

基于双酶切级联信号放大的核酸检测方法

廉翔^{1,2}, 吴望华², 范宏亮³, 张勇¹, 张涛²

(1. 山西大学化学化工学院, 太原 030006;

2. 浙江大学工业控制技术国家重点实验室, 智能系统与控制研究所, 分析仪器研究中心, 杭州 310027;

3. 浙江省医学科学院卫生学研究所, 杭州 310013)

摘要 利用茎环结构定位探针构建了一个基于双酶切反应的级联信号放大体系, 并将其用于核酸的检测. 在该体系中, 茎环结构定位探针首先是内切酶 Tth Endonuclease IV 的作用底物, 被剪切后又作为定位探针介导切口酶 Nt.BstNBI 对分子信标实施剪切, 将这 2 步剪切反应结合起来可有效克服切口酶对于目标核酸中特定识别序列的依赖, 同时进一步提高了检测灵敏度. 实验结果表明, 荧光信号与目标 DNA 浓度的对数值呈线性相关, 响应范围为 1 pmol/L~1 nmol/L, 并且具有良好的识别单碱基变异的能力. 此外, 本方法序列设计简单, 通用性强, 仅改变定位探针的部分序列即可实现对不同目标 DNA 的检测. 对掺杂于血清中的目标 DNA 的检测结果验证了本方法在实际样品检测中的应用潜力.

关键词 级联信号放大; 分子信标; 切口酶; 定位探针; 核酸检测

中图分类号 O655.9

文献标志码 A

核酸的高灵敏、高特异性检测在分子生物学研究、司法鉴定及临床诊断等领域具有重要意义^[1,2]. 聚合酶链式反应(PCR)^[3~5]是最早提出的微量核酸扩增技术, 也是目前最灵敏、应用最广泛的核酸检测技术之一, 但其热循环过程对仪器设备的要求较高, 限制了其在即时检测(Point-of-care testing)方面的应用. 近年来, 涌现出一系列等温指数扩增方法^[6~9], 可以在较温和的恒定温度下进行, 而且具有反应速度快、检测灵敏度高等优点^[10,11]. 但这些方法普遍采用较为复杂的引物/探针设计, 且无法避免聚合酶的非特异性扩增产生的背景信号^[12,13]. 因此, 进一步发展简单、快速、高灵敏且高特异性的核酸检测方法仍然十分必要.

分子信标(MB)是一种非常简单的信号探针, 其通过与目标核酸分子杂交即可释放荧光信号^[14], 具有特异性强、反应迅速等优点, 在核酸、蛋白质及各种离子检测等方面得到了广泛应用^[15~17]. 但以传统 MB 作为探针的检测方法也具有明显的局限性, 即 1 个目标分子只能与 1 个 MB 作用, 限制了该方法的检测灵敏度. 通常, MB 对核酸的定量检测只能达到约 1 nmol/L^[18,19]. 为了进一步提高灵敏度, 需要与其它信号放大方法联用, 其中最常用的是切口酶信号放大(NESA)^[20,21]. 这些方法设计简单, 可以将检出限降低近 3 个数量级, 在核酸和蛋白质检测中都有应用^[20~22]. 采用三通结构(Three-way junction)设计可以解决 NESA 对目标核酸分子中特定识别序列的依赖^[23], 但由于体系中的 MB 和辅助探针分别含有互补的单链识别序列, 它们可以在切口酶的帮助下(甚至自发地)形成完整的双链识别序列, 因而容易造成信号泄漏, 且单一线性信号放大的检测灵敏度也较低.

前文^[24]曾提出了一种茎环结构的定位探针(DNA Aligner, DA), 其茎部包含完整的切口酶识别序列, 两侧臂与目标核酸分子互补. 因此, 切口酶可以结合在 DA 的茎部, 并通过 DA 两侧臂与目标核酸分子的杂交而定位于指定位置, 进而实施剪切, 我们称之为定位探针介导剪切(Aligner-mediated

收稿日期: 2018-01-02. 网络出版日期: 2018-06-21.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 21275129)、工业控制技术国家重点实验室自主课题(批准号: ICT1805)、国家重大科学仪器设备开发专项(批准号: 2013YQ470781)和浙江省医药卫生科技计划项目(批准号: 2015KYA061, 2016KYB070)资助.

