

金纳米粒子与单链 DNA 的相互作用

孙莉萍¹, 张建锋¹, 李 辉¹, 王秀燕¹, 张召武¹, 王 霜¹, 张其清^{1,2}

(1. 厦门大学材料学院生物医学工程研究中心, 厦门市生物医学工程技术研究中心,
福建省生物医学工程重点实验室, 厦门 361005;

2. 中国医学科学院中国协和医科大学生物医学工程研究所, 天津市生物医学材料重点实验室, 天津 300192)

摘要 研究了金纳米粒子与单链 DNA 在不同 pH 值时的相互作用以及金纳米粒子与不同碱基序列单链 DNA 的相互作用. 结果表明, 在 pH 为 12.6 的强碱性条件下, 单链 DNA 能使金纳米粒子稳定分散在溶液中; 在 pH 为 1.4 的强酸性条件下, 单链 DNA 能保护金纳米粒子不发生融合, 而只发生团聚, 且团聚现象具有可逆性. 不同寡核苷酸对金纳米粒子的亲和力按 poly dA > poly dC > poly dT 的顺序依次减弱. 单链 DNA 对纳米金的保护作用强度与单链 DNA 的长度成正比.

关键词 金纳米粒子; 单链 DNA; 相互作用; ssDNA

中图分类号 O629.74; O648.14

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)01-0095-05

金纳米粒子(Gold nanoparticles, GNPs)以其独特的光学、电学性质以及生物亲和效应,在催化、传感器和 DNA 分析检测等方面表现出很多潜在的应用价值^[1~3],受到了化学、物理及生命科学等相关领域的广泛关注.研究表明,GNPs 表面既可与氨基发生非共价的静电吸附,又可与巯基形成很强的共价键. GNPs 和 DNA 形成复合物后,利用 GNPs 特殊的颜色效应及良好的导电性能或质量体积效应,通过光学、电化学、基因芯片及生物传感器等不同分析手段均可对特异核苷酸序列进行检测,为遗传性疾病的早期诊断提供重要依据.为了进一步改善基于 GNPs 的 DNA 检测技术,使特异核苷酸序列的检测手段更加简便、快捷、灵敏、检测成本更加低廉,需要对金纳米粒子与 DNA 之间的相互作用进行更深入的研究.用柠檬酸钠还原氯金酸法制备出的 GNPs 由于表面吸附了带负电荷的柠檬酸根离子而相互排斥,在溶液中处于均匀分散的稳定状态.但若加入一定量的盐离子,稳定状态即被打破,金纳米粒子发生团聚,溶液颜色立即由红色变为蓝灰色,而且这种变化是不可逆的.1996 年, Mirkin 等^[4]首次报道了 GNPs 在 DNA 的交联作用下的聚集现象.他将巯基修饰的单链 DNA 结合到 GNPs 上,通过 DNA 碱基的严格互补配对原则,识别带有互补序列的 GNPs,使 GNPs 相互交联,形成网状结构的超分子聚集体,体系颜色发生显著变化,且这种变化具有可逆性.若 DNA 发生解链,体系颜色即可恢复.随后又利用纳米金探针和单链 DNA 之间的“三明治”杂交方式,分别通过不同的分析手段对生物大分子进行检测分析^[5~11].这些研究手段均需对 GNPs 或 DNA 作复杂的表面修饰或标记,仪器设备价格昂贵.

本文通过微波合成法,经一步还原,制备出粒径均一、分散性较好的金纳米粒子,考察了 HCl 和 NaOH 对未作任何修饰的金纳米粒子与未进行修饰的单链 DNA (Single strand DNA, ssDNA)之间相互作用的影响,并探讨了不同序列和不同长度的 ssDNA 对 GNPs 溶液稳定性的影响.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)和柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)均为分析纯,购自广东汕头西陇化工

收稿日期: 2008-04-22.

基金项目: 福建省青年科技人才创新项目(批准号: 2006F3128)和厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室开放课题基金(批准号: 200602)资助.

