



(10) 授权公告号 CN 114761806 B

(45) 授权公告日 2025. 05. 09

(21) 申请号 202080083381.8

(22) 申请日 2020.10.15

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114761806 A

(43) 申请公布日 2022.07.15

(30) 优先权数据
10-2019-0130215 2019.10.18 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.05.31

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2020/014110 2020.10.15

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/075881 KO 2021.04.22

(73) 专利权人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔

(72) 发明人 奉纪完 卢允镐 文硕骏 李贤智
金株延

(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事
务所(普通合伙) 11413
专利代理师 回振海 王庆艳

(51) Int.Cl.
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(56) 对比文件
KR 20190072829 A, 2019.06.26
David C Appleyard .et al.Bar-coded
hydrogel microparticles for protein
detection: synthesis.《nature protocols》
.2011,第6卷(第11期),1761-1774.
David C Appleyard .et al.Bar-coded
hydrogel microparticles for protein
detection: synthesis.《nature protocols》
.2011,第6卷(第11期),1761-1774.

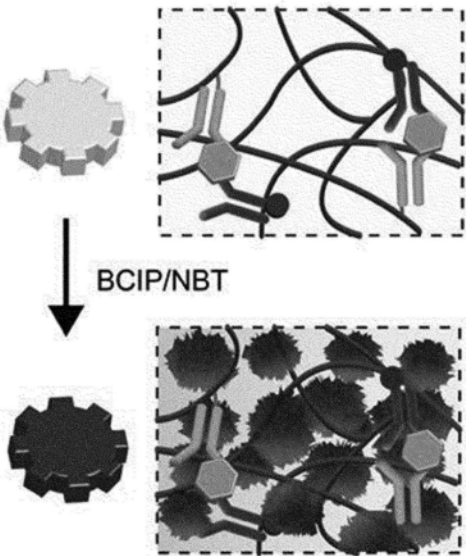
审查员 袁建新
权利要求书1页 说明书9页 附图8页

(54) 发明名称

基于水凝胶颗粒的靶材料的比色检测

(57) 摘要

本发明涉及基于水凝胶颗粒的靶材料的比色检测。根据本发明的实施方案的基于水凝胶颗粒的靶材料的比色检测包括以下步骤:使包含靶材料的样品与负载有特异性结合到靶材料的探针的水凝胶颗粒反应;在水凝胶颗粒中积累和放大不溶性比色材料以标记结合到探针的靶材料。在这里,水凝胶颗粒由聚合物网络制成,通过结合到聚合物网络负载探针,将不溶性比色材料固定在聚合物网络中。



1. 一种基于水凝胶颗粒的靶分析物的比色检测方法,所述方法包括(a)使含有靶分析物的样品与负载有与靶分析物特异性结合的探针的水凝胶颗粒反应,(b)在水凝胶颗粒中积累和放大不溶性比色材料以标记结合到探针的靶分析物,其中水凝胶颗粒形成聚合物网络,探针结合并被负载到聚合物网络中,不溶性比色材料被固定在聚合物网络上;

其中,样品包含不同的靶分析物,

其中,水凝胶颗粒能够负载不同的探针,使得不同的靶分析物分别结合到不同的水凝胶颗粒,

其中,每个水凝胶颗粒具有以几何形状形成的编码,用于识别不同的探针,和其中步骤(b)包括将酶与结合到探针的靶分析物缀合,并添加与酶反应的底物以产生不溶性比色材料。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中在水凝胶颗粒的合成过程中或合成后负载探针。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中每个在水凝胶颗粒合成后负载的探针包含与相应靶分析物特异性结合的捕获部分和与捕获部分连接并且与连接到聚合物网络的碳-碳双键形式的未反应末端结合的官能团。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中探针是与靶分析物特异性结合的化合物、寡核苷酸、寡糖、蛋白质、抗体、肽或适配体。

5. 根据权利要求3所述的方法,其中官能团选自巯基(-SH)和胺基(-NH₂)。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中的酶的缀合包括添加与靶分析物特异性结合的次级结合材料和添加用于与次级结合材料结合的酶。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中次级结合材料是与靶分析物特异性结合的化合物、寡核苷酸、寡糖、蛋白质、抗体、肽或适配体。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中酶选自碱性磷酸酶(ALP)、 β -半乳糖苷酶、过氧化物酶、荧光素酶、细胞色素P450及其组合。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中底物选自溴氯吲哚磷酸酯(BCIP)/氮蓝四唑(NBT)、萘酚-AS-B1-磷酸盐、对硝基苯磷酸酯(PNPP)、增强的化学荧光(ECF)、4-氯萘酚、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)、3-氨基-9-乙基吡唑(AEC)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、4-氯萘酚、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)、3-氨基-9-乙基吡唑(AEC)、6-氯-3-吲哚基- β -D-吡喃半乳糖苷(Red-gal)、及其组合。

基于水凝胶颗粒的靶材料的比色检测

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于水凝胶颗粒的靶分析物的比色检测方法,更具体地涉及一种通过在水凝胶颗粒中引入比色反应来检测靶分析物的方法。

背景技术

[0002] 编码的水凝胶颗粒已经在诊断医学、药物筛选、和分子生物化学等领域引起了广泛关注,这些领域需要具有针对靶生物分子的高的检测性能,因为它们能对靶生物分子进行高灵敏度和特异性地多重检测。与编码的水凝胶颗粒结合的靶分析物可以用荧光材料标记。然而,使用昂贵的系统例如光源、显微镜、和相机对于荧光分析是至关重要的,这使得通常在没有荧光分析系统的地方使用荧光材料是困难的。当在荧光标记过程中或在荧光标记后的清洗过程中暴露在光下时,荧光材料可能会由于荧光漂白而失去它们的荧光性质。此外,荧光材料与支持物例如底物或膜的非特异性结合可能产生假阳性信号,从而影响定量分析的可靠性。荧光材料可以被用于定性分析和定量分析。使用荧光材料的定量分析也需要相同的用于定量分析以确定靶分析物的结合的昂贵的系统。此外,定量分析应该在有限空间例如暗室进行以防止荧光漂白。由于这些问题,荧光分析应该只能在中心化实验室进行,难以扩展到主要由定性分析占多数的即时检测(POCT)。

[0003] 因此,有必要开发具有与常规的荧光测定相当的高的灵敏度的不使用昂贵的系统或没有空间限制的能分析生物分子的新技术。

发明内容

[0004] 本发明将要解决的问题

[0005] 本发明致力于解决现有技术的问题,并且本发明中的一个方面提供了基于水凝胶颗粒的靶分析物的比色检测方法,其中将探针负载到水凝胶颗粒中,靶分析物特异性结合到探针,不溶性比色材料在水凝胶颗粒中积累和放大。

[0006] 解决问题的方法

[0007] 根据本发明的实施方案的基于水凝胶颗粒的靶分析物的比色检测方法包括(a)使含有靶分析物的样品与负载有特异性结合到靶分析物的探针的水凝胶颗粒反应(b)在水凝胶颗粒中积累和放大不溶性比色材料以标记结合到探针的靶分析物,其中的水凝胶颗粒形成聚合物网络,探针结合并被负载到聚合物网络中,不溶性比色材料被固定在聚合物网络上。

[0008] 水凝胶颗粒可以是几何形状的并且被编码以识别探针。

[0009] 可以在水凝胶颗粒的合成过程中或合成后负载探针。

[0010] 合成水凝胶颗粒后负载的每个探针可以包括特异性结合到相应的靶分析物的捕获部分和与捕获部分连接并且与连接到聚合物网络的碳碳双键形式的未反应末端结合的官能团。

