

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2016.11.018

基于氯化血红素对 G-四链体/盐酸小檗碱复合物的竞争作用构建 DNA 逻辑门^①

高建帮

临沂大学 费县分校, 山东 临沂 263400

摘要: 利用荧光法研究了盐酸小檗碱对不同 DNA 构象的识别能力, 研究发现盐酸小檗碱与 G-四链体有较强的相互作用, 形成的复合物可以在 530 nm 处发出较强的荧光. 当一定量的氯化血红素加入到 G-四链体/盐酸小檗碱复合物中时, 氯化血红素与 G-四链体结合力更强, 从而把盐酸小檗碱置换出来, 荧光发生猝灭. 利用这种荧光信号的开关响应, 成功构建了 INHIBIT 逻辑门.

关键词: 盐酸小檗碱; 氯化血红素; G-四链体; 逻辑门

中图分类号: O657.3; X703

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)11-0119-05

DNA 具有精确的分子识别能力和极强的信息存储能力, 以核酸分子生物学特性为基础来构建分子级别的布尔逻辑门并实现相关逻辑运算, 是近年来分子计算机科学和分子生物学交叉产生的新兴科研领域, 在生物医学领域具有重要意义, 引起了研究者的广泛关注^[1-2]. 这是因为基于 DNA 的生物运算具有结构简单、构象可控等优点, 通过互补链的杂交以及与目标分子(离子、有机小分子和蛋白质等)的相互作用可以构建一系列 DNA 逻辑门, 从而展现其在 DNA 计算方面的优势^[3].

近年来, 科研工作者在 DNA 逻辑门的构建方面进行了大量的研究工作. Elbaz 等人^[4]利用 DNA 镊子结构实现了 pH 诱导的可重置的逻辑门; Zhu 等人^[5]将 DNA 链置换技术与 G-四链体组装技术结合, 在体外实现了光敏剂 PPIX 的可控释放; Pei 等人^[6]研制了一种 DNA 纳米三角锥, 通过输入不同信号(ATP、H⁺, 金属离子等)使其构象发生改变, 产生了相应的荧光信号, 构建了一系列 DNA 分子逻辑门; Liu 等人^[7]利用 pH 变化和光控条件, 基于富含胞嘧啶的核苷酸链设计了一种逻辑门元件, 实现了 NAND 逻辑功能操作.

盐酸小檗碱是一种从黄连、黄柏等植物中提取的生物碱, 具有显著的抑菌作用^[8]. 当它在水溶液中时, 具有极弱的荧光信号^[9]. 董川教授课题组^[10-11]设计了一种 G-四链体结构, 研究发现盐酸小檗碱可以与 G-四链体结合发出较强荧光. 本文在此基础上利用盐酸小檗碱实现了对不同构象 DNA 的识别, 之后利用氯化血红素与 G-四链体的强嵌入作用与盐酸小檗碱竞争, 从而使荧光猝灭. 以荧光信号的开关性能构建了 INHIBIT 逻辑门.

① 收稿日期: 2015-10-23

基金项目: 国家自然科学基金(21273174).

作者简介: 高建帮(1963-), 男, 山东临沂人, 副教授, 主要从事生化分析和生物传感的研究.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

日立 F-4500 荧光分光光度计, WFH-204B 手提式紫外分析仪. 本文中所使用的寡核苷酸序列均由上海生工生物工程有限公司(中国上海)合成. G-DNA: 5'-GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3', i-DNA: 5'-CCCTAACCCTAACCCTAACCCA-3'. 实验中所使用的溶液均由超纯水(18.2 M Ω cm)配制而成. 盐酸小檗碱、氯化血红素等化学试剂均购买自阿拉丁试剂有限公司(中国上海). G-四链体溶液的制备: 将 G-DNA 溶于 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲(0.5 mol/L KCl, pH=7.4)中, 在 90 $^{\circ}$ C 条件下恒温 10 min 后缓慢降至室温, 使其形成 G-四链体结构. i-motif 溶液的制备: 将 i-DNA 溶于 10 mmol/L Na₂HPO₄-醋酸缓冲(pH=6)中即可形成 i-motif 结构. 单链 DNA 溶液的制备: 将 G-DNA 溶于 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲(100 mmol/L NaCl, pH=7.4)中即可形成单链 DNA 结构. 双链 DNA 溶液的制备: 将等摩尔量的 G-DNA 和 i-DNA 溶解于 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲(100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂, pH=7.4)中静置 30 min 后使用.