联系人简介: 孙莉萍,女,博士,讲师,主要从事纳米材料及生物化学研究. E-mail: sunliping@xmu.edu.cn

张其清,男,教授,博士生导师,主要从事纳米材料、生物材料及药物控释等研究. E-mail: zhangqiq@xmu.edu.cn

厂; ssDNA 购自上海生工生物技术公司(序列列于表 1); 其它试剂为市售分析纯; 实验用水为去离子超纯水(电阻率 18.2 M Ω · cm).

Table 1 Oligonucleotides corresponding to the target sequence

ssDNA	Sequence
T ₁	5'-GAACAGCTTTGAGGTGCTTGTTCGCCTG-3'
poly dA ₅ , poly dA ₁₀ , poly dA ₂₀	Consisted of 5, 10, 20 adenines in length, respectively
poly dA ₃₀ , poly dC ₃₀ , poly dT ₃₀	Consisted of 30 nucleotides in length, respectively

Nikon 5400 型高清数码相机, Beckman DU800 型核酸蛋白分析仪, 微量石英比色皿(50 μ L), JEM 2100HC 型透射电子显微镜.

1.2 实验过程

1.2.1 金纳米粒子的制备 在 250 mL 锥形瓶中分别加入 94 mL 超纯水、1 mL 1% (质量分数) 氯金酸溶液和 5 mL 1% (质量分数) 柠檬酸三钠溶液, 室温下混匀, 立即放入微波炉中, 高火加热 1 min 左右, 使之快速沸腾; 再调至中火, 继续加热保持沸腾状态 5 min 后, 自然冷却至室温.

1.2.2 pH 值对 GNPs 与 ssDNA 相互作用的影响 取 1 μ L 50 μ mol/L 的 ssDNA(T₁), 加入到 40 μ L 的 GNPs 溶液中, 混匀后室温孵育 10 min; 再分别向各反应体系中加入 2 μ L 1 mol/L 的 HCl 或 NaOH 溶液, 迅速混匀后观察其颜色变化, 用于 UV-Vis 吸收光谱检测和透射电镜测试.

1.2.3 不同碱基序列对 GNPs 与 ssDNA 相互作用的影响 分别取 1 μ L 50 μ mol/L 的不同碱基序列的 ssDNA 与 40 μ L 的 GNPs 溶液于室温下作用 10 min 后, 再加入适量的 1 mol/L HCl, 迅速混匀后观察其颜色变化, 用于 UV-Vis 吸收光谱检测.

1.2.4 分析和测试 将 GNPs 样品滴在镀有炭膜的镍网上, 于 37 $^{\circ}$ C 烘干后置于样品台上, 用于 JEM-2100 透射电镜(TEM)观察, 仪器工作电压为 200 kV. 粒径分布采用 TEM 图像进行统计, 每次取 50 个金纳米粒子进行分析, 并按下式求得其粒径标准偏差(δ)和分散系数(ε).

$$\delta = \left[\sum_{i=1}^n (D_i - D)^2 / (n - 1) \right]^{1/2}, \quad \varepsilon = \delta / D$$

式中, δ 为标准偏差; D_i 为单个粒子的直径; D 为粒子的平均直径; n 为粒子数目. 用 Nikon 5400 数码相机拍照. 用 Beckman DU800 型核酸蛋白分析仪检测 GNPs 溶液的 UV-Vis 吸收光谱.

2 结果与讨论

2.1 金纳米粒子的制备

图 1 为 GNPs 的 TEM 照片. 从图 1 可以看出, 所制备的金纳米粒子呈规则的球形, 分散性很好, 粒径均一. 计算得知其平均粒径为 13.58 nm, 标准偏差 δ 为 0.945 nm, 分散系数 ε 为 0.070. UV-Vis 吸收光谱(图 2 谱线 c)表明, 其最大吸收峰在 520 nm 处, 与 Mirkin 等^[12]的报道一致, 且特征吸收峰很尖锐. 特征峰越窄, 表明粒径分布越均匀. 所制备的金纳米粒子相当稳定(pH = 6.8), 在室温下放置

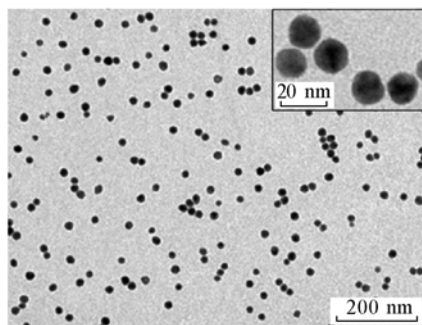


Fig. 1 TEM micrograph of gold nanoparticles(pH = 6.8)

Inset is the high-magnification image of the particles.

