

基于新型发夹核酸探针和G-四链体/血红素脱氧核酶的多功能生物传感器

王蕾 宋吉祥 刘兴奋* 黄艳琴 范曲立

(南京邮电大学, 有机电子与信息显示国家重点实验室, 江苏省生物传感材料与技术重点实验室,
信息材料与纳米技术研究院, 南京 210023)

摘 要 以发夹核酸探针(HP)为识别元件,基于靶介导的 DNA 构象转换,构建了一种用于检测血红素和血红蛋白的荧光“turn-on”模式的生物传感器。以游离 HP 为分子信标探针,供体与受体之间可发生高效荧光共振能量转移,导致荧光猝灭;当探针的富 G 序列在血红素诱导下形成稳定的 G-四链体/血红素复合物时,供体与受体之间的距离拉大,荧光信号恢复。荧光法对血红素和血红蛋白的检出限分别为 283 和 109 pmol/L。进一步,基于 G-四链体/血红素复合物的类过氧化物酶活性以及 L-半胱氨酸对酶活性的抑制,实现了对 L-半胱氨酸的可视化分析,检出限为 3.6 $\mu\text{mol/L}$,低于细胞内半胱氨酸的正常水平(30~200 $\mu\text{mol/L}$)。这种多功能生物传感平台具有检测快速、简便和灵敏的优点,在生物分析、药物筛选和疾病诊断等领域具有潜在的应用价值。

关键词 G-四链体;脱氧核酶;血红素;血红蛋白;生物传感器

脱氧核酶(DNAzyme)是 20 世纪 90 年代发现的一类具有靶标识别能力和催化功能的单链 DNA 分子。迄今为止,已发现十余种不同功能的 DNAzyme。其中,8-17 DNAzyme 是研究最多的脱氧核酶,与 10-23 DNAzyme 都具有识别并切割 RNA 的功能^[1];Cu²⁺依赖性 DNAzyme 具有切割 DNA 底物的功能^[2];E47 DNAzyme 可催化 DNA 之间的连接反应^[3];G-四链体/血红素 DNAzyme 具有类过氧化物酶活性,可催化底物显色或发光反应^[4-5];UV1C DNAzyme 具有类似光解酶的活性,可使胸腺嘧啶二聚体发生解聚^[6]。在这些功能各异的 DNAzymes 中,G-四链体/血红素 DNAzyme 因具有良好的稳定性、较高的特异性和酶活性而备受关注。G-四链体是 G-四链体/血红素 DNAzyme 的关键组成部分,在 K⁺或 Na⁺诱导下,富含鸟嘌呤(Guanine, G)的 DNA 序列可形成 G-四链体结构,进而与血红素结合形成具有酶活性的 G-四链体/血红素 DNAzyme。其中,G-四链体是由多个 G4 片层通过碱基之间的 π - π 堆积作用构成;G4 片层可由富含串联重复 G 序列的 DNA 构成,根据 DNA 链的长短不同,可形成分子内或分子间的 G4 片层^[7]。近年来,G-四链体/血红素 DNAzyme 已在生物传感、生物成像和疾病诊疗等领域得到广泛研究和应用^[8-11]。

血红素是一种天然的铁卟啉化合物,作为血红蛋白的辅基,对人体血液中氧气的运输具有重要作用。血红素也是肌红蛋白、细胞色素和过氧化物酶、过氧化氢酶等的辅基,参与细胞的电子传递和能量产生等多种生物化学反应。此外,血红素也是临床重要的补铁药物之一。因此,对血红素的准确定性和定量分析对疾病诊断与治疗、生物药物的研发等具有重要意义。目前,已报道了多种血红素的分析方法,包括分光光度法^[12-13]、化学发光法^[14]和电化学法^[15]等。其中,荧光分光光度法灵敏度高、操作简便、检测时间短,已得到普遍认可和应用。目前,对血红素的荧光检测主要基于两种机制:利用血红素对发光纳米材料荧光的特异性猝灭机制,以及利用各种核酸探针与血红素之间的特异性结合机制。研究者分别报道了具有荧光发射特性的石墨相氮化碳纳米片^[12]、碳纳米点^[16]和金纳米团簇^[17],利用靶分子介导的荧光猝灭,实现了血红素的简便、快速检测,检出限分别为 0.15、0.25 和 0.43 nmol/L。这些方法特异性强、选择性高,但灵敏度尚显不足;另外,“turn-off”模式的荧光检测具有一定的局限性。与人工合成纳米材料相

2021-12-15 收稿;2024-07-04 接受

江苏高校优势学科建设工程项目(No. YX030003)和南京邮电大学科研项目(Nos. NY222151, NY221091)资助

* E-mail: iamxfliu@njupt.edu.cn

比, DNA 作为一种被广泛使用的纳米生物材料,具有可精确合成、稳定性好、容易标记等优点,而且 DNAzyme 具有较高的催化活性,可实现血红素的灵敏检测,因而在多个领域均显示出良好的实用性^[13,18]。

血红蛋白(Hemoglobin, Hb)是生物体内红细胞的重要组成部分,主要负责氧气的携带和运输,血红素辅基是血红蛋白能够携氧的关键。血红蛋白浓度异常会导致某些疾病发生,例如贫血和白血病与血红蛋白浓度降低有关,而心血管病和糖尿病与糖化血红蛋白水平升高有关^[19-22],因此,对人体内血红蛋白浓度的监测具有重要意义。临床上使用最广泛的血红蛋白检测方法为比色法,需要将血红蛋白转变为稳定的血红蛋白衍生物再进行检测。近年报道的一些新方法,如电化学方法^[23-24]、表面等离子体共振^[25-26]和荧光法^[27-30]等,具有较高的选择性、灵敏度和实用性。上述方法的不足之处在于不能直接对血红蛋白进行检测^[30],需要用蛋白酶水解释放出血红素辅基,增加了检测成本;而基于荧光猝灭机制的方法容易受到温度和pH 值等因素的影响^[31-32]。因此,迫切需要开发响应快、准确度高、成本低、操作简便的血红蛋白检测新方法。

