



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120253985 A

(43) 申请公布日 2025. 07. 04

(21) 申请号 202510734697.3
(22) 申请日 2025.06.04
(71) 申请人 成都岷山创芯生物芯片科技有限公司
地址 610213 四川省成都市中国(四川)自
由贸易试验区成都高新区和民街366
号2号楼5层501、502号
(72) 发明人 瞿润连 范自强 代雨婷
(74) 专利代理机构 北京中济纬天专利代理有限
公司 11429
专利代理师 傅剑涛
(51) Int. Cl.
G01N 27/26 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C12N 15/115 (2010.01)

C12Q 1/6886 (2018.01)
C12Q 1/6844 (2018.01)
C12N 15/11 (2006.01)
G01N 27/327 (2006.01)

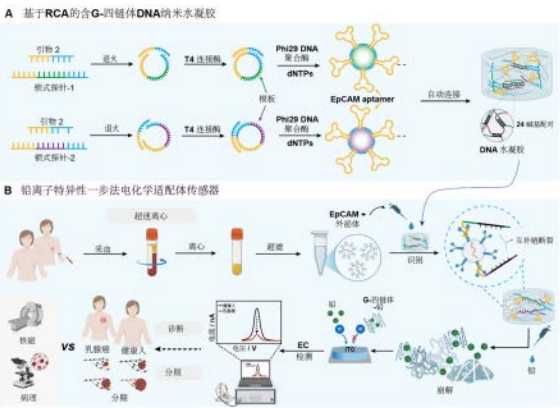
权利要求书2页 说明书10页
序列表(电子公布) 附图7页

(54) 发明名称

基于DNA-Pb²⁺功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法及应用

(57) 摘要

本发明提供了一种基于DNA-Pb²⁺功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法及应用,涉及生物医学诊断分析方法技术领域,本发明基于滚环扩增(RCA)方法制备的DNA纳米水凝胶,结合G-四链体结构与Pb²⁺特异性识别机制构建而成,选取外泌体表面的上皮细胞黏附分子(EpCAM)作为检测靶标,利用EpCAM与其适配体之间的特异性结合引发DNA纳米水凝胶崩解,进而暴露出由RCA生成的大量G-四链体结构,后者可与Pb²⁺选择性结合并调控电化学信号输出,该方法实现了一锅法、快速、高效的检测流程,整个过程在45分钟内完成。



1. 一种基于DNA-Pb²⁺功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法,其特征在于,所述方法包括基于RCA产物为基础构建DNA纳米水凝胶,所述DNA纳米水凝胶包括用于识别的核酸适配体、互补碱基杂交区域及用于信号输出的G-四链体;

基于所述核酸适配体是否与目标物特异性结合导致所述DNA纳米水凝胶崩解暴露G-四链体,以及基于所述G-四链体是否与Pb²⁺形成G-四链体-Pb²⁺复合物,通过Pb²⁺的电化学信号定量所述目标物,所述目标物为外泌体。

2. 根据权利要求1所述基于DNA-Pb²⁺功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法,其特征在于,所述Pb²⁺与所述G-四链体-Pb²⁺复合物具有明显的电化学信号差异,所述Pb²⁺的电子传输性能远大于所述G-四链体-Pb²⁺复合物。

3. 根据权利要求2所述基于DNA-Pb²⁺功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法,其特征在于,当上皮细胞粘附分子存在时,其与对应的所述核酸适配体结合引发所述DNA纳米水凝胶崩解,暴露出所述G-四链体并结合游离Pb²⁺,减少游离Pb²⁺的浓度,导致电化学信号强度下降;

当上皮细胞粘附分子不存在时,所述DNA纳米水凝胶保持完整,所述G-四链体未暴露,Pb²⁺可自由扩散至ITO电极表面,显著增强电化学信号输出。

4. 根据权利要求3所述基于DNA-Pb²⁺功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法,其特征在于,所述G-四链体为GT GGG TA GGG C GGG TT GG。

5. 根据权利要求3所述基于DNA-Pb²⁺功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法,其特征在于,DNA纳米水凝胶的引物包括Primer-1和Primer-2;

所述Primer-1为GTG GGT AGG GCG GGT TGG TGA AGG TTC GTT GTT T;

所述Primer-2为ACA GAT TTT GGG AAT GGT GGG TAG GGC GGG TTG G。

6. 根据权利要求3所述基于DNA-Pb²⁺功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法,其特征在于,DNA纳米水凝胶的挂锁包括Padlock-1和Padlock-2;

所述Padlock-1为Phosphate-CCA ACC CGC CCT ACC CAC GTG TGA TGA GAC TAA ATA CTA AAG CAT TCC CAA AAT CTG TAT CTC TTC TAA AGA GTC TAC ACC CAC CGA AAC AAC GAA CCT TCA;

所述Padlock-2为Phosphate-CAT TCC CAA AAT CTG TAT CTC TTC TAA AGA GTC TAC ACC CAC CGA AAC AAC GAA CCT TCA CTT TAG TAT TTA GTC TCA TCA CAC CCA ACC CGC CCT ACC CAC。

7. 根据权利要求3所述基于DNA-Pb²⁺功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法,其特征在于,所述Pb²⁺的电流峰值与所述上皮细胞粘附分子的浓度对数值的线性回归方程为 $Y = -100\log C + 1242$,相关系数 R^2 为0.988,所述上皮细胞粘附分子的浓度范围为100 ag/mL至10 pg/mL。

8. 根据权利要求1所述基于DNA-Pb²⁺功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法,其特征在于,所述Pb²⁺可替换为亚甲基蓝或者阿霉素。

9. 根据权利要求1-8任一所述基于DNA-Pb²⁺功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法,其特征在于,所述外泌体为上皮细胞粘附分子阳性表达。

10. 一种基于DNA-Pb²⁺功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法的应用,其特征在于,所述应用包括将权利要求1-8任一所述基于DNA-Pb²⁺功能纳米水凝胶进行外泌

体检测的均相电化学分析方法用于上皮细胞粘附分子的定量分析。

基于DNA-Pb²⁺功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学 分析方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学诊断分析方法技术领域,尤其是涉及基于DNA-Pb²⁺功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法及应用。

背景技术

[0002] 准确的乳腺癌诊断和分期对于指导临床治疗策略和预测患者的生存预后至关重要。然而,现有的诊断技术仍存在一定局限性:影像学方法在检测微小肿瘤及微转移方面灵敏度不足,而组织活检作为当前的“金标准”,由于具有创伤性,不适用于多次重复检测,限制了其在实时动态监测中的临床应用。近年来,外泌体作为肿瘤标志物进行液体活检已成为一种很有前途的癌症筛查和早期诊断技术。研究表明,外泌体的水平与肿瘤分期存在显著相关性,通常在癌症晚期阶段,外泌体的水平较高,被认为是监测肿瘤进展的有前景的生物标志物。

[0003] 然而,现有的外泌体定量检测方法,如纳米粒子追踪分析(NTA)和基于免疫学的流式细胞术,存在一定的局限性。它们往往无法有效区分不同的外泌体亚型,或者需要复杂的标记和分离步骤,从而导致操作繁琐且检测效率低下,对实验设备和技术人员要求较高,且在灵敏度上存在不足,限制了其在临床中的推广应用。因此,迫切需要一种新的外泌体检测方法,能够实现精确识别、具备高灵敏度并且操作简便,从而克服现有方法的不足,提高外泌体检测的准确性和实用性。

[0004] 近年来开发了多种新型传感技术,包括表面增强拉曼光谱、荧光检测、电化学检测、电化学发光以及比色法等方法用于外泌体分析。尽管上述方法在检测灵敏度方面表现优异,但普遍依赖磁珠富集或复杂的材料修饰及合成过程,导致检测流程繁琐。相较于抗体,核酸适配体因其合成简便、靶标亲和力强等优势,已被广泛应用于生物传感领域。适配体可与多种核酸扩增策略(如滚环扩增(RCA)、聚合酶链式反应及杂交链式反应等)联用,以实现高灵敏度的目标物检测。然而,尽管级联放大方法可显著提升信号响应效果,但相较于单一信号放大策略,其操作流程更为复杂,限制了实际应用的便捷性。当前,多种基于DNA的功能性纳米结构(包括DNA纳米球、DNA四面体及DNA纳米水凝胶)因其在增强检测灵敏度和简化操作方面的双重优势而受到广泛关注。其中,DNA纳米水凝胶主要由RCA产物互补组装而成,具有良好的可编程性、高负载能力及对特定分析物的响应能力。因此,功能集成性DNA纳米水凝胶可作为集目标识别、信号放大与输出为一体的有前景的高灵敏度传感平台。

