

基于引物交换反应的非标记荧光探针用于脱嘌呤/脱嘧啶核酸 内切酶 1 的高灵敏检测

王芸花 王乐如 杨力改 陈佳政 杜雨润 侯嘉慧 翟翔
赵旭华* 于保锋*

(山西医科大学基础医学院, 生物化学与分子生物学教研室, 太原 030001)

摘 要 脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 1(Apurinic/aprimidinic endonuclease 1, APE 1)是一种多功能蛋白质,在 DNA 修复和基因表达调控中发挥重要作用。由于 APE 1 在多种癌症中过表达,因此可作为癌症生物标志物,用于辅助临床诊断、指导用药及预后监测。本研究采用引物交换反应(Primer exchange reaction, PER)策略,设计了一种非标记型荧光探针,用于 APE 1 活性的高灵敏检测。当体系中不存在 APE 1 时,催化发夹(Catalytic hairpin, HP)的结构稳定,无 G-四链体(G-quadruplex)生成。此时,游离的硫磺素 T(Thioflavin T, ThT)不发射荧光,体系的背景荧光很低。加入 APE 1 后,催化发夹上的无嘌呤/嘧啶(Apurinic/aprimidinic, AP)位点被特异性识别并切割,断裂生成的短核酸序列可直接作为引物引发 PER 扩增,生成大量 G-四链体。游离的 ThT 嵌入 G-四链体结构并发出荧光,导致传感体系的荧光信号显著增强。PER 扩增反应策略和催化发夹的低背景设计使此探针展现出很高的灵敏度,线性检测范围为 0.001~0.07 U/mL,检出限(3 σ)为 0.0008 U/mL。此外,引物序列可由 APE 1 切割直接生成而不需要额外添加,这不仅提高了反应的特异性,还简化了操作步骤。非标记型荧光信号的使用大大降低了实验成本,实现了 APE 1 的快速检测。利用此荧光探针检测人血清样品中 APE 1 的含量,回收率在 91%~104%之间,表明其在生物酶研究方面拥有巨大的应用潜力。

关键词 脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 1; 引物交换反应; G-四链体; 硫磺素 T; 非标记荧光探针

脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 1(Apurinic/aprimidinic endonuclease 1, APE 1)是一种人体组织中广泛存在的多功能蛋白质,在碱基切除修复和基因表达调控中不可或缺^[1-2]。作为细胞中重要的 DNA 修复酶, APE 1 识别并催化切割双链 DNA 上的无嘌呤/嘧啶(Apurinic/aprimidinic, AP)位点并产生缺口,然后通过聚合和连接反应完成修复,从而确保基因组完整^[3]。此外, APE 1 还可激活氧化应激反应中几种重要的转录因子,如 p53、AP-1、NF- κ B、HIF- α 和 PAX-5 等,进而调控基因表达^[4]。然而,这种在正常生理过程中发挥关键作用的酶,在肿瘤细胞中却呈现出异常的高表达。这种异常表达不仅通过促进细胞增殖、抑制细胞凋亡和增强细胞侵袭能力来促进多种肿瘤的生长和扩散,还通过调控转录因子活性,影响肿瘤细胞对放化疗的敏感性,进而降低治疗效果^[5-8]。因此, APE 1 可作为重要的癌症标志物辅助临床诊断、指导用药及预后监测。

传统的 APE 1 活性测定方法包括酶联免疫吸附分析法、电化学分析方法和化学发光免疫分析方法。这些方法具有灵敏度高、特异性好且结果可靠等优势,但存在操作复杂、耗时长和成本高等缺点^[9-11]。荧光分析法具有快速、高时空分辨率以及仪器操作相对简单等优点,引起了广泛关注^[12-14]。Liu 等^[13]将滚环扩增反应(RCA)与 G-四链体(G-quadruplex)相结合设计了一种荧光探针,用于 APE 1 的灵敏检测; Huang 等^[14]利用聚合酶和内切酶共同作用的等温扩增技术与 G-四链体相结合开发了一种可检测 APE 1

2024-12-05 收稿; 2025-02-19 接受

山西省自然科学基金项目(Nos. 202303021221139, 202203021222259)、中国博士后科学基金项目(No. 2024M761887)和山西医科大学细胞生理学教育部重点实验室开放基金项目(No. CPOF202301)资助。

* E-mail: zhaoxuhua1985@126.com; shanxiyangcheng@126.com

的高灵敏传感器。上述传感器虽然具有较高的灵敏度,但在设计过程中需要 T4 DNA 连接酶、核酸外切酶 I (Exonuclease I, Exo I) 和核酸外切酶 III (Exonuclease III, Exo III) 的共同作用形成环状模板,或需要内切酶的辅助进行下一轮扩增。多种酶的联合使用不仅会引起非特异性识别和假性信号的风险,还会增加检测的成本和操作的复杂性。因此,发展灵敏度高、特异性好且操作简单的 APE 1 检测技术具有非常重要的意义。