半胱氨酸(*L*-Cys)是一种重要的含巯基的氨基酸,参与多种含硫化合物的生物合成,与细胞内的新陈代谢过程密切相关。*L*-Cys 还参与蛋白质的折叠、半胱氨酸蛋白酶的催化以及生理信号的转导等过程。*L*-半胱氨酸水平异常会引起一系列生理疾病,如生长迟缓、毛发褪色、肝脏损伤、关节炎和阿尔茨海默病等^[33-35]。因此,开发高效检测 *L*-Cys 的新方法具有重要的临床意义。目前,用于检测 *L*-半胱氨酸的方法主要有光谱法^[36-37]、毛细管电泳法^[38]、高效液相色谱法^[39]和电化学发光法^[40]等。然而,这些方法需要昂贵的设备,操作复杂,样品制备过程较繁琐,普适性不佳。近年来,研究者报道了多种具有类过氧化物酶活性的纳米材料,如碳纳米点^[36]、金属@金属氧化物纳米笼^[41]、金属氧化物填充聚吡咯纳米管^[42]和氧化钴纳米管^[38]等,为 *L*-Cys 的检测提供了新思路。

本研究利用富 G 发夹核酸探针,构建了一种简便、快速和高灵敏的光学方法用于血红素和血红蛋白的检测。紫外-可见吸收光谱分析结果表明,此核酸探针与血红素之间发生了特异性相互作用。基于此,利用 G-四链体/血红素 DNAzyme 的类过氧化物酶活性,成功实现了 *L*-Cys 的快速比色检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

RF-6000 荧光分光光度计和 UV-3600 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); PHS-2C 型实验室 pH 计(上海今迈有限公司); K30 干式恒温器(奥盛仪器有限公司)。

血红素(上海昂一生物科技有限公司); *L*-Cys、*L*-丝氨酸(*L*-Ser)、*L*-谷氨酸(*L*-Glu)、牛血清白蛋白(BSA)和甘氨酸(上海惠兴生化试剂公司); 原卟啉 IX(PPIX, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 血红蛋白、溶菌酶(Lys)、*L*-抗坏血酸和叶酸(上海生工生物工程公司); 细胞程序性死亡蛋白配体 1(PD-L1, 北京义翘神州科技有限公司); 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)和过氧化氢(阿拉丁生化科技有限公司)。实验用水为超纯水(电阻率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$),由 Mill-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司)制备。所用磷酸盐缓冲溶液(PB)成分为 $0.55 \text{ mmol/L MgCl}_2$ 、 137 mmol/L NaCl 、 2.7 mmol/L KCl 、 $10 \text{ mmol/L Na}_2\text{HPO}_4$ 和 $1.8 \text{ mmol/L KH}_2\text{PO}_4$, pH=7.4。DNA 探针(HP)由上海生工生物工程公司合成,采用 HPLC 纯化,其寡核苷酸序列为 5'-BHQ1-TA CAGGTTCTGGGGGG TGGCTGGGGAACCTGTT-FAM-3',根据文献^[43]的方法设计。

1.2 实验方法

1.2.1 血红素的检测

向 $36 \mu\text{L}$ PB 中加入 $4 \mu\text{L}$ HP 溶液($2 \mu\text{mol/L}$)和 $20 \mu\text{L}$ 血红素($8 \mu\text{mol/L}$), 37°C 反应 30 min , 补充缓冲溶液至总体积为 $400 \mu\text{L}$, 测定荧光光谱。激发波长 480 nm , 发射波长 $490\sim 650 \text{ nm}$ 。后续实验中,待测样品的体积均为 $20 \mu\text{L}$ 。特异性实验中,用 $100 \mu\text{mol/L}$ 的原卟啉 IX、*L*-Ser、*L*-Glu 和 *L*-Cys 各 $20 \mu\text{L}$ 作为阴性对照。模拟复杂体系(Mix)由浓度均为 $8 \mu\text{mol/L}$ 的上述 4 种物质混合而成,体积各为 $20 \mu\text{L}$ 。

1.2.2 血红素/HP体系吸收光谱的测定

将 $4 \mu\text{L}$ 浓度为 0、10、20、30 和 $40 \mu\text{mol/L}$ 的 HP 溶液分别加入到 $20 \mu\text{L}$ $80 \mu\text{mol/L}$ 血红素中,于 37°C 反应 30 min , 补充 PB 溶液至终体积为 $400 \mu\text{L}$, 测定紫外-可见吸收光谱。

1.2.3 血红蛋白的检测

血红蛋白检测的实验方法及过程与血红素检测相同。不同之处在于特异性实验中的阴性对照为 BSA、Lys 和 PD-L1, 浓度均为 8 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2.4 L-Cys 的检测

在 HP (4 μL , 2 $\mu\text{mol/L}$) 和血红素 (20 μL , 8 $\mu\text{mol/L}$) 反应后的溶液中, 加入 100 μL L-Cys (浓度分别为 0、18、36、72、180、720 和 1440 $\mu\text{mol/L}$)。室温反应 2 min 后, 加入体积各为 100 μL 的 TMB (10 mmol/L)、 H_2O_2 (50 mmol/L) 和 HAc-NaAc 缓冲溶液 (pH=4.2), 37 $^\circ\text{C}$ 反应 20 min 后, 用肉眼观察并拍照, 然后测定紫外-可见吸收光谱, 建立样品吸收值随 L-Cys 浓度变化的标准曲线。特异性实验中, 以浓度均为 1440 $\mu\text{mol/L}$ 的 Gly、L-Glu、L-Ser、叶酸和 L-抗坏血酸作为阴性对照进行实验。

