



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 118961820 B

(45) 授权公告日 2025. 04. 25

(21) 申请号 202411441085.7

CN 117191906 A, 2023.12.08

(22) 申请日 2024.10.16

CN 104964969 A, 2015.10.07

(65) 同一申请的已公布的文献号

审查员 张楠喆

申请公布号 CN 118961820 A

(43) 申请公布日 2024.11.15

(73) 专利权人 天津市协和医药科技集团有限公司

地址 300450 天津市滨海新区滨海科技园
高新五路38号

专利权人 协和生物制药(天津)有限公司

(72) 发明人 阎尔坤 杨梦凯 杨思思 刘炳锐

(51) Int. Cl.

G01N 27/12 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 118465254 A, 2024.08.09

权利要求书1页 说明书5页

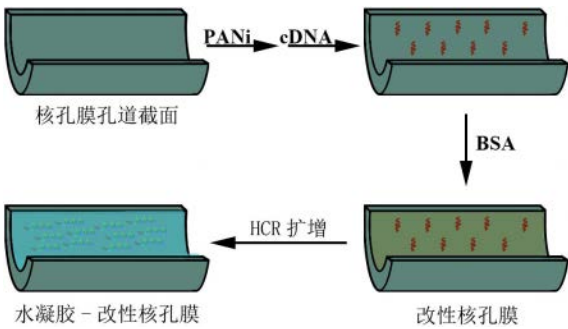
序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

一种基于HCR修饰改性多孔膜的信号放大技术用于电化学生物传感器

(57) 摘要

本发明公开了一种基于HCR修饰改性多孔膜的信号放大技术用于电化学生物传感器,及其对生物大分子和化学物质基于HCR技术实现信号放大的电化学检测方法,并验证了该信号放大技术与传感器的生物检测应用,属于电化学生物传感器技术领域。以检测黄曲霉毒素AFB1为例,将与亲水聚合物偶联的核酸链利用HCR技术使其在多孔膜孔道内形成适配体,而亲水聚合物则基于适配体的结构聚合形成水凝胶,聚集在多孔膜的孔道内。由于配体与适配体的结合会使水凝胶结构崩解,释放孔道通量,降低电荷转移电阻,而水凝胶的崩解程度与待测物的浓度呈正相关。将待测物浓度转化为电化学性能实现信号放大,进而实现对生物大分子和化学物质的低检出限、高特异性、高灵敏度检测。



1. 一种基于HCR修饰改性多孔膜的信号放大方法,其特征在于,在多孔膜孔道内使用聚苯胺进行聚酰胺化,实现对DNA进行捕获后,将与亲水聚合物偶联的DNA链通过HCR技术堆积在多孔膜的孔道中形成水凝胶,对纳米孔道进行一定程度上的封堵,配体与适配体的结合会使水凝胶结构崩解,释放孔道通量,使电荷转移电阻明显降低,而待测物的含量与水凝胶崩解程度呈正相关,进而实现基于HCR修饰改性多孔膜的信号放大方法。

2. 根据权利要求1所述的一种基于HCR修饰改性多孔膜的信号放大方法,其特征在于,以AFB1作为配体,核孔膜作为多孔膜时,具体实施步骤如下:

步骤1、将聚苯胺负载在核孔膜中,对DNA链1进行捕获,随后使用BSA对孔道内的剩余活性位点进行封闭,得到改性多孔膜;

步骤2、将改性多孔膜与DNA链2共孵育,使DNA链2与DNA链1碱基互补,并将未与DNA链1结合的DNA链2洗脱;

步骤3、将DNA链3与DNA链5分别与亲水聚合物进行偶联反应,得到HA-3和HA-5;

步骤4、将HA-3与DNA链4共孵育,得到HA-3/4共聚物;

步骤5、将步骤2和步骤4的产物与HA-5混合孵育,利用HCR扩增技术,使DNA链杂交至孔道内壁形成适配体,与适配体偶联的HA聚合得到水凝胶,得到水凝胶-改性多孔膜;

步骤6、将水凝胶-改性多孔膜浸泡在不同浓度的配体溶液中孵育,使配体与适配体结合,水凝胶崩解,反应完全后固定在双槽电解池中作为隔膜,在电解池中加入电解质溶液,对水凝胶崩解后的多孔膜进行电化学性能测试,得到改性多孔膜电化学性质与待测物浓度的量化关系;

步骤7、对待测溶液重复步骤6的步骤,测定其电化学性能,代入量化方程中得到待测样品的浓度。

3. 根据权利要求1所述的一种基于HCR修饰改性多孔膜的信号放大方法,其特征在于,封堵孔道的水凝胶基于HCR技术构成,使与DNA链偶联的亲水聚合物参与HCR扩增,进而使亲水聚合物形成水凝胶堆积在孔道内,得到水凝胶-改性多孔膜。

4. 根据权利要求1所述的一种基于HCR修饰改性多孔膜的信号放大方法,其特征在于,电化学测试基于水凝胶的崩解实现电化学信号放大,通过对配体与适配体的结合使核酸链结构发生变化,水凝胶发生崩解,进而对水凝胶崩解前后的电信号进行测试,得到待测物质的浓度。

5. 根据权利要求2所述的一种基于HCR修饰改性多孔膜的信号放大方法,其特征在于,当靶标为AFB1时,步骤2到步骤5中所述的DNA链1-5的序列在SEQ ID NO.2-6中展示。

一种基于HCR修饰改性多孔膜的信号放大技术用于电化学生物传感器

技术领域

[0001] 本发明属于生物传感技术领域,具体涉及一种基于HCR修饰改性多孔膜的信号放大技术及其电化学生物传感器构建方法用于生物大分子和化学物质检测的应用。

背景技术

[0002] 在致病因子和疾病早期异常表达物质的快速检测对促进一般公众健康和尽早取得有效的临床结果至关重要。以致病因子黄曲霉毒素(AF)为例,黄曲霉毒素具有很强的急性毒性、慢性毒性和致癌性,被列为I级致癌物质。而黄曲霉毒素B1 (AFB1)在整个AF家族中致癌性最强,且广泛分布在食品中,对人们的健康构成极大威胁。传统的检测方式需要集中的实验室,繁琐的预处理和昂贵的大型设备。近年来,酶联免疫吸附法、荧光法、质量法等便捷的检测方法逐渐在检测领域占据一席之地。这些方法虽然具有较高的选择性与便捷性,但致病因子和疾病早期异常表达物质丰度极低且干扰物种类繁多复杂,难以做到极低检出限的高灵敏度、高特异性的快速检测。电化学生物传感器检测技术由于其成本低、易于微型化、反应迅速和灵敏度高的特点,被认为是一种十分有前景的策略。

