

# 连接酶反应介导的荧光策略用于高效检测 尿嘧啶-DNA 糖基化酶的活性<sup>①</sup>

吴玉姝<sup>1</sup> 吴 敏<sup>2</sup> 刘 敏<sup>1</sup>

(1.聊城大学 生物制药研究院,山东 聊城 252059;2.聊城市人民医院,山东 聊城 252000)

**摘 要** 目的:灵敏检测尿嘧啶-DNA 糖基化酶(UDG)活性有利于生物医学研究和疾病预后。这里,构建一种连接酶反应介导的荧光策略用于高效检测 UDG 活性。方法:在本策略中,两条短寡核苷酸链分别与发夹探针环部序列的一半杂交,形成含缺口的 DNA 复合物。在 UDG 作用下,发夹探针环部的单个 U 碱基被移除,产生无嘌呤/无嘧啶(AP)位点。AP 位点能抑制缺口处的连接酶反应,使位于发夹探针末端的立足点和链迁移区域仍彼此邻近,从而引发杂交链式反应(HCR),产生大量 G 四倍体(G4)结构。最后,G4 与 N 甲基卟啉 IX(NMM)结合,产生增强的荧光信号。结果:本策略检测限低至 0.000 20 U/mL,并能区分 UDG 与其它 DNA 糖基化酶。结论:本策略为生物医学研究和疾病预后提供了一种有潜力的工具用于灵敏定量检测 UDG 活性。

**关键词** 连接酶反应;尿嘧啶-DNA 糖基化酶;单个尿嘧啶碱基;无嘌呤/无嘧啶位点;碱基错配

**中图分类号** O611.6

**文献标识码** A

## 0 引言

尿嘧啶 DNA 糖基化酶(UDG)是一种关键的 DNA 修复酶,有助于保持基因组的完整性<sup>[1,2]</sup>。UDG 特异性移除 DNA 中的尿嘧啶(U)碱基,产生无嘌呤/无嘧啶(AP)位点用于下游的修复过程<sup>[3-5]</sup>。UDG 活性的异常能导致修复过程紊乱和基因突变,最终导致相关疾病,包括淋巴瘤<sup>[6]</sup>、布卢姆综合症<sup>[7]</sup>和人类免疫缺陷病<sup>[8]</sup>。因此,检测 UDG 活性是一种候选工具用于生物医学研究和疾病预后<sup>[9]</sup>。

通常,检测 UDG 活性的常用策略包括凝胶策略<sup>[10,11]</sup>、电化学策略<sup>[12]</sup>和比色策略<sup>[13,14]</sup>。与这些策略相比,荧光策略由于具有安全、简单和灵敏的优点而受到关注。检测 UDG 活性的荧光策略一般是基于含多个 U 碱基的 DNA 探针<sup>[15-20]</sup>。当 UDG 移除 DNA 探针中的多个 U 碱基时,DNA 探针的构型将会发生变化,进而将对目标物 UDG 的识别事件转换成输出信号。尽管这些策略已经实现了良好的性能,但是仍然存在一些不足影响它们在检测低活性 UDG 中的应用。由于每个 DNA 探针中的多个 U 碱基不能被低活性的 UDG 同时移除,使得 DNA 探针的构型不能发生彻底的改变,从而导致低效率的信号转导。因此,期望发展一种信号转导效率高的新型荧光策略用于 UDG 活性的检测。

连接酶反应是指在连接 DNA 双链中的单链缺口时,DNA 连接酶只能在缺口两侧碱基对完全匹配时,才能将其特异地连接<sup>[21,22]</sup>。而当缺口 3'侧存在碱基错配时,连接酶反应将被抑制<sup>[23-26]</sup>。这里,发展了一种连接酶反应介导的荧光策略用于高效检测 UDG 活性。首先,两条短寡核苷酸链分别与发夹探针环部序列的一半进行杂交,形成含缺口的 DNA 复合物。此时,这两条短寡核苷酸链的刚性不足以打开发夹探

① 收稿日期:2018-01-16

基金项目:国家自然科学基金项目(21473085);山东省自然科学基金项目(ZR2018LB023);山东省抗体制药协同创新中心开放课题(CIC-AD1830);聊城大学博士科研启动基金项目(318051632)资助

通讯作者:刘敏,女,汉族,博士,教授,研究方向:小分子与生物大分子相互作用、药物包合技术与缓控释等,E-mail:liumin2@lcu.edu.cn.

