

应用羧基荧光素-寡核苷酸-羧基四甲基罗丹明 荧光探针测量吸收剂量

马洪鸽 史盼影 林温文 张保国
(苏州大学医学部放射医学与防护学院 苏州 215123)

摘要 用 X-射线照射不同浓度羧基荧光素-寡核苷酸-羧基四甲基罗丹明(Carboxyfluorescein-Oligonucleotide-carboxytetramethylrhodamine, FAM-DNA-TAMRA)水溶液, 测量溶液发出的荧光强度, 研究吸收剂量与荧光强度之间的关系。结果表明, 对于含不同浓度 FAM-DNA-TAMRA 荧光探针的水溶液, 在 0–20 Gy 剂量范围内, 荧光强度与吸收剂量之间的线性关系很好, 并且荧光稳定性良好, 但存在荧光本底比较高, 影响测量吸收剂量灵敏度的问题。研究结果提示, FAM-DNA-TAMRA 荧光探针可以用于测量水溶液的吸收剂量。

关键词 羧基荧光素-寡核苷酸-羧基四甲基罗丹明荧光探针, 荧光强度, 吸收剂量

中图分类号 TL81, R811

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2015.rj.33.050202

吸收剂量是放射生物学和辐射防护中最重要的物理量, 各种生物效应的发射与吸收剂量密切相关。测量辐射吸收剂量的方法很多, 常用的固体剂量计有电离室剂量计^[1], 热释光剂量计^[2], 与辐射变色薄膜剂量计^[3-4]等, 每种方法都有它的局限性: 如组织等效问题, 电离室对不同能量的射线响应不一样, 需要进行刻度修正, 在不知道射线能谱的情况下就无法使用; 对于复杂形状的物体也无法测量, 如放射治疗计划三维剂量验证。另一类剂量计是液体化学剂量计, 人体组织的主要组成物质是水, 水溶液化学剂量计是组织等效的, 并且可以根据测量的要求做成各种形状, 用于不适合使用固体剂量计的场所。化学剂量计利用辐射在适当的化学体系引起的化学变化与吸收剂量的关系测量物质中的吸收剂量, 测量这些化学变化最常用的测量方法是光学测量方法, 以吸光度法和荧光法最为常用, 荧光测量法根据测量样品受光激发后发出荧光强度, 确定样品中物质的浓度。

荧光分析方法最主要的特点是灵敏度高, 其最低检测浓度可达 10^{-7} – 10^{-9} g/mL, 比紫外-可见分光光度法高出 10^3 倍^[5], 可以定量测定许多痕量无机和有机组分。Fricke 剂量计^[6-7]是最实用的利用光吸收法测量的化学剂量计, 其组织等效性好, 但灵敏度差, 适合测量 20 Gy 以上情况, 而很多情况需要

测量的剂量低于 20 Gy, 如放射治疗的单次照射吸收剂量范围就在 0–20 Gy。过去利用荧光法测量吸收剂量并不理想, 直接用荧光染料测量吸收剂量的灵敏度和线性范围与用吸光度法测量的结果相近, 而吸光度法测量方法更简便^[8-9]。因此需要寻找新测量体系测量吸收剂量, 其线性范围在 0–20 Gy, 组织等效性好并且灵敏度和测量精度高。

射线与水发生反应时产生大量自由基, 自由基的数量与水的吸收剂量成正比^[10], 测定自由基的数量, 就可以测量出吸收剂量。羧基荧光素-寡核苷酸-羧基四甲基罗丹明(Carboxyfluorescein-oligonucleotide-carboxytetramethylrhodamine, FAM-DNA-TAMRA)荧光探针是基于荧光能量共振转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)原理^[11]设计的 FRET 荧光探针, FAM ($\lambda_{\text{ex}}=496$ nm, $\lambda_{\text{em}}=518$ nm)和 TAMRA ($\lambda_{\text{ex}}=558$ nm, $\lambda_{\text{em}}=576$ nm)是两种荧光染料, 分别标记在 DNA 的 5'端和 3'端, FAM-DNA-TAMRA 构成荧光共振转移体系。当 FAM 和 TAMRA 相距很近时(<10 nm), FAM 辐射的荧光可以被 TAMRA 共振吸收, FAM 发出的荧光被淬灭, 测量不到 FAM 发出的荧光; FAM 的荧光淬灭效率与两分子的空间距离有关, 也与 FAM 的发射光谱与 TAMRA 的吸收光谱的重叠程度相关。当 DNA 链发生断裂时 FAM 和 TAMRA

