

# 基于外切酶驱动策略构建荧光减弱式 T4 PNK 免标记传感器

刘业玲,袁 琿,刘炳鑫,黄圣荣,周冰倩,李 霞,薛庆旺

(聊城大学 化学化工学院,山东 聊城 252059)

**摘 要** T4 多核苷酸激酶(T4 polynucleotide kinase, T4 PNK)是 5'-激酶家族的主要成员,可以将三磷酸腺苷(ATP)的  $\gamma$  位点磷酸基团转移到单链或双链 DNA/RNA、寡核苷酸或具有 3'-磷酸基团的单核苷酸的 5'-羟基进行催化。核酸中 5'-羟基末端的磷酸化在 DNA 重组、复制和损伤中起着重要作用,与恶性疾病的生成发展密切相关。因此构建一种灵敏的 T4 PNK 的检测方法对于许多疾病早期治疗具有重要意义。本文提出基于  $\lambda$  核酸外切酶驱动荧光减弱式检测 T4 PNK 活性的策略,拟利用 T4 PNK 可将 DNA 的 5'端由羟基化变为磷酸化的特点,磷酸化 DNA 能被  $\lambda$  核酸外切酶( $\lambda$ -exonuclease)特异性识别和切割的特点降解底物双链 DNA,导致与荧光染料 SG I 键合位点急剧减少,荧光信号输出由“on”模式切换到“off”模式,荧光强度大大减少。因此,可利用荧光减弱的程度来实现对 T4 PNK 的免标记荧光定量检测。

**关键词** T4 多核苷酸激酶;外切酶驱动;免标记荧光

**中图分类号** O656

**文献标识码** A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



## Label-free Sensing of T4 PNK Using Exoenzyme-Driven Fluorescence Attenuation Strategy

LIU Yeling, YUAN Hui, LIU Bingxin, HUANG Shengrong,  
ZHOU Bingqian, LI Xia, XUE Qingwang

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

**Abstract** T4 polynucleotide kinase (T4 PNK) is a major member of the 5'-kinase family and can transfer the  $\gamma$ -site phosphate group of adenosine triphosphate to the 5'-hydroxyl group of single-stranded and double-stranded DNA for phosphorylation. The phosphorylation of 5'-hydroxyl terminus in nucleic acids plays an important role in DNA recombination, replication and damage, and is closely related to the formation and development of malignant diseases. Therefore, the construction of a sensitive T4 PNK detection method is of great significance for the early treatment of many diseases. Herein, we proposed a strategy for detecting T4 PNK activity based on  $\lambda$ -exonuclease driven fluorescence signal reduction and labeling-free sensor. Firstly, the T4 PNK can be used to change the 5' end of DNA from hydroxylation to phosphorylation. Secondly, the phosphorylated DNA can be degraded by  $\lambda$ -exonuclease specific recognition and cleavage.

收稿日期:2021-07-07

基金项目:国家自然科学基金项目(21675072)资助

通讯作者:薛庆旺,男,汉族,博士,副教授,研究方向:生物传感与食品分析,E-mail:xueqingwang1983@163.com。

As a result, the binding sites with the fluorescent dye SG I were sharply reduced. The output of the fluorescent signal was switched from the “on” mode to the “off” mode, and the fluorescence intensity was greatly reduced. Therefore, the degree of fluorescence reduction can be used to realize the label-free fluorescence quantitative detection of T4 PNK.

**Key words** T4 polynucleotide kinase; exonuclease driven; labeling-free fluorescence

## 0 引言

T4 多核苷酸激酶(T4 PNK)是 PNK 家族的主要成员,属于 DNA 修复酶,其功能是将三磷酸腺苷(ATP)的  $\gamma$  位转移到核酸的 5'-OH 端,以催化核酸的磷酸化过程<sup>[1-3]</sup>。T4 PNK 在 DNA 损伤修复和维持基因组稳定性中起关键作用,许多研究证明:T4 PNK 活性的异常与人类多种恶性疾病密切相关<sup>[4-6]</sup>。因此 T4 PNK 活性的灵敏检测对临床诊断和疾病治疗至关重要。

