



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115684091 A

(43) 申请公布日 2023. 02. 03

(21) 申请号 202210864309.X

B82Y 5/00 (2011.01)

(22) 申请日 2022.07.21

B82Y 15/00 (2011.01)

(30) 优先权数据

10-2021-0096028 2021.07.21 KR

10-2022-0082508 2022.07.05 KR

(71) 申请人 高丽大学校产学协力团

地址 韩国首尔

(72) 发明人 沈相俊 宋昭珍 李钟旭

(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事

务所(普通合伙) 11413

专利代理师 袁波 刘继富

(51) Int.Cl.

G01N 21/552 (2014.01)

B82Y 30/00 (2011.01)

B82Y 40/00 (2011.01)

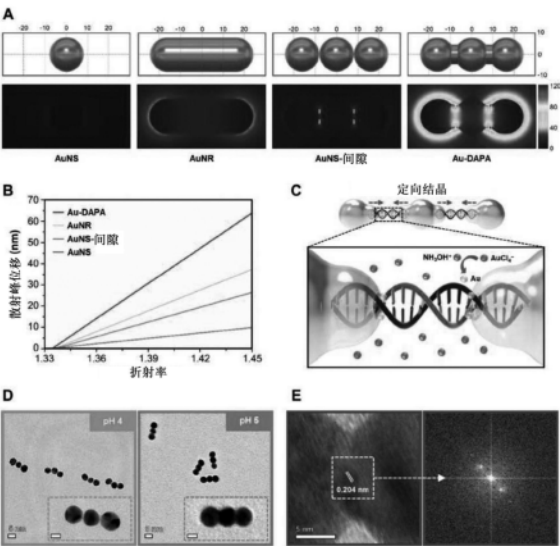
权利要求书2页 说明书18页 附图16页

(54) 发明名称

基于生物分子的金属纳米结构体、以及使用该金属纳米结构体的纳米等离子体生物传感器

(57) 摘要

本发明涉及一种基于生物分子的金属纳米结构体、以及使用该金属纳米结构体的纳米等离子体生物传感器。该金属纳米结构体为单金属-DAPA (DNA组装高级等离子体结构), 其特征在于, 包含至少一个接合有一条单链DNA (1ssDNA) 的金属纳米球、以及至少一个接合有与所述单链DNA 互补的两条单链DNA (2ssDNA) 的金属纳米球, 所述金属纳米球相互桥联, 所述单金属-DAPA 包含大于0且小于等于2nm的纳米间隙。由此能够从分离的血清中准确检出、并且即使在非常低的检测限下也能够检出阿尔茨海默病的exo-miR生物标志物。



1. 一种单金属-DAPA (DNA组装高级等离子体结构, DNA-Assembled advanced plasmonic architecture), 其特征在于, 包含至少一个接合有一条单链DNA (1ssDNA) 的金属纳米球、以及至少一个接合有与所述单链DNA互补的两条单链DNA (2ssDNA) 的金属纳米球 (nanosphere),

所述金属纳米球相互桥联,

所述单金属-DAPA包含大于0且小于等于2nm的纳米间隙。

2. 根据权利要求1所述的单金属-DAPA, 其以2:1的比例包含接合有一条单链DNA (1ssDNA) 的金属纳米球、以及接合有与所述单链DNA互补的两条单链DNA的金属纳米球。

3. 根据权利要求1所述的单金属-DAPA, 其中,

所述金属为选自金 (Au)、铜 (Cu)、铂 (Pt) 及钯 (Pd) 中的任一种。

4. 根据权利要求1所述的单金属-DAPA, 其用于生物传感器。

5. 一种基于单DAPA的无标记纳米等离子生物传感器, 其包含:

基板;

金属-DAPA (DNA-Assembled advanced plasmonic architecture), 固定于所述基板, 接合有与靶标生物标志物特异性结合的捕获探针, 以及

测定部, 用于测定金属-DAPA的局部表面等离子体共振现象。

6. 根据权利要求5所述的基于单DAPA的无标记纳米等离子生物传感器, 其中,

所述金属-DAPA包含3个连接有一条单链DNA、且相互桥联的金属纳米球。

7. 根据权利要求6所述的基于单DAPA的无标记纳米等离子生物传感器, 其中,

所述DAPA以2:1的比例包含至少一个接合有一条单链DNA (1ssDNA) 的金属纳米球、以及至少一个接合有与所述单链DNA互补的两条单链DNA的金属纳米球。

8. 根据权利要求6所述的基于单DAPA的无标记纳米等离子生物传感器, 其中,

所述DNA的长度为75bp至150bp。

9. 根据权利要求5所述的基于单DAPA的无标记纳米等离子生物传感器, 其中,

所述金属-DAPA包含纳米间隙。

10. 根据权利要求9所述的基于单DAPA的无标记纳米等离子生物传感器, 其中,

所述纳米间隙大于0且小于等于2nm。

11. 根据权利要求5所述的基于单DAPA的无标记纳米等离子生物传感器, 其中,

所述金属为选自金 (Au)、铜 (Cu)、铂 (Pt) 和钯 (Pd) 中的任一种。

12. 根据权利要求5所述的基于单DAPA的无标记纳米等离子生物传感器, 其中,

所述靶标生物标志物为DNA、miRNA或肽。

13. 根据权利要求12所述的基于单DAPA的无标记纳米等离子生物传感器, 其中,

所述miRNA来源于外泌体。

14. 根据权利要求13所述的基于单DAPA的无标记纳米等离子生物传感器, 其中,

所述miRNA为exo-miR125b、exo-miR15a、exo-miR361或它们的组合。

15. 根据权利要求14所述的基于单DAPA的无标记纳米等离子生物传感器, 其特征在于,

所述生物传感器通过测定因外泌体来源miRNA的特异性结合而产生的瑞利散射光谱的变化, 检测外泌体来源miRNA蛋白。

16. 根据权利要求5所述的基于单DAPA的无标记纳米等离子生物传感器, 其中,

所述捕获探针包含DAN或LNA。

17. 一种外泌体来源miRNA的检测方法,包括用生物标志物混合物处理权利要求5至16中任一项所述的生物传感器的步骤。

18. 根据权利要求17所述的外泌体来源miRNA的检测方法,其中,所述生物标志物混合物为血液或除去凝集素的血清。

19. 根据权利要求18所述的外泌体来源miRNA的检测方法,其中,所述生物标志物混合物包含外泌体来源miRNA。

20. 一种阿尔茨海默病的诊断方法,其包括如下步骤:

用生物标志物混合物处理权利要求5至16中任一项所述的生物传感器的步骤;以及用外泌体来源miRNA检测探针处理所述生物传感器的步骤。

21. 根据权利要求20所述的阿尔茨海默病的诊断方法,其中,所述检测探针包含DNA或LNA。

22. 一种基于单DAPA的纳米等离子体生物传感器的制造方法,包括如下步骤:

(a) 将单链DNA-金属纳米颗粒和具有与所述单链DNA互补序列的单链DNA-金属纳米颗粒以2:1的比例进行杂交,获得金属-DAPA种子的步骤;

(b) 用预定的材料涂敷所述金属-DAPA种子的步骤;

(c) 用金属前体和还原剂对经涂敷的金属-DAPA种子进行处理而使其结晶的步骤;

(d) 将金属-DAPA固定于基板的步骤;以及

(e) 将特异性结合于分离的靶标生物标志物的捕获探针接合于金属-DAPA的步骤。

23. 根据权利要求22所述的基于单DAPA的纳米等离子体生物传感器的制造方法,其中,用聚乙二醇(PEG)涂敷所述金属-DAPA种子。

24. 根据权利要求22所述的外泌体来源miRNA的检测方法,还包括在所述(d)步骤之前,用(3-巯基丙基)三甲氧基硅烷(MPTES)涂敷基板的步骤。

25. 根据权利要求22所述的外泌体来源miRNA的检测方法,其中,所述结晶在pH为5的条件下进行。

26. 一种单金属-DAPA的制造方法,包括如下步骤:

(a) 将一条单链DNA(1ssDNA)-金属纳米颗粒与具有与所述单链DNA互补序列的两条单链DNA(2ssDNA)-金属纳米颗粒以2:1的比例进行杂交,获得金属-DAPA种子的步骤;

(b) 用预定的材料涂敷所述金属-DAPA种子的步骤;以及

(c) 用金属前体和还原剂对经涂敷的金属-DAPA种子进行处理而使其结晶的步骤。

基于生物分子的金属纳米结构体、以及使用该金属纳米结构体的纳米等离子体生物传感器

技术领域

[0001] 本发明涉及基于生物分子的金属纳米结构体、以及使用该金属纳米结构体的纳米等离子体生物传感器。

背景技术

[0002] 根据最近的统计,全球约有5000万人正遭受痴呆症带来的病痛,预计该数值每20年会翻一番,到2050年达到约1.52亿例。其中,阿尔茨海默病(Alzheimer's疾病,AD)是老年人最常见的神经退行性疾病,以进行性认知功能下降为特征,其主要症状是记忆丧失以及无法产生新的记忆。特别是阿尔茨海默病在疾病发展到一定程度之后,就只能延缓病情发展而无法康复,所以早期诊断和判断病情非常重要。

[0003] 根据目前的报告,阿尔茨海默病是在淀粉样蛋白级联反应、Tau蛋白磷酸化、神经递质、兴奋性毒性或氧化应激等多种复杂的病理学和生理学条件下诱发的。因此,阿尔茨海默病的发病和疾病进展非常难于预防,所以目前的重点转向了早期诊断和治疗以减缓疾病进展和改善认知衰退。

[0004] 阿尔茨海默病(AD)的主要病理性特征为 β -淀粉样蛋白(A β)肽的脑内蓄积或Tau蛋白的神经原纤维缠结(NFT),这与在其发病过程中因神经元和突触的毒性和破坏而相继产生的神经退行性机制密切相关。

[0005] 作为目前的诊断方法,有脑成像、认知功能测试、通过脑脊液的检测方法等,但这些方法只有在阿尔茨海默病的很大一部分症状出现后才能应用,因此这些方法不足以进行早期诊断。此外,在经济上也需要花费大量的诊断费用,侵入性检查步骤还存在潜在的危险等,这样的生物标志物的测试并不总是可行的,存在局限性。

[0006] 与之相对,基于血液的诊断由于是非侵入性的、且廉价、能够进行大规模的多次采样,所以有助于克服这些缺点。因此,在最近的许多研究中,对基于血液的阿尔茨海默病生物标志物和脑的病理学变化之间的相关性进行了研究。然而,尽管做出了这些努力,但仍缺乏能够直接反映阿尔茨海默病的发病和疾病进展的基于血液的阿尔茨海默病生物标志物的检测方法。

[0007] 另一方面,外泌体是从包括中枢神经系统(CNS)在内的各种类型的细胞中释放出来的、尺寸在30~100nm范围内的小囊泡。根据报告,它们会在致病蛋白的扩散和A β 、Tau蛋白及朊病毒等蛋白在大脑中的聚集中发挥作用。此外,由于它们能够携带与神经功能相关的各种遗传物质(DNA、miRNA、蛋白质等)穿过血脑屏障(BBB),所以更容易获得有关大脑状态的信息。特别是外泌体miRNA(exo-miRs)会参与到成熟神经元的神经元分化、发育及功能等中枢神经系统的各种基本过程,因此它可以根据疾病进展提供有关阿尔茨海默病各种特征的准确信息。因此,exo-miR作为一种新的诊断和治疗AD的生物标志物正在受到重视。然而,与在脑脊液中发现的浓度相比,基于血液的生物标志物的浓度低 10^{-10} 倍,且血液中还包含许多干扰物质,需要开发出一种准确可靠的方法来检测这种生物标志物。

[0008] 进而,最近,定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)和微阵列技术被用于检测exo-miR,这种技术主要基于荧光进行,因此存在因荧光染料方面的问题(如光漂白和闪烁等)而导致检测的可靠性和灵敏度下降的局限性。此外,由于miRNA的特性(如体液的长度短、同源性高、表达水平低等),还存在难以获得准确的分析的局限性。

发明内容

[0009] 发明要解决的问题

[0010] 最近,基于等离子体单纳米颗粒(NP)的传感器因具有与入射光相互作用产生局部表面等离子体共振(LSPR)的能力而成为克服上述局限性的替代方案,因此引起了越来越多的关注。这种物理现象是通过吸收NP周边折射率(RI)变化,并将其转换成散射光谱的等离子体带的位移来表现的,所以允许单个NP对小尺寸也具有超敏感性。此外,由于LSPR现象很大程度上取决于纳米颗粒的形状、尺寸、局部RI及排列,所以可以通过调节这些因素来容易地改善基于纳米颗粒的LSPR生物传感器的灵敏度。在最近的几项研究中,就引入了基于LSPR的传感器用于miRNA检测。这似乎也在反映这一趋势。然而,由于exo-miR的检测灵敏度不足、重现性和选择性低,在临床应用领域的使用仍然在受到限制,仍然需要进行研究来克服这一点。

[0011] 本发明是为了解决上述问题而提出的,本发明的目的在于提供一种基于DNA组装高级等离子体结构(DNA-assembled advanced plasmonic architecture,DAPA)的无标记(label-free)等离子体生物传感器和通过利用该生物传感器从分离的血清中准确检出、并且即使在非常低的检测限下也能够检出阿尔茨海默病的exo-miR生物标志物的方法。

[0012] 用于解决问题的方案

[0013] 本发明的一个实施方式为单金属-DAPA。

[0014] 在一个具体例中,上述金属-DAPA的特征在于包含接合有一条单链DNA的金属纳米球和接合有与其互补的两条单链DNA的金属纳米球(nanosphere),具有桥结构,包含大于0且小于等于2nm的纳米间隙。

[0015] 在另一个具体例中,上述DAPA的特征在于,上述接合有一条单链DNA的金属纳米球和接合有与其互补的两条单链DNA的金属纳米球以2:1的比例构成。

[0016] 在又一个具体例中,其特征不在于,上述金属为选自由金(Au)、铜(Cu)、铂(Pt)和钯(Pd)中的任一种。

[0017] 在又一个具体例中,上述单金属-DAPA的特征在于,其用于生物传感器。

[0018] 本发明的另一个实施方式为基于单DAPA的无标记纳米等离子生物传感器。

[0019] 在一个具体例中,上述生物传感器的特征在于包含:基板;金属-DAPA(DNA-Assembled advanced plasmonic architecture),固定于上述基板,接合有与靶标生物标志物特异性结合的捕获探针;以及测定部,用于测定金属-DAPA的局部表面等离子体共振现象。

