



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114634968 B

(45) 授权公告日 2024. 05. 31

(21) 申请号 202210186694.7

(22) 申请日 2022.02.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114634968 A

(43) 申请公布日 2022.06.17

(73) 专利权人 复旦大学
地址 200433 上海市杨浦区邯郸路220号

(72) 发明人 魏大程 孔德荣

(74) 专利代理机构 上海科盛知识产权代理有限公司 31225
专利代理师 顾艳哲

(51) Int. Cl.
G12Q 1/68 (2018.01)

(56) 对比文件

CN 101866860 A, 2010.10.20

CN 108796036 A, 2018.11.13

WO 2016161375 A2, 2016.10.06

CN 111850168 A, 2020.10.30

CN 110229799 A, 2019.09.13

US 2018320226 A1, 2018.11.08

CN 112683977 A, 2021.04.20

WO 2021174068 A1, 2021.09.02

审查员 白晓岩

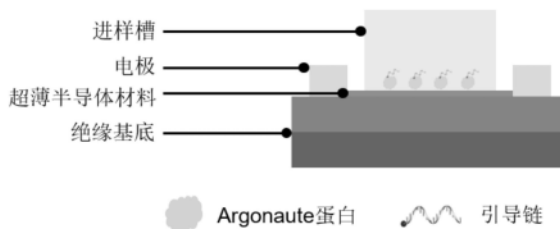
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

基于Argonaute蛋白的场效应晶体管核酸传感器及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明属于传感器技术领域,具体为一种基于Argonaute蛋白的场效应晶体管核酸传感器及其制备方法。本发明的场效应晶体管核酸传感器包括:绝缘衬底;设置于绝缘衬底上的超薄半导体材料层;在超薄半导体材料层两端的源漏电极;所述超薄半导体材料表面上修饰Argonaute蛋白和引导链。在检测时,将该场效应晶体管传感器放置到检测溶液中,连接电学测试设备,向溶液中加入目标核酸,则可以实现痕量核酸分析物的检测。本发明实现了简便、快速和特异性地检测目标核酸的目的,与目前检测核酸所使用的传统核酸靶向光学测试方法相比,无需扩增,检测时间大大缩短,灵敏度高,特异性好,具有良好的应用前景。



1. 一种基于Argonaute蛋白的场效应晶体管核酸传感器,其特征在于,该场效应晶体管核酸传感器包括:绝缘衬底;设置于绝缘衬底上的超薄半导体材料层;在超薄半导体材料层两端的源漏电极;所述超薄半导体材料表面上修饰Argonaute蛋白和引导链;

其中,所述引导链用于与待测的目标核酸通过碱基互补配对结合,使得待测的目标核酸接触到所述的场效应晶体管传感器表面产生电信号;

所述Argonaute蛋白用于辅助引导链提高捕获待测的目标核酸的速度和效率;

其中,所述Argonaute蛋白为嗜热栖热菌的Argonaute蛋白;

所述引导链是5'磷酸化,长度为13-25个碱基的寡核苷酸链;

所述绝缘衬底采用二氧化硅/硅基底;

所述超薄半导体材料为石墨烯。

2. 如权利要求1所述的一种基于Argonaute蛋白的场效应晶体管核酸传感器的制备方法,其特征在于,其制备方法步骤如下:

(1) 在绝缘基底上加工源漏电极;

(2) 将超薄半导体材料转移到绝缘基底上,利用光刻技术将超薄半导体材料刻蚀成特定形状连接在源极和漏极之间,从而制备超薄半导体材料沟道暴露在外的场效应晶体管器件;

(3) 在制备好的器件的超薄半导体材料沟道上修饰连接分子;

(4) 将Argonaute蛋白和引导链修饰固定到超薄半导体材料沟道表面;

(5) 在场效应晶体管上制造液体槽后保存备用;

其中,步骤(3)所述的修饰连接分子的具体方法为,将超薄半导体材料沟道暴露在外的场效应晶体管器件浸泡在1-苊丁酸N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液或1-苊基丁酸溶液中室温下2~4小时或4摄氏度12小时,然后用丙酮冲洗2~3次,再用超纯水水冲洗1~2次;

步骤(4)所述将Argonaute蛋白和引导链修饰固定到超薄半导体材料沟道表面,具体修饰方法选自以下两种:

(1) 分步修饰,先将场效应晶体管器件在室温下浸泡到浓度为1~100微摩尔的Argonaute蛋白中1~2小时,后用反应缓冲液冲洗干净;再将器件在室温下浸泡到浓度为1~100微摩尔的引导链溶液中4~6小时,后用反应缓冲液冲洗干净;

(2) 一步修饰,将1~100微摩尔的Argonaute蛋白和1~100微摩尔的引导链溶液等体积混合,并放置在50~60摄氏度下孵育30~60分钟,后将场效应晶体管器件在室温下浸泡到Argonaute蛋白和引导链的混合溶液中4~6小时,后用反应缓冲液冲洗干净。

3. 根据权利要求2所述的一种基于Argonaute蛋白的场效应晶体管核酸传感器的制备方法,其特征在于,步骤(5)所述场效应晶体管传感器保存方法为,不使用时,在液体槽中加入10~100微升的反应缓冲液于低温下保存,最佳保存温度为4摄氏度。

