

文章编号: 1674-5566(2013)03-0370-06

## 新型纳米复合物 17S-AuNPs 制备及特性研究

胡春玲<sup>1,2</sup>, 陶妍<sup>1,2</sup>, 薛斌<sup>1,2</sup>, 吴继魁<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

**摘要:** 利用配体交换反应将巯基修饰的“8-17”脱氧核酶(“8-17” DNAzyme/“8-17” Dz)底物链(17S)通过 Au-S 共价键自组装在纳米金胶(AuNPs)表面, 制得一种新型纳米复合物 17S-AuNPs。利用紫外-可见吸收光谱和动态光散射(dynamic light scattering, DLS)对其进行了表征。紫外-可见吸收光谱表明 17S-AuNPs 在 523 nm 波长处有表面等离子共振峰, 较 AuNPs 红移了 3 nm; 经 DLS 测定的 17S-AuNPs 的流体动力学平均直径为 38.6 nm, 较 AuNPs 的 21.8 nm 增大了 16.8 nm。另外, 利用紫外-可见光谱和目视比色法对 AuNPs 和 17S-AuNPs 的耐盐稳定性分别进行了比较研究, 结果表明: 随着水溶液中 Na<sup>+</sup> 浓度的逐渐提高, AuNPs 在 600 nm 处的吸收峰不断增强, 溶液颜色逐渐由红变成蓝紫色; 而 17S-AuNPs 在 600 nm 处并未出现吸收峰, 且溶液颜色一直保持为红色; 表明 17S-AuNPs 纳米复合物的稳定性较 AuNPs 显著提高。

**研究亮点:** 作为新型金属离子特异性识别元件, DNAzyme 具有高效催化功能, 稳定性好, 且易于化学合成和修饰等特点, 受到了分析工作者的高度关注。结合 AuNPs 独特的光学-电子特性, 本文制备了一种新型纳米生物探针—DNAzyme-AuNPs 纳米复合物, 并对其稳定性进行了探讨。

**关键词:** 脱氧核酶; 纳米金胶; 自组装; 稳定性

**中图分类号:** O 657.3

**文献标志码:** A

纳米金胶(AuNPs)具有优良的生物兼容性, 既能与氨基非共价键吸附, 也可以与巯基共价结合, 从而使其能与多种生物识别元件相互结合, 形成纳米复合探针, 用于多种靶目标(如 DNA、蛋白质、重金属离子等)的高灵敏检测。AuNPs 的消光系数极高, 比普通有机发色基团高出 3~5 个数量级<sup>[1]</sup>。近年来, 国内外研究者利用这一独特光学特性, 结合生物识别元件(aptamer、DNAzyme、protein 等)的特异性, 构建了比色<sup>[1-5]</sup>、荧光<sup>[5-9]</sup>及电化学<sup>[10-12]</sup>等多种生物传感体系。MIRKIN 等<sup>[2]</sup>和 ELGHANIAN 等<sup>[3]</sup>将两条不同序列的 DNA 探针与 AuNPs 进行自组装形成 DNA-AuNPs 纳米复合物, 当它们与其完全互补的靶 DNA 序列发生杂交后形成网状聚集体, 导致 AuNPs 溶液由红色变为蓝色, 利用该颜色变化实现了对靶 DNA 的高灵敏检测; WANG 等<sup>[5]</sup>利用金属离子诱导的单链 DNA(ssDNA)构象的改变

以及 AuNPs 与 ssDNA、dsDNA 之间静电亲和力的差异, 构建了一种高效检测 Hg<sup>2+</sup> 的荧光和比色的双传感体系; FEI 等<sup>[10]</sup>利用 DNA-AuNPs 复合物修饰的电极对肌红蛋白(myoglobin, Mb)进行直接电化学和电催化研究。