联系人简介: 张涛, 男, 博士, 副教授, 主要从事生化传感与分析仪器方面的研究. E-mail: zhtao@zju.edu.cn

张勇, 男, 博士, 教授, 主要从事光谱分析方面的研究. E-mail: zhangyong@sxu.edu.cn

cleavage, AMC). 该方法不需要目标核酸中存在任何特定序列, 且只需要一种切口酶即可在任意位置进行剪切, 从而有效克服了切口酶对于目标核酸中识别序列的依赖. 在此基础上, 本文进一步改进 DA 的结构, 设计了一种含脱碱基位点 (Abasic Site) 的改进定位探针 (Modified DNA Aligner, MDA), 构建了一个利用内切酶 Tth Endonuclease IV 和切口酶 Nt.BstNBI 进行双酶切反应的级联信号放大体系. 在此体系中, MDA 既是 Tth Endonuclease IV 的作用底物, 被剪切后又可作为介导 Nt.BstNBI 剪切的定位探针, 将这 2 步反应结合起来即可实现对目标 DNA 的灵敏检测.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

实验所用寡核苷酸由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 序列见表 1; 切口酶 Nt.BstNBI, 内切酶 Tth Endonuclease IV, NEBuffer 3.1 和 ThermoPol Reaction Buffer 购自 New England Biolabs 公司; DNA 级水购自 Fisher Scientific 公司; 其它常用试剂均购自 Sigma-Aldrich 公司; 健康人血清样本由浙江大学医院提供.

Table 1 Sequence of oligonucleotides used in the experiment *

Name	Sequence(5'-3')
Molecular Beacon-1 (MB-1)	FAM-GCAGTGACTTTGTACTGGACGTGGAGATACCGATTGTCAGTGC-Dabeyl
Molecular Beacon-2 (MB-2)	FAM-CTGCAGTGACTTTGTACTGGACGTGGAGATACCGATTGTCAGTGCAG-Dabeyl
DNA Aligner (DA)	TCGGTATCTCCTGACTCAGTTTTTCGTGAGTCAACGTCCAGTAC
Modified DNA Aligner (MDA)	GCAGTGAACCTCAGGTAGAGTCAAC * G * T * C * CAGTACCAAGTGT <u>CACCTTGCT</u> CACAT-GAGTTCGGTATCTCCTGACTCTACCTGAGTTCAGTGC
Modified DNA Aligner-FAM (MDA-FAM)	FAM-GCAGTGAACCTCAGGTAGAGTCAAC * G * T * C * CAGTACCAAGTGT <u>CACCTTGCT</u> CACATGAGTTCGGTATCTCCTGACTCTACCTGAGTTCAGTGC
Modified DNA Aligner-1 (MDA-1)	GCAGTGAACCTCAGGTAGAGTCAAC * G * T * C * CAGTACACCACTCAACCTTCTAGACT-GACTCTCGGTATCTCCTGACTCTACCTGAGTTCAGTGC
Modified DNA Aligner-2 (MDA-2)	GCAGTGAACCTCAGGTAGAGTCAAC * G * T * C * CAGTACTGCTCACATCTGATTCGACACTGT-CACTCGGTATCTCCTGACTCTACCTGAGTTCAGTGC
Target DNA	ACTCATGTGAGCAAGGTGACACTTG
Target DNA-1 (T-1)	GAGTCAGTCTAGAAGGTTGAGTGGT
Target DNA-2 (T-2)	GTGACAGTGTGCAATCAGATGTGAGCA
Mutant target DNA-1 (MT-1)	ACTCATGTGAGCAAGcTGACACTTG
Mutant target DNA-2 (MT-2)	ACTCAcGTGAGCAAGcTGACACTTG
Mutant target DNA-3 (MT-3)	ACTgATGTGAGCAAGcTGACACaTG

* The asterisks indicate the sites of phosphorothioation. The bases underlined represent the abasic sites. The lowercase bases in target show the positions of mutations.

荧光光谱在岛津公司 RF-5301PC 型荧光光度计上测定; 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 实验在美国伯乐公司 Bio-Rad PowerPac™ 电泳仪上完成; 凝胶图像通过上海培清科技公司 JS-2012 型凝胶成像分析仪采集.

1.2 定位探针介导剪切实验

反应体系的总体积为 25 μ L, 包含 100 nmol/L MB-1, 10 U Nt.BstNBI, 1 \times NE Buffer 3.1 (pH=7.9, 100 mmol/L NaCl+50 mmol/L Tris-HCl+10 mmol/L MgCl₂+100 μ g/mL BSA) 和不同浓度的 DA. 将混合溶液于 55 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 1 h, 再于 80 $^{\circ}$ C 水浴中加热 20 min 使 Nt.BstNBI 失活; 最后将产物转移到 15% 的变性聚丙烯酰胺凝胶中, 室温下施加 180 V 恒压, 约 40 min 后停止, 用凝胶成像仪采集图像.

