

基于多光子激发荧光-毛细管电泳的 DNA 分析新技术*

陈胜^{1,2}, 徐友志¹, 杜伟¹, 刘笔锋^{1**}

(1 华中科技大学 生物医学光子学教育部重点实验室, 武汉 430074)

(2 湖北师范学院 电工电子教学示范中心, 湖北 黄石 435001)

摘 要:研制了一套新型毛细管电泳-连续光多光子激发荧光检测系统,并用该系统对含有多种荧光染料的样品进行了电泳分离和多光子激发荧光检测.结果表明:该系统具有分离效率高、质量检测限低和宽谱激发等特点,适合生物体系等复杂样品的测量并实现了 DNA 样品的分离分析.

关键词:毛细管电泳;多光子激发荧光;DNA 分析

中图分类号:R318.5

文献标识码:A

文章编号:1004-4213(2008)02-0356-4

0 引言

DNA 分析是基因组学和现代分子生物学领域最重要的技术环节之一,也是了解基因结构和功能的基础.例如 DNA 序列测定,基于化学测序法和双脱氧链终止法开发的各种测序方法在技术环节上不断改进.上世纪 90 年代提出的人类基因组计划^[1],给 DNA 测序技术提出了严峻的挑战.毛细管电泳激光荧光法具有操作简单、经济实用、探测灵敏、分离效率高等优点. Smith 等人采用 4 种荧光试剂标记和 4 光谱通道检测,首次进行了毛细管电泳激光荧光检测的 DNA 序列分析^[2]. 随后, Mathies 和 Kambara 等提出一种将 20 支毛细管并列电泳测序装置,采用激光荧光电荷耦合阵列检测器(CCD)检测^[3-4],提高了灵敏度. Yeung 等又提出了 100 支毛细管阵列电泳装置,采用 CCD 检测器同时检测 100 支毛细管的 DNA 分离样品^[5],均获得满意效果. Zhang 等采用鞘流检测池技术^[6],将阵列型电泳方案推向市场.毛细管阵列电泳技术的发明无疑是 HGP 成功的关键,也极大地激发了后续对众多生物物种的测序计划.目前,已经有超过 100 种生物的全基因组序列被测定.当前,测序技术仍然在向前推进,研发速度更快、消耗更低的测序仪已成为共识,例如基于微流控芯片技术的测序方法^[7]等.

尽管运用毛细管电泳激光荧光的 DNA 测序取得了很大进步,但也面临一些问题,如采用多线激发光源,不仅价格昂贵,而且影响仪器的灵敏度. 1998 年, Shear 研究组将多光子激发荧光检测技术引入毛细管电泳^[8],成功实现了生物分子分离和 zmol 水平的检测限^[9].

在各种激光器中,半导体激光器具有体积小、功率高、操作简单、价格低廉、维护费用低等诸多优点.近红外激发光源,可避开拉曼散射和瑞利散射,且远离发射光谱,有利于降低背景和噪音,提高仪器系统的灵敏度.本文自组装了毛细管电泳-连续光多光子激发荧光检测仪器^[10],通过单一的成本低廉的半导体红外激光器同时激发六种不同荧光染料的多光子荧光,并实现基于毛细管电泳分离和多光子荧光探测的 DNA 分析为建立快速、简捷、经济的高速 DNA 测序新技术开辟了新视野.

1 材料和方法

1.1 仪器

毛细管电泳-多光子激发荧光检测分析在自组装实验平台上完成^[11],该平台系统包括基于连续光的多光子激发毛细管电泳荧光检测仪如图 1,由激光器、毛细管电泳部分、荧光检测部分和数据处理等 4 部分构成,工作原理是:激光器采用半导体激光器 5,用于提供激发光源,实现双光子激发,发射的激光经过二向色镜 12 和全反射镜 11 的反射后进入物镜,物镜 3 将光束聚焦成一点,照射在毛细管 2 的检测出口使待测物质实现双光子激发;激发所产生的荧光被物镜所收集,在全反射镜反射,透过二向色镜,经带通滤光片组 6 过滤后,荧光通过并到达光电倍增管 7,将荧光放大后送给数据采集卡 8,再传送给计算机 9 加以处理完成.

