

基于法布里-珀罗微腔激光的高分辨率熔解技术研究

梁希月^{**}, 侯梦迪, 张婷婷, 邱诚玉, 王文杰^{*}

太原理工大学新型传感器与智能控制教育部重点实验室, 山西 太原 030024

摘要 基于所制备的高品质法布里-珀罗(F-P)光学微腔,研究了一种基于激光信号的腔内高灵敏度熔解(HRM)曲线检测方法,即将F-P光学微腔作为微激光腔,将嵌入式饱和染料作为增益介质,以产生的激光信号作为检测信号,通过温度扫描,实现了对碱基错配DNA分子的高灵敏度检测与筛查。分别研究了25个碱基对和50个碱基对的目标DNA及碱基错配DNA的熔解曲线,理论及实验结果表明:基于激光信号的HRM检测技术具有低的熔解温度和高的信噪比。

关键词 生物光学; 高分辨熔解技术; 光微流激光; 法布里-珀罗光学微腔

中图分类号 R-331; O433.5+4

文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP55.101702

High Resolution Melting Technology Based on Fabry-Perot Microcavity Laser

Liang Xiyue^{**}, Hou Mengdi, Zhang Tingting, Qiu Chengyu, Wang Wenjie^{*}

Key Laboratory of Advanced Transducers and Intelligent Control System of Ministry of Education, Taiyuan University of Technology, Taiyuan, Shanxi 030024, China

Abstract We study a high-resolution melting (HRM) analysis method based on laser signal in self-made Fabry-Perot (FP) optical microcavity with high quality. We utilize the F-P optical microcavity as the micro-laser cavity, intercalated saturation dyes as the gain media and emitted laser signal as the detection signal to achieve high-resolution detection and screening of mismatched DNA by temperature scanning. We investigate on the melting curves of target DNA and mismatched DNA with 25 base-pairs and 50 base-pairs, respectively. Theoretical and experimental results indicate that the HRM detection method based on laser signal has lower melting temperature and higher signal-to-noise ratio.

Key words biotechnology; high-resolution melting method; optofluidic laser; Fabry-Perot optical microcavity

OCIS codes 170.4090; 170.6280

1 引言

DNA序列中单碱基错配可能引发严重的生物学后果,这些小的改变可能是癌症的根源,或是一些疾病对常规抗生素治疗不产生反应的原因^[1],故实现对单碱基错配DNA的精确、快速检测将会极大地促进疾病诊断、个体化治疗以及基础生化研究等的发展^[2-3]。高分辨熔解分析技术(HRM)是近几年来兴起的一种用于DNA突变扫描的新型遗传学分析方法^[4-8]。HRM利用嵌入型饱和染料产生的荧光作为传感信号来实现样品的检测,具体原理如下:

当饱和染料与双链DNA(dsDNA)结合时,就会产生较强的荧光;随着温度升高,dsDNA逐渐裂解成单链DNA(ssDNA),饱和染料从dsDNA中释放,导致荧光强度降低;通过测量荧光强度随温度的变化可以得到DNA熔解曲线;熔解曲线与构成dsDNA的两组ssDNA之间的亲和力相关,而亲和力的大小取决于DNA序列的长度及错配DNA序列的数目;不同DNA亲和力的差异会造成完全配对DNA与单碱基错配DNA熔解曲线之间的热动力学差异。

采用HRM技术与微流控技术相结合的方法可

收稿日期: 2018-04-10; 修回日期: 2018-05-04; 录用日期: 2018-05-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(61471254)、山西省自然科学基金项目(201601D011010)

