



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110095443 A

(43)申请公布日 2019.08.06

(21)申请号 201910383373.4

(22)申请日 2019.05.09

(71)申请人 重庆医科大学

地址 400016 重庆市渝中区医学院路1号

(72)发明人 张普 涂爱萍 尚京川 尹一兵
刘来成

(51) Int. Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

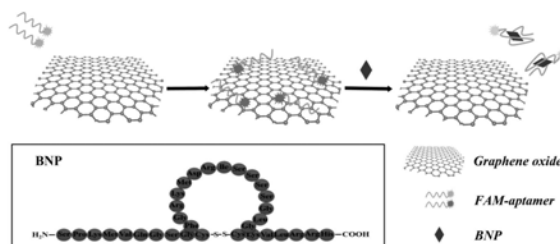
权利要求书1页 说明书9页 附图5页

(54)发明名称

一种基于氧化石墨烯/核酸适配体检测脑钠肽的荧光方法

(57)摘要

本发明提供了一种脑钠肽(BNP)的高灵敏、高选择性、低成本的均相荧光检测新方法。该方法首先通过构建氧化石墨烯/荧光染料标记的核酸适配体复合探针,利用氧化石墨烯对染料的荧光猝灭作用,降低检测的荧光背景信号;当BNP的加入与其核酸适配体通过特异性分子识别作用使荧光染料远离氧化石墨烯时,染料的荧光信号得以恢复,基于BNP浓度与荧光强度的变化建立线性工作曲线;最后通过测定加入样品后的荧光强度变化值并代入工作曲线计算得到临床样本中BNP的准确浓度。本发明方法克服了各种免疫分析法因使用抗体识别存在交叉反应的缺点,避免了相关肽等的干扰,具有简单、快速、低成本、高灵敏、高选择性等优点,并且可以用于临床上患者血液中BNP的定量检测,用以及时诊断、指导治疗及提示预后。



1. 一种基于氧化石墨烯/核酸适配体检测脑钠肽的荧光方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 荧光染料标记的核酸适配体探针的荧光测定:

将荧光染料标记的核酸适配体探针溶液和磷酸盐缓冲液涡旋混匀后,检测混合溶液的荧光强度;

(2) 氧化石墨烯纳米片/荧光染料标记的核酸适配体荧光猝灭体系的构建:

将荧光染料标记的核酸适配体溶液和氧化石墨烯纳米片分散液及磷酸盐缓冲液涡旋混匀后,氧化石墨烯能够通过 π - π 堆积吸附核酸适配体探针,形成氧化石墨烯/染料标记的核酸适配体复合物,此时染料的荧光被氧化石墨烯猝灭,检测并计算混合溶液荧光强度变化与氧化石墨烯浓度之间的关系,确定氧化石墨烯的最佳猝灭浓度;

(3) 氧化石墨烯纳米片/荧光染料标记的核酸适配体复合探针检测脑钠肽的线性关系建立:

向由一定量的氧化石墨烯纳米片/荧光染料标记的核酸适配体溶液和磷酸盐缓冲溶液组成的混合溶液中加入脑钠肽标准溶液,涡旋混匀后,脑钠肽与核酸适配体发生特异性分子识别,核酸适配体的构象改变并脱离氧化石墨烯表面,染料的荧光信号得以恢复,检测并计算混合溶液荧光强度变化与脑钠肽浓度之间的关系,建立相应的荧光恢复线性方程;

(4) 氧化石墨烯纳米片/荧光染料标记的核酸适配体复合探针检测临床样本中的脑钠肽:

在由一定量的氧化石墨烯纳米片/荧光染料标记的核酸适配体溶液和磷酸盐缓冲溶液组成的混合溶液中加入含脑钠肽的临床待测样本溶液,涡旋混匀后,检测其荧光强度变化值并代入步骤(3)构建的线性方程,计算得到临床样本中脑钠肽的含量。

2. 根据权利要求1所述的一种基于氧化石墨烯/核酸适配体检测脑钠肽的荧光方法,其特征在于,所述方法为均相荧光测定法。

3. 根据权利要求1所述的一种基于氧化石墨烯/核酸适配体检测脑钠肽的荧光方法,其特征在于,步骤(2)中,所述的氧化石墨烯纳米片分散液的制备方法为:商品化的氧化石墨烯纳米片经超声分散于超纯水中,浓度为0-40 μ g/mL。

4. 根据权利要求1所述的一种基于氧化石墨烯/核酸适配体检测脑钠肽的荧光方法,其特征在于,步骤(2)中,所述的氧化石墨烯纳米片猝灭荧光染料标记的核酸适配体的最佳浓度为20 μ g/mL,涡旋时间为1-2min。

5. 根据权利要求1所述的一种基于氧化石墨烯/核酸适配体检测脑钠肽的荧光方法,其特征在于,步骤(3)中,所述的线性方程为 $Y=1.787X-0.1331$, $r=0.9929$,对脑钠肽的检测限为0.045pg/mL;其中Y为荧光恢复效率,X为脑钠肽的浓度,单位pg/mL。

一种基于氧化石墨烯/核酸适配体检测脑钠肽的荧光方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学检验技术领域,具体涉及一种脑钠肽的高灵敏、高特异性荧光检测新方法。

背景技术

[0002] 心血管疾病是现代社会发病率及致残率最高的疾病之一,严重威胁着人类健康。而心力衰竭(Heart failure, HF)是心血管疾病的终末期阶段,其死亡率及再入院率均较高,但通过早期发现和及时治疗可以避免许多由心衰造成的死亡事件,所以心衰的早期诊断具有重大意义。生理指标(例如心电图、胸部X射线检查、超声心动图)和生化指标(例如特异性生物标志物)监测是临床上诊断心衰的主要方法。与生理指标监测相比,生化指标监测简单、准确、成本低,且无需专家分析,只需将测定结果与参考值比较即可。因此,生物标志物的准确检测在心衰的诊断中扮演着重要的角色。脑钠肽(Brain natriuretic peptide, BNP)是由32个氨基酸组成的多肽,主要在心室中合成,其同时存在于健康人和心衰患者中,并在外周血管中循环,但由于心脏体积膨胀和压力超负荷,心衰患者的BNP分泌显著增加,且其水平与心衰严重程度成正比。因此,BNP水平可以反映心脏功能,有助于心衰的诊断和预后,是心衰诊断的金标准。此外,另一种多肽氨基端脑钠肽前体(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP),也是诊断心衰的标志物,两者都来自脑钠肽前体(pro-brain natriuretic peptide, proBNP),proBNP在第76个和第77个残基之间被切割而产生生物活性肽BNP和非活性肽NT-proBNP,这三种BNP形式和BNP的代谢物同时存在于血液循环中。目前,检测BNP含量时,其相关肽的存在很可能发生交叉反应,使得BNP含量测定误差较大。

