



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109884304 A

(43)申请公布日 2019.06.14

(21)申请号 201910237326.9

(22)申请日 2019.03.27

(71)申请人 四川大学

地址 610000 四川省成都市一环路南一段
24号

(72)发明人 周翠松 尹翠云 李晓玲 肖丹

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 吕纪涛

(51)Int.Cl.

G01N 33/576(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

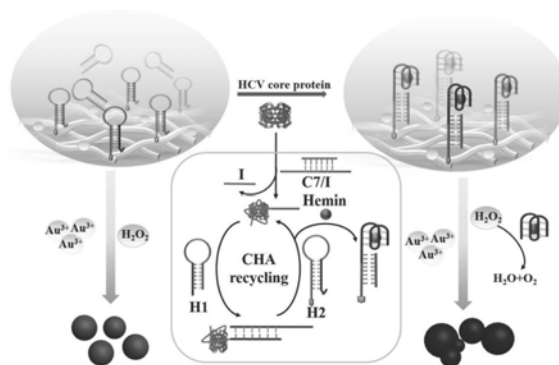
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

一种HCV核心蛋白的CHA放大反应体系及超灵敏可视化检测方法

(57)摘要

本发明提供了一种HCV核心蛋白的CHA放大反应体系及超灵敏可视化检测方法,涉及分析化学技术领域。本发明所述CHA放大反应体系包括B-H2功能化纳米纤维膜,序列C7,序列I,探针H1,谷胱甘肽,第一缓冲液和第二缓冲液,利用所述CHA放大反应体系检测HCV核心蛋白时,该放大反应既避免了蛋白为诱导物在纤维膜上诱导CHA放大效率不高的缺点,也保证了HCV核心蛋白的无酶、无标记、可视化及特异性识别,可视化检测到低至 10^{-13} mg/mL的HCV核心蛋白,而且还展现了高特异性、良好的重复使用性和长期稳定性。



1. 一种HCV核心蛋白的CHA放大反应体系,其特征在于,包括B-H2功能化纳米纤维膜,序列C7,序列I,探针H1,谷胱甘肽,第一缓冲液和第二缓冲液;所述序列C7的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,所述序列I的序列如SEQ ID NO.3所示,所述序列H1的序列如SEQ ID NO.4所示;所述第一缓冲液为含H₂O₂的MES缓冲液;所述第二缓冲液为含HAuCl₄的MES缓冲液。

2. 根据权利要求1所述CHA放大反应体系,其特征在于,所述B-H2功能化纳米纤维膜的制备方法,包括以下步骤:(1) 将聚苯乙烯和四丁基溴化铵混合后溶解于N,N-二甲基甲酰胺中,得PS/TBAB/DMF溶液;所述聚苯乙烯和所述四丁基溴化铵的质量为所述PS/TBAB/DMF溶液质量的15~25%;

(2) 将所述PS/TBAB/DMF溶液进行静电纺丝,烘干后得PS纳米纤维膜;所述静电纺丝时的电压为10~20kV,进样速度为0.15~0.45mL/h,接收距离为7~15cm,收集时间为1.5~3h;

(3) 利用介质阻挡放电产生的大气压空气等离子体处理所述PS纳米纤维膜,得处理后的PS纳米纤维膜;所述处理的电压为40~50 V,电流为1.2~2.5A,放电处理时间为1~3min;

(4) 将所述处理后的PS纳米纤维膜浸泡于亲和素溶液中0.5~1.3h,取出后清洗,然后再与B-H2溶液反应0.6~1.5h,清洗后得B-H2功能化的纳米纤维膜;所述B-H2为经生物素标记的核苷酸序列,所述核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

3. 根据权利要求2所述CHA放大反应体系,其特征在于,步骤(1)所述四丁基溴化铵在所述PS/TBAB/DMF溶液的质量体积比为0.1~0.5%。

4. 根据权利要求2所述CHA放大反应体系,其特征在于,步骤(1)所述溶解时伴随搅拌,所述搅拌的时间为20~28h。

5. 根据权利要求2所述CHA放大反应体系,其特征在于,步骤(2)所述烘干的温度为75~85℃,烘干的时间为3.2~4.5h。

6. 根据权利要求2所述CHA放大反应体系,其特征在于,步骤(2)得所述PS纳米纤维膜后,还包括对所述PS纳米纤维膜进行修剪。

7. 根据权利要求2所述CHA放大反应体系,其特征在于,步骤(4)所述亲和素溶液的浓度为2~5μM。

8. 根据权利要求2所述CHA放大反应体系,其特征在于,步骤(4)所述B-H2溶液的浓度为1~2.5μM。

9. 一种非治疗目的的HCV核心蛋白检测方法,其特征在于,包括以下步骤:(1) 将权利要求8所述CHA放大反应体系中的序列C7和序列I退火杂交,得杂交链C7-I;

(2) 将所述杂交链C7-I与HCV核心蛋白反应2~5h,得反应体系;

(3) 将所述B-H2功能化纳米纤维膜浸泡于所述反应体系中,进行CHA放大反应,得反应后的纳米纤维膜;

(4) 将所述反应后的纳米纤维膜清洗后,与血红素溶液反应,得DNAzyme/纳米纤维膜;

(5) 清洗所述DNAzyme/纳米纤维膜后,置于96孔板底部,添加第一缓冲液反应0.3~0.8h后,添加第二缓冲液反应0.25~0.5h,然后添加谷胱甘肽,通过溶液颜色变化判断HCV核心蛋白的存在;若所述溶液为红色,HCV核心蛋白不存在,若所述溶液由红色向蓝色突变,则存在HCV核心蛋白。

一种HCV核心蛋白的CHA放大反应体系及超灵敏可视化检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于分析化学技术领域,具体涉及一种HCV核心蛋白的CHA放大反应体系及超灵敏可视化检测方法。

