



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110079584 B

(45)授权公告日 2020.07.28

(21)申请号 201910247622.7

(22)申请日 2019.03.29

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110079584 A

(43)申请公布日 2019.08.02

(73)专利权人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 许文涛 罗云波 邵向丽 朱龙佼

冯瑜祥 黄昆仑

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

11002

代理人 王文君 黄爽

(51)Int.Cl.

C12Q 1/682(2018.01)

(56)对比文件

CN 108845003 A, 2018.11.20, 全文.

CN 108823288 A, 2018.11.16, 全文.

CN 107849603 A, 2018.03.27, 全文.

CN 107988321 A, 2018.05.04, 全文.

Jifeng Qian等.Sequence dependence of isothermal DNA amplification via EXPAR.《Nucleic Acids Research》.2012,第40卷(第11期),e87.

Hongxia Jia等.Real-time fluorescence detection of Hg²⁺ ions with high sensitivity by exponentially isothermal oligonucleotide amplification.《RSC Advances》.2014,第4卷9439-9444.

YanyanYu等.Ultrasensitive electrochemical detection of avian influenza A(H7N9) virus DNA based on isothermal exponential amplification coupled with hybridization chain reaction of DNAzyme nanowires.《Biosensors and Bioelectronics》.2014,第64卷566-571.

审查员 夏向东

权利要求书3页 说明书10页

序列表2页 附图4页

(54)发明名称

基于3D-HCR水凝胶的汞离子快速可视化检测方法

(57)摘要

本发明提供一种基于3D-HCR水凝胶的汞离子快速可视化检测方法。根据T碱基和Hg²⁺结合形成“T-Hg²⁺-T”碱基-金属离子复合物,设计Hg²⁺诱导型的恒温指数扩增实现信号的识别与放大,结合DNA水凝胶与AuNPs实现信号的二次放大与可视化,整合建立一种检测Hg²⁺的宏量、可视化传感平台,实现了Hg²⁺的定性、定量检测。

1. 一种汞离子响应型超快扩增可视化传感器,其特征在于,包括:(1) EXPAR扩增体系,(2) 酶切体系,(3) 3D-HCR及显色检测体系;

所述检测体系用于对待测样品依次经由所述EXPAR扩增体系、酶切体系和3D-HCR体系进行反应后所得产物进行显色检测;

其中,所述EXPAR扩增体系包括模板链和/或双重扩增模板链,以及底物链:

底物链X1:5'-CTA CAC GCG ATT CAT GAG TC TTTA-3'

模板链X'-Y':5'-CTG GCT CCT GTG ATT GTG CTC TAG T TTTT GACTC ATG AAT CGC GTG TAG-3'

双重扩增模板链Y'-Y':5'-CTG GCT CCT GTG ATT GTG CTC TAG AACA GACTC CTG GCT CCT GTG ATT GTG CTC TAG-3';

所述酶切体系包括Nt.BstNBI切刻内切酶;

所述3D-HCR及显色检测体系包括:两条引物、3D-HCR缓冲液和AuNPs包被液:

引物H1:5'-GAT CGC GAT C CTG GCT CCT GTG ATT GTG CTC TAG ACA TCG CTA GAG CAC AAT CAC AGG-3'

引物H2:5'-CTA GAG CAC AAT CAC AGG AGC CAG TTTT CCT GTG ATT GTG CTC TAG CGA TGT-3'

3D-HCR缓冲液:2.5mM NaH₂PO₄·2H₂O,8mM Na₂HPO₄·12H₂O,150mM NaCl,2mM MgCl₂·6H₂O,pH 7.4。

2. 根据权利要求1所述的传感器,其特征在于,所述AuNPs包被液的制备方法如下:1) 在圆底烧瓶中加入超纯水196mL,1%氯金酸1mL加热至沸腾;然后加入1%柠檬酸三钠3mL,反应一段时间后可见液体颜色逐渐加深至黑色,而后变为樱桃红色,5min后停止加热,冷却至室温,得到AuNPs溶液,避光4℃保存;

2) 以PBS缓冲液为溶剂配制10%BSA溶液,每1mL AuNPs溶液中加入20μL BSA溶液,混合孵育40min即得AuNPs包被液。

3. 权利要求1或2所述传感器在检测汞离子中的应用。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述检测为定性检测或定量检测。

5. 基于核酸纳米金3D水凝胶的汞离子快速可视化定性检测方法,其特征在于,利用权利要求1或2所述传感器对汞离子进行定性检测,包括如下步骤:

方案I:单重EXPAR扩增

S1、向反应管中加入待测样品、模板链X'-Y'、底物链X1、dNTPs和水,95℃变性5min,然后37℃孵育30min,得到体系1;

S2、EXPAR扩增反应:向体系1中加入Bst DNA聚合酶和Thermpol Buffer,55℃孵育10min,进行EXPAR扩增反应,得到体系2;

S3、酶切反应:向体系2中加入Nt.BstNBI切刻内切酶和BalbBuffer 3.1,55℃孵育20min,得到产物Y;

S4、HCR反应及显色检测:将引物H1、H2分别溶解于所述3D-HCR缓冲液中,95℃变性10min后冷却至室温,分别得到H1液和H2液;将产物Y溶解于所述3D-HCR缓冲液中,得到Y液;将H1液、H2液、Y液、AuNPs包被液和3D-HCR缓冲液加入反应管中,37℃孵育过夜,进行HCR反应;肉眼监测反应结果,若所得反应混合液分层,且上清液为无色或浅红色,下层为红色的

水凝胶,则反应结果为阳性,待测样品中含有汞离子;

方案II:双重EXPAR扩增

S1'、双重EXPAR扩增反应:向反应管中加入待测样品、模板链X'-Y'、底物链X1、双重扩增模板链Y'-Y'、dNTPs和水,95℃变性5min,然后37℃孵育30min,得到体系1';

S2'、酶切反应:向体系1'中加入Bst DNA聚合酶和Thermpol Buffer,55℃孵育10min,进行双重EXPAR扩增反应,得到体系2';

S3'、向体系2'中加入Nt.BstNBI切刻内切酶和BalbBuffer 3.1,55℃孵育20min,得到产物Y;

S4'、HCR反应及显色检测:将引物H1、H2分别溶解于所述3D-HCR缓冲液中,95℃变性10min后冷却至室温,分别得到H1液和H2液;将产物Y溶解于所述3D-HCR缓冲液中,得到Y液;将H1液、H2液、Y液、AuNPs包被液和3D-HCR缓冲液加入反应管中,37℃孵育过夜,进行HCR反应;肉眼监测反应结果,若所得反应混合液分层,且上清液为无色或浅红色,下层为红色的水凝胶,则反应结果为阳性,待测样品中含有汞离子。

6.根据权利要求5所述的方法,其特征在于,步骤S1中反应体系为:待测样品、1μM模板链X'-Y' 6μL、1μM底物链X1 6μL、2.5mM dNTPs 3μL和水6.8μL;

步骤S2中反应体系为:向体系1中加入8U/μL Bst DNA聚合酶0.1μL和10×Thermpol Buffer 3μL;

步骤S3中反应体系为:向体系2中加入10U/μL Nt.BstNBI切刻内切酶1.2μL和BalbBuffer 3.1 1.5μL;

步骤S4中反应体系为:3D-HCR缓冲液中引物H1、引物H2、产物Y和AuNPs的终浓度分别为320μM、320μM、6.4μM和18nM。

7.根据权利要求5所述的方法,其特征在于,步骤S1'中反应体系为:待测样品、1μM模板链X'-Y' 6μL、1μM底物链X1 6μL、1μM双重扩增模板链Y'-Y' 6μL、2.5mM dNTPs 3μL和水6.8μL;

