



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112458151 B

(45) 授权公告日 2022.09.13

(21) 申请号 202011527793.4

EP 1580280 A1,2005.09.28

(22) 申请日 2020.12.22

Xie, NL等.Competition-Mediated FRET-Switching DNA Tetrahedron Molecular Beacon for Intracellular Molecular Detection.《ACS SENSORS》.2016,第1卷第1445-1452页,参见第1446页-1450页,Figure 1、3、5及 Supporting Information.

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112458151 A

(43) 申请公布日 2021.03.09

(73) 专利权人 闽江学院  
地址 350108 福建省福州市闽侯县上街镇  
溪源宫路200号

Pei, H等.Reconfigurable Three-Dimensional DNA Nanostructures for the Construction of Intracellular Logic Sensors.《ANGEWANDTE CHEMIE-INTERNATIONAL EDITION》.2012,第9020-9024页.

(72) 发明人 邢超 王军

(74) 专利代理机构 福州元创专利商标代理有限公司 35100  
专利代理师 饶文君 蔡学俊

Wang, H等.High-performance biosensing based on autonomous enzyme-free DNA circuits.《TOPICS IN CURRENT CHEMISTRY》.2020,第9020-9024页.

(51) Int.Cl.  
C12Q 1/682 (2018.01)

审查员 徐烜

(56) 对比文件  
CN 111175268 A,2020.05.19  
CN 111793673 A,2020.10.20

权利要求书1页 说明书5页  
序列表2页 附图4页

(54) 发明名称  
加速的DNA四面体分子探针在miRNA检测及活细胞成像中的应用

(57) 摘要  
本发明公开了加速的DNA四面体分子探针在miRNA检测及活细胞成像中的应用。该核酸传感器由探针HP和DTMB组合而成;本发明整合催化杂交组装(CHA)的无酶信号放大技术与DNA四面体分子探针于一体,制备了加速的DNA四面体分子探针,利用空间限域效应,有效的实现了细胞内miRNA的快速成像检测。局部CHA可以有效实现信号放大,同时加快检测速度和检测灵敏度。DNA四面体可以避免细胞内核酸酶的降解作用,降低假阳性信号。本分子探针具有反应迅速,灵敏度高,抗干扰能力强等优点,能够弥补现有miRNA检测方法的不足,实现miRNA的快速准确的检测。

1. 加速的DNA四面体分子探针, 其特征在于, 所述加速的DNA四面体分子探针 accelerated-DTMB包含: 一个DNA发卡结构HP和一个荧光染料修饰的分子探针MB嵌入的DNA四面体, 即DNA四面体分子探针DTMB; 所述DNA四面体分子探针DTMB由四条DNA单链S1、S2、S3和S4自组装而成; 所述DNA发卡结构HP序列如SEQ ID NO.5所示; 所述S1、S2、S3和S4序列如SEQ ID NO.1-4所示; 荧光染料FAM和Dabcyl1分别修饰在分子探针MB的颈部两侧对应位置, 所述分子探针MB位于DTMB的一条棱S1的延伸部分, DNA发卡结构HP通过碱基互补连接在靠近MB的顶点;

所述的加速的DNA四面体分子探针的制备方法的制备步骤如下:

(1) 将DNA发卡结构HP预先溶于 $1 \times \text{TAE}/\text{Mg}^{2+}$ 缓冲液, 其HP终浓度为 $2\mu\text{M}$ ,  $95^\circ\text{C}$ 加热5分钟后, 迅速放入冰浴中, 维持半小时, 使其形成稳定的发卡结构HP;

(2) 将探针S1、S2、S3和S4等比例溶于 $1 \times \text{TAE}/\text{Mg}^{2+}$ 缓冲液中, 使得各探针浓度为 $2\mu\text{M}$ ,  $95^\circ\text{C}$ 加热8分钟, 迅速放入冰浴中, 维持半小时, 使其完全杂交形成DNA四面体分子探针DTMB;

(3) 等体积比例混合HP和DTMB于 $1 \times \text{TAE}/\text{Mg}^{2+}$ 缓冲液中, 在 $37^\circ\text{C}$ 下反应3小时, 组装形成加速的DNA四面体分子探针。

2. 一种如权利要求1所述的加速的DNA四面体分子探针在miRNA检测及活细胞成像中的应用。

## 加速的DNA四面体分子探针在miRNA检测及活细胞成像中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及加速的DNA四面体分子探针在检测、成像领域中的应用,尤其涉及一种加速的DNA四面体分子探针在活细胞内miRNA检测、成像中的应用,属于生物技术领域。

