

# 目录

摘要.....	1
Abstract.....	3
第一章 绪论.....	5
1 核酸适配子概述.....	5
1.1 核酸适配子简介.....	5
1.2 核酸适配子在生物分析中的应用.....	7
1.3 核酸适配子的前景与展望.....	13
2 生物传感器的概述.....	13
2.1 生物传感器.....	13
2.2 生物传感器的制作.....	14
2.3 生物传感器的应用与前景.....	15
3 稀土纳米晶上转换材料的概述.....	15
3.1 上转换发光材料.....	15
3.2 上转换发光材料的应用.....	18
3.3 上转换发光材料的前景.....	21
4 本论文的研究意义.....	21
5 参考文献.....	22
第二章 基于核酸适配子的生物传感器对低丰度蛋白的检测.....	26
1 引言.....	26
2 实验部分.....	27
2.1 试剂.....	27
2.2 仪器.....	28
3 实验方法.....	28
3.1 aptamer 修饰的金电极的制备.....	28
3.2 夹心结构 Aptamer/Thrombin/Aptamer 的体系构建.....	28
3.3 电化学检测.....	29
4 实验结果与讨论.....	29
4.1 电化学 Aptamer/Thrombin/Aptamer 夹心结构免疫分析原理.....	29
4.2 方波溶出伏安法凝血酶的标准样品的检测.....	31
4.3 电化学 aptamer 传感器在检测实际样品中的应用.....	33
5 结论及展望.....	34
6 参考文献.....	35
第三章 基于纳米金淬灭水溶性功能化稀土纳米晶的 DNA 检测.....	38
1 引言.....	38
2 实验部分.....	40
2.1 试剂.....	40
2.2 仪器.....	40
3 实验方法.....	41
3.1 稀土纳米晶材料的制备.....	41
3.2 纳米金胶的制备.....	41
3.3 制备探针 DNA <sub>1</sub> 修饰的纳米金胶.....	41
3.4 制备探针 DNA <sub>2</sub> 修饰的稀土纳米晶上转换材料.....	42

3.5 杂交实验 .....	42
3.6 目标 DNA 的检测 .....	42
4 实验结果与讨论 .....	42
4.1 稀土纳米晶上转换材料的表征 .....	42
4.2 金胶的表征 .....	45
4.3 修饰了探针 DNA <sub>1</sub> 的纳米金的紫外测试 .....	45
4.4 目标 DNA 的荧光检测 .....	46
5 小结与展望 .....	49
6 参考文献 .....	49
硕士期间发表论文情况 .....	52
致谢 .....	53

## 摘要



DNA 作为遗传信息的载体,是一类极其重要的生物活性分子中起着重要的作用。同时, DNA 又是最常用的分子探针,被广泛地应用于生物化学分析中。核酸适配子 (aptamer) 是目前应用最广泛的 DNA 探针,具有很多优点,如亲和力高、选择性强、易于修饰与分离、稳定性好等。目前核酸适配子已经被应用于生物化学、医学检验、药物合成筛选、环境监测等领域,有着广泛的发展空间和良好的应用前景。本论文以核酸适配子为分析对象,通过其与量子点和稀土上转换纳米晶材料相结合而成的生物传感器,成功实现了对低丰度蛋白的测定和 DNA 杂交生物过程的监测,取得了满意的分析效果。本论文包括以下几个方面的内容:

### 一. 概述了核酸适配子在生物分析中的应用

概述了核酸适配子分析技术的发展现状,例如 SELEX 技术的简介、核酸适配子的特点以及与其他分析技术相结合等。介绍了核酸适配子在生物分析中的应用,并对核酸适配子未来的发展趋势及其应用领域进行了展望,最后着重讨论了本论文研究的目的及意义。

### 二. 基于核酸适配子的生物传感器的研究

本章重点介绍了基于核酸适配子的量子点标记夹心法检测凝血酶,实现了对实际样品一人血清中凝血酶的测定。在本实验中, CdSe 量子点被标记到二级核酸适配子上,作为示踪剂。当 CdSe 量子点被硝酸溶解后,得到的  $\text{Cd}^{2+}$  用电化学溶出伏安法进行检测。该传感器可以达到 1 pM 的检出限,同时,可以将被测样品的消耗体积降低至 5  $\mu\text{L}$ 。结果表明,该方法具有良好的选择性并降低了非特异性吸附,因而该方法可以被应用于实际样品一人的血清中凝血酶的检测。这种基于核酸适配子的生物传感器有望用于筛选复杂体系中的低含量的生物标记物。

### 三. 基于稀土上转换材料的 DNA 检测的研究

稀土纳米晶上转换发光材料与传统的发光的生物标记材料相比,有很多优点,如低毒性、化学稳定性高、生物相容性好、光漂白和光损伤低、量子产率高、长波的激发光穿透深度大等。本章重点介绍了基于纳米金淬灭稀土上转换材料的 DNA 检测。该单分散的稀土纳米晶上转换纳米粒子被 980 nm 的长波红光激发,

发射出的绿色荧光被 5 nm 的纳米金吸收（纳米金在 520 nm 处有强的吸收），即发生了荧光共振能量转移（FRET 过程）。实验结果表明，该方法可以很好的对 DNA 进行定性分析。这种基于稀土纳米晶的上转换材料今后可被应用于细胞成像、组织成像等生物医学检测中。

关键词：核酸适配子，凝血酶，量子点，纳米金，稀土纳米晶上转换材料，DNA 检测，生物传感器。

## Abstract

DNA is a kind of very important biomolecule, as the carrier of genetic information, playing an important role in biologic activity. DNA is widely applied in bio-chemical analysis as the molecular probe. Aptamers is one of the most popular DNA probes, and aptamers offer several advantages over antibodies, owing to their relative ease of isolation and modification, high selectivity, tailored binding affinity, and resistance against denaturizing. Aptamers have been used in biochemistry, diagnosis, drug screening and environmental monitoring, etc. Aptamers are now widely used in many areas. In this work, we designed an aptamer-based biosensor by using quantum dots and up-converting nanophosphors as labels to selectively detect thrombin and target DNA at low levels. The detailed points of the thesis are described as follows:

### 1. Introduction of aptamer and its application in bioanalysis

A review on aptamers and its application in bioanalysis is presented. This part includes:

- (1) introduction of SELEX technologies
- (2) brief introduction of the recent research progress in aptamers, including the combination with other techniques,
- (3) trend of aptamers in bioanalysis application,
- (4) purpose and significance of this thesis.

### 2. Aptamer-based biosensor for sensitive thrombin detection

A sensitive aptamer-based sandwich-type sensor is presented to detect human thrombin using quantum dots as electrochemical label. CdSe quantum dots were labeled to the secondary aptamer, which were determined by the square wave tripping voltammetric analysis after dissolution with nitric acid. The aptasensor has a lower detection limit at 1 pM, while the sample consumption is reduced to 5  $\mu$ l. The proposed approach shows high selectivity and minimizes the nonspecific adsorption, so that it was used for the detection of target protein in the human serum sample. Such an aptamer-based biosensor provides a promising strategy for screening biomarkers at ultratrace levels in the complex matrices.

### 3. Up-converting nanophosphors based biosensor for DNA detection

Up-converting rare-earth nanophosphors (UCNPs) have superior potential to revolutionize biological luminescent labels, which are resistant to photobleaching and photodamage, nontoxic, biocompatible, chemical stable, high quantum yielding. The most important one is that the long-wavelength (low-energy) light penetrates deeper (hundreds of micrometers) into samples. In this work, we demonstrate a novel biosensor for the detection of target DNA which is based on FRET between bioconjugated UC nanoparticles and gold nanoparticles. The strong green UC luminescence from suspensions of the nanoparticles in water upon excitation with a 980-nm laser was absorbed by the 5 nm gold nanoparticles, which had a strong absorption at 520 nm wavelength. The results indicated that such a FRET system was simple for the DNA detection. The UCNPs would be applied in biological analyses such as cell imaging and tissue imaging in future.

**Keywords:** Aptamer, Thrombin, Quantum Dots, Up-converting rare-earth nanophosphors, DNA detection, Biosensor.

# 第一章 绪论

## 1 核酸适配子的概述

在生物体系中, DNA是一类极其重要的生物活性大分子, 在生命活动中起着重要的作用。DNA作为遗传信息的载体, 主要参与遗传信息在细胞内的存储、编辑、传递和表达, 从而促成代谢过程及其控制。从某种意义上来说, 生命中的一切过程都是依照存储在DNA中的信息进行的。近年来, 从材料和信息科学的角度研究DNA, 拓宽了DNA科学的研究领域, 如DNA分子器件<sup>[1]</sup>、DNA计算机<sup>[2]</sup>, 以及基于DNA的纳米组装体<sup>[3-5]</sup>等新的研究方向。从化学角度看, DNA是一种具有独特双螺旋结构的带负电的化合物。如果把DNA看成一种储存有“信息”的密码子, 通过它与其它物质之间的协同相互作用, 利用分子组装技术, 可以形成更为有序的、功能化的分子组装体。近年来, 有关DNA分子组装体的构筑、结构和性质, 如光诱导电子转移<sup>[6]</sup>、电荷传递<sup>[7]</sup>、基因治疗<sup>[8]</sup>等研究成为人们关注的焦点。

DNA 探针是最常用的核酸探针, 指长度在几百碱基对以上的双链 DNA 或单链 DNA 探针。近年来, DNA 探针被广泛应用于生物分析中, 成为有力的分析工具。现有的 DNA 探针有很多种, 包括细菌、病毒、原虫、真菌、动物和人类细胞的 DNA 探针。DNA 探针多为基因的全部或部分序列, 或是非编码序列。这些 DNA 探针的 DNA 序列必须是特异的, 有着特殊的生物意义的。某些 DNA 探针在特定的生物环境中, 具有特殊的结构特征, 这些特征成功的被人们利用, 应用于分析检测中。这些 DNA 探针的获得, 有助于分子克隆技术的发展和运用。此外, 相比于 RNA、蛋白质等生物分子, DNA 在体外性质稳定, 易于保存与操作, 因而近年来被广泛应用于体外分析中, 并在生物分析研究中占据了越来越重要的地位。

90 年代初核酸适配子 (aptamer) 出现, 迅速成为人们关注的焦点。核酸适配子作为 DNA 探针的一种, 具有很强的亲和力和选择性, 逐渐取代传统的抗体, 被广泛的应用于生化分析中<sup>[9,10]</sup>。

### 1.1 核酸适配子的简介

#### 1.1.1 核酸适配子的特点

核酸适配子 (aptamer, 或适体) 是一小段经过体外筛选 SELEX 技术 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, 即指数式富集法配体演化技术) [11] 得到的寡核苷酸链。它是从人工合成的 DNA 或 RNA 随机库中筛选出来的, 能与对应的配体靶分子进行高亲和力和强特异性的结合。靶分子范围广泛, 包括多种有机分子、无机分子、细胞等物质。

核酸适配子与靶分子结合原理完全不同于传统的抗原与抗体结合的机理。一般情况下, 无需知道结合内部结构及原理, 只要通过 SELEX 技术筛选出特定的具有很高的结合力的核酸序列即可。因而使得核酸适配子成为很有应用前景的分子识别物之一。

相对于传统的蛋白质抗体, 核酸适配子具有以下特点:

亲和力高。核酸适配子与目标靶分子结合, 形成稳定的化合物, 解离常数 (Kd) 一般为 0.05 – 50 pmol/L, 高于传统的抗原抗体间的亲和力。

特异性强。核酸适配子只能识别与其结合的生物大分子的空间结构, 因而核酸适配子具有很好的选择性。

靶分子范围广。与核酸适配子结合的靶分子可以是生物大分子, 如蛋白质、细胞, 也可以是小分子物质, 如肽段, 甚至可以识别整个细胞, 细菌等物质。

制备简单。成功筛选一种物质的核酸适配子, 只需几个月的时间, 并可通过 PCR 技术放大, 大量制备, 而抗体筛选的周期要比核酸适配子长很多。

易于修饰。由于核酸适配子本质上是寡聚核苷酸链, 因而易于进行化学修饰。而传统的抗原抗体是蛋白质, 相比之下, 难于修饰。

稳定性好。核酸适配子具有良好的稳定性, 便于长期保存, 并能反复使用, 而传统的抗体易变性, 难于保存。

与目标靶分子的结合条件可控。核酸适配子是通过体外的 SELEX 技术筛选出来的, 可以根据实验需要设定筛选条件, 进而实现结合条件的调控。

应用范围广。核酸适配子的靶分子范围广, 意味着它有很广的应用范围。此外, 核酸适配子是寡聚核苷酸链, 分子量小, 可以穿过细胞膜, 进而可以检测细胞内的物质。

## 1.12 SELEX技术的简介

SELEX 技术的基本原理就是建立人工合成的单链随机寡聚核苷酸文库, 其中随机序列的长度一般都在 20-40 bp 左右, 文库中有  $10^{14}$ - $10^{15}$  条链。单链寡聚核苷酸易于形成发卡、口袋、假节、G-四聚体等二级结构, 因而可以与靶分子结



合，形成具有很强的结合力的复合物。

根据这一原理，将随机寡聚核苷酸文库与目标靶分子相互作用，洗脱，将未结合的寡聚核苷酸链分离，筛选出与靶分子结合力强的，具有特定序列的寡聚核苷酸链文库。经RT-PCR以及体外转录生成新的次一级文库，再将其与靶分子作用。经过数个如此的循环（一般进行8-15轮筛选），即可筛选出与目标靶分子结合力强的核酸适配子。图1.1为SELEX筛选技术的流程图。

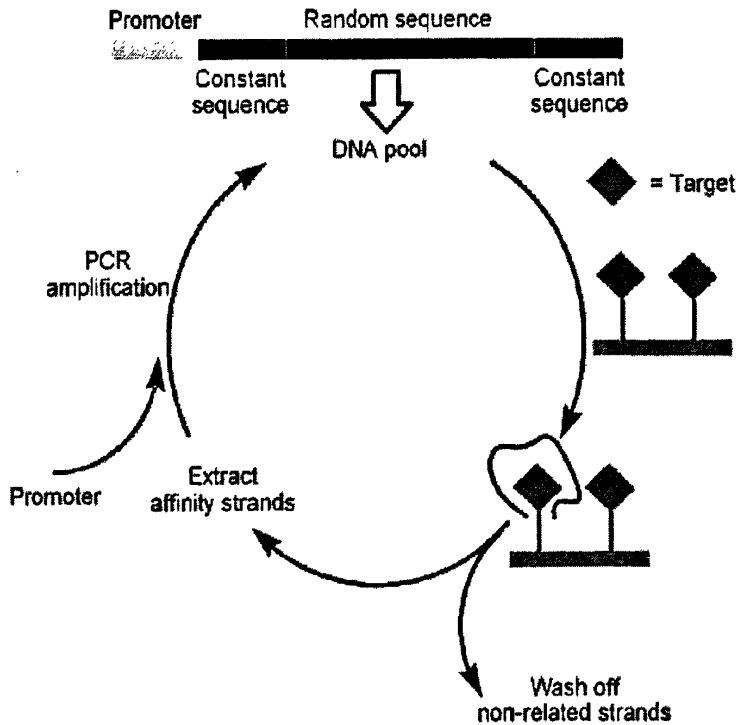


图 1.1 SELEX 筛选技术流程图

## 1.2 核酸适配子在生物分析中的应用

### 1.2.1 核酸适配子在分子信标中的应用

主要通过形成发卡结构使得寡聚核苷酸链两端修饰的荧光发光基团和淬灭基团紧密接触，发生荧光淬灭现象（FRET 过程，即荧光共振能量转移）。当核酸适配子中的功能部分与目标靶分子结合后，形成发卡结构，荧光发光基团与淬

灭基团紧密接触，淬灭剂对荧光剂发生淬灭作用，荧光强度降低。通过荧光强度的变化，对目标靶分子做定性和定量的分析<sup>[12]</sup>。这与传统的分子信标方法类似，但是此方法不仅可以检测核酸分子，还可用于检测蛋白质、无机小分子、有机小分子。Takenaka 等人<sup>[13]</sup>利用这种方法，构建了与凝血酶（Thrombin）特异性结合的核酸适配子，成功的对凝血酶进行了检测。（图 1.2）

