

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810051391.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

[43] 公开日 2009年3月25日

[11] 公开号 CN 101393201A

[22] 申请日 2008.11.6

[21] 申请号 200810051391.4

[71] 申请人 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所

地址 130033 吉林省长春市东南湖大路16号

[72] 发明人 孔祥贵 张友林 曾庆辉 孙雅娟
刘晓敏

[74] 专利代理机构 长春菁华专利商标代理事务所
代理人 赵炳仁

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

[54] 发明名称

多生物靶标快速检测系统及其应用

[57] 摘要

本发明涉及一种能够同时实现对多种生物靶标进行检测的多生物靶标快速检测系统，包括倏逝波光纤生物传感器和具有荧光标记的识别生物分子溶液，在所述的倏逝波光纤生物传感器的一根光纤探针的表面上阵列式分区植被多种捕获生物分子，所述的具有荧光标记的识别生物分子溶液是用不同粒径的量子点分别标记的多种识别生物分子的混合溶液。实现了单根光纤探针的多生物靶标的检测，缩短了多种生物靶标多次检测所需要的时间；并克服了多种荧光染料进行多生物标记时产生的荧光光谱重叠难于分辨的而不能识别的问题。

1. 一种多生物靶标快速检测系统，包括倏逝波光纤生物传感器和具有荧光标记的识别生物分子溶液，其特征在于，在所述的倏逝波光纤生物传感器的一根光纤探针的表面上阵列式分区植被多种捕获生物分子，所述的具有荧光标记的识别生物分子溶液是用不同粒径的量子点分别标记的多种识别生物分子的混合溶液。

2. 根据权利要求 1 所述的检测系统，其特征在于：所述量子点是指能够发射荧光的具有核壳结构的纳米粒子，其核壳由半导体材料包覆而成，其核心部分为 CdS、CdSe、CdTe、PbS 或 PbSe。

3. 权利要求 1 所述的多生物靶标快速检测系统在快速检测多种生物分子中的应用，其特征是将权利要求 1 所述的倏逝波光纤生物传感器的光纤探针放入待测溶液中，如果该溶液中存在与光纤探针上捕获生物分子同种的生物分子，由于生物分子的特异性结合而被捕获形成复合分子；然后再将光纤探针放入权利要求 1 所述的识别生物分子溶液中，该溶液中的识别生物分子与光纤生物探针上的相应的复合分子结合，则将标记在识别分子上的量子点固定在光纤生物探针上，在倏逝波光纤生物传感器上即可根据不同粒径量子点发射不同的荧光来同时判定得知被测溶液中多种生物分子的存在。

多生物靶标快速检测系统及其应用

技术领域

本发明涉及可广泛适用于分子生物学、生物医学、食品检验、生物战剂和环境监测等领域的生物检测装置，特别是一种能够同时实现对多种生物靶标，如细菌、生物战剂分子、病毒、脱氧核糖核酸（DNA）、多肽、抗原抗体等生物分子进行检测的快速检测系统。

背景技术

目前，广泛使用的基于倏逝波光纤生物传感器的生物检测系统，是采用光波在光纤内以全反射方式传输过程中产生的倏逝波激发以生物亲和反应而结合于光纤探针表面生物分子上标记的荧光染料。把表面固定了一种捕获生物分子的光纤探针置于被检测样品中，该样品中如果存在与固定在光纤探针表面的生物分子同种生物物质，则两者将发生亲和反应形成复合分子，样品中的被测生物分子则结合到光纤探针的表面。然后再把该光纤探针置于具有荧光染料标记的识别生物分子溶液中，同样两者也会发生特异反应，该溶液中的识别生物分子与光纤生物探针上的复合分子结合，则将荧光染料固定于光纤探针的表面。通过倏逝波激发光纤探针表面倏逝波场范围内的荧光染料，从而检测被检测分子的生物物质的属性及其含量。一根光纤只能探测样品中的一种生物物质的属性及其含量，而将多根光纤同时置于一个被测样品中，才能实现同时探测该样品中多种生物物质的属性及其含量。目前的多生物靶标检测，均通过多根光纤探针和多个识别生物分子溶液的组合来实现对于多个生物靶标检测；现有的另外一种多靶标检测的方式，是通过单探头来实现的。但是此种仪器需要多种光源，以及复杂的光路系统，到目前为止，最多

