

[12] Tsutsui S, Inoue H, Yasuda K, et al. Angiopoietin-2 expression in invasive ductal carcinoma of the osteosarcoma: Its rela-

tionship to the VEGF expression and microvessel density [J]. Breast Cancer Res Treat, 2018, 98 (3): 261-266.

• 基础研究 •

基于 DNA 纳米枝构建可视化比色传感器用于骨肉瘤相关 miRNA 检测

厦门大学附属福州第二医院骨科研究所 (福州 350009) 吴冬枝 何文慧 张 韬¹

【摘 要】 目的 通过 DNA 纳米枝和 DNA 双链-SYBR Green I (SG) 复合物构建可视化比色传感器, 并将其应用于骨肉瘤标志物 miR-135b-5p 的检测。**方法** 通过目标 miR-135b-5p 启动 X 探针聚合生成 DNA 纳米枝, 接着, 通过 SG 嵌入 DNA 纳米枝形成大量 DNA 双链-SG 复合物催化氧化显色底物构建可视化比色传感器。**结果** 成功构建了一种基于 DNA 纳米枝的可视化比色传感器, 其吸光度与 miR-135b-5p 浓度的对数值在 50 pM~1 M 范围内成正比, 检测限 (S/N=3) 为 4.98 pM, 具有较高的灵敏度和选择性。已成功应用骨肉瘤细胞 143B 和小鼠胚胎成纤维细胞 3T3 细胞内 miR-135b-5p 的检测。**结论** 基于 DNA 纳米枝成功构建一种可视化比色传感器, 可能用于骨肉瘤患者的早期筛查和预后监测。

【关键词】 miR-135b-5p; DNA 纳米枝; DNA 双链-SG 复合物; 骨肉瘤

【中图分类号】 R738 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2021)02-0138-03

骨肉瘤多发于儿童和青少年, 致死致残率高, 严重威胁患者的生命, 而早诊断早治疗可有效降低骨肉瘤患者的死亡率, 提高患者的生存率和生活质量^[1]。可视化比色传感器通过肉眼观察溶液颜色变化即可实现对目标物的检测, 具有直观、简单、方便等优点, 在肿瘤标志物的快速检测方面具有独特的优势。本研究基于 DNA 纳米枝和 DNA 双链-SYBR Green I (SG) 核酸染料复合物构建可视化生物传感器用于骨肉瘤相关标志物 miR-135b-5p 的检测。该传感器通过目标 miR-135b-5p 加入后启动两 X 探针的聚合生成具有大量 DNA 双链的 DNA 纳米枝实现信号的放大, 然后, 利用 SG 嵌入 DNA 双链中形成 SG-DNA 双链复合物在光诱导下催化氧化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 实现对微量 miRNA 的可视化检测。旨在为后续小型便携骨肉瘤早期诊断试剂盒

的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料: 1) 试剂: 链霉亲和素修饰磁珠 (MB, 挪威 Dynal Biotech ASA 公司); TMB (东京化成工业株式会社); 三羟甲基氨基甲烷 (Tris, Sigma-Aldrich 公司); 柠檬酸、柠檬酸钠和 EDTA·Na₂ (麦克林公司); HCl、NaCl (国药集团); BSA 和 10 000×SG 核酸染料 (北京索莱宝公司); RNAex Pro RNA 提取试剂盒 (艾克瑞生物公司)。DNA 和 miRNA 由上海生工生物工程有限公司合成 (表 1)。2) 仪器: 可见光光源为氙灯光源 (300 W, 上海比朗仪器制造有限公司), 装有可见光滤光片 ($\lambda \geq 400$ nm)。所有紫外-可见吸收光谱和吸光度均于 iD3 多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司) 上采集。

