

# 基于多足DNA步行器和主客体技术的 可再生电化学生物传感器用于心梗 microRNA的高灵敏检测

代志江, 单腾腾, 李益和, 杨建梅, 赵 焱

(云南省现代分离分析与物质转化重点实验室, 云南师范大学化学化工学院, 昆明 650500)

**摘要** 基于多足DNA步行器和主客体技术, 构建了高灵敏检测 miRNA-133a-5p 的可再生电化学生物传感器. 在电极表面修饰还原氧化石墨烯-金纳米颗粒复合材料(rGO@AuNPs)以固定大量的 $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD), 构建了可再生传感界面. 当 miRNA-133a-5p 存在时, 其触发3个发夹DNA探针自组装形成三足DNA步行器, 同时置换出 miRNA-133a-5p, 使其循环参与反应, 最终产生大量步行器. 步行器高效剪切信号探针, 释放出大量二茂铁(Fc)标记的单链DNA片段. 这些片段通过主客体作用被电极表面的 $\beta$ -CD捕获, 产生电流信号, 从而实现对 miRNA-133a-5p 的高灵敏检测. 由于目标物循环参与反应和三足DNA步行器的高效剪切效率, 使传感器的检出限达 19.7 fmol/L. 同时, 利用电化学可控调节 Fc 与  $\beta$ -CD 间的主客体作用, 可使传感器实现6次再生循环利用. 本研究为心梗诊断提供了新平台, 也为电化学生物传感器的再生利用提供了有效策略.

**关键词** 电化学生物传感器; 急性心肌梗死; DNA步行器; miRNA-133a-5p; 可再生

中图分类号 O657.1 文献标志码 A doi: 10.7503/cjcu20250255

## Regenerable Electrochemical Biosensor Based on Multi-legged DNA Walker and Host-guest Chemistry for Highly Sensitive Detection of Myocardial Infarction-related microRNA

DAI Zhijiang, SHAN Tengting, LI Yihe, YANG Jianmei\*, ZHAO Yan\*

(Yunnan Key Laboratory of Modern Separation Analysis and Substance Transformation, College of Chemistry and Chemical Engineering, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China)

**Abstract** A highly sensitive and regenerable electrochemical biosensor was developed for detecting microRNA-133a-5p (miRNA-133a-5p) via integrating a multi-legged DNA walker with host-guest recognition. The sensor featured a regenerable interface constructed by modifying the electrode surface with reduced graphene oxide-gold nanoparticle composites (rGO@AuNPs) and immobilizing abundant  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD). Upon introduction of miRNA-133a-5p, the target triggered the self-assembly of three hairpin DNA probes into a three-legged DNA walker. Crucially, miRNA-133a-5p was displaced during this process, enabling its cyclic reuse and subsequent amplification of walker generation. The resulting walkers efficiently cleaved signal probes, yielding numerous ferrocene (Fc)-labeled single-stranded DNA fragments. These fragments were captured by  $\beta$ -CD on the electrode

收稿日期: 2025-09-10. 网络首发日期: 2025-10-22.

联系人简介: 杨建梅, 女, 博士, 副教授, 主要从事纳米材料与生物传感方面的研究. E-mail: yangatynnu@163.com

赵 焱, 女, 硕士, 教授, 主要从事超分子化学方面的研究. E-mail: zhaoyann@163.com

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 22364023)、云南省基础研究计划-面上项目(批准号: 202301AT070074)和云南师范大学博士科研启动项目(批准号: 2020ZB009)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 22364023), the Yunnan Fundamental Research Project, China(No. 202301AT070074) and the PhD Scientific Research Foundation of Yunnan Normal University, China(No.2020ZB009).

surface *via* host-guest interactions, generating measurable current signals for ultrasensitive miRNA-133a-5p detection. Benefiting from target recycling amplification and the high cleavage efficiency of the three-legged DNA walker, the sensor achieved a remarkably low detection limit of 19.7 fmol/L. Furthermore, electrochemical regulation of the host-guest interaction between Fc and  $\beta$ -CD facilitated six regeneration cycles. This work establishes a novel platform for myocardial infarction diagnosis and proposes an effective strategy for designing regenerable electrochemical biosensors.

**Keywords** Electrochemical biosensor; Acute myocardial infarction; DNA walker; miRNA-133a-5p; Regenerable

急性心肌梗死(AMI)是一种因冠状动脉急性阻塞引发心肌细胞缺血坏死的致命性心血管疾病,其发病急、致死率高,早期精准诊断对改善患者预后至关重要<sup>[1]</sup>. 临床上,心肌肌钙蛋白(cTn)虽被视为AMI诊断的金标准,但通常发病后4~6 h才显著升高,且特异性不足,这往往导致诊断延迟和敏感性低<sup>[2,3]</sup>. 研究表明,在AMI的病理过程中, microRNA-133a-5p(miR-133a-5p)作为血浆中的主要亚型,其水平在发病后会迅速升高,且变化显著早于心肌肌钙蛋白(cTn). 该分子表达丰度高,与心肌损伤程度呈正相关,加之其特有的组织特异性和高稳定性,被认为是理想的超早期诊断标志物<sup>[4-6]</sup>. 然而,血液中AMI相关miRNA存在含量低、同源序列干扰严重以及复杂血液基质背景等问题,给检测技术的灵敏度和特异性带来了严峻挑战. 电化学生物传感器因兼具高灵敏度、快速响应及操作便捷性优势,在miRNA检测领域展现出广阔前景<sup>[7-10]</sup>. 然而,传统传感器的识别界面在发生特异性结合后难以可逆解离,因此多局限于一次性使用,无法满足连续监测的需求,从而限制了其在临床动态追踪中的应用. 因此,开发兼具超高灵敏度与可再生能力的电化学传感平台,已成为推动AMI诊断技术升级的迫切需求.

为提高电化学传感平台对痕量miRNA的检测能力,核酸信号放大技术被引入传感器设计中,包括滚环扩增(RCA)<sup>[11-13]</sup>、催化发夹自组装(CHA)<sup>[14-16]</sup>及DNA步行器(DNA Walker)<sup>[17,18]</sup>等. 其中,DNA步行器作为一种模拟生物分子运动的纳米机器,具备自主行走、程序可控及扩增效率高等独特优势,显著提升了检测灵敏度. 根据驱动机制的不同,DNA步行器主要分为核酸酶驱动型、DNAzyme驱动和链置换驱动型. 其中,DNAzyme驱动型的DNA步行器凭借其内源性催化裂解能力,在金属离子辅助下无需外源燃料链即可实现高效、自主地行走,表现出优异的信号放大效率和操作稳定性. 根据“足”的数量,DNA步行器可分为单足、双足和多足类型. 相较于单足DNA步行器<sup>[19,20]</sup>,多足DNA步行器可通过多个运动单元协同作用,显著增加与底物的结合位点,利用并行切割实现指数级信号扩增,而且其Walker链和轨道链之间的连接作用力较大,可以削弱Walker链的脱轨,极大地提高了信号放大效率<sup>[21-24]</sup>. 因此,构建由DNAzyme驱动的多足DNA步行器有望实现低丰度生物标志物的检测.

