

DNA 纳米传感器荧光成像技术

邓楚芸, 李佳敏, 马万云*

清华大学物理系原子分子纳米科学教育部重点实验室, 北京 100084

摘要 把基于量子点的 DNA 纳米传感器模型应用到 ICCD 荧光显微成像系统中, 利用量子点的量子产率高、荧光寿命长、激发谱宽而发射谱窄、发射波长可由材料尺寸调谐等特性, 以量子点为供体, Cy5(一种小分子荧光染料)为受体, 结合 ICCD 系统的全内反射荧光成像功能、实时成像功能和双通道成像功能, 证实了 DNA 纳米传感器可以在溶液中检测到含 30 个碱基的单链目标 DNA 片段。实时拍摄了溶液中链霉亲和素包被的量子点对两头分别连着 Cy5 和生物素的单链 DNA 片段(Cy5-ssDNA-Biotin)的捕获过程。并在活的中国仓鼠卵巢细胞样品中加入链霉亲和素包被的量子点和 Cy5-ssDNA-Biotin 进行实时荧光成像, 拍摄到链霉亲和素包被的量子点和 Cy5-ssDNA-Biotin 进入细胞中并发生 FRET 的过程, 初步表明了 DNA 纳米传感器在活细胞内进行 DNA(或 RNA)片段检测的可行性。

关键词 ICCD; 荧光共振能量转移; 量子点; DNA 纳米传感器

中图分类号: TH74 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)01-0220-05

引言

FRET(fluorescence resonance energy transfer, 荧光共振能量转移)技术被誉为“光学尺”^[1], 可用于测量纳米量级的微观距离, 在生物医学检测领域具有广泛应用。而量子点因其独特的光学性质(如量子产率高、荧光寿命长、激发谱宽而发射谱窄, 并可通过调整粒子尺寸来得到不同颜色的荧光, 可用于多色标记等)已成为标记生物大分子的新探针。近年来, 将其二者结合进行量子点 FRET 现象的研究形成了新的热点^[2-7]。Zhang 等设计出一种基于单量子点的 DNA 纳米传感器模型(single-quantum-dot-based DNA nanosensor)^[8], 这种传感器克服了量子点 FRET 检测中经常遇到的能量转移效率低的问题, 灵敏度非常高, 引起了广泛的重视^[9-19]。这套模型主要采用以毛细管加雪崩二极管为主体的荧光强度检测平台, 测量溶液中的 DNA(或 RNA)片段^[8, 10], 虽然灵敏度很高, 但无法对探测目标进行实时成像与跟踪。为了适应细胞水平的研究, 需要有一种既能够实时成像跟踪、又能保证高灵敏度的检测系统, 而 ICCD(intensified charge coupled device)荧光显微成像系统便是符合要求的一种新型的检测平台。将 ICCD 系统与 DNA 纳米传感器模型结合起来, 在成像水平上实现了 DNA 纳米传感器的功

能, 为量子点 FRET 模型应用于活细胞研究提供了一种新方法。

1 DNA 纳米传感器技术

DNA 纳米传感器的结构和工作原理如图 1^[8]所示: 为检测有 30 个碱基数的特定 DNA 片段(target DNA), 制作 3'端修饰有生物素的捕获探针(capture probe)和 5'端修饰有荧光染料 Cy5 的报告探针(reporter probe), 它们与待测的 DNA 片段碱基互补配对。如果样品中存在待测的特定 DNA 片段, 则捕获探针与报告探针将分别与该 DNA 片段结合形成杂交聚合体(sandwiched hybrid), 实现生物素与 Cy5 之间的连接。此时再加入表面经链霉亲和素修饰过的量子点(streptavidin-conjugated QD), 由于生物素与链霉亲和素间高特异性的结合, 杂交聚合体将被量子点捕获并形成纳米传感聚合体