[0005] 利用DNA纳米水凝胶在结构可编程性和分子响应性方面的优势,越来越多的研究致力于将其用于封装信号分子,以实现信号的快速响应。然而,传统的物理封装存在信号分子负载量低等问题,导致检测灵敏度受限,稳定性亦难以保障。为克服上述缺陷,近年来提出了一种将重复功能性DNA结构单元(如G-四链体或发卡结构)引入DNA纳米水凝胶的策略,用于增强信号放大和输出特异性。其中,G-四链体结构因其可特异性结合多种信号分子(如亚甲基蓝(MB)、阿霉素(DOX)、铅离子(Pb²⁺)等)而被广泛应用。例如,有研究表明G-四链体可

选择性结合MB,通过检测游离MB与G-四链体-MB复合物之间的电化学信号差异实现目标分子的精准定量。然而,相较于MB和DOX, Pb^{2+} 对G-四链体具有更强的亲和力,这为构建基于G-四链体- Pb^{2+} 识别机制的DNA纳米水凝胶平台提供了新的技术路径。电化学传感器因其小型化、操作简便及高灵敏度等特点受到关注,但其依赖电极修饰的方式常导致可重复性下降。[0006] 因此,如能实现对 Pb^{2+} 与G-四链体- Pb^{2+} 复合物的有效区分,建立一种均相(一锅法)电化学策略具有应用可行性。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明的目的之一在于提供一种基于DNA- Pb^{2+} 功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法,以解决传统的物理封装存在信号分子负载量低等问题,导致检测灵敏度受限,稳定性亦难以保障的技术问题。

[0008] 本发明的目的之二在于提供一种基于DNA- Pb^{2+} 功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法的应用。

[0009] 为了实现上述目的之一,本发明提供了一种基于DNA- Pb^{2+} 功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法,所述方法包括基于RCA产物为基础构建DNA纳米水凝胶,所述DNA纳米水凝胶包括用于识别的核酸适配体、互补碱基杂交区域及用于信号输出的G-四链体;

基于所述核酸适配体是否与目标物特异性结合导致所述DNA纳米水凝胶崩解暴露G-四链体,以及基于所述G-四链体是否与 Pb^{2+} 形成G-四链体- Pb^{2+} 复合物,通过 Pb^{2+} 的电化学信号定量所述目标物,所述目标物为外泌体。

[0010] 可选地,所述外泌体为上皮细胞粘附分子阳性表达。

[0011] 可选地,所述 Pb^{2+} 与所述G-四链体- Pb^{2+} 复合物具有明显的电化学信号差异,所述 Pb^{2+} 的电子传输性能远大于所述G-四链体- Pb^{2+} 复合物。

[0012] 可选地,当上皮细胞粘附分子存在时,其与对应的所述核酸适配体结合引发所述DNA纳米水凝胶崩解,暴露出所述G-四链体并结合游离 Pb^{2+} ,减少游离 Pb^{2+} 的浓度,导致电化学信号强度下降;

当上皮细胞粘附分子不存在时,所述DNA纳米水凝胶保持完整,所述G-四链体未暴露, Pb^{2+} 可自由扩散至ITO电极表面,显著增强电化学信号输出。

[0013] 可选地,所述G-四链体为GT GGG TA GGG C GGG TT GG。

[0014] 可选地,DNA纳米水凝胶的引物包括Primer-1和Primer-2;

所述Primer-1为GTG GGT AGG GCG GGT TGG TGA AGG TTC GTT GTT T;

所述Primer-2为ACA GAT TTT GGG AAT GGT GGG TAG GGC GGG TTG G。

[0015] 可选地,DNA纳米水凝胶的挂锁包括Padlock-1和Padlock-2;

所述Padlock-1为Phosphate-CCA ACC CGC CCT ACC CAC GTG TGA TGA GAC TAA ATA CTA AAG CAT TCC CAA AAT CTG TAT CTC TTC TAA AGA GTC TAC ACC CAC CGA AAC AAC GAA CCT TCA;

所述Padlock-2为Phosphate-CAT TCC CAA AAT CTG TAT CTC TTC TAA AGA GTC TAC ACC CAC CGA AAC AAC GAA CCT TCA CTT TAG TAT TTA GTC TCA TCA CAC CCA ACC CGC CCT ACC CAC。

[0016] 可选地,所述 Pb^{2+} 的电流峰值与所述上皮细胞粘附分子的浓度对数值的线性回归方程为 $Y = -100\log C + 1242$,相关系数 R^2 为0.988,所述上皮细胞粘附分子的浓度范围为100 ag/mL至10 pg/mL。

[0017] 可选地,所述 Pb^{2+} 可替换为亚甲基蓝或者阿霉素。

[0018] 为了实现上述目的之二,一种基于DNA- Pb^{2+} 功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法的应用,所述应用包括将上述任一所述基于DNA- Pb^{2+} 功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法用于上皮细胞粘附分子的定量分析。

[0019] 本发明提供的基于DNA- Pb^{2+} 功能纳米水凝胶进行外泌体检测的均相电化学分析方法及应用,具有以下技术效果:

本发明基于滚环扩增(RCA)方法制备的DNA纳米水凝胶,结合G-四链体结构与 Pb^{2+} 特异性识别机制构建而成,选取外泌体表面的上皮细胞黏附分子(EpCAM)作为检测靶标,利用EpCAM与其适配体之间的特异性结合引发DNA纳米水凝胶崩解,进而暴露出由RCA生成的大量G-四链体结构,后者可与 Pb^{2+} 选择性结合并调控电化学信号输出,该方法实现了一锅法、快速、高效的检测流程,整个过程在45分钟内完成。

附图说明

[0020] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0021] 图1为靶向蛋白调控的DNA纳米水凝胶实现乳腺癌来源外泌体均相电化学检测策略示意图;

图2为含G-四链体的DNA纳米水凝胶的制备和表征图;

图2a为基于RCA进行DNA纳米水凝胶合成示意图;

图2b为RCA的琼脂糖凝胶电泳图;

图2c1-c3为引物和锁式探针在连接前以及连接后和RCA产物的代表性AFM图像;

图2d为RCA产物1、RCA产物2和DNA纳米水凝胶在日光和紫外光下的拍摄图像;

图2e为DNA纳米水凝胶的流变特性图;

图2f为SYBR green I染色的DNA纳米水凝胶的荧光显微镜图像;

图2g为DNA纳米水凝胶的扫描电子显微镜图像;

图3为电化学分析实现对 Pb^{2+} 及G四链体- Pb^{2+} 复合物的特异性识别图;

图3a为 Pb^{2+} 作为G-四链体结合探针进行电化学分析的示意图;

图3b为不同G-四链体与 Pb^{2+} 结合后电化学信号情况图;

图3c为电化学峰值电流与PS2.M对数浓度之间的关系图;

图3d为在不同锁式探针浓度存在下,RCA产物和 Pb^{2+} 之间的电化学信号情况图;

图3e为G-四链体的CD谱图;

图4为EpCAM分析条件的优化图;

图4a为T4连接酶的体积图;

图4b为连接时间图;

图4c为dNTPs的体积图；
图4d为Phi29 DNA聚合酶的体积图；
图4e为扩增时间图；
图5为EpCAM的分析性能图；
图5a为使用ICP-MS检测将EpCAM加入到DNA纳米水凝胶中后游离 Cu^{2+} 和 Pb^{2+} 浓度图；
图5b-c为RCA产物1和2、DNA水凝胶的DLS和Zeta电位图；
图5d为DPV测量值图；
图5e在不同EpCAM浓度下的相应峰值电流图；
图5f为峰值电流与EpCAM浓度的对数值的线性相关性图；
图5g为EpCAM的蛋白选择性，误差线表示从三次重复测量中获得的数据图；
图6为外泌体的分析性能；
图6a为外泌体分离、表征和分析性能评估的工作流程示意图；
图6b-c为从MCF-7细胞培养上清液或血浆样品中分离的外泌体的NTA测定图；
图6d-e为来源于MCF-7细胞和血浆的外泌体的TEM图像；
图6f为MCF-7来源的外泌体标志物的Western blot分析图；
图6g-h为不同外泌体浓度下的DPV响应和 Pb^{2+} 的相应峰值电流图；
图6i为峰值电流与外泌体对数浓度的线性相关性图；
图7为临床乳腺癌患者诊断及结果分析图；
图7a为临床样本采集和分析流程图；
图7b为诊断结果条形图；
图7c为诊断结果箱形图；
图7d为诊断结果热图；
图7e为ROC分析图；
图7f为患者的临床MRI结果图；
图7g为病理结果图；
图8为临床乳腺癌患者分期及结果分析；
图8a为临床样本分期的分析流程图；
图8b为分期结果条形图；
图8c为分期结果箱形图；
图8d为分期结果热图；
图8e为ROC分析图；
图8f为早期和晚期乳腺癌患者的相应CT和图8g为病理结果图。

