



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108956991 B

(45) 授权公告日 2021.04.27

(21) 申请号 201810829706.7

(22) 申请日 2018.07.25

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108956991 A

(43) 申请公布日 2018.12.07

(73) 专利权人 南通大学  
地址 226019 江苏省南通市啬园路9号

(72) 发明人 于艳艳 朱敏 周垚 苏高星  
朱红艳

(74) 专利代理机构 北京汇捷知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11531

代理人 李宏伟

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

C12Q 1/6818 (2018.01)

(56) 对比文件

CN 104880556 A, 2015.09.02

CN 106011142 A, 2016.10.12

CN 102971422 A, 2013.03.13

CN 101208437 A, 2008.06.25

CN 104155278 A, 2014.11.19

CN 107884373 A, 2018.04.06

WO 2016168656 A1, 2016.10.20

Heyduk, E等. Nucleic acid-based fluorescence sensors for detecting proteins.《ANALYTICAL CHEMISTRY》.2005,第77卷(第4期),第1147-1156页.

仲津漫等. 前列腺癌适配体的研究进展及其应用.《现代生物医学进展》.2015,第15卷(第29期),第5751-5753页.

审查员 刘莉丹

权利要求书1页 说明书4页

序列表1页 附图4页

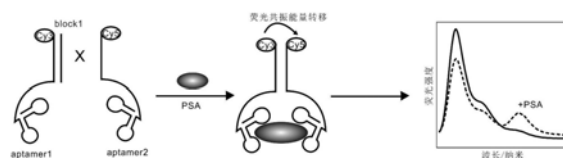
(54) 发明名称

一种荧光共振能量转移生物传感器及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种荧光共振能量转移生物传感器及其应用。该传感器包括第一结合探针和第二结合探针；其中，第一结合探针由aptamer1和block1杂交形成双螺旋结构，aptamer1和block1均为DNA序列；aptamer1序列3'末端上修饰荧光分子A，5'末端上组装一个用于结合靶物质前列腺癌抗原(PSA)一位点上的第一PSA适配体；第二结合探针为aptamer2，该aptamer2为DNA序列；aptamer2序列3'末端上组装一个用于结合靶物质PSA另一位点上的第二PSA适配体，5'末端上修饰荧光分子B；在靶物质PSA存在的情况下，aptamer2取代block1并与aptamer1杂交形成双螺旋结构，荧光分子A、荧光分子B彼此靠近并形成强荧光共振能量转移效应。该传感器应用在对血清前列腺特异抗原PSA的检测方面，具有灵敏

度高、检测过程简单、分析成本低、标志物诊断准确性好等优点。



1. 一种荧光共振能量转移生物传感器,其特征在于,该传感器包括第一结合探针和第二结合探针;其中,

所述第一结合探针由aptamer1和block1杂交形成双螺旋结构,aptamer1和block1均为DNA序列;aptamer1序列3'末端上修饰荧光分子A,5'末端上组装一个用于结合靶物质PSA一位点上的第一PSA适配体;

所述第二结合探针为aptamer2,该aptamer2为DNA序列;aptamer2序列3'末端上组装一个用于结合靶物质PSA另一位点上的第二PSA适配体,5'末端上修饰荧光分子B;

在靶物质PSA存在的情况下,aptamer2取代block1并与aptamer1杂交形成双螺旋结构,荧光分子A、荧光分子B彼此靠近并形成强荧光共振能量转移效应;

所述aptamer1的DNA序列为:

5' -TTTTTAATTAAGCTCGCCATCAAATAGCTGGGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTCAAGATGGTT-3' ;

所述Aptamer2的DNA序列为:

5' -TTCCATCTTGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGCAATGGTACGGTACTTCCTATGGCGATGTGTTGGCTGTGTGTTGGGTGCAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3' ;