脱氧核酶(deoxyribozyme, DNAzyme/Dz)是一类利用体外分子进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)得到<sup>[13-14]</sup>具有催化功能的 DNA 分子。它们对 Pb<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、UO<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup> 等二价金属离子具有很好的特异性和灵敏性, 目前已成为构建重金属离子生物传感器的研究热点。BROWN 等<sup>[15]</sup>和 LIU 和 LU<sup>[16]</sup>以 Dz 为特异性识别元件, 结合比色、荧光等传感平台, 构建了高效、灵敏检测 UO<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup> 等金属离子的生物传感体系; ZHANG 等<sup>[17]</sup>利用荧光染料 Picogreen(PG)与“8-17”Dz 构建一种无需标记、简单高效的 Pb<sup>2+</sup> 荧光生物传

收稿日期: 2012-10-19 修回日期: 2013-02-22

基金项目: 上海市自然科学基金(11ZR1415400); 上海市科学技术委员会工程中心建设项目(11DZ2280300)

作者简介: 胡春玲(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物传感器。E-mail: m100207334@st.shou.edu.cn

通信作者: 吴继魁, E-mail: jkqu@shou.edu.cn

感器;WU 等<sup>[18]</sup>通过量子点 (quantum dots, QDs) 标记的 QDs-Dz 实现了  $\text{Pb}^{2+}$  与  $\text{Cu}^{2+}$  离子的多重检测。

利用 AuNPs 高效的荧光淬灭性能以及 Dz 高效的催化功能,构建一种基于 Dz-AuNPs 的新型纳米生物荧光探针,对实现重金属离子的高灵敏度、高选择性检测具有重要意义。本文利用配体交换反应将巯基修饰的“8-17”脱氧核酶(“8-17” DNzyme/“8-17” Dz) 底物链(17S)通过 Au-S 共价键自组装在 AuNPs 表面,制得一种新型纳米复合物 17S-AuNPs,并利用动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 和紫外-可见吸收光谱对其进行了表征。另外,利用紫外-可见光谱对 AuNPs 和 17S-AuNPs 的耐盐稳定性进行了比较研究。

## 1 实验方法

### 1.1 仪器与试剂

巯基修饰的“8-17” Dz 底物链(17S)由大连 TaKaRa 生物工程有限公司合成,经 HPLC 纯化,其序列为 5'-ACTCACTATrAGGAAGAGATGT TTTTTTTTT-( $\text{CH}_2$ )<sub>6</sub>-HS-3';  $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (99.99%)、Tris、NaCl 购自 Sigma-Aldrich 公司,柠檬酸三钠及其他化学试剂购自上海国药集团化学试剂有限公司,均为分析纯。实验用水为 MilliQ 超纯水(比电阻达 18.2 M $\Omega$ ,美国密理博有限公司);恒温孵育器(Eppendorf,德国)。透射式电子显微镜(JEM-2100,日本)用于测定制备的 AuNPs 粒径大小;通过纳米粒度-Zeta 电位分析仪(Zetasizer nano ZS,英国马尔文公司)对 AuNPs 和 17S-AuNPs 进行动态光散射(dynamic light scattering, DLS)表征;AuNPs 和 17S-AuNPs 耐盐稳定性的比较研究在双光束紫外可见分光光度计(TU-1901,北京普析通用仪器公司)上进行。

### 1.2 13 nm AuNPs 的制备

纳米金胶(AuNPs)的制备参考文献[19],所有玻璃仪器先用去污剂洗涤干净,再用王水浸泡过夜,用大量的去离子水和 MilliQ 水冲洗后,于 121  $^{\circ}\text{C}$  灭菌 20 min,烘干备用。将 100 mL 1.0 mmol/L 的  $\text{HAuCl}_4$  溶液加热至沸,磁力搅拌下迅速加入 10 mL 38.8 mmol/L 的柠檬酸三钠溶液,在搅拌的状况下继续加热回流 20 min,黄色的液体逐渐转变为黑色,然后变紫,最后成为红色,移去热源继续搅拌冷却至室温,用 0.22  $\mu\text{m}$  的膜进

行过滤,于棕色瓶中 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。用紫外-可见分光光度计对实验制备的 AuNPs 进行扫描,其最大吸收峰在 520 nm 处,依据 AuNPs 的消光系数为  $2.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  可得出 AuNPs 的浓度约为 10 nmol/L。TEM 统计结果显示 AuNPs 平均粒径约为  $(13 \pm 0.1) \text{ nm}$ 。