具体实施方式

[0022] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将对本发明的技术方案进行详细的描述。显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所得到的所有其它实施方式，都属于本发明所保护的范围。

[0023] 本发明分析方法的原理如下：

如图1所示，为一种基于DNA纳米水凝胶构建的均相电化学分析方法，用于检测乳腺癌来源的外泌体。该分析方法通过将G-四链体结构引入DNA水凝胶体系，实现了对 Pb^{2+} 的特异性识别，具有乳腺癌早期诊断与分期的潜在应用价值。

[0024] 具体以RCA产物为基础构建DNA纳米水凝胶，该水凝胶结构中集成了用于靶标识别的核酸适配体、互补碱基杂交区域及用于信号输出的G-四链体序列。当靶标分子与纳米水凝胶中的适配体特异性结合后，邻近区域的互补碱基配对结构被破坏，进而导致DNA纳米水凝胶结构崩解。该崩解过程暴露出大量G-四链体结构，后者迅速与体系中的游离 Pb^{2+} 发生选择性结合，形成G-四链体- Pb^{2+} 复合物，实现信号放大。

[0025] 由于游离 Pb^{2+} 具有优异的电子传输性能，可被电化学仪器直接检测；而G-四链体- Pb^{2+} 复合物在ITO电极上呈惰性，二者之间具有可明显区分的电化学信号差异，因此，可实现无修饰的均相电化学定量检测。

[0026] 在检测过程中，当EpCAM存在时，其与适配体结合引发纳米水凝胶崩解，暴露出G-四链体并结合游离 Pb^{2+} ，从而减少游离 Pb^{2+} 的浓度，导致电化学信号强度下降。相反，在EpCAM不存在时，水凝胶保持完整，G-四链体未暴露， Pb^{2+} 可自由扩散至ITO电极表面，显著增强电化学信号输出。

[0027] 下面结合实施例对本发明的技术方案进行具体验证。

[0028] 1 材料与方法

1.1 材料与试剂

所有不同序列的寡核苷酸均由生工生物工程有限公司(中国上海)合成并纯化，序列如表1所示。

[0029] T4 DNA连接酶、phi29 DNA聚合酶、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTPs)、牛血清白蛋白(BSA)及琼脂糖购自上海生工生物工程有限公司。

[0030] 重组人表皮细胞黏附分子(EpCAM)蛋白购自上海诺唯赞生物科技有限公司。

[0031] 硝酸铅($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)和氯化钠(NaCl)购自阿拉丁试剂有限公司(上海,中国)。

[0032] DNA分子量标准(25-500 bp)及4S Gel-Red染料购自BBI生物技术有限公司(上海,中国);6×DNA上样缓冲液购自Thermo Fisher Scientific(美国马萨诸塞州沃尔瑟姆)。

[0033] 人血清白蛋白(HSA)、胰蛋白酶、葡萄糖氧化酶(GOD)、免疫球蛋白G(IgG)、胃蛋白酶、链霉亲和素(SA)、前列腺特异性抗原(PSA)、转铁蛋白、 γ -干扰素($\text{IFN-}\gamma$)、木瓜蛋白酶、核基质蛋白22(NMP-22)、糖皮素3(GPC3)、溶菌酶、凝血酶、人类免疫缺陷病毒(HIV)p24蛋白及破伤风类毒素均购自Sigma-Aldrich(美国密苏里州圣路易斯)。

[0034] Dulbecco改良型Eagle培养基(DMEM)及人乳腺癌MCF-7细胞株购自湛江通博医疗科技有限公司。

[0035] 胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素、磷酸盐缓冲液(PBS)及0.22 μm 针头式过滤器购自Gibco Invitrogen Corporation(美国加州)。

[0036] 抗CD9、抗CD63、抗CD81抗体购自Proteintech公司(美国伊利诺伊州罗斯蒙特)，EpCAM抗体购自Thermo Fisher。

[0037] 超净离心管(25 × 89 mm, 38.5 mL, 无菌, 开口薄壁)购自Beckman Coulter(美国印第安纳州)。

[0038] 所有实验所用水均经成都超纯科技有限公司的超纯水系统纯化,电阻率为18.25 M Ω ·cm。所有工作液均以3-(N-吗啉)丙磺酸(MOPS)缓冲液(10 mM MOPS和100 mM NaNO₃, pH 7.4)配制。

[0039] 本发明中所使用的所有试剂均为分析纯或更高纯度,未经进一步纯化即直接使用。所有溶液均于4℃冰箱中保存至使用。健康人血浆样本及乳腺癌患者全血样本由四川大学华西医院提供,相关研究已获四川大学华西医院生物医学伦理委员会批准(成都,中国,批准号:20221489)。

[0040] 表1. 研究中使用的寡核苷酸的序列

Names	Sequences (5'-3')
G-quadruplex (PS2.M, G4)	GT GGG TA GGG C GGG TT GG
Primer-1	GTG GGT AGG GCG GGT TGG TGA AGG TTC GTT GTT T
Padlock-1	Phosphate-CCA ACC CGC CCT ACC CAC GTG TGA TGA GAC TAA ATA CTA AAG CAT TCC CAA AAT CTG TAT CTC TTC TAA AGA GTC TAC ACC CAC CGA AAC AAC GAA CCT TCA
Primer-2	ACA GAT TTT GGG AAT GGT GGG TAG GGC GGG TTG G
Padlock-2	Phosphate-CAT TCC CAA AAT CTG TAT CTC TTC TAA AGA GTC TAC ACC CAC CGA AAC AAC GAA CCT TCA CTT TAG TAT TTA GTC TCA TCA CAC CCA ACC CGC CCT ACC CAC
AGRO100 (G1)	GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GG
T30695 (G2)	GGG T GGG T GGG T GGG T
PW17 (G3)	GGG TA GGG C GGG TT GGG
PS2.M (G4)	GT GGG TA GGG C GGG TT GG
EAD2 (G5)	CT GGG A GGG A GGG A GGG A
TBA15 (G6)	GGT TGG TGT GGT TGG
TBA27 (G7)	AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT
Apt _{ATP} (G8)	ACC TGG GGG AGT ATT GCG GAG GAA GGT
HTG ^a (G9)	A GGG TTAAGGG TTAAGGG TTAAGGG
T2 ^b (G10)	GGGG TT GGGG TT GGGG TT GGGG

[0041] 1.2 细胞培养和外泌体分离

细胞培养:MCF-7细胞在含有10%(v/v) FBS的Dulbecco氏改良Eagle培养基(DMEM)中进行培养,培养条件为37℃、5% CO₂的细胞培养箱中。当细胞融合度达到70%-80%时,使用不含任何添加成分的纯DMEM对细胞进行两次洗涤,随后更换为无血清DMEM继续培养48小时。培养结束后,将所有细胞上清液收集于50 mL无菌锥形离心管中,进行梯度离心以提取外泌体。

[0042] 外泌体提取:首先以500 ×g、4℃离心10分钟以沉淀细胞及其碎片;所得上清液再以2,000 ×g、4℃离心20分钟以进一步去除细胞碎片和凋亡小体;随后将上清液以10,000 ×g、4℃离心30分钟以去除较大的细胞外囊泡。之后,上清液通过孔径为0.22 μm的滤膜进行过滤,以尽可能减少微粒污染。过滤后的培养基采用150,000 ×g、4℃条件下超高

速离心2小时,沉淀所得外泌体用PBS洗涤后再次以相同条件离心。最终,提取得到的外泌体重悬于200 μL PBS中,并于 -80°C 保存备用。所提取外泌体通过纳米粒子追踪分析(NTA)、透射电子显微镜(TEM)及蛋白质印迹(Western blot)方法进行特征鉴定。

