

感染性疾病新方法新技术专题 · 论著

基于三螺旋核酸探针构象转换的电化学传感新方法 构建及其单碱基分辨率验证^{*}

朱全敬, 郑清源, 龚兴欣, 冯攀, 沈陈兰, 贺勇[△]

四川大学华西医院实验医学科/四川大学华西医院临床检验医学研究中心/四川省医学检验
临床医学研究中心, 四川成都 610041

摘要:目的 探究 DNA 甲基化对三螺旋核酸结构稳定性的影响, 并构建基于三螺旋核酸构象稳定性与抗体-信号放大单元协同调控的动态传感方法以实现 DNA 甲基化单碱基分辨率检测。方法 通过分子建模构建了一种三螺旋核酸探针, 并通过分子动力学模拟分析甲基化位点对该探针结构稳定性的影响。然后, 基于该三螺旋核酸探针构象转换建立了一种电化学传感新方法, 并对该体系进行了一系列表征及性能验证。结果 当三螺旋附近存在 1~2 个甲基化位点时, 三螺旋整体结构保持相对稳定。而当甲基化位点数目增加到 5 个时, 三螺旋结构的稳定性开始下降。基于三螺旋核酸构象转换构建的特异性电化学传感新方法, 实现了 DNA 甲基化位点的单碱基分辨率检测, 其最大分辨能力为 7 个甲基化位点。结论 该研究揭示了 DNA 甲基化修饰对三螺旋核酸结构稳定性的调控机制, 并建立了一种 DNA 甲基化单碱基分辨率检测策略。

关键词:三螺旋核酸; DNA 甲基化; 电化学; 金纳米颗粒; 单碱基分辨

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2026.15.002 中图法分类号:R446

文章编号:1673-4130(2026)15-1801-07 文献标识码:A

Construction of a novel electrochemical method based on triplex-helix nucleic acid probe conformational transition and its single-base resolution verification^{*}

Zhu Quanjing, Zheng Qingyuan, Gong Xingxin, Feng Pan, Shen Chenlan, He Yong[△]

Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University/Clinical Laboratory Medicine Research Center, West China Hospital, Sichuan University/Sichuan Clinical Research Center for Laboratory Medicine, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of DNA methylation on the stability of triplex nucleic acid structures, and to construct a dynamic sensing method based on triplex nucleic acid conformational transition for single-base resolution detection of DNA methylation. **Methods** A triple-helix nucleic acid probe was constructed through molecular modeling, and the influence of the methylation site on the structural stability of the probe was analyzed through molecular dynamics simulation. Subsequently, a novel electrochemical sensing method was established based on the conformational transition of the triple-helix nucleic acid probe, and a series of characterizations and performance validations were conducted on this system. **Results** When 1—2 methylation sites were present near the triple-helix, the overall structure remained relatively stable. However, when the number of methylation sites increased to 5, the stability of the triple-helix structure began to decline. Additionally, a specific electrochemical sensing method based on triple-helix nucleic acid conformational transition was developed, achieving single-base resolution detection of DNA methylation sites with a maximum resolution capability of 7 sites. **Conclusion** This study revealed the regulatory mechanism of DNA methylation modification on the stability of triple-helix nucleic acid structure, and established a single-base resolution detection strategy for DNA methylation.

Key words: triple-helix nucleic acids; DNA methylation; electrochemical; AuNPs; single-base resolution

DNA 甲基化是最稳定的表观遗传修饰。在哺乳动物中, 它通常发生在 CpG 二核苷酸的胞嘧啶上。

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金项目(82402735); 四川省自然科学基金青年基金项目(2025ZNSFSC1560); 四川大学华西医院博士后科研基金项目(2023HXBH122)。

作者简介: 朱全敬, 女, 主管技师, 主要从事临床检验新方法新技术的研究。 [△] 通信作者, E-mail: heyong1011@163.com。

DNA 甲基化在许多生理和病理过程中至关重要。异常的 DNA 甲基化模式与包括癌症在内的许多人类重大疾病密切相关^[1-2]。因此, DNA 甲基化位点的单碱基分辨率检测对疾病早期诊断和个性化治疗至关重要。在表观遗传学研究中, 基于亚硫酸氢盐转化的测序方法, 仍是当前评估 DNA 甲基化的标准方法。但是亚硫酸氢盐处理会导致大多数 DNA 片段发生非均匀的序列依赖性降解, 限制了分析的灵敏度。近年来, 随着限制性酶切预处理分析和长读长测序方法的发展虽然能克服一些亚硫酸氢盐测序的缺陷, 但需要专门的实验方案^[3-5]。电化学传感技术凭借其仪器便携性、高特异性和易于集成等特点在分析检测领域备受关注^[6]。在分子生物学与纳米科学的交叉融合推动下, 多种电化学传感策略被开发用于 DNA 甲基化分析, 然而传统检测方法受限于 Watson-Crick 碱基配对原则, 这种严格的配对模式不仅影响了探针对靶标序列的识别范围, 也限制了传感器在复杂样本中的检测性能^[7-8], 难以区分单碱基差异。