* E-mail: wangwenjie@tyut.edu.cn; ** E-mail: lxiyue913@163.com

以极大地降低样品用量。例如,微流控技术已被广泛用于检测生物分子,因所需样品低至纳升量级,故而能够实现芯片上的检测^[9-10]。然而,与所有基于荧光检测 DNA 分析技术类似,随着 DNA 序列长度增加,完全配对 DNA 与错配 DNA 在检测过程中产生的荧光强度的差异越来越小,最后将变得难以分辨。特别是在 HRM 技术中引入微流通道以实现芯片检测时,因微流检测所需样品仅有纳升量级,会进一步降低荧光强度及差异,所以信号极易被系统噪声掩盖。当要分辨出具有更多碱基对,但只有一个碱基对不同的两种 DNA 时,如何精确、高效地检测两者之间的微小热动力学差异就显得极为重要。

2012 年,美国密西根大学范旭东团队首先提出了基于光微流激光的 HRM 技术^[11],他们采用中空的玻璃毛细管(直径 850 μm)作为样品通道和激光微腔(即基于回音壁模式的环形腔),将传统的荧光信号转化为激光信号,通过实验实现了对 40 个碱基对的目标 DNA 和单碱基错配 DNA 的检测。环形微腔具有高的品质因子 Q ,作为激光微腔时可以产生低阈值激光^[12-13]。但是,环形激光腔还有一系列不足,主要为:1) 参与激光振荡的增益介质(检测物质)只分布在腔壁周围,绝大部分待测介质并不参与激光的产生,造成了样品的浪费;2) 在光抽运条件下,未参与激光振荡的待测物质以荧光信号辐射能量,产生了多余的背景光及噪声,对待检测激光信号产生干扰;3) 不易与温控系统结合;4) 不易于集成和实现通量检测。本课题组近期的工作表明^[14-15],通过镀膜技术及几何结构设计制备的法布里-珀罗(F-P)微腔可实现高达 10^5 的 Q 值。将 F-P 微腔与微流控结合时,F-P 微腔的几何腔长为几十微米量级,所需检测样品的体积可低至几百纳升,同时参与激光振荡的增益介质体积约为几纳升(见实验部分说明);如此低的样品用量(或增益介质)需要高 Q 值的光学微腔来保证激光信号的产生。此外,采用高品质因子的光学微腔作为光微流激光谐振腔可以实现较低的激光抽运阈值,因此可以采用比较低的抽运能量产生激光信号,降低染料分子的光漂白效应,增加检测时间。与环形腔相比,基于 F-P 微腔产生的激光信号没有背景荧光信号的干扰,且易与温控系统结合,易于集成及实现通量检测。

因此,本工作采用具有高品质因子的 F-P 光学微腔作为微流控通道及激光谐振腔,通过与温控系统相结合,分别实现了 25 个碱基对和 50 个碱基对的目标与碱基错配 DNA 的检测。理论及实验结果

表明,基于激光信号的 HRM 检测技术具有低的熔解温度和高的信噪比。实验中使用的 DNA 样品由上海生工生物工程股份有限公司提供。25 个碱基对的 DNA 链为:5'-ACA ACA AAG AAC ATA CAT AGG ATA G-3'和 3'-TGT TGT TTC TTG/A TAT GTA TCC TAT C -5'。50 个碱基对的 DNA 链为:5'-ACA ACA AAG AAC AAA TAT ACA TAT ATG ATA TAA CAA CAA ACT AAG TAT GA-3',3'- TGT TGT TTC TTG TTT ATA TGT ATA TA/GC TAT ATT GTT GTT TGA TTC ATA CT -5'和 3'- TGT TGT TTC TT/CG TTT ATA TGT ATA TA/GC TAT ATT GTT GTT TGA TTC ATA CT -5'。其中:加粗位置表示碱基变异失配的位置;单斜线左边表示没有变异时的碱基,即目标 DNA 链(target);单斜线右边表示变异失配后的碱基,即失配 DNA 链。DNA 单链上只有一个碱基失配位置的,称为单碱基失配链,有两个碱基失配位置的称为双碱基失配链。嵌入性饱和染料和缓冲液分别为 SYTO13 和 Tris-acetate-EDTA 缓冲液($\text{pH}=8.3$)。常温下,染料、缓冲液和不同类别的 DNA 双链充分混合,染料和 DNA 的浓度都为 250 $\mu\text{mol/L}$ 。常温时,DNA 以双链形式存在,嵌入性饱和染料和双链 DNA 结合时,可以发射较强的荧光;当温度升高到一定值时,DNA 双链逐渐熔解为单链 DNA,SYTO13 从双链 DNA 中释放出来,逐渐失去发射荧光的能力。