目前,对 T4 PNK 活性分析检测传统方式有放射性同位素<sup>32</sup>P 标记<sup>[7]</sup>,聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[8]</sup>等方式,但这些检测方法存在操作复杂,灵敏度低等不足的缺点。为此,具有更高灵敏度的电化学<sup>[9]</sup>、比色<sup>[10]</sup>、荧光<sup>[11]</sup>检测方法陆续被开发。其中,通过荧光发射强度为信号的荧光分析方法以其简单、快速、信号转导模式灵活而被科研工作者所青睐<sup>[12]</sup>。核酸探针基于它的碱基互补配对原则以及良好的生物相容性备受关注。在常用的荧光检测体系中,大多数报道的信号输出探针以荧光标记型核酸探针为主<sup>[11,13]</sup>,但将荧光基团共价键合到 DNA 末端的操作过程复杂,需要专业的技术人员合成并对其进行复杂的 HPLC 纯化流程,实验成本较高,因此限制了标记型探针的广泛应用。为此,各种成本低廉的免标记荧光探针被逐渐开发。通过荧光染料分子如:硫黄素 T(ThT)<sup>[14]</sup>、锌卟啉(ZnPPIX)、SYBR Green I(SG I)<sup>[15]</sup>,其中,鉴于游离态 SYBR Green I(SG I)荧光染料分子几乎不产生荧光,并且对 DNA 序列没有要求,当与双链 DNA 特异性结合后激活出强烈稳定免标记荧光信号,因此 DNA-SG 免标记信号输出探针逐渐引起研究人员的广泛关注。虽然 DNA-SG I 复合物为低背景、免标记荧光分析提供了新契机,但所涉及的基底探针以双链 DNA 或发夹 DNA 为主,双链部分处于未封闭状态,即使在靶标不存在情况,仍能产生较高的背景信号。因此构建一种低背景的免标记荧光方法,对于提高 T4 PNK 活性测定灵敏度具有重要意义。

在这里,我们提出了基于  $\lambda$  核酸外切酶驱动荧光减弱式检测 T4 PNK 活性的策略。首先,我们采用了两种类型的 DNA 探针 sg 和 msg。二者可以杂交形成无任何标记的双链 DNA(dsDNA)。在没有 T4 PNK 的存在下,加入  $\lambda$  核酸外切酶( $\lambda$  exo)和核酸外切酶 I(Exo I)之后不会对底物 dsDNA 产生影响,加入与 dsDNA 特定结合的荧光染料 SG I 后产生较强荧光;然而在靶标 T4 PNK 存在的情况下,dsDNA 的 5'端由羟基变为磷酸基团,而  $\lambda$  exo 催化 dsDNA 分子从 5'-P 末端进行逐步的水解释放出 5'-单核苷酸。但不能降解 5'-OH 末端。之后加入 Exo I 持续切割另一条单链 sg,体系中的 dsDNA 减少,导致与荧光染料 SG I 键合位点减少,其荧光强度被大大减少。因此,可以利用荧光减弱的程度来实现对 T4 PNK 的免标记荧光检测。

## 1 实验部分

### 1.1 实验药品

T4 多核苷酸激酶、 $\lambda$  核酸外切酶、核酸外切酶 I、三磷酸腺苷、RNase-free water、牛血清白蛋白(BSA)、SYBR Green I(SG I)、上样缓冲液>Loading Buffer)、凝胶核酸染料 Super Gelblue 均购买来自 New England Biolabs 公司(北京)。脱氧核苷酸溶液混合物(dNTPs)、三磷酸腺苷(ATP)和所有 HPLC 纯化的寡核苷酸序列均由生工生物工程股份有限公司(上海,中国)获得;所涉及的寡核苷酸序列如下:具有 5'-OH-TAA TAC GAC TCA CTA TA GGG TAA TTT CTA CTA AGT GTA GAT GAG AAG TCA TCT AAT AAG GCG-OH -3'的序列的 DNA 探针(表示为 DNA-sg);具有 5'-OH-CGC CTT ATT AGA TGA CTT CTC

ATC TAC ACT TAG TAG AAA TTA CCC TAT AGT GAG TCG TAT TA-OH-3' 序列的引物探针(表示为 DNA-msg); 其他化学试剂(分析纯)均购自标准试剂提供商。实验中所用水均为高压灭菌过的高纯水 ( $\geq 18.2 \text{ M}\Omega$ )

