

紫外光激活的催化发夹自组装/脱氧核酶级联扩增传感器的研究及对miR-21的检测

李星月, 王国瑞, 王雪, 舒杨

(东北大学理学院化学系, 辽宁沈阳 110819)

摘要: MicroRNA-21 (miR-21) 作为人类基因组最早发现的miRNA之一, 为癌症的早期诊断、药物治疗和预后评估提供重要信息。针对miRNA丰度低、背景干扰复杂等问题, 本研究利用紫外光触发DNA链断裂, 结合催化发夹自组装(CHA)与脱氧核酶(DNAzyme)放大技术, 构建了一种光控、级联放大传感器(CHA-DNAzyme)。CHA的引发链最初被包含光裂解键的发夹链封锁, 仅在紫外光和靶标miR-21共同作用下, 引发链能被释放并启动CHA反应。同时, 无催化活性的DNAzyme片段分别整合于亚稳态的CHA发夹反应物, 在CHA过程中形成DNAzyme。活性的DNAzyme循环切割底物链S, 实现信号放大。在最佳条件下, 该平台在0.3-10 nM范围内呈现良好的线性关系, 检出限为189 pM。此外, 该平台对不同碱基错配序列具有高特异性, 且成功用于稀释血清样本中miR-21的检测。总之, 该平台在miRNA高灵敏分析中具有广泛的应用潜力。

关键词: 催化发夹自组装; DNAzyme; 信号放大; 紫外光激活; miR-21

中图分类号: **文献标识码:** **文章编号:** 1004-4957(XXXX)XX-0001-14

Research on a UV-Activated Catalytic Hairpin Assembly/Deoxyribozyme Cascade Amplification Sensor for the Detection of miR-21

LI Xing-yue, Wang Guo-rui, Wang Xue, Shu Yang

(Department of Chemistry, School of Science, Northeastern University, Shenyang, 110819, China)

Abstract: MicroRNA-21 (miR-21), one of the earliest discovered miRNAs in the human genome, provides crucial information for the early diagnosis, drug treatment, and prognosis assessment of cancer. To address the issues of low miRNA abundance and complex background interference, this study developed a light-controlled, cascade amplification sensor (CHA-DNAzyme) by combining ultraviolet light-triggered DNA strand cleavage with catalytic hairpin assembly (CHA) and deoxyribozyme (DNAzyme) amplification techniques. The initiation strand of CHA was initially blocked by a hairpin strand containing a photolysis bond. Only under the combined action of ultraviolet light and target miR-21 could the initiation strand be released and the CHA reaction initiated. Meanwhile, inactive DNAzyme fragments were integrated into the metastable CHA hairpin reactants, forming active DNAzyme during the CHA process. The active DNAzyme cyclically cleaved the substrate strand S, achieving signal amplification. Under optimal conditions, the platform exhibited a good linear relationship within the range of 0.3-10 nM, with a detection limit of 189 pM. Additionally, the platform demonstrated high specificity for different base-mismatched sequences and was successfully applied to the detection of miR-21 in diluted serum samples. In conclusion, this platform holds great potential for high-sensitivity miRNA analysis.

Key words: Catalytic hairpin assembly; DNAzyme; Signal amplification; Ultraviolet light activation; miR-21

微小RNA (miRNA) 是一类长度为19-25个核苷酸的单链非编码RNA, 在基因沉默、转录后调控等过程中发挥关键作用^[1, 2]。近年大量证据表明, miRNA几乎在所有肿瘤中均异常表达^[3-5], 可作为疾病的早期诊断和预后评估的生物标志物^[6, 7]。其中, miR-21在肺癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤中过度表达, 其表达水平与肿瘤分期、转移及预后密切相关, 因此miR-21的精准检测具有重要临床意义^[8-10]。

迄今为止,研究者已经开发了Northern印迹^[11]、微阵列技术^[12]和逆转录定量聚合酶链反应(RT-qPCR)^[13]等传统方法。然而,这些方法在实际应用中仍面临挑战:Northern印迹法操作复杂,需经历电泳、转膜及荧光或放射性标记等步骤,且仅能获得半定量结果;微阵列芯片检测的特异性和灵敏度不足;RT-qPCR需要额外的逆转录操作、复杂的热循环及酶的参与。因此,开发一种操作简便、性能可靠的miRNA传感平台具有重要意义。

为克服传统方法的局限,多种新型等温扩增技术被用于miRNA检测。催化发夹自组装(Catalytic Hairpin Assembly, CHA)是由引发链依次打开发夹H1和H2,形成稳定的双链复合物,同时自身被置换出来进入下一轮循环的等温扩增技术。CHA虽然具有操作简便、无需热循环等优势,但单一CHA的广泛应用仍受限于其固有的扩增效率。为弥补这一不足,研究者将CHA与滚环扩增(RCA,涉及蛋白质酶)^[14, 15]、无蛋白酶杂交链式反应(HCR)^[16, 17]以及熵驱动催化策略(EDC)^[18]等其他扩增方法相结合,开发了级联扩增技术,并将其应用于传感平台。脱氧核酶(DNAzyme)作为一种人工合成的功能性核酸,可在Mg²⁺、Mn²⁺等特定金属离子存在下催化多种反应^[19, 20]。通过合理设计其底物结合臂序列,DNAzyme在靶标识别和切割中更具灵活性。将DNAzyme与CHA结合构建级联放大体系,可有效弥补单一CHA扩增效率不足的缺陷^[21-23]。CHA/DNAzyme级联扩增策略避免了对外源蛋白酶及热循环的依赖,且操作简单、设计灵活,这使其在开发低成本的检测与诊断方法方面展现出独特优势。近年来,基于CHA/DNAzyme级联扩增的miRNA传感策略取得了重要研究进展。然而,这类等温核酸级联扩增方法处于“始终活跃”状态,易与复杂生物环境中的非靶标分子结合而被激活,导致高背景信号甚至假阳性结果^[24, 25]。因此,开发一种时空可控的传感策略,实现对miRNA的精准触发式检测,仍是当前该领域的重要挑战。

针对上述问题,本文构建了一种基于CHA/DNAzyme的紫外光(Ultraviolet, UV)激活生物传感器,用于miR-21的高灵敏检测。该平台通过在辅助发夹BH0中引入光解键,实现了对传感器的光控“按需激活”。经紫外光照射后,BH0中的光解键断裂,其后的5个碱基序列因无法形成稳定的双链而脱落,得到产物H0。当体系中存在靶标miR-21时,miR-21与发夹H0杂交,释放出隐藏其中的CHA引发序列,启动CHA扩增反应。产物H1/H2组装形成具有高效催化活性的DNAzyme。该DNAzyme对底物链S(两端分别修饰荧光基团与猝灭剂)进行循环切割,从而输出显著荧光信号。当体系中没有靶标miR-21或没有紫外光照射时,CHA的引发序列被锁定在发夹结构中,传感器保持沉默。通过将紫外光激活与级联CHA/DNAzyme扩增策略相结合,本方法成功实现了高灵敏度、高特异性的miR-21定量检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

氯化钾(KCl)、氯化钠(NaCl)、氯化镁(MgCl₂)、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)、过硫酸铵(APS)、盐酸(HCl)均由阿拉丁公司(中国上海)提供。6×甘油凝胶上样缓冲液VII、4SGelred 10000×水溶液、1×TE缓冲液、DEPC处理水以及10×TBE预混粉末购自生工生物工程上海(股份)有限公司。四甲基乙二胺(TEMED)、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺以及丙烯酰胺均由麦克林生物化学公司(中国上海)提供。其余所有溶液均使用微纯水(18.2 MΩ·cm)配制而成。本研究中所用的DNA寡核苷酸均由生工生物工程上海(股份)有限公司合成并纯化。具体序列列于表1中。

荧光光谱记录在RF-6000荧光分光光度计上(岛津,日本)。聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)在DYCZ-24F电泳仪(北京,中国)上进行。寡核苷酸的浓度用Nanodrop 2000(牛津,英国)测定。

1.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析(PAGE)

BH0、H0、H1、H2在退火反应缓冲液(20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH为7.9)中从95°C至25°C、-1.3°C/min退火形成稳定结构,放于4°C冰箱保存备用。PAGE实验样品制备:向离心管中加入2 μL H1-2 (2.5 μM)、2 μL H2-2 (2.5 μM)、1 μL BH0 (1 μM)、1 μL miR-21 (1 μM),用反应缓冲溶液(20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 100 mM NaCl, 30 mM MgCl₂, pH为7.9)补齐至10 μL。紫外光激活的参数:使用波长为365 nm的UV紫外线鉴定灯,功率为42 W,照射距离为4.2 cm,

照射时间为 30 s。样品经 37°C 孵育 5 h。凝胶在 130 V 恒定电压下, 0.5×TBE 缓冲液中运行 60 min。随后, 用 4SGelred 染料染色核酸 10 min, 凝胶成像分析系统成像。

