

构建 G4-DNAzyme 比色生物传感器检测 肿瘤标志物 miRNA-21 的研究

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2019.03.006

汤 力 文崇程
龚 亮 汤建新

湖南工业大学
生命科学与化学学院
湖南 株洲 412007

摘 要: miRNA-21 在大部分肿瘤中都存在高表达, 其含量的异常可作为肿瘤发生的早期诊断标志。基于 G-四链体-hemin DNAzyme 能催化 H_2O_2 氧化 2, 2'-联氨双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 生成 ABTS^+ , 利用链的竞争作用构建了 G4-DNAzyme 比色生物传感器, 该传感器检测 miRNA-21 时具有操作简单、响应快速的特点。在优化核酸序列设计、反应温度、反应时间等实验条件的基础上, 利用紫外分光光度计测量 ABTS^+ 的最大吸光度, 并计算其与空白样品的信背比 (SBR), 在不同浓度的 miRNA-21 下, 绘制浓度-SBR 曲线。结果显示: 实验可检测 miRNA-21 的最低浓度约为 $0.1 \mu\text{mol/L}$; 在 miRNA-21 浓度为 $0.1 \sim 1.2 \mu\text{mol/L}$ 时, SBR 与 miRNA-21 的浓度呈现出良好的线性关系, 其线性方程为: $y=0.8349x+0.8983$, 相关系数 $R^2=0.995$ 。该 G4-DNAzyme 比色生物传感器设计简单, 操作方便, 无需高精密仪器, 对目标物有良好响应性及高选择性。

关键词: G4-DNAzyme; 比色生物传感器; miRNA-21

中图分类号: TP212.3

文献标志码: A

文章编号: 1674-7100(2019)03-0037-07

引文格式: 汤 力, 文崇程, 龚 亮, 等. 构建 G4-DNAzyme 比色生物传感器检测肿瘤标志物 miRNA-21 的研究 [J]. 包装学报, 2019, 11(3): 37-43.

1 研究背景

随着现代生活节奏加快、工作压力增大及生态环境日益恶化, 肿瘤发病率不断上升, 全球癌症发病率及死亡率持续增长。相关数据显示癌症将成为新世纪人类的第一杀手, 已对全球公共卫生构成了巨大挑战^[1]。癌症的死亡率之所以居高不下, 其主要原因是

癌症早期没有明显的症状, 一旦被发现, 病情基本已到中晚期, 此时肿瘤细胞扩散迅猛, 增加了患者治疗的难度。因此, 开发快速而有效的检测早期肿瘤标志物的方法, 实现对癌症患者的早期诊断和治疗, 降低癌症的威胁具有重要意义。

研究发现, 小分子核糖核酸 (micro RNA,

收稿日期: 2019-03-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21705043, 51774128), 湖南省教育厅科研基金资助项目 (17A055), 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: 汤 力 (1988-), 男, 湖南张家界人, 湖南工业大学博士生, 主要研究方向为功能材料,
E-mail: 308926207@qq.com

通信作者: 龚 亮 (1987-), 女, 湖南双峰人, 湖南工业大学讲师, 博士, 主要从事荧光探针与生物传感方面的研究,
E-mail: gl569940808@126.com

miRNA) 可通过类似癌基因、抑癌基因或其他方式调控肿瘤的发生、发展和转化过程, 在很多肿瘤中 miRNA 都存在差异表达。因此, miRNA 成为肿瘤病理学研究领域中备受关注的生物大分子之一, 尤其是 miRNA-21^[2-4]。miRNA-21 可以通过负调节靶基因, 如第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)、程序性细胞死亡因子 4 (programmed cell death factor 4, PDCD4) 等^[5-6], 调控肿瘤细胞的增殖、凋亡及侵入转移, 并在大部分实体肿瘤中都存在高表达, 故对 miRNA-21 的检测可作为肿瘤疾病的早期诊断方法之一^[7]。近年来, 关于 miRNA-21 的研究陆续被报道, 如 miRNA-21 的分析检测及体内成像^[8]、miRNA-21 的表达机制与靶基因的研究^[9]等, 但这些检测研究中, 大多需要使用精密仪器, 抑或检测时间冗长, 限制了 miRNA-21 使用的普遍性。因此, 设计一种操作简单、响应快速的 miRNA-21 检测方法势在必行^[10]。

