



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109908464 A

(43)申请公布日 2019.06.21

(21)申请号 201910303143.2

(22)申请日 2019.04.16

(71)申请人 北京师范大学

地址 100875 北京市海淀区新街口外大街  
19号北京师范大学

(72)发明人 那娜 沈晓彤 欧阳津

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51)Int.Cl.

A61M 37/00(2006.01)

A61B 5/00(2006.01)

C12Q 1/6883(2018.01)

B81B 1/00(2006.01)

B81C 1/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书15页  
序列表1页 附图4页

(54)发明名称

一种生物可降解的硅纳米针注射器及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种生物可降解的硅纳米针注射器及其应用。本发明提供的硅纳米针注射器是负载有生物分子的硅纳米针,所述负载有生物分子的硅纳米针的制备方法包括如下步骤:采用静电吸附或EDC偶联羧基氨基的方法,通过生物分子所带的羧基与硅纳米针表面的氨基进行偶联,或通过核酸分子表面所带的负电荷与硅纳米针表面的正电荷进行静电吸附,使所述生物分子负载在所述硅纳米针的介孔中和/或表面上。本发明的硅纳米针注射器是一种高效、灵敏、安全、可降解的复合纳米材料,可用于活细胞内多靶标检测和基因治疗,能很好地实现诊疗一体化,具有快速诊断和高效治疗肿瘤的潜力,在生物医学研究和临床诊断中具有很大应用价值。

1. 一种硅纳米针, 其为表面具有介孔, 底部直径为50-100nm、长度为1-2 $\mu$ m, 由硅制成的锥形结构。

2. 一种硅纳米针注射器, 其包括权利要求1所述的硅纳米针和生物分子;

所述生物分子负载在所述硅纳米针的介孔中和/或表面上。

3. 根据权利要求2所示的硅纳米针注射器, 其特征在于:

所述生物分子包括核酸扩增所需的酶和/或核酸分子;

或, 所述核酸扩增所需的酶为如下至少一种: DNA聚合酶、DNA解旋酶、DNA连接酶、DNA切割酶;

或, 所述核酸分子为核酸探针和/或核酸链;

或, 所述核酸探针为锁式探针和/或荧光探针;

或, 所述核酸链为如下至少一种: 单链DNA、双链DNA、单链RNA、双链RNA。

或, 所述生物分子还包括用于提高核酸扩增效率的物质;

或, 所述用于提高核酸扩增效率的物质为牛血清白蛋白;

或, 所述生物分子由DNA聚合酶、DNA连接酶、核酸探针和牛血清白蛋白组成;

或, 所述生物分子由DNA聚合酶、DNA连接酶、核酸探针、核酸链和牛血清白蛋白组成。

4. 权利要求1所述的硅纳米针的制备方法, 包括如下步骤: 采用湿法刻蚀的方法制备硅纳米线阵列, 然后利用氢氧化钾刻蚀阵列尖端, 再从阵列上剥离得到权利要求1所述的硅纳米针。

5. 根据权利要求4所述的方法, 其特征在于: 所述方法包括如下步骤:

1) 将单晶硅片浸入HF溶液中活化, 使其表面生成硅氢键;

2) 将步骤1) 得到的硅片浸入混合溶液中, 避光缓慢震荡, 使硅片表面均匀的镀上一层纳米Ag颗粒层;

所述混合溶液由溶质和溶剂组成, 所述溶剂为水, 所述溶质为HF和AgNO<sub>3</sub>;

3) 将步骤2) 得到的硅片浸入刻蚀液中避光刻蚀, 使其形成一层硅纳米线阵列;

所述刻蚀液由溶质和溶剂组成, 所述溶剂为水, 所述溶质为HF和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;

4) 将步骤3) 得到的硅片浸入KOH溶液中, 以刻蚀阵列尖端, 得到具有针尖结构的硅片;

5) 将步骤4) 得到的硅片浸入浓HNO<sub>3</sub>溶液中, 以去除Ag催化剂;

6) 将步骤5) 得到的硅片进行剥离处理, 得到硅纳米针。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其特征在于:

所述1) 前还包括如下步骤: 将单晶硅片切成面积约为1cm $\times$ 1cm的小块, 依次经过丙酮溶液、无水乙醇溶液和piranha清洗液超声清洗, 得到超声清洗后的硅片; 然后用去离子水将所述超声清洗后的硅片清洗后再用氮气吹干;

或, 所述丙酮溶液超声清洗10min; 所述乙醇溶液超声清洗10min; 所述piranha清洗液超声清洗30min;

或, 所述1) 中, 所述HF溶液的质量分数为5%, 所述活化的时间为30min;

或, 所述1) 和所述2) 之间还包括如下步骤: 将硅片用去离子水清洗后再用氮气吹干;

或, 所述2) 中, 所述HF和所述AgNO<sub>3</sub>在所述混合溶液中的浓度分别为10%和0.02mol/L; 所述震荡的时间为2min;

或, 所述2) 和所述3) 之间还包括如下步骤: 将硅片用去离子水进行清洗;

或,所述3)中,所述HF和所述H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在所述刻蚀液中的溶度分别为4.8mol/L和0.6mol/L;所述刻蚀的时间为30min;

或,所述3)和所述4)之间还包括如下步骤:将硅片用去离子水清洗后再用氮气吹干;

或,所述4)中,用质量分数为10%的KOH溶液处理2min;

或,所述5)中,用质量分数为65-68%的浓HNO<sub>3</sub>溶液处理2min;

或,所述5)和所述6)之间还包括如下步骤:将硅片用去离子水清洗后再用氮气吹干;

或,所述6)中,用小刀刮的方式进行剥离处理。

7. 权利要求2或3所述的硅纳米针注射器的制备方法,包括如下步骤:

(1) 按照权利要求4-6任一所述的方法制备硅纳米针;

(2) 将所述硅纳米针分散至无水乙醇溶液中,然后加入3-氨丙基三乙氧基硅烷,使所述硅纳米针氨基化,表面带有正电荷,得到氨基化的硅纳米针;

(3) 向所述氨基化的硅纳米针中加入蛋白质交联剂进行活化,得到活化的硅纳米针;

(4) 向所述活化的硅纳米针中加入权利要求2或3中所述的生物分子,通过静电吸附或交联剂偶联羧基氨基作用,使所述生物分子负载在所述硅纳米针的介孔中和/或表面上。

8. 一种产品,其包括权利要求1所述的硅纳米针或按照权利要求4-6任一所述的方法制备得到的硅纳米针或权利要求2或3所述的硅纳米针注射器或按照权利要求7所述的方法制备得到的硅纳米针注射器;

所述产品的功能为如下a)-d)中任一种:

a) 向细胞中递送生物分子;

b) 检测或辅助检测细胞内多个靶标分子;

c) 实现细胞内核酸等温扩增与化学药物载带协同;

d) 肿瘤诊断和/或治疗;

e) 诱导肿瘤细胞凋亡。

9. 如下A)-G)任一所述的应用:

A) 权利要求1所述的硅纳米针或按照权利要求4-6任一所述的方法制备得到的硅纳米针在作为向细胞中递送生物分子的载体中的应用;

B) 权利要求1所述的硅纳米针或按照权利要求4-6任一所述的方法制备得到的硅纳米针在作为向细胞中递送生物诊断试剂和/或肿瘤治疗药物的载体中的应用;

C) 权利要求1所述的硅纳米针或按照权利要求4-6任一所述的方法制备得到的硅纳米针或权利要求2或3所述的硅纳米针注射器或按照权利要求7所述的方法制备得到的硅纳米针注射器或权利要求8所述的产品在制备检测或辅助检测肿瘤细胞内多个靶标分子的产品中的应用;

D) 权利要求1所述的硅纳米针或按照权利要求4-6任一所述的方法制备得到的硅纳米针或权利要求2或3所述的硅纳米针注射器或按照权利要求7所述的方法制备得到的硅纳米针注射器或权利要求8所述的产品在制备诱导肿瘤细胞凋亡的产品中的应用;

E) 权利要求1所述的硅纳米针或按照权利要求4-6任一所述的方法制备得到的硅纳米针或权利要求2或3所述的硅纳米针注射器或按照权利要求7所述的方法制备得到的硅纳米针注射器或权利要求8所述的产品在制备肿瘤诊断和/或治疗的产品中的应用;

F) 权利要求1所述的硅纳米针或按照权利要求4-6任一所述的方法制备得到的硅纳米

针或权利要求2或3所述的硅纳米针注射器或按照权利要求7所述的方法制备得到的硅纳米针注射器或权利要求8所述的产品在制备实现细胞内核酸等温扩增与化学药物载带协同的产品中的应用；

G) 权利要求1所述的硅纳米针或按照权利要求4-6任一所述的方法制备得到的硅纳米针或权利要求2或3所述的硅纳米针注射器或按照权利要求7所述的方法制备得到的硅纳米针注射器或权利要求8所述的产品在制备肿瘤细胞内多靶标检测与治疗一体化的产品中的应用。

10. 一种检测或辅助检测肿瘤细胞内多个靶标分子的方法，是基于权利要求2或3所述的硅纳米针注射器或按照权利要求7所述的方法制备得到的硅纳米针注射器和核酸等温扩增技术实现的。

## 一种生物可降解的硅纳米针注射器及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种复合纳米材料。具体地,本发明涉及一种可实现恶性肿瘤的诊断和治疗,特别是实现细胞内核酸等温扩增,协同化学药物载带的肿瘤诊断、治疗的复合纳米材料及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 早期癌症快速、高效的筛查、诊断和治疗,以及癌症的转移和并发症的发生,使得肿瘤细胞中多种肿瘤靶标标志物的同时的高灵敏检测比单个靶标标志物的检测更为重要。随着纳米材料在癌症诊断学或治疗学中的应用,有效地将生物诊断试剂和肿瘤治疗分子导入细胞逐渐成为癌症诊断和治疗的根本挑战。例如,将核酸或生物酶传递到细胞内且保持其生物活性是基于扩增的高灵敏性检测mRNA靶标或调节基因表达用于治疗的关键点。但是,由于转染效率低、毒性和降解问题、靶标位点可及性有限以及在递送过程中的复杂修饰,仍然限制了基于纳米颗粒的诊断和治疗的进一步发展。因此,复杂的纳米颗粒,能够有效地将核酸和酶传递到细胞中进行灵敏的多重诊断,筛选和治疗,目前仍然是诊疗很受欢迎的手段。

