

DNA四面体对嵌入式染料荧光各向异性的影响

黄秋灵^{1,3} 陈 静^{1,2} 李 江^{1,2} 诸 颖^{1,2} 王丽华^{1,2}

1(中国科学院上海应用物理研究所 中国科学院微观界面物理与探测重点实验室 上海 201800)

2(中国科学院上海高等研究院 基础交叉研究中心 张江实验室 上海 201210)

3(中国科学院大学 北京 100049)

摘要 嵌入式染料的荧光各向异性在核酸分析、荧光探针构建和生物传感等领域具有重要的应用意义,而目前基于框架核酸的嵌入式染料的荧光各向异性的研究很少。本工作通过DNA序列设计精确调控DNA四面体(DNA Tetrahedrons, TDN)框架核酸的尺寸,利用同步辐射X射线小角散射表征DNA纳米结构,结合嵌入式染料SYBR Green I、DAPI和DiYO-1,构建了一系列TDN荧光各向异性探针,研究了TDN尺寸对探针荧光各向异性的影响。实验结果表明:对于单嵌入式SYBR Green I和DAPI,随着TDN尺寸增加,探针的荧光各向异性增加。对于双嵌入式DiYO-1,探针的荧光各向异性随着四面体棱长的增加先降低后增加。该研究表明通过精确调控TDN尺寸可以实现对荧光染料各向异性的调控,以框架核酸为载体的荧光各向异性探针有望成为一种新型的优异探针。

关键词 荧光各向异性, DNA四面体(TDN), 嵌入式染料, X射线小角散射

中图分类号 TL99

DOI: 10.11889/j.0253-3219.2021.hjs.44.070502

DNA tetrahedron for fluorescence anisotropy of intercalators

HUANG Qiuling^{1,3} CHEN Jing^{1,2} LI Jiang^{1,2} ZHU Ying^{1,2} WANG Lihua^{1,2}

1(Division of Physical Biology, CAS Key Laboratory of Interfacial Physics and Technology, Shanghai Institute of Applied Physics,

Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

2(The Interdisciplinary Research Center, Shanghai Synchrotron Radiation Facility, Zhangjiang Laboratory, Shanghai Advanced Research Institute,

Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China)

3(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract [Background] The fluorescence anisotropy of intercalative dye plays important roles in nucleic acid analysis, the construction of fluorescent probes, and biosensing. However, there are few studies on the fluorescence anisotropy of intercalative dyes based on framework nucleic acids (FNA). [Purpose] This study aims to use DNA tetrahedrons (TDN) as scaffold to build the fluorescence anisotropy probes of SYBR Green I, DAPI and DiYO-1. [Methods] A series of TDN fluorescence anisotropy probes were constructed by precisely regulating the size of DNA

国家自然科学基金(No.21775157、No.21705159)、国家重点研发计划(No.2016YFA0400900)资助

第一作者: 黄秋灵, 女, 1994年出生, 2016年毕业于湘潭大学, 现为博士研究生, 研究领域为纳米材料和纳米生物学

通信作者: 陈静, E-mail: chenjing@sari.ac.cn

收稿日期: 2021-02-25, 修回日期: 2021-04-20

Supported by National Natural Science Foundation of China (No.21775157, No.21705159), National Key Research and Development Program (No.2016YFA0400900)

First author: HUANG Qiuling, female, born in 1994, graduated from Xiangtan University in 2016, doctoral student, focusing on nanomaterials and nanobiology

Corresponding author: CHEN Jing, E-mail: chenjing@sari.ac.cn

Received date: 2021-02-25, revised date: 2021-04-20

tetrahedrons through DNA sequence design, characterizing DNA nanostructures by using synchrotron radiation small angle X-ray scattering (SAXS). The influence of TDN size on fluorescence anisotropy of SYBR Green I, DAPI and DiYO-1 was investigated by experiments. **[Results]** The results show that the fluorescence anisotropy of probes increased with the increase of TDN size of SYBR Green I and DAPI, separately. For TDN/DiYO-1 probes, the fluorescence anisotropy decreases with the increase of TDN size as the edge length of TDN is between 7~20 bp, however, the fluorescence anisotropy increases as the edge length of TDN is bigger than 20 bp. After the dye interacted with the tetrahedron, the structure of DiYO-1 changes, resulting in the decrease of fluorescence anisotropy. **[Conclusions]** Therefore, the fluorescence anisotropy of intercalators could be tuned by controlling the TDN size precisely. The fluorescence anisotropy probes based on FNA is expected to be an excellent probe.