[0043] 1.3 EpCAM/MCF-7细胞的分析步骤

首先,将5'-磷酸化的padlock-1(100 μM ,1 μL)、primer-1(100 μM ,1 μL)与NaCl溶液(800 mM,2 μL)和16 μL 超纯水混合。采用相同方式,将5'-磷酸化的padlock-2(100 μM ,1 μL)与primer-2(100 μM ,1 μL)进行处理。所述混合液分别在 95°C 加热5分钟后缓慢冷却至室温。

[0044] 随后,向上述混合液中加入T4 DNA连接酶(5 U/ μL ,1 μL)、T4 DNA连接酶反应缓冲液(10 $\times$,5 μL)及24 μL 超纯水,并于 37°C 孵育75分钟以完成连接反应,并将反应混合液在 65°C 加热10分钟。将脱氧核糖核苷三磷酸混合液(dNTPs,25 mM,4 μL)、phi29 DNA聚合酶(10 U/ μL ,1.25 μL)、phi29反应缓冲液(10 $\times$,10 μL)、牛血清白蛋白(25 mg/mL,1 μL)、NaCl溶液(800 mM,5 μL)及29.5 μL 超纯水,加入连接反应产物中,并在 37°C 下反应2.5小时,随后于 65°C 加热10分钟以灭活phi29 DNA聚合酶。

[0045] 最终,将上述所得反应液1(30 μL)与反应液2(30 μL)混合,形成DNA水凝胶。

[0046] 向该混合液中加入60 μL MOPS缓冲液(10 mM MOPS,100 mM NaNO_3 ,pH 7.3),随后加入60 μL 不同浓度的EpCAM蛋白溶液,并在室温下孵育30分钟。接着加入 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (10 μM ,20 μL),继续反应15分钟。最后,向溶液中加入200 μL 10 mM MOPS缓冲液。

[0047] 所有测试均在CHI660E电化学工作站(中国上海)上进行,该工作站配备了一个三电极系统,包括预处理的氧化铟锡(ITO)电极作为工作电极,饱和Ag/AgCl作为参比电极,铂丝电极作为辅助电极。选择差分脉冲伏安法(DPV)进行 $-0.7 - 0.1$ V范围内的测量。脉冲幅度设定为0.05 V,脉冲宽度为0.05 s,电位增量为0.004 V,周期为0.5 s。

[0048] 1.4 临床样本的预处理

患者外周血样本由四川大学华西医院(中国,成都)采集,所有操作均在伦理批准(批准编号:20221489)后进行。每位受试者采集4 mL静脉全血,采集容器为无菌、EDTA包被的真空抗凝管。为实现血浆的有效分离,所采集的血样需在2小时内进行处理。首先在 25°C 下以2500 g离心15分钟,获得上层血浆。随后,将分离出的血浆层小心转移,并在相同条件下再次离心,以去除残余血小板。最终获得的血浆样本储存在 -80°C 直至后续分析使用。

[0049] 2 含G-四链体的DNA纳米水凝胶的合成

本发明采用基于RCA成功合成了DNA纳米水凝胶,如图2所示。

[0050] 为验证RCA环状模板及其扩增产物的有效形成,进行2.5%琼脂糖凝胶电泳分析(如图2b所示)。结果表明,环状RCA模板(泳道7和8)迁移速度明显慢于线性单链DNA(泳道1至6),而RCA产物1和产物2(泳道9和10)则停留在凝胶孔内,表明其分子量远远增大。同时,利用原子力显微镜(AFM)对RCA过程中的DNA结构变化进行了成像分析(图2c)。在连接前,AFM图像显示为均匀分布的纳米点(图2c1),对应于单个引物及锁式探针,尺寸与短DNA片段一致。连接完成后,观察到直径约40 nm的环状纳米结构(图2c2),证实RCA模板形成成功。随后,RCA反应形成大量缠绕的DNA纳米丝,表明超长RCA产物的生成(图2c3)。

[0051] 将RCA产物1与产物2混合后可形成半透明凝胶(图2d),其物理特性明显区别于初始溶液状态,进一步证实了水凝胶的成功构建。在流变学性能测试中,DNA纳米水凝胶的储

能模量 (G' , 约10 Pa) 显著高于损耗模量 (G'' , 约1 Pa), 表明其呈超软固态特性。通过时间扫描测试, G' 值在整个测试过程中持续高于 G'' , 进一步验证了该水凝胶的机械稳定性 (图2e)。采用荧光显微镜和扫描电子显微镜 (SEM) 对水凝胶的结构进行分析, 揭示其内部具有明确的多孔三维结构。SYBR Green I 染色后的荧光图像显示出均匀分布的绿色荧光 (图2f)。高分辨率SEM图像进一步揭示了纤维直径从几十纳米至数百纳米不等的三维交联网络结构 (图2g)。该多尺度孔隙结构赋予该DNA纳米水凝胶在外泌体检测及相关生物医学领域中巨大的应用潜力。

[0052] 3 电化学分析实现对 Pb^{2+} 及 Pb^{2+} -G四链体复合物的特异性识别

本发明提供了一种基于电化学分析技术实现 Pb^{2+} 特异性识别的方法, 其中 Pb^{2+} 作为电化学信号指示分子, 与G-四链体结构发生特异性结合, 从而形成稳定复合物。

[0053] G-四链体作为一种独特的核酸二级结构, 其与 Pb^{2+} 具有特异性结合能力, 是信号转换过程中的关键介质。随着G-四链体浓度的升高, 与 Pb^{2+} 结合产生的电化学信号呈现逐渐减弱的趋势, 表明G-四链体浓度与电化学信号强度之间存在负相关关系 (图3a)。

[0054] 进一步对一系列不同序列的G-四链体进行 Pb^{2+} 结合能力测试, 并对相应电化学信号的信噪比 (SNR) 进行分析。其中, PS2.M序列表现出最为显著的线性响应关系, 其G-四链体浓度与电化学信号衰减程度之间的相关性较高, 信噪比达到1.7, 适合用于构建高灵敏度的电化学检测系统 (图3b和图3c)。

[0055] 基于该发现, 进一步研究了环形模板浓度对G-四链体扩增效果的影响。结果显示, 随着RCA产物的累积, 电化学信号持续下降, 证明扩增产物可与 Pb^{2+} 结合, 促进G-四链体结构的形成, 从而增强检测灵敏度 (图3d)。

[0056] 为进一步验证G-四链体结构的形成, 采用圆二色性光谱 (CD) 进行结构确认。如图3e所示, 人工合成的G-四链体显示出在310 nm处的正带和在265 nm处的负带, 这一谱图特征与已知的G-四链体一致, 确认了在 Pb^{2+} 存在的条件下, RCA成功生成了呈反平行构象的G-四链体结构。

[0057] 4 EpCAM的可行性和分析性能

为了显示最佳结果, 优化实验条件, 如图4所示, 特别关注EpCAM和 Pb^{2+} 的孵育时间和浓度。

[0058] 在优化条件下, 针对体系中EpCAM蛋白响应的可行性进行了多维度验证, 如图5所示。

[0059] 首先, 分别对体系中游离的 Cu^{2+} 及 Pb^{2+} 含量进行定量分析, 在不同浓度的EpCAM加入DNA纳米水凝胶后, 随着水凝胶的崩解, 原先包裹的 Cu^{2+} 释放, 导致信号强度上升; 包含G-四链体- Pb^{2+} 复合结构的DNA链也同样释放至上清液中, 增强电化学信号强度。通过动态光散射 (DLS) 技术进一步验证该体系的结构变化: 分别加入EpCAM蛋白浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 、10 fg/mL 与1 pg/mL 时, RCA产物1、产物2与DNA水凝胶的粒径依次为106 nm、122 nm、955 nm、825 nm、712 nm和531 nm。Zeta电位测试结果显示, 在DNA水凝胶形成过程中, RCA产物的电位由-4.0 mV变化为-0.1 mV, 表明由于结构致密化及电荷屏蔽作用, 磷酸骨架所携带的负电荷暴露度降低。随着蛋白浓度升高, 水凝胶的粒径显著下降及Zeta电位绝对值升高, 反映出网络结构的崩解及DNA链的重新分散, 验证了该水凝胶在生物传感方面的响应特性。