4. 如权利要求1所述的一种基于Argonaute蛋白的场效应晶体管核酸传感器的非疾病诊断目的的应用,其特征在于,在液体槽里面加入待测目标核酸,使其能够接触半导体沟道,通过电信号变化实现待测目标核酸的检测;测试时的目标核酸为单链DNA或RNA;

待测目标核酸的具体检测方法如下:

(1) 将制备好的超薄半导体材料沟道暴露在外的场效应晶体管器件的源极连接电学测试系统正极,漏极连接电学测试系统负极;

(2) 在超薄半导体材料沟道上架设一个液体槽,在液体槽中加入10~100微升的反应缓冲液;

(3) 测试模式选自以下两种:

①选择电学测试系统中的电流-栅压测试模式,给定源漏电压和栅极电压扫描范围,当阈值电压或者狄拉克点变化值小于仪器电压分辨率时,则开始进行目标核酸溶液测试;

②选择电学测试系统中的电流-时间测试模式,调节测试的输出电压使源漏电流保持恒定,当源漏电流基本稳定时:电流变化百分比小于0.2%,则开始进行目标核酸溶液测试;

(4) 在液体槽中抽取反应缓冲液,再加入相同体积的目标核酸溶液;连接在Argonaute蛋白上的引导链通过碱基互补配对反应捕获到目标核酸,使得待测的目标核酸接触到超薄半导体材料沟道表面从而产生电信号;使用电流-栅压测试模式时,在加入目标核酸溶液2~20分钟后,读取信号,信号读取方式为阈值电压或者狄拉克点的变化值;使用电流-时间测试模式时,加入目标核酸溶液后,随着时间其电流响应达到平衡稳定时,读取其归一化后的电流信号响应值- $\Delta I_{ds}/I_{ds0}$;

(5) 目标核酸检出方式的判断根据检测模式选自以下两种:

①在电流-栅压测试模式下,根据加入非目标核酸后阈值电压或者狄拉克点变化值- ΔV 来判断:当阈值电压或者狄拉克点变化值大于 $3\Delta V$ 时,表示待测核酸为检出;

②在电流-时间测试模式,根据加入非目标核酸后归一化后的电流信号响应值 $\Delta I_{ds}/I_{ds0}$ 判断:当目标核酸的 $\Delta I_{ds}/I_{ds0}$ 大于非目标核酸的 $3\Delta I_{ds}/I_{ds0}$ 时,表示待测核酸为检出。

基于Argonaute蛋白的场效应晶体管核酸传感器及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于传感器技术领域,具体涉及一种基于Argonaute蛋白的场效应晶体管核酸传感器及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 对疾病的快速和准确诊断是有效治疗和预防长期后遗症的核心。核酸作为与疾病相关的生物标志物对于诊断至关重要,事实上,基于核酸的诊断已经成为各种急慢性疾病的金标准,特别是那些由传染病引起的疾病。目前,依赖于定量聚合酶链反应(qPCR)或测序的核酸诊断已被广泛采用,其中PCR是大多数基于核酸的诊断的金标准技术。但PCR技术的试剂成本高、设备昂贵,并且需要训练有素的人员。

[0003] 随着目前诊断技术的发展,等温核酸扩增技术和基于常间回文重复序列丛集(CRISPR)/相关核酸酶(Cas)的方法也被应用于改进传统的核酸靶向光学测试。等温核酸扩增技术规避了对热循环器的需要,但仍然需要进行耗时的核酸扩增并且无法避免非特异性扩增,容易造成假阳性;基于CRISPR/Cas系统的方法,是一种可以对序列特异性靶向的核酸检测工具,但其在目标核酸识别过程中存在前间区序列邻近基序(PAM)识别序列的限制问题,并且大多仍然依赖通过重组酶聚合酶扩增技术和T7转录的初始扩增步骤,从而增加了试剂成本和检测时长。

[0004] 因此,开发一种新的方法来克服目前核酸检测策略的局限性,以提供简单、快速、低成本的基于核酸的诊断工具,以扩大其临床效用。

[0005] 场效应晶体管作为一种很有前途的分析平台,通过监测半导体通道电导率的变化来检测微量生物分析物,具有快速响应、信号转导高效、无标记检测、操作方便、高集成性、便携性等优点,在核酸检测中具有很大的潜力。专利CN111850168A公开了一种检测病毒SARS-CoV-2核酸的场效应晶体管传感器及其制备方法和应用,该场效应晶体管传感器包括绝缘衬底、设于绝缘衬底上的半导体层及电极,半导体层上设有暴露的半导体沟道,半导体沟道内修饰固定DNA探针。然而传统的场效应晶体管核酸传感器使用DNA探针,裸DNA探针和目标核酸结合是一个缓慢的过程,结合速率大约为1000秒每纳摩尔。

发明内容

[0006] 本发明的目的就是为了解决目前核酸检测策略存在的试剂成本高、检测时间长等局限性,在本发明中,使用Argonaute蛋白和场效应晶体管进行结合,提供一种基于Argonaute蛋白的场效应晶体管核酸传感器及其制备方法和应用。本发明使用了Argonaute蛋白,将DNA探针(引导链)预装到Argonaute蛋白上,可以大大加快捕获目标核酸的速度和效率。

[0007] 本发明实现了简便、快速和特异性地检测目标核酸的目的,与目前检测核酸所使用的传统核酸靶向光学测试方法相比,无需扩增,检测时间大大缩短,灵敏度高,特异性好,