1.3 目标 DNA 的检测

将 100 nmol/L MDA, 10 U Tth Endonuclease IV, 不同浓度的目标 DNA 及 1 \times 缓冲溶液 (35 mmol/L Tris-HCl+50 mmol/L NaCl+5 mmol/L KCl+5 mmol/L MgCl₂+1 mmol/L MgSO₄+5 mmol/L (NH₄)₂SO₄+100 μ g/mL BSA+0.05% Triton X-100) 于 55 $^{\circ}$ C 水浴中混合、孵育后, 加入 150 nmol/L MB-2 和 10 U Nt.BstNBI. 反应溶液在 55 $^{\circ}$ C 下继续孵育 15 min, 将得到的反应产物稀释至 100 μ L, 使用荧光光度计测定

其荧光发射光谱, 激发波长为 485 nm. 为了验证方法对于复杂生物样品的检测能力, 将目标 DNA 加入到未经处理的健康人血清中, 按上述操作过程进行检测, 并将检测结果与标准溶液实验测试所得结果进行比较.

2 结果与讨论

2.1 双酶切级联信号放大检测目标 DNA 的原理

定位探针介导剪切 (AMC) 的原理如图 1(A) 所示, 基于双酶切反应的级联信号放大体系的原理如图 1(B) 所示. 反应体系包含 1 个改进的茎环结构定位探针 (MDA)、分子信标探针 (MB)、内切酶 *Tth* Endonuclease IV 和切口酶 *Nt.Bst*NBI. MDA 由 1 个较长的茎部与环部组成, 其中茎部靠近环的位置含有 *Nt.Bst*NBI 的识别序列, 环上包含与 MB 的环互补的序列 (序列 1, 4 和 5) 以及与目标 DNA 互补的序列 (序列 2 和 3), 并在序列 2 和 3 之间引入 1 个脱碱基位点. *Tth* Endonuclease IV 是一种热稳定核酸内切酶, 可水解双链 DNA 中的脱碱基位点. 由于与 MB 互补的序列分别位于 MDA 环的两侧, 且受茎环结构的保护, 因而当不存在目标 DNA 时, MDA 和 MB 分别保持自身稳定的茎环结构. 而当存在目标 DNA 时, 它首先与 MDA 的环形成双链结构, 此时 MDA 的脱碱基位点处会被 *Tth* Endonuclease IV 水解断裂, 使得目标 DNA 容易与 MDA 分离, 并进一步与新的 MDA 作用, 实现第一步信号放大; 另一方面, 断裂后的 MDA 由于具有较长的茎部仍可保持 *Nt.Bst*NBI 的双链识别序列, 且两侧臂可与 MB 的环杂交, 从而作为定位探针介导 *Nt.Bst*NBI 对 MB 进行循环剪切, 实现第二步信号放大.

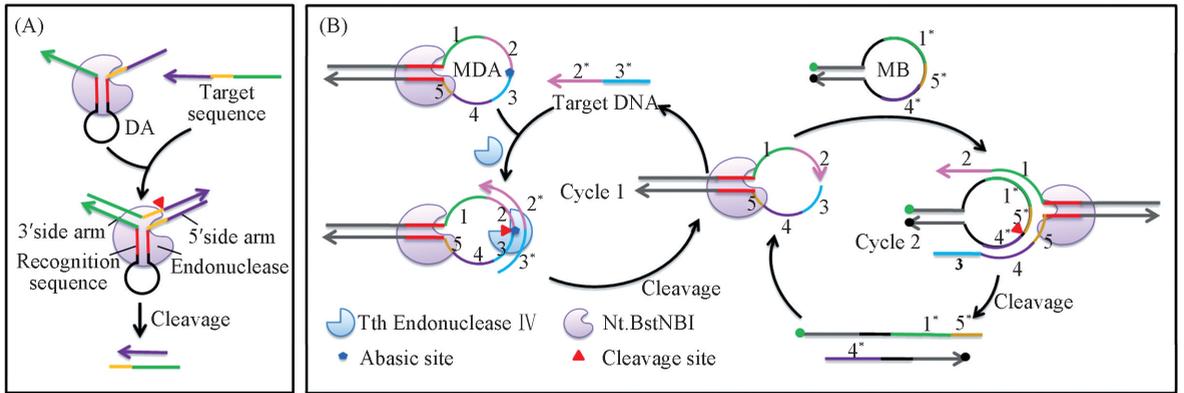


Fig.1 Schematics of AMC(A) and the proposed cascade signal amplification strategy(B)

