

分子信标的构建及其应用研究进展

向东山^{a,b*} 翟 琨^b

(湖北民族学院^a生物资源保护与利用湖北省重点实验室;^b化学与环境工程学院 恩施 445000)

摘 要 分子信标(molecular beacon, MB)是一种寡聚核苷酸荧光探针,其具有灵敏度高、特异性强、操作简单以及不必与未反应的探针分离即可实时检测等优点,在分子生物学和基因组学及分子医学等领域具有十分重要的应用价值。本文介绍了近年来出现的各种新型分子信标的结构及工作原理,概述了分子信标技术在生命科学领域中的应用,展望了分子信标技术的发展趋势。

关键词 分子信标,构建,生化分析,应用

中图分类号:O651

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2014)01-0011-09

DOI:10.3724/SP.J.1095.2014.30116

分子信标是一种寡聚核苷酸荧光探针,由 Tyagi 于 1996 年发明^[1],具有灵敏度高、特异性强、操作简单以及不必与未反应的探针分离即可实时检测等优点^[2-3],现已广泛应用于活细胞中 DNA/RNA 杂交分析^[4-5]、聚合酶链反应的实时监测^[6]、基因突变的快速分析^[7]、DNA/RNA 的定量检测^[8-11]、蛋白质的定量检测^[12]、细菌及病毒检测^[13-16]、酶降解监测^[17-19]以及核酸-蛋白质的相互作用研究^[20]等领域。

1 分子信标的合成与性能参数

1.1 分子信标的合成及纯化方法

分子信标在 DNA 合成仪上合成,一般采用 3'端荧光基团标记的控制微孔玻璃珠(controlled pore glass, CPG)为合成载体,在 5'端引入猝灭基团。荧光基团和猝灭基团与核酸末端的核苷酸,一般均是通过其活性基团(如—NH₂、—OH、—COOH等)脱水缩合而相连^[1]。合成完毕后经氨解、脱氨,离心除去 CPG 后取上清液即得合成粗产物,然后通过纯化即可得相应的分子信标。纯化方法主要有聚丙烯酰胺凝胶电泳法(PAGE)、毛细管凝胶电泳法(HPCE)和高效液相色谱法(HPLC)等。

1.2 分子信标的性能参数

分子信标的性能参数主要包括荧光寿命、灵敏度、检测限、稳定性、荧光背景、选择性及反应速度等。通常,一个好的分子信标应该具备荧光寿命长、灵敏度高、检测限低、稳定性好、荧光背景低、选择性好及反应速度快等性能^[2,5]。

1.3 荧光基团与猝灭基团的选择原则

分子信标是基于荧光共振能量转移的原理而设计的^[1],因此选择荧光基团和猝灭基团的原则为荧光基团所发射的荧光能够被猝灭基团所吸收。也就是说,荧光基团的发射光谱与猝灭基团的吸收光谱能够重叠。荧光基团的最大发射波长与猝灭基团的最大吸收波长越靠近,荧光猝灭的效果就越好,其荧光背景就越低^[3]。

2 分子信标的类别

2.1 不同结构的分子信标

2.1.1 经典分子信标 经典分子信标是指 Tyagi 于 1996 年最初发明的分子信标,它由茎、环、常见的有机荧光染料(如 FAM、ROX 和 TAMRA 等)及有机猝灭基团(如 DABCY 和 BHQ 等)4 部分构成^[1]

2013-03-08 收稿,2013-05-27 修回,2013-06-20 接受

国家自然科学基金(21267009)、生物资源保护与利用湖北省重点实验室开放基金(PKLHB1110)、湖北省教育厅自然科学基金(D20131905)、湖北民族学院博士科研启动基金(MY2012B016)资助项目

通讯联系人:向东山,副教授;Tel/Fax:0718-8437531;E-mail:zk3100@sohu.com;研究方向:分子光谱

(图 1)。经典分子信标具有合成简单、操作容易、选择性好以及不必与未反应的探针分离即能实时检测等优点。但它在实际应用中也存在一定的局限性,主要表现在背景荧光较强、有机荧光基团易发生光漂白、荧光寿命短、斯托克斯位移小、受光源以及其它环境因素影响较大和反应速度慢致使杂交反应时间较长等缺陷^[21-23]。为了克服这些缺陷,通过改变经典分子信标的结构,设计了多种新的分子信标。

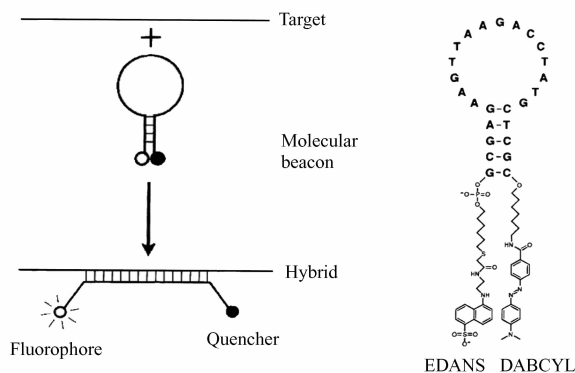


图 1 传统分子信标的工作原理

Fig. 1 Principle of operation of traditional molecular beacon^[1]

