

文章编号:2095-0411(2015)03-0084-05

毛细管电泳在量子点生物分析中的应用

王建浩,张晨澄,李静燕,杨 丽,樊 杰,邱 琳,蒋鹏举

(常州大学 制药与生命科学学院,江苏 常州 213164)

摘要:量子点(Quantum dots, QDs)作为一种荧光纳米染料,有着传统染料所不具有的优点,已经引起了各个领域广泛的关注,其中在生物分析领域的应用更是不容小觑。毛细管电泳(Capillary electrophoresis, CE)是一种高效微量分离的新方法,它在量子点的表征分离、量子点和其他生物分子的结合分析中有着不可取代的作用。基于毛细管电泳的量子点探针在生物分析领域将有着广阔的应用前景。

关键词:量子点;毛细管电泳;生物分析

中图分类号:Q 51

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2015.03.017

The Application of Capillary Electrophoresis in Quantum Dots Bioanalysis

WANG Jianhao, ZHANG Chencheng, LI Jingyan, YANG Li, FAN Jie, QIU Lin, JIANG Pengju

(School of Pharmaceutical Engineering and Life Science, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: Quantum dots (QDs) are luminescent nanomaterials, which have the advantages that traditional dyes do not possess and have already aroused the wide attention in various fields, especially in the field of bioanalysis. Capillary electrophoresis (CE) is an effective new method for micro separation. It has irreplaceable effect in separation and characterization of QDs and the conjugation of QDs with biomolecules. The application of QDs based on capillary electrophoresis in the field of bioanalysis has an extensive prospect of application.

Key words: quantum dots; capillary electrophoresis; bioanalysis

量子点是一种主要由 IIB-VIA、IIIA-VA 或 IVA-VIA 族元素组成半导体纳米颗粒,能够吸收激发光的能量产生荧光。量子点的粒径一般在 2~10nm 之间,由于存在量子尺寸效应和表面效应,从而导致其呈现出许多独特的不同于传统材料的物理及光学性质^[1]。由于量子点具有荧光激发谱宽、发射谱窄且对称、发射波长可调、光化学稳定性好等光

学性质,引起了多个研究领域的广泛关注。作为一种新型的荧光探针,量子点弥补了传统荧光探针的不足,已在生物分析检测方面得到了广泛应用^[2]。目前,量子点最有前途的应用领域是在生物体系中作为荧光标记物。作为荧光探针,量子点的光学特性比在免疫荧光分析法中经常采用的传统荧光染料(如罗丹明 6G 或其它有机染料分子)有明显的优越

收稿日期:2015-03-12。

基金项目:国家 863 计划(2014 AA 020521);国家自然科学基金资助(31100530, 81201085)。

作者简介:王建浩(1981—),男,山东文登人,博士,副教授,主要从事纳米生物分析及化学生物学研究。通讯联系人:蒋鹏举(1979—),E-mail: peng_ju.jiang@gmail.com

性。不同大小的量子点能被单一波长的光激发而发出不同颜色的荧光(图1)^[1]。而对于传统荧光染料,不同染料的荧光都需要不同波长的激发光激发^[3]。因此,量子点的使用不仅降低了实验费用,而且使分析变得更加简单。而当延长照射时间时,有机染料的荧光信号往往会很快暗下来(光漂白)。而半导体量子点则可持续发光,其荧光寿命可达有机染料分子的100倍以上^[4]。量子点的应用主要集中在生化分析;生物标记;基于荧光共振能量转移分析;生物成像等4个方面。

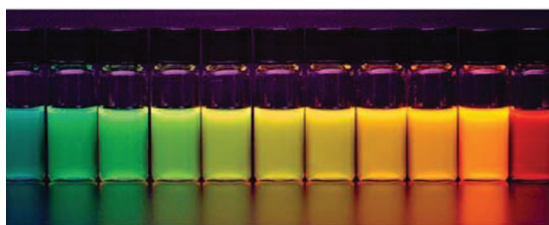


图1 不同尺寸的CdTe QDs受同一蓝色激发光照射的荧光图

Fig.1 Fluorescence emission of different sized CdTe QDs excited by blue laser

毛细管电泳是离子或荷电粒子在外加电场的驱动下,在毛细管中根据其淌度/分配系数的差异得到高效、快速分离的一种电泳新方法^[5],CE的仪器结构如图2所示^[1]。作为一种微分离分析技术,CE结合了经典电泳技术和现代微柱分离技术的优势,CE具有分离效率高,适合用于复杂样品组分的分析;分离过程迅速,易于实现高通量;进样体积小,可达纳升级,非常适用于稀少生物样品的分析^[6-7]3个优点。正因为CE具有上述优点,使它在生物分析检测中得到了广泛应用。