针. 然后, 在 UDG 的作用下, 发夹探针环部的单个 U 碱基被移除并产生 AP 位点. 其中, AP 位点也是一种类型的碱基错配<sup>[27]</sup>. 相应地, 位于缺口 3' 侧的 AP 位点能抑制连接酶反应, 使得位于发夹探针末端的立足点和链迁移区域仍保持彼此邻近的状态. 随后, 邻近的立足点和链迁移区域能够引发杂交链式反应 (HCR) 反应, 产生大量的 G 四倍体 (G4) 结构. 最后, G4 结构能与 N 甲基卟啉 IX (NMM) 相互作用, 产生增强的荧光信号. 当 UDG 不存在时, 连接酶反应能将缺口两侧短寡核苷酸链连接成一条刚性增强的长 DNA 链, 进而将发夹探针打开, 使得位于发夹探针末端的立足点和链迁移区域彼此分离, 不能引发随后的 HCR 反应. 本策略对 UDG 活性的检测限低至 0.00020 U/mL, 并能将 UDG 与其它 DNA 糖基化酶很好地区分开来. 此外, 本策略也能用于检测 HeLa 细胞裂解液中的 UDG 活性, 并且细胞中其它组分对本策略造成的干扰很小. 本策略为生物医学研究和疾病预后提供了一种灵敏定量 UDG 活性的潜在工具.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

本工作使用的 DNA 寡核苷酸由生工生物工程有限公司 (中国, 上海) 合成, 具体序列如表 1 所示. UDG、人类 8-氧化鸟嘌呤 DNA 糖基化酶 (hOGG1)、人类烷基化腺嘌呤 DNA 糖基化酶 (hAAG)、尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制剂 (UGI) 都是购于纽英伦生物技术有限公司 (中国, 北京). 大肠杆菌 DNA 连接酶购于宝生物工程有限公司 (中国, 大连). NMM 购于 Frontier Scientific (美国, 犹他州). NMM 溶液是将二甲亚砜 (DMSO) 作溶剂来制备. 超纯水是由 Milli-Q 水净化系统 (>18.25 M $\Omega$ ·cm) 制备.

表 1 本工作使用的 DNA 寡核苷酸序列

名称	序列 (5'-3')
H0	CCTTGCAATTCCTCTCCCTTGTTGAGTTUTACCGCCCGAGAGGACAACGAACACGTTACC
寡核苷酸 1	GGCGGTAAA
寡核苷酸 2	p-ACTCAACAAG
H1	ACAACGAACACGTTACCGGGTAGGGCGTTAGGAGGTAACGTGTTGTTGTAATTGCA AGG
H2	TGGGTTCTAACGCCCTACCCGGTAACGTGTTGTTGCAATTACAACGAACACGTTACCGGGTAGGGCGGG

本工作中样品的荧光检测均在日立 F-7000 荧光分光光度计上进行. 激发波长是 399 nm, 发射光谱的收集是从 570 nm 到 700 nm. 位于 618 nm 处的荧光强度被用于评价本策略的分析性能. 激发和发射的狭缝宽度均设置为 10 nm. 光电倍增管电压为 700 V.

### 1.2 检测 UDG 活性

为得到发夹结构, 发夹探针 H0、H1、H2 分别置于 90°C 下加热退火 5 min, 然后缓慢降至室温. H0 (250 nM)、寡核苷酸 1 (300 nM) 和寡核苷酸 2 (300 nM) 被加入到 1 × NEB UDG 缓冲溶液 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.0 mM DTT, 1.0 mM EDTA) 中, 得到终体积为 20  $\mu$ L 的混合溶液. 该混合溶液在 26°C 条件下孵育 20 min, 得到含缺口的 DNA 复合物 Oligo1-H0-Oligo2. 然后, 各种浓度的 UDG 被加入到上述溶液中, 并在 37°C 条件下孵育 50 min 以进行 UDG 识别反应. 随后, 1 × 大肠杆菌 DNA 连接酶缓冲溶液 (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 4.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.2 mM EDTA, 0.10 mM NAD<sup>+</sup>, 0.005% BSA) 和 0.050 U/ $\mu$ L 大肠杆菌 DNA 连接酶被加入到上述溶液中, 终体积为 40  $\mu$ L. 连接酶反应在 26°C 下进行 20 min. 接着, H1 (300 nM)、H2 (300 nM) 和 10  $\mu$ L 10 × HCR 反应缓冲溶液 (1.0 M NaCl, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 60 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) 被加入到上述反应体系中, 终体积为 100  $\mu$ L. 该混合溶液在 37°C 条件下孵育 90 min 以进行 HCR 反应. 最后, NMM (4.0  $\mu$ M) 被加入到混合溶液并在 37°C 条件下孵育 30 min. 混合溶液的荧光强度在日立 F-7000 荧光分光光度计上进行检测.

### 1.3 检测 UDG 活性的抑制

为检测 UDG 活性的抑制, 在加入 0.50 U/mL UDG 之前, 不同浓度的 UGI 被加入到传感系统中. 其它操作与检测 UDG 活性时的操作相同. 在连接酶反应和 HCR 反应之后, 传感系统的荧光强度在日立 F-7000 荧光分光光度计上进行检测.

