

# 具不同碱基数单链核酸的光致发光特性

梁昌能<sup>1</sup>, 张杰<sup>1</sup>, 徐文<sup>1,2</sup>, 丁岚<sup>1</sup>, 钱伟<sup>3</sup>, 李旋<sup>4</sup>

<sup>1</sup>云南大学物理与天文学院, 云南 昆明 650091;

<sup>2</sup>中国科学院固体物理研究所, 安徽 合肥 230031;

<sup>3</sup>云南大学材料科学与工程学院, 云南 昆明 650091;

<sup>4</sup>云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650091

**摘要** 采用标准光荧光方法,在不加入探针或荧光、磷光染料的情况下,测量了具有 56 个和 29 个碱基的两种核酸单链样品的光致发光特性;该方法不会对样品造成破坏或污染。结果表明:当激发波长在 310~410 nm 之间时,能够在 410~480 nm 波长区间观测到样品明显的发光峰;两种样品的发光峰随着抽运波长的红移而红移,且发光峰的强度随激发波长的增加而先增强后减弱;具有两种不同碱基数和序列的核酸样品由于具有不同的电子能级结构而显示出了不同的光致发光特性,原理上可以用于甄别两种不同的核酸材料,有助于单链核酸样品的无损、无标记检测和鉴别。

**关键词** 光谱学;光致发光;荧光;单链核酸;无损检测

中图分类号 O433.2; O433.4

文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP55.033004

## Photoluminescence Properties of Single-Stranded Nucleic Acids with Different Base Sequences

Liang Changneng<sup>1</sup>, Zhang Jie<sup>1</sup>, Xu Wen<sup>1,2</sup>, Ding Lan<sup>1</sup>, Qian Wei<sup>3</sup>, Li Xuan<sup>4</sup>

<sup>1</sup> School of Physics and Astronomy, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China;

<sup>2</sup> Institute of Solid State Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui 230031, China;

<sup>3</sup> School of Materials Science and Engineering, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China;

<sup>4</sup> School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China

**Abstract** We employ the standard fluorescence method to measure the photoluminescence (PL) properties of the single-stranded nucleic acids samples with 56 and 29 base sequences. This method does not need the help of probe and fluorescence or phosphorescence material, does not damage or contaminate the sample during the measurements. It is found that when the excitation wavelength is in the range of 310-410 nm, the PL peak of the samples can be observed in the wavelength range of 410-480 nm. The PL peak red-shifts when the pumping wavelength red-shifts, while the intensity of the PL peak increases and then decreases with the increase of excitation wavelength. The single-stranded nucleic acid samples with two different base sequences show different properties of the PL spectra due to their different electronic band structures. The results are helpful for non-invasively and label-free measurement and identification of nucleic acid materials.

**Key words** spectroscopy; photoluminescence; fluorescence; single-stranded nucleic acids; non-invasively measurement

**OCIS codes** 300.6280; 260.2510; 260.3800

收稿日期: 2017-07-27; 收到修改稿日期: 2017-09-19

基金项目: 国家自然科学基金(11304272, 11574319, 11364045)、云南大学第五批中青年骨干教师培养计划、云南省科技厅项目(2016FC001)、云南大学创新团队项目

作者简介: 梁昌能(1992—),男,硕士研究生,主要从事电子材料系统光电物理特性方面的研究。

E-mail: liangchangneng@mail.ynu.edu.cn

导师简介: 徐文(1962—),男,博士,教授,主要从事量子功能材料基本物理特性方面的研究。

E-mail: wenxu\_issp@aliyun.com(通信联系人)