2 理论分析

首先从理论上对基于激光的 HRM 曲线进行分析。基于激光理论,激光阈值条件决定于表达式:

$$n_x \sigma_e = (n_T - n_x) \sigma_a + 2\pi m / (\lambda_e Q_0), \quad (1)$$

引入参数 $\gamma = n_x / n_T$, 令 $Q_{\text{abs}} = 2\pi m / (\lambda_e n_T \sigma_a)$, 则:

$$\gamma = \frac{\sigma_a}{\sigma_a + \sigma_e} \left(1 + \frac{Q_{\text{abs}}}{Q_0} \right), \quad (2)$$

式中: n_x 为抽运阈值时处于激发态的粒子数浓度; n_T 为总的粒子数浓度; σ_e 为辐射激光波长下对应的吸收截面; σ_a 为抽运波长下对应的吸收截面; λ_e 为辐射激光波长; m 为待测液折射率; Q_0 为空心腔品质因子; Q_{abs} 为由待测液等的吸收引起的吸收因子。

根据三能级系统,在稳态情况下,激光的抽运阈值 I_{th} 可表示为

$$I_{\text{th}} = \gamma / (\Gamma - \gamma), \quad (3)$$

式中: Γ 为与双链 DNA 结合的可发光染料分子与待测液中总的染料分子浓度之比。因此 Γ 值的大

小与双链 DNA 的浓度成正比。较低温度时, $\Gamma = 1$; 达到一定温度时, $\Gamma < 1$; 当超过一定温度后, 双链 DNA 全部解为单链, $\Gamma = 0$ 。由热力学理论分析推导可知, Γ 是双链 DNA 分子溶解过程中自由能 ΔG 与温度 T 的函数; 自由能 ΔG 的大小与 DNA 链的长度(碱基个数)、碱基成分及变异或失配碱基个数有关。根据热力学碱基对最近邻法可以求出不同结构 DNA 链的熵值、焓值及自由能^[16]。

基于上述分析及数值模拟可以分别得出待测液为 25 个碱基对 DNA 和 50 个碱基对 DNA 时激光抽运阈值随溶解温度的变化曲线, 如图 1(a) 和图 1(b) 所示(target 表示目标 DNA, mismatch 1 表

示单个碱基错配 DNA, mismatch 2 表示 2 个碱基错配 DNA)。可以看出: 随着温度升高, 双链 DNA 逐渐溶解为单链 DNA, 可发光染料的浓度降低, 激光抽运阈值升高; 对于同样链长的 DNA, 在相同的温度下, 错配 DNA 的激光抽运阈值要高于目标 DNA; 两个碱基错配 DNA 的抽运阈值要高于单个碱基错配 DNA。这是因为错配(两个碱基错配) DNA 的自由能低于目标(单个碱基错配) DNA, 因此在相同的温度下, DNA 链的溶解程度更大, 抽运阈值更高。同理可以看出, 在相同的温度下, 长链 DNA 的激光抽运阈值更低, 或者说在相同的激光抽运阈值下, 长链 DNA 对应的温度更高。

