

基于 DNA 荧光探针的 T4 多聚核苷酸激酶 免标记荧光检测

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2021.01.001

马昌杯 郑立阳

赵 涵 颜 颖

中南大学

生命科学学院

湖南 长沙 410013

摘 要: 开发一种新型的基于 DNA 荧光探针的 T4 多聚核苷酸激酶 (T4 PNK) 活性检测方法。先设计了可以形成发卡结构的 DNA 探针 (PNK-Tb), 再通过引入 T4 PNK、ATP 和 λ 核酸外切水解酶 (λ exo), 打开发卡结构, 释放发卡结构 3' 末端富含 G 的碱基序列, 随后与 Tb^{3+} 结合形成 G-四链体产生显著的荧光信号。通过反应前后荧光信号的变化实现 T4 PNK 的高灵敏检测。实验结果表明: 成功制备了新的免标记 DNA 荧光探针, 创新性地将 Tb^{3+} 应用到 T4 PNK 活性的检测中; 本荧光法定量检测的线性范围为 0~100 U/mL, 检测下限为 2 U/mL; 该策略具有良好的特异性并且可用于评估 ADP 对 T4 PNK 活性的抑制作用。基于免淬灭标记 DNA 荧光探针构建的 T4 PNK 活性检测新策略反应快速 (不超过 60 min)、成本低廉、灵敏度高, 在药物开发以及生物化学研究中具有广阔的应用前景。

关键词: 荧光探针; 多聚核苷酸激酶; 抑制剂

中图分类号: Q555⁺.7

文献标志码: A

文章编号: 1674-7100(2021)01-0001-07

引文格式: 马昌杯, 郑立阳, 赵 涵, 等. 基于 DNA 荧光探针的 T4 多聚核苷酸激酶免标记荧光检测 [J]. 包装学报, 2021, 13(1): 1-7.

0 引言

T4 多聚核苷酸激酶 (T4 polynucleotide kinase, T4 PNK) 于 1965 年被发现, 可以催化 γ -磷酸从三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 转移到核酸分子的 5'-OH 末端^[1-2]。研究表明 T4 PNK 活性与核酸的复制、重组、修复密切相关^[3-5]。异常 T4 PNK 行为会抑制由于 DNA 异常或损伤而引发的细胞免疫, 从而引起人类患病如 Werner 综合症、Loom's 综合症和 Rothmund-Thomson 综合症等重大疾病^[6]。因此,

T4 PNK 在开发药物、疾病诊断等方面均具有重要现实意义。有关 T4 PNK 的研究已经引起研究人员的广泛关注^[7-10]。而发展检测 T4 PNK 活性的可靠、简单方法, 更是当下重要的研究方向之一。

传统的检测 T4 PNK 活性方法有放射自显影法、放射性同位素 ³²P 标记法以及聚丙烯酰胺凝胶电泳法等^[11-12]。虽然这些方法的精确度较高、检测丰度较低, 但仍然存在一些缺陷, 例如操作程序复杂、费时费力, 甚至有潜在的辐射危害, 这极大地限制了其应用。为克服这些缺点, 研究人员提出了电化学、

收稿日期: 2020-11-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21205142)

作者简介: 马昌杯 (1977-), 男, 湖南邵阳人, 中南大学副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事肿瘤标志物检测方面的研究, E-mail: macb2012@csu.edu.cn

荧光法、生物发光法和比色分析法等多种分析技术用于 T4 PNK 活性的高灵敏检测^[13-17]。在这些方法中, 基于荧光的分析策略因其高灵敏度和操作简易受到了研究人员的广泛青睐。Sun N. N. 等^[18] 基于荧光标记核酸探针开发了氧化石墨烯生物传感平台, 该平台能用于 T4 PNK 活性检测。Tang Z. W. 等^[19] 利用分子信标探针和 T4 DNA 连接酶检测 DNA 磷酸化。尽管上述研究人员在 DNA 磷酸化测定中做出了许多努力, 但这些方法主要取决于荧光染料或特定染料标记的核酸探针的使用, 其中双标记分子信标修饰成本较高, 样本稳定性较差。由此可见, 提高定量检测 T4 PNK 活性的灵敏度、优化检测步骤和方法、降低检测成本等将是研究人员研发 T4 PNK 检测试剂盒时所面临的挑战性问题。

