



(21) 申请号 202310986994.8

(22) 申请日 2023.08.07

(71) 申请人 中国科学院地球化学研究所

地址 550081 贵州省贵阳市观山湖区林城西路99号

申请人 广东省科学院生态环境与土壤研究所

(72) 发明人 刘承帅 陈俊华 陈曼佳 孙静

吴非 孟方圆

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有

限公司 44205

专利代理师 罗新

(51) Int. Cl.

G12Q 1/6818 (2018.01)

G01N 21/64 (2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一种检测铅和镉的半减器分子逻辑门智能化检测系统及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种检测铅和镉的半减器分子逻辑门智能化检测系统及其应用,涉及分析检测领域。本发明公开了用于检测两种不同重金属的试剂,两种不同重金属为第一重金属和第二重金属;所述试剂包括发夹探针组、对第一重金属具有特异性的第一核酸核酶和对第二重金属具有特异性的第二核酸核酶;所述发夹探针组包括发夹探针H0、发夹探针H1、发夹探针H2、发夹探针H3和发夹探针H4。该试剂能够准确的智能化检测待检样品中是否含有铅和镉,且特异性好,对于其他非目标金属离子均不会产生假阳性。且灵敏度高,对铅、镉的检测限分别为58fM、25fM,相比于常规的检测技术更加灵敏智能。

1. 一种用于检测两种不同重金属的试剂,其特征在于,两种不同重金属为第一重金属和第二重金属;所述试剂包括发夹探针组、对第一重金属具有特异性的第一核酸核酶和对第二重金属具有特异性的第二核酸核酶;

所述发夹探针组包括发夹探针H0、发夹探针H1、发夹探针H2、发夹探针H3和发夹探针H4;

所述发夹探针H0从5'端至3'端依次包括5*序列、6序列、3*序列、2*序列、1*序列、6*序列和5*序列;6片段和6*片段互补,形成茎环;

所述发夹探针H1从5'端至3'端依次包括1序列、2序列、3序列、4*序列、3*序列和2*序列;2-3片段和3*-2*片段互补,形成茎环;

所述发夹探针H2从5'端至3'端依次包括3序列、4序列、3*序列、2*序列和4*序列;4片段和4*片段互补,形成茎环;

发夹探针H3从5'端至3'端依次包括a序列、b序列、c序列、d*序列、c*序列和b*序列;b-c片段和c*-b*片段互补,形成茎环;

所述发夹探针H4从5'端至3'端依次包括c序列、d序列、c*序列、b*序列和d*序列;6片段和6*片段互补,形成茎环;d片段和d*片段互补,形成茎环;

所述第一核酸核酶包括反向互补配对的第一酶链和第一底物链;所述第一底物链中含有第一酶切位点,酶切后得到A片段和B片段;所述A片段与所述发夹探针H0的5*-6片段互补;

所述第二核酸核酶包括反向互补配对的第二酶链和第二底物链;所述第二底物链中含有第二酶切位点,酶切后得到C片段和D片段;所述C片段与所述发夹探针H0的6*-5*片段互补;

所述B片段与所述D片段反向互补;

其中,所述1序列与所述1*序列反向互补,所述2序列与所述2*序列反向互补,所述3序列与所述3*序列反向互补,所述4序列与所述4*序列反向互补,所述5序列与所述5*序列反向互补,所述6序列与所述6*序列反向互补,所述a序列与所述a*序列反向互补,所述b序列与所述b*序列反向互补,所述c序列与所述c*序列反向互补,所述d序列与所述d*序列互补。

2. 根据权利要求1所述的试剂,其特征在于,所述第一重金属和所述第二重金属分别独立选自铅和镉;

优选地,所述第一酶链和第一底物链的核苷酸序列分别如SEQ ID No.1和SEQ ID No.2所示;和/或

所述第二酶链和第二底物链的核苷酸序列分别如SEQ ID No.3和SEQ ID No.4所示;

其中,rA表示腺嘌呤核糖核苷酸,rA*表示腺嘌呤核糖核苷酸用硫代硫酸酯修饰。

3. 根据权利要求2所述的试剂,其特征在于,所述发夹探针H0、所述发夹探针H1、所述发夹探针H2、所述发夹探针H3和所述发夹探针H4的核苷酸序列分别如SEQ ID No.5~SEQ ID No.9所示。

4. 根据权利要求1至3任一项所述的试剂,其特征在于,所述第一酶切位点的对立两侧分别修饰有第一荧光基团和第一淬灭基团;

所述第二酶切位点的对立两侧分别修饰有第二荧光基团和第二淬灭基团;

所述第一荧光基团与所述第二荧光基团不同。

5. 一种重金属检测试剂盒,其特征在于,包括权利要求1至4任一项所述的试剂。

6. 权利要求1至4任一项所述的试剂或权利要求5所述的重金属检测试剂盒在重金属检测或制备重金属检测产品中的应用。

7. 一种重金属检测系统,其特征在于,包括:

A1) 权利要求1至4任一项所述的试剂或权利要求5所述的重金属检测试剂盒;

A2) 荧光检测仪器。

8. 一种检测两种不同重金属的方法,其特征在于,包括以下步骤:

将待检样品与权利要求4中所述的第一核酸核酶、第二核酸核酶混合反应后,继续加入权利要求1至3任一项所述的发夹探针组反应,检测荧光信号,分析所述待检样品中的重金属存在情况。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,待检样品与所述第一核酸核酶、所述第二核酸核酶混合反应的体系包括:

第一核酸核酶80nM~120nM;

第二核酸核酶80nM~120nM;

和/或,加入所述发夹探针组后的反应体系包括:

探针 H0 100 nM~200 nM;

探针 H1 100 nM~200 nM;

探针 H2 100 nM~200 nM;

探针 H3 100 nM~200 nM;

探针 H4 100 nM~200 nM。

10. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,分析所述待检样品中的重金属存在情况包括:

1) 第一荧光基团和第二荧光基团的相对荧光强度均小于期望荧光强度阈值,所述待检样品中不存在第一重金属和第二重金属,或所述待检样品中同时存在第一重金属和第二重金属;

2) 第一荧光基团的相对荧光强度大于期望荧光强度阈值,第二荧光基团的相对荧光强度小于期望荧光强度阈值,所述待检样品中存在第一重金属,不存在第二重金属;

3) 第一荧光基团和第二荧光基团的相对荧光强度均大于期望荧光强度阈值,所述待检样品中不存在第一重金属,存在第二重金属。

一种检测铅和镉的半减器分子逻辑门智能化检测系统及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分析检测技术领域,尤其是涉及一种检测铅和镉的半减器分子逻辑门智能化检测系统及其应用。