引物交换反应(Primer exchange reaction, PER)策略是一种新颖而强大的等温核酸扩增技术,在新一代荧光放大生物传感器的构建方面展现出巨大的应用前景。该技术以催化发夹(Catalytic hairpin, HP) DNA 为模板,在聚合酶的作用下启动可逆且重复的链置换反应,最终以自主、可编程和等温的方式合成多条特定的单链 DNA^[15]。与滚环扩增等其它扩增技术相比,PER 发夹设计简单,只需一种聚合酶即可实现特异且快速的信号扩增^[16-17]。Xie 等^[18]将 CRISPR/Cas 体系与 PER 技术相结合构建了一种高灵敏的生物探针用于核糖核酸酶 H 检测。Li 等^[19]利用 PER 技术开发了自主 DNA 合成器,用于痕量的鼠伤寒沙门菌检测。这些传感器显著提高了检测的灵敏度和稳定性,但需要复杂的核酸修饰或标记过程。非标记荧光探针无需对信号分子进行标记,具有操作简便、成本低以及可实时监测生物体系动态变化等优势。

利用 PER 技术简洁的设计和有良好的放大能力,本研究构建了一种非标记型的荧光探针,用于 APE 1 活性的快速、高灵敏检测。由于催化发夹中的富 G 序列被全部固定于发夹结构的颈部,且结构稳定,硫磺素 T(Thioflavin T, ThT)游离于溶液中,体系的背景荧光很低。加入 APE 1 后,催化发夹上的 AP 位点被切割,生成的短核酸序列可作为引物引发 PER 扩增,生成大量的 G-四链体。游离的 ThT 嵌入 G-四链体结构并发出荧光,导致体系的荧光信号显著增强。PER 扩增反应策略以及催化发夹的低背景设计使此传感体系展现出较高的灵敏度。此外,PER 扩增不需要额外添加引物,简化了操作步骤,而且非标记型荧光信号的使用降低了实验成本。将本方法用于人血清样本中 APE 1 活性分析,结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

F-4500 荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司); FE-28 pH 计(美国 Mettler-Toledo 公司)。

APE 1、Exo I、Exo III、Bst DNA 聚合酶(Bst DNA polymerase)、脱氧核糖核酸酶 I (Dnase I) 和辣根过氧化物酶(HRP)购自美国 New England Biolabs 公司; ThT、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)和催化发夹(5'-AAGGGTT/dSp/GGGTTAGGGTTAGGGCCCCGTTTTCCGGGCCCTAACCCCTAACCCCTT-3')由生工生物工程(上海)股份有限公司提供; NaCl、MgCl₂、Tris-HCl 缓冲液和牛血清白蛋白(BSA)均购自北京索莱宝科技有限公司。1×NEB 2.1 缓冲液(50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L MgCl₂, 100 μg/mL BSA, pH 7.9, 25 °C)购自美国 New England Biolabs 公司。以上试剂均为分析纯,无需其它处理。实验用水为 MILI-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)制备的超纯水(18.2 MΩ·cm)。

1.2 实验方法

1.2.1 APE 1 活性的检测

将 2 μL 不同浓度的 APE 1、2 μL 催化发夹(10 μmol/L)、2 μL 10×NEB 缓冲液 4 和 4 μL DEPC 水混合均匀。在 37 °C 反应 60 min 后,在 65 °C 加热 20 min 使 APE 1 失活。然后移取 10 μL 上述反应体系、2 μL Bst DNA 聚合酶(1 U/mL)、4 μL 10×ThermoPol 反应缓冲液、4 μL 10×MgSO₄溶液、1 mmol/L dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)各 4 μL 和 2 μL ThT(40 μmol/L)至 EP 管中,补加 DEPC 水至总体积为 40 μL,混匀,于 37 °C 孵育 120 min。反应结束后,继续补加 1×NEB 2.1 缓冲液至总体积为 100 μL; 在激发波长为 425 nm、发射波长为 480 nm 条件下测定体系的荧光强度。

1.2.2 实际样品中 APE 1 的测定

本研究中的血液样本由山西医科大学第一医院提供,并获得了审查委员会的批准和参与者的知情同意。血液样本首先在 4 °C 以 10000 r/min 离心 10 min,获得上层血清,稀释 3 倍,于 65 °C 加热 15 min,使血清中的蛋白酶失活。将不同浓度的 APE 1 加入到上述血清中,并按 1.2.1 节的方法测量荧光强度,计算血清样品中 APE 1 的回收率。

2 结果与讨论

2.1 实验原理

基于 PER 策略的非标记荧光探针设计原理如图 1 所示,靠近催化发夹的 5'端含有 AP 位点,便于目标物 APE 1 的识别; 3'端修饰 Inverted dT 以避免非特异性扩增^[20]; 靠近环状部位含有一段终止序列(3 对 G-C 碱基),用于终止扩增反应。未加入 APE 1 时,催化发夹的结构稳定,处于游离状态的 ThT 不发射荧光,传感体系的背景荧光很低。加入 APE 1 后, APE 1 特异性识别并切割催化发夹上的 AP 位点,断裂生成的短核酸序列(绿色)可作为 PER 扩增的引物。随后,在 Bst DNA 聚合酶的催化作用下,引物利用加入的 dNTP 进行延伸,直至到达终止序列时扩增结束。由于分子内竞争杂交的影响,延长的 DNA 序列移位并折叠成 G-四链体,游离的 ThT 嵌入 G-四链体结构且发出荧光,传感体系的荧光信号显著增强。基于 PER 策略的非标记荧光探针为快速、灵敏测定 APE 1 活性提供了一种新方法。