表 1 所有探针的碱基序列

序列名称	相关碱基序列
微小 RNA-135b-5p (miR-135b-5p)	5'-UAUGGCUUUUCAUCCUAUGUGA-3'
单碱基错配序列 (SM)	5'-UAUGGCUUCUCAUCCUAUGUGA-3' (下划线部分为错配碱基)
微小 RNA-135b-3p (miR-135b-3p)	5'-AUGUAGGGCUAAAAGCCAUGGG-3'
微小 RNA-21 (miR-21)	5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'
捕获探针 (C)	5'-biotin-AAAAAAAAAATCACATAGGAAT-3'
单链探针 1 (DNA1)	5'-GAAAAGCCATAGCTCATCCATGCCTAGACTGGCGATAAGTAGCCAGC-3'
单链探针 2 (DNA2)	5'-GAAAAGCCATAGCTCAGCAAGCGTTATGCGTCTAGGCATGGATGAGC-3'
单链探针 3 (DNA3)	5'-GAAAAGCCATAGCTCTGGTATGCATGTCGGCATAACGCTTGCTGAGC-3'
单链探针 4 (DNA4)	5'-GAAAAGCCATAGCTGGCTACTTATCGCCACGACATGCATACCCAGAGC-3'
单链探针 5 (DNA5)	5'-CGACCGATGAATAGCGGTCAGATCCGTACCTACTCGTCACATAGGAAT-3'
单链探针 6 (DNA6)	5'-CGAGTAGGTACGGATCTGCGTATTGCGAACGACTCGTCACATAGGAAT-3'
单链探针 7 (DNA7)	5'-CGAGTCGTTTCGAATACGGCTGTACGTATGGTCTCGTCACATAGGAAT-3'
单链探针 8 (DNA8)	5'-CGAGACCATACGTACAGCACCGCTATTCATCGGTCGTCACATAGGAAT-3'

基金项目: 福州市卫生计生中青年科学研究项目 (2018-S-wq10); 福州市卫生计生创新平台建设项目 (2017-S-wp1)

¹ 通信作者, 副研究员, 肿瘤细胞与分子生物学研究方向; Email: james155@foxmail.com

1.2 方法:

1.2.1 比色传感器的构建: 1) 参照文献 [2], 根据目标序列 miR-135b-5p 的序列特征和 DNA 纳米枝的结构特点设计 8 条 DNA 单链探针 (DNA 1~8)。2) 取 5 L 的 MB, 加入 10 L 的 1×B&W 缓冲液 (5 mM Tris, 0.5 mM EDTA·Na₂ 和 1M NaCl, 用 HCl 调 pH 至 7.5) 清洗 1 次, 加入 10 L 4 M 捕获探针 C, 室温下孵育 15 min。磁性分离后, 用 3% BSA 室温下封闭 1 h。3) 加入 4 L 不同浓度的 miR-135b-5p, 4 °C 孵育 1 h。同时, 将 6 L 的不同浓度的 miR-135b-5p 与 0.4 M X1 及 0.4 M X2 (X1 和 X2 分别由 DNA 1~4 和 DNA 5~8 通过 95 °C 变性, 缓慢退火降至室温合成) 室温下混合反应 10 min 生成 DNA 纳米枝。4) 将生成的 DNA 纳米枝移入装有 MB 反应液的 EP 管, 4 °C 继续孵育 1 h。磁性分离弃上清, 加入 3 L 400×SG (10 000×SG 原液用 1×B&W 缓冲液稀释 25 倍), 4 °C 孵育 15 min。弃去上清, 用 1×B&W 缓冲液洗去未结合的 SG。5) 用 pH 4.5 的柠檬酸钠缓冲液重悬浮 MB, 加入 500 M 的 TMB, 氙灯光照 1 min, 吸取上清液用酶标仪扫描紫外-可见吸收光谱。

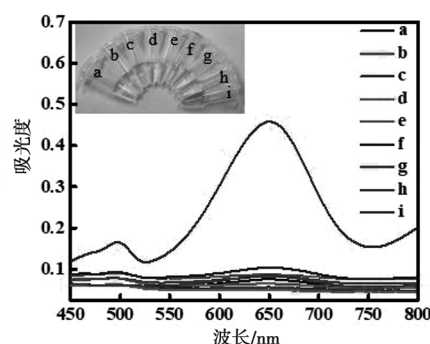
1.2.2 实际样本检测: 分别取 2×10^6 骨肉瘤细胞 143B 和小鼠胚胎成纤维细胞 3T3, 用 RNAex ProRNA 提取试剂盒按说明书操作提取总 RNA。接着, 用构建的可视化比色传感器和反转录-PCR 法分别检测总 RNA 中 miR-135b-5p 的浓度。

