DOI：10.19789/j.1004-9398.2024.03.008
文献引用：潘雅杰，张巧巧，王峥，等. 高效化学偶联的H1N1灭活病毒核酸适配体比色传感器[J]. 首都师范大学学报（自然科学版），2024，45（3）：87-96. PAN Y J，ZHANG Q Q，WANG Z，et al. Colorimetric aptasensor for the detection of H1N1 inactivated virus-based on highly efficient chemical crosslinking[J]. Journal of Capital Normal University（Natural Science Edition），2024，45（3）：87-96.

高效化学偶联的H1N1灭活病毒核酸适配体比色传感器*

潘雅杰#，张巧巧#，王　峥，娄新徽**
（首都师范大学化学系，北京　100048）

摘要：以A型H1N1灭活流感病毒为例，建立一种高灵敏、高特异、便于产业化和高生物安全性的快速检测高传染性病原体的方法——磁交联沉淀-纳米金联用（MCP-GNP）比色法。首先，利用磁珠上活化的羧基与灭活病毒表面上蛋白质的一级胺基之间高效的化学偶联实现对灭活病毒的捕获；其次，将核酸适配体与捕获了灭活病毒的磁珠进行孵育，核酸适配体特异性识别H1N1灭活病毒，磁性分离后热洗脱磁珠上结合的核酸适配体；再次，对热洗脱的核酸适配体进行聚合酶链式反应（PCR）扩增；最后，利用纳米金对单链引物和双链扩增产物吸附能力的差异，实现对H1N1灭活病毒的比色检测。以H5N1灭活病毒为阴性对照组，检出限（*S*/*N*=3）为1 ng/L，是本课题组之前报道的特异性电化学阻抗传感器检出限的1/900。利用上述方法首次实现了对低病毒载量临床H1N1灭活病毒阳性咽拭子样本的比色检测。未经优化的条件下，从灭活病毒捕获到检测的全流程在3 h内完成，初步展示了其临床应用价值。此外，文中所有比色检测结果均与荧光定量PCR技术的测量结果一致，证实了方法的可靠性。本文的核心创新点是利用化学偶联进行超低质量浓度灭活病毒捕获，无需对病毒核酸进行提取和富集，更加便捷。此外，本研究利用H1N1灭活病毒的DNA核酸适配体实现病毒的特异性检测，不直接检测活病毒，具有高生物安全性。

关键词：H1N1灭活病毒；核酸适配体；化学偶联；纳米金；比色检测；荧光实时定量PCR
中图分类号：O65　　**文献标志码**：A

Colorimetric aptasensor for the detection of H1N1 inactivated virus-based on highly efficient chemical crosslinking*

PAN Yajie#，ZHANG Qiaoqiao#，WANG Zheng，LOU Xinhui**
（Department of Chemistry，Capital Normal University，Beijing　100048）

Abstract：Taking type A H1N1 inactivated influenza virus as an example，a rapid detection method with high sensitivity，specificity，biosafety and easy industrialization was established，referred as colorimetric assay using magnetic crosslinking precipitation coupled with gold nanoparticles（MCP-GNP）. Firstly，the efficient capture of the inactivated virus was achieved by performing the chemical coupling between the activated carboxyl group on the magnetic bead and the primary amine group of

收稿日期：2023-10-30
* 国家自然科学基金项目（22374104，21675112）
# 第一作者
** 通信作者：xinhuilou@cnu.edu.cn

the protein on the surface of the inactivated virus. Secondly, the aptamer was incubated with magnetic beads containing the captured viruses, followed by the magnetic separation and heat elution of the bead-bound aptamer. The aptamer specifically recognized the H1N1 inactivated virus. Thirdly, the polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify the eluted aptamer. Finally, the colorimetric detection of the H1N1 inactivated virus was realized, which was based on the different binding affinity of single-strand primers and double-strand amplified products on GNP. When H5N1 inactivated virus was used as the blank control, the detection of limit (S/N=3) was 1 ng/L, which was 1/900 of the detection limit of the specific electrochemical impedance sensor previously reported by our research group. The colorimetric detection of clinical H1N1 inactivated virus positive throat swab samples with low viral load was also achieved for the first time. Under non-optimized conditions, the full process from virus capture to detection was completed within 3 h, demonstrating the clinical application value of MCP-GNP. In addition, all the results of colorimetric detection in this study were consistent with those of fluorescence quantitative PCR, which confirmed the reliability of our method. The core innovation of this work is the use of chemical coupling reaction to conveniently achieve the capture of inactivated virus at ultra-low concentration without the need of viral nucleic acid extraction and enrichment. In addition, the DNA aptamer targeting the H1N1 inactivated virus, instead of the active virus, was used for the specific recognition of the virus, enabling the high biosafety.

Keywords: H1N1 inactivated virus; aptamer; chemical crosslinking; gold nanoparticles; colorimetric detection; real-time quantitative PCR

CLC: O65 **DC**: A

0 引 言

流感病毒分为A型、B型和C型3种，A型流感病毒因为具有非常频繁的抗原漂移和抗原转换行为，增加了抗流感病毒特效药、疫苗或诊断方法的研发难度。H1N1流感病毒属于A型流感病毒，是一种对人类具有高传染性的病原体。

现有病毒检测方法主要分为基因和抗体2类检测法[1-2]。基因检测法利用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测病毒的DNA或者RNA遗传物质，方法灵敏度高，是目前病毒检测的“金标准”。基于基因的检测方法因需要提取病毒核酸，对操作人员的技术要求高，且生物安全性差。抗体检测法通过检测宿主抗体来实现对病毒的检测，操作简单、快捷，但灵敏度不高，特别是宿主抗体在体内出现的时间较晚，常常造成“假阴性”的检测结果，不适合用于普通人群筛查和流行病学调查。急需研发高灵敏、高特异、高生物安全性的快速检测病毒的方法。

