

• 综 述 •

催化发夹组装反应用于检测生物标志物的研究进展*

翁 琴¹, 李建军², 杨丰宁³, 艾军宇⁴ 综述, 余 华^{5△} 审校

(1. 成都中医药大学医学与生命科学学院, 四川 成都 611137; 2. 陆军军医大学第一附属医院肿瘤科, 重庆 400038; 3. 成都中医药大学临床医学院, 四川 成都 611137; 4. 成都中医药大学护理学院, 四川 成都 611137; 5. 成都中医药大学附属医院普外科, 四川 成都 610072)

[摘 要] 催化发夹组装(CHA)是一种不依赖酶生物催化作用和温度循环的高效核酸扩增方法,具有生物相容性好、操作简单、反应条件温和等特点。通过将 CHA 与各种信号输出模式相结合,可实现对各种生物靶标(核酸、小分子、蛋白质、细胞)的高灵敏度检测,在诊断疾病方面显示出巨大的应用潜力。该文主要介绍了经典 CHA、改良 CHA,以及基于 CHA 策略与其他等温无酶扩增方法的几种级联反应,并对其在诊断疾病方面的应用进行了简单总结。还讨论了当前 CHA 策略在诊断疾病方面所面临的挑战和应用前景。

[关键词] 催化发夹组装; 生物标志物; 信号放大策略; 生物传感器; 综述

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2024.17.027

中图法分类号:R446;Q52

文章编号:1009-5519(2024)17-3001-05

文献标识码:A

Study on the application of catalytic hairpin assembly reaction in
the detection of biomarkers*

WENG Qin¹, LI Jianjun², YANG Fengning³, AI Junyu⁴, YU Hua^{5△}

(1. School of Medicine and Life Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 611137, China; 2. Department of Oncology, the Southwest Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China; 3. School of Clinical Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 611137, China; 4. School of Nursing, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 611137, China; 5. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610072, China)

[Abstract] Catalytic hairpin assembly (CHA) is an efficient nucleic acid amplification method that does not depend on enzyme biocatalysis and temperature cycling, and is characterized by good biocompatibility, simple operation, and mild reaction conditions. By combining CHA with various signal output modes, highly sensitive detection of various biological targets (nucleic acids, small molecules, proteins, cells) can be realized, which shows great potential for application in disease diagnosis. Therefore, this paper focuses on classical CHA, modified CHA, and several cascade reactions based on the CHA strategy with other isothermal enzyme-free amplification methods, and briefly reviews their applications in disease diagnosis. In addition, the challenges and application prospects of current CHA strategies in disease diagnosis are discussed.

[Key words] Catalytic hairpin assembly; Biomarkers; Signal amplification strategies; Biosensor; Review

近年来,等温无酶核酸扩增技术凭借其简单、可靠、高效等特点被广泛应用于生物标志物检测,并实现了对各种生物靶标的高灵敏度检测^[1-2]。无酶扩增策略主要包括熵驱动电路(EDC)^[3]、杂交链反应(HCR)^[4]、催化发夹组装(CHA)^[5],以及具有 RNA 裂解活性^[6]或类辣根过氧化物酶催化活性的脱氧核

酶(DNAzyme)^[7]。CHA 作为一种简单、通用、级联放大信号的无酶 DNA 电路,通过触发 2 种亚稳态 DNA 发夹探针之间的连续杂交反应自动进行信号的等温放大^[8],已成为生物标志物检测的理想选择^[9]。由于其无酶、等温、非能量驱动等特点,具有理想的可控性,极大程度地避免了复杂环境对靶标分析的干

* 基金项目:四川省科学技术厅重点研发项目(2022YFS0201);四川省中医药管理局面上项目(2023MS637)。

△ 通信作者, E-mail: yuhua1232021@163.com。

扰。此外,CHA 还可结合荧光、比色、电化学信号等将核酸信息转换为可测量的信号^[10]。随着对 CHA 机制的深入探讨,人们提出了一些新颖而优秀的 CHA 策略,以及结合各种放大技术的 CHA 级联策略。因此,现重点介绍基于经典或改良 CHA 的生物传感器,以及与其他核酸扩增方法相结合的 CHA 策略在诊断疾病方面的应用研究。另外,还讨论了 CHA 传感策略在生物医学领域面临的挑战与发展前景,旨在促进其在生物分析和临床诊断中的应用。