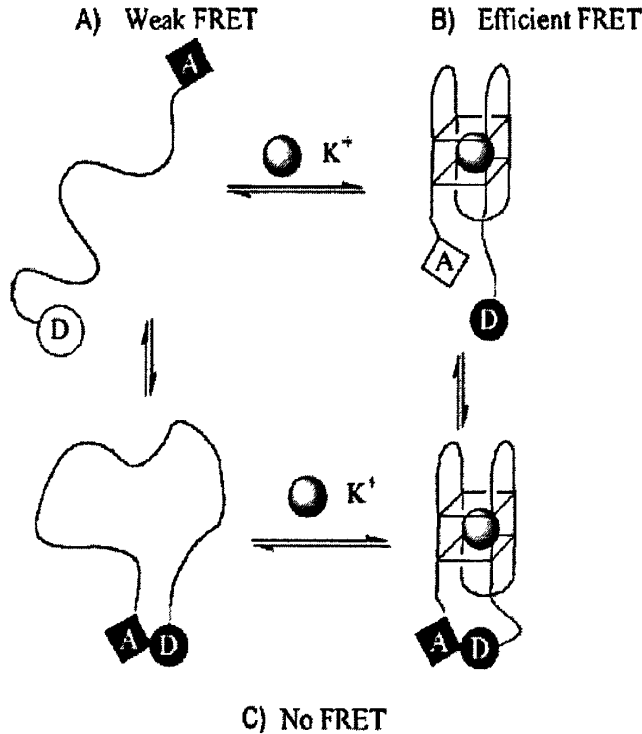


图 1.2 利用核酸适配子—分子信标技术对凝血酶进行检测

## 1.22 核酸适配子在生物传感器中的应用

大多数的生物传感器是由分子识别元件和信号转换元件组成的。核酸适配子由于具有高的亲和力、强的选择性、良好的稳定性和易修饰性等特点，近年来逐渐取代传统的抗体、组织细胞等，成为特殊的分子识别元件，被广泛的应用于生物传感器中<sup>[14,15]</sup>，如石英晶体微天平（QCM）、表面等离子共振（SPR）、电化学传感器、电化学交流阻抗（EIS）等。汪尔康课题组提出了基于核酸适配子，利用电化学交流阻抗进行检测，识别多种靶分子的方法<sup>[16]</sup>，如图 1.3。该方法利用混合的核酸适配子，对凝血酶和 ATP 小分子进行了检测，得到了低检出限，宽

检测范围的结果。

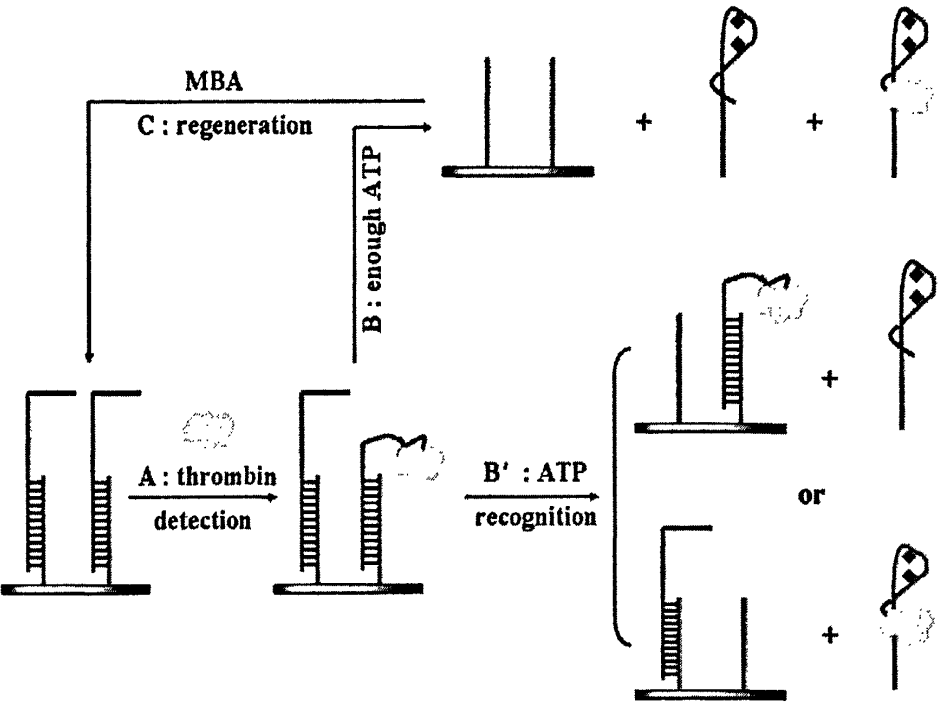


图 1.3 利用混合的核酸适配子检测多种物质的方法示意图

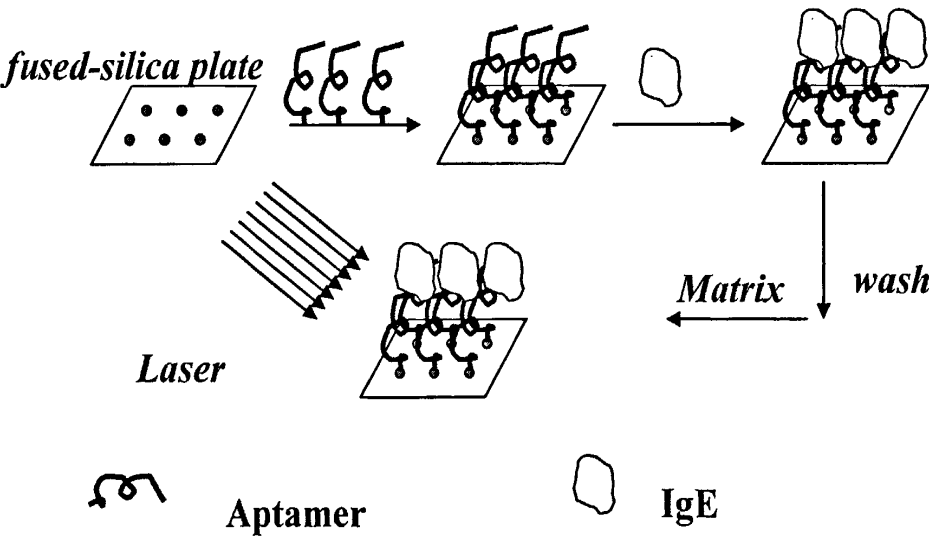


图 1.4 基于核酸适配子在质谱中鉴定蛋白质的方法示意图

### 1.23 核酸适配子在生物质谱中的应用

近年来,核酸适配子又与基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)结合,用来替代传统的抗体,作为捕获蛋白质的工具<sup>[17,18]</sup>。将与特定靶分子结合的核酸适配子固定在靶板上,利用核酸适配子来捕获蛋白质,然后用质谱进行鉴定。McGown 课题组<sup>[18]</sup>首先提出了以上想法,并成功利用核酸适配子对血液中的凝血酶和 IgE 进行检测。(图 1.4)在和不能形成 G-四聚体的随机寡聚核苷酸链进行了对照实验后,发现只有特定的核酸适配子才可以成功捕获靶分子。凝血酶的检测范围为 5-10 pM。该方法可以成功地从复杂体系中选择性地捕获凝血酶。

### 1.24 核酸适配子在 PCR 中的应用

由于核酸适配子与靶分子有很强的亲和作用,并且核酸适配子是寡聚核苷酸链,因而核酸适配子被应用于亲和-PCR中。将目标物质与核酸适配子充分作用,将未结合的物质分离出来。使靶分子与核酸适配子的结合体在适合的条件解离,释放出核酸适配子。通过PCR将核酸适配子扩增,起到放大的作用。X. Chris Le就是利用亲和-PCR的方法,成功对人类HIV-1 RTase蛋白进行了检测,检出限达到1 nM<sup>[19]</sup>。(图1.5)

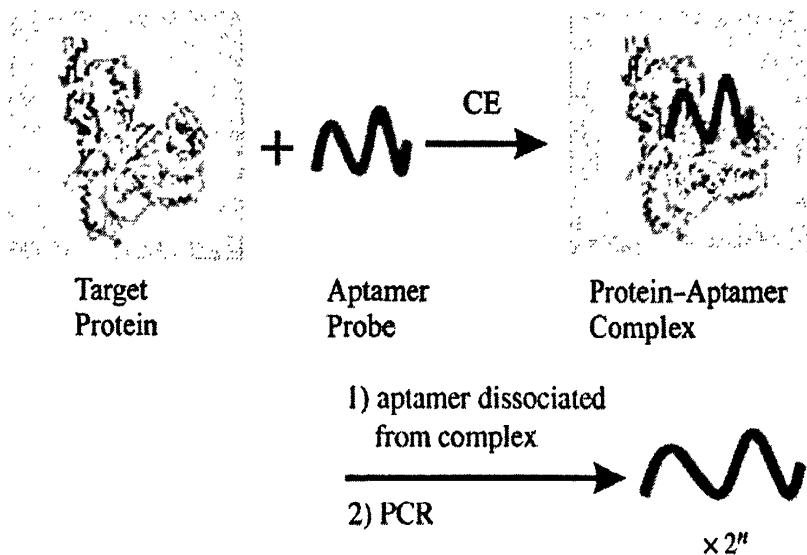


图 1.5 基于核酸适配子的 PCR 扩增方法, 对目标蛋白质进行检测示意图

## 1.25 核酸适配子在免疫分析中的应用

免疫分析主要是基于免疫反应的高度特异性，即抗体对抗原的特异性识别，以及抗体抗原相互结合的高度稳定性的基础上发展起来的。传统的免疫分析包括酶联免疫吸附（ELISA）、放射免疫分析（RIA）等，这些免疫方法在蛋白质的定性和定量分析中起着至关重要的作用。近年来随着核酸适配子的发展，核酸适配子逐渐取代传统的抗原抗体，被应用于免疫分析中。Willner<sup>[20]</sup>等人采用核酸适配子/凝血酶/核酸适配子的夹心结构法，对凝血酶进行定性和定量的分析。（图 1.6）

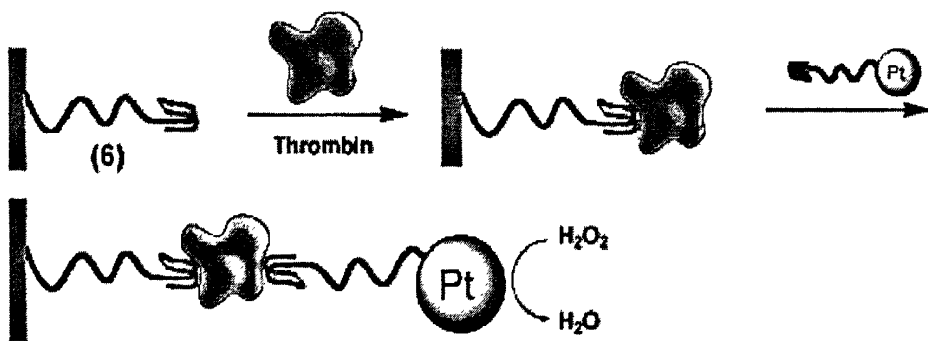


图 1.6 基于核酸适配子的夹心法对凝血酶进行检测

## 1.26 核酸适配子在细胞分析中的应用

肿瘤，特别是恶性肿瘤，严重危害了人类的生活健康和生命安全。癌症的早期诊断是非常重要的，早期诊断有赖于肿瘤标志物的发现和准确检测。由于核酸适配子的靶分子范围广，可以是整个细胞，同时，利用核酸适配子筛选癌细胞周期短，成本低，因而近年来核酸适配子被逐渐应用于癌细胞的筛选中。核酸适配子形成某些特定的结构，与癌细胞作用，从而对癌细胞进行分离和检测。谭蔚红课题组在体外成功筛选出多种与癌细胞结合的核酸适配子，为癌症的早期检测做出了巨大的贡献。图 1.7 为利用与特定癌细胞相互作用的核酸适配子对 CEM, Toledo, Ramos 三种不同的癌细胞进行分离与鉴定<sup>[21]</sup>。

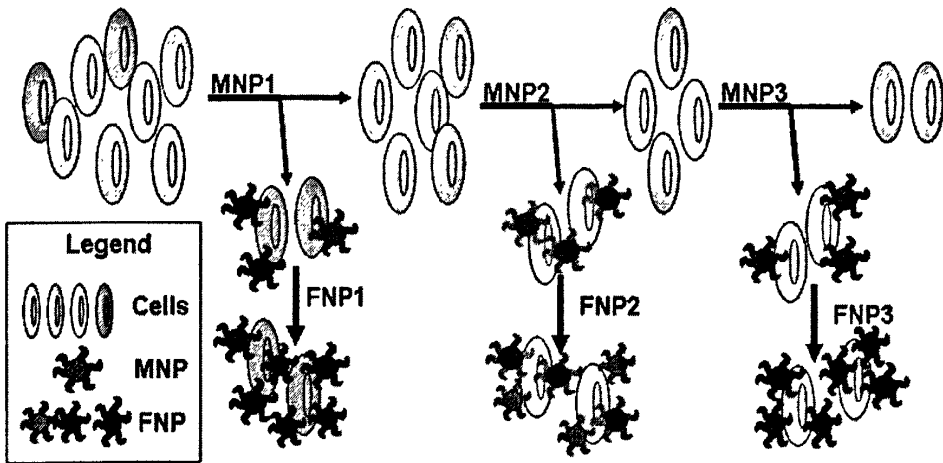


图 1.7 利用与特定癌细胞相互作用的核酸适配子，对癌细胞进行分析

## 1.27 核酸适配子在药物释放中的应用

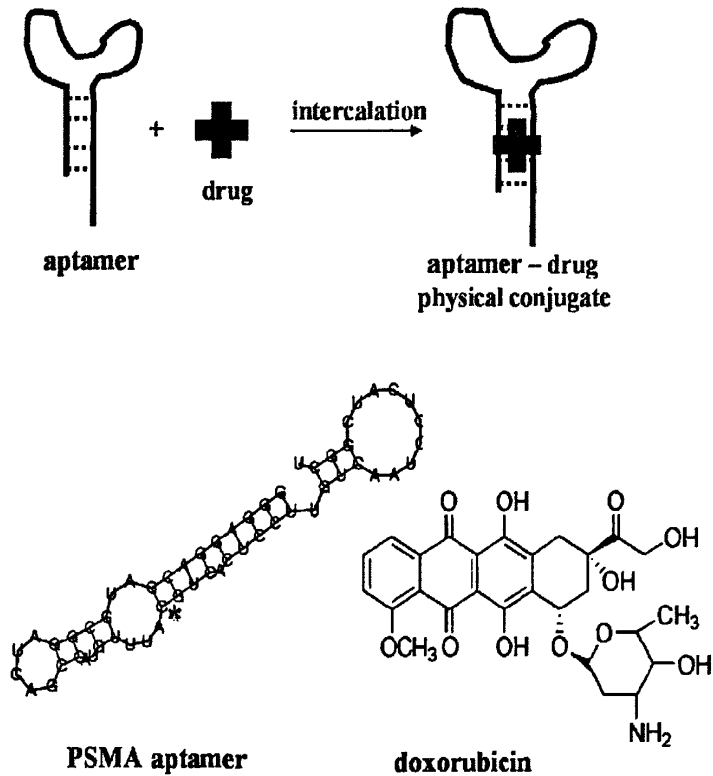


图 1.8 利用核酸适配子作为药物的载体，达到药物释放的目的

20世纪90年代以来,药物剂型和制剂研究已进入药物释放系统(drug delivery System, DDS)时代。新型药物释放系统已成为药学领域的重要发展方向,而新型药物释放主要包括缓释、长效制剂、靶向给药制剂等。同时,药物释放需要一个稳定,无毒副作用的物质作为载体。核酸适配子具有稳定、无毒副作用、靶向性强、易于穿过细胞膜等特点,近年来逐渐成为药物释放的载体<sup>[22-25]</sup>。Sangyong Jon等人<sup>[26]</sup>成功筛选出可以与抗肿瘤药物阿霉素(doxorubicin)相结合的核酸适配子,利用筛选出的核酸适配子做载体,进而实现对肿瘤细胞的药物释放。筛选出的核酸适配子在特定条件下,可以形成Y型结构,Y的下半部分可以与药物结合。同时该Y型结构的核酸适配子可以与前列腺癌细胞结合(Prostate-specific membrane antigen, PSMA)(见图1.8),因而可以将药物分子成功输送到癌细胞处。

### 1.3 核酸适配子的前景与展望

基于上文中提到的SELEX技术的多种优点,核酸适配子具有良好的应用前景。凡是涉及到利用抗体进行诊断的领域,几乎都可以用核酸适配子进行代替,特别是可以弥补抗体在生化分析和临床检测中的缺陷与不足。而传统的蛋白质抗体力所不及的领域,核酸适配子也可以应用。

尽管核酸适配子在生化分析领域中目前尚处于起步阶段,但随着研究的深入,相信这类应用会越来越广。在不久的将来,核酸适配子将会在分子生物学、疾病预防、临床诊断、新药研发、环境检测、疾病的早期检测、毒理学、食品安全检测等领域得到广泛的应用。

## 2 生物传感器的概述

### 2.1 生物传感器

传感器是能感受特定的被检测的物质的量并按照一定规律将其转换成可用的信号的器件或装置。它通常由敏感元件、转换元件和相应的机械结构和电子线路组成。

1962年,Clark在氧电极的基础上首次提出了酶传感器的原理和概念,而世界上的第一支葡萄糖传感器则是由Updike于1967年研制出来的,开启了各类生物传感器发展的新时代。生物传感器是感知生物体内的各种生理、病理的信息,把它们转化为易处理的信号的装置。生物传感器的组成部分有:一种或多种相关

生物活性材料（生物膜）；把生物活性表达的信号转换成为电信号的物理或化学换能器（传感器）。

生物传感器采用固定化生物活性物质（包括酶、抗体、抗原、微生物、细胞、组织、核酸等有生物活性的物质）作催化剂，专一性强，只对特定的底物起反应，具有分析速度快，灵敏度高，稳定性强，准确度高、操作简单，成本低等优点。

