

# 激光与光电子学进展

## 基于激光的 G-四链体高分辨率熔解曲线分析

张婷婷, 侯梦迪, 贾卓楠, 花双全, 王文杰\*, 刘绍鼎

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** 结合所制备的高品质法布里-珀罗(F-P)光学微腔,利用基于激光的高分辨率熔解曲线(HRM)分析研究了 G-四链体脱氧核糖核酸(DNA)结构的热稳定性。探究了 $K^+$ 存在的情况下,诱导富含鸟嘌呤(G)的DNA单链形成 G-四链体,不同 $K^+$ 浓度的DNA溶液,对应于溶液中G-四链体结构的不同热稳定性。实验结果表明,激光HRM曲线能很好地分辨出不同 $K^+$ 浓度的DNA结构。此外,通过分析不同DNA溶液在任意温度下的激光阈值,发现利用较低的泵浦能量可以很好地降低曲线的熔解温度。

**关键词** 医用光学; G-四链体; 高分辨率熔解曲线; 法布里-珀罗光学微腔

中图分类号 R331;O433.4

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202259.0717002

## Laser-Based High Resolution Melting Analysis for Studying G-Quadruplex

Zhang Tingting, Hou Mengdi, Jia Zhuonan, Hua Shuangquan,  
Wang Wenjie\*, Liu Shaoding

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

**Abstract** Combined with the high quality Fabry-Perot (F-P) optical microcavities, we studied the thermal stability of G-quadruplex DNA structure laser-based high resolution melting (HRM) analysis. DNA solutions with three different concentrations of  $K^+$ , which corresponds to different thermostability of the G-quadruplex DNA structure in the solution, are studied. Experimental results show that DNA structure with different  $K^+$  concentrations can be well distinguished by laser-based HRM curves. Further, by analyzing the laser thresholds of different DNA solutions at arbitrary temperature, it is found that the melting temperature of the curves can be well decreased by using a lower pump energy.

**Key words** medical optics; G-quadruplex; high resolution melting; Fabry-Perot optical microcavity

### 1 引言

鸟嘌呤-四链体(G-quadruplex)是一种脱氧核糖核酸(DNA)二级结构,其核心结构是由至少两个G-四分体组成,并通过单价阳离子和 $\pi$ - $\pi$ 键堆叠稳定<sup>[1-2]</sup>。G-四分体是由四个鸟嘌呤组成,且鸟嘌呤之间通过Hoogsteen氢键相互作用。有证据表明,这

些结构的形成不仅可以在体外进行,也可以在体内发生<sup>[3]</sup>。在细胞中,这些结构可以调节转录<sup>[4]</sup>、选择性剪接<sup>[5]</sup>和翻译<sup>[6]</sup>,因此对G-四链体的研究具有重要的生物学意义。作为一种DNA分析平台,高分辨率熔解(HRM)分析是一种简单、快速且经济高效的DNA分子分析方法<sup>[7-15]</sup>,例如可以识别发生突变和发生甲基化的DNA序列。它依靠靶标与被分析

收稿日期: 2021-06-01; 修回日期: 2021-06-29; 录用日期: 2021-07-06

通信作者: \*wangwenjie@tyut.edu.cn

DNA之间由环境温度改变产生的热力学差异来进行区分<sup>[11, 15]</sup>。荧光共振能量转移(FRET)是另一种广泛使用的DNA分析工具<sup>[16-21]</sup>,它可以被用作精确的标尺来测量装饰在DNA分子不同位置的两个生色团之间的距离,并且具有原子级的分辨率。而基于FRET的高分辨率熔解测定法已广泛用于研究DNA结构(例如G-四链体结构)的热稳定性<sup>[18, 21]</sup>。

高分辨率熔解曲线分析将生色团的荧光作为传感检测信号。最近,研究人员提出了基于激光的HRM-DNA分析方法,该方法利用了激光腔实现了信号的光学放大,以产生的激光信号作为检测信号<sup>[22-24]</sup>。与基于荧光的HRM相比,基于激光的HRM具有许多优势。例如,激光信号比荧光强得多,因此在分析DNA结构之间的差异时提供了更高的辨别率。另一方面,基于激光的HRM的熔解温度可以在一定的温度范围内根据激光条件任意调节。因此,可以通过优化光学条件实现上述检测目标。例如通过使用较低的外部激励或较低的Q因子将熔解温度移至较低的温度范围。