[0011] 探针可以是特异性结合到靶分析物的化合物、寡核苷酸、寡糖、蛋白质、抗体、肽或

适配体。

[0012] 官能团可以选自巯基 (-SH) 和胺基 (-NH₂)。

[0013] 步骤 (b) 可以包括将酶与结合到探针的靶分析物缀合和添加与酶反应的底物去以生成不溶性比色材料。

[0014] 酶的缀合可以包括添加特异性结合到靶分析物的次级结合材料和添加用于结合到次级结合材料的酶。

[0015] 次级结合材料可以是特异性结合到靶分析物的化合物、寡核苷酸、寡糖、蛋白质、抗体、肽或适配体。

[0016] 酶可以选自碱性磷酸酶 (ALP)、 β -半乳糖苷酶、过氧化物酶、荧光素酶、细胞色素 P450 及其组合。

[0017] 底物可以选自溴氯吲哚磷酸酯 (BCIP)/氮蓝四唑 (NBT)、萘酚-AS-B1-磷酸酯、对硝基苯磷酸酯 (PNPP)、增强的化学荧光 (ECF)、4-氯萘酚、3,3'-二氨基联苯胺 (DAB)、3-氨基-9-乙基咔唑 (AEC)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)、4-氯萘酚、3,3'-二氨基联苯胺 (DAB)、3-氨基-9-乙基咔唑 (AEC)、6-氯-3-吲哚基- β -D-吡喃半乳糖苷 (Red-gal) 及其组合。

[0018] 靶分析物可以包括一种或多于一种选自 DNA、RNA、蛋白质、外泌体、和病毒的材料。

[0019] 本发明的特点和优点将参照附图从以下描述中变得明显。

[0020] 在本发明的详细描述之前,应该理解,鉴于发明人可以适当地定义术语和词语的概念以使用最好的方法描述他/她的发明的原则,在说明书和权利要求书中使用的术语和词语不应被解释为具有常见的和字典上的含义而是被解释为与本发明的技术精神相对应的含义和概念。

[0021] 发明效果

[0022] 根据本发明,不溶性比色材料在水凝胶颗粒中被积累和放大,而不是使用荧光材料标记结合到水凝胶颗粒内部的靶分析物(例如,核酸和蛋白质),即使不使用昂贵的分析系统或单独的空间也能获得与使用荧光材料所实现的检测灵敏度和特异性相当的结果。

[0023] 根据本发明,比色材料标记的颗粒中的靶分析物只能通过肉眼或明场像检测到,可以只通过简单的系统包括 USB 显微镜和智能手机,对靶分析物定量,而不需要昂贵的系统。此外,比色材料在水凝胶颗粒中积累和放大,实现了与现有比色反应无法实现的检测灵敏度和特异性相当的性能。该比色材料的积累和放大使得即使在一个并非例如暗室的有限空间的地方也能以高可靠性对靶分析物进行定量分析,因为不会发生荧光漂白。因此,本发明可广泛用于中心化实验室以外的即时检测 (POCT) 领域被领域以及靶分析物例如核酸和蛋白质的定量分析。

附图说明

[0024] 图1为示意性地说明了根据本发明的实施方案的用于基于水凝胶颗粒的靶分析物的比色检测方法中使用的合成水凝胶颗粒的过程的图。

[0025] 图2示出了通过图1的过程合成的水凝胶颗粒的不同形状的平面图。

[0026] 图3为说明了将探针结合到通过图1的过程合成的水凝胶颗粒中残留的未反应末端的过程的图。

[0027] 图4和图5为说明了在使用根据本发明的实施方案的基于水凝胶颗粒的靶分析物

的比色检测方法对靶分析物检测之后,通过标记的酶在水凝胶颗粒中的酶-底物反应使比色材料不溶的过程的图。

[0028] 图6图示了在实验实施例3.3中通过比色检测方法对三种先兆子痫相关的蛋白质进行单一检测的结果。

[0029] 图7示出了揭示了在实验实施例3.3中通过比色检测方法对三种先兆子痫相关的蛋白质进行单一检测的结果的图。

[0030] 图8示出了揭示了在实验实施例3.4中通过比色检测方法对三种先兆子痫相关的蛋白质进行多重检测的结果的图。

[0031] 图9图示了在实验实施例3.4中通过比色检测方法对三种先兆子痫相关的蛋白质进行多重检测的结果。

[0032] 图10将在实验实施例3.5中通过比色检测方法对在血浆中加入的蛋白质检测的结果与ELISA的结果进行比较。

[0033] 图11为示意性地说明了在实验实施例3.5中将比色检测方法应用于从真实的先兆子痫患者中提取的血浆以及使用USB显微镜和智能手机进行分析的过程的图。

[0034] 图12示出了在实验实施例3.5中通过比色检测方法对从真实的先兆子痫患者和健康的对象中提取的血浆样品中的两种蛋白质进行多重检测的结果。

[0035] 图13示出了在实验实施例3.6中通过比色检测方法对核酸进行单一检测的结果。

[0036] 图14示出了在实验实施例3.6中通过比色检测方法对核酸进行多重检测的结果。

具体实施方式

[0037] 本发明的目的、具体的优点、和新颖特征将从以下详细描述和优选的实施方案中变得更明显,其实例在附图中示出。避免对众所周知的技术进行详细描述以免混淆本发明的主题。

[0038] 现将参照附图详细地描述本发明优选的实施方案。

[0039] 图1为示意性地说明根据本发明的实施方案的用于基于水凝胶颗粒的靶分析物的比色检测方法中使用的合成水凝胶颗粒的过程的图。图2示出了通过图1的过程合成的水凝胶颗粒的不同形状的平面图。图3为说明将探针结合到通过图1的过程合成的水凝胶颗粒中残余的未反应末端的过程的图。图4和图5为说明了在使用根据本发明的实施方案的基于水凝胶颗粒的靶分析物的比色检测方法对靶分析物检测之后,通过标记的酶在水凝胶颗粒中的酶-底物反应使比色材料不溶的过程的图。

[0040] 如图1至图5所示,根据本发明的实施方案的基于水凝胶颗粒的靶分析物的比色检测方法包括:使包含靶分析物的样品与负载有与靶分析物特异性结合的的探针的水凝胶颗粒反应;在水凝胶颗粒中积累和放大不溶性比色材料以标记结合到探针的靶分析物。水凝胶颗粒形成聚合物网络,探针结合并被负载到聚合物网络中,不溶性比色材料固定在聚合物网络上。

[0041] 本发明的方法使用引入水凝胶颗粒中的比色反应检测靶分析物。使用荧光材料检测靶分析物的常规荧光测定需要使用昂贵的系统例如光源、显微镜、和相机进行荧光分析。当暴露在光下时,荧光材料可能会被荧光漂白并且可能会非特异性地结合到支持物从而产生假阳性信号,从而影响定量分析的可靠性。使用荧光材料的定量分析也需要昂贵的系统

并且也应该在有限空间例如暗室进行以防止荧光漂白。由于这些问题,荧光分析应该只能在中心化实验室进行,难以扩展到主要由定性分析占多数的即时检测(POCT)。本发明提供了对常规的荧光测定的问题的解决方案。

[0042] 具体地,本发明的方法包括使样品与负载有探针的水凝胶颗粒反应和积累和放大不溶性比色材料。

[0043] 首先,允许样品与负载有探针的水凝胶颗粒反应。负载有探针的水凝胶颗粒形成聚合物网络并且具有多个从外向内延伸的孔。探针结合并被负载到聚合物网络中。

[0044] 在负载有探针的水凝胶颗粒中,探针与靶分析物结合。这个反应与在溶液中的反应相似,能够三维进行,可以在宽动态范围内高特异性和灵敏度地检测生物分子。探针特异性结合靶分析物。具体地,当包含靶分析物的样品与负载有探针的水凝胶颗粒混合后,靶分析物通过水凝胶颗粒的孔渗透进水凝胶颗粒中并且与负载有水凝胶颗粒中的探针特异地结合。