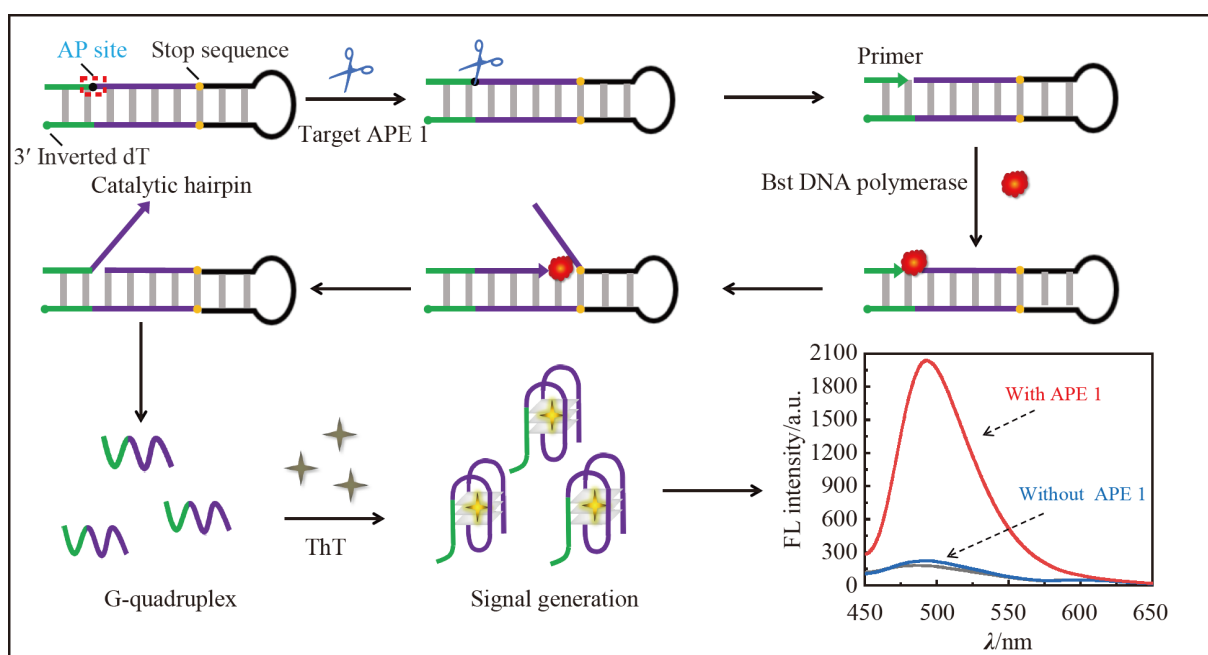


图1 基于引物交换反应(PER)策略的非标记荧光探针用于脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 1(APE 1)活性检测的原理示意图

Fig.1 Principle diagram of label-free fluorescent biosensor based on primer exchange reaction (PER) strategy for detection of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE 1) activity

2.2 传感体系的可行性分析

为了验证此传感体系检测 APE 1 的可行性,考察了不同实验条件下溶液的荧光变化。如图 2A 所示,染料 ThT 游离于溶液中,荧光信号很弱(曲线 a)。加入催化发夹后,溶液的荧光信号几乎与背景信号持平(曲线 b),这表明催化发夹的结构稳定, ThT 不能与之结合。加入 dNTP 和 Bst DNA 聚合酶,此传感体系的荧光信号仍较低(曲线 c)。加入 APE 1 后,此传感体系的荧光信号显著增强(曲线 d),这是由于 APE 1 特异地识别并切割催化发夹上的 AP 位点,断裂生成的短核酸序列直接作为引物引发 PER 扩增,生成大量 G-四链体。游离的 ThT 嵌入 G-四链体结构并发出荧光。如图 2B 所示,加入 APE 1 之前,在紫外光照射下未观察到荧光(管 1); 加入 APE 1 后,观测到明显的荧光(管 2),此结果与传感体系荧光光谱的变化一致。上述结果表明,本传感体系可用于 APE 1 活性检测。

2.3 实验条件的优化

为了使传感体系的检测性能达到最佳,对 dNTP、Bst DNA 聚合酶和 ThT 的浓度以及 PER 扩增反应时间等实验条件进行优化。利用传感体系的荧光强度比值(F/F_0)评价传感体系的性能,其中, F 为存在

