



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114032290 A

(43) 申请公布日 2022.02.11

(21) 申请号 202111254335.2

(22) 申请日 2021.10.27

(71) 申请人 中山大学

地址 510275 广东省广州市海珠区新港西路135号中山大学化学学院

(72) 发明人 张卓旻 黄路 李攻科

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务有限公司 44205

代理人 梁嘉琦

(51) Int. Cl.

G12Q 1/6825 (2018.01)

G01N 21/65 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

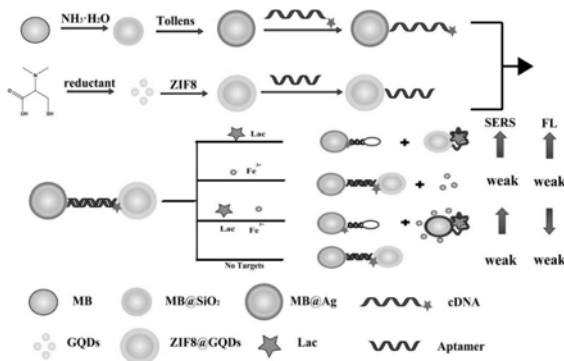
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54) 发明名称

一种基于适配体功能化的SERS-FL传感器及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种基于适配体功能化的SERS-FL传感器,包括:量子点,所述量子点上结合有核酸适配体,所述核酸适配体用于特异性结合待测分子;贵金属纳米粒子,所述贵金属纳米粒子上结合有核酸分子,所述核酸分子在远离所述贵金属纳米粒子的一端修饰有拉曼分子;其中,所述核酸分子被配置为能够与所述核酸适配体发生碱基互补配对而结合形成桥连双链;并且所述核酸分子上还具有若干个互补碱基,所述互补碱基被配置为在所述核酸适配体与所述待测分子特异性结合使所述桥连双链解链时,发生配对使所述核酸分子形成发卡结构。该基于适配体功能化的SERS-FL传感器能够对血清内特定生物标志物进行定量分析,且检测便捷高效,特异性强、灵敏度高、准确度高,有利于提高贫血早期的辨识度。



1. 一种基于适配体功能化的SERS-FL传感器,其特征在于:包括:  
量子点,所述量子点上结合有核酸适配体,所述核酸适配体用于特异性结合待测分子;  
贵金属纳米粒子,所述贵金属纳米粒子上结合有核酸分子,所述核酸分子在远离所述贵金属纳米粒子的一端修饰有拉曼分子;  
其中,所述核酸分子被配置为能够与所述核酸适配体发生碱基互补配对而结合形成桥连双链;并且所述核酸分子上还具有若干个互补碱基,所述互补碱基被配置为在所述核酸适配体与所述待测分子特异性结合使所述桥连双链解链时,发生配对使所述核酸分子形成发卡结构。
2. 根据权利要求1所述的一种基于适配体功能化的SERS-FL传感器,其特征在于:所述量子点为石墨烯量子点。
3. 根据权利要求2所述的一种基于适配体功能化的SERS-FL传感器,其特征在于:所述石墨烯量子点的粒径为5-12nm。
4. 根据权利要求1所述的一种基于适配体功能化的SERS-FL传感器,其特征在于:所述贵金属纳米粒子的粒径为50-150nm。
5. 根据权利要求1所述的一种基于适配体功能化的SERS-FL传感器,其特征在于:所述核酸适配体的长度为30-60base。
6. 一种如权利要求1-5任一项所述基于适配体功能化的SERS-FL传感器的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:
  - a. 贵金属纳米粒子的制备:
  - b. 量子点的制备:
  - c. SERS-FL传感器的制备:
    - c1. 将双链核酸适配体加入到量子点的溶液中,振荡后离心;
    - c2. 将可与c1中的双链核酸适配体其中一条核酸链互补的核酸分子加入到贵金属纳米粒子的溶液中,振荡后离心,其中核酸分子的末端修饰有拉曼分子;
    - c3. 将c1制得的双链核酸适配体修饰后的量子点及c2制得的核酸分子修饰后的贵金属纳米粒子分别重悬于水中后混合,振荡后离心,即得。
7. 一种检测方法,其特征在于:包括以下步骤:  
将人血样离心分离得到血清后,将血清稀释后加入到权利要求1-5任一项所述的基于适配体功能化的SERS-FL传感器的溶液中,孵育后分离形成上清液和下层沉淀,将上清液进行FL检测,下层沉淀进行SERS检测,并分别与标准线性方程进行对比,得到检测结果。
8. 权利要求1-5任一项所述的基于适配体功能化的SERS-FL传感器在制备贫血症诊断试剂盒中的应用。