[0020] 作为另一个具体例,上述金属-DAPA的特征在于,包含3个具有连接单链DNA的桥结构的金属纳米球(nanosphere)。

[0021] 作为又一个具体例,上述DAPA的特征在于,以2:1的比例包含接合有一条单链DNA的纳米球以及接合有由与其互补序列构成的两条单链DNA的纳米球。

- [0022] 作为又一个具体例,其特征在于,上述DNA由75bp至150bp构成。
- [0023] 作为又一个具体例,上述金属-DAPA的特征在于包含纳米间隙。
- [0024] 作为又一个具体例,其特征在于,上述纳米间隙大于0且小于等于2nm。
- [0025] 作为又一个具体例,其特征在于,上述金属为选自由金(Au)、铜(Cu)、铂(Pt)及钯(Pd)中的任一种。
- [0026] 作为又一个具体例,其特征在于,上述靶标生物标志物为DNA、miRNA或肽。
- [0027] 作为又一个具体例,其特征在于,上述miRNA来源于外泌体。
- [0028] 作为又一个具体例,其特征在于,上述miRNA是exo-miR125b、exo-miR15a、exo-miR361或它们的组合。
- [0029] 作为又一个具体例,其特征在于,上述生物传感器的特征在于通过测定因外泌体来源miRNA的特异性结合而产生的瑞利散射光谱的变化,检测外泌体来源miRNA蛋白。
- [0030] 作为又一个具体例,其特征在于,上述捕获探针包含DNA或LNA。
- [0031] 本发明的另一个实施方式为一种外泌体来源miRNA的检测方法,包括用生物标志物混合物处理上述生物传感器的步骤。
- [0032] 作为一个具体例,其特征在于,上述生物标志物混合物为血清、血液或去除凝集素的血浆。
- [0033] 在又一个具体例中,其特征在于,上述生物标志物混合物包含外泌体来源miRNA。
- [0034] 本发明的又一个实施方式为一种阿尔茨海默病的诊断方法,包括:用生物标志物混合物处理上述生物传感器的步骤;以及用外泌体来源miRNA检测探针处理上述生物传感器的步骤。
- [0035] 作为一个具体例,其特征在于,上述检测探针包含DNA或LNA。
- [0036] 本发明的又一个实施方式为基于单DAPA的纳米等离子体生物传感器的制造方法。
- [0037] 作为一个具体例,其特征在于,包含:(a)将单链DNA-金属纳米颗粒和具有与其互补序列的单链DNA-金属纳米颗粒以2:1的比例进行杂交,获得金属-DAPA种子的步骤;(b)对上述金属-DAPA种子进行涂敷的步骤;(c)用金属前体和还原剂对上述经涂敷的金属-DAPA种子进行处理而使其结晶的步骤;(d)将金属-DAPA固定于基板的步骤;以及(e)将特异性结合于分离的靶标生物标志物的捕获探针接合于金属-DAPA的步骤。
- [0038] 作为另一个具体例,其特征在于,使用聚乙二醇(PEG)进行上述涂敷。
- [0039] 在又一个具体例中,其特征在于,还包括在上述(d)步骤之前,用(3-巯基丙基)三甲氧基硅烷((3-Mercaptopropyl) trimethoxysilane, MPTES)涂敷基板的步骤。
- [0040] 在又一个具体例中,其特征在于,上述结晶在pH为5的条件下进行。
- [0041] 本发明的又一个实施方式为单金属-DAPA的制造方法。
- [0042] 在一个具体例中,上述方法的特征在于,包括:(a)将一条单链DNA-金属纳米颗粒和具有与其互补序列的两条单链DNA-金属纳米颗粒以2:1的比例进行杂交,获得金属-DAPA种子的步骤;(b)对上述金属-DAPA种子进行涂敷的步骤;以及(c)用金属前体和还原剂对上述经涂敷的金属-DAPA种子进行处理而使其结晶的步骤。
- [0043] 发明效果
- [0044] 根据本发明的一个实施例,能够以高选择性和高灵敏度对血液中存在的发病标记因子,例如外泌体来源miRNA进行多重非标记检测,从而能够有效地应用于miRNA相关的疾

病诊断和临床应用。

附图说明

[0045] 图1示出了根据本发明的一个实施例的不同设计的DNA组装高级等离子体结构(DAPA)的合成。具体而言,(A)示出了设计的金纳米颗粒(AuNP)结构(顶部面板,单位,nm)和等离子体共振电场的分布(底部面板,单位, Vm^{-1}),(B)示出了针对AuNP周边的局部表面等离子体共振(LSPR)波长位移和折射率(RI)变化进行的线性拟合,(C)示出了使用不同方向的结晶技术,用 NH_3OH^+ 还原 $AuCl_4^-$,由此使Au原子结晶的过程示意图,(D)示出了分别在pH为4和5的合成条件下合成的DAPA。纳米间隙和纳米结构如EF-TEM图像(比例尺,5nm)所示生成。(E)示出了以白色点划线表示的格子内的DNA诱导的结晶(左)和高速傅里叶变换模式(右)的FE-TEM图像(比例尺,5nm)。

[0046] 图2示出了根据本发明的一个实施例的Au-桥联纳米探针的FDTD模拟结果。具体而言,(A)示出了设计的Au桥联纳米探针(顶部面板,单位,nm)和等离子体共振电场的分布(底部面板,单位, Vm^{-1});(B)示出了针对Au桥联纳米探针环境中局部表面等离子体共振(LSPR)波长的位移和折射率(RI)变化进行的线性拟合。

[0047] 图3为根据本发明的一个实施例的针对DAPA制剂的种子的全部工序,(A)为使用凝胶电泳对接合有一条单链DNA(ssDNA)和两条ssDNA的金纳米颗粒(AuNP)进行分离的结果,(B)为以2:1的体积比对一个DNA-AuNP和两个DNA-AuNP进行杂交的结果,(C)为使用凝胶电泳对DAPA的种子进行分离的结果。

[0048] 图4示出了根据本发明的一个实施例的DAPA的尺寸分布。具体而言,(A)为长度、(B)为直径、(C)为桥联直径、(D)为使用ImageJ软件测定DAPA的间隙长度的结果,这些是从200个DAPA中得到的统计结果。

[0049] 图5为根据本发明的一个实施例的局部表面等离子体共振(LSPR)实验装置的示意图。

[0050] 图6示出了根据在本发明的一个实施例的DAPA表面产生的捕获LNA探针、靶标miRNA、检测LNA探针的结合过程而产生的单DAPA的具有代表性的瑞利散射光谱。

[0051] 图7为根据本发明的一个实施例的DAPA的表征结果,(A)示出了实验测定的单DAPA($n=5$)的瑞利光散射光谱,插入:在 $100\times$ 倍率下的单DAPA的暗场像。(B)示出了通过时域有限差分法(FDTD,Finite-Difference Time-Domain)模拟算出的单DAPA的计算散射光谱,(C)示出了用于表征纵向结合偶极等离子体(LBQP)(上)和纵向结合四极等离子体(LBDP)(下)的在特定波长下被激发时的单DAPA的电荷密度分布。

[0052] 图8为构建根据本发明的一个实施例的基于单DAPA的无标记等离子体生物传感器的结果。具体而言,(A)为构成用于检测阿尔茨海默病(AD)生物标志物的基于单DAPA的等离子体生物传感器的整个实验过程的示意图。(B)示出了根据在DAPA表面产生的捕获LNA探针、靶标miRNA及检测LNA探针的结合过程而产生的单DAPA的具有代表性的瑞利(Rayleigh)光散射光谱。(1:固定于经MPTES处理的载玻片上的单DAPA;2:LNA捕获探针-接合DAPA;3:在DAPA表面形成接合有LNA捕获探针、靶标exo-miR、LNA检测探针的复合物)。

[0053] 图9为对根据本发明的一个实施例的基于单DAPA的无标记等离子体生物传感器的灵敏度进行验证的结果。示出了在 $10^0\sim 10^{10}$ aM范围的浓度下,对(A)exo-miR-125b、(B)exo-

miR-15a、以及(C) exo-miR-361的检测,并示出了LSPR峰位移与(D) exo-miR-125b、(E) exo-miR-15a、及(F) exo-miR361在 $10^1 \sim 10^9$ aM范围浓度之间的线性回归关系。误差线表示从30个DAPA的测定中得到的标准偏差。

[0054] 图10为对使用根据本发明的一个实施例的各种靶标miRNA的基于单DAPA的无标记等离子体生物传感器的选择性进行验证的结果。具体而言,示出了对(A) exo-miR-125b、(B) exo miR-15a、以及(C) exo-miR-361进行检测的结果。在 10^9 aM浓度下,使用靶标miRNA和相对于各个靶标miRNA具有单点突变的3种类型的miRNA序列,进行LSPR光谱位移的确认。误差线表示从30个DAPA的测定中得到的标准偏差。

[0055] 图11为对根据本发明的一个实施例的基于单DAPA的无标记等离子体生物传感器的灵敏度进行验证的结果。具体而言,示出了在 $10^0 \sim 10^7$ fM范围的浓度下,对(A) exo-miR-125b、(B) exo-miR-15a、及(C) exo-miR-361的检测。示出了LSPR峰位移与(D) exo-miR-125b、(E) exo-miR-15a、以及(F) exo-miR-361的浓度之间的线性回归关系在 $10^1 \sim 10^6$ fM范围。误差线表示30个DAPA测定值的标准偏差。

[0056] 图12为对使用根据本发明的一个实施例的各种靶标miRNA的基于单DAPA的无标记等离子体生物传感器的选择性进行验证的结果。具体而言,示出了对(A) exo-miR-125b、(B) exo-miR-15a、以及(C) exo-miR-361的检测。使用各个靶标exo-miR和靶标exo-miR中具有单点突变的两种类型的miRNA序列测定了LSPR光谱位移,误差线表示30个DAPA测定值的标准偏差。

[0057] 图13示出了根据本发明的一个实施例的对从血清样品中分离出的外泌体进行表征的结果,(A)为分离的外泌体的FE-TEM图像,该外泌体的尺寸分布为50~250nm的圆形,(B)和(C)分别为显示外泌体的NTA分析和DLS分析,(D)中采用全细胞裂解液(TCL)以及蛋白免疫(Western)印迹法对ALIX、CD9和钙连蛋白的表达进行了分析。作为参考,右侧给出了每个标志物的分子量。

[0058] 图14为根据本发明的一个实施例的对阿尔茨海默病患者(n=10)和HC(n=6)进行临床诊断的应用结果(***p<0.002),(D)表示个别exo-miR和(E) exo-miR组合的受试者工作特征(ROC)曲线,用于从健康对照组(HC)中区分出AD患者。

[0059] 图15为表示根据本发明的一个实施例的从AD患者(n=10)和HC(n=6)的血清中推定出的(A) exo-miR-125b、(B) exo-miR-15a、及(C) exo-miR-361的qRT-PCR相对表达水平的箱线图(*p<0.05,**p<0.02)。

[0060] 图16为显示根据本发明的一个实施例的miRNA表达水平与阿尔茨海默病临床特性(年龄和MMSE分值)之间的相关性的热图(Heat map)(*p<0.05,**p<0.01)。

[0061] 图17示出了根据本发明的一个实施例的用于从HC中区分出AD患者的(A) exo-miR-125b、(B) exo-miR-15a、及(C) exo-miR-361的受试者工作特征(Receiver operating characteristic,ROC)曲线。

具体实施方式

[0062] 下面对此进行详细说明。另外,本发明中公开的各个描述和实施方式可以相互应用到其他描述和实施方式中。也就是说,本发明中公开的各种要素的所有组合都在本发明的范围内。此外,下面记载的具体描述不能视为是对本发明的范围的限制。

[0063] 此外,本领域技术人员能够仅通过常规实验认识到或者确认本发明所记载的本发明的特定实施方式的各种等同实施方式。本发明旨在涵盖这些等同实施方式。

[0064] 本发明旨在解决蛋白免疫(Western)印迹法或qRT-PCR在检测阿尔茨海默病相关靶标生物标志物方面存在局限性的问题。

[0065] 因此,在本发明的一个实施方式中,本发明提供一种单金属-DAPA,其特征在于,包含接合有一条单链DNA的金属纳米球和接合有与其互补的两条单链DNA的金属纳米球(nanosphere),具有桥联结构,包含大于0nm且小于等于2nm的纳米间隙。

[0066] 此外,在本发明的另一个实施方式中,本发明提供一种基于单DAPA的无标记纳米等离子体生物传感器。

[0067] 具体而言,上述生物传感器可包含:基板;金属-DAPA(DNA-Assembled advanced plasmonic architecture),固定于上述基板,接合有与上述靶标生物标志物特异性结合的捕获探针;以及测定部,用于测定金属-DAPA的局部表面等离子体共振现象。

[0068] 下面,对本发明进行更详细的说明。

[0069] 在本发明中,术语“纳米等离子体生物传感器”是指能够测定等离子体的生物传感器,其中等离子体是指电子或空穴密度真空,即等离子体振荡的量子,该生物传感器包含测定部,能够测定这种金属内部的自由电子集体振荡的类似颗粒即等离子体。

[0070] 上述生物传感器的特征可为基于单DAPA的无标记(label-free)生物传感器。

[0071] 在本发明中,术语“DAPA(DNA-Assembled advanced plasmonic architecture)”是接合有DNA的高级等离子体结构的缩写。

[0072] 上述DAPA可包含3个连接有单链DNA的金属纳米球(nanosphere)。

[0073] 此外,上述DAPA可以2:1的比例包含一条单链DNA和由与其互补序列构成的两条单链DNA。

[0074] 上述一条单链DNA是指由一条链形成的DNA,接合有一条单链DNA的纳米球是指纳米球的一面接合有一条单链DNA的纳米球。

[0075] 上述两条单链DNA是指包含两个由一条链形成的DNA,两条单链DNA接合在纳米球的两端,具体而言,是呈180度接合,此时,一条单链DNA和两条单链DNA可为能够相互杂交的互补序列。

[0076] 上述接合有一条单链DNA的纳米球和接合有两条单链DNA的纳米球可以2:1的比例构成,一条单链DNA可与两条单链DNA中的一条链相互互补结合,另一条单链DNA可与两条单链DNA中剩余的一条链互补结合。

[0077] 由此,3个纳米球可通过各个DNA的互补结合进行杂交,3个纳米球形成桥联结构。

[0078] 上述DNA只要能够互补结合,即可不受限制地使用,其长度例如可为75bp至150bp,此外例如可为85bp至120bp,另外例如可为100bp,但不限于此。

[0079] 构成上述金属-DAPA的纳米球可形成桥联结构。

[0080] 上述桥联结构是指,在3个纳米球中分别包含DNA序列,通过该DNA杂交,然后结晶,并且在pH为5的条件下沿DNA方向结晶形成的桥联结构。

[0081] 上述金属-DAPA可包含纳米间隙。

[0082] 上述纳米间隙是指以纳米尺寸张开的间隙,例如可以大于0且小于等于2nm。

[0083] 上述金属可为选自金(Au)、铜(Cu)、铂(Pt)及钯(Pd)中的任一种,例如可为金,但

不限于此。

[0084] 上述金属-DAPA可接合有特异性结合于靶标生物标志物的捕获探针。

[0085] 在本发明中,术语“靶标生物标志物”是指从活体获得的分离形式的待检测或待诊断的生物标志物,例如可为DNA、miRNA或肽,此外例如可为miRNA,但不限于此。

[0086] 上述miRNA是一种微型RNA (microRNA),其为短的(20-24nt)非编码RNA,对mRNA的稳定性和翻译均有影响,并参与多细胞生物中基因表达的转录后的调控。例如上述miRNA可来源于外泌体,此外例如上述miRNA可为从患有阿尔茨海默病的个体中获得的外泌体来源miRNA。

[0087] 上述外泌体是在细胞内产生并释放到外部的一种囊泡(胞外囊泡,extracellular vesicles,EVs),是在真核生物中通过细胞间的信息交换而分泌的尺寸为50~150nm的小型泡体。

