

# 基于金纳米粒子的 DNA 探针和 Exo III 辅助信号放大平台用于 HIV-DNA 的检测

田建袅,李晴,梁雪花,谭莉,陆江南,王鑫

(广西师范大学 化学与药学院;省部共建药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室,广西 桂林 541004)

**摘要:**设计了一种金纳米粒子(AuNP)和核酸外切酶 III(Exo III)辅助靶标循环信号放大的新型纳米探针用于 HIV-DNA 的检测.该纳米探针由 AuNP 和捕获探针 p1 和信号探针 p2 构成.在靶标 HIV-DNA 不存在的情况下,此时纳米探针抗 Exo III 水解,信号探针 p2 与 AuNP 之间的距离较近产生荧光共振能量转移,体系的荧光基本被猝灭.但是,在靶标存在的情况下,靶标与信号探针 p2 杂交,将 p1 置换下来,此时与靶标杂交的信号探针 p2 双链体能在 Exo III 的作用下发生水解,使荧光团释放,体系荧光增强.同时,靶标也被释放并与 AuNP 上的探针 p2 作用,以驱动下一个反应,达到靶标循环目的,因此这种方式检测时间较短且稳定性高.该方法的线性范围为 100 pmol/L~50 nmol/L,检测限为 38.68 pmol/L(信噪比  $S/N=3$ ).该方法具有良好的抗干扰性,可用于复杂生物样品检测,回收率在 98.72%~106.72%之间.

**关键词:** HIV DNA;金纳米粒子;核酸外切酶 III;信号放大

**中图分类号:** O657.3

**文献标志码:** A

艾滋病是由人类免疫缺陷病毒(HIV)感染所引起的一种获得性免疫缺陷综合征<sup>[1-2]</sup>. HIV 是一种逆转录病毒,其 RNA 链可以转录成 DNA<sup>[3]</sup>,而后通过逆转录进一步在宿主细胞中表达<sup>[2,4]</sup>.因此,为了对艾滋病进行早期诊断和临床治疗, HIV 相关的 DNA(HIV-DNA)的检测就显得尤为重要.目前已经报道了许多用于 DNA 的分析方法,例如比色法<sup>[5-6]</sup>、荧光法<sup>[7-8]</sup>、电化学法<sup>[9-10]</sup>和表面增强拉曼散射<sup>[11-12]</sup>等.在这些生物传感测定中,基于荧光的检测方法具有简单、快速且成本低的优点,为了使荧光法实现对低丰度分析物的灵敏检测,研究者已构建了一些扩增策略,包括纳米材料辅助扩增、酶介导信号扩增<sup>[13-14]</sup>和滚环扩增(RCA)<sup>[15-16]</sup>以及端点介导的链置换反应扩增<sup>[17-18]</sup>等生物传感信号放大方法.

金属纳米颗粒由于其独特的物理化学及生物学性能而在纳米材料领域应用广泛,金属基纳米材料经常与功能性核酸(FNA)相结合以制备新型 FNA 金属纳米材料<sup>[19]</sup>.其中,金纳米颗粒(AuNP)因具有合成简单、易于表面修饰、尺寸和表面电荷可调等性质,在生物传感领域中广泛用于构建新型探针对各种分析物进行检测<sup>[13,20]</sup>.为了进一步提高纳米探针的灵敏度,研究者在体系中引入多种核酸扩增策略,如 2017 年 Yin 小组报道<sup>[21]</sup>了一种由支点介导的链置换反应驱动 DNA 纳米机器,其行走链通过 DNA 杂交和链置换的催化反应在核酸-AuNP 共轭物上自主行走,从而导致 DNA 底物的连续释放.该方法为活细胞中无酶 DNA 纳米机器的应用提供了一个很好的方案,但是这种无酶扩增介导的纳米探针往往反应时间较长<sup>[22]</sup>.为了解决这一问题,可使用酶辅助扩增策略结合功能性纳米材料来构造功能性纳米探针<sup>[14,18,23-24]</sup>.而核酸外切酶 III(Exo III)是一种很常用的核酸酶,它不需要特定的识别位点,并且它只作用于双链 DNA 的 3'-羟基平末端或凹末端<sup>[14]</sup>.此外,基于 Exo III 的反应对环境的敏感性不高.因此,Exo III 被广泛使用来构建简单、快速且灵敏度高的探针.

本文构建了基于 AuNP 和 Exo III 辅助靶标循环扩增的新型纳米探针用于 HIV-DNA 的检测.该纳米探

收稿日期:2020-12-17;修回日期:2021-02-07.

基金项目:国家自然科学基金(22064003;21465007;21565007)

作者简介(通信作者):田建袅(1977-),女,山西代县人,广西师范大学教授,博士生导师,研究方向为纳米光学探针及生物传感分析,E-mail:birdtjn@sina.com.

