

doi:10.3788/gzxb20174609.0923003

基于荧光共振能量转移的核酸适体传感器研究

姜利英, 刘帅, 任林娇, 张培, 闫艳霞, 郑晓婉, 陈青华, 姜素霞

(郑州轻工业学院 电气信息工程学院, 郑州 450002)

摘 要: 基于荧光共振能量转移的原理, 以修饰于核酸适体上的 FAM 作为能量供体, 以氧化石墨烯作为能量受体, 构建了荧光适体传感器, 分别对不同浓度的胰岛素和多巴胺进行检测。结果表明, 胰岛素的线性检测范围为 $0.05 \sim 10 \mu\text{mol/L}$, 多巴胺的线性检测范围为 $1 \sim 500 \mu\text{mol/L}$, 当胰岛素和多巴胺检测浓度相同时, 胰岛素检测信号远强于多巴胺。对胰岛素和多巴胺分别进行特异性实验, 发现该传感器对胰岛素和多巴胺有较强的特异性。说明基于荧光共振能量转移的核酸适体传感器不仅可实现多种物质的微量检测, 还具有较强的选择性, 在生物和医药检测领域应用前景广阔。

关键词: 荧光共振能量转移; 氧化石墨烯; 能量受体; 荧光适体传感器; 微量检测

中图分类号: TP212

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2017)09-0923003-5

Study of the Fluorescent Aptasensor Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer

JIANG Li-ying, LIU Shuai, REN Lin-jiao, ZHANG Pei, YAN Yan-xia,
ZHENG Xiao-wan, CHEN Qing-hua, JIANG Su-xia

(Department of Electric Information Engineering, Zhengzhou University of Light Industry,
Zhengzhou 450002, China)

Abstract: One fluorescent aptasensor based on the fluorescence resonance energy transfer was constructed and used to detect insulin and dopamine. Aptamer labeled FAM (aptamer-FAM) was in charge of energy donor, while graphene oxide served as an energy acceptor. The results show that the linear detection range of insulin is from $0.05 \mu\text{mol/L}$ to $10 \mu\text{mol/L}$ and dopamine is from $1 \mu\text{mol/L}$ to $500 \mu\text{mol/L}$, meanwhile the signal intensity of insulin is stronger than dopamine at the same concentration. The specificity experiments for insulin and dopamine have indicated that this fluorescent aptasensor have a good specificity. Due to its detection for different targets and high selectivity, this fluorescent aptasensor offers a promising prospect in the detection field of biological and medical.

Key words: Fluorescence resonance energy transfer; Grapheme oxide; Energy acceptor; Fluorescent aptasensor; Trace detection

OCIS Codes: 230.0040; 230.0250; 260.2160; 260.2510; 280.1415; 300.6280

0 引言

荧光适体传感器^[1-3]是通过换能器将核酸适体^[4-6]与靶目标的强亲和力和特异性结合转换为荧光信号的变化, 由荧光信号的变化量来对靶目标进行检测分析, 具有灵敏度高、检测效率高和操作简单的优点。荧光适体传感器中较常见的是利用荧光基团(供体)和淬灭剂(受体)构建基于荧光共振能量转移体系来测量荧光强度的变化。Wang Bin 等^[7]以纳米金作为能量受体, 与荧光掺氮碳量子点构建荧光淬灭系统, 实现了对黄曲霉毒素 B1 的特异性检测; Hu Kun 等^[8]利用氧化石墨烯作为淬灭剂和异硫氰酸荧光素作为荧光基团, 构建了

基金项目: 国家自然科学基金项目(No.61002007)、河南省科技创新人才计划项目(No.124100510001)、郑州轻工业学院博士科研基金项目(Nos.2014BSJJ041; 2015BSJJ023)和郑州轻工业学院 2016 年度研究生科技创新基金项目(No.2016027)资助

第一作者: 姜利英(1981-), 女, 教授, 博士, 主要研究方向为生物传感器及检测微系统。Email: jiangliyong@zzuli.edu.cn

收稿日期: 2016-12-28; 录用日期: 2017-04-20

检测免疫球蛋白 E 的荧光适体传感器,且具有较好的检测性能.氧化石墨烯^[9-11](Graphene Oxide, GO)可以与 DNA 碱基发生 π - π 堆积相互作用,能吸附单链 DNA,并可使其上修饰的荧光基团荧光淬灭,由于它的淬灭效率普遍高于常见的有机淬灭剂,且生产成本低、毒性小,所以是淬灭剂的常用选择.

