



(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,其特征就在于,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,其特征就在于,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,其特征就在于,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,其特征就在于,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酐缸中浸泡过夜, 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 |

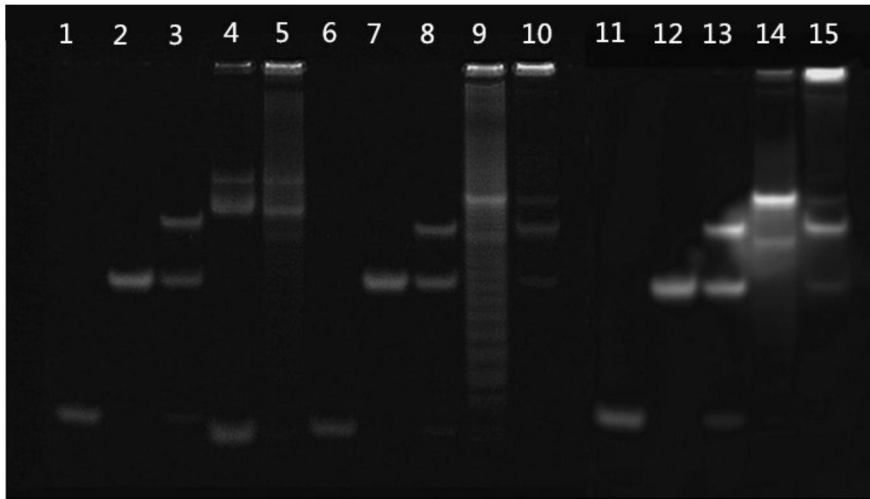


图1

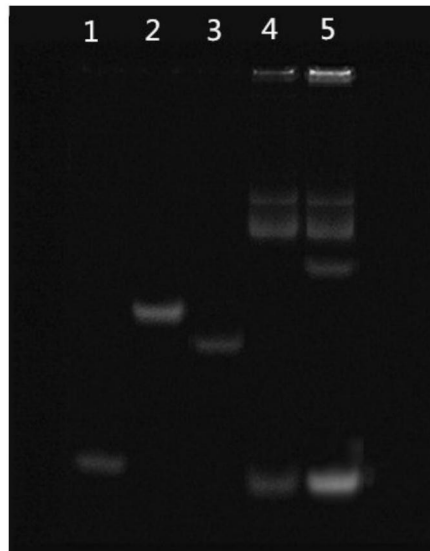


图2

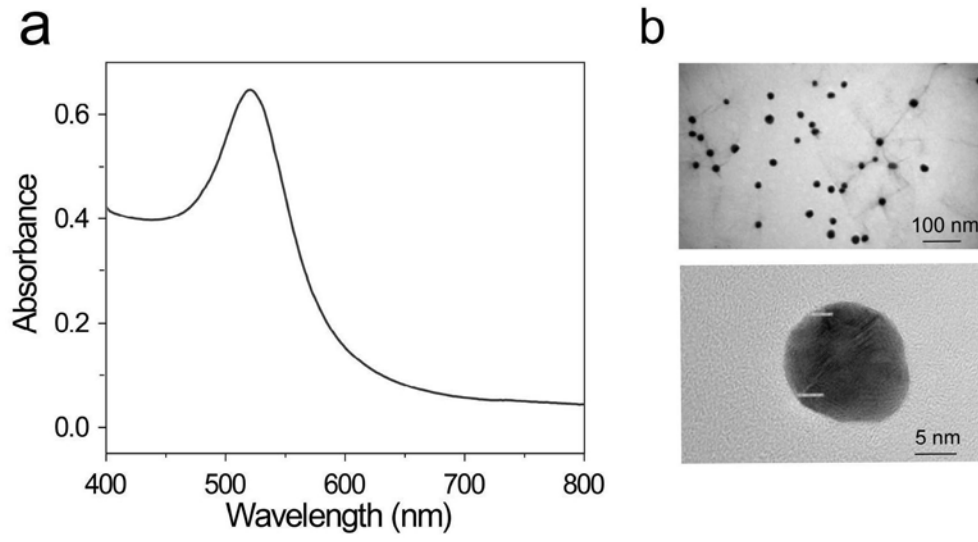


图3

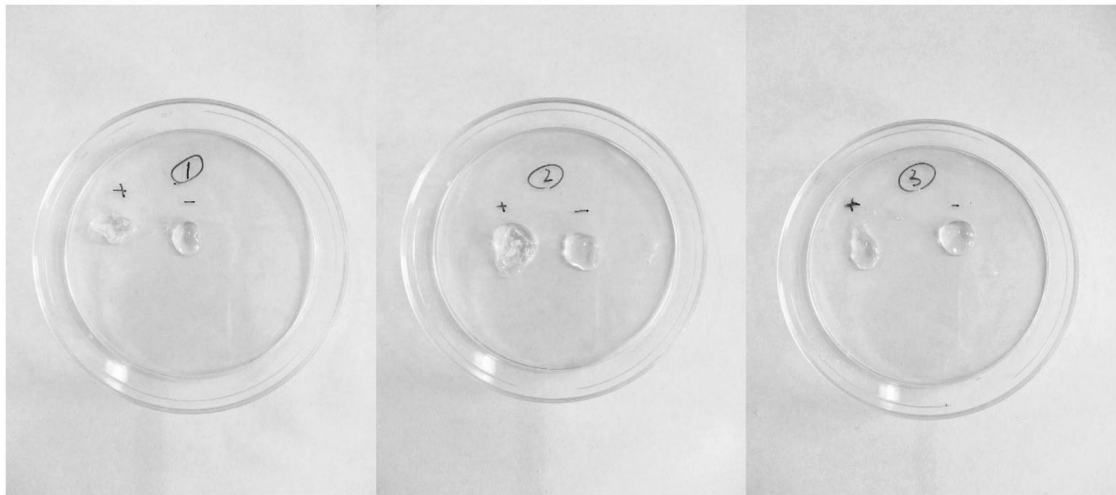