表 1 实验中所涉及的核酸序列

Table 1 Nucleic acid sequences involved in the experiment

引物名称	引物序列 (5'-3')	长度/nt
H0-9	GAAACACCACCCACGCTAGCCTTCAACATCAGTCTGATAAGCTAAGGCTAGC	52
H1-2	GGGTCTGAAGGCTAGCGTGGGTGGTGTTCACCATGTACAACACCACCCACGC	53
H2-2	GCGTGGGTGGTGTGTACATGGTGAACACCACCCACTACAACGACTTGCTCAG	54
BH0	GAAACACCACCCACGCTAGCCTTCAACATCAGTCTGATAAGCTAAGGCTAGC/iPCLink/GTGGG	57
S	FAM-CTGAGCAAG/rA/rU/TCAGACCC-BHQ1	19
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	22
Mut-1	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	22
Mut-2	UAGCUUAUCAGACUGAUGAAGA	22
Mut-3	UAGCUUAUCAGACUGAUGUACT	22
H0-7	GAAACACCACCCACGCTAGCCTTCAACATCAGTCTGATAAGCTAAGGCTA	50
H0-11	GAAACACCACCCACGCTAGCCTTCAACATCAGTCTGATAAGCTAAGGCTAGCGT	54
H0-13	GAAACACCACCCACGCTAGCCTTCAACATCAGTCTGATAAGCTAAGGCTAGCGTGG	56
H1-1	GGGTCTGAAGGCTAGCGTGGGTGGTGTTCACCATGTACAACACCACCCACGC	53
H1-3	GGGTCTGAAGGCTAGCGTGGGTGGTGTTCATCATGTACAACACCACCCACGC	53
H1-4	GGGTCTGAAGGCTAGCGTGGGTGGTGTTCATAATGTACAACACCACCCACGC	53
H2-3	GCGTGGGTGGTGTGTACATGATGAAACACCACCCACTACAACGACTTGCTCAG	54
H2-4	GCGTGGGTGGTGTGTACATTATGAAACACCACCCACTACAACGACTTGCTCAG	54
miR-221	AGCUACAUUGUCUGCGGGUUUC	23
miR-155	UUA AUGCUA AUCGUGAUAGGGGU	23
miR-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUA	23
miR-10b	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG	23

1.3 CHA-DNAzyme 传感器检测 miR-21

分别移取 2 μL 2.5 μM H1-2、2 μL 2.5 μM H2-2、1 μL 1 μM BH0、1 μL 1 μM miR-21、1 μL 10 μM S, 以及 1 μL 10×反应缓冲溶液, 使用 DEPC 水补齐至 10 μL , 用移液枪吹吸混匀。样品在 37°C PCR 仪中孵育 5 小时, 以保证 CHA-DNAzyme 级联扩增反应充分进行。孵育结束后, 向离心管内加入 DEPC 水, 将反应体系总体积补齐至 100 μL , 混匀。对反应体系进行荧光强度检测。激发波长为 490 nm, 荧光发射光谱的扫描范围为 510-710 nm, 狭缝宽度 10 nm。

1.4 特异性分析

在进行特异性分析时, 采用相同浓度的错配序列 (Mut-1、Mut-2、Mut-3) 以及其他干扰 miRNA (miR-10b、miR-221、miR-155、miR-17) 代替上述反应中的 miR-21, 用移液枪吹吸混匀。将样品经紫外光照射后, 37°C 孵育 5 h, 用 DEPC 水补齐至 100 μL , 按照 1.3 节中设定的荧光检测参数, 按照 1.3 节中的荧光法进行检测。

1.5 实际样分析

为进一步评估所构建生物传感器在复杂生物基质中的实际分析性能, 将不同浓度梯度的 miR-21 标准品分别添加至上述 5% 健康人血清基质中, 混匀。其中 miR-21 标准品的浓度设定为 1 nM、5 nM、10 nM 三个梯度。采用本研究构建的 CHA-DNAzyme 传感器, 对每个加标样品中的 miR-21 浓度进行精准的定量检测。每个浓度梯度的加标样品均设置三组平行实验。

2 结果与讨论

2.1 紫外光激活的 CHA-DNAzyme 传感器构建

紫外光激活的 CHA-DNAzyme 级联扩增的传感器的构建如图 1 所示。无紫外光照射时, CHA 的引发序列被锁定于辅助发夹 BH0 的发夹结构内, H1 和 H2 以相对稳定的构象共存, 分裂型 10-23 DNAzyme 序列分别整合于发夹 H1 和发夹 H2 中。整个体系处于沉默状态。

紫外光照射下, 辅助发夹 BH0 中的光解键断裂, 一段 5 个碱基的短链序列因杂交不稳定而自发解离, 剩余部分形成活化的发夹 H0。H0 与靶标 miR-21 互补配对后, CHA 的引发序列被暴露。该引发序列可通过 toehold 介导的链置换反应, 特异性识别并结合发夹 H1 的 toehold, 形成 H0/H1 双链。此时,

miR-21 被置换释放, 可参与下一轮循环。同时, H1 中新暴露的序列进一步打开发夹 H2, 形成 H1/H2 双链。CHA 过程使分别整合在 H1 和 H2 中的两个分裂型 10-23 DNAzyme 片段相互靠近并组装, 形成具有完整催化活性的 DNAzyme。在 Mg^{2+} 存在下, DNAzyme 高效循环切割底物链 S, 使荧光基团与淬灭基团分离, 输出显著荧光信号。综上所述, 该传感器将光控激活与信号级联放大相结合, 实现 miR-21 的高灵敏度检测。

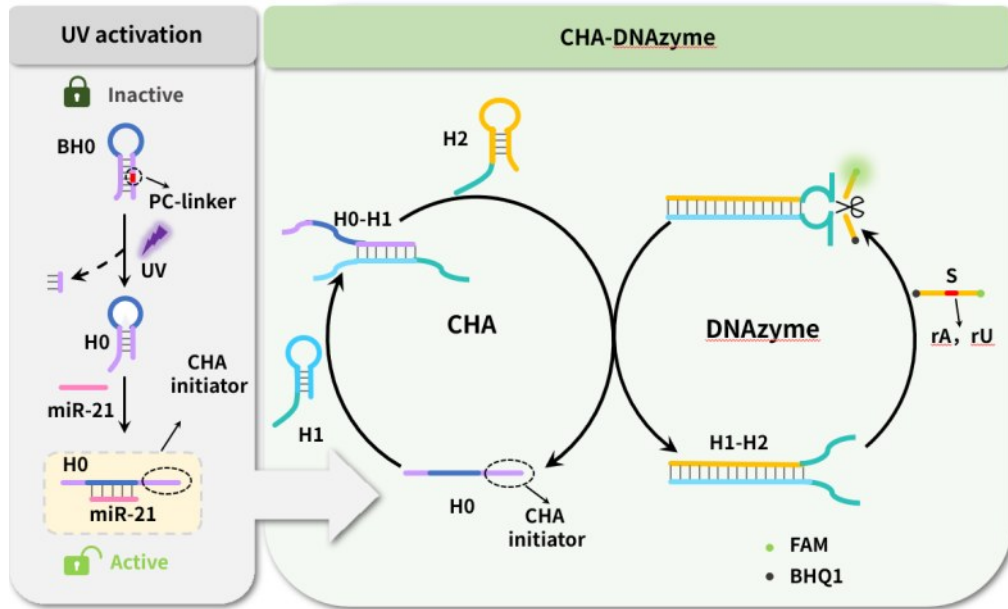


图1 紫外光激活的CHA-DNAzyme级联扩增的传感器检测miR-21的示意图。

Fig. 1 Schematic diagram of the sensor for detecting miR-21 based on the ultraviolet light-activated CHA-DNAzyme cascade amplification.