步骤S2'中反应体系为:向体系1'中加入8U/μL Bst DNA聚合酶0.1μL和10×Thermpol Buffer 3μL;

步骤S3'中反应体系为:向体系2'中加入10U/μL Nt.BstNBI切刻内切酶1.2μL和BalbBuffer 3.1 1.5μL;

步骤S4'中反应体系为:3D-HCR缓冲液中引物H1、引物H2、产物Y和AuNPs的终浓度分别为320μM、320μM、6.4μM和18nM。

8.基于核酸纳米金3D水凝胶的汞离子快速可视化定量检测方法,其特征在于,利用权利要求1或2所述传感器对汞离子进行定量检测,包括如下步骤:

A、制作标准曲线:

利用已知浓度的汞离子溶液,构建具有不同汞离子浓度的EXPAR扩增体系,EXPAR扩增、酶切、HCR反应与显色检测步骤与权利要求5-7任一项所述方法中的步骤相同;

以汞离子浓度为横坐标,(A₀-A)/A₀为纵坐标,绘制标准曲线;其中,A₀和A分别代表不存在汞离子和存在不同浓度汞离子时上清液OD₅₂₄值;

B、按照权利要求5-7任一项所述的方法对待测样品进行检测,将测得的OD₅₂₄值代入标准曲线,计算得到待测样品中汞离子的含量,实现对汞离子的定量检测。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,汞离子浓度的线性检测范围为0.5-10nM。

10. 根据权利要求8或9所述的方法,其特征在于,显色检测步骤中,采用酶标仪测定上清液OD₅₂₄值。

基于3D-HCR水凝胶的汞离子快速可视化检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物传感器技术领域,具体地说,涉及一种基于3D-HCR水凝胶的汞离子快速可视化检测方法。

背景技术

[0002] Hg^{2+} 是一种全球性重金属污染物。释放到环境中的 Hg^{2+} 可在大气沉降和海洋环流的作用下进入淡水或海洋,并经过食物链的累积,最终对人类的生命健康造成威胁。因此,实现 Hg^{2+} 的快速、灵敏检测对环境保护和人类健康具有重要意义。

[0003] 与其他金属离子一样, Hg^{2+} 的检测方法也经历了由仪器分析到传感器检测的过程。仪器分析法包括原子吸收光谱法,原子发射光谱法,原子荧光光谱法和质谱法等。仪器分析法在灵敏度和准确性方面具有明显的优势,但昂贵的设备和繁琐的样品处理过程使其难以广泛应用。传感器检测法弥补了仪器分析法的不足。利用传感器检测的核心思路是构建敏感元件和换能元件。在搭建检测汞的传感器时,敏感元件利用汞与多种不同基团相互作用的性质实现了 Hg^{2+} 的特异性捕获,如荧光基团、核酸、纳米粒子、肽、蛋白质、酶等。换能元件则将传感器对汞的识别信息转换成可检测的信号,实现 Hg^{2+} 的定量检测。

[0004] 与蛋白质相比,DNA具有许多理想的特性。首先,DNA易于进行化学合成且具有较低的合成成本;第二,DNA高度稳定,可以经过多次变性复性过程而不改变与金属离子结合的性质。第三,DNA高度可编辑,可以在DNA序列的多个位点进行化学修饰,从而增加金属离子与DNA的亲合力或特异性,对DNA序列的调整也使得传感器具有更好的通用性。根据 Hg^{2+} 与胸腺嘧啶可以T- Hg^{2+} -T的方式结合,研究人员利用T- Hg^{2+} -T结构,建立了大量检测 Hg^{2+} 的核酸传感器,或将该结构用于 Hg^{2+} 诱捕,单核苷酸多态性(SNP)检测等。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种基于3D-HCR水凝胶的汞离子快速可视化检测方法。

[0006] 本发明构思如下:通过构建基于恒温指数扩增技术(EXPAR),三维杂交链式反应(3D-HCR)水凝胶和金纳米粒子(AuNPs)的 Hg^{2+} 可视化检测的方法,实现了 Hg^{2+} 的定性、定量检测。EXPAR是一种新型核酸扩增技术,能够在较短时间内(30min),实现目标序列的扩增。本发明利用T- Hg^{2+} -T结构对传统的EXPAR进行改造,构建 Hg^{2+} 浓度响应型的EXPAR实现 Hg^{2+} 识别,并将 Hg^{2+} 的化学信号转化为核酸信号。EXPAR的扩增产物可以触发3D-HCR反应生成3D-HCR水凝胶。3D-HCR水凝胶是线性HCR在宏观领域的拓展,即在线性HCR的基础上,通过改变发夹的结构,使得发夹相互交联形成高度锁水的三维网络。同时,形成的3D-HCR水凝胶对AuNPs具有很好的束缚能力,且3D-HCR水凝胶对AuNPs的束缚能力取决于水凝胶的致密性,而水凝胶的致密性又取决于EXPAR扩增产物的浓度,最终取决于体系中的 Hg^{2+} 的浓度,从而实现 Hg^{2+} 的快速和超灵敏检测。

[0007] 为了实现本发明目的,第一方面,本发明提供一种汞离子响应型超快扩增可视化传感器,包括:(1) EXPAR扩增体系,(2) 酶切体系,(3) 3D-HCR及显色检测体系。

[0008] 其中,所述EXPAR扩增体系包括模板链和底物链,任选包含双重扩增模板链:

[0009] 底物链X1:5'-CTA CAC GCG ATT CAT GAG TC TTTA-3'

[0010] 模板链X'-Y':5'-CTG GCT CCT GTG ATT GTG CTC TAG T TTTT GACTC ATG AAT CGC GTG TAG-3'

[0011] 双重扩增模板链Y'-Y':5'-CTG GCT CCT GTG ATT GTG CTC TAG AACA GACTC CTG GCT CCT GTG ATT GTG CTC TAG-3'。

[0012] 所述酶切体系包括Nt.BstNBI切刻内切酶。

[0013] 所述3D-HCR及显色检测体系包括:两条引物、3D-HCR缓冲液和AuNPs包被液:

[0014] 引物H1:5'-GAT CGC GAT C CTG GCT CCT GTG ATT GTG CTC TAG ACA TCG CTA GAG CAC AAT CAC AGG-3'

[0015] 引物H2:5'-CTAGAG CAC AAT CAC AGG AGC CAG TTTT CCT GTG ATT GTG CTC TAG CGA TGT-3'

[0016] 3D-HCR缓冲液:2.5mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, 8mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂ · 6H₂O, pH 7.4。

[0017] 所述AuNPs包被液的制备方法如下:1) 在圆底烧瓶中加入超纯水196mL, 1%氯金酸1mL加热至沸腾;然后加入1%柠檬酸三钠3mL,反应一段时间后可见液体颜色逐渐加深至黑色,而后变为樱桃红色,5min后停止加热,冷却至室温,得到AuNPs溶液,避光4℃保存;

[0018] 2) 以PBS缓冲液为溶剂配制10%BSA溶液,每1mL AuNPs溶液中加入20μL BSA溶液,混合孵育40min即得AuNPs包被液。

[0019] 第二方面,本发明提供所述传感器在检测汞离子中的应用。所述检测为定性检测或定量检测。

[0020] 第三方面,本发明提供基于核酸纳米金3D水凝胶的汞离子快速可视化定性检测方法,利用所述传感器对汞离子进行定性检测,包括如下步骤:

