

新型量子点修饰分子灯塔探针 及其作为 DNA 传感器应用

代 昭¹, 张纪梅¹, 许世超¹, 郭 宁¹, 尹雪莹¹, 孙 波²

(1. 天津工业大学材料与化工学院 改性与功能纤维天津市重点实验室, 天津 300160;
2. 南开大学化学学院, 天津 300071)

摘要:以 CdTe 量子点为能量供体, BHQ-1 为能量受体构建了一种基于能量共振转移原理(FRET)的分子灯塔探针。能量供体与受体分别连接于分子灯塔探针 DNA 链的两端, 由于探针的自杂交作用可将能量供体与受体之间的距离控制在 1~10 nm 之间, 并且供体的荧光发射光谱与受体的紫外吸收光谱存在一定程度的重叠, 因此满足 FRET 原理。此探针体系可以作为 DNA 传感器较好的区分与探针碱基序列完全匹配的 DNA、单碱基错配的 DNA、完全不匹配的 DNA。

关键词: CdTe 量子点; 分子灯塔探针; 荧光共振能量转移; DNA 传感器

中图分类号: O657

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2008)03-0047-03

Preparation of a novel molecular beacon and its application as DNA biosensor

DAI Zhao¹, ZHANG Ji-mei¹, XU Shi-chao¹, GUO Ning¹, YIN Xue-ying¹, SUN Bo²

(1. Tianjin Key Laboratory of Fiber Modification and Functional Fiber, School of Material Science and Chemical Engineering, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300160, China; 2. School of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: A novel molecular beacons (MBs) system based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) from CdTe quantum dots (QDs) donors to the Black Hole Quencher™ dyes (BHQ-1) as energy acceptor is designed. CdTe QDs as energy donors are prepared in water and linked to 5'-NH₂-DNA-BHQ-1 when 1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodi-imide hydrochloride (EDC) exists. The self-hybridization exists in the stem part of probe DNA because the base pairs of the stem part are complementary, and this results in the FRET process occurring between acceptor and donor because the energy acceptor and donor are close enough just about 1-10 nm and the emission spectra of donors and the absorption spectra of acceptors have a certain degree of overlap. The DNA detection results indicate that this DNA biosensors system can distinguish complementary target DNA, a mismatching base-pair DNA and non-complementary DNA sequence.

Key words: CdTe quantum dots; molecular beacons; fluorescence resonance energy transfer; DNA biosensor

分子灯塔探针(也称分子信标)是一种基于荧光共振能量转移原理(FRET)的、由寡聚核酸形成的发夹型分子。它包括一个环-干(loop-stem)结构,其中环由与靶分子(目标 DNA)互补的核酸碱基序列组成,干为两列互补的并杂交的碱基序列构成。基于分子灯塔探针的生物传感器可以用于 DNA 碱基序列检测、环境监测、药物研究、法医鉴定及食品检验等多方面。FRET 体系在以往的研究和商业化产品中多采用传统有机染料作为供受体对,有机染料在大多数情况下,由于它们的激发光谱都较窄,所以很难同时激发多种组分,而其荧光光谱又较宽,分布不对称,给区分不同探针分子的荧光带来困难,因此要

同时检测多种组分较为困难^[1]。同时不同波长激发之间的重叠也会使各个能量给体和受体之间的能量转移变得不明显,增加数据分析的复杂性^[2]。有机染料的光化学稳定性也较差,光漂白与光解作用使每个染料探针能够发出的荧光光子平均数量不可能太多,光解产物又往往会生物体产生不利的影响。因此选择新的材料作为能量供受体构建荧光检测体系是这一领域的发展方向。半导体纳米晶体(亦称为量子点, QDs)拥有独特的光、电效应,因此成为一类比较特殊的荧光纳米材料,近年来尤其是在生物与医学领域吸引了大量的科学家进行探索^[3-5]。与传统染料相比,量子点有以下几个显著的特点:荧光