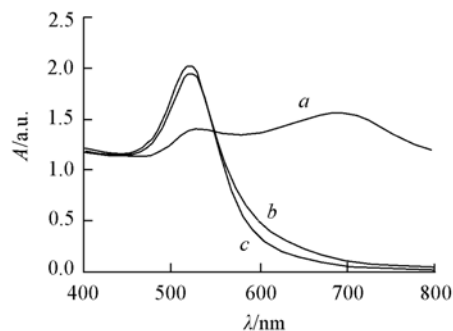


Fig. 2 UV-Vis absorption spectra of gold nanoparticles

a. GNPs at pH = 12.6; b. ssDNA-GNPs at pH = 12.6; c. GNPs at pH = 6.8.

1 年仍稳定存在, 颜色鲜红透亮.

2.2 NaOH 对 GNPs 与 ssDNA 相互作用的影响

一般情况下, 在 GNPs 溶液中加入 NaCl 后, 颜色会由红色变为灰色, 特征吸收峰也会明显红移. 向 GNPs 溶液中加入 NaOH 也可以使体系颜色立即发生变化. 如图 2 谱线 *a* 所示, 体系颜色变为蓝灰色(溶液 pH = 12.6), 特征吸收峰由 520 nm 红移至 700 nm, 电镜图片显示 GNPs 发生了团聚[图 3 (A)]. 但是, 如果 GNPs 先与 ssDNA(T_1)作用一定时间, 再加入等量的 NaOH, 体系颜色并未发生改变, 仍然呈酒红色, 特征吸收峰位于 522 nm 处(图 2 谱线 *b*). 透射电镜结果显示, GNPs 均处于分散状态, 没有发生团聚[图 3(B)], 说明 ssDNA 对 GNPs 的稳定性起到了很强的保护作用. ssDNA 直径仅 1 nm, 且在电镜下衬度很低, 因此不能通过 TEM 直接观察, 但 GNPs 与 ssDNA 作用后, 特征吸收峰由 520 nm 红移至 522 nm, 说明 ssDNA 与 GNPs 发生了相互作用, 使吸收峰发生红移. 推测可能的原因如下: ssDNA 在碱性条件下处于伸展状态, 碱基暴露在外, 而组成 DNA 序列的 4 种碱基 A, T, C, G 与 GNPs 表面均有不同程度的吸附能力^[13], 因此 ssDNA 被吸附到 GNPs 的表面, 且碱基上的磷酸基团带有负电荷, 使 GNPs 能够相互排斥而稳定分散在溶液中.

