

www.pibb.ac.cn



荧光核酸适配体:核酸酶学分析新机遇*

犬 1,2)** 高子珩^{1,2)} 邹 $_{1,2}^{1,2}$ 周 $_{1,2}^{1,2}$ 薛婷婷^{1,2)} 陈显军^{1,2)**} 杨 (1) 华东理工大学,生物反应器工程国家重点实验室,光遗传学与合成生物学交叉学科研究中心,上海 200237; 2) 华东理工大学药学院,上海市细胞代谢光遗传学技术前沿科学研究基地,上海 200237)

摘要 DNA和RNA的合成与降解等核酸代谢过程是维持生命体生长发育、新陈代谢、遗传变异、个体衰老等生命过程的基 础代谢单元,广泛参与机体生命活动的全过程。核酸代谢相关酶活性对于维持细胞内环境的稳定性至关重要,其活性的改 变可能会引起多种疾病的发生与发展。核酸代谢相关酶已成为多种疾病研究的重要靶点,也是生物技术和生物工程领域中 不可或缺的重要工具,如聚合酶链反应、定点诱变、分子克隆和DNA测序等。因此,核酸代谢是所有核酸研究和相关生命 科学领域研究的基础。本文将介绍核酸代谢的酶学分析常用方法,并聚焦于操作简单、实时快速的荧光法,按照荧光法的 检测原理、发展历史和应用进行分类阐述与比较,并对核酸酶学分析工具未来研究与发展方向进行展望。

关键词 核酸代谢,酶活性检测,荧光法,荧光核酸适配体 中图分类号 O528

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0128

核酸的代谢过程遵循着一系列的规律,包括自 我复制、修饰、转录、剪接、转运、翻译和降解。 某些病毒中的逆转录和高等动物特有的端粒复制也 是核酸代谢过程的一部分。核酸代谢不仅是生物体 正常生长发育、遗传变异和细胞分化的重要因素, 而且还与癌症、辐射损伤、病毒感染、溃传病和代 谢病等疾病的发生和发展有着密切联系^[14]。因此, 与核酸代谢相关的酶是维持生物代谢和细胞内稳态 的重要角色。

DNA 解旋酶 BLM、WRN 和 RECO4 的异常可 能会导致许多罕见的疾病,包括布卢姆综合征 (Bloom syndrome,又称面部红斑侏儒综合征)、沃 纳综合征 (Werner syndrome, 又称成人早老综合 征)和罗斯蒙-汤姆森综合征(Rothmund-Thomson syndrome),甚至肿瘤^[5-6]。拓扑异构酶的异常会对 大脑发育过程中的遗传机制产生深远影响,可能导 致自闭症谱系障碍 (autistic spectrum disorder, ASD)的发生^[7];核糖核酸酶RNase H2则可以激 活先天免疫模式,识别受体,引发炎症反应,从而 影响大脑的发育过程; 爱卡迪-古蒂综合征 (Aicardi-Goutieres sydrome, AGS)^[8-9] 是一种儿童 炎症性疾病, 它会导致端粒缩短, 这种缩短会提高 患心血管疾病、肝硬化、高血压症状、动脉粥样硬 化、骨髓衰竭、高血糖和肿瘤等疾病的风险^[10-11]。

因此,酶活性水平的改变已被用作许多病理研 究的指标和主要的研究靶点。某些常见的靶标酶, 如DNA聚合酶、甲基转移酶、拓扑异构酶和解旋 酶,对于核酸的代谢过程具有重要的调节作用,可 以促进细胞生长与个体发育。同时,核酸代谢相关 酶是DNA测序、分子克隆、定点诱变、表观修饰 和聚合酶链反应等生物技术和生物工程领域不可或 缺的工具。本文将参与核酸体内代谢过程的相关酶 进行了整理与分类(表1)。

^{*}国家重点研发计划(2022YFC3400100, 2019YFA0904800)和国 家自然科学基金(32121005)资助项目。

^{**} 通讯联系人。

陈显军 Tel: 13482210575, E-mail: xianjunchen@ecust.edu.cn 杨弋 Tel: 15821675757, E-mail: yiyang@ecust.edu.cn 收稿日期: 2023-04-07, 接受日期: 2023-04-19

2023; 50 (5)

·1043·

Table 1 Nucleic acid metabolism in vivo and related enzymes 表1 核酸的体内代谢过程及相关酶

核酸类型与过程	相关酶	代表性商业酶制剂
DNA 复制	DNA聚合酶、DNA解旋酶、引物酶、核酸外切酶、DNA 连接酶	Taq DNA聚合酶、T4 gp41 DNA解旋酶、Tte UvrD解旋酶
修复	多聚ADP-核糖聚合酶、多核苷酸激酶、DNA内切酶、	T4多核苷酸激酶、尿嘧啶DNA糖基化酶、胸腺嘧啶DNA糖
	DNA外切酶、DNA解旋酶、DNA连接酶、DNA聚合酶、	基化酶、8-氧代鸟嘌呤DNA糖基化酶I、N-甲基嘌呤DNA糖
	DNA糖基化酶、DNA末端转移酶、DNA甲基转移酶、环	基化酶、小牛胸腺DNA末端转移酶、大肠杆菌核酸内切
	丁烷嘧啶二聚体光裂合酶、(6-4)光裂合酶、AP核酸内切	酶I、脱腺嘌呤脱嘧啶核酸内切酶I、瓣状核酸内切酶I
	酶、切除核酸酶、DNA蛋白激酶、瓣状核酸内切酶、	
	DNA依赖的RNA聚合酶、X射线修复交叉互补蛋白	
重组	DNA外切酶、DNA限制性内切酶、DNA聚合酶、DNA连	Bsal-HFv2 (Golden Gate Kit)、RecA、核酸外切酶V (Rec
++ =	接爾、DNA車组爾、λ整合爾、转座爾	BCD)、NGS In5转座階
转求	DNA 依赖的RNA 蒙台酶	17 RNA衆合酶、13 RNA衆合酶
修饰	DNA甲基转移酶、DNA甲基胞嘧啶双加氧酶、5-甲基胞 嘧啶族酶 名取技式验谢酶 IdtA定白 去进股复技	Dam甲基化酶、Sss1甲基化酶、Dcm甲基化酶、EcoK1甲基
	密处修即时、多家核日散激时、J结百重口、木珈脱氧核 糖核酸钴移酶	化酶、CpG中茎化酶、14多核日酸激酶、101不响转移酶
水解	DNA 贞切酶, $DNA 外切酶, 碱性磷酸酶, 酸性磷酸酶$	HindIII DNA内切酶 核酚外切酶I. 核酚外切酶III. 岮毒磷
	DIVISION DIVISION OF A LEGENZARY	酸二酯酶、DNase I、S1核酸酶、小牛肠碱性磷酸酶
连接	DNA连接酶	T4 DNA连接酶、T3 DNA连接酶、T7 DNA连接酶、Tag
		DNA连接酶、PBCV-1 DNA连接酶
超螺旋	DNA拓扑异构酶	DNA拓扑异构酶I、DNA 促旋酶
端粒	端粒酶	
RNA 逆转录	RNA依赖的DNA聚合酶(逆转录酶)、RNA酶H、端粒酶	AMV逆转录酶、M-MLV逆转录酶、Marathon逆转录酶
转录后修饰	RNA加帽酶、RNA内切酶、核苷酰转移酶	牛痘病毒加帽酶、大肠杆菌Poly(A)聚合酶、Poly(U) 聚合酶
修饰	甲基转移酶、去甲基化酶、假尿苷合成酶	
修复	多核苷酸激酶、RNA连接酶	T4多核苷酸激酶、T4 RNA连接酶
水解	RNA内切酶、RNA外切酶	RNase A、RNase R、RNase H
剪接	锤头型核酶、发夹状核酶、VS核酶、包含U2和U6 RNA的	
	剪接体	
翻译	核糖体、tRNA氨酰合成酶	Thermo Scientific一步法人体外翻译系统
核糖体组装	DNA蛋白激酶、甲基转移酶	
复制	RNA依赖的RNA聚合酶、RNA内切酶、RNA连接酶、	AMV逆转录酶、M-MLV逆转录酶
	RNA依赖的DNA聚合酶、DNA依赖的RNA聚合酶	

1 传统核酸酶学分析方法

建立核酸代谢酶的活性检测方法对于疾病的诊断、临床治疗和病理研究具有重要意义。酶的标准 活性检测方法一般是通过测定合成或降解核酸底物 的量来进行测定的。传统的核酸酶学分析方法包括 比色法^[12]、高效液相色谱法^[13]、电化学法^[14]、凝 胶电泳法^[15]、放射性标记法^[16]和酶联免疫吸附 法^[17]等。本文对传统的核酸代谢酶检测方法的优 缺点进行了整理比较(表2)。

 Table 2 Comparison of traditional nucleic acid metabolism enzyme detection methods
 [18-41]

 表2 传统的核酸代谢酶检测方法比较
 [18-41]

名称	优点	缺点	举例	参考文献
比色法	成本低,肉眼可视	受实际样品的颜色限制,灵敏度低,存在误差	端粒酶、聚合酶	[18,
				24-28]
高效液相色谱法	分辨率高, 流动相种类多	不连续性、仪器成本高、操作复杂、耗时长	磷酸二酯酶	[19,
				29-30]
放射性标记法	结果稳定	具有放射性危害,操作复杂、专业性强	聚合酶、糖基化酶	[22,
				31-34]
凝胶电泳法	成本低,重复性好,分离能力好	操作繁琐,检测耗时长,定量分析不够精确	端粒酶	[21, 35]
电化学法	仪器设备简单,价格低廉	选择性低,检测灵敏度有限	DNA甲基转移酶、端粒酶	[20,
				36-37]
酶联免疫吸附法	方法灵敏常见	不同反应的抗体需更换,非特异性高	内切酶、甲基化酶	[23,
				38-39]
聚合酶链式反应	特异性强、灵敏度高	仪器要求高,操作复杂	聚合酶、外切酶、甲基化酶	[40-41]

2 基于荧光法的核酸酶学分析探针

1962年2月,日本籍海洋生物学家下村修^[18] 在水母体内发现了一种特殊的蛋白质,它在紫外光 照射下会产生一种耀眼的绿色荧光,这种蛋白质被 命名为绿色荧光蛋白(GFP)。Tsien 教授^[19]进一 步改良了它,并开发出了一系列具有不同颜色的荧 光蛋白,以满足不同的应用需求。在此基础上,越 来越多的荧光基团陆续被报道,这些荧光基团被广 泛用作酶活性检测中的报告分子。基于荧光的分析 方法具备价格便宜、使用简便、敏感度高的优势, 而且可以通过多种荧光基团的组合实现正交检测。 经过多年的发展,基于荧光法的酶活性分析检测成 为实现酶活性快速实时、准确、低成本检测的重要 技术。

到目前为止,基于荧光的核酸酶学分析探针可 以大致分为3类:非特异性结合核酸的荧光探针, 基于荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)原理的特异性探针,以及 遗传编码的荧光 DNA 适配体/荧光 RNA 适配体的 特异性探针。按照时间的发展顺序,分别称其为第 一代、第二代和第三代。

2.1 第一代荧光探针: 非特异性结合核酸的荧光 探针

核酸染料是一类在结合核酸之后荧光显著增强 的小分子化合物,通常具有苯环或共轭双键等离域 π键体系提供用于接收激发光的核外电子,同时还 要有与DNA特异性相互作用的基团。如图1所示, 这种相互作用力主要可分为插入DNA的碱基之间 以及与DNA 双螺旋的小沟相互作用,依赖于前者的代表性核酸染色染料为溴化乙锭(ethidium bromide, EB),依赖于后者的代表性核酸染色染料为Hoechst系列染料。



 Fig. 1
 Schematic diagram of non-specific nucleic acid dyes

 图1
 非特异性核酸染料与双链DNA结合示意图

EB与核酸结合时荧光增强^[20]并可用于电泳凝 胶中的DNA检测^[21],是分子生物学中应用最广泛 的技术之一。但是,使用EB染色的背景荧光高, 而且易导致DNA突变,具有核酸毒性,不利于实 验人员的健康。碘化丙锭(propidium iodide, PI) 是一种溴化乙锭的衍生物,它能够吸收紫外光,产 生明亮的荧光,通过PI与吖啶橙(acridine orange, AO)联用可以鉴别死/活细胞,活细菌会产生明亮 的绿色荧光,而死细菌则会产生鲜艳的红色荧 光^[22]。7-氨基-放线菌素D(7-amino-actinomycin D, 7-AAD)是1974年合成的染色剂,它可以用来检 测染色体的结构和功能。7-AAD对于染色质的结 合不受染色质凝聚程度的影响[23],可以区分活细 胞、凋亡细胞和死亡细胞^[24],其发射波谱较PI窄, 对其他检测通道的干扰更小,在多色荧光分析中是 PI的最佳替代品。此外,荧光素二乙酸酯和PI也 可以用于细胞染色,以更准确地鉴定死亡细胞。 SYBR Green I由 Molecule Probes 公司开发,并于 1997年被首次应用和报道用于细胞计数[25]。 SYBR Green I已被广泛应用于多种 DNA 检测和分 析技术,其中包括流式细胞术^[25]、实时荧光定量 聚合酶链式反应 (qPCR) 以及其他多种应用 中^[26]。SYBR Green I与双链 DNA 相互作用后可显 著增加亮度^[27]。然而溶液的酸碱度会明显影响 SYBR系列的染色效果,如果溶液pH高于8.3或低 于7.5, 它的检测灵敏度将会显著下降^[28]。Pico Green 染料和 SYBR Green I 具有相似的结构和光 谱,由 Molecule Probes 公司开发,荧光关于双链 DNA浓度的线性关系范围从双链DNA浓度25 ng/L 至1 mg/L。即使在盐、蛋白质、聚乙二醇、尿素、 氯仿、酒精和琼脂糖等存在的情况下,该染料测定 的结果也能保持稳定^[29]。Gel Red、Gel Green是 EB的结构类似物,通过插层作用结合DNA^[30],但 是由于是两分子桥联的产物,因此该染料分子质量 大,难以透过细胞膜,对DNA和RNA的迁移影响 小。Super Gel Blue (US EVERBRIGHT INC) 无致 突变性,可用蓝光成像避免紫外伤害,热稳定且无 需避光储存,可用于琼脂糖及聚丙烯酰胺凝胶电泳 中DNA或RNA染色。