### 1.3 17S-AuNPs 纳米复合物的制备

实验所需离心管用 12 mol/L 的 NaOH 室温下浸泡 1 h,然后用大量的去离子水和 MilliQ 水冲洗。将 17S (32  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{mol/L}$ ) 逐滴滴加到 AuNPs 溶胶中(2 200  $\mu\text{L}$ , 6.7 nmol/L) 在恒温孵育器中以 350 r/min 室温反应 16 h,然后再加入 8  $\mu\text{L}$  的 500 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH = 8.2) 和 32  $\mu\text{L}$  的 1 mol/L NaCl,继续以 350 r/min 振荡室温反应 28 h 后,再逐滴滴加 4  $\mu\text{L}$  的 500 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH = 8.2) 和 90  $\mu\text{L}$  的 1 mol/L NaCl,室温下以同样的振荡速率反应 18 h, Tris-HCl 的最终浓度为 5 mmol/L, NaCl 的最终浓度为 100 mmol/L,使 17S 充分组装在 AuNPs 表面。溶液中游离的 17S 通过离心的方式除去(16 110 g, 20 min),然后用 10 mmol/L 的 Tris-HCl (pH = 8.2) 以同样的转速和时间分别洗涤三次,最后将其重新分散于 10 mmol/L Tris-HCl (200  $\mu\text{L}$ , pH = 8.2, 100 mmol/L NaCl), 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

## 2 结果与讨论

硫醇极易与 Au 基底形成 Au-S 共价键,并放出大量的热,这样可以把部分已经吸附的分子推在一起形成紧密堆积的有序组装: $\text{RS-H} + \text{Au}_n = \text{RS}^-\text{Au}^+\text{Au}_n^0 + 1/2\text{H}_2$ <sup>[20]</sup>,基于此机理,在 17S 的 3'端修饰上巯基,使之形成巯基化寡核苷酸探针,从而有效与 AuNPs 相结合,以达到制备 AuNPs 纳米复合物的目的,它们的共价键合过程如图 1 所示。

### 2.1 AuNPs 及其纳米复合物 17S-AuNPs 的表征

17S-AuNPs 纳米复合物成功制备的先决条件很大程度上取决于所使用 AuNPs 的质量,如 AuNPs 粒径大小不一、表面电荷分布不均等因素都可能自组装操作的失败,因而首先对所制备的 AuNPs 进行了表征。如图 2 所示,实验所制备 AuNPs 呈酒红色,电子透射电镜(TEM)结果显示 AuNPs 颗粒粒径大小均一,且都为比较规整的



AuNPs 的稳定性,对发挥其生物探针的分析功能具有重要意义。

采用紫外-可见吸收光谱法与目视比色法两种手段,对 17S-AuNPs 和 AuNPs 的稳定性分别进行了考察。在紫外-可见吸收光谱法中,分别向 AuNPs 和 17S-AuNPs 中依次滴加 5 mol/L 的 NaCl 溶液,并同时记录它们的紫外-可见光谱。结果发现,随着水溶液中  $\text{Na}^+$  浓度不断增大,AuNPs 在 520 nm 波长处的等离子共振峰强度不断降低,同时在 600 ~ 700 nm 波长范围内的吸收峰不断增强(图 5a);而同样实验条件下的 17S-AuNPs 并未出现此现象,吸收峰一直保持在 520 nm 左右(图 5b)。这说明随着溶液盐度的不断增大,AuNPs 发生了聚集,而 17S-AuNPs 却仍旧处于良好的分散状态,即 17S-AuNPs 的稳定性较 AuNPs 得到了很大程度上的提高。