本研究以 FAM 荧光基团^[12-14]标记的核酸适体作为检测探针,以氧化石墨烯作为淬灭剂,构建了基于荧光共振能量转移的核酸适体传感器,并分别对靶目标胰岛素^[15-17](Insulin, INS)和多巴胺^[18-20](Dopamine, DA)进行检测,从而验证该传感器的性能.

1 实验

1.1 仪器与试剂

F-7000 型荧光光谱仪(日本 HITACHI 公司);GL-16 II 型离心机(上海安亭科学仪器厂);电子天平和酸度计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);07HWS-2 型数显恒温磁力搅拌器(杭州仪表电机有限公司);DHG-9030A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);牛胰岛素和多巴胺盐酸盐(北京索莱宝科技有限公司);2 mg/mL 氧化石墨烯溶液(苏州恒球科技有限公司);标记有 FAM 荧光基团的核酸适体由上海生工生物技术有限公司(上海)合成,胰岛素适体序列:5'-GGT GGT GGG GGT TGG TAG GGT GTC TTC-FAM-3',多巴胺适体序列:5'-FAM-GTC TCT GTG TGC GCC AGA GAA CAC TGG GGC AGA TAT GGG CCA GCA CAG AAT GAG GCC C-3';50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH=7.4,含 30 mmol/L NaCl,50 mmol/L KCl);实验用水为去离子水,实验温度为室温.

1.2 核酸适体的固定

首先将保存于 -20°C 的装有核酸适体的离心管取出,离心 30 s(12 000 rpm)使附在管壁上的适体聚于管底,防止打开时散失,再加入 Tris-HCl 缓冲液,震荡均匀,将核酸适体激活.将激活后的核酸适体与氧化石墨烯溶液混合,室温下静置一段时间,使核酸适体固定于氧化石墨烯上,并使 FAM 的荧光淬灭,也即得到不同靶目标的工作溶液,核酸适体与氧化石墨烯的浓度比为 100 nmol/L:90 $\mu\text{g/mL}$.

1.3 靶目标的检测

在胰岛素工作溶液中加入不同浓度胰岛素制得待测液,孵育一段时间后,取 3 mL 放入荧光光谱仪检测荧光,并以胰岛素工作溶液作为空白对照组,计算不同浓度待测液的荧光强度并绘制标准曲线.同样,测量不同浓度多巴胺待测液的荧光强度并绘制多巴胺标准曲线.

1.4 特异性检测

胰岛素检测的易干扰物质有牛血清蛋白(Bull Serum Albumin, BSA)、生物素(Vitamin H, VH)及链霉亲和素(Streptavidin, SA),分别配置 5 $\mu\text{mol/L}$ 的待测液,在检测胰岛素相同实验条件下,利用荧光光谱仪检测上述 3 种待测液的荧光强度,每个样品平行测定 3 次,将得到的荧光强度与相同浓度的胰岛素的荧光强度作比较,检验该传感器对胰岛素的特异性.

多巴胺检测的易干扰物质有肾上腺素(Epinephrine, E)、去甲肾上腺素(Norepinephrine, NE)及抗坏血酸(Ascorbic Acid, AA),分别配置 200 $\mu\text{mol/L}$ 的待测液,将测得的荧光强度与相同浓度多巴胺的荧光强度作比较,检验该传感器对多巴胺的特异性.

2 结果与讨论

2.1 检测原理

以修饰有 FAM 的核酸适体与氧化石墨烯构建的荧光适体传感器,基于荧光共振能量转移对靶目标检测的原理如图 1 所示.未加入靶目标分子时,核酸适体通过 π - π 堆积作用力吸附在 GO 表面,其上的 FAM 荧光基团与 GO 发生能量共振转移,FAM 作为供体将能量传递给 GO,导致荧光淬灭;加入靶目标分子后,核酸适体与靶分子的特异性结合力强于 π - π 堆积作用力,故核酸适体会脱离氧化石墨烯而与靶分子结合,此时,FAM 远离 GO 表面,能量共振转移作用消失,FAM 荧光恢复且荧光强度与加入靶分子的浓度在一定范围内呈正相关的线性关系,检测恢复荧光的强度变化即可实现靶目标的浓度检测.

