



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105821132 A

(43)申请公布日 2016.08.03

(21)申请号 201610276057.3

(22)申请日 2016.04.29

(71)申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号江南大学生物工程学院

(72)发明人 周楠迪 王淑玲 田亚平 孙笑凡

(74)专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所 (普通合伙) 32104

代理人 时旭丹 张仕婷

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

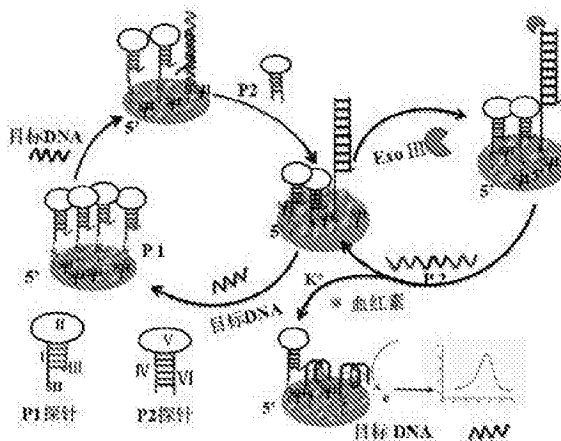
权利要求书2页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种基于核酸外切酶和核酸探针的电化学检测特定单链DNA浓度的方法

(57)摘要

一种基于核酸外切酶和核酸探针的电化学检测特定单链DNA浓度的方法,属于分析化学技术领域。本发明设计合成了两种发夹型探针P1和P2。首先,用1,6-己二硫醇HDT将金纳米颗粒修饰金电极,制备AuNPs-HDT-Au电极,然后将P1探针修饰到电极上。以特定单链目标DNA作待检测物,在没有目标DNA存在时,P1和P2探针能够共存;在目标DNA、P2探针和核酸外切酶Exo III存在时,目标DNA能触发两个独立的反应循环。最后在血红素存在时,保留在电极表面的P1探针的G-四链体序列和血红素相互作用,产生强烈的电信号,用差分脉冲伏安法对目标DNA进行检测,峰电流信号与目标DNA浓度之间在一定浓度范围内呈相关性,实现对目标DNA浓度的检测。本发明方法具有灵敏度高、特异性强的优点。



1.一种基于核酸外切酶和核酸探针的电化学检测特定单链DNA浓度的方法,其特征在于包括如下步骤:金纳米颗粒的制备;金纳米颗粒修饰金电极的制备;将P1探针固定到金纳米颗粒修饰的金电极上;将不同浓度的特定单链目标DNA、P2探针、核酸外切酶ExoIII和固定在电极表面的P1探针混合杂交作用,包括:单链目标DNA-简称TD和P1探针的II区发生杂交反应形成P1-TD杂交双链,P2探针取代TD序列和P1探针发生杂交反应形成P1-P2杂交双链,TD释放并再次进入杂交循环,ExoIII识别P1-P2杂交双链并水解切割双链区的P1探针使得线性的P2探针释放出来再次进入循环;P1探针的I区保留在电极表面,在血红素hemin存在时形成G-四链体-hemin复合物,电化学法检测响应电流值;

P1探针由三部分组成:II区含有形成G-四链体结构的核酸序列,III区是目标DNA的互补序列,III区和I区为互补序列;

P2探针也由三部分组成:IV区能和P1探针的3'端序列互补,并能被VI区杂交封闭,VI区含有和目标DNA相同的碱基序列。

2.根据权利要求1所述基于核酸外切酶和核酸探针的电化学检测特定单链DNA浓度的方法,其特征在于具体步骤如下:

(1)金纳米颗粒的制备:金纳米颗粒的制备采用柠檬酸钠还原法;将100 mL质量浓度为0.01%的HAuCl₄溶液倒入三角烧瓶中,在500 rpm均匀搅拌下加热煮沸;快速加入3.5 mL 1%柠檬酸三钠溶液;持续煮沸15 min,溶液颜色由灰色、转蓝色、转紫色、转紫红色、转酒红色;关闭热源,继续搅拌15-30 min冷却至室温,4℃避光保存;