2 结果与讨论

2.1 传感策略

基于发夹核酸探针 HP 和 G-四链体/血红素 DNAzyme 的多功能生物传感原理如图 1 所示。HP 为含有串联重复 G 序列的 DNA, 末端分别标记荧光基团 (FAM) 和猝灭基团 (BHQ1) 构成分子信标。HP 处于游离状态时, 由于 5' 末端和 3' 末端的互补碱基之间的氢键配对, 形成稳定的发夹结构。此时, FAM 和 BHQ1 相互靠近, 发生高效的荧光共振能量转移 (Föster resonance energy transfer, FRET), FAM 的荧光被猝灭。靶标存在时, 血红素诱导探针 HP 形成 G-四链体并与之结合成稳定的血红素/G-四链体复合物, 此时 FAM 与 BHQ1 相互远离, 不能发生 FRET, FAM 的荧光恢复。通过监测分子信标探针的荧光变化, 可实现对血红素及含血红素的蛋白质的特异性检测。基于 G 四链体/血红素复合物的类过氧化物酶活性以及 L-半胱氨酸对酶活性的抑制, 可进一步实现对 L-Cys 的可视化检测。不存在 L-Cys 时, 底物 TMB 与 H_2O_2 在类过氧化物酶的催化作用下生成的产物的吸收峰位于 652 nm 处, 溶液呈蓝色; 当 L-半胱氨酸存在时, 类过氧化物酶活性被抑制, 溶液呈无色, 没有明显的吸收峰。

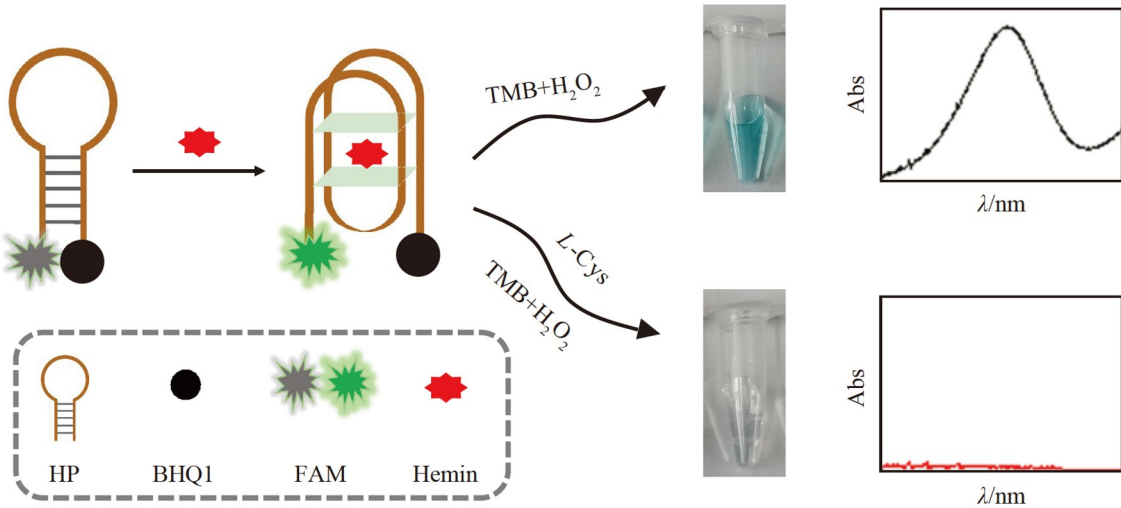


图1 基于发夹核酸探针 HP 和 G-四链体/血红素 DNAzyme 的多功能生物传感器原理图

Fig.1 Mechanism of the multifunctional biosensor based on hairpin probe (HP) and G-quadruplex/hemin DNAzyme
FAM, 3'末端标记荧光素 (Fluorescein); TMB, 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine); BHQ1, 黑洞猝灭剂 1 (Black hole quencher 1); L-Cys, L-半胱氨酸 (L-Cysteine)

2.2 基于HP的血红素检测

首先, 对基于分子信标探针的血红素检测策略的可行性进行了研究。如图 2A 所示, 空白组中分子信标探针的荧光发射较弱, 这是由于形成了特殊的发夹结构, FAM 的荧光被 BHQ1 高效猝灭。靶标血红素存在时, 血红素诱导分子信标探针形成 G-四链体并与其结合成稳定的血红素/G-四链体复合物, 荧光供体与受体之间的距离显著增大, 不能发生 FRET, FAM 的荧光恢复, 荧光强度达到空白组的 4.1 倍。为了

验证血红素与 HP 之间的特异性结合,对结合 HP 前后的血红素的吸收光谱进行分析。如图 2B 所示,向血红素(4 $\mu\text{mol/L}$)中加入不同浓度的 HP(0.1、0.2、0.3 和 0.4 $\mu\text{mol/L}$)后,血红素的吸收峰增强并与 HP 浓度呈正相关。此外,还观察到血红素本身的吸收峰位于 394 nm,与 HP 形成复合物后吸收峰红移至 402 nm,并且在 418 nm 出现等吸光点,说明血红素与发夹探针 HP 之间确实发生了相互作用。

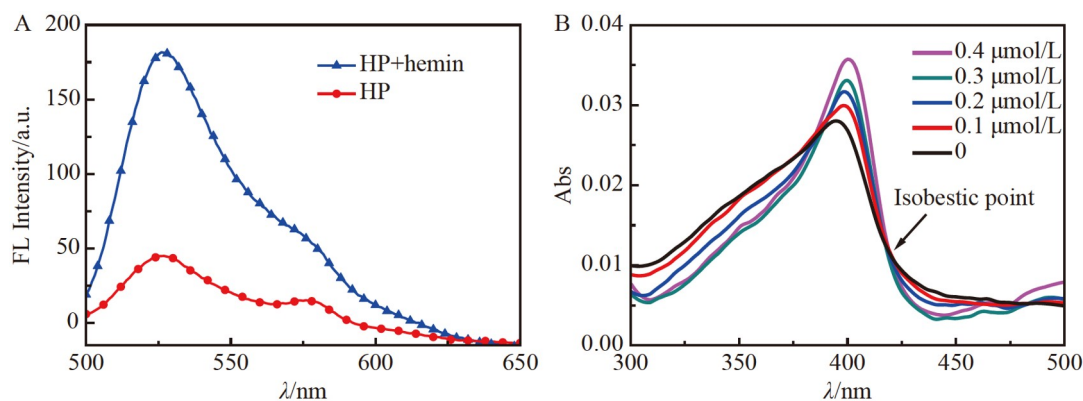


图2 (A)检测血红素的荧光光谱图;(B)血红素溶液中加入 HP 探针前后的紫外-可见吸收光谱图(HP 浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4 $\mu\text{mol/L}$)

