

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.13.001

文章编号: 1005-8982(2020)13-0001-05

基础研究·论著

量子点流式微球技术用于 DNA 的检测研究*

蔡冰洁¹, 熊晓庆²

(1. 武汉大学人民医院 检验科, 湖北 武汉 430060; 2. 海南医学院 热带医学与检验医学院, 海南 海口 571199)

摘要: 目的 构建一种基于新型纳米材料量子点的流式微球技术, 用于高通量的 DNA 检测, 实现 DNA 的快速、低成本检测。**方法** 将能与靶 DNA 一端杂交的探针 DNA(P1) 标记在微球表面, 与 DNA 配对杂交后, 加入能与靶 DNA 另一端杂交的量子点标记的探针 DNA(P2), 组装成一种流式微球-探针 P1、靶 DNA、量子点-探针 P2 的夹心复合结构, 通过测定杂交前后平均荧光强度的变化检测 DNA 的浓度。**结果** 该新型检测方法可以区分出完全互补、单碱基错配及完全非互补的 DNA ($P < 0.05$), 且随着 DNA 浓度的升高, 检测到的平均荧光强度逐渐增强 ($P < 0.05$), 对 DNA 的最低检出限可达 0.2 nmol/L。**结论** 新型量子点流式微球技术检测 DNA 具有高敏感性和高特异性、分析速度快、操作简单等优点, 是一种非常重要的具有潜力的新型临床检测方法。

关键词: 量子点流式微球技术; DNA; 快速检测

中图分类号: R440

文献标识码: A

Quantum dots cytometric bead assay for DNA detection*

Bing-jie Cai¹, Xiao-qing Xiong²

(1. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China; 2. School of Tropical and Laboratory Medicine, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571199, China)

Abstract: Objective To detect DNA with high through, efficiency and low-cost, a novel nanomaterial based method established by combining quantum dots with cytometric bead assay. **Methods** The DNA probes (P1) which can hybridize with one end of target DNA are immobilized onto the surface of microsphere. After hybridizing with target DNA, quantum dots decorated probe DNA (P2) were introduced to hybridize with the other end of target DNA. Then a complex structure of microsphere-P1, target DNA and quantum dots-P2 was fabricated, the concentration of target DNA was detected by measuring changes in mean fluorescence intensity before and after hybridization. **Results** Complementary, one-base mismatched and non-complementary DNA can be distinguished by the novel method ($P < 0.05$). With the increasing concentration of target DNA, the mean fluorescence intensity increased synchronously ($P < 0.05$). The detection limit of target DNA can reach 0.2 nmol/L. **Conclusions** The DNA was detected by the novel method of quantum dots cytometric bead assay. It has the advantages of high sensitivity and specificity, rapid analysis, easy operation and so on. It is of great importance in point-of-care testing and is a promising novel method in clinical application.

Keywords: quantum dots; cytometric bead assay; DNA; rapid detection

目前基因检测的方法主要有 PCR、液态生物芯片、基因芯片、微流控技术等, 这些传统的检测方法

收稿日期: 2020-01-05

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81802111)

有一些较明显的缺陷,如操作繁琐、易污染、耗时耗力、成本高等^[1-4]。量子点是一种新型半导体纳米材料,尺寸 2 ~ 10 nm,是一种较传统荧光染料更优良的荧光探针^[5-7]。流式微球技术是在流式细胞术的基础上新建的一种技术。其作用机制是通过携带有荧光信号微球与待测物结合在一起形成一个可以发荧光的复合物,然后通过检测其平均荧光强度反映待测物的浓度^[8]。流式细胞仪可以对细胞水平之外的分子水平进行检测^[9-10]。为建立一种高通量、操作简单、成本低的快速检测方法,本文拟利用新型纳米材料量子点流式微球技术检测 DNA,该新型方法结合量子点优异的荧光特性和流式微球技术的高通量,具有反应灵敏快速、操作简单等优势,利用微球-DNA-量子点夹心结构,通过检测核酸杂交前后荧光强度的变化来实现 DNA 的高通量快速检测。该新型技术有望实现临床疾病相关核酸分子的快速检测。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

量子点购自武汉珈源量子点技术开发有限公司,链霉亲和素包被的微球购自武汉珈源生物医学工程有限公司,3-二甲氨基丙基-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)、生物素琥珀酰亚胺酯(生物素-NHS)购自美国 Sigma Aldrich 公司,DNA 序列购自宝生生物工程(大连)有限公司(见表 1),通过高效液相纯化,并用 1×磷酸盐缓冲液(PBS)稀释,其余试剂购自上海捷瑞生物有限公司。