[0003] 近年来,基于特定生物标志物的电化学生物传感器具有灵敏度高、选择性好、成本低、反应快等特点,被广泛应用于各种物质的检测。然而现有的电化学生物传感器面临施加电压后的稳定性与重现性较差,以及极低丰度下的信号不理想的问题。这些问题同样是限制电化学生物传感器发展的关键因素。因此,发展低检出限、高灵敏、快速、准确、稳定的生物标志物电化学检测技术和分析方法对疾病诊断具有重要的意义和现实需求。

发明内容

[0004] 本发明针对上述现有检测技术灵敏度低、稳定性与重现性差、极低检出限的信号放大的问题,提出一种基于HCR修饰改性多孔膜的信号放大技术用于电化学生物传感器,通过改变孔道通量变化引起电信号变化,实现对生物大分子和化学物质的高灵敏度、高重现性的快速检测。

[0005] 为了解决上述问题,本发明采用如下技术方案:

[0006] 一种基于HCR修饰改性多孔膜的信号放大技术用于电化学生物传感器,通过将带电荷的吸附剂在孔道内负载对多孔膜进行改性,随后将设计成含有DNA探针的水凝胶通过HCR技术堆积在孔道内,构建水凝胶-改性多孔膜,并构建电化学生物传感器,实现稳定的低丰度信号放大作用。

[0007] 按上述方案,使用聚苯胺酰胺化核孔膜孔道内壁后,对DNA链1进行捕获,并使用牛血清白蛋白(BSA)对孔道内的剩余活性位点进行封闭,得到负载扩增位点的改性核孔膜。

[0008] 按上述方案,将得到的产物与DNA链2共孵育,使DNA链2与DNA链1碱基互补,并将未与DNA链1结合的DNA链2洗脱,得到改性核孔膜-1/2;将DNA链3与DNA链5分别与透明质酸(HA)进行偶联反应,得到HA-3和HA-5;将HA-3与DNA链4共孵育,得到HA-3/4共聚物;将改性

核孔膜-1/2、HA-3/4、HA-5混合孵育,利用HCR扩增技术,使HA偶联的DNA链杂交至孔道内的DNA链1上,得到含有探针的水凝胶-改性多孔膜。

[0009] 按上述方案所述的水凝胶-改性多孔膜,能够与目标物发生特异性结合,由于适配体与目标物更易结合,改变了适配体-水凝胶的空间构型,进而导致水凝胶崩解,孔道通量上升,阻抗下降;水凝胶的崩解程度与测试溶液中的靶标含量呈正相关,且水凝胶崩解程度的变化会导致电信号的变化,从而实现对目标物的低检出限,高灵敏,稳定的快速检测。

[0010] 按上述方案,所述多孔膜为PET核孔膜,厚度为1~100 μm ,所述核孔膜孔道的孔径为0.01~10 μm ,所述核孔膜孔道分布密度为 $5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^{12}$ 个/ cm^2 。

[0011] 按上述方案,当目标物为AFB1时,所述DNA链的序列如下表所示。

名称	序列	编号
AFB1apt	GTTGGGCACGTGTTGCTCTCTGCTCTCGTGCCCTTCGCTAGGCCACACA	SEQ ID NO.1
DNA链1	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6$ -TTTTTTTAGCTAAGCTGTGGG	SEQ ID NO.2
DNA链2	ATGTGATATGGGATGTGTTGGGCACGTGTTGCTCTCTGCTGCTCGTGCCCTTCGCTAGGCCACACAGCTTAGCT	SEQ ID NO.3
DNA链3	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6$ -TGCTCTAGATCTGGTA	SEQ ID NO.4
DNA链4	ACTACCCATATCAGCTAGCTGAGTTGGGCACGTGTTGCTCTCTGCTGCTCGTGCCCTTCGCTAGGCCACATACCAGATCTAGAGC	SEQ ID NO.5
DNA链5	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6$ -TTTTTTTGTGTTGGGCACGTGTTGCTCTCTGCTGCTCGTGCCCTTCGCTAGGCCACAGGATGTAGATAGATGATCAGCT	SEQ ID NO.6

[0013] 注:加粗部分代表适配体序列。

[0014] 上述基于HCR修饰改性多孔膜信号放大的电化学生物传感器的制备方法,以检测AFB1为例,主要步骤如下:

[0015] 1.将核孔膜固定在蠕动泵的滤头中间,利用蠕动泵将1-5g/L的苯胺和过硫酸铵溶液流经孔道15-60min;待反应完成后用去离子水冲洗核孔膜表面3次,得到孔道活化的核孔膜,室温干燥保存。

[0016] 2.将孔道活化的核孔膜浸泡在DNA链1溶液中,在0-15 $^{\circ}\text{C}$ 的环境下孵育6-12h,使用PBS溶液洗涤表面3次除去松散结合的DNA链1;随后将其在0.5-5g/L的BSA水溶液中孵育30-60min封闭位点,结束后使用去离子水洗净表面,得到改性核孔膜。

[0017] 3.以1:1.2的比例将附着在孔道内的DNA链1与加入的DNA链2通过碱基互补配对作用杂交6-12h,洗涤数次来去除未杂交的下游反应启动元件DNA链2,将得到的产物在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下储存,以供后续使用。

[0018] 4.将氨基修饰的DNA链3和DNA链5的溶液在95 $^{\circ}\text{C}$ 下加热5min,并在0 $^{\circ}\text{C}$ 下冷却2min,以避免DNA聚集体的形成;用1-5 g/L的EDC和0.5-2g/L 的NHS混合溶液活化1-5%透明质酸(HA)溶液30-60min;然后,将浓度为10-500 μM DNA链3或DNA链5与HA偶联反应过夜,得到聚合物HA-3和HA-5,通过三次超滤纯化过程将HA-3和HA-5从混合物中去除;随后通过紫外光谱对DNA链3进行定量,并与相等浓度的DNA链4在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育3-6h,以产生共聚物HA-3/4;其中,适配体被设计成具有发夹结构的DNA链4和5的一部分。从而赋予DNA在水凝胶中的特异性识别功能。

