论文

氧化石墨烯增强荧光各向异性新策略在microRNA检测中的应用

陶静, 肖雪, 李春宏, 门晨, 甄淑君*

发光与实时分析化学教育部重点实验室; 西南大学化学化工学院, 重庆 400715

*通讯作者, E-mail: zsj@swu.edu.cn

收稿日期: 2017-07-18; 接受日期: 2017-09-14; 网络版发表日期: 2017-10-20

国家自然科学基金(编号: 21305113)、重庆市基础科学与前沿技术研究项目(编号: cstc2017jcyjBX0068)和中央高校基本科研业务费(编号: XDJK2015B029)资助项目

摘要 microRNA (miRNA)是一类与癌症等重大疾病的发生密切相关的非编码小分子RNA. 本文基于氧化石墨烯(GO)放大荧光各向异性(FA)原理, 构建了GO/cDNA/Linker DNA/pDNA (DNA-GO)复合探针体系, 结合靶物催化诱导信号循环放大策略, 实现了miRNA-21的灵敏检测. 在复合探针形成后, GO增加了荧光旋转体的体积和质量, Linker DNA上染料分子的荧光各向异性值增大. miRNA-21可通过“toehold”介导的链置换反应与Linker DNA杂交, 使pDNA脱离Linker DNA. 进一步加入Fuel DNA后, Fuel DNA与Linker DNA配对形成双链, 从GO表面脱离, 使Linker DNA上染料分子的荧光各向异性减小. 被置换下来的miRNA-21进入下一循环, 因此一个目标分子可以诱导形成多个Fuel DNA与Linker DNA的杂交双链, 使荧光各向异性进一步减小. 利用减小的荧光各向异性值实现了miRNA-21的灵敏检测. 在本方法中, 荧光各向异性减小值与miRNA-21浓度在10~330 nmol/L范围内呈线性关系, 检测限为1.09 nmol/L.

关键词 氧化石墨烯, 荧光各向异性, 链置换反应, microRNA

1 引言

荧光各向异性法与分子在激发态寿命期间的旋转运动相关, 不受荧光强度波动的影响, 不需要同位素标记和分离^[1-3], 因此被广泛用于金属离子^[4-6]、核酸分子^[7,8]、小分子^[4,9-13]等的检测. 但当检测靶物的体积(或质量)较小时, 靶物与探针结合后不能引起明显的荧光各向异性值的改变, 需要加入一定的荧光各向异性增强剂放大信号以提高检测灵敏度^[14]. 氧化石墨烯(GO)易合成, 相较于传统球形纳米颗粒, GO的独

特二维平面结构使其具有更大的质量和体积、更慢的旋转速度, 可使染料分子的荧光各向异性值更大程度地增大, 因此能作为优良的荧光各向异性增强剂^[14]. 但传统的GO增强荧光各向异性存在以下2个缺点: (1) GO能显著猝灭荧光染料的荧光强度, 使测得的荧光信号容易被散射光影响, 难以得到准确的荧光各向异性值^[15-18]; (2) GO与核酸探针之间存在强的 π - π 堆积作用和静电作用, 仅通过目标分子的竞争较难使核酸探针从GO表面释放^[15,19]. 本课题组^[14]通过将染料修饰的探针分子间接连接在GO表面, 创建了灵敏度与准确

引用格式: 陶静, 肖雪, 李春宏, 门晨, 甄淑君. 氧化石墨烯增强荧光各向异性新策略在microRNA检测中的应用. 中国科学: 化学, 2018, 48: 85-92
Tao J, Xiao X, Li C, Men C, Zhen S. A new graphene oxide enhanced fluorescence anisotropy strategy for microRNA detection. *Sci Sin Chim*, 2018, 48: 85-92, doi: 10.1360/N032017-00126

度都大幅提高的GO增强荧光各向异性的新方法. 该方法不仅能有效减弱GO对荧光染料的猝灭从而提高测得的荧光各向异性值的准确性, 还能通过链置换反应使探针分子更容易从GO表面脱离, 从而提高方法的灵敏度. 但是该方法中一个目标分子仅能使一个探针分子从GO表面释放, 使灵敏度的增加受到限制.