近年来核酸适配体技术快速发展，为病毒快速检测技术提供了新的机遇。核酸适配体是通过配体指数富集系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)得到的单链核苷酸，可特异性地识别多种靶标，如小分子、蛋白、完整细胞，甚至组织切片[3-7]。相比抗体，核酸适配体具有成本低、稳定性好、批次重现性好、容易化学合成、修饰和标记等优点[8-9]，近年来广泛用于快速检测技术的开发[10-12]。目前，已经报道了多种病毒的核酸适配体[13-15]及其基于核酸适配体的检测方法[16-23]。由于灵敏度高、仪器小型化和操作自动化的优势，电化学传感器是最受关注的一大类检测方法[24-28]。2018年，本课题组基于H1N1灭活病毒的DNA核酸适配体成功构建了电化学阻抗传感器，实现了对H1N1灭活病毒的高灵敏和特异性的检测[26]。该方法针对灭活病毒，具有高生物安全性。此外，该研究中核酸适配体识别病毒上的靶点不是易于变异的蛋白，而是相对稳定和保守的病毒外壳结构，因而具有高的稳定性。在传感器的检测性能方面，由于单个病毒与电极上固定的核酸适配体多位点结合的协同效应，该传感器的灵敏度与电极表面上的核酸适配体的密度密切相关，在高探针密度下，检测灵敏度高(3 ng/L)，但特异性差；在低探针密度下，特异性好，但检测灵敏度相对较低(900 ng/L)。探针密度的可控制备需要严格控制实验条件[29]，同时用来在电极上固定核酸适配体的Au—S键长期

化学稳定性较差[30-33]。以上2个因素使得基于Au电极的病毒传感器难以产业化,另外,由于Au电极表面对多种物质的非特异性吸附都很强,在该工作中没有实现对咽拭子中H1N1灭活病毒的检测。

低质量浓度灭活病毒的高效捕获是实现咽拭子中病毒检测的一个核心环节。2019—2021年,本课题组利用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide,EDC)/ N-羟基琥珀酰亚胺(N-Hydroxysuccinimide,NHS)活化羧酸修饰的磁珠和蛋白质靶标一级胺基之间的高效偶联反应,构建了高效的核酸适配体筛选方法——磁交联沉淀-SELEX(magnetic crosslinking precipitation-SELEX,MCP-SELEX)[34-35]。该方法的关键是利用化学偶联实现对低浓度蛋白的捕获。各类病毒表面均具有高密度表达的蛋白,而每个蛋白质大分子又含有多个赖氨酸残基(含一级胺基),这样每个病毒颗粒的一级胺基的浓度会非常高。因此,可以预期利用EDC/NHS活化的羧基修饰的磁珠进行病毒捕获应该是极为高效的。

基于以上研究基础,本研究拟建立一种检测H1N1灭活病毒的新方法,即磁交联沉淀-纳米金联用比色法(magnetic crosslinking precipitation-gold nanoparticle, MCP-GNP),其核心创新点是利用EDC/NHS活化的羧基修饰的磁珠与灭活病毒表面上蛋白质的一级胺基之间高效的化学偶联实现对病毒的捕获,无需对病毒核酸进行提取和富集,操作简单便捷、病毒捕获效率高。另外,本研究方法利用特异性识别H1N1灭活病毒的DNA核酸适配体实现对灭活病毒的特异性识别和信号放大,不但生物安全性高,而且便于与高效的PCR联用来提高检测的灵敏度;利用纳米金(gold nanoparticle,GNP)对单链引物和双链扩增产物吸附能力的差异,实现对H1N1灭活病毒的比色检测,检测方法简单、检测时间短。本文首先结合荧光定量PCR技术,证实了磁交联沉淀(magnetic crosslinking precipitation,MCP)可以用于病毒的高效捕获,并优化了捕获病毒的实验条件,进而测试了MCP-GNP方法的高灵敏度和高特异性,最后利用MCP-GNP对低病毒载量的临床H1N1灭活病毒阳性咽拭子样本进行了检测。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

本研究中使用的H1N1(A/California/07/2009 NYMC,X-179A)、H5N1灭活病毒,H1N1灭活病毒样本的标准品由北京微生物研究所病原体与生物安全国家重点实验室提供。活性病毒在0.1%甲醛中4 ℃下孵育1周进行灭活,通过连续流动离心和随后的蔗糖密度离心进行纯化,通过Lowry法测定蛋白质的浓度来确定其质量密度。H3N2、H5N1灭活病毒样本的标准品,H1N1病毒阳性咽拭子由军事科学院军事医学研究院提供。

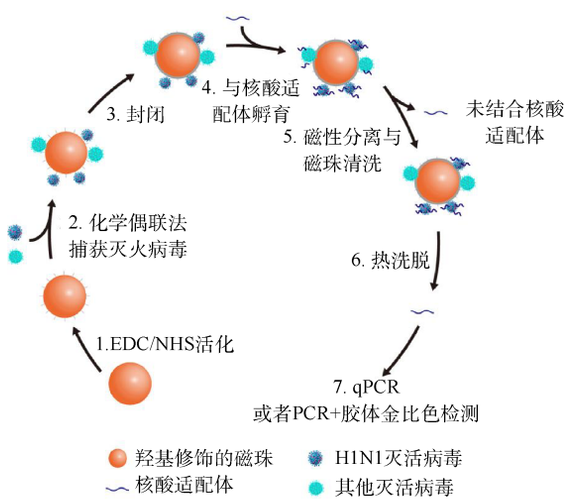
本研究中用于灭活病毒检测的核酸适配体P-A8S购自生物工程(上海)股份有限公司,其序列为5′-GCAATGGTACGGTACTTCCATTCGACCTCTGTAACAGCCACGAAAACCCTATATCAAAAGTGCACGCTACTTTGCTAA-3′[26];羧基包被磁珠Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid由美国GE公司生产;GNP溶胶由实验室按照柠檬酸还原法自制,直径为13 nm;实时定量PCR试剂盒、EDC、NHS、酵母tRNA、鲑鱼精DNA、吐温80、2-吗啉乙磺酸(2-morpholine ethanesulfonic acid,MES)、葡萄糖及文中所用无机盐均购自生物工程(上海)股份有限公司。本研究中使用到以下4种缓冲溶液,MES溶液(25.00 mmol/L,pH 5.0)、磷酸盐缓冲溶液1(总物质的量浓度为0.01 mol/L的Na_2HPO_4和NaH_2PO_4混合溶液,5.00 mmol/L $MgCl_2$,pH 7.4)、磷酸盐缓冲溶液2(总物质的量浓度为0.01 mol/L的Na_2HPO_4和NaH_2PO_4混合溶液,5.00 mmol/L $MgCl_2$、0.50 mol/L NaCl,pH 7.4)、咽拭子培养液(Hanks缓冲溶液:137.93 mmol/L NaCl、5.33 mmol/L KCl、4.17 mmol/L $NaHCO_3$、0.44 mmol/L KH_2PO_4、0.34 mmol/L Na_2HPO_4、5.56 mmol/L葡萄糖,pH 7.4),以上缓冲液均按照手册标准配置。文中使用了2种用于磁珠界面封闭的溶液,分别为封闭液1(磷酸盐缓冲溶液1、1 mg/mL酵母tRNA、100 μg/mL鲑鱼精DNA)、封闭液2(封闭液1、体积分数为0.1%吐温80),均通过在磷酸盐缓冲溶液1中分别添加酵母tRNA、鲑鱼精DNA或吐温80高浓度储备液进行配制。实验用水均为超纯水。

