

生化与药用试剂

基于 DAPI 介导纳米金聚集的呼吸道合胞病毒检测

许永杰¹, 严艳琴¹, 刘兴梅¹, 安仕刚¹, 黄俊², 张华^{*1}

(1. 贵州省人民医院 检验科, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州大学 材料与冶金学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 纳米金比色法是一种应用前景广阔的可视化即时检测, 然而盐诱导的纳米金聚集仍存在比色信号变化弱的问题, 不利于肉眼判读结果, 有待探究新型纳米金聚集诱导剂。4,6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 是一种带正电荷的细胞核 DNA 染料, 推测其通过电荷吸引作用介导表面带有负电荷的纳米金聚集。比色实验表明, DAPI 可介导纳米金聚集, 促使酒红色纳米金转变为蓝色, 此信号变化优于盐诱导法。根据 DAPI 嵌入 AT 碱基双链 DNA 的特性, 巧妙构建循环链置换聚合反应等温扩增体系; 体系中富含 AT 碱基的扩增产物吸附 DAPI 至双链 DNA, 阻断其介导的纳米颗粒聚集, 从而建立 DAPI 作为新型诱导剂的纳米金比色法。方法操作简单、比色变化显著, 检测限为 3.8 fmol/L, 特异性强, 有望应用于呼吸道合胞病毒的即时检测。

关键词: 纳米金; 等温扩增; 呼吸道合胞病毒; 生物传感; 比色法

中图分类号: R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283 (2025) 02-0016-08

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0414

Detection of Respiratory Syncytial Virus Based on DAPI-mediated Aggregation of Gold Nanoparticles XU Yong-jie¹, YAN Yan-qin¹, LIU Xing-mei¹, AN Shi-gang¹, HUANG Jun², ZHANG Hua^{*1} (1. Department of Clinical Laboratory, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China; 2. College of Materials and Metallurgy, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: The gold nanoparticles-based colorimetric sensing system is a visual on site detection with broad application prospects. However, the salt-induced gold nanoparticle detection system still has the shortcoming of weak colorimetric signal change, which is not conducive to the visual interpretation of the results. It is highly needed to explore a new reagent to induce the aggregation of gold nanoparticles with more significant changes in colorimetric signal. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) is a positively charged nuclear DNA dye. It is speculated that DAPI, filled with negative charges on the surface, can mediate the aggregation of gold nanoparticles through positive and negative charge attraction. Colorimetric experiments showed that DAPI can be used as a novel inducer to mediate the aggregation of gold nanoparticles, which promotes the transformation of gold nanoparticles from burgundy into blue. The change of colorimetric signal by DAPI is better than that of salt inducers. According to the intercalation characteristics of DAPI and AT-based double-stranded DNA, an isothermal amplification system of cyclic strand displacement polymerization reaction was precisely constructed. The amplification products rich in AT bases of this system adsorbed DAPI to double-stranded DNA and blocked DAPI-mediated nanoparticle aggregation, thereby establishing a gold nanoparticle colorimetric method using DAPI as a new inducer. This method is simple and has significant chromogenic signal changes. The detection limit is 3.8 fmol/L, and the specificity is strong. It is expected to be applied to the on site detection of respiratory syncytial virus.

Key words: gold nanoparticles; isothermal amplification; respiratory syncytial virus; biosensing; colorimetry

呼吸道合胞病毒 (Respiratory syncytial virus, RSV) 是引起小儿病毒性肺炎最常见的病原体^[1]。儿童普遍易感, 2019 年全球 5 岁以下儿童 RSV 相关急性下呼吸道感染病例高达 3300 万例, 其每年在全球范围内造成巨大的疾病负担^[2-4]。RSV 感染后主要出现咳嗽、喘息、呼吸急促等症状, 重症病例甚至出现呼吸衰竭^[5]。因此, 快速准确的检测方法对 RSV 的早期诊断和防控具有重要意义。传统的检测方法有基于抗原抗体反应的胶体金法、免疫荧光实验和基于核酸靶标的 PCR 检测。免疫学方法检测存在灵敏度不高、假阳性等问

题^[6,7]; 逆转录定量聚合酶链式反应 (Reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR) 虽然应用广泛, 但受限于复杂的逆转录操作和精密的热循环仪^[8]。因此, 探究快速简便的 RSV 分子诊断策

收稿日期: 2024-09-21; 修回日期: 2024-10-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82160026); 贵州省科学技术厅项目 (黔科合基础-ZK[2021]一般 492)。

作者简介: 许永杰 (1983-), 男, 贵州贵阳人, 博士, 主任技师, 主要研究方向为分子诊断。

通讯作者: 张华, E-mail: 780837482@qq.com。

略具有重要临床价值。

金纳米粒子 (Gold nanoparticles, AuNPs) 具有局域表面等离子体共振特性,对紫外-可见光谱波段具有强吸收作用^[9,10]。AuNPs 的距离依赖性颜色变化被广泛用于开发比色传感平台,其操作简单、可视化、所需设备成本低,特别适用于现场检测^[11]。目前,基于 AuNPs 的比色方法已用于检测各种类型的分析物,包括小分子^[12]、核酸^[13]、蛋白质^[14]和金属离子^[15]。纳米金比色方法中,盐介导的纳米金聚集较为常见,由于纳米金表面带有柠檬酸盐负电荷,盐的加入可屏蔽金纳米粒子之间负电荷排斥作用,使纳米金聚集,但该方法灵敏度不高,显色信号变化不易观察^[16]。我们推断,带多个正电荷的化学试剂通过正负电荷吸引作用也能达到使纳米金聚集的效果,尝试找到一种新的诱导纳米金聚集的试剂。

