

催化发夹组装用于碱基切除修复酶活性检测研究

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2019.03.004

王 涛 汤建新

李 青

湖南工业大学

生命科学与化学学院

湖南 株洲 412007

摘 要: 碱基切除修复酶在 DNA 损伤修复过程中具有重要作用, 且其检测与癌症等疾病的诊断相关。传统的碱基切除修复酶检测方法操作复杂、灵敏度低, 且仅对酶的浓度进行定量分析而非酶的活性。为此, 建立了基于催化发夹组装介导信号放大用于核酸内切酶 IV (Endo IV) 活性的检测方法。该方法利用 Endo IV 的活性作用于底物探针, 将引发序列释放而引发催化发夹自组装信号放大, 以实现 Endo IV 的活性检测分析。通过荧光检测实验可知, 该方法检测下限为 3.7×10^{-7} U/mL, 可选择性地对 Endo IV 的活性进行检测, 是一种设计简单、操作简便、灵敏度高的碱基切除修复酶活性检测方法。

关键词: 催化发夹组装; 碱基切除修复酶; 酶活性检测; 无酶信号放大; 核酸内切酶 IV

中图分类号: F274; F224

文献标志码: A

文章编号: 1674-7100(2019)03-0024-06

引文格式: 王 涛, 汤建新, 李 青. 催化发夹组装用于碱基切除修复酶活性检测 [J]. 包装学报, 2019, 11(3): 24-29.

1 研究背景

DNA 的损伤修复在保持基因完整性中起着重要作用^[1]。对 DNA 进行损伤修复主要有以下几种途径: 碱基切除修复 (base excision and repair, BER), 核苷切除修复 (nucleoside excision and repair, NER) 和错配修复 (nucleoside mismatch repair, NMR)^[2]。其中, BER 是用于保护细胞免受碱基损伤影响的主要途径。BER 主要修复在碱基化学结构上发生变化的损伤碱基, 其修复过程由一种特殊的糖苷酶催化 N-糖苷键的断裂而引发, 然后释放出损伤碱基并形成一个脱碱基位点 (abasic site, AP 位点)。随后再通过

AP 核酸内切酶、脱氧核糖磷酸二酯酶、DNA 聚合酶和 DNA 连接酶共同作用完成整个修复^[3-5]。可见, 碱基切除修复酶在 DNA 损伤修复过程中具有重要作用, 并且其检测与癌症等疾病的诊断相关^[6-7]。

传统的碱基切除修复酶检测方法主要有放射性标记、凝胶电泳、色谱和磁珠分离等^[8-11]。这些方法时耗长、灵敏度低, 且仅对酶的浓度进行定量分析而不是对酶的活性进行检测。为了改进方法, 研究者主要着重于研发一些操作方便灵敏度高且可用于碱基切除修复酶活性测定的荧光检测方法^[12-15]。然而, 这些体外酶活性的检测方法大多需要特定反应条件的酶信号放大方式, 以至于检测过程变得复杂。因此,

收稿日期: 2019-01-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21705042), 中国包装联合会“绿色包装与安全”专项研究基金资助项目(2017ZBLY14)