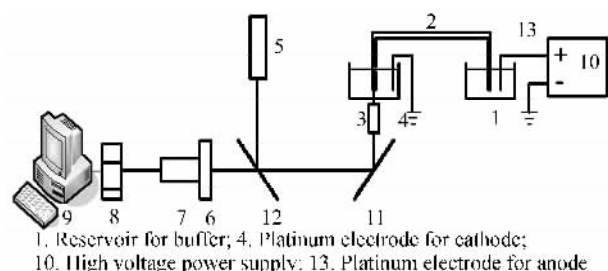


图 1 采用半导体激光器的 MPE-CE 系统

Fig. 1 Illustration of MPE-CE system based on laser diode

* 国家自然科学基金(20405006, 20105004)和华中科技大学研究生创新基金资助

** Tel: 027-87792203 Email: bfliu@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2006-10-26

1.2 试剂

DNA 样品: P_1 : 5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTT-AGGG-3' 和 P_2 : 5'-CCCTAACCCCTAACCCCTAACCC-T AA-3'(北京奥科生物技术有限责任公司), P_1 和 P_2 为 5'端 FITC 修饰. 荧光素异硫氰酸酯 (Fluorescein Isothio Cyanate, FITC), Rh6G, RhB, SRh, coumarin, calcein 和 APTS(MO, USA), 十水合四硼酸钠(天津市石英钟厂霸州市化工分厂), 硼酸(武汉联碱厂), 丙酮(天津博迪化工有限公司), NaOH(北京化工厂), HCl(武汉市亚泰化工试剂有限公司), 所用水均为 Direct-Q 系统过滤的超纯水, 除特殊注明外, 所用试剂均为分析纯或以上, 且所有溶液使用前都进行过滤处理(400 nm). DNA 样品与 FITC 缩合衍生反应, 通过检测 FITC 的荧光就可以间接实现对 DNA 样品的分析.

1.3 方法

毛细管处理: 对多种荧光染料分离, 每次进样前分别以 0.1 mol/L HCl、0.1 mol/L 氢氧化钠、水和 25 mmol/L 硼砂(pH 9.50)溶液, 冲洗石英毛细管(57 cm×75 μ m)10 min; 对 DNA 分离, 每次进样前分别以 0.1 mol/L HCl、0.1 mol/L 氢氧化钠、水和 2% HEC/1×TBE/20 mmol/L 冲洗石英毛细管(57 cm×75 μ m)10 min, 再用 1% PVA 对处理后的毛细管进行表面改性; 进样方式: 对多种荧光染料进样: 采用虹吸进样, 15 cm/60 s, 对 DNA 进样: 电动进样, -6 kV/10 s. 实验条件: 电泳实验前, 毛细管需要先进行高电压平衡 10 min. PMT 工作电压为 1 000 V; 数据处理采用 Matlab 处理; 分离电压为 20 kV, 半导体激光器功率为 800 mw, 采用 100 倍油镜进行柱后检测, 将物镜焦点对准在阴极端毛细管出口的中心.

2 结果与讨论

2.1 多种荧光染料的毛细管电泳分离和多光子激发荧光检测

多光子激发荧光理论上可以实现宽谱激发. 通常情况下, 一个分子或者原子每次只能吸收一个光子, 从基态跃迁到激发态. 当光强足够高时, 就会产生多光子跃迁, 即一次可以吸收多个光子. 以荧光物质的双光子吸收为例(图 1): 荧光分子同时吸收两个相同频率的光子, 被激发至高能级, 经过一个弛豫过程后发生自发跃迁, 辐射出一频率略小于两倍入射光频率的荧光光子. 由此推出: 采用多光子激发荧光^[12-14], 可以用单线激光取代多线激光, 能有效降低系统成本. 激发原理如图 2, 高能量的 350 nm 的光子激发的荧光与吸收两个近红外的 700 nm 的光子

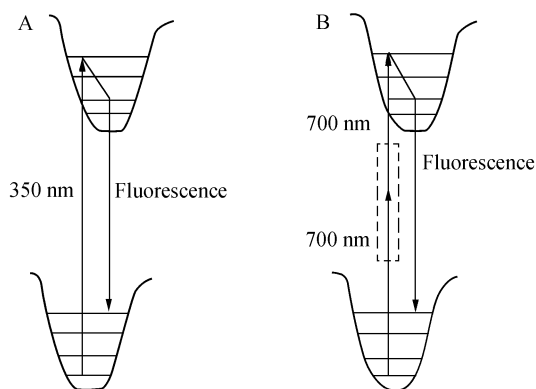


图 2 单光子激发和多光子激发原理比较图

Fig. 2 Parallel illustration of laser induced fluorescence and multiphoton excited fluorescence

激发的荧光一样; 这样可以看出, 只要有足够能量的 700 nm 激光, 可以实现从激发波长在 350~690 nm 以内的、多光子激发效率高的荧光试剂的同时多光子荧光激发. 因此, 多光子激发可以实现超宽谱线激发, 即同时实现多种不同激发波长荧光试剂的激发. 本文选取了 6 种荧光染料分子, 其荧光参量如表 1. 如果采用单光子激发则需要多种波长的激光器, 如果采用多光子激发荧光, 可以同时实现激发和荧光收集.