本文使用基于激光的高分辨率熔解分析研究了G-四链体DNA结构的热稳定性。研究了具有三种不同K<sup>+</sup>浓度的DNA溶液,其对应于溶液中G-四链体结构的不同热稳定性。实验结果表明,与传统的基于荧光的HRM技术相比,基于激光的HRM曲线在G-四链体DNA分子检测方面具有更大的优势。

## 2 实验部分

### 2.1 实验材料及仪器

实验材料为样品DNA[设计序列为5'-GGGTTTGGGTATGGGTTTGGG-3',T为胸腺嘧啶,其中5'端连羟基荧光素(FAM),3'端连接羟

基四甲基罗丹明(TAMRA)荧光基团,购自生物化工公司,纯化方式为高压液相色谱法]、Tris-HCl溶液(pH=7.2,浓度为0.1 mol/L)、KCl溶液和LiCl溶液。

实验仪器为光学参量振荡器(OPO)可调谐激光器、温控系统、光谱仪。

### 2.2 实验设计

本实验设计了三种不同K<sup>+</sup>浓度的DNA样品溶液,其浓度为50 μmol/L,而溶液中K<sup>+</sup>浓度分别为0 mmol/L、1 mmol/L、10 mmol/L。并且在此样品中加入不同浓度的LiCl溶液以保证DNA溶液中的Cl<sup>-</sup>浓度相同。加入的LiCl溶液的浓度分别为100 mmol/L、99 mmol/L和90 mmol/L(Li<sup>+</sup>对G-四链体的形成无影响)。图1(a)为样品DNA在K<sup>+</sup>的诱导下形成的G-四链体结构。

基于激光的G-四链体高分辨率熔解曲线分析实验装置如图1(b)所示。采用488 nm的脉冲激光作为泵浦源,脉冲持续时间为5 ns,频率为20 Hz。激光束经过衰减片、分光棱镜、反射镜、会聚透镜斜入射到检测平台。检测平台由法布里-珀罗(F-P)微腔和温控系统组成,法布里-珀罗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<sub>2</sub>和Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>介质层交替组成,中心波长为550 nm处的反射率大于等于99.99%。反射镜分别采用Si和SiO<sub>2</sub>作为基底,并且在SiO<sub>2</sub>基底上制备凹面结构,封装形成平凹型法布里-珀罗微腔。Si基底与温控加热装置充分接触,样品溶液通过注射方式注入微腔内。F-P微腔的几何腔长约为30 μm,几何腔长由两片反射镜间的隔片厚度决定。法布里-珀罗微腔出射信号由多模光纤采集并传送到光谱仪中进行分析。

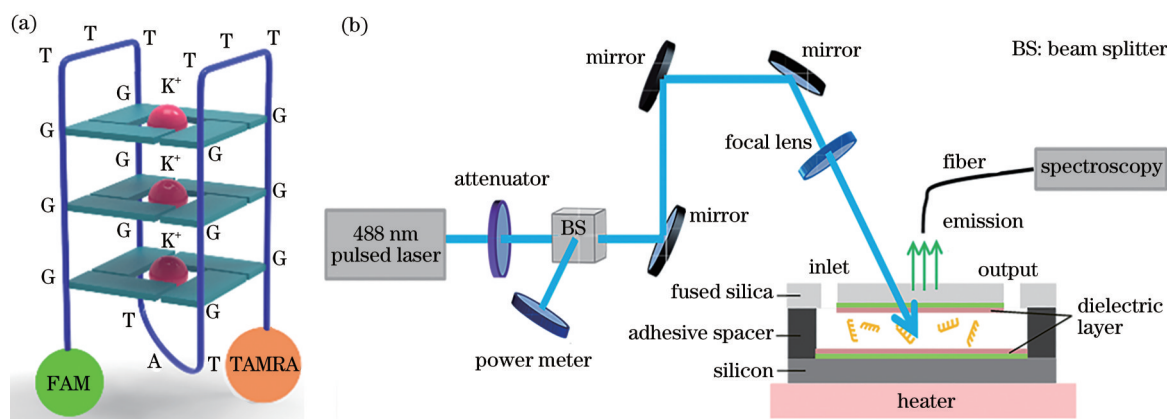


图1 实验材料与装置。(a) G-四链体结构;(b)实验装置

Fig. 1 Experimental materials and devices. (a) Structure of G-quadruplex; (b) experimental setup