## 1.4 制备 HeLa 细胞裂解液

取出  $1.0 \times 10^8$  个 HeLa 细胞置于离心管中,在 3 000 rpm 的条件下离心 5 min,弃去上清液.为了使 HeLa 细胞溶胀破裂,向上述离心管中加入 20 mL 10 mM 的 Tris-HCl 低渗缓冲溶液,同时用移液枪对该混合物进行吹打溶解.为了使 HeLa 细胞充分裂解,将上述混合物在冰浴条件下孵育 30 min,期间每隔 10 min,把混合物置于 3 000 rpm 的条件下涡旋 30 s.然后,将上述混合物在 12 000 rpm 的条件下离心 30 min,取出上清液.最后,将取出的上清液在  $0.45 \mu\text{m}$  的滤膜上进行过滤,得到 HeLa 细胞裂解液,并将其置于  $-20^\circ\text{C}$  的条件下保存备用.

## 2 结果与讨论

### 2.1 连接酶反应介导的荧光策略用于检测 UDG 活性的原理

连接酶反应介导的荧光策略用于检测 UDG 活性的原理如原理图 1 所示.系统中包含两条短寡核苷酸链(寡核苷酸 1 和寡核苷酸 2),一个发夹探针(H0)及两个部分互补的发夹探针(H1 和 H2).其中,单个 U 碱基位于 H0 的环部,立足点区域(1)和链迁移区域(2,3)位于 H0 的末端.起初,寡核苷酸 1 和寡核苷酸 2 分别与 H0 环部序列的一半进行杂交,形成含缺口的 DNA 复合物 Oligo1-H0-Oligo2.此时,寡核苷酸 1 和寡核苷酸 2 的刚性不足以打开 H0 的发夹结构.然后,在 UDG 的作用下,H0 中的单个 U 碱基被移除,产生 AP 位点.相应地,位于缺口 3' 侧的 AP 位点能抑制连接酶反应,使立足点区域(1)和链迁移区域(2,3)仍保持彼此邻近,从而能引发 HCR 反应.具体来讲,H0 末端彼此邻近的区域 1,2,3 作为引物与发夹探针 H1 的粘性末端杂交并打开 H1;打开的 H1 能与发夹探针 H2 的粘性末端杂交并打开 H2;打开的 H2 又可作为新的引物序列来打开 H1,从而进行级联的杂交过程.由于在设计发夹探针 H2 中封入了 G4 序列,因此得到的反应产物为含多个 G4 结构的长双链 DNA 聚合物.G4 结构与荧光染料 NMM 结合,产生增强的荧光信号.然而,当 UDG 不存在时,连接酶反应能将 Oligo1-H0-Oligo2 复合物中的缺口连接,使两条短寡核苷酸链连接成一条刚性增强的长 DNA 链.该长 DNA 链能将 H0 的发夹结构打开,导致立足点区域(1)和链迁移区域(2,3)彼此分离,从而不能引发随后的 HCR 反应.因此,本策略理论上能用于检测 UDG 的活性.