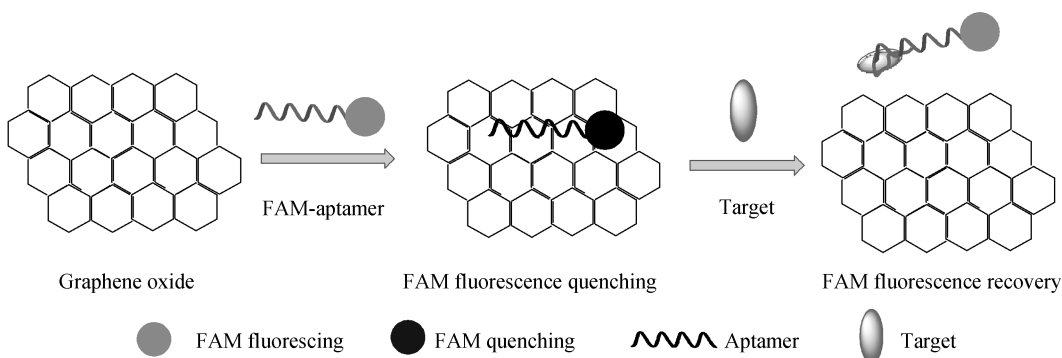


图1 检测靶目标的原理

Fig.1 Schematic illustration of the detection of target

2.2 传感器对靶目标的响应特性

为检验该传感器对胰岛素和多巴胺的响应特性,分别检测 FAM-核酸适体溶液、工作溶液和加入靶目标分子后的荧光强度,胰岛素的响应特性如图 2 所示,多巴胺的响应特性如图 3 所示.图中 *a* 曲线是 FAM-核酸适体溶液的荧光强度,*b* 曲线是加入 GO 后的工作溶液的荧光强度,*c* 曲线是在工作溶液中加入靶目标后的荧光强度,可以看到,*b* 曲线的荧光强度远低于 *a* 曲线,说明 GO 对 FAM 具有很好的淬灭效果;*c* 曲线的荧光强度远高于 *b* 曲线,说明加入靶分子后,FAM-核酸适体脱离 GO,荧光恢复.由此可知该传感器对胰岛素和多巴胺具有较好的响应特性,可以用来检测胰岛素和多巴胺.

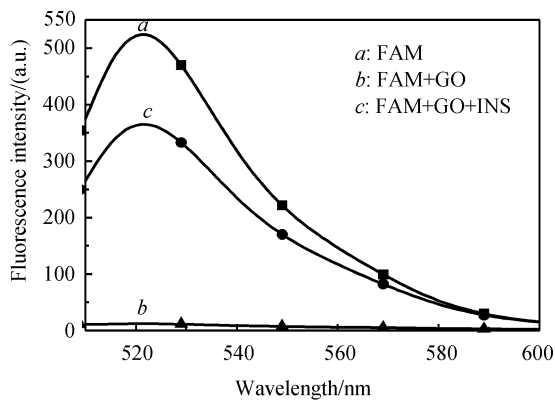


图2 胰岛素响应特性

Fig.2 The response characteristic of insulin

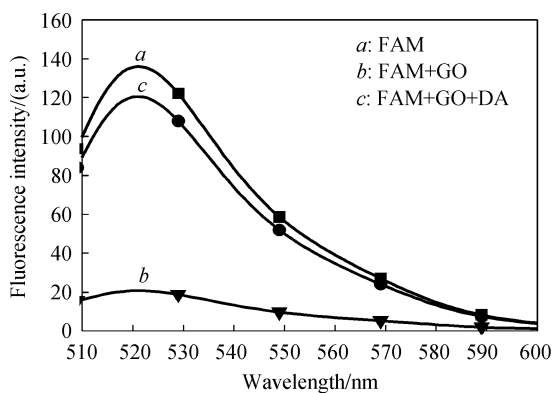


图3 多巴胺响应特性

Fig.3 The response characteristic of dopamine

2.3 不同浓度靶目标对传感器响应特性的影响

分别对不同浓度胰岛素 ($0 \mu\text{mol/L}$, $0.05 \mu\text{mol/L}$, $1 \mu\text{mol/L}$, $5 \mu\text{mol/L}$, $10 \mu\text{mol/L}$) 和多巴胺 ($0 \mu\text{mol/L}$, $1 \mu\text{mol/L}$, $50 \mu\text{mol/L}$, $100 \mu\text{mol/L}$, $200 \mu\text{mol/L}$, $500 \mu\text{mol/L}$) 进行检测,将得到的不同浓度的荧光强度绘制成曲线图,并对靶目标浓度和相应的荧光强度的关系进行分析.图 4 为胰岛素的检测范围.图 5 为多巴胺的检测范围.