DAPI 是一种细胞核 DNA 染色剂,其分子两端含胺基正电荷,典型用途是细胞染色后观察细胞凋亡^[17,18]。据文献^[19]报道,DAPI 对 dsDNA (Double-stranded DNA) 有高亲和力,可插入 dsDNA 的小沟中,倾向结合富含 A-T 序列的区域,其相互作用机制为 DAPI 分子中吡啶氮与两个连续 AT 碱基对的胸腺嘧啶氧原子形成氢键。DAPI 与 dsDNA 结合的碱基特异性,归因于小沟的宽度、静电因素和空间因素。利用 DAPI 与 dsDNA 结合后荧光强度明显增加的特点^[20],DAPI 还用于建立荧光传感平台检测 DNA^[21]。DAPI 与不同核酸链亲和力不同,该性质有利于建立无标记比色传感体系。

核酸等温扩增技术是一种在恒定温度下扩增核酸序列的方法,因其简单快速,不需要热循环仪,而成为病毒核酸检测的研究热点^[22]。其中,等温循环链置换聚合反应 (Isothermal circular strand-displacement polymerization reaction, ICSDPR) 体系设计简单、操作方便,避免了常规等温扩增多对引物或者多种酶的复杂体系^[23,24]。同时,靶标可以是 ssDNA、RNA,无需逆转录过程,可应用于多种分析平台,如电化学法^[25]、等离子体质谱^[26]、化学发光^[27]。

本研究发现 DAPI 可以介导纳米金聚集,促使纳米金溶液由红色变成蓝色,对比盐聚集纳米金形成的灰色,视觉上更敏感,有望成为一种新的纳米金聚集诱导剂。同时 DAPI 可以嵌入 dsDNA,DAPI 诱导的纳米金聚集可以通过 dsDNA

的形成与否来调节,建立一种简单的比色传感平台。综上,本研究基于 DAPI 介导纳米金聚集的传感模式联合循环链置换聚合反应扩增技术,建立一个简单的比色传感新方法,无需逆转录和复杂的设备,实现对呼吸道合胞病毒核酸的可视化检测。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Gel Doc™ XR+ 型凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); DYY-8C 型电泳分析仪 (北京六一公司); Synergy H1 型全功能酶标仪 (美国 Biotek 公司)。

柠檬酸三钠 (C₆H₅Na₃O₇)、氯金酸 (HAuCl₄) (上海生物工程公司); 4,6 二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI)、EDTA、硼酸、Tris、Gel-red (北京索莱宝科技公司); 10 × NE Buffer (pH 7.9、100 mmol/L NaCl、10 mmol/L MgCl₂、50 mmol/L Tris-HCl、100 μg/mL BSA)、dNTPs (美国 New England Biolabs 公司); KlenowDNA 聚合酶 exo⁻ (上海碧云天生物技术公司); 所用试剂均为分析纯。

靶序列选取 GeneBank 基因库中呼吸道合胞病毒 (NC-038235) N 基因序列,通过 Blast 验证其特异性。针对该序列设计发卡探针 (Hairpin, HP) 和引物 Primer。随机设计只含 AT 碱基的互补序列 AT1、AT2,和只含 CG 碱基的互补序列 CG1、CG2。特异性检测所需不同病毒序列,如甲型流感病毒 (Influenza A virus, Flu-A)^[28]、乙型流感病毒 (Influenza B virus, Flu-B)^[28]、人偏肺病毒 (Human metapneumovirus, HMPV)^[29]、2019-新型冠状病毒

表 1 实验中使用的核苷酸序列

Tab.1 Nucleotide sequences used in experiment

Nucleotide	Sequences (5'-3')
RSV Target	TACACCATCCAACGGAGCACAGGAGATAGT
HP	TAATAATAATAATAATAATAATGTCCACCT GTGCTCCGTTGGATGCTGTCAGGTGGGACT
Primer	GTCCACCC
AT-1	ATTATTATTATTATT
AT-2	AATAATAATAATAAT
CG-1	CGGGCGGGCGGGCGGG
CG-2	CCCCGCCCCGCCCCG
Flu-A	TCTAACCGAGGTGCGAAACGTACGTTCTTTTC
Flu-B	GCAATAATTGTACTACTCATGCTAGTAACA
HMPV	CCTCAGGCTTAGGCATAATCGGTATGTATC
SARS-CoV-2	CAAAGACAACGTATACACCAGGTATTTGGT
HRV	AAGTGGACAAGGTGTGAAGAGCCTATTGTC

(SARS-CoV-2)^[30] 和鼻病毒 (Humanrhinovirus, HRV)^[31], 通过查询文献确定。所有序列由上海生物工程公司合成, 序列详见表 1。序列用 DEPC 水溶解备用, 发夹探针 95 °C 水浴 5 min, 缓慢冷却至 4 °C, 以形成发卡结构的 HP。

1.2 实验方法

1.2.1 纳米金的制备及 DAPI 介导纳米金聚集的检测

AuNPs 制备采用柠檬酸还原法^[32]。将 100 mL 0.01% 的 HAuCl₄ 溶液加入玻璃瓶中加热至沸腾。然后在快速搅拌的 HAuCl₄ 溶液中加入 4 mL 1% 的柠檬酸钠溶液。将上述溶液保持沸腾, 搅拌 15~20 min, 最后搅拌冷却至室温。制备的 AuNPs 在 4 °C 的黑暗中保存。纳米金使用酶标仪采集吸光度, 并进行扫描电镜采集图像。一系列浓度 (终浓度为: 0.5、1、1.5、2、2.5、3.5、5 μmol/L) 的 DAPI 添加到 90 μL AuNPs 溶液中混匀, 经酶标仪 400~700 nm 测量溶液的紫外-可见吸收光谱。

