

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001985

新型邻位诱导熵驱动策略用于幽门螺杆菌 DNA 的高灵敏检测

李丹丹¹, 莫菲², 丁世家², 陈维贤¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院检验科, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:构建新型邻位诱导熵驱动信号放大策略用于 DNA 的高灵敏检测。**方法:**靶 DNA 诱导邻位连接, 与两亲和探针共同形成夹心复合物, 从而形成邻位引物。所获得的邻位引物通过介导分支迁移点亮熵驱动放大环路以实现 DNA 的检测。**结果:**在最优实验条件下, 本工作所制备的 DNA 传感策略显示出非常高的灵敏度和选择性, 动态范围从 0.01~100 nmol/L, 检测限低至 6.7 pmol/L。**结论:**这种快速、高性价比和高效率的信号放大策略为 DNA 检测提供了一个简单且灵敏的平台。

【关键词】邻位诱导; 熵驱动; DNA; 高灵敏**【中图分类号】**R446.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-06-14

A novel strategy based on proximity binding-induced entropy-driven amplification circuits for high-sensitivity detection of *Helicobacter pylori* DNA

Li Dandan¹, Mo Fei², Ding Shijia², Chen Weixian¹

(1. Department of Clinical Laboratory Diagnostics, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 2. Key Laboratory of Diagnostic Medicine Designated by the Ministry of Education, Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To establish a novel strategy based on proximity binding-induced entropy-driven amplification circuits for high-sensitivity detection of DNA. **Methods:** Target DNA was used to trigger proximity binding to form a sandwich complex with two affinity probes and then a proximity trigger, which lit up the entropy-driven amplification circuits by mediating branch migration for DNA detection. **Results:** Under the optimal experimental conditions, the DNA sensing strategy established in this study showed high sensitivity and selectivity, with a wide dynamic range of 0.01–100 nmol/L and a limit of detection as low as 6.7 pmol/L. **Conclusion:** This rapid, cost-effective, and highly efficient signal amplification strategy provides a simple and sensitive platform for DNA detection.

【Key words】proximity binding; entropy-driven; DNA; high-sensitivity

DNA 的高灵敏、高特异性检测对临床疾病的诊断治疗、病原微生物检测及环境监测具有十分重要的作用^[1-5]。近年来,随着基因诊断的快速发展,序列特异性 DNA 片段的快速、高灵敏传感策略备受人们关注。DNA 传感策略是一种利用核酸碱基配对原则进行识别的方法,能对特定序列的基因片段进行持续、快速、灵敏和选择性检测。目前,已报道的

DNA 传感检测方法有比色法^[6-7]、荧光法^[8]、电化学法^[9]等,其中荧光法因其简便、快速、稳定等优点成为最常用的分析方法。然而,由于实际样品中待测的目标 DNA 序列含量极低,而且样品成分复杂。因此,高灵敏度和高特异性成为 DNA 检测亟待解决的问题。

近年来, DNA 纳米技术前所未有的快速进展为各个领域提供了重要的发展契机,如逻辑门操作、生物标志物生物传感及疾病诊断等^[9-11]。如新进展的一些基于目标触发 DNA 杂交的生物分析策略用于疾病标志物的高特异和高灵敏分析^[12-15]。其中,基于邻近诱导的邻位连接法 (proximity ligation assay, PLA) 是一种简单、快速、利用 DNA 辅助生物分子检测的策略^[16]。邻位诱导基本分析原理为:用 2 个或多

作者介绍:李丹丹, Email: ldd696@126.com,

研究方向:分子诊断和靶向治疗。

通信作者:陈维贤, Email: Chenweixian75@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (编号:81702083)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190530.1453.006.html>
(2019-05-31)

