基于金纳米棒基因探针对多元基因的识别与检测

孙桂敏^①, 刘媚^①, 杨培慧^{①②*}, 蔡继业^{①②}

① 暨南大学化学系, 广州 510632;

② 光电信息与传感技术广东普通高校重点实验室, 广州 510632

* 联系人, E-mail: typh@jnu.edu.cn

2010-12-20 收稿, 2011-02-24 接受

国家自然科学基金(21071064)和国家重点基础研究发展计划(2010CB833603)资助项目

摘要 通过晶种生长法制备长径比分别为 4:1 和 8:1 的金纳米棒, 分别在其表面修饰上抑癌基因 p53 和 pTEN 2 种不同序列的模型基因片段, 构建金纳米棒基因探针, 这两种基因探针分别于 800 和 1100 nm 处有 2 个近红外吸收峰。基于探针基因识别靶基因时, 金纳米棒的纵向等离子共振吸收峰吸光度的变化, 对 2 种靶基因片段混合体系建立特异性识别及检测方法。结果表明, 在 pH 为 7.0 的 PBS 缓冲溶液中, NaCl 浓度为 0.2 mol/L 时, 在靶基因片段的浓度为 3.0~9.0 nmol/L 范围内, 金纳米棒的纵向等离子共振吸收峰的变化与靶基因的浓度成线性关系, 检出限分别为 1.6 和 1.2 nmol/L。实现了在同一混合体系中同时对两种靶基因片段的特异性识别及检测。

关键词

金纳米棒
表面等离子共振吸收
基因探针

金纳米粒子具有非常奇特的局域表面等离子体共振光学性质, 其局域表面等离子体共振不仅与材料有关, 还与粒子的形状、周围的介质、粒子间的距离及粒子的对称性有关, 因此不同种类、不同尺寸的纳米颗粒会有不同的吸收峰, 使其在化学和生物传感中得到广泛的应用^[1]。目前大部分研究利用 DNA 或者其他生物分子对纳米颗粒的距离等进行调控, 基于键合诱导的球形粒子聚集, 利用其表面等离子共振峰的变化来实现对生物分子的检测。1996 年, Mirkin 等人^[2]发展了核酸比色分析法为核酸检测提供了新的启示, 并为纳米金探针检测 DNA 奠定了理论基础, 此后用纳米金作为探针比色法检测 DNA 的研究蓬勃开展起来。Lu 研究小组^[3,4]在此基础上发展了基于核酸适体、核酶等新型生物识别体系的可视化检测方法。球形纳米粒子作为分析探针已被广泛应用于生物技术中。

金纳米棒(gold nanorod, GNR)是一种胶囊状的金纳米粒子, 比球形胶体金具有更为独特的光电性质。金纳米棒有一个横向等离子共振(transverse surface plasmon resonance, TSPR)吸收峰和一个纵向等离子

共振(longitudinal surface plasmon resonance, LSPR)吸收峰, 分别对应其横轴和纵轴 2 个特征尺寸, 纵轴长度和横轴直径之比为金纳米棒的长径比(aspect ratio, AR)。GNR 这一独特的光学性质在生物和化学传感中打开了引人入胜的应用前景。GNR 用于光学传感比球形金纳米粒子有很多优势: (1) GNR 有 2 个等离子吸收峰; (2) 可制备长径比可调的 GNR, 改变 GNR 的长径比, 其 LSPR 吸收峰可从可见光区向近红外光区调控^[5]; (3) GNR 的 LSPR 吸收峰对周围环境的介电性质十分敏感^[6], 可有效地提供界面反应的光学传导信号。GNR 这些独特的光学特性使其在抗原检测^[7]、癌细胞成像和光热治疗^[8,9]等生物医学领域的应用受到人们的广泛关注。目前, 应用于生物分析多组分测定的纳米材料有荧光染料掺杂的二氧化硅纳米粒子^[10]和量子点^[11]等, 量子点价格昂贵, 而荧光染料发射光谱较宽易导致光谱重叠, 限制它们在多组分检测方面的应用。Yu 等人^[12]通过构建抗体生物功能化的 GNR 分子探针, 基于 GNR 的 LSPR 吸收峰的红移, 实现在同一混合体系中对多种抗原的同时检测。而