[0088] 上述外泌体来源miRNA可为exo-miR125b、exo-miR15a、exo-miR361或它们的组合,但不限于此。

[0089] 上述术语“捕获探针”可与结合探针、捕获探针等混用,其特征为可与待检测的靶标或靶标生物标志物特异性结合。

[0090] 上述捕获探针可包含DNA或LNA。

[0091] 上述术语“LNA”是为了使传感器的灵敏度和选择性进一步提高而导入的,其可包含通过邻亚甲基桥(0-methylene bridge)固定于2'-氧与4'-碳之间的嵌合核糖环(chimeric ribose ring)部分。这种LNA的结构可提高生物传感器的杂交特异性(hybridization specificity)、双链稳定性(duplex stability)及结合亲和力(binding affinity)。

[0092] 在本发明的一个具体实施方式中确认到,具有与含有两个LNA的探针完全相同的互补序列的靶标exo-miRNA与等离子生物传感器结合,由此稳定地保持夹心结构,从而稳定地提供检测信号。

[0093] 上述生物传感器可通过测定外泌体来源miRNA的特异性结合而产生的瑞利散射光谱的变化来检测外泌体来源miRNA蛋白质。

[0094] 此外,上述生物传感器的特征可为对埃摩尔量级的极少含量范围的外泌体来源miRNA进行检测。

[0095] 根据本发明的一个实施例,上述生物传感器的特征可为在低检出限下也能对外泌体来源miRNA进行检测,但不限于此。

[0096] 术语“基板”是指可固定于上述金属纳米颗粒平台、以便在显微镜下等观察的板,具体可为载玻片,但不限于此。

[0097] 在本发明的一个具体实施例中,制造金DAPA后,将其固定在基板上,将分离出的靶标生物标志物,例如包含对外泌体来源miRNA具有特异性的DNA或LNA的捕获探针进行接合来得到纳米等离子体生物传感器,并且确认到,当该纳米等离子体生物传感器注入了靶标生物标志物即外泌体来源miRNA,特别是exo-miR125b、exo-miR15a、exo-miR361或它们的组合时,可通过检测探针在埃摩尔量级的极小量级进行有效检测。

[0098] 作为另一个实施方式,本发明提供一种外泌体来源miRNA的检测方法,包含用生物标志物混合物处理基于单DAPA的无标记纳米等离子体生物传感器的步骤。

[0099] 上述术语“基于单DAPA的无标记纳米等离子生物传感器”、“外泌体”及“miRNA”同上述说明。

[0100] 在本发明中,术语“生物标志物混合物”是指混合有本发明中待检测的生物标志物的混合物,例如可为血浆、血液、或除去凝集素的血浆,此外例如上述生物标志物混合物可包含外泌体来源miRNA,另外例如可包含从患有阿尔茨海默病的个体中分离出的外泌体来源miRNA,此外例如可包含exo-miR125b、exo-miR15a、exo-miR361或它们的组合,但只要是包含本发明的待测定的miRNA的混合物,即可无限制地包含在内。

[0101] 作为又一个实施方式,本发明提供一种阿尔茨海默病的诊断方法,包含:用生物标志物混合物处理基于单DAPA的无标记纳米等离子生物传感器的步骤;以及用外泌体来源miRNA检测探针处理上述生物传感器的步骤。

[0102] 上述术语“基于单DAPA的无标记纳米等离子生物传感器”、“生物标志物混合物”、“外泌体”及“miRNA”同上述说明。

[0103] 在本发明中,术语“阿尔茨海默病”是在淀粉样蛋白级联、Tau蛋白磷酸化、神经递质、兴奋性毒性或氧化应激等各种复杂的病理学和生理学条件下诱发的一种疾病,主要病理特征为 β -淀粉样蛋白(AB)肽的大脑蓄积或Tau蛋白的神经原纤维缠结(NFT),据报道,这与在其发病过程中因神经元和突触毒性和破坏而相继产生的神经退行性机制密切相关。

[0104] 在本发明中,术语“检测探针”是能够检测与结合在生物传感器所包含的具有桥联结构的纳米球上的捕获探针互补结合的靶标miRNA的探针,例如为能够与靶标miRNA互补结合使其能够检出的探针,此外例如可为包含DNA或LNA的探针,但不限于此。

[0105] 作为又一个实施方式,本发明提供一种基于单DAPA的纳米等离子体生物传感器的制造方法,包括:(a)将一条单链DNA-金属纳米颗粒和具有与其互补序列的两条单链DNA-金属纳米颗粒以2:1的比例进行杂交,获得金属-DAPA种子的步骤;(b)对上述金属-DAPA种子进行涂敷的步骤;(c)用金属前体和还原剂对经涂敷的金属-DAPA种子进行处理而使其结晶的步骤;(d)将金属-DAPA固定于基板的步骤;(e)将特异性结合于分离的靶标生物标志物的捕获探针接合于金属-DNA组装高级等离子体结构的步骤。

[0106] 上述术语“基于单DAPA的无标记纳米等离子生物传感器”、“一条单链DNA-金属纳米颗粒”、“具有与其互补序列的两条单链DNA-金属纳米颗粒”、“杂交”、“金属-DAPA”、“捕获探针”及“基板”同上述说明。

[0107] 上述术语“涂敷”是指在物质的外表面被覆特定物质使其具有薄膜,例如可用聚乙二醇(PEG)涂敷,但不限于此。

[0108] 上述术语“结晶”是指在纳米结构合成期间用金属前体和还原剂将 AuCl_4^- 还原成Au原子使金属-DAPA结晶,相比于沿着金属NP的表面,金属结晶更可能沿着dsDNA链产生。

[0109] 此外,上述结晶可通过将pH调节到合适的范围而使得桥联结构更好地形成,例如可在pH为5的条件下进行。

[0110] 本发明提供的基于单DAPA的纳米等离子体生物传感器的制造方法还包括可在上述(d)步骤之前,用(3-巯基丙基)三甲氧基硅烷((3-Mercaptopropyl) trimethoxysilane, MPTES)涂敷基板的步骤。

[0111] 作为又一个实施方式,本发明提供一种单金属-DAPA的制造方法,包括如下步骤:(a)将一条单链DNA-金属纳米颗粒和具有与其互补序列的两条单链DNA-金属纳米颗粒以2:

1的比例进行杂交,获得金属-DAPA种子的步骤;(b)对上述金属-DAPA种子进行涂敷的步骤;以及(c)用金属前体和还原剂对上述经涂敷的金属-DAPA种子进行处理而使其结晶的步骤。

[0112] 上述术语“基于单DAPA的无标记纳米等离子生物传感器”、“一条单链DNA-金属纳米颗粒”、“具有与其互补序列的两条单链DNA-金属纳米颗粒”、“杂交”、“金属-DAPA”、“涂敷”及“结晶”同上述说明。

[0113] 作为又一个实施方式,本发明提供一种单金属-DAPA的用途,上述单金属-DAPA的特征在于包含接合有一条单链DNA的金属纳米球及接合有与其互补的两条单链DNA的金属纳米球(nanosphere),并且包含大于0且小于等于2nm的纳米间隙。

[0114] 上述术语“接合有一条单链DNA的金属纳米球”、“接合有与其互补的两条单链DNA的金属纳米球”、“纳米间隙”及“单金属-DAPA”同上述说明。

[0115] 以下通过实施例对本发明进行更详细的说明。本领域技术人员应当理解,这些实施例仅用于说明本发明,本发明的范围不应被解释为受这些实施例的限制。因此,本发明的实质范围将由所附权利要求及其等同物来定义。

[0116] 实验例1:材料

[0117] 无水乙醇(Anhydrous ethyl alcohol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, $\geq 99.5\%$)、双(对磺酰苯基)苯基膦化二钾盐二水合物(bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphine dihydrate dipotassium salt, BSPP)、1,4-二硫苏糖醇(1,4-dithiothreitol, DTT)、乙酸乙酯(ethyl acetate, 无水, 99.8%)、乙醇胺、氯化金(III)三水合物($\geq 99.0\%$)、盐酸(HCl, 水中含量 37wt%)、(3-巯基丙基)三甲氧基硅烷((3-mercaptopropyl)trimethoxysilane, MPTES)、十二烷基硫酸钠(SDS)、氯化钠(NaCl)购自西格玛奥德里奇公司(SIGMA-ALDRICH, 韩国)。甲氧基聚乙二醇-硫醇(Methoxypolyethylene glycol-thiol, mPEG-SH)购自未来化学公司(Futurechem, 韩国)。

[0118] 金纳米种子(Gold nanoseed, AuNS; 15nm)溶液购自英国Biocell国际(British BioCell International)。盐水柠檬酸钠(SSC)缓冲液, 5×TBE缓冲液及焦碳酸二乙酯(DEPC)处理液购自韩国生物世界(Biosesang)。盖玻片(22×40×0.1mm)购自德国德科玻璃(Deckglaser), DNALoBind管购自德国艾本德公司(Eppendorf)。捕获/检测DNA探针((Capture/Detection DNA probe)、靶标miRNA(target miRNA)及单点突变miRNA(single point mutated miRNA)购自韩国生物先驱(Bioneer)。整套外泌体RNA分离试剂盒(Total Exosome RNA Isolation kit)购自美国赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific)。健康对照组血清及AD患者血清购自美国PrecisionMed公司。全部溶液使用超纯水($18.2\text{m}\Omega\text{cm}^{-1}$)配制。

[0119] 实验例2:制造单链DNA(ssDNA)接合金纳米颗粒(AuNP)

[0120] 将AuNPs(15nm)的100mL溶液与330mg双(对磺酰苯基)苯基膦化二钾盐二水合物(BSPP)混合, 孵育过夜。然后, 将上述溶液与15.0g的NaCl混合, 在500×g离心30分钟后, 去除上清液, 将沉淀物再悬浮于1mL的BSPP(0.5mM)溶液和0.5mL的MeOH中。将AuNP再次离心(500×g, 30分钟)后, 溶解于1mL包含0.5mM BSPP的0.5×TBE缓冲液中。使用紫外-可见-近红外分光光度计(UV-3600; 岛津, 日本京都)测定回收的AuNPs的光密度。将100-bp的5'硫醇-突变核苷酸(thiol-modified nucleotides)用DTT溶液处理15分钟后, 使用乙酸乙酯分离3次。然后, 将膦稳定化的AuNP在25℃于包含40mM NaCl的0.5×TBE缓冲液中以1:2.5的摩

尔比与ssDNA一起孵育过夜。然后,在75V、3.0%琼脂糖凝胶中,使用凝胶电泳对ssDNA-接合AuNP进行1小时分离。剪取包含AuNP-1DNA和AuNP-2DNA的条带在 $0.5 \times$ TBE缓冲液中洗脱几天。将洗脱得到的产物在10000rpm浓缩30分钟,在450nm测定吸光度,计算纳米颗粒的浓度。

[0121] 实验例3:从临床样品中分离外泌体miRNA

[0122] 将血清试样上样,按照基本流程使用PBS缓冲液进行洗脱过程。使用Amicon Ultra 0.5mL离心过滤器(Merck Millipore)将分离的外泌体浓缩至最终体积为200 μ L,并用生物高压电子显微镜(JEM-1400 Plus at 120kV和JEM-1000BEF at 1000kV;JEOL Ltd.,日本)对外泌体的形态进行确认。按照手册使用总外泌体RNA和蛋白质分离试剂盒(英杰公司,美国)分离血清来源外泌体miRNA,使用纳米液滴分光光度计(nanodrop spectrophotometer, NANODROP2000,赛默飞世尔科技,美国)测定外泌体(exosomal)miRNA的浓度。

[0123] 实验例4:定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)分析

[0124] 使用qRT-PCR推定6名健康对照组(HC)和10名AD患者的血清来源外泌体miRNA含量。用TaqMan miRNA逆转录试剂盒(赛默飞世尔科技,美国)将总RNA(2ng/ μ L)在16 $^{\circ}$ C逆转录30分钟、在42 $^{\circ}$ C逆转录30分钟、在85 $^{\circ}$ C逆转录5分钟、在4 $^{\circ}$ C逆转录5分钟,得到cDNA。实时qPCR是使用TaqMan miRNA分析试剂盒(赛默飞世尔科技,美国)和Applied Biosystems StepOnePlus实时PCR系统(应用生物系统,Applied Biosystems)在95 $^{\circ}$ C进行10分钟、接着在95 $^{\circ}$ C进行15秒、然后在60 $^{\circ}$ C进行1分钟42个循环(cycle)。周期阈值(Ct)的值使用SDS程序(v2.0.1;Applied Biosystems)生成,靶标外泌体miRNA的相对表达水平使用内部标准化对照组(U6)标准化后计算。

[0125] 实验例5:统计分析

[0126] 用OriginPro 8软件(OriginLab)使用Pearson相关性考察AD相关临床参数(年龄和MMSE)与miRNA表达水平之间的相关性。依据标准双样本T检验计算相关性的统计显著性。 $p < 0.05$ 视为具有统计显著性。

[0127] 实施例1:使用时域有限差分法(finite-difference time-domain,FDTD)模拟设计DAPA

[0128] 为了计算散射光谱和电场(EF),使用Lumerical FDTD解决方案程序(Lumerical公司,加拿大不列颠哥伦比亚省温哥华)进行FDTD模拟。

[0129] AuNP是在基于单纳米颗粒(NP,nano particle)的等离子体生物传感器中将生物分子分析物和固定于NP表面的受体之间的结合转换为物理学及电化学信号,由此进行高效的信号转换。尺寸、形状及长宽比等NP的结构参数及几何参数对等离子体生物传感器的光谱灵敏度具有很大的影响。对于AuNP,由于纵向等离子体会吸收更多的光从而提高EF,所以与球形NP相比,其RI灵敏度更高。因此,基于条形结构进行DAPA的设计。

[0130] 具体而言,利用金(Au)板(直径11.2nm)连接3个金纳米球(AuNS,每个直径为15.8nm),最终制作出长宽比(AR)为3.04的DAPA。

[0131] 然后,为了大幅提高等离子体结构的光谱灵敏度,在条形结构内部制作出两条窄的纳米间隙(2nm)。

[0132] 为了说明在上述制作出的本发明的DAPA和电场(EF)分布中纳米间隙的等离子体结合效果,制作了具有间隙的纳米球、具有间隙的金属纳米棒(AuNR;AR 3.04)、不具有桥联结构的3个纳米球及具有桥联结构的纳米探针,对本发明的DAPA与其他Au纳米结构的EF分

布进行了比较。入射光的波长范围设定为400-1000nm,网格尺寸设定为0.5nm,灵敏度通过将周围介质的RI从1.333变更至1.45进行确定。

[0133] 由图1和图2可以看出,由于本发明的Au-DAPA通过生成纳米间隙对入射光进行了压缩,使得Au-DAPA的整体表面显现出了强的EF分布,并且形成了电磁场能量强度扩大至数十倍的热点。特别是2nm以下的纳米间隙,在分析如DNA、miRNA或肽这样的小尺寸的生物分子方面具有巨大的潜力,即使是纳米间隙内的小的变化,也能在纳米间隙区域的局部光场的作用下使等离子体共振位移大幅扩大。

[0134] 接下来,通过模拟环境RI变化下的散射峰的位移评价本发明的Au-DAPA的RI灵敏度(图1的B)。根据报告,由于基于单NP的等离子体生物传感器能够通过因对RI的局部变化的反应引起的散射峰位移来检测靶标生物标志物,所以散射峰的RI灵敏度直接关系到等离子体生物传感器的检测灵敏度。