[0003] 已有文献报道采用化学发光免疫分析法(Chemiluminescence immunoassay, CLIA)、酶联免疫吸附测定(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和免疫层析法(Immunochromatography assay, ICA)等方法来检测BNP的含量,但这些方法都存在一些弊端。其中,临床上最常用的化学发光免疫分析法具有高灵敏度、宽线性范围等优点,但检测易受干扰,并且需要引入磁珠进行分离,检测成本较高;酶联免疫吸附测定的特异性好,已被用于开发各种商用检测试剂盒,但低灵敏度和精密度限制了其应用;免疫层析法简单、快速、便于携带,适合于床旁快速检测(Point of care testing, POCT),但其灵敏度不够且易受干扰,使得准确测定受到限制。此外,上述方法均为免疫分析法,这些方法在检测BNP的同时,也会检测到proBNP和BNP代谢产物,因为它们具有相同的抗体表位,这导致BNP的浓度常常被高估。因此,更高灵敏度、高选择性、低成本的检测BNP方法亟需开发。

[0004] 在该发明中,我们引入核酸适配体作为识别元件来避免BNP与相关肽之间的交叉反应,提高方法的选择性。核酸适配体是通过指数富集的配基系统进化技术(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)筛选出的寡聚核苷酸,通过折叠成各种构象而特异性结合靶物,它也被称作“化学抗体”。相比于抗体,核酸适配体具有易于化学合成、成本低、稳定性好等优点。通过标记核酸适配体得到的探针已被广泛用于检

测各种无机离子、小分子、生物大分子、甚至细胞和生物组织等。本发明以荧光染料标记的核酸适配体为识别及信号基团,构建了一种均相荧光测定BNP法。

[0005] 均相测定是指在溶液中进行,无需对游离和结合的组分进行分离的系统。均相体系的检测方法既简单、精确且容易实现自动化。在过去十年中开发并成功上市了两种基本的均相免疫测定法,分别是荧光激发转移免疫测定(FETI)和荧光偏振免疫测定(FPIA),它们均是基于荧光标签对抗原-抗体结合的物理性质的变化。可见,使用荧光方法的另外一个好处就是可开发均相检测体系,极大降低使用成本、提高检测实用性。

[0006] 本发明通过引入氧化石墨烯(Graphene oxide,G0)作为荧光猝灭剂,用于降低检测的背景信号,实现对BNP的高灵敏检测。G0是一种新型的单层二维纳米材料,近年来由于其独特的光学和催化特性,在生物分析、药物递送、电催化等领域受到广泛关注。因为其具有较大的表面积和独特的 sp^2 (sp^2/sp^3)键合网络,所以能够通过 π - π 堆积与柔性的单链DNA结合。此外,G0还可以作为能量转移体系中的能量受体,强烈吸收各种荧光团的光辐射导致其发生荧光猝灭,构建基于荧光共振能量转移(FRET)的传感器。当BNP存在时,核酸适配体与BNP通过特异性分子识别作用形成更稳定的结合,使得核酸适配体脱离G0表面,染料的荧光得以恢复。在本发明中,通过整合G0对荧光团的高效猝灭作用和核酸适配体对BNP的高亲和力,构建了一种高灵敏、高特异性、低成本检测BNP的均相荧光分析新方法。

发明内容

[0007] 针对以上的问题和技术,本发明提供了一种基于荧光染料标记核酸适配体/氧化石墨烯复合探针检测脑钠肽的新方法,包括以下步骤:

[0008] 一种脑钠肽(以下简称BNP)的荧光检测新方法,其特征在于:首先,氧化石墨烯(以下简称G0)通过 π - π 堆积与荧光染料标记的核酸适配体(以下简称FAM-aptamer)作用,两者间的能量转移导致荧光猝灭,背景信号降低,然后样品中BNP通过特异性分子识别作用与FAM-aptamer结合,而这种结合会改变FAM-aptamer的构象,使aptamer的螺旋结构解卷,并破坏aptamer与G0间的相互作用,从而使得FAM-aptamer从G0表面释放出来,染料的荧光得以恢复,其荧光恢复程度与BNP浓度呈线性关系,做出相应的标准曲线,并据此计算样品中BNP的含量。

[0009] 本发明中BNP的检测方法,其特征在于:将G0、FAM-aptamer、含BNP的样品在磷酸盐(以下简称PB)缓冲液中反应,反应结束后在荧光分光光度计上扫描200-800nm的最大激发波长和最大发射波长,同时做空白试验;根据最大发射波长处的荧光强度变化与BNP标准品浓度所建立的工作曲线,即可计算出样品中BNP的含量。

[0010] 作为优化,上述BNP的荧光检测方法,其特征在于:所述G0的浓度为3-40 μ g/mL。

[0011] 作为进一步优化,上述BNP的荧光检测方法,其特征在于,采用如下步骤:先将BNP标准品加入到G0(20 μ g/mL)和PB缓冲液(pH7.4)的混合溶液中涡旋混匀,室温下静置30min;然后再加入FAM-aptamer涡旋混匀,室温下静置30min;在荧光分光光度计上测定荧光,设置最大激发波长为495nm,扫描505-650nm的荧光发射光谱,以最大发射波长519nm处的荧光强度进行定量,同时做空白试验;所述样品中的BNP含量按下式计算:

[0012] $Y=1.787X-0.1331$ (标准曲线方程)

[0013] 式中:

[0014] Y为荧光恢复效率 $(F_2-F_1)/(F_0-F_1)$ ，其中 F_0 表示空白探针的荧光强度， F_1 表示加GO而不加BNP时溶液的荧光强度， F_2 表示同时存在GO和BNP时溶液的荧光强度)；X为BNP标准品的浓度(单位：pg/mL)。

[0015] 一种BNP的荧光检测方法，包括空白试验1、空白试验2、样品检测及计算结果步骤，其特征在于：

[0016] (1) 空白试验1：

[0017] 在1.5mL离心管中依次加入40 μ L PB缓冲液(pH7.4)与15 μ L FAM-aptamer(100nmol/L)，加超纯水补充至总体积为400 μ L，涡旋混匀，室温下静置30min；然后在荧光分光光度计上设置最大激发波长为495nm，扫描505-650nm的荧光强度，将最大发射波长519nm处的荧光强度记为 F_0 ；

