



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104711347 A

(43) 申请公布日 2015.06.17

(21) 申请号 201510102427.7

(22) 申请日 2015.03.09

(71) 申请人 山东大学

地址 250061 山东省济南市历下区文化西路
44号

(72) 发明人 王磊 姜玮 孙杰威

(74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司 37221

代理人 赵妍

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页

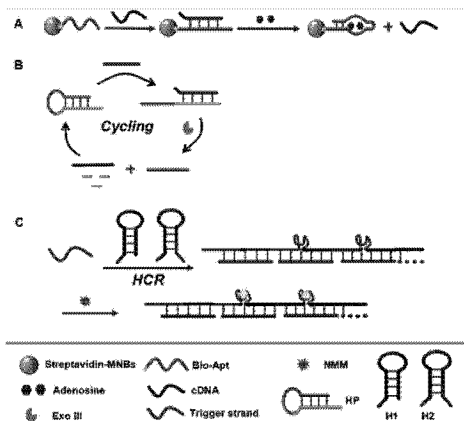
序列表5页 附图6页

(54) 发明名称

基于双重扩增策略构建的免标记荧光适体传感器检测腺苷

(57) 摘要

本发明公开了一种基于双重扩增策略构建的免标记荧光适体传感器检测腺苷,包括以下步骤:(1)链霉亲和素化磁珠-探针的制备;(2)Exo III 辅助的 DNA 循环和 HCR 反应;(3) 荧光测量:HCR 反应完成后,向反应产物中加入 NMM 和 KCl,孵育后进行荧光测量,得荧光值;(4) 计算:根据上述所测得的荧光值利用下述线性方程计算含有腺苷的待检测物中腺苷的浓度。本发明中的两种信号扩增策略的结合为体液中低腺苷水平的检测提供了较高的灵敏度;该方法还能显著的区分癌症病人和正常人尿液中腺苷的含量,表明该方法能够为医学研究和早期临床诊断提供一种新的可靠的用于腺苷定量的策略。



1. 一种基于双重扩增策略构建的免标记荧光适体传感器,其特征是:包含催化链、适体链和链霉亲和素化磁球三功能探针;

其中,所述催化链为:5'-ACT GCA TCG CAA TAC TCG ATT TTT T-3',核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;

所述适体链为:5'-biotin-TTT TTT TTT ACC TGG GGG AGT ATT GCG GAG GAA GTT-3',核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 如权利要求1所述的基于双重扩增策略构建的免标记荧光适体传感器,其特征是:添加的链霉亲和素磁球呈悬浮液状态,浓度为 3.324×10^{11} beads mL^{-1} ,添加的体积占溶液总体积的1/11,在溶液中,催化链的浓度为 $4.55 \mu\text{mol L}^{-1}$,适体链的浓度为 $4.55 \mu\text{mol L}^{-1}$ 。

3. 权利要求1所述的基于双重扩增策略构建的免标记荧光适体传感器在检测腺苷中的应用。

4. 权利要求1所述的基于双重扩增策略构建的免标记荧光适体传感器检测腺苷的方法,其特征是,具体步骤如下:

(1) 链霉亲和素化磁球-探针的制备:

首先,用TTL缓冲液对链霉亲和素化的磁球洗涤,得活化后的链霉亲和素化的磁球;

然后,将分装好的适体链和催化链进行退火,退火后冷却至室温;随后将两者混合并与活化后的链霉亲和素化磁球混合在室温下孵育;

最后,孵育后的链霉亲和素化磁球用PBS缓冲液洗涤,制得链霉亲和素化磁球-探针;

(2) Exo III 辅助的DNA循环和HCR反应:

首先,将含有腺苷的待检测物与TNaK缓冲液加入到试管中,在室温下孵育;随后,在磁场作用下分离出链霉亲和素化磁球,并保留反应液至新离心管中;

然后,分别取探针HP, Exo III和 $10 \times$ Exo III缓冲液加入到离心管中;混匀后进行Exo III辅助DNA循环反应;水解完成之后,加热以终止酶的活性;

最后,加入发卡探针H1和探针H2,混匀进行HCR反应;

(3) 荧光测量

HCR反应完成后,向反应产物中加入NMM和KCl,孵育后进行荧光测量,得荧光值;

(4) 计算:根据上述所测得的荧光值利用下述线性方程计算含有腺苷的待检测物中腺苷的浓度。

5. 如权利要求4所述的检测腺苷的方法,其特征是:步骤(1)中,所有的洗涤步骤均是在外加磁场作用下完成的;

TTL缓冲液对链霉亲和素化的磁球洗涤次数为5次;所述退火温度为 95°C ,时间为5min;所述孵育时间为2h;链霉亲和素化磁球用PBS缓冲液洗涤的次数2次;

所述TTL缓冲液的组成为:由Tris-HCl、Tween20、LiCl和水组成,其中,各组分的浓度为: 0.1mol L^{-1} Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% (v/v) Tween-20, 1.0mol L^{-1} LiCl;

所述PBS缓冲液的组成为:由NaCl、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 和水组成,其中,各组分的浓度为: 0.15mol L^{-1} NaCl, 7.6mmol L^{-1} NaH_2PO_4 , 2.4mmol L^{-1} Na_2HPO_4 , pH 7.4。

6. 如权利要求4所述的检测腺苷的方法,其特征是:步骤(2)中,

所述含有腺苷的待检测物为人的尿液,用量为 $5 \mu\text{L}$;

所述TNaK缓冲液的组成为:Tris、NaCl、KCl和水组成,其中各组分的浓度为:

20mmol L⁻¹Tris, 600mmol L⁻¹NaCl, 5mmol L⁻¹KCl, pH 7.5; 添加量为 15 μL;

所述孵育时间为 2h;

所述探针 HP 为: 5'-GCA ATA CTC GAA CAC GTT ACC-3', 核苷酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示; 浓度为 5 μmol L⁻¹, 用量为 5 μL;

所述 10×Exo III 缓冲液的组成为: Tris-HCl、MgCl₂、DTT 和水组成, 其中, 各组分的浓度为: 0.5mol L⁻¹Tris-HCl, 50mmol L⁻¹MgCl₂, 10mmol L⁻¹DTT; 添加量为 5 μL。

7. 如权利要求 4 所述的检测腺苷的方法, 其特征是: 步骤 (2) 中,

所述 Exo III 的用量为 0.20 ~ 0.40U mL⁻¹;

混匀后放至 37°C 进行 Exo III 辅助 DNA 循环反应;

所述探针 HP、H1 和 H2 在使用之前进行退火, 退火的步骤是: 探针 HP、H1、H2 在 95°C 下退火 5min, 并冷却至室温;

水解完成之后, 加热以终止酶的活性的加热时间为 20min, 温度为 75°C;

所述 HCR 反应的温度是 37°C。

8. 如权利要求 4 所述的检测腺苷的方法, 其特征是: 步骤 (2) 中,

所述发卡探针 H1 为: 5'-CTC GAA CAC GTT ACC GGG TAG GGC GTT AGG AGG TAA CGT GTT CGA GTA TTG C-3', 核苷酸序列如 SEQ ID NO. 11 所示; 浓度为 $0.8 \times 10^{-6} \sim 1.2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, 用量为 5 μL;

所述探针 H2 为: 5'-TGG GTT CCT AAC GCC CTA CCC GGT AAC GTG TTC GAG GCA ATA CTC GAA CAC GTT ACC GGG TAG GGC GGG-3', 核苷酸序列如 SEQ ID NO. 12 所示; 浓度为 $1.2 \times 10^{-6} \sim 1.8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, 用量为 5 μL。

9. 如权利要求 4 所述的检测腺苷的方法, 其特征是: 步骤 (3) 中, 所述 NMM 的浓度为 $1.5 \times 10^{-6} \sim 2.5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, 用量为 2 μL; 所述 KCl 的浓度为 1mol L⁻¹, 用量为 8 μL;

所述荧光测量中荧光光度计的基本设置是: 室温条件下, 激发波长为 399nm, 扫描范围为 550 ~ 680nm, 狭缝宽度均为 10nm, PMT 电压 700V。

10. 如权利要求 4 所述的检测腺苷的方法, 其特征是: 步骤 (4) 中, 利用下述线性方程计算得到腺苷的浓度: $\Delta F = 15.12 + 143.58 \times 10^5 C$, $r = 0.998$;

其中, ΔF 表示荧光净信号值, C 表示腺苷的浓度, 单位为 mol L⁻¹; 该线性方程的线性范围是 1.0×10^{-6} mol L⁻¹ ~ 1.0×10^{-4} mol L⁻¹ 之间。

基于双重扩增策略构建的免标记荧光适体传感器检测腺苷

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于外切酶 III 辅助的 DNA 循环和杂交链反应的双重扩增策略构建的免标记荧光适体传感器检测腺苷。

背景技术

[0002] 腺苷是一种内源性核苷,也是 ATP 降解产物,其中枢神经系统、外周神经系统和免疫系统中起着非常重要的作用 [1, 2]。最近,越来越多的证据表明腺苷具有促进肿瘤活性的作用 [3-5]。因此,作为一种潜在的肿瘤标志物,腺苷的灵敏检测对理解其在肿瘤细胞增殖和进一步说明其在癌症临床诊断和治疗方面功能上具有重要的作用。传统方法包括高效液相色谱法 (HPLC) [6, 7]、毛细管电泳法 [8] 和放射性免疫法 [9],但是这些方法具有一些局限性,比如繁琐的样品前处理、较大的样品和试剂用量、低灵敏度以及放射性元素的危害。作为另一种选择,荧光适体传感器因其简便、快速、高选择性和灵敏度的优势引起了越来越多的关注。为了获得荧光信号,研究者建立了一些常见的标记为基础的方法 [10-12]。Dong 课题组构建了一种基于氧化石墨烯和外切酶 III 辅助信号扩增的荧光适体传感器 [12]。这种适体传感器实现了对腺苷的灵敏检测,但是标记的步骤可能会降低信号探针的性能。此外,复杂性和高成本也会限制该方法的普遍应用。