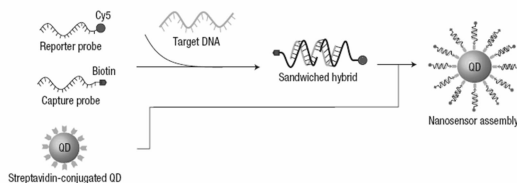


Fig. 1 Configuration of single quantum dot based DNA nanosensor^[8]

收稿日期: 2009-05-10, 修订日期: 2009-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(10874099)资助

作者简介: 邓楚芸, 1988 年生, 清华大学物理系博士研究生 e-mail: dcy04@mails.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人 e-mail: mawy@tsinghua.edu.cn

(nanosensor assembly), 见图 1。在纳米传感聚合体里一个量子点(供体)外连接了多个 Cy5(受体), 故量子点与 Cy5 间的 FRET 效率得到大幅度的提高。QD 和 Cy5 的激发谱与发射谱如图 2 所示, 若用 488 nm 的激发光(能激发 QD, 不能激发 Cy5)进行照射, 将可看到明显的受体荧光, 受体荧光的出现标志着样品中特定 DNA 片段的存在。

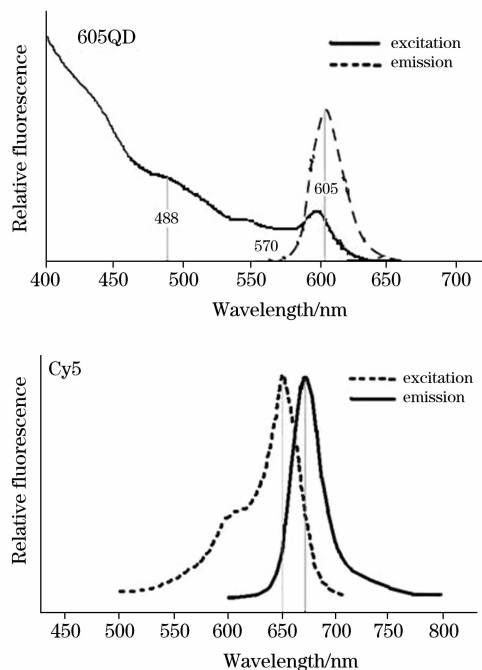


Fig. 2 Spectra of QD and Cy5 (from product manuals of Invitrogen Corp.)

2 ICCD 荧光显微成像系统

ICCD 系统装置如图 3 所示。其主要部件为: 发射波长为 488 nm 的氩离子激光器(Melles Griot, USA), 安装有全内反射荧光(total internal reflection fluorescence, TIRF)专用油浸物镜($\times 60/1.45$ NA; Nikon, Japan)的倒置显微镜(TE2000; Nikon, Japan), 双波长分束器(Dual-View; Optical Insights, USA), 像增强型 CCD(I-PentaMAX Gen4; Roper Scientific, USA), 以及用于系统控制和图像处理的软件 MetaMorph(Universal Imaging Corp., USA)。激光器光功率密度调至 $17.6 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。

显微镜中的二色片(Dichroic, 495DCXT; Chroma Technology)与长通滤波片(Filter, E515pv2, Chroma Technology)用于对物镜收集到的光信号做筛选。双波长分束器中的二色片采用 630dcxr(Chroma Technology), 两块滤波片分别采用 D680/35 与 S605/40(Chroma Technology)。相关滤波片和二色片谱图详见图 4, 这些滤波片的选取是由激发光的波长和 QD、Cy5 的光谱决定的。Dual-View 将供体荧光和受体荧光分开并分别成像在 ICCD 的左右两个区域, 即实现了用一个 ICCD 探测器同时拍摄供体荧光和受体荧光, 适合观测 FRET 现象。

