

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2016.05.012

基于荷正电聚合物探针的共振光散射法 DNA 杂交检测^①

于媛媛, 杜娟, 郑鹤志, 隆异娟

西南大学 化学化工学院, 重庆 400715

摘要: 荷正电高分子聚合物可以通过静电作用与 DNA 寡核苷酸序列进行结合, 其与单链 DNA 和双链 DNA 结合后有不同的共振光散射(RLS)信号. 基于此, 设计了一种杂交 DNA 检测探针, 实现了完全互补序列与单碱基错配序列及非互补碱基序列的区分, 并建立了一种简单、快速、免标记的 DNA 杂交检测方法. 在最佳条件下, 在 $\lambda=470$ nm 处, 光散射强度达到最大, 并且与目标 DNA 浓度在 5.0~500 nmol/L 范围内呈线性, 检出限为 2 nmol/L.

关键词: 共振光散射; DNA 杂交; 荷正电高分子聚合物

中图分类号: O657

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)05-0071-05

目前, DNA 杂交检测已广泛地运用于病毒及遗传疾病的诊断之中. 常用的杂交检测方法有: 分光光度法^[1]、分子信标探针技术^[2]、表面等离子体共振技术^[3]、微阵列技术^[4]、共振光散射技术(RLS)^[5]等. 但是, 这些测定方法往往要先对 DNA 进行标记, 标记的过程通常较为复杂, 所花费的时间也较长. 因此, 人们近年来正在努力利用非标记法进行 DNA 的杂交检测.

荧光共振聚合物是具有高度共振结构的链状大分子. 其分子内含有大量的重复共振生色团, 能量在链间的传递可以被显著放大, 因而可以表现出很强的荧光^[6-10]. Leclerc 研究组已将其用于 DNA 的杂交检测中^[11-12]. 但是, 荧光共振聚合物的种类有限, 且合成所要求的条件很高, 步骤也较为繁琐, 因此, 在应用上受到限制. 近年来, 共振光散射光谱法以其操作简便、灵敏度高、分析速度快等优点, 在生物大分子检测中得到了广泛应用. 本研究使用带正电的荷电高分子聚合物(聚(4-乙基-N-乙基)吡啶季铵盐), 通过静电作用使其与 DNA 进行结合, 利用共振光散射光谱法^[13], 实现了对 DNA 的杂交检测.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

F-4500 型荧光分光光度计(日本日立公司); 2383K 高速台式冷冻离心机(德国 HERMLE 公司); 手提式不锈钢蒸汽消毒器(上海三申医疗器械公司); pH5-4C 型酸度计(成都方舟科技开发公司); XH-C 型漩涡混合器(金坛市医疗器械厂).

① 收稿日期: 2015-05-26

基金项目: 国家自然科学基金(21175110); 西南大学中央高校基本业务费(XDJK2012C048); 西南大学博士基金(SWU112071).

作者简介: 于媛媛(1990-), 女, 河南新乡人, 硕士研究生, 主要从事发光分析及光学生物传感器研究.

通信作者: 隆异娟, 女, 高级实验师.

荷正电高分子聚合物, 聚(4-乙烯基-N-乙基)吡啶季铵盐, 分子量为 34 000 g/mol, 由西南大学化学化工学院刘昌华老师提供, 21.6 mg/L^[14]; 缓冲溶液为 0.02 mol/L PBS (pH=7.0), 内含 10 mmol/L NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 和 0.30 mmol/L NaCl; 其余试剂均为市售分析纯, 实验用水均为 Milli-Q-Plus 系统所制的超纯水(18.2 MΩ).

实验中所用的寡核苷酸序列购于北京三博生物技术有限公司, 直接使用. 所用的序列包括探针寡核苷酸序列、完全互补寡核苷酸序列、单碱基错配寡核苷酸序列及完全不互补寡核苷酸序列, 具体的序列见表 1.