Fig.2 (A) Fluorescence spectra for detection of hemin; (B) UV-Vis absorption spectra of hemin before and after addition of different concentrations of HP (0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 $\mu\text{mol/L}$)

为了考察本方法对血红素检测的特异性,采用 HP 探针针对非靶标物质进行了分析。PPIX 是血液中的主要卟啉类物质,是使血红素呈红色的主要物质,也是血红素生物合成途径中的前体。*L*-Ser、*L*-Glu 和 *L*-Cys 是 3 种合成蛋白质的重要氨基酸。靶标血红素浓度为 400 nmol/L,对照组的浓度远高于血红素,均为 5 $\mu\text{mol/L}$ 。如图 3A 所示,血红素体系的荧光强度远高于空白组 and 对照组。含血红素、PPIX、*L*-Ser、*L*-Glu 和 *L*-Cys 体系的荧光强度与空白组荧光强度的比值分别为 2.79、1.53、1.12、1.28 和 1.22,表明这种富 G 的发夹探针对血红素具有很强的结合能力,而对非血红素物质的结合非常弱。另外,也观察到含 PPIX 体系的荧光信号高于含氨基酸体系的荧光信号,这是由于 PPIX 具有卟啉结构,也可与富 G 核酸进行结合^[44]。值得注意的是,含氨基酸组的荧光强度略高于空白组,可能是由于核酸与氨基酸之间的静电吸引使发夹结构发生改变,能量供体与受体之间的距离增大,从而使得荧光增强。为了考察本方法的选择性,对复杂混合体系(Mix)中的血红素进行了分析(图 3B)。结果表明,复杂体系中的血红素仍然具有很强的荧光响应,非靶标物质的存在不影响血红素的检测。

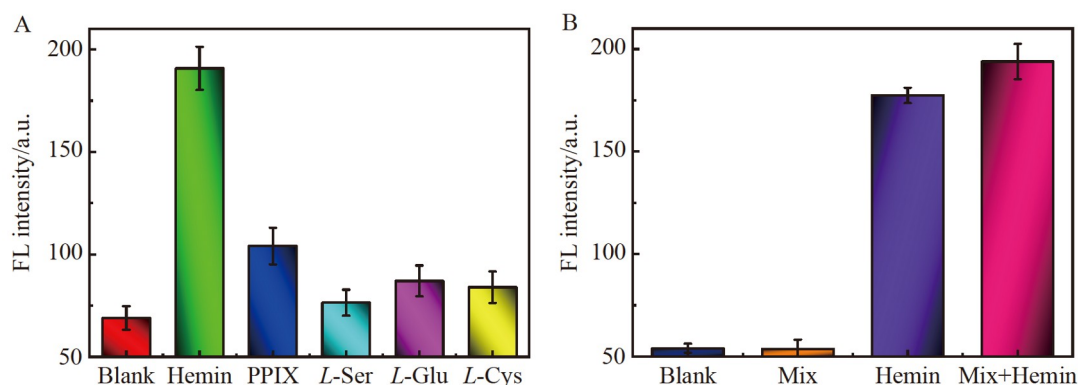


图3 (A)HP 对血红素和阴性对照物(PPIX、*L*-Ser、*L*-Glu 和 *L*-Cys)的荧光响应;(B)混合体系(Mix)中血红素的荧光响应(Mix 为 PPIX、*L*-Ser、*L*-Glu 和 *L*-Cys 的混合物,浓度均为 400 nmol/L)

Fig.3 (A) Fluorescence responses of hemin and negative controls (PPIX, *L*-Ser, *L*-Glu and *L*-Cys); (B) Fluorescence responses of Mix, hemin as well as hemin in Mix. Mix contains PPIX, *L*-Ser, *L*-Glu, and *L*-Cys, each at 400 nmol/L
PPIX: 原卟啉 IX (Protoporphyrin IX); *L*-Ser: *L*-丝氨酸(*L*-Serine); *L*-Glu: *L*-谷氨酸(*L*-Glutamic acid)

考察了本方法对血红素定量分析的性能。由图 4A 可见,向 HP 中加入 0.2 nmol/L 血红素,体系的荧光显著增强,随着血红素浓度增大,荧光信号持续增强,呈先急剧增强、后缓慢增加的趋势。由图 4B 可见,血红素浓度在 20~400 nmol/L 范围内,与体系荧光信号具有良好的线性关系,线性方程为 $y=0.109x+139.309$ (y 为体系荧光强度, x 为血红素浓度(nmol/L),相关系数 $R^2=0.954$)。对低浓度范围即 0~2 nmol/L 血红素的荧光响应也进行了分析,结果表明,在 0.5~2 nmol/L 浓度范围内,本方法也具有较好的线性关系,线性方程为 $y=21.100x+52.708$ ($R^2=0.978$) (图 4C),检出限(3σ)为 283 pmol/L。通过检测 10%血清中的血红素考察了本方法的实用潜力。与缓冲溶液体系相比,稀释血清溶液中血红素的检测信号略有增强,但荧光强度随血红素浓度的变化趋势不变;当血红素加标浓度分别为 20、100 和 200 nmol/L 时,加标回收率分别为 101.7%、105.5%和 95.4%。

将本方法与其它血红素的检测方法进行比较,结果见表 1。基于血红素对纳米材料荧光猝灭机制的方法^[12,16-17]多采用“turn-off”模式,容易受到环境因素干扰,而本方法以“turn-on”模式的荧光为检测