1 集成 CHA 的 DNA 生物传感器

CHA 作为一种等温无酶核酸信号放大系统,凭其出色的灵敏度和特异度而备受关注。随着对 CHA 技术的不断研究,各种新型的 CHA 技术也相继提出,如错配 CHA(mCHA)、自复制 CHA(SRCHA)和局域化 CHA(LCHA)。现重点介绍基于经典或改良 CHA 的生物传感器在诊断疾病方面的应用。

1.1 经典 CHA CHA 是一种新型的无酶、等温核酸扩增技术,最早由 YIN 等^[11]提出。启动器 I 介导级联的分支迁移,从而催化 2 个亚稳态发夹 A、B 之间的双链形成,导致双链 DNA(dsDNA)产物的扩增。由于其高效的扩增性能,该技术已被广泛用于核酸、蛋白质、小分子的检测,以及活细胞成像。ZHANG 等^[12]提出了一种通用的 CHA 系统(uniCHA)量化 piwi 相互作用 RNA(piRNA)和微小 RNA(miRNA)。值得注意的是,该系统包括了一个可随意设计以识别不同 piRNA 和 miRNA 的触发探针 H0 和 2 条通用发夹 H1、H2。因此,uniCHA 系统能以低背景泄漏和高灵敏度分析相同实验参数下的各种 piRNA 和 miRNA。此外,该研究成功地在 10^6 particles μL^{-1} 外泌体水平上检测到 piR-651 和 miR-1246,并在 21 例乳腺癌患者和 13 例健康对照者的队列中进行了血浆活检,实现了对乳腺癌的精准诊断。这种通用的生物传感系统为分析复杂生物样本中的多个 piRNA/miRNA 生物标志物提供了简单、有效的策略,表明 CHA 在癌症诊断中的临床应用潜力。

1.2 mCHA 经典 CHA 能实现靶标的高灵敏度检测,但由于 DNA 发夹 A、B 之间存在部分互补序列,YIN 等^[11]报道的动力学分析数据表明,3.5%的 A 和 B 在没有引发剂的情况下会发生自发杂交,即存在呼吸效应,产生背景信号泄漏。然而,较高的背景信号可能会极大地抵消 CHA 在诊断方面的价值。因此,为降低背景信号的泄露,JIANG 等^[13]提出了 mCHA 这一概念,简单来说,即在可能会发生呼吸效应的结构域中引入错配的核苷酸。有研究发现,在发夹环区的末端加入错配的核苷酸序列仅牺牲了部分反应速率,却能显著减少 CHA 体系的背景泄漏,其中单突变设计 H1,其信噪比较经典的 CHA 策略提高了 23 倍

左右。mCHA 凭其显著提升了 CHA 环路性能这一优势而被广泛用于生物靶标检测中。BODULEV 等^[14]通过异质酶连接的寡核苷酸检测与 mCHA 相结合策略对 miRNA-155 进行了定量检测,检测限为 400 fM。此外,LIU 等^[15]将错配燃料 CHA 介导的超敏生物传感器用于快速检测 miRNA,实现了较短的反应时间(40 min)和较快的反应扩增速率(9.56×10^6),且检测限低至 0.17 fM。进一步说明了 mCHA 在生物标志物检测中具有巨大的应用前景。

1.3 SRCHA 为解决基于 CHA 信号放大策略的检测时间较长这一局限性,DAI 等^[16]基于 DNA 自复制特性和 CHA 技术,提出了一种快速信号扩增 DNA 检测方法,即 SRCHA:(1)通过将 2 个分裂的目标 DNA 序列分别整合在发夹 H1、H2 中,H1 识别并结合靶标后启动第 1 轮 CHA 循环,得到产物 Target-H1-H2。其中游离出的靶标继续触发第 1 轮的循环反应,而产物 H1-H2 复合物的游离端则能通过链置换反应解开 H1,从而进行第 2 轮循环反应,导致荧光信号快速而显著地增强,极大地提升反应速率和灵敏度。与已报道的 DNA 检测系统比较,该策略可在 15 min 内实现皮摩尔 DNA 检测,大大节省了检测时间。(2)有学者也使用 SRCHA 体系成功地在 15 min 内完成了对黄曲霉毒素 B1 的检测,检测限可达 0.13 ng/mL^[17]。进一步验证了 SRCHA 体系在提升反应速率的同时也能提高检测限。但由于 CHA 发夹序列被设计为包含部分靶标,背景信号的泄漏在一定程度上也会增加,因此,发夹结构的设计仍需进一步优化,减少热力学效应产生的噪声。

