**肿瘤相关酶活性的检测新方法研究**

作者：陈思忆[[1]](#footnote-0) 谢作维[[2]](#footnote-1) 赵子鑫2 易钢2

**摘要**

**研究背景及目的：**

DNA损伤修复机制作为保障基因组稳定性以及实现DNA精准复制中的关键程序，如果其出现紊乱会促使恶性肿瘤的发生发展。皮瓣内切酶1（Flap endonuclease 1，FEN1）因具有特异性识别并切割 DNA代谢途径中产生的5’端分支DNA链的特点，成为DNA代谢途径中的关键酶。因此，FEN1的相关分析为肿瘤研究和化疗药物的发展提供了不可估量的支持。然而，很少有分析技术能够实现FEN1活性的灵敏，方便、快捷检测。在此，我们构建了一种双翼开关纳米器件（Double-wing switch nanodevice，DWSN）介导的引物交换反应（Primer exchange reaction，PER），用于快速和无标记地精准定量 FEN1 活性。

**方法：**

靶标FEN1通过识别DWSN上的三碱基错配位点，切割并释放5’-分支DNA链。所释放的DNA链可作为引物触发PER而产生大量不同长度的端粒重复片段。伴随着荧光染料硫黄素T（ThT）的插入，实现了酶活性的转化和荧光信号的显著放大。荧光结果可通过荧光分光光度计进行记录。

**结果：**

（1）12%的 Native-PAGE观察到不同分子量的显著连续条带以及不同条件的荧光响应均可证明该策略具有可行性。

（2）在最优条件下，该策略所记录的荧光信号与FEN1活性在0.001U ~ 8U范围内呈线性关系(Y = 302.72 × [FEN1] + 51.34, R2 = 0.997)。根据S/N = 3的规则，检测限(LOD)为0.55 mU。

（3）该策略不受生物代谢途径中其他生物酶的干扰，仅在FEN1存在时检测出强烈的荧光信号。

（4）根据金精三羧酸（ATA）浓度与FEN1的相对活性之间的关系，计算出ATA的半抑制浓度（IC50）为0.19μM。

（5）该方法检测到肿瘤细胞（A549、HepG2、MCF-7）中FEN1的水平明显高于L02。并且，FEN1在细胞核中表达更活跃。

（6）通过血清加标回收实验测得FEN1样品的回收率在98.18% ~102.78%之间，相对标准偏差在0.71% ~3.43%之间，满足了分析方法的要求。

**结论：**

本研究打破了传统单个位点鉴定的局限性，表现出令人满意的灵敏度和特异性。此外，该策略可用于FEN1相关抑制剂的体外筛选和评估，定量检测人癌细胞中 FEN1 的活性，为肿瘤的早期筛查和靶向耐多药细胞的药物开发提供新的灵感。

1. 四川大学华西医院输血科 610044 [↑](#footnote-ref-0)
2. 重庆医科大学检验医学院 400016 [↑](#footnote-ref-1)