2.1.2 改变猝灭基团的新型分子信标 经典分子信标的背景荧光会严重影响分子信标在定量分析中的灵敏度和检测限。为了克服经典分子信标存在的背景荧光大的缺点,许多研究通过改变经典分子信标中的猝灭基团降低其背景荧光,来提高检测的灵敏度,降低分子信标的定量限。Maxwell^[24]和Dubertret^[25]用金纳米粒子作为荧光猝灭剂替代经典分子信标中的有机猝灭基团,设计了新型分子信标,用其对单链核酸检测。这种分子信标的合成分 2 步,首先利用金氯酸(HAuCl_4)在还原剂作用下制备纳米金;然后将两端分别修饰巯基和荧光基团的 DNA 探针与纳米金按照一定的比例混合,静置过夜,使 DNA 探针通过 Au-S 键共价键合到金纳米粒子上,再将其放入到含有氯化钠的磷酸缓冲溶液中进行老化,即可获得相应的分子信标。与经典分子信标相比,金纳米粒子对荧光基团具有更好的猝灭效果和更宽的猝灭范围,金纳米粒子对荧光胺(FAM)的平均猝灭效率可达到 98.68%。另外,这种分子信标仍然保留了经典分子信标的茎-环结构,因此对单碱基错配的核酸具有较好的识别能力。Song 等^[26]将几种不同的分子信标(一端修饰荧光染料,另一端修饰巯基)通过 Au-S 键共价键合到较大粒径的金纳米粒子(15 nm)上,构建了多种纳米尺度的分子信标探针(图 2),用该探针同时检测 3 种不同的核酸,取得了良好的结果。Brunner 等^[27]用一种能与 Cu^{2+} 发生配位反应的有机分子替代经典分子信标中的猝灭基团,使有机分子与 Cu^{2+} 发生配位反应,让 Cu^{2+} 与荧光基团靠近,利用 Cu^{2+} 对荧光基团的猝灭作用,构建了利用金属离子为猝灭剂的新型分子信标,并用于单链核酸的检测。该分子信标的合成方法与经典分子信标相似,首先在单链 DNA 的 3'端连接一个荧光基团,5'端连接一个氨基;然后羧基化的 5-(2-吡啶基)吡啶通过标准酰胺偶联反应与氨基相连;最后由 5-(2-吡啶基)吡啶与 Cu^{2+} 发生配位反应得到分子信标。由于这种分子信标荧光基团和猝灭基团相互作用的强度可以通过空间接触进行调整和优化,从而可以利用金属离子与荧光基团的高信噪比特性设计出更优良的探针来避免在生物样品分析中引起的假阳性。Yang 等^[28]用多个猝灭基团组装成一个猝灭分子阵列,同时对一个荧光基团进行猝灭,对经典分子信标进行改进,构建了超猝灭分子信标探针(图 3),其合成方法见文献^[28]。这种分子信标的荧光背景比金纳米粒子为猝灭剂的分子信标更低。研究表明,用 3 个 DABCYL 组成的分子阵列对 FAM 的平均猝灭效率可达 99.5%。用这种超猝灭分子信标探针对核酸进行检测,荧光强度可以增加 320 倍,而用单个 DABCYL 为猝灭剂的分子信标荧光强度只能增加 14 倍。Kurata 等^[29]利用鸟嘌呤(G 碱基)通过光诱导的电子转移可猝灭某些荧光基团发光的原理,构建了以 G 碱基为猝灭基团的新型分子信标,并成功地用于特定序列核酸的定量检测。这种分子信标利用 G 碱基对荧光基团发光实现猝灭,不用修饰有机猝灭基团,可明显缩短分子信标的合成时间,降低合成成本。Lu 等^[30]利用氧化石墨烯替代分子信标中的有机猝灭基团,成功地实现了对 DNA 的检测。其原理是氧化石墨烯对分子信标(无猝灭基团)具有

很强的吸附能力,并能高效地猝灭分子信标中荧光基团的荧光;当分子信标与目标分子作用后,分子信标从氧化石墨烯表面脱落下来,分子信标荧光得到恢复。由于氧化石墨烯对荧光基团具有极高的猝灭效率,因此该方法能显著降低分子信标的背景荧光,得到很高的信噪比,从而可极大提高检测的灵敏度,降低检出限。与经典分子信标相比,该分子信标还能提高对单碱基错配 DNA 的识别能力。另外,功能化的纳米氧化石墨烯吸附分子信标后,由于空间位阻效应使得脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) 不能结合到 MB 上,可有效地避免 DNase I 对 ss-DNA 和 ds-DNA 非特异性剪切。Xiang 等^[31] 利用氧化石墨烯的比表面大能同时猝灭多个荧光探针的特性,构建了多色传感器,可同时检测同一溶液中的多种 DNA。利用这种分子信标,通过同步荧光法可实现 2 种不同 DNA 的同时定量分析,具有快速、灵敏和高选择性特点。

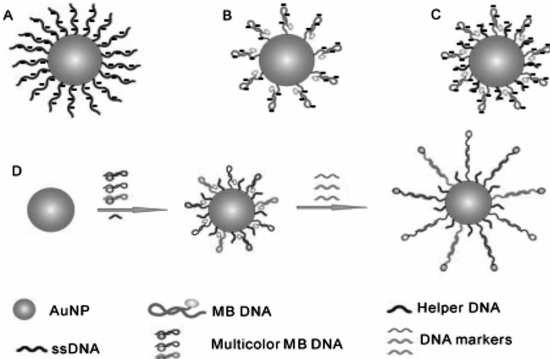


图 2 基于纳米金的多色纳米信标对特定核酸序列的分析

Fig. 2 Gold-nanoparticle-based multicolor nanobeacons for sequence-specific DNA analysis^[26]