针使用 AuNP 作为载体和猝灭剂,猝灭信号探针上荧光基团的荧光以减少背景信号.靶标不存在时,体系抗 Exo III 切割,此时无荧光信号产生;而当靶标存在的时候,靶标与信号探针结合,导致信号探针被 Exo III 水解,使荧光基团和靶标被释放,释放的靶标进行循环作用以释放更多的荧光基团,使荧光信号大大增强.该策略将 AuNP 与核酸酶扩增策略相结合,可在一步反应中对 HIV-DNA 进行检测,且无须复杂的离心分离过程、操作简单.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和材料

三水合氯金酸( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 99%)和三(2-羧乙基)膦盐酸盐( $\text{TCEP} \cdot \text{HCl}$ )均购自上海阿拉丁生化科技有限公司;RNase-free 离心管和枪头,三羟甲基氨基甲烷(Tris),HPLC(高效液相色谱)纯化的 DNA 序列均购于上海生工生物技术有限公司;氯化钠( $\text{NaCl}$ ),磷酸二氢钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )和磷酸氢二钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )购于广东西陇化工股份有限公司;六水合氯化镁( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )购自北京华威锐科化工有限公司;Exo III 购于纽英伦(NEB)生物技术(北京)有限公司;Tween-20 购于北京索莱宝科技有限公司;琼脂糖购于北京全式金生物科技有限公司.所有试剂均为分析纯,实验中所用缓冲溶液均为超纯水( $18.2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ )配制.人血清样品由桂林市第五人民医院提供.实验所用的寡核苷酸序列如表 1 所示.

表 1 实验所用寡核苷酸序列

Tab. 1 The Oligonucleotide sequences used in this experiment

名称	序列(5'-3')
p1	HS-TTTTTTTTTTGGCCAGATATACGTGCCAGGGGGTGGTT
p2	FAM-TTTTTTCACCTGGCAGCTATACTGGACTATGG
HIV-DNA	CAT AGT CCA GAT ATA CGT GCC AGG TGG AGT ACG
M1	CAT AGT CCA GCT ATA CGT GCC AGG TGG AGT ACG
M2	CAT AGT CCA GCT ATA CGT GTC AGG TGG AGT ACG
M3	CAT AGT CGA GCT ATA CGT GTC AGG TGG AGT ACG
NC	AGA AGA TAT TTG GAA TAA CAT GAC CTG GAT GCA

注:p1 和 p2 中加粗的斜体序列部分为互补序列,p2 的波浪线序列部分为 HIV-DNA 的识别序列;M1, M2, M3 和 NC 中下划线的碱基是与 HIV-DNA 错配的碱基(M1:单碱基错配;M2:二碱基错配;M3:三碱基错配;NC:多碱基错配).

### 1.2 主要仪器

Zetasizer Nano ZS(上海思百吉仪器系统有限公司),透射电子显微镜(TEM,FEI Talos F200S,赛默飞世尔科技),LS-55 型荧光分光光度计(Perkin Elmer, USA),TU-1905 型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),Omega 16 凝胶成像系统(Ultra-Lum, US),KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,江苏),PHS-3C 智能酸度计(成都世纪方舟科技有限公司),Direct-Q3 超纯水系统(Merck Millipore, USA),XW-80A 微型旋涡混合仪(沪西仪器厂有限公司,上海),TGL-16M 台式高速冷冻离心机(湘仪有限公司,湖南).

### 1.3 实验所需溶液的配制

20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液:20mmol/L Tris,50 mmol/L NaCl,5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ,pH 7.4.

20 mmol/L PBS 缓冲液:3.8 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,16.2 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,100 mmol/L NaCl,5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ,pH 7.4.

10 mmol/L PBS 缓冲液:1.9 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,8.1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,300 mmol/L NaCl,5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ,pH 7.4.

5×TBE 缓冲液:450 mmol/L Tris- $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,10 mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,pH 8.3.

将 p2 和 HIV-DNA 干粉 4 000 r/min 离心 1 min 后分别用 Tris-HCl 缓冲液和超纯水溶解配制,p2 终浓度为 40  $\mu\text{mol/L}$ ,HIV-DNA 终浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$ ,同时在混旋仪上混匀 6 min,p2 与 HIV-DNA 于 0 °C 避光保存.

### 1.4 纳米探针的合成(AuNP-p1/p2)

通过改进文献[25]中的方法制备柠檬酸盐稳定的金纳米颗粒(AuNP).首先用三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP·HCl)还原所有硫醇化修饰的 p1 链 15 min,以还原硫醇化寡核苷酸中的二硫键.将纯化的 p1(40  $\mu\text{mol/L}$ ,68  $\mu\text{L}$ )与 1 mL 10.88 nmol/L AuNP(20 nm)混合.将混合物在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  的冰箱中冷冻 4 h,然后在室温下解冻,将解冻的 DNA 官能化 AuNP 溶液离心并重新悬浮于 10 mmol/L PBS 缓冲液(0.01%吐温 20),重复 3 次以除去多余的硫醇化寡核苷酸.最后,将 DNA 功能化的 AuNP 重悬于 PBS 中,总体积为 1 mL.将 2  $\mu\text{L}$  40  $\mu\text{mol/L}$  p2 加入到 88  $\mu\text{L}$  储备溶液于  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应 10 min,自然冷却至室温,然后将混合物离心并重悬于 PBS 中,重复 3 次后储存于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用.通过朗伯-比尔定律计算 AuNP 浓度:  $A = \epsilon bc$ ,其中  $A$  为吸光度; $b$  为吸收层厚度,cm; $c$  为吸收物质浓度,mol/L;尺寸为 20 nm 的 AuNP 的消光系数  $\epsilon(\lambda_{520})$  为  $5.41 \times 10^8\text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### 1.5 人血清样品的预处理

本实验中用于分析复杂样品的实际样品是人血清样品.将 30 KDa 超滤离心管用超纯水浸泡过夜,将人血清样品添加到 30 KDa 超滤离心管中,并在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下以 7 000 r/min 离心 20 min.将滤液储存在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  的冰箱中备用.