[0003] 硅纳米针由于具有可以穿透细胞膜的刚性锥形结构,且硅纳米材料有良好的生物相容性、低毒性和高承载能力,正在发展成为最受欢迎的体内传递工具。由于硅基微阵列制备或硅纳米针的规模较大,传统的细胞内给药方式主要是在基质上垂直阵列注射。然而这很难完全进入活细胞,阻碍了其在生物系统中的进一步应用。最近,有游离的硅纳米线通过超声脱离硅片,长度从4 $\mu$ m缩短为500nm,进一步的通过负载药物进入细胞。但此方法的产率低,且纳米材料的长度不易受控制。因此,寻找尺寸合适的多功能化的硅纳米针材料,将生物诊断试剂和肿瘤治疗分子导入细胞,对于生物过程中的高效诊断和治疗具有重要意义。

[0004] 细胞内扩增是检测细胞内microRNA肿瘤标志物的一种灵敏方法。传统的等温扩增方法由于步骤复杂、灵敏度较低、背景自荧光较差,不适合在活细胞中检测多种肿瘤标志物。最近,有研究报道了活细胞内“一步法”反转录-依赖解旋酶的等温扩增技术(HDA)。虽然成像是基于荧光(FL)染料结合在dsDNA的双螺旋小沟区域的信号,但可通过引入荧光探针进行选择性的多重检测的进一步改进,这对于肿瘤细胞的灵敏检测是非常重要的。滚环扩增(Rolling circle amplification,RCA)技术是活细胞内靶标mRNA灵敏检测成像的另一种有效途径,由于其进入细胞前依赖繁琐复杂的体外成环等步骤,其在细胞内的应用过程尚需改进。近年来,有报道称,在不借助纳米颗粒的情况下,利用SplintR连接酶催化靶标RNA在细胞内形成环状结构,在固定细胞中检测mRNA。因此,利用独立的硅纳米针材料高效、稳定地递送生物试剂,改进细胞内RCA技术,从而有效地检测活细胞(而不仅仅是固定后的细胞)中多重肿瘤标志物具有重大的意义,在生物技术和医药技术领域具有重要的科研和临床应用前景。

## 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种在生物环境下稳定性好,负载能力强,功能性强,且具有生物应用价值的肿瘤诊断与治疗材料,该材料可实现肿瘤细胞内多靶标的检测以及肿瘤治疗。

[0006] 为了实现上述目的,本发明首先提供了一种硅纳米针。

[0007] 本发明提供的硅纳米针为表面具有介孔,底部直径为50-100nm、长度为1-2 $\mu$ m,由硅制成的锥形结构。

[0008] 在本发明的一个实施例中,所述硅纳米针为表面具有介孔,底部直径为100nm、长度为1 $\mu$ m,由硅制成的锥形结构。

[0009] 所述长度为锥形结构的最顶端到底部中心的距离。

[0010] 为了实现上述目的,本发明又提供了一种硅纳米针注射器。

[0011] 本发明提供的硅纳米针注射器包括上述硅纳米针和生物分子;其中的生物分子,可以是用于诊断和/或用于治疗的生物分子,比如DNA、蛋白质、RNA。

[0012] 所述生物分子负载在所述硅纳米针的介孔中和/或表面上。

[0013] 进一步的,

[0014] 所述生物分子包括核酸扩增所需的酶和/或核酸分子;

[0015] 所述核酸扩增所需的酶可为如下至少一种:DNA聚合酶、DNA解旋酶、DNA连接酶、DNA切割酶;

[0016] 所述核酸分子可为核酸探针和/或核酸链;

[0017] 所述核酸探针可为锁式探针和/或荧光探针;

[0018] 所述核酸链可为如下至少一种:单链DNA、双链DNA、单链RNA、双链RNA。

[0019] 所述生物分子(酶)通过表面所带的羧基与硅纳米针表面的氨基进行偶联,或所述生物分子(核酸分子)通过表面所带的负电荷与硅纳米针表面的正电荷进行静电吸附,从而使其负载在所述硅纳米针的介孔中和/或表面上。

[0020] 更进一步的,

[0021] 所述生物分子还可包括用于提高核酸扩增效率的物质,如牛血清白蛋白(BSA)。

[0022] 在本发明的一个具体实施例中,所述生物分子由DNA聚合酶、DNA连接酶、核酸探针和BSA组成。其中,所述DNA聚合酶为phi29DNA聚合酶;所述DNA连接酶为splintR连接酶;所述核酸探针为锁式探针,所述锁式探针序列具体如下:5'-CTACTACCTCATTTCCTGTTACCCACCAGTCCACCCCCACATTTTAACTATACAAC-3'。

[0023] 在本发明的另一个具体实施例中,所述生物分子由DNA聚合酶、DNA连接酶、核酸探针、核酸链和BSA组成。其中,所述DNA聚合酶为phi29DNA聚合酶;所述DNA连接酶为splintR连接酶;所述核酸探针为锁式探针,所述锁式探针序列具体如下:5'-CTACTACCTCATTTCCTGTTACCCACCCAGTCCACCCCCACATTTTAACTATACAAC-3';所述核酸链为siRNA,所述siRNA为用于干扰VEGF基因表达的siRNA,其正义链序列具体如下:5'-GGAGUACCCUGAUGAGAUC-dTdT-3';反义链为其反向互补链。

[0024] 上述锁式探针的5'端和3'端分别有11个碱基可通过碱基互补原则特异性识别Let-7a部分序列,与靶标序列完全匹配时,在连接酶的作用下,锁式探针连接成闭合的圆环,并以此为模板,在DNA聚合酶的作用下进行滚环扩增(RCA),生成具有成百上千个重复单

元的DNA单链。

[0025] 为了实现上述目的,本发明还提供了上述硅纳米针的制备方法。

[0026] 本发明提供的硅纳米针的制备方法包括如下步骤:采用湿法刻蚀的方法制备硅纳米线阵列,然后利用氢氧化钾刻蚀阵列尖端,再从阵列上剥离得到上述硅纳米针。

[0027] 进一步的,

[0028] 上述硅纳米针的制备方法可包括如下步骤:

[0029] 1) 将单晶硅片浸入HF溶液中活化,使其表面生成硅氢键;

[0030] 2) 将步骤1)得到的硅片浸入混合溶液中,避光缓慢震荡,使硅片表面均匀的镀上一层纳米Ag颗粒层;

[0031] 所述混合溶液由溶质和溶剂组成,所述溶剂为水,所述溶质为HF和AgNO<sub>3</sub>;

[0032] 3) 将步骤2)得到的硅片浸入刻蚀液中避光刻蚀,使其形成一层硅纳米线阵列;

[0033] 所述刻蚀液由溶质和溶剂组成,所述溶剂为水,所述溶质为HF和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;

[0034] 4) 将步骤3)得到的硅片浸入KOH溶液中,以刻蚀阵列尖端,得到具有针尖结构的硅片;

[0035] 5) 将步骤4)得到的硅片浸入浓HNO<sub>3</sub>溶液中,以去除Ag催化剂;

[0036] 6) 将步骤5)得到的硅片进行剥离处理,得到硅纳米针。

[0037] 更进一步的,

[0038] 所述1)前还包括如下步骤:将单晶硅片切成面积约为1cm×1cm的小块,依次经过丙酮溶液、无水乙醇溶液和piranha清洗液超声清洗,得到超声清洗后的硅片;然后用去离子水将所述超声清洗后的硅片清洗后再用氮气吹干;

[0039] 所述无水丙酮溶液超声清洗10min;所述乙醇溶液(分析纯)超声清洗10min;所述piranha清洗液(30%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液与98%的浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液的体积比为1:3)超声清洗30min;

[0040] 所述单晶硅片可为任意一种晶向和掺杂浓度的单晶硅片;在本发明的一个实施例中,所述单晶硅片为p型B掺杂的单晶硅片;

[0041] 所述1)中,所述HF溶液的质量分数为5%,所述活化的时间为30min;

[0042] 所述1)和所述2)之间还包括如下步骤:将硅片用去离子水清洗后再用氮气吹干;

[0043] 所述2)中,所述HF和所述AgNO<sub>3</sub>在所述混合溶液中的浓度分别为10%和0.02mol/L;所述震荡的时间为2min;

[0044] 所述2)和所述3)之间还包括如下步骤:将硅片用去离子水清洗;

[0045] 所述3)中,所述HF和所述H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在所述刻蚀液中的溶度分别为4.8mol/L和0.6mol/L;所述刻蚀的时间为30min;

[0046] 所述3)和所述4)之间还包括如下步骤:将硅片用去离子水清洗后再用氮气吹干;

[0047] 所述4)中,用质量分数为10%的KOH溶液处理2min;

[0048] 所述5)中,用质量分数为65-68%的浓HNO<sub>3</sub>溶液处理2min;

[0049] 所述5)和所述6)之间还包括如下步骤:将硅片用去离子水清洗后再用氮气吹干;

[0050] 所述6)中,用小刀刮的方式进行剥离处理。

[0051] 为了实现上述目的,本发明还提供了上述硅纳米针注射器的制备方法。

[0052] 本发明提供的上述硅纳米针注射器的制备方法包括如下步骤:

[0053] (1) 按照上述硅纳米针的制备方法制备得到硅纳米针;

[0054] (2) 将所述硅纳米针分散至无水乙醇溶液中, 然后加入3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES), 使所述硅纳米针氨基化, 表面带有正电荷, 得到氨基化的硅纳米针;

