

• 基础研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.19.003

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240704.1327.002\(2024-07-05\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240704.1327.002(2024-07-05))

结合三螺旋分子探针和催化发夹组装反应对 甲胎蛋白的快速无酶比色分析

翁 琴¹,董 严²,白 刚¹,雷小东¹,余 华^{3△}

(1. 成都中医药大学医学与生命科学学院,成都 611137;2. 陆军军医大学第一附属医院肿瘤科,重庆 400038;
3. 成都中医药大学附属医院普外科,成都 610072)

[摘要] **目的** 构建一种基于三螺旋分子探针(THMP)和催化发夹组装(CHA)反应的新型无酶比色生物传感器(T-CHA),用于低丰度甲胎蛋白(AFP)的可视化检测和精准定量分析。**方法** 通过凝胶电泳以及紫外-可见分光光度计记录 AFP 诱导 T-CHA 体系产生的吸光度,以评估 T-CHA 策略的可行性。分别对 THMP 和 CHA 的摩尔比、CHA 的反应时间、温度及缓冲液 pH 值等参数进行了优化。用不同浓度 AFP 诱导 T-CHA 发生显色反应,以探究 T-CHA 的检测效能。**结果** 在最佳实验条件下,不同浓度 AFP 的对数值在 5 pg/mL 至 10 ng/mL 呈现线性关系,检测限为 2.29 pg/mL。T-CHA 体系在 105 min 内即可完成对低丰度 AFP 的精准定量分析及无标记的可视化检测,且 T-CHA 的灵敏度优于 ELISA。**结论** 利用 THMP 的低背景泄漏和 CHA 的高催化效率,T-CHA 体系可以实现肝细胞癌的早期精准诊断,且在即时检验中具有一定的应用前景。

[关键词] 肝细胞癌;甲胎蛋白;三螺旋分子探针;催化发夹组装;比色分析

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2024)19-2892-06

Rapid enzyme-free colorimetric analysis of alpha-fetoprotein by combining triple-helix molecular probe and catalytic hairpin assembly reaction

WENG Qin¹,DONG Yan²,BAI Gang¹,LEI Xiaodong¹,YU Hua^{3△}

(1. School of Medicine and Life Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 611137, China; 2. Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Army Military Medical University, Chongqing 400038, China; 3. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610072, China)

[Abstract] **Objective** To construct a novel enzyme-free colorimetric biosensor (T-CHA) based on triple-helix molecular probe (THMP) and catalytic hairpin assembly (CHA) reaction for visual detection and precise quantitative analysis of low-abundance alpha-fetoprotein (AFP). **Methods** The absorbance produced by AFP induced T-CHA system was recorded by gel electrophoresis and ultraviolet-visible spectrophotometer to evaluate the feasibility of T-CHA strategy. The molar concentration ratio of THMP and CHA, reaction time of CHA, temperature and pH value of buffer solution were optimized respectively. The color reaction of T-CHA was induced by different concentrations of AFP to explore the detection efficiency of T-CHA. **Results** Under the optimal experimental conditions, the logarithmic values of AFP at different concentrations showed a linear relationship from 5 pg/mL to 10 ng/mL, and the detection limit was 2.29 pg/mL. The T-CHA system could complete accurate quantitative analysis of low abundance AFP and visual free-labeled detection within 105 min, moreover the sensitivity of T-CHA was superior to that of ELISA. **Conclusion** Utilizing the low background leakage of THMP and the high catalytic efficiency of CHA, the T-CHA system could realize the early accurate diagnosis of hepatocellular carcinoma, moreover which has a certain application prospect in the real time detection.

