



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110501486 A

(43)申请公布日 2019. 11. 26

(21)申请号 201910762604.2

(22)申请日 2019.08.20

(71)申请人 西安拾忆信息科技有限公司

地址 710000 陕西省西安市高新区丈八街
办高新一路18号海归楼1-301-41

(72)发明人 姚小虎 王兴

(74)专利代理机构 北京和信华成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11390

代理人 胡剑辉

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

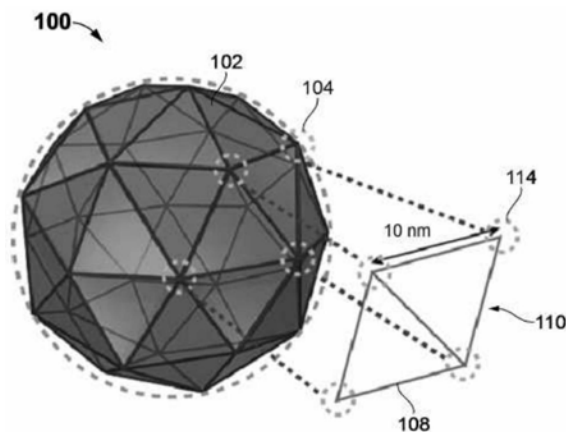
权利要求书1页 说明书9页 附图6页

(54)发明名称

脱氧核糖核酸纳米传感器及其用于致病实体的检测方法

(57)摘要

本发明属于生物传感器和病毒抑制剂领域。尤其涉及一种脱氧核糖核酸纳米结构传感器及其用于致病实体的检测方法。包括以下步骤,识别和分析致病实体表面配体的模式;针对致病实体表面配体图案,设计DNA纳米结构;合成或选择针对致病结构域的粘合剂,以实现致病实体表面配体的高效匹配;将粘合剂结合到DNA纳米结构上,形成多价DNA纳米结构粘合剂复合物;将多价DNA纳米结构粘合剂复合物结合到致病实体表面配体上,以检测或/和抑制疾病。可直接用于检测致病实体DEC,检测灵敏度及效率更高,耗时更短,对医疗设备的要求更低,价格更加低廉;对致病实体的检测适应性更广。



1. 一种基于脱氧核糖核酸纳米结构传感器的致病实体检测方法, 其特征在于: 包括以下步骤,

(1) 识别和分析致病实体表面配体模式;

(2) 针对致病实体表面配体图案, 设计DNA纳米结构;

(3) 合成或选择针对致病实体表面结构域的粘合剂, 以实现DNA纳米结构与致病实体表面配体的高效匹配;

(4) 将粘合剂结合到DNA纳米结构上, 以匹配致病实体表面配体的位置和间距, 形成多价DNA纳米结构粘合剂复合物;

(5) 将多价DNA纳米结构粘合剂复合物结合到致病实体表面配体上, 检测或/和抑制疾病。

2. 根据权利要求1所述的基于脱氧核糖核酸纳米结构传感器的致病实体检测方法, 其特征在于: 所述粘合剂为肽、适体、寡糖或小分子中的至少一种。

3. 根据权利要求1所述的基于脱氧核糖核酸纳米结构传感器的致病实体检测方法, 其特征在于: 其中DNA纳米结构是一维线性DNA纳米结构、二维平面DNA纳米结构或三维立体DNA纳米结构之中的至少一种。

4. 根据权利要求1所述的基于脱氧核糖核酸纳米结构传感器的致病实体检测方法, 其特征在于: 其中该疾病引起实体或疾病是病毒、细菌、癌细胞、蛋白质、微生物毒素、癌症特异性生物标记物及传染性物质中之任一种。

5. 根据权利要求1所述的基于脱氧核糖核酸纳米结构传感器的致病实体检测方法, 其特征在于: 其中DNA纳米结构是带负电荷的DNA纳米结构, 被配置为在血清或血浆中, 用于有效的疾病抑制。

6. 根据权利要求1所述的基于脱氧核糖核酸纳米结构传感器的致病实体检测方法, 其特征在于: 其中所述DNA纳米结构包括一对荧光团和一个猝灭剂分子, 其中所述荧光团通过碱基配对与猝灭剂分子配对。

7. 一种脱氧核糖核酸纳米结构传感器, 其特征在于: 包括与致病实体表面配体相适应的DNA纳米结构和粘合剂; 所述DNA纳米结构还包括设置在其中心的荧光团和猝灭剂分子; 没有致病实体DCE存在下, 所述荧光团和猝灭剂分子通过碱基对在单链中杂交, 形成一个茎环, 荧光团无荧光; 其中粘合剂结合在DNA纳米结构适当位置, 用于使DNA纳米结构与致病实体表面配体具有高度匹配性。

8. 根据权利要求7所述的脱氧核糖核酸纳米结构传感器, 其特征在于: 致病实体DCE存在下, 茎环被转换成双链DNA, 荧光团激活发出荧光。

9. 根据权利要求7所述的脱氧核糖核酸纳米结构传感器, 其特征在于: 所述致病实体为病毒、细菌、癌细胞、蛋白质、微生物毒素、癌症特异性生物标记物或传染性物质中的任一种。

10. 根据权利要求8所述的脱氧核糖核酸纳米结构传感器, 其特征在于: 所述脱氧核糖核酸纳米结构传感器用于癌细胞的检测。

脱氧核糖核酸纳米传感器及其用于致病实体的检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物传感器和病毒抑制剂领域。尤其涉及一种脱氧核糖 核酸纳米结构传感器及其用于致病实体的检测方法。

背景技术

[0002] 在当今世界,新病原体的大量出现需要一个更智能的相关疾病诊断 方法,这给临床医师和医生在临床方法上带来了许多挑战。根据世界卫 生组织的研究,2015年全世界大约有5640万人死亡,其中超过一半的死亡是由前10大原因造成的。这些原因包括缺血性心脏病和中风、慢性阻塞性肺病、肺癌、糖尿病、痴呆、下呼吸道感染、腹泻、肺结核和道路 损伤。然而死亡的主要原因,主要基于各种不同的因素,如地理区域、年龄、经济 and 性别。具体来说,在非洲地区,传染病、产妇、新生儿和 营养不良仍然是主要的死亡原因,这些原因在2015年占死亡人数的56%。

[0003] 此外,传染病仍然是五岁以下儿童死亡的主要原因。全球主要传染病包括结核病、艾滋病等性病、腹泻病、百日咳、白喉、麻疹、破伤风、脑膜炎、脑炎、肝炎、疟疾、登革热和黄热病等儿童丛集性疾病。就疾病相关死亡率而言,非洲和东南亚地区是受影响最严重的地区。因此,有必要在传染病的防治中争取新的作用机制,以处理抗微生物耐药性、预防性疫苗的使用、更有效的分子结构或更有效的药物预防方案,以提高治疗率。除治疗外,及时准确的早期诊断对于确定最有效的治疗方案 至关重要。