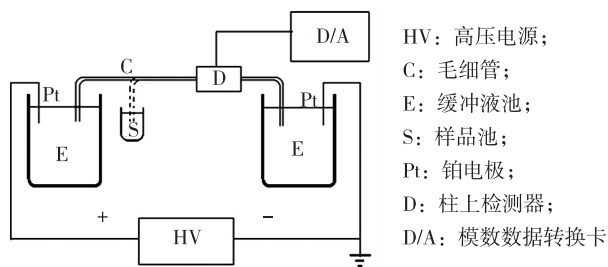


图2 CE仪器结构图

Fig.2 Asketch scheme of fundamental CE instrument structure

1 基于毛细管电泳的量子点表征分离

由于QDs的特性受大小影响很大,不同大小的QDs在相同波长的激发光的照射下,它的发射光波长是不一样的,所以如果用CE对QDs进行表征,

将拓宽QDs在生物分析领域的应用。

2006年,HUANG等用CE和激光诱导荧光(Laser induced fluorescence,LIF)对QDs及其偶合物进行表征,他们用巯基丙酸包裹CdTe QDs,再结合到蛋白质上,在CE-LIF的检测下发现QDs偶合物在最佳缓冲液的pH下有效的分离出自由的QDs^[8];2007年,Mark等用毛细管区带电泳(Capillary zone electrophoresis,CZE)表征分离QDs,用磷酸钠做缓冲液,他们发现EDC/sulfo-NHS能很好的和中性的QDs生物偶联,但不能和带负电的QDs偶联^[9];2008年,GLORIMAR等也用CE-LIF对QDs表征分离,他们将聚合物添加到CE缓冲液中,提高了QDs偶联物的分辨率,然后将QDs和链霉亲和素偶联物(QDSt)以及和生物素的偶联物(QDBi)混合,用一种激发波长得到2种不同波长的发射光^[10];2009年,LI等发现了一种高效的基于CE的方法测定水溶性CdSe/ZnS QDs大小,他们用聚合物添加剂作为筛分介质,得到电泳淌度和QDs大小关系的方程^[11];2011年,CAROLINA等通过CE表征和分离CdSe QDs,这个衍生的方法是基于QDs和几种表面活性剂形成的复合体来提高QDs的亲水性和稳定性。这些基于CZE的QDs分离是根据荷质比的不同,确定迁移时间增加或峰宽减小和QDs核大小的粒径分布相关性^[12]。

2 毛细管电泳检测量子点的生物应用

2.1 基于毛细管电泳的量子点生化分析

QDs可以直接与无机离子作用,引起荧光变化,QDs还可以直接用于生物分子检测。2010年,Chen等用CE和固定化QDs荧光检测蔬菜中有机磷农药,他们的这种方法只需要简单的预处理,检测限可达到50 to 180mg/kg^[13];2010年,LIŠKOVÁ M.等通过CE用QDs的免疫发光探针来分析蛋白质的制备级合反应^[14];2011年,ZHAO等用QDs提高化学发光(chemiluminescence,CL)来同时检测多巴胺(DA)和肾上腺素(E),在一定范围内,CL强度的减小和DA以及E的浓度成比例,DA和E的检测限分别是 2.3×10^{-8} mol/L和 9.3×10^{-9} mol/L^[16];2011年,KAREL Kleparnik等通过CE用共轭QDs进行免疫测定^[17];2011年,CUI等用QDs纳米探针标记了流行感冒病毒^[18],可以看到QDs的靶向探针可以特异性识别病毒颗粒并且和其结合,从而达到标记的目的(图3);2011年,LI等