近年来, 生物传感技术不断发展, 免标记型荧光生物传感器引起了研究人员的广泛关注。免标记型核酸探针的构建避免了繁琐的标记过程及假阳性等不利因素, 该探针具有特异性较强、稳定性较好, 使样品活性保持时间较长等优点, 因而在生物传感领域有很好的应用潜力。Zhao H. 等^[20] 基于单链纳米铜荧光探针和核酸外切酶 III (exonuclease III, Exo III) 辅助的信号放大策略实现了多聚核苷酸激酶的免标记检测分析。Chen M. J. 等^[21] 基于末端脱氧核苷酸转移酶和 G- 四链体 -ThT 体系建立了前列腺抗原的免标记荧光检测方法。基于上述研究, 本课题组利用功能核酸探针, 基于 G- 四链体的荧光转化, 发展了一种对 T4 PNK 进行高灵敏度和特异性检测的免标记荧光法。该方法的成功构建可潜在地筛选 T4 PNK 抑制剂, 为药物发现和疾病治疗提供有力工具。

1 实验

1.1 材料与试剂

T4 PNK (10 U/ μ L)、 λ 核酸外切酶 (λ exo) 均采购自 New England Biolabs 公司; DNA 探针 PNK-Tb (序列为 5' - CCTAACCCTTTT TAGGGTTAGGGT TAGGGTTAGGG - 3') 合成纯化于 Sangon Biological Engineering Technology & Services 公司, DNA 探针用 Tris-EDTA 缓冲液配备成溶液后置于 -20 °C 下保存, 待用; TbCl₃、ATP、二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 均采购自美国 Sigma-Aldrich 公司; MgCl₂ 采购自 Sinopharm Chemical Reagent 公司; 实验所用缓冲液均是 Tris-HCl 缓冲液 (70 mmol/L,

pH 8.0); 实验所使用的超纯水是通过 18.25 M Ω ·cm⁻¹ 的 Milli-Q 净水系统所获得。

1.2 实验仪器

荧光分光光度计, F-2700 型, 日本高新技术公司; 漩涡振荡器, MX-E 型, 大龙兴创实验仪器 (北京) 有限公司; 恒温水浴锅, CH1015 型, 上海恒平科学仪器有限公司; 微量进样器, 瑞士 Hamilton 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验原理

图 1 阐述了基于 DNA 荧光探针的 T4 PNK 活性检测的基本反应原理。首先, 本课题组设计了可以形成发卡结构的 DNA 探针 PNK-Tb, 在发卡探针 3' 末端具有一段富含 G- 的碱基序列 (图中的蓝色结构)。正常情况下, PNK-Tb 探针通过形成发卡结构, 使探针 3' 末端富含 G 的碱基序列大部分被封闭在发卡结构的茎部双链中, 因此导致与 Tb³⁺ 结合形成的 G- 四链体结构减少, 最终只能检测到微弱的荧光信号。当加入 T4 PNK 之后, T4 PNK 可在 ATP 提供磷酸基团的情况下, 在 PNK-Tb 探针形成的发卡结构 5' - 羟基末端加上磷酸基团, 转变成 5' 磷酸化末端, 然后在工具酶 λ exo (一种能够特异性水解 5' 磷酸化双链末端的核酸外切酶) 的作用下, 将发卡结构 5' 磷酸化末端水解, 从而使发卡结构打开, 释放出其 3' 末端富含 G 的碱基序列, 通过与 Tb³⁺ 结合使荧光信号提升^[22-23]。对比加入 T4 PNK 前后的荧光变化, 可以对 T4 PNK 活性进行定量检测分析。