三螺旋核酸是通过第 3 条寡核苷酸链以 Hoogsteen 氢键嵌入 Watson-Crick 双链大沟形成的超分子结构, 兼具高稳定性、构象可调性及功能模块化特性。基于其三链柔性构象与靶标响应的构象转换能力, TNAs 已被设计为分子开关, 并成功构建荧光、电化学等生物传感器, 应用于分子成像、分析检测及 RNA 监测等领域^[9-10]。但三螺旋核酸实现其功能的关键点在于结构的稳定性, 虽然已有研究证实胞嘧啶修饰可增强其构象稳定性, 然而该特性并未得到深入研究且在 DNA 甲基化检测领域尚未被探索^[11-13]。基于此,

本研究探讨了 DNA 甲基化对三螺旋核酸结构稳定性的影响, 并且将三螺旋核酸的构象动态特性与电化学传感技术相结合, 基于靶标分子触发探针从双链态向三螺旋态的可逆转换, 建立了 DNA 甲基化单碱基分辨率检测新方法。

1 材料与方法

1.1 材料 电化学测试采用上海辰华仪器公司生产的 CHI660E 型电化学分析仪, 超声处理使用昆山市超声仪器有限公司的 KQ218 型超声清洗仪。三螺旋构象分析通过英国应用光物理有限公司的圆二色性 (CD) 光谱仪完成, 溶液 pH 值由上海精密科学仪器有限公司 PHS-3E 型 pH 计测定。纳米材料形貌表征使用德国蔡司公司提供的透射电子显微镜 (TEM)。试剂包括: Sigma 公司 (美国) 的胍、氧化石墨烯 (GO)、亚甲基蓝 (MB)、氨水 (25%)、二甲基亚砜 (DMSO)、6-巯基乙醇 (MCH) 及血红素; 生工生物工程 (上海) 股份有限公司的三 (2-羧乙基) 膦盐酸盐 (TCEP, 98%)、TE 缓冲液 (pH 8.0)、PBS 缓冲液 (pH 7.4) 及 HEPES 缓冲液; 阿拉丁生物科技有限公司供应的铁氰化钾、亚铁氰化钾、氯化钾 (KCl)、过氧化氢 (H₂O₂)、柠檬酸三钠、链霉亲和素、硼氢化钠 (NaBH₄) 和氯金酸 (HAuCl₄ · 3H₂O)。金电极 (直径 2 mm) 及氧化铝抛光粉购自天津艾达恒晟科技有限公司, 生物素标记抗 5-甲基胞嘧啶 (m⁵C) 抗体购自美国 Abcam 公司。实验中涉及的核酸链序列及修饰信息见表 1, 所有核酸链由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。试剂纯度均为分析纯级, 溶液配制使用超纯水。

表 1 实验所用核酸序列

名称	核酸序列 (5′-3′)
捕获探针	SH-ATATGAGAAGGGAGTGACTCAT
辅助探针	CCTTCTCAT
靶序列 (无位点)	CTCTTCCACGTGATCACGAACCAGGATCCCTTCTC
靶序列 (1 个位点)	CTCTTCCACGTGATCACGAACCAGGATCCmCTTCTC
靶序列 (2 个位点)	CTCTTCCACGTGATCACGAACCAGGATCCmCTTmCTC
靶序列 (3 个位点)	CTCTTCCACGTGATCACGAACCAGGATCCmCTTmCTmC
靶序列 (4 个位点)	CTCTTCCACGTGATCACGAACCAGGATmCCmCTTmCTmC
靶序列 (5 个位点)	CTCTTmCCACGTGATCACGAACCAGGATmCCmCTTmCTmC
靶序列 (6 个位点)	CTmCTTmCCACGTGATCACGAACCAGGATmCCmCTTmCTmC
靶序列 (7 个位点)	CTmCTTmCCAmCGTGATCACGAACCAGGATmCCmCTTmCTmC
靶序列 (8 个位点)	CTmCTTmCCAmCGTGATCACGAACmCAGGATmCCmCTTmCTmC
杂交链 A	SH-AAAAAAAAAAAAAAAAAGGGTGCTCCCCCTAGTGG
杂交链 B	SH-AAAAAAAAAAAAAAAAACCACTAGGGGGAGCACCC
杂交链 C	Biotin-CAAGCGACACCGTGGACGAAAAAAAAA-SH
G 链	GGGTAGGGCGGGTTGGGTACGCA-SH
单碱基错配 (T1)	CTCTTCCACGTGATCACGAACCAGGATmCCmCTGCTmC
多碱基错配 (Tx)	TTmCGTACACGTGATCACGAACCAGGATGmCTGmCTA
非互补序列 (Tn)	CATCGmCGATGTGGATACTCTCTAGCAGTTmCGCTAmC