## 1.2 仪器

Milli-Q 超纯水处理系统(美国 Millipore); 立式压力蒸汽灭菌器(LDZX-50KBS, 上海申安医疗器械厂); 真空干燥箱(DZ-ZA 型, 天津市泰斯特仪器有限公司); 干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司); 凝胶成像仪(Bio-Rad, Gel Doc XR+, 美国)、电泳仪(DYY-6C 型, 北京六一仪器厂)。所有荧光强度的测量均使用 F-7000 荧光分光光度计(日本, 日立), 激发波长设定为 490 nm, 发射波长设定为 510~650 nm, 激发狭缝为 5 nm, 发射狭缝为 10 nm, PMT 检测电压为 650 V。

## 1.3 实验步骤

将两种类型的 DNA 探针 sg 和 msg 于 37 °C 下在 1X T4 PNK Buffer 中孵育 2 h 形成 dsDNA(浓度为 2.1  $\mu\text{mol/L}$ )。取 5  $\mu\text{L}$  dsDNA 之后加入 3  $\mu\text{L}$  10 mmol/L ATP 和一定量的 T4 PNK 于 37 °C 下在 1X T4 PNK Buffer 中孵育 2 h。自然冷却至室温后, 分别加入 1  $\mu\text{L}$  5 U  $\lambda\text{exo}$ , 1.5  $\mu\text{L}$   $\lambda\text{exo}$  Buffer, 0.5  $\mu\text{L}$  20 U Exo I 和 1.5  $\mu\text{L}$  Exo I Buffer, 在 37 °C 下孵育 2 h, 80 °C 下反应 20 min 对上述酶灭活。自然冷却至室温后加入 10  $\mu\text{L}$  SG I 在 37 °C 下避光反应 30 min。自然冷却至室温, 加水稀释到 100  $\mu\text{L}$  进行荧光光谱表征。最后, 用 12% 非变性聚丙烯酰胺(PAGE)凝胶电泳分析产物, 其条件在 1X TBE 缓冲液(9 mmol/L Tris-HCl, pH 7.90, 9 mmol/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.2 mmol/L EDTA), 20 °C、120 V 恒定电压下进行。获得的凝胶用 Super Gelblue 染色并使用凝胶成像仪拍摄。

## 1.4 实际样品检测

为评估所提出的方法在实际样品中的应用效果, 对细胞裂解液样品中的 T4 PNK 进行了检测分析。所用细胞裂解液为 HeLa 细胞的裂解液。在分析之前, 将细胞裂解液样品稀释 1000 倍, 之后, 往细胞裂解液样本中分别加入一定量的 T4 PNK 进行分析, 分析步骤与上述过程相同。

# 2 结果与讨论

## 2.1 实验基本原理

本文所提出的外切酶驱动的荧光减弱式 T4 PNK 传感器原理如图 1 所示。在提出的检测策略中, 以两种类型的 DNA 探针(sg 和 msg)杂交形成无任何标记的双链 DNA(dsDNA)作为基底探针单元。由于 SG I 在游离态或与单链 DNA(ssDNA)键合时荧光信号非常弱, 但当它嵌入到双链 DNA 时荧光信号显著增强。当 T4 PNK 不存在时, msg 探针的 5'-OH 末端未被磷酸化保持完整的 5'-OH 末端。随后加入的  $\lambda\text{exo}$  和 Exo I 无法降解 dsDNA。因此, 当加入与 dsDNA 结合的荧光染料 SG I 后产生较强荧光。相反, 在靶标 T4 PNK 存在的情况下, msg 探针的 5' 末端被磷酸化, 并产生具有  $\lambda\text{exo}$  特定的识别位点-磷酸基团。因此,  $\lambda\text{exo}$  催化 dsDNA 分子从 5'-P 末端进行逐步的水解释放出 5'-单核苷酸, 后续加入的 Exo I 继续降解单链 DNA-sg, 体系中的 dsDNA 减少导致与荧光染料 SG I 键合位点减少, 其荧光强度被大大减弱。因此, 利用荧光减弱的程度可实现对 T4 PNK 的免标记荧光检测。