[0135] 作为其结果,由图1的B可以看出,与已知的显示出强的RI灵敏度的纳米棒(nanorod)结构相比,Au-DAPA的RI灵敏度提高了1.66倍,由图2的B可以看出,与2个纳米球桥联的结构相比,3个纳米球桥联的本申请发明的Au-DAPA结构具有更高的RI灵敏度。

[0136] 由此可知,本发明的一条ssDNA-AuNP和具有与其互补序列的两条ssDNA-AuNP以2:1的比例进行杂交而制作出的本发明的Au-DAPA结构具有最高的RI灵敏度,在纳米等离子体生物传感器中能够更有效地使用。

[0137] 实施例2:合成DAPA (DNA-Assembled advanced plasmonic architecture)

[0138] 将一条单链DNA-金纳米颗粒(一条ssDNA-AuNP)和具有与其互补序列的两条单链DNA-金纳米颗粒(两条ssDNA-AuNP)以2:1的比例进行杂交后,在37℃培养3小时得到DAPA的种子(seed)。将上述种子在100V、2.0%琼脂糖凝胶中使用凝胶电泳进行20分钟纯化。将包含上述种子的条带浸渍在包含100mM NaCl的0.5×TBE缓冲液中,然后在25℃历时16小时用摩尔比1:100的中性聚乙二醇(PEG)对种子表面进行涂敷。然后分别历时1小时和3小时将上述种子(0.5nM)与4.5μL的金前体和7.90μL的还原剂进行轻微搅拌。分别将金前体(HAuCl_4 , 0.03%)和还原剂($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, 1mM)溶液调节至pH为4.0和pH为5.0,然后将得到的最终产物在8000rpm清洗30分钟并再悬浮于超纯水中。

[0139] 然后,通过FDTD模拟确认事先设计并合成的DAPA是否实际具有改善的光学特性。通过100bp单链DNA(ssDNA)与15nm球形AuNP相结合的两种类型的ssDNA-AuNP(一条ssDNA-AuNP和两条ssDNA-AuNP)的杂交过程制造DAPA的种子(图3),之后,用PEG对种子的AuNP表面进行改性。杂交之后的种子的双链DNA(dsDNA)会提供方向特异性导向,涂有PEG的AuNP在胶体纳米结构的合成期间会起到降低将 AuCl_4^- 还原成Au原子所需的活化能的作用。因此,相比于沿着AuNP的表面,会更快地沿着dsDNA链产生Au结晶。此外,由于DNA的表面电荷会受到pH的影响,所以确认了不同pH条件下的DAPA合成状态。结果由图1的C可以看出,在pH为5的条件下,dsDNA的等电点(pI)在4.0至4.5之间,双链DNA(dsDNA)略微带有负电荷。从结果来看, AuCl_4^- 离子与围绕dsDNA的高浓度 NH_3OH^+ 离子反应,进而从AuNP/DNA界面开始Au结晶,然后沿着dsDNA轮廓生长(图1的C)。另一方面,在pH为4的条件下,结晶反应不完全,在AuNS之间留有0.96nm的间隙。

[0140] 通过这样的方法,最终确认到,均匀地合成了具有如下形态的本发明的Au-DAPA:长度 $48.00 \pm 0.66\text{nm}$ 、直径 $15.79 \pm 0.30\text{nm}$ 、桥直径 $11.20 \pm 0.59\text{nm}$ 、间隙 $2.00 \pm 0.07\text{nm}$ (图1

的D,图4)。

[0141] 对于作为DNA-定向(directed)区域的桥,可以看出在Au的FCC(Face-Centered Cubic,面心立方)结晶结构的生长方向,沿着晶格纹路显现出 $0.204 \pm 0.005\text{nm}$ 的晶格面间距(图1的E)。

[0142] 然后,为了表征DAPA,取 $10\mu\text{L}$ 的样品滴加到400目铜网(F/C, Ted Pella, Inc., 美国加利福尼亚州雷丁)中,在 25°C 干燥过夜。使用能量过滤TEM(EF-TEM; LIBra 200FE, Carl Zeiss AG, 德国)得到DAPA的图像。使用ImageJ软件对包括长度、直径、桥直径及间隙长度在内的DAPA的形态进行了分析。使用场发射TEM(FE-TEM; Tecnai G2 F30ST, FEI公司, 美国)确认了DAPA的结晶结构。

[0143] 首先,为了确认DAPA的光学特性,使用实验装置测定了单DAPA的散射光谱(图5和图6)。结果由图6可以看出,在单DAPA的散射光谱的 590nm 和 460nm 附近可以确认到与具有相同AR的纳米棒结构类似的两个特征峰(图6)。特别是以窄的纳米间隙结构为特征的DAPA,其在等离子体耦合效应的作用下,显现出了散射光谱的显著强度。此外,基于在 $589.81 \pm 0.75\text{nm}$ 处产生的个别DAPA的LSPR峰值位置的一致性可知,合成的颗粒的尺寸和形态实质上非常均匀(图7的A)。

[0144] 然后,为了确认实验测定的光谱是否准确,使用FDTD模拟进一步计算了单DAPA的散射光谱。结果由图7的B可以看出,计算得到的瑞利(Rayleigh)散射光谱与实验测定的光谱非常一致(图7的B)。DAPA中算出的电荷密度表明,较长波长区域(589nm)属于纵向结合偶极等离子体(longitudinal bonding quadrupole plasmon, LBDP)模式,而 510nm 峰归属于纵向结合四极等离子体(longitudinal bonding dipolar plasmon, LBQP)模式(图7的C)。但是,由于四极励磁响应(quadrupole excitation response)是与入射光弱结合的亚辐射(sub-radiant)模式,所以与偶极条带(dipolar band)相比,没有实现清晰的观察。基于这种结果,可以确认本发明的DAPA的均匀性和信号再现性能够充分适用于传感材料。

[0145] 实施例3:制作基于单DAPA的无标记(label-free)等离子体生物传感器

[0146] 为了检测基于单DAPA的AD生物标志物,制作了无标记,即没有标记的等离子体生物传感器。

[0147] 具体而言,为了制作基于DAPA的无标记等离子体生物传感器,将 $10\mu\text{L}$ 的DAPA溶液(0.01)滴加到经MPTES处理后的显微镜盖玻片上,在 25°C 干燥2小时。然后将固定DAPA的盖玻片插入成像室(RC-30, 华纳仪器公司, 美国康涅狄格州哈姆登镇),然后插入暗场显微镜支架(Marzhauser Sensotech, 德国韦茨拉尔市),固定于注射泵(PHD2000, 哈佛仪器公司, 美国马萨诸塞州霍利斯顿镇)。然后,为了除去未固定的DAPA和污染物质,历时1小时,以 $160\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 向室内注入超纯水(ultra-pure water)。为了用22-bp(碱基对)DNA或LNA捕获探针对DAPA的表面进行改性,将上述捕获探针($1\mu\text{M}$) 在 30°C , $3 \times \text{SSC}/0.04\%$ SDS中培养6小时后,用清洗溶液($2 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS)以 $160\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 历时5分钟除去未结合的捕获探针。为了抑制非特异性结合,用 0.1M 乙醇胺对DAPA的非反应性表面进行30分钟处理后,用清洗液清洗。接着,将 $5 \times \text{SSC}/\text{DEPC}$ 处理水中所含的exo-miR注入到捕获探针(capture probe)-连接(conjugated)DAPA中,在 42°C 的培养箱(FINEPCR, 韩国首尔)中孵育16小时。使用在 42°C 预热的清洗液除去未杂交的exo-miR(exo-miR)。最后,将检测探针($1\mu\text{M}$) 在 $5 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS/DEPC处理缓冲液中,在 60°C 培养4小时,历时5分钟用 $2 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS/DEPC-处理缓冲

液除去过量的检测探针。各个孵育步骤后,利用分光光度计 (Microspec 2300i, Roper Scientific, 法国) 和电荷耦合器件 (CCD) 相机 (PIXIS, 400B, 普林斯顿仪器公司, 美国) (Song et al., 2020), 在白光源 (100W 卤素光源, Type 7724, 飞利浦)、70℃ 下测定单DAPA的清洗的瑞利散射光谱的变化。用OriginPro8软件 (OriginLab, 北安普顿, 美国), 使用洛伦兹式 (Lorentzian) 算法 ($\lambda_{\max}$ (反应后) - $\lambda_{\max}$ (反应前)), 计算上述LSPR光谱变化。

[0148] 另一方面, 对于血液来源exo-miR-125b、-15a、-361, 目前用于阿尔茨海默病诊断的诊断用生物标志物正备受瞩目, 因此被用作阿尔茨海默模型分析物质。在阿尔茨海默病患者的血清中, 这些分析物质的高度上调与Tau蛋白磷酸化和促进细胞凋亡等阿尔茨海默病的发病机制显著相关, 因此在本发明的等离子体生物传感器设计为: 应用三明治分析原理在DAPA表面形成捕获探针/靶标exo-miR/检测探针复合物以实现靶标miRNA的检测 (图8的A)。

[0149] 此外, 为了进一步提高传感器的灵敏度和选择性, 导入了LNA探针。包含通过邻亚甲基桥 (0-methylene bridge) 固定于2'-氧与4'-碳之间的嵌合核糖环 (chimeric ribose ring) 部分的LNA的结构有助于提高生物传感器的杂交特异性 (hybridization specificity)、双链稳定性 (duplex stability) 和结合亲和力 (binding affinity)。

[0150] 因此, 本发明的等离子体生物传感器会与具有同两个探针完全一致的互补序列的靶标miRNA结合, 并由此稳定地维持三明治结构, 从而稳定地提供检测信号。关于本发明中使用的靶标miRNA和捕获/检测探针序列的详细信息如下表1所示。

[0151] 表1

[0152] 靶标miRNA、LNA捕获/检测探针以及DNA捕获/检测探针的碱基序列信息

指定名称		序列 (5' → 3')	长度 (bp)	T _m (°C)
miRNA	miR-125b	UCCUGAGACCCUAAUCUGUGA	22	
	miR-125b A	UCCUGAGACCCUAAUCUGAGA	22	
	miR-125b B	UCGUGAGACCCUAAUCUGUGA	22	

[0153]

	miR-125b C	UCCUGAGACCGAACUGUGA	22	
	miR-15a	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	22	
	miR-15a A	UAGCAGCACAUAAUGGUUCUG	22	
	miR-15a B	UACCAGCACAUAAUGGUUUGUG	22	
	miR-15a C	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	22	
	miR-361	UUAUCAGAAUCCAGGGGUAC	22	
	miR-361 A	UUAUCAGAAUCCAGGGGAAC	22	
	miR-261 B	UUCUCAGAAUCCAGGGGUAC	22	
	miR-361 C	UUAUCAGAAUCCAGGGGUAC	22	
LNA 捕获探针	miR-125b	Thiol-TC*AC*AA*G*TTA*G	11	71.0
	miR-15a	Thiol-CA*C*AAAC*C*ATT	11	73.0
	miR-361	Thiol-GTACC*CCTGGA	11	72.0
LNA 检测探针	miR-125b	GGTC*TCAGG*GA	11	71.0
	miR-15a	ATG*TGC*TG*CTA	11	72.0
	miR-361	GATT*C*TG*AT*AA	11	71.0
DNA 捕获探针	miR-125b	Thiol-TCACAAGTTAG	11	
	miR-15a	Thiol-CACAAACCATT	11	
	miR-361	Thiol-GTACCCCTGGA	11	
DNA 检测探针	miR-125b	GGTCTCAGGGA	11	
	miR-15a	ATGTGCTGCTA	11	
	miR-361	GATTCTGATAA	11	

[0154] 以*表示的核苷酸是被LNA取代的核苷酸

[0155] 同时,由于与LBQP模式相比,LBDP模式对DAPA周围介质的介电常数的改变更加敏感,对单DAPA的LBDP峰进行了分析,并对杂交反应过程进行了监控以确认该平台的有效性(图6)。

[0156] 结果由图8的A可以看出,5'末端被硫醇基(-S)改性的捕获探针在固定于盖玻片上的DAPA表面形成共价结合(Au-S)(图8的B的1~2步骤)。平台上产生的 $16.53 \pm 0.76 \text{ nm}$ 的LSPR红移 λ_{max} 表示捕获探针已成功地结合于DAPA表面。之后,诱导特异性杂交,在DAPA表面依次添加靶标miRNA和检测探针。探针通过氢键和 π 检测堆叠与靶标miRNA结合,产生 $21.49 \pm 0.95 \text{ nm}$ 的饱和LSPR红移 λ_{max} (图8的B的2-3步骤)。这种结果表示,捕获/检测探针已完美地与血清内靶标exo-miR杂交,在单DAPA表面形成了稳定的三明治结构。

[0157] 由此可以确认,本发明的等离子体生物传感器即使不经标记过程也可有效地检测出复杂样品中存在的miRNA。

[0158] 实施例4:验证基于单DAPA的无标记等离子体生物传感器的性能

[0159] 通常,生物传感器的定性和定量分析过程会很大程度上受到分析物质的浓度、设备灵敏度、检出限、线性度和选择性等各种参数的影响。其中,作为传感器的关键性能特性的检出限(LOD)体现的是能够稳定地检测出靶标分子的分析物的最低浓度,因此需要进行

验证。特别是需要检测人体生物样品中以极低浓度存在的生物标志物的生物传感器必须具有比靶标生物分子更低的LOD和更宽的动态范围。

[0160] 在这一方面,为了定量确认本发明的等离子体生物传感器的灵敏度,通过改变模拟血清中exo-miR-125b、-15a及-361这三种模型分析物的浓度,测定了LSPR信号的变化(图9的A-C)。确认到各靶标exo-miR虽然顺序不同,但在 10^1 至 10^9 aM的范围,LSPR红移 $\lambda_{\max}$ 与浓度对数之间具有强的线性关系(图9的D-F)。

[0161] 这里,线性回归方程如下进行计算:

[0162] (1) exo-miR-125b的情况下, $y=2.2911\log(x)+0.254$ ($R^2=0.996$);

[0163] (2) exo-miR-15a的情况下, $y=2.3191\log(x)+0.115$ ($R^2=0.993$);

[0164] (3) exo-miR-361的情况下, $y=2.3361\log(x)+0.320$ ($R^2=0.995$),

[0165] 式中,x为各exo-miR的浓度,决定系数(R^2)的值大于0.99。

[0166] 基于上述方程,等离子体传感器对AD生物标志物的LOD值的计算结果分别为:exo-miR-125b是10.54、-15a是13.53、以及-361是11.10aM。这些值比阿尔茨海默病患者的血液中miRNA表达水平和之前报道的miRNA检测LSPR传感器低 $10^3\sim 10^4$ 倍(表2)。

[0167] 表2

[0168] 本发明的基于DNA组装高级等离子体结构(DAPA)的等离子体生物传感器与现有公知的其他传感器的感知性能比较

[0169]

