

# 基于纳米金复合探针的基因芯片膜转印检测法

李海燕<sup>1,2</sup>, 景奉香<sup>2</sup>, 高秋月<sup>1</sup>, 贾春平<sup>2</sup>, 陈季武<sup>1</sup>, 金庆辉<sup>2</sup>, 赵建龙<sup>2</sup>

1 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062

2 中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 上海 200050

**摘要:** 建立了一种基于纳米金复合探针的基因芯片膜转印核酸检测新方法。首先, 用纳米金颗粒同时标记检测探针 P2 和两种长短不同且生物素化的信号探针 (T10, T40), 其中检测探针与靶 DNA 5'端互补, 两种信号探针起信号放大作用。当靶 DNA 分子存在时, 芯片表面捕捉探针 P1 (与靶 DNA 分子 3'端互补) 通过碱基互补配对原则结合靶 DNA 分子, 将其固定于芯片上, 同时检测探针通过与靶 DNA 5'端互补配对将纳米金复合探针结合于芯片表面, 结果在芯片表面形成“三明治”结构, 后通过链霉亲和素-生物素反应, 使芯片表面对应有靶 DNA 分子的部位结合上碱性磷酸酶, 最后利用 BCIP/NBT 显色系统使芯片表面信号结果镜面转印至尼龙膜表面。当检测探针和信号探针摩尔比为 1:10, T10 和 T40 摩尔比为 9:1 时可以检测 1 pmol/L 合成靶 DNA 分子或 0.23 pmol/L 结核分枝杆菌 16S rDNA PCR 扩增产物, 检测结果通过普通的光学扫描仪读取或肉眼直接判读信号有无。本芯片检测系统灵敏度高, 操作方法简单、快速, 不需要特殊仪器设备, 在生物分子的检测方面具有较高的应用价值。

**关键词:** 纳米金复合探针, 基因芯片膜转印检测法, 杂交, DNA 检测

## Membrane transfer-based colorimetric DNA detection using enzyme modified gold nanoparticles

Haiyan Li<sup>1,2</sup>, Fengxiang Jing<sup>2</sup>, Qiuyue Gao<sup>1</sup>, Chunping Jia<sup>2</sup>, Jiwu Chen<sup>1</sup>, Qinghui Jin<sup>2</sup>, and Jianlong Zhao<sup>2</sup>

1 School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China

2 Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China

**Abstract:** We report here a novel membrane transfer-based DNA detection method, in which alkaline phosphatase labeled gold nanoparticle (AuNP) probes were used as a means to amplify the detection signal. In this method, the capture probe P1, complimentary to the 3' end of target DNA, was immobilized on the chip. The multi-component AuNP probes were prepared by co-coating AuNPs with the detecting probe P2, complimentary to the 5' end of target DNA, and two biotin-labeled signal probes (T10 and T40) with different lengths. In the presence of target DNA, DNA hybridization led to the attachment of AuNPs on the chip surface where specific DNA sequences were located in a “sandwich” format. Alkaline phosphatase was then introduced to the surface via biotine-streptavidin interaction. By using BCIP/NBT alkaline phosphatase color development kit, a colorimetric DNA detection was achieved through membrane transfer. The signal on the membrane was then detected by the naked eye or an ordinary optical

Received: March 1, 2010; Accepted: May 13, 2010

Supported by: Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Sciences (No. KG CX2-5YW-111-2).

Corresponding author: Fengxiang Jing. Tel/Fax: +86-21-62511070-8706; E-mail: jingfx@mail.sim.ac.cn

中国科学院知识创新工程重要方向项目 (No. KG CX2-5YW-111-2) 资助。

scanner. The method provided a detection of limit of 1 pmol/L for synthesized target DNA and 0.23 pmol/L for PCR products of *Mycobacterium tuberculosis* 16S rDNA when the ratio of probes used was 9:1:1 (T10:T40:P2). The method described here has many desirable advantages including high sensitivity, simple operation, and no need of sophisticated equipment. The method can be potentially used for reliable biosensings.