使用上海仪电科学仪器股份有限公司生产的PHS-3C型pH计测量溶液的酸碱度;使用日本岛津公司生产的UV-2550型紫外-可见吸收光谱仪测量溶液的吸光度;使用英国BioCote公司生产的SB3型可调速旋转混合器均速混均样品;使用美国Scientific Industries公司生产的Vortex-Genie 2型涡旋混匀仪快速混均样品;使用北京百晶生物有限公司生产的BG-Qspin™ 10000 rpm型微型高速离心机进

行样品离心处理;使用美国Millipore公司的Simplicity UV Mili-Q型纯水系统净化实验用水;使用南京晓励生物公司生产的RT-1000 PCR型荧光定量PCR(qPCR)仪进行核酸扩增和定量分析。

1.2　基于化学偶联和核酸适配体检测H1N1灭活病毒的原理及步骤

基于高效化学偶联和核酸适配体检测H1N1灭活病毒的流程如图1所示。(1)磁珠的活化,将羧基功能化的磁珠用EDC和NHS进行活化处理,磁珠上的羧基转化为NHS活性酯;(2)通过化学偶联捕获灭活病毒,在活化的磁珠中加入含有灭活病毒的样品,磁珠表面的活性酯与灭活病毒表面蛋白的一级胺基之间发生化学偶联反应,形成共价键,从而将灭活病毒捕获到磁珠上;(3)磁珠表面封闭,用封闭液1或者2对磁珠表面的非特异性吸附位点进行封闭处理,减少下一步核酸适配体在界面上的非特异性吸附;(4)核酸适配体与捕获灭活病毒的特异性结合,加入H1N1灭活病毒的特异性核酸适配体P-A8S与偶联了灭活病毒的磁珠进行孵育;(5)获得与磁珠结合的核酸适配体,通过磁性分离收集与磁珠结合的核酸适配体,丢弃上清中未结合的核酸适配体;(6)核酸适配体的洗脱,通过加热将核酸适配体P-A8S分离到洗脱液中;(7)核酸适配体的定量检测,将热洗脱液进行qPCR定量;或者在PCR之后加入GNP进行比色检测。



注:EDC为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐;NHS为N-羟基琥珀酰亚胺;PCR为聚合酶链式反应;qPCR为荧光定量PCR。

图1　基于高效化学偶联和核酸适配体检测H1N1灭活病毒的流程

1.3　GNP比色法检测灭活病毒的原理

GNP比色检测灭活病毒的原理如图2所示。利用了单链DNA和单核苷酸比双链DNA(PCR产物)能够更强地吸附在GNP表面,从而更有效地提高GNP的耐盐能力的现象[36-38]。处于分散状态的直径13 nm的GNP,其等离子共振吸收峰在520 nm,因而呈现红色;当其发生聚集时,在520 nm吸收减弱[39-40]。GNP的聚集是动态过程,时间越长,聚集越严重,颜色由红变紫。在本研究中,当样品中没有H1N1灭活病毒时,PCR反应无扩增模板(热洗脱的核酸适配体),故没有PCR产物生成,这时PCR反应液中的单核苷酸和引物(单链DNA)在GNP上吸附,很好地稳定GNP,且颜色保持红色;反之,当样品中含有H1N1灭活病毒时,PCR反应会产生大量双链DNA产物,将其加入GNP中,由于双链DNA在GNP的表面上的吸附力较弱,稳定GNP的能力较弱,因此GNP发生聚集。H1N1灭活病毒的含量越高,磁珠所捕获的灭活病毒的量就越大,与灭活病毒结合的核酸适配体的数量就越大,产生的双链DNA产物的量就越大,PCR体系中所剩余的单核苷酸和引物的量就越少,因而GNP的聚集就越严重。基于此,通过紫外-可见吸收光谱测定,就可以实现对灭活病毒的检测。

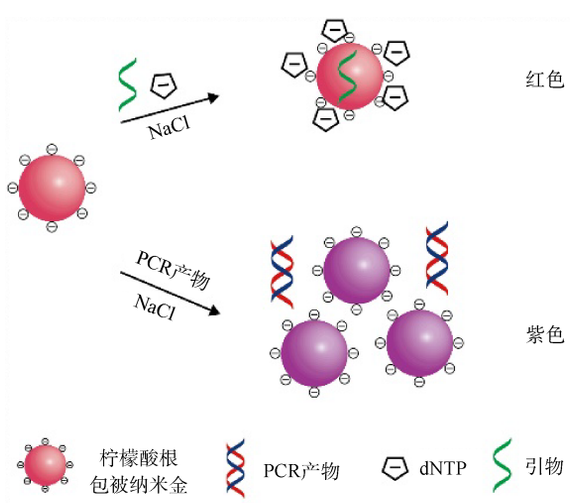


图2　纳米金(GNP)比色法检测灭活病毒的原理

1.4　qPCR技术检测H1N1灭活病毒

1.4.1　活化磁珠

将装有羧基包被磁珠的试剂瓶置于旋转混匀仪上,以转速7 r/min混匀15 min;移取10 μL上述溶液,置于1 500 μL离心管中;加入50 μL MES缓冲液清洗,室温下7 r/min混匀,充分混合10 min后磁性