[0003] 为了简化实验并降低成本,研究者建立了一些免标记的荧光适体传感器用于检测腺苷 [13-15]。Lu 课题组建立了一种基于孔雀石绿荧光的适体传感器,实现对腺苷的免标记检测 [13],但是因为目标物与信号是 1:1 的比率,这种方法的灵敏度相对较低,检测限为 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 。为了提高灵敏度,一些信号扩增的策略被引入到免标记荧光适体传感器的构建中,用于腺苷的检测分析 [16-18]。在这些方法当中,我们课题组报道了一种基于目标物催化发卡自组装的免标记适体传感器用于腺苷的扩增检测 [17],通过采用信号扩增,该方法的灵敏度有了一定的提高,检测限为 $6.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$,但是这仍然达不到体液中低腺苷含量的检测水平 [19-21]。因此,腺苷检测的灵敏度需要进一步提高。

[0004] 此外,专利《基于共区域化触发链式杂交反应的适体传感器检测腺苷申请号: 20140344669. 2》中报道了一种通过共区域化诱导的链式杂交反应为基础的适体传感器检测腺苷,其主要是利用 HCR 和 SYBR Green I 产生双重放大的荧光信号,同时结合共区域化和磁球分离作用以实现低的背景。但是,由于该发明将识别腺苷的适体链分为两部分,这就降低了适体本身的结合常数,影响适体与目标物的结合。而本发明是采用不同原理的荧光传感设计——Exo III 辅助的 DNA 循环和 HCR 构建的新型荧光适体传感器,实现对腺苷的灵敏检测;同时本发明是采用完整的适体结构,避免了上述结合常数低的问题。

[0005] 在过去的十年里,许多信号扩增策略作为一种有效提高目标物检测灵敏度的工具被建立 [22-25]。Exo III 辅助的 DNA 循环方法便是常用方法之一。不同于切割内切酶,Exo III 无需特异的识别位点,能够选择性的催化双链 DNA,从其 3' 突出端或嵌入端开始逐步水解成单核苷酸 [23, 26-28]。通过 Exo III 辅助的 DNA 循环反应,可以获得大量的单链 DNA 用于信号扩增。但是,采用 Exo III 辅助 DNA 循环的大多数工作均涉及标记步骤,比如

标记有荧光团用于光学检测,或标记有氧化还原基团用于电化学分析 [12, 27, 29, 30]。

发明内容

[0006] 针对现有技术中存在的不足,本发明的目的是提供一种基于双重扩增策略构建的免标记荧光适体传感器,将该适体传感器用于腺苷的分析检测。

[0007] 为了获得免标记的基于 Exo III 辅助 DNA 循环方法用于检测腺苷,结合了杂交链反应 (HCR) 来产生大量的 G- 四分体结构,通过许多 N- 甲基卟啉二丙酸 IX (NMM) 的绑定获得有效的信号输出和信号扩增 [31-33]。通过这两种信号扩增策略,构建了一种新型免标记和双重扩增的荧光适体传感器用于灵敏检测腺苷。首先,构建了一个包含催化链、适体链和链霉亲和素化磁球的三功能探针。该链霉亲和素化磁球的功能是对目标物进行富集和分离从而获得低背景信号。当目标物被适体链识别之后,催化链会立即被释放。然后,催化链触发 Exo III 辅助的 DNA 循环,产生大量的 DNA 片段,从而获得第一次扩增。随后, DNA 片段作为触发链引发 HCR,形成带有许多 G- 四分体结构的双螺旋,获得了第二次扩增。最终, NMM 插入到 G- 四分体结构中,产生增强的荧光响应,实现了免标记的检测。在该方法中,少量的腺苷可被转化成大量的 DNA 触发链,致使目标物的扩增。该方法具有高的灵敏度,检测限为 $4.2 \times 10^{-7} \text{mol L}^{-1}$,这主要归功于 Exo III 辅助 DNA 循环和 HCR 的双重扩增作用以及链霉亲和素化磁球的低背景信号。更为重要的是,该方法能够显著的区分癌症病人和正常人尿样中腺苷的含量,表明我们的方法能够为医学研究和早期临床诊断提供一种新的可靠的用于腺苷定量的策略。

[0008] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0009] 一种基于双重扩增策略构建的免标记荧光适体传感器,包括催化链、适体链和链霉亲和素化磁球三功能探针;

[0010] 其中,所述催化链 (cDNA) 为:5' -ACT GCA TCG CAA TAC TCG ATT TTT T-3' (核苷酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示);

[0011] 所述适体链 (Bio-Apt) 为:5' -biotin-TTT TTT TTT ACC TGG GGG AGT ATT GCG GAG GAA GTT-3' (如 SEQ ID NO. 1 所示);

[0012] 所述链霉亲和素化磁球,为现有技术中已有的常规产品,密度为 1.343g mL^{-1} ,直径为 350nm。

[0013] 其中,添加的链霉亲和素磁球呈悬浮液状态,浓度为 $3.324 \times 10^{11} \text{beads mL}^{-1}$,添加的体积占溶液总体积的 1/11,在溶液中,催化链的浓度为 $4.55 \mu \text{M}$,适体链的浓度为 $4.55 \mu \text{M}$ 。

[0014] 所述基于双重扩增策略构建的免标记荧光适体传感器,用于检测腺苷的过程如下:

[0015] (1) 链霉亲和素化磁球-探针的制备:因链霉亲和素化磁球含有大量表面活性剂,为了防止磁球的聚集,在使用前需将这些表面活性剂洗去,以活化磁球的功能。具体步骤如下:

[0016] 首先,用 TTL 缓冲液对链霉亲和素化磁球洗涤,得到活化后的链霉亲和素化磁球。

[0017] 然后,将分装好的 Bio-Apt 和 cDNA 退火,冷却至室温;随后将两者混合并与活化后的链霉亲和素化的磁球混合在室温下孵育。

[0018] 最后, 孵育后的链霉亲和素化磁球用 PBS 缓冲液洗涤, 以除去多余的 cDNA, 得到链霉亲和素化磁球-探针。本工作中所有的洗涤步骤均是在外加磁场作用下完成的。

[0019] 所述 TTL 缓冲液的组成为: 由 Tris-HCl、Tween20、LiCl 和水组成, 其中, 各组分的浓度为: 0.1mol L^{-1} Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% (v/v) Tween-20, 1.0mol L^{-1} LiCl。

[0020] 所述 PBS 缓冲液的组成为: 由 NaCl、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 和水组成, 其中, 各组分的浓度为: 0.15mol L^{-1} NaCl, 7.6mmol L^{-1} NaH_2PO_4 , 2.4mmol L^{-1} Na_2HPO_4 , pH 7.4。

[0021] 进一步地, 用 TTL 缓冲液对链霉亲和素化磁球洗涤的次数为 5 次。

[0022] 进一步地, 退火温度为 95°C , 时间为 5min。

[0023] 进一步地, 孵育时间为 2h。

[0024] 进一步地, 链霉亲和素化磁球用 PBS 缓冲液洗涤的次数为 2 次。

[0025] (2) Exo III 辅助的 DNA 循环和 HCR 反应:

[0026] 首先, 将含有腺苷的待检测物与 TNaK 缓冲液加入到试管中, 在室温下孵育; 随后, 在磁场作用下分离出链霉亲和素化磁球, 并保留反应液至新离心管中。

[0027] 然后, 分别取探针 HP, Exo III 和 $10\times$ Exo III 缓冲液加入到离心管中。混匀后进行 Exo III 辅助 DNA 循环反应。水解完成之后, 加热以终止酶的活性。

[0028] 最后, 加入发卡探针 H1 和 H2, 混匀进行 HCR 反应。

[0029] 所述探针 HP 为: $5' -\text{GCA ATA CTC GAA CAC GTT ACC}-3'$ (核苷酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示);

[0030] 所述探针 H1 为: $5' -\text{CTC GAA CAC GTT ACC GGG TAG GGC GTT AGG AGG TAA CGT GTT CGA GTA TTG C}-3'$ (核苷酸序列如 SEQ ID NO. 11 所示)。

[0031] 所述探针 H2 为: $5' -\text{TGG GTT CCT AAC GCC CTA CCC GGT AAC GTG TTC GAG GCA ATA CTC GAA CAC GTT ACC GGG TAG GGC GGG}-3'$ (核苷酸序列如 SEQ ID NO. 12 所示)。

[0032] 所述 TNaK 缓冲液的组成为: Tris、NaCl、KCl 和水组成, 其中各组分的浓度为: 20mmol L^{-1} Tris, 600mmol L^{-1} NaCl, 5mmol L^{-1} KCl, pH 7.5。添加量为 $15\ \mu\text{L}$ 。

[0033] 所述 $10\times$ Exo III 缓冲液的组成为: Tris-HCl、 MgCl_2 、DTT 和水组成, 其中, 各组分的浓度为: 0.5mol L^{-1} Tris-HCl, 50mmol L^{-1} MgCl_2 , 10mmol L^{-1} DTT。