个连有单链 DNA 的亲合探针特异性识别靶分子,并将分子识别事件转化为特定的寡核苷酸检测。即当无靶分子存在时,亲和探针不会相互邻近,从而无后续反应进行;反之,靶分子存在时,亲和探针同时识别和结合到同一靶分子上,亲和探针相互邻近启动后续信号放大反应,如聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)、滚环扩增(rolling circle amplification,RCA)、催化茎环自组装(catalytic hairpin self-assembly,CHA)、链杂交反应(hybridization chain reaction,HCR),以及 toehold 介导的链置换反应(toehold-mediated strand displacement reaction,TSDR)等^[17-21]。

邻位诱导策略由于采用双识别或多识别机制,明显降低了交叉反应,提升了识别特异性;在各信号放大策略的辅助下,PLA 的灵敏度在一定程度也有所提升。但是,传统的 PLA 存在不依赖 toehold 的链置换反应及中间复合体,这些均会产生不可忽略的背景信号。同时,PLA 的转换动力学主要取决于亲和探针形成的邻位引物与随后的 DNA 链之间的分支迁移^[22]。由于邻位引物具有缺口,所以转换过程需要跨越该缺口,这大大延长了反应时间并损害了转换效率。熵驱动放大环路(entropy-driven amplification,EDC)是 TSDR 领域的一个具有里程碑意义的报道,它使用一系列线性单链 DNA 在放大电路中扮演多重角色。与普通的基于发夹的设计相比,EDC 具有简便、快速和稳定性好等优点^[23]。此外,EDC 可以不使用具有复杂的亲吻环或二级结构的 DNA 分子,这大大降低了随机碰撞和亚稳发夹结构之间的相互作用概率,从而减少了背景信号的泄漏。然而,目前有关 EDC 用于 PLA 后续信号放大的策略罕见报道。

综上,为了解决传统邻位连接引起的转换速率慢、背景泄露等问题,本工作设计了一种新型邻位连接诱导 EDC 的传感策略,实现对均相中的特定序列的 DNA 分子的快速和高灵敏检测(图 1)。本研究以幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)特异 DNA 序列(*H. pylori* DNA)为靶分子,通过引入结构域之间单碱基易位的独特策略以增强邻位诱导熵驱动策略(proximity-binding induced entropy-driven amplification circuits, PEDC)的转换动力学,同时消除背景噪音以提高检测灵敏度。在存在靶 DNA 时,邻位连接诱导亲和探针 1(probe 1, P1)和 P2 的组装形成邻位引物,继而启动后续 EDC,实现对靶 DNA

的快速、特异性和超灵敏检测。该测定法具有均相(无任何洗涤步骤)、样品量小且检测限低等优点,对靶分子检测具有显著的分析性能,为生物分析和早期临床诊断提供了一个强有力的平台。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 主要仪器 恒温水浴箱(瑞华,中国)。MilliQ 纯水仪(Millipore,美国)。NanoDrop1000 分光光度计(Thermo Scientific, Wilmington, DE, 美国)用于 DNA 悬浮液浓度测定。荧光分光光度计(安捷伦,美国)用于检测荧光信号。

1.1.2 主要材料和试剂 DNA 寡核苷酸序列(high performance liquid chromatography, HPLC)纯化由生工(上海,中国)合成,见表 1。DNA 序列均用 TE 缓冲液(pH 8.0, 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA)溶解、分装,储存于-20℃,使用前稀释。其余试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 探针的制备 将各 DNA 组分分别在 95℃变性 5 min,冷却至室温。熵信标复合物(QBR):信号输出链(Report, R),副产物链(Byproduct, B)和淬灭链(Quencher, Q)以摩尔浓度为 1:1:1.2 的比例在 1×TAE/Mg²⁺缓冲液(1 mmol/L EDTA, 40 mmol/L Tris-乙酸盐, 12.5 mmol/L MgCl₂, pH 8.0)中混合,在 3 h 内以恒定速率从 95℃降至 20℃。所获得的 DNA 溶液在 4℃下保存备用。

1.2.2 邻位连接及 PDEC 反应 将单链靶 DNA(*H. pylori* DNA, 0.25 μmol/L)与亲和探针(P1 和 P2, 0.25 μmol/L)一起温育 30 min;将 0.25 μmol/L QBR 复合物和 0.25 μmol/L 燃料链的反应缓冲液以引发 EDC,并在室温下再孵育 30 min。