所述block1的DNA序列为:5' -CCATCTGAGG-3' 。

2. 如权利要求1所述的荧光共振能量转移生物传感器,其特征在于,所述荧光分子A为荧光分子Cy3,荧光分子B为荧光分子Cy5。

3. 权利要求1~2任一项所述的荧光共振能量转移生物传感器在对血清前列腺特异抗原PSA的检测方面的应用。

4. 如权利要求3所述的应用,其特征在于,该应用包括以下步骤:

(1) 将aptamer1储备液和block1储备液加入缓冲液后95℃到4℃退火,得到第一结合探针溶液;将aptamer2储备液加入缓冲液后95℃到4℃退火,得到第二结合探针溶液;

(2) 将第一结合探针溶液、第二结合探针溶液混合后加入PSA溶液,混合均匀,室温避光反应1小时后测荧光。

## 一种荧光共振能量转移生物传感器及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物传感器技术领域,尤其涉及一种荧光共振能量转移生物传感器及其应用。

### 背景技术

[0002] 前列腺癌是泌尿外科最常见的恶性肿瘤之一。有数据统计,在美国和欧洲,前列腺癌的发病率和死亡率分别排在男性恶性肿瘤的第一位和第二位。血清前列腺特异抗原(PSA)是由前列腺上皮细胞产生,具有较强的器官特异性。PSA作为一种肿瘤标志物已经在临床上广泛应用,使前列腺癌的检出率得到了明显的提高。

[0003] 临床生化检验一般要求样品用量少、快速、准确,最好能够进行高通量的分析。目前,常规的临床生化分析一般借助免疫分析法。酶联免疫分析法(ELISA)、放射性免疫分析法(RIA)、荧光免疫分析和时间分辨荧光免疫分析、化学发光免疫分析等技术常用于临床血清标志物的检测。这些方法虽然对疾病诊断有一定的价值,但存在分析检测周期长、操作步骤繁琐、成本高、分析通量低等缺点,限制了其临床的进一步应用。应用更为简便灵敏的标记方式开发PSA检测新方法仍有很大发展空间和应用需求。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种荧光共振能量转移生物传感器及其应用,该生物传感器能应用到血清前列腺特异抗原PSA检测,具有操作简单、检测速度快、检测结果准确的特点。

[0005] 本发明是这样实现的,一种荧光共振能量转移生物传感器,该传感器包括第一结合探针和第二结合探针;其中,

[0006] 所述第一结合探针由aptamer1和block1杂交形成双螺旋结构,aptamer1和block1均为DNA序列;aptamer1序列3'末端上修饰荧光分子A,5'末端上组装一个用于结合靶物质PSA一位点上的第一PSA适配体;

[0007] 所述第二结合探针为aptamer2,该aptamer2为DNA序列;aptamer2序列3'末端上组装一个用于结合靶物质PSA另一位点上的第二PSA适配体,5'末端上修饰荧光分子B;

[0008] 在靶物质PSA存在的情况下,aptamer2取代block1并与aptamer1杂交形成双螺旋结构,荧光分子A、荧光分子B彼此靠近并形成强荧光共振能量转移效应。

[0009] 优选地,所述aptamer1的DNA序列为:

[0010] 5'-TTTTTAATTAAGCTCGCCATCAAATAGCTGGGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTCAAGATGTT-3';

[0011] 所述Aptamer2的DNA序列为:

[0012] 5'-TTCCATCTTGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCAATGGTACGGTACTTCCTATGGCGATGTGTTGGCTGTGTGTTGGGGTGCAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3';

[0013] 所述block1的DNA序列为:5'-CCATCTTGAGG-3'。

[0014] 优选地,所述荧光分子A为荧光分子Cy3,荧光分子B为荧光分子Cy5。

[0015] 本发明进一步公开了上述荧光共振能量转移生物传感器在对血清前列腺特异抗原PSA的检测方面的应用。

[0016] 优选地,该应用包括以下步骤:

[0017] (1) 将aptamer1储备液和block1储备液加入缓冲液后95℃到4℃退火,得到第一结合探针溶液;将aptamer2储备液加入缓冲液后95℃到4℃退火,得到第二结合探针溶液;