发现了 QDs 和 Au 结合后可以用于检测 DNA^[15]; 2013 年, GEMA 等用 CdSe/ZnS QDs 量化检测水样中的百草枯(一种除草剂), 用亲水性硫醇对水样预处理, 检测限达到 3.0 ng/L ^[19]; 2014 年, ZHANG 等通过 CE 和 QDs 以及辣根过氧化物酶(HRP)增强化学发光来同时定量检测 5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)和 5-羟色胺(5-HT), 用量子点和 HRP 增强荧光, CL 的抑制强度和被检测物的浓度成比例, 5-HIAA 和 5-HT 检测限分别是 $7.0 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 和 $6.0 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ ^[20]; 2014 年, EFFREY 等通过激光诱导荧光毛细管电泳同时检测紫外线 A 和 B 诱导 DNA 损伤^[21]。

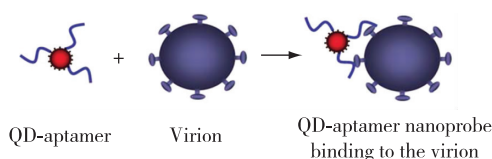


图 3 量子点识别并标记病毒颗粒的原理图

Fig.3 A schematic diagram of QD-aptamer nanoprobe designed to recognize and label virus particles

2.2 基于毛细管电泳的量子点偶联分析

QDs 很多时候不能直接和一些生物大分子偶联, 从而需要通过一些多肽或蛋白质如链霉亲和素、生物素、组氨酸等来连接其他核酸或蛋白等生物大分子。2008 年, SHAO 等将 QDs 与牛血清蛋白(BSA)结合, 他们首次运用了毛细管电泳迁移实验来研究量子点和蛋白质的相互作用, 在化学计量比 1:1 时, 观察到 BSA 轻易的吸附到量子点上^[22]; 2008 年, MARK 等在抗体非选择性或选择性生物偶联后用 CE 对 QDs 表征来免疫测定, 他们用 QDs 和蛋白质以及免疫球蛋白(IgG)相连, 用 EDC · HCl(碳酰二亚胺盐酸盐)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)作为偶联剂, 将 BSA 和肌红蛋白连接到羧基功能化的 QDs 上; 同时用 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧基磺基琥珀酰亚胺酯钠盐做结合剂, 部分减少了免疫球蛋白 G(IgG)和胺功能化 QDs 的结合以及氧化高碘酸盐 IgG 和酰肼功能化 QDs 的结合^[23]; 2009 年, WANG 等提出了一种用 QDs 提高超灵敏检测 DNA 键结加成物的方法, 用 QDs 和抗体结合检测二氢环氧苯并芘-DNA(BPDE-DNA)加成物, 检测限能达到 $6.6 \times 10^{-21} \text{ mol/L}$ ^[24]; 2010 年, MARY 等通过 CE-LIF 研究了腐殖酸在 QDs 上的影响^[25]; 2010 年, LI 等将

QDs 和分子信标(MB)结合, 用 CE 检测基因突变^[26]; 2011 年, 王建浩课题组通过 CE 观察到组氨酸多肽聚合体(PHPD)和 QDs 的优先结合^[27]; 2012 年, SYLVIE 等研究了 QDs 和金属硫因蛋白的相互作用^[28], QDs 和分子结合后再和目标 DNA 杂交, 激发光照射时, 通过观察发射光谱图检测 DNA 是否突变(图 4)。

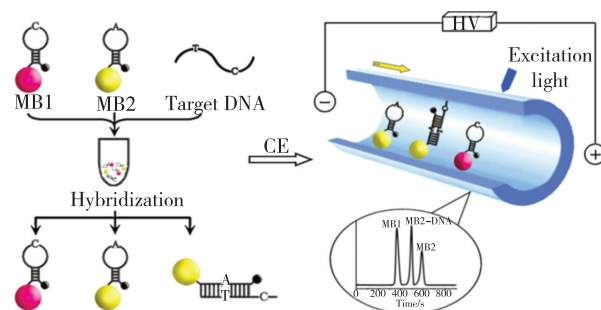


图 4 量子点-分子信标生物传感器检测基因突变原理图

Fig.4 A schematic diagram of CE-assisted QD-MB biosensor for the simultaneous detection of single-base mutation conditions at two position