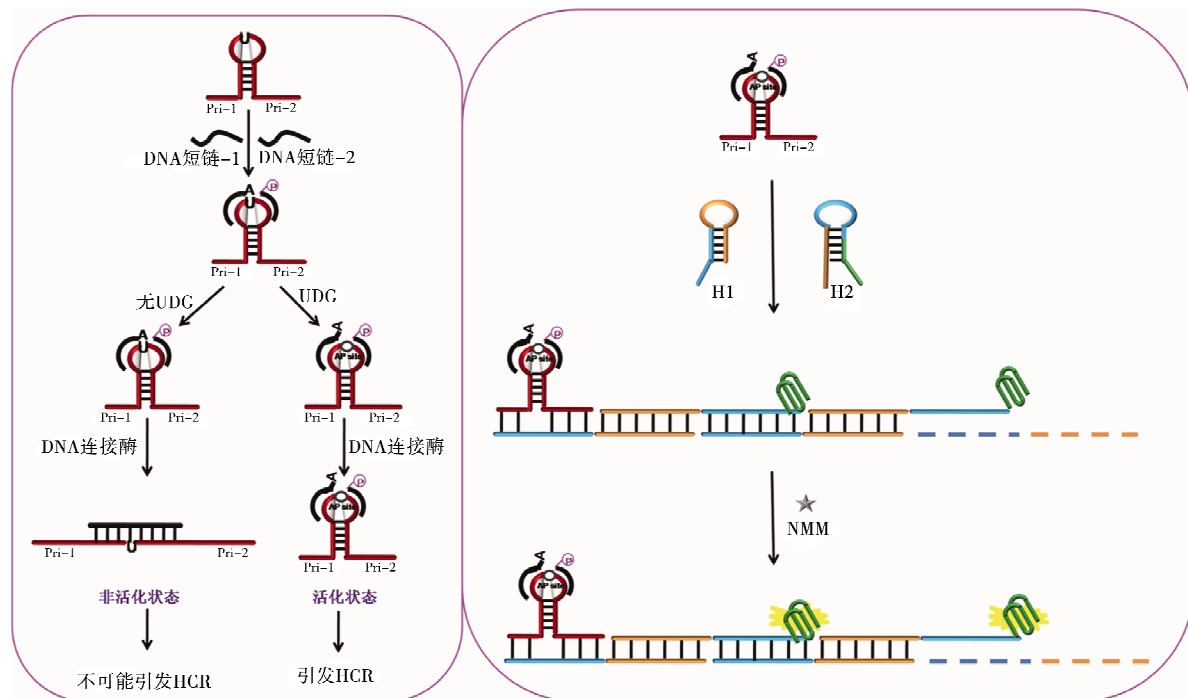


图 1 连接酶反应介导的荧光策略用于检测 UDG 活性的原理图

### 2.2 连接酶反应介导的荧光策略用于检测 UDG 活性的可行性研究

如图 1 所示,荧光发射光谱可用来考察连接酶反应介导的荧光策略在检测 UDG 活性中的可行性.当

H0 不存在时,系统显示出非常低的荧光信号(图 1,曲线 a),表明 H0 对本策略而言是必需的.在不含 UDG 的对照实验中,系统显示出低的荧光信号(图 1,曲线 b).然而,当向含有 H0、寡核苷酸 1、寡核苷酸 2、连接酶、H1 和 H2 的系统加入 UDG 之后,系统的荧光强度发生明显增强(图 1,曲线 c).这些结果证明本策略能用于检测 UDG 的活性.

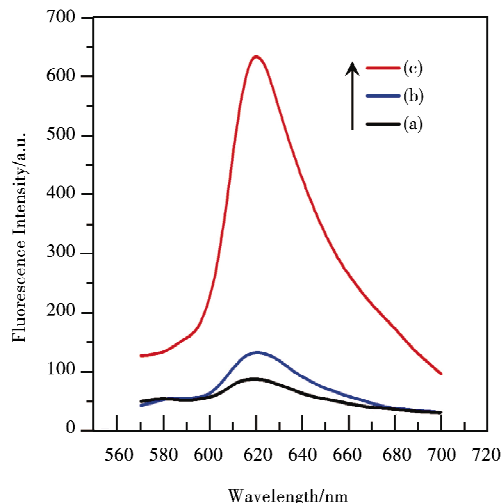


图 1 在不同条件下,传感系统的荧光发射光谱

(a)不存在 H0,(b)不存在 UDG,(c)存在 UDG

### 2.3 连接酶反应介导的荧光策略用于检测 UDG 活性的条件优化

为得到本策略的最好性能,首先优化了发夹探针 H0 颈部的碱基对数目. H0 颈部的碱基对数目从 2 增加至 10. 如图 2 所示,当 H0 颈部的碱基对数为 6 时, $\Delta F$  ( $\Delta F = F - F_0$ , 其中  $F$  和  $F_0$  分别表示当 UDG 存在和不存在时,系统的荧光强度)达到最大值. 然后,随着 H0 的颈部碱基对数从 6 增至 10, $\Delta F$  逐渐降低. 因此,选择 6 为发夹探针 H0 颈部碱基对数目的最优值.

本策略的性能也受到连接酶浓度和 NMM 浓度的影响. 因此,这些因素对本策略的影响也分别被进行了考察. 如图 3、4 所示,分别选择  $0.050 \text{ U}/\mu\text{L}$ 、 $4.0 \mu\text{M}$  作为连接酶和 NMM 的最优浓度.