Key words Fluorescence anisotropy, DNA tetrahedron (TDN), Intercalators, Small angle X-ray scattering (SAXS)

基于脱氧核糖核酸(DeoxyriboNucleic Acid, DNA)结构的嵌入式染料的荧光各向异性主要用于嵌入染料的取向研究、核酸结构分析、纳米探针的构建、生物传感器等领域^[1-5]。例如Peterman等利用花菁素类非对称嵌入式染料YOYO-1的荧光各向异性研究了染料在双链DNA中的取向变化^[5],并通过染料的荧光各向异性首次证实了S-DNA中碱基的排列^[1]。Ravelet等利用SYBR Green I构建了荧光寿命敏感的荧光各向异性探针用于酪氨酸酰胺、腺苷分子和汞(II)离子的检测^[3]。这些研究都是基于双链DNA的嵌入式染料荧光各向异性的变化进行的,而目前基于框架核酸的嵌入式染料荧光各向异性的研究则很少。

框架核酸(framework nucleic acids)是一类依据

Watson-Crick 碱基互补配对原则,设计并合成的一维到三维的核酸纳米结构,是一类具有独特物理、化学和生物学特性的新型核酸^[6-7]。DNA四面体(DNA tetrahedrons, TDN)是一种典型的框架核酸,其生物相容性好,通过碱基序列的合理设计可精确调控TDN的尺寸。同时,相比于双链DNA结构,TDN还可实现功能基团在空间上的精确排布,降低功能基团之间的串扰,在生物传感、诊断、生物成像和药物递送等领域得到广泛应用^[8-12]。因此利用TDN作为载体,对嵌入式染料的性质进行研究,有望构建新型的优异光学纳米探针。

本文设计了不同尺寸的TDN荧光各向异性分子探针,研究TDN的尺寸变化对不同类型的嵌入式染料的荧光各向异性的影响(图1)。

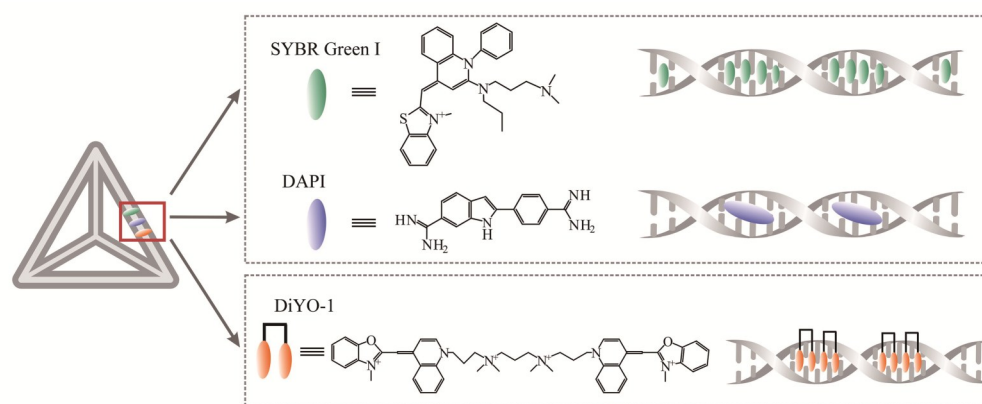


图1 基于TDN的嵌入式染料的荧光各向异性分子探针示意图

Fig.1 Schematic diagram of the fluorescence anisotropy probe for intercalative dyes based on TDN

1 实验材料

1.1 实验试剂

所有的DNA均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;Agarose琼脂糖(A21813)购自美国Bio-Rad公司;SYBR Green I购自苏州宇恒生物科技有限公司;DAPI购自碧云天生物技术有限公司;