[0055] (3) 向所述氨基化的硅纳米针中加入蛋白质交联剂进行活化, 得到活化的硅纳米针;

[0056] (4) 向所述活化的硅纳米针中加入上述生物分子, 通过静电吸附或交联剂偶联羧基氨基作用, 使所述生物分子负载在所述硅纳米针的介孔中和/或表面上。

[0057] 进一步的,

[0058] 所述(2)中, 将所述硅纳米针分散到4mL无水乙醇溶液中, 然后加入10 $\mu$ L APTES溶液, 室温搅拌3小时后, 得到氨基化的硅纳米针;

[0059] 所述(3)中, 所述蛋白质交联剂是具有2个或者更多的针对特殊基团(-NH<sub>2</sub>、-COOH、-HS等)的反应性末端, 可以和2个或者更多的分子分别偶联, 从而使这些分子结合在一起的小分子化合物。在本发明的一个实施例中, 所述蛋白质交联剂为乙基二甲基胺丙基碳化二亚胺(EDC);

[0060] 将500 $\mu$ L所述氨基化的硅纳米针中加入50 $\mu$ L浓度为4mg/mL的EDC溶液, 冰浴搅拌10min, 得到活化的硅纳米针;

[0061] 所述(4)中, 向所述活化的硅纳米针中加入生物分子的方法可包括如下步骤:

[0062] (4-1) 向所述活化的硅纳米针中加入12.5 $\mu$ L splintR连接酶(25U/ $\mu$ L), 5 $\mu$ L phi29DNA聚合酶(10U/ $\mu$ L)和5 $\mu$ L BSA(10mg/mL), 冰浴搅拌2小时, DEPC水洗涤, 离心, 收集沉淀, 并将所述沉淀分散到4mL二次水中, 得到硅纳米针溶液;

[0063] (4-2) 向所述硅纳米针溶液中加入5 $\mu$ L浓度为 $1 \times 10^{-6}$ M的锁式探针溶液, 冰浴搅拌30min, 用二次水进行洗涤后离心, 收集沉淀, 得到负载有生物分子(splintR连接酶、phi29DNA聚合酶、BSA、锁式探针)的硅纳米针(SiNSs), 即为本发明的硅纳米针注射器, 可用于体外/体内的核酸扩增;

[0064] 或, 向所述硅纳米针溶液中加入5 $\mu$ L浓度为 $1 \times 10^{-6}$ M的锁式探针溶液和5 $\mu$ L浓度为 $1 \times 10^{-6}$ M的siRNA溶液, 冰浴搅拌30min, 用二次水进行洗涤后离心, 收集沉淀, 得到负载有生物分子(splintR连接酶、phi29DNA聚合酶、BSA、锁式探针、siRNA)的硅纳米针(SiNSs+siRNA), 即为本发明的硅纳米针注射器, 可用于体外/体内的核酸扩增和基因干扰与肿瘤治疗。

[0065] 本发明制备的硅纳米针注射器上负载的生物分子的负载厚度为5nm, 具有生物可降解性。

[0066] 为了实现上述目的, 本发明还提供了一种产品。

[0067] 本发明提供的产品包括上述硅纳米针或按照上述硅纳米针的制备方法制备得到的硅纳米针或上述硅纳米针注射器或按照上述硅纳米针注射器的制备方法制备得到的硅纳米针注射器;

[0068] 所述产品的功能为如下a)-d)中任一种:

[0069] a) 向细胞中递送生物分子;

[0070] b) 检测或辅助检测肿瘤细胞内多个靶标分子;

[0071] c) 实现细胞内核酸等温扩增与化学药物载带;

[0072] d) 肿瘤诊断和/或治疗;

[0073] e) 诱导肿瘤细胞凋亡。

[0074] 进一步的，

[0075] 所述产品还可包括检测探针。

[0076] 在本发明的一个实施例中，所述检测探针由FAM-Probe和Cy5-Probe组成；所述FAM-Probe序列具体如下：5'-FAM-AACTATACAACCTACTACCTCA-3'；所述Cy5-Probe序列具体如下：5'-Cy5-TACCCACCCAGTCCACCCCCACA-3'。

[0077] 更进一步的，

[0078] 所述产品还可包括用于核酸扩增所需的其他试剂，所述用于核酸扩增所需的其他试剂包括dNTPs和反应缓冲液。

[0079] 如下A)-G)任一所述的应用也属于本发明的保护范围：

[0080] A) 上述硅纳米针或按照上述硅纳米针的制备方法制备得到的硅纳米针在作为向细胞中递送生物分子的载体中的应用；

[0081] B) 上述硅纳米针或按照上述硅纳米针的制备方法制备得到的硅纳米针在作为向细胞中递送生物诊断试剂和/或肿瘤治疗药物的载体中的应用；

[0082] C) 上述硅纳米针或按照上述硅纳米针的制备方法制备得到的硅纳米针或上述硅纳米针注射器或按照上述硅纳米针注射器的制备方法制备得到的硅纳米针注射器或上述产品在制备检测或辅助检测肿瘤细胞内多个靶标分子的产品中的应用；

[0083] D) 上述硅纳米针或按照上述硅纳米针的制备方法制备得到的硅纳米针或上述硅纳米针注射器或按照上述硅纳米针注射器的制备方法制备得到的硅纳米针注射器或上述产品在制备诱导肿瘤细胞凋亡的产品中的应用；

[0084] E) 上述硅纳米针或按照上述硅纳米针的制备方法制备得到的硅纳米针或上述硅纳米针注射器或按照上述硅纳米针注射器的制备方法制备得到的硅纳米针注射器或上述产品在制备肿瘤诊断和/或治疗的产品中的应用；

[0085] F) 上述硅纳米针或按照上述硅纳米针的制备方法制备得到的硅纳米针或上述硅纳米针注射器或按照上述硅纳米针注射器的制备方法制备得到的硅纳米针注射器或上述产品在制备实现细胞内核酸等温扩增与化学药物载带协同的产品中的应用；

[0086] G) 上述硅纳米针或按照上述硅纳米针的制备方法制备得到的硅纳米针或上述硅纳米针注射器或按照上述硅纳米针注射器的制备方法制备得到的硅纳米针注射器或上述产品在制备肿瘤细胞内多靶标检测与治疗一体化的产品中的应用。

[0087] 上述应用中，所述B)中，所述生物诊断试剂可为肿瘤细胞内靶标识别所需试剂；具体的，所述肿瘤细胞内靶标识别所需试剂可为上述核酸扩增所需的酶和/或上述核酸分子。

[0088] 在本发明的具体实施例中，所述肿瘤细胞内靶标识别所需试剂由DNA聚合酶、DNA连接酶、核酸探针和BSA组成。其中，所述DNA聚合酶为phi29DNA聚合酶；所述DNA连接酶为splintR连接酶；所述核酸探针为锁式探针，所述锁式探针序列具体如下：5'-CTACTACCTCA TTTCCCGGTACCCACCCAGTCCACCCCCACATTTTAACTATACAAC-3'。

[0089] 所述肿瘤治疗药物可为用于干扰基因表达的物质。具体的，所述用于干扰基因表达的物质可为siRNA。在本发明的具体实施例中，所述siRNA为用于干扰VEGF基因表达的siRNA，其正义链序列具体如下：5'-GGAGUACCCUGAUGAGAUC-dTdT-3'；反义链为其反向互补链。

[0090] 为了实现上述目的,本发明最后提供了一种检测或辅助检测肿瘤细胞内多个靶标分子的方法。

[0091] 本发明提供的检测或辅助检测肿瘤细胞内多个靶标分子的方法是基于上述硅纳米针注射器或按照上述硅纳米针注射器的制备方法制备得到的硅纳米针注射器和核酸等温扩增技术实现的。

[0092] 上述方法中,所述多个靶标分子可为两个靶标分子或两个以上靶标分子。在本发明的一个实施例中,所述多个靶标分子为两个靶标分子,所述两个靶标分子具体可为Let-7a和VEGF。

[0093] 进一步的,

[0094] 所述检测方法可按照如下步骤进行:

[0095] m1) 将dNTPs、反应缓冲液、细胞培养基混匀,然后加入上述硅纳米针注射器,得到混合溶液;将所述混合溶液与肿瘤细胞共孵育;

[0096] m2) 孵育完成后,加入检测探针,孵育,通过激光共聚焦成像,实现肿瘤细胞内靶标分子的检测。

[0097] 更进一步的,

[0098] 所述m1)中,将120 $\mu$ L dNTPs ( $10 \times 10^{-3}$ M), 50 $\mu$ L 10 $\times$ Mix buffer (由splintR连接酶反应缓冲液和phi29DNA聚合酶反应缓冲液组成,体积比为1:1) 和250 $\mu$ L RPMI-1640培养基混匀,然后再加入80 $\mu$ L硅纳米针注射器 (SiNSs或SiNSs+siRNA) 溶液;所述孵育的条件如下: 37 $^{\circ}$ C, 5%二氧化碳培养箱中培养4小时;

[0099] 所述m2)中,孵育完成后,加入1mL RPMI-1640培养基,再向其中分别加入25 $\mu$ L浓度为 $10^{-6}$ M的Cy5-Probe探针溶液和25 $\mu$ L浓度为 $10^{-6}$ M的FAM-Probe探针溶液(探针溶液的溶剂均为DEPC水,Cy5-Probe和FAM-Probe探针在细胞培养体系中的终浓度均为 $5 \times 10^{-8}$ M);所述孵育的条件如下: 37 $^{\circ}$ C, 5%二氧化碳培养箱中培养10min;所述FAM-Probe序列具体如下: 5'-FAM-AACTATACAACCTACTACCTCA-3';所述Cy5-Probe序列具体如下: 5'-Cy5-TACCCACCCAGTCCACCCCAACA-3'。

