

基于黑磷荧光淬灭特性的肿瘤细胞探测

闫武娟, 王秀翔, 姚倩, 乔鹏飞, Lang Marion C

北京工业大学激光工程研究院生物医学光子学实验室, 北京 100011

摘要 黑磷(BP)纳米片可淬灭荧光染料的荧光,基于这一特性,合成了可特异性识别人乳腺癌细胞 MCF7 的脱氧核糖核酸(DNA)适体,并用荧光染料 5-羧基荧光素(FAM)将其标记。当 BP 纳米片与该适体混合时,其荧光被淬灭。而当 MCF7 细胞存在时,DNA 适体由于可以识别该细胞并与其结合,会从 BP 纳米片上脱离,从而实现荧光恢复。恢复的荧光强度与细胞数量呈线性关系。实验结果表明,利用 BP 纳米片检测乳腺癌细胞具有高效、特异、灵敏的优势,这一方法可以推广至其他肿瘤细胞的检测。

关键词 医用光学; 乳腺癌细胞检测; 荧光淬灭; 核酸适体

中图分类号 Q631

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0207030

Detection of Cancer Cells Based on Fluorescence Quenching Property of Black Phosphorus

Yan Wujuan, Wang Xiuhong, Yao Qian, Qiao Pengfei, Lang Marion C

Laboratory for Biomedical Photonics, Institute of Laser Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100011, China

Abstract Black phosphorus (BP) nanosheets can quench the fluorescence of a fluorescent dye, and based on this property, the deoxyribonucleic acid(DNA) aptamer which can specifically recognize the human breast cancer cells MCF7 are synthesized and labeled with 5-carboxyfluorescein (FAM). When the DNA aptamer is mixed with BP nanosheets, its fluorescence is quenched. However, in the presence of MCF7 cells, the DNA aptamer can recognize the MCF7 cells and interact with these cells, and the disassociation of DNA aptamer from BP nanosheets occurs and then the restoration of fluorescence is realized. The fluorescence intensity shows the linear relationship with the number of cancer cells. The experimental results indicate that it is highly efficient, specific and sensitive to use BP nanosheets for detecting breast cancer cells and this method can be applied in the detection of other kinds of cancer cells.

Key words medical optics; breast cancer cell detection; fluorescence quenching; DNA aptamer

OCIS codes 170.1530; 160.1435; 160.2540; 160.4236

1 引言

纳米材料具有特殊的光学性能,可以用于光学成像和诊断以及光学治疗,其在生物学中的应用备受瞩目^[1-2]。近年来,二维(2D)纳米材料因其特有的物理化学性质,以及在光学、电子、能量转换、生物学方面表现出的优异性能,得到了广大科研工

作者的广泛研究^[3-5]。研究发现,石墨烯氧化物(GO)和 MoS₂ 都有良好的淬灭荧光的性能,基于 GO 和 MoS₂ 的荧光核酸适体探针可以利用 GO、MoS₂ 和 DNA 分子之间的相互作用,以及 DNA 单链和目标物之间的匹配原理来探测溶液中的靶分子^[6-9]。黑磷(BP)是一种新型的二维层状晶体,是正交磷组中最稳定的同素异形体。BP 的直接能带

收稿日期: 2017-09-18; 收到修改稿日期: 2017-09-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(61378088)

作者简介: 闫武娟(1994—),女,硕士研究生,主要从事基于纳米材料的光学检测方面的研究。

E-mail: yanwujuan2016@163.com

导师简介: 王秀翔(1972—),女,副教授,硕士生导师,主要从事生物光子学方面的研究。

E-mail: wxh2012@bjut.edu.cn(通信联系人)

隙结构^[10]以及带隙稳定性使其在光电子行业中的应用(从通信到热成像)几乎覆盖整个电磁波谱^[11-12]。基于BP与石墨烯的相似性,BP在生物学中的应用也在迅速发展,其应用涉及到药物递送、生物学成像、气体探测和疾病治疗等。BP具有高的消光系数和光热转换效率及良好的生物降解性和较低的生物毒性,这使得它在光热治疗、光动力治疗、光声成像和载药方面有很大的优势^[3,13-15]。本文报道了BP纳米片对荧光物质的淬灭作用,并且利用此高淬灭性能和特异性荧光标记的核酸适体来实现肿瘤细胞的探测,发现BP纳米片能够有效地淬灭核酸适体的荧光。将此荧光淬灭的混合物加到靶细胞上并孵育后,发现被淬灭的荧光可以恢复。因此,通过荧光的淬灭与恢复可以检测靶细胞的存在。本探测手段有以下优势:1)探测过程操作简单,且成本低;2)BP的吸附力强,可以有效地吸附更多的荧光核酸适体,提高探测效率;3)BP的淬灭效果显著,微量BP即可实现荧光淬灭;4)BP的生物降解性能好,而且磷也是生命体内所需物质,所用的荧光核酸适体不会产生免疫反应;5)本探测方法的适用范围比较广泛,可以合成识别其他生物化学分子的探针以实现探测。实验结果表明,利用BP纳米片的荧光淬灭性能,BP纳米片与荧光核酸适体的复合物可以作为探针有效地检测肿瘤细胞的存在。这种方法高效、安全、灵敏,为癌症的早期诊断提供了一种新思路。