[0060] 随后, 对体系进行检测性能定量评估。在EpCAM浓度从100 $\mu\text{g/mL}$ 至10 pg/mL 的范

围内, Pb^{2+} 电化学信号呈显著下降趋势, 且电流峰值与EpCAM浓度对数值呈良好线性关系。线性回归方程为 $Y = -100\text{LogC} + 1242$, 相关系数 R^2 为 0.988, 3倍信噪比计算的检测限 (LOD) 为 30 ag/mL。

[0061] 为评估本体系在复杂生物样本中的特异性与抗干扰能力, 进一步引入一组常见外源蛋白 (包括人血清白蛋白及肿瘤标志物如glypican 3) 作为干扰物进行对比分析。在干扰物浓度为 1 pg/mL 时, 其产生的电化学信号与空白对照几乎一致, 而EpCAM即使在低浓度 (100 ag/mL 与 1 fg/mL) 条件下, 仍引起显著电信号下降。这些结果共同证明了该检测方法具有出色的灵敏度和高选择性, 使其适用于后续的临床样品分析。

[0062] 5 外泌体的分析性能

在对本发明的外泌体检测方法的分析性能进行评估之前, 首先对来源于MCF-7细胞上清液和临床血浆样本的外泌体进行表征, 重点分析其尺寸、浓度、形态以及表面蛋白表达等关键参数 (如图6a所示)。

[0063] 采用NTA对外泌体的浓度和尺寸分布进行定量分析。结果显示, 从MCF-7细胞上清液中分离的外泌体浓度约为 1.6×10^{10} 颗粒/mL, 平均直径为 160 nm (如图6b所示)。

[0064] 与此相比, 从临床血浆样本中分离的外泌体浓度稍低, 为 5.9×10^9 颗粒/mL, 平均直径略大, 为 172 nm (如图6c所示)。实时NTA图像如图6b和图6c所示。

[0065] 为了进一步验证外泌体的形态, 采用TEM进行观察, 结果表明外泌体典型的杯状结构, 具有双层膜结构 (如图6d和图6e所示)。观察到的形态与NTA的尺寸分布数据一致, 进一步证实了表征的准确性。

[0066] 此外, 采用Western blot对这些外泌体的表面蛋白表达进行检测, 如CD9、CD63和CD81以及EpCAM (如图6f所示)。这些蛋白的存在进一步表明外泌体已成功分离, 且适用于后续分析, 证明其作为临床应用中可靠检测靶标的潜力。电化学信号与外泌体浓度的对数之间呈强线性相关。在外泌体浓度范围为 10^3 至 10^7 颗粒/mL 时, 电化学信号与外泌体浓度呈负相关。外泌体浓度的回归方程为 $Y = -124.2\text{LogC} + 1769.4$, 相关系数 R^2 为 0.993 (如图6g-i 所示)。与现有的电化学方法相比, 本发明的方法通过间接测量表面蛋白EpCAM的表达来定量外泌体, 具有明显优势。

[0067] 6 外泌体分析方法的临床适用性

为了进一步评估这种电化学方法的实用性和准确性, 收集了健康个体 ($n = 12$) 和乳腺癌患者 ($n = 27$) 的 39 份临床血液样本进行验证。对上述临床样本进行电化学分析后发现, 健康对照组与乳腺癌患者之间的电化学峰值之间存在显著差异 (见图7b与7c)。

[0068] 具体而言, 乳腺癌患者样本中测得的电化学峰值明显降低, 这与其外泌体中EpCAM表达水平升高密切相关。此外, 为了更直观地区分乳腺癌患者与健康个体, 本发明生成热图, 图中较浅的颜色代表EpCAM浓度升高 (图7d)。为了进一步验证本系统的诊断性能, 采用受试者工作特征曲线 (ROC曲线) 分析方法进行评估。本发明所述检测系统在临床样本中的诊断能力表现出优异的特异性与灵敏度, 具体为特异性 91.7% (11/12) 与灵敏度 92.6% (25/27) (图7e)。

[0069] 此外, 曲线下面积 (AUC) 为 0.944, 进一步证实了本方法在乳腺癌检测中的高准确性。进一步地, 该外泌体分析方法的检测结果与磁共振成像 (MRI) 和组织病理学检测结果表现出高度一致性 (见图7f与7g), 进一步验证了本方法的可靠性。与现有临床主流诊断手段

之间的高度一致性表明,该方法具有作为乳腺癌筛查与诊断的补充或替代方案的潜在临床应用价值。

[0070] 为进一步评估本发明所述电化学检测系统在乳腺癌分期中的临床应用潜力(图8a),本发明对来自27例不同分期的乳腺癌患者的血液样本进行了系统性分析。

[0071] 电化学检测结果显示,随着肿瘤分期的进展,电化学信号呈现逐步下降趋势(图8b)。对早期(I-II期)与晚期(III-IV期)乳腺癌患者的电化学信号进行定量比较,结果表明晚期患者的信号强度显著低于早期患者(图8c-d)。

[0072] 为验证该平台在乳腺癌分期识别中的诊断性能,进一步进行ROC曲线分析,结果显示该系统在区分早期与晚期乳腺癌方面具有良好诊断能力,曲线下面积(AUC)为0.864,灵敏度为86%,特异性为70%(图8e)。

[0073] 具体实验中,对第1号与第7号患者的检测结果进行了比较分析。依据其计算机断层扫描(CT)结果及组织病理学检查,第1号患者未见远处器官转移,而第7号患者存在远处转移,提示其乳腺癌处于更晚期阶段(图8f-g)。与之对应,二者在电化学信号上存在显著差异。

[0074] 综上所述,本发明所述无创电化学检测平台可实现对乳腺癌分期的准确识别,具有作为临床辅助工具的重要价值,尤其适用于传统影像学手段受限的临床场景,在制定个体化治疗策略中具有潜在应用前景。

[0075] 7 结论

本发明成功开发了一种一锅法电化学分析方法,用于检测肿瘤来源的外泌体。

[0076] 该方法将适配体识别与靶向响应的DNA水凝胶相结合,诱导形成G-四链体-Pb²⁺复合物,并利用Pb²⁺状态的电化学差异进行信号输出。该一锅法检测过程使得检测在仅45分钟内即可迅速高效地完成。该方法进一步应用于临床样本中外泌体的检测,结果与临床诊断和分期高度一致,为个性化治疗策略和管理提供了辅助工具。尽管EpCAM作为代表性标志物用于本研究,但它并不能全面捕捉乳腺癌的异质性。未来的研究应集中在整合更多的信号分子,以开发多靶点系统,从而优化肿瘤诊断和分期的灵敏度和特异性。此外,该策略还可适应整合多种靶向不同生物标志物的适配体,实现多重检测。

[0077] 以上所述,仅为本发明的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此,本发明的保护范围应以所述权利要求的保护范围为准。

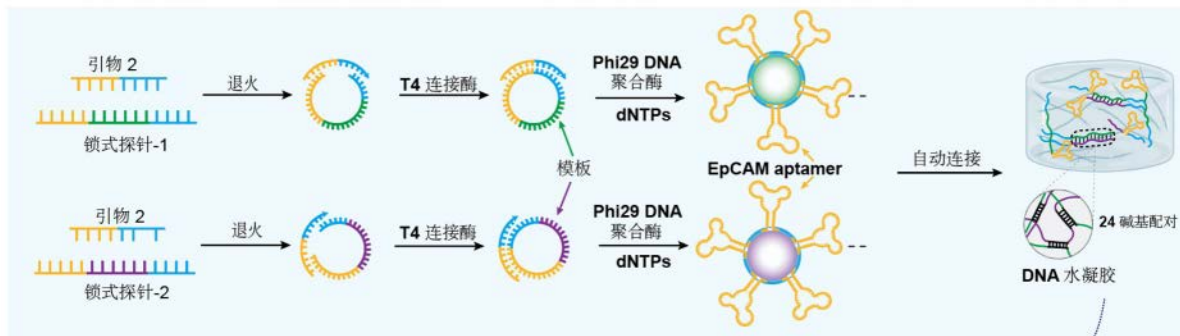
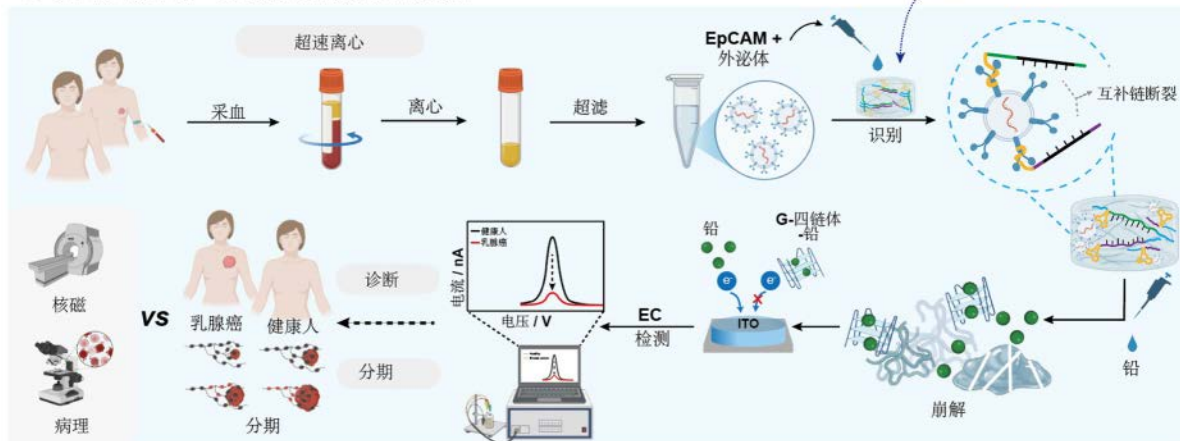
A 基于RCA的含G-四链体DNA纳米水凝胶**B 铅离子特异性一步法电化学适配体传感器**