只能实现双靶标检测。因此目前的多靶标检测仪器系统复杂，价格昂贵，灵敏度低。导致上述问题的产生，都是由于用于标记生物分子的荧光染料荧光谱线宽、激发谱线窄和荧光易漂白的缺点，不同种染料分子只能用不同波长光激发所带来的。导致了当前基于倏逝波的光纤生物传感器不能实现单探针多生物靶标的快速检测和实时监测。

发明内容

本发明的目的在于：为克服上述已有技术的缺点，以实现对含有多种生物分子的混合溶液能同时进行检测及实时监测，提出一种多生物靶标快速检测系统。其操作简单、结果直观、检测费用低廉。

本发明多生物靶标快速检测系统，包括倏逝波光纤生物传感器和具有荧光标记的识别生物分子溶液，在所述的倏逝波光纤生物传感器的一根光纤探针的表面上阵列式分区植被多种捕获生物分子，所述的具有荧光标记的识别生物分子溶液是用不同粒径的量子点分别标记的多种识别生物分子的混合溶液。

本发明多生物靶标快速检测系统在快速检测多种生物分子中的应用，是将所述的倏逝波光纤生物传感器的光纤探针放入待测溶液中，如果该溶液中存在与光纤探针上捕获生物分子同种的生物分子，由于生物分子的特异性结合而被捕获形成复合分子；然后再将光纤生物探针放入所述的识别生物分子溶液中，该溶液中的识别生物分子与光纤生物探针上的相应的复合分子结合，则将其标记的量子点固定在光纤探针上，即可同时根据不同粒径量子点发射不同的荧光来同时判定得知被测溶液中多种生物分子的存在。所述的量子点（或称为半导体纳米晶体）是指能够发射荧光的具有核壳结构的纳米粒子，其核壳由半导体材料包覆而成，其核心部分为 CdS、CdSe、CdTe、PbS 或 PbSe，其发光颜色因大小不同而异。

由于生物分子的特异结合性，被测溶液中的多种生物分子与一根生物探

针上的相应活性捕获生物分子相结合，而形成复合分子，然后将光纤探针放入具有多种识别生物分子溶液中，识别溶液中的与光纤探针上的相应的复合分子结合，即将标记于相应识别生物分子上的量子点固定在光纤探针上。实现同时根据不同大小粒径发射不同的荧光来观测溶液中多种生物分子的存在和根据不同粒径大小的量子点的荧光强度的变化演示多元分子的反应过程。

本发明与现有技术相比具有以下优点：

1. 实现了单根光纤探针的多生物靶标的检测：(1)、由于采用荧光谱线窄、激发光谱线宽和荧光稳定的量子点替代了常规使用的荧光谱线宽、激发光谱线窄和荧光易漂白的荧光染料进行生物标记，从而克服了多种荧光染料进行多生物标记时产生的荧光光谱重叠难于分辨的而不能识别的问题；(2)、单根光纤探针上阵列式分区植被多种生物分子，克服了一根光纤探针只能植被一种生物分子，因而单根光纤只能检测一种生物靶标的难题。

2. 实现了单根光纤生物传感器多生物靶标的快速检测。由于多生物靶标采用不同粒径尺寸的量子点进行荧光标记和单根光纤探针植被了相应的多种异性靶标生物分子，因此，极大地缩短了多种生物靶标多次检测所需要的时间。

3. 光纤生物传感器整体仪器结构得到了简化，便于仪器的小型化和微型化。由于标记多种识别生物分子发射不同波长的量子点同一激发波长即可激光，取代了现有技术中标记生物分子的染料需不同波长激发的方式；多种生物靶标采用单根光纤探针代替现有技术中的多根光纤探针分别检测的方法。极大地简化了仪器整体化的结构，实现了仪器结构的小型化和微型化。