表 1 荧光染料的光谱参量

染料名称	最大激发波长/nm	最大发射波长/nm
Rhodamine 6G	525	555
Rhodamine B	540	625
Sulphorhodamine B	520	595
Coumarin	445	525
Calcein	494	517
APTS	424	505

基于此种分析, 本文构建了一套毛细管电泳-连续光多光子激发荧光检测分析系统, 并对上述 6 种荧光染料进行了分离分析. 结果表明, 该系统可以实现不同激发波长物质的同时测量. 图 3 给出了电泳谱图, 峰图标号和浓度分别为: Peak identity: 1. rhodamine 6G(0.14 mM); 2. rhodamine B(0.2 mM); 3. sulforhodamine (0.2 mM); 4. calcein (0.03 mM); 5. coumarin (0.2 mM); 6. APTS(0.17 mM); Buffer;

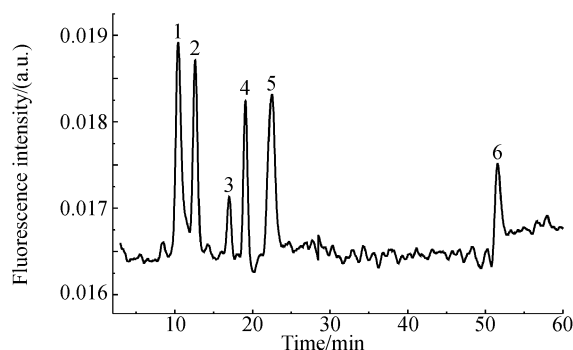


图 3 毛细管电泳-连续光多光子激发荧光检测分析荧光染料
Fig. 3 Electropherogram of small-molecule dyestuffs using CW-based MPE fluorescence detection by LD laser

15 mmol/L borate(pH 9.50). 根据图 3, 可以确认, 本文建立的分析系统可以满足复杂体系分离分析的要求, 尤其是对于多荧光标记体系如 DNA 测序等.

2.2 DNA 分析

为进一步探讨应用本系统进行 DNA 分析的可能性, 本文进行了模型实验. 对 FITC 标记的 DNA 样本(含 2 段等碱基长度的 DNA 片段)进行了毛细管电泳分离和基于连续光多光子激发荧光检测分析, 实验结果如图 4, 峰图标号和浓度分别为: Peak identity: 1. $P_1 (4 \times 10^{-5} \text{ mol/L})$; 2. $P_2 (4 \times 10^{-5} \text{ mol/L})$; $P_3 (P_1 3 \times 10^{-5} \text{ mol/L} + P_2 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L})$; Buffer: 2% HEC/1×TBE/20 mmol/L. 毛细管电泳分离模式采用的是基于筛分机制的无胶筛分毛细管电泳, 在该模式下, DNA 由于其片段长度不同而获得分离. 在本研究中, 样品 P_1 和 P_2 为等长度的分子链, 但由于其在溶液中的构象不同而显示出不同的表观链长, 从而获得分离. 当 P_1 和 P_2 两种样品混合在一起后, 由于链与链之间的相互作用, 使两者的电泳迁移率都发生改变. 该研究表明, 本方法完全可以适用于 DNA 分析, 为探索 DNA 测序检测新方法提供了新思路.

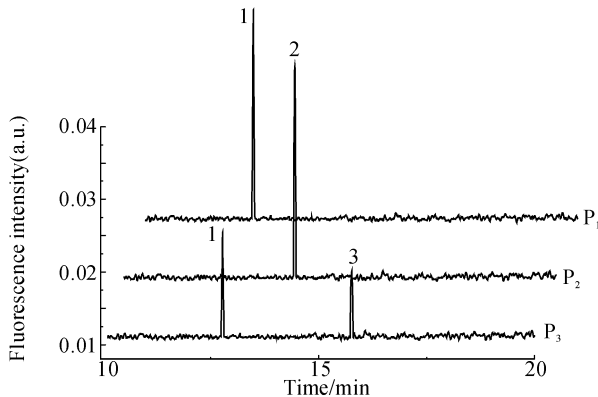


图 4 毛细管电泳-连续光多光子激发荧光检测分析 DNA
Fig. 4 Electropherogram of DNA using CW-based MPE fluorescence detection by LD laser

3 结论

毛细管电泳-连续光多光子激发荧光检测系统成功地应用于 DNA 分析. 研究表明, 该系统具有宽谱激发荧光的特点, 适于复杂体系的测量, 尤其是多荧光标记体系的测量, 为发展 DNA 测序检测新方法提供了可能的新的选择.