[0018] (2) 将第一结合探针溶液、第二结合探针溶液混合后加入PSA溶液,混合均匀,室温避光反应1小时后测荧光。

[0019] 本发明克服现有技术的不足,提供一种荧光共振能量转移生物传感器及其制备方法与应用。本发明的基本原理如图1所示,其中,两个结合探针上组装了两个不同的PSA适配体,可以同时与PSA上不同的位点结合,而结合探针1由aptamer1和block1杂交而得。aptamer1和aptamer2上分别修饰了荧光分子Cy3和和Cy5。在没有靶物质PSA的情况下,aptamer1与block1形成双螺旋杂交结构,此时,阻挡了aptamer2与aptamer1的杂交,从而使得Cy3与Cy5距离较远,无法形成有效的荧光共振能量转移。而当两个结合探针同时与PSA杂交后,由于邻位介导杂交原理,aptamer2与aptamer1会形成双螺旋结构,并将block1取代替换下来。由此,Cy3与Cy5距离较近,能够形成很强的荧光共振能量转移效应,并且,此效应与PSA的浓度成正比。

[0020] 本发明以邻位免疫分析为基础,利用荧光共振能量转移技术,实现了PSA的高灵敏检测,本发明解决了目前肿瘤标志物诊断中所存在的灵敏度低、检测过程繁琐、分析成本高、标志物诊断准确性差以及难以满足现场检测不足。

[0021] 相比于现有技术的缺点和不足,本发明具有以下有益效果:本发明荧光共振能量转移生物传感器的制备简单、快速,所得到的荧光共振能量转移生物传感器用于临床癌症标志物的特异性检测,有利于前列腺癌的早期筛查和诊断,具有灵敏度高、检测过程简单、分析成本低、标志物诊断准确性好等优点。

## 附图说明

[0022] 图1是本发明荧光共振能量转移生物传感器的原理示意图;

[0023] 图2是荧光共振能量转移信号随时间的变化;

[0024] 图3是PSA系列浓度标准溶液的荧光检测结果;

[0025] 图4是不同肿瘤标志物在此检测体系中的信号响应结果;

[0026] 图5是在不同基质中进行反应的PSA信号结果图。

## 具体实施方式

[0027] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0028] 1、第一结合探针溶液的制备

[0029] 将aptamer 1和block1储备液用紫外荧光分光光度计进行定量,使其浓度为100μM。然后各取2μL储备液溶解于100μL缓冲液中(20mM HEPES,500mM NaCl,pH 7.4),95℃到4

℃进行退火,退火过程为95℃十分钟后降温到4℃,并在4℃至少保持10分钟。

#### [0030] 2、第二结合探针溶液的制备

[0031] 将aptamer 2储备液用紫外荧光分光光度计进行定量,使其浓度为100μM。然后取2μL储备液溶解于100μL缓冲液中(20mM HEPES,500mM NaCl,pH7.4),95℃到4℃进行退火,退火过程为95℃十分钟后降温到4℃,并在4℃至少保持10分钟。

#### [0032] 3、PSA检测过程

[0033] 取上述已经制备好的第一结合探针溶液和第二结合探针溶液各49μL,混合于离心管中,然后加入2uL不同浓度的PSA溶液,将溶液混合均匀后,室温避光反应1小时,得到待检测溶液。

#### [0034] 4、荧光检测过程

[0035] 将上述已经反应结束的待检测溶液置于100μL荧光比色皿中,通过荧光分光光度计进行检测,检测条件为:激发波长为488nm,检测波长范围为540~750nm。

#### [0036] 5、不同反应时间对PSA检测结果的影响

[0037] 取上述已经制备好的第一结合探针溶液和第二结合探针溶液各49μL,混合于离心管中,然后加入2uL PSA溶液(0.5μM),将溶液混合均匀后,置于100μL荧光比色皿中室温避光反应。每隔20分钟测一次荧光,测到100分钟结束。通过荧光分光光度计进行检测,检测条件为:激发波长为488nm,检测波长范围为540~750nm。

