



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102260745 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 30

(21) 申请号 201110212461. 1

(22) 申请日 2011. 07. 27

(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  
3888 号

(72) 发明人 刘晓敏 孔祥贵 涂浪平 张友林  
曾庆辉

(74) 专利代理机构 长春菁华专利商标代理事务  
所 22210

代理人 南小平

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

C12N 15/11 (2006. 01)

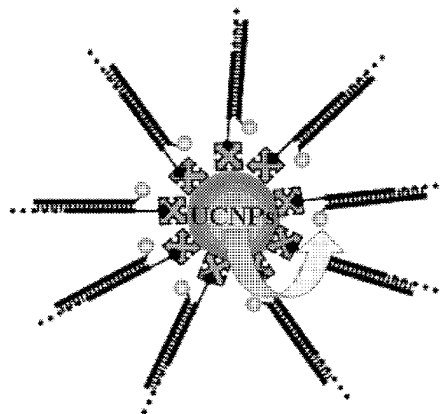
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 2 页

### (54) 发明名称

上转换纳米粒子标记适配子的荧光生物探针

### (57) 摘要

本发明上转换纳米粒子标记适配子的荧光生物探针属于生物分子检测技术领域。为了克服现有 QDs 标记适配子的生物探针所存在的技术问题,包括导致靶分子所在生物体核酸的损伤, QDs 的高背景信号、潜在毒性、“blinking”效应和化学不稳定性,提供一种上转换纳米粒子标记适配子的荧光生物探针,包括由上转换纳米粒子作为荧光供体标记的适配子,和与适配子互补的 DNA 链, DNA 链上连接有可与荧光供体发生 FRET 效应作为荧光受体的染料分子。本发明使用的荧光供体为 UCNP,其优点为低背景信号、无毒、无“blinking”效应并且化学稳定性强。



1. 上转换纳米粒子标记适配子的荧光生物探针,包括由荧光供体标记的适配子,和与适配子互补的 DNA 链,DNA 链上连接有可与荧光供体发生 FRET 效应的染料分子作为荧光受体,其特征在于,由上转换纳米粒子作为荧光供体。

2. 根据权利要求 1 所述的上转换纳米粒子标记适配子的荧光生物探针,其特征在于,所述的上转换纳米粒子是水溶性的。

3. 根据权利要求 1 所述的上转换纳米粒子标记适配子的荧光生物探针,其特征在于,上转换纳米粒子与适配子以亲和素和生物素连接。

4. 根据权利要求 1 所述的上转换纳米粒子标记适配子的荧光生物探针,其特征在于,所述上转换纳米粒子为  $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Er}$ 、 $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Tm}$ 、 $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Ho}$ 、 $\text{LaF}_3:\text{Yb, Er}$ 、 $\text{LaF}_3:\text{Yb, Tm}$  或  $\text{LaF}_3:\text{Yb, Ho}$  中的一种。

## 上转换纳米粒子标记适配子的荧光生物探针

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物分子检测技术领域,具体地,本发明涉及上转换纳米粒子(UCNPs)标记适配子的荧光生物探针。

### 背景技术

[0002] 适配子是一类特殊的核苷酸链,它针对多数靶分子具有高特异性和高亲合力,诸如有机染料分子、氨基酸、抗生素、蛋白,甚至整个细胞和微生物病原菌。适配子是通过在一个合成的随机序列寡核苷酸库中,以指数富集配基的系统进化过程方式经反复地洗脱、收集和再扩增而筛选制备出来。与传统抗体相比而言,适配子作为生物传感识别元件具有很多优异的特性。比如尺寸小、制备过程简单、保存期长、再生和化学修饰容易。其中最重要的是适配子能够折叠成多变的三级结构,通过氢键、范德华力和碱基堆积力的作用,以构象互补的方式与靶分子相互作用,这一过程的特点是借助靶分子构象变化,实现靶分子检测。这一特点使得适配子生物探针的设计灵活和简便。

[0003] 目前,用来标记适配子作为荧光供体的物质主要分为两类:荧光素类(如 FAM, FITC)、罗丹明类(如 TRITC, TAMRA)、花菁类(如 Cy3, Cy5)等染料分子和半导体量子点。