超分子主客体化学的核心是可逆的非共价键相互作用,该特性为传感器界面的“重置”或“再生”提供了可能.  $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD)作为主客体化学中主要的大环主体分子,是一种七元环状寡糖,呈漏斗状,内部疏水,外部亲水<sup>[25]</sup>. 其独特的结构能够与电活性分子二茂铁(Fc)实现可逆的包合作用,并且可以通过电化学刺激调控其结合. 还原态的二茂铁(Fc)因疏水环戊二烯基与空腔匹配,可通过疏水相互作用被特异性包合形成稳定复合物,而氧化态的Fc( $\text{Fc}^+$ )因带正电荷且疏水性降低导致包合作用减弱,使Fc分子从 $\beta$ -CD空腔中解离<sup>[26-28]</sup>. 这一特性为构建可再生的传感界面提供了新的思路.

本文基于多足DNA步行器与主客体识别技术,构建了一种高灵敏且可再生的电化学生物传感器,用于检测心肌梗死标志物miRNA-133a-5p. 首先,在电极表面修饰具有高比表面积和优异导电性的还原氧化石墨烯-金纳米颗粒复合材料(rGO@AuNPs),并固定大量 $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CDs),构建了可再生传感界面. 当目标物miRNA-133a-5p存在时,可触发3个发夹DNA探针自组装,形成含有3个 $\text{Mg}^{2+}$ -DNAzyme活性中心的三足DNA步行器;同时置换出miRNA-133a-5p,使其循环参与反应,产生大量步行器. 该步行器可高效剪切两端标记二茂铁(Fc)的发夹型信号探针,将其裂解为大量Fc标记的单链DNA片段. 这些片段通过主客体作用被电极表面的 $\beta$ -CD捕获,当施加氧化电位时可产生显著电流信号,实现对miRNA-133a-5p的高灵敏检测;同时,氧化态Fc因疏水性下降而与 $\beta$ -CD解离. 通过利用

电化学氧化还原可控的调节 $\beta$ -CD与不同氧化还原状态Fc之间的相互作用,从而实现了传感界面的再生.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

氧化石墨烯(GO),上海源叶生物科技有限公司;氯金酸( $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ),上海思域化工科技有限公司;柠檬酸三钠和硼氢化钠( $\text{NaBH}_4$ ),上海泰坦科技股份有限公司;SH- $\beta$ -环糊精(SH- $\beta$ -CD),山东滨州智源生物科技有限公司.所用试剂均为分析纯,实验用水为超纯水.实验所用寡核苷酸序列如表1所示,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成并经HPLC纯化.

Table 1 Oligonucleotide sequences used in the experiments

| Name  | Sequence(5'→3')  |
|---|--|
| H1  | TTGAATTCAGCGATATATTTGGTTCCATTTTACCAGCTGTTTGACAAGAGAGCTGGTAAAATCACCCAT<br>GTTACTCTCC  |
| H2  | TTGAATTCAGCGATATTTTACCAGCTCTCTGTCTCAAACGGAACCAAATATGTTTGACAAGAGCACCCA<br>TGTTACTCTCC |
| H3  | TTGAATTCAGCGATCTCTTTGTCAAACATATTTGGTTCCAGCTGGTAAAATGGAACCAAATATCACCCAT<br>GTTACTCTCC |
| Fc-HP-Fc                                      | Fc-CACCACAGCGAGGGAGACTAT/rA/GGAATTCAAGACAACCTGGTG-Fc                                 |
| miRNA-133a-5p(miRBase<br>ID: hsa-miR-133a-5p) | AGCUGGUAAAAUGGAACCAAU  |
| miRNA-208(miRBase ID:<br>hsa-miR-208b-5p)     | AAGCUUUUUGCUCGAAUUAUGU   |
| miRNA-499(miRBase ID:<br>hsa-miR-499a-5p)     | UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU  |
| miRNA-328(miRBase ID:<br>hsa-miR-328-3p)      | CUGGCCUCUCUGCCCUCCGU   |
| miRNA-133b(miRBase ID:<br>hsa-miR-133b)       | UUUGGUCCCUUCAACCAGCUA  |
| single-base mismatch                          | AGCUGGUAAAAUGGATCCAAU  |

CHI660E型电化学工作站,上海辰华仪器公司;Tecnai F20型透射电子显微镜,美国FEI公司;D8型X射线粉末衍射仪,德国布鲁克公司.

### 1.2 实验过程

1.2.1 还原氧化石墨烯-金纳米颗粒复合材料( $\text{rGO@AuNPs}$ )的合成 还原氧化石墨烯通过 $\text{NaBH}_4$ 化学还原合成<sup>[29,30]</sup>.首先,将0.6 g氧化石墨烯(GO)加入100 mL水中,超声处理10 min后,向悬浮液中缓慢加入1 g  $\text{NaBH}_4$ 并搅拌3 h,反应所得还原氧化石墨烯( $\text{rGO}$ )在80 °C下干燥24 h.随后,制备了金纳米颗粒( $\text{AuNPs}$ )功能化的 $\text{rGO}$ .将3.0 mg  $\text{rGO}$ 放入20 mL去离子水中,超声30 min使其完全分散;将该样品加入50 mL浓度为0.37 mmol/L的氯金酸( $\text{HAuCl}_4$ )溶液中,搅拌30 min;将溶液置于水浴锅中煮沸,再滴加1 mL(38.8 mmol/L)柠檬酸三钠;溶液在室温下静置20 min,完成 $\text{AuNPs}$ 在 $\text{rGO}$ 表面的沉积.最后,将样品以8000 r/min转速离心10 min进行分离,并用去离子水洗涤2次,得到还原氧化石墨烯-金纳米颗粒复合材料( $\text{rGO@AuNPs}$ ).

1.2.2 电化学生物传感界面的构建 首先,分别用1.5, 0.3和0.05  $\mu\text{m}$ 的氧化铝抛光粉打磨玻碳电极(GCE)各5 min.然后,依次用硝酸/去离子水混合液(体积比1:1)、无水乙醇和去离子水各超声3 min,以去除电极上残留的氧化铝粉末,用氮气吹干备用.