### 1.6 HIV-DNA 的荧光分析

首先,将 20  $\mu\text{L}$  AuNP-p1/p2(1.0  $\mu\text{mol/L}$  p2,3.0  $\mu\text{mol/L}$  p1)和不同浓度的 HIV-DNA 加入 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,终体积为 50  $\mu\text{L}$ ,于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下反应 2.5 h,反应完成后加入 20 mmol/L PBS 缓冲液至最终体积为 200  $\mu\text{L}$ .最后,用 LS-55 荧光光度计进行荧光分析,电压设置为 700 V,激发和发射狭缝均设置为 10 nm,激发波长为 488 nm,发射波长为 520 nm.

### 1.7 琼脂糖凝胶电泳分析

通过将琼脂糖溶解在  $1 \times \text{TBE}$  缓冲液(2 mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,90 mmol/L Tris,90 mmol/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,pH 8.3)中制备 4% 琼脂糖凝胶,并在制备过程中添加 0.01% 的凝胶红核酸染料(Gel Red).将 10  $\mu\text{L}$  制备好的样品加入凝胶加样孔中,在  $1 \times \text{TBE}$  中于 70 V 的恒定电压下运行 10 min,100 V 的电压下运行 80 min,然后用 Omega 16ic 凝胶成像系统进行扫描.

## 2 结果与讨论

### 2.1 纳米探针的设计原理

本文设计了一种基于 Exo III 辅助靶标循环的纳米探针用于 HIV-DNA 的检测,具体原理如图 1 所示.

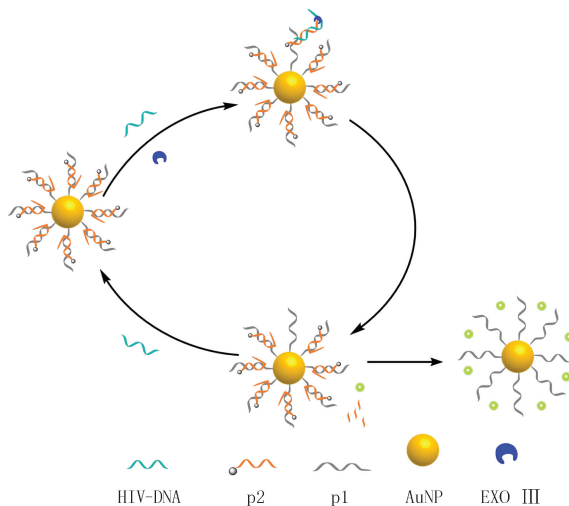


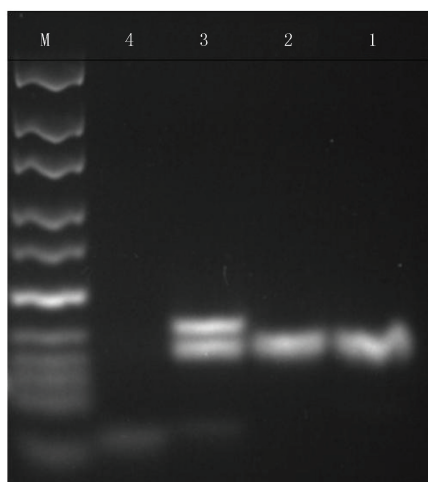
图1 基于AuNP和核酸Exo III辅助构建的纳米探针用于HIV-DNA检测原理

Fig.1 The principle of nanoprobes for HIV-DNA detection based on AuNP and Exo III

AuNP 用作载体和猝灭剂,其上带有捕获探针 p1 和信号探针 p2,p2 与 AuNP 彼此靠近,发生荧光共振能量转移,荧光染料 FAM 的荧光被有效地猝灭,并且 p1 和 p2 形成的双链体抗 Exo III 的水解作用.因此,当没有靶标 HIV-DNA 时,系统溶液的各个部分都处于稳定状态,无荧光产生.当靶标存在时,HIV-DNA 与 p2 杂交使 p2 的 3' 端形成平末端,而靶标 HIV-DNA 的 3' 端为突出端,该双链体中的 p2 被核酸 Exo III 水解,使荧光基团和靶标释放,荧光信号恢复.同时,释放的靶标触发下一个反应周期,直到所有的 p2 被核酸 Exo III 水解,从而实现信号的循环放大.因此,可以通过加靶前后系统荧光强度的变化,灵敏和稳定地检测靶标 HIV-DNA.