表 1 实验中所用的寡核苷酸序列

寡核苷酸名称	序列
P, 探针 DNA	5'-CAT GAT TGA ACC ATC CAC CA-3'
T, 完全互补 DNA	5'-TGG TGG ATG GTT CAA TCA TG-3'
MT1, 单碱基错配 DNA	5'-TGG TGG <u>A</u> AG GTT CAA TCA TG-3'
NCT, 完全不互补 DNA	5'-AAT ACC ACA TCA TCC ACA TA-3'

注: 加下划线的为错配碱基.

1.2 实验方法

杂交反应在恒温水浴中进行, 在 30 μL 杂交缓冲液中加入 30 μL 21.6 mg/L 聚合物溶液, 15 μL 1×10⁵ mol/L 探针 DNA 和适量的完全互补靶物 DNA 序列, 加入超纯水补充体积至 300 μL, 漩涡混匀. 42 °C 下杂交反应 1.5 h 后, 在荧光分光光度计上以 λ_{ex}=λ_{em} 方式进行同步扫描(扫描范围为 200~700 nm), 记录 RLS 光谱, 以 470 nm 处的 RLS 强度进行定量.

2 结果与讨论

2.1 杂交反应的光谱特性

分别测定空白聚合物、聚合物加入探针 DNA、聚合物加入探针 DNA 及靶物 DNA 之后的 RLS 光谱. 得到的光谱见图 1. 从图 1 中可以看出, 单纯的聚合物的 RLS 值很低, 而加入单链探针 DNA 之后, 散射强度有所增加, 再加入靶物 DNA 之后, 散射信号增加明显, 因此可以实现杂交反应的检测. 加入靶物 DNA 之后, 在 200~700 nm 处的散射信号都显著增加, 其中 470 nm 处最强且最为稳定, 因此在后面的实验中, 选择 470 nm 为测定时所用波长.

2.2 反应条件的优化

2.2.1 聚合物质量浓度的优化

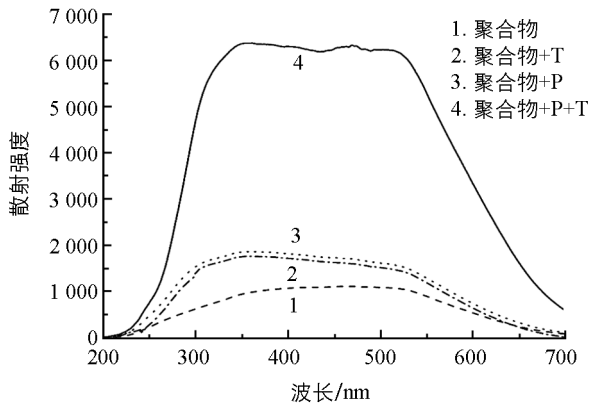
固定探针 DNA 的浓度为 5.0×10⁻⁷ mol/L, 加入相同浓度的靶物 DNA, 改变聚合物的质量浓度, 考察不同聚合物的质量浓度对杂交反应的影响. 实验得到的结果见图 2. 当聚合物的质量浓度为 2.16 mg/L 时, 杂交体系的区分效果最好, 所以在之后的实验中选择此质量浓度为实验的最佳质量浓度.

2.2.2 杂交温度的优化

不同的杂交温度影响着杂交反应的效果. 实验考察了 4 个温度下杂交反应进行的情况, 分别为 40, 42, 45, 48 °C. 实验的结果见图 3. 由图 3 中可以看出, 在 42 °C 时, 杂交检测的效果最好, 所以, 实验选择的杂交温度为 42 °C.

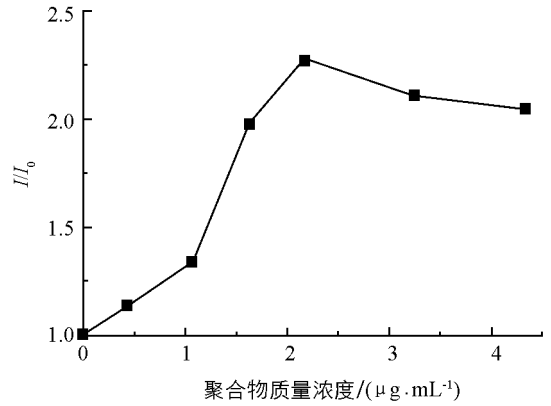
2.2.3 杂交时间的优化

不同的杂交时间也影响着杂交检测的灵敏度. 实验考察了不同杂交的时间对于杂交检测的影响, 分别为 1.0, 1.5, 3.0 h. 反应的结果见图 4. 从图 4 中可以明显地看出, 当杂交反应进行到 1.5 h 的时候, 杂交检测的效果最好, 因此, 实验选择杂交时间为 1.5 h.