[Key words] hepatocellular carcinoma; alpha-fetoprotein; triple-helix molecular probe; catalytic hairpin assembly; colorimetric analysis

△ 通信作者, E-mail: yuhua1232021@163.com。

肝细胞癌(HCC)是全球最常见的癌症致死原因之一,早期诊断是有效治疗的关键^[1-3]。尽管许多肿瘤生物标志物不断被提出,临床上筛查和诊断 HCC 仍然高度依赖于甲胎蛋白(AFP)的血清学评估^[4-5]。然而,大多数蛋白质的检测方法依赖于大型精密仪器或涉及复杂操作步骤。因此,开发一种简单、无酶、高灵敏度的快速比色分析方法势在必行。值得注意的是,由于功能核酸优越的可编程性、出色的检测性能和易于合成等特点,已成为当前分析蛋白最常用的方法之一^[6]。而等温无酶核酸扩增策略中的催化发夹组装(CHA)则是一种级联放大信号的 DNA 电路,具有理想的可控性,能够极大程度避免复杂环境对蛋白分析的干扰^[7-8]。重要的是,G-四链体/氯化血红素脱氧核酶(G4/Hemin DZ)具有类辣根过氧化物酶活性,可直接用于比色分析中信号的输出^[9-10]。因此,本研究基于三螺旋分子探针(THMP)的稳定性和 CHA 核酸扩增技术,构建了一种用于 AFP 放大检测的新型无酶比色生物传感器(T-CHA),为可视化检测和快速精准定量分析 AFP 开辟了新的途径,也为 HCC 的

即时检验提供新的选择,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

所有 DNA 寡核苷酸经高效液相色谱分离纯化,购于上海生工生物工程股份有限公司,其详细核酸序列见表 1。磷酸缓冲盐溶液(PBS)、氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、六水合氯化镁(MgCl₂ · 6H₂O)、6×DNA 上样缓冲液和 30%制胶液(29 : 1)均购于中国索莱宝科技有限公司。N, N, N', N'-四甲基乙二胺(TEMED)、氯化血红素(Hemin)和 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)液体底物体系由上海阿拉丁生物化学技术有限公司提供。核酸染料 Super GelRed 购于北京博迈德基因技术有限公司。1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5)、过硫酸铵替代物(APS)和 Tris-硼酸-ED-TA(TBE)缓冲液购于上海碧云天生物技术有限公司(中国)。二甲基亚砜购于上海麦克林生化有限公司(中国)。DNA 分子量标准品[20 bp DNA Ladder (Dye Plus)]由宝日医生物技术(北京)有限公司提供。实验所用试剂和溶剂均为分析级。

表 1 寡核苷酸序列

寡核苷酸	序列(5'-3')
Triplex-AFP	TTC TCC TTC TTC TCA GGT GCA GTT CTC GAC TCG GTC TTG ATG TGG GTT CTT TTT CT
T	TGA CGC AAG AAG GAG AAA TGG CGA
H1	TCG CCA TTT CTC CTT CTT GCG TCA AAT GGT GGT GGT GAC GCA AGA AGG AGA
H2	TTG CGT CAC CAC CAC CAT TTG ACG CAA GAA GGA GAA ATG GTG GTG GTG GTT

1.2 方法

1.2.1 设计原理

基于既往研究^[11]和经典 ELISA,针对 THMP 缺乏信号扩增能力及 ELISA 存在的洗脱步骤烦琐、耗时等问题,本课题组提出了一种结合 THMP 和 CHA 的比色生物传感体系(T-CHA),用于 AFP 快速无酶比色分析。首先,设计 1 个含有 AFP 适配子的 DNA 发夹,用于特异性识别目标蛋白 AFP。随后,将能够启动 CHA 反应的触发探针(T)与之进行自组装,制备得到 THMP。THMP 中的 T 在 Watson-Crick 配对和 Hoogsteen 氢键作用下与茎区杂交,保持刚性。其次,又设计了 1 对存在互补碱基序列的 DNA 发夹 H1、H2,其中,G-四链体序列被整合到 H2 中,而发夹 H1 和 H2 的互补序列则被分别设计在茎区,两个发夹由于动力学阻断因素不能进行自发杂交。当且仅当在 AFP 存在的情况下,稳定的 THMP 能够特异性识别 AFP 并打开发夹结构,形成 AFP/THMP 复合物,释放出 T。T 与 H1 反应后,介导分支迁移逐步打开发夹 H1,形成 T-H1 中间体。随着 H1 结构域的暴露(H2 互补序列),与 H2 结合后,再次启动分支迁移