收稿日期: 2007-11-29

基金项目: 天津市自然科学基金项目(06TJJC14400, 07JCYBJC15900); 天津工业大学青年教师基金(029624)资助项目

作者简介: 代昭(1975-), 男, 博士, 副教授, 主要从事功能生物与纳米材料以及精细化工方面的研究, daizhao@gmail.com; 张纪梅(1958-), 女, 博士, 教授, 主要从事生物与纳米技术研究, 通讯联系人, 022-24528127, zjimei@gmail.com; 孙波(1955-), 男, 博士, 教授, 主要从事发光材料研究, sunb@nankai.edu.cn。

颜色强烈地依赖于量子点的尺寸、激发谱带宽、不同颜色荧光可用同一光源同时激发、发射光谱窄而对称、光稳定性好等^[6-9]。近年来我国科学家对半导体量子点的合成以及与聚合物复合等方面做了大量开拓性的工作^[10-12]。笔者尝试以碲化镉量子点为能量供体,合成了基于 FRET 原理的新型量子点修饰分子灯塔探针,并对其 DNA 检测性能进行探索。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

WFY-28 荧光分光光度计,天津光学仪器厂; HELIOS- γ 紫外分光光度计,英国 Thermo Spectronic Corp.; LG10-2.4A 高速离心机,北京医用离心机厂。

碲粉,高纯级,天津德兰精细化工厂;氯化镉、硼氢化钠、巯基乙酸(TGA)等试剂均为分析纯;1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚氨盐酸盐(EDC),吉尔生化(上海)有限公司。实验所用所有 DNA 均由上海英俊生物技术公司提供,其碱基序列如下:

5'-NH₂-(CH₂)₆-GCGA CTTT GGG AAGG TTTC TCGC-3'-BHQ-1(序列 1)

5'-A GAAA CCCT TCCC AAAG-3'(序列 2)

5'-A GAAA CCCT ACCC AAAG-3'(序列 3)

5'-TGGC ATAG AGTT GGTA-3'(序列 4)

1.2 CdTe 半导体量子点的合成

将 86.6 mg CdCl₂ 溶于 297 mL 二次水中,加入 79.22 μ L 的巯基乙酸(TGA),在搅拌下滴加 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节溶液 pH 至 10.2,在氮气保护下加入新制的碲化氢钠溶液(在氮气保护下碲粉与硼氢化钠反应生成),继续搅拌 20 min,使其混合均匀,最后在 100℃ 的水浴中加热回流, Cd²⁺/Te²⁻/MPA 的摩尔比为 1:0.5:2.4。控制回流时间,得到不同颜色的溶液(即不同粒径分布的纳米晶),其表面修饰有羧基。在 CdTe 溶液中加入一定量的异丙醇以降低 CdTe 的溶解度,然后于 10 000 r/min 下超速离心 30 min 以提纯 CdTe 量子点。

1.3 CdTe 量子点修饰的灯塔探针合成

在 pH = 8.0 的磷酸溶液中加入 12 μ L CdTe 溶液与 4.46 nmol 的 BHQ-1 修饰的 DNA(序列 1)混合,加入一定量的 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚氨盐酸盐,于室温下避光反应 24 h 即得到 CdTe 量子点修饰的灯塔探针。

1.4 分子灯塔探针与目标 DNA 杂交

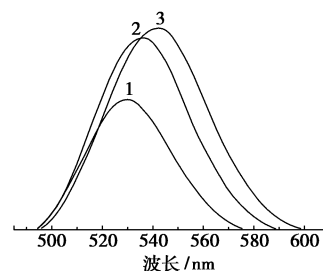
在 Tris-HCl 杂交缓冲溶液中加入上述 CdTe 量子点修饰的灯塔探针与 50D 的目标 DNA(序列 2),

于 37℃ 在恒温空气振荡浴中杂交 2 h。

2 结果与讨论

2.1 CdTe 量子点合成与荧光特性

CdTe 量子点的合成只有在碱性条件下反应,因为 CdTe 量子点表面的负电荷是阻止其进一步团聚和沉淀的主要因素,而这种负电荷来源于稳定剂 TGA 分子的羧酸盐负离子。在溶液中 Cd²⁺ 既可以与稳定剂巯基乙酸中的巯基作用,又能与羧基作用,在适当的 pH 值下硫镉化合物(Cd-SR)与量子点表面的相互作用最强,形成较厚的 Cd-SR 复合物层,这种钝化层必然降低纳米晶的生长速度。图 1 为 pH 为 10.2 时不同回流时间下 CdTe 量子点的荧光发射光谱。