将1 mg  $\text{rGO@AuNPs}$ 分散在1 mL超纯水中,与5%(体积分数)Nafion按体积比1:1比例混合,经超声处理得到均匀的混合液;在电极表面滴加10  $\mu\text{L}$ 上述复合材料并干燥,所得电极命名为 $\text{rGO@AuNPs/GCE}$ .将10  $\mu\text{L}$  2 mmol/L的SH- $\beta$ -CD溶液滴加到电极上,避光孵育1.5 h,所得电极命名为

SH- $\beta$ -CD/rGO@AuNPs/GCE. 为了降低背景影响,防止电极表面和DNA的非特异性吸附,在电极表面滴加牛血清白蛋白(BSA)以封闭活性位点.

1.2.3 三足 DNA 步行器(DNA Walker)的制备 实验前将发夹探针 H1, H2 和 H3 在 95 °C 下加热 5 min 后冷却至室温,以获得稳定的茎环结构. 室温下将一系列不同浓度的 miRNA-133a-5p 分别引入到探针 H1 (50 nmol/L), H2 (50 nmol/L) 和 H3 (50 nmol/L) 的混合物中孵育 50 min, 确保形成稳定的三足 DNA 步行器结构. 将三足 DNA 步行器与 Fc-HP-Fc 探针混合孵育 60 min, 实现三足 DNA 步行器对底物 Fc-HP-Fc 探针的循环剪切. 最后, 将上述溶液滴加到电极表面孵育后进行电化学检测.

1.2.4 电化学检测 所有电化学检测均在 CHI 660E 型电化学工作站上进行,采用三电极系统: GCE, 铂电极和甘汞电极分别作为工作电极、辅助电极和参比电极. 循环伏安法(CV)的电位扫描范围为 -0.2~0.6 V; 差分脉冲伏安法(DPV)的电位扫描范围为 0.2~0.5 V, 检测溶液为 20 mmol/L PBS (pH=7.4)缓冲溶液.

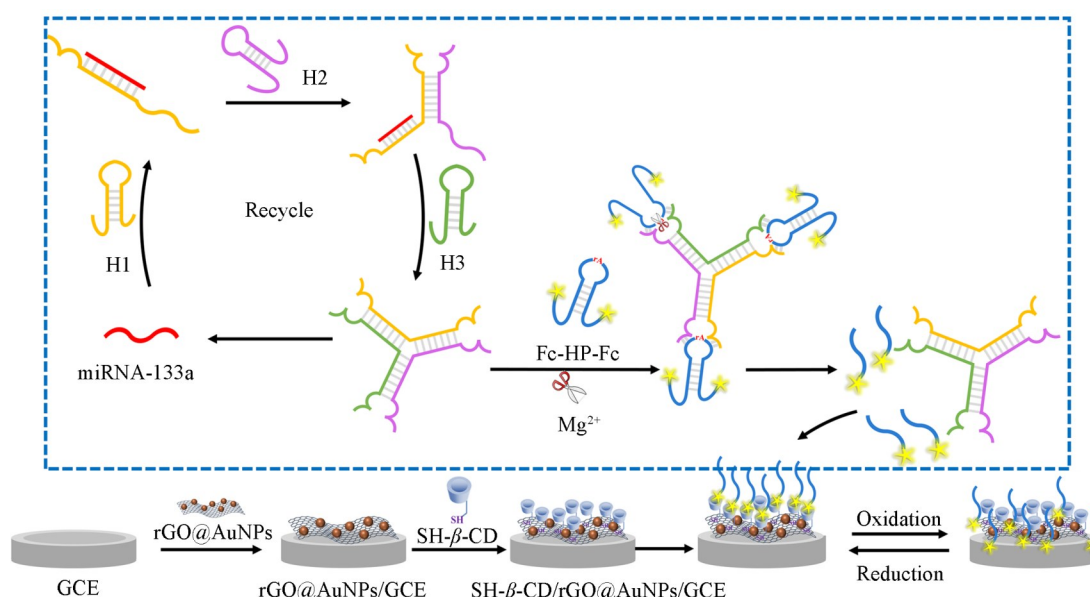
1.2.5 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分析 将 10  $\mu$ L 核酸样品(2  $\mu$ mol/L)与 2  $\mu$ L 上样缓冲液 (loading buffer)混匀,在 100 V 电压下,于 16% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳 90 min,用 GelRed 染色 30 min 后,将凝胶图像置于紫外灯下用手机进行拍照.

1.2.6 电化学生物传感界面可再生性能的探究 在传感界面滴加标记有 Fc 的 DNA 片段(10  $\mu$ L), 避光孵育 1 h, 使 Fc 与  $\beta$ -CD 进行主客体识别. 采用 DPV 对电极施加氧化电位, 使 Fc 被氧化, 记录电流信号; 接着用去离子水清洗电极, 再次滴加 DNA 溶液. 重复上述操作, 观察电流信号变化, 分析传感界面的再生性能.

## 2 结果与讨论

### 2.1 传感器的构建原理

基于多足 DNA 步行器的可再生电化学生物传感器检测心梗 miRNA 的原理如 Scheme 1 所示. 实验中设计了 4 个发夹型 DNA 探针: Fc-HP-Fc, H1, H2 和 H3. Fc-HP-Fc 探针两末端均修饰有电活性分子二茂铁(Fc), 作为信号探针. H1, H2 和 H3 分别都包含 3 个区域: 与底物发夹 Fc-HP-Fc 环部部分互补的区域、Mg<sup>2+</sup>-DNAzyme 催化核心的部分区域以及 3 个发夹之间的互补区域. 在没有目标物 miRNA-133a-5p 时, H1, H2 和 H3 这 3 个发夹探针能稳定共存, 不会发生 DNA 自组装. 此时, 每个发夹中的 DNAzyme 催化核心区域都是不完整的, 因此不能剪切 Fc-HP-Fc. Fc-HP-Fc 保持发夹结构时, 其茎环结



Scheme 1 Schematic diagram of the regenerable electrochemical biosensor based on the multi-legged DNA Walker and the host-guest recognition