## 2.2 HIV 检测的电泳可行性分析

为了证明该纳米探针对 HIV-DNA 检测的可行性,进行了凝胶电泳实验和荧光实验对其进行分析.首先,通过凝胶电泳实验对该策略的原理进行验证.如图 2 所示,与单独的 p1-p2(泳道 1)相比,泳道 2 中双链体的条带没有消失,说明 p1-p2 双链体可以抵抗核酸外切酶 III 的水解.当完整的体系加入靶标后,p1-p2 双链体的条带消失(泳道 4),说明靶标可以将 p1 置换并与 p2 杂交形成双链体,而靶标-p2 双链体能被核酸外切酶 III 水解.电泳的实验结果表明,Exo III 可实现体系的循环放大.



M: DNA Marker; 1: p1-p2; 2: p1-p2+Exo III; 3: p1-p2+HIV-DNA;  
4: p1-p2+HIV-DNA+Exo III; p1-p2 的浓度为  $1 \mu\text{mol/L}$ , HIV-DNA 的浓度为  $500 \text{ nmol/L}$ , Exo III 为  $10 \text{ U}$ , 4% 琼脂糖凝胶.

图2 体系的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 The agarose gel electrophoretogram of the system

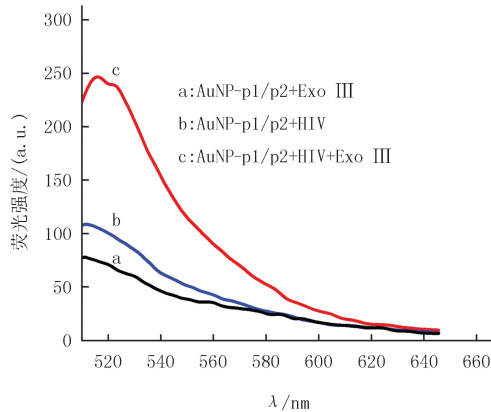
## 2.3 HIV 检测的荧光可行性分析

为了更进一步验证原理的可行性,实验对体系的荧光光谱进行分析,如图 3 所示,当溶液中不存在靶标 HIV-DNA 时,由于 AuNP 上的 p1-p2 双链体被设计为可抗外切酶 III 水解的结构,AuNP 与 FAM 发生荧光共振能量转移导致体系荧光很弱(曲线 a).当溶液中加入靶标 HIV-DNA 但不加入核酸 Exo III 时,信号链 p2 与 HIV-DNA 杂交并游离在溶液中,但无法发生酶切反应,体系的荧光信号没有被放大,呈部分恢复的状态(曲线 b).然而,当溶液中同时存在靶标 HIV-DNA 和 Exo III 时,体系的荧光信号显著增强(曲线 c),这表明靶标 HIV-DNA 将 p1 置换下来与 p2 杂交,同时 Exo III 的加入成功实现了荧光信号的放大.综合以上结果,说明本文设计的实验原理可行.

## 2.4 实验条件的优化

为了获得最佳分析性能,对影响体系检测性能的各项参数进行了优化,主要包括 AuNP-p1/p2 的用量、Exo III 的用量、酶切时间.实验将加靶前后体系荧光信号的比值  $F/F_0$  作为信号输出值( $F_0$  代表溶液中不存在靶标 HIV-DNA 时体系的荧光强度; $F$  代表溶液中存在靶标 HIV-DNA 时体系的荧光强度).该方法是通过 AuNP 和 Exo III 辅助来实现信号的放大,其中 AuNP 构建的纳米探针是实验产生荧光信号最为重要的一

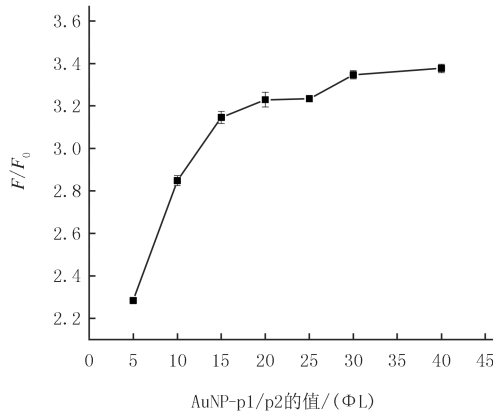
部分,因此首先对 AuNP-p1 的用量进行优化,结果如图 4 所示,随着 AuNP-p1/p2 的加入, $F/F_0$  迅速增加,直到加入的 AuNP-p1/p2 的体积达到 20  $\mu\text{L}$  后  $F/F_0$  增加缓慢趋于稳定,所以选择 20  $\mu\text{L}$  作为实验中纳米探针的加入量.其次,Exo III 的作用关乎实验体系的信号放大程度,所以接下来对 Exo III 的用量及作用时间进行了优化.结果如图 5(A)所示,随着 Exo III 用量的增加, $F/F_0$  也逐渐变大直至用量达到 0.8 U 时  $F/F_0$  最大,当 Exo III 的用量超过 0.8 U 时, $F/F_0$  呈下降趋势.这是因为使用的 Exo III 用量太小,体系中酶切反应不够完全,释放出来的荧光基团较少,荧光信号弱;但是如果加入的 Exo III 用量太大,可能会对纳米探针有切割的作用,导致背景荧光信号增大.因此,本实验选用 Exo III 的最佳用量为 0.8 U.从图 5(B)中可以看出当酶切时间为 2.5 h 时, $F/F_0$  的值最大,本实验选用的最佳酶切时间为 2.5 h.