1.2 三螺旋核酸结构的构建 使用 PyMol 和 VMD 初步构建包含靶序列的 DNA 双链体。通过修改复制链的残基名称生成第 3 条链,使其与靶序列匹配,调整碱基序列及空间位置后保存为 PDB 文件。该结构使用 GROMACS 进行初步能量松弛,并保存为 PDB 文件^[14],接下来建立了 9 个模拟组,包括没有甲基化位点的三螺旋结构和包含有不同数目甲基化位点的结构。将甲基化之后的胞嘧啶名称在力场文件 dna.rtp 中定义为 DCM,而 3' 端的 DNA 胞嘧啶名称定义为 3CM,随后使用 GaussView 进行合理的加氢操作之后对 DCM 与 3CM 分别进行 RESP 电荷计算,采用 DFT 方法, B3LYP 泛函与 6-311g(d,p) 基组进行计算。得出的电荷和参数被整合到 AMBER14sb_OL15 力场文件中^[15]。之后对体系进行能量最小化,每个体系的最小化均进行两步操作:第一步,约束全部分子,优化共进行 10 000 步,首先采用最陡下降法进行前 5 000 步优化,随后切换至共轭梯度法继续完成后续 5 000 步迭代计算;第二步,对系统内所有原子施加预平衡处理,消除因初始原子位置不合理引起的内部应力,最终获得稳定的低能构型,作为分子动力学模拟的初始输入结构。

1.3 分子动力学(MD)模拟 在 60 ps 内,将整个体系从 0 K[热力学温度 $T(K) = 273.15 + t(^{\circ}C)$]逐步升温到 298 K,并用温度耦合算法,使体系在恒定的 298 K 温度下进行 10 ns 的 NVT 系综分子动力学模拟。NVT 系综模拟是在体系原子数(N)、压强(P)和温度(T)恒定条件下的分子动力学模拟,在模拟过程中,通过 SHAKE 算法对氢原子键长振动进行动力学约束,同时将范德华力与静电相互作用的长程截断半径调整为 12 Å(1 Å=0.1 nm),以平衡计算精度与效率。应用 Particle Mesh Ewald (PME)方法处理长程静电相互作用。体系温度上升至 310 K 后将温度稳定至 310 K,在 NVT 系综下开展 100 ns 的分子动力学模拟,分子动力学模拟采用 2 fs 的时间步长,采样间隔设置为 1 ps。使用 GROMACS 工具计算稳定性指标三链体骨架的均方根偏差(RMSD)和氢键数量变化,量化不同的甲基化位点对整体体系所造成的稳定性影响^[16]。计算软件:GROMACS、VMD、Python、PyMol、Discovery Studio、Gaussview 等。

1.4 基于三螺旋核酸构象转换的电化学传感新方法的建立 首先,构建电化学信号放大策略体系。第一步, AuNPs@rGO 复合材料制备,对氧化石墨烯(GO)溶液施加超声振荡,促进其均匀分散,加入氨和胍进行还原,随后与 HAuCl₄ 溶液反应,通过 NaBH₄ 和柠檬酸钠的快速注入,即可获得 AuNPs@rGO 复合物^[17]。接着,核酸链 ABC 杂交诱导与 G 链形成 He-min 模拟酶信号放大单元,使用 TCEP 活化杂交链,与金纳米颗粒(AuNPs)溶液混合孵育,经过 SDS 和 NaCl 的处理,形成 A-AuNPs 和 B-AuNPs 复合

物^[18]。这两种复合物等比混合后,通过杂交反应得到信号放大单元,并分散在含 MB 的缓冲液中备用。然后是传感器的组装包括金电极的打磨和活化,电极表面经 AuNPs@rGO 溶液修饰后,浸入含巯基捕获探针的溶液中,促进探针与纳米材料表面的特异性结合,再用 MCH 溶液阻断非特异性结合位点。最后,电极在靶序列与辅助探针的混合溶液中孵育后,利用生物素-链霉亲和素体系进行特异性识别,实现信号放大单元在电极表面的高效捕获,并在甲基化位点存在时检测到显著放大的电流信号。

1.5 基于三螺旋核酸构象转换的电化学传感新方法的评价 方法的评价包括反应体系的条件优化和性能评价。首先,对体系中的 pH(4.0~7.0)、反应温度(25~45 ℃)和时间(30~150 min)进行一系列优化,经电化学测量分析后得出最适宜的反应条件。采用 CHI660E 型电化学工作站进行全过程的电化学测量,用循环伏安法(CV){0.1 mol/L KCl、2 mmol/L [Fe(CN)₆]^{3-/4-}、电位范围-0.3~0.7 V,扫描速率 50 mV/s}表征电极的组装过程。用差分脉冲伏安法(DPV)测量电信号(电压范围:-0.6~0.1 V,脉冲幅度:50 mV,脉冲宽度:5 ms),缓冲体系为 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS,含 0.1 mol/L KCl 和 2.5 mmol/L H₂O₂)。接下来,设计甲基化位点个数分别为 0、1、2、3、4、5、6、7、8 的靶序列进行分析,以评价电化学传感新方法的单碱基分辨率,并设计空白、T1、Tx 和 Tn 序列作为干扰,评估检测特异性,分析相同甲基化位点个数的靶序列,将电极体系于 4 ℃ 储存,每 7 天检测一次,持续 4 周,评价稳定性。