Hoechst 33258 和 Hoechst 33342 长时间暴露在 紫外光下不仅会导致光漂白,还会导致其在蓝光的 激发下发射出以绿色为主同时带有黄色和橙色的荧 光,可能会对同时使用Hoechst染料与GFP的实验 带来干扰和影响^[31]。SiR-Hoechst是一种使用远红 外光激发的核酸染料,由基于硅罗丹明的荧光团 (SiR)和能与DNA小沟结合的基团双苯甲酰亚胺 组合而成。结合双链 DNA 后在 670 nm 处的荧光增 强了50倍,并且与双链RNA集合几乎没有荧光, 除此之外,应用于活细胞染色时,使用SiR-Hoechst 对细胞的影响相比于 SYTO 61、Vibrant Dye cycle Ruby 和 DRAQ5 等 DNA 染料更小^[32]。 DAPI 是一种 DNA 序列特异性的染料,其通过附着 在富含腺嘌呤-胸腺嘧啶的DNA 序列的小沟中形成 荧光复合物,此外还可以与仅含有鸟嘌呤-胞嘧啶 碱基组成的 DNA 结合形成无荧光复合物^[33]。DIPI

是 DAPI 的结构类似物, 但是 DIPI 对于紫外光照射 有更好的抗性,在30min内几乎不会褪色^[34]。 Hoechst系列染料可以方便地与其他常用的红色/绿 色荧光基团联用,对活细胞进行正交染色。AO早 在1967年之前就被应用于核酸染色[35],其可以通 过染色后的颜色区分 DNA 和 RNA。该染料对 DNA 染色呈绿色而对 RNA 染色则呈现红色荧光^[36]。 AO能透过细胞膜,可以对活细胞及死细胞内的核 酸进行染色^[37]。普卡霉素 (mithramycin) 可以与 DNA 中富含鸟嘌呤-胞嘧啶的区域结合,并且这种 结合主要是这两种化合物从溶液中疏水转移到 DNA的小沟中, 吸收470 nm 波长的青光并发射 554 nm的黄光,褶皱霉素和色霉素与普卡霉素拥 有相同的核心三环结构,而连有不同的寡糖链,因 此其一样可以与DNA的小沟结合, 而吸收/发射光 谱略有不同^[38]。

还有一类专门用作溶液中DNA定量的核酸染 料 如 Quant Fluor (Promega) 、 Accu Clear (Biotium)、Qubit (Life Technologies) 等核酸定量 试剂盒。这些商业试剂盒除了实现DNA及RNA的 高灵敏定量进而分析核酸代谢的相关酶的酶活 性^[39]之外,还在辅助RNA样品提取^[40]、生物气 溶胶分析^[41]、药物筛选^[39]、高通量测序文库构 建^[42]、类器官培养^[43]等方面提供了基础平台。 To-Pro-3 是一种噻唑橙的衍生物,是一种可以由 642 nm 激光激发的红色荧光团 [44]。它无法穿过细 胞膜,可以在流式细胞术中染色死亡细胞^[45]。 To-Pro-3及其二聚体TOTO-3与双链和单链DNA间 存在多种相互作用力,有很强的结合能力^[46]。 DRAQ5是一种红外荧光双烷基氨基蒽醌染料,对 DNA具有高亲和力且可以进入活细胞^[47]。它的最 大吸收峰在646 nm,最大发射峰在681 nm。但是 DRAQ5浓度高至1 µmol/L时会引起核结构的变化, 造成染色质的异常聚集问题^[48]。SYTO是一组跨 越广域光谱范围的染料,涵盖广泛的可见光激发和 发射光谱。所有SYTO染料在无细胞系统中均显示 出低本底荧光,与DNA或RNA结合后荧光显著增 加^[49],量子产率增加了近40倍^[50]。Vibrant Dye cycle Ruby 是由 Molecule Probe 公司开发的 Vibrant Dye cycle Ruby 染料家族的新型低细胞毒性红色荧 光染料,主要用于流式细胞术中的细胞染色^[51-52]。

综上,我们对常见核酸染料的优缺点进行了比较(表3)。相比放射性同位素标记,使用核酸染料不仅同样可以在染色后的电泳凝胶上直观地展示

名称	优点	缺点
EB	高灵敏度,价格低廉	背景荧光高,易突变,具有基因毒性,有安全隐患
SYBR Green I	高亮度,低诱变性	易猝灭, pH耐受范围窄(7.5~8.3)
SYBR Gold	相比SYBR Green I具有更高灵敏度	化学稳定性, pH耐受范围窄(7.5~8.3)
SYBR Safe	比SYBR Green I具有更低的致突变性	pH耐受范围窄(7.5~8.3)
Gel Red	不易猝灭,高灵敏度,与聚丙烯酰胺凝胶兼容	影响DNA迁移
Gel Green	不易猝灭,高灵敏度,低毒性,高稳定性	影响DNA迁移
Gold View	灵敏度高,大片段染色良好	易猝灭,低安全性,低稳定性
Super Gel Blue	高安全性, 高灵敏度, 蓝光紫外双成像	价格高
AO	与DNA与RNA结合发出不同荧光,能透过细胞膜	对DNA有诱变性, 信噪比低
DAPI	能透过细胞膜	光漂白明显,仅结合A-T区域,潜在诱变性
Hoechst系列	能透过细胞膜	倾向于富含A-T的区域
7-AAD	发射光谱对其他检测通道的干扰小	不能透过活细胞的细胞膜,价格高
To-Pro-3	使用红光激发	不能透过细胞膜

 Table 3 Comparison of advantages and disadvantages of common nucleic acid dyes

 表3 常见核酸染料优缺点比较

核酸的浓度和分布,而且无需繁琐的预处理和针对 放射性元素的防护。当核酸染料用于液体样品的检 测时,使用酶标仪即可代替昂贵的液体闪烁计数 仪。正因如此,在如今的研究中核酸染料已经几乎 完全取代了放射性同位素标记法成为主流。但是核 酸染料也有着自身的局限性,由于核酸染料已经几乎 列依赖性的,因此在对核酸进行标记时无法区分序 列不同的核酸,也无法通过染色区分某一特定的引 物的延伸产物,同时,使用核酸染料进行实时荧光 定量 PCR时也不得不考虑假阳性问题等。为了摆 脱以上种种困境,以TaqMan 探针为代表的使用荧 光基团标记的寡核苷酸探针被开发出来,这些经过 设计的序列以FRET 原理为基础,成为了第二类基 于荧光的核酸代谢相关酶研究方法。

2.2 第二代荧光探针:基于荧光共振能量转移 (FRET)原理的特异性探针

第二代荧光探针基于 FRET 的原理,它能够将 分子间的能量以非辐射的方式转移到另一个荧光 团,这种转移过程受到分子间距离的限制。这种技 术可以有效地检测出分子间的相互作用,从而提高 检测的灵敏度和准确性。当供体和受体之间相距在 1~10 nm 区域内时,由于供体发出的荧光能量被受 体吸取,导致供体荧光强度显著降低,而受体荧光 强度则会显著增强^[53]。

第二代荧光探针可分为化学水解型荧光探针、 核酸杂交型荧光探针和分子互作型荧光探针^[54]。 化学水解型荧光探针中的猝灭基团吸收来自报告基 团的荧光信号。在扩增过程中,寡核苷酸与互补目 标序列杂交后利用核酸酶的酶切活性,探针中的磷酸二酯键被水解,报告基团和猝灭基团分离,从而释放出荧光信号,如TaqMan^[55]、QZyme^[56-57]等探针。核酸杂交型荧光探针通过与标记了报告基团的探针与目标DNA结合从而实现报告基团与猝灭基团的分离,比如双杂交探针^[58]、分子信标(MB)^[59]、MGB Eclipse 探针^[60]、蝎型探针^[61]、Ampli-fluor 探针^[62]和LUX 引物^[63],它们会在延伸过程中无损释放,报告基因和猝灭剂之间建立物理距离,释放报告基因的荧光信号。分子互作型荧光探针的报告基团在连接到RNA上后不会立即被激活,只有当RNA与相关的蛋白质结合之后,才会发出强烈的荧光,如PIFE 探针^[64]。

2.2.1 化学水解型探针

化学水解型探针通常用于实时定量 PCR。当 扩增未开始时,猝灭基团可以有效地吸收报告基团 的荧光信号,在扩增步骤中,基于热稳定型 Taq聚 合酶 5'-3'的核酸外切酶活性^[55],短寡核苷酸与互 补目标序列杂交后被水解,报告基团和猝灭基团分 开,进而释放出荧光信号,实现实时检测核酸扩增 的目的(图 2c)。TaqMan 探针可以在指数扩增阶 段准确地定量产物^[65-66]。得益于其高特异性,除 实时荧光 qPCR,TaqMan 探针还可用于量化基因表 达,遗传多样性等检测,也能够用于各种核酸酶的 活性及抑制检测,如靶向核酸切割^[67]、糖基 化^[68]、甲基化^[69-70]和磷酸化^[71]的酶。

由 BD Biosciences 公司 2003 年研发的 QZyme Assay 的原理与其他定量 PCR 系统的原理相似,但

涉及不同的荧光信号生成机制^[56-57]。DNAzyme是 一种具有独特催化活力的寡核苷酸,它具有两种底 物识别结构域,能够在特殊的磷酸二酯键处有效地 切割核酸底物(图 2a),QZyme系统包括了 DNAzyme以及与其非活性链相连的5'端特异性引 物和3'端特异性引物各一条,还有一种DNAzyme 特异性的荧光底物,这是一种一端标记有报告基 团,另一端标记有猝灭基团的寡核苷酸片段。在扩 增过程中,产生包含活性的正向DNAzyme拷贝的 扩增子,从而裂解底物,在空间上分离荧光团和猝 灭剂,因此扩增子的积累伴随着荧光的增加。

2.2.2 核酸杂交型探针

双杂交探针,即相邻杂交探针,由Heller和 Morrison^[58]于1985年首次提出。该测定使用两个 与相邻DNA序列杂交的寡核苷酸探针。两个探针 末端分别用发色团标记,其中一个探针有3'供体, 另一个有1个5'受体。FRET在双杂交后形成,通 过供体的猝灭和受体荧光的敏化发出荧光信号。两 个荧光基团的激发光光谱有一定程度的重叠,且两 条探针需要与靶核酸的杂交位置应相互邻近(通常 为1~5个碱基)。两个探针需要被精确地杂交到特 定的靶顺序上才能够探测到荧光,因此该方法具有 极强的特异性(图2b)。

1996年, Tyagi和 Kramer^[59]首次提出了分子 信标。分子信标是由15~30个碱基组成的 DNA 序 列,两侧分别有2个短的互补茎序列,当整个序列 在缺少目标序列时,将自发形成茎环结构。茎环结 构的形成可以令猝灭剂和荧光团之间更加紧密地结 合,有效地抑制荧光信号。当目标 DNA 或 RNA 分 子存在时,它们之间会发生杂交,杂交越强,荧光 团和猝灭剂之间的空间分离更加明显,从而提高荧 光信号的强度(图 2d)^[72]。相比于 TaqMan 探针, 分子信标在扩增过程中具有更高的稳定性,不会出 现降解现象,而且在每个循环中,它都能够与靶标 序列结合,从而产生可测量的荧光信号。这种基于 分子信标设计的荧光响应目标酶的检测探针已应用 于监测各种核酸酶的催化过程,如切割^[73-75]、连 接、糖基化^[75]、甲基化^[76-77]和磷酸化^[78-79]。

Afonina 等^[60] 于 2002 年报道了 MGB Eclipse probe, 其主要特征是在 5'端 DNA 小沟结合基团 (minor groove binder, MGB) 配体以及猝灭剂, 在 3'端具有荧光团。单链 MGB Eclipse 探针的荧光 在未杂交时被末端染料和猝灭基团的相互作用而有 效猝灭。在与互补目标杂交后, MGB 分子嵌入双 链并使探针高度稳定,这使更短、更特异的探针序 列成为可能。5'-MGB-quencher 基团还可以防止探 针在 PCR 过程中被 Taq DNA 聚合酶水解。如图 2e 所示,归因于MGB和碱基杂交赋予的出色特异性, MGB Eclipse 探针可广泛应用于实时荧光 qPCR。 MGB Eclipse probe 系统显著地增强特异性,尤其 是对于某些特定类型的单核苷酸多态性识别,如富 含鸟嘌呤-胞嘧啶的错配、或富含腺嘌呤-胸腺嘧啶 的目标核酸中鸟嘌呤-胸腺嘧啶替换,以及任何情 况下的鸟嘌呤-胸腺嘧啶错配。

Nazarenko 等^[62] 于 2002 年 首 次 提 出 LUX (Light Upon eXtension) 探针。LUX 探针基于寡核 苷酸的一级和二级结构对共轭荧光团发射特性的影 响,只有探针在与 PCR 产物杂交形成双链时,共 轭荧光团才会增加荧光强度。LUX 探针设计由以 下元素构成:以C或G作为引物的3'端核苷酸,荧 光团连接至从3'端起的第2个或第3个碱基(T), 在标记核苷酸两侧的3个核苷酸内的一个或多个 G,以及茎环结构的发夹引物。LUX 探针的5'端在 低于其熔点的温度下形成平末端发夹。LUX 探针 的设计十分简单,可以通过将引物的上述特征和其 他如长度和熔解温度(Tm)的特征输入专门的软 件,来产生位于整个目标序列中的大量引物对^[64]。 2.2.3 分子相互作用型探针

对于RNA及相关靶向酶的检测,蛋白质诱导 荧光增强(protein-induced fluorescence enhancement, PIFE)能够补充FRET对蛋白质-RNA互相作用的检测。PIFE能够记录蛋白质与RNA结合后的运动和活性,且PIFE可以通过全内反射荧光显微镜观察和监测,并只需要一种染料就可以标记一条RNA链(图2f)。PIFE的好处在于它可以节省设计染料结合位点的时间,它不会使染料影响蛋白质的结合亲和力和解离。通常,染料位于