## 一种基于适配体功能化的SERS-FL传感器及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于纳米材料和生物传感技术领域,特别涉及一种基于适配体功能化的SERS-FL传感器及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 随着科技日新月异的发展,人们生活水平也显著提高但也伴随着一些健康状况,其中贫血症比较常见,大概20%的女性有患贫血症的风险。由于其种类较多,产生机制也不尽相同,因此其所造成的影响可大可小。贫血症主要包括由造血原料缺乏导致的缺铁性贫血、由骨髓造血机制下降导致的再生障碍性贫血、由促红血清生长因子缺乏造成的肾性贫血、由血红蛋白被大量破坏导致的地中海贫血等等。总之,贫血是一种消耗性疾病,不仅会降低生活质量,也容易诱发其他疾病的产生,因此贫血症早期的发现、诊断及治疗较为重要。

[0003] 目前临床上常见预判方法是检测血液中铁蛋白和铁饱和度,只能粗略判断,不稳定且无法准确。因此,开发一种能对血清直接定量分析的传感器,从而构建早期贫血症生物标志物的精准诊断分析方法具有重要的研究意义。

### 发明内容

[0004] 本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此,本发明提出一种基于适配体功能化的SERS-FL传感器及其制备方法和应用,该传感器能够对血清内特定生物标志物进行定量分析,且检测便捷高效,特异性强、灵敏度高、准确度高,有利于提高贫血早期的辨识度。

[0005] 本发明的上述技术目的是通过以下技术方案得以实现的:

[0006] 一种基于适配体功能化的SERS-FL传感器,包括:量子点,所述量子点上结合有核酸适配体,所述核酸适配体用于特异性结合待测分子;贵金属纳米粒子,所述贵金属纳米粒子上结合有核酸分子,所述核酸分子在远离所述贵金属纳米粒子的一端修饰有拉曼分子;其中,所述核酸分子被配置为能够与所述核酸适配体发生碱基互补配对而结合形成桥连双链;并且所述核酸分子上还具有若干个互补碱基,所述互补碱基被配置为在所述核酸适配体与所述待测分子特异性结合使所述桥连双链解链时,发生配对使所述核酸分子形成发卡结构。

[0007] 优选的,所述量子点为石墨烯量子点。

[0008] 优选的,所述石墨烯量子点的粒径为5-12nm。

[0009] 优选的,所述贵金属纳米粒子的粒径为50-150nm。

[0010] 优选的,所述核酸适配体的长度为30-60base。

[0011] 一种如上所述基于适配体功能化的SERS-FL传感器的制备方法,包括以下步骤:

[0012] a. 贵金属纳米粒子的制备:

- [0013] b.量子点的制备:
- [0014] c.SERS-FL传感器的制备:
- [0015] c1.将双核酸适配体加入到量子点的溶液中,振荡后离心;
- [0016] c2.将可与c1中的双链核酸适配体其中一条核酸链互补的核酸分子加入到贵金属纳米粒子的溶液中,振荡后离心,其中核酸分子的末端修饰有拉曼分子;
- [0017] c3.将c1制得的双链核酸适配体修饰后的量子点及c2制得的核酸分子修饰后的贵金属纳米粒子分别重悬于水中后混合,振荡后离心,即得。
- [0018] 进一步优选的,上述基于适配体功能化的SERS-FL传感器的制备方法,具体包括以下步骤:
- [0019] a.四氧化三铁/银粒子复合粒子的制备:
- [0020] a1.四氧化三铁的制备:将六水合氯化铁、乙酸钠及乙二醇混合分散后,进行水热反应,洗涤、干燥后得到四氧化三铁颗粒;
- [0021] a2.四氧化三铁/二氧化硅复合粒子的制备:取a1制得的四氧化三铁颗粒,加入乙醇溶液、氨水,逐滴加入正硅酸乙酯,搅拌,洗涤、干燥后得到四氧化三铁/二氧化硅复合粒子;
- [0022] a3.取a2制得的四氧化三铁/二氧化硅复合粒子,加入乙醇、银氨溶液,搅拌,加入聚乙烯吡咯烷酮的乙醇溶液,反应后,洗涤、干燥,即得到四氧化三铁/银粒子复合粒子;
- [0023] b.2-甲基咪唑锌盐/石墨烯量子点复合粒子的制备:
- [0024] b1.将柠檬酸、青霉胺及水混合后进行水热反应,冷却后用透析袋透析得到石墨烯量子点溶液;
- [0025] b2.取b1制得的石墨烯量子点溶液,加入六水硝酸锌,搅拌后逐滴加入2-甲基咪唑溶液,即得2-甲基咪唑锌盐/石墨烯量子点复合粒子;
- [0026] c.SERS-FL传感器的制备:
- [0027] c1.将活化巯基后的双链核酸适配体加入到b制得的2-甲基咪唑锌盐/石墨烯量子点复合粒子的溶液中,振荡后离心;
- [0028] c2.将可与c1中的双链核酸适配体其中一条核酸链互补的cDNA加入到a制得的四氧化三铁/银粒子复合粒子的溶液中,振荡后离心,其中cDNA的末端修饰有拉曼分子Cy3;
- [0029] c3.将c1制得的双链核酸适配体修饰后的2-甲基咪唑锌盐/石墨烯量子点复合粒子及c2制得的cDNA修饰后的四氧化三铁/银粒子复合粒子分别重悬于水中后混合,振荡后离心,即得。优选的,所述a1中水热反应的温度为190-220℃,反应时间为6-10小时。
- [0030] 优选的,所述a3中加入聚乙烯吡咯烷酮的乙醇溶液后,反应温度为60-100℃,反应时间为6-10小时。
- [0031] 优选的,所述b1中水热反应的温度为150-200℃,反应时间为2-6小时。
- [0032] 优选的,所述四氧化三铁/银粒子复合粒子的粒径为50-150nm。
- [0033] 优选的,所述核酸适配体的DNA链长度在为30-60base。
- [0034] 一种检测方法,包括以下步骤:将人血样离心分离得到血清后,将血清稀释后加入到上述的基于适配体功能化的SERS-FL传感器的溶液中,孵育后分离形成上清液和下层沉淀,将上清液进行FL检测,下层沉淀进行SERS检测,并分别与标准线性方程进行对比,得到检测结果。

[0035] 上述基于适配体功能化的SERS-FL传感器在制备贫血症诊断试剂盒中的应用。

[0036] 本发明的基于适配体功能化的SERS-FL传感器的制备方法得到的SERS-FL传感器是将具有专一性的双链核酸适配体修饰在量子点粒子表面,其互补链核酸分子修饰在贵金属纳米粒子表面,通过碱基互补配对形成双模桥联结构。当目标分子被双链核酸适配体识别后,核酸适配体的双链断开,贵金属纳米粒子表面上核酸分子因自身结构互补生成环状“发夹”DNA,导致核酸分子末端修饰的拉曼分子被迅速拉近至贵金属纳米粒子表面,在激光照射下产生强大的SERS增强信号,而此时被释放出来的量子点因荧光恢复得到蓝色的FL信号,这种独特的SERS-FL双模传感设计可成功用于实现人血清中乳铁蛋白和铁离子 $\text{Fe}^{3+}$ 双目标物的检测。

[0037] 本发明的有益效果是:

[0038] (1) 本发明基于适配体功能化的SERS-FL传感器的制备方法制备得到SERS-FL传感器具有性质稳定,制备简单,均一性强和稳定性好等优点,能够实际应用于血清等生物样品中。

[0039] (2) 本发明基于适配体功能化的SERS-FL传感器的检测方法其便捷高效,特异性强、灵敏度高、准确度高,有利于提高贫血症患者体内血清标志物的辨识度,构建早期贫血症的SERS-FL精准诊断分析方法。

## 附图说明

[0040] 图1为本发明基于适配体功能化的SERS-FL传感器制备及应用的实验流程示意图;

[0041] 图2为本发明基于适配体功能化的SERS-FL传感器制备过程中各粒子的形态表征图;

[0042] 图3为制备上述基于适配体功能化的SERS-FL传感器的过程中分别对2-甲基咪唑与六水硝酸锌的摩尔比、石墨烯量子点加入体积、柠檬酸与青霉胺的摩尔比、适配体孵育盐浓度、适配体浓度和孵育时间等进行优化的结果图;

[0043] 图4为采用上述基于适配体功能化的SERS-FL传感器分别对Lac和 $\text{Fe}^{3+}$ 的选择性和重现性考察;

[0044] 图5为采用上述基于适配体功能化的SERS-FL传感器分别对Lac建立的SERS线性方程以及对 $\text{Fe}^{3+}$ 建立的FL线性方程;