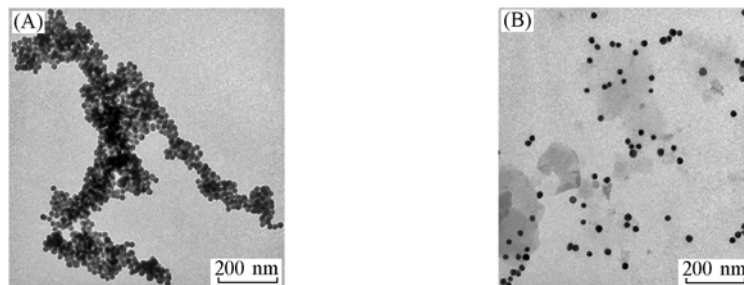


Fig. 3 TEM photographs of GNPs(A) and ssDNA-GNPs(B) at pH = 12.6

2.3 HCl 对 GNPs 与 ssDNA 相互作用的影响

HCl 对 GNPs 的影响更为独特. GNPs 溶液单独加入 HCl 后, 体系颜色慢慢由红色变得接近无色(溶液 pH = 1.4), 特征吸收峰基本消失(如图 4 谱线 *a*). 透射电镜观察发现, GNPs 形状发生了融合, 不再具备 GNPs 的特征[图 5(A)]. 如果 GNPs 先与 ssDNA(T_1)作用一定时间, 再加入 HCl, 体系的 颜色则变为蓝紫色, 吸收峰红移至 640 nm 左右(图 4 谱线 *b*). 透射电镜图像表明, 此时 GNPs 形状并没有发生大的变化, 只发生了团聚[图 5(B)]. Shi 等^[14]的报道曾指出 GNPs 由于具有特殊的理化性质, 在 HCl 中会发生缓慢的溶解. 因此, 没有 ssDNA 存在时, GNPs 在 HCl 的作用下, 发生了缓慢的融合; 而有 ssDNA 存在时, GNPs 受到了保护, 不再发生融合. 但是由于大量的 H^+ 消除了碱基上磷酸基团所带的负电荷, 因而 GNPs 发生了团聚,

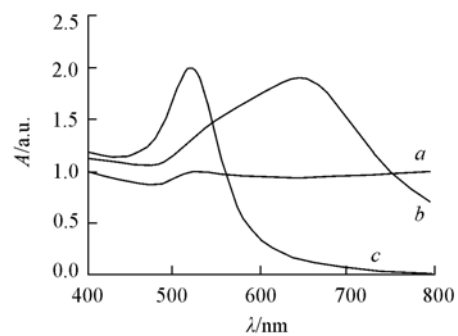


Fig. 4 UV-Vis absorption spectra of gold nanoparticles

a. GNPs at pH = 1.4; *b.* ssDNA-GNPs at pH = 1.4; *c.* GNPs at pH = 6.8.

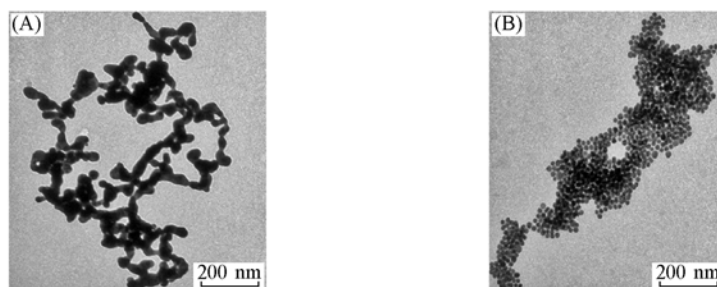


Fig. 5 TEM photographs of GNPs(A) and ssDNA-GNPs(B) at pH = 1.4

变为蓝紫色.

实验证实, HCl 所引起的这种颜色变化和团聚现象是一个可逆的过程. 图 6 表明, 加入 HCl 后再加入等量的 NaOH 至 pH 为 6.8 时, 体系颜色立即由紫色恢复为红色, UV-Vis 吸收光谱中的最大吸收峰也立刻由 607 nm 回移至 524 nm, 如此现象可以随着 HCl 和 NaOH 的交替加入而重复出现. zeta 电位检测结果表明(表 2), GNP 与 ssDNA 作用后再加入 HCl, 其 zeta 电位立即由 -37.8 mV 降至 -12.6 mV, 再加入等量的 NaOH 后, zeta 电位从 -12.6 mV 恢复至 -29.5 mV. 推测原因可能是 NaOH 的加入, 起到了“中和” H^+ 的作用, 使 ssDNA 上的负电荷得以恢复, 使得 GNP 很快排斥开来, 重新分散在溶液中. 当再加入 HCl 至一定浓度时, ssDNA 负电荷消失而失去排斥力, 再次引起 GNP 聚集.

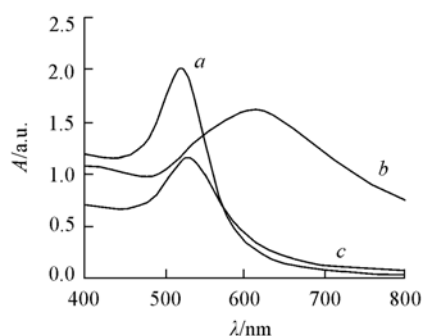


Fig. 6 UV-Vis absorption spectra of gold nanoparticles in a reversible process

a. GNP 于 pH = 6.8; b. ssDNA-GNP 于 pH = 1.4;
c. ssDNA-GNP 于 pH = 6.8.