[0045] 参照图2,可以对负载有探针的水凝胶颗粒进行编码。在这里,水凝胶颗粒可以是几何形状的并且被编码以识别探针。水凝胶颗粒可以负载不同的探针。在这种情况下,水凝胶颗粒具有不同的形状作为用以识别探针的代码。因此,能根据赋予颗粒的代码区分水凝胶颗粒和负载的探针,从而能够对多个靶分析物进行同时检测。在图2中,水凝胶颗粒被多达八个矩形齿轮状突起编码。或者,水凝胶颗粒可以用不同的几何形状编码。

[0046] 编码的负载有探针的水凝胶颗粒可以通过流动光刻合成。参照图1,紫外光辐照到流动的前体流体上以通过流动光刻合成颗粒。穿过光掩模的紫外光引起前体的聚合以合成与光掩模有相同形状的颗粒。流体在微通道中形成层流并且可以在不混合的情况下以多个并流构造,从而能够在UV辐照后合成多功能的不对称颗粒。

[0047] 前体流体可以包括具有碳-碳双键($C=C$)作为官能团的光固化单体和光敏引发剂。具有碳-碳双键作为官能团的光固化单体可以是,例如,甲基丙烯酸酯、马来酰亚胺、乙烯砜、丙烯酸酯或丙烯酰胺。前体流体还可以包括成孔剂例如聚乙二醇。去离子水(DI水)可以作为用于分散成孔剂的溶剂。在使用前体流体合成的水凝胶颗粒中,光固化单体分子聚合以形成聚合物网络结构。在颗粒的合成过程中单体分子中的高反应性的和生物化学不稳定的碳-碳双键交联形成网络。碳-碳双键在交联后转化成了反应性非常低的单键。然而,不是所有在前体流体中存在的单体分子的官能团在流动光刻过程中被转化,并且碳-碳双键中的一些保持未反应。一些未反应的碳-碳双键结合到网络上。就是说,在反应后单体分子中的一些官能团在网络中是交联的,但是单体分子中的一些官能团保持未反应。以碳-碳双键形式与网络连接的未反应官能团被定义为未反应末端。

[0048] 由于在颗粒合成后未反应末端即使通过冲洗也不会被除去,它们存在于通过流动光刻合成的水凝胶颗粒中,如图3所示。探针与聚合物网络连接的未反应末端结合。

[0049] 每个探针可以包括特异性结合到靶分析物的捕获部分和与捕获部分连接并且结合到未反应末端的官能团。以碳-碳双键形式结合到未反应末端的探针的官能团可以选自巯基($-SH$)和胺基($-NH_2$)。巯基-烯点击反应用于碳-碳双键和巯基之间的反应。巯基-烯点击反应非常快速,产率达到几乎100%,并且不会产生副反应或副产物。氮杂-迈克尔加成反应能用于碳-碳双键和胺基之间的反应。

[0050] 这些反应可以是自由基反应、催化反应或自发反应。探针的捕获部分可以与水凝

胶颗粒内部交联。根据自由基反应,将水凝胶颗粒分散在介质例如水或溶剂中,添加并分散包含能够通过自由基反应与未反应末端反应的官能团的捕获部分(探针),添加光敏引发剂或热引发剂,并且在预定的时间段内施加光(UV)或热能以在碳-碳双键和官能团之间诱导共价键。结果,探针被负载到水凝胶颗粒中并且未反应末端被除去。催化反应是指催化剂介导的反应。催化反应使用有机催化剂代替自由基反应中使用的引发剂以在碳-碳双键和官能团之间诱导共价键。结果,探针被负载并且未反应末端被除去。自发反应适合负载对自由基或催化剂敏感的探针。根据自发反应,探针通过在溶液中移动的电子与水凝胶颗粒交联。缓冲液或极性溶剂中的电子作为亲核试剂以在官能团和碳-碳双键之间形成共价键。

[0051] 然而,编码的水凝胶颗粒的合成不一定限于流动光刻。包括复制模塑的不同工艺可用于合成编码的水凝胶颗粒。复制模塑是通过将流体负载到刻有凹版微图案的微型模具中并且使紫外光辐照到流体上来合成颗粒的工艺。颗粒的形状与刻在微型模具上的凹版图案相同。

[0052] 用于检测靶分析物的探针不仅可以在水凝胶颗粒合成后负载,也可以在水凝胶颗粒的合成过程中负载。探针(捕获部分)是能与靶分析物特异性结合的材料物质。例如,探针(捕获部分)可以是与靶分析物特异性结合的化合物、寡核苷酸、寡糖、蛋白质、抗体、肽或适配体。特别地,作为探针(捕获部分)的抗体通过抗原-抗体反应特异性结合到靶分析物。靶分析物不是特别受限的,只要它们特异性结合到探针(捕获部分)即可。靶分析物可以包括一种或多种选自DNA、RNA、蛋白质、外泌体、和病毒的材料。

[0053] 然后,不溶性比色材料被积累和放大。不溶性比色材料标记结合到探针的靶分析物以确定靶分析物的结合。不溶性比色材料在亲水环境中局部聚集并且被固定在负载探针的水凝胶颗粒的聚合物网络中。结果,不溶性比色材料不会从颗粒中流出而是在水凝胶颗粒中被积累和放大。如图4所示,在颗粒中标记靶分析物的不溶性比色材料只能通过肉眼或明场像检测到。因此,靶分析物只能通过包括USB显微镜和智能手机的简单的系统定量,而不需要昂贵的系统。比色材料在水凝胶颗粒中的积累和放大能达到与荧光测定的检测灵敏度和特异性相当的性能,并且即使在一个并非例如暗室的有限空间的地方,也能以高可靠性对靶分析物进行定量分析,因为没有发生光漂白。

[0054] 在其中不溶性比色材料在水凝胶颗粒中被积累和放大的一个实施方案中,酶与结合到探针的靶分析物缀合,并且添加酶反应的底物以产生不溶性比色材料。酶可以选自碱性磷酸酶(ALP)、 β -半乳糖苷酶、过氧化物酶、荧光素酶、细胞色素P450及其组合。底物可以选自溴氯吲哚磷酸酯(BCIP)/氮蓝四唑(NBT)、萘酚-AS-B1-磷酸盐、对硝基苯磷酸酯(PNPP)、增强的化学荧光(ECF)、4-氯萘酚、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)、3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、4-氯萘酚、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)、3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)、6-氯-3-吲哚基- β -D-吡喃半乳糖苷(Red-gal)、及其组合。

[0055] 例如,碱性磷酸酶(ALP)和5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸酯/氮蓝四唑(BCIP/NBT)可以分别用作酶和底物。在这种情况下,在负载有探针的水凝胶颗粒中捕获的靶分析物被酶ALP标记并且将BCIP/NBT底物溶液添加到水凝胶颗粒中,通过水凝胶颗粒中的酶-底物反应导致不溶性比色材料的积累和放大。结果,水凝胶颗粒呈暗紫色(见图5)。靶分析物可以通过与探针结合的靶分析物特异性结合的次级结合材料被酶标记。次级结合材料可以是特异性结合到靶分析物的化合物、寡核苷酸、寡糖、蛋白质、抗体、肽或适配体。可以依次添加次级结

合材料和酶以诱导次级结合材料与酶之间的结合。或者,可以添加与酶聚合的次级结合材料。在一个实施方案中,次级结合材料可以通过抗原-抗体反应特异性结合到靶分析物的二抗。在这个实施方案中,生物素化的二抗特异性结合到被探针捕获的靶分析物,添加链霉亲和素聚合的ALP(链霉亲和素-ALP),使链霉亲和素结合到生物素,添加BCIP/NBT,导致在水凝胶颗粒中不溶性比色材料的积累和放大。

[0056] 总体而言,根据本发明,当负载有探针的水凝胶颗粒与样品混合并放置预定时间进行检测反应时,只有对负载到颗粒中的探针特异的材料结合到探针。在完成检测反应后,需要鉴定探针和靶分析物之间的结合以确定靶分析物是否与水凝胶颗粒结合。根据常规的荧光测定,结合部位被荧光材料标记并且用包括光源、显微镜、和相机的荧光分析仪分析荧光的存在和强度。相反,根据本发明,在水凝胶颗粒中不溶性比色材料的积累和放大能达到与荧光测定的检测灵敏度和特异性相当的性能同时避免荧光测定的问题。

