

# G-四链体特性及其基于核酸辅助检测方法的研究进展

刘健慧, 孙 炜, 封龙宽, 田益玲, 檀建新\*

(河北农业大学食品科技学院, 河北省农产品加工工程技术中心, 保定 071000)

**摘 要:** G-四链体(G-quadruplex)是多聚鸟嘌呤(G)重复序列通过 Hoogsteen 氢键配对形成的由四链构成的非典型二级结构, 可与氯化血红素(hemin)结合, 形成具有类似过氧化物酶活性的脱氧核酶, 可使其底物显色, 或改变某些染料的荧光强度, 起到生物传感器的作用。G-四链体作为功能性核酸, 以其稳定、灵敏、特异性强等优势, 受到越来越多的重视。本文主要综述了 G-四链体的脱氧核酶特征、G-四链体的改造和修饰、G-四链体结构的诱导形成、其与核酸分析技术联用构建的多种检测方法以及在检测方面应用的研究进展和趋势。

**关键词:** G-四链体; 脱氧核酶; 核酸改造; 核酸扩增; 检测技术

## Review of characteristics of G-quadruplex and development of its nucleic acid assisted detection method

LIU Jian-Hui, SUN Wei, FENG Long-Kuan, TIAN Yi-Ling, TAN Jian-Xin\*

(College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China)

**ABSTRACT:** A G-quadruplex is a noncanonical secondary structure composed of four strands formed by repeating sequences of polyguanine (G) through Hoogsteen hydrogen bonding. It can combine with hemin to form a deoxyribozyme (DNAzyme) with similar peroxidase activity, which can make its substrate change color, or alter the fluorescence intensity of certain dyes to play the role of a biosensor. As a functional nucleic acid, G-quadruplex has received more and more attention because of its stability, sensitivity, and strong specificity. This paper mainly reviewed the characteristics of G-quadruplex as DNAzyme, the modification of G-quadruplex, the induced formation of G-quadruplex structure, its multiple detection methods established in combination with nucleic acid analysis technology as well as the research progress and trends in the application of detection methods.

**KEY WORDS:** G-quadruplex; DNAzyme; nucleic acid modification; nucleic acid amplification; detection techniques

**基金项目:** “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFD0400200)、河北省重点研发计划项目(16275505D)、河北省自然科学基金重点项目(C2019204342)

**Fund:** Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0400200), the Key Research and Development Program of Hebei Province (16275505D), and National Natural Science Foundation of Hebei Province (C2019204342)

\*通信作者: 檀建新, 博士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术。E-mail: jianxintan@sina.com

\*Corresponding author: TAN Jian-Xin, Ph.D, Professor, College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, No.2596, Lekai South Street, Baoding 071000, China. E-mail: jianxintan@sina.com

## 0 引言

随着现代食品行业的迅猛发展,食品安全问题受到越来越多关注。防范食品安全事件发生的重要措施之一就是快速、及时、准确地检出有问题食品,防止其流入市场。因此,高效、便捷、准确的检测方法的建立和应用也变得至关重要。在目前常用的检测方法中,传统检测方法较为准确,但却耗时耗力;免疫学检测方法虽然具有快速、灵敏等优点,但抗体制备过程复杂、专业性强且不易得到;依赖于核酸的检测技术具有特异性强、灵敏性高等特点,已广泛应用于食源性致病菌、食品腐败菌、掺假食品、转基因食品的检测和鉴定中<sup>[1-6]</sup>。

G-四链体是一段富含鸟嘌呤(G)的单链核酸,人们可利用其核酸特性进行检测<sup>[7]</sup>。同时,作为一种功能性核酸,它可与 Hemin 结合,形成过氧化物酶的模拟活性<sup>[8]</sup>,也可增强染料的荧光强度<sup>[9]</sup>,用于特定分子的检测。G-四链体还可通过修饰和改造自身,实现对短链核酸片段或目的基因的检测,或通过结合其他功能核酸及信号扩增方案实现检测信号的放大<sup>[7]</sup>。目前,在 G-四链体结构的参与下已开发出多种基于核酸水平上的检测方法<sup>[10-11]</sup>。本文简要介绍了 G-四链体的结构及其主要功能特性,并整理分析了近几年基于 G-四链体的核酸辅助检测方面的方法,为其自身结构改造和修饰、诱导形成、及偶联核酸扩增实现信号放大等实验方法的研究提供理论依据,为此类技术实际检测效果的提升提供新的思路。

## 1 G-四链体的介绍

### 1.1 G-四链体的结构及分类

1962 年, GELLERT 等<sup>[12]</sup>通过 X 射线首次发现鸟苷酸

可以形成 G-四链体结构,拉开富 G 序列可形成特殊结构的序幕,自 20 世纪 90 年代以来,研究人员陆续发现端粒及基因启动子区可形成 G-四链体结构,更进一步证明 G-四链体具有重要生物功能和分子识别性能,为其结构和功能的研究打下坚实基础<sup>[13-14]</sup>。