1.2.2 DAPI 与不同核酸链亲和力差异检测

首先组装 dsDNA (CG)、dsDNA (AT)。将一系列浓度的 ssDNA (AT1)、ssDNA (CG1)、dsDNA (AT)、dsDNA (CG) 链结合 DAPI, 随后加入纳米金溶液。经酶标仪 400~700 nm 测量溶液的紫外-可见吸收光谱。100 μL 反应体系中, 单链终

浓度为 0、50、100、150、200、300 和 500 nmol/L; 双链终浓度为 0、10、20、40、60、80 和 100 nmol/L。

1.2.3 比色方法的可行性检测

1.2.3.1 循环链置换聚合反应

循环链置换聚合反应扩增体系各组分: 不同浓度 RSV 序列、HP (150 nmol/L)、Primer (150 nmol/L)、Klenow fragment DNA 聚合酶 (2.5 U)、dNTP (25 μmol/L)、1×NEBuffer 缓冲液。37 °C 孵育 60 min。

1.2.3.2 电泳

配制 2% 琼脂糖凝胶。凝胶放入电泳槽中, 上述体系 10 μL 混合液上样, 在 0.5×TBE 缓冲液 (pH 8.0、90 mmol/L Tris-HCl、90 mmol/L 硼酸和 2 mmol/L EDTA) 中, 以 120 V 电泳下电泳 30 min。凝胶中预加有 Gel-red 核酸染料, 最后使用凝胶成像仪进行成像。

1.2.3.3 吸光度检测

上述体系中加入 DAPI (终浓度为 20 μmol/L), 然后加入 AuNPs 溶液混合, 总体积为 100 μL。每组进行 3 次重复实验。酶标仪测量溶液的 400~700 nm 紫外-可见吸收光谱。吸光度原始数据采用 A_{520/610} 比值处理, 并计算平均值与标准偏差。使用 Graphpad prism9 软件对吸光度信号进行分析并作图以及拟合标准曲线。

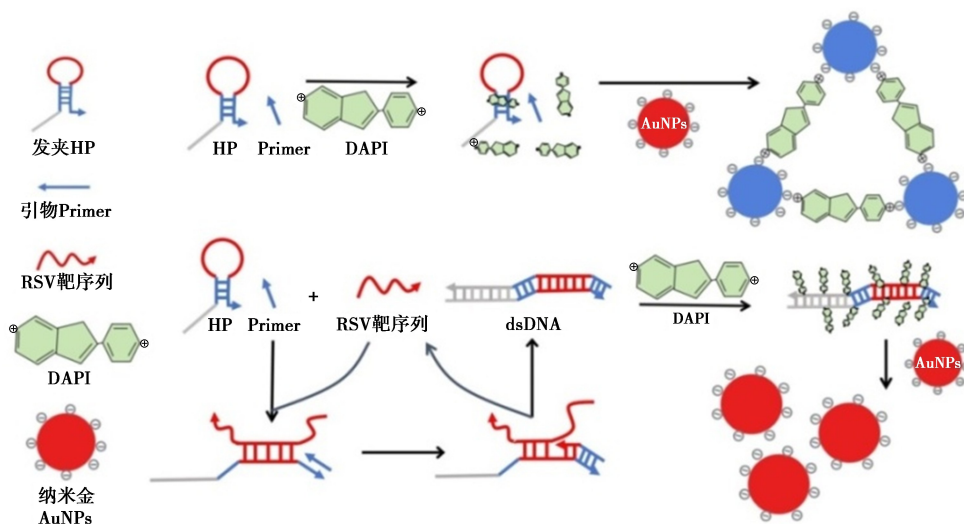


图 1 基于 DAPI 介导纳米金聚集和循环链置换聚合反应的 RSV 比色检测原理

Fig.1 Principle of the colorimetric detection of RSV based on DAPI-mediated aggregation of gold nanoparticles and circular strand-displacement polymerization reaction

2 结果与讨论

2.1 比色传感方法的检测原理

比色检测体系原理如图 1 所示。发夹探针

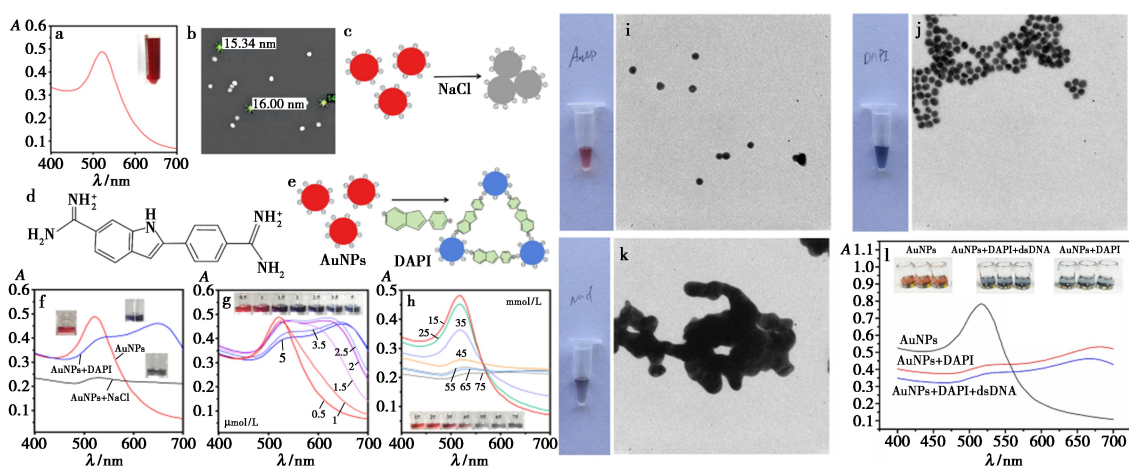
HP 包含了 3 个区域: 包含与 RSV 靶序列互补的序列的红色环部区域, 包含与引物 Primer 互补的立足点序列的蓝色茎部区域, 5' 端设计大量 AT 碱