基金资助: 江苏省高校优势学科建设项目(PAPD)资助

第一作者: 马洪鸽, 女, 1989 年 8 月出生, 2012 年毕业于山西医科大学, 现为苏州大学放射医学专业在读硕士研究生,

E-mail: hgma2012@126.com

通讯作者: 张保国, 研究员, E-mail: bgzhang@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2015-04-29, 修回 2014-05-29

在空间上被分开,不能发生荧光共振转移,可以测量到 FAM 发出的荧光。FAM-DNA-TAMRA 荧光探针在分子生物学被广泛用作荧光定量 PCR 中 Taqman 水解探针、分子信标探针^[12],检测样品核酸的含量。Soh 等^[13]用 FAM-DNA-TAMRA 作为检测活细胞内羟自由基的探针。射线照射 DNA 水溶液时, DNA 链断裂主要是由羟自由基引起的, DNA 断裂数量与吸收剂量成正比^[14]。射线照射使 FAM-DNA-TAMRA 中的 DNA 链断裂,可以测量到 FAM 发出的荧光,荧光强度与 DNA 断裂数量成正比,即荧光强度与水吸收剂量成正比。

本研究以 6-羧基荧光素(FAM)和 5-羧基四甲基罗丹明(TAMRA)双标记的寡核苷酸 DNA 作为荧光探针,研究 FAM-DNA-TAMRA 水溶液对 X-射线的响应,探索用荧光法测量水吸收剂量的可能性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

FAM-DNA-TAMRA 荧光探针由生工生物工程(上海)有限公司合成, FAM-DNA-TAMRA 荧光探针中的 DNA 的序列为 5'-AGGGTTAGGG-3' (HPLC 纯化), FAM 标记在 5'端, TAMRA 标记在 3'端。多功能酶标仪(Synergy2, 美国 BioTek 公司), X 射线生物辐照仪(RS-2000Pro, 美国 Rad Source 公司), 电离室剂量计(Accu-Dose, 美国 Radical 公司)。

1.2 FAM-DNA-TAMRA 荧光探针储存条件

将 FAM-DNA-TAMRA 荧光探针用去离子水配制成浓度为 1 mmol/L 的储存液,于 4℃冰箱中避光保存,使用时用去离子水按比例稀释。

1.3 辐照条件

用 X-射线生物辐照仪照射样品。射线能量为 160 kVp,照射剂量率为 1.15 Gy/min。照射时使用直径 60 mm 的一次性塑料培养皿,培养皿内加 1 mL FAM-DNA-TAMRA 水溶液,培养皿放置在照射室中央,距 X-射线光源距离 40 cm。辐照完成后,样品在室温或者 4℃条件下保存。照射剂量用电离室剂量计测量。

1.4 荧光强度检测

将 1 mmol/L 的 FAM-DNA-TAMRA 水溶液用纯水稀释,配制成浓度分别为 2.5、5.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的实验样品。在直径为 60 mm 的一次性塑料培养皿中加入 1 mL 不同浓度的 FAM-DNA-TAMRA 水溶液,将培养皿放入 X-射线生物照射仪中进行照射,照射至吸收剂量分别为 0、2、4、6、8、10 和 15 Gy,将辐照后的 FAM-DNA-TAMRA 水溶液加入检查荧光专用的黑色 96 孔板中,每孔 200 μL 。在室温下,使用多功能酶标仪检测每个孔的荧光强度,检测条件为:激发波长: 485 nm / 20 nm,发射波长: 528 nm / 20 nm。每种浓度每个剂量点设有 3 个平行样本,每个样品检测 3 次,实验重复 3 次。