2 结 果

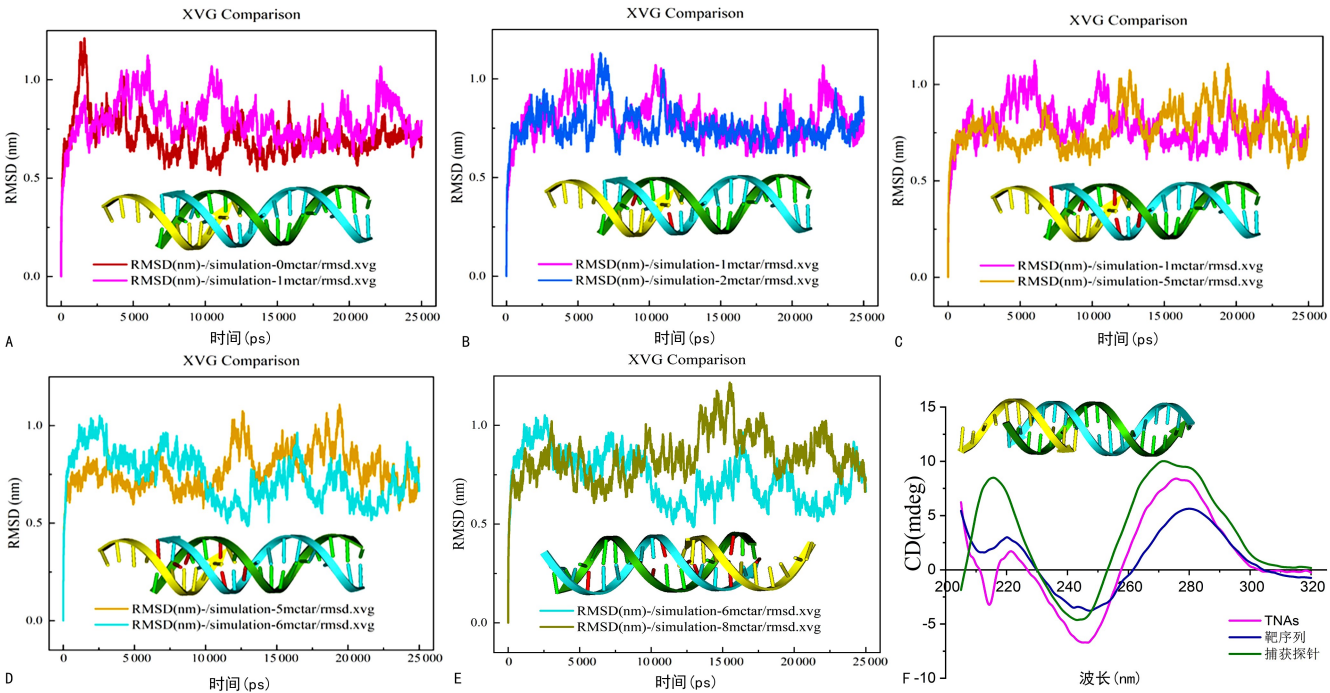
2.1 三螺旋核酸结构的分子动力学模拟 DNA 初始结构对分子动力学模拟影响很大,一个合理的起始结构,可以加快分子动力学模拟轨迹的收敛速度,提高采样的效率。因此,本研究的模拟体系采用 Discovery Studio 进行 DNA 三螺旋结构的构建,然后采用 GROMACS 进行分子动力学模拟。通过对比不同数目甲基化位点的 RMSD 变化,发现 DNA 三螺旋结构的稳定性受到甲基化位点数目的显著影响,尤其是靠近三螺旋区域的甲基化位点。具体表现为,当三螺旋附近存在 1~2 个甲基化位点时,RMSD 波动较小 DNA 整体结构保持相对稳定(图 1A、B)。然而,当甲基化位点数目增加到 5 个时,可见 RMSD 大幅波动,说明甲基化位点数量对结构稳定性开始产生显著影响,三螺旋结构的稳定性开始下降(图 1C)。这一趋势在远离三螺旋区域的甲基化位点中也存在,但影响程度相对较弱(图 1D、E)。以上结果表明,甲基化位点的数目及其位置对 DNA 三螺旋结构的稳定性具有重要调控作用,且靠近三螺旋区域的甲基化位点影响更为显著。

通过圆二色光谱分析(200~320 nm 波长扫描,

响应时间 4 s,扫描速率 100 nm/min)验证了三螺旋结构的形成。当三螺旋结构形成时,在 240 nm 附近出现显著增强的负峰,同时在 213 nm 处显现不同于靶序列和捕获探针的特异性吸收峰(图 1F),与文献^[19]中三链核酸结构特征一致,说明三螺旋核酸结构的构建是成功的。

分别对不同甲基化位点数目的体系进行氢键数量绘图,可以观察到 DNA 体系内分子氢键数量在 1~2 个甲基化位点时其氢键数量浮动并不明显,在 5 个甲基化位点时出现下降,在 8 个甲基化位点时氢键数目骤降,以上结果表明,当单个甲基化位点存在时,

可能通过增强局部堆积或限制构象而略微提高稳定性,但是数量较少没有进一步在空间位阻层面影响分子内氢键网络,焓驱动的稳定性的提升。当甲基化位点增加时,多个甲基累加可能产生立体阻碍,破坏理想的碱基堆积或引起局部几何畸变,降低稳定性,过多的甲基可能使糖-磷酸骨架或碱基取向过度受限,降低系统对扰动的适应性,所以,当体系中甲基化位点在 7 个以上时会导致空间位阻等多个层面过度受限从而导致分子内氢键网络的形成受阻,从而降低了体系的稳定性。