[0038] 不同反应时间点反应体系的荧光强度如图2所示。从图2中可以得出,随着反应时间的增加,565nm处吸收峰强度逐渐降低,而670nm处吸收峰的强度逐渐增强。而超过60分钟后,此峰强度的变化趋于稳定,因此反应60分钟即可达到最大值。

#### [0039] 6、PSA系列浓度标准溶液的荧光检测

[0040] 取上述已经制备好的第一结合探针和第二结合探针各49μL,混合于离心管中,然后加入2uL PSA系列浓度标准溶液(0.5μM),将溶液混合均匀后,置于100μL荧光比色皿中通过荧光分光光度计进行检测,检测条件为:激发波长为488nm,检测波长范围为540~750nm。

[0041] 取670nm处荧光吸收的增加值与PSA浓度进行线性回归,得到的结果如下图3所示。回归方程为 $y=1.5+123.8x$ ,其回归系数为:0.991。方程中y表示在670nm处获得的荧光强度变化值,x表示目标物PSA的浓度。

#### [0042] 7、此反应体系对PSA的选择性

[0043] 取上述已经制备好的第一结合探针溶液和第二结合探针溶液各49μL,混合于离心管中,然后加入2uL PSA溶液(0.5μM),将溶液混合均匀后,置于100μL荧光比色皿中室温避光反应1h,通过荧光分光光度计进行检测,检测条件为:激发波长为488nm,检测波长范围为540~750nm。用同样方法,分别测定在探针中加入2μL癌胚抗原(2μM),癌抗原125(2μM)和肿瘤坏死因子(2μM)后,荧光的变化。

[0044] 加入不同物质后,670nm处的荧光强度如图4所示。从图4中可以得出,只有加入靶物质PSA后,此波长处的荧光强度有很大提升,而其他的肿瘤标志物并不能够造成信号的增加。

#### [0045] 8、不同复杂基质对PSA检测的影响

[0046] 取上述已经制备好的第一结合探针溶液和第二结合探针溶液各49μL,混合于离心

管中,然后加入2 $\mu$ L PSA溶液(0.5 $\mu$ M),加入10 $\mu$ L血清或者10 $\mu$ L细胞裂解液,将溶液混合均匀后,置于100 $\mu$ L荧光比色皿中室温避光反应1h,通过荧光分光光度计进行检测,检测条件为:激发波长为488nm,检测波长范围为540~750nm。

[0047] 670nm处的荧光强度如图5所示。从图5中可以看出,无论是在缓冲液中还是在血清以及细胞裂解液中进行反应,所得结果相差不大,所构建的生物传感体系能够有效排除复杂基质的干扰。

[0048] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 南通大学
- [0003] <120> 一种荧光共振能量转移生物传感器及其应用
- [0004] <141> 2018-07-23
- [0005] <160> 3
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 68
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> Artificial Sequence
- [0011] <400> 1
- [0012] tttttaatta aagctcgcca tcaaatagct gggggttttt tttttttttt tttttcctca 60
- [0013] agatggtt 68
- [0014] <210> 2
- [0015] <211> 105
- [0016] <212> DNA
- [0017] <213> Artificial Sequence
- [0018] <400> 2
- [0019] ttccatcttg agtttttttt tttttttttt ttgcaatggt acggtacttc ctatggcgat 60
- [0020] gtgttgctg tgtgtggggt gcaaaagtgc acgctacttt gctaa 105
- [0021] <210> 3
- [0022] <211> 11
- [0023] <212> DNA
- [0024] <213> Artificial Sequence
- [0025] <400> 3
- [0026] ccatcttgag g 11