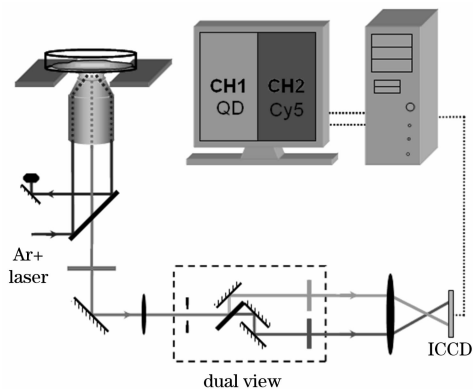


Fig. 3 Scheme of the ICCD system

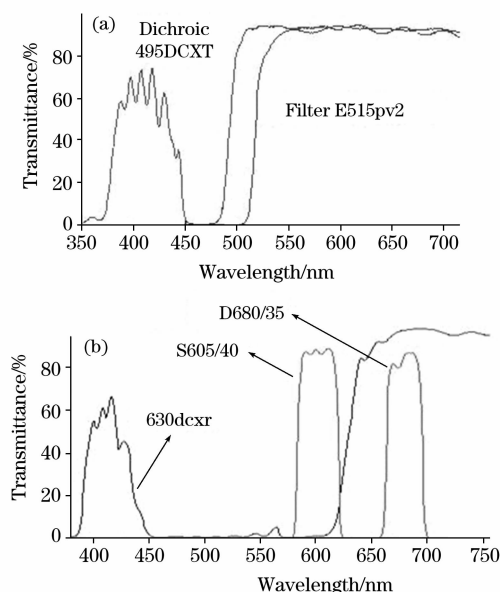


Fig. 4 Transmittance curves of the filters and dichroics heet (a); Microscope; (b); Dual-View

实验中采用全内反射激发荧光方式(TIRF), 这种激发方式的优点在于只激发贴近界面约 100 nm 范围内的样品^[12], 有效的减小了激发体积, 减少了背景噪声, 信噪比高, 对样品的光损伤和光漂白也很小, 所以非常适合活细胞实验。

3 实验结果及分析

3.1 检测目标 DNA 片段

设计了量子点与多受体间发生荧光共振能量转移的 FRET 发生模型。量子点(Qdot 605 ITK Streptavidin Conjugate Kit, 简记为 605QD, Cat. Number: Q10001MP, Invitrogen Corp., USA)的直径在 10~15 nm, 荧光量子产率约为 59%, 表面修饰有 12~15 个链霉亲和素, 每个链霉亲和素可以结合 3 个生物素。待测目标 DNA 片段含 30 个碱基 5/-CTC TGT CTT ATC GTA GCT AGT CAA GGT AAC-

3/, 捕获探针为 Biotin-3/-GAG ACA GAA TAG CAT, 报告探针为 CGA TCA GTT CCA TTG-5/-Cy5。作为对照, 设计与目标 DNA 片段碱基序列不同的非目标 DNA 片段(non-specific target DNA): 5/-TAG CAG TGA CGA CAC CTA CCG GTT ACG CTA-3/。以上基因序列均从上海基康生物技术有限公司购置。杂交反应缓冲液为 PH 8.0 的 100 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, 其中含有 (NH₄)₂SO₄ 10 mmol · L⁻¹, MgCl₂ 3 mmol · L⁻¹。