构存在较大空间位阻, 远超环糊精空腔容纳范围, 同时还会限制Fc空间自由度, 进一步阻碍其与环糊精的主客体识别, 难以被环糊精修饰电极捕获, 只会产生微弱的背景电流信号. 而当引入目标miRNA-133a-5p时, 其通过toehold链置换反应将发夹H1打开, 使H1暴露出能与H2茎部末端杂交的DNA序列; H1同样通过toehold链置换反应, 将发夹H2打开, 使H2暴露出能与H3茎部末端杂交的DNA序列, 并且H1和H2杂交的两末端靠近, 形成一个完整的 $Mg^{2+}$ -DNAzyme催化核心; 随后, H2通过toehold链置换反应, 将发夹H3打开, 使H3暴露出能与H1茎部末端杂交的DNA序列, H2和H3杂交的两末端靠近, 也形成一个完整的 $Mg^{2+}$ -DNAzyme催化核心; 同样地, H3通过toehold链置换反应, 与H1杂交, H3和H1杂交的两末端靠近, 形成一个完整的 $Mg^{2+}$ -DNAzyme催化核心, 并置换出目标物miRNA-133a-5p. 此时, H1, H2和H3通过DNA自组装形成具有3个完整 $Mg^{2+}$ -DNAzyme催化核心的三足DNAzyme步行器. 被置换出的目标物miRNA-133a-5p循环参与反应, 引发更多的H1, H2和H3发生DNA自组装, 生成大量的三足DNAzyme步行器. 三足DNAzyme步行器能高效剪切Fc-HP-Fc, 使双标记Fc的发夹DNA变为单标记Fc的单链DNA. 由于Fc与环糊精间特异性的主客体识别作用, Fc可以进入到环糊精空腔内, 因此单标记Fc的单链DNA片段被捕获到电极表面. 当施加氧化电位时, Fc被氧化, 产生显著增强的电化学信号. 由于氧化态的Fc疏水性显著降低, 其与疏水性的 $\beta$ -CD空腔的结合常数减弱, 因此脱离环糊精空腔, 使传感界面回到最初的状态, 实现了传感界面的再生<sup>[26-28]</sup>.

## 2.2 材料的表征

通过透射电子显微镜(TEM)、拉曼光谱(Raman)和X射线粉末衍射(XRD)等手段对还原氧化石墨烯(rGO)及其金纳米颗粒复合材料(rGO@AuNPs)进行了表征. TEM分析结果显示, rGO呈现均匀形态, 表面具有少量褶皱, 类似透明丝织物[图1(A)]; rGO具有强大的自组装驱动力, 通过静电吸引作用连接AuNPs并促进其还原, 使AuNPs均匀分散于单层rGO表面[图1(B)]. AuNPs呈球形, 平均尺寸约为50 nm. 拉曼光谱分析进一步揭示了材料的结构演变, 如图1(C)所示, GO与rGO均在1347和1575  $cm^{-1}$ 附近出现典型的D峰与G峰. GO还原为rGO后,  $I_D/I_G$ 比值由0.886升高至1.121. 该变化表明GO在还原过程中发生了 $sp^2$ 碳域的重组, 形成了平均尺寸更小的 $sp^2$ 纳米晶域, 其大量增加的域边界增强了D峰信号, 证实了GO的还原<sup>[31,32]</sup>. 利用XRD谱图进一步揭示了材料结构的变化. 如图1(D)所示, GO在 $2\theta=11.7^\circ$ 处观察到1个尖锐的(001)晶面衍射峰, 根据布拉格方程计算得出其层间距为0.76 nm. 在rGO的XRD谱图中, 归属于GO(001)晶面的特征衍射峰基本消失, 同时在 $2\theta=24.7^\circ$ 和 $44.1^\circ$ 附近分

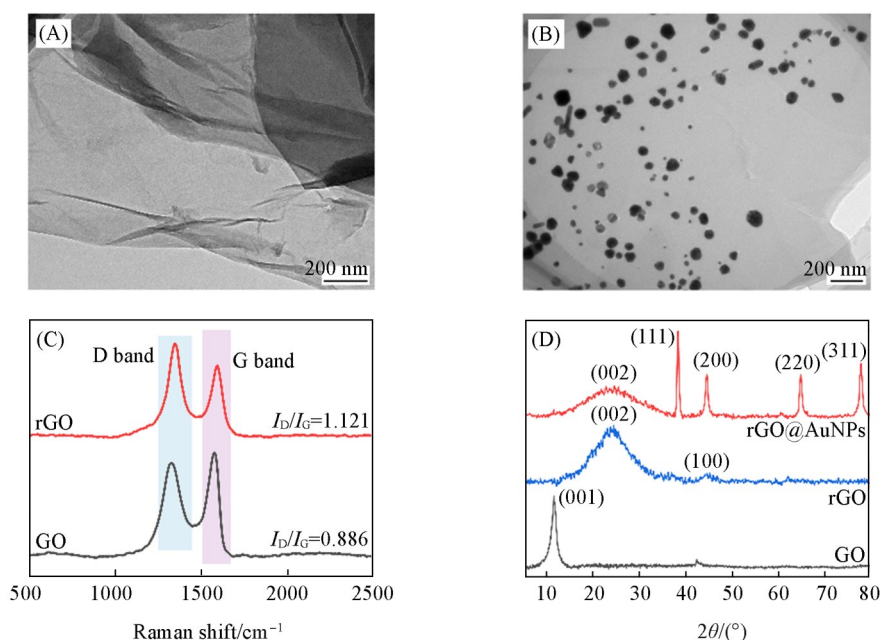


Fig. 1 TEM images of rGO(A) and rGO@AuNPs(B), Raman spectra of GO and rGO(C), XRD patterns of GO, rGO and rGO@AuNPs(D)

别出现了对应于 rGO 的(002)和(100)晶面的宽化衍射峰, 计算得出其层间距减小至 0.36 nm. 这表明 GO 片层上部分含氧官能团被有效去除, 层间排斥作用减弱, rGO 片层发生重新堆叠<sup>[33]</sup>. 此外, 在 rGO@AuNPs 复合材料的 XRD 谱图中可见位于 38.4°, 44.5°, 64.9° 和 77.8° 处的衍射峰, 分别对应 Au 纳米颗粒的(111), (200), (220)和(311)晶面, 证实 AuNPs 已合成并负载于 rGO 表面<sup>[34]</sup>. 利用 AuNPs 修饰 rGO 不仅可以提升传感器的导电性, 同时金纳米颗粒的引入为传感界面的进一步功能化提供了必要的功能基团.

### 2.3 传感界面的表征

采用循环伏安法(CV)探究了传感界面的构建过程. 如图 2(A)所示, 裸玻碳电极(GCE)在  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  溶液中呈现一对可逆的氧化还原峰(曲线 a). 在电极表面修饰 rGO@AuNPs 复合材料后, 由于 rGO@AuNPs 具有良好的导电性, 促进了电子转移, 因此氧化还原峰电流显著增强(曲线 b). 进一步在电极表面修饰 SH- $\beta$ -CD 后, 氧化还原峰电流减小(曲线 c), 这是因为 SH- $\beta$ -CD 导电性差, 在一定程度上阻碍了电子转移, 但为后续特异性识别提供了稳定的分子界面. 以上实验结果表明传感界面已成功构建. 同时, 采用电化学阻抗谱(EIS)进一步表征了传感界面的构建过程. 图 2(B)中高频区的半圆直径对应于电极界面的电荷转移电阻( $R_{ct}$ ). 裸 GCE 显示出较小的  $R_{ct}$  值(曲线 a), 表明其表面电子转移阻力较低. 修饰 rGO@AuNPs 复合材料后, 由于复合材料的导电性增强, 所以电极的  $R_{ct}$  值显著降低(曲线 b); 但当电极表面修饰 SH- $\beta$ -CD 后, 由于  $\beta$ -CD 可阻碍电子传递, 使传感器导电性能降低,  $R_{ct}$  值明显增大(曲线 c). CV 和 EIS 测试结果一致, 也表明传感界面的成功构建.

