DOI:10.16016/j.2097-0927.202112211

基于三维刚性 DNA 桥式纳米探针的 DNA 甲基化光电化学传感器的制备和效果评价

朱垂雨[1,2],黄 辉[2],李 艳[2],方立超[2],汪莉娜[2],刘华敏[2],李承红[2],曾 涛[1],郑峻松[2] 510515 广州,南方医科大学检验与生物技术学院[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系临床检验与野战检验教研室[2]

[摘要] **目的** 构建一种基于三维刚性 DNA 桥式纳米探针(3D-TPN)的光电化学(photoelectrochemistry, PEC)传感器,用于 DNA 甲基化位点分析研究。**方法** 将二氧化钛(TiO_2)悬浮液滴加到 ITO 电极表面,形成薄膜,通过电位溶出法在 TiO_2 纳米膜表面沉积金纳米粒子(AuNPs),进一步通过 Au-S 将三维刚性 DNA 桥式探针固载到电极表面。制备 5-甲基胞嘧啶抗体和碲化镉量子点(Ab-CdTe QDs)偶联物。靶序列存在时,5-甲基胞嘧啶与抗体特异性结合,使 Ab-CdTe QDs 连接到电极表面,与 AuNPs/TiO_2 形成共敏化结构提高光电信号。在含 L-抗坏血酸(AA)的磷酸盐缓冲液(PBS)中检测该传感器的光电化学信号响应。**结果** 成功制备了三维刚性 DNA 桥式纳米探针。TiO_2 悬浮液最佳浓度为 4 mg/mL,5-甲基胞嘧啶抗体最佳浓度为 10 μg/mL。在最优实验条件下,平行检测同一条件制备的 5 支电极,其相对标准差(RSD)为 1.8%;4 周后光电流仍保持初始值的 92.5%;且该传感器对目标序列有良好的选择性。DNA 甲基化位点数与光电响应值呈线性关系,回归方程为 $\Delta I=-0.004\ 7+4.011\ 4\times N$,决定系数 R^2 为 0.999 7。**结论** 该光电化学传感器具有优异的稳定性和特异性,可用于多位点 DNA 甲基化的定量检测。

[关键词] DNA 甲基化;桥式纳米探针;光电化学;生物传感技术
[中图法分类号] R197.39; R312; R446 [文献标志码] A

Preparation and effectiveness evaluation of DNA methylation photoelectrochemical sensor based on 3-D rigid DNA bridge nanoprobes

ZHU Chuiyu[1,2], HUANG Hui[2], LI Yan[2], FANG Lichao[2], WANG Lina[2], LIU Huamin[2], LI Chenghong[2], ZENG Tao[1], ZHENG Junsong[2] [1]School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515; [2]Department of Clinical and Military Laboratory Medicine, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To construct a photoelectrochemical (PEC) sensor based on a 3-dimensional (3-D) rigid DNA bridge nanoprobe for the analysis of DNA methylation sites. **Methods** Titanium dioxide (TiO_2) suspension was dropped onto the surface of ITO electrode to form a thin film; gold nanoparticles (AuNPs) were deposited on the TiO_2 nanofilm by potentiometric stripping, and then the 3-D rigid DNA bridge probe was fixed to the electrode surface by Au-S binding. Furthermore, the 5-methylcytosine antibody and cadmium telluride quantum dots (Ab-CdTe QDs) conjugate were prepared. In the presence of the target sequence, the 5-methylcytosine specifically bound to the antibody, and made Ab-CdTe QDs connect to the electrode surface, and then a co-sensitized structure with AuNPs/TiO_2 was formed to enhance the photoelectric signal. The PEC signal response of the sensor was measured in phosphate buffer (PBS) containing L-ascorbic

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81873982);重庆市基础研究与前沿探索专项面上项目(cstc2019jcyj-zdxm0037)
[通信作者] 曾 涛,E-mail:zengt@smu.edu.cn
郑峻松,E-mail:zhengalpha@sina.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

acid (AA). **Results** 3-D rigid DNA bridge nanoprobes were successfully prepared. The optimal concentration of TiO_2 suspension was 4 mg/mL, and that of 5-methylcytosine antibody was 10 μg/ml. Under the optimal experimental conditions, 5 electrodes prepared under the same condition were tested parallelly, and the relative standard deviation (RSD) was only 1.8%. After 4 weeks, the photocurrent of the sensor still maintained 92.5% of the initial value. Meanwhile, the sensor presented good selectivity to the target sequence, and the photoelectric response value exhibited a linear relationship with the number of DNA methylation sites. The regression equation was $\Delta I = -0.004\ 7 + 4.011\ 4 \times N$, and the coefficient of determination R^2 was 0.999 7. **Conclusion** The developed photoelectrochemical sensor involves excellent stability and specificity, and can be used for quantitative detection of multi-site DNA methylation.