参考文献

[1] WATSON J D. The human genome project: past, present, and future[J]. *Science*, 1990, **248**(4951): 44-49.

[2] DROSSMAN H, LUCKEY J A, KOSTICHKA A J, *et al.* High-speed separations of DNA sequencing reactions by capillary electrophoresis[J]. *Anal Chem*, 1990, **62**(9): 900-903.

[3] HUANG X H, QUESADA M A, MATHIES R A. Capillary array electrophoresis using laser-excited confocal fluorescence detection[J]. *Anal Chem*, 1992, **64**(8): 967-972.

[4] HASHIMOTO K, ITO K, ISHIMORI Y. Multiple sheath-flow gel capillary-array electrophoresis for multicolor fluorescent DNA detection[J]. *Anal Chem*, 1994, **66**(7): 1021-1026.

[5] UENO K, YEUNG E S. Simultaneous monitoring of DNA fragments separated by electrophoresis in a multiplexed array of 100 capillaries[J]. *Anal Chem*, 1994, **66**(9): 1424-1431.

[6] DOVICH N J, ZHANG J Z. How capillary electrophoresis sequenced the human genome[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2000, **39**(24): 4463-4468.

[7] EMRICH C A, TIAN H, MEDINTZ I L, *et al.* Microfabricated 384-lane capillary array electrophoresis bioanalyzer for ultrahigh-throughput genetic analysis[J]. *Anal Chem*, 2002, **74**(19): 5076-5083.

[8] GOSTKOWSKI M L, MCDONIEL J B, SHEAR J B, *et al.* Characterizing spectrally diverse biological chromophores using capillary electrophoresis with multiphoton-excited fluorescence[J]. *J Am Chem Soc*, 1998, **120**(1): 18-22.

[9] PLENERT M L, SHEAR J B. Microsecond electrophoresis: proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA, 2003[C]. Washington: PNAS, 2003, **100**(7): 3853-3857.

[10] CHEN S, LIU B F, FU L, *et al.* Continuous wave-based multiphoton excitation fluorescence for capillary electrophoresis[J]. *J Chromatogr A*, 2006, **1109**(2): 160-166.

[11] Huazhong University of Science and Technology. A novel capillary electrophoresis system utilizing multiphoton excitation fluorescence detection; China, ZL2003 2001 5844. 8 [P]. 2004-11-03.
华中科技大学. 基于连续光的多光子激发毛细管电泳荧光检测仪器; 中国, ZL2003 2011 5844. 8 [P]. 2004-11-03.

[12] LIU Chang, The effect of self-shortening on the stability region of passive kerr mode-locking laser[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2004, **33**(5): 525-528.
刘畅. 自缩短效应对 Kerr 被动锁模激光器稳定区的影响[J]. 光子学报, 2004, **33**(5): 525-528.

[13] TIAN F, HUANG S, Bai J, *et al.* All 2 solid 2 state multi 2 wavelength femto second pulse laser system [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2002, **31**: 1112-1115.

[14] WANG Shui-cai, HE Jun-fang, PENG Ju. Studies on detection technique of ultrafast glimmer molecule spectra [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2004, **33**(7): 871-875.
王水才, 贺俊芳, 彭菊, 等. 超快微光分子光谱探测技术研究[J]. 光子学报, 2004, **33**(7): 871-875.

New Technology for DNA Analysis Based on Multiphoton Excited Fluorescence-capillary Electrophoresis

CHEN Sheng^{1,2}, XU You-zhi¹, DU Wei¹, LIU Bi-feng¹

(1 Key Lab of Biomedical Photonics of MOE, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

(2 CEET of Hubei Normal University, Huangshi, Hubei 435001, China)

Received date: 2006-10-26

Abstract: A novel system, capillary electrophoresis (CE) coupled with continuous wave-based multiphoton excited fluorescence (MPEF) detection, was demonstrated for biomedical analysis. A model sample containing various fluorescent dyestuffs was separated using CE and detected with this unique MPEF detector. It is shown that this CE-MPEF system exhibits various advantages such as high performance separation capability, low mass detectability and spectral excitability in a wide range. And this novel system is employed successfully for DNA analysis, which indicated a promising future of CE-MPEF method in biomedical analysis.

Key words: Capillary electrophoresis; Multiphoton excited fluorescence; DNA analysis



CHEN Sheng was born in 1972, and received his Bachelor's degree in physics from Lanzhou University in 1996. Now he is a Ph. D. candidate at Huazhong University of Science and Technology. His current work focuses on bio-analysis in system biology.