DNA 酶 (DNAzyme) 是指具有催化性能的 DNA 分子, 具有易于复制、合成、修饰及热稳定性好、不易水解等优点, 在生物模拟酶的研究中占有极其重要的地位。G- 四链体是由 DNAzyme 序列形成的一种特殊的二级结构, 它是由一段或者几段富 G 序列构成, 能在 K^+ 、 Pb^{2+} 或 NH_2^+ 的环境中折叠形成平行或反平行的四链体结构, 其中 K^+ 对维持 G- 四链体结构的稳定性效果最好^[11]。相关研究发现, G- 四链体的中心存在一个离子通道, 特定的金属离子可以进入该离子通道, 并能对 G- 四链体结构的稳定性起到积极的作用。G- 四链体结构形成后, 能与氯化血红素 (hemin) 作用, 形成一种具有过氧化物酶活性的人工模拟酶^[12], 能催化 H_2O_2 , 使 2, 2'-联氮双 (3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐 (2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS) 氧化为 $ABTS^+$, 溶液由无色变为绿色。

近几年来, G- 四链体-hemin DNAzyme 作为一类重要的 DNAzyme, 在分析化学领域受到了前所未有的关注, 并被应用于多种传感器中^[13-15]。在分析检测时, G- 四链体-hemin DNAzyme 能促使 ABTS 氧化变色, 研究人员可通过肉眼直接观察到实验现象, 无需精密仪器检测, 操作简单、成本低廉, 因而该分析法具有明显的优势^[16]。

本研究基于 G- 四链体-hemin DNAzyme 能催

化双氧水 (H_2O_2) 氧化 ABTS 生成 $ABTS^+$ 的变色原理, 以 miRNA-21 作为目标检测物, 设计一种可通过肉眼直接观察实验现象的比色检测方案 (如图 1 所示)。具体设计如下: 将 G4-DNAzyme 与互补链 C-21 杂交成双链, 在不含目标物 miRNA-21 时, G4-DNAzyme 被 C-21 “锁住”, 无法在 K^+ 环境中折叠成 G- 四链体结构, 因此无法与 hemin 结合, ABTS 无法被氧化, 溶液颜色无变化; 而当目标物 miRNA-21 存在时, miRNA-21 与 G4-DNAzyme 竞争结合 C-21, 因 miRNA-21 与 C-21 具有更强的结合作用, 故溶液中会释放出大量游离的 G4-DNAzyme, 该序列在 K^+ 环境中能折叠成 G- 四链体结构, 其与 hemin 结合后, 可催化 H_2O_2 , 使 ABTS 被氧化生成 $ABTS^+$, 溶液由无色变成绿色, 从而实现对 miRNA-21 的检测。

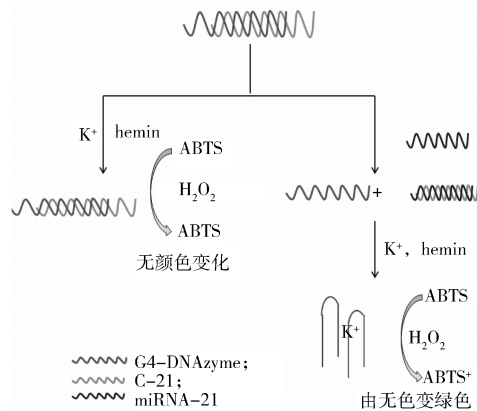


图 1 实验原理图

Fig. 1 Schematic illustration of the biosensor

2 实验部分

2.1 主要仪器、设备及试剂

1) 仪器与设备

电子分析天平, ME-T 型, 梅特勒-托利多国际贸易 (上海) 有限公司; 紫外分光光度计, 756S 型, 上海棱光技术有限公司; 智能控温磁力搅拌器, SZCL-2 型, 巩义市予华仪器有限责任公司; 离心沉淀机, 800 型, 常州市仪都仪器有限公司。