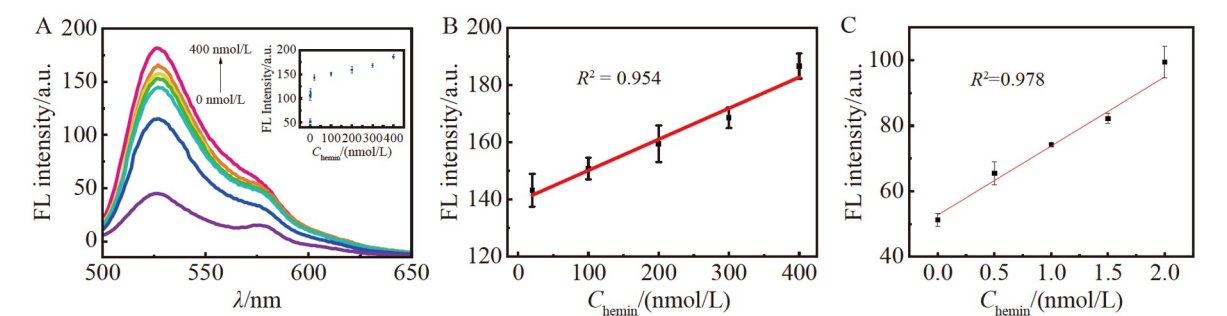


图4 (A)采用本方法检测不同浓度血红素(0、0.2、2、20、100、200、300、400 nmol/L)时的荧光光谱,插图为荧光强度与血红素浓度之间的关系曲线; (B)高浓度范围(20~400 nmol/L)和(C)低浓度范围(0.5~2 nmol/L)血红素区间的线性关系曲线

Fig.4 (A) Fluorescence spectra for detection of different concentrations of hemin by this method; Linear relationship in (B) high concentration (20–400 nmol/L) and (C) low concentration (0.5–2 nmol/L) range of hemin

表1 不同血红素检测方法的性能比较

Table 1 Comparison of performance of reported methods with this method for detection of hemin

检测方法 Method	材料和试剂 Materials and reagents	线性范围 Linear range/ (nmol/L)	检出限 Limit of detection/ (nmol/L)	模式 Mode	参考文献 Ref.
荧光法 Fluorescence	g-C ₃ N ₄ 纳米片 g-C ₃ N ₄ nanosheets	500~25000	150	Off	[12]
荧光法 Fluorescence	碳量子点 Carbon quantum dots	500~10000	250	Off	[16]
荧光法 Fluorescence	金团簇、青蒿琥酯 Au nanoclusters and artesunate	1~25	0.43	Off	[17]
荧光法 Fluorescence	富 G 核酸、原卟啉 IX G-rich DNA and PPIX	50~2250	36	Off	[44]
荧光法 Fluorescence	富 G 核酸、四甲基联苯胺、过氧化氢 G-rich DNA, TMB and H ₂ O ₂	1~100	0.88	On	[18]
比色法 Colorimetric	富 G 核酸、ABTS、过氧化氢 G-rich DNA, ABTS and H ₂ O ₂	1~120	0.637	On	[13]
化学发光法 Chemiluminescence	青蒿琥酯、鲁米诺、过氧化氢 Artesunate, luminol and H ₂ O ₂	1~100	0.37	On	[14]
电化学法 Electrochemical	富 G 核酸、羧基化石墨烯 G-rich DNA and COO-GR	1~150	0.64	On	[15]
荧光法 Fluorescence	富 G 核酸 G-rich DNA	0.5~2; 20~400	0.283	On	本方法 This work

注(Note): g-C₃N₄ nanosheets: g-C₃N₄纳米片(Graphitic carbon nitride nanosheets); ABTS: 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)(2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid); COO-GR: 羧基化石墨烯(Carboxylated graphene)。

信号,干扰少,普适性好。基于 DNA 嵌入剂的荧光方法^[44],由于嵌入剂和血红素都可与富 G 的核酸探针结合,因而会发生竞争和取代反应,在一定程度上降低了反应效率,并且存在背景信号较高的问题。与文献^[18]报道的基于 DNAzyme 催化反应的比色法相比,本方法的检测范围更宽、灵敏度更高。与其它检测血红素的比色法^[13]、化学发光法^[14]和电化学方法^[15]相比,本方法具有操作简便、检测时间短和普适性好的优点。

2.3 基于HP的血红蛋白的检测

血红蛋白是一种异源四聚体蛋白,由两个 α 亚基和两个 β 亚基组成,每个亚基都包含一个血红素辅基。为了考察本方法对含血红素的蛋白质进行检测的应用潜力,采用 HP 探针含血红素的血红蛋白和不含血红素的 BSA、Lys 和 PD-L1 进行了识别和检测。如图 5 所示,含血红蛋白体系的荧光强度明显高于空白组和不含血红素的对照蛋白组,血红蛋白、BSA、Lys 和 PD-L1 体系的荧光强度与空白组荧光强度的比值分别为 2.94、1.06、0.84、1.19; Lys 体系的荧光强度低于空白组,这是由于 Lys 的等电点为 10.5~11.0,在中性缓冲溶液中带有正电荷,可与带负电荷的 HP 探针发生静电结合,进一步拉近了供体与受体之间的距离,导致猝灭效率提高。相比而言,BSA 和 PD-L1 在相同的条件下呈中性或带少量负电荷,因对 HP 探针荧光的影响很小。以上结果表明,以 HP 为识别探针,可实现对含血红素的蛋白质的直接检测,具有较高的特异性。

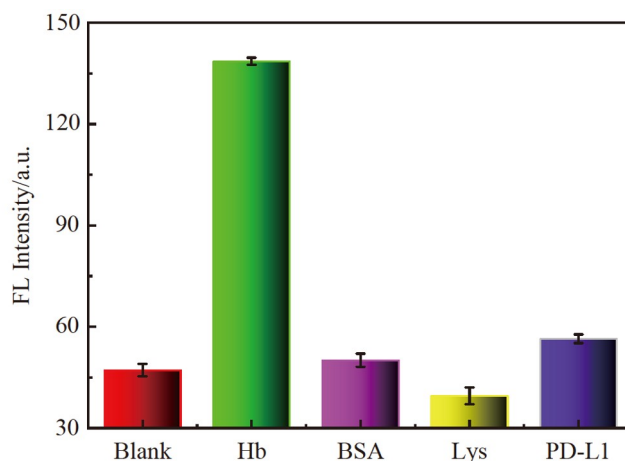


图5 探针 HP 对血红蛋白(Hb)、牛血清白蛋白(BSA)、溶菌酶(Lys)和程序性死亡蛋白配体 1(PD-L1)的检测

Fig.5 Fluorescence intensity of probe HP for detection of hemoglobin (Hb), bovine serum albumin (BSA), lysozyme (Lys) and programmed death protein 1 ligand 1 (PD-L1)