2.3 基于毛细管电泳的量子点 FRET 分析

荧光共振能量转移(FRET)是指当供体和受体之间的距离小于 FÖRSTER 半径时所发生的从供体到受体的非辐射能量转移, 具体表现为供体荧光强度的下降和受体荧光强度的上升。FRET 能有效测量供受体之间距离的变化, 因此已被广泛用于核酸检测、免疫分析以及生物大分子相互作用研究。2006 年, ZHANG 等研究了一种基于 FRET 的用 QDs 检测 DNA 的方法, 和其他方法相比, 他们直接在毛细管中进行, 能提高 FRET 效率和敏感性^[29], DNA 一端偶联染料, 一端偶联 QDs, 当 QDs 和染料之间的距离在一定值时它们之间才会发生 FRET(图 5), 在 CE 内很容易被检测到; 2009 年, LI 等提出了一种高效的基于 FRET 和 CE 的量子点生物分析法, 他们分别把不同的 QDs(一个供体, 一个受体)和小鼠的免疫球蛋白和抗免疫球蛋白相连, 这样能保证两种 QDs 有足够近的距离发生 FRET^[30]; 2012 年, 王建浩课题组用量子点和六聚组氨酸多肽(PHPD)结合, 多肽另一端结合染料, 发生 FRET, 王建浩首先发现 QDs 和 PHPD 可以在很短时间内自组装^[31], 当加入凝血酶时, 多肽水解从而 FRET 消失^[32]; 2013 年, CHANG 等首次研究了一种基于 CE 和 FRET 的超灵敏检测并量化酸性双糖的方

法,他们把双糖分别标记在链霉亲和素连接的 QDs 供体上和染料受体上,从而发生 FRET^[33];2013 年,王建浩课题组用桥状二聚体蛋白质和量子点相连来研究蛋白质和蛋白质的相互作用对蛋白质和 QDs 自组装的影响^[34];2013 年, WANG 等用多肽与 QDs 相连,从而构建的形状可以与免疫球蛋白、抗免疫球蛋白结合,这样可以进行人体免疫分析;还有用多价蛋白配体与 QDs 自组装,发生 FRET^[35]。

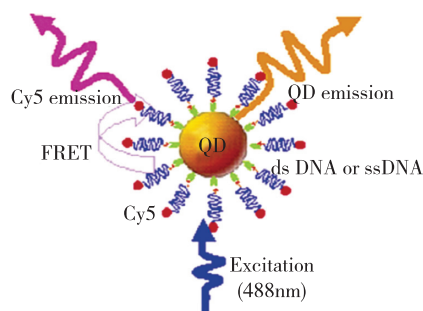


图 5 基于 FRET 量子点 Cy5 标记 DNA 原理图

Fig.5 Principles of QD-based FRET. Cy5-labeled DNA

2.4 基于毛细管电泳的量子点生物成像

生物学的研究离不开光学成像技术,而 QDs 作为一种荧光标记探针,展现出许多传统荧光染料所没有的光学特性,因此在对特定细胞、器官、蛋白及核酸标记成像中具有广阔的应用前景。2013 年,王建浩课题组通过毛细管电泳研究 QDs 与结肠癌靶向多肽的相互作用,通过组氨酸标签和 QDs 偶联制备肿瘤靶向生物探针,能特异性识别结肠癌肿瘤细胞,从而可以用于生物成像(图 6)^[36]。

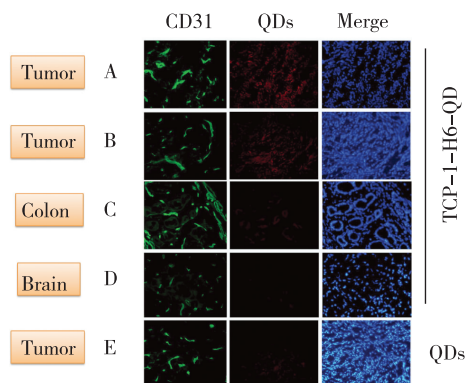


图 6 TCP-1-H6-QD 识别结肠癌肿瘤组织

Fig.6 TCP-1-H6-QD identify colon cancer tumor tissue

3 结论与展望

毛细管电泳是一种非常灵敏和高效的分离和表

征量子点的方法,它有着简单、高效、低廉以及用样小等优点。虽然毛细管电泳能更好的分离和表征量子点,但是仍然需要对毛细管电泳进行进一步的研究,以便更好地拓展量子点的生物应用。相信随着基于量子点的毛细管电泳的快速发展,毛细管电泳将会成为纳米生物分析中广泛使用的技术。另外,通过毛细管电泳和量子点的结合,将会发展出更高灵敏度的用于生物检测和临床诊断的新方法。

