

基于 HCR 放大的无标记型荧光传感器的构建及 H5N1 DNA 检测

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2024.03.007

龚亮 单秀芝

朱琳 徐琳

汤力

湖南工业大学

生命科学与化学学院

湖南 株洲 412007

摘要: 对于高致病性 H5N1 禽流感病毒,构建检测该病毒的高灵敏生物传感器,并与智能包装相结合用于实时监测,这对禽流感的防控具有重要意义。基于杂交链式反应(HCR)信号放大策略,以 AgNCs 作为荧光信号基团,构建了一种无标记“turn on”型荧光生物传感器用于检测代表 H5N1 病毒的 H5N1 基因序列。该传感器以 H5N1 DNA 作为触发剂引发 HCR 过程,使 AgNCs 产生强的荧光信号变化。研究表明,当 H5N1 DNA 浓度在 0.2~800.0 nmol/L 内,该传感器具有良好的响应信号,且在 0.2~200.0 nmol/L 之间的荧光强度与 H5N1 DNA 浓度呈线性相关,线性方程为 $y=10.982C+567.435$ ($R^2=0.992\ 73$),检测限为 176 pmol/L。核酸传感体系具有通用性,通过简单调整目标序列,可实现对不同目标物的特异性灵敏检测。该研究有望为高灵敏分析禽流感病毒标志物的通用传感平台设计提供思路。

关键词: 杂交链式反应;银纳米簇;荧光生物传感器;禽流感病毒标志物 H5N1 DNA

中图分类号: TP212.3; O657.3

文献标志码: A

文章编号: 1674-7100(2024)03-0052-09

引文格式: 龚亮,单秀芝,朱琳,等.基于 HCR 放大的无标记型荧光传感器的构建及 H5N1 DNA 检测[J].包装学报,2024,16(3): 52-60.

1 研究背景

随着传感器的发展和包装材料的创新,传感器已应用到包装材料中,实现智能包装系统^[1]。包装上的智能传感器与外部环境或内部成分、代谢产物等相互作用,通过颜色变化或信号实时反馈,可用于识别检测有害物质,监测产品新鲜度、湿度变化等^[2]。例如,

TOXIN ALERT 开发了一种基于抗原抗体特异性反应的可视化生物传感器,通过固定在聚乙烯薄膜上的抗体与目标病原体的反应,使其形状或颜色发生变化,实现对致病菌的识别^[3]。Deng Y. 等^[4]通过金纳米颗粒、壳聚糖和萘酚改性纳米多孔碳构建了一种乙酰胆碱酯酶生物传感器,实现了对有机磷、甲基及硫磷农药^[5]的灵敏检测,可用于果蔬类农产品的相关检测。目前,

收稿日期: 2024-02-12

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(2022JJ50062);湖南省教育厅科学研究基金资助项目(22B0606);湖南工业大学研究生科研创新基金资助项目(CX2202)

作者简介: 龚亮(1987-),女,湖南双峰人,湖南工业大学副教授,博士,主要研究方向为荧光探针与生物传感,
E-mail: gl569940808@126.com

通信作者: 汤力(1988-),男,湖南张家界人,湖南工业大学讲师,博士,主要从事水凝胶传感器的构建研究,
E-mail: tangli_352@163.com

智能包装系统中生物传感器的研发尚处于初步研究阶段。

禽流感病毒是流行性传染病的罪魁祸首之一, 其高致病性、致死性和变异性对家禽业和公共健康构成严重威胁^[6-7]。例如, 高致病性 H5N1 禽流感病毒可在家禽中引起严重疾病, 死亡率几乎为 100%^[8-10]; 同时, 它可以跨过物种障碍直接感染人类。自 2003 年以来, 世界卫生组织报告了 876 例 H5N1 人类感染病例, 其中 458 例死亡^[11]。调查显示, 曾在环境样本、外包装上检测出禽流感核酸阳性。因此, 针对禽流感病毒, 建立快速、准确、灵敏的检测方法, 可有效地防止其大肆传播, 对禽流感的防控具有重要意义。目前, 已经开发了许多鉴定和检测禽流感病毒的方法, 如病毒分离培养、逆转录聚合酶链式反应、酶联免疫吸附测定法以及微流控芯片技术等^[12-16]。这些方法稳定性好, 鉴定结果相对确切, 但通常存在操作繁琐、程序耗时、成本高等问题, 限制了它们在禽流感病毒早期诊断中的广泛应用。荧光传感器凭借简单快速、特异性好以及灵敏度相对较高等特点, 为解决上述问题提供了可行有效的策略。然而, 对于检测分析低丰度的禽流感病毒标志物, 荧光传感器的灵敏度仍需改善。

杂交链式反应 (hybridization chain reaction, HCR) 于 2004 年首次被提出, 其在生物分析中具有设计灵活和信号扩增效率高等特点^[17], 可用于构建设计简单、响应灵敏的荧光传感器, 并已广泛应用于各种低丰度分子的检测分析^[18]。HCR 的反应原理是两个亚稳态 DNA 发夹稳定共存, 只有触发链在体系中存在时核酸反应才被启动。第一个发夹 (H1) 被特定触发链特异性识别杂交以暴露结合区域, 该暴露的结合区域可以与第二个发夹 (H2) 杂交, 从而暴露另一个结合区域并打开另一个 H1, 之后再打开另一个 H2, 以这种方式重复。最后, 通过这种连续的链式反应, 形成了带有缺口的长双链核酸复合体。Peng X. 等^[19]以 miRNA-21 作为 HCR 反应的触发剂构建的无酶无标记型传感器已实现体外与体内对目标物 miRNA-21^[20]的高灵敏特异检测分析。作为一类发射颜色可调的无标记型荧光探针, 以 DNA 为模板合成的银纳米簇 (silver nanoclusters, AgNCs) 具有小尺寸、荧光明亮等特点。因此, 在生物传感中, DNA-AgNCs 常被用作检测生物分子的荧光信号。Lee S. T. 等^[21]报道 AgNCs 成核序列 (-ACC CAC CCA-) 可实现强黄光发射。DNA-AgNCs 的光学特