净荧光强度 $F = (\text{照射后样品的荧光强度} - \text{未照射样品的荧光强度})$ 。

1.5 荧光稳定性观察

1 mL 5.0 $\mu\text{mol/L}$ FAM-DNA-TAMRA 水溶液加入到直径为 60 mm 的一次性塑料培养皿中,将培养皿放入 X-射线生物照射仪中照射,照射至吸收剂量分别为 0、2、6 和 10 Gy,每个剂量点设有 3 个平行样本。将辐照后的 FAM-DNA-TAMRA 水溶液加入到检查荧光专用的黑色 96 孔板中,每孔 200 μL 。在室温下,使用多功能酶标仪检测每个孔的荧光强度,检测条件为:激发波长 485 nm / 20 nm,发射波长 528 nm / 20 nm。照射后 6 h 内,每隔 0.5 h 检测一次。6 h 后,每间隔 24 h 测量一次样品的荧光强度。每次检测完成后,立即放入 4℃冰箱中避光保存。

1.6 统计学分析

各组实验都重复 3 次,实验结果用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析。应用 SPSS3.0 统计软件包进行分析。

2 结果与讨论

2.1 吸收剂量与荧光强度的线性关系

图 1 为 5.0 $\mu\text{mol/L}$ FAM-DNA-TAMRA 水溶液对吸收剂量的响应曲线。

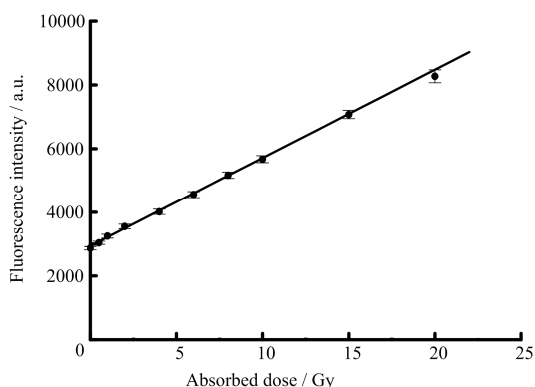


图1 荧光强度与吸收剂量关系
Fig.1 Fluorescence intensity-absorbed dose relationship

从图1可知,在0–20 Gy 剂量范围内,荧光强度和吸收剂量之间有线形关系,但由于荧光本底比较高,吸收剂量小于0.5 Gy 时,测量误差比较大。

2.2 不同浓度 FAM-DNA-TAMRA 水溶液剂量响应曲线

图2为不同浓度 FAM-DNA-TAMRA 水溶液的剂量响应曲线。可以看出,在0–20 Gy 范围内,不同浓度的 FAM-DNA-TAMRA 水溶液的剂量响应曲线的线性都很好。比较3个浓度的曲线,可以看出,使用的 FAM-DNA-TAMRA 水溶液测量吸收剂量浓度最好大于10.0 $\mu\text{mol/L}$,浓度低时,测量小于1 Gy 剂量误差比较大。

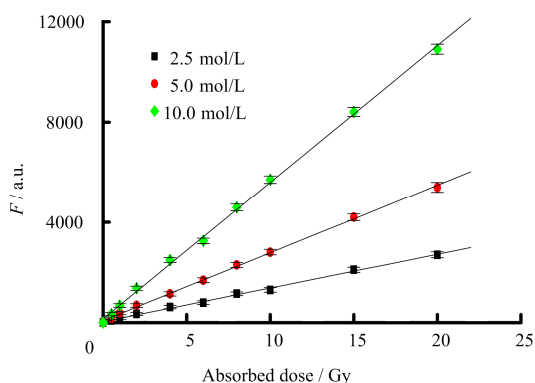


图2 不同浓度 FAM-DNA-TAMRA 水溶液的剂量响应曲线
Fig.2 Fluorescence intensity-based dose responses of FAM-DNA-TAMRA aqueous solutions of various concentrations

2.3 荧光强度稳定性的研究

图3为照射后6 h 内5.0 $\mu\text{mol/L}$ FAM-DNA-

TAMRA 水溶液发射的荧光强度变化曲线。

由图3可看出, FAM-DNA-TAMRA 水溶液受照射后,荧光强度有所下降,但0.5 h 内稳定下来。在1–6 h 之间,荧光强度保持稳定,从而满足在一定时间内反复测量的要求。