[0019] 5.将第4步得到的产物与HA-3/4和HA-5在42 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下以2:2:1的比例混合孵育3-12h;随后,对产物进行三次纯化以除去未反应的物质,最终得到DNA水凝胶-改性核孔膜以供AFB1检测使用。

[0020] 本发明还提供一种基于HCR修饰改性多孔膜用于电化学生物传感器的检测方法,主要步骤为:

[0021] 1.将得到的水凝胶-改性核孔膜作为双槽电解池的隔膜,固定在水槽电解槽中间,

在两侧的电解池中加入 $\text{pH} > 4.7$ 的缓冲溶液作为电解液,得到检测AFB1的电化学生物传感器。

[0022] 2.对上述传感器进行I-V、EIS测试,得到基底电化学数据,随后将隔膜更换为在不同靶标浓度下孵育30-120min后的水凝胶-改性核孔膜进行测试,根据电化学测试的得到的数据绘制靶标浓度-电化学性质的量化曲线。

[0023] 3.将水凝胶-改性核孔膜在待测液中孵育30-120min后进行电化学测试,将得到的数据代入上述步骤得到的量化曲线,计算得到待测物在溶液中的浓度。

[0024] 本发明的技术原理是:本发明提供了一种基于HCR修饰改性多孔膜的信号放大技术用于电化学生物传感器;本发明以检测AFB1为例,首先将孔道酰胺化并负载DNA链,将其余活性位点封闭,对多孔膜进行改性;随后通过HCR技术将适配体探针和水凝胶组装在多孔膜的孔道内;由于配体与适配体的结合会使水凝胶结构崩解,从而使多孔膜的孔道通量增加,阻抗降低,引起电化学信号变化,而待测物的含量与水凝胶的崩解程度呈正相关;将待测物浓度转化为电化学性能进行放大,进而实现对生物大分子和化学物质的低检出限、高特异性、高灵敏度检测;另外,本发明的检测目标物不限于AFB1,其他能够与水凝胶中的探针结合使水凝胶崩解,进一步实现影响导电层暴露面积的生物大分子和化学物质也应该视为本发明的保护范围。

[0025] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0026] 1.本发明所述的基于HCR修饰改性多孔膜的信号放大技术,靶标的作用为使水凝胶崩解,不直接参与电化学测试过程,电化学测试的目标为因水凝胶崩解而产生变化的电信号;该方法相较于直接参与电化学测试的方法,不涉及其他电化学测试发生的反应,无需考虑待测分子在测试环境中施加电压后是否稳定,进一步提升了测试过程中的准确性,稳定性与重现性。

[0027] 2.本发明利用HCR技术,对DNA链进行扩增,并以此为基础使偶联在DNA链上的亲水性聚合物交联形成水凝胶,将HCR作为测试前驱体的制备手段,而不是靶标的扩增手段;该方法相较于直接扩增待测物,进一步提升了HCR技术的可控性及出品率,同时避免了实际检测中,干扰物质对HCR的影响。

附图说明

[0028] 图1为用于本发明的电化学生物传感器隔膜修饰流程图。

[0029] 图2为用于本发明的电化学生物传感器装置示意图。

[0030] 图3为实施例2中水凝胶-改性核孔膜不同修饰状态下的I-V曲线。

[0031] 图4为实施例2中水凝胶-改性核孔膜不同修饰状态下的EIS曲线。

[0032] 图5为实施例2中基于本发明的AFB1电化学生物传感器的I-V标准曲线。

[0033] 图6为实施例2中基于本发明的AFB1电化学生物传感器的 $\Delta I - 1gC$ 量化曲线。

[0034] 图7为实施例3中基于本发明的AFB1电化学生物传感器的重现性测试。

[0035] 图8为实施例4中基于本发明的AFB1电化学生物传感器的检测稳定性测试。

[0036] 图9为实施例5中基于本发明的AFB1电化学生物传感器的稳定性测试。

[0037] 图10为实施例6中基于本发明的AFB1电化学生物传感器的特异性检测。

[0038] 图11为实施例7中基于本发明的壳聚糖-改性核孔膜电化学生物传感器的重现性

测试。

具体实施方式

[0039] 为了使本领域的技术人员更好地理解本发明的技术方案,下面结合具体实施例对本发明做进一步的详细说明。

[0040] 实施例1透明质酸水凝胶-改性多孔膜的构建

[0041] 1.将2g/L的苯胺和过硫酸铵混合溶液流经孔道30min;待反应完成后用去离子水冲洗核孔膜表面3次,得到孔道聚酰胺化的核孔膜,室温干燥保存。

[0042] 2.孔道聚酰胺化的核孔膜浸泡在DNA链1溶液中,在10℃的环境下孵育6h,使用PBS溶液冲洗3次除去松散结合的DNA链1;随后将其在5g/L的BSA水溶液中孵育30min封闭位点,结束后使用去离子水冲洗干净,得到改性核孔膜。

[0043] 3.以1.2:1.0的比例加入DNA链2与附着在孔道内的DNA链1通过碱基互补配对作用杂交8h,洗涤数次来去除未杂交的下游反应启动元件DNA链2,将得到的产物在4℃条件下储存,以供后续使用。

[0044] 4.将氨基修饰的DNA链3和DNA链5的溶液在95℃下加热5分钟,并在0℃下冷却2分钟,以避免DNA聚集体的形成,用5g/L的EDC和2g/L的NHS混合溶液活化5%透明质酸(HA)溶液30分钟;然后,与浓度为200μM DNA链3或DNA链5与HA偶联反应过夜,得到聚合物HA-3和HA-5,通过三次超滤纯化过程将HA-3和HA-5从混合物中去除;随后通过紫外光谱对DNA链3进行定量,并与相等浓度的DNA链4在37℃下孵育6h,以产生共聚物HA-3/4;其中,探针被设计成具有发夹结构的DNA链4和5的一部分,从而赋予DNA在水凝胶中的特异性识别功能。

[0045] 5.将第4步得到的产物与HA-3/4和HA-5在42℃的条件下以2:2:1的比例混合孵育6h,随后,对产物进行三次纯化以除去未反应的物质,最终得到DNA水凝胶-改性核孔膜以供AFB1检测使用。

[0046] 水凝胶-改性核孔膜构建流程中,孔道截面示意图如图1所示。

[0047] 实施例2 基于本发明的AFB1电化学生物传感器的构建及检测方法

[0048] 1.将实施例1中得到的水凝胶-改性核孔膜作为双槽电解池的隔膜,固定在水槽电解槽中间,在两侧的电解池中加入0.01M的PBS缓冲溶液作为电解液,得到检测AFB1的电化学生物传感器,其示意图如图2所示;对其电化学性质进行表征,结果如图所示,其中图3为不同修饰状态下的I-V曲线,图4为不同修饰状态下的EIS曲线。