1.2 荧光法研究盐酸小檗碱对不同 DNA 构象的识别

取 10 mmol/L 的盐酸小檗碱分别与不同浓度的 G-四链体、i-motif、单链 DNA 和双链 DNA 溶液混合均匀, 实验最终体积均为 500 μ L, 静置 10 min 后使用荧光分光光度计测量. 激发波长为 365 nm, 激发和发射狭缝均为 10 nm, 光电倍增管电压为 400 V.

1.3 荧光法研究氯化血红素对 G-四链体-盐酸小檗碱配合物的竞争作用

取 10 mmol/L 的盐酸小檗碱与 1 μ mol/L G-四链体形成 G-四链体-盐酸小檗碱配合物, 记录其荧光信号. 向其加入不同浓度的氯化血红素, 5 min 后通过荧光分光光度计记录其荧光信号. 实验参数同 1.2.

2 结果与讨论

2.1 盐酸小檗碱对不同构象 DNA 的识别

将盐酸小檗碱与不同浓度的 G-四链体、i-motif、单链 DNA 和双链 DNA 分别混合, 通过荧光法研究盐酸小檗碱对不同构象 DNA 的识别作用. 由图 1(a)可见, 在盐酸小檗碱浓度为 $20\ \mu\text{mol/L}$ 的条件下, 单链 DNA 和双链 DNA 几乎没有荧光信号产生, 对 i-motif DNA 和 G-四链体均有荧光信号产生, 说明盐酸小檗碱可以嵌入 i-motif 和 G-四链体结构中并发出荧光. 值得注意的是, 盐酸小檗碱与 G-四链体结合后能够产生与 i-motif 结合后更强的荧光信号, 且随着 DNA 浓度的增加荧光信号增强, 这说明相比于 i-motif 结构盐酸小檗碱更容易嵌入 G-四链体中. 图 1(b)为不同浓度为盐酸小檗碱在 $10\ \text{mmol/L}$ Tris-HCl 缓冲溶液和 $1\ \mu\text{mol/L}$ 的 G-四链体 DNA 中的荧光图谱. 结果显示, 即使大浓度的盐酸小檗碱在缓冲溶液中也不会发出荧光, 而在 G-四链体 DNA 中随着盐酸小檗碱浓度的增加荧光信号增强. 因此, 通过不同荧光信号可以利用盐酸小檗碱实现对不同构象 DNA 的识别, 图 1(c)为 $20\ \mu\text{mol/L}$ 盐酸小檗碱加入 $1\ \mu\text{mol/L}$ 的 G-四链体后, 在不同时间下的荧光变化曲线, 实验发现, 在 $1\ \text{min}$ 之内即有较明显的荧光产生, $1\ \text{min}$ 之后荧光稳定.

2.2 氯化血红素对 G-四链体/盐酸小檗碱复合物的竞争作用

由于氯化血红素可以嵌入 G-四链体中形成具有模拟辣根过氧化物酶活性的 DNA 复合物, 因此探讨了氯化血红素与盐酸小檗碱在 G-四链体中的竞争作用. 由图 2 可以看出, 随着加入的氯化血红素浓度的增大, 体系中的荧光强度降低. 这是由于氯化血红素与 G-四链体之间具有很强的亲和力, 氯化血红素加入到体系中时, 会将 G-四链体/盐酸小檗碱复合物中的盐酸小檗碱挤出, 并与 G-四链体形成更加稳定的复合物. 氯化血红素与 G-四链体之间的相互作用主要是外部 π - π 堆积模式进行结合^[12]. G-四链体结构上的鸟

嘌呤碱基与氯化血红素中卟啉环上两个负电荷的羧基可以形成分子间氢键，分子间氢键的形成对 G-四链体/氯化血红素复合物的稳定性也起着重要的作用^[13]。如图 3 所示，体系最终发生荧光猝灭。因此，可以利用这个竞争关系构建一个氯化血红素荧光检测方法。图 4 显示的是氯化血红素浓度与相应荧光强度直接的线性关系。通过分析可以得出，此方法对盐酸小檗碱的响应线性范围为 0~2 μmol/L，线性相关系数为 0.994 6，检测限可达到 17 nmol/L(S/N=3)。

