

基于发卡探针 DNA/G-四链体模拟酶结构转化的 高灵敏无标记荧光检测 DNA

宋璐娜¹ 张永花^{1,2} 薄红艳¹ 高强^{*1}

¹(陕西师范大学化学化工学院, 西安 710062) ²(洛阳师范学院化学化工学院, 洛阳 471022)

摘 要 建立了基于目标 DNA 诱导的发卡探针 DNA 转化为 G-四链体 DNA 过氧化物模拟酶的非标记荧光增强型 DNA 检测新体系。发卡探针 DNA 即分子信标探针由两部分构成, 环状部分与目标 DNA 互补, 茎部一端由一条富 G 序列构成。无目标 DNA 存在时, 分子信标处于闭合状态, 形成发卡结构; 富 G 序列由于部分处于杂交状态, 无法形成 G 四链体。当目标 DNA 与发卡探针 DNA 杂交并打开发卡结构, 富 G 序列解链并自发折叠成 G-四链体结构。G-四链体结构与血红素结合形成 DNA 模拟酶, 催化 H_2O_2 还原的同时将无荧光的底物 10-乙酰基-3,7-二羟基吩恶嗪 (ADHP) 氧化成荧光产物。通过测量荧光信号, 实现对目标 DNA 的定量检测。优化后的体系检测条件为 pH 8.0, 10 mmol/L K^+ , 0.2 μ mol/L Hemin, 50 μ mol/L ADHP。在优化的条件下, 目标 DNA 在 0.005 ~ 1.0 nmol/L 浓度范围内与体系荧光信号呈线性关系, 检出限为 3.0 pmol/L。本方法可以区分完全互补和单碱基错配的目标 DNA。

关键词 荧光; DNA; 发卡探针; G-四链体模拟酶; 结构转化

1 引 言

近年来, DNA 检测在临床诊断、基因变异识别、环境监测、食品安全以及生物学研究等领域的应用愈加广泛, 显示出良好的应用前景, 引起了研究者的广泛关注^[1]。常见的 DNA 检测方法包括聚合酶链式反应 (PCR) 法^[2]、质谱法^[3]、光谱法^[4]、色谱法^[5]、电化学法^[6]等。在光谱分析中, 荧光法具有操作简单、检测快速、灵敏度高和选择性好等优点, 是 DNA 定量检测时应用最广泛的方法之一^[7]。

分子信标 (Molecular beacon, MB) 是一种常用的特异性检测目标 DNA 或 RNA 的 DNA 探针^[8]。常规的 MB 茎环结构的两端通常需要标记荧光基团和淬灭基团, 在无目标物存在时闭合形成发卡式的茎环结构, 淬灭基团通过荧光共振能量转移的方式淬灭发光基团发出的荧光。当目标 DNA 与 MB 的环状区特异杂交之后, 闭合的茎环发卡结构被打开, 发光基团因远离淬灭基团而发出荧光, 根据荧光信号的强度来定量目标 DNA。得益于发卡状茎环结构, 基于 MB 的 DNA 检测方法通常具有较高的选择性和灵敏度, 但标记过程较为复杂耗时。此外, 目标 DNA 和 MB 荧光标记分子的 1:1 的比例关系也严重制约了基于 MB 方法灵敏度的提高^[9]。因此, 开发高灵敏度的免标记 MB 逐渐引起研究者的关注^[10]。

近年来, DNA 过氧化物模拟酶 (DNAzyme) 因其表现出过氧化物酶的活性, 且具有稳定性好、成本低、易合成、易修饰等优点而成为传感器信号放大研究的热点^[11~13]。DNAzyme 是富含 G 碱基的单链寡核苷酸在一定条件下折叠成 G-四链体结构, 再与血红素结合形成的复合物。利用 DNAzyme 的催化活性, 可以实现多种物质的高灵敏度检测, 如金属离子^[14]、小分子^[15]、蛋白质^[16]和 DNA^[17]等。在大部分过氧化物模拟酶催化体系中, 主要采用 2,2'-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 做为酶底物, 通过比色法定量^[18]。虽然比色分析法简单, 但检测实际样品时干扰较多且灵敏度较荧光法低。因而开发基于 DNAzyme 催化活性的荧光检测体系逐渐引起了研究者的兴趣^[19]。