**Keywords:** gold nanoparticle probes, memberane transfer-based DNA chip, hybridization, DNA detection

基因芯片技术是上世纪 90 年代初发展起来的一种全新的生物微量分析技术。目前通用的基因芯片技术,生物样品 DNA 需经 PCR 扩增,且多采用荧光素或同位素为信号报告分子,均不同程度地存在着灵敏度不高、较高的仪器设备要求、操作复杂、易污染等缺陷,从而限制了该技术在医学临床诊断方面的应用<sup>[1-2]</sup>。

纳米技术是 20 世纪 80 年代发展起来的一门新兴科技。纳米金颗粒 (Gold nanoparticles) 是指直径为纳米范围的金颗粒制作简单,且具有很好的生物兼容性,可以通过弱的相互作用与生物大分子结合,也可以通过化学键与生物大分子偶联而不改变其生物活性,多年来一直在生物科学领域应用广泛。随着纳米技术的进一步发展,由于纳米金颗粒直径小、比表面积大,因此单位面积可以连接数量很多的生物分子起到信号放大的作用,并且标记了纳米金颗粒的生物活性分子的结合性质也得到了很大的提高<sup>[2-3]</sup>,这种利用纳米金作为探针进行生物分子的检测与传统检测方法相比有诸多优点<sup>[4-5]</sup>。Mirkin CA 课题组报道的“生物条形码扩增技术”(Bio-bar-code amplification, BCA) 就是一例将纳米金颗粒与多种生物分子结合应用于生物学检测的典范<sup>[6-7]</sup>,纳米金不再仅仅作为信号分子,而作为一种信号分子的载体,为特定 DNA 序列检测的研究和应用开辟了一个崭新领域。

近几年,基于纳米金的基因芯片检测方法已成为一种趋势<sup>[6,8-9]</sup>。Xi 等<sup>[9-10]</sup>用纳米金探针结合尼龙膜斑点杂交法,可检测 10 pmol/L 合成靶 DNA 和 PCR 扩增产物;用 Fe @Au 纳米颗粒(内核为氧化铁,外壳为金)探针结合尼龙膜斑点杂交法,同样可检测 10 pmol/L 合成靶 DNA 和 PCR 扩增产物,采用磁分离的方法对核酸进行富集可将检测灵敏度提高到 1 pmol/L,此法没有对 PCR 扩增产物进行检测。

且该方法操作以及实验结果影响因子较复杂。2009 年,本实验室开发出采用纳米金结合荧光信号探针进行基因芯片检测的方法<sup>[11]</sup>,同样可以达到 1 pmol/L 合成靶 DNA 的检测限,此法也没有对 PCR 扩增产物进行检测,由于纳米金颗粒本身是荧光的强烈淬灭剂,对实验过程及操作要求较严格,探针价格也较昂贵,且需特殊的仪器设备进行检测,故实际应用中荧光检测法也将受到很大限制。

本文在荧光检测法基础上,开发新型的纳米金复合探针结构,结合本实验室开发的基因芯片的膜转印检测法,进行一种新型基因芯片检测方法的研究。即在纳米金表面按照一定的比例,同时标记与靶 DNA 互补的 DNA 检测探针和标记有生物素的信号探针构成纳米金复合探针,利用生物素-链霉亲和素反应,用 BCIP/NBT 显色系统显色使对应靶 DNA 分子部位的尼龙膜显色,然后直接裸眼或者采用常规的光学扫描仪扫描记录、判断实验结果。并用此方法进行结核分枝杆菌 *M. tuberculosis* 特异性片段的快速检测。结核病 (Tuberculosis) 在全球广泛流行,严重危害人类健康,成为全球重大公共卫生问题和社会问题<sup>[12-14]</sup>。目前结核病诊断及分枝杆菌分型主要依赖于显微检测、分离培养以及生化分析等方法,但由于前者灵敏度不高<sup>[15]</sup>,后者检测时间长、操作复杂,临床应用受到很大限制。因此探索快速、廉价、高灵敏度检测结核分枝杆菌对结核病预防、发现、诊治具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

#### 1.1.1 试剂

基因芯片、纳米金溶液由本实验室自行制备;HAuCl<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O、柠檬酸三钠、PVP、Tween-20、BSA、PEG8000、PEG20000 购自 Sigma 公司;胶

体金重悬液 (0.1 mol/L Tris-HCl, PVP, tween-20, BSA, PEG8000, 蔗糖); 0.1 mol/L PB (pH 7.2); 0.1 mol/L PBS (pH 7.2); 5 mol/L NaCl; 洗脱缓冲液 I (0.2×SSC, 0.1% SDS); 洗脱缓冲液 II (0.05 mol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl, 0.3% tween-20, pH 7.5); 亲和素酶联连体 (150 U, 200 μL)、杂交液 EasyHyb、封闭剂、BCIP/NBT 显色液购自 Roche Germany; 封闭液 (0.05 mol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl, 1%

封闭剂); 平衡液 (0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 9.5); 尼龙膜 (Hybond); Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa); dNTPs (GE Healthcare Life Science); QIAquick<sup>®</sup> PCR purification kit (QIAGEN); 银染液 (现配现用); NaNO<sub>3</sub> 洗液。