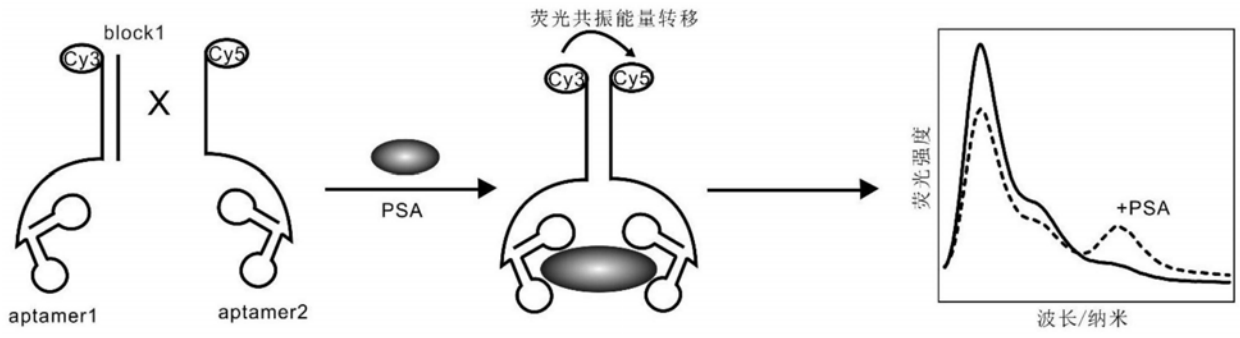


图1

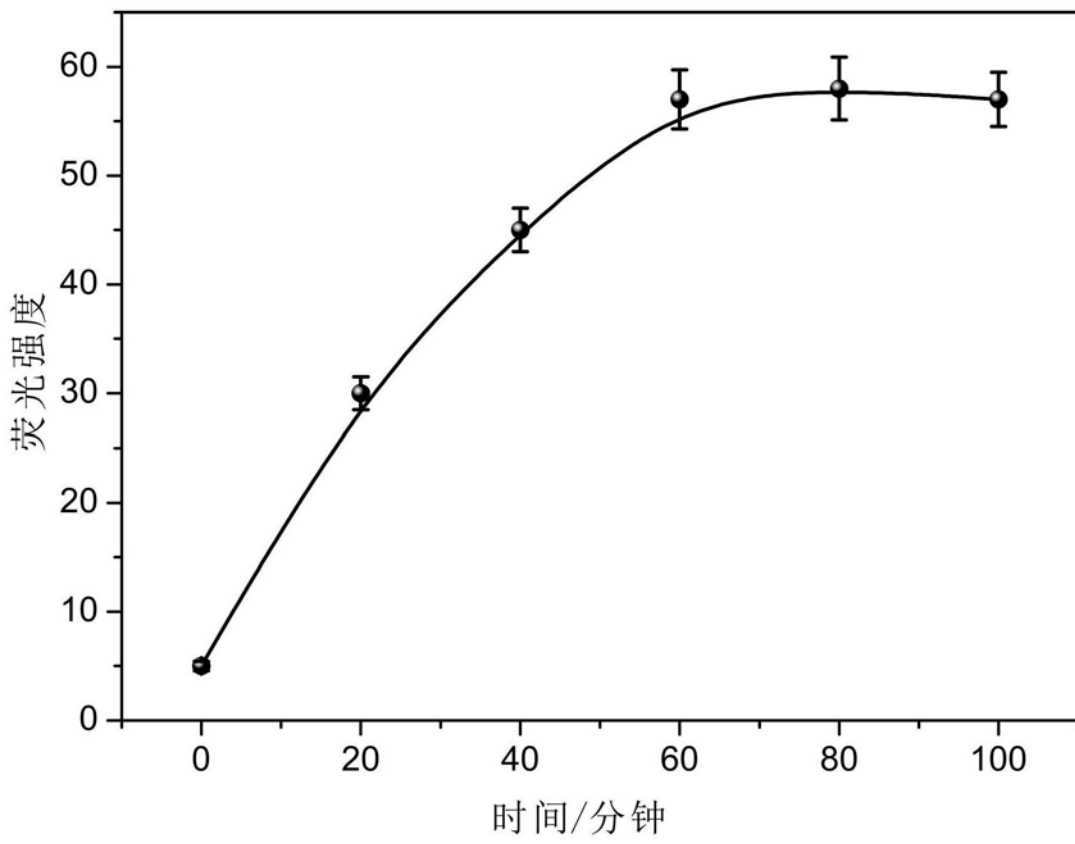