[0100] 通过激光共聚焦成像检测肿瘤细胞内靶标分子的判定方法具体如下:当肿瘤细胞荧光成像呈绿色时,说明肿瘤细胞中存在Let-7a和VEGF;当肿瘤细胞荧光成像呈橘色时,说明肿瘤细胞中只存在Let-7a,不存在VEGF。

[0101] 上述方法还可包括通过上述硅纳米针注射器向肿瘤细胞中载入用于肿瘤细胞治疗的物质。

[0102] 进一步的,所述用于肿瘤细胞治疗的物质可为沉默或干扰基因表达的物质。

[0103] 更进一步的,所述沉默或干扰基因表达的物质可为沉默VEGF基因表达的siRNA,其正义链序列具体如下: 5'-GGAGUACCCUGAUGAGAUC-dTdT-3';反义链为其反向互补链。本发明的沉默VEGF基因表达的siRNA可有效干扰VEGF基因的表达,从而抑制白血病的发作。

[0104] 上述方法中,所述检测可为体内检测或体外检测。所述肿瘤细胞可为活细胞。

[0105] 上述任一所述产品或应用或方法中,所述肿瘤可为现有技术中的常见肿瘤,如乳腺癌、肺癌、结肠癌、肾癌、喉癌等。在本发明的一个具体实施例中,所述肿瘤为急性淋巴细胞白血病。所述肿瘤细胞也可作为现有技术中常见的肿瘤细胞,在本发明的一个具体实施例中,所述肿瘤细胞为白血病肿瘤细胞,具体为人急性淋巴白血病细胞 (CCRF-CEM)。

[0106] 本发明提供了一种生物可降解的硅纳米针注射器及其在活细胞内多靶标检测和基因治疗中的应用。本发明的硅纳米针注射器合成方法如下：采用静电吸附或EDC偶联羧基氨基的方法，通过生物分子所带的羧基与硅针表面的氨基进行偶联，或通过核酸分子表面所带的负电荷与硅针表面的正电荷进行静电吸附，使生物分子负载在硅纳米针的介孔中和/或表面上。本发明还通过对锁式探针碱基的巧妙设计，利用滚环扩增技术实现对肿瘤细胞内双靶标的同时检测，进一步的，硅纳米针注射器还可以载带抗肿瘤药物进入肿瘤细胞，实现基因治疗，最终可实现活细胞内双靶标检测与基因治疗一体化。通过实验证明：本发明可通过与滚环扩增产物的不同位点的结合，实现不同的荧光成像，达到Let-7a和VEGF双检测的目的；而且通过沉默基因siRNA的载入，干扰了VEGF基因的表达，从而抑制了白血病的发作。本发明的硅纳米针注射器是一种高效、灵敏、安全、可降解的复合纳米材料，可用于肿瘤细胞内的靶标扩增，能很好地实现诊疗一体化，具有快速诊断和高效治疗肿瘤的潜力，在生物医学研究和临床诊断中具有很大应用价值。

## 附图说明

[0107] 图1为本发明制备的用于肿瘤检测 and 治疗的硅纳米针注射器合成示意图。图1A为湿法刻蚀技术制备的介孔硅纳米针。图1B为通过将介孔硅纳米针改性与生物试剂的负载合成的“硅纳米针注射器”。

[0108] 图2为本发明制备的硅纳米针注射器用于细胞内“一步法”RCA对靶标Let-7a和VEGF的双检测，以及siRNA阻断VEGF表达的基因治疗示意图。其中I：VEGF过量表达的CCRF-CEM细胞。II：无VEGF表达的非白血病肿瘤细胞。III：CCRF-CEM细胞的基因治疗。

[0109] 图3为本发明制备的硅纳米针注射器在体外缓冲溶液条件下对不同靶标梯度浓度进行的双检测。图3A为520nm处特异性检测Let-7a的荧光图。图3B为664nm处特异性检测VEGF的荧光图。图3A和图3B中插入的小图为荧光信号强度与靶标浓度的线性关系。

[0110] 图4为琼脂糖凝胶电泳法验证硅纳米针注射器用于RCA检测Let-7a的可行性。其中，M：2000-bp DNA marker；1：传统RCA；2：SiNSs-RCA法检测Let-7a；3：SiNSs-RCA法空白对照组（无靶标）。

[0111] 图5为本发明制备的硅纳米针注射器的生物可降解性验证。图5A为在37℃细胞培养基中浸泡，随着时间的推移逐渐溶解，其结构在1h后开始坍塌，4h后彻底失去形状，16h后仅剩实心残端。图5B为随着孵育时间的增长，硅纳米针注射器浓度逐渐降低。

[0112] 图6为本发明制备的硅纳米针注射器在活细胞内的双检测成像，进一步的，通过细胞内核酸提取来验证结果。图6A为SiNSs-RCA对CCRF-CEM细胞的荧光成像图。其中a) 为无siRNA；b) 为有siRNA干扰（图中标尺为10μm）。图6B为RT-PCR法对VEGF-mRNA的检测。其中，a) 为无siRNA和有siRNA干扰的CCRF-CEM细胞提取物的检测。b) 为RT-PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图像。1：SiNSs干扰；2：siRNA-SiNSs干扰；3：水为靶标的PCR产物。

[0113] 图7为本发明制备的负载siRNA的硅纳米针注射器对CCRF-CEM皮下异种移植裸鼠的体内抗肿瘤作用。图7A为肿瘤小鼠注射负载siRNA的SiNSs后第1、4、7、10、14天的肿瘤大小照片。图7B为肿瘤小鼠体内荧光成像图，其中，a) 为治疗前的小鼠；b) 为经14天治疗后的小鼠。图7C为治疗不同天数的小鼠肿瘤大小随时间的变化。图7D为治疗不同天数的小鼠体重随时间的变化曲线。图7E为肿瘤及其他组织切片的H&E染色图像。其中a) 为治疗前的小

鼠;b)为经14天治疗后的小鼠。

## 具体实施方式

[0114] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂公司购买得到的。以下实施例中的定量实验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

### [0115] 实施例1、硅纳米针的制备

[0116] 利用改进的湿法刻蚀的方法,制备出底部直径为100nm、长度为1 $\mu$ m的硅纳米针。本实施例制备硅纳米针的流程如图1A所示。具体步骤如下:

[0117] (1) 选取任意一种晶向和掺杂浓度的单晶硅片(合肥科晶材料技术有限公司;硅片,p型B掺杂),将其切成面积约为1cm $\times$ 1cm小块后,在室温下依次经过分析纯丙酮溶液超声清洗10min、无水乙醇溶液超声清洗10min、piranha清洗液(30%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液与98%的浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液的体积比为1:3)超声清洗30min,然后将硅片用流动的去离子水清洗干净,氮气吹干。

[0118] (2) 完成步骤(1)后,将步骤(1)处理后的硅片浸入质量分数为5%的HF溶液(溶剂为水)中活化30min,使其表面生成硅氢键,然后将硅片用流动的去离子水清洗干净,氮气吹干。

[0119] (3) 完成步骤(2)后,将步骤(2)处理后的硅片浸入混合溶液(混合溶液由溶剂和溶质组成,溶剂为水,溶质及其浓度分别为HF 10%(质量分数)、AgNO<sub>3</sub> 0.02mol/L)中,避光缓慢震荡2min,使硅片表面均匀的镀上一层纳米Ag颗粒层,然后将硅片用去离子水清洗干净。

[0120] (4) 完成步骤(3)后,将步骤(3)处理后的硅片浸入刻蚀液(刻蚀液由溶剂和溶质组成,溶剂为水,溶质及其浓度分别为HF 4.8mol/L、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.6mol/L)中,避光刻蚀30min,使其形成一层硅纳米线阵列,然后将硅片用流动的去离子水清洗干净,氮气吹干。

[0121] (5) 完成步骤(4)后,将步骤(4)处理后的硅片浸入质量分数为10%的KOH溶液(溶剂为水)中浸泡2min,以刻蚀阵列尖端,得到具有针尖结构的硅纳米针。

[0122] (6) 完成步骤(5)后,将步骤(5)获得的具有针尖结构的硅纳米针浸入质量分数为65%的浓HNO<sub>3</sub>溶液中浸泡2min,以去除Ag催化剂,然后将硅片用去离子水清洗干净,氮气吹干。

[0123] (7) 完成步骤(6)后,用小刀刮的方式将具有针尖结构的硅纳米针阵列进行剥离处理,得到硅纳米针。将硅纳米针溶于1mL无水乙醇溶液中,得到溶于无水乙醇溶液的游离的硅纳米针溶液。

### [0124] 实施例2、负载生物分子的硅纳米针(硅纳米针注射器)的制备

#### [0125] 一、生物分子的设计与合成

##### [0126] 1、锁式探针的设计

[0127] 本实施例的锁式探针依次由特异性识别miRNA Let-7a第1-11位、第47-57位的核酸分子、特异性识别VEGF基因第20-42位的核酸分子,具体序列如下:

5'-p-CTACTACCTCATTTCCCGGTACCCACCCAGTCCACCCCCACATTTTAACTAT

ACAAC-3' (序列1)。

[0128] 其中,锁式探针5'端磷酸化,5'端和3'端分别有11个碱基与Let-7a部分序列互补,中间部分设计成VEGF的适配体互补序列。图2中的锁式探针中的红色部分(单下划线标注的碱基)所示的序列可特异性识别miRNA Let-7a第1-11位、第47-57位;黑色部分(加粗标注的碱基)所示的序列为随机序列,蓝色部分(双下划线标注的碱基)所示的序列可特异性识别VEGF基因第20-42位。

[0129] 2、检测探针的设计

[0130] 本实施例中的检测探针由检测探针1和检测探针2组成。

[0131] FAM-Probe (检测探针1):5'-FAM-AACTATACAACCTACTACCTCA-3' (序列2);

[0132] Cy5-Probe (检测探针2):5'-Cy5-TACCCACCCAGTCCACCCCCACA-3' (序列3)。

[0133] 3、VEGF-siRNA的设计

[0134] 本实施例中的VEGF-siRNA是一条双链RNA,该双链RNA的正义链序列为5'-GGAGUACCCUGAUGAGAUC-dTdT-3' (序列4);反义链为其反向互补链。