如表 1 所示, 所需探针序列均由 TaKaRa 公司合成。

表 1 核酸探针序列表

Table 1 DNA sequences

Name	Probe sequences (5'-3')
Synthesized target DNA	ggccgtatctcagtcagacatgcatcccgtg
Primer F	gataagcctgggaaactg
Primer R	tgctcccgtaggagtctgg
Detecting probe (P2, thiol-modified)	ggactgagatacggcc-poly(t)28-SH
Signal probe 1 (T10, thiol and biotin-modified)	SH-poly(t) <sub>10</sub> -Biotin
Signal probe 2 (T40, thiol and biotin-modified)	SH-poly(t) <sub>40</sub> -Biotin
Capture probe (P1, amino-modified)	NH <sub>2</sub> -poly(t) <sub>10</sub> -cacgggatgcatgtct
Negative control probe (P3, amino-modified)	NH <sub>2</sub> -poly(t) <sub>10</sub> -cacgggaagcatgtct
Anchor point probe <sup>a</sup> (P4, amino-modified)	NH <sub>2</sub> -poly(t) <sub>10</sub> -ggccgtatctcagtc

a: anchor point probe is complementary sequence of detecting probe.

### 1.1.2 主要仪器

芯片点样仪 (型号 Prosys 5510A, Cartesian), PCR 仪 (型号 TP600, TaKaRa), Alphamager TM2200 (Alpha Innotech), 杂交仪 (型号 FYY-3, 兴化市仪器分析厂), Simplicity 水纯化系统 (法国 Millipore), 紫外-可见光光谱仪 (型号 V-670, Jasco), 高速冷冻离心机 (型号 5804R, Eppendorf), 精密数显酸度计 (型号 pHs-3TC, 上海天达仪器有限公司), 电热恒温鼓风干燥箱 (型号 DGG-9053A, 上海森信实验仪器有限公司), 超声仪 (型号 SCQ150, 上海声浦超声设备厂)。

### 1.2 芯片制备

芯片点样仪将氨基修饰探针 (图 1 中 P1、P3、P4) 点阵于醛基化修饰芯片表面, 点直径 100 μm, 点间距 500 μm, 点样量为 0.7 nL, DNA 探针浓度为 75 μmol/L, 用点样仪分别取 3 种探针溶液点于芯片相应位置 (图 1)。点阵好的芯片置湿度 75%、温度 30℃ 密闭空间固定 24~48 h。

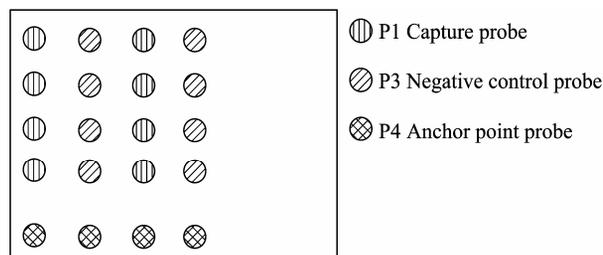


图 1 基因芯片点样模式

Fig. 1 Spotting mode of gene chip.

### 1.3 靶 DNA 分子、探针及引物的设计

细菌 16S rDNA 由于其功能保守, 进化缓慢, 因此我们根据结核分枝杆菌 16S rDNA 基因保守区核酸片段序列进行合成靶 DNA 分子、探针及引物的设计 (GenBank Accession No. X52917)。

### 1.4 结核分枝杆菌 16S rDNA 基因保守区扩增

PCR 采用 50 μL 扩增体系, 共 3 管。结核分枝杆菌基因组 DNA 样品 2 μL 与 48 μL PCR 扩增体系混合 (扩增体系包括: 10× PCR 反应缓冲液, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 650 μmol/L dNTPs, 上游及下游引物各

0.5  $\mu\text{mol/L}$ , 2 U *Taq* DNA 聚合酶) 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳检测。

## 1.5 纳米金探针制备

### 1.5.1 纳米金颗粒的制备<sup>[16]</sup>

配制 1 nmol/L 的  $\text{HAuCl}_4$  溶液、38.8 mmol/L 柠檬酸三钠溶液。按预先设计的反应条件量取 250 mL  $\text{HAuCl}_4$  溶液加热回流 10 min 并搅拌, 快速加入 25 mL 柠檬酸三钠溶液, 溶液颜色由浅黄迅速变为深红时, 再持续加热回流 15 min 并搅拌, 待溶液自然冷却至室温 (持续搅拌), 用 0.22  $\mu\text{m}$  硝酸纤维薄膜过滤器过滤, 即可得到尺寸为 13 nm 的纳米金溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$  避光保存备用。

### 1.5.2 纳米金复合探针标记

纳米金颗粒表面标记有 3 种巯基修饰的 DNA 探针: 2 种是带有生物素的信号探针 (T10、T40), 起信号放大作用; 第 3 种是能与靶 DNA 分子另一端互补的检测探针 (P2)。