1.4 LCHA DNA 折纸是利用 DNA 碱基配对的原理创建具有极高精度和功能性纳米结构的一种创新的纳米技术,已广泛用于药物输送和生物传感器^[18]。通过控制 DNA 分子的空间位置,利用空间限制效应可引导分子计算的定向进行,以产生特定的输出。因此,局部 DNA 反应单元可被用来提高信号放大的效率。WU 等^[19]开发了一种基于 LCHA 的 DNA 纳米机器,用于在活细胞中快速、高效地进行痕量 miRNA-21 的荧光共振能量转换(FRET)成像。通过将 CHA 发夹限制在紧凑区,增加了反应单元的局部浓度,同时,利用 miRNA-21 作为催化剂,在每个纳米机器的定子链上快速、高效地组装了一对高碰撞频率的发夹探针。与游离 CHA 纳米机器比较,反应时间缩短了高达 4.5 倍,体外检测 miRNA-21 的灵敏度也提高了 7.6 倍,重要的是还实现了痕量 miRNA-21 在活细胞内的高效成像。此外,QING 等^[20]开发了一种用于 mRNA 的 FRET 成像的分子内 CHA 策略,通过将 CHA 发夹锚定在 DNA 四面体上缩短反应物之间的距离,发夹的局部浓度是游离 CHA 的 808 倍左

右,使初始反应速度提高了 15.6 倍。WANG 等^[21]提出了一种用于 miRNA-155 的 FRET 成像的分子间 CHA 策略,线性范围为 0.5~30.0 nM,检测限为 0.35 nM。

2 CHA 结合其他扩增技术策略

为开发灵敏度更高的生物传感器,可通过级联多种放大策略使上游反应的产物可作为下游反应的触发因素。而 CHA 策略能在不消耗靶标的情况下循环触发发夹的催化杂交反应,形成大量的 dsDNA 产物。这种特性使其可以很容易地与其他扩增方法相结合,以提高 CHA 检测方法的信号放大能力,增强传感性能。因此,现将 CHA 级联其他扩增策略的最新进展总结如下。

2.1 CHA 和 CHA 的级联反应 通过级联多个 CHA 电路可实现输出信号的指数扩增,如 PAN 等^[22]报道了一种基于发夹探针介导的脚趾结合和分支迁移的镉离子(Cd^{2+})扩增检测的无酶 DNA 电路。该体系通过采用一系列脚趾介导的 DNA 链位移反应引导 DNA 自组装,简单来说,在 Cd^{2+} 存在情况下形成的 Cd^{2+} -aptamer 复合物以结构域 a 为支点与 H1 的结构域 A * 结合,启动分支迁移依次打开发夹 H1、H2,得到的产物 Cd^{2+} -aptamer-H1-H2 则不稳定,解离出的 Cd^{2+} -aptamer 能继续触发 Cycle I 循环,同时,含有结构域 A 和 B 的 H1-H2 复合物可激活 H1 和 H2 之间的另一个组装过程(Cycle II 循环)。该方法灵敏度高,检测限为 5 pM,具有满意的回收率和良好的准确性。由于其通用性,该策略已被用于 γ 干扰素的检测,检测限达到 0.6 pM^[23]。

