极 (直径 3mm) 浸入 5  $\mu$  M 实施例 1 制备的 DNA 单链溶液中, 1 小时后取出;

[0070] 将所述金电极冲洗后置于 10mM 巯基己醇 (MCH) 溶液中, 放置 30 分钟;

[0071] 将上述在巯基己醇 (MCH) 溶液中放置的金电极浸入 5  $\mu$  M 实施例 1 制备的 part ds-DNA 和 500  $\mu$  M ATP 的混合溶液中, 反应 30 分钟后取出;

[0072] 最后, 将所述金电极置于 20mM Ru(phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 溶液中反应 1h。

[0073] ECL 检测在 0.2M PBS(pH 7.5, 含 20mM 草酸盐作为共反应剂) 中进行, 循环伏安扫描在 0-1.3 伏范围内进行, 扫速 0.05 伏 / 秒。

[0074] 实施例 6

[0075] 在 DNA 单链的 5' 末端修饰巯基后, 将金电极 (直径 3mm) 浸入 5  $\mu$  M 实施例 1 制备的 DNA 单链溶液中, 1 小时后取出;

[0076] 将所述金电极冲洗后置于 10mM 巯基己醇 (MCH) 溶液中, 放置 30 分钟;

[0077] 将上述在巯基己醇 (MCH) 溶液中放置的金电极浸入 5  $\mu$  M part ds-DNA 和 1000  $\mu$  M ATP 的混合溶液中, 反应 30 分钟后取出;

[0078] 最后, 将所述金电极置于 20mM Ru(phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 溶液中反应 1h。

[0079] ECL 检测在 0.2M PBS(pH 7.5, 含 20mM 草酸盐作为共反应剂) 中进行, 循环伏安扫描在 0-1.3 伏范围内进行, 扫速 0.05 伏 / 秒。

[0080] 对实施例 2 ~ 6 中对不同浓度的 ATP 进行检测的检测结果为: ECL 响应变化值  $\Delta I_{ECL}$  随着 ATP 浓度的增大而增大, 在  $6.4 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-3}$  M 范围内呈线性响应, 其 ECL 变化值和浓度的线性响应方程为:  $\Delta I_{ECL}(\text{a. u.}) = 7.7714C_{ATP}(\mu\text{M}) + 314.04$ , 相关系数为 0.9986, 检测限为 0.64  $\mu$  M。

[0081] 从上述实施例可以看出, 本发明提供一种 ATP 的检测方法, 利用了钌化合物配体较大的芳香环能嵌入到双链 DNA 凹槽的特性, 无需使用将探针分子化学标记到 DNA 上的方法, 实现对 ATP 的检测, 方法简单。

[0082] 对所公开的实施例的上述说明, 使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的, 本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下, 在其它实施例中实现。因此, 本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例, 而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

[0001]

## 序 列 表

## SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院长春应用化学研究所

<120> ATP 含量的检测方法及 ATP 适配体传感器

<130> MP1004752

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

acctggggga gtat

14

<210> 2

<211> 13

<212> DNA

[0002]



<213> 人工序列

<400> 2

tgccgaggaa ggt

13

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

caaaaagatc agataataag

20

<210> 4

<211> 27

<212> DNA