125 nmol/L p1, 375 nmol/L p2, 50 nmol/L HIV-DNA, Exo III 为 1 U.

图3 体系的荧光光谱可行性验证

Fig. 3 The fluorescence spectra of system



50 nmol/L HIV-DNA, 1 U Exo III, 37  $^{\circ}\text{C}$  酶切反应 2 h.

图4 纳米探针的用量对体系的影响

Fig. 4 The effect of the amount of nanoprobe

## 2.5 纳米探针对于 HIV-DNA 检测性能的分析

在最优的实验条件下,实验研究了不同浓度的靶标 HIV-DNA (0.10、0.30、0.90、5.00、10.00、15.00、20.00、25.00、30.00、40.00、50.00、75.00、100.00、150.00、200.00 nmol/L) 对体系荧光强度的影响,实验结果如图 6(A) 所示,随着 HIV-DNA 浓度的增加,FAM 的荧光信号也在增强,当 HIV-DNA 的浓度达到 75 nmol/L 时,荧光强度达到了平台.图 6(B) 为加靶前后体系荧光强度比值  $F/F_0$  与靶标 HIV-DNA 浓度的变化关系,其中,插图显示了靶标浓度在 0.10~50.00 nmol/L 时, $F/F_0$  与靶标的浓度之间具有良好的线性关系.其线性方程为  $F/F_0 = 0.0465C + 1.1922$ ,  $R^2 = 0.9968$  ( $F_0$  表示溶液中不存在靶标 HIV-DNA

时体系的荧光强度; $F$ 表示溶液中加入 HIV-DNA 之后体系的荧光强度; $C$ 表示靶标 HIV-DNA 的浓度)。该方法的检测限为  $38.68 \text{ pmol/L}$  ( $S/N=3, n=15$ ),这与已报道的基于纳米材料的荧光探针分析方法相当(表 2)。

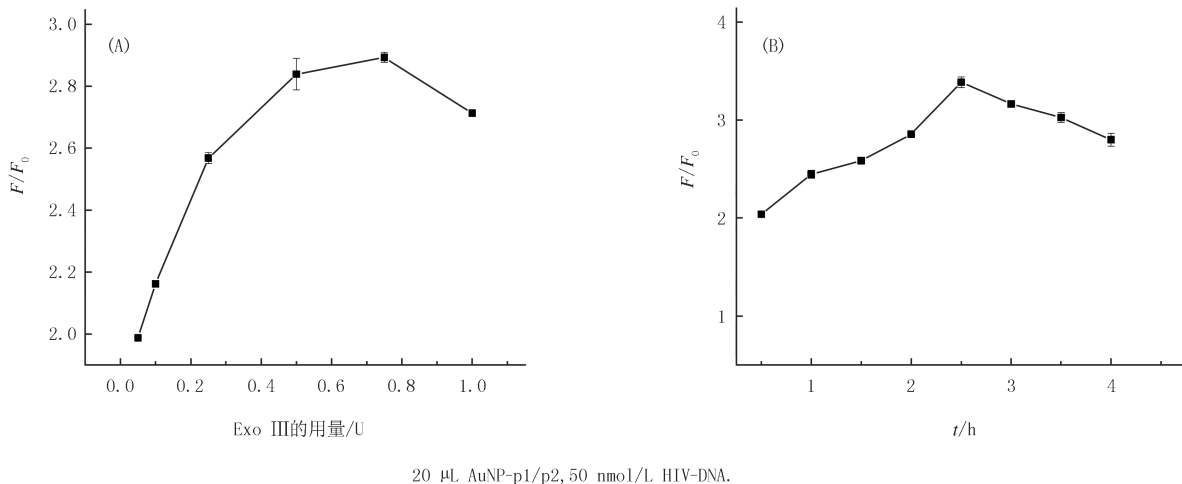
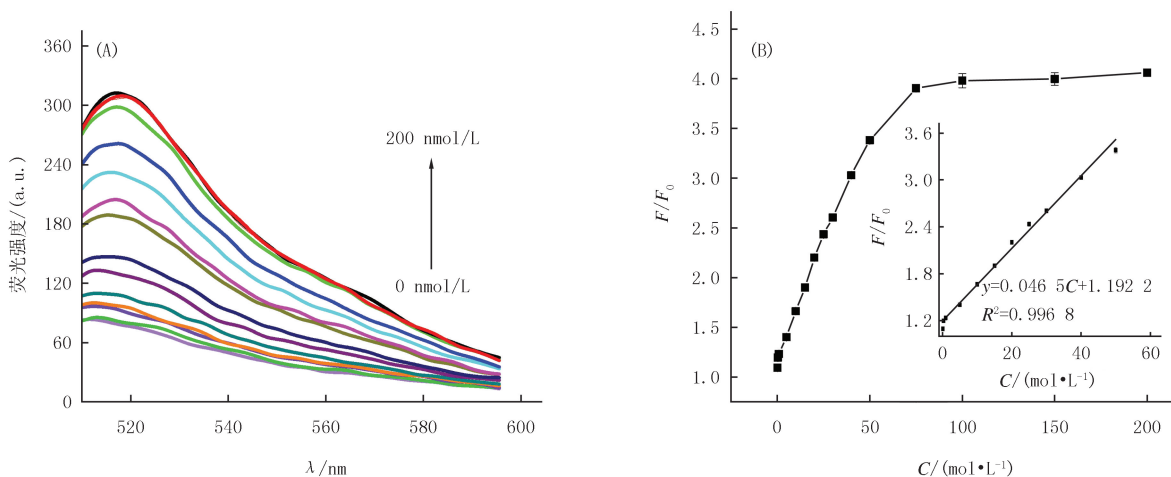