### 3 实验结果及分析

基于上述实验装置,分别检测了三种不同 $K^+$ 浓度的溶液中的DNA样品的熔解温度。图2(a)为在相同泵浦能量,不同的 $K^+$ 浓度下,波长从555 nm到625 nm的受体荧光发射信号的总强度与温度的关系图。由于单链DNA在溶液中呈蜷曲状态,所以在无 $K^+$ 存在时,供体和受体的距离此时已经部分发生了FRET。随着 $K^+$ 的加入,样品DNA受 $K^+$ 影响形成G-四链体,根据热动力学分析,其焓熵值增加导致DNA熔解温度升高。图2(b)为在泵浦光能量密度

为 $500 \mu J/mm^2$ 下,波长从580 nm到620 nm的受体激光发射信号的总强度与温度关系图。0 mmol/L、1 mmol/L、10 mmol/L  $K^+$ 样品溶液中DNA熔解温度分别为 $43^\circ C$ 、 $55^\circ C$ 、 $59^\circ C$ 。 $K^+$ 的加入促使样品DNA形成G-四链体,且在一定浓度范围内, $K^+$ 浓度的升高对G-四链体的形成有促进作用。图2(c)~(d)分别为1 mmol/L  $K^+$ 溶液在不同温度下的荧光和激光出射光谱。基于激光的G-四链体高分辨率熔解曲线可在DNA熔解温度范围内进行扫描实现,同时,相比于传统的聚合酶链式反应(PCR)分析技术,其检测的熔解温度大幅度降低。

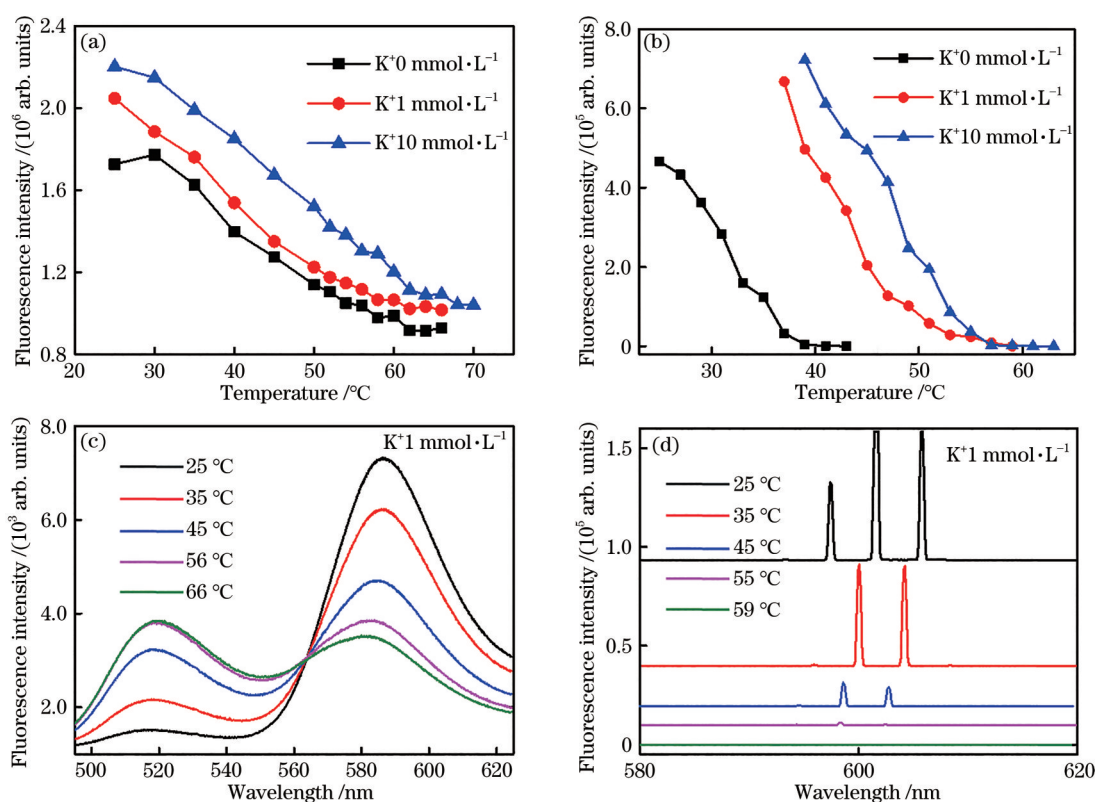


图2 荧光或激光辐射光强与温度的关系。(a)相同泵浦能量、不同 $K^+$ 浓度下,波长从555~620 nm的出射荧光信号的总强度与温度的关系;(b)相同泵浦能量密度不同 $K^+$ 浓度下,波长从580 nm到620 nm的出射激光信号的总强度与温度的关系;(c) 1 mmol/L  $K^+$ 浓度不同温度下的荧光出射光谱;(d) 1 mmol/L  $K^+$ 浓度不同温度下的激光出射光谱