背景技术

[0002] 近年来,随着工业、农业、加工业等行业的迅猛发展,环境中重金属污染日趋加剧。铅和镉等重金属广泛存在于水体、土壤等环境中,严重危害环境安全和人体健康。

[0003] 相关技术中,常用的重金属分析方法主要有比色法、紫外分光光度法、原子吸收光谱法、电感耦合等离子体质谱法等。比色法存在特异性不好,灵敏度较低等缺点,多用于定性或者半定量检测;紫外分光光度法的步骤复杂(需要先将重金属离子转变为能够吸收光谱的物质),还会产生副产物,干扰检测结果,且灵敏度不高;原子吸收光谱法的样品前处理繁琐,检测耗时长;电感耦合等离子体质谱法的检测仪器和检测成本高昂,操作技术要求高。

[0004] 因此,迫切需要开发一种灵敏度高、特异性高,且能够实现智能化识别重金属铅和镉,的检测方法。

发明内容

[0005] 本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此,本发明提出一种用于检测两种不同重金属的试剂,可以在分子水平上实现对铅和镉的智能化识别与传感,特异性好,灵敏度高。

[0006] 本发明还提供一种重金属检测试剂盒。

[0007] 本发明还提供上述试剂或重金属检测试剂盒在重金属检测或制备重金属检测产品中的应用。

[0008] 本发明还提供一种重金属检测系统。

[0009] 本发明还提供一种检测两种不同重金属的方法。

[0010] 根据本发明的第一方面实施例的一种用于检测两种不同重金属的试剂,两种不同重金属为第一重金属和第二重金属;所述试剂包括发夹探针组、对第一重金属具有特异性的第一核酸核酶和对第二重金属具有特异性的第二核酸核酶;

[0011] 所述发夹探针组包括发夹探针H0、发夹探针H1、发夹探针H2、发夹探针H3和发夹探针H4;

[0012] 所述发夹探针H0从5'端至3'端依次包括5*序列、6序列、3*序列、2*序列、1*序列、6*序列和5*序列;6片段和6*片段互补,形成茎环;

[0013] 所述发夹探针H1从5'端至3'端依次包括1序列、2序列、3序列、4*序列、3*序列和2*序列;2-3片段和3*-2*片段互补,形成茎环;

[0014] 所述发夹探针H2从5'端至3'端依次包括3序列、4序列、3*序列、2*序列和4*序列;4

片段和4*片段互补,形成茎环;

[0015] 发夹探针H3从5'端至3'端依次包括a序列、b序列、c序列、d*序列、c*序列和b*序列;b-c片段和c*-b*片段互补,形成茎环;

[0016] 所述发夹探针H4从5'端至3'端依次包括c序列、d序列、c*序列、b*序列和d*序列;6片段和6*片段互补,形成茎环;d片段和d*片段互补,形成茎环;

[0017] 所述第一核酸核酶包括反向互补配对的第一酶链和第一底物链;所述第一底物链中含有第一酶切位点,酶切后得到A片段和B片段;所述A片段与所述发夹探针H0的5*-6片段互补;

[0018] 所述第二核酸核酶包括反向互补配对的第二酶链和第二底物链;所述第二底物链中含有第二酶切位点,酶切后得到C片段和D片段;所述C片段与所述发夹探针H0的6*-5*片段互补;

[0019] 所述B片段与所述D片段反向互补;

[0020] 其中,所述1序列与所述1*序列反向互补,所述2序列与所述2*序列反向互补,所述3序列与所述3*序列反向互补,所述4序列与所述4*序列反向互补,所述5序列与所述5*序列反向互补,所述6序列与所述6*序列反向互补,所述a序列与所述a*序列反向互补,所述b序列与所述b*序列反向互补,所述c序列与所述c*序列反向互补,所述d序列与所述d*序列互补。

[0021] 根据本发明实施例的试剂,至少具有如下有益效果:

[0022] 实施例的试剂能够准确的智能化检测待检样品中是否含有铅和镉,且特异性好,对于其他非目标金属离子均不会产生假阳性。且灵敏度高,对铅、镉的检测限分别为58fM、25fM,相比于常规的检测技术更加灵敏智能。

[0023] 根据本发明的一些实施例,所述第一重金属和所述第二重金属分别独立选自铅和镉。

[0024] 根据本发明的一些实施例,所述反向互补配对的第一酶链和第一底物链具体包括:所述第一底物链的rA两端序列与所述第一酶链反向互补。

[0025] 根据本发明的一些实施例,所述第一酶链和第一底物链的核苷酸序列分别如SEQ ID No.1和SEQ ID No.2所示;其中,rA表示腺嘌呤核糖核苷酸。

[0026] 根据本发明的一些实施例,所述反向互补配对的第二酶链和第二底物链具体包括:所述第二底物链的rA*两端序列与所述第二酶链反向互补。

[0027] 根据本发明的一些实施例,所述第二酶链和第二底物链的核苷酸序列分别如SEQ ID No.3和SEQ ID No.4所示;其中,rA*表示腺嘌呤核糖核苷酸用硫代硫酸酯修饰。

[0028] 根据本发明的一些实施例,所述发夹探针H0、所述发夹探针H1、所述发夹探针H2、所述发夹探针H3和所述发夹探针H4的核苷酸序列分别如SEQ ID No.5~SEQ ID No.9所示。

[0029] 根据本发明的一些实施例,所述第一酶切位点的对立两侧分别修饰有第一荧光基团和第一淬灭基团;所述第二酶切位点的对立两侧分别修饰有第二荧光基团和第二淬灭基团;所述第一荧光基团与所述第二荧光基团不同。

[0030] 根据本发明的一些实施例,所述荧光基团选自FAM、VIC、HEX、Cy5、Cy3;

[0031] 根据本发明的一些实施例,所述淬灭基团选自BQH1、MGB、TAMARA、BHQ2、BHQ3。

[0032] 例如:所述第一荧光基团为FAM,所述第一淬灭基团为BHQ1;所述第二荧光基团为

Cy5,所述第二淬灭基团为BHQ3。

[0033] 根据本发明的第二方面实施例的一种重金属检测试剂盒,包括上述试剂。由于重金属检测试剂盒采用了上述实施例的试剂的全部技术方案,因此至少具有上述实施例的技术方案所带来的所有有益效果。

[0034] 根据本发明的一些实施例,所述第一酶链上标记有生物素;和/或,所述第二酶链上标记有生物素。具体地,可以在第一酶链和/或第二酶链的5'端标记生物素。

[0035] 根据本发明的一些实施例,所述试剂盒还包括磁珠。所述磁珠可以通过链酶亲和素与生物素之间以形成共价键,与第一酶链和/或第二酶链偶联。

[0036] 根据本发明的第三方面实施例的上述试剂或重金属检测试剂盒在重金属检测或制备重金属检测产品中的应用。

[0037] 根据本发明的一些实施例,所述产品为检测试剂盒或生物传感器。

[0038] 根据本发明的第四方面实施例的一种重金属检测系统,包括:

[0039] A1) 上述试剂或上述重金属检测试剂盒;

[0040] A2) 荧光检测仪器。

[0041] 根据本发明的第五方面实施例的一种检测两种不同重金属的方法,包括以下步骤:

[0042] 将待检样品与所述第一核酸酶、所述第二核酸酶混合反应后,继续加入所述发夹探针组反应,检测荧光信号,分析所述待检样品中的重金属存在情况。

[0043] 根据本发明的一些实施例,待检样品与所述第一核酸酶、所述第二核酸酶混合反应的体系包括:

[0044] 第一核酸酶 80nM~120nM;

[0045] 第二核酸酶 80nM~120nM。

[0046] 具体地,所述体系可以包括:

[0047] 第一核酸酶 100nM;

[0048] 第二核酸酶 100nM。

[0049] 根据本发明的一些实施例,加入所述发夹探针组后的反应体系包括:

探针 H0 100 nM~200 nM;

探针 H1 100 nM~200 nM;

[0050] 探针 H2 100 nM~200 nM;

探针 H3 100 nM~200 nM;

探针 H4 100 nM~200 nM。

[0051] 具体地,所述体系可以包括:

	探针 H0	150 nM;
	探针 H1	150 nM;
[0052]	探针 H2	150 nM;
	探针 H3	150 nM;
	探针 H4	150 nM。

[0053] 根据本发明的一些实施例,所述混合反应的温度为 $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。

[0054] 根据本发明的一些实施例,待检样品与所述第一核酸核酶、所述第二核酸核酶混合反应的时间为30min~50min。

[0055] 根据本发明的一些实施例,加入所述发夹探针组后的反应时间为50min~70min。

[0056] 根据本发明的一些实施例,所述方法执行XOR和INHIBIT逻辑门。所述第一荧光基团的荧光信号用于表征XOR分子逻辑门;所述第二荧光基团的荧光信号用于表征INHIBIT分子逻辑门

[0057] 根据本发明的一些实施例,分析所述待检样品中的重金属存在情况包括:

[0058] 1) 第一荧光基团和第二荧光基团的相对荧光强度均小于期望荧光强度阈值,所述待检样品中不存在第一重金属和第二重金属,或所述待检样品中同时存在第一重金属和第二重金属;

[0059] 2) 第一荧光基团的相对荧光强度大于期望荧光强度阈值,第二荧光基团的相对荧光强度小于期望荧光强度阈值,所述待检样品中存在第一重金属,不存在第二重金属;

[0060] 3) 第一荧光基团和第二荧光基团的相对荧光强度均大于期望荧光强度阈值,所述待检样品中不存在第一重金属,存在第二重金属。

[0061] 本发明的其它特征和优点将在随后的说明书中阐述,并且,部分地从说明书中变得显而易见,或者通过实施本发明而了解。

附图说明

[0062] 图1是本发明实施例中的半减器分子逻辑门生物传感器构建原理;

[0063] 图2为本发明实施例中的铅、镉不同输入组合情况下的荧光光谱;

[0064] 图3为本发明实施例中的半减器分子逻辑门的电路示意图;

[0065] 图4为本发明实施例中的半减器分子逻辑门生物传感器的特异性检测结果;

[0066] 图5为本发明实施例中的半减器分子逻辑门生物传感器对铅离子的灵敏度检测结果;

[0067] 图6为本发明实施例中的半减器分子逻辑门生物传感器对镉离子的灵敏度检测结果。

具体实施方式

[0068] 以下将结合实施例对本发明的构思及产生的技术效果进行清楚、完整地描述,以充分地理解本发明的目的、特征和效果。显然,所描述的实施例只是本发明的一部分实施例,而不是全部实施例,基于本发明的实施例,本领域的技术人员在不付出创造性劳动的前提下所获得的其他实施例,均属于本发明保护的范围。

[0069] 实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0070] 在本发明的描述中,如果有描述到第一、第二等只是用于区分技术特征为目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量或者隐含指明所指示的技术特征的先后关系。

[0071] 在本发明的描述中,术语“包括”和“具有”以及他们的任何变形,意图在于覆盖不排他的包含,例如,包含了一系列步骤或单元的过程、方法、系统、产品或设备不必限于清楚地列出的那些步骤或单元,而是可包括没有清楚地列出的或对于这些过程、方法、产品或设备固有的其它步骤或单元。

[0072] 本发明中的词语“优选地”、“更优选地”等是指,在某些情况下可提供某些有益效果的本发明实施方案。然而,在相同的情况下或其他情况下,其他实施方案也可能是优选的。此外,对一个或多个优选实施方案的表述并不暗示其他实施方案不可用,也并非旨在将其他实施方案排除在本发明的范围之外。

[0073] 当本文中公开一个数值范围时,上述范围视为连续,且包括该范围的最小值及最大值,以及这种最小值与最大值之间的每一个值。进一步地,当范围是指整数时,包括该范围的最小值与最大值之间的每一个整数。此外,当提供多个范围描述特征或特性时,可以合并该范围。换言之,除非另有指明,否则本文中所公开之所有范围应理解为包括其中所归入的任何及所有的子范围。

[0074] 若无特殊说明,本发明中“室温”表示 $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。

[0075] 在下述实施例中,所有核酸探针均用稀释缓冲液(20mM Tris-Ac,150mM NaAC,pH 7.4)溶解。

[0076] 本发明中,(0,0)、(1,0)、(0,1)和(1,1)中的0和1均为二进制表示法,1表示有(基于不同的情况,可以表示添加或有荧光),0表示未/无(基于不同的情况,可以表示未添加或无荧光)。

[0077] 一种用于检测铅和镉的半减器分子逻辑门生物传感器

[0078] 本实施例的用于检测重金属铅和镉的半减器分子逻辑门生物传感器,其核酸酶识别重金属并发生切割反应、茎环结构核酸的组装,主要通过不同的荧光编码,结合分子逻辑门二进制运算,实现对重金属铅和镉的智能化、高精度度识别与监测。

[0079] 该半减器分子逻辑门生物传感器由发夹探针组、对铅具有特异性的第一核酸酶和对镉具有特异性的第二核酸酶。发夹探针组由发夹探针H0、发夹探针H1、发夹探针H2、发夹探针H3、发夹探针H4组成。第一核酸酶由生物素(Biotin)修饰的探针S1和探针D1组成;第二核酸酶由生物素(Biotin)修饰的探针S2和探针D2组成。