2.2 紫外光激活的CHA-DNAzyme传感器的可行性验证

紫外光激活的CHA-DNAzyme生物传感器的成功运行依赖紫外光的激活和miR-21催化的CHA扩增。我们首先利用PAGE实验验证了紫外光激活的CHA传感器的成功构建。如图2A所示, 在无miR-21和紫外光照射(泳道5)时, 出现了一条十分微弱的新带且电泳迁移率较低, 对应H1/H2双链, 这表明CHA的引发序列被有效封锁于发夹BH0中。仅有miR-21或仅紫外光照射时, CHA产物对应的条带微弱, 表明传感器保持沉默状态(泳道6、7)。相比之下, 当紫外光和miR-21同时存在时(泳道8), H1和H2的条带显著减弱, 同时出现大量明亮的H1/H2双链条带。这些结果共同证明了光激活的CHA模块的成功运行。

随后, 我们进一步进行荧光发射光谱分析, 以评估紫外光激活的CHA-DNAzyme的传感器检测miR-21的可行性。实验结果如图2B所示, 当没有紫外光照射时, 无论有无靶标miR-21, 都没有捕获到明显的FAM荧光信号, 表明几乎没有组装出具有活性的DNAzyme。紫外光激活后, 在不添加miR-21的情况下, 荧光强度几乎没有变化, 表明该传感器的背景信号较低。只有紫外光照射和miR-21同时存在时, 能够观察到显著的荧光信号, 表明启动CHA反应, 成功组装DNAzyme以切割底物S。这些结果证明了我们所构建的CHA-DNAzyme传感器仅在光激活后才开启信号响应, 实现了对miR-21检测过程的时间可控性。

2.3 序列优化

为了获得良好的传感性能, 我们对H1环区GC碱基的总个数、H0茎区碱基个数进行了优化。保持H1发夹其他碱基不改变, 仅改变该区域的GC碱基总个数, 以调控H1/H2双链体的稳定性。在互补配对碱基总数相同的情况下, GC碱基对之间形成3个氢键, 而AT碱基对之间形成2个氢键, 因此, GC含量越高, 双链杂交越稳定。但是, 无靶标时, 体系中自发形成H1/H2双链带来的非特异性信号泄露也会增加。我们设置4组不同GC碱基个数, 分别为3、4、5、6。如图3A所示, 随着环区GC碱基总个数由3个增加到6个时, 该系统的信噪比(S/N)先增加后降低, 因此, 我们选择GC碱基总个数为5的

序列，用于后续实验。

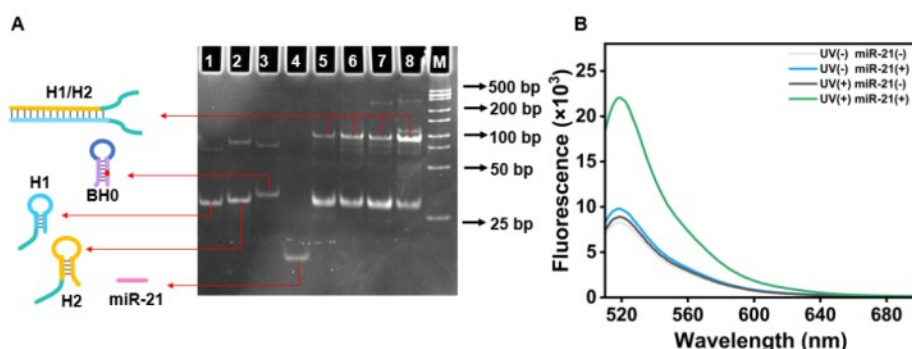


图2 紫外光激活的CHA-DNAzyme传感器的可行性验证。(A) 紫外光激活的CHA传感单元的凝胶电泳验证。泳道1: H1; 泳道2: H2; 泳道3: BH0; 泳道4: miR-21; 泳道5: H1+H2+BH0; 泳道6: H1+H2+BH0+miR-21; 泳道7: H1+H2+BH0+UV; 泳道8: H1+H2+BH0+miR-21+UV; 泳道9: DNA Marker。(B) 紫外光激活的CHA-DNAzyme传感器的荧光光谱验证。

Fig. 2 Feasibility verification of ultraviolet-activated CHA-DNAzyme sensor. (A) Gel electrophoresis experiment of CHA sensor activated by UV light. Lane 1: H1; Lane 2: H2; Lane 3: BH0; Lane 4: miR-21; Lane 5: H1+H2+BH0; Lane 6: H1+H2+BH0+miR-21; Lane 7: H1+H2+BH0+UV; Lane 8: H1+H2+BH0+miR-21+UV; Lane 9: DNA Marker. (B) Fluorescence spectral verification of the sensor of CHA-DNAzyme activated by ultraviolet light.

辅助发夹H0的稳定性直接影响着CHA引发序列的封锁效果。通过调整H0茎区的碱基个数从而调控发夹H0的稳定性。凝胶电泳结果显示(图3B), 具有较短的茎部序列(7 bp)的发夹H0-7(泳道8)存在明显的泄露, 表明H0-7稳定性不足, CHA引发序列未能被有效封锁。反之, 如果发夹H0的茎部序列(13 bp)过长(泳道3), 反应物H1、H2的消耗几乎可以忽略不计, 表明发夹H0-13过于稳定, CHA引发序列在遇到靶标miR-21后未能完全暴露。根据反应物H1和H2的消耗水平, 最终我们选择茎部碱基对为9 bp的H0-9开展后续实验。

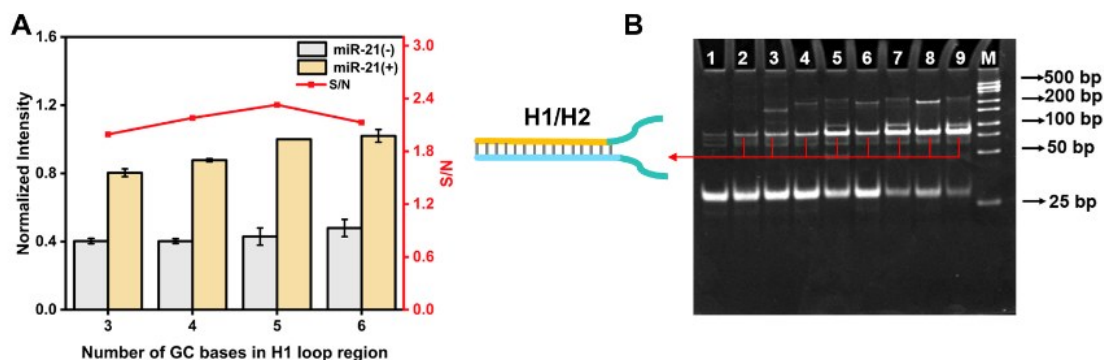


图3 (A) H1环区GC碱基总个数优化。每个数据点为三组平行实验的平均值(平均值±标准偏差)。(B) H0茎区序列优化。泳道1: H1-2+H2-2; 泳道2: H1-2+H2-2+H0-13; 泳道3: H1-2+H2-2+H0-13+miR-21; 泳道4: H1-2+H2-2+H0-11; 泳道5: H1-2+H2-2+H0-11+miR-21; 泳道6: H1-2+H2-2+H0-9; 泳道7: H1-2+H2-2+H0-9+miR-21; 泳道8: H1-2+H2-2+H0-7; 泳道9: H1-2+H2-2+H0-7+miR-21; 泳道10: DNA Marker。

Fig. 3 (A) Optimization of the total number of GC bases in the H1 ring area. Each data point represents the average value of three sets of parallel experiments (average value ± standard deviation). (B) Sequence optimization of the H0 stem region. Lane 1: H1-2+H2-2 Lane 2: H1-2+H2-2+H0-13 Lane 3: H1-2+H2-2+H0-13+miR-21 Lane 4: H1-2+H2-2+H0-11 Lane 5: H1-2+H2-2+H0-11+miR-21 Lane 6: H1-2+H2-2+H0-9 Lane 7: H1-2+H2-2+H0-9+miR-21 Lane 8: H1-2+H2-2+H0-7 Lane 9: H1-2+H2-2+H0-7+miR-21 Lane 10: DNA Marker.

2.4 反应条件优化

紫外光激活的CHA-DNAzyme传感器的检测灵敏度受一系列反应参数影响, 包括发夹H1和H2的浓度、反应时间、 Mg^{2+} 浓度等。为最大化该传感器的检测性能, 我们优化了这些参数。如图4A所示, 随着H1和H2浓度的增加, S/N先升高后降低。因此, 选择S/N值最高时的发夹链H1和H2浓度, 即 $0.5 \mu M$, 作为最佳浓度。随着反应时间由4 h延长至7 h, 该传感器的S/N呈现先上升后下降的趋势,

在 5 h 处达到最大值 (图 4B)。这主要是因为反应在 5 h 内已基本完成, 进一步延长反应时间会使背景信号干扰增强。Mg²⁺既可以提高 DNA 双链的稳定性, 也能提高 DNAzyme 催化活性。实验结果如图 4C 所示, 我们最终选择 30 mM Mg²⁺作为最佳反应条件。

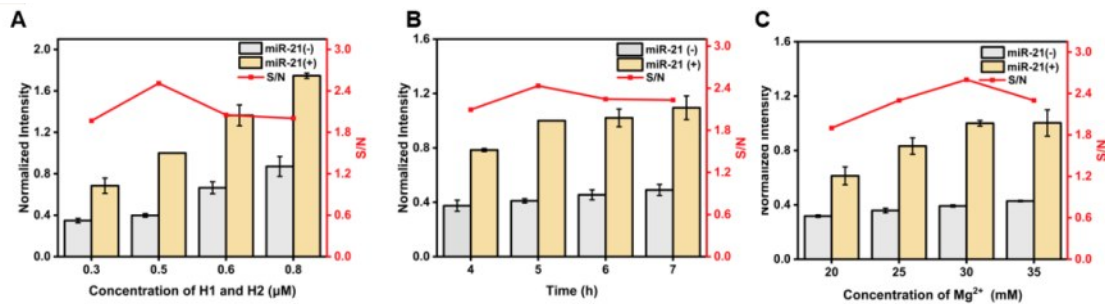


图 4 (A) H1 和 H2 浓度的优化。(B) 反应时间的优化。(C) Mg²⁺浓度的优化。每个数据点为三组平行实验的平均值 (平均值±标准偏差)。

Fig. 4 (A) Optimization the concentration of H1 and H2 concentration. (B) Optimization of reaction time. (C) Optimization the concentration of Mg²⁺. Each data point represents the average value of three sets of parallel experiments (average value ± standard deviation) .