背景技术

[0002] 丙型肝炎(丙肝)是由丙肝病毒(Hepatitis C Virus, HCV)引起的血液传染性疾病,会进一步发展成脂肪肝、肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌等高风险性疾病。据世界卫生组织统计,全球丙肝病毒的感染率约为3%,约有1.8亿人感染了丙型肝炎,每年新发病例约3.5万例。迄今为止还没有开发出有效的疫苗用于预防丙肝感染,因此早期检测、早期诊断具有重要意义。目前,检测HCV的方法主要有检测HCV RNA的PCR法、检测抗-HCV抗体和HCV抗原的ELISA法。但这些方法都存在一定的局限性,如HCV的抗体产生周期长(2-6个月),HCV RNA的窗口期较短(1周)但易出现假阴性或假阳性结果。HCV核心蛋白是病毒核壳的重要组成部分,在感染一周后就出现在血液中,因此将HCV核心蛋白高灵敏检测应用于HCV疾病的早期筛查潜力巨大,2000年市场上出现了商品化检测HCV核心蛋白的ELISA试剂盒。

[0003] 核酸适配体因其易合成、高特异性、高亲和力等优点,已用于凝血酶、内皮生长因子等蛋白的检测。方晓红课题组首次筛选了HCV核心蛋白的核酸适配体,并建立了一种基于适配体的HCV核心蛋白检测方法,检出限为 276.4pg/mL(张振,赵子龙,徐丽,吴新姣,朱海珍,谭蔚泓,方晓红,基于核酸适配体的丙肝病毒核心蛋白检测新方法,中国科学:化学,2011,1312-1318.)。与ELISA试剂盒相比,方提出的核酸适配体方法能很好地替代抗体来捕获靶分子HCV核心蛋白,并获得了相媲美的检测灵敏度。然而,信号放大体系仍利用酶标技术,目前为止,非酶的信号放大体系还未见报道。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种HCV核心蛋白的CHA放大反应体系,对HCV核心蛋白进行检测时,无需特殊仪器,操作简单,灵敏度高,且具有无酶、免标记和可视化的特点。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0006] 本发明提供了一种HCV核心蛋白的CHA放大反应体系,包括B-H2功能化纳米纤维膜,序列C7,序列I,探针H1,谷胱甘肽,第一缓冲液和第二缓冲液;所述序列C7的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,所述序列I的序列如SEQ ID NO.3所示,所述序列H1的序列如SEQ ID NO.4所示;所述第一缓冲液为含H₂O₂的MES缓冲液;所述第二缓冲液为含HAuCl₄的MES缓冲液。

[0007] 优选的,所述B-H2功能化纳米纤维膜的制备方法,包括以下步骤:(1) 将聚苯乙烯和四丁基溴化铵混合后溶解于N,N-二甲基甲酰胺中,得 PS/TBAB/DMF溶液;所述聚苯乙烯和所述四丁基溴化铵的质量为所述 PS/TBAB/DMF溶液质量的15~25%;

[0008] (2) 将所述PS/TBAB/DMF溶液进行静电纺丝,烘干后得PS纳米纤维膜;所述静电纺丝时的电压为10~20kV,进样速度为0.15~0.45mL/h,接收距离为7~15cm,收集时间为1.5~3h;

[0009] (3) 利用介质阻挡放电产生的大气压空气等离子体处理所述PS纳米纤维膜,得处理后的PS纳米纤维膜;所述处理的电压为40~50V,电流为1.2~2.5 A,放电处理时间为1~3min;

[0010] (4) 将所述处理后的PS纳米纤维膜浸泡于亲和素溶液中0.5~1.3h,取出后清洗,然后再与B-H2溶液反应0.6~1.5h,清洗后得B-H2功能化的纳米纤维膜;所述B-H2为经生物素标记的核苷酸序列,所述核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0011] 优选的,步骤(1)所述四丁基溴化铵在所述PS/TBAB/DMF溶液的质量体积比为0.1~0.5%。

[0012] 优选的,步骤(1)所述溶解时伴随搅拌,所述搅拌的时间为20~28h。

[0013] 优选的,步骤(2)所述烘干的温度为75~85℃,烘干的时间为3.2~4.5 h。

[0014] 优选的,步骤(2)得所述PS纳米纤维膜后,还包括对所述PS纳米纤维膜进行修剪。

[0015] 优选的,步骤(4)所述亲和素溶液的浓度为2~5μM。

[0016] 优选的,步骤(4)所述B-H2溶液的浓度为1~2.5μM。

[0017] 本发明还提供了一种非治疗目的的HCV核心蛋白检测方法,包括以下步骤:(1)将所述CHA放大反应体系中的序列C7和序列I退火杂交,得杂交链C7-I;

[0018] (2) 将所述杂交链C7-I与HCV核心蛋白反应2~5h,得反应体系;

[0019] (3) 将所述B-H2功能化纳米纤维膜浸泡于所述反应体系中,进行CHA 放大反应,得反应后的纳米纤维膜;

[0020] (4) 将所述反应后的纳米纤维膜清洗后,与血红素溶液反应,得 DNAzyme/纳米纤维膜;

[0021] (5) 清洗所述DNAzyme/纳米纤维膜后,置于96孔板底部,添加第一缓冲液反应0.3~0.8h后,添加第二缓冲液反应0.25~0.5h,然后添加谷胱甘肽,通过溶液颜色变化判断HCV核心蛋白的存在;若所述溶液为红色,HCV 核心蛋白不存在,若所述溶液由红色向蓝色突变,则存在HCV核心蛋白。