[0135] 4、双检测过程设计

[0136] 本发明设计的锁式探针和检测探针可实现肿瘤细胞Let-7a和VEGF的双检测(图2):

[0137] 1) MiRNA Let-7a检测:当细胞中存在靶标Let-7a时,锁式探针5'端和3'端分别有11个碱基可通过碱基互补原则特异性识别Let-7a部分序列,与靶标序列完全匹配时,在连接酶的作用下,锁式探针连接成闭合的圆环,并以此为模板,在聚合酶的作用下进行滚环扩增(RCA),生成具有成百上千个重复单元的DNA单链(RCA产物),每个重复单元的序列具体如下: TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTAAAATGTGGGGGTGGACTGGGTGGGTACCGGGAAA, FAM-Probe探针可与RCA产物的重复单元B区(此处重复单元B区是指重复单元第1-22位)互补生成荧光信号,实现信号放大。当细胞中不存在靶标Let-7a时,不会进行RCA扩增,无产物生成。

[0138] 2) 血管内皮生长因子(VEGF)检测:产生RCA产物后,当细胞中存在VEGF时,会与RCA产物的重复单元A区(此处重复单元A区是重复单元第27-49位)以适配体的方式互补,无任何荧光产生;当细胞中不存在VEGF时,Cy5-Probe会取代VEGF的位置,与重复单元A区互补产生红色荧光。因此,通过荧光颜色的变化实验可实现VEGF检测。

[0139] RCA产物的重复单元A区既可以与靶标VEGF以适配体的方式互补,又可以与Cy5-Probe (检测探针2) 互补配对,RCA产物的重复单元B区可以与FAM-Probe (检测探针1) 互补配对。所以当肿瘤细胞荧光成像呈绿色时,说明肿瘤细胞中同时存在Let-7a和VEGF;当肿瘤细胞荧光成像呈橘色(此处同时显示红色和绿色,在荧光显微镜下重叠后呈现出橘色)时,说明肿瘤细胞中只存在Let-7a,不存在VEGF。

[0140] 5、治疗过程设计

[0141] 本发明设计的VEGF-siRNA可沉默基因VEGF,可由硅纳米针作为载体带入细胞中,表现出特异性的基因沉默作用(图2)。

[0142] 当负载有VEGF-siRNA的硅纳米针注射器进入急性淋巴白血病细胞(CCRF-CEM)时,Let-7a触发的滚环扩增产物分别与VEGF和FAM-Probe探针作用,产生绿色荧光;VEGF-siRNA通过基因干扰的作用机理降低VEGF的浓度,使得RCA产物的重复单元A区成单直链状态并与Cy5-Probe探针互补配对,产生红色荧光。

[0143] 二、负载生物分子的硅纳米针(硅纳米针注射器)的制备

[0144] 采用静电吸附或EDC偶联羧基氨基的方法,通过生物分子所带的羧基与硅纳米针表面的氨基进行偶联,或通过核酸分子表面所带的负电荷与硅纳米针表面的正电荷进行静电吸附,使所述生物分子负载在实施例1中制备的硅纳米针的介孔中和/或表面上。

[0145] 本实施例制备硅纳米针注射器的流程如图1B所示。具体步骤如下:

[0146] (1) 将1mL实施例1制备的硅纳米针溶液分散到4mL无水乙醇溶液中,然后加入10 $\mu$ L APTES (3-氨丙基三乙氧基硅烷, Sigma Aldrich, 440140), 室温搅拌3小时后,得到反应产物。

[0147] (2) 完成步骤(1)后,取500 $\mu$ L反应产物分别用无水乙醇溶液和二次水洗涤,洗涤后离心(8000rpm, 8min),收集沉淀,并向沉淀中滴加10 $\mu$ L水杨醛(西亚化工, E13895), 沉淀变黄,证明硅纳米针氨基化成功。

[0148] 将剩余反应产物分别用无水乙醇溶液和二次水洗涤,洗涤后离心(8000rpm, 8min),收集沉淀,并将沉淀分散到4mL二次水中,得到氨基化的硅纳米针,用于制备硅纳米针注射器。

[0149] (3) 向500 $\mu$ L步骤(2)制备的氨基化的硅纳米针中加入50 $\mu$ L浓度为4mg/mL的EDC(乙基二甲基胺丙基碳化二亚胺, Sigma Aldrich, E6383), 冰浴搅拌10min使其表面活化。

[0150] (4) 完成步骤(3)后,向活化的硅纳米针中加入12.5 $\mu$ L splintR连接酶(New England Biolabs, M0375L, 25U/ $\mu$ L), 5 $\mu$ L phi29DNA聚合酶(New England Biolabs, M0269L, 10U/ $\mu$ L)和5 $\mu$ L BSA(牛血清白蛋白, New England Biolabs, 10mg/mL), 继续冰浴搅拌2小时, DEPC水洗涤,离心(8000rpm, 8min),收集沉淀,并将沉淀重新分散到4mL二次水中,得到硅纳米针溶液。

[0151] (5) 完成步骤(4)后,向硅纳米针溶液再加入5 $\mu$ L浓度为 $1 \times 10^{-6}$ M的步骤一中设计的锁式探针,冰浴搅拌30min,用二次水进行洗涤后离心(8000rpm, 8min),收集硅纳米针注射器沉淀,并将硅纳米针注射器沉淀重分散到4mL DEPC水中,得到SiNSs溶液。SiNSs溶液中溶质为负载有生物分子(splintR连接酶、phi29DNA聚合酶、BSA、锁式探针)的硅纳米针,即为本发明的硅纳米针注射器,可用于体外/体内的核酸扩增。

[0152] (6) 完成步骤(4)后,向硅纳米针溶液再加入5 $\mu$ L浓度为 $1 \times 10^{-6}$ M的步骤一中设计的锁式探针和5 $\mu$ L浓度为 $1 \times 10^{-6}$ M的步骤一中设计的VEGF-siRNA,冰浴搅拌30min,用二次水进行洗涤后离心(8000rpm, 8min),收集硅纳米针注射器沉淀,并将硅纳米针注射器沉淀重分散到4mL DEPC水中,得到SiNSs+siRNA溶液。SiNSs+siRNA溶液中溶质为负载有生物分子(splintR连接酶、phi29DNA聚合酶、BSA、锁式探针、siRNA)的硅纳米针,即为本发明的硅纳米针注射器,可用于体外/体内的核酸扩增和基因干扰与肿瘤治疗。

[0153] 本发明制备的硅纳米针注射器上负载的生物分子的负载厚度为5nm左右。

[0154] 实施例3、硅纳米针注射器在体外线性实验中的应用

[0155] 一、体外线性实验

[0156] 1、体外线性实验方法

[0157] (1) 靶标溶液的制备

[0158] 分别合成靶标分子Let-7a (Let-7a: UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU) 和VEGF(血管表皮生长因子, 购于sigma公司)。

[0159] 将合成的靶标分子Let-7a和VEGF分别溶于DEPC水中,得到靶标溶液。

[0160] 按照靶标溶液中Let-7a或VEGF浓度的不同,分别得到如下靶标溶液:

[0161] 靶标溶液1-1 (Let-7a浓度为100aM);靶标溶液1-2 (Let-7a浓度为1fM);靶标溶液1-3 (Let-7a浓度为10fM);靶标溶液1-4 (Let-7a浓度为100fM);靶标溶液1-5 (Let-7a浓度为1pM);靶标溶液1-6 (Let-7a浓度为10pM);靶标溶液1-7 (Let-7a浓度为100pM);靶标溶液1-8 (Let-7a浓度为1nM);靶标溶液2-1 (VEGF浓度为100fM);靶标溶液2-2 (VEGF浓度为1pM);靶标溶液2-3 (VEGF浓度为10pM);靶标溶液2-4 (VEGF浓度为100pM);靶标溶液2-5 (VEGF浓度为1nM);靶标溶液2-6 (VEGF浓度为10nM);靶标溶液2-7 (VEGF浓度为100nM);靶标溶液2-8 (VEGF浓度为1 $\mu$ M)。

[0162] (2) 滚环扩增

[0163] (2-1) 检测Let-7a

[0164] 以步骤(1)中的靶标溶液为模板进行滚环扩增,得到滚环扩增产物(RCA产物)。同时以等体积的DEPC水为靶标进行扩增作为空白对照(Blank)。

[0165] 滚环扩增体系(总体积为50 $\mu$ L)如下:5 $\mu$ L靶标(Let-7a)溶液,12 $\mu$ L dNTPs (10mM), 2.5 $\mu$ L splintR连接酶反应缓冲液(New England Biolabs,M0375L),2.5 $\mu$ L phi29 DNA聚合酶反应缓冲液(New England Biolabs,M0269L),2.5 $\mu$ L FAM-Probe(在体系中的终浓度为 $5 \times 10^{-8}$ M),2.5 $\mu$ L Cy5-Probe(在体系中的终浓度为 $5 \times 10^{-8}$ M),23 $\mu$ L实施例2步骤二制备的SiNSs溶液。靶标(Let-7a)溶液分别为步骤(1)中的靶标溶液1-1到1-8。

[0166] 滚环扩增条件如下:在PCR扩增仪上37 $^{\circ}$ C反应2小时。

[0167] 同时,以传统RCA(无纳米材料参与的扩增)检测Let-7a作为对照。

[0168] 传统RCA体系(总体积为50 $\mu$ L)如下:5 $\mu$ L靶标(Let-7a)溶液(在体系中的终浓度为 $10^{-8}$ M),5 $\mu$ L锁式探针(在体系中的终浓度为 $10^{-7}$ M),12 $\mu$ L dNTPs (10mM),1 $\mu$ L phi29 DNA聚合酶(New England Biolabs,M0269L,10U/ $\mu$ L),2.5 $\mu$ L splintR连接酶(New England Biolabs,M0375L,25U/ $\mu$ L),2.5 $\mu$ L splintR连接酶反应缓冲液(New England Biolabs,M0375L),2.5 $\mu$ L phi29 DNA聚合酶反应缓冲液(New England Biolabs,M0269L),1 $\mu$ L BSA(牛血清白蛋白,New England Biolabs,10mg/mL),2.5 $\mu$ L FAM-Probe(在体系中的终浓度为 $5 \times 10^{-8}$ M),2.5 $\mu$ L Cy5-Probe(在体系中的终浓度为 $5 \times 10^{-8}$ M),13.5 $\mu$ L DEPC水。