[0021] 方案I:单重EXPAR扩增

[0022] S1、向反应管中加入待测样品、模板链X1、底物链X'-Y'、dNTPs和水,95℃变性5min,然后37℃孵育30min,得到体系1;

[0023] S2、EXPAR扩增反应:向体系1中加入Bst DNA聚合酶和Thermpol Buffer,55℃孵育10min,进行EXPAR扩增反应,得到体系2;

[0024] S3、酶切反应:向体系2中加入Nt.BstNBI切刻内切酶和BalbBuffer 3.1,55℃孵育20min,得到产物Y(作为促发子,序列5'-CTA GAG CAC AAT CAC AGG AGC CAG-3');

[0025] S4、HCR反应及显色检测:将引物H1、H2分别溶解于所述3D-HCR缓冲液中,95℃变性10min后冷却至室温,分别得到H1液和H2液;将产物Y溶解于所述3D-HCR缓冲液中,得到Y液;将H1液、H2液、Y液、AuNPs包被液和3D-HCR缓冲液加入反应管中,37℃孵育过夜,进行HCR反应;肉眼监测反应结果,若所得反应混合液分层,且上清液为无色或浅红色,下层为红色的水凝胶,则反应结果为阳性,待测样品中含有汞离子。

[0026] 方案II:双重EXPAR扩增

[0027] S1'、双重EXPAR扩增反应:向反应管中加入待测样品、模板链X1、底物链X'-Y'、双重扩增模板链Y'-Y'、dNTPs和水,95℃变性5min,然后37℃孵育30min,得到体系1';

[0028] S2'、酶切反应:向体系1'中加入Bst DNA聚合酶和Thermpol Buffer,55℃孵育

10min,进行双重EXPAR扩增反应,得到体系2';

[0029] S3'、向体系2'中加入Nt.BstNBI切刻内切酶和BalbBuffer 3.1,55℃孵育20min,得到产物Y(作为促发子,序列5'-CTA GAG CAC AAT CAC AGG AGC CAG-3');

[0030] S4'、HCR反应及显色检测:将引物H1、H2分别溶解于所述3D-HCR缓冲液中,95℃变性10min后冷却至室温,分别得到H1液和H2液;将产物Y溶解于所述3D-HCR缓冲液中,得到Y液;将H1液、H2液、Y液、AuNPs包被液和3D-HCR缓冲液加入反应管中,37℃孵育过夜,进行HCR反应;肉眼监测反应结果,若所得反应混合液分层,且上清液为无色或浅红色,下层为红色的水凝胶,则反应结果为阳性,待测样品中含有汞离子。

[0031] 对应于方案I,步骤S1中反应体系为:待测样品、1 μ M模板链X1 6 μ L、1 μ M底物链X'-Y' 6 μ L、2.5mM dNTPs 3 μ L和水6.8 μ L;

[0032] 步骤S2中反应体系为:向体系1中加入8U/ μ L Bst DNA聚合酶0.1 μ L和10 \times Thermpol Buffer 3 μ L;

[0033] 步骤S3中反应体系为:向体系2中加入10U/ μ L Nt.BstNBI切刻内切酶1.2 μ L和BalbBuffer 3.1 1.5 μ L;

[0034] 步骤S4中反应体系为:3D-HCR缓冲液中引物H1、引物H2、产物Y和AuNPs的终浓度分别为320 μ M、320 μ M、6.4 μ M和18nM。

[0035] 对应于方案II,步骤S1'中反应体系为:待测样品、1 μ M模板链X1 6 μ L、1 μ M底物链X'-Y' 6 μ L、1 μ M双重扩增模板链Y'-Y' 6 μ L、2.5mM dNTPs 3 μ L和水6.8 μ L;

[0036] 步骤S2'中反应体系为:向体系1'中加入8U/ μ L Bst DNA聚合酶0.1 μ L和10 \times Thermpol Buffer 3 μ L;

[0037] 步骤S3'中反应体系为:向体系2'中加入10U/ μ L Nt.BstNBI切刻内切酶1.2 μ L和BalbBuffer 3.1 1.5 μ L;

[0038] 步骤S4'中反应体系为:3D-HCR缓冲液中引物H1、引物H2、产物Y和AuNPs的终浓度分别为320 μ M、320 μ M、6.4 μ M和18nM。

[0039] 第四方面,本发明提供基于核酸纳米金3D水凝胶的汞离子快速可视化定量检测方法,利用所述传感器对汞离子进行定量检测,包括如下步骤:

[0040] A、制作标准曲线:

[0041] 利用已知浓度的汞离子溶液,构建具有不同汞离子浓度的EXPAR扩增体系,EXPAR扩增、酶切、HCR反应与显色检测步骤与方案I或II所述方法中的步骤相同;

[0042] 以汞离子浓度为横坐标,(A₀-A)/A₀为纵坐标(A₀和A分别代表不存在汞离子和存在不同浓度汞离子时上清液OD₅₂₄值),绘制标准曲线;

[0043] B、按照方案I或II所述的方法对待测样品进行检测,将测得的OD₅₂₄值代入标准曲线,计算得到待测样品中汞离子的含量,实现对汞离子的定量检测。

[0044] 汞离子浓度的线性检测范围为0.5-10nM。最低检测限可达0.2nM。

[0045] 优选地,显色检测步骤中,采用酶标仪测定上清液OD₅₂₄值。

[0046] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0047] 本发明通过优化EXPAR扩增反应的底物链、模板链序列、3D-HCR水凝胶的缓冲液组分、HCR引物浓度及孵育时间,将3D-HCR水凝胶与AuNPs结合在一起,构建了检测Hg²⁺的宏量、可视化传感平台,实现了Hg²⁺的定性、定量检测。本发明基于3D-HCR水凝胶的汞离子快速可

视化检测方法具有以下优点：

[0048] (一)具有良好的特异性。双重EXPAR中的T-T错配结构是该传感器良好特异性的基础。该结构能够特异识别和结合 Hg^{2+} ，且结构不易受到常见二价离子的干扰。

[0049] (二)灵敏度高。与“turn-on”型传感器相比，“turn-off”型传感在低靶物质浓度区间具有更高的灵敏度。同时，EXPAR双重放大及3D-HCR的进一步放大使灵敏度大大提升。

[0050] (三)能够实现 Hg^{2+} 的定性、定量检测。肉眼检测限为1nM，如果利用酶标仪进行定量检测，检测的最低限可达0.2nM。

附图说明

[0051] 图1为本发明较佳实施例中EXPAR模板结构对生成产物Y的影响。其中，1: X_1 ；2: $X' - Y'$ ；3: $X_1 + X' - Y'$ ；4: 以 X_1 为模板的EXPAR (+)；5: 以 X_1 为模板的EXPAR (-)；6: X_2 ；7: $X' - Y'$ ；8: $X_2 + X' - Y'$ ；9: 以 X_2 为模板的EXPAR (+)；10: 以 X_2 为模板的EXPAR (-)；11: X_3 ；12: $X' - Y'$ ；13: $X_3 + X' - Y'$ ；14: 以 X_3 为模板的EXPAR (+)；15: 以 X_3 为模板的EXPAR (-)。

[0052] 图2为本发明较佳实施例中EXPAR与biEXPAR扩增效率对比。其中，1: X_1 ；2: $X' - Y'$ ；3: $Y' - Y'$ ；4: EXPAR (+)；5: biEXPAR (+)。

[0053] 图3为本发明较佳实施例中AuNPs的表征。其中，(a) 紫外-可见光谱图；(b) SEM图。

[0054] 图4为本发明较佳实施例中缓冲液对3D-HCR水凝胶的影响。其中，①3D-HCR缓冲液；② $1 \times \text{TAE-Mg}^{2+}$ 缓冲液；③Tris-HCl B1缓冲液。“+”为阳性，“-”为阴性。