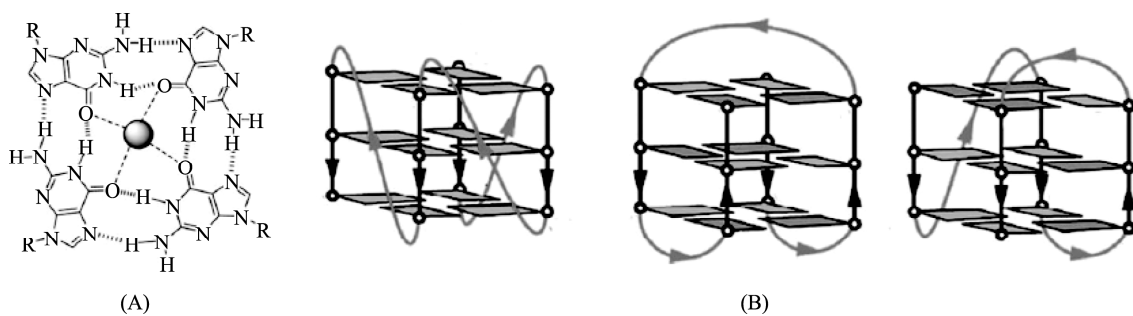
截至目前,人们已经对 G-四链体晶体结构有了清晰的认知(图 1A): 4 个鸟嘌呤(G)形成一个共平面的四分体(G-quartet),相邻的鸟嘌呤之间通过 2 个氢键(Hoogsteen)结合,作用位点分别在鸟苷酸的 O6 和 N7 之间,两层及以上共平面由  $\pi$ - $\pi$  键堆叠成 G-四链体构型,一价阳离子占据着 G-四链体的中间空隙,中和内部鸟嘌呤上氧原子的静电斥力以稳定结构<sup>[15-17]</sup>。

作为一种稳定性高、广泛存在且具有非典型性二级结构的功能核酸,富 G 的单链核苷酸序列通常由几组连续的含 3 到 4 个 G 碱基序列及其间隔开来的环状序列组成,环状序列是指 G-四链体中将四分体连接起来的结构<sup>[18-20]</sup>。G-四链体形成受核苷酸序列数量的影响,可以仅由一段富 G 的序列在分子内形成,也可由 2 段及以上富 G 序列在分子间形成。依赖于环境中的阳离子和环状核酸序列的差异,根据四股链的走向,G-四链体可形成平行、反平行和混合型 3 种结构形式(图 1B)<sup>[21]</sup>。

### 1.2 G-四链体的特性

#### 1.2.1 脱氧核酶特性

脱氧核酶(deoxyribozyme, DNAzyme)是一类具有高效催化活力和结构识别能力的单链核酸片段,打破了酶的化学本质多为蛋白质,少为 RNA 的概念<sup>[22]</sup>。相比于传统的生物酶,脱氧核酶具有稳定性高,相对分子质量小,易于合成、修饰与复制,受温度、pH 等环境因素影响小的特点。同时,其序列组成和结构也决定了与核酸分析技术联用时事半功倍的应用效果<sup>[23]</sup>。



(A) G-四分体结构(图中灰色球为一价阳离子)(B) G-四链体的拓扑结构: 平行(左)、反平行(中)、混合型(右)

图 1 G-四链体结构及分类<sup>[14]</sup>

Fig.1 Structure and classification of G-quadruplex<sup>[14]</sup>

G-四链体可与辅助因子 Hemin 结合产生具有类似过氧化物酶的催化活性,故称为脱氧核酶(DNAzyme),可催化  $H_2O_2$  参与的各种底物氧化反应,如 2,2'-联氮-双(3-乙基-苯并噻唑琳-6-磺酸)二胺盐(diammonium 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)、鲁米诺(Luminol)等,产生肉眼可视的颜色变化或是强烈的化学发光信号<sup>[9,24]</sup>。TRAVASCIO 等<sup>[25]</sup>在筛选核酸适配体过程中对 DNAzyme 的催化机理进行了推断和阐述:适配体-Hemin 复合物比单独的 Hemin 具有更高的过氧化物酶活性,且与辣根过氧化物酶类似, Hemin 在 G-四链体平面结构的中间不被自由基氧化。但后续研究又发现 Hemin 是通过大平面的末端堆积方式与 G-四链体结合来实现的催化反应。DNAzyme 的催化活性常受自身序列组成、末端碱基的添加、中心离子的种类和浓度、环境 pH 值变化及某些高能物质作用等因素影响<sup>[10,20]</sup>。

基于上述 DNAzyme 结构及其酶学特性,人们已实现 G-四链体偶联核酸分子的可视化检测和生物传感器的开发应用,改进了某些传统核酸检测所需的繁琐步骤,使检测工作更为直观、快速、高效<sup>[10]</sup>。

### 1.2.2 增强荧光染料特性

近年来,荧光检测以其灵敏度高、选择性强、线性范围广、外界干扰小等优势受到越来越多的重视<sup>[26]</sup>。荧光染料易与蛋白质、核酸及其他大分子相互作用,使荧光性质发生变化,且具有化学稳定性好,荧光寿命长,光稳定性强等特点,因此在荧光检测中广泛应用<sup>[27]</sup>。

G-四链体与其他核酸一样携带高负电荷,可与一些特定的荧光染料结合,为其提供疏水环境,在免标记的情况下即可达到信号的输出效果。目前常用的荧光染料主要分为有机小分子(花菁类染料及其衍生物、三苯甲烷类染料、豆香素类、卟啉类染料等),金属配合物(酞菁类染料的金属螯合物、钌系金属化合物等)及抗体 3 类,其大都具有平面芳环共轭结构,可区别核酸的双链,单链或其他二级结构。根据 G-四链体的拓扑结构和结合荧光染料后荧光信号的变化特点,可将信号输出效果分为增强与减弱 2 种形式<sup>[28-31]</sup>。目前,菁类染料噻唑橙(thiazole orange, TO)及其衍生物硫磺素 T(thioflavin T, ThT); 三苯甲烷类染料结晶紫(crystal violet, CV); 卟啉类染料原卟啉(protoporphyrin IX, PPIX)、N-甲基卟啉二丙酸 IX(N-methylmesoporphyrin IX, NMM)等化合物已普遍运用于 G-四链体的核酸检测中,更有望用于高灵敏要求的活体细胞 G-四链体标记检测中<sup>[32-33]</sup>。