图2



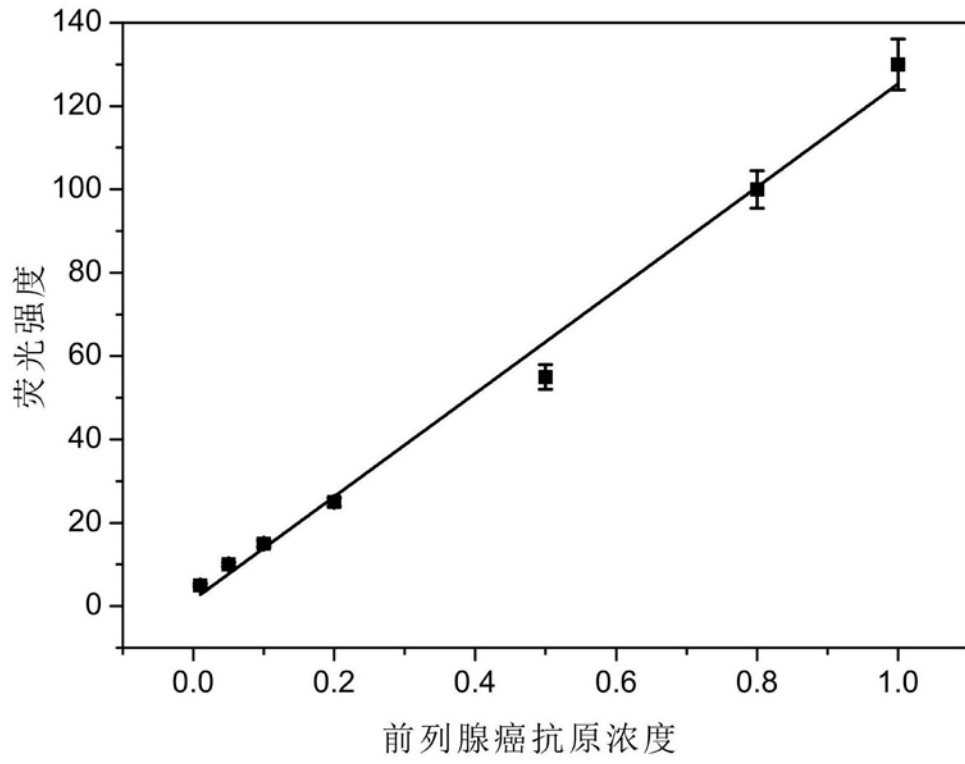


图3