[0055] 图5为本发明较佳实施例中H1, H2, Y引物浓度优化结果。其中，① $c(H1) = c(H2) = 200\mu\text{M}$ ；② $c(H1) = c(H2) = 320\mu\text{M}$ ；③ $c(H1) = c(H2) = 380\mu\text{M}$ 。左边为阳性，含有Y。右边为阴性，不含Y。

[0056] 图6为本发明较佳实施例中3D-HCR水凝胶成胶时间优化结果。

[0057] 图7为本发明较佳实施例中3D-HCR水凝胶的流变学及扫描电镜表征结果。其中，(a) 储能模量(G')与损耗模量(G'')的频率依赖性；(b) 储能模量(G')与损耗模量(G'')的时间依赖性；(c) 储能模量(G')与损耗模量(G'')的时间依赖性。(d) 3D-HCR水凝胶的扫描电镜图(750X)。(e) 3D-HCR水凝胶的细节图(8000X)。(f) 包被了AuNPs的3D-HCR水凝胶的细节图(20000X)。

[0058] 图8为本发明较佳实施例中3D-HCR水凝胶-AuNPs传感器灵敏性分析结果图。其中，(a) Y浓度对3D-HCR水凝胶束缚AuNPs的影响(Y的浓度依次为： $1\mu\text{M}$, $2\mu\text{M}$, $4\mu\text{M}$, $8\mu\text{M}$, $16\mu\text{M}$, $32\mu\text{M}$)；(b) 3D-HCR水凝胶-AuNPs传感器检测范围(Hg^{2+} 的浓度依次为： 0nM , 0.1nM , 0.2nM , 0.5nM , 1nM , 2nM , 5nM , 10nM , 20nM , 50nM , 100nM , 200nM , and 500nM)；(c) 3D-HCR水凝胶-AuNPs传感器线性检测区间。

具体实施方式

[0059] 以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。若未特别指明，实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段，所用原料均为市售商品。

[0060] 实施例1基于3D-HCR水凝胶的汞离子快速可视化检测方法

[0061] 1. 实验材料 ▼

[0062] 1.1 EXPAR所需试剂

[0063] EXPAR体系中所用到的Bst DNA聚合酶、Nt.Bst NBI核酸内切酶(切割内切酶)、dNTP,10×Thermpol Buffer及Buffer 3.1(BalbBuffer 3.1)均购自于美国纽英伦生物技术有限公司(New England Biolabs)。

[0064] 1.2制备AuNPs试剂

[0065] 氯金酸(HAuCl_4)、柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)及牛血清白蛋白(BSA)均购于美国Sigma公司。

[0066] 1.3制备聚丙烯酰胺凝胶电泳所需试剂

[0067] (1) 聚丙烯酰胺凝胶:配制40%丙烯酰胺原液,配方为丙烯酰胺38g,N,N'-甲叉双丙烯酰胺2g,加入蒸馏水定容至100mL,室温避光保存。

[0068] (2) 5×TBE缓冲液:称取Tris 54g,硼酸27.5g,加入20mL 0.5mol/L EDTA,调节pH至8.3,加水定容至1L。

[0069] (3) 10%过硫酸铵(AP):AP 1g加水定容到10mL,4℃下可存贮数周。

[0070] (4) TEMED(N',N',N',N'-四甲基乙二胺)、SYBR Gold核酸染料、Gene Ruler超低分子量DNA Ladder和6×DNA Loading buffer均购自于赛默飞世尔科技有限公司。

[0071] 2. 引物序列

[0072] EXPAR及3D-HCR反应所需要的引物序列由上海英维捷基生物有限公司合成,详见表1(SEQ ID NO:1-8)。

[0073] 表1实验中所用的模板链、底物链,产物及引物序列

序号	名称	序列(5'→3')
1	X1	CTA CAC GCG ATT CAT GAG TC <u>TTTA</u>
2	X2	CTA CAC GCG ATT CAT GAG TC <u>TTT</u>
3	X3	CTA CAC GCG ATT CAT GAG TC <u>TTTT</u>
[0074] 4	X'-Y'	CTG GCT CCT GTG ATT GTG CTC TAG T <u>TTTT</u> <i>GACTC</i> ATG AAT CGC GTG TAG
5	Y'-Y'	CTG GCT CCT GTG ATT GTG CTC TAG <i>ACA</i> <u>GACTC</u> CTG GCT CCT GTG ATT GTG CTC TAG
6	Y	CTA GAG CAC AAT CAC AGG AGC CAG
7	H1	GAT CGC GAT C CTG GCT CCT GTG ATT GTG CTC TAG ACA TCG CTA GAG CAC AAT CAC AGG
8	H2	CTA GAG CAC AAT CAC AGG AGC CAG TTTT CCT GTG ATT GTG CTC TAG CGA TGT

[0075] 注:下划线表示EXPAR反应中的T-T错配区;斜体表示Nt.Bst NBI核酸内切酶核酸内切酶的识别区;代表切割位点。

[0076] 3. Hg^{2+} 响应型的EXPAR反应

[0077] 首先以X'-Y'序列为模板,对单重EXPAR的模板序列的结构进行了优化,实现产物Y序列的指数扩增。其中,X1,X2,X3与X'-Y'在切割位点上游的末位的4个碱基分别为5'-TTTA-3',5'-TTT空-3',5'-TTTT-3'。换言之,对于序列X1与X2,二者与X'-Y'在切割位点上游有3个T-T错配用于 Hg^{2+} 的特异性识别和结合。而X2在3'末端不含可以与X'-Y'互补的A碱基。两组的试验结果可用于判定3'端的A-T配对是否会影响Nt.BstNBI和Bst DNA聚合酶的活性。对于序列X3,X3与X'-Y'在切割位点上游T-T错配数有4个。扩增Y产物的反应过程如

下:

[0078] (1) 将X1, X2, X3与X' -Y' 引物溶解在超纯水中, 终浓度为1 μ M。

[0079] (2) 按照表2和表3的加样及孵育顺序扩增Y产物。

[0080] 表2单重EXPAR反应体系及反应过程

引物或试剂	初浓度	加样量	终浓度
X1/X2/X3	1 μ M	6 μ L	0.20 μ M
X'-Y'	1 μ M	6 μ L	0.20 μ M
Hg ²⁺	10 μ M	2.4 μ L	0.80 μ M
dNTP	2.5 mM	3 μ L	
超纯水	-	6.8 μ L	-

[0081]

高温变性 95 $^{\circ}$ C, 5 min, 孵育 37 $^{\circ}$ C, 30 min

Bst DNA 聚合酶	8 U/ μ L	0.1 μ L	0.02 U/ μ L
-------------	--------------	-------------	-----------------

Thermpol Buffer	10 \times	3 μ L	
-----------------	-------------	-----------	--

孵育 55 $^{\circ}$ C, 10 min

Nt. Bst NBI	10 U/ μ L	1.2 μ L	0.37 U/ μ L
-------------	---------------	-------------	-----------------

Buffer 3.1		1.5 μ L	
------------	--	-------------	--

孵育 55 $^{\circ}$ C, 20 min

[0082] 表3双重EXPAR反应体系及反应过程

[0083]