DiYO-1购自齐一生物科技(上海)有限公司。

1.2 实验器材

紫外分光光度计(UV-2600),日本SHIMADZU公司;荧光光谱仪(FS-5),英国Edinburgh公司;微量定量仪器(P300),上海舟卓科学仪器有限公司/百泰国际贸易(香港)有限公司;PCR仪器(T100),美国Bio-Rad公司;离心机(5417R),美国Eppendorf公

司;电泳仪(PowerPac),美国Bio-Rad公司;凝胶成像系统(G:BOX),美国Syngene公司;原子力显微镜(mode 8),美国Bruker公司。

2 实验方法

2.1 TDN的合成、纯化与表征

TDN的合成:将4条或者8条DNA单链等比例混合于TM缓冲液中,退火形成TDN。TM缓冲液的配置如下:10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, pH=8.0。退火程序如下:95 °C变形10 min,然后快速冷却至4 °C保存。

TDN的纯化:由于退火过程中会形成聚体等其他结构,故通过高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)纯化收集TDN单体。HPLC流动相的配置如下:450 mmol·L⁻¹ NaCl, 25 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH=7.2。并通过2%琼脂糖凝胶电泳进行表征。

2.2 样品制备与荧光各向异性测量

TDN和嵌入式染料复合物的制备。取TDN和嵌入式染料在TM缓冲液中混合,总体积为100 μL,并在室温下避光孵育30 min。其中不同尺寸TDN的浓度均为100 nmol·L⁻¹,三种嵌入式染料按照碱基对和染料的摩尔比为4:1的比例加入。

荧光光谱仪测量荧光各向异性。荧光各向异性的计算公式为: $r = (I_p - I_v) / (I_p + 2I_v)$,其中: I_p 和 I_v 分别代表与激发光偏振方向平行和垂直的荧光强度。染料分子的激发波长和接收的范围分别如下:SYBR Green I的激发光为488 nm,荧光发射的接收范围为500~650 nm;DAPI的激发光为354 nm,荧光发射的接收范围为400~600 nm,DiYO-1的激发光为

488 nm,荧光发射接收范围为500~650 nm。

3 实验结果与讨论

3.1 TDN的合成与表征

通过PCR退火形成棱长分别为7 bp、13 bp、17 bp、20 bp和37 bp的TDN。不同尺寸TDN的DNA序列如表1所示。在退火的过程中,形成的TDN不均一,因此首先利用HPLC对TDN进行了纯化,成功得到了均一的TDN单体。通过琼脂糖凝胶电泳进一步证明不同大小的TDN的成功合成(图2(a)),并利用同步辐射小角散射(Small Angle X-ray Scattering, SAXS)对DNA纳米结构进行表征(图2(b)),结果表明:TDN的尺寸与文献报道是一致的^[13-16]。

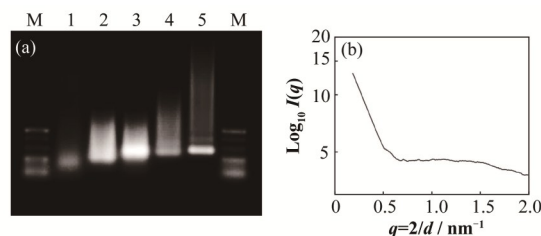


图2 不同尺寸的TDN的表征
(a) PAGE表征TDN, (b) 同步辐射小角散射表征DNA纳米结构(M代表DNA marker,泳道1~5分别为棱长为7 bp、13 bp、17 bp、20 bp和37 bp的TDN)

Fig.2 Characterization of tetrahedron with varied size
(a) PAGE characterization of TDN, (b) SAXS characterization of DNA nanostructure (M representative DNA marker, lane 1 to 5 are tetrahedrons with edge length of 7 bp, 13 bp, 17 bp, 20 bp and 37 bp, respectively)