本文在上述方法基础上结合信号循环放大策略^[20], 进一步构建了一种新型的DNA-GO复合探针. 该复合探针既能有效避免GO对染料分子的荧光猝灭作用, 还能实现一个目标分子诱导多个DNA-GO复合探针荧光各向异性值的改变, 进一步提高检测灵敏度. 为了验证本方法的可行性, 本文采用miRNA-21作为检测对象. miRNA是一类与多种生命活动中的基因表达调控有关的内源性小分子, 对细胞的增殖、分化、凋亡等有重要的调节作用^[21]. 近年来研究发现, 在特定组织中的miRNA表达失控与多种病变过程有关, 如病毒性疾病、心血管疾病、免疫紊乱和癌症等^[22,23]. 并且, 大多数胞外miRNA携带着特殊的信息, 与多种疾病密切相关^[22]. miRNA-21含量在人体恶性胶质瘤中的失调与多个胶质母细胞瘤细胞系凋亡细胞的死亡有关^[24]. 因此实现miRNA-21的灵敏检测具有重要意义.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

高效液相色谱(HPLC)纯化的DNA和焦碳酸二乙酯(DEPC)处理水购于上海生工生物技术有限公司(中国), 氧化石墨烯(GO)购于南京先丰纳米材料科技有限公司(中国), 磷酸盐缓冲液(PBS) (20×)购于鼎国生物仪器用品公司(中国), miRNA-21、Mis-5和miRNA-126

购于TAKARA (日本).

本实验中用到的核酸序列(5'-3')见表1.

本实验中所有的荧光光谱均由附带偏振片的F-2500荧光分光光度计(日立, 日本)测量, 温度控制由HH-2数显恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司, 中国)完成.

2.2 实验步骤

0.5 mg/mL GO溶液的制备: 称取10 mg片状GO于20 mL煮沸冷却后的超纯水中, 室温超声90 min, 所得溶液即为所需GO.

miRNA-21的检测: 在无酶的1.5 mL微量离心管中加入20 μL 1 μmol/L的cDNA、20 μL 1 μmol/L的pDNA、20 μL 1 μmol/L的Linker DNA、10 μL PBS (20×)和一定量的DEPC水(保证总体积为200 μL), 混匀, 在95℃水浴中反应5 min后, 缓慢冷却至室温并保持30 min. 加入6 μL 0.5 mg/mL的GO, 室温下缓慢搅拌反应40 min. 加入30 μL 1 μmol/L的Fuel DNA和适量miRNA-21, 37℃水浴反应120 min后于F-2500荧光光度计上测量荧光各向异性值.

2.3 测量条件与荧光各向异性(FA)的计算方法

测量条件: 激发波长为560 nm, 扫描发射波长范围为570~700 nm, 激发和发射的狭缝宽度均为5.0 nm, 光电倍增管(PMT)电压为700 V, 利用荧光光度计分别测量每个样品在4个方向(HH、HV、VH、VV)上的荧光强度, 其中V、H表示方向, V (vertical)代表垂直方向, H (horizontal)代表水平方向.

荧光各向异性(*r*)的计算: 在581 nm处读取发射强度, 并根据以下公式计算:

表1 本实验中用到的核酸序列(5'-3')

核酸名称	序列(5' to 3')
cDNA	AAAAAAAAAAAAAAAAAATCTCACTAACTTACGG
Linker DNA	TAMRA-TCAACATCAGTCTGATAAGCTATAGGGCCGTAAGTTAGTGAGA
Fuel DNA	CTAACTTACGGCCCTATAGCTTATCAGACT
pDNA	CCCTATAGCTTATCAGACT
pDNA-1	CCCTATAGCTTATCAGACTGATGTT
pDNA-2	CCCTATAGCTTATCAGACTGATG
pDNA-3	CCCTATAGCTTATCAGACTGA
pDNA-4	CCCTATAGCTTATCAGA
miRNA-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
Mis-5	UAGCUUACCAGCCUAAUCUAGA
miRNA-126	CAUUAUUACUUUUGGUAC

$$r = (I_{VV} - G \times I_{VH}) / (I_{VV} + 2G \times I_{VH}) \quad (1)$$

$$G = I_{HV} / I_{HH} \quad (2)$$

其中, I 是指待测液的荧光强度, 第一个角标(V或H)表示激发光方向的偏振片位置, 第二个角标(V或H)表示发射光方向的偏振片位置.