2.2 CHA 和 HCR 的级联反应 LI 等^[24]通过将 CHA 与 HCR 集成,开发了一种等温自催化杂交反应电路(AHR),用于检测甲基化相关甲基转移酶及其抑制剂。AHR 电路的示意图由 HCR 放大器和 CHA 转换器组成。CHA 转换器被设计为暴露出与 HCR 启动剂相同的序列,以反向驱动 HCR 放大器。启动剂介导的 HCR 放大器产生了大量的触发剂,用于激发 CHA 转换器,后者暴露 HCR 启动剂以逆向激发 HCR 放大器,从而产生了极大放大的荧光读数。因此,微量目标可通过 HCR 和 CHA 系统之间的自催化反馈循环产生指数级放大的荧光读数。此外,LI 等^[25]将回文 HCR(PHCR)的概念与 CHA 技术相结合,设计了用于 miRNA-21 检测的 CHA-PHCR 分析体系。目标 miRNA 低至 10 pM 可以被定量检测到,具有很高的检测特异性。

2.3 CHA 和 EDC 的级联反应 由于 CHA 可在不引入场外信号泄漏的前提下很容易与 EDC 燃料子单位集成,同时,还可特异性地刺激 EDC 不活跃的二元燃料链发生现场放大重构,用于目标检测。因此,

ZHU 等^[26]构建了基于 CHA 和 EDC 的级联扩增体系,充分利用传统熵驱动催化反应中浪费的副产物链作为功能输出链,构建单信号输出生物传感系统,甚至双信号输出比例生物传感平台,以及系统地检测重复性和可靠性。该扩展体系显著提高了反应速率和信号放大能力,对卡那霉素的检测下限为 0.03 pg/mL,汞离子(Hg^{2+})为 0.21 pM。而 HE 等^[27]设计了一种可用于 miRNA 灵敏度检测的熵驱动级联 CHA 反应,上游的 F-CHA 反应在 miRNA 存在的情况下产生活化的燃料链 F,继而参与下游的 EDR 反应,实现了正交扩增,对 miRNA-21 的检测下限为 6.8 pM,并验证了在细胞成像和活体成像中的高特异性。

2.4 CHA-HCR-DNAzyme 的级联反应 CHA、HCR 和 DNAzyme 的级联反应实现了强大的信号放大和高灵敏度的检测性能,如 WANG 等^[28]开发了一个用于 miR-21 分析和细胞内成像的 CHA-HCR-DNAzyme 策略的多功能信号放大平台。自主 CHA-HCR-DNAzyme 电路由 CHA、HCR 和 DNAzyme 放大单元组成。上游 CHA 识别特定的引发剂 I,产生大量编码 HCR 触发序列的 dsDNA 链,以激发下游 HCR 中发夹反应物的交叉打开。HCR 生成的长 dsDNA 复合物中 H4 桥接 H3 和 H5 的 2 个分离的 DNAzyme 片段,使 DNAzyme 单元连续整合。在镁离子(Mg^{2+})存在下该 DNAzymes 可切割荧光团标记的底物,以产生极大放大的荧光读数,实现更高的放大效率。

3 小 结

与 EDC、HCR、DNAzyme 等无酶扩增方法比较,CHA 具有催化效率高、背景信号低、反应体系简单稳定等优点,由于靶标的释放对细胞内靶标生物学功能的影响可忽略不计。通过改进 CHA 本身或将其与其他放大技术相结合可有效提高比单一扩增更高的扩增效率,实现了强大的信号放大和高灵敏度的检测性能,已被广泛用于金属离子、小分子、蛋白质、核酸、细胞等的检测。见表 1。尽管 CHA 在生物传感领域的应用取得了重大进展,但仍面临一些挑战:(1)在没有触发探针存在的情况下,CHA 发夹之间可能发生非特异性反应,导致高背景信号。为提高检测的灵敏度,解决背景泄漏问题势在必行。因此,需合理设计 dsDNA 序列,最大限度地减少背景信号。(2)对 CHA 电路的构造,大多数电路均是基于对目前现有经典反应的轻微调整而编程的,很少有系统而明确的设计方法。因此,迫切需要开发辅助设计反应序列的软件,如 DNAzyme Builder,可通过已报道的序列库快速、自动地设计 RNA/DNA 切割 DNAzyme^[29]。(3)经典 CHA 反应依赖于发夹的随机碰撞,动力学相对较慢,检测时间较长。为有效缩短反应时间,可从