图4



图5

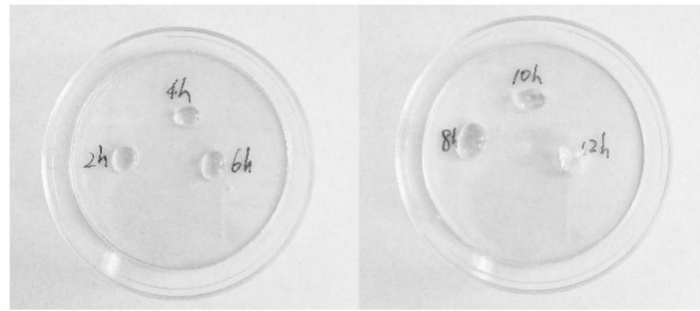


图6

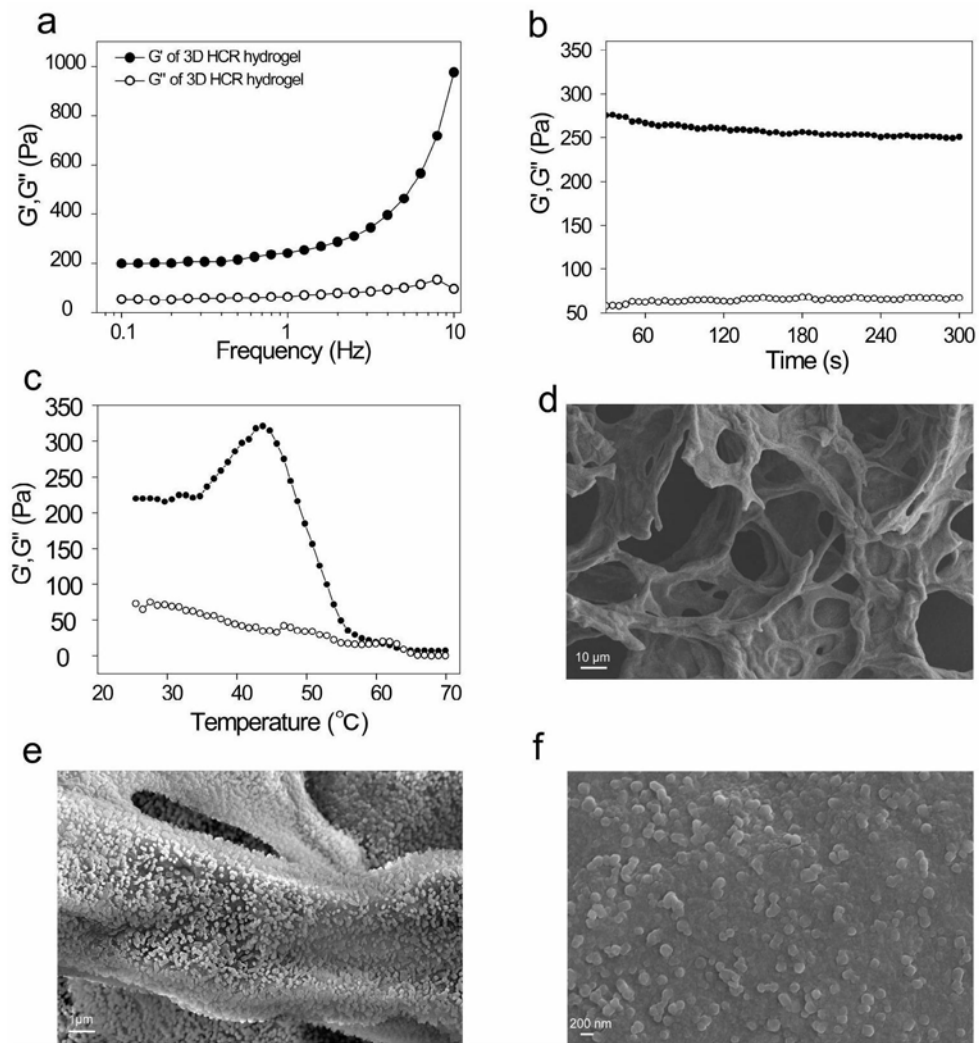
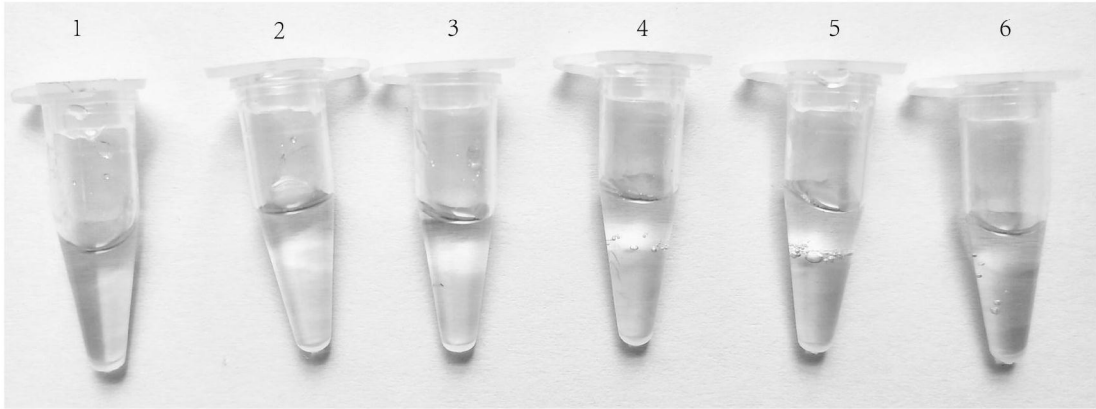
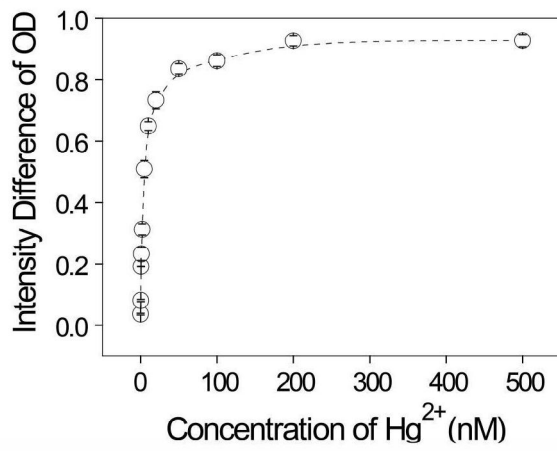


图7

a



b



c

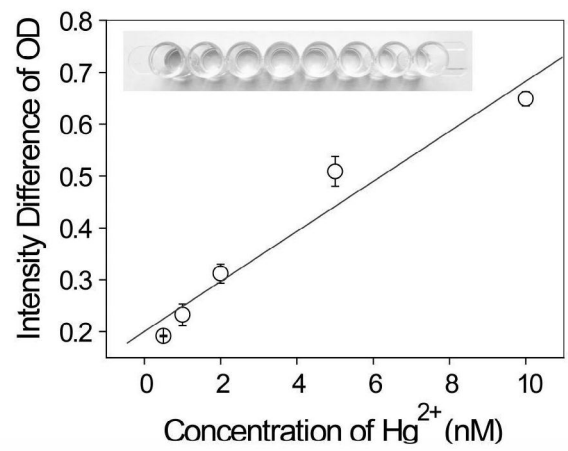


图8