

基于双重猝灭原理的分子信标定量检测凝血酶

翟 琨^{1,2} 李奉权³ 史伯安² 向东山^{*1,2}

¹(生物资源保护与利用湖北省重点实验室,湖北民族学院,恩施 445000)

²(湖北民族学院化学与环境工程学院,恩施 445000) ³(湖北民族学院医学院,恩施 445000)

摘 要 利用 G 碱基和有机猝灭基团对荧光基团的双重猝灭作用构建了分子信标,建立了一种基于双重猝灭原理的检测凝血酶的简单方法。此分子信标中荧光基团设计为羧基荧光素 (FAM),有机猝灭基团设计为 Black Hole Quencher 1 (BHQ-1),BHQ-1 连接 3 个含有 G 碱基的核苷酸,分子信标的环设计为凝血酶的核酸适配体。体系中没有凝血酶时,分子信标呈茎环结构,荧光基团 FAM 与有机猝灭基团 BHQ-1 及 G 碱基相互靠近,FAM 的荧光在 BHQ-1 及 G 碱基的双重猝灭下,其荧光信号很弱;当体系中有凝血酶存在时,分子信标与凝血酶特异性结合,形成 G-四联体结构,茎-环结构被破坏,FAM 远离猝灭基团 BHQ-1 及 G 碱基,其荧光得到恢复。在最适条件下,体系的荧光强度 (ΔI) 与凝血酶的浓度 (C) 在 0.4 ~ 40 nmol/L 范围内具有良好的线性关系,线性回归方程为 $\Delta I = 24.63C$ (nmol/L) + 13.06 ($R^2 = 0.9972$),检出限为 0.18 nmol/L ($3\sigma, n = 9$)。实际血样加标回收率为 96.3% ~ 98.7%。

关键词 双重猝灭; 分子信标; 凝血酶; 荧光; 定量检测

1 引言

凝血酶 (Thrombin, TB) 是一种由凝血酶前体形成的丝氨酸蛋白酶,在人体凝血过程中发挥了重要作用^[1,2]。适配体是通过指数富集的配体系统进化技术,经体外筛选得到的能与蛋白质或小分子的特定区域相结合的寡聚核苷酸片段 (DNA 或 RNA),可以特异性地识别相应的靶分子^[3~8]。迄今,已筛选到的凝血酶核酸适配体序列有两个,一个是由 15 个碱基构成的能识别凝血酶的肝素结合位点的适配体,另一个是由 29 个碱基构成的能识别凝血酶血纤维蛋白结合位点的适配体^[9,10]。目前,这两种凝血酶核酸适配体都已被广泛用于凝血酶的检测^[11~14]。

分子信标是一种可形成发夹结构的茎-环双标记的寡核苷酸探针,具有选择性好、检测速度快以及无需与未反应的探针分离即可实时检测等特点,广泛应用于核酸检测分析^[15~17]。目前分子信标在凝血酶的检测中已有应用,但使用的多为传统的分子信标,荧光背景较高,影响了定量分析的灵敏度^[18,19]。

本研究基于鸟嘌呤 (G 碱基) 对 FAM 具有较好的猝灭作用^[20,21]的原理,利用 G 碱基和有机猝灭基团对 FAM 的双重猝灭作用,设计了一种结构简单、合成容易的具有双重猝灭作用的分子信标,稳定性好,荧光背景信号低,与凝血酶反应速度快,基于此建立了快速定量检测凝血酶的新方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

RF-5301PC 荧光光谱仪 (日本 Shimadzu 公司); 凝血酶 (上海麦克林生化科技有限公司 (中国)); 牛血清蛋白 (BSA)、鸡卵清白蛋白 (OVA)、牛血红蛋白 (HB),购于上海邦景实业有限公司; 其它试剂均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司; 实验所用缓冲溶液为 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液; 所有的分子信标均由上海生工生物技术有限公司 (中国) 合成,其序列如表 1 所示。