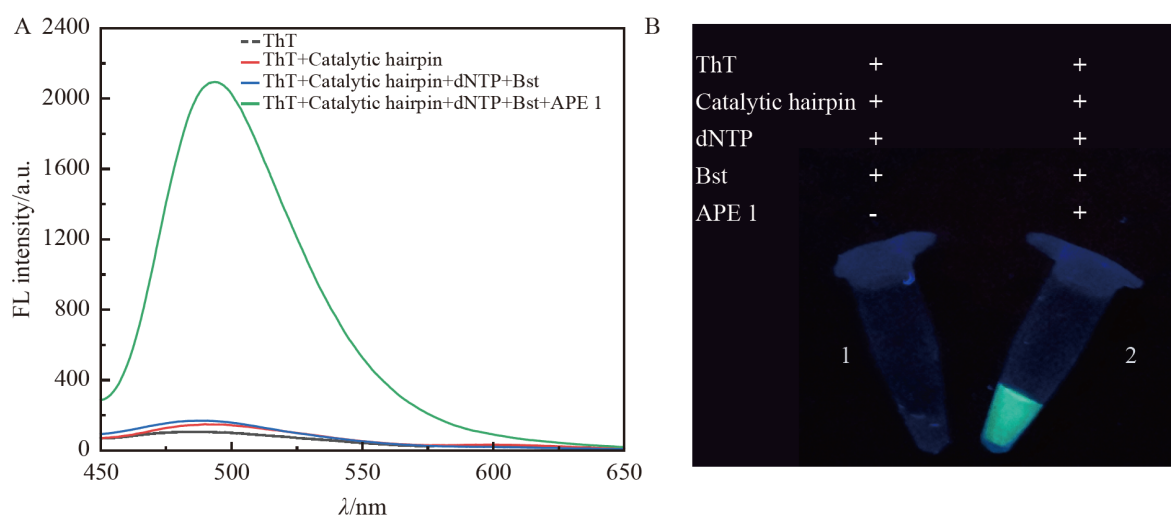


图2 传感体系的可行性分析: (A)不同条件下各物质的荧光响应情况,其中硫磺素 T(ThT)、催化发夹和脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)的浓度分别为 800、200和 40 nmol/L, Bst DNA 聚合酶与 APE 1 的浓度则分别为 1和 0.1 U/mL; (B)加入 APE 1前(管 1)后(管 2)传感体系的紫外光照射图像

Fig.2 Feasibility analysis of sensing system: (A) Fluorescence response of biosensor under different conditions. Concentrations of thioflavin T (ThT), hairpin and deoxy-ribonucleoside triphosphate (dNTP) are 800, 200 and 40 nmol/L, respectively, while Bst DNA polymerase and APE 1 are 1 U/mL and 0.1 U/mL, respectively; (B) Fluorescence images of the biosensor with (Tube 1) and without (Tube 2) APE 1 under UV light irradiation

APE 1 时的荧光强度, F_0 为不存在 APE 1 时的荧光强度。如图 3A 所示,随着 dNTP 浓度增大, F/F_0 逐渐增大,当 dNTP 浓度增至 100 nmol/L 时, F/F_0 达到平台期。Bst DNA 聚合酶浓度对此传感体系性能的影响如图 3B 所示,当 Bst DNA 聚合酶浓度为 1.6 U/mL 时, F/F_0 达到最大值。ThT 浓度对此传感体系性能的影响如图 3C 所示,在 ThT 浓度为 2 μ mol/L 时, F/F_0 达到峰值。PER 扩增反应时间对此传感体系性能的影响如图 3D 所示,随着反应时间延长, F/F_0 逐渐增大,并在 120 min 时达到峰值。此外,由于 K^+ 对 G-四链体结构的形成和稳定有一定影响^[21],考察了 KCl 浓度对此传感体系性能的影响。如图 3E 所示,当 KCl 浓度从 0 增至 10 mmol/L 时, F/F_0 未发生显著变化,说明 K^+ 的加入对传感体系的检测性能基本无影响,这可能由于溶液中的 Na^+ 浓度足以使 G-四链体形成稳定的折叠结构。

将此探针在 4 $^{\circ}$ C 环境下保存不同时间后,测定其对 APE 1 的荧光响应,以评估探针的稳定性。结果如图 3F 所示,探针在 4 $^{\circ}$ C 环境中保存 24 h 后, F/F_0 只略微下降,表明其具有一定的稳定性。

综上所述,本研究选择在传感体系中加入 100 nmol/L dNTP、1.6 U/mL Bst DNA 聚合酶和 2 μ mol/L ThT,反应 120 min 后进行后续实验。

2.4 传感体系的分析性能

在最优实验条件下,评估了此传感体系对不同浓度 APE 1 的响应性能,如图 4A 所示,不存在 APE 1 时,催化发夹的结构稳定,因此 ThT 游离于溶液中,无荧光发射,传感体系的背景荧光很低。随着 APE 1 浓度增大,传感体系的荧光强度随之增强。这主要由于 APE 1 切割催化发夹上的 AP 位点,生成的引物经 PER 扩增后折叠成 G-四链体结构并与 ThT 结合,显著提升了荧光响应。此传感体系的 F/F_0 与 APE 1 浓度的关系如图 4B 所示,当 APE 1 浓度达到 1 U/mL 时, F/F_0 趋于稳定。图 4B 插图为此传感体系检测 APE 1 的校正曲线,线性检测范围为 0.001~0.07 U/mL,线性方程为 $y = 52.06x + 0.91$,相关系数 (R^2) 为 0.995,检出限 (3σ) 为 0.0008 U/mL,与文献报道的标记性荧光传感器(表 1)灵敏度相当甚至更优,这主要归因于发夹探针的低背景设计和 PER 的高效扩增。

