

双修饰三螺旋DNA荧光分子开关高灵敏检测玉米*Bt*转基因

张非凡¹,褚秀玲²,张川²,陆羽新¹,朱德颂^{1*}

1. 山东农业大学化学与材料科学学院, 山东 泰安 271018

2. 山东省泰安生态环境监测中心, 山东 泰安 271000

摘要: 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称*Bt*)是抗虫类转基因作物的重要外源基因来源,对作物防治虫害至关重要。*Bt*转基因作物的种植和推广大大减少了合成杀虫剂的使用,给农民带来了巨大收益。然而,*Bt*转基因作物的安全性也逐渐引起人们的关注。因此,开发简便、灵敏的作物*Bt*转基因检测方法具有重要意义。本文构建了双修饰三螺旋DNA荧光分子开关(dual-modified triple helix DNA fluorescent molecular switch, 简称DTHFMS),系统研究了DTHFMS的稳定性的影响因素和变化规律。结果表明T-AoT和C-GoC三联体交替出现的双修饰三螺旋DNA荧光分子开关的稳定性适当,能够用于作物(玉米)种子中*Bt*转基因的高灵敏检测。本文通过优化关键检测参数获得了优异的检测结果。检测限为0.05 pM,线性范围(0.1~6.0×10⁴)pM。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; 三螺旋DNA; 分子开关; 高灵敏检测

中图法分类号: O652.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2025)05-0731-07

Dual-Modified Triple Helix DNA Fluorescence Molecular Switch for Highly Sensitive Detection of *Bt* Transgene in Maize

ZHANG Fei-fan¹, CHU Xiu-ling², ZHANG Chuan², LU Yu-xin¹, ZHU De-song^{1*}

1. College of Chemistry and Material Science/Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

2. Shandong Taian Ecological Environment Monitoring Center, Tai'an 271000, China

Abstract: The *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) gene, an important exogenous gene in insect-resistant transgenic crops, plays a crucial role in crop pest control. The cultivation and promotion of *Bt* transgenic crops have greatly reduced the use of synthetic insecticides and brought huge benefits to farmers. However, the safety of *Bt* transgenic crops has gradually attracted people's attention. Therefore, it is of great significance to develop a simple and sensitive method for detection of *Bt* transgene in crops. This study constructs a dual-modified triple helix DNA fluorescent molecular switch (DTHFMS) and systematically investigates the influencing factors and variation rules of the stability of DTHFMS. The results show that DTHFMS with alternating triplets of T-AoT and C-GoC demonstrates proper stability, making it suitable for highly sensitive detection of *Bt* transgenes in maize seeds. This study achieves excellent detection results by optimizing key detection parameters. The limit of detection is 0.05 pM, with a linear range of (0.1–6.0×10⁴) pM.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; triple helix DNA; molecular switch; highly sensitive detection

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称*Bt*)是抗虫类转基因作物的重要外源基因来源,对作物防治虫害至关重要。*Bt*转基因已成为植物基因工程及转基因育种中应用最广泛,最具潜力和应用前景的抗虫基因。*Bt*转基因作物的种植和推广大大减少了合成杀虫剂的使用,给农民带来了巨大的利益。然而,由于转基因作物的存在只有短短十多年的时间,许多长期影响目前还不得而知。因此,其食用安全性一直存在着巨大的争议。*Bt*转基因作物的安全性也逐渐引起

人们的关注^[1,2]。我国近些年玉米进口量持续增长,自2010年就从玉米净出口国变为净进口国^[3],在我国主要的进口玉米贸易国中,除乌克兰外,美国、阿根廷、巴西等均均是商品化转基因玉米广泛种植国。我国对进口玉米实施转基因安全风险监控,不允许未经批准的转基因产品流入国内。因此,开发简单、灵敏的作物中*Bt*转基因检测方法具有重要的现实意义。*Bt*转基因的传统检测方法有Southern印迹杂交^[4]、聚合酶链反应(PCR)^[5]、DNA微阵列^[6]、放射免疫分析^[7]等。

收稿日期: 2024-05-10

修回日期: 2025-08-24

基金项目: 中国博士后面上资助项目(2018M632697);泰安市科技创新发展项目(2021NS362)