[0004] 例如,在主要影响热带全球南部的病毒感染情况下,通过几种金标准诊断方法,例如酶联免疫吸附试验(ELISA)、横向流免疫分析(LFIA) 和逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)或其衍生方法,来进行最终诊断。这些方法包括分离和测试病毒、检测患者血液中的病毒抗体或检测特定于病毒的分子信号。然而在病毒和细菌诊断和治疗程序的金标准方法中 有几个主要的局限性。在病毒检测中,金标准诊断方法采用病毒分离、抗原或抗体捕获免疫分析和分子诊断试验。这些通常是耗时和昂贵的。其中PCR和ELISA等大多数手段需要复杂的专业临床实验室设置和技术 人员的熟练使用技能,因此不适用于边远地区等资源不足的地区,以及 采样现场或附近即刻需要进行分析的情况。另一方面,新的LFIA具有特异性不足的缺点,在所需样本体积较小时的时候的敏感性不够。另外,一些金标准的诊断方法(如酶联免疫吸附试验)在患者感染疾病后只能在 特定的晚期检测窗口才能实现检测,在疾病早期不能作为可靠的诊断工具,因此不适用于疾病的早期检测,进而导致患者错过重要的早期治疗 窗口。

[0005] 针对病毒的传统治疗方法是这样的,病毒感染的预防或治疗通常依赖于中和抗体(NABs)对抗病毒表面的靶表位,其中生产NABs的过程 可由入侵宿主的疫苗或活性病毒触发。然而,NABS可能诱导抗体依赖性感染的增强,或可能由于遗传漂变(如流感中的抗原漂变)而无法预防新的流行病。与病毒检测一样,细菌诊断的标准实验室测试也依赖于 耗时和昂贵的过程,这些过程需要复杂的临床实验室设置和专业技术。因此这些方法也不适用于边远地区等资源不足的地区,以及采样现场或 附近即刻进行分析的环境。

[0006] 一般来说,细菌感染可以在诊断后用处方抗生素治疗。但是与病毒一样,细菌也具有极强的适应性,抗生素的过度使用会使许多细菌对抗生素产生耐药性。这可能会造成非常严重的问题,尤其是在医院环境中,超级细菌,即耐药细菌感染,会导致难以或不可能治疗的感染。

[0007] 尽管现有的弱结合配体与表位相互作用可与现有的合成支架(例如聚合物、树枝状聚合物、纳米纤维、纳米颗粒和脂质纳米乳剂)相连,但对理想和精确的配体模式空间显示所需的支架形状和配基价值不能提供有限的控制。因此,合成支架不能解决配体的空间格局问题。此外,合成支架对生物相容性极低的生物体具有毒性。此外,在偶发匹配表位平均间距的同时,它对多价结合亲和力的改善有限。

[0008] 综上所述我们需要一种可定制的分子几何架构来适应致病蛋白的任何表面结构模式,这个结构需要识别致病实体或其他形式的疾病生物标记物的漂移,例如流感病毒。此外,还需要一种更高灵敏度的检测方法,以便在监测和诊断网络中及时检测和控制流行疫情。更进一步的,我们需要一种DNA纳米结构来定制适合病毒、细菌、癌细胞、蛋白质、微生物毒素、癌症特异性生物标志物和其他传染性物质的HA模式,用于传感应用,并有效阻止病毒的感染,而不管这些致病蛋白的突变如何。然而这些技术问题在现有技术中都没能得到有效的解决。

发明内容

[0009] 本发明的目的是提供一种个性化DNA纳米结构实现病毒检测和抑制的方法,从而解决现有技术中的致病实体(DCE)检测步骤繁琐、设备仪器要求高、检测效率低,精度差的技术问题。

[0010] 为了解决上述技术问题,本发明的具体技术方案是,一种基于脱氧核糖核酸纳米结构传感器的致病实体检测方法,包括以下步骤,

[0011] (1) 识别和分析致病实体表面配体模式;

[0012] (2) 针对致病实体表面配体图案,设计DNA纳米结构;

[0013] (3) 合成或选择针对致病实体表面结构域的粘合剂,以实现与致病实体表面配体的高效匹配;

[0014] (4) 将粘合剂结合到DNA纳米结构上,以匹配致病实体表面配体的位置和间距,形成多价DNA纳米结构粘合剂复合物;

[0015] (5) 将多价DNA纳米结构粘合剂复合物结合到致病实体表面配体上,检测或/和抑制疾病。

[0016] 进一步的,所述粘合剂为肽、适体、寡糖或小分子中的至少一种。

[0017] 进一步的,其中DNA纳米结构是一维线性DNA纳米结构、二维平面DNA纳米结构或三维立体DNA纳米结构之中的至少一种。

[0018] 进一步的,其中该疾病引起实体或疾病是病毒、细菌、癌细胞、蛋白质、微生物毒素、癌症特异性生物标记物及传染性物质中之任一种。

[0019] 进一步的,其中DNA纳米结构是带负电荷的DNA纳米结构,被配置为在血清或血浆中,用于有效的疾病抑制。

[0020] 进一步的,其中所述DNA纳米结构包括一对荧光团和一个猝灭剂分子,其中所述

荧光团通过碱基配对与猝灭剂分子配对。

[0021] 进一步的,包括与致病实体表面配体相适应的DNA纳米结构和粘合剂;所述DNA纳米结构还包括设置在其中心的荧光团和猝灭剂分子;没有致病实体DCE存在下,所述荧光团和猝灭剂分子通过碱基对在单链中杂交,形成一个茎环,荧光团无荧光;其中粘合剂结合在DNA纳米结构适当位置,用于使DNA纳米结构与致病实体表面配体具有高度匹配性。

[0022] 进一步的,致病实体DCE存在下,茎环被转换成双链DNA,荧光团激活发出荧光。

[0023] 进一步的,所述致病实体为病毒、细菌、癌细胞、蛋白质、微生物毒素、癌症特异性生物标记物或传染性物质中的任一种。

[0024] 进一步的,所述脱氧核糖核酸纳米结构传感器用于癌细胞的检测。

[0025] 本发明相比现有技术的有益效果:本发明所述的脱氧核糖核酸纳米结构传感器及用于致病实体的检测方法,针对于样本本体较小的致病实体,灵敏性更高,并且针对所有致病实体的检测在疾病早期就可实现可靠检测,显著解决现有技术中的部分检测方法无法在疾病早期就实现可靠检测的问题;并且相比现有技术中的检测,如酶联免疫吸附试验、横向流免疫分析、逆转录酶聚合酶链反应等,检测效率更高,特异性更强,耗时更短,对医疗设备的要求更低,价格更加低廉;并且通过多价相互作用,也就是通过将一个致病实体的多个配体结合到另一个致病实体的多个配体上,从而进一步实现对耐药性细菌的检测及抑制;相比现有技术中的检测方法,对致病实体的检测适应性更广,可实现对病毒、细菌、癌细胞、蛋白质、微生物毒素、癌症特异性生物标志物以及其他传染性物质的检测,甚至实现对突变的病毒或细菌的检测,以及有效抑制病毒的感染。