2.5 紫外光激活的CHA-DNAzyme传感器的检测性能

在优化的检测条件下, 我们评估紫外光激活的CHA-DNAzyme传感器的检测性能。探究了不同浓度 (0.3–50 nM) 的miR-21的荧光响应, 并记录相应的荧光发射光谱。如图 5A 所示, 该体系的荧光强度均随着miR-21浓度的增加而增加, 并在 10 nM 到达平台。荧光强度与miRNA浓度在 0.3–10 nM 范围内呈线性关系, 线性回归的R²值为 0.9917。线性回归方程为 $F=1053.5C_{\text{miR-21}}+11745.0$ (图 5B)。通过对照组 (有 UV 照射、无 miR-21) 的平均信号加上三倍标准差计算得出其检测限 (LOD) 为 189 pM。

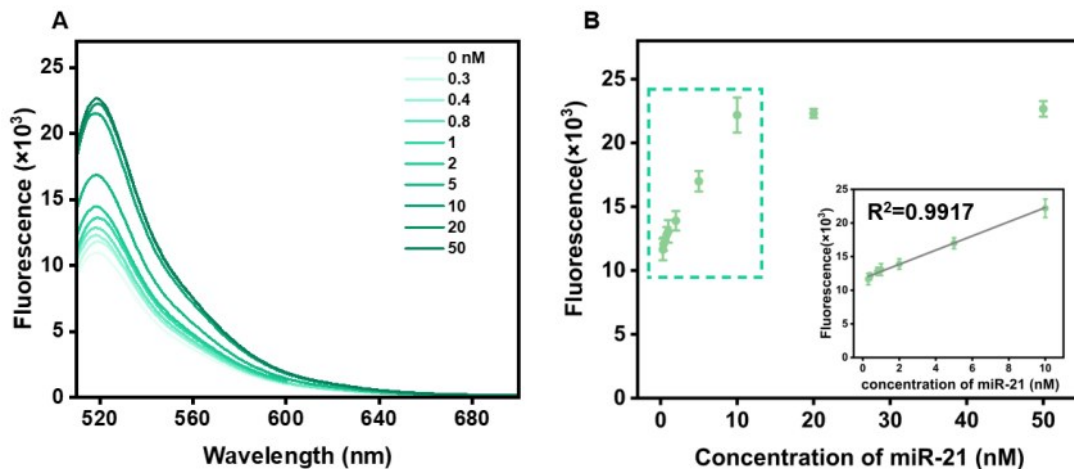


图 5 (A) 不同浓度 miR-21 的荧光响应。(B) 荧光强度与 miR-21 浓度的关系。每个数据点为三组平行实验的平均值 (平均值±标准偏差)。

Fig. 5 (A) Fluorescence responses of miR-21 at different concentrations. (B) The relationship between fluorescence intensity and different concentrations of miR-21. Each data point represents the average value of three sets of parallel experiments (average value ± standard deviation) .

2.6 紫外光激活的CHA-DNAzyme传感器的特异性

该传感器对 miR-21 与高度同源序列的区分能力是实现精准诊断的关键。本研究针对若干单碱基突变型 miR-21 变体 (Mut-1、Mut-2、Mut-3) 以及其他肿瘤相关 miRNA (miR-10b、miR-221、miR-155 和 miR-17), 评估了该体系对 miR-21 的特异性。如图 6A、B 所示, 只有在完全匹配的 miR-21 存在时, 该传感器才会输出强烈的荧光信号; 而所有突变体及干扰 miRNA 组均仅输出较低的荧光信号。上述结果表明, 该检测平台具有令人满意的特异性。

2.7 人血清样本分析

为评估该传感器在实际复杂生物样本中检测的适用性和可靠性, 进行了加标回收实验。将 1.00、

5.00 和 10.00 nM 的 miR-21 加入到 5% 稀释血清样本中。如表 1 所示，miR-21 的回收率范围为 96.1–101.6%，相对标准偏差 (Relative standard deviation, RSD) 为 1.9–4.2%。上述结果初步验证了该方法在稀释健康人血清加标样本中的可行性。

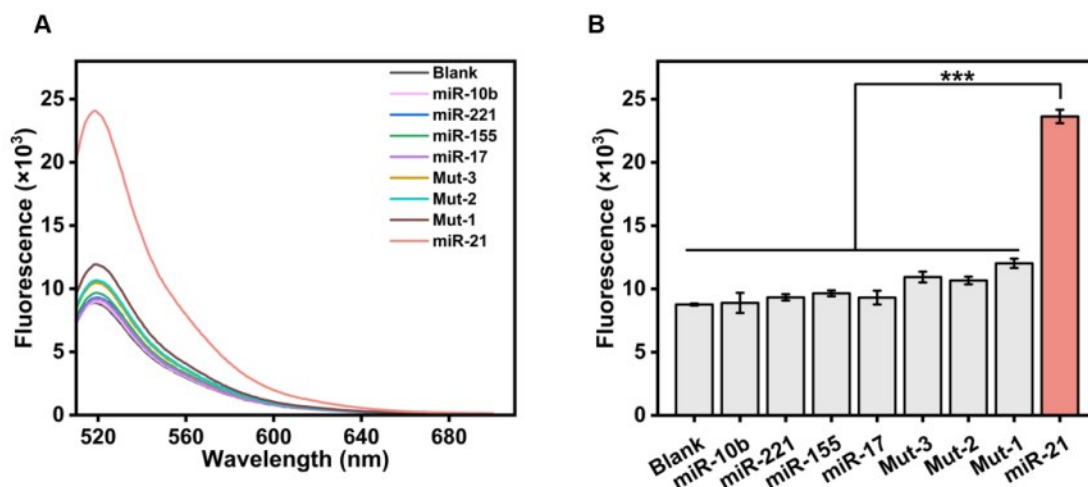


图 6 紫外光激活的 CHA-DNAzyme 传感器的特异性。(A) 荧光光谱图。(B) 对应的柱状分析图。所有 miRNA 浓度均为 100 nM。每个数据点为三组平行实验的平均值 (平均值±标准偏差)。

Fig. 6 Specificity of ultraviolet-activated CHA-DNAzyme sensor. (A) Fluorescence spectrogram. (B) Corresponding bar charts. The concentration of all miRNAs was 100 nM. Each data point represents the average value of three sets of parallel experiments (average value ± standard deviation).

表 1 稀释后血清样品中 miR-21 的回收率 (n=3)

Table 1 Recovery rates of miR-21 in diluted serum samples (n=3)

Sample	Added (nM)	Found (nM)	Recovery (%)	RSD (%)
5% Human serum	1.00	0.96	96.1	4.2
	5.00	5.04	100.8	3.8
	10.00	10.16	101.6	1.9

3 结 论

总之，我们成功构建了一种基于 CHA/DNAzyme 级联放大的光激活生物传感器，实现了 miR-21 的高灵敏度检测。该传感器的创新之处在于：该系统仅在紫外光与靶标 miR-21 共同作用下才能被激活，实现了对传感器的光控“按需激活”。同时，利用靶标分子触发 DNAzyme 的组装，随后，DNAzyme 进一步高效切割 DNA 底物，实现信号的级联放大，显著提升检测灵敏度。此外，该传感器无需引入蛋白酶，可在 37°C 等温条件下完成检测，无需复杂的热循环程序，有效降低了检测的成本。得益于上述光控激活与级联信号放大的优势，该平台为今后开发时间可控的、灵敏的痕量核酸检测提供了新策略。

紫外光激活的催化发夹自组装/脱氧核酶级联扩增传感器的研究及对 miR-21 的检测

(东北大学理学院化学系，辽宁沈阳 110819)

摘要：MicroRNA-21 (miR-21) 作为人类基因组最早发现的 miRNA 之一，为癌症的早期诊断、药物治疗和预后评估提供重要信息。针对 miRNA 丰度低、背景干扰复杂等问题，本研究利用紫外光触发 DNA 链断裂，结合催化发夹自组装 (CHA) 与脱氧核酶 (DNAzyme) 放大技术，构建了一种光控、级联放大传感器 (CHA-DNAzyme)。CHA 的引发链最初被包含光裂解键的发夹链封锁，仅在紫外光和靶标 miR-21 共同作用下，引发链能被释放并启动 CHA 反应。同时，无催化活性的 DNAzyme 片段分别整合于亚稳态的 CHA 发夹反应物，在 CHA 过程中形成 DNAzyme。活性的 DNAzyme 循环切割底物链 S，实现信号放大。在最佳条件下，该平台在 0.3–10 nM 范围内呈现良好的线性关系，检出限为 189 pM。此外，该平台对不同碱基错配序列具有高特异性，且成功用于稀释血清样本中 miR-21 的检测。总之，该平台在 miRNA 高灵敏分析中具有良好的应用潜力。

