

doi: 10.12452/j.fxcxb.

DNA条形码和滚环扩增信号放大策略构建蛋白激酶A电化学传感器

杨清迪¹, 李蓉¹, 杨金菊¹, 张艳丽^{1*}, 门雪¹, 王红斌¹, 杨文荣²,
庞鹏飞^{1*}

(1. 云南民族大学 化学与环境学院, 云南省教育厅功能纳米材料基化学生物传感科技创新团队, 云南 昆明 650504; 2. 迪肯大学 生命与环境科学学院, 澳大利亚维多利亚州 吉朗 3217)

摘要: 蛋白激酶A (PKA) 在各种生物学过程中发挥重要作用, 可调控细胞信号、细胞增殖、分化和凋亡, 监测和抑制PKA活性在医学诊断和药物发现中具有重要意义。基于DNA条形码 (DNA barcode) 和滚环扩增 (RCA) 信号放大策略构建电化学传感平台, 以实现PKA活性分析及其抑制剂筛选。以金纳米笼/二硫化钼 (AuNCs/MoS₂) 复合材料作为电极修饰材料, 多肽底物链通过金-硫键自组装到修饰电极 (AuNCs/MoS₂/GCE) 表面。多肽底物链在PKA诱导作用下末端发生磷酸化, 进而与DNA条形码标记金纳米粒子 (DNA barcode-AuNPs) 高特异性结合。在T4 DNA连接酶作用下, DNA barcode-AuNPs中DNA链与环形模板DNA链杂交形成挂锁探针, 加入phi29 DNA聚合酶和dNTP后诱导产生RCA反应。RCA产物与血红素 (hemin) 形成具有G-四链体-hemin催化活性模拟酶, 实现电化学响应信号放大及PKA活性分析。该电化学传感平台对PKA活性分析的线性响应范围为5 mU/mL ~ 100 U/mL, 检出限 (LOD) 为1 mU/mL。该方法也可用于PKA抑制剂筛选及人乳腺癌细胞 (MCF-7) 和肝癌细胞 (HepG-2) 裂解液中PKA活性分析, 为激酶活性分析提供一种新的技术方法。

关键词: DNA条形码; 滚环扩增; 蛋白激酶; 磷酸化; 电化学传感器

中图分类号: **文献标识码:** **文章编号:** 1004-4957(XXXX)XX-0001-09

Electrochemical Sensor for PKA Detection Based on DNA Barcode and Rolling Circle Amplification Signal Amplification Strategy

YANG Qing-di¹, LI Rong¹, YANG Jin-ju¹, ZHANG Yan-li^{1*}, MEN Xue¹, WANG Hong-bin¹,
Yang Wen-rong², PANG Peng-fei¹

(1. Functional Nanomaterial-based Chemical and Biological Sensing Technology Innovation Team of Department of Education of Yunnan Province, School of Chemistry and Environment, Yunnan Minzu University, Kunming 650500, China; 2. School of Life and Environmental Sciences, Deakin University, Geelong VIC 3217, Australia)

Abstract: Protein kinase A (PKA) plays an important role in various biological processes, regulating cell signaling, proliferation, differentiation, and apoptosis. Monitoring and inhibiting PKA activity is of great significance in medical diagnosis and drug discovery. An electrochemical sensing platform was constructed based on DNA barcode and rolling circle amplification (RCA) signal amplification strategy for detection of PKA activity and its inhibitor screening. Gold nanocages/molybdenum disulfide (AuNCs/MoS₂) composite was used as electrode modified material. Peptide substrate strand was self-assembled on surface of modified electrode (AuNCs/MoS₂/GCE) by gold-sulfur bonds. Peptide substrate was phosphorylated at the terminal in the presence of PKA, which was further linked with DNA barcode-gold nanoparticles (DNA barcode-AuNPs) through a high specific affinity. The DNA of DNA barcode-AuNPs hybridized with circular template DNA to form a padlock probe in the presence of T4 DNA ligase, initiating RCA reaction in presence phi29 DNA poly-

收稿日期: XXXX-XX-XX; 修回日期: XXXX-XX-XX

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (Nos. 21665027, 21565031); 云南省科技厅应用基础研究项目 (202001AT070012); 云南省教育厅青年基金项目 (2024J0543)

* 通讯作者: 张艳丽, 博士, 教授, 研究方向: 化学与生物传感, E-mail: ylzhang@ymu.edu.cn;
庞鹏飞, 博士, 教授, 研究方向: 电化学和荧光传感分析, E-mail: pfpang@aliyun.com

merase and dNTP. RCA product combined with hemin to form G-quadruplex-hemin structure with mimic enzyme activity, producing an enhanced electrochemical response signals and quantitative analysis of PKA activity. The linear response range of this electrochemical sensing platform for PKA activity analysis is 5 mU/mL to 100 U/mL, with a limit of detection (LOD) of 1 mU/mL. This method can also be used to screen PKA inhibitors and analyze PKA activity in the lysates of human breast cancer cells (MCF-7) and liver cancer cells (HepG-2), providing a new technical method for kinase activity analysis and kinase related drug screening.

Key words: DNA barcode; Rolling circle amplification; Protein kinase; Phosphorylation; Electrochemical sensor

蛋白激酶 (Protein Kinases, PK) 通过催化各种蛋白质底物的磷酸化来控制细胞内信号网络, 其在细胞生理学和各种生物学途径中起着重要作用, 有助于细胞增殖、分化和凋亡的正常进行^[1]。此外, 作为一种翻译后修饰 (如磷酸化、糖基化、甲基化、脂质化、泛素化、酰化和亚硝基化等), PK 调节的蛋白磷酸化是真核细胞中最常见的翻译后修饰之一, 在调节蛋白质结合亲和力、活性和稳定性方面发挥着重要作用^[2]。蛋白激酶 A (Protein Kinase A, PKA) 是最常见的一种激酶, 作为一种癌症生物标志物, PKA 活性的过度表达常与癌症细胞增殖和肿瘤转化有关^[3]。PKA 也是调节广泛细胞过程的触发器, 包括发育、存活、凋亡、代谢控制、转录信号等。值得强调的是, 不同的原发性免疫缺陷疾病 (PIDs) 与 PKA 缺陷有关。因此, 监测和抑制 PKA 活性在医学诊断和药物发现中尤为重要^[4]。