图5 Exo III用量的优化(A)和Exo III时间的优化(B)

Fig. 5 The optimization of Exo III concentration(A) and the optimization of Exo III reaction time(B)



(A) 在体系中加入不同浓度的靶标HIV-DNA后的荧光发射光谱图; (B)  $F/F_0$ 与HIV-DNA浓度的关系曲线, 插图为HIV-DNA分析的线性相关性曲线。

图6 基于AuNP和Exo III辅助信号放大的纳米探针对于HIV-DNA的分析性能

Fig. 6 The analytical performance for HIV-DNA using AuNP and Exo III-assisted signal amplification nanoprobe

表 2 与文献方法比较

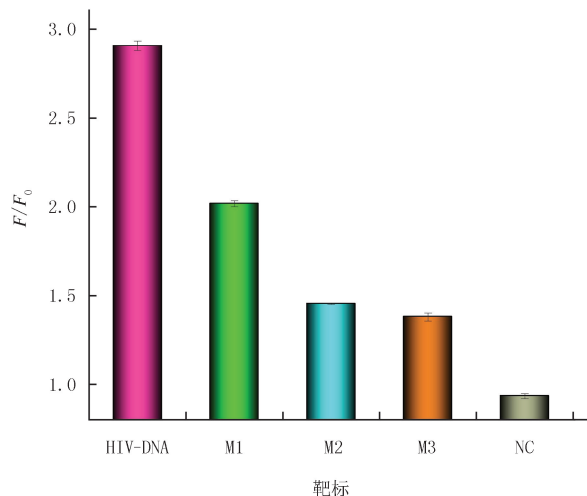
Tab. 2 Comparison with the reported methods

所用材料	分析方法	线性范围	检测限	文献
DNA-Ag NCs	荧光分析	15~150 nmol/L	3.18 nmol/L	[3]
QDs	荧光侧流分析	1 pmol/L~10 nmol/L	0.76 pmol/L	[26]
3-D DNA walker	荧光分析	2 pmol/L~5 nmol/L	2 pmol/L	[27]
DNA-AgNCs-CNPs	荧光能量转移	1~50 nmol/L	0.40 nmol/L	[28]
AuNPs-DNA walker	荧光分析	100 pmol/L~50 nmol/L	38.68 pmol/L	本文

注: Ag NCs(Ag 纳米簇), QDs(量子点), CNPs(碳纳米颗粒), AuNPs(Au 纳米颗粒)。

## 2.6 特异性分析

为了考察该方法的特异性,在相同的实验条件下分别测定了 HIV-DNA 浓度为 50 nmol/L 以及靶标 HIV-DNA 的类似物浓度为 150 nmol/L 时体系的荧光强度.如图 7 所示,只有靶标 HIV-DNA 存在时,  $F/F_0$  变化最显著.检测 1、2、3 及多个碱基错配的靶标类似物时,荧光信号均有所不同,但均显著低于全匹配的 HIV-DNA,表明该方法可以区分碱基错配,具有良好的选择性.



20  $\mu$ L AuNP-p1/p2, 50 nmol/L HIV-DNA, 0.8 U Exo III, 150 nmol/L 类似物.

图7 方法的特异性考察

Fig.7 The specificity of this method

## 2.7 实际样品分析

为了验证此方法用于实际样品测试的可行性,在 5% 人血清样品中进行了 HIV-DNA 的检测.在人血清样品中加入 0.300 nmol/L, 0.900 nmol/L, 5.000 nmol/L, 25.000 nmol/L HIV-DNA 进行荧光测定,结果如表 3 所示,回收率在 98.72%~106.72% 之间,结果表明该纳米探针对实际样品的检测中具有很好的应用潜力.

表 3 5% 人类血清样品中 HIV-DNA 的加标回收分析

Tab. 3 Analysis of standard addition recovery of HIV-DNA in 5% human serum samples

样品	添加量/(nmol $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	实测值/(nmol $\cdot$ L <sup>-1</sup> )	回收率/%	RSD/% (n=3)
1	0.300	0.316	105.33	0.86
2	0.900	0.902	100.22	3.01
3	5.000	5.340	106.72	6.52
4	25.000	24.700	98.72	1.67

## 3 结论

本文设计了基于 AuNP 和 Exo III 辅助的纳米探针用于 HIV-DNA 分析.此纳米探针制备简单方便,只需一步反应即可对靶标物质进行检测.该方法使用 AuNP 作为载体和猝灭剂,有效降低了背景信号;利用靶标的杂交反应来启动 Exo III 的切割反应,可以有效区分碱基错配.该方法可有效缩短反应时间,整个检测过程只需 2.5 h 便可获得 38.68 pmol/L 的检测限,为生物医学研究和 HIV-DNA 临床诊断的检测提供了简单、快速、灵敏的分析方法.