[0018] (2) 空白试验2：

[0019] 在1.5mL离心管中依次加入40 μ L PB缓冲液(pH7.4)、20 μ L GO(20 μ g/mL)与15 μ L FAM-aptamer(3.75nmol/L)，加超纯水补充至总体积为400 μ L，涡旋混匀，室温下静置30min；然后在荧光分光光度计上设置最大激发波长为495nm，扫描505-650nm的荧光强度，将最大发射波长519nm处的荧光强度记为 F_1 ；

[0020] (3) 样品测定：

[0021] 在1.5mL离心管中依次加入40 μ L PB缓冲液(pH7.4)、20 μ L GO(20 μ g/mL)与一定体积分含BNP的样品溶液涡旋混匀，静置30min，再加入15 μ L FAM-aptamer(3.75nmol/L)，加超纯水补充至总体积为400 μ L，涡旋混匀，室温下静置30min；然后在荧光分光光度计上设置最大激发波长为495nm，扫描505-650nm的荧光强度，将最大发射波长519nm处的荧光强度记为 F_2 ；

[0022] (4) 计算结果：

[0023] 所述样品中BNP的含量按下式计算：

[0024] $Y=1.787X-0.1331$ (标准曲线方程)

[0025] 式中：

[0026] Y为荧光恢复效率 $(F_2-F_1)/(F_0-F_1)$ ；X为BNP的浓度(单位：pg/mL)。本发明所述原料及试剂均为市售产品。本发明中的PB(Phosphate Buffer)缓冲液为本领域所熟知的磷酸盐缓冲液。本发明中FAM-aptamer的前处理方法为：将FAM-aptamer的冻干粉末于6000rpm离心5min，加入800 μ L煮沸后的超纯水复溶至2 μ mol/L。本发明中BNP特异性的适配体的序列为5'-H₂N-TTT TTT TAA ACG CTC AAA GGA CAG AGG GTG CGT AGG AAG GGT ATT CGA CAG GAG GCT CAC A-3'(Hye Ri Jang, Alastair W. Wark, Seung Hee Baek, Bong Hyun Chung, Hye Jin Lee, 2014, Analytical Chemistry, 86, 814-819)。

[0027] 在临床血样检测实验中，我们对比了本发明方法测定值与临床诊断值，临床上采用双抗体夹心化学发光免疫分析法检测血样中的BNP，以Siemens B型心钠素测定试剂盒为诊断试剂盒。试剂盒主要由标记试剂、固相试剂和测定标准曲线卡组成。第一抗体是吡啶酯标记的单克隆鼠抗人抗体，存在于标记试剂中，针对BNP的环状结构，第二抗体是与磁性颗粒共价结合的单克隆鼠抗人抗体，存在于固相试剂中，针对BNP的C端部分。化学发光信号由ADVIA Centaur化学发光免疫分析系统分析获得。

[0028] 有益效果：

[0029] 本发明先利用GO猝灭FAM-aptamer的荧光,降低背景信号,然后样品中的BNP通过特异性分子识别作用与FAM-aptamer结合形成复合物,使得FAM-aptamer从GO表面释放出来,探针的荧光得以恢复,通过监测BNP对GO/FAM-aptamer复合探针的荧光强度的影响,根据荧光恢复效率与BNP浓度间的线性关系建立标准曲线,并据此定量样品中的BNP,建立了一种快速、简便、低成本的均相荧光分析新方法,对样品中BNP含量实现了高灵敏、高特异性检测。

[0030] 选择性实验证明血液中存在潜在的干扰物质如氨基端脑钠肽前体(NT-proBNP)、干扰素(Interferon, IFN)、半胱氨酸(Cysteine, Cys)、甘氨酸(Glycine, Gly)、精氨酸(Arginine, Arg)、组氨酸(Histidine, His)、人血清白蛋白(Human serum albumin, HSA)和牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)等对检测结果的影响较小,与BNP浓度相同的干扰物对GO/FAM-aptamer复合探针的荧光基本无恢复,即使是同样作为心衰诊断金标准的NT-proBNP也不会干扰测定,这是由于核酸适配体的引入克服了目前免疫分析方法中存在的交叉反应干扰,提高了方法选择性。

[0031] 本方法的实用性较强,尤其是样品中BNP的浓度在0.074-0.56pg/mL范围内时,BNP含量与荧光恢复效率呈良好的线性关系($r=0.9929$),在血样加标回收实验中,加标回收率为96.44-109.46%,RSD为1.58-6.87%。临床血液样本检测中,共收集并测定45个临床样本(其中14个女性和31个男性血样,年龄均小于16岁),并将测定结果与临床诊断值进行对比,本发明检测结果值低于医院临床化学发光免疫分析法测定值,推测是由于方法学间差异引起。本发明方法的检测限为0.045pg/mL,远低于临床化学发光免疫分析法的检测限(2.0pg/mL)。可见,本方法更加灵敏。

[0032] 在检测成本估算中,本发明方法购买1g氧化石墨烯(GO)花费100元,10D FAM-aptamer冻干粉末(加16 μ L超纯水配成浓度为100 μ mol/L的溶液)的价格为70元,一瓶BNP冻干粉末(加2mL试剂水配成浓度为1482pg/mL的溶液)售价400元,一个样本的测定包括标准曲线的建立和实际样本的测定,根据各试剂用量及相应的浓度(GO:20 μ g/mL;FAM-aptamer:3.75nmol/L),估算出试剂成本约为1元,而临床采用化学发光免疫分析法检测BNP,按照重庆市医疗收费标准,检测一个样本收取180元。可见,相比于临床化学发光免疫分析法,本方法的另一优势是均相荧光检测使成本大大降低。

[0033] 此外,根据临床诊断结果(是否心衰)及本发明方法与临床化学发光免疫分析法对临床标本血样中BNP含量的测定结果,构建受试者工作曲线(ROC)评价BNP诊断HF的能力,结果表明两种方法均具有较好的诊断准确度,两种方法的阈值用于诊断心衰时均具有100%的灵敏度,用于心衰的排除时均具有极高的阴性预测值(100%)。但相比于医院临床化学发光免疫分析法,本发明方法用于心衰的诊断具有更高的特异性(本发明方法与临床化学发光免疫分析法的特异性分别为66.7%和63.6%)。因本次采集研究对象标本为儿童样品,心衰患病率较低,加上部分非心衰儿童有不同程度的肾损伤,影响血中BNP水平,本方法给目前儿童心衰诊断困难提供了新思路,同时本方法在成人心衰诊断中会有更好的效果。