方法	靶标	LOD	动态范围	样品类型	疾病
LSPR	miR-125b	10.54 aM	10 aM - 1 aM	血清	AD
	miR-15a	13.53 aM			
	miR-361	11.10 aM			
LSPR	miR-10-b	2.45 pM	5 pM- 10pM	DSN	胃癌
LSPR	miR-let-7a	13.00 fM	nM-50nM	PBS	胃癌
LSPR	miR-205	5.00 pM	0pM-1 μ M	血清	肝癌
LSPR	miR-27a	16.50 fM	00fM-3pM	PBS	乳腺癌
EIS	miR-137	1.70 fM	fM-750fM	血清	AD
EIS	miR-34a	261.7 nM	nM-1.45 μ M	PBS	AD
FRET	miR-29a	745 pM	nM-20nM	血清	AD
荧光及GO	miR-137	82 pM	0.05nM-5 nM	血清	AD
	miR-142				

[0170] *LSPR:局部表面等离子共振;EIS:电化学阻抗谱;FRET:荧光共振能量转移;GO:氧化石墨烯;DSN:双链特异性核酸酶。

[0171] 人们已在人类血液中鉴定出超过17000种成熟miRNA,其家族组之间仅存在1或2个核苷酸差异。因此,分析miRNA的传感器必须还能够识别出这种具有高度同源性的miRNA之间的单核苷酸差异。在这一方面,为了考察本发明的生物传感器的选择性,准备了相对各个miRNA在3'-末端(类型A)、5'-末端(类型B)和中间(类型C)具有单点突变的3个额外miRNA。

分析3个靶标exo-miR序列(表1)中传感器表面生成的信号。结果,具有与捕获探针及检测探针的序列完全互补序列的靶标exo-miR在传感器表面显现出约21.00nm的LSPR信号位移,与之相对,为使其具有点突变而准备的exo-miR中则确认到了序列的不一致。捕获探针及检测探针的结合部位产生了小于2.00nm的微小LSPR红移 $\lambda_{\max}$ (图10)。这一结果表明,本发明的基于单DAPA的等离子体生物传感器不会受到血液中干扰物质的干扰,在埃摩尔量级也能够准确检测出靶标exo-miR。

[0172] 其原因推测为:i) DAPA的2.0nm窄间隙能够提高纳米结构表面的EF,并且增强RI灵敏度;ii) 与传统的DNA探针相比,导入LNA探针能够使DAPA的亲力和选择性大幅提高。可以看出,与应用现有的DNA探针的生物传感器的LOD相比,本发明生物传感器的LOD最小低至768倍(图11),此外,与DNA探针相比,能够更准确识别靶标miRNA(图12)。该结果表明,本发明的等离子体生物传感器能够在阿尔茨海默病的诊断中应用于临床。

[0173] 实施例5:临床诊断上的应用

[0174] Exo-miR直接反映大脑的生理学状态,在大脑和人体体液(例如CSF、血清、血浆和尿)中有高的表达。因此,外泌体的血液来源miRNA具有在阿尔茨海默病的诊断、预后及治疗中作为生物标志物使用的巨大潜力。为了评价传感器的临床应用可行性,在从10名阿尔茨海默病患者和6名健康对照组(HC)分离出的外泌体中对3个靶标miRNA的表达水平进行了分析。关于这些AD和HC患者的详细信息如下表3所示。

[0175] 表3

[0176] 阿尔茨海默病(AD)患者及健康对照组(HC)信息

[0177]

患者编号	类型	性别	种族	年龄	MMSE 分值	ADAS	CDR	诊断
8148	血清	M	白种人	80	19	52	2	AD
8238	血清	M	白种人	80	15	52	1	AD
8327	血清	F	白种人	71	19	32	0.5	AD
8339	血清	F	白种人	72	14	53	2	AD
8377	血清	M	白种人	79	17	31	1	AD
8420	血清	F	白种人	73	19	27	1	AD
8464	血清	F	白种人	76	16	32	1	AD
8471	血清	M	白种人	76	20	30	1	AD
8566	血清	F	白种人	74	16	43	1	AD
8567	血清	F	白种人	69	21	33	1	AD
8201	血清	F	白种人	73	30			HC
8204	血清	M	白种人	73	30			HC
8210	血清	M	白种人	65	30			HC
8212	血清	F	白种人	70	30			HC
8213	血清	M	白种人	73	30			HC
8218	血清	F	白种人	67	30			HC

[0178] MMSE:最低精神状态测试;最大分值为30分(20-24:轻度痴呆;13-20:中度痴呆;<12:重症痴呆)。

[0179] ADAS:阿尔茨海默病评定量表,最大分值为70分(分值越高(≥ 18),越表示具有认知障碍)。CDR:临床痴呆等级,最大分值为3分(0:无痴呆;0.5:疑似痴呆;1:轻度认知障碍;2:中度认知障碍;3:重症认知障碍)。

[0180] 对外泌体进行表征,确认外泌体是否从血清样品中得到了合适的分离。使用TEM、纳米颗粒跟踪分析(NTA)和动态光散射(DLS)技术测定分离的外泌体的形态。结果,其形态为30~150nm范围的尺寸的圆形(图13的A-C)。通过蛋白免疫(Western)印迹法确认外泌体膜上的外泌体特异性标志物(CD9和ALIX)的表达(图13的D)。

[0181] 之后,按照操作手册(Methods in support information),利用总外泌体RNA和蛋白质分离试剂盒分离外泌体的miRNA。使用现有的标准qRT-PCR和本发明的等离子体生物传感器测定AD组和HC组之间的3种靶标生物标志物的表达水平差异。使用曼-惠特尼(Mann-Whitney)U测试确定统计显著性。

[0182] 结果由图14可以看出,AD组的平均LSPR红移 λ_{max} 为2.09(exo-miR-125b, $p=0.0014$)、2.53(exo-miR-15a, $p=0.0014$)和3.85(exo-miR-361, $p=0.0012$ 倍高)。该结果表明,与HC组相比,3个exo-miR的LSPR红移可用于准确地将AD患者与HC进行区分(图14的A-C)。

[0183] 同样地,用qRT-PCR测定的3种生物标志物的相对表达水平也显现出与本发明的生物传感器相似的倾向。但是,可以看出,与本发明的生物传感器相比,其统计显著性相对较低($p<0.05$) (图15)。

[0184] 最后,确认了3种exo-miR的相对表达水平与AD相关参数之间的相关性。确认结果,3个生物标志物呈现出了与年龄和量的相关性,并与简易智能评估(mini-mental state测试,MMSE)分值显示出具有强的负相关性(图16)。之后,分析各生物标志物的ROC(接收器工作特性)曲线值,推定诊断效果。ROC分析是用于评价传感器的灵敏度、选择性及准确度等诊断测试性能的标准统计学近似手段。曲线下面积(AUC)是表示准确的临床预测的接近于1.0的值,量化了传感器的诊断准确度。

[0185] 结果,对于3个生物标志物,本发明的基于DAPA的等离子体生物传感器的AUC值均高于0.96(图14的D),而传统的qRT-PCR方法能算出0.78至0.84范围的较低的AUC值(图17)。

[0186] 此外,本发明的生物传感器能够使用个别exo-miR生物标志物以83.33%的平均灵敏度、90.00%的选择性和97.83%的准确度成功地区分出阿尔茨海默病患者与HC,其中,exo-miR-361(AUC:0.9750)是用于AD诊断的最佳单生物标志物(表4)。

[0187] 表4

[0188] 使用基于单DAPA的无标记等离子体生物传感器的诊断性能总结

生物标志物	临界值 (nm)	灵敏度 (%)	选择性 (%)	准确度 (%)	AUC
Exo-miR-125b	≥ 4.10	83.33	90.00	97.83	0.9667
Exo-miR-15a	≥ 4.05	83.33	90.00	97.83	0.9667
Exo-miR-361	≥ 5.05	83.33	90.00	97.83	0.9750
Exo-miR-125b + Exo-miR-15a	≥ 4.05	83.33	90.00	97.83	0.9688

[0189]

Exo-miR-125b + Exo-miR-361	≥ 4.60	91.67	95.00	99.52	0.9813
Exo-miR-15a + Exo-miR-361	≥ 4.60	91.67	90.00	99.00	0.9729
Exo-miR-125b + Exo-miR-15a + Exo-miR-361	≥ 4.60	94.44	90.00	99.35	0.9759

[0190] *灵敏度=真正值/总正值,选择性=真负值/总负值,准确度=总正值/总值

[0191] 然而,由于阿尔茨海默病发病的复杂性,在从认知上的正常人中预测出罹患阿尔茨海默病的危险性增加的个体方面,与单生物标志物相比,评价生物标志物的组合更加有效。因此,为了准确地诊断阿尔茨海默病,研究了exo-miR生物标志物的组合。

[0192] 结果由图14的E可知,exo-miR-125b和exo-miR-361的组合以0.9813的AUC、91.67%的灵敏度、95.00%的选择性、99.52%的准确度显示出了最优的AD诊断性能(图14的E)。

[0193] 该结果表示,利用本发明的基于DAPA的等离子体生物传感器对临床样品中的exo-miR-125b、15a及-361的表达水平进行定量,能够以97.83%以上的准确度判别出阿尔茨海默病患者。

[0194] 综上,本发明的基于DAPA的等离子体生物传感器中,由DAPA的窄的纳米间隙(2nm)产生等离子体耦合效应使传感器能够在埃摩尔量级以超高灵敏度进行miRNA检测,此外,通过DAPA表面上发生的LNA探针与靶标miRNA之间的杂交反应,能够识别出miRNA间的单核苷酸差异。

[0195] 特别是在临床血清中验证了针对3种不同类型的exo-miR(miR-125b、-15a和-361)的基于DAPA的传感器的临床关联性,并且确认了具有这样的临床灵敏度、选择性和准确度的传感器的各个exo-miRNA均充分适用于临床。可以看出,其中,exo-miR-125b和-361的组合表现出了最佳的诊断性能,以99.52%的准确度区分出阿尔茨海默病患者和HC患者。

[0196] 该结果表示,进行exo-miR分析的本发明的基于DAPA的等离子体生物传感器能够在临床上通过外泌体miRNA分析对痴呆进行早期诊断和预测痴呆的疾病进展,是一种有前景的候选方法。

[0197] 如上所述,对本发明的特征部分进行了详细描述。本领域普通技术人员应当理解,这些具体技术仅为优选的实施例,本发明的保护范围不限于此。因此,本发明的实质性范围由所附权利要求及其等价物限定。