反应,形成 T-H1-H2 络合物。然而,这种复合物极不稳定,被游离出的 T 继续触发额外的 CHA 反应,从而实现信号的级联放大。最后,得到了具有完整 G-四链体结构的 H1-H2 双链,与 Hemin 相互作用后,形成的 G4/Hemin DZ 具有催化活性,能够介导 TMB 发生氧化反应,生成 TMB₂⁺,导致溶液颜色发生明显改变,见图 1。因此,鉴于 CHA 的级联信号放大优势和便捷的比色分析方法,本文提出的 T-CHA 策略可以实现微量 AFP 的可视化检测。

1.2.2 THMP 的制备

实验前,将寡核苷酸分别在 95 ℃下加热 5 min,并使其以 1 ℃/min 的速率缓慢冷却至室温。将触发探针 T 与含有 AFP 适配子的核酸链按摩尔比 1 : 1.2 在 Tris-HCl 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L Na⁺, 5 mmol/L Mg²⁺, pH 7.2)中充分混合,在 95 ℃加热 5 min 后,室温反应 30 min,自组装形成 THMP。

1.2.3 T-CHA 反应和比色法测量

首先,将制备得到的 THMP 溶液稀释至 100 nmol/L(THMP 的终浓度即参与自组装 T 的终浓度),

依次加入 400 nmol/L 的 H1、H2 和一定浓度的 AFP，在 25 ℃ 下孵育 60 min。然后，将 1 μmol/L Hemin、5 mmol/L KCl 与上述溶液混合，继续反应 30 min。接下来，分别加入 100 μL TMB 和 H₂O₂，于黑暗环境下充分反应 15 min，完成显色反应。最后，在室温下通过紫外-可见分光光度计测量样品的吸收光谱。

1.2.4 凝胶电泳分析

将每个 DNA 样品 (5 μL, 1 μmol/L) 与 DNA 上样缓冲液 (1 μL) 混合，分别负载在 12% 的聚丙烯酰胺凝胶上。然后，使用凝胶电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司) 在 1×TBE 缓冲液中以 80 V 运行 75 min。最后，在稀释的 Super GelRed™ 染色液中染色 30 min，使用图像采集和分析软件 Image Lab™ (美国 Bio-RAD 公司) 成像。