作者简介: 王 涛(1995-), 男, 河南项城人, 湖南工业大学硕士生, 主要研究方向为生物传感与生化分析,

E-mail: 1076985802@qq.com

通信作者: 李 青(1988-), 女, 江西抚州人, 湖南工业大学讲师, 博士, 主要从事生物传感与生化分析方面的教学与研究,

E-mail: liqing880523@163.com

研究操作简单灵敏度高的 DNA 碱基切除修复酶检测方法具有重要意义。

催化发夹组装 (catalyzed hairpin assembly, CHA) 是一种基于核酸的高灵敏无酶信号放大方式, 这种放大方式可以产生百倍的催化扩增, 目前已作为一种高灵敏且设计简单的核酸扩增方式而被广泛应用。以核酸内切酶 IV (endonuclease IV, Endo IV) 为例, 设计 3 条发夹探针, 实验原理如图 1 所示。其中酶底物探针 HP 设计成包含有 CHA 的引发序列, 该部分序列被封闭于发夹中, 同时在发夹的茎端双链部分设计 Endo IV 酶识别的 AP 位点。H1、H2 为参与催化发夹组装的信号放大探针。H1 探针的茎端中修饰供体基团 Cy3 及受体基团 BHQ2, 该发夹探针由于供体-受体的荧光共振能量转移^[16]而具有低的荧光强度值。当 Endo IV 存在时, 其特异性地作用于底物探针的 AP 位点, 而在该探针的双链茎端部分产生缺口, 产生缺口的两部分序列由于熔链温度太低而无法在反应温度条件下杂交而释放出两条单链 (CHA 引发序列 C1 及短片段 C2 序列)。C1 与 H1 探针杂交使 H1 释放, 释放的 H1 将 H2 探针打开, H2 探针再链置换出的 C1 探针, 最后得到了 H1:H2 的双链杂交复合物, 该双链结构使得荧光供体基团与受体基团之间的距离变大从而恢复供体基团 Cy3 的荧光, 而置换出的 C1 探针进入下一个 CHA 放大循环, 产生增强的荧光信号。当体系中没有 Endo IV 时, C1 序列由于被封闭在发夹探针中无法引发下游的 CHA 放大而得到激活式的荧光信号, 使得 Cy3 的荧光强度值很低。由于该荧光信号是基于 Endo IV 酶激活式的荧光响应信号, 因此该方法可实现对 Endo IV 简便、高灵敏的检测。本课题组将无酶参与的催化发夹组装信号放大方法用于 DNA 碱基切除修复酶检测, 以期实

现 Endo IV 的简便且高灵敏检测, 并为其其他 DNA 碱基切除修复酶的检测提供一定参考。

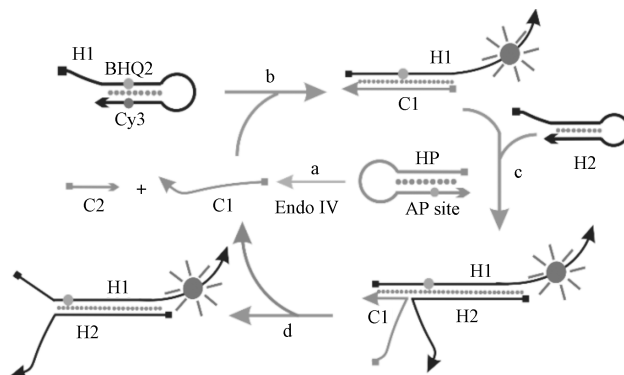


图 1 发夹催化自组装信号放大用于内切酶 IV 活性分析实验原理图

Fig. 1 Schematic illustration of enzyme-free signal amplification platform based on catalytic hairpin self-assembly for detection of endonuclease IV activity

2 实验部分

2.1 主要试剂与仪器

1) 实验试剂

核酸内切酶 IV、10 倍浓度的 NE Buffer 3 (各成分浓度为: 1 mol/L NaCl、0.5 mol/L Tris-HCl、0.1 mol/L MgCl₂ 和 0.01 mol/L 二硫苏糖醇, pH 值为 7.9), 均购于 New England Biolabs 公司 (美国); 染料 SYBR Green I (10 000 倍), 购于 Life Technologies 公司 (美国); 5 倍浓度的硼酸缓冲液 (各成分浓度为: 0.45 mol/L Tris-硼酸、0.01 mol/L 乙二胺四乙酸, pH 值为 8.0), 购于生工生物工程股份有限公司 (上海); 其它化学试剂均为分析纯购于国药集团化学试剂有限公司。实验中用到的探针由生工生物工程股份有限公司 (上海) 合成, 探针序列如表 1 所示。

表 1 寡聚核苷酸探针序列
Table 1 Sequences of DNA probes

Probes	Sequence (5' to 3')
HP Probe	GTTAGCAGTGGTCAGTGACCCAGGTTAACTTAGCTCACTGACXACTGCTAAC
H1	GTCAGTGAGCTAAGTTAACTGGGCCATGAGAAGACCCAGGTTAACTT ^T AGC
H2	AACCTGGGTCTTCTCATGGCCAGGTTAACTTAGCCCATGAGAAGAC