图4为照射后7 d 以内5.0 $\mu\text{mol/L}$ FAM-DNA-TAMRA 水溶液发射的荧光强度变化曲线。图4表明,若 FAM-DNA-TAMRA 水溶液避光储存在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,至少在7 d 之内荧光测量结果是稳定的。

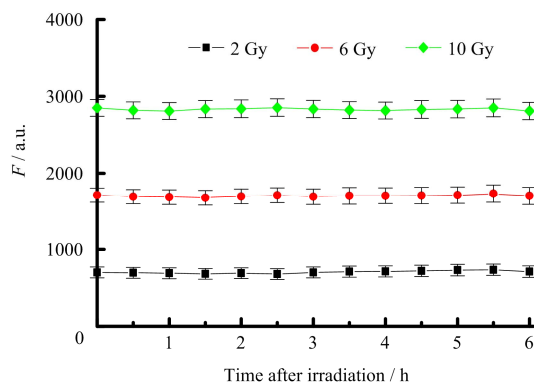


图3 照射后 FAM-DNA-TAMRA 水溶液的荧光强度变化
Fig.3 Post-irradiation stability of FAM-DNA-TAMRA aqueous solutions stored in dark

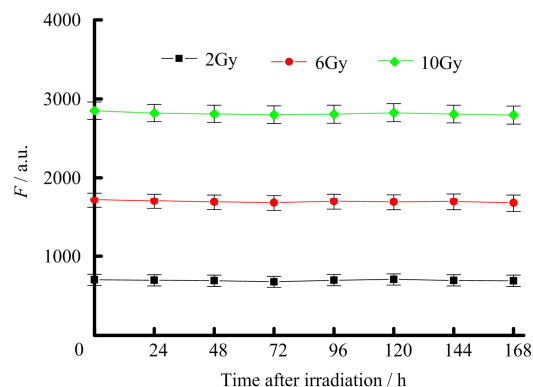


图4 照射后 FAM-DNA-TAMRA 水溶液长期荧光强度变化
Fig.4 Post-irradiation long-term stability of FAM-DNA-TAMRA aqueous solutions stored in dark

3 结论

本研究的实验结果表明在0–20 Gy 范围内,荧光强度与吸收剂量成线性关系,荧光稳定性好,并且荧光本底比较高。这表明 FAM-DNA-TAMRA 荧光探针水溶液可以用来测量吸收剂量,但高荧光本

底会影响测量的灵敏度, 测量剂量的线性范围。高荧光本底是由 TAMRA 对 FAM 的荧光淬灭效率低造成, 其原因是 FAM 的发射光谱和 TAMRA 的吸收光谱不完全匹配。我们可以对荧光探针进行改造, 用其它合适的分子代替 TAMRA 作为淬灭剂, 提高荧光淬灭效率, 降低荧光本底。美国 Biosearch Technologies 公司研制出 BHQ (Black Hole Quencher) 系列染料 BHQ-1、BHQ-2 和 BHQ-3。使用 BHQ 染料作为淬灭剂的 FRET 荧光探针, 具有较低的荧光本底, 因而具有更高的信噪比, 动态范围更大, 灵敏度更高^[15]。BHQ-1 的吸收光谱与 FAM 的发射光谱匹配, 可以作为淬灭剂, FAM-DNA-BHQ-1 荧光探针测量吸收剂量灵敏度和测量精度会更好。

荧光法测辐射吸收剂量有着明显的优势, 操作简单, 检测条件要求不高, 灵敏度高, 可以进行原位测量。可以将荧光探针加入到不同基质中, 用于为更广泛的检测目的, 如把荧光探针掺入到细胞中, 测量细胞的吸收剂量, 测量带电粒子径迹; 加入到水凝胶材料中, 制成三维组织等效模体, 测量三维剂量分布, 用于放射治疗计划剂量验证等。本研究首次将双标记 DNA 作为荧光探针用于吸收剂量测量, 研究结果证实双标记 DNA 作为荧光探针测量吸收剂量是可行的。还需要进行进一步的研究, 筛选出合适的标记分子, 研制出实用的双标记 DNA 荧光探针。