2 主要仪器与试剂

荧光核酸适体溶液的配制:荧光核酸适体为核

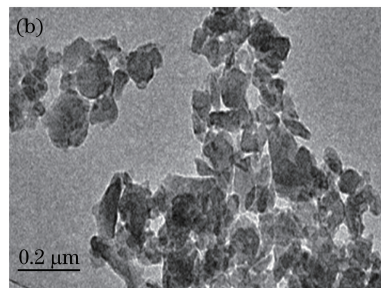
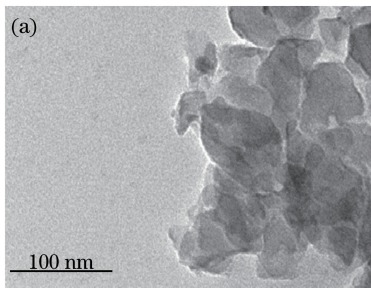


图1 BP纳米片的透射电镜图
Fig. 1 TEM images of BP nanosheets

3.2 BP的淬灭性能

合成了可以特异性识别乳腺癌细胞MCF7的核酸适体,并将其用荧光染料5-羧基荧光素(FAM)标记。荧光标记的核酸适体在不同浓度下的荧光强度如图2所示。从实验结果可以看出,随着核酸适

酸与荧光基团的连接物,是通过一种新的体外筛选技术,从随机单链寡聚核苷酸文库中得到的能特异结合蛋白质或其他小分子物质的单链寡聚核苷酸,可以是核糖核酸(RNA),也可以是脱氧核糖核酸(DNA)^[16]。实验中用到的可以特异识别MCF7细胞的适体DNA的序列为:GGC TAT AGC ACA TGG GTA AAA CGA C-FAM。荧光核酸适体由北京三博远志生物技术有限责任公司生产供应。

BP溶液的配制:BP粉末中加入超纯水,用超声波分散机超声30 min,再用超声清洗仪超声6 h,用离心机将溶液离心2 h(2000 r/min, 4 °C),最后取上清液使用。对所得到的BP清液进行定量分析,得到其浓度(单位体积内的质量)为1.5 mg/ml。

细胞的培养:人乳腺癌细胞MCF7属于贴壁生长的细胞。培养条件:用包含牛血清蛋白的完全培养基培养细胞,细胞置于恒温培养箱中孵育。

实验所用到的主要测量仪器为德国Berthold Technologies公司的Mithras² LB 943多功能酶标仪。

3 实验结果与讨论

3.1 BP的形貌表征

用粉末BP为原料,以超纯水为介质,利用液相剥离法,通过多次超声和离心清洗制备出了纳米尺寸的BP。在透射电镜下观察到的结构近似为片状,片径大约在50~100 nm之间,如图1所示。利用原子力显微镜分析得出其厚度大约为4 nm,因此制备所得到的是少层的BP纳米片。对于这种近似于片状结构的BP,其优势在于能提供更大的体积表面积比,为有效结合提供了一个很好的平台。

体浓度的增大,荧光强度也在不断增大,说明溶液中的荧光基团数目在增加。

在荧光标记的核酸适体浓度一定(50 nmol/L)的条件下,研究了不同浓度BP对其的荧光淬灭效果,结果见表1。通过对比加入BP前后荧光强度的

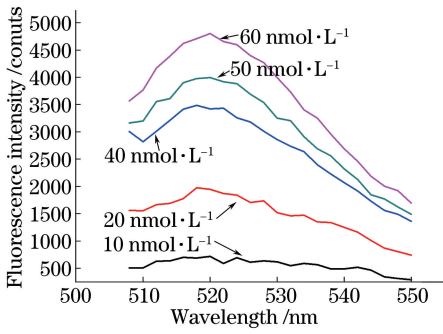


图 2 不同浓度荧光标记的核酸适体的荧光强度

Fig. 2 Fluorescence intensity of DNA aptamer labeled with different fluorescence concentrations