关键词：催化发夹自组装；DNAzyme；信号放大；紫外光激活；miR-21

Research on a UV-Activated Catalytic Hairpin Assembly/Deoxyribozyme Cascade Amplification Sensor for

the Detection of miR-21

(Department of Chemistry, School of Science, Northeastern University, Shenyang, 110819, China)

Abstract: MicroRNA-21 (miR-21), one of the earliest discovered miRNAs in the human genome, provides crucial information for the early diagnosis, drug treatment, and prognosis assessment of cancer. To address the issues of low miRNA abundance and complex background interference, this study developed a light-controlled, cascade amplification sensor (CHA-DNAzyme) by combining ultraviolet light-triggered DNA strand cleavage with catalytic hairpin assembly (CHA) and deoxyribozyme (DNAzyme) amplification techniques. The initiation strand of CHA was initially blocked by a hairpin strand containing a photolysis bond. Only under the combined action of ultraviolet light and target miR-21 could the initiation strand be released and the CHA reaction initiated. Meanwhile, inactive DNAzyme fragments were integrated into the metastable CHA hairpin reactants, forming active DNAzyme during the CHA process. The active DNAzyme cyclically cleaved the substrate strand S, achieving signal amplification. Under optimal conditions, the platform exhibited a good linear relationship within the range of 0.3–10 nM, with a detection limit of 189 pM. Additionally, the platform demonstrated high specificity for different base-mismatched sequences and was successfully applied to the detection of miR-21 in diluted serum samples. In conclusion, this platform holds great potential for high-sensitivity miRNA analysis.

Keywords: Catalytic hairpin assembly; DNAzyme; Signal amplification; Ultraviolet light activation; miR-21

微小RNA (miRNA) 是一类长度为 19–25 个核苷酸的单链非编码 RNA, 在基因沉默、转录后调控等过程中发挥关键作用^[1, 2]。近年大量证据表明, miRNA 几乎在所有肿瘤中均异常表达^[3–5], 可作为疾病的早期诊断和预后评估的生物标志物^[6, 7]。其中, miR-21 在肺癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤中过度表达, 其表达水平与肿瘤分期、转移及预后密切相关, 因此 miR-21 的精准检测具有重要临床意义^[8–10]。迄今为止, 研究者已经开发了 Northern 印迹^[11]、微阵列技术^[12]和逆转录定量聚合酶链反应 (RT-qPCR)^[13]等传统方法。然而, 这些方法在实际应用中仍面临挑战: Northern 印迹法操作复杂, 需经历电泳、转膜及荧光或放射性标记等步骤, 且仅能获得半定量结果; 微阵列芯片检测的特异性和灵敏度不足; RT-qPCR 需要额外的逆转录操作、复杂的热循环及酶的参与。因此, 开发一种操作简便、性能可靠的 miRNA 传感平台具有重要意义。

为克服传统方法的局限, 多种新型等温扩增技术被用于 miRNA 检测。催化发夹自组装 (Catalytic Hairpin Assembly, CHA) 是由引发链依次打开发夹 H1 和 H2, 形成稳定的双链复合物, 同时自身被置换出来进入下一轮循环的等温扩增技术。CHA 虽然具有操作简便、无需热循环等优势, 但单一 CHA 的广泛应用仍受限于其固有的扩增效率。为弥补这一不足, 研究者将 CHA 与滚环扩增 (RCA, 涉及蛋白质酶)^[14, 15]、无蛋白酶杂交链式反应 (HCR)^[16, 17]以及熵驱动催化策略 (EDC)^[18]等其他扩增方法相结合, 开发了级联扩增技术, 并将其应用于传感平台。脱氧核酶 (DNAzyme) 作为一种人工合成的功能性核酸, 可在 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 等特定金属离子存在下催化多种反应^[19, 20]。通过合理设计其底物结合臂序列, DNAzyme 在靶标识别和切割中更具灵活性。将 DNAzyme 与 CHA 结合构建级联放大体系, 可有效弥补单一 CHA 扩增效率不足的缺陷^[21–23]。CHA/DNAzyme 级联扩增策略避免了对外源蛋白酶及热循环的依赖, 且操作简单、设计灵活, 这使其在开发低成本的检测与诊断方法方面展现出独特优势。近年来, 基于 CHA/DNAzyme 级联扩增的 miRNA 传感策略取得了重要研究进展。然而, 这类等温核酸级联扩增方法处于“始终活跃”状态, 易与复杂生物环境中的非靶标分子结合而被激活, 导致高背景信号甚至假阳性结果^[24, 25]。因此, 开发一种时空可控的传感策略, 实现对 miRNA 的精准触发式检测, 仍是当前该领域的重要挑战。

针对上述问题, 本文构建了一种基于 CHA/DNAzyme 的紫外光 (Ultraviolet, UV) 激活生物传感器, 用于 miR-21 的高灵敏检测。该平台通过在辅助发夹 BH0 中引入光解键, 实现了对传感器的光控“按需激活”。经紫外光照射后, BH0 中的光解键断裂, 其后的 5 个碱基序列因无法形成稳定的双链而脱落, 得到产物 H0。当体系中存在靶标 miR-21 时, miR-21 与发夹 H0 杂交, 释放出隐藏其中的 CHA 引

发序列, 启动 CHA 扩增反应。产物 H1/H2 组装形成具有高效催化活性的 DNAzyme。该 DNAzyme 对底物链 S (两端分别修饰荧光基团与猝灭剂) 进行循环切割, 从而输出显著荧光信号。当体系中没有靶标 miR-21 或没有紫外光照射时, CHA 的引发序列被锁定在发夹结构中, 传感器保持沉默。通过将紫外光激活与级联 CHA/DNAzyme 扩增策略相结合, 本方法成功实现了高灵敏度、高特异性的 miR-21 定量检测。

1. 实验部分

1.1 仪器与试剂

氯化钾 (KCl)、氯化钠 (NaCl)、氯化镁 ($MgCl_2$)、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCl)、过硫酸铵 (APS)、盐酸 (HCl) 均由阿拉丁公司 (中国上海) 提供。6×甘油凝胶上样缓冲液 VII、4SGelred 10000×水溶液、1×TE 缓冲液、DEPC 处理水以及 10×TBE 预混粉末购自生工生物工程上海 (股份) 有限公司。四甲基乙二胺 (TEMED)、N、N'-亚甲基双丙烯酰胺以及丙烯酰胺均由麦克林生物化学公司 (中国上海) 提供。其余所有溶液均使用微纯水 ($18.2 M\Omega \cdot cm$) 配制而成。本研究中所用的 DNA 寡核苷酸均由生工生物工程上海 (股份) 有限公司合成并纯化。具体序列列于表 1 中。

荧光光谱记录在 RF-6000 荧光分光光度计上 (岛津, 日本)。聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 在 DY CZ-24F 电泳仪 (北京, 中国) 上进行。寡核苷酸的浓度用 Nanodrop 2000 (牛津, 英国) 测定。

表 1 实验中所涉及的核酸序列

Table 1 Nucleic acid sequences involved in the experiment

引物名称	引物序列 (5'-3')	长度/nt
H0-9	GAAACACCACCCACGCTAGCCTTCAACATCAGTCTGATAAGCTAAGGCTAGC	52
H1-2	GGGTCTGAAGGCTAGCGTGGGTGGTGTTCACCATGTACAACACCACCCACGC	53
H2-2	GCGTGGGTGGTGTGTACATGGTAAACACCACCCACTACAACGACTTGCTCAG	54
BH0	GAAACACCACCCACGCTAGCCTTCAACATCAGTCTGATAAGCTAAGGCTAGC/iPCLink/GTGGG	57
S	FAM-CTGAGCAAG/rA//rU/TCAGACCC-BHQ1	19
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	22
Mut-1	UAGCUUAUCAGACUGAUGUCA	22
Mut-2	UAGCUUAUCAGACUGAUGAAGA	22
Mut-3	UAGCUUAUCAGACUGAUGUACT	22
H0-7	GAAACACCACCCACGCTAGCCTTCAACATCAGTCTGATAAGCTAAGGCTA	50
H0-11	GAAACACCACCCACGCTAGCCTTCAACATCAGTCTGATAAGCTAAGGCTAGCGT	54
H0-13	GAAACACCACCCACGCTAGCCTTCAACATCAGTCTGATAAGCTAAGGCTAGCGTGG	56
H1-1	GGGTCTGAAGGCTAGCGTGGGTGGTGTTCACCATGTACAACACCACCCACGC	53
H1-3	GGGTCTGAAGGCTAGCGTGGGTGGTGTTCATCATGTACAACACCACCCACGC	53
H1-4	GGGTCTGAAGGCTAGCGTGGGTGGTGTTCATAATGTACAACACCACCCACGC	53
H2-3	GCGTGGGTGGTGTGTACATGATGAAACACCACCCACTACAACGACTTGCTCAG	54
H2-4	GCGTGGGTGGTGTGTACATTATGAAACACCACCCACTACAACGACTTGCTCAG	54
miR-221	AGCUACAUUGUCUGUGGUUUC	23
miR-155	UUA AUGCUA AUCGUGAUAGGGGU	23
miR-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUA	23
miR-10b	UACCCUGUAGAACCGAAUUGUG	23