2) 试剂

氯化血红素、2, 2'-联氮双 (3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐、三羟甲基氨基甲烷 (Tris(hydroxymethyl)methyl aminomethane, Tris) 缓冲液、N, N-二甲基甲酰胺 (dimethyl formamide, DMF), 以上试剂均为分析纯, 购于天津希恩生

化科技有限公司; 双氧水、氯化钠、硝酸钾、氯化镁、乙醇, 以上试剂均为分析纯, 购于萨恩化学技术(上海)有限公司。

实验所用 DNA 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 并由该公司采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)进行纯化分离。根据实验需要, 所设计的核酸序列如表 1 所示。

表 1 实验所用的 DNA 碱基序列

Table 1 Sequences of oligonucleotides used in this work

DNA 序列名称	碱基序列
miRNA-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
C-21	TCAACTTCAGTCTGATAAGCTA
G4-miR21-1	GGGTTGGGTAGCTTATCAGACTGA TGGGGTAGGG
G4-miR21-2	GGGTTGGGTAGCTTATCAGACTAG GGTAGGG
G4-miR21-3	GGGTTGGGTAGCTTATCAGACTGG GGTAGGG
G4-miR21-4	GGGTTGGGTAGCTTATCAGACTGA GGGTAGGG
G4-miR21-5	GGGTTGGGTAGCTTATCAGACTGA GGGTAGGG
DNA-21-1 base	TAGCTTATCACACTGATGTTGA
DNA-21-2 base	TAGCATATCACACTGATGTTGA
DNA-21-3 base	TAGCATATCACACTGAAGTTGA
DNA-21-4 base	TAGCATATCACAGAAGTTGA

2.2 实验方法

根据前面所述的方案设计, 首先需验证实验原理的可行性; 然后在确保实验现象明显的前提下, 对实验条件(如反应温度、反应时间、设计序列等)进行优化, 以获得最优实验条件; 其次在最优实验条件下, 利用紫外分光光度计检测不同浓度 miRNA-21 下, 最终反应溶液中 ABTS⁺ 的最大吸光度与空白样品的信背比(signal-to-background ratio, SBR), 绘制浓度-SBR 曲线, 并获取相应线性关系, 绘制标准曲线; 最后, 为验证 G4-DNAzyme 比色生物传感器对检测目标物 miRNA-21 的专一性和选择性, 本研究选用与 miRNA-21 分别具有 1, 2, 3, 4 个碱基差异的序列进行对比。

2.3 实验步骤

2.3.1 溶液的配制

1) 配制浓度为 20 mmol/L 的 Tris-HCl 溶液, 其中 Na⁺ 浓度为 100 mmol/L, Mg²⁺ 浓度为 2 mmol/L, 溶液的 pH 值为 8.0。

2) 以 Tris-HCl 为缓冲溶液, 将所需的 DNA 链溶解并稀释至浓度为 10 μmol/L。

3) 对 C-21 和 G4-DNAzyme 序列进行杂交退火处理, 即将该序列组合在 95 °C 水浴中加热 5 min, 然后缓慢冷却至室温, 将其储存在 4 °C 冰箱中, 编号为 G4+C。

