

## 综述 ·

## 纳米金在基因突变检测及 SNP 分析中的应用

张建锋<sup>1)</sup>, 孙莉萍<sup>1)</sup>\*, 李辉<sup>1)</sup>, 王秀燕<sup>1)</sup>, 张其清<sup>1), 2)</sup>\*<sup>1)</sup>厦门大学生物医学工程研究中心, 福建省生物医学工程重点实验室, 厦门市生物医学工程技术研究中心, 福建 厦门 361005;<sup>2)</sup>中国医学科学院, 中国协和医科大学生物医学工程研究所, 天津市生物医学材料重点实验室, 天津 300192

**摘要** 对特异核苷酸序列的高选择性检测在生物医学研究和临床检测中日趋重要. 纳米金特殊的光学性质、电学性质、化学性质、以及良好的生物相容性, 使之成为检测生物大分子的首选工具. 本文介绍了几种典型的基因突变检测及单核苷酸多态性(SNP)分析系统: 基因芯片、生物传感器和光学检测系统. 综述了多种颇有新意的检测方法和原理, 详细阐明了它们的检测机制和研究进展, 分析并比较了纳米金不同的作用方式, 为纳米金在突变检测上的进一步研究提供了一定思路和参考.

**关键词** 纳米金; 基因突变; 单核苷酸多态性(SNP)

**中图分类号** Q75

## Gold Nanoparticles Application in Gene Mutation Detection and SNP Analysis

ZHANG Jian-Feng<sup>1)</sup>, SUN Li-Ping<sup>1)</sup>\*, LI Hui<sup>1)</sup>, WANG Xiu-Yan<sup>1)</sup>, ZHANG Qi-Qing<sup>1), 2)</sup>\*<sup>1)</sup> Research Center of Biomedical Engineering, Xiamen University, Key Laboratory of Biomedical Engineering of Fujian,Technology Research Center of Biomedical Engineering of Xiamen, Xiamen 361005, Fujian, China; <sup>2)</sup> Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Key Laboratory of Biomedical Materials of Tianjin, Tianjin 300192, China

**Abstract** Highly selective detection of specific oligonucleotide sequences is increasingly important in biomedical research and clinical diagnosis. The excellent optical, electrical, and chemical properties make gold nanoparticles (GNPs) unique tools for biomolecule detection. GNPs-based methods for the detection of gene mutation and single nucleotide polymorphism (SNP) are more selective, sensitive, and cost-efficient, compared to the conventional technologies, which require bulky and expensive instruments or involve time-cost procedures. This paper presents and demonstrates the principles and mechanisms of several typical GNPs-based methods for gene mutation and SNP analysis, aiming to provide some ideas and references for further studies.

**Key words** gold nanoparticles; gene mutation; single nucleotide polymorphism (SNP)

基因突变是指基因组 DNA 序列中 1 个或多个位点的碱基发生突变或者缺失、插入等现象, 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 是指在进化过程中, 由基因组核苷酸的变异引起的 DNA 序列差异, 包括碱基的缺失、插入以及单个碱基的转换或颠换, 是导致遗传性疾病和肿瘤的重要原因之一<sup>[1]</sup>. 基因突变及 SNP 分析在生物医学研究中有着非常重要的作用, 可以作为遗传性疾病、肿瘤等的早期临床检测指标, 对疾病的及时发现和治疗具有重要的意义.

传统的基因突变检测方法大多依赖平板凝胶电泳分析 DNA 构象或解链特性, 再根据其电泳时迁移率的不同判断是否存在突变. 这些方法有的特异性差、灵敏度不高, 有的操作复杂、费时费力, 有的易产

生假阳性结果和高成本检测, 因此不能满足临床上大量样品分析的需要. DNA 测序法是最直接最准确的方法, 被作为基因突变检测的“金标准”, 但需要特殊的仪器, 且耗时费力, 成本昂贵, 不便在一般单位使用. 因此, 建立一种快速、高效、低成本、高灵敏度

收稿日期: 2007-12-12; 接受日期: 2008-02-27

福建省青年科技人才创新项目 (No. 2006F3128) 资助

\* 联系人 Tel/Fax: 0592-2185299,

E-mail: sunliping@xmu.edu.cn, zhangqiq@xmu.edu.cn

Received: December 12, 2007; Accepted: February 27, 2008

Supported by Science Technology Innovation Fund for Young Scientific Scholar of Fujian Province (No. 2006F3128)