[**Key words**] DNA methylation; bridge DNA nanoprobes; photoelectrochemistry; biosensing techniques

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81873982) and the Basic Research and Frontier Exploration Project of Chongqing Science and Technology Commission (cstc2019jcyj-zdxm0037). Corresponding author: ZENG Tao, E-mail: zengt@smu.edu.cn; ZHENG Junsong E-mail: zhengalpha@sina.com

DNA 甲基化是一种重要的表观遗传机制,在染色质结构和基因表达调控中起重要作用[1]。现今,国内外大量研究发现 DNA 甲基化与心血管疾病[2]、糖尿病[3]、肺癌[4]、肝癌[5]和宫颈癌[6]等多种疾病相关。因此,准确检测 DNA 甲基化水平对甲基化修饰紊乱类疾病的诊断和病理机制研究至关重要。光电化学(photoelectrochemistry, PEC)传感技术因背景噪声低、成本低、操作简便和响应速度快等特点被广泛应用于 DNA 甲基化检测[7-8],但是目前大多数生物传感器是通过对 DNA 甲基转移酶活性的检测从而间接推算 DNA 甲基化水平[9-10],不是对 DNA 甲基化水平进行直接检测。因此,建立一种准确、特异的 DNA 甲基化位点分析方法已成为表观遗传疾病诊断的迫切需求。

有研究表明纳米传感器有限的界面面积限制了固定化探针分子的有效杂交数量,从而降低了探针与靶分子之间碰撞和结合的概率[11]。为突破传感器界面面积的限制,有研究者应用四面体 DNA 框架纳米结构控制螺旋 ssDNA 之间的横向距离,提高探针与靶分子之间的结合率,以提高 DNA 杂交效率和杂交动力学,从而提高传感器的灵敏度和特异性[12]。基于上述理论基础,本研究拟构建一种新型 3D-TPN,该探针以具有三维立体结构的 DNA 三棱柱(TP)为纳米框架,连接探针为纳米机械手柄,将 ssDNA 生物探针拉伸并固定在生物传感界面,以提高与靶序列的结合率、杂交效率和检测特异性。

本研究利用三维刚性 DNA 桥式纳米探针联合 AuNPs/TiO_2@CdTe QDs 双信号放大体系,探索建立一种能直接、准确分析 DNA 甲基化丰度的光电化学传感器,为 DNA 甲基化的定量检测提供一种新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 L-抗坏血酸(AA)、二氧化钛(TiO_2)、氯化镉($CdCl_2$)、亚碲酸钠($NaTeO_3$)、巯基丙酸(MPA)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;四氯金酸三水合物($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$)、硼氢化钠($NaBH_4$)购自西格玛奥德里奇贸易有限公司;5-甲基胞嘧啶(5-mC)抗体购自美国 Abcam 公司。所有化学试剂为分析纯,实验用水为超纯水(电阻率 18 MΩ/cm)。实验所用 DNA 寡核苷酸序列,均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成并经过高效液相色谱法纯化(表 1)。

1.1.2 主要仪器 CHI660D 电化学工作站(上海辰华);CompactStat Potentiostat 光电化学工作站(荷兰 Ivium);Bruker 原子力显微镜(德国布鲁克公司);Spectra S 透射电子显微镜(荷兰赛默飞);Zeiss 扫描电子显微镜(德国蔡司)。

1.2 方法

1.2.1 3D-TPN 的制备 各取 C1、C2 和 C3 序列(100 μmol/L)1 μL 加入 97 μL Tris-Mg$(OAc)_2$ 缓冲液[40 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 12.5 mmol/L Mg$(OAc)_2$],振荡混匀后于 PCR 仪中按以下程序退火处理:95 ℃/5 min,4 ℃/30 s,通过热变性法自组装成 TP 结构。使用自动 PCR 热循环仪将连接序列和锚定序列依次加载到 TP 上,退火程序如下:60 ℃/30 min,50 ℃/30 min,37 ℃/30 min,4 ℃/60 min。最后,将 500 nmol/L 的探针与上述产物混合于 37 ℃水浴中组装成三维刚性桥式 DNA 纳米探针,存于 4 ℃备用,原理见图 1。

表 1 实验所用核酸序列

名称	序列(5'→3')
C1	TCGCTGAGTATTTTGCCTGGCCTTGGTCCATTTGTTTTGCAAGTGTGGGCACGCACACTTTTCGCACCGCGACTGCGAGGACTTTTCACAAATCTG
C2	CACTGGTCAGTTTTCCACCAGCTAGATGTTGAAGTTTTTACTCAGCGACAGATTTGTGTTTTCGCTCTTCTATACTGGCGGATTTTGGTTTGCTGA
C3	CCACACTTGCTTTTGTGCCTGGCCTTCCAGTTTGTTTTCTGACCAGTGTCAGCAAACCTTTTGCGACCGCGAGGACGTCCTGTTTTGTGTGCGTGCTCC
linker strand 1(L1)	TCCTCCTCCTTTTTTTTTTCAAATGGACCAAGGCCAGGC
linker strand 2(L2)	TCCTCCTCCTCCTTTTTTTTTTCTTCAACATCTAGCTGGTGG
linker strand 3(L3)	TCCTCCTCCTCCTTTTTTTTTTCAAACTGGAAGGCCAGGCAC
anchor strand 1(A1)	GTCCTCGCAGTCGCGGTCCG
anchor strand 2(A2)	TCCGCCAGTATAGAAGAGAG
anchor strand 3(A3)	CAGGACGTCCTCGCGGTCGC
probe	GGAGGAGGAGGATTTTTTTTTTCGCGTTGACCGCGGGGTCCGACATGATGGCTGGTGGGCAGCGGGTCGCGCGTTTTTTTTTTGGAGGAGGAGGA
Target 1	C/i5MedC/GCGCGACCCGCTGCCCACCAGCCATCATGTCGGACCCCGCGGTCAACGCG
Target 2	C/i5MedC/GC/i5MedC/GCGACCCGCTGCCCACCAGCCATCATGTCGGACCCCGCGGTCAACGCG
Target 3	C/i5MedC/GC/i5MedC/GC/i5MedC/GACCCGCTGCCCACCAGCCATCATGTCGGACCCCGCGGTCAACGCG
Target 4	C/i5MedC/GC/i5MedC/GC/i5MedC/GACCC/i5MedC/GCTGCCCACCAGCCATCATGTCGGACCCCGCGGTCAACGCG
Target 5	C/i5MedC/GC/i5MedC/GC/i5MedC/GACCC/i5MedC/GCTGCCCACCAGCCATCATGTC/i5MedC/GGACCCCGCGGTCAACGCG
Target 6	C/i5MedC/GC/i5MedC/GC/i5MedC/GACCC/i5MedC/GCTGCCCACCAGCCATCATGTC/i5MedC/GGACCCC/i5MedC/GCGGTCAACGCG
Target 7	C/i5MedC/GC/i5MedC/GC/i5MedC/GACCC/i5MedC/GCTGCCCACCAGCCATCATGTC/i5MedC/GGACCCC/i5MedC/GC/i5MedC/GGTCAACGCG
M1	C/i5MedC/GGGCGACCCGCTGCCCACCAGCCATCATGTCGGACCCCGCGGTCAACGCG
M3	C/i5MedC/GGGCGACCCGCTGCCCACCAGCCATCATGTCGGACCCCGCGGTCAACGCG
M5	C/i5MedC/GGGCGACCCGCTGCGCACCAGCGATCATGTCGGACCCGGCGGTGAACGCG
Mn	C/i5MedC/GGGCGACACGTTGCGCATCAGCGATGATGTCGGAACCGGCGGTGAACGCG