本研究设计了免标记的发卡式荧光 DNA 分子探针, 当探针与目标 DNA 特异性杂交后, 发卡结构被打开, 探针 DNA 的一部分会自发形成 G-四链体, 在血红素存在时表现出过氧化物酶的活性。以无荧光的 10-乙酰基-3,7-二羟基吩恶嗪 (ADHP) 为模拟酶底物, 利用其氧化产物具有荧光的性质实现了高灵敏

2015-04-23 收稿; 2015-06-17 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 21175089)、陕西省重大基础研究计划 (Nos. 2013SZS08-Z01, 2013SZS08-P01) 和中央高校科研业务费 (Nos. GK21405003, GK261001080) 项目资助

* E-mail: gaoqiang@snnu.edu.cn

的 DNA 检测。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

UV-2400PC 紫外可见分光光度计(日本岛津工公司); F-7000 荧光仪(日本日立公司); MIR 系列 PCR 仪(东胜创新公司)。

ADHP、30% H₂O₂、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、TritonX-100(Sigma-Aldrich 公司); 血红素(Hemin)、二甲基亚砜(DMSO)、醋酸钾(Alfa Aesar 公司); 实验用水均为超纯水(≥18.2 Ω·cm)。Tris-HAc (pH 8.0) 缓冲液(10 mmol/L Tris, 10 mmol/L HAc, 0.05% (w/V) TritonX-100)。Hemin 用 DMSO 配成 5 mol/L 储备液, -20℃ 暗处保存。ADHP 用 DMSO 配成 20 mmol/L 储备液, 冷冻保存。使用时用 Tris-HAc (pH 8.0) 缓冲液稀释到所需浓度。

DNA 序列均由上海生物工程技术服务有限公司合成, 序列如表 1 所示。

表 1 DNA 序列
Table1 DNA sequence

名称 Name	DNA 序列 DNA sequence
分子信标 Molecular Beacon(MB)	5'-GCCCTACCCAGCCTTA ACTGTAGTACTGGTGAAATTGCTGCCATT -TGGGTAGGGCGGGTTGGG-3'
完全互补目标 DNA Complementary target DNA	5'-AATGGCAGCAATTT CACCAGTACTACAGTTAAGGC -3'
单碱基错配 DNA Single-base mismatch DNA	5'-AAT <u>C</u> GCAGCAATTT CACCAGTACTACAGTTAAGGC -3'
两碱基错配 DNA Two-base mismatch DNA	5'-AAT <u>CC</u> CAGCAATTT CACCAGTACTACAGTTAAGGC -3'
完全不互补 DNA Non-complementary DNA	5'-AGTTCGCGTGGATAGCAATTT CACGCGTGGATA -3'

注: 黑斜体部分为与目标 DNA 互补的序列, 带下划线的碱基为错配碱基
Note: The italic and bold type portion is the sequence complementary to the target DNA. The underlined potions are mismatched bases.

2.2 实验方法

将目标 DNA 样品溶液加入 DNA 探针溶液中, 在室温下反应 1 h, 使探针发卡结构打开。加入适量 Tris-HAc 缓冲液(pH 8.0) 及血红素, 在室温下反应 40 min, 以形成 DNA 过氧化物模拟酶体系。然后, 将 ADHP 和 H₂O₂ 溶液加入到溶液中, 室温反应 1 h。用荧光仪测定溶液荧光, 激发波长为 540 nm, 发射波长为 581 nm。

3 结果与讨论

3.1 检测原理

无标记荧光检测 DNA 的原理如图 1 所示。非标记的发卡型 DNA 探针的茎状部分一端是富含 G 碱基的序列, 与分子信标另一端茎状部分互补。无目标序列存在时, 分子信标处于闭合状态形成发卡结构, 富含 G 碱基的序列无法形成 G-四链体。当加入目标 DNA 后, 分子信标环状部分与目标 DNA 进行杂交导致发卡结构被打开, 从而使富含 G 碱基的序列游离出来, 在 K⁺ 和 Hemin 作用下形成具有过氧化物酶活性的 DNA 模拟酶。当加入 H₂O₂ 和底物 ADHP, 本身不发荧光的 ADHP 被氧化成具有荧光的物质, 通过测量体系的荧光信号达到检测目标 DNA 的目的。这种无标记分子信标的优点在于不需要在 DNA 探针上标记荧光基团和猝灭基团, 而且由于引入了过氧化物模拟酶的催化反应, 放大了信号, 提高了测定灵敏度。