2.2 样品制备及检测

将分子信标及凝血酶分别用 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲溶液配制成 400 nmol/L 储备液,并

2017-03-17 收稿; 2017-08-28 接受

本文系国家自然科学基金项目 (Nos. 21465010, 31460172), 生物资源保护与利用湖北省重点实验室开放基金 (No. PKLHB1532), 湖北民族学院博士启动基金 (No. MY2015B015) 及湖北省林学一级学科资助

* E-mail: zk3100@sohu.com

表 1 分子信标的类型及序列
Table 1 Sequences of molecular beacons (MB)

分子信标 Molecular beacon (MB)	分子信标序列 Sequences of MBs
MB1	5'-FAM-(CH ₂) ₆ - <u>CCCGCGGGTTGGTGTGGTTGGCGCGGG</u> -(CH ₂) ₆ -BHQ-1-3'
MB2	5'-FAM-(CH ₂) ₆ - <u>CCGCGCGGGTTGGTGTGGTTGGCGCCGG</u> -(CH ₂) ₆ -BHQ-1-3'
MB3	5'-FAM-(CH ₂) ₆ - <u>CTGCGCGGGTTGGTGTGGTTGGCGCCAG</u> -(CH ₂) ₆ -BHQ-1-3'
MB4	5'-FAM-(CH ₂) ₆ - <u>TTGGCGGGTTGGTGTGGTTGGCGCCAA</u> -(CH ₂) ₆ -BHQ-1-3'
MB5	5'-FAM-(CH ₂) ₆ - <u>CCCGCGGGTTGGTGTGGTTGGCGCGGG</u> -3'
MB6	5'-FAM-(CH ₂) ₆ - <u>TTGGCGGGTTGGTGTGGTTGG</u> <u>CGCCAA</u> -3'

注：带下划线的碱基表示分子信标中互补配对的碱基。
Note: The underlined bases represent the complementary bases in molecular beacon.

分别稀释成不同浓度的溶液,备用。取 50 μL 凝血酶溶液加入到 50 μL 的分子信标溶液中,混合均匀,补加 Tris-HCl 缓冲溶液至 500 μL,室温下反应 30 min,检测荧光信号。本研究采用同步荧光分析法,因为 FAM 的最大激发波长与最大发射波长之差(斯托克斯位移)为 26 nm,因此实验中同步扫描的波长间隔(Δλ)设置为 26 nm,荧光分光光度计的激发及发射狭缝宽度均设置为 10 nm。

2.3 选择性实验

在 4 份 50 μL 400 nmol/L 凝血酶溶液中,分别加入 50 μL 蒸馏水、50 μL 浓度为 4×10⁻⁴ mol/L 的牛血清蛋白(BSA)、卵清白蛋白(OVA)、牛血红蛋白(HB)溶液,再分别加入 50 μL 400 nmol/L 分子信标溶液,最后加入 Tris-HCl 缓冲溶液至 500 μL,混合均匀,常温下反应 30 min 后,进行荧光检测。

3 结果与讨论

3.1 检测原理

利用双重猝灭分子信标检测凝血酶的原理如图 1 所示。体系中没有凝血酶存在时,分子信标呈茎环结构,荧光基团 FAM 与猝灭基团 BHQ-1 及 G 碱基相互靠近,FAM 的荧光在 BHQ-1 及 G 的双重猝灭下,其荧光信号很弱;体系中存在凝血酶时,分子信标的环即凝血酶的适配子序列与凝血酶特异性结合形成 G-四联体结构,茎-环结构被破坏,FAM 荧光基团远离猝灭基团 BHQ-1 及 G 碱基,荧光得到恢复。凝血酶浓度越高,与其结合的分子信标越多,即更多的环被打开,因此体系的荧光信号越强,通过 FAM 荧光信号增强的程度可实现对凝血酶的定量检测。