生物传感器按生物分子识别元件上的敏感物质可分为：免疫传感器、组织传感器、细胞传感器、酶传感器、微生物传感器、DNA 传感器等。按照其内部信号转换器可分为：电化学生物传感器、光化学生物传感器、声学生物传感器、热学生物传感器。按照其生物敏感物质相互作用的方式可分为：催化型生物传感器、亲和型生物传感器、代谢型生物传感器等。

电化学生物传感器则是指由生物材料作为敏感元件，电极（固体电极、离子选择性电极、气敏电极等）作为转换元件，以电势或电流为特征检测信号的传感器。根据所用的生物材料的不同，电化学生物传感器可分成为：酶电极传感器、电化学 DNA 传感器、微生物电极传感器、微生物电极传感器等。由于使用生物材料作为传感器的敏感元件，因而电化学生物传感器具有高选择性。是快速、直接取得被分析物信息的理想分析方法。近年来，电化学生物传感器被广泛应用于生物医学、环境监测、临床检测、食品检测等领域。

## 2.2 生物传感器的制作

由上述部分可知，生物传感器是由生物识别元件和信号转换器两部分组成的，并且这两部分必须保持直接的空间接触。因而生物传感器的制作就意味着，如何通过适当的方式将生物识别元件和信号转换器两部分结合起来。因此，生物传感器的制作主要由以下三个步骤组成<sup>[27]</sup>。

### 1. 生物识别组分的选择

生物传感器中用以检测待测物质的应是具有特异性识别功能的生物分子。目前文献报道的生物传感器中，作为识别元件的生物活性分子一般为生物催化剂、微生物、抗体或抗原、核酸等。

### 2. 信号转换器的选择

信号转换部件能把膜上进行生化反应中消耗或生成的化学物质，或产生的光热等转化为电信号，最后把所得的电信号经电子技术处理后，在仪器上显示或记录下来。信号转换器的选择依赖于反应的类型和底液中物质的释放或消耗。另外，



信号转换器的选择也取决于所构造的生物传感器所预期的应用。此外,生物传感器一般都是以生物分子作为检测对象,因而所构造的生物传感器必须具有良好的生物相容性,这样才能保证检测结果的正确性和稳定性。如果是用在活体中,则应使传感器微型化,并且形状应适合以至于对活体组织不能引起过多的损害。

### 3. 生物组分的固定化

将生物活性物质固定到信号转换器上的时候,必须保证该物质的生物活性,这是确保传感器好的选择性和稳定性的前提条件。选择适合的固定方法应满足以下条件:固定后的生物识别分子仍能保持原有的生物活性;生物膜应与转换器紧密接触,并且能适用于多种测试环境;用于固定的物质应具有良好的稳定性与耐用性;尽量减少生物膜中生物组分的相互作用以保持其原有的高选择性。常用的固定生物活性物质的方法有:夹心法、吸附法、包埋法、共价键合法、交联法等<sup>[28,29]</sup>。我们实验室有良好的固定生物活性物质的研究基础,利用夹心法、包埋法、共价键合法,研发了多种电化学生物传感器,对生物医学、食品、环境等多个领域进行了分析检测。

## 2.3 生物传感器的应用与前景

生物传感器的高度自动化、微型化、便携性,减少了对使用者的技术和适用环境的要求,尤其适用于大型检测仪器不方便出入的野外现场分析,以及对于突发事件的应急检测。因而生物传感器在生物医学、环境监测、食品分析、军事应用等多个领域都有着重要的应用价值。近年来,越来越多的生物传感器与纳米材料、高分子材料等具有生物相容性的基元材料相结合,这些基元材料被组装后,并不影响它的结构以及和其它分子的亲和性,因此还可以与其它任何生物分子如酶、受体、抗体等结合。用组装技术构建纳米复合膜,把酶等具有生物活性的分子或具有生物活性的细胞、组织固定在组装膜修饰的电极上,对特定物质选择性的产生响应,可制成相应的传感器。相信随着科技的不断进步,生物传感器将会被应用到越来越多的,与人类生产生活息息相关的领域中。

## 3 稀土纳米晶上转换材料的概述

### 3.1 上转换发光材料

### 3.11 上转换发光材料的理论研究

所谓上转换材料是指受到光激发时,可以发射出比激发光波长短的荧光的材料。它是基于稀土元素 4f 电子间的跃迁,由于外壳层电子对 4f 层电子有屏蔽作用,使得 4f 电子态之间的跃迁受基质的影响很小,每种稀土离子都有其确定的能级位置。由于稀土离子不同,则有不同的上转化过程<sup>[30]</sup>。上转化过程可分为激发态吸收(Excited State Absorption)、能量转移(Energy Transfer)和“光子雪崩”(Photon Avalanche)三种过程。

#### 1. 激发态吸收

激发态吸收是上转换发光的最基本的过程。其原理是:在发光中心处于基态能级  $E_1$  上的离子吸收能量为  $\phi_1$  的光子,跃迁至中间态  $E_2$ ,如果另外一个光子的振动能级  $\phi_2$  刚好与  $E_2$  和更高的激发态能级  $E_3$  的能量间隔匹配,则  $E_2$  上的该离子通过吸收该光子而跃迁至  $E_3$  形成双光子吸收。只要该高能级上粒子数足够多,形成粒子数反转,就可实现较高频率的激光发射,出现上转换<sup>[31]</sup>。(见图 1.9)

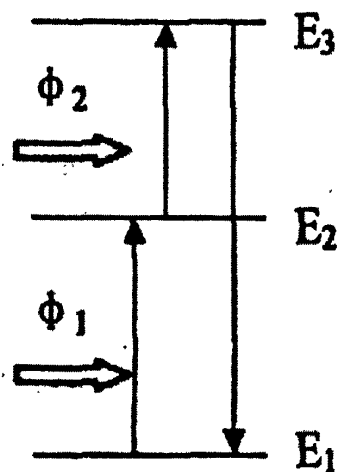


图 1.9 激发态吸收过程图解

#### 2. 能量转移

根据能量转移的方式不同,可以分为连续能量转移(Successive Energy Transfer)、交叉弛豫(Cross Relaxation)和合作上转换(Cooperative Upconversion)三种形式。其中,连续能量转移一般发生在不同类型的离子之间的,交叉弛豫发生在相同或不同类型的离子之间,合作上转换发生在同时位于激发态的同一类型的离子之间,也可以理解为三个离子之间的相互作用<sup>[30,32,33]</sup>。(见图 1.10)

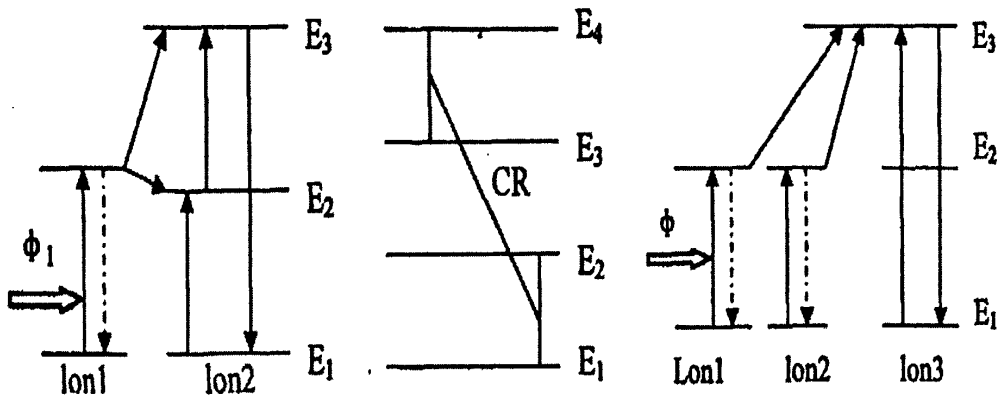


图 1.10 从左到右依次为连续能量转移、交叉弛豫和合作上转换的过程图解

### 3. “光子雪崩”

“光子雪崩”是激发态吸收和能量转移相结合的过程，其原理如图 1.11 所示。即  $E_2$  上的一个离子吸收该能量后被激发到  $E_3$ ， $E_3$  与  $E_1$  发生交叉弛豫过程，离子都被积累到  $E_2$  能级上，使得  $E_2$  上的粒子数像雪崩一样增加。

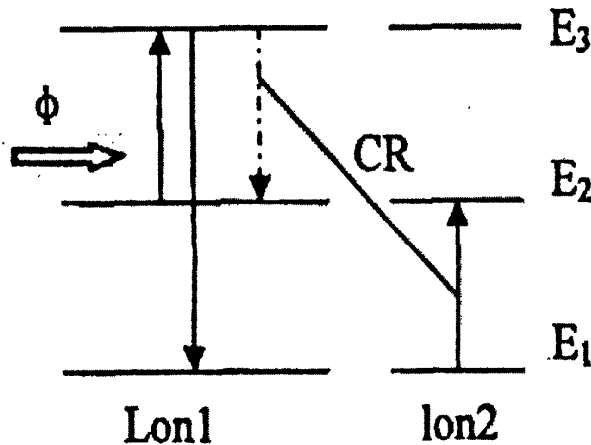


图 1.11 “光子雪崩”的过程图解

## 3.12 上转换发光材料的合成方法

### 1. 高温固相法

固相法是合成上转换材料最简单也最传统的方法。即是利用所需氧化物高纯

粉料,按化学计量比配料混合均匀,在特定的条件下(温度、反应时间等)经高温煅烧后,得到的具有一定粒度的上转换发光材料。该方法工艺简单、效率高、成本低,然而合成的粉体烧结性能却不理想。

## 2. 溶胶-凝胶法

溶胶-凝胶法是利用含高化学活性组分的化合物的前驱体,在液相下将这些原料均匀混合,并进行水解、缩合反应,在溶液中形成稳定的透明溶胶体系。再将凝胶干燥、焙烧去除有机成分,最后得到无机材料。此法几乎适用于所有发光材料的合成。该方法所需设备比较简单,制备过程中产品的性能与结构易控制,合成的产品均匀,重复性好。既可以合成无定形的材料,又可以制备结晶态的材料。不过目前使用该方法制备上转换材料的报道相对较少。

## 3. 水热合成法

这是一种新型的无机合成方法。在水热的条件下,反应物以各种配合物的形式溶解在水中,水分子将会参与这个过程,属于液相反应。此方法的优点在于,实验时温度低,材料的生产过程易控制。合成的材料晶形好,物相均匀及产率率高。

## 4. 共沉淀法

共沉淀法又称“化学沉积法”。以水溶性物质为原料,通过液相化学反应,生成难溶解的物质,从水中将其分离出来,洗涤、过滤、煅烧、热分解,最后得到超细粉发光材料。与传统的高温固相反应相比,共沉淀法的主要优点是,操作简单,流程短,能直接得到化学成分均一的粉体材料,同时,可以精确地控制粒子的成核与长大,得到粒度可控、分散性良好的粉体材料。但是,该方法受较多因素的影响(如溶液的组成、浓度、温度、时间等),形成分散性较好粒子的条件苛刻,并且沉淀剂易作为杂质混入沉淀物。沉淀过程中各种成分的分离困难和沉淀剂不易溶于水溶液等。因此该方法对于复杂的多组分体系制备有一定的局限性。

# 3.2 上转换发光材料的应用

## 3.21 上转换发光材料在生物分析中的应用

上转换材料由于其高灵敏性、高灵活性、高稳定性、高安全性等优点，近年来作为新型的生物标记物与免疫层析技术、光学传感技术相结合，被应用于生物医学检测领域。上转换发光材料具有良好的生物相容性，同时，上转换材料是由惰性材料合成的，在其激发光的过程中，对检测者、被检测样品、环境均无任何危害，因而被广泛的应用于生物分析中。李亚栋等<sup>[34]</sup>利用稀土纳米晶上转换发光材料，对抗原抗体间的特异性作用进行检测，对目标蛋白进行了定性和定量的分析。（图 1.12）李富友课题组<sup>[35]</sup>利用稀土纳米晶上转换发光材料，对 DNA 杂交进行了定性和定量分析，并取得了较好的结果。（图 1.13）

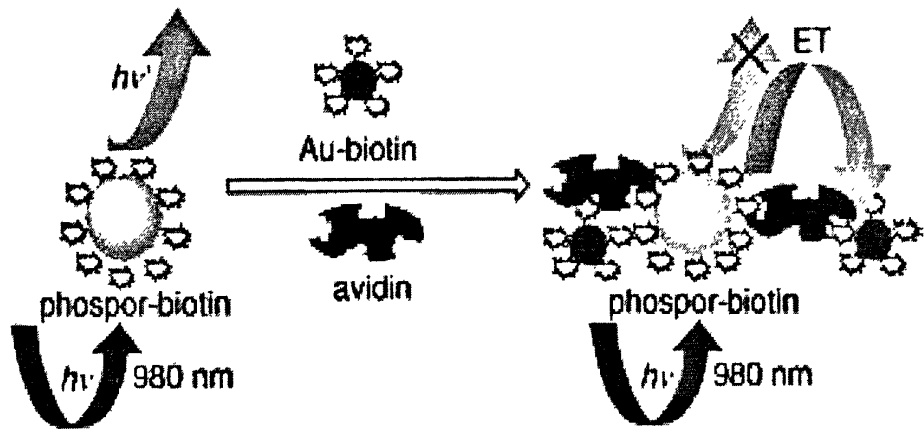


图 1.12 基于上转换发光材料和纳米金对 biotin 进行检测的图解

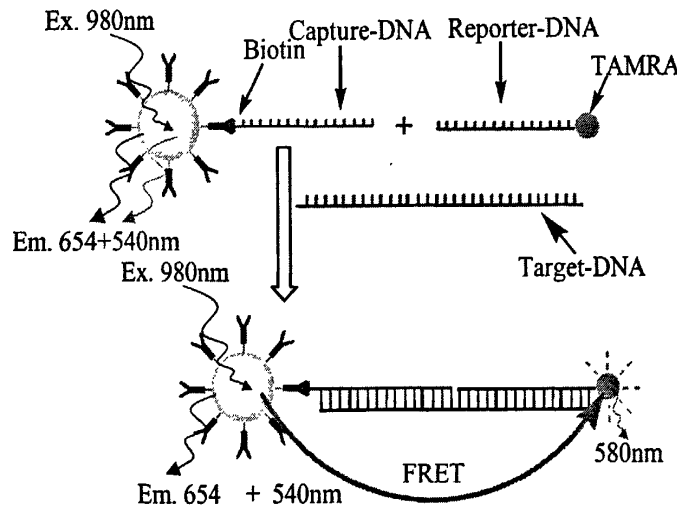


图 1.13 基于上转换发光材料和荧光染料对 DNA 杂交进行检测的图解

荧光光谱对于组织和细胞成像，一直是人们研究的热点。与传统的荧光发光物质相比，上转换材料的激发光——低能量的长波，更易于穿透样品，到达更深的位置，同时，光损伤和光漂白也大大降低。因而上转换纳米荧光材料被应用于细胞成像和活体跟踪实验，成为人们研究的热点。李富友课题组<sup>[36,37]</sup>利用 980 nm 激发光的稀土纳米晶上转换荧光发光材料，进行了细胞成像实验，对细胞进行了分析。图 1.14 中，a 是标记了传统荧光染料 DAPI 的 HeLa 细胞在 405 nm 的激发波长下的成像图，呈蓝色；b 是标记了传统荧光染料 DiI 的 HeLa 细胞在 543 nm 的激发光下的成像图，呈红色；c 是标记了稀土纳米晶上转换材料的 HeLa 细胞在 980 nm 的激发光下的成像图，呈绿色。

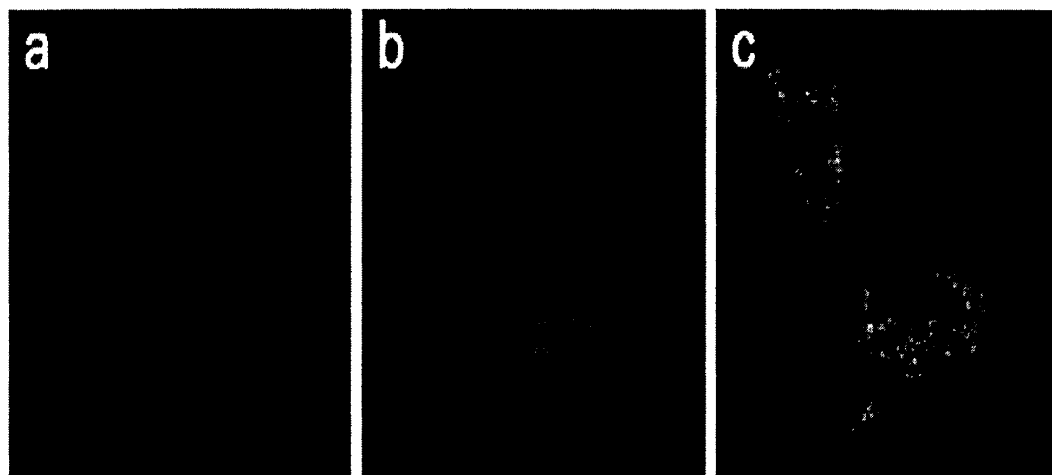


图 1.14 稀土上转换纳米晶材料和传统的荧光染料在 HeLa 细胞成像的比较图解。a. 标记了传统荧光染料 DAPI 的 HeLa 细胞；b. 标记了传统荧光染料 DiI 的 HeLa 细胞；c. 标记了稀土纳米晶上转换材料的 HeLa 细胞。