RNA的5'端或3'端,染料的选择也类似于FRET, 需要考虑量子产率、荧光强度、寿命、动态各向异 性和光稳定性。与FRET相同,PIFE也具有距离依 赖性,并且在荧光团和蛋白质附近的0~3 nm范围 内表现更好,而FRET在3~10 nm处表现出最高的 灵敏度。这表明FRET和PIFE在短距离测量RNA-蛋白质复合物动力学方面能够彼此补充^[80]。总之, PIFE可广泛应用于研究RNA与不同酶如聚合酶、 解旋酶或核酶和核糖开关的相互作用,以实现 RNA识别和酶活性的检测。





(a) QZyme Assay的原理; (b) 双杂交探针的原理; (c) Taqman探针的原理; (d) 分子信标的原理; (e) MGB Eclipse探针的原理; (f) 蛋 白质诱导荧光增强的原理; (g) 蝎型探针的原理。

2.3 第三代荧光探针:基于遗传编码的荧光RNA 适配体和荧光DNA适配体

为了开发低成本、高通量、快速的检测核酸代

谢相关酶的方法,研究者们进行了一些新的探索。 荧光蛋白可在基因水平上进行遗传编码,并在细胞 自身生化反应机制下产生荧光。将荧光蛋白与目标

·1049·

蛋白融合可以帮助研究人员"照亮"目标蛋白,揭示目标蛋白在活细胞与活体中的各种行为,为研究 细胞内蛋白质在生命活动中的作用提供技术支持,即应用荧光蛋白检测蛋白质的代谢过程,以及蛋白 质代谢相关酶的活性。受到荧光蛋白的启发,基于 荧光核酸适配体的检测方法被开发出来以应用于对 核酸代谢酶活性的研究。

何谓"荧光核酸适配体"?荧光核酸适配体指 的是通过合成生物学技术得到的可以与荧光团染料 特异性结合并可以激活染料荧光的一类核酸适配 体^[81]。荧光核酸适配体在自然界中并不存在,必 须通过人工合成与筛选的方式得到^[82-83]。筛选荧光 核酸适配体所使用的技术为指数富集的配体系统进 化技术(SELEX)。研究人员构建出长度 20~100 nt (丰富度可以达到10¹⁴~10¹⁵)的单链寡核苷酸文库, 随后需要依次经过与靶标(染料小分子)的孵育、 洗杂、洗脱、富集、次级文库的制备等多个步骤作 为一轮筛选,一般经过6~15轮的筛选后即可得到 与靶标特异性结合的序列。核酸具有制备简便、结 构修饰容易、选择性高、亲和力强等多种优势。荧 光核酸适配体按照其化学本质可以分为荧光 RNA 适配体和荧光 DNA 适配体。

2.3.1 荧光RNA适配体

荧光 RNA 适配体孔 雀石绿适配体 (MG aptamer)由 Grate 和 Wilson^[84]于 1999年报道。染料 MG 结合与该适配体结合后,其最大吸收波长产生了 14 nm 的红移。2003年,Babendure 等^[81]发现 MG Aptamer 可以结合孔雀石绿 (MG)及其衍生物并显著增强它们的荧光,荧光激活倍数有的可达 2 300 倍以上,据此提出了荧光核酸适配体这一概念。本文对已报道的荧光 RNA 适配体及其发色团按照复合物的发射波长进行了总结 (图3)。研究者们基于传统染料如 Hoechst、噻唑橙、二甲基吲哚红和磺基罗丹明 B 等开发了诸如 Hoechst 1c^[85]、Mango^[86]、Peach^[87]、DIR2s-apt^[88]、o-Coral^[89]和 SRB-2^[90]等 RNA荧光适配体。

2008年, Sando等^[85]合成了一种Hoechst衍生物Hoechst1,随后筛选获得了该染料的RNA适配体I-mini3-4,其荧光激活倍数近30倍,平衡解离常数($K_{\rm D}$)为35 nmol/L。Dolgosheina等^[86]在2014年筛选得到了可以特异性识别并结合TO1的RNA适配体Mango。Mango以很高的亲和力($K_{\rm D}$ =3 nmol/L)结合TO1-biotin并发出黄色荧光,结合TO1的衍生物TO3-Biotin产生红色荧光。2008年,



Fig. 3 Fluorescent RNAs and fluorophore ligands 图3 目前已有荧光RNA适配体及其荧光团配体

图中以配基荧光团:适配体的形式列出,以彩色细线表示其发射 波长。例如MG:MGA表示以MG荧光团为配基的适配体MGA收 到激发时的发射波长为650 nm。

Constantin 等^[91] 筛选获得了称为 DIR-Apt1 的 RNA 适配体,它与 DIR 结合的 $K_{\rm D}$ 为 86 nmol/L,复合物 发出明亮的红色荧光。2017年,Tan 等^[92] 筛选获 得了另一种可以特异性结合 DIR 染料的 RNA 适配 体 DIR2s-Apt,亲和力为 966 nmol/L。

基于荧光蛋白的生色团具有小分子质量、电中 性、背景荧光弱的特性,研究人员期望获得类似荧 光蛋白性能的"拟荧光蛋白 RNA",即用一个 RNA 适配体去结合、包裹并激活生色团的荧光。目前已 报道的荧光 RNA 适配体及其配体在光谱上的分布 如图 3。2011年, Jaffrey 研究团队^[93]模拟 GFP 荧

光团 HBI 合成了染料分子 DFHBI 及其 RNA 适配体 Spinach。DFHBI在没有结合 Spinach 时的背景荧光 很低,结合 Spinach 之后相对荧光强度较高,平衡 解离常数 $(K_{\rm D})$ 为 537 nmol/L。由于 Spinach 热稳 定性差,亮度很低,研究者们相继研究出 Spinach2^[94]、Broccoli^[95]、iSpinach^[94]和 Baby Spinach^[96]的RNA适配体,提高了它们的亮度和 热稳定性还降低了其对离子浓度的敏感性并缩小了 它的尺寸。然而由于DFHBI及其类似物极易发生 顺/反光异构化,因此以其为荧光团开发的荧光 RNA大多存在较为严重的光猝灭现象。2017年, 科学家们在 RFP 的荧光团基础上设计了新的染料 分子 DFHO。通过体外筛选得到了选择性结合 DFHO的RNA适配体Corn^[97]。Corn分子体积小(~ 30 nt), 但其光稳定性优于 Spinach 和 Broccoli, 可 以提供高精度的定量结果。这充分说明,光稳定性 取决于染料分子与RNA适配体形成的复合物,而 不仅仅取决于染料分子。这些荧光RNA适配体与 染料分子结合后亮度较低,且亲和力较弱、热稳定 性较差、容易错误折叠,且 Spinach、Broccoli 和 Com不具备生物正交性。

2019年,杨弋课题组与朱麟勇课题组^[98]构成 的联合攻关团队在荧光RNA适配体领域取得了突 破性进展,他们基于全新的分子设计理念设计合成 了全新的荧光团分子HBC。HBC是结构上具有乙 烯桥的分子转子。在自由溶液中,分子转子受激发 时获得的能量主要通过围绕乙烯桥旋转运动进行非 辐射衰减,因此HBC在水溶液中几乎没有荧光; 当分子转子被蛋白质或核酸结合时,乙烯桥的运动 会被限制,受激发时获得的能量会通过产生荧光的 方式进行辐射衰减。Pepper是能够特异性结合并激 活HBC的RNA适配体。Pepper对HBC有着很强的 结合力, K_n为3.5 nmol/L,结合后的荧光增强倍数 超过3000倍。另外,其热稳定性好,光谱涵盖绿 色(485 nm)到红色(620 nm)的荧光波段,为 实现多种RNA代谢酶活性检测以及多色检测提供 了应用前景。此外,HBC有着极低的细胞毒性且 容易进入细胞,相对于Broccoli和Corn, Pepper在 大肠杆菌细胞和哺乳动物细胞中的荧光亮度要高一 个数量级以上。因此Pepper系列荧光RNA适配体 也为活细胞中研究目标RNA的功能提供了极具价 值的工具。

基于荧光 RNA 适配体的应用分为体内成像与 体外检测两种。基于核酸代谢相关酶的活性研究主 要集中在体外的检测,上述荧光 RNA 适配体可被 用于构建无标记的生物传感器,相较于早期的方法 能够实现更加简便、灵活和高灵敏的检测。譬如早 期在体外检测转录的方法很大程度上依赖于放射性 核苷酸的掺入或基于杂交的方法检测转录过程以及 转录酶的活性。近年来,将蛋白质输入直接转导至 核酸输出是一种提高蛋白质检测灵敏度的创新策 略,因为它可以进一步整合多种核酸扩增技术,如 环介导等温扩增(LAMP)、链置换扩增(SDA)、 杂 交 链 式 反 应 (HCR) 和 滚 环 扩 增 (RCA)^[99-102]等。

2.3.2 荧光DNA适配体

相比于荧光RNA适配体,荧光DNA适配体具 有更好的稳定性,因此在生物分析和细胞外分子成 像中具有更广泛的应用。与荧光RNA适配体的发 展相比,荧光DNA适配体的发展较为缓慢,基于 荧光DNA适配体构建小分子或蛋白质等生物传感 器的报道较少。

很多已知的G四联体DNA比如EAD、c-Myc、 c-kit2、 bcl-2、 c-kit1、 Kras、 T95、 TBA、 Hras、 HTG-21、Telo21、Oxy、Hum 21, 如花菁染料、 三苯基甲烷染料、咔唑、卟啉等这些荧光染料配体 在与这些G四联体 DNA 结合后荧光被显著增 强^[103]。不同分子与G四联体的结合位点不同,荧 光响应机制也不同。根据不同的折叠拓扑结构,G 四联体可以识别凹槽中的小分子,并将小分子堆叠 在凹槽的顶部或底部上,或者允许小分子插入G四 联体的平面之间。静电力、范德华力、氢键、π-π 堆积和其他非共价相互作用共同稳定了G四联体与 染料配体之间的结合。大多数G四联体的配体都含 有一个平面芳香核,其通过π-π堆积与外部G四联 体相互作用,侧链通过氢键与DNA碱基和环的磷 酸骨架相互作用后形成稳定的复合物。Jin 等^[104] 设计并开发了 V 型染料 BPBC。BPBC 在水性缓冲 液条件下几乎没有荧光,与平行G四联体(EAD、 c-Myc、c-kit 2等)结合后荧光增加 330~1 800 倍, 与单链或双链DNA结合后荧光仅增加约30倍,与 反平行G四联体结合时增加30~110倍。G四联体 共有3种结构类型:平行G四联体、反平行G四联 体和混合型G四联体,常见G四联体的序列及其结 构类型见表4。

除了表4中所列举的一些已报道的G四联体可 以与通用的G四联体特异性染料结合后产生荧光激 活的DNA外,还有一些是经过严格的SELEX筛选

·1051·

表4 常见的G四联体的序列及其结构类型				
名称	序列5'→3'	结构类型		
c-Myc	GGGTGGGTAGGGTGGG	平行G四联体		
TT3T	GGGTGGGTTTGGGTGGG	平行G四联体		
c-Kit2	CGGGCGGGGCGCGAGGGAGGG	平行G四联体		
Hum12	TTAGGGTTAGGG	平行G四联体		
Hum21	GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG	反平行G四联体		
TBA	GGTTGGTGTGGTTGG	反平行G四联体		
Oxy28	GGGGTTTTGGGGGTTTTGGGGG	反平行G四联体		
Oxy12	GGGGTTTTGGGG	反平行G四联体		
HT 22	AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG	混合型		
22AG (in K+)	AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG	混合型		

 Table 4 Common sequences of G-quadruplex and their structural types

 表4
 常见的G四联体的序列及其结构类型

和结构优化而得到的只针对某种染料具有激活效果的特异性荧光DNA适配体,它们之中有G四联体也有非G四联体。Sando等^[105]于2007年报道了第一个荧光DNA适配体并命名为Class1-1-mini,其可以与常规的DNA染料Hoechst的衍生物产生近200倍的荧光增强。自2007年至今,已有报道的荧光DNA适配体共有13条,适配体大小在18~99 nt之间。根据文献的报道把目前已有的荧光DNA适配体进行了归纳整理^[104-116](表5)。在荧光DNA适配体的筛选工作中,裴仁军研究员团队的工作比较突出,在已报道的13条适配体中,有8条出自该团队,分别是MG.1-3、BBR4S3、ThT.2-2、DIR2-1、CV30S、Nm1、Nm2和ZnP1.2。这些荧光DNA适配体所使用的染料分别为孔雀石绿、小檗碱、硫磺素T、DIR、结晶紫、N-甲基卟啉二丙酸 IX等常见

的核酸染料^[110, 112-116]。达泊氧磺酰乙二胺(SEDA) 和达泊氧磺酸(SA)是达泊氧染料的两种衍生物。 DAP-10-42可以同时激活 SEDA 和 SA 两种染料分 别722倍和35倍,由于其与染料的较高亲和力,常 被用来设计为生物传感器^[107]。Jaffrey团队^[111]于 2022年报道了一种荧光 DNA 适配体适配体 Lettuce,可以有100倍左右的激活效果,其激活的 染料是 DFHBI-1 T,与作为荧光 RNA 适配体的 Spinach 的染料 DFHBI 相似,都是模拟 GFP荧光团 HBI 的染料分子。聂舟团队^[117]报道了一组类似于 RFP 发色团的全新多色发色团的设计,证明了 G四 联体可以将 DFHBFSI 等 RFP 发色团类似物封装入 G 四联体形成的空隙空间中,其激发波长跨越了 583~668 nm,几乎覆盖了整个 RFP 家族的荧光 波段。

Table 5 Fluorescent DNAs and fluorophore ligands 表5 目前已报道的荧光DNA适配体及其荧光团配体

名称	碱基数	配体	激活倍数	$K_{\rm D}/(\mu {\rm mol}\cdot{\rm L}^{-1})$	参考文献
Class1-1-mini	25	Hoechst衍生物	191	0.878	[105]
DAP-10-42	42	dapoxyl SEDA	722	0.007 6±0.001 2	[109]
MG.1-3	26	MG	8.17	2.43±0.39	[115]
BBR4S3	21	Berberine	<10	$5.93{\pm}0.59$	[114]
ThT.2-2	33	ThT	119	4.17±0.5	[113]
DIR2-1	42	DIR	140	0.65 ± 0.17	[112]
NG16	16	DFHBFSI	75	$1.27{\pm}0.11$	[117]
CV30S	44	CV	<10	$0.49{\pm}0.04$	[107]
Nm1	42	NMM	24	0.75	[116]
Nm2	46	NMM	19	13.27	[116]
ZnP1.2	41	NMM	28	1.35 ± 0.17	[110]
Apt5.9-32	24	ThT	90	6 ± 2	[108]
Lettuce	99	DFHBI	100	0.35	[111]