2.5 传感体系的选择性

为了考察此传感体系对 APE 1 活性检测的特异性,测定了其在 Exo I、Exo III、Dnase I、HRP 以及 BSA 等干扰物存在时的荧光响应。如图 5 所示,加入目标物 APE 1 时,传感器显示出较高的响应信号 (F/F_0);

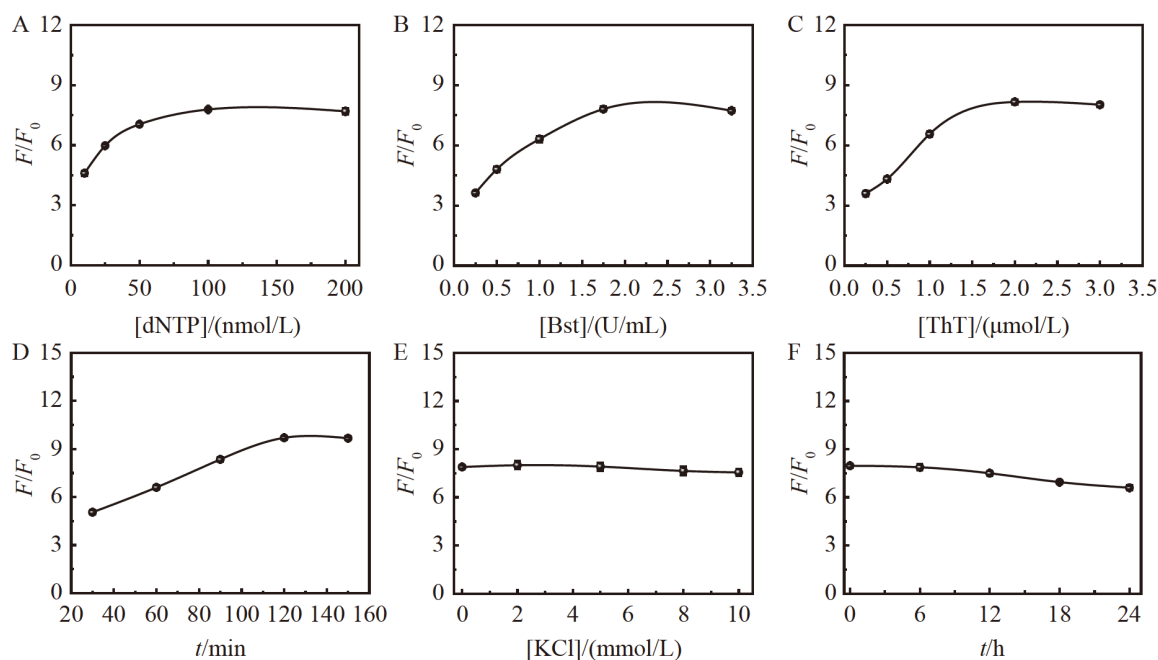


图3 实验条件的优化: (A) dNTP 浓度; (B) Bst DNA 聚合酶浓度; (C) ThT 浓度; (D) PER反应时间; (E) KCl 浓度对传感体系检测性能的影响; (F) 4 °C环境下探针的稳定性测试结果。F 和 F_0 分别为存在和不存在 APE 1 时传感体系的荧光强度,误差棒表示 3 次重复实验的标准差

Fig.3 Optimization of experiment condition: (A) dNTP concentration; (B) Bst DNA polymerase concentration; (C) ThT concentration; (D) PER reaction time; (E) Impact of KCl concentration on detection performance of sensing system; (F) Stability testing results of probe at 4 °C. F and F_0 are the fluorescence intensities of sensing system in the presence and absence of APE 1, respectively. Error bars represent the standard deviation from 3 experiments