## 1 引言

核酸是构成生命的基本物质之一,早在 1953 年 Watson 和 Crick 就提出了核酸的双螺旋结构<sup>[1]</sup>,之后 Langridge 等<sup>[2]</sup>也通过理论模型证明了这种结构的正确性。至今已经发现核酸有 A、B、C、D、E、S 和 Z 等构象<sup>[1,3]</sup>,可以使用磷酸三脂法、固相磷酸三脂法、固相亚磷酸胺法、cDNA 法和聚合酶链式反应法进行人工合成<sup>[4]</sup>。目前,常采用标记和加入染料的方法动态观测核酸的转录、转运和基因的表达过程。在荧光配对探针探测核酸技术中,靶和器件上的低聚核苷酸配对会产生荧光能量的共振转移,从而导致荧光猝灭。该技术可以探测体内外的核酸,具有高灵敏性和选择性<sup>[5]</sup>。此外,由于寡核苷酸可以吸附特定的配合基,故可制备核酸荧光探针,完成蛋白质、小分子和铁离子等靶的探测<sup>[6]</sup>。利用荧光团共价键吸附寡核苷酸的方式,可对 DNA 序列进行分析<sup>[7]</sup>。近年来,人们发现采用石墨稀和二硫化钼制作的场效应晶体管进行修饰后同样可用于探测核酸,探测灵敏度可达  $10^{-18}$  mol/L<sup>[8]</sup>。

目前对核酸的研究分析方法主要有电学和光学两类。与毛细管电泳法<sup>[9-10]</sup>、阳极溶出伏安法<sup>[9,11]</sup>等电学方法相比,光学方法能提供高效的非接触测量,且能反映更丰富的物质组分和分子结构等信息,故在核酸探测中被广泛采用。常见的光学方法包括紫外分光光度法<sup>[9,12-14]</sup>、共振光散射法<sup>[12]</sup>、荧光共振能量转移技术<sup>[5]</sup>以及固体基质室温磷光法<sup>[9,15-16]</sup>等。为了提高探测灵敏度,增大测量范围,这些方法往往需要加入特定的荧光剂、试剂或探针,从而带来了样品污染、环境毒性和成本增高等问题。

众所周知,标准光荧光技术广泛应用于物理和材料的分析中,具有灵敏度高、选择性好、成本低和操作简便等优点<sup>[17-19]</sup>。为了探索上述问题的解决途径以及研究短链和长链核酸单链样品光致发光特性的差别,本文使用标准光荧光方法,在不加入探针或荧光、磷光染料的情况下,测量了 56 个和 29 个碱基的两种核酸单链样品的光致发光特性。该方法可以通过改变抽运光的波长、强度来测量核酸样品的发光特性,不会对样品造成破坏或污染。由于核酸上的碱基功能团(具共轭双键结构)与核酸结构(由五碳糖、碱基、磷酸形成的核苷酸构成)耦合,形成了独特的电子能级结构,在抽运光场作用下会产生光致发光,其发光谱的峰位和宽度与系统的电子能级结构、本征载流子和光生载流子浓度密切相关。实验

结果显示,当激发波长在 310~410 nm 区间时,能够在 410~480 nm 波长区间观测到明显的光致发光峰。两种样品的发光峰位置随抽运波长的红移而红移,并且发光峰的强度随激发波长的增加而先增强后减弱。更重要的是,实验发现具有两种不同碱基数和序列的核酸样品显示不同的光致发光谱宽特性,原理上可以用于甄别两种不同的核酸材料。这些结果将在单链核酸样品的无损、无标记快速检测和鉴别中具有潜在应用。