性受相邻碱基的影响, 因此, 可基于 DNA 链的改变实现 AgNCs 荧光信号的变化, 用于检测分析目标物^[22-23]。例如, 富胞嘧啶碱基可导致 AgNCs 的尺寸更大且发射波长变得更长^[24]。

本研究以 HCR 为信号放大策略, 利用 DNA 为模板合成的 AgNCs 作为荧光探针, 构建了一种无标记 “turn on” 型荧光生物传感器。以 -ACC CAC CCA- 作为 AgNCs 成核序列, 设计了 Hp1, -ACC CAC CCA- 位于其 3' 端突出部位, -CCCC- 位于其 5' 端突出部位。当 Hp1 以发夹结构稳定存在时, 由于富 C 靠近 AgNCs 成核序列, 改变了该 AgNCs 的黄光发射特性, 使其在 495 nm 激发波长下无荧光发射。图 1 为基于 HCR 放大的 AgNCs 无标记型荧光传感器检测 H5N1 DNA 的原理图。如图 1 所示, 以目标物 H5N1 DNA 作为 HCR 触发链, 当 H5N1 不存在时, Hp1 与 Hp2 以发夹形式稳定共存, 因此无黄光 AgNCs 荧光信号; 当 H5N1 存在时, H5N1 DNA 与 Hp1 特异性杂交, 启动 Hp1 与 Hp2 之间的 HCR, 形成一段长的 H5N1-[Hp1-Hp2]_n 双链复合体, 使得 AgNCs 成核序列远离 -CCCC- 碱基, 经 NaBH₄ 还原 Ag⁺ 作用后, 产生黄光 AgNCs, 可检测到明显的荧光信号。根据该荧光信号的变化, 可实现对 H5N1 DNA 的定量检测。

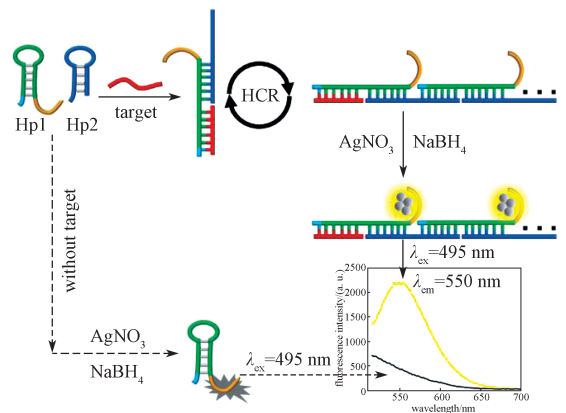


图 1 基于 HCR 放大的 AgNCs 无标记型荧光传感器检测 H5N1 DNA 的原理图

Fig. 1 Scheme illustration of HCR amplified AgNCs label-free fluorescence sensor for H5N1 DNA detection

2 实验部分

2.1 实验试剂与仪器

1) 主要试剂

三羟甲基氨基甲烷、乙酸镁、硼氢化钠, 均为

分析纯，购于国药集团化学试剂有限公司；硝酸银，优级纯，购于国药集团化学试剂有限公司；琼脂糖，分析纯，购于上海生工生物工程股份有限公司；所用 DNA 寡核苷酸链均由上海生工生物工程股份有限公司合成，具体碱基序列如表 1 所示。

表 1 实验所用的 DNA 碱基序列

Table 1 Sequences of oligonucleotides used in this research

DNA 序列名称	碱基序列
Hp1	CCCCACTCTTGAGTTCTCAGTATGTCTCTC CTGAGAACTCAAGATTACCCACCCA
Hp2	CTGAGAACTCAAGAGTGGGTCTTGAGT TCTCAGGAGAGA
H5N1 DNA	CATACTGAGAACTCAAGAGTCT
单碱基错配 (SM)	CATACTGATAACTCAAGAGTCT
双碱基错配 (DM)	CATACTGATAAGTCAAGAGTCT
三碱基错配 (TM)	CATACTGATAAGTGAAGAGTCT
H1N1 DNA	CGACTACACTCTCGATGAAGAA
H7N9 DNA	AAGAGAGAACAAGCAGG AATT
随机序列 R	GTAGGCTTAGTAGATTAA GAGT

2) 主要仪器

离心机，C1H2050R 型，湖南湘立科学仪器有限公司；电子分子天平，ME-T 型，梅特勒-托利多国际贸易（上海）有限公司；荧光光谱仪，F7100 型，日本日立仪器有限公司；透射电子显微镜（transmission electron microscopy, TEM），JEM1230 型，日本电子株式会社；电子恒温水浴锅，HH-SZ 型，郑州长城工贸有限公司。