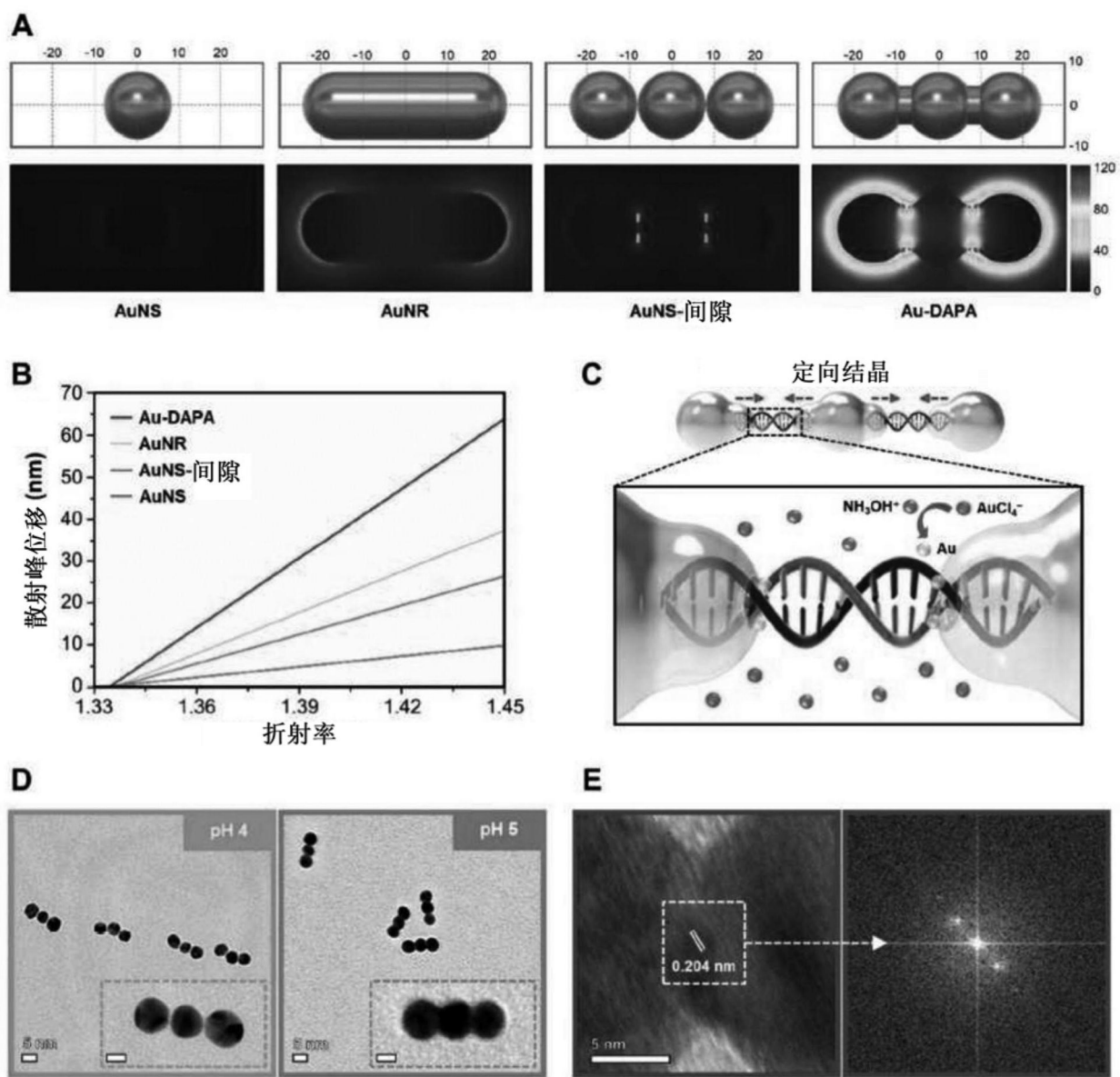


图1

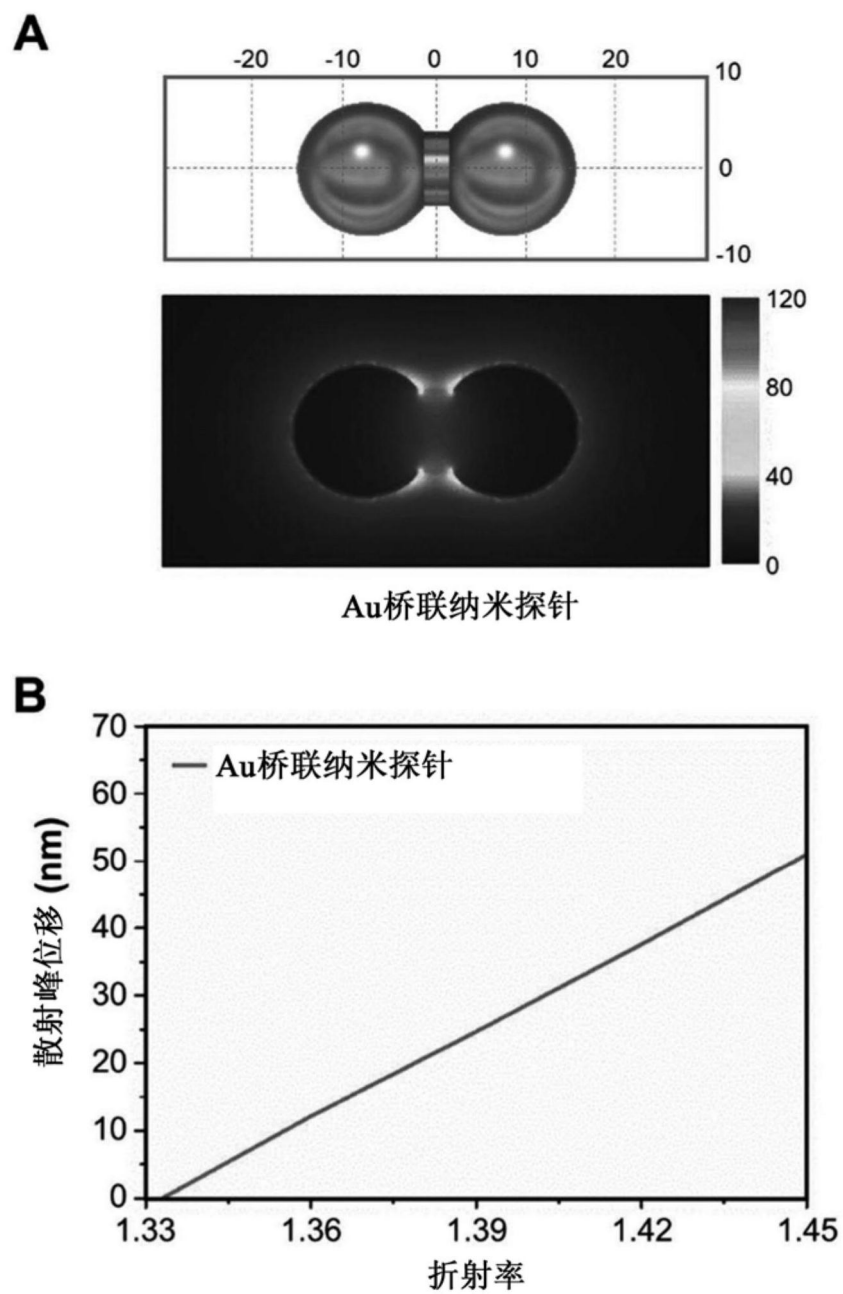


图2

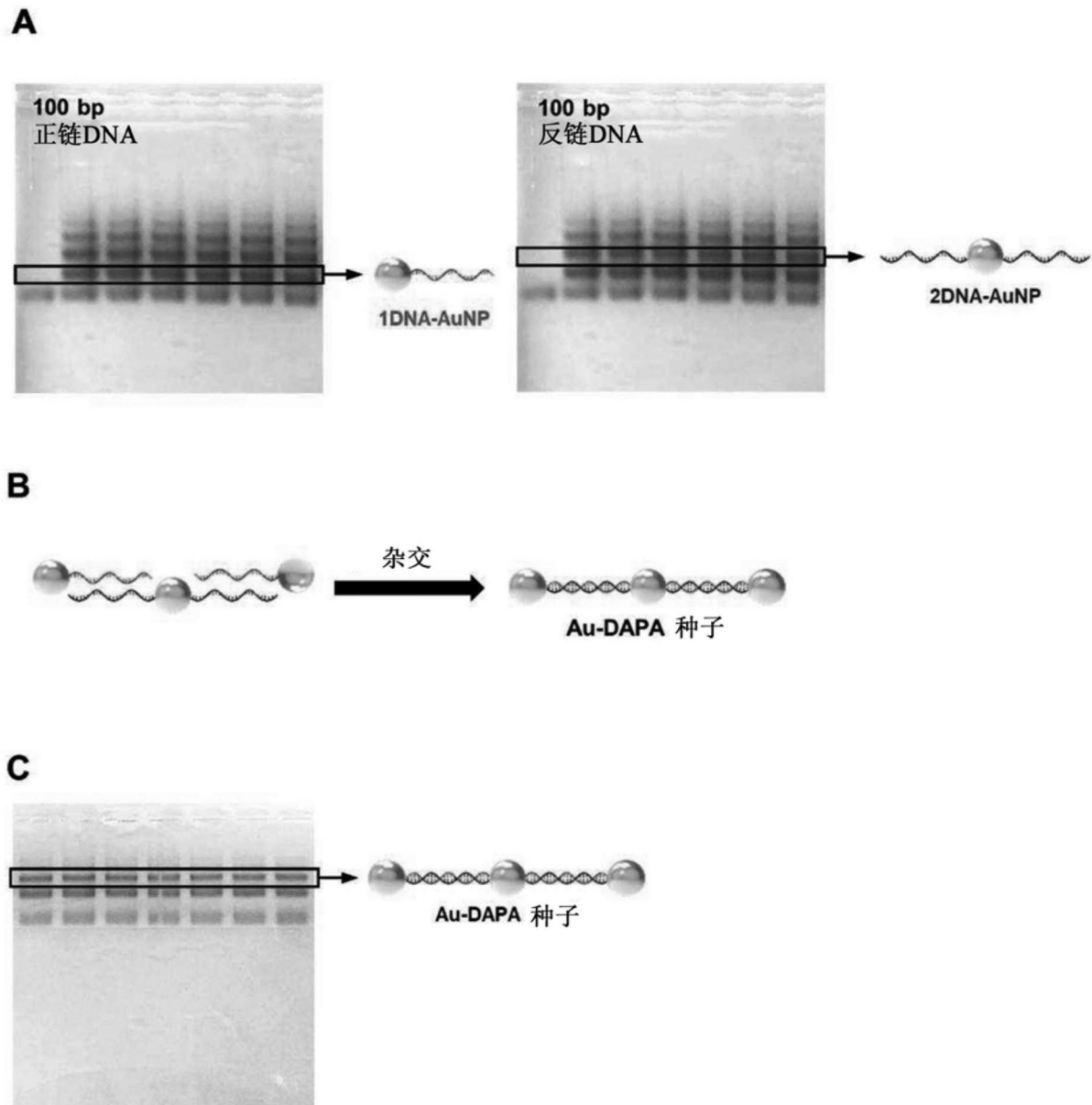


图3

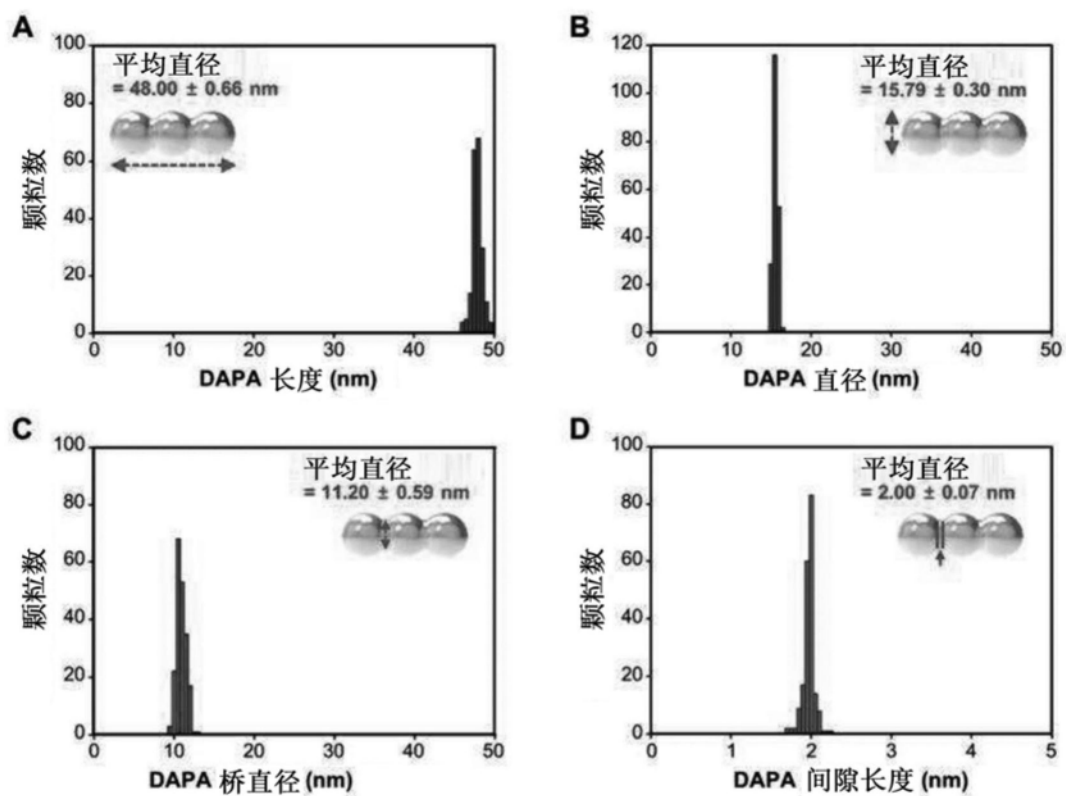


图4



图5

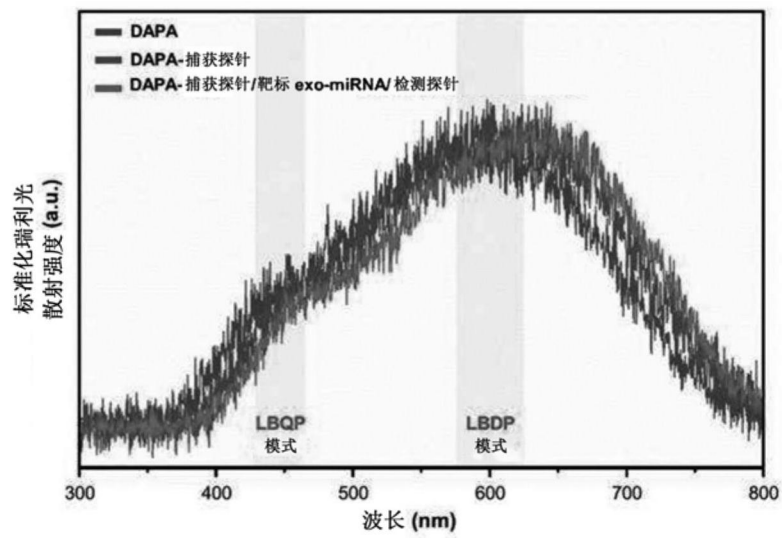


图6