\* Corresponding author Tel/Fax: 0592-2185299,

E-mail: sunliping@xmu.edu.cn, zhangqiq@xmu.edu.cn

的基因突变检测方法显得尤为重要。

理想的基因突变检测技术应当具有简便、快捷、高特异性、高灵敏度、高自动化和低成本性等特点。纳米材料由于具有许多特殊的性质,为基因突变研究提供了新的思路。用于基因突变分析的纳米材料主要有纳米颗粒<sup>[2,3]</sup>、碳纳米管<sup>[4]</sup>、纳米聚合物<sup>[5]</sup>、磁性纳米材料<sup>[6]</sup>等。纳米金颗粒由于具有更为独特的理化性质,已成为生物、医学、化学、物理等学科领域的研究热点之一<sup>[7]</sup>。纳米金用于基因突变检测及单核苷酸多态性分析是近几年兴起并迅速发展的一个研究领域。

## 1 纳米金的作用机理和制备方法

### 1.1 作用机理

纳米金是指直径介于 1~100 nm 之间的金颗粒。纳米金具有非常独特的物理性质和化学性质,主要包括以下 3 个方面:(1) 纳米金易于制备,稳定性非常好;(2) 具有纳米颗粒所特有的小尺寸效应、表面效应、量子效应和宏观量子隧道效应。(3) 具有独特的光学效应(光吸收和光散射)、催化效应和特殊的生物亲和效应<sup>[8]</sup>。

纳米金有很高的摩尔吸光系数,例如粒径为 13 nm 的金颗粒吸光系数为  $2.7 \times 10^8 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,同时在 520 nm 左右具有很强的特征等离子吸收峰,其最大吸收波长依赖于微粒之间的距离和凝聚体的大小。由于表面带负电荷而相互排斥,纳米金在溶液中处于均匀分散的稳定状态,颜色呈透亮的酒红色。但若加入一定量的盐离子,稳定状态即被打破,原来分散的纳米金颗粒立即聚集成团,间距小于平均粒子直径,表面等离子共振吸收峰发生红移,导致溶液颜色很快由红色转为紫色最后呈蓝灰色。纳米金还具有特殊的氧化-还原能力,能够催化银离子在其表面被还原而发生沉积,形成“银染反应”,促使反应信号进一步提高  $10^6$  倍<sup>[9]</sup>。

纳米金既可与氨基发生非共价的静电吸附,也能与巯基形成很强的 Au-S 共价键而牢固结合。DNA 序列经巯基修饰后即可与纳米金相互结合。纳米金与 DNA 之间也有着微妙的作用。DNA 序列中的 4 种碱基 A、T、C、G 与金表面均有不同程度的吸附作用<sup>[10]</sup>。值得注意的是,单链 DNA 和双链 DNA 与纳米金的作用效果明显不同:单链 DNA 能结合到纳米金表面形成保护层,使纳米金在高盐浓度的溶液中不发生聚集,反应体系颜色基本没有变化,依然呈现酒红色。其作用效果与单链 DNA 长度和纳米金的尺

寸、形状有关;而双链 DNA 不能附着在纳米金表面,无法阻止纳米金在高盐溶液中发生聚集,导致反应体系颜色很快由红色变成蓝灰色,最大吸收峰相应发生红移<sup>[11]</sup>。基于纳米金的突变检测及 SNP 分析技术是以 DNA 碱基严格互补,配对杂交形成双链的特性为基础,以纳米金是否发生聚集或颜色改变为信号,来判定所检测的靶基因序列是否存在突变。

### 1.2 纳米金的制备

在氯金酸中加入还原剂使之还原并聚积即可形成纳米金。常用的制备方法有:柠檬酸三钠还原法、鞣酸-柠檬酸钠混合还原法、白磷还原法、抗坏血酸还原法、硼氢化钠还原法等。前两种方法制得的金颗粒粒径比较均一,溶液澄清,稳定性好,因此目前最为常用。一般而言,制备粒径在 3~13 nm 之间的纳米金多选择鞣酸-柠檬酸钠来还原氯金酸,制备粒径大于 13 nm 的则选择柠檬酸三钠还原氯金酸。选定一种还原方法后,在一定范围内,还原剂用量越多,金颗粒直径越小。纳米金的制备并不难,但要制备高质量的纳米金却不容易,因此,对每次制好的纳米金应加以鉴定,主要检查指标有颗粒大小、粒径均一度及有无凝集颗粒等。制备好的纳米金最好装在玻璃瓶中,4℃ 保存,以免长时间放置后发生聚集。