2 结果

2.1 传感器检测机理: 当目标 miR-135b-5p 存在时, 通过其两端分别与 X1 和 X2 的黏性末端杂交启动 X1 和 X2 的交联聚合形成具有大量 DNA 双链的 DNA 纳米枝。同时, 修饰有生物素的捕获探针 C, 通过生物素-链霉亲和素结合反应固定于修饰有链霉亲和素的 MB 上。接着, 通过目标 miR-135b-5p 两端分别与 C 和 DNA 纳米枝的黏性末端杂交, 将 DNA 纳米枝固定在 MB 表面。然后, 加入双链特异性核酸染料 SG, 其嵌入 DNA 纳米枝的核酸双链中形成 DNA 纳米枝-SG 复合物。通过磁性分离将 DNA 纳米枝-SG 复合物从溶液中分离出来。最后, 利用 DNA 双链-SG 复合物在氙灯光照下不需要过氧化氢 (H₂O₂) 的存在下即可催化氧化 TMB, 使溶液由无色变为蓝色, 实现对目标 miR-135b-5p 的可视化定量检测。相反, 当目标 miR-135b-5p 不存在时, X1 和 X2 无法聚合形成 DNA 纳米枝, 而且, 缺乏 miR-135b-5p 的交联, X1 和 X2 无法固定于 MB 表面, MB 表面只有单链 C, 无法形成能够催化氧化 TMB 的 DNA 双链-SG 复合物, 溶液始终为无色。该传感器通过目标 miRNA 启动 X 探针聚合形成 DNA 纳米枝, 引入大量 DNA 双链, 大大提高了 SG 的插入量, 实现对微量目标 miRNA 的可视化信号放大检测。

2.2 可视化传感器的可行性分析: 通过考察不同探针存在时体系的颜色变化及吸光度变化, 验证信号放大型可视化比色传感器的可行性, 结果如图 1 所示。其中, 只有 MB 存在时 (a), 溶液为无色, oxTMB 的吸收峰 (652 nm) 较小, 表明 MB 在光照下无法催化氧化 TMB, MB 对体系无影响。与 a 相比, 在只有单链探针 C (b)、两条探针存在 [C+miR-135b-5p (c)、C+X1 (d) 和 C+X2 (e)] 和三条探针存在 [C+miR-135b-5p+X1 (f)、C+miR-135b-5p+X2

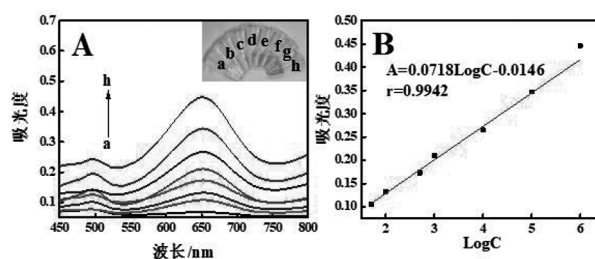
(g) 和 C+X1+X2 (h)] 的情况下, 只有 C+miR-135b-5p+X1 (f) 由于 miR-135b-5p 能够与 C 和 X1 杂交形成三明治结构, 生成少量核酸双链-SG 复合物催化 TMB 使得吸光度略微上升, 其他均无法形成足够多的双链-SG 复合物催化 TMB 产生明显的颜色变化, 溶液几乎为无色。仅当 C、miR-135b-5p、X1、X2 四者同时存在时, miR-135b-5p 启动 X1 和 X2 聚合生成具有大量 DNA 双链的 DNA 纳米枝, 实现信号放大, 使得溶液明显变蓝, 652 nm 处吸光度明显增高 (i)。实验结果验证了利用 DNA 纳米枝构建比色传感器用于 miRNA 的信号放大检测的可行性。



注: a 为 MB、b 为 MB+C、c 为 MB+C+miR-135b-5p、d 为 MB+C+X1、e 为 MB+C+X2、f 为 MB+C+miR-135b-5p+X1、g 为 MB+C+miR-135b-5p+X2、h 为 MB+C+X1+X2 和 i 为 MB+C+miR-135b-5p+X1+X2 分别加入 SG 后, 加入 TMB 光照 1 min 后测定。