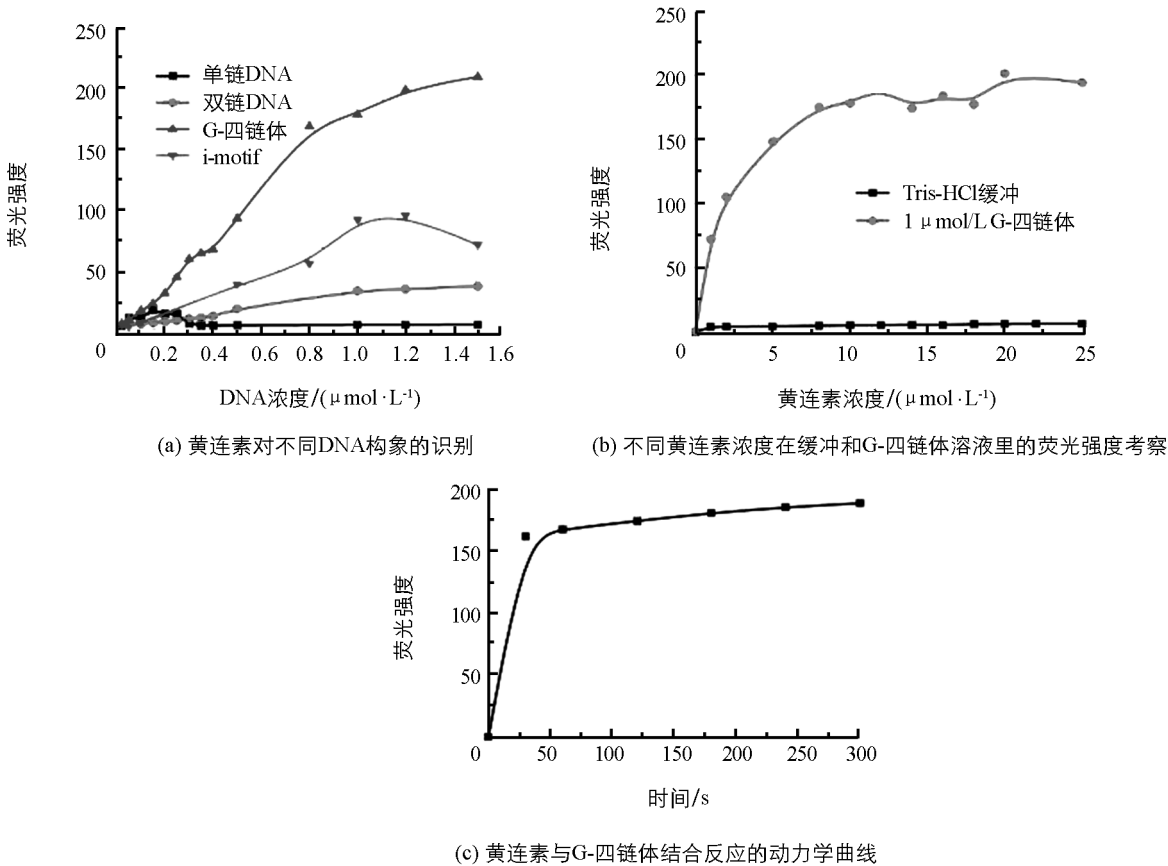
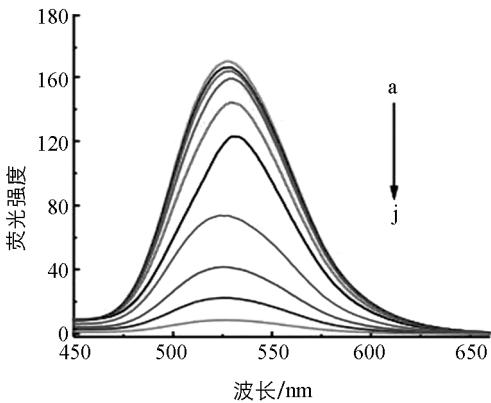
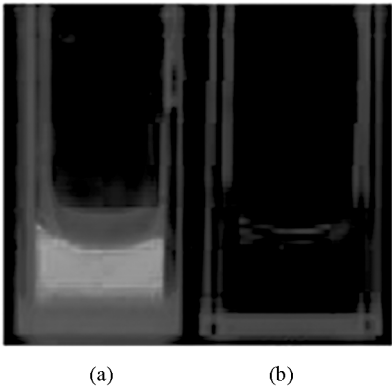


图 1 荧光法研究盐酸小檗碱对不同构象 DNA 的识别作用



从 a 到 j 氯化血红素的浓度依次为：0,50,250,500 nmol/L，
1,2,5,10,20,30,60 μmol/L.