附图说明

[0026] 本文中的实施例将从以下参考图纸的详细说明中得到更好的理解,其中:

[0027] 图1显示本发明实施例中流感病毒的表面图案和相应的DNA纳米结构。

[0028] 图2显示了本发明的一个实施例中的血凝素(HA)三聚体和相应的DNA三角形。

[0029] 图3A显示了本发明实施例中不存在致病实体DCE时DNA纳米结构传感器茎环部分的结构图。

[0030] 图3B是本发明实施例中存在在致病实体DCE时DNA纳米结构传感器茎环部分的结构图。

[0031] 图4A~4B显示在本发明的一个实施例中使用基于DNA纳米结构的传感器和抑制剂诊断病原体或疾病的方法流程示意图。

[0032] 图5是本发明基于脱氧核糖核酸纳米结构传感器的致病实体检测方法流程图。

[0033] 图6是本发明所述检测方法应用于流感病毒时的灵敏性检测实验结果。

[0034] 图7是本发明所述检测方法应用于流感病毒特异性检测实验结果。

具体实施方式

[0035] 现在将参考图给出本发明实施例的描述。我们知道本发明可以在不背离其精神或本质特征的前提下,以其他具体形式体现,因而所述实施例仅在各方面被视为说明性的,而非限制性的。因此,本发明的范围由所附权利要求书而不是由上述说明书指明。在权利要求的含义和等效范围内的所有变更都应在其范围内进行。

[0036] 参考图1每一个致病实体(DCE)的表面图案,都具有唯一的空间图案。致病实体(DCE)可以是但不限于病毒、细菌、癌细胞、蛋白质、微生物毒素和其他传染性物质。负电荷宿主细胞表面糖胺聚糖与各种病原体表面蛋白相互作用,促进宿主细胞入侵各种传染病,如疟疾寄生虫、登革热病毒(denv)、寨卡病毒(zikv),以及甲型流感病毒。

[0037] 实施例1,参考图1。我们选择的检测目标是流感病毒HA。其中,图1中显示的是流感病毒100的表面图案102;流感病毒的表面模式102至少可以是一个正方形的,一个七面体,一个多边形,一个三角形,和一个多面体,这里只是举例,实际表面结构形态也可以不限于此。带负电荷的宿主细胞表面糖胺聚糖(GAGs)与各种病原体表面蛋白相互作用,以促进宿主细胞在各种传染病(如流感病毒)中的入侵。

[0038] 在实施例中,分布在流感病毒表面100上的多个血凝素(HA)106。血凝素(HA)组织在流感病毒表面100上形成多个HA三聚体104。多个HA三聚体104可以具有至少一个形状,包括但不限于圆形、三角形、椭圆形和五角形。两个HA三聚体(HA三聚体-HA三聚体)104之间的正交距离约为10.0nm。HA三聚体104是三价HA三聚体。

[0039] 根据流感病毒表面100上的HA三聚体104的分布设计DNA纳米结构。在示例性实施例中,设计菱形DNA纳米结构110以匹配HA三聚体104的图案和间距。菱形DNA纳米结构110在每个顶点携带一个DNA三角形配体基序114,以匹配HA三聚体内部和内部排列的图案和间距。DNA纳米结构110设计为二维(2D)DNA纳米结构。DNA纳米结构110可以设计成一维或者三维(3D)DNA纳米结构。

[0040] 参照图2,通过分析HA三聚体104内血凝素(HAs)106之间的距离/间距,和HA三聚体104之间的正畸距离/间距,以形成多个HA三聚体内和间排列。在一个实施例中,在HA三聚体104内的两种血凝素(HA-HA)106之间的直立距离约为3.6nm。三价HA三聚体104包含在其其他相邻血凝素(HAs)之间约3.6nm但不限于3.6nm的正畸间隔距离。流感病毒表面100上的多个HA三聚体104的图案可以是三角形、七边形、多边形和多面体中的至少一个,但不限于此。在一个示例性实施例中,流感病毒的多个HA三聚体104包括三角形图案。

[0041] 我们设计了一个菱形DNA纳米结构110以匹配分布在病原表面100上的HA三聚体104的图案和间距。菱形DNA纳米结构110在每个顶点携带一个DNA三角形配体基序114,以匹配HA三聚体内部和内部排列的图案和间距。在一个实施例中,DNA纳米结构110在每个顶点进一步包含粘合剂116,其中粘合剂是唾液酸乳糖,其中DNA三角形配体基序114的每个角包含唾液酸乳糖。在一个实施例中,DNA三角形配体基序114包含相邻唾液酸乳糖之间约3.6nm(但不限于)的正交间距。

[0042] DNA纳米结构110是双链DNA分子。DNA纳米结构110的形状设计类似于致病实体或致病实体的表面结构形状。在一个示例性实施例中,基于致病性表面配体106的图案102设计DNA纳米结构110。在一个示例性实施例中,DNA纳米结构110设计为菱形结构。在一些实施例中,DNA纳米结构110可设计成包括但不限于五角形、三角形和多边形的形状。链状DNA结构包含多个DNA分子。DNA纳米结构110可设计为(但不限于)一维(1D),二维(2d)结构和三维结构(3d)。

[0043] 一种DNA纳米结构的设计方法,包括至少两个步骤。第一步,依据每个DNA链108的特定长度绘制所需的几何图案;第二步使用工具或计算机程序(例如SEQUIN)获得每个DNA链108的最佳寡核苷酸序列。在一个实施例中,DNA纳米结构110设计有多个寡核苷酸或DNA

分子。

[0044] 在一个实施例中，DNA纳米结构用于设计DNA传感器，所述DNA传感器配置为感测致病实体(DCE)、抗原或疾病特异性生物标记物，并进一步抑制DCE。在一个实施例中，DNA传感器包含多个寡核苷酸。在一个实施例中，利用菱形DNA纳米结构110设计用于感测和抑制任何类型DCE的DNA传感器。在一个实施例中，每个致病实体在其表面上包含一个独特的空间模式。在一个示例性实施例中，基于DNA纳米结构的传感器设计为匹配例如流感病毒的致病配体100的表面图案102。

[0045] 在一个实施例中，DNA传感器包括菱形结构。在一个实施例中，DNA传感器的中心部分包括支架链108。这个支架链中心是感测区域118。如图3A所示DNA传感器中心部分的感测区域118由荧光团(FAM)分子120和猝灭剂(BHQ-1)分子122形成。FAM分子120和BHQ-1分子122在感测区域118中使用碱基对进行杂交，并形成茎环或发夹126。DNA传感器的中心部分的每条链包含一个分子类似于信标式的感应基元，该基序具有一对FAM分子120和BHQ-1分子122。DNA传感器的中心部分的每条链都具有一个“茎环”或“发夹环”结构(也称作“茎环”或“发夹环”DNA，或简称“茎环”或“发夹环”)，FAM分子120与BHQ-1分子122碱基配对。FAM分子120和BHQ-1分子122与发夹或茎环126两侧的每条内边缘链杂交。