第1作者简介: 张非凡(2004-),女,本科生,研究方向:应用化学。E-mail: 375452082@qq.com

*通讯作者: Author for correspondence. E-mail: zhudesong@sdau.edu.cn

这些方法操作过程较为复杂,并且灵敏度有时不能满足痕量检测的要求。因此,一系列新型检测策略,如荧光发射光谱法^[8-10]和电化学分析^[11, 12]、表面增强拉曼光谱法^[13, 14]以及其他方法^[15, 16]相继被开发。这些方法具有较高的特异性和灵敏度,但往往需要外切酶、内切酶等扩增酶的辅助,需要严格的实验条件以及较长的扩增周期。因此,迫切需要开发一种简单、无酶、灵敏的 *Bt* 转基因检测方法。

近年来,三螺旋 DNA 已在许多领域引起极大关注。通过三螺旋 DNA 的构象转化,已经实现双链 DNA、蛋白质、小分子和离子的检测^[17-19]。

本文针对目前 *Bt* 转基因检测方法存在的灵敏度较低、需要外加辅助酶等局限,通过组装适度稳定的双修饰三螺旋 DNA 荧光分子开关(double modified triple helix DNA fluorescent molecular switch, 简称 DTHFMS),构建了一种简单、无酶、高灵敏的 *Bt* 转基因新型检测方法。详细研究 DNA 猝灭单链(BHQ-1-TFO)的不同碱基组成和序列长度、BHQ-1-TFO 的浓度、猝灭时间(组装时间)、目标物 *Bt* 转基因与荧光分子开关的结合时间等实验参数对 DTHFMS 检测性能的影响规律,在此基础上确定了最优检测条件,获得了优异的传感性能。本文构建的 DTHFMS 可以用于检测实际样品(玉米种子)中 *Bt* 转基因,显示了其在作物安全检测方面的巨大潜力。

1 材料与方法

1.1 材料来源

本文涉及的所有寡核苷酸均购自上海生工有限公司(上海,中国),序列见表 1。不含 *Bt* 转基因的正常玉米种子和转基因玉米种子(*Bt* 801)由山东农业大学小麦育种国家重点实验室提供。实时荧光定量 PCR 试剂盒和限制性内切酶均购自赛默飞世尔科技公司。所有其他化学品(分析级)均购自国药集团(北京,中国),无需进一步处理,直接使用。所有溶液均采用超纯水(电阻率大于 18.2 MΩ·cm)制备。所有 DNA 储备液(100 μM)由 TE 缓冲液(Tris-EDTA 缓冲液)溶解 DNA 干粉制备,-20 °C 保存。所有 DNA 工作溶液(10 μM)均由 10 mM HAc-Ac 缓冲液(pH 5.0)稀释储备液制备,4 °C 保存。

1.2 检测方法

1.2.1 组装双修饰三螺旋 DNA 荧光分子开关(DTHFMS) 10 mM HAc-Ac 缓冲液(pH 5.0, 300 mM NaNO₃)中两端标记荧光基团(6-羧基荧光素,简称 6-FAM)的双螺旋分子信标(Double helix molecular beacon,简称 DHMB)(10 μM,初始浓度)与标记黑洞猝灭剂的(BHQ-1)的三链形成寡核苷酸(triplex-forming oligonucleotides,简称 TFO)(10 μM)混合,在 37 °C 组装 1.5 h 即可获得 DTHFMS。

1.2.2 目标物 *Bt* 转基因与 DTHFMS 杂交及荧光测定 不同浓度的 *Bt* 转基因加入到包含 DTHFMS 的 10 mM HAc-Ac 缓冲液中,最终体积为 200 μL,在 37 °C 下孵育 0.8 h。利用荧光光度计(F-7000)测定荧光强度。激发波长为 495 nm,发射波长为 518 nm。

1.2.3 实际样品分析 正常玉米种子或转基因玉米种子(*Bt* 801)加入到 10 mM HAc-Ac 缓冲液中,最终体积为 200 μL,组织匀浆处理,4 °C,1 500 转/分离心 0.5 h,利用孔径 0.5 mm 的纤维素膜过滤得到上清液,通过限制性内切酶消化后,加入到上述含有 DTHFMS 的检测系统中,最终体积为 200 μL。37 °C 下孵育 0.8 h。在转基因玉米样品(*Bt* 801)中加入不同浓度的 *Bt* 转基因,并研究其回收率。