[0169] 传统RCA滚环扩增条件如下:在PCR扩增仪上37 $^{\circ}$ C反应2小时。

[0170] (2-2) 检测VEGF

[0171] 将步骤(2-1)得到的滚环扩增产物与靶标(VEGF)溶液混合,于37 $^{\circ}$ C下孵育30min,靶标(VEGF)溶液分别为步骤(1)中的靶标溶液2-1到2-8。

[0172] (3) 荧光检测

[0173] 滚环扩增结束后,将产物置于微量荧光比色皿中,在激发波长494nm,发射波长522nm下测得Let-7a的荧光检测线;在激发波长649nm,发射波长670nm下测得VEGF的荧光检测线,分别得到Let-7a和VEGF的荧光检测图。并以荧光信号强度为纵坐标,分别以发射波长和靶标浓度的对数为横坐标绘制标准曲线。

[0174] 2、体外线性实验结果

[0175] 结果如图3所示。图3A为520nm处特异性检测Let-7a的荧光图。图3B为664nm处特异性检测VEGF的荧光图。

[0176] 二、体外扩增电泳验证实验

[0177] 电泳检测步骤一获得的RCA产物。具体步骤如下：

[0178] 1、配制1%浓度的琼脂糖凝胶，具体配制方法如下：

[0179] 1) 准确称量0.2g琼脂糖，倒入锥形瓶中。

[0180] 2) 用专门的量筒量取约22mL TAE缓冲液(包含： $40 \times 10^{-3}\text{M}$  Tris,  $20 \times 10^{-3}\text{M}$ 醋酸,  $2 \times 10^{-3}\text{M}$ 乙二胺四乙酸(EDTA), pH 8.0) (避免加热时蒸发使胶浓度过高)，倒入锥形瓶中。轻轻摇晃使混匀，不要过于用力防止药粉沾到杯壁上不利于后面的溶解。

[0181] 3) 混匀，放入微波炉中加热，至锥形瓶中液体开始沸腾并等待些许时间，至溶液澄清透明。可取出观察，若看到颗粒状物质继续加热。加热时间不宜过久，防止液体蒸干。加热时间约为2min。

[0182] 4) 取出放置稍许冷却。待手可以碰触的温度时，加入染液1×Sybr Green。加染液时量比较少所以会粘在枪头上不易打下去，可以将染液打在杯壁上然后晃动锥形瓶使其溶解。

[0183] 5) 最后，倒膜。根据经验，一般冷却20min即可。

[0184] 6) 清洗锥形瓶时若残留凝胶不易清洗可加入少量水微热后直接倒入废液缸。最后跑完的胶要用手套包裹后丢弃或统一回收。

[0185] 2、取6μL步骤一获得的RCA产物加入0.2mL EP管中，向其中加入6μL 1×gel loading buffer，混合均匀。电泳槽中倒入1×TAE溶液，摸过琼脂糖凝胶的点样孔，用移液枪向点样孔中点样品，设置120V运行35min。

[0186] 3、运行结束后，将凝胶捞起，用二次水冲洗，然后用凝胶成像系统ChampGel 5000拍照保存。

[0187] 结果如图4所示。其中，1：传统RCA；2：SiNSs-RCA法检测Let-7a；3：SiNSs-RCA法空白对照组(无靶标)。

[0188] 实施例4、硅纳米针注射器的生物可降解性验证

[0189] 1、将实施例2步骤二(5)中的离心后的硅纳米针注射器沉淀于0.5mL的RPMI-1640培养基(赛默飞世尔科技(中国)有限公司)中浸泡搅拌，37℃条件下分别孵育不同时间(1h、4h、8h、16h、24h)。分别在孵育不同时间后观察硅纳米针注射器的结构变化。

[0190] 结果如图5A所示。结果表明：随着孵育时间的增长，硅纳米针注射器逐渐溶解，其结构在孵育1h后开始坍塌，4h后彻底失去形状，16h后仅剩实心残端。

[0191] 2、收集孵育不同时间组的硅纳米针注射器，用二次水洗涤后离心(8000rpm, 8min)，收集沉淀，并将沉淀重分散在20μL二次水中，混匀观察。

[0192] 结果如图5B所示。结果表明：随着孵育时间的增长，相同体积的溶液浑浊度逐渐降低，说明硅纳米针注射器浓度逐渐降低，证明其被逐渐降解，直至24h基本被完全降解。

[0193] 实施例5、硅纳米针注射器在细胞实验中的应用

[0194] 硅纳米针注射器用于体外肿瘤细胞成像，具体步骤如下：

[0195] 一、实验方法

[0196] (1) 将CCRF-CEM细胞(中国科学院细胞库)在含有10%FBS的RPMI-1640培养基中，于37℃, 5%二氧化碳培养箱中培养过夜。

[0197] (2) 完成步骤(1)后，取无菌的1.5μL的离心管，加入120μL dNTPs ( $10 \times 10^{-3}\text{M}$ )，50μL

10×Mix buffer (由splintR连接酶反应缓冲液和phi29DNA聚合酶反应缓冲液组成, 体积比为1:1) 和250μL RPMI-1640培养基, 混匀, 向其中加入80μL硅纳米针注射器 (实施例2步骤二中 (5) 或 (6) 制备的SiNSs溶液或SiNSs+siRNA溶液), 得到混合溶液; 然后将500μL的混合溶液加入步骤 (1) 过夜培养的细胞中共孵育, 于37℃, 5%二氧化碳培养箱中培养4小时。

[0198] (3) 完成步骤 (2) 后, 将步骤 (2) 培养后的细胞用PBS (pH 7.4) 洗三遍, 加入1mL RPMI-1640培养基, 再向其中分别加入25μL浓度为 $10^{-6}$ M的Cy5-Probe探针溶液和25μL浓度为 $10^{-6}$ M的FAM-Probe探针溶液 (探针溶液的溶剂均为DEPC水, Cy5-Probe和FAM-Probe探针在细胞培养体系中的终浓度均为 $5 \times 10^{-8}$ M), 于培养箱中孵育培养10min; 然后重复PBS冲洗的步骤。

[0199] (4) 完成步骤 (3) 后, 将步骤 (3) 冲洗后的细胞固定在1mL的冷甲醇中, 在-20℃冰箱中保持10min, 重复PBS冲洗的步骤; 然后用浓度为500ng/mL的DAPI室温下孵育10min, 重复PBS冲洗的步骤; 最后加入1mL PBS分散细胞, 用于激光共聚焦成像。

[0200] (5) 完成步骤 (3) 后, 提取SiNSs溶液组、SiNSs+siRNA溶液组细胞内的RNA进行体外RT-PCR对VEGF-mRNA进行检测, 另外以DEPC水为靶标进行RT-PCR作为Blank对照, 分别得到RT-PCR产物, 并将RT-PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

[0201] RT-PCR反应体系 (20μL) 如下: 2μL cDNA, 10μL 2×SYBR Select Master Mix, 2μL 上游引物FP ( $5 \times 10^{-6}$ M), 2μL 下游引物RP ( $5 \times 10^{-6}$ M), 4μL RNase-free水。

[0202] RT-PCR反应条件如下: 95℃ 保持5min, 然后95℃ 15s, 60℃ 30s, 72℃ 30s, 运行40个循环。

[0203] 上游引物FP: CGAAACCATGAACTTTCTGC;

[0204] 下游引物RP: CCTCAGTGGGCACACACTCC。

## [0205] 二、实验结果

### [0206] 1、荧光成像结果

[0207] 为了验证SiNSs-RCA应用于细胞成像的可行性, 以细胞内VEGF检测为例, 通过引入siRNA阻断VEGF表达来控制其浓度, 进一步达到基因治疗的目的。选择CCRF-CEM细胞进行成像, 结果如图6A-a) 所示, FAM-Probe探针通过与Let-7a触发的RCA产物杂交, 在细胞质内产生显著的绿色荧光 (过程如图2-I所示)。而通过加入siRNA干扰VEGF基因表达后, 结果如图6A-b) 所示, 可以观察到细胞质内红色荧光显著增加, 这是因为siRNA干扰VEGF基因后, VEGF浓度降低, Cy5-Probe占据扩增产物中VEGF适配体的位点, 与其杂交产生红色荧光 (过程如图2-III所示)。说明本发明的SiNSs-RCA技术 (基于硅纳米针注射器的滚环扩增技术) 可以实现细胞内双靶标miRNA Let-7a和VEGF的成像检测与传感。

### [0208] 2、RT-PCR结果

[0209] 采用传统的RT-PCR方法验证了本发明SiNSs-RCA技术的可靠性。将各组细胞内的RNA提取进行体外RT-PCR, 结果如图6B-a) 所示, 与未受siRNA干扰的CCRF-CEM细胞 (红线, 图6B-a)) 相比, 受siRNA干扰的 (蓝线, 图6B-a)) 荧光曲线出峰时间出现了延迟。说明在siRNA干扰VEGF基因后, 细胞内VEGF-mRNA浓度降低, 荧光强度与细胞内VEGF-mRNA浓度呈动态相关。这也与步骤1中细胞成像结果图一致 (图6A)。将RT-PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 得到长度为302bp的扩增产物, 与实验设计一致。说明本发明的SiNSs-RCA技术对细胞内VEGF的成像检测是可行的。