由图 4(a)可知随着胰岛素浓度的不断增大,荧光强度也随之不断地增强,在 521 nm 波长附近有最大荧光强度,取该处荧光值,做与不同浓度的胰岛素的对应关系图.最终得到胰岛素的线性检测范围如图 4(b)所示,在 $0.05 \sim 10 \mu\text{mol/L}$ 范围内满足线性关系: $y = 73.14 + 15.91x$, 其中 y 代表荧光强度, x 代表胰岛素浓度,其相关系数 $R = 0.998$.

由图 5(a)可知随着多巴胺浓度的不断增大,荧光强度也随之不断地增强,在 521 nm 波长附近有最大荧光强度,取该处荧光值,做与不同浓度的多巴胺的对应关系图.最终得到多巴胺的线性检测范围如图 5(b)所示,在 $1 \sim 500 \mu\text{mol/L}$ 范围内满足线性关系: $y = 38.66 + 0.15x$, 其中 y 代表荧光强度, x 代表多巴胺浓度,其相关系数 $R = 0.994$.

由图 4 和图 5 可知,靶目标的浓度越大,传感器的响应特性越强.而且传感器对胰岛素的响应特性要强于多巴胺,低浓度的胰岛素就可产生较大的响应信号,而同样大小的响应信号则需较大浓度的多巴胺.