[0080] 各核酸探针的核苷酸序列如下:

[0081] 探针S1(酶链):5'-Biotin-AAAAAACATCTCAAGTCCGAGCCGGTCAAGCCTAC GTG-3'
(如SEQ ID No.1所示);

[0082] 6*序列5序列a序列b序列

[0083] 探针D1(底物链):5'-ACGATCCAAGTA--AAGCACGTAGGC--rA--GCTTGA--GATGT
TAGG--GAGTAGTGC-3'(如SEQ ID No.2所示);

[0084] c序列

[0085] 从5'端至3'端,探针D1依次包括6*序列、5序列、rA酶切位点、a序列、b序列和c序列;其中,rA表示腺嘌呤核糖核苷酸;

[0086] 其中,探针S1和探针D1之间,加粗标记部分互相反向互补,下划线标记部分互相反向互补。

[0087] 探针S2(酶链):5'-Biotin--AAAAAAGAGTAGTGCTTCGATAGTTAAAACGATCCAA-3'(如SEQ ID No.3所示);

[0088] 5序列6序列c*序列

[0089] 探针D2(底物链):5'-AAGCACGTAGGC--TACTTGGATCGT--rA*--GCACTACTC--CCTAACATC--TCAAGC-3'(如SEQ ID No.4所示);

[0090] b*序列a*序列

[0091] 从5'端至3'端,探针D2依次包括5序列、6序列、rA*酶切位点、c*序列、b*序列和a*序列;其中,rA*表示腺嘌呤核糖核苷酸用硫代硫酸酯修饰;

[0092] 5*序列6序列3*序列2*序列

[0093] 其中,探针S2和探针D2之间,加粗标记部分互相反向互补,下划线标记部分互相反向互补。

[0094] 发夹探针H0:5'-GCCTACGTGCTT--TACTTGGATCGT--CGACATCT--AACCTAGC--TCACTGACT--ACGATCCAAGTA--GCCTACGTGCTT-3'(如SEQ ID No.5所示);1*序列6*序列5*序列

[0095] 从5'端至3'端,发夹探针H0依次包括5*序列、6序列、3*序列、2*序列、1*序列、6*序列和5*序列;6片段和6*片段互补,形成茎环;

[0096] 1序列2序列3序列4*序列

[0097] 发夹探针H1:5'-AGTCAGTGA--GCT(BHQ1)AGGTT--AGATGTCG--CCATGTGTAGA--CGACATCT--AACCTAGC--(FAM)-3'(如SEQ ID No.6所示);

[0098] 3*序列2*序列

[0099] 从5'端至3'端,发夹探针H1依次包括1序列、2序列、3序列、4*序列、3*序列和2*序列;其中,2序列上修饰有淬灭基团BHQ1,2*序列的3'末端修饰有荧光基团FAM;2-3片段和3*-2*片段互补,形成茎环;

[0100] 3序列4序列3*序列2*序列4*序列

[0101] 发夹探针H2:5'-AGATGTCG--TCTACACATGG--CGACATCT--AACCTAGC--CCATGTGTAGA-3'(如SEQ ID No.7所示);

[0102] 从5'端至3'端,发夹探针H2依次包括3序列、4序列、3*序列、2*序列和4*序列;4片段和4*片段互补,形成茎环;

[0103] a序列b序列c序列d*序列

[0104] 发夹探针H3:5'-GCTTGA-GAT(BHQ3)GTTAGG-GAGTAGTGC-TCCAATCACAAC-GCACTACTC-CCTAACATC-Cy5-3'(如SEQ ID No.8所示);

[0105] c*序列b*序列

[0106] 从5'端至3'端,发夹探针H3依次包括a序列、b序列、c序列、d*序列、c*序列和b*序列;其中,b序列上修饰有淬灭基团BHQ3,b*序列的3'末端修饰有荧光基团Cy5;b-c片段和c*-b*片段互补,形成茎环;

[0107] c序列d序列c*序列b*序列

[0108] 发夹探针H4:5'-GAGTAGTGC--GTTGTGATTGGA--GCACTACTC--CCTAACATC--TCC AATCACAAC-3' (如SEQ ID No.9所示);

[0109] d*序列

[0110] 从5'端至3'端,发夹探针H4依次包括c序列、d序列、c*序列、b*序列和d*序列;d片段和d*片段互补,形成茎环。

[0111] 上述探针S1、探针S2、探针D1、探针D2、发夹探针H0、发夹探针H1、发夹探针H2、发夹探针H3、发夹探针H4中,1序列与1*序列反向互补,2序列与2*序列反向互补,3序列与3*序列反向互补,4序列与4*序列反向互补,5序列与5*序列反向互补,6序列与6*序列反向互补,a序列与a*序列反向互补,b序列与b*序列反向互补,c序列与c*序列反向互补,d序列与d*序列互补。

[0112] 用于检测重金属铅和镉的半减器分子逻辑门生物传感器的工作原理如图1所示。具体如下:

[0113] 以0和1对重金属铅和镉进行编码,0表示检测体系中不存在铅或镉;1表示检测体系中存在铅或镉。(0,0)表示不存在铅和镉;(1,0)表示只存在铅,不存在镉;(0,1)表示只存在镉,不存在铅;(1,1)表示同时存在铅和镉。并以0和1对输出的荧光信号进行编码,当荧光信号值低于阈值(即相对荧光强度小于 2×10^6 RFU)时,对应信号输出为0;当荧光信号值超过阈值(即相对荧光强度大于或等于 2×10^6 RFU)时,对应信号输出为1。

[0114] 探针S1和探针D1能形成用于识别铅的核酸核酶(S1-D1);当检测体系中存在铅时,该核酸核酶会发生切割反应,具体为在探针D1的rA位置发生切割,释放两段核酸序列(5-6*片段和a-b-c片段)。

[0115] 探针S2和探针D2能形成用于识别镉的核酸核酶(S2-D2);当检测体系中存在镉时,该核酸核酶会发生切割反应,具体为在探针D2的rA*位置发生切割,释放两段核酸序列(6-5片段和a*-b*-c*片段)。