本文整理了目前已有的荧光DNA适配体及其 配体在光谱上的分布(图4a)以及各荧光DNA适 配体的二级结构的模拟结果(图4b)。相较于荧光 RNA适配体领域已开发出Spinach、Broccoli和 Pepper等一批性质优秀的适配体而言,目前荧光 DNA适配体的发展仍不足,尚有需要改善的空间, 比如进一步开发出碱基数少、分子质量小、高荧光 激活倍数且高亲和力的适配体。而且需要注意的 是,荧光核酸适配体通常需要镁离子的激活,但是 不同的荧光核酸适配体对于镁离子的需求浓度不 同,因此开发出低镁离子依赖以及镁离子不依赖的 荧光核酸适配体亦是未来的发展需求。



Fig. 4The spectral distribution (a) and secondary structure (b) of fluorescent DNAs图4目前已有荧光DNA适配体的光谱分布(a)及二级结构(b)

综上,荧光核酸适配体领域中已有一批荧光 DNA适配体和荧光RNA适配体被开发并用作分子 生物学研究的新工具,其中一项重要的应用就是目 前基于荧光DNA适配体和荧光RNA适配体的探 针。探针的设计策略主要是将荧光核酸适配体的序 列设计在检测体系之中,将目标酶的催化作用与荧 光核酸适配体的合成或降解相关联,使作为输出信 号的荧光上升或下降,同时可结合纳米技术、核酸 扩增技术等实现信号的级联放大,大大提高荧光核 酸适配体的检测灵敏度,这对于高通量药物筛选、 体外诊断、预后监测等多个领域都具有重要意义。

3 基于荧光法的核酸酶学分析探针的应用

基于荧光法的核酸酶学分析探针在核酸检测、 RNA代谢检测以及各种核酸代谢相关酶的活性分 析等多个领域展现出其强大的优势。相关领域的检测会随着荧光法的更新与迭代,不断提高探针检测的灵敏度、特异性和通用性。研究者可以通过加入非特异性核酸染料来实现单色的实时荧光检测(图 5a),该方法是有效的,但是不能提供多重靶核酸的即时检测,且具有较高的背景荧光。

基于FRET原理的第二代荧光法通过标记多种 颜色的荧光基团,克服了核酸染料不能检测多重核 酸的局限。这其中最著名的方法是分子信标法^[59]。 这种方法可以简单快速地检测靶标序列^[72-73](图 5b)。然而分子信标法的问题在于它需要至少合成 含有两种不同小分子共轭物即荧光染料和猝灭剂的 发夹寡核苷酸,且为了准确鉴定靶核酸中的关键序 列能特异性地与分子信标杂交而不与检测样品中其 他相似序列杂交,需要设置多组多色的分子信标, 这需要花费大量的时间和人力,增加了检测成本。



(a) 核酸染料作用示意图; (b) Taqman探针作用示意图; (c) 分裂Lettuce作用示意图。

基于荧光核酸适配体原理的第三代荧光法对核 酸的检测有多种策略,有的研究者们通过对荧光 DNA适配体(如Lettuce)和荧光RNA适配体(如 Pepper、Spinach、Broccoli)进行修饰,使其在5' 和3'端含有侧翼序列,这些序列可与靶核酸序列杂 交^[94-95, 111, 118-120]。通过对荧光核酸适配体进行修饰 或者将荧光核酸适配体分裂成两个无荧光的RNA, 缩短关键螺旋茎降低其热力学稳定性,使荧光核酸 适配体无法折叠。当侧翼序列与靶核酸结合时,适 配体可以折叠并产生荧光,大大提高了该方法的特 异性。也有研究者将荧光核酸适配体技术与等温扩 增技术相结合,实现恒温下信号的级联放大实现高 特异性和高灵敏度的miRNA检测。随着技术的不 断发展,等温扩增技术已经形成了一个庞大的家 族,包括滚环扩增 (RCA)、指数扩增反应 (EXPAR)、杂交链式反应(HCR)、催化发夹装配 (CHA)、链置换扩增(SDA)、双链特异性核酸酶 信号扩增(DSNSA)及其环介导等温扩增 (LAMP) 等,这些技术的实现主要依赖于酶的聚 合作用、水解反应或无酶链替换过程[121-125] (图5c)。

荧光法在核酸检测和RNA代谢、DNA代谢相 关酶活检测方面发挥着重要作用,为分子生物学和 生物医学工程方面提供了重要的支持。接下来,将 以T7 RNA聚合酶、甲基转移酶和T4多核苷酸激 酶等为例,具体讨论三代荧光检测法的区别与 联系。

3.1 T7 RNA聚合酶的活性检测

T7 RNA 聚合酶(T7 RNA polymerase, T7 RNAP)可催化从 5'到 3'方向的 RNA 合成。T7 RNAP已广泛应用于原核生物和真核生物中的高水 平基因表达,也被用于 RNA干扰、 RNA编辑、合成基因电路、构建 Vaccinia/T7 混合系统等。T7 RNAP 是体内和体外方法中广泛使用的最重要的酶之一,检测 T7 RNA 聚合酶的活性对于分子生物学和生物工程领域具有重要意义^[126]。

3.1.1 基于核酸染料法的酶活性检测

SYBR Green II 是可以非特异性结合 RNA 的核酸染料,有研究者使用该染料对 T7 RNA 聚合酶突变体文库进行高通量筛选:加入修饰的 NTP 底物和含有 T7 启动子的双链 DNA 模板进行转录,转录后使用 DNA 核酸酶 I 消化模板,加入 RNA 染料 SYBR Green II,只有成功转录产生产物的孔会被检测到荧光,最后获得了一个对 2-甲基硒修饰的

NTP 耐受度更高的 T7 RNA 聚合酶突变体。该方法 直观简单,但是具有较高的背景荧光(图 6a)。

3.1.2 基于FRET原理的荧光探针法的酶活性检测

有研究者使用 T7 RNA 聚合酶将荧光 rU_{Thie}TP 残基直接掺入 RNA 中,随后用 T7 RNA 聚合酶将 rU_{ami}TP 残基直接引入 RNA 中,然后与亚基丙二腈 烯胺(P3)反应。所得到的多重标记 RNA 在 RNA 中的两个荧光标记之间表现出 FRET,当 RNA 从单 链结构转化为 G 四联体时,FRET 信号强度增加。 这种使用 RNA 聚合酶将位点特异性 FRET 标记到 RNA 中的方法提示了在 RNA 中的预定位置进行其 他不同位点特异性修饰的可能性(图 6b, c)。还 有研究者利用 T7 转录期间从起始到延伸转变过程 中的构象变化,使得供体和受体之间的距离发生改 变,从而发生荧光的变化。这种方法相比于核酸染 料法大大提高了特异性,但是由于需要体外合成或 引入荧光团等,操作复杂^[126-127]。

3.1.3 基于荧光核酸适配体法的酶活性检测

研究者将荧光 RNA 适配体引入 T7 RNAP 活性的检测方案,将 Broccoli的反向互补序列设计在转录模板中。当 T7 RNAP 不存在时,体系中不会有荧光 RNA适配体的产生即不会有荧光;当 T7 RNA 聚合酶存在时,随着转录产物 Broccoli不断产生, 荧光信号逐渐增强,并且荧光信号的强弱与 T7 RNAP 的活性关联。这种方案可以方便地应用于各种噬菌体来源的体外转录系统,并为开发更优的体 外转录系统提供平台(图 6d)。该方法无需化学合成、体外标记等操作,简化了实验步骤,且由于荧 光 RNA 适配体的高荧光激活倍数使得该方法的检 测灵敏度极高^[128]。

3.2 甲基转移酶的活性检测

DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNA MTase)能够将甲基 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM)迁移到目标腺嘌呤 或胞嘧啶残基,从而在DNA 识别中发挥重要 作用^[129]。

3.2.1 基于核酸染料的酶活性检测

研究者结合甲基化特异性和基于 SYBR Green 的荧光定量 PCR 进行 O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转 移 酶 (O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase, MGMT) 启动子甲基化分析。这种技术是一种高 度特异性、灵敏且可重复的方法,它不仅可以定量 测定完全甲基化的序列,而且可以根据百分比定量 测定完全未甲基化的亚硫酸氢盐转化的 MGMT





(a) 基于核酸染料法的T7 RNA聚合酶活性检测示意图;(b) 基于FRET原理的荧光探针法的T7 RNA聚合酶活性检测示意图;(c) 基于 FRET原理的构象变化法的T7 RNA聚合酶活性检测示意图;(d) 基于荧光核酸适配体法的酶活性检测示意图。

DNA种类。该方法操作复杂,耗时长,且只能检测单重信号^[130]。

3.2.2 基于FRET原理的荧光探针的酶活性检测

研究者通将分子信标与酶促级联反应相结合,利用甲基转移酶与核酸内切酶(如 DpnI和 Nt.AlwI)的序列识别特异性,将限制性内切酶识

别位点设计到模板中,在甲基转移酶存在时触发切 割效应伴随荧光增强,当甲基转移酶不存在时荧光 不增加(图7b)。该方法对于人体无损伤,检测时 间短,特异性强,可以设置多重荧光检测^[131]。 **3.2.3** 基于荧光核酸适配体的酶活性检测

检测原理与基于FRET 的荧光探针法类似,不

同点在于,荧光核酸适配体法中无需再添加化学合成的含有荧光团标记的探针,而是利用G四联体形成的DNA酶与凝血酶的显色反应而实现甲基转移酶活性检测策略(图7a),原理简单,而且该方法中G四联体序列可以替换为荧光强度更高的

NG16、CV30S、ZnP1.2、Apt5.9-32或者Lettuce等 荧光DNA适配体,该方法是一种具有通用性的原理简单、操作容易、无标记的检测甲基化酶活性的方法^[132]。



 Fig. 7
 Schematic diagram of methyltransferases activity detection based on fluorescence method

 图7
 基于荧光法的甲基转移酶活性检测示意图

(a) 基于G四联体的甲基转移酶活性检测示意图;(b)基于FRET的甲基转移酶活性检测示意图。

3.3 T4多核苷酸激酶的活性检测

T4 多核苷酸激酶(T4 polynucleotide kinase, T4 PNK)可以促进核酸5⁻端的磷酸化,参与细胞 修复受损的DNA。有研究表示DNA连接酶和多核 苷酸激酶的活性与癌细胞的转移相关,因此针对它 们的活性研究是很有必要的。

3.3.1 基于核酸染料的酶活性检测

研究者于2018年开发出一种使用SYBR Green I 核酸染料的DNA 连接酶和磷酸激酶触发的超分支 滚环扩增(HRCA)荧光检测平台,在这个体系下 如存在 T4 PNK便可以将所示探针环化,并作为模 板开启 HRCA,产生大量双链 DNA,其与 SYBR Green I结合后荧光显著增强(图8a, b)。

3.3.2 基于FRET原理的荧光探针的酶活性检测

研究人员开发了一种一步法、灵敏快速的荧光 分析 T4 PNK 活性的方法,该方法采用环状分子信 标荧光探针(图 8c)。在 T4 PNK 存在的情况下, 与探针互补的两个短寡核苷酸中的一个被磷酸化, 导致 DNA 连接酶促进与另一个寡核苷酸的连接, 在连接的 DNA 和分子信标之间形成稳定的双链后 构成了完整的切刻酶酶切位点,伴随着切刻酶的辅 助作用,荧光信号得以产生和富集^[133]。同时,研 究人员们又开发了一种结合核酸外切酶活性和基于 分子信标的 T4 PNK 活性检测策略,该方法是在赵 美萍等^[134] 首次提出的 T4 PNK 酶活性检测方法的 基础上进行的改进和优化(图 8d)。在这种方法 中,发夹探针被 T4 PNK 磷酸化,然后立即被λ外 切酶切割, DNA 片段得以释放,释放后的 DNA 片 段与分子信标1(MB1)杂交,导致荧光增强。同 时,引入分子信标2(MB2)结合在互补域 MB1 中,导致 T4 PNK 传感的荧光信号放大^[135]。

3.3.3 基于荧光核酸适配体的酶活性检测

底物为5'端和3'端均为磷酸基团修饰的单链寡 核苷酸,T4 PNK 在缺失 ATP 并且存在 ADP 的情况 下,T4 多聚核苷酸激酶可以显示出磷酸酯酶的活 性,可以将3'端的磷酸基团切除留下羟基,在末端 脱氧核苷酸转移酶和富含脱氧鸟苷三磷酸的脱氧核 苷三磷酸底物存在的情况下引发聚合反应^[136],所 得延长的DNA可形成G四联体,当使用硫黄素T 作为G四联体特异性荧光染料时会产生强烈的荧光 信号^[137](图8e)。



 Fig. 8
 Schematic diagram of T4 polynucleotide kinase activity detection based on fluorescence method

 图8
 基于荧光法的T4 多核苷酸激酶活性检测示意图

(a, b)利用SYBR Green I核酸染料,由酶触发的超分支滚环扩增(HRCA)荧光检测法;(c)利用环状分子信标荧光探针;(d)利用双分子信标荧光探针;(e)利用G四联体荧光核酸适配体的检测法。

3.4 脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶1的活性检测

脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶1 (apurinic/ apyrimidinic endonuclease 1, APE1),又称氧化还 原因子1 (Ref-1),是人体必需的基因调控蛋白和 DNA修复蛋白^[138]。作为最重要的DNA修复酶, APE1作用于双链DNA(dsDNA)中的脱嘌呤/脱 嘧啶位点(AP位点)并启动碱基切除修复(BER) 通路^[139-140]。APE1还可以通过其氧化还原功能调 节许多转录因子的DNA结合活性。以往研究表明, 人体血液中APE1含量的异常变化和组织细胞与多 种疾病有关,例如前列腺癌^[141]、肺癌^[142]、卵巢 癌^[143-144]和膀胱癌^[145]。因此开发出有效检测APE1 的酶活性方法对于癌症诊断、预后监测和抗癌药物 筛选均具有重要意义。