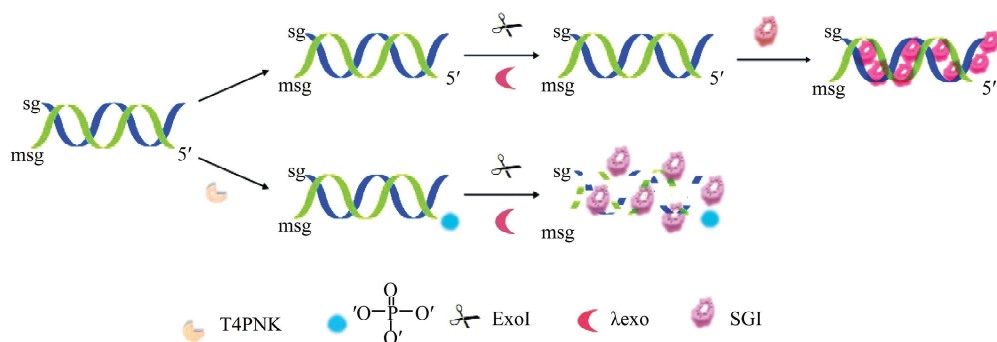


图 1 基于外切酶驱动的荧光减弱式 T4 PNK 传感器原理图

## 2.2 可行性验证

为验证本工作所提出的 T4 PNK 检测策略的可行性,首先进行了荧光光谱分析。如图 2 所示,在 T4 PNK 不存在的情况下,系统显示出非常强的荧光信号(图 2,曲线 *a*)。这表明: $\lambda_{\text{exo}}$  对 5'-OH 末端基团不起作用,无法产生 ssDNA,Exo I 不消化 dsDNA,dsDNA 仍然保持完整,因此加入 SG I 后嵌入到 dsDNA 时荧光信号显著增强。在 T4 PNK 存在的对照体系中,系统显示出微弱的荧光信号(图 2,曲线 *b*)。这是因为:5'-OH 末端被磷酸化,并产生具有  $\lambda_{\text{exo}}$  特定的识别位点-磷酸基团。因此, $\lambda_{\text{exo}}$  催化双链 DNA 分子从 5'-P 末端进行逐步的水解释放出 5'-单核苷酸,生成单链 DNA-sg,加入的 Exo I 继续降解单链 DNA-sg,体系中的 dsDNA 减少导致与荧光染料 SG I 键合位点减少,其荧光强度被大大减弱。综合上述结果表明,通过荧光光谱表征证明了本检测方案具有良好的可行性。

因此,为了进一步验证所提出的基于外切酶驱动的荧光减弱式传感器的可行性,进行了非变性 PAGE 实验。泳道 1 和泳道 2 分别对应 sg 与 msg,因此只有单一条带作为参与反应的初始链存在,二者可以通过碱基互补配对原则进行杂交生成 dsDNA(泳道 3),因 sg 与 msg 的杂交产物,分子量大于 sg 与 msg 单链,因此位置高于泳道 1 和泳道 2,泳道 3 表明 sg 与 msg 成功杂交形成 dsDNA 分子量增加,因此出现一条位置靠上的新的条带。在目标 T4 PNK 存在时,dsDNA 的 5'-OH 末端被磷酸化,产生具有  $\lambda_{\text{exo}}$  特定的识别位点-磷酸基团,在  $\lambda_{\text{exo}}$  的作用下被识别降解,同时产生可被 Exo I 识别降解的 DNA 链,最后在 Exo I 作用下降解 DNA 单链,导致体系中的 dsDNA 被降解,条带明显变浅(泳道 5、6);而在没有 T4 PNK 存在的情况下,dsDNA 的 5'-OH 末端保持不变, $\lambda_{\text{exo}}$  与 Exo I 无法进行作用,dsDNA 保持不变(泳道 4)。非变性 PAGE 结果进一步证实了所提出的基于外切酶驱动的荧光减弱式传感器是可行性。