基的灰色区域。RSV 序列不存在时,发夹探针保持茎环结构,和引物稳定共存于溶液中。由于 DAPI 与 ssDNA 亲和力较低,发夹探针和引物链对 DAPI 的结合较少,溶液中剩余大量游离的 DAPI。DAPI 分子两端带有正电荷,纳米金表面带有负电荷,基于正负电荷吸引作用,DAPI 介导纳米金聚集,溶液呈蓝色。RSV 序列存在时,该序列与发夹环上互补碱基结合打开发夹探针,立足点位置暴露。引物与立足点结合启动聚合反应,产生含 AT 碱基对的 dsDNA 产物,同时置换出 RSV 序列。置换出的 RSV 序列可以打开新的发夹探针,实现循环链置换聚合扩增,产生大量含 AT 碱基对的 dsDNA。DAPI 与 dsDNA 中富含 AT 碱基对的区域有高亲和力,DAPI 嵌入到这些双链 DNA 中,导致 DAPI 对纳米金的聚集作用减弱,溶液呈红色,从而实现 RSV 靶序列的可视化检测。

2.2 纳米金的表征及 DAPI 介导纳米金聚集分析

通过柠檬酸盐还原法制备的纳米金(AuNPs)溶液为酒红色,且出现 520 nm 处特征吸收峰(图 2a)。扫描电镜图像显示,纳米金为尺寸均匀且分散的球形颗粒,平均直径约为 15 nm(图 2b)。红色胶体溶液、特征吸收峰和电镜的结果表明纳米金制备成功。纳米金比色方法中,盐介导的纳米金聚集较为常见,NaCl 导致 AuNPs 不稳定从而聚集(图 2c)。DAPI 两端带胺基正电荷

(图 2d),纳米金颗粒表面带有柠檬酸盐负电荷,推断通过正负电荷吸引作用,DAPI 能够使纳米金聚集(图 2e)。如图 2f 所示,将 DAPI 直接加入纳米金溶液中,结果显示溶液从红色迅速变成蓝色,紫外-可见吸收峰从 520 nm 位移至 650 nm。溶液吸收峰发生的大幅度位移,是因纳米金颗粒间距急剧改变引起,表现为溶液颜色发生变化,此时纳米金颗粒成聚集状态,因此说明 DAPI 可诱导纳米金聚集。对比 NaCl 介导 AuNPs 聚集形成的灰色,溶液颜色变化更显著。随着 NaCl 浓度增加,溶液颜色从红色逐渐转变成灰色,520 nm 吸收峰值逐渐降低,仅单峰变化(图 2h)。随着 DAPI 浓度增加,溶液从红色逐渐变成蓝色,520 nm 吸收峰值逐渐降低,伴随 650 nm 吸收峰值逐渐增加,呈现双峰变化(图 2g);吸光度曲线间位移更明显,且双吸收峰变化可采用吸光度比率值计算结果,可进一步放大信号差异,有助于提高灵敏度。透射电镜显示纳米金呈分散球形颗粒(图 2i);加入 DAPI 后,分散的纳米金颗粒被连接,呈葡萄串状结构(图 2j);加入 NaCl 后分散的纳米金颗粒被聚集呈团块样结构(图 2k)。图 2i、2j 结果说明 DAPI 介导纳米金聚集可控,单个金仍清晰可见,蓝色溶液变化显著且具有更好稳定性。图 2l 显示,DAPI 介导纳米金聚集的溶液添加 dsDNA,蓝色未被逆转为红色,说明该聚集不可逆。



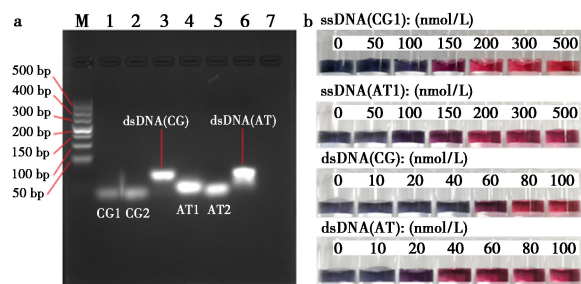
a. 纳米金的溶液、紫外-可见吸收光谱; b. 扫描电镜图像; c. NaCl 介导纳米金聚集的示意图; d. DAPI 化学结构式; e. DAPI 介导纳米金聚集的示意图; f. DAPI 和 NaCl 分别加入纳米金溶液后, 溶液颜色及吸光度曲线变化; g. DAPI 浓度对纳米金聚集的影响; h. NaCl 浓度对纳米金聚集的影响; i. 纳米金的透射电镜图像; j. DAPI 介导纳米金聚集的透射电镜图像; k. NaCl 介导纳米金聚集的透射电镜图像; l. DAPI 介导纳米金聚集后再加入 dsDNA 溶液颜色及吸光度曲线变化

图 2 纳米金的表征和 DAPI 介导纳米金聚集

Fig.2 Characterization of gold nanoparticles and DAPI-mediated aggregation of gold nanoparticles

