

基于分子信标方法对 DNAzyme 反应的 优化与检测

孙璇^{1,2}, 白家磊¹, 高志贤^{1*}

(1. 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所, 天津 300050;

2. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070)

摘要: **目的** 建立 DNAzyme 与分子信标结合-切割-释放的级联放大方法, 优化反应的条件, 对 DNAzyme 进行定量检测。**方法** 选择 4 个优化条件, 分别是: 金属离子种类、金属离子浓度、pH 值和反应时间。在最佳条件下建立标准曲线, 对 DNAzyme 进行检测。**结果** 本方法的最佳反应条件为: Mg^{2+} 金属离子催化反应、 Mg^{2+} 浓度为 10 mmol/L、pH 为 9.5、反应时间为 4 h。标准曲线为 $Y=17.1628X+420.7767$ ($r^2=0.9402$), 检测范围为 0.5~100 nmol/L。**结论** 此方法理论正确, 实验的准确度高, 为 DNAzyme 的应用提供了一个成熟的方法和新的思路。

关键词: DNAzyme; 分子信标; 条件优化; 定量检测

Optimization and detection of DNAzyme reaction based on molecular beacon method

SUN Xuan^{1,2}, BAI Jia-Lei¹, GAO Zhi-Xian^{1*}

(1. Institute of Environmental and Operational Medicine, Academy of Military Medical Science, Academy of Military Science, Tianjin 300050, China; 2. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT: Objective To establish a cascade amplification method combining DNAzyme with molecular beacon-cleavage-release, optimize the reaction conditions, and quantitatively detect DNAzyme. **Methods** Four optimization conditions were selected, including metal ion species, metal ion concentration, pH and reaction time. A standard curve was established under optimal conditions to detect DNAzymes. **Results** The optimal reaction conditions for this method were: Mg^{2+} metal ion catalytic reaction, Mg^{2+} concentration of 10 mmol/L, pH of 9.5, and reaction time of 4 h. The standard curve was $Y=17.1628X+420.7767$ ($r^2=0.9402$) and the detection range was 0.5–100 nmol/L. **Conclusion** The method is correct and the accuracy of the experiment is high, which provides a mature method and new ideas for the application of DNAzyme.

KEY WORDS: DNAzyme; molecular beacon; optimization; quantitative detection

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFF0108403, 2017YFC1200903), 天津市科技支撑计划项目(18YFZCNC01260)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program (2017YFF0108403, 2017YFC1200903) and Tianjin Science and Technology Support Program (18YFZCNC01260)

***通讯作者:** 高志贤, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向为食品安全快速检测新材料和新技术研究。E-mail: gaozhx@163.com

***Corresponding author:** GAO Zhi-Xian, Professor, Institute of Environmental and Operational Medicine, Academy of Military Medical Science, Academy of Military Science, Tianjin 300030, China. E-mail: gaozhx@163.com

1 引 言

DNAzyme 主要用于生物传感检测技术中核酸的恒温催化信号放大反应。在检测病原菌、小分子物质时,传统的直接检测法已经无法满足我们高灵敏度和高特异性的要求,因此常常采用纳米材料等生物传感器方法对检测信号进行放大,采用电化学或荧光方法检出信号^[1-4]。其中,DNAzyme 是一类具有催化功能的 DNA 分子,它在金属离子的辅助下能形成一定空间结构,并切割靶 DNA 序列中特异性 RNA 位点。由于它比一般的蛋白酶具有更高的稳定性和特异性,因此它在生物传感器、DNA 纳米技术等方面得到了广泛的关注^[5-8]。