注: X 代表 AP 位点; T 表示碱基修饰 BHQ2 染料; T 表示碱基修饰 Cy3 染料。

2) 实验仪器

F-7000 荧光光谱仪, 日本日立公司; 凝胶电泳仪, DYCP-31D 型, 北京六一生物科技有限公司; 凝胶成像系统, Tocan 240 型, 上海东灿生物科技有限公司;

超纯水仪, Milli-Q 型, Millipore 公司。

2.2 基于催化发夹组装信号放大的 Endo IV 活性测定

在 37 °C 下, 将不同活性的 Endo IV、浓度为 0.1 μmol/L 的 Endo IV 底物探针 HP 于 1 倍浓度的 NE

Buffer 3 缓冲液中反应 2 h 后, 加入浓度为 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 的发夹探针 H1、H2, 继续反应 2 h; 反应结束后, 测定每个样品的荧光光谱。测定过程使用 640 nm 激发波长, 5 nm 激发发射狭缝, 850 V 电压, 发射光谱从 555 nm 记录到 625 nm 。

2.3 琼脂糖凝胶电泳测定

所得样品采用含有琼脂糖质量分数为 3%, 经浓度为 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 的 GoldView、 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 的溴化乙锭染色后的凝胶电泳进行测定。将琼脂糖凝胶电泳置于 0.5 倍浓度的硼酸缓冲液中, 每个泳道加入 $10 \mu\text{L}$ 样品 (含 1 倍浓度的硼酸缓冲液), 在 101 V 恒定电压下电泳 120 min 。最后得到的电泳条带用 Tocan 240 凝胶成像系统观察并拍照。

2.4 底物探针 HP 浓度的优化

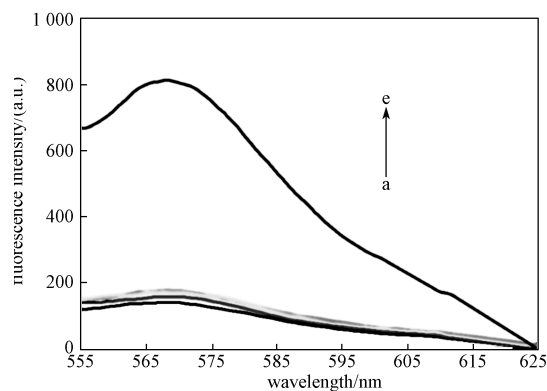
在 37°C 下, 将酶活力为 0.1 U/L 的 Endo IV、浓度分别为 30, 50, 80, 100, 200, 500 nmol/L 的 Endo IV 底物探针 HP 于 1 倍浓度的 NE Buffer 3 缓冲液中反应 2 h 后, 加入浓度为 500 nmol/L 的发夹探针 H1、H2, 继续反应 2 h, 反应结束后, 测定每个样品的荧光光谱值 F 。同时, 在不加入 Endo IV 条件下, 体系中包含有上述不同浓度的 Endo IV 底物探针 HP 于 1 倍浓度的 NE Buffer 3 缓冲液中反应 2 h 后, 加入浓度为 500 nmol/L 的发夹探针 H1、H2, 继续反应 2 h, 反应结束后, 测定每个样品的荧光光谱值 F_0 。 F/F_0 即为体系中的信背比。测定过程使用 640 nm 激发波长, 5 nm 激发发射狭缝, 850 V 电压, 发射光谱从 555 nm 记录到 625 nm 。