同时,通过荧光光谱的测量得知,SYBR Green I, DiYO-1和DAPI分别与TDN结合之后,光谱分别蓝移了12 nm、27 nm和16 nm(图3)。

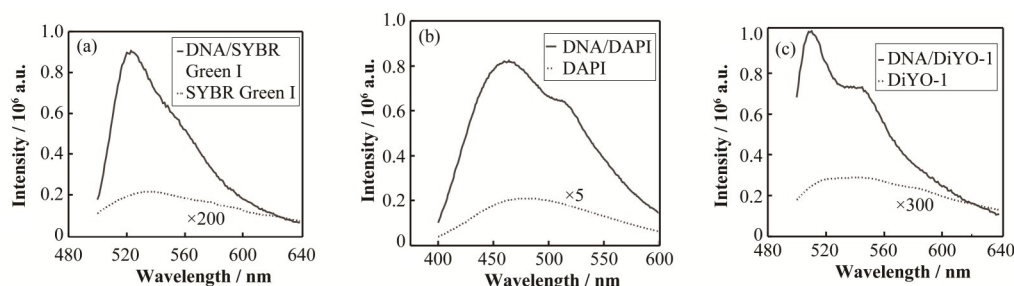


图3 嵌入染料与DNA结合前后的荧光光谱

(a) SYBR Green I, (b) DAPI, (c) DiYO-1

Fig.3 Fluorescence spectra of dyes and DNA/dyes complexes

(a) SYBR Green I, (b) DAPI, (c) DiYO-1

3.2 TDN的尺寸大小对SYBR Green I和DAPI的荧光各向异性的影响

SYBR Green I是一种单嵌入式的染料分子,据

文献报道,它与双链DNA主要以插入碱基对的模式相互作用^[17];DAPI也是一种单嵌入式的染料分子,而据文献报道,它与双链DNA主要以结合在双链

表1 不同尺寸TDN的DNA序列
Table 1 The DNA sequences of tetrahedron with varied edge length

引物 Primer	序列(5'-3')Sequence (5' to 3')
TH7-s1	GAGCGTTAGCCACACACACAGTC
TH7-s2	TTAGGCGAGTGTGGCAGAGGTGT
TH7-s3	CGCCTAAACAAGTGGAGACTGTG
TH7-s4	AACGCTCACCACCTTGAACACCTC
TH13-s1	ACACTACGTCAGAACAGCTTGCATCACTGGTCACCAGAGTA
TH13-s2	ACGAGCGAGTTGATGTGATGCAAGCTGAATGCGAGGGTCCT
TH13-s3	TCAACTCGCTCGTAACTACACTGTGCAATACTCTGGTGACC
TH13-s4	TCTGACGTAGTGTATGCACAGTGTAGTAAGGACCCTCGCAT
TH17-s1	ACATTCTAAGTCTGAAACATTACAGCTTGCTACACGAGAAGAGCCGCCATAGTA
TH17-s2	TATCACCAGGCAGTTGACAGTGTAGCAAGCTGTAATAGATGCGAGGGTCCAATAC
TH17-s3	TCAACTGCCTGGTGATAAACGACACTACGTGGGAATCTACTATGGCGGCTCTTC
TH17-s4	TTCAGACTTAGGAATGTGCTTCCACGTAGTGTCTGTTTGTATTGGACCCTCGCAT
TH20-s1	TCACCAGGCAGTTGAGACGAACATTCCTAAGTCTGAAATTTATCACCCGCCATAGTAGACGTA
TH20-s2	TCACCAGGCAGTTGAGACGAACATTCCTAAGTCTGAAATTTATCACCCGCCATAGTAGACGTA
TH20-s3	GGTGATAAACGCTGTAGCAAGCTGTAATCGACGGGAAGAGCATGCCCATCCACTACTATGGCG
TH20-s4	CCTCGCATGACTCAACTGCCTGGTGATACGAGGATGGGCATGCTCTTCCCGACGGTATTGGAC
TH37-s1.1	CCCTGTACTGGCTAGGAATTCACGTTTTAATCTGGGCTTTGGGTTAAGAACTCCCCG
TH37-s1.2	CGCTGGAGGCGCATCACCGTTTTCGTATGTGTTCTGTGCGGCCTGCCGTCCCGTGTGGG
TH37-s2.1	CGGTGATGCGCCTCCAGCGCGGGGAGTTTCTTAACCCCTTCCGACTTACAAGAGCCGG
TH37-s2.2	GCGAGACTCAGGTGGTGCCTTTGGCATTTCGACCAGGAGATATCGCGTTCAGCTATGCCC
TH37-s3.1	CCCATGAGAATAATACCGCCGATTTACGTACGTCCGGTTTCCACACGGGACGGCAGGC
TH37-s3.2	CGCACAGAACACATACGCTTTGGGCATAGCTGAACGCGATATCTCCTGGTCAATGCC
TH37-s4.1	GCCCAGATTAACCGTGAATTCCTAGCCAGTACAGGGTTTCCGGACTGACGTAAATCGG
TH37-s4.2	CGGTATTATTCTCATGGGTTTGGCACCACTGAGTCTCGCCCGGCTCTTGTAAGTCGG