[0045] 图6为采用Lac商业试剂盒和 $\text{Fe}^{3+}$ 商业试剂盒建立的线性方程,以及分别采用上述传感器和试剂盒对8份人血清的检测结果对比图。

## 具体实施方式

[0046] 下面结合具体实施例对本发明做进一步的说明。

[0047] 实施例1:

[0048] 一种基于适配体功能化的SERS-FL传感器,包括:量子点,所述量子点上结合有核酸适配体,所述核酸适配体用于特异性结合待测分子;贵金属纳米粒子,所述贵金属纳米粒子上结合有核酸分子,所述核酸分子在远离所述贵金属纳米粒子的一端修饰有拉曼分子;其中,所述核酸分子被配置为能够与所述核酸适配体发生碱基互补配对而结合形成桥连双链;并且所述核酸分子上还具有若干个互补碱基,所述互补碱基被配置为在所述核酸适配

体与所述待测分子特异性结合使所述桥连双链解链时,发生配对使所述核酸分子形成发卡结构。

[0049] 如图1所示,一种基于适配体功能化的SERS-FL传感器的具体制备方法,包括以下步骤:

[0050] a. 四氧化三铁/银粒子复合粒子的制备:

[0051] a1. 四氧化三铁的制备:称取1-4g六水合氯化铁和2-6g乙酸钠加入100mL烧杯中,加入20-80mL乙二醇用玻璃棒搅拌10min,超声分散20min后,转入聚四氟乙烯反应釜,并置于190-220℃高压反应釜中水热反应6-10h,冷却至室温后,通过磁性分离用乙醇和水各洗涤数次,然后在60℃真空干燥12h,得到四氧化三铁颗粒;

[0052] a2. 四氧化三铁/二氧化硅复合粒子的制备:称取20mg a1制得的四氧化三铁颗粒,加入20mL乙醇和水的混合液(v/v,4:1),0.2mL氨水,搅拌20min,待搅拌均匀后,逐滴加入0.2mL正硅酸乙酯,然后在室温下搅拌8h,通过磁性分离用乙醇洗3次,60℃真空干燥12h,得到四氧化三铁/二氧化硅复合材;

[0053] a3. 取a2制得的四氧化三铁/二氧化硅复合粒子,加入20mL乙醇,将现配的银氨溶液缓慢加入溶液中,搅拌1h,提前10min加入50mL 20-60mg/mL聚乙烯吡咯烷酮的乙醇溶液,置于60-100℃条件下反应6-10h,通过磁性分离用乙醇洗3次,60℃真空干燥12h,得到四氧化三铁/银粒子复合粒子,四氧化三铁/银粒子复合粒子的粒径为50-150nm;

[0054] b. 2-甲基咪唑锌盐/石墨烯量子点复合粒子的制备:

[0055] b1. 称取1-3g柠檬酸和0.5-2.0g青霉胺加入烧杯中,倒入20mL去离子水,搅拌均匀后,转入到聚四氟乙烯反应釜中,置于150-200℃烘箱中反应2-6h,冷却至室温后,用3KDa透析袋连续透析24h,得到石墨烯量子点溶液,石墨烯量子点的粒径为5-12nm;

[0056] b2. 取2mLb1制得的石墨烯量子点溶液,加入6.25mg/mL六水硝酸锌,搅拌20min,使其充分混匀,逐滴加入2-甲基咪唑溶液,继续搅拌2-6h,离心2次得到2-甲基咪唑锌盐/石墨烯量子点复合粒子;

[0057] c. SERS-FL传感器的制备:

[0058] c1. 取500μL 1μM DNA与等体积的三(2-羧乙基)膦溶液置于暗处1h,活化巯基,然后加入到b制得的2-甲基咪唑锌盐/石墨烯量子点复合粒子的溶液中,置于振荡器反应12h,离心分离两次,其中DNA链长度在为30-60base;

[0059] c2. 将可与c1中的DNA其中一条核酸链互补的cDNA加入到a制得的四氧化三铁/银粒子复合粒子的溶液中,置于振荡器反应12h,离心分离两次,其中cDNA的末端修饰有拉曼分子Cy3;

[0060] c3. 将c1制得的DNA修饰后的2-甲基咪唑锌盐/石墨烯量子点复合粒子及c2制得的cDNA修饰后的四氧化三铁/银粒子复合粒子分别重悬于水中后混合,振荡后离心,即得。