2.3.2 可行性验证

为了验证游离的 G4-DNAzyme 能在 K⁺ 环境中与 hemin 结合, 催化 H₂O₂, 使无色的 ABTS 被氧化生成绿色的 ABTS⁺, 而与 C-21 杂交后的 G4-DNAzyme (G4+C) 不能使溶液颜色发生变化, 进行可行性实验。本研究设计实验步骤如下: 在 2 个 200 μL 离心管内分别加入适量的 Tris-HCl 缓冲溶液、5 μL 浓度为 1 mol/L 的 K⁺ 溶液以及 5 μL 浓度为 10 μmol/L 的 G4+C 或 G4-DNAzyme, 室温下反应 30 min; 然后加入 5 μL 浓度为 100 μmol/L 的 hemin 溶液, 反应 30 min; 最后, 迅速加入 5 μL 的 H₂O₂ 溶液、5 μL 浓度为 1 mmol/L 的 ABTS 溶液, 静置 5~10 min, 观察颜色并记录。

2.3.3 实验条件的优化

G4-DNAzyme 碱基序列的差异, 对实验结果有较大的影响。若 G4-DNAzyme 与 C-21 杂交碱基过多, 则导致 miRNA-21 无法将 G4-DNAzyme 序列竞争下来, 实验现象不明显; 若与 C-21 杂交碱基过少, 则导致杂交熔链温度(T_m)过低, 游离 G4-DNAzyme 过多, 实验背景颜色较深。因此, 本研究设计了 5 种与 C-21 不同杂交程度的 G4-DNAzyme (G4-miR21-1~G4-miR21-5), 通过对比各 G4-DNAzyme 样品信号与空白样品之间的 SBR, 选出最大值, 与其对应的即为最优 G4-DNAzyme。

DNA 序列的杂交是链结合和解链之间的动态变化, 达到动态平衡之前目标物 miRNA-21 的含量在不断变化。因此, 加入目标物 miRNA-21 后的反应时间对实验结果也有影响。本研究向溶液中加入 miRNA-21 后, 分别反应 10, 20, 30, 40, 50, 60 min 时, 观察样品的 SBR 变化情况, 记录实验结果。

2.3.4 miRNA-21 的检测

在 200 μL 离心管内分别加入适量的 Tris-HCl 缓冲溶液、5 μL 浓度为 1 mol/L 的 K⁺ 溶液以及 5 μL 浓度为 10 μmol/L 的 G4+C, 常温下反应 30 min; 再加入不同浓度的 miRNA-21, 反应 30 min; 向各样品中加入 5 μL 浓度为 100 μmol/L 的 hemin 溶液, 继续反

应 30 min; 最后, 迅速加入 5 μL 的 H_2O_2 溶液、5 μL 浓度为 1 mmol/L 的 ABTS 溶液, 静置 5~10 min, 观察样品颜色并记录。

2.3.5 标准曲线的绘制

在最优实验条件下, 将实验的最终反应溶液在波长为 420 nm 的光照下, 利用紫外分光光度计检测溶液中 ABTS^+ 的吸光度, 绘制浓度-SBR 曲线, 并选取呈线性相关的浓度范围, 绘制标准曲线。

2.3.6 选择性验证

为验证所制备的 G4-DNAzyme 比色生物传感器对检测目标物 miRNA-21 的专一性和选择性, 本研究分别选用与 miRNA-21 具有 1, 2, 3, 4 个碱基差异的序列 (具体碱基序列如表 1 中 DNA-21-1 base 至 DNA-21-4 base), 参照 2.3.4 所述实验步骤进行实验, 观察并记录实验结果。

3 结果与讨论

3.1 可行性验证

为了验证本研究设计方案的可行性, 按照 2.3.2 所述实验步骤进行实验, 实验现象如图 2 所示, 其中: a 为与 C-21 杂交的 G4-DNAzyme 序列的样品, b 为仅含有 G4-DNAzyme 序列的样品。