2.3 DAPI 与不同核酸链亲和力差异的分析

实验设计了碱基数目相同但碱基组成不同的 ssDNA 序列 CG1、CG2、AT1、AT2,并组装成仅含 C-G 碱基对和仅含 A-T 碱基对的 dsDNA。泳道 1、2 分别为单链 CG1 和 CG2,泳道 3 后移的条带为组装成功的 dsDNA(CG)。泳道 4、5 分别为单链 AT1 和 AT2,泳道 6 后移的条带为组装成功的 dsDNA(AT) (图 3a)。核酸链与 DAPI 结合程度不同,对纳米金的保护作用不同,通过溶液颜色变化来测试 DAPI 与 ssDNA(CG1)、ssDNA(AT1)、dsDNA(AT)、dsDNA(CG) 链结合的差异。结果如图 3b 所示,溶液从蓝色转变为红色,需要 150~200 nmol/L 的 ssDNA(CG1)或 ssDNA(AT1)、60~80 nmol/L 的 dsDNA(CG),仅需要 20~40 nmol/L 的 dsDNA(AT)。可见 DAPI 嵌入 A-T 碱基对 dsDNA 的量明显多于嵌入 AT 碱基 ssDNA 的量,说明 DAPI 对富含 A-T 碱基对的 dsDNA 序列有高亲和力,对 ssDNA 亲和力低。鉴于此特点,本实验设计了 5' 端含大量 AT 碱基单链的发夹探针,通过靶诱导的聚合反应形成含大量 A-T 碱基对的 dsDNA。从 ssDNA 到含 A-T 碱基对的 dsDNA 的结构转变,会显著增加 DAPI 与核酸链的结合,进而减弱 DAPI 对纳米金的聚集,引起溶液颜色的变化。即溶液颜色的改变,取决于含 A-T 碱基对 dsDNA 合成量及其对 DAPI 结合,以用于后续 RSV 检测。



a. dsDNA 组装电泳图,泳道 1. CG1,泳道 2. CG2,泳道 3. CG1+CG2,泳道 4. AT1,泳道 5. AT2,泳道 6. AT1+AT2; b. 不同的核酸链结合 DAPI,引起的纳米金溶液颜色变化

图 3 DAPI 与不同核酸链亲和力的分析
Fig.3 Affinity analysis between DAPI and different nucleic acid chains

2.4 可行性分析

2.4.1 循环链置换聚合扩增体系的可行性

实验对反应产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。如图 4 所示,泳道 1、2 为 RSV 序列条带和 HP 条带,作为实验对照条带。泳道 3 仅出现了 RSV 条

带,Primer 因只含 8 个碱基在电泳图上未显示,说明 RSV 与 Primer 不发生反应。泳道 4 显示为 RSV 靶序列打开 HP 发夹结构,形成 RSV/HP 杂交物条带。泳道 5 仅出现了 HP 条带,Primer 只含 8 个碱基在电泳图上未显示,说明无 RSV 序列情况下,HP 和 Primer 未发生杂交反应,共同稳定存在。在泳道 5 的体系中加入 RSV 序列后,泳道 6 中 HP 条带消失并出现了明显后移的 dsDNA 新条带以及置换出的 RSV 序列条带。该电泳结果说明,RSV 序列存在时,循环链置换聚合反应被激活,促使 HP 和 Primer 识别杂交,并在聚合酶和 dNTPs 共同作用下聚合产生富含 A-T 碱基对的 dsDNA,扩增反应具有可行性。泳道 7 显示,HP 发夹结构被 RSV 序列打开后,Primer 与 HP 茎部区域结合,在没有 DNA 聚合酶时,形成 RSV/HP/Primer 的杂交物条带。

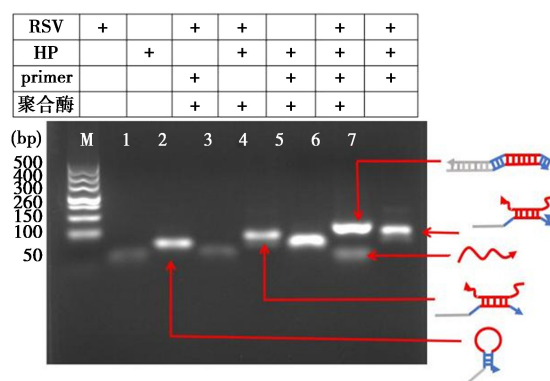
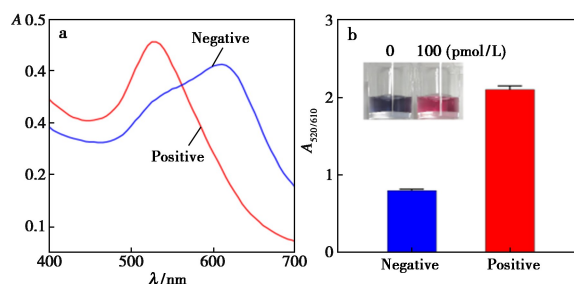


图 4 循环链置换聚合反应的电泳分析

Fig.4 Electrophoretic analysis of circular strand-displacement polymerization reaction

2.4.2 比色方法的可行性

将不含 RSV 的阴性组和含 RSV 的阳性组进行信号对比。如图 5 所示,阴性组中无 RSV 序列,发夹探针和引物未发生聚合反应,溶液中核酸链与 DAPI 结合少,过量的 DAPI 介导纳米金聚



a. 吸光度曲线; b. 吸光度 $A_{520/610}$ 比率值及溶液颜色

图 5 比色传感体系的可行性分析

Fig.5 Feasibility analysis of colorimetric sensing system

集,使溶液变成蓝色,吸收峰在 610 nm 附近。阳性组中加入终浓度 100 pmol/L 的 RSV 序列,发生 ICSDPR 扩增反应,将发夹探针和引物聚合形成富含 A-T 碱基对的 dsDNA。该 dsDNA 能够结合大量 DAPI,剩余少量游离 DAPI 对纳米金的聚集作用减弱,溶液呈现红色,吸收峰在 520 nm 附近,阳性组对应的 $A_{520/610}$ 比率值明显高于阴性组。上述证明了所提出的方法的可行性。