[0034] 所述探针 HP 的浓度为 $5\ \mu\text{M}$, 用量为 $5\ \mu\text{L}$ 。

[0035] 所述 Exo III 的用量为 $0.20 \sim 0.40\text{U mL}^{-1}$ 。

[0036] 所述发卡探针 H1 的浓度为 $0.8 \times 10^{-6} \sim 1.2 \times 10^{-6}\text{M}$, 优选浓度 $1.0 \times 10^{-6}\text{M}$, 用量为 $5\ \mu\text{L}$ 。

[0037] 所述发卡探针 H2 的浓度为 $1.2 \times 10^{-6} \sim 1.8 \times 10^{-6}\text{M}$, 优选浓度 $1.5 \times 10^{-6}\text{M}$, 用量为 $5\ \mu\text{L}$ 。

[0038] 进一步地, 所述含有腺苷的待检测物为人的尿液, 添加量为 $5\ \mu\text{L}$ 。

[0039] 进一步地, 孵育时间为 2h。

[0040] 进一步地, 混匀后放至 37°C 进行 Exo III 辅助 DNA 循环反应。

[0041] 进一步地, 探针 HP、H1 和 H2 在使用之前进行退火, 目的是确保发卡结构的形成。退火的步骤是: 探针 HP、H1、H2 在 95°C 下退火 5min, 并冷却至室温。

[0042] 进一步地, 水解完成之后, 加热以终止酶的活性的加热时间为 20min, 温度为 75°C 。

[0043] 进一步地, HCR 反应的温度是 37°C。

[0044] (3) 荧光测量:

[0045] HCR 反应完成后, 向反应产物中加入 NMM 和 KCl, 孵育后进行荧光测量, 得荧光值。

[0046] 所述 NMM 的浓度为 $1.5 \times 10^{-6} \sim 2.5 \times 10^{-6} \text{M}$, 优选浓度为 $2.0 \times 10^{-6} \text{M}$, 用量为 $2 \mu\text{L}$ 。

[0047] 所述 KCl 的浓度为 1M, 用量为 $8 \mu\text{L}$ 。

[0048] 进一步地, 孵育的温度是 37°C, 时间是 20 ~ 40min。

[0049] 进一步地, 所述荧光测量中荧光光度计的基本设置是: 室温条件下, 激发波长为 399nm, 扫描范围为 550 ~ 680nm, 狭缝宽度均为 10nm, PMT 电压 700V。

[0050] (4) 计算: 根据上述所测得的荧光值, 利用下述线性方程计算含有腺苷的待检测物中腺苷的浓度。

[0051] 进一步地, 利用下述线性方程计算得到腺苷的浓度:

[0052] $\Delta F = 15.12 + 143.58 \times 10^5 C, r = 0.998$;

[0053] 其中, ΔF 表示荧光净信号值, C 表示腺苷的浓度, 单位为 mol L^{-1} ; 该线性方程的线性范围是 $1.0 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{mol L}^{-1}$ 之间。

[0054] 本发明基于双重扩增策略构建的免标记荧光适体传感器的设计原理: 该新型免标记且灵敏检测腺苷的荧光适体传感器主要由三部分组成, 如原理图 1 所示, 首先生物素化标记的腺苷适体链 (Bio-Apt) 连接到链霉亲和素化磁球上, 另一条单链-催化链 (cDNA) 与该适体链互补, 如此便构建了一个由催化链、适体链和链霉亲和素化磁球的三功能探针。在腺苷存在条件下, 适体链与腺苷结合, 诱导适体构象发生改变, 使得双链 DNA 不稳定, 最终导致 cDNA 的释放。其次, cDNA 通过粘性末端打开发卡 HP, 形成带有 3' 平末端的双链 DNA。Exo III 能够从 3' 平端逐步催化水解双链 DNA 生成单核苷酸, 同时释放出 cDNA 并形成触发链。释放的 cDNA 进一步绑定另一个 HP 分子触发新一轮的切割过程, 与此同时, 在每一轮切割过程中均释放出触发链。最终, 触发链通过粘性末端介导的链置换反应打开发卡探针 H1; 类似地, 打开的 H1 暴露出新的序列能够打开 H2, H2 包含有触发链相同序列, 因此 H2 能够进一步打开 H1, 致使两个发卡探针 H1 和 H2 的自主交替杂交, 形成带有切口的双螺旋。需要注意的是, G-四分体序列存在于 H2 的茎部和末端, 当 H2 处于发卡状态时, 部分 G-四分体序列隐藏于 H2 的茎部, 因此不能够形成 G-四分体结构。但是, 通过 HCR 反应, G-四分体序列能够自组装形成整合的 G-四分体结构。因此, 形成了包含许多 G-四分体结构的带切口双螺旋。在此, 选择 NMM 作为信号报告者, 其对 G-四分体具有明显的结构选择性, 对三链体、双链或单链形式不起作用。一旦向该系统加入此报告者, 便会通过与许多 G-四分体结构的绑定实现一个增强的荧光响应。

[0055] 本发明的有益效果是:

[0056] 本发明建立了一种免标记且灵敏的双重扩增荧光适体传感器用于腺苷的检测。通过 Exo III 辅助 DNA 循环反应和 HCR 相结合, 该新型方法主要具有以下优势: (i) 两种信号扩增策略的结合为体液中低腺苷水平的检测提供了较高的灵敏度; (ii) HCR 过程中形成的 G-四分体结构提供了免标记的检测, 使得该系统更加简便, 且成本较低; (iii) 该方法还能显著的区分癌症病人和正常人尿液中腺苷的含量, 表明该方法能够为医学研究和早期临床诊断提供一种新的可靠的用于腺苷定量的策略。

附图说明

[0057] 图 1 是基于 Exo III 辅助的 DNA 循环和杂交链反应的荧光适体传感器工作原理示意图。

[0058] 图 2 典型实验的荧光图谱, 其中, (a)H1+H2, (b)HP+Exo III+H1+H2, (c)Bio-Apt+cDNA+HP+Exo III+H1+H2, (d)Bio-Apt+cDNA+HP+Exo III+H1+H2+adenosine($1.0 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$)。

[0059] 图 3 示:HCR 中 H1 和 H2 的设计。

[0060] 图 4 是不同 Exo III 浓度对 ΔF 的影响示意图。

[0061] 图 5 是不同 H1 浓度对 ΔF 的影响示意图。

[0062] 图 6 是不同 H2 浓度对 ΔF 的影响示意图。

[0063] 图 7 不同 NMM 浓度对 ΔF 的影响示意图。

[0064] 图 8-1 是体系荧光强度对腺苷浓度的响应示意图。其中, (a) background, (b) $5.0 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$, (c) $1.0 \times 10^{-5} \text{mol L}^{-1}$, (d) $2.0 \times 10^{-5} \text{mol L}^{-1}$, (e) $5.0 \times 10^{-5} \text{mol L}^{-1}$, (f) $8.0 \times 10^{-5} \text{mol L}^{-1}$, (g) $1.0 \times 10^{-4} \text{mol L}^{-1}$ 。

[0065] 图 8-2 是 ΔF 与腺苷浓度的线性关系示意图。

[0066] 图 9 是腺苷与其类似物的选择性实验结果示意图。

具体实施方式

[0067] 下面结合附图和实施例对本发明进一步说明。

[0068] 下述实施例中, 未详尽描述的试剂、方法均为所属领域的常规试剂、方法。

[0069] 实施例 1 基于双重扩增策略构建的免标记荧光适体传感器, 用来检测腺苷。

[0070] 1. 材料与试剂

[0071] 本实施例所用的所有核酸探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成和提纯, 碱基序列如表 1 所示。DNA 贮备液为 TE Buffer(10mM Tris-HCl , $\text{pH } 8.0$, 1mM EDTA-2Na), 并保藏在 -20°C 。腺苷购于 Sigma-Aldrich(上海, 中国)。胞苷、尿苷、鸟苷、Exo III 和 DMSO 均购于上海生工。链霉亲和素化的磁球(直径 350nm , 0.05% Tween-20, 和 $10 \mu\text{M EDTA}$, 浓度为 $3.324 \times 10^{11} \text{beads mL}^{-1}$, 1.343g mL^{-1}), Tris($> 99.8\%$) 购于 Amresco Inc。NMM(N-methylmesoporphyrinIX) 购于 J&KScientificLtd.(北京, 中国)。NMM 贮备液采用 DMSO 溶解并避光贮存于 -20°C 下。试验中所有试剂(分析纯)均由标准试剂供应商提供。所有溶液均由 Millipore Milli-Q water($18.25 \text{M}\Omega$) 制备。临床血清和尿样均取自于山东大学医院。文中 M 指 mol/L , mM 指 mmol/L , μM 指 $\mu\text{mol/L}$ 。

[0072] 表 1 本发明中所用寡核苷酸序列

[0073]

名称	序列 (5'-3')
Bio-Apt	biotin-TTT TTT TTT ACC TGG GGG AGT ATT GCG GAG GAA GTT
cDNA	ACT GCA TCG CAA TAC TCG ATT TTT T
HP	GCA ATA CTC GAA CAC GTT ACC AAT CGA GTA TTG CGA TGC AGT
Trigger	GCA ATA CTC GAA CAC GTT ACC
H1-1	CTC GAA CAC GTT ACC GGG TAG GGC TTA GGA GGT AAC GTG TTC GAG TAT TGC
H2-1	TCC TAA GCC CTA CCC GGT AAC GTG TTC GAG GCA ATA CTC GAA

[0074]