[0057] 实施本发明的方式

[0058] 将参考以下实验实施例更具体地解释本发明。

[0059] 1. 实验例

[0060] 1.1. 微流控芯片的制作

[0061] 使用AutoCAD(美国,加利福尼亚州Autodesk)设计了用于合成水凝胶颗粒的微流控芯片并且打印在光掩模上(韩国Han&All technology)。SU-8 25是负性光刻胶,在硅片上涂覆52 μm 的厚度,随后通过光刻构建SU-8母模。重量比为10:1的PDMS(美国Corning)和固化剂的混合物倒入SU-8母模并且在70°C固定8小时。将固化的PDMS从SU-8母模中分离并切成片。此后,使用1.0mm和10.0mm的活检穿孔器钻出在切片上雕刻的通道的入口和出口。将重量比为10:1的PDMS和固化剂的混合物倒入载玻片并且在70°C固定25分钟。将制备的切片贴在载玻片的表面并且70°C下固化过夜以制作微流控芯片。

[0062] 1.2. 停流光刻(SFL)的设置

[0063] 通过停流光刻合成水凝胶颗粒(见图1)。对于SFL,使用定制的电路板和LabView(美国,得克萨斯州National Instruments)程序构建了UV和压力控制系统。将微流控芯片放在倒置显微镜(德国Zeiss)上并且通过移液管尖端将前体注入微流控芯片。在这里,前体通过空气注入,空气的压力受压力调节器控制。将刻有不同图案的光掩模固定在显微镜场阑并且使用LED灯作为固化前体的来源。UV的强度保持在2200mW cm^{-2} 。

[0064] 1.3. 抗体-功能化水凝胶颗粒的制备

[0065] 注入微流控芯片的前体由20% (体积/体积) 的聚乙二醇二丙烯酸酯(美国Sigma Aldrich, PEG700DA)、40% (体积/体积) 的作为成孔剂的聚乙二醇600(, Sigma Aldrich, PEG600)、35% (体积/体积) 的去离子水、和5% (体积/体积) 的作为光敏引发剂的Darocur 1173(Sigma Aldrich)。注入微流控的前体通过流动(400ms)、停止(200ms)、UV接触(65ms)、和持续时间(335ms)的连续循环合成水凝胶颗粒。不同的光掩模用于编码蛋白质组。在1x PBST(包含0.005%吐温20的磷酸盐缓冲液)中冲洗合成的颗粒3次。接下来,12 μL 重组捕获抗体(12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的P1GF、6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的sFIT-1、6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的sEng)与16.5 μL 颗粒(~ 75 每 μL)反应并且与1.5 μL 不同功能的PEG接头(Thiol-PEG 2000-NHS)在1500rpm、25°C下搅拌。将所得的抗体缀合的水凝胶颗粒保存在4°C、1x PBST中。

[0066] 1.4. 通过比色反应检测蛋白质

[0067] 蛋白质检测反应在80 μ L体积中进行。在每个检测反应中,将1x PBST中的40 μ L (~50 μ L) 负载有抗体的水凝胶颗粒与FBS中的2x靶蛋白质混合。使反应在1500rpm和25 $^{\circ}$ C下进行2小时。在反应完成后,用1x PBST冲洗反应混合物3次并且添加二抗(15ng/ μ L的P1GF、125ng/ μ L的sFIT-1、12.5ng/ μ L的sEng)。反应再次在1500rpm和25 $^{\circ}$ C下进行1小时。

[0068] 在用1x PBST冲洗3次后,水凝胶颗粒通过在1%BSA中的链霉亲和素-AP被酶标记。最终,50 μ L的BCIP/NBT溶液与颗粒在微管中混合,随后反应在25 $^{\circ}$ C下反应7分钟。在完成反应后,用DI水+吐温20溶液冲洗反应混合物3次。通过连接笔记本电脑(韩国Insan commerce)、3D打印机、和国产光源系统的USB显微镜获得明场像。

[0069] 2.比较例

[0070] ELISA

[0071] 将100 μ L捕获抗体(4 μ g/ μ L的P1GF、2 μ g/ μ L的sFIT-1、2 μ g/ μ L的sEng)涂在96孔微孔板上并用1x PBST冲洗3次。用1%BSA封闭孔。将在FBS中的不同浓度的靶蛋白质的稀释液注入孔中并且使反应在室温下进行2小时。在冲洗这些孔后,将100 μ L检测抗体(60ng/ μ L的P1GF、500ng/ μ L的sFIT-1、50ng/ μ L的sEng)添加到孔中。反应在室温下进行2小时。在冲洗3次后,将链霉亲和素-HRP添加到孔板中。反应在室温下进行20分钟。冲洗孔板3次,添加100 μ L底物溶液,随后反应20分钟。在注射50 μ L终止液后,使用酶标仪测量光学密度。

[0072] 3.分析和评估

[0073] 3.1.编码的水凝胶颗粒的合成

[0074] 参照图1和图2,通过停流光刻(SFL)合成了具有多达8个齿轮状突起的圆柱形的编码的水凝胶颗粒。在合成编码的水凝胶颗粒后,巯基化抗体通过巯基-烯反应以水凝胶颗粒的碳-碳双键形式结合到非反应末端。结果,抗体被负载到水凝胶颗粒中(见图3)。在颗粒的合成过程中由于与光敏引发剂的不相容,抗体的结合可能会诱导抗体的聚集。然而,在合成颗粒后,在蛋白质稳定化溶液中的抗体的结合可以使抗体高密度地负载到颗粒中。因此,使抗体负载到合成的水凝胶颗粒中确保了比在颗粒的合成过程中抗体结合高的分析灵敏度。

[0075] 3.2.比色反应

[0076] 在这个实验实施例中,通过在水凝胶颗粒中的酶-底物反应诱导显色。为此,碱性磷酸酶(ALP)和5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸酯/氮蓝四唑(BCIP/NBT)分别用作酶和底物。对于在水凝胶颗粒中的比色反应,抗原特异性结合到捕获抗体和生物素化的二抗。生物素化的二抗结合到链霉亲和素-ALP。之后,引入了BCIP/NBT底物溶液。BCIP/NBT底物通过ALP酶在水凝胶中的酶-底物反应转化换成不溶性比色材料。不溶性比色材料被积累和放大。在这个过程中,水凝胶颗粒被染成暗紫色(见图4和图5)。不溶性比色材料在亲水环境中局部聚集并且固定在水凝胶颗粒的网络上。

[0077] 3.3.蛋白质单一检测

[0078] 研究了三种先兆子痫相关蛋白质(P1GF、F1t-1、和内皮联蛋白)的可检测区间和最低浓度。结果如图6和图7所示。图6图示了通过比色检测方法对三种先兆子痫相关的蛋白质进行单一检测的结果。图7示出了揭示了通过比色检测方法对三种先兆子痫相关的蛋白质进行单一检测的结果的图像。

[0079] 结果发现,P1GF、F1t-1、和内皮联蛋白的检测区间分别是41.3pg/ μ L至7500pg/ μ L、136.3pg/ μ L至30000pg/ μ L、和73.5pg/ μ L至15000pg/ μ L,超过了通过使用分光计测量吸光度

获得的ELISA结果 (P1GF为31.2pg/ μ L至2000pg/ μ L、F1t-1为125pg/ μ L至8000pg/ μ L、并且内皮联蛋白为125pg/ μ L至8000pg/ μ L)。