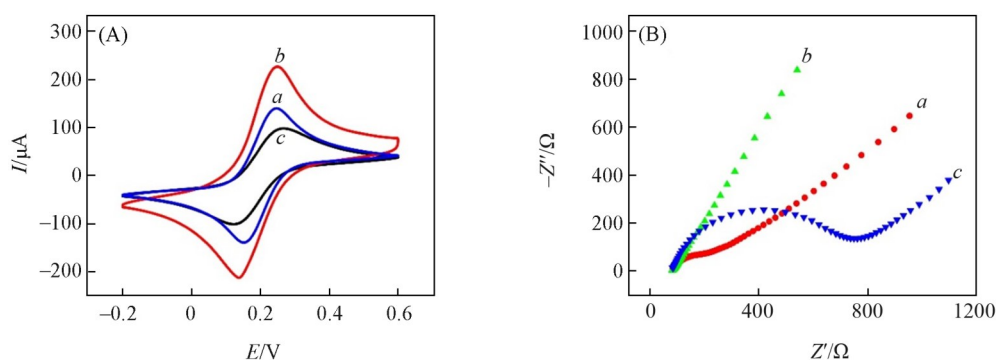


Fig. 2 CV curves(A) and EIS spectra(B) of different modified electrodes

a. bare GCE; b. rGO@AuNPs/GCE; c. SH- $\beta$ -CD/rGO@AuNPs/GCE.

### 2.4 三足 DNAzyme 步行器的组装及 DNAzyme 剪切非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分析

采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳实验验证了三足 DNAzyme 步行器的组装及其对底物发夹探针的剪切效应. 如图 3 所示, 泳道 M 是具有不同分子量的 DNA Marker; 泳道 1, 2, 3 和 4 分别为 miRNA-133a-5p, H1, H2 和 H3 相应的电泳条带. 在目标物 miRNA-133a-5p 存在下, 从泳道 5 可以观察到产生了一条新的分子量明显变大的迁移条带和对应于 miRNA-133a-5p 的条带, 并且对应于 H1, H2 和 H3 的电泳条带明显变浅, 表明 miRNA-133a-5p 触发 H1, H2 和 H3 3 个发夹探针自组装形成了三足 DNAzyme 步行器, 并将目标物 miRNA-133a-5p 置换出来. 当不存在 miRNA-133a-5p 时, H1, H2 和 H3 混合溶液的电泳条带未产生明显变化(泳道 6), 表明没有目标物时, 3 个发夹探针能稳定共存, 不能自组装形成三足 DNA 步行器. 泳道 7 是信号探针 HP 的迁移条带. 在  $\text{Mg}^{2+}$  存在下, 加入 miRNA-133a-5p 与发夹 H1, H2, H3 的混合反应液时(泳道 8), 对应于 HP 的电泳条带消失, 并产生了一条分子量明显变小的电泳条带, 该条带为 HP 被切割后的产物与目标物 miRNA 的叠加, 表明 HP 被三足 DNAzyme 步行器剪切. 而不存在 miRNA-133a-5p 时, 3 个发夹不能组装形成三足 DNAzyme 步行器, 无法产生  $\text{Mg}^{2+}$ -DNAzyme 活性中心, 信号探针 HP 不能被剪切, 所以 HP 的条带仍然存在(泳道 9). 以上结果表明, 只有目标物 miRNA-133a-5p 存在时, 才可以触发 3 个 DNA 发夹自组装形成三足 DNAzyme 步行器, 从而实现对信号发夹探针 Fc-HP-Fc 的剪切.

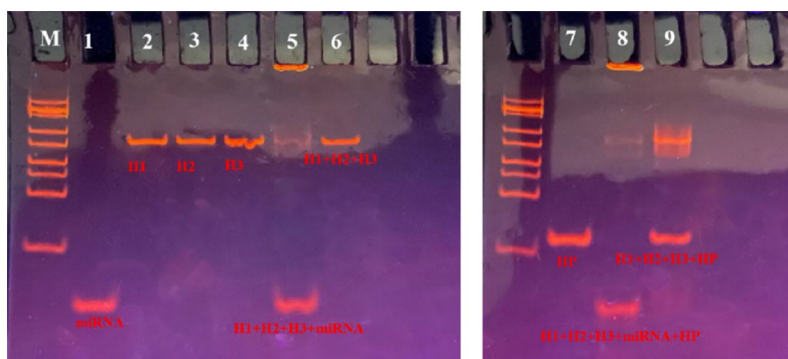


Fig. 3 Native PAGE analysis

Lane M: DNA marker; lane 1: miRNA; lane 2: H1; lane 3: H2; lane 4: H3; lane 5: H1+H2+H3+miRNA; lane 6: H1+H2+H3; lane 7: HP; lane 8: H1+H2+H3+miRNA+HP; lane 9: H1+H2+H3+HP.

## 2.5 生物传感器的可行性

采用电化学方法对传感器的可行性进行了探究. 如图4所示, 当不存在目标物 miRNA-133a-5p 时, 仅检测到微弱的背景电流信号(曲线 *a*), 表明没有目标物时发夹探针 H1, H2 与 H3 可稳定共存, 无法自组装形成有效的三足 DNA 步行器结构及  $Mg^{2+}$ -DNAzyme 活性中心, 因此不能剪切信号探针(HP)释放标记 Fc 的信号分子. 加入目标 miRNA-133a-5p 但缺失 H2 和 H3 时, 电流响应与空白组相近且无显著变化(曲线 *b*), 证实仅 miRNA-133a-5p 与 H1 的杂交不足以稳定形成具有催化活性的  $Mg^{2+}$ -DNAzyme 中心. 进一步引入 H2 形成 miRNA-133a-5p + H1 + H2 体系, 电流响应增大(曲线 *c*), 这是由于 miRNA-133a-5p 特异性打开 H1, 促使 H1 与 H2 杂交形成具有剪切活性的  $Mg^{2+}$ -DNAzyme 中心(相当于单足 DNA 步行器), 从而剪切 HP 释放 Fc 标记片段; 释放的片段随后通过  $\beta$ -CD 与 Fc 之间的主体识别作用被捕获至电极表面, 产生可检测的信号. 最终, 在目标 miRNA-133a-5p 存在下引入完整的发夹探针组(H1+H2+H3), 电流信号显著增强(曲线 *d*). 这归因于目标物触发 3 个发夹探针协同自组装形成完整的三足 DNA 步行器, 可以高效剪切 HP 释放大量标记有 Fc 的 DNA 片段, 从而产生显著放大的电流响应信号. 以上结果表明, 目标 miRNA-133a-5p 是触发三足 DNA 步行器组装的必要条件, 该三足结构具有 3 个  $Mg^{2+}$ -DNAzyme 活性中心, 对 HP 的剪切效率显著高于仅含单个活性中心的单足结构, 从而产生更强的电流信号(曲线 *d* vs. 曲线 *c*), 这也验证了此传感策略的可行性.