国内外对 DNAzyme 的研究和应用十分广泛。Wang 等^[9]通过设计滚环扩增反应(rolling circle amplification, RCA)中的环探针为 DNAzyme 序列,使得扩增的长链为 DNAzyme 片段的重复。当产物与发夹探针互补并催化切割时,荧光恢复,此方法对 DNA 的最低检测限为 1 amol/L。Wu 等^[10]创新性地设计了细胞内纳米探针,即 AuNP-DNAzyme 探针,用于检测活细胞中的 miRNA。当存在 miRNA 时,它与 AuNP 上两个 DNAzyme 底物组成完整的 DNAzyme,并对底物进行催化切割。本方法对 miRNA 的最低检测限为 10 pmol/L。Zhang 等^[11]采用 DNAzyme 偶联磁珠进行金纳米粒子的酶促催化扩增,此方法在水环境中能够特异性检测痕量铈酰离子,目测的检测限为 74 pmol/L。

如图 1 所示,首先根据待测 DNAzyme 序列设计 DNA

分子信标。分子信标(molecular beacon, MB)呈发夹结构,环中央存在一个核糖核酸位点。分子信标一端修饰荧光基团,一端修饰猝灭基团。这时 2 个信号基团相互靠近,发生荧光共振能量转移,荧光基团的荧光信号被猝灭基团所猝灭^[12-14]。当 DNAzyme 和分子信标共存时,DNAzyme 的首尾序列与分子信标的环互补,并在核糖核酸位点形成一个环。当体系中存在一定浓度金属离子时,金属离子会与 DNAzyme 形成一定的空间结构,切割核糖核酸位点,使分子信标结构坍塌。这时分子信标的荧光基团和猝灭基团相互远离,荧光基团的荧光信号恢复。此反应释放的 DNAzyme 再次与下一个分子信标结合进行切割-释放的过程,形成级联放大循环^[15,16]。在此过程中,DNAzyme 分子越多,产生的荧光信号越强,因此我们可以根据荧光强度对 DNAzyme 进行定量检测。本研究采用分子信标级联放大的方法对 DNAzyme 进行定量分析,以期生物传感检测技术中的恒温核酸检测提供新的思路。

2 材料与方法

2.1 仪器、材料与试剂

F97Pro 荧光分光光度计(上海棱光技术有限公司); OSE-DB-01/02 加热/制冷型五段程控金属浴(北京天根生化科技公司)。

DNA(序列如表 1 所示,生工生物工程(上海)公司合成)。

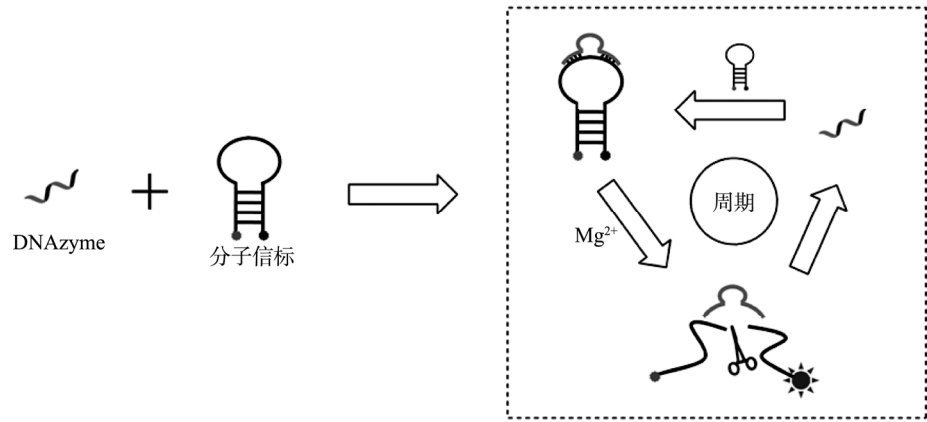


图 1 DNAzyme-分子信标法示意图
Fig.1 Schematic diagram of DNAzyme-molecular beacon method

表 1 DNA 序列
Table 1 The sequence of DNA

名称	序列(5'to3')
DNAzyme	CATCTCTTCTCCGAGCCGGTCGAAATAGTTGGT
MB1	FAM-CCACCATCACCAACTAT(A) _n *GGAAGAGATGTTTGGTGG-BHQ1
MB2	FAM-CCACCATCACCAACTATAGGAAGAGATGTTTGGTGG-BHQ1