### 3.22 上转换发光材料在防伪技术中的应用

以红外光为激发光的上转换材料配置的油墨是无色的，红外光源也是人眼看不见的，因此这类材料具有良好的防伪标识功能。当前广泛应用的是紫外激发发光的标识材料，相比之下，红外上转换标识材料合成成分复杂，技术要求高，难以仿造。使用高效的红外上转换材料和价格比较低廉的红外激发器来实现发光过程，达到标识和防伪的目的，将会是一项含量很高的防伪技术，可用于图书发行，各类名牌商标、证件、银行卡、信用卡和品牌包装。

### 3.23 上转换发光材料在显示技术中的应用

近几年来,近红外上转换材料被广泛应用于新型的高性能显示器中。此种显示器具有体积小,效率高,亮度高,寿命长和色彩鲜艳等特点,而且还可以实现真三维立体显示等优点。目前很多人从事这个领域的研究,并取得了一定的成果。目前已研制出了一种红外光束探测板,属于发光显示器件领域。该显示器结构简单,使用安全,性能可靠,有效红外工作波段为 700 nm -1500 nm。该显示器可以发出红、绿、蓝可见光,且光斑清晰,视觉效果极好。

### 3.3 上转换发光材料的前景

随着上转换材料在生物医学、防伪和显示技术方面的应用越来越广泛,人们对上转换发光材料的兴趣越来越大,对其质量要求也越来越高,制备工艺对上转换发光效率有很大的影响。因而,近年来,上转换材料的合成方法的研究,成为了人们研究的热点。相信随着合成工艺的不断完善,寻找到不同的材料使用不同的合成方法,最终将得到理想的材料。而上转换材料将会被广泛应用于产品商标防伪,生物医学,细胞成像,活体成像等多个研究领域。

## 4 本论文的研究意义

本研究工作旨在利用核酸适配子亲和力高、制备简单、易于修饰、稳定性好等优点,代替传统的抗原抗体分析体系,以 DNA 为平台,同时与量子点、新型稀土上转换纳米材料相结合,对在生物医学中有着特殊意义的蛋白质或 DNA,进行分析。

在第一部分工作中,将核酸适配子与量子点相结合,起到了信号放大的作用。利用此生物传感器对低丰度蛋白—凝血酶进行定性和定量的分析。通过核酸适配子与目标蛋白特异性结合作用,取代传统的抗原—抗体模式,有效的克服了常规免疫分析的缺点。通过电化学溶出伏安法,对量子点溶解后得到的重金属离子进行检测,提高了灵敏度,降低了检出限,同时样品的消耗量也大大降低。本实验还解决了非特异性吸附的问题,提高了该传感器的选择性。通过对实际样品人的血清、牛血清白蛋白、胎牛血清的检测结果的比较,进一步证明了该方法用于实际样品分析的可行性。由于核酸适配子的作用力强、靶分子范围广等多种优点,在不久的将来,核酸适配子将会在分子生物学、疾病预防、临床诊断、新药研发、

环境检测、疾病的早期检测、毒理学、食品安全检测等领域得到广泛的应用。

在第二部分工作中,将新型的稀土纳米晶上转换材料与纳米金相结合,对具有特殊生物意义的目标 DNA 进行检测。通过稀土纳米晶上转换材料与纳米金颗粒之间的距离变化,即发生了 FRET 过程,荧光的强度的变化,来对 DNA 杂交过程进行监测。该方法在体外实验中,已经取得了较好的结果。由于稀土纳米晶上转换材料具有生物相容性好、更易于穿透样品、光损伤和光漂白低等优点,因而,其在细胞成像、活体跟踪等生物医学方面有着广阔的应用前景。

## 5 参考文献

- [1] Mao C. D., Sun W. Q., Shen Z. Y., Seeman N. C. A nanomechanical device based on the B-Z transition of DNA [J]. *Nature*, 1999, 397: 144-146.
- [2] Adleman L. M. Molecular computation of solutions to combinatorial problems [J]. *Science*, 1994, 266: 1021-1024.
- [3] Alivisatos A. P., Johnsson K. P., Peng X. G., Wilson T. E., Loweth C. J., Bruchez M. P., Schultz P. G. Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA [J]. *Nature*, 1996, 382: 609-611.
- [4] Braun E., Eichen Y., Sivan U., Ben-Yoseph G. DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire [J]. *Nature*, 1998, 391: 775-778.
- [5] Mao C. D., Sun W. Q., Seeman N. C. Assembly of Borromean rings from DNA [J]. *Nature*, 1997, 386: 137-138.
- [6] Murphy C. J., Arkin M. R., Jenkins Y., Ghatlia N. D., Bossmann S. H., Turro N. J., Barton J. K. Long-Range Photoinduced Electron-Transfer Through A DNA Helix [J]. *Science*, 1993, 262: 1025-1029.
- [7] Dandliker P. J., Holmlin R. E., Barton J. K. Oxidative thymine dimer repair in the DNA helix [J]. *Science*, 1997, 275: 1465-1468.
- [8] Monkkonen J., Urtti A. Lipid fusion in oligonucleotide and gene delivery with cationic lipids [J]. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 1998, 34: 37-49.
- [9] Osborne S. E., Ellington A. D. Nucleic acid selection and the challenge of combinatorial chemistry [J]. *Chem. Rev.*, 1997, 97: 349-370.
- [10] Hermann T., Patel D. J. Biochemistry - Adaptive recognition by nucleic acid aptamers [J]. *Science*, 2000, 287: 820-825.
- [11] Ulrich H., Martins A. H. B., Pesquero J. B. RNA and DNA aptamers in cytomics



- analysis [J]. *Cytom. Part A*, 2004, 59A: 220-231.
- [12] Jiang Y. X., Fang X. H., Bai C. L. Signaling aptamer/protein binding by a molecular light switch complex [J]. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 5230-5235.
- [13] Nagatoishi S., Nojima T., Galezowska E., Juskowiak B., Takenaka S. G quadruplex-based FRET probes with the thrombin-binding aptamer (TBA) sequence designed for the efficient fluorometric detection of the potassium ion [J]. *Chembiochem*, 2006, 7: 1730-1737.
- [14] Lai R. Y., Plaxco K. W., Heeger A. J. Aptamer-based electrochemical detection of picomolar platelet-derived growth factor directly in blood serum [J]. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 229-233.
- [15] Huang C. C., Huang Y. F., Cao Z. H., Tan W. H., Chang H. T. Aptamer-modified gold nanoparticles for colorimetric determination of platelet-derived growth factors and their receptors [J]. *Anal. Chem.*, 2005, 77: 5735-5741.
- [16] Du Y., Li B. L., Wei H., Wang Y. L., Wang E. K. Multifunctional label-free electrochemical biosensor based on an integrated aptamer [J]. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 5110-5117.
- [17] Cole J. R., Dick L. W., Morgan E. J., McGown L. B. Affinity capture and detection of immunoglobulin E in human serum using an aptamer-modified surface in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 273-279.
- [18] Dick L. W., McGown L. B. Aptamer-enhanced laser desorption/ionization for affinity mass spectrometry [J]. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 3037-3041.
- [19] Zhang H. Q., Wang Z. W., Li X. F., Le X. C. Ultrasensitive detection of proteins by amplification of affinity aptamers [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45: 1576-1580.
- [20] Polsky R., Gill R., Kaganovsky L., Willner I. Nucleic acid-functionalized Pt nanoparticles: Catalytic labels for the amplified electrochemical detection of biomolecules [J]. *Anal. Chem.*, 2006, 78: 2268-2271.
- [21] Smith J. E., Medley C. D., Tang Z. W., Shanguan D., Lofton C., Tan W. H. Aptamer-conjugated nanoparticles for the collection and detection of multiple cancer cells [J]. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 3075-3082.
- [22] Nutiu R., Yu J. M. Y., Li Y. F. Signaling aptamers for monitoring enzymatic activity and for inhibitor screening [J]. *Chembiochem*, 2004, 5: 1139-1144.
- [23] Elowe N. H., Nutiu R., Allah-Hassani A., Cechetto J. D., Hughes D. W., Li Y. F.,

- Brown E. A. Small-molecule screening made simple for a difficult target with a signaling nucleic acid aptamer that reports on deaminase activity [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45: 5648-5652.
- [24] Shoji A., Kuwahara M., Ozaki H., Sawai H. Modified DNA aptamer that binds the (R)-Isomer of a thalidomide derivative with high enantioselectivity [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129: 1456-1464.
- [25] Ho H. A., Leclerc M. Optical sensors based on hybrid aptamer/conjugated polymer complexes [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126: 1384-1387.
- [26] Bagalkot V., Farokhzad O. C., Langer R., Jon S. An aptamer-doxorubicin physical conjugate as a novel targeted drug-delivery platform [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45: 8149-8152.
- [27] 杨海朋. 纳米电化学生物传感器研究 [D]. 北京: 清华大学, 2005: 5-6.
- [28] 董绍俊, 车广礼, 谢远武. 化学修饰电极 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 501-538.
- [29] 司士辉. 生物传感器 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 1-4.
- [30] 何广海. 氟氧玻璃上转换发光材料的制备与表征 [D]. 长春理工大学, 2006.
- [31] Szachowicz M., Tascu S., Joubert M. F., Moretti P., Nikl M. Realization and infrared to green upconversion luminescence in  $\text{Er}^{3+}$ :  $\text{YAlO}_3$  ion-implanted optical waveguides [J]. *Opt. Mater.*, 2006, 28: 162-166.
- [32] 杨建虎, 戴世勋, 姜中宏. 稀土离子的上转换发光及研究进展 [J]. *物理学进展*, 2003, 23: 284-298.
- [33] 于辉, 尚庆坤, 王红丹, 孔祥贵. 纳米  $\text{TiO}_2$  基质掺杂稀土离子  $\text{Er}^{3+}$  和  $\text{Yb}^{3+}$  的上转换发光特性 [J]. *分子科学学报*, 2007, 23: 112-119.
- [34] Wang L. Y., Yan R. X., Hao Z. Y., Wang L., Zeng J. H., Bao H., Wang X., Peng Q., Li Y. D. Fluorescence resonant energy transfer biosensor based on upconversion-luminescent nanoparticles [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, 44: 6054-6057.
- [35] Chen Z. G., Chen H. L., Hu H., Yu M. X., Li F. Y., Zhang Q., Zhou Z. G., Yi T., Huang C. H. Versatile synthesis strategy for carboxylic acid-functionalized upconverting nanophosphors as biological labels [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130: 3023-3029.
- [36] Yu M. X., Li F. Y., Chen Z. G., Hu H., Zhan C., Yang H., Huang C. H. Laser Scanning Up-Conversion Luminescence Microscopy for Imaging Cells Labeled with Rare-Earth Nanophosphors [J]. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 930-935.

- [37] Yu M. X., Shi M., Chen Z. G., Li F. Y., Li X. X., Gao Y. H., Xu J., Yang H., Zhou Z. G., Yi T., Huang C. H. Highly sensitive and fast responsive fluorescence turn-on chemodosimeter for  $\text{Cu}^{2+}$  and its application in live cell imaging [J]. Chem. Eur. J., 2008, 14: 6892-6900.

## 第二章 基于核酸适配子的生物传感器对低丰度蛋白的检测

### 1 引言

对蛋白质进行检测和定量分析是基础研究如临床诊断中一项最基本的研究。而很多作为癌症标记物的蛋白质在人体中含量很低。所以建立有效的低丰度蛋白的检测非常关键。对低丰度蛋白的检测现在大多是通过蛋白的富集得到的,但这并不是解决实际问题的根本,并且会受一定条件的限制。血液中含有很多的肿瘤标志物,然而血液中成分复杂,肿瘤标志物在检测过程中容易受到干扰或掩盖而难以测到。现在血液检查作为临床上比较方便的检测,通过检测血液中肿瘤标志物而做到癌症的早期诊断有很重要的研究意义。

对于低丰度蛋白的检测不能像检测DNA一样可以通过PCR的反应使目标分子的量增加。核酸适配子(aptamer)是通过一种新的体外筛选技术—SELEX(指数富集配体系统进化),从随机单链寡聚核苷酸筛选得到的,可以是DNA,也可以是RNA。aptamer是从随机序列库中筛选出的最佳的核酸,该核酸能够与所提供的配体作用,如蛋白质、有机小分子、金属离子、肽段、细胞等目标靶分子,有很高的亲和性的结合<sup>[1-4]</sup>。近年来,aptamer逐渐取代抗体,成为人们研究的热点。与传统的抗体相比,aptamer具有相当多的优点:(1) aptamer是化学合成的,所以对温度有很好的稳定性,保存期限长;(2) 可以在固定的部位与多种分子很容易的结合而不影响它们的亲和性,因为标记的核苷酸能够引入到识别的平台外面;(3) 适合于多种靶分子,包括毒素、免疫原分子,与多克隆的抗体产品相比,aptamer将成批的变异降到了最小;(4) 由于aptamer是寡聚核苷酸链,所以易于分离和进行化学修饰。Drolet首先报道了aptamer在免疫分析方面的应用,酶联aptamer分析(ELAA)由ELISA/ELAA混合夹心组成,在微量滴定板上来检测人血管内皮生长因子。类似的混合分析方法被报道,在微珠的表面固定上或标记上aptamer作为捕获和检测的试剂。将aptamer用作传感器试剂和aptamer分子信标都得到了证实。

近年来,aptamer被普遍应用于蛋白质检测的分析体系中,其中包括了基于电化学<sup>[5]</sup>、荧光<sup>[6]</sup>、无标记<sup>[7]</sup>等多种分析体系。电化学由于其高灵敏度和简易性,引起了人们极大的关注,并被广泛的应用于分析研究中<sup>[8-9]</sup>。例如,已有文献报道,将氧化还原反应活性的物质(如二茂铁、亚甲基蓝)标记在aptamer一端,

然后将此 aptamer 固定在电极上,通过 aptamer 的构型变化,来检测凝血酶<sup>[10-11]</sup>。此外还有将 HRP (辣根过氧化物酶)、ALP (碱性磷酸酶) 等氧化还原酶标记在 aptamer 上<sup>[12-14]</sup>,通过酶催化底物产生的电信号的变化,对蛋白质进行间接地定性和定量的分析。金纳米粒子、银纳米粒子、量子点、磁粒子等纳米材料<sup>[15-19]</sup>由于其本身所具有的灵敏的光的、电化学特点以及良好的生物相容性,近年来逐渐被应用于生化分析中。近期有文章报道,采用量子点作为“示踪剂”,有利于加强电化学检测 DNA 杂交和具有夹心结构的免疫分析<sup>[20-21]</sup>。

凝血酶是一种由凝血酶前体形成的蛋白质水解酶,催化纤维蛋白元变成纤维蛋白而促使血液凝固。用于毛细血管出血的局部止血以及外科手术后组织愈合。由于人血液中的低浓度凝血酶是与疾病密切相关的,因而,拥有高灵敏度的检测手段有着极其重要的意义。与凝血酶特异性结合的 aptamer 也是人类在体外筛选得到的首批 aptamer<sup>[22]</sup>,此 aptamer 是由 15 个碱基构成的短链 DNA,它可以特异性的、选择性的结合凝血酶。

在本文中我们构建了基于 aptamer 的夹心结构电化学传感器,用于检测人的凝血酶。在这个实验中,我们采用 CdSe 量子点作为标记物,将量子点标记于二级 aptamer 的一端,它可以溶解在硝酸中,形成二价的 Cd 离子。通过电化学溶出伏安法检测形成的二价 Cd 离子,进而间接的对凝血酶进行定性和定量的分析。该体系采用玻碳电极作为工作电极,与离子选择性电极相比,玻碳电极则更加灵敏和便捷<sup>[23-24]</sup>。此检测过程是在一个小体积 (1 mL) 的体系中进行。

我们所构建的这种方法不仅选择性好,灵敏度高,而且仅仅需要 5  $\mu\text{L}$  样品,在很大程度上降低了样品消耗量,适用于实际样品的检测。如将该方法与高通量体系结合,则对于检测复杂体系中的低含量的生物标记物,具有很好的应用前景。

## 2 实验部分

### 2.1 试剂

人凝血酶  $\alpha$  重组体 (thrombin, Sigma Aldrich 化学试剂公司, 美国); DNA (上海生工, 上海); 表面修饰有链亲和素 (Streptavidin) 的 CdSe 量子点 (Invitrogen 化学试剂公司, 美国, 1  $\mu\text{M}$ ); 胎牛血清 (Fetal calf serum, FCS) (Gibco 生物试剂有限公司, 美国); 牛血清白蛋白 (BSA) (上海西唐科技有限公司, 上海); 人血清 (Human serum) (上海胸科医院, 上海); 氧化铝粉末 (颗粒大小分别为 1.0  $\mu\text{m}$ , 0.3  $\mu\text{m}$ , 0.05  $\mu\text{m}$ , CHI 辰华公司, 上海)。