2.5 反应条件的优化

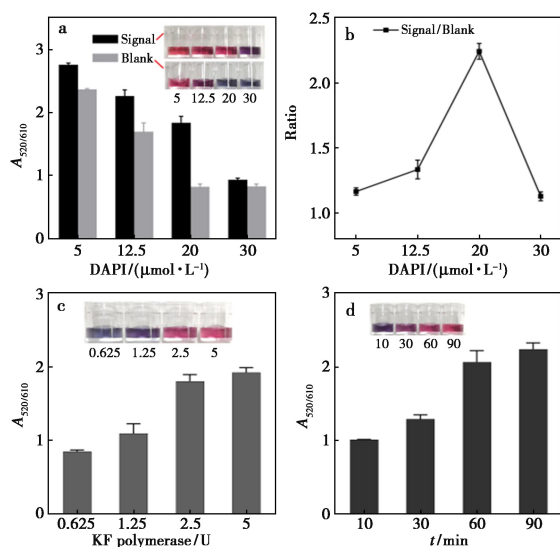
为达到最佳的实验条件,对关键参数进行了优化。DAPI 浓度是影响纳米金聚集的重要因素,实验设置不同 DAPI 浓度 (5、12.5、20、30 $\mu\text{mol/L}$),并对比含不同浓度 DAPI 的背景组和信号组的颜色变化。如图 6a、6b 所示,仅当 DAPI 为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时,能够使不含 RSV 序列的背景组变成蓝色,含 RSV 序列的信号组变为红色,对应的 $A_{520/610}$ 比率值差异最显著,达到其最佳信噪比,从而有效区分 RSV 序列的存在。循环链置换聚合反应的扩增效率受 Klenow DNA 聚合酶浓度及反应时间影响。首先,Klenow DNA 聚合酶浓度梯度设置为 0.625、1.25、2.5、5 U。另外,反应时间分别设置为 10、30、60、90 min。如图 6c 和 6d 所示,随着 DNA 聚合酶浓度及反应时间的增加,溶液颜色逐渐转变为红色。当聚合酶量为 2.5 U 时,反应时间为 60 min 时,溶液开始出现红色, $A_{520/610}$ 值呈显著上升,此时循环链置换聚合反

应的效率较高,合成的 dsDNA 足够保护纳米金免受 DAPI 的聚集。进一步增加 DNA 聚合酶浓度及反应时间, $A_{520/610}$ 值接近平台期。因此,最佳 DNA 聚合酶量为 2.5 U,最佳反应时间为 60 min。这些最佳参数用于后续实验中。

2.6 方法性能评价

2.6.1 灵敏度及线性范围

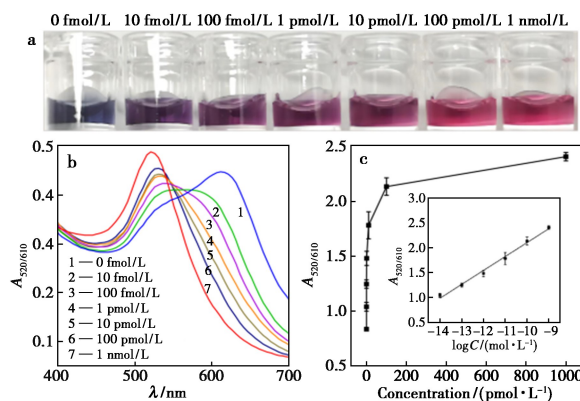
在优化的实验条件下,本实验测量不同浓度 RSV 序列 (10 fmol/L~1 nmol/L) 对应的吸光度信号,以评估检测方法的灵敏度。随着 RSV 浓度的增加,溶液的颜色从蓝色逐渐到红色 (图 7a);610 nm 的吸光度值逐渐降低,520 nm 的吸光度值逐渐上升 (图 7b),对应的吸光度 $A_{520/610}$ 比率值逐渐增加 (图 7c)。RSV 在 10 fmol/L~1 nmol/L 的浓度范围内,吸光度 $A_{520/610}$ 比值 (Y) 和 RSV 浓度的对数 (C) 之间呈线性关系 (图 7c),线性方程式如下: $Y = 0.2808 \log C + 4.913$ ($R^2 = 0.9923$)。根据 3σ 规则,计算最低检测限 (LOD) 为 3.8 fmol/L,低于 NaCl 介导纳米金聚集的比色平台的 11.3 pmol/L^[33];与其他报道的 RSV 检测方法的性能比较,该方法的检测限低于 SERS 的 38 fmol/L^[34] 和 CRISPR 斑点印迹法的 0.70 nmol/L^[35] 等方案,具有灵敏度高的优势。虽然 RT-PCR 检测限更低^[36],但其需要精密控温的设备。因此,研究提供了一种灵敏度高且能够实现简单、快速检测的替代方案。



a. DAPI 浓度; b. 不同 DAPI 浓度的信噪比;
c. Klenow DNA 聚合酶浓度; d. 反应时间

图 6 反应条件优化

Fig.6 Optimization of reaction conditions



a. 溶液颜色变化; b. 吸光度曲线变化; c. 吸光度 $A_{520/610}$ 比率值的变化 (RSV = 10 fmol/L~1 nmol/L)