[0116] 发夹探针H1同时修饰淬灭基团BHQ1和荧光基团FAM;发夹探针H3同时修饰淬灭基团BHQ3和荧光基团Cy5。

[0117] 在(0,0)状态时,检测体系没有反应,此时只有很低的FAM和Cy5的背景荧光(相对荧光强度均小于 2×10^6 RFU),两种荧光信号输出都为0。

[0118] 在(1,0)状态时,识别铅的核酸核酶(S1-D1)中的探针D1被切割,释放6*-5片段和a-b-c片段。进一步地,释放的6*-5片段通过与发夹探针H0的5*-6片段互补,打开发夹探针H0的发夹结构,暴露3*-2*-1*片段;3*-2*-1*片段与发夹探针H1的1-2-3片段互补,打开发夹探针H1的发夹结构,暴露3*片段;以3*为DNA支点,继续与发夹探针H2的3片段杂交,通过DNA支点介导的链置换反应,打开发夹探针H2,形成H1-H2探针复合物,释放探针H0;同时,淬灭基团BHQ1和荧光基团FAM远离,产生很强的FAM荧光信号,FAM荧光输出信号为1。但是发夹探针H3和发夹探针H4不参与反应过程,只有很低的Cy5背景荧光,Cy5的荧光输出信号为0。

[0119] 在(0,1)状态时,识别镉的核酸核酶(S2-D2)中的探针D2被切割,释放5-6片段以及c*-b*-a*片段。进一步地,释放的5-6片段通过与发夹探针H0的6*-5*片段互补,打开发夹探针H0的发夹结构,暴露3*-2*-1*片段;3*-2*-1*片段与发夹探针H1的1-2-3片段互补,打开发夹探针H1的发夹结构,暴露3*片段;以3*为DNA支点,继续与发夹探针H2的3片段杂交,通过DNA支点介导的链置换反应,打开发夹探针H2的发夹结构,形成H1-H2探针复合物,释放探

针H0;同时,淬灭基团BHQ1和荧光基团FAM远离,产生很强的FAM荧光信号,FAM荧光输出信号为1。同时,释放的c*-b*-a*片段通过与发夹探针H3的a-b-c片段互补,打开发夹探针H3的发夹结构,暴露d*-c*片段;d*-c*片段与发夹探针H4的c-d片段互补,打开发夹探针H4的发夹结构,并形成H3-H4复合物;同时,淬灭基团BHQ3和荧光基团Cy5远离,从而产生很强的Cy5荧光信号,Cy5荧光输出信号为1。

[0120] 在(1,1)状态时,识别铅的核酸核酶(S1-D1)中的探针D1以及识别镉的核酸核酶(S1-D1)中的探针D1同时被切割,并分别释放6*-5片段和a-b-c片段、5-6片段和c*-b*-a*片段;其中,6*-5片段和5-6片段通过6序列和6*序列互补杂交,a-b-c片段和c*-b*-a*片段杂交。从而无法打开发夹探针H0,从而无法进一步发生探针H1和探针H2、以及探针H3和探针H4之间的杂交反应。此时只有很低的FAM和Cy5的背景荧光(相对荧光强度均小于 2×10^6 RFU),两种荧光信号输出都为0。

[0121] 在半减器分子逻辑门中,FAM信号用于表征XOR分子逻辑门;Cy5信号用于表征INHIBIT分子逻辑门;XOR和INHIBIT耦合构成半减器分子逻辑门。

[0122] 不同输入组合情况下,半减器分子逻辑门FAM信号、Cy5信号的输出情况分别如图2中A图、B图所示。同步输出FAM和Cy5荧光信号的结果如图2中C图所示。

[0123] 在(0,0)和(1,1)情况下,FAM信号低于阈值,信号输出均为0。在(1,0)和(0,1)情况下,FAM信号高于阈值,信号输出为1。在此,FAM信号编码XOR逻辑功能,执行差位输出(Difference Digit)功能。

[0124] 在(0,0)、(1,0)和(1,1)情况下,Cy5信号低于阈值,信号输出均为0。在(0,1)情况下,Cy5信号高于阈值,信号输出为1。在此,Cy5信号编码INHIBIT逻辑功能,执行借位输出(Borrow Digit)功能。

[0125] 表1.半减器分子逻辑门的真值表

样品输入 (Inputs)		荧光输出 1 (FAM)	荧光输出 2 (Cy5)
Input 1 (Pb ²⁺)	Input 2 (Cd ²⁺)	XOR 逻辑门 差位输出	INHIBIT 逻辑门 借位输出
0	0	0	0
1	0	1	0
0	1	1	1
1	1	0	0

[0126] 半减器分子逻辑门的电路示意图如图3所示。

[0127] 半减器分子逻辑门由XOR和INHIBIT逻辑门耦合而成,分别以FAM荧光信号和Cy5荧光信号进行编码。通过荧光信号的真值表排情况,可实现智能化监测铅和镉的组合情况。在(0,0)时,FAM和Cy5的荧光信号输出均为0,此时差位输出和借位输出均为0。在(1,0)时,FAM的荧光信号输出为1,Cy5的荧光信号输出为0,此时差位输出为1,借位输出为0。在(0,1)时,FAM和Cy5的荧光信号输出均为1,此时差位输出为1,借位输出为1。在(1,1)时,FAM和Cy5的荧光信号输出均为0,此时差位输出和借位输出均为0。

[0128] 因此,对于XOR-INHIBIT逻辑门,其对于镉、铅的智能化检测标准为:

[0129] 当检测到FAM荧光信号和Cy5荧光信号均小于相对荧光强度阈值时,说明样品中存

在A1) ~ A2) 中任一种情况:

[0131] A1) 检测样品中不含有铅和镉;

[0132] A2) 检测样品中同时含有铅和镉。

[0133] 当检测到FAM荧光信号大于相对荧光强度阈值,且Cy5荧光信号小于相对荧光强度阈值时,说明样品中存在铅,不存在镉。

[0134] 当检测到FAM荧光信号小于相对荧光强度阈值,且Cy5荧光信号大于相对荧光强度阈值时,说明样品中不存在铅,存在镉。

[0135] 用于检测铅和镉的半减器分子逻辑门生物传感器的使用方法

[0136] 上述实施例中的半减器分子逻辑门生物传感器可基于XOR和INHIBIT逻辑门对样品进行检测。具体检测步骤如下:

[0137] (1) 试验材料的准备与前处理:

[0138] (1.1) 将100 μ L生物素修饰的探针S1 (100nM) 加入到200 μ L链霉亲和素修饰的磁珠 (MB, 1.2mg/mL) 中,室温反应30min,分离磁珠,去除上清,用清洗缓冲液 (20mM PBS, 0.01% Tween-20, pH 7.4) 清洗磁珠三次,获得MB-S2。采用同样的方法处理探针S1,获得MB-S2。

[0139] (1.2) 向MB-S1中加入120nM探针D1,室温反应30min,分离磁珠,去除上清,获得MB-S1-D1复合物。采用同样的方法处理MB-S2,获得MB-S2-D2复合物。

[0140] 其中,反应体系中,探针S1与探针D1的摩尔比为1:1.2;探针S2与探针D2的摩尔比为1:1.2。

[0141] (1.3) 将MB-S1-D1复合物和MB-S2-D2复合物按摩尔比1:1混合,分散在稀释缓冲液中,得到检测复合物。

[0142] (2) 铅和镉的检测:

[0143] 在本实施例中,铅和镉的检测是基于XOR和INHIBIT逻辑门的方式实现。按照分子逻辑门输入组合,共具有四种情况,分别为(0,0)、(1,0)、(0,1)和(1,1)。

[0144] 其中,(0,0)表示样品中未添加铅和镉;(1,0)表示样品中添加铅,未添加镉;(0,1)表示样品中只添加镉,未添加铅;(1,1)表示样品中同时添加铅和镉。

[0145] (2.1) 按照四种组合分别向检测复合物中加入铅和/或镉(按照组合方式的不同,铅、镉的终浓度分别为0nM或10nM),室温反应40min后,分离磁珠,取上清液。

[0146] (2.2) 将步骤(2.1)的上清液加入到100 μ L探针H0、探针H1、探针H2、探针H3、探针H4 (均为150nM) 的混合物中,室温反应60min,检测荧光信号强度 (FAM的荧光信号:激发峰495nm,发射峰525nm;Cy5的荧光信号:激发峰640nm,发射峰667nm)。

[0147] 用于检测铅和镉的半减器分子逻辑门生物传感器的有效性

[0148] 1、特异性

[0149] 为进一步验证上述方法的有效性,测试了该半减器分子逻辑门生物传感器分别对铅、镉以及其他非目标重金属 (Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Sn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ag^{+} 、 As^{3+}) 的响应情况。测试浓度均为10nM。

[0150] 检测结果如图4所示。

[0151] 当样品中有铅时,能够产生较高的FAM荧光信号;当样品中有镉时,能够产生较高的FAM和Cy5荧光信号。其他重金属产生的荧光信号均较低,荧光强度低于设定的阈值 (2×10^6 RFU)。这表明该半减器分子逻辑门生物传感器具有很好的特异性,对目标重金属铅和镉

均具有较好的响应,而对其他重金属无响应。

[0152] 2、灵敏度

[0153] 为进一步验证上述方法的有效性,测试了该半减器分子逻辑门生物传感器对铅和镉的灵敏度。分别配制铅离子标准溶液和镉离子标准溶液,测试浓度分别为100fM、1pM、10pM、100pM、1nM、10nM。

[0154] (1) 用于检测铅离子标准溶液时,按照(1,0)组合进行分析(只有铅存在)。反应后检测FAM荧光强度。

[0155] 检测结果如图5所示。

[0156] 以铅离子浓度的对数(LgC)为横坐标,荧光强度为纵坐标,绘制标准曲线,二者具有很好的线性关系,线性范围是从100fM到10nM,线性方程是: $F=2.26 \times 10^6 \text{LgC}-5.98 \times 10^5$ ($R^2=0.992$);其中,F为荧光强度,C为铅离子浓度。按照3倍信噪比标准(3S/N),其对铅的检测限为58fM。

[0157] (2) 用于检测镉离子标准溶液时,按照(0,1)组合进行分析(只有镉存在)。反应后检测Cy5荧光强度。

[0158] 检测结果如图6所示。

[0159] 以镉离子浓度的对数(LgC)为横坐标,荧光强度为纵坐标,绘制标准曲线。二者具有很好的线性关系,线性范围是从100fM到10nM,线性方程是: $F=1.32 \times 10^6 \text{LgC}-7.09 \times 10^5$ ($R^2=0.995$);其中,F为荧光强度,C为铅离子浓度。按照3倍信噪比标准(3S/N),其对镉的检测限为25fM。

[0160] 上面结合实施例对本发明实施例作了详细说明,但本发明不限于上述实施例,在所属技术领域普通技术人员所具备的知识范围内,还可以在不脱离本发明宗旨的前提下作出各种变化。