DNA的小沟的模式相互作用^[18]。我们将这两种具有不同单嵌入模式的染料分子分别与不同尺寸的TDN组装,研究了TDN尺寸大小对探针的荧光各向异性的影响。实验结果(图4)表明:随着TDN尺寸的增加,两种单嵌入式染料分子的荧光各向异性都有所增加。

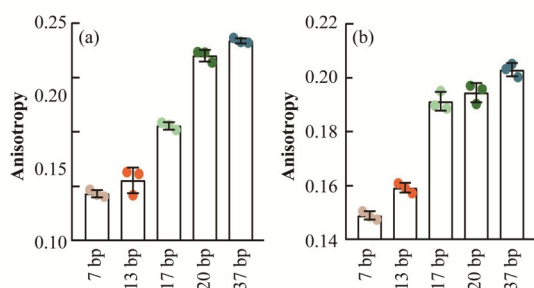


图4 不同尺寸TDN对SYBR Green I (a)和DAPI (b)的荧光各向异性的影响

Fig.4 The effect of tetrahedrons with different size on the fluorescence anisotropy of SYBR Green I (a) and DAPI (b)

根据之前的研究报道^[19-22],荧光各向异性与分子布朗运动引起的旋转扩散直接相关,而分子在溶液中的旋转扩散直接影响其旋转相关时间(θ),故荧

光各向异性与荧光复合物的旋转相关时间十分相关。同时由于布朗运动的存在, θ 的大小取决于溶液的粘度、温度和荧光复合物的分子大小。所以当荧光复合物的分子质量增加, θ 增加,荧光各向异性增加;当荧光复合物的分子质量降低,则 θ 减小,荧光各向异性降低。因此,SYBR Green I和DAPI的荧光各向异性随着TDN尺寸的增加而逐渐增加,是因为随着TDN尺寸增加,分子探针的运动减慢,旋转相关时间增加,从而导致了荧光各向异性增大。对TDN-SYBR Green I复合探针,与TDN棱长为7 bp时相比,染料的荧光各向异性随着TDN棱长的增加分别增加了0.009、0.047、0.095和0.106。对TDN-DAPI复合探针,与TDN棱长为7 bp时相比,荧光各向异性分别增加了0.010、0.042、0.046和0.054。实验结果表明:不同尺寸的TDN对SYBR Green I的荧光各向异性的影响更为显著。

3.3 TDN的尺寸大小对DiYO-1的荧光各向异性的影响

DiYO-1是一种双嵌入式的染料分子,据文献报

道,它与双链DNA主要以嵌入相邻碱基对的双嵌入模式相互作用^[4]。我们对这种双嵌入模式的花菁素非对称染料分子和不同尺寸的TDN组装后的荧光各向异性进行了研究。实验结果表明:随着TDN尺寸的增加,探针的荧光各向异性先降低后增加(图5)。当TDN的棱长小于20 bp时,与TDN棱长为7 bp时相比,染料分子的荧光各向异性随着棱长的增加而分别降低了0.022、0.055、0.058。当TDN的棱长从20 bp增加到37 bp时,染料分子的荧光各向异性增加了0.018。

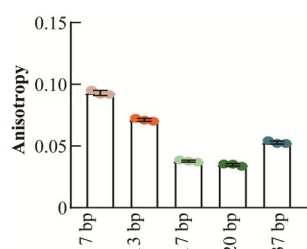


图5 DiYO-1嵌入棱长为7~37 bp的TDN后的荧光各向异性

Fig.5 The fluorescence anisotropy values of DiYO-1 after intercalating tetrahedrons with edge length of 7 to 37 bp