[0061] 图2中图A为四氧化三铁、图B为四氧化三铁/二氧化硅复合粒子,图C和图D为四氧化三铁/银粒子复合粒子,XRD图谱可证明石墨烯量子点(图E)和四氧化三铁/银粒子复合粒子(图F)制备成功,XPS图谱可进一步证明2-甲基咪唑锌盐/石墨烯量子点复合粒子(图G)和四氧化三铁/银粒子复合粒子(图H)制备成功。

[0062] 实施例2:

[0063] 一种检测方法,包括以下步骤:

[0064] (1) 将乳铁蛋白标准品用PBS稀释至0、1、10、30、50、70和100ng/mL,将铁离子标准品用水稀释至0.01、0.5、0.1、0.2、0.4、0.6 $\mu$ M,然后取0.02mL双标准品混合品加入0.5mL实施例1制得的SERS-FL传感器溶液中,37 $^{\circ}$ C摇床上避光孵育20min,通过磁性分离吸出上清液,用PBS清洗2次,将上清液进行FL检测,下层沉淀用于SERS检测,得到不同浓度相应线性方程;

[0065] (2) 将获取的新鲜人血样在室温条件下放置半小时,然后置于4000rpm离心机离心5min,即得到上层黄色正常血清样品,分管储存于-20 $^{\circ}$ C冰箱备用,取0.2mL血清稀释50倍,各取3mL加入实施例1制得的SERS-FL传感器溶液中,在37 $^{\circ}$ C摇床上孵育培养12h,通过磁性分离吸出上清液和下层沉淀,将上清液进行FL检测,下层沉淀进行SERS检测,并分别与步骤(1)中相应线性方程进行对比,得到检测结果。

[0066] 为了制备均一性强和稳定性好的传感器,分别对制备过程中2-甲基咪唑与六水硝酸锌的摩尔比、石墨烯量子点加入体积、柠檬酸与青霉胺的摩尔比、适配体孵育盐浓度、适配体浓度和孵育时间等反应条件进行优化,结果如图3所示;

[0067] 为了考察传感器的选择性和重现性,分别采用一定浓度的Lac、Cys、Thr、GSH、His、Glu、Na $^{+}$ 、K $^{+}$ 、Fe $^{2+}$ 、Fe $^{3+}$ 、Mg $^{2+}$ 等不同物质进行考察,结果说明该传感器对Lac和Fe $^{3+}$ 的响应最高,因此选择性良好;并且经过9次重复测试,Lac和Fe $^{3+}$ 的RSDs均在5%以内说明重现性好,如图4所示;

[0068] 为了对两种目标标志物进行定量分析,采用上述传感器对Lac和Fe $^{3+}$ 分别构建SERS/FL线性方程曲线,结果如图5所示;

[0069] 为了更好地判断传感器检测的准确性,采用Lac商业试剂盒和Fe $^{3+}$ 商业试剂盒分别对Lac和Fe $^{3+}$ 建立线性曲线方程,然后采用上述传感器和试剂盒等两种方法对8份不同人血清进行定量分析,其RSDs小于10%,说明该方法准确可靠,结果如图6所示。