[0080] 3.4.蛋白质多重检测

[0081] 对三种蛋白质 (P1GF、F1t-1和内皮联蛋白) 进行多重检测。结果如图8和图9所示。图8示出了揭示了通过比色检测方法对三种先兆子痫相关的蛋白质进行多重检测的结果的图像。图9图示了通过比色检测方法对三种先兆子痫相关的蛋白质进行多重检测的结果。

[0082] 在单一检测和多重检测中,根据每种蛋白的存在或缺失在8个案例中的三种蛋白质 (P1GF、F1t-1、和内皮联蛋白) 没有显示交叉反应。P1GF的回收率为92.6%、F1t-1的回收率为125.2%、内皮联蛋白的回收率为122.9%,都分布在通常可接受的范围内 (70%至130%)。

[0083] 3.5.血浆样品中蛋白质的检测

[0084] 在将不同浓度的P1GF加入到健康对象的血浆样品中后,通过通常被用于比色反应和蛋白质检测的ELISA检测P1GF。图10将通过比色检测方法对在血浆中加入的蛋白质检测的结果与ELISA的结果进行比较。

[0085] 参照图10,比色反应和ELISA显示了线性关系,表明比色反应可应用于在真实的血浆样品中蛋白质的检测。

[0086] 图11为示意性地说明了将比色检测方法应用于从真实的先兆子痫患者中提取的血浆以及使用USB显微镜和智能手机进行分析的过程的图。基于上述的结果,对来自真实的先兆子痫患者和健康的对象的血浆样本进行P1GF和F1t-1的多重检测。结果如图12所示。图12示出了通过比色检测方法对从真实的先兆子痫患者和健康的对象中提取的血浆样品中的两种蛋白质进行多重检测的结果。

[0087] 因此,在血浆样品中P1GF和F1t-1浓度差异很大,因此难以进行多重检测。用于区分先兆子痫的F1t-1的量和F1t-1/P1GF的比率在患者和正常组之间存在显著差异。然而,P1GF的量没有显著差异,这是由于在患者和正常组中的案例数较少导致的 (正常:5例,病人:5例)。

[0088] 3.6.核酸检测

[0089] 使用比色反应检测核酸。结果如图13和图14所示。图13示出了通过比色检测方法对核酸进行单一检测的结果。图14示出了通过比色检测方法对核酸进行多重检测的结果。通过比色反应检测核酸的可检测LoD为33.72amol (见图13)。在使用两种靶物的交叉反应测试中也观察到高特异性 (见图14)。

[0090] 虽然本文已经参照具体的实施方案描述了本发明,这些实施方案不用于限制本发明而是用于解释的目的。对于那些在本领域的技术人员显而易见的是,可以在不背离本发明的精神和范围的情况下进行修改和改进。

[0091] 本发明的简单修改和改进属于本发明的范围,本发明的具体的范围将在权利要求书中明确界定。

[0092] 工业应用

[0093] 根据本发明,靶分析物与负载到水凝胶颗粒中的探针特异性结合,并且即使不使用昂贵的分析系统或单独的空间,不溶性比色材料在水凝胶颗粒中被积累和放大以获得与使用荧光材料所达到的检测灵敏度和特异性相当的结果。因此,认为本发明在工业上是可