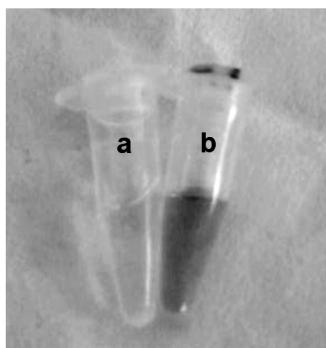


图 2 可行性验证实验现象

Fig. 2 Experimental feasibility verification



彩图

从图 2 可以看出, 离心管 a 中的溶液为无色, 这是因为 G4-DNAzyme 在被 C-21 “锁住”的情况下, 无法折叠成 G-四链体, 也无法与 hemin 结合, 使溶液发生变色反应, 因而在没有目标物 miRNA-21 存在下, 样品的背景颜色为无色; 离心管 b 中的溶液为绿色, 这是因为游离的 G4-DNAzyme 可以在 K^+ 环境中折叠成 G-四链体, 并与 hemin 结合, 进一步催化 H_2O_2 氧化 ABTS, 使溶液发生变色反应。

因此, 本研究所设计的 G4-DNAzyme 不存在

其他二级结构限制其折叠成 G-四链体; 在验证 miRNA-21 存在时, G4-DNAzyme 可表现出明显的信号差别, 因此本研究方案具有可行性。

3.2 G4-DNAzyme 序列的优化

G4-DNAzyme 序列的设计直接影响实验结果。由于目标物 miRNA-21 的碱基序列已固定, 故用来锁住 G4-DNAzyme 的 C-21 序列也已固定, 因此, 能编码的只有 G4-DNAzyme, 该序列与 C-21 的杂交稳定性是本研究的关键。若两者杂交碱基过多, 则 miRNA-21 无法与 G4-DNAzyme 竞争结合 C-21, 样品中游离的 G4-DNAzyme 较少, 从而导致其信号弱; 若两者杂交碱基较少, 则 C-21 无法有效锁住 G4-DNAzyme, 致使溶液中仍存有该序列, 即使在不含 miRNA-21 的情况下, 溶液也可以由无色变为绿色, 达不到检测目标物的目的。

本研究根据杂交序列 T_m 的差异, 设计了 5 种与 C-21 具有不同杂交程度的 G4-DNAzyme 序列 (G4-miR21-1~G4-miR21-5) 进行实验。该 5 种 G4-DNAzyme 序列在相同试验条件下进行反应, 对比有 miRNA-21 (信号样品) 和无 miRNA-21 (空白样品) 两种情况下的颜色差异, 并利用紫外分光光度计检测溶液中 ABTS^+ 的吸光度, 计算 SBR, 具体结果如图 3 所示。

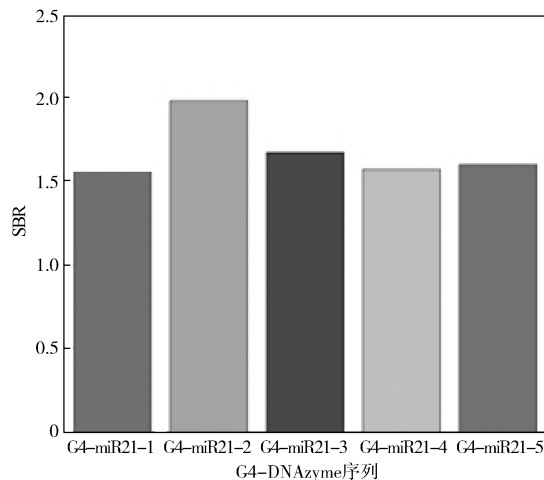


图 3 不同 G4-DNAzyme 序列对 SBR 的影响

Fig. 3 Effects of different G4-DNAzyme to SBR

从图 3 中可以看出, G4-miR21-2 序列的 SBR 最大, 这是因为该序列与 C-21 杂交程度适中, 且当 miRNA-21 与其竞争 C-21 时, 解链也相对容易, 样品信号和背景对比较明显。

3.3 反应时间的优化

G4-DNAzyme 比色生物传感器是通过 C-21 与

miRNA-21 杂交实现识别及传感功能, 故 miRNA-21 加入后的反应时间对传感响应有一定影响。本研究分别选取加入 miRNA-21 后, 反应 10, 20, 30, 40, 50, 60 min 等 6 个时间段, 检测不同时间段时样品的吸光度, 并计算其 SBR, 所得结果如图 4 所示。