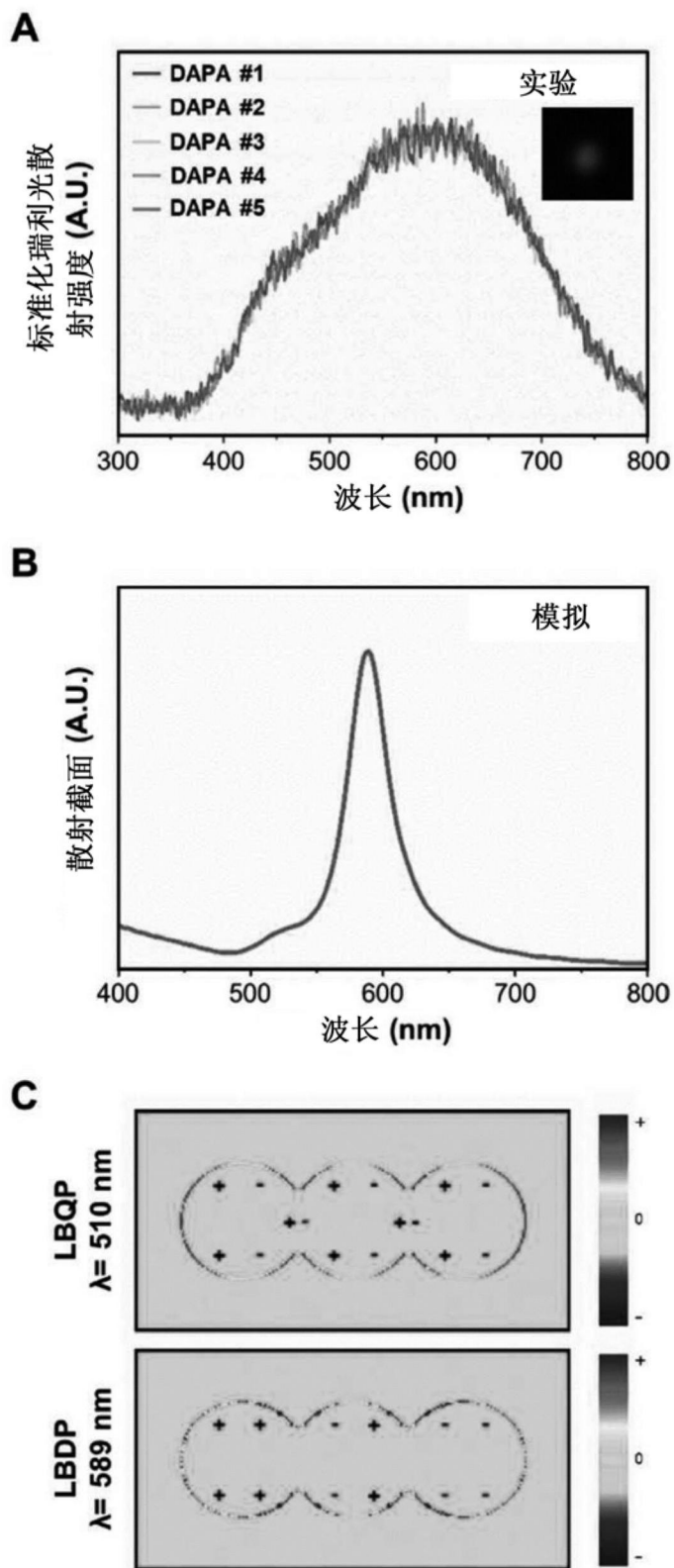


图7

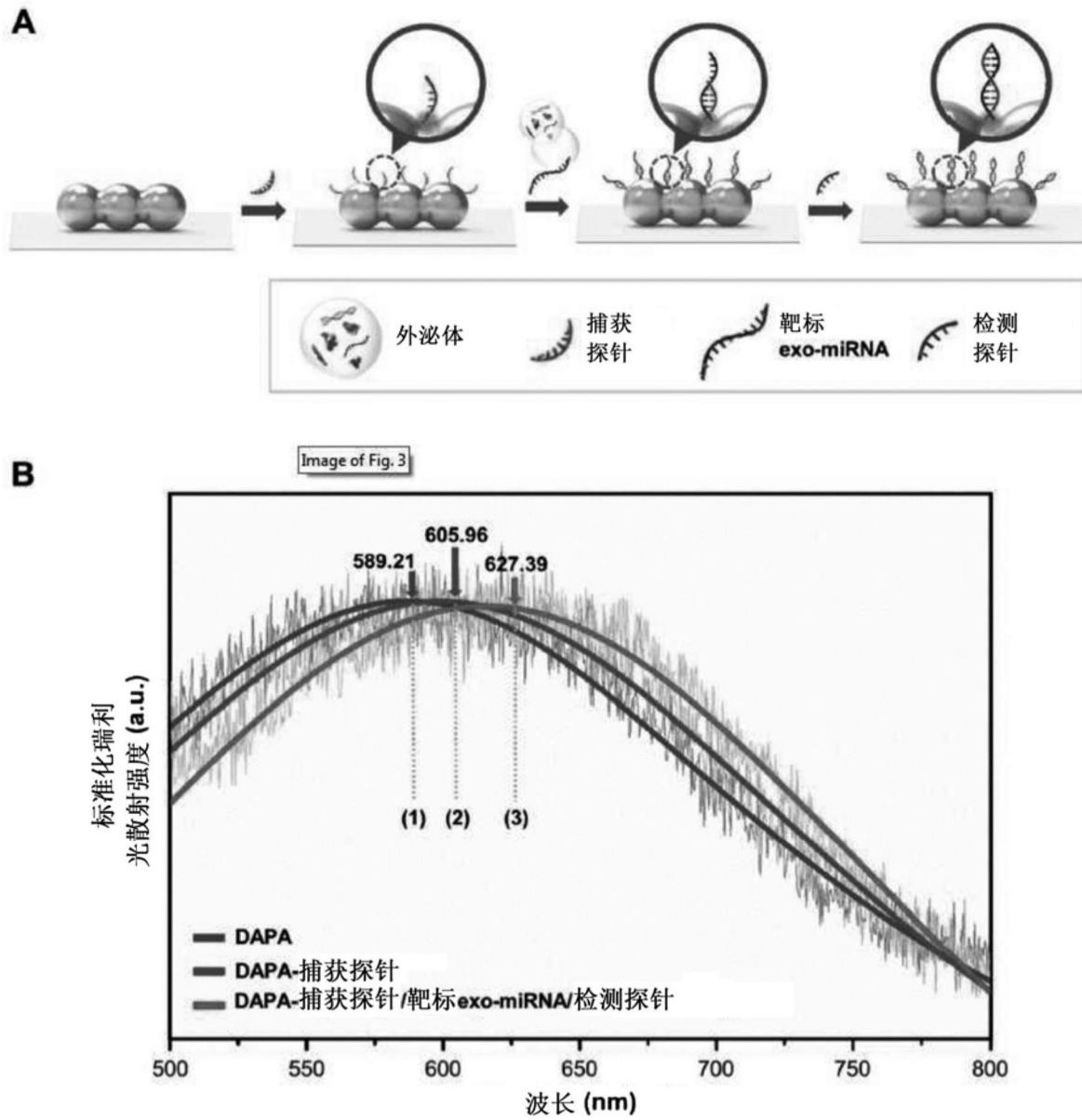


图8

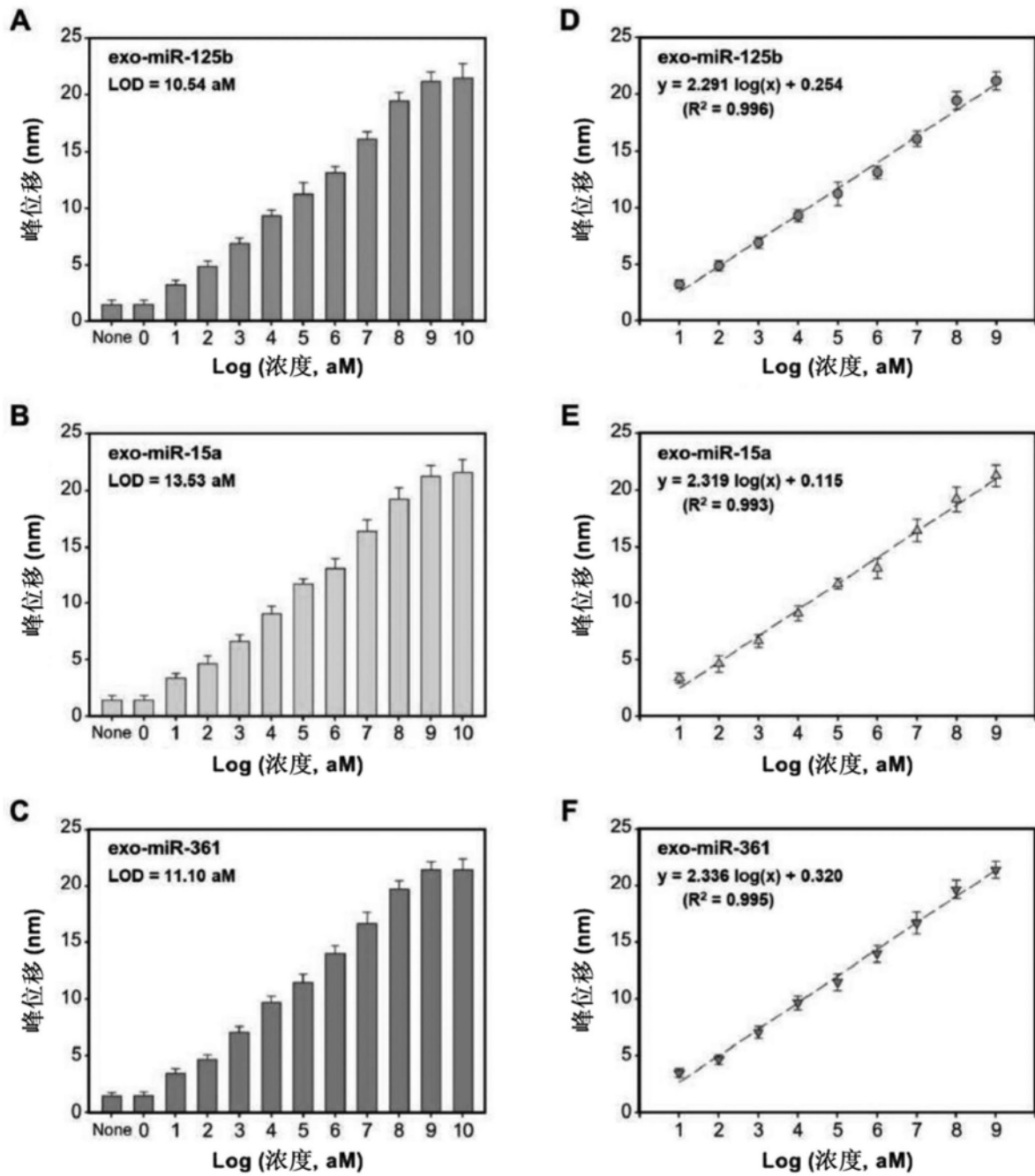


图9

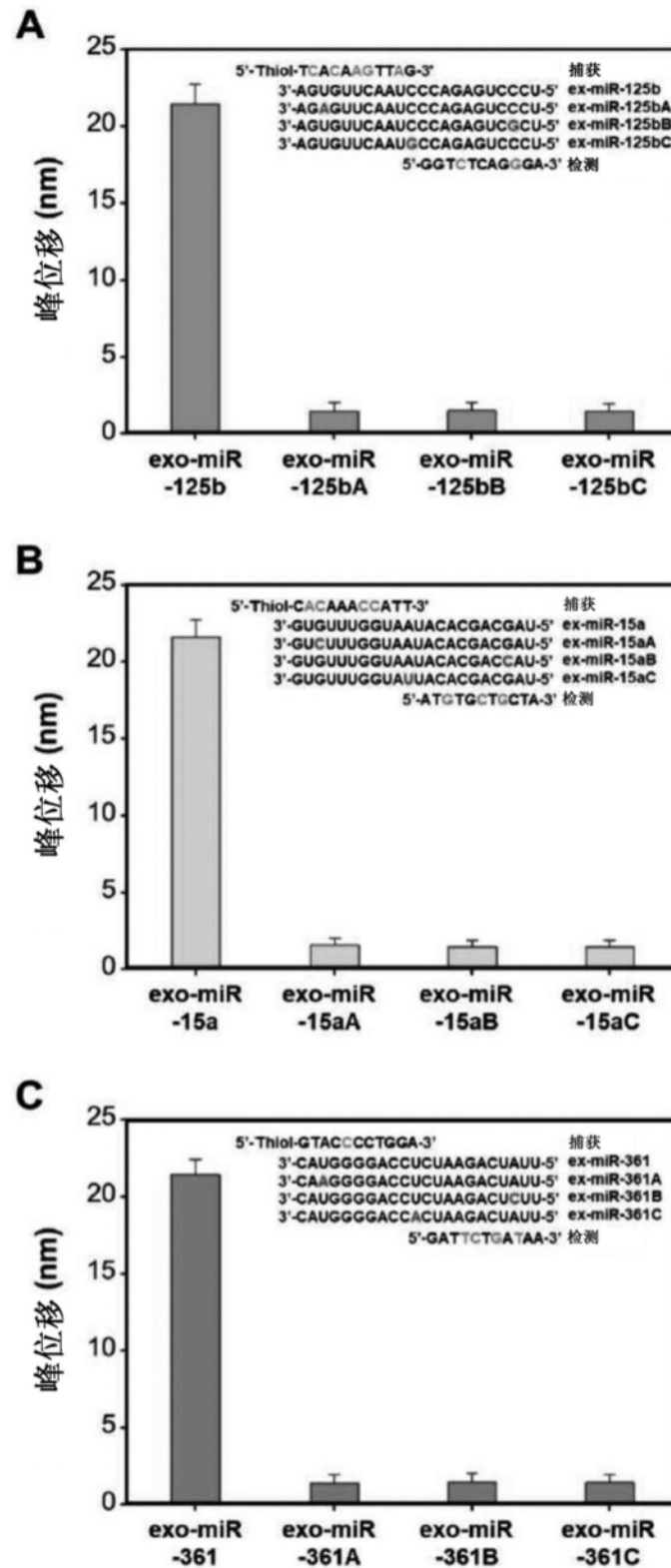


图10

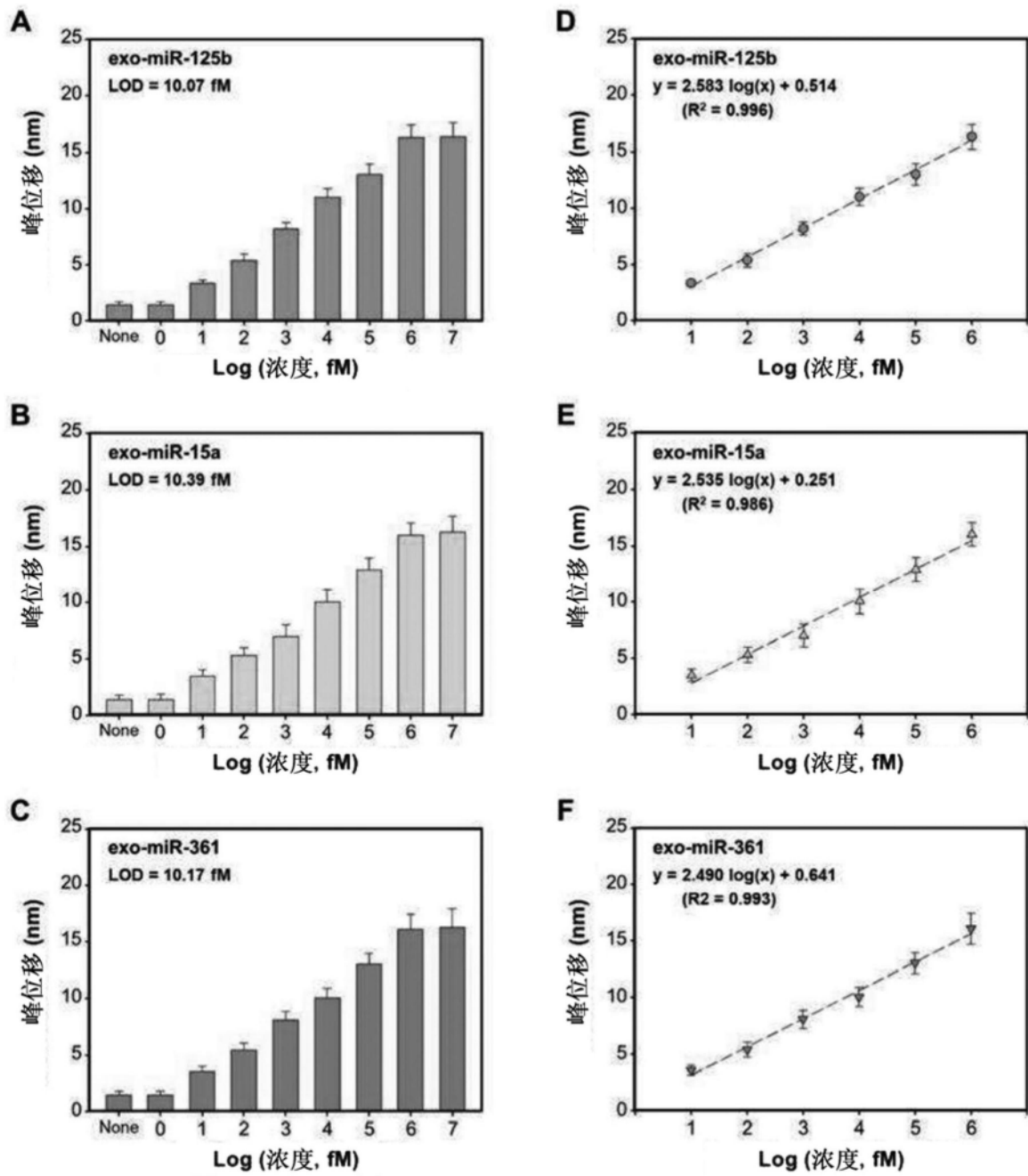


图11

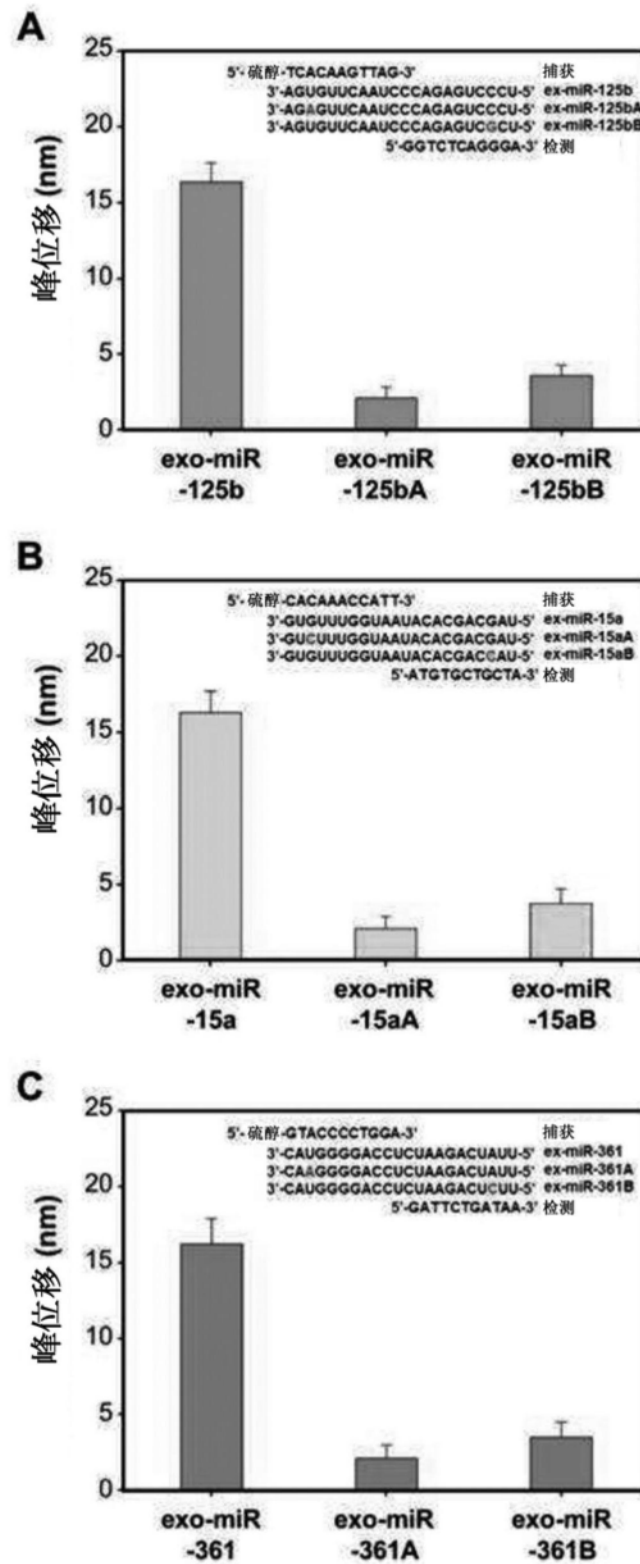