具有良好的应用前景。

[0008] 本发明的目的通过以下技术方案实现：

[0009] 一种基于Argonaute蛋白的场效应晶体管核酸传感器，该场效应晶体管核酸传感器包括：绝缘衬底；设置于绝缘衬底上的超薄半导体材料层；在超薄半导体材料层两端的源漏电极；所述超薄半导体材料表面上修饰Argonaute蛋白和引导链。在检测时，将该场效应晶体管传感器放置到检测溶液中，连接电学测试设备，向溶液中加入目标核酸，则可以实现痕量核酸分析物的检测。

[0010] 优选地，所述绝缘衬底采用二氧化硅/硅基底。

[0011] 优选地，所述超薄半导体材料为石墨烯、氧化石墨烯、二硫化钼、二硫化钨或者含硅、锗、有机半导体薄膜，厚度只有单个或几个原子厚（典型厚度小于50纳米）。

[0012] 优选地，所述电极为图案化电极，电极材料选自金、银、铜、镍、钛、铁、铝等金属，电极材料厚度为20~2000纳米。

[0013] 优选地，所述Argonaute蛋白是一类DNA或RNA介导的核酸内切酶，其可以在DNA或RNA引导下高效且准确地识别捕获目标核酸。在本发明中，所述Argonaute蛋白为原核生物Argonaute蛋白，包括格氏嗜盐碱杆菌的Argonaute蛋白（NgAgo）、风产液菌的Argonaute蛋白（AaAgo）、闪烁古生球菌的Argonaute蛋白（AfAgo）、嗜热栖热菌的Argonaute蛋白（TtAgo）、古火球菌的Argonaute蛋白（PfAgo）或詹氏甲烷球菌的Argonaute蛋白（MjAgo）。

[0014] 优选地，所述引导链是5'磷酸化或羟基化，长度为13-25个碱基的寡核苷酸（DNA）链。

[0015] 优选地，所述目标核酸可以为单链DNA或RNA。

[0016] 一种基于Argonaute蛋白的场效应晶体管核酸传感器的制备方法，包括以下步骤：

[0017] (1) 在绝缘基底上加工源漏电极；

[0018] (2) 将超薄半导体材料转移到绝缘基底上，利用光刻技术将超薄半导体材料刻蚀成特定形状连接在源极和漏极之间，从而制备超薄半导体材料沟道暴露在外的场效应晶体管器件；

[0019] (3) 在制备好的器件的超薄半导体材料沟道上修饰连接分子；

[0020] (4) 将Argonaute蛋白和引导链修饰固定到超薄半导体材料沟道表面；

[0021] (5) 在场效应晶体管上制造液体槽后备用保存。使用时，在液体槽里面加入待测目标核酸，使其能够接触半导体沟道，通过电信号变化实现待测目标核酸的高灵敏度检测。

[0022] 优选地，步骤(3)所述的修饰连接分子的具体方法为，将超薄半导体材料沟道暴露在外的场效应晶体管器件浸泡在1-苊丁酸N-羟基琥珀酰亚胺酯溶液或1-苊基丁酸溶液中室温下2~4小时或4摄氏度12小时，然后用丙酮冲洗2~3次，再用超纯水冲洗1~2次。

[0023] 优选地，步骤(4)所述将Argonaute蛋白和引导链修饰固定到超薄半导体材料沟道表面，具体修饰方法有以下两种：

[0024] (1) 分步修饰。先将场效应晶体管器件在室温下浸泡到浓度为1~100微摩尔的Argonaute蛋白中1~2小时，后用反应缓冲液冲洗干净；再将器件在室温下浸泡到浓度为1~100微摩尔的引导链溶液中4~6小时，后用反应缓冲液冲洗干净。

[0025] (2) 一步修饰。将1~100微摩尔的Argonaute蛋白和1~100微摩尔的引导链溶液等体积混合，并放置在50~60摄氏度下孵育30~60分钟。后将场效应晶体管器件在室温下浸

泡到Argonaute蛋白和引导链的混合溶液中4~6小时,后用反应缓冲液冲洗干净。

[0026] 其中,Argonaute蛋白和引导链可以通过分子间氢键作用结合在一起;1×ThermoPol反应缓冲液是由20毫摩尔三羟甲基氨基甲烷盐酸盐,10毫摩尔氯化钾,10毫摩尔硫酸铵,2毫摩尔硫酸镁和0.1%聚乙二醇辛基苯基醚配置而成,其pH值为8.8。

[0027] 优选地,步骤(5)中场效应晶体管传感器保存方法为,不使用时,在液体槽中加入80~100微升的反应缓冲液于4摄氏度下保存。

[0028] 优选地,步骤(5)中场效应晶体管传感器使用时,其具体检测方法如下:

[0029] (1)将制备好的超薄半导体材料沟道暴露在外的场效应晶体管器件的源极连接电学测试系统正极,漏极连接电学测试系统负极;

[0030] (2)在超薄半导体材料沟道上架设一个液体槽,在液体槽中加入10~100微升的反应缓冲液;

[0031] (3)测试模式分为两种:

[0032] ①.选择电学测试系统中的电流-栅压测试模式,给定源漏电压和栅极电压扫描范围,当阈值电压或者狄拉克点变化值小于仪器电压分辨率时,则开始进行目标核酸溶液测试;