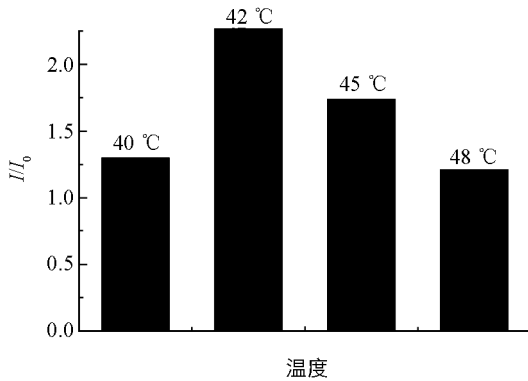
$c_{\text{聚合物}} = 21.6 \text{ mg/L}$; $c_{\text{探针DNA}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; $c_{\text{靶序列}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; $\text{pH} = 7.0$; $c_{\text{NaCl}} = 0.030 \text{ mol/L}$; 温度: $42 \text{ }^\circ\text{C}$.

图 1 杂交反应的光谱表征



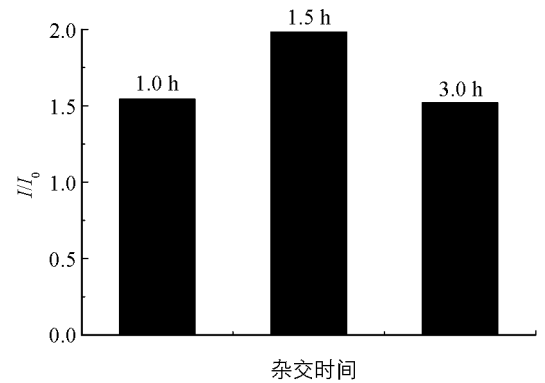
$c_{\text{探针DNA}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; $c_{\text{靶序列}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; $\text{pH} = 7.0$; $c_{\text{NaCl}} = 0.030 \text{ mol/L}$; 温度: $42 \text{ }^\circ\text{C}$. 其中 I 和 I_0 分别为有靶物 DNA 和无靶物 DNA 时的 RLS 强度.

图 2 不同聚合物质量浓度对反应体系的影响



$c_{\text{聚合物}} = 21.6 \text{ mg/L}$; $c_{\text{探针DNA}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; $c_{\text{靶序列}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; $\text{pH} = 7.0$; $c_{\text{NaCl}} = 0.030 \text{ mol/L}$; 其中 I 和 I_0 分别为有靶物 DNA 和无靶物 DNA 时的 RLS 强度.

图 3 不同温度下杂交反应的情况



$c_{\text{聚合物}} = 21.6 \text{ mg/L}$; $c_{\text{探针DNA}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; $c_{\text{靶序列}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; $\text{pH} = 7.0$; $c_{\text{NaCl}} = 0.030 \text{ mol/L}$; 温度: $42 \text{ }^\circ\text{C}$; 其中 I 和 I_0 分别为有靶物 DNA 和无靶物 DNA 时的 RLS 强度.

图 4 不同杂交时间对于反应体系的影响

2.2.4 离子强度的影响

使用 NaCl 溶液来控制体系的离子强度, 钠离子可以减少 DNA 的磷酸骨架和临近的碱基之间的静电斥力, 还可以减少 ssDNA (单链 DNA) 之间的静电斥力, 有利于杂交反应的发生. 但过高浓度的钠离子会使得聚合物与 DNA 形成的聚合体发生解离, 导致反应的 RLS 信号的降低^[15]. 实验最终选择的 NaCl 浓度为 0.030 mol/L , 盐溶液随缓冲溶液一同加入至反应体系中.