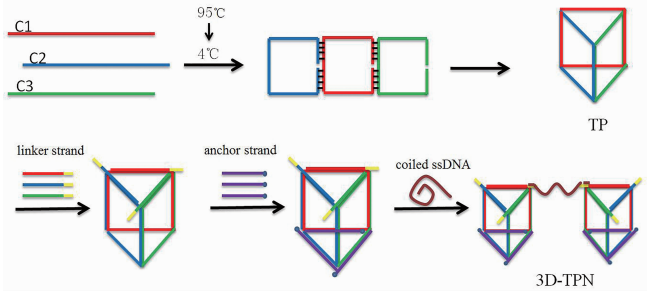


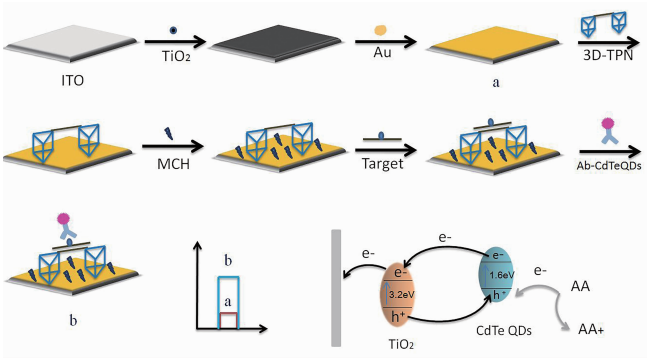
图 1 三维刚性桥式 DNA 纳米探针构建原理

1.2.2 Ab-CdTe QDs 生物偶联物的制备 根据文献[13]制备羧基化 CdTe 量子点。取 0.11 g $CdCl_2$ 和 87 μL MPA 溶于 120 mL 超纯水,超声溶解,继续加入 120 mg $NaBH_4$ 和 13.3 mg $NaTeO_3$,搅拌混匀,100 ℃加热回流 6 h,离心洗涤得到 CdTe QDs。用含 20 mmol/L EDC 和 40 mmol/L NHS 的混合液活化 CdTe QDs,将 5-甲基胞嘧啶抗体加入 CdTe QDs 溶液中,37 ℃反应 1 h,离心弃上清,重悬于 10 mmol/L PBS,标记产物为 Ab-CdTe QDs 生物偶联物,放于 4 ℃冰箱保存。

1.2.3 PEC 生物传感器的制备 用丙酮、乙醇和去离子水依次超声清洗 ITO 导电玻璃 10 min,氮气中干燥,滴加 10 μL TiO_2 悬浮液(2 mg/mL)于电极表面,晾干,将电极置于马弗炉 450 ℃煅烧 30 min,得到 TiO_2/ITO 电极;再将电极浸入 $HAuCl_4$ 溶液(0.025 mol/L)进行电沉积(电位:-0.2 V,时间:120 s),超纯水冲洗,氮气吹干,制得 AuNPs/TiO_2/ITO 电极;10 μL 三维刚性 DNA 桥式纳米探针滴加到电极表面,置于 4 ℃冰箱过夜。超纯水充分冲洗,得到 TPN/AuNPs/TiO_2/ITO 电极;滴加 10 μL 2 mmol/L MCH,室温放置 1 h,以阻断非特异性位点,超纯水清洗,标记为 MCH/TPN/AuNPs/TiO_2/ITO,即制得实验所用传感器。

1.2.4 PEC 传感器检测原理 取 10 μL 靶 DNA 序列滴加到制备好的电极表面,37 ℃孵育 2 h,去离子水冲洗,10 μL Ab-CdTe QDs 偶联物(10 μg/mL)滴加到电极表面,37 ℃孵育 1 h 后冲洗。5-甲基胞嘧啶抗体