注:A~E 为不同甲基化位点数目的三螺旋核酸结构分子动力学模拟 RMSD 曲线图;F 为三螺旋核酸结构的圆二色光谱图。

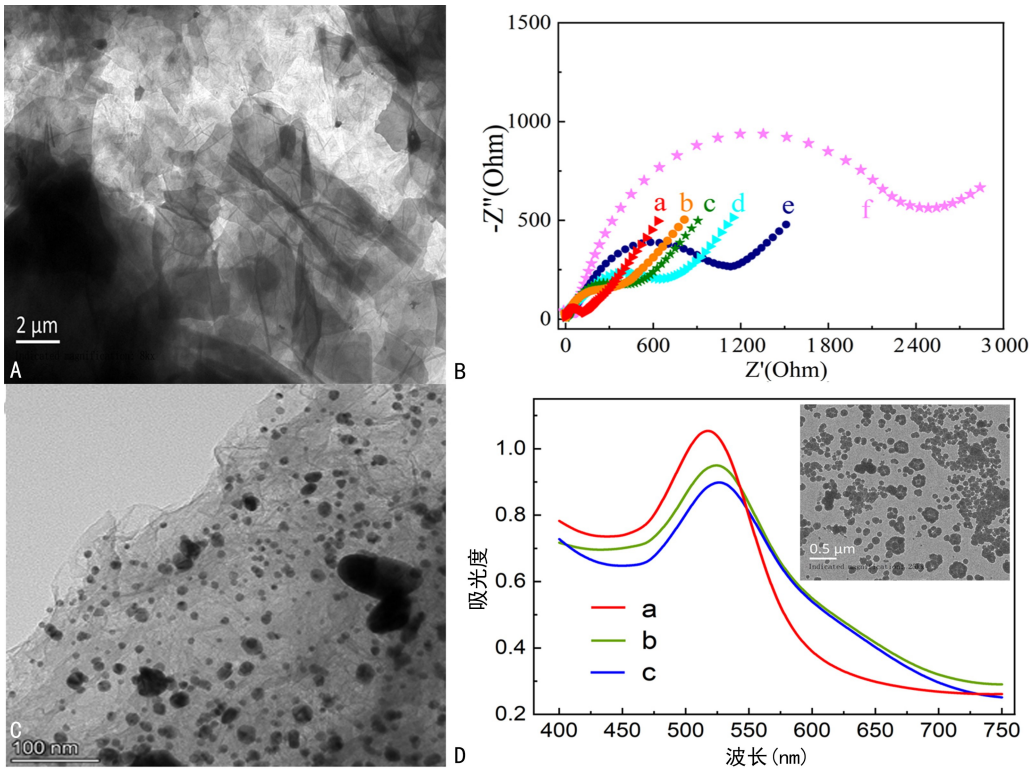
图 1 三螺旋核酸结构的分子动力学结果

2.2 电化学传感体系的表征 使用透射电子显微镜对 AuNPs@rGO 复合材料和核酸链杂交诱导形成的信号放大单元进行表征,结果见图 2。GO 的薄片状结构与表面褶皱特征通过图 2A 可见。通过原位还原策略,AuNPs 被均匀负载于还原性 GO(rGO)表面,形成 AuNPs@rGO 纳米复合材料(图 2C)。传感体系的组装过程通过电化学阻抗谱(EIS)表征(图 2B),电子转移电阻(R_{et})的演变规律为电子传递动力学的定量研究提供了依据。曲线 a~f 依次为空白金电极,修饰 AuNPs@rGO,捕获探针组装,MCH 封闭,三螺旋核酸结构形成,捕获信号放大单元。R_{et} 值依次为 95、332、380、590、1 000、2 200 Ω,表明随着空间位阻的增大,R_{et} 值逐步增加,电化学传感体系的构建过程是成功的。图 2D 为紫外-可见吸收光谱(UV-Vis)表征信号放大单元的形成,可见曲线 a 在 520 nm 处有一个吸收峰,此为 AuNPs 特有光学特性,曲线 b 和 c 的吸收峰下降且出现红移,表明核酸杂交链成功结合