2-巯基乙醇 (Sigma Aldrich 化学试剂公司, 美国); Tris (上海弘怡贸易有限

公司);  $\text{MgCl}_2$  (上海青析化工科技有限公司);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (上海文旻生化科技有限公司); 其它试剂均为分析纯, 所有实验用蒸馏水均为二次蒸馏水。

一级aptamer的序列: 5' - SH -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> - TT TTT TTT TTG GTT GGT GTG GTT GG-3' (下划线部分是aptamer序列)。

二级aptamer的序列: 5' - biotin - GGT TGG TGT GGT TGG -3' 。

## 2.2 仪器

超声仪(SCO 50 型, 220V/50Hz, 上海申波超声有限公司); CHI 1030 电化学分析仪(CHI 辰华公司, 上海); 裸金电极 (99.99%, 多晶金棒, CHI 辰华公司, 上海); 三电极体系: 工作电极为玻碳电极, 铂丝为对电极, 饱和甘汞电极为参比电极。所有的电位与 SCE 参比电极有关。

## 3 实验方法

### 3.1 aptamer 修饰的金电极的制备

金电极用氧化铝粉末抛光 (铝粉的颗粒大小依次为 1.0, 0.3, 0.05  $\mu\text{m}$ ), 然后依次用乙醇和二次蒸馏水超声 5 min 清洗, 以去除金电极表面附着的非特异性吸附的物质, 最后用氮气吹干。金电极在初次使用时, 需用 Piranha 溶液清洗电极 (30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  / 70% 浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 注意: Piranha 能与有机物发生剧烈的反应, 并且清洗的时间要短, 以免损伤金电极表面)。将一级 aptamer 溶解于 50 mM Tris-HCl 缓冲溶液 (140 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.4) 中, 使得终浓度为 1  $\mu\text{M}$ 。将配制好的一级 aptamer (5  $\mu\text{L}$ ) 滴加在经过预处理的金电极表面, 在常温下过夜反应 (12 小时)。用上述 50 mM Tris-HCl 缓冲溶液淋洗, 将电极表面未结合的物质洗脱。此后将经过处理的金电极浸泡在 2-巯基乙醇溶液中 (100 mM) 30 分钟, 使其在金电极表面形成 2-巯基乙醇的自组装单分子层 (SAM), 以降低非特异性吸附。

### 3.2 夹心结构 (Aptamer/Thrombin/Aptamer) 的体系构建

将二级 aptamer 溶解于 50 mM Tris-HCl 缓冲溶液 (140 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.4) 中, 使得终浓度达到 0.5  $\mu\text{M}$ 。然后将配制好的二级 aptamer 溶液与表面修饰了链亲和素的 CdSe 量子点混合 (1  $\mu\text{M}$ ), 使得二级 aptamer 与 CdSe 量子点的物质的量之比等于 5:1。将混合液在 4  $^\circ\text{C}$  下反应 30 分钟, 使之充分结合。

由于生物素 (biotin) 和链亲和素 (streptavidin) 之间强烈的结合作用, CdSe 量子点将会被标记到二级 aptamer 上。将一系列不同浓度的凝血酶标准溶液 (0 nM-25 nM) 滴加到修饰了一级 aptamer 的金电极表面, 室温下反应 1 小时。此后, 将上述标记了 CdSe 量子点的二级 aptamer 溶液, 滴加到金电极上, 常温下再次反应 1 小时。由于每一步反应完成后, 都要用 50 mM Tris-HCl 缓冲溶液淋洗, 去除金电极表面未结合的物质, 因而, 标记了 CdSe 量子点的二级 aptamer 并不需要进行分离提纯。

### 3.3 电化学检测

将表面结合了 CdSe 量子点的金电极放在 100  $\mu\text{L}$  的 0.1 M  $\text{HNO}_3$  溶液中超声 1 小时。然后将此溶液转移至 900  $\mu\text{L}$  0.1 M 醋酸缓冲液 ( $\text{pH}=4.6$ ) 中, 得到总体积为 1 mL。利用 CHI1030 电化学工作站的方波溶出伏安法对溶液中还的  $\text{Cd}^{2+}$  进行检测, 采用三电极体系 (玻碳电极作为工作电极, 饱和甘汞电极作为参比电极, 铂电极作为对电极) 进行分析, 要配备搅拌装置。电化学检测过程如下: 在 +0.6V 电位下进行 1 分钟的预处理, 除去玻碳电极表面的杂质; 在 -1.00V 进行 2 min 的电沉积, 将溶液中的  $\text{Cd}^{2+}$  还原成金属 Cd, 并沉积在玻碳电极的表面; 采用方波溶出伏安法, 使得玻碳电极表面的金属 Cd 再次溶解, 形成  $\text{Cd}^{2+}$ 。扫描范围是 -1.20V 到 -0.2V。电化学实验的支持电解质为 0.1 M 醋酸缓冲液。实验温度都控制在室温。

## 4 实验结果与讨论

### 4.1 电化学 Aptamer/Thrombin/Aptamer 夹心结构免疫分析原理

图 2.1 是基于 aptamer 对凝血酶进行电化学检测的分析方案示意图。首先, 将修饰了巯基的一级 aptamer 通过自组装, 固定在金电极的表面, 然后用 2-巯基乙醇对金电极表面未修饰一级 aptamer 的部位进行封闭, 进而降低非特异性吸附。随后向金电极表面滴加标准的凝血酶溶液, 使得凝血酶与固定在金电极表面的一级 aptamer 充分反应, 让 aptamer 捕获溶液中的目标分子—凝血酶, 形成了被分析物和单链 DNA 的复合物。将生物素标记的二级 aptamer 与表面修饰了链亲和素的 CdSe 量子点混合, 通过生物素与链亲和素的相互作用, 即抗原与抗体的作用, 将 CdSe 量子点标记到二级 aptamer 上。然后将标记了 CdSe 量子点的二级 aptamer 溶液, 滴加到已经捕获了目标分子的金电极上, 充分反应, 使得目标分

子与二级 aptamer 结合，最终形成 Aptamer/Thrombin/Aptamer 的夹心结构。将金电极浸泡在 0.1 M  $\text{HNO}_3$  溶液中，进而 CdSe 量子点被硝酸溶解，生成二价的 Cd 离子。用电化学方波溶出伏安法对溶解得到的二价 Cd 离子进行分析，通过电信号的变化，对目标分子凝血酶进行定性和定量分析。该研究中，我们采用 CdSe 量子点作为“示踪剂”。而电化学溶出伏安法是一种很灵敏的检测重金属离子的方法，灵敏度高，检出限低。因而，将量子点与电化学溶出伏安法结合，可以起到信号放大的作用，提高了该分析体系的灵敏度，降低了目标物质的检出限。

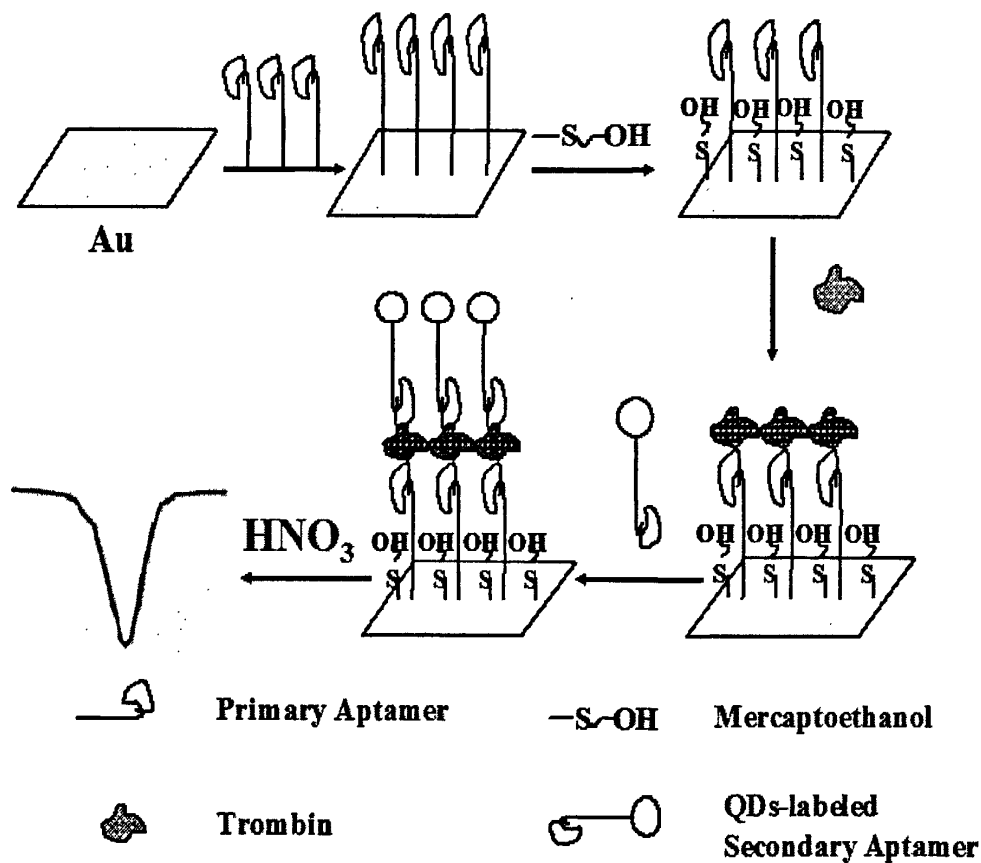


图2.1 基于aptamer的夹心法检测凝血酶的反应示意图



## 4.2 方波溶出伏安法对凝血酶的标准样品的检测

采用电化学方波溶出伏安法(SWSV)进行电化学检测, 电流信号随着目标分子凝血酶(Thrombin)浓度的变化而变化。由图 2.2 可以看出, 当目标蛋白质凝血酶存在的时候, 标记了 CdSe 量子点的二级 aptamer 可以被凝血酶捕获到金电极的表面上。当 CdSe 量子点被硝酸溶解后, 得到的二价 Cd 离子, 可以通过方波溶出伏安法检测。所得到的电化学信号是与被检测物质凝血酶的量成正比的。当不含目标分子的空白溶液滴加到电极表面时, 电化学检测得不到明显的二价 Cd 离子的峰。当目标蛋白的浓度不断增加, 所得到的电信号的峰电流也随之增大。

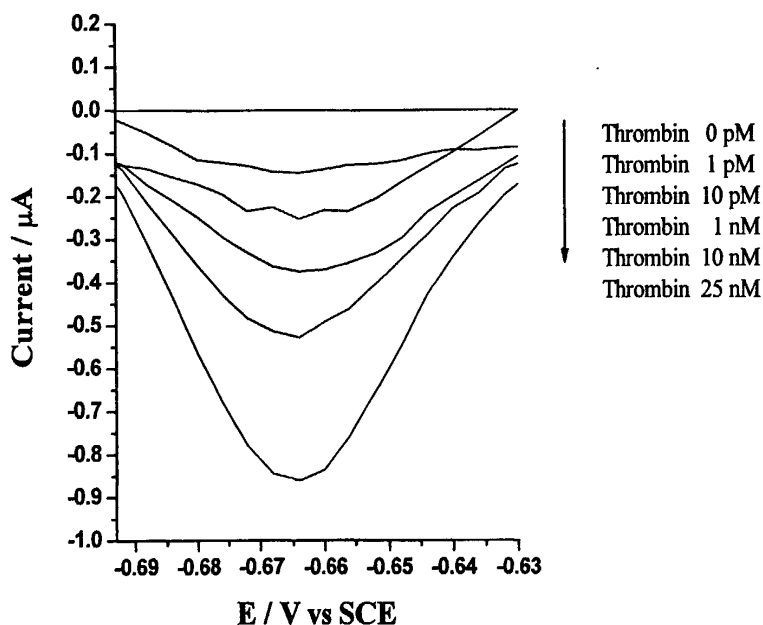


图 2.2 方波溶出伏安法(SWSV)检测对不同浓度凝血酶(0 nM-25nM)的响应

利用此装置, 我们得到了目标蛋白为 1 pM 的检出限, 这个结果, 比之前文献报道的检测凝血酶的方法的 100 pM-2.8 nM 的检出限要低<sup>[25]</sup>, 同时, 也与当前报道的最灵敏的检测凝血酶的方法的检出限相当, 都是可以检测到 attomole 物质的量级别的目标蛋白。不同浓度标准凝血酶对应的电流响应值的线性关系可见图 2.3。当标准蛋白凝血酶的浓度在 1 pM 到 25 nM 的范围内时, 正好与健康人体中凝血酶凝结起作用的浓度相吻合。

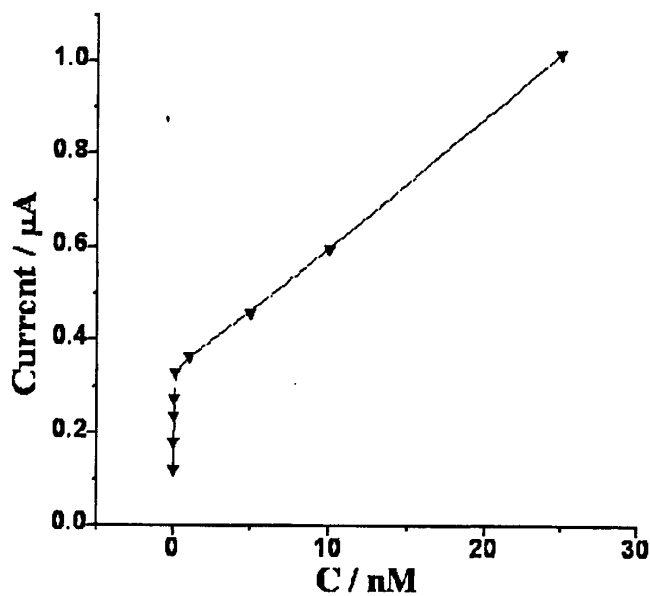


图 2.3 峰电流对不同浓度凝血酶(0 nM-25nM)标准溶液的对应关系

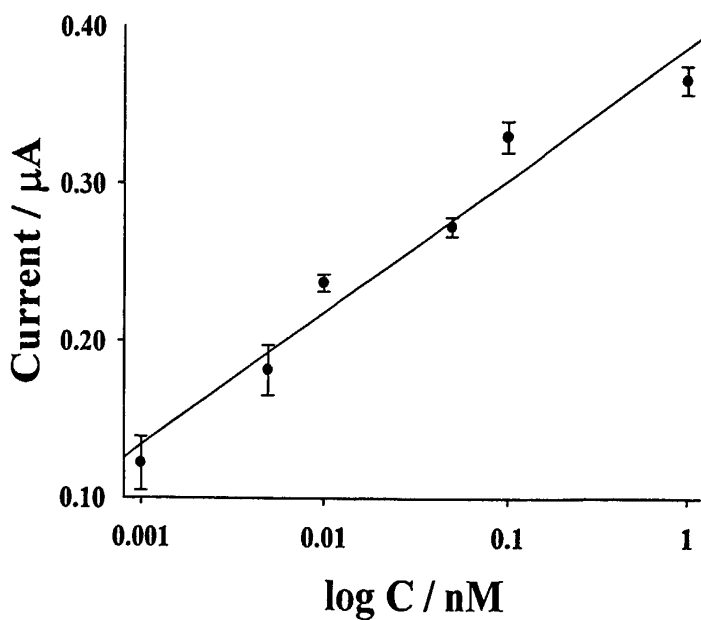


图 2.4 峰电流对不同浓度凝血酶(1 pM-1nM)标准溶液的对数值线性关系

当凝血酶标准溶液的浓度在 1 pM 到 1 nM 的范围内时, 峰电流值与浓度的

对数值成正比,即呈线性关系。(见图 2.4) 因而此范围可用于对低浓度的凝血酶进行定性分析。同时,据文献报道,该浓度范围下的凝血酶,与疾病产生有着紧密的联系,故而,此线性对于检测实际样品有着很大的意义。而当凝血酶标准溶液的浓度在 1 nM 到 25 nM 范围内时,峰电流与凝血酶的浓度是成线性关系的。出现这种现象的原因是,当凝血酶的浓度增大,相对过量的凝血酶会影响凝血酶与 aptamer 的结合,因而当高浓度的目标蛋白质凝血酶存在时,峰电流值反而会缓慢增加。这种现象在其它免疫分析中经常会出现。此外,该方法具有良好的重现性,对于标准溶液进行检测的相对标准偏差为 9.3% ( $n=5$ )。