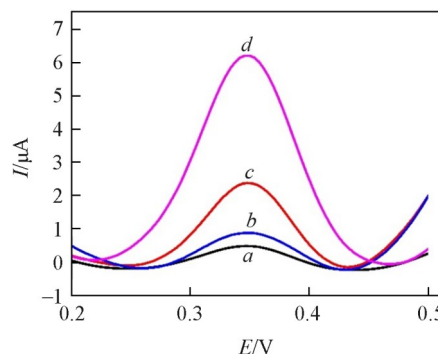


Fig. 4 DPV current responses of different reaction systems incubated with signal probe Fc-HP-Fc  
*a.* H1+H2+H3 (without target); *b.* miRNA+H1;  
*c.* miRNA+H1+H2 (single-legged DNA walker);  
*d.* miRNA+H1+H2+H3 (three-legged DNA walker).

## 2.6 实验条件的优化

为了获得最佳的检测性能, 对关键的实验参数进行了优化, 包括底物信号探针 HP 的浓度、三足 DNAzyme 步行器的组装时间和循环剪切时间. 如图5(A)所示, 当信号探针 HP 的浓度从 0.1  $\mu\text{mol/L}$  增加到 1.8  $\mu\text{mol/L}$  时, 电化学信号逐渐增强; 当浓度为 1.0  $\mu\text{mol/L}$  时, 峰值电流最强; 当浓度比超过 1.0  $\mu\text{mol/L}$  时, 电化学信号不再增强. 因此, 信号探针 HP 的最佳浓度为 1.0  $\mu\text{mol/L}$ . 实验探究了三足 DNAzyme 步行器组装时间的影响. 如图5(B)所示, 随着组装时间的增加, 电流信号迅速增强, 且在 50 min 达到最大值, 表明三足 DNAzyme 步行器组装已经完成. 因此, 选择 50 min 作为三足 DNAzyme 步行器组装的最优时间. 最后, 对  $Mg^{2+}$ -DNAzyme 循环剪切时间进行了探究, 结果如图5(C)所示, 随着时间的延长, 电流响应信号迅速增加, 当反应时间达到 60 min 时, 检测到最大电流强度, 因此  $Mg^{2+}$ -DNAzyme 的最佳循环剪切时间为 60 min.

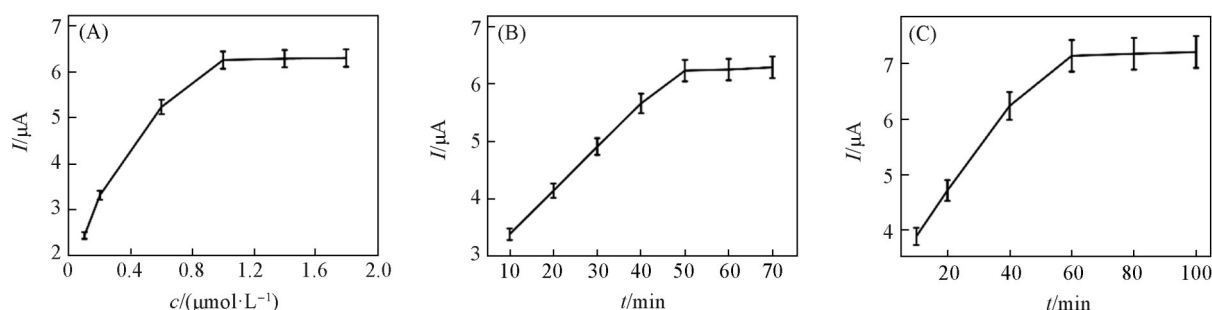


Fig. 5 Effect of concentration of the Fc-HP-Fc probe(A), assembly time of DNA Walker(B) and the cyclic cleavage time of  $\text{Mg}^{2+}$ -DNAzyme(C)

## 2.7 生物传感器的响应性能

在最优实验条件下,对传感器的检测性能进行了探究.利用构建的生物传感器检测不同浓度的目标物 miRNA-133a-5p,结果如图6(A)所示,随着 miRNA-133a-5p 浓度从 0~1 nmol/L 逐渐增加,电流响应信号不断增强.由图6(B)可以看到,DPV 峰值电流与 miRNA-133a-5p 浓度的对数值之间呈现良好的线性关系,线性方程为  $I=1.38 \lg c+7.1$  ( $R^2=0.996$ ),  $I(\mu\text{A})$  代表峰值电流,  $c(\text{nmol/L})$  为 miRNA-133a-5p 的浓度.根据  $3\sigma$  规则计算得出该方法的检出限低至 19.7 fmol/L,与文献[35~37]报道的 miRNA 检测方法相比,该传感器具有出色的检测性能.通过 6 次重复实验检测了 1.0 nmol/L 的 miRNA-133a-5p,6 次测定结果的相对标准偏差(RSD)为 2.4%,表明传感器具有良好的重现性.

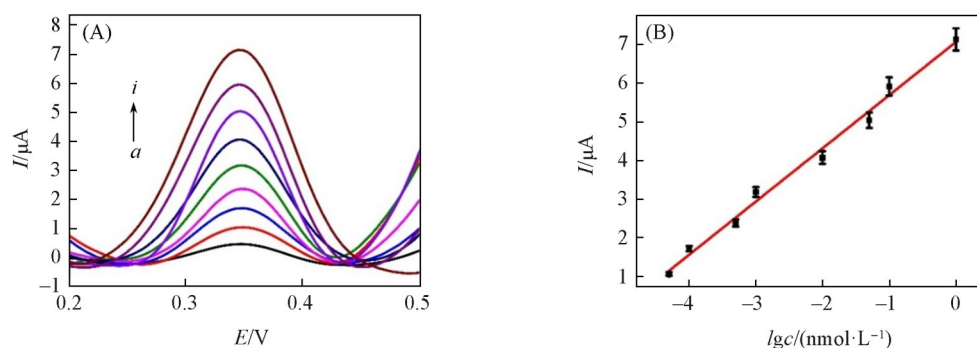


Fig. 6 DPV responses of different concentrations of miRNA-133a-5p(A), calibration curve between the current response value of the DPV and the logarithmic value of the miRNA-133a-5p concentration

$c(\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1})$ ,  $a \rightarrow i$ : 0,  $5.00\times 10^{-5}$ ,  $1.00\times 10^{-4}$ ,  $5.00\times 10^{-4}$ ,  $1.00\times 10^{-3}$ ,  $1.00\times 10^{-2}$ ,  $5.00\times 10^{-2}$ ,  $1.00\times 10^{-1}$ , 1.00.