	CAC GTT ACC GGG TAG GGC GGG TTG GG
H1-2	CTC GAA CAC GTT ACC GGG TAG GGC GGG CGA GAG GAG GTA ACG TGT TCG AGT ATT GC
H2-2	TCC TCT CGC CCG CCC TAC CCG GTA ACG TGT TCG AGG CAA TAC TCG AAC ACG TTA CCG GGT AGG GCG GGT TGG G
H1-3	CTC GAA CAC GTT ACC GTG GGT AGG GCT TAG GAA CGG TAA CGT GTT CGA GTA TTG C
H2-3	TCC TAA GCC CTA CCC ACG GTA ACG TGT TCG AGG CAA TAC TCG AAC ACG TTA CCG TGG GTA GGG CGG GTT GGG
H1-4	CTC GAA CAC GTT ACC GGG TAG GGC GTT AGG AGG TAA CGT GTT CGA GTA TTG C
H2-4	TGG GTT CCT AAC GCC CTA CCC GGT AAC GTG TTC GAG GCA ATA CTC GAA CAC GTT ACC GGG TAG GGC GGG

[0075] 2 实验步骤

[0076] 2.1 链霉亲和素磁球 - 探针的制备

[0077] 因链霉亲和素磁球含有大量表面活性剂,为了防止磁球的聚集,在使用前需将这些表面活性剂洗去,以活化磁球的功能。首先,用 200 μ L 的 TTL 缓冲液 (0.1M Tris-HCl, pH8.0, 0.1% (v/v) Tween-20, 1.0M LiCl) 对 1 μ L 链霉亲和素磁球洗涤 5 次,得到活化后的链霉亲和素磁球;然后,将分装好的 5 μ L Bio-Apt (10 μ M) 和 5 μ L cDNA (10 μ M) 在 95 $^{\circ}$ C 下退火 5min,冷却至室温;随后将两者混合并与活化后的链霉亲和素磁球混合在室温下孵育 2h。最后,孵育后的链霉亲和素磁球用 PBS 缓冲液 (0.15M

NaCl, 7.6mM NaH₂PO₄, 2.4mM Na₂HPO₄, pH 7.4) 洗涤 2 次, 以除去多余的 cDNA。本工作中所有的洗涤步骤均是在外加磁场作用下完成的。

[0078] 其中, TTL 缓冲液对链霉亲和素化磁球洗涤方法为: ①在离心管中加入 200 μL 的 TTL 缓冲液和 1 μL 链霉亲和素化的磁球, 经充分震荡洗涤后 (震荡约 5min), 将离心管置于磁球分离架上静置 7min, 移除溶液部分 (用移液枪小心吸出溶液, 弃去);

[0079] ②重复上述①的操作 5 次, 最后得到活化后的链霉亲和素化的磁球 (1 μL), 待用。

[0080] 2.2Exo III 辅助的 DNA 循环和 HCR

[0081] 此过程是在 TNaK 缓冲液中进行的。将探针 HP、H1、H2 在 95℃ 下退火 5min, 并冷却至室温以确保发卡结构的形成。首先将 5 μL 腺苷与 15 μL TNaK 缓冲液加入到试管中, 在室温下孵育 2h; 随后, 在磁场作用下分离出链霉亲和素化磁球, 并保留反应液至新离心管中。然后, 分别取 5 μL HP (5 μM), Exo III (0.4U mL⁻¹) 和 5 μL 10×Exo III 缓冲液 (0.5M Tris-HCl, pH 8.0, 50mM MgCl₂, 10mM DTT) 加入到离心管中。混匀后放至 37℃ 进行 Exo III 辅助 DNA 循环反应, 时间为 1h。水解完成之后, 在 75℃ 下加热 20min 以终止酶的活性。最后, 加入 5 μL H1 (1.0 μM) 和 5 μL H2 (1.5 μM), 混匀在 37℃ 下进行 HCR 反应, 时间为 3.5h。

[0082] 2.3 荧光测量与仪器

[0083] HCR 反应完成后, 向反应产物中加入 2 μL NMM (5.0×10⁻⁵M) 和 8 μL KCl (1M), 在 37℃ 条件下孵育 30min 后进行测量。所有的荧光测量均在日立 F-2500 荧光分光光度计 (日立, 日本) 且室温下进行。荧光光度计的基本设置为激发波长为 399nm, 扫描范围为 550 ~ 680nm, 狭缝宽度均为 10nm, PMT 电压 700V。

[0084] 3. 结果与讨论

[0085] 3.1 荧光适体传感器的设计原理

[0086] 该新型免标记且灵敏检测腺苷的荧光适体传感器主要由三部分组成, 如原理图 1 所示, 首先生物素化标记的腺苷适体链 (Bio-Apt) 连接到链霉亲和素化磁球上, 另一条单链 - 催化链 (cDNA) 与该适体链互补, 如此便构建了一个由催化链、适体链和链霉亲和素化磁球的三功能探针。在腺苷存在条件下, 适体链与腺苷结合, 诱导适体构象发生改变, 使得双链 DNA 不稳定, 最终导致 cDNA 的释放。其次, cDNA 通过粘性末端打开发卡 HP, 形成带有 3' 平末端的双链 DNA。Exo III 能够从 3' 平端逐步催化水解双链 DNA 生成单核苷酸, 同时释放出 cDNA 并形成触发链 (核苷酸序列如 SEQ ID NO. 4 所示)。释放的 cDNA 进一步绑定另一个 HP 分子触发新一轮的切割过程, 与此同时, 在每一轮切割过程中均释放出触发链。最终, 触发链通过粘性末端介导的链置换反应打开发卡探针 H1; 类似地, 打开的 H1 暴露出新的序列能够打开 H2, H2 包含有触发链相同序列, 因此 H2 能够进一步打开 H1, 致使两个发卡探针 H1 和 H2 的自主交替杂交, 形成带有切口的双螺旋。需要注意的是, G- 四分体序列存在于 H2 的茎部和末端, 当 H2 处于发卡状态时, 部分 G- 四分体序列隐藏于 H2 的茎部, 因此不能够形成 G- 四分体结构。但是, 通过 HCR 反应, G- 四分体序列能够自组装形成整合的 G- 四分体结构。因此, 形成了包含许多 G- 四分体结构的带切口双螺旋。在此, 我们选择 NMM 作为信号报告者, 其对 G- 四分体具有明显的结构选择性, 对三倍体、双链或单链形式不起作用。一旦向该系统加入此报告者, 便会通过与许多 G- 四分体结构的绑定实现一个增强的荧光响应。

[0087] 3.2 设计的可行性

[0088] 为了验证现有方法的可行性,我们进行了不同条件下的荧光发射光谱,如图 2 所示。图 2 中曲线 a 代表只有 H1 和 H2 时的荧光光谱,表明两种发卡结构的设计泄露很小,足够稳定;曲线 b 代表体系中含有 HP、Exo III、H1 和 H2 的荧光图谱,可观察到有微弱的荧光增长;曲线 c 是往体系中再加入 Bio-Apt 和 cDNA 后产生的些许增长荧光值,在此我们定义它为背景信号。此背景信号主要源于 Bio-Apt 和 cDNA 之间的一呼吸 II 作用以及没有触发剂时燃料发卡结构的泄露。当体系中加入腺苷时,显示一个明显增强的荧光响应,如图 2 中曲线 d 所示,表明此腺苷检测系统具有显著的扩增性能。

[0089] 3. 3HCR 中序列设计的优化

[0090] 在 HCR 过程中,发卡探针 (H1 和 H2) 的序列设计对信号的获取具有至关重要的作用。合理的发卡结构设计能够有效的减少信号的泄露。在此,为了获得更强的荧光信号,我们进行了四种不同的序列设计,将 G- 四分体序列整合到发卡探针中,它们的序列设计如表 1 所示:(1) 1/2 的 G- 四分体序列隐藏在 H2 的茎部,剩余 1/2 在 H2 的末端;(2) 3/4 的 G- 四分体序列隐藏在 H2 的茎部,剩余 1/4 在 H2 的末端;(3) 1/2 的 G- 四分体序列隐藏在 H2 的茎部,剩余 1/2 在 H2 的末端,但是 H2 的茎部有所增长;(4) 3/4 的 G- 四分体序列在 H2 的 3' 端,剩余 1/4 在 H2 的 5' 端。由图 3 我们可以看出,设计 1 (H1-1 和 H2-1;核苷酸序列如 SEQ ID NO. 5 和 SEQ ID NO. 6 所示) 和设计 2 (H1-2 和 H2-2;核苷酸序列如 SEQ ID NO. 7 和 SEQ ID NO. 8 所示) 产生了较高的背景信号,可能是由于在没有触发链时少许发卡探针被打开形成 G- 四分体结构,从而与 NMM 结合产生了荧光信号。为了进一步减少背景信号,我们将设计 1 中 H2 的茎部增长,由图 3 中设计 3 (H1-3 和 H2-3;核苷酸序列如 SEQ ID NO. 9 和 SEQ ID NO. 10 所示) 可知,阴性信号得到了有效的降低,但不幸的是,阳性信号也被抑制。因此我们进行了进一步的设计(设计 4 (H1-4 和 H2-4;核苷酸序列如 SEQ ID NO. 11 和 SEQ ID NO. 12 所示)),在设计 4 中 G- 四分体序列存在于 H2 的两端,背景信号得到了明显的抑制。考虑上述四种设计,最终选择设计 4 作为最优设计。

[0091] 其中条件为 $C_{\text{trigger}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{mol L}^{-1}$, $C_{\text{H1}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$, $C_{\text{H2}} = 1.5 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$, $C_{\text{NMM}} = 2.0 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$, 反应温度 37°C 。