## 2 纳米金介导的基因突变及 SNP 分析方法

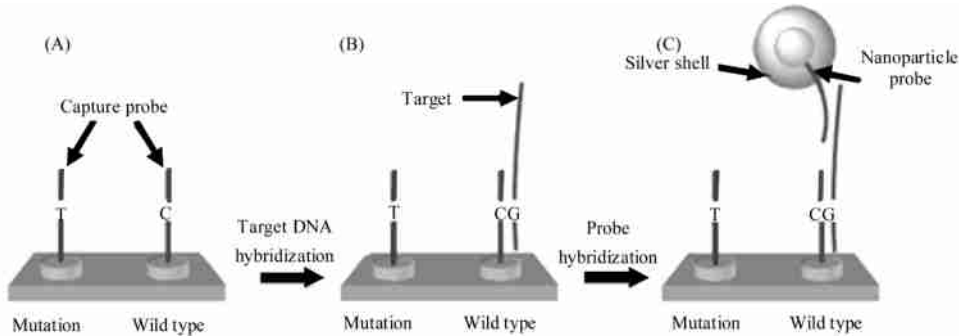
### 2.1 纳米金新型基因芯片检测系统

基因芯片技术的基本原理是用已知的寡核苷酸作为探针,与标记的靶基因进行杂交,通过检测杂交信号进行分析。Fig. 1 是利用可视化基因芯片检测突变的示意图<sup>[12]</sup>,其检测机制分为以下几个步骤:第 1 步,捕获探针的固定:将经氨基修饰后的寡核苷酸探针固定在微阵列上,如 Fig. 1A;第 2 步,与靶 DNA 杂交:加入靶 DNA 后,通过精确控温,只有完全互补的探针可以与靶 DNA 一端发生杂交,“捕获”到靶基因,形成双链结构,有突变的探针不能发生杂交,靶 DNA 经冲洗即被除去,如 Fig. 1B;第 3 步,杂交信号放大:首先将巯基化的寡核苷酸与纳米金结合形成金探针,然后加到反应体系与靶 DNA 另一端进行严格杂交,通过金探针的聚集情况来指示靶 DNA 的杂交情况。由于采用“三明治”方式的反应,因此检测系统中发生的所有杂交反应都最终通过纳米金来指示。靶 DNA 在其中起到“桥梁”的作用。最后在纳米金表面进行“银染”,使杂交信号进一步放大,如 Fig. 1C。最终通过紫外-可见分光光度计,甚至通过肉眼观察颜色变化即可推断是否有杂交反应发生,

判别靶 DNA 是否发生突变以及突变种类. 该机制将纳米金作为信号报告分子, 回避了酶、荧光染料、放射性同位素等传统标记物耗时、繁琐、灵敏度低、有

放射性等不足, 并利用最后的“银染”使颜色反差更加显著, 结果更为直观, 大大提高了灵敏度.

Taton 等<sup>[13]</sup>做了一系列的研究, 报道了这种新的

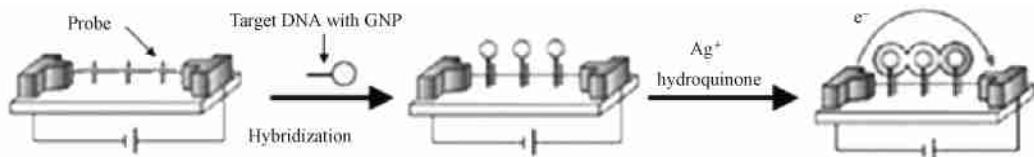


**Fig. 1 Schematic diagram of optical detection for gene mutation based on microarray** Target DNA and gold nanoparticle probes are sequentially hybridized to the microarray containing capture probes representing the two possible alleles. After the two hybridization steps, the array is subjected to stringency washes and a silver development step. The scatter signal from the test sites is imaged subsequently to obtain results

“可视化”芯片. 与传统的荧光标记法进行对比, 结果表明, 其灵敏度要比荧光标记高 100 倍. 研究还发现, 金标记复合体的解链温度 (melting temperature,  $T_m$ ) 比荧光标记的高很多, 后者解链时的半峰宽很大, 导致当温度处于  $T_m$  时, 有错配的双链与无错配的双链两者之间的解链程度较为接近, 纳米金聚集情况无显著差异; 而纳米金标记的复合体解链时半峰宽很小, 两者之间的解链程度差异十分显著, 信号比为 10:1. 最后经过银染, 检测结果可以通过目视很清晰地识别出来. 该体系具有非常高的选择性, 通过小范围内调节温度可以辨别突变、缺失、插入等各种不同的目的片段. Bao 等<sup>[12]</sup>对纳米金介导的基因芯片系统进行优化后, 所检测的靶基因不需通过 PCR 扩增, 只需 500 ng 的基因组 DNA——1 滴血中的含量, 即可鉴别出靶基因是否发生突变, 大大简化了该检测手段的操作步

骤, 降低了检测成本, 其检测限为 200 fmol/L.