传统的蛋白激酶检测方法主要是基于使用 ³²P 标记的三磷酸腺苷 (ATP)^[5], 但由于放射性废物和 ³²P 标记的 ATP 半衰期短等缺陷, 研究者开发出了多种非放射性方法替代方案, 如核磁共振 (NMR)^[6]、质谱 (MS)^[7]、反相高效液相色谱 (RP-HPLC)^[8]、毛细管区带电泳 (CZE)^[9] 等方法。虽然这些仪器方法的准确度较高, 但存在检测成本高, 需要专业人员, 耗时等不足。因此, 人们又发展出了多种高灵敏度的传感检测技术, 如比色 (CL)^[10-11]、荧光 (FL)^[12-13]、光电化学 (PEC)^[14-15]、电化学发光 (ECL)^[16-17]、电化学 (EC)^[18-21] 等传感方法。其中, 电化学传感器因其信号响应快、灵敏度高、成本低、线性范围宽等优点, 已成为研究 PK 磷酸化和检测其活性的经典分析方法^[4, 22-23]。

DNA 条形码检测 (DNA barcode assay) 技术利用短寡核苷酸作为蛋白质和核酸检测中的靶识别链和替代扩增单元, 是一种用于蛋白质和核酸靶标的扩增和检测技术^[24-27]。利用寡核苷酸修饰纳米颗粒的特性, 包括易于合成、结合能力强、稳定性好、优异的催化能力和光学特性, 通过在纳米粒子表面 (如磁性粒子、金纳米粒子等) 共价附着靶标的识别元件 (如抗体、寡核苷酸、适配体等), 形成 DNA 条形码-纳米颗粒实现蛋白质、核酸和各种小分子的分析检测^[28-31]。作为一种等温核酸扩增技术, 滚环扩增 (Rolling circle amplification, RCA) 因其简单、高效和稳健的核酸扩增优势而受到关注, 在临床应用、食品安全检测和即时检测 (POCT) 等领域获得广泛应用^[32-36]。本工作结合 DNA 条形码修饰金纳米粒子 (DNA barcode-AuNPs) 和 RCA 反应介导信号放大策略构建电化学传感平台, 用于 PKA 活性分析和抑制剂筛选。DNA barcode-AuNPs 中 DNA 链与环形模板 DNA 链杂交形成挂锁探针, 利用 phi29 DNA 聚合酶和 dNTP 诱导产生 RCA 反应, RCA 产物与血红素 (hemin) 形成具有 G-四链体-hemin 催化活性模拟酶, 实现电化学响应信号放大及 PKA 活性分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

电化学分析仪 (Autolab PGSTAT302N, 瑞士万通); 紫外-可见光度计 (UV-2600i, 日本岛津); 扫描电镜 SEM (Sigma 300, 德国 Zeiss); 透射电镜 TEM (JEM-2100, 日本 JEOL); 凝胶电泳仪 (DYCP-31BN, 北京六一); 凝胶成像仪 (ChemiDoc XRS, 美国 Bio-Rad); 高速离心机 (TGL-16G, 上海安亭)。

多肽链 (peptide, Cys-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly) 和三磷酸腺苷 (ATP) 购自上海吉尔生化有限公司; L-半胱氨酸、四水合氯金酸 ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、六亚甲基四胺 (HMTA, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$)、牛血清蛋白 (BSA)、抗坏血酸 (AA)、聚乙烯吡咯烷酮 K30 (PVP)、T4 DNA 连接酶、phi29 DNA 聚合酶、三磷酸脱氧核糖核苷酸 (dNTP) 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 蛋白激酶 A (PKA) 购自广

州 NEB 公司; 磷酸丝氨酸抗体 (p-Ser) 由武汉亚科因生物技术有限公司提供; 辣根过氧化物酶 (HRP)、T4 多聚核苷酸激酶 (T4 PNK)、溶菌酶 (Lys)、碱性磷酸酶 (ALP) 均购自上海生工生物工程股份有限公司; H-89 二盐酸盐 ($C_{20}H_{20}BrN_3O_2S$) 购于美国 EMD Biosciences 公司; 钼酸钠 ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)、亚铁氰化钾 ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$)、铁氰化钾 ($K_3Fe(CN)_6$)、柠檬酸三钠 ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)、氯化血红素 (hemin) 和过氧化氢 (H_2O_2) 均购自天津市丰川科技有限公司。本实验所设计的 DNA 碱基序列列于表 1, 委托大连宝生物工程有限公司合成。实验所用试剂未经说明均为分析纯, 采用高纯灭菌水配制溶液。

表 1 实验所用 DNA 碱基序列
Table 1 Base sequences of the used DNA

Abbreviation	Sequences (from 5' to 3')
DNA S1	5'-GTT GGG TTC ACT AGA GAT ACT GAT TCG GGT TG-SH-3'
DNA S2	5'-PO ₄ -CTC TAG TGA ACC CAA CCC GCC CTA CCC AAG ATG CAA CCC GCC CTA CCC AAC CCG AAT CAG TAT-3'

1.2 MoS₂ 纳米片和 AuNCs 合成

MoS₂ 纳米片利用水热法合成^[20, 37], 具体制备过程如下: 将 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (2.4 g) 溶解于 50 mL 超纯水, 采用超声溶解分散, 滴加 HCl (0.1 mol/L) 调节溶液 pH 6.5, 添加 L-半胱氨酸 (3.6 g), 超声溶解后, 将混合液转移至高压反应釜 (100 mL), 在 200 °C 下反应 48 h。冷却至室温, 并通过离心进行分离 (8000 rpm 离心 5 min), 得到的沉淀物分别用无水乙醇和高纯水洗涤 3 次, 随后 60 °C 下真空干燥过夜, 从而获得 MoS₂ 纳米片。

金纳米笼 (AuNCs) 采用无模板和金种子一锅法制备^[38-39], HAuCl₄ 溶液 (0.75 mmol/L, 5 mL) 搅拌下逐滴加入 5 mL HMTA 溶液 (30 mmol/L), 混合溶液颜色由亮黄变为澄清。然后, 依次加入 5 mL PVP 溶液 (0.30 mol/L)、200 μL AgNO₃ 溶液 (10 mmol/L)、100 μL AA 溶液 (80 mmol/L), 混合液室温下静置反应 12 h, 离心分离 (8000 rpm 离心 10 min), 产物分别用无水乙醇和高纯水洗涤 3 次, 60 °C 真空干燥 12 h, 得到 AuNCs。