[0092] 3.4 反应条件的优化

[0093] 为了获得该传感器的最优性能,我们采用净信号 ΔF ($\Delta F = F_2 - F_1$) 作为标准调查了反应的各项条件,在此 F_1 和 F_2 分别是目标物不存在和存在条件下 G- 四分体-NMM 复合物的荧光强度。

[0094] 据报道 Exo III 的浓度对 Exo III 辅助 DNA 循环反应的性能具有很重要的影响。图 4 所示,随着 Exo III 浓度的增加, ΔF 值快速增长,到 0.40U mL^{-1} 时达到最大值然后保持平稳。因此,我们选择 0.40U mL^{-1} 作为 Exo III 最终的用量。

[0095] 同时,我们也调查了探针的浓度以获得最优的信倍比。在我们的研究中, H1 和 H2 是扩增探针, NMM 是信号探针。这些探针的浓度均是在腺苷浓度 $1.0 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$ 条件下进行测定的,图 5-7 所示,当 H1、H2 和 NMM 的浓度分别为 $1.0 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$, $1.5 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$, $2.0 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$ 时, ΔF 达到最大值,因此选择这些浓度作为最优浓度。

[0096] 其中, Exo III 浓度的优化时,条件为: $C_{\text{Adenosine}} = 1.0 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$, $C_{\text{Bio-Apt}} = C_{\text{cDNA}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$, $C_{\text{HP}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{mol L}^{-1}$, $C_{\text{H1}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$, $C_{\text{H2}} = 1.5 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$, $C_{\text{NMM}} = 2.0 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$, 反应温度 37°C 。

[0097] H1 浓度的优化时, 条件为: $C_{\text{Adenosine}} = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{\text{Bio-Apt}} = C_{\text{cDNA}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{\text{HP}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{\text{H2}} = 1.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{\text{NMM}} = 2.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{Exo III} = 0.40 \text{ U mL}^{-1}$, 反应温度 37°C 。

[0098] H2 浓度的优化时, 条件为: $C_{\text{Adenosine}} = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{\text{Bio-Apt}} = C_{\text{cDNA}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{\text{HP}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{\text{H1}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{\text{NMM}} = 2.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{Exo III} = 0.40 \text{ U mL}^{-1}$, 反应温度 37°C 。

[0099] NMM 浓度的优化条件为: $C_{\text{Adenosine}} = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{\text{Bio-Apt}} = C_{\text{cDNA}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{\text{HP}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{\text{H1}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $C_{\text{H2}} = 1.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{Exo III} = 0.40 \text{ U mL}^{-1}$, 反应温度 37°C 。

[0100] 其他未提到的条件, 均按照本文中—2 实验步骤 II 上的条件进行。

[0101] 3.5 适体传感器的分析性能

[0102] 我们对该定量检测腺苷的荧光适体传感器性能进行了分析。图 8-1 显示了不同腺苷浓度条件下对应的不同荧光响应值。当腺苷的浓度从 0 逐渐增加到 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 时, 荧光强度也随之戏剧性的增强。在最优实验条件下, 该方法线性良好, 如图 8-2 所示, 线性范围在 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ – $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 之间, 相关系数为 0.998。检测限为 $4.2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ 。对比于其他已报道的免标记且扩增策略 [16–18], 我们的方法提供了更高的灵敏度。

[0103] 为了考察该适体传感器对腺苷检测的特异性识别作用, 我们对腺苷及其类似物 (尿苷、鸟苷和胞苷) 进行了实验。如图 9 所示, 体系对腺苷类似物显示了微弱的荧光响应, 其荧光强度几乎与背景信号相同。但是由于适体对目标物的特异性识别作用, 当加入腺苷后, 荧光有明显的增强。与此同时, 我们还证实了腺苷与四种核苷混合物的荧光响应几乎没有差别。上述现象显示出我们的适体传感器具有良好的选择性, 能对腺苷和其类似物进行有效的区分。

[0104] 为了考察该适体传感器在实际生物样本中的应用, 进行了在复杂生物样本中腺苷回收率的实验, 包括人血清样本和尿样, 结果如表 2 和 3 中所示。腺苷在血清中的回收率在 96.2%–107.0% 之间, 相对标准偏差在 1.6%–3.3%。与此同时, 腺苷在尿样中的回收率在 97.8%–109.2% 之间, 相对标准偏差为 1.7%–3.6%。结果表明该方法在复杂生物样本中的精密度和回收率令人满意。

[0105] 表 2 人血清中的样品回收率

[0106]

样品号	加入量 (mol L ⁻¹)	测定值(mol L ⁻¹)	回收率(%)	相对标准偏差 (% , n = 3)
1	1.0×10^{-5}	1.1×10^{-5}	107.0	3.3
2	5.0×10^{-5}	4.8×10^{-5}	96.2	2.8
3	1.0×10^{-4}	1.0×10^{-4}	101.3	1.6

[0107] 表 3 人尿样中的样品回收率

[0108]

样品号	加入量 (mol L ⁻¹)	测定值(mol L ⁻¹)	回收率(%)	相对标准偏差 (% , n = 3)
1	1.0×10^{-5}	1.0×10^{-5}	104.3	3.6
2	5.0×10^{-5}	5.5×10^{-5}	109.2	1.7
3	1.0×10^{-4}	9.8×10^{-5}	97.8	2.3

[0109] 随后,分别对三组正常人和癌症病人的尿样进行了腺苷含量的检测,如表 4 中所示,三组正常人尿样的腺苷浓度集中在 $3.4 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$ 到 $4.8 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$,与文献报道的人尿样正常腺苷浓度范围 ($2.0 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$ 到 $7.0 \times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$) 相符 [19, 21]。此外,三组正常人尿样的腺苷浓度集中在 $2.2 \times 10^{-5} \text{mol L}^{-1}$ 到 $4.3 \times 10^{-5} \text{mol L}^{-1}$ 。文献报道在癌症病人尿样中腺苷含量比正常人要高 5 ~ 10 倍 [34]。因此结果表明,本发明方法在实际样品的临床诊断方面有着潜在的应用价值。

[0110] 表 4 本发明方法对正常人和癌症病人的实际样分析

[0111]

尿样	样品号	浓度 (mol L ⁻¹)	相对标准偏差 (% , n = 3)
正常人	A	3.9×10^{-6}	1.9
	B	3.4×10^{-6}	3.5
癌症病人	C	4.8×10^{-6}	2.7
	a	3.2×10^{-5}	2.2
	b	2.2×10^{-5}	2.9
	c	4.3×10^{-5}	1.8

[0112]

[0113] 上述虽然结合附图对本发明的具体实施方式进行了描述,但并非对本发明保护范围的限制,所属领域技术人员应该明白,在本发明的技术方案的基础上,本领域技术人员不需要付出创造性劳动即可做出的各种修改或变形仍在本发明的保护范围以内。

[0114] 参考文献

[0115] [1] Zhang, S. , Xia, J. , Li, X. , 2008. Anal. Chem. 80, 8382 - 8388.

[0116] [2] Wang, Y. , Feng, J. , Tan, Z. , Wang, H. , 2014. Biosens. Bioelectron. 60, 218 - 223.

[0117] [3] Spsychala, J. , 2000. Pharmacol. Ther. 87, 161 - 173.

[0118] [4] Goyal, R. N. , Gupta, V. K. , Chatterjee, S. 2008. Talanta, 76, 662 - 668.

[0119] [5] Giglioni, S. , Leoncini, R. , Aceto, E. , Chessa, A. , Civitelli, S. , Bernini,

