

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230751

· 论 著 ·

金纳米颗粒表面催化发夹组装无酶信号放大快速荧光法检测微RNA-721

刘英¹, 奚潇雨², 封加栋², 陆峰^{1,2*}

1. 上海理工大学健康科学与工程学院, 上海 200093

2. 海军军医大学(第二军医大学)药学系药物分析学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 构建一种自催化发夹组装无酶信号放大的靶标快速荧光法, 用于检测靶标 miRNA。 **方法** 首先在金纳米颗粒 (AuNP) 表面修饰 5-羧基荧光素 (FAM) 标记的 DNA 发夹探针 H1, 形成探针 AuNP-H1, H1 的荧光被 AuNP 猝灭。加入靶标 miRNA 会导致 AuNP 上的 H1 标记荧光素远离 AuNP 而重新发射荧光, 随后 H1 与 DNA 发夹探针 H2 发生循环自组装, 靶标循环被利用, 导致荧光信号放大。将探针 AuNP-H1、探针 H2 及不同浓度的 miRNA-721 共反应后, 在 480 nm 激发波长下测定体系的荧光强度。 **结果** 以急性心肌炎生物标志物 miRNA-721 为模型靶标, 在优化的实验条件下使用 20 μ L 探针 AuNP-H1、50 μ L 3 μ mol/L 探针 H2 (退火缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl、5 mmol/L MgCl₂, pH 7.4) 与 50 μ L 不同浓度 (0.1~5 μ mol/L) 的 miRNA-721 在 30 $^{\circ}$ C 共反应 20 min, 发现在 520 nm 处的相对荧光强度变化值 ($\Delta F = F - F_0$) 与 miRNA-721 浓度 (C) 呈良好的线性关系, 拟合线性方程为 $\Delta F = 29\ 232 \times \lg C - 52\ 435$ ($R^2 = 0.991\ 0$)。该荧光法检测限为 1.23 nmol/L。在正常人血清中的加标回收率为 92.71%~104.02%。一次完整的 miRNA 分析可以在 20 min 内完成。 **结论** 该方法可用于生物样品中 miRNA-721 的检测, 为急性心肌炎的早期诊断提供了一种快速检测手段。

[关键词] 荧光; 无酶信号放大; 催化发夹组装; 微RNA-721; 金纳米颗粒

[引用本文] 刘英, 奚潇雨, 封加栋, 等. 金纳米颗粒表面催化发夹组装无酶信号放大快速荧光法检测微RNA-721[J]. 海军军医大学学报, 2024, 45(6): 717-724. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230751.

Rapid fluorescence detection of microRNA-721 through enzyme-free signal amplification by surface-catalyzed hairpin assembly of gold nanoparticle

LIU Ying¹, XI Xiaoyu², FENG Jiadong², LU Feng^{1,2*}

1. School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

2. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To develop a rapid fluorescence assay testing method for microRNA-721 (miRNA-721) detection using catalytic hairpin assembly for signal amplification without the need of enzymes. **Methods** A DNA hairpin probe H1 labeled with 5-carboxyfluorescein (FAM) was modified on the surface of gold nanoparticle (AuNP) to form probe AuNP-H1, and the fluorescence of H1 was quenched by AuNP. When the target miRNA was introduced, it caused the fluorescein modified in H1 on the AuNP to move away from the AuNP and emit fluorescence. This was followed by cyclic self-assembly between H1 and H2, and the target cycle was used to amplify the fluorescence signal. The fluorescence intensity of the system was measured at 480 nm excitation wavelength after co-reacting with the probe AuNP-H1, probe H2 and different concentrations of miRNA-721. **Results** When biomarker of acute myocarditis miRNA-721 was used as a model target, 20 μ L of probe AuNP-H1 and 50 μ L of 3 μ mol/L probe H2 (annealing buffer of 20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂, pH 7.4) were co-reacted with 50 μ L of miRNA-721 at various concentrations ranging from 0.1 to 5 μ mol/L at 30 $^{\circ}$ C for 20 min. The change in relative fluorescence intensity at 520 nm ($\Delta F = F - F_0$) had a good linear relationship with the concentration of miRNA-721 (C), and the fitted linear equation was $\Delta F = 29\ 232 \times \lg C - 52\ 435$ ($R^2 = 0.991\ 0$). The detection limit of this fluorescence method was 1.23 nmol/L. The recovery rate in normal human serum ranged from 92.71% to 104.02%. A comprehensive miRNA analysis could be completed in just 20 min. **Conclusion** The present method can be applied to detect miRNA-721 in biological samples, which providing a rapid diagnostic tool for acute myocarditis.

[收稿日期] 2023-12-19

[接受日期] 2024-02-20

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82273894). Supported by General Program of National Natural Science Foundation China (82273894).