## 2 实验方法

在常规的核酸单链研究及应用中,通常合成小于 60 个碱基的核酸,这是因为过长的核酸链会使核酸变得不稳定,容易因为理化环境的波动而发生变质。基于此,实验中分别制备了含有 56 个和 29 个碱基的核酸单链,用于研究长链和短链核酸样品光致发光特性的差别。由于本实验的主要目的是证明在不加入探针或荧光、磷光染料的情况下,光致发光谱中的某些特性可用于鉴别不同的核酸单链,因此,为了增大样品的任意性并避免人为选择因素的干扰,实验采用了具有不同碱基序列和长度的核酸单链。将核酸单链用双蒸水配制成浓度相同的溶液,并装入石英比色皿,具体参数如表 1 所示。需要指出的是,样品的碱基序列及数目都已在制备环节中由基因测序仪器标定,实验主要关注两种样品光致发光谱特性的差别,而非基因测序的验证。为了排除比色皿及溶剂的影响,设置的对照组分别为空比色皿及盛装了双蒸水的比色皿。实验采用的标准光荧光系统如图 1 所示。氙灯光源的宽谱光经过 Gemini180 单色仪后变为单色抽运光,照射到样品室内的样品上,样品发出的荧光进入 iHR320 光谱仪后被光电倍增管(PMT)探测到,信号经计算机处理后得到样品的光致发光信号谱。

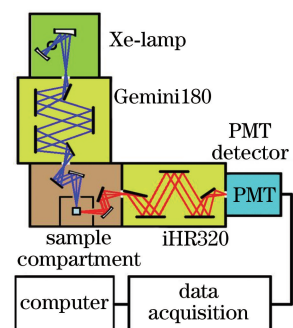


图 1 发光检测光路示意图

Fig. 1 Schematic of optical path of fluorescence detection

表1 核酸样品的属性

Table 1 Properties of nucleic acid samples

Sample	Sequence 5'-3'	Number of base sequence	Embellish	Purification way	Temperature of melting / $^{\circ}\text{C}$	Concentration / ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
61191	TAG-AAT-TCA-TGA-CAA- CAG-TTC-CTA-CGG-AT	29	None	PAGE	58.2	5
61192	TAT-CGG-CCG-CTT-CCG- CCA-CCC-TGG-AAG-TAC- AGG-TTT-TCA-GCC- ACA-GCA-TTA-TCC-CT	56	None	PAGE	73.7	5

Note: PAGE represents polyacrylamide gel electrophoresis.

为了保证实验结果的可靠性,对样品组(61191和61192)和对照组(空比色皿,比色皿中加入双蒸水(ddwater))都使用了三次测量后取平均值的方法进行数据处理。当抽运光(或称激发光)波长 $\lambda_{\text{ex}}$ 在310~410 nm之间以步长10 nm增大时,在空比色皿的光致发光谱中未检测到信号,说明比色皿在该波段不发生光致发光效应。实验观测到的样品组及

双蒸水均能在抽运光激发下产生发光效应,其发射光谱如图2所示。 $I$ 为强度, $\lambda_{\text{em}}$ 为发射波长。显然,双蒸水对样品组的结果存在一定干扰,导致发射光谱短波处出现了峰值。考虑到双蒸水和核酸单链之间不存在能级耦合与能量交换,故可将样品光谱直接减去双蒸水光谱,以扣除溶剂的影响,得到更真实的核酸单链的光致发光光谱。