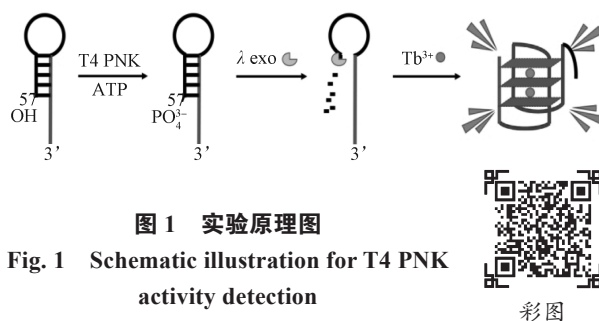


图 1 实验原理图

Fig. 1 Schematic illustration for T4 PNK activity detection

彩图

1.3.2 荧光测定与其信号处理

实验选用的荧光染料 Tb³⁺ 的激发波长为 260 nm, 发射波长为 545 nm。发射波长区间设置为 460~560 nm, 激发狭缝为 5.0 nm, 发射狭缝为 10.0 nm, 测量电压为 700 V。测量时, 应极其注意玻璃皿的清洁程度。测量体系应为 100 μ L。多次测量, 直至观测到荧光值稳定后, 取该值作为本轮测量的最终数据。实验数据均通过多次重复试验 ($n \geq 3$)。

1.3.3 反应条件的优化

为了获得实验最佳的灵敏度、节约试剂用量, 本课题组对 Mg^{2+} 浓度、ATP 浓度、 λ exo 浓度、 Tb^{3+} 浓度多个核心反应条件进行了优化。

1) Mg^{2+} 浓度优化

首先, 在 100 μ L Tris-HCl 缓冲液 (70 mmol/L, pH 8.0) 中加入 200 nmol/L PNK-Tb 探针和不同浓度的 Mg^{2+} (1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 mmol/L), 在 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 5 min; 然后, 将 20 U/mL T4 PNK、1 mmol/L ATP 以及 8 U λ exo 加入上述反应体系中并继续在 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 30 min; 最后, 加入 150 μ mol/L 荧光染料 Tb^{3+} , 常温下避光反应 15 min; 随后进行荧光测定。

2) ATP 浓度优化

首先, 在 100 μ L Tris-HCl 缓冲液 (70 mmol/L, pH 8.0) 中加入 200 nmol/L PNK-Tb 探针和最佳浓度的 Mg^{2+} , 在 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 5 min; 然后, 分别将 20 U/mL T4 PNK、不同浓度的 ATP (0.2, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 mmol/L) 以及 8 U λ exo 加入上述反应体系中并继续在 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 30 min; 最后, 加入 150 μ mol/L 荧光染料 Tb^{3+} , 常温下避光反应 15 min; 随后进行荧光测定。

3) λ exo 浓度优化

首先, 在 100 μ L Tris-HCl 缓冲液 (70 mmol/L, pH 8.0) 中加入 200 nmol/L PNK-Tb 探针和最佳浓度的 Mg^{2+} , 在 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 5 min; 然后, 分别将 20 U/mL T4 PNK、最佳浓度的 ATP 以及不同浓度的 λ exo (1.0, 5.0, 8.0, 12.0, 16.0 U) 加入上述反应体系中并继续在 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 30 min; 最后, 加入 150 μ mol/L 荧光染料 Tb^{3+} , 常温下避光反应 15 min; 随后进行荧光测定。

4) Tb^{3+} 浓度优化

首先, 在 100 μ L Tris-HCl 缓冲液 (70 mmol/L, pH 8.0) 中加入 200 nmol/L PNK-Tb 探针和最佳浓度的 Mg^{2+} , 在 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 5 min; 然后, 分别将 20 U/mL T4 PNK、最佳浓度的 ATP 以及最佳浓度的 λ exo 加入上述反应体系中并继续在 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 30 min; 最后, 加入不同浓度的荧光染料 Tb^{3+} (20.0, 50.0, 100.0, 200.0, 300.0 μ mol/L), 常温下避光反应 15 min; 随后进行荧光测定。

1.3.4 T4 PNK 活性分析

本文根据所测定的最优实验条件, 对 T4 PNK 进行定量分析。在 100 μ L 反应缓冲液中加入 200 nmol/L

PNK-Tb 探针和最佳浓度 Mg^{2+} , 在 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 5 min 后加入一系列的 T4 PNK (0~100 U/mL); 然后, 将最佳浓度的 ATP、T4 PNK 以及 λ exo 加入上述反应体系中, 继续在 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 30 min; 最后, 加入最佳浓度的荧光染料 Tb^{3+} , 常温下避光反应 15 min 后进行荧光测定。