1.2.3 荧光检测 激发和发射狭缝宽度均设定为 5 nm,激发波长设为 480 nm,发射光谱扫描范围为 490~600 nm。最大荧光发射强度在 518 nm 处获得。通过测量 3 h 的荧光来监测反应动力学。每次测量之前,将比色杯在蒸馏水中漂洗 5 次,在 70%乙醇中漂洗 3 次,再在蒸馏水中漂洗 3 次,最后用氮气干燥。

2 结果

2.1 基于邻位连接诱导熵驱动信号放大原理

基于邻位连接诱导熵驱动信号放大策略用于 DNA 检测的原理如图 1 所示。熵信标复合物(QBR)由 B、R 及 Q 3 条链互补杂交组装而成,其中 R 链修饰有荧光基团, Q 链修饰有淬灭基团。当靶 DNA 存在时,探针 P1 的 x 域和 P2 的 y 域分别与靶 DNA 的 x* 与 y* 域结合,其促使 P1 的 a 域与 P2 的 a* 域结合,形成邻位引物(proximity trigger, PT)。PT 通过 2 域识别 QBR 的 2* 域并发生分支迁移,分别形成中间复合物 C1、

表 1 核酸序列信息

核酸名称	核酸序列 (5'-3')
<i>H. pylori</i> DNA	TCAATGATCCTGCCCTTTGGAACGC
SM	TCAATGATCCTGCCCTTTGCAACGC
DM	TCAATGATCCTCCCTTTGCAACGC
NC	<u>GAGTGTTAGGA GAAGGTGAAGGTAA</u>
P1	GCGTTCCAAAGGG TTT TTT TTT TTT GTGACC AATTCCAAC
P2	GCCCTTACTCCC GGT CAC TTT TTT TTT TTT CAGG ATCATTGA
P1(a 域 3 nt)	GCGTTCCAAAGGG TTT TTT TTT TTT GTGCAATTC CAAC
P1(a 域 4 nt)	GCGTTCCAAAGGG TTT TTT TTT TTT GTGCCAATT CCAAC
P1(a 域 5 nt)	GCGTTCCAAAGGG TTT TTT TTT TTT GTGACCAATTCCAAC
P2(a* 域 3 nt)	GCCCTTACTCC_ CAC TTT TTT TTT TTT CAGGATC ATTGA
P2-(a* 域 4 nt)	GCCCTTACTCC_ GCAC TTT TTT TTT TTT CAGG ATCATTGA
P2-(a* 域 5 nt)	GCCCTTACTCC_ GT CAC TTT TTT TTT TTT CAGG ATCATTGA
Report(R)	FAM-CCTACGTCTCCAACCTAAGTACGG
Quencher(Q)	GTTGGAATTGGGACTAAGGGCAGGCCCTAAGTTAGTTGGAGACGTAGG-BHQ1
Byproduct(B)	TTTTTTTTTTTTTTTCCCTGCCCTTACTCCC
Fuel(F)	CCTACGTCTCCAACCTAAGTACGGCCCTGCCCTTACTCCCAAT

注:SM, single base mismatch, 单碱基错配;DM: Double bases mismatch, 双碱基错配;NC: None complementary, 完全错配;Report: 信号输出链;Quencher: 淬灭链;Byproduct: 副产物链;Fuel: 燃烧链