[作者简介] 刘英, 硕士生. E-mail: 13524176613@163.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871260, E-mail: fenglu@smmu.edu.cn

[Key words] fluorescence; enzyme-free amplification; catalytic hairpin assembly; microRNA-721; gold nanoparticle

[Citation] LIU Y, XI X, FENG J, et al. Rapid fluorescence detection of microRNA-721 through enzyme-free signal amplification by surface-catalyzed hairpin assembly of gold nanoparticle[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(6): 717-724. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230751.

miRNA作为一种内源性非编码单链RNA,广泛存在于人体和几乎所有动植物细胞中,在细胞的增殖、发育、生长分化、凋亡、代谢及癌变等一系列生命过程中起着重要调控作用^[1-2]。miRNA也存在于许多高度稳定的生物液体中,可以很容易地从血液或其他液体、细胞中提取出来。miRNA还对组织或细胞类型有很高的特异性,可见miRNA-721符合作为一种良好生物标志物的标准:高特异性、易获得性和灵敏性^[3]。自2008年以来,miRNA已被确定为癌症的生物标志物,miRNA-155、miRNA-210、miRNA-21可用于诊断弥漫性大B细胞淋巴瘤^[4];miRNA-378被认为是可靠的结肠癌生物标志物^[5];血清中miRNA-221-3p、miRNA-378c-3p和miRNA-744-5p的变化有助于胃癌的早期筛查^[6];hsa-miRNA-375-APH1B、hsa-miRNA-107-CDC42SE2、hsa-miRNA-375-CELF2和hsa-miRNA-107-IL6被认为是阿尔茨海默病的潜在生物标志物^[7];在类风湿关节炎中miRNA-22的血浆浓度可被视为与疾病活动相关的潜在分子标志物^[8];miRNA-1、miRNA-19a、miRNA-208和miRNA-499等的浓度在急性心肌梗死患者的血液中持续升高,有可能成为急性心肌梗死诊断和预后的生物标志物^[9]。miRNA-721作为一种新的急性心肌炎诊断生物标志物,建立其早期、灵敏、快速和特异的血液检测方法对提高急性心肌炎的诊断具有重大的临床意义^[10]。由于miRNA分子较小、表达水平低、序列同源性较高、易降解,用传统的Northern印迹法^[11]检测时存在步骤烦琐、耗时、灵敏度不佳和特异性差等问题。

为了满足低丰度miRNA的灵敏、定量检测需求,各种酶辅助等温扩增策略相继被开发出来,如滚环扩增^[12]、环介导的等温扩增^[13]和等温指数扩增反应^[14]等。这些扩增技术一般需要2种或更多类型的酶,实验成本高昂且比较耗时。作为一种无酶、恒温的DNA信号放大技术,催化发夹组装技术受到越来越多的关注^[15-16]。2022年Li等^[17]通过基于MOF@Au@G-triplex/hemin nanozyme分子

信标催化发夹组装的通用、非酶类电化学生物传感器实现了对生物样本中的miRNA-721的超灵敏检测,但该研究中样品制备和探针设计均较复杂,且目前用于miRNA检测的电化学发光传感器基本仅限在实验室使用。

本研究利用金纳米颗粒(gold nanoparticle, AuNP)猝灭荧光的特性,结合催化发夹组装技术,研究了一种检测miRNA-721的新方法。催化发夹DNA自组装无酶信号放大用于miRNA检测的原理如图1所示,该信号放大功能由DNA发夹探针H1-5-羧基荧光素(5-carboxyfluorescein, FAM)功能化的AuNP和未标记的DNA发夹探针H2完成。选择急性心肌炎生物标志物miRNA-721作为靶标。

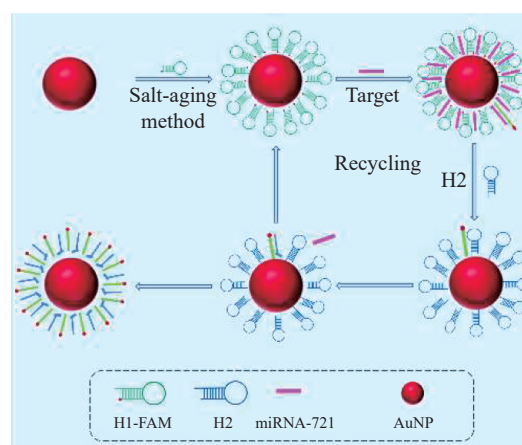


图1 基于AuNP催化发夹组装检测miRNA-721的实验原理图

Fig 1 Experimental schematic of miRNA-721 detection based on AuNP-catalyzed hairpin assembly

AuNP: Gold nanoparticle; miRNA: MicroRNA; H1, H2: DNA hairpin probe; FAM: 5-carboxyfluorescein.

根据miRNA-721序列,设计H1为识别探针(5'端修饰-SH、3'端修饰FAM),设计H2为辅助探针,并用Oligo7分析软件分别对其二级结构进行分析,结果显示2条发夹DNA的熔链温度均在60℃以上,确保了它们各自的稳定性。H1通过硫键与AuNP共价结合,由于荧光共振能量转移效应,

H1 的荧光被 AuNP 猝灭。当加入靶标 miRNA-721 时,其与探针 H1 5'端茎部的序列互补杂交,将 H1 的发夹结构打开形成 H1-miRNA 中间体, H1 标记的 FAM 因远离 AuNP 而恢复荧光。随后该中间体通过 Toehold 结构域可进一步与 H2 发夹结构的茎环部互补杂交,触发 Toehold 辅助的链置换反应,形成稳定的 H1-H2 双链结构,置换下的 miRNA-721 又可以引发 AuNP 表面多个 H1 和 H2 探针的循环组装。通过这种方法靶标 miRNA 被循环利用,实现了无酶荧光信号放大。一次 miRNA 分析可以在 20 min 内完成,明显优于既往文献报道的荧光检测 miRNA 所需的反应时间(40~120 min)^[18]。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器 氯金酸(HAuCl₄)购自上海化学试剂公司。二水合柠檬酸三钠、Tris-HCl、六水氯化镁(MgCl₂·6H₂O)、氯化钠(NaCl)、三(2-羧乙基)-膦[Tris-(2-carboxyethyl)phosphine, TCEP]盐酸盐、PBS、DEPC(无DNA、RNA酶)由生工生物工程(上海)股份有限公司提供,正常人血清由上海久心研生物科技有限公司提供。除另有说明,其他试剂均为分析级试剂。所有寡核苷酸(表1)均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成和纯化。