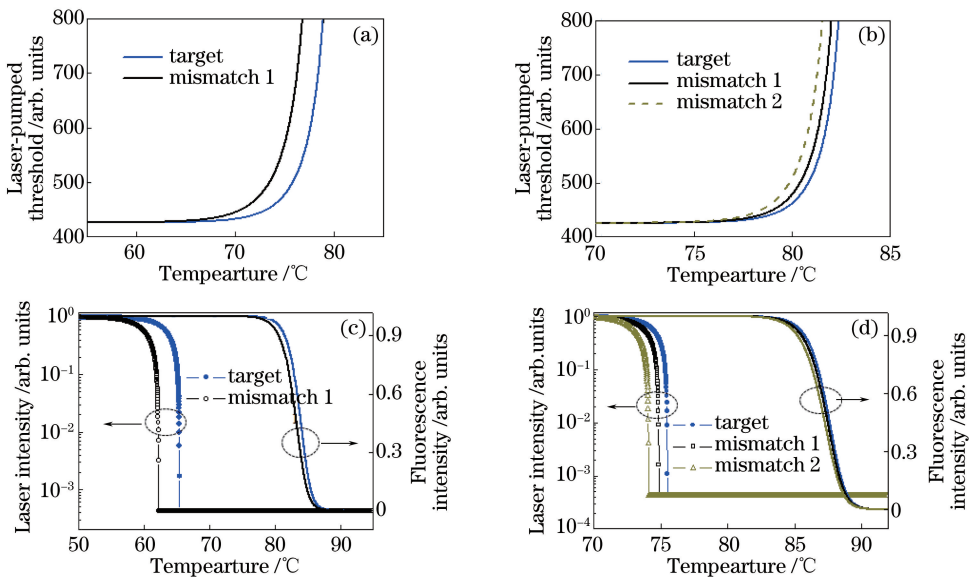


图 1 (a) 25 个碱基对 DNA 及(b) 50 个碱基对 DNA 的激光抽运阈值随温度的变化;
(c) 25 个碱基对 DNA 及(d) 50 个碱基对 DNA 基于激光和荧光的 HRM 曲线

Fig. 1 Variations of laser-pumped threshold with temperature for (a) 25 base-pairs DNA and (b) 50 base-pairs DNA;
HRM curves based on laser and fluorescence for (c) 25 base-pairs DNA and (d) 50 base-pairs DNA

由激光理论分析可知, 当抽运激光能量大于阈值时, F-P 激光腔内振荡产生的激光能量 I_a 可表示为

$$I_a \propto (I_p/I_{th} - 1) = I_p (\Gamma/\gamma - 1) - 1, \quad (4)$$

式中: I_p 为抽运光的能量。当待测液置于一般的容器中时, 发射的荧光强度 I_f 与可发光染料的分子个数成正比:

$$I_f \propto \Gamma. \quad (5)$$

基于以上分析, 结合数值模拟^[17]可以得到不同长度 DNA 的激光 HRM 溶解曲线和荧光 HRM 溶解曲线, 如图 1(c) 和图 1(d) 所示。在模拟过程中保持入射的抽运光能量不变, 随着温度升高, 可发光的染料分子个数减少, 相应的激光抽运阈值升高; 当入

射的抽运光能量小于抽运阈值时, 没有激光信号产生, 输出的激光强度从一个相对较高的值直接变为零信号输出; 相比于激光信号, 基于荧光信号的溶解曲线随着温度升高呈逐渐降低的趋势, 这是由(5)式决定的。对比图 1(c) 和图 1(d) 可以看出: 1) 基于激光 HRM 曲线的突变温度往往比较低, 且主要由入射抽运光的强度决定, 因此基于激光信号的 HRM 可以避免上升到过高的溶解温度, 如接近待测液的沸点, 这对于多个碱基对的长链 DNA 尤为重要; 2) 对于相同的目标 DNA 和碱基错配 DNA, 基于激光 HRM 的信号差异大于基于荧光 HRM 的信号差异, 这主要是由激光本身的特点决定的, 即可以实现对微小信号的放大。