图 2 不同浓度的氯化血红素与 G-四链体/盐酸小檗碱复合物结合后的荧光图



(a) 为 G-四链体/盐酸小檗碱复合物溶液的荧光数码照片；
(b) 为加入氯化血红素后体系荧光猝灭的数码照片。

图 3 G-四链体复合物溶液加入氯化血红素前后的数码照片

2.3 逻辑门的构建

依据体系中荧光信号的开关性质,可以构建一个 INHIBIT 逻辑门.以盐酸小檗碱和氯化血红素分别为输入信号 1(Input 1)和输入信号 2(Input 2),以 530 nm 处的荧光强度(强和弱)为输出信号(Output 1 和 0).图 5 给出了各中输出状态下的荧光发射行为和逻辑符号.当无任何输入信号时,输入信号为(0,0),系统没有荧光,输出信号为(0);当只有盐酸小檗碱输入时,输入信号为(1,0),系统有较强的荧光,输出信号为(1);当只有氯化血红素输入时,输入信号为(0,1),系统没有荧光,输出信号为(0);当同时存在氯化血红素和盐酸小檗碱时,输入信号为(1,1),系统在 530 nm 处几乎没有荧光,输出信号为(0).逻辑门的真值行为总结在表 1 中,这是一个典型的 INHIBIT 逻辑系统.

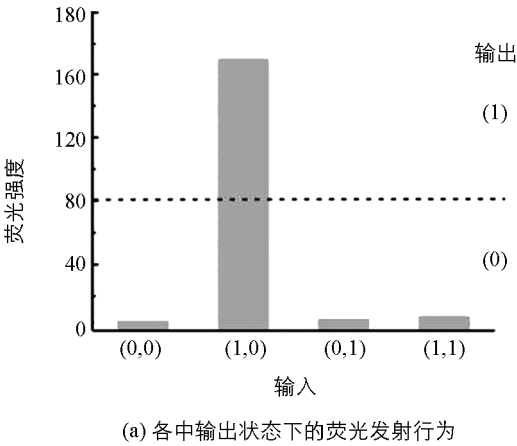


图 5 各输出状态下的荧光发射行为和逻辑符号

表 1 逻辑开关的信号与输出真值表

输入 1(盐酸小檗碱)	输入 2(氯化血红素)	输出(530 nm)	输入 1(盐酸小檗碱)	输入 2(氯化血红素)	输出(530 nm)
0	0	0	0	1	0
1	0	1	1	1	0

3 结 论

利用盐酸小檗碱与不同构象 DNA 的结合能力不同这一性质,实现了对不同构象 DNA 的荧光识别. G-四链体与盐酸小檗碱结合后产生的荧光信号最强,但是加入氯化血红素之后,由于氯化血红素与 G-四链体的结合力大于盐酸小檗碱与 G-四链体的结合力,从而使得荧光猝灭.利用这种荧光信号的开关性质成功构建了一种盐酸小檗碱和氯化血红素作为双输入、530 nm 处荧光信号作为单输出的 INHIBIT 逻辑门.

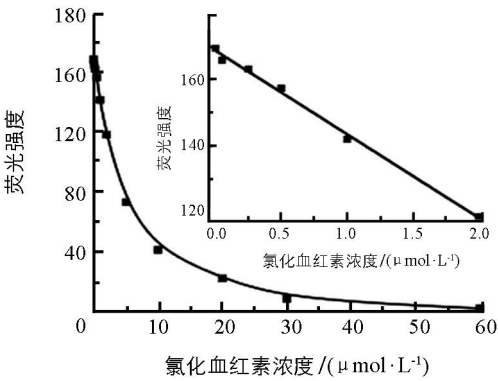
参考文献:

[1] OGIHARA M, RAY A. Simulating Boolean Circuits on a DNA Computer [J]. Algorithmica, 1999, 25(2): 239-250.