英文引用格式: Sun G M, Liu M, Yang P H, et al. Simultaneous recognition and detection of multiplex genes by gold nanorod gene probes (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2011, 56: 1007-1012, doi: 10.1360/972010-884

基于 GNR 对多组分基因检测的文献的报道很少, 本文合成不同长径比的 GNR, 以 p53 和 pTEN 两种抑癌基因序列作为模型基因, 分别修饰上 2 种不同序列的探针基因, 基于 GNR 的 LSPR 吸收峰的变化, 快速地识别和检测 2 种不同序列的靶基因, 拓展了金纳米棒在多组分分析中的应用.

1 材料与方法

(i) 材料和仪器. 氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 上海润捷化学试剂有限公司), 十六烷基三甲基溴化胺(CTAB, 上海源聚生物科技有限公司), 基因片段(上海生工生物工程有限公司, 其序列见表 1). 其他试剂均为分析纯, 实验用水为去离子超纯水($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). Cary5000 紫外-可见-近红外分光光度计(美国瓦里安技术有限公司), TECNAI10 透射电子显微镜(荷兰飞利浦公司).

(ii) 金纳米棒的制备及表征. 采用晶种生长法制备金纳米棒, 即 NaBH_4 还原 HAuCl_4 后得到晶种, 在 CTAB, AgNO_3 和抗坏血酸的作用下, 金离子被还原并以晶种作为纳米晶体各向异性生长的核, 定向生长为一定长径比的金纳米棒. 改变 AgNO_3 的量可得到不同长径比的金纳米棒. 用紫外-可见-近红外分光光度计和 TEM 对其进行表征.

(iii) 金纳米棒基因探针的构建及对 2 种靶基因片段的同时检测. 将浓度为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的 2 种不同的探针基因分别与长径比不同的金纳米棒作用 30 min, 10000 r/min 离心 10 min, 再用浓度为 1 mg/mL 的牛血清白蛋白(BSA)封堵未结合的位点, 分别构建成 2 个金纳米棒基因探针, 将 2 个金纳米棒基因探针混合后加入 2 种不同的靶基因, 以金纳米棒的 LSPR 吸收峰作为检测信号, 在 400~1400 nm 范围内扫描金纳米棒的紫外-可见-近红外吸收光谱.

表 1 基因序列

Gene	Sequences
Target gene1 (简称 tgene1, p53)	5'-TTT-GTG-GTC-TGC-CAG-CTA-AAG-3'
Probe gene1 (简称 pgene1, p53)	3'-AAA-CAC-CAG-ACG-GTC-GAT-TTC-5'
Target gene2 (简称 tgene2, pTEN)	5'-GAC-GGA-ACA-GCT-TTG-AGG-TGC-3'
Probe gene2 (简称 pgene2, pTEN)	3'-CTG-CCT-TGT-CGA-AAC-TCC-ACG-5'

2 结果与分析

2.1 金纳米棒的表征

合成长径比分别为 4:1(简称 rod1)和 8:1(简称 rod2)的金纳米棒对应的长径、直径分别为(50 ± 4) nm, (12 ± 4) nm(图 1(b))和(65 ± 8) nm, (8 ± 4) nm(图 1(c)), 其纵向等离子共振吸收峰分别为 800 和 1100 nm 左右, 横向等离子共振吸收峰均在 520 nm 左右(图 1(a)), 随着长径比的增加, 金纳米棒的纵向等离子共振吸收峰红移, 结果与文献[13]报道的一致.