- A. , Tanzini, G. , Carraro, F. , Pucci, A. , Vannoni, D. , 2008. *Nucleosides. Nucleotides. Nucleic Acids.* 27, 750 - 754.
- [0120] [6] Luippold, G. , Delabar, U. , Kloor, D. , Muhlbauer, B. , 1999. *J. Chromatogr. B.* 724, 231 - 238.
- [0121] [7] Dobolyi, A. , Reichart, A. , Szikra, T. , Szilagy, N. , Kekesi, A. K. , Karancsi, T. , 1998. *Neurochem Int.* 32, 247 - 256.
- [0122] [8] Lin, H. , Xu, D. K. , Chen, H. Y. , 1997. *J Chromatogr A.* 760, 227 - 233.
- [0123] [9] Siragy, H. M. , Linden, J. , 1996. *Hypertension* 27, 404 - 407.
- [0124] [10] Zhang, X. B. , Wang, Z. , Xing, H. , Xiang, Y. , Lu, Y. , 2010. *Anal. Chem.* 82, 5005 - 5011.
- [0125] [11] Dave, N. , Liu, J. , 2012. *Chem. Commun.* 48, 3718 - 3720.
- [0126] [12] Hu, P. , Zhu, C. , Jin, L. , Dong. S. , 2012. *Biosens. Bioelectron.* 34, 83 - 87.
- [0127] [13] Xu. W. , Lu, Y. , 2010. *Anal. Chem.* 82, 574 - 578.
- [0128] [14] Xiang, Y. , Tong, A. , Lu, Y. , 2009. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 15352 - 15357.
- [0129] [15] Xiang, Y. , Wang, Z. , Xing, H. , Wong, N. Y. , Lu, Y. , 2010. *Anal. Chem.* 82, 4122 - 4129.
- [0130] [16] Song, P. , Xiang, Y. , Xing, H. , Zhou, Z. , Tong, A. , Lu, Y. , 2012. *Anal. Chem.* 84, 2916 - 2922.
- [0131] [17] Fu, B. , Cao, J. , Jiang, W. , Wang, L. , 2013. *Biosens. Bioelectron.* 44, 52 - 56.
- [0132] [18] Liao, D. , Jiao, H. , Wang, B. , Lin Q. , Yu, C. , 2012. *Analyst*, 137, 978 - 982.
- [0133] [19] Dolezalova, P. , Krijt, J. , Chladek, J. , Nemcova, D. , Hoza, J. , 2005. *Rheumatology.* 44, 74 - 79.
- [0134] [20] Kloor, D. , Yao, K. Z. , Delabar, U. , Osswald, H. , 2000. *Clinical Chemistry.* 46, 537 - 542.
- [0135] [21] Chen, S. J. , Huang, Y. F. , Huang, C. C. , Lee, K. H. , Lin, Z. H. , Chang, H. S. , 2008. *Biosens. Bioelectron.* 34, 1749 - 1753.
- [0136] [22] Peng, Y. , Li, L. , Yi, X. , Guo, Lin. , 2014. *Biosens. Bioelectron.* 59, 314 - 320.
- [0137] [23] Liu, S. , Wang, C. , Zhang, C. , Wang, Y. , Tang, B. , 2013. *Anal. Chem.* 85, 2282 - 2288.
- [0138] [24] Ma, C. , Liu, S. , Shi, C. , 2014. *Biosens. Bioelectron.* 58, 57 - 60.
- [0139] [25] Zheng, A. X. , Li, J. , Wang, J. R. , Song, X. R. , Chen, G. N. , Yang, H. H. , 2012. *Chem. Commun.* 48, 3112 - 3114.
- [0140] [26] Xu, Q. , Cao, A. , Zhang, L. , Zhang, C. Y. , 2012. *Anal. Chem.* 84, 10845 - 10851.
- [0141] [27] Gao, Y. , Li, B. , 2014. *Anal. Chem.* 86, 8881 - 8887.
- [0142] [28] Zhang, H. , Li, F. , Dever, B. , Li, X. F. , Le, X. C. , 2013. *Chem. Rev.* 113, 2812 - 2841.
- [0143] [29] Liu, S. , Lin, Y. , Wang, L. , Liu, T. , Cheng, C. , Wei, W. , Tang, B. , 2014. *Anal. Chem.* 86, 4008 - 4015.

- [0144] [30] Xuan, F., Luo, X., Hsing, I. M., 2012. *Anal. Chem.* 84, 5216 - 5220.
- [0145] [31] Shimron, Simcha., Wang, F., Orbach, R., Willner, I., 2012. *Anal. Chem.* 84, 1042 - 1048.
- [0146] [32] Ren, J., Wang, J., Han, L., Wang, E., Wang, J., 2011. *Chem. Commun.* 47, 10563 - 10565.
- [0147] [33] Dong, J., Cui, X., Deng, Y., Tang, Z., 2012. *Biosens. Bioelectron.* 38, 258 - 263.
- [0148] [34] Xu, G. W., Schmid, H. R., Lu, X., Liebich, H. M., Lu, P., 2000. *Biomedical Chromatography.* 14, 459 - 463.

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 山东大学

<120> 基于双重扩增策略构建的免标记荧光适体传感器检测腺苷

<130> 2015

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

tttttttta cctgggggag tattgcggag gaagtt

36

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

actgcatcgc aatactcgat ttttt

25

[0002]

<210> 3

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

gcaatactcg aacacgttac caatcgagta ttgcgatgca gt

42

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

gcaatactcg aacacgttac c

21

<210> 5

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

ctcgaacacg ttaccgggta gggcttagga ggtaacgtgt tcgagtattg c

51

[0003]

<210> 6

<211> 68

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

tcctaagccc tacccegtaa cgtgttcgag gcaatactcg aacacgttac cgggtagggc 60

gggttggg

68

<210> 7

<211> 56

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

ctcgaacacg ttaccgggta gggcgggcga gaggaggtaa cgtgttcgag tattgc 56

<210> 8

<211> 73

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

tcctctgcc cgcctacce ggtaacgtgt tcgaggeaat actcgaacac gttaccgggt 60

agggcgggtt ggg

[0004]

73

<210> 9

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

ctcgaacacg ttaccgtggg taggcttag gaacggtaac gtgttcgagt aitgc

55

<210> 10

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 10

tectaagccc taccacggg aacgtgttcg aggcaatact cgaacacgtt accgtgggta

60

gggcgggtg gg

72

<210> 11

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 11

[0005]