图 1 不同探针存在时体系的吸光度图谱

2.3 传感器灵敏度: 对传感器的灵敏度进行考察。如图 2A 所示, 随着目标 miRNA miR-135b-5p 浓度增加可见光吸收峰逐渐增大, 溶液由无色变成蓝色。在 50 pM~1 M 浓度范围 miR-135b-5p 浓度对数值与 652 nm 处吸光度呈线性相关 (图 2B), 线性方程 $A=0.0718 \text{ Log}C-0.0146$, 相关系数 $r=0.9942$, 检测限为 4.98 pM (S/N=3)。

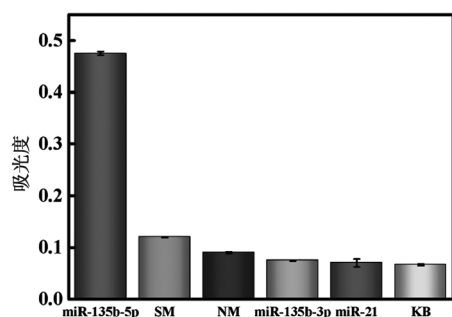


注: 从 a 到 h miR-135b-5p 的浓度分别为 0、50 pM、100 pM、500 pM、1 nM、10 nM、100 nM 和 1 M。

图 2A 不同浓度 miR-135b-5p 的吸光度谱图 图 2B 652 nm 处吸光度对 miR-135b-5p 浓度对数的线性校正曲线

2.4 传感器选择性: 在最佳条件下, 选择单碱基错配 miRNA (SM)、完全不匹配 miRNA (NM)、miR-135b-3p、miR-21 对传感器的选择性进行考察 (图 3)。与 miR-135b-

5p 相比,传感器对 SM、NM、miR-135b-3p 和 miR-21 的信号响应都较小,与空白 (KB) 相比差别不大。表明传感器能够很好地区分碱基错配 miRNA 以及其他 miRNA,对目标 miRNA 具有很好的选择性,有望用于实际样本的检测。



注: 比色传感器对 miR-135b-5p、单碱基错配 miRNA (SM)、完全不匹配 miRNA (NM)、miR-135b-3p、miR-21 和空白 (KB) 的响应值。所有 miRNA 的浓度均为 1M。

图 3 传感器对不同 miRNA 的吸光度响应值

2.5 实际样本检测: 为验证构建的比色传感器是否可用于复杂生物样本 miRNA 检测,将该传感器用于检测骨肉瘤细胞 143B 和小鼠胚胎成纤维细胞 3T3 细胞 miR-135b-5p 含量,并与 RT-PCR 检测结果对比,结果如表 2 所示。创建的比色传感器检测结果与 RT-PCR 检测结果接近,表明该传感器有望用于实际样本检测。

表 2 细胞提取液中 miR-135b-5p 检测结果比较

细胞	比色传感器/nM	RT-PCR/nM
143B	18.48	17.81
3T3	2.88	2.91

3 讨论

骨肉瘤是常见的原位骨肿瘤,也是儿童和青少年最为多发的肿瘤之一。近年来,随着放化疗的引入,骨肉瘤患者生存率有所提高,但 10 年生存率仍仅有 50%,预后仍不理想^[3]。早诊断早治疗是降低骨肉瘤死亡率,提高患者生存质量的关键环节。目前,临床上常用的骨肉瘤诊断方法有 X 线检查、穿刺活检等,虽然在诊断骨肉瘤上具有较高的准确性,但操作繁琐、具有一定的侵入性、对早期肿瘤检出率不高,不便应用于骨肉瘤的大规模筛查。因此,研制一种安全、准确、简单、便携的新检测技术,并将其应用于骨肉瘤筛查,具有重要的意义。