引物或试剂	初浓度	加样量	终浓度
-------	-----	-----	-----

	XI	1 μ M	6 μ L	0.20 μ M
	X'-Y'	1 μ M	6 μ L	0.20 μ M
	Y'-Y'	1 μ M	1.5 μ L	0.05 μ M
	Hg ²⁺	10 μ M	2.4 μ L	0.80 μ M
	dNTP	2.5 mM	3 μ L	
	H ₂ O	-	5.3 μ L	-
[0084]	高温变性 95°C, 5 min, 孵育 37°C, 30 min			
	Bst DNA polymerase	8 U/ μ L	0.1 μ L	0.02 U/ μ L
	Thermpol Buffer	10×	3 μ L	
	孵育 55°C, 10 min			
	Nt. Bst NBI	10 U/ μ L	1.2 μ L	0.37 U/ μ L
	Nt.BstNBI reaction buffer	1×	1.5 μ L	
	孵育 55°C, 20 min			

[0085] 4. 3D-HCR水凝胶的制备

[0086] (1) 将H1, H2, Y溶解在3D-HCR缓冲液 (2.5mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, 8mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂ · 6H₂O, pH 7.4) 中, 终浓度分别为1000 μ M, 1000 μ M, 100 μ M;

[0087] (2) 将溶解后的H1, H2置于95°C条件下, 高温变性10min后取出并冷却至室温。按照H1、H2、Y的终浓度分别为320 μ M, 320 μ M, 6.4 μ M, 将引物溶解于PCR管中, 加入3D-HCR缓冲液, 使得水凝胶的总体积为50 μ L;

[0088] (3) 将PCR管放置37°C恒温箱中孵育过夜。

[0089] 5. 聚丙烯酰胺凝胶电泳

[0090] 聚丙烯酰胺凝胶配方如表4所示, 电压和电泳时长分别为120V, 90min。电泳结束后, 将聚丙烯酰胺凝胶浸泡于用1×TBE缓冲液中, 加入稀释10000倍的SYBR Gold核酸染料, 室温避光色10min, 之后用1×TBE洗涤两次, 每次10min。用BioDoc-It凝胶成像系统采集图像。

[0091] 表4聚丙烯酰胺凝胶的配制

	组分	终浓度	加样量
	40%丙烯酰胺	20%	12.5 mL
	5×TBE	1×	5 mL
[0092]	10% AP	0.072%	180 μ L
	TEMED	0.064%	16 μ L
	超纯水		补齐至 25 mL

[0093] 6. 金纳米粒子的制备与包被

[0094] 将烧制AuNPs所需的圆底烧瓶、量筒等玻璃容器置于酸酞缸中浸泡过夜, 以去除盐离子的干扰。取出后用蒸馏水清洗3次。在圆底烧瓶中加入超纯水250mL, 用电热套加热至沸

腾,圆底烧瓶中的蒸馏水废弃不用。随后,在圆底烧瓶中重新加入超纯水196mL、1%氯金酸1mL并加热至沸腾。一次性加入3mL的1%柠檬酸三钠。一段时间后可观察到圆底烧瓶中的液体颜色逐渐加深至黑色,而后变为樱桃红色。5min后停止加热,冷却至室温后,避光4℃保存。

[0095] AuNPs表面上带有正电荷,BSA带有负电荷,两者通过静电吸附作用结合,可防止AuNPs在高盐浓度的水凝胶形成缓冲液中的聚合。AuNPs包被方案为:以PBS缓冲液为溶剂配制10%BSA溶液,每1mL AuNPs溶液中加入20μL BSA溶液,在血液混匀仪上旋转孵育40min即可。

[0096] 7. 可视化3D-HCR水凝胶的制备

[0097] (1) 按照H1、H2、Y、AuNPs (15nm) 的终浓度分别为320μM, 320μM, 6.4μM, 18nM, 将引物溶解于PCR管中,加入3D-HCR缓冲液,使得水凝胶的总体积为50μL;

[0098] (2) 将PCR管放置37℃恒温箱中孵育过夜。

[0099] 8. 基于核酸纳米轨道(核酸纳米金3D水凝胶)的Hg²⁺快速可视化检测方法的设计原则

[0100] 3D-HCR水凝胶是在线性HCR基础上,通过改变发夹的结构和结合方式,形成的核酸纳米轨道状的多孔性三维结构,是一种宏量的纳米材料。AuNPs同样具有纳米级的粒径,并具有良好的光学特性,被广泛应用于比色传感平台。本发明结合双重EXPAR, 3D-HCR水凝胶和AuNPs,建立了可视化Hg²⁺检测生物传感平台。在Hg²⁺存在的情况下,Hg²⁺与T碱基形成T-Hg-T结构,诱导EXPAR的扩增。EXPAR的扩增产物Y序列,可作为3D-HCR水凝胶的促发子。形成3D-HCR水凝胶需要包含3个组分:Y, H1, H2。与传统的线性HCR不同,3D-HCR中的H1的粘性末端含有长度为10nt的回文序列,退火后,粘性末端互相结合形成H1二聚体结构。当体系中没有Y时,H1, H2以发夹结构的形式稳定共存;当体系中含有Y时,Y与H1结合并打开H1的发夹结构,从而使H1露出新的粘性末端,打开H2发夹。经过多次循环,复杂的分支状链接会形成三维网络结构,即DNA水凝胶。

[0101] 3D-HCR水凝胶是一种多孔性结构,其孔隙可以束缚AuNPs。在加入Y前先加入BSA包被的AuNPs, AuNPs游离在溶液中,体系呈现均匀的红色溶胶状态。再加入Y,水凝胶生成, AuNPs被束缚在凝胶的孔隙中。此时加入缓冲液,可观察到体系呈现明显的分层:上层是无色至浅红色的缓冲溶液,下层是红色的水凝胶。

[0102] 3D-HCR水凝胶束缚AuNPs的能力与Y的浓度呈正相关。当Y浓度低,水凝胶孔径大时,其对AuNPs的束缚力弱。当加入缓冲液时,部分AuNPs被释放至缓冲液中,使溶液呈现红色;当Y浓度高,水凝胶孔径小时,更多的AuNPs被束缚在水凝胶中,释放进入缓冲液的AuNPs浓度低,溶液颜色浅。Y的生成量与EXPAR体系中Hg²⁺浓度呈正相关。因此,可通过测定上清液吸光度值实现Hg²⁺的定量检测。

[0103] 9. 电泳分析Hg²⁺响应型的EXPAR反应

[0104] 对EXPAR引物的结构进行优化,得到了能特异识别并结合Hg²⁺的模板结构。以X1, X2, X3分别结合X' -Y' 模板,促发单重EXPAR反应。以EXPAR (-) 表示体系中不加入Hg²⁺, EXPAR (+) 表示体系中加入Hg²⁺, 且Hg²⁺的浓度为1μM。其反应结果如图1所示。

[0105] 由图1可知,当以X1, X' -Y' 为模板时,在Hg²⁺存在情况下可以产生明显的Y条带。而当体系中没有Hg²⁺时,没有Y条带生成。而以X2/X3及X' -Y' 为模板时,无论加不加Hg²⁺,都不

能产生明显的Y条带。由此可知,切割位点末端的A-T配对有利于Nt.BstNBI和Bst DNA聚合酶的切割或延伸,而T-Hg²⁺-T错配难以作为Nt.Bst NBI和Bst DNA聚合酶的作用位点。因此,在后续实验中,我们选择X1,X'-Y'为EXPAR生成Y产物的模板。

[0106] EXPAR作为传感器中实现信号放大的单元,起到了增加传感器灵敏度的作用。双重EXPAR在EXPAR体系中增加了Y'-Y'序列,实现了信号的双重放大。图2为EXPAR与双重EXPAR生成Y产物后经聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)得到的结果。由图2可知,双重EXPAR扩增后产生的Y条带,其浓度要高于普通EXPAR。