图 1

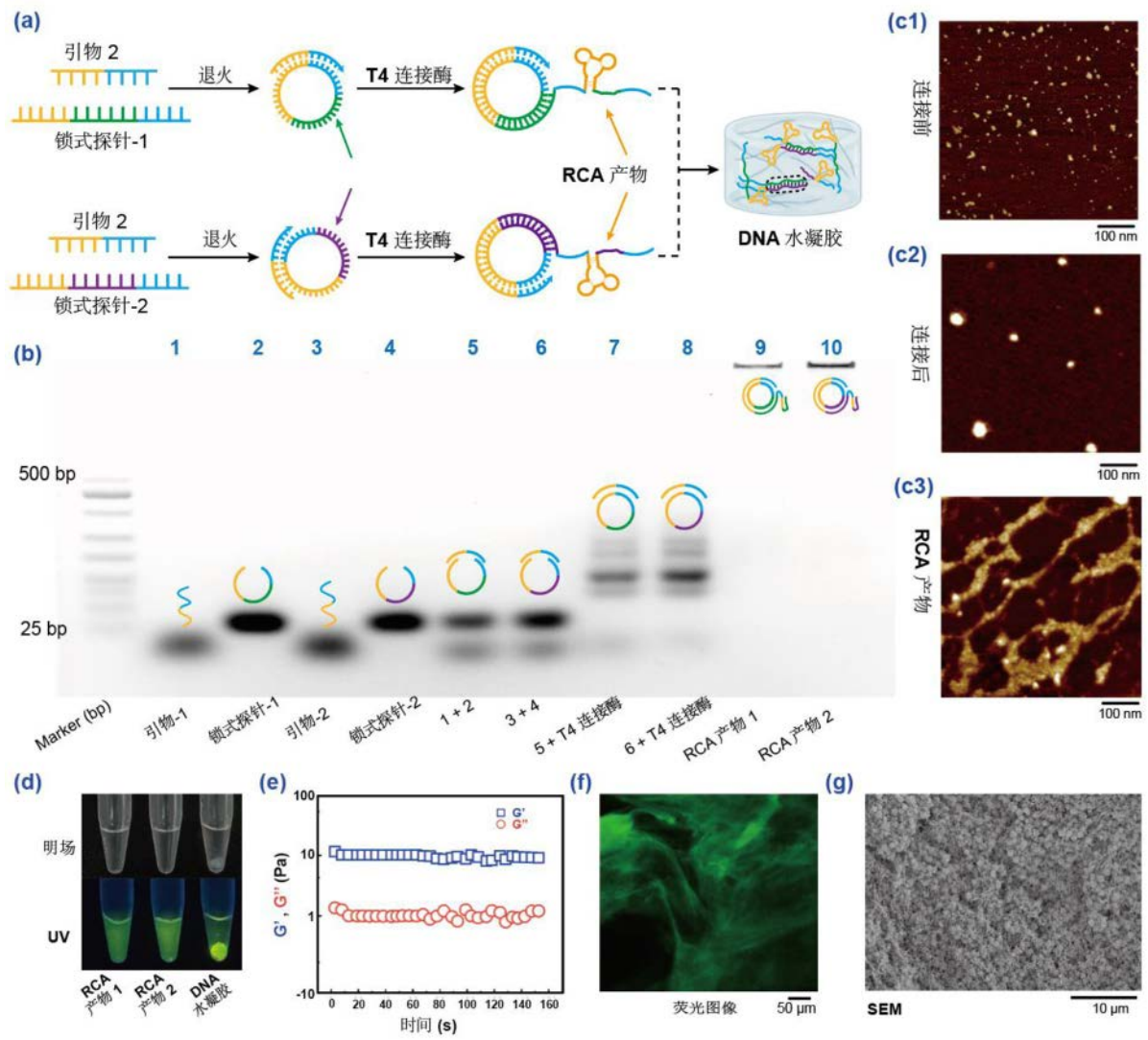


图 2

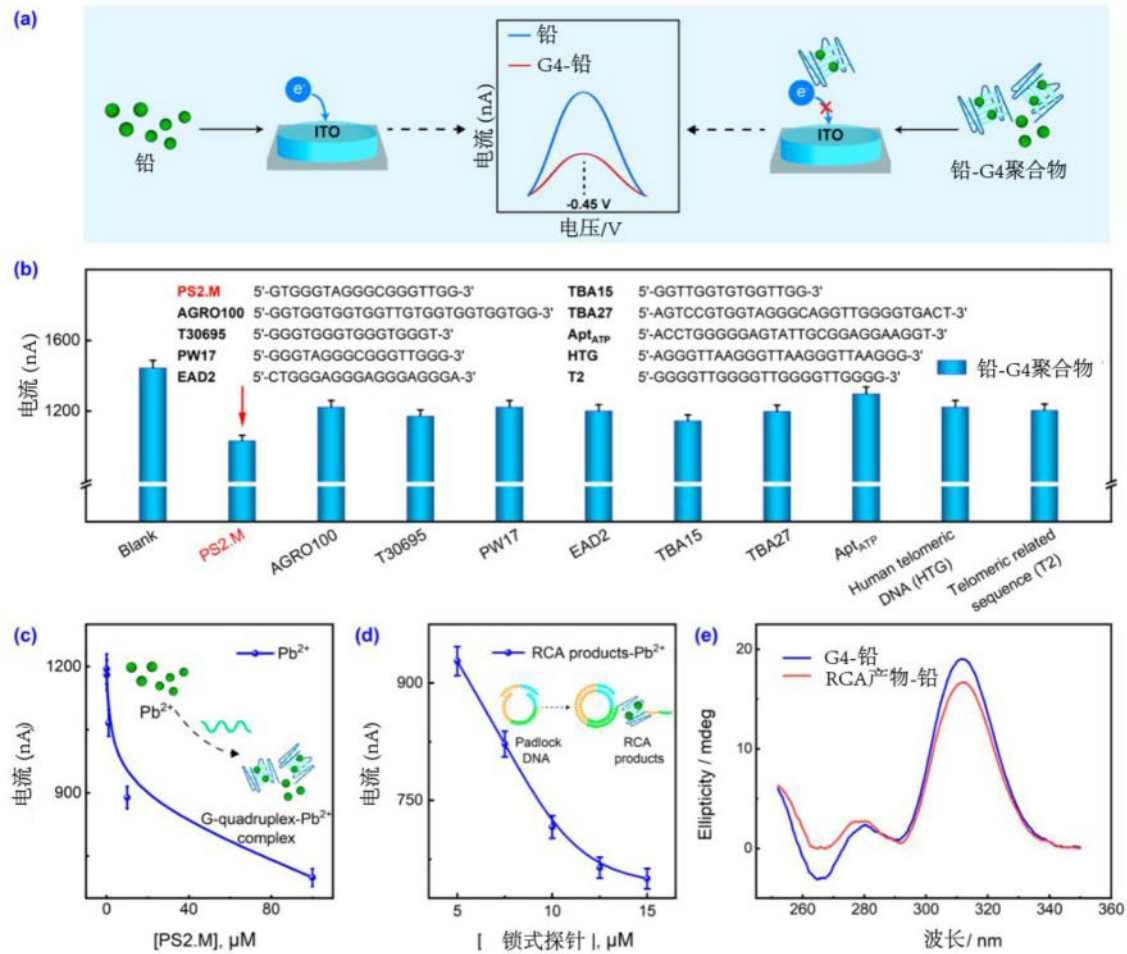


图 3