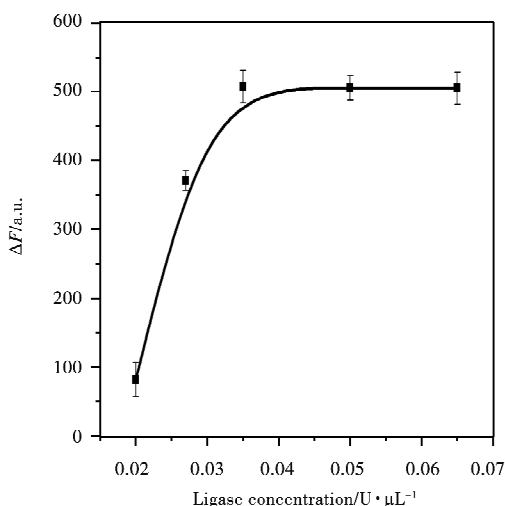


图 3 不同浓度的大肠杆菌 DNA 连接酶对传感系统

$\Delta F$  的影响,误差棒为三次平行实验结果的标准偏差

### 2.4 连接酶反应介导的荧光策略用于检测 UDG 活性的分析性能

在最优条件下,本策略检测了不同浓度的 UDG 活性. 如图 5A 所示,随着 UDG 浓度从 0 增至  $0.50 \text{ U}/\text{mL}$ ,系统的荧光强度逐渐升高. 图 5B 显示了净信号  $\Delta F$  相对于 UDG 浓度的标准曲线. 如图 5B 的内插图所示,UDG 浓度范围在  $0.00050 \text{ U}/\text{mL}$  到  $0.020 \text{ U}/\text{mL}$  之间时, $\Delta F$  与 UDG 浓度之间显示出良好的线

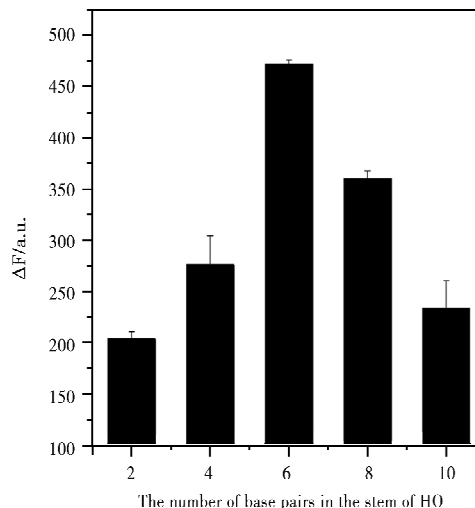


图 2 发夹探针 H0 颈部的碱基对数目对传感系统

$\Delta F$  的影响,误差棒为三次平行实验结果的标准偏差

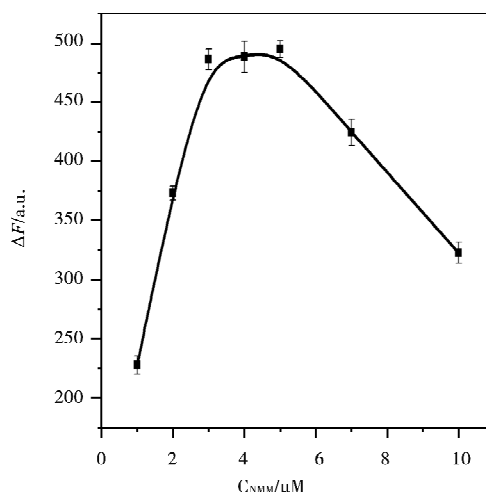


图 4 不同浓度的 NMM 对传感系统  $\Delta F$  的影响,

误差棒为三次平行实验结果的标准偏差

性关系. 该线性关系为  $\Delta F = 19.1 + 1.30 \times 10^4 C$ , 其中相关系数  $R^2 = 0.999$ ,  $C$  代表 UDG 的浓度. 根据 3 $\sigma$  原则, 本策略对 UDG 活性的检测限为 0.000 20 U/mL, 这比其它 UDG 活性检测法的检测限更低或相当<sup>[15-20]</sup>. 在本策略中, 由于仅移除单个 U 碱基之后产生的 AP 位点即能抑制连接酶反应, 因此实现了高效率的信号转导. 所以, 本策略为生物医学研究和疾病预后提供了一种有潜力的工具用于灵敏定量 UDG 的活性.