[0022] 本发明提供了一种HCV核心蛋白的检测体系,检测HCV核心蛋白时,以HCV核心蛋白为靶分子,同时设计了两条DNA序列C7和I,其中C7 中包含了HCV核心蛋白核酸适配体序列和诱导CHA放大反应的引发序列。利用杂交竞争原理,将C7和I杂交后,可提高HCV核心蛋白的识别特异性。本发明包含所述B-H2功能化纳米纤维膜的试剂盒中,基于该CHA放大反应识别体系、PS纳米纤维膜和AuNPs等离子共振可视化信号,构建了一个高灵敏的等离子纳米平台,用于HCV核心蛋白的可视化检测。该平台既避免了蛋白质诱导的CHA放大反应在界面上效率不高的缺点,也保证了HCV 核心蛋白的特异性识别。结果表明该等离子纳米平台能实现HCV核心蛋白的超灵敏检测,并具备高特异性、良好的重复使用性和长期稳定性。三十个临床样本实验结果证实了该等离子纳米传感平台能成功检测出丙肝病人血清中的核心蛋白,并大大优于业内公认的ELISA试剂盒,在丙型肝炎的快速检测、早期诊断和临床分析等领域具有应用潜力。

附图说明

- [0023] 图1为本发明所述HCV核心蛋白检测原理图；
- [0024] 图2为本发明实施例中CHA放大反应的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果图；
- [0025] 图3为本发明实施例中在不同条件下的紫外可见吸收光谱结果图；
- [0026] 图4为本发明实施例中DNAzyme/PS纳米纤维膜和DNAzyme/PS薄膜的紫外可见吸收光谱图；
- [0027] 图5为本发明实施例中对不同浓度HCV核心蛋白的检测结果图；
- [0028] 图6为本发明实施例中对HCV病人血清样品的检测结果对比图。

具体实施方式

[0029] 本发明提供了一种HCV核心蛋白的CHA放大反应体系,包括B-H2功能化纳米纤维膜,序列C7,序列I,探针H1,谷胱甘肽,第一缓冲液和第二缓冲液;所述序列C7的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,所述序列I的序列如SEQ ID NO.3所示,所述序列H1的序列如SEQ ID NO.4所示;所述第一缓冲液为含H₂O₂的MES缓冲液;所述第二缓冲液为含HAuCl₄的MES 缓冲液。本发明所述第一缓冲液中H₂O₂的浓度优选为200~300μM,更优选为220~280μM,最优选为240μM。本发明所述第二缓冲液中HAuCl₄的浓度优选为0.2~0.5mM,更优选为0.4mM。

[0030] 在本发明CHA放大反应体系中,所用的各序列如表1所示:

[0031] 表1放大反应体系中包含的序列

[0032]

名称	序列 (5'-3')	SEQ ID NO
H1	GCTAGAGATTTTCGTGTCTGACTTCTCTAGCGGGTTTTGGGTTTTAGTCAGAC ACGAAAA	4
B-H2	biotin-CTGACTAAAACCCAAAACCCGCTAGAGAAGTCAGACACGAAAAT CTCTAGCGGGTTTTGGGTTTTGGGTTTTGGG	1
C7	<u>ACTATACACAAAAATAACACGACCGACGAAAAAACACAACCAGTCAGACAC</u> GAAAATCTCTAGC	2
I	GTCTGACTGGTTGTGTTTTTTC	3

[0033] 本发明所述CHA放大反应体系中,所述B-H2功能化纳米纤维膜的制备方法包括以下步骤:(1)将聚苯乙烯和四丁基溴化铵混合后溶解于N,N- 二甲基甲酰胺中,得PS/TBAB/DMF溶液;所述聚苯乙烯和四丁基溴化铵的混合物质量为所述PS/TBAB/DMF溶液质量的15~25%;

[0034] (2)将所述PS/TBAB/DMF溶液进行静电纺丝,烘干后得PS纳米纤维膜;所述静电纺丝时的电压为10~20kV,进样速度为0.15~0.45mL/h,接收距离为7~15cm,收集时间为1.5~3h;

[0035] (3)利用介质阻挡放电产生的大气压空气等离子体处理所述PS纳米纤维膜,得处

理后的PS纳米纤维膜;所述处理的电压为40~50V,电流为1.2~2.5 A,放电处理时间为1~3min;

[0036] (4) 将所述处理后的PS纳米纤维膜浸泡于亲和素溶液中0.5~1.3h,取出后清洗,然后再与B-H2溶液反应0.6~1.5h,清洗后得B-H2功能化的纳米纤维膜;所述B-H2为经生物素标记的核苷酸序列,所述核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0037] 本发明在制备所述B-H2功能化纳米纤维膜时,将聚苯乙烯和四丁基溴化铵混合后溶解于N,N-二甲基甲酰胺中,得PS/TBAB/DMF溶液;所述聚苯乙烯和四丁基溴化铵的混合物质量为所述PS/TBAB/DMF溶液质量的 15~25%。本发明以所述N,N-二甲基甲酰胺(DMF)为溶剂,将聚苯乙烯(PS)和四丁基溴化铵(TBAB)溶解,最终形成PS/TBAB/DMF溶液,所述PS/TBAB/DMF溶液中,PS和TBAB的质量浓度优选为16~24%,更优选为18~22%,最优选为20%。在本发明所述PS/TBAB/DMF溶液中,所述TBAB的质量体积比优选为0.1~0.5%,更优选为0.2~0.4%,最优选为0.3%。本发明在制备所述PS/TBAB/DMF溶液时,优选伴随搅拌,所述搅拌的时间优选为20~28h,更优选为22~25h,最优选为24h。本发明所述本发明所述搅拌的速率优选为30~40r/s。本发明对所述搅拌的温度并没有特殊限定,在室温下进行即可,优选为18~25℃。