2001 年, Fritzsche 等<sup>[14]</sup>提出, DNA 杂交可以“牵引”纳米金颗粒至 2 个微金电极之间, 银染后能够形成完整的银层从而接通整个电路系统 (Fig. 2). 基于此理论, Mirkin 等<sup>[15]</sup>将上述检测原理推广到微电极芯片中进行 SNP 分析. 银染后, 完全互补的探针致使微电极间电阻下降到 500 欧, 而存在单碱基错配的电极间电阻则超过  $2 \times 10^8$  欧, 信号比达  $10^5:1$ , 其检测限为 500 fmol/L. 这种方法不需严格控温, 室温下即可达到检测目的. 随后, Fritzsche 等<sup>[16]</sup>研制了一套完整的 DNA 序列微电极芯片检测装置. 此芯片包含 42 个检测位点, 每个位点由 1 对间隔  $1 \mu\text{m}$  的微电极组成, 检测结果由系统内置的微电脑进行识别并读出. 此装置有微型化、高通量、高自动化等特点, 能方便携带, 快速检测.



**Fig. 2 Schematic diagram of gene mutation detection based on microelectrode array** Selective binding occurs between “capture” oligonucleotide strand located in the gap between two fixed microelectrodes and “target” DNA. Gold nanoparticle probes fill the gap. The conductivity of the device can be markedly increased by silver enhancement

## 2.2 生物传感器

纳米金具有良好的生物相容性和明显的信号放大效果, 能有效提高生物传感器的灵敏度. 在众多的生物传感器中, 石英晶体微天平 (quartz crystal

microbalance, QCM) 是最重要的 DNA 检测技术手段之一. QCM 是对质量敏感的检测传导装置, 主要有以下几个检测步骤: 首先, 在石英晶体表面镀一层金膜作为电极; 然后将巯基化的单链寡核苷酸探针固

定在金膜表面作为捕获探针;启动 QCM,待频率稳定后,加入适量靶 DNA. 靶 DNA 的一端将与捕获探针进行严格互补配对,通过精确控温,使只有与靶 DNA 完全互补的探针发生杂交反应;最后加入经纳米金修饰的单链寡核苷酸作为指示探针,与靶 DNA 的另一端完全互补杂交. 同“三明治”杂交形式类似,纳米金被“固定”到了靶 DNA 上,进入杂交体系,最终沉积在金电极上. 由于金原子比重很大,因此金颗粒的沉积将导致金电极的质量发生显著增加. 探针在高频交变电场作用下会产生振荡,而质量的显著增加将导致探针振荡频率的大幅下降. 最终通过振荡频率的下降程度即可推断出杂交率,进一步判别靶 DNA 的错配情况. 因为频率改变的数据可以很快通过晶片读出 (< 1 s),所以本方法能够实时监测反应体系的 DNA 杂交状况.

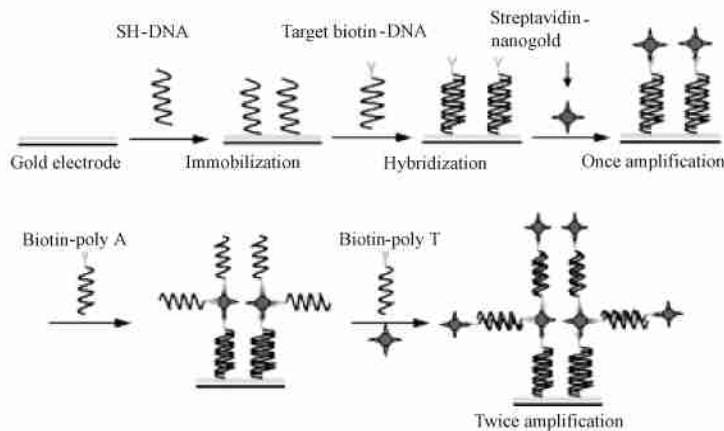
沈鹤柏等<sup>[17]</sup>利用 QCM 实时检测 DNA 错配的研究表明,靶基因突变个数和位点分布的不同使其与探针之间的杂交效率明显不同:有 1 个碱基突变点的靶基因杂交效率为 79%,有 3 个连续突变点的只有 20%,有 3 个非连续突变点的基本没有杂交信号. Zhou 等<sup>[18]</sup>利用纳米金和 QCM 来检测靶 DNA,检测限为 30 pmol/L,其杂交信号比传统检测方法高出 50 倍. Willner 等<sup>[19]</sup>指出,在此基础上通过纳米金的二级级联信号放大,可使灵敏度再提高 30 倍,最后

再作银染,灵敏度可达到 fmol/L 级别.