2.2 实验条件优化

2.2.1 Tris 缓冲液的 Mg^{2+} 浓度和 pH 优化

1) 配制 Tris 缓冲液：分别称取一定量的 Tris 和 $C_4H_6O_4Mg \cdot 4H_2O$ ，溶解于超纯水中，配制含有 20 mmol/L Tris 和不同浓度 $C_4H_6O_4Mg \cdot 4H_2O$ (3, 4, 5, 6, 8, 10 mmol/L) 的 Tris 缓冲液，并根据反应荧光的信背比 (F/F_0) 结果确定最佳 Mg^{2+} 浓度。

2) 用稀释的冰醋酸溶液调节 Tris 缓冲液的 pH 值，得到不同 pH 值 (6.0, 6.4, 7.0, 7.4, 8.0, 8.4, 9.0) 的 Tris 缓冲液，并根据信背比结果确定最佳 pH 值。

2.2.2 HCR 的反应温度和时间优化

HCR 反应温度分别设置为 25, 30, 32, 34, 37, 40, 45 $^{\circ}C$ ；HCR 反应时间分别设置为 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0 h。根据信背比结果分别确定 HCR 的最佳反应温度和时间。

2.2.3 AgNCs 的合成优化

将 Hp1 与 Hp2 DNA 进行淬火处理，即沸水中放置 5 min，再冰浴 30 min。将 H5N1、Hp1、Hp2 等摩尔比混合于 Tris 缓冲液（按最佳 Mg^{2+} 浓度和 pH 值配制），每种 DNA (20 $\mu mol/L$) 各 5 μL ，反应总体积为 100 μL ，进行 HCR 杂交（按最佳反应温度和时间）；向 HCR 反应完成的溶液中，加入一定量的 $AgNO_3$ ，震荡 30 s，4 $^{\circ}C$ 避光孵育 15 min；加入一定量用冰水现配制的 $NaBH_4$ ，4 $^{\circ}C$ 避光孵育一定的时间 (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0 h)；合成过程中，Hp1 与 Ag^+ 、 $NaBH_4$ 摩尔比分别设置为 1:6:6, 1:8:8, 1:10:10, 1:12:12, 1:14:14, 1:16:16, 1:18:18。根据信背比结果，确定合成 AgNCs 的最佳 Hp1: Ag^+ : $NaBH_4$ 的摩尔比、孵育时间。

2.3 性能检测方法

2.3.1 灵敏度测定

将 5 μL Hp1 (20 $\mu mol/L$)、Hp2 (20 $\mu mol/L$) 分别与 5 μL 不同浓度的 H5N1 DNA (0.2, 1.0, 10.0, 50.0, 100.0, 150.0, 200.0, 300.0, 500.0, 800.0 nmol/L) 混合于 Tris 缓冲液 (pH = 7.4, Mg^{2+} = 6 mmol/L)，37 $^{\circ}C$ 水浴杂交 3 h；再加入一定量的 $AgNO_3$ ，震荡 30 s，4 $^{\circ}C$ 避光孵育 15 min；然后，加入一定量用冰水现配制的 $NaBH_4$ ，4 $^{\circ}C$ 避光孵育 3 h。反应体系中，Hp1、 Ag^+ 与 $NaBH_4$ 摩尔比为 1:10:10，反应总体积为 100 μL 。最后，对上述样品进行荧光测试，荧光参数为：495 nm 激发、550 nm 最大发射峰、激发狭缝宽度 10 nm、发射狭缝宽度 10 nm、电压 800 V。

2.3.2 选择性检测

将 5 μL Hp1 (20 $\mu mol/L$)、Hp2 (20 $\mu mol/L$) 分别与 5 μL 的空白、单碱基错配 (SM)、双碱基错配 (DM)、三碱基错配 (TM)、H1N1、H7N9、随机序列 R 混合于 Tris 缓冲液 (pH = 7.4, Mg^{2+} = 6 mmol/L) 中，按照 2.3.1 中的方法，分别配制成总体积为 100 μL 待测样品。将这些样品作为干扰物进行荧光测试，测定荧光生物传感器的选择性。

2.3.3 稀释人血清中样品检测

选择健康人血清为实际样本，按加标回收法考察该荧光生物传感器对目标物 H5N1 DNA 的实际检测性能。首先，对血清样品进行预处理。用质量分数为 15% 的三氯乙酸沉淀血清中的蛋白质，离心后取上清液，再用 Tris 缓冲液稀释 100 倍后作为样品溶液。然后，向样品溶液中加入 N-乙基马来酰亚胺去除疏

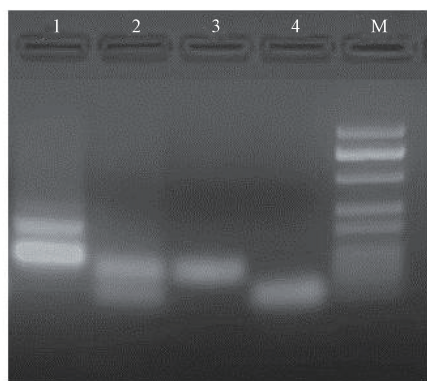
基,再加入特定浓度的H5N1 DNA(2, 20, 180 nmol/L), 进行荧光定量分析。