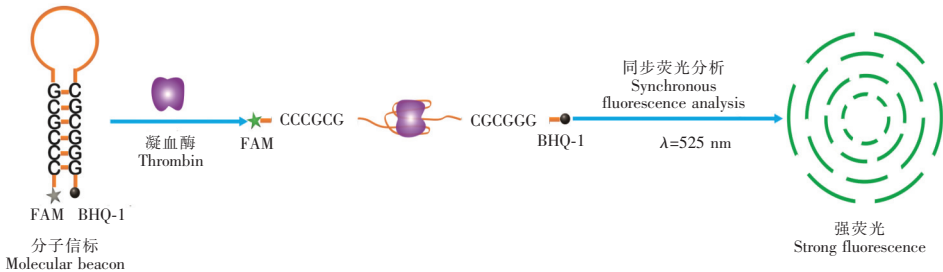


图 1 双猝灭法检测凝血酶的原理
Fig. 1 Principle for detection of thrombin (TB) by dual-quenching

3.2 双重猝灭分子信标的构建

本研究中,凝血酶的检测是基于有机猝灭基团和 G 碱基对荧光基团的双重猝灭作用。选择能被 G 碱基猝灭的有机染料 FAM 作为分子信标的荧光基团, BHQ-1 作为分子信标的猝灭基团,因为 BHQ-1 的最大吸收波长为 535 nm,FAM 的最大发射波长为 525 nm,因此在 BHQ-1 与 FAM 相互靠近时,FAM 的荧光能被 BHQ-1 很好地猝灭。另外,与 BHQ-1 相连接的 G 碱基数目越多,猝灭的效果越好^[22]。本研究设计了 G 碱基数目分别为 3 个、2 个、1 个及没有 G 碱基的 4 种分子信标(即 MB1、MB2、MB3、MB4),并与没有猝灭基团的分子信标(MB6)的猝灭效果进行比较(图 2)。结果表明,随着 G 碱基数目的增加,分子信标的背景荧光逐渐降低,但降低的程度逐渐减小。这主要是因为增加的 G 碱基与荧光基团的距离逐渐增加

的缘故。因此,选择 MB1 对凝血酶进行检测。

3.3 双重猝灭分子信标性能评价

对不同猝灭基团猝灭 FAM 的效果进行考察(图 3)。结果表明,当分子信标中既没有 G 碱基也没有猝灭基团(MB6)时,体系具有较强的荧光信号(图 3d);当分子信标中只有有机猝灭基团(MB4)或只有 G 碱基(MB5)时,分子信标的荧光信号显著减弱(图 3b, 3c),说明有机猝灭基团 BHQ-1 和 G 碱基对 FAM 都具有很好的猝灭作用;当分子信标中既有 G 碱基,又有有机猝灭基团 BHQ-1(MB1)时,分子信标的荧光信号变得非常微弱(图 3a),说明 G 碱基和有机猝灭基团 BHQ-1 对 FAM 的双重猝灭效果更好。根据计算,经典分子信标(MB4)的猝灭效率为 90.3%,信背比(没有猝灭基团的分子信标所产生的信号与有猝灭基团的分子信标所产生的信号之比)为 10.3;双重猝灭分子信标的猝灭效率为 97.5%,信背比为 39.8。因此,基于双重猝灭的分子信标的荧光背景远低于经典分子信标。

3.4 工作曲线及检出限

考察了凝血酶的浓度与相应的体系荧光强度之间的关系,图 4 为不同浓度的凝血酶所对应的同步荧光光谱图。在 0.4 ~ 40.0 nmol/L 范围内,体系的荧光强度(ΔI)与凝血酶的浓度(C)具有良好的线性关系(图 4 插图),线性回归方程为 $\Delta I = 24.63 C \text{ (nmol/L)} + 13.06$ ($R^2 = 0.9972$),检出限为 0.18 nmol/L ($3\sigma, n=9$)。对 3.0 nmol/L 凝血酶重复测定 9 次,响应值的相对标准偏差(RSD)为 3.7%,说明此方法精密度良好。