注: *为核糖核酸位点。

硫酸铅(PbSO_4)、二水合氯化钡($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、六水合氯化铝($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、三氯化铁六水合物($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、六水合硫酸镍($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、七水合硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)(均为分析纯,上海阿拉丁生化科技公司);盐酸、氢氧化钠(分析纯,国药集团);实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L): 0.6057 g 的 Tris 溶于超纯水,用浓盐酸调节 pH 至 7.4(溶液在 37 °C 下配置并存储)。

7 种金属离子溶液: 分别称取 0.3033 g 的 PbSO_4 、0.2443 g 的 $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.2414 g 的 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.2703 g 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.2629 g 的 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.2465 g 的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 分别溶于 100 mL 超纯水制成 10 mmol/L 的金属离子储存液。

2.2.2 可行性分析

反应体系如表 2 所示,反应的总体积为 200 μL ,反应条件为: 37 °C 下孵育 4 h^[9,10]。测定荧光信号: 激发光为 480 nm,测定的发射范围为 510~600 nm,设置为中增益。

表 2 反应体系
Table 2 Reaction system

种类	添加量/ μL	终浓度/(nmol/L)
MB1/MB2(1 $\mu\text{mol/L}$)	5	25
DNAzyme(1 $\mu\text{mol/L}$)	5	25
Mg^{2+} (10 mmol/L)	5	250
Tris-HCl 缓冲液	185	—

2.2.3 实验条件优化

(1) 金属离子种类

反应体系如表 2 所示,将其中的 Mg^{2+} (10 mmol/L)分别替换为 10 mmol/L 的 PbSO_4 、 BaCl_2 、 AlCl_3 、 FeCl_3 、 NiSO_4 、 MgSO_4 溶液。反应总体积为 200 μL ,反应条件为: 37 °C 下孵育 4 h。测定荧光信号: 激发光为 480 nm,测定的发射范围为 510~600 nm,设置为中增益。

(2) 金属离子浓度

将 Mg^{2+} 溶液(MgSO_4)进行梯度稀释,浓度分别为 100、10、1、0.1、0.01 mmol/L。将上述梯度离子溶液分别加入反应体系中(表 2)。反应总体积为 200 μL ,反应条件为: 37 °C 下孵育 4 h。测定荧光信号: 激发光为 480 nm,测定的发射范围为 510~600 nm,设置为中增益。

(3) pH

将 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液分别用浓盐酸或 NaOH 溶液(10 mmol/L)调节 pH 至 7.5、8.0、8.5、9.0、9.5。将上述不同 pH 的 Tris-HCl 缓冲液分别加入反应体系中(表 2)。反应总体积为 200 μL ,反应条件为: 37 °C 下孵育 4 h。测定荧光信号: 激发光为 480 nm,测定的发射范围为

510~600 nm,设置为中增益。

(4) 反应时间

反应体系如表 2 所示,反应的总体积为 200 μL ,反应条件为: 37 °C,孵育分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 h。测定荧光信号: 激发光为 480 nm,测定的发射范围为 510~600 nm,设置为中增益。

2.2.4 标准曲线的建立

将 DNAzyme 溶液分别稀释至浓度 0.1、0.5、1.0、10、20、40、60、80、100、200 nmol/L,反应体系如表 2 所示。反应总体积为 200 μL ,反应条件为: 37 °C 下孵育 4 h。测定荧光信号: 激发光为 480 nm,测定的发射范围为 510~600 nm,设置为中增益。

3 结果与分析

3.1 可行性分析

由图 2 可知,由于分子信标(MB1、MB2)形成发卡结构,荧光被猝灭,因此 a、b 在 520 nm 处无峰值。DNAzyme 也无荧光(c)。当采用无核糖核酸位点的 MB2 与 DNAzyme 反应时,MB2 无法被切割,因此 d 无荧光。当采用有核糖核酸位点的 MB1 与 DNAzyme 反应时,MB1 被成功切割, FAM 荧光基团重新发光, e 在 520 nm 处显示较强荧光强度。以上实验不仅说明 DNAzyme-分子信标法的可行性,也说明了 DNAzyme 专一性切割 DNA 链中的核糖核酸位点。