Fig. 2 Spectrally integrated emission intensity as a function of the temperature. (a) Spectrally integrated emission intensity of the fluorescence from 555 nm to 620 nm as a function of the temperature with different concentrations of  $K^+$  solution at same pump energy density; (b) spectrally integrated emission intensity of the lasing from 580 nm to 620 nm as a function of the temperature with different concentrations of  $K^+$  solution at same pump energy density; (c) fluorescence spectra at different temperatures with 1 mmol/L concentration of  $K^+$  solution; (d) laser spectra at different temperatures with 1 mmol/L concentration of  $K^+$  solution

图3(a)为两种 $K^+$ 浓度的样品溶液在泵浦光能量密度为 $370 \mu J/mm^2$ 和 $500 \mu J/mm^2$ 时,激光强度与温度的关系。对于不同 $K^+$ 浓度且相同泵浦光能量密度, $K^+$ 浓度的存在或增大使得DNA熔解温度升高。

对于相同 $K^+$ 浓度且不同泵浦光能量密度,熔解温度受到外界泵浦的影响,随泵浦光能量密度增大而升高。图3(b)展示了不同 $K^+$ 浓度样品溶液中受体激光出射阈值与温度的关系。溶液中无 $K^+$ 时,阈值随

温度上升明显,约 45 °C 后不再出射激光,  $K^+$  的浓度为 1 mmol/L 时,激光阈值比无  $K^+$  时显著降低,约 60 °C 后受体荧光减弱到法布里-珀罗微腔不能产生激光辐射。当  $K^+$  的浓度为 10 mmol/L 时,  $K^+$  浓度的增大导致了更多的 G-四链体结构形成,并进一步降

低激光阈值、升高溶解温度。同时,根据图 3(b) 可知,通过比较同一温度下激光阈值或同一激光阈值下溶解温度,即可分辨样本溶液中  $K^+$  浓度高低或 G-四链体的形成情况。

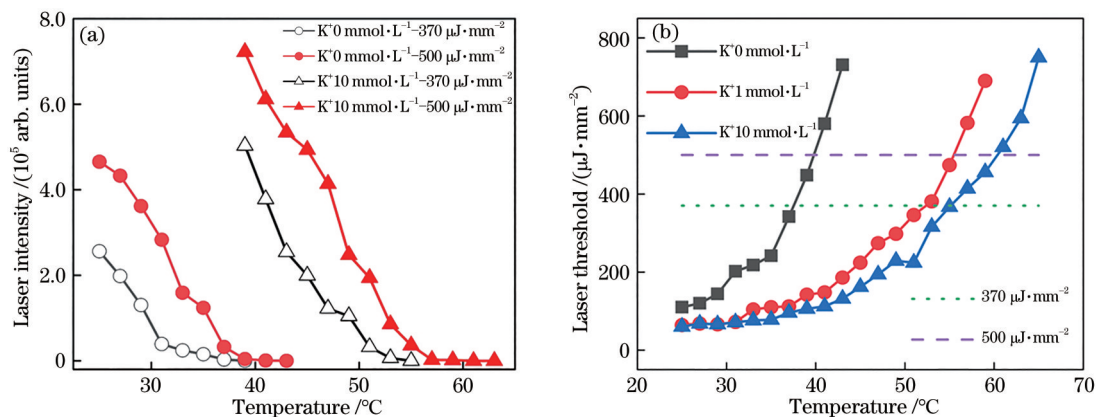


图 3 激光出射强度或激光阈值与温度的关系。(a) 相同泵浦能量不同  $K^+$  浓度下,波长从 580~620 nm 受体激光出射总强度与温度的关系;(b) 不同  $K^+$  浓度下,受体激光出射阈值与温度的关系

Fig. 3 Spectrally integrated emission intensity of lasing or the threshold of the lasing action as a function of the temperature. (a) Spectrally integrated emission intensity of the lasing from 580 nm to 620 nm as a function of the temperature with different concentrations of  $K^+$  solution at same pump energy density; (b) threshold of the lasing action from the acceptor as a function of the temperature with different concentrations of  $K^+$  solution