3.4.1 基于FRET原理的荧光探针法的酶活性检测

研究人员们构建了一种含有硫代磷酸化修饰的 AP 位点的 DNA 探针^[146],其在 AP 位点 3'端的第4 个碱基和 AP 位点 5'端的第5个碱基分别标记猝灭 基团 和荧光基团,当不存在 APE1 酶时,基于 FRET 原理,荧光被猝灭基团猝灭,在 APE1 存在 的情况下,AP 位点的 5'端的脱氧核糖-磷酸主链将 被快速切割裂解,含有荧光团的短链被释放从而可 以检测到荧光(图 9a)。该方法无需额外的清理或 预处理步骤,简单快速,一步完成,线性工作范围 为 0.1~5.0 U/ml,检测下限为 0.1 U/ml。该方法的 灵敏度有限。

随后有研究人员,优化设计了新的检测探针, 开发出TdT和Endo IV辅助的双信号放大测酶活力 的方法(图9b)。他们设计了3'端进行氨基修饰含 有AP位点发夹状的DNA,当APE1存在时,其可 以切除发夹 DNA 底物上的 AP 位点, 生成 3'-OH 端,此时TdT可以在3'端继续延伸,通过添加三磷 酸脱氧腺苷(dATP)使得底物产生大量的poly-A 尾。此时,含有荧光基团和猝灭基团的poly-T探针 (猝灭状态)可以大量地杂交在 poly-A 尾。随后高 温加热将 APE1 和 TdT 失活并加入内切酶 IV (Endo IV) 来切割AP位点,产生带有荧光基团的 短链,随着其与猝灭基团的分离而发出荧光。当体 系中不存在APE1时,3'端的氨基修饰阻断了末端 脱氧核苷酸转移酶(TdT)的延伸,后续反应不发 生。该方法具有高灵敏度和高选择性,该方法的检 测下限为1.7×10-3 U/L。

3.4.2 基于荧光核酸适配体的酶活性检测

研究人员开发出基于聚合酶和切刻酶共同辅助 的等温扩增方法来检测 APE1 酶的活性。在发夹结 构探针中设计 AP 位点,当 APE1 存在时,产生 3'-OH 端此时 在聚合酶克列诺片段(Klenow Fragment)的作用下将模板的发夹结构打开,聚合 成双链 DNA,产生了切刻酶的酶切位点,伴随着 切刻酶与聚合酶的作用下,促进G四联体短链的指 数生成,G四联体可以与NMM结合发出荧光(图 9c)。该方法具有高灵敏度,检出限为6 U/L^[147]。 但是在此方法中没有测试其他非特异性核酸内切酶或核酸外切酶的干扰。

最近,研究人员们开发了一种基于滚环扩增结 合G四联体的高灵敏度和无标记地检测APE1的新 方法。标记有AP位点的发夹探针可以被APE1识 别并切割,导致引物序列的释放从而启动RCA反 应(图9d)。RCA的模板上含有G四联体的反向互 补序列,因此反应中不断产生含有串联的G四联体 结构的长链扩增产物,产物可与硫黄素T(ThT) 结合产生荧光,实现APE1的高灵敏度无标记检 测。该方法的检出限低至1.52×10⁻³ U/L。

3.5 端粒酶的活性检测

端粒酶是一种逆转录酶,其本身是一种大型核 糖核蛋白复合物,负责在线性染色体的3'端逐步合 成端粒DNA重复序列(TTAGGG),从而逆转每一 轮复制中的DNA丢失^[148]。且最近的研究报道, 除了维持端粒外,端粒酶还参与基因表达调控、细 胞增殖、细胞凋亡、WNT/β连环蛋白信号、NF-κB 信号、MYC驱动的肿瘤发生、DDR、细胞黏附和 迁移、上皮-间质转化等活动^[149-152],这些端粒酶的 功能与肿瘤的发生过程有重要联系。因此,作为一 种通用的肿瘤生物标志物,研究端粒酶的活性和抑 制作用对于癌症的诊断和治疗具有重要意义。

3.5.1 基于核酸染料法的酶活性检测

传统的TRAP测定需要进行聚丙烯酰胺凝胶电 泳和放射自显影,以此使典型的六碱基产物阶梯可 视化,并在光密度测定后定量端粒酶活性。研究者 结合了SYBR Green的荧光定量PCR与传统的端粒 重复扩增方案(TRAP),优化了实时定量的TRAP 测定^[153],但其应用受到扩增相关的错误和耗时程 序的限制。

3.5.2 基于FRET原理的荧光探针法的酶活性检测

为了解决基于 PCR 的局限性, 双扩增荧光测 定法被用于无 PCR 检测端粒酶活性^[154]。检测平台 应用了一种拱形结构 DNA 探针来专门控制链置换 反应和随后的酶辅助扩增。端粒酶底物引物被端粒 酶延伸形成含有多个 TTAGGG 重复单元的长延伸 产物。因此,一个延伸产物可以通过链置换反应释 放出多个触发 DNA (t-DNA),从而实现第一次扩 增。随后,t-DNA 特异性地打开分子信标以恢复荧 光。同时,t-DNA 在切口核酸内切酶的帮助下循 环,不断打开越来越多的分子信标,实现二次扩 增。该方法能够测定相当于5个 HeLa 细胞或10个 CCRF-CEM 细胞的端粒酶活性。





(a)利用含有硫代磷酸化修饰的AP位点的荧光探针;(b)利用TdT和Endo IV辅助的双信号放大荧光探针;(c)利用Klenow片段合成的G四 联体荧光核酸适配体的检测法;(d)基于滚环扩增合成的G四联体荧光核酸适配体的检测法。

3.5.3 基于荧光核酸的酶活性检测

研究团队研发了"DNA机器",它是一款由T7 核酸外切酶(T7 Exo)、无标记识别分子信标 (RMB)和具有突出5'端的信号分子信标(SMB) 组成的探针,用于端粒酶活性的灵敏检测^[155]。首 先,端粒酶延长端粒酶底物(TS)引物,产生具 有串联重复序列(TTAGGG)n的端粒酶延长产物 (TEP)。EP通过与RMB杂交激活DNA机器,展开 具有凹陷5'端的RMB,使RMB从T7 Exo脱出, 发生T7 Exo辅助循环切割,从而释放完整的TEP 和大量DNA片段(触发DNA)。随后,触发DNA 特异性打开SMB并被T7 Exo回收,释放出多个 G四联体(G4)结构。最后,TEP和释放的G4结 构与N-甲基-中卟啉IX(NMM)强烈相互作用后 产生显著增强的荧光。以这种方式,每个端粒酶介导的延伸事件被有效地转化为放大的荧光信号。该检测方式能够测量相当于50个HeLa细胞/ml的端粒酶活性,线性范围为50~2000个细胞/ml,相较其他方式大大提高了灵敏度。

3.6 8-羟基鸟嘌呤DNA糖基化酶的活性检测

由 ROS 促成的氧化产物 8-羟基鸟嘌呤 (8-oxoG)是DNA中发现的最普遍的碱基损伤。 8-羟基鸟嘌呤DNA糖基化酶(OGG)是一种关键 的碱基切除修复(BER)酶,可以识别 8-oxoG并 从DNA中切除^[156]。OGG的表达水平与多种人类 癌症密切相关,包括肺癌、胃癌、胆囊癌和膀 胱癌^[157-160]。

3.6.1 基于核酸染料法的酶活性检测

研究者开发了一种简单的混合读取测定法,使用多重循环酶促修复扩增来灵敏检测hOGG1^[161]。hOGG1活性产生一个AP位点,AP位点会被脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶1(APE1)切割,产生带有游离基团的底物片段3'-OH端。底物片段可以启动循环酶促修复扩增,指数级地产生触发器,并使用SYBR Green II作为荧光染料可以简单地检测扩增产物。该方法可以灵敏地测量hOGG1,检测限为2.97×10⁻² U/L。

3.6.2 基于FRET原理的荧光探针法的酶活性检测

研究者开发了一种基于自主核酸外切酶III (Exo III) 辅助信号放大的酶活性检测技术,构建 了用于hOGG1活性检测的新型高灵敏度荧光生物 传感平台^[162]。发卡探针HP1在8-oxoG位点被切割 并被Exo III消化,释放触发DNA片段(tDNA1)。 tDNA1与发卡探针HP2部分杂交,启动Exo III循 环切割,释放另一个触发DNA片段(tDNA2),进 而触发DNA荧光探针(FP)的循环切割,从而释 放大量荧光信号,用于hOGG1活性检测。基于荧 光探针的酶活检测具有高灵敏度以及良好的选择 性,直接测量检测限低至1U/L,并具有等温实验 条件、简单和方便的优点。

3.6.3 基于荧光核酸的酶活性检测

研发团队报道了一种利用 λ 外切核酸酶切割进行 DNA 糖基化酶活性测定的方法^[163]。hOGG1选择性地切割含有 8-oxoG的DNA 双链体时,能够生成具有 5'-PO4端的新DNA 双链体,从而被 λ 外切核酸酶消化,释放出游离的G四联体单链,并与血红素结合形成具有催化活性的G四联体-血红素DNAzyme。DNAzyme可以催化形成ABTS⁻,因此hOGG1的活性能够通过紫外-可见光指示吸收强度来进行灵敏的定量测定,线性范围从0.05~32 U/ml,检测限0.01 U/ml。

3.7 尿嘧啶DNA糖基化酶的活性检测

尿嘧啶 DNA 糖基化酶(UDG)是一种高度保 守的损伤修复蛋白,能够通过糖基化酶活性启动碱 基切除修复途径,切除尿嘧啶碱基^[164]。UDG 在维 持细胞周期调控、细胞凋亡、病毒增殖等基因组完 整性方面起着关键作用^[165]。DNA 糖基化酶的异常 表达与人类多种疾病密切相关,如人类免疫缺陷、 布卢姆综合症、癌症等^[166-169]。因此,UDG 的检测 对于研究许多基本生化过程的机制和功能以及疾病 诊断尤其重要。

3.7.1 基于核酸染料法的酶活性检测

在众多基于核酸染料法中,研究者们为更精确的UDG检测方式设计了各种核酸扩增的方式,包括杂交链式反应(HCR)^[170]、催化发夹组装(CHA)^[171]、指数扩增反应(EXPAR)^[172]、链置换扩增(SDA)^[173-174]和滚环扩增(RCA)^[165, 175-176]。但这些方法往往伴随着复杂的探针设计和反应步骤。其中,自启动多重RCA法获得的检测灵敏性较高^[165],线性范围为0.05~1.25 U/L,检出限为1.7×10⁻² U/L。

3.7.2 基于FRET原理的荧光探针法的酶活性检测

多个研究团队设计了利用分子信标检测尿嘧啶 -DNA糖基化酶(UDG)的策略。2007年时,就有 研究团队利用FRET原理检测UDG酶活^[177]。双链 探针由P1和P2两条反向互补链组成:一条标记 DABCYL作为受体,另一条标记TAMRA作为供 体,中间位置有四个尿嘧啶碱基。当UDG添加至 体系中时,具有4个AP位点的P1P2探针因熔化温 度降低而被分离,从而发出荧光信号,低检测限为 33 U/L。虽然这种检测方式较传统方法在灵敏度与 简便性上有所突破,但依旧受限于复杂环境下的不 稳定性。

2014年,研究者报道了一种基于尿嘧啶修饰的分子信标,探针的茎中仅包含两个尿嘧啶碱基(6个碱基对),非常适合作为UDG的底物^[178]。尿嘧啶被切除后,产生的AP位点将显着降低分子信标的熔化温度,并且由此产生的荧光团标记信标与互补链解离,使得荧光显着增加。该方法无需扩增,低检测限为5 U/L。

3.7.3 基于荧光核酸的酶活性检测

研发团队利用G四联体DNAzyme链(GS)被 UDG活性激活的设计,开发了一种比色测定UDG 活性的无酶和无标记策略^[179]。该策略依赖于目标 激活的立足点介导的链置换(TMSD)电路,采用 由含尿嘧啶链(US)和催化剂链(CS)组成的检 测双链探针。样品中存在的UDG会切割US内的尿 嘧啶碱基并破坏检测双工探针的稳定性,释放CS。 游离CS促进TMSD反应,从而释放出最初被阻断 链(BS)笼罩的G四联体DNAzyme链(GS)。大 量GS被UDG活性激活,并且通过释放的GS的过 氧化物酶模拟活性促进的ABTS氧化产生明显的比 色信号。基于这一设计原则,能够非常灵敏且选择 性极佳地检测到UDG活性。通过可靠地测定人血 清中的UDG活性也证明了该测定的实际适用性。 该方法的检测限低至6U/L。

综上,无论是基于荧光RNA适配体的酶活性 检测方法还是基于荧光DNA适配体的酶活性检测 方法,其本质都是一样的,即利用荧光适配体实现 高特异性、高灵敏度、无标记的实时荧光定量检测 酶的活性,且上述体系由于其原理简单、合成容 易、成本低廉、方法特异性强、检测灵敏等优点, 相较于非特异性的核酸染料法以及TaqMan探针法 展现出巨大的优势。因此,基于荧光核酸适配体的 方法具备用于新型高通量药物筛选和临床即时诊断 的高通量分析的潜力和实力。

4 总结与展望

本文从比色法、高效液相色谱法、放射性标记 法、凝胶电泳法、电化学法、酶联免疫吸附法和聚 合酶链式反应法等传统酶活性检测方法讲起,分别 比较了各个方法的优点与缺点。目前这些方法具有 操作复杂、对仪器的要求高、具备放射性危害、灵 敏度低等限制性因素,很难进行高通量、高灵敏 度、高特异性以及低成本的检测。本文将荧光法按 照其发展历史分为荧光染料法、基于FRET原理的 特异性探针法和荧光核酸适配体法(表6),把这3 种荧光检测方法的优势、劣势、代表性研究以及作 用原理进行了整理。