### 背景技术

[0002] miRNA作为一种重要的肿瘤标志物,它在细胞中的分布和表达水平与癌症的发生发展有着重要关联。因此,实现细胞内miRNA的原位成像和检测对于肿瘤的早期诊断、预后监测以及相关药物研发具有重要意义。传统的miRNA检测方法包括Northern印迹杂交法,微阵列杂交和实时定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)等。尽管这些方法的准确性好,但在实际应用中仍存在一些不足。例如Northern印迹和微阵列杂交技术的特异性和灵敏度不高,qRT-PCR方法操作繁琐、引物设计严格且必须依赖精良仪器等,而且目前大多数的检测技术只能用于体外检测,对活细胞内miRNA的原位成像检测仍然存在困难。因此,发展用于活细胞内microRNA原位成像的新型探针具有重要的意义。

[0003] 本发明将“催化杂交组装”(CHA)无酶信号放大技术与DNA四面体分子探针结合起来,制备了加速的DNA四面体分子探针。CHA可以实现信号放大,提高了待测miRNA的检测灵敏度。DNA四面体可以避免细胞内核酸酶的降解作用,降低假阳性信号。同时,DNA四面体对CHA发卡对的空间限域作用,可以有效的提高CHA反应的速率,缩短检测时间。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提出加速的DNA四面体分子探针在miRNA检测及活细胞成像中的应用。

[0005] 当待测miRNA存在时,引发DNA四面体探针上的原位CHA放大过程,HP与MB杂交生成双链,FAM与Dabcyl的相对距离变大,荧光恢复,从而以miR-21分子为模型实现了活细胞内miRNA的原位成像。通过相对荧光变化值F与miRNA浓度成正比的关系,实现了对不同浓度的miR-21的定量。

[0006] 所述加速的DNA四面体分子探针包含:一个DNA发卡结构(HP)和一个修饰有荧光染料的分子探针MB嵌入的DNA四面体(DNA四面体分子探针DTMB);所述的DNA四面体分子探针DTMB由四条DNA单链S1、S2、S3和S4自组装而成;所述分子探针MB位于单链S1中,组装后位于DTMB的一条棱S1的延伸部分。荧光染料FAM和Dabcyl分别修饰在MB的茎部两侧对应位置,所述DNA发卡结构HP通过碱基互补连接在靠近MB的顶点。所述HP与MB构成催化杂交组装(CHA)发卡对,在miRNA存在时,HP被miRNA打开后与MB杂交并释放出miRNA。

[0007] 所述DNA发卡结构HP序列如SEQ ID NO.5所示;所述S1、S2、S3和S4序列如SEQ ID NO.1-4所示。

[0008] 所述的加速的DNA四面体分子探针的合成步骤如下:

[0009] (1)将发卡结构HP预先溶于1xTAE/Mg<sup>2+</sup>缓冲液,其HP终浓度为2μM,95℃加热5分钟

后,迅速放入冰浴中,维持半小时,使其形成稳定的发卡结构HP;

[0010] (2)将探针S1、S2、S3和S4等比例溶于1xTAE/Mg<sup>2+</sup>缓冲液中,使得各探针浓度为2μM,95℃加热8分钟,迅速放入冰浴中,维持半小时,使其完全杂交形成DNA四面体分子探针(DTMB);

[0011] (3)等体积比例混合HP和DTMB于1xTAE/Mg<sup>2+</sup>缓冲液中,在37℃下反应3小时,组装形成加速的DNA四面体分子探针(accelerated-DTMB)。

[0012] 上述方法中,所述的1xTAE/Mg<sup>2+</sup>缓冲液成分为20 mM Tris、2 mM EDTA、12.5 mM MgCl<sub>2</sub>;pH 7.4。

[0013] 所述的加速的DNA四面体分子探针在制备miRNA检测及活细胞成像试剂中的应用。

[0014] 所述的加速的DNA四面体分子探针对miRNA的检测及成像步骤如下:

[0015] (1)基于加速的DNA四面体分子探针实现miRNA的检测:在1xTAE/Mg<sup>2+</sup>缓冲液中,将accelerated-DTMB探针(100nM)与miRNA(终浓度0,0.1,1,2,5,8,10,20,50,100 nM)混合,在室温下孵育1h,利用荧光光谱仪测量体系的荧光强度;

[0016] (2)进一步地,基于加速的DNA四面体分子探针实现活细胞内miRNA的成像分析:将100μL accelerated-DTMB探针(500nM)混匀于900μL opti-MEM中,5min后将混合液加入细胞中,37℃培养2h后,用PBS进行洗涤,然后通过共聚焦显微镜对细胞进行成像,通过荧光来对细胞内miRNA成像。同时,通过荧光信号强弱判断不同细胞内miRNA含量的高低。