4. 极大的降低了检测成本。

用于本发明多生物靶标快速检测系统的倏逝波光纤生物传感器的光纤探针的制作方法，包括以下步骤：

1、对光纤探针表面进行光刻处理，做成矩阵式分布的凹陷表面单元；

- a. 用常规的方法在制版玻璃上镀 Cr 膜，由图形发生器生成所需矩阵图案，经过感光、显影，制成矩阵式模板；
- b. 用 CVD 法，在上述光纤探针表面上生成 SiO_2 膜层；
- c. 按常规方法在 SiO_2 膜层上涂感光胶、固化、加掩膜、光照、显影，以去除矩阵间隔部分的 SiO_2 ；
- d. 按常规方法将上述方法得到的纤芯用碱腐蚀，使间隔部分绒面化，其中 NaOH 碱腐蚀液浓度为 20%，在 80℃ 条件下，腐蚀 10 分钟；
- e. 用 H_2SO_4 : H_2O_2 , 4: 1V/V 的清晰液，清洁表面；

2、表面亲水化处理：

将上述得到的表面矩阵化的光纤探针表面先在清洗液 1 中清洗 30 分钟，再在清洗液 2 中清洗 30 分钟，然后在清洗液 3 中煮沸 10 分钟，制备出在表面矩阵化的光纤探针上具有亲水的极化层。

所述清洗液 1 为：浓 HCl:乙醇=1:1 (V/V)

清洗液 2 为：浓硫酸

清洗液 3 为：超纯水

3、捕获生物分子层的制备：

将上述处理好的光纤探针表面矩阵化格点上分别用加样枪滴加不同种类的捕获生物分子溶液，使不同生物分子自然吸附在格点表面上持续 1 小时，然后用去离子水洗净，即得到活性捕获生物分子层；

用于本发明多生物靶标快速检测系统的具有荧光标记的识别生物分子溶液的制备方法，包括以下步骤：

- a. 表面含有氨基集团的量子点与识别生物分子的偶联：

以戊二醛与量子点的摩尔浓度比 300—500: 1 来配制溶液，目的在于使体系中形成一种活性比较高的中间体，可以和随后加入的识别分子上的氨基反应。

b. 表面含有羧基集团的量子点与识别生物分子的偶联:

向量子点溶液中以量子点: EDC: NHS=1: 1000: 100 的比例加入 EDC 和 NHS, 目的在于使体系中形成一种活性比较高的中间体, 可以和随后加入的识别分子上的氨基反应。

采用本发明多生物靶标快速检测系统进行生物分子探测按如下步骤进行:

将上述的生物探针浸入待测的混合溶液, 经过一定反应时间后, 溶液中的检测生物分子与探针表面上相应格点上的同种捕获生物分子特异性结合, 形成分子复合物; 然后把光纤探针再浸入上述不同粒径量子点一一对应标记的识别生物分子的混合溶液中, 把相应粒径的量子点固定于探针的表面上。然后将光纤探针通过透镜耦合到倏逝波光纤检测系统, 利用在光纤中以全反射方式传播的激光产生的倏逝波激发探针表面的量子点, 使其发光, 通过不同粒径大小产生不同颜色的光, 来识别溶液中含有哪几种物质; 通过不同颜色光的荧光强度来识别溶液中所含物质的含量。

附图说明

图 1 双靶标得到的结果示意图;

图 2 三靶标得到的结果示意图。

具体实施方式

以下结合实施例对本发明作进一步详细描述。

本发明多生物靶标快速检测系统, 包括倏逝波光纤生物传感器和具有荧光标记的识别生物分子溶液, 在所述的倏逝波光纤生物传感器的一根光纤探针的表面上阵列式分区捕获多种生物分子, 所述的具有荧光标记的识别生物分子溶液是用不同粒径的量子点分别标记的多种识别生物分子的混合溶液。