(2)金纳米颗粒修饰金电极:

a、金电极的预处理:将金电极在氧化铝粉末上打磨;后依次在超纯水、乙醇、超纯水中超声清洗2-3 min;清洗结束后将金电极插入到0.5 M H₂SO₄溶液中循环伏安法扫描活化,扫描范围从-0.4 V至+1.5 V,扫描速度100 mV/s,直到获得稳定的CV图为止;将电极用超纯水冲洗并用氮气吹干;

b、1,6-己二硫醇HDT的自组装:将上述预处理后的裸金电极浸没于10 mM的1,6-己二硫醇HDT溶液中,同时向溶液中通入氮气;HDT分子在金电极表面自组装3 h;得到的HDT-Au修饰电极用乙醇和超纯水充分清洗,每次4-6 min,氮气吹干;

c、金纳米颗粒的修饰:将HDT-Au电极插入到制备好的金纳米颗粒溶液中温育12 h,结束后用10 mM PBS、1 M NaCl和1 M MgCl₂组成的pH7.2的清洗缓冲液清洗电极,并用氮气吹干,制得AuNPs-HDT-Au修饰电极;

(3)P1探针的固定:将合成好的P1、P2探针用20 mM核酸储存液溶解,-20℃冰箱中保藏;将P1探针用核酸稀释液稀释;将100 μL、0.35 μM的发夹型P1探针溶液倒扣到AuNPs-HDT-Au电极上,P1探针在电极表面的AuNPs上形成自组装单分子层;用2 mM 巯基己醇封闭电极2 h;用清洗缓冲液淋洗电极1 min,氮气吹干待用;

核酸储存液为20 mM Tris-HCl,其中含有2 mM MgCl₂、0.2 M NaCl和20 mM KCl,其pH为7.4;

核酸稀释液为10 mM Tris-HCl,其中含有0.1 M NaCl、1 mM EDTA和10 mM 三(2-羧乙基)膦TCEP,其pH为7.4;

(4)P1探针、目标DNA以及P2探针之间的杂交和酶切反应:将修饰有P1探针的电极浸没到100 μL的反应体系中,37℃温育2 h;

所述反应体系为:0.5 μM P2探针、不同浓度的特定单链目标DNA、50 U的Exo**III**和Exo**III**酶缓冲液及20 mM Tris-HCl混合溶液;

(5)G-四链体-hemin复合物的形成:向上述反应体系中加入5 μL 20 mM 血红素hemin和95 μL 25 mM 4-羟乙基哌嗪乙磺酸HEPES缓冲液,该HEPES缓冲液含200 mM NaCl、20 mM KCl和1% DMSO,pH7.4,混匀;将反应液继续倒扣到电极上,室温下1 h;用清洗缓冲液冲洗电极30 s,用于电化学检测;

(6)电化学检测:采用三电极系统,上述金电极作为工作电极,Ag/AgCl作为参比电极,铂丝作为对电极;检测前,电解液20 mM HEPES缓冲液,其中含20 mM KCl,pH7.4;先通入氮气30min;

检测方法为差分脉冲伏安法DPV,扫描范围-0.1~-0.6 V,振幅50 mV;取不同浓度的目标DNA,以步骤(1)-(5)同样操作后对其进行检测,绘制峰电流和目标DNA浓度的关系曲线。

3.根据权利要求2所述基于核酸外切酶和核酸探针的电化学检测特定单链DNA浓度的方法,其特征在于:

以K-ras原癌基因片段作为目标DNA,简称TD,其序列为:5'-TGGAGCTGGT GGC GTAGGCA-3' ;

设计P1探针序列为:5'-HS-(CH₂)₆-GGGTGGGCGGGATGGGT TACGCCACCA GCTCCA ACCCATCCTT-3' ;

GGGTGGGCGGGATGGGT为**I**区,TACGCCACCA GCTCCA为**II**区,ACCCATCCTT为**III**区;