图12

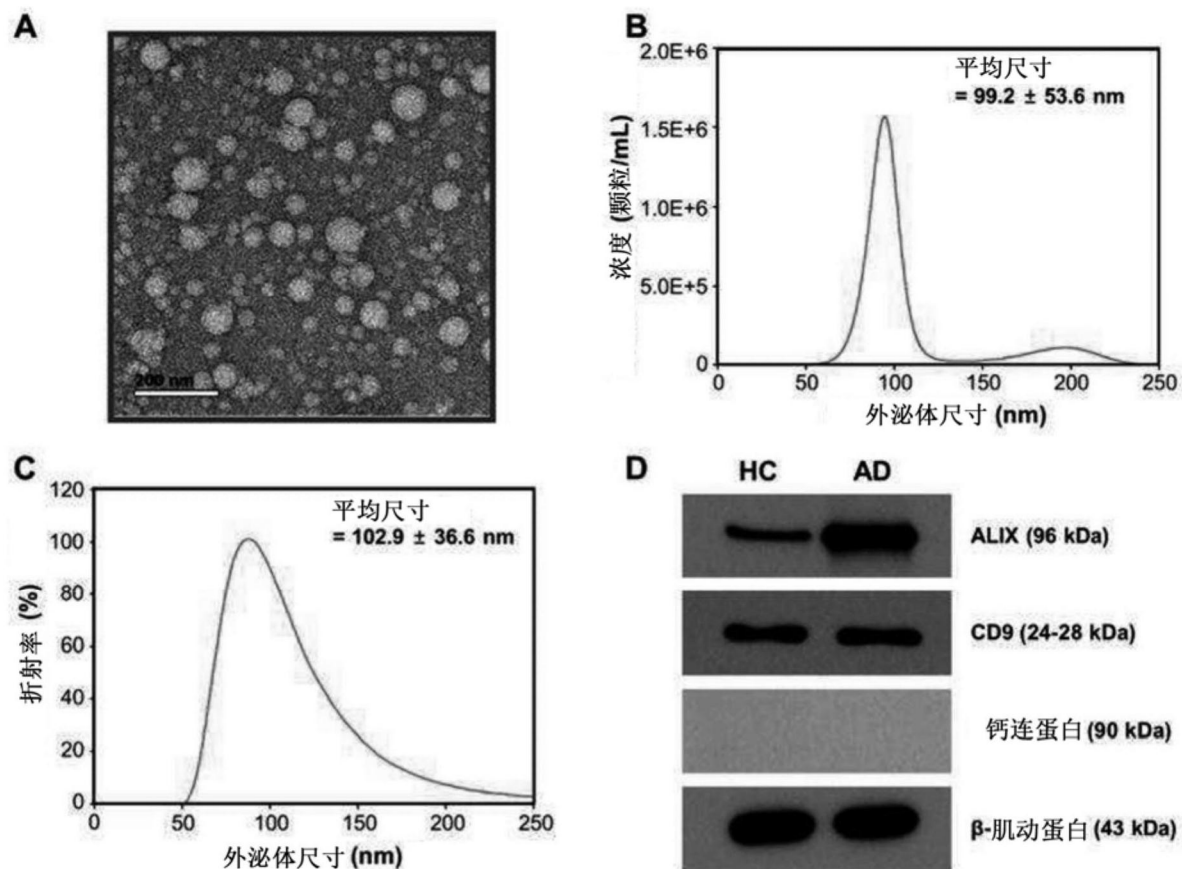


图13

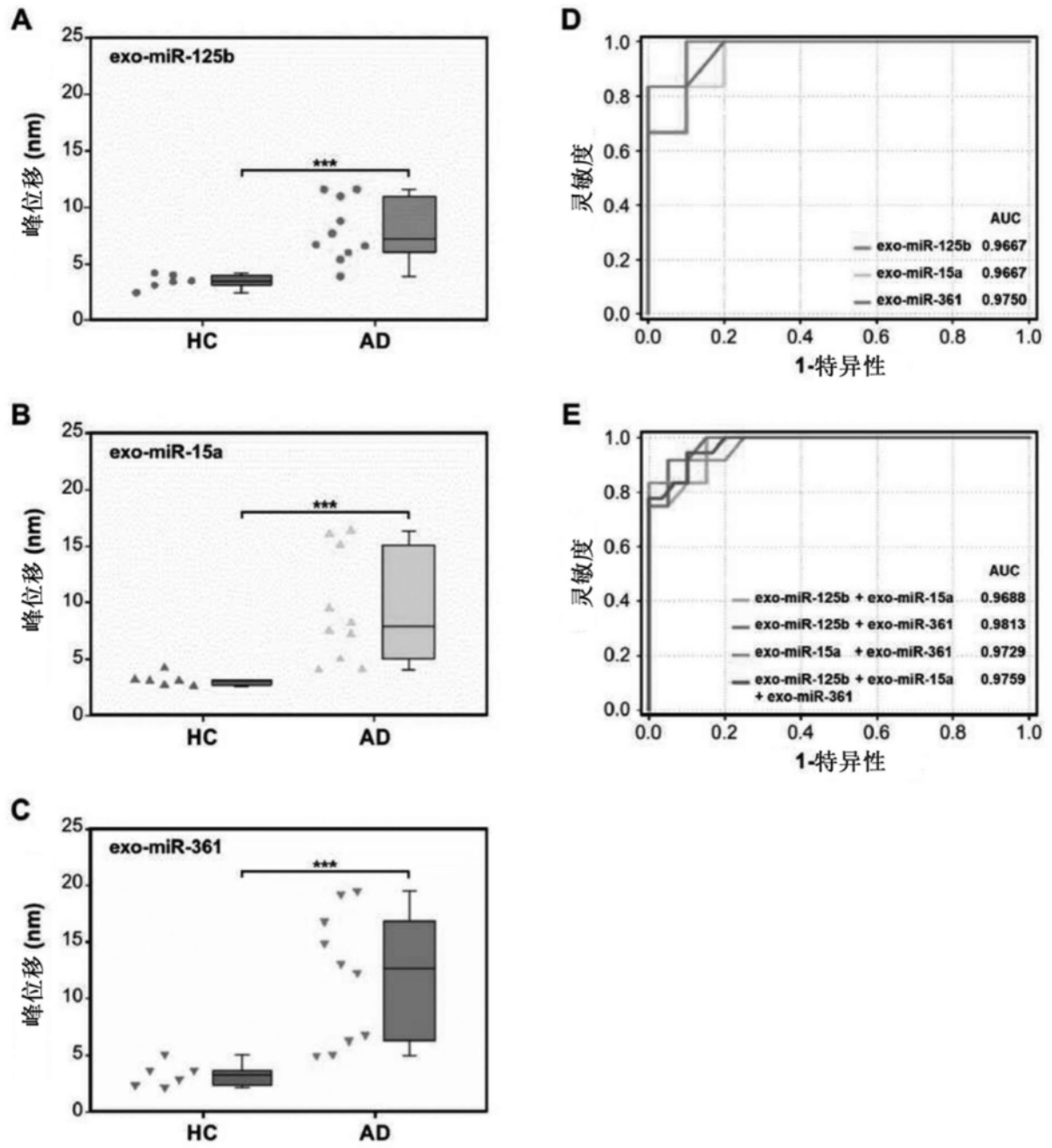


图14

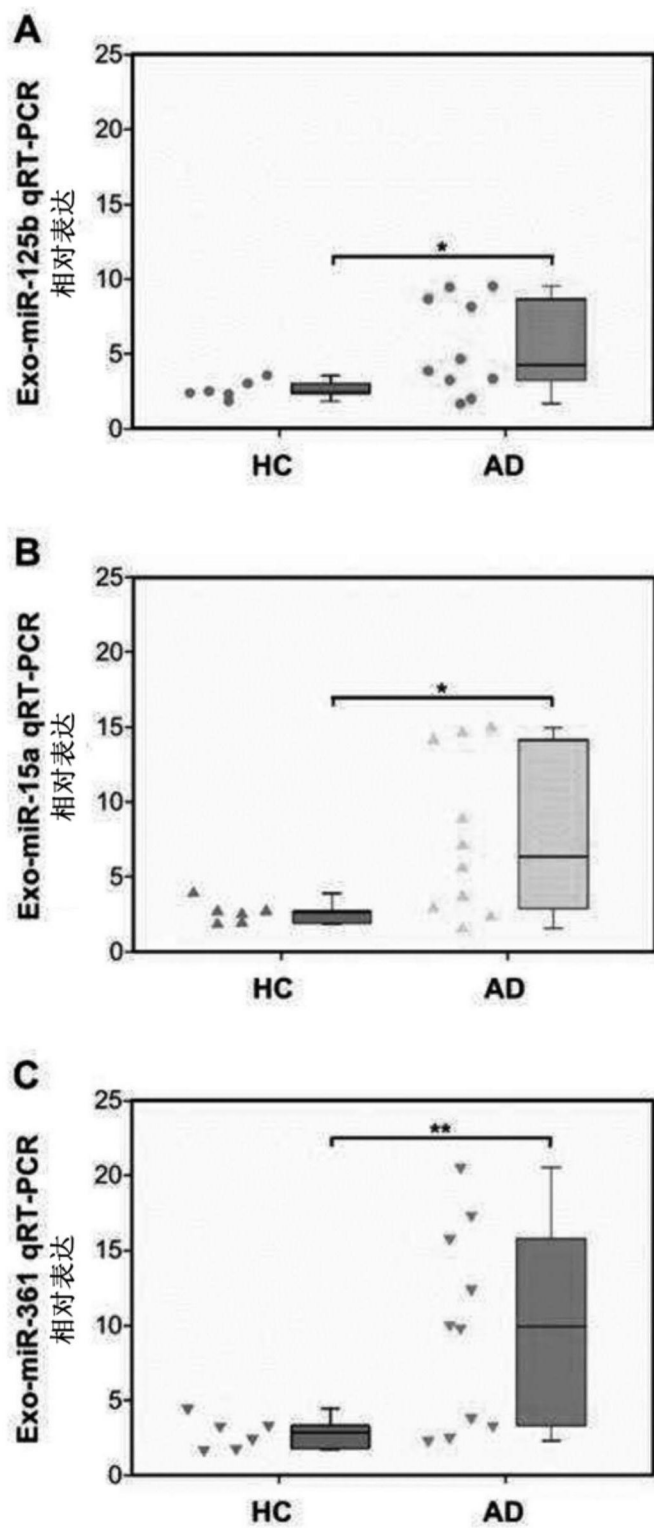


图15

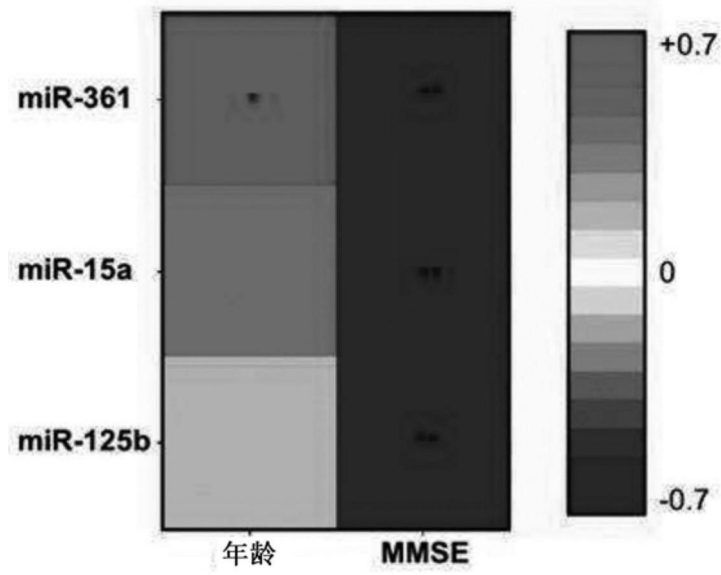


图16

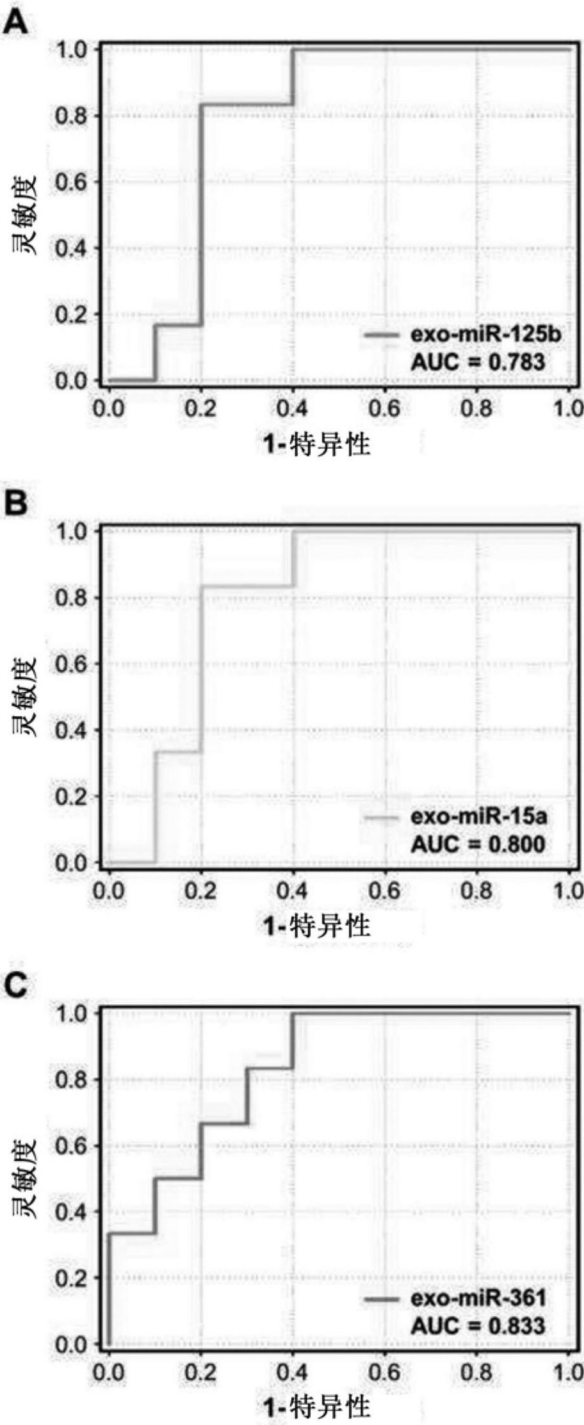


图17