## 2 核酸辅助 G-四链体直接检测目标物的应用

### 2.1 G-四链体的修饰、改造

近年来,通过偶联 G-四链体,并对其进行修饰、改造,可将 G-四链体序列直接引入到反应体系中,通过对 G-四

链体结构的检测,直接反应目标物的有无,从而提出了多种生物传感应用策略,现已被广泛用于核酸、蛋白(酶)或小分子的检测中,检测效率高,特异性强,适用于现场的快速检测。

#### 2.1.1 “封闭-解封”型 G-四链体的检测

“封闭-解封”型 G-四链体的检测是目前应用较为普遍的方法之一,封闭、解封指的是所设计的包含 G-四链体序列结构受到目标序列影响后的改变过程。通过设计分子信标等手段,以达到免标记的信号输出效果。在研究核酸与  $Hg^{2+}$ 、 $Ag^+$  的相互作用时发现,  $Hg^{2+}$ 、 $Ag^+$  可分别与 2 个胸腺嘧啶碱基(T)、胞嘧啶碱基(C)相结合生成 T- $Hg^{2+}$ -T、C- $Ag^+$ -C 碱基对,通过错配来稳定核酸的结构,这一特性常常应用于“封闭-解封”型 G-四链体检测中<sup>[34]</sup>。此外,诸如发夹结构探针的设计,酶位点的引入等策略也常用于此类检测中。

WANG 等<sup>[35]</sup>通过 T- $Hg^{2+}$ -T 错配和 GC 碱基配对建立了一个以 N-甲基卟啉二丙酸 IX(N-methylmesoporphyrin IX, NMM)/G-四链体为信号定量检测牛乳中三聚氰胺的无标记荧光传感器,设计了一条包含 G-四链体序列及其间隔的多个胸腺嘧啶(T)的寡核苷酸链,当含  $Hg^{2+}$  反应液中无三聚氰胺时,该寡核苷酸链被封闭,当三聚氰胺存在时,三聚氰胺可与  $Hg^{2+}$  产生复杂的强配位能力,使得该核苷酸链解封并游离于反应液中,形成 G-四链体结构,与 NMM 作用产生强烈的荧光信号,检出限为 12.5 nmol/L。LIU 等<sup>[36]</sup>设计了 2 个发夹结构 H1、H2, H1 包含 G-四链体序列及靶 DNA 的互补链,且将 G-四链体封闭其中,当存在靶 DNA 时, H1 与其部分杂交,发夹结构解封,这时 H2 与 H1 中互补部分杂交,并置换了靶 DNA,置换的靶 DNA 再次与新的 H1 杂交,启动链置换循环,解封大量活性 G-四链体,与 NMM 结合,实现了对目标 DNA 的检测,检出限达 40 pmol/L。LAN 等<sup>[37]</sup>将 Klenow 片段(KF)的酶位点设计到 miRNA 互补引物序列与 G-四链体结构之间,当与合适的靶 miRNA 模板杂交后, KF 聚合酶被选择性激活,使 G-四链体结构解封并扩增成双链,在添加 Hemin,  $ABTS^{2-}$ ,  $H_2O_2$  的反应体系中,使 DNAzyme 活性降低或消失,进而显色变浅或至无色,该方法检出限为 4.5 nmol/L,且还可鉴别 miRNA 类似物之间是否存在碱基错配现象。

“封闭-解封”型 G-四链体的检测往往无需额外的操作与任何样品处理及化学修饰,仅仅将所设计的封闭探针信标在反应过程中解封,释放出信号物质,通过光谱分析,即可快速获得结果,甚至在大多数情况下通过肉眼观察,达到检测的目的与效果。

#### 2.1.2 “分裂-完整”型 G-四链体的检测

“分裂-完整”型 G-四链体的检测是目前应用较为新颖的方法之一,“分裂”指的是 G-四链体序列被设计成分割的两部分,分别连接到含有目标识别序列的探针上,处于不

能相互作用的状态。“完整”指的是当目标序列存在时,含有目标识别序列的探针与其识别配对形成双链,探针及其富含 G 序列在目标序列构建的“桥梁”上相互靠近,最终形成完整的 G-四链体,用于后续的检测。

JIANG 等<sup>[38]</sup>将此方法用于鉴定转基因生物(genetically modified organism, GMO),设计了探针 Probe-A 和 B, Probe-A 的 5'端序列和 Probe-B 的 3'端序列与靶标 DNA-T 互补,2 个探针剩余部分各包含 2 组 GGG 重复碱基,当靶标 DNA-T 存在时,探针 A、B 与 DNA-T 识别并形成双链结构,不配对的富 G 重复序列则相互靠近结合形成 G-四链体,在 Hemin 存在时,产生 DNAzyme 活性,催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 介导的 ABTS<sup>2-</sup>显现绿色,可鉴别 0.9% 的目标 DNA-T。CUI 等<sup>[39]</sup>将二分裂的 G-四链体序列设计在 2 个封闭的发卡探针中检测食品中的抗生素,实现了“封闭-解封”与“分裂-完整”方法的结合。首先借助适配体-引物(Apt-Pr)杂交双链体探针识别靶标物质,适配体与靶标结合从而释放引物序列 Pr, Pr 不断地识别、杂交、释放并启动下一个循环,如此周而复始,解封大量含 1 个富 G 重复序列的探针和含 3 个富 G 重复序列的探针,二者在辅助 DNA(helper DNA)的帮助下,组装成 G-四链体,通过比色法检测卡那霉素,检出限可低至 14.7 pmol/L。