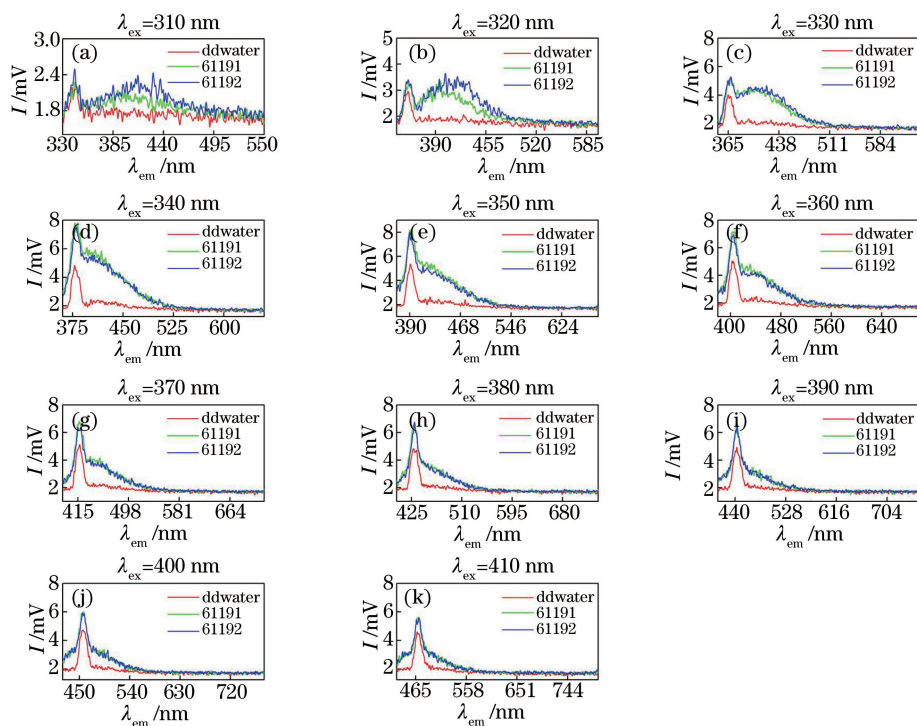


图2 两种核酸样品溶液和双蒸水的发光光谱

Fig. 2 Fluorescence spectra of two nucleic acid sample solutions and double distilled water

### 3 实验结果及讨论

当抽运光(或称激发光)波长 $\lambda_{\text{ex}}$ 在310~410 nm之间以步长10 nm增大时,两种单链核酸样品(61191样品和61192样品)的光致发光谱(已扣除双蒸水和比色皿的影响)如图3(a)和图3(b)所示。显然,在不加入探针或荧光、磷光染料的情况

下,两种样品在发射波长 $\lambda_{\text{em}}=400\sim 480$  nm之间有显著的光致发光效应。通常,能吸收波长大于220 nm光子的有机分子带有衍生的 $\pi$ -电子轨道或共轭双键<sup>[20]</sup>。而核酸由五碳糖、碱基和磷酸组成的核苷酸分子构成,因此,共轭双键碱基与其他结构的耦合将形成独特的电子能级或能带,从而导致实验观测到光致发光现象。

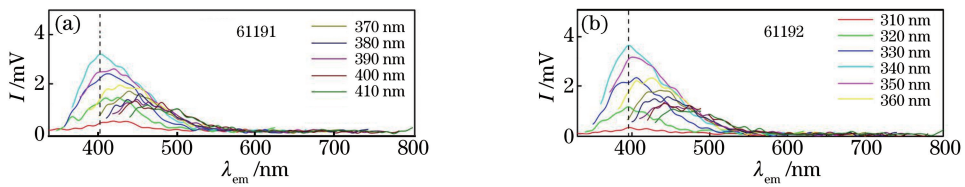


图 3 两种核酸样品的发光光谱。(a) 61191 样品;(b) 61192 样品

Fig. 3 Fluorescence spectra of two nucleic acid. (a) Sample 61191; (b) sample 61192

基于图 3, 还可进一步得出核酸样品发光峰波长  $\lambda_{em}$  和峰值强度  $I_{peak}$  随激发光波长  $\lambda_{ex}$  的变化关系, 分别如图 4(a)、(b) 所示。两种样品都有抽运光子能量大于荧光光子能量 (即  $\lambda_{ex} < \lambda_{em}$ ) 的现象。这是由于两种样品能带中的基态电子被激发后, 都通过无辐射跃迁过程进入了亚稳态, 并进一步以辐射跃迁的方式回到基态, 同时辐射出能量较小的荧光光子, 如图 5 所示。图 5 中, S 表示能态, V 表示振动能级。此外,  $\lambda_{em}$  也对应了在  $\lambda_{ex}$  激发下发生概率最高的辐射跃迁, 而其对应的峰值