[0017] 本发明的技术原理为:

[0018] 本发明的工作原理如图1所示。所述的加速的DNA四面体分子探针包含DNA发卡结构(HP)和荧光染料修饰的MB嵌入的DNA四面体分子探针(DTMB)两个组分。探针进入细胞后,在没有目标miRNA存在时,accelerated-DTMB上的HP和MB不会发生杂交。在目标miRNA存在时,待测miRNA与HP杂交,打开HP的发卡结构,暴露出能与MB杂交的结构域,进而与MB发生杂交形成HP-MB复合结构,同时目标miRNA被置换下来。HP与MB的杂交导致MB两端FAM和Dabcyl远离,FAM荧光恢复,产生可以检测的荧光信号,用于指示细胞内miRNA的分布。同时,释放出的miRNA可以触发其他的accelerated-DTMB发生原位CHA循环以实现信号放大。此时,探针上FAM的荧光强度改变值与miRNA的浓度呈正相关,根据荧光团的荧光强度改变值判断miRNA的浓度。

[0019] 与现有技术相比,本发明具有以下特点:

[0020] (1)单个目标miRNA可以循环催化产生多个HP/MB复合物,从而对荧光信号进行放大,可以实现细胞内低浓度目标miRNA的成像检测。

[0021] (2)DNA四面体分子探针上的HP和MB由于相对距离较近,可形成“空间限制效应”加速CHA反应速率,缩短检测时间,实现快速检测。

[0022] (3)由于DNA四面体在细胞内具有稳定性,可以避免细胞内核酸酶的降解作用影响,从而避免了检测的假阳性信号。

## 附图说明

[0023] 图1为加速的DNA四面体分子探针用于体内miRNA检测的原理图。

[0024] 图2 accelerated-DTMB的合成PAGE电泳表征图。其中Lane 1, S1; Lane 2, S1 + S2; Lane 3, S1 + S2 + S3; Lane 4, S1 + S2 + S3 + S4; Lane 5, S1 + S2 + S3 +

S4 + HP。

[0025] 图3为加速的DNA四面体分子探针与非加速的DNA四面体探针用于检测不同浓度的目标miRNA分子的荧光图谱及相应的荧光强度与浓度的标准曲线。其中,A为非加速的DNA四面体探针用于检测不同浓度的目标miRNA分子的荧光图谱,B为相应的荧光强度与浓度的标准曲线;C为加速的DNA四面体探针用于检测不同浓度的目标miRNA分子的荧光图谱;D为相应的荧光强度与浓度的标准曲线。

[0026] 图4 accelerated-DTMB 对不同检测序列的特异性识别能力。

[0027] 图5非加速的DNA四面体探针和加速的DNA四面体探针的稳定性对比。(A) accelerated-DTMB在0.5 U/ml的DNase I的稳定性;(B) MBs在0.5 U/ml的DNase I的稳定性。

[0028] 图6非加速的DNA四面体探针和加速的DNA四面体探针对细胞内miRNA的成像能力对比。

[0029] 图7为加速的DNA四面体分子探针与非加速的DNA四面体探针分析不同种类活细胞内的miR-21的情况对比。

### 具体实施方式

[0030] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白,以下结合具体实施例,并参照附图,对本发明进一步详细说明,但本发明不受下述实施例的限制。

[0031] 本发明所用到的DNA序列链如下:

[0032] 表1实验所用探针完整序列

| Name     | Sequence (5'-3')  |
|----------|---|
| S1       | CCGACGTAGCTGTGTTTTTTTTTTTAGTCTGAATTCCTGGAGATACATGGC<br>ATTTGCTACACGCCCTATTAGAAGGTCCGATTTAAGCT/FAM/AGAGCATCC<br>AATGTAGCTTATCAGACTGCATTGGATGCT/Dabcyl/CCGAAGAGCCGTAGCA |
| S2       | GCAGTTGACGCGACAGTCGTTCAAGCCTTTCGGACCTTCTAATAGGGCGTG<br>TAGCATTATGCGAGGGTCCAATACTCTGTTCCGG   |
| S3       | GGCTTGAACGACTGTCGCGTCAACTGCTTACGACACTACGTAACGGTCGAG<br>GACTGTTGCTACGGCTCTTCG  |
| S4       | TGCCATGTATCTCCAGGAATTCAGACTTTCAGTCCCGACCGTTACGTAGTG<br>TCGTTTCCGGAACAGAGTATTGGACCCTCGCAT  |
| HP       | CACAGCTACGTCGGTTTCAACATCAGTCTGATAAGCTACATTGGATGCTCT<br>AGCTTATCAGACTG   |
| miRNA21  | UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A   |
| miR-429  | UAAUACUGUCUGGUAAAACCGU  |
| miR-200b | UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA  |
| let-7d   | AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU  |