### 4.3 电化学 aptamer 传感器在检测实际样品中的应用

上面我们已经证明了该方法具有高的灵敏性,为了检验所构建系统的选择性和抗非特异性吸附的能力,我们对实际样品一人的血清进行了检测。血液成分复杂,很多成分会对被测物质进行掩盖,使得检测结果出现假阴性或假阳性。我们对健康人的血清 (Human Serum)、胎牛血清 (Fetal Calf Serum)、牛血清白蛋白 (BSA) 进行了逐一检测,结果如图 2.5 所示。所有的实际样品在未经预处理的情况下,直接用我们构建的方法进行检测。通过检测,正常血清中凝血酶的浓度为 3.1 nM,正好处于健康人血液中凝血酶的浓度范围中 (nM 数量级),而低于 pM 级别浓度的凝血酶是与一系列疾病相关联的。在这个实验中,胎牛血清和牛血清白蛋白是作为对照实验的。检测胎牛血清和牛血清白蛋白得到了很小的峰电流,而人血清对应得到比较大的峰电流值。人血清得到的峰电流值是胎牛血清和牛血清白蛋白得到的峰电流值的 7 倍多。这充分说明了,此基于 aptamer 的电化学传感器,对人的凝血酶有很好的选择性。这种良好的抗非特异性吸附的能力是由于在固定了一级 aptamer 之后,向金电极上滴加了封闭剂 2-巯基乙醇,封闭了金电极上剩余的位点,降低了非特异性吸附。基于该方法的高灵敏度和高选择性,此方法适用于检测实际样品中的目标蛋白—凝血酶。然而,这种方法还是有一定弊端的,当用硝酸溶解后,修饰在电极表面的结构也将会被破坏,因而此装置不能重复利用,有待进一步的改进。

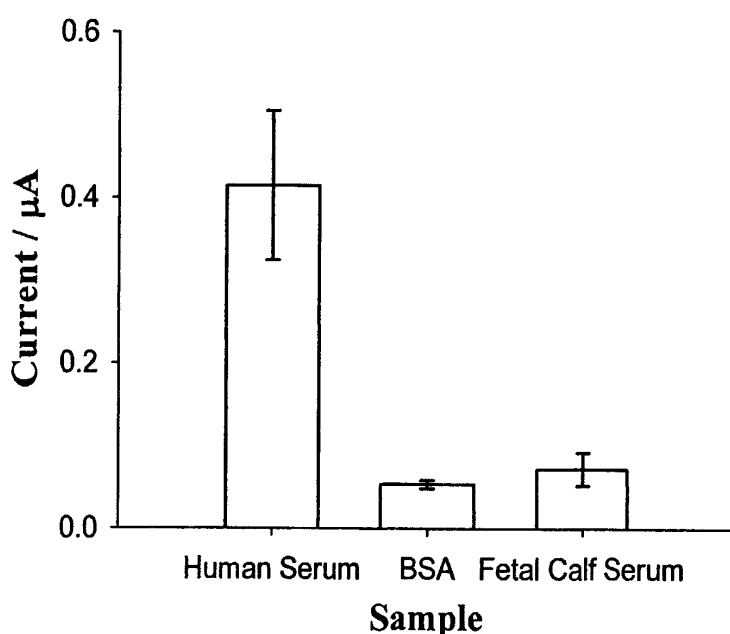


图 2.5 峰电流对应于人的血清 (Human Serum)、胎牛血清 (Fetal Calf Serum)、牛血清白蛋白 (BSA)

## 5 结论及展望

近年来,核酸适配子传感器的研究得到了飞速的发展,在核酸适配子传感器的设计、分析特性如灵敏度、线性范围和稳定性的改善,以及应用范围等研究方面取得了显著的进展。核酸适配子传感器的研究将继续是一个十分活跃的研究领域。设计新的核酸适配子传感器模式,进一步提高核酸适配子传感器的灵敏度和检出限,使得核酸适配子传感器微型化、高通量阵列化,已经成为核酸适配子传感器今后发展的主要方向。

我们在现有的对核酸适配子传感器的研究基础上,在实验室原有的电化学检测的实验平台上,构建了基于aptamer的量子点标记的电化学传感器,对人的凝血酶进行定性和定量分析,并将此方法应用于了实际样品一人的血清样品的检测。

在本章工作中,我们突破长期以来人们对量子点光学性质的关注,从其电化学特性方面进行分析,即将量子点溶解,得到低浓度的二价的重金属Cd离子。我们采用了对检测重金属离子极为灵敏的电化学方波溶出伏安法对所得的二价的重金属离子Cd进行检测,起到了信号放大的作用。而aptamer与蛋白质结合时

具有高亲和力和高选择性,因此在寡核苷酸和蛋白质之间建立起了一座桥梁。运用核酸适配子与目标蛋白质凝血酶的强亲和力,构建了aptamer/thrombin/aptamer的夹心结构,取得了满意的效果。用核酸适配子检测目标蛋白,保留了过去免疫分析检测的高专一性和选择性的特点。由于核酸适配子的化学合成具有极佳的准确性和重复性,很很高的纯度,几乎消除了核酸适配子制备的批间误差。将量子点标记在aptamer的一端,因此,用aptamer检测蛋白比用传统的免疫方法检测更有优势。传统的蛋白质检测分析者,往往需要修饰蛋白,但标记物对蛋白活性影响较大,而且很多蛋白是不能标记的。夹心结构则不需要修饰蛋白,两条识别不同结合位点的aptamer的协调作用,使得此传感器具有极佳的选择性。2-巯基乙醇的封闭,可以大大降低非特异性吸附,从而在一定程度上,提高了体系的选择性。通过对人的凝血酶标准溶液的分析 and 检测,得到了从1 pM到1 nM的线性检测范围,检测下限是1 pM,对检测人的病变血液有着重要的意义。该装置耗费的样品量少,仅仅需要5  $\mu$ L,因而适用于采样量少的实际样品的检测。基于以上的特点,我们对未经预处理的实际样品一人的血清进行了检测,并以胎牛血清和牛血清白蛋白作为参照,进行了对照实验,结果达到了预期的效果。

我们所研究的具有高灵敏度和高选择性的凝血酶传感器的体系,可以用于蛋白质组学分析、药物筛选、免疫分析、复杂样品分析等诸多分析领域。该方法将以制备和操作简易,成本低廉的优势在临床的早期检测中占据更重要的位置,具有良好的应用前景。改进体系的重复利用性,将会对有多种物质存在的复杂体系的分析研究,有着极其重大的意义。

## 6 参考文献

- [1] Hermann T., Patel D. J. Biochemistry - Adaptive recognition by nucleic acid aptamers [J]. Science, 2000, 287: 820-825.
- [2] 黄思敏, 许杨. 核酸适配子SELEX技术筛选研究进展 [J]. 中国公共卫生, 2008, 24: 211-311.
- [3] O'Sullivan C. K. Aptasensors - the future of biosensing [J]. Anal. Bioanal. Chem., 2002, 372: 44-48.
- [4] 漆红兰, 李延, 李晓霞, 张成孝. 适体传感器研究新进展 [J]. 化学传感器, 2007, 27: 1-3.
- [5] Osborne S. E., Ellington A. D. Nucleic acid selection and the challenge of combinatorial chemistry [J]. Chem. Rev., 1997, 97: 349-370.

- [6] Xiao Y., Lubin A. A., Heeger A. J., Plaxco K. W. Label-free electronic detection of thrombin in blood serum by using an aptamer-based sensor [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, 44: 5456-5459.
- [7] Nutiu R., Li Y. F. Structure-switching signaling aptamers [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125: 4771-4778.
- [8] Li B. L., Wei H., Dong S. J. Sensitive detection of protein by an aptamer-based label-free fluorescing molecular switch [J]. *Chem. Commun.*, 2007, 73-75.
- [9] Bang G. S., Cho S., Kim B. G. A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 21: 863-870.
- [10] Zuo X. L., Song S. P., Zhang J., Pan D., Wang L. H., Fan C. H. A target-responsive electrochemical aptamer switch (TREAS) for reagentless detection of nanomolar ATP [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129: 1042-1043.
- [11] Radi A. E., Sanchez J. L. A., Baldrich E., O'Sullivan C. K. Reagentless, reusable, ultrasensitive electrochemical molecular beacon aptasensor [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128: 117-124.
- [12] Xiao Y., Piorek B. D., Plaxco K. W., Heeger A. J. A reagentless signal-on architecture for electronic, aptamer-based sensors via target-induced strand displacement [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127: 17990-17991.
- [13] Mir M., Vreeke M., Katakis L. Different strategies to develop an electrochemical thrombin aptasensor [J]. *Electrochem. Commun.*, 2006, 8: 505-511.
- [14] Centi S., Tombelli S., Minunni M., Mascini M. Aptamer-based detection of plasma proteins by an electrochemical assay coupled to magnetic beads [J]. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 1466-1473.
- [15] Ikebukuro K., Kiyohara C., Sode K. Novel electrochemical sensor system for protein using the aptamers in sandwich manner [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 20: 2168-2172.
- [16] Polsky R., Gill R., Kaganovsky L., Willner I. Nucleic acid-functionalized Pt nanoparticles: Catalytic labels for the amplified electrochemical detection of biomolecules [J]. *Anal. Chem.*, 2006, 78: 2268-2271.
- [17] 徒永华, 程圭芳, 林莉, 郑静, 吴自荣, 何品刚, 方禹之. 基于核酸适配体的新型荧光纳米生物传感器用于凝血酶的测定 [J]. *高等学校化学学报*, 2006, 27: 2266-2270.
- [18] Park S. J., Taton T. A., Mirkin C. A. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes [J]. *Science*, 2002, 295: 1503-1506.

- [19] Cui R., Pan H. C., Zhu J. J., Chen H. Y. Versatile immunosensor using CdTe quantum dots as electrochemical and fluorescent labels [J]. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 8494-8501.
- [20] Wang J., Liu G. D., Merkoci A. Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125: 3214-3215.
- [21] Liu G. D., Lee T. M. H., Wang J. S. Nanocrystal-based bioelectronic coding of single nucleotide polymorphisms [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127: 38-39.
- [22] Bock L. C., Griffin L. C., Latham J. A., Vermaas E. H., Toole J. J. Selection Of single-stranded-DNA molecules that bind and inhibit human thrombin [J]. *Nature*, 1992, 355: 564-566.
- [23] Numnuam A., Chumbimuni-Torres K. Y., Xiang Y., Bash R., Thavarungkul P., Kanatharana P., Pretsch E., Wang J., Bakker E. Aptamer-based potentiometric measurements of proteins using ion-selective microelectrodes [J]. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 707-712.
- [24] Thurer R., Vigassy T., Hirayama M., Wang J., Bakker E., Pretsch E. Potentiometric immunoassay with quantum dot labels [J]. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 5107-5110.
- [25] Hansen J. A., Wang J., Kawde A. N., Xiang Y., Gothelf K. W., Collins G. Quantum-dot/aptamer-based ultrasensitive multi-analyte electrochemical biosensor [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128: 2228-2229.

## 第三章 基于纳米金淬灭水溶性功能化稀土纳米晶的 DNA 的检测

### 1 引言

自从1998年Alivosato and Nie 小组在Science上报道的量子点用于生物成像以来, 纳米发光材料在生物学领域的应用已经引起了人们广泛的关注。<sup>[1,2]</sup>特别是量子点, 由于其独特的光学性质已经广泛应用于生物分析研究。但是仍存在着缺陷, 如一直存在的量子点毒性、光稳定性等问题。更重要的是量子点使用单光子激发, 即短波激发长波发射, 因此就存在两个问题: (1)低的穿透深度和相对低的空间分辨率, (2)生物样品内源性荧光物质的自发荧光的干扰, 导致单分子荧光成像很难, 这就迫切需要寻找一种新型荧光物质。<sup>[3-5]</sup>上转换发光是一个吸收低能量光子, 发射出高能量光子的反斯托克位移过程。稀土粒子由于存在丰富的4f电子和能级, 稀土粒子掺杂的稀土无机发光材料, 在连续980 nm激光激发下, 可以吸收多个光子, 很容易实现上转换发光。稀土上转换发光材料具有窄带发射, 上转换效率高, 发射寿命长等特性。因此, 稀土上转换发光探针具有传统标记物所无法比拟的优势: (1)用光子能量高的紫外光对标记物进行激发时, 会对被检测的生物样品产生损伤, 而上转换发光材料采用低光子能量的红外光源为激发光, 所以用上转换发光材料作为标记物可进行无损伤的动态监测; (2)一般荧光标记物在检测过程中会产生淬灭, 使得时间分辨检测无法进行, 而上转换发光材料发光性能稳定, 因而用它做标记物使实验方法更灵活, 不受标记物的限制; (3)980 nm激发, 无背景荧光, 穿透深度提高。

用于生物标记的稀土上转换纳米粒子首先必须满足尺寸足够小(一般小于20 nm), 水溶性和生物相容性, 表面功能化(如:  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{SH}$ )能与生物分子联接。目前已经报道的稀土上转换纳米粒子主要是采用热裂解和水热合成法, 这两种方法采用油酸作为表面活性剂, 着重于结晶度和形貌的控制, 制备的纳米粒子具有较好的油溶性。但是无法用于生物学的研究。所以将油溶性的纳米粒子改性为水溶性纳米粒子并能进行表面功能化是生物应用的前提。目前, 解决水溶性和生物相容性的方法主要有二氧化硅包覆和聚合物包覆的方法。<sup>[6-10]</sup>然而, 二氧化硅包覆的方法很难控制包覆的二氧化硅壳层的厚度, 和包覆后的单分散性; 采用聚合物包覆主要是靠有机分子间的非共价键作用而不是取代原有表面的有机分子, 所以这种作用力很弱, 在复杂的生物环境中极易游离下来, 而且纳



米粒子团聚严重。

碳碳双键的环氧化反应是经典的反应,并已广泛用于工业生产中。<sup>[11]</sup>由于含有双键的油酸、亚油酸、油胺等已被用于很多纳米粒子的制备中作为表面配体,我们采用过氧化物为环氧化试剂,将表面配体的双键氧化为三元环氧化合物的中间体,利用三元环氧化合物容易开环的特性,可以进一步与带有双-OH、-COOH、-NH<sub>2</sub>或-SH的PEG反应,达到纳米晶的水溶性功能化的目的。与已经报道的几种方法比较,本法具有以下优点:反应温和、速度快,易控制,环氧化效率高,制备的三元环氧化合物中间体,可以与带有不同官能团的PEG耦联,一步实现水溶性和功能化的目的。而且原有的油酸表面配体没有被破坏,带有功能团的PEG是以化学键的形式连接到表面配体上,比非共价键作用力稳定,不易游离掉。原有的亲油性油酸表面配体和嫁接的亲水性PEG配体一起包覆在纳米晶表面,形成两亲性表面配体,更有利于纳米晶穿透细胞膜,而且能有效的保护纳米晶不受水分子和活性氧原子的破坏。

纳米金是指金的微小颗粒,通常在水溶液中以胶体的形态存在。目前经典的制备金胶的方法是柠檬酸钠还原法。根据还原剂的种类和浓度的不同,可以在实验室条件下制备出不同粒径的金胶,且合成方法简单、原料价廉。金胶在510-550 nm可见光谱范围内有强的吸收峰,吸收波长随金颗粒直径增大而增加。当粒径从小变大时,表观颜色依次呈现出淡橙黄色(小于5 nm)、葡萄酒红色、深红色和蓝紫色变化。金胶的性质主要取决于金颗粒的直径及其表面特性。由于其直径在1-100 nm之间,而大多数重要的生物分子(如蛋白质、核酸等)的尺寸都在这一范围内,因此可以利用纳米金作探针进入生物组织内部探测生物分子的生理功能,进而在分子水平上揭示生命过程,而它独特的颜色变化也是其应用于生物化学的重要基础。

对特定病原体或遗传疾病DNA序列的检测,以往的方法大多是建立在标记有放射性、荧光和化学发光物质的探针与靶序列杂交的基础上。1996年Mirkin等<sup>[12]</sup>发展的核酸比色分析法为核酸检测提供了新的启示。其原理是利用巯基修饰的寡核苷酸在一定尺寸的金纳米粒子上进行组装,形成寡核苷酸包裹的金粒子探针,当该探针与互补的靶分子杂交时,使纳米金等离子共振吸收峰由520 nm红移至600 nm,形成网状聚集体而使纳米金溶液颜色由红变紫,从而指示靶分子的存在。

金纳米粒子由于良好的生物相容性和无毒副作用,近年来广泛应用于生物分析化学中,在生物分子标记和检测、纳米生物传感器和纳米生物芯片等技术的开发和应用方面取得了重要的进展。<sup>[13-17]</sup>本实验利用纳米金对功能化稀土纳米晶上转换材料所发出的520 nm附近的波长的光的特异性吸收,对DNA进行定性和定

量的分析。<sup>[18-20]</sup>

本文对稀土纳米晶上转换材料在生物分析中的应用,做了初步的探索。将修饰了化学基团的两条短链DNA,分别标记在纳米晶上转换材料和纳米金上,混合,使之杂交。由于稀土纳米晶上转换材料此时与纳米金离得很近,发生淬灭现象。向上述两个混合体系中加入目标DNA链,取代其中的一条链,此时荧光将恢复。通过这一荧光从淬灭到恢复的过程,对DNA进行分析。