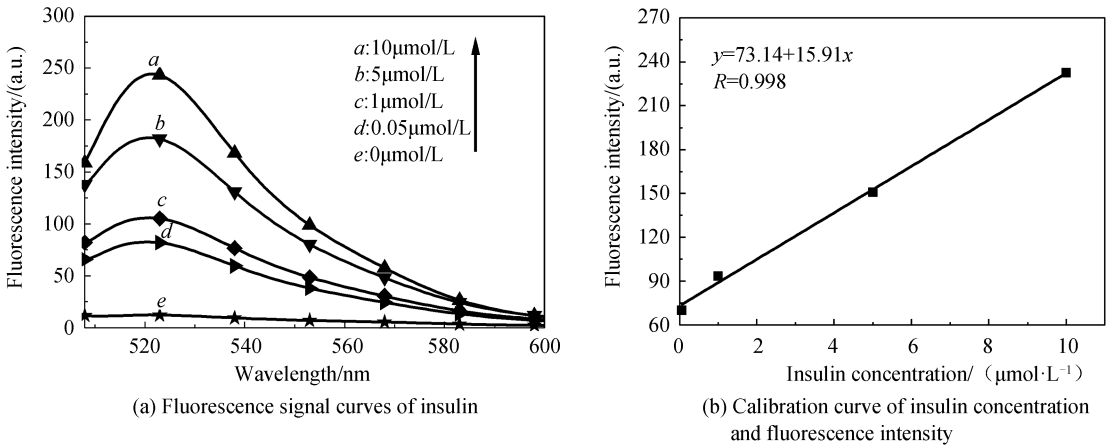


图4 胰岛素的检测范围
Fig.4 The detection range of insulin

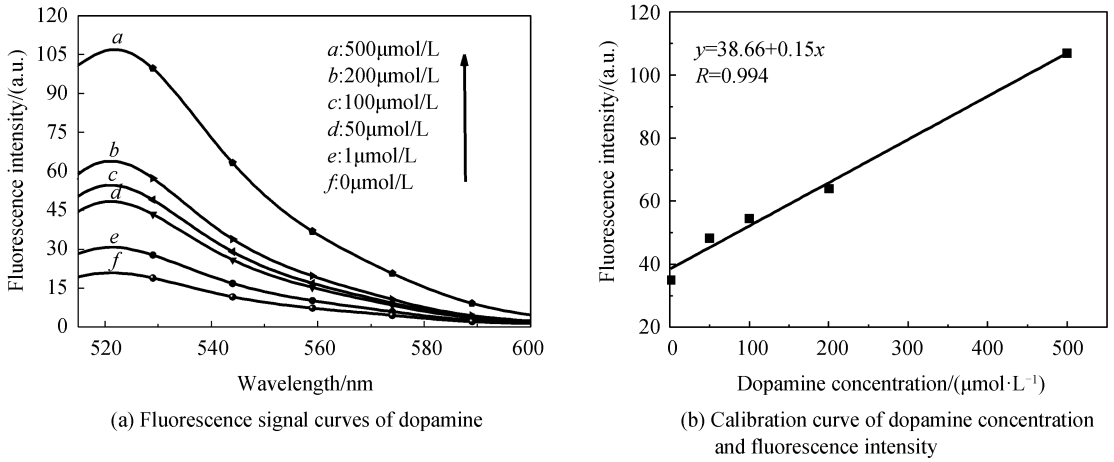


图5 多巴胺的检测范围
Fig.5 The detection range of dopamine

2.4 传感器的特异性实验

分别对胰岛素和多巴胺两种靶目标进行特异性实验.选择三种各自的易干扰物质,在相同实验条件下,测得靶目标与干扰物在相同浓度时的荧光强度,并作图分析,其中,图6为胰岛素特异性实验结果,图7为多巴胺特异性实验结果.

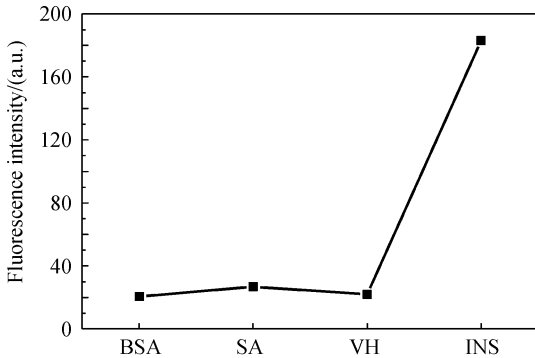


图6 胰岛素的特异性检测(5 μmol/L)
Fig.6 The specific detection of insulin (5 μmol/L)

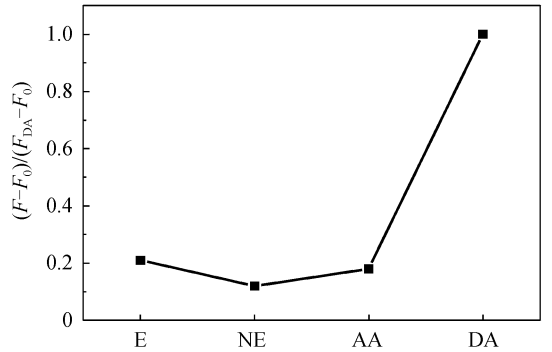


图7 多巴胺的特异性检测(200 μmol/L)
Fig.7 The specific detection of dopamine (200 μmol/L)

由图6可知,在胰岛素的线性检测范围内选择一个浓度(5 μmol/L),在相同实验条件下检测,牛血清蛋白、链霉亲和素与生物素等干扰物的荧光强度远低于胰岛素,并且由 $(F - F_0) / (F_{INS} - F_0)$ 计算相对荧光强度,其中 F_0 和 F 分别表示加入不同选择性物质前后的荧光强度, F_{INS} 表示胰岛素的荧光强度,计算其荧光强度比依次为:0.11 : 0.15 : 0.12 : 1.0.因此,该传感器对胰岛素的检测具有较好的特异性.

由图 7 可知,在多巴胺的线性检测范围内选择一个浓度(200 $\mu\text{mol/L}$),在相同实验条件下检测,肾上腺素,去肾上腺素与维生素等干扰物的荧光强度远远低于多巴胺,计算的荧光强度比依次为:0.21 : 0.12 : 0.18 : 1.0.因此,该传感器对多巴胺的检测具有较好的特异性.

3 结论

将修饰有 FAM 的核酸适体与氧化石墨烯构建荧光适体传感器,基于荧光共振能量转移原理对胰岛素和多巴胺不同靶目标进行检测,结果表明该传感器能够实现对胰岛素和多巴胺的特异性检测,同时具备操作简单的优点.使用新型荧光供体材料与受体材料构建荧光适体传感器,并用于生物和医疗方面的小分子检测,具有较大的研究潜力.