[0033] ②.选择电学测试系统中的电流-时间测试模式,调节测试的输出电压使源漏电流保持恒定,当源漏电流基本稳定时(电流变化百分比小于0.2%),则开始进行目标核酸溶液测试;

[0034] (4)在液体槽中抽取一定量的反应缓冲液,再加入相同体积的目标核酸溶液。连接在Argonaute蛋白上的引导链通过碱基互补配对反应捕获到目标核酸,使得待测的目标核酸接触到超薄半导体材料沟道表面从而产生电信号。使用电流-栅压测试模式时,在加入目标核酸溶液2~20分钟后,读取信号,信号读取方式为阈值电压或者狄拉克点的变化值;使用电流-时间测试模式时,加入目标核酸溶液后,随着时间其电流响应达到平衡稳定时,读取其归一化后的电流信号响应值($\Delta I_{ds}/I_{ds0}$)。

[0035] (5)目标核酸检出方式的判断根据检测模式有以下两种:

[0036] ①.在电流-栅压测试模式下,根据加入非目标核酸后阈值电压或者狄拉克点变化值(ΔV)来判断:当阈值电压或者狄拉克点变化值大于 $3\Delta V$ 时,表示待测核酸为检出。

[0037] ②.在电流-时间测试模式,根据加入非目标核酸后归一化后的电流信号响应值 $\Delta I_{ds}/I_{ds0}$ (非目标核酸)判断:当 $\Delta I_{ds}/I_{ds0}$ (目标核酸)大于 $3\Delta I_{ds}/I_{ds0}$ (非目标核酸)时,表示待测核酸为检出。

[0038] 本发明中的场效应晶体管传感器,是一种通过传导和监控核酸分子吸附以及脱附过程中导致二维敏感材料性能改变,后以电信号的形式输出的传感器件,具有无标记、高灵敏度、高选择性以及实时监测等优点。检测时,在场效应晶体管上制造液体槽,在里面加入待测核酸,使得修饰在场效应晶体管上的引导链与待测核酸互补配对结合,使其接触到场效应晶体管二维敏感材料沟道表面,使其电信号发生变化,最低检测浓度为 10^{-20} 摩尔/升,灵敏度远远高于专利CN111850168A公开的传感器。

[0039] 与使用的传统核酸靶向光学测试方法相比,本发明的优点在于:构建了一种基于Argonaute蛋白的场效应晶体管核酸传感器,其原理为,通过设计合成可以靶向目标核酸的引导链,将其与Argonaute蛋白结合形成复合物后修饰固定到场效应晶体管传感器的二维

敏感材料沟道上,通过目标核酸与引导链互补杂交结合后引起器件电导率的变化来实现检测,具有操作简便、无需扩增、灵敏度高、特异性好、响应时间短、可集成化、低成本等优点。

附图说明

- [0040] 图1是实施例1中场效应晶体管表面示意图;
- [0041] 图2是实施例1中检测人工合成DNA的电流响应曲线;
- [0042] 图3是实施例2中检测病毒核酸RNA的电流响应曲线;
- [0043] 图4是实施例3中检测病毒核酸cDNA的电流响应曲线;
- [0044] 图5是实施例4中检测新冠病毒核酸RNA的电流响应曲线。

具体实施方式

[0045] 为了加深对本发明的理解,下面将结合实施例和附图对本发明作进一步详述,该实施例仅用于解释本发明,并不构成对本发明保护范围的限定。

[0046] 实施例1

[0047] 制备一种基于Argonaute蛋白的场效应晶体管核酸传感器用于检测一段序列长度较短的人工合成DNA,长度为23个碱基,其序列如下:

[0048] 5'-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3'。

[0049] 首先,根据检测的目标序列设计DNA引导链,所设计的5'磷酸化DNA引导链序列为,5'-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3'。使用体积为1~5微升,浓度为1~10微摩尔/升的嗜热栖热菌的Argonaute蛋白和体积为1~5微升,浓度为1~10微摩尔/升的DNA引导链放入1×ThermoPol反应缓冲液中,在50~60摄氏度下反应孵育30~60分钟。其中,1×ThermoPol反应缓冲液是由20毫摩尔三羟甲基氨基甲烷盐酸盐,10毫摩尔氯化钾,10毫摩尔硫酸铵,2毫摩尔硫酸镁和0.1%聚乙二醇辛基苯基醚配置而成,其pH值为8.8。

[0050] 接下来,制备石墨烯场效应晶体管传感器。利用化学气相沉积法在25微米厚的铜箔上制备单层石墨烯,采用电化学剥离法将制得的石墨烯转移到洁净的二氧化硅/硅衬底上。采用紫外光刻法以及氧等离子刻蚀技术制备图案化电极,再通过热蒸镀技术制备铬/金(5/40纳米)源漏电极,得到石墨烯场效应晶体管。然后,将石墨烯场效应晶体管浸泡到含5~10毫摩尔苯甲酸N-羟基琥珀酰亚胺酯的丙酮溶液中室温下2~4小时或4摄氏度12小时后,先用丙酮冲洗两遍,再用超纯水冲洗一遍。将石墨烯场效应晶体管浸泡到80~100微升的嗜热栖热菌的Argonaute蛋白和DNA引导链的复合物溶液中4~6小时后,用1×ThermoPol反应缓冲液冲洗干净。制作PDMS槽放置在石墨烯沟道上,液体槽的容量大约为80~100微升,得到用于检测核酸的石墨烯场效应晶体管传感器。