1.3.5 T4 PNK 抑制剂分析

以 ADP 作为 T4 PNK 活性的抑制剂。在 100 μ L 反应缓冲液中加入 200 nmol/L PNK-Tb 探针和 10 mmol/L Mg^{2+} , 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 5 min 后加入 50 U/mL T4 PNK; 然后, 将最佳浓度的 ATP、T4 PNK 以及 λ exo 加入上述反应体系中, 并加入一定量的 ADP, 继续置于 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 30 min; 最后, 加入最佳浓度的荧光染料 Tb^{3+} , 置于常温下避光反应 15 min 后进行荧光测定。

2 结果与讨论

2.1 实验条件优化结果

为了获得最佳的实验结果, 本课题组对可能影响检测性能的条件进行了优化。其中, Mg^{2+} 浓度对发卡结构的稳定性有重要作用。ATP 为 T4 PNK 磷酸化反应提供磷酸基团。 λ exo 可以特异性切割 DNA 双链磷酸化末端, 从而释放富含 G 的碱基序列, 因此其浓度的变化对切割效率有重要的影响。 Tb^{3+} 可以与 G-四链体结合产生显著的荧光信号, 其浓度的变化直接影响荧光强度。基于上述因素, 在下文中对 Mg^{2+} 、ATP、 λ exo 及 Tb^{3+} 浓度分别进行了优化。

2.1.1 Mg^{2+} 浓度优化

根据实验结果绘制图 2。

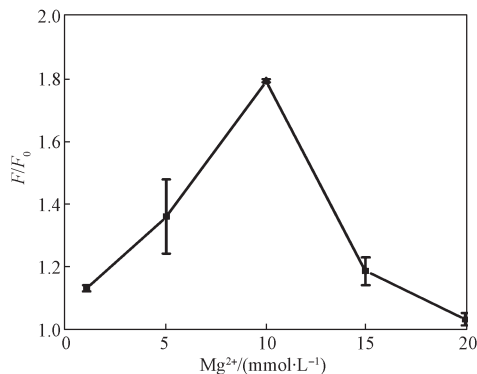


图 2 反应放大比随 Mg^{2+} 浓度变化的曲线图

Fig. 2 The effect of the concentration of Mg^{2+}

图 2 中, F_0 为不加 T4 PNK 的荧光强度, F 为加

入 T4 PNK 后的荧光强度。由图可知, 随着 Mg^{2+} 浓度的增强, 反应效果不断增大, 当浓度为 10 mmol/L 时达到峰值, 继续增加 Mg^{2+} 浓度, 反应的放大效果反而降低。因此, 10 mmol/L 是 Mg^{2+} 的最佳浓度, 用于后续实验。

2.1.2 ATP 浓度优化

ATP 在本实验中主要是提供 PO_4^{3-} 。ATP 浓度优化结果如图 3 所示。由图可知, 随着 ATP 浓度增加, 反应效果逐渐提高, 并在 ATP 浓度为 1 mmol/L 处达到最大值, 然后随着 ATP 浓度的增加, 反而会抑制反应的进行, 导致反应的放大比例降低。因此, 选择浓度为 1 mmol/L 的 ATP 用于之后的反应。