3 结果与讨论

3.1 检测原理

本文利用GO能有效增强荧光各向异性的原理, 构建了GO/cDNA/Linker DNA/pDNA (DNA-GO)复合探针体系, 结合靶物催化诱导信号循环放大策略, 实现了miRNA-21的灵敏检测. 如图1所示, cDNA与Linker DNA部分配对, pDNA与Linker DNA完全配对, cDNA上未与Linker DNA配对的A₂₀单链部分通过 π - π 堆积作用吸附到GO表面, 形成对荧光染料部分猝灭的DNA-GO复合探针体系, 增强了Linker DNA上染料分子的荧光各向异性值. 当加入miRNA-21后, miRNA-21通过toehold 1与Linker DNA进行碱基互补配对, pDNA与Linker DNA分离, toehold 2出现. Fuel DNA通过toehold 2与Linker DNA配对, 使cDNA和miRNA-21脱离Linker DNA, 形成Linker DNA-Fuel DNA双链并远离GO, Linker DNA上染料分子的荧光各向异性减小. 值

得一提的是, 此时cDNA依然与GO结合, 所以没有留出位点使多余的miRNA-21、Fuel DNA与GO结合^[25], 因此游离miRNA-21能诱导下一循环, 使荧光各向异性值进一步减小. 通过检测荧光各向异性的减小值可定量检测miRNA-21.

3.2 检测miRNA的可行性研究

本文首先考察了GO增强荧光各向异性的能力和Fuel DNA协助检测靶标催化诱导信号循环放大的作用. 实验结果(图2)表明, 当体系中不存在GO时, 加入miRNA-21前后的荧光各向异性变化值太小, 仅为0.002, 不能用于miRNA-21的检测. 当体系中存在GO时, miRNA-21的加入能诱导荧光各向异性的显著改变, 使荧光各向异性变化值达到0.081. 其中, GO可使背景荧光各向异性值增强3倍, miRNA-21加入后荧光各向异性的差值增强40.5倍. 当体系中不存在Fuel DNA时, 加入miRNA-21前后的荧光各向异性变化值较小, 仅为0.015, Fuel DNA的存在可使信号放大5.4倍. 以上实验结果证明了GO能使体系的背景荧光各向异性信号增强, Fuel DNA能协助靶物催化诱导信号循环放大, 因此本文提出的策略可有效提高检测miRNA-21的灵敏度.

为了进一步验证检测原理, 对比了反应溶液离心后上清液的荧光强度. 结果(图3)表明, 当在溶液中加入

图1 miRNA-21的检测示意图(网络版彩图)

图2 不同检测方法的荧光各向异性响应(1: cDNA+Linker DNA+pDNA+GO+Fuel DNA; 2: cDNA+Linker DNA+pDNA+Fuel DNA; 3: cDNA+Linker DNA+pDNA+GO. 浓度: cDNA、Linker DNA、pDNA, 100 nmol/L; Fuel DNA, 150 nmol/L; GO, 14 μ g/mL; miRNA-21, 100 nmol/L)

入miRNA-21后, 上清液的荧光强度增强, 证明miRNA-21可以诱导Linker DNA与Fuel DNA杂交形成双链并离开GO表面。离心后, GO/cDNA/pDNA复合体因为质量较大沉积到底部, Linker DNA-Fuel DNA双链保留在上清液中, 因而上清液荧光较强, 进一步证实了检测原理。

本文进一步利用琼脂糖凝胶电泳验证靶物催化过程和多种DNA构型的形成。图4(a)表明, miRNA-21可以通过链置换反应使pDNA从cDNA-Linker DNA-pDNA

复合三链中脱离。图4(b)表明了Fuel DNA的加入可以使cDNA、miRNA-21与Linker DNA分离, 进而验证了靶物催化循环过程。综上, 链置换反应机制、靶物催化循环过程和多种DNA构型均得到成功验证。