[0033] 实施例1

[0034] 所述的加速的DNA四面体分子探针的合成步骤如下:

[0035] (1)将发卡结构HP预先溶于1xTAE/Mg<sup>2+</sup>缓冲液,终浓度为2μM,95℃加热5分钟后,迅速放入冰浴中,维持半小时,使其形成稳定的发卡结构HP;

[0037] (2)将探针S1、S2、S3和S4等比例溶于1xTAE/Mg<sup>2+</sup>缓冲液中,使得各探针浓度为2μM,95℃加热8分钟,迅速放入冰浴中,维持半小时,使其完全杂交形成DNA四面体分子探针(DTMB);

[0038] (3)等体积比例混合HP和DTMB于1xTAE/Mg<sup>2+</sup>缓冲液中,在37℃下反应3小时,组装形成加速的DNA四面体分子探针(accelerated-DTMB)。

[0039] 使用PAGE凝胶电泳进行表征分析,如图2所示,随着DNA序列的增多,电泳条带迁移逐渐变慢,证明合成的物质分子量逐渐变大,由此可以证明accelerated-DTMB的成功合成。

[0040] 实施例2 accelerated-DTMB用于体外miRNA检测

[0041] 在1xTAE/Mg<sup>2+</sup>缓冲液中,将accelerated-DTMB探针(终浓度100nM)与不同浓度的目标miRNA(终浓度0,0.1,1,2,5,8,10,20,50,100 nM)混合,在室温下孵育1h,利用荧光光谱仪测量体系的荧光强度。

[0042] 由图3C可见,随着目标miRNA浓度的增加,体系的荧光强度逐渐升高,该荧光强度的改变值与目标miRNA浓度在0.1-8 nM范围内呈良好的线性关系(图3D),检出限为2 pM,实现了对目标miRNA的高灵敏性检测。为了论证accelerated-DTMB优于传统CHA的检测能力,此处将未结合的HP-DTMB探针(游离的HP与DTMB的混合体)同时用于检测不同浓度的靶标miRNA分子(图3A和B),对比发现,accelerated-DTMB探针的灵敏度更高,检测效果更好。

[0043] 实施例3 考察accelerated-DTMB探针对不同miRNA的特异性识别

[0044] 在1xTAE/Mg<sup>2+</sup>缓冲液中,将accelerated-DTMB探针(终浓度100nM)分别与终浓度10nM的miR-429,miR-200b,let-7d以及miRNA21等miRNA分别混合,在室温下孵育1h,利用荧光光谱仪测量各体系的荧光强度。

[0045] 由图4可见,miRNA 21实验组中荧光强度的荧光强度明显高于其他组,证明accelerated-DTMB可以对目标miRNA 21进行特异性识别。

[0046] 实施例4 考察accelerated-DTMB探针的稳定性

[0047] 将accelerated-DTMB探针(浓度3 μM)和单纯的发卡探针HP(浓度3 μM)分别与0.5 U/ml的DNase I酶反应不同时间(0-60分钟),用琼脂糖凝胶来验证accelerated-DTMB探针的稳定性。结果如图5所示,accelerated-DTMB探针(A)在0.5 U/ml的DNase I酶中反应60分钟条带未发生明显变化,而单纯的发卡探针HP(B)在40分钟时已经被降解,表明accelerated-DTMB探针在复杂的生物环境中具有相当好的稳定性。

[0048] 实施例5 基于accelerated-DTMB探针的miRNA-21的细胞成像分析

[0049] 以上实验结果的基础上,我们应用accelerated-DTMB探针于活细胞成像。具体步骤为:

[0050] 将100μL accelerated-DTMB探针(浓度500nM)混匀于900μL opti-MEM中,5min后将混合液加入细胞中,37℃培养2h后,用PBS进行洗涤,然后通过共聚焦显微镜对细胞进行成像,通过荧光来对细胞内miRNA成像。

[0051] 图6共聚焦显微镜图像显示,当HeLa细胞与accelerated-DTMB孵育后,在细胞中能同时观察到明显的绿色通道荧光,绿色通道代表FAM荧光信号。这说明accelerated-DTMB探针上的HP与MB原位杂交生成双链,FAM与Dabcyl的相对距离变大,荧光恢复,从而以miRNA-21分子为模型实现了hella活细胞内miRNA的原位成像。为了进一步证明accelerated-DTMB探针对不同细胞内miRNA-21的成像能力,我们选择了LO2,Hella,MCF-7