变化可以发现,当向荧光标记的核酸适体溶液中加入 BP 纳米片后,BP 的纳米层状结构所带负电荷^[17]与单链 DNA 中带正电荷的碱基形成了静电作用力^[18],BP 纳米片将溶液中荧光标记的核酸适体分子吸附在其表面上,形成了 BP 与荧光标记的核酸适体的结合物(BP-Aptamer),标记在 DNA 末端的荧光基团与 BP 之间发生了荧光共振能量转移^[19-20]现象,从而导致了荧光标记的核酸适体荧光的淬灭,如图 7 所示。这种淬灭呈现浓度依赖性,随着 BP 浓度的增大,BP 纳米片对荧光的淬灭效果越显著。体积分数为 25% 的 BP 纳米片便可以达到 53% 的荧光淬灭效率。此处计算荧光淬灭效率的公式为

$$\eta = \frac{F_0 - F}{F_0} \quad (1)$$

式中 F_0 为荧光标记的浓度为 50 nmol/L 的核酸适体的荧光强度值, F 为加入 BP 后的 BP-Aptamer 结合物的荧光强度值, η 为荧光淬灭效率。

表 1 不同浓度黑磷的淬灭率

Table 1 Fluorescence quenching rate of BP with different concentrations

Volume fraction of BP / %	0	10	15	20	25	30	35
Quenching rate / %	0	21.1	22.9	41.8	53.0	68.7	74.8

除了能够淬灭 FAM 的荧光之外,还研究了 BP 对荧光量子点的淬灭作用。实验中所用的量子点是 CdTe 量子点,浓度为 500 nmol/L。实验发现,BP 纳米片的荧光淬灭作用与其体积分数有关,如图 3 所示,黑磷的体积分数从上到下依次为 0, 20%, 40%, 60%。随着 BP 纳米片体积分数的增大,BP 对量子点荧光的淬灭作用明显增强。

3.3 乳腺癌细胞检测

利用 BP 纳米片的荧光淬灭性能,初步尝试了

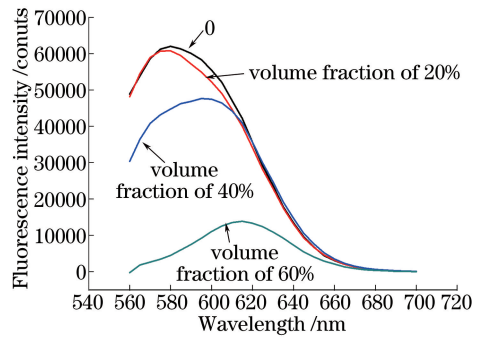


图 3 不同浓度的 BP 对 CdTe 量子点的荧光淬灭效果

Fig. 3 Fluorescence quenching effects of BP nanosheets with different concentrations on CdTe quantum dots

对乳腺癌细胞 MCF7 的检测。在培养皿中分别培养 0, 5000, 10000, 15000 个 MCF7 细胞,待细胞贴壁并健康生长之后,吸取细胞溶液中的培养基,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞,向细胞中加入 BP-Aptamer 溶液(核酸适体最终浓度为 50 nmol/L, BP 纳米片最终体积分数为 25%,即表 1 中淬灭率为 53% 的配比浓度)。孵育 2 h 后,检测每个样品的荧光强度。实验发现 MCF7 细胞的参与使得被淬灭的荧光得到了恢复。如图 4 所示,从上到下对应的细胞数目依次为 15000, 10000, 5000, 0,可以看出,随着细胞数目的增加,荧光恢复效果越来越明显。实验中使用体积分数为 25% 的黑磷以及浓度为 50 nmol/L 的核酸适体最低可检测到约 2500 个细胞,而其饱和探测值为 15000 个左右的细胞,图 5 所示为不同数量细胞下的 520 nm 处的荧光峰值。