[0038] 得PS/TBAB/DMF溶液后,本发明将所述PS/TBAB/DMF溶液进行静电纺丝,烘干后得PS纳米纤维膜;所述静电纺丝时的电压为10~20kV,进样速度为2~8μL/min,接收距离为7~15cm,收集时间为1.5~3h。本发明所述静电纺丝的电压优选为12~18kV,更优选为14~16kV,最优选为15kV。本发明所述静电纺丝时的进样速度优选为0.2~0.4mL/h,更优选为0.25~0.35 mL/min,最优选为0.3mL/min。本发明优选将经过静电纺丝后的纤维膜接收到铝箔上,所述接收距离优选为8~14cm,更优选为9~12cm,最优选为10cm。本发明所述收集时间优选为1.6~2.5h,更优选为1.8~2.2h,最优选为2h。本发明在进行所述静电纺丝时,环境湿度优选为45~50%。本发明将接收在铝箔上的纳米纤维膜优选进行烘干处理,所述烘干的温度优选为75~85℃,更优选为78~82℃,最优选为80℃。本发明所述烘干的时间优选为3.2~4.5 h,更优选为3.6~4.2h,最优选为4h。本发明得所述PS纳米纤维膜后,优选还包括对所述PS纳米纤维膜进行修剪,所述修剪优选为剪成直径d=5 mm的圆片。

[0039] 得PS纳米纤维膜后,本发明利用介质阻挡放电产生的大气压空气等离子体处理所述PS纳米纤维膜,得处理后的PS纳米纤维膜;所述处理的电压为40~50V,电流为1.2~2.5A,放电处理时间为1~3min。本发明所述处理的电压优选为42~48V,更优选为44~46V,最优选为45V。本发明所述处理的电流优选为1.5~2.4A,更优选为1.8~2.2A,最优选为2A。本发明所述放电处理的时间优选为1.2~2.8min,更优选为1.6~2.5min,最优选为2min。本发明所述等离子体处理可以改善PS纳米纤维膜的表面亲水性。

[0040] 得处理后的PS纳米纤维膜后,本发明将所述处理后的PS纳米纤维膜浸泡于亲和素溶液中0.5~1.3h,取出后清洗,然后再与B-H2溶液反应0.6~1.5 h,清洗后得B-H2功能化的纳米纤维膜;所述B-H2为经生物素标记的核苷酸序列,所述核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。本发明对所述浸泡的温度并没有特殊限定,优选在室温下,更优选为18~25℃。本发明所述亲和素溶液的浓度优选为2~5μM,更优选为2.5~4μM,最优选为3μM。本发明所述浸泡的时间优选为0.6~1.2h,更优选为0.8~1h。本发明所述亲和素浸泡可以达到纳米纤维膜修饰上亲和素的效果。本发明中,两次所述清洗优选的均为超纯水清洗,所述清洗的次数优

选为三次。本发明所述B-H2溶液的浓度优选为1~2.5 μ M,更优选为1.4~2 μ M,最优选为1.6 μ M。本发明所述反应的温度优选为35~40 $^{\circ}$ C,更优选为37 $^{\circ}$ C。本发明所述反应的时间优选为0.8~1.2h,更优选为1h。本发明所述B-H2的序列优选为: Biotin-CTGACTAAAACCCAAAACCCGCTAGAGAAGTCAGTGTGGAAAA TCTCTAGCGGGTTTTGGGTTTTGGGTTTTGGG (SEQ ID NO.1)。本发明所述B-H2溶液反应可以达到B-H2固载在纳米纤维膜上以及能够特异性检测HCV核心蛋白的效果。

[0041] 本发明所述C7序列中包括HCV核心蛋白核酸适配体序列和诱导CHA 放大反应的引发序列,其中HCV核心蛋白核酸适配体序列在表1中用横线进行了标记。

[0042] 本发明还提供了一种非治疗目的的HCV核心蛋白检测方法,包括以下步骤:(1) 将所述CHA放大反应体系中的序列C7和序列I退火杂交,得杂交链C7-I;

[0043] (2) 将所述杂交链C7-I与HCV核心蛋白反应2~5h,得反应体系;

[0044] (3) 将所述B-H2功能化纳米纤维膜浸泡于所述反应体系中,进行CHA 放大反应,得反应后的纳米纤维膜;

[0045] (4) 将所述反应后的纳米纤维膜清洗后,与血红素溶液反应,得 DNAzyme/纳米纤维膜;

[0046] (5) 清洗所述DNAzyme/纳米纤维膜后,置于96孔板底部,添加第一缓冲液反应0.3~0.8h后,添加第二缓冲液反应0.25~0.5h,然后添加谷胱甘肽,通过溶液颜色变化判断HCV核心蛋白的存在;若所述溶液为红色,HCV 核心蛋白不存在,若所述溶液由红色向蓝色突变,则存在HCV核心蛋白。

[0047] 在本发明所述HCV核心蛋白检测方法中,将所述CHA放大反应体系中的序列C7和序列I退火杂交,得杂交链C7-I。本发明所述退火杂交的温度优选为90~100 $^{\circ}$ C,更优选为92~98 $^{\circ}$ C,最优选为95 $^{\circ}$ C。本发明所述退火杂交的时间优选为2~8min,更优选为4~6min,最优选为5min。本发明所述序列I为抑制链,可与序列C7竞争性杂交。

[0048] 得杂交链C7-I后,本发明将所述杂交链C7-I与HCV核心蛋白反应2~5h,得反应体系。本发明所述杂交链C7-I的浓度优选为0.2~0.6 μ M,更优选为 0.3~0.5 μ M,最优选为0.4 μ M。本发明所述杂交链C7-I与HCV核心蛋白反应的体积优选为80~120 μ L,更优选为90~110 μ L,最优选为100 μ L。本发明所述杂交链C7-I与HCV核心蛋白反应的时间优选为2.5~4h,更优选为3 h。

[0049] 得反应体系后,本发明将所述B-H2功能化纳米纤维膜浸泡于所述反应体系中,进行CHA放大反应,得反应后的纳米纤维膜。本发明所述浸泡的时间优选为12~20h,更优选为15~18h,最优选为16h。