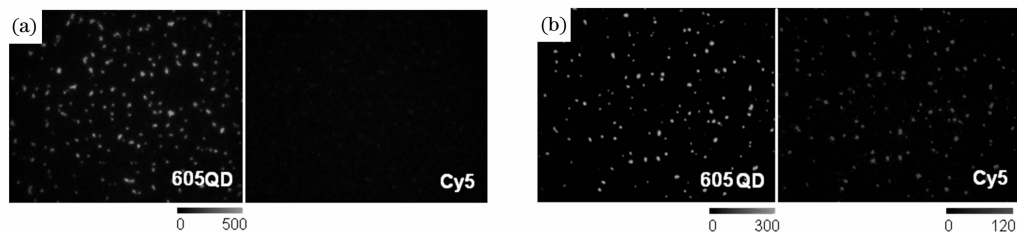


Fig. 5 Results of detecting specific target DNA and non-specific target DNA

(a): Non-specific target DNA; (b): Specific target DNA

图 5(a)是第一组的实验结果, 由于非目标基因与捕获探针和报告探针之间没有碱基互补配对, 捕获探针和报告探针无法连接, 故加入量子点后, 量子点通过链霉亲和素与生物素的结合将捕获探针聚集到身边, 但报告探针却一直处于游离状态, 无法与量子点接近。所以, 在成像时只能观察到 605 通道量子点的荧光而无法看到 Cy5 荧光, 即没有 FRET 发生。同时, 也证明了量子点的荧光没有泄露到 Cy5 通道, 这正是应用量子点作为供体的优点之一。图 5(b)是第二组的实验结果, 图中可以看到非常明显的 FRET 信号。由于目标 DNA 片段的存在, 通过碱基互补配对, 把生物素与 Cy5 连接在一起, 加入量子点后, 量子点通过链霉亲和素与生物素之间的结合将 Cy5 聚合在身边, 发生 FRET。

3.2 DNA 捕获实时观测

设计两端直接连接有 Cy5 和生物素的寡聚核苷酸单链 (Cy5-5/-AAA GGA CCA GGC GCA ACT AAA TTC A-3/-Biotin, 简记为 Cy5-ssDNA-Biotin)。取 2×10^{-10} mol · L⁻¹ 的 605QD 溶液 5 μ L 滴于洁净玻璃片 (24 × 24 mm) 上, 待水分蒸发完全后在量子点沉淀区域滴加 4.8×10^{-8} mol · L⁻¹ 的 Cy5-ssDNA-Biotin 溶液 5 μ L。采用防漂白法进行连续拍摄, 即曝光时间为 100 ms, 而每两张图象的间隔时间为 8 s, 只有曝光拍摄的 100 ms 内有激发光, 以免长期照射使得 Cy5 光漂白。

分析两通道荧光强度随时间的变化曲线发现, 刚开始时 605 通道量子点的荧光较强, 680 通道 Cy5 的荧光很弱, 但随着时间的推移, 605 通道荧光随时间减弱, 680 通道荧光随时间增强, 这反映了 FRET 效率在不断的增加。FRET 效率逐渐增加的原因在于: 量子点对 Cy5-ssDNA-Biotin 的收集是靠链霉亲和素与生物素的特异性结合, 由于溶液中的布朗运动, 这个结合过程不可能在瞬间完成, 需要时间的积累, 随着时间的增加, 量子点捕获 DNA 越多, 发生 FRET 的效率也就越高, 所以 680 通道 Cy5 的荧光随时间增强, 同时导致 605 通道量子点的荧光随时间减弱, 直致量子点被 DNA

饱和。因此, 量子点荧光和 Cy5 荧光随时间的变化记录了量子点捕获 DNA 的过程。

3.3 QD 和 Cy5-ssDNA-Biotin 进入活细胞发生 FRET 观测

所用生物样品是首都儿科研究所提供的中国仓鼠卵巢细胞(CHO)。细胞经 PBS 清洗后再在培养皿中加入 0.2 mL PBS, 接着加入 0.01 mL 2×10^{-8} mol · L⁻¹ 量子点。避光静置 1 h 待量子点进入细胞, 然后用 PBS 清洗掉未进入细胞的量子点, 拍摄荧光像。再加入 0.01 mL 4.8×10^{-6} mol · L⁻¹ 15base 的 Cy5-ssDNA-Biotin, 继续进行实时拍摄。结果如图 6 所示。