三种细胞来进行试验。已有的研究表明L02细胞内的miRNA-21低表达,而Hella,MCF-7细胞中的miRNA-21高表达。图7共聚焦显微镜图像显示,三种细胞与accelerated-DTMB探针孵育后,L02细胞没有明显的绿色荧光,而Hella,MCF-7细胞能观察到明显的绿色荧光。表明accelerated-DTMB探针可以对不同细胞中miRNA-21进行成像。

[0052] 以上所述的具体实施例,对本发明的目的、技术方案和有益效果进行了进一步详细说明,应理解的是,以上所述仅为本发明的具体实施例而已,并不用于限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 闽江学院
- [0003] <120> 加速的DNA四面体分子探针在miRNA检测及活细胞成像中的应用
- [0004] <130> 9
- [0005] <160> 9
- [0006] <170> PatentIn version 3.3
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 145
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <400> 1
- [0012] cgcacgtagc tgtgtttttt ttttttagtc tgaattcctg gagatacatg gcatttgcta 60
- [0013] cagccctat tagaaggtcc gatttaagct agagcatcca atgtagctta tcagactgca 120
- [0014] ttggatgctc cgaagagccg tagca 145
- [0015] <210> 2
- [0016] <211> 85
- [0017] <212> DNA
- [0018] <213> 人工序列
- [0019] <400> 2
- [0020] gcagttgacg cgacagtcgt tcaagccttt cggaccttct aatagggcgt gtagcattat 60
- [0021] gcgagggtcc aatactctgt tccgg 85
- [0022] <210> 3
- [0023] <211> 72
- [0024] <212> DNA
- [0025] <213> 人工序列
- [0026] <400> 3
- [0027] ggcttgaacg actgtcgcgt caactgctta cgacactacg taacggtcga ggactgttgc 60
- [0028] tacggctctt cg 72
- [0029] <210> 4
- [0030] <211> 85
- [0031] <212> DNA
- [0032] <213> 人工序列
- [0033] <400> 4
- [0034] tgccatgtat ctccaggaat tcagactttc agtcctcgac cgttacgtag tgtcgtttcc 60
- [0035] ggaacagagt attggaccct cgcac 85
- [0036] <210> 5
- [0037] <211> 65
- [0038] <212> DNA

- [0039] <213> 人工序列
- [0040] <400> 5
- [0041] cacagctacg tcggtttcaa catcagctctg ataagctaca ttggatgctc tagcttatca 60
- [0042] gactg 65
- [0043] <210> 6
- [0044] <211> 22
- [0045] <212> DNA
- [0046] <213> 人工序列
- [0047] <400> 6
- [0048] uagcuuauca gacugauguu ga 22
- [0049] <210> 7
- [0050] <211> 22
- [0051] <212> DNA
- [0052] <213> 人工序列
- [0053] <400> 7
- [0054] uaauacuguc ugguaaaacc gu 22
- [0055] <210> 8
- [0056] <211> 22
- [0057] <212> RNA
- [0058] <213> 人工序列
- [0059] <400> 8
- [0060] uaauacugcc ugguaaugau ga 22
- [0061] <210> 9
- [0062] <211> 22
- [0063] <212> RNA
- [0064] <213> 人工序列
- [0065] <400> 9
- [0066] agagguagua gguugcauag uu 22