[0050] 得反应后的纳米纤维膜后,本发明将所述反应后的纳米纤维膜清洗后,与血红素溶液反应,得DNAzyme/纳米纤维膜。本发明所述清洗优选为利用超纯水清洗三次。本发明所述血红素溶液的浓度优选为2~6 μ M,更优选为 3~5 μ M,最优选为4 μ M。

[0051] 得DNAzyme/纳米纤维膜后,本发明清洗所述DNAzyme/纳米纤维膜后,置于96孔板底部,添加第一缓冲液反应0.3~0.8h后,添加第二缓冲液反应 0.25~0.5h,然后添加谷胱甘肽,通过溶液颜色变化判断HCV核心蛋白的存在;若所述溶液为红色,HCV核心蛋白不存在,若所述溶液由红色向蓝色突变,则存在HCV核心蛋白。本发明将所述DNAzyme/纳米纤维膜清洗后,优选利用滤纸吸干。本发明所述添加第一缓冲液反应的时间优选为0.4~0.6h,

更优选为0.5h。本发明所述第二缓冲液的反应时间优选为0.3~0.4h,更优选为1/3h。

[0052] 本发明通过颜色变化判断HCV核心蛋白存在与否后,优选还包括用紫外可见分光光度计来检测,波长测试范围为400nm~800nm,并记录550nm 处的吸光度值。吸光度减少值命名为 $\Delta A=A-A_0$,其中 A_0 表示测试溶液中没有HCV核心蛋白的吸光度值,而A表示测试溶液中有HCV核心蛋白的吸光度值。

[0053] 在本发明中,所述检测方法的检测原理如图1所示,四条核酸链即单链 C7、抑制链 I、两条发夹型核酸探针H1和B-H2,其中B-H2的3'-端嵌有一段富G片段。C7由HCV核心蛋白核酸适配体序列和诱导CHA放大反应的引发序列组成,并使抑制链I与C7的部分诱导序列杂交。将发夹探针B-H2 固载在纳米纤维膜表面,在没有HCV核心蛋白时,C7的引发序列被抑制链I抑制,不能引发溶液中的H1和膜上的B-H2发生CHA放大反应。然而,当HCV核心蛋白存在时,C7的适配体序列与HCV核心蛋白特异性结合,并把抑制链I竞争下来,释放出引发序列。释放出来的引发序列诱导溶液中的H1和膜上的B-H2发生CHA放大反应,使膜表面产生大量的B-H2/H1 双螺旋复合物,此时嵌在B-H2的富G片段被释放出来,并在血红素(hemin) 存在下形成hemin/G-四链体过氧化物模拟酶(DNAzyme),制得DNAzyme/PS 静电纺丝传感界面。膜上的DNAzyme催化溶液中 H_2O_2 分解,使 H_2O_2 浓度降低,减缓了溶液中AuNPs的生长速率,溶液为蓝色。通过观察红色至蓝色的颜色突变,可直接检测HCV核心蛋白。

[0054] 下面结合实施例对本发明提供的一种HCV核心蛋白的CHA放大反应体系及超灵敏可视化检测方法进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0055] 实施例1

[0056] 以DMF为溶剂,配制质量分数为20%的PS/TBAB/DMF溶液,其中 TBAB为0.3% (w/v),在室温下搅拌24h,混合均匀后进行静电纺丝。纺丝条件:电压15kV,进样速度0.3mL/h,接收距离10cm,收集时间2h,环境湿度45%~50%。将接收在铝箔上的纳米纤维薄膜放于烘箱中80℃处理4h,然后将纳米纤维膜剪成直径d=5mm的圆片备用。

[0057] 通过介质阻挡放电(DBD)产生的大气压空气等离子体来改善PS纳米纤维膜表面的亲水性,电压设为45V,电流为2.2A,处理时间为2min。将等离子体处理过的PS纳米纤维膜立即浸泡于100 μ L 3 μ M亲和素溶液中1h,取出用超纯水浸泡清洗三次,然后在100 μ L 1.6 μ M的B-H2溶液中浸泡1h,取出用超纯水清洗三次,制备得到B-H2功能化的纳米纤维膜。

[0058] 实施例2

[0059] 将100 μ L HCV核心蛋白与退火后的C7-I (0.4 μ M) 反应3h,并把实施例1制备好的B-H2功能化的纳米纤维膜浸泡在该反应液中反应16h进行 CHA放大反应。反应结束后取出用超纯水清洗三次,最后在100 μ L 4 μ M hemin溶液中浸泡2h,取出用超纯水清洗三次。即得到DNAzyme/纳米纤维膜,并储存于4℃冰箱。

[0060] DNAzyme/纳米纤维膜经清洗后用滤纸吸干并置于96-孔板底部,往每个孔中加入100 μ L含有240 μ M H_2O_2 的MES缓冲液。反应30min后加入100 μ L含有0.4mM $HAuCl_4$ 的MES缓冲液,反应20min后加入50 μ L100 μ M 的谷胱甘肽。随后用数码相机拍摄照片,并通过紫外可见分光光度计来检测,波长测试范围为400nm~800nm,并记录550nm处的吸光度值。吸光度减少值命名为 $\Delta A=A-A_0$,其中 A_0 表示测试溶液中没有HCV核心蛋白的吸光度值,而A表示测试溶液中有HCV核心蛋白的吸光度值。

[0061] 制备12%聚丙烯酰胺凝胶,然后将8 μ L DNA样品与2 μ L 6 $\times$ 凝胶加样缓冲液

(0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青, 40% (w/v) 蔗糖溶液) 充分混合, 加入到凝胶加样孔中, 进行电泳。在 $1\times$ TBE 缓冲液 (89mM Tris、89mM 硼酸、2mM EDTA, pH=8.3) 和 100V 恒定电压下电泳 1h。此时将凝胶用 Stains-All 染色过夜, 在自然光下曝光半小时后使用数码相机拍摄 DNA 条带位置。