[0051] 最后,开始进行电学测试。将制备好的石墨烯场效应晶体管传感器的源极连接电学测试系统正极,漏极连接电学测试系统负极。在PDMS槽中加入80~100微升的1×ThermoPol反应缓冲液,选择电学测试系统中的电流-栅压测试模式,给定源漏电压和栅极电压扫描范围,当阈值电压或者狄拉克点变化值小于仪器电压分辨率时,则开始进行人工合成DNA的测试。测试时,先从PDMS槽中抽取8~10微升的1×ThermoPol反应缓冲液,再向其中加入8~10微升的人工合成DNA溶液,测试浓度从 1×10^{-21} 摩尔/升到 1×10^{-10} 摩尔/升。每个浓度的人工合成DNA溶液加入PDMS槽后,等待5~15分钟后读取信号,信号读取方式为狄

拉克点的变化值。

[0052] 图1是实施例1中场效应晶体管表面示意图。图2是实施例1中该场效应晶体管传感器检测人工合成DNA的电流-电压响应曲线,可知构建的该款传感器对DNA具有高灵敏度响应,检测限为 1×10^{-20} 摩尔/升。

[0053] 实施例2

[0054] 制备一种基于Argonaute蛋白的场效应晶体管核酸传感器用于检测MicroRNA(miRNA),miRNA是一类内生的、长度约20~24个核苷酸的小RNA,可以作为一些疾病的潜在标志物。在该实施例中,检测的miRNA为miRNA 21,其序列如下:

[0055] 5' -UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'。

[0056] 首先,根据检测的目标序列设计DNA引导链,所设计的5'磷酸化DNA引导链序列为,5' -TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3'。使用体积为1~5微升,浓度为1~10微摩尔/升的嗜热栖热菌的Argonaute蛋白和体积为1~5微升,浓度为1~10微摩尔/升的DNA引导链放入 $1 \times$ ThermoPol反应缓冲液中,在50~60摄氏度下反应孵育30~60分钟。其中, $1 \times$ ThermoPol反应缓冲液是由20毫摩尔三羟甲基氨基甲烷盐酸盐,10毫摩尔氯化钾,10毫摩尔硫酸铵,2毫摩尔硫酸镁和0.1%聚乙二醇辛基苯基醚配置而成,其pH值为8.8。

[0057] 接下来,制备石墨烯场效应晶体管传感器。利用化学气相沉积法在25微米厚的铜箔上制备单层石墨烯,采用电化学剥离法将制得的石墨烯转移到洁净的二氧化硅/硅衬底上。采用紫外光刻法以及氧等离子刻蚀技术制备图案化电极,再通过热蒸镀技术制备铬/金(5/40纳米)源漏电极,得到石墨烯场效应晶体管。然后,将石墨烯场效应晶体管浸泡到含5~10毫摩尔苯甲酸N-羟基琥珀酰亚胺酯的丙酮溶液中室温下2~4小时或4摄氏度12小时后,先用丙酮冲洗两遍,再用超纯水冲洗一遍。将石墨烯场效应晶体管浸泡到80~100微升的嗜热栖热菌的Argonaute蛋白和DNA引导链的复合物溶液中4~6小时后,用 $1 \times$ ThermoPol反应缓冲液冲洗干净。制作PDMS槽放置在石墨烯沟道上,液体槽的容量大约为80~100微升,得到用于检测核酸的石墨烯场效应晶体管传感器。

[0058] 最后,开始进行电学测试。将制备好的石墨烯场效应晶体管传感器的源极连接电学测试系统正极,漏极连接电学测试系统负极。在PDMS槽中加入80~100微升的 $1 \times$ ThermoPol反应缓冲液,选择电学测试系统中的电流-栅压测试模式,给定源漏电压和栅极电压扫描范围,当阈值电压或者狄拉克点变化值小于仪器电压分辨率时,则开始进行miRNA 21的测试。测试时,先从PDMS槽中抽取8~10微升的 $1 \times$ ThermoPol反应缓冲液,再向其中加入8~10微升的miRNA 21溶液,测试浓度从 1×10^{-21} 摩尔/升到 1×10^{-10} 摩尔/升。每个浓度的miRNA 21溶液加入PDMS槽后,等待5~15分钟后读取信号,信号读取方式为狄拉克点的变化值。

[0059] 图3是实施例2中该场效应晶体管传感器检测miRNA 21的电流-电压响应曲线,可知构建的该款传感器对miRNA21具有高灵敏度响应,检测限为 1×10^{-20} 摩尔/升。

[0060] 实施例3

[0061] 制备一种基于Argonaute蛋白的场效应晶体管核酸传感器用于检测病毒核酸RNA。在该实施例中,检测的病毒核酸为新型冠状病毒SARS-CoV-2的RNA。

[0062] 首先,根据检测的目标序列设计DNA引导链,针对新型冠状病毒SARS-CoV-2的核酸保守区域N基因段设计引导链,所设计的5'磷酸化DNA引导链序列为,5' -

TTGCTGCTGCTTGACAGATT-3'。使用体积为1~5微升,浓度为1~10微摩尔/升的嗜热栖热菌的Argonaute蛋白和体积为1~5微升,浓度为1~10微摩尔/升的DNA引导链放入1×ThermoPol反应缓冲液中,在50~60摄氏度下反应孵育30~60分钟。其中,1×ThermoPol反应缓冲液是由20毫摩尔三羟甲基氨基甲烷盐酸盐,10毫摩尔氯化钾,10毫摩尔硫酸铵,2毫摩尔硫酸镁和0.1%聚乙二醇辛基苯基醚配置而成,其pH值为8.8。

