

# 抗体和寡核苷酸双标记纳米金生物探针的制备及生物学特性

李富荣<sup>1</sup>, 乔飞燕<sup>2</sup>, 孔小丽<sup>1</sup>, 周汉新<sup>1</sup>, 齐 晖<sup>1</sup>, 任莉莉<sup>1</sup>

(1. 暨南大学第二临床医学院(深圳人民医院)临床医学研究中心, 深圳 518020;

2. 兰州大学化学化工学院, 兰州 730000)

**摘要** 纳米金通过静电吸附抗体, 与寡核苷酸共价结合制备双标记纳米金生物探针, 比较了双标记纳米金生物探针和单标记抗体 IgG 或 ss-DNA 的稳定性和反应性. 结果表明, 在水溶液中纳米金由于 ss-DNA 的结合使 IgG 抗体的吸附能力明显改善, IgG 的吸附也影响二硫苏糖醇(DDT)对 ss-DNA 的解离作用. 双标记纳米金粒上覆盖(50 ± 15)条 ss-DNA 和(10 ± 2)条 IgG, 较单标记 ss-DNA 纳米金上的(70 ± 15)条要少. 斑点免疫和杂交实验证明, 纳米金表面标记的 IgG 和 ss-DNA 具有良好生物学活性. 双标记纳米金生物探针在超微量蛋白质的检测中具有应用价值.

**关键词** 金纳米粒子; 生物探针; 寡核苷酸; 抗体

中图分类号 O629.7

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)01-0060-04

目前, 在早期癌抗原及某些神经肽等极微量抗原检测上, 荧光标记及酶标记技术还缺乏足够的灵敏性, 在一些超微量蛋白, 如早期肿瘤抗原和神经肽的检测, 同位素的检测灵敏性虽然可达到 1 μg/mL, 但需要特殊的设备和安全保护, 限制了其使用. 由于纳米金具有很强的免疫标记能力, 可以和很多基团进行键合, 其共轭化合物有很宽的 pH 稳定性、很高的离子强度以及离子稳定性, 为生物学检测提供了一个很好的平台<sup>[1,2]</sup>. 纳米金已经被应用到许多超敏感生物传感器上<sup>[3~6]</sup>. Mirkin 等<sup>[7~9]</sup>建立了“生物条码核酸芯片检测法”, 成功应用于 PSA, HCG 及 AFP 等超微量物质的检测, 检测下限比传统的 ELISA 低 6 个数量级. 目前有关双标记纳米金生物探针制备报道甚少, 有关双标记后抗体和 DNA 的相互影响及其在应用中活性的保持等尚待研究. 本文就双标记纳米金生物探针的制备和生物学特性进行了探索研究, 并对纳米金上抗体和 ss-DNA 吸附的稳定性进行了探讨.

## 1 实验部分

### 1.1 材料与仪器

胶体金粒径为(10 ± 5) nm(上海久山化工有限公司); 羊抗兔 IgG(北京鼎国生物技术公司); ss-DNA 由上海生工生物工程公司人工合成, 硫醇修饰的 ss-DNA 序列: 5'-GCTAGTGAACACAGTTGTG-TAAAAA(AA)<sub>3</sub>-SH-3', 互补序列: 5'-ACACAACACTGTGTTCACTAGCTTTTTTTTTTCGATCACT-TGTGTCAACACA-3'. 上游引物: 5'-GCTAGTGAACACAGT-3', 下游引物: 5'-(T)<sub>10</sub>ACAC-3', 硝酸纤维素膜(碧云天生物技术研究); 其它化学试剂均为分析纯; 实验用水为灭菌二次水.

DU800 紫外分光光度计(美国 Beckman 公司); 透射电子显微镜(TECHAI-10, 荷兰 PHILIPS); HS-3 垂直混合器(宁波新芝生物科技股份有限公司); 0.22 μm 微孔滤膜(北京鼎国生物技术公司).

### 1.2 金纳米粒子生物探针的制备

1.2.1 纳米金抗体(IgG-Au)的标记 将金纳米粒子用 0.22 μm 的微孔滤膜进行过滤. 取 5 mL 纳米金粒子溶液, 用 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调 pH 值为 9, 加入 25 μg 羊抗兔 IgG, 摇匀 5 min 后, 迅速加入 250 μL 质量分数

收稿日期: 2008-04-23.