参考文献:

- [1]李永强. 基于毛细管电泳的量子点生物探针分离检测新技术研究[D]. 武汉:华中科技大学,2011.
- [2]MICHALET X, PINAUD F F, BENTOLILA L A, et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics[J]. science, 2005, 307(5709): 538-544.
- [3]LEUTWYLER W K, BÜRGI S L, BURGL H. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots[J]. Science, 1996, 271(5251): 933-937.
- [4]KLIMOV V I, MIKHAILOVSKY A A, XU S, et al. Optical gain and stimulated emission in nanocrystal quantum dots [J]. Science, 2000, 290(5490): 314-317.
- [5]DOLNÍK V, LIU S, JOVANOVIČ S. Capillary electrophoresis on microchip[J]. Electrophoresis, 2000, 21(1): 41-54.
- [6]BAHARIFAR H, FAKHARI A R, ZIYADI H, et al. Influence of polymeric coating on capillary electrophoresis of iron oxide nanoparticles[J]. Journal of the Iranian Chemical Society, 2014, 11(1): 279-284.
- [7]PEDERSEN-BJERGAARD S, RASMUSSEN K E. Liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis[J]. Anal Chem, 1999, 71(14): 2650-2656.
- [8]HUANG X Y, WENG Y F, SANG F M, et al. Characterization of quantum dot bioconjugates by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescent detection[J]. J Chromatogr A, 2006, 1113(1): 251-254.
- [9]PEREIRA M, EDWARD P C L, BRYAN H. Characterization of quantum dots using capillary zone electrophoresis[J]. Electrophoresis, 2007, 28(16): 2874-2881.
- [10]VICENTE G, LUIS A Colón. Separation of bioconjugated quantum dots using capillary electrophoresis[J]. Anal Chem, 2008, 80(6): 1988-1994.
- [11]LI Y Q, WANG H Q, WANG J H, et al. A highly efficient capillary electrophoresis-based method for size determination of water-soluble CdSe/ZnS core-shell quantum dots[J]. Anal Chim Acta, 2009, 647(2): 219-225.
- [12]CARRILLO-CARRION C, MOLINER-MARTINEZ Y, BARTOLOME M S, et al. Capillary electrophoresis method for the characterization and separation of CdSe quantum dots[J]. Anal Chem, 2011, 83(7): 2807-2813.