1.3 DNA barcode-AuNPs 合成

DNA 条形码修饰金纳米粒子 (DNA barcode-AuNPs) 参照文献报道方法改进后合成^[40-41]。首先, 利用柠檬酸还原法制备 AuNPs, HAuCl₄ 溶液 (1.0 mmol/L, 20 mL) 加热至沸腾后, 快速加入还原剂柠檬酸三钠溶液 (40 mmol/L, 2 mL), 保持沸腾 10 min, 得到酒红色 AuNPs 溶液, 冷却至室温后, 4 °C 下储存。之后, 利用制备的 AuNPs 进一步合成 DNA barcode-AuNPs, 详细过程如下: 移取 30 μL AuNPs 溶液, 依次加入 10 μL DNA S1 溶液 (TCEP 活化, 70 μmol/L) 和 10 μL p-Ser 溶液 (TCEP 活化, 1 μmol/L), 振荡反应 12 h, 得到 DNA barcode-AuNPs。DNA barcode-AuNPs 在 NaCl 溶液 (0.1 mol/L, 50 mmol/L Tris-HCl) 中老化处理 24 h, 离心分离 (12000 rpm 离心 5 min), 高纯水洗涤 3 次, 产物溶解于 Tris-HCl 缓冲液 (25 mmol/L, pH 7.4), 4 °C 储存。

1.4 修饰电极制备

玻碳电极 (GCE, $\varphi = 3$ mm) 用 Al₂O₃ 粉末 (粒径 0.05 μm) 在抛光布上进行打磨抛光, 分别用高纯水、乙醇、高纯水超声清洗 5 min, 空气晾干。移取 8 μL MoS₂ 溶液 (1 mg mL⁻¹) 滴涂于 GCE 表面, 红外灯下干燥, 再滴涂 8 μL AuNCs 溶液 (1 mg mL⁻¹), 干燥后得到 AuNCs/MoS₂/GCE。之后, AuNCs/MoS₂/GCE 表面滴涂 10 μL 多肽溶液 (500 μmol/L, 含 15 mmol/L TCEP), 室温孵育 12 h。将修饰电极插入 PKA (不同浓度) 和 ATP (250 μmol/L) 溶液中磷酸化反应持续 2 h。然后, 电极表面滴加 5 μL BSA 溶液 (1%) 和 5 μL DNA barcode-AuNPs, 室温下孵育 1 h。最后, 电极表面均匀滴加 5 μL T4 DNA 溶液 (5 U/mL, 1 μmol/L DNA S2), 室温孵育 1 h, 再滴涂 5 μL RCA 反应缓冲液 (20 U/mL phi29 DNA, 200 μmol/L dNTP, 0.1 mg/mL BSA), 室温孵育 80 min。修饰电极浸入 hemin 溶液 (2 mmol/L) 反应 1 h, 在 PBS 缓冲液 (10 mmol/L, pH 7.4, 0.2 mmol/L H₂O₂) 中测量传感器电化学响应信号。

1.5 电化学测量

利用电化学阻抗谱 (EIS) 和循环伏安 (CV) 技术对电极修饰过程进行表征与分析, 具体测试条件如下: EIS 测试频率范围 0.1 Hz 至 100 kHz, 电位振幅 10 mV; 电位扫描范围 -0.2 至 0.6 V, 扫描速

率 100 mV/s。采用微分脉冲伏安 (DPV) 技术对 PKA 活性进行定量检测, 测试条件为: 测试底液 PBS 缓冲液 (10 mmol/L, pH 7.4, 0.2 mmol/L H_2O_2), 电位扫描范围 $-0.6 \sim -0.1$ V, 调制和间隔时间分别为 0.02 s 和 0.5 s, 振幅 0.05 V。本实验所有电化学测量均在 25 °C 环境下进行。

实际样品的电化学检测, 通过 DMEM 培养基 (10% 胎牛血清, 37 °C, 5% CO_2) 对人乳腺癌细胞 (MCF-7) 和肝癌细胞 (HepG-2) 进行孵育。2 种细胞培养样品加入细胞裂解液, 4 °C 反应 0.5 h, 细胞裂解后离心分离 (12000 rpm 离心 15 min), 取上清液用 PBS 缓冲液稀释 10 倍, 进行 DPV 电化学测量和加标回收实验。

2 结果与讨论

2.1 传感器制备和检测原理

利用 DNA 条形码 (DNA barcode) 和滚环扩增 (RCA) 信号放大策略用于构建 PKA 电化学传感器, 其修饰过程及检测原理如图 1 所示。采用滴涂法依次将 MoS_2 纳米片和 AuNCs 粒子修饰在 GCE 表面 ($\text{AuNCs}/\text{MoS}_2/\text{GCE}$), 通过 $\text{AuNCs}/\text{MoS}_2$ 复合材料增强电极比表面积及其电催化活性。多肽底物链 (peptide) 通过金-硫键被固定于修饰电极表面 (peptide/ $\text{AuNCs}/\text{MoS}_2/\text{GCE}$)。peptide 在目标物 PKA 和 ATP 作用下末端发生磷酸化 (P-peptide), 磷酸基团 ($-\text{PO}_4^{3-}$) 与 DNA barcode-AuNPs 通过亲和力特异性结合, 将 DNA barcode-AuNPs 修饰到电极表面。在 T4 DNA 连接酶作用下, DNA barcode-AuNPs 中 DNA 链与环形模板 DNA S2 链杂交形成挂锁探针, 加入 phi29 DNA 聚合酶和 dNTP 后诱导产生 RCA 反应。最后, RCA 反应产物与血红素 (hemin) 形成具有 G-四链体-hemin 催化活性模拟酶, 实现电化学响应的信号放大及 PKA 定量测定。