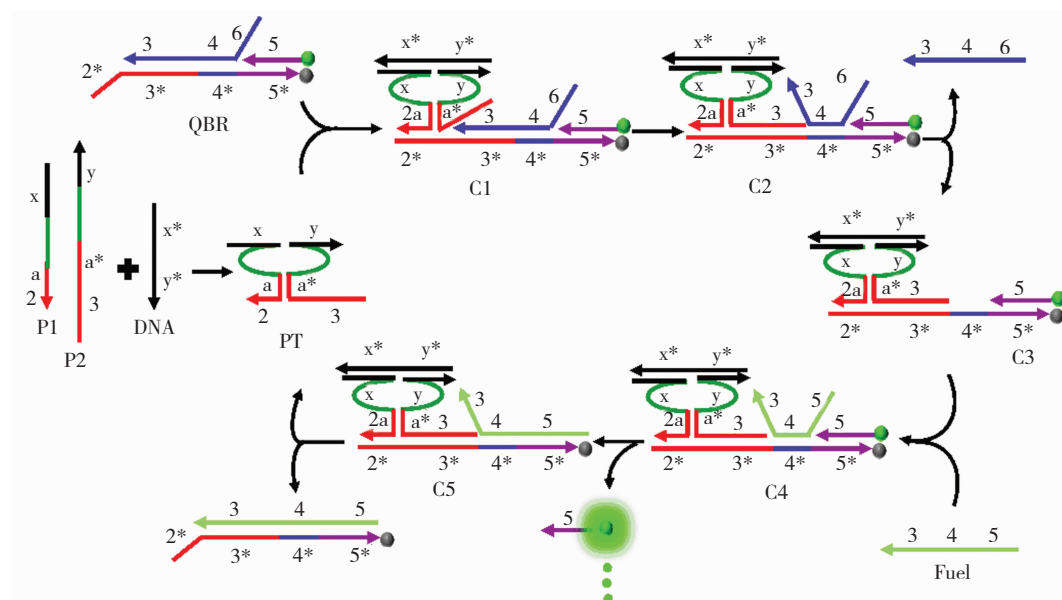


图 1 新型邻位诱导的熵驱动信号放大策略用于 DNA 高灵敏检测原理图

C2、C3, 在 Fuel 的辅助下, 随着链替置换反应的进行, R 链的荧光信号得以输出, 从而检测到荧光信号。同时 PT 又进入下一个新的循环, 产生大量的输出荧光信号 (fluorescence, FL), 从而实现对靶 DNA 的高灵敏检测。

2.2 邻位连接诱导熵驱动信号放大策略可行性分析

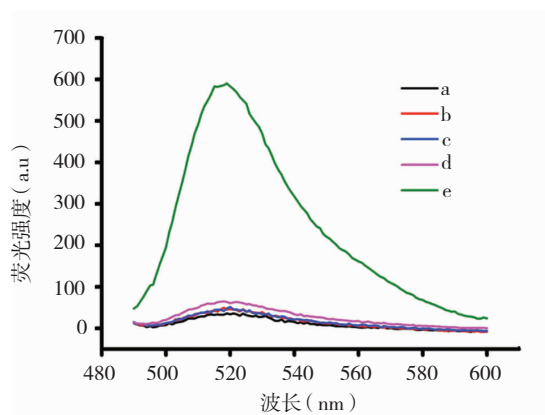
首先, 本工作在不同条件下对所构建的 DNA 传感器进行了可行性分析, 如图 2 所示。其中纵坐标表示荧光强度, 横坐标表示波长, 最高峰在 518 nm 处。在无靶 DNA 存在时, 熵标复合物 (QBR) 的荧光基团与淬灭基团相靠近, 荧光强度

(FL intensity) 微弱; 相反, 当靶 DNA 存在时, 由于邻位连接诱导 EDC 的信号放大作用, 荧光强度明显增加, 提示所构建的传感策略用于检测 DNA 是可行的。