2 结果与分析

2.1 双修饰三螺旋 DNA 荧光分子开关(DTHFMS)高灵敏检测 *Bt* 转基因原理

基于 DTHFMS 的新型高灵敏传感器检测 *Bt* 转基因的检测原理如图 1 所示。两端标记荧光团(6-FAM)的分子信标(DHMB)序列中间包含 *Bt* 转基因识别序列(绿色),两端包含碱基序列组成相同的嘧啶链(黑色,含有胞嘧啶 C 和胸腺嘧啶 T)。标记黑洞猝灭剂的(BHQ-1)的 DNA 单链(BHQ-1-TFO)含有腺嘌呤 A 和鸟嘌呤 G。DHMB 与 BHQ-1-TFO 通过沃森-克里克和胡斯坦氢键作用形成 T-AoT 和 C-GoC(“-”代表沃森-克里克氢键,“o”代表胡斯坦氢键)三联体交替出现的新型三螺旋 DNA 荧光分子开关(DTHFMS)。靶基因 *Bt* 转基因不存在时,DTHFMS 稳定,保持“闭合”状态。此时,黑洞猝灭剂的(BHQ-1)与荧光团(6-FAM)

表 1 双修饰三螺旋DNA 荧光分子开关检测 *Bt* 转基因涉及 DNA 序列
Table 1 DNA sequences for the detection of *Bt* transgene by DTHFMS

| 名称 Name | 序列 Sequences (5'-3') |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| DHMB-1 | FAM- <u>TTTTTTTTTTTTTTT</u> GAGGTGCTGCCGCTGCCGAGTGCCTGGT <u>TTTTTTTTTTTTTTT</u> -FAM |
| DHMB-2 | FAM- <u>CCCCCCCCCCCCC</u> GAGGTGCTGCCGCTGCCGAGTGCCTGGT <u>CCCCCCCCCCCCC</u> -FAM |
| DHMB-3 | FAM- <u>TCTCTCTCTCTCTC</u> GAGGTGCTGCCGCTGCCGAGTGCCTGGT <u>TCTCTCTCTCTCTC</u> -FAM |
| BHQ-1-TFO-1 | (BHQ-1)-AAAAAA |
| BHQ-1-TFO-2 | (BHQ-1)-AAAAAAA |
| BHQ-1-TFO-3 | (BHQ-1)-AAAAAAAAA |
| BHQ-1-TFO-4 | (BHQ-1)-AAAAAAAAAAA |
| BHQ-1-TFO-5 | (BHQ-1)-AAAAAAAAAAAAA |
| BHQ-1-TFO-6 | (BHQ-1)-GGGGGG |
| BHQ-1-TFO-7 | (BHQ-1)-GGGGGGGG |
| BHQ-1-TFO-8 | (BHQ-1)-GGGGGGGGGG |
| BHQ-1-TFO-9 | (BHQ-1)-GGGGGGGGGGG |
| BHQ-1-TFO-10 | (BHQ-1)-GGGGGGGGGGGG |
| BHQ-1-TFO-11 | (BHQ-1)-AGAGAG |
| BHQ-1-TFO-12 | (BHQ-1)-AGAGAGAG |
| BHQ-1-TFO-13 | (BHQ-1)-AGAGAGAGAG |
| BHQ-1-TFO-14 | (BHQ-1)-AGAGAGAGAGAG |
| BHQ-1-TFO-15 | (BHQ-1)-AGAGAGAGAGAGAG |
| <i>Bt</i> transgene | ACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTC |
| SM-DNA-1 | ACCAGCCACTTCGGCAGCGGCAGCACCTC |
| SM-DNA-2 | ACCAGCGCACTTCGGGAGCGGCAGCACCTC |
| SM-DNA-3 | ACCAGCGCACTTCGGCAGCGGCAGCTCCTC |
| TM-DNA | ACCAGCCACTTCGGCTGCGGCAGCACGTC |

注:DHMB-1、DHMB-2和DHMB-3中的下划线区域表示同型嘧啶(三螺旋分子开关DTHFMS的两侧部分)。DHMB-1、DHMB-2和DHMB-3中的斜体区域表示*Bt*转基因的互补序列。SM-DNA-1、SM-DNA-2、SM-DNA-3和TM-DNA中的下划线区域表示错配碱基。

Note: The underlined areas in DHMB-1, DHMB-2, and DHMB-3 represent homopyrimidine chains (two sides of DTHFMS). The italic regions in DHMB-1, DHMB-2, and DHMB-3 represent complementary sequences of *Bt* transgene. The underlined regions in SM-DNA-1, SM-DNA-2, SM-DNA-3, and TM-DNA indicate mismatched bases.