[0046] 在一个实施例中，在适当位置将黏合剂116并入DNA传感器以实现匹配致病实体的蛋白表面的图案102。在一个实施例中，粘合剂116可以是但不限于肽、适体、低聚糖和小分子中的至少一种。在一个示例性实施例中，在适当位置将粘合剂并入DNA传感器以形成DNA纳米结构粘合剂复合物。以流感病毒举例，粘合剂116使得DNA纳米结构110能够匹配致病实体DCE表面100上的HA三聚体104的图案和间距102。在没有目标DCE的情况下，FAM 120和BHQ 122通过发夹中的碱基对(FAM和BHQ彼此接近)布置初始未发光的荧光共振能量转移的位置，其中FAM 120处于非活动状态。DNA传感器中心部分的每一条链在收缩状态下的长度约为(但不限于)10.3nm。在DCE存在的情况下，粘合剂116和DCE上的表面配体106之间的结合相互作用将发夹126完全转换为单链DNA(ssDNA)，从而使FAM 120远离BHQ分子122，从而在杂交过程中产生荧光。在一个实施例中，使用一个通用的荧光检测器来检测荧光。如果检测到了荧光，可以确认致病实体DCE的存在。在一个实施例中，FAM分子120和BHQ分子122通过但不限于沃森-克里克碱基对配对在一起。

[0047] 在存在目标致病实体DCE的情况下，FAM分子120和BHQ-1分子122彼此拉开至拉伸状态，其中FAM 120处于活性状态124。此外，将DNA纳米结构簇复合物的发夹126拉至拉伸状态并转换为单链DNA(ssDNA)，其中DNA纳米结构110结合到例如流感病毒表面的致病实体DCE表面的HA三聚体104。在一个实施例中，基于DNA纳米结构的传感器的中心部分的每条链在拉伸状态下的长度约为(但不限于)15.3纳米。

[0048] 此外，DNA纳米结构110和表面配体106可保证基于脱氧核糖核酸(DNA)纳米结构的传感器和抑制剂对目标致病实体DCE具有高度的结合亲和力和特异性。

[0049] 图例3A展示了在没有致病实体DCE的情况下基于分子信标样基序的DNA纳米结构的传感器的单个感知区域118。在一个实施例中，DNA传感器的单个感测区域118包含(FAM)120和淬灭剂(BHQ)分子122。FAM分子120处于非活性状态或没有荧光时，FAM分子120和BHQ-1分子122在DNA的单链/感知区域118中通过碱基配对进行杂交。在一个实施例中，FAM分子120通过沃森-克里克碱基对与BHQ-1分子122配对。在没有针对的致病实体DCE的情况

下,FAM分子120和BHQ-1分子122通过发夹126中的DNA 碱基配对以未发光的荧光共振能量转移(FRET)形式排列,其中FAM分子120和BHQ-1分子122彼此接近。

[0050] 图例3B展示了当致病实体DCE存在的情况下,作为分子信标模体的 DNA纳米结构传感器的感应致病实体DCE的区域。在一个实施例中,DNA 传感器包含粘合剂116,在图示的位置接入DNA纳米结构110上,它的放置和间隔要匹配致病实体DCE表面配体106以形成多价DNA纳米结构结合物。粘合剂116可以是肽420、核酸适配体422、低聚糖424和小分子426中的至少一种,但不限于其中一种,如图4A所示。在致病实体DCE存在下,DNA传感器的感知区域118结合到目标致病实体DCE,目标核酸杂交过程中,完整地将发夹126转换到单链DNA,从而产生的被检测到的荧光。在一个实施例中,单链DNA区域提供局部结构灵活性,这样即使在由于温度或其他环境变化了,仍然可以让DNA纳米结构模板化结构与有轻微变形排列标致病实体DCE表面配体106的匹配,允许在这些干扰下保持等效结合能力。

[0051] 在一个实施例中,还可以根据癌细胞表面结合配体的二维几何图案设计DNA纳米结构110,该结构可用于快速、低成本的高灵敏度的癌细胞传感/检测。粘合剂116与表面配体106之间的结合作用将FAM分子120从BHQ-1分子122处拉离,其中FAM分子为活性状态。在一个实施方案中,DNA纳米结构110是带负电荷的DNA纳米结构,这样的配置成为在血清和血浆中提供额外的有效的疾病抑制。DNA纳米结构110至少包含任何形状,包括但不限于三角形,菱形、星形(五角星,六角星)、七边形、多边形和多面体。在本实例中,致病实体(DCE)是甲型流感病毒,也可以是病毒、细菌、癌细胞、蛋白质、微生物毒素、癌症特异性生物标志物和其他传染性物质中的任何一种。在一个实施例中,DNA纳米结构110可设计为(但不限于)一维线性,二维平面和三维立体的DNA纳米结构。

[0052] 参考图4A和4B本发明公开了一种使用基于DNA纳米结构的传感器和抑制剂诊断疾病的方法400。方法400是一种用于检测和抑制任何致病实体/致病实体的独特的分子平台设计方法。在一个实施例中,致病实体(DCE)是流感病毒。在一些实施例中,致病实体或疾病是病毒、细菌、癌细胞、蛋白质、微生物毒素、癌症特异性生物标志物和其他传染性物质中的任何一种。在一个实施例中,方法400包括DNA纳米结构110的特定设计和用于感测和抑制DCE的特定病原体表面配体106的合成或选择。

[0053] 在一个实施例中,方法400包含以下步骤:在步骤402中,识别并分析病原体表面配体106的图案。在一个实施例中,病原体表面配体的原子坐标、X射线衍射图或电子低温电子显微镜(cryoEM)密度图可通过已知的加入码在蛋白质数据库(PDB)和电子显微镜数据库中查询获得。在一个实施例中,可使用成熟的软件或计算机分子可视化和分析工具(例如但不限于PyMol和UCSF蛋白质结构检查器)显示和分析病原体表面配体的表面图案102。PyMol和UCSF Chimera是开放源码的分子可视化系统,可以生成高质量的生物大分子三维图像。通过这些软件,可以得到任何感兴趣的配体之间的距离。然后依据这些距离来设计,也就是利用所感兴趣的治病实体DCE表面配体之间的二维几何图案和配体间距离为DNA纳米结构110的设计。另外还可以通过便携式荧光检测仪来测量DNA纳米结构和DCE结合后的荧光强度来定性或定量测量被测目标的存在或浓度,或通过原子力显微镜捕获DNA纳米结构的图像,或者使用荧光显微镜捕获DNA-DCE荧光光图案图像,并且还可使用视觉算法和深度学习算法进一步分析和计算机识别结合后DNA纳米结构产生的荧光图案,以便更加准确地确认致病实体的种类。