据文献报道,DiYO-1与DNA相互作用之后,DiYO-1的结构发生了变化^[23],而结构的变化导致光物理性质的变化^[24],会引起荧光各向异性变化。所以我们认为在TDN-DiYO-1复合探针中存在两种影响染料荧光各向异性的因素:1)DiYO-1结构的变化对荧光各向异性的影响;2)荧光复合物的分子质量对荧光各向异性的影响。7~20 bp的棱长范围内,染料分子构象的变化对荧光各向异性的影响起主导作用,可能导致了染料的荧光各向异性逐渐降低;而当TDN的棱长大于20 bp时,荧光复合物的分子质量的影响起主导作用,即分子探针的整体旋转相关时间占主导地位,导致荧光各向异性随着棱长而增大。

4 结语

本工作以生物相容性好的TDN作为载体,构建了嵌入式染料的荧光各向异性探针。研究了不同尺寸大小的TDN对嵌入式染料荧光各向异性的影响。对于SYBR Green I和DAPI单嵌入式染料分子,染料的荧光各向异性会随着TDN的尺寸而增加,主要原因是随着TDN的尺寸的增加其质量增加,使得分子探针旋转相关时间的增加,进而增加了其探针的荧光各向异性。同时我们发现,对于DiYO-1这种花菁素类的双嵌入式染料,染料的荧光各向异性会随着TDN的尺寸的增大先减小再增大。主要原因是DiYO-1双嵌入式染料分子的荧光各向异性不仅与分子探针的旋转相关时间有关,还会受到染料与

TDN相互作用的影响。当DiYO-1与TDN的相互作用占主导时,DiYO-1的构象变化可能减小了其荧光各向异性;当复合探针的旋转相关时间占主导时,荧光各向异性随TDN质量而增加。本工作系统地研究了不同尺寸TDN对嵌入式染料荧光各向异性的影响,通过精确调控TDN尺寸可以实现对荧光染料各向异性的调控。该工作的探索有利于实现具有精确调控能力的荧光各向异性探针的构建,为提高荧光各向异性多靶标检测奠定了基础。

参考文献

- 1 Backer A S, Biebricher A S, King G A, *et al.* Single-molecule polarization microscopy of DNA intercalators sheds light on the structure of S-DNA[J]. *Science Advances*, 2019, **5**(3): 1083–1092. DOI: 10.1126/sciadv.aav1083.
- 2 Zhen S J, Yu Y, Li C M, *et al.* Graphene oxide amplified fluorescence anisotropy for label-free detection of potassium ion[J]. *The Analyst*, 2015, **140**(1): 353–357. DOI: 10.1039/c4an01433b.
- 3 Chovelon B, Fiore E, Faure P, *et al.* A lifetime-sensitive fluorescence anisotropy probe for DNA-based bioassays: The case of SYBR Green[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, **90**: 140–145. DOI: 10.1016/j.bios.2016.11.049.
- 4 Murade C U, Subramaniam V, Otto C, *et al.* Force spectroscopy and fluorescence microscopy of dsDNA-YOYO-1 complexes: implications for the structure of dsDNA in the overstretching region[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, **38**(10): 3423–3431. DOI: 10.1093/nar/gkq034.
- 5 van Mameren J, Vermeulen K, Wuite G J L, *et al.* A polarized view on DNA under tension[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2018, **148**(12): 123306–123314. DOI: 10.1063/1.5004019.
- 6 谢荣, 谷沛霖, 李宇, 等. 框架核酸在生化检测中的应用[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2019, **37**(5): 050101. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2019.rj.37.050101.
- 7 XIE Mo, GU Peilin, LI Yu, *et al.* Application of framework nucleic acids in biochemical detection[J]. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 2019, **37**(5): 050101. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2019.rj.37.050101.
- 8 赵彦, 李凡, 郭琳洁, 等. 基于核定位序列-DNA四面体复合纳米结构的细胞核成像研究[J]. *核技术*, 2017, **40**(5): 050501. DOI: 10.11889/j.0253-3219.2017.hjs.40.