基金项目: 国家“八六三”计划项目(批准号: 2003BA310A23)和深圳市科技局计划项目(批准号: 2004B110)资助.

联系人简介: 李富荣, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事医用纳米技术研究. E-mail: fli62@yahoo.com

为 1% 的聚乙二醇(PEG)溶液, 在常温下放置 2~3 h, 在 4 °C 低温下离心 30 min, 吸去上清液, 在沉淀中加入 pH = 7.2 的磷酸盐缓冲溶液(PBS), 除去未结合的抗体和 PEG, 重复操作 2 次后, 将样品溶于 5 mL 0.05% 的 PEG(pH = 7.0 的 PBS 和 0.05% 的叠氮钠)溶液, 于 4 °C 下冷藏保存备用。

1.2.2 纳米金单链寡核苷酸(Au-DNA)标记 将 5.5 mg 硫醇荧光团标记的 ss-DNA 与 5 mL 纳米金混合, 振摇 3 min 后室温孵育 12 h, 加入 500 mL 0.2 mol/L NaCl 和 500 mL 10 mmol/L PBS(pH = 7.0)后, 于 45 °C 孵育 12 h, 以 14000 r/min 离心 20 min, 移去上层清液, 重复操作 2 次, 除去未反应的 DNA, 沉淀物溶于相同溶液, 于 4 °C 保存备用。

1.2.3 抗体和 ss-DNA 双标记纳米金(IgG-Au-DNA)生物探针的制备 将 5.5 mg 硫醇荧光团标记 ss-DNA 与 5 mL IgG-Au 溶液混合, 振摇 5 min 后于室温孵育 12 h, 加入 500  $\mu$ L 0.5 mol/L NaCl 和 500 mL 10 mmol/L PBS(pH = 7.0), 室温放置 2 h, 以 14000 r/min 离心 20 min, 移去上层清液, 重复操作 2 次, 除去未反应的 DNA, 沉淀物溶于相同溶液, 于 4 °C 保存备用。

### 1.3 生物学特性检测

1.3.1 样品电镜检测 用微量取样器分别取一定量液体样品加入铜网中, 在白炽灯下烘烤 0.5 h, 直到液体蒸干后, 放入透射电子显微镜中检测。

1.3.2 聚丙烯酰胺凝胶(PAEG)电泳检测 采用 2 mL 制备好的双标记纳米金生物探针, 加入二硫苏糖醇(DTT), 低温超速离心后取上清液, 作为 PCR 扩增样品. 采用 20  $\mu$ L 反应体系进行扩增, 预变性 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 50 °C/60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环扩增 35 次, 最后于 72 °C 延伸 3 min. 将扩增产物用饱和尿素处理, 高温 55 °C 水浴 10 min, 速冻, 加入 7 mol/L 尿素, 用体积分数为 15% 的变性 PAGE 分析. 每孔点样 20  $\mu$ L, 以溴酚蓝为对比示踪剂, 以合成的 15, 30 和 50 bp 寡核苷酸混合物为 Marker, 电压 80 V, 对 1 h 后溴化乙锭(EB)染液中凝胶成像系统进行观察拍照。

1.3.3 ss-DNA 连接率的检测 取 2 mL 制备好的双标记纳米金生物探针(2.7 nmol/L), 加入 0.1 mol/L DTT 至终浓度为 0.01 mol/L, 静置 30 min~1 h. 每 3 min 紫外扫描 1 次, 观察 DTT 取代纳米金探针上硫醇修饰的寡核苷酸的动力学变化, 并以纳米金溶胶和普通免疫金探针作对照, 通过溶液荧光检测寡核苷酸的数量。

1.3.4 抗体活性检测 剪取 2 cm  $\times$  4 cm 的硝酸纤维素膜, 在 pH = 9.0 的碳酸钠溶液中浸泡 10 min. 干燥后在其表面涂覆一层环形羊抗兔 IgG, 湿盒 37 °C 作用 20 min, 洗涤 2~3 次, 滤纸吸干. 将 10  $\mu$ L 样品(金纳米粒子、抗体修饰的金纳米粒子和 ss-DNA 修饰的金纳米粒子)加入到环形圈内, 37 °C 孵育, 在有颜色变化前用 PBST[PBS(10 mmol/L, pH = 7.0)和 Tween-20, 体积比 20:1]洗涤后读取结果。