“分裂-完整”型 G-四链体的检测形式其背景值相比于体系中已存在 G-四链体序列的检测结果要低,且几个探针同时识别目标物,特异性强,设计巧妙,检测快速。

## 2.2 G-四链体偶联核酸适配体的检测

指数富集的配体系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)筛选的核酸

适配体(aptamer)是一种与抗体相似的单链寡核苷酸。在靶标存在下,折叠成不同的二级和三级结构,实现对目标分子高特异性、高亲和力的检测<sup>[40]</sup>。适配体与 G-四链体同属于短链核酸序列,易于修饰合成,稳定性好,因此很容易将两者结合起来,直接用于目标物的检测。适配体偶联 G-四链体用于检测方法有:在设计随机文库时适当提高鸟嘌呤的比例,从而得到具有 G-四链体序列形式的适配体;将 G-四链体序列完整或分裂地固定到已经成熟的适配体中等。

目前,已获得多种 G-四链体序列形式的适配体,用于有机小分子、生物大分子的核酸检测,表 1 列出了近年来具有代表性的 G-四链体适配体。

近年来,将 G-四链体修饰到已经筛选出来的核酸适配体上,对其序列稍加改造,从而通过对 G-四链体结构的检测,达到对靶标信号的检测。WANG 等<sup>[45]</sup>设计的三螺旋适体探针(TAP),由位于中间的适配体及两端的 G-四链体和其互补序列组成,当赭曲霉毒素 A(ochratoxin A, OTA)存在时,处于茎环结构的 TAP 打开,使 G-四链体序列裸露,在 Hemin 和 K<sup>+</sup>孵育下,使 Luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 体系化学发光显著提高,检出限低至 0.07 ng/mL。WANG 等<sup>[46]</sup>巧妙地将 G-四链体分成两部分,分别连接到与适配体适当部分互补的序列上,当适配体及 Hemin 存在时,该部分在 K<sup>+</sup>作用下自组装成具有催化活性的 DNAzyme,催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化邻苯二胺(o-phenylenediamine, OPD),致使荧光信号产生,且多余的 Hemin 吸附在 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 表面上,降低背景值。靶标浓度增大时,该结构解离,荧光信号下降,该方法检出限达 0.02 ng/mL。

表 1 G-四链体结构型适配体在检测中的应用  
Table 1 Application of G-quadruplex structural aptamers in detection

检测分析物	适配体序列(5'→3')	识别 G-四链体物质	检测原理	检出限	参考文献
卡那霉素	TGGGGGTTGAGGCTA AGCCGA	TO	卡那霉素增多,其结合 DNA 适体致使 TO 从 G-四链体的共轭物中被置换出来,导致荧光信号降低	59 nmol/L	[41]
乙醇胺	ATACCAGCTTATTCAATT TGAGGCGGGTGGGTG GGTTGA	ThT	乙醇胺增多,适体将更倾向于与之结合,ThT 则被释放并失去其荧光特性	641 μmol/L	[42]
环丙氨嗪	FAM-GGTTGGTTGGTTG GTTTT	FAM	修饰在适配体上的荧光素 FAM 会在 520 nm 处释放出荧光,当体系中加入靶标后,其与胸腺嘧啶结合,促进功能核酸形成 G-四链体结构,抑制了荧光释放	0.68 mg/L	[43]
海洋神经毒素(GTX1/4)	AACCTTTGGTCGGGCA AGGTAGGTT	生物膜干涉技术	靶标与适配体高稳定的反平行 G-四链体结构顶端的小沟相契合,稳定了两者的结合,从而表现出高亲和力的结合活性	0.05 ng/mL	[44]

综上, 核酸辅助偶联 G-四链体或对其进行修饰、改造后所构建的生物传感器检测方法, 均将 G-四链体引入反应体系中, 直接用于目标物的放大检测, 虽然操作简单、反应迅速、检测效果良好, 但要达到最佳的检测灵敏度, 需要添加大量的富 G 序列才能保证。

### 3 核酸扩增 G-四链体辅助检测目标物的应用

G-四链体本身就是一段核酸序列, 将其互补序列设计到引物上, 通过 DNA 扩增可使富 G 序列的目的片段不断积累, 再通过酶切或解链等多种形式形成完整的富 G 片段, 达到利用核酸扩增辅助检测目标物的目的, 避免上述需要添加大量 G-四链体信标的弊端。

#### 3.1 聚合酶链式反应中 G-四链体的辅助检测

聚合酶链式反应(PCR)以其操作简便、原理清晰、成本低廉等优势, 广泛用于核酸扩增和检测, 而 PCR 与 G-四链体结构相结合的检测手段, 既改变 PCR 扩增结果的输出方式, 又在短时间内积累大量 G-四链体序列, 提高检测灵敏度。由于 G-四链体多以单链形式检测, 常无法直接与提取的基因组 DNA 结合, 因此, 将 PCR 与 G-四链体技术相结合解决了这一矛盾。

王心一等<sup>[47]</sup>在设计正向引物的 5'端连接一段 G-四链体的反向互补序列, 利用不对称 PCR 技术, 获得单链 G-四链体序列, 通过显色, 鉴定了肉制品中羊源性成分, 检出最低质量分数为 5%。LIU 等<sup>[48]</sup>在单增李斯特氏菌基因组 DNA 的下游引物 5'端连接一段 G-四链体的反向互补序列, 使扩增出来的目的片段均带有 G-四链体序列, 扩增结束后, 对扩增产物进行 100 °C 孵育 5 min 处理, 使双链变为单链状态, 再加入 Hemin、NaCl, 诱导 G-四链体形成, 检出限为 50 pg/反应。此外, 还有在 PCR 产物的 G-四链体位置前设计酶切位点<sup>[7]</sup>、将富 C 序列的核酸链磷酸化及利用核酸外切酶切割<sup>[49]</sup>等依赖于酶切处理获得 G-四链体单链的检测方法。