[0034] 总之,本发明方法快速、简便、成本低、灵敏度高、选择性好、实用性强,适用于临床标本中BNP含量的准确检测,并能为心衰病人的诊断及预后提供重要的参考价值,适宜进行推广使用。

附图说明

- [0035] 图1是本发明检测BNP的原理示意图；
- [0036] 图2是不同浓度GO对FAM-aptamer荧光猝灭的光谱图；
- [0037] 图3是BNP使GO/FAM-aptamer复合探针荧光恢复的光谱图；
- [0038] 图4是荧光恢复效率相对于BNP浓度所拟合的工作曲线；
- [0039] 图5是不同干扰物质的选择性考察；
- [0040] 图6是不同序列DNA探针的特异性考察；
- [0041] 图7是GO (a)、GO/FAM-aptamer复合物 (b) 及GO/BNP/FAM-aptamer复合物 (c) 的形貌及横截面的原子力显微镜图；
- [0042] 图8是临床标本样品本方法血样测定与医院临床化学发光免疫法测定数据对比散点分析；
- [0043] 图9是本发明方法与医院临床化学发光免疫法测定BNP的受试者工作 (ROC) 曲线对比结果。

具体实施方式

[0044] 下面结合具体实施例对本发明做进一步的描述,在此指出以下实施例只用于对本发明做进一步说明,不能理解为对本发明保护范围的限制,本领域的技术熟练人员可以根据上述发明内容对本发明作出一些非本质的改进和调整。

[0045] 仪器与材料

[0046] 仪器

[0047] RF-5301PC荧光分光光度计(日本岛津)用于样品溶液的荧光测定;使用Dimension Icon原子力显微镜系统(美国)获得原子力显微镜(AFM)图像;MX-S涡旋混合仪(北京大龙有限公司)用来混匀溶液;BY-R18高速冷冻医用离心机(北京白洋医疗器械有限公司)用于FAM-aptamer冻干粉末和血液样品的离心;Sartorius电子天平(德国)用于样品的称量。

[0048] 材料

[0049] BNP和NT-proBNP购自Siemens Healthcare Diagnostics Inc.(美国);对BNP特异的核酸适配体序列为:5'-H₂N-TTT TTT TAA ACG CTC AAA GGA CAG AGG GTG CGT AGG AAG GGT ATT CGA CAG GAG GCT CAC A-3';随机序列1:5'-H₂N-CGG ACC GCG CAT AGT CGG ATC TGT CTA ACT TAC CTA CGT ATC CAG TAC TGA TGT AAG TGT G-3';随机序列2:5'-H₂N-GCC AGG CGC GAA ACA GCG TAG ACA GAT AGA TTG GTT GGA AAG CCC TTG TCAACATTC ACA C-3';随机序列3:5'-H₂N-ATT TAC TCA CAA AGC CGA CCA GAC CCG ACC AAT TT-3';随机序列4:5'-H₂N-ATG TAC GAC CAC AAA AAA ACC TCA CAA AGC ACA AA-3';随机序列5:5'-H₂N-AGT AAT GCC CGG TAG TTA TTC AAA GAT GAG TAG GAA AAG A-3'(上海生工生物技术有限公司);氧化石墨烯(GO)购自南京先丰纳米材料科技有限公司;干扰素(IFN)、半胱氨酸(Cys)、甘氨酸(Gly)、人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、精氨酸(Arg)和组氨酸(His)购自上海阿拉丁试剂公司;血液样本获自重庆医科大学附属儿童医院;磷酸盐缓冲液(0.2mol/L)用于调节体系的酸度;所用试剂均为分析纯,实验用水为煮沸后的超纯水(18.2 MΩ·cm)。

[0050] 病人信息

[0051] 我们总共研究了45名疑似心衰的患者(男/女=31/14,年龄为3小时至16岁),他们都因呼吸困难、浮肿、少尿或心脏杂音、心动过缓、心率增快而入院。除了年龄和性别,我们还考察了肥胖和肾功能情况,以便在ROC曲线分析中能够尽量避免它们的影响,一般而言,肥胖会使血中BNP水平下降,而肾损害使其水平上升。所有患者入院时的平均BMI为 $15.0 \pm 3.2 \text{ kg/m}^2$ (BMI的正常范围为 $18.5\text{--}24.9 \text{ kg/m}^2$),BMI在 $25.0\text{--}29.9 \text{ kg/m}^2$ 范围内时,为肥胖,故本研究不涉及肥胖患者。我们以简化的MDRD公式计算各患者的肾小球滤过率(GFR),以此评估他们的肾损伤情况,一般而言,GFR的正常值为 $80\text{--}120 \text{ mL/min/1.73m}^2$,低于该范围就可能存在不同程度的肾损伤。部分HF患者的肾功能明显下降,在4例确诊为HF的患者中,有2名患者的GFR分别为 3.7 和 6.7 mL/min ,而在其他41名非心衰患者中,GFR的范围为 $24.1\text{--}181.8 \text{ mL/min}$,个别非心衰患者也存在不同程度的肾损伤。HF的确诊是专家根据所有检查结果做出的判断,包括病史、血液常规分析、体格检查、心电图、胸部X光和超声心动图。

[0052] 实施例1溶液的配制及检测方法

[0053] FAM-aptamer储备液的制备

[0054] 将FAM-aptamer的冻干粉末于 6000 rpm 离心 5 min ,加入煮沸后的超纯水 $800 \mu\text{L}$ 配制成为 $2 \mu\text{mol/L}$ 的储备液,于 4°C 冰箱中保存。临用前稀释成浓度为 100 nmol/L 。

[0055] BNP标准品储备液的制备

[0056] 使用移液枪在冻干粉末中加入 2 mL 煮沸后的超纯水,室温下($20\text{--}30^\circ\text{C}$)平衡 $15\text{--}20 \text{ min}$,使冻干粉完全溶解,然后轻轻的旋转/颠倒试剂至均匀,配置的储备液的浓度为 1482 pg/mL ,于 -20°C 冰箱中保存,临用前稀释。