2.2 可行性研究

为便于比较, 首先考察了定位探针介导 *Nt.Bst*NBI 剪切 MB 实验. 图 2(A) 示出了不同浓度的 DA 存在时, *Nt.Bst*NBI 对 MB-1 (100 nmol/L) 进行剪切后的变性聚丙烯酰胺凝胶结果, 其中泳道 1~7 分别对应于浓度为 0, 0.1, 0.2, 1, 2, 10 及 100 nmol/L 的 DA. 可见, 当 DA 的浓度大于 1 nmol/L 时, MB-1

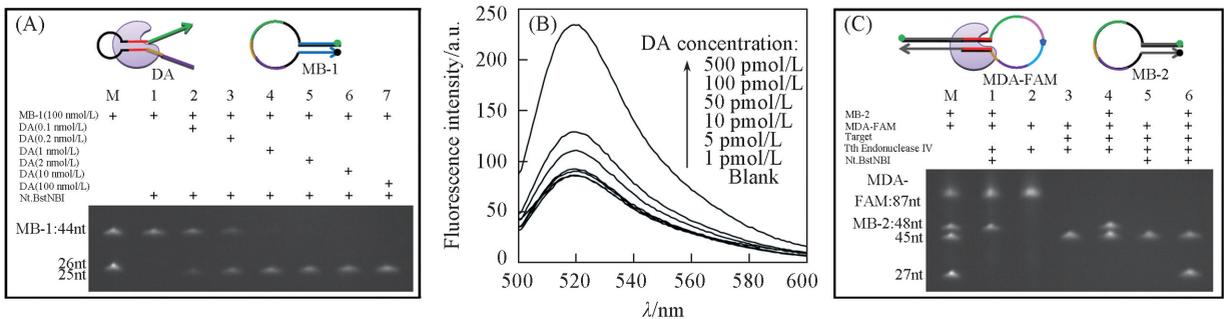


Fig.2 Denaturing PAGE image(A) and fluorescence spectra(B) of the cleavage of MB mediated by varied concentrations of DA and denaturing PAGE image of the cleavage of MDA and/or MB with or without target DNA(C)

(44 nt)全部被剪切为 25 nt 的产物. 这一方面证明了定位探针介导 Nt.BstNBI 剪切分子信标的可行性, 另一方面也显示了切口酶的信号放大作用, 例如, 即使 DA 的浓度只有 MB-1 的 1%, 也可实现对全部 MB-1 的剪切, 相较于传统的分子信标与目标分子的一对一作用, 灵敏度明显提高. 但是, 当 DA 的浓度低至 0.2 nmol/L 时, 即便反应较长时间(1 h)也仅有约 1/2 的 MB-1 被剪切, 说明该信号放大作用不超过 500 倍. 荧光光谱[图 2(B)]也表明, 当仅使用 Nt.BstNBI 时无法区分 10 pmol/L 的 DA 与背景信号. 这可以解释为什么早期的 NESA 方法检出限高于 pmol/L^[20].

为证明双酶切级联信号放大反应可行性, 研究了体系中包含不同组分时 2 种酶 Tth Endonuclease IV 和 Nt.BstNBI 分别对荧光标记的定位探针 (MDA-FAM) 和分子信标 MB-2 的剪切行为. 如图 2(C) 所示, 当体系中不存在目标 DNA 时, MDA-FAM 和 MB-2 均未被剪切(泳道 1); 而当体系中存在 Tth Endonuclease IV 和目标 DNA 时, MDA-FAM 的条带消失, 同时出现了 1 条约 45 nt 的新条带(泳道 3). 对比泳道 2 可知, 仅在目标 DNA 存在时, 才能触发 Tth Endonuclease IV 对 MDA-FAM 的剪切. 继续同时引入 MB-2 和 Nt.BstNBI, 可以观察到另 1 条约 27 nt 的新条带, 为 MB-2 被 Nt.BstNBI 剪切的产物(泳道 6). 以上结果表明, 目标 DNA 首先诱导了 MDA-FAM 被 Tth Endonuclease IV 剪切, 产生了“活化”的定位探针, 进而继续介导 Nt.BstNBI 对 MB-2 实施剪切. 这与图 1(B) 所示的反应机理完全吻合, 证明了双酶切级联信号放大反应的可行性.