分离,舍弃上清液,重复清洗3次;用MES缓冲液分别配制质量浓度为50 mg/mL的EDC和NHS溶液;向上述磁珠中分别加入25 μL EDC和NHS溶液,室温下旋转混匀,转速7 r/min,30 min后进行磁性分离,弃去上清液,用50 μL MES清洗3次。上述经EDC/NHS活化后的磁珠立即用于下面的灭活病毒捕获实验。

1.4.2 化学偶联法捕获灭活病毒

向对应的离心管中加入MES配制的不同质量浓度的50 μL灭活病毒溶液孵育。以不含灭活病毒的50 μL MES缓冲溶液实验为阴性对照组。孵育结束后用MES清洗磁珠3次。

1.4.3 封闭磁珠

为了降低核酸适配体在活化磁珠界面上的非特异性吸附,在磁珠捕获灭活病毒之后添加了磁珠界面封闭的步骤。分别利用封闭液1和封闭液2对磁珠进行封闭,向离心管中加入50 μL封闭液1或封闭液2,室温低速摇匀孵育30 min。

1.4.4 偶联灭活病毒的磁珠与核酸适配体孵育

向离心管中加入在磷酸盐缓冲溶液1中配制的50 μL 50 nmol/L的P-A8S核酸适配体溶液,室温下转速6 r/min孵育2 h。

1.4.5 磁性分离与清洗磁珠

用磷酸盐缓冲溶液1清洗磁珠3次,每次50 μL,转速6 r/min清洗5 min。

1.4.6 热洗脱与灭活病毒结合的核酸适配体

取50 μL磷酸盐缓冲溶液1加入离心管中,将离心管置于95 ℃水浴中孵育5 min,趁热磁性分离,取出上清液保存。

1.4.7 利用qPCR对洗脱液中核酸适配体的数量进行检测

qPCR试验的参数设定为:95 ℃ 59 s,1轮循环;95 ℃ 30 s、50 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s,30轮循环。所有qPCR实验体积20 μL,使用商业qPCR试剂盒。

1.5 高质量浓度H1N1灭活病毒的检测与选择性测试

按照1.2中的步骤进行(无1.2.3步骤),且1.2.4中使用了不同的孵育条件:将不同质量浓度的H1N1或者H5N1灭活病毒(1 000、100和10 μg/L),与活化的磁珠在室温下转速6 r/min孵育2 h之后,将离心管放在4 ℃冰箱内继续孵育12 h。

1.6 优化活化磁珠与灭活病毒孵育时间

配制质量浓度为10 ng/L的H1N1溶液,分别以质量浓度为10 ng/L H5N1和MES缓冲溶液为阴性对照组,在室温下转速6 r/min孵育2 h,孵育结束后清洗磁珠3次,随后加入封闭液2,孵育30 min,磁性分离弃去上清液后参照1.4中实验步骤进行实验。

1.7 H1N1灭活病毒捕获效率测试

在优化的封闭条件(含吐温80)下,参照1.2的步骤,进行质量浓度为1、10、100、1 000和10 000 ng/L的H1N1灭活病毒的检测,分别以质量浓度为100 ng/L H5N1和MES缓冲溶液为阴性对照组。

1.8 核酸适配体P-A8S的特异性测试

分别配制质量浓度为100、10和1 ng/L的H1N1、H3N2灭活病毒溶液,以10 ng/L H5N1灭活病毒溶液和MES缓冲溶液为阴性对照组。参照1.4进行实验。

1.9 基于MCP-GNP的H1N1灭活病毒的比色检测

按照上述优化后的实验条件进行10和1 ng/L H1N1灭活病毒溶液的检测,分别以MES缓冲溶液和10 ng/L H5N1灭活病毒溶液为阴性对照组,得到其热洗脱液。将热洗脱液进行15轮PCR反应。将5 μL PCR产物加入50 μL GNP溶液中,再加入15 μL H_2O,涡旋混匀后立即加入20 μL磷酸盐缓冲溶液1。同时开始计时,分别在第1、2、5和10 min时测定紫外-可见吸收光谱。

1.10 咽拭子中H1N1灭活病毒的检测

向50 μL咽拭子培养液中加入5 μL 1%甲醛溶液,对咽拭子进行病毒的灭活处理。将浓盐酸稀释20倍,取1 500 nL稀释后的盐酸加入上述咽拭子培养液中,轻涡旋混匀,调节溶液酸碱度至pH 5,样品与活化的磁珠在室温下孵育2 h,随后用MES缓冲溶液清洗3次,其他实验条件和步骤参照1.4和1.9。

2 结果与讨论

2.1 qPCR定量法验证化学偶联法捕获病毒的可行性

通过qPCR进行核酸适配体定量,验证化学偶联捕获H1N1病毒的可行性,相关结果如图3所示。随着H1N1灭活病毒质量浓度的增加,洗脱液中核酸适配体的数量逐渐增加,表明被磁珠捕获的灭活病毒的数量增加,证实了化学偶联捕获灭活病毒的可行性。当H1N1灭活病毒质量浓度为1 000 μg/L时,洗脱液中核酸适配体的数量(约1.0×10^{10}条)高于缓冲液阴性对照组的值(约5.5×10^{9}条)。当H1N1灭活病毒为10和100 μg/L时,洗脱液中核酸适配体的数

量均显著低于缓冲液阴性对照组的值,说明磁珠上存在较强的非特异性吸附[41]。有趣的是,随着H5N1灭活病毒的增加,洗脱液中核酸适配体的数量基本相同,且均低于缓冲液阴性对照组的值。该结果进一步证实了通过化学交联反应可以高效地捕获灭活病毒,且捕获了H5N1灭活病毒后的磁珠表面上热洗脱的核酸适配体的数量比缓冲液阴性对照组降低了约2/3,这应该是由于核酸适配体对H5N1灭活病毒的亲和力小于对活化磁珠的亲和力。因此,以H5N1灭活病毒为阴性对照组,可以降低检出限。