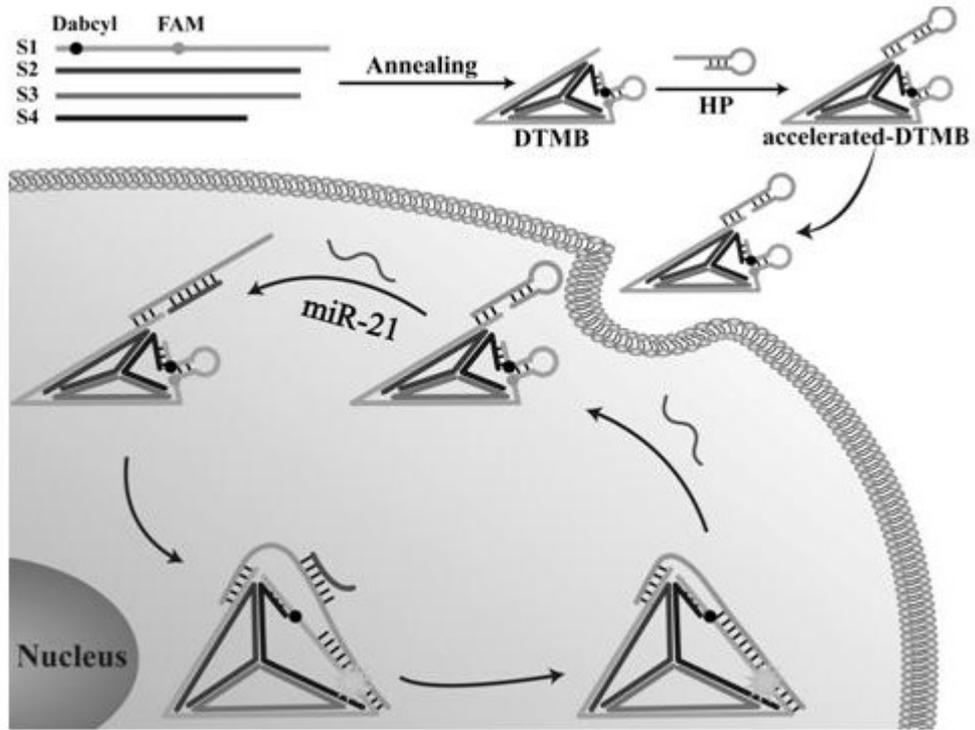


图1

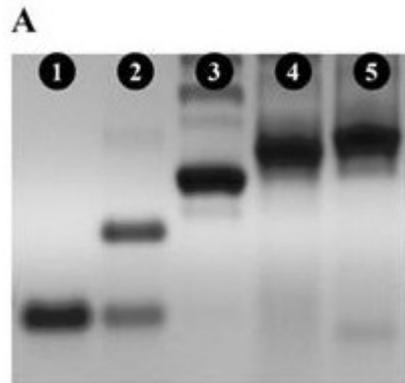


图2