[0049] 2.对上述传感器进行I-V、EIS测试,得到基底电化学数据,随后将隔膜更换为在不同靶标浓度下孵育30min后的DNA水凝胶-改性核孔膜进行测试,得到图5不同靶标浓度的I-V曲线。

[0050] 3.对得到的I-V曲线图进行数学处理,得到如图6所示的,以lgC为横坐标,ΔI为纵坐标的AFB1量化曲线,以供AFB1的定量检测。

[0051] 实施例3 基于本发明的AFB1电化学生物传感器的重现性

[0052] 1.对实施例2步骤1中组装完成的AFB1的电化学生物传感器在室温下进行I-V测试。

[0053] 2.每经过一小时,对传感器进行一次I-V测试,并记录其峰值电流并绘制谱图。

[0054] 3.结果如图7所示,水凝胶-改性核孔膜即使在测试溶液中长时间放置,测试电流

仅有微弱变化,表明该传感器具有良好的重现性。

[0055] 实施例4 基于本发明的AFB1电化学生物传感器的检测稳定性

[0056] 1.对实施例2中组装完成的AFB1的电化学生物传感器进行恒电压测试,其中电压为1V,持续时间为2小时。

[0057] 2.测试结果如图8所示,测试2小时后,其电流变化率仅为5%,表明AFB1电化学传感器具有良好的检测稳定性,可以支持较长时间的检测。

[0058] 实施例5 基于本发明的AFB1电化学生物传感器的稳定性

[0059] 1.对实施例2步骤1中组装完成的AFB1的电化学生物传感器在室温下进行I-V测试。

[0060] 2.测试完成后,记录峰值电流,随后将隔膜取下,使用去离子水冲洗表面后室温干燥,表面干燥后保存在4°C冰箱中以备后续测试。

[0061] 3.每天重复上述步骤1次,持续14天,结果如图9所示,表明该传感器具有良好的稳定性。

[0062] 实施例6 基于本发明的AFB1电化学生物传感器的特异性检测

[0063] 1.将实施例2中第二步更换不同靶标浓度孵育得到的水凝胶-改性核孔膜,更换为在3pM的AFB1溶液中孵育,以及在浓度为1pM的其他构型的黄曲霉毒素溶液中孵育得到的水凝胶-改性核孔膜,对得到的这些水凝胶-改性核孔膜的电化学性质进行测试。

[0064] 2.测试结果如图10所示,从图中可以明显的看到,以实施例1和实施例2的方法构建的电化学传感器具有良好的选择特异性。

[0065] 实施例7壳聚糖水凝胶-改性核孔膜的构建

[0066] 1.基于实施例1的实验方案,将步骤4中的5%透明质酸更换为5g/L的壳聚糖溶液,最终得到以壳聚糖为原料的水凝胶-改性核孔膜。

[0067] 2.将上一步得到的水凝胶-改性核孔膜使用实施例3的测试方式检测其重现性,结果如图11所示,使用壳聚糖简单替换透明质酸所构建的水凝胶-改性核孔膜可作为实施例1的替代品,从而获得以本方法制备得到的电化学生物传感器。