应用的。

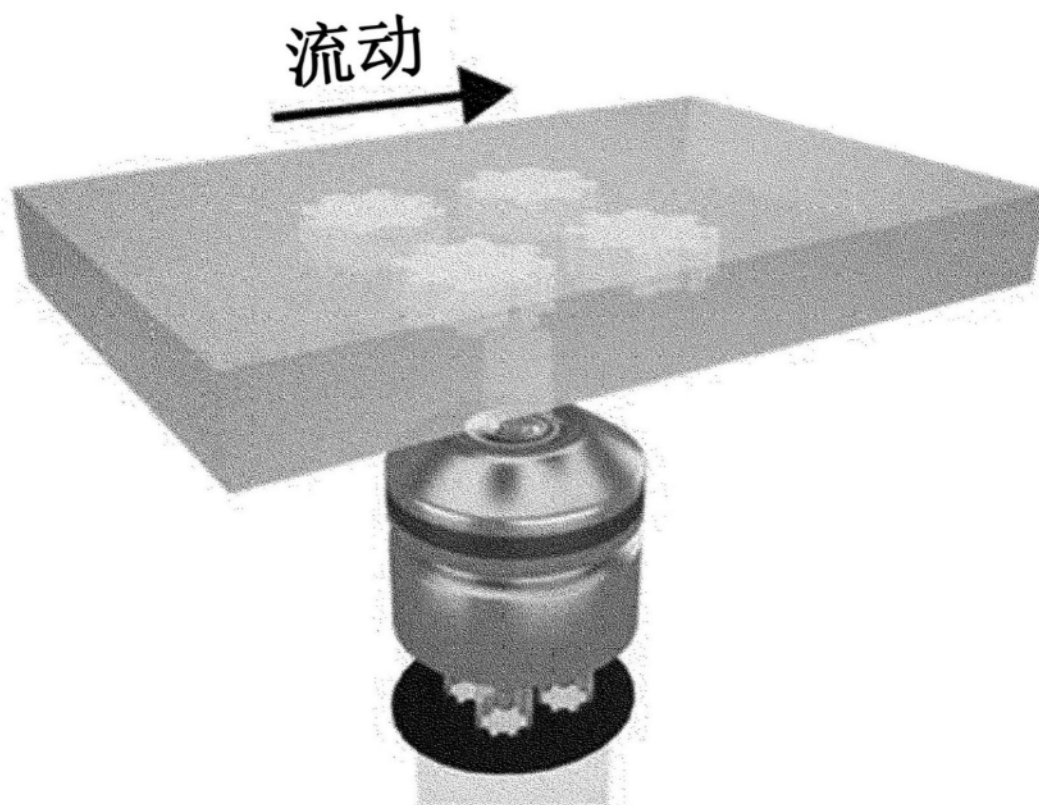


图1

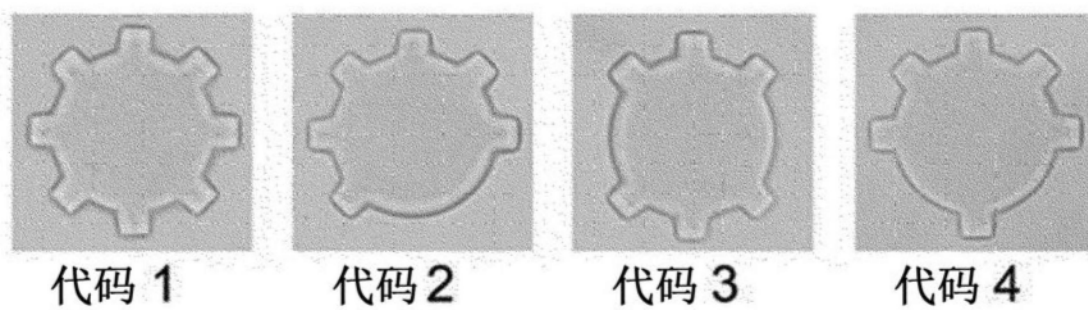


图2

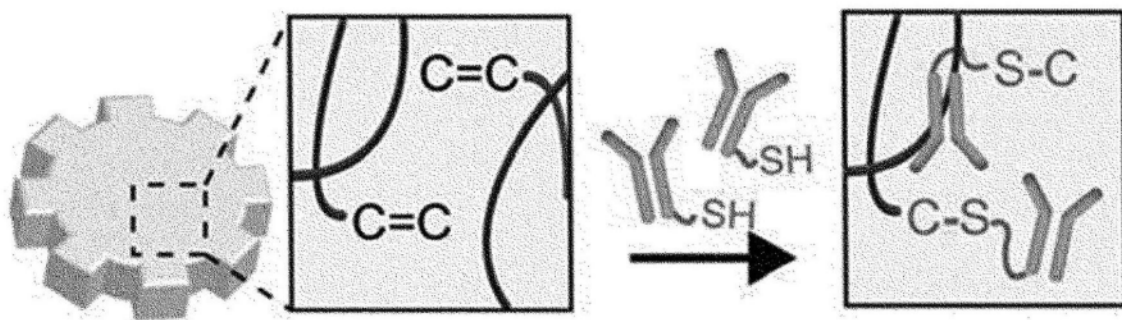


图3

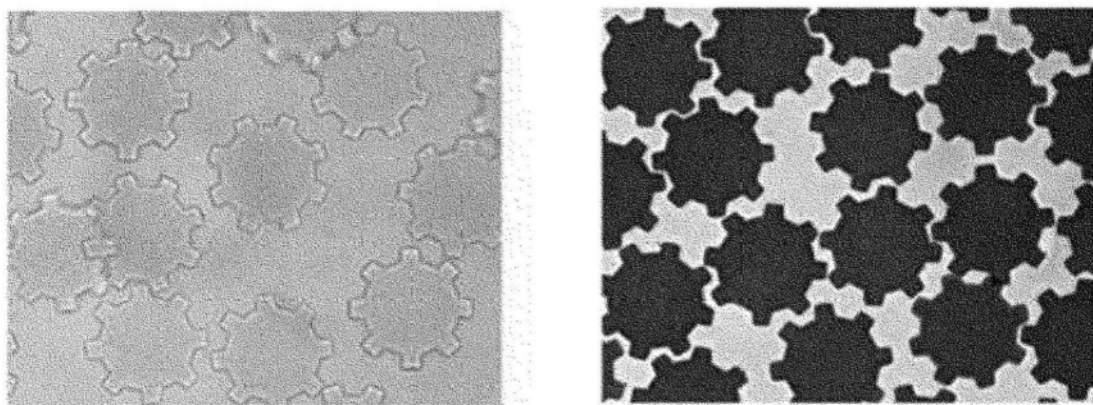


图4

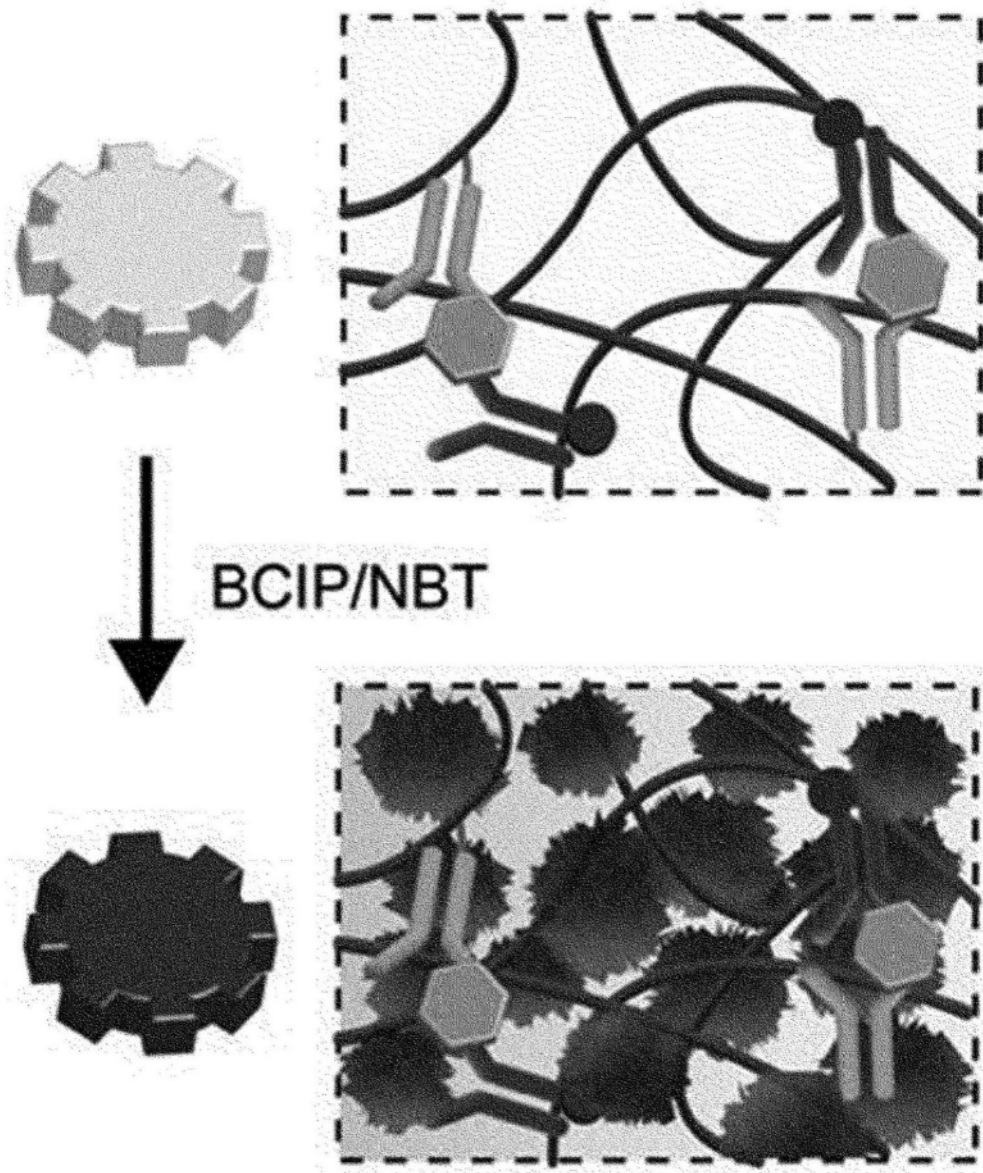