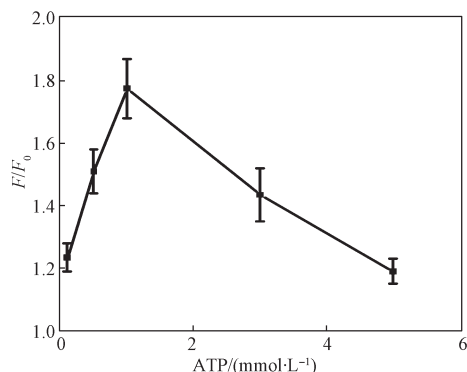


图 3 反应放大比随 ATP 浓度变化的曲线图

Fig. 3 The effect of the concentration of ATP

2.1.3 λ exo 浓度优化

根据实验结果绘制图 4。

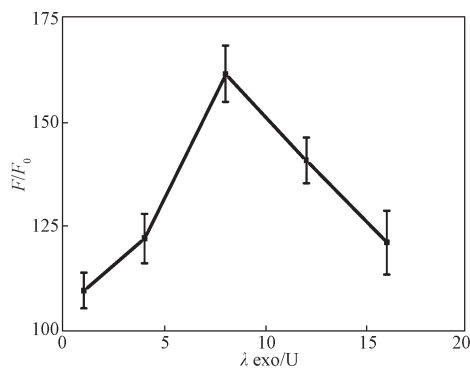


图 4 反应放大比随 λ exo 浓度变化的曲线图

Fig. 4 The effect of the concentration of λ exo

由图 4 可知, 随着 λ exo 浓度的提高, 其切除 DNA 双链磷酸化末端的作用逐渐增强, 在 λ exo 活性达到 8 U 时, 反应的荧光放大比例达到最大值; 但再继续提高 λ exo 浓度, 反应的放大比例反而有所减

小, 说明高浓度的 λ exo 对该反应有一定的抑制效果。因此, 将 8U 的 λ exo 加入反应体系, 用于后续实验。

2.1.4 Tb^{3+} 浓度优化

Tb^{3+} 主要是用来与反应生成的 G-rich 序列形成 G-四链体结构, 从而产生荧光。根据实验结果绘制图 5。由图可知, 随着 Tb^{3+} 浓度的增强, 荧光强度的放大比例不断增大, 当浓度为 200 μ mol/L 时达到最大值, 继续增加 Tb^{3+} 浓度, 反应的放大效果反而降低。因此, 将浓度为 200 μ mol/L 的 Tb^{3+} 用于后续实验。

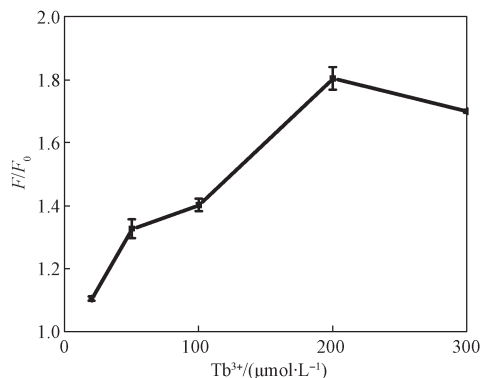


图 5 反应放大比随 Tb^{3+} 浓度变化的曲线图

Fig. 5 The effect of the concentration of Tb^{3+}

2.2 T4 PNK 的活性分析及标准曲线绘制

取得最优实验条件后, 本课题组对不同浓度 T4 PNK (0, 2, 4, 6, 8, 10, 50, 100 U/mL) 活性进行了分析。T4 PNK 的考察区间为 0~10 U/mL。图 6 是不同的 DNA 聚合酶浓度与反应荧光放大倍数的对应关系。

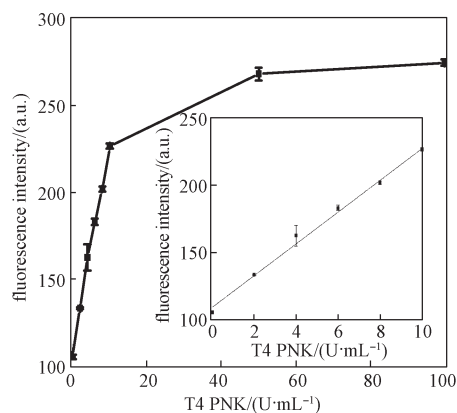


图 6 T4 PNK 浓度与荧光放大倍数的关系曲线

Fig. 6 The relationship of fluorescence magnification to concentration of T4 PNK

由图 6 可知, 当 T4 PNK 的浓度为 0~10 U/mL 时, 两者呈线性关系, 其线性方程式为

$$Y=109.158\ 34+11.790\ 46X, R^2=0.997\ 8。$$

另外, 本实验的检测下限为 2.0 U/mL。

图 7 是不同浓度 T4 PNK 酶的荧光光谱图。由图可知, 随着 T4 PNK 浓度的增加, 同一时间内荧光强度增加的量也逐渐增加。因此, 通过使用廉价又简单的荧光染料, 本课题组成功地构建了一种低成本和高灵敏的 DNA 聚合酶活性实时监测方法。