在上述检测机制的基础上, Yu 等<sup>[20]</sup>引进了 DNA 连接酶,建立了一种新的压电方法来检测 DNA 点突变. 此方法在进行“三明治”形式的杂交之后,加入 DNA 连接酶,如果靶 DNA 没有突变,连接酶将弥补两种探针之间的碱基空缺点,整体上形成一个完整的互补双链;如果存在单碱基突变,连接酶则不起任何作用,双链中的碱基空缺点依然存在,导致其  $T_m$  相对降低 3~5. 当温度升高时,存在突变的反应体系首先发生解链,金探针变为游离状态,然后被洗掉,致使石英晶体振动频率不会发生显著改变.

以上提到的都是用纳米金标记的探针直接与靶 DNA 进行配对杂交,可以定义为“直接标记法”,而 He 等<sup>[21]</sup>则通过“间接标记法”对信号进行多级放大. 标记原理如图 3 所示:用生物素标记靶基因,用链酶亲和素标记纳米金颗粒,纳米金通过生物素-链酶亲和素与靶基因相连,使杂交信号得到一级放大;然后纳米金与生物素标记的 poly A 和 poly T 结合, poly T 一端的生物素再次与纳米金结合,形成信号二级放大效应. 信号经一级放大后,检测限为 100 fmol/L,而经二级放大后达到 10 fmol/L. 结果表明,在同样的条件下,间接标记法的频率变化程度要显著高于直接标记法.

通过比较粒径分别为 30 nm、60nm 和 120 nm 的



**Fig. 3 The principle of detecting gene mutation with twice amplification based on QCM** After one-time amplification of indirect-labelling hybridization, one layer of streptavidin-nanogold is connected to the surface of the gold electrode. Then biotin-poly A is dropped to conjugate with streptavidin-nanogold. The second time of hybridization is performed by adding biotin-poly T onto the surface of a gold electrode. Finally, the second layer of gold nanoparticles is connected with streptavidin-nanogold conjugation

金颗粒, Mo 等<sup>[22]</sup>研究发现,3 者中 120 nm 的金颗粒引起电极振荡频率的改变最大. Jiang 等<sup>[23]</sup>用 50 nm 的金颗粒所获得的检测信号要明显比 12 nm 所获得的信号强. 因此,利用 QCM 进行核酸检测时的灵敏

度与纳米金粒径的大小有密切关系,在一定程度上灵敏度与纳米金的粒径大小成正比. 原因可能是由于大的金颗粒在电极表面所占空间比较大,需要较少的靶基因作用即可附着在电极上,而且大的金颗

粒比较重,因此使频率改变信号得以增强,达到了信号的检出限。

Jiang 等<sup>[23]</sup>研究了利用 QCM 检测时 pH 和盐浓度对杂交信号的影响。pH 和盐浓度较高时,频率改变程度较大。原因可能是  $H^+$  过多时对纳米金的沉积有抑制作用;盐离子浓度高时一方面有利于 DNA 杂交,另一方面可以中和金颗粒表面的电荷,更多的盐还会具有“盐析”效应。

## 2.3 光学检测法

### 2.3.1 光吸收

最早利用纳米金的高吸光系数进行比色法检测的是美国西北大学 Mirkin 教授领导的研究小组,他们对纳米金与 DNA 之间的相互作用作了大量的研究工作,为特定 DNA 序列检测的研究和应用开辟了一个新领域。Mirkin 等<sup>[24]</sup>用两种不同的,分别与靶基因的两端互补的巯基化寡核苷酸与纳米金通过“Au-S”共价键结合,形成两种探针,此时纳米金处于单分散状态,颜色呈红色。在与靶 DNA 序列杂交后,形成了以 DNA 杂交体为纽带的多个纳米金粒子构成的三维网状结构,光学性质发生改变,导致体系颜色由红变蓝。由于突变靶基因的  $T_m$  下降,且具有陡直的熔解曲线,与完全互补的靶基因区别非常明显,可达到  $10 \text{ fmol/L}$  的检测限。进一步的研究表明,加热或冷冻反应体系能加速杂交进程,其颜色变化更加迅速。将反应液滴加到反相薄层硅板上,杂交后颜色的反差更加明显,5 min 内通过目视即可辨别出靶 DNA 中的错配情况,即所谓的“斑点识别法”<sup>[25]</sup>。