回流时间:1—30 min;2—1 h;3—2 h

图 1 pH 为 10.2 时 CdTe 量子点的荧光发射光谱

随着回流时间的增加,CdTe 量子点的粒子粒径会逐渐增大,此时荧光发射峰发生红移(依次为 529、535、542 nm)。CdTe 纳米粒子的体积大小严格控制着它的光吸收和发射特征。晶体颗粒越小,比表面积越大,分布于表面的原子就越多,而表面的光激发的正电子或负电子受钝化表面的束缚作用就越大,其表面束缚能就越高,吸收的光能也越高,即存在量子尺寸效应,使其吸收带红移,荧光发射峰位也相应红移。随着回流时间的变化,量子点不断地生长,其荧光发射峰也向长波长方向移动,荧光颜色由绿色向红色逐渐变化,荧光强度变强。这说明回流一段时间后,稳定剂 TGA 修饰 CdTe 量子点的表面,减少量子点表面缺陷,使其荧光强度增强,因此选择回流时间为 2 h 时 CdTe 量子点进行后续实验。

2.2 EDC 用量对分子灯塔探针的影响

在 CdTe 与 DNA 偶联的过程中,关键是通过偶联剂 EDC 活化 CdTe 上的羧基使其与 DNA 5' 端的氨基相联,1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚氨盐酸盐是一种水溶性的偶联试剂,它可以活化羧基并在上面偶联氨基,主要用作缩氨酸、多肽、蛋白质、核

苷酸合成以及蛋白质与核苷酸交联反应中的脱水剂^[13]。一般 EDC 的用量是 DNA 量的 10 倍以上。笔者实验得出,EDC 与 CdTe 比例越大,DNA 与 CdTe 偶联后的样品的迁移距离越小,说明当 EDC/CdTe 摩尔比例为 100:1 时,DNA 与 CdTe 的偶联反应更充分,且无负面干扰,这与文献^[14]结果一致。

2.3 FRET 体系的构建

在分子灯塔探针中,荧光基团共价地连接在其干部分的 5'端,淬灭基团也靠共价键连接在干部分的 3'端。荧光信号传导机制是基于荧光能量转移基础上的。因为笔者选定 CdTe 量子点作为荧光基团,寡核苷酸链的长短以及淬灭基团的淬灭效果,对最终检测灵敏度都有影响。根据 FRET 规则,能量供体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱必须有一定程度的重叠,因此选用 BHQ-1 (the Black Hole Quencher™ dyes)作为分子探针的能量受体,它对多种发射光谱不同的荧光基团都有很好的淬灭作用,图 2 是 DNA-BHQ-1 的荧光发射光谱与 CdTe 量子点的吸收光谱。

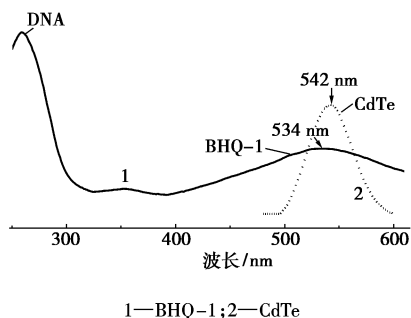


图 2 DNA-BHQ-1 的荧光发射光谱与 CdTe 量子点的吸收光谱

BHQ-1 的最大吸收峰波长为 534 nm, CdTe 量子点的最大发射波长是 542 nm, 两者的吸收峰有部分重叠,而位于 260 nm 左右的是 DNA 的最大吸收峰。因此只要能够满足 CdTe 量子点与 BHQ-1 之间的距离控制在 1.0 ~ 10.0 nm 之间,就能产生 FRET 现象,分子探针的荧光强度降低。此条件下供体的激发光不会对受体产生直接的干扰,能获得足够灵敏而准确的结果,可作为 FRET 体系的能量给体和受体,构建 FRET 体系。

2.4 目标 DNA 的检测

分子灯塔探针的检测原理如图 3 所示,当分子灯塔与目标 DNA 结合时,分子灯塔探针发生构型的变化,干部分被打开,从而使能量供体与受体之间的距离拉大,体系荧光得到恢复,从而通过检测探针体系的荧光强度的变化来确认目标 DNA 是否存在。