为了探究本方法可否用于血红蛋白的定量分析,采用 HP 探针对 0~400 nmol/L 范围内的血红蛋白进行检测。如图 6A 所示,随着血红蛋白浓度增大,体系的荧光强度逐渐增大,呈现出明显的非线性变化趋势(图 6A 插图);在 20~400 nmol/L 浓度范围内呈现较好的线性关系,线性方程为 $y=0.135x+88.381$ ($R^2=0.988$)(图 6B)。为了考察本方法的灵敏度,对 0~2 nmol/L 浓度范围内的 Hb 进行分析(图 6C),结果表明,在 0.5~2 nmol/L 浓度范围内本方法也呈较好的线性关系,线性方程为 $y=17.639x+50.884$ ($R^2=0.992$),检出限(3σ)为 109 pmol/L。与对血红素的检测相比,本方法对血红蛋白的检出限更低,这是由于血红蛋白含有 4 个血红素辅基,即使只有 1 个血红素诱导形成 G-四链体,也能导致体系荧光强度显著变化,从而提高了探针的灵敏性。与类似的基于核酸探针构象转换的血红蛋白分析方法^[30]相比,本方法无需采用胰蛋白酶对血红蛋白进行水解,可直接检测,而且线性范围更宽,检出限更低,“turn-on”模式的检测更便于信号收集。

2.4 基于DNAzyme的 L-半胱氨酸的检测

通过酶促反应考察了基于 HP 探针的 G-四链体/血红素 DNAzyme 的类过氧化物酶活性。四甲基联苯胺和过氧化氢为常用的过氧化物酶的显色底物,当其被 DNAzyme 催化后,生成蓝色的产物,紫外-可见吸

收峰位于 652 nm。以上结果与文献[4-5]报道的结果一致,表明基于 HP 的 DNAzyme 具有类过氧化物酶活性。继续加入不同浓度的 *L*-Cys,使浓度分别为 0、3.6、7.2、14.4、36、144、288 $\mu\text{mol/L}$,可观察到 *L*-Cys 浓度较低($\leq 36 \mu\text{mol/L}$)时,溶液由深蓝色逐渐变为浅蓝色,对应 652 nm 处的吸收峰强度降低;当 *L*-Cys 浓度较高($>144 \mu\text{mol/L}$)时,溶液变为无色,对应的吸收峰完全消失(图 7A 和 7B)。如图 7C 所示,在 3.6~36 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内,本方法具有良好的线性关系,线性方程为 $y=-0.004x+0.331$ ($R^2=0.994$),检出限 (3σ)为 3.6 $\mu\text{mol/L}$,与基于氧化钨纳米酶[45]的比色方法的灵敏度相近。此外,以 Gly、*L*-Glu、*L*-Ser、叶

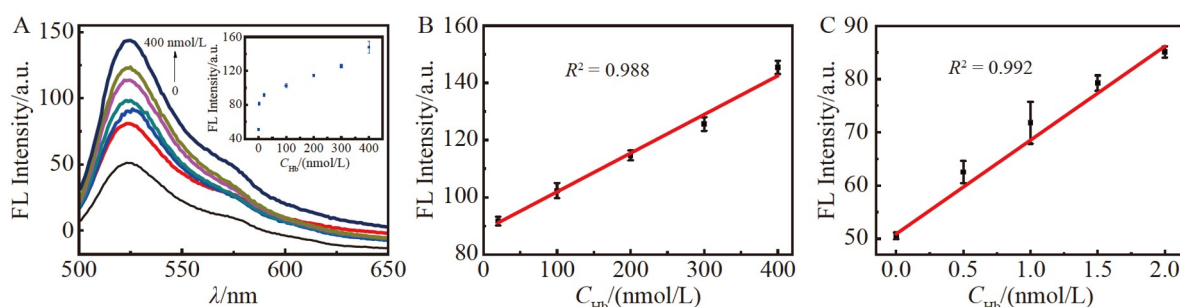


图6 (A)采用本方法检测不同浓度 Hb(0、2、20、100、200、300、400 nmol/L)的荧光光谱,插图为荧光强度与 Hb 浓度之间的关系;(B)高浓度(20~400 nmol/L)和(C)低浓度(0.109~2 nmol/L)范围内 Hb 浓度与荧光强度间的线性关系曲线

Fig.6 (A) Fluorescence spectra for detection of different concentrations of Hb by this method, inset shows the change trend of fluorescence intensity with Hb concentrations; Linear relationship curves in the (B) high concentration (20~400 nmol/L) and (C) low concentration (0.109~2 nmol/L) range of Hb