实施例 1

制备能同时检测 2 种靶标生物分子的光纤探针和与其相应的识别生物分子溶液。

(1) 光纤探针的表面处理：光纤的总长为 100mm，其中光纤芯长为 50mm，光纤纤芯的材料为石英，直径为 1mm，包层材料为有机硅，它们在使用波长下的折射率分别为 1.514 和 1.41，所以光纤的数值孔径为 0.367，在纤芯表面进行光刻，制备矩阵化表面：

- a. 在制版上：Cr 膜+感光胶，由图形发生器生产 3.14X3.14mm 方格，间隔 1mm 矩阵周期图案；感光、显影，制成矩阵式掩膜；
- b. CVD 法，在纤芯表面生成 250nm SiO₂ 膜层；
- c. 在纤芯表面上涂感光胶、固化、加掩膜、光照、显影，以去除矩阵间隔部分的 SiO₂；
- d. NaOH 碱腐蚀液浓度为 20%，在 80℃条件下，腐蚀 10 分钟，使间隔部分绒面化；
- e. CVD 生长 SiO₂ 减反射层，约 150nm；
- f. 去掩膜、光照、显影，去除矩阵格点处的 SiO₂；
- g. 用浓 H₂SO₄: H₂O₂=4: 1 V/V, 清洁表面；

(2) 表面亲水极化处理：

将上述得到的表面矩阵化的纤芯表面先在清洗液 1 中清洗 30 分钟，再在清洗液 2 中清洗 30 分钟，然后在清洗液 3 中煮沸 10 分钟，制备出在表面矩阵化的纤芯上具有亲水的极化层。

其中清洗液 1 为：浓 HCl:乙醇=1:1 (V/V)

清洗液 2 为：浓硫酸

清洗液 3 为：超纯水

(3) 捕获分子层的制备

将上述表面亲水化处理具有矩阵化表面的纤芯，在其格点表面上分别滴

加 BSA, IgG, 蛋白质溶液 (1mg/ml), 使不同蛋白分子自然吸附在上述对应的格点表面上, 持续 30 分钟时间, 然后洗净, 即形成了检测上述两种蛋白抗体的双靶标蛋白质探针。

(4) 制备量子点标记的识别分子

选择发光波长在 525nm 和 585nm 的两种量子点, 其表面含有羧基, 浓度为 10^{-7} M 的量子点溶液, 各向发光在在 525nm 和 585nm 的两种量子点中分别加入 20 μ L 0.05M 的 NHS 以及同样体积的 0.5M 的 EDC 溶液, 搅拌 30—60 分钟; 之后向发光在 525nm 的量子点溶液中加入 10^{-7} — 5×10^{-7} M 的 BSA 抗体, 向发光在 585nm 的量子点溶液中加入同样浓度的 IgG 抗体。即得到不同量子点标记的识别分子。

(5) 应用上述两种蛋白抗体的多靶标生物探针进行生物分子检测;

将该探针浸入含有 525nm 标记的识别分子溶液, 或 585nm 标记的识别分子溶液, 或两种的混合溶液, 经过一定反应时间后探针表面上的相应格点上的特定生物分子与对应溶液中的抗体分子特异性结合, 使得量子点固定在探针的表面。量子点的发光通过倏逝波光纤生物传感器系统检测到, 如果两种抗体都存在, 则会得到图 1 所示光谱图。

实施例 2

制备能同时检测 3 种靶标生物分子的光纤探针和与其相应的识别生物分子溶液。

完全按照实施例 1 的工艺制备出亲水化的探针后, 完成三种分析物的检测:

(1) 捕获生物分子层的制备:

将上述表面亲水化处理具有矩阵化表面的纤芯, 在其格点表面上分别滴加 BSA, IgG, HBs 蛋白质溶液 (1mg/ml), 使不同蛋白分子自然吸附在上述对应的格点表面上, 持续 30 分钟时间, 然后洗净, 即形成了检测上述三种蛋白

抗体的多靶标蛋白质探针。

(2) 制备量子点标记的识别生物分子:

选择发光波长在 525nm、585nm 和 650nm 的三种量子点，其表面含有羧基，浓度为 10^{-7} M 的量子点溶液，各向发光在在 525nm、585nm 和 650nm 的三种量子点中分别加入 20 μ L 0.05M 的 NHS 以及同样体积的 0.5M 的 EDC 溶液，搅拌 30—60 分钟；之后向发光在 525nm 的量子点溶液中加入 10^{-7} — 5×10^{-7} M 的 BSA 抗体，向发光在 585nm 的量子点溶液中加入同样浓度的 IgG 抗体，向发光在 650nm 的量子点溶液中加入同样浓度的乙肝表面抗体。即得到不同量子点标记的识别分子。

(3) 应用上述三种蛋白抗体的多靶标生物探针进行生物分子检测:

将该探针浸入含有 525nm 标记的识别分子溶液，585nm 标记的识别分子溶液，650nm 标记的分子溶液或三种的混合溶液，经过一定反应时间后探针表面上的相应格点上的特定生物分子与对应溶液中的抗体分子特异性结合，使得量子点固定在探针的表面。量子点的发光通过倏逝波光纤生物传感器系统检测到，如果三种抗体都存在，则会得到图 2 所示光谱图。

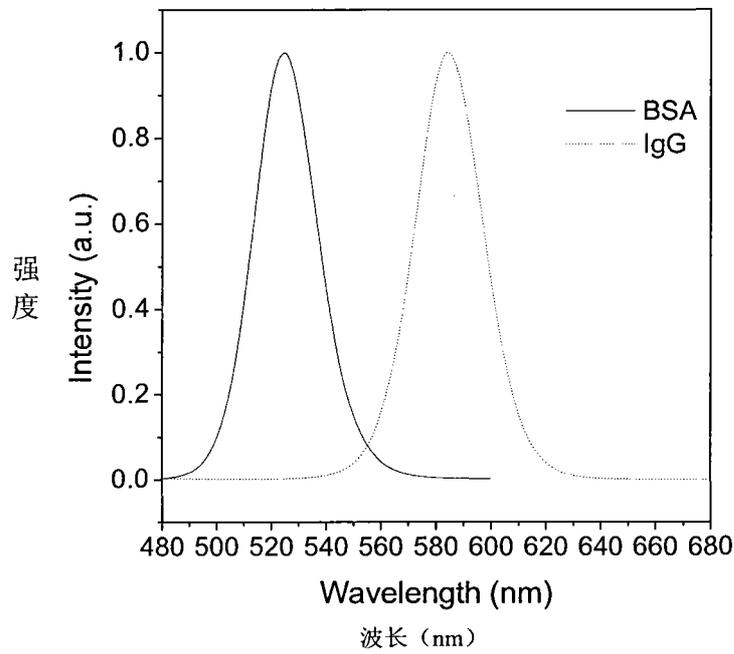


图 1

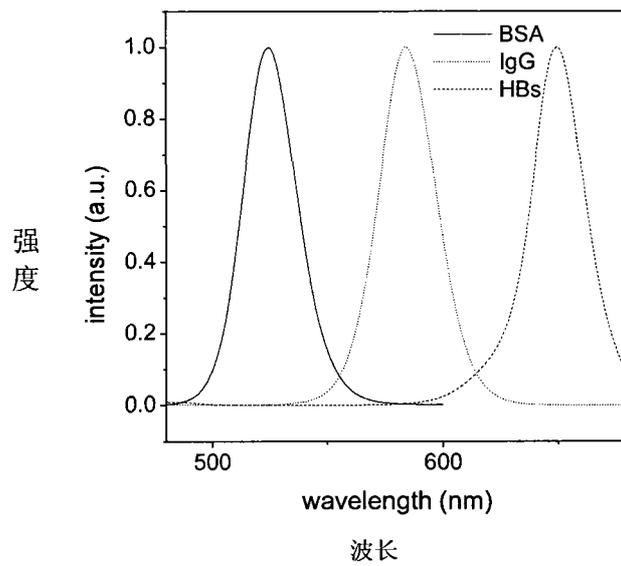


图 2