生物传感器具有选择性好、灵敏度高、成本低等优点,在肿瘤诊断领域有着重要的应用价值。在众多传感器中,可视化比色传感器通过肉眼观察溶液颜色变化即可实现对目标物的检测,具有直观、简单、方便等优点,有希望真正实现小型化、便携化和智能化肿瘤检测,成为基于大型仪器检测方法的补充,实现大规模肿瘤筛查的目的,有效提高肿瘤患者的早诊率。目前,常用辣根过氧化物酶 (HRP) 系列或金属模拟酶催化 H_2O_2 氧化使底物产生颜色变化,作为信号探

针构建可视化传感器实现对目标物的检测^[4-5];但这种传感技术存在一定不足:1) 酶易受环境变化影响而变性失活;2) 氧化剂 H_2O_2 易分解;3) 需要标记,增加了检测成本;4) 显色反应不可控^[6-7]。研究发现,双链特异性核酸染料 SG 嵌入 DNA 双链形成的 SG-DNA 双链复合物具有光诱导的类氧化物酶活性,不需 H_2O_2 的存在下即可在光诱导下催化氧化 TMB 产生颜色变化^[8]。该颜色反应具有稳定性好,对反应环境依赖性较低,可通过光照时间控制显色反应等优点,在构建 DNA 可视化比色传感器方面具有较高的应用价值。

由于骨肉瘤标志物 miRNA 的含量低,这就对可视化比色传感器的灵敏度提出了较高的要求。目前常通过杂交连锁反应、酶辅助靶标循环放大反应、滚环扩增反应等实现信号放大获得较高的灵敏度,如此存在耗时、繁琐、需要酶参与等缺点。值得关注的是, Dong 等^[2]通过目标快速启动两 X 探针交联聚合反应生成 DNA 纳米枝构建生物传感器实现单碱基突变基因的检测。该传感器简单、快速且不需要酶的参与,具有较好的稳定性、较高的特异性和灵敏度。为此,本文基于 DNA 纳米枝和 SG-DNA 双链复合物构建可视化比色传感器用于骨肉瘤相关 miR-135b-5p 的检测。该检测方法的吸光度值与 miR-135b-5p 浓度的对数值在 50 pM~1 M 浓度范围呈线性相关,检测限为 4.98 pM,具有较高的灵敏度和选择性,初步应用,可成功检测细胞中 miR-135b-5p。该方法结合了 DNA 纳米枝的信号放大作用和 SG-DNA 双链复合物的光诱导类氧化物酶活性,具有简单、稳定、价廉、反应条件温和可控、检测结果肉眼可见的优点。有望开发出简单、便携的骨肉瘤筛查试剂盒,造福于骨肉瘤患者。

参考文献

- [1] 张浩强,李明辉,王臻,等. 免疫荧光联合原位杂交技术检测骨肉瘤患者外周血中循环肿瘤细胞的表达及临床意义 [J]. 中华肿瘤杂志, 2017, 39 (7): 485-489.
- [2] Dong Y, Yao C, Wang Z, et al. Target-triggered polymerization of branched DNA enables enzyme-free and fast discrimination of single-base changes [J]. iScience, 2019, 21: 228-240.
- [3] Gao X, Li L, Cai X, et al. Targeting nanoparticles for diagnosis and therapy of bone tumors: Opportunities and challenges [J]. Biomaterials, 2021, 265: 120404.
- [4] Zhu W J, Feng D Q, Chen M, et al. Bienzyme colorimetric detection of glucose with self-calibration based on tree-shaped paper strip [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014, 190 (1): 414-418.
- [5] Wang K, Fan D, Liu Y, et al. Highly sensitive and specific colorimetric detection of cancer cells via dual-aptamer target binding strategy [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2015, 73: 1-6.
- [6] Du J, Wang J, Huang W, et al. Visible Light-activatable oxidase mimic of 9-mesityl-10-methylacridinium ion for colorimetric detection of biothiols and logic operations [J]. Analytical Chemistry, 2018, 90 (16): 9959-9965.
- [7] 刘里. 荧光素的模拟酶活性及分析应用研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2017.
- [8] Zhang X, Huang C, Xu S, et al. Photocatalytic oxidation of TMB with the double stranded DNA-SYBR Green I complex for label-free and universal colorimetric bioassay [J]. Chemical Communications, 2015, 51 (77): 14465-14468.