3.3 检测条件的优化

Toehold 1碱基数与miRNA-21和Linker DNA进行碱基互补配对的能力大小相关。随着toehold 1碱基个数的增加, miRNA-21和Linker DNA进行碱基互补配对的能力增大。但若toehold 1碱基数太多, 反而不利于

图3 离心后上清液的荧光强度(1: cDNA+Linker DNA+pDNA+GO+Fuel DNA, 2: cDNA+Linker DNA+pDNA+GO+Fuel DNA+miRNA-21. 浓度: cDNA、Linker DNA、pDNA, 100 nmol/L; Fuel DNA, 150 nmol/L; GO, 14 μ g/mL; miRNA-21, 100 nmol/L)

图4 凝胶电泳图。(a) 条带1: DNA marker, 条带2: cDNA+Linker DNA+pDNA, 条带3: cDNA+Linker DNA+miRNA-21+pDNA, 条带4: cDNA+Linker DNA+miRNA-21, 条带5: pDNA. 浓度: cDNA和Linker DNA, 500 nmol/L; pDNA, 1.5 μ mol/L; miRNA-21, 650 nmol/L; (b) 条带1: DNA marker, 条带2: cDNA+Linker DNA+miRNA-21, 条带3: cDNA+Linker DNA+miRNA-21+Fuel DNA, 条带4: Linker DNA+Fuel DNA, 条带5: cDNA. 浓度: cDNA, 2 μ mol/L; Linker DNA, 500 nmol/L; Fuel DNA, 750 nmol/L; miRNA-21, 500 nmol/L (网络版彩图)

pDNA 脱离 Linker DNA, 抑制了下一步 Fuel DNA 与 Linker DNA 的结合. 如图 5 所示, 等量的 miRNA-21 引起的荧光各向异性差值随着 toehold 1 碱基数的增加而逐渐增大, 达到 8 个碱基数后趋于稳定. 因此选择 toehold 1 碱基个数为 8.

Fuel DNA 的浓度可影响荧光各向异性差值的大小. Fuel DNA 随着浓度增大, 更易与 Linker DNA 结合, 荧光各向异性差值进一步增大. 但若 Fuel DNA 浓度太大, 反而有可能阻碍 miRNA-21 和 Linker DNA 进行配对. 如图 6 所示, 随着 Fuel DNA 浓度的增大, 荧光各向异性差值先逐渐增大, 随后逐渐减小. 因此选择 Fuel DNA 的最佳浓度为 150 nmol/L.

接下来优化了 GO 的浓度. 若 GO 浓度太小, 则只有少量的 cDNA/Linker DNA/pDNA 复合体能固定在 GO 表面, 产生较低的荧光各向异性背景值. 但若 GO 浓度

太大, 散射信号会影响荧光各向异性值的准确测量. 当 GO 浓度为 15 $\mu\text{g/mL}$ 时, 荧光各向异性差值达到最大 (图 7), 故选择 GO 的最佳浓度为 15 $\mu\text{g/mL}$.

进一步考察了反应时间的影响. 反应时间越长, miRNA-21 与 Linker DNA 结合越充分. 但若反应时间太长, miRNA-21 可能受外界环境影响而发生降解. 结果表明, 随着反应时间延长, 荧光各向异性差值先逐渐增大后逐渐减小, 在 120 min 处达到最大值 (图 8). 因此选择最佳反应时间为 120 min.

3.4 miRNA-21 的分析测定

在上述最优条件下, 在复合探针中加入不同浓度的 miRNA-21. 随着 miRNA-21 浓度由 0 nmol/L 变为 360 nmol/L, 荧光各向异性值逐渐减小后趋于平稳. 在 10~330 nmol/L 范围内, 荧光各向异性差值与 miRNA-21 浓度呈良好的线性关系 (图 9), 线性方程为: $\Delta r = 0.00032c$

图 5 toehold 1 碱基个数 (N) 对荧光各向异性值 (a) 和荧光各向异性差值 (b) 的影响. 浓度: cDNA、Linker DNA、pDNA、pDNA-1、pDNA-2、pDNA-3、pDNA-4, 100 nmol/L; Fuel DNA, 130 nmol/L; GO, 15 $\mu\text{g/mL}$; miRNA-21, 100 nmol/L