2.3 反应条件的优化

为了提高检测的灵敏度, 使用 1 nmol/L 的目标 DNA 对实验条件进行了优化. 首先考察了分子信标浓度对检测结果的影响, 即在不同 MB-2 浓度下 (25, 50, 100, 150 和 200 nmol/L) 观察目标 DNA 存在与不存在时的荧光信号. 本文采用荧光比率 (F/F_0-1) 作为评价指标, 其中 F 和 F_0 分别表示有、无目标 DNA 时 520 nm 处的荧光强度. 该值越大, 越容易区分阳性信号与背景信号, 也越有利于获得更高的灵敏度. 如图 3(A) 所示, 尽管随着 MB-2 浓度的增加, 由目标 DNA 引起的阳性荧光信号显著增强, 但同时也伴随着背景信号的逐渐升高. 图 3(B) 示出了不同浓度 MB-2 所对应的荧光比率, 该值在 [MB-2] = 150 nmol/L 时达到最大, 故选择 150 nmol/L 的 MB-2 进行后续实验.

在确定了 MB-2 的优化浓度后, 进一步考察了反应时间对检测结果的影响. 图 3(C) 和 (D) 示出了反应时间分别为 10, 15, 30, 60, 90 和 120 min 所获得的荧光曲线与荧光比率值. 从荧光发射光谱图中

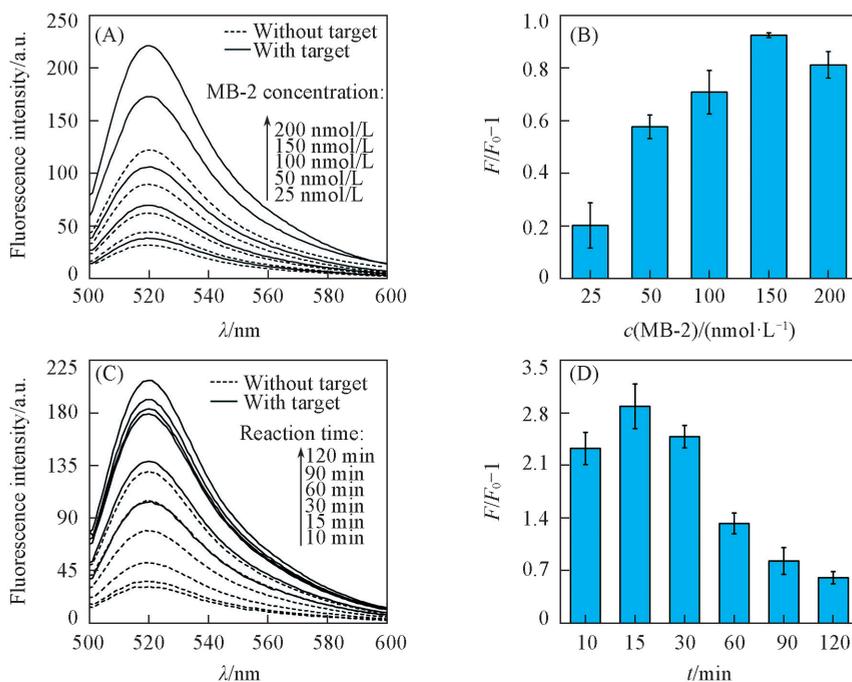


Fig.3 Effects of molecular beacon concentrations(A, B) and reaction time(C, D) on the performance of the proposed method

可以看出,随着反应时间的延长背景信号上升较快,但阳性信号在 30 min 后增长已经变得很缓慢,因此宜选用较短的反应时间.图 3(D)所示的荧光比率也证实了这一点,其最大值出现在约 15 min.因此,选择 15 min 的剪切时间来进行后续实验.

2.4 检测方法的灵敏度

在优化的反应条件下,考察了该方法对目标 DNA 检测的灵敏度.由图 4(A)所示的荧光发射光谱可见,随着目标 DNA 的浓度从 1 pmol/L 增加到 100 nmol/L,荧光强度也逐渐升高.图 4(B)插图示出了目标 DNA 的浓度在 1 pmol/L~1 nmol/L 范围内时,荧光强度与目标 DNA 浓度对数值($\lg c$)的线性关系,线性回归方程为 $Y = 32.97\lg c + 178.06$,相关系数 $R^2 = 0.9965$ (Y 代表 520 nm 发射峰的荧光强度, c 代表目标 DNA 的浓度).此结果与仅用 MB 作为信号探针^[18,19]及早期的 NESA 检测方法^[21,23]相比,检出限分别降低了 3~4 和 1~2 个数量级.