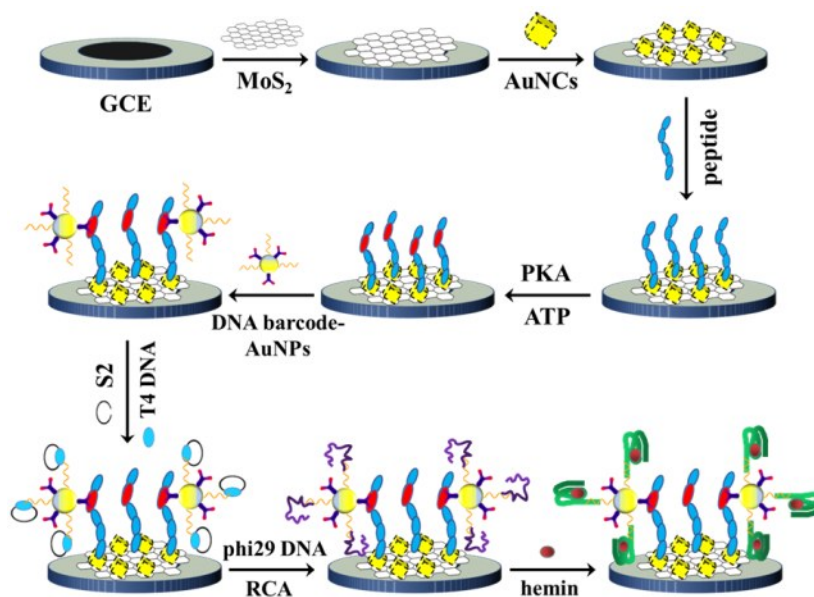


图1 电化学传感器的修饰过程及其检测 PKA 原理示意图

Fig. 1 Schematic illustration of modified process of electrochemical sensor and PKA detection principle

2.2 材料形貌和结构表征分析

MoS_2 和 AuNCs 的形貌与结构通过透射电镜 (TEM)、扫描电镜 (SEM) 及 X 射线能谱分析 (EDS) 进行了详细表征。图 2 展示了 MoS_2 和 AuNCs 的 SEM 图像, 合成得到的 MoS_2 呈层状排列, 具有类似石墨烯的二维结构, 其片层平均直径约 200 nm (图 2A), 在高分辨 TEM 图中, 可以观察到其类似石墨烯的褶皱结构。合成得到的 AuNCs 粒子分散均匀, 呈现边缘亮、中心暗的典型空心立方结构, 平均粒径约为 50 nm (图 2B)。图 2B 中插图展示了 AuNCs 高分辨 TEM 图像, 也可以观察到其独特的中空笼状结构。X 射线能谱分析测试表明, MoS_2 构成元素主要为钼 (Mo) 和硫 (S)。以上结果说明, 电极修饰材料 MoS_2 和 AuNCs 成功合成。

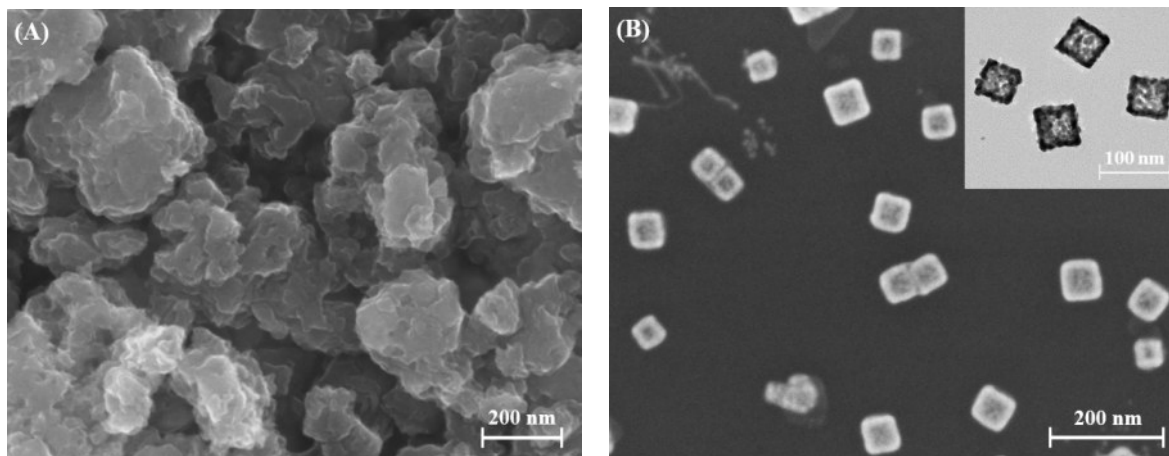


图2 (A) MoS_2 和 (B) AuNCs 的扫描电镜图 (插图为 AuNCs 透射电镜图)
Fig. 2 SEM images of (A) MoS_2 and (B) AuNCs (Inset is TEM image of AuNCs)

2.3 传感器可行性探究

DNA 条形码标记金纳米粒子 (DNA barcode-AuNPs) 通过表面修饰的磷酸丝氨酸抗体 (p-Ser) 与磷酸化多肽链 (P-peptide) 特异性结合固定到电极表面 (图 1), DNA barcode-AuNPs 的紫外-可见吸收光谱和 AuNPs 的 TEM 测试表明, 相较于 AuNPs 在 525 nm 处的表面等离子共振 (SPR) 特征吸收峰, DNA barcode-AuNPs 的 SPR 特征吸收峰略微红移 (528 nm), 并在 257 nm 处观察到 DNA 的紫外-可见特征吸收峰。由 TEM 图可见, 合成的 AuNPs 分散均匀, 呈球形结构, 其平均粒径约为 14 nm。

为了探究所构建 PKA 电化学传感器的可行性, 采用 DPV 法分别测试了传感器对 0 和 50 U/mL PKA 的电化学响应信号大小。如图 3 所示, 当不存在分析物 PKA 时 (0 U/mL PKA), 传感器显示出较低的背景电流 (曲线 a); 当 PKA 浓度为 50 U/mL 时, 传感器呈现明显的 DPV 电流信号 (曲线 b)。上述实验结果说明, DNA barcode-AuNPs 通过磷酸化多肽链固定到修饰电极表面, 结合滚环扩增反应增强传感器电化学响应信号, 用于 PKA 活性的定量分析。

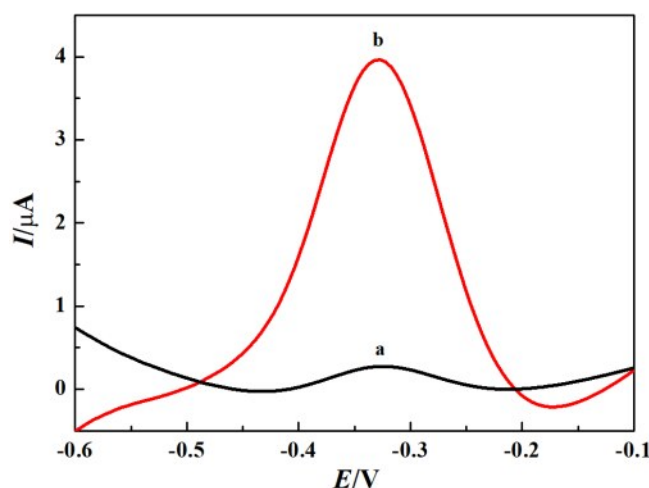


图3 电化学传感器对 PKA 的 DPV 响应曲线 (a: 0 U/mL PKA, b: 50 U/mL PKA)
Fig. 3 DPV response curves of electrochemical sensor for PKA (a: 0 U/mL PKA, b: 50 U/mL PKA)