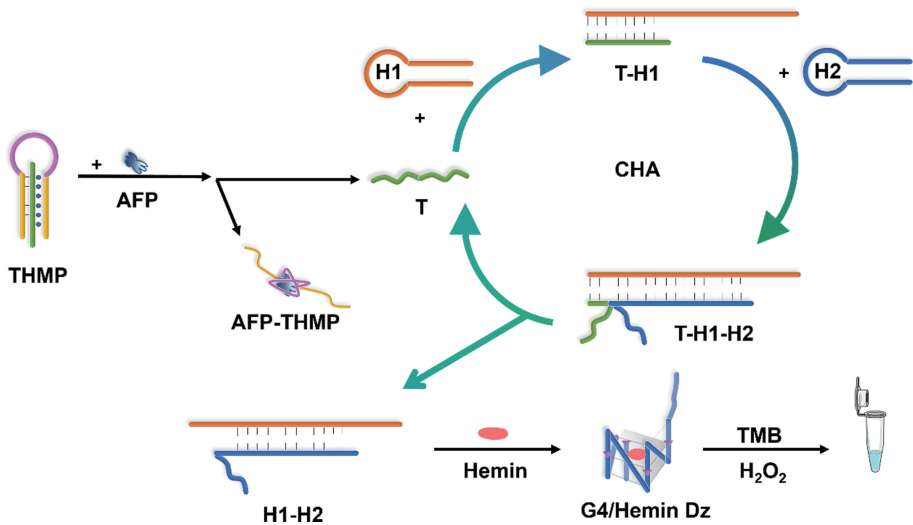


图 1 T-CHA 传感体系检测 AFP 的原理示意图

1.3 统计学处理

计数资料以例数或百分比表示。

2 结 果

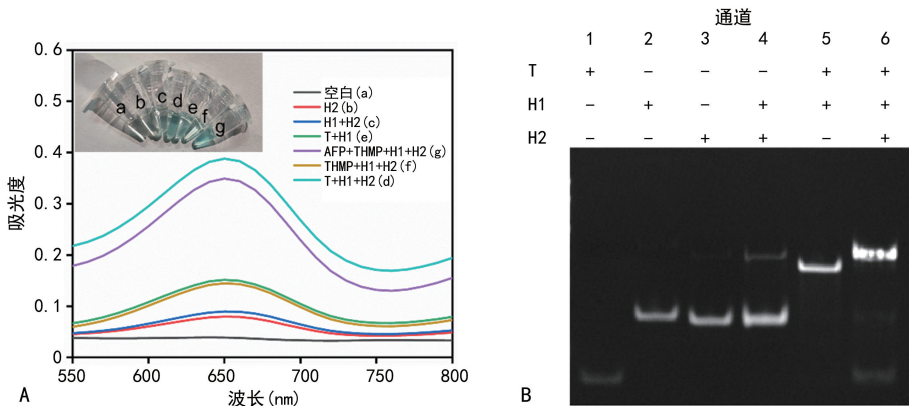
2.1 可行性分析

对比实验组 g 和对照组 f，二者的溶液颜色及吸光度都存在明显差异。此外，T 能够与 H1 发生反应 (泳道 5)，H1 和 H2 只发生了极少的杂交反应 (泳道

4)。而泳道 6 出现了明亮迁移较低的条带，见图 2。表明 T-CHA 策略可以用于 AFP 的可视化及精准定量分析。

2.2 T-CHA 实验参数的优化

T 和 H1 的最佳摩尔比为 1 : 4，CHA 的最适反应时间是 60 min，最佳温度条件为 25 ℃，缓冲液 pH 值为 7.2 时 T-CHA 的检测性能最佳，见图 3。