利用 DNA 连接酶,Shen 等<sup>[26]</sup>建立了新的比色法来检测点突变。如图 4 所示,只有探针与靶基因杂交后完全互补,连接酶才起作用,“弥补缺口”成为完整的双链。此双链在高温时 ( $75^\circ\text{C}$ ) 仍不发生解链,使纳米金继续保持网络结构;而有错配者则发生解链,纳米金处于分散状态。加入盐后通过颜色变化或紫外-可见分光光度计均可看到两者的区别,检测限为  $74 \text{ pmol/L}$ 。

纳米金溶液的颜色变蓝主要是由于形成了三维网状结构而聚集,而 Charrier 等<sup>[27]</sup>则利用纳米金的二维聚集来检测突变。其检测体系自下而上分为 3 层:基底层、脂质双分子层和金探针层。由于脂质双分子层的两面均带正电荷,故基底层的表面需要带负电荷或电中性。用聚乙烯比色皿的底部作为基底,与脂质层的下表面相互吸附。因金粒子表面带负电荷,因此脂质层的上表面可以吸附两种分别与靶基因两端互补的金探针。靶基因加入后与金探针在比

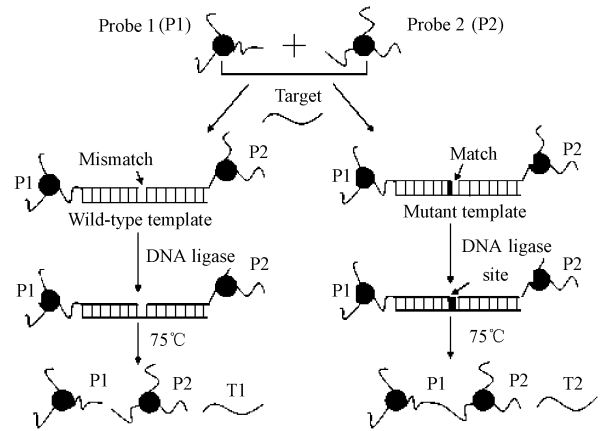


Fig. 4 Scheme of gene mutation detection based on DNA ligase

The gold nanoparticles are chemically modified with primer. These primers flank a single-base mutation on the target template. High-fidelity DNA ligase covalently joins the two adjacent primers when perfectly matched to the template, resulting in a purple color after annealing at  $75^\circ\text{C}$ . Conversely, for the unligated primers, a red color of separated gold nanoparticles is observed.

色皿底部杂交,空间上形成二维的聚集,然后开始升温,同时监测  $A_{527}$  的读数变化。由于有突变的靶基因  $T_m$  较低,首先发生解链,金探针很快就游离扩散开来,导致  $A_{527}$  值在短时间内发生陡然增加。

纳米金通过 DNA 交联的方式能够发生聚集,研究表明,通过非交联的方式,纳米金也可以发生聚集,而且速度要比交联方式快很多。Brook 等<sup>[28]</sup>设计了一种特殊的能“变形”的 DNA 探针 (aptamer),在特定的盐浓度下,aptamer 先与金探针杂交,此时金探针能稳定地分散在溶液中。但在加入靶基因后,aptamer 立即改变结构,从纳米金表面脱离,而与靶基因发生特异性结合,金探针很快发生聚集,导致体系颜色从红色变为紫色。

Rothberg 等<sup>[11]</sup>利用了双链 DNA 解链的动力学:室温下,突变型靶 DNA 会在短时间内解链出较多的单链 DNA,而野生型则比较稳定。因此,先让靶 DNA 在室温解链,2 min 后再加入盐离子、缓冲液及纳米金,即能观察到野生型靶 DNA 杂交体系呈蓝紫色,突变型呈红色。这一点主要是由于单链 DNA 和双链 DNA 对纳米金表面的不同作用效果所致。实验还发现,超声可以显著加快突变型靶 DNA 的解链速度。该法能在 5 min 内检测到最低  $100 \text{ fmol}$  的靶 DNA。进一步研究<sup>[29]</sup>证实,单链 DNA 与纳米金的结合速率受序列长度和环境温度两种因素影响。此方法中的探针不需作巯基修饰,PCR 产物也无需纯化,因此简化