表1 实验中所用的探针和 miRNA 序列

Tab 1 Sequences of probes and miRNA in this study

Name	Sequence (5'-3')
miRNA-721	UCUUGCAAUAAAAGGGGGAA
H1	SH-TTTTTTTTTTTTCCCCCTTTAATTGC-ACGACATCTAACTGCAATTAATAA-FAM
H2	TAATTGCAGTTAGATGTCGTGCAATTAATAA-ACGACATCTAACT
MT1	UCUUGCAAUAAUAGGGGGAA
MT3	UCUUGCAAUAAAUGGUUGAA
Random	AUCAAGGUUACGCGUAACCUU
miRNA-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
miRNA-122	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG

H1 and H2 are DNA hairpin probes, microRNA (miRNA)-721 is the target RNA; MT1 is single-base mismatch; MT3 is 3-base mismatch; random, miRNA-21, and miRNA-122 are RNA sequences; and the 5' end of the H1 probe is modified with sulfhy functional group (SH) and the 3' end is modified with 5-carboxyfluorescein (FAM).

超微量紫外可见分光光度计(NanoDrop One, 美国 ThermoFisher Scientific 公司), 荧光分

光光度计(FL6500, 美国 PerkinElmer 公司), 电子天平(HA-202M, 日本 A&D 公司), 多功能涡旋混合器(Vortex-Genie2, 美国 Scientific Industries 公司), 高速离心机(TG16-WS, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司), 数控超声波清洗仪(KQ-2250-DB, 昆山市超声波仪器有限公司), 电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司), 实验室纯水系统(Smart-D UV, 上海和泰仪器有限公司), 透射电子显微镜(HT7700 Exalens, 日本日立公司), 粒径电位测定仪(Zetasizer Nano ZS, 英国 Malvern 公司)。Bio-Rad 凝胶成像系统(ChemiDoc, 美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 AuNP 的制备 采用经典的柠檬酸钠还原法^[19]制备 AuNP, 取 100 mL HAuCl₄ 溶液(1.0×10⁻³ mol/L)加入到三颈烧瓶中, 设置搅拌器加热温度为 240 °C, 同时放入洗净的磁力搅拌子, 等待液体加热至沸腾后, 打开搅拌器保证磁力搅拌子在烧瓶的正中央旋转, 以控制 AuNP 的均一性, 设置转速为每分钟 800 转, 在剧烈搅拌下一次性加入 10 mL 二水合柠檬酸三钠(3.88×10⁻² mol/L)溶液。大约 3 min 后反应液颜色由淡黄色变为酒红色, 继续在回流条件下加热搅拌 25 min。随后在室温下继续搅拌 30 min, 缓慢冷却至室温后放于 4 °C 冰箱中待用。

1.3 AuNP 表面 H1 的修饰 将 7.17 μL H1-FAM (1.0×10⁻⁴ mol/L) 溶液与 4.5 μL 新鲜制备的 2.0×10⁻² mol/L TCEP 缓冲液混合, 在室温下活化 1 h, 以将 S-S 还原为 -SH。随后, 将活化后的 H1 与 250 μL AuNP 混合。室温条件下孵育 24 h 后, 每隔 8 h 依次加入 4.39、4.54、4.84 μL 2 mol/L NaCl 溶液, 使溶液中盐浓度提高到 0.1 mol/L。修饰结束后, 16 200×g 离心 20 min, 并用含 0.05% 吐温-20 的 PBS 洗涤 3 次, 以去除溶液中游离的 H1, 最后将 DNA 功能化的 AuNP 重新悬浮于 PBS 中, 置于 4 °C 冰箱中待用^[20-21]。

1.4 基于 AuNP 催化发夹组装定量检测 miRNA

1.4.1 催化发夹 DNA 的组装 将 20 μL 发夹探针 H1 功能化的 AuNP 和 50 μL 发夹探针 H2 (3 μmol/L) 与 50 μL 靶标 miRNA-721 以不同浓度(0.1~5 μmol/L)混合, 在 30 °C 下反应 20 min, 进行催化发夹组装信号放大。