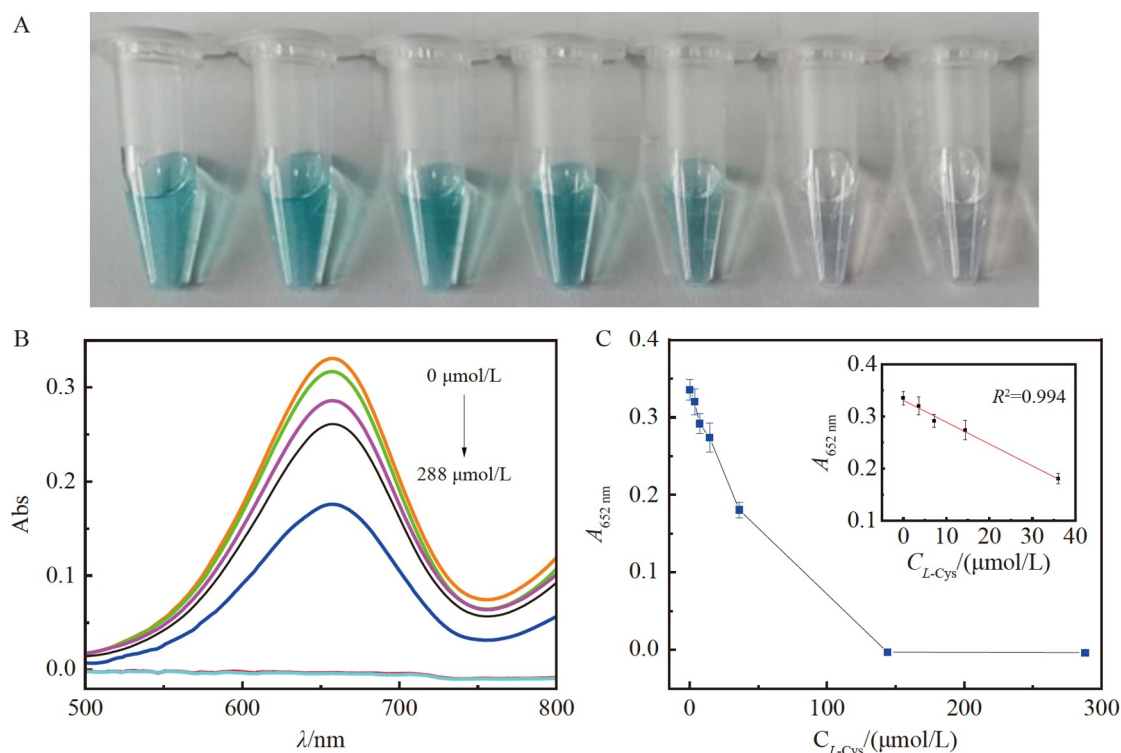


图7 不同浓度 *L*-Cys 与 G-四链体/血红素 DNAzyme 反应后的(A)比色图(浓度从左至右依次增大)和(B)紫外-可见吸收光谱;(C) 0~300 $\mu\text{mol/L}$ 和 3.6~36 $\mu\text{mol/L}$ (插图)范围内 *L*-Cys 浓度与 652 nm 处吸收值($A_{652 \text{ nm}}$)之间的关系

Fig.7 (A) Color and (B) absorption spectra of G-quadruplex/hemin DNAzyme with different concentrations of *L*-Cys (the concentration of *L*-Cys in Fig. 7A increases from left to right); (C) Relationship between *L*-Cys concentration and absorbance at 652 nm ($A_{652 \text{ nm}}$) (the inset shows the linear relationship in the range of 3.6~36 $\mu\text{mol/L}$)

酸和 *L*-抗坏血酸作为阴性对照,考察了本方法对 *L*-Cys 检测的特异性。结果表明, Gly、*L*-Glu、*L*-Ser、叶酸和 *L*-抗坏血酸均不能抑制 DNAzyme 的类酶活性,并且会使此类过氧化物酶活性分别增强 63%、37%、49%、43%和 38%,表明 *L*-Cys 作为 G-四链体/血红素 DNAzyme 的抑制剂,具有较好的特异性。

3 结论

构建了一种多用途的荧光/比色生物传感平台,基于靶分子介导的 DNA 构象转换和 G-四链体/血红素 DNAzyme 的类过氧化物酶活性,实现了对血红素及含血红素蛋白质的简便、快速分析,以及对 *L*-Cys 的可视化检测。与现有的血红素分析技术相比,本方法检测范围宽、灵敏度高。与其它血红蛋白检测方法相比,本方法可实现直接、灵敏和快速检测,检出限低至 109 pmol/L。本方法为血红素相关蛋白和药物的分析提供了一种新思路,在临床诊断与治疗、药物筛选等方面具有较好的应用潜力。

References

- [1] SANTORO S W, JOYCE G F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, 94(9): 4262-4266.
- [2] CHEN Z, HE Q, ZHAO M, LIN C, LUO F, LIN Z, CHEN G. *Microchim. Acta*, 2017, 184(10): 4015-4020.
- [3] XIANG Y, WANG Z, XING H, LU Y. *Chem. Sci.*, 2013, 4(1): 398-404.
- [4] FU Y, DU C, ZHANG Q, XIAO K, ZHANG X, CHEN J. *Anal. Chem.*, 2022, 94(43): 15040-15047.
- [5] SHANG Q, SU Y, LIANG Y, LAI W, JIANG J, WU H, ZHANG C. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, 412(15): 3787-3797.
- [6] CHINNAPEN D J F, SEN D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, 101(1): 65-69.
- [7] CUI X, LI R, LIU X, WANG J, LENG X, SONG X, PEI Q, WANG Y, LIU S, HUANG J. *Anal. Chim. Acta*, 2018, 997: 1-8.
- [8] ZHOU W, DING J, LIU J. *Theranostics*, 2017, 7(4): 1010-1025.
- [9] KHAN S, BURCIU B, FILIPE C D M, LI Y, DELLINGER K, DIDAR T F. *ACS Nano*, 2021, 15(9): 13943-13969.
- [10] MCCONNELL E M, COZMA I, MOU Q, BRENNAN J D, LU Y, LI Y. *Chem. Soc. Rev.*, 2021, 50(16): 8954-8994.
- [11] XU J Q, JIANG R D, HE H L, MA C B, TANG Z W. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2021, 139: 116257.
- [12] GUO Z, LI B, ZHANG Y, ZHAO Q, ZHAO J, LI L, FENG L, WANG M, MENG X, ZUO G. *ChemistrySelect*, 2019, 4(28): 8178-8182.
- [13] LI R, JIANG Q, CHENG H, ZHANG G, ZHEN M, CHEN D, GE J, MAO L, WANG C, SHU C. *Analyst*, 2014, 139(8): 1993-1999.
- [14] GAO W, WANG C, MUZYKA K, KITTE S A, LI J, ZHANG W, XU G. *Anal. Chem.*, 2017, 89(11): 6161-6166.
- [15] GAO L, XIAO Y, WANG Y, CHEN X, ZHOU B, YANG X. *Talanta*, 2015, 132: 215-221.
- [16] ZHANG Q Q, CHEN B B, ZOU H Y, LI Y F, HUANG C Z. *Biosens. Bioelectron.*, 2018, 100: 148-154.
- [17] FERREJA S L, FANG Z, LI P, GUO J, FERREJA T H, CHEN W. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2021, 413(6): 1639-1649.
- [18] LI D, LI C, LIANG A, JIANG Z. *Sens. Actuators, B*, 2019, 297: 126799.
- [19] FUCHAROEN S, WINICHAGOON P. *Curr. Opin. Hematol.*, 2000, 7(2): 106-112.
- [20] WALKER I R, ALI M A. *Can. Med. Assoc. J.*, 1973, 108(7): 843-847.
- [21] WU C Y, HU H Y, CHOU Y J, HUANG N, CHOU Y C, LI C P. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 2016, 64(6): 1233-1241.
- [22] FURLAN J C, FANG J, SILVER F L. *Acta Neurol. Scand.*, 2016, 134(2): 123-130.
- [23] THAPA M, HEO Y S. *Biosens. Bioelectron.*, 2023, 221: 114907.
- [24] YUAN Y, NI X, CAO Y. *J. Electroanal. Chem.*, 2019, 837: 219-225.
- [25] BIJALWAN A, RASTOGI V. *Appl. Opt.*, 2018, 57(31): 9230-9237.
- [26] MORENO Y, SONG Q, XING Z, SUN Y, YAN Z. *Chin. Opt. Lett.*, 2020, 18(10): 100601.
- [27] ZHAO Y, CHEN Y, FANG M, TIAN Y, BAI G, ZHUO K. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, 412(23): 5811-5817.
- [28] WANG X, YU S, LIU W, FU L, WANG Y, LI J, CHEN L. *ACS Sens.*, 2018, 3(2): 378-385.
- [29] CAI L, ZHANG Z, XIAO H, CHEN S, FU J. *Microchem. J.*, 2020, 154: 104603.
- [30] PANG S, LIU S, SU X. *Talanta*, 2014, 118: 118-122.
- [31] LI D, XU X, ZHOU P, HUANG Y, FENG Y, GU Y, WANG M, LIU Y. *New J. Chem.*, 2019, 43(48): 19338-19343.
- [32] LI Q, PENG K, YU Y, RUAN X, WEI Y. *Electrophoresis*, 2019, 40(16-17): 2129-2134.
- [33] SHAHROKHIAN S. *Anal. Chem.*, 2001, 73(24): 5972-5978.
- [34] ZHOU H, RAN G, MASSON J F, WANG C, ZHAO Y, SONG Q. *Anal. Chem.*, 2018, 90(5): 3374-3381.
- [35] CHAMSAZ M, HOSSEIN ARBAB-ZAVAR M, AKHONDZADEH J. *Anal. Sci.*, 2008, 24(6): 799-801.
- [36] HUANG S, YANG E, YAO J, LIU Y, XIAO Q. *Anal. Chim. Acta*, 2018, 1035: 192-202.
- [37] KAMACI U D, KAMACI M. *J. Fluoresc.*, 2021, 31(2): 401-414.