## 2.3 条件优化

磷酸化反应时间和外切酶对磷酸化 DNA 的酶切效果会影响传感系统的荧光强度。为探索该方法的最佳反应条件,我们利用单因素变量法对  $\lambda_{\text{exo}}$ 、Exo I 和磷酸化反应时间分别进行了优化。如图 4(a)所示,荧光强度的变化随着  $\lambda_{\text{exo}}$  含量的增加,荧光强度不断减弱。当达到 4 U 时,荧光强度降至最低达到平台。在平台期, $\lambda_{\text{exo}}$  的最佳用量记录为 4 U。如图 4(c)所示,随着 Exo I 的不断增多,荧光强度出现一个低谷,此时的 Exo I 用量为 15 U。因此,将 Exo I 的最佳反应用量选择 15 U。T4 PNK 可以使 dsDNA 的 5'端由羟基化变为磷酸化,T4 PNK 与 dsDNA 作用时间的长短决定体系中 dsDNA 磷酸化的程度。随着 T4 PNK 与 dsDNA 的作用时间的延长,荧光信号发生变化。当 T4 PNK 与 dsDNA 的作用时间为 40 min 时,荧光减弱的程度最多。最终,选择 40 min 作为最佳反应时间(图 4(b))。因此根据图 4 的实验结果,最终选择  $\lambda_{\text{exo}}$  的用量、Exo I 的用量和磷酸化反应时间分别为 4 U、15 U

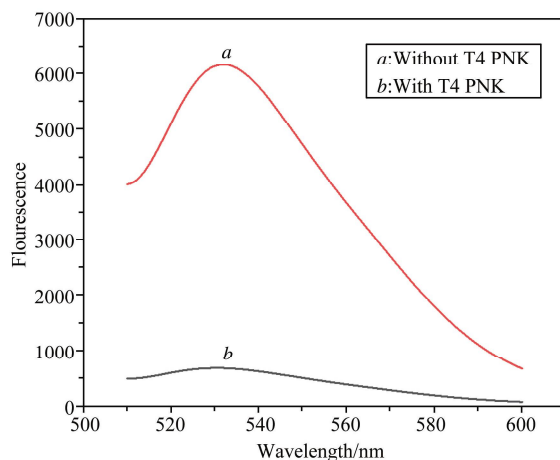


图 2 不同条件下的荧光光谱验证所构筑的 T4 PNK 传感器的可行性(曲线 *a*)在 T4 PNK( $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )存在下;(曲线 *b*)在没有 T4 PNK 存在下; $\lambda_{\text{exo}}$ , $50 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; Exo I, $200 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;SG I( $10\text{X}$ ), $10 \mu\text{L}$

lanc	1	2	3	4	5	6
sg	+	-	-	-	-	-
msg	-	+	-	-	-	-
dsDNA	-	-	+	+	+	+
$10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ T4 PNK	-	-	-	-	-	+
$5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ T4 PNK	-	-	-	-	+	-
$\lambda_{\text{exo}}$	-	-	-	+	+	+
Exo I	-	-	-	+	+	+
RNase-free Water	-	-	-	-	-	-