[0054] 在一个实施例中,病原体表面配体图案102可以具有与炭疽上的七价结合位点412匹配的七臂形DNA结构,所述炭疽具有7臂(原子价为7)连接。在另一实施例中,病原体表面配体图案102包含与流感病毒表面100上发现的血凝素(HA)三聚体104匹配的三角形DNA结构112,其具有3个臂(原子价为3)。

[0055] 参考图例4A,步骤404展示根据病原体表面配体106的空间表面图案102设计DNA纳米结构110。正确的DNA纳米结构110的设计的原则是要实现任何DNA序列片段重复率的最小化。在一个实施例中,DNA纳米结构110的设计包括两个步骤,其中包括:(a)绘制具有DNA链各组成部分的特定长度的所需几何图案,以及(b)使用独特的计算机应用获得每个DNA链的最佳寡核苷酸序列。在一个实施例中,在保证满足序列对称性最小化的前提下,DNA纳米结构110可以由具有不同序列的相同DNA链制成。DNA纳米结构110的形成可以首先用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)表征,然后通过原子力显微镜(AFM)或透射电子显微镜(TEM)成像。在一个实施例中,我们使用SEQUIN计算机应用程序。SEQUIN可以减少或避免同样DNA序列片段的重复。在一个实施例中,DNA纳米结构可以是二维(2D)DNA纳米结构。在一个示例性实施例中,DNA纳米结构设计成七价体形状,以与炭疽上七价结合位点412的图案相匹配,但不限于此。在一个实施例中,DNA纳米结构包含多个三角形DNA 112。在一个示例性实施例中,DNA三角形112设计为与流感病毒表面100上发现的血凝素(HA)三聚体104的图案匹配,但不限于此。DNA纳米结构110在溶液中、冷冻干燥后或在滤纸上干燥后在室温下稳定保存几个月。

[0056] 参考图例4A,步骤406针对致病区域合成或选择结合物并匹配致病表面配体放置。在一个实施例中,粘合剂选自包括但不限于肽420、核酸适配体422、低聚糖424和小分子426的组。在大约2-3个月的时间内可以获得肽420。在大约1-2个月的时间内获得核酸适配体422。在1-2个月的时间内可获得424低聚糖。小分子426可以在大约3-4个月的时间内获得。在一个实施例中,使用有机合成方法生成多种候选结合物分子池(420、422、424和428)(如图例4A所示),然后针对致病实体DCE的配体106进行筛选测试,从中间挑选出能与致病实体DCE有高热特异性的结合。在一个实施例中,根据与致病性表面配体域/位置的精确匹配来选择特定的粘合剂。在一个实施例中,结合物(420、422、424和428)可以是基于DNA/RNA适体的结合物和基于蛋白质/肽的结合物。可使用定向进化方法(如配体指数富集(SELEX)的系统进化和噬菌体/酵母展示)来创建结合物。在一个实施例中,合成和演化的粘合剂(420、422、424和428)可以具有与配体106表面的低微极(μm)解离常数(kd)范围。

[0057] 参考图例4A,步骤408在适当位置将合成的和选择的粘合剂(420、422、424和428)结合到所设计的DNA纳米结构上,根据致病区域的位置和间距设置粘合剂的位置和间距,从而形成多价DNA纳米结构粘合剂复合物。在一个实施例中,粘合剂的摆放形成一个二维(2d)图案。在一个示例性实施例中,多价DNA纳米结构结合物可以(但不限于)为七边形的DNA结构428,也可以是三角形的DNA结构430,分别用以精确匹配炭疽上的七价结合位点412的图案和在流感病毒表面发现的血凝素(ha)三聚体414。在确定好DNA结构几何特性后,选择低聚糖以在适当位置并入设计的七边形DNA结构428和三角形DNA结构430。此外,在步骤410中,多价DNA纳米结构结合物与致病性表面配体结合,具有非常强的相互吸引作用,这个结合不仅可以检测致病实体,还能通过抑制致病实体与宿主的结合来抑制疾病。在一个示例性实施例中,七边形DNA结构428和三角形DNA结构430分别与炭疽上的七价

结合位点412和流感病毒表面的血凝素(ha)三聚体414结合。

[0058] 参考图5,公开了用于感测病原体或诊断和抑制疾病的方法500。在步骤502中,识别并分析致病实体或致病性表面配体106的几何图形102。在一个实施例中,使用计算机分子可视化和分析工具分析致病性表面配体的几何图形102,所述计算机分子可视化和分析工具包括(但不限于) Pymol和USCF Chimera嵌合体中的至少一个。在步骤504中,设计与致病性表面配体图案102相似的DNA纳米结构。在一个实施例中,DNA纳米结构是二维(2D) DNA纳米结构。在一个实施例中,DNA纳米结构也可以是一维或三维(3D) DNA纳米结构。在步骤506中,针对致病区域合成或选择结合物并匹配致病表面配体放置。在一个实施例中,粘合剂是肽420、核酸适配体422、低聚糖424和小分子426中的至少一种,但不限于此。在步骤508中,选择特定的结合物并在适当位置将其并入DNA纳米结构,以匹配致病性表面配体的位置和间距,从而形成多价DNA纳米结构结合物。最终在步骤510中,多价DNA纳米结构结合物结合到致病性表面配体上,以便有效地相互作用,以感测和抑制疾病和/或引起疾病的实体,例如流感病毒。在一些实施例中,致病实体或疾病是病毒、细菌、癌细胞、蛋白质、微生物毒素、癌症特异性生物标志物和其他传染性物质中的任何一种。

[0059] 根据本发明,DNA纳米结构可以在血液循环环境中存在最多24小时,它们最终可以通过肝脏和肾脏将其从血液中去掉。带负电荷的宿主细胞表面GAGs被证明可广泛与多种病原表面蛋白相结合来促进感染性疾病宿主细胞的侵袭。所以当纳米结构与DCE(如病毒或细菌)强结合后,可以对宿主细胞表面GAGs产生静电排斥,达到物理和静电隔离DCE与宿主细胞,以上这些作用赋予了DNA纳米结构在血清和血浆中额外的疾病抑制效果。因此DNA纳米结构可作为治疗药剂,结合并随后抑制、杀死或清除个体或患者的DCE。在最近一个实施方案中,根据登革热病毒表面可以和宿主细胞结合的蛋白(ED3蛋白)的几何分步图形,DNA五角星(Star)的纳米结构被设计和制造来用于排列和ED3可以结合的DNA适体。这个DNA五角星病毒抑制剂可以达到2-纳摩药物半数最大有效浓度(EC50)。这个数值好于单个DNA适体抗病毒效果的7500倍。基于一些单个DNA适体已经用于人类疾病的治疗,以DNA纳米结构为模版的DNA适体聚合物在治疗药剂领域有着巨大的潜力。对比传统的免疫检测方法,本发明的检测方法直接检测致病实体DCE而不是检测对应的抗体,这样可以避免由于先前感染产生的免疫球蛋白G(IgG)的假阳性检测。