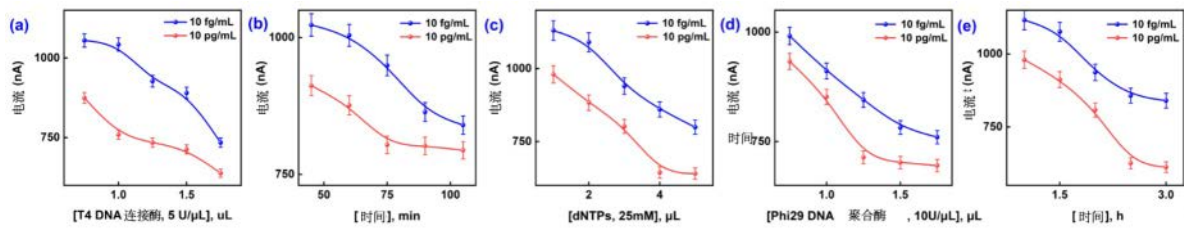


图 4

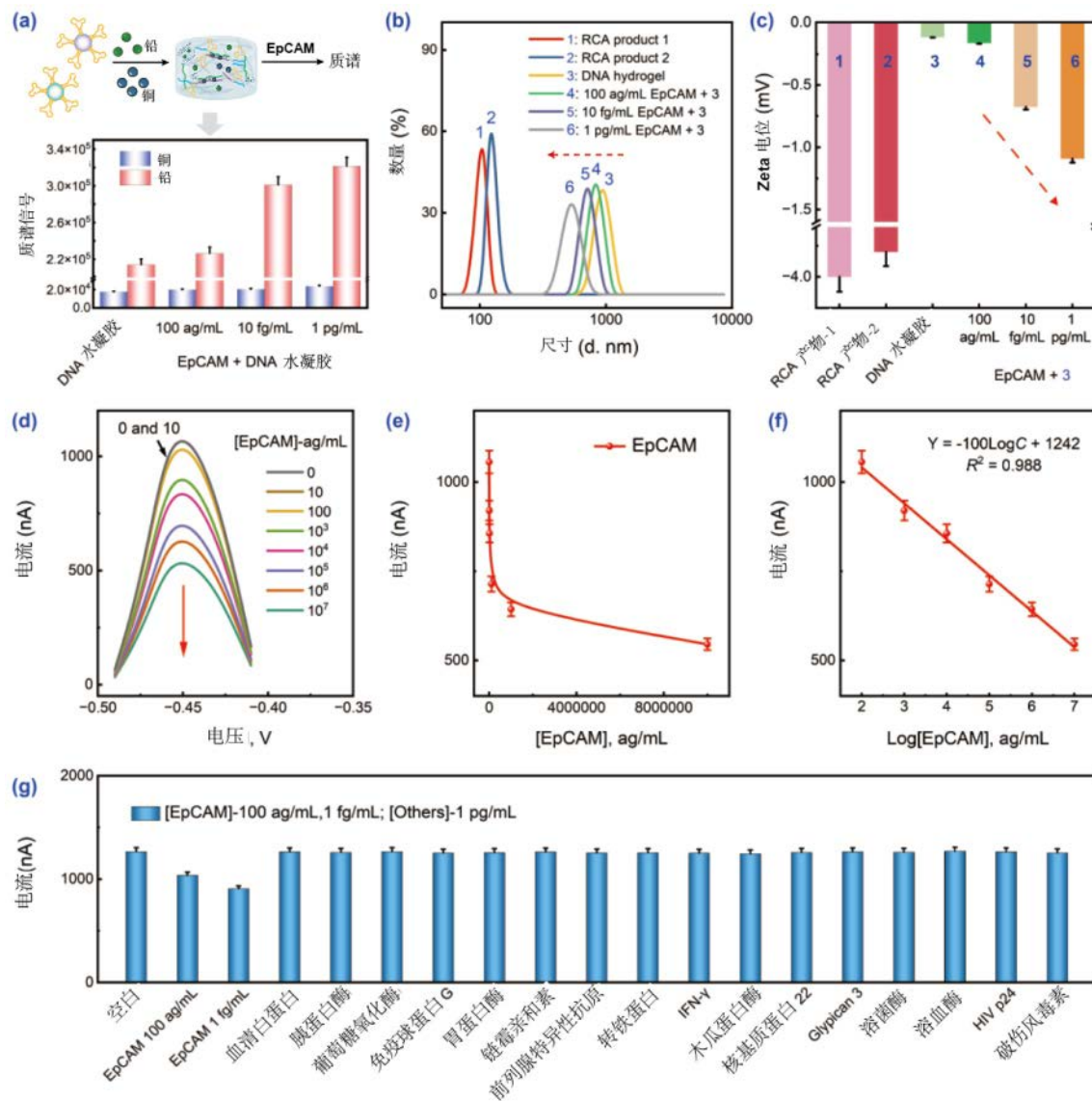


图 5

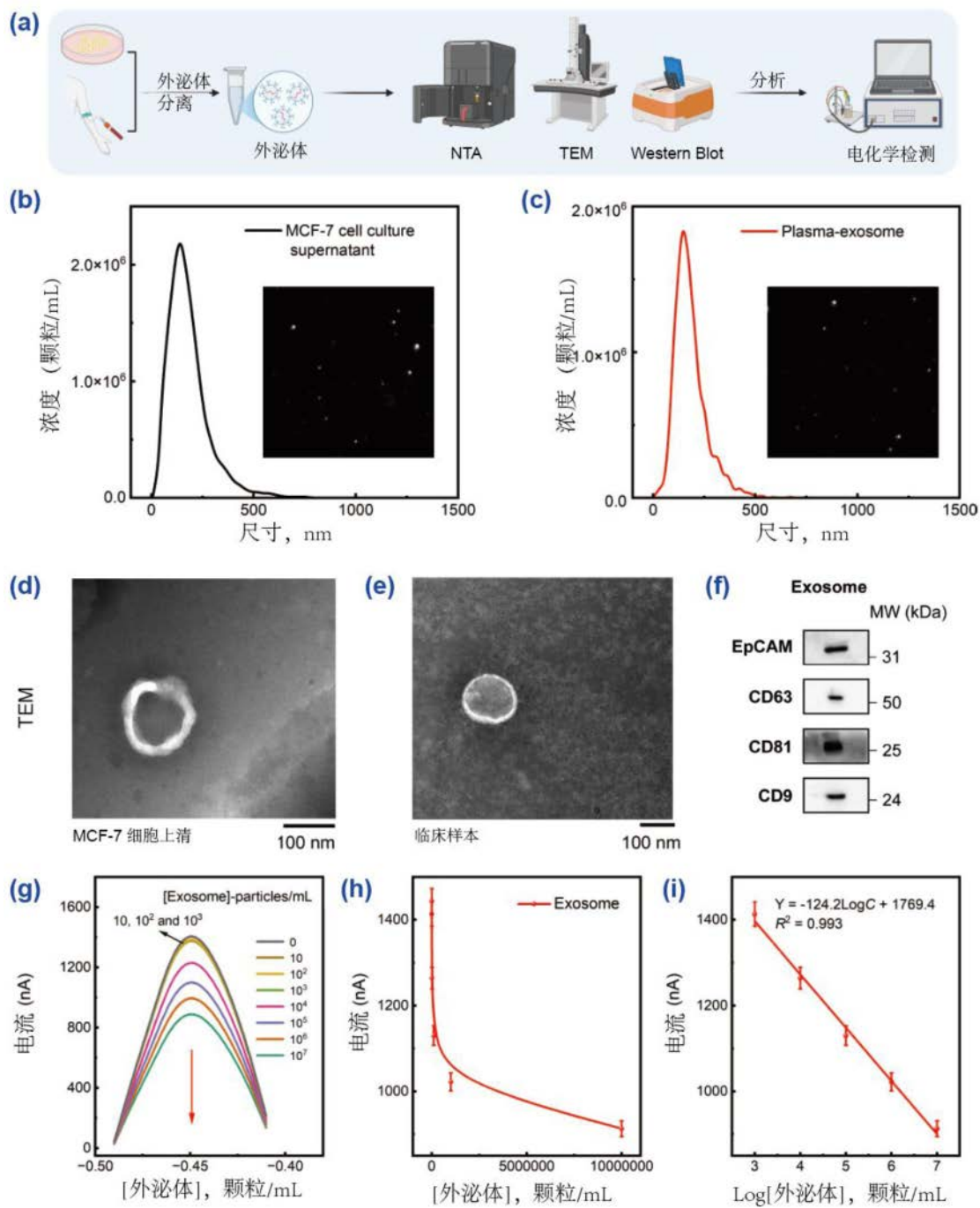