3.2 可行性验证

首先, 对检测原理的可行性进行了验证。如图 2 所示, 在没有目标 DNA 时, 体系具有微弱的荧光

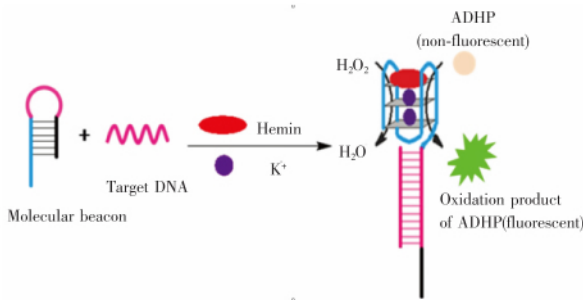


图 1 无标记荧光法检测 DNA 原理示意图
Fig.1 Schematic illustration of the non-labeled fluorescent assay for DNA detection

(图 2 曲线 a)。由于血红素自身具有类过氧化物酶活性,但是催化活性极低,这一微弱荧光可能来自于血红素催化 ADHP 氧化为荧光产物。加入目标 DNA 后,体系荧光信号明显增强,并且荧光强度随目标 DNA 的浓度的升高而增大(图 2 曲线 b 和 c),荧光信号与目标 DNA 浓度具有相关性。为了证明荧光信号确实来自 DNA 模拟酶的催化作用,考察了溶液中没有血红素和没有 DNA 探针时体系的荧光,结果如图 2 曲线 d 和 e 所示。在没有血红素的情况下,体系并未表现出任何荧光,表明单独存在的 G-四链体 DNA 本身并不会催化 ADHP 氧化。当没有 DNA 探针时,体系表现出类似于没有目标 DNA 时的微弱的荧光,表明目标 DNA 和血红素共存物也不能有效地催化无荧光的 ADHP 氧化为荧光产物。以上实验结果表明,只有在目标 DNA 存在下,与探针结合打开探针 DNA 的发卡结构,探针 DNA 的富 G 部分在 K^+ 存在下折叠成 G-四链体 DNA,然后与血红素结合形成复合物,从而表现出明显的过氧化物酶活性^[19]。

3.3 实验条件的优化

为了提高目标 DNA 检测的灵敏度,对缓冲溶液 pH 值、 K^+ 浓度、血红素的浓度以及荧光底物的浓度进行了优化,结果如图 3 所示。从图 3A 可见,当缓冲溶液 pH 值从 6.5 增大到 9.0,体系荧光强度随着 pH 值的增加先增加后减少,当 pH = 8.0 时,荧光强度最大。这可能是由于溶液的 pH 值影响过氧化物模拟酶的活性。从图 3B 和 3C 可见,模拟酶的催化活性受溶液中 K^+ 、Hemin 浓度的影响,这主要是由

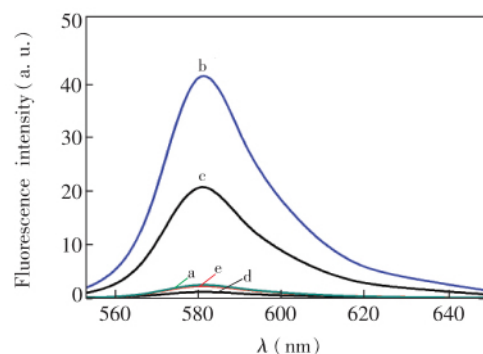


图 2 不同物质存在下体系的荧光光谱图

Fig. 2 Fluorescence spectra of DNA detection system in the presence of different substances.

a. 无目标 DNA; b. 1.0 nmol/L 目标 DNA 存在; c. 0.5 nmol/L 目标 DNA 存在; d. 血红素存在; e. 无发卡 DNA 探针。
a, in the absence of target DNA; b, in the presence of target DNA (1.0 nmol/L); c, in the presence of target DNA (0.5 nmol/L); d, in the absence of hemin; e, in the absence of hairpin probe DNA.