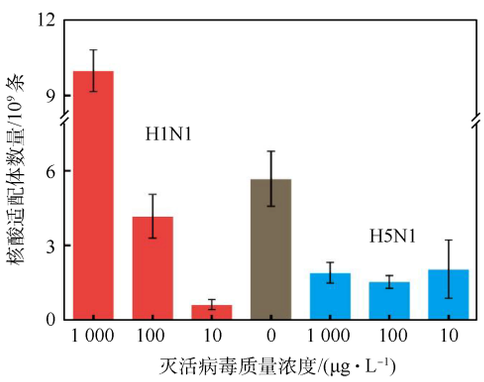


图3　通过qPCR进行核酸适配体定量验证了化学偶联捕获H1N1灭活病毒的可行性

2.2　优化与改进

2.2.1　界面封闭显著降低核酸适配体在磁珠界面上的非特异性吸附

活化磁珠的界面用封闭液1进行封闭后,非特异性吸附的核酸适配体的数量约降低至未封闭时的1/14,由未封闭时的约5.5×10^9条(图3,灰色柱)降低为约4.0×10^8条;封闭液2更为有效,非特异性吸附的核酸适配体的数量也约降低至1/55,应该归功于吐温80的作用。研究报道也表明表面活性剂可以有效降低DNA在界面上的非特异性吸附[42-44],本实验结果与文献报道一致。当使用封闭液2时,在H1N1灭活病毒质量浓度为10 μg/L时,热洗脱的核酸适配体的数量约为1.05×10^{10}条,比缓冲液阴性对照组高一个数量级。在下面的研究中均采用封闭液2对活化磁珠进行界面封闭。

2.2.2　磁珠与病毒孵育时间的优化

在以上测试中,活化磁珠与灭活病毒样品的孵育条件为室温2 h,然后4 ℃冰箱内继续孵育12 h。为了验证4 ℃孵育12 h是否必要,以对10 ng/L的H1N1和H5N1灭活病毒的检测为例,仅进行2 h的室温孵育。结果表明,与4 ℃孵育12 h相比,10 ng/L的H1N1灭活病毒样本和缓冲液阴性对照组的洗脱液中核酸适配体的数量均大幅下降,但前者依然可以检出。因此,在下面的实验中灭活病毒与活化的磁珠的孵育条件定为室温2 h,以大幅缩短检测耗时。此外,在此条件下对10 ng/L的H5N1灭活病毒样本进行测试时,洗脱液中核酸适配体的数量依然比缓冲液阴性对照组低了60%,再次证实了通过化学交联反应可以高效地捕获灭活病毒,且捕获了H5N1灭活病毒后的磁珠表面对核酸适配体的非特异性吸附显著低于缓冲液阴性对照组。

2.3　qPCR定量法证实化学偶联捕获灭活病毒的高效性以及P-A8S核酸适配体的高特异性

在优化了磁珠捕获灭活病毒的实验条件之后,通过测试不同质量浓度的H1N1、H3N2、H5N1灭活病毒,利用qPCR定量进一步证实化学偶联法捕获H1N1灭活病毒的高效性,相关检测结果如图4所示。洗脱液中,核酸适配体的数量与H1N1灭活病毒质量浓度成正相关。测试1 ng/L的H1N1灭活病毒时,洗脱液中核酸适配体的数量与阴性对照组相当,但显著高于H5N1灭活病毒组。说明1 ng/L的H1N1灭活病毒可以通过化学偶联被磁珠捕获。与本课题组之前报道相比[26],此次特异性电化学阻抗传感器的检出限(900 ng/L)大约低了3个数量级。以缓冲液为阴性对照组,能够检出10 ng/L的H1N1灭活病毒。特异性测试结果显示,100 ng/L的H3N2和H5N1灭活病毒测试时的洗脱液中核酸适配体数量均远小于同等质量浓度的H1N1灭活病毒,甚至小于1 ng/L的H1N1。结果证实了P-A8S核酸适配体识别H1N1灭活病毒的高特异性。

2.4　MCP-GNP用于H1N1灭活病毒的高灵敏和高特异性检测

尽管如上所示qPCR法检测H1N1灭活病毒具有很高的灵敏度和特异性,但是qPCR仪器较为昂贵,在基层的普及还比较困难。因此,进一步测试了基于GNP比色的检测方法。

1和10 ng/L的H1N1灭活病毒、10 ng/L的H5N1灭活病毒以及不含病毒的MES缓冲液,按照图1所示流程进行1~6步的操作,分别获得含有不同数量核酸适配体的洗脱液。将洗脱液进行15轮PCR扩增,将PCR产物与GNP混合孵育不同时间后,进行紫外-可见吸收光谱测试,相关检测结果如图5所示。所有样品均随着放置时间延长,GNP的

团聚逐渐严重,颜色由红变紫,GNP等离子共振产生的吸收峰逐渐红移,吸光度降低。在同一时间对比不同样品的颜色和吸光度,H1N1病毒样品的颜色偏紫色且吸光度较低,且H1N1质量浓度越高,颜色越紫、吸光度越低;而缓冲液阴性对照组和H5N1对照组颜色偏红且吸光度较高,H5N1对照组的颜色最红、吸光度最高。该结果与图4基于qPCR的测试结果具有一致性,也与图2所示的GNP比色检测的原理一致。放置时间为2~5 min时,GNP比色法最灵敏,能够检出1 ng/L的H1N1灭活病毒,该检出限略优于qPCR方法。当使用qPCR进行定量检测,以缓冲液为阴性对照组时,1 ng/L的H1N1灭活病毒与空白信号相当(图4(a)),不能检出。

2.5　咽拭子中H1N1灭活病毒的检测

利用上述qPCR和MCP-GNP方法分别测试了临床的3例H1N1灭活病毒阳性的咽拭子样本(图6),以初步测试本论文方法对真实样品的适用性。检测结果如下,咽拭子1、2和3洗脱液中核酸适配体的数量均值分别为2.2×10^{8}、2.4×10^{9}和2.0×10^{9}条,缓冲液阴性对照组的均值为1.5×10^{8}条,10 ng/L H5N1灭活病毒组的均值为3.0×10^{7}条。因此,以10 ng/L的H5N1灭活病毒组或者缓冲液阴性对照组为参照,基于qPCR的检测均能够检出3个咽拭子中的H1N1灭活病毒,进一步证实为咽拭子阳性样本。