A: 7 种不同样品的吸光度曲线 (插图分别为各样品相应的比色响应的数码相机照片); B: T-CHA 凝胶电泳图。

图 2 T-CHA 比色生物传感器用于 AFP 的可行性分析

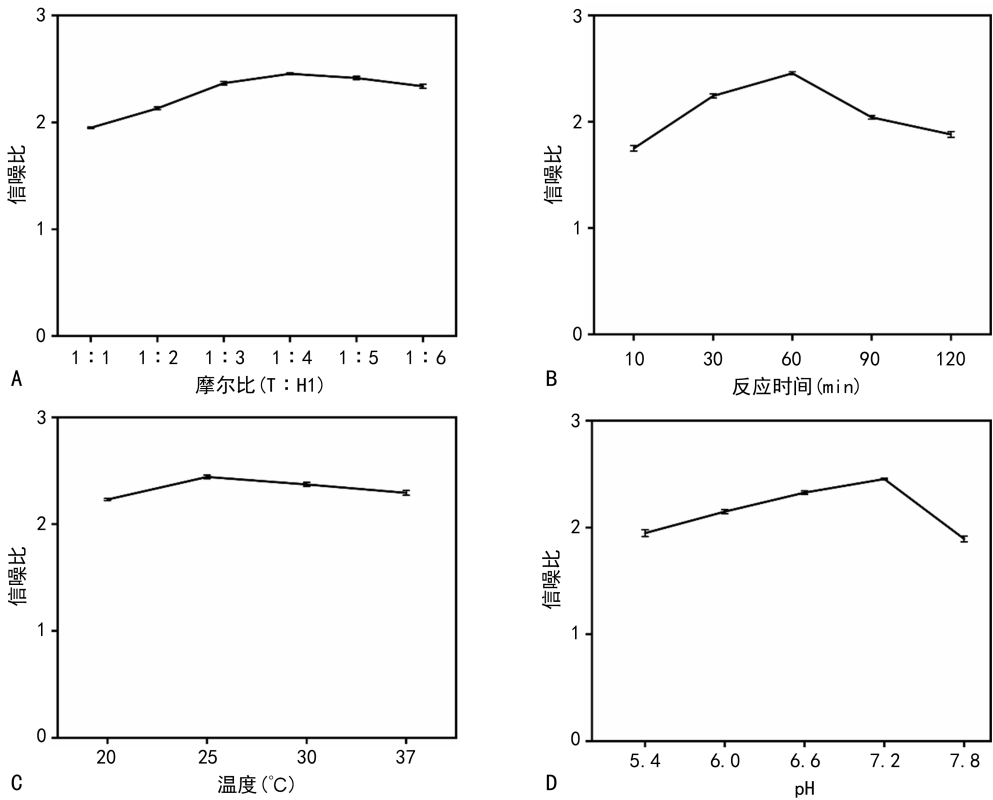
2.3 T-CHA 比色策略的检测性能

在理想的实验条件下，随着 AFP 浓度的增加，T-CHA 策略在 650 nm 处的吸光度也随之升高，同时，相应的溶液变蓝，且颜色逐渐加深，允许视觉检测低

至 5 pg/mL。检测范围为 5 pg/mL 至 10 ng/mL，线性回归方程为 $Y=0.1051\times\lg(C_{AFP})+0.0388$ ，检测限为 2.29 pg/mL (3σ 方法)。此外，使用 ELISA 对 AFP 进行了测量分析。随着 AFP 浓度从 100 pg/mL

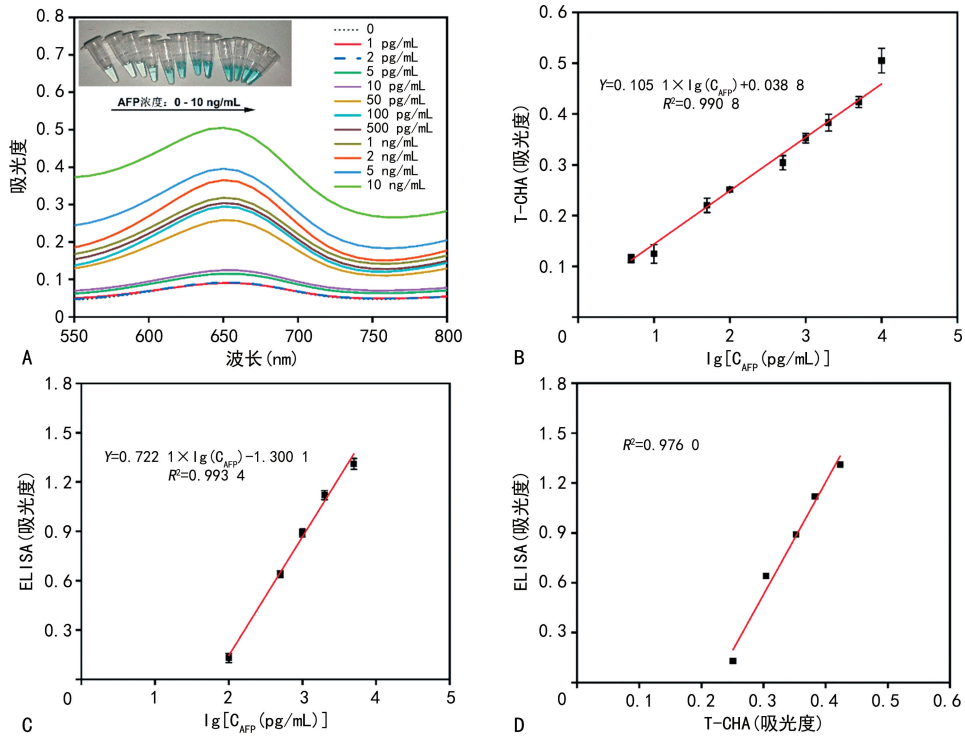
增加至 5 ng/mL,吸光度呈现持续增加的趋势($R^2 = 0.993\ 4$),检测限为 50.12 pg/mL。同时,T-CHA 策