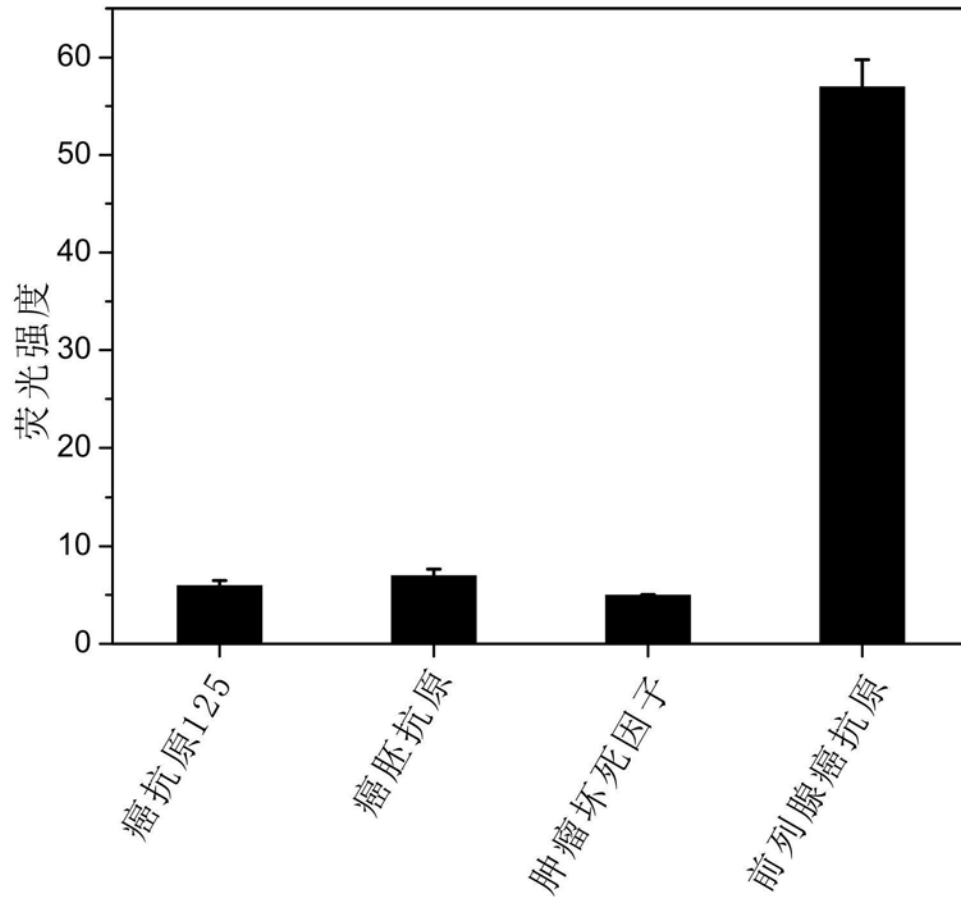


图4

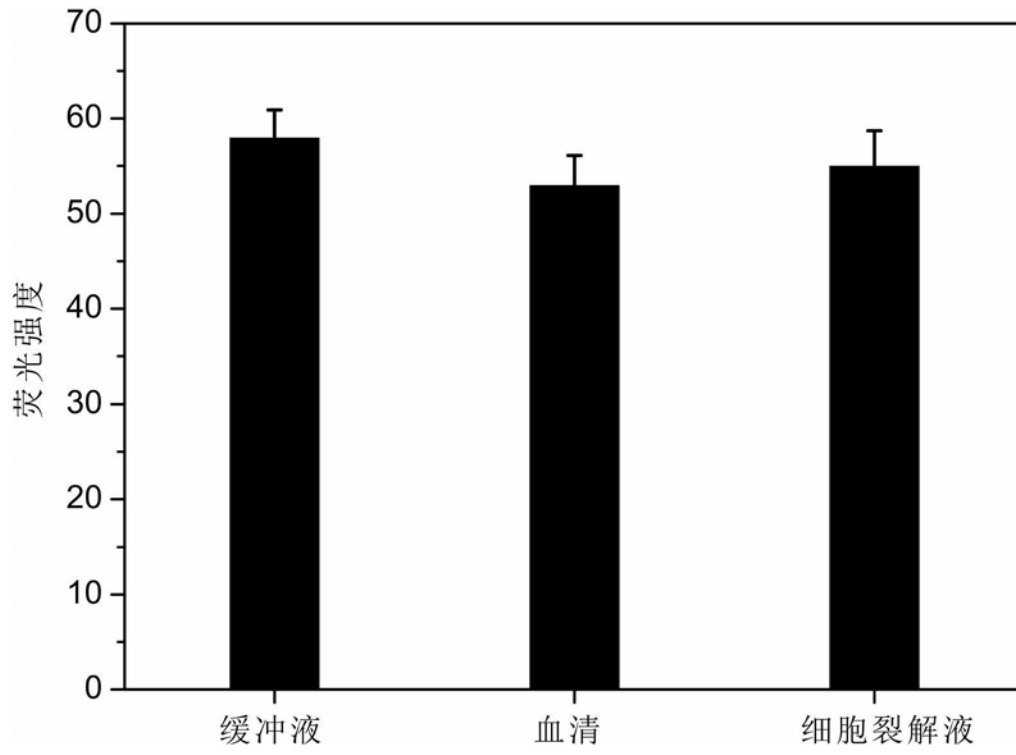


图5