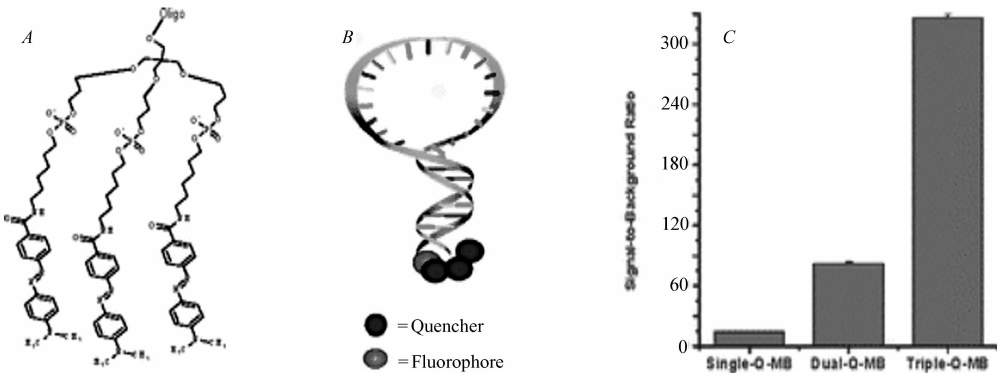


图 3 超猝灭基团的分子组装及其与信号分子的相互作用

Fig. 3 Molecular assembly of superquenchers in signaling molecular interactions^[28]

A. structure of a superquencher consisting of three DABCYLs; B. schematic of a molecular beacon with a superquencher

2.1.3 改变荧光基团的新型分子信标 经典分子信标中的荧光基团多为常见的有机荧光染料,它们的发光极易被激发光漂白、荧光寿命短、斯托克斯位移小、受光源以及其它环境因素影响较大^[22]。为解决这些问题,许多研究者通过改变分子信标中的荧光基团,来改进分子信标的性能和检测效果。Conlon 等^[32] 利用苾的多聚体代替经典分子信标的荧光基团构建的分子信标对目标核酸进行了实时分析。这种分子信标的合成采用 3'端猝灭基团(DABCYL)标记的 CPG 为合成载体,在 5'端通过树枝状的亚磷酰胺与荧光基团苾分子相连。当有目标 DNA 存在时,苾的多聚体发射荧光。由于苾的多聚体所产生的荧光信号与苾的单体数量成比例,苾聚合度越高,其荧光强度、量子产率及激发态寿命就越大,因此可通过改变苾的聚合度调节分子信标的荧光强度;而且分子信标的荧光寿命比较长(40 ns),斯托克斯位移较大(130 nm),可避免瑞利散射对荧光测定的干扰。这种分子信标具有能容易地区分细胞介质中靶标分子的构象的特点(茎闭合和茎打开),具有很高的灵敏度和较高的选择性。Wu 和 Chi 等^[8,33] 用量子点替代经典分子信标的荧光基团,构建了以量子点为荧光供体的新型分子信标,并用于目标核酸的检测分析。这种分子信标利用羧基化的量子点与氨基化的核酸探针通过酰基化反应,或利用亲和素修饰的量

量子点与生物素修饰的核酸探针通过亲和反应得到。该分子信标荧光寿命长,光稳定性好,可克服传统分子信标中有机荧光基团易被光漂白降低荧光强度和斯托克斯位移小的缺点。另外,利用不同尺寸的量子点代替有机荧光基团可得到不同的分子信标物,从而可提供多元 DNA、RNA 成像分析及对单碱基错配核酸的识别。Zhang 等^[34]分别用香豆素(最大激发波长 350 nm,最大发射波长 447 nm,能量供体)和 6-羧基荧光素(6-FAM,最大激发波长 492 nm,最大发射波长 518 nm,能量受体)2 种荧光染料构建了新型分子信标,利用信标中 2 个荧光基团荧光信号之比对目标核酸进行了检测,显著提高了检测的灵敏度。此外,这种方法受光源以及其它环境因素影响较小,选择性更高。Tyagi 等^[35]设计了一种荧光波长转移分子信标,他们在分子信标的一端同时连接 2 个荧光基团,在另一端连接 1 个猝灭基团(图 4)。2 个荧光基团一个作为荧光供体,另外一个作为荧光受体,可发生荧光共振能量转移。在没有目标 DNA 存在时,分子信标处于茎闭合状态,荧光供体与猝灭基团靠近,荧光被猝灭,分子信标不产生荧光;当分子信标与目标 DNA 分子杂交后,其构象发生改变,荧光供体与猝灭基团分开,荧光供体产生的荧光转移给荧光受体,荧光受体发射出特征荧光。与经典分子信标相比,这种分子信标具有较大的斯托克斯位移,可减少反射光和瑞利散射光对荧光信号的影响,从而能提高检测的灵敏度。通过选择不同荧光供体和荧光受体,可使分子信标发射出不同颜色的荧光,实现多组分的同时检测。但构建这种分子信标的困难在于合成难度大,可供选择的荧光供体-受体对较少。Tsourkas 等^[36]用 2 种分子信标构建出双重荧光共振能量转移分子信标的结构模型(图 5)。这种分子信标中的 2 种荧光基团互为荧光共振能量转移的供体/受体对,只有当 2 种分子信标同时与目标核酸反应之后,才会发生荧光共振能量转移。因此,使用此分子信标可避免经典分子信标测定细胞内核酸时被核酸酶降解或非特异性地吸附而导致的假阳性。同时,采用这种分子信标能显著地降低散射光产生的背景信号,提高检测灵敏度及区分单碱基的多态性。