强度  $I_{peak}$  则反映了两种样品中发生不同跃迁的电子浓度,  $I_{peak}$  越大则发生该跃迁的电子在能带中的浓度越高。此外, 由图 4(a) 可见, 当激发光在 350 ~ 390 nm 范围时, 两种核酸样品的  $\lambda_{ex}-\lambda_{em}$  较为接近, 但当  $\lambda_{ex} < 350$  nm 和  $\lambda_{ex} > 390$  nm 时则有显著差异。在图 4(b) 中也能观测到两种核酸样品的  $\lambda_{ex}-I$  曲线存在差异。这种差异反映了两种核酸样品能带结构的差异以及碱基中某些光敏感结构浓度的差异。因此, 基于这些结果可对两种样品进行无标记鉴别。

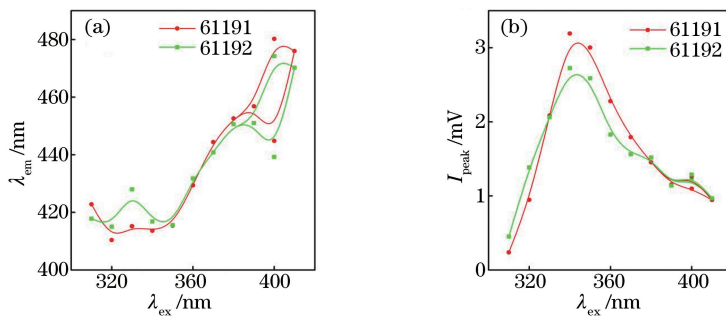


图 4 (a) 核酸样品荧光峰峰位与激发波长的关系;(b) 核酸样品荧光峰强度与激发波长的关系

Fig. 4 (a) Relationship between fluorescence peak position and the excitation wavelength; (b) relationship between fluorescence peak intensity and the excitation wavelength

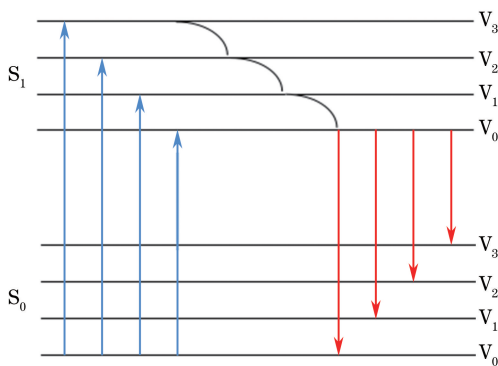


图 5 光致发光过程原理示意图

Fig. 5 Schematic of photoluminescence process

实验中测得激发光波长  $\lambda_{ex}$  在 310 ~ 410 nm 之间变化时, 两种样品的最强荧光峰位置都是  $\lambda_{em} = 413.6$  nm。此外, 还研究了不同波长的抽运光子  $\lambda_{ex}$  激发起 413.6 nm 荧光的强度, 如图 6 所示。该图反

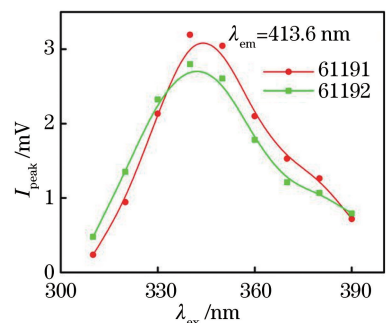


图 6 两种核酸样品最强荧光峰峰位的激发谱

Fig. 6 Excitation spectra of highest intensity fluorescence peak of two nucleic acid samples

映了不同抽运光子激发峰值荧光的发光效率  $\eta$ , 它与峰值荧光强度的关系为  $\eta \propto I_{peak}$ 。由图可见, 两种样品发出了 413.6 nm 的荧光, 其发光效率均随抽运光波长的增大而先增后降,  $\lambda_{ex} = 340$  nm 时的发光