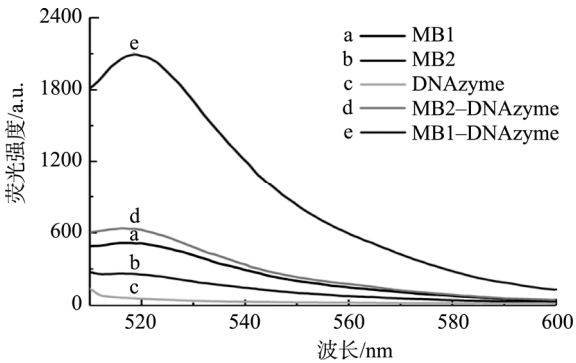
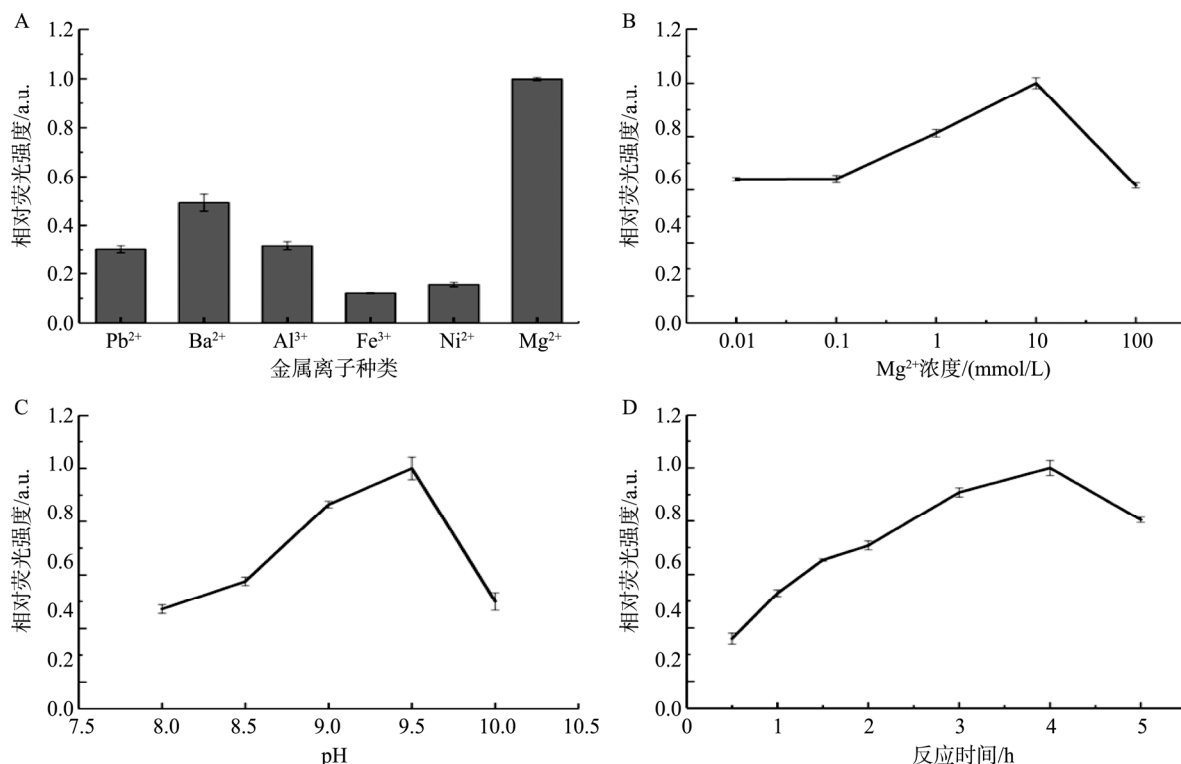