[0070] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

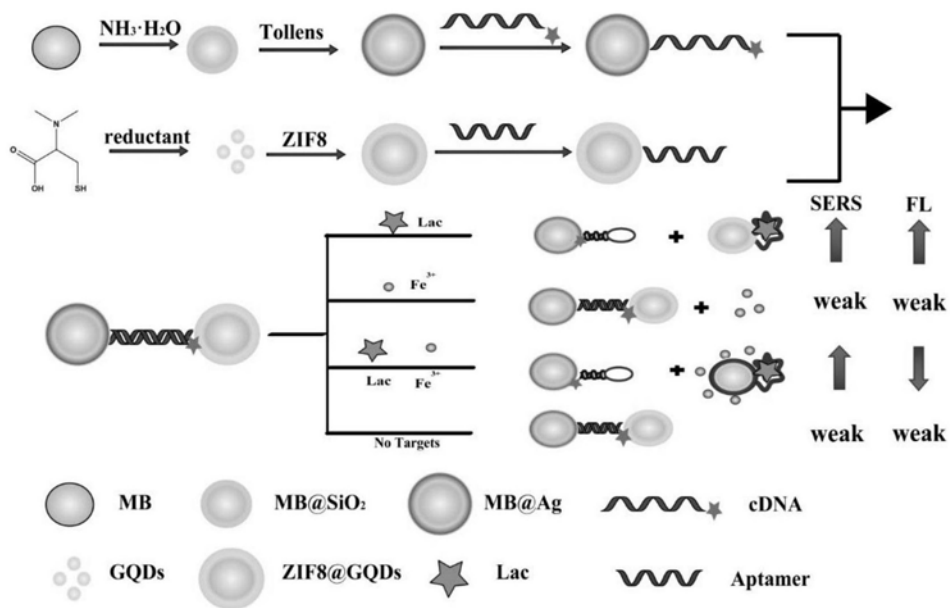


图1