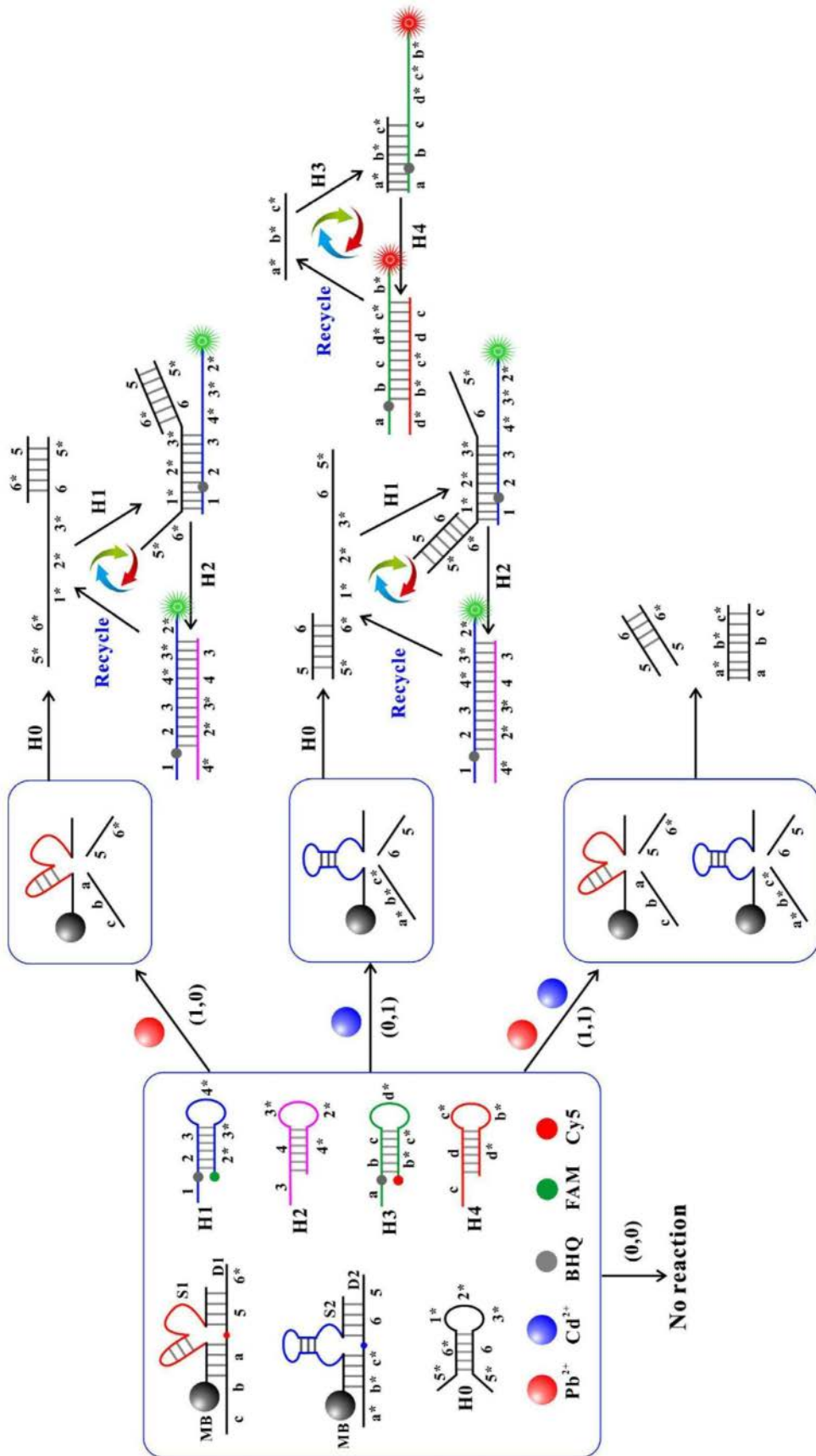


图1

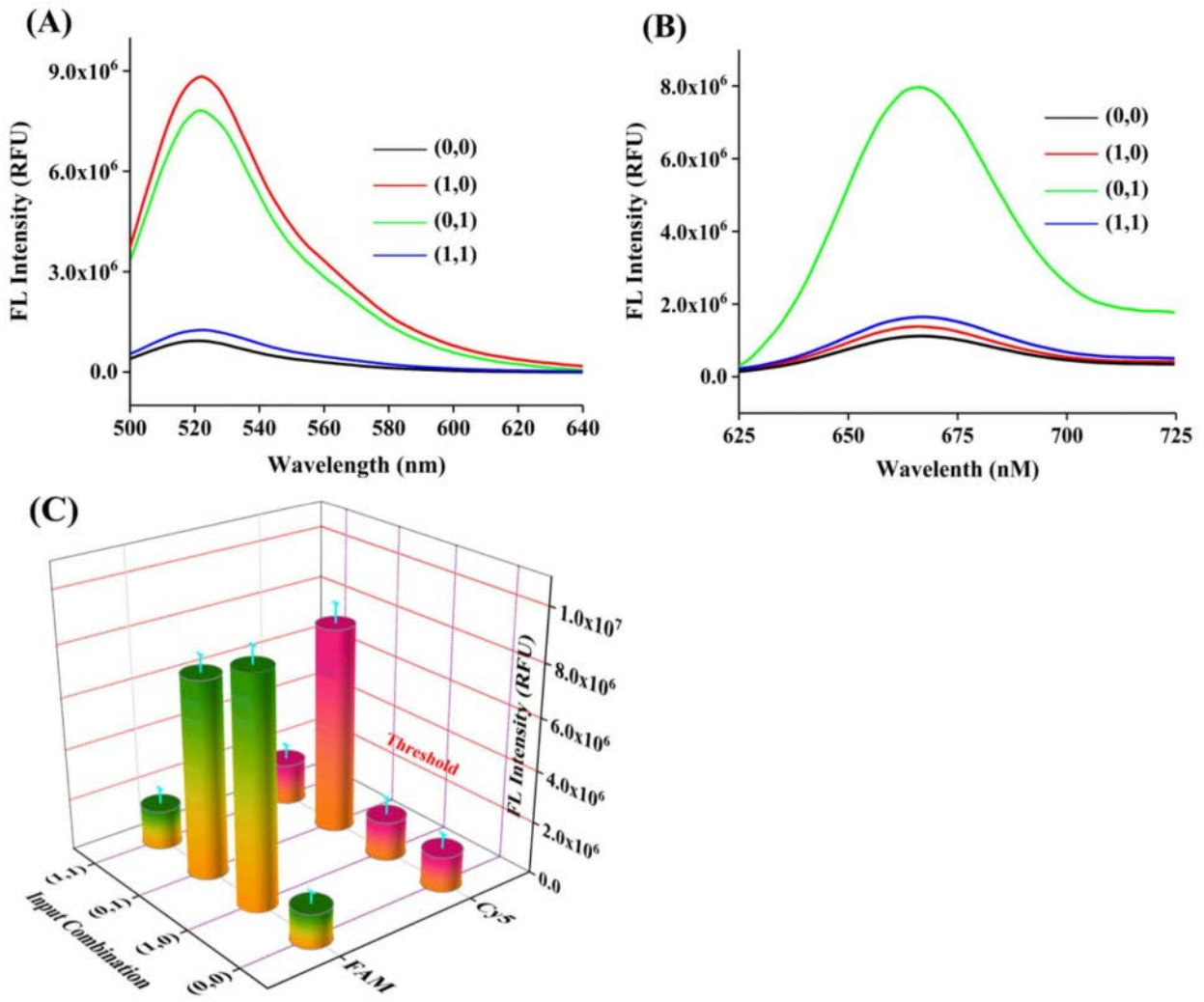


图2

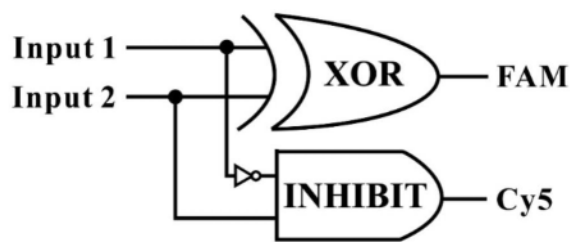


图3