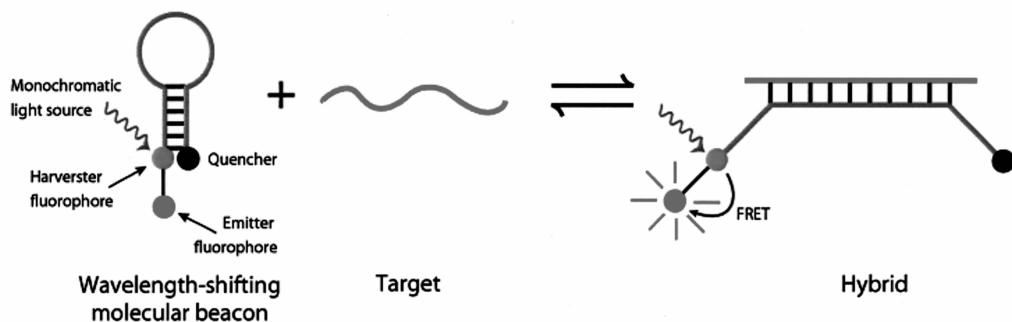


图 4 波长转移分子信标的工作原理

Fig. 4 Principle of operation of wavelength-shifting molecular beacons^[35]

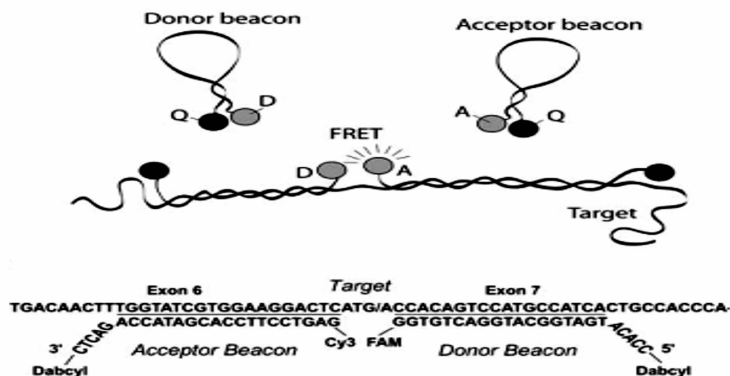


图 5 双重荧光共振能量转移分子信标的工作原理

Fig. 5 Principle of operation of dual fluorescence resonance energy-transfer molecular beacons^[36]

2.1.4 无荧光基团和猝灭基团的分子信标 为了简化经典的分子信标的构成,Wang 等^[37]设计了一种

既无荧光基团又无猝灭基团的分子信标,并结合量子点用于核酸检测(图 6)。这个分子信标的茎是由 T-Hg-T 结构构成的,在没有目标 DNA 存在时, Hg^{2+} 与核苷酸中的胸腺嘧啶(T 碱基)形成稳定的 T-Hg-T 结构(分子信标中的茎), Hg^{2+} 对量子点(QD)无猝灭作用;而当有目标 DNA 存在时,具有 T-Hg-T 结构的分子信标与目标 DNA 杂交,形成双链,T-Hg-T 结构被破坏, Hg^{2+} 被释放出来,对量子点产生猝灭作用,由此实现对核酸的定量检测。与传统分子信标相比,这种分子信标可避免在核酸两端同时进行荧光染料和猝灭基团标记的繁琐操作,其选择性和灵敏性容易调节,可大大节约分子信标的合成成本。但是,由于存在 Hg^{2+} 和 CdTe 量子点的生物相容性和毒性问题,很难用于活细胞中靶标核酸的检测。

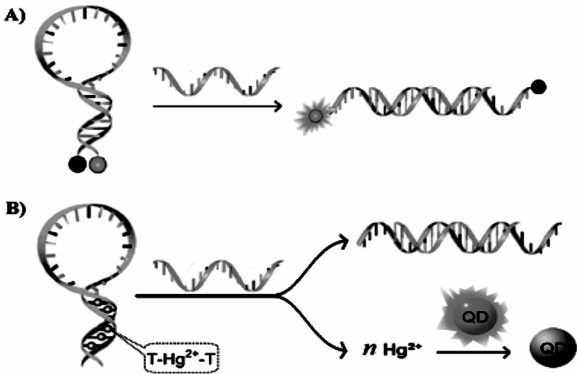


图 6 利用分子信标及量子点对核酸的检测原理

Fig. 6 Principle of detection for DNA with molecular beacons and QDs^[37]