[0107] 10. AuNPs的表征

[0108] 如图3a所示,AuNPs的紫外-可见吸收光谱在524nm处有最大吸收峰。利用JOEL透射电子显微镜JEM2100观察制备出的AuNPs,如图3b所示,AuNPs在体系中的分散性良好,呈规则的圆球状,平均直径约15nm。

[0109] 11. 3D-HCR水凝胶体系的优化

[0110] 首先对生成3D-HCR水凝胶的反应条件和反应时间进行探索。比较了缓冲液种类、模板浓度、孵育时间对3D-HCR水凝胶生成的影响,并证明了3D-HCR水凝胶的特异性,与AuNPs的兼容性及其凝胶束缚AuNPs的能力与I链浓度的关系。为实现Hg²⁺的定量检测进行了可行性论证。

[0111] 11.1 缓冲液对3D-HCR水凝胶生成的影响

[0112] 配制三种缓冲液3D-HCR缓冲液、1×TAE-Mg²⁺缓冲液(40mM Tris,20mM乙酸,2mM EDTA,12.5mM Mg²⁺,pH 7.4)、Tris-HCl B1缓冲液(10mM Tris,1mM MgCl₂,pH 7.4)。阳性组、阴性组中的H1、H2终浓度均为320μM。阳性组加入Y 6.4μM,阴性体系中不加。37℃条件下孵育过夜后,结果如图4所示。

[0113] 由图4可知,对于三种缓冲液而言,只有H1与H2共存时均无法促发3D-HCR。在加入Y后,3D-HCR缓冲液生成凝胶的效果最好。1×TAE-Mg²⁺缓冲液也能够促发水凝胶的形成,但凝胶中还含有大量的游离水,结构疏松,成胶不完全。三种缓冲液中,Tris-HCl缓冲液的凝胶效果最差,阳性组与阴性组呈现差别不大的溶胶状态。

[0114] 11.2 H1,H2引物浓度对3D-HCR水凝胶的影响

[0115] 水凝胶的形成需要促发子Y和发夹H1,H2均达到一定的浓度水平。模板浓度过低时,形成的凝胶结构疏松,或不能形成凝胶,以溶胶的形式存在。模板浓度过高时,个别不稳定的发夹之间可能互相交联,在没有促发子Y的情况下就形成松散的凝胶结构。因此,对引物浓度进行了优化,结果如图5所示。

[0116] 由图5可知,随着H1,H2浓度的增加,阳性组形成的水凝胶中游离水的含量降低。③组阴性条件下也能形成松散的凝胶,说明体系中存在少量解链的发夹,彼此之间能够形成交联。当H1,H2浓度为320μM时,阳性组成胶状态良好,阴性组不能成胶,两组的差异最明显。因此,本发明选用的引物浓度为c(H1),c(H2)=320μM,Y=6.4μM。

[0117] 11.3 3D-HCR水凝胶生成时间优化

[0118] 为尽可能缩短实现Hg²⁺检测的时间,本发明对水凝胶的成胶过程进行了监测。3D-HCR水凝胶的成胶过程如图6所示。

[0119] 由图6可知,反应前6h,体系呈现溶胶状态,肉眼不能观察到块状凝胶的生成。8~10h体系出现松散的凝胶。12h后,水凝胶成胶情况良好,大量游离水被锁在水凝胶中。因此,

本发明所选择的孵育时间为12h。

[0120] 12. 3D-HCR水凝胶的表征

[0121] 水凝胶的功能和应用在很大程度上取决于其力学性能。对3D-HCR水凝胶的进行了动态力学测试研究它的流变性能(图7a-c)。如图7a所示,在0.1~10Hz的扫描频率下,3D-HCR水凝胶的储能模量 G' 始终大于损耗模量 G'' ,该结果表明,3D-HCR水凝胶具有凝胶特性。如图7b所示,在固定频率下扫描300s, G' 始终大于 G'' ,再次证明水凝胶的稳定存在。此外,3D-HCR水凝胶的流变学行为对温度敏感,如图7c所示,当温度高于42℃左右时, G' 迅速下降,当温度高于62℃时 G'' 甚至高于 G' ,这说明62℃是凝胶到溶胶转变点。用SEM表征3D-HCR水凝胶的结构特性,如图7d所示,水凝胶真空干燥后的样品具有典型的三维交联形貌。为了进一步了解3D-HCR水凝胶的结构细节,在高倍镜下观察水凝胶结构的微观细节,如图7e所示,水凝胶交联结构的表面覆盖着致密的盐颗粒。用同样的方法表征束缚了AuNPs的3D-HCR水凝胶的微观结构,如图7f所示,束缚了AuNPs的水凝胶表面颗粒的尺寸与普通的水凝胶非常相似,但是表面形态有着明显的差异,这可能是由盐颗粒在球状的AuNP上的覆盖引起的。

[0122] 13. Hg^{2+} 的定量检测

[0123] 促发子Y的浓度与凝胶的密度具有相关关系,Y浓度高,生成的3D-HCR水凝胶宏观上更为紧实;Y浓度低,生成的3D-HCR水凝胶较为松散。本发明以AuNPs作为显色介质描述3D-HCR水凝胶对AuNPs的束缚能力,其结果如图8a所示。

[0124] 在优化后的实验条件下,以 Hg^{2+} 浓度为横坐标, $(A_0-A)/A_0$ 为纵坐标(A_0 和A分别代表不存在汞离子和存在不同浓度汞离子时上清液OD₅₂₄值),绘制标准曲线,实现对 Hg^{2+} 的定量检测。3D-HCR水凝胶-AuNPs传感器的检测范围及线性区间如图8b所示。在0~100nM范围内,随着 Hg^{2+} 浓度的增加,水凝胶上清液的OD值降低,并在100nM后达到稳定。如图8c所示,当 Hg^{2+} 浓度为0.5~10nM时,传感器对 Hg^{2+} 浓度的响应是线性的,其线性相关性可表征为 $y = 0.0458x + 0.2088$,相关系数 $R^2 = 0.9577$ 。图8c中的内嵌图像是线性区间范围内,肉眼观察到AuNPs的颜色变化,说明该传感器实现了 Hg^{2+} 的可视化检测。对于目视检测,可在1~10nM的浓度范围内观察到明显的颜色变化。如果利用酶标仪进行定量检测,检测的最低限可达到0.2nM。

[0125] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

		序列表	
[0001]			
[0002]	<110>	中国农业大学	
[0003]	<120>	基于3D-HCR水凝胶的汞离子快速可视化检测方法	
[0004]	<130>	KHP191110795.4	
[0005]	<160>	8	
[0006]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0	
[0007]	<210>	1	
[0008]	<211>	24	
[0009]	<212>	DNA	
[0010]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0011]	<400>	1	
[0012]		ctacacgcga ttcattgagtc tttta	24
[0013]	<210>	2	
[0014]	<211>	23	
[0015]	<212>	DNA	
[0016]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0017]	<400>	2	
[0018]		ctacacgcga ttcattgagtc ttt	23
[0019]	<210>	3	
[0020]	<211>	24	
[0021]	<212>	DNA	
[0022]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0023]	<400>	3	
[0024]		ctacacgcga ttcattgagtc tttt	24
[0025]	<210>	4	
[0026]	<211>	49	
[0027]	<212>	DNA	
[0028]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0029]	<400>	4	
[0030]		ctggctcctg tgattgtgct ctagtttttg actcatgaat cgcgtgtag	49
[0031]	<210>	5	
[0032]	<211>	57	
[0033]	<212>	DNA	
[0034]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0035]	<400>	5	
[0036]		ctggctcctg tgattgtgct ctagaacaga ctctggctc ctgtgattgt gctctag	57
[0037]	<210>	6	
[0038]	<211>	24	