由于细胞贴壁生长, 根据 TIRF 的原理, 成像范围在细胞底部上方薄层内。图 6(a)是未加入 Cy5-ssDNA-Biotin 的成像结果, 左通道的荧光由量子点发出的, 右通道几乎没有光信号, 与未加入 Cy5-ssDNA-Biotin 没有发生 FRET 相吻合。由于样品已经经过清洗, 所以这里看到的量子点只可能是附着在细胞膜上或者通过内吞作用进入了细胞质。加入 Cy5-ssDNA-Biotin 之后, 成像结果如图 6(b)所示, 左右两个通道均有荧光, 表明有 FRET 发生, 图中 2 个圆形区域的荧光强度随时间的实时拍摄结果如图 6(c)所示。可以看出, 右通道 Cy5 的荧光逐渐增强, 而左通道量子点的荧光逐渐减弱, 这与 3.2 节中类似, 是 FRET 效率逐渐增加的过程, 表明 Cy5-ssDNA-Biotin 逐渐被量子点捕获。当量子点被 Cy5-ssDNA-Biotin 饱和时, 右通道 Cy5 的荧光达到最大, 而左通道量子点的荧光减至最小。在实时拍摄的后期, 由于 Cy5 开始被光漂白, Cy5 通道的光开始减弱。被漂白的 Cy5 不再参与 FRET 相互作用, 因此量子点通道的光开始增强, 表明 FRET 效率逐渐降低。

4 总 结

运用 ICCD 快速荧光显微成像系统和量子点 FRET 效应实现了对目标 DNA 片段的检测; 发挥 ICCD 双通道实时探

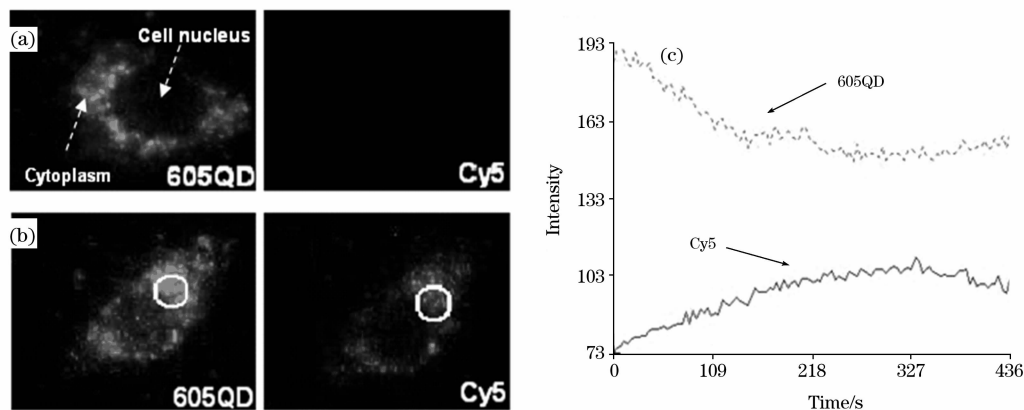


Fig. 6 Fluorescence images of living Chinese hamster ovary(CHO) cells

(a): One cell after removing QDs around cells; (b): Another cell after adding Cy5-ssDNA-Biotin

(c): Fluorescence curves of the two circular regions in (b) representing FRET

测的优势,对量子点捕获溶液中单链 DNA 的过程进行了实时记录,并在活细胞中观测到链霉亲和素包被的量子点和连接有 Cy5 和生物素的寡聚核苷酸单链进入细胞里,并发生 FRET 现象,为纳米传感器应用于检测活细胞中特定 DNA