#### 3.2 等温扩增技术中 G-四链体的辅助检测

相比 PCR 反应需要变性、退火、延伸 3 种温度交替变化, 对仪器控温要求高, 等温扩增在恒定且较为宽泛的温度下进行, 扩增效率极高, 较 PCR 具有显著优势。目前, 将 G-四链体结构与等温扩增相结合的检测手段成为放大信号的一种有效方式。近年来, 已开发了只需要单一聚合酶的滚环扩增、环介导等温扩增及切刻酶辅助的链置换扩增等多种形式的 G-四链体辅助检测方法<sup>[50]</sup>。

##### (1) 滚环扩增

滚环扩增技术(rolling circle amplification, RCA)是仿照自然界中环状分子复制方式, 以环状 DNA 为模板, 在具有链置换活性的 DNA 聚合酶作用下完成的扩增。

因为富 G 序列在单链形式下才能折叠成 G-四链体结构, 因此将 G-四链体的互补序列插入到环状模板中, 并添加一条与环状序列互补的引物, 即可扩增出近千倍长度的单链 DNA<sup>[51]</sup>。

LIU 等<sup>[52]</sup>将非对称拖尾 PCR(asymmetrical trailing-PCR, AT-PCR)获得的单链产物识别并打开由 G-四链体互补序列、互补的双链茎序列和引物位点构成的类似哑铃型探针, 致使 RCA 过程的启动, 最终对克氏杆菌属的检出限达  $4.3 \times 10^1$  CFU/mL。且哑铃型环状茎环结构的设计, 避免了传统环状 DNA 设计中存在的稳定性不高, 自身诱发 RCA 过程, 产生假阳性等诸多问题, 提高了反应的特异性。但传统 RCA 产物多为冗长的单链 DNA, 可能会产生空间位阻, 使 G-四链体结构形成受阻, 从而影响检测的灵敏度。为了防止这一问题, 目前常采取在环状 DNA 中引入酶切位点的策略。JIANG 等<sup>[53]</sup>在线性模板中添加了切刻内切酶(*Nb.BbvCI*)的 3 个识别位点, 当靶标 microRNA 存在, 使线性模板成环, 引发线性 RCA 过程, 同时 *Nb.BbvCI* 识别切割产物, 得到的富 G 序列折叠成 G-四链体并激活荧光染料, 检出限为 4 amol/L。

##### (2) 环介导等温扩增

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)针对靶基因的 6 个位点, 设计了 4 种引物, 通过扩增启动阶段和循环扩增阶段, 仅在恒温条件下就可达到极高的扩增效率<sup>[50,54]</sup>。目前, LAMP 体系可通过 SYBR Green I、钙黄绿素、羟基萘酚蓝等指示剂的加入引起的颜色变化判断扩增产物<sup>[55]</sup>, 但无法精准定量, 而 G-四链体结构与 LAMP 联用放大信号策略以其可见的梯度变化, 让检测更加灵敏、便捷。ZHU 等<sup>[56]</sup>区别于传统 LAMP 的视觉功能, 将富含 17 个核苷酸 C 的寡核苷酸信号前体插入正向内部引物中作为连接子, 进行不对称修饰, 在靶 DNA 存在下, 扩增产生了数十万个 G-四链体序列, 对沙门氏菌检出限达 0.5 pg DNA。

##### (3) 链置换扩增

链置换扩增技术(strand displacement amplification, SDA)是一种酶促 DNA 体外等温扩增方法, 引物包括切刻位点碱基及与靶标互补序列。在聚合酶作用下, 引物与靶标的 3'端延伸扩增出双链 DNA, 之后切刻酶在切刻位点切掉一条链, 从而出现新的 3'端, 并在聚合酶的作用下继续延伸和链置换, 如此反复进行, 产生大量包含靶序列的单链 DNA<sup>[57]</sup>。因其产物为短的单核苷酸, 且具备周期性的聚合、断裂, 因此可与 G-四链体序列结合。YIN 等<sup>[58]</sup>通过靶标识别适配体, 使与适配体互补的引物解链, 该链诱发了包含 G-四链体互补序列的结合链的 SDA 反应, G-四链体信号链不断地被合成切割下来, 折叠成 G-四链体, 实现了利用不同适配体来区分和检测不同目标真菌毒素的目的。

### 3.3 基于辅助诱导形成 G-四链体的检测

脱氧核糖末端转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) 是一种无需模板, 便在 DNA 的 3' 端催化延伸的 DNA 聚合酶<sup>[59]</sup>, 可使其在富 G 环境中形成 G-四链体序列, 其形成如图 2 所示<sup>[60]</sup>, 目前该方法可实现基于辅助诱导形成 G-四链体的检测。ZHANG 等<sup>[61]</sup>将 TdT 用于经过重组聚合酶识别扩增靶序列, 且由双链特异性酶切割形成短的含 3'-OH 的 DNA 中, 短时间即可扩增出大量长的富 G 单链 DNA, 对沙门氏菌属检出限达 6 CFU/mL。