图 2 DNAzyme-分子信标法可行性分析

Fig.2 Feasibility analysis of DNAzyme-molecular beacon method

3.2 实验条件优化

如图 3 所示,本研究选择了金属离子种类、金属离子浓度、反应 pH、反应时间为待优化条件。金属离子能与 DNAzyme 形成一定的空间结构,使其具有切割活性。不同的金属离子对 DNAzyme 具有不同的影响。如图 3A, Pb^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 基本不能促进 DNAzyme 活性; Ba^{2+} 能使 DNAzyme 具有较低活性; Mg^{2+} 对 DNAzyme 催化活性的影响最大,能有效促进 DNAzyme 切割分子信标,释放荧光信号。因此,本研究最佳的金属离子为 Mg^{2+} 。

图 3 实验条件优化($n=3$)Fig.3 Experimental condition optimization ($n=3$)

如图 3B, 为了探究 Mg^{2+} 浓度对反应的影响, 选择了 0.01、0.1、1.0、10、100 mmol/L 的 Mg^{2+} 进行实验。研究发现 Mg^{2+} 浓度过低时, 只能与少量的 DNAzyme 进行装配, 使其切割活性较低, 荧光强度较弱; 当 Mg^{2+} 浓度过高时, 反而抑制了 DNAzyme 活性, 使其切割活力降低。当 Mg^{2+} 浓度为 10 mmol/L 时, 几乎与溶液中所有的 DNAzyme 进行结合, 使 DNAzyme 具有最高的切割活性, 这时荧光强度最高。因此, 本研究中最优的 Mg^{2+} 浓度为 10 mmol/L。

不同的 pH 对 Mg^{2+} 和 DNA 链空间结构的形成均存在影响, 因此选择 pH 分别为 7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 进行优化。如图 3C, 当 pH 为 9.5 时, DNAzyme 显示最佳的切割活性, 荧光强度最高。因此本研究中最优的 pH 为 9.5。与此同时, 为了确定最佳的反应时间, 选择 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 h 的反应时间进行优化。如图 3D, 当反应时间为 4 h 时, 所有的分子信标均被 DNAzyme 切割完毕, 荧光强度显示最高。因此本研究中最优的反应时间为 4 h。

3.3 标准曲线的建立

采用优化后的反应条件(Mg^{2+} 金属离子的浓度为 10 mmol/L, pH 为 9.5, 反应时间为 4 h), 建立 DNAzyme 浓度测定的标准曲线: $Y=17.1628X+420.7767$ ($r^2=0.9402$) (DNAzyme 浓度范围为 0.5~100 nmol/L), 如图 4。此方法及其标准曲线为 DNAzyme 浓度测定奠定了基础。

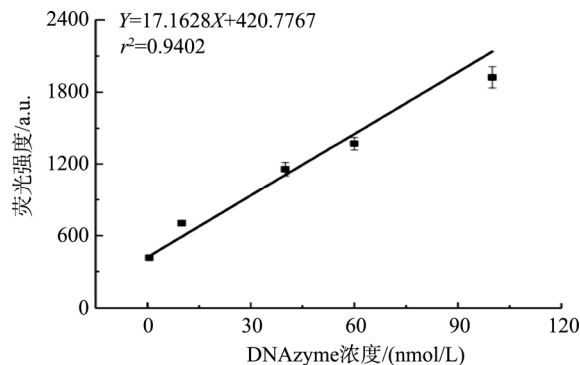


图 4 标准曲线

Fig.4 Standard curve line

4 结 论

DNAzyme 作为恒温级联扩增方法的一部分, 常用于多种生物传感器, 提高检测的灵敏度和特异性, 是食品中病原菌、毒性小分子检测技术中不可或缺的一部分(通过核酸和适配体进行 DNA 扩增放大检测信号)。本研究提出了一个恒温无酶催化、通过级联放大反应监测 DNAzyme 的分子信标法。与此同时, 通过可行性验证, 确定了此方法理论的正确性和实验的准确度; 通过条件优化, 确定了此方法的最佳反应条件。综上, 建立 DNAzyme 浓度检测的标准曲线, 即 $Y=17.1628X+420.7767$ ($r^2=0.9402$), 检测范围