2.3 检测条件的优化

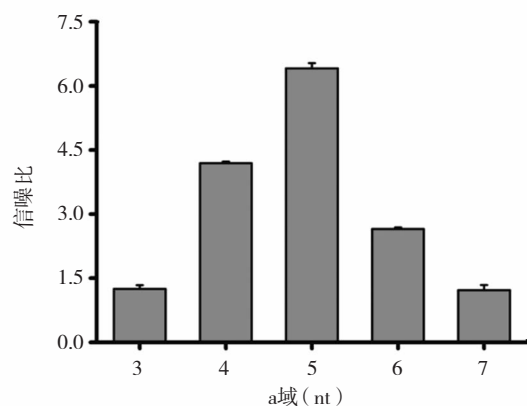
为了达到最佳的生物传感分析性能, 本研究对其中的重要实验条件进行了优化, 如 P1 探针 a 域碱基数、QBR 的浓度、反应温度和反应时间。所有优化的先决条件是保证靶 DNA 浓度为 100 pmol/L, 如图 3A~D 所示。首先对 P1 探针 a 域碱基数进行优化, 当 a 域碱基为 5 nt 时, 所构建的传感器信噪

比达到最高。因此,在后续实验中采用的 a 域碱基为 5 nt。通过图 3B~D 的结果显示,QBR 的浓度、反应温度和反应时间分别为 250 nmol/L、37 °C 和 1 h。由于本课题组在序列设计时进行了碱基易位(即 P2 探针 3 域的 A 碱基易位到 P1 探针 2 域),所以本研究所构建的传感器检测时间大大缩短。在后续实验中将采用上述最优点进行实验。