图5

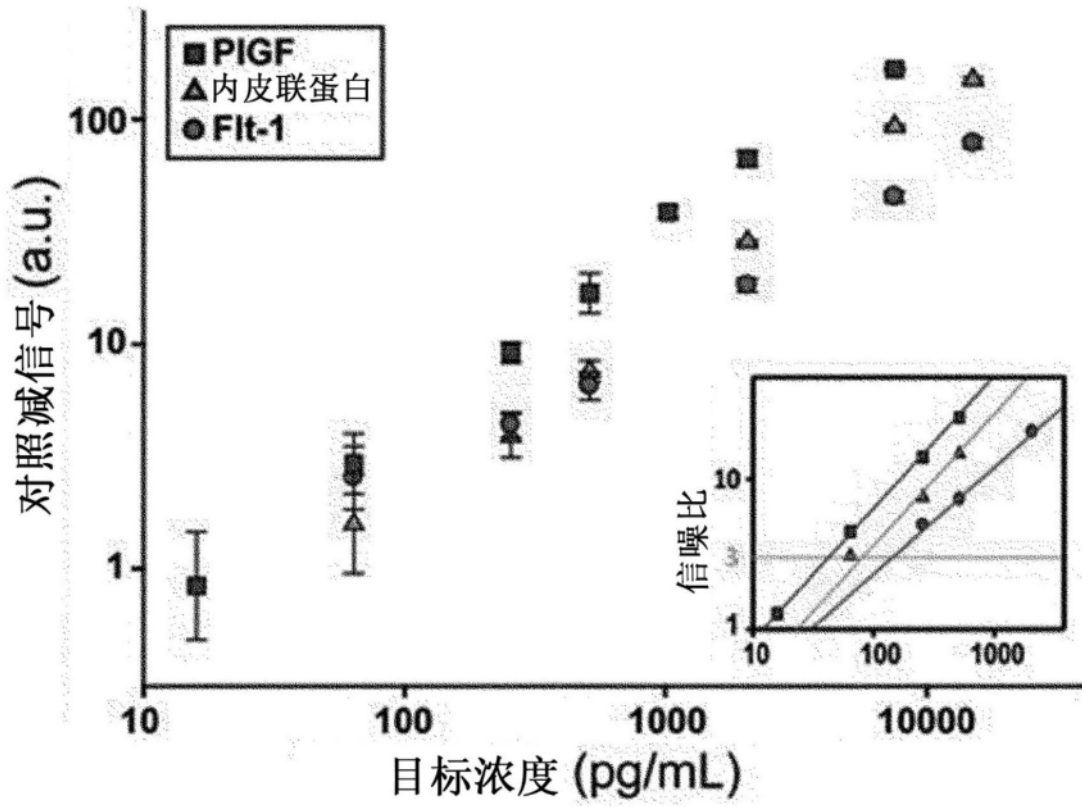


图6

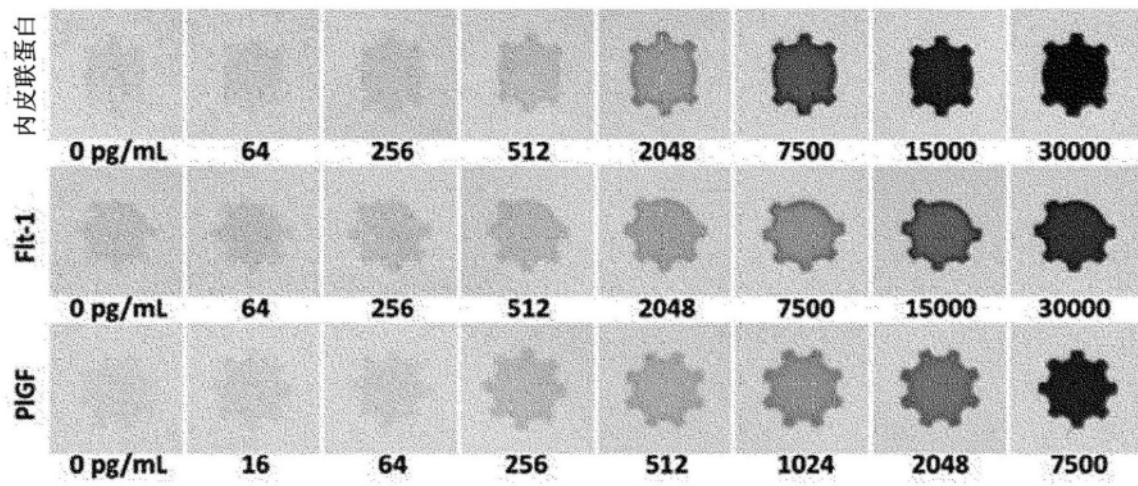


图7

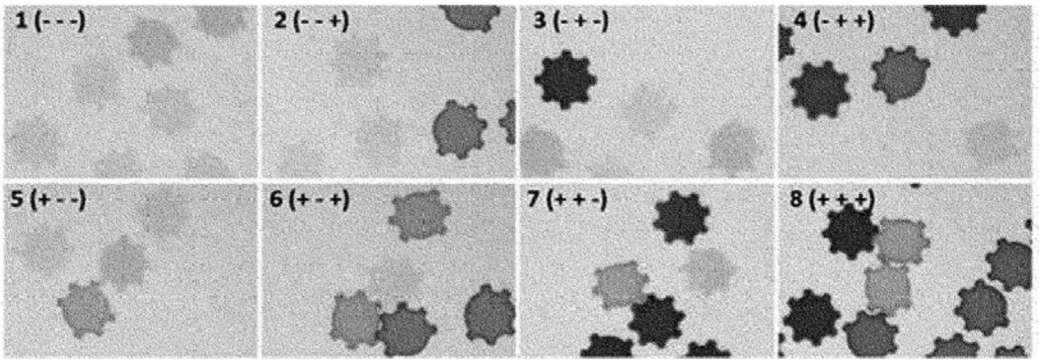


图8

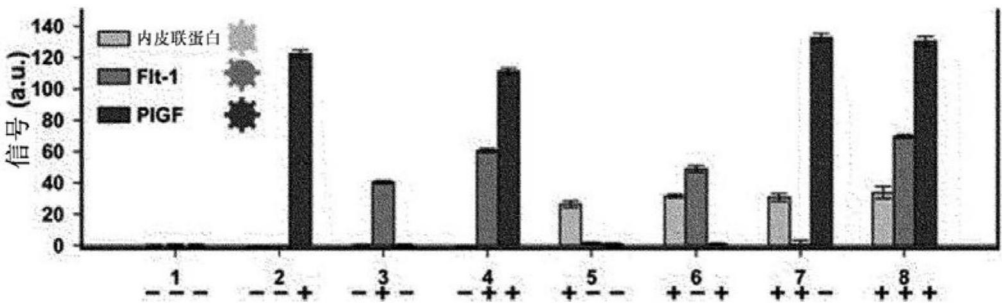


图9