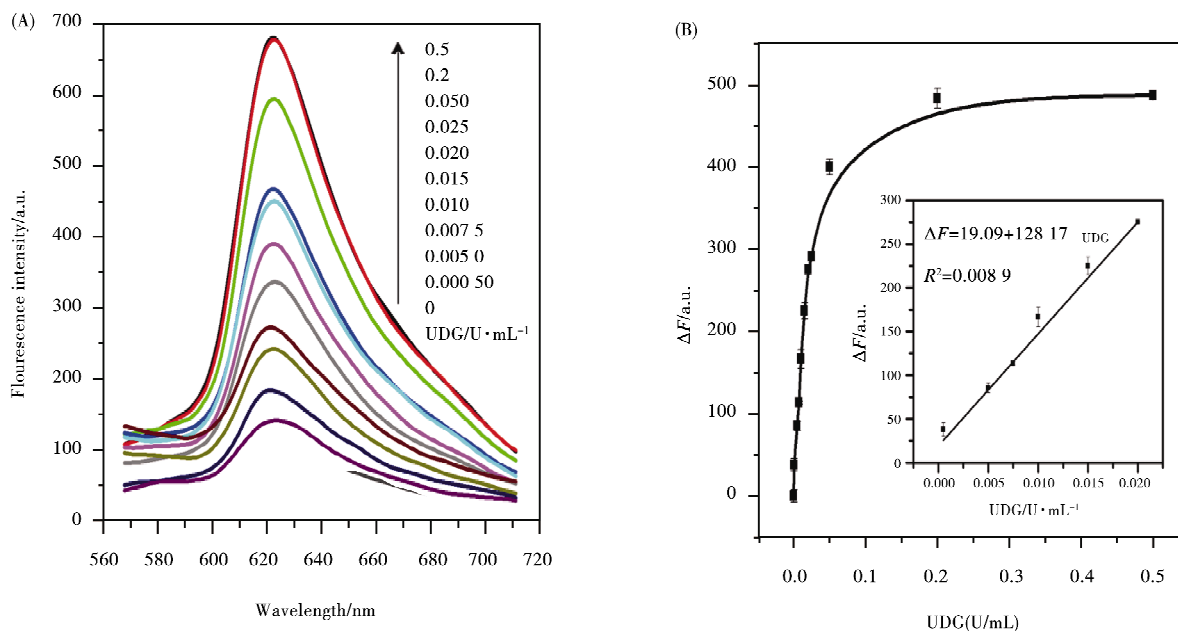


图 5 (A) 传感系统检测不同浓度 UDG 时的荧光发射光谱, (B)  $\Delta F$  相对于 UDG 浓度的标准曲线内插图为传感系统对低浓度 UDG 活性的线性响应, 误差棒为三次平行实验结果的标准偏差

为研究本策略的选择性, 我们考察了本策略对 UDG 以及其它 DNA 糖基化酶(包括 hAAG 和 hOGG1) 的荧光响应. 每种糖基化酶的浓度为 0.50 U/mL. 如图 6 所示, 系统只对 UDG 有强的相对荧光强度响应, 而对 hAAG 或 hOGG1 的相对荧光强度响应则与空白溶液的相当. 这些结果表明, 相对于其它 DNA 糖基化酶, 本策略对 UDG 具有良好的选择性.

为考察其在实际样品中的应用, 本策略也被进一步用于检测 HeLa 细胞裂解液中的 UDG 活性. 如图 7 所示, 浓度为  $1.0 \times 10^4$  个细胞/ $\mu\text{L}$  的 HeLa 细胞裂解液能引起系统明显的荧光信号增强, 而裂解缓冲溶液能引起非常弱的荧光强度. 另外, 当 UDG 的抑制剂 UGI 被加入到细胞裂解液之后, 系统显示出弱的荧光强度. 这些结果表明, 系统的荧光信号增强是由 UDG 引起的, 而不是由细胞裂解液中的任何其它组分引起的. 另外, 这些结果还表明, 本策略能耐受细胞中其它组分的干扰, 有潜力应用于生物医学研究和疾病预后中的 UDG 活性检测.

## 2.5 检测 UDG 活性的抑制

本策略也被用于检测 UDG 活性的抑制. UGI 被选作一种模型抑制剂. 如图 8 所示, 随着 UGI 浓度的增加, 系统的相对荧光强度逐渐降低. 这表明本策略能被用于检测 UDG 活性的抑制.