特异性识别 5-甲基胞嘧啶位点,将 Ab-CdTe QDs 偶联物加载到靶序列上,CdTe QDs 对 AuNPs/TiO_2 的敏化作用使得光电信号产生变化,从而实现对 DNA 甲基化的定量分析,检测原理如图 2 所示。



a:AuNPs/TiO_2 的光电流响应;b:PEC 传感器组装完成后的光电流响应

图 2　基于三维刚性桥式纳米探针的 DNA 甲基化光电化学传感器构建原理图

1.2.5　光电化学检测　　PEC 检测采用标准三电极体系,辅助电极为铂丝电极,参比电极为 Ag/AgCl 电极,ITO 电极为工作电极;电解质溶液为 0.1 mol/L PBS 缓冲液(含 10 mmol/L AA),测试光源为蓝色发光二极管(15 mW/cm^2),偏置电压为 0 V,开关光间隔时间为 10 s。

1.2.6　观察指标　　①采用电化学阻抗谱(EIS)对该传感器的逐层组装过程进行表征;②PEC 生物传感器实验条件优化,包括 TiO_2 悬浮液浓度和 5-甲基胞嘧啶抗体浓度;③DNA 甲基化丰度分析:分别对 DNA 靶序列 Target1~Target7 进行检测,观察 PEC 光电响应与 DNA 甲基化位点数量的关系;④PEC 传感体系重复性、稳定性和特异性检测。

2　结果

2.1　TP 的电泳表征

图 3A 示各单链、2 条链组合和 3 条链组合通过一步热变性法合成后,在 10%聚丙烯酰胺凝胶中的电泳结果。从图中可以看出:条带的迁移速度随着 DNA 碱基数和结构复杂程度的增加而减慢,泳道 8 为 DNA 三棱柱结构,由于其分子量最大且为三维立体结构,因此迁移速率最慢。图 3B 是连接序列和锚定探针在 TP 上逐步组装的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果,泳道 2 至泳道 7 迁移速率逐渐减慢,表明连接序列和锚定探针已成功固定于 TP 上。三维刚性桥式 DNA 纳米合成结果用 1%琼脂糖进行表征,如图 3C 所示:泳道 4 是 3D-TPN 产物,由于它的碱基数目最多、三维结构最复杂,导致其迁移速度最慢。电泳结果证明 TP 和 3D-TPN 结构均组装成功。

2.2　3D-TPN 的原子力显微镜表征

采用原子力显微镜对 3D-TPN 结构进行表征。如图 4 所示:3D-TPN 具有桥式链接空间结构,表示桥式 DNA 纳米结构探针合成成功。

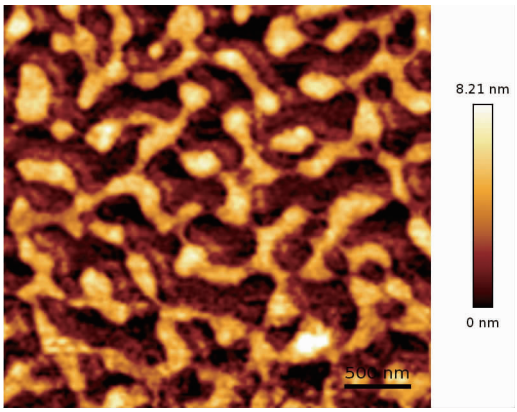
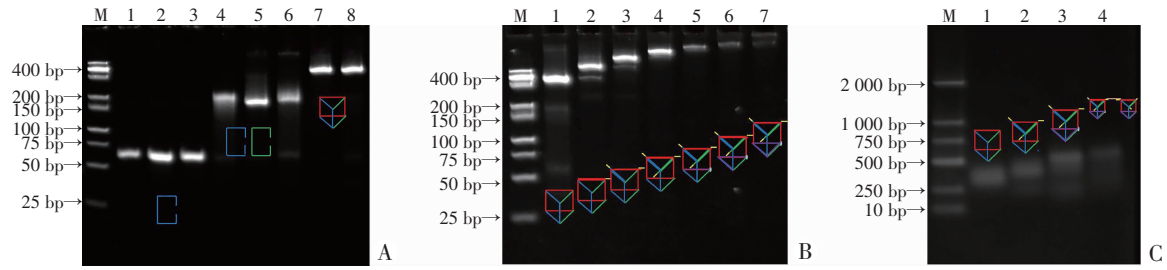


图 4　3D-TPN 的原子力显微镜表征图



A:DNA 三棱柱合成过程　M:500 bp DNA marker;1:C1;2:C2;3:C3;4:C1+C2;5:C2+C3;6:C1+C3;7:C1+C2+C3;8:C1+C2+C3(热循环);B:DNA 纳米框架探针机械臂组装过程　M:500 bp DNA marker;1:TP;2:TP+L1;3:TP+L1+L2;4:TP+L1+L2+L3;5:TP+L1+L2+L3+A1;6:TP+L1+L2+L3+A1+A2;7:TP+L1+L2+L3+A1+A2+A3;C:三维刚性 DNA 桥式纳米探针组装过程　M:2 000 bp DNA marker;1:TP;2:TP+L1+L2+L3;3:TP+L1+L2+L3+A1+A2+A3;4:3D-TPN