图 6 Fuel DNA 浓度对荧光各向异性值 (a) 和荧光各向异性差值 (b) 的影响. 浓度: cDNA、Linker DNA、pDNA, 100 nmol/L; GO, 15 $\mu\text{g/mL}$; miRNA-21, 100 nmol/L

+0.05776, 其中 c 是miRNA-21的浓度(nmol/L), 线性相关系数 R^2 为0.9968, 检测限为1.09 nmol/L (3σ). 以上结

果充分证明了本文构建的靶物催化信号放大协助GO增强荧光各向异性策略能够定量检测miRNA-21.

图7 GO浓度对荧光各向异性值(a)和荧光各向异性差值(b)的影响. 浓度: cDNA、Linker DNA、pDNA, 100 nmol/L; Fuel DNA, 150 nmol/L; miRNA-21, 100 nmol/L (网络版彩图)

图8 反应时间对荧光各向异性值(a)和荧光各向异性差值(b)的影响. 浓度: cDNA、Linker DNA、pDNA, 100 nmol/L; Fuel DNA, 150 nmol/L; GO, 15 $\mu\text{g/mL}$; miRNA-21, 100 nmol/L

图9 (a) 荧光各向异性值与miRNA-21浓度的关系. (b) 荧光各向异性差值与miRNA-21浓度的线性关系. 浓度: cDNA、Linker DNA、pDNA, 100 nmol/L; Fuel DNA, 150 nmol/L; GO, 15 $\mu\text{g/mL}$

3.5 方法的选择性

为了考察本方法的选择性, 在相同实验条件下, 分别对相同浓度的miRNA-21、Mis-5、miRNA-126进行检测. 实验结果(图10)表明, 只有当miRNA-21存在时, 荧光各向异性的差值较高, 与Mis-5、miRNA-126产生的信号有较明显的差别, 证明了本方法具有较好的选择性.

4 结论

本文基于GO放大荧光各向异性, 结合靶物催化诱导信号循环放大策略, 构建了新型DNA-GO复合探针体系, 实现了miRNA-21的灵敏检测. 本方法具有以下3点优势: 首先, DNA-GO复合探针结构能适当减弱GO对荧光染料的荧光猝灭效果, 使测得的荧光各向异性值更准确; 其次, 靶物催化诱导信号循环放大策略使一个目标分子可以与多个DNA-GO复合探针杂交,

图10 方法的选择性. 浓度: cDNA、Linker DNA、pDNA, 100 nmol/L; Fuel DNA, 150 nmol/L; GO, 15 μ g/mL; miRNA-21, Mis-5, miRNA-126, 150 nmol/L

使信号得到放大, 方法灵敏度得以增加; 最后, 本方法具有通用性, 通过更换探针序列可实现其他目标分子的定量检测.