为 0.5~100 nmol/L。本方法为 DNAzyme 的应用提供了一个新的思路。

参考文献

- [1] Liu SF, Ming JJ, Lin Y, *et al.* Highly sensitive detection of T4 polynucleotide kinase activity by coupling split DNAzyme and ligation-triggered DNAzyme cascade amplification [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 14(55): 225–230.
- [2] Lu LM, Zhang XB, Kong RM, *et al.* A ligation-triggered DNAzyme cascade for amplified fluorescence detection of biological small molecules with zero-background signal [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(30): 11686–11691.
- [3] Wang F, Elbaz J, Orbach R, *et al.* Amplified analysis of DNA by the autonomous assembly of polymers consisting of DNAzyme wires [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(43): 17149–17151.
- [4] Wang F, Elbaz J, Willner I. Enzyme-free amplified detection of DNA by an autonomous ligation DNAzyme machinery [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(12): 5504–5507.
- [5] Freage L, Wang F, Orbach R, *et al.* Multiplexed analysis of genes and of metal ions using enzyme/DNAzyme amplification machineries [J]. *Anal Chem*, 2014, 86(22): 11326–11333.
- [6] Hu R, Liu T, Zhang XB, *et al.* DLISA: A DNAzyme-based elisa for protein enzyme-free immol/lunoassay of multiple analytes [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(15): 7746–7753.
- [7] Li L, Feng J, Fan YY, *et al.* Simultaneous imaging of Zn²⁺ and Cu²⁺ in living cells based on DNAzyme modified gold nanoparticle [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(9): 4829–4835.
- [8] Li C, Tao YQ, Yang Y, *et al.* *In Vitro* analysis of DNA-protein interactions in gene transcription using DNAzyme-based electro-chemical assay [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(9): 5003–5007.
- [9] Wang F, Lu CH, Liu XQ, *et al.* Amplified and multiplexed detection of DNA using the dendritic rolling circle amplified synthesis of DNAzyme reporter units [J]. *Anal Chem*, 2014, 86(3): 1614–1621.
- [10] Wu YA, Huang J, Yang XH, *et al.* Gold nanoparticle loaded split-DNAzyme-probe for amplified miRNA detection in living cells [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(16): 8377–8383.
- [11] Zhang HY, Lin L, Zeng XX, *et al.* Magnetic beads-based DNAzyme recognition and AuNPs-based enzymatic catalysis amplification for visual detection of trace uranyl ion in aqueous environment [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 78: 73–79.

- [12] Liu SF, Cheng CB, Liu T, *et al.* Highly sensitive fluorescence detection of target DNA by coupling exonuclease-assisted cascade target recycling and DNAzyme amplification [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 63: 99–104.
- [13] Wu H, Zhang K, Liu YL, *et al.* Binding-induced and label-free colorimetric method for protein detection based on autonomous assembly of hemin/G-quadruplex DNAzyme amplification strategy [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 64: 572–578.
- [14] Xia H, Li LL, Yin ZY, *et al.* Biobar-Coded gold nanoparticles and DNAzyme-Based dual signal amplification strategy for ultrasensitive detection of protein by electrochemiluminescence [J]. *ACS Appl Mater Interface*, 2015, 7(1): 696–703.
- [15] Yang JM, Dou BT, Yuan R, *et al.* Proximity binding and metal ion-dependent DNAzyme cyclic amplification-integrated aptasensor for label-free and sensitive electrochemical detection of thrombin [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(16): 8218–8223.
- [16] Yang YJ, Huang J, Yang XH, *et al.* Gold nanoparticle based hairpin-locked-DNAzyme probe for amplified miRNA imaging in living cells [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(11): 5850–5856.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介

孙 璇, 博士研究生, 主要研究方向
微生物学, 生物传感器方向。
E-mail: 13367280239@163.com

白家磊, 副研究员, 主要研究方向为
光子晶体的制备和应用。
E-mail: baijialeitj@163.com

高志贤, 研究员, 博士生导师, 主要研
究方向为研究方向为生物传感技术、食品安
全关键技术。
E-mail: gaozhx@163.com