1.2 仪器与设备

FACSCanto II 流式细胞仪(美国 BD 医疗器械有限公司),干式恒温器(杭州奥盛有限公司),HFsafe-1500TE 生物安全柜(上海力申有限公司),高速离心机(德国艾本德有限公司),震荡器(海门市其林贝尔仪器

制造有限公司),纯水过滤器(法国 ELGA 有限公司),YM75Z 高温高压灭菌锅(上海三申医疗器械有限公司)。

1.3 方 法

1.3.1 在微球表面固定探针 P1(微球-P1) 将 25 μl 、10 $\mu\text{mol/L}$ 的探针 P1 加入 150 μl 、5 mmol/L 的生物素-NHS 中,室温避光反应 4 h,反应完后用 1×PBS 洗涤 3 次,除去未结合的探针,接着用 1×PBS 配成 50 μl 、5 $\mu\text{mol/L}$ 的生物素化的探针 P1(Biotin-P1)。将约 7 $\mu\text{g/ml}$ 链霉亲和素包被的微球用 1×PBS 洗涤 2 次后,取 20 μl 洗涤后的磁珠溶液和 5 μl 、5 $\mu\text{mol/L}$ Biotin-P1 于干燥的 Ep 管中,混匀,室温避光反应 30 min。

1.3.2 量子点修饰探针 P2(QDs-P2) 将 5 μl 、10 mmol/L 的 EDC, 5 μl 、10 mmol/L 的 NHS, 5 μl 、2 $\mu\text{mol/L}$ 的 QDs, 5 μl 、400 $\mu\text{mol/L}$ 的探针 P2 分别加到干燥 Ep 管中,室温反应 2 h,反应后用 1×PBS 洗涤 3 次,最终用 1×PBS 配成 400 μl 、5 $\mu\text{mol/L}$ 的 QDs-P2。

1.3.3 核酸杂交反应及检测分析 取 1.3.1 中合成的微球-P1 与 5 μl 不同浓度的 DNA 在 56℃ 恒温箱中杂交 30 min,接着于杂交体系中加入 1.3.2 中 QDs-P2 在 56℃ 恒温箱中杂交 30 min,杂交完成后用 1×PBS 将体系终体积补液至 1 ml,随后用流式细胞仪进行荧光信号检测。分别研究互补 DNA、单碱基错配 DNA 及完全非互补 DNA。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用方差分析,进一步两两比较用 LSD-t 检验,同时做一元线性(线性拟合)回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实验原理

灰色圆球为固定有探针 DNA(探针 P1)的磁珠,绿色为固定有探针 DNA(探针 P2)且发绿色荧光的量子点。首先,将靶 DNA 与固定有能与 DNA 一端互补的探针 P1 的磁珠微球反应,然后加入能与 DNA 另一端互补杂交的 QDs-P2,最后形成一个微球-P1-DNA-P2-QDs 复合结构,该结构为不易洗脱的复合物。用 1×PBS 洗涤 2 次,去除反应体系中未结合的物质,接着用流式细胞仪检测其反应前后平均荧光强度的变化,该平均荧光强度与 DNA 的浓度成正比,从而实现 DNA 的检测。见图 1。

表 1 DNA 序列

核酸	序列 5'-3'	碱基数
核酸探针 P1	CTGATAAGCTA	11
核酸探针 P2	TCAACATCAGT	11
DNA 序列	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA	22
单碱基错配 DNA	TAGCTTATCAGACTGAAGTTGA	22
完全非互补 DNA	CGATCCGCTGAGTCAGCACCAG	22

2.2 方法可行性分析

为验证该新型检测方法的可行性, 分别检测空白组 (不含 DNA 和 DNA 测试组的平均荧光强度变化。在没有 DNA 存在的条件下, 微球 -P1、QDs-P2 不能特异结合, 洗涤后检测其荧光信号, 其荧光强度极弱, 荧光强度仅在 1 ~ 10 MFI; 而在 DNA 存在的条件下, 微球 -P1、DNA 及 QDs-P2 核酸杂交, 形成一个特异的紧密复合体结构, 洗涤后检测其荧光强度在 10 ~ 100 MFI 区间内较空白磁珠明显增大。实验结果符合预期, 所以本实验所设计方案具有可行性, 可以用该新型方法检测 DNA。见图 2。