## 参 考 文 献

- [1] FALASCA F, DI CARLO D, DE VITO C, et al. Evaluation of HIV-DNA and inflammatory markers in HIV-infected individuals with different viral load patterns[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2017, 17(1): 581.
- [2] LIU X Y, ZHOU X M, XIA X Y, et al. Catalytic hairpin assembly-based double-end DNAzyme cascade-feedback amplification for sensitive fluorescence detection of HIV-1 DNA[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1096: 159-165.
- [3] FANG B Y, LI C, AN J, et al. HIV-related DNA detection through switching on hybridized quenched fluorescent DNA-Ag nanoclusters[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(12): 5532-5538.
- [4] KONG J, WANG Y F, QI W, et al. Enzyme-free visualization of nucleic acids during HIV infection by *Octopus*-like DNA[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 150: 122-128.
- [5] LIANG P, JUAN C, YU H, et al. Dithiothreitol-regulated coverage of oligonucleotide-modified gold nanoparticles to achieve optimized biosensor performance[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(4): 4233-4242.
- [6] HAN Y, ZOU R, XIANG L, et al. Engineering a label-and enzyme-free detection of HIV-DNA on a cyclic DNA self-assembling strategy using G-triplexes as the signal reporter[J]. *Microchemical Acta*, 2020, 155: 104656.
- [7] CHEN P P, HU P Y, HUANG K, et al. Detection of nucleic acids via G-quadruplex-controlled L-cysteine oxidation and catalyzed hairpin assembly-assisted signal amplification[J]. *RSC Advances*, 2018, 8(71): 40564-40569.
- [8] ZHENG J, JI X, DU M, et al. Rational construction of a DNA nanomachine for HIV nucleic acid ultrasensitive sensing[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(36): 17206-17211.
- [9] FENG Q M, WANG M Y, HAN X G, et al. Construction of an electrochemical biosensing platform based on hierarchical mesoporous NiO@N-doped C microspheres coupled with catalytic hairpin assembly[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2020, 3(2): 1276-1282.
- [10] XU J G, YAN C, WANG X X, et al. Ingenious design of DNA concatamers and G-quadruplex wires assisted assembly of multibranch DNA nanoarchitectures for ultrasensitive biosensing of miRNA[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(15): 9747-9753.
- [11] SEEFELD T H, ZHOU W J, CORN R M. Rapid microarray detection of DNA and proteins in microliter volumes with surface plasmon resonance imaging measurements[J]. *Langmuir*, 2011, 27(10): 6534-6540.
- [12] ZHOU W J, HALPERN A R, SEEFELD T H, et al. Near infrared surface plasmon resonance phase imaging and nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance phase imaging for ultrasensitive protein and DNA biosensing with oligonucleotide and aptamer microarrays[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(1): 440-445.
- [13] HUANG J, ZHU L Y, JU H X, et al. Telomerase triggered DNA walker with a superhairpin structure for human telomerase activity sensing[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(11): 6981-6985.
- [14] ZHANG Y, CHAI Y Q, WANG H J, et al. Target-induced 3D DNA network structure as a novel signal amplifier for ultrasensitive electrochemiluminescence detection of MicroRNAs[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(22): 14368-14374.
- [15] QIN P Z, YAO L, XU J G, et al. Smart engineering of a dual-DNA machine with a high signal-to-noise ratio for one-pot robust and sensitive miRNA signaling[J]. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2019, 55(95): 14367-14370.
- [16] WANG R, ZHAO X, CHEN X, et al. Rolling circular amplification(RCA)-assisted CRISPR/Cas9 cleavage(RACE) for highly specific detection of multiple extracellular vesicle MicroRNAs[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(2): 2176-2185.
- [17] LI D X, WU Y L, GAN C F, et al. Bio-cleavable nanoprobe for target-triggered catalytic hairpin assembly amplification detection of microRNAs in live cancer cells[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(37): 17623-17628.
- [18] LIU J, DU P, ZHANG J, et al. Sensitive detection of intracellular microRNA based on a flowerlike vector with catalytic hairpin assembly[J]. *Chemical Communications*, 2018, 54(20): 2550-2553.
- [19] WANG L, WAN Y, XU Q, et al. Long-term functional stability of functional nucleic acid-gold nanoparticle conjugates with different secondary structures[J]. *Langmuir*, 2019, 35(36): 11791-11798.
- [20] MA P Q, LIANG C P, ZHANG H H, et al. A highly integrated DNA nanomachine operating in living cells powered by an endogenous stimulus[J]. *Chemical Science*, 2018, 9(13): 3299-3304.
- [21] LIANG C P, MA P Q, LIU H, et al. Rational engineering of a dynamic, entropy-driven DNA nanomachine for intracellular MicroRNA imaging[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(31): 9077-9081.
- [22] ZHANG J J, SONG C Y, ZHOU H L, et al. A dual signal amplification strategy for the highly sensitive fluorescence detection of nucleic acids[J]. *The Analyst*, 2020, 145(4): 1219-1226.
- [23] PENG H, LI X F, ZHANG H, et al. A microRNA-initiated DNAzyme motor operating in living cells[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14378.
- [24] XIE Y, NIU F, YU A, et al. Proximity binding-triggered assembly of two MNazymes for catalyzed release of G-quadruplex DNAzymes and an ultrasensitive homogeneous bioassay of platelet-derived growth factor[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 92(1): 593-598.
- [25] HE D G, WONG K W, DONG Z Z, et al. Recent progress in live cell mRNA/microRNA imaging probes based on smart and versatile