参考文献

- Benitez E M, Casado F J, Garcia-Pareja S, *et al.* Evaluation of a liquid ionization chamber for relative dosimetry in small and large fields of radiotherapy photon beams [J]. *Radiation Measurements*, 2013, **58**: 79-86.
- Marrazzo L, Pallotta S, Kłosowski M, *et al.* Clinical tests of large area thermoluminescent detectors under radiotherapy beams [J]. *Radiation Measurements*, 2013, **51-52**: 25-30.
- Hue C, Dagois S, Derreumaux S, *et al.* Characterization and optimization of EBT2 radiochromic films dosimetry system for precise measurements of output factors in small fields used in radiotherapy [J]. *Radiation Measurements*, 2012, **47**: 40-49.
- Carnicer A, Angellier G, Gérard A, *et al.* Development and validation of radiochromic film dosimetry and Monte Carlo simulation tools for acquisition of absolute, high-spatial resolution longitudinal dose distributions in ocular proton therapy [J]. *Radiation Measurements*, 2013, **59**: 225-232.
- 袁存光, 祝优珍, 田晶, 等. 现代仪器分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012: 81-89.
YUAN Cunguang, ZHU Youzhen, TIAN Jing, *et al.* Modern Instrumental Analysis [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2012: 81-89.
- Fricke H, Hart E J. Chemical dosimetry. In: Attix H, Roesch W. *Radiation Dosimetry*, Vol. II, Instrument [M]. London: Academic Press, 1969: 167-232.
- Gupta B L, Narayan G R. $G(Fe^{3+})$ values in the FBX dosimeter [J]. *Physics in Medicine and Biology*, 1985, **30**: 337-340.
- Ebraheem S, Abdel-Fattah, Beshir W B, *et al.* Formyl violet cyanide liquid dosimetry system [J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 2007, **76**: 1218-1221.
- Beshir W B, Eid S, Gafar S M, *et al.* Application of solutions of Rhodamine B in dosimetry [J]. *Applied Radiation and Isotopes*, 2014, **89**: 13-17.
- 夏寿萱. 放射生物学[M]. 北京: 军事医学出版社, 1998: 26-28.
XIA Shouxuan. Radiation biology [M]. Beijing: Military Medicine Press, 1998: 26-28.
- Stryer L, Hangland R P. Fluorescence energy transfer: a spectroscopic ruler [J]. *PNAS*, 1969, **58**: 719-726.
- 黄留玉. PCR 最新技术原理、方法及其应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 52-57.
HUANG Liuyu. PCR technology: principle, method and application [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 52-57.
- Soh N, Makiyara K, Sokoda E, *et al.* A ratiometric fluorescent probe for imaging hydroxyl radicals in living cell [J]. *Chemical Communications*. 2004, **4**: 496-497.
- 夏寿萱. 放射生物学 [M]. 北京: 军事医学出版社, 1998: 72.
XIA Shouxuan. Radiation biology [M]. Beijing: Military Medicine Press, 1998: 72.
- Yeuong A T. Evaluation of dual-labeled fluorescent DNA probe purity versus performance [J]. *Biotechniques* 2004, **36**: 266-270, 272, 274-275.

Application of carboxyfluorescein-oligonucleotide-carboxytetramethylrhodamine fluorescent probe in dosimetry

MA Hongge SHI Panying LIN Wenwen ZHANG Baoguo

(School of Radiation Medicine and Protection, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT To explore the relationship between absorbed dose and fluorescence intensity, FAM-DNA-TAMRA (Carboxyfluorescein-oligonucleotide-carboxytetramethylrhodamine) aqueous solution of different concentrations combined with X-ray irradiation was used to measure the fluorescence intensity. The results showed that the linear relation between fluorescence intensity and absorbed dose was good for different-concentration FAM-DNA-TAMRA aqueous solution containing fluorescent probe in the dose range of 0–20 Gy. The fluorescence had good stability, but the fluorescence background affected the sensitivity of absorbed dose greatly. The results suggest that the FAM-DNA-TAMRA fluorescent probe can be used to measure the absorbed dose of aqueous solution.

KEYWORDS Carboxyfluorescein-oligonucleotide-carboxytetramethylrhodamine fluorescence probe, Fluorescence intensity, Absorbed dose

CLC TL81, R811