略与 ELISA 显示出良好的线性相关性($R^2 = 0.976\ 0$),进一步验证了该策略的可靠性,见图 4。



A:T-CHA 策略中 T 与 H1 的摩尔比;B:CHA 的反应时间;C:反应温度;D:缓冲液 pH 对分析性能的影响;误差棒为 3 次实验中重复测量的标准偏差。

图 3 实验参数的优化



A:T-CHA 检测不同浓度 AFP 的紫外可见吸光光谱;B:T-CHA 策略检测 AFP 的标准曲线,吸光度范围为 5 pg/mL 至 10 ng/mL;C:ELISA 检测 AFP 的标准曲线,吸光度范围 100 pg/mL 至 5 ng/mL;D:T-CHA 策略和 ELISA 之间的线性相关性。

图 4 T-CHA 比色策略的检测性能

3 讨 论

AFP 不仅是临床上诊断 HCC 最常用的血清生物标志物^[12],还在疾病评估和预后方面具有潜在价值。在慢性肝病患者中,血清 AFP 水平的升高,可能反映组织环境允许癌症的发生,可用于评估其发展为 HCC 的风险^[13]。此外,AFP 还可作为药物反应(如索拉菲尼)的预测因子,对肝细胞癌患者具有额外的预后价值^[14]。目前,临床上常用的检测方法主要有 3 种,分别是 ELISA、放射免疫分析法和放射免疫电泳法。然而,这些方法存在一定缺陷,如操作步骤多、检测时间长、高度依赖酶的生物催化活性^[15-16],需要精准的温度控制,易受复杂环境的干扰,且成本高^[17]。因此,急需开发一种能够快速、简单、高效检测 AFP 的方法。而功能核酸中的三螺旋 DNA 分子结构在生理环境下极其稳定^[18],可以被自由设计为分析不同生物分子的特定探针,具备操作的简单性和高经济效益^[19-20]。重要的是,因其具有高度特异性和稳定性,在进行蛋白质分析时,能够极大程度地减少非特异性反应的发生,从而降低背景泄露,减少噪声^[21]。将 THMP 和 CHA 方法相结合的无酶比色分析生物传感器,具有良好的热稳定性、易于制备和修饰等特性^[22],形成的 G4/Hemin DZ 在 H_2O_2 存在的情况下,可催化 TMB、ABTS 等特定底物氧化,使其颜色和吸收光谱发生明显变化^[23-25],可直接进行视觉检测。

在可行性分析中,CHA 反应的 H1 和 H2 之间能够稳定共存的原因是动力学阻碍因素^[26],使之极小概率发生自杂交反应,只有在 T 存在的情况下,才能触发一系列的 CHA 反应。当游离的 T 与 H1、H2 结合后,触发了 CHA 循环反应,明显放大信号的输出,导致溶液变成深蓝色。这一现象表明,通过 CHA 循环反应形成的 G-四链体具有良好的信号响应能力。此外,在没有靶蛋白存在的情况下,THMP 显示出的低背景,进一步证实了 THMP 的正确组装是稳定的,可以大大减少背景泄露。而在加入一定浓度的 AFP 后,溶液变成深蓝色,吸光度也发生明显变化。表明 AFP 可以识别特定的核酸序列并破坏 THMP 的稳定结构,释放被包埋的 T,从而进一步触发 CHA 循环反应,形成具有超催化活性的 G4/Hemin DZ。