了检测步骤,并大大降低了检测成本。

同样不需要对纳米金进行修饰,周等<sup>[30]</sup>提出了一种新的点突变检测方法.用突变型引物对靶序列进行等位特异性扩增.突变型样品扩增产物中大部分是双链 DNA,而野生型由于不能顺利扩增,产物中大部分是单链 DNA.以纳米金作为报告基团,向两种不同基因型扩增产物中依次加入纳米金和盐溶液,野生型基因扩增产物使得纳米金在适宜浓度的盐溶液中不发生聚集;突变型样品扩增产物则使纳米金发生聚集,导致吸收光谱和颜色方面均存在显著差异.该方法能够检测到 1.5 pmol 的样品,为点突变检测提供了一种实用的新方法。

### 2.3.2 光散射

除了具有很大的吸收光系数,纳米金还具有很高的散射光系数.一个 60 nm 的金粒子,其散射效率相当于  $3 \times 10^5$  个荧光素分子.超瑞利散射技术(Hyper-Rayleigh scattering, HRS)比其他光学技术敏感度要高出 1~2 个数量级,在纳米金溶液中 HRS 信号强度可提高  $10^5$  倍,能够用来对寡核苷酸链的单碱基错配进行超敏感检测,而不用对 DNA 作任何修饰.Ray 等<sup>[31]</sup>报道了这一方法,结果表明,完全互补的靶序列导致纳米金聚集使 HRS 信号显著增强,而有碱基错配的 HRS 信号基本没有改变.如果进一步优化该系统,通过改变纳米金的形状和粒径来增强 HSR 信号,可以将灵敏度再提高几个数量级。

## 3 前景与展望

由于纳米金易于制备和保存,且由其所介导的突变检测技术操作步骤大大减少,不需要荧光染料等特殊标记物,不需要昂贵的仪器设备,因此真正做到了低成本、高通量、高自动化检测,在检测的灵敏度上,最后的银染技术虽然不能准确定量,但能大大提高正常基因序列与突变基因序列所引起的纳米金颜色反差,增强检测信号,使得最低检测限大大降低,与传统检测手段相比,灵敏度得到了显著提高。

随着生物、化学、医学、工程学等研究领域之间的密切协作,各种技术将取长补短,相互结合.纳米金用于基因突变的检测具有很大的潜力.有理由相信,在未来的几年内,纳米金介导的基因突变及 SNP 分析技术将具有更加快速、简便、低成本、高通量、高自动化、高灵敏度等特点,成为遗传性疾病和肿瘤等早期诊断最有力的工具之一。

### 参考文献 (References)

[1] Ferrari M, Cremonesi L, Bonini P, *et al.* Single nucleotide

polymorphism and mutation identification by microelectronic chip technology [J]. *Methods Mol Med*, 2005, **144**(3-4): 93-106

[2] Kim N H, Beak T J, Park H J, *et al.* Highly sensitive biomolecule detection on a quartz crystal microbalance using gold nanoparticles as signal amplification probes [J]. *Anal Sci*, 2007, **23**(2): 177-181

[3] Liu C H, Li Z P, Du B A, *et al.* Silver nanoparticle-based ultrasensitive chemiluminescent detection of DNA hybridization and single nucleotide polymorphisms [J]. *Anal Chem*, 2006, **78**(11): 3738-3744

[4] Star A, Tu E, Niemann J, *et al.* Label-free detection of DNA hybridization using carbon nanotube network field-effect transistors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**(4): 921-926

[5] Sato K, Sawayanagi M, Hsokawa K, *et al.* Single-base mutation detection using neutravidin-modified polystyrene nanoparticle aggregation [J]. *Anal Sci*, 2004, **20**(6): 893-894

[6] Zhu X, Han K, Li G. Magnetic nanoparticles applied in electrochemical detection of controllable DNA hybridization [J]. *Anal Chem*, 2006, **78**(7): 2447-2449

[7] 赵立凡,李柏生,黑笑涵,等.银染增强的纳米金探针技术检测微量核酸[J].中国生物化学与分子生物学报(Zhao Li-Fan, Li Bo-Sheng, Hei Xiao-Han, *et al.* A colorimetric polynucleotides detection method based on nanoparticle probes with silver staining enhancement [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2006, **22**(11): 919-923

[8] Daniel M C, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology [J]. *Chem Rev*, 2004, **104**(1): 293-346

[9] Storhoff J J, Lazarides A A, Mucic R C. What controls the optical properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies [J]. *J Am Chem Soc*, 2000, **122**(19): 4640-4650

[10] Zhao W, Lee T M, Leung S S, *et al.* Tunable stabilization of gold nanoparticles in aqueous solutions by mononucleotides [J]. *Langmuir*, 2007, **23**(13): 7143-7147