图 6

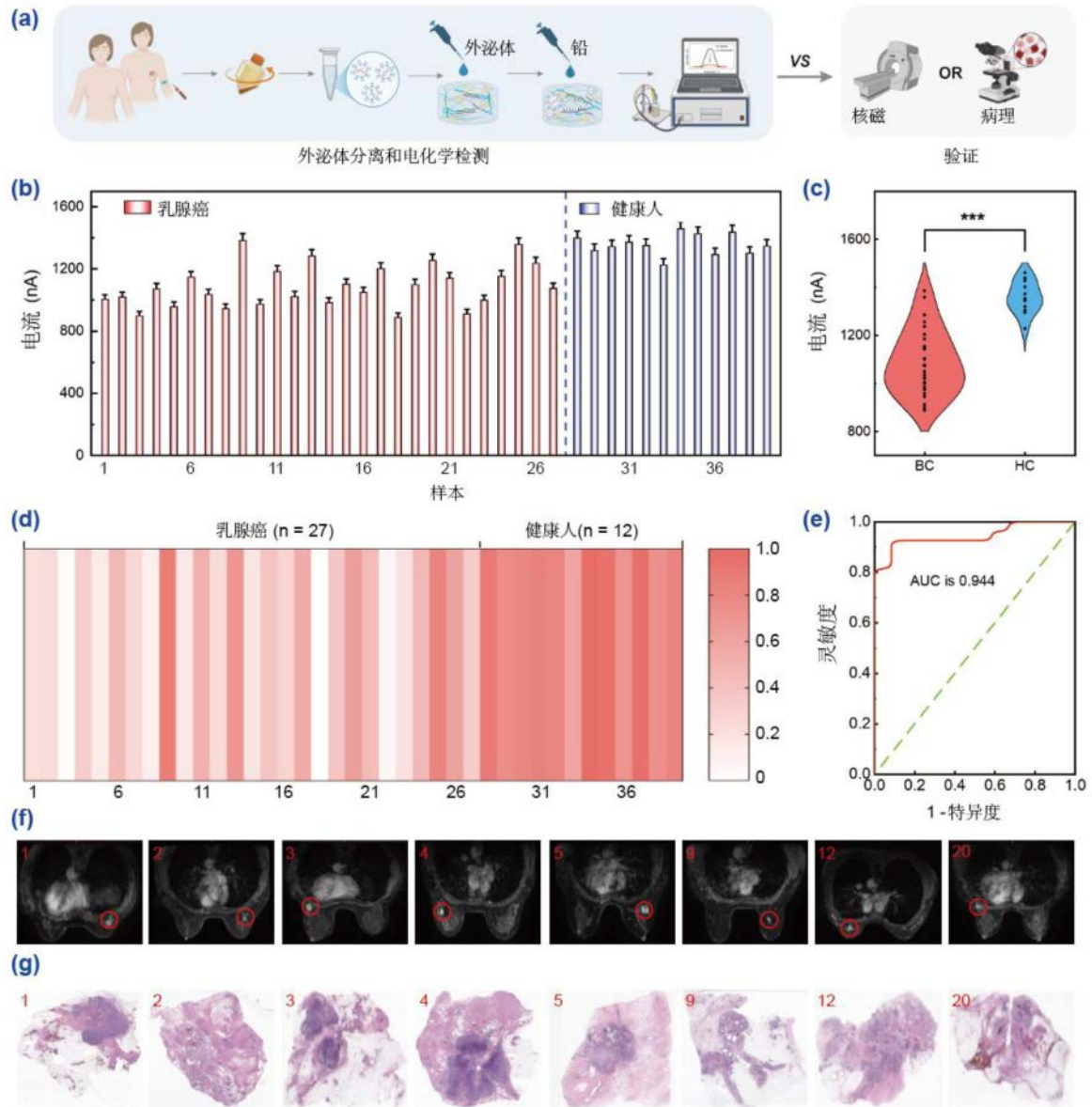


图 7

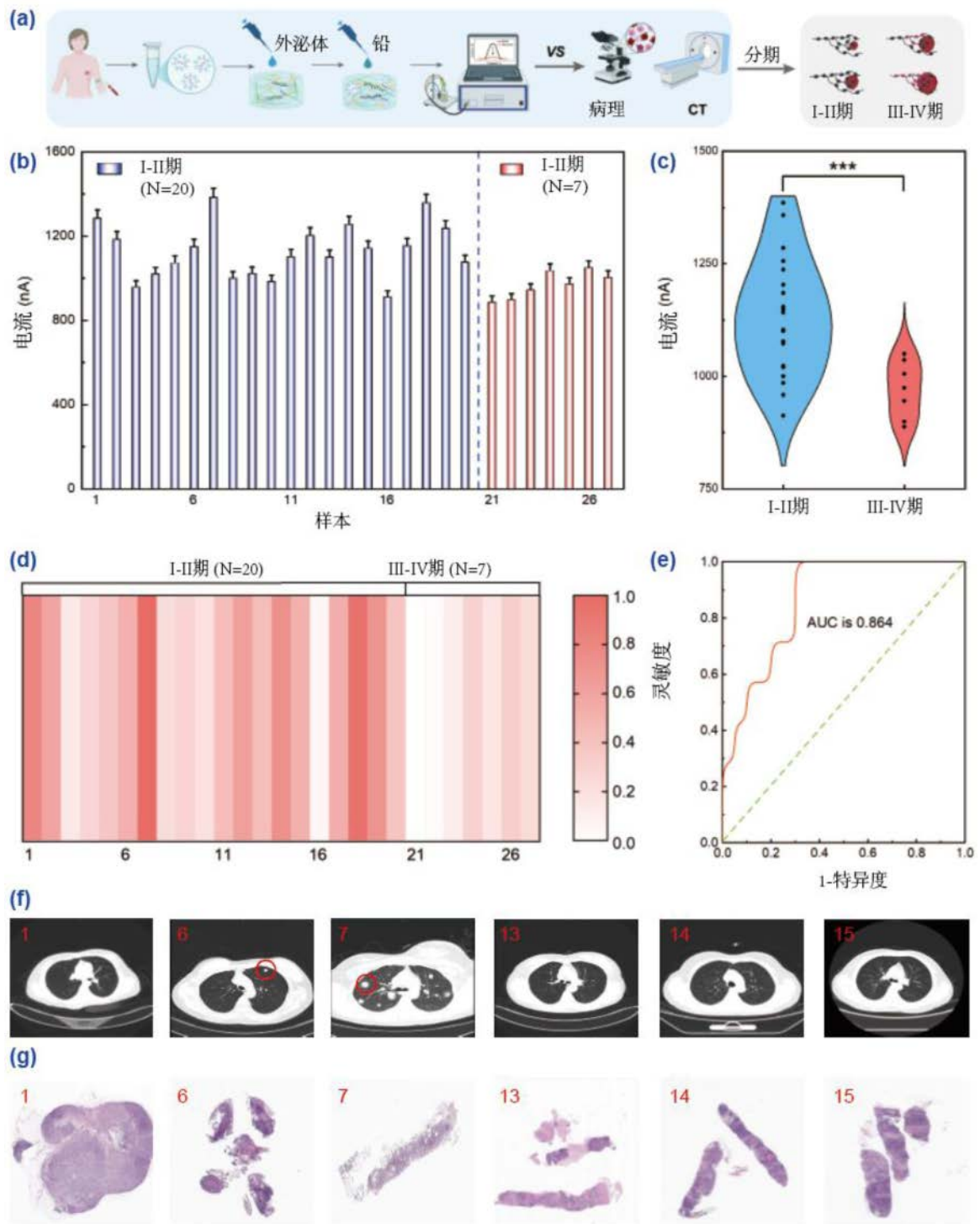


图 8