1.4.2 荧光检测 取上述反应溶液共 120 μL 用荧光分光光度计测定荧光强度和荧光光谱(激发

波长为 480 nm, 发射波长为 520 nm), 以定量 miRNA。

1.5 信号放大策略的可行性和特异性

1.5.1 可行性 取 4 种反应液(发夹探针 AuNP-H1, 发夹探针 AuNP-H1 与发夹探针 H2 混合液, 发夹探针 AuNP-H1 与靶标 miRNA-721 混合液, 发夹探针 AuNP-H1、发夹探针 H2 和靶标 miRNA-721 混合液)分别测定其荧光信号强度。通过 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳验证 miRNA-721 引发的催化发夹组装信号放大策略的可行性。10 μL 上样反应液包括终浓度为 6.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 DNA、PBS、DNA 上样缓冲液。凝胶电泳条件: 电压 120 V, 60 min, 室温, Tris-硼酸电泳缓冲液。凝胶电泳结束后使用核酸染料浸泡凝胶, 室温震荡 30 min 进行染色, 将染色后的凝胶置于 Bio-Rad 凝胶成像系统显影。

1.5.2 特异性 在一系列离心管中分别加入 miRNA-721、单碱基错配 miRNA-721 (MT1)、三碱基错配 miRNA-721 (MT3)、随机序列 (random)、miRNA-21 和 miRNA-122 等 6 种 miRNA, 所有 miRNA 浓度均为 3 $\mu\text{mol/L}$ 。其他参数条件为 20 μL AuNP-H1、50 μL H2 (3 $\mu\text{mol/L}$)。在 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min, 以荧光分光光度计测定荧光信号强度和荧光光谱, 每个样本平行 3 份检测。

1.6 发夹探针 H1 功能化的 AuNP 表征 取制备好的 AuNP 经透射电子显微镜、紫外分光光度计进行表征。另取发夹探针 H1 功能化的 AuNP 进行粒径和 Zeta 电位表征。

1.7 关键参数的优化

1.7.1 探针 AuNP-H1 用量 分别取 15、20、25、30、35、40 μL 探针 AuNP-H1 与 50 μL 探针 H2 (3 $\mu\text{mol/L}$)、50 μL 靶标 miRNA-721 (1 $\mu\text{mol/L}$) 混合, 测定相应的荧光信号强度 (S) 和空白信号强度 (N), 计算信噪比 (S/N), 每个样本平行 3 份检测。

1.7.2 探针 H2 不同退火缓冲液 设 5 种退火缓冲液进行条件优化实验, 第 1 种为 20 mmol/L Tris-HCl、140 mmol/L NaCl、5 mmol/L KCl, pH 7.5; 第 2 种为 20 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl、5 mmol/L MgCl_2 , pH 7.4; 第 3 种为 10 mmol/L Tris-HCl、10 mmol/L MgCl_2 , pH 7.2; 第 4 种为 10 mmol/L Tris-HCl、0.1 mmol/L EDTA, pH 8.0; 第 5 种为

H_2O 。所有探针都经过 95 $^{\circ}\text{C}$ 退火 5 min, 缓慢冷却至室温备用。分别取上述 5 种不同的探针 H2 退火缓冲液 50 μL (3 $\mu\text{mol/L}$) 与 20 μL 探针 AuNP-H1 和 50 μL 靶标 miRNA-721 (1 $\mu\text{mol/L}$) 混合, 测定相应的荧光信号强度 (S) 和空白信号强度 (N), 计算信噪比 (S/N), 每个样本平行 3 份检测。

1.7.3 反应温度 将 20 μL 探针 AuNP-H1 和 50 μL 探针 H2 (3 $\mu\text{mol/L}$) 与 50 μL 靶标 miRNA-721 (1 $\mu\text{mol/L}$) 混合, 分别置于 20、25、30、37、40 $^{\circ}\text{C}$ 下测定相应的荧光信号强度 (S) 和空白信号强度 (N), 计算信噪比 (S/N), 每个样本平行 3 份检测。

1.7.4 反应时间 将 20 μL 探针 AuNP-H1 和 50 μL 探针 H2 (3 $\mu\text{mol/L}$) 与 50 μL 靶标 miRNA-721 (1 $\mu\text{mol/L}$) 混合后, 分别反应 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 min 后测定相应的荧光信号强度 (S) 和空白信号强度 (N), 计算信噪比 (S/N), 每个样本平行 3 份检测。

1.8 miRNA-721 检测方法的线性、检测限 (limit of detection, LOD) 和生物样品测定

1.8.1 线性及 LOD 以不同浓度 (0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、2、3、4、5 $\mu\text{mol/L}$) 的 miRNA-721 的对数作为横坐标, 在上述优化条件下以不同浓度 (0.1~5 $\mu\text{mol/L}$) 体系下发生催化发夹组装反应的荧光强度 (F) 与空白荧光强度 (F_0) 的差值 ($\Delta F = F - F_0$) 为纵坐标绘制标准曲线, 并按照 $\text{LOD} = 3.3\delta/m$ 公式计算 LOD^[22] (式中 δ 为响应值的偏差, m 为标准曲线的斜率), 每个样本平行 3 份检测。

1.8.2 生物样品测定 样品为稀释的正常人血清, 在优化条件下, 加入了不同浓度 (0.2、0.4 和 4.0 $\mu\text{mol/L}$) 的 miRNA-721, 然后根据 1.4.2 节方法检测荧光信号强度, 并计算回收率, 每个样本平行 3 份检测。

2 结果

2.1 验证信号放大策略的可行性 如图 2A 所示, 发夹探针 H1 功能化的 AuNP 由于对 FAM 荧光的猝灭作用, 发射出微弱的荧光信号 (黑色曲线), 当在传感系统中加入发夹探针 H2 时荧光强度变化不大 (红色曲线), 这表明在没有 miRNA-721 的情况下 AuNP-H1 和 H2 几乎不会发生相互杂交。当 miRNA-721 和发夹探针 AuNP-H1 混合时, 传感系