从实验参数优化的结果来看,信噪比随着 H1 浓度的增加而增加,1:5 处开始下降,这可归因于在较高的摩尔比时,过量的 H1 增加了与 THMP 自杂交的机会,导致了高背景噪声。CHA 反应在 60 min 内就达到饱和值,反应趋于平衡。此外,温度变化会明显影响 DNA 发夹结构的稳定性和 G4/Hemin DZ 催化反应的进行。众所周知,DNA 发夹结构在较低的反应温度下具有优异的热稳定性。而过低的温度则不利于提高 DNA 杂交,也影响 G4/Hemin DZ 的催化反应效率,相反,较高的温度会增加 THMP 的背景

泄漏并降低 G4/Hemin DZ 的稳定性,从而导致噪声信号的增加和相应的靶标特异性识别反应降低。因此,本实验选择 25 °C 作为最佳温度条件,最适 pH 值为 7.2 可能与 C-G·C+碱基配对在酸性 pH 下更稳定,而 G4/Hemin DZ 在 pH 7~8 时表现出较高的过氧化物酶样活性有关^[27-28]。

在灵敏度分析中,该传感器检测 AFP 允许的可视化检测低至 5 pg/mL,检测下限达到 2.29 pg/mL,在 5 pg/mL 至 10 ng/mL 范围内,吸光度与 AFP 浓度的对数呈良好的线性关系($R^2=0.990\ 8$)。表明 T-CHA 对不同浓度的 AFP 有良好的响应性,具有高灵敏度和较大的动态范围,这种高灵敏度主要归功于 THMP 的稳定性和无酶扩增方法 CHA 的级联信号放大能力。值得注意的是,T-CHA 的灵敏度明显优于常规 ELISA(约 22 倍)。同时,对比 ELISA,T-CHA 无须经过多次反复的洗涤步骤,不需要任何酶参与和长时间的孵育反应,具有高灵敏度、低成本、快速等优点,更具成本效益和时间效益。

综上所述,本研究利用低背景泄露的 THMP 和辅助靶标信号循环放大的 CHA 技术相结合的 T-CHA,成功设计并应用于肝癌的 AFP 检测。值得注意的是,整个反应过程在室温下进行,不需要任何酶参与,且无须复杂的程序和长时间的精密操作。此外,通过具有辣根过氧化物酶样活性的 G4/Hemin DNAzyme 催化 TMB 体系显色原理,可以实现对 AFP 进行半定量可视化分析。更重要的是,通过改变 THMP 上相应的适体序列,该适体传感器可以扩展到检测其他蛋白或核酸,具有良好的可编程性和简单性。因此,该方法在肿瘤的视觉监测中具有一定的应用潜力。

参考文献

- [1] XU Y,ZHANG X,ZHANG R,et al. AFP deletion leads to anti-tumorigenic but pro-metastatic roles in liver cancers with concomitant CTNNB1 mutations[J]. Cancer Lett, 2023, 566: 216240.
- [2] WANG W,WEI C. Advances in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. Genes Dis, 2020, 73: 308-319.
- [3] 尤楠,王峥,吴柯,等. BC047440 通过 ERK1/2- β -catenin 信号通路调控肝癌干细胞分化的分子机制研究[J]. 重庆医学, 2023, 52(11): 1627-1632.
- [4] HU X,CHEN R,WEI Q,et al. The landscape of alpha fetoprotein in hepatocellular carcinoma: where are we? [J]. Int J Biol Sci, 2022, 182: 536-551.