2.4 修饰电极电化学表征

修饰电极的制备过程, 利用电化学阻抗谱 (EIS) 和循环伏安法 (CV) 进行了电化学表征, 根据 EIS 中半圆直径大小 (电荷转移阻抗, R_{ct}) 和 CV 中峰电流曲线变化来考察传感器制备过程。由图 4A 可见, 工作电极 GCE 滴涂 MoS_2 后, R_{ct} 值显著增大 (曲线 a $\rightarrow$ b), 修饰 AuNCs 后 R_{ct} 值又明显减小 (曲线 b $\rightarrow$ c), 这是由于 MoS_2 半导体性质, 用来提供大比表面积, AuNCs 具有优良导电性。进一步修饰底物肽链 (peptide) 和肽链发生磷酸化 (P-peptide), R_{ct} 值均增大 (曲线 d 和 e), 可归因于多肽生物分子惰

性本质和磷酸基团所带负电荷阻碍了电极表面电子传递。后续逐步修饰 DNA barcode-AuNPs、DNA S2 和 RCA 反应后, 由于引入生物惰性分子和生物分子负电荷与电活性分子的静电排斥作用, R_{ct} 值逐步增大 (曲线 f $\rightarrow$ h)。CV 曲线中峰电流变化方向与 R_{ct} 相反 (图 4B), GCE 表面修饰 MoS_2 、AuNC 后, CV 峰电流先减小后增大, 后续依次修饰 peptide、peptide 磷酸化、修饰 DNA barcode-AuNPs、DNA S2 及 RCA 反应后, CV 曲线峰电流依次逐渐减小。以上 EIS 和 CV 测试结果表明, PKA 电化学传感器成功构建。

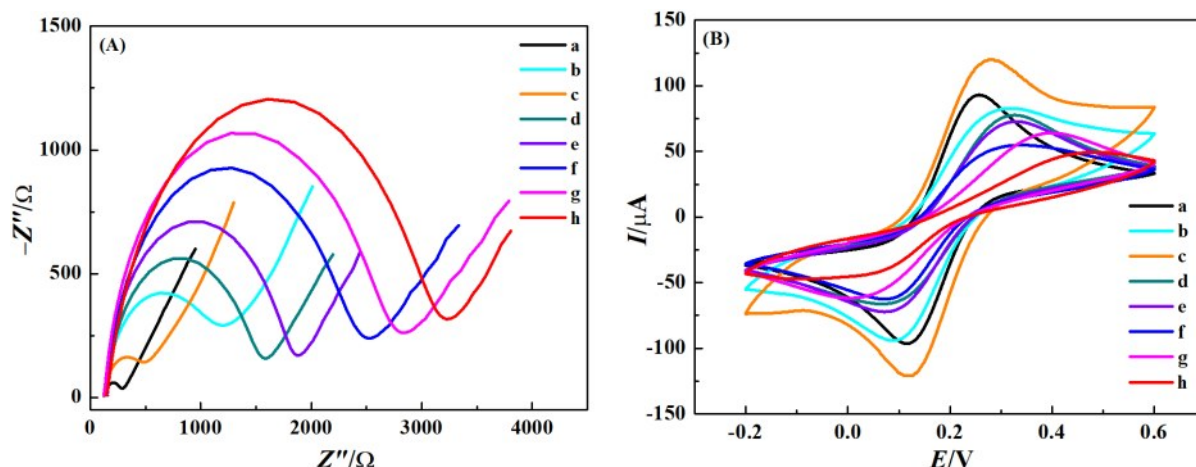


图4 不同步骤修饰GCE的(A)电化学阻抗谱与(B)循环伏安图

Fig. 4 (A) EIS and (B) CVs curves of different modified GCE

a-GCE, b- MoS_2 /GCE, c-AuNCs/ MoS_2 /GCE, d-peptide/AuNCs/ MoS_2 /GCE, e-P-peptide/AuNCs/ MoS_2 /GCE, f-DNA barcode-AuNPs/P-peptide/AuNCs/ MoS_2 /GCE, g-DNA S2/DNA barcode-AuNPs/P-peptide/AuNCs/ MoS_2 /GCE, h-RCA/DNA barcode-AuNPs/P-peptide/AuNCs/ MoS_2 /GCE

2.6 实验参数优化

传感器的制备和测试条件直接影响其分析检测性能, 为了提升并获得最佳分析性能, 对其修饰过程及测试参数 (材料物料比, ATP 浓度, 磷酸化反应时间, DNA barcode-AuNPs 孵育时间, phi29 浓度, RCA 时间, hemin 和 H_2O_2 浓度) 进行了系统优化。电极修饰材料 MoS_2 和 AuNCs 物料比从 1: 3 至 3: 1 范围, 当物料比为 1: 1 时, 传感器显示出最大响应峰值电流。ATP 在 50 至 300 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 响应电流逐渐增大, 当 ATP 浓度为 250 $\mu\text{mol/L}$ 时趋于饱和。多肽底物磷酸化反应时间在 30 至 150 min 范围, 当磷酸化时间为 120 min 时, 传感器响应电流达到饱和状态。P-peptide 与 DNA barcode-AuNPs 孵育时间在 20 至 100 min 范围, 响应信号达到饱和时对应的孵育时间为 60 min。RCA 缓冲液中 phi29 DNA 浓度在 5 至 30 U/mL 范围, 响应峰电流在 phi29 DNA 浓度为 20 U/mL 时达到最大。RCA 反应时间在 20 至 100 min 范围, 传感器响应电流在 RCA 反应 80 min 时达到稳定和最大值。对 hemin 和 H_2O_2 浓度优化结果表明, 随 hemin 和 H_2O_2 浓度增加, 响应峰电流逐渐增大, hemin 和 H_2O_2 浓度分别为 2 mmol/L 和 0.2 mmol/L 时, 传感器响应信号达到饱和状态。基于上述条件优化结果, 选择 MoS_2 和 AuNCs 物料比 1: 1, ATP 浓度 250 $\mu\text{mol/L}$, 多肽底物磷酸化反应时间 120 min, 磷酸化多肽与 DNA barcode-AuNPs 孵育时间 60 min, phi29 DNA 浓度 20 U/mL, RCA 反应时间 80 min, hemin 和 H_2O_2 浓度分别为 2 mmol/L 和 0.2 mmol/L 作为本实验最佳条件, 传感器呈现最优的电化学响应信号。