Table 6	Comparison of three fluorescence methods
	表6 三种荧光法比较

方法名称	已应用的酶	优势	劣势	代表性探针	
第一代荧光法非特异性	内切酶G、脱氧核糖核酸酶I、	使用方法简单	特异性低、背景荧	EB、SYBR Green、Gel Red、	
结合双链DNA的荧光	HMGB1蛋白、多核苷酸激酶、DNA		光高	Gel Green、Gel Blue	
染料法	连接酶、T7 RNA聚合酶				
第二代荧光法基于荧光	DNA甲基转移酶、核酸外切酶I、尿	特异性强	操作复杂、很难应	报告基团: FAM、TET、	
共振能量转移原理的特	嘧啶DNA糖基化酶、RNase H、多核		用于活细胞、背景	VIC、HEX; 猝灭基团:	
异性探针法	苷酸激酶、单链特异性核酸酶、核酸		高、需化学合成、	TAMRA, BHQ	
	外切酶III、端粒酶		红外波段很难实现		
第三代荧光法基于遗传	T7 RNA聚合酶、甲基转移酶、	高特异性、高灵敏	不耐高温、对于工	荧光RNA适配体: Spinach、	
编码的荧光DNA适配	cGAMP合成酶 (cGAS)、端粒酶、	度、无标记、低成	作环境中酸碱性及	Pepper、Broccoli; 荧光DNA	
体/荧光RNA适配体法	核酸外切酶III、λ外切酶、多聚核苷	本, 可整合多种核	离子种类、浓度依	适配体: ZnP1.2、CV30S、	
	酸激酶	酸扩增技术	赖性高	DAP-10-42	

基于遗传编码的荧光核酸适配体检测方法的最 大优势就是其原理简单、成本低廉、特异性高、稳 定性强、安全性好以及易于实现高通量等优势。荧 光核酸适配体将会在接下来的时间中,逐渐接过核 酸染料和TaqMan探针的接力棒,为酶活性检测这 一领域开展新的篇章。荧光核酸适配体法在酶学分 析与检测上有着前所未有的热度,不同于无法穿过 细胞膜的核酸染料、需要体外合成的TaqMan等探 针,分子质量小、设计灵活的遗传编码的荧光核酸 适配体可以在活细胞内进行高时空分辨率的成像, 直观地展现活细胞内核酸代谢的精确位置和数量, 为核酸代谢相关酶的体内细胞环境的功能研究提供 更好的机遇。

目前来说,荧光RNA适配体的发展已取得了 长足的进步,并在活细胞成像领域展现出巨大潜 力,评价荧光RNA适配体的性质需要从染料背景 荧光、光稳定性、亲和力以及生物正交性等多方面 进行考察,比如荧光RNA适配体Mango和Pepper 具有较高的亲和力(纳摩尔级别)。然而,已有报 道的生物传感器大多基于早期开发的荧光RNA适 配体,且目前基于RNA相关酶的酶活性检测方法 受限于针对酶作用机制的研究。荧光核酸适配体目 前在应用过程中存在的不足有以下几点。

首先,目前在各个领域,包括酶活检测领域应 用较为广泛的荧光DNA适配体均为G四联体,检 测时加入NMM、TO等G四联体的通用染料。G四 联体是由Hoogsteen氢键连接4个G形成环状平面, 两层或以上的四分体通过π-π堆积形成四联体,因 此链与链之间存在相互作用,当把不同种类的G四 联体放在同一体系中,极易发生分子之间的错误交 联。这样的错误交联一旦发生,一个是无法形成正 确的G四联体结构也就无法检测到荧光。另外,目 前没有只针对某种G四联体染料响应的序列,大多 数的染料均为G四联体结构依赖型的通用染料,例 如研究者们开发出的荧光 DNA 适配体 DAP-10-42 是基于 dapoxyl SEDA 筛选得到的,但是有研究证 明它对多种芳基甲烷类染料均有激活效果,其中对 于 AO^[107] 的激活效果达2070倍,激活倍数高于其 筛选的靶标染料(722倍)。基于上述两个原因, 当前已有的荧光 DNA 适配体很难实现生物正交性, 即同一体系中很难存在2个及以上的不同的 G 四 联体。

其次,应用荧光核酸适配体设计的各种探针, 在其基于荧光核酸适配体的信号输出阶段需要依赖 荧光核酸适配体的正确折叠。荧光核酸适配体发挥 功能需要其形成特定的二级结构,如果二级结构无 法正常形成,那么荧光核酸适配体不能折叠成具有 激活染料功能的二级结构,则无法产生荧光。 Baldrich等^[180]探究了基于适配体的生物传感器在 不同的金属离子浓度、不同温度等条件下受到的影 响。因此,如果溶液中离子浓度、温度、pH等环 境不能满足荧光核酸适配体的要求,则荧光核酸适 配体无法正常折叠,最终会影响荧光强度的检测。

最后,高性能的荧光核酸适配体开发难度极 大,这是目前荧光核酸适配体的应用受限的一大原 因。目前已报道的荧光核酸适配体,尤其是荧光 DNA适配体,其与染料配体结合后的荧光亮度较 低、亲和力较弱等自身固有的性质仍待改 进^[104-116]。研究者们应用荧光核酸适配体进行检 测、分析的过程中,会发现其检测限受到极大的限 制,虽原理简单操作方便,但是基于目前已报道的 荧光核酸适配体很难实现单分子检测。

基于上述,本文对于荧光核酸适配体的发展进 行如下展望: a. 当前的荧光核酸适配体筛选的方法 较为传统而且周期长,因此需要优化荧光核酸适配 体的筛选策略,建立周期短、通用性强的筛选平 台; b. 目前基于荧光核酸适配体的生物探针主要 以"分裂式"、"二聚体式"、"倒置融合"和"环状 排序"等形式进行设计检测 microRNA、肿瘤标记 物等,需加强基于荧光核酸适配体的生物探针的开 发力度; c. 开发基于荧光核酸适配体的活细胞上高 时空分辨率的成像, 直观地展现活细胞内核酸代谢 的精确位置和数量,为核酸代谢相关酶的体内细胞 环境的功能研究贡献更多策略; d. 目前荧光核酸适 配体尤其是荧光RNA适配体已经基本覆盖可见光 光谱的各个波段,但是近红外、远红外波段上的荧 光DNA适配体和荧光RNA适配体数量较少,应该 拓展当前荧光核酸适配体的光谱波长,丰富荧光核 酸适配体的种类和数量以及正交型荧光核酸适配体 对,实现多重检测与疾病诊断; e.针对酶的作用机 制研究需要更加深而广,才能更加有助于研究者们 基于不同种类的酶的特有性质设计针对性更强的酶 活性检测体系,从而搭建基于荧光核酸适配体的核 酸代谢新型药物筛选平台; f.荧光DNA适配体相 较于荧光RNA适配体具有更加稳定的物理化学性 质,因此荧光DNA适配体未来将在成为医学诊断 和预后诊断中扮演更加重要的角色。

荧光核酸适配体的开发仍然在不断进行,未来 核酸适配体有望在生物化学分析、优势酶的定向进 化、活细胞成像、医学检验等领域为实验人员提供 更广阔稳定的平台。研究者们将进一步丰富荧光核 酸适配体的工具库,拓展其在生命科学相关领域内 的应用。

参考文献

- Chu W K, Hickson I D. RecQ helicases: multifunctional genome caretakers. Nat Rev Cancer, 2009, 9(9): 644-654
- [2] Breitbach S, Tug S, Simon P. Circulating cell-free DNA: an upcoming molecular marker in exercise physiology. Sports Med, 2012, 42(7): 565-586
- [3] El Ridi R, Tallima H. Physiological functions and pathogenic potential of uric acid: a review. JAdv Res, 2017, 8(5): 487-493
- [4] García-Olmedo F, Rodríguez-Palenzuela P, Molina A, et al. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence. FEBS Lett, 2001, 498(2-3): 219-222
- [5] Bythell-Douglas R, Deans A J. A structural guide to the bloom syndrome complex. Structure, 2021, 29(2): 99-113
- [6] Wu Y, Brosh R M Jr. Helicase-inactivating mutations as a basis for dominant negative phenotypes. Cell Cycle, 2010, 9(20): 4080-4090
- [7] Crewe M, Madabhushi R. Topoisomerase-mediated DNA damage in neurological disorders. Front Aging Neurosci, 2021, 13: 751742
- [8] Cristini A, Tellier M, Constantinescu F, et al. RNase H2, mutated in Aicardi-Goutières syndrome, resolves co-transcriptional Rloops to prevent DNA breaks and inflammation. Nat Commun, 2022, 13(1): 2961
- [9] Feng S, Cao Z. Is the role of human RNase H2 restricted to its enzyme activity?. Prog Biophys Mol Biol, 2016, 121(1): 66-73
- [10] Hoffmann J, Richardson G, Haendeler J, et al. Telomerase as a therapeutic target in cardiovascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021, 41(3): 1047-1061
- [11] Zvereva M I, Shcherbakova D M, Dontsova O A. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. Biochemistry (Mosc), 2010, 75(13): 1563-1583
- [12] Wan C F, Chir J L, Wu A T. A colorimetric sensor for the selective detection of fluoride ions. Luminescence, 2017, 32(3): 353-357
- [13] Hogrefe H H, Hogrefe R I, Walder R Y, et al. Kinetic analysis of

Escherichia coli RNase H using DNA-RNA-DNA/DNA substrates. J Biol Chem, 1990, **265**(10): 5561-5566

- [14] Zhang K, Zhu X, Wang J, *et al.* Strategy to fabricate an electrochemical aptasensor: application to the assay of adenosine deaminase activity. Anal Chem, 2010, 82(8): 3207-3211
- [15] Kanaya E, Kanaya S. Kinetic analysis of *Escherichia coli* ribonuclease HI using oligomeric DNA/RNA substrates suggests an alternative mechanism for the interaction between the enzyme and the substrate. Eur J Biochem, 1995, 231(3): 557-562
- [16] 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. Cell, 2001, 104(1): 107-117
- [17] Ma L, Chu H, Wang M, et al. hOGG1 Ser326Cys polymorphism is associated with risk of bladder cancer in a Chinese population: a case-control study. Cancer Sci, 2012, 103(7): 1215-1220
- [18] Shimomura O. Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture). Angew Chem Int Ed Eng, 2009, 48(31): 5590-5602
- [19] Tsien R Y. The green fluorescent protein. Annu Rev Biochem, 1998, 67(1): 509-544
- [20] Lepecq J B, Paoletti C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: physical-chemical characterization. J Mol Biol, 1967, 27(1): 87-106
- [21] Sharp P A, Sugden B, Sambrook J. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. Biochemistry, 1973, 12(16): 3055-3063
- [22] Jones K H, Senft J A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetatepropidium iodide. J Histochem Cytochem, 1985, 33(1): 77-79
- [23] Cowden R, Curtis S. Microfluorometric investigations of chromatin structure: I. Evaluation of nine DNA-specific fluorochromes as probes of chromatin organization. Histochemistry, 1981, 72(1): 11-23
- [24] Philpott N, Turner A, Scopes J, et al. The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. Blood, 1996, 87(6): 2244-2251
- [25] Marie D, Partensky F, Jacquet S, *et al.* Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. Appl Environ Microbiol, 1997, **63**(1): 186-193
- [26] Saffer L D, Gu R, Corwin J T. An RT-PCR analysis of mRNA for growth factor receptors in damaged and control sensory epithelia of rat utricles. Hear Res, 1996, 94(1-2): 14-23
- [27] Becker A, Reith A, Napiwotzki J, *et al.* A quantitative method of determining initial amounts of DNA by polymerase chain reaction cycle titration using digital imaging and a novel DNA stain. Anal Biochem, 1996, **237**(2): 204-207
- [28] Karsai A, Müller S, Platz S, et al. Evaluation of a homemade SYBR® Green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. Biotechniques, 2002, 32(4): 790-796
- [29] Blotta I, Prestinaci F, Mirante S, *et al.* Quantitative assay of total dsDNA with PicoGreen reagent and real-time fluorescent

detection. Ann Ist Super Sanita, 2005, 41(1): 119

- [30] Crisafuli F, Ramos E, Rocha M. Characterizing the interaction between DNA and GelRed fluorescent stain. Eur Biophys J, 2015, 44: 1-7
- [31] Karg T J, Golic K G. Photoconversion of DAPI and Hoechst dyes to green and red-emitting forms after exposure to UV excitation. Chromosoma, 2018, 127: 235-245
- [32] Lukinavičius G, Blaukopf C, Pershagen E, et al. SiR-Hoechst is a far-red DNA stain for live-cell nanoscopy. Nat Commun, 2015, 6(1):8497
- [33] Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. Biotech Histochem, 1995, 70(5): 220-233
- [34] Otto F, Tsou K. A comparative study of DAPI, DIPI, and Hoechst 33258 and 33342 as chromosomal DNA stains. Stain Technol, 1985, 60(1): 7-11
- [35] Hayashi M, Sofuni T, Ishidate Jr M. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. Mutat Res, 1983, 120(4): 241-247
- [36] Mcmaster G K, Carmichael G G. Analysis of single-and doublestranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74(11): 4835-4838
- [37] Kasibhatla S, Amarante-Mendes G P, Finucane D, et al. Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining to detect apoptosis. CSH Protoc, 2006, 2006(3): 4493
- [38] Barcelo F, Ortiz-Lombardia M, Martorell M, et al. DNA binding characteristics of mithramycin and chromomycin analogues obtained by combinatorial biosynthesis. Biochemistry, 2010, 49(49):10543-10552
- [39] Kocabas F, Turan R D, Aslan G S. Fluorometric RdRp assay with self-priming RNA. Virus Genes, 2015, 50: 498-504
- [40] Gandhi V, O'brien M H, Yadav S. High-quality and high-yield RNA extraction method from whole human saliva. Biomarker Insights, 2020, 15: 1177271920929705
- [41] Luhung I, Wu Y, Ng C K, et al. Protocol improvements for low concentration DNA-based bioaerosol sampling and analysis. PLoS One, 2015, 10(11): e0141158
- [42] DNA Pipeline R&D, Farr B, Rajan D, et al. COVID-19 ARTIC v3 Illumina library construction and sequencing protocol V. 1. Protocols, 2020. doi: 10.17504/protocols.io.beuzjex6
- [43] Pettinato G, Perelman L T, Fisher R A. Development of a scalable three-dimensional culture of human induced pluripotent stem cells-derived liver organoids. Methods Mol Biol, 2022, 2455: 131-147
- [44] Beisker W, Weller-Mewe E M, Nüsse M. Fluorescence enhancement of DNA - bound TO - PRO - 3 by incorporation of bromodeoxyuridine to monitor cell cycle kinetics. Cytometry, 1999, 37(3): 221-229
- [45] Kerstens M, Boulet G, Tritsmans C, et al. Flow cytometric enumeration of bacteria using TO-PRO®-3 iodide as a single-stain viability dye. J Lab Autom, 2014, 19(6): 555-561
- [46] Milanovich N, Suh M, Jankowiak R, et al. Binding of TO-PRO-3 and TOTO-3 to DNA: fluorescence and hole-burning studies. J Phys Chem, 1996, 100(21): 9181-9186
- [47] Smith P J, Wiltshire M, Davies S, et al. A novel cell permeant and