2.3 分析性能

固定探针 DNA 的浓度不变, 随靶物 DNA 的量的逐渐增加, 体系的光散射信号也逐渐增加(图 5). 在 $5.0 \sim 500 \text{ nmol/L}$ 的范围内, 反应体系呈线性, 线性方程为 $I/I_0 = 1.08 + 0.00112c$, 线性系数为 0.997 , 检测限约为 2.0 nmol/L . 其中 I 和 I_0 分别为有靶物 DNA 和无靶物 DNA 时的 RLS 强度.

为了考察本体系能否成功应用于点突变检测, 保持 ssDNA 浓度均为 $5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, 分别测定了聚合物与探针 DNA、与完全互补的 DNA 序列、与非互补序列和与一个碱基错配的 DNA 序列的 RLS 信号, 并以此来评价反应的特异性. 得到的结果见图 6. 由图 6 中可以看出, 聚合物在探针 DNA 和完全互补 DNA 的混合溶液中的 RLS 信号最强, 且和单碱基错配及非互补序列的信号有显著的差异, 表明体系具有很好的选择性, 可以用于碱基突变的检测当中.

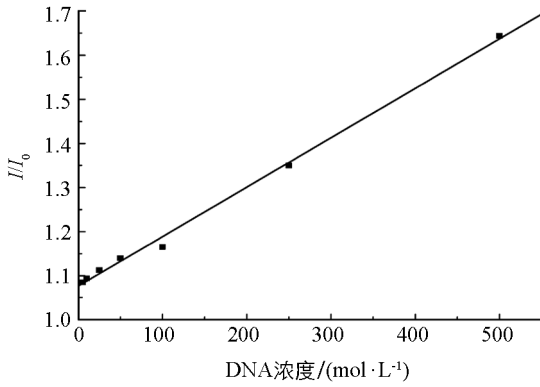


图 5 检测的工作曲线
 $c_{\text{聚合物}} = 21.6 \text{ mg/L}$; $c_{\text{探针DNA}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; $c_{\text{靶序列}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; $\text{pH} = 7.0$; $c_{\text{NaCl}} = 0.030 \text{ mol/L}$; 温度: $42 \text{ }^\circ\text{C}$; 其中 I 和 I_0 分别为有靶物 DNA 和无靶物 DNA 时的 RLS 强度.

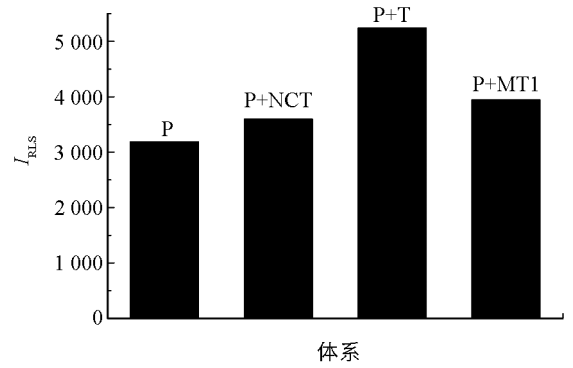


图 6 碱基错配检测
 $c_{\text{聚合物}} = 21.6 \text{ mg/L}$; $c_{\text{探针DNA}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; $c_{\text{靶序列}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; $\text{pH} = 7.0$; $c_{\text{NaCl}} = 0.030 \text{ mol/L}$; 温度: $42 \text{ }^\circ\text{C}$.

图 5 检测的工作曲线

图 6 碱基错配检测

3 结论与展望

本实验以荷正电的线性高分子聚合物为杂交检测探针, 该聚合物可以通过静电作用与 DNA 寡核苷酸序列进行结合, 其与单链 DNA 和双链 DNA 结合后有不同的 RLS 信号, 实现了对 DNA 的杂交检测. 实验步骤简单, 只需要将聚合物与 DNA 溶液混合即可, 且不需要进行标记, 检测快速. 通过这种方法, 可以很容易地将完全互补的和有碱基错配的序列进行区分, 在疾病的诊断方面有着潜在的应用价值.