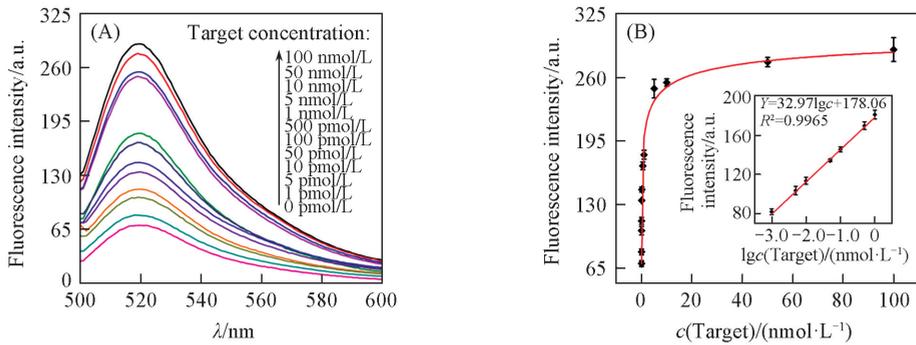


Fig.4 Fluorescence spectra caused by varied concentrations of target DNA (A) and correlation between the fluorescence intensity and target DNA concentration (B)

Inset of (B) is the linear relationship plot.

2.5 检测方法的特异性

为了探究本方法对目标 DNA 中碱基错配的识别能力,分别测定了目标 DNA、单碱基变异序列 (MT-1)、双碱基变异序列 (MT-2) 和三碱基变异序列 (MT-3) 所引起的荧光信号.由图 5 可见,即使只有 1 个碱基错配 (MT-1),其荧光比率值 ($F/F_0 - 1$) 也只有目标 DNA 的 25%,随着碱基错配数量增加到 3 个 (MT-3),其荧光信号已与背景信号非常接近,这说明本方法具有较高的特异性,可以很好地区分目标序列中的单个碱基变异.

2.6 检测方法的通用性

除高灵敏度、高特异性外,本方法还具有通用性强、序列设计简单等优点,只需改变 MDA 上与目标 DNA 互补的序列,即可实现对不同目标 DNA 的检测.图 6 示出了对另外 2 条目标序列 (T-1 和 T-2) 的检测结果,其线性范围为 1 pmol/L~1 nmol/L,对应的线性关系分别为 $Y = 15.24\lg c + 87.78$ ($R^2 = 0.9861$) 和 $Y = 30.80\lg c + 161.40$ ($R^2 = 0.9807$),检出限分别为 3 和 2 pmol/L.

此外,还考察了该方法对于复杂生物样品中目标 DNA 的检测能力.将不同浓度的目标 DNA 掺杂于健康人血清中,然后进行检测.如图 7 所示,获得的荧光发射光谱及线性关系均与标准样品溶液测试所得结果相似(线性范围为 1 pmol/L~1 nmol/L),表明本方法在实际样品检测中具有较好的抗干扰能力.在响应范围 1 pmol/L~1 nmol/L 内,选取了 3 个不同浓度目标序列的 3 组平行数据进行了回收率考察.结果(表 2)表明,本方法对掺杂于健康人血清中的目标序列进行检测的回收率为 83.1%~117.7%.

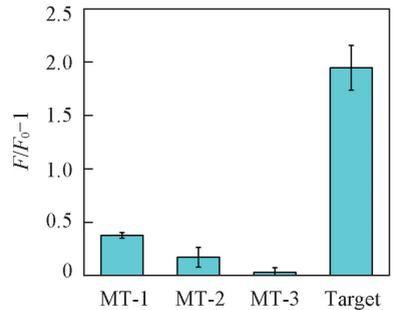


Fig.5 Fluorescence increase caused by one-, two-, three-nucleotide mutant and wild target DNA

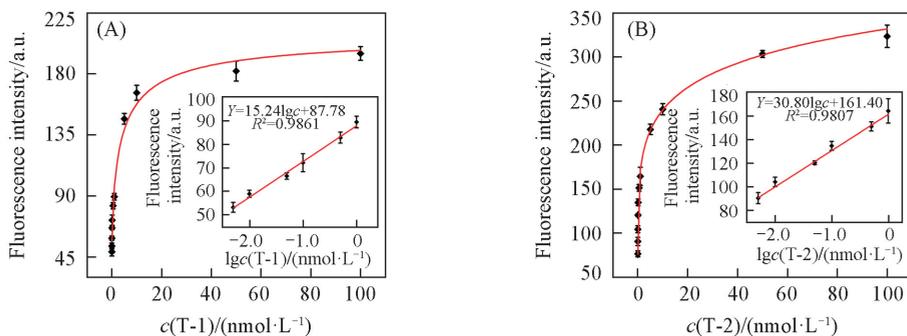


Fig.6 Correlation between the fluorescence intensity and concentration of target DNA T-1(A) and T-2(B)

Insets show the linear relationship plots.