## 2 结果和讨论

### 2.1 纳米金生物探针的制备

IgG 或 ss-DNA 标记纳米金制备已有相关报道<sup>[10~12]</sup>, 关于 IgG 和 ss-DNA 双标记纳米金则尚未见报道. 选择将纳米金与 IgG 抗体结合后再与 ss-DNA 结合的方法. 如果纳米粒先被 ss-DNA 修饰, 将影响下一步与 IgG 的结合, 主要是由硫醇修饰的 ss-DNA 吸附到纳米金表面形成一个密封层所致。

没有修饰的胶体金在高浓度盐溶液条件下处于不稳定状态, 当加入 0.5 mol/L HCl 溶液时, 纳米金溶液就会发生聚集, 颜色会迅速由红变蓝, 这主要是溶液中残留的负离子在纳米金周围形成负电荷层, 在纳米颗粒之间形成聚合力的缘故<sup>[13]</sup>. IgG 和 IgG/ss-DNA 可以改变纳米颗粒表面的电荷, 使修饰后的纳米金处于稳定状态. 没有修饰的纳米金在 0.5 mol/L NaCl 溶液中会发生聚集[图 1(A)], 在相同条件下, IgG-Au[图 1(B)]和 IgG-Au-DNA[图 1(C)]仍保持稳定状态, 没有发生聚集. 而个别纳米金聚集形成二聚体的现象, 可能是抗体和寡核苷酸修饰不足, 处于不稳定状态所致。

ss-DNA 修饰较 IgG 修饰简单, 纳米金和寡核苷酸的反应需在高浓度的氯化钠溶液以及 pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲溶液中完成, 纳米金表面修饰抗体后, 微粒间的稳定性大大提高, 又可使 ss-DNA 在其表面结合, 在高浓度的盐溶液中不会发生聚集, 解决了纳米金在免疫试验中假阳性的问题. 没有修饰纳米金的紫外-可见光谱最大吸收值在 518 nm, 修饰抗体后的金纳米粒子的吸收峰发生了轻微的移动,

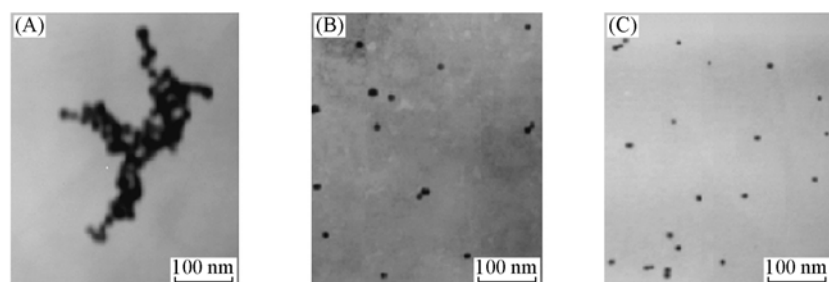


Fig. 1 TEM images of unmodified gold nanoparticles (A), IgG-Au (B) and IgG-Au-DNA (C)

从 518 nm 处移向 522 nm. 而抗体和 ss-DNA 共同修饰的金纳米粒子的吸收峰在 524 nm 处 (图 2), 表明纳米金对周围环境非常敏感. 由图 2 可见, 吸附了抗体和 DNA 的纳米金的紫外-可见光谱没有发生明显改变, 表明纳米金没有明显变化.

## 2.2 IgG 和 ss-DNA 连接数量

利用考马斯亮蓝 (G-250) 检测纳米金上覆盖 IgG 的数量. G-250 与蛋白质通过范德华力相互作用, 形成蛋白质-考马斯亮蓝复合物, 使考马斯亮蓝最大吸收峰, 从 465 nm 红移到 595 nm. 由于此结合物的吸光度远高于考马斯亮蓝在 465 nm 处的吸光度, 从而大大提高了蛋白质的测量灵敏度<sup>[14]</sup>. 用此法检测 IgG-Au 和 IgG-Au-DNA 的离心上清液, 结果表明, 吸附在纳米金上的 IgG 数量为  $(10 \pm 2)$  个.

纳米金的荧光最大吸收峰值位于 524 nm, 表面结合 DNA 后, 由于荧光共振能量转移 (FRET) 作用, 纳米金粒子表面标记的荧光发生猝灭. 由于 ss-DNA 可以被更强结合力的分子 (如 DTT) 所取代, 使标记的 ss-DNA 寡核苷酸被释放出来, 通过测定荧光密度计算出 ss-DNA 的数量. 结果表明, 每个 IgG-Au 和 IgG-Au-DNA 表面覆盖的寡核苷酸分别为  $(70 \pm 15)$  条和  $(50 \pm 15)$  条 ss-DNA, 标记在纳米金表面的 IgG 和 DNA 的比值约为 2:5.