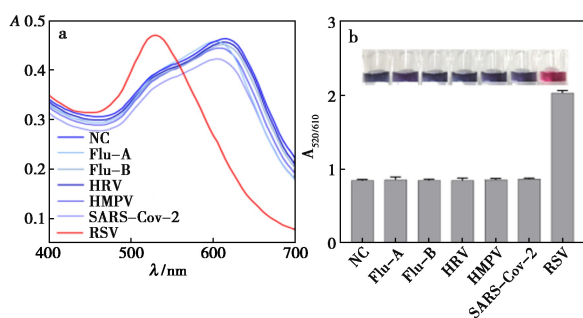
图 7 比色传感体系的灵敏度分析

Fig.7 Sensitivity analysis of the colorimetric sensing system

2.6.2 比色检测体系的特异性

为了评估本方法的特异性,研究将不同的 RNA 病毒序列 (100 pmol/L) 进行对比,包括 Flu-

A、Flu-B、HRV、HMPV、SARS-CoV-2 以及 RSV target 序列。如图 8 所示,Flu-A、Flu-B、HRV、HMPV、SARS-CoV-2 反应溶液的吸光度曲线和颜色与空白对照相比,变化可以忽略不计。这表明它们没有被发夹探针识别,未触发 ICSDPR 扩增,因此没有产生结合 DAPI 的 dsDNA。然而,RSV 序列存在时,其溶液颜色变成红色,吸收峰从 610 nm 位移至 520 nm,对应的吸光度 $A_{520/610}$ 值显著增加。结果表明该方法具有良好的特异性,其可归因于特异性发夹识别探针的设计。



Flu-A、Flu-B、HRV、HMPV、SARS-CoV-2、RSV 等不同病毒序列存在时, a. 吸光度曲线变化; b. 吸光度 $A_{520/610}$ 比率值及溶液颜色变化, NC 为空白对照组

图 8 比色传感体系的特异性分析

Fig.8 Specificity analysis of the colorimetric sensing system

2.6.3 重复性

为评价重复性,浓度相同的 RSV 序列重复检测 6 次。结果显示,6 个体系所测得的吸光度值转换成 $A_{520/610}$ 比率值,计算相对标准偏差 RSD 为 3.43%,说明该体系具有较好重复性。

2.6.4 加标回收实验

为评估生物样品对检测系统的干扰,实验将 50、500 pmol/L 两种不同浓度的 RSV 序列加入 100 倍稀释的血清中进行回收率试验,并测定溶液的吸光度。依据测定的 $A_{520/610}$ 吸光度比值,代入标准曲线方程式计算 RSV 序列浓度值。表 2 显示,50 pmol/L 的 RSV 序列掺入体系中,测得浓度值为 48.02 pmol/L,回收率为 96.04%

表 2 回收率测定

Tab.2 Determination of recovery rate

Calculated value	Number	
	1	2
Doped Concentration/($\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	50	500
Detection Concentration/($\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	48.02	447.23
Recovery Rate/%	96.04	89.45
RSD/%	3.84	5.93

($\text{RSD} = 3.84\%$, $n = 5$); 500 pmol/L 的 RSV 序列掺入体系中,测得浓度值 447.23 pmol/L,回收率为 89.45% ($\text{RSD} = 5.93\%$, $n = 5$)。结果表明该方法具有抗干扰性,有望应用于复杂基质中 RSV 序列的检测。

3 结论

综上,可以发现 DAPI 可作为一种新型纳米金聚集诱导剂,其通过电荷吸引作用介导 AuNPs 聚集。与常规的盐诱导聚集相比,DAPI 诱导的聚集能产生更明显的颜色变化以及更高的灵敏度。基于 DAPI 介导纳米金聚集的新传感模式,联合循环链置换聚合反应进行信号放大,成功建立了一种检测呼吸道合胞病毒核酸的比色传感新方法,检测限达 3.8 fmol/L。该方法无需进行 RNA 逆转录,能够在 37 °C 恒温反应 1 h 完成检测,以颜色及吸光度作为输出信号,所需设备试剂简单,便于即时诊断测试。然而,本方法无逆转录工作流程,使得对病毒 RNA 的保存条件要求较高,有望通过进一步优化以应用于实际临床样本检测。DAPI 诱导纳米金聚集是基于正负电荷吸引作用,适用于其他带负电荷的等离子体纳米颗粒,有望为比色传感开发提供新途径。另外,通过对 HP 靶标识别区针对性的设计,可拓展应用于对其他病毒的检测。

参考文献:

- [1] Shang Z, Tan S, Ma D. *Int. J. Biol. Sci.*, 2021, **17**(14): 4 073-4 091.
- [2] Li Y, Johnson E K, Shi T, Campbell H, Chaves S S, Commaillie-Chapus C, Dighero I, James S L, Mahé C, Ooi Y, Paget J, Van P T, Viboud C, Nair H. *Lancet Respir. Med.*, 2021, **9**(2): 175-185.
- [3] Girma A. *Virus Res.*, 2024, **350**: 199 483.
- [4] Li Y, Wang X, Blau D M, Caballero M T, Feikin D R, Gill C J, Madhi S A, Omer S B, Simões E A F, Campbell H, Pariente A B, Bardach D, Bassat Q, Casalegno J S, Chakhunashvili G, Crawford N, Danilenko D, Do L A H, Echavarria M, Gentile A, Gordon A, Heikkinen T, Huang Q S, Jullien S, Krishnan A, Lopez E L, Markić J, Miral-Iglesias A, Moore H C, Moyes J, Mwananyanda L, Nokes D J, Noordeen F, Obodai E, Palani N, Romero C, Salimi V, Satav A, Seo E, Shchomak Z, Singleton R, Stolyarov K, Stoszek S K, Gottberg A, Wurzel D, Yoshida L M, Yung C F, Zar H J. *Lancet*, 2022, **399**(10 340): 2 047-2 064.