2.1.5 改变茎结构的分子信标 经典分子信标中的茎是由 5~8 个互补配对的碱基构成的,存在反应速度慢、在复杂体系中容易被酶降解产生假阳性等缺点。为解决这个问题,研究者对经典分子信标中的茎进行了改造。因为传统分子信标中的荧光基团和猝灭基团只是一个辅助基团,真正对靶标核酸起识别作用的是分子信标的环状部分。Gifford 等^[38]将传统的分子信标两端互补的部分去掉,构成一个无茎的分子信标。这种分子信标的结构比经典分子信标简单,与目标核酸杂交反应的速度更快。但这种分子信标最大的缺点是稳定性较差,易受外界环境的影响,背景荧光也比较强。Maxwell 等^[24]设计了一种利用金纳米粒子作为荧光猝灭基团的无茎分子信标。他们将一端修饰有巯基另一端修饰有荧光基团的分子信标通过 Au—S 键连接到金纳米粒子上,构成以金纳米粒子为猝灭基团的分子信标。在没有目标 DNA 存在时,连接在金纳米粒子上的寡聚核苷酸链具有很好的柔韧性,而且金纳米粒子对有机染料具有很强的亲和性。因此,连接有机染料的核苷酸容易形成一个环状结构,使荧光基团与金纳米粒子靠近,从而导致荧光基团的荧光被金纳米粒子猝灭。当存在目标 DNA 时,目标 DNA 与寡聚核苷酸杂交形成双链,分子的刚性增加,使荧光基团远离金纳米粒子的表面,荧光得到恢复。这种分子信标不需要茎结构,与目标 DNA 的杂交反应速度较快,而且背景荧光几乎不受体系温度等的影响。Tsourkas 等^[39]设计合成了一种共臂分子信标(Shared stem MB),这种分子信标的茎的一端与待检测 DNA 部分互补,也就是说茎的一端也参与杂交反应。与经典分子信标相比,这种结构的分子信标稳定性更高,可以提高杂交反应的速率和选择性。一般来说,经典分子信标一旦引入到复杂基质中(例如活细胞),将会发生非特异性作用或酶降解而产生假阳性。为克服这些问题,Wang 等^[40]将锁核苷酸(LNA)引入到分子信标中,设计了一种稳定性很高的锁核苷酸分子信标。它在环境温度高于 90℃ 时还能稳定存在,并能与目标 DNA 保持较高的亲和性。它还具有抗核酸酶降解作用,在与核酸酶作用 24 h 后仍能保持其茎环结构不破坏。还可通过优化该分子信标茎环区的碱基数目,提高对靶标检测的选择性,对单碱基多态性(SNP)的检测结果明显地优于经典分子信标。因为可以避免分子信标在复杂基质中由于非特异性作用而产生的假阳性,因此可提高检测的准确性。

2.2 功能不同的分子信标

2.2.1 环为目标核酸互补序列的分子信标 这类分子信标主要用于生物体外或体内目标核酸的检测与分析^[4-8],是目前应用最广泛的一类分子信标。构成这类分子信标环状部分的碱基序列与待测目标序

列完全互补配对,当有目标核酸存在时,分子信标与目标核酸杂交形成双链,茎环结构被破坏,荧光基团与猝灭基团分开,分子信标的荧光强度增强,利用此原理可对目标核酸进行定性或定量分析。

2.2.2 环为适配体的新型分子信标 这种分子信标与经典分子信标的不同之处在于构成分子信标的环为某种待检测分子的适配体,它能与目标分子进行特异性强亲和作用。Wang^[41]和 Li^[42]等分别利用这种分子信标对蛋白质进行了定量检测并取得了较好的效果。这种分子信标的优点在于,只要筛选出目标分子的适配体,就可设计出相应的分子信标对其进行检测,应用范围广,具有很好的应用前景。另外,由于适配体能与目标分子进行特异性强亲和作用,因此使用这种分子信标对目标物检测的选择性很高。

3 分子信标在生化分析中的应用

3.1 用于核酸的分析与检测

分子信标在生化分析中应用最多的是对核酸的分析与检测。Tyagi 首次发明的分子信标就是用于核酸的检测,几乎每种类型的分子信标均能用于核酸的检测。分子信标用于核酸的分析与检测主要有活细胞中 DNA/RNA 杂交分析^[4-5]、聚合酶链反应的实时监测^[6]、基因突变的快速分析^[7]、体外 DNA/RNA 的定量检测^[8-11]及核酸-蛋白质的相互作用研究^[20]等领域。

3.2 用于蛋白质的分析与检测

用于蛋白质分析与检测的分子信标的环为被测目标蛋白质分子的适配体。由于具有高度的选择性,在蛋白质的检测中具有十分广阔的应用前景。根据分子信标原理,Tan 等^[43]设计了适配体分子信标用于直接检测蛋白质。在没有目标蛋白时,分子信标中的荧光基团与猝灭基团靠近,荧光被完全猝灭。当目标蛋白存在时,适配体会折叠成一定的构象,通过三维结构与目标蛋白发生特异性结合,导致适配体分子信标的茎环结构被破坏,荧光基团与猝灭基团分开,荧光恢复,从而实现目标蛋白的检测。与酶联免疫吸附蛋白质测定法相比,适配体分子信标技术具有简单、直接、灵敏和省时等优点。许多这类分子信标在蛋白质检测中均取得了满意的结果^[44-47]。

3.3 用于金属离子的分析与检测

目前,用分子信标检测金属离子,应用最成功的就是汞离子。其主要原理是利用 Hg^{2+} 离子能与核酸中的 T 碱基形成稳定 T-Hg-T 结构。该结构形成之后,核酸分子的构型发生改变导致荧光基团的荧光发射发生变化,通过测定荧光强度的变化来检测汞离子。Lin 等^[48]将分子信标两端的碱基均设计成 T 碱基,在没有 Hg^{2+} 时,分子信标因两端的碱基不能互补配对,荧光基团与猝灭基团不能靠近,分子信标具有较强的荧光;当有 Hg^{2+} 存在时,分子信标两端的 T 碱基与 Hg^{2+} 形成稳定 T-Hg-T 结构,导致荧光基团与猝灭基团彼此靠近,其荧光强度下降。这样就实现了对 Hg^{2+} 的定量检测。其它研究者对 Hg^{2+} 检测的应用也取得了很好的结果^[49-52]。这种检测方法选择性和灵敏度较高,不受共存离子干扰。