- [48] Wojcik K, Dobrucki J W. Interaction of a DNA intercalator DRAQ5, and a minor groove binder SYTO17, with chromatin in live cells—influence on chromatin organization and histone-DNA interactions. Cytometry A, 2008, 73(6): 555-562
- [49] Bedner E, Li X, Gorczyca W, et al. Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. Cytometry, 1999, 35(3): 181-195
- [50] Haugland R P. The Molecular Probes Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. Eugene: Invitrogen Corp, 2005: 710
- [51] El-Jawhari J J, Cuthbert R, Mcgonagle D, *et al.* The CD45lowCD2
 71high cell prevalence in bone marrow samples may provide a useful measurement of the bone marrow quality for cartilage and bone regenerative therapy. J Bone Joint Surg Am, 2017, **99**(15): 1305
- [52] Silva F, Lourenço O, Queiroz J A, *et al.* Bacteriostatic versus bactericidal activity of ciprofloxacin in *Escherichia coli* assessed by flow cytometry using a novel far-red dye. J Antibiot (Tokyo), 2011, 64(4): 321-325
- [53] Sekar R B, Periasamy A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. J Cell Biol, 2003, 160(5): 629
- [54] Ruijter J M, Lorenz P, Tuomi J M, et al. Fluorescent-increase kinetics of different fluorescent reporters used for qPCR depend on monitoring chemistry, targeted sequence, type of DNA input and PCR efficiency. Mikrochim Acta, 2014, 181: 1689-1696
- [55] Holland P M, Abramson R D, Watson R, et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(16): 7276-7280
- [56] Mokany E, Todd AV, Fuery CJ, et al. Diagnosis and monitoring of PML-RARα-positive acute promyelocytic leukemia by quantitative RT-PCR. Methods Mol Med, 2006, 125: 127-147
- [57] Qzyme B D. Assays for quantitative PCR. Clontechniques, 2003, 18(4): 2-3
- [58] Heller M J, Morrison L E. Chemiluminescent and fluorescent probes for DNA hybridization systems//Kingsbury D T, Falkow S. Rapid Detection and Identification of Infectious Agents. Orlando: Academic Press, 1985: 245-256
- [59] Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nat Biotechnol, 1996, 14(3): 303-308
- [60] Afonina I, Reed M, Lusby E, *et al.* Minor groove binderconjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence. Biotechniques, 2002, **32**(4): 940-949
- [61] Whitcombe D, Theaker J, Guy S P, et al. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. Nat Biotechnol, 1999, 17(8): 804-807
- [62] Nazarenko I A, Bhatnagar S, Hohman R J. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. Nucleic Acids Res, 1997, 25(12): 2516-2521
- [63] Nazarenko I, Lowe B, Darfler M, et al. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore.

Nucleic Acids Res, 2002, 30(9): e37

- [64] Hwang H, Myong S J. Protein induced fluorescence enhancement (PIFE) for probing protein-nucleic acid interactions. Chem Soc Rev, 2014, 43(4): 1221-1229
- [65] Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard S H. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. Adv Biomed Res, 2014, 3:85
- [66] Maes R, Langohr I, Wise A, et al. Beyond H&E: integration of nucleic acid-based analyses into diagnostic pathology. Vet Pathol, 2014, 51(1): 238-256
- [67] Jung Y, Lee C Y, Park K S, *et al.* Target-activated DNA polymerase activity for sensitive RNase H activity assay. Biotechnol J, 2019, 14(7): 1800645
- [68] Park K S, Lee C Y, Kang K S, et al. Aptamer-mediated universal enzyme assay based on target-triggered DNA polymerase activity. Biosens Bioelectron, 2017, 88: 48-54
- [69] Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. MethyLight: a highthroughput assay to measure DNA methylation. Nucleic Acids Res, 2000, 28(8): e32
- [70] Bryzgunova O, Laktionov P J. Current methods of extracellular DNA methylation analysis. Mol Biol (Mosk), 2017, 51: 167-183
- [71] Brennan J D, Bialy R M, Ali M M, et al. Protein-mediated suppression of rolling circle amplification for biosensing with an aptamer-containing DNA primer. Chemistry, 2020, 26(22): 5085-5092
- [72] Tan W, Wang K, Drake T J. Molecular beacons. Curr Opin Chem Biol, 2004, 8(5): 547-553
- [73] Li J J, Geyer R, Tan W J. Using molecular beacons as a sensitive fluorescence assay for enzymatic cleavage of single-stranded DNA. Nucleic Acids Res, 2000, 28(11): e52
- [74] Wu X, Chen J, Zhao J. Ultrasensitive detection of 3'-5' exonuclease enzymatic activity using molecular beacons. Analyst, 2014, 139(5): 1081-1087
- [75] Zong S, Wang Z, Chen H, *et al.* Colorimetry and SERS dual-mode detection of telomerase activity: combining rapid screening with high sensitivity. Nanoscale, 2014, 6(3): 1808-1816
- [76] 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. Cancer Res, 2007, 67(14): 6619-6625
- [77] Chen F, Zhao Y. Methylation-blocked enzymatic recycling amplification for highly sensitive fluorescence sensing of DNA methyltransferase activity. Analyst, 2013, 138(1): 284-289
- [78] Hou T, Wang X, Liu X, *et al.* Amplified detection of T4 polynucleotide kinase activity by the coupled λ exonuclease cleavage reaction and catalytic assembly of bimolecular beacons. Anal Chem, 2014, **86**(1): 884-890
- [79] Chen F, Zhao Y, Qi L, et al. One-step highly sensitive florescence detection of T4 polynucleotide kinase activity and biological small molecules by ligation-nicking coupled reaction-mediated signal amplification. Biosens Bioelectron, 2013, 47: 218-224
- [80] Du J, Dartawan R, Rice W, et al. Fluorescent platforms for RNA chemical biology research. Genes (Basel), 2022, 13(8): 1348
- [81] Babendure J R, Adams S R, Tsien R Y. Aptamers switch on

fluorescence of triphenylmethane dyes. J Am Chem Soc, 2003, **125**(48): 14716-14717

- [82] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. Science, 1990, 249(4968): 505-510
- [83] Ellington A D, Szostak J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature, 1990, 346(6287): 818-822
- [84] Grate D, Wilson C. Laser-mediated, site-specific inactivation of RNA transcripts. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(11): 6131-6136
- [85] Sando S, Narita A, Hayami M, et al. Transcription monitoring using fused RNA with a dye-binding light-up aptamer as a tag: a blue fluorescent RNA. Chem Commun (Camb), 2008, 33: 3858-3860
- [86] Dolgosheina E V, Jeng S C, Panchapakesan S S, *et al.* RNA mango aptamer-fluorophore: a bright, high-affinity complex for RNA labeling and tracking. ACS Chem Biol, 2014, 9(10): 2412-2420
- [87] Kong K Y S, Jeng S C Y, Rayyan B, et al. RNA Peach and Mango: orthogonal two-color fluorogenic aptamers distinguish nearly identical ligands. RNA, 2021, 27(5): 604-615
- [88] Bouhedda F, Fam K T, Collot M, et al. A dimerization-based fluorogenic dye-aptamer module for RNA imaging in live cells. Nat Chem Biol, 2020, 16(1): 69-76
- [89] Fam K T, Pelletier R, Bouhedda F, et al. Rational design of selfquenched rhodaminedimers as fluorogenic aptamer probes for live-cell RNA imaging. Anal Chem, 2022, 94(18): 6657-6664
- [90] Sunbul M, Jäschke A. SRB-2: a promiscuous rainbow aptamer for live-cell RNA imaging. Nucleic Acids Res, 2018, 46(18): e110
- [91] Constantin T P, Silva G L, Robertson K L, et al. Synthesis of new fluorogenic cyanine dyes and incorporation into RNA fluoromodules. Org Lett, 2008, 10(8): 1561-1564
- [92] Tan X, Constantin T P, Sloane K L, et al. Fluoromodules consisting of a promiscuous RNA aptamer and red or blue fluorogenic cyanine dyes: selection, characterization, and bioimaging. J Am Chem Soc, 2017, 139(26): 9001-9009
- [93] Paige J S, Wu K Y, Jaffrey S R. RNA mimics of green fluorescent protein. Science, 2011, 333(6042): 642-646
- [94] Strack R L, Disney M D, Jaffrey S R. A superfolding Spinach2 reveals the dynamic nature of trinucleotide repeat-containing RNA. Nat Methods, 2013, 10(12): 1219-1224
- [95] Filonov G S, Moon J D, Svensen N, *et al.* Broccoli: rapid selection of an RNA mimic of green fluorescent protein by fluorescencebased selection and directed evolution. J Am Chem Soc, 2014, 136(46): 16299-16308
- [96] Song W, Strack R L, Svensen N, et al. Plug-and-play fluorophores extend the spectral properties of Spinach. J Am Chem Soc, 2014, 136(4): 1198-1201
- [97] Song W, Filonov G S, Kim H, et al. Imaging RNA polymerase III transcription using a photostable RNA-fluorophore complex. Nat Chem Biol, 2017, 13(11): 1187-1194
- [98] Chen X, Zhang D, Su N, et al. Visualizing RNA dynamics in live cells with bright and stable fluorescent RNAs. Nat Biotechnol, 2019, 37(11): 1287-1293
- [99] Cao G, Long K, Qiu Y, *et al.* A light-up fluorescence platform based DNA: RNA hybrid G-quadruplet for detecting single

nucleotide variant of ctDNA and miRNA-21. Talanta, 2023, 257: 124373

- [100] Reid M S, Le X C, Zhang H. Exponential isothermal amplification of nucleic acids and assays for proteins, cells, small molecules, and dnzyme activities: an EXPAR dxample. Angew Chem Int Ed Engl, 2018, 57(37): 11856-11866
- [101] Xu L, Duan J, Chen J, et al. Recent advances in rolling circle amplification-based biosensing strategies-a review. Analytica ChimicaActa, 2021, 1148: 238187
- [102] Yao C, Zhang R, Tang J, et al. Rolling circle amplification (RCA)based DNA hydrogel. Nat Protoc, 2021, 16(12): 5460-5483
- [103] Wang X, Zhu L, Li S, et al. Fluorescent functional nucleic acid: principles, properties and applications in bioanalyzing. Trends Analyt Chem, 2021, 141: 116292
- [104] Jin B, Zhang X, Zheng W, et al. Fluorescence light-up probe for parallel G-quadruplexes. Anal Chem, 2014, 86(1): 943-952
- [105] Sando S, Narita A, Aoyama Y. Light-up Hoechst-DNA aptamer pair: generation of an aptamer-selective fluorophore from a conventional DNA-staining dye. Chembiochem, 2007, 8(15): 1795-1803
- [106] Anon. Outstanding reviewers for photochemical and photobiological sciences in 2017. Photochem Photobiol Sci, 2020, 17(5): 533-533
- [107] Connelly R P, Madalozzo P F, Mordeson J E, et al. Promiscuous dye binding by a light-up aptamer: application for label-free multiwavelength biosensing. Chem Commun (Camb), 2021, 57(30): 3672-3675
- [108] Islam M M, Ghielmetti V M, Allen P B. Graphene oxide assisted light-up aptamer selection against Thioflavin T for label-free detection of microRNA. Sci Rep, 2021, 11(1): 4291
- [109] Kato T, Shimada I, Kimura R, et al. Light-up fluorophore--DNA aptamer pair for label-free turn-on aptamer sensors. Chem Commun (Camb), 2016, 52(21): 4041-4044
- [110] Li W, Luo Y, Gao T, et al. In vitro selection of DNA aptamers for a small-molecule porphyrin by gold nanoparticle-based SELEX. J Mol Evol, 2019, 87(7-8): 231-239
- [111] Varnbuhler B S, Moon J, Dey S K, *et al.* Detection of SARS-CoV-2 RNA using a DNA aptamer mimic of green fluorescent protein. ACS Chem Biol, 2022, 17(4): 840-853
- [112] Wang H, Wang J, Wang Q, et al. Selection and characterization of dimethylindole red DNA aptamers for the development of light-up fluorescent probes. Talanta, 2017, 168: 217-221
- [113] Wang H, Wang J, Xu L, et al. Selection and characterization of thioflavin T aptamers for the development of light-up probes. Anal Methods, 2016, 8(48): 8461-8465
- [114] Wang J, Zhang Y, Wang H, et al. Selection and analysis of DNA aptamers to berberine to develop a label-free light-up fluorescent probe. New J Chem, 2016, 40(11): 9768-9773
- [115] Wang H, Wang J, Sun N, et al. Selection and characterization of Malachite green aptamers for the development of light-up probes. ChemistrySelect, 2016, 1(8): 1571-1574
- [116] Yang L, Ding P, Luo Y, et al. Exploration of catalytic nucleic acids on porphyrin metalation and peroxidase activity by in vitro selection of aptamers for N-Methyl mesoporphyrin IX. ACS Comb Sci, 2019, 21(2): 83-89