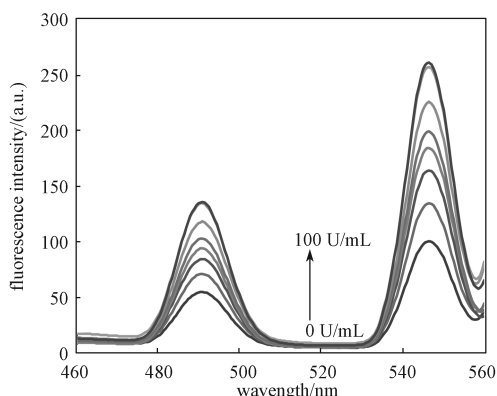


图 7 不同 T4 PNK 浓度下的荧光光谱图

Fig. 7 Fluorescence intensity of different concentrations of T4 PNK

2.3 T4 PNK 特异性分析

为了进一步评估本文分析方法的特异性, 本实验选取了 4 种酶 UDG、BSA、EcoR I 和 Exo I 用作特异性实验分析, 结果如图 8 所示。

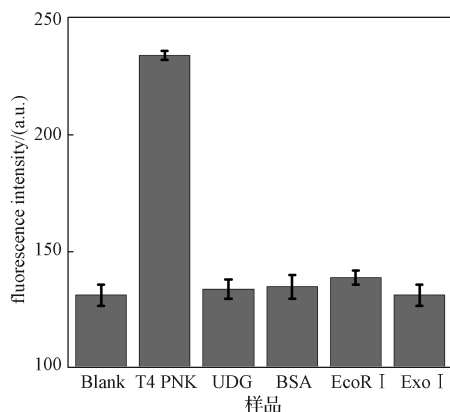


图 8 特异性分析

Fig. 8 Selectivity study

由图 8 可知, 含有 UDG、BSA、EcoR I 和 Exo I 的实验样品与空白组相比, 荧光值没有明显变化, 这说明 4 种酶在整个反应体系没有发挥作用, 并不能导致上述反应的发生, 而加入 T4 PNK 的实验样品中荧光强度的变化非常明显。可见, 本实验方法对 T4 PNK 具有良好的选择特异性。

2.4 T4 PNK 抑制剂的筛选

在药物筛选上 T4 PNK 抑制剂分析有着重要意义。ADP 是一种常见的 T4 PNK 抑制剂。本实验之所以选择 ADP 作为模式抑制剂, 是因为大量研究表明 10 mmol/L 以下的 ADP 对 λ exo 的活性没有影响。根据实验结果绘制图 9, 其中横坐标代表实验所加 ADP 的浓度, 纵坐标代表相对活性。由图可知, 相对活性随 ADP 浓度升高而下降, 说明抑制效果随 ADP 浓度升高而增大, 当 ADP 浓度为 4 mmol/L 时, 抑制率可达到 90 % 以上, 说明 ADP 作为 T4 PNK 的抑制剂, 具有良好的抑制效果。因此, 本文方法能应用于 T4 PNK 抑制剂的筛选, 且在小分子药物筛选甚至生物化学机理研究中皆具有应用前景, 可以为以后生产抑制 T4 PNK 活性的药物打下基础。

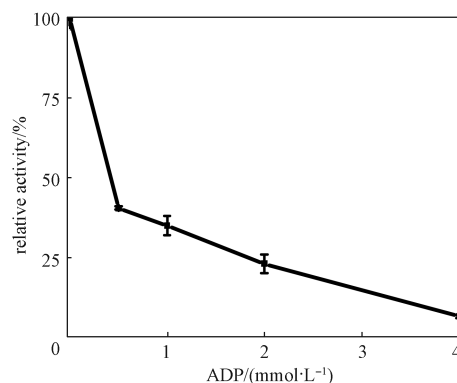


图 9 ADP 对 T4 PNK 活性的影响

Fig. 9 The effect of ADP on T4 PNK activity

3 结语

T4 PNK 是 DNA 复制和损伤修复中的重要角色。T4 PNK 活性异常与许多疾病有关, 因此开发出一种快速、经济、灵敏、操作简单的检测方式对 T4 PNK 活性进行检测并且筛选其抑制剂, 对临床诊断研究以及现代医药研究具有重大意义。因此, 本课题组基于免淬灭标记荧光探针针对 T4 PNK 的活性进行了荧光检测以及抑制剂分析, 创新性地将稀土元素 Tb^{3+} 应用到 T4 PNK 活性的检测中, 构建并验证了一种快速地检测 T4 PNK 新方法, 探究了该实验方法的最佳实验条件, 同时为该实验找了合适的抑制剂 ADP, 使得反应可控、高效进行。根据实验结果, 本课题组绘制了一定浓度范围内的 T4 PNK 标准曲线, 以实现在一定范围内快速测定 T4 PNK 浓度, 为 T4 PNK 的后续研究提供一些思考。