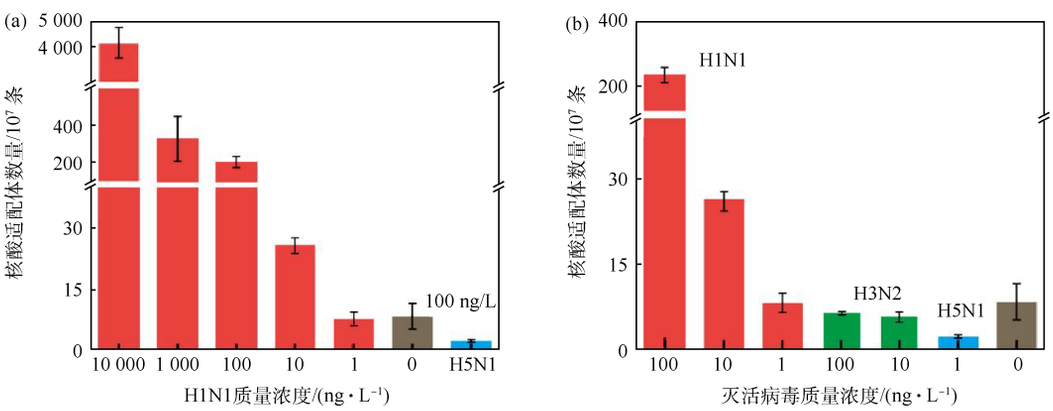


图4　不同质量浓度和种类的灭活病毒检测

(a) H1N1;(b)H1N1、H3N2、H5N1

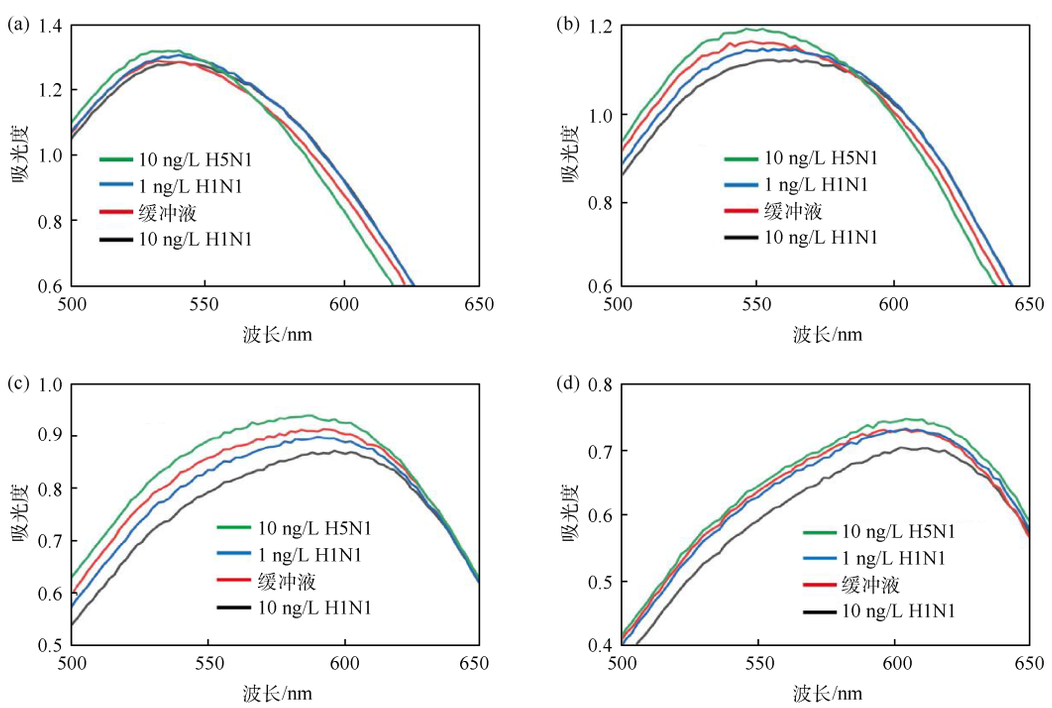


图5　磁交联沉淀-纳米金联用比色法检测H1N1灭活病毒在不同孵育时间时的紫外-可见吸收光谱

(a) 1 min;(b) 2 min;(c) 5 min;(d) 10 min

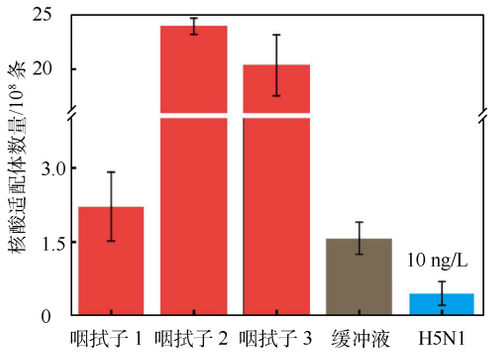


图6　利用qPCR法证实咽拭子为H1N1病毒阳性样本

3例咽拭子中,以病毒含量最低的咽拭子1为例,利用MCP-GNP法进行检测,相关结果如图7所示。在孵育时间为1~10 min时,咽拭子样品1在550~750 nm的吸光度较缓冲液阴性对照组均有下降。随着孵育时间的延长,二者在550~750 nm的吸光度均随之下降,且咽拭子样品1的吸光度的下降更多,与阴性对照组的差异更大。因此,在1~10 min的孵育时间内,H1N1阳性的咽拭子样品均可以检出。该结果还表明,咽拭子样品中的其他杂质蛋白并没有显著干扰对H1N1灭活病毒的检测。这应该是由于咽拭子样品中的杂质蛋白浓度较低,而且病毒的局域蛋白浓度远高于游离的杂质蛋白,因此在MCP捕获的步骤中病毒依然被捕获。

3　结束语

本论文建立了一种简单、快捷、灵敏检测H1N1灭活病毒的MCP-GNP新方法,其有4个优势:(1)MCP-GNP捕获灭活病毒的方法高效、简单、便宜、便于自动化。现有捕获完整病毒的方法主要是利用抗体或者适配体修饰的磁珠,需要对磁珠进行抗体或者适配体的修饰,不但成本高,而且捕获效率受到界面探针密度的影响大。MCP-GNP利用活化的羧酸修饰的磁珠与病毒表面蛋白一级胺基之间的高效化学偶联反应进行病毒捕获,步骤更少、批次间稳定性更佳。特别是,上述化学偶联反应的反应产率极高,即nmol/L物质的量浓度的蛋白质在室温下,仅需几~30 min就能以>90%的偶联率结合到磁珠上[34]。此外,病毒表面高的蛋白浓度使得在极低病毒含量的情况下,也能够高效地将病毒偶联到磁珠表面,这一点在本研究中得到了证实。(2)MCP-GNP利用能够特异性识别A型H1N1灭活病毒的DNA核酸适配体为识别探针,通过检测核酸适配体的量来实现对病毒含量的间接检测,避免了提取病毒基因的步骤,也避免了病毒基因不稳定所带来的各种问题。(3)MCP-GNP针对灭活病毒进行检测,临床样本先灭活,不直接检测活病毒,具有高生物安全性。(4)检测热洗脱下来的核酸适配体的