设计P2探针序列为:5'-AA GGATGGG TGGAGCTGGTGGCGTAGGCA CTCCACCCATCC AGAC-3' ;

AA GGATGGG为**IV**区,TGGAGCTGGTGGCGTAGGCA为**V**区,CTCCACCCATCC AGAC为**VI**区。

一种基于核酸外切酶和核酸探针的电化学检测特定单链DNA浓度的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于核酸外切酶和核酸探针辅助目标循环放大的电化学检测特定单链DNA浓度的方法,属于分析化学技术领域。

背景技术

[0002] 对特定DNA或RNA序列(如肿瘤、糖尿病等疾病相关的易感基因或癌标记物基因序列)的检测,在临床诊断、疾病预防和治疗等方面有十分重要的意义。比较传统的DNA检测方法有酶法、化学降解法、随机克隆法,现代的DNA检测有荧光定量PCR、DNA自动化测序、比色法等,但这些方法存在一定的缺点,如酶法和化学降解法操作繁琐、可能导致放射性污染、效率低速度慢,后几种方法需要昂贵的检测仪器,耗时长,样品需要复杂的预处理、灵敏度不高等。电化学DNA传感器作为近几十年发展起来的DNA分析检测技术,由电化学输出设备、信号转换元件和灵敏性的分子识别层三部分组成,因方法的高灵敏性、高选择性、高效率等优点,已应用到众多研究领域中来,成为DNA检测的重要手段。

[0003] 因此完善和提高电化学DNA传感器的灵敏度,开发出高特异性、低检测限的特定基因序列的检测方法在医学、分子生物学、食品、环境等诸多领域具有重要意义和广泛的应用前景。

发明内容

[0004] 本发明的目的是将生物传感技术、纳米技术及信号放大技术相结合,以G-四链体-hemin作为信号放大策略,建立一种简单快捷而又具有高灵敏和高特异性的DNA检测方法。

[0005] 本发明的技术方案,一种基于核酸外切酶和专门设计的核酸探针的检测特定单链DNA序列的电化学方法,其设计合成了两种特殊的核酸探针P1和P2,P1探针由三部分组成:**I**区含有形成G-四链体结构的核酸序列,**II**区是目标DNA的互补序列,**III**区和**I**区为互补序列。P2探针也由三部分组成:**IV**区能和P1探针的3'端序列互补,并能被**VI**区杂交封闭,**V**区含有和目标DNA相同的碱基序列。将P1探针固定到金纳米颗粒修饰的金电极表面;当体系中加入目标DNA时,目标DNA(TD)和P1探针发生杂交反应形成P1-TD杂交双链;此时游离的P1探针的**III**区和P2探针开始杂交结合,使得P2逐渐取代目标DNA,形成P1-P2杂交双链而使目标DNA释放;Exo**III**识别杂交的P1-P2链,并从P1的3'端开始识别切割,导致P2探针释放;Exo**III**完成水解切割后仅剩P1探针的**I**区保留在电极表面形成G-四链体结构,在血红素hemin存在时形成G-四链体-hemin复合物,G-四链体结构与血红素hemin共同作用产生电信号。目标DNA浓度和产生的信号响应之间存在线性相关,从而实现对目标DNA的定量灵敏分析,具体原理如图1。

[0006] 本发明的技术方案:一种基于核酸外切酶和核酸探针的电化学检测特定单链DNA浓度的方法,包括如下步骤:金纳米颗粒的制备;金纳米颗粒修饰金电极的制备;将P1探针固定到金纳米颗粒修饰的金电极上;将不同浓度的特定单链目标DNA、P2探针、核酸外切酶

Exo III和固定在电极表面的P1探针混合杂交作用,包括:单链目标DNA-简称TD和P1探针的 II区发生杂交反应形成P1-TD杂交双链,P2探针取代TD序列和P1探针发生杂交反应形成P1-P2杂交双链,TD释放并再次进入杂交循环,Exo III识别P1-P2杂交双链并水解切割双链区的P1探针使得线性的P2探针释放出来再次进入循环;P1探针的 I区保留在电极表面,在血红素hemin存在时形成G-四链体-hemin复合物,电化学法检测响应电流值;