[0068] 尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

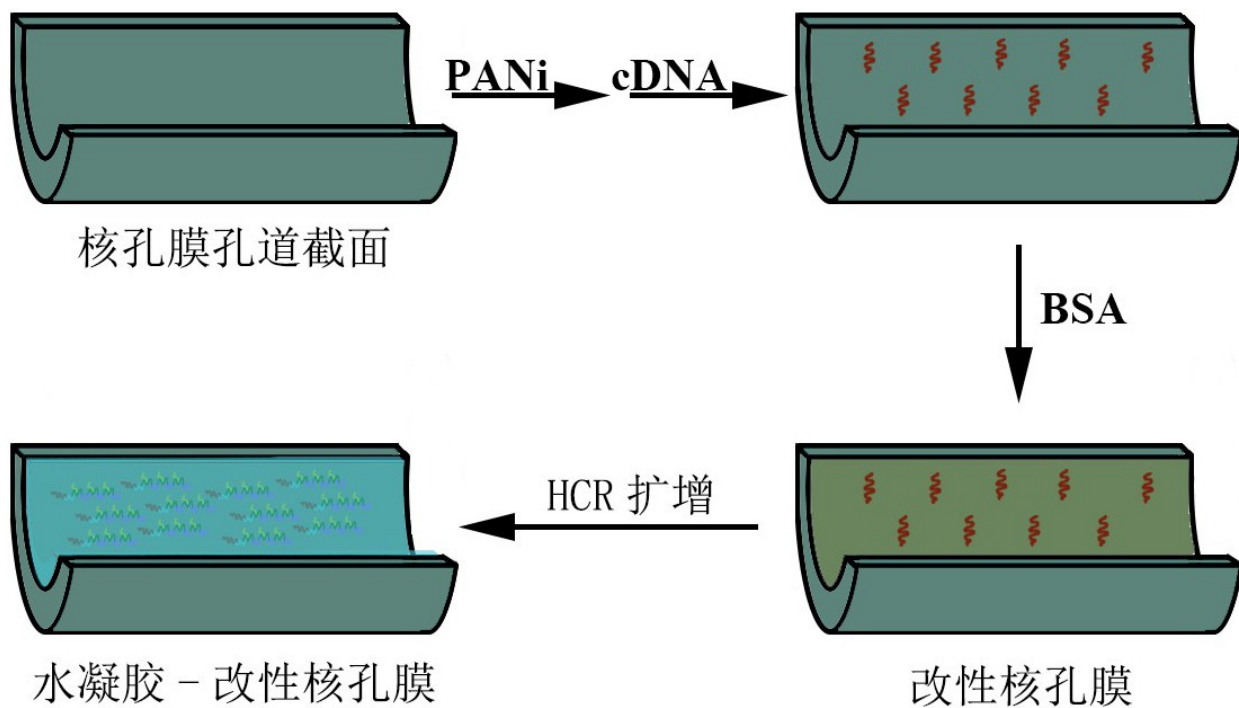


图 1

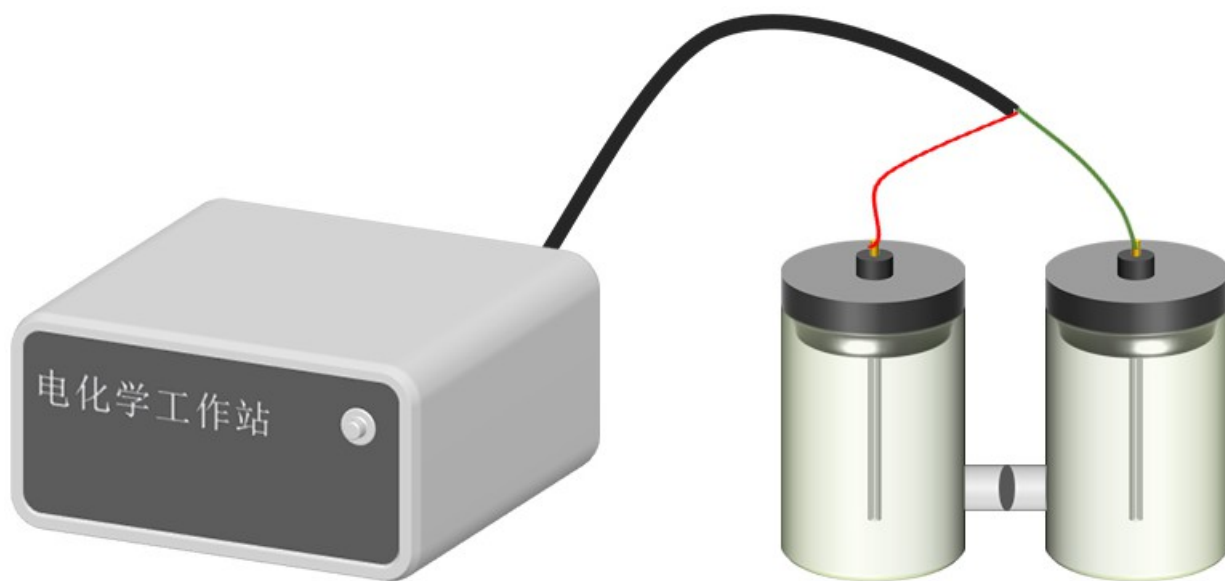