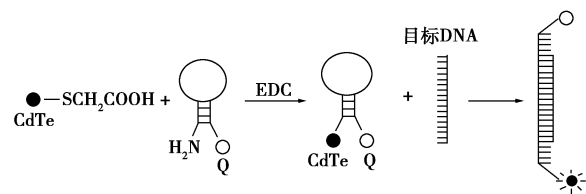
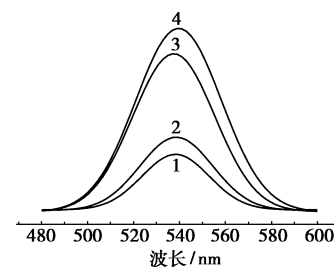


图 3 分子灯塔探针的检测原理(Q = quencher)

笔者分别以与探针环部碱基序列完全匹配的 DNA(序列 2),与探针环部碱基序列单碱基错配的 DNA(序列 3),与探针环部碱基序列完全不匹配的 DNA(序列 4)为目标 DNA,对探针检测性能进行了测试,其结果列于图 4。



1—MBs;2—MBs + 序列 4;3—MBs + 序列 3;4—MBs + 序列 2

图 4 探针(MB)与 DNA 杂交后荧光强度的变化

从图 4 可看出,当探针与目标 DNA 杂交后体系荧光强度有所恢复,其中探针与完全匹配的目标 DNA 杂交后,体系荧光强度恢复最强。这说明加入目标 DNA 后,灯塔探针与序列互补的目标 DNA 结合,探针干的结构被打开,从而使能量供体与受体的距离被拉开,量子点 CdTe 产生的荧光得到恢复。当目标 DNA 的碱基序列与探针环部碱基序列单碱基错配时,探针体系荧光强度的恢复程度要低于完全匹配的 DNA,当目标 DNA 与探针环部碱基序列完全不匹配时,体系的荧光强度略强于探针的,这表明这种探针体系可良好地辨别目标 DNA 是否发生了碱基变异。

参考文献

- [1] Lakowicz J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy[M]. New York: Kluwer Academic, 1983:341 - 379.
- [2] Turro N J. Modern Molecular Photochemistry[M]. California: University Science Books Mill Valley, 1991:310.
- [3] Dubertret B, Skourides P, Norris D J, et al. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles[J]. Science, 2002, 298: 1759 - 1762.
- [4] Mattoussi H, Mauro J M, Goldman E R, et al. Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein[J]. J Am Chem Soc, 2000, 122:12142 - 12150.

扫描电镜;电化学反应池为三电极体系,CHI660B 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司),其中固定 HRP 的玻碳电极为工作电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极,铂电极为对电极。

1.2 制备步骤

以 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 NaOH 为原料,采用水热法在 180°C 下保温 20 h,得到直径约 150 nm 的花状纳米 ZnO^[6]。

直径为 3 mm 的玻碳电极基体分别用金相砂纸和 Al_2O_3 粉抛光至镜面,用 1:1 硝酸超声洗涤 5 min,然后用二次水冲洗干净后干燥备用。

取适量花状纳米 ZnO 超声分散于 0.5% 壳聚糖中,形成 62.5 mg/mL ZnO-CHIT 稳定悬浮液。将 10 μL ZnO-CHIT 悬浮液与 10 μL HRP 混合,最后取上述溶液 6 μL 滴加于电极表面,放入 4°C 冰箱中过夜,即形成了 ZnO-CHIT/HRP 电极。电极不用时放入 4°C 冰箱中保存。

2 结果与讨论

2.1 花状纳米 ZnO 的表征及对电极响应的影响

图 1 为制备 ZnO 材料的 SEM 图,ZnO 晶体形貌呈花状,由直径约 150 nm 的纳米棒组成。图 2 显示了 ZnO-CHIT/HRP、CHIT/HRP 及空白电极在含有 1 mL 对苯二酚的 PBS(pH 7.0) 中的电流响应,工作电位为 -150 mV 。结果表明,相同 H_2O_2 浓度下加入纳米颗粒的电极其电流响应值比未加纳米颗粒的高约 40 倍,空白电极几乎没有响应。电流响应值显著提高的原因有:纳米 ZnO 比表面积大、表面自由能高,因而 HRP 可以在纳米颗粒表面得到强有力的固定;ZnO 由于自身的亲和基团有利于与酶等生物分子的结合^[4];纳米颗粒的吸附场能引起酶的整齐排列,这样吸附在纳米颗粒上的 HRP 就具有定向作