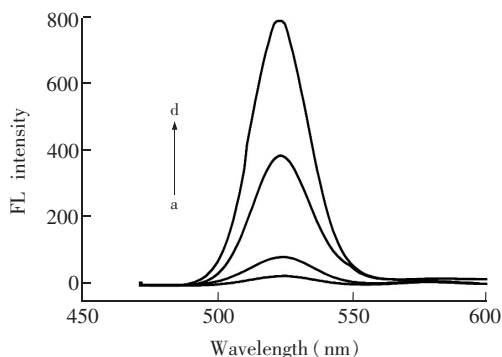


图 3 不同分子信标的性能比较(a→d: MB1, MB4, MB5, MB6),各分子信标的浓度均为 32 nmol/L

Fig. 3 Comparison of the performance of different MBs (a→d: MB1, MB4, MB5, MB6). Concentration of each MBs is 32 nmol/L respectively

3.5 选择性

对建立的检测方法的特异性进行了考察(图 5)。结果表明,40 nmol/L 凝血酶溶液中加入 40.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 BSA、OVA 及 HB 后,各体系的荧光强度几乎无变化,说明这几种干扰蛋白的存在对凝血酶的检测没有明显影响,表明此分析方法具有良好的选择性。

与文献报道的利用适配体或荧光方法检测凝血酶方法相比(表 2),本方法检出限更低。另外,本方

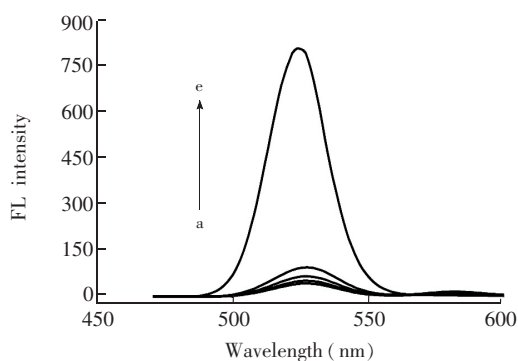


图 2 分子信标茎的不同 G 碱基数目对猝灭效果的影响(a→e: MB1, MB2, MB3, MB4, MB6),各分子信标的浓度均为 32 nmol/L

Fig. 2 Effect of the number of G base in the stem of MB on quenching effect (a→e: MB1, MB2, MB3, MB4, MB6). Concentration of each MBs is 32 nmol/L, respectively

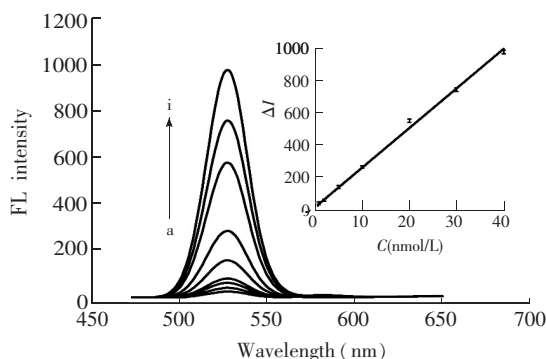


图 4 基于双重猝灭分子信标方法检测不同凝血酶荧光响应曲线。插图为线性关系曲线。凝血酶的浓度为(a→i): 0, 0.4, 0.8, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 nmol/L

Fig. 4 Fluorescent response curves for detection of different concentrations of thrombin by double quenching MBs. Concentration of thrombin is (a→i): 0, 0.4, 0.8, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 nmol/L respectively