统的荧光强度从 10 400 增加到 30 922(蓝色曲线),表明 miRNA-721 可以打开 H1 的发夹,使 FAM 远离 AuNP, 荧光恢复。当 AuNP-H1、miRNA-721

和 H2 共存时, 荧光强度增加到 58 723(绿色曲线), 这表明 miRNA-721 可以在 H2 探针的辅助下激活催化发夹组装反应, 实现无酶扩增。

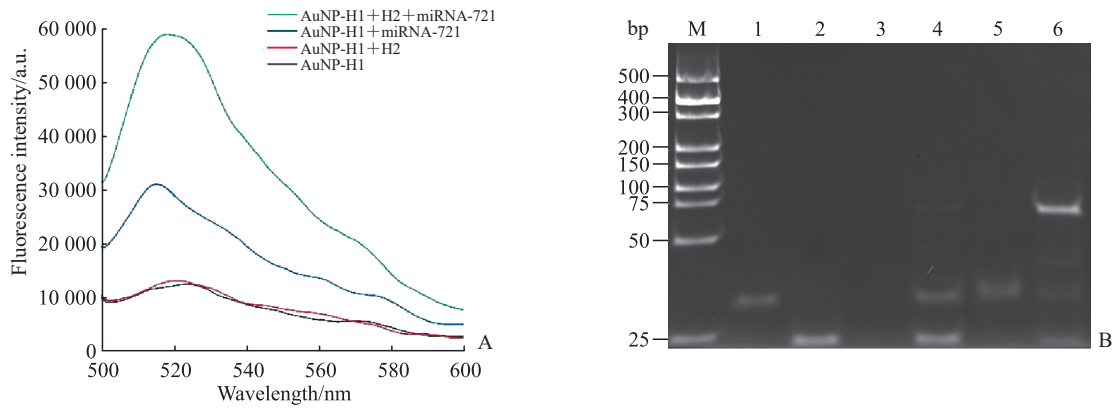


图 2 基于催化发夹组装的荧光传感器用于 miRNA-721 检测的可行性验证

Fig 2 Feasibility validation of a fluorescent sensor based on catalytic hairpin assembly for miRNA-721 detection

A: Fluorescence spectra under different conditions; B: Analysis by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The concentrations of all samples were 6.0 $\mu\text{mol/L}$. miRNA: MicroRNA; a.u.: Arbitrary unit; AuNP: Gold nanoparticle; H1, H2: DNA hairpin probe; M: Marker; 1: AuNP-H1; 2: H2; 3: miRNA-721; 4: AuNP-H1 + H2; 5: AuNP-H1 + miRNA-721; 6: AuNP-H1 + H2 + miRNA-721.

非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果(图 2B)显示,在不加入靶标时 2 条发夹链基本不发生杂交反应,与荧光光谱结果一致; miRNA-721 与 AuNP-H1 共孵育后出现了 1 条新的颜色变浅的条带,这表明 miRNA-721 可以将 H1 的发夹打开,形成复合物。miRNA-721 与 AuNP-H1 和 H2 的混合物形成了迁移速率最低的高亮新条带,说明通过靶标引发了催化发夹组装反应,形成了 H1 和 H2 双链 DNA 的复合条带。荧光和电泳实验的结果充分证明了 miRNA-721 触发的催化发夹组装具有科学上的可行性。

单分散体系,未观察到有团聚现象,直径约 13 nm。AuNP 的紫外吸收光谱中可见紫外吸收峰位于 520 nm 处(图 3B)。进一步利用动态光散射(dynamic lightscattering, DLS)对 AuNP 和 AuNP-H1 进行粒径检测, AuNP 平均流体力学尺寸为 20 nm,相较于透射电子显微镜的结果偏大,可能的原因是 DLS 所测到的不是 AuNP 的真实尺寸,而是 AuNP 在溶液中的水合直径,而发夹探针 H1 功能化的 AuNP 粒径增加到 37 nm(图 3C),说明吸附在 AuNP 表面的发夹探针 H1 呈直立状态,导致粒径增大。AuNP 和 AuNP-H1 的 Zeta 电位分别为 -16.2 mV 和 -33.6 mV ,后者具有更小的负 Zeta 电位。上述结果都说明, H1 被成功修饰到 AuNP 上。