nanomaterials[J].Journal of Materials Chemistry B,2018,6(47):7773-7793.

- [26] DENG X L,WANG C,GAO Y,et al.Applying strand displacement amplification to quantum dots-based fluorescent lateral flow assay strips for HIV-DNA detection[J].Biosensors & Bioelectronics,2018,105:211-217.
- [27] YE Y D,XIA L,XU D D,et al.DNA-stabilized silver nanoclusters and carbon nanoparticles oxide:A sensitive platform for label-free fluorescence turn-on detection of HIV-DNA sequences[J].Biosensors and Bioelectronics,2016,85:837-843.

## The HIV-DNA detection platform based on Au nanoparticle DNA probe and Exo III-assisted signal amplification

Tian Jianniao, Li Qing, Liang Xuehua, Tan Li, Lu Jiangnan, Wang Xing

(Key Laboratory for the Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources(Ministry of Education of China;  
School of Chemistry and Pharmaceutical Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

**Abstract:** A novel nanoprobe with Au nanoparticles(AuNP) and Exo III assisted target circulating signal amplification was designed for HIV-DNA detection. The nanoprobe is composed of AuNP, capture probe p1 and signal probe p2. In the absence of the target HIV-DNA, the nanoprobe is resistant to Exo III hydrolysis at this time, and the distance between the signal probe p2 and AuNPs is close to produce fluorescence resonance energy transfer, and the fluorescence of the system is basically quenched. However, in the presence of a target, the target hybridizes to the signal probe p2 and replaces p1. At this time, the signal probe p2 duplex that hybridizes with the target can hydrolyze under the action of Exo III, the fluorophore is released, and then the system fluorescence is enhanced. At the same time, the target is also released and interacts with the probe p2 on AuNPs to drive the next reaction in order to achieve the goal of target circulation, so this method has a short detection time and high stability. Therefore, this method has higher detection sensitivity. The linear range of this method is 100 pmol/L-50 nmol/L, and the detection limit is 38.68 pmol/L( $S/N=3$ ). With good anti-interference ability, the method can be used for the detection of complex biological samples with a recovery rate between 98.72%-106.72%.

**Keywords:** HIV-DNA; Au nanoparticle; Exo III; signal amplification

[责任编辑 赵晓华 陈留院]



## 本期专家介绍



刘文安,河南师范大学教授,博士,河南省优秀教师,河南省科技创新杰出青年,河南省教育厅学术技术带头人.主要从事应用概率与统计、组合最优化、计算机数学等方面研究,兼任美国《数学评论》评论员,*International Journal of Game Theory, Discrete Math, Discrete Appl Math, Theoretical Computer Science* 等 SCI 期刊审稿人,河南省数学会常务理事,河南省应用统计学会常务理事、副秘书长,河南省统计学类教学指导委员会副主任委员.主持参与完成国家自然科学基金(面上项目)5 项,河南省高校科技创新团队及河南省基础研究等省级项目 5 项,在 *Discrete Appl Math, Theoretical Computer Science, J Statist Plann Inference* 等国内外学术期刊发表学术论文 50 余篇,出版专著《离散空间上的容错搜索理论》1 部,主编《概率论与数理统计》教材 2 部.

徐秀丽,燕山大学教授,博士,博士生导师,研究方向为随机服务系统理论及优化、流体排队模型理论及其经济学分析.中国运筹学会随机服务与运作管理分会常务理事,河北省现场统计学会副理事长,河北省统计学会常务理事,河北省统计学会学术委员会委员.主持国家自然科学基金项目和多项河北省自然科学基金项目.已在相关领域主要学术期刊上发表论文 60 余篇,其中近 30 篇在 SCI, EI 源期刊上发表,完成专著 1 部.“多服务台休假排队系统的理论和方法”获河北省自然科学三等奖.“自组织传感网络节能关键技术研究与应用”获河北省科学技术进步三等奖.2015 年入选河北省新世纪“三三人才工程”.



田建婵,广西师范大学教授,博士,博士生导师,2001 年在西北师范大学获理学硕士学位,2004 年于兰州大学化学与化工学院博士研究生毕业并获理学博士学位,主要研究方向为纳米光学探针及生物传感分析,在 *Biosensors and Bioelectronics, Chemical Communication, Analytical Chimica Acta, Sensors and Actuators B, Analyst* 等 SCI 源期刊发表论文 70 余篇,已主持国家自然科学基金 3 项,2014 年作为第二完成人获得广西壮族自治区自然科学奖二等奖.