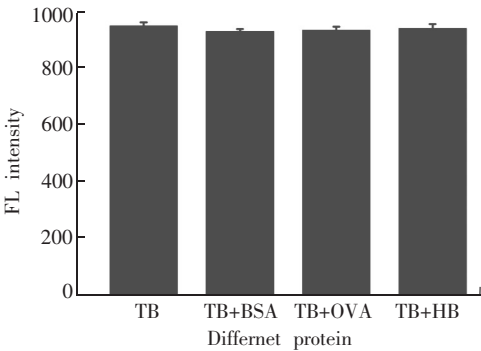


图 5 选择性实验结果。分子信标的浓度为40 nmol/L，凝血酶的浓度为 40 nmol/L,BSA,OVA 及 HB 的浓度为 40 μmol/L

Fig.5 Selectivity of the developed method toward thrombin. Concentration of MB is 40 nmol/L, concentration of TB is 40 nmol/L, and concentrations of bovine serum albumin (BSA), ovalbumin (OVA) and hemoglobin (HB) are all 40 μmol/L respectively

表 2 检测凝血酶的不同方法的比较

Table 2 Comparison of different methods for detection of thrombin

检测方法 Detection method	线性范围 Linear range (nmol/L)	检出限 Detection limit (nmol/L)	Ref.
基于适配体的电化学分析法 Electrochemical detection based on aptamer	40 ~ 100	10	[23]
荧光检测法 Fluorescence detection	0.5 ~ 20	0.18	[24]
基于 G 碱基猝灭分子信标荧光检测法 Fluorescence detection based on guanine-quenching molecular beacon	原文未给出 Not mentioned in original reference	0.81	[18]
基于分子信标的荧光检测 Fluorescence detection based on molecular beacon	0 ~ 30	0.83	[19]
双重猝灭分子信标荧光检测法 Fluorescence detection based on dual quenching molecular beacon	0.4 ~ 40.0	0.18	本工作 This work

法所用探针合成较简单、稳定性较好、成本低。

3.6 血清样品的加标回收实验

取人血清样品,离心后稀释500 倍;取 2 份稀释后的血清样品,分别加入不同浓度水平的凝血酶,利用本方法进行检测(表 3)。两个加标水平的回收率为96.3%和 98.7%,说明本方法具有较高的准确性。

表 3 血清样品中凝血酶的加标回收率

Table 3 Recoveries of thrombin spiked in serum samples

样品 Samples	加入值 Added (nmol/L)	测得值 Found (nmol/L)	回收率 Recovery (n=6, %)	相对标准偏差 RSD (%)
1	3.00	2.89	96.3	3.9
2	30.00	29.61	98.7	3.3

4 结 论

利用 G 碱基和有机猝灭基团对荧光基团的双猝灭作用构建了一种结构简单的基于双重猝灭原理的分子信标,并建立了一种检测凝血酶的简单方法,获得了更低的检出限(0.18 nmol/L)。

References

1 Shen G, Zhang H, Yang C R, Yang Q F, Tang Y L. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(1): 548–551

2 Shi K, Dou B T, Yang J M, Yuan R, Xiang Y. *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 87: 495–500

3 Hassan E M, Willmore W G, Derosa M C. *Nucleic Acid Ther.*, **2016**, 26(6): 335–347

4 Kakoti A, Goswami P. *BBA-Gen. Subjects*, **2017**, 1861(1): 3289–3299

5 Li X L, He Y J, Ma Y Y, Bie Z J, Liu B R, Liu Z. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(19): 9805–9812

6 Nguyen V T, Seo H B, Kim B C, Kim S K, Song C S, Gu M B. *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, 86: 293–300