[0062] 实验结果如图 2 所示, 其中条带 1: H1; 条带 2: H2; 条带 3: H1+H2; 条带 4: H1+H2+C7/I; 条带 5: H1+H2+C7/I+0.1mg/mL HCVcp; 条带 6: (H1+ H2) 退火。且在各条带中 $H1=H2=1.0\mu\text{M}$, $C7/I=0.4\mu\text{M}$ 。当有 0.1mg/mL 的 HCV 核心蛋白存在时, 有大量的 H1-H2 双螺旋复合物形成 (Lane 1-6), 证明了 HCV 核心蛋白能特异性诱导 CHA 放大反应的发生。

[0063] 纳米纤维膜的 SEM 如图 3 右上角所示, 纳米纤维具有无序、直径均一等特点 (直径约为 450nm), 其中 (A) B-H2; (B) B-H2、H1; (C) B-H2、H1、C7/I; (D) B-H2、H1、C7/I、1ng/mL HCV 核心蛋白, $H1=H2=1.6\mu\text{M}$, $C7/I=0.4\mu\text{M}$ 。纤维膜上 HCV 核心蛋白诱导的 CHA 放大反应也通过显色液的颜色和吸光度变化来证明。当 $120\mu\text{M}$ 的 H_2O_2 与 0.2mM 的 HAuCl_4 反应 20min 后得到红色溶液, 并且在 550nm 处有最大吸收。当把不论是否与 H1 孵育的 B-H2 功能化纳米纤维膜浸入 H_2O_2 溶液中反应 30min, HAuCl_4 的加入不会改变溶液的颜色 (图 3 中 A, 图 3 中 B)。当把与 H1、C7/I 孵育后的 B-H2 功能化纳米纤维膜浸入显色液, 得到红色的溶液 (图 3 中 C), 说明单独的 C7/I 不能诱导 H1 与 B-H2 发生 CHA 放大反应。然而, 当把与 1ng/mL HCV 核心蛋白、H1 和 C7/I 孵育后的 B-H2 功能化纳米纤维膜浸入显色液中时, 得到蓝色溶液, 其最大吸收波长红移 (图 3 中 D, 图 3 中 d), 吸收曲线变宽, 吸光度值降低。这是因为 HCV 核心蛋白引发膜表面发生 CHA 放大反应, 导致纤维膜上 DNAzyme 的形成, 膜上的 DNAzyme 催化了 H_2O_2 的分解, 减缓了金纳米粒子的生长速率。因此, 所述 HCV 核心蛋白检测体系能用于 HCV 核心蛋白的可视化检测。

[0064] 实施例 3

[0065] 基于实施例 2 的条件进行试验, 分别验证 DNAzyme/PS 纳米纤维膜和 DNAzyme/PS 薄膜引起的显色液信号响应值。实验结果如图 4 所示, 当以 PS 薄膜为基底经过同样的修饰过程后, 1ng/mL HCV 核心蛋白的存在仅使显色液的吸收曲线范围变宽了一点, 颜色几乎没有变化 (图 4B)。然而, 对于 PS 纳米纤维膜, 1ng/mL 的 HCV 核心蛋白就能引起 550nm 处的相对吸光度值减少了 61%, 颜色变为蓝色 (图 4A)。与 PS 薄膜相比, 纳米纤维膜展现了优良的检测优势。这是因为纳米纤维膜比 PS 薄膜具有更大的比表面积, 有助于生物分子的大量固载并能增加与分析物的作用, 从而有效提高检测性能。

[0066] 实施例 4

[0067] 通过实施例 3 中的实验条件, 设置 HCV 核心蛋白浓度从左到右依次为 $0, 10^{-16}, 10^{-15}, 10^{-14}, 10^{-13}, 10^{-12}, 10^{-11}, 10^{-10}\text{mg/mL}$ 。实验结果如图 5 所示, 当 HCV 核心蛋白浓度大于 10^{-13}mg/mL 时, 溶液为蓝色。相反, 当浓度低于 10^{-14}mg/mL 时, 溶液颜色为红色。检出限 (LOD) 低至 10^{-13}mg/mL 。对应的 550nm 处的吸光度减少值也证实了该结果的可靠性, 当 HCV 核心蛋白浓度大于 10^{-13}mg/mL 时, 550nm 处吸光度的减少始终比空白值大 0.09。该方法的检出限 (10^{-4}pg/mL) 比市售试剂盒的检出限 (5pg/mL) 高四个数量级, 而且其检测信号更易观察。

[0068] 实施例 5

[0069] 为了评估该等离子纳米平台对 HCV 核心蛋白的特异性检测, 在实施例 3 的条件下比较了不同类型的蛋白质引起的颜色变化, 并通过紫外可见光谱比较了它们的光谱变化差异。5nM 的牛血清白蛋白 (BSA)、人血清白蛋白 (HSA)、葡萄糖氧化酶 (GOx)、溶菌酶 (Lzm) 均

使显色液溶液变成红色,其550nm处的吸光度值与空白样相比,几乎没有发生变化。然而1pg/mL HCV核心蛋白引起显色液的颜色为蓝色,其550nm处的吸光度值减少了0.15。该现象表明该等离子纳米平台对HCV核心蛋白具有很好的特异性。

[0070] 为了测定该检测体系的重复使用性,使用同一张DNAzyme/PS纳米纤维膜在测试溶液中连续测试六次的相对标准偏差小于1.3%。这表明了该检测体系具有良好的重复使用性。

[0071] 此外,该检测体系的长期稳定性也被测试。在20天内每隔一段时间测定了该检测体系的响应情况。该检测体系,尤其是DNAzyme/PS纳米纤维膜在存储20天期间,它们的吸光度值变化量仅为3%。这说明该检测体系有较为满意的稳定性。以上实验结果表明该检测体系具有良好的重复使用性和长期稳定性,因此可用于复杂体系中的检测。