如何提高扩增效率和反应物的局域浓度等方面入手。

因此,构建多靶标传感平台会更有利于生物医学的应用。

(4)大多数文献报道的策略均集中在特定靶标检测方面,然而,临床诊断疾病需多种生物标志物的辅助。

表 1 基于 CHA 策略的不同分析方法

项目	靶标	检测限	线性范围	参考文献
uniCHA	piR-651,piR20365,piR-16926,miR-1246 miR-21,Cel-miR-39	0.02 nM	0.05~1.00 nM	[12]
mCHA	miR-155	400 fM	—	[14]
SRCHA	DNA	58 pM	1~60 nM	[16]
LCHA	miR-155	0.35 nM	0.5~30.0 nM	[21]
CHA-CHA	Cd ²⁺	5 pM	10 pM 至 100 μM	[22]
CHA-HCR	miR-21	10 pM	0~4 nM	[25]
CHA-EDC	卡那霉素	0.03 pg/mL	0.1~10.0 pg/mL	[26]
	Hg ²⁺	0.21 pM	0.5 pM 至 50 nM	
CHA-HCR-DNAzyme	miR-21	1.5 pM	10 pM 至 1 nM	[28]

注:—表示无数据。

虽然 CHA 在生物传感领域的应用还存在不足,但人们仍在努力提高 CHA 的自组装效率和灵敏度、拓展 CHA 的应用领域,以及探索 CHA 与其他技术的结合,以期为生物传感器的发展做出贡献。相信未来将会出现更多基于 CHA 的先进扩增策略,最终将会成为生物分析和临床诊断疾病的有力工具之一。

参考文献

[1] WANG S Y, SHANG J H, ZHAO B Y, et al. Integration of isothermal enzyme-free nucleic acid circuits for high-performance biosensing applications[J]. *Chempluschem*, 2023, 88(10): e202300432.

[2] SONG Z H, ZHOU Y, SHEN M Z, et al. MUC1 detection and in situ imaging method based on aptamer conformational switch and hybridization chain reaction[J]. *Talanta*, 2022, 239: 123129.

[3] LI Y X, LUO Z W, ZHANG C Y, et al. Entropy driven circuit as an emerging molecular tool for biological sensing: A review[J]. *Trends Anal Chem*, 2021, 134: 116142.

[4] WU J T, LV J R, ZHENG X Q, et al. Hybridization chain reaction and its applications in biosensing[J]. *Talanta*, 2021, 234: 122637.

[5] LUO Z W, LI Y X, ZHANG P, et al. Catalytic hairpin assembly as cascade nucleic acid circuits for fluorescent biosensor: Design, evolution and application[J]. *Trends Anal Chem*, 2022, 151: 116582.

[6] MCCONNELL E M, COZMA I, MOU Q B, et

al. Biosensing with DNAAzymes[J]. *Chem Soc Rev*, 2021, 50(16): 8954-8994.

[7] XU T, SUN Y, YU S, et al. A fluorogenic RNA aptamer nanodevice for the low background imaging of mRNA in living cells[J]. *Chem Commun(Camb)*, 2022, 589: 1354-1357.

[8] QING Z H, XU J Y, HU J L, et al. In situ amplification-based imaging of RNA in living cells[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58(34): 11574-11585.

[9] YANG X J, YUAN L Q, XU Y, et al. Target-catalyzed self-assembled spherical G-quadruplex/hemin DNAAzymes for highly sensitive colorimetric detection of microRNA in serum[J]. *Anal Chim Acta*, 2023, 1247: 340879.

[10] SUN W Y, WANG Y, ZHU Z X, et al. Accurate and nonpurified identification of extracellular vesicles using dual-binding recognition mode[J]. *Anal Chem*, 2021, 93(36): 12383-12390.

[11] YIN P, CHOI H M T, CALVERT C R, et al. Programming biomolecular self-assembly pathways[J]. *Nature*, 2008, 451(7176): 318-322.

[12] ZHANG L M, GAO Q X, CHEN J, et al. A Universal catalytic hairpin assembly system for direct plasma biopsy of exosomal PIWI-interacting RNAs and microRNAs [J]. *Anal Chim Acta*, 2022, 1192: 339382.