P1探针由三部分组成: I区含有形成G-四链体结构的核酸序列, II区是目标DNA的互补序列, III区和 I区为互补序列;

P2探针也由三部分组成: IV区能和P1探针的3'端序列互补,并能被 VI区杂交封闭, V区含有和目标DNA相同的碱基序列。

[0007] 具体步骤如下:

(1)金纳米颗粒的制备:金纳米颗粒的制备采用柠檬酸钠还原法;将100 mL质量浓度为0.01%的HAuCl₄溶液倒入三角烧瓶中,在500 rpm均匀搅拌下加热煮沸;快速加入3.5 mL 1%柠檬酸三钠溶液;持续煮沸15 min,溶液颜色由灰色、转蓝色、转紫色、转紫红色、转酒红色;关闭热源,继续搅拌15-30 min冷却至室温,4℃避光保存;

(2)金纳米颗粒修饰金电极:

a、金电极的预处理:将金电极在氧化铝粉末上打磨;后依次在超纯水、乙醇、超纯水中超声清洗2-3 min;清洗结束后将金电极插入到0.5 M H₂SO₄溶液中循环伏安法扫描活化,扫描范围从-0.4 V至+1.5 V,扫描速度100 mV/s,直到获得稳定的CV图为止;将电极用超纯水冲洗并用氮气吹干;

b、1,6-己二硫醇HDT的自组装:将上述预处理后的裸金电极浸没于10 mM的1,6-己二硫醇HDT溶液中,同时向溶液中通入氮气;HDT分子在金电极表面自组装3 h;得到的HDT-Au修饰电极用乙醇和超纯水充分清洗,每次4-6 min,氮气吹干;

c、金纳米颗粒的修饰:将HDT-Au电极插入到制备好的金纳米颗粒溶液中温育12h,结束后用10 mM PBS、1 M NaCl和1 M MgCl₂组成的pH7.2的清洗缓冲液清洗电极,并用氮气吹干,制得AuNPs-HDT-Au修饰电极;

(3)P1探针的固定:将合成好的P1、P2探针用20 mM核酸储存液溶解,-20℃冰箱中保藏;将P1探针用核酸稀释液稀释;将100 μL、0.35 μM的发夹型P1探针溶液倒扣到AuNPs-HDT-Au电极上,P1探针在电极表面的AuNPs上形成自组装单分子层;用2 mM 巯基己醇封闭电极2 h;用清洗缓冲液淋洗电极1 min,氮气吹干待用;

核酸储存液为20 mM Tris-HCl,其中含有2 mM MgCl₂、0.2 M NaCl和20 mM KCl,其pH为7.4;

核酸稀释液为10 mM Tris-HCl,其中含有0.1 M NaCl、1 mM EDTA和10 mM 三(2-羧乙基)膦TCEP,其pH为7.4;

(4)P1探针、目标DNA以及P2探针之间的杂交和酶切反应:将修饰有P1探针的电极浸没到100 μL的反应体系中,37℃温育2 h;

所述反应体系为:0.5 μM P2探针、不同浓度的特定单链目标DNA、50 U的Exo III和Exo III酶缓冲液及20 mM Tris-HCl混合溶液;

(5)G-四链体-hemin复合物的形成:向上述反应体系中加入5 μL 20mM 血红素hemin和95 μL 25 mM 4-羟乙基哌嗪乙磺酸HEPES缓冲液,该HEPES缓冲液含200 mM NaCl、20 mM

KCl和1% 二甲基亚砷DMSO,pH7.4,混匀;将反应液继续倒扣到电极上,室温下1 h;用清洗缓冲液冲洗电极30 s,用于电化学检测;

(6)电化学检测:采用三电极系统,上述金电极作为工作电极,Ag/AgCl作为参比电极,铂丝作为对电极;检测前,电解液20 mM HEPES缓冲液,其中含20 mM KCl,pH7.4;先通入氮气30min;