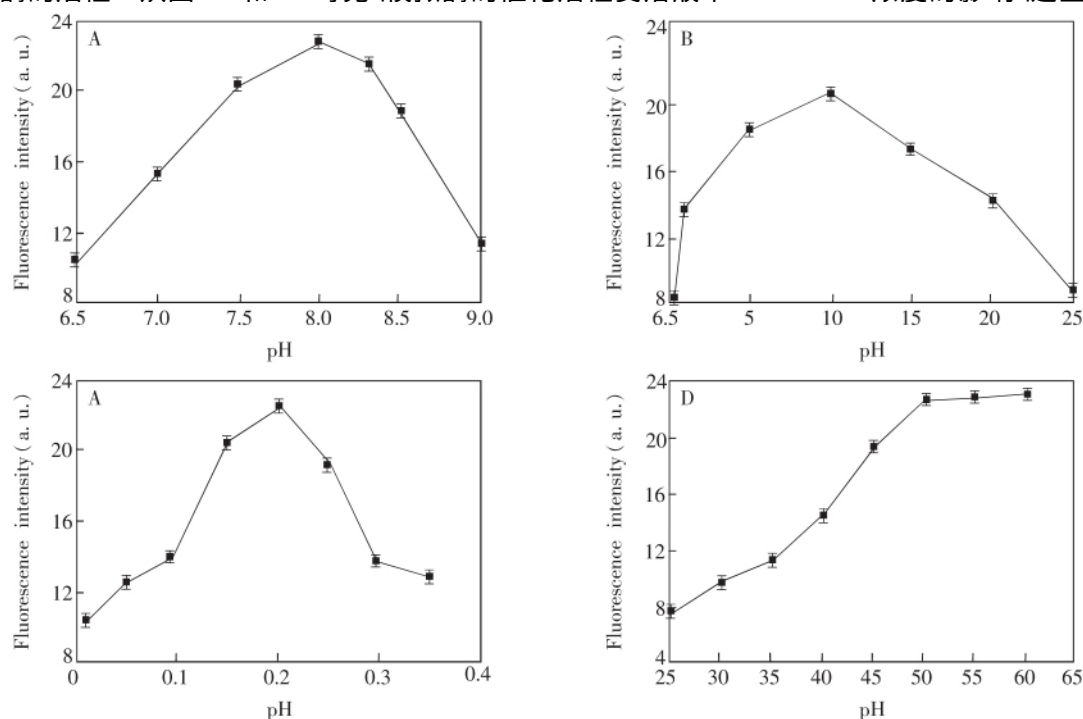


图 3 缓冲液 pH 值 (A)、 K^+ 浓度 (B)、血红素浓度 (C) 和 ADHP 浓度 (D) 对体系荧光信号强度的影响

Fig. 3 Effect of buffer pH (A), K^+ concentration (B), hemin concentration (C) and 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenozin (ADHP) concentration (D) on fluorescence intensity

于 K^+ 影响 G-四链体的折叠,而 Hemin 是模拟酶催化活性的核心^[15],二者浓度都对模拟酶的活性有较大影响。当 K^+ 浓度为 10 mmol/L, Hemin 浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 时,体系荧光强度达到最大值。从图 3D 可见,随着荧光底物 ADHP 的浓度的增加,荧光强度不断增大,当 ADHP 浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,体系荧光强度达到稳定值。综上所述,优化的检测体系溶液组成为: pH 8.0, 10 mmol/L K^+ , 0.2 $\mu\text{mol/L}$ Hemin, 50 $\mu\text{mol/L}$ ADHP。

3.4 工作曲线和检出限

在优化的实验条件下,考察了体系的荧光强度和目标 DNA 浓度的关系。结果如图 4 所示,荧光强度随目标 DNA 浓度增加而增大。荧光强度和目标 DNA 浓度在 $5 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-9}$ mol/L 范围内呈良好的线性关系(图 4B),线性方程 $F = 1.26 + 0.047c$ (pmol/L),相关系数 $r = 0.954$ 。依据信噪比为 3 ($S/N = 3$),确定体系检出限为 3.0 pmol/L。本方法对 DNA 的检测限优于文献[20~24],证明本方法具有很高的灵敏度。