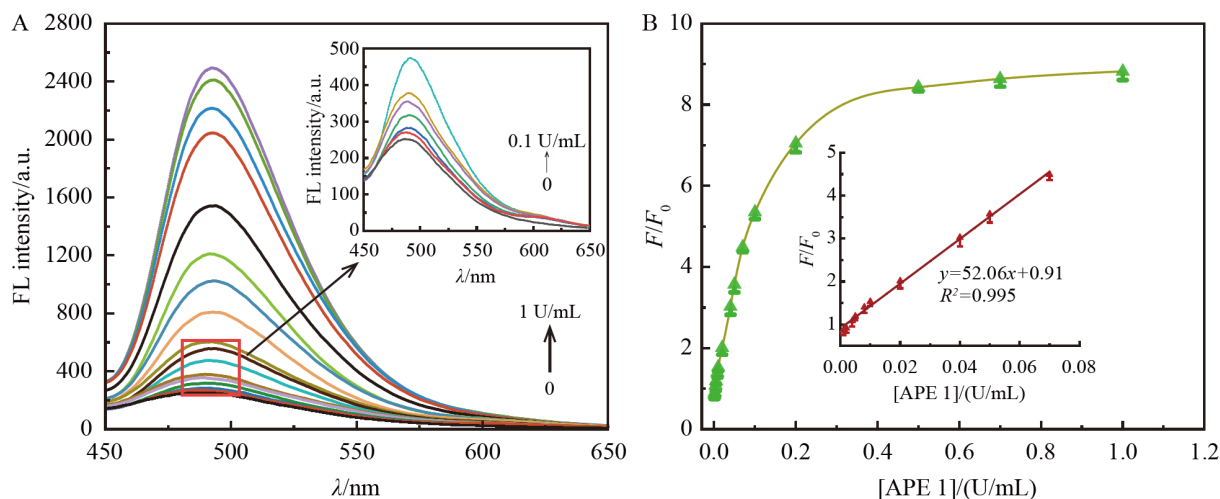


图4 传感体系的分析性能: (A)加入不同浓度 APE 1 时传感体系的荧光发射光谱; (B)传感体系的荧光强度比值与 APE 1 浓度的关系,插图为传感体系的校正曲线

Fig.4 Analytical performance of the sensing system: (A) Fluorescence emission spectra of sensing system to different concentrations of APE 1; (B) Relationship between fluorescence intensity ratio of sensing system and concentration of APE 1, inset shows calibration curve

加入其它干扰物时,传感器的荧光响应与空白样品相近,上述结果表明,此传感体系对 APE 1 具有良好的选择性。

2.6 实际样品中 APE 1 的测定

采用本方法对人血清样品中的 APE 1 活性进行测定。向稀释 3 倍的人血清样品中添加不同浓度的

表 1 不同 APE 1 传感体系检测性能的比较

Table 1 Comparison of detection performance of different APE 1 sensing systems

检测方法 Detection method	线性范围 Linear range/ (U/mL)	检出限 Detection limit/ (U/mL)	参考文献 Ref.
基于 CRISPR 级联扩增的荧光法 Fluorescence method based on CRISPR cascade amplification	1.0×10 ⁻⁶ ~10	2.51×10 ⁻⁶	[5]
基于 AuCu合金和氧化石墨烯的表面增强拉曼散射法 Surface-enhanced Raman scattering (SERS) based on AuCu alloy and graphene oxide	0.002~20	0.001	[22]
基于分子门控超支化滚环扩增的荧光法 Fluorescence method based on molecular gated hyper-branched rolling circle amplification (HRCa)	0.0001~0.2	0.0001	[23]
基于荧光核酸适配体的荧光法 Fluorescence method based on fluorescence aptamer-centered hybridization chain reaction (FAC-HCR)	0.5~16	0.1174	[24]
基于双足 DNA 纳米行走器的荧光法 Fluorescence based on bipedal DNA nanowalkers	0.02~1	0.01	[25]
基于随机双足双 DNA 行走器的荧光法 Fluorescence based on stochastic bipedal dual-DNA walkers	0.001~10	0.001	[26]
基于分子信标的荧光法 Fluorescence based on molecular beacons	0.01~40	0.0026	[27]
基于引物交换反应的非标记荧光探针法 Label-free fluorescence probe method based on PER	0.001~1	0.0008	本方法 This work

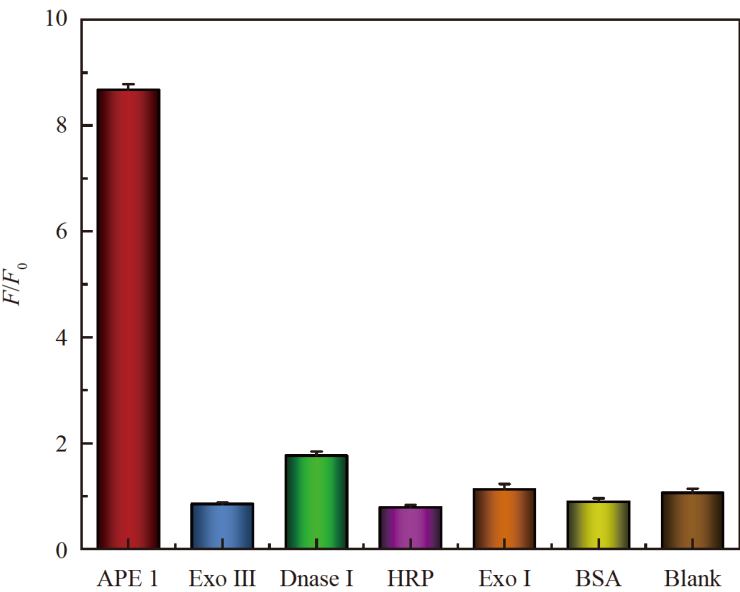


图5 传感体系的特异性考察：APE 1 的浓度为 0.2 U/mL,BSA 的浓度为 2 μg/mL,其它酶的浓度为 2 U/mL,误差棒表示3次实验的标准差。HRP：辣根过氧化物酶；BSA：牛血清白蛋白