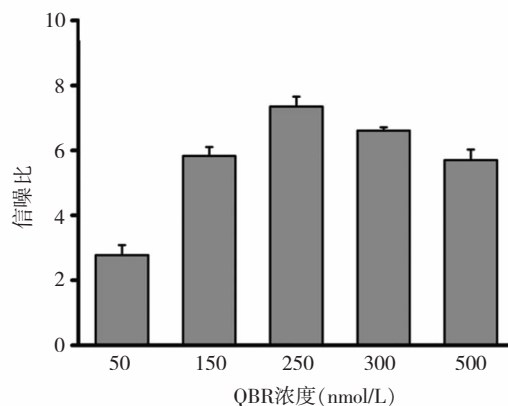


注:a,QBR;b:QBR+Fuel;c:QBR+Fuel+P1;d:QBR+Fuel+P1+P2;
e:QBR+Fuel+P1+P2+ 靶 DNA

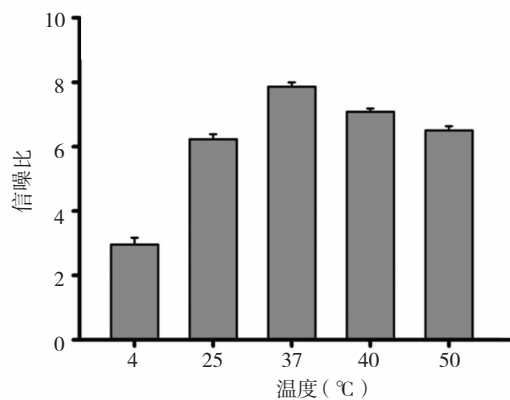
图2 新型邻位诱导的熵驱动信号放大策略可行性分析



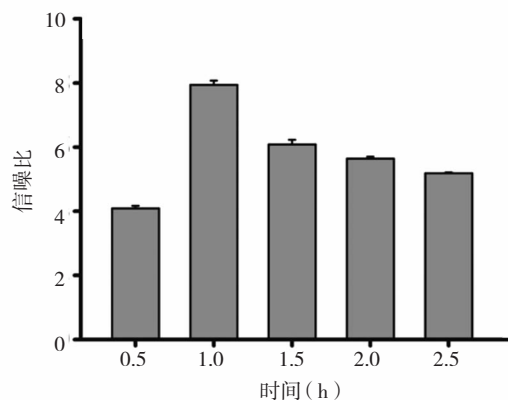
A. a 域优化



B. QBR 浓度优化



C. 反应温度优化



D. 反应时间优化

图3 检测条件优化

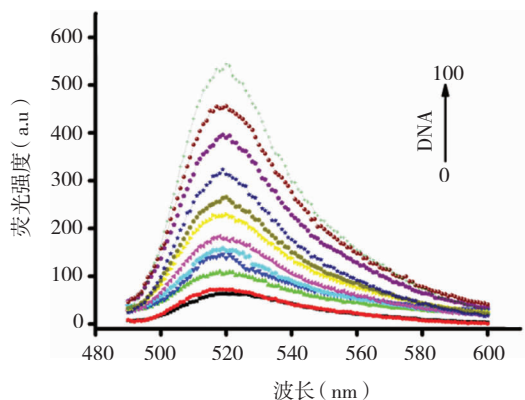
2.4 构建的 DNA 传感器的分析性能

在最佳实验条件下,本研究对所构建的 DNA 传感器的分析性能进行了考察,如图 4 所示。随着靶 DNA 浓度的增加,荧光信号强度不断增加,证明该输出信号的强度取决于靶 DNA 的浓度(图 4A)。在 0.01~100 nmol/L 范围内,信号值与靶物质浓度对数值之间呈良好的线性关系(图 4B)。本研究发展的 DNA 传感器检测灵敏度为 6.7 pmol/L,相比其他已报道的方法,如比色^[6-7]、电化学^[8]等,该方法因特异性强、稳定性好、简便、快速等优点而更具有临床转化优势。

2.5 构建的 DNA 传感器的特异性和重现性

本研究通过生物传感系统分别对 4 类 DNA 序列,包括完全互补的目标序列、单碱基错配(single mismatch,SM)、双碱基错配(double mismatch,DM)、完全不互补(none complementary,NC)分别在 10.0、50.0、50.0 和 50.0 nmol/L 的荧光强度对 DNA 传感器的特异性进行考察。荧光强度对靶 DNA 的响应信号远大于 SM、DM、NC,其荧光响应信号分别是 *H. pylori* DNA 的 27%、24%和 20.5%(图 5)。本研究构建的 DNA 传感器对靶 DNA 的特异性甄别能力主要归因于亲和探针 P1 和 P2 的高保真度和较好的特异性识别能力。此外,为评价所制备 DNA 传感系统的再现性,本工作分别对 100 fmol/L 和