[0004] 荧光素类(如 FAM, FITC)、罗丹明类(如 TRITC, TAMRA)及花菁类(如 Cy3, Cy5)等染料分子,作为荧光供体标记适配子形成的生物探针,是通过被标记的适配子与靶分子之间荧光各向异性的改变,来揭示适配子与靶分子之间的相互作用过程。但是,这类用于标记适配子的染料分子荧光性质极易受附近溶液环境以及其它分子的影响,导致荧光性质不稳定,会影响其检测灵敏度。另外,荧光染料分子的激发谱带窄、发射荧光谱带宽,并且荧光不稳定,这些缺陷使适配子生物探针在实际应用中在诸多方面受到了很大限制。

[0005] 后来人们使用半导体量子点(QDs)代替染料分子作为荧光供体,采用 QDs 标记适配子制备生物探针。所制备的生物探针其具体结构如下:核心区域为 QDs, QDs 以亲和素和生物素连接适配子,适配子上连接有与之互补的 DNA 链,在 DNA 链上连接有可与 QDs 发生 FRET 效应的染料分子作为荧光受体。但是, QDs 在实际的生物应用中需要用紫外等短波长激发光激发,这种激发光会导致靶分子所在生物体核酸的损伤。而且, QDs 还存在高背景信号、潜在毒性、“blinking”效应和化学不稳定性等不足。

### 发明内容

[0006] 为了克服现有 QDs 标记适配子的生物探针所存在的技术问题,包括导致靶分子所在生物体核酸的损伤, QDs 的高背景信号、潜在毒性、“blinking”效应和化学不稳定性,提供一种上转换纳米粒子标记适配子的荧光生物探针。

[0007] 上转换纳米粒子标记适配子的荧光生物探针,包括由荧光供体标记的适配子,和与适配子互补的 DNA 链, DNA 链上连接有可与荧光供体发生 FRET 效应作为荧光受体的染料分子,其特征在于,由上转换纳米粒子作为荧光供体。

[0008] 本发明其效果在于,本发明所述的生物探针,由于标记适配子的 UCNPs 与染料分

子靠的很近,满足 FRET 效应的距离要求。这时,在 980nm 光的激发下,UCNPs 与染料分子发生 FRET 效应,相应的荧光信号可以被检测到。当体系中加入序列可以与适配子序列互补的靶分子时,由于适配子结合靶分子的能力要强于与之互补的 DNA 链,互补的双链结构就会被破坏,连接染料分子的 DNA 链就会脱离适配子,染料分子也就远离了 UCNPs,这样 FRET 效应减弱,相应的荧光信号发生变化。

[0009] 本发明与现有 QDs 标记适配子的生物探针相比,具有如下优点:

[0010] (1) 利用近红外光 (980nm) 激发得到 535nm 和 650nm 的上转换光,可避免高能量的激发光 (紫光或蓝光) 对被检测生物体核酸的损伤,同时也可避免生物体自荧光,这将会大大提高检测灵敏度和图像的清晰度。

[0011] (2) 本发明使用的荧光供体为 UCNPs,其优点为低背景信号、无毒、无“blinking”效应并且化学稳定性强。

[0012] (3) 使用本发明上转换纳米粒子标记适配子的荧光生物探针不需要昂贵的超短脉冲激光器。

[0013] (4) 采用 UCNPs 作为荧光供体,其发光具有光学稳定性强、发光谱线窄、发光能级寿命长等特点。

[0014] (5) 对于荧光信号的分析检测时间短和不需要昂贵的分辨仪器。

[0015] (6) 和 QDs 相比,UCNPs 具有高的稳定性,在激发的情况下不产生单态氧成分,不会造成被检测生物样本的损伤。

#### 附图说明

[0016] 图 1 为现有技术中 QDs 标记适配子生物探针的示意图;

[0017] 图 2 为本发明上转换纳米粒子标记适配子的荧光生物探针的结构示意图;