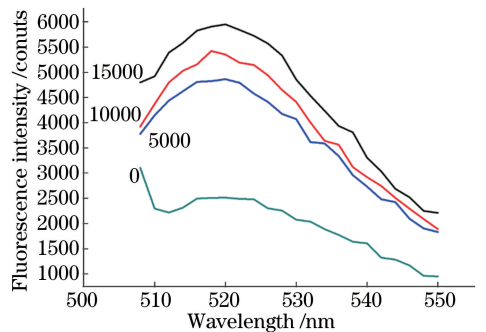


图 4 细胞数目对荧光强度恢复的影响

Fig. 4 Effect of cell number on restoration of fluorescence intensity

然而,如果将荧光标记的特异性核酸适体序列换为荧光标记的非特异性的随机 DNA 序列(random-DNA),研究发现,虽然 BP 纳米片也可以有效地淬灭其荧光,但是 MCF7 细胞却不能使其荧光恢复,实验结果如图 6。因为随机序列的 DNA 无法识别 MCF7 细胞,不能与细胞结合,因此无法脱

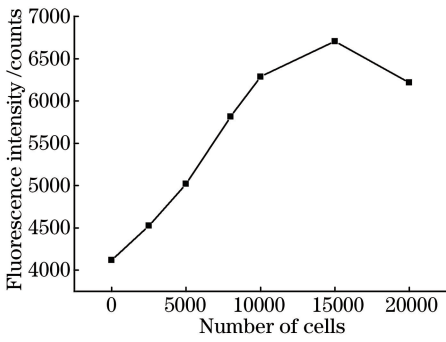


图 5 不同细胞数目下 520 nm 处的荧光强度

Fig. 5 Fluorescence intensities at 520 nm under different number of cells

离 BP 纳米片表面,如图 7(a)所示。而核酸适体与 MCF7 细胞的特异性结合使核酸适体脱离 BP 纳米片表面,BP 对核酸适体的淬灭作用消失,因此荧光恢复,淬灭及恢复原理见示意图 7(b)。这一结果说

明 BP 纳米片和荧光标记的特异性核酸适体的复合物可以作为有效的探针,特异性地识别并检测肿瘤细胞。目前,肿瘤细胞的检测主要依赖流式细胞分析技术,这一结果将为开发肿瘤检测新技术提供新思路。

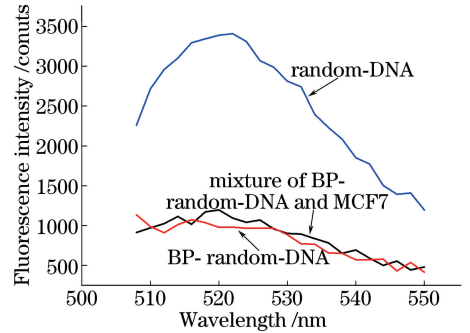


图 6 不同条件下的荧光强度

Fig. 6 Fluorescence intensities under different conditions

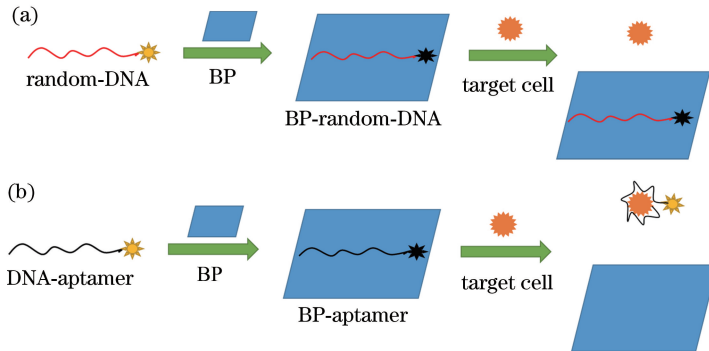


图 7 荧光淬灭以及恢复示意图。(a)加入靶细胞可以恢复 DNA-aptamer 的荧光;(b)加入靶细胞不能恢复随机序列的荧光

Fig. 7 Schematic of fluorescence quenching and restoration. (a) Fluorescence of specific DNA-aptamer can be restored with the addition of target cells; (b) fluorescence of random-DNA sequence can not be restored with the addition of target cells

4 结 论

在发现新型二维材料 BP 具有荧光淬灭特性的基础上,应用荧光核酸适体与目标物的特异性识别,实现了肿瘤细胞 MCF7 的特异性探测,并说明了特异性荧光核酸适体与目标物的结合作用强于与黑磷的结合作用。BP 与荧光核酸适体的巧妙结合是一种非常有效且简便的探测方法,相信这一方法可以为生物医学领域的研究工作提供便利。

参 考 文 献

[1] Gan S Y, Zhong L J, Han D X, *et al.* Probing bio-nano interactions between blood proteins and monolayer-stabilized graphene sheets[J]. *Small*, 2015, 11(43): 5814-5825.
 [2] Balapanuru J, Yang J X, Si X, *et al.* A graphene

oxide-organic dye ionic complex with DNA-sensing and optical-limiting properties[J]. *Angewandte Chemie*, 2010, 49(37): 6549-6553.