检测方法为差分脉冲伏安法DPV,扫描范围-0.1~-0.6 V,振幅50 mV;取不同浓度的目标DNA,以步骤(1)-(5)同样操作后对其进行检测,绘制峰电流和目标DNA浓度的关系曲线。

[0008] 以K-ras原癌基因片段作为目标DNA,简称TD,其序列为:5'-TGGAGCTGGTGGCGTAGGCA-3' ;

设计P1探针序列为:5'-HS-(CH₂)₆-GGGTGGGCGGGATGGGT TACGCCACCA GCTCCA ACCCATCCTT-3' ;

GGGTGGGCGGGATGGGT为**I**区,TACGCCACCA GCTCCA为**II**区,ACCCATCCTT为**III**区;

设计P2探针序列为:5'-AA GGATGGG TGGAGCTGGTGGCGTAGGCA CTCCACCCATCC AGAC-3' ;

AA GGATGGG为**IV**区,TGGAGCTGGTGGCGTAGGCA为**V**区,CTCCACCCATCC AGAC为**VI**区。

[0009] 本发明的有益效果:①构建了一种具有极高灵敏度、高特异性的电化学DNA传感器,对特定目标DNA序列的高灵敏检测具有重要意义;②以G-四链体-hemin为信号放大标记实现了信号转换和放大,通过合理的设计,将纳米生物技术、电化学检测等多领域的优势联合起来,大大提高了检测的灵敏度。

附图说明

[0010] 图1:基于Exo**III**辅助目标循环信号双重放大的电化学检测特定单链DNA原理图。

[0011] 图2:不同浓度的目标DNA存在下的DPV曲线图。

[0012] 图3:DPV峰电流值与目标DNA浓度关系标准曲线图。

[0013] 图4:目标DNA和不同碱基错配DNA存在时峰电流变化直方图。

具体实施方式

[0014] 以下实施例中的P1、P2探针由上海生工生物工程有限公司合成,Exo**III**和Exo**III**酶缓冲液购自宝生物工程有限公司。

[0015] 实施例1. K-ras原癌基因片段作为待检测的目标DNA序列。

[0016] K-ras基因是位于12号染色体上长约35 kb的原癌基因,该基因的表达能调控细胞正常生长。该基因发生突变将导致细胞生长异常,细胞过度增殖扩散引发癌变。据统计胰腺癌患者体内K-ras基因发生突变的几率高达90%-100%。K-ras基因突变常发生在癌变早期,野生型的K-ras基因的第12号密码子碱基是GGT,易突变为GTT、GAT、GCT等突变型,GAT突变型是最常见的突变类型可以作为表征胰腺癌的标志,以该突变位点所在的基因片段为检测目标序列开发出灵敏的检测方法对于胰腺癌的早期筛查具有十分重要的意义。

[0017] 以K-ras原癌基因片段作为目标DNA,检测步骤同上所述。

[0018] 目标DNA(TD)序列为:5'-TGGAGCTGGT GGCGTAGGCA-3'。

[0019] 设计P1探针序列为:5'-HS-(CH₂)₆-GGGTGGGCGGGATGGGT TACGCCACCA GCTCCA ACCCATCCTT-3',P1探针的5'-端修饰巯基用以自组装至金电极表面的金纳米颗粒上。

[0020] 设计P2探针序列为:5'-AAGGATGGG TGGAGCTGGTGGCGTAGGCA CTCCACCCATCC AGAC-3'。

[0021] 经金纳米颗粒的制备、金纳米颗粒修饰金电极、P1探针固定至电极、P1探针与目标DNA以及P2探针之间的杂交及Exo III酶切反应、G-四链体-hemin复合物形成后,所得电极作为工作电极,用差分脉冲伏安法(DPV)进行检测;取不同浓度的目标DNA,以步骤(1)-(5)同样的操作和试剂进行反应后,测定目标DNA在不同浓度条件下的DPV曲线图(图2)。分析DPV曲线中峰电流值与目标DNA浓度之间的关系,绘制线性拟合曲线(图3)。随着目标DNA浓度的增加,氧化峰电流信号也随之增强,在目标DNA浓度在50 fM到10 nM范围内,响应电流与目标DNA浓度的对数呈线性相关,拟合曲线方程 $y=3.147+0.46\log x$ (x是目标DNA的浓度/pM,y是峰电流值/ $1e-6A$),线性相关系数0.997。目标DNA检测限达到 3.98×10^{-15} M。