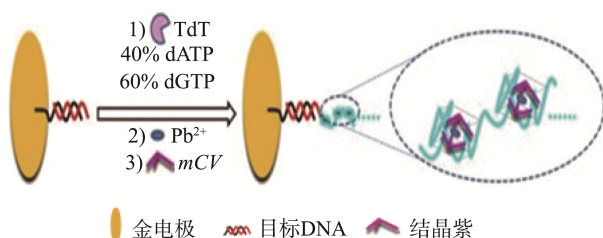


图 2 基于 TdT 酶催化形成的 G-四链体结构示意图<sup>[60]</sup>

Fig.2 Schematic diagram of G-quadruplex structure formed by TdT enzyme catalysis<sup>[60]</sup>

## 4 结论与展望

本文针对 G-四链体及其特性, 综述了核酸辅助检测无标记可视化方法在食源性致病菌、生物毒素、转基因成分等多方面的开发与应用。但随着对此类方法的深入研究, 不难发现存在如下缺点: 含 G-四链体序列的信标直接投入反应体系所产生的信号有限; G-四链体活性及其检测灵敏性可能被复杂样品干扰; G-四链体 DNAzyme 的形成对样品所处环境要求高等。

综上, 对 G-四链体核酸检测的探究, 应突出在含 G-四链体核酸适配体的筛选; 通过核酸扩增不断累积 G-四链体序列以改善灵敏度; 多信号多信标的同时识别, 提高特异性并降低其他物质干扰等方面。今后充分、灵活的应用 G-四链体特性和功能, 并与新的检测技术结合, 将极大地促进基于核酸辅助检测方法的发展及其在多领域的应用。

### 参考文献

- [1] WEI QY, WANG XM, SUN DW, *et al.* Rapid detection and control of psychrotrophic microorganisms in cold storage foods: A review [J]. Trends Food Sci Technol, 2019, 86: 453–464.
- [2] OLSEN JE. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens [J]. Food Res Int, 2000, 33(3/4): 257–266.
- [3] NOORDIANA N, AZAHYAN, JAAFAR AA, *et al.* Sensitive detection of multiple pathogens using a single DNA probe [J]. Biosens Bioelectron, 2016, 86: 398–405.
- [4] COTTENET G, BLANCPAINC, SONNARDV, *et al.* Two fast multiplex real-time PCR reactions to assess the presence of genetically modified organisms in food [J]. Food Chem, 2019, 274: 760–765.

- [5] XIONG Y, LENG YK, LI XM, *et al.* Emerging strategies to enhance the sensitivity of competitive ELISA for detection of chemical contaminants in food samples [J]. Trac-Trend Anal Chem, 2020, 126: 115861.
- [6] SN/T 1870—2016 出口食品中食源性致病菌检测方法实时荧光 PCR 法 [S].  
SN/T 1870—2016 Method for the detection of pathogens in food for export-Real-time PCR method [S].
- [7] 盛磊. G-四链体级联信号扩增可视化在转基因检测中的应用[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2017.  
SHENG L. The application of G-quadruplex cascade signals amplification visual in transgenic detection [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2017.
- [8] WANG LL, WEN YL, LI LY, *et al.* Sensitive and label-free electrochemical lead ion biosensor based on a DNAzyme triggered G-quadruplex/hemin conformation [J]. Biosens Bioelectron, 2018, 115: 91–96.
- [9] ARTHANARI H, BASU S, KAWANO TL, *et al.* Fluorescently dyesspecific for quadruplex DNA [J]. Nucl Acids Res, 1998, 26(16): 3724–3728.
- [10] 吴显庸, 袁园园, 刘战民, 等. 鸟嘌呤四链体 DNAzyme 在微生物、生物小分子和核酸检测中的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(3): 688–693.  
WU XY, YUAN YY, LIU ZM, *et al.* Research progress of G-quadruplex DNAzyme in detection of microorganism, biomolecule and nucleic acids [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(3): 688–693.
- [11] ROEMBKE BT, NAKAYAMA S, SINTIM HO. Nucleic acid detection using G-quadruplex amplification methodologies [J]. Methods, 2013, 64(3): 185–198.
- [12] GELLERT M, LIPSETT MN, DAVIES DR. Helix formation by guanidyl acid [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1962, 48: 2013–2018.
- [13] MONCHAUD D, TEULADEFICHOU M. A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands [J]. Org Biomol Chem, 2008, 6(4): 627–636.
- [14] 常天俊, 李刚, 李卫国. G-四链体核酸的生物学功能[J]. 生命的化学, 2014, 34(3): 385–391.  
CHANG TJ, LI G, LI WG. The biological functions of G-quadruplex nucleic acids [J]. Chem Life, 2014, 34(3): 385–391.
- [15] ZIMMERMAN SB. An "acid" structure for polyriboguanidyl acid observed by X-ray diffraction [J]. Biopolymers, 1975, 14(4): 889–890.
- [16] KENRY MA. Quadruplex structures in nucleic acids [J]. Biopolymers, 2000, 56: 123–146.
- [17] HISAO M, NAKO K, RINO F, *et al.* Molecular architecture of G-quadruplex structures generated on duplex Rif1-binding sequences [J]. J Bio Chem, 2018, 293(44): 17033–17049.
- [18] ALEX K, JACOB C, JANET S, *et al.* G-quadruplex formation in double strand DNA probed by NMM and CV fluorescence [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(16): 61–70.
- [19] YUAN JH, SHAO W, CHEN SB, *et al.* Recent advances in fluorescent probes for G-quadruplex nucleic acids [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 531: 18–24.
- [20] LIU ZL, TAO CA, WANG JF. Progress on applications of G-quadruplex in biochemical analysis [J]. Chin J Anal Chem, 2020, 48(2): 153–163.
- [21] TATEISHI-KARIMATA H, BANERJEE D, OHYAMA T, *et al.* Hydroxyl groups in cosolutes regulate the G-quadruplex topology of telomeric DNA [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 525(1):