[0057] 检测方法

[0058] 空白组1:在 1.5 mL 离心管中依次加入 $40 \mu\text{L}$ PB缓冲液($\text{pH}7.4$)与 $15 \mu\text{L}$ FAM-aptamer (3.75 nmol/L),加煮沸的超纯水补充至总体积为 $400 \mu\text{L}$,涡旋混匀,室温下静置 30 min ;在荧光分光光度计上测定溶液的荧光强度(激发波长: 495 nm ;发射光谱扫描范围: $505\text{--}650 \text{ nm}$;扫描速度:Very Fast;狭缝宽度:ex: 5 nm ,em: 5 nm),测定的荧光强度记为 F_0 。

[0059] 空白组2:在 1.5 mL 离心管中依次加入 $40 \mu\text{L}$ PB缓冲液($\text{pH}7.4$)、 $20 \mu\text{L}$ GO ($20 \mu\text{g/mL}$)与 $15 \mu\text{L}$ FAM-aptamer (3.75 nmol/L),加煮沸的超纯水补充至总体积为 $400 \mu\text{L}$,涡旋混匀,室温下静置 30 min ;在荧光分光光度计上测定溶液的荧光强度(激发波长: 495 nm ;发射光谱扫描范围: $505\text{--}650 \text{ nm}$;扫描速度:Very Fast;狭缝宽度:ex: 5 nm ,em: 5 nm),测定的荧光强度记为 F_1 。

[0060] 实验组:在 1.5 mL 离心管中依次加入 $40 \mu\text{L}$ PB缓冲液($\text{pH}7.4$)、 $20 \mu\text{L}$ GO ($20 \mu\text{g/mL}$)与一定体积含BNP的样品溶液涡旋混匀,静置 30 min ,再加入 $15 \mu\text{L}$ FAM-aptamer (3.75 nmol/L),加煮沸的超纯水补充至总体积为 $400 \mu\text{L}$,涡旋混匀,室温下静置 30 min ;在荧光分光光度计上测定溶液的荧光强度(激发波长: 495 nm ;发射光谱扫描范围: $505\text{--}650 \text{ nm}$;扫描速度:Very Fast;狭缝宽度:ex: 5 nm ,em: 5 nm),测定的荧光强度记为 F_2 。

[0061] 参照实施例1,运行实施例2-8,测定样品中BNP的含量。

[0062] 实施例2影响因素考察

[0063] 发明人研究了GO浓度对FAM-aptamer探针荧光的影响,具体如下。

[0064] 将一系列不同浓度的GO溶液分别加入到PB缓冲液($\text{pH}7.4$)与FAM-aptamer (3.75 nmol/L)的混合溶液中,再用超纯水定容至 $400 \mu\text{L}$,涡旋混匀,室温下静置 30 min ,按实

施例1荧光参数进行测定。

[0065] GO浓度为0-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,体系中FAM-aptamer荧光强度变化如图2所示。由图可知,当GO加入后,FAM-aptamer的荧光被迅速猝灭,且随着GO浓度的增加,荧光强度逐渐降低直至完全猝灭。本发明选择20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GO作为后续检测条件。

[0066] 实施例3标准曲线的绘制

[0067] 将一系列不同浓度的BNP标准溶液分别加入到由20 μL GO (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和40 μL PB缓冲液 (pH7.4) 组成的混合溶液中,涡旋混匀,室温下静置30min,然后向各混合溶液中加入15 μL FAM-aptamer (3.75nmol/L),并用超纯水定容至400 μL ,涡旋混匀,室温下静置30min,按实施例1设定的荧光参数进行测定。重复做三次实验。

[0068] 由图3可知,GO/FAM-aptamer复合探针的荧光强度随BNP浓度的增加而逐渐恢复。以荧光恢复效率 $(F_2-F_1)/(F_0-F_1)$ 为纵坐标,BNP浓度为横坐标,拟合线性,在BNP浓度为0.074-0.56pg/mL的范围内具有良好的线性关系(图4),标准曲线方程为: $Y=1.787X-0.1331$ ($r=0.9929$)。本发明简便、快速、灵敏度高,平均每个样品的检测时间为1min,标准曲线方程为样品溶液中BNP的定量提供了依据。

[0069] 实施例4选择性实验

[0070] 发明人考察了生物样品中可能共存的干扰物质对该检测方法的影响,如图5所示,主要考察了溶液中存在氨基端脑钠肽前体(2号)、干扰素(3号)、半胱氨酸(4号)、甘氨酸(5号)、人血清白蛋白(6号)、牛血清白蛋白(7号)、精氨酸(8号)和组氨酸(9号)等血液中潜在干扰物质时体系的荧光恢复效率,并与相同浓度的脑钠肽(1号)样品溶液比较。

[0071] 实验结果表明:与BNP浓度相同的干扰物对GO/FAM-aptamer复合探针的荧光基本无恢复。即使是同样作为心衰诊断金标准且拥有更长半衰期的BNP同源代谢物NT-proBNP,也不会干扰测定。所以,本方法可实现高选择性检测BNP而不受血液中潜在干扰物质的干扰。

[0072] 实施例5探针特异性考察

[0073] 发明人还考察了本实验中使用的核酸适配体的特异性,随机选取了全部用荧光染料标记的五段不同序列的DNA片段,用20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GO猝灭各染料标记DNA的荧光,然后加入相同浓度(0.2pg/mL)的BNP,观察各探针荧光强度的改变。

[0074] 结果如图6所示,可以看出,FAM-aptamer的荧光恢复效率达37%,而其他随机序列DNA探针的荧光恢复效率均在7%以下。可见,核酸适配体与BNP的结合亲和力高、特异性好,适配体的引入提高了检测方法的选择性。

[0075] 实施例6原子力显微镜(AFM)表征

[0076] 分别表征以下样品溶液的AFM:1)GO (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$);2)GO (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与FAM-aptamer (3.75nmol/L)的混合溶液;3)GO (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、FAM-aptamer (3.75nmol/L)与BNP (0.30pg/mL)的混合溶液。

[0077] 表征结果如图7所示,GO纳米片的平均厚度约为1.5nm,这表明GO纳米片在溶液中分散良好,几乎都是以单层或双层形式存在;引入FAM-aptamer后,在GO纳米片表面出现了一些平均高度约为5.0nm的“岛”,这说明FAM-aptamer吸附在了GO表面;加入BNP后,纳米片的高度又恢复到了1.5nm,而在纳米片的旁边形成了许多高度约为60nm的复合物,表明FAM-aptamer能以更强的作用力与BNP结合,从GO纳米片的表面释放。