在目视比色法中,实验分为 A 组: AuNPs 和

B 组: 17S-AuNPs,就  $\text{Na}^+$  浓度与他们的颜色变化进行了对比研究(图 5c)。每组取 6 支离心管,分别加入相同体积的 AuNPs 和 17S-AuNPs,各组依次加入 0  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、30  $\mu\text{L}$ 、40  $\mu\text{L}$  和 50  $\mu\text{L}$  不同体积 5 mol/L 的 NaCl 溶液,结果显示: A 组中,随着体系中离子强度的逐渐加强,AuNPs 逐渐由红色变成蓝紫色,这表明体系中的  $\text{Na}^+$  中和了 AuNPs 表面的负电荷,使之发生了聚集,因而红光被吸收而蓝光被反射出来;对于 B 组,6 支离心管中的 17S-AuNPs 均呈现红色,表明此离子强度并未能引起 17S-AuNPs 的聚集,这是因为修饰在 AuNPs 表面的 17S 所含的磷酸基团带有大量的负电荷,增大了 AuNPs 表面的负电荷密度,从而提高了 17S-AuNPs 的耐盐稳定性。实际上当溶液中的  $\text{Na}^+$  浓度达 300 mmol/L 时,17S-AuNPs 仍保持稳定的红色分散态。

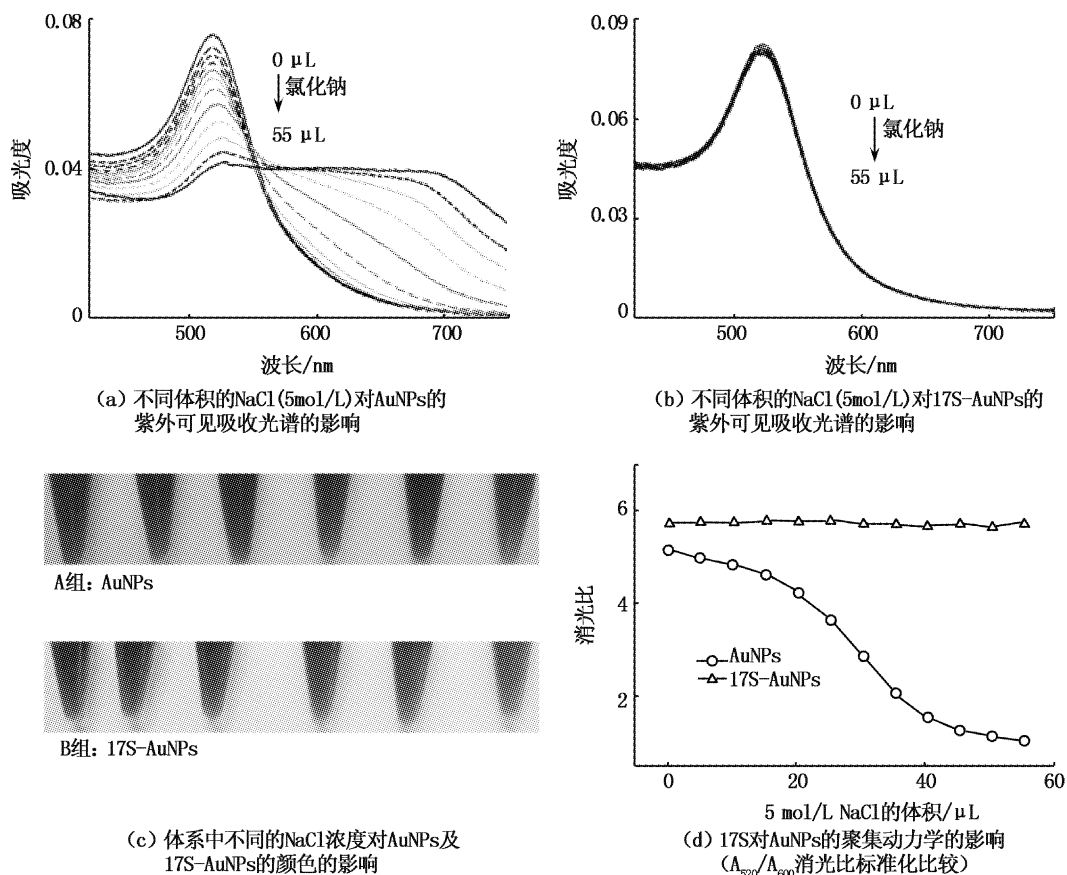


图 5 17S-AuNPs 的稳定性研究

Fig. 5 Stability study of 17S-AuNPs

图 (c) 从左到右每支离心管中加入的 5 mol/L NaCl 的体积依次为 0, 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{L}$ , 实验测定条件为 10 mmol/L Tris-HCl, pH = 7.2。