[0063] 接下来,制备石墨烯场效应晶体管传感器。利用化学气相沉积法在25微米厚的铜箔上制备单层石墨烯,采用电化学剥离法将制得的石墨烯转移到洁净的二氧化硅/硅衬底上。采用紫外光刻法以及氧等离子刻蚀技术制备图案化电极,再通过热蒸镀技术制备铬/金(5/40纳米)源漏电极,得到石墨烯场效应晶体管。然后,将石墨烯场效应晶体管浸泡到含5~10毫摩尔苯甲酸N-羟基琥珀酰亚胺酯的丙酮溶液中室温下2~4小时或4摄氏度12小时后,先用丙酮冲洗两遍,再用超纯水冲洗一遍。将石墨烯场效应晶体管浸泡到80~100微升的嗜热栖热菌的Argonaute蛋白和DNA引导链的复合物溶液中4~6小时后,用1×ThermoPol反应缓冲液冲洗干净。制作PDMS槽放置在石墨烯沟道上,液体槽的容量大约为80~100微升,得到用于检测核酸的石墨烯场效应晶体管传感器。

[0064] 最后,开始进行电学测试。将制备好的石墨烯场效应晶体管的源极连接电学测试系统正极,漏极连接电学测试系统负极。在PDMS槽中加入80~100微升的1×ThermoPol反应缓冲液,选择电学测试系统中的电流-栅压测试模式,给定源漏电压和栅极电压扫描范围,当阈值电压或者狄拉克点变化值小于仪器电压分辨率时,则开始进行新型冠状病毒SARS-CoV-2RNA的测试。该实施例检测的是新型冠状病毒SARS-CoV-2的上呼吸道咽拭子样本,在测试前,对测试的样品需要进行处理。在收集到的病毒上呼吸道咽拭子样本的采集管中抽取100~200微升的样本,放入核酸提取试剂盒,接着将试剂盒放入自动或半自动核酸提取仪,提取得到新型冠状病毒SARS-CoV-2核酸并置于4摄氏度保存。测试时,先从PDMS槽中抽取8~10微升的1×ThermoPol反应缓冲液,再向其中加入8~10微升的SARS-CoV-2RNA溶液,测试浓度从0.01拷贝数/微升到1000拷贝数/微升。每个浓度的SARS-CoV-2RNA溶液加入PDMS槽后,等待5~15分钟后读取信号,信号读取方式为狄拉克点的变化值。

[0065] 图4是实施例3中该场效应晶体管传感器检测SARS-CoV-2RNA的电流-电压响应曲线,可知构建的该款传感器对SARS-CoV-2RNA具有高灵敏度响应,检测限为0.01拷贝数/微升。

[0066] 实施例4

[0067] 制备一种基于Argonaute蛋白的场效应晶体管核酸传感器用于检测病毒核酸RNA的逆转录DNA(cDNA)。

[0068] 首先,根据检测的目标序列设计DNA引导链,针对新型冠状病毒SARS-CoV-2的核酸保守区域N基因段设计引导链,所设计的5'磷酸化DNA引导链序列为,5'-AATCTGTCAAGCAGCAGCAA-3',该引导链可以靶向SARS-CoV-2 cDNA。使用体积为1~5微升,浓度为1~10微摩尔/升的嗜热栖热菌的Argonaute蛋白和体积为1~5微升,浓度为1~10微摩尔/升的DNA引导链放入1×ThermoPol反应缓冲液中,在50~60摄氏度下反应孵育30~60分钟。

[0069] 接下来,制备石墨烯场效应晶体管传感器。利用化学气相沉积法在25微米厚的铜箔上制备单层石墨烯,采用电化学剥离法将制得的石墨烯转移到洁净的二氧化硅/硅衬底

上。采用紫外光刻法以及氧等离子刻蚀技术制备图案化电极,再通过热蒸镀技术制备铬/金(5/40纳米)源漏电极,得到石墨烯场效应晶体管。然后,将石墨烯场效应晶体管浸泡到含5~10毫摩尔苯甲酸N-羟基琥珀酰亚胺酯的丙酮溶液中室温下2~4小时或4摄氏度12小时后,先用丙酮冲洗两遍,再用超纯水冲洗一遍。将石墨烯场效应晶体管浸泡到80~100微升的嗜热栖热菌的Argonaute蛋白和DNA引导链的复合物溶液中4~6小时后,用1×ThermoPol反应缓冲液冲洗干净。制作PDMS槽放置在石墨烯沟道上,液体槽的容量大约为80~100微升,得到用于检测核酸的石墨烯场效应晶体管传感器。