形成信号放大单元;图 2D 中的右上插图信号放大单元的透射电镜图,可见杂交链与 AuNPs 聚集形成网络状结构。

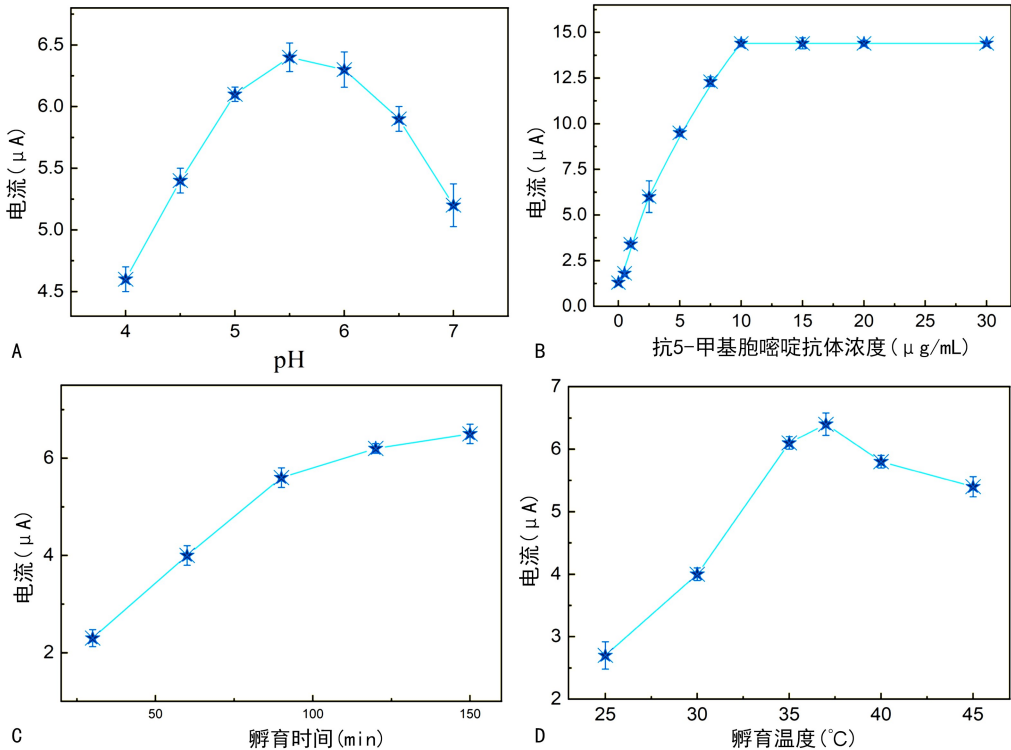
2.3 实验条件的优化 本研究通过多参数系统优化确立了三螺旋核酸组装及检测体系的最佳条件。基于 Hoogsteen 氢键的 pH 敏感性特征^[20],首先用不同 pH 的缓冲体系进行分析(4.0~7.0),电化学结果表明 DPV 峰电流在 pH 5.5 时达到峰值,证实弱酸性环境可增强三螺旋结构的稳定性(图 3A)。随后,DPV 检测结果显示抗 m⁵C 抗体在 0~10 μg/mL 范围内与电流响应正相关,质量浓度超过 10 μg/mL 时因表位饱和导致信号增幅趋缓,结合成本效益分析,选定 10 μg/mL 为最适抗体质量浓度(图 3B)。孵育时间与电化学信号在 30~150 min 内呈正相关,150 min 后进入平台期,提示体系达到稳定状态(图 3C)。最后,对反应体系的温度进行探究发现,在不同温度梯度下(25~45 ℃),37 ℃ 时信号响应最强,说明该温度是反

应体系的最适宜温度(图 3D)。



注:A 为 GO;B 中 a 为空白金电极,b 为 AuNPs@rGO 修饰的金电极,c 为在金电极上组装捕获探针,d 为 MCH 封闭非特异性结合位点,e 为三螺旋核酸结构组装,f 为信号放大单元捕获到电极表面;C 为 AuNPs@rGO;D 中为 a 为 AuNPs,b、c 为 A-AuNPs 和 B-AuNPs,右上插图为信号放大单元的透射电镜图。

图 2 电化学传感体系的表征结果



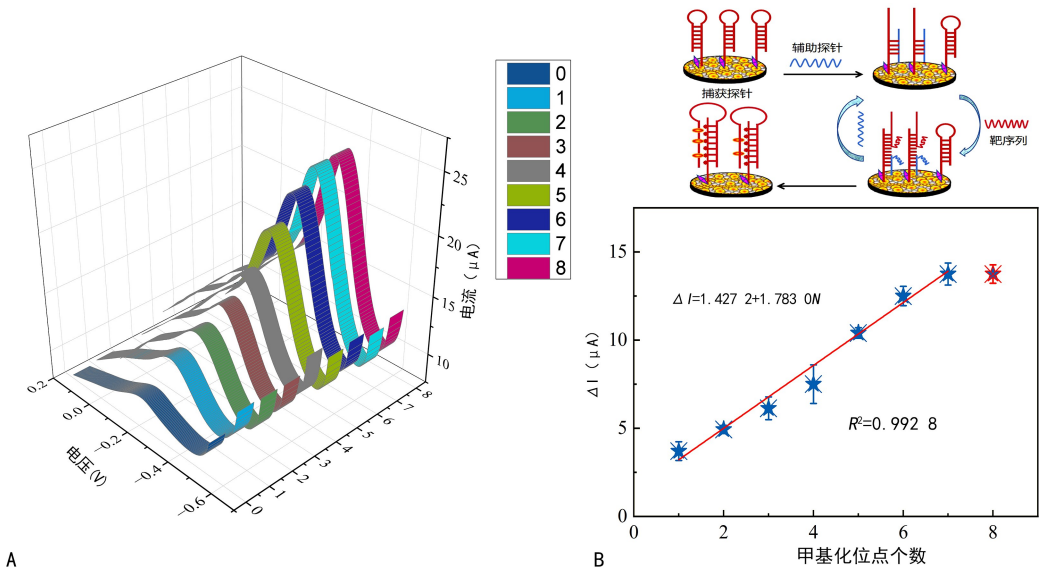
注:A 为检测体系缓冲液 pH;B 为抗 m⁵C 抗体质量浓度;C 为孵育时间;D 为孵育温度。