1.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 (PAGE)

BH0、H0、H1、H2 在退火反应缓冲液 (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 为 7.9) 中从 95°C 至 25°C、-1.3°C/min 退火形成稳定结构, 放于 4°C 冰箱保存备用。PAGE 实验样品制备: 向离心管中加入 2 μ L H1-2 (2.5 μ M)、2 μ L H2-2 (2.5 μ M)、1 μ L BH0 (1 μ M)、1 μ L miR-21 (1 μ M), 用反应缓冲溶液 (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 100 mM NaCl, 30 mM $MgCl_2$, pH 为 7.9) 补齐至 10 μ L。紫外光激活的参数: 使用波长为 365 nm 的 UV 紫外线鉴定灯, 功率为 42 W, 照射距离为 4.2 cm, 照射时间为 30 s。样品经 37°C 孵育 5 h。凝胶在 130 V 恒定电压下, 0.5×TBE 缓冲液中运行 60 min。随后, 用 4SGelred 染料染色核酸 10 min, 凝胶成像分析系统成像。

1.3 CHA-DNAzyme 传感器检测 miR-21

分别移取 2 μ L 2.5 μ M H1-2、2 μ L 2.5 μ M H2-2、1 μ L 1 μ M BH0、1 μ L 1 μ M miR-21、1 μ L 10 μ M S, 以及 1 μ L 10×反应缓冲溶液, 使用 DEPC 水补齐至 10 μ L, 用移液枪吹吸混匀。样品在 37°C PCR 仪中孵育 5 小时, 以保证 CHA-DNAzyme 级联扩增反应充分进行。孵育结束后, 向离心管内加入 DEPC

水, 将反应体系总体积补齐至 100 μL , 混匀。对反应体系进行荧光强度检测。激发波长为 490 nm, 荧光发射光谱的扫描范围为 510–710 nm, 狭缝宽度 10 nm。

1.4 特异性分析

在进行特异性分析时, 采用相同浓度的错配序列 (Mut-1、Mut-2、Mut-3) 以及其他干扰 miRNA (miR-10b、miR-221、miR-155、miR-17) 代替上述反应中的 miR-21, 用移液枪吹吸混匀。将样品经紫外光照射后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 h, 用 DEPC 水补齐至 100 μL , 按照 1.3 节中设定的荧光检测参数, 按照 1.3 节中的荧光法进行检测。

1.5 实际样分析

为进一步评估所构建生物传感器在复杂生物基质中的实际分析性能, 将不同浓度梯度的 miR-21 标准品分别添加至上述 5% 健康人血清基质中, 混匀。其中 miR-21 标准品的浓度设定为 1 nM、5 nM、10 nM 三个梯度。采用本研究构建的 CHA-DNAzyme 传感器, 对每个加标样品中的 miR-21 浓度进行精准的定量检测。每个浓度梯度的加标样品均设置三组平行实验。

2. 结果与讨论

2.1 紫外光激活的 CHA-DNAzyme 传感器构建

紫外光激活的 CHA-DNAzyme 级联扩增的传感器的构建如图 1 所示。无紫外光照射时, CHA 的引发序列被锁定于辅助发夹 BH0 的发夹结构内, H1 和 H2 以相对稳定的构象共存, 分裂型 10–23 DNAzyme 序列分别整合于发夹 H1 和发夹 H2 中。整个体系处于沉默状态。

紫外光照射下, 辅助发夹 BH0 中的光解键断裂, 一段 5 个碱基的短链序列因杂交不稳定而自发解离, 剩余部分形成活化的发夹 H0。H0 与靶标 miR-21 互补配对后, CHA 的引发序列被暴露。该引发序列可通过 toehold 介导的链置换反应, 特异性识别并结合发夹 H1 的 toehold, 形成 H0/H1 双链。此时, miR-21 被置换释放, 可参与下一轮循环。同时, H1 中新暴露的序列进一步打开发夹 H2, 形成 H1/H2 双链。CHA 过程使分别整合在 H1 和 H2 中的两个分裂型 10–23 DNAzyme 片段相互靠近并组装, 形成具有完整催化活性的 DNAzyme。在 Mg^{2+} 存在下, DNAzyme 高效循环切割底物链 S, 使荧光基团与淬灭基团分离, 输出显著荧光信号。综上所述, 该传感器将光控激活与信号级联放大相结合, 实现 miR-21 的高灵敏度检测。

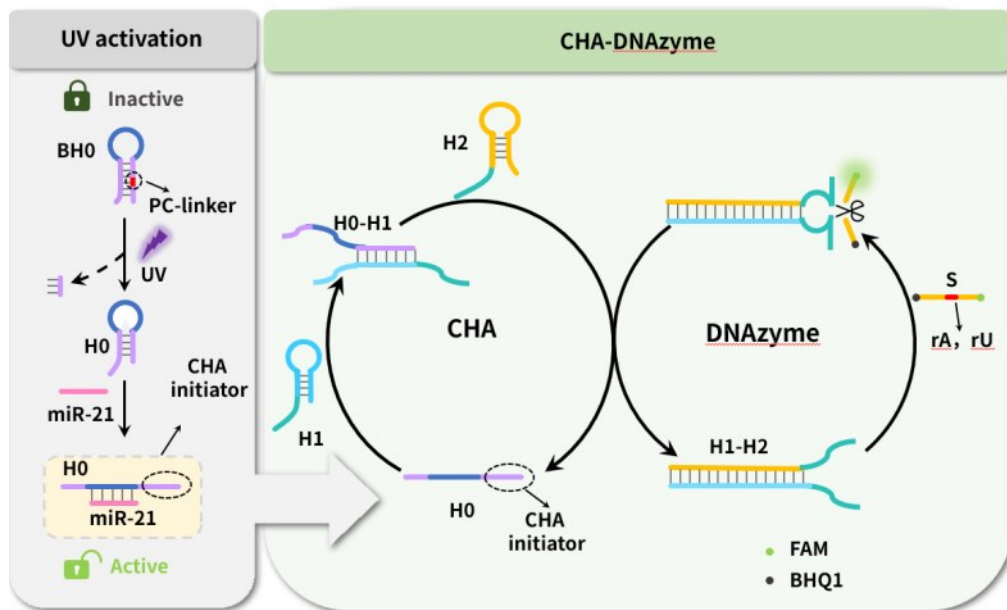


图 1 紫外光激活的 CHA-DNAzyme 级联扩增的传感器检测 miR-21 的示意图。

Fig. 1 Schematic diagram of the sensor for detecting miR-21 based on the ultraviolet light-activated CHA-DNAzyme cascade amplification.

2.2 紫外光激活的CHA-DNAzyme传感器的可行性验证

紫外光激活的CHA-DNAzyme生物传感器的成功运行依赖紫外光的激活和miR-21催化的CHA扩增。我们首先利用PAGE实验验证了紫外光激活的CHA传感器的成功构建。如图2A所示，在无miR-21和紫外光照射（泳道5）时，出现了一条十分微弱的新带且电泳迁移率较低，对应H1/H2双链，这表明CHA的引发序列被有效封锁于发夹BH0中。仅有miR-21或仅紫外光照射时，CHA产物对应的条带微弱，表明传感器保持沉默状态（泳道6、7）。相比之下，当紫外光和miR-21同时存在时（泳道8），H1和H2的条带显著减弱，同时出现大量明亮的H1/H2双链条带。这些结果共同证明了光激活的CHA模块的成功运行。

随后，我们进一步进行荧光发射光谱分析，以评估紫外光激活的CHA-DNAzyme的传感器检测miR-21的可行性。实验结果如图2B所示，当没有紫外光照射时，无论有无靶标miR-21，都没有捕获到明显的FAM荧光信号，表明几乎没有组装出具有活性的DNAzyme。紫外光激活后，在不添加miR-21的情况下，荧光强度几乎没有变化，表明该传感器的背景信号较低。只有紫外光照射和miR-21同时存在时，能够观察到显著的荧光信号，表明启动CHA反应，成功组装DNAzyme以切割底物S。这些结果证明了我们所构建的CHA-DNAzyme传感器仅在光激活后才开启信号响应，实现了对miR-21检测过程的时间可控性。