本文检测方法的反应时间较短（不超过 60 min），所需的试剂价格低廉，在很大程度上降低了实验检测成本。因此，该方法在生物药物开发以及生物化学研究中具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] RICHARDSON C C. Phosphorylation of Nucleic Acid by an Enzyme from T4 Bacteriophage-Infected Escherichia Coli[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1965, 54(1): 158-165.
- [2] RASOULI-NIA A, KARIMI-BUSHERI F, WEINFELD M. Stable Down-Regulation of Human Polynucleotide Kinase Enhances Spontaneous Mutation Frequency and Sensitizes Cells to Genotoxic Agents[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(18): 6905-6910.
- [3] WANG L K, LIMA C D, SHUMAN S. Structure and Mechanism of T4 Polynucleotide Kinase: An RNA Repair Enzyme[J]. EMBO Journal, 2002, 21(14): 3873-3880.
- [4] WHITEHOUSE C J, TAYLOR R M, THISTLETHWAITE A, et al. XRCC1 Stimulates Human Polynucleotide Kinase Activity at Damaged DNA Termini and Accelerates DNA Single-Strand Break Repair[J]. Cell, 2001, 104(1): 107-117.
- [5] LIU H S, MA C B, WANG J, et al. Label-Free Colorimetric Assay for T4 Polynucleotide Kinase/Phosphatase Activity and Its Inhibitors Based on G-Quadruplex/Hemin DNAzyme[J]. Analytical Biochemistry, 2017, 517: 18-21.
- [6] KARIMI-BUSHERI F, RASOULI-NIA A, ALLALUNIS-TURNER J, et al. Human Polynucleotide Kinase Participates in Repair of DNA Double-Strand Breaks by Nonhomologous End Joining but not Homologous Recombination[J]. Cancer Research, 2007, 67(14): 6619-6625.
- [7] ZHANG G Y, CHAI H N, TIAN M W, et al. Zirconium-Metalloporphyrin Frameworks-Luminol Competitive Electrochemiluminescence for Ratiometric Detection of Polynucleotide Kinase Activity[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(10): 7354-7362.
- [8] ZHANG X L, ZHENG C, DING L, et al. CRISPR-Cas12a Coupled with Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated Isothermal Amplification for Sensitive Detection of Polynucleotide Kinase Activity[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021, 330: 129317.
- [9] JIN T, ZHANG J W, ZHAO Y F, et al. Magnetic Bead-Gold Nanoparticle Hybrids Probe Based on Optically Countable Gold Nanoparticles with Dark-Field Microscope for T4 Polynucleotide Kinase Activity Assay[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2020, 150: 111936.
- [10] 刘 杨, 邹笑然, 李琛琛, 等. 激酶检测方法的最新研究进展 [J]. 分析化学, 2018, 46(1): 11-19.
LIU Yang, ZOU Xiaoran, LI Chenchen, et al. Recent Advances in Sensitive Detection of Kinases[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2018, 46(1): 11-19.
- [11] JILANI A, RAMOTAR D, SLACK C, et al. Molecular Cloning of the Human Gene, PNKP, Encoding a Polynucleotide Kinase 3'-Phosphatase and Evidence for Its Role in Repair of DNA Strand Breaks Caused by Oxidative Damage[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(34): 24176-24186.
- [12] KARIMI-BUSHERI F, LEE J, WEINFELD M, et al. Repair of DNA Strand Gaps and Nicks Containing 3'-Phosphate and 5'-Hydroxyl Termini by Purified Mammalian Enzymes[J]. Nucleic Acids Research, 1998, 26(19): 4395-4400.
- [13] SONG W L, YIN W S, ZHANG Z H, et al. A DNA Functionalized Porphyrinic Metal-Organic Framework as a Peroxidase Mimicking Catalyst for Amperometric Determination of the Activity of T4 Polynucleotide Kinase[J]. Microchimica Acta, 2019, 186(3): 1-8.
- [14] MAC B, LIU H S, DU J Y, et al. Quencher-Free Hairpin Probes for Real-Time Detection of T4 Polynucleotide Kinase Activity[J]. Analytical Biochemistry, 2016, 555: 133-138.
- [15] DU J, XU Q F, LU X Q, et al. A Label-Free Bioluminescent Sensor for Real-Time Monitoring Polynucleotide Kinase Activity[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(16): 8481-8488.
- [16] JIANG H X, KONG D M, SHEN H X. Amplified Detection of DNA Ligase and Polynucleotide Kinase/Phosphatase on the Basis of Enrichment of Catalytic G-Quadruplex DNAzyme by Rolling Circle Amplification[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 55: 133-138.
- [17] 欧丽娟, 刘宏伟. 基于核酸外切酶酶切反应的纳米金比色法检测 T4 多聚核苷酸激酶活性 [J]. 分析试验室, 2014, 33(6): 625-629.
OU Lijuan, LIU Hongwei. Detection of T4 Polynucleotide Kinase Activity by a Colorimetric Method with Gold Nanoparticles Coupled with Exonuclease Cleavage[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory,