参考文献

- Jameson DM, Ross JA. *Chem Rev*, 2010, 110: 2685–2708
- Huang Y, Zhao S, Chen ZF, Shi M, Liang H. *Chem Commun*, 2010, 48: 7480–7482
- Clayton AHA, Hanley QS, Arndt-Jovin DJ, Subramaniam V, Jovin TM. *BioPhys J*, 2002, 83: 1631–1649
- Yin BC, Zuo P, Huo H, Zhong X, Ye BC. *Anal Biochem*, 2010, 401: 47–52
- He Y, Tian J, Zhang J, Chen S, Jiang Y, Hu K, Zhao Y, Zhao S. *Biosens Bioelectron*, 2014, 55: 285–288
- Yu Y, Liu Y, Zhen SJ, Huang CZ. *Chem Commun*, 2013, 49: 1942–1944
- Wang X, Zou M, Huang H, Ren Y, Li L, Yang X, Li N. *Biosens Bioelectron*, 2013, 41: 569–575
- Zhang M, Guan YM, Ye BC. *Chem Commun*, 2011, 47: 3478–3480
- Liu J, Wang C, Jiang Y, Hu Y, Li J, Yang S, Li Y, Yang R, Tan W, Huang CZ. *Anal Chem*, 2013, 85: 1424–1430
- Zhao Q, Lv Q, Wang H. *Anal Chem*, 2014, 86: 1238–1245
- Zhu Z, Ravelet C, Perrier S, Guieu V, Fiore E, Peyrin E. *Anal Chem*, 2012, 84: 7203–7211
- Cui L, Zou Y, Lin N, Zhu Z, Jenkins G, Yang CJ. *Anal Chem*, 2012, 84: 5535–5541
- Huang Y, Liu X, Zhang L, Hu K, Zhao S, Fang B, Chen ZF, Liang H. *Biosens Bioelectron*, 2015, 63: 178–184
- Xiao X, Li YF, Huang CZ, Zhen SJ. *Chem Commun*, 2015, 51: 16080–16083
- Jang H, Kim YK, Kwon HM, Yeo WS, Kim DE, Min DH. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 5703–5707
- Guo JF, Fang RM, Huang CZ, Li YF. *RSC Adv*, 2015, 5: 46301–46306
- Piao Y, Liu F, Seo TS. *Chem Commun*, 2011, 47: 12149–12151
- He S, Song B, Li D, Zhu C, Qi W, Wen Y, Wang L, Song S, Fang H, Fan C. *Adv Funct Mater*, 2010, 20: 453–459
- Gao L, Lian C, Zhou Y, Yan L, Li Q, Zhang C, Chen L, Chen K. *Biosens Bioelectron*, 2014, 60: 22–29
- He X, Zeng T, Li Z, Wang G, Ma N. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 2948
- 赵晓鸿, 赫捷. *中华肿瘤防治杂志*, 2010, 17: 547–550
- Lv W, Zhao J, Situ B, Li B, Ma W, Liu J, Wu Z, Wang W, Yan X, Zheng L. *Biosens Bioelectron*, 2016, 83: 250–255
- Ma G, Liu Z. *Sci Bull*, 2015, 60: 2142–2144
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. *Cancer Res*, 2005, 65: 6029–6033
- Miyahata T, Kitamura Y, Futamura A, Matsuura H, Hatakeyama K, Koinuma M, Matsumoto Y, Ihara T. *Chem Commun*, 2013, 49: 10139–10141

A new graphene oxide enhanced fluorescence anisotropy strategy for microRNA detection

Jing Tao, Xue Xiao, Chunhong Li, Chen Men, Shujun Zhen^{*}

Key Laboratory on Luminescent and Real-Time Analytical Chemistry, Ministry of Education; School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Corresponding author (email: zsj@swu.edu.cn)*

Abstract: MicroRNAs (miRNA) are a class of small non-coding RNA molecules, whose abnormal expression or perturbation is associated with cancer and other diseases. Thus, identification of perturbed miRNAs using sensitive detection techniques is crucial. In view of this, we developed a novel graphene oxide (GO) amplified fluorescence anisotropy (FA) strategy for the detection of miRNA-21. In this method, a GO/capture DNA (cDNA)/Linker DNA/probe DNA (pDNA) (DNA-GO) composite probe was constructed, wherein target catalyzed signal cyclic amplification strategy was used to assist GO to amplify the FA signal. After the formation of DNA-GO composite probe, the FA of the fluorophore on Linker DNA was enhanced by GO because of the increased volume and mass. With the addition of miRNA-21, pDNA was released from Linker DNA through toehold-mediated strand exchange reaction. Fuel DNA then hybridized with Linker DNA to form a double-stranded DNA (dsDNA), which was detached from the surface of GO, and FA of the fluorophore on Linker DNA was reduced. Additionally, miRNA-21 was released after the formation of dsDNA, which triggered the next cycle, resulting in further reduction of FA value. By monitoring the reduced FA values, miRNA-21 could be detected in the range of 10–330 nmol/L and the limit of detection (LOD) was 1.09 nmol/L.

Keywords: graphene oxide, fluorescence anisotropy, strand exchange reaction, microRNA

doi: [10.1360/N032017-00126](https://doi.org/10.1360/N032017-00126)