进行双重荧光共振能量转移(D-FRET),荧光被高效猝灭,获得超低背景信号。*Bt*转基因存在时,*Bt*转基因与荧光分子开关(DTHFMS)的识别序列进行特异性杂交,进而打开分子开关,导致猝灭链BHQ-1-TFO与分子信标(DHMB)分离,荧光共振能量转移现象消失(NO-FRET),荧光团的荧光恢复。通过测定荧光强度可以方便和灵敏地定量目标基因。

2.2 DTHFMS 高灵敏检测 *Bt* 转基因可行性验证

通过不同实验条件下的荧光光谱验证 DTHFMS 传感应用的可行性。如图 2 所示,分子信标(DHMB)显示较强的荧光强度(曲线 a);当加入 DNA 猝灭单链(BHQ-1-TFO)时,荧光强度

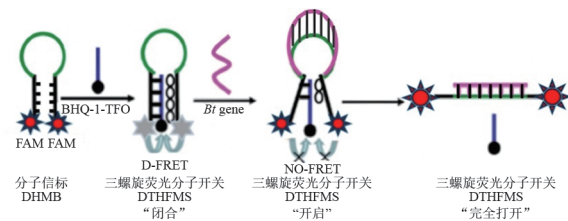


图 1 双修饰三螺旋DNA 荧光开关高灵敏检测玉米 *Bt* 转基因示意图

Fig. 1 Schematic diagram of high-sensitivity detection of *Bt* transgene in maize by DTHFMS

明显减弱(曲线 b),表明形成了大量的三螺旋DNA 荧光分子开关DTHFMS,通过双重荧光共振能量转移(D-FRET),荧光基团的荧光被高效猝灭。当将靶基因 *Bt* 转基因加入到系统中后,荧光强度显著增强(曲线 c),这表明 *Bt* 转基因特异性结合 DTHFMS 中的识别序列导致荧光分子

开关开启, DTHFMS 解体, 猝灭单链 (BHQ-1-TFO) 与分子信标 (DHMB) 分离, 荧光共振能量转移效应消失, 荧光恢复。

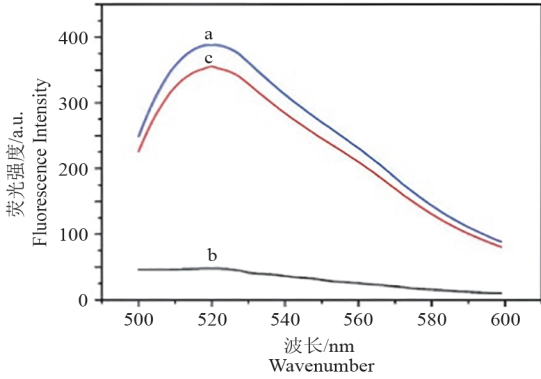


图 2 不同条件的荧光光谱

Fig. 2 Fluorescence spectra under different conditions

注: (a) 分子信标; (b) 分子信标+猝灭单链; (c) 分子信标+猝灭单链+Bt 转基因实验条件: 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲溶液 (pH 5.0), 300 mM 硝酸钠, 100 nM 分子信标 (DHMB-3), 400 nM 猝灭单链 (BHQ-1-TFO-13), 100 nM Bt 转基因, 37 °C 下猝灭 (组装) 反应 1.5 h, 37 °C 下 Bt 转基因与分子开关 (DTHFMS) 结合反应 0.8 h。

Note: (a) DHMB-3; (b) DHMB-3+BHQ-1-TFO-13; (c) DHMB-3+BHQ-1-TFO-13+Bt transgene. Experimental conditions: 10 mM HAc-Ac- buffer (pH 5.0), 300 mM NaNO₃, 100 nM DHMB-3, 400 nM (BHQ-1-TFO-13), 100 nM Bt transgene, 1.5 h of quenching (self-assembly) at 37 °C, 0.8 h of binding at 37 °C.