[0022] 实施例2. 电化学DNA传感器的特异性分析

仍然以上述K-ras原癌基因片段为例,用发生单碱基错配和三碱基错配的DNA取代原目标DNA参与杂交反应,具体步骤同实施例1。

[0023] 目标DNA(TD)序列为:5'-TGGAGCTGGT GGCCTAGGCA-3'

单碱基错配序列为:5'-TGGAGCTGAT GGCCTAGGCA-3'

三碱基错配序列为:5'-TGGAGCTCCAGGCCTAGGCA-3'

比较目标DNA、单碱基错配DNA、三碱基错配DNA三种不同DNA存在下的信号响应。如图4,传感器在识别目标DNA的单碱基突变和三碱基突变序列上能产生很明显的DPV信号强度对比。相比较于完全配对的目标DNA产生的信号增加(a),单碱基(b)和三碱基错配(c)产生的信号强度要低得多。完全配对的目标DNA产生的信号强度是单碱基错配和三碱基错配的5倍以上,从而验证了构建的DNA传感器能很好地辨别目标DNA和突变序列。

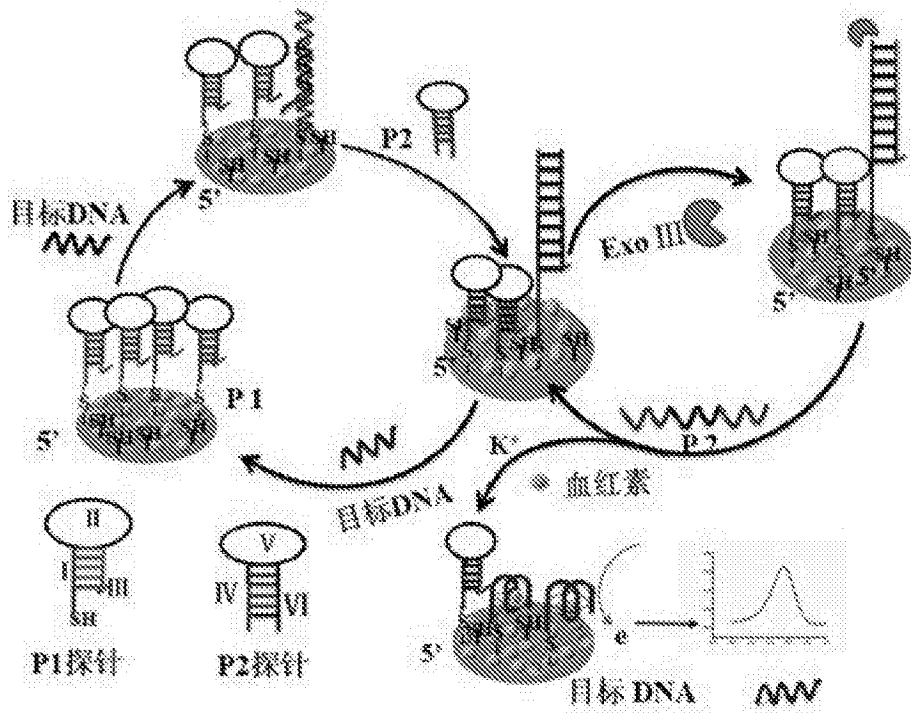


图1

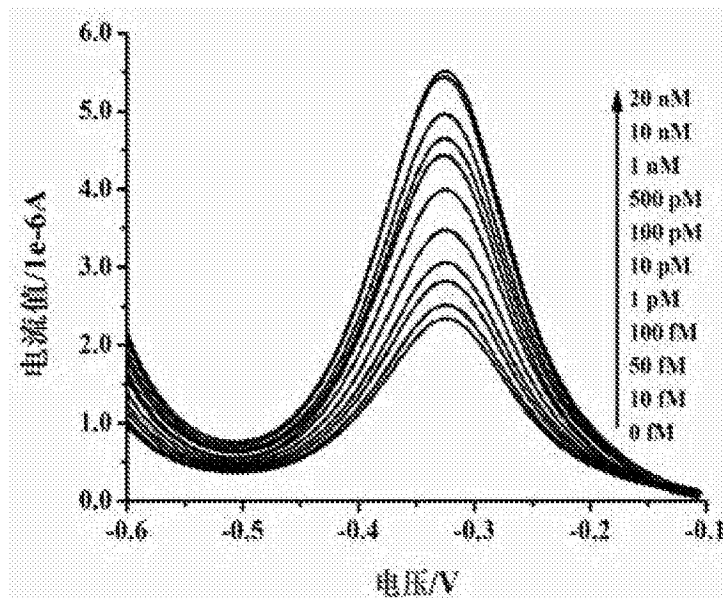


图2

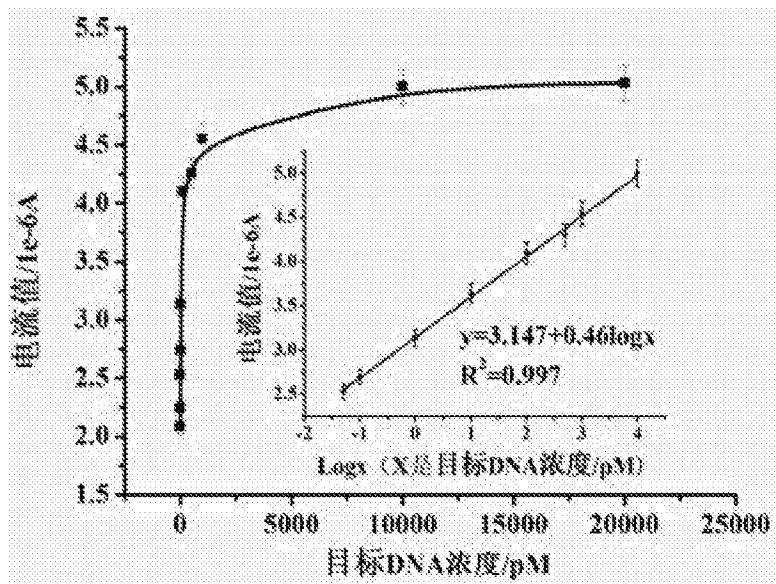


图3

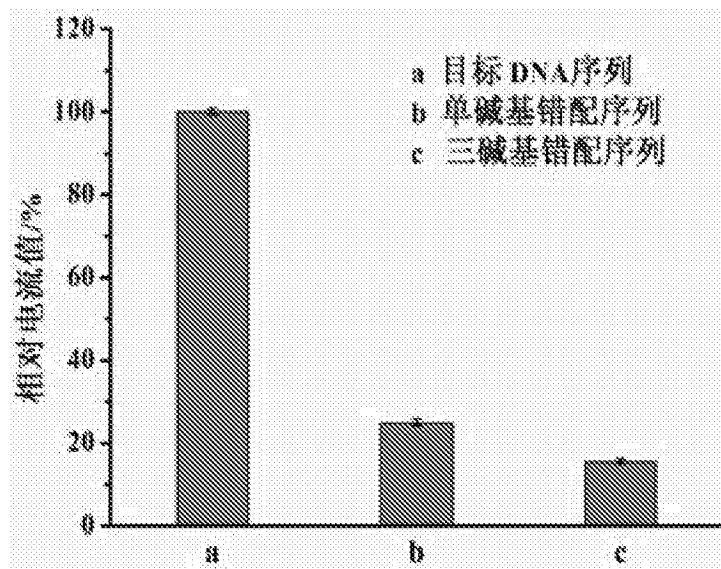


图4