2.7 PKA 分析性能

优化实验条件下, 采用微分脉冲伏安法 (DPV) 测试所构建电化学传感器对 PKA 不同浓度的 DPV 电流信号。由图 5 可见, 随着目标物 PKA 浓度增大 (0.005, 0.05, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 U/mL), 传感器 DPV 响应信号增大, 这是由于随 PKA 浓度增大, 电极表面多肽底物磷酸化增多, 可结合更多的 DNA barcode-AuNPs, 生成更多的 RCA 反应产物和获得更大的电化学响应信号。DPV 电流信号与 PKA 浓度对数值在 0.005 ~ 100 U/mL 范围内成线性关系 (图 5B 插图), 其线性回归方程为 $I (\mu\text{A}) = 0.93 \lg C (\text{U/mL}) + 2.55$, 相关系数 (R^2) 为 0.9916, 根据 3 倍信噪比计算得到检出限为 0.001 U/mL ($S/N = 3$)。对比本工作与已报道的比色 (CL)、荧光 (FL)、光电化学 (PEC)、电化学发光 (ECL) 等不同传感方法检测 PKA 分析效能, 所构建的电化学传感器呈现低检出限和宽线性范围的

显著优势, 为样品中 PKA 的灵敏和准确分析提供了一种新的检测方法。

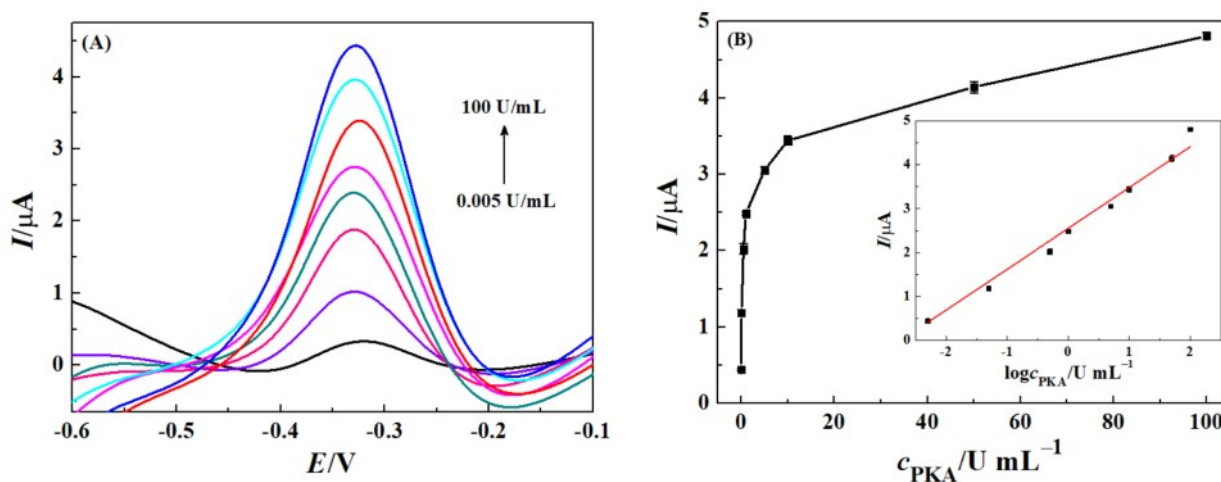


图5 (A) 电化学传感器对 PKA 不同浓度的 DPV 响应曲线和 (B) DPV 峰电流与 PKA 浓度的关系曲线 (插图为 DPV 峰电流与 PKA 浓度对数关系)

Fig. 5 (A) DPV curves of electrochemical sensor to PKA at different concentrations and (B) relationship between DPV current and PKA concentrations (Inset is the plot of DPV current vs. logarithm of PKA concentrations)

以 H-89 二盐酸盐作为蛋白激酶 A 抑制剂, 考察其对 PKA 活性抑制筛选与分析性能, 在 DPV 测试底液加入不同浓度 H-89, 测试传感器对 PKA 的 DPV 信号。随着抑制剂 H-89 浓度升高, 电极表面多肽底物磷酸化过程受到抑制 (PKA 活性减弱), 传感器的 DPV 响应信号逐渐减弱 (图 6)。根据抑制实验计算得到 H-89 对 PKA 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 83 nmol/L, 该值与文献中报道的结果相符合^[20-21]。H-89 抑制实验结果说明, 构建的传感器可应用于筛选蛋白激酶抑制剂, 从而推动与激酶相关药物的发现和分析。

2.8 传感器抗干扰性能和稳定性

传感器的抗干扰能力、重现性和稳定性等性能是其实际应用的一项重要评价指标。首先, 考察了电化学传感器对可能存在于实际样品中的其它种类激酶和蛋白的电化学行为。传感器仅对目标物 PKA (20 U/mL) 表现出显著的 DPV 响应信号, 而对于过量的其它干扰物, 如辣根过氧化物酶 (HRP, 1 mg/mL)、牛血清蛋白 (BSA, 1 mg/mL)、T4 多聚合核苷酸激酶 (T4 PNK, 40 U/mL)、溶菌酶 (Lysozyme, 5 mg/mL) 和碱性磷酸酯酶 (ALP, 2 mg/mL), 传感器未显示出明显的电化学响应信号 (图 7A), 表明制备的 PKA 传感器具有较好的抗干扰能力和良好的选择性。通过相同的制备步骤分别构建了五支传感器, 并测试其对相同浓度 PKA (20 U/mL) 的 DPV 响应信号 (如图 7B 所示), 5 支传感器的电化学响应信号相接近, 其相对标准偏差值 (RSDs) < 4.2%, 表明传感器良好的重现性。此外, 考察了 PKA 传感器的时间稳定性, 制备好的修饰电极于冰箱中 4℃ 存储不同时间, 测试其对相同 PKA 的 DPV 响应信号, 实验结果显示, 传感器存储 15 天后, 其 DPV 响应信号仍能保持其初始响应信号的 91% 以上, 说明传感器具有好的稳定性。