2.3 高灵敏检测 Bt 转基因关键实验参数优化

2.3.1 DNA 猝灭单链 (BHQ-1-TFO) 的碱基组成和序列长度的优化 为了达到最佳的检测性能,

保持三螺旋 DNA 荧光分子开关 (DTHFMS) 的适当稳定性是必要的。DNA 猝灭单链 (BHQ-1-TFO) 的碱基组成和序列长度是影响 DTHFMS 稳定性的关键因素。因此, 我们对两者进行了详细的研究, 并用 F/F_0 进行评估 (其中 F 为目标物 Bt 转基因存在时的荧光强度; F_0 为无目标物时的荧光强度), 如图 3 所示。当碱基序列均为腺嘌呤 A (对应 BHQ-1-TFO-1 至 BHQ-1-TFO-5) 时 (图 3(a)), DTHFMS 仅由氢键能较弱的 T-AoT 三联体组成, 稳定性较低, 开关容易打开, 导致背景信号较高。 F/F_0 随着序列长度的增加而增加, 在碱基数为 12 时达到平台值。当碱基序列均为鸟嘌呤 G (对应 BHQ-1-TFO-6 至 BHQ-1-TFO-10) 时 (图 3(b)), DTHFMS 由具有较强氢键能的 C-GoC 三联体组成。此时开关具有较高的稳定性, 虽然可以保持较低的背景信号, 但开启难度大。 F/F_0 随着序列长度的增加而增加, 并在碱基为 8 时达到最大值。当 BHQ-1-TFO 的碱基序列为 A 和 G 交替出现时 (对应 BHQ-1-TFO-11 至 BHQ-1-TFO-15) (图 3(c)), 与上述两种情况相比, 由 T-AoT 和 C-GoC 三联体组成的 DTHFMS 稳定性适中。 F/F_0 随着序列长度的增加而增加, 并在碱基数为 10 (对应 BHQ-1-TFO-13) 时达到最大值。因此, 选择含有 5 个 A 碱基和 5 个 G 碱基的 DNA 猝灭单链 (BHQ-1-TFO-13) 进行进一步研究。与之对应的分子信标 (DHMB) 应选择 DHMB-3。

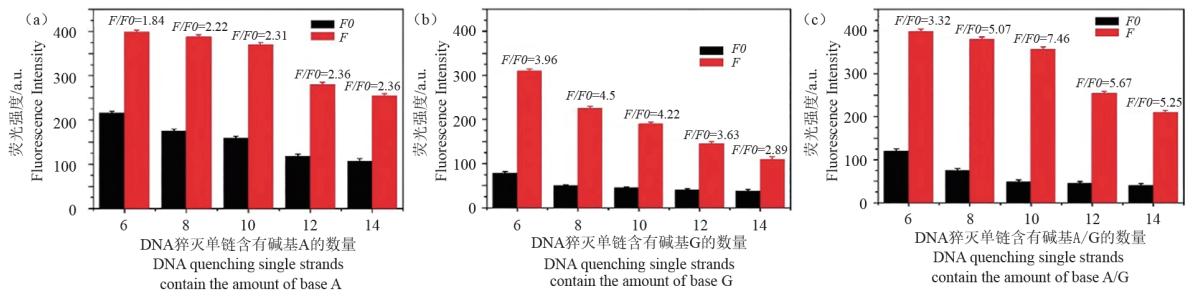


图 3 DNA 猝灭单链碱基组成和序列长度对三螺旋 DNA 荧光分子开关稳定性的影响

Fig. 3 Base composition and sequence length of BHQ-1-TFO on the stability of DTHFMS

2.3.2 其他实验参数优化 DNA 猝灭单链 (BHQ-1-TFO) 的浓度、猝灭时间 (组装时间)、目标物 Bt 转基因与荧光分子开关的结合时间等实验参数也会对三螺旋 DNA 荧光分子开关 (DTHFMS) 的检测性能产生影响。因此, 本文首先考察了 DNA 猝灭单链 (BHQ-1-TFO) 浓度的影响。净荧光强度 $\Delta F (\Delta F = F - F_0)$ 随浓度的增加而

增加, 在 400 nM 后趋于平稳。因此, 选择 400 nM BHQ-1-TFO 进行下一步研究。当猝灭时间 (组装时间) 从 0.5 h 增加到 2.5 h 时, ΔF 呈先上升后下降趋势, 在 1.5 h 时达到最大值。较长的猝灭时间会使三螺旋 DNA 荧光分子开关 (DTHFMS) 稳定性增强, 带来较高的荧光共振能量转移效率和较低的背景信号, 但也会使靶基因 (Bt 转基因)

结合 DTHFMS 中的识别序列进而打开开关更加困难。因此,1.5 h 是最适宜猝灭时间。最后,本文考察了 *Bt* 转基因与荧光分子开关的结合时间对检测性能的影响。结果表明 ΔF 随着结合时间的增加而增加,0.8 h 后趋于平稳,因此,选择 0.8 h 作为最佳结合时间。