纳米金复合探针的标记方法: 取 1 mL 浓度为 12.5 nmol/L 的 13 nm 纳米金溶液于 EP 管中, 9 000 r/min 离心 50 min, 弃上清, 沉淀用 100  $\mu\text{L}$  0.1 mol/L PB (0.01% SDS, pH 7.2) 重悬; 向重悬液中加入 100  $\mu\text{mol/L}$  的 DNA 探针 4  $\mu\text{L}$  (P2、T10、T40 按一定比例混合, 使探针终浓度为 4  $\mu\text{mol/L}$ ), 充分混匀, 室温放置 20 min; 用 5 mol/L NaCl 调 NaCl 浓度至 0.1 mol/L, 超声处理 10 s 后; 放置 25 $^{\circ}\text{C}$  杂交仪中孵育过夜 (6 r/min), 然后加入 1/10 体积 5% PEG (分子量为 20 000), 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜。用胶体金重悬液洗涤 4 次, 弃上清, 加 100  $\mu\text{L}$  胶体金重悬液重悬, 4 $^{\circ}\text{C}$  储存备用。用紫外-可见光光谱仪测其吸光光谱及 OD 值; 用透射电镜扫描 DNA 探针标记前后的纳米金。

### 1.6 芯片杂交及转膜显色

检测过程: 1  $\mu\text{L}$  合成靶 DNA 或 PCR 扩增产物 (预先变性) 与 9  $\mu\text{L}$  杂交液混匀, 均匀滴于芯片点阵区, 盖上盖玻片, 置 35 $^{\circ}\text{C}$  预热的杂交盒中杂交 30 min, Wash buffer I 洗涤芯片 2 min, 氮气吹干。2  $\mu\text{L}$  纳米金复合探针溶液与 8  $\mu\text{L}$  杂交液混匀, 均匀滴于晾干

芯片的点阵区, 35 $^{\circ}\text{C}$  杂交 30 min, Wash buffer I 洗涤芯片 5 min, 氮气吹干。向点阵区加 Streptavidin-AP-conjugate (SA-AP) 稀释液 (用封阻液稀释 500 倍) 15  $\mu\text{L}$ , 室温反应 30 min, Wash buffer II 洗涤芯片 5 min, 然后用平衡液平衡 1 min, 氮气吹干。用尼龙膜蘸取 BCIP/NBT 显色液后覆盖于芯片点阵区, 盖上盖玻片, 室温避光放置 30 min, 纯化水洗涤尼龙膜, 肉眼根据信号有无判读结果 (图 2)。

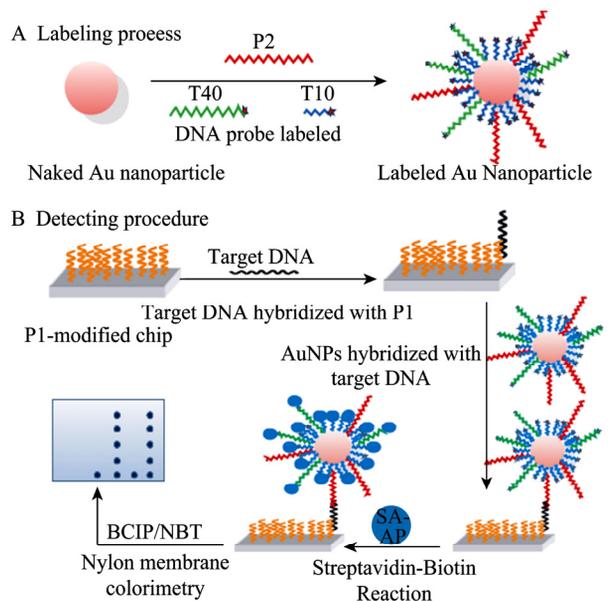


图 2 纳米金复合探针标记过程和靶 DNA 检测过程示意图

Fig. 2 Schematic diagrams of the preparation of AuNP probes and the DNA detecting procedure. (A) Schematic diagram of the preparation of AuNP probes. (B) Schematic diagram of the DNA detecting procedure.