[0039]	<212>	DNA	
[0040]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0041]	<400>	6	
[0042]		ctagagcaca atcacaggag ccag	24
[0043]	<210>	7	
[0044]	<211>	58	
[0045]	<212>	DNA	
[0046]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0047]	<400>	7	
[0048]		gatcgcgatc ctggctcctg tgattgtgct ctagacatcg ctagagcaca atcacagg	58
[0049]	<210>	8	
[0050]	<211>	52	
[0051]	<212>	DNA	
[0052]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0053]	<400>	8	
[0054]		ctagagcaca atcacaggag ccagttttcc tgtgattgtg ctctagcgat gt	52

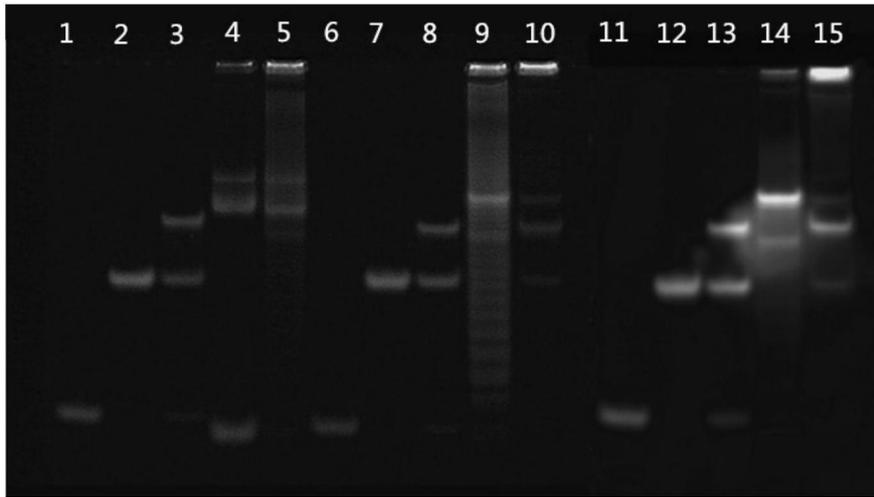


图1

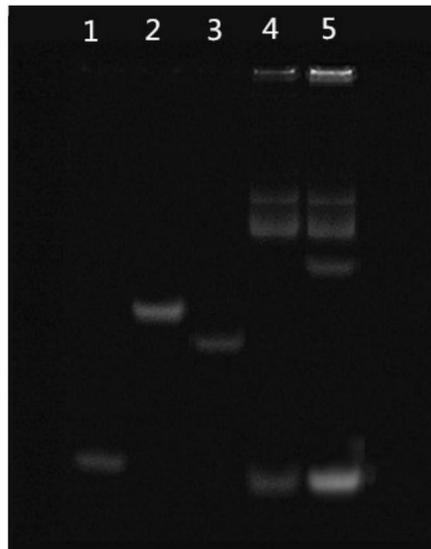


图2

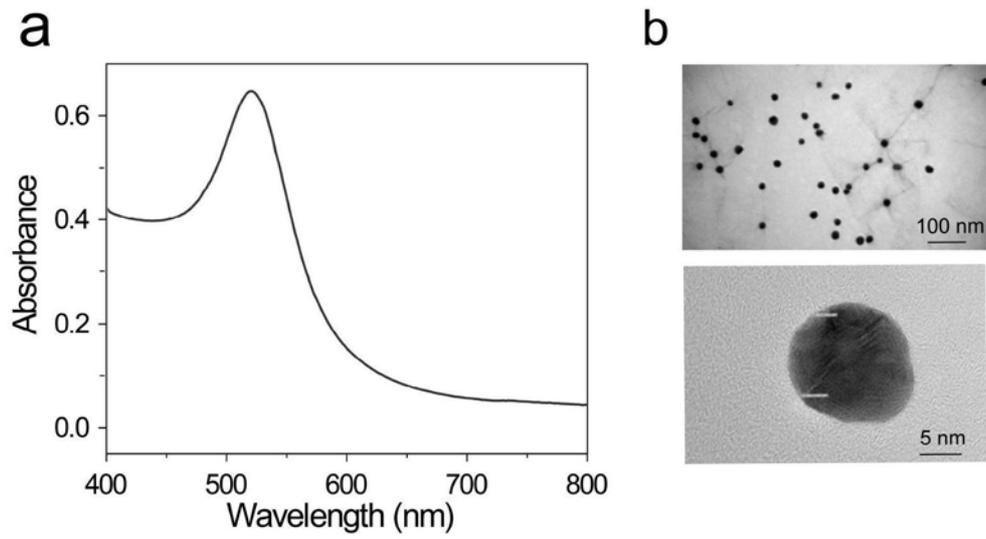


图3

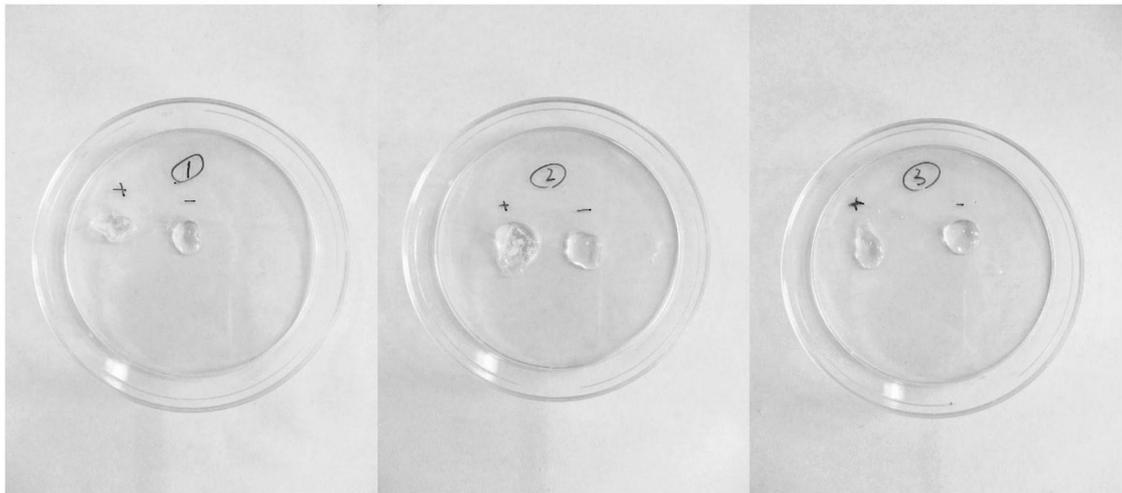


图4

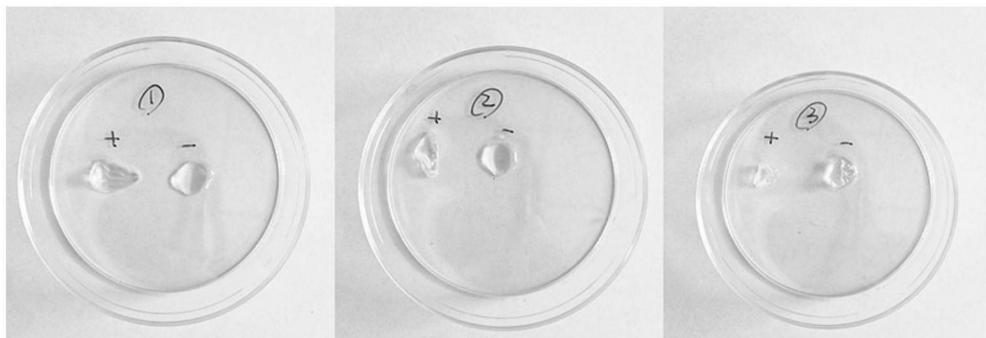


图5

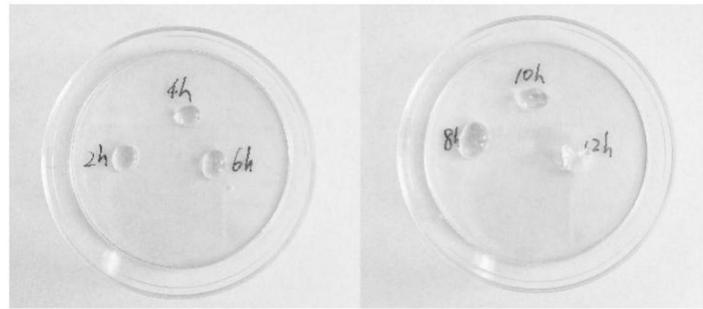


图6

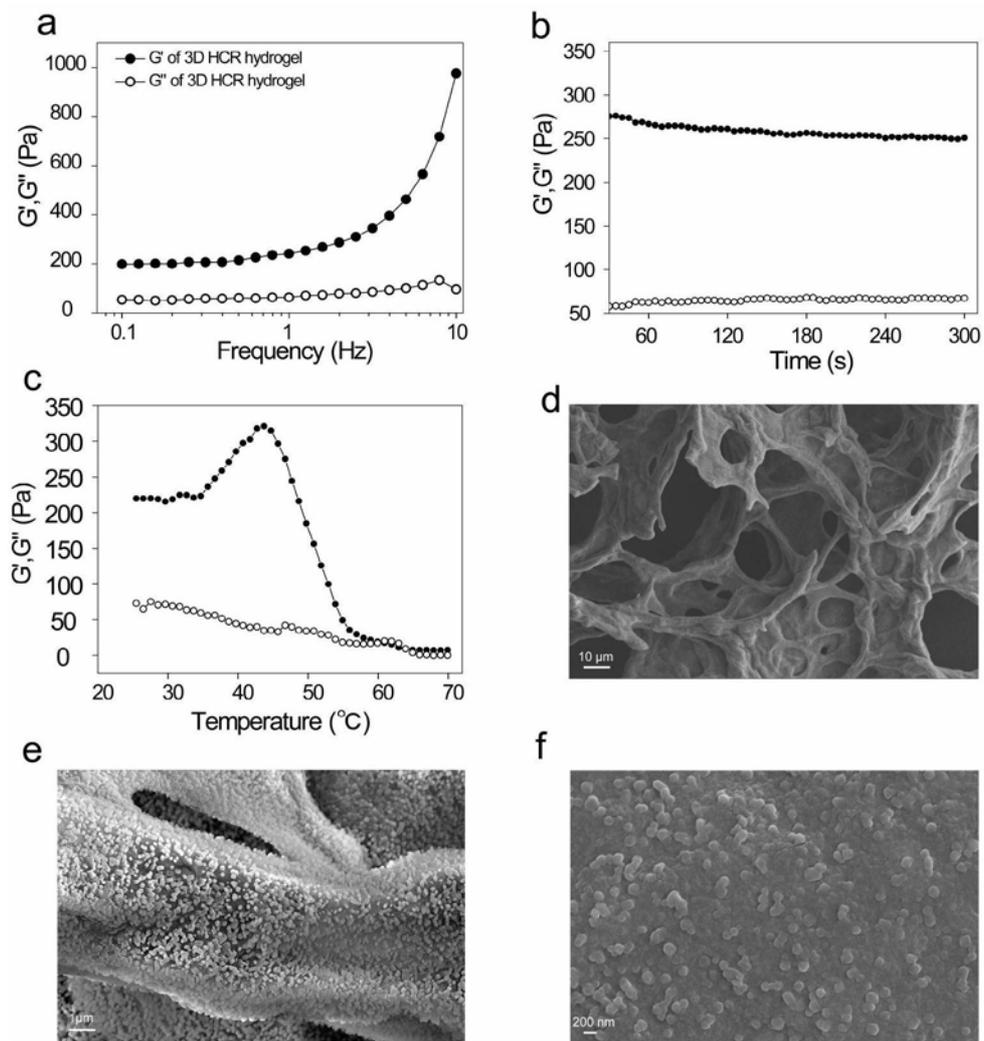
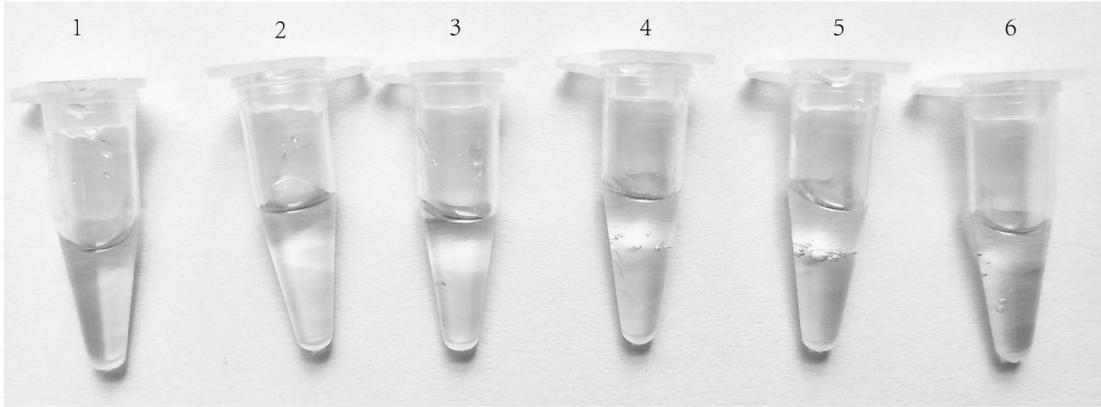
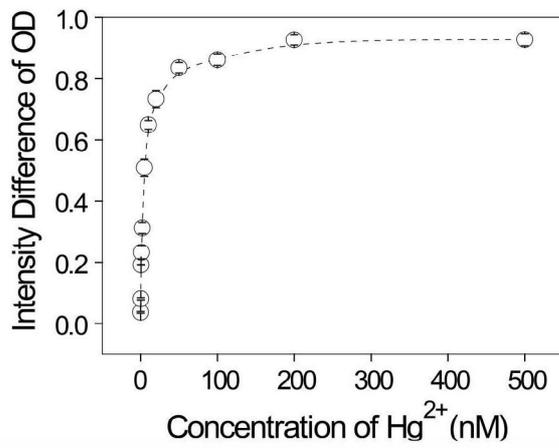


图7

a



b



c

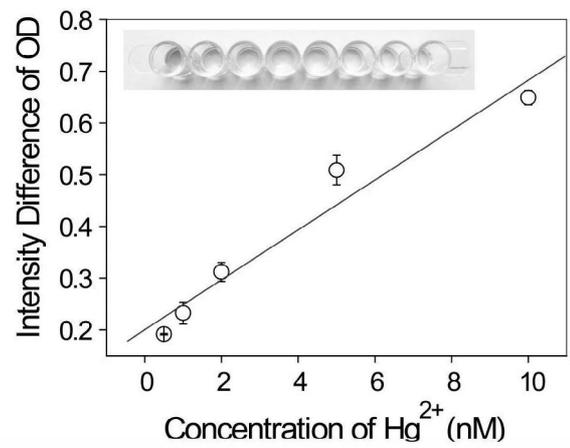


图8