- 177–183.
- [22] SILVERMAN SK. Catalytic DNA: Scope, applications, and biochemistry of deoxyribozymes [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(7): 595–609.
- [23] 聂绩, 周颖琳, 张新祥. 脱氧核酶传感器研究进展[J]. *大学化学*, 2013, 28(2): 1–10.  
NIE J, ZHOU YL, ZHANG XX. Research progress of deoxyribozyme sensors [J]. *Univ Chem*, 2013, 28(2): 1–10.
- [24] LOIC S, FRANCK D, DAVID M. Insights into how nucleotide supplements enhance the peroxidase-mimicking DNAzyme activity of the G-quadruplex/heminsystem [J]. *Nucl Acids Res*, 2012, 40(17): 8759–8772.
- [25] TRAVASCIO P, LI YF, SEN D. DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA-aptamer-hemin complex [J]. *Chem Biol*, 1998, 5(9): 505–517.
- [26] WAN J, MA X J, XING L. Highly sensitive fluorescence detection of mercury (II) ions based on DNA machine amplification [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2013, 178: 615–620.
- [27] 傅妮娜, 王红, 张华山. 近红外荧光探针及其在生物分析中的应用进展[J]. *分析科学学报*, 2008, 2: 233–239.  
FU NN, WANG H, ZHANG HS. Progress in near-infrared fluorescent probe and its bioanalytical application [J]. *J Anal Sci*, 2008, 2: 233–239.
- [28] 郭亚辉, 姚卫蓉, 裴仁军, 等. G-四链体在生物传感器中的应用[J]. *武汉大学学报*, 2017, 63(1): 9–21.  
GUO YH, YAO WR, PEI RJ, *et al.* Application of G-quadruplexes for the construction of biosensors [J]. *J Wuhan Univ*, 2017, 63(1): 9–21.
- [29] 李诗雨. 免标记的 G-四链体荧光传感器的构建及对 DNA 和 miRNA 的研究[D]. 湖南: 湘潭大学, 2018.  
LI SY. Construction of label-free and G-quadruplex-based fluorescent sensors and application for DNA and miRNA [D]. Hunan: Xiangtan University, 2018.
- [30] 董承. 选择性识别生物重要分子的荧光探针的合成及其生物活性[D]. 广州: 南方医科大学, 2016.  
DONG C. Synthesis and bioactivity of selective fluorescent probes for biologically important molecules [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2016.
- [31] 李锦. 基于螺吡喃分子开关的 G-四链体 DNA 荧光探针的构建与应用研究[D]. 西安: 西北大学, 2019.  
LI J. Development of fluorescent probes based on spiropyran in situ switching for G-quadruplex DNA and their biological applications [D]. Xi'an: Northwest University, 2019.
- [32] 张素格, 孙红霞, 唐亚林. DNA G-四链体识别探针研究进展[J]. *化学通报*, 2016, 79(5): 387–394.  
ZHANG SG, SUN HX, TANG YL. Research progress in the probes targeting DNA G-quadruplex [J]. *Chem Bull*, 2016, 79(5): 387–394.
- [33] CHILKA P, DESAI N, DATTA B. Small molecule fluorescent probes for G-quadruplex visualization as potential cancer theranostic agents [J]. *Molecules*, 2019, 24(4): 1–15.
- [34] 孔德明. G-四链体-氯化血红素 DNA 酶在传感器设计中的应用[J]. *化学进展*, 2011, 23(10): 2119–2131.  
KONG DM. Applications of G-quadruplex-hemin DNAzymes in sensor design [J]. *Prog Chem*, 2011, 23(10): 2119–2131.
- [35] WANG JJ, WU Y, WU QH, *et al.* Highly sensitive detection of melamine in milk samples based on N-methylmesoporphyrin IX/G-quadruplex structure [J]. *Microchem J*, 2020, 155: 104751.
- [36] LIU Y, LIAO R, WANG H, *et al.* Accurate and sensitive fluorescence detection of DNA based on G-quadruplex hairpin DNA [J]. *Talanta*, 2018, 176: 422–427.
- [37] LAN L, WANG RL, LI L, *et al.* A label-free colorimetric detection of microRNA via G-quadruplex-based signal quenching strategy [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 1079: 207–211.
- [38] JIANG XH, ZHANG HM, WU J, *et al.* G-quadruplex DNA biosensor for sensitive visible detection of genetically modified food [J]. *Talanta*, 2014, 128: 445–449.
- [39] CUI XJ, LI RG, LIU XF, *et al.* Low-background and visual detection of antibiotic based on target-activated colorimetric split peroxidase DNAzyme coupled with dual nicking enzyme signal amplification [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 997: 1–8.
- [40] GAO SX, HU W, ZHENG X, *et al.* Functionalized aptamer with an antiparallel G-quadruplex: Structural remodeling, recognition mechanism, and diagnostic applications targeting CTGF [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 142: 111475.
- [41] XING YP, LIU C, ZHOU XH, *et al.* Label-free detection of kanamycin based on a G-quadruplex DNA aptamer-based fluorescent intercalator displacement assay [J]. *Sci Rep-UK* 2015, 5: 64–72.
- [42] BAYRAC AT, ACAR Y. Label-free G-Quadruplexaptamer and Thioflavin-T based turn-off fluorescent detection of ethanolamine [J]. *Dyes Pigment*, 2020, 172: 107788.
- [43] 邢海波, 胡晓钧, 周世英, 等. 一种基于 G-四联体核酸适配体荧光探针检测牛奶中环丙氨嗪的方法: 中国, 201710705105.0[P]. 2017-12-22.  
XING HB, HU XJ, ZHOU SY, *et al.* A method for detection of cypromazine in milk based on g-quadruplex nucleic acid aptamer fluorescent probe is presented: CN, 201710705105.0 [P]. 2017-12-22.
- [44] 高顺祥. 膝沟藻毒素 1/4 核酸适配体的筛选, 结合机制及其应用研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2016.  
GAO SX. Selection, binding mechanism, and application of aptamers against gonyautoxin 1/4 [D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2016.
- [45] WANG YH, FANG ZY, NING G, *et al.* G-quadruplex-bridged triple-helix aptamer probe strategy: A label-free chemiluminescence biosensor for ochratoxin A [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2019, 298: 126867.
- [46] WANG LM, ZHU FW, CHEN M, *et al.* Rapid and visual detection of aflatoxin B1 in foodstuffs using aptamer/G-quadruplexDNAzyme probe with low background noise [J]. *Food Chem*, 2019, 271: 581–587.
- [47] 王心一, 刘榜, 湛阳, 等. 基于 G-四联体比色生物传感器检测肉制品中羊源性成分[J]. *生物技术进展*, 2019, 9(6): 641–646.  
WANG XY, LIU B, SHEN Y, *et al.* A colorimetric biosensor based on G-quadruplex for detection of sheep-derived components [J]. *Curr Biotechnol*, 2019, 9(6): 641–646.
- [48] LIU ZM, YAO CH, YANG CY, *et al.* Development of DNAzyme-based PCR signal cascade amplification for visual detection of *Listeria monocytogenes* in food [J]. *Anal Biochem*, 2018, 553: 7–11.
- [49] WONG BY, SHIN SJ, FU RZ, *et al.* One-step electrochemical method for DNA detection that utilizes a peroxidase-mimicking DNAzyme amplified through PCR of target DNA [J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 30(1): 73–77.
- [50] 路威. 基于等温扩增和 DNAzyme 的生化分析新方法的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.  
LU W. New methods for biochemical analysis based on isothermal