2.3 方法的敏感性

为检验方法的敏感性, 分别将 0.2、1.0、10.0、20.0 和 100.0 nmol/L 互补 DNA 加入体系中与微球 -P1 和 QDs-P2 进行杂交, 通过检测杂交前后荧光强度的变化来分析方法的敏感性。流式细胞仪检测到的平均荧光强度随着 DNA 浓度的升高, 其荧光强度也不断增强。因为 DNA 的浓度越大, DNA 中的碱基对与探针 DNA 互补序列中的碱基对杂交就愈多, 从而形成的微球荧光复合结构越多, 其荧光强度越大, 所以随着 DNA 的浓度高, 检测到的荧光强度越强 (见图 3)。荧光强度与 DNA 浓度成良好的线性关系, 其线性回归方程为 $Y=23.55X+24.36$ [Y 为平均荧光强度, X 为 $\lg C$ (DNA 浓度)], 方程的决定系数 $R^2=0.989$ 。基于 $3\sigma/S$ (σ 为空白对照的标准偏差, S 为线性方程

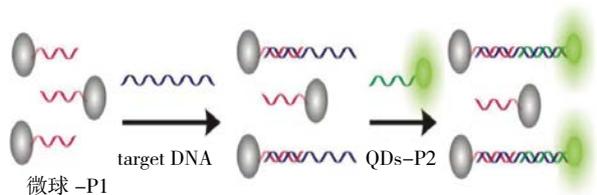


图 1 实验原理图

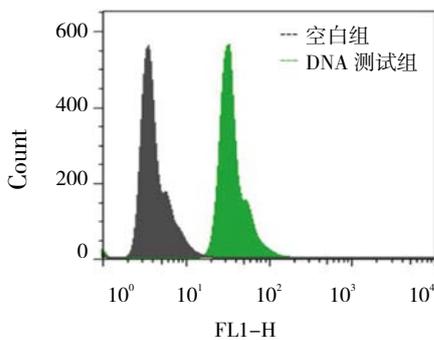


图 2 可行性验证荧光图

的斜率), 可计算该方法的最低检测限为 0.2 nmol/L。不同浓度 DNA 测量值比较, 差异有统计学意义 ($F=98.250, P=0.001$)。DNA 浓度 0.0 与 0.2 nmol/L 的检测值比较, 差异有统计学意义 ($t=3.003, P=0.008$), DNA 浓度 0.2 与 1.0 nmol/L 的检测值比较, 差异有统计学意义 ($t=5.232, P=0.001$), DNA 浓度 1.0 与 10.0 nmol/L 的检测值比较, 差异有统计学意义 ($t=5.396, P=0.001$), DNA 浓度 10.0 与 20.0 nmol/L 的检测值比较, 差异有统计学意义 ($t=6.663, P=0.001$), DNA 浓度 20.0 与 100.0 nmol/L 的检测值比较, 差异有统计学意义 ($t=5.318, P=0.001$) (见图 4)。

2.4 量子点流式微球技术的特异性

为探讨本文构建的新检测方法的特异性, 分别将完全非互补 DNA、单碱基错配 DNA、互补 DNA 加入体系中反应。将 100.0 nmol/L 完全非互补 DNA、单碱基错配 DNA、互补 DNA 分别与微球 -P1 和 QDs-P2 进行杂交反应, 接着用流式细胞仪检测杂交前后的荧光强度变化。不同 DNA 在量子点流式微球技术中的荧光强度比较, 差异有统计学意义 ($F=171.622, P=0.001$)。完全非互补 DNA 和单碱基错配 DNA 引起的荧光强度

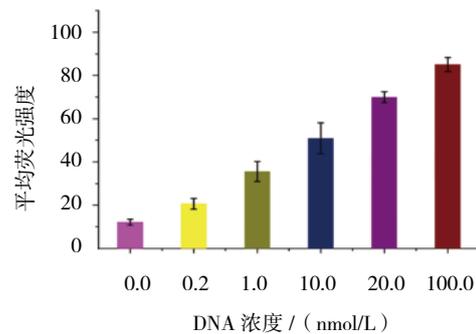


图 3 不同浓度 DNA 在量子点流式微球技术中的平均荧光强度 ($\bar{x} \pm s$)