[0072] 实施例6

[0073] 为了评估该等离子纳米传感平台的实际应用价值,选择三十个临床HCV 患者的血清作为实际样品,对其中的HCV核心蛋白进行了检测。血清样品与缓冲溶液等比例混合,通过显色液的颜色变化和 $-\Delta A_{550}$ 来进行结果检测。如图6A所示,该等离子纳米平台成功实现了对HCV患者血清的检测, $-\Delta A_{550}$ 数据也证明了该结果的可靠性。当 $-\Delta A_{550} > 0.09$ 时表明该病人的核心蛋白含量高于 10^{-4} pg/mL,结果为阳性;当 $-\Delta A_{550} < 0.09$ 时表明该病人的核心蛋白含量低于 10^{-4} pg/mL或者未感染HCV,结果为阴性。把该检测结果与丙型肝炎病毒核心抗原ELISA检测试剂盒的检测结果(图6B)对比,发现试剂盒检测的阳性结果,用本方法检测结果也为阳性,并且我们的方法能检测出更多的阳性结果(图中红色)。这是因为本方法的检出限为 10^{-4} pg/mL,比试剂盒的检出限(5pg/mL)低很多。因此,当病人核心蛋白的含量在0.0001-5pg/mL 时,试剂盒检测结果不为阳性,而本方法检测为阳性。该方法有望发展成为简便、灵敏、低成本的HCV早期诊断和血清筛查新方法。

[0074] 本发明设计了基于CHA识别体系构建了一个高灵敏识别HCV核心蛋白的等离子纳米平台。该CHA放大反应避免了蛋白为诱导物在纤维膜上诱导CHA放大效率不高的缺点,保证了HCV核心蛋白的特异性识别。该等离子纳米平台能够可视化检测到低至 10^{-13} mg/mL的HCV核心蛋白,同时还展现了高特异性、良好的重复使用性和长期稳定性。更重要的是,三十个临床样本实验结果证实了该等离子纳米传感平台能成功检测出丙肝病人血清中的核心蛋白,并大大优于业内公认的ELISA试剂盒。这种无酶、无标记、可视化的的纳米传感平台有望用于丙型肝炎病毒的快速检测、早期诊断和临床分析等领域。

[0075] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

序列表

<110> 四川大学

<120> 一种HCV核心蛋白的CHA放大反应体系及超灵敏可视化检测方法

<160> 4

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

ctgactaaaa cccaaaaccc gctagagaag tcagacacga aaatctctag cgggttttgg 60
gttttgggtt ttggg 75