2.2 金纳米棒基因探针的构建及检测原理

金纳米棒基因探针的构建及用于基因检测的原理见图 2. 金纳米棒在制备过程中以阳离子表面活性剂 CTAB 作为诱导剂和稳定剂, CTAB 在金纳米棒表面形成双层膜结构, 使金纳米棒表面带正电. 基因带负电的磷酸骨架或 C-端通过静电作用吸附于带正电的金纳米棒表面, 构建成金纳米棒基因探针. 金纳米棒基因探针与靶基因识别, 导致金纳米棒的 LSPR 峰吸光度发生变化从而检测靶基因. 在不同长径比的金纳米棒表面分别修饰上不同的探针基因并混合, 可实现在同一混合体系中对多个不同的靶基因的同时识别和检测.

图 1 rod1 和 rod2 的吸收光谱(a)及 TEM 图((b), (c))

(a) rod1 和 rod2 的近红外吸收光谱; (b) rod1 的 TEM 图; (c) rod2 的 TEM 图

2.3 金纳米棒基因探针对单个基因片段的识别及其吸收光谱

在 rod1 溶液中加入探针基因 pgene1, pgene1 通过静电作用修饰于 rod1 表面构建 pgene1/rod1 基因探针(简称 p1), 随着靶基因片段 tgene1 的加入, 基因发生识别使 rod1 聚集(图 3(c)), 800 nm 处的吸收峰逐渐下降, 且吸光度变化与 tgene1 靶基因的浓度在一定范围内成线性关系(图 3(a)). 在 rod2 中加入 pgene2 探针基因构建 pgene2/rod2 基因探针(简称 p2), 加入 tgene2 靶基因片段后, 结果与检测 tgene1 基因的相似(下文以 p1-tgene1 表示 p1 识别 tgene1 靶基因, p2-tgene2 表示 p2 识别 tgene2 靶基因).

2.4 实验条件优化

为避免非特异性吸附, 确保探针基因尽可能多地覆盖金纳米棒表面, 实验用过量的探针基因与金纳米棒孵育后离心分离, 进一步用 1 mg/mL BSA 来封堵未被探针基因吸附的正电荷位点. 溶液酸度实验表明, 在 pH 6.0~8.0 范围内基因的识别能力最强, 选择 PBS 缓冲液的 pH 为 7.0. 调节一定的离子强度可以减少探针基因与靶基因之间的静电排斥, 提高识别效率, 而过高的离子强度而会抑制基因和 GNR 之间的静电作用^[14]. 本实验以氯化钠调节溶液的离子强度, 当其浓

度为 0.2 mol/L 时, 金纳米棒基因探针识别靶基因能力最强. 金纳米棒基因探针与靶基因作用 10 min 后可使基因识别反应达到平衡. 温度过高或过低都不利于金纳米棒的性质稳定, 选择室温作为反应温度.

2.5 金纳米棒基因探针对 tgene1, tgene2 混合基因片段的特异性识别

pgene1 和 pgene2 两种探针基因通过静电作用分别修饰于 rod1 和 rod2 上, 构建 2 个金纳米棒基因探针 p1 和 p2, 将它们混合后体系在 520, 800, 1100 nm 左右各有一个吸收峰, 分别为 p1 和 p2 共同的 TSPR 吸收峰, p1 的 LSPR 吸收峰, p2 的 LSPR 吸收峰, 混合的金纳米棒基因探针识别靶基因后 2 个 LSPR 吸收峰的吸光度发生明显变化(图 4). 当靶基因浓度低于 3.0 nmol/L 时, 2 个 LSPR 吸收峰的吸光度随靶基因浓度增加逐渐上升, 当靶基因浓度高于 3.0 nmol/L 时, 2 个 LSPR 吸收峰的吸光度随靶基因浓度增加而逐渐下降(图 5(a)).