3 实验过程、结果及分析

3.1 实验过程

F-P 光学微腔由两片镀有高反射介质膜的反射镜组成。其中,介质膜由 15 对 SiO_2 和 Ta_2O_5 介质层交替组成,中心波长 550 nm 处的反射率 $\geq 99.9\%$ 。F-P 微腔的几何腔长约为 30 μm ,由两片反射镜间的隔片厚度决定。反射镜分别采用 Si 和 SiO_2 作为基底,其中 Si 基底与温控加热装置充分接触,如图 2 所示。温控系统由温度控制器、半导体加热片和温度传感器组成。微流通道横向尺寸约为 1 mm(宽) \times 5 mm(长),待检测液样品总用量约为 150 nL。激光抽运区域聚焦光斑的直径约为 200 μm ,因此参与激光振荡的样品体积约为 6 nL。待检测液由入口注入到微流通道和 FP 微腔中,通过温控系统实现对待检测液的温度控制,温度控制精度为 0.1 $^\circ\text{C}$ 。

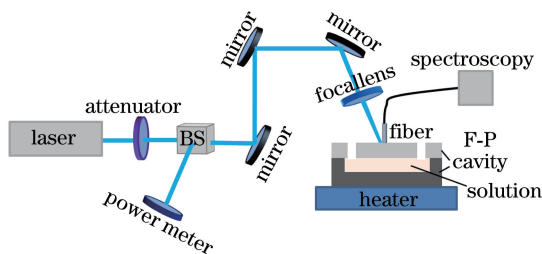


图 2 基于激光信号的 HRM 实验示意图

Fig. 2 HRM experimental schematic based on laser signals

如图 2 所示,从脉冲激光器(入射波长 488 nm,

脉冲宽度 5 ns,重复频率 20 Hz)出射的抽运光经衰减片、分光棱镜(分光比为 50:50)、反射镜后,再经由聚焦透镜($f = 100$ mm)斜入射到 F-P 微腔中。分别通过衰减片和光功率计调节和记录抽运光的强度。微流控芯片及温控装置位于三维平移台上,通过调节平移台,可使聚焦光斑正好入射到 F-P 微腔中,以保证最大的抽运光能量密度。出射的荧光^[18]或激光信号经由光纤直接传输到光谱仪中(Horriba 320)进行分析。

3.2 实验结果及分析

首先测量了常温下(25 $^\circ\text{C}$)待测溶液的激光抽运阈值。实验数据表明,25 个碱基对和 50 个碱基对的 DNA 待测液在常温下的激光抽运阈值约为 30 $\mu\text{J}/\text{mm}^2$ 。这是因为实验中保持各待测液中染料分子的浓度相同,即 250 $\mu\text{mol}/\text{L}$,且在常温时染料分子充分与双链 DNA 结合。随后保持抽运能量密度不变,约为 10³ $\mu\text{J}/\text{mm}^2$,通过逐渐改变待测溶液的温度,使用光谱仪分别记录不同待测液的激光出射情况。图 3 给出了待测液为 50 个碱基对的目标 DNA、单碱基错配 DNA 和双碱基错配 DNA 在不同温度下的激光出射光谱。为更清楚地进行对比,不同温度下的光谱在竖直方向上进行了平移,但每幅图的坐标范围都保持一致。可以看出:随着温度升高,激光信号强度逐渐降低,当超过某一温度时,没有激光信号产生,即待测液中可发光的染料分子浓度带来的增益不足以弥补激光腔内的各种损耗,这一温度为溶解温度 T_m 。