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增产物浓度计算

PCR 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在紫外光照射下可见一条长度约 200 bp 的 dsDNA 条带 (图 3)。将 3 管 PCR 产物混合, 取 50  $\mu\text{L}$  用 QIAquick PCR purification kit 进行纯化, 纯化产物用纯化水定容至 500  $\mu\text{L}$ , 用紫外-可见光光谱仪测其浓度为 2.85 ng/ $\mu\text{L}$ , 根据 QIAquick PCR purification kit 对 PCR 产物的回收效率为 95%, 计算出原 PCR 产物浓度为 30 ng/ $\mu\text{L}$ 。根据 PCR 产物长度 (200 bp)、碱基对平均分子量 (649), 计算得出 PCR 扩增产物的摩尔浓度约为 0.23  $\mu\text{mol/L}$ 。

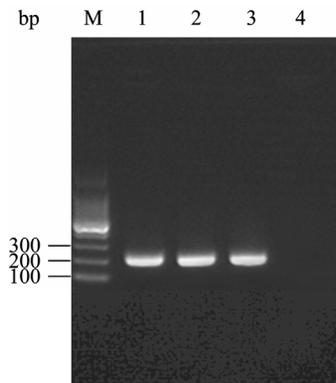


图3 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 3 Electrophorogram of PCR amplification products. M: DNA marker; 1-3: PCR amplification products; 4: negative control.

## 2.2 纳米金复合探针标记过程的优化

### 2.2.1 检测探针和信号探针标记比例优化

纳米金表面 DNA 分子的密度和构象对其杂交效率有重要影响,当纳米金表面 DNA 分子密度较高时,空间位阻会降低其杂交效率<sup>[17]</sup>;而当 DNA 分子密度很低时, DNA 分子中的碱基在纳米金表面的非特异性吸附同样会降低杂交效率<sup>[18]</sup>,因此,对纳米金表面 DNA 分子的组装进行研究至关重要。Mirkin 等研究发现,在纳米金表面标记核酸时,与其他碱基相比,由于 poly (T) 带电性质的不同,不容易在纳米金表面堆积,因此可以得到更高的标记效率<sup>[19]</sup>,并且在一个 15 nm 的纳米金表面可以负载约 160 条左右的 poly (T) 分子,本研究在此研究基础上,探针浓度根据纳米金浓度调整到纳米金与总探针摩尔比为 1 : 320,然后进一步优化检测探针和两种不同长度信号探针 (T10、T40) 的标记比例,结果表明,当检测探针与信号探针 (T10 与 T40 摩尔比为 1 : 1) 摩尔比为 1 : 10 时,检测信号最强 (图 4)。

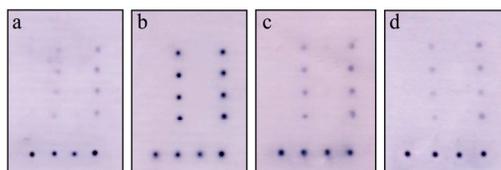


图4 不同检测探针与信号探针摩尔比 (T10 : T40=1 : 1) 在合成靶 DNA 浓度为 100 nmol/L 时芯片转膜显色图

Fig. 4 Results of different ratios between detecting probe and signal probe (T10:T40=1:1) of 100 nmol/L synthesized target DNA. (a) 1:5. (b) 1:10. (c) 1:20. (d) 1:30.

### 2.2.2 信号探针标记比例优化

在检测探针与信号探针标记比例确定的前提下 (1 : 10), 进一步研究不同长度信号探针间比例 (T10 : T40) 对杂交信号的影响。结果表明,当 T10 与 T40 摩尔比为 9 : 1 时,检测信号最强 (图 5)。

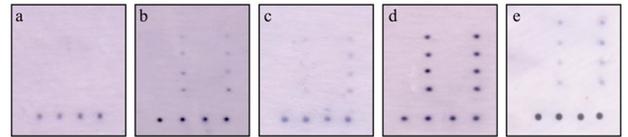


图5 不同信号探针比例在合成靶 DNA 浓度为 1 nmol/L 时芯片转膜显色图

Fig. 5 Results of different ratios between T10 and T40 of 1 nmol/L synthesized target DNA. (a) 2:8:1. (b) 5:5:1. (c) 7:3:1. (d) 9:1:1. (e) 19:1:2.

膜转印检测法的信号检测原理是基于碱性磷酸酶的显色反应。本研究通过信号探针的标记将生物素分子结合到纳米金表面,但是由于 SA-AP 的尺寸效应大大限制了同一平面上生物素分子的利用率。本实验采用长短不同的两种信号探针同时对纳米金进行标记 (图 2),从三维上降低 SA-AP 与生物素反应过程中由于 SA-AP 的尺寸效应所带来的空间位阻的影响,因此可以有效增加检测信号强度。

### 2.3 纳米金及纳米复合探针的表征分析

由透射电镜 TEM (图 6A) 可知,制备的纳米金颗粒粒径为 (13±2) nm,大小均匀,分散良好,且周围界面清晰。由图 6B 可知,标记后的纳米金颗粒周围有一层灰色的晕圈,表明 DNA 探针已标记到纳米金颗粒表面,且纳米金颗粒仍可稳定悬浮于溶液中,无聚集现象发生。