Table 2 Zeta-potential change of ssDNA-GNPs

Sample	Zeta potential/mV
13 nm GNP + ssDNA	-37.8
13 nm GNP + ssDNA + HCl	-12.6
13 nm GNP + ssDNA + HCl + NaOH	-29.5

2.4 不同碱基序列的 ssDNA 与 GNP 的相互作用

选用具有代表性的碱基序列 poly dA₃₀, poly dC₃₀ 和 poly dT₃₀ 分别与 GNP 作用后加入 HCl, 观察不同碱基序列的 ssDNA 所引起的不同作用效果. 由图 7 结果可见, poly dA₃₀ 对 GNP 的稳定性保护作用最好, 颜色只发生了少许改变, 吸收峰红移程度较小, 然后依次是 poly dC₃₀ 和 poly dT₃₀, 表明不同寡核苷酸对 GNP 的吸附能力按 poly dA₃₀ > poly dC₃₀ > poly dT₃₀ 的顺序依次减弱, 与 Hsing 等^[7] 的研究结果一致. 需要指出的是, poly dC 由于在酸性条件下易形成四聚体^[15-17], 引起金纳米粒子聚集, 而使 poly dC 的保护作用降低.

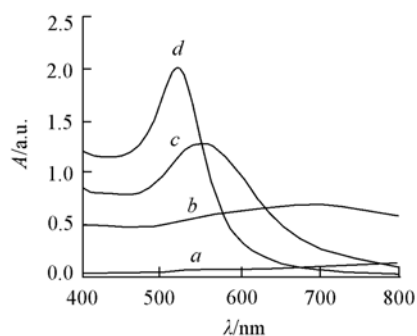


Fig. 7 UV-Vis absorption spectra of gold nanoparticles with poly dA₃₀, poly dC₃₀ and poly dT₃₀

a. Poly dT₃₀-GNPs at pH = 1.4; b. poly dC₃₀-GNPs at pH = 1.4; c. poly dA₃₀-GNPs at pH = 1.4;
d. GNP 于 pH = 6.8.

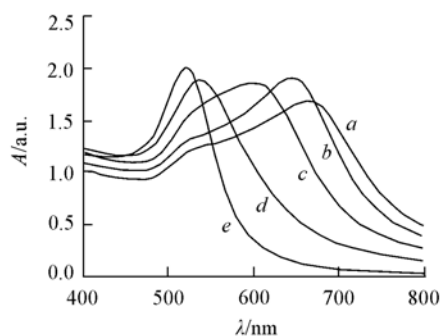


Fig. 8 UV-Vis absorption spectra of gold nanoparticles with different ssDNA in length

a. Poly dA₅-GNPs at pH = 1.4; b. poly dA₁₀-GNPs at pH = 1.4; c. poly dA₂₀-GNPs at pH = 1.4;
d. poly dA₃₀-GNPs at pH = 1.4; e. GNP 于 pH = 6.8.

由于 ssDNA 对 GNP 的保护作用还可能受到其碱基序列长度的影响, 因此选用了典型的不同长度的寡核苷酸链 poly dA₅, poly dA₁₀, poly dA₂₀ 和 poly dA₃₀, 分别与 GNP 进行作用. 加入 HCl 后, 结果如图 8 所示. 随着单核苷酸链长度的增加, poly dA-GNP 体系颜色逐渐由蓝向紫转变, 最大吸收峰的位置越来越接近 520 nm, 表明在一定范围内, 较长的 ssDNA 对 GNP 具有更强的保护作用. 因此, ssDNA