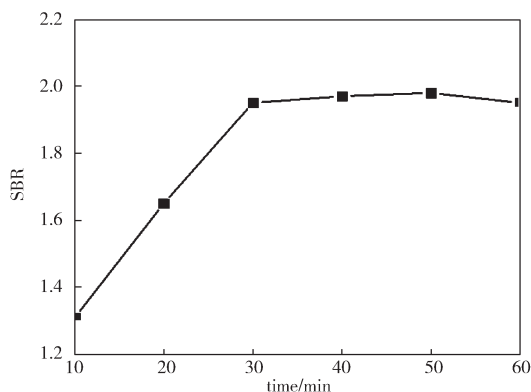


图 4 样品的信背比随时间变化曲线

Fig. 4 The change curve of the sample SBR with time

从图 4 中可以看出, 向溶液中加入 miRNA-21 后, 随着反应时间的增加, 样品的 SBR 先逐渐增强, 达到一定值后增强趋势减缓, 逐渐趋于稳定。这是因为刚加入 miRNA-21 时, 其浓度相对较高, 与 C-21 结合的速度大于结合物解离的速度, 溶液中游离的 G4-DNAzyme 越来越多, 导致样品颜色不断加深, SBR 逐渐增大; 当反应至 30 min 时, 两者的结合速度与解离速度相等, 反应达到动态平衡, 此时溶液中游离的 G4-DNAzyme 最多, 样品颜色达到最深, SBR 达到最大; 30 min 之后, 样品的 SBR 较大并基本趋于稳定。因此, 本研究在加入 miRNA-21 后, 最佳的反应时间为 30 min。

3.4 miRNA-21 的检测

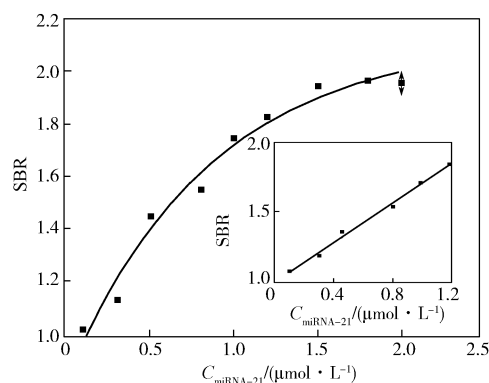
在优化后的实验条件下, 考察了 G4-DNAzyme 比色生物传感器对不同浓度 miRNA-21 ($C_{\text{miRNA-21}}$) 的响应效果, 结果如图 5 所示。



a) 颜色变化



彩图



b) SBR 变化

图 5 传感器对不同浓度 miRNA-21 的响应现象

Fig. 5 Biosensor response to different concentration of miRNA-21

从图 5a 可以看出, 随着 miRNA-21 浓度的增加, 样品的颜色逐渐增加, 实验现象明显。图 5b 中, 随着 miRNA-21 浓度的增大, ABTS^+ 的吸光度随之增强, 本研究可检测到 miRNA-21 的最低浓度约为 $0.1 \mu\text{mol/L}$; 在 miRNA-21 浓度为 $0.1 \sim 1.2 \mu\text{mol/L}$ 时, ABTS^+ 吸光度与空白样品之间的 SBR 与 miRNA-21 的浓度呈现出良好的线性关系, 其线性方程为: $y=0.8349x+0.8983$, 相关系数 $R^2=0.995$ 。

3.5 传感器选择性验证

理想传感器应具有高灵敏度和高选择性, 以降低假阳性信号的产生。碱基的错配对杂交链的 T_m 影响较大, 因此, 即使相似度较高的 DNA 或者 RNA 序列, 理论上都不影响该传感器的使用。为了考察 G4-DNAzyme 比色生物传感器的选择性, 本研究选用了 4 个与 miRNA-21 具有不同碱基差异的序列 (DNA-21-1 base~DNA-21-4 base) 进行干扰实验, 并与 miRNA-21 进行对比, 所得 SBR 如图 6 所示。