基因与金纳米棒相互作用先后经历了 3 个过程: (1) 探针基因与靶基因识别导致金纳米棒 LSPR 峰的吸光度下降, 从表 2 的粒度分析看出, 探针基因修饰金纳米棒后粒度为未修饰前的 2 倍左右, 表明探针基因通过静电作用吸附于金纳米棒表面, 金纳米棒主要以单体形式存在, 部分由探针基因交联形成二聚体或者多聚体使得吸光度稍有下降; (2) 当靶基因浓

图2 金纳米棒基因探针的构建及用于靶基因检测的原理及示意图

图3 p1 基因探针检测 tgene1 靶基因的吸收光谱图(a)及其 TEM 成像(b),(c)

(a) 曲线 0: rod1; 曲线 1: p1; 曲线 2~7: p1-tgene1, C_{tgene1} 分别为 3×10^{-9} , 6×10^{-9} , 9×10^{-9} , 12×10^{-9} , 15×10^{-9} , 18×10^{-9} mol/L; (b) p1 的 TEM 成像; (c) p1 识别 tgene1 的 TEM 成像

图 4 金纳米棒基因探针同时检测两种靶基因的原理图

图 5 金纳米棒基因探针同时检测 2 种靶基因的吸收光谱(a)及其线性关系(b)

表 2 各种金纳米颗粒的粒度

样品	粒径(nm)
rod1	54±4
p1	97±6
p1-tgene1	746±33
rod2	73±6
p2	132±5
p2-tgene2	766±37
rod1+rod2	56±12
p1+p2	113±14
p1-tgene1+p2-tgene2	819±37

度较低时,靶基因与探针基因交叉识别的几率很低,靶基因的识别诱导了基因在金纳米棒表面的排布更为有序,金纳米棒基因探针分散性更好使得吸光度上升;(3)当靶基因浓度较大时,靶基因与探针基因交叉识别的几率增大,导致金纳米棒聚集(表 2)从而引起 LSPR 吸收峰明显下降并蓝移(图 5(a)),这种聚集程度随着靶基因浓度增加而增大。

当在 2 种基因探针 p1 和 p2 中加入单个靶基因时,

探针基因只与相应的靶基因识别。如在混合基因探针中加入 tgene1 时,基因探针 p1 的 LSPR 峰吸光度有明显的下降,而基因探针 p2 的 LSPR 峰信号基本不变(图 6(a)),反之亦然。这充分显示了两种探针基因对其互补基因的特异性识别。而当向混合探针基因中加入非特异性蛋白 BSA 时,两种基因探针的 LSPR 峰均没有明显变化。因此所制备的基因探针对多元基因识别具有较好的特异性。

2.6 金纳米棒基因探针对 tgene1, tgene2 混合基因片段的同时检测

基于不同的金纳米棒基因探针对同一混合体系中的 tgene1 和 tgene2 两种基因片段同时检测,靶基因浓度相对较高时, LSPR 吸收峰吸光度则随靶基因浓度增加而逐渐下降,且金纳米棒的 LSPR 吸收峰吸光度变化与靶基因的浓度在一定范围内呈线性关系,

图 6 混合金纳米棒基因探针对于单个靶基因的识别
(a) 混合探针基因中只加入 tgene1; (b) 只加入 tgene2

表 3 检测靶基因的线性方程、相关系数、检出限及线性范围

靶基因	线性方程	相关系数	检出限(nmol/L)	线性范围(nmol/L)
target gene1	$\Delta A = -0.169 + 0.056C$	0.9929	1.6	3.0~9.0
target gene2	$\Delta A = -0.157 + 0.067C$	0.9947	1.2	3.0~9.0

其线性回归方程见表 3.

3 结论

制备了不同长径比的金纳米棒, 利用其具有不

同的 LSPR 吸收峰的光学特性, 在不同长径比的金纳米棒表面分别修饰上两种不同的探针基因, 实现在同一体系中对不同基因的同时特异性识别和检测, 为多组分基因的识别和检测提供了一种新方法.