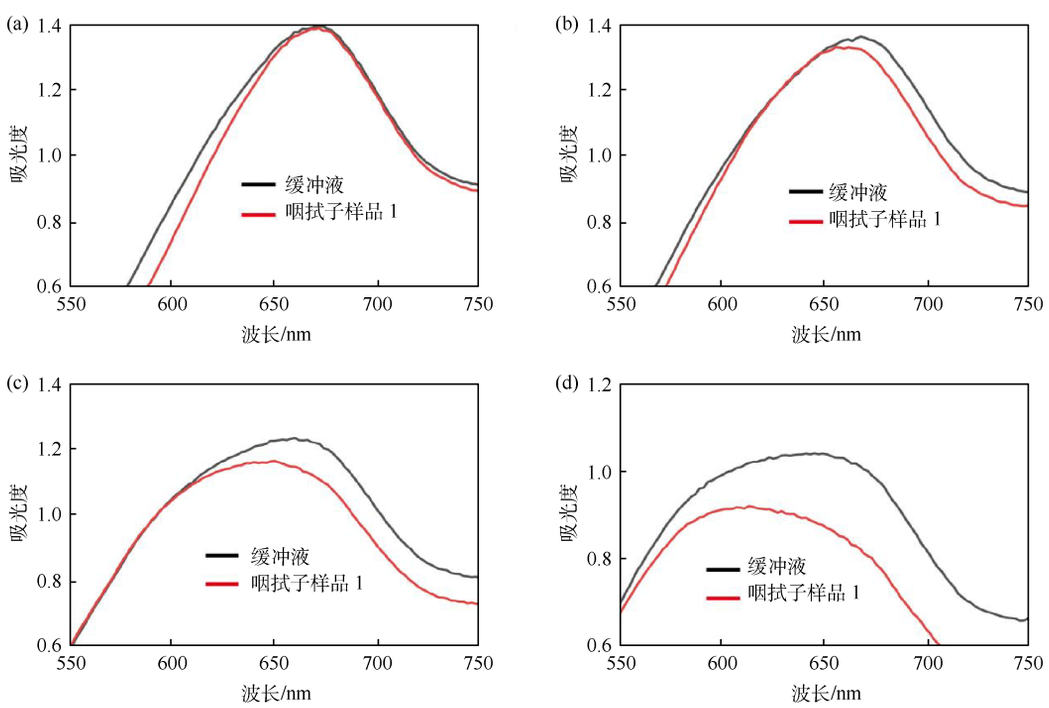


图7　利用GNP比色法检测咽拭子中H1N1灭活病毒在不同孵育时间时的紫外-可见吸收光谱
(a) 1 min;(b) 2 min;(c) 5 min;(d) 10 min

方法众多,可以与各种检测平台/技术联用。本论文展示了利用qPCR和GNP比色法实现定量检测的2个例子,热洗脱下来的核酸适配体还可以利用其他技术进行检测,比如电化学传感器、光纤传感器等。

需要说明的是,本论文仅测试了3例H1N1病毒阳性咽拭子,还需要开展更多的测试来充分验证方法对实际样品的适用性。由于咽拭子样本的复杂性,MCP-GNP比色法更适用于对咽拭子中H1N1灭活病毒的定性筛查,其定量测试结合qPCR法更为准确。本研究的方法理论上也可以推广到对其他病毒的检测,比如新型冠状病毒等。

志谢 衷心感谢军事科学院军事医学研究院邵宁生研究员提供灭活病毒样本的标准品、姜永强课题组提供H1N1阳性咽拭子样本。

参 考 文 献

[1] VEMULA S V, ZHAO J Q, LIU J K, et al. Current approaches for diagnosis of influenza virus infections in humans[J]. Viruses, 2016, 8(4): 96.

[2] HARSH, TRIPATHI P. Medical viruses: diagnostic techniques[J]. Virology Journal, 2023, 20(1): 143.

[3] ELLINGTON A D, SZOSTAK J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. Nature, 1990, 346(6287): 818-822.

[4] TUERK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. Science, 1990, 249(4968): 505-510.

[5] BOCK L C, GRIFFIN L C, LATHAM J A, et al. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin[J]. Nature, 1992, 355(6360): 564-566.

[6] SHANGGUAN D, LI Y, TANG Z W, et al. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(32): 11838-11843.

[7] HAN Y, DIAO D L, LU Z W, et al. Selection of group-specific phthalic acid esters binding DNA aptamers via rationally designed target immobilization and applications for ultrasensitive and highly selective detection of phthalic acid esters[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(10): 5270-5277.

[8] DUNN M R, JIMENEZ R M, CHAPUT J C. Analysis of aptamer discovery and technology[J]. Nature Reviews Chemistry, 2017, 1(10): 76.

[9] SHARMA T K, BRUNO J G, DHIMAN A. ABCs of DNA aptamer and related assay development[J]. Biotechnology Advances, 2017, 35(2): 275-301.

[10] NGUYEN V T, KWON Y S, GU M B. Aptamer-based environmental biosensors for small molecule contaminants[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2017, 45: 15-23.

[11] SHEN J W, LI Y B, GU H S, et al. Recent development of sandwich assay based on the nanobiotechnologies for proteins, nucleic acids, small molecules, and ions[J]. Chemical Reviews, 2014, 114(15): 7631-7677.

[12] XING H, WONG N Y, XIANG Y, et al. DNA aptamer functionalized nanomaterials for intracellular analysis, cancer cell imaging and drug delivery[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2012, 16(3/4): 429-435.