[13] JIANG Y S, BHADRA S, LI B L, et al. Mismatches improve the performance of strand-displacement nucleic acid circuits[J]. *Angew*

- Chem Int Ed Engl, 2014, 53(7):1845-1848.
- [14] BODULEV O L, GALKIN I I, ZHAO S L, et al. Quantitation of microRNA-155 in human cells by heterogeneous enzyme-linked oligonucleotide assay coupled with mismatched catalytic hairpin assembly reaction[J]. Biosensors (Basel), 2022, 12(8):570.
- [15] LIU W W, ZHANG X L, ZHU L, et al. Mismatch-fueled catalytic hairpin assembly mediated ultrasensitive biosensor for rapid detection of microRNA[J]. Anal Chim Acta, 2022, 1204: 339663.
- [16] DAI J A, DUAN Z J, CAO M Z, et al. Rapid DNA detection based on self-replicating catalyzed hairpin assembly using nucleotide base analog pyrrolo-deoxycytidine as fluorophore [J]. Talanta, 2018, 181:142-146.
- [17] ZHAO L J, MAO J F, HU L, et al. Self-replicating catalyzed hairpin assembly for rapid aflatoxin B1 detection[J]. Anal Methods, 2021, 13(2):222-226.
- [18] ZHANG L H, ZHAO H Y, YANG H X, et al. Coarse-grained model simulation-guided localized DNA signal amplification probe for miRNA detection [J]. Biosens Bioelectron, 2023, 239:115622.
- [19] WU J, TIAN Y H, HE L, et al. An efficient localized catalytic hairpin assembly-based DNA nanomachine for miRNA-21 imaging in living cells[J]. Analyst, 2021, 146(9):3041-3051.
- [20] QING Z H, HU J L, XU J Y, et al. An intramolecular catalytic hairpin assembly on a DNA tetrahedron for mRNA imaging in living cells: Improving reaction kinetics and signal stability [J]. Chem Sci, 2019, 11(7):1985-1990.
- [21] WANG Y, BAI Y, CAO L P, et al. Catalytic hairpin assembled polymeric tetrahedral DNA frameworks for microRNA imaging in live cells[J]. Biosens Bioelectron, 2022, 197:113783.
- [22] PAN J F, ZENG L W, CHEN J H. An enzyme-free DNA circuit for the amplified detection of Cd^{2+} based on hairpin probe-mediated toehold binding and branch migration[J]. Chem Commun (Camb), 2019, 55(79):11932-11935.
- [23] WANG S J, LI X, JIANG B Y, et al. Target-triggered programming of cascaded catalytic hairpin assemblies for enzyme-free and highly sensitive sensing of cytokines[J]. Sens Actuators B Chem, 2019, 298:126929.
- [24] LI F Z, CHEN Y Y, SHANG J H, et al. An isothermal autocatalytic hybridization reaction circuit for sensitive detection of DNA methyltransferase and inhibitors assay [J]. Anal Chem, 2022, 94(10):4495-4503.
- [25] LI C C, ZHANG J J, GAO Y S, et al. Nonenzymatic autonomous assembly of Cross-Linked network structures from only two palindromic DNA components for intracellular fluorescence imaging of miRNAs[J]. ACS Sens, 2022, 7(2): 601-611.
- [26] ZHU L P, ZHU L, ZHANG X M, et al. Programmable electrochemical biosensing platform based on catalytic hairpin assembly and entropy-driven catalytic cascade amplification circuit [J]. Anal Chim Acta, 2023, 1278:341715.
- [27] HE S Z, YU S S, LI R M, et al. On-Site non-enzymatic orthogonal activation of a catalytic DNA circuit for self-reinforced in vivo microRNA imaging[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2022, 61(45):e202206529.
- [28] WANG H, WANG H M, WU Q, et al. A DNzyme-amplified DNA circuit for highly accurate microRNA detection and intracellular imaging[J]. Chem Sci, 2019, 10(41): 9597-9604.
- [29] MOHAMMADI-ARANI R, JAVADI-ZARNA-GHI F, BOCCALETTO P, et al. DNzyme-Builder, a web application for in situ Generation of RNA/DNA-cleaving deoxyribozymes[J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50(W1):W261-W265.

(收稿日期:2024-02-01 修回日期:2024-05-29)