[3] Tao W, Zhu X B, Yu X H, *et al.* Black phosphorus nanosheets as a robust delivery platform for cancer theranostics[J]. *Advanced Materials*, 2016, 29(1): 1603276.
 [4] Kenry, Lim C T. Biocompatibility and nanotoxicity of layered two-dimensional nanomaterials [J]. *ChemNanoMat*, 2017, 3(1): 5-16.
 [5] Ma Z J, Wei R F, Hu Z L, *et al.* 2D materials and quasi-2D materials: Nonlinear optical properties and corresponding applications[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2017, 44(7): 0703002.
 马志军, 魏荣妃, 胡忠亮, 等. 2D 材料及准 2D 材料的非线性光学特性及应用 [J]. *中国激光*, 2017, 44(7): 0703002.

- [6] He S J, Song B, Li D, *et al.* A graphene nanoprobe for rapid, sensitive, and multicolor fluorescent DNA analysis[J]. *Advanced Functional Materials*, 2010, 20(3): 453-459.
- [7] Lu C H, Yang H H, Zhu C L, *et al.* A graphene platform for sensing biomolecules[J]. *Angewandte Chemie*, 2009, 48(26): 4785-4787.
- [8] Wei W, Gao C Y, Xiong Y X, *et al.* A fluorescence method for detection of DNA and DNA methylation based on graphene oxide and restriction endonuclease HpaII[J]. *Talanta*, 2015, 131: 342-347.
- [9] Zhu C F, Zeng Z Y, Li H, *et al.* Single-layer MoS₂-based nanoprobe for homogeneous detection of biomolecules[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(16): 5998-6001.
- [10] Liu M, Yan Y R, Wang X D, *et al.* Black phosphorus quantum dots saturable absorber for dual-wavelength pulsed cluster fiber laser [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2017, 44(7): 0703013.
刘萌, 闫玉蓉, 汪徐德, 等. 基于黑磷量子点可饱和吸收体的多波长脉冲簇光纤激光器[J]. *中国激光*, 2017, 44(7): 0703013.
- [11] Eswaraiah V, Zeng Q S, Long Y, *et al.* Black phosphorus nanosheets: Synthesis, characterization and applications [J]. *Small*, 2016, 12(26): 3480-3502.
- [12] Zhao Y, Chen Y, Zhang Y H, *et al.* Recent advance in black phosphorus: Properties and applications[J]. *Materials Chemistry and Physics*, 2017, 189: 215-229.
- [13] Lee H U, Park S Y, Lee S C, *et al.* Black phosphorus (BP) nanodots for potential biomedical applications[J]. *Small*, 2016, 12(2): 214-219.
- [14] Qian X Q, Gu Z, Chen Y. Two-dimensional black phosphorus nanosheets for theranostic nanomedicine [J]. *Materials Horizons*, 2017, 4(5): 800-816.
- [15] Chen W S, Ouyang J, Liu H, *et al.* Black phosphorus nanosheet-based drug delivery system for synergistic photodynamic/photothermal/chemotherapy of cancer [J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(5): 1603864.
- [16] Ellington A D, Szostak J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. *Nature*, 1990, 346(6287): 818-822.
- [17] Yang D, Yang G X, Yang P P, *et al.* Assembly of Au plasmonic photothermal agent and iron oxide nanoparticles on ultrathin black phosphorus for targeted photothermal and photodynamic cancer therapy [J]. *Advanced Functional Materials*, 2017, 27(18): 1700371.
- [18] Wu C K, Zheng L Q, Feng S L. Sequence specific recognition of double-stranded DNA with graphene oxide[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2013, 32(4): 52-55.
吴呈珂, 郑立庆, 冯素玲. 基于氧化石墨烯识别特定双螺旋DNA[J]. *分析实验室*, 2013, 32(4): 52-55.
- [19] Peng J J, Liu S P, Wang L, *et al.* Studying the interaction between CdTe quantum dots and Nile blue by absorption, fluorescence and resonance Rayleigh scattering spectra[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2010, 75(5): 1571-1576.
- [20] Peng J J, Liu S P, Yan S G, *et al.* A study on the interaction between CdTe quantum dots and chymotrypsin using optical spectroscopy[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 2010, 359(1/2/3): 13-17.