Fig.5 Investigation of specificity of the sensing system. Concentrations of APE 1 and BSA are 0.2 U/mL and 2 μg/mL, respectively, and other enzymes are 2 U/mL, respectively. Error bars represent the standard deviation of 3 experiments. HRP: horse radish peroxidase; BSA: bovine serum albumin

APE1,测定结果如表 2 所示,血清样品中 APE 1 的加标回收率为91%~104%,相对标准偏差<5.2%,表明此传感体系可用于实际样品中 APE 1 活性分析。

表 2 人血清样品中 APE 1 的测定结果
Table 2 Detection results of APE 1 in human serum samples

样本序号 No.	加入值 Added/(U/mL)	测得值 Found/(U/mL)	回收率 Recovery/%	相对标准偏差 Relative standard deviation/ (%,n=3)
1	0.005	0.0046	92	4.8
	0.03	0.0292	97	2.8
	0.07	0.0731	104	0.9
2	0.005	0.0046	92	3.6
	0.03	0.0274	91	5.1
	0.07	0.0682	97	4.7

3 结论

基于 PER 扩增策略构建了一种非标记型荧光探针,用于 APE 1 活性的高灵敏测定。催化发夹的低背景设计以及 PER 的高效扩增使此探针展现出很高的灵敏度,检出限低至 0.0008 U/mL。此外,PER 扩增不需额外添加引物,简化了操作步骤,而且非标记型荧光信号的使用大大降低了实验成本。将本方法用于人血清样本中 APE 1 活性分析,结果令人满意。

References

[1] OLIVEIRA T T, COUTINHO L G, DE OLIVEIRA L O A, TIMOTEO A R S, FARIAS G C, AGNEZ-LIMA L F. *Front. Immunol.* , 2022, 13: 793096.

[2] FANG S M, CHEN L, ZHAO M P. *Anal. Chem.* , 2015, 87(24): 11952-11956.

[3] ALMOHDAR D, MURCIA D, TANG Q, ORTIZ A, MARTINEZ E, PARWAL T, KAMBLE P, ÇAĞLAYAN M. *J. Biol. Chem.* , 2024, 300(6): 107355.

[4] ZHAN Xiao-Zhen, ZHANG Qing-Yuan, DI Hao-Nan, YAN Xiao-Mei. *Chin. J. Anal. Chem.* , 2024, 52(10): 1390-1402. 詹小贞, 张清源, 底浩楠, 颜晓梅. *分析化学*, 2024, 52(10): 1390-1402.

[5] ZHANG L F, LUO S H, FAN R, LI R X, LI W B, CHEN S T, LAN F, ZHU Y T, JI T T, ZHANG Y, LI L. *Talanta*, 2024, 280: 126773.

[6] SIQUEIRA P B, RODRIGUES M M D, DE AMORIM I S S, DA SILVA T G, OLIVEIRA M D, RODRIGUES J A, DA FONSECA A D, MENCALHA A L. *Mol. Biol. Rep.* , 2024, 51(1): 47.

[7] ZHOU J, WEI Z, YANG C, JIA D, PAN B, ZENG Y, SUN D, YU Y. *Transl. Oncol.* , 2023, 36: 101749.

[8] CHEN L, LAI J, DONG S, LIU W, ZHANG X, YANG H. *Anal. Chem.* , 2025, 97(1): 382-391.

[9] WEI X, LI Y B, LI Y, LIN B C, SHEN X M, CUI R L, GU Y J, GAO M, LI Y G, ZHANG S. *J. Cancer*, 2017, 8(8): 1492-1497.

[10] MOU J Y, ZHANG H P, ZHANG L H, ZHANG B B, LIU J J, ZHENG S S, KOU Q N, WANG H, SU X, GUO S J, KE Y G, ZHANG Y W. *Small*, 2024, 20(33): e2400963.

[11] LI C C, LIU W X, HU J, ZHANG C Y. *Chem. Sci.* , 2019, 10(37): 8675-8684.

[12] PENG Kong-Hao, PENG Wei, BAI An-Qi, WANG Ling-Nan, ZHAO Wei-Xin, WU Yue, GUO Wen, LI Shu-Rong, LUO Li-Xia, MENG Pei-Jun. *Chin. J. Anal. Chem.* , 2024, 52(5): 685-694. 彭孔浩, 彭微, 白安琪, 王凌男, 赵伟馨, 武玥, 郭文, 李淑荣, 罗利霞, 孟佩俊. *分析化学*, 2024, 52(5): 685-694.

[13] LIU B R, YANG Z Z, HUANG T, LI M M, DUAN W J, XIE B P, CHEN J X, DAI Z, CHEN J. *Talanta*, 2022, 244: 123404.

[14] HUANG Y F, MA Y F, LI Y, XIONG M, LI X J, ZHANG L L, ZHAO S L. *New J. Chem.* , 2017, 41(5): 1893-1896.