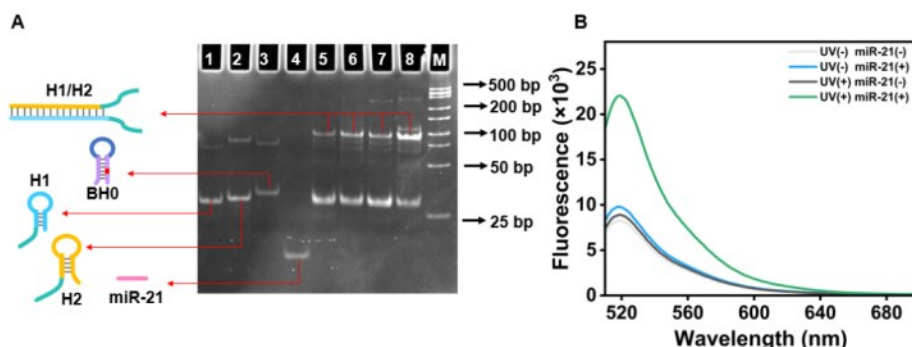


图2 紫外光激活的CHA-DNAzyme传感器的可行性验证。(A) 紫外光激活的CHA传感单元的凝胶电泳验证。泳道1: H1; 泳道2: H2; 泳道3: BH0; 泳道4: miR-21; 泳道5: H1+H2+BH0; 泳道6: H1+H2+BH0+miR-21; 泳道7: H1+H2+BH0+UV; 泳道8: H1+H2+BH0+miR-21+UV; 泳道9: DNA Marker。(B) 紫外光激活的CHA-DNAzyme传感器的荧光光谱验证。

Fig. 2 Feasibility verification of ultraviolet-activated CHA-DNAzyme sensor. (A) Gel electrophoresis experiment of CHA sensor activated by UV light. Lane 1: H1; Lane 2: H2; Lane 3: BH0; Lane 4: miR-21; Lane 5: H1+H2+BH0; Lane 6: H1+H2+BH0+miR-21; Lane 7: H1+H2+BH0+UV; Lane 8: H1+H2+BH0+miR-21+UV; Lane 9: DNA Marker. (B) Fluorescence spectral verification of the sensor of CHA-DNAzyme activated by ultraviolet light.

2.3 序列优化

为了获得良好的传感性能，我们对H1环区GC碱基的总个数、H0茎区碱基个数进行了优化。保持H1发夹其他碱基不改变，仅改变该区域的GC碱基总个数，以调控H1/H2双链体的稳定性。在互补配对碱基总数相同的情况下，GC碱基对之间形成3个氢键，而AT碱基对之间形成2个氢键，因此，GC含量越高，双链杂交越稳定。但是，无靶标时，体系中自发形成H1/H2双链带来的非特异性信号泄露也会增加。我们设置4组不同GC碱基个数，分别为3、4、5、6。如图3A所示，随着环区GC碱基总个数由3个增加到6个时，该系统的信噪比(S/N)先增加后降低，因此，我们选择GC碱基总个数为5的序列，用于后续实验。

辅助发夹H0的稳定性直接影响着CHA引发序列的封锁效果。通过调整H0茎区的碱基个数从而调控发夹H0的稳定性。凝胶电泳结果显示（图3B），具有较短的茎部序列（7 bp）的发夹H0-7（泳道8）存在明显的泄露，表明H0-7稳定性不足，CHA引发序列未能被有效封锁。反之，如果发夹H0的茎部序列（13 bp）过长（泳道3），反应物H1、H2的消耗几乎可以忽略不计，表明发夹H0-13过于稳定，CHA引发序列在遇到靶标miR-21后未能完全暴露。根据反应物H1和H2的消耗水平，最终我们选择茎部碱基对为9 bp的H0-9开展后续实验。

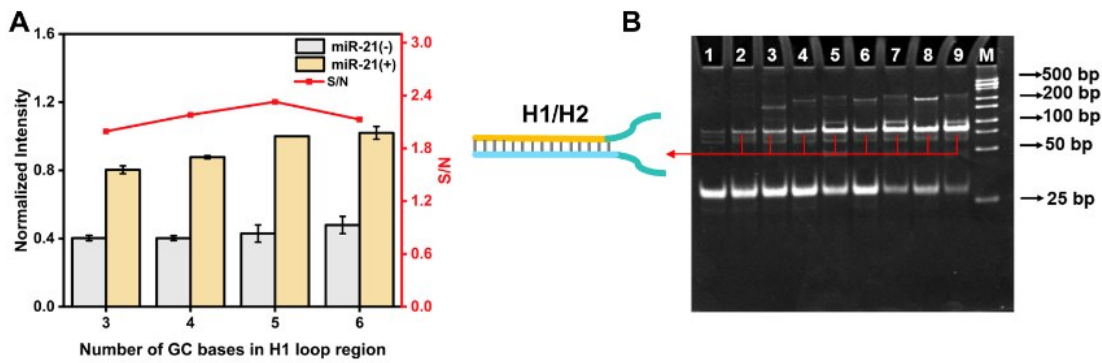


图3 (A) H1环区GC碱基总个数优化。每个数据点为三组平行实验的平均值(平均值±标准偏差)。(B) H0茎区序列优化。泳道1: H1-2+H2-2; 泳道2: H1-2+H2-2+H0-13; 泳道3: H1-2+H2-2+H0-13+miR-21; 泳道4: H1-2+H2-2+H0-11; 泳道5: H1-2+H2-2+H0-11+miR-21; 泳道6: H1-2+H2-2+H0-9; 泳道7: H1-2+H2-2+H0-9+miR-21; 泳道8: H1-2+H2-2+H0-7; 泳道9: H1-2+H2-2+H0-7+miR-21; 泳道10: DNA Marker。

Fig. 3 (A) Optimization of the total number of GC bases in the H1 ring area. Each data point represents the average value of three sets of parallel experiments (average value ± standard deviation). (B) Sequence optimization of the H0 stem region. Lane 1: H1-2+H2-2 Lane 2: H1-2+H2-2+H0-13 Lane 3: H1-2+H2-2+H0-13+miR-21 Lane 4: H1-2+H2-2+H0-11 Lane 5: H1-2+H2-2+H0-11+miR-21 Lane 6: H1-2+H2-2+H0-9 Lane 7: H1-2+H2-2+H0-9+miR-21 Lane 8: H1-2+H2-2+H0-7 Lane 9: H1-2+H2-2+H0-7+miR-21 Lane 10: DNA Marker.

2.4 反应条件优化

紫外光激活的CHA-DNAzyme传感器的检测灵敏度受一系列反应参数影响,包括发夹H1和H2的浓度、反应时间、 Mg^{2+} 浓度等。为最大化该传感器的检测性能,我们优化了这些参数。如图4A所示,随着H1和H2浓度的增加,S/N先升高后降低。因此,选择S/N值最高时的发夹链H1和H2浓度,即 $0.5 \mu M$,作为最佳浓度。随着反应时间由4h延长至7h,该传感器的S/N呈现先上升后下降的趋势,在5h处达到最大值(图4B)。这主要是因为反应在5h内已基本完成,进一步延长反应时间会使背景信号干扰增强。 Mg^{2+} 既可以提高DNA双链的稳定性,也能提高DNAzyme催化活性。实验结果如图4C所示,我们最终选择 $30 mM Mg^{2+}$ 作为最佳反应条件。

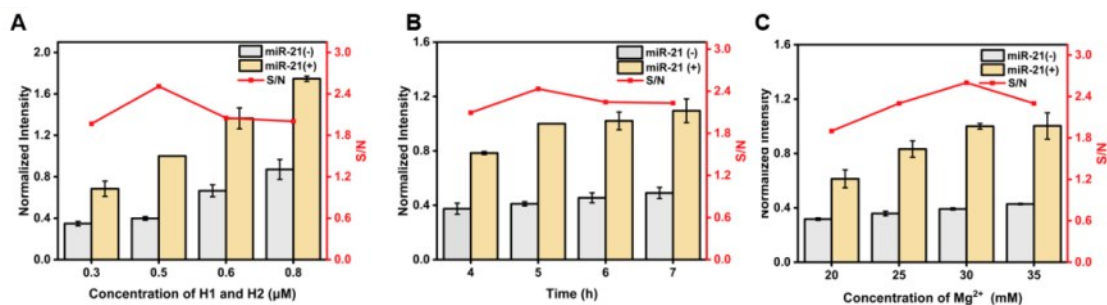


图4 (A) H1和H2浓度的优化。(B) 反应时间的优化。(C) Mg^{2+} 浓度的优化。每个数据点为三组平行实验的平均值(平均值±标准偏差)。

Fig. 4 (A) Optimization the concentration of H1 and H2 concentration. (B) Optimization of reaction time. (C) Optimization the concentration of Mg^{2+} . Each data point represents the average value of three sets of parallel experiments (average value ± standard deviation).