3.4 用于酶活力的测定

分子信标既存在单链 DNA 结构(环)又存在双链 DNA 结构(茎),单链或双链核酸酶能破坏分子信标的茎-环结构,使其荧光信号增强,所以分子信标可用于核酸酶的分析。将不同的限制性内切酶的酶切位点设计在相应位置,就可特异性地对限制性内切酶的活力进行分析。当有限制性内切酶存在时,由于限制性内切酶的剪切作用,使分子信标中的荧光基团与猝灭基团完全分开,根据荧光恢复的程度可实现对内切酶活力的测定。Biggins 等^[53]将不同的限制性内切酶的酶切位点设计在含有双链结构的茎部,通过限制性内切酶的酶切作用使分子信标的荧光强度增大,用于研究限制性内切酶的活力及影响酶切反应的各种因素,取得了较好的结果。

3.5 用于小分子的分析与检测

用于分析与检测小分子的分子信标的环为被测小分子的适配体,它可与相应的小分子特异性地结合,使分子信标茎-环结构发生改变,导致其荧光增强。He 等^[54]利用分子信标(无猝灭基团)及氧化石墨烯高灵敏的特异性地检测了 ATP 分子。在这种分子信标中,将分子信标的环设计为 ATP 分子的适配体。利用氧化石墨烯能高效猝灭分子信标荧光基团的特性,在没有 ATP 分子时,分子信标被氧化石墨烯吸附,荧光基团与氧化石墨烯靠近,荧光被猝灭;当存在 ATP 分子时,分子信标与 ATP 分子特异性结合,

形成三维空间结构,分子信标的荧光基团与氧化石墨烯的距离增加,荧光恢复。利用此原理对 ATP 分子进行检测,取得了良好的结果。

3.6 用于温度传感器

分子信标在其融解温度(T_m)以下时,荧光强度对温度有很强的依赖性,其荧光强度会随着温度的升高而增强。因此分子信标可作为生物体的温度传感器:Ke 等^[55]利用非天然碱基 L-DNA 分子信标设计了一个细胞温度传感器,对细胞内的温度进行监测,取得了满意的结果。这种分子信标中非天然碱基 L-DNA 的骨架可以防止分子信标与细胞内的核酸和蛋白发生非特异性作用,也可以防止核酸酶对分子信标的降解,从而可保证温度传感器的稳定性和准确性。

4 小结及展望

分子信标的独特设计和优越性能,使其自发明以来的十多年中,受到了生物医学研究者的极大关注。尽管最初设计的目的是利用它来对体外核酸进行定量检测,以提高核酸检测的选择性。但经过 10 多年的研究改进,相继开发了一系列新型的分子信标,其应用领域也从对体外核酸分析检测扩展到活体中的核酸代谢分析、DNA 与蛋白质相互作用分析、蛋白质的检测与分析 and 金属离子及其它小分子的检测分析中。

尽管分子信标在化学、医学、分子生物学、环境科学等领域的应用取得了重要进展,但进一步提高其选择性和灵敏度仍然是分子信标技术的重要课题。在实际样品及活细胞的分析中,如能增强分子信标的稳定性、耐酶降解能力以及降低其非特异性相互作用造成的假阳性也是需要解决的实际问题。

参 考 文 献

- [1] Tyagi S, Kramer F R. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization[J]. *Nat Biotech*, 1996, **14**(3): 303-308.
- [2] Lv C, Yu L L, Wang J, et al. A Dumbbell Molecular Beacon for the Specific Recognition of Nucleic Acids[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, **20**(22): 6547-6550.
- [3] Haner R, Biner S M, Langenegger S M, et al. A Highly Sensitive, Excimer-controlled Molecular Beacon[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2010, **49**(7): 1227-1230.
- [4] Peng X H, Cao Z H, Xia J T, et al. Real-time Detection of Gene Expression in Cancer Cells Using Molecular Beacon Imaging: New Strategies for Cancer Research[J]. *Cancer Res*, 2005, **65**(5): 1909-1917.
- [5] Li N, Wong P K. Transfection of Molecular Beacons in Microchannels for Single-cell Gene-expression Analysis[J]. *Bioanalysis*, 2010, **2**(10): 1689-1699.
- [6] Singh J, Batish V K, Grover S. Molecular Beacon Based Real-time PCR Assay for Simultaneous Detection of *Listeria Monocytogenes* and *Salmonella Spp* in Dairy Products[J]. *Dairy Sci Technol*, 2011, **91**(3): 373-382.
- [7] 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.
- [8] Wu C S, Oo M K K, Cupps J M, et al. Robust Silica-coated Quantum Dot-molecular Beacon for Highly Sensitive DNA Detection[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, **26**(9): 3870-3875.
- [9] Kong R M, Zhang X B, Zhang L L, et al. Molecular Beacon-based Junction Probes for Efficient Detection of Nucleic Acids via a True Target-triggered Enzymatic Recycling Amplification[J]. *Anal Chem*, 2011, **83**(1): 14-17.
- [10] Nitin N, Santangelo P J, Kim G, et al. Peptide-linked Molecular Beacons for Efficient Delivery and Rapid mRNA Detection in Living Cells[J]. *Nucl Acids Res*, 2004, **32**(6): e58.
- [11] Liu B, Yang X H, Wang K M, et al. Quantitative Detection of p21 mRNA in Tumor Cells Based on Molecular Beacon[J]. *Acta Chim Sin*, 2010, **68**(13): 1303-1307.
- [12] Tang D, Liao D L, Zhu Q K, et al. Fluorescence Turn-on Detection of a Protein Through the Displaced Single-stranded DNA Binding Protein Binding to a Molecular Beacon[J]. *Chem Commun*, 2011, **47**(19): 5485-5487.
- [13] Ganguli P S, Chen W, Yates M V. Detection of Murine Norovirus-1 by Using TAT Peptide-delivered Molecular Beacons[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, **77**(15): 5517-5520.
- [14] Bercovici M, Kaigala G V, Mach K E, et al. Rapid Detection of Urinary Tract Infections Using Isotachophoresis and Molecular Beacons[J]. *Anal Chem*, 2011, **83**(11): 4110-4117.
- [15] Peng Z Y, Soper S A, Pingle M R, et al. Ligase Detection Reaction Generation of Reverse Molecular Beacons for Near Real-time Analysis of Bacterial Pathogens Using Single-pair Fluorescence Resonance Energy Transfer and a Cyclic Olefin