2.2 AuNP 和发夹探针 H1 功能化的 AuNP 表征 由透射电子显微镜照片(图 3A)可见, AuNP 为球形的

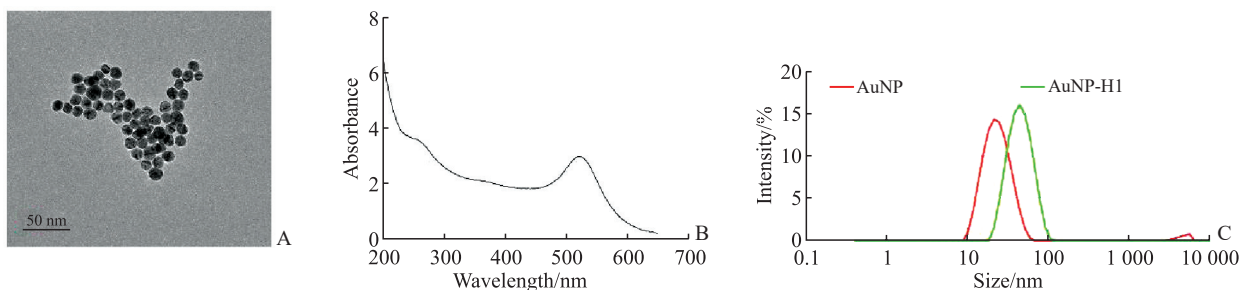


图 3 AuNP 及 H1 功能化的 AuNP 的表征

Fig 3 Characterization of AuNP and H1-functionalized AuNP

A: Transmission electron microscope image of AuNP; B: Ultraviolet-visible absorption spectrum of AuNP; C: Particle size analysis of AuNP and AuNP-H1. AuNP: Gold nanoparticle; H1: DNA hairpin probe.

2.3 关键参数的优化结果

2.3.1 AuNP-H1 用量 当探针 AuNP-H1 的用量为 15、20、25、30、35、40 μL 时, AuNP-H1、H2、miRNA-721 混合液的信噪比分别为 4.16 ± 0.18 、 4.38 ± 0.15 、 4.19 ± 0.27 、 3.94 ± 0.17 、 3.25 ± 0.13 、 3.26 ± 0.15 。在 AuNP-H1 用量为 20 μL 时体系信噪比达到最高, 之后缓慢下降, 在后续实验中 AuNP-H1 的用量为 20 μL 。

2.3.2 探针 H2 的退火缓冲液 用第 1、2、3、4、5 种 H2 退火缓冲液时, AuNP-H1、H2、miRNA-721 混合液的信噪比分别为 2.49 ± 0.2 、 4.20 ± 0.23 、 3.16 ± 0.13 、 2.42 ± 0.03 、 2.67 ± 0.17 。用第 2 种探针 H2 退火缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl、5 mmol/L MgCl_2 , pH 7.4) 时体系信噪比优于其他 4 种缓冲液, 后续实验采用第 2 种探针 H2 退火缓冲液。

2.3.3 反应温度 20、25、30、37、40 $^{\circ}\text{C}$ 反应温度下, AuNP-H1、H2、miRNA-721 混合液的信噪比分别为 3.10 ± 0.29 、 3.92 ± 0.22 、 4.26 ± 0.06 、 3.25 ± 0.11 、

3.13 ± 0.11 。反应温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 时体系信噪比最佳, 在后续实验反应温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3.4 反应时间 反应时间为 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 min 时, AuNP-H1、H2、miRNA-721 混合液的信噪比分别为 3.20 ± 0.10 、 4.02 ± 0.20 、 4.38 ± 0.17 、 5.02 ± 0.06 、 4.67 ± 0.20 、 4.96 ± 0.22 、 4.87 ± 0.25 、 5.06 ± 0.30 、 4.46 ± 0.05 、 5.07 ± 0.06 、 4.94 ± 0.07 、 4.83 ± 0.06 。反应时间为 20 min 时体系信噪比趋于稳定, 在后续实验反应时间为 20 min。

2.4 基于 AuNP 的催化发夹组装信号放大检测 miRNA-721 优化实验条件下, 催化发夹组装体系的荧光信号强度随着 miRNA-721 浓度的增加而增强 (图 4A); 520 nm 处的相对荧光信号强度变化值 ($\Delta F = F - F_0$) 与 miRNA-721 浓度 (C) 呈良好的线性关系 (图 4B): $\Delta F = 29\,232 \times \lg C - 52\,435$ ($R^2 = 0.991\,0$), 线性范围为 0.1~5 $\mu\text{mol/L}$ 。本方法的 LOD 为 1.23 nmol/L。

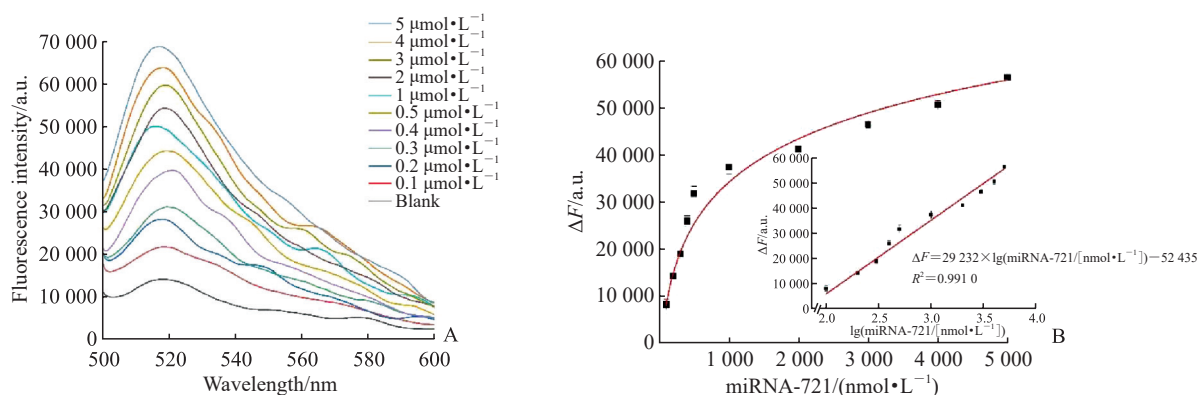


图 4 荧光强度与 miRNA-721 浓度的关系

Fig 4 Relationship between fluorescence intensity and miRNA-721 concentration

A: Fluorescence spectra of miRNA-721 at different concentrations. B: Linear relationship between fluorescence intensity and different miRNA-721 concentrations. $\Delta F = F - F_0$. F and F_0 are the fluorescence intensity of the system in the presence and absence of miRNA-721, respectively. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. miRNA: MicroRNA; a.u.: Arbitrary unit.