10 pmol/L 的 DNA 进行了 5 次重复测量,其变异系数分别为 1.5%和 1.9%,表明本方法具有可接受的再现性。



A. 不同靶输入浓度 (0, 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100 nmol/L, 下→上) 对应的荧光强度

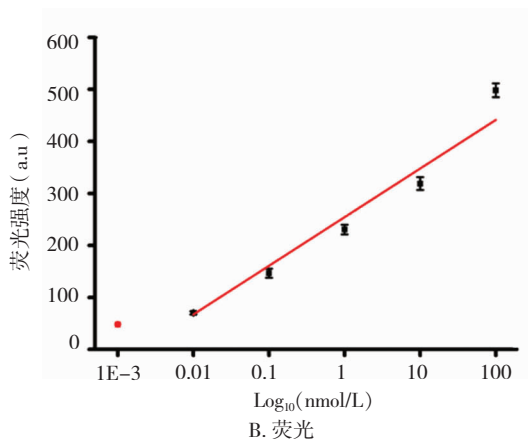


图 4 强度与输入浓度的校准曲线

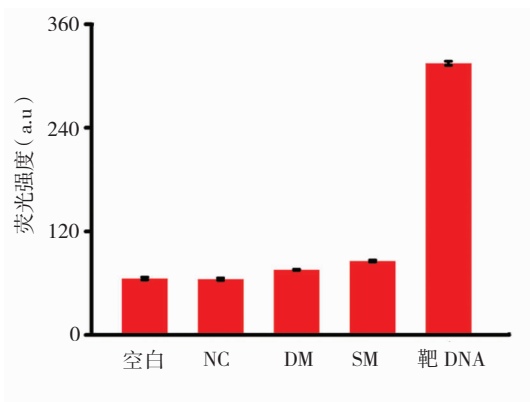


图 5 DNA 传感器的特异性分析

3 讨论

3.1 传感器条件的优化

本实验对 4 个主要影响因素:P1 探针 a 域碱基

数、QBR 的浓度、反应温度和反应时间的最适条件进行考察。P1 探针 a 域碱基数结果表明随着 a 域碱基数的增加,传感器信噪比逐渐增加,当碱基数为 5 nt 时信噪比最高,这主要是因为 a 域碱基数大于 5 nt 时噪音将随之增大,从而导致信噪比降低。QBR 的浓度结果表明,传感器随着浓度的增加而增加,在 250 nmol/L 时达顶点。温度结果表明,低温时因核酸分子杂交碰撞效率不足导致信号偏低,从而使最终信噪比偏低,不断升高孵育温度能有效提高最终的信号输出并在 37 ℃达到信噪比的最高点。当温度继续升高时,不利于核酸的杂交从而降低信噪比。时间优化结果表明,随着孵育时间增加,传感器信噪比增加,当孵育时间足够反应完全时,熵驱动的链替代置换反应趋于平衡,1 h 为最优条件。

3.2 传感器的性能分析

本实验考察了不同浓度的靶标 DNA 对传感器信号响应的影响,并根据所得结果绘制校准曲线。结果表明,本实验所发展的熵驱动信号放大策略具有较低的检测限和宽的检测线性范围,可与文献中已报道信号放大策略检测核酸的方法相媲美^[3,6-7,24],见表 2。这表明该分析方法在临床检验诊断中具有潜在应用价值。

3.3 传感器的特异性分析

根据特异性分析研究的考察结果,本实验所构建传感器对不同干扰核酸序列的荧光响应与空白对照的荧光响应信号基本无变化,并可与靶标 *H. pylori* DNA 结果有明显区分。这表明所制备的生物传感器可以特异地识别靶标 DNA 和非靶标核酸,具有高的特异性。这主要归因于亲和探针 P1 和 P2 的高保真度和较好的特异性识别能力。只有当靶 DNA 与 P1 的 x 域和 P2 的 y 域分别结合时,才能促使 P1 的 a 域与 P2 的 a* 域结合,形成特异性较强的邻位引物从而诱导后续的熵驱动反应。

总之,通过整合邻位连接的特异性识别和 EDC 信号放大的优点,本研究成功构建了一种基于邻位连接诱导熵驱动信号放大的 DNA 传感器用于 *H. pylori* 特定 DNA 片段的高特异性和高灵敏检测。本研究通过碱基易位提高了邻位诱导转化速率,整个检测过程只需 1 h。同时,由于 EDC 的信号放大作用,所构建的 DNA 传感策略不仅具有简便、快速等优点,且展现出宽的线性范围(0.05~100 nmol/L)