2.10 细胞样品测定

以细胞裂解液作为实际样品考察传感器对 PKA 检测的实用性, 肝癌细胞 (HepG2) 和人乳腺癌细胞 (MCF7) 在 DMEM 中培养后, 加入细胞裂解液, 离心收集上清液, PBS 缓冲液稀释 10 倍, 采用标

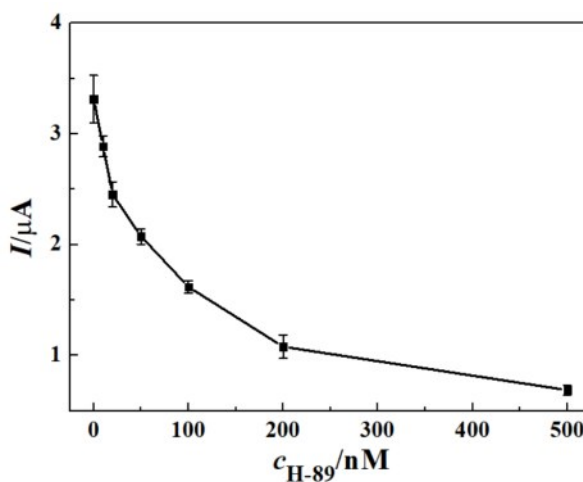


图6 H-89 对 PKA 活性的抑制实验

Fig. 6 Inhibition experiment of H-89 on PKA activity

准加入法进行回收实验。HepG2和MCF7裂解液中分别加入1, 50和100 U/mL PKA, 测定结果列于表2, 传感器DPV响应信号的相对标准偏差值(RSDs)为2.8%~4.1%, 回收率为95.07%~100.86%, 测定结果表明, 所制备的电化学传感器在实际样品细胞裂解液中对PKA的检测是可行的。

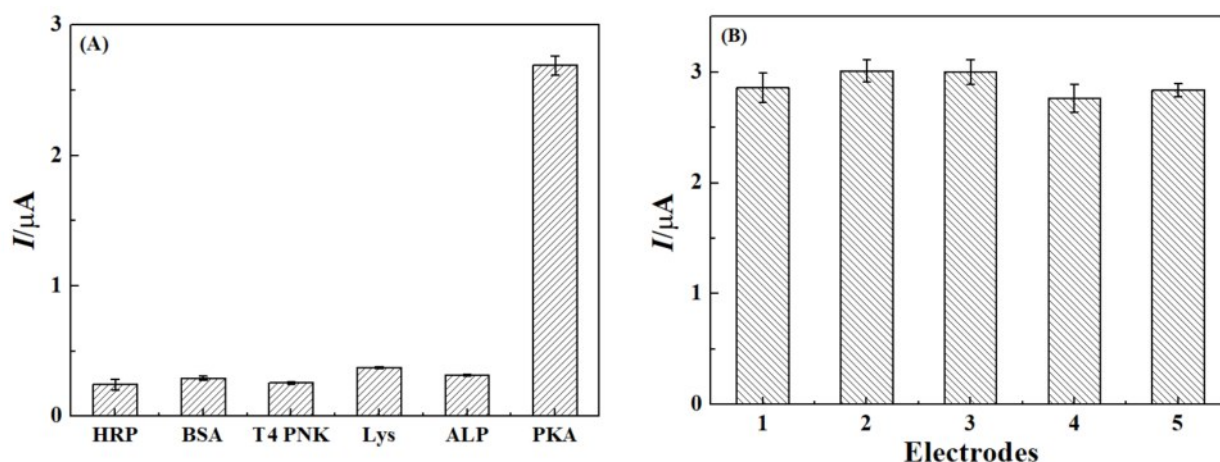


图7 电化学传感器的(A)选择性和(B)重现性

Fig. 7 (A) Selectivity and (B) reproducibility of the electrochemical sensor

表1 细胞裂解液中PKA测定结果

Table 1 Determination results of PKA activity in cell lysates ($n = 3$)

Cell samples	Added/ (U/mL)	Found/ (U/mL)	RSD/ (% , $n = 3$)	Recovery/ (%)
HepG2	1	1.0026	3.2	100.26
	50	50.43	2.9	100.86
	100	95.07	3.6	95.07
MCF7	1	0.9824	3.1	98.24
	50	48.46	2.8	96.92
	100	100.34	4.1	100.34

3 结 论

本文基于DNA条形码(DNA barcode)和滚环扩增(RCA)介导的信号放大策略构建了一种电化学传感平台, 实现对蛋白激酶A(PKA)活性分析及其抑制剂筛选。高导电性和大比表面积的金纳米笼/二硫化钼(AuNCs/MoS₂)作为电极修饰功能材料, 多肽底物链通过金-硫键自组装到修饰电极表面。多肽底物链末端被PKA诱导磷酸化后, 进而与DNA条形码标记金纳米粒子(DNA barcode-AuNPs)高特异性结合, T4 DNA连接酶作用下, DNA barcode-AuNPs中DNA链与环形模板DNA链杂交形成挂锁探针, phi29 DNA聚合酶和dNTP诱导产生RCA反应。RCA产物与血红素(hemin)形成G-四链体-hemin催化活性模拟酶, 实现电化学响应信号放大及PKA活性定量分析。构建的电化学传感平台具有良好的传感分析性能, 成功用于细胞裂解液中PKA活性分析, 为激酶活性分析及其抑制剂筛选提供一种新的分析检测方法。

参考文献:

- [1] Nagarajan S N, Lenoir C, Grangeasse C. *Trends Microbiol.*, **2022**, 30 (6): 553 - 566.
- [2] Tarrant M K, Cole P A. *Annu. Rev. Biochem.*, **2009**, 78: 797 - 825.
- [3] Cho Y S, Park Y G, Lee Y N, Kim M K, Bates S, Tan L Z, Cho-Chung Y S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, 97 (2): 835 - 840.
- [4] Fathi N, Saadati A, Alimohammadi M, Abolhassani H, Sharifi S, Rezaei N, Hasanzadeh M. *Microchem. J.*, **2022**, 182: 107961.
- [5] Hastie C J, McLauchlan H J, Cohen P. *Nat. Protoc.*, **2006**, 1: 968 - 971.
- [6] Keane N E, Chavanieu A, Quirk P G, Evans J S, Levine B A, Calas B, Wei L, Ellis L. *Eur. J. Biochem.*, **1994**, 226 (2): 525 - 536.
- [7] Kim Y P, Oh E, Oh Y H, Moon D W, Lee T G, Kim H S. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46: 6816 - 6819.
- [8] Cann A D, Wolf I, Kohanski R A. *Anal. Biochem.*, **1997**, 247 (2): 327 - 332.