[0210] 实施例6、负载生物分子的硅纳米针注射器在动物活体实验中的应用

## [0211] 一、实验方法

### [0212] 1、CCRF-CEM肿瘤组织异种移植模型的建立

[0213] 选取健康雄性BALB/c裸鼠,年龄在6周(16-20g)左右,通过皮下注射 $\approx 1 \times 10^7$ 个人急性淋巴白血细胞(CCRF-CEM)于小鼠右腋窝下,将CCRF-CEM细胞异种移植到裸鼠体内,建立得到CCRF-CEM肿瘤组织异种移植模型(荷瘤鼠)。

### [0214] 2、基因治疗处理

[0215] 当荷瘤鼠的肿瘤长到一定体积时,对荷瘤鼠进行基因治疗处理,根据基因治疗处理所用的溶液的不同随机分成三组:PBS、SiNSs、SiNSs+siRNA,每个实验组有5只重复实验鼠。处理方法为皮下注射,注射部位均为腋下肿瘤部位。具体处理方法如下:

[0216] PBS组:注射200 $\mu$ L PBS (pH7.4) 溶液。

[0217] SiNSs组:注射200 $\mu$ L SiNSs溶液;SiNSs溶液是将实施例2步骤二(5)中的离心后的硅纳米针注射器沉淀溶于200 $\mu$ L PBS (pH7.4) 溶液后得到的。

[0218] SiNSs+siRNA组:注射200 $\mu$ L SiNSs+siRNA溶液, SiNSs+siRNA溶液是将实施例2步骤二(6)中的离心后的硅纳米针注射器沉淀溶于200 $\mu$ L PBS (pH7.4) 溶液后得到的。通过注射负载siRNA的硅纳米针注射器干预肿瘤小鼠内VEGF的表达。

### [0219] 3、肿瘤体积和体重大小检测

[0220] 治疗后继续喂养两周,期间每隔一天记录小鼠肿瘤体积大小和体重大小。用单反相机(日本尼康)拍摄肿瘤照片,显示不同实验组对应不同大小的肿瘤(肿瘤大小由游标卡尺测量),按如下公式计算:肿瘤体积 $V = \text{长} \times \text{宽} \times (\text{长} + \text{宽}) / 2$ 。

### [0221] 4、体内光学成像实验

[0222] 在基因治疗后第14天,分别向各个实验组注射200 $\mu$ L检测试剂,由扩增溶液(100 $\mu$ L)和探针溶液(100 $\mu$ L)组成,扩增溶液由48 $\mu$ L dNTPs ( $10 \times 10^{-3}$ M), 20 $\mu$ L  $10 \times$  Mix buffer (由splintR连接酶反应缓冲液和phi29DNA聚合酶反应缓冲液组成,体积比为1:1)和32 $\mu$ L上述步骤2中的SiNSs溶液组成;探针溶液由FAM-Probe、Cy5-Probe和PBS溶液组成,探针溶液中FAM-Probe和Cy5-Probe浓度均为 $5 \times 10^{-8}$ M。检测试剂经皮下注射到肿瘤内后再喂养半小时左右,在480nm和640nm激发波长照射下,用体内成像系统对小鼠进行荧光成像。

### [0223] 5、H&E染色实验

[0224] 在基因治疗后第14天,分别取三个实验组的小鼠处死,收集肿瘤及重要器官(心、肝、脾、肺、肾)进行组织切片的H&E染色,进一步证明硅纳米针注射器对小鼠体内器官的影响。具体方法如下:用生理盐水冲洗肿瘤和器官三次,用4%多聚甲醛固定。用石蜡封存的肿瘤和组织切片经染色后,用倒置荧光显微镜系统(日本Olympus)观察。

## [0225] 二、实验结果

### [0226] 1、肿瘤体积和体重大小检测结果

[0227] 结果如图7所示,通过向小鼠肿瘤内注入负载siRNA的硅纳米针注射器,观察到基因治疗两天后肿瘤明显变小,在基因治疗后第14天,肿瘤大小减小到约91mm<sup>3</sup>。而仅注射PBS和SiNSs的对照组,肿瘤体积会随着时间的推移而增大,其中PBS组和SiNSs组在第14天肿瘤体积分别为2350mm<sup>3</sup>和2621mm<sup>3</sup>(图7A和图7C)。基因治疗后不同时间的不同处理组的肿瘤大小对比结果如图7C所示。在siRNA基因治疗过程中,没有观察到小鼠体重的明显变化,说明

此方法对小鼠自身的影响较小(图7D)。

## [0228] 2、体内光学成像检测结果

[0229] 体内光学成像结果如图7B所示,未基因治疗组(PBS组)的小鼠,肿瘤部位存在由Let-7a导致的显著的FAM-Probe探针绿色荧光信号和VEGF导致的较低的Cy5-Probe探针红色荧光信号。经过siRNA基因治疗14天的小鼠(SiNSs+siRNA组),观察到与对照组(PBS组)类似的绿色荧光信号,但由Cy5-Probe探针产生红色荧光信号明显增强。证明siRNA经硅纳米针注射器负载传送到细胞内成功的干扰了肿瘤细胞中VEGF基因的表达,具有良好的治疗效果。

## [0230] 3、H&E染色检测结果

[0231] H&E染色实验结果如图7E所示,与未经基因治疗小鼠(PBS组)的肿瘤组织切片相比,基因治疗组(SiNSs+siRNA组)的小鼠肿瘤组织切片可以观察到明显的肿瘤细胞凋亡(图7E-b))。而在心脏、肝脏、脾脏、肺、肾等组织中,两组间无明显差异。说明通过负载siRNA的硅纳米针注射器进行基因治疗可以诱导肿瘤细胞凋亡,而且该方法是安全的,对其他组织几乎没有副作用。

## 序列表

&lt;110&gt;北京师范大学

&lt;120&gt;一种生物可降解的硅纳米针注射器及其应用

&lt;160&gt;4

&lt;170&gt;PatentIn version 3.5

&lt;210&gt;1

&lt;211&gt;57

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;400&gt;1

ctactacctc atttcccggt acccaccag tccacccca cattttaact atacaac 57

&lt;210&gt;2

&lt;211&gt;22

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;400&gt;2

aactatacaa cctactacct ca 22

&lt;210&gt;3

&lt;211&gt;23

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;400&gt;3

taccaccca gtccacccc aca 23

&lt;210&gt;4

&lt;211&gt;19

&lt;212&gt;RNA

&lt;213&gt;人工序列 (Artificial Sequence)