050501.
ZHAO Yan, LI Fan, GUO Linjie, *et al.* The nuclei imaging of nucleus localization signal-DNA tetrahedron composite nanostructures[J]. Nuclear Techniques, 2017, **40**(5): 050501. DOI: 10.11889/j.0253-3219.2017.hjs.40.050501.
- 8 Li J, Dai J, Jiang S, *et al.* Encoding quantized fluorescence states with fractal DNA frameworks[J]. Nature Communications, 2020, **11**(1): 2185–2194. DOI: 10.1038/s41467-020-16112-z.
 - 9 Li J, Pei H, Zhu B, *et al.* Self-assembled multivalent DNA nanostructures for noninvasive intracellular delivery of immunostimulatory CpG oligonucleotides[J]. ACS Nano, 2011, **5**(11): 8783–8789. DOI: 10.1021/nn202774x.
 - 10 Zhang L H, Wang F, Li Q, *et al.* Classifying cell types with DNA-encoded ligand-receptor interactions on the cell membrane[J]. Nano Letters, 2020, **20**(5): 3521–3527. DOI: 10.1021/acs.nanolett.0c00445.
 - 11 Wen Y L, Li L Y, Li J, *et al.* DNA framework-mediated electrochemical biosensing platform for amplification-free MicroRNA analysis[J]. Analytical Chemistry, 2020, **92**(6): 4498–4503. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b05616.
 - 12 Song P, Shen J, Ye D, *et al.* Programming bulk enzyme heterojunctions for biosensor development with tetrahedral DNA framework[J]. Nature Communications, 2020, **11**(1): 838 – 847. DOI: 10.1038/s41467-020-14664-8.
 - 13 Liu X G, Jing X X, Liu P, *et al.* DNA framework-encoded mineralization of calcium phosphate[J]. Chem, 2020, **6** (2): 472–485. DOI: 10.1016/j.chempr.2019.12.003.
 - 14 Chen X L, Liu X G, Yao G B, *et al.* PolyA-based DNA bonds with programmable bond length and bond energy [J]. NPG Asia Materials, 2020, **12**: 49–58. DOI: 10.1038/s41427-020-0231-x.
 - 15 Bruetzel L K, Gerling T, Sedlak S M, *et al.* Conformational changes and flexibility of DNA devices observed by small-angle X-ray scattering[J]. Nano Letters, 2016, **16**(8): 4871 – 4879. DOI: 10.1021/acs.nanolett.6b01338.
 - 16 Tian F, Li X H, Wang Y Z, *et al.* Small angle X-ray scattering beamline at SSRF[J]. Nuclear Science and Techniques, 2015, **26**(3): 030101. DOI: 10.13538/j.1001-8042/nst.26.030101.
 - 17 Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, *et al.* Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications[J]. Nucleic Acids Research, 2004, **32**(12): 103–112. DOI: 10.1093/nar/gnh101.
 - 18 Holmgaard List N, Knoops J, Rubio-Magnieto J, *et al.* Origin of DNA-induced circular dichroism in a minor-groove binder[J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, **139**(42): 14947 – 14953. DOI: 10.1021/jacs.7b05994.
 - 19 Dubach J M, Vinegoni C, Mazitschek R, *et al.* *In vivo* imaging of specific drug-target binding at subcellular resolution[J]. Nature Communications, 2014, **5**: 3946 – 3944. DOI: 10.1038/ncomms4946.
 - 20 Vallée-Bélisle A, Ricci F, Uzawa T, *et al.* Bioelectrochemical switches for the quantitative detection of antibodies directly in whole blood[J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, **134**(37): 15197 – 15200. DOI: 10.1021/ja305720w.
 - 21 Jameson D M, Ross J A. Fluorescence polarization/anisotropy in diagnostics and imaging[J]. Chemical Reviews, 2010, **110**(5): 2685 – 2708. DOI: 10.1021/cr900267p.
 - 22 Gradinaru C C, Marushchak D O, Samim M, *et al.* Fluorescence anisotropy: from single molecules to live cells[J]. The Analyst, 2010, **135**(3): 452 – 459. DOI: 10.1039/b920242k.
 - 23 Armitage B A. Cyanine dye – DNA interactions: intercalation, groove binding, and aggregation[M]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005: 55 – 75. DOI: 10.1007/b100442.
 - 24 Cosa G, Focsaneanu K S, McLean J R N, *et al.* Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution[J]. Photochemistry and Photobiology, 2001, **73** (6): 585 – 599. DOI: 10.1562/0031-8655(2001)073<0585: Ppofdd>2.0.co;2.