[0070] 最后,开始进行电学测试。将制备好的石墨烯场效应晶体管传感器的源极连接电学测试系统正极,漏极连接电学测试系统负极。在PDMS槽中加入80~100微升的1×ThermoPol反应缓冲液,选择电学测试系统中的电流-栅压测试模式,给定源漏电压和栅极电压扫描范围,当阈值电压或者狄拉克点变化值小于仪器电压分辨率时,则开始进行新型冠状病毒SARS-CoV-2 cDNA的测试。该实施例检测的是新型冠状病毒SARS-CoV-2的上呼吸道咽拭子样本,在测试前,对测试的样品需要进行处理。在收集到的病毒上呼吸道咽拭子样本的采集管中抽取100~200微升的样本,放入核酸提取试剂盒,接着将试剂盒放入自动或半自动核酸提取仪,提取得到新型冠状病毒SARS-CoV-2核酸并置于4摄氏度保存。后将提取出的新型冠状病毒SARS-CoV-2核酸用逆转录试剂盒逆转录处理,处理方法为加热到25摄氏度保持10分钟,随后加热到37摄氏度保持2小时,最后加热到85摄氏度保持5分钟。将逆转录后得到的DNA序列置于4摄氏度保存。测试时,先从PDMS槽中抽取8~10微升的1×ThermoPol反应缓冲液,再向其中加入8~10微升的SARS-CoV-2cDNA溶液,测试浓度从0.01拷贝数/微升到1000拷贝数/微升。每个浓度的SARS-CoV-2 cDNA溶液加入PDMS槽后,等待5~15分钟后读取信号,信号读取方式为狄拉克点的变化值。

[0071] 图5是实施例4中该场效应晶体管传感器检测SARS-CoV-2 cDNA的电流-电压响应曲线,可知构建的该款传感器对SARS-CoV-2 cDNA具有高灵敏度响应,检测限为0.01拷贝数/微升。

[0072] 上述的对实施例的描述是为便于该技术领域的普通技术人员能理解和使用发明。熟悉本领域技术的人员显然可以容易地对这些实施例做出各种修改,并把在此说明的一般原理应用到其他实施例中而不必经过创造性的劳动。因此,本发明不限于上述实施例,本领域技术人员根据本发明的揭示,不脱离本发明范畴所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。