图 3　3D-TPN 合成的电泳表征图

2.3　CdTe 纳米微粒的表征

采用透射电镜对 CdTe QDs 进行表征,如图 5 所示:CdTe QDs 为颗粒状,形态清晰,尺寸约为 4 nm。

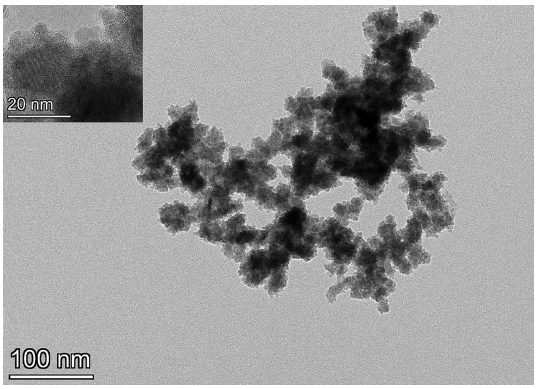
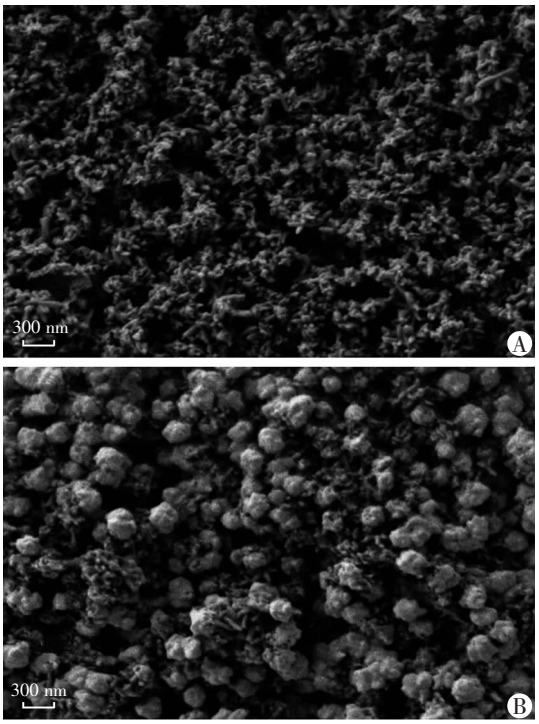


图 5　CdTe QDs 的透射电镜表征图

2.4　AuNPs/TiO_2/ITO 电极的表征

采用扫描电镜对 AuNPs/TiO_2 修饰的 ITO 电极进行形貌表征,如图 6A 所示:TiO_2 微粒较小,在 ITO 电极表面分布均匀;由图 6B 可见:覆盖于 TiO_2/ITO 电极表面的金纳米粒子均匀分布,粒径较大,表明 AuNPs 和 TiO_2 均已成功修饰到 ITO 电极表面。

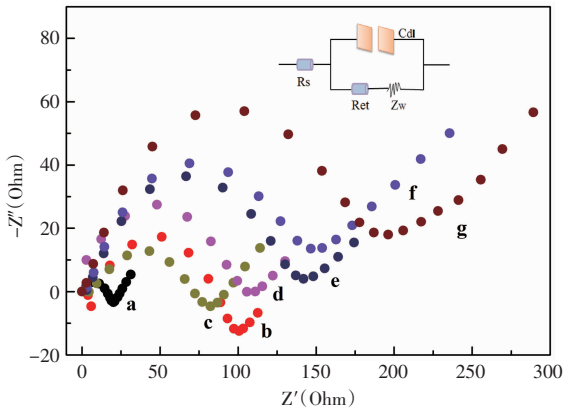


A:TiO_2 修饰 ITO 电极;B:AuNP 修饰 TiO_2/ITO 电极

图 6　AuNPs/TiO_2 修饰 ITO 电极的扫描电镜表征图

2.5　传感器组装的电化学表征

采用 EIS 在含有 5 mmol/L $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 的 0.1 mol/L KCl 电解液中对电极逐层组装过程进行表征。结果如图 7 所示:与裸 ITO 电极(曲线 a)相比,TiO_2 纳米膜覆盖后电极(曲线 b)阻抗值增大,这是由于 TiO_2 阻碍了电子转移;沉积 AuNPs 后电极(曲线 c)的阻抗值减小,是因为 AuNPs 可以加快电子的传递速率;TPN 修饰后的电极(曲线 d)所产生的阻抗值增大;表明 TPN 已成功固定到电极表面,随后依次进行 MCH 的封闭、靶序列的杂交和 Ab-CdTe QDs 复合物的组装,电极产生的阻抗值逐渐增大,是由于这些生物分子修饰在电极表面后导致空间位阻逐渐增大,影响了电荷在电解液和电极表面之间的转移和扩散。EIS 表征结果表明,光电化学传感器的每一步组装均是成功的。



a:裸 ITO;b:TiO_2/ITO;c:AuNPs/TiO_2/ITO;d:TPN/AuNPs/TiO_2/ITO;e:MCH/TPN/AuNPs/TiO_2/ITO;f:DNA/MCH/TPN/AuNPs/TiO_2/ITO;g:Ab-CdTe QDs/DNA/MCH/TPN/AuNPs/TiO_2/ITO