<210> 2

<211> 64

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

actatacaca aaaataacac gaccgacgaa aaaacacaac cagtcagaca cgaaaatctc 60
tagc 64

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

gtctgactgg ttgtgttttt tc 22

<210> 4

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

gctagagatt ttcgtgtctg acttctctag cgggttttgg gttttagtca gacacgaaaa 60

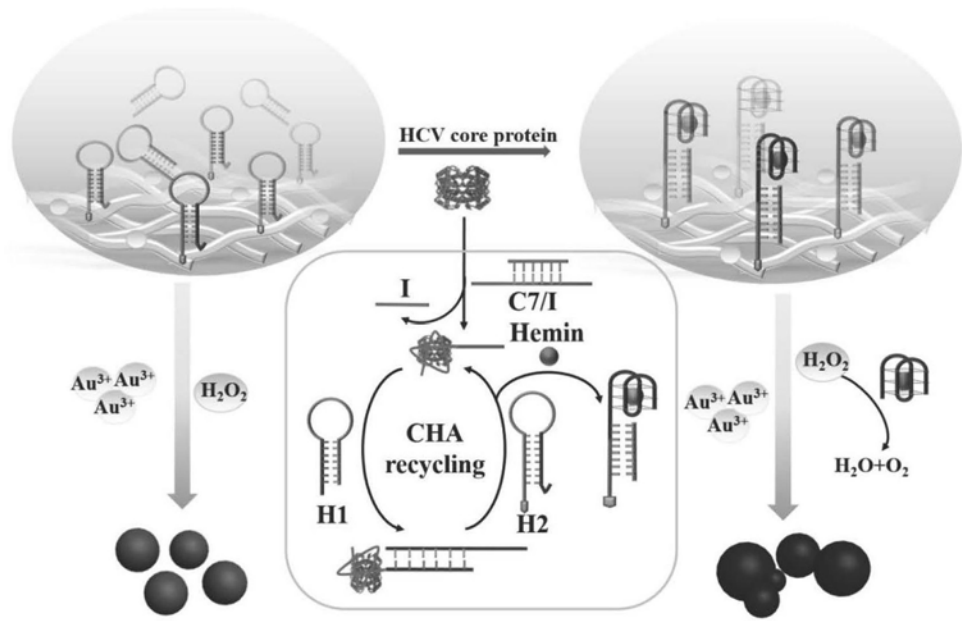


图1

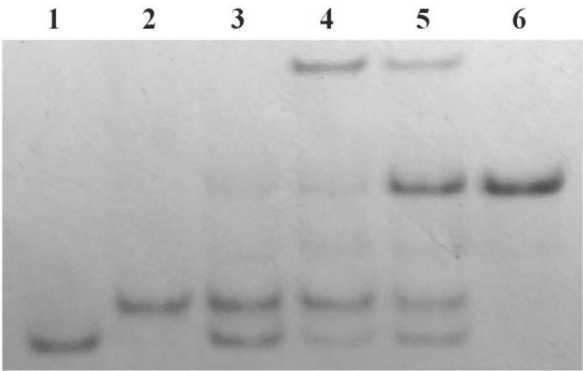


图2

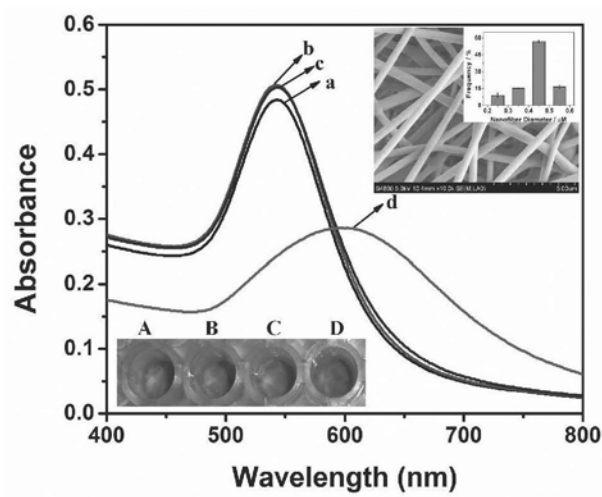


图3

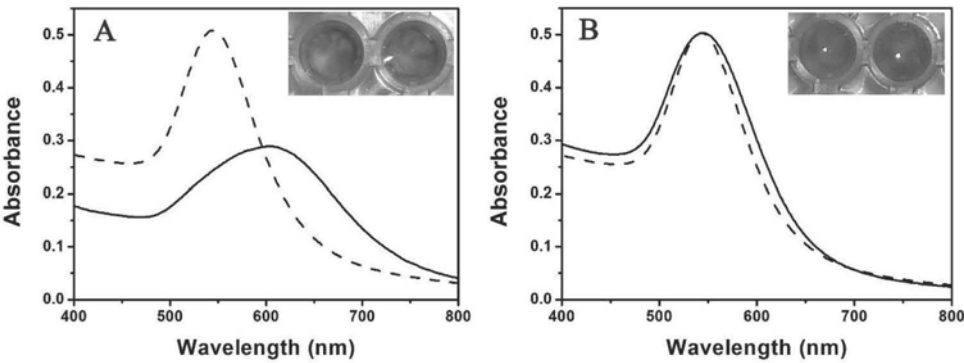


图4

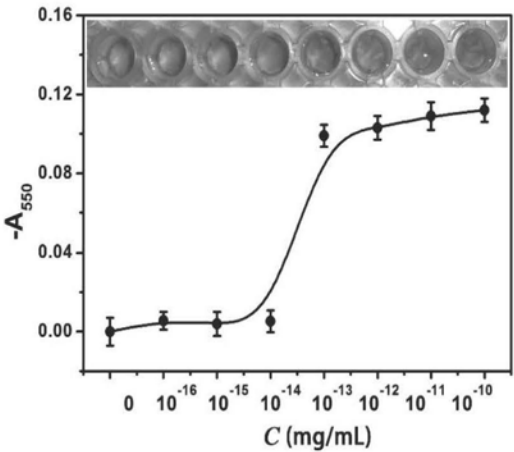
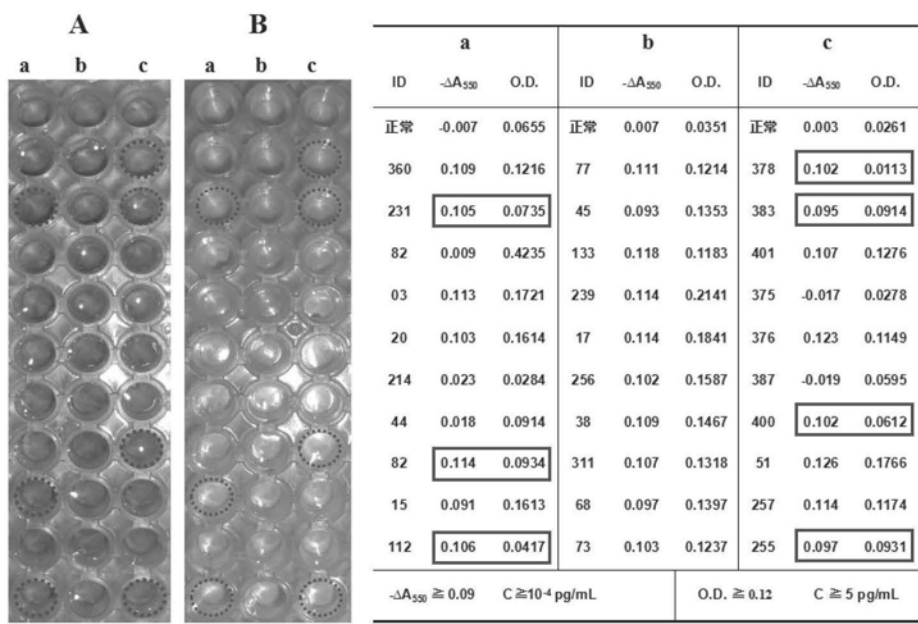


图5



专利名称(译)	一种HCV核心蛋白的CHA放大反应体系及超灵敏可视化检测方法		
公开(公告)号	CN109884304A	公开(公告)日	2019-06-14
申请号	CN201910237326.9	申请日	2019-03-27
[标]申请(专利权)人(译)	四川大学		
申请(专利权)人(译)	四川大学		
当前申请(专利权)人(译)	四川大学		
[标]发明人	周翠松 尹翠云 李晓玲 肖丹		
发明人	周翠松 尹翠云 李晓玲 肖丹		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/68 G01N33/531 G01N33/544		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种HCV核心蛋白的CHA放大反应体系及超灵敏可视化检测方法，涉及分析化学技术领域。本发明所述CHA放大反应体系包括B-H2功能化纳米纤维膜，序列C7，序列I，探针H1，谷胱甘肽，第一缓冲液和第二缓冲液，利用所述CHA放大反应体系检测HCV核心蛋白时，该放大反应既避免了蛋白为诱导物在纤维膜上诱导CHA放大效率不高的缺点，也保证了HCV核心蛋白的无酶、无标记、可视化及特异性识别，可视化检测到低至10-13mg/mL的HCV核心蛋白，而且还展现了高特异性、良好的重复使用性和长期稳定性。