效率最高。与图 4 类似,两种样品的发光效率曲线也呈现出差异特性,可用于无标记检验及鉴别。

## 4 结 论

采用标准光荧光方法分别测量了具有 56 个和 29 个碱基的两种核酸单链样品的光致发光特性,测量中未加入探针或荧光、磷光染料,不会对样品造成污染和破坏。结果显示,当抽运光波长在 310~410 nm 区间变化时,能够在 410~480 nm 波长区间观测到显著的光致发光峰。两种样品的  $\lambda_{em}$  随  $\lambda_{ex}$  的红移而红移,并且发光峰的强度随  $\lambda_{ex}$  的增大而先增强后减弱。更重要的是,本研究证实了两种样品在  $\lambda_{ex}$ - $\lambda_{em}$  特性、 $\lambda_{ex}$ - $I$  特性以及  $\lambda_{ex}$ - $I_{peak}$  特性等方面都存在差异,这种差异反映了两种核酸样品中的能带结构差异以及碱基中某些光敏感结构的浓度差异。结合这三种光致发光特性可以对两种样品进行无标记检验和鉴别。

本研究初步证明了在不加入探针或荧光、磷光染料的情况下,通过测量样品的光致发光特性可以间接得到单链核酸的能带结构和不同能态电子浓度的信息,从而鉴别出单链核酸的种类。若能通过实验测量建立一整套不同单链核酸样品的  $\lambda_{ex}$ - $\lambda_{em}$  特性、 $\lambda_{ex}$ - $I$  特性以及  $\lambda_{ex}$ - $I_{peak}$  特性数据库,就能在应用中通过对样品的光谱特性进行数据匹配,快速完成无标记样品的分类和鉴别,且这种鉴别不会对样品造成破坏和污染,没有环境毒性,成本低廉。总之,本研究结果也可推广到其他生物大分子的检测中,在未来的生物和医学领域具有潜在应用价值。

## 参 考 文 献

- [1] Whelan D R, Hiscox T J, Rood J I, *et al.* Detection of an en masse and reversible B-to A-DNA conformational transition in prokaryotes in response to desiccation [J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2014, 11(97): 20140454.
- [2] Langridge R, Marvin D A, Seeds W E, *et al.* The molecular configuration of deoxyribonucleic acid: II. Molecular models and their Fourier transforms [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1960, 2(1): 38-62.
- [3] 张今, 张红樱, 李青山, 等. 核酸结构与动力学导论 [M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [4] Lin X C, Zhang X C. The newest study about the artificial synthesis of RNA and DNA [J]. *Journal of Fuzhou Teachers College (Natural Science Edition)*, 1999, 19(3): 49-50.

林祥潮, 张秀春. 核酸人工合成的研究进展 [J]. *福州师专学报(自然科学版)*, 1999, 19(3): 49-50.