7 Scoville D J, Uhm T K B, Shallcross J A, Whelan R J. *J. Nucleic Acids*, **2017**: 8979135

8 Vorobyeva M, Vorobjev P, Venyaminova A. *Molecules*, **2016**, 21(12): 1613–1634

- 9 Cai B B, Yang X T, Sun L D, Fan X M, Li L Y, Jin H W, Wu Y, Guan Z, Zhang L R, Zhang L H. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12(44): 8866–8876
- 10 Trapaidze A, Herault J P, Herbert J M, Bancaud A, Gue A M. *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, 78: 58–66
- 11 Zhao Q, Cheng L. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2013**, 405(25): 8233–8239
- 12 Hao L H, Zhao Q. *Microchim. Acta*, **2016**, 183(6): 1891–1898
- 13 Li L D, Zhao H T, Chen Z B, Mu X J, Guo L. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 398(1): 563–570
- 14 Wang G L, Hu X L, Wu X M, Dong Y M, Li Z J. *Microchim. Acta*, **2016**, 183(2): 765–771
- 15 Ma Y, Dai X, Hong T, Munk G B, Libera M. *Analyst*, **2017**, 142(1): 147–155
- 16 ZHANG Song-Bai, ZHENG Li-Ying, HU Xia, SHEN Guang-Yu, LIU Xue-Wen, SHEN Guo-Li, YU Ru-Qin. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2015**, 43(11): 1688–1694
张松柏, 郑丽英, 胡霞, 沈广宇, 刘学文, 沈国励, 俞汝勤. *分析化学*, **2015**, 43(11): 1688–1694
- 17 Zhou H, Yang C, Chen H F, Li X, Li Y D, Fan X L. *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 87: 552–557
- 18 Wang W J, Chen C L, Qian M X, Zhao X S. *Sens. Actuators B*, **2008**, 129(1): 211–217
- 19 ZHONG Zhi-Hong, YANG Xiao-Hai, WANG Ke-Min, TAN Wei-Hong, LI Hui-Min, MENG Xiang-Xian, GUO Qiu-Ping. *Life Sci. Res.*, **2006**, 10(3): 206–209
仲志鸿, 羊小海, 王柯敏, 谭蔚泓, 李惠敏, 孟祥贤, 郭秋平. *生命科学研究*, **2006**, 10(3): 206–209
- 20 Maruyama T, Shinohara T, Hosogi T, Ichinose H, Kamiya N, Goto M, *Anal. Biochem.*, **2006**, 354(1): 8–14
- 21 Datta B, Bier M E, Roy S, Armitage B A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127(12): 4199–4207
- 22 Xiang D S, Zhai K, Wang L Z. *Analyst*, **2013**, 138(18): 5318–5324
- 23 Ikebukuro K, Kiyohara C, Sode K. *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, 20(10): 2168–2172
- 24 Wang Y H, Bao L, Liu Z H, Pang D W. *Anal. Chem.*, **2011**, 83(21): 8130–8137

Detection of Thrombin Using Double Quenching Molecular Beacon

ZHAI Kun^{1,2}, Li Feng-Quan³, SHI Bo-An², XIANG Dong-Shan^{*1,2}

¹(Key Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization of Hubei Province,
Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China)

²(School of Chemical and Environmental Engineering, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China)

³(Medical School, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China)

Abstract A double quenching molecular beacon (MB) with simple structure was designed based on organic quencher and G bases, and a simple detection method for thrombin was developed using this MB. In this MB, FAM and BHQ-1 were selected as fluorophore and organic quencher, three continuous nucleotides with G base were connected with BHQ-1, and the loop of MB was designed as a nucleic acid aptamer of thrombin. In the absence of thrombin, the MB was in the stem-loop structure, the fluorophore FAM was close to BHQ-1 and G bases, the fluorescence of FAM was dual quenched by BHQ-1 and G bases, and the fluorescence signal of FAM was very weak. In the presence of thrombin, MB specifically bound thrombin and formed a G-quadruplex structure. The stem-loop structure of the MB was destroyed, and FAM was separated with BHQ-1 and G bases, leading to recovery of fluorescence of FAM. Under the optimal conditions, the fluorescence intensity of FAM exhibited a good linear relationship with concentration of thrombin in the range of 0.4–40.0 nmol/L, and regression equation was $\Delta I = 24.63C \text{ (nmol/L)} + 13.06$ ($R^2 = 0.9972$) with the detection limit of 0.18 nmol/L (3σ , $n=9$). The average recoveries of this method in serum samples were 96.3%–98.7%, which indicated that the method had high accuracy.

Keywords Double quenching molecular beacon; Thrombin; Fluorescence; Quantitative detection

(Received 17 March 2017; accepted 28 August 2017)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21465010, 31460172).