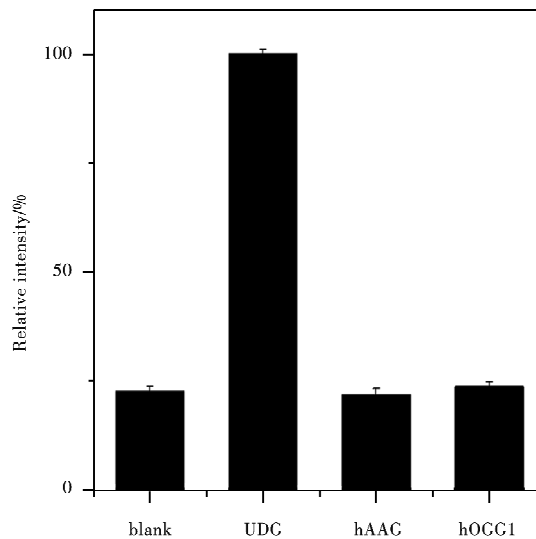


图 6 传感系统对 UDG 及 hAAG、hOGG1 的相对荧光强度响应. 误差棒为三次平行实验结果的标准偏差

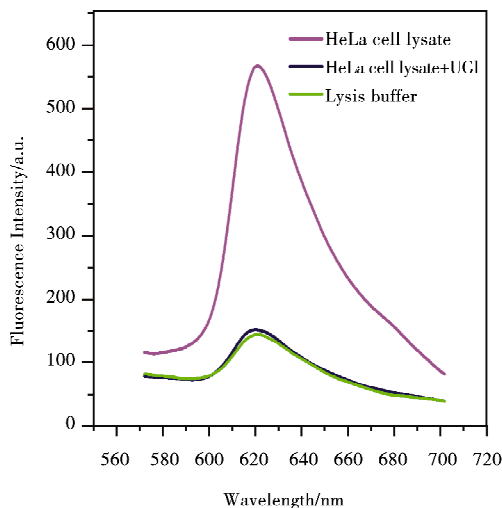


图 7 传感系统对 HeLa 细胞裂解液的荧光光谱响应以及 UGI 对 HeLa 细胞裂解液中 UDG 活性的抑制效果

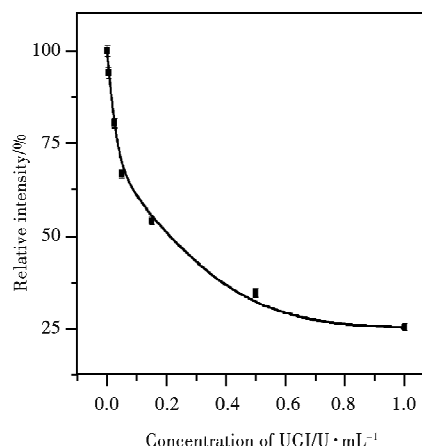


图 8 当存在不同浓度 UGI(0 U/mL, 0.005 0 U/mL, 0.025 U/mL, 0.050 U/mL, 0.15 U/mL, 0.50 U/mL, 1.0 U/mL)时,传感系统的相对荧光强度,误差棒为三次平行实验结果的标准偏差

### 3 结论

总之,建立了一种连接酶反应介导的荧光策略用于高效检测 UDG 的活性.本策略主要基于连接酶反应和信号扩增反应 HCR.起初,两条短的寡核苷酸分别与发夹探针环部序列的一半进行杂交,形成一种含缺口的 DNA 复合物.当 UDG 移除位于缺口 3' 侧的单个 U 碱基之后,产生的 AP 位点作为一种碱基错配能抑制连接酶反应,使位于发夹探针末端的立足点和链迁移区域仍保持彼此邻近.然后,邻近的立足点和链迁移区域能引发 HCR 反应.由于仅移除单个 U 碱基之后产生的 AP 位点即能抑制连接酶反应,因此本策略实现了高效率的信号转导.本策略对 UDG 活性的检测限为 0.000 20 U/mL,这与其它 UDG 活性的检测方法相比更低或相当.另外,本策略能将 UDG 与其它 DNA 糖基化酶很好地区分开.此外,本策略也能用于检测 HeLa 细胞裂解液中的 UDG 活性,并且细胞中其它组分对本策略造成的干扰很小.这些结果表明本策略为生物医学研究和疾病预后提供了一种有潜力的工具用于灵敏定量检测 UDG 的活性.

### 参 考 文 献

- [1] Sancar A. DNA excision repair[J]. *Annu Rev Biochem*, 1996, 65: 43-81.
- [2] Zharkov D O. Base excision DNA repair[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 1544-1565.
- [3] Savva R, McAuley-Iiecht K, Brown T, et al. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase[J]. *Nature*, 1995, 373: 487-493.
- [4] Parikh S S, Putnam C D, Tainer J A. Lessons learned from structural results on uracil-DNA glycosylase[J]. *Mutat Res*, 2000, 460: 183-199.
- [5] Kunkel T A, Erie D A. DNA mismatch repair[J]. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74: 681-710.
- [6] Sousa M M, Krokan H E, Slupphaug G. DNA-uracil and human pathology[J]. *Mol Aspects Med*, 2007, 28: 276-306.
- [7] Seal G, Brech K, Karp S J, et al. Immunological lesions in human uracil DNA glycosylase; association with Bloom syndrome[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1988, 85: 2339-2343.
- [8] Imai K, Slupphaug G, Lee W-I, et al. Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4: 1023-1028.
- [9] Ono T, Edwards S K, Wang S, et al. Monitoring eukaryotic and bacterial UDG repair activity with DNA-multifluorophore sensors[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 127-138.
- [10] Souza-Pinto N C, Harris C C, Bohr V A. p53 functions in the incorporation step in DNA base excision repair in mouse liver mitochondria[J]. *Oncogene*, 2004, 23: 6559-6568.
- [11] Prorok P, Alili D, Saint-Pierre C, et al. Uracil in duplex DNA is a substrate for the nucleotide incision repair pathway in human cells [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2013, 110: 3695-3703.
- [12] McWilliams M A, Anka F H, Balkus K J, et al. Sensitive and selective real-time electrochemical monitoring of DNA repair[J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 54: 541-546.