ctcgaacacg ttaccgggta gggcgttagg aggtaacgtg ttcgagtatt gc 52

<210> 12

<211> 69

<212> DNA

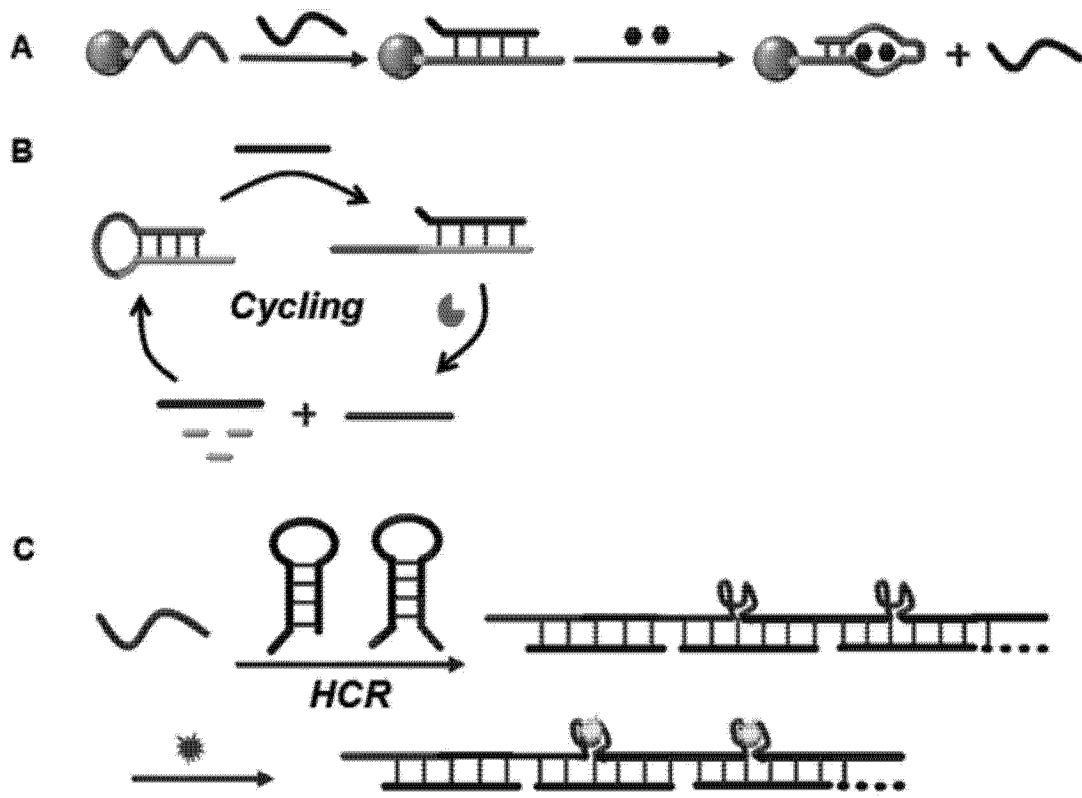
<213> 人工序列

<400> 12

tgggttccta acgccctacc cggtaacgtg ttcgaggcaa tactcgaaca cgtaccggg 60

tagggcggg

69



Streptavidin-MNBs	Bio-Apt	NMM	H1	H2
Adenosine	cDNA	HP		
Exo III	Trigger strand			

图 1

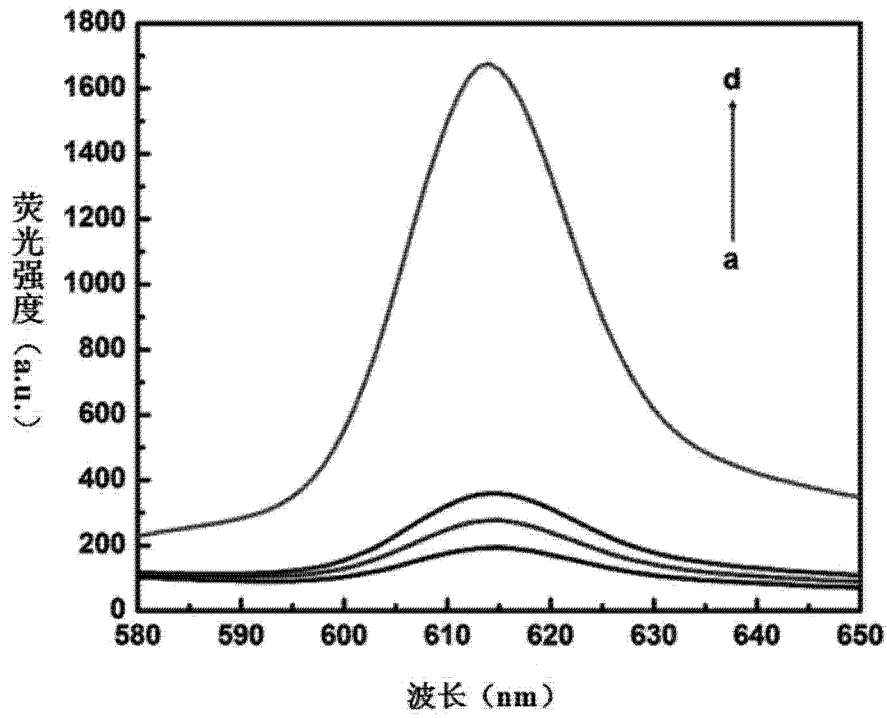


图 2