- [13] CHEN Q D, FUNG Y S. Capillary electrophoresis with immobilized quantum dot fluorescence detection for rapid determination of organophosphorus pesticides in vegetables [J]. *Electrophoresis*, 2010, 31(18): 3107-3114.
- [14] LIŠKOVÁ M, VORÁČOVÁ I, KLEPÁRNÍK K, et al. Conjugation reactions in the preparations of quantum dot-based immunoluminescent probes for analysis of proteins by capillary electrophoresis[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400(2): 369-379.
- [15] LI Y Q, GUAN L Y, ZHANG H L, et al. Distance-dependent metal-enhanced quantum dots fluorescence analysis in solution by capillary electrophoresis and its application to DNA detection[J]. *Anal Chem*, 2011, 83(11): 4103-4109.
- [16] ZHAO Y S, ZHAO S L, HUANG J M, et al. Quantum dot-enhanced chemiluminescence detection for simultaneous determination of dopamine and epinephrine by capillary electrophoresis[J]. *Talanta*, 2011, 85(5): 2650-2654.
- [17] KAREL K R, VORÁČOVÁ V, MARCELA L, et al. Capillary electrophoresis immunoassays with conjugated quantum dots[J]. *Electrophoresis*, 2011, 32(10): 1217-1223.
- [18] CUI Z Y, REN Q, WEI H P, et al. Quantum dot - aptamer nanoprobe for recognizing and labeling influenza A virus particles[J]. *Nanoscale*, 2011, 6(6): 2454-2457.
- [19] GEMA M D, ANA M C, ÁNGEL R. Use of CdSe/ZnS quantum dots for sensitive detection and quantification of paraquat in water samples[J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 801(4): 152-153.
- [20] ZHANG L L, ZHAO Y S, HUANG Y M, et al. Simultaneous quantification of 5-hydroxyindoleacetic acid and 5-hydroxytryptamine by capillary electrophoresis with quantum dot and horseradish peroxidase enhanced chemiluminescence detection[J]. *J Chromatogr B*, 2014, 967: 190-194.
- [21] GUTHRIE J W, LIMMER R T, BROOKS E A, et al. Simultaneous detection of ultraviolet B-induced DNA damage using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 853: 676-681.
- [22] SHAO L W, DONG C Q, HUANG X Y, et al. Using capillary electrophoresis mobility shift assay to study the interaction of CdTe quantum dots with bovine serum albumin [J]. *Chinese Chem Lett*, 2008, 19(6): 707-710.
- [23] PEREIRA M, LAI E P. Capillary electrophoresis for the characterization of quantum dots after non-selective or selective bioconjugation with antibodies for immunoassay[J]. *J Nanobiotechnol*, 2008, 6(1): 1-9.
- [24] WANG Z X, LU M L, WANG X L, et al. Quantum dots enhanced ultrasensitive detection of DNA adducts[J]. *Anal Chem*, 2009, 81(24): 10285-10289.
- [25] CELIZ M D, LUIS A C, DAVID F W, et al. Study on the effects of humic and fulvic acids on quantum dot nanoparticles using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [J]. *Environ Sci Technol*, 2011, 45(7): 2917-2924.
- [26] LI Y Q, GUAN L Y, WANG J H, et al. Simultaneous detection of dual single-base mutations by capillary electrophoresis using quantum dot-molecular beacon probe [J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26(5): 2317-2322.
- [27] WANG J H, XIA J. Preferential binding of a novel polyhistidine peptide dendrimer ligand on quantum dots probed by capillary electrophoresis [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(16): 6323-6329.
- [28] SKALICKOVA S, ZITKA O, NEJDL L, et al. Study of interaction between metallothionein and CdTe quantum dots [J]. *Chromatographia*, 2013, 76(7): 345-353.
- [29] ZHANG C Y, LAWRENCE W J. Quantum dot-based fluorescence resonance energy transfer with improved FRET efficiency in capillary flows [J]. *Anal Chem*, 2006, 78(15): 5532-5537.
- [30] LI Y Q, WANG J H, ZHANG H L, et al. High-sensitivity quantum dot-based fluorescence resonance energy transfer bioanalysis by capillary electrophoresis [J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25(6): 1283-1289.
- [31] WANG J H, JIANG P J, HAN Z Y, et al. Fast self-assembly kinetics of quantum dots and a dendrimeric peptide ligand [J]. *Langmuir*, 2012, 28(21): 7962-7966.
- [32] WANG J H, XIA J. Capillary electrophoretic studies on displacement and proteolytic cleavage of surface bound oligohistidine peptide on quantum dots [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 709(2): 120-127.
- [33] CHANG Y Q, CAI C, LI Y, et al. Ultrasensitive detection and quantification of acidic disaccharides using capillary electrophoresis and quantum dot-based fluorescence resonance energy transfer [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(19): 9356-9362.
- [34] WANG J H, JIANG P J, GAO L Q, et al. Unique self-assembly properties of a bridge-shaped protein dimer with quantum dots [J]. *J Nanopart Res*, 2013, 15(9): 1914.
- [35] WANG J P, NIE Y Y, LU Y, et al. Assembly of multivalent protein ligands and quantum dots: A multifaceted investigation [J]. *Langmuir*, 2014, 30(8): 2161-2169.
- [36] 王建设, 李志杰, 邱琳, 等. 基于靶向多肽的量子点探针用于结肠癌肿瘤组织识别 [J]. *科学通报*, 2013, 58(7): 556-560.

(责任编辑:殷丽莉)