## 2.8 生物传感器的选择性

为了考察该生物传感器的选择性,在相同实验条件下采用高浓度心梗相关的 miRNA (包括 miRNA-499, miRNA-328, miRNA-208, miRNA-133b 和单碱基错配) 作为干扰物质,进行了选择性评估.实验结果表明,高浓度干扰 miRNA 产生的电流响应信号较微弱(图 7);而目标 miRNA-133a-5p (浓度比干扰物小 10 倍) 则产生显著增强的电流响应信号.这归因于目标核酸与探针之间完美的碱基互补配对,证明该传感器对 miRNA-133a-5p 具有优异的选择性.此外,干扰 miRNA 与目标 miRNA 混合溶液产生的信号与目标物信号无明显区别,表明检测信号主要来源于目标物,进一步证明该传感器具有良好的抗干扰能力,能够有效区分完全互补的靶 miRNA 和非特异性序列.

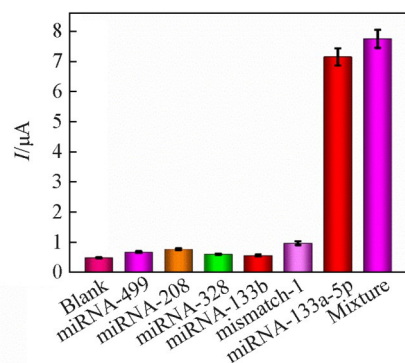


Fig. 7 DPV responses of the biosensor to blank, miRNA-499(10 nmol/L), miRNA-208(10 nmol/L), miRNA-328(10 nmol/L), miRNA-133b(10 nmol/L), single-base mismatch(10 nmol/L), miRNA-133a-5p(1 nmol/L), and the mixture of the above miRNAs

## 2.9 生物传感界面的可再生性能

还原态Fc通过主客体相互作用进入环糊精空腔后,可被有效捕获于电极表面.当对电极施加氧化电位时,Fc被氧化并产生相应的氧化电流;同时,氧化态Fc因疏水性减弱与环糊精空腔不再匹配,导致结合力减弱,从而脱离空腔,实现传感界面的再生.通过多次再生循环测试评估了传感器的可再生性能.如图8所示,首次检测并在施加氧化电位时,可观察到显著的电流响应;对传感界面进行冲洗后,电流信号降至背景水平,表明标记有Fc的DNA片段已脱离环糊精空腔,传感界面恢复至初始状态,实现了再生.经过6次完整的“检测-再生”循环后,电流响应信号仍能保持在初始值的95.1%左右.以上结果表明,该电化学传感器具有良好的再生性能与循环使用稳定性.

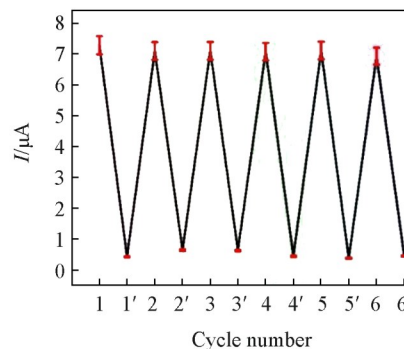


Fig. 8 Reusability of the biosensor

## 2.10 加标回收实验

通过标准加入法评估了所构建生物传感器在复杂生物基质中的分析性能.将不同浓度的miRNA-133a-5p(0.500, 10.0和 $1.00 \times 10^3$  pmol/L)加入到10倍稀释的血清样本中,采用该传感器进行定量检测.结果如表2所示,3个浓度水平的加标回收率在97%~106%之间,RSD在2.1~3.9%之间.这些数据充分证明该生物传感器在复杂生物样本中具有优异的准确度和精密度,能够满足实际临床样本中miRNA-133a-5p的定量检测需求,展现出良好的临床应用前景.

Table 2 Recovery results of miRNA-133a-5p in diluted serum samples( $n=3$ )<sup>\*</sup>

| Sample | Added/(pmol·L <sup>-1</sup> ) | Found/(pmol·L <sup>-1</sup> ) | Recovery (%) | RSD(%) |
|--------|-------------------------------|-------------------------------|--------------|--------|
| 1      | 0.500                         | 0.52                          | 104          | 2.1    |
| 2      | 10.0                          | 9.7                           | 97           | 3.9    |
| 3      | $1.00 \times 10^3$            | $1.06 \times 10^3$            | 106          | 2.7    |

<sup>\*</sup> Take the average of three measurements.

## 3 结 论

构建了一种基于三足DNAzyme步行器和Fc-环糊精主客体识别的新型无酶电化学生物传感器,实现了对心肌梗死标志物miRNA-133a-5p的高灵敏检测.目标miRNA-133a-5p通过碱基互补配对触发3个DNA发夹探针自组装形成具有剪切活性的三足DNAzyme步行器.在Mg<sup>2+</sup>辅助下,三足步行器能够高效剪切Fc-HP-Fc发夹结构,释放出大量Fc标记的单链DNA信号分子.这些信号分子通过环糊精与Fc间的主客体作用被特异性捕获在电极表面,产生显著增强的电化学响应信号.得益于目标物的循环利用机制和三足DNAzyme步行器的高效剪切能力,该传感器实现了从痕量目标物输入到大量信号分子输出的高效转换,检测灵敏度达到飞摩尔级(fmol/L).严格的碱基互补配对原则确保了传感器优异的选择性,而基于二茂铁氧化还原状态依赖的环糊精主客体相互作用则赋予了传感界面良好的再生性能,经实验验证可实现6次以上的稳定循环检测.该研究不仅为心肌梗死的早期诊断提供了一种高灵敏、高特异的检测新方法,其创新的信号放大与界面再生策略也为其它疾病相关生物标志物的检测提供了新思路,在临床诊断和基础医学研究领域展现出广阔的应用前景.