- [5] Guo J, Ju J Y, Turro N J. Fluorescent hybridization probes for nucleic acid detection [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 402(10): 3115-3125.
- [6] Juskowiak B. Nucleic acid-based fluorescent probes and their analytical potential [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 399(9): 3157-3176.
- [7] Smith L M, Sanders J Z, Kaiser R J, *et al.* Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis [J]. *Nature*, 1986, 321(6071): 674-679.
- [8] Fang R. Label-free detection of deoxyribonucleic acid (DNA) hybridisation on 2D materials: Graphene and MoS<sub>2</sub> [D]. Taiwan: Chiao Tung University, 2014.
- [9] Zhang M, Zhao H, Lü Q L, *et al.* Studies on the determination of adenine in DNA hydrolyzate based on the fluorescence quenching of evans blue and its mechanism [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2008, 27(3): 263-265.  
张敏, 赵虎, 吕庆鑫, 等. 核酸水解产物中腺嘌呤的荧光猝灭法测定及机理研究 [J]. *分析测试学报*, 2008, 27(3): 263-265.
- [10] Xu X Y, Peng J, He Z K. Basic principle of capillary electrophoresis and related technology [J]. *Ningxia Journal of Agriculture and Forestry Science and Technology*, 2012, 53(11): 91-92, 95.  
徐祥云, 彭君, 何志坤. 浅谈毛细管电泳的基本原理及相关技术 [J]. *宁夏农林科技*, 2012, 53(11): 91-92, 95.
- [11] Yin D C, Ren B Z, Hou B L. Online determination of lead and cadmium in nonferrous metal mining area rain runoff by anodic stripping voltammetry [J]. *Journal of Hunan Institute of Engineering (Natural Science Edition)*, 2012, 22(2): 69-72.  
印得澈, 任伯帜, 侯保林. 阳极溶出伏安法在线测定有色金属矿区雨水径流中铅和镉 [J]. *湖南工程学院学报(自然科学版)*, 2012, 22(2): 69-72.
- [12] Feng S, Li Z P, Zhang S H, *et al.* Recent advance of resonance light scattering technique for the determination of nucleic acids [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2004, 24(12): 1676-1680.  
冯硕, 李正平, 张淑红, 等. 红共振光散射技术测定核酸的研究进展 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2004, 24(12): 1676-1680.
- [13] Ji T Y, Xu L R, Zhou P. Study on nucleic acid fluorescent probe detection of lead ion [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2010, 29(1): 51-54.  
戢太云, 徐鲁荣, 周培. 核酸荧光探针检测铅离子的

- 研究[J]. 分析测试学报, 2010, 29(1): 51-54.
- [14] Gao Y, Li J S, Li W L, *et al.* Study on mechanism of interactions between DNA and antragallol of madder color[J]. *Acta Optica Sinica*, 2015, 35(2): 0230003.  
高颜, 李军生, 李蔚仑, 等. 茜草色素蒽棕与 DNA 的相互作用机理研究[J]. *光学学报*, 2015, 35(2): 0230003.
- [15] Feng X H, Mai Y, Dong C, *et al.* Determination of trace adenine by paper-substrate room temperature phosphorescence[J]. *Journal of Fuzhou University (Natural Science Edition)*, 1999, 27(s1): 131-133.  
冯小花, 麦洋, 董川, 等. 纸基质室温磷光法测定痕量腺嘌呤[J]. *福州大学学报(自然科学版)*, 1999, 27(s1): 131-133.
- [16] 徐文婷. 固体基质室温磷光法新基质的研究与应用[D]. 北京: 首都师范大学, 2008.
- [17] Liu X P, Chang W H, Application of fluorescence spectra on analysis of nucleic acid [J]. *Henan Chemical Industry*, 2005, 22(3): 41-42.  
刘雪平, 常伟华. 荧光光谱在核酸分析中的应用[J]. *河南化工*, 2005, 22(3): 41-42.
- [18] Wang S T, Chen D Y, Wang X L, *et al.* Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons combining fluorescence analysis with ABC-BP neural network [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2015, 42(11): 1115001.  
王书涛, 陈东营, 王兴龙, 等. 荧光分析法和 ABC-BP 神经网络相结合的多环芳香烃的检测[J]. *中国激光*, 2015, 42(11): 1115001.
- [19] Wang S T, Chen D Y, Wei M, *et al.* Application of fluorescence spectroscopy and PSO-BP neural network in the detection of potassium sorbate concentration[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2015, 42(5): 0515004.  
王书涛, 陈东营, 魏蒙, 等. 荧光光谱法和 PSO-BP 神经网络在山梨酸钾浓度检测中的应用[J]. *中国激光*, 2015, 42(5): 0515004.
- [20] 彭采尔, 高洛维娜, 罗诺夫, 等. 分子发光分析法(荧光法和磷光法)[M]. 祝大昌, 陈剑铓, 朱世盛, 译. 上海: 复旦大学出版社, 1985: 1-20.