- [5] LIU Z, PU Y, BAO Y, et al. Investigation of potential molecular biomarkers for diagnosis and prognosis of AFP-negative HCC[J]. *Int J Gen Med*, 2021, 14: 4369-4380.
- [6] XU M, TANG D. Recent advances in DNA walker machines and their applications coupled with signal amplification strategies; a critical review[J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1171: 338523.
- [7] YANG X, YUAN L, XU Y, et al. Target-catalyzed self-assembled spherical G-quadruplex/hemin DNazymes for highly sensitive colorimetric detection of microRNA in serum[J]. *Anal Chim Acta*, 2023, 1247: 340879.
- [8] TIAN Z, ZHOU C, ZHANG C, et al. Recent advances of catalytic hairpin assembly and its application in bioimaging and biomedicine[J]. *J Mater Chem B*, 2022, 1028: 5303-5322.
- [9] CHEN J, WANG M, ZHOU C, et al. Label-free and dual-mode biosensor for HPV DNA based on DNA/silver nanoclusters and G-quadruplex/hemin DNzyme[J]. *Talanta*, 2022, 247: 123554.
- [10] YE T, CHEN H, BAI L, et al. A colorimetric and fluorescent dual-mode sensor based on bifunctional G-quadruplex-hemin complex for the determination of Pb²⁺[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2024, 309: 123807.
- [11] FAN Z, WENG Q, LI Y, et al. Accurate and rapid quantification of PD-L1 positive exosomes by a triple-helix molecular probe[J]. *Anal Chim Acta*, 2023, 1251: 340984.
- [12] JOHNSON P, ZHOU Q, DAO D Y, et al. Circulating biomarkers in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 1910: 670-681.
- [13] GALLE P R, FOERSTER F, KUDO M, et al. Biology and significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma[J]. *Liver Int*, 2019, 3912: 2214-2229.
- [14] SCHLEGEL A, FOLEY D P, SAVIER E, et al. Recommendations for donor and recipient selection and risk prediction: working group report from the ILTS consensus conference in DCD liver transplantation[J]. *Transplantation*, 2021, 1059: 1892-1903.
- [15] HAYRAPETYAN H, TRAN T, TELLEZ-CORRALES E, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay: types and applications[J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2612: 1-17.
- [16] TABATABAEI M S, AHMED M. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2508: 115-134.
- [17] TAKAHATA Y, HARA M, NISHINO K, et al. Immuno-mass spectrometry workflow for quantification of serum alpha-fetoprotein using antibody-immobilized magnetic beads and modified eluents[J]. *Mass Spectrom*, 2023, 121: A0122.
- [18] LIN P Y, CHI R, WU Y L, et al. Applications of triplex DNA nanostructures in sensor development[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2022, 41418: 5217-5237.
- [19] NAGDA R, PARK S, JUNG I L, et al. Silver nanoclusters serve as fluorescent rivets linking hoogsteen triplex DNA and hairpin-loop DNA structures[J]. *ACS Nano*, 2022, 168: 13211-13222.
- [20] SACHENBACHER K, KHOSHOUEI A, HONEMANN M N, et al. Triple-stranded DNA as a structural element in DNA origami[J]. *ACS Nano*, 2023, 1710: 9014-9024.
- [21] ZHANG Y, LI J H, ZHANG X L, et al. Aluminum(III)-based organic nanofibrous gels as an aggregation-induced electrochemiluminescence emitter combined with a rigid triplex DNA walker as a signal magnifier for ultrasensitive DNA assay[J]. *Anal Chem*, 2022, 952: 1686-1693.
- [22] WENG S, LIN D, LAI S, et al. Highly sensitive and reliable detection of microRNA for clinically disease surveillance using SERS biosensor integrated with catalytic hairpin assembly amplification technology[J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 208: 114236.
- [23] FU Y, DU C, ZHANG Q, et al. Colorimetric and photocurrent-polarity-switching photoelectrochemical dual-mode sensing platform for highly selective detection of mercury ions based on the split G-quadruplex-hemin complex[J]. *Anal Chem*, 2022, 9443: 15040-15047.
- [24] FAN P, LI Q, ZHANG Z, et al. A G-quadruplex-assisted target-responsive dual-mode aptasensor based on copper nanoclusters synthesized in situ in a DNA hydrogel for ultrasensitive detection of ochratoxin A[J]. *Talanta*, 2024, 270: 125550.