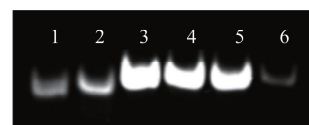


图 3 聚丙烯酰胺凝胶电泳表征图

和 40 min 作为反应体系的最佳反应条件。

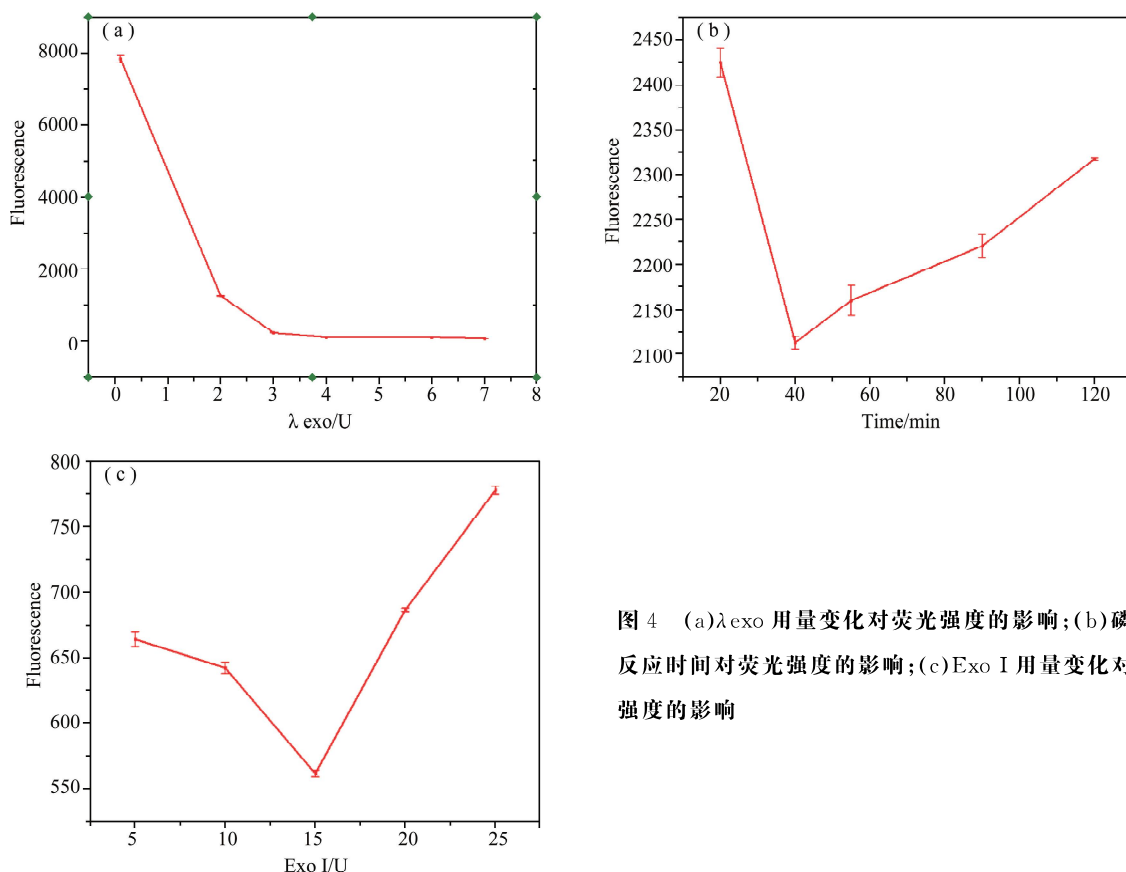


图 4 (a)  $\lambda_{\text{exo}}$  用量变化对荧光强度的影响; (b) 磷酸化反应时间对荧光强度的影响; (c) Exo I 用量变化对荧光强度的影响

## 2.4 传感器的线性范围分析

在上述最佳反应条件下,我们评估了本工作提出的基于外切酶驱动的荧光减弱式传感器对 T4 PNK 灵敏检测的灵敏度。如图 5(a)和(b)所示,发现荧光强度与 T4 PNK 的浓度在  $0.01 \sim 5.00 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  的范围内线性良好, T4 PNK 浓度的线性函数为  $\Delta F = 3265.29 \times \log C + 5691.71$  ( $C$  为 T4 PNK 的浓度;  $R^2 = 0.99945$ ), 检测下限为  $0.0173 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 所得的检测限优于和跟之前文献报道的结果相当。

表 1 不同方法检测 T4 PNK 酶活性的比较

signal readout	LOD/ ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	linear range/ ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	Ref.
fluorescence	0.0089	0.01-5.0	[13]
dark field microscope	0.0058	0.01-1.0	[16]
fluorescence	0.0067	0.01-0.3	[17]
linear sweep voltammetry	0.0100	0.1-20.0	[18]
fluorescence	0.0173	0.01-5.0	this work

## 2.5 传感选择性考察

为了评估 T4 PNK 传感器的选择性,在相同的实验条件下,我们研究了灭活后的 T4 PNK,牛血清白蛋白(BSA)、Klenow 片段聚合酶(KFP)等几种非特异性蛋白对体系的干扰。实验结果如图 6 所示,在 T4 PNK 存在的情况下,荧光强度发生较明显的降低。而在灭活后的 T4 PNK 存在时,荧光强度没有明显的下降,因为体系中 dsDNA 没有磷酸化反应的发生,无法触发之后的切割反应,导致体系中存在较多的 dsDNA 与 SG I 相互作用,发出强烈的荧光信号。同样,在 BSA 和 KFP 存在时,也未检测到明显的荧光信号降低。这一结果表明该方法对 T4 PNK 检测具有良好的选择性。