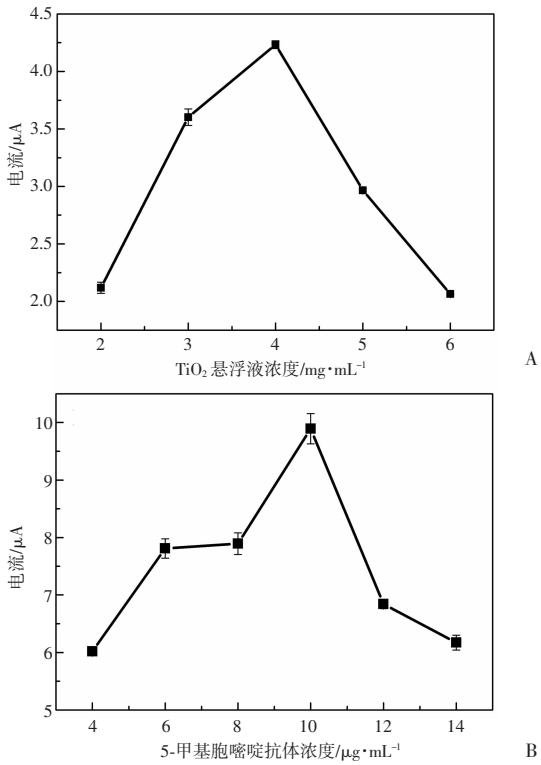
图 7　PEC 传感器的电化学阻抗谱表征

2.6　TiO_2 悬浮液浓度的优化

TiO_2 悬浮液的浓度直接影响 PEC 传感体系的检测性能,为达到最佳检测效果,对 TiO_2 悬浮液浓度(1、2、3、4、5 mg/mL)进行优化(图 8A)。由图所示:TiO_2 溶液在低浓度时,光电信号较低,在浓度为 4 mg/mL 时,响应电流值达到最大,继续增大 TiO_2 溶液浓度,光电响应变小。因此,选择 4 mg/mL 作为 TiO_2 悬浮液的最佳浓度。

2.7　5-甲基胞嘧啶抗体的优化

本研究中 Ab-CdTe QDs 偶联物作为信号放大单元,抗体浓度直接影响光电流信号的产生,通过控制 5-甲基胞嘧啶抗体浓度这一单一变量研究其对传感器响应的影响。如图 8B 所示:当抗体浓度从 3 μg/mL 增加到 10 μg/mL,光电流响应值逐渐增大,在 10 μg/mL 达到峰值,但抗体浓度大于 10 μg/mL,光电流响应逐渐下降,说明抗体浓度已达到饱和,故 10 μg/mL 为本研究中 5-甲基胞嘧啶抗体最佳浓度。



A: TiO_2 悬浮液浓度对 PEC 电流响应值的影响; B: 5-甲基胞嘧啶浓度对 PEC 电流响应值的影响

图 8 不同实验因素对 PEC 电流响应值的影响

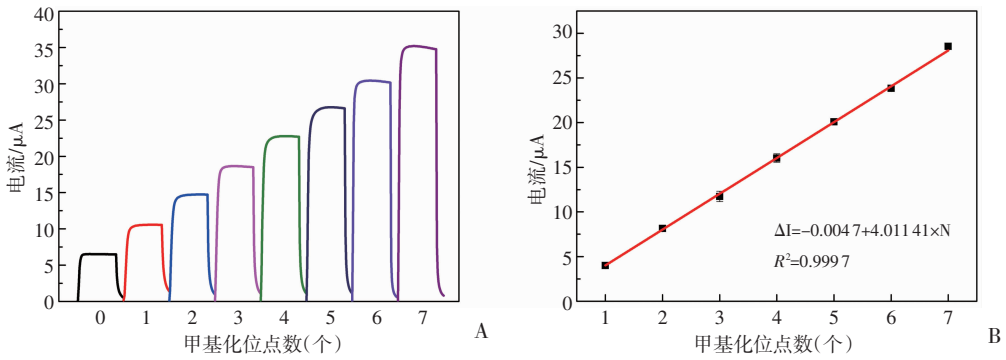
2.8 PEC 生物传感器对 DNA 甲基化位点的定量分析

在最适实验条件下,利用该 PEC 传感器分别对 100 mmol/L 的 Target1~Target7 进行检测,PEC 信号响应随着 DNA 甲基化位点数量的增加而增大,在 1~7 个甲基化位点,PEC 信号响应值与 DNA 甲基化位点数量呈线性关系,并计算得回归方程 $\Delta I = -0.004\ 7 + 4.011\ 4 \times N$,决定系数 R^2 为 0.999 7,见图 9。

2.9 PEC 传感器的重复性、稳定性和特异性研究

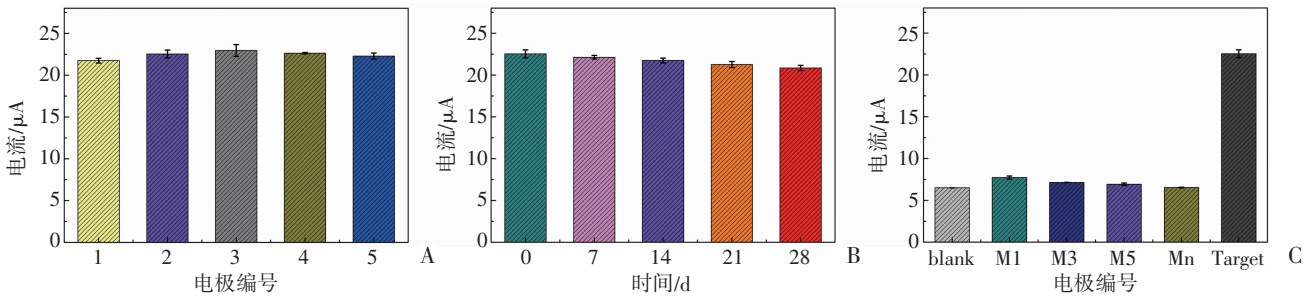
在相同实验条件下,同时制备 5 支电极对 100 mmol/L 的 Target4 目标序列进行光电信号检测,每根电极重复测量 3 次,结果如图 10A 所示:计算所得光电信号相对标准差为 1.8%,证明该传感器具有良好的重复性。将制备好的电极置于 4 ℃冰箱保存,每周重新检测其光电信号响应值,如图 10B 所示:4 周后光电流仍保持初始值的 92.5%,该传感器稳定性较佳。