2.5 紫外光激活的CHA-DNAzyme传感器的检测性能

在优化的检测条件下,我们评估紫外光激活的CHA-DNAzyme传感器的检测性能。探究了不同浓度(0.3–50 nM)的miR-21的荧光响应,并记录相应的荧光发射光谱。如图5A所示,该体系的荧光强度均随着miR-21浓度的增加而增加,并在10 nM到达平台。荧光强度与miRNA浓度在0.3–10 nM范围内呈线性关系,线性回归的 R^2 值为0.9917。线性回归方程为 $F=1053.5C_{miR-21}+11745.0$ (图5B)。通过对照组(有UV照射、无miR-21)的平均信号加上三倍标准差计算得出其检测限(LOD)为189 pM。

2.6 紫外光激活的CHA-DNAzyme传感器的特异性

该传感器对miR-21与高度同源序列的区分能力是实现精准诊断的关键。本研究针对若干单碱基突

变型 miR-21 变体 (Mut-1、Mut-2、Mut-3) 以及其他肿瘤相关 miRNA (miR-10b、miR-221、miR-155 和 miR-17), 评估了该体系对 miR-21 的特异性。如图 6A、B 所示, 只有在完全匹配的 miR-21 存在时, 该传感器才会输出强烈的荧光信号; 而所有突变体及干扰 miRNA 组均仅输出较低的荧光信号。上述结果表明, 该检测平台具有令人满意的特异性。

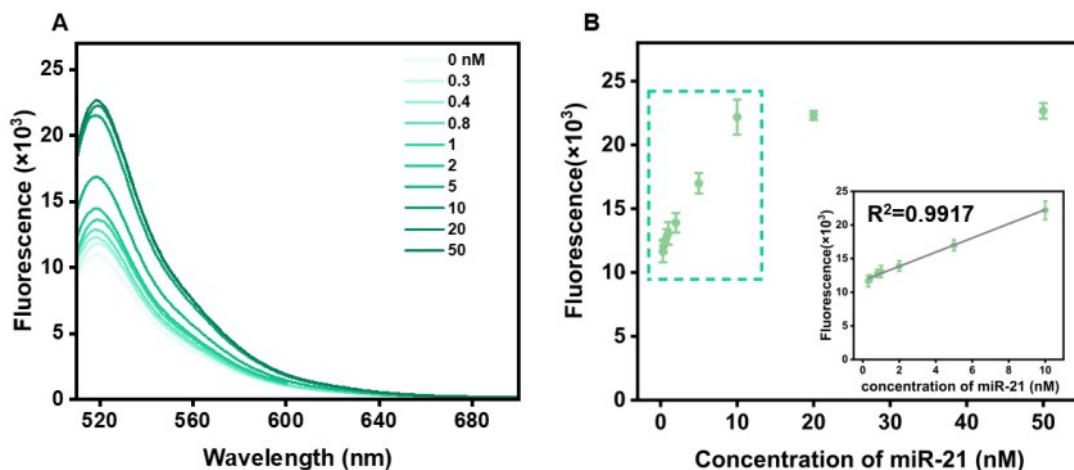


图 5 (A) 不同浓度 miR-21 的荧光响应。(B) 荧光强度与 miR-21 浓度的关系。每个数据点为三组平行实验的平均值 (平均值 \pm 标准偏差)。

Fig. 5 (A) Fluorescence responses of miR-21 at different concentrations. (B) The relationship between fluorescence intensity and different concentrations of miR-21. Each data point represents the average value of three sets of parallel experiments (average value \pm standard deviation).

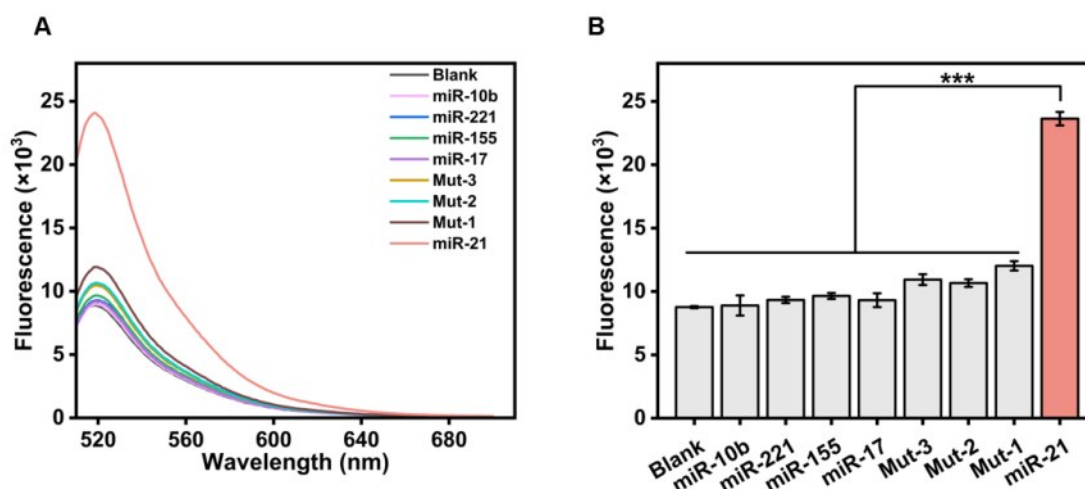


图 6 紫外光激活的 CHA-DNAzyme 传感器的特异性。(A) 荧光光谱图。(B) 对应的柱状分析图。所有 miRNA 浓度均为 100 nM。每个数据点为三组平行实验的平均值 (平均值 \pm 标准偏差)。

Fig. 6 Specificity of ultraviolet-activated CHA-DNAzyme sensor. (A) Fluorescence spectrogram. (B) Corresponding bar charts. The concentration of all miRNAs was 100 nM. Each data point represents the average value of three sets of parallel experiments (average value \pm standard deviation).

2.7 人血清样本分析

参考文献:

- [1] Bartel D P. *Cell*, **2004**, 116 (2): 281-297.
- [2] Song Y, Xu Z, Wang F. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, **2020**, 21: 555-567.
- [3] Ryan B M, Robles A I, Harris C C. *Nature Reviews Cancer*, **2010**, 10 (6): 389-402.
- [4] Zhou H M, Jiang Y, Zhao W J, Zhang S S. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2022**, 14 (11): 13070-13078.
- [5] Hamidi A A, Taghehchian N, Basirat Z, Zangouei A S, Moghbeli M. *Biomarker Research*, **2022**, 10 (1): 40.
- [6] Li J B, Tan S B, Kooger R, Zhang C Y, Zhang Y. *Chemical Society Reviews*, **2014**, 43 (2): 506-517.
- [7] Zhou W J, Li D X, Yuan R, Xiang Y. *Analytical Chemistry*, **2019**, 91 (5): 3628-3635.

- [8] Karaca G Y, Kuralay F, Ozakpinar O B, Uygun E, Koc U, Ulusoy S, Tinaz G B, Oksuz L, Oksuz A U. *Applied Nanoscience*, 2021: 367.
- [9] Zhu Q Y, Li H, Xu D K. *Rsc Advances*, 2020, 10 (29): 17037–17044.
- [10] Liang Z X, Huang X, Tong Y L, Lin X A, Chen Z G. *Talanta*, 2022, 247: 123568.
- [11] Várallyay E, Burgyán J, Havelda Z. *Nature Protocols*, 2008, 3 (2): 190–196.
- [12] Niu J X, Meng X K, Ren J J. *World Journal of Gastroenterology*, 2015, 21 (44): 12605–12611.
- [13] Jung S, Kim W J, Kim B K, Kim J, Kim M J, Kim K P, Kim S K. *Biosensors & Bioelectronics*, 2020, 163: 112301.
- [14] Zhuang J Y, Lai W Q, Chen G N, Tang D P. *Chemical Communications*, 2014, 50 (22): 2935–2938.
- [15] Song W L, Zhang Q, Sun W B. *Chemical Communications*, 2015, 51 (12): 2392–2395.
- [16] Quan K, Huang J, Yang X H, Yang Y J, Ying L, Wang H, Xie N L, Ou M, Wang K M. *Analytical Chemistry*, 2016, 88 (11): 5857–5864.
- [17] Wang H M, Li C X, Liu X Q, Zhou X, Wang F. *Chemical Science*, 2018, 9 (26): 5842–5849.
- [18] Xiong E H, Zhen D S, Jiang L. *Chemical Communications*, 2018, 54 (89): 12594–12597.
- [19] McConnell E M, Cozma I, Mou Q B, Brennan J D, Lu Y, Li Y F. *Chemical Society Reviews*, 2021, 50 (16): 8954–8994.
- [20] Zhou Y F, Zhou C Z. *Nature Chemistry*, 2021, 13 (4): 299–301.
- [21] Ren R H, Bi Q, Yuan R, Xiang Y. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, 304: 127068.
- [22] Yang L, Wu Q, Chen Y Q, Liu X Q, Wang F, Zhou X. *ACS Sensors*, 2019, 4 (1): 110–117.
- [23] Liu X, Zhou X, Xia X, Xiang H. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1096: 159–165.
- [24] Zhao T T, Sun X M, Chen J, Li D, Cao W, Chen S W, Yin Y, Xu S H, Luo X L. *Analytical Chemistry*, 2022, 94 (13): 5399–5405.
- [25] Zheng Y L, Li L N S, Chen Y L, Lin Z N, Ruan X H, Lin Q T, Xing C, Lu C H. *Biosensors & Bioelectronics*, 2024, 259: 116409.

(责任编辑:)