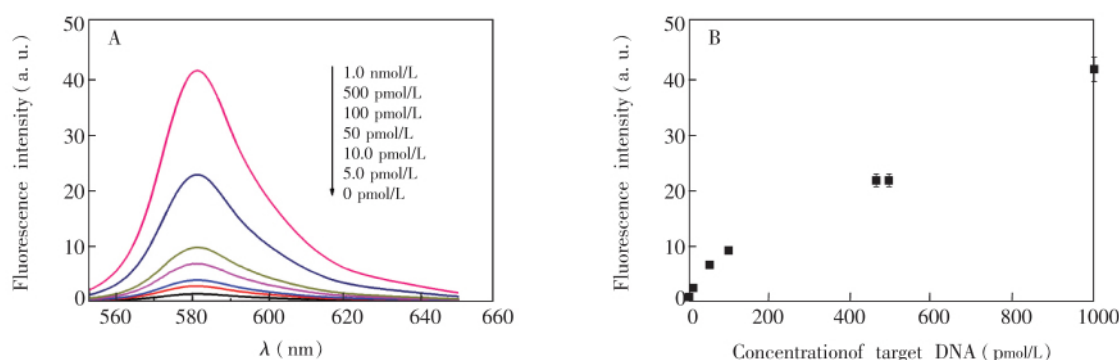


图4 (A) 不同浓度的目标 DNA 存在下体系的荧光光谱图 (B) 检测 DNA 的线性范围

Fig. 4 Fluorescence spectra of the system in the presence of different concentrations of target DNA (A) and linear range for DNA detection (B)

3.5 方法的选择性

发卡型 DNA 探针的最大特点在于其较高的单碱基变异区分能力。为了考察新型分子信标探针对完全互补和碱基错配的 DNA 序列的区分能力,将体系用于含单碱基错配、两碱基错配和非互补 DNA 序列的检测,结果如图 5 所示。相对于完全互补的目标 DNA 序列产生的荧光信号,单碱基错配 DNA 只产生了弱的荧光信号,两碱基变异的 DNA 的荧光信号只有完全互补序列信号的十分之一,非互补随机序列的目标 DNA 几乎没有引起体系荧光强度的变化。上述结果表明,体系具有较高的单碱基区分能力,可以区分完全互补和碱基错配的 DNA 序列,具有较好的选择性。

4 结论

建立了高灵敏度、选择性荧光检测 DNA 的体系。设计了免标记的发卡型 DNA 分子探针,其特点在于当 DNA 探针发卡结构与目标 DNA 结合而打开后,探针序列的一部分会自发形成 G-四链体,在血红素存在时表现出类过氧化物酶的活性。以无荧光的 ADHP 为模拟酶底物,利用其氧化产物具有荧光的性质实现了高灵敏度 DNA 检测。DNA 模拟酶催化反应的引入,提高了检测的灵敏度,具有较高的灵敏度和较低的检出限(3.0 pmol/L)。本体系具有较好的选择性,可以区分完全互补和单碱基错配的

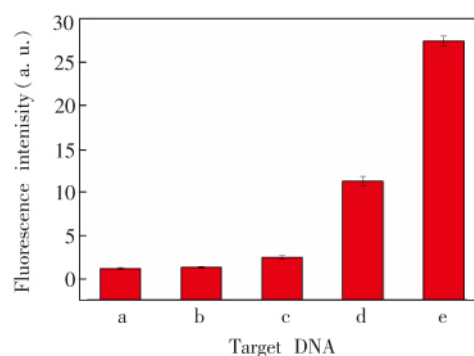


图5 体系的选择性

Fig. 5 Fluorescence spectra of the system in the presence of different DNA sequences

a 空白溶液; b 完全互补的 DNA; c 单碱基错配 DNA; d 两碱基错配 DNA; e 非互补 DNA。

a, blank; b, fully-complementary target DNA; c, one-base mismatch DNA; d, two-bases mismatch DNA; e, non-complementary DNA. The concentration of DNA is 0.5 nmol/L.