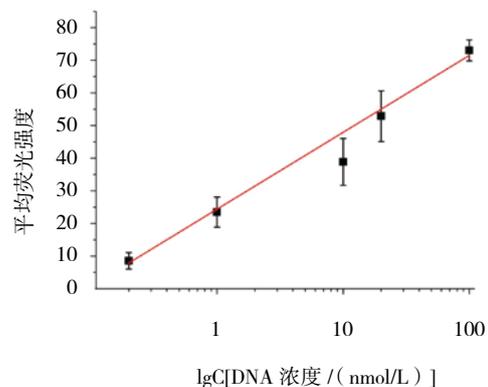


图 4 不同浓度 DNA 在量子点流式微球技术中的线性拟合曲线

几乎可以忽略不计, 互补 DNA 引起的荧光强度变化较完全非互补 DNA 及单碱基错配 DNA 强。从实验结果可知该新型方法可以很好地将互补 DNA 和完全非互补 DNA、单碱基错配 DNA 区别开来 ($P < 0.05$), 所以该技术对检测 DNA 具有很好的特异性。见图 5。

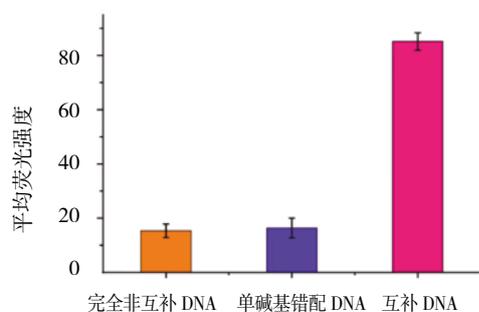


图 5 不同 DNA 在量子点流式微球技术中的荧光强度 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

量子点是一种可以应用到各种学科中的新型半导体纳米材料, 其粒子直径往往 < 20 nm, 由几种元素混合构成, 其组成元素多是 II ~ IV 族元素中的 Zn S、Cd Se、Cd S 和 III ~ V 族元素中的 In As、Pa 等^[5, 11-12]。传统的荧光染料有一些明显的缺陷, 如荧光容易消散、激发光谱较窄、容易被光漂白、荧光效率低、对环境有危害等。量子点是一种新型荧光材料的出现, 很好地解决传统荧光染料的上述缺陷。量子点的性质比较活泼, 荧光稳定且寿命长; 激发光谱宽且发射光谱窄; 通过调节量子点的组成元素和大小, 改变荧光的发射光谱, 实现不仅能检测紫外区域, 还可以检测到红外区域, 减少因紫外辐射对生物体的危害; 不会损坏检测对象的结构, 还可以接受激发光产生荧光; 非常适用于生物分子的荧光标记^[13-14]。综上可知, 量子点是一种非常优良的荧光探针, 在未来的科学研究中有望被广泛应用^[15-18]。

近年来, 一种可以定量检测和分析细胞水平以及微生物水平的新方法流式细胞术产生^[19], 流式细胞术可同时对多个参数进行分析, 分析时间短且效率高, 高通量且灵敏, 还可以对其设定的检测项目大量收集, 并进行全面分析, 具有非常强的灵活性, 在临床医学中主要用于细胞分析^[20]。流式微球技术是在流式细胞术的基础上新建的一种技术, 作用机制是通过携带有荧光信号的微球与待测物结合在一起形成一个可以发荧光的复合物, 然后通过检测其平均荧光强度从而反

映待测物的浓度^[21]。该技术检测速度较快, 可以通过将生物分子结合在微球上, 从而实现在生物分子水平上的检测, 实现流式细胞仪对细胞水平之外的分子水平进行检测^[22-27]。

本实验将高性能的量子点和流式细胞术结合, 形成一种崭新的量子点荧光探针流式微球技术用于 DNA 分子的快速、高通量检测, 该新型技术能高敏感性、高特异地检测 DNA 分子, 最低检出限能达到 0.2 nmol/L, 且具有操作简单、成本低、耗时短等优势, 有望用于各疾病相关核酸分子的高敏感性、高特异性及高通量的检测。

参 考 文 献:

- [1] CAI B J, HUANG L, ZHANG H, et al. Gold nanoparticles-decorated graphene field-effect transistor biosensor for femtomolar microRNA detection[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 74: 329-334.
- [2] LI J, YAO B, HUANG H, et al. Real-time polymerase chain reaction microRNA detection based on enzymatic stem-loop probes ligation[J]. *Anal Chem*, 2009, 81(13): 5446-5451.
- [3] GUO S, YANG F, ZHANG Y L, et al. Amplified fluorescence sensing of miRNA by combination of graphene oxide with duplex-specific nuclease[J]. *Anal Methods*, 2014, 6(11): 3598-3603.
- [4] CAI B J, GUO S, LI Y. MoS₂-based sensor for the detection of miRNA in serum samples related to breast cancer[J]. *Anal Methods*, 2018, 10(2): 230-236.
- [5] JI X Y, PENG F, ZHONG Y L, et al. Fluorescent quantum dots: synthesis, biomedical optical imaging, and biosafety assessment[J]. *Colloids & Surfaces B Biointerfaces*, 2014, 124: 132-139.
- [6] MATEA C T, MOCAN T, TABARAN F, et al. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2017(12): 5421-5431.
- [7] PLESKOVA S, MIKHEEVA E, GORNOSTAEVA E. Using of quantum dots in biology and medicine[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2018, 1048: 323-334.
- [8] 胡晓璐, 王占科. 流式微球技术及量子点在实验室诊断中的应用进展 [J]. *山东医药*, 2012, 52(42): 90-92.
- [9] LENG Y K, SUN K, CHEN X Y, et al. Suspension arrays based on nanoparticle-encoded microspheres for high-throughput multiplexed detection[J]. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(15): 5552-5595.
- [10] KONG W J, XIAO C B, YING G Y, et al. Magnetic microspheres-based cytometric bead array assay for highly sensitive detection of ochratoxin A[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 94: 420-428.
- [11] MEDINTZ I L, UYEDA H T, GOLDMAN E R, et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing[J]. *Nat Mater*, 2005, 4(6): 435-446.
- [12] ALIVISATOS A P. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots[J]. *Science*, 1996, 271(5251): 933-937.
- [13] MARUKHYAN S S, GASPARYAN V K. Fluorometric

- immunoassay for human serum albumin based on its inhibitory effect on the immunoaggregation of quantum dots with silver nanoparticles[J]. *Spectrochimica Acta Part A Molecular & Biomolecular*, 2017, 173: 34-38.
- [14] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [15] SMITH A M, MOHS A M, NIE S. Tuning the optical and electronic properties of colloidal nanocrystals by lattice strain[J]. *Nat Nanotechnol*, 2009, 4(1): 56-63.
- [16] MURPHY C J. Optical sensing with quantum dots[J]. *Anal Chem*, 2002, 74(19): 520A-526A.
- [17] WOLFGANG J P, DANIELE G, TERESA P, et al. Biological applications of colloidal nanocrystals[J]. *Nanotechnology*, 2003, 14(7): R15-R27.
- [18] BRUS L. Electronic wave functions in semiconductor clusters: experiment and theory[J]. *The Journal of Physical Chemistry*, 1986, 90(12): 2555-2560.
- [19] 肖剑, 陈娟丽, 张彬彬, 等. 大肠杆菌 O157 快速检测板在肉与肉制品检测中的应用 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(1): 331-335.
- [20] 李锦媛, 杨炳华, 何杨, 等. 流式微球技术检测血小板特异性抗体 [J]. *临床检验杂志*, 2010, 28(2): 110-112.
- [21] 常丽贤, 杨林花, 陈剑芳, 等. 应用流式细胞术检测原发性血小板减少症患者血小板膜糖蛋白 IIb/IIIa 的表达及其临床意义 [J]. *中华血液学杂志*, 2011, 32(9): 630-632.
- [22] LIU X J, BING T, SHANGGUAN D. Microbead-based platform for multiplex detection of DNA and protein[J]. *Acs Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(11): 9462-9469.
- [23] SHEN L Y, BING T, LIU X, et al. Flow cytometric bead sandwich assay based on a split aptamer[J]. *Acs Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(3): 2312-2318.
- [24] QI Y, QIU L Y, FAN W J, et al. An enzyme-free flow cytometric bead assay for the sensitive detection of microRNAs based on click nucleic acid ligation-mediated signal amplification[J]. *Analyst*, 2017, 142(16): 2967-2973.
- [25] MERBAH M, ONKAR S, GRIVEL J C, et al. Standardization of a cytometric p24-capture bead-assay for the detection of main HIV-1 subtypes[J]. *J Virol Methods*, 2016, 230: 45-52.
- [26] QIU L Y, ZHANG Y C, LIU C H, et al. A versatile size-coded flow cytometric bead assay for simultaneous detection of multiple microRNAs coupled with a two-step cascading signal amplification[J]. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2017, 53(20): 2926-2929.
- [27] 李晓非, 黄山, 梁桂亮, 等. 细胞因子联合检测对活动性结核与潜伏性结核鉴别诊断的预测价值分析 [J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(20): 34-39.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 蔡冰洁, 熊晓庆. 量子点流式微球技术用于 DNA 的检测研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(13): 1-5.