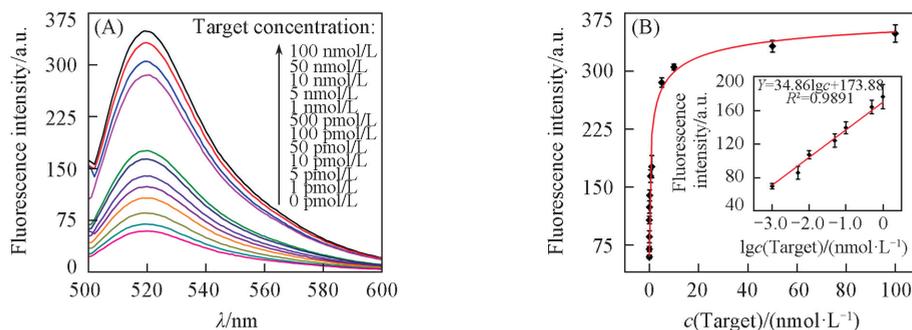


Fig.7 Fluorescence spectra caused by varied concentrations of target DNA spiked in human serum(A) and correlation between the fluorescence intensity and target DNA concentration(B)

Inset of (B) is the linear relationship plot.

Table 2 Recovery results of target added in human serum samples

Target sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Added/ $(pmol \cdot L^{-1})$	10.0	10.0	10.0	100.0	100.0	100.0	500.0	500.0	500.0
Found/ $(pmol \cdot L^{-1})$	12.1	9.9	8.7	91.3	110.8	95.4	589.0	461.5	522.2
Recovery (%)	117.1	95.1	83.1	90.9	110.4	95.0	117.7	92.2	104.3

3 结 论

利用改进的茎环结构探针, 结合内切酶 *Tth* Endonuclease IV 和切口酶 *Nt.Bst*NBI 构建了一个双酶切级联信号放大体系, 实现了对目标 DNA 的灵敏检测, 线性范围在 1 pmol/L~1 nmol/L 之间. 相较于传统的使用 MB 作为信号探针的检测方法, 检出限降低了 3~4 个数量级, 并且可以很好地区分目标 DNA 上的单个碱基变异. 另外, 本方法还具有序列设计简单、通用性强等优点, 对血清等复杂样本具有很好的适应性, 在核酸分子检测中具有重要价值.

参 考 文 献

- [1] Tan W. H., Donovan M. J., Jiang J. H., *Chem. Rev.*, **2013**, 113(4), 2842—2862
- [2] Zhao Y. X., Chen F., Li Q., Wang L. H., Fan C. H., *Chem. Rev.*, **2015**, 115(22), 12491—12545
- [3] Sonkar S. C., Sachdev D., Mishra P. K., Kumar A., Mittal P., Saluja D., *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, 86, 41—47
- [4] Sanders R., Mason D. J., Foy C. A., Huggett J. F., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, 406(26), 6471—6483
- [5] Chen G. H., Tang X. Y., Sun Y., Zhou L., Li D., Bai Y., Mai K. J., Li Y. Y., Wu Q. W., Ma J. Y., *J. Virol. Methods*, **2018**, 251, 129—132
- [6] Chen P. P., Peng W., Zhang Y. X., Chen J. B., Jiang X. M., Zheng C. B., Hou X. D., *Anal. Chem.*, **2016**, 88(24), 12386—12392
- [7] Xu W. T., Wang C. G., Zhu P. Y., Guo T. X., Xu Y. C., Huang K. L., Luo Y. B., *Analyst*, **2016**, 141(8), 2542—2552
- [8] Xu Y. Z., Niu C., Xiao, X. F., Zhu W. Y., Dai Z., Zou X. Y., *Anal. Chem.*, **2015**, 87(5) 2945—2951
- [9] Kong X. J., Wu S., Cen Y., Chen T. T., Yu R. Q., Chu X., *Analyst*, **2016**, 141(14), 4373—4380