- Copolymer Microfluidic Chip[J]. *Anal Chem*, 2010, **82**(23):9727-9735.
- [16] Yeh H Y, Hwang Y C, Yates M V, *et al.* Detection of Hepatitis A Virus by Using a Combined Cell Culture-molecular Beacon Assay[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(7):2239-2243.
- [17] Ma C B, Tang Z W, Huo X Q, *et al.* Real-time Monitoring of Double-stranded DNA Cleavage Using Molecular Beacons[J]. *Talanta*, 2008, **76**(2):458-461.
- [18] Meng X X, Wang K M, Tan W H, *et al.* Ribozyme Probe Based on Molecular Beacon for Real Time Monitoring of Enzymatic Cleavage Process[J]. *Chinese Sci Bull*, 2003, **48**(23):2581-2584.
- [19] Meng X X, Tang Z W, Wang K M, *et al.* Ultrasensitive Monitoring of Ribozyme Cleavage Product Using Molecular-beacon-ligation System[J]. *Chinese Sci Bull*, 2007, **52**(5):603-607.
- [20] Wang J, Onoshima D, Aki M, *et al.* Label-free Detection of DNA-binding Proteins Based on Microfluidic Solid-state Molecular Beacon Sensor[J]. *Anal Chem*, 2011, **83**(9):3528-3532.
- [21] Hara Y, Fujii T, Kashida H, *et al.* Coherent Quenching of a Fluorophore for the Design of a Highly Sensitive In-stem Molecular Beacon[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2010, **49**(32):5502-5506.
- [22] Wang K M, Tang Z W, Yang C Y J, *et al.* Molecular Engineering of DNA: Molecular Beacons[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2009, **48**(5):856-870.
- [23] Gifford L K, Jordan D, Pattanayak V, *et al.* Stemless Self-quenching Reporter Molecules Identify Target Sequences in mRNA[J]. *Anal Biochem*, 2005, **347**(1):77-88.
- [24] Maxwell D J, Taylor J R, Nie S M. Self-assembled Nanoparticle Probes for Recognition and Detection of Biomolecules[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**(32):9606-9612.
- [25] Dubertret B, Calame M, Libchaber A J. Single-mismatch Detection Using Gold-quenched Fluorescent Oligonucleotides[J]. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**(7):680-681.
- [26] Song S P, Liang Z Q, Zhang J, *et al.* Gold-nanoparticle-based Multicolor Nanobeacons for Sequence-specific DNA Analysis [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2009, **48**(46):8670-8674.
- [27] Brunner J, Kraemer R. Copper(II)-quenched Oligonucleotide Probes for Fluorescent DNA Sensing[J]. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(42):13626-13627.
- [28] Yang C Y J, Lin H, Tan W H. Molecular Assembly of Superquenchers in Signaling Molecular Interactions[J]. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(37):12772-12773.
- [29] Kurata S, Kanagawa T, Yamada K, *et al.* Fluorescent Quenching-based Quantitative Detection of Specific DNA/RNA Using a BODIPY(R) FL-labeled Probe or Primer[J]. *Nucl Acids Res*, 2001, **29**(6):e34.
- [30] Lu C H, Li J, Liu J J, *et al.* Increasing the Sensitivity and Single-base Mismatch Selectivity of the Molecular Beacon Using Graphene Oxide as the "Nanoquencher"[J]. *Chem-Eur J*, 2010, **16**(16):4889-4894.
- [31] Xiang D S, Zheng A H, Luo M, *et al.* Graphene Oxide and Molecular Beacons-based Multiplexed DNA Detection by Synchronous Fluorescence Analysis[J]. *Sci China Chem*, 2013, **56**(3):380-386.
- [32] Conlon P, Yang C Y J, Wu Y R, *et al.* Pyrene Excimer Signaling Molecular Beacons for Probing Nucleic Acids[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(1):336-342.
- [33] Chi C W, Lao Y H, Li Y S, *et al.* A Quantum Dot-aptamer Beacon Using a DNA Intercalating Dye as the FRET Reporter; Application to Label-free Thrombin Detection[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, **26**(7):3346-3352.
- [34] Zhang P, Beck T, Tan W H. Design of a Molecular Beacon DNA Probe with Two Fluorophores[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2001, **40**(2):402-405.
- [35] Tyagi S, Marras S A E, Kramer F R. Wavelength-shifting Molecular Beacons[J]. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(11):1191-1196.
- [36] Tsourkas A, Behlke M A, Xu Y Q, *et al.* Spectroscopic Features of Dual Fluorescence/Luminescence Resonance Energy-transfer Molecular Beacons[J]. *Anal Chem*, 2003, **75**(15):3697-3703.
- [37] Wang Y X, Li J S, Jin J Y, *et al.* Strategy for Molecular Beacon Binding Readout; Separating Molecular Recognition Element and Signal Reporter[J]. *Anal Chem*, 2009, **81**(23):9703-9709.
- [38] Gifford L K, Jordan D, Pattanayak V, *et al.* Stemless Self-quenching Reporter Molecules Identify Target Sequences in mRNA[J]. *Anal Biochem*, 2005, **347**(1):77-88.
- [39] Tsourkas A, Behlke M A, Bao G. Structure-function Relationships of Shared-stem and Conventional Molecular Beacons[J]. *Nucl Acids Res*, 2002, **30**(19):4208-4215.
- [40] Wang L, Yang C Y J, Medley C D, *et al.* Locked Nucleic Acid Molecular Beacons[J]. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(45):15664-15665.
- [41] Wang W J, Chen C L, Qian M X, *et al.* Aptamer Biosensor for Protein Detection Based on Guanine-quenching[J]. *Sens Actuators B*, 2008, **129**(1):211-217.
- [42] Li J W J, Fang X H, Tan W H. Molecular Aptamer Beacons for Real-time Protein Recognition[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **292**(1):31-40.