- [117] Feng G, Luo C, Yi H, et al. DNA mimics of red fluorescent proteins (RFP) based on G-quadruplex-confined synthetic RFP chromophores. Nucleic Acids Res. 2017, 45(18): 10380-10392
- [118] Roszyk L, Kollenda S, Hennig S. Using a specific RNA-protein interaction to quench the fluorescent RNA spinach. ACS Chem Biol, 2017, 12(12): 2958-2964
- [119] Kikuchi N, Kolpashchikov D M. Split spinach aptamer for highly selective recognition of DNA and RNA at ambient temperatures. Chembiochem, 2016, 17(17): 1589-1592
- [120] Chandler M, Lyalina T, Halman J, et al. Broccoli fluorets: split aptamers as a user-friendly fluorescent toolkit for dynamic RNA nanotechnology. Molecules, 2018, 23(12):3178
- [121] Barbash S, Shifman S, Soreq H. Global coevolution of human microRNAs and their target genes. Mol Biol Evol, 2014, 31(5): 1237-1247
- [122] Benning L, Robinson S, Follo M, *et al*. Digital PCR for quantifying circulating microRNAs in acute myocardial infarction and cardiovascular disease. J Vis Exp, 2018, 3(137): 57950
- [123] Campomenosi P, Gini E, Noonan D M, et al. A comparison between quantitative PCR and droplet digital PCR technologies for circulating microRNA quantification in human lung cancer. BMC Biotechnol, 2016, 16(1): 60
- [124] Chapin S C, Doyle P S. Ultrasensitive multiplexed microRNA quantification on encoded gel microparticles using rolling circle amplification. Anal Chem, 2011, 83(18): 7179-7185
- [125] Gao Z, Wu C, Lv S, et al. Nicking-enhanced rolling circle amplification for sensitive fluorescent detection of cancer-related microRNAs. Anal Bioanal Chem, 2018, 410(26): 6819-6826
- [126] Imburgio D, Rong M, Ma K, et al. Studies of promoter recognition and start site selection by T7 RNA polymerase using a comprehensive collection of promoter variants. Biochemistry, 2000, 39(34): 10419-10430
- [127] Diaz G A, Raskin C A, Mcallister W T. Hierarchy of basepreference in the binding domain of the bacteriophage T7 promoter. J Mol Biol, 1993, 229(4): 805-811
- [128] Kartje Z J, Janis H I, Mukhopadhyay S, et al. Revisiting T7 RNA polymerase transcription in vitro with the broccoli RNA aptamer as a simplified real-time fluorescent reporter. J Biol Chem, 2020, (296):100175
- [129] Lyko F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. Nat Rev Genet, 2018, 19(2): 81-92
- [130] Hattermann K, Mehdorn H M, Mentlein R, et al. A methylationspecific and SYBR-green-based quantitative polymerase chain reaction technique for O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation analysis. Anal Biochem, 2008, 377(1): 62-71
- [131] Chen F, Zhao Y. Methylation-blocked enzymatic recycling amplification for highly sensitive fluorescence sensing of DNA methyltransferase activity. Analyst, 2013, 138(1): 284-289
- [132] Li W, Liu Z, Lin H, et al. Label-free colorimetric assay for methyltransferase activity based on a novel methylationresponsive DNAzyme strategy. Anal Chem, 2010, 82(5): 1935-1941
- [133] Chen F, Zhao Y, Qi L, et al. One-step highly sensitive florescence detection of T4 polynucleotide kinase activity and biological small

molecules by ligation-nicking coupled reaction-mediated signal amplification. Biosens Bioelectron, 2013, **47**: 218-224

- [134] Song C, Zhao M. Real-time monitoring of the activity and kinetics of T4 polynucleotide kinase by a singly labeled DNA-hairpin smart probe coupled with lambda exonuclease cleavage. Anal Chem, 2009, 81(4): 1383-1388
- [135] Hou T, Wang X, Liu X, *et al.* Amplified detection of T4 polynucleotide kinase activity by the coupled λ exonuclease cleavage reaction and catalytic assembly of bimolecular beacons. Anal Chem, 2014, **86**(1): 884-890
- [136] Shi Z, Zhang X, Cheng R, *et al.* A label-free cyclic assembly of Gquadruplex nanowires for cascade amplification detection of T4 polynucleotide kinase activity and inhibition. Analyst, 2015, 140(17): 6124-6130
- [137] Cheng R, Tao M, Shi Z, et al. Label-free and sensitive detection of T4 polynucleotide kinase activity via coupling DNA strand displacement reaction with enzymatic-aided amplification. Biosens Bioelectron, 2015, 73: 138-145
- [138] Browner W S, Kahn A J, Ziv E, et al. The genetics of human longevity. Am J Med, 2004, 117(11): 851-860
- [139] Evans A R, Limp-Foster M, Kelley M R. Going APE over ref-1. Mutat Res, 2000, 461(2): 83-108
- [140] Demple B, Sung J S. Molecular and biological roles of Apel protein in mammalian base excision repair. DNA Repair, 2005, 4(12): 1442-1449
- [141] Kelley M R, Cheng L, Foster R, et al. Elevated and altered expression of the multifunctional DNA base excision repair and redox enzyme Ape1/ref-1 in prostate cancer. Clin Cancer Res, 2001,7(4): 824-830
- [142] Wang D, Xiang D B, Yang X Q, et al. APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells. Lung Cancer, 2009, 66(3): 298-304
- [143] Kharat S S, Ding X, Swaminathan D, et al. Degradation of 5hmCmarked stalled replication forks by APE1 causes genomic instability. Sci Signal, 2020, 13(645): 8091
- [144] Zhang M, Zhao Z, Chen S, *et al*. The association of polymorphisms in base excision repair genes with ovarian cancer susceptibility in Chinese women: a two-center case-control study. J Cancer, 2021, 12(1): 264-269
- [145] Shin J H, Choi S, Lee Y R, et al. APE1/Ref-1 as a serological biomarker for the detection of bladder cancer. Cancer Res Treat, 2015, 47(4): 823-833
- [146] Fang S, Chen L, Zhao M. Unimolecular chemically modified DNA fluorescent probe for one-step quantitative measurement of the activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 in biological samples. Anal Chem, 2015, 87(24): 11952-11956
- [147] Huang Y, Ma Y, Li Y, et al. Sensitive and label-free fluorescence detection of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 activity based on isothermal amplified-generation of G-quadruplex. New J Chem, 2017, 41(5): 1893-1896
- [148] Jafri M A, Ansari S A, Alqahtani M H, et al. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. Genome Med, 2016, 8(1): 69
- [149] Ghosh A, Saginc G, Leow S C, et al. Telomerase directly regulates

- [150] Koh C M, Khattar E, Leow S C, et al. Telomerase regulates MYCdriven oncogenesis independent of its reverse transcriptase activity. J Clin Invest, 2015, 125(5): 2109-2122
- [151] Liu H, Liu Q, Ge Y, et al. hTERT promotes cell adhesion and migration independent of telomerase activity. Sci Rep, 2016, 6(1): 1-9
- [152] Liu Z, Li Q, Li K, et al. Telomerase reverse transcriptase promotes epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like traits in cancer cells. Oncogene, 2013, 32(36): 4203-4213
- [153] Wege H, Chui M S, Le H T, et al. SYBR Green real-time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity. Nucleic Acids Res, 2002, 31(2): e3
- [154] Zhang X, Cheng R, Shi Z, et al. A PCR-free fluorescence strategy for detecting telomerase activity via double amplification strategy. Biosens Bioelectron, 2016, 75: 101-107
- [155] Li K, Wang L, Xu X, et al. Label-free molecular beacons-based cascade amplification DNA machine for sensitive detection of telomerase activity. Talanta, 2017, 167: 645-650
- [156] Faucher F, Doublié S, Jia Z J. 8-Oxoguanine DNA glycosylases: one lesion, three subfamilies. Int J Mol Sci, 2012, 13(6): 6711-6729
- [157] Shinmura K, Kohno T, Kasai H, et al. Infrequent mutations of the hOGG1 gene, that is involved in the excision of 8-hydroxyguanine in damaged DNA, in human gastric cancer. Jpn J Cancer Res, 1998, 89(8): 825-828
- [158] Ma L, Chu H, Wang M, et al. hOGG1 Ser326Cys polymorphism is associated with risk of bladder cancer in a Chinese population: a case-control study. Cancer Sci, 2012, 103(7): 1215-1220
- [159] Weiss J, Goode E, Ladiges W, et al. Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature. Mol Carcinog, 2005, 42(3): 127-141
- [160] Gackowski D, Speina E, Zielinska M, et al. Products of oxidative DNA damage and repair as possible biomarkers of susceptibility to lung cancer. Cancer Res, 2003, 63(16): 4899-4902
- [161] Hu J, Liu W, Wang J, et al. Simple mix-and-read assay with multiple cyclic enzymatic repairing amplification for rapid and sensitive detection of DNA glycosylase. Anal Chem, 2021, 93(18): 6913-6918
- [162] Wang X, Hou T, Lu T, et al. Autonomous exonuclease III-assisted isothermal cycling signal amplification: a facile and highly sensitive fluorescence DNA glycosylase activity assay. Anal Chem, 2014, 86(19): 9626-9631
- [163] Liu S C, Wu H W, Jiang J H, et al. A novel DNAzyme-based colorimetric assay for the detection of hOGG1 activity with lambda exonuclease cleavage. Anal Methods, 2013, 5(1): 164-168
- [164] Hoeijmakers J H J N. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature, 2001, 411(6835): 366-374
- [165] Dong L, Zhang X, Li Y, et al. Highly sensitive detection of rracil-DNA glycosylase activity based on self-initiating multiple rolling circle amplification. ACS Omega, 2019, 4(2): 3881-3886
- [166] Pulukuri SMK, Knost JA, Estes N, et al. Small interfering RNA -

高子珩,等:荧光核酸适配体:核酸酶学分析新机遇

directed knockdown of uracil DNA glycosylase induces apoptosis and sensitizes human prostate cancer cells to genotoxic stress UNG knockdown induces apoptosis. Mol Cancer Res, 2009, 7(8): 1285-1293

- [167] Imai K, Slupphaug G, Lee W I, et al. Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. Nat Immunol, 2003, 4(10):1023-1028
- [168] Sousa M M, Krokan H E, Slupphaug G. DNA-uracil and human pathology. Mol Aspects Med, 2007, 28(3-4): 276-306
- [169] Seal G, Brech K, Karp S J, et al. Immunological lesions in human uracil DNA glycosylase: association with Bloom syndrome. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85(7): 2339-2343
- [170] Xi Q, Li J J, Du W F, et al. A highly sensitive strategy for base excision repair enzyme activity detection based on graphene oxide mediated fluorescence quenching and hybridization chain reaction. Analyst, 2016, 141(1): 96-99
- [171] Xu X, Wang L, Wu Y, et al. Uracil removal-inhibited ligase reaction in combination with catalytic hairpin assembly for the sensitive and specific detection of uracil-DNA glycosylase activity. Analyst, 2017, 142(24): 4655-4660
- [172] Wang LJ, Ren M, Zhang Q, et al. Excision repair-initiated enzymeassisted bicyclic cascade signal amplification for ultrasensitive detection of uracil-DNA glycosylase. Anal Chem, 2017, 89(8): 4488-4494
- [173] Wu Y, Wang L, Jiang W J B, et al. Toehold-mediated strand displacement reaction-dependent fluorescent strategy for sensitive detection of uracil-DNA glycosylase activity. Biosens Bioelectron, 2017, 89: 984-988
- [174] Du Y C, Jiang H X, Huo Y F, et al. Optimization of strand displacement amplification-sensitized G-quadruplex DNAzymebased sensing system and its application in activity detection of uracil-DNA glycosylase. Biosens Bioelectron, 2016, 77: 971-977
- [175] Zhang P, Wang L, Zhao H, et al. Self-primer and self-template recycle rolling circle amplification strategy for sensitive detection of uracil-DNA glycosylase activity. Anal Chim Acta, 2018, 1001:119-124
- [176] Xu Y, Cui Y X, Zhao Q G, et al. Label-free and sensitive detection of uracil-DNA glycosylase using exponential real-time rolling circle amplification. Anal Methods, 2018, 10(20): 2405-2410
- [177] Liu B, Yang X, Wang K, et al. Real-time monitoring of uracil removal by uracil-DNA glycosylase using fluorescent resonance energy transfer probes. Anal Biochem, 2007, 366(2): 237-243
- [178] Li C, Long Y, Liu B, et al. Real time monitoring uracil excision using uracil-containing molecular beacons. Anal Chim Acta, 2014, 819:71-77
- [179] Kim Y, Park Y, Lee C Y, et al. Colorimetric assay for uracil DNA glycosylase activity based on toehold-mediated strand displacement circuit. Biotechnol J, 2020, 15(3): 1900420
- [180] Baldrich E, Restrepo A, O'sullivan C K. Aptasensor development: elucidation of critical parameters for optimal aptamer performance. Anal Chem, 2004, 76(23): 7053-7063

Fluorogenic Aptamers: New Opportunities for Analysis of Nucleic Acid Metabolism-related Enzymes^{*}

GAO Zi-Heng^{1,2)}, ZOU Xuan^{1,2)}, ZHOU Yi^{1,2)}, XUE Ting-Ting^{1,2)}, CHEN Xian-Jun^{1,2)**}, YANG Yi^{1,2)**}

(¹⁾Research Center of Optogenetics and Synthetic Biology, State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

²⁾Shanghai Advanced Research Base of Cell Metabolism Optogenetics, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Graphical abstract



Abstract Nucleic acid metabolism processes such as the synthesis and degradation of DNA and RNA are the basic metabolic units to maintain the growth and development, metabolism, genetic variation and aging, and widely participate in the whole process of the body's life activity. The enzyme activity related to nucleic acid metabolism is crucial for maintaining the stability of the intracellular environment, and the change of the activity may cause the occurrence and development of many diseases. The enzymes related to nucleic acid metabolism have become important targets for the study of various diseases and are indispensable tools in the field of biotechnology and bioengineering, such as polymerase chain reaction, site-directed mutagenesis, molecular cloning and DNA sequencing. Therefore, nucleic acid metabolism is the basis of all nucleic acid studies and related life science researches. In this paper, we introduce the common methods of enzymatic analysis of nucleic acid metabolism, and focus on the simple and fast real-time fluorescence method, classify and compare them according to their principles, development history and applications, and also prospect the future study and development of tools for enzymatic analysis of nucleic acid.

Key words nucleic acid metabolism, enzyme activity detection, fluorescence method, fluorogenic aptamers **DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0128

^{*} This work was supported by grants from State Key Research and Development Program (2022YFC3400100, 2019YFA0904800) and The National Natural Science Foundation of China (32121005).

^{**} Corresponding author.

CHEN Xian-Jun. Tel: 86-13482210575, E-mail: xianjunchen@ecust.edu.cn

YANG Yi. Tel: 86-15821675757, E-mail: yiyang@ecust.edu.cn

Received: April 7, 2023 Accepted: April 19, 2023