3 结果与讨论

3.1 实验可行性分析

3.1.1 核酸探针设计原理分析

基于 HCR 放大的 AgNCs 无标记型荧光传感器检测 H5N1 DNA 的设计原理为: 1) 无 Target H5N1 时, Hp1 与 Hp2 各自以发夹结构存在; 2) H5N1 存在时, 触发 HCR 反应, Hp1 与 Hp2 被相继打开, 形成长的链复合体。本研究通过 2% 琼脂糖凝胶电泳法验证核酸探针反应原理, 结果如图 2 所示, 其中序号 1 为反应体系中含有 Hp1、Hp2、Target H5N1 三种 DNA; 序号 2 只含有 Hp1 与 Hp2; 序号 3 只含有 Hp1; 序号 4 只含有 Hp2; M 为 marker。由图 2 可知, 当无 Target H5N1 时 (即 2~4), Hp1 与 Hp2 各自以发夹结构存在; H5N1 存在时 (即 1), Hp1 与 Hp2 形成长的链复合体。电泳结果与设计原理相符。



1	2	3	4	
+	+	+	-	Hp1
+	+	-	+	Hp2
+	-	-	-	T

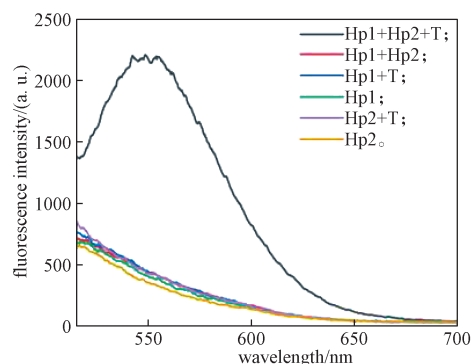
图 2 2% 琼脂糖凝胶电泳结果图

Fig. 2 Result of 2% agarose gel electrophoresis

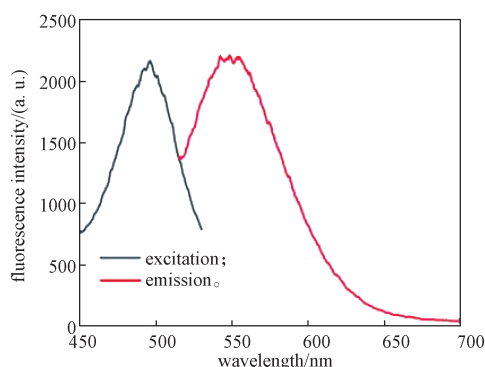
3.1.2 AgNCs 合成分析

不同样品的 AgNCs 荧光强度及 AgNCs 的激发与发射图谱如图 3 所示。由图 3a 可知, 只有 Hp1+Hp2 + H5N1 样品具有荧光, 其他背景样品 Hp1+ Hp2、Hp1 + T、Hp1、Hp2 + T、Hp2 均无荧光响应, 这说明基于 H5N1 DNA 触发的 HCR 放大 AgNCs 无标记型荧光传感器设计可行。由图 3b 的激发与发射图谱可知, 合成 AgNCs 的最佳激发波长为

495 nm, 最佳发射波长为 550 nm。



a) 荧光强度

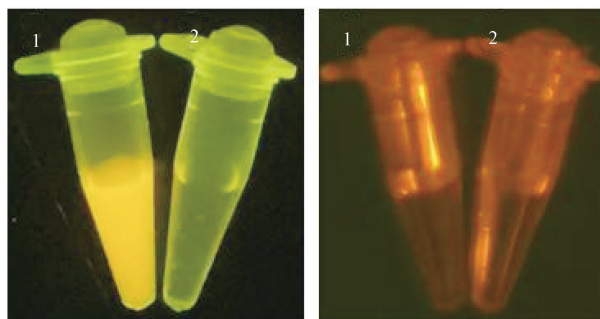


b) 激发与发射图谱

图 3 不同样品的 AgNCs 荧光强度及 AgNCs 的激发与发射图谱

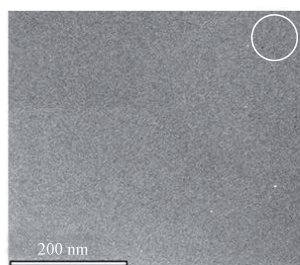
Fig. 3 Fluorescence intensity of AgNCs in different samples and the excitation and emission spectra of AgNCs

AgNCs 样品在紫外灯与白炽灯照射下的效果图及 TEM 图如图 4 所示。由图 4a~b 可知, 在紫外灯照射下, 信号 AgNCs 样品 1 号 (Hp1 + Hp2 + H5N1) 呈现明亮的黄光, 符合文献报道的黄光银簇的荧光特性, 背景样品 2 号 (Hp1 + Hp2) 无荧光; 在白炽灯照射下, 样品 1 号和 2 号均无荧光。由图 4c 中 AgNCs 的 TEM 可以发现, AgNCs 的粒径约为 2~3 nm。



a) 紫外灯照射下

b) 白炽灯照射下



c) TEM 图

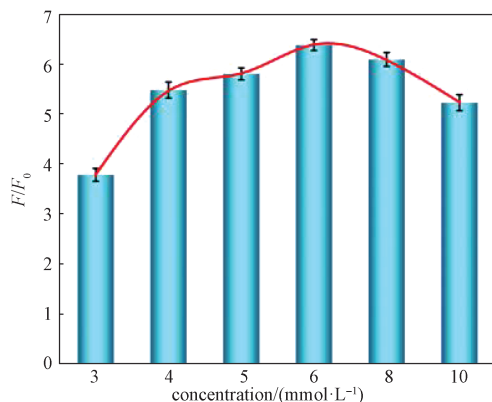
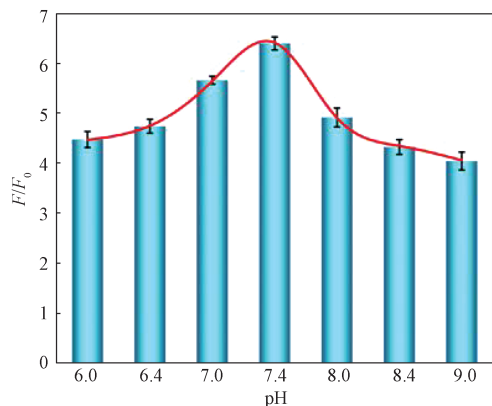
图4 紫外灯与白炽灯照射下的 AgNCs 信号样品与背景样品及 AgNCs 样品的 TEM 图