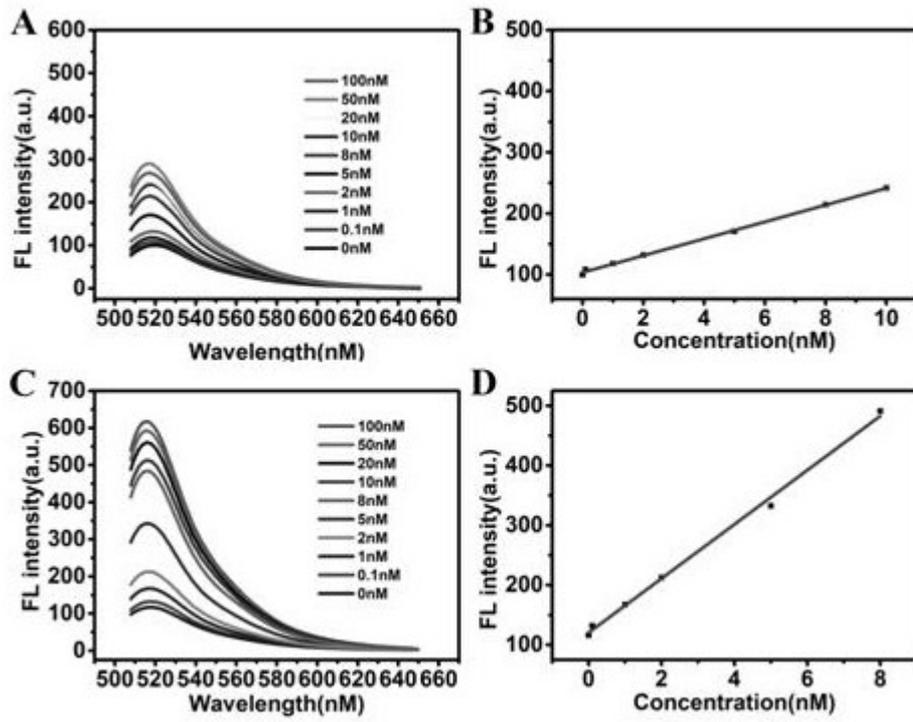


图3

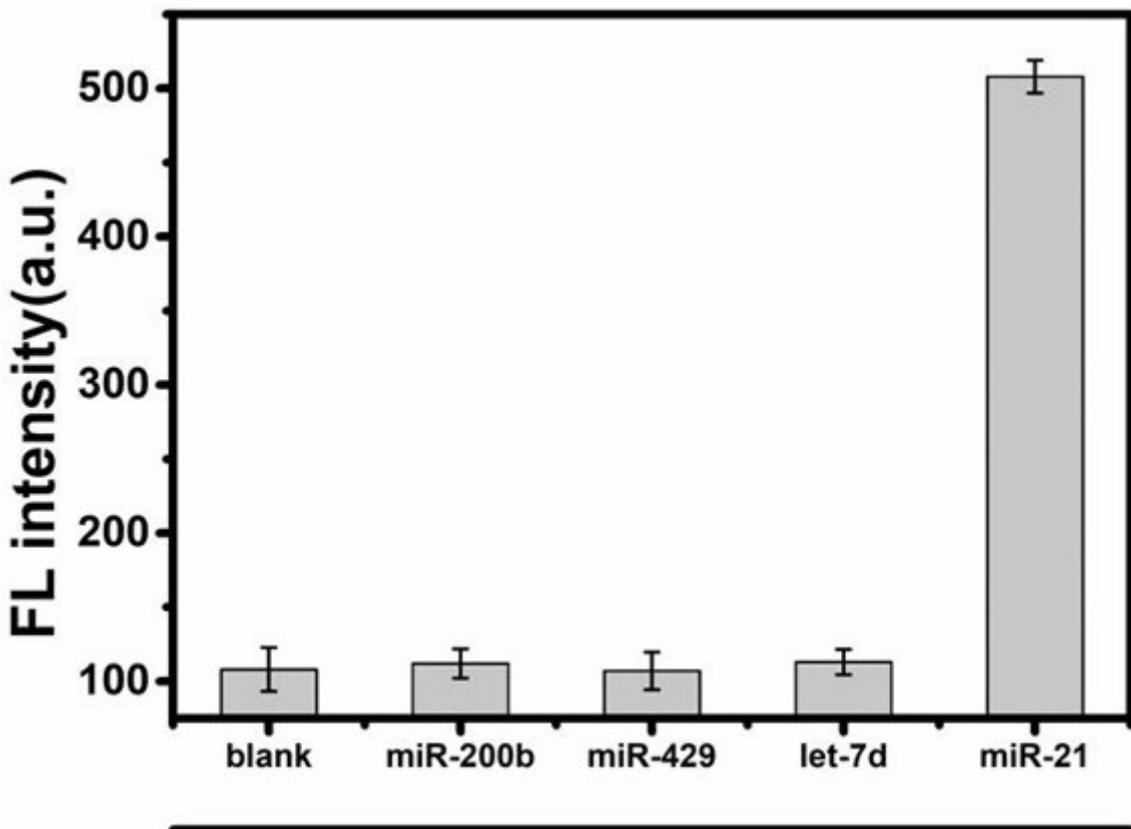


图4

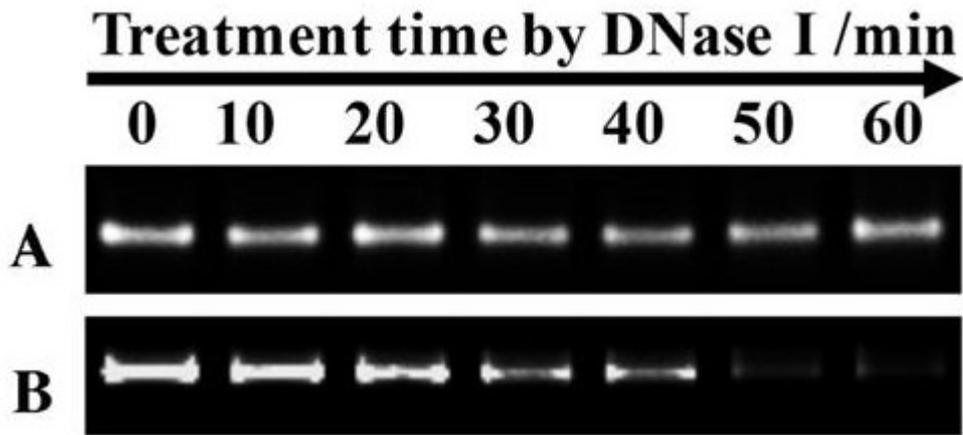