DNA 序列。

References

- 1 Taton T A , Mirkin C A , Letsinger R L. *Science* , **2000** , 289(5485) : 1757 – 1760
- 2 Zhang N , Appella D H. *J. Am. Chem. Soc.* , **2007** , 129(27) : 8424 – 8425
- 3 Qiu F , Jiang D W , Ding Y B , Zhu J , Huang L Q L. *Angew. Chem. Int. Ed.* , **2008** , 47(27) : 5009 – 5012
- 4 ZHENG Ai-Hua , ZHU Qing , XIANG Dong-Shan , HE Zhi-Ke. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2013** , 41(3) : 325 – 329
郑爱华 , 朱庆 , 向东山 , 何治柯. 分析化学 , **2013** , 41(3) : 325 – 329
- 5 Zhang J J , Zhang L , Zhou K , Ye X , Liu C , Zhang L , Kang J , Cai C. *Anal. Biochem.* , **2011** , 413: 164 – 170
- 6 LÜ Cui , KANG Tian-Fang , LU Li-Ping , XIONG Yue. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2012** , 40(12) : 1822 – 1826
吕翠 , 康天放 , 鲁理平 , 熊岳. 分析化学 , **2012** , 40(12) : 1822 – 1826
- 7 Wang F , Elbaz J , Willner I. *J. Am. Chem. Soc.* , **2012** , 134(12) : 5504 – 5507
- 8 Maxwell D J , Taylor J R , Nie S. *J. Am. Chem. Soc.* , **2002** , 124(32) : 9606 – 9612
- 9 Zhang P , Beck T , Tan W H. *Angew. Chem. Int. Ed.* , **2001** , 40(2) : 402 – 405
- 10 GUO Qiu-Ping , ZHAO Xia-Yu , XIE Qin , WANG Ke-Min , WAN Jun , YUAN Bao-Yin , TAN Yu-Yu. *Chem. J. Chinese Universities* , **2014** , 35(8) : 1646 – 1651
郭秋平 , 赵下雨 , 谢琴 , 王柯敏 , 万俊 , 袁宝银 , 谭誉宇. 高等学校化学学报 , **2014** , 35(8) : 1646 – 1651
- 11 Zhang Y F , Li B X , Jin Y. *Analyst* , **2011** , 136(16) : 3268 – 3273
- 12 Wang F A , Freage L , Orbach R , Willner I. *Anal. Chem.* , **2013** , 85(17) : 8196 – 8203
- 13 DUAN Na-Na , WANG Na , YANG Wei , KONG De-Ming. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2014** , 42(10) : 1414 – 1420
段娜娜 , 王娜 , 杨薇 , 孔德明. 分析化学 , **2014** , 42(10) : 1414 – 1420
- 14 Zhou X H , Kong D M , Shen H X. *Anal. Chem.* , **2010** , 82(3) : 789 – 793
- 15 Yang C , Lates V , Prieto-Simón B , Marty J , Yang X R. *Biosens. Bioelectron.* , **2012** , 32: 208 – 212
- 16 Huang Y , Chen J , Zhao S L , Shi M , Chen Z F , Liang H. *Anal. Chem.* , **2013** , 85(9) : 4423 – 4430
- 17 Deng M G , Zhang D , Zhou Y Y , Zhou X. *J. Am. Chem. Soc.* , **2008** , 130(19) : 13095 – 13102
- 18 Shimron S , Wang F A , Orbach R , Willner I. *Anal. Chem.* , **2012** , 84(2) : 1042 – 1048
- 19 Golub E , Freeman R , Niazov A , Willner I. *Analyst* , **2011** , 136(21) : 4397 – 4401
- 20 Ma J L , Yin B C , Le H N , Ye B C. *ACS Appl. Mater. Interfaces* , **2015** , 7(23) : 12856 – 12863
- 21 Hu Y L , Zhang L , Zhang Y , Wang B , Wang Y W , Fan Q L , Huang W , Wang L H. *ACS Appl. Mater. Interfaces* , **2015** , 7(4) : 2459 – 2466
- 22 Zhang L B , Zhu J B , Zhou Z X , Guo S J , Li J , Dong S J , Wang E K. *Chem. Sci.* , **2013** , 4(10) : 4004 – 4010
- 23 Huang J H , Su X F , Li Z G. *Anal. Chem.* , **2012** , 84(14) : 5939 – 5943
- 24 Xu L G , Zhu Y Y , Ma W , Kuang H , Liu L Q , Wang L B , Xu C L. *J. Phys. Chem. C* , **2011** , 115(33) : 16315 – 16321

Highly Sensitive and Label-free Fluorescence Detection of DNA Based on Structure Switch of Hairpin Probe DNA to G-Quadruplex-based DNzyme

SONG Lu-Na¹ , ZHANG Yong-Hua^{1,2} , BO Hong-Yan¹ , GAO Qiang^{*1}

¹ (School of Chemistry and Chemical Engineer , Shaanxi Normal University , Xi'an 710062 , China)

² (School of Chemistry and Chemical Engineer , Luoyang Normal University , Luoyang 471022 , China)

Abstract A label-free fluorescent assay for highly sensitive detection of DNA was developed based on structure switch of hairpin DNA probe to a G-quadruplex-based DNzyme triggered by target DNA. The hairpin DNA probe includes sequences that correspond to the base sequence of the G-quadruplex and to the sequence complementary to the target DNA , respectively. The hairpin structure of the probe DNA is

This work was supported by National natural Science Foundation of China (No. 21175089)

中国化学会质谱分析专业委员会
浙江大学化学系