3 结果与讨论

3.1 催化发夹组装信号放大用于 Endo IV 活性分析的实验原理验证

图 2 为基于催化发夹组装信号放大用于 Endo IV 活性分析检测的特征光谱图。从图中可以看出, 当体系中只有发夹探针 H1、H2 时, 仅有非常低的荧光信号, 表明设计的探针在没有引发链存在下, 不会发生催化自组装反应; 当在以上体系中加入酶底物探针 HP 时, 体系中的荧光信号仍很低, 与单独只有 H1、H2 信号相当, 表明设计的 HP 探针很好的将引发序列封闭在探针当中而无法引发催化发夹自组装反应; 当体系中同时存在 Endo IV、底物探针 HP 及发夹探针 H1、H2 时, 可以观察到增强的 Cy3 荧光信号, 其信背比约为 5.81。另外, 用质量浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$

的牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 代替 Endo IV 加入到上述体系当中, 基本观察不到任何荧光增强信号。上述结果表明, 由于 Endo IV 的特异性作用, 可水解底物探针 HP 上的 AP 位点, 将封闭在底物探针 HP 内的引发序列释放, 使得催化自组装放大反应得以引发, 得到增强的 Cy3 荧光信号。通过监测 Cy3 的荧光信号可实现对 Endo IV 酶活性的定量分析检测, 表明建立的发夹催化自组装信号放大可用于 Endo IV 的活性分析检测。

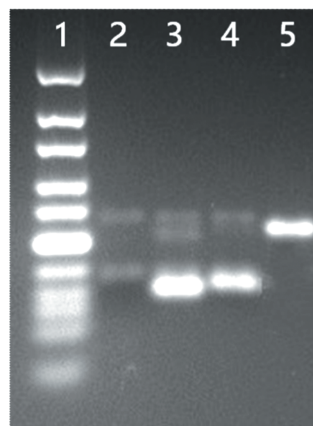


a—H1; b—H1+H2; c—HP+H1+H2; d—HP+H1+H2+BSA; e—HP+H1+H2+Endo IV

图 2 催化发夹组装信号放大用于 Endo IV 活性分析的荧光光谱响应图

Fig. 2 Typical fluorescence spectra of Endo IV activity analysis with the hairpin assembly signal amplification

图 3 为各检测样品的琼脂糖凝胶电泳图。



注: 泳道 1 为 DNA marker ($10\sim 300 \text{ bp}$); 2 为 HP; 3 为 HP + H1; 4 为 HP + H1 + H2; 5 为 HP + H1 + H2 + Endo IV。

图 3 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis images of products

从图 3 可以看出, 泳道 4 为体系中存在底物发夹探针 HP、发夹探针 H1、H2 的混合物条带, 并没有

更长的双链杂交体条带的产生。而当在这个混合物中加入 Endo IV 后 (泳道 5), 底物发夹探针 HP、发夹探针 H1、H2 的混合物条带消失, 随之产生了一个新的长的双链杂交体条带, 该条带可能为催化自组装体系最后得到的 H1、H2 杂交的双链复合物。结果表明, 加入的 Endo IV 后, 其特异活性作用介导引发了催化自组装的放大反应, 证明了该方法的可行性。

3.2 底物探针 HP 浓度的优化

为了得到最优的分析性能, 对影响实验的因素进行了优化。加入的底物探针 HP 浓度影响着体系的背景信号以及响应信号, 因此其浓度对传感器用于 Endo IV 活性测定具有重要的影响。图 4 为不同浓度底物探针 HP 用于 Endo IV 活性分析的信背比图。由图可知, HP 浓度由 30 nmol/L 提高到 100 nmol/L 时, 体系中的信背比也随之增大。而在 HP 浓度超过 100 nmol/L 时, 体系中的信背比逐渐降低。因此, 选择浓度为 100 nmol/L 时的底物探针 HP 用于 Endo IV 活性的测定。