&lt;400&gt;4

ggaguacccu gaugagauc 19

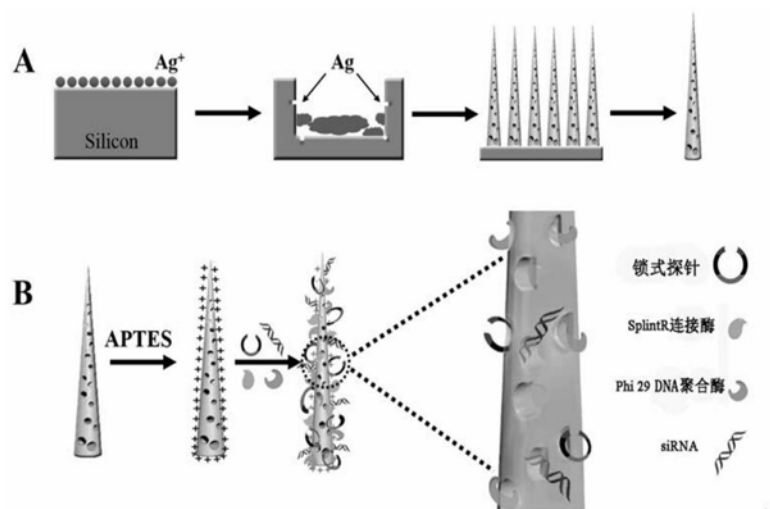


图1

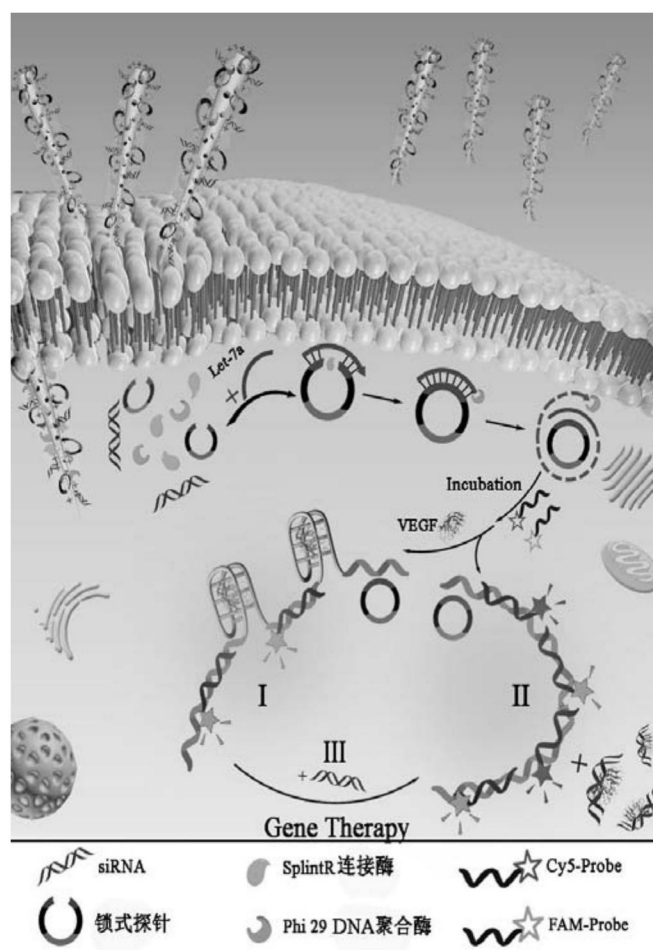


图2

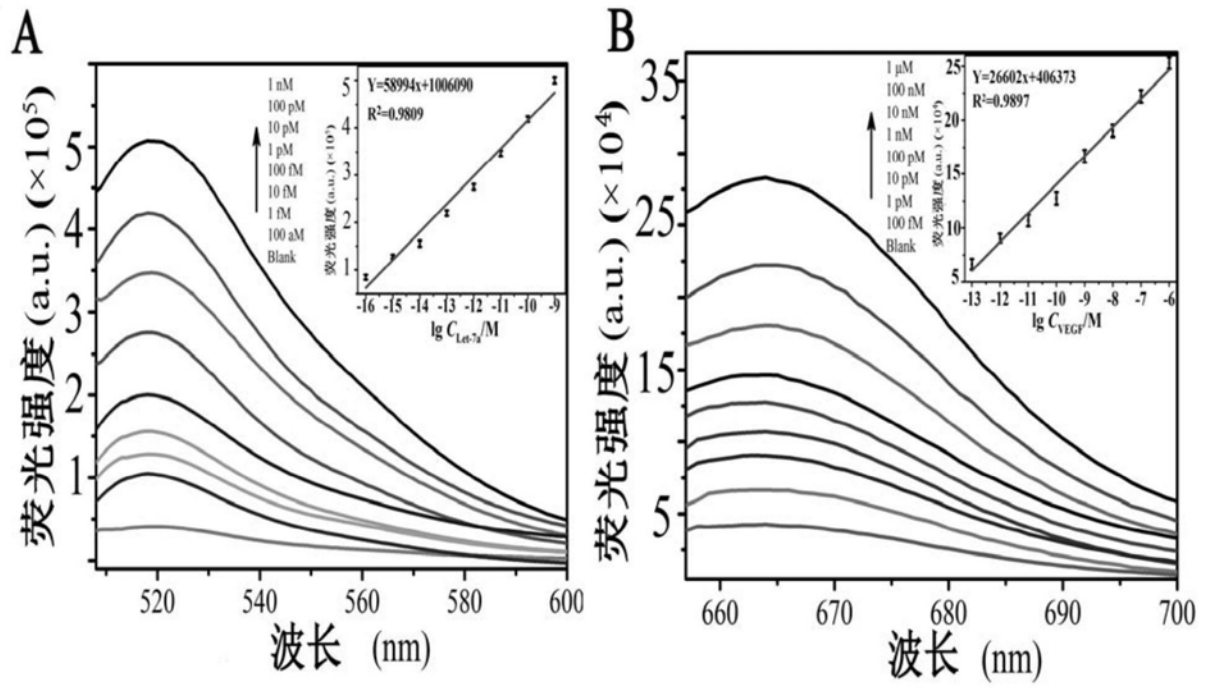


图3

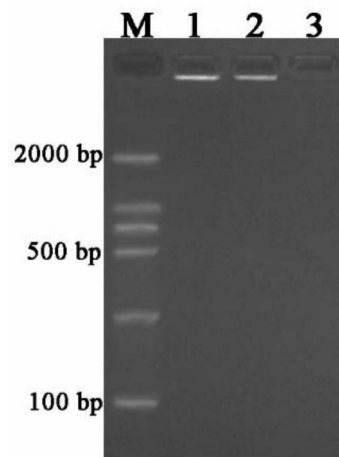


图4

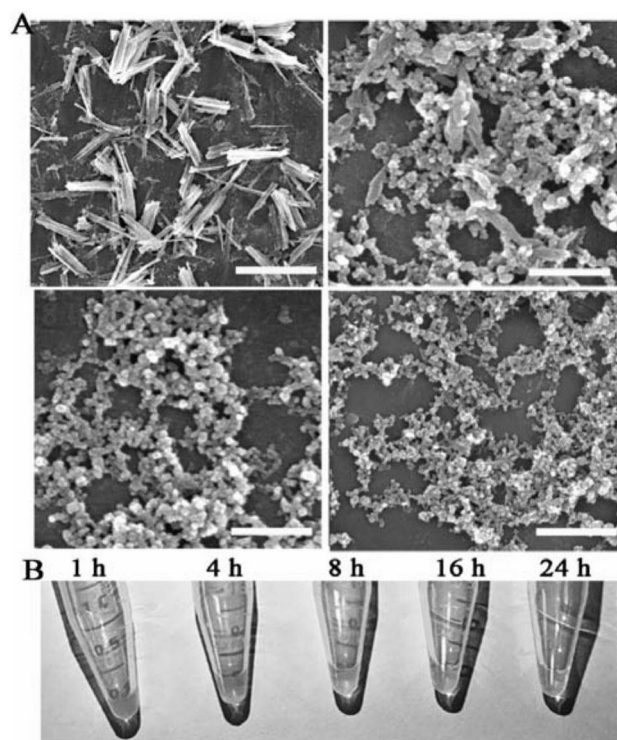


图5

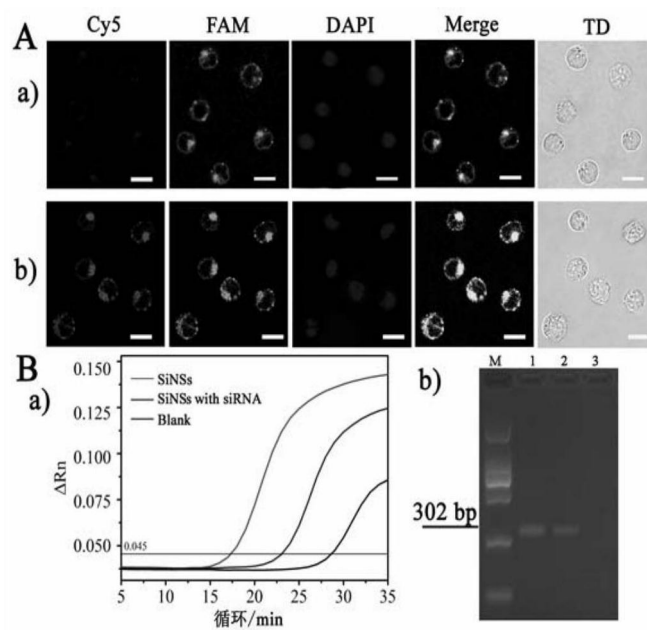


图6

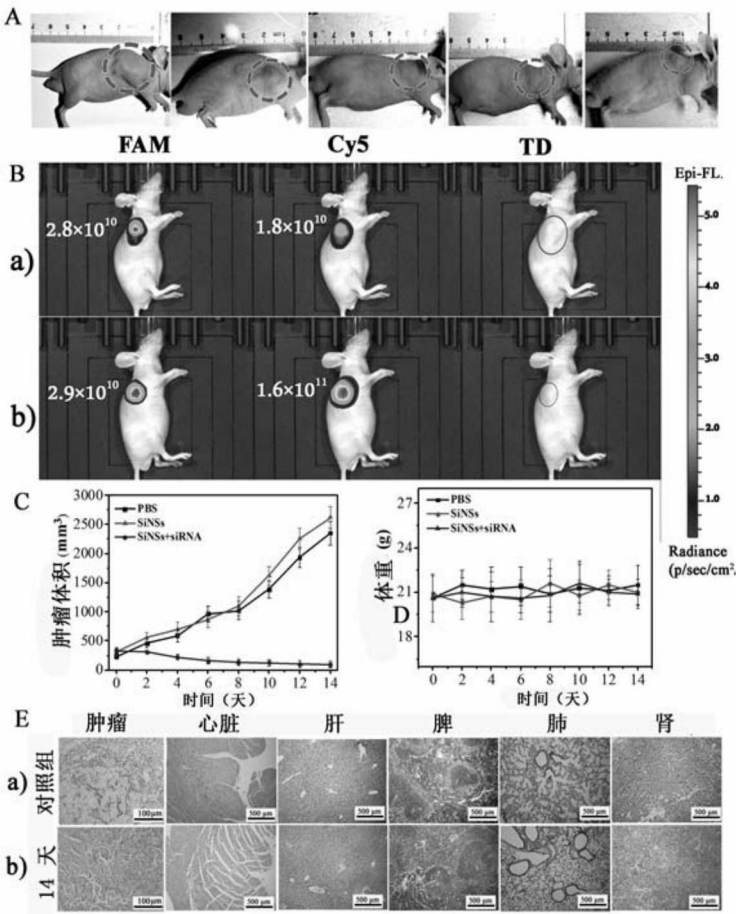


图7

|                |                                                 |         |            |
|----------------|-------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种生物可降解的硅纳米针注射器及其应用                             |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN109908464A</a>                    | 公开(公告)日 | 2019-06-21 |
| 申请号            | CN201910303143.2                                | 申请日     | 2019-04-16 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 北京师范大学                                          |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 北京师范大学                                          |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 北京师范大学                                          |         |            |
| [标]发明人         | 那娜<br>沈晓彤<br>欧阳津                                |         |            |
| 发明人            | 那娜<br>沈晓彤<br>欧阳津                                |         |            |
| IPC分类号         | A61M37/00 A61B5/00 C12Q1/6883 B81B1/00 B81C1/00 |         |            |
| 代理人(译)         | 关畅                                              |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>  |         |            |

#### 摘要(译)

本发明公开了一种生物可降解的硅纳米针注射器及其应用。本发明提供的硅纳米针注射器是负载有生物分子的硅纳米针，所述负载有生物分子的硅纳米针的制备方法包括如下步骤：采用静电吸附或EDC偶联羧基氨基的方法，通过生物分子所带的羧基与硅纳米针表面的氨基进行偶联，或通过核酸分子表面所带的负电荷与硅纳米针表面的正电荷进行静电吸附，使所述生物分子负载在所述硅纳米针的介孔中和/或表面上。本发明的硅纳米针注射器是一种高效、灵敏、安全、可降解的复合纳米材料，可用于活细胞内多靶标检测和基因治疗，能很好地实现诊疗一体化，具有快速诊断和高效治疗肿瘤的潜力，在生物医学研究和临床诊断中具有很大应用价值。