纳米金颗粒随粒径的增大,对应吸收峰的峰位会呈现向长波段红移的趋势<sup>[20]</sup>。采用紫外-可见光谱对纳米金颗粒溶液进行 400~700 nm 波长范围的扫描,表征样品对应的特征吸收峰。由图 6 可见,未标记 DNA 探针的纳米金颗粒在 521 nm 左右有很强的吸收峰,已标记 DNA 探针的纳米金颗粒在 526.5 nm 左右有很强的吸收峰,波段红移说明纳米金颗粒粒径有所增大, DNA 探针标记到了纳米金颗粒的表面。

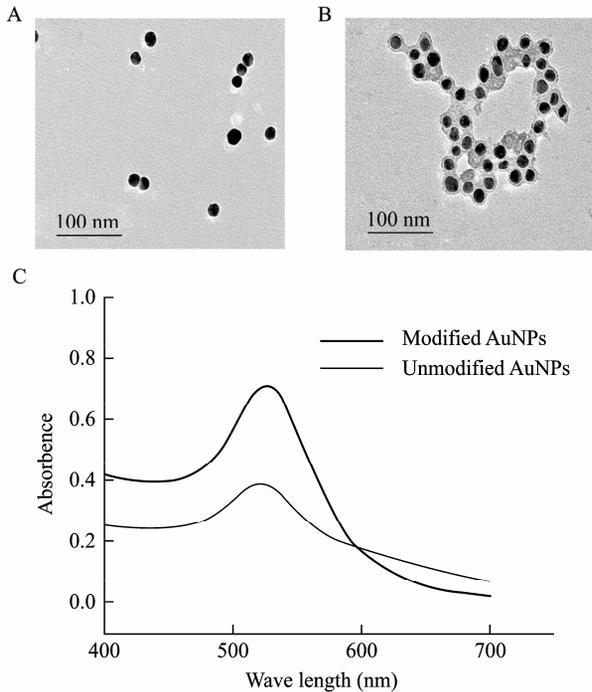


图6 标记 DNA 探针前后的纳米金 TEM 图和紫外-可见光谱扫描图

Fig. 6 Scanning results of AuNPs and AuNP probes with TEM and UV-Vis Spectrophotometer. (A) TEM image of AuNPs. (B) TEM image of AuNP probes. (C) UV-Vis spectra of AuNPs and AuNP probes.

#### 2.4 芯片杂交及膜转印显色结果与分析

本实验采用纳米金复合探针结合本实验室开发的基因芯片膜转印显色法, 在多个条件优化下发现当所用纳米金颗粒上的检测探针和信号探针的比例为 1:10, 信号探针 T10 与 T40 的比例为 9:1 时, 可以检测最低浓度为 1 pmol/L 的合成靶 DNA 分子 (图 7) 或 0.23 pmol/L 的 PCR 扩增产物 (图 8), 检测信号好, 肉眼可见, 且随 DNA 分子浓度降低, 信号结果呈现减弱趋势, 在一定浓度范围内呈现良好的线性关系。

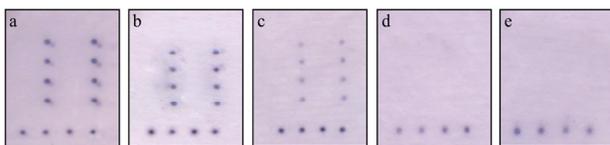


图7 纳米金复合探针检测不同浓度合成靶 DNA 芯片转膜显色图

Fig. 7 Results of synthesized target DNA of different concentrations. (a)  $10^{-10}$  mol/L. (b)  $10^{-11}$  mol/L. (c)  $10^{-12}$  mol/L. (d)  $10^{-13}$  mol/L. (e) 0 mol/L.

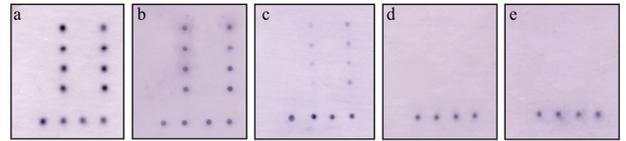


图8 纳米金复合探针检测不同浓度 PCR 扩增产物芯片转膜显色图

Fig. 8 Results of PCR product of different concentrations. (a)  $2.3 \times 10^{-11}$  mol/L. (b)  $2.3 \times 10^{-12}$  mol/L. (c)  $2.3 \times 10^{-13}$  mol/L. (d)  $2.3 \times 10^{-14}$  mol/L. (e) 0 mol/L.