对 GNPs 的作用效果不仅与碱基的序列密切相关, 而且与 DNA 的长度有关。

参 考 文 献

- [1] Valden M. , Lai X. , Goodman D. W. . Science[J], 1998, **281**(5383) : 1647—1650
- [2] MIAO Qian(缪谦), JIN Bao-Kang(金葆康), LIN Xiang-Qin(林祥钦). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2000, **21**(1) : 27—30
- [3] CAI Hong(蔡宏), WANG Yan-Qin(王延琴), HE Pin-Gang(何品刚), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2003, **24**(8) : 1390—1394
- [4] Mirkin C. A. , Letsinger R. L. , Mucic R. C. , *et al.* . Nature[J], 1996, **382**(6592) : 607—609
- [5] Elghanian R. , Storhoff J. J. , Mucic R. C. , *et al.* . Science[J], 1997, **277**(5329) : 1078—1081
- [6] Taton T. A. , Mirkin C. A. , Letsinger R. L. . Science[J], 2000, **289**(5485) : 1757—1760
- [7] Park S. J. , Taton T. A. , Mirkin C. A. . Science[J], 2002, **295**(5559) : 1503—1506
- [8] Cao Y. W. C. , Jin R. C. , Mirkin C. A. . Science[J], 2002, **297**(5586) : 1536—1540
- [9] Hill H. D. , Mirkin C. A. . Nat. Protoc. [J], 2006, **1**(1) : 324—336
- [10] Rosi N. L. , Giljohann D. A. , Thaxton C. S. , *et al.* . Science[J], 2006, **312**(5776) : 1027—1030
- [11] Park S. Y. , Lytton-Jean A. K. R. , Lee B. , *et al.* . Nature[J], 2008, **451**(7178) : 553—556
- [12] Storhoff J. J. , Lazarides A. A. , Mirkin A. A. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J], 2000, **122**(19) : 4640—4650
- [13] Storhoff J. J. , Elghanian R. , Mirkin C. A. . Langmuir[J], 2002, **18**(17) : 6666—6670
- [14] Shi H. Z. , Bi H. J. , Yao B. D. , *et al.* . Appl. Surf. Sci. [J], 2000, **161**(1/2) : 276—278
- [15] Gehring K. , Leroy J. L. , Gueron M. . Nature[J], 1993, **363**(6429) : 561—565
- [16] Kang C. H. , Berger I. , Lockshin C. , *et al.* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA[J]. 1994, **91**(24) : 11636—11640
- [17] Gilbert D. E. , Feigon J. . Curr. Opin. Struct. Biol. [J], 1999, **9**(3) : 305—314

Interaction Between Gold Nanoparticles and ssDNA

SUN Li-Ping^{1*}, ZHANG Jian-Feng¹, LI Hui¹, WANG Xiu-Yan¹,
ZHANG Zhao-Wu¹, WANG-Shuang¹, ZHANG Qi-Qing^{1,2*}

(1. Research Center of Biomedical Engineering, College of Materials, Xiamen University, Technology Research Center of Biomedical Engineering of Xiamen, Key Laboratory of Biomedical Engineering of Fujian, Xiamen 361005, China;

2. Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

Abstract The interaction between unmodified gold nanoparticles and single-stranded DNA (ssDNA) was studied at different pH value. And the sequence-dependent stability of ssDNA-GNPs complex was investigated. GNPs precipitated from red colloid solution in the form of aggregation after alkalization with NaOH or dissolve after acidification with HCl. Both processes were irreversible. If the same particles were incubated with ssDNA, ssDNA-GNPs complex were stable against NaOH-induced aggregation at pH = 12.6, and aggregated at pH = 1.4, while redispersed at pH = 12.6. It was concluded that unmodified GNPs could be coated by unmodified ssDNA, which protected GNPs dispersing in solution at pH = 12.6, and prevented GNPs from dissolving at pH = 1.4, as measured by TEM and UV-Vis absorption spectrum. The binding affinities of oligonucleotides to GNPs were different in the order of poly dA > poly dC > poly dT. Moreover, longer ssDNA had stronger protective effect to gold nanoparticles. HCl-induced GNPs aggregation could be an effective method to identify the diversity of deoxyribonucleotides in ssDNA sequences.

Keywords Gold nanoparticle; Single-stranded DNA; Interaction; ssDNA

(Ed. : H, J, Z)