2.3.3 检测性能 双修饰三螺旋DNA 荧光开关 (DTHFMS) 高灵敏检测玉米 *Bt* 转基因的检测性能包括灵敏度、线性范围、特异性及实际样品分析。本文通过改变 *Bt* 转基因的浓度来评估灵敏度和线性范围。如图 4 所示,荧光强度与目标 *Bt* 转基因浓度 ($0.1 \sim 6.0 \times 10^4$) pM 的对数值成线性相关。线性回归方程为 $\Delta F = 46.77 \lg C + 199.16$ ($C: \text{nM}, R^2 = 0.98$), 检测限 (LOD) 为 0.05 pM ($\text{LOD} = 3\sigma/S, \sigma$ 为线性斜率, S 为 5 次空白样的检测值的标准偏差)。本研究的检测限优于文献报道检测方法的检测限^[12-14]。详细比较见表 2。本方法的高灵敏度归

于构建的三螺旋DNA 荧光分子开关通过双重荧光共振能量转移能够保持较低的背景信号以及双重荧光标记引起的双重信号放大。

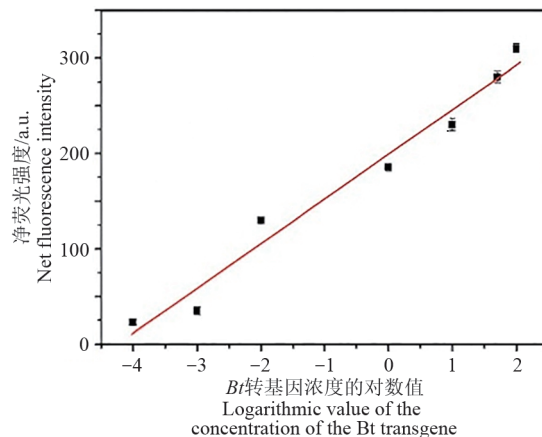


图 4 荧光强度与 *Bt* 转基因浓度的关系

Fig. 4 Relationship between fluorescence intensity and *Bt* transgene concentration

表 2 *Bt* 转基因检测方法性能比较

Table 2 Performance comparison of *Bt* transgene detection methods

| 检测方法 Detection method | 检测限/pM Detection limit | 线性范围/pM Liner range | 参考文献 Reference |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------|
| SERS based on target triggered self-assembly of Au nanoparticles | 50 | (50~500) | [13] |
| SERS based on Au@Ag NRs and magnetic beads | 0.14 | (0.1~1.0×10 ³) | [14] |
| Ratiometric fluorescence sensor based on silica coated supermagnetic nanoparticles and quantum dots | 0.1 | (5~1.0×10 ⁴) | [15] |
| DTHFMS | 0.05 | (0.1~6.0×10 ⁴) | This work |

通过比较相同实验条件不同 DNA 序列的荧光强度来考察本方法的检测特异性,如图 5 所示。三个随机位置的单碱基错配 DNA 序列 (SM-DNA-1、SM-DNA-2、SM-DNA-3) 表现出相似的荧光强度(2, 3, 4), 并且与对照实验(1)的荧光强度相比没有明显变化。此外,三碱基错配 DNA (TM-DNA) 的荧光强度的变化(5)也可以忽略不计。由于 *Bt* 转基因与 DTHFMS 中识别序列的高效杂交, 荧光强度(6)远高于存在碱基错配的 DNA 的荧光强度。因此, 本文提出的 DTHFMS 对检测 *Bt* 转基因具有较高的特异性。

Bt 转基因序列是转基因玉米种子中转基因成分的特异性核酸片段。为了证明本文构建的 DTHFMS 在实际样品中的应用前景, 我们研究了不同样品条件下的荧光强度, 如图 6 所示。与的对照实验(不含玉米种子, 曲线 a)相比, 不含 *Bt* 转基因的玉米种子(曲线 b)显示的荧光强度变

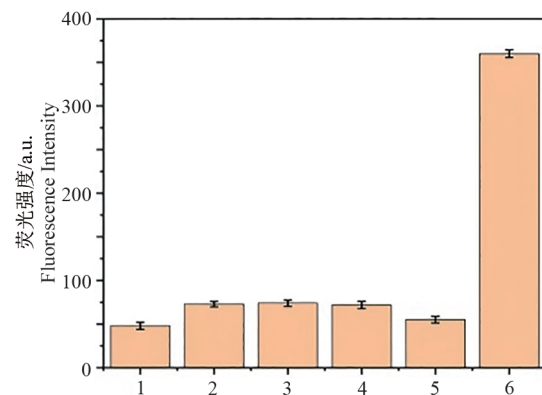


图 5 三螺旋 DNA 荧光分子开关的检测特异性

Fig. 5 Detection specificity of DTHFMS

注: 1: 对照(无 DNA); 2: SM-DNA-1; 3: SM-DNA-2; 4: SM-DNA-3; 5: TM-DNA; 6: *Bt* 转基因。

Note: 1: Control (without DNA); 2: SM-DNA-1; 3: SM-DNA-2; 4: SM-DNA-3; 5: TM-DNA; 6: *Bt* transgene.