目前, 基于纳米金探针结合基因芯片银染法对靶 DNA 的检测已有诸多报道<sup>[21-23]</sup>。靶 DNA 一端与芯片上的捕获探针杂交, 另一端与纳米金探针结合, 在芯片上形成“三明治”结构, 通过银染增强技术来判断靶 DNA 的存在。用膜转印显色 (图 7) 后的基因芯片进行银染, 用以比较膜转印检测法与银染检测法的灵敏度, 如图 9 所示, 纳米金探针结合基因芯片银染法也可肉眼判断试验结果, 但其检测灵敏度仅为 100 pmol/L 的合成靶 DNA 分子且阴性对照有干扰。由此可见, 本文用纳米金颗粒同时标记一定比例检测探针和两种信号探针, 采用膜转印检测法使检测信号得到放大, 靶 DNA 检测具有更高的灵敏度 (可检测 1 pmol/L 的合成靶 DNA)。

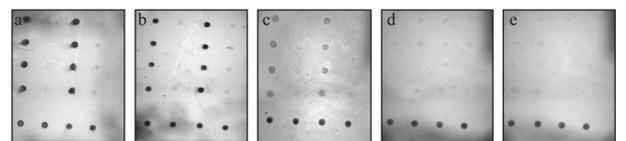


图9 银染法检测不同浓度合成靶 DNA 的芯片扫描图

Fig. 9 Results of synthesized target DNA of different concentrations. (a)  $10^{-8}$  mol/L. (b)  $10^{-9}$  mol/L. (c)  $10^{-10}$  mol/L. (d)  $10^{-11}$  mol/L. (e) 0 mol/L.

纳米金颗粒表面按照一定比例标记检测探针和两种信号探针, 检测探针的作用是通过与芯片表面的靶 DNA 分子结合, 将纳米金 (带有两种生物素标记的信号探针) 也结合于芯片表面; 然后利用生物素-链霉亲和素反应, 使芯片上与靶 DNA 分子互补的探针结合上碱性磷酸酶; 最后通过 BCIP/NBT 显色系统使芯片表面的结果镜面转印到尼龙膜上。由此可知, 检测探针与信号探针之间的比例是信号放大的关键。理论上, 信号探针比例越高, 信号放大倍数越大。然而实际上, 信号探针比例越高, 纳米

金上可以进行有效杂交的检测探针也越少, 从杂动力学上来讲, 也越不利于杂交反应的右向发展<sup>[24]</sup>。因此本研究在二者比例为 1:10 时得到最佳结果。

本研究信号分子实际上是 SA-AP, 实验证明, 由于 SA-AP 分子较大而形成的空间位阻效应大大限制了 SA-AP 在纳米金表面的结合效率。因此, 本文使用长短不同的信号探针在纳米金表面建立一个错落有致的空间立体结构, 有效地解决了空间位阻问题。当 T10 与 T40 摩尔比为 9:1 时, 检测信号最强。

本研究中, PCR 扩增产物的灵敏度 (0.23 pmol/L) 稍高于合成靶 DNA (ssDNA, 1 pmol/L), 可能因为 PCR 扩增产物序列较长 (200 bp), 降低了纳米金复合探针及 SA-AP 分子堆积时的空间位阻所致。一般情况下, 长链 PCR 扩增产物二级结构所产生的空间位阻的确会大大减少其与芯片捕获探针结合的几率, 但在本文实验条件下, 长为 200 bp PCR 扩增产物形成的二级结构所产生的空间位阻并没有纳米复合探针以及 SA-AP 分子堆积时所产生的空间位阻大。主要是因为我们的 PCR 产物链不长, 二级结构所产生的空间位阻较纳米复合探针以及 SA-AP 分子堆积时所产生的空间位阻小的缘故。

### 3 结论

本文提出的基于纳米金复合探针的基因芯片膜转印检测法, 是根据纳米金颗粒物化特性与生物学特性, 将纳米技术和基因芯片技术有机结合而建立起来的一种新的 DNA 分子检测方法。实验用纳米金颗粒同时标记检测探针和长短不同的两种信号探针, 检测探针是与待测靶 DNA 5'端互补的 DNA 片段, 生物素化信号探针起到信号放大和封闭作用。在靶 DNA 存在时形成捕捉探针 P1-靶 DNA-纳米金复合探针组成的“三明治”结构, 利用生物素-链霉素和素反应, 使芯片上对应靶 DNA 分子部位结合上碱性磷酸酶, 最后通过 BCIP/NBT 显色系统使芯片表面的结果镜面转印到尼龙膜上, 检测结果可以通过普通的光学扫描仪读取或者肉眼根据信号有无判读。通过实验, 初步确定当纳米金上的检测探针和信号探针比例为 1:10, 两种信号探针 T10 和 T40 比例为 9:1 时结果最佳, 其检测下限为 1 pmol/L