## 参 考 文 献

- [1] Reed G. W., Rossi J. E., Cannon C. P., *The Lancet*, 2017, 389(10065), 197—210
- [2] Zhang J., Guo Y., Bai Y., Wei Y., *J. Nanobiotechnol.*, 2023, 21, 298
- [3] Reyes-Retana J. A., Duque-Ossa L. C., *Curr. Probl. Cardiol.*, 2021, 46(3), 100739
- [4] Xiao Y., Zhao J., Tuazon J. P., Borlongan C. V., Yu G., *Cell Transplant.*, 2019, 28(7), 831—838

- [ 5 ] Zhang L., Ding H., Zhang Y., Wang Y., Zhu W., Li P., *Front. Physiol.*, **2020**, *11*, 1088
- [ 6 ] Li H. J., Huang C., Wang F., Shen Y., Jin L., Feng Q., Chen X., Liao Q., Zhu M., Wang D., Hou X., He B., *Anal. Chem.*, **2025**, *97*(12), 6686—6693
- [ 7 ] Liu R. Z., Li X. Y., *Chem. J. Chinese Universities*, **2017**, *38*(3), 383—391(刘仁植, 李晓严. 高等学校化学学报, **2017**, *38*(3), 383—391)
- [ 8 ] Jiang J., Gong T. T., Zhang C. P., Liu X. Q., Zhao J. W., *Chem. J. Chinese Universities*, **2022**, *43*(1), 20210561(蒋君, 宫田田, 张成鹏, 刘晓倩, 赵俊伟. 高等学校化学学报, **2022**, *43*(1), 20210561)
- [ 9 ] Dastidar M. G., Schumann U., Nisbet D. R., Natoli R., Murugappan K., Tricoli A., *Chemical Engineering Journal*, **2025**, *508*, 160903
- [ 10 ] Zhang X. L., Yang Z. H., Chang Y. Y., Liu D., Li Y. R., Chai Y. Q., Zhuo Y., Yuan R., *Chemical Science*, **2020**, *11*, 148—153
- [ 11 ] Chen Y., He S., Lian H., Liu G., Liu B., Wei X., *Anal. Chem.*, **2024**, *96*(14), 5625—5632
- [ 12 ] Li W., Li Y., Zhao L. D., Yuan R., Zhuo Y., Zhong X., *Sensors Actuators B: Chem.*, **2024**, *409*, 135599
- [ 13 ] Bialy R. M., Mainguy A., Li Y., Brennan J. D., *Chem. Soc. Rev.*, **2022**, *51*(21), 9009—9067
- [ 14 ] Li T., Xin S. M., Liu Y., *Chem. J. Chinese Universities*, **2023**, *44*(8), 20230140(李婷, 邢思敏, 刘洋. 高等学校化学学报, **2023**, *44*(8), 20230140)
- [ 15 ] Wang Y., Hai X., Yan Y., Zhi S., Bi S., *Adv. Funct. Mater.*, **2025**, *35*, 2420480
- [ 16 ] Zhao J., Han H., Liu Z., Chen J., Liu X., Sun Y., Wang B., Zhao B., Pang Y., Xiao R., *Anal. Chim. Acta*, **2024**, *1295*, 342306
- [ 17 ] Long Y., Zhao J., Ma W., He C., Pei W., Hou J., Hou C., Huo D., *Anal. Chem.*, **2024**, *96*(12), 4774—4782
- [ 18 ] Luo L., Dong F., Li D., Li X., Li X., Fan Y., Qi C., Luo J., Li L., Shen B., *ACS Sensors*, **2024**, *9*, 1438—1446
- [ 19 ] Oishi M., Saito K., *ACS Nano*, **2020**, *14*(3), 3477—3489
- [ 20 ] Man Y., Liu J., Wu J., Yin L., Pei H., Wu Q., Xia Q., Ju H., *Anal. Chim. Acta*, **2020**, *1107*, 48—54
- [ 21 ] Liu C., Wu T., Deng L., Li X., Fu X., Liao S., Ma W., Zou G., Yang H., *Chinese Chemical Letters*, **2024**, *35*(9), 109307
- [ 22 ] Chen Y., Meng X., Lu H., Dong H., *Anal. Chim. Acta*, **2022**, *1209*, 339339
- [ 23 ] Ru Z., Chen J., Lv L., Gao N., Ren X., Du Y., Yang L., Wei Q., *Chemical Engineering Journal*, **2025**, *519*, 165379
- [ 24 ] Tan S. Y., Hou T. L., Zhang X. L., Wang X., Chai Y. Q., Yuan R., *Biosens. Bioelectron.*, **2025**, *267*, 116719
- [ 25 ] Wei Z. Y., Wu Z. K., Ru S., Ni L. B., Wei Y. G., *Chem. J. Chinese Universities*, **2022**, *43*(1), 20210665(魏哲宇, 吴志康, 茹诗, 倪鲁彬, 魏永革. 高等学校化学学报, **2022**, *43*(1), 20210665)
- [ 26 ] Tomokazu M., Evans D. H., Osa T., Kobayashi N., *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*(12), 3411—3417
- [ 27 ] Domenico O., Andrea C., Carlo N., Mauro R., Roberto G., *Organometallics*, **2000**, *19*(14), 2791—2797
- [ 28 ] Qu H. N., Meng Q. Y., Wang L., Xing H. F., Yang L. R., Liu H. Z., *Spectroscopy and Spectral Analysis*, **2018**, *38*(10), 305—306(屈虹男, 孟启宇, 王丽, 邢慧芳, 杨良嵘, 刘会洲, 光谱学与光谱分析, **2018**, *38*(10), 305—306)
- [ 29 ] Yang F., Zhang B., Dong S., Wang C., Feng A., Fan X., Li Y., *Journal of Energy Chemistry*, **2019**, *29*, 72—78
- [ 30 ] Zhao X., Xu D., Liu K., Dai P., Gao J., *Appl. Surf. Sci.*, **2020**, *512*, 145746
- [ 31 ] Tamang S., Rai S., Bhujel R., Bhattacharyya N. K., Swain B. P., Biswas J., *J. Alloys Compd.*, **2023**, *947*, 169588
- [ 32 ] Jiao X., Qiu Y., Zhang L., Zhang X., *RSC Adv.*, **2017**, *7*(82), 52337—52344
- [ 33 ] Viprya P., Kumar D., Kowshik S., *Eng. Proc.*, **2023**, *59*(1), 84
- [ 34 ] Nguyen L. D., Dang C. M., Doan T. C. D., *Microchem. J.*, **2023**, *190*, 108717
- [ 35 ] Chen G., Shen Y., Xu T., Ban F., Yin L., Xiao J., Shu Y., *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, *77*, 1020—1025
- [ 36 ] Nsabimana A., Ma X., Yuan F., Du F., Abdussalam A., Lou B., Xu G., *Electroanalysis*, **2018**, *31*(2), 177—187
- [ 37 ] Li P., Ye Y., Li Y., Xie Z., Ye L., Huang J., *Biosens. Bioelectron.*, **2024**, *251*, 116129

(Ed.: F, K)