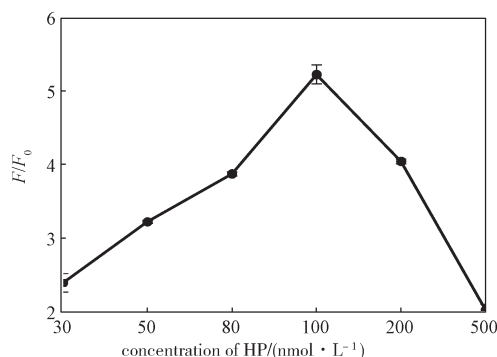
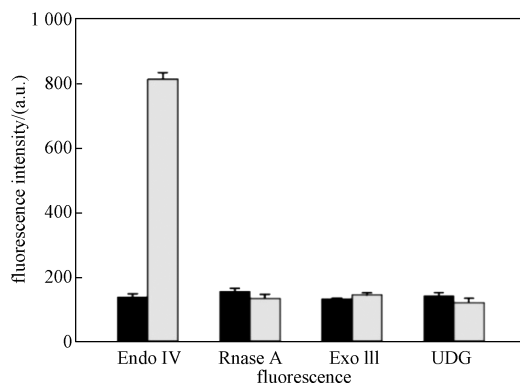


图 4 不同浓度的底物探针 HP 用于 Endo IV 活性分析的信背比图

Fig. 4 The variation in fluorescence signal ratio with different concentration of HP

3.3 分析方法的选择性研究

为了验证催化发夹组装介导信号放大方法能特异性地应用于 Endo IV 的活性分析, 选择核糖核酸酶 A (ribonuclease A, Rnase A)、外切酶 III (exonuclease III, Exo III) 及尿嘧啶糖基化酶 (uracil-DNA glycosylase, UDG) 3 种非特异性酶进行实验, 结果如图 5 所示。由图可知, 建立的分析方法对 Endo IV 能产生较强的荧光响应信号, 而对其它 3 种非特异性酶的荧光响应相对较弱, 能够将 Endo IV 从其它 3 种非特异性酶中区分开来。因此, 该分析方法对 Endo IV 具有较好的选择性。



注: 黑色柱状图为背景, 灰色柱状图为响应; Endo IV 和 3 种非目标酶活力均为 0.1 U/L; 误差棒为 3 次测量的标准偏差。

图 5 Endo IV 酶活性测定方法的选择性研究结果

Fig. 5 Specificity of Endo IV assay

3.4 传感器分析性能研究

在最优实验条件下, 利用建立的分析方法对不同酶活力的 Endo IV 进行了分析。图 6 为不同酶活力的 Endo IV 荧光响应曲线。由图可知, 随着 Endo IV 的酶活力从 0 提高到 1.0 U/mL, Cy3 的荧光强度也逐渐增强, 最小实际检测浓度为 1.0×10^{-6} U/mL。

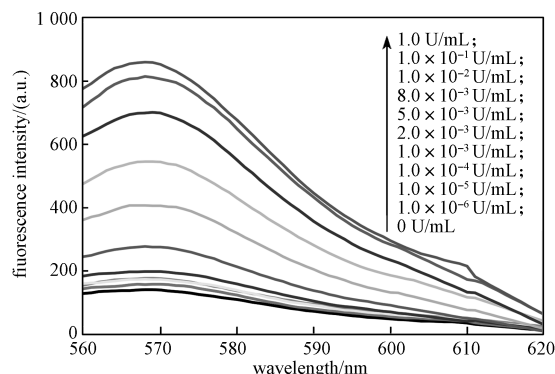


图 6 不同酶活力的 Endo IV 加入到反应体系后的 Cy3 荧光光谱图

Fig. 6 Typical fluorescence spectra with addition of different concentrations of Endo IV

图 7 为 Endo IV 酶活力与荧光强度的校正曲线, 通过将 Endo IV 酶活力取对数并与荧光峰强度作图, 得到荧光强度与 Endo IV 酶活力对数之间的线性关系图, 如图 8 所示。由图可知, Endo IV 的酶活力在 $0.1 \times 10^{-2} \sim 0.1$ U/mL 范围内, 两者呈线性关系, 其线性方程为 $F=345.29 \lg C+1217.3$ ($R_2=0.9926$, F 为荧光峰强度, C 为内切酶 IV 活度)。

通过校正曲线和 3σ 规则计算, 该方法检测下限约为 3.7×10^{-7} U/mL。与其他有酶参与的信号放大用于 Endo IV 酶活力检测分析方法相比, 该下限值与之