2.5 特异性实验 在最佳反应条件下, miRNA-721、MT1、MT3、random、miRNA-21 和 miRNA-122 的平均荧光强度分别为 $60\,338 \pm 431$ 、 $16\,674 \pm 815$ 、 $12\,049 \pm 809$ 、 $11\,909 \pm 200$ 、 $12\,682 \pm 1552$ 、 $11\,736 \pm 892$, MT1 和 MT3 的荧光强度分别约为 miRNA-721 的 28% 和 20%, 表明该方法可以区分 miRNA-721 序列中的单碱基错配和三碱基错配; miRNA-21、miRNA-122、random 的荧光强度与 MT3 相近。结果表明, 该方法对 miRNA-721 的荧光检测具有较好的选择性。

2.6 生物样品测定 稀释的正常人血清中加入 0.2、0.4 和 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 miRNA-721 后, 加标回收率分别为 94.02%、104.02%、92.71%, RSD 分别为 2.52%、3.69%、4.73%, 表明本研究提出的检测 miRNA-721 的方法可行, 在临床上可用于快速筛查急性心肌炎。

3 讨论

经过一系列反应条件的优化, 发现最优探针 H2 的退火缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L

NaCl、5 mmol/L MgCl₂, pH 7.4) 可以使H2正确折叠,可能是由于加入适当配比的NaCl和MgCl₂后使发夹茎部的Gibbs自由能增加,部分改善了发夹探针正确折叠的质量,会相对减少具有畸形三维结构的发夹分子的形成,对降低催化发夹组装的背景噪音和提高信噪比具有至关重要的影响^[23]。温度是催化发夹组装反应的另一个关键因素^[24],优化后发现荧光信号随着反应温度的升高逐渐增加,同时H1+H2背景信号也会随着反应温度的升高而增加,在30℃时得到最优信噪比,背景信号的增加也可能是由于在较高温度下H1的双链结构部分打开所致。催化发夹组装随反应时间的延长,H1+H2背景信号会逐渐增加,并在20 min时达到最优信噪比,原因可能是随着反应时间的增加荧光会发生猝灭,不利于实验的进行,所以尽量选择较短的反应时间^[25]。

在H1和AuNP之间引入T12序列作为间隔区后,催化发夹组装反应的时间大大缩短。这可能是由于T12序列间隔区使H1与靶标结合时的空间位阻降低,从而使催化发夹组装反应速度更快^[26]。

本研究提出了一种快速、无酶信号放大方法,可用于急性心肌炎生物标志物miRNA-721的检测,整个分析过程可在20 min内完成,具有潜在的临床应用前景,为急性心肌炎的早期诊断提供了一种快速检测手段。

血液中miRNA的表达水平极低,检测难度极大,本研究使用了核酸信号放大策略并首次用荧光法检测miRNA-721,实验的灵敏度相较于文献所报道的数据仍有很大的提升空间^[27-28]。一方面由于探针之间可能存在交叉反应和聚集效应,导致灵敏度降低;另一方面由于存在立体位阻效应,用于识别目标的探针会被部分隐藏起来,降低了目标的负载和结合效率。此外,荧光miRNA传感器最大的缺点是高背景信号带来的灵敏度损失。

[参考文献]