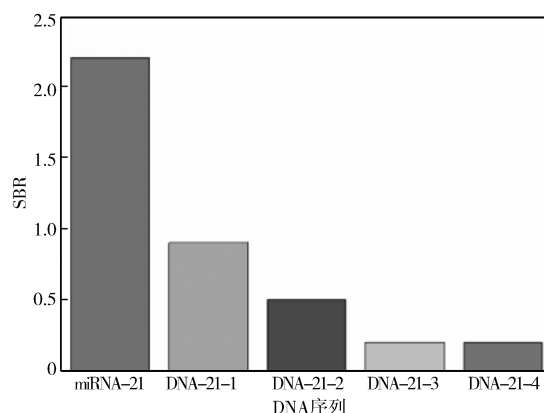


图 6 传感器的选择性验证

Fig. 6 Selectivity of the G4-DNAzyme biosensor

从图6可以看出,只有miRNA-21能引起ABTS⁺吸光度的明显变化,其他类似序列响应不明显。实验结果表明,该G4-DNAzyme比色生物传感器对目标物miRNA-21具有较高的选择性。

4 结语

本研究利用DNA链的竞争作用,构建了G4-DNAzyme比色生物传感器,实现了以肉眼直观的方式,简单、快速地检测肿瘤标志物miRNA-21。该传感器设计简单,操作方便,无需高精密仪器,对目标物有良好的响应。同时,因为DNA序列是由4个碱基编码(A/T/C/G)排列而成,该方法具有通用性,即可通过调整杂交碱基实现对不同疾病标志物,如DNA、RNA分子的检测,在环境和生物医学领域具有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] 董志伟,乔友林,李连弟. 中国癌症控制策略研究报告[J]. 中国医学科学院学报, 2002, 24(3): 334. DONG Zhiwei, QIAO Youlin, LI Liandi. Report of Chinese Cancer Control Strategy[J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 2002, 24(3): 334.
- [2] 刘咏梅,王 阶. microRNA与心血管疾病[C]//第九次全国中西医结合中青年学术研讨会. 黄山: 中国中西医结合学会青年工作委员会, 2011: 297-302. LIU Yongmei, WANG Jie. MicroRNA and Cardiovascular Diseases[C]//The Ninth National Young and Middle-Aged Academic Seminar on Integrated Traditional Chinese and Western Medicine. Huangshan: Youth Working Committee of Chinese Society of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2011: 297-302.
- [3] CHAN J A, KRICHEVSKY A M, KOSIK K S. MicroRNA-21 is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells[J]. Cancer Research, 2005, 65(14): 6029-6033.
- [4] GAO W, LU X, LIU L X, et al. MiRNA-21: A Biomarker Predictive for Platinum-Based Adjuvant Chemotherapy Response in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer[J]. Cancer Biology & Therapy, 2012, 13(5): 330-340.
- [4] 刘宏德,张德金,谢建明,等. miRNA基因和编码基因启动子区核小体定位分析[J]. 科学通报, 2010, 55(14): 1335-1340.
- LIU Hongde, ZHANG Dejin, XIE Jianming, et al. Nucleosome Localization Analysis of miRNA Gene and Coding Gene Promoter Region[J]. Chinese Science Bulletin, 2010, 55(14): 1335-1340.
- [5] VAN KOUWENHOVE M, KEDDE M, AGAMI R. MicroRNA Regulation by RNA-Binding Proteins and Its Implications for Cancer[J]. Nature Reviews Cancer, 2011, 11(9): 644-656.
- [6] GAO W, LU X, LIU L X, et al. MiRNA-21[J]. Cancer Biology & Therapy, 2012, 13(5): 330-340.
- [7] XI Q, ZHOU D M, KAN Y Y, et al. Highly Sensitive and Selective Strategy for MicroRNA Detection Based on WS₂ Nanosheet Mediated Fluorescence Quenching and Duplex-Specific Nuclease Signal Amplification[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(3): 1361-1365.
- [8] 惠 越,张 鑫,刘国跃,等. MicroRNA-21相关靶基因的研究进展[J]. 重庆医学, 2016, 45(8): 1121-1124. HUI Yue, ZHANG Xin, LIU Guoyue, et al. Advances in Research on MicroRNA-21 Related Target Genes[J]. Chongqing Medicine, 2016, 45(8): 1121-1124.
- [9] 李 娟,王 翔,张有光. microRNA检测方法的研究进展[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 2010, 33(8): 1234-1240. LI Juan, WANG Xiang, ZHANG Youguang. Research and Development of Detection Methods for MicroRNA[J]. Journal of Hefei University of Technology (Natural Science), 2010, 33(8): 1234-1240.
- [10] GONG L, ZHAO Z L, LÜ Y F, et al. DNAzyme-Based Biosensors and Nanodevices[J]. Chemical Communications, 2015, 51(6): 979-995.
- [11] 任松磊. 基于脱氧核酶的新型重金属离子荧光探针的研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2016. REN Songlei. Novel Heavy Metal Ions Fluorescent Probes Based on DNazymes[D]. Changsha: Hunan University, 2016.
- [12] 孔德明,杨 薇. G-四链体的构型、热稳定性测试及其在钾离子定量检测中的应用[J]. 化学通报(印刷版), 2010, 73(5): 388-395. KONG Deming, YANG Wei. Structures, Thermal Stability Detection of G-Quadruplexes and Their Applications in K⁺ Quantitation[J]. Chemistry, 2010, 73(5): 388-395.
- [13] 孔德明. G-四链体-氯化血红素DNA酶在传感器设计中的应用[J]. 化学进展, 2011, 23(10): 2119-2131. KONG Deming. Applications of G-Quadruplex-Hemin DNazymes in Sensor Design[J]. Progress in Chemistry,