[13] ZHU L, LING J J, ZHU Z, et al. Selection and applications of functional nucleic acids for infectious disease detection and prevention[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2021, 413(18): 4563-4579.

[14] CHAKRABORTY B, DAS S, GUPTA A, et al. Aptamers for viral detection and inhibition[J]. ACS Infectious Diseases, 2022, 8(4): 667-692.

[15] SÁNCHEZ-BÁSCONES E, PARRA F, LOBO-CASTAÑÓN M J. Aptamers against viruses: selection strategies and bioanalytical applications[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2021, 143: 116349.

[16] CHEN H L, HSIAO W H, LEE H C, et al. Selection and characterization of DNA aptamers targeting all four serotypes of dengue viruses[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0131240.

[17] DIBA F S, KIM S, LEE H J. Amperometric bioaffinity sensing platform for avian influenza virus proteins with aptamer modified gold nanoparticles on carbon chips[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2015, 72: 355-361.

[18] CHEN C H, ZOU Z, CHEN L, et al. Functionalized magnetic microparticle-based colorimetric platform for influenza A virus detection[J]. Nanotechnology, 2016, 27(43): 435102.

[19] KULABHUSAN P K, PISHVA P, CAPKIN E, et al. Aptamer-based emerging tools for viral biomarker detection: a focus on SARS-CoV-2[J]. Current Medicinal Chemistry, 2023, 30(8): 910-934.

[20] LOU B B, LIU Y F, SHI M L, et al. Aptamer-based biosensors for virus protein detection[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2022, 157: 116738.

[21] PATRA I, KADHIM M M, SALEH M M, et al. Aptasensor based on microfluidic for foodborne

pathogenic bacteria and virus detection: a review [J]. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2024, 54(4): 872-881.

[22] KIM S M, KIM J, NOH S, et al. Recent development of aptasensor for influenza virus detection [J]. Biochip Journal, 2020, 14(4): 327-339.

[23] BHARDWAJ J, CHAUDHARY N, KIM H, et al. Subtyping of influenza A H1N1 virus using a label-free electrochemical biosensor based on the DNA aptamer targeting the stem region of HA protein [J]. Analytica Chimica Acta, 2019, 1064: 94-103.

[24] LABIB M, ZAMAY A S, MUHAREMAGIC D, et al. Electrochemical sensing of aptamer-facilitated virus immunoshielding [J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(3): 1677-1686.

[25] LABIB M, ZAMAY A S, MUHAREMAGIC D, et al. Aptamer-based viability impedimetric sensor for viruses [J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(4): 1813-1816.

[26] BAI C J, LU Z W, JIANG H, et al. Aptamer selection and application in multivalent binding-based electrical impedance detection of inactivated H1N1 virus [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2018, 110: 162-167.

[27] SVITKOVÁ V, KONDERÍKOVÁ K, NEMCEKOVÁ K. Photoelectrochemical aptasensors for detection of viruses [J]. Monatshefte für Chemie, 2022, 153(11): 963-970.

[28] LI F Q, YU Z G, HAN X D, et al. Electrochemical aptamer-based sensors for food and water analysis: a review[J]. Analytica Chimica Acta, 2019, 1051: 1-23.

[29] ZHAO T, LIU R, DING X F, et al. Nanoprobe-enhanced, split aptamer-based electrochemical sandwich assay for ultrasensitive detection of small molecules[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(15): 7712-7719.

[30] WANG L, WAN Y, XU Q, et al. Long-term functional stability of functional nucleic acid-gold nanoparticle conjugates with different secondary structures [J]. Langmuir, 2019, 35(36): 11791-11798.

[31] LI Y Z, HUANG J Y, MCIVER R T, et al. Characterization of thiol self-assembled films by laser desorption fourier-transform mass-spectrometry [J]. Journal of the American Chemical Society, 1992, 114(7): 2428-2432.

[32] PESIKA N S, STEBE K J, SEARSON P C. Kinetics of desorption of alkanethiolates on gold [J]. Langmuir, 2006, 22(8): 3474-3476.

[33] BHATT N, HUANG P J, DAVE N, et al. Dissociation and degradation of thiol-modified DNA on gold nanoparticles in aqueous and organic solvents [J]. Langmuir, 2011, 27(10): 6132-6137.

[34] QIAO N, LI J, WU X, et al. Speeding up in vitro discovery of structure-switching aptamers via magnetic cross-linking precipitation [J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(21): 13383-13389.

[35] LI J Y, REN X J, ZHAO J X, et al. PD-L1 aptamer isolation via modular-SELEX and its applications in cancer cell detection and tumor tissue section imaging [J]. Analyst, 2021, 146(9): 2910-2918.

[36] LI H X, ROTHBERG L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(39): 14036-14039.

[37] LI H, ROTHBERG L J. Label-free colorimetric detection of specific sequences in genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction [J]. Journal of the American Chemical Society, 2004, 126(35): 10958-10961.

[38] ZHAO W T, LEE T M H, LEUNG S S Y, et al. Tunable stabilization of gold nanoparticles in aqueous solutions by mononucleotides[J]. Langmuir, 2007, 23(13): 7143-7147.

[39] ZOU R X, LOU X H, OU H C, et al. Highly specific triple-fragment aptamer for optical detection of cocaine [J]. RSC Advances, 2012, 2(11): 4636-4638.

[40] ELGHANIAN R, STORHOFF J J, MUCIC R C, et al. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles[J]. Science, 1997, 277(5329): 1078-1081.

[41] DIAO D L, QIAO N, WU X, et al. An efficient method to evaluate experimental factor influence on in vitro binding of aptamers[J]. Analytical Biochemistry, 2018, 556: 7-15.

[42] LOU X H, HE L. Surface passivation using oligo (ethylene glycol) in ATRP-assisted DNA detection [J]. Sensors and Actuators B (Chemical), 2008, 129(1): 225-230.

[43] ZHAO J X, LU Z W, WANG S, et al. Nanoscale affinity double layer overcomes the poor antimatrix interference capability of aptamers[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(9): 4317-4325.

[44] TANG Y F, GU C M, WANG C, et al. Evanescent wave aptasensor for continuous and online aminoglycoside antibiotics detection based on target binding facilitated fluorescence quenching[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2018, 102: 646-651.

(责任编辑:王 媛)