图5

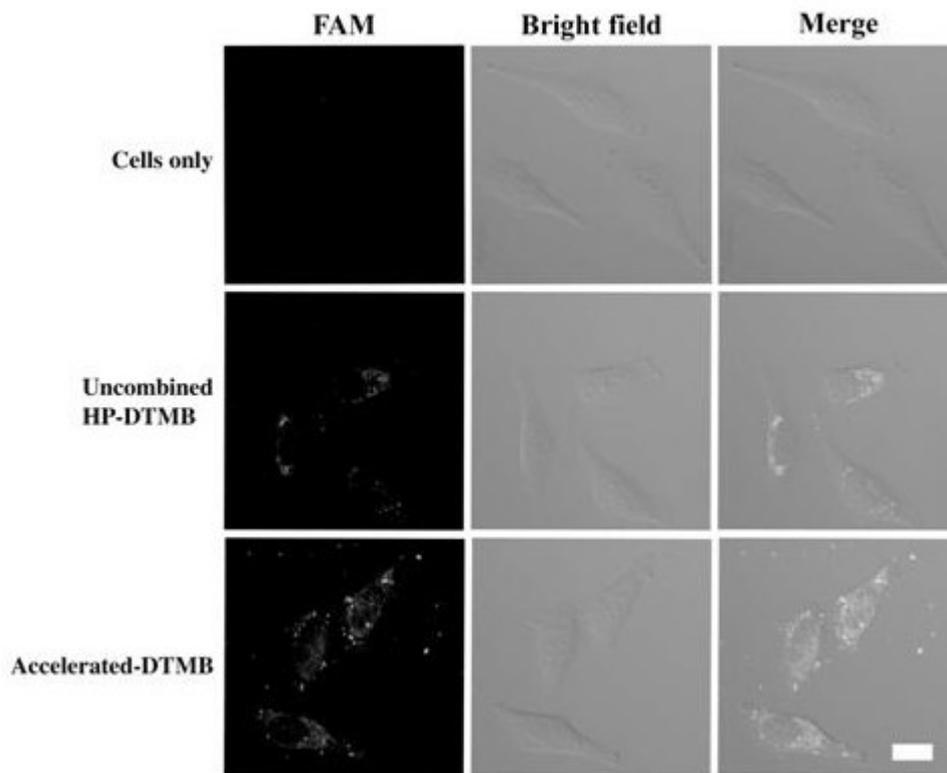


图6

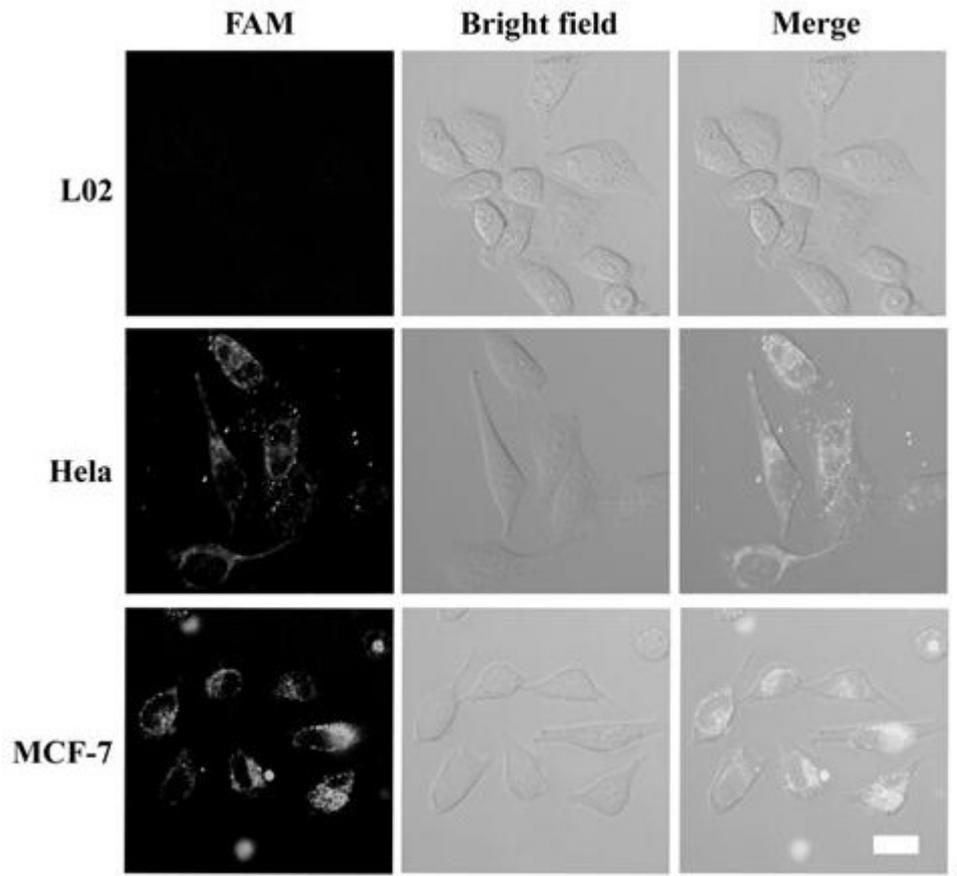


图7