参考文献

- [1] YANG C, SPINELLI N, PERRIER S, *et al.* Macrocyclic host-dye reporter for sensitive sandwich-type fluorescent aptamer sensor[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, **87**(6): 3139-3143.
- [2] ZHANG K, YANG Q L, ZHANG J, *et al.* An enzyme substrate binding aptamer complex based time-resolved fluorescence sensor for the adenosine deaminase detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, **42**: 87-92.
- [3] XU J N, WEI C Y. The aptamer DNA-templated fluorescence silver nanoclusters: ATP detection and preliminary mechanism investigation[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, **87**: 422-427.
- [4] NEZLIN R. Use of aptamers in immunoassays[J]. *Molecular Immunology*, 2016, **70**: 149-154.
- [5] ILGU M, NILSEN H M. Aptamers in analytics[J]. *Analyst*, 2016, **141**(5): 1551-1568.
- [6] WANG Y, GAN N, ZHOU Y, *et al.* Novel single-stranded DNA binding protein-assisted fluorescence aptamer switch based on FRET for homogeneous detection of antibiotics[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, **87**: 508-513.
- [7] WANG B, CHEN Y, WU Y, *et al.* Aptamer induced assembly of fluorescent nitrogen-doped carbon dots on gold nanoparticles for sensitive detection of AFB1[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, **78**: 23-30.
- [8] HU K, YANG H, ZHOU J, *et al.* Aptasensor for amplified IgE sensing based on fluorescence quenching by graphene oxide[J]. *Luminescence*, 2013, **28**(5): 662-666.
- [9] MAHMOUDIA N, SIMCHIAB A. On the biological performance of graphene oxide-modified chitosan/polyvinyl pyrrolidone nanocomposite membranes: In vitro and in vivo effects of graphene oxide[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2017, **70**(2): 121-131.
- [10] WENG X, NEETHIRAJAN S. A microfluidic biosensor using graphene oxide and aptamer-functionalized quantum dots for peanut allergen detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, **85**: 649-656.
- [11] LU Z S, CHEN X J, WANG Y, *et al.* Aptamer based fluorescence recovery assay for aflatoxin B1 using a quencher system composed of quantum dots and graphene oxide[J]. *Microchimica Acta*, 2015, **182**(3): 571-578.
- [12] LI Z, NI Y N, KOKOT S. A new fluorescent nitrogen-doped carbon dot system modified by the fluorophore-labeled ssDNA for the analysis of 6-mercaptopurine and Hg (II) [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, **74**: 91-97.
- [13] LING K, JIANG H Y, LI Y, *et al.* A self-assembling RNA aptamer-based graphene oxide sensor for the turn-on detection of theophylline in serum[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, **86**: 8-13.
- [14] DOU X W, CHU X F, KONG W J, *et al.* An indirect competitive fluorescence assay for ochratoxin A based on molecular beacon[J]. *RSC Advances*, 2016, **6**(11): 8791-8796.
- [15] VERDIAN D A, HOUSAINDOKHT M R. Spectroscopic study of the interaction of insulin and its aptamer - sensitive optical detection of insulin[J]. *Journal of Luminescence*, 2015, **159**: 1-8.
- [16] LEI C, NOONAN O, JAMBHRUNKAR S, *et al.* Sensitive detection of human insulin using a designed combined pore approach[J]. *Small*, 2014, **10**(12): 2413-2418.
- [17] LIU Y X, ZHANG Y F, WU D, *et al.* Visible-light driven photoelectrochemical immunosensor for insulin detection based on MWCNTs@SnS2@CdS nanocomposites[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, **86**: 301-307.
- [18] MCCUTCHEON J E. The role of dopamine in the pursuit of nutritional value[J]. *Physiology and Behavior*, 2015, **152** (B): 408-415.
- [19] DOMSCHKE K, WINTER B, GAJEWSKA A, *et al.* Multilevel impact of the dopamine system on the emotion-potentiated startle reflex[J]. *Psychopharmacology*, 2015, **232**(11): 1983-1993.
- [20] THURM F, SCHUCK N W, FAUSER M, *et al.* Dopamine modulation of spatial navigation memory in Parkinson's disease[J]. *Neurobiology of Aging*, 2016, **38**: 93-103.