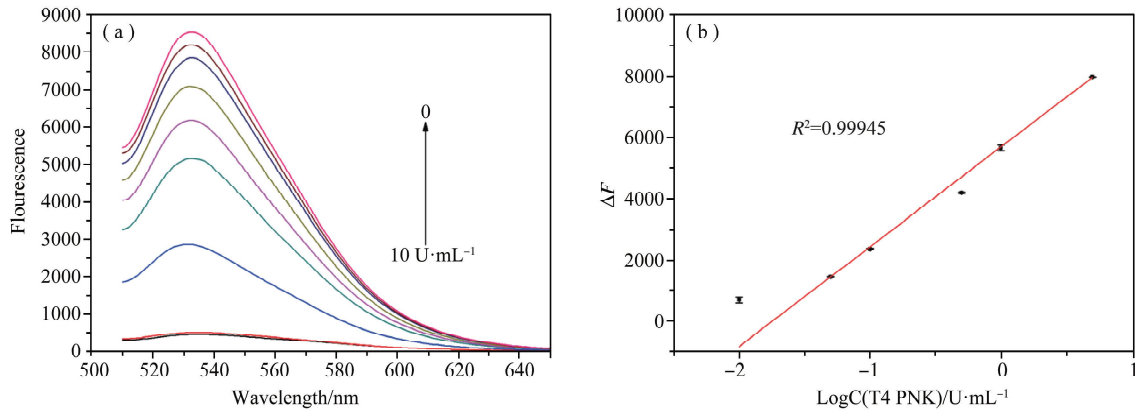


图 5 (a) 不同浓度的 T4 PNK 所对应的荧光强度-波长曲线, T4 PNK 浓度由  $0 \sim 10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;

(b) 荧光强度与 T4 PNK 浓度的线性范围关系图

## 2.6 实际样品分析

为了证明该传感方法在实际样品测定中的应用前景,对细胞裂解液样品中的 T4 PNK 进行了研究。结果表明回收率为 104.7%,并且相应的 RSD 值小于 7.5%。因此,该方法在复杂的生物样品中可以很好地工作,在实际样品分析中具有很大的应用潜力。

## 3 结论

开发了一种新的基于外切酶驱动的荧光减弱式传感器对 T4 PNK 的灵敏检测。在我们的策略中,利用  $\lambda_{\text{exo}}$ 、Exo I 的切割反应,成功地建立了一种无标记、灵敏的荧光测定 T4 PNK 活性的方法。该方案显示出对 T4 PNK 检测的良好分析性能,具有较高的灵敏度、特异性和可重复性。在最佳条件下,测得线性范围在  $0.01 \sim 5.00 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。并且与其他基于荧光的策略相比,所提出的方法具有以下优点:它不需要使用荧光染料或用荧光团、淬灭剂对其标记,使得 DNA 探针的设计具有成本效益且简单;并且该方法具有普适性,对任何序列的 DNA 都适用。此策略为探测 T4 PNK 活动提供了一种非常简便的方法,有望应用于生物医学研究。

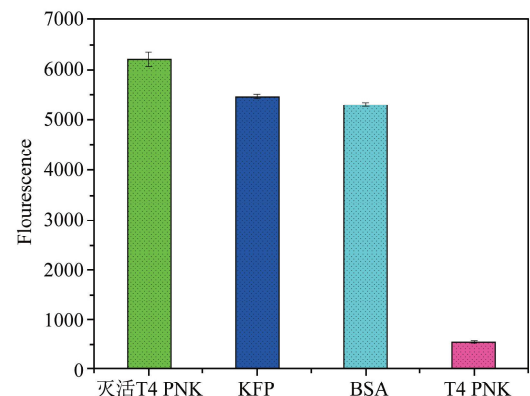


图 6 基于所构筑的 T4 PNK 传感器选择性

考察(灭活 T4 PNK、KFP、BSA、T4 PNK 浓度均为  $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