[15] LUO M, LAN F, LI W B, CHEN S T, ZHANG L F, SITU B, LI B, LIU C C, PAN W L, GAO Z W, ZHANG Y, ZHENG L. *Anal. Chim. Acta*, 2023, 1283: 341824.

[16] ZHANG Y, LIU M H, WANG X Y, ZHU W C, LI C C, ZHANG C Y. *Sens. Actuators, B*, 2024, 404: 135304.

[17] ZHOU H Y, LIU T T, WANG J, LIU M L, LEI Y Y, TAN X H, WANG R H, LUO X J, CHEN Y Q. *J. Anal. Sci. Technol.* , 2023, 14(1): 25.

[18] XIE Z W, CHEN S Y, ZHANG W X, ZHAO S H, ZHAO Z X, WANG X Y, HUANG Y Q, YI G. *Biosens. Bioelectron.* , 2022, 206: 114135.

[19] LI Q, ZHANG M, ZHANG Q, ZHU Z, GUO Z, LI J, XU W, ZHU J, YAO Y, LI Z, WANG Y, HUANG J, LIU S. *Talanta*, 2023, 252: 123833.

- [20] DYRKHEEVA N S, LEBEDEVA N A, LAVRIK O I. *Biochemistry*, 2016, 81(9): 951-967.
- [21] REN Lin-Jiao, XUE Meng-Xiao, CHEN Qing-Hua, WEI Ming-Hang, ZHANG Pei, QIN Zi-Rui, YAN Yan-Xia, JIANG Li-Ying. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2023, 51(6): 962-971.
任林娇, 薛梦晓, 陈青华, 魏铭航, 张培, 秦自瑞, 闫艳霞, 姜利英. *分析化学*, 2023, 51(6): 962-971.
- [22] LI J, HENG H, LV J, JIANG T, WANG Z, DAI Z. *Small*, 2019, 15(48): e1901506.
- [23] KANG Q, YANG X Y, DU Y M, QI Y X, HE Z Q, XIANG H. *Microchem. J.*, 2023, 191: 108880.
- [24] LIU M X, TAN Y J, ZHOU C, FU Z M, HUANG R, LI J, LI L. *Biosensors*, 2024, 14(6): 274.
- [25] LV M M, LIU J W, YU R Q, JIANG J H. *Chem. Sci.*, 2020, 11(38): 10361-10366.
- [26] LIU Q Y, ZHANG Q D, MAO Y, SHENG W B, YANG Z, HU J H, ZHOU X D, WEN Z C, LI Y, WANG W, PENG C Y, WANG H Z. *Talanta*, 2024, 280: 126758.
- [27] HAN Y L, WANG Y H, ZHOU F Y, JIANG Y Y, LIU F. *Sens. Actuators, B*, 2021, 355: 131258.

Label-free Fluorescence Probe Based on Primer Exchange Reaction for High Sensitivity Detection of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1

WANG Yun-Hua, WANG Le-Ru, YANG Li-Gai, CHEN Jia-Zheng, DU Yu-Run, HOU Jia-Hui,
ZHAI Xiang, ZHAO Xu-Hua*, YU Bao-Feng*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Shanxi Medical University,
Taiyuan 030001, China)

Abstract Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE 1) is a multifunctional protein that plays important roles in DNA repair and regulation of gene expression. Because APE 1 is overexpressed in various cancers, it can serve as a cancer biomarker for aiding clinical diagnosis, guiding therapy, and monitoring prognosis. On this basis, a label-free fluorescent probe was designed based on the primer exchange reaction (PER) strategy for highly sensitive detection of APE 1 activity. In the absence of APE 1, the structure of catalytic hairpin (HP) was stable and could not form G-quadruplex. Therefore, the background fluorescence of this sensing system was very low due to the dissociation of thioflavin T (ThT). In the presence of APE 1, the apurinic/apyrimidinic (AP) site of HP was cleaved by APE 1 and a short nucleic acid fragment that acted as a primer to initiate PER was generated. After PER reaction, a large number of G-quadruplex were produced, which could specifically bind with ThT and resulted in significant increase of fluorescence signal. The combination of low background design of HP and PER amplification made this biosensor had high sensitivity with a detection limit (3σ) of 0.0008 U/mL. Furthermore, the primer sequence was directly generated by the cleavage of APE 1 without additional addition, which not only increased the specificity of the reaction, but also simplified the experiment procedure. Moreover, the use of label-free fluorescence signal reduced the cost of the experiment, and realized rapid detection of APE 1. Finally, this sensor was used to detect APE 1 in human serum samples with spiked recoveries of 91%–104%, proving great potential in study of biological enzyme.

Keywords Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1; Primer exchange reaction; G-quadruplex; Thioflavin T; Label-free fluorescence probe

(Received 2024-12-05; accepted 2025-02-19)

Supported by the Natural Science Foundation of Shanxi Province, China (Nos. 202303021221139, 202203021222259), the China Postdoctoral Science Foundation (No. 2024M761887) and the Open Fund from Key Laboratory of Cellular Physiology (Shanxi Medical University), Ministry of Education, China (No. CPOF202301).