- [5] Huang L S, Chen Z M, Zeng M. *J. Clin. Pediatr.*, 2024, **42**(1):1-14.
黄丽素, 陈志敏, 曾玫. 临床儿科杂志, 2024, **42**(1):1-14.
- [6] Kanwar N, Hassan F, Nguyen A, Selvarangan R. *J. Clin. Virol.*, 2015, **65**:83-86.
- [7] Bhandary R, Boloor R. *J. Clin. Diagn. Res.*, 2016, **10**(6):10-12.
- [8] Abdel-Moneim A S, Shehab G M, Alsulaimani A A, Al-Malky M I R. *Mol. Cell Probes*, 2017, **33**:16-19.
- [9] Kumar S, Wang Z, Zhang W, Liu X, Li M, Li G, Zhang B, Singh R. *Biosensors (Basel)*, 2023, **13**(1):85.
- [10] Oliveira B B, Ferreira D, Fernandes A R, Baptista P V. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2023, **15**(1):e1836.
- [11] Yañez-Aulestia A, Gupta N K, Hernández M, Osorio-Toribio G, Sánchez-González E, Guzmán-Vargas A, Rivera J L, Ibarra I A, Lima E. *Chem. Commun.*, 2022, **58**(78):10886-10895.
- [12] De F M, De F M, Zappi D, Antonacci A, Scognamiglio V. *Biosens. Bioelectron.*, 2022, **205**:114101.
- [13] Wei Y, Fu Y, Li C, Chen S, Xie L, Chen M. *Mikrochim. Acta*, 2024, **191**(11):671.
- [14] Xia Y, Lei X, Ma X, Wang S, Yang Z, Wu Y, Ren X. *Molecules*, 2023, **28**(14):5528.
- [15] Padzil F, Mariatulqabtiah A R, Tan W S, Ho K L, Isa N M, Lau H Y, Abu J, Chuang K P. *Animals (Basel)*, 2021, **12**(1):76.
- [16] Xiao S, Lu J, Sun L, An S. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2022, **271**:120924.
- [17] Mabrouk R, Gotkiewicz M, Rauramaa T, Tanila H. *J. Alzheimers Dis.*, 2022, **88**(3):949-955.
- [18] Munyenymbe K, Timmons C, Weiner A K M, Katz L A, Yan Y. *Eur. J. Protistol.*, 2021, **81**:125840.
- [19] Kapuscinski J. *Biotech. Histochem.*, 1995, **70**(5):220-233.
- [20] Jin X, Sun T, Wu Z, Wang D, Hu F, Xu J, Li X, Qiu J. *Anal. Chim. Acta*, 2022, **1221**:340113.
- [21] Guo Y, Chen Q, Qi Y, Xie Y, Qian H, Yao W, Pei R. *Biosens. Bioelectron.*, 2017, **87**:320-324.
- [22] Boonbanjong P, Treerattrakoon K, Waiwinya W, Pitikultham P, Japrunng D. *Biosensors (Basel)*, 2022, **12**(9):677.
- [23] Lu Y, Luo F, Li Z, Dai G, Chu Z, Zhang J, Zhang F, Wang Q, He P. *Talanta*, 2021, **222**:121686.
- [24] Bellassai N, D'Agata R, Spoto G. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2022, **414**(22):6431-6440.
- [25] Zhang Z, Zhang L, Wang Y, Yao J, Wang T, Weng Z, Yang L, Xie G. *Anal. Chim. Acta*, 2021, **1147**:108-115.
- [26] Xiao G, Chen B, He M, Li X, Hu B. *Talanta*, 2019, **202**:207-213.
- [27] Solovjev A M, Galkin I I, Medved'ko A V, Pletjushkina O Y, Zhao S, Sakharov I Y. *Analyst*, 2022, **147**(19):4293-4300.
- [28] Wu H, Zou M, Fan X, Su F, Xiao F, Zhou M, Sun Y, Zhao F, Wu G. *ACS Omega*, 2022, **7**(17):15074-15081.
- [29] Qian W, Huang J, Wang T, He X, Xu G, Li Y. *Virus Res.*, 2021, **305**:198568.
- [30] Hang X M, Wang H Y, Liu P F, Zhao K R, Wang L. *Biosens. Bioelectron.*, 2022, **216**:114683.
- [31] Qian W, Wang X, Huang J, Liu J, Chen S, Wang T, Zhang D, Li Y. *Virus Res.*, 2023, **323**:199001.
- [32] Turkevich J, Stevenson P C, Hillier J. *Discuss. Soc.*, 1951, **11**:55-75.
- [33] He H, Dai J, Duan Z, Zheng B, Meng Y, Guo Y, Dan X. *Sci. Rep.*, 2016, **6**:30878.
- [34] Zhang D, Huang L, Liu B, Ge Q, Dong J, Zhao X. *Theranostics*, 2019, **9**(17):4849-4859.
- [35] Hu T, Ke X, Li W, Lin Y, Liang A, Ou Y, Chen C. *Adv. Sci.*, 2023, **10**(2):e2204689.
- [36] Wang L, Piedra P A, Avadhanula V, Durigon E L, Machabishvili A, López M R, Thornburg N J, Peret T C T. *J. Virol. Methods*, 2019, **271**:113676.