Fig. 4 AgNCs signal samples and background samples under ultraviolet irradiation and incandescent irradiation, and TEM results of AgNCs

3.2 实验条件优化分析

3.2.1 Tris 缓冲液的 Mg^{2+} 浓度和 pH 优化分析

本研究分别配制不同 Mg^{2+} 浓度 (3, 4, 5, 6, 8, 10 mmol/L) 及 pH (6.0, 6.4, 7.0, 7.4, 8.0, 8.4, 9.0) 的 Tris 缓冲液, 根据反应荧光的信背比结果 (见图 5), 优化实验条件。

a) 不同 Mg^{2+} 浓度

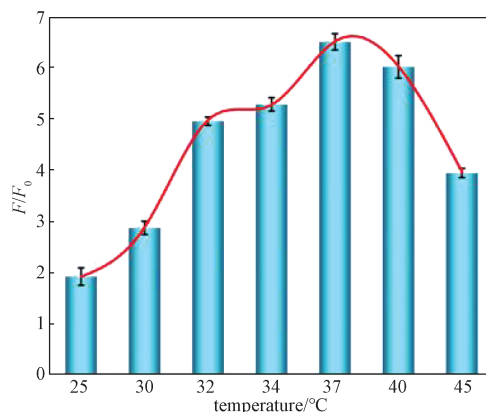
b) 不同 pH

图5 不同 Mg^{2+} 浓度及 pH 下 Tris 缓冲液中的 F/F_0 Fig. 5 The F/F_0 of different Mg^{2+} concentration and different pH of Tris buffer solution

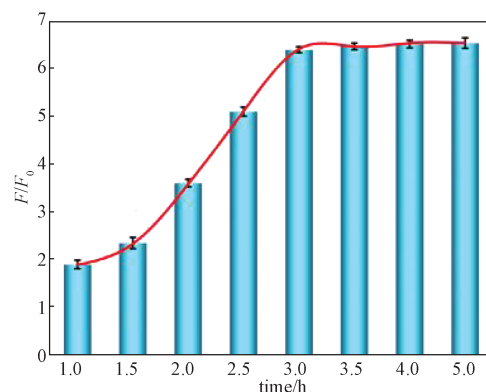
由图 5a 可知, 在 Mg^{2+} 浓度为 6 mmol/L 时, 反应体系的信背比最佳, 故 Tris 缓冲液的最佳 Mg^{2+} 浓度为 6 mmol/L。由图 5b 可知, 在 pH 为 7.4 时, 信背比最佳, 故 Tris 缓冲液的最佳 pH 为 7.4。

3.2.2 HCR 的反应温度和时间优化分析

HCR 杂交效果是影响该实验检测性能的关键因素。本研究通过对 HCR 的反应温度 (25, 30, 32, 34, 37, 40, 45 °C) 和时间 (1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0 h) 进行优化, 根据反应荧光的信背比结果 (见图 6), 确定 HCR 杂交的最佳反应条件。



a) 不同反应温度



b) 不同时间

图6 不同 HCR 反应温度及反应时间下的 F/F_0 Fig. 6 The F/F_0 of different temperature and different reaction time of HCR

如图 6a 可知, HCR 反应温度为 37 °C 时, 体系的信背比最佳。这是因为, 过低的温度使 HCR 杂交效果不好, 从而导致体系的信背比降低; 过高的温度使背景荧光相对增加, 同样导致信背比降低。如图 6b 可知, 体系的信背比随 HCR 反应时间的增加先逐渐增大, 3 h 后信背比的变化进入平台期。这是因为, 过短的反应时间使 HCR 杂交不充分导致产生的荧光

信号低,而在 3 h 后, HCR 杂交充分, 信背比随时间变化不大。考虑到时间效率方面, 选择 3 h 为最佳 HCR 反应时间。

3.2.3 Hp1、 Ag^+ 与 NaBH_4 的摩尔比优化分析

Hp1、 Ag^+ 与 NaBH_4 的摩尔比是影响 AgNCs 合成效果的关键因素。本研究将 Hp1、 Ag^+ 与 NaBH_4 的摩尔比分别设置为 1:6:6, 1:8:8, 1:10:10, 1:12:12, 1:14:14, 1:16:16, 1:18:18, 测定体系的荧光信背比, 优化结果如图 7 所示。由图 7 可知, 当 Hp1、 Ag^+ 与 NaBH_4 的摩尔比为 1:10:10 时, 体系的信背比效果最佳。因此, 选择 Hp1、 Ag^+ 与 NaBH_4 的摩尔比为 1:10:10。