化可以忽略不计。而转基因玉米种子(*Bt* 801) 的荧光强度却大幅增加(曲线 c)。根据上述线性

回归方程可以估算转基因玉米种子(*Bt* 801)中 *Bt* 转基因浓度约为 11 nM,与实时 PCR 试剂盒检测的数据(8.5 nM)基本一致。此外,我们通过向转基因玉米样品中添加了不同浓度的 *Bt* 转基因进行回收率研究。结果如表 2 所示。回收率在 98%~102.3%之间,相对标准偏差(RSD)在 2.1%~3.1%之间。以上结果充分证实了本文提出的新型三螺旋荧光开关具有较强的实际应用前景。

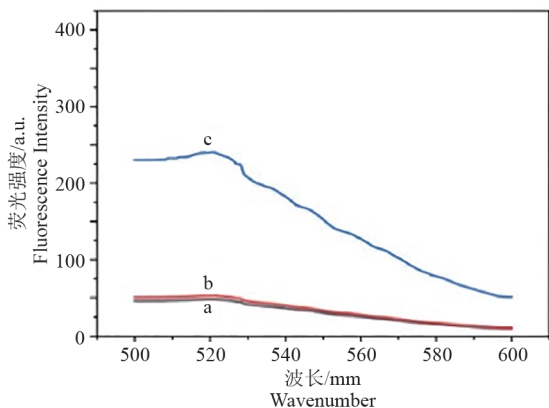


图 6 三螺旋 DNA 荧光分子开关检测实际样品

Fig. 6 Detection of actual samples by DTHFMS

注:(a)对照:分子信标+猝灭单链;(b)分子信标+猝灭单链+非转基因玉米种子;(c)分子信标+猝灭单链+转基因玉米种子(*Bt* 801)。

Note: (a)Control: DHMB-3+BHQ-1-TFO-13; (b) DHMB-3+BHQ-1-TFO-13+maize seeds without *Bt* transgene; (c) DHMB-3+BHQ-1-TFO-13+transgenic maize seeds (*Bt* 801).

表 2 双修饰三螺旋 DNA 荧光分子开关检测转基因玉米种子 (*Bt* 801) 中 *Bt* 转基因回收率

Table 2 Recovery rate of *Bt* transgene in transgenic corn seeds (*Bt* 801) by DTHFMS

| 样品 Sample | 目标基因加 入量 Added | 回收量 Found | 回收率 Recovery | 相对标准 偏差 RSD |
|---------------|-------------------|--------------|-----------------|----------------|
| <i>Bt</i> 801 | 0.1 pM | 0.097 pM | 97 % | 2.5 % |
| <i>Bt</i> 801 | 0.1 nM | 0.102 nM | 102 % | 2.3 % |
| <i>Bt</i> 801 | 100 nM | 102.4 nM | 102.4 % | 3.1 % |

3 讨论

本文构建的三螺旋 DNA 荧光分子开关通过双重荧光共振能量转移能够保持较低的背景信号。新型荧光分子开关的设计思路是基于作者前期的研究工作经验和文献报道^[16-18]。更重要的是本文详细考察了三螺旋 DNA 的稳定性的影响因素及变化规律。结果表明 T-AoT 和 C-GoC 三联体交替出现的三螺旋 DNA 具有适度稳定性,可以用于构建高灵敏传感器,检测作物种子

中的特定基因,对于评估作物中存在的潜在风险具有重要意义。与文献报道的 *Bt* 转基因检测方法相比,DTHFMS 具有以下特点:(1)高效的双荧光共振能量转移(FRET)保证了较低的背景信号。检测灵敏度优于文献报道检测方法。(2)DTHFMS 不涉及生物酶,操作过程简单,实验条件温和。(3)DTHFMS 设计方便,通用性良好,通过改变相应的识别序列,可以构建一系列用于检测其他特殊基因的检测探针。