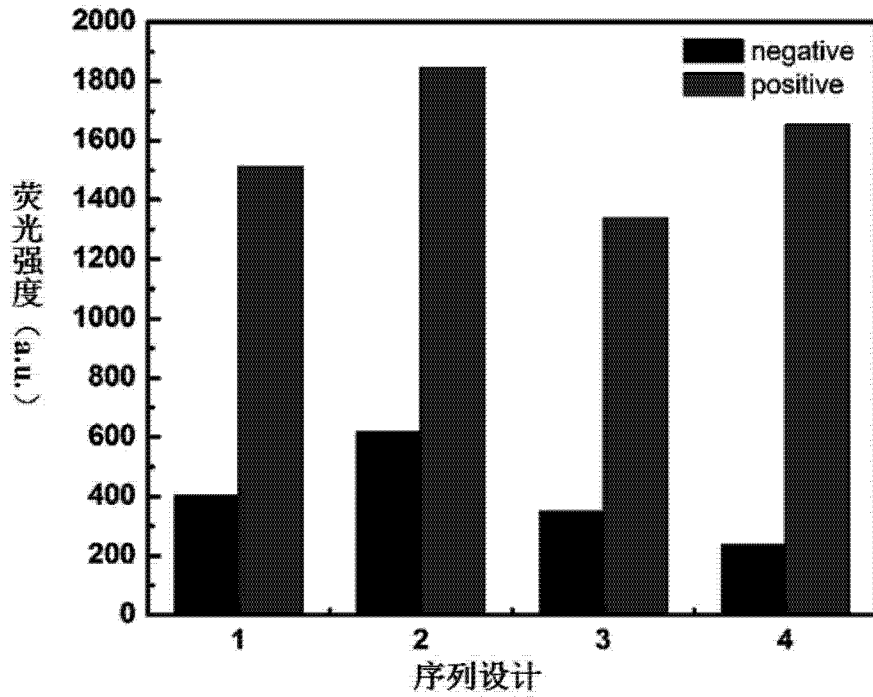


图 3

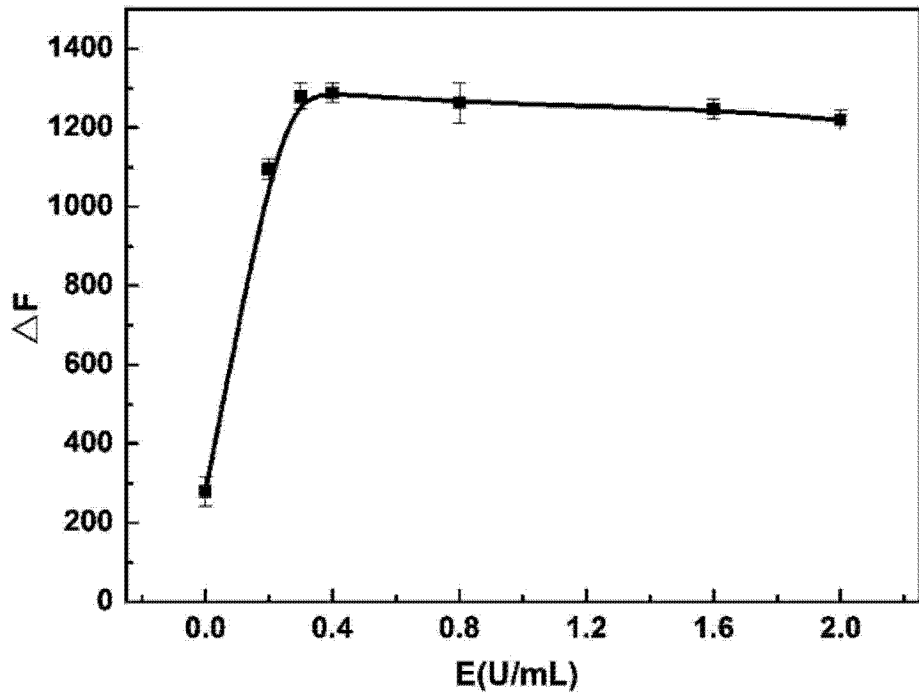


图 4

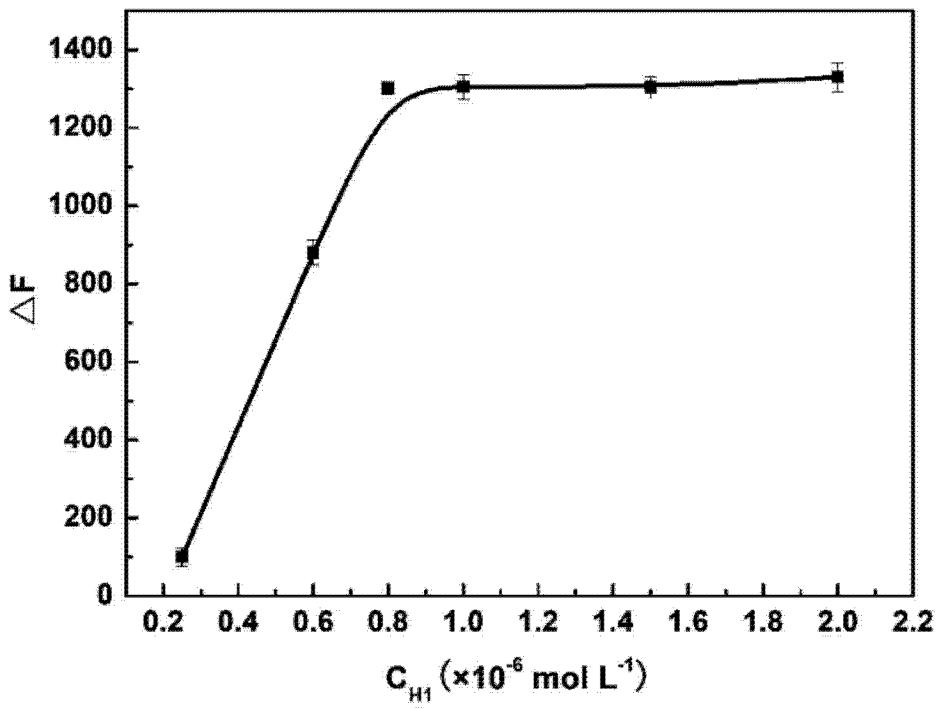


图 5

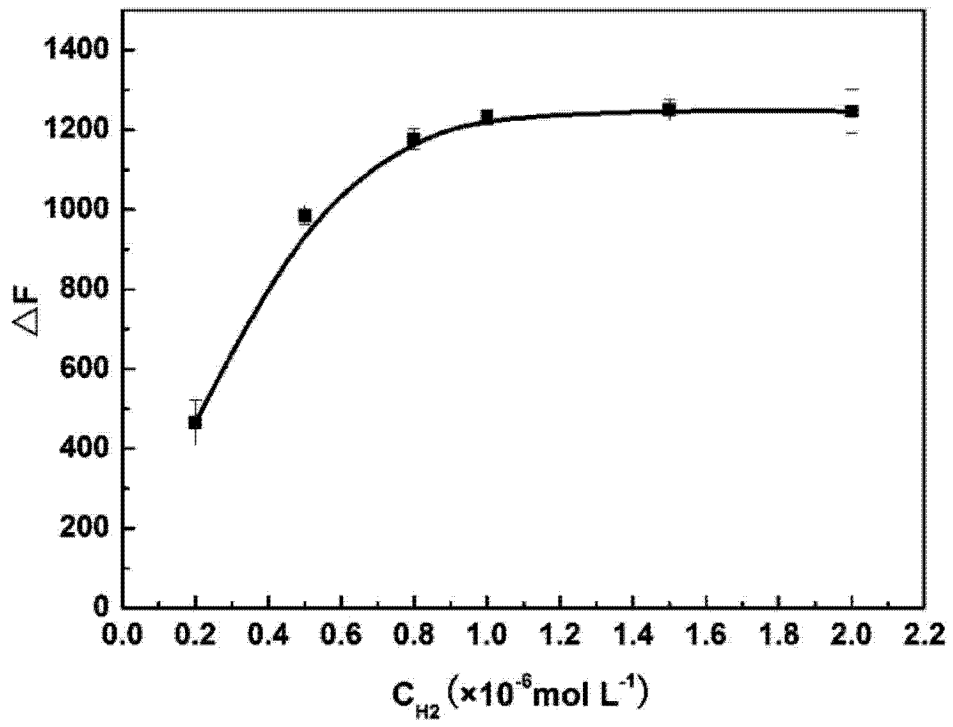


图 6

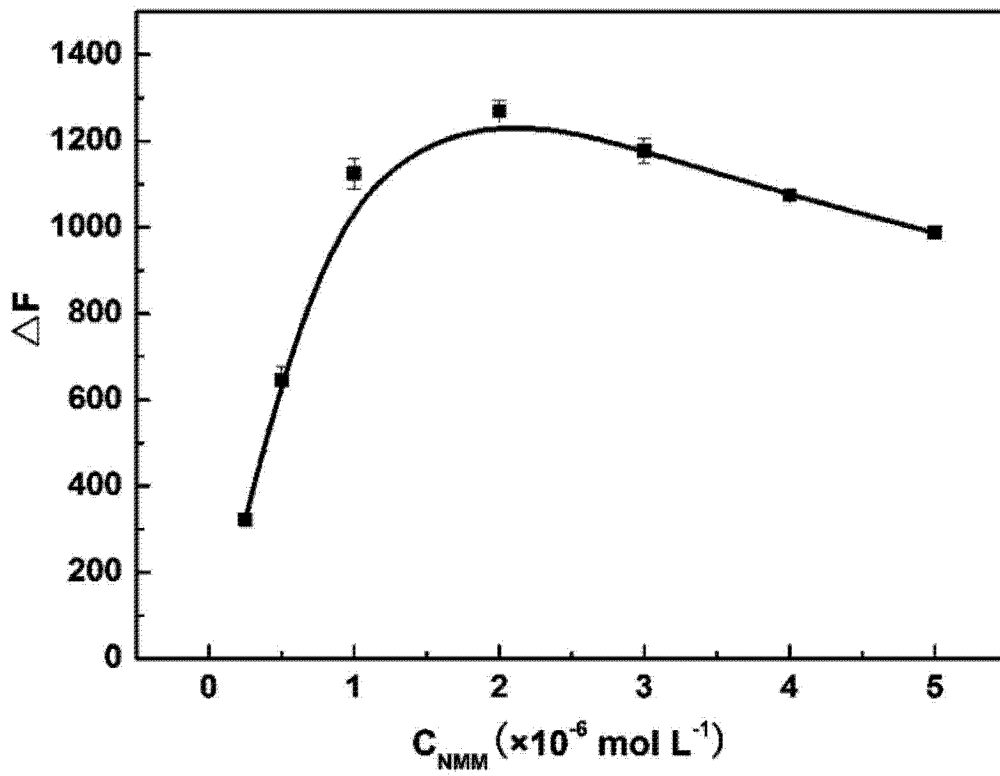


图 7

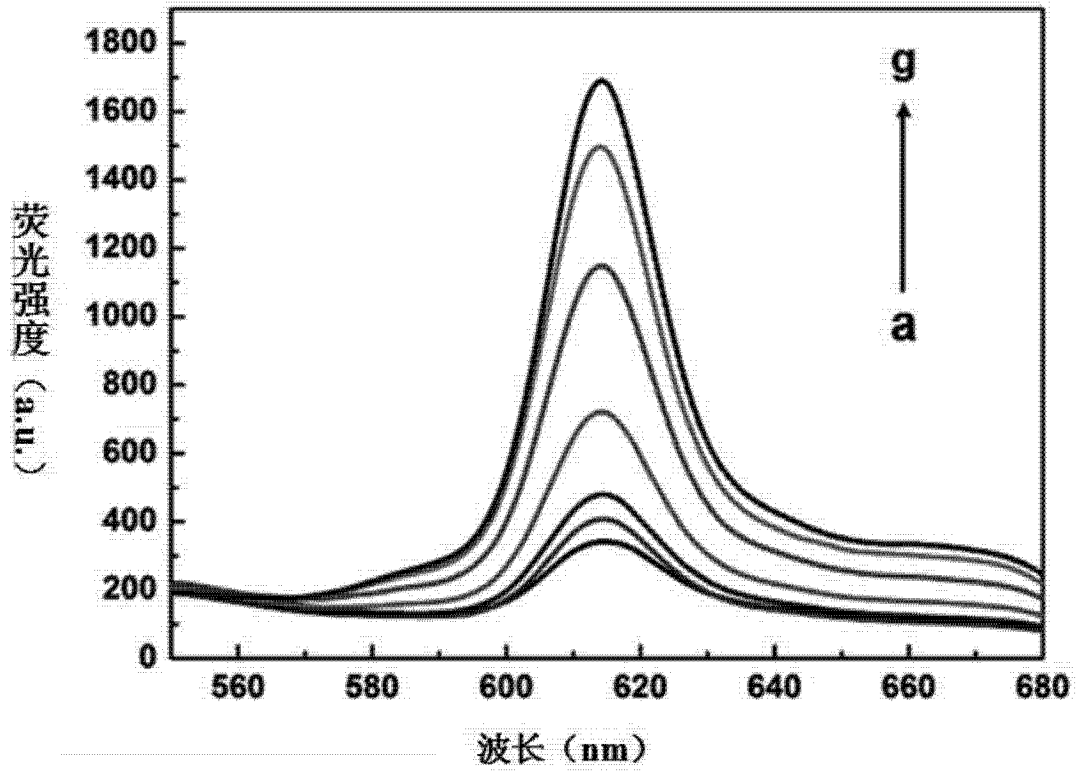


图 8-1

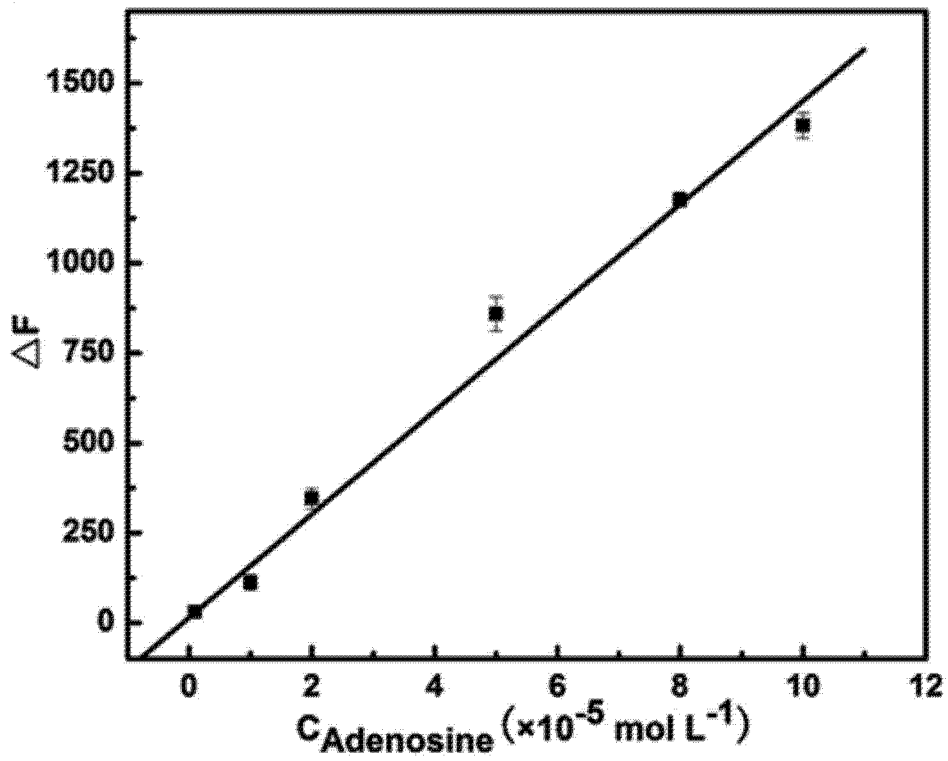


图 8-2

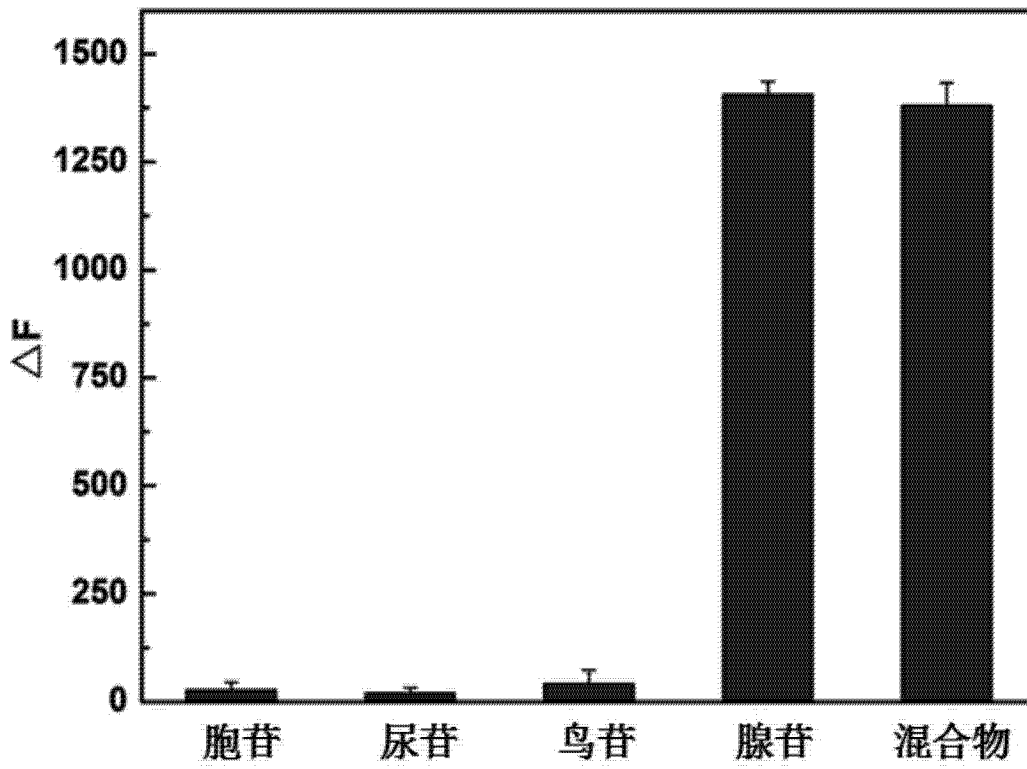


图 9