[0078] 实施例7临床标本血样加标回收实验

[0079] 首先,将血液标本于10000rpm离心20min,取上层液体,再参照临床化学发光免疫分析测定值将各血样稀释一定倍数,然后将各临床血样分为两组,一组直接取25 μ L血样作为待测样品,另一组取25 μ L血样分别与浓度为0.074、0.296和0.393pg/mL的BNP标准溶液混合作为待测样品,随后将待测样品加入到G0 (20 μ g/mL) 和PB缓冲液 (pH7.4) 的混合溶液中涡旋混匀,室温下静置30min,最后向各混合溶液中加入FAM-aptamer (3.75nmol/L),并用超纯水定容至400 μ L,涡旋混匀,室温下静置30min,按实施例1设定的荧光参数进行测定。重复三次实验。将荧光恢复效率 $(F_2-F_1)/(F_0-F_1)$ 代入拟合的线性方程 $Y=1.787X-0.1331$, 计算出BNP血样加标后的浓度 $C_{\text{供试品+标准品}}$, 并根据公式: 加标回收率 (%) = $(C_{\text{供试品+标准品}} - C_{\text{供试品}}) / C_{\text{标准品}} \times 100\%$; 计算临床标本血样加标回收率。测定结果见表1。

[0080] 表1血液样本中BNP加标回收实验结果

[0081]

血样	加标量 (pg/mL)	总测量值 (pg/mL, n=3)	RSD (%, n=3)	回收率 (%, n=3)
1	0.074	0.081	1.58	109.46
2	0.296	0.287	6.62	96.96
3	0.393	0.389	4.46	98.98
4	0.074	0.077	6.87	104.05
5	0.296	0.293	2.20	98.99
6	0.393	0.379	4.94	96.44

[0082] 由表1可知,各血样平行测量三次的RSD为1.58-6.87%,加标回收率为96.44-109.46%,表明本发明方法准确可靠,精密度高且实用性强。开发的均相荧光检测方法在临床标本血样中具有潜在应用价值,可通过工作曲线定量检测临床样本中的BNP。

[0083] 实施例8临床血液样本BNP含量测定

[0084] 考虑到本发明方法具有高灵敏度、高特异性,同时能避免血液中潜在干扰物质的干扰,因此进一步将其应用于临床标本血样中BNP的含量测定,并与医院临床诊断值进行比较。共收集并测定45个临床样本(其中14个女性和31个男性血样,年龄均小于16岁)。血液样本首先于10000rpm离心20min,然后参照临床诊断值将各血样稀释一定倍数,使样品溶液中BNP理论含量在线性范围内,之后将稀释过的血样加入到G0 (20 μ g/mL) 和PB缓冲液 (pH7.4) 的混合溶液中涡旋混匀,室温下静置30min,然后向混合溶液中加入FAM-aptamer (3.75nmol/L),并用超纯水定容至400 μ L,涡旋混匀,室温下静置30min,按实施例1荧光参数进行测定。重复三次实验。将荧光恢复效率 $(F_2-F_1)/(F_0-F_1)$ 代入拟合的线性方程 $Y=1.787X-0.1331$, 计算出血液样本中BNP的含量,乘上相应的稀释倍数,即得各血样中BNP实际含量。

[0085] 将测定结果与临床诊断值进行对比,结果如图8所示,本发明方法的测得值均低于医院临床诊断值,但总体趋势一致,即临床化学发光免疫分析法测定为高值的血样用本发明方法测出来同样为高值,中值、低值亦同,推测数值大小差异由方法学差异引起。此外,根据临床诊断结果及临床标本血样中BNP含量的测定结果,构建受试者工作曲线(ROC) (图9) 评价BNP诊断HF的能力。因为BNP含量随年龄增长而逐渐增加,出生后体内BNP含量显著升高,之后一周内降至正常水平,且BNP含量在10岁以下儿童体内无性别差异,为了排除年龄和性别的影响,我们选择出生7天到10岁儿童的临床标本血样做ROC曲线分析,共计37个临

床标本(女/男=12/25,其中4个心衰患者,33个正常人)。具体而言,本发明方法AUC=0.856(95%置信区间[CI],0.689-1.000, $P<0.05$),由尤登指数(Youden index)计算出诊断的临界值(cut-off)为101.4pg/mL(敏感性为100%,特异性为66.7%,诊断准确度为70.3%);临床化学发光免疫分析法AUC=0.864(95%置信区间[CI],0.697-1.000, $P<0.05$),诊断的最优临界值(cut-off)为122.6pg/mL(敏感性为100%,特异性为63.6%,诊断准确度为67.6%)。ROC曲线及相应的AUC分析结果说明两种方法均具有较好的诊断准确度,两种方法的阈值对于心衰的诊断均具有100%的灵敏度,用于心衰的排除时均具有极高的阴性预测值(100%)。但相比于医院临床化学发光免疫分析法,本发明方法用于心衰的诊断具有更高的特异性,推测是因为本方法使用核酸适配体作为识别基团,避免了BNP与其相关肽间的交叉反应。此外,本发明方法引入的核酸适配体可大量体外化学合成、成本低廉,并且不需要磁珠分离,更加使本产品实际成本降低。因本次采集研究对象标本为儿童样品,心衰患病率较低,加上部分非心衰儿童有不同程度的肾损伤,影响血中BNP水平,本方法给目前儿童心衰诊断困难提供了新思路,同时本方法在成人心衰诊断中会有更好的效果。值得注意的是,由ROC确定的医院临床化学发光免疫法的cut-off值大于该法使用说明书推荐的100pg/mL,AUC也远低于说明书中描述的AUC值(0.919,95% [CI],0.904-0.934),推测与化学发光免疫法本身准确度和抗干扰性能不稳定有关,也可能与采集检测的临床样本状态有关。