[0060] 此外,DNA纳米结构/平台/支架可设计成各种无毒/生物相容性和生物稳定性的二维或三维平台,能够控制外部配体价和空间排列。此外,DNA纳米结构能够以复杂的二维或三维几何图形显示分子配体,并具有精确的纳米(nm)配体间距。此外,将DNA发夹和分子信标样基序整合到DNA纳米结构中,用于疾病检测和诊断。此外,本发明还提供了一种敏感、快速和经济有效的方法来检测和抑制任何类型的DCE。为了验证本发明的使用效果,我们依据本发明实例描述的方法制作了针对流感病毒A的钻石形状的DNA纳米结构病毒检测传感器。在实验前,准备了包含流感病毒的血液样本组,不同的样本包含了不同数量具有感染性的流感病毒。在实验中,我们将提前配备好的钻石形状的DNA纳米结构病毒检测装置的试剂与血液样本混合,当血液标本里包含流感病毒时,会DNA结构与流感病毒配体形成强有力的结合从而产生可被检测的荧光,依据荧光测量仪依据荧光测量仪的读数可以用来判断样本是否含有病毒,同时可以定量检测。针对病毒的传感器的检测,其可以达到100个活性病毒/毫升,整个检测过程只需要1-2分钟,并且不需要任何复杂的大型仪

器,甚至未来可以用手持式荧光灯在户外现场通过检测荧光来完成检测,或将DNA纳米结构放置于侧向层析试纸上,就可以用来进行定性测试。该传感器及其检测方法在灵敏度、检测的速度(所需要的时间)和成本方面优于RT-PCR和ELISA酶联免疫吸附法等现有病毒检测手段。

[0061] 如图6所示是流感病毒灵敏性检测结果。通过一系列含有不同活性流感病毒浓度的血清或者血浆样品来确定以钻石形状DNA纳米结构为构架的传感器检测灵敏度。通过实验结果可以看出,当流感病毒在血清中是其灵敏度为100活性病毒/毫升;在血浆中的灵敏度为1,000活性病毒/毫升;每一个病毒浓度对应的荧光强度是6次平行实验的平均值。目前医疗检测中最灵敏的RT-PCR方法的检测灵敏度为1,000活性病毒/毫升;本发明所示的检测方法不但灵敏度上相比现有技术有优势,同时要比RT-PCR的办法快至少1,200倍,而价格便宜至少400倍。由于血浆含有更多的蛋白质,因此溶液显示出一些混浊,这会造成部分荧光信号被光散射,从而一定程度上导致灵敏度的缺失。即使这样,在我们发明的传感器在血浆中的灵敏度也高于RT-PCR。

[0062] 图7是流感病毒特异性检测结果。为了测试钻石状DNA纳米传感器在检测流感病毒上的特异性,我们用含有高浓度腺病毒的血清做为对照样品进行了测试。实验结果证实,设计用于流感病毒的钻石状-适体复合物即使在高浓度的腺病毒中也不会导致任何荧光信号增加,而仅对流感病毒产生荧光,从而证明了DNA纳米传感器的高效特异性。

[0063] 上述说明包含本发明的说明性实施例。如此描述了本发明的示例性实施例后,本领域技术人员应该可以注意到,所公开的内容仅为示例性的,并且可以在本发明的范围内进行各种其他替代、改编和修改。仅按特定顺序列出或编号方法的步骤不构成对该方法步骤顺序的任何限制。本发明的许多修改和其他实施例将使本发明所属领域的技术人员想到,并受益于上述说明中所述的教学。尽管本文中可能使用特定术语,但它们仅用于一般和描述性意义,而不用于限制目的。因此,本发明不限于本文所示的具体实施例。