相当, 具有较好的灵敏度。并且, 该分析方法是基于无酶参与催化发夹组装介导的信号放大, 设计简明且操作简单。综上所述, 该分析方法可以用于低浓度的 Endo IV 活性检测。

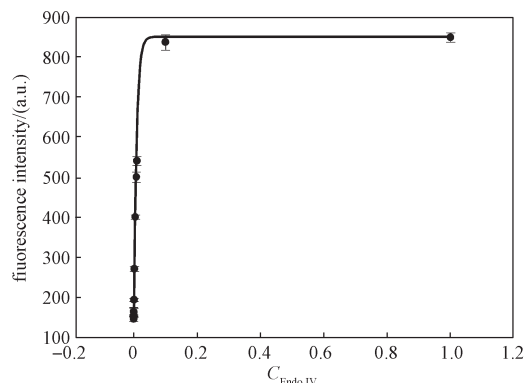


图 7 荧光强度与 Endo IV 酶活力的校正曲线图

Fig. 7 Fluorescence peak intensity versus Endo IV concentration in logarithmic scale

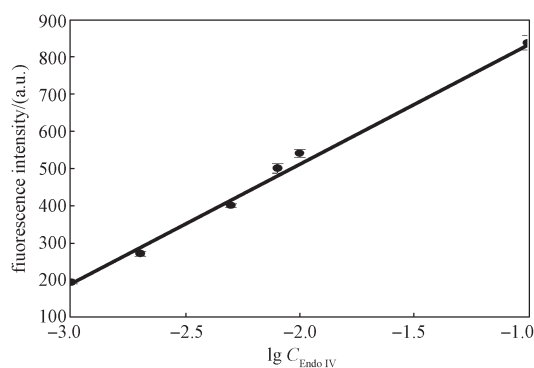


图 8 Cy3 在 494 nm 处荧光峰强度与 Endo IV 酶活力对数之间的线性关系图

Fig. 8 Linear relationship between the logarithm of fluorescence intensity and the logarithm of Endo IV concentration of Cy3 at 494 nm

4 结论

本研究基于催化发夹组装的无酶参与信号放大方法, 构建了一种新型的 Endo IV 活性检测方法, 以实现灵敏且设计简单的碱基切除修复酶的活性检测。该方法通过 Endo IV 作用于底物探针的 AP 位点, 使封闭在底物探针中的引发序列释放出来, 从而触发催化发夹自组装信号放大, 以实现对 Endo IV 活性的分析检测。实验结果表明, 建立的方法灵敏度高且操作简便, 分析检测限为 3.7×10^{-7} U/mL, 可为 Endo IV 活性的检测提供一个新的方法, 并有望用于其他碱基切除修复酶的检测及相关抑制剂的筛选。

参考文献:

- [1] DROHAT A C, COEY C T. Role of Base Excision "Repair" Enzymes in Erasing Epigenetic Marks from DNA[J]. Chemical Reviews, 2016, 116(20): 12711–12729.
- [2] WILSON III D, BOHR V. The Mechanics of Base Excision Repair, and Its Relationship to Aging and Disease[J]. DNA Repair, 2007, 6(4): 544–559.
- [3] MOL C D, IZUMI T, MITRA S, et al. DNA-Bound Structures and Mutants Reveal Abasic DNA Binding by APE1 DNA Repair and Coordination[J]. Nature, 2000, 403(6768): 451–456.
- [4] LI Q, WANG Y D, SHEN G L, et al. Split Aptamer Mediated Endonuclease Amplification for Small-Molecule Detection[J]. Chemical Communications, 2015, 51(20): 4196–4199.
- [5] LJUNGMAN M. Targeting the DNA Damage Response in Cancer[J]. Chemical Reviews, 2009, 109(7): 2929–2950.
- [6] ABBOTTS R, MADHUSUDAN S. Human AP Endonuclease 1 (APE1): From Mechanistic Insights to Druggable Target in Cancer[J]. Cancer Treatment Reviews, 2010, 36(5): 425–435.
- [7] WANG D, LUO M, KELLEY M R. Human Apurinic Endonuclease 1 (APE1) Expression and Prognostic Significance in Osteosarcoma; Enhanced Sensitivity of Osteosarcoma to DNA Damaging Agents Using Silencing RNA APE1 Expression Inhibition[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2004, 3(6): 679–686.
- [8] WILSON III D M. Ape1 Abasic Endonuclease Activity is Regulated by Magnesium and Potassium Concentrations and is Robust on Alternative DNA Structures[J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 345(5): 1003–1014.
- [9] CESARATTO L, CODARIN E, VASCOTTO C, et al. Specific Inhibition of The Redox Activity of Ape1/Ref-1 by E3330 Blocks TNF- α -Induced Activation of IL-8 Production in Liver Cancer Cell Lines[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e70909. doi: 10.1371/journal.pone.0070909.
- [10] ZHUO Y, LIAO N, CHAI Y Q, et al. Ultrasensitive Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 Immunosensing Based on Self-Enhanced Electrochemiluminescence of a Ru(II) Complex[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(2): 1053–1060.
- [11] HAN J, ZHUO Y, CHAI Y Q, et al. Ultrasensitive Electrochemical Strategy for Trace Detection of APE-1 Via Triple Signal Amplification Strategy[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 41: 116–122.

- [12] FANG S M, CHEN L, ZHAO M P. Unimolecular Chemically Modified DNA Fluorescent Probe for One-Step Quantitative Measurement of the Activity of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 in Biological Samples[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(24): 11952–11956.
- [13] ZHAI J Q, LIU Y B, HUANG S, et al. A Specific DNA-Nanoprobe for Tracking the Activities of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 in Living Cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(6): e45.
- [14] HUANG Y F, MA Y F, LI Y N, et al. Sensitive and Label-Free Fluorescence Detection of Apurinic/aprimidinic Endonuclease 1 Activity Based on Isothermal Amplified-Generation of G-Quadruplex[J]. *New Journal of Chemistry*, 2017, 41(5): 1893–1896.
- [15] FLAENDER M, COSTA G, NONGLATON G, et al. A DNA Array Based on Clickable Lesion-Containing Hairpin Probes for Multiplexed Detection of Base Excision Repair Activities[J]. *Analyst*, 2016, 141(22): 6208–6216.
- [16] 周礼义, 龚 亮, 李学强, 等. 基于分子工程能量转移构建的比率型双光子荧光探针在生物成像中的应用[J]. *包装学报*, 2018, 10(1): 54–66.
- ZHOU Liyi, GONG Liang, LI Xueqiang, et al. Molecular Engineering of Energy Transfer-Based Ratiometric Two-Photon Fluorescent Probes for Bioimaging Applications[J]. *Packaging Journal*, 2018, 10(1): 54–66.
- (责任编辑: 黄海波)

An Enzyme-Free Signal Amplification Platform Based on Catalytic Hairpin Self-Assembly for Detection of Endonuclease IV Activity

WANG Tao, TANG Jianxin, LI Qing

(College of Life Sciences and Chemistry, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China)

Abstract: Base excision repair enzymes played an important role in DNA damage repair, and their detection was related to cancer and disease diagnosis. The traditional detection of base excision repair enzymes was complex and low-sensitive, which only quantitatively analyzed the concentration of enzymes, rather than enzyme activity detection. A signal amplification platform based on catalytic hairpin self-assembly was established to detect endonuclease IV activity in base excision repair enzymes. This method was based on the activation of endonuclease IV acting on the substrate probe and releasing the initiation sequence, which caused the amplification of self-assembly signal of catalytic hairpin to realize the detection and analysis of endonuclease IV activity. According to the fluorescence detection experiment, the detection lower limit of this method was 3.7×10^{-7} U/mL, and Endo IV activity could be selectively detected. Therefore, this method was simple in design and operation and high in sensitivity.

Keywords: catalyzed hairpin assembly; base excision repair enzyme; enzyme activity detection; enzyme-free signal amplification; Endo IV