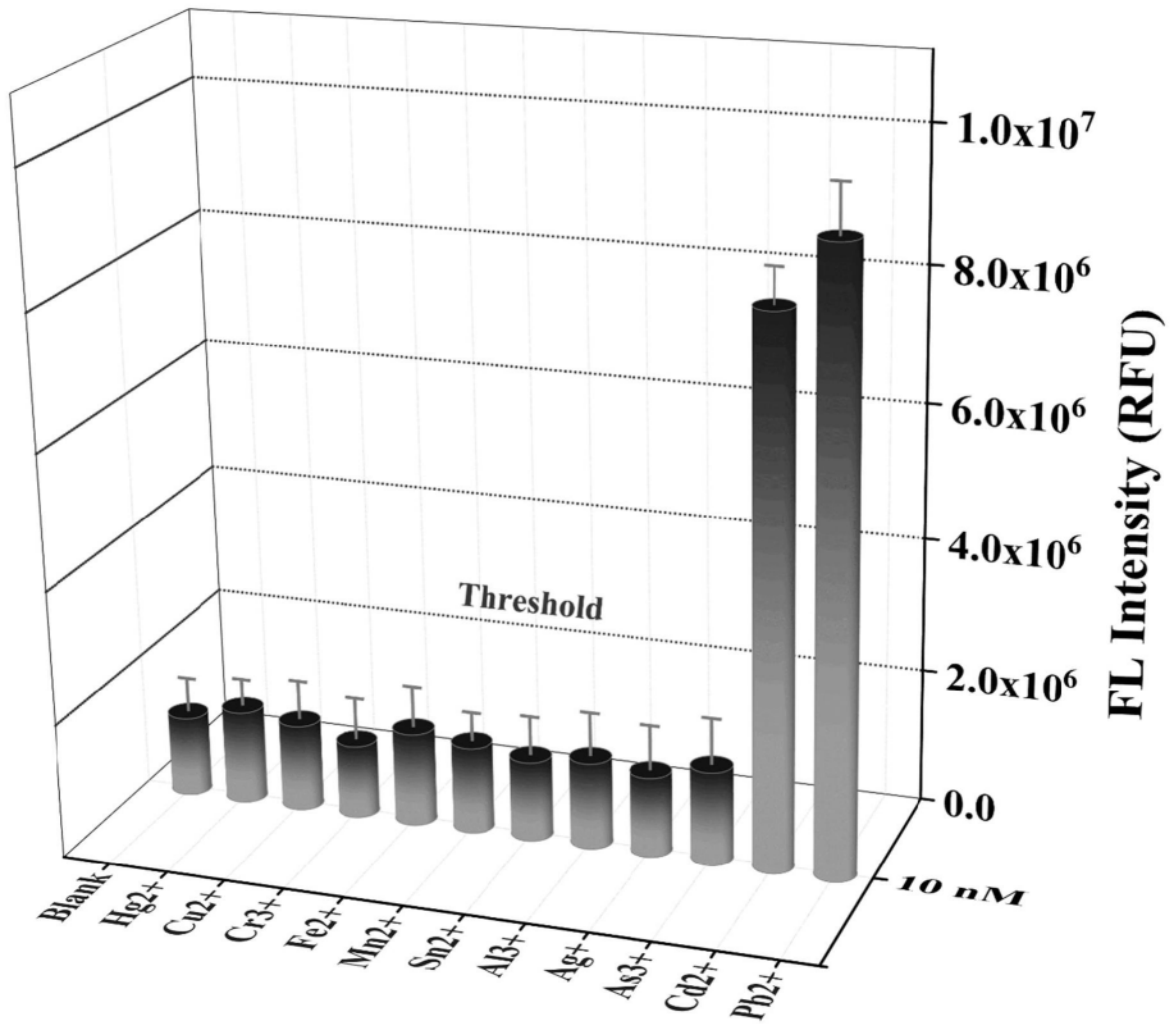


图4

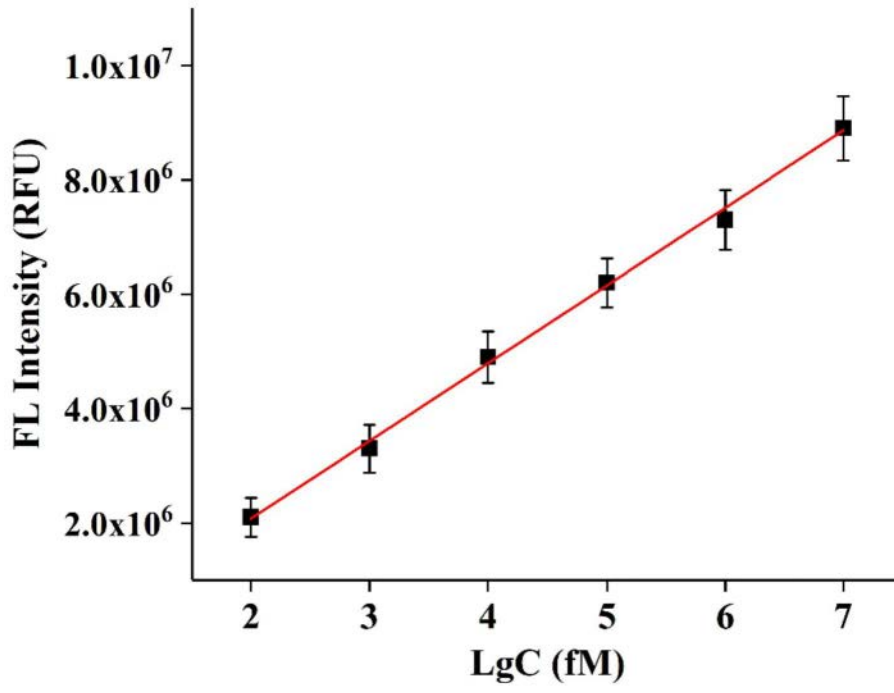


图5

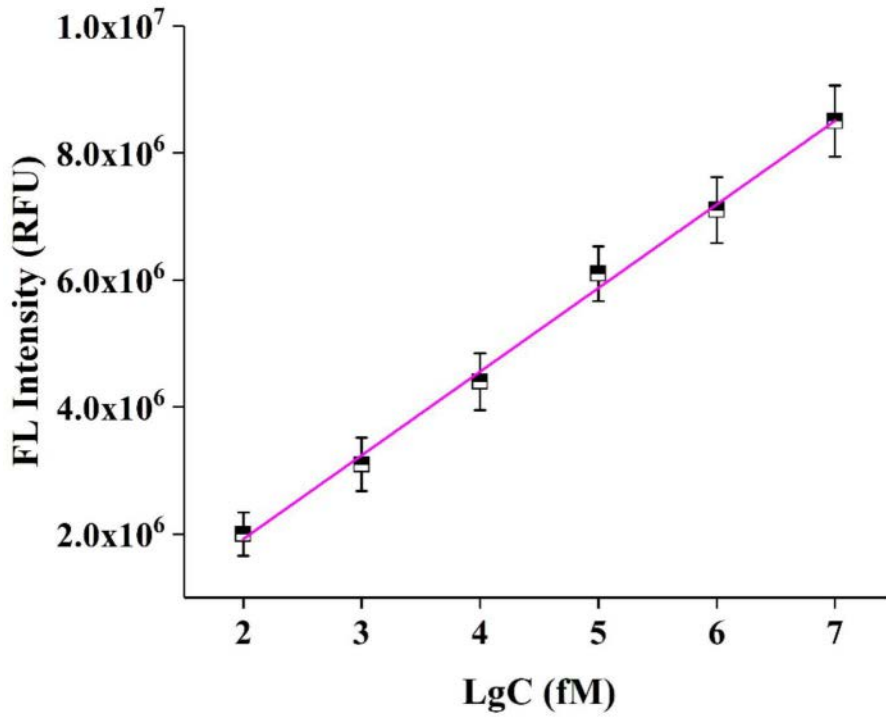


图6