为评估该传感器的特异性,将 TPN 修饰后的工作电极分别与浓度为 100 mmol/L 的一碱基错配序列(M1)、三碱基错配序列(M3)、五碱基错配序列(M5)和非互补序列(Mn)杂交,检测其光电流信号。从图 10C 可见:目标序列 Target4 的光电流响应值远高于其他干扰 DNA 序列,结果表明该传感器对目标序列的检测有较高的特异性。



A:不同数量甲基化位点的 PEC 响应;B:PEC 信号强度与甲基化 DNA 位点数的相关曲线

图 9 PEC 生物传感器的检测性能



A:重复性检测;B:稳定性分析;C:特异性研究 blank:未加互补序列;M1:一碱基错配序列;M3:三碱基错配序列;M5:五碱基错配序列;Mn:非互补序列;Target:Target 4

图 10 PEC 传感器分析体系的性能

3 讨论

TiO_2 具有良好的载流子传输性能、高稳定性和低毒性等优点,被广泛应用于光电化学生物传感,但其带隙较宽(3.2 eV),仅在 387.5 nm 下有紫外活性,导致光转换率低[14]。金纳米粒子是一种常见的贵金属,可产生表面等离子体共振效应从而提高 TiO_2 的光电转换效率[15]。为扩大吸收范围,引入 AuNPs 对 TiO_2 进行修饰,可有效抑制电子-空穴对的复合,提高光电转换效率,从而产生强而稳定的光电流信号[16]。同时,本研究采用共敏化放大策略来增强实验中的光电流信号。CdTe QDs 具有优异的光物理特性,可充分利用光能,能有效促进载流子分离[17]。由于 CdTe QDs 带隙比 AuNPs/TiO_2 窄,CdTe QD 对 AuNPs/TiO_2 有敏化作用,可增强传感器的光电流信号响应。

与细胞内 DNA 杂交不同,体外 DNA 检测中,ssDNA 的无序构象限制 DNA 的杂交过程,导致杂交动力学低、结合效率低和特异性低[18]。近年来,纳米机械力的应用促进了体外 DNA 分析设计的发展,如生物传感器和生物芯片可灵敏地检测生物分子,被广泛用于精准医学、生物研究和诊断[19]。本研究采用 DNA 三棱柱框架作为纳米机械手臂拉伸捕获探针,形成三维刚性 DNA 桥式纳米探针,可极大地提高生物传感器检测的准确性和特异性,为体外 DNA 甲基化丰度检测提供一种新方法。

目前检测 DNA 甲基化的经典方法是亚硫酸盐转化法和甲基化敏感的限制性内切酶消化(MSRE)法。亚硫酸氢盐测序法检测结果较为准确,但易出现假阳性结果,且目前无法统一认证检测结果。MSREs 可识别和切割 DNA 甲基化特异性序列,但目前只有少数 MSRE(例如 HpaII 和 DpnI)可用,仅能检测特定的 DNA 甲基序列[20]。并且,目前大多数生物传感器是基于 DNA 甲基转移酶活性间接推算 DNA 甲基化水平,不能直接、准确地量化 DNA 甲基化水平。本研究采用三维刚性桥式 DNA 纳米探针为捕获探针,AuNPs/TiO_2 联合 CdTe QDs 为光活性材料构建光电化学传感器并用于 DNA 甲基化的定量检测。当靶序列存在时,三维刚性桥式 DNA 纳米探针通过碱基互补配对将其固定在电极表面,Ab-CdTe QDs 偶联物通过 5-甲基胞嘧啶抗体特异性识别 5-甲基胞嘧啶连接到电极表面,CdTe QDs 共敏化 AuNPs/TiO_2 复合材料可促进电子从抗坏血酸电解质向电极表面转移,提高 AuNPs/TiO_2 的光电流响应。在最佳实验条件下,随着甲基化位点数目的增多,结合到电极表面的 Ab-CdTe QDs 偶联物也增多,光电信号响应值随之增高,且变化值与 DNA 甲基化位点数量成正比,可对 DNA 甲基化位点数量进行检测分析,更换捕获探针序列后可检测其他未知的甲基化位点。所构建的光电化学传感器可对多甲基化位点进行分析,且具备准确性高、稳定性好和检测时间短等优点,有望应用于表观遗传类疾病和相关肿瘤的早期临床诊断。

参考文献:

[1] HUANG J, ZHANG S, MO F, *et al*. An electrochemical DNA biosensor analytic technique for identifying DNA methylation specific sites and quantify DNA methylation level [J]. Biosens Bioelectron, 2019, 127: 155-160. DOI:10.1016/j.bios.2018.12.022.