[0018] 图 3 为本发明上转换纳米粒子标记适配子的荧光生物探针对 ATP 的检测效果图。

#### 具体实施方式

[0019] 具体实施方式一:结合图 2 说明本实施方式,上转换纳米粒子标记适配子的荧光生物探针,包括由荧光供体标记的适配子,和与适配子互补的 DNA 链,DNA 链上连接有可与荧光供体发生 FRET 效应作为荧光受体的染料分子,由 UCNPs 作为荧光供体,本实施方式所述 UCNPs 为  $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Er}$ 、 $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Tm}$ 、 $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Ho}$ 、 $\text{LaF}_3:\text{Yb, Er}$ 、 $\text{LaF}_3:\text{Yb, Tm}$  或  $\text{LaF}_3:\text{Yb, Ho}$  中的一种,本实施方式所述的 UCNPs 是水溶性的,本实施方式所述的 UCNPs 与适配子以亲和素和生物素连接。

[0020] 具体实施方式二:结合图 2 和图 3 说明本实施方式,本实施方式为具体实施方式一所述的上转换纳米粒子标记适配子的荧光生物探针的制备方法:

[0021] (1) 制备 UCNPs:将 0.272 克  $\text{CF}_3\text{COONa}$ ,0.376 克  $\text{Y}(\text{CF}_3\text{COO})_3$ ,0.113 克  $\text{Yb}(\text{CF}_3\text{COO})_3$  和 0.055g 克  $\text{Er}(\text{CF}_3\text{COO})_3$  溶解于 10ml 的油胺中,置入三颈瓶中,在氩气保护下,100℃ 搅拌 30 分钟,逐步升温至 320℃ 并保持 1 小时。产物离心分离,并用环己烷超声洗涤,得到 UCNPs 的环己烷溶液。

[0022] (2) 利用氨基磷酸对步骤 (1) 制备出的 UCNPs 进行水相转移:称取 0.13 克氨基磷酸分散于 5ml 乙醇中,向其中滴加 3mlUCNPs 的环己烷溶液,室温搅拌 24 小时,产物用乙醇

离心洗涤,并分散于 PBS 溶液,得到 UCNP<sub>s</sub> 晶体分散于 PBS 的胶体溶液。

[0023] (3) 将亲合素加入到步骤 (2) 所得到的产物中,生成连有亲和素的 UCNP<sub>s</sub>:取 2mL 步骤 (2) 所得到的胶体溶液,并加入终浓度为 5%的戊二醛,搅拌反应 12 小时;对产物离心清洗三次除掉过量的戊二醛后,重新分散于 PBS 缓冲液中。

[0024] (4) 将连有生物素的适配子与连有亲和素的 UCNP<sub>s</sub> 偶联,生成由 UCNP<sub>s</sub> 标记的适配子:在步骤 (3) 得到的产物中加入 1mg 亲合素分子,在 4℃下继续振荡反应 48 小时;将生成物离心纯化,4℃保存于测试信号缓冲液 (pH 8.2,20mM Tris-HCl,5mM KCl,1mM MgCl<sub>2</sub>) 中。

[0025] (5) 向由步骤 (4) 得到的产物中加入由染料分子标记的与适配子互补的 DNA 链,生成 UCNP<sub>s</sub> 标记适配子的生物探针:步骤 (4) 得到的产物中加入由染料分子标记的与适配子互补的 DNA 链,如表 1 所示,表 1 为构建 UCNP<sub>s</sub> 标记适配子的荧光探针所用的 DNA 序列,在信号缓冲液中先振荡加热至 70℃,保持 3min,然后再将溶液缓慢的降至室温,得产物。

[0026] 表 1

[0027]

名称	序列
UCNP <sub>s</sub> 标记的 DNA 序列	5`-/biotin/TTCACTGACCTGGGGGAGTATTGCGGAG GAAGGT-3
突变体 DNA	5`-/biotin/TTCACTGACCTGGGGGAGTA <sup>□</sup> TGCGGAG <sup>□</sup> CAAGGT-3`
荧光受体标记的 DNA 序列	5`-CCCAGGTCAGTG/TAMRA/-3