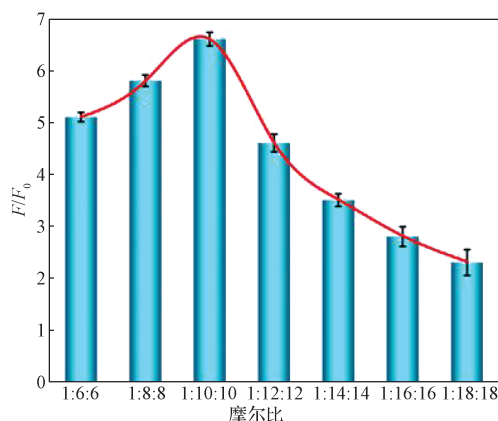


图 7 不同 Hp1、 Ag^+ 与 NaBH_4 摩尔比下的 F/F_0

Fig. 7 The F/F_0 of different molar ratio of Hp1, Ag^+ and NaBH_4

3.2.4 AgNCs 的孵育时间优化分析

AgNCs 的孵育时间也是影响 AgNCs 荧光强度的重要因素。本研究将 AgNCs 的孵育时间分别设置为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0 h, 测定体系的荧光信背比, 优化结果如图 8 所示。

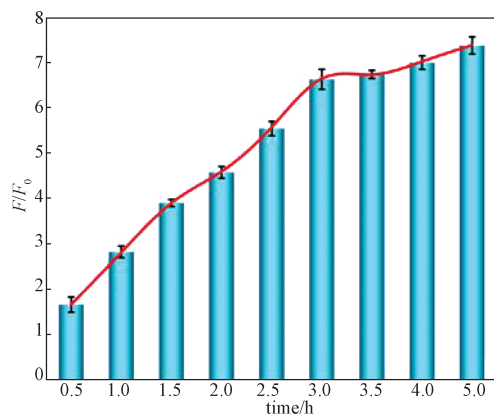


图 8 不同 AgNCs 孵育时间下的 F/F_0

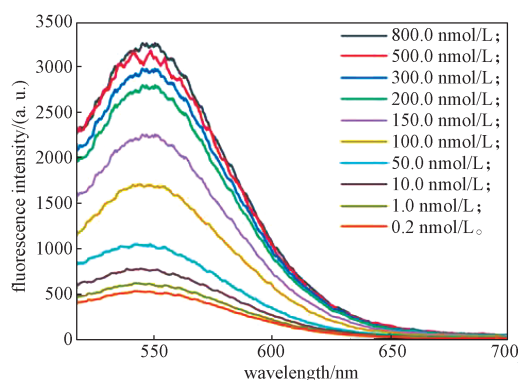
Fig. 8 The F/F_0 of different incubation time of AgNCs

由图 8 可知, 随着 AgNCs 孵育时间的增加, AgNCs 荧光强度在逐渐增强, F/F_0 逐渐增大。在 3 h 以后, F/F_0 增幅明显平缓, 3 h 对应的 F/F_0 已达 6.54, 即信背比效果显著。考虑到反应时间效率, 以 3 h 为最佳 AgNCs 孵育时间。

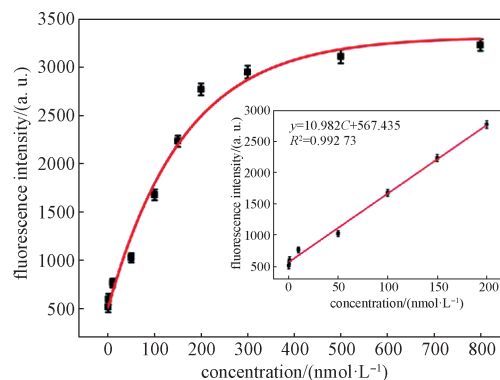
3.3 性能分析

3.3.1 灵敏度分析

为了分析基于 HCR 放大的无标记型荧光传感器对 H5N1 DNA 的检测性能, 通过改变目标物 H5N1 DNA 的浓度 (0.2, 1.0, 10.0, 50.0, 100.0, 150.0, 200.0, 300.0, 500.0, 800.0 nmol/L), 在最佳实验条件下, 测量其相应的荧光强度, 结果如图 9 所示。



a) 不同 H5N1 DNA 浓度下的荧光强度



b) 荧光强度与 H5N1 DNA 浓度关系曲线

图 9 不同 H5N1 DNA 浓度下的荧光强度及荧光强度与 H5N1 DNA 浓度关系曲线

Fig. 9 The fluorescence intensity at different concentrations of H5N1 DNA, and the relationship between fluorescence intensity and H5N1 DNA concentration

由图 9a 中不同 H5N1 DNA 浓度下反应溶液的荧光强度曲线可知, 当目标物 H5N1 DNA 的浓度从 0.2 nmol/L 增加到 800.0 nmol/L 时, 反应体系的荧

光强度随着 H5N1 DNA 浓度的增加而增强。由图 9b 中荧光强度与 H5N1 浓度的关系校准曲线可知, 在 H5N1 DNA 浓度为 0.2~200.0 nmol/L 范围内, 荧光强度与 H5N1 DNA 浓度呈线性关系, 其回归方程为 $y = 10.982C + 567.435$, $R^2 = 0.99273$, 最低检测限为 176 pmol/L, 其中 y 代表反应溶液的荧光强度。该结果表明, 基于 HCR 信号放大的无标记型荧光传感器可以实现对 H5N1 DNA 的高灵敏检测。

3.3.2 选择性分析

选择性是评价荧光生物传感器分析性能的重要指标。为了考察基于 HCR 放大的无标记型荧光传感器对于目标物 H5N1 DNA 的选择性, 选用 SM、DM、TM、H1N1、H7N9、随机序列 R 作为干扰物, 进行荧光检测对比, 结果如图 10 所示。由图可知, 该传感器对目标物 H5N1 具有良好的选择性, 其对 H5N1 的 F/F_0 高达 6.87, 显著高于其他干扰物。