- [10] Li J., Macdonald J., *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, *64*, 196—211
- [11] Deng H. M., Gao Z. Q., *Anal. Chim. Acta*, **2015**, *853*(1), 30—45
- [12] Tan E., Erwin B., Dames S., Ferguson T., Buechel M., Irvine B., Voelkerding K., Niemz A., *Biochem.*, **2008**, *47*(38), 9987—9999
- [13] Shinde D. N., Ramfrezbarrera A. J., Hintze A., Adami C., Niemz A., *Nucleic Acids Res.*, **2012**, *40*(11), e87
- [14] Tyagi S., Kramer F. R., *Nat. Biotechnol.*, **1996**, *14*(3), 303—308
- [15] Dong H. F., Meng X. D., Dai W. H., Cao Y., Lu H. T., Zhou S. F., Zhang X. J., *Anal. Chem.*, **2015**, *87*(8), 4334—4340
- [16] Zhang W. C., Hu F., Zhang Q., Zhang J. Q., Mao Y. B., Wang P., Gu Y. Q., *Talanta*, **2018**, *179*, 685—692
- [17] Zhang L. L., Wong J. X. H., Li X. C., Li Y. C., Yu H. Z., *Anal. Chem.*, **2015**, *87*(10), 5062—5067
- [18] Zhang P., Beck T., Tan W. H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*(2), 402—405
- [19] Xu H., Zhang R. B., Li F., Zhou Y. Y., Peng T., Wang X. D., Shen Z. F., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2016**, *408*(22), 6181—6188
- [20] Li J. W. J., Chu Y. Z., Lee B. Y. H., Xie X. L. S., *Nucleic Acids Res.*, **2008**, *36*(6), e36
- [21] Zhao Y. X., Chen F., Wu Y. Y., Dong Y. H., Fan C. H., *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, *42*(1), 56—61
- [22] Xu W., Xue X. J., Li T. H., Zeng H. Q., Liu X. G., *Angew. Chem.*, **2009**, *48*(37), 6849—6852
- [23] Kong R. M., Zhang X. B., Zhang L. L., Huang Y., Lu D. Q., Tan W. H., Shen G. L., Ru R. Q., *Anal. Chem.*, **2011**, *83*(1), 14—17
- [24] Wu W. H., Zhang T., Han D., Fan H. L., Zhu G. Z., Ding X., Wu C. C., You M. X., Qiu L. P., Li J., Zhang L. Q., Lian X., Hu R., Mu Y., Zhou J. G., Tan W. H., *Chem. Sci.*, **2018**, *9*(11), 3050—3055

Dual Enzyme Cleavage-based Cascade Signal Amplification for Nucleic Acids Detection[†]

LIAN Xiang^{1,2}, WU Wanghua², FAN Hongliang³, ZHANG Yong^{1*}, ZHANG Tao^{2*}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. Research Center for Analytical Instrumentation, Institute of Cyber-Systems and Control,

State Key Laboratory of Industrial Control Technology, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;

3. Department of Environmental Medicine, Institute of Hygiene, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

Abstract Dual enzyme cleavage-based cascade signal amplification for nucleic acids detection was developed. In this system, a modified DNA aligner(MDA) that contains an abasic site was first cleaved by Tth Endonuclease IV in the presence of target DNA, and then served as an aligner to mediate the cleavage of molecular beacon by nicking endonuclease Nt. BstNBI. These cascade reactions not only overcame the sequence dependence of Nt.BstNBI, but also improved the detection sensitivity. The results showed a good linear correlation between the fluorescence intensity and the logarithm of target DNA concentration(lgc) ranging from 1 pmol/L to 1 nmol/L. Moreover, the proposed method also showed a good capability of identifying single base mutation in target DNA. In addition, this method also features simple probe design and excellent universality. By modifying a small fragment on MDA's loop, it can be used to sense various target DNAs. Experiments with target DNA spiked in human serum showed the potential of applying this method to real samples.

Keywords Cascade signal amplification; Molecular beacon; Nicking endonuclease; DNA aligner; Nucleic acid detection

(Ed.: N, K)

[†] Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.21275129), the Autonomous Research Project of the State Key Laboratory of Industrial Control Technology, China (No. ICT1805), the National Key Foundation for Exploring Scientific Instruments, China (No.2013YQ470781) and the Medical and Health Technology Project of Zhejiang Province, China (Nos.2015KYA061, 2016KYB070).