的合成靶 DNA 分子或 0.23 pmol/L 的结核分枝杆菌 16S rDNA PCR 扩增产物。

综上所述可见, 纳米复合探针的有效性不仅受纳米金表面信号分子数量的影响, 纳米金表面探针的空间立体结构对其有效性, 包括杂交反应以及信号标记两方面的影响都非常大。本文在此方面只是进行了初步的探索, 如果在此基础上进一步对信号探针的分子组成、分子长度进行进一步的分析和优化, 有望得到更高的检测灵敏度。

本文提出的基于纳米金复合探针的基因芯片膜转印检测法, 检测系统灵敏度高, 不需要特殊设备, 操作方法简单、快速, 尼龙膜上呈现的斑点清晰、稳定、易长久保存, 且无需特殊信号读取设备, 具有比较大的应用潜力。

### REFERENCES

- [1] Stears RL, Martinsky T, Schena M. Trends in microarray analysis. *Nat Med*, 2003, **9**(1): 140-145.
- [2] Call DR, Borucki MK, Loge FJ. Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays. *J Microbiol Meth*, 2003, **53**: 235-243.
- [3] Wolfgang F, Andrea C, Robert M. Gold nanoparticles as novel label for DNA diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*, 2002, **2**(2): 187-193.
- [4] Parak WJ, Gerion D, Pellegrino T, *et al.* Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology*, 2003, **14**: 15-27.
- [5] Niemeyer CM. Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science. *Angew Chem Int Ed*, 2001, **40**: 4128-4158.
- [6] Nam JM, Thaxton CS, Mirkin CA. Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science*, 2003, **301**: 1884-1886.
- [7] Nam JM, Park SJ, Mirkin CA. Bio-bar codes based on oligonucleotide-modified nanoparticles. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**: 3820-3821.
- [8] Wolfgang F, Andrew T. Metal nanoparticles as labels for heterogeneous, chip-based DNA detection. *Nanotechnology*, 2003, **14**: 63-73.
- [9] Xi D, Luo XP, Ning Q, *et al.* The detection of HBV DNA with gold nanoparticle gene probes. *J Nanjing Med Univ*, 2007, **21**(4): 207-212.
- [10] Xi D, Ning Q, Lu QH, *et al.* The detection of HBV DNA

- with gold-coated iron oxide nanoparticle gene probes. *J Nanopart Res*, 2008, **10**: 393–400.
- [11] Bao H, Jia CP, Zhou ZL, *et al.* A novel DNA detection method based on gold nanoparticle probes and gene chips. *Acta Chem Sin*, 2009, **67**(18): 2144–2148.  
包华, 贾春平, 周忠良, 等. 基于纳米金探针和基因芯片的 DNA 检测新方法. 化学学报, 2009, **67**(18): 2144–2148.
- [12] Singh S. Tuberculosis. *Curr Anaesthesia Crit Care*, 2004, **15**: 165–171.
- [13] Lu CC, Lai HC. Current dilemma and developments in the diagnosis of mycobacterium tuberculosis infection. *J Formos Med Assoc*, 2008, **107**(5): 353–354.
- [14] Arentz M, Hawn TR. Tuberculosis infection: insight from immunogenomics. *Drug Discov Today Dis Mech*, 2007, **4**(4): 231–236.
- [15] Caws M, Wilson SM, Clough C, *et al.* Role of IS6110-targeted PCR, culture, biochemical, clinical, and immunological criteria for diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**(9): 3150–3155.
- [16] Freeman RG, Grabar KC, Allison KJ, *et al.* Self-assembled metal colloid monolayers: an approach to SERS substrates. *Science*, 1995, **267**(5204): 1629–1632.
- [17] Demers LM, Mirkin CA, Mucic RC, *et al.* A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles. *Anal Chem*, 2000, **72**(22): 5535–5541.
- [18] Parak WJ, Pellegrino T, Micheel CM, *et al.* Conformation of oligonucleotides attached to gold nanocrystals probed by gel electrophoresis. *Nano Lett*, 2003, **3**(1): 33–36.
- [19] Hurst SJ, Lytton-Jean AKR, Mirkin CA. Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes. *Anal Chem*, 2006, **78**: 8313–8318.
- [20] Sun YG, Xia YN. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science*, 2002, **298**: 2176–2179.
- [21] Park SJ, Taton TA, Mirkin CA. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. *Science*, 2002, **295**: 1503–1506.
- [22] Cao YWC, Jin RC, Mirkin CA. Nanoparticles with raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*, 2002, **297**: 1536–1540.
- [23] Taton TA, Mirkin CA, Letsinger RL. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science*, 2000, **289**: 1757–1760.
- [24] Nam JM, Stoeva SI, Mirkin CA. Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**: 5932–5933.