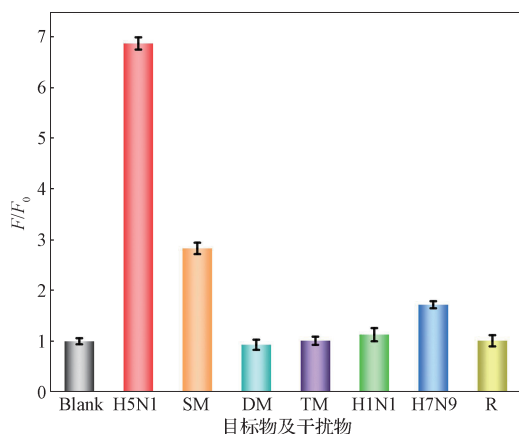


图 10 H5N1 DNA 检测方法对其他干扰物的选择性结果

Fig. 10 Selectivity results of the detection method for H5N1 DNA against other interferences

3.3.3 稀释人血清中的样品分析

为了考察基于 HCR 放大的无标记型荧光传感器对血清样品的潜在应用性, 在 100 倍稀释处理后的健康人血清中分别添加了 2, 20, 180 nmol/L 的 H5N1 DNA, 并对添加的 H5N1 进行了回收率测试, 结果如表 2 所示。

表 2 稀释人血清中的样品分析

Table 2 Analysis of samples in diluted human serum

样品	加入量 / (nmol·L ⁻¹)	检测量 / (nmol·L ⁻¹)	回收率 /%	RSD/% [n = 3]
1	2	1.87	93.33	2.41
2	20	20.20	101.02	3.63
3	180	186.40	103.56	4.67

由表 2 可知, 回收率在 93.33%~103.56%, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 在 2.41%~4.67% 范围内, 这表明该荧光生物传感器对血清中的 H5N1 DNA 检测具有潜在应用价值。

4 结论

本研究构建了基于 HCR 放大的 AgNCs 无标记型荧光传感器, 利用核酸分子之间的特异性杂交, 实现了对代表禽流感病毒 H5N1 的 DNA 序列 (H5N1 DNA) 的高灵敏、高选择性检测。研究结果表明, 荧光强度随着目标物 H5N1 DNA 浓度增加而逐渐增强, 在 0.2~200 nmol/L 之间呈线性响应, 其回归方程为 $y = 10.982C + 567.435$, $R^2 = 0.99273$, 最低检测限为 176 pmol/L。该传感器对目标物 H5N1 DNA 具有良好的选择性 (F/F_0 值为 6.87)。该传感器可用于人血清样品中 H5N1 DNA 的检测, 加标回收率在 93.33%~103.56% 范围内, 且 RSD 在 2.41%~4.67% 之间。相比于酶介导的信号放大, 基于 HCR 放大的传感方法操作相对简单、更加稳定。相比于标记型荧光探针, DNA-AgNCs 探针制备简便且成本低廉。该核酸传感体系具有通用性, 可根据不同目标物来改变核酸探针序列, 实现对其他疾病相关分子的放大检测。基于 HCR 放大的无标记型荧光传感器在智能包装方面有潜在应用前景, 为用于监测病毒的智能包装设计提供思路。

参考文献:

- [1] 廖恺芯, 夏宇轩, 王 军. 果蔬可视化新鲜度检测智能包装研究进展 [J]. 湖南包装, 2021, 36(2): 35~37, 44.
LIAO Kaixin, XIA Yuxuan, WANG Jun. Research Progress of Intelligent Packaging for Visual Freshness Detection of Fruits and Vegetables [J]. Hunan Packaging, 2021, 36(2): 35~37, 44.
- [2] 樊巍巍, 滕玉红, 李欣悦, 等. 传感器在食品质量实时监测和智能包装中的应用 [J]. 数字印刷, 2020(4): 12~22.
FAN Weiwei, TENG Yuhong, LI Xinyue, et al. Sensors for Food-Quality Real-Time Monitoring and Intelligent Packaging [J]. Digital Printing, 2020(4): 12~22.
- [3] BIJI K B, RAVISHANKAR C N, MOHAN C O, et