图 2

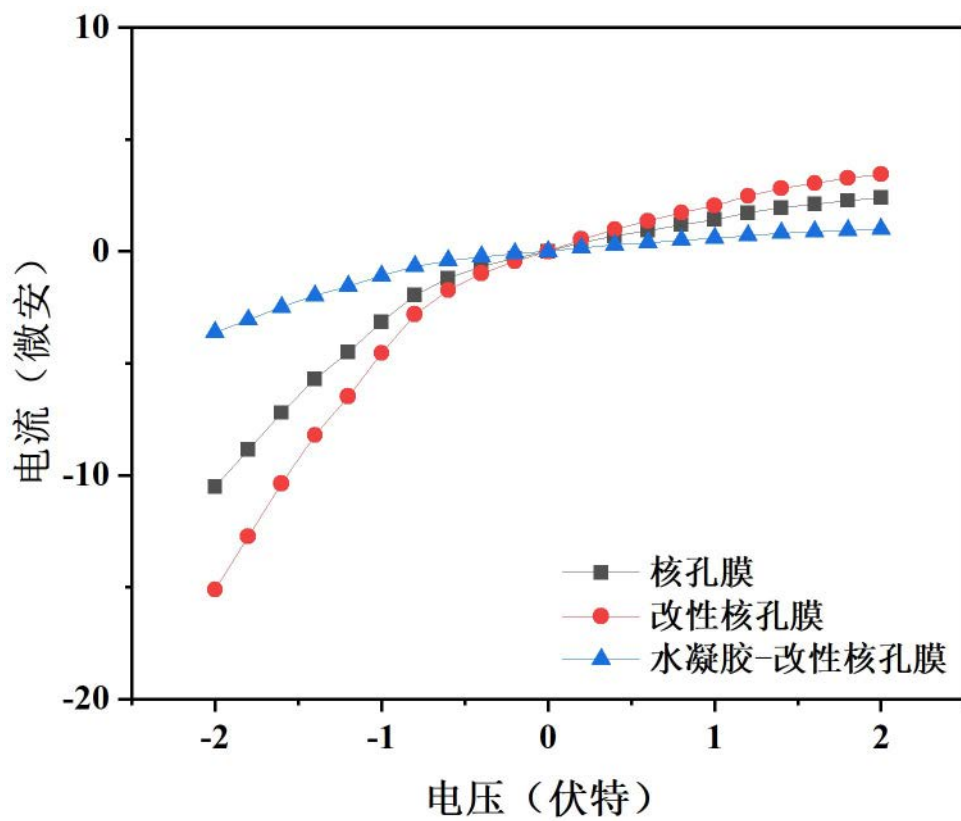


图 3

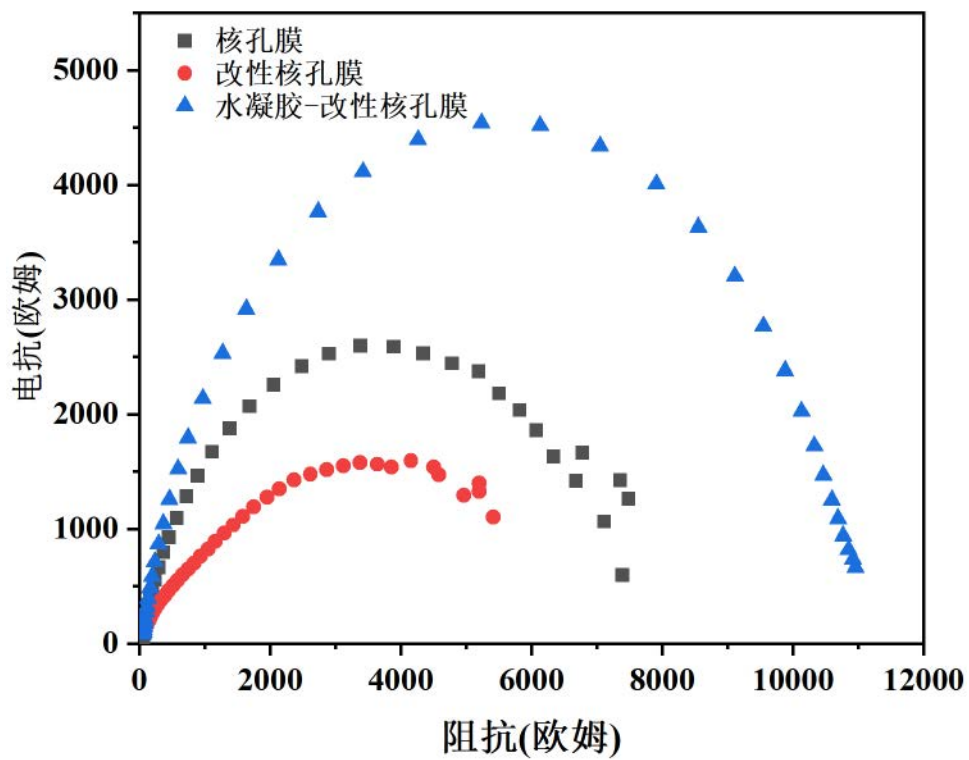


图 4

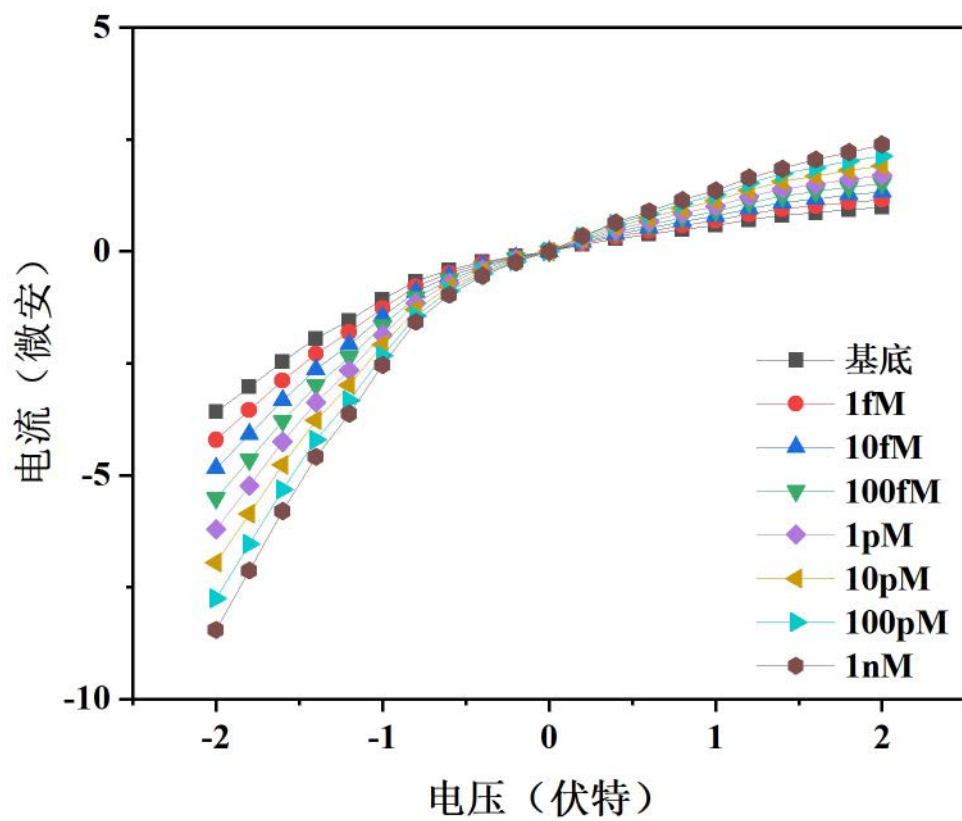