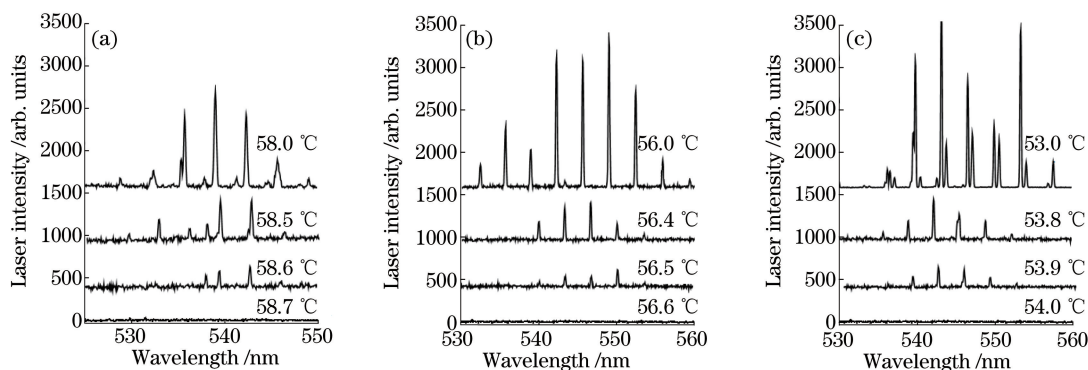


图 3 50 个碱基对的(a)目标 DNA、(b)单碱基错配 DNA 和(c)双碱基错配 DNA 在不同温度下的光谱图

Fig. 3 Spectra of (a) target DNA, (b) single-base mismatch DNA, and (c) double-base mismatch DNA with 50 base-pairs at different temperatures

通过对不同温度下的激光出射光谱进行积分求和,分别给出了 25 个碱基对和 50 个碱基对的不同类型 DNA 的 HRM 曲线,如图 4 所示。可以看出:随着温度升高到一定数值,激光信号逐渐降低;当温

度等于溶解温度 T_m 时,激光信号强度约为 10⁴ ~ 10⁵ 量级;当温度超过溶解温度 T_m 后,激光信号强度即变为零,无任何其他荧光信号的干扰,因而具有高的信噪比。根据图 4(a)可得 25 个碱基对的目标

DNA 和单碱基错配 DNA 的熔解温度分别为 52.0 °C 和 57.4 °C, 熔解温度差为 $\Delta T_m = 5.4$ °C; 同理, 根据图 4(b) 可得 50 个碱基对的目标 DNA、单碱基错配 DNA、双碱基错配 DNA 的熔解温度分别

为 58.6, 56.5, 53.9 °C, 与图 3 所示结果相同。单碱基错配 DNA 和双碱基错配 DNA 与目标 DNA 的熔解温度差分别为 2.1 °C 和 4.7 °C, 因此, 通过 T_m 的差异可以对碱基错配 DNA 进行筛查。

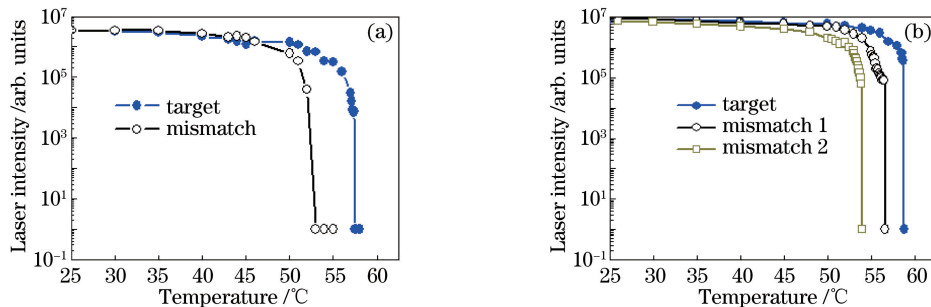


图 4 基于激光信号的 HRM 曲线。(a) 25 个碱基对 DNA; (b) 50 个碱基对 DNA

Fig. 4 HRM curves based on laser signal. (a) 25 base-pairs DNA; (b) 50 base-pairs DNA

4 结 论

本课题组采用高品质因子 F-P 光学微腔作为微型激光谐振腔, 通过与温控系统结合, 分别实现了对 25 个碱基对和 50 个碱基对的目标 DNA 及碱基错配 DNA 的筛查和检测。理论及实验结果表明: 基于激光信号的 HRM 检测技术具有低的熔解温度和高的信噪比; 25 个碱基对的目标 DNA 和单碱基错配 DNA 的熔解温度分别为 57.4 °C 和 52.0 °C; 50 个碱基对的目标 NDNA、单碱基错配 DNA、双碱基错配 DNA 的熔解温度分别为 58.6, 56.5, 53.9 °C。可见, 基于激光信号的 HRM 检测技术具有低的熔解温度和高的信噪比。