- 2014, 33(6): 625–629.
- [18] SUN N N, KONG R M, QU F L, et al. An Amplified Fluorescence Detection of T4 Polynucleotide Kinase Activity Based on Coupled Exonuclease III Reaction and a Graphene Oxide Platform[J]. Analyst, 2015, 140(6): 1827–1831.
- [19] TANG Z W, WANG K M, TAN W H, et al. Real-Time Investigation of Nucleic Acids Phosphorylation Process Using Molecular Beacons[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(11): e97.
- [20] ZHAO H, YAN Y, CHEN M J, et al. Exonuclease III-Assisted Signal Amplification Strategy for Sensitive Fluorescence Detection of Polynucleotide Kinase Based on Poly(Thymine)-Templated Copper Nanoparticles[J]. Analyst, 2019, 144(22): 6689–6697.
- [21] CHEN M J, MA C B, YAN Y, et al. A Label-Free Fluorescence Method Based on Terminal Deoxynucleotidyl Transferase and Thioflavin T for Detecting Prostate-Specific Antigen[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2019, 411(22): 5779–5784.
- [22] YANG W J, RUAN Y J, WU W H, et al. A “Turn-on” and Label-Free Fluorescent Assay for the Rapid Detection of Exonuclease III Activity Based on Tb³⁺-Induced G-Quadruplex Conjugates[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(18): 4535–4540.
- [23] WU K F, MA C B, LIU H S, et al. Label-Free Fluorescence Assay for Rapid Detection of RNase H Activity Based on Tb³⁺-Induced G-Quadruplex Conjugates[J]. Analytical Methods, 2017, 9(20): 3055–3060.
- (责任编辑: 邓 彬)

Label-Free Fluorescence Detection of T4 Polynucleotide Kinase Activity Based on DNA Fluorescent Probes

MA Changbei, ZHENG Liyang, ZHAO Han, YAN Ying

(School of Life Sciences, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: The objective is to develop a novel method for T4 polynucleotide kinase (T4 PNK) activity determination based on functional nucleic acid fluorescent probes. The experiment designed a DNA probe (PNK-Tb) that could form a hairpin structure. By introducing T4 PNK, ATP and lambda exonuclease (λ exo), the hairpin structure was opened and the G-rich sequences were released. Then, the released G-rich sequences combined with Tb³⁺ to form G-quadruplex structure, producing a significant fluorescence signal. Through the change of fluorescence signal, T4 PNK could be detected with high sensitivity. The results showed that a label-free DNA fluorescent probe was successfully prepared and Tb³⁺ was innovatively applied to T4 PNK assay. The linear range of this method was 0–100 U/mL, and the detection limit was 2 U/mL. This strategy has good specificity and can be used to evaluate the inhibitory effect of ADP on T4 PNK activity. In conclusion, the novel strategy for T4 PNK assay based on label-free DNA fluorescence probe is rapid (less than 60 min), with low cost and high sensitivity, and has broad application prospects in drug development and biochemical research.

Keywords: fluorescence probe; polynucleotide kinase; inhibitor