## 2 实验部分

### 2.1 试剂

DNA (上海生工, 上海);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (上海文旻生化科技有限公司); 吐温-20 (国药集团化学试剂有限公司);  $\text{NaOH}$ ,  $\text{NaF}$ , 乙醇, 叔-丁醇,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 环己烷, 丙酮, 盐酸,  $\text{KMnO}_4$  和  $\text{NaIO}_4$  (国药集团化学试剂有限公司); 油酸 (Alfa Aesar); 稀土氧化物 ( $\text{Y}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Yb}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Er}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Ho}_2\text{O}_3$  和  $\text{Tm}_2\text{O}_3$ ) (北京镧素科技公司); 所有实验用蒸馏水均为二次蒸馏水。

DNA序列:

探针DNA<sub>1</sub>: 5' - CTT GAG AAA GGG CTG CCA AA<sub>20</sub>-NH<sub>2</sub> - 3'

探针DNA<sub>1</sub>: 3' - SH- CCC GAC GGT T - 5'

目标DNA: 3' - GAA CTC TTT CCC GAC GGT - 5'

### 2.2 仪器

X-射线衍射图 (XRD) 用德国 Bruker D4 型衍射仪测得, 采用的是 Cu-K $\alpha$  射线, Ni 滤光片。投射电镜 (TEM) 用日本 JEOL JEM2011 型高分辨投射电子显微镜测得。紫外-可见光吸收光谱用 Shimadzu 型紫外-可见分光光度计, 测试所用的光路都是双光路系统, 以校正仪器系统误差, 并尽可能扣除溶剂自身吸收的干扰。使用的样品池为 1.0 cm  $\times$  1.0 cm 的四面透光的石英比色皿; 紫外及可见光照采用 CHF-XM-550W 氙灯仪作为光源 (附带 Omega 滤光片)。荧光发射光谱是在 Edinburgh 公司 FLS920 荧光光谱上测得的。光源为 450W 的氙灯, 测试温度为室温, 探测器为半导体制冷的光电倍增管 (PMT)。使用的样品池为 1.0 cm  $\times$  1.0 cm 的四面透光的石英比色皿。

### 3 实验方法

#### 3.1 稀土纳米晶材料的制备

制备表面为油酸的 UCNPs: UCNPs 通过一种改进的水热法来制得。将 NaOH (1.2 g), 蒸馏水 (9 mL), 乙醇 (10 mL) 和油酸 (20 mL) 混合在一起, 搅拌直至形成透明的溶液。在不停的磁力搅拌下加入总量为 0.6 mmol 的稀土氯化物 (1.2 mL, 0.5 mol/L  $\text{LnCl}_3$ , Ln 为 Y 或者 78 mol%Y+20 mol%Yb+2 mol%Er (Ho or Tm)) 水溶液。随后在以上混合体系中加入 4 mL NaF (1.0 M) 水溶液。搅拌混合溶液大约 10 min, 将它们转移到一个 50 mL 水热釜, 封装, 在 160 °C 水热处理 8 h。自然冷却后, 可以发现样品沉积于水热釜底部, 用环己烷溶解样品, 加入乙醇使样品析出, 离心分离, 用乙醇洗涤几次可得较纯的样品。

氧化配体: 将新制的 0.1 g UCNPs 样品分散于 100 mL 环己烷中, 加入 70 mL 叔-丁醇、10 mL 水和 5 mL  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (5 wt %) 水溶液, 室温下搅拌 20 min。再加入 20 mL Lemieux-von Rudloff 试剂 (5.7 mM  $\text{KMnO}_4$  和 0.105 M  $\text{NaIO}_4$  水溶液)。以上混合溶液在 40 °C 搅拌超过 48 小时。冷却后, 离心分离, 并依次用蒸馏水、丙酮、乙醇洗涤沉淀。为了酸化沉淀, 将它们分散于稀盐酸溶液 (pH=4~5) 中搅拌大约 30min, 离心, 并用蒸馏水或者乙醇洗涤。为了方便表征, 可以将其冷冻真空干燥。

#### 3.2 纳米金胶的制备

取 18 mL 的二次蒸馏水于干净的圆底烧瓶中, 向其中加入 0.5 mL 0.01M 的  $\text{HAuCl}_4$  和 0.5 mL 0.01M 的柠檬酸钠, 搅拌均匀。然后向圆底烧瓶中, 加入用冰水新配置的 0.5 mL 0.1M 的  $\text{NaBH}_4$ , 搅拌, 待溶液的颜色由无色变为酒红色, 停止搅拌, 在室温下静置两小时。反应停止后, 应用铝箔包被置于 4 °C 的冷藏室中。

#### 3.3 制备探针 $\text{DNA}_1$ 修饰的纳米金胶

将 62.5  $\mu\text{L}$  24  $\mu\text{M}$  的探针  $\text{DNA}_1$  加入到 437.5  $\mu\text{L}$  5nm 的金胶溶液中, 使探针  $\text{DNA}_1$  的终浓度达到 3  $\mu\text{M}$ , 室温下反应 16 小时, 体系的溶液为 pH 为 7.4 的 0.01 M PBS TWEEN-20 (0.1 %)。在接下来的老化过程中, 分步滴加 NaCl 溶液, 使得 NaCl 的终浓度达到 0.01 M。

### 3.4 制备探针 DNA<sub>2</sub> 修饰的稀土纳米晶上转换材料

取 6 mg 的稀土纳米晶上转换材料 (UCNP<sub>5</sub>) 溶解于 2.5 mL PBS 中, 加入 45 mg NHS, 15mg EDC, 活化 8 h。离心, 洗涤, 反复操作 3 次。溶解于 1.25 mL PBS 中, 加入 100  $\mu$ L 的 10  $\mu$ M DNA<sub>2</sub>, 混合, 反应 12 小时。离心, 洗涤, 定容到 1.25 mL。

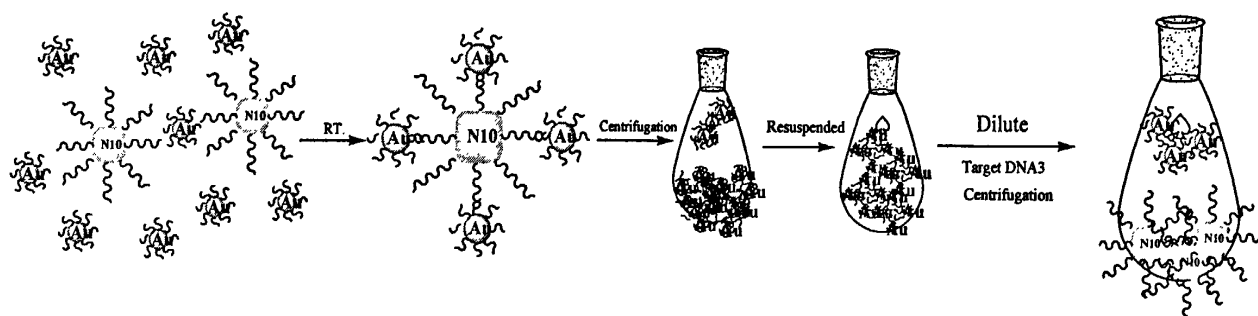


图 3.1 示意图

### 3.5 杂交实验

混合 3.3 中制备的 Au-DNA<sub>1</sub> 和 3.4 中制备的 UCNP-DNA<sub>2</sub>, 将混合物加热到 70  $^{\circ}$ C, 缓慢冷却到室温, 在暗室保存 12 小时。测试荧光光谱强度。

### 3.6 目标 DNA 的检测

将上述溶液离心, 去除上清液, 用 PBS 缓冲液清洗 3 次, 将沉积物重新溶解在 1.25 mL PBS 缓冲液中, 超声分散。向其中加入目标链 DNA<sub>3</sub> 80  $\mu$ L (25  $\mu$ M), 37  $^{\circ}$ C 下反应 6 小时, 测试荧光光谱强度。实验示意图见图 3.1。

## 4 实验结果与讨论

### 4.1 稀土纳米晶上转换材料的表征

制备的水溶性稀土纳米晶上转换材料经TEM测试，证明形貌很好，是边长为20 nm的方形材料。但由于两亲性表面配体，所以粒子由于静电和非共价键作用有一定的聚集（图3.2）。FITR测试证实改性后纳米晶表面连接有PEG（图3.3）。Zeta电势证明水溶性稀土纳米晶上转换材料表面是带负电的（表3.1）。

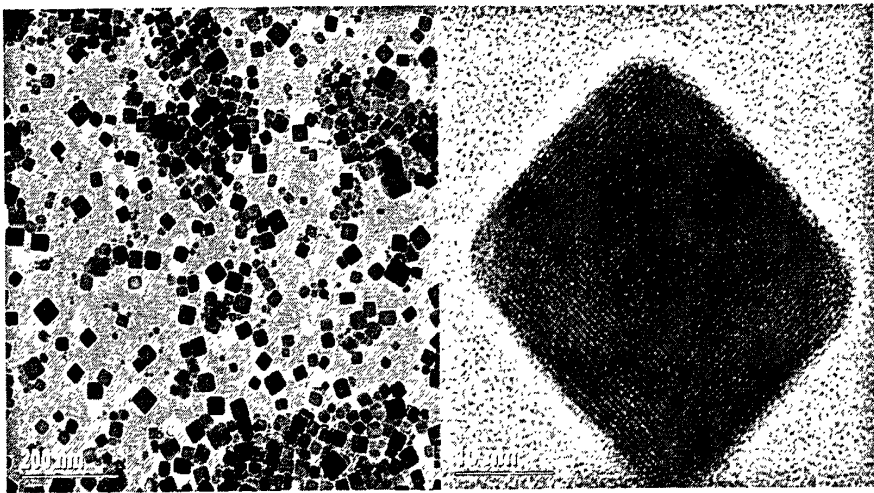


图 3.2 稀土纳米晶上转换材料的TEM图

Nanopaticales (pH=7)	Zeta potential(mV)
Pure SiO2	-35.2
UCNPs/SiO2-NH2	-9.23
UCNPs/SiO2-COOH	-25.6

表 3.1 稀土纳米晶上转换材料表面的 Zeta 电势测定

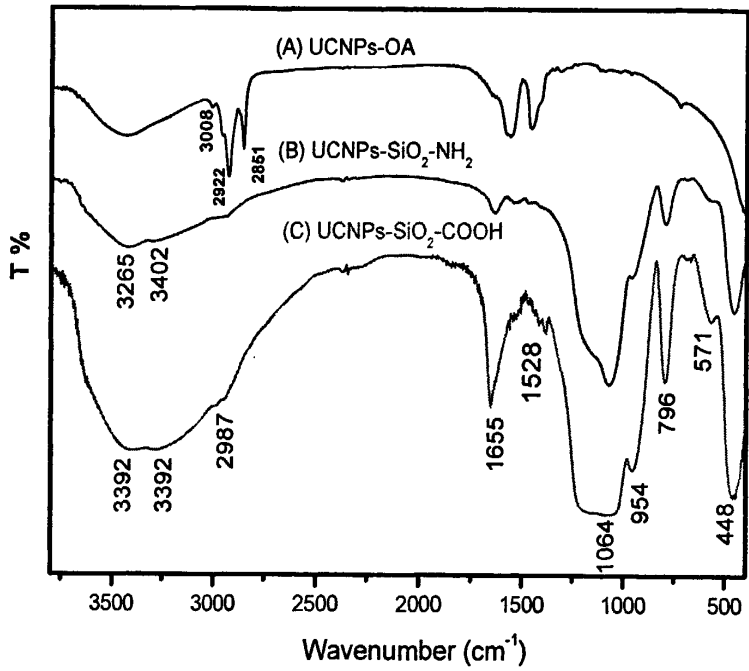


图 3.3 稀土纳米晶上转换材料的红外测试图

我们知道,大多数的生物实验都选择 PBS 作为缓冲液,以保证生物体的活性。为了证明所合成的稀土纳米晶上转换材料能够溶于 PBS 缓冲液,并且能保持其原有的性质,我们对在不同 pH 值的 PBS 缓冲液中,对稀土上传换材料进行了荧光强度测定。结果证明,合成的稀土上传换材料在 PBS 缓冲液中是能够稳定存在的,随着 pH 值的变化,荧光强度变化不大。见图 3.4。

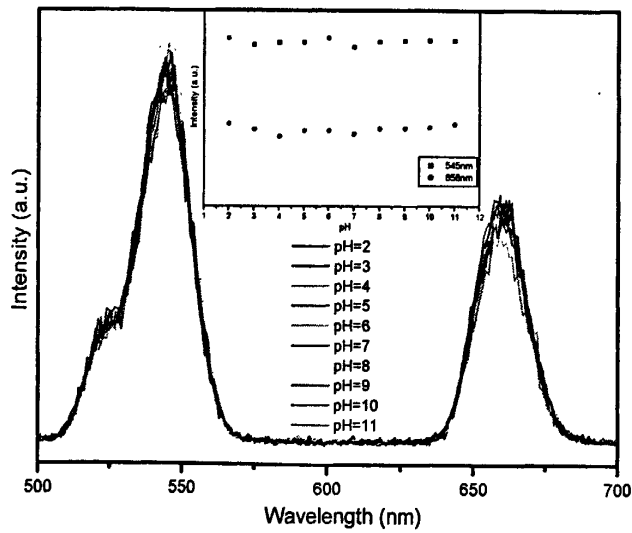


图 3.4 稀土上转换纳米晶在不同 pH 值的 PBS 中的荧光测试图

4.2 金胶的表征

纳米金颗粒是表面带负电的易团聚的纳米粒子，而纳米金颗粒的单分散性，对实验的结果起着极为重要的作用。实验证明，我们所合成的直径为 5 nm 的纳米金单分散性很好（图 3.5）。

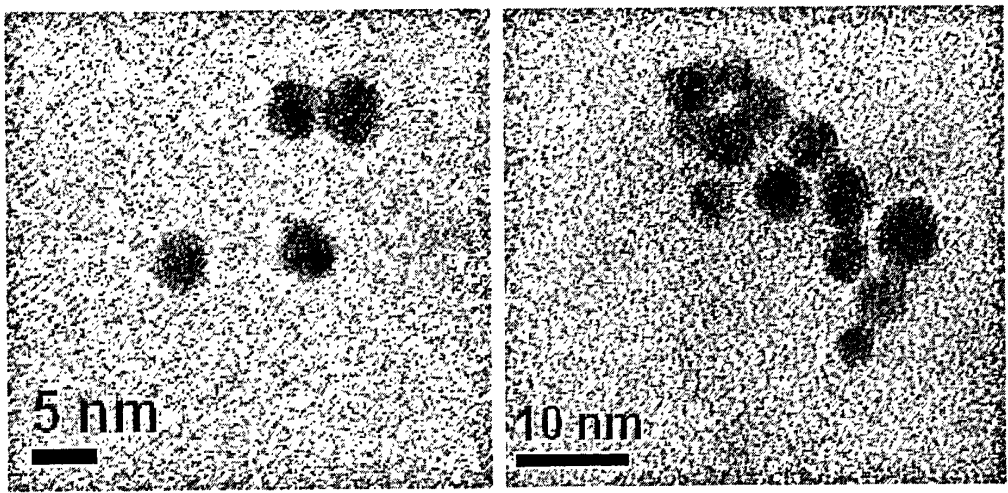


图 3.5 5 nm 纳米金的 TEM 图

4.3 修饰了探针 DNA<sub>1</sub> 的纳米金的紫外测试

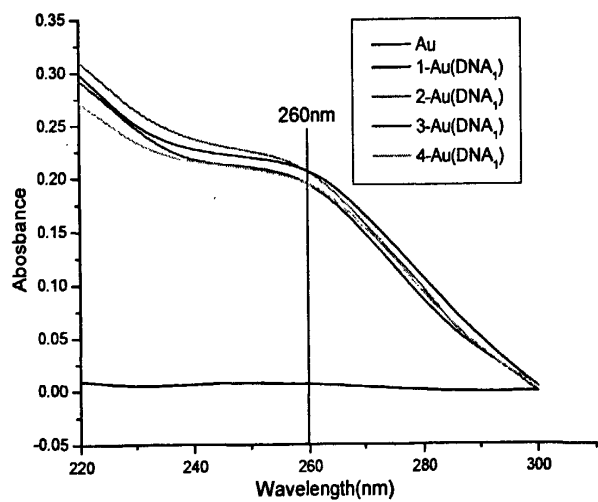


图 3.6 5 nm 金胶在修饰探针 DNA 前后的紫外吸收图

文献报道, 单分散性良好的纳米金在 520 nm 处有紫外吸收峰, 而 DNA 则在 260 nm 处有特征紫外吸收峰。为了验证探针 DNA 是否被修饰到 AuNP 上, 我们分别对纳米金在修饰了探针 DNA 前后进行了紫外测试。见图 3.6。实验证明, 探针 DNA 被修饰到了纳米金上。

在修饰了探针 DNA 的 AuNPs 与 UCNP 混合杂交后, 将溶液离心, 去上层清液。用 PBS 缓冲液洗涤沉积物, 再次离心, 去掉二次离心后得到的上层清液。将两次离心得到的上层清液进行比较。(图 3.7) 第一次离心的清液在 520 nm 处有吸收峰出现, 而第二次则没有吸收峰。这说明过量的纳米金已被去除。