- [43] Tan X H, Chen W J, Lu S, *et al.* Molecular Beacon Aptamers for Direct and Universal Quantitation of Recombinant Proteins from Cell Lysates[J]. *Anal Chem*, 2012, **84**(19):8272-8276.
- [44] Zhuang H L, Zhen S J, Wang J, *et al.* Sensitive Detection of Prion Protein Through Long Range Resonance Energy Transfer Between Graphene Oxide and Molecular Aptamer Beacon[J]. *Anal Method*, 2013, **5**(1):208-212.
- [45] Guetschow E D, Black W, Walsh C M, *et al.* Detection of Prolactin Inducible Protein mRNA, a Biomarker for Breast Cancer Metastasis, Using a Molecular Beacon-based Assay[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, **404**(2):399-406.
- [46] Jiang Y L, McGoldrick C A, Yin D L, *et al.* A Specific Molecular Beacon Probe for the Detection of Human Prostate Cancer Cells[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, **22**(11):3632-3638.
- [47] Shukoor M I, Altman M O, Han D, *et al.* Aptamer-nanoparticle Assembly for Logic-based Detection[J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2012, **4**(6):3007-3011.
- [48] Lin Y W, Chang H T. Detection of Mercury and Phenylmercury Ions Using DNA-based Fluorescent Probe[J]. *Analyst*, 2011, **136**(16):3323-3328.
- [49] Gao Y, Li Y, Zou X, *et al.* Highly Sensitive and Selective Detection of Biothiols Using Graphene Oxide-based “Molecular Beacon”-Like Fluorescent Probe[J]. *Anal Chim Acta*, 2012, **731**:68-74.
- [50] Qi L, Zhao Y, Yuan H, *et al.* Amplified Fluorescence Detection of Mercury (II) Ions (Hg^{2+}) Using Target-induced DNzyme Cascade with Catalytic and Molecular Beacons[J]. *Analyst*, 2012, **137**(12):2799-2805.
- [51] Stobiecka M, Molinero A A, Chalupa A, *et al.* Mercury/Homocysteine Ligation-induced ON/OFF-Switching of a T-T Mismatch-based Oligonucleotide Molecular Beacon[J]. *Anal Chem*, 2012, **84**(11):4970-4978.
- [52] Zhang M, Yin B C, Tan W, *et al.* A Versatile Graphene-based Fluorescence “On/Off” Switch for Multiplex Detection of Various Targets[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, **26**(7):3260-3265.
- [53] Biggins J B, Prudent J R, Marshall D J, *et al.* A Continuous Assay for DNA Cleavage: The Application of “Break Lights” to Eneidyne, Iron-dependent Agents, and Nucleases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(25):13537-13542.
- [54] He Y, Wang Z G, Tang H W, *et al.* Low Background Signal Platform for the Detection of ATP: When a Molecular Aptamer Beacon Meets Graphene Oxide[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, **29**(1):76-81.
- [55] Ke G L, Wang C, Ge Y, *et al.* L-DNA Molecular Beacon: A Safe, Stable, and Accurate Intracellular Nano-thermometer for Temperature Sensing in Living Cells[J]. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(46):18908-18911.

Construction of Molecular Beacons and Their Research Progress of Application

XIANG Dongshan^{a, b *}, ZHAI Kun^b

(^aKey Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization of Hubei Province;

^bSchool of Chemical and Environmental Engineering, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China)

Abstract Molecular beacon is an oligonucleotide probe of fluorescence. Molecular beacons are playing a very important role in molecular biology, genetics and molecular medicine because they have been shown to have very high selectivity, high sensitivity, and real-time detection capabilities. The structures and working mechanisms of a variety of novel molecular beacons have been outlined here. We briefly summarize the application of molecular beacon technology in the field of life sciences, and propose the prospect this technology.

Keywords molecular beacons, construction, biochemical analysis, application

Received 2013-03-08; Revised 2013-05-27; Accepted 2013-06-20

Supported by the Science Foundation of Hubei Provincial Department of Education(D20131905), the Open Foundation of Key Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization of Hubei Province(PKLHB1110), the National Natural Science Foundation of China(21267009), the Start-up Foundation for Doctor of Hubei University for Nationalities(MY2012B016)

Corresponding author: XIANG Dongshan, associate professor; Tel/Fax: 0718-8437531; E-mail: zk3100@sohu.com; Research interests: molecular spectroscopy