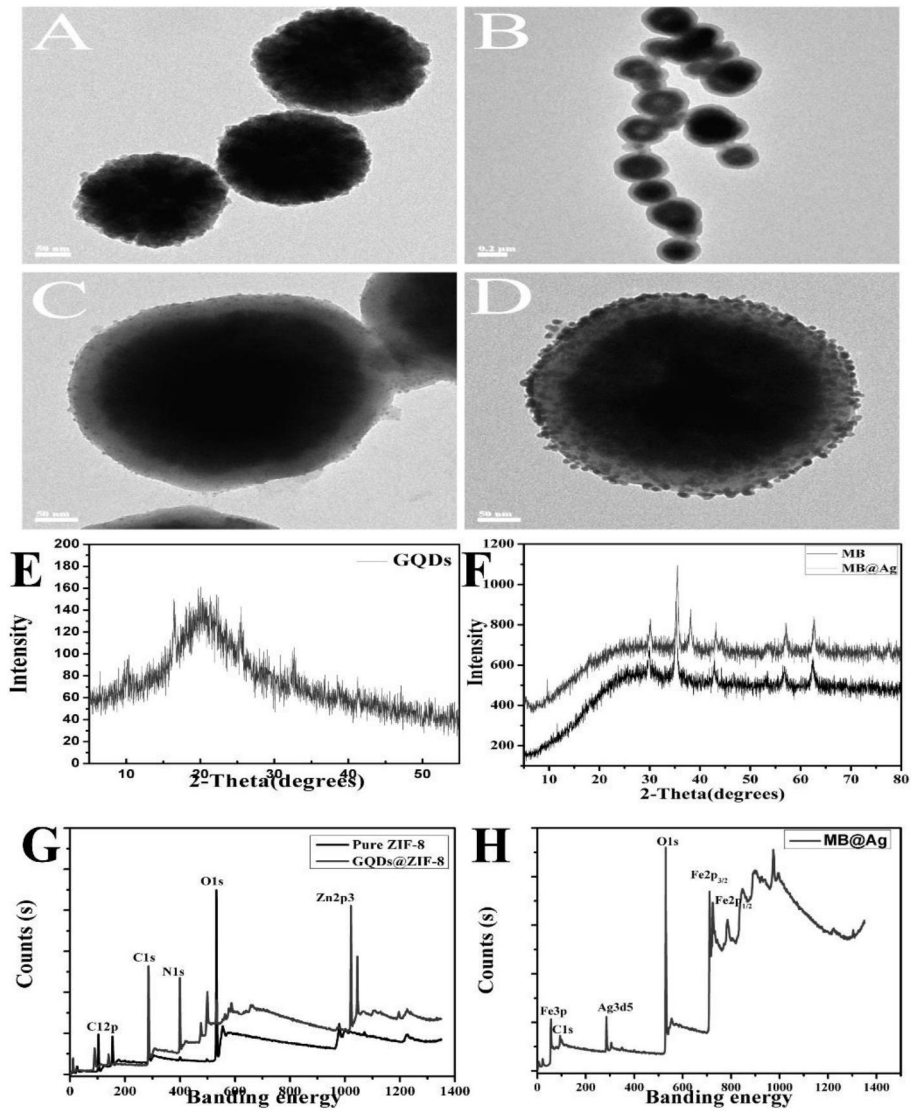


图2

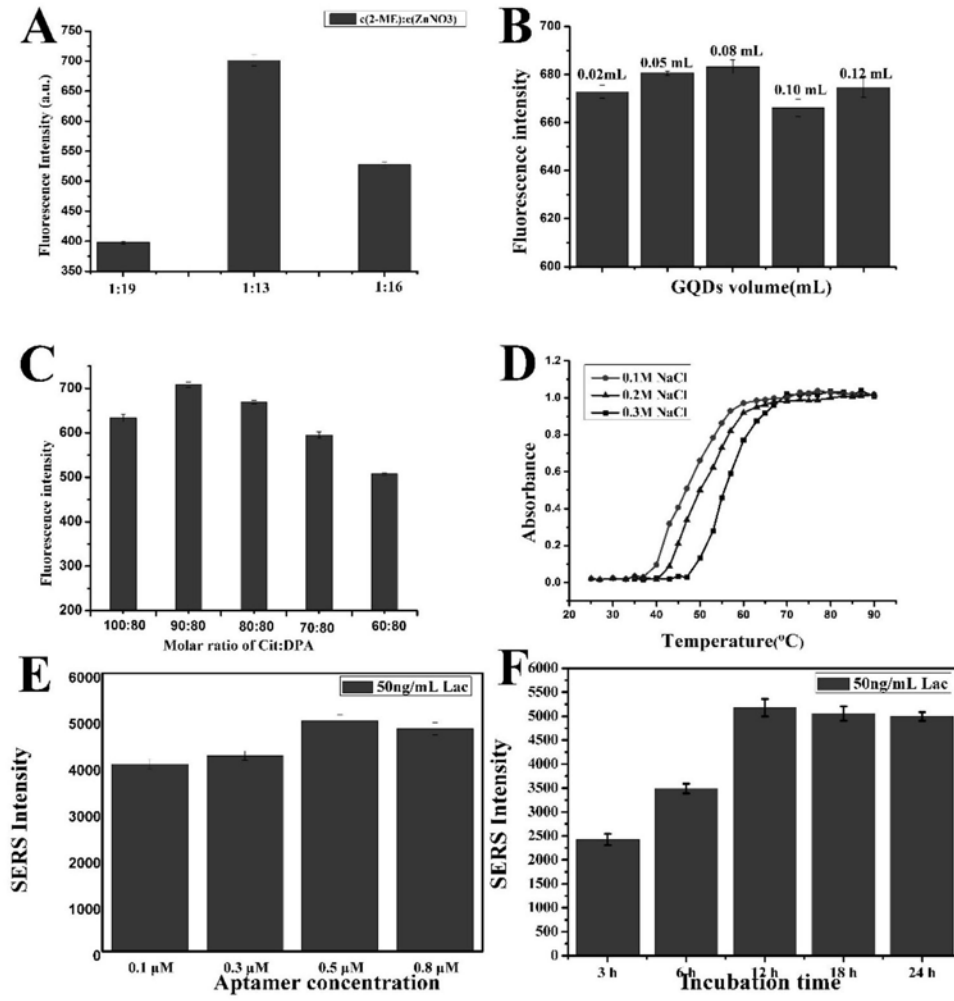


图3

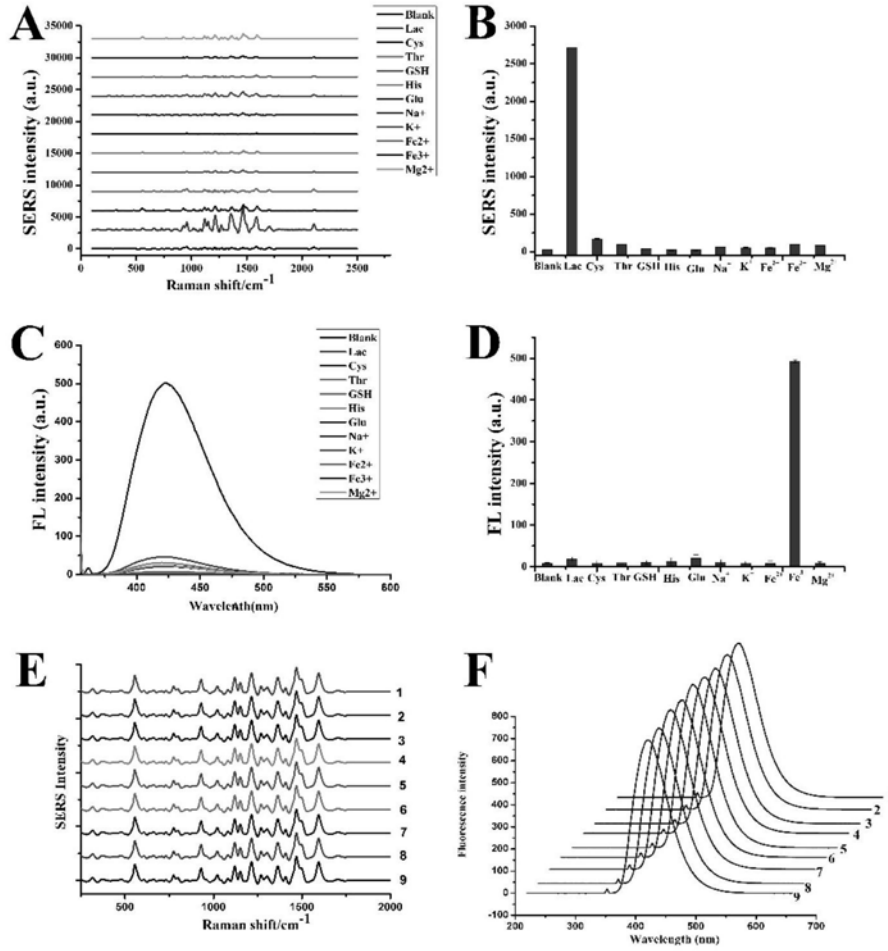