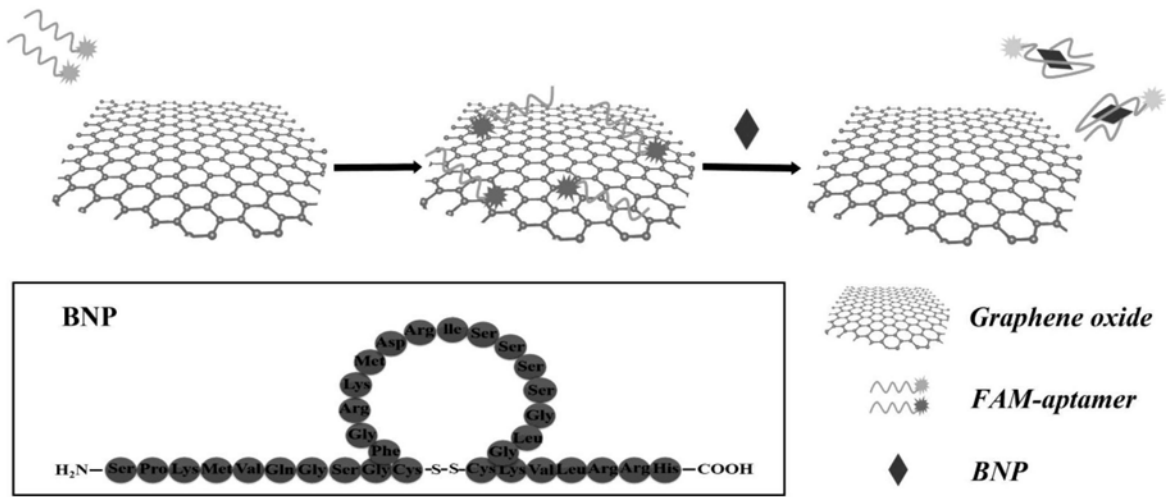


图1

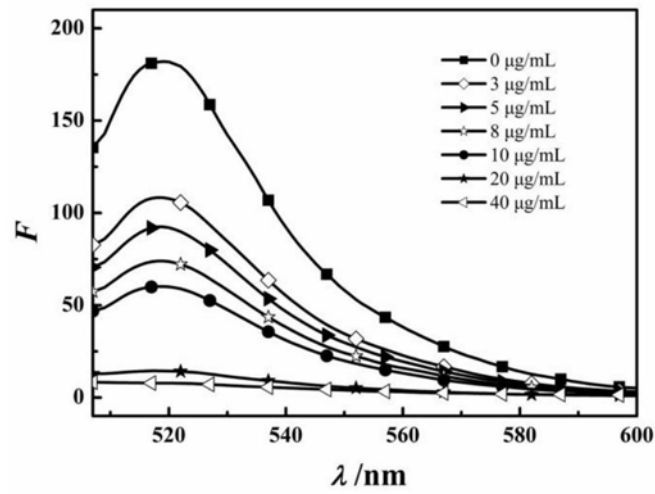


图2

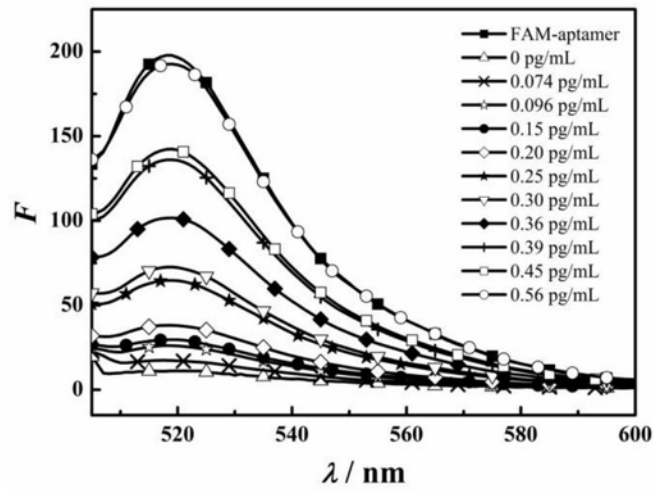


图3

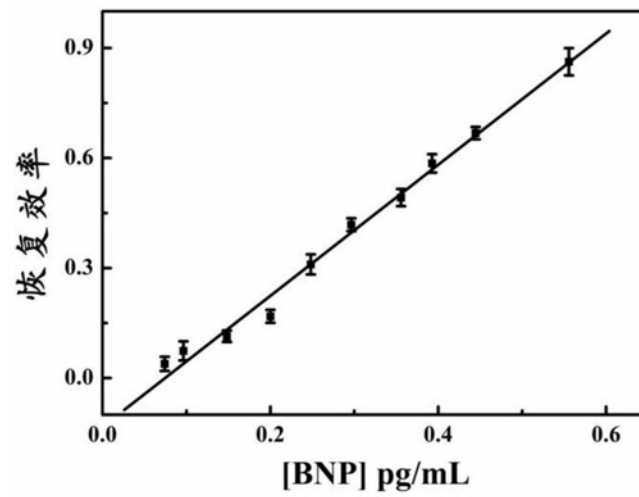


图4

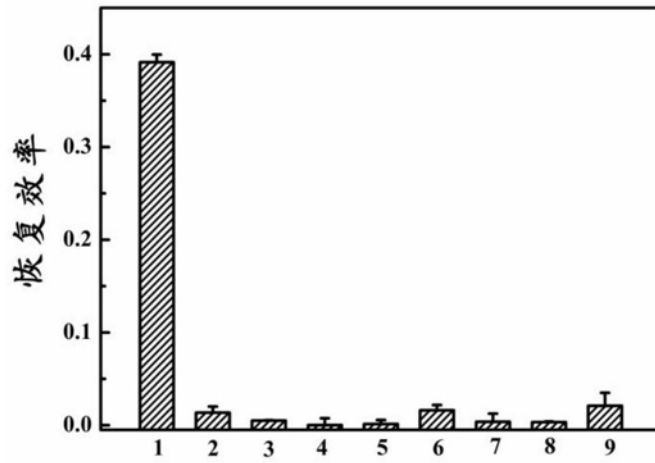


图5

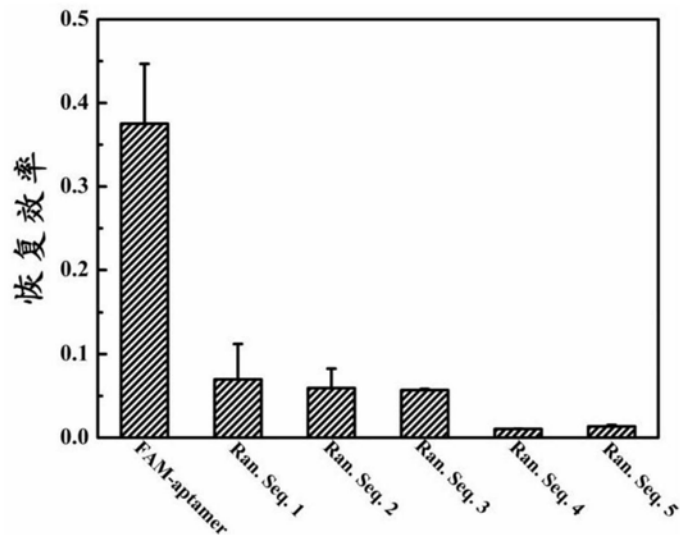


图6

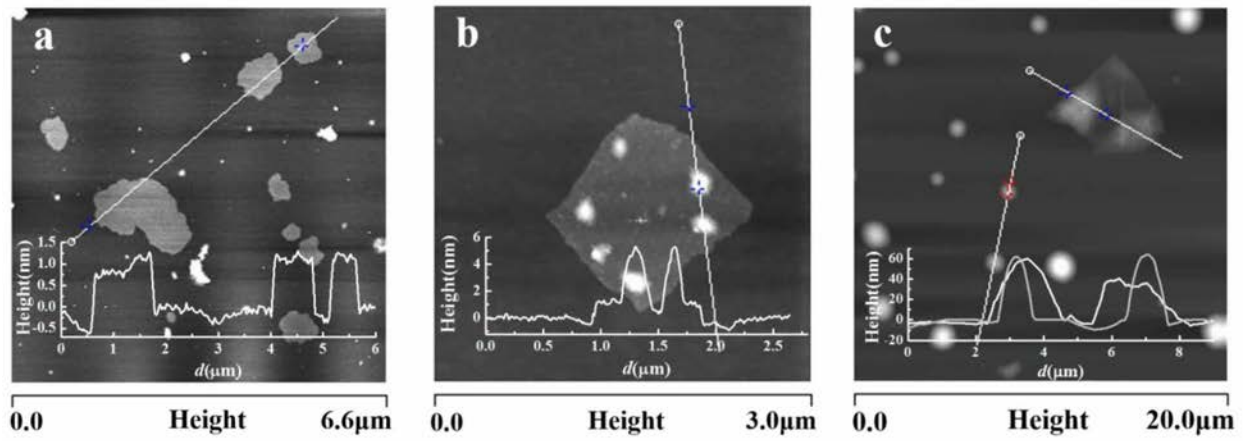


图7

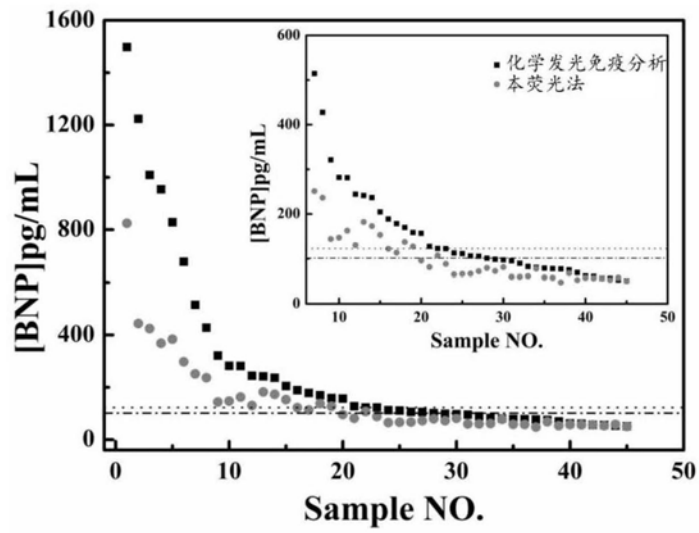


图8

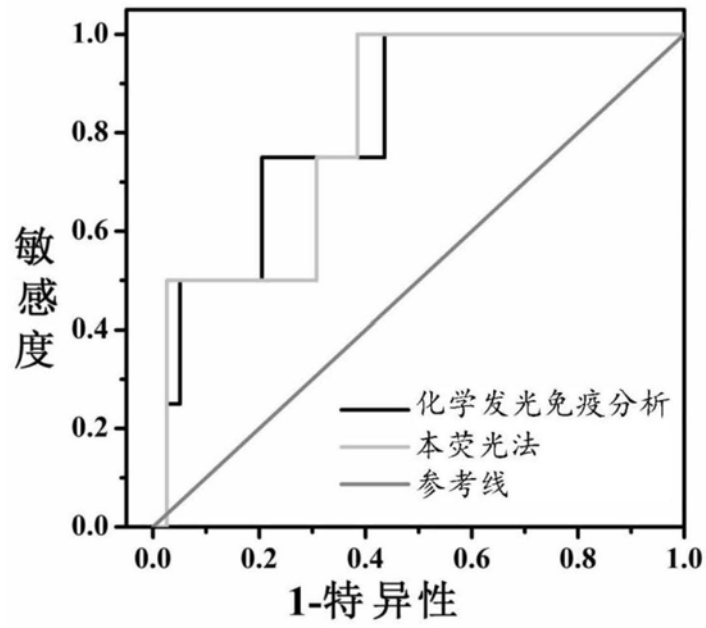


图9

专利名称(译)	一种基于氧化石墨烯/核酸适配体检测脑钠肽的荧光方法		
公开(公告)号	CN110095443A	公开(公告)日	2019-08-06
申请号	CN201910383373.4	申请日	2019-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	重庆医科大学		
申请(专利权)人(译)	重庆医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	重庆医科大学		
[标]发明人	张普 尚京川 尹一兵 刘来成		
发明人	张普 涂爱萍 尚京川 尹一兵 刘来成		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	G01N21/6486 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/577 G01N33/6821		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种脑钠肽(BNP)的高灵敏、高选择性、低成本的均相荧光检测新方法。该方法首先通过构建氧化石墨烯/荧光染料标记的核酸适配体复合探针，利用氧化石墨烯对染料的荧光猝灭作用，降低检测的荧光背景信号；当BNP的加入与其核酸适配体通过特异性分子识别作用使荧光染料远离氧化石墨烯时，染料的荧光信号得以恢复，基于BNP浓度与荧光强度的变化建立线性工作曲线；最后通过测定加入样品后的荧光强度变化值并代入工作曲线计算得到临床样本中BNP的准确浓度。本发明方法克服了各种免疫分析法因使用抗体识别存在交叉反应的缺点，避免了相关肽等的干扰，具有简单、快速、低成本、高灵敏、高选择性等优点，并且可以用于临床上患者血液中BNP的定量检测，用以及时诊断、指导治疗及提示预后。