- [38] TUKHMETOVA D, LISEC J, VOGL J, MEERMANN B. *Anal. Chem.*, 2024, 96(8): 3276-3283.
- [39] YAMAMOTO H, FUJIWARA T, FUNATSU T, TSUNODA M. *Molecules*, 2021, 26(8): 2365.
- [40] KARIMI A, HUSAIN S W, HOSSEINI M, AZAR P A, GANJALI M R. *Microchim. Acta*, 2020, 187(7): 398.
- [41] ZHAO J, DONG W, ZHANG X, CHAI H, HUANG Y. *Sens. Actuators, B*, 2018, 263: 575-584.
- [42] CHI M, CHEN S, ZHONG M, WANG C, LU X. *Chem. Commun.*, 2018, 54(46): 5827-5830.
- [43] HUANG M, YANG J, WANG T, SONG J, XIA J, WU L, WANG W, WU Q, ZHU Z, SONG Y, YANG C. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2020, 59(12): 4800-4805.
- [44] KANG B H, LI N, LIU S G, LI N B, LUO H Q. *Anal. Sci.*, 2016, 32(8): 887-892.
- [45] SINGH M, WEERATHUNGE P, LIYANAGE P D, MAYES E, RAMANATHAN R, BANSAL V. *Langmuir*, 2017, 33(38): 10006-10015.

A New Multifunctional Biosensor Based on a Hairpin Oligonucleotide Probe and G-Quadruplex/Hemin DNAzyme

WANG Lei, SONG Ji-Xiang, LIU Xing-Feng*, HUANG Yan-Qin, FAN Qu-Li

(Institute of Advanced Materials, Jiangsu Key Laboratory for Biosensors, State Key Laboratory for Organic Electronics and Information Displays, Nanjing University of Posts & Telecommunications, Nanjing 210023, China)

Abstract A new multifunctional fluorescent "turn-on" biosensor was constructed based on a guanine-rich hairpin probe and G-quadruplex/hemin DNAzyme. The probe was labeled with quencher and fluorescein at 5' and 3' terminus, respectively. In the absence of the target, the probe form hairpin structure and the fluorescence of the fluorescein was quenched by the quencher. However, in the presence of the target, the hairpin structure transformed to G-quadruplex and the fluorescence was recovered. By monitoring the fluorescence of the probe before and after combining with the target, both hemin and hemoglobin were detected rapidly and conveniently with high sensitivity. The limit of detection for hemin and hemoglobin were estimated to be 283 pmol/L and 109 pmol/L, respectively. The specific interaction between the DNA probe and hemin were investigated via absorption and fluorescence spectra. Furthermore, *L*-cysteine was detected with naked eyes based on the peroxidase-like activity of the new G-quadruplex/hemin DNAzyme. The limit of detection for *L*-cysteine was estimated to be 3.6 $\mu\text{mol/L}$, which was lower than the normal level of intracellular *L*-cysteine (30–200 $\mu\text{mol/L}$). The method developed here was rapid, simple and sensitive for detection of hemin, hemoglobin and *L*-cysteine, demonstrating great potential in bioanalysis, drug screening, and disease diagnosis.

Keywords G-Quadruplex; DNAzyme; Hemin; Hemoglobin; Biosensor

(Received 2021-12-15; accepted 2024-07-04)

Supported by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (No. YX030003) and the Program of Nanjing University of Posts and Telecommunications (Nos. NY222151, NY221091).