参考文献

- Hutter E, Pileni M P. Detection of DNA hybridization by gold nanoparticle enhanced transmission surface plasmon resonance spectroscopy. *J Phys Chem B*, 2003, 107: 6497-6499
- Mirkin C A, Letsinger R L, Mucic R C, et al. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 1996, 382: 607-609
- Liu J, Lu Y. Accelerated color change of gold nanoparticles assembled by DNAzymes for simple and fast colorimetric Pb^{2+} detection. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 12298-12305
- Liu J, Mazumdar D, Lu Y. A simple and sensitive "dipstick" test in serum based on lateral flow separation of aptamer-linked nanostructures. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 7955-7959
- Huang X H, El-Sayed I H, Qian Wei, et al. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 2115-2120
- Nusz G J, Marinakos S M, Curry A C, et al. Label-free plasmonic detection of biomolecular binding by a single gold nanorod. *Anal Chem*, 2008, 80: 984-989
- Parab H J, Chen H M, Lai T C, et al. Biosensing, cytotoxicity, and cellular uptake studies of surface-modified gold nanorods. *J Phys Chem C*, 2009, 113: 7574-7578
- Wang C G, Chen J J, Talavage T, et al. Gold nanorod/ Fe_3O_4 nanoparticle "Nano-Pearl-Necklaces" for simultaneous targeting, dual-, ode imaging, and photothermal ablation of cancer cells. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 2759-2763
- Norman R S, Stone J W, Gole A, et al. Targeted photothermal lysis of the pathogenic bacteria, *pseudomonas aeruginosa*, with gold nanorods. *Nano Lett*, 2008, 8: 302-306
- Wang L, Zhao W J, O'Donoghue M B, et al. Fluorescent nanoparticles for multiplexed bacteria monitoring. *Bioconjugate Chem*, 2007, 18: 297-301

- 11 Yang L J, Li Y B. Simultaneous detection of escherichia coli O157:H7 and salmonella typhimurium using quantum dots as fluorescence labels. *Analyst*, 2006, 131: 394–401
- 12 Yu C X, Irudayaraj J. Multiplex biosensor using gold nanorods. *Anal Chem*, 2007, 79: 572–579
- 13 Nikoobakht B, El-Sayed M A. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chem Mater*, 2003, 15: 1957–1962
- 14 Leal C, Moniri E, Pegado L, et al. Electrostatic attraction between DNA and a cationic surfactant aggregate. The screening effect of salt. *J Phys Chem B*, 2007, 111: 5999–6005

Simultaneous recognition and detection of multiplex genes by gold nanorod gene probes

Sun GuiMin¹, Liu Mei¹, Yang PeiHui^{1,2} & Cai JiYe^{1,2}

¹ Department of chemistry, Ji'nan University, Guangzhou 510632, China;

² Key Laboratory of Optoelectronic Information and Sensing Technologies of Guangdong Higher Education Institutes, Guangzhou 510632, China

Gold nanorods, with mean aspect ratios of 4 and 8, were synthesized by seed-mediated growth. Sequences of Antioncogene p53 and pTEN were used as model gene probes. Surface modification of gold nanorods with the different probe genes yielded gold nanorod gene probes. The Antioncogene p53 and pTEN gold nanorod gene probes both showed a weak transverse plasmon band at 520 nm and a strong longitudinal plasmon band at 800 and 1100 nm, respectively. Two different target gene sequences were detected, based on the recognition of target gene sequences by the gold nanorod gene probes, in one solution, simultaneously. The results showed that, in a PBS solution at pH 7.0 with 0.2 mol/L NaCl, the change in absorbance of the longitudinal plasmon band was related to the concentration of the target gene. The absorbance displayed a good linear relationship with the target gene concentration in the range of 9.0–30 nmol/L. In principle, the method presented here could be extended to detect multiple targets simultaneously using gold nanorod bioprobes of different aspect ratios.

gold nanorod, surface plasmon resonance, gene probe

doi: 10.1360/972010-884