- amplification and DNAzyme [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.
- [51] 朱智壕, 葛丽雅, 涂晓波, 等. 等温扩增技术在食源性致病菌检测中的应用进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(12): 4787-4794.  
ZHU ZH, GE LY, TU XB, *et al.* Progress on application of isothermal amplification for food-borne pathogen detection [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(12): 4787-4794.
- [52] LIU J, ZHAN ZX, LIANG TB, *et al.* Dual-signal amplification strategy: Universal asymmetric tailing-PCR triggered rolling circle amplification assay for fluorescent detection of *Cronobacter* spp. in milk [J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(4): 3055-3065.
- [53] JIANG HX, LIANG ZZ, MA YH, *et al.* G-quadruplex fluorescent probe-mediated real-time rolling circle amplification strategy for highly sensitive microRNA detection [J]. *Anal Chim Acta*, 2016, 943: 114-122.
- [54] 柯飞, 王赞, 胡兴安, 等. 环介导等温扩增技术及其在水生动物病毒检测中的应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(4): 935-941.  
KE F, WANG Y, HU XA, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification technology and its application in detection of aquatic animal viruses [J]. *Genome Biol*, 2014, 33(4): 935-941.
- [55] 徐匆, 罗华建, 黄皓, 等. 单增李斯特菌反转录环介导等温扩增检测方法的建立[J/OL]. 现代食品科技, 2020, 36(6): 297-302.  
XU C, LUO HJ, HUANG H, *et al.* Establishment of RT-LAMP-HNB Method for *Listeria monocytogenes* [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2020, 36(6): 297-302.
- [56] ZHU LJ, XU YC, CHENG N, *et al.* A facile cascade signal amplification strategy using DNAzyme loop-mediated isothermal amplification for the ultrasensitive colorimetric detection of *Salmonella* [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2017, 242: 880-888.
- [57] CHEN X, WANG X, LU Z, *et al.* Ultra-sensitive detection of  $Pb^{2+}$  based on DNAzymes coupling with multi-cycle strand displacement amplification (M-SDA) and nano-graphene oxide [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2020, 311: 127898.
- [58] YIN JJ, LIU YQ, WANG S, *et al.* Engineering a universal and label-free evaluation method for mycotoxins detection based on strand displacement amplification and G-quadruplex signal amplification [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2018, 256: 573-579.
- [59] 刘卓靓, 陶呈安, 王建方. 鸟嘌呤四链体在生化分析中的应用进展[J]. 分析化学, 2020, 48(2): 153-163.  
LIU ZL, TAO CA, WANG JF. Progress on applications of g-quadruplex in biochemical analysis [J]. *Chin J Anal Chem*, 2020, 48(2): 153-163.
- [60] HU YF, SHEN QP, LI W, *et al.* A TdT-mediated cascade signal amplification strategy based on dendritic DNA matrix for label-free multifunctional electrochemical biosensing [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 63: 331-338.
- [61] ZHANG Y, TIAN JJ, LI K, *et al.* Label-free visual biosensor based on cascade amplification for the detection of *Salmonella* [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 1075: 144-151.

(责任编辑: 王 欣)

## 作者简介



刘健慧, 硕士, 主要研究方向为食品科学。

E-mail: 1795105565@qq.com。



檀建新, 博士, 教授, 主要研究方向为食品生物技术。

E-mail: jianxintan@sina.com。