和低的检测限(6.7 pmol/L)。通过对亲和探针靶分子识别部分的不同设计,所构建的传感策略可方便地转化用于蛋白及生物小分子的免疫传感。因此,该传感策略为临床分子诊断提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] Liu ZP, Su XG. A novel fluorescent DNA sensor for ultrasensitive detection of *Helicobacter pylori*[J]. Biosens Bioelectron, 2017, 87: 66–72.
- [2] 叶青, 江泽飞. 循环肿瘤 DNA 检测在乳腺癌诊断中的临床应用[J]. 中国癌症杂志, 2016, 26(11): 947–951.
- [3] Saingam P, Li B, Yan T. Use of amplicon sequencing to improve sensitivity in PCR-based detection of microbial pathogen in environmental samples[J]. J Microbiol Methods, 2018, 149: 73–79.
- [4] 黄荣, 陈江燕, 胡接力, 等. 体外培养细胞内乙肝病毒共价闭合环状 DNA 检测方法的建立[J]. 重庆医科大学学报, 2013, 38(12): 1393–1397.
- [5] Tao CY, Yan YR, Xiang H, et al. A new mode for highly sensitive and specific detection of DNA based on exonuclease III-assisted target recycling amplification and mismatched catalytic hairpin assembly[J]. Chem Commun, 2015, 51(20): 4220–4222.
- [6] Nie J, Zhang DW, Tie C, et al. G-quadruplex based two-stage isothermal exponential amplification reaction for label-free DNA colorimetric detection[J]. Biosens Bioelectron, 2014, 56: 237–242.
- [7] Teengam P, Siangproh W, Tuantranont A, et al. Multiplex paper-based colorimetric dna sensor using pyrrolidiny peptide nucleic acid-induced AgNPs aggregation for detecting MERS-CoV, MTB, and HPV oligonucleotides[J]. Anal Chem, 2017, 89(10): 5428–5435.
- [8] Zhou F, Li B. Exonuclease III-assisted target recycling amplification coupled with liposome-assisted amplification; one-step and dual-amplification strategy for highly sensitive fluorescence detection of DNA[J]. Anal Chem, 2015, 87(14): 7156–7162.
- [9] Li DD, Cheng W, Li YJ, et al. Catalytic hairpin assembly actuated DNA nanotweezer for logic gate building and sensitive enzyme-free biosensing of microRNAs[J]. Anal Chem, 2016, 88(15): 7500–7506.
- [10] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. Science, 2017, 356(6336): 438–442.
- [11] Xing YL, Li XM, Yuan TX, et al. Engineering high-performance hairpin stacking circuits for logic gate operation and highly sensitive biosensing assay of microRNA[J]. Analyst, 2017, 142(24): 4834–4842.
- [12] Qian Y, Fan T, Wang P, et al. A novel label-free homogeneous electrochemical immunosensor based on proximity hybridization-triggered isothermal exponential amplification induced G-quadruplex formation[J]. Sens Actuators B Chem, 2017, 248: 187–194.
- [13] Chen J, Zuehlke A, Deng B, et al. A target-triggered DNzyme motor enabling homogeneous, amplified detection of proteins[J]. Anal Chem, 2017, 89(23): 12888–12895.
- [14] Ren K, Wu J, Ju H, et al. Target-driven triple-binder assembly of MNzyme for amplified electrochemical immunosensing of protein biomarker[J]. Anal Chem, 2015, 87(3): 1694–1700.
- [15] Li Y, Liu S, Zhao Z, et al. Binding induced strand displacement amplification for homogeneous protein assay[J]. Talanta, 2017, 164: 196–200.
- [16] Zhang H, Li F, Dever B, et al. Assembling DNA through affinity binding to achieve ultrasensitive protein detection[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2013, 52(41): 10698–10705.
- [17] Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J, et al. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(5): 473–477.
- [18] Koos B, Cane G, Grannas K, et al. Proximity-dependent initiation of hybridization chain reaction[J]. Nat Commun, 2015, 6: 7294.
- [19] Koos B, Söderberg O. Designing and applying proximity-dependent hybridization chain reaction[J]. Curr Protoc Protein Sci, 2016, 85: 19.28.1–19.28.13.
- [20] Zhou F, Yao Y, Luo J, et al. Proximity hybridization-regulated catalytic DNA hairpin assembly for electrochemical immunoassay based on in situ DNA template-synthesized Pd nanoparticles[J]. Anal Chim Acta, 2017, 969: 8–17.
- [21] Li W, Wang L, Jiang W. A catalytic assembled enzyme-free three-dimensional DNA walker and its sensing application[J]. Chem Commun, 2017, 53(40): 5527–5530.
- [22] Tang YN, Lin Y, Yang XL, et al. Universal strategy to engineer catalytic DNA hairpin assemblies for protein analysis[J]. Anal Chem, 2015, 87(16): 8063–8066.
- [23] Lv Y, Cui L, Peng R, et al. Entropy beacon: a hairpin-free DNA amplification strategy for efficient detection of nucleic acids[J]. Anal Chem, 2015, 87(23): 11714–11720.
- [24] Luo R, Li Y, Lin X, et al. A colorimetric assay method for invA, gene of Salmonella, using DNzyme probe self-assembled gold nanoparticles as single tag[J]. Sens Actuators B Chem, 2014, 198: 87–93.

(责任编辑: 冉明会)