图4

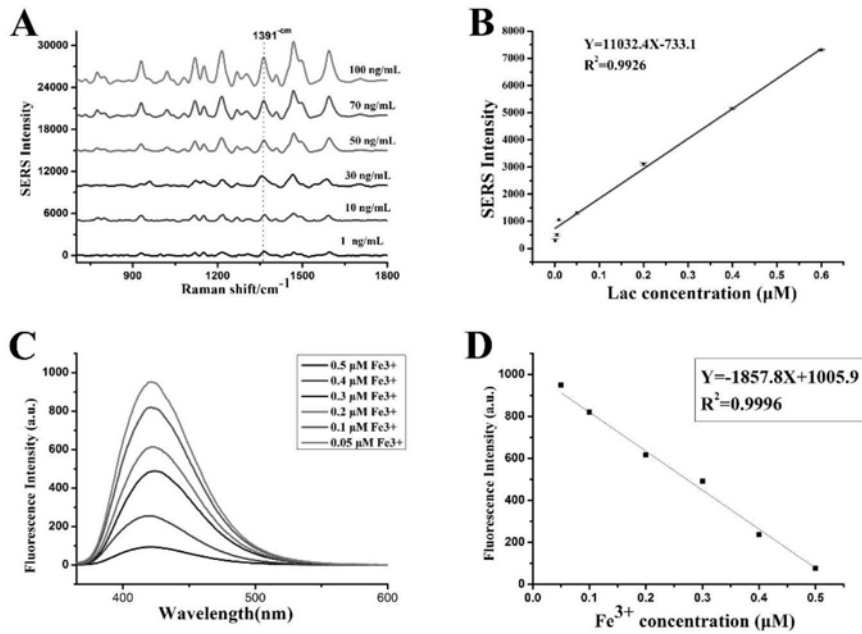


图5

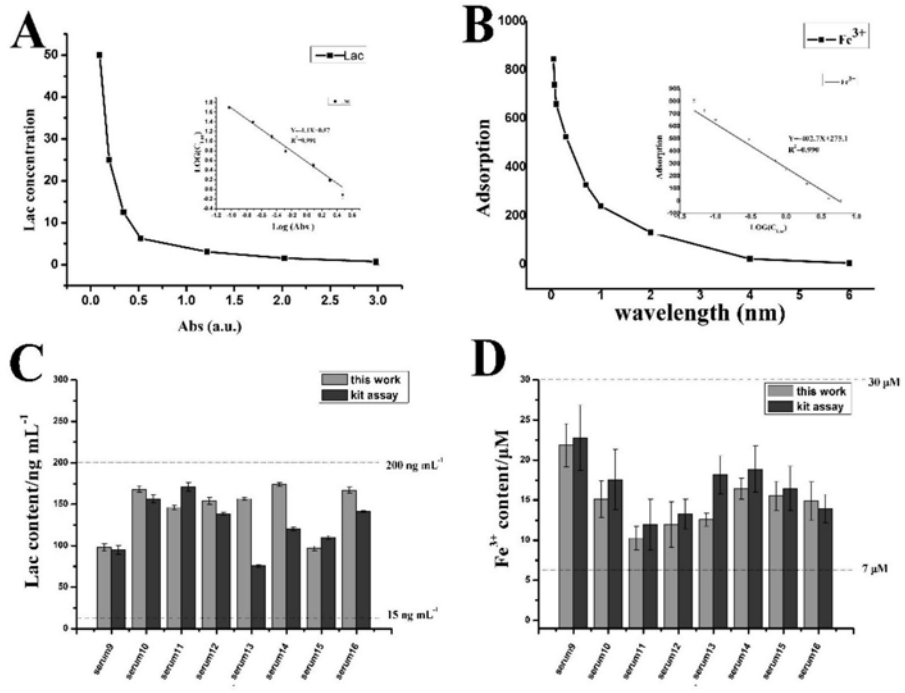


图6