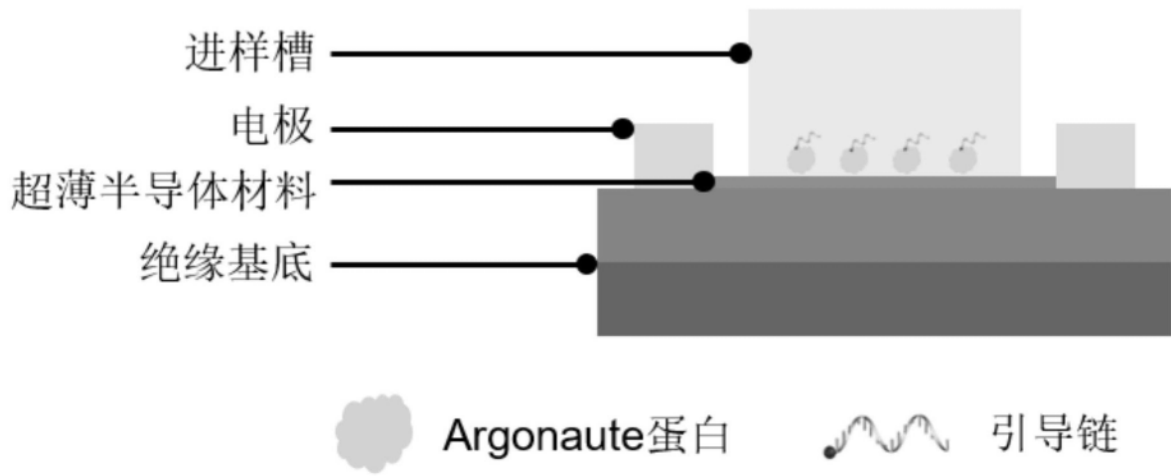


图1

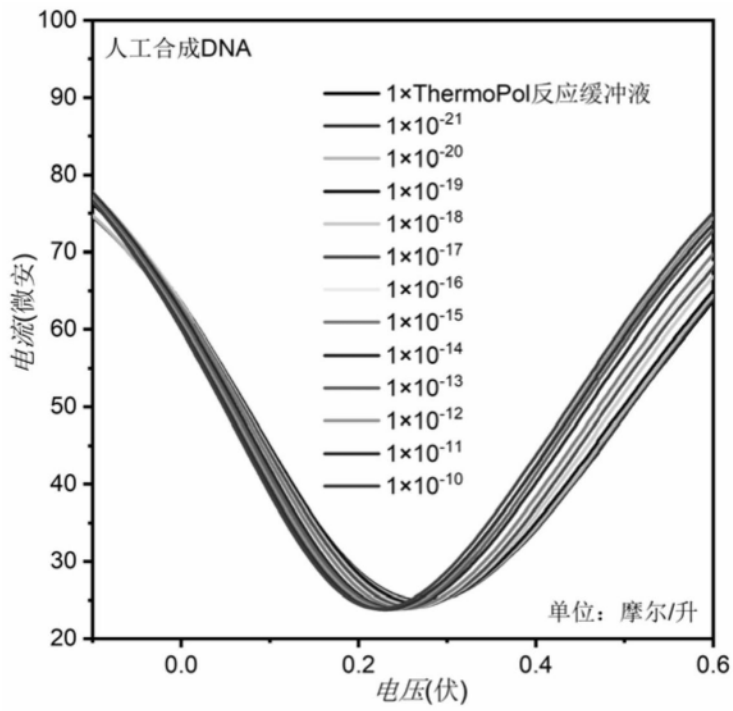


图2

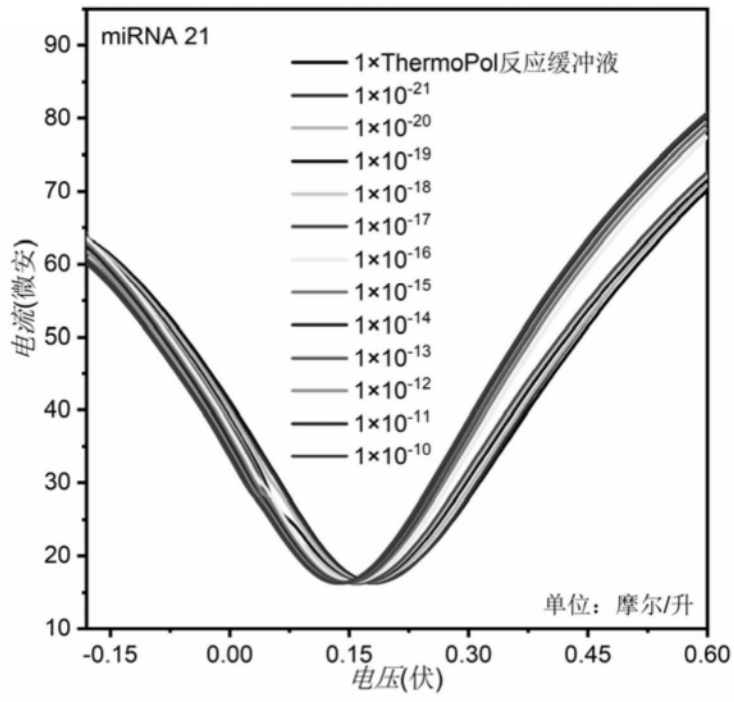


图3

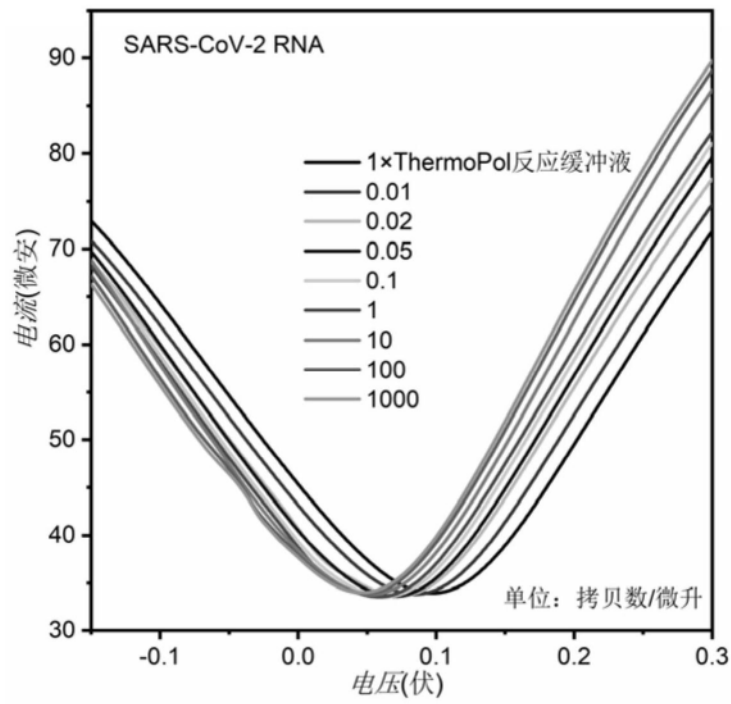


图4

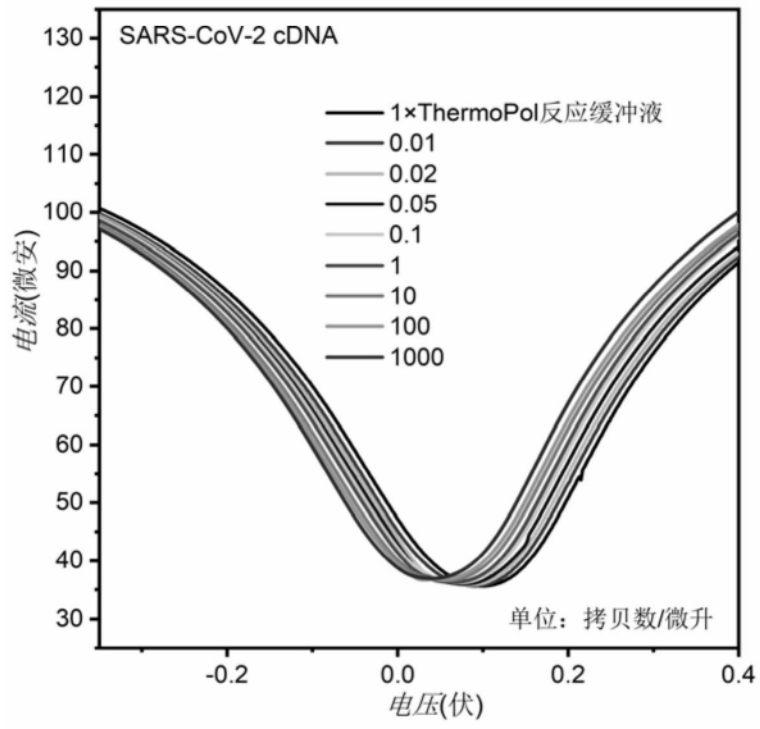


图5