由于每个 DTT 分子有 2 个硫醇团, 通过共价键可结合 2 个纳米金. 当在 DNA 修饰的纳米颗粒中加入 DTT, 可替代寡核苷酸发生纳米颗粒聚集使颜色由红变蓝, 颜色反应可用来检测这种替代的发生 [见图 3(A)]. 加入 DTT 后, 纳米金谱带变宽, 并逐步从 524 nm 转移到 650 nm, 这段时间大约需要 2 min. 原来的 524 nm 谱带完全消失, 但移动速度在双标记纳米金上变化较慢, 在 30 min 后仍能看到 524 nm 谱带. 这主要是 IgG-Au-DNA 上的 IgG 较大, 可能阻碍了 DTT 进入纳米金表面所致.

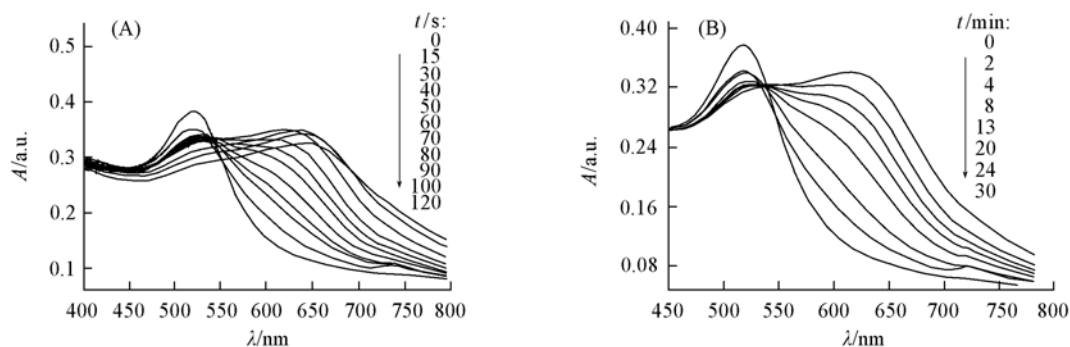


Fig. 3 Time evolution of UV-Vis spectra of Au-DNA (A) and IgG-Au-DNA (B) after adding DTT

## 2.3 纳米金表面的抗体活性

利用斑点免疫技术检测纳米金表面 IgG 的含量 (见图 4). 在 IgG-Au 和 IgG-Au-DNA 覆盖区可见颜色沉淀, 表明发生抗原抗体反应; 而无 IgG 区没有颜色变化. 表明 IgG-Au 和 IgG-Au-DNA 生物探针上

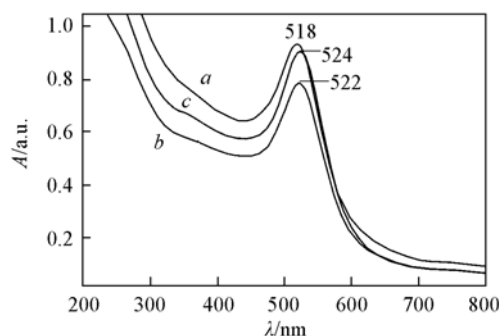


Fig. 2 UV-Vis spectra of unmodified gold nanoparticles (a), IgG-Au (b) and IgG-Au-DNA (c) nanoparticles

抗体保留了生物活性. IgG-Au 和 IgG-Au-DNA 纳米颗粒之间没有明显差异, 说明吸附 ss-DNA 不影响 IgG 的反应.

#### 2.4 纳米金上 ss-DNA 的活性

为了证明纳米金表面的寡核苷酸是否可与互补序列杂交, 设计了一个互补寡核苷酸. 这个序列有两个相同部分可与纳米金上寡核苷酸互补并可与 2 个纳米金发生反应, 通过杂交出现纳米金聚集, 30 min 后 ss-DNA 修饰的纳米颗粒溶液会变蓝, IgG-Au-DNA 纳米颗粒紫外吸收峰移到 580 nm 处, 表明纳米金上的寡核苷酸与互补寡核苷酸发生杂交, 发生凝聚.