## 参 考 文 献

- [1] SHI Z L, ZHANG X F, CHENG R, et al. A label-free cyclic assembly of G-quadruplex nanowires for cascade amplification detection of T4 polynucleotide kinase activity and inhibition[J]. Analyst, 2015, 14:6124-6130.
- [2] WANG L K, LIMA C D, SHUMAN S. Structure and mechanism of T4 polynucleotide kinase: an RNA repair enzyme[J]. The EMBO Journal, 2002, 21:3873-3880.
- [3] ZHAO H Z, LIU Q, LIU M, et al. Label-free fluorescent assay of T4 polynucleotide kinase phosphatase activity based on G-quadruplex-thioflavin T complex [J]. Talanta, 2017, 165:653-658.
- [4] LI X, XU X W, SONG J, et al. Sensitive detection of T4 polynucleotide kinase activity based on multifunctional magnetic probes and polymerization nicking reactions mediated hyperbranched rolling circle amplification[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 91:631-636.
- [5] LIN L, LIU Y, YAN J, et al. Sensitive nanochannel biosensor for T4 polynucleotide kinase activity and inhibition detection[J]. Analytical Chemistry, 2013, 85:334-340.
- [6] LIN L, LIU Y, ZHAO X, LI J H. Sensitive and rapid screening of T4 polynucleotide kinase activity and inhibition based on coupled exo-

- nuclease reaction and graphene oxide platform[J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83:8396-8402.
- [7] SHARMA S, DOHERTY K M, BROSH, R M. Mechanisms of RecQ helicases in pathways of DNA metabolism and maintenance of genomic stability[J]. *Biochemical Journal*, 2006, 398: 319-337.
- [8] PHILLIPS D H, ARLT V M. The 32P-postlabeling assay for DNA adducts[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2: 2772-2781.
- [9] ZHANG Y L, FANG X, ZHU Z Y, et al. A sensitive electrochemical assay for T4 polynucleotide kinase activity based on titanium dioxide nanotubes and a rolling circle amplification strategy[J]. *RSC Advances*, 2018, 8: 38436-38444.
- [10] LIN L, SHI D M, LI Q F, WANG G F, ZHANG X J. Detection of T4 polynucleotide kinase based on a MnO<sub>2</sub> nanosheet-3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) colorimetric system[J]. *Analytical Methods*, 2016, 8: 4119-4126.
- [11] LI J L, MA J H, ZHANG Y C, et al. A fluorometric method for determination of the activity of T4 polynucleotide kinase by using a DNA-templated silver nanocluster probe[J]. *Microchimica Acta*, 2019, 186: 48-54.
- [12] WANG D, CHAI Y Q, YUAN Y L, et al. Precise regulation of enzyme cascade catalytic efficiency with DNA tetrahedron as scaffold for ultrasensitive electrochemical detection of DNA[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91: 3561-3566.
- [13] CHAI Y Y, CHENG X, XU G H, et al. A nanoplatform based on metal-organic frameworks and coupled exonuclease reaction for the fluorimetric determination of T4 polynucleotide kinase activity and inhibition[J]. *Microchimica Acta*, 2020, 187: 243-250.
- [14] JING S H, LIU Q, JIN Y, LI B X. Dimeric G-Quadruplex: an effective nucleic acid scaffold for lighting up thioflavin T[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93: 1333-1341.
- [15] YIN F, LIU L Q, SUN X, et al. A facile deoxyuridine/biotin-modified molecular beacon for simultaneous detection of proteins and nucleic acids via a label-free and background-eliminated fluorescence assay[J]. *Analyst*, 2019, 144: 5504-5510.
- [16] JIN T, ZHANG J W, ZHAO Y F, et al. Magnetic bead-gold nanoparticle hybrids probe based on optically countable gold nanoparticles with dark-field microscope for T4 polynucleotide kinase activity assay[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 150: 111936-11942.
- [17] FENG C, WANG Z H, CHEN T S, et al. A dual-enzyme-assisted three-dimensional DNA walking machine using T4 polynucleotide kinase as activators and application in polynucleotide kinase assays[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90: 2810-2815.
- [18] JIANG Y, CUI J J, ZHANG T, et al. Electrochemical detection of T4 polynucleotide kinase based on target-assisted ligation reaction coupled with silver nanoparticles[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1085: 85-90.