4 结论

本文构建了 T-AoT 和 C-GoC 三联体交替出现的双修饰三螺旋 DNA 荧光分子开关(DTHFMS),并将其用于转基因玉米种子中 *Bt* 转基因的灵敏检测。通过探究检测性能的关键影响因素确定了最优检测条件。检测结果令人满意,检测灵敏度为 0.05 pM,线性范围(0.1~6.0×10⁴) pM。此外,本文构建的 DTHFMS 不需要生物酶,操作程序简单,实验条件温和。通过改变 DTHFMS 中相应的识别序列,可以构建一系列用于检测其他特殊基因的检测探针,具有较好的通用性。

参考文献

- [1] 刘鼎阔,董惠峰,宁未萌,等. 苏云金芽孢杆菌 *BT* 蛋白动物安全性试验[J]. 生物化工,2023,9(04):39-41.
- [2] 胡飞,徐婷婷,苏贤岩,等. 苏云金杆菌微型颗粒剂对玉米鳞翅目害虫的防治效果[J]. 中国生物防治报, 2023,39(01):46-53.
- [3] 焦悦,韩宇,杨桥,等. 全球转基因玉米商业化发展态势概述及启示[J]. 生物技术通报,2021,37(04): 164-176.
- [4] Yang L, Pan A, Jia J, et al. Validation of a tomato-specific gene, LAT52, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic tomatoes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005,53(2):183-190.
- [5] Hiroshi A, Takahiro W, Kaoru W, et al. Quantitative detection system for maize sample containing combined-trait genetically modified maize [J]. Analytical Chemistry, 2005,77(22):7421-7428.
- [6] Morisset D, Dobnik D, Hamels S, et al. NAIMA: target amplification strategy allowing quantitative on-chip detection of GMOs [J]. Nucleic Acids Reserch, 2008,36: e118.

- [7] Emanuela PA, Dang J, Gebhardt JS, et al. Recombinant antibodies: a new reagent for biological agent detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2000,14:751-759.
- [8] Ma JL, Yin BC, Le H, et al. Label-free detection of sequence-specific DNA based on fluorescent silver nanoclusters-assisted surface plasmon-enhanced energy transfer [J]. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2015,7(23): 12856-12863.
- [9] Ma, PY, Liang FH, Diao QP, et al. Selective and sensitive SERS sensor for detection of Hg^{2+} in environmental water base on rhodamine-bonded and amino group functionalized SiO_2 -coated Au-Ag core-shell nanorods [J]. *RSC Advances*, 2015,5: 32168-32174.
- [10] Su S, Fan JW, Xue B, et al. Label-free impedimetric sensing platform for microRNA-21 based on ZrO_2 -reduced graphene oxide nanohybrids coupled with catalytic hairpin assembly amplification [J]. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2014,6: 1152-1157.
- [11] Cui HF, Cheng L, Zhang J, et al. An electrochemical DNA sensor for sequence-specific DNA recognition in a homogeneous solution [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014,56: 124-128.
- [12] Rasheed PA, Sandhyarani N. A highly sensitive DNA sensor for attomolar detection of the BRCA1 gene: signal amplification with gold nanoparticle clusters [J]. *Analyst*, 2015,140: 2713-2718.
- [13] Chen K, Wu L, Jiang X, et al. Target triggered self-assembly of Au nanoparticles for amplified detection of *Bacillus thuringiensis* transgenic sequence using SERS [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014,62:196-200.
- [14] Wu L, Xiao X, Chen K, et al. Ultrasensitive SERS detection of *Bacillus thuringiensis* special gene based on Au@Ag NRs and magnetic beads [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 92:321-327.
- [15] Wu L, Deng M, Tan X, et al. Ratiometric fluorescence sensor for the sensitive detection of *Bacillus thuringiensis* transgenic sequence based on silica coated supermagnetic nanoparticles and quantum dots [J]. *Sensors and Actuators B:Chemical*, 2018,254:206-213.
- [16] Tian T, Li ZQ, Lee E. Sequence-specific detection of DNA using functionalized graphene as an additive [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014,53:336-339.
- [17] Xiao ZY, Guo XT, Ling LS. Sequence-specific recognition of double-stranded DNA with molecular beacon with the aid of Ag^+ under neutral pH environment [J]. *Chemical Communications*, 2013, 49 (34):3573-3575.
- [18] 朱德颂,褚秀玲,艾仕云. Ag^+ 稳定的剪刀形三螺旋分子开关快速灵敏检测转录因子[J]. *分析实验室*, 2019,38(07):787-791.
- [19] 王子棋,高亚芳,谭心韵,等. 基于三螺旋适体探针的双向开关传感同时灵敏测定四环素和氯霉素[J]. *分析实验室*,2023,42(10):1317-1323.