- [1] DIGGINS N L, HANCOCK M H. Viral miRNA regulation of host gene expression[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2023, 146: 2-19. DOI: 10.1016/j.semcdb.2022.11.007.
- [2] BACKES C, MEESE E, KELLER A. Specific miRNA disease biomarkers in blood, serum and plasma: challenges and prospects[J]. *Mol Diagn Ther*, 2016, 20(6): 509-518. DOI: 10.1007/s40291-016-0221-4.
- [3] HO P T B, CLARK I M, LE L T T. MicroRNA-based diagnosis and therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 7167. DOI: 10.3390/ijms23137167.
- [4] LAWRIE C H, GAL S, DUNLOP H M, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Br J Haematol*, 2008, 141(5): 672-675. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x.
- [5] ZANUTTO S, PIZZAMIGLIO S, GHILOTTI M, et al. Circulating miR-378 in plasma: a reliable, haemolysis-independent biomarker for colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(4): 1001-1007. DOI: 10.1038/bjc.2013.819.
- [6] SONG M Y, PAN K F, SU H J, et al. Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33608. DOI: 10.1371/journal.pone.0033608.
- [7] VOGRINC D, GORIČAR K, KUNEJ T, et al. Systematic search for novel circulating biomarkers associated with extracellular vesicles in Alzheimer's disease: combining literature screening and database mining approaches[J]. *J Pers Med*, 2021, 11(10): 946. DOI: 10.3390/jpm11100946.
- [8] CIEŚLA M, KOLARZ B, MAJDAN M, et al. Plasma micro-RNA-22 is associated with disease activity in well-established rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2022, 40(5): 945-951. DOI: 10.55563/clinexprheumatol/zdhkrp.
- [9] VIERECK J, THUM T. Circulating noncoding RNAs as biomarkers of cardiovascular disease and injury[J]. *Circ Res*, 2017, 120(2): 381-399. DOI: 10.1161/circresaha.116.308434.
- [10] BLANCO-DOMÍNGUEZ R, SÁNCHEZ-DÍAZ R, DE LA FUENTE H, et al. A novel circulating microRNA for the detection of acute myocarditis[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(21): 2014-2027. DOI: 10.1056/NEJMoa2003608.
- [11] 成永强,赵亚青,高舒心,等.基于金纳米粒子的催化发夹DNA组装检测microRNA[J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(2): 147-153. DOI: 10.3969/j.issn.1000-1565.2018.02.006.
- [12] ASA T A, RAVI KUMARA G S, SEO Y J. Highly sensitive, selective, and rapid detection of miRNA-21 using an RCA/G-quadruplex/QnDESA probing system[J]. *Anal Methods*, 2022, 14(2): 97-100. DOI: 10.1039/d1ay01696b.
- [13] WU S, ABDULLAH AL-MASKRI A A, LI Q, et al. A novel miRNA detection method using loop-mediated isothermal amplification[J]. *Int J Anal Chem*, 2023, 2023: 6624884. DOI: 10.1155/2023/6624884.
- [14] QU X M, REN X D, SU N, et al. Isothermal exponential amplification reactions triggered by circular templates

- (cEXPAR) targeting miRNA[J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(4): 3653-3659. DOI: 10.1007/s11033-023-08291-x.
- [15] WU Y, FU C, SHI W, et al. Recent advances in catalytic hairpin assembly signal amplification-based sensing strategies for microRNA detection[J]. *Talanta*, 2021, 235: 122735. DOI: 10.1016/j.talanta.2021.122735.
- [16] LIU J, ZHANG Y, XIE H, et al. Applications of catalytic hairpin assembly reaction in biosensing[J]. *Small*, 2019, 15(42): e1902989. DOI: 10.1002/sml.201902989.
- [17] LI Y, ZHANG C, HE Y, et al. A generic and non-enzymatic electrochemical biosensor integrated molecular beacon-like catalyzed hairpin assembly circuit with MOF@Au@G-triplex/hemin nanozyme for ultrasensitive detection of miR-721[J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 203: 114051. DOI: 10.1016/j.bios.2022.114051.
- [18] DUAN Z, LI Z, DAI J, et al. Nucleotide base analog pyrrolo-deoxycytidine as fluorescent probe signal for enzyme-free and signal amplified nucleic acids detection[J]. *Talanta*, 2017, 164: 34-38. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.10.079.
- [19] FRENS G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions[J]. *Nat Phys Sci*, 1973, 241: 20-22. DOI: 10.1038/physci.241020a0.
- [20] LIU B, LIU J. Methods for preparing DNA-functionalized gold nanoparticles, a key reagent of bioanalytical chemistry[J]. *Anal Methods*, 2017, 9(18): 2633-2643. DOI: 10.1039/C7AY00368D.
- [21] PARK S Y, LYTTON-JEAN A K, LEE B, et al. DNA-programmable nanoparticle crystallization[J]. *Nature*, 2008, 451(7178): 553-556. DOI: 10.1038/nature06508.
- [22] PAN L, HUANG Y, WEN C, et al. Label-free fluorescence probe based on structure-switching aptamer for the detection of interferon gamma[J]. *Analyst*, 2013, 138(22): 6811-6816. DOI: 10.1039/c3an01275a.
- [23] BODULEV O L, ZHAO S, SAKHAROV I Y. Improving the sensitivity of the miRNA assay coupled with the mismatched catalytic hairpin assembly reaction by optimization of hairpin annealing conditions[J]. *Anal Chem*, 2021, 93(17): 6824-6830. DOI: 10.1021/acs.analchem.1c00820.
- [24] 刘丹. 发夹探针和等温指数扩增介导的MICRORNA定量分析[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2021. DOI: 10.27674/D.CNKI.GCYKU.2021.001173.
- [25] 李文华. 基于DNA为模板金属纳米簇的新型荧光生物传感方法[D]. 长沙: 湖南大学, 2013.
- [26] LIU Q, LIU M, JIN Y, et al. Rapid and enzyme-free signal amplification for fluorescent detection of microRNA via localized catalytic hairpin assembly on gold nanoparticles[J]. *Talanta*, 2022, 242: 123142. DOI: 10.1016/j.talanta.2021.123142.
- [27] OU X, ZHAN S, SUN C, et al. Simultaneous detection of telomerase and miRNA with graphene oxide-based fluorescent aptasensor in living cells and tissue samples[J]. *Biosens Bioelectron*, 2019(124/125): 199-204. DOI: 10.1016/j.bios.2018.10.009.
- [28] WANG Z, ZHANG J, CHEN F, et al. Fluorescent miRNA analysis enhanced by mesopore effects of polydopamine nanoquenchers[J]. *Analyst*, 2017, 142(15): 2796-2804. DOI: 10.1039/c7an00528h.

[本文编辑] 尹 茶