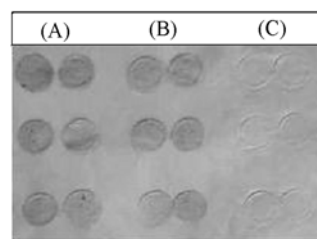


Fig. 4 Dot immuno-gold nanoprobe detection of IgG-Au (A), IgG-Au-DNA (B) and unmodified gold nanoparticles (C)

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Oliver C. . Methods Mol. Biol. [J], 1999, **115**(3): 347—54
- [ 2 ] Willner I. , Basnar B. , Willner B. . FEBS. J. [J], 2007, **274**(2): 302—309
- [ 3 ] Park S. J. , Taton T. A. , Mirkin C. A. . Science[J], 2002, **295**(5559): 1503—1506
- [ 4 ] Fan C. , Wang S. , Hong J. W. , *et al.* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA[J], 2003, **100**(11): 6297—6301
- [ 5 ] Xiao Y. , Patolsky F. , Katz E. , *et al.* . Science[J], 2003, **299**(5614): 1877—1881
- [ 6 ] Dubertret B. , Calame M. , Libchaber A. J. . Nat. Biotechnol. [J], 2001, **19**(4): 365—370
- [ 7 ] Nam J. M. , Thaxton C. S. , Mirkin C. A. . Science[J], 2003, **301**(5641): 1884—1886
- [ 8 ] Stoeva S. I. , Lee J. S. , Smith J. E. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J], 2006, **128**(26): 8378—8379
- [ 9 ] Stoeva S. I. , Lee J. S. , Thaxton C. S. , *et al.* . Angew. Chem. Int. Ed. Engl. [J], 2006, **45**(20): 3303—3306
- [ 10 ] Georganopoulou D. G. , Chang L. , Nam J. M. , *et al.* . Proc. Natl. Acad. USA[J], 2005, **102**(7): 2273—2276
- [ 11 ] Kim E. Y. , Stanton J. , Vega R. A. , *et al.* . Nucl. Acids. Res. [J], 2006, **34**(7): 47—54
- [ 12 ] Ackerson C. J. , Sykes M. T. , Kornberg R. D. . Proc. Natl. Acad. Sci. USA[J], 2005, **102**(38): 13383—13385
- [ 13 ] Kanaras A. G. , Wang Z. , Bates A. D. , *et al.* . Angew. Chem. Int. Ed. Engl. [J], 2003, **42**(2): 191—194
- [ 14 ] YAN Qiu-Ping(颜秋平), LI Fu-Rong(李富荣), TANG Shun-Qing(汤顺清), *et al.* . Chin. J. Biomed. Eng. (中国生物医学工程报) [J], 2006, **25**(3): 305—309

## Preparation and Biological Characterization of Antibody and DNA Dual-labeled Gold Nanoparticles

LI Fu-Rong<sup>1\*</sup>, QIAO Fei-Yan<sup>2</sup>, KONG Xiao-Li<sup>1</sup>, ZHOU Han-Xin<sup>1</sup>, QI Hui<sup>1</sup>, REN Li-Li<sup>1</sup>

(1. Clinic Medical Research Center, The 2nd Clinic Medical College(Shenzhen People's Hospital),

Jinan University, Shenzhen 518020, China;

2. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

**Abstract** Gold nanoparticles labeled by both antibody(IgG) and single stranded DNA(ss-DNA) were synthesized and characterized. The stability and reactivity of the dual-labeled nanoparticles were compared with the conventional IgG or ss-DNA modified nanoparticles. It was found that the IgG adsorption significantly improved the stability of the nanoparticles in aqueous solution, which is beneficial for attaching ss-DNA. The presence of IgG also effectively prohibits the desorption of ss-DNA against dithiothreitol(DTT) displacement. The coverage on dual-labeled nanoparticles was found to be  $(50 \pm 15)$  ss-DNA/nanoparticle and  $(10 \pm 2)$  IgG/nanoparticle, respectively, compared to the value of  $(70 \pm 15)$  ss-DNA/nanoparticle of only ss-DNA-labeled gold nanoparticles. Dot-immuno and cross-linking experiments confirmed that both the IgG and ss-DNA retained their bioactivity on the nanoparticle surface. The dual-labeled nanoparticles have potential to be used as novel bio-probes for ultrasensitive detection.

**Keywords** Gold nanoparticle; Bio-probes; DNA; Antibody

(Ed. : H, J, Z)