[0028] 结合图 3,向步骤 (5) 所获得的产物中不断地滴入如图横坐标所示的一系列浓度 ATP 分子,37℃下孵育 1h,然后进行光谱测试。以 I540/I577 值与加入 ATP 浓度作关系曲线。当体系中没有 ATP 分子时,荧光供体和荧光受体通过碱基互补配对的原则,形成双链结构。这种结构足够的稳定所以会把荧光供体牵拉到与荧光受体距离很近的位置,导致荧光供体与荧光受体之间产生高效的荧光能量共振传递。当向体系中加入 ATP 分子时,由于适配子序列更倾向与 ATP 分子结合。这种动力学的趋势要大于碱基互补配对的趋势,这就迫使荧光受体从 DNA 双链中解离下来,荧光受体与 UCNP<sub>s</sub> 的距离变远。进而伴随着荧光信号的改变。当 ATP 的浓度达到一定值时, I540/I577 值几乎达到饱和状态。这是因为 UCNP<sub>s</sub> 对适配子分子空间位阻效应,阻止了更多的 ATP 分子与适配子结合。在 ATP 浓度为 0.05-0.75mM 之间, I540/I577 值与之有很好的线性对应关系。

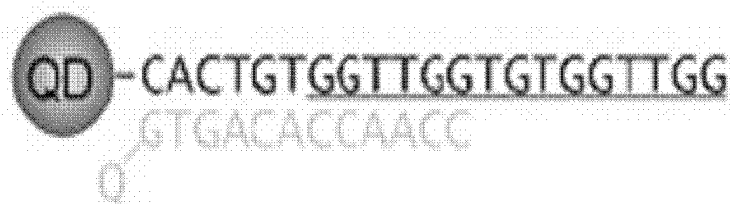


图 1

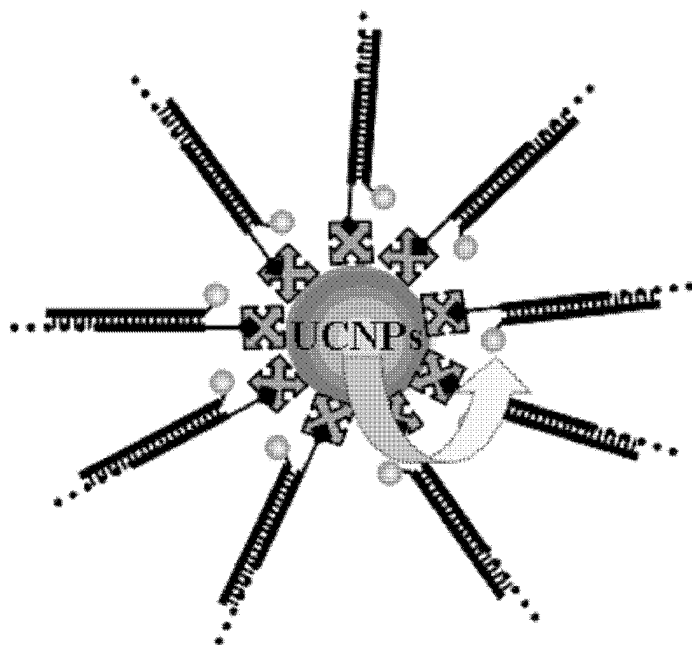


图 2

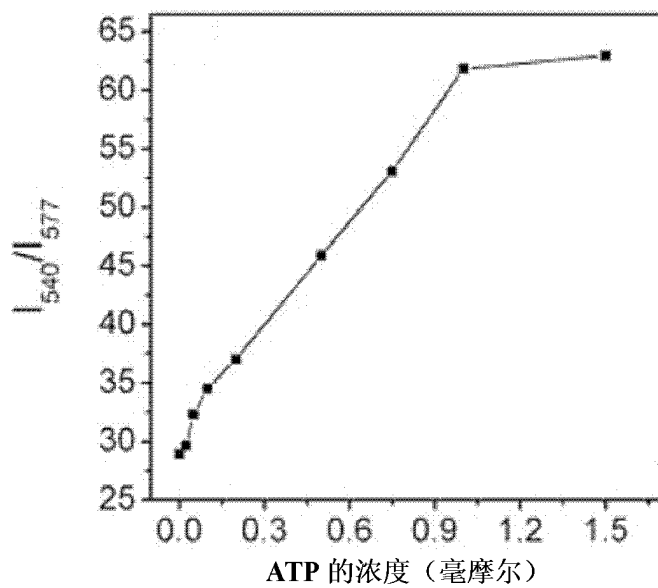


图 3