图 5

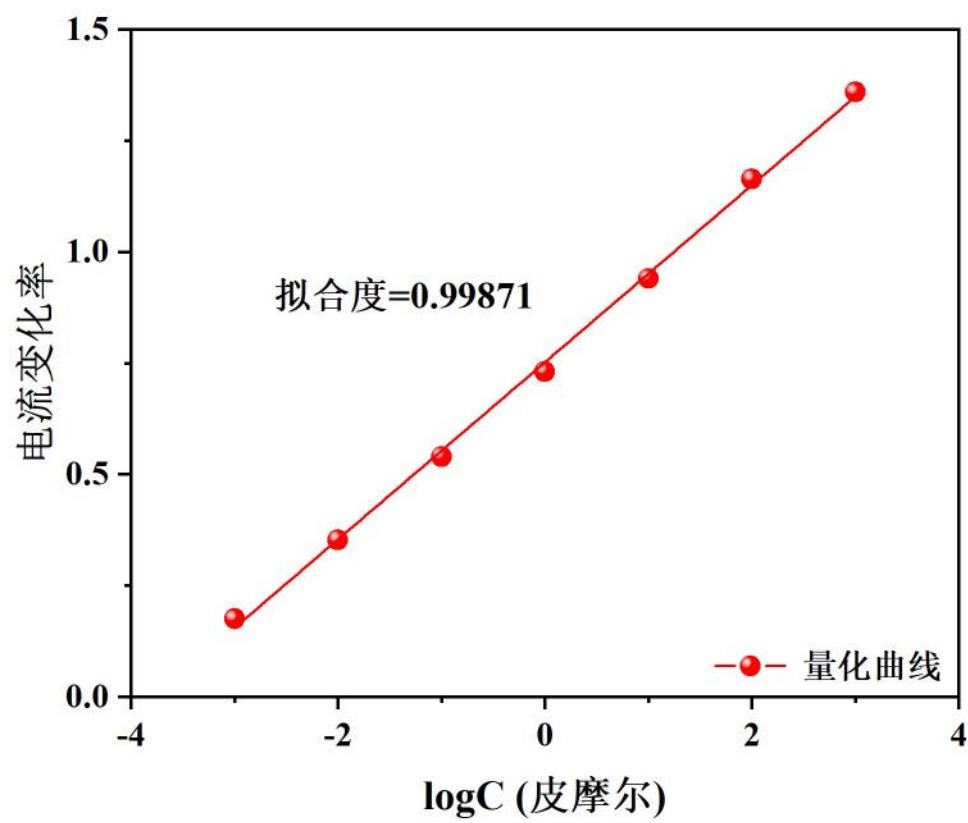


图 6

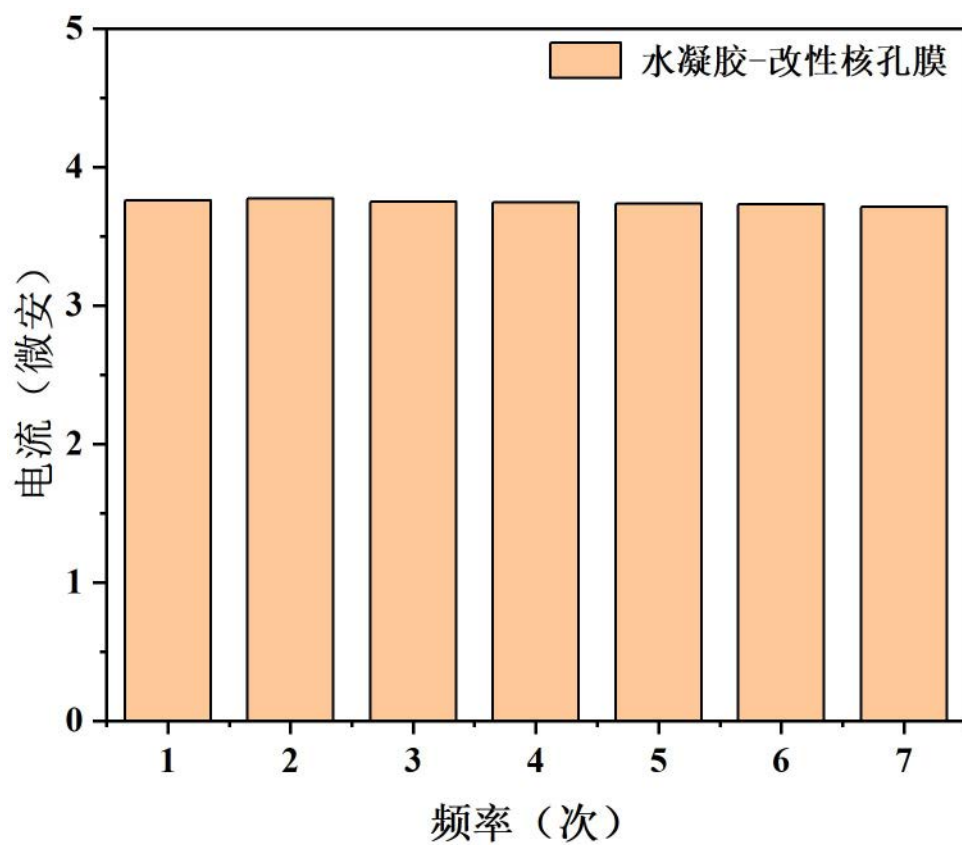


图 7

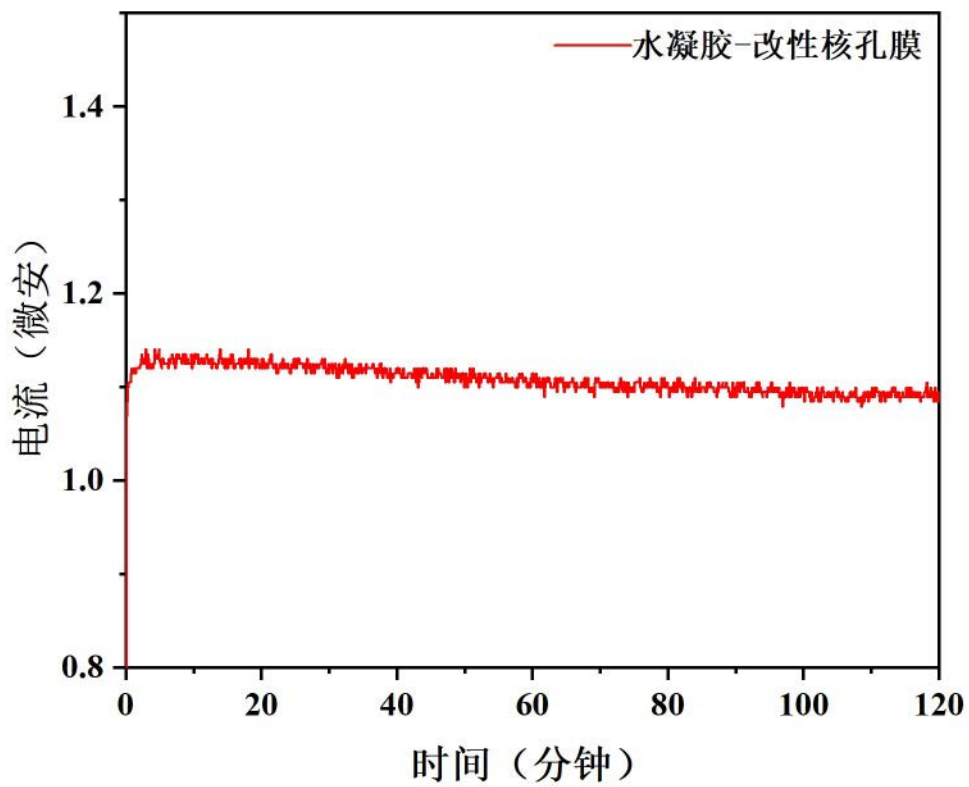