- al. Smart Packaging Systems for Food Applications: A Review[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(10): 6125–6135.
- [4] DENG Y, LIU K K, LIU Y, et al. An Novel Acetylcholinesterase Biosensor Based on Nano-Porous Pseudo Carbon Paste Electrode Modified with Gold Nanoparticles for Detection of Methyl Parathion[J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2016, 16(9): 9460–9467.
- [5] 冯金霞, 田亚玲, 邓培红, 等. 非酶纳米电化学传感器用于有机磷农药残留物检测综述 [J]. *包装学报*, 2021, 13(6): 81–94.
FENG Jinxia, TIAN Yaling, DENG Peihong, et al. Review of Non-Enzymatic Nano Electrochemical Sensor for Detection of Organophosphorus Pesticide Residues[J]. *Packaging Journal*, 2021, 13(6): 81–94.
- [6] WONG S S Y, YUEN K Y. Avian Influenza Virus Infections in Humans[J]. *Chest*, 2006, 129(1): 156–168.
- [7] LUPIANI B, REDDY S M. The History of Avian Influenza[J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2009, 32(4): 311–323.
- [8] SHORTRIDGE K F, ZHOU N N, GUAN Y, et al. Characterization of Avian H5N1 Influenza Viruses from Poultry in Hong Kong[J]. *Virology*, 1998, 252(2): 331–342.
- [9] WATANABE Y, IBRAHIM M S, SUZUKI Y, et al. The Changing Nature of Avian Influenza a Virus (H5N1) [J]. *Trends in Microbiology*, 2012, 20(1): 11–20.
- [10] LAI S J, QIN Y, COWLING B J, et al. Global Epidemiology of Avian Influenza a H5N1 Virus Infection in Humans, 1997–2015: A Systematic Review of Individual Case Data[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2016, 16(7): e108–e118.
- [11] World Health Organization. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO[R]. Geneva: WHO, 2023: 1.
- [12] YOON J, YUN S G, NAM J, et al. The Use of Saliva Specimens for Detection of Influenza A and B Viruses by Rapid Influenza Diagnostic Tests[J]. *Journal of Virological Methods*, 2017, 243: 15–19.
- [13] CHAN C Y, SHI J Y, FAN Y D, et al. A Microfluidic Flow-Through Chip Integrated with Reduced Graphene Oxide Transistor for Influenza Virus Gene Detection[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 251: 927–933.
- [14] HORM S V, TARANTOLA A, RITH S, et al. Intense Circulation of A/H5N1 and Other Avian Influenza Viruses in Cambodian Live-Bird Markets with Serological Evidence of Sub-Clinical Human Infections[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2016, 5(7): e70.
- [15] LIN J H, WANG R H, JIAO P R, et al. An Impedance Immunosensor Based on Low-Cost Microelectrodes and Specific Monoclonal Antibodies for Rapid Detection of Avian Influenza Virus H5N1 in Chicken Swabs[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 67: 546–552.
- [16] KIM Y T, JUNG J H, CHOI Y K, et al. A Packaged Paper Fluidic-Based Microdevice for Detecting Gene Expression of Influenza A Virus[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, 61: 485–490.
- [17] DIRKS R M, PIERCE N A. Triggered Amplification by Hybridization Chain Reaction[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(43): 15275–15278.
- [18] WU J T, LV J R, ZHENG X Q, et al. Hybridization Chain Reaction and Its Applications in Biosensing[J]. *Talanta*, 2021, 234: 122637.
- [19] PENG X, YANG J, LIANG W B, et al. Double Loop-Stem Hairpins Mediated Hybridization Chain Reaction A Multifunctional DNA Molecular Tool to Produce the Intact Aptamer for Label-Free Biosensing[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 369. DOI: 10.1016/j.snb.2022.132327.
- [20] 汤力, 文崇程, 龚亮, 等. 构建 G4-DNAzyme 比色生物传感器检测肿瘤标志物 miRNA-21 的研究 [J]. *包装学报*, 2019, 11(3): 37–43.
TANG Li, WEN Chongcheng, GONG Liang, et al. Construction of G4-DNAzyme Colorimetric Biosensor for Detecting Tumor Marker MiRNA-21[J]. *Packaging Journal*, 2019, 11(3): 37–43.
- [21] LEE S T, BEAUMONT D, SU X D, et al. Formulation of DNA Chimera Templates: Effects on Emission Behavior of Silver Nanoclusters and Sensing[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1010: 62–68.
- [22] ZHANG L B, ZHU J B, ZHOU Z X, et al. A New Approach to Light up DNA/Ag Nanocluster-Based Beacons for Bioanalysis[J]. *Chemical Science*, 2013, 4(10): 4004–4010.
- [23] PARK J, LEE J, BAN C, et al. An Approach Toward SNP Detection by Modulating the Fluorescence of DNA-Templated Silver Nanoclusters[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 43: 419–424.

[24] MAO A Q, WEI C Y. Cytosine-Rich ssDNA-Templated
Fluorescent Silver and Copper/Silver Nanoclusters:
Optical Properties and Sensitive Detection for Mercury(II)

[J]. Microchimica Acta, 2019, 186(8): 541.

(责任编辑: 李玉华)

Construction of Label-Free Fluorescence Sensor Based on HCR Amplification for Detection of H5N1 DNA

GONG Liang, SHAN Xiuzhi, ZHU Lin, XU Lin, TANG Li

(College of Life Sciences and Chemistry, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China)

Abstract: For the highly pathogenic H5N1 avian influenza virus, the construction of highly sensitive biosensors to detect the virus, combined with intelligent packaging for real-time detection, is of great significance for the prevention and control of avian influenza. Based on HCR signal amplification strategy and using AgNCs as fluorescence signal group, a labeled “turn on” fluorescent biosensor was constructed to detect H5N1 gene sequence representing H5N1 virus. The sensor used H5N1 DNA as a trigger to trigger the HCR process, which caused AgNCs to produce strong fluorescence signal changes. The research has shown that the sensor had a good response signal when the H5N1 DNA concentration was within 0.2~800.0 nmol/L, and the fluorescence intensity was linearly correlated with the H5N1 DNA concentration between 0.2~200.0 nmol/L. The linear equation was $y = 10.982C + 567.435$ ($R^2 = 0.99273$), and the detection limit was 176 pmol/L. The nucleic acid sensing system is universal, and can realize specific sensitive detection of different targets by simply adjusting the target sequence. This research is expected to provide ideas for the design of a universal sensing platform for highly sensitive analysis of avian influenza virus markers.

Keywords: hybridization chain reaction; silver nanocluster; fluorescent biosensor; avian influenza virus marker H5N1 DNA