- 2011, 23(10): 2119-2131.
- [14] LI W, LI Y, LIU Z L, et al. Insight into G-Quadruplex-Hemin DNAzyme/RNAzyme: Adjacent Adenine as the Intramolecular Species for Remarkable Enhancement of Enzymatic Activity[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(15): 7373-7384.
- [15] WANG Z Y, ZHAO J, BAO J C, et al. Construction of Metal-Ion-Free G-Quadruplex-Hemin DNAzyme and Its Application in S₁ Nuclease Detection[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2016, 8(1): 827-833.
- [16] TANG G, ZHAO C L, GAO J, et al. Colorimetric Detection of Hydrogen Sulfide Based on Terbium-G-Quadruplex-Hemin DNAzyme[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016, 237: 795-801.

(责任编辑: 李玉华)

Construction of G4-DNAzyme Colorimetric Biosensor for Detecting Tumor Marker MiRNA-21

TANG Li, WEN Chongcheng, GONG Liang, TANG Jianxin

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

Abstract: MiRNA-21 is highly expressed in almost all tumors, and abnormal miRNA-21 content can be used as an early diagnostic marker for tumor. G-quadruplex-hemin DNAzyme can catalyze the oxidation of 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) to ABTS⁺ by H₂O₂, and based on chain replacement, a visual detection sensor with simple operation and fast response for miRNA-21 was constructed. After optimizing nucleic acid sequence, reaction temperature and time, measuring maximum UV absorbance of ABTS⁺ with different concentrations of miRNA-21 and calculating the SBR with the blank sample, the concentration-SBR curve was drawn. It was found that the lowest concentration to detect was 0.1 μmol/L, when the concentration of miRNA-21 was within the range from 0.1 to 1.2 μmol/L, there was a good linear relationship between SBR and miRNA-21 concentration with the linear equation being $y=0.8349x+0.8983$, the linear correlation coefficient being $R^2=0.995$. Meanwhile, this colorimetric biosensor was simple in design and operated with high selectivity for detecting miRNA-21.

Keywords: G4-DNAzyme; colorimetric biosensor; miRNA-21