[11] Li H, Rothberg L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, **101**(39): 14036-14039

[12] Bao Y P, Huber M, Wei T F, *et al.* SNP identification in unamplified human genomic DNA with gold nanoparticles probes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(2): e15

[13] Taton T A, Mirkin C A, Letsinger R L. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes [J]. *Science*, 2000, **289**(5485): 1757-1760

[14] Moller R, Csaki A, Fritzsche W, *et al.* Electrical classification of the concentration of bioconjugated metal colloids after surface adsorption and silver enhancement [J]. *Langmuir*, 2001, **17**(18): 5426-5430

[15] Park S J, Taton T A and Mirkin C A. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes [J]. *Science*, 2002, **295**(5559): 1503-1506

[16] Urban M, Moller R, Fritzsche W. A paralleled readout system for an electrical DNA-hybridization assay based on a microstructured

- electrode array [J]. *Rev Sci Instru*, 2003, **74**(2): 1077-1081
- [17] 高玉香,朱龙章,沈鹤柏,等.基于金纳米粒子的 QCM 实时检测 DNA 错配的研究.化学研究与应用(Gao Y X, Zhu L Z, Shen H B, *et al.* In-situ measurement of DNA mismatch basing on gold nanoparticle by quartz crystal microbalance (QCM) [J]. *Chem Res Appl*, 2005, **17**(4): 452-456
- [18] Zhou X C, O'Shea S J, Li S F Y. Amplified microgravimetric gene sensor using Au nanoparticle modified oligonucleotides [J]. *Chem Commun*, 2000, **11**: 953-954
- [19] Weizmann Y, Patolsky F, Willner I. Amplified detection of DNA and analysis of single-base mismatches by the catalyzed deposition of gold on Au-nanoparticles[J]. *Analyst*, 2001, **126**(9): 1502-1504
- [20] Pang L, Li J, Yu R, *et al.* DNA point mutation detection based on DNA ligase reaction and nano-Au amplification: A piezoelectric approach [J]. *Anal Biochem*, 2006, **358**(1): 99-103
- [21] Nie L B, Yang Y, He N Y. Enhanced DNA detection based on the amplification of gold nanoparticles using quartz crystal microbalance [J]. *Nanotechnology*, 2007, **18**(30): 305501-305505
- [22] Mo Z, Wang H, Liang Y, *et al.* Highly reproducible hybridization assay of zeptomole DNA based on adsorption of nanoparticle-bioconjugate [J]. *Analyst*, 2005, **130**(12): 1589-1594
- [23] Zhao H Q, Lin L, Jiang L, *et al.* DNA biosensor with high sensitivity amplified by gold nanoparticles [J]. *J Nanopart Res*, 2001, **3**(4): 321-323
- [24] Elghanian R, Storhoff J J, Mirkin C A, *et al.* Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles [J]. *Science*, 1997, **277**(5329): 1078-1081
- [25] Storhoff J J, Elghanian R, Mirkin C A, *et al.* One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes[J]. *J Am Chem Soc*, 1998, **120**(9): 1959-1964
- [26] Li J, Chu X, Shen G, *et al.* A colorimetric method for point mutation detection using high-fidelity DNA ligase [J]. *Nucl Acids Res*, 2005, **33**(19): e168
- [27] Charrier A, Candoni N, Liachenko N, *et al.* 2D aggregation and selective desorption of nanoparticle probes: A new method to probe DNA mismatches and damages[J]. *Biosens Bioelectron*, 2007, **22**(9-10): 1881-1886
- [28] Zhao W, Chiunan W, Brook M A, *et al.* Simple and rapid colorimetric biosensors based on DNA aptamer and noncrosslinking gold nanoparticle aggregation[J]. *ChemBioChem*, 2007, **8**(7): 727-731
- [29] Li H, Rothberg L. Label-free colorimetric detection of specific sequences in genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction[J]. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(35): 10958 ~ 10961
- [30] 周政,朱德斌,邢达,等.未修饰的纳米金结合等位特异性扩增来检测 Kras 基因点突变.化学学报(Zhou Zheng, Zhu De-Bin, Xing-Da, *et al.* Detection of Kras point mutation by unmodified gold nanoparticles and allele-specific amplification[J]. *Acta Chim Sin*), 2006, **64**(12): 1279-1283
- [31] Ray P C. Diagnostics of Single base-mismatch DNA hybridization on gold nanoparticles by using the Hyper-Rayleigh Scattering technique [J]. *Angew Chem (Int Ed Engl)*, 2006, **45**(7): 1151-1154