[2] 马 香,刘小刚,李利改,等.用于研制柑橘 DArT 芯片的 DNA 探针文库的制备 [J].西南大学学报(自然科学版), 2015, 37(12): 1-8.

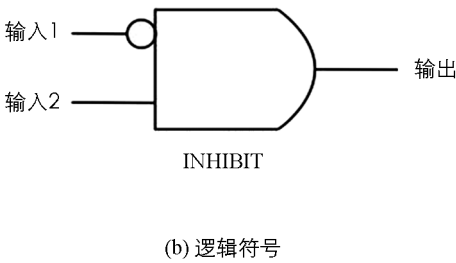
[3] 曹青锋,闫舒雅,龙佳宝,等.基于核酸适体和胶体金技术构建凝血酶的 DNA 逻辑门 [J].生命科学研究, 2015, 19(3): 210-212.

[4] ELBAZ J, WANG Z G, ORBACH R, et al. pH-Stimulated Concurrent Mechanical Activation of Two DNA “Tweezers”.



插图显示的是对低浓度氯化血红素的线性信号响应.

图 4 荧光强度与氯化血红素浓度直接的关系



A “Set-Reset” Logic Gate System [J]. Nano Lett, 2009, 9(12): 4510—4514.

[5] ZHU J B, ZHANG L B, LI T, Enzyme-Free Unlabeled DNA Logic Circuits Based on Toehold-Mediated Strand Displacement and Split G-Quadruplex Enhanced Fluorescence [J]. Adv Mater, 2013, 25(17): 2440—2444.

[6] PEI H, LIANG L, Yao G, et al. Reconfigurable Three-Dimensional DNA Nanostructures for the Construction of Intracellular Logic Sensors [J]. Angew Chem Int Ed, 2012, 51(36): 9020—9024.

[7] LIU H J, ZHOU Y C, YANG Y, et al. Photo-pH Dually Modulated Fluorescence Switch Based on DNA Spatial Nanodevice [J]. J Phys Chem B, 2008, 112: 6893—6896.

[8] 任贻军, 高逢喜. 黄连素的研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(1): 50—51.

[9] QIN Y, PANG J Y, CHEN W H, et al. Synthesis, DNA-Binding Affinities, and Binding Mode of Berberine Dimers [J]. Bioorg Med Chem, 2006, 14 (1) : 25—32.

[10] GUO Y, CHEN Y, WEI Y, et al. Label-Free Fluorescent Aptasensor for Potassium Ion Using Structure-Switching Aptamers and Berberine [J]. Spectrochim Acta A, 2015, 136(2): 1635—1641.

[11] WEI Y, CHEN Y, LI H, et al. An Exonuclease I-Based Label-Free Fluorometric Aptasensor for Adenosine Triphosphate (ATP) Detection with a Wide Concentration Range [J]. Biosens Bioelectron, 2015, 63: 311—316.

[12] PAVLOV V, XIAO Y, GILL R, et al. Amplified Chemiluminescence Surface Detection of DNA and Telomerase Activity Using Catalytic Nucleic Acid Labels [J]. Anal Chem, 2004, 76(7): 2152—2156.

[13] LU T, LI B, DONG S. Aptamer-Based Label-Free Method for Hemin Recognition and DNA Assay by Capillary Electrophoresis with Chemiluminescence Detection [J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 389(3): 887—893.

DNA Logic Gate Based on the Competitive Reaction Between Hemin and G-Quadruplex/Berberine Composite

GAO Jian-Bang
College of Feixian, Linyi University, Linyi Shandong 263400, China

Abstract: In this work, we studied the recognition ability of berberine for different conformation DNA, including single strand DNA, double strand DNA, G-quadruplex, and i-motif DNA. We found that berberine has the strongest binding ability with G-quadruplex, and display a strong fluorescence signal. However, with the addition of hemin, the fluorescence signal quenched immediately due to the higher binding ability between G-quadruplex and hemin than berberine. The INHIBIT logic gate is successfully constructed using this fluorescence switches.

Key words: berberine; hemin; G-quadruplex; logic gate

责任编辑 潘春燕