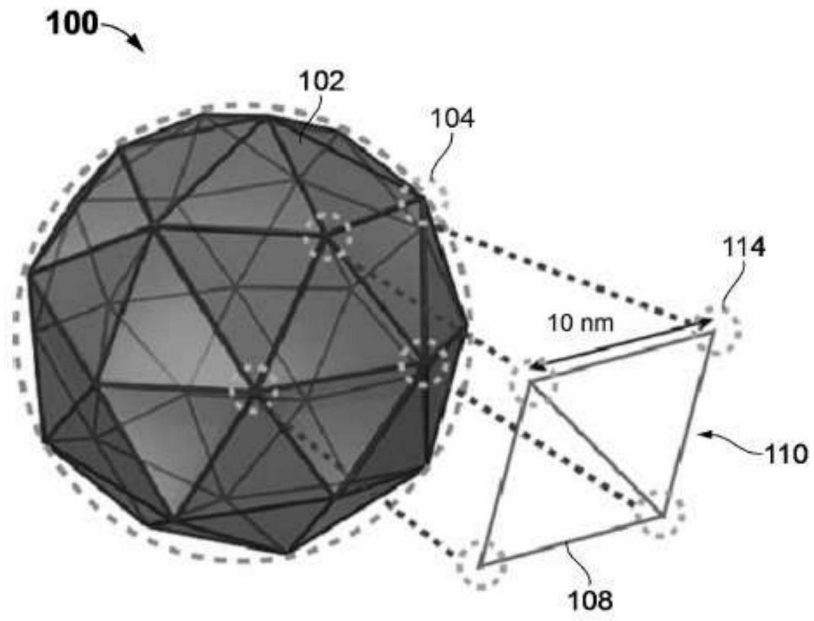


图1

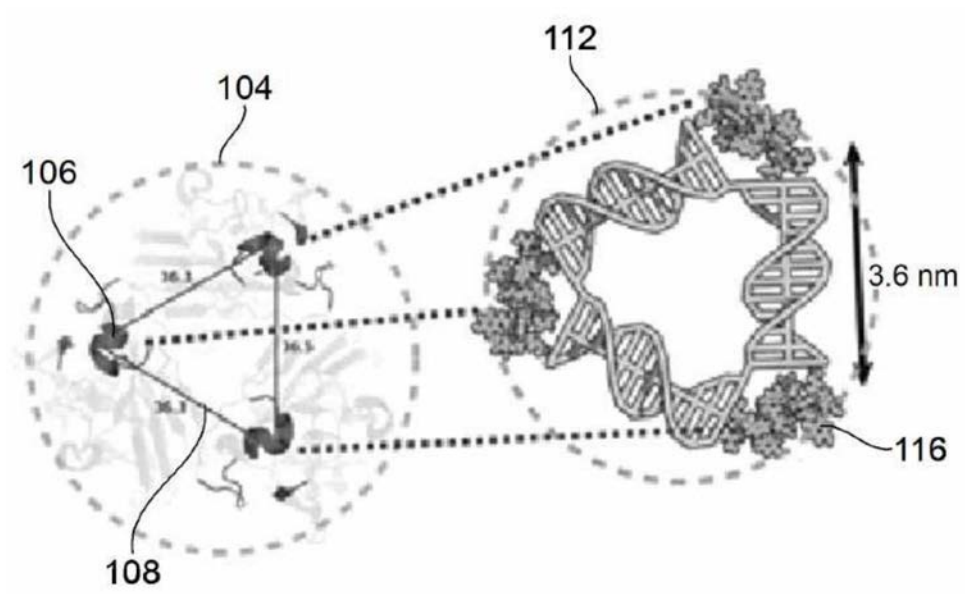


图2

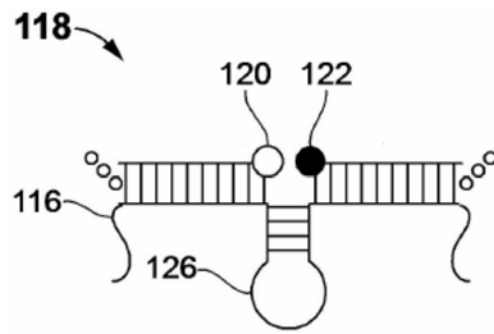


图3A

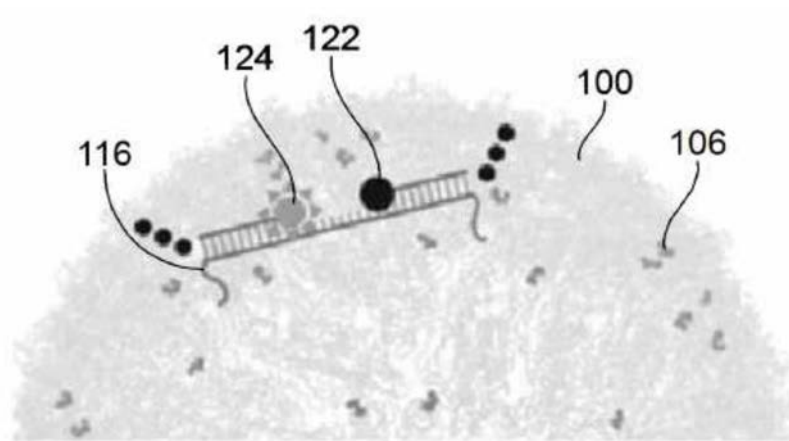


图3B

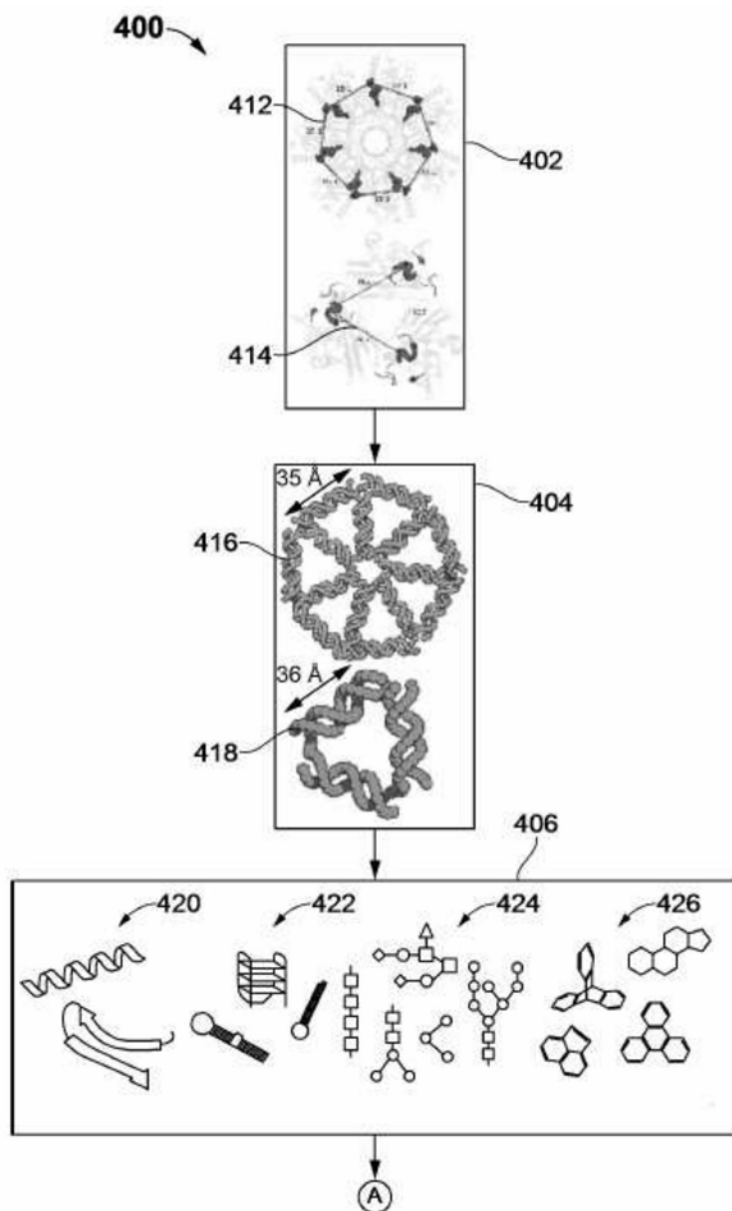


图4A

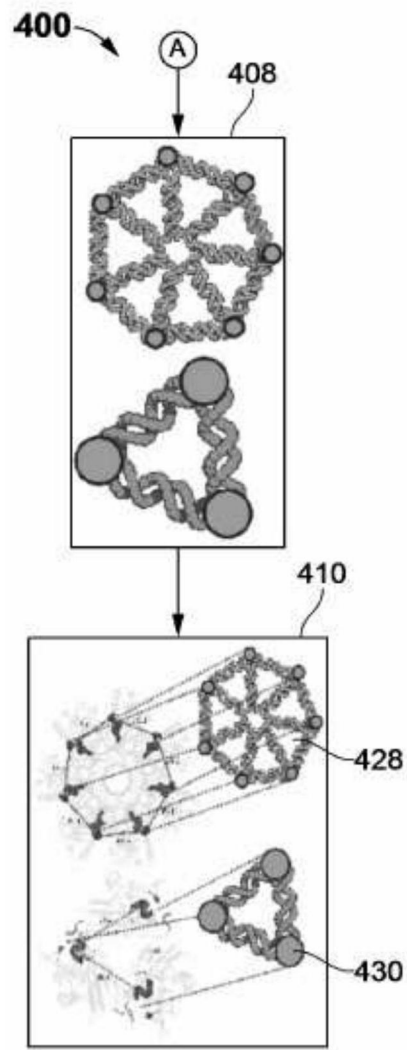


图4B

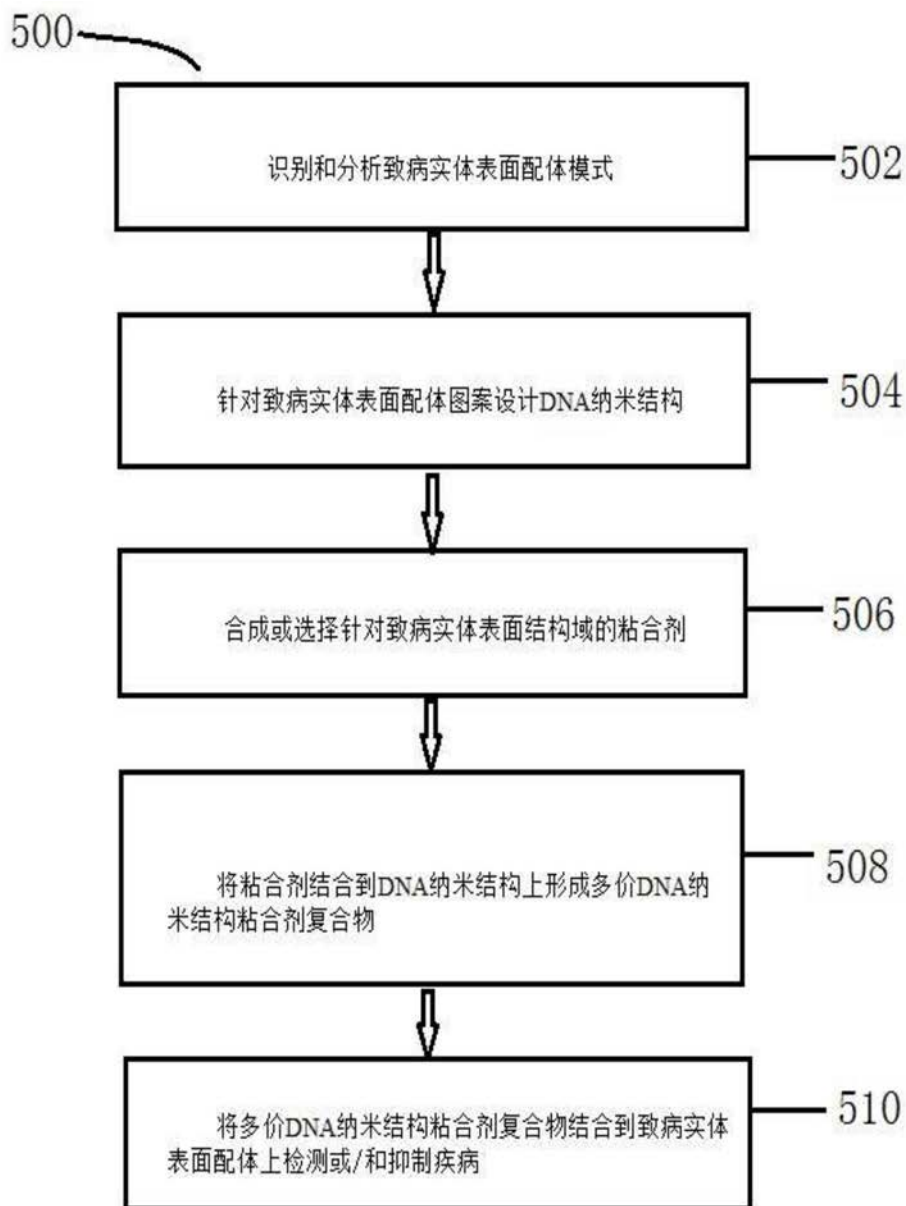


图5

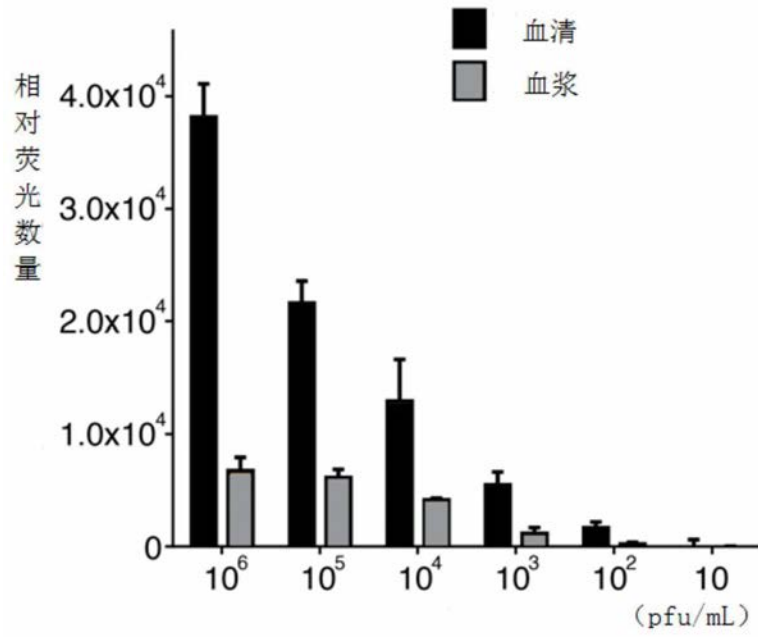


图6

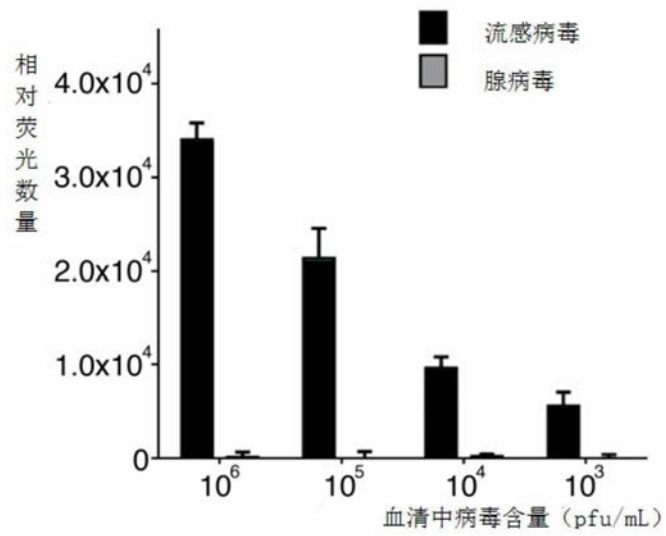


图7

专利名称(译)	脱氧核糖核酸纳米传感器及其用于致病实体的检测方法		
公开(公告)号	CN110501486A	公开(公告)日	2019-11-26
申请号	CN201910762604.2	申请日	2019-08-20
[标]发明人	姚小虎 王兴		
发明人	姚小虎 王兴		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6486 G01N33/53 G01N33/56983		
代理人(译)	胡剑辉		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物传感器和病毒抑制剂领域。尤其涉及一种脱氧核糖核酸纳米结构传感器及其用于致病实体的检测方法。包括以下步骤，识别和分析致病实体表面配体的模式；针对致病实体表面配体图案，设计DNA纳米结构；合成或选择针对致病结构域的粘合剂，以实现致病实体表面配体的高效匹配；将粘合剂结合到DNA纳米结构上，形成多价DNA纳米结构粘合剂复合物；将多价DNA纳米结构粘合剂复合物结合到致病实体表面配体上，以检测或/和抑制疾病。可直接用于检测致病实体DEC,检测灵敏度及效率更高，耗时更短，对医疗设备的要求更低，价格更加低廉；对致病实体的检测适应性更广。