图 3 反应条件的优化

2.4 单碱基分辨率的验证 在成功构建三螺旋核酸 探针并且基于该探针构建了电化学传感新方法后,通

过 DNA 甲基化单碱基分辨率验证了该方法的检测能力。在最适实验条件下,该体系对甲基化位点数量(1~8 个)的响应呈现显著特异性;随着 DNA 分子中甲基化位点个数从 1 逐步增加至 7,对应的 DPV 峰电流响应展现出高度规律性的单碱基分辨特征。电流响应与甲基化位点个数(1~7)呈现线性关系 $[\Delta I(\mu A)=1.427\ 2+1.783\ 0N,R^2=0.992\ 8]$,尤其在位点个数为 5 时电流响应增强幅度明显,并且甲基化位点个数为 5 时三螺旋结构也最为稳定,证实了该方法

能够实现单碱基水平的甲基化位点定量检测,其最大分辨能力达到 7 个位点,见图 4。本方法实现单碱基分辨率的核心在于甲基化程度差异调控三螺旋构象稳定性,进而线性放大电化学信号。靶序列甲基化位点数量(1~7 个)的增加显著增强三螺旋结构稳定性,促进抗 m^5C 抗体结合。抗体结合后扩大空间位阻,导致信号放大单元的电化学响应效率逐级降低,因此,当甲基化位点数目超过 7 个时,电化学响应与位点数目便不再存在线性关系。

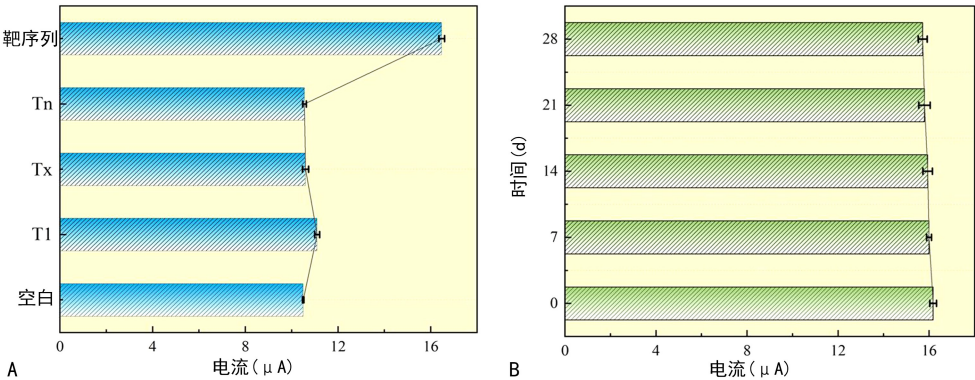


注:A 为单碱基分辨率检测的电流响应;B 为三螺旋核酸探针构象转换和电流响应与甲基化位点数目的线性曲线。

图 4 DNA 甲基化单碱基分辨率验证结果

2.5 特异性和稳定性分析 为评估所构建电化学方法的性能,对其稳定性和特异性进行了系统验证。在稳定性测试中,同一批次制备的 10 支电极对同一靶序列检测显示,DPV 峰电流相对标准偏差(RSD)为 1.47%;在 4℃ 储存条件下持续监测 4 周,峰电流仅衰减 2.84%,其间 RSD 稳定在 1.13%,证实了电极的长期稳定性。特异性实验则通过对比靶序列与空白(无甲基化位点)、单碱基错配(T1)、多碱基错配(Tx)及非互补序列(Tn)的 DPV 响应值,发现靶序列电流

信号显著高于所有干扰组,表明该方法对目标甲基化序列的高度特异性识别能力。非目标核酸干扰已被排除。假阳性风险通过双级特异性识别机制排除。一级识别:三螺旋形成依赖 Hoogsteen 氢键(pH 5.5),仅兼容互补靶序列(Tn 干扰组信号明显衰减);二级识别:抗 m^5C 抗体特异性结合 m^5C (与非甲基化胞嘧啶无交叉反应),确保仅甲基化位点触发信号响应(T1 单碱基错配组信号降低)。见图 5。



注:A 为特异性;B 为稳定性。

图 5 电化学传感方法的性能研究

3 讨 论

DNA 甲基化作为表观遗传修饰的核心机制,在表观遗传紊乱相关疾病的发生和进展中具有至关重要的作用。因此,精确识别和定量分析 DNA 甲基化位点对于这些疾病的早期诊断以及靶向去甲基化治疗具有重要价值。然而,尽管现有多种 DNA 甲基化检测方法各具优势,但它们在临床实验室中的广泛应用仍面临诸多挑战。而电化学生物传感技术因其便携性和快速的响应特性,在生物检测领域备受青睐^[21]。此外,由于核酸序列的可设计性,三螺旋核酸探针在信号转导方面具有巨大的优势,使其能够灵活适配荧光、电化学及拉曼等多模态信号转导机制,为开发高灵敏、高特异性传感平台提供了新策略^[22-23]。因此,本研究创新性地将电化学传感技术与三螺旋核酸探针的构象转化相结合,成功实现了 DNA 甲基化位点的单碱基分辨率检测。