为更清晰的表明 17S 表面自组装对 AuNPs 稳定性的影响,实验就 AuNPs 和 17S-AuNPs 的消光比  $A_{520}/A_{600}$  随着体系中所滴加 NaCl 浓溶液的体积变化趋势进行了比较分析(图 5d)。从图 5d 可以看出,随着体系中离子强度的不断增强,17S-AuNPs 的消光比无明显变化。而 AuNPs 在低离子浓度时变化缓慢,在高离子浓度时有较大趋势的下滑。该结果更直观表明,17S-AuNPs 的耐盐稳定性较 AuNPs 有了显著提高。

### 3 小结

DNAzyme 具有高效的催化性能与金属特异性,近年来在生物传感、医药及基因治疗等众多高科技领域得到高度的关注。另外,AuNPs 具有优异的光学和电子性能,在电子学、药物诊断、探针、传感以及光学等诸多领域有着广泛的应用。本文基于此二者的优势性能,将 DNAzyme 与 AuNPs 通过 Au-S 共价键组装为一体,制得一种新型纳米复合物 17S-AuNPs,并以 AuNPs 作参照离子,对其进行了表征和稳定性研究。结果表明:(1) UV-Vis 和 DLS 结果均显示 17S-AuNPs 的粒径增大;(2) UV-Vis 分析数据及比色结果显示同等离子强度下,17S-AuNPs 的消光比  $A_{520}/A_{600}$  基本无变化,且溶液颜色一直保持为红色,而 AuNPs 则呈现较大的下滑,同时,溶液颜色逐渐由红色变为蓝紫色。17S-AuNPs 的耐盐稳定性较 AuNPs 有了很大提高,这拓宽了其在比色、电化学、荧光等诸多分析领域的应用范围,同时若将实验中的 17S 更换成其他的底物或适配子,可应用于 DNA、蛋白质以及小分子等靶物质的检测。

#### 参考文献:

- [1] LIU J W, LU Y. Accelerated color change of gold nanoparticles assembled by DNAzymes for simple and fast colorimetric  $Pb^{2+}$  detection [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126 (39): 12298 - 12305.
- [2] MIRKIN C A, LETSINGER R L, MUCIC R C, et al. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials [J]. *Letters to Nature*, 1996, 382 (15): 607 - 609.
- [3] ELGHANIAN R, STORHOFF J J, MUCIC R C, et al. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles [J]. *Science*, 1997, 277(22): 1078 - 1081.
- [4] WU J K, LI L Y, ZHU D, et al. Colorimetric assay for mercury (II) based on mercury-specific DNA-functionalized gold nanoparticles [J]. *Analytical Chimica Acta*, 2011, 694 (1/2): 115 - 119.
- [5] WANG H, WANG Y X, JIN J Y, et al. Gold nanoparticle-based colorimetric and "turn-on" fluorescent probe for mercury (II) ions in aqueous solution [J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(23): 9021 - 9028.
- [6] ZHENG D, SEFEROS D S, GILJOHANN D A, et al. Aptamer nano-ares for molecular detection in living cells [J]. *Nano Letters*, 2009, 9(9): 3258 - 3261.
- [7] KIM J H, HAN S H, CHUNG B H, Improving  $Pb^{2+}$  detection using DNAzyme-based fluorescence sensors by pairing fluorescence donors with gold nanoparticles [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26(5): 2125 - 2129.
- [8] GUO Y M, WANG Z, SHAO H W, et al. Stable fluorescent gold nanoparticles for detection of  $Cu^{2+}$  with good sensitivity and selectivity [J]. *Analyst*, 2012, 137(2): 301 - 304.
- [9] SHANG L, YIN J Y, LI J, et al. Gold nanoparticle-based near-infrared fluorescent detection of biological thiols in human plasma, *Biosensors and Bioelectronics* [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 25(2): 269 - 274.
- [10] FEI W W, ZHANG Y, SUN X M, et al. Direct electrochemistry and electrocatalysis of myoglobin immobilized on DNA-gold nanoparticle clusters composite film [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2012, 675: 5 - 10.
- [11] AHAMMAD A J S, CHOI Y H, KOH K, et al. Electrochemical detection of cardiac biomarker troponin I at gold nanoparticle-modified ITO electrode by using open circuit potential [J]. *International Journal of Electrochemical Science*, 2011, 6: 1906 - 1916.
- [12] WU S, ZHONG Z Y, WANG D, et al. Gold nanoparticle-labeled detection antibodies for use in an enhanced electrochemical immunoassay of hepatitis B surface antigen in human serum [J]. *Microchimica Acta*, 2009, 166(3/4): 269 - 275.
- [13] TUERK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. *Science*, 1990, 249(4968): 505 - 510.
- [14] FAMULOK M. Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1999, 9(3): 324 - 329.
- [15] BROWN A K, LIU J W, He Y, et al. Biochemical characterization of a uranyl ion-specific DNAzyme [J]. *A European Journal of Chemical Biology*, 2009, 10(3): 486 - 492.
- [16] LIU J W, LU Y, Rational design of "turn-on" allosteric DNAzyme catalytic beacons for aqueous mercury ions with ultrahigh sensitivity and selectivity [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46(40): 7587 - 7590.
- [17] ZHANG L B, HAN BY, LI T, et al. Label-free DNAzyme-based fluorescing molecular switch for sensitive and selective detection of lead ions [J]. *Chemical Communications*,