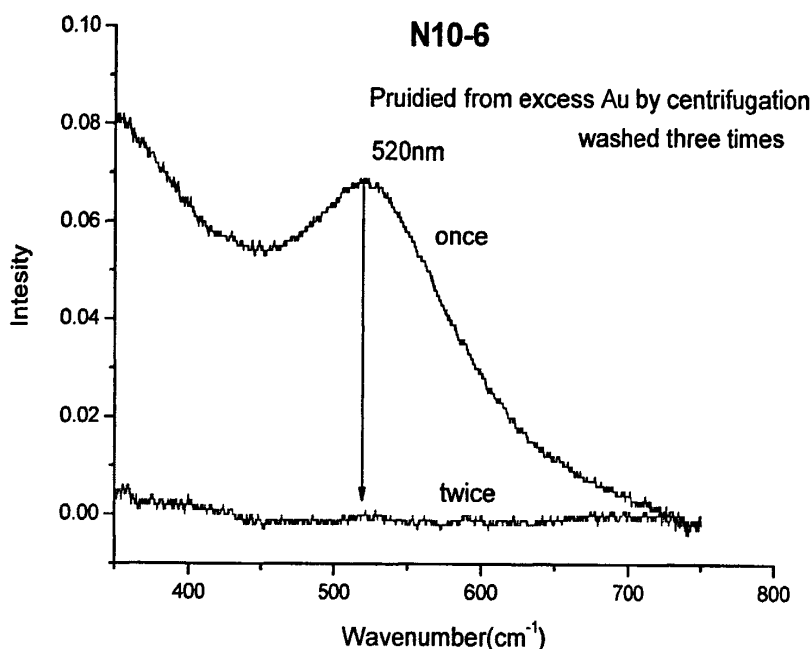


图 3.7 将修饰了探针 DNA 的 AuNP 与 UCNP 混合物离心去除过量的 AuNP, 洗涤前后上层清液的紫外光谱图。

#### 4.4 目标 DNA 的荧光检测

将修饰了巯基 DNA 探针的金胶与修饰了氨基 DNA 探针的稀土纳米晶上转换材料混合, 加热到 70 °C, 维持 5 分钟, 停止加热, 使之自然冷却到室温。测定荧光强度。离心分离。用 PBS 缓冲液清洗两次, 将沉积物重新溶解在 PBS 中, 离心, 分散。图 3.8 为 50  $\mu$ L 修饰了探针 DNA<sub>1</sub> 的金胶与浓度为 2.4 mg/mL 的修饰了探针 DNA<sub>2</sub> 的 UCNP 反应前后, 及加入 80  $\mu$ L 25  $\mu$ M 的目标 DNA 前后的荧



光强度。修饰了巯基 DNA 探针的金胶与修饰了氨基 DNA 探针的纳米晶混合后，荧光强度变为混合前的 44.04%。当加入目标 DNA 之后，杂交的两条 DNA 链解开，AuNP 与 UCNP 距离变大，荧光恢复。由此可见，AuNP 对 UCNP 的淬灭率是 55.96%，达到了预期的效果。

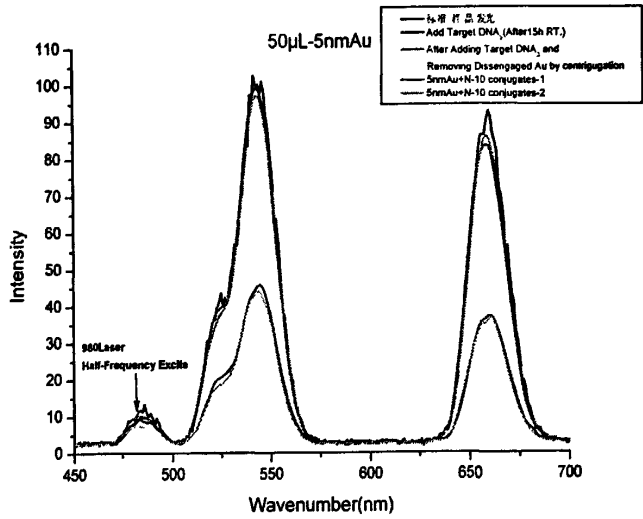


图 3.8 将 2.4 mg/mL 的 UCNP-DNA<sub>2</sub> 与 50 μL 的 AuNP-DNA<sub>1</sub> 混合前后的荧光强度的变化，及向体系中加入 80 μL 25 μM 的目标 DNA 后的荧光强度的变化测试图。

实验中我们采用的是 5 nm 的金胶，由于粒子颗粒很小，无法用常规的离心机离心。而将 AuNP-DNA<sub>1</sub> 与 UCNP-DNA<sub>2</sub> 反应物离心后，发现原本是白色的 UCNPs 变成了红色的沉淀物。（图 3.9）沉淀物之所以由白色变成了粉红色，是因为探针 DNA<sub>1</sub> 与探针 DNA<sub>2</sub> 发生了杂交，使得 5 nm 的金粒子也被离心下来。

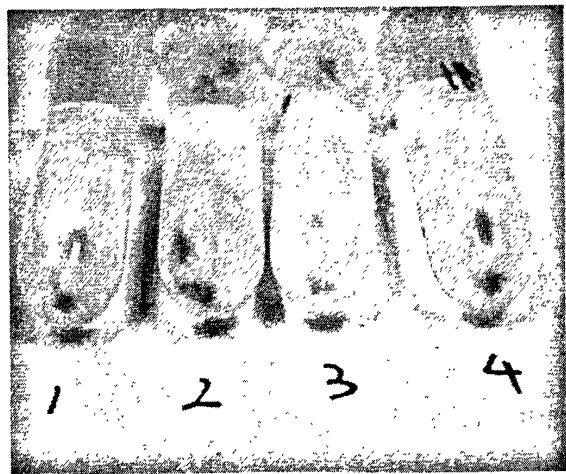


图 3.9 将 AuNP-DNA<sub>1</sub> 与 UCNP-DNA<sub>2</sub> 反应物离心，得到不同颜色的沉淀物。其中，1、2、4 为 AuNP-DNA<sub>1</sub> 与 UCNP-DNA<sub>2</sub> 的混合物，而 3 为 UCNP-DNA<sub>2</sub>。

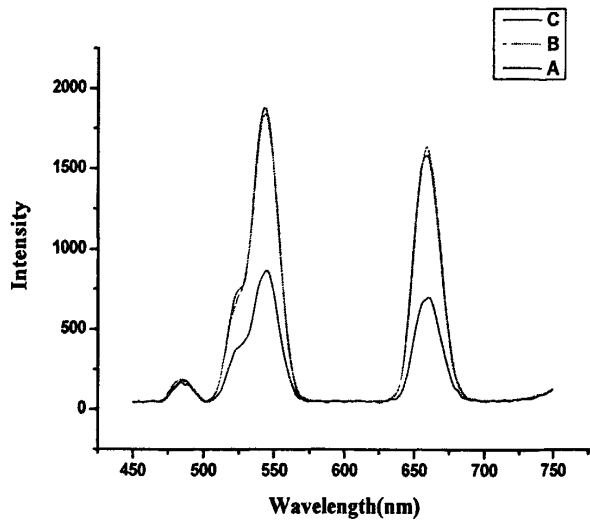


图 3.10 (A) AuNP-DNA<sub>1</sub> 与 UCNP-DNA<sub>2</sub> 反应物的荧光强度; (B) 加入目标 DNA 后离心, 去除上清液重新分散的沉积物的荧光强度; (C) 加入目标 DNA 后, 体系的荧光强度。

将体系 (AuNP-DNA<sub>1</sub>+UCNP-DNA<sub>2</sub>+Target DNA) 离心, 去除上清液后, 将沉积物重新溶解在 PBS 中, 超声分散, 进行荧光强度的测试, 见图 3.10, 发现与离心前的荧光强度变化不大。说明目标 DNA 成功取代 AuNP-DNA<sub>1</sub>, 与探针 DNA<sub>2</sub> 发生杂交。

本实验所合成的稀土纳米金上转换材料是功能化水溶性的材料, 然而当 UCNP 的浓度较大时, 将会发生团聚, 这将对实验定量分析产生影响。(图 3.11) 因而该稀土纳米晶上转换材料的单分散性有待改进。

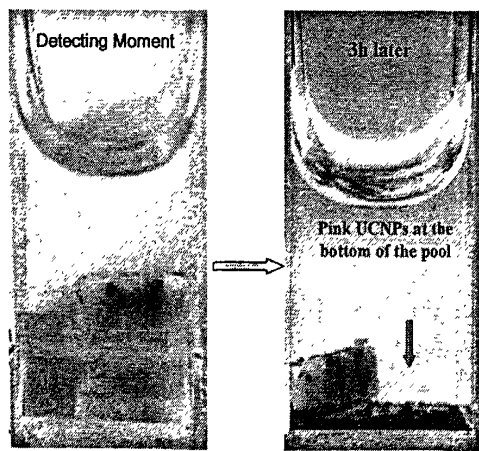


图 3.11 反应前后实拍图。图为检测过程中和反应完 3 小时后的样品状态。

## 5 小结与展望

本实验通过纳米金颗粒淬灭水溶性功能化稀土纳米晶上转换材料所发射的荧光,在体外对 DNA 检测做了初步的探索。纳米金与稀土纳米晶上转换材料均有很好的生物相容性,并且无毒副作用,因而其在生物探针和生物成像研究领域有着广阔的应用前景。本实验对具有特殊意义的 DNA 序列进行了定性分析,作为前期体外工作部分,取得了不错的结果。在下一步工作中,可对水溶性功能化稀土纳米晶上转换材料的单分散性进行改进,以求将该方法能够在定量分析以及细胞成像方面取得突破。

## 6 参考文献

- [1] Bruchez M., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos A. P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels [J]. *Science*, 1998, 281: 2013-2016.
- [2] Chan W. C. W., Nie S. M. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection [J]. *Science*, 1998, 281: 2016-2018.
- [3] van de Rijke F., Zijlmans H., Li S., Vail T., Raap A. K., Niedbala R. S., Tanke H. J. Up-converting phosphor reporters for nucleic acid microarrays [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19: 273-276.
- [4] Yi G. S., Lu H. C., Zhao S. Y., Yue G., Yang W. J., Chen D. P., Guo L. H. Synthesis, characterization, and biological application of size-controlled nanocrystalline NaYF<sub>4</sub>: Yb, Er infrared-to-visible up-conversion phosphors [J]. *Nano Lett.*, 2004, 4: 2191-2196.
- [5] Heer S., Kompe K., Gudel H. U., Haase M. Highly efficient multicolour upconversion emission in transparent colloids of lanthanide-doped NaYF<sub>4</sub> nanocrystals [J]. *Adv. Mater.*, 2004, 16: 2102-2015.
- [6] Aldana J., Wang Y. A., Peng X. G. Photochemical instability of CdSe nanocrystals coated by hydrophilic thiols [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123: 8844-8850.
- [7] Bentzen E. L., Tomlinson I. D., Mason J., Gresch P., Warnement M. R., Wright D., Sanders-Bush E., Blakely R., Rosenthal S. J. Surface modification to reduce nonspecific binding of quantum dots in live cell assays [J]. *Bioconjugate Chem.*, 2005, 16: 1488-1494.
- [8] Fan H. Y., Leve E. W., Scullin C., Gabaldon J., Tallant D., Bunge S., Boyle T., Wilson M. C., Brinker C. J. Surfactant-assisted synthesis of water-soluble and

- biocompatible semiconductor quantum dot micelles [J]. *Nano Lett.*, 2005, 5: 645-648.
- [9] Sivakumar S., Diamente P. R., van Veggel F. C. Silica-coated Ln(3+)-doped LaF<sub>3</sub> nanoparticles as robust down- and upconverting biolabels [J]. *Chem. Eur. J.*, 2006, 12: 5878-5884.
- [10] Li Z. Q., Zhang Y. Monodisperse silica-coated polyvinylpyrrolidone/NaYF<sub>4</sub> nanocrystals with multicolor upconversion fluorescence emission [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45: 7732-7735.
- [11] Chen Z. G., Chen H. L., Hu H., Yu M. X., Li F. Y., Zhang Q., Zhou Z. G., Yi T., Huang C. H. Versatile synthesis strategy for carboxylic acid-functionalized upconverting nanophosphors as biological labels [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130: 3023-3029.
- [12] Mirkin C. A., Letsinger R. L., Mucic R. C., Storhoff J. J. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials [J]. *Nature*, 1996, 382: 607-609.
- [13] Li J., Song S. P., Liu X. F., Wang L. H., Pan D., Huang Q., Zhao Y., Fan C. Enzyme-based multi-component optical nanoprobe for sequence-specific detection of DNA hybridization [J]. *Adv. Mater.*, 2008, 20: 497-500.
- [14] Hurst S. J., Lytton-Jean A. K. R., Mirkin C. A. Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes [J]. *Anal. Chem.*, 2006, 78: 8313-8318.
- [15] Seferos D. S., Giljohann D. A., Hill H. D., Prigodich A. E., Mirkin C. A. Nano-flares: Probes for transfection and mRNA detection in living cells [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129: 15477-15479.
- [16] Claridge S. A., Mastroianni A. J., Au Y. B., Liang H. W., Micheel C. M., Frechet J. M. J., Alivisatos A. P. Enzymatic ligation creates discrete multinanoparticle building blocks for self-assembly [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130: 9598-9605.
- [17] Zhang J., Song S. P., Wang L. H., Pan D., Fan C. A gold nanoparticle-based chronocoulometric DNA sensor for amplified detection of DNA [J]. *Nat. Protoc.*, 2007, 2: 2888-2895.
- [18] Wang L. Y., Yan R. X., Hao Z. Y., Wang L., Zeng J. H., Bao H., Wang X., Peng Q., Li Y. D. Fluorescence resonant energy transfer biosensor based on upconversion-luminescent nanoparticles [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, 44: 6054-6057.
- [19] Wang L. Y., Li Y. D. Green upconversion nanocrystals for DNA detection [J].

Chem. Commun., 2006, 2557-2559.

- [20] Zhang P., Rogelj S., Nguyen K., Wheeler D. Design of a highly sensitive and specific nucleotide sensor based on photon upconverting particles [J]. J. Am. Chem. Soc., 2006, 128: 12410-12411.

## 硕士期间发表论文情况

1. Hui Yang, Ji Ji, Yun Liu, Jilie Kong and Baohong Liu, "An aptamer-based biosensor for sensitive thrombin detection" *Electrochemistry Communications*, 2009, 11, 38-40.
2. Ji Ji, Hui Yang, Yun Liu, Hui Chen, Jilie Kong, and Baohong Liu, "TiO<sub>2</sub>-assisted silver enhanced biosensor for kinase activity profiling", *Chemical Communications*, 2009, 1508-1510.

## 致谢

在本论文完成之际，我谨向我的恩师刘宝红教授表示由衷地感谢。在这三年之中，刘老师在科研上给了我很多的启发和悉心的指导，引领我走近科学的神圣殿堂。刘老师严谨的科研态度、高涨的科研热情、勤勉的工作精神和谦虚的人生品格，值得我用一生去学习。

衷心感谢孔继烈教授和杨芃原教授对我研究工作的大力指导、关心和帮助。

我还要特别感谢本论文的合作者先进材料学院的黄春辉院士、李富友教授和曹天野、胡鹤、周晶同学。感谢他们给予我很多的实验上的帮助。

感谢乔亮同学的无私帮助，才让我有机会走进复旦大学化学系，进行硕士研究生阶段的学习与深造。

我要感谢实验室的各位老师和同学，大家共同营造的良好的学习和科研气氛让我终生难忘。特别要感谢张松副教授、陈慧老师、刘芸师姐、单喆师姐、游春萍师姐、张鹏、王慧香、万晶晶、纪季、王颖、郭锴、钱昆、李玮、蔡少瑜、许小丽、刘程程、黄静瑜、顾浩亮等给予我科研、工作和生活上的热情帮助，让我收获颇多。

最后，我要感谢我的父母、亲人和朋友，感谢他们一直以来对我的关心、支持和照顾，使我能够乐观的面对困难和挫折，不断的前行。

杨 慧

2009 年 4 月





# 基于核酸适配子的生物传感器的研究

作者：杨慧

学位授予单位：复旦大学

## 本文读者也读过(6条)

1. 孙倩 新型纳米材料在环境与生物传感研究中的应用[学位论文]2011
2. 游春苹 基于介孔碳材料的电化学生物传感器研究[学位论文]2009
3. 李玮 新型化学修饰电极体系的研究及其在痕量铅检测中的应用[学位论文]2008
4. 魏黎明 基于纳米金刚石的蛋白质组学新技术和新方法研究[学位论文]2011
5. 王琪 Hs-MB型电化学活性开关分子信标的研制及其应用研究[学位论文]2011
6. 李颖 新型纳米材料的合成及其应用于葡萄生物传感器的研究[学位论文]2011

本文链接：[http://d.g.wanfangdata.com.cn/Thesis\\_Y1966723.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Thesis_Y1966723.aspx)