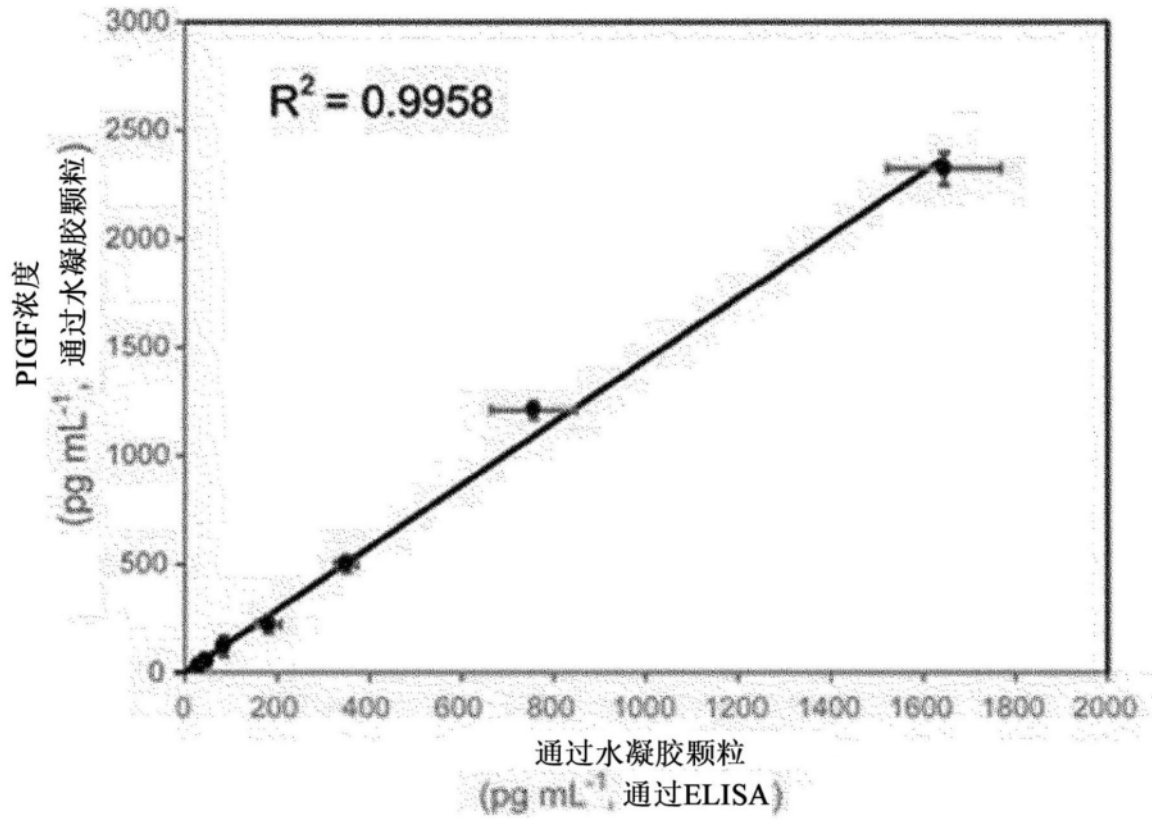


图10

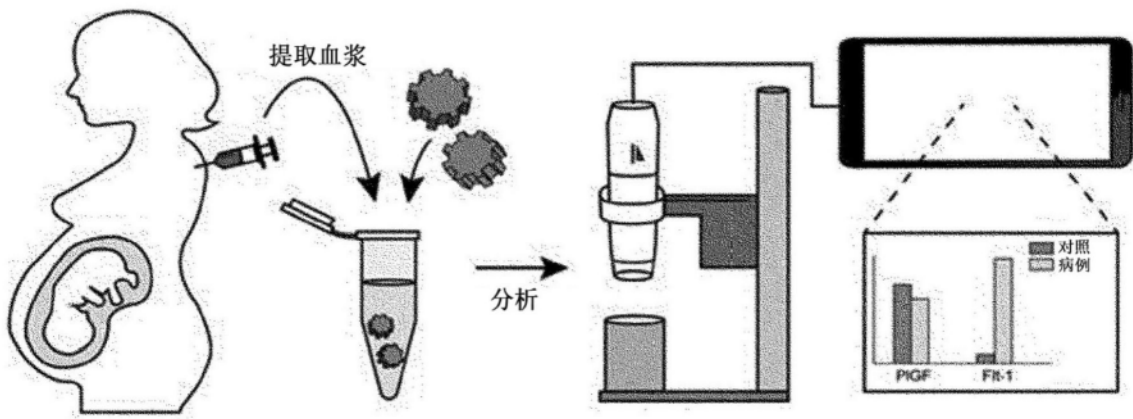


图11

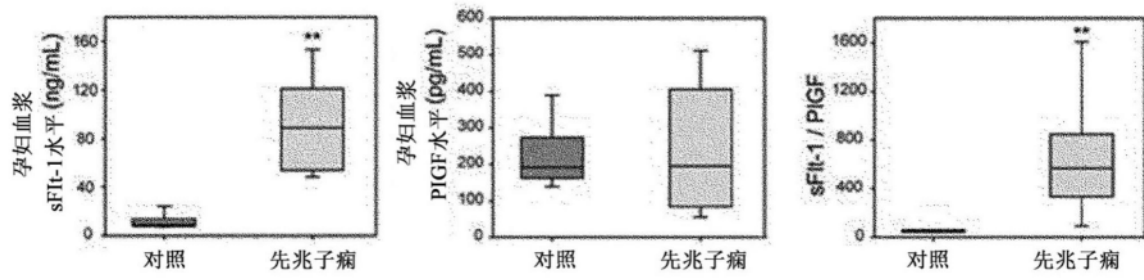


图12

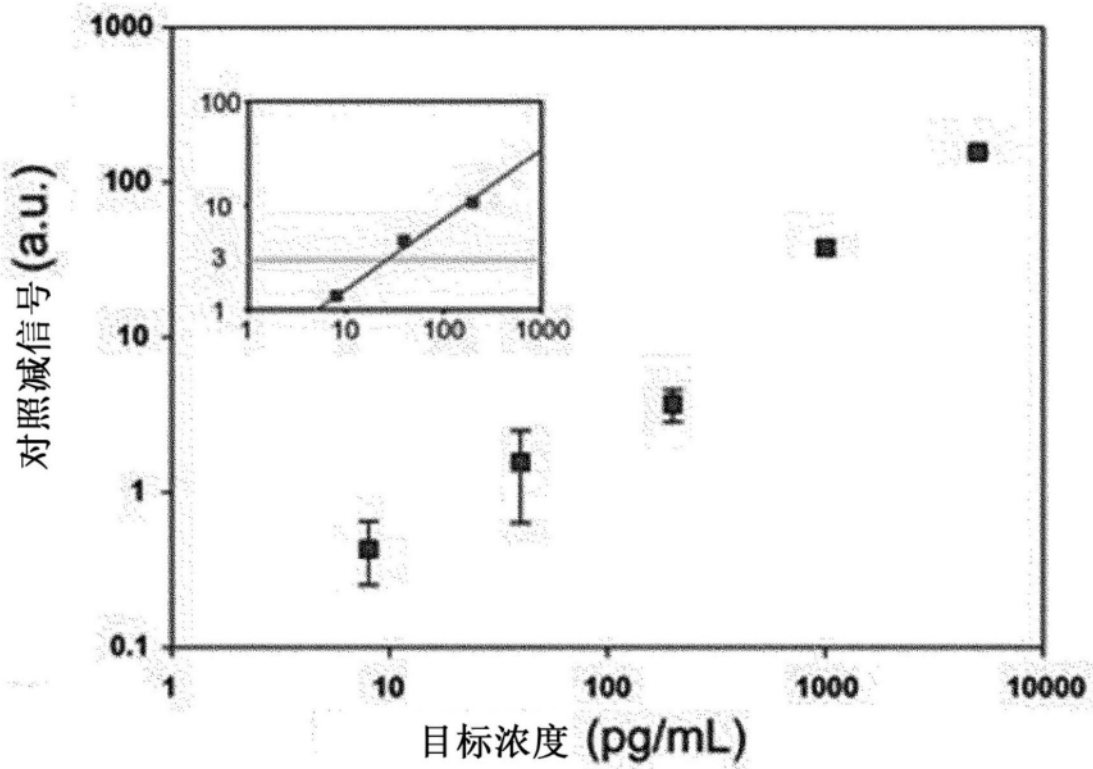


图13

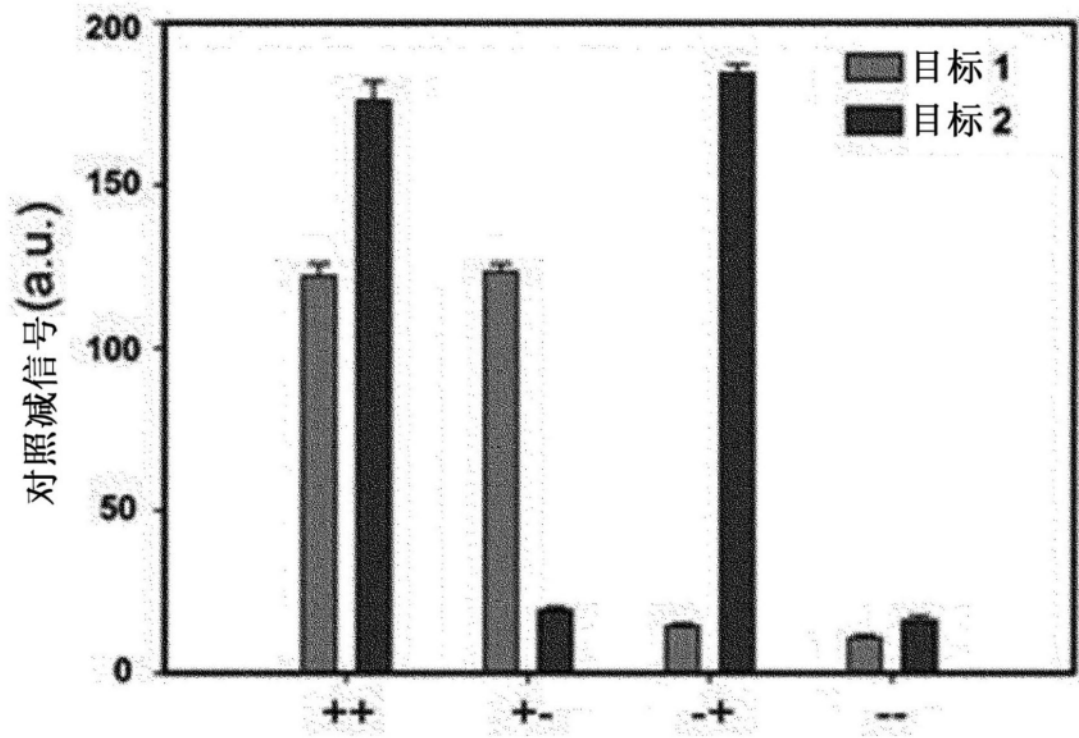


图14