参考文献:

- [1] ELGHANIAN R, STOTHOFF J J, MUEIE R C, et al. Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles [J]. *Science*, 1997, 277(5329): 1078–1081.
- [2] BOATENG J, ZAHORCHAK R, PEEK J, et al. Novel Stem-loop Probe DNA Arrays: Detection of Specific Acetotrophic 16S Ribosomal RNA Signatures [J]. *Analytical biochemistry*, 2013, 435(1): 60–67.
- [3] BARROW S J, FUNSTON A M, GÓMEZ D E, et al. Surface Plasmon Resonances in Strongly Coupled Gold Nanosphere Chains from Monomer to Hexamer [J]. *Nano letters*, 2011, 11(10): 4180–4187.
- [4] STERRENBURG E, TURK R, BOER J M, et al. A Common Reference for cDNA Microarray Hybridizations [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(21): 228.
- [5] DU B A, LI Z P, LIU C H. One-Step Homogeneous Detection of DNA Hybridization with Gold Nanoparticle Probes by Using a Linear Light-Scattering Technique [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45(47): 8022–8025.
- [6] MCQUADE D T, PULLEN A E, SWAGER T M. Conjugated Polymer-Based Chemical Sensors [J]. *Chemical Reviews*, 2000, 100(7): 2537–2574.
- [7] MUTI M, KURALAY F, ERDEM A. Single-Walled Carbon Nanotubes-Polymer Modified Graphite Electrodes for DNA Hybridization [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012, 91: 77–83.
- [8] DUAN X R, LI Z, HE F, et al. A Sensitive and Homogeneous SNP Detection Using Cationic Conjugated Polymers [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(14): 4154–4155.
- [9] WANG S, GAYLORD B S, BAZAN G C. Fluorescein Provides a Resonance Gate for FRET from Conjugated Polymers to DNA Intercalated Dyes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(17): 5446–5451.
- [10] LIU B, BAZAN G C. Methods for Strand-Specific DNA Detection with Cationic Conjugated Polymers Suitable for Incorporation into DNA Chips and Microarrays [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(3): 589–593.

- [11] HO H A, BOISSINOT M, BERGERON M G, et al. Colorimetric and Fluorometric Detection of Nucleic Acids Using Cationic Polythiophene Derivatives [J]. *Angewandte Chemie*, 2002, 41(9): 1548–1551.
- [12] DORÉ K, DUBUS S, HO H A, et al. Fluorescent Polymeric Transducer for the Rapid, Simple, and Specific Detection of Nucleic Acids at the Zeptomole Level [J], *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(13): 4240–4244.
- [13] 刘绍璞, 胡小莉, 范莉, 等. 用新洁尔灭测定核酸的共振瑞利散射方法研究 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2002, 27(2): 188–192.
- [14] 杜娟, 卢一卉, 郑鹤志, 等. 荷正电聚合物作为探针共振光散射法测定蛋白质 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2009, 31: 73–77.
- [15] PASTEMACK R F, BRIGANDI R A, ABRAMS M J, et al. Interactions of Porphyrins and Metalloporphyrins with Single-Stranded Poly (dA) [J]. *Inorganic Chemistry*, 1990, 29(22): 4483–4486.

Positive Charged Polymer as a Probe for the Determination of DNA Hybridization by Resonance Light Scattering

YU Yuan-yuan, DU Juan, ZHENG Hu-zhi, LONG Yi-juan

School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: In this paper, we applied a positive-charged-polymer for the determination of DNA hybridization, proposed a simple and speedy assay for specific oligonucleotide sequences and single-base mismatch based on the different resonance light scattering (RLS) signals of polymer/ssDNA and polymer/dsDNA, and established a new label-free method for the determination of DNA hybridization. Under the optimum conditions, the enhanced RLS intensity at 470 nm was proportional to the concentration of target DNA over the range of 5.0 to 500 nmol/L, with the limit of determination about 2 nmol/L.

Key words: resonance light scattering; DNA hybridization; positive charged polymer

责任编辑 潘春燕