本研究结果表明,甲基化位点的数目及其位置对 DNA 三螺旋结构的稳定性具有重要调控作用,且靠近三螺旋区域的甲基化位点影响更为显著。当三螺旋附近的甲基化位点数目小于 5 个时,整体结构保持相对稳定,当甲基化位点数目增加到 5 个时,甲基化位点数量对结构稳定性开始产生显著影响。然而电化学分析结果却显示当甲基化位点数目为 7 个时,电流响应最强。研究表明,甲基化修饰可在一定程度上通过增强局部疏水相互作用或形成有利的氢键网络来稳定结构^[24]。当位点增加到 5 时,这些相互作用达到平衡,结构趋于稳定。然而,超过 5 个位点后,过多的甲基可能引入空间位阻或破坏原有的相互作用网络,导致结构松散或不稳定。但结构的不稳定性反而可能增加分子的动态灵活性,使其在电极表面更易调整构象,暴露出更多电化学活性位点。此外,动态构象变化可能促进电子转移效率,结构不稳定的分子可能更倾向于吸附在电极表面以降低能量,形成更有序的界面层,从而提高有效反应面积和信号强度。并且当甲基化位点数目超过 5 个时,会存在远离三螺旋区域的甲基化位点,这些修饰位点虽对整体稳定性影响较小,但可能更靠近电子传递路径,能直接参与电化学反应,从而提升电流响应^[25]。

本研究通过分子动力学模拟证实,三螺旋核酸探针在甲基化靶标结合时发生从双链到三螺旋的动态构象转换,随着甲基化位点数目增加到 5 个,三螺旋结构的稳定性开始下降,表明甲基化位点的数目及其位置对 DNA 三螺旋结构的稳定性具有重要调控作用,且靠近三螺旋区域的甲基化位点影响更为显著。然后通过三螺旋构象稳定性与抗体-信号放大单元的协同调控,将甲基化位点数量差异转化为可量化的电学信号,实现了单碱基分辨率检测,其特异性由 Hoogsteen 氢键的空间选择性与抗 m⁵C 抗体的化学特异性双重保障,有效规避假阳性。这一策略为临床

精准医学提供了一种无需复杂预处理的 DNA 甲基化检测新方法,具有巨大的潜力和广阔的应用前景。

尽管本研究主要使用合成 DNA 验证性能,但已通过高严格性特异性实验间接证明抗干扰潜力:非互补序列(Tn)响应信号远远小于靶标信号,表明探针对于非靶核酸的排斥性;同时电极界面设计(rGO 修饰+探针巯基锚定+MCH 封闭)负电荷排斥阻隔带负电的蛋白/脂质体吸附;而弱吸附物质则由多步冲洗流程移除,能有效抵抗血清基质干扰^[26-27]。此外,本研究虽未与金标准亚硫酸氢盐测序(Bisulfite-Seq)进行严格比对,但其对现有技术存在的痛点进行了突破,克服了复杂前处理易导致样本损失,高设备门槛限制普及,单次检测成本过高等问题,并且可以通过微电极阵列进行扩展实现高通量检测。本研究体系的最大分辨率只达到了 7 个甲基化位点,该分辨极限是多重约束的平衡点:分子动力学模拟显示,≥5 个位点时 RMSD 大幅波动,氢键数量开始下降,三螺旋结构达到了失稳临界点,7 个甲基化位点时触发了空间位阻主导的构象应变,导致三螺旋结构稳定性崩溃;此外,电流信号在≥7 个位点时梯度消失出现了平台期,说明抗 m⁵C 抗体在>7 个位点后结合效能趋于饱和,导致信号放大能力受限。因此,能检测到 7 个位点,是因为信号放大单元占主导;而超过 7 个位点之后,构象稳定占主导,探针完全失去构象特异性,故检测达到了上限。

但本研究仍存在一些局限性,未来研究将重点关注以下方面:(1)动态构象与信号响应的关联性未完全阐明,尽管通过分子动力学模拟揭示了甲基化位点数目对三螺旋结构稳定性的影响,但结构不稳定性与电化学信号之间的分子机制仍需进一步验证。(2)具体的电子传递路径未明确,甲基化位点是否直接参与电子传递、如何影响电极界面的电荷分布等关键问题尚未完全揭示。(3)位点数目上限的制约,当前方法的最大分辨能力为 7 个甲基化位点,超过此数目时可能因空间位阻或信号饱和导致灵敏度下降。未来需优化探针设计以拓展检测范围。(4)尽管本研究在实验室条件下取得了良好的结果,但其未在临床样本中得到充分验证。接下来需开展大规模的临床验证研究,以验证其临床转化的可行性。

参考文献

- [1] Liu Y, Reed S C, Lo C, et al. FinaleMe: predicting DNA methylation by the fragmentation patterns of plasma cell-free DNA[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 2790.
- [2] Lee A V, Nestler K A, Chiappinelli K B. Therapeutic targeting of DNA methylation alterations in cancer[J]. Pharmacol Ther, 2024, 258: 108640.
- [3] Gong T, Borgard H, Zhang Z, et al. Analysis and performance assessment of the whole genome bisulfite sequencing