用,分子在定向之后,其功能会有所改善,使酶的电流响应增加^[7];纳米 ZnO 是宽带隙半导体,可以降低电子在电极和固定化酶间的迁移阻力,提高电子迁移率^[8-9],进而提高了电流响应值。

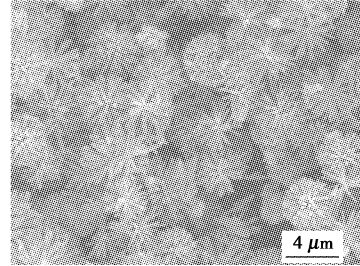
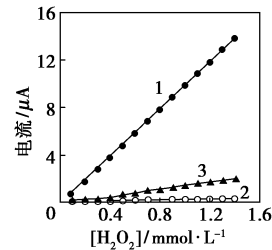


图 1 ZnO 的扫描电镜图



1—GC 电极;2—CHIT/HRP 电极;3—ZnO-CHIT/HRP 电极

图 2 纳米 ZnO 对 HRP 酶电极电流响应的影响

2.2 实验条件的优化

2.2.1 酶和对苯二酚的浓度对电流响应的影响

图 3(a) 显示了固定不同酶浓度的 ZnO-CHIT/HRP 电极在含有 1 mL 对苯二酚的 PBS(pH 7.0) 中对 H_2O_2 的电流响应图,工作电位为 -150 mV (vs. SCE)。可见固定酶的活性随固定酶量的增加而减小。当酶的量增加到 20.0 mg/mL 时,电极几乎没有响应。当酶用量过大会导致传感器阻抗的增加,且酶的一部分活性中心被多余的酶所隐藏,导致酶无法有效的催化反应^[10],使得响应电流反而减小。可以认为 HRP 质量浓度 5.0 mg/mL 为最佳。

(上接第 49 页)

- [5] Qu L H, Peng X G. Control of photoluminescence properties of CdSe nanocrystals in growth[J]. J Am Chem Soc, 2002, 124: 2049 - 2055.
- [6] Weller H. Colloidal semiconductor Q-particles: Chemistry in the transition region between solid state and molecules[J]. Angew Chem, 1993, 32: 41 - 53.
- [7] Murray C B, Norris D B, Bawendi M G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = S, Se, Te) semiconductor nanocrystals[J]. J Am Chem Soc, 1993, 115: 8706 - 8715.
- [8] Trindade T, O'Brien P, Pickett N L. Nanocrystalline semiconductors: Synthesis, properties, and perspectives[J]. Chem Mater, 2001, 13: 3843 - 3858.
- [9] Sutherland A J. Quantum dots as luminescent probes in biological sys-

tems[J]. Curr Opin Solid State Mater Sci, 2002, 6: 365 - 370.

- [10] Zhang H, Cui Z, Wang Y, et al. From water-soluble CdTe nanocrystals to fluorescent nanocrystal-polymer transparent composites using polymerizable surfactants[J]. Adv Mater, 2003, 15: 777 - 780.
- [11] Zhang H, Wang L, Xiong H, et al. Hydrothermal synthesis for high-quality CdTe nanocrystals[J]. Adv Mater, 2003, 15: 1712 - 1715.
- [12] Hao E C, Sun H P, Zhou Z, et al. Synthesis and Optical Properties of CdSe and CdSe/CdS Nanoparticles[J]. Chem Mater, 1999, 11: 3096 - 3102.
- [13] Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization[J]. Nat Biotechnol, 1996, 14: 303 - 308.
- [14] Merkoci A, Aldavert M, Marin S, et al. New materials for electrochemical sensing V: Nanoparticles for DNA labeling[J]. Trends Anal Chem, 2005, 24(4): 341 - 349. ■