- [9] Dawson J F, Boland M P, Holmes C F B. *Anal. Biochem.*, **1994**, 220 (2): 340 – 345.
- [10] Shen C C, Zhang K N, Gao N X, Wei S J, Liu G M, Chai Y L, Yang M H. *Microchim. Acta*, **2016**, 183: 2933 – 2939.
- [11] Liu S S, Zheng S T, Chu J. *Anal. Sci.*, **2021**, 37 (7): 1039 – 1043.
- [12] Feng T T, Yan S Z, Wang Z, Fan X H. *Luminescence*, **2022**, 37 (6): 922 – 929.
- [13] Liu Z P, Bai J, Liang C X, Wang Y M, Nie H L, Liu X X, Yan H Y. *Biosens. Bioelectron.*, **2022**, 203: 114055.
- [14] Yan Z Y, Li Y S, Wei X X, Li P, Jiang J J, Chen Y J, Duan P F, Wang X Y, Deng P Y, Liu X W. *Biosens. Bioelectron. X*, **2022**, 11: 100204.
- [15] Wang Y, Li X, Waterhouse G I N, Zhou Y L, Yin H S, Ai S Y. *Talanta*, **2019**, 196: 197 – 203.
- [16] Sun Y, Zhang Y M, Zhang H X, Liu M L, Liu Y. *Anal. Chem.*, **2020**, 92 (15): 10668 – 10676.
- [17] Luo Q S, Li Y, Liang R P, Cao S P, Jin H J, Qiu J D. *J. Electroanal. Chem.*, **2020**, 856: 113706.
- [18] Men X, Li R, Su A W, Zhang Y L, Gao L X, Wu C X, Wang H B, Yang W R, Pang P F. *Microchem. J.*, **2024**, 207: 112272.
- [19] Liao Y, Zhang Y Q, Su A W, Zhang Y L, Wang H B, Yang W R, Pang P F. *Talanta*, **2023**, 260: 124612.
- [20] Zhang H L, Su A W, Wu Y J, Zhang Y L, Wang H B, Yang W R, Pang P F. *J. Instrum. Anal.* (张慧莲, 苏爱雯, 吴永菊, 张艳丽, 王红斌, 杨文荣, 庞鹏飞. 分析测试学报), **2023**, 42 (11): 1452 – 1460.
- [21] Hu Q, Su L F, Luo Y L, Cao X J, Hu S H, Li S Q, Liang Y Y, Liu S J, Xu W J, Qin D D, Niu L. *Anal. Chem.*, **2022**, 94: 6200 – 6205.
- [22] Yan Z Y, Deng P Y, Liu Y. *Int. J. Mol. Sci.*, **2019**, 20 (6): 1440.
- [23] Ragone A, Salzillo A, Spina A, Zappavigna S, Caraglia M, Sapio A, Naviglio S. *J. Clin. Med.*, **2021**, 10 (18): 4096.
- [24] Nam J M, Park S J, Mirkin C A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124 (15): 3820 – 3821.
- [25] Nam J M, Thaxton C S, Mirkin C A. *Science*, **2003**, 301 (5641): 1884 – 1886.
- [26] Hill H D, Mirkin C A. *Nat. Protoc.*, **2006**, 1: 324 – 336.
- [27] Wang X F, Qi H L, Zhang X C. *Sci. Sin. Chim.* (王晓飞, 漆红兰, 张成孝. 中国科学: 化学), **2021**, 51 (3): 388 – 394.
- [28] Wang Y S, Jin M J, Chen G, Cui X Y, Zhang Y D, Li M J, Liao Y, Zhang X Y, Qin G X, Yan F Y, Abd El-Aty A M, Wang J. *J. Adv. Res.*, **2019**, 20: 23 – 32.
- [29] Hou Y, Chen R P, Wang Z G, Lu R, Wang Y H, Ren S Y, Li S, Wang Y, Han T, Yang S P, Zhou H Y, Gao Z X. *Anal. Chim. Acta*, **2023**, 1267: 341351.
- [30] Beiderman M, Ashkenazy A, Segal E, Barnoy E A, Motiei M, Sadan T, Salomon A, Rahimipour S, Fixler D, Popovtzer R. *ACS Appl. Nano Mater.*, **2020**, 3 (8): 8414 – 8423.
- [31] Kantak M, Batra P, Shende P. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2023**, 230: 123262.
- [32] Liu J, Xie G Y, Lv S D, Xiong Q, Xu H Y. *TrAC-Trend. Anal. Chem.*, **2023**, 160: 116953.
- [33] Xu L L, Duan J X, Chen J M, Ding S J, Cheng W. *Anal. Chim. Acta*, **2021**, 1148: 238187.
- [34] Zhang Y Q, Liao Y, Yin X H, Zhang Y L, Yang Z, Wang H B, Yang W R, Pang P F. *Microchem. J.*, **2023**, 189: 108544.
- [35] Liu J, Liang T B, Xu H Y. *J. Instrum. Anal.* (刘巨, 梁涛波, 许恒毅. 分析测试学报), **2020**, 39 (12): 1556 – 1560.
- [36] Gao X Y, Li J H. *Sci. Sin. Chim.* (高晓怡, 李景虹. 中国科学: 化学), **2022**, 52 (9): 1609 – 1626.
- [37] Zhang Y L, Chen M, Li H Y, Yan F Q, Pang P F, Wang H B, Wu Z, Yang W R. *Sens. Actuators B*, **2017**, 244: 606 – 615.
- [38] Wang Z Y, Li W, Gong Z, Sun P R, Zhou T, Cao X W. *New J. Chem.*, **2019**, 43: 1733 – 1742.
- [39] Zhang Y, Sun Y J, Liu Z L, Xu F G, Cui K, Shi Y, Wen Z W, Li Z. *J. Electroanal. Chem.*, **2011**, 656 (1–2): 23 – 28.
- [40] Zhu L P, Ye J, Yan M X, Zhu Q J, Wang S, Huang J S, Yang X R. *ACS Sens.*, **2019**, 4 (10): 2778 – 2785.
- [41] Hou T, Liu X J, Wang X Z, Jiang A W, Liu S F, Li F. *Sens. Actuators B*, **2014**, 190: 384 – 388.

(责任编辑:)