- [13] Liu X J, Chen M Q, Hou T, et al. Label-free colorimetric assay for base excision repair enzyme activity based on nicking enzyme assisted signal amplification[J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 54: 598-602.
- [14] Nie H, Wang W, Li W, et al. A colorimetric and smartphone readable method for uracil-DNA glycosylase detection based on the target-triggered formation of G-quadruplex[J]. *Analyst*, 2015, 140: 2771-2777.
- [15] Hu D, Huang Z Z, Pu F, et al. A Label-Free, Quadruplex-Based Functional Molecular Beacon (LFG4-MB) for Fluorescence Turn-On Detection of DNA and Nuclease[J]. *Chem Eur J*, 2011, 17: 1635-1641.
- [16] Zhang L L, Zhao J J, Jiang J H, et al. A target-activated autocatalytic DNAzyme amplification strategy for the assay of base excision repair enzyme activity[J]. *Chem Commun*, 2012, 48: 8820-8822.
- [17] Leung K H, He H Z, Ma V P Y, et al. Detection of base excision repair enzyme activity using a luminescent G-quadruplex selective switch-on probe[J]. *Chem Commun*, 2013, 49: 5630-5632.
- [18] Lee C Y, Park K S, Park H G. A fluorescent G-quadruplex probe for the assay of base excision repair enzyme activity[J]. *Chem Commun*, 2015, 51: 13744-13747.
- [19] Lu Y J, Liu D P, Deng Q, et al. Sensitive and selective detection of uracil-DNA glycosylase activity with a new pyridinium luminescent switch-on molecular probe[J]. *Analyst*, 2015, 140: 5998-6004.
- [20] Wu Y S, Wang L, Zhu J, et al. A DNA machine-based fluorescence amplification strategy for sensitive detection of uracil-DNA glycosylase activity[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 68: 654-659.
- [21] Wabuyele M B, Farquar H, Stryjewski W, et al. Approaching real-time molecular diagnostics: single-pair fluorescence resonance energy transfer (spFRET) detection for the analysis of low abundant point mutations in K-ras oncogenes[J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 6937-6945.
- [22] Li J, Chu X, Liu Y, et al. A colorimetric method for point mutation detection using high-fidelity DNA ligase[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: e168.
- [23] Li J, Deng T, Chu X, et al. Rolling circle amplification combined with gold nanoparticle aggregates for highly sensitive identification of single-nucleotide polymorphisms[J]. *Anal Chem*, 2010, 82: 2811-2816.
- [24] Huang Y, Zhang Y L, Xu X, et al. Highly specific and sensitive electrochemical genotyping via gap ligation reaction and surface hybridization detection[J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 2478-2480.
- [25] Wang H Q, Liu W Y, Wu Z, et al. Homogeneous label-free genotyping of single nucleotide polymorphism using ligation-mediated strand displacement amplification with DNAzyme-based chemiluminescence detection[J]. *Anal Chem*, 2011, 83: 1883-1889.
- [26] Xu Q, Huang S Q, Ma F, et al. Controllable mismatched ligation for bioluminescence screening of known and unknown mutations[J]. *Anal Chem*, 2016, 88: 2431-2439.
- [27] Fang S, Chen L, Zhao M P. Unimolecular chemically modified DNA fluorescent probe for one-step quantitative measurement of the activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 in biological samples[J]. *Anal Chem*, 2015, 87: 11952-11956.

## A Ligase Reaction-mediated Fluorescent Strategy for Highly Efficient Assaying of Uracil-DNA Glycosylase Activity

WU Yu-shu<sup>1</sup> WU Min<sup>2</sup> LIU Min<sup>1</sup>

(1. Institute of BioPharmaceutical Research, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China; 2. Liaocheng People's Hospital, Liaocheng 252000, China)

**Abstract** Objective: Sensitive detection of uracil-DNA glycosylase (UDG) activity is beneficial for biomedical study and disease prognosis. Here, a ligase reaction-mediated fluorescent strategy was constructed for highly efficient detection of UDG activity. Methods: In the strategy, two short oligonucleotides were separately hybridized to one-half of the loop of a hairpin probe to form a DNA complex with a nick. Under the action of UDG, only one uracil base in the hairpin-loop was removed to generate apurinic/apyrimidinic (AP) site. Accordingly, the AP site locating at the 3'-side of the nick could inhibit the ligase reaction, leaving the toehold and branch-migration domains in the ends of hairpin probe are still adjacent. Subsequently, the adjacent toehold and branch-migration domains could initiate the hybridization chain reaction (HCR), generating numerous G-quadruplex (G4) structures. Finally, the G4 structures could interact with N-methyl-mesoporphyrin IX (NMM) to generate enhanced fluorescent signal. Results: The detection limit was as low as 0.000 20 U/mL for UDG. In addition, UDG could be well distinguished from other DNA glycosylases. Conclusion: This strategy provided a promising tool for sensitive quantification of UDG activity in biomedical study and disease prognosis.

**Key words** ligase reaction; uracil-DNA glycosylase; only one uracil base; apurinic/apyrimidinic site; mismatched base