(或 RNA)片段提供了一种可行的方法。

致谢:感谢首都儿科研究所提供的样品和相关合作,感谢张春阳老师给予的指导。

参 考 文 献

- [1] Stryer L, Haugland R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1967, 58: 719.
- [2] Jares-Erijman Elizabeth A, Jovin Thomas M. Nature Biotechnology, 2003, 21(11): 1387.
- [3] Giepmans Ben N G, Adams Stephen R, Ellisman Mark H et al. Science, 2006, 312: 217.
- [4] Nienhaus Gerd Ulrich. Macromolecular Bioscience, 2006, 6(11): 907.
- [5] Clapp Aaron R, Medintz Igor L, Mattoussi Hedi. Chem. Phys. Chem., 2006, 7(1): 47.
- [6] Piston David W, Kremers Gert-Jan. Trends in Biochemical Sciences, 2007, 32(9): 407.
- [7] Deniz Aarok A, Mukhopadhyay Samrat, Lemke Edward A. Journal of the Royal Society Interface, 2008, 5(18): 15.
- [8] Zhang Chunyang, Yeh Hsin-Chin, Kuroki Marcos T, et al. Nature Materials, 2005, 4(11), 826.
- [9] Allen Michael D, Zhang Tin.. Angew. Chem. Int. Ed., 2008, 47(3): 500.
- [10] Zhang Chunying, Johnson Lawrence W. Angew. Chem. Int. Ed., 2007, 46(19): 3482.
- [11] Nakane Jonathan, Wiggin Matthew, Marzialli Andre. Biophysical Journal, 2004, 87(1): 615.
- [12] Mattheyses Alexa L, Axelrod Daniel, Axelyod Daniel. Journal of Biomedical Optics, 2006, 11(1): 014006.
- [13] Zhang Chun-yang, Johnson Lawrence W. J. Am. Chem. Soc., 2006, 128(16): 5324.
- [14] Suzuki Miho, Husimi Yuzuru, Komatsu Hirokazu, et al. J. Am. Chem. Soc., 2008, 130(17): 5720.
- [15] Diltemiz S E, Say Ridvan, Buyuktiyaki Sibel, et al. Talanta, 2008, 75(4): 890.
- [16] Vo-Dinh T, Cullum Brian M, Stokes Darid L. Sensors and Actuators B, Chemical, 2001, 74(1-3): 2.
- [17] WANG Yan-jun, LI Yong-sheng, YANG Quan-yu, et al(王艳君, 李永生, 杨全玉, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2009, 29(1): 165.
- [18] LU Jin-ling, CHU Jun, YANG Jie, et al(陆锦玲, 储 军, 杨 杰, 等). Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展), 2008, 35(3): 268.
- [19] LIU Chun-chun, HANG Hai-ying(刘春春, 杭海英). Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展), 2006, 33(3): 292.

DNA Nanosensor Fluorescence Imaging Microscopy

DENG Chu-yun, LI Jia-min, MA Wan-yun*

The Key Laboratory of Atomic and Molecular Nanosciences, Ministry of Education, Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract Quantum dots have many excellent optical properties such as high quantum yield, long fluorescence lifetime, wide excitation spectrum and narrow emission spectrum, tunable emission wavelength and so on, thus have become a new popular type of fluorescence probes in these years. Quantum-dot-based DNA nanosensor comprising streptavidin-conjugated quantum dots, capture probes with biotin and reporter probes with Cy5 was designed to detect DNA or RNA segments. Capture probes and reporter probes were connected by the target DNA or RNA segments so that quantum dots and Cy5s could be together and FRET (fluorescence resonance energy transfer) could be detected. In the present work, quantum-dot-based DNA nanosensor was combined with ICCD fluorescence microscopy imaging system through the authors' experiments. Using the total internal reflection fluorescence (TIRF), FRET between quantum dots and Cy5s was recorded by ICCD showing that segments of single-stranded target DNA with 30-base length were detected in solution using DNA nanosensor. When Cy5-ssDNA-Biotins were added into streptavidin-conjugated quantum dots in solution, by real time recording, the FRET efficiency was found to increase with time, which indicated the process of streptavidin-conjugated quantum dots capturing Cy5-ssDNA-Biotins. It was also observed that streptavidin-conjugated quantum dots and Cy5-ssDNA-Biotins could both enter living Chinese hamster ovary cells and have FRET. The process of streptavidin-conjugated quantum dots capturing Cy5-ssDNA-Biotins was detected in the cells as well and Cy5s were photobleached after a long time of irradiation. It has been proved that detecting DNA or RNA segments in living cells with DNA nanosensor is possible.

Keywords ICCD; FRET; Quantum dot; DNA nanosensor

(Received May 10, 2009; accepted Aug. 20, 2009)

* Corresponding author