## 4 结 论

使用基于激光的高分辨率溶解曲线分析研究了 G-四链体 DNA 结构的热稳定性。通过对三种不同  $K^+$  浓度样品溶液中 DNA 溶解温度分析,证实  $K^+$  对 G-四链体形成的影响,同时根据固定泵浦光能量密度扫描或固定温度扫描的方法可区分样本溶液体系中  $K^+$  的浓度。另一方面,基于激光的 HRM 的溶解曲线分析通过使用较低的泵浦能量可以很好地降低曲线的溶解温度。

本文腔内检测方法适用于多种物质的检测(如细胞、蛋白质检测等),同时与温控系统相结合可推广至众多生化检测项目中,有利于降低检测温度以减小对样品破坏程度且兼具高灵敏度,为生化医学检测提供了新平台。

## 参 考 文 献

- [1] Williamson J R. G-quartet structures in telomeric DNA[J]. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1994, 23: 703-730.
- [2] Davis J T. G-quartets 40 years later: from 5' -GMP to molecular biology and supramolecular chemistry [J]. Angewandte Chemie (International Ed. in English), 2004, 43(6): 668-698.
- [3] Lipps H J, Rhodes D. G-quadruplex structures: *in vivo* evidence and function[J]. Trends in Cell Biology, 2009, 19(8): 414-422.
- [4] Reinhold W C, Mergny J L, Liu H, et al. Exon array analyses across the NCI-60 reveal potential regulation of TOP1 by transcription pausing at guanosine quartets in the first intron[J]. Cancer Res, 2010, 70(6): 2191-2203.
- [5] Gomez D, Lemarteleur T, Lacroix L, et al. Telomerase downregulation induced by the G-quadruplex ligand 12459 in A549 cells is mediated by hTERT RNA alternative splicing[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(1): 371-379.
- [6] Gomez D, Guédin A, Mergny J L, et al. A G-quadruplex structure within the 5' -UTR of TRF2 mRNA represses translation in human cells[J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(20): 7187-7198.
- [7] Wittwer C T, Reed G H, Gundry C N, et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen[J]. Clinical Chemistry, 2003, 49(6): 853-860.
- [8] 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.
- [9] Monis P T, Giglio S, Saint C P. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis[J]. *Analytical Biochemistry*, 2005, 340(1): 24-34.
- [10] Do H, Krypuy M, Michael P L, et al. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies[J]. *BMC Cancer*, 2008, 8(1):142.
- [11] 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.
- [12] Sundberg S O, Wittwer C T, Greer J, et al. Solution-phase DNA mutation scanning and SNP genotyping by nanoliter melting analysis[J]. *Biomedical Microdevices*, 2007, 9(2): 159-166.
- [13] 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.
- [14] Mackay J F, Wright C D, Bonfiglioli R G. A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the verification of grapevine and olive cultivars[J]. *Plant Methods*, 2008, 4: 8.
- [15] López C M R, Asenjo B G, 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.
- [16] Jares-Erijman E A, Jovin T M. Determination of DNA helical handedness by fluorescence resonance energy transfer[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 257(3): 597-617.
- [17] Dolgih E, Roitberg A E, Krause J L. Fluorescence resonance energy transfer in dye-labeled DNA[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2007, 190(2/3): 321-327.
- [18] de Cian A, Guittat L, Kaiser M, et al. Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands [J]. *Methods*, 2007, 42(2): 183-195.
- [19] Huang F, Ying L, Fersht A R. Direct observation of barrier-limited folding of BBL by single-molecule fluorescence resonance energy transfer[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(38): 16239-16244.
- [20] Liu H L, Wang Y H, Shen A G, et al. Highly selective and sensitive method for cysteine detection based on fluorescence resonance energy transfer between FAM-tagged ssDNA and graphene oxide[J]. *Talanta*, 2012, 93: 330-335.
- [21] de Rache A, Mergny J L. Assessment of selectivity of G-quadruplex ligands via an optimised FRET melting assay[J]. *Biochimie*, 2015, 115: 194-202.
- [22] Lee W, Fan X. Intracavity DNA melting analysis with optofluidic lasers[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(21): 9558-9563.
- [23] Liang X Y, Hou M D, Zhang T T, et al. High resolution melting technology based on Fabry-Perot microcavity laser[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2018, 55(10): 101702.  
梁希月, 侯梦迪, 张婷婷, 等. 基于法布里-珀罗微腔激光的高分辨率熔解技术研究[J]. *激光与光电子学进展*, 2018, 55(10): 101702.
- [24] Hou M D, Liang X Y, Zhang T T, et al. DNA melting analysis with optofluidic lasers based on Fabry-Pérot microcavity[J]. *ACS Sensors*, 2018, 3 (9): 1750-1755.