图 8

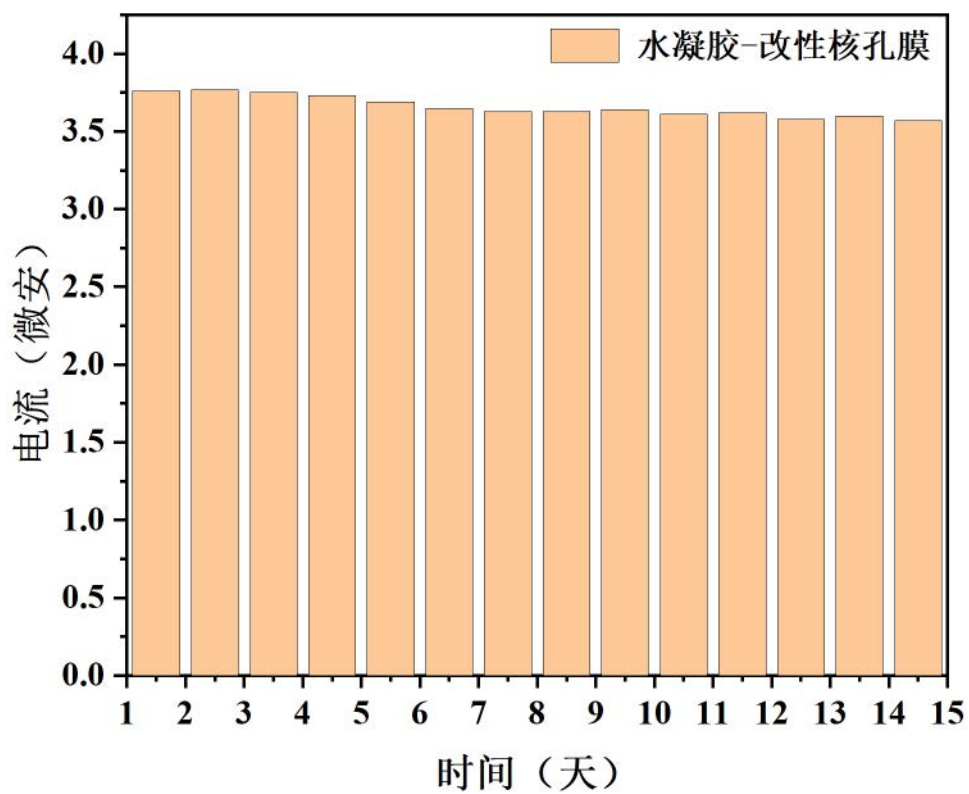


图 9

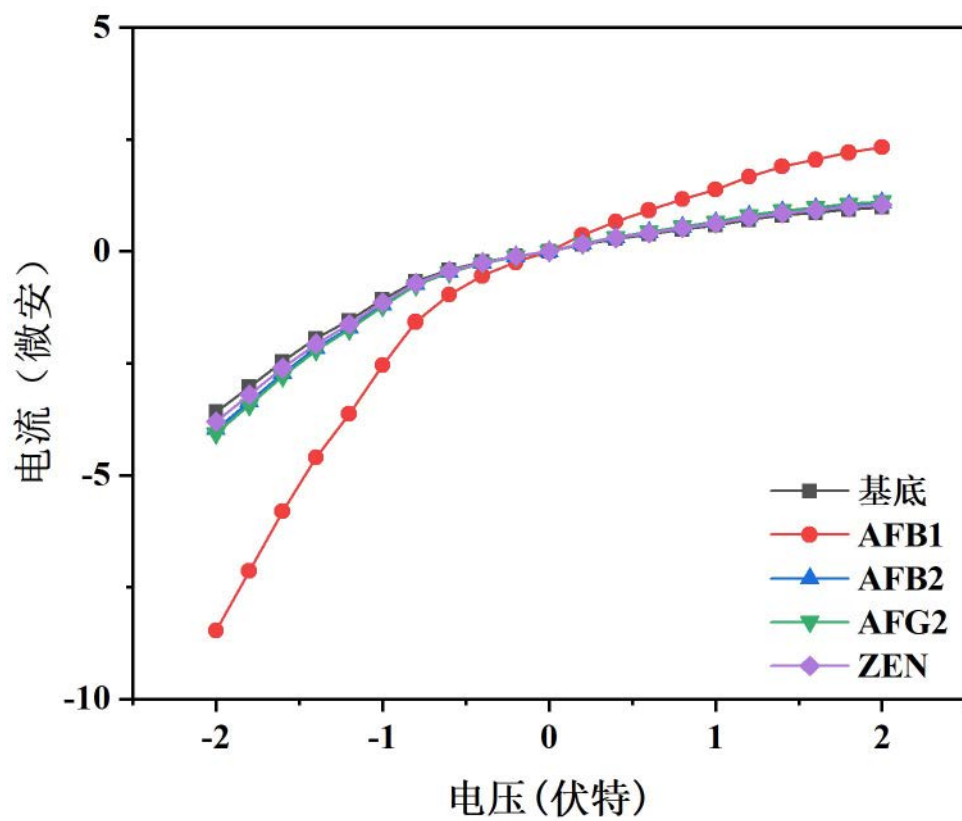


图 10

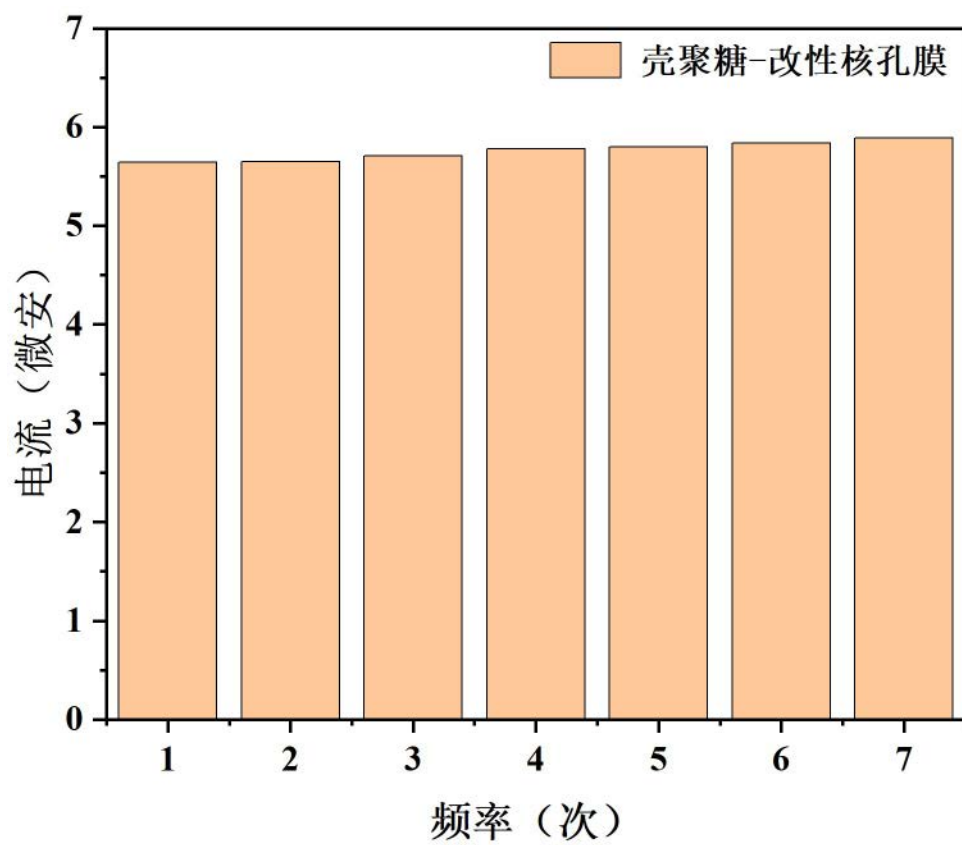


图 11