[2] PRASHER D, GREENWAY S C, SINGH R B. The impact of epigenetics on cardiovascular disease [J]. Biochem Cell Biol, 2020, 98(1): 12-22. DOI:10.1139/bcb-2019-0045.

[3] ZHANG Y H, CHEN Y Y, QU H M, *et al*. Methylation of HIF3A promoter CpG Islands contributes to insulin resistance in gestational diabetes mellitus [J]. Mol Genet Genomic Med, 2019, 7(4): e00583. DOI:10.1002/mgg3.583.

[4] WEI B, WU F X, XING W Q, *et al*. A panel of DNA methylation biomarkers for detection and improving diagnostic efficiency of lung cancer [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 16782. DOI:10.1038/s41598-021-96242-6.

[5] ZHENG Y C, HUANG Q Q, DING Z J, *et al*. Genome-wide DNA methylation analysis identifies candidate epigenetic markers and drivers of hepatocellular carcinoma [J]. Brief Bioinform, 2018, 19(1): 101-108. DOI:10.1093/bib/bbw094.

[6] SALTA S, MAIA-MOÇO L, ESTEVÃO-PEREIRA H, *et al*. Performance of DNA methylation-based biomarkers in the cervical cancer screening program of northern Portugal: a feasibility study[J]. Int J Cancer, 2021, 149(11): 1916-1925. DOI:10.1002/ijc.33778.

[7] WANG H Y, YIN H S, HUANG H, *et al*. Dual-signal amplified photoelectrochemical biosensor for detection of N^6-methyladenosine based on $BiVO_4$-110-TiO_2 heterojunction, Ag^+-mediated cytosine pairs[J]. Biosens Bioelectron, 2018, 108: 89-96. DOI:10.1016/j.bios.2018.02.056.

[8] XIE Y Z, ZHANG M, BIN Q Y, *et al*. Photoelectrochemical immunosensor based on CdSe@ $BiVO_4$ co-sensitized TiO_2 for carcinoembryonic antigen [J]. Biosens Bioelectron, 2020,

150: 111949. DOI:10.1016/j.bios.2019.111949.

[9] HOU T, XU N N, WANG W X, *et al*. Label-free and immobilization-free photoelectrochemical biosensing strategy using methylene blue in homogeneous solution as signal probe for facile DNA methyltransferase activity assay[J]. Biosens Bioelectron, 2019, 141: 111395. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111395.

[10] HAQUE M H, GOPALAN V, ISLAM M N, *et al*. Quantification of gene-specific DNA methylation in oesophageal cancer via electrochemistry[J]. Anal Chim Acta, 2017, 976: 84-93. DOI:10.1016/j.aca.2017.04.034.

[11] LIN M H, WANG J J, ZHOU G B, *et al*. Programmable engineering of a biosensing interface with tetrahedral DNA nanostructures for ultrasensitive DNA detection[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2015, 54(7): 2151-2155. DOI:10.1002/anie.201410720.

[12] LI F Q, MAO X H, LI F, *et al*. Ultrafast DNA sensors with DNA framework-bridged hybridization reactions[J]. J Am Chem Soc, 2020, 142(22): 9975-9981. DOI:10.1021/jacs.9b13737.

[13] DING M L, WANG K, FANG M, *et al*. MPA-CdTe quantum dots as "on-off-on" sensitive fluorescence probe to detect ascorbic acid *via* redox reaction[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2020, 234: 118249. DOI: 10.1016/j.saa.2020.118249.

[14] JIAO W, ZHU J X, LING Y, *et al*. Photoelectrochemical properties of MOF-induced surface-modified TiO_2 photoelectrode[J]. Nanoscale, 2018, 10(43): 20339-20346. DOI:10.1039/c8nr06471g.

[15] LIU X P, CHEN J S, MAO C J, *et al*. Enhanced photoelectrochemical DNA sensor based on TiO_2/Au hybrid structure[J]. Biosens Bioelectron, 2018, 116: 23-29. DOI:10.1016/j.bios.2018.05.036.

[16] SHI H M, ZHANG S, ZHU X P, *et al*. Uniform gold-nanoparticle-decorated{001}-faceted anatase TiO_2 nanosheets for enhanced solar-light photocatalytic reactions[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9(42): 36907-36916. DOI: 10.1021/acsami.7b12470.

[17] SUN B, DONG J, CUI L, *et al*. A dual signal-on photoelectrochemical immunosensor for sensitively detecting target avian viruses based on AuNPs/g-C_3N_4 coupling with CdTe quantum dots and in situ enzymatic generation of electron donor[J]. Biosens Bioelectron, 2019, 124/125: 1-7. DOI:10.1016/j.bios.2018.09.100.

[18] GUO C L, HARRIS N C, WIJERATNE S S, *et al*. Multiscale mechanobiology: mechanics at the molecular, cellular, and tissue levels[J]. Cell Biosci, 2013, 3(1): 25. DOI:10.1186/2045-3701-3-25.

[19] BLANCHARD A T, SALAITA K. Emerging uses of DNA mechanical devices[J]. Science, 2019, 365(6458): 1080-1081. DOI:10.1126/science.aax3343.

[20] ZHANG Q, WU Y X, XU Q F, *et al*. Recent advances in biosensors for *in vitro* detection and *in vivo* imaging of DNA methylation[J]. Biosens Bioelectron, 2021, 171: 112712. DOI:10.1016/j.bios.2020.112712.

(收稿:2021-12-23;修回:2022-01-24)

(编辑 邓强庭)