- 2011, 4(11):3099–3101.
- [18] WU C S, OO M K K, FAN X D. Highly sensitive multiplexed heavy metal detection using quantum-dot-labeled DNazymes [J]. ACS NANO, 2010, 4 (10): 5897–5904.
- [19] L IU J W, LU Y. Preparation of aptamer-linked gold nanoparticle purple aggregates for colorimetric sensing of analytes [J]. Nature Protocols, 2006, 1(1): 246–252.
- [20] 吴迪,吴健. 金-硫键自组装生物分子膜[J]. 化学通报, 2004,2(2): 132–137.
- [21] 张立德,牟季美. 纳米材料科学[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社, 1994.
- [22] RODRIGUEZ-FERNANDEZ J, PEREZ-JUSTE J, LIZ-MARZAN L M, et al. Dynamic light scattering of short Au-Rods with low aspect ratio [J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2007, 111(13): 5020–5025.
- [23] DEMERS L M, MIRKIN C A, MUCIC R C, et al. A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization effect of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles [J]. Analytical Chemistry, 2000, 72(22): 5535–5541.

## Preparation, characterization and stability of “8-17” DNzyme substrate-gold nanoparticle conjugates

HU Chun-ling<sup>1,2</sup>, TAO Yan<sup>1,2</sup>, XUE Bin<sup>1,2</sup>, WU Ji-kui<sup>1,2</sup>

(1. College of Food and Science Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** “8-17” DNzyme substrate-gold nanoparticles conjugates (17S-AuNPs) were prepared by ligand exchanged reaction. It was characterized using dynamic light scattering (DLS) and UV-Vis absorption spectrum. The results indicated that the well-dispersed gold nanoparticles showed a surface plasma peak at 520 nm in the UV-Vis absorption spectrum, whereas the peak of 17S-AuNPs conjugates red shifted to wavelength 523 nm. Meanwhile, the hydrodynamic radius of AuNPs and 17S-AuNPs were confirmed to be 21.8 nm and 38.6 nm, respectively, using DLS. Moreover, the stability toward salt-induced aggregation of AuNPs and 17S-AuNPs was further investigated, respectively. As the concentrations of Na<sup>+</sup> increased gradually, the absorptiom peak of AuNPs increased at 600 nm, following with a color change from red to blue. For 17S-AuNPs a peak at 600 nm is not observed, and the color of the 17S-AuNPs solution keeps red. The aforementioned results indicated that 17S-AuNPs showed a higher stability than that of AuNPs.

**Key words:** DNzyme; gold nanoparticle; self-assembly; stability