随着 DNA 链长度增加, 单碱基错配 DNA 与目标 DNA 的热力学差异越来越小。在接下来的实验中, 本课题组将继续增加 DNA 链的长度, 研究基于激光的 HRM 技术可以筛查和检测的单碱基错配 DNA 链的最大长度。

参 考 文 献

- [1] Wang D G, Fan J B, Siao C J, *et al.* Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome[J]. *Science*, 1998, 280(5366): 1077-1082.
- [2] Christopoulos T K. *Nucleic acid analysis* [J]. *Analytical Chemistry*, 1999, 71(18): 425-438.
- [3] Hawkins R D, Hon G C, Ren B. Next-generation genomics: an integrative approach [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(7): 476-486.
- [4] Wittwer C T. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen[J]. *Clinical Chemistry*, 2003, 49(6): 853-860.
- [5] Reed G H, Wittwer C T. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis [J]. *Clinical Chemistry*, 2004, 50(10): 1748-1754.
- [6] Montgomery J, Wittwer C T, Palais R, *et al.* Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis [J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(1): 59-66.
- [7] Gudnason H, Dufva M, Bang D D, *et al.* Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(19): e127.
- [8] Rodríguez López C M, Guzmán Asenjo B, Lloyd A J, *et al.* Direct detection and quantification of methylation in nucleic acid sequences using high-resolution melting analysis [J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(21): 9100-9108.
- [9] Zeng X Y, Zhang K D, Pan J, *et al.* Chemiluminescence detector based on a single planar transparent digital microfluidic device [J]. *Lab on A Chip*, 2013, 13(14): 2714-2720.
- [10] Ju Y R, Song J, Geng Z X, *et al.* A microfluidics cytometer for mice anemia detection [J]. *Lab on A Chip*, 2012, 12(21): 4355-4362.
- [11] Lee W, Fan X D. Intracavity DNA melting analysis with optofluidic lasers [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(21): 9558-9563.
- [12] Shopova S I, Cupps J M, Zhang P, *et al.* Optofluidic ring resonator lasers based on highly efficient resonant energy transfer [J]. *Optics Express*, 2007, 15(20): 12735-12742.

- [13] Lee W, Li H, Suter J D, *et al.* Tunable single mode lasing from an on-chip optofluidic ring resonator laser [J]. *Applied Physics Letters*, 2011, 98(6): 061103.
- [14] Wang W J, Zhou C H, Zhang T T, *et al.* Optofluidic laser array based on stable high-Q Fabry-Pérot microcavities [J]. *Lab on A Chip*, 2015, 15 (19): 3862-3869.
- [15] Zhang T T, Zhou C H, Wang W J, *et al.* Generation of low-threshold optofluidic lasers in a stable Fabry-Pérot microcavity [J]. *Optics & Laser Technology*, 2017, 91: 108-111.
- [16] SantaLucia J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(4): 1460-1465.
- [17] Li W Y, Wang P, Zhang J W, *et al.* Three-dimensional visualization for numerical simulation data of laser transmission [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2017, 54(11): 111410.
黎万义, 王鹏, 张军伟, 等. 激光传输数值模拟数据的三维可视化研究 [J]. *激光与光电子学进展*, 2017, 54(11): 111410.
- [18] Zhang X H, Liu C, Liang C, *et al.* Microlens array applied for laser induced fluorescence detection [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2017, 54 (8): 080402.
张学海, 刘冲, 梁超, 等. 应用于激光诱导荧光检测的微透镜阵列 [J]. *激光与光电子学进展*, 2017, 54 (8): 080402.