

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 24020051302550

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

纳米金与 DNA 的相互作用
及在人 p53 基因突变检测中的应用

The interaction between gold nanoparticles with DNA
and application in the detection of human p53 gene mutation

张建锋

指导教师姓名: 张其清教授/博导

孙莉萍讲师/硕导

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2008 年 7 月

论文答辩时间: 2008 年 7 月

学位授予日期: 2008 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2008 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
第一章 绪论	1
1.1 纳米金概述	1
1.1.1 纳米金的定义.....	1
1.1.2 纳米金的性质.....	2
1.1.3 纳米金的制备.....	3
1.1.4 纳米金与核酸的相互作用.....	4
1.2 p53 基因概述	4
1.2.1 p53 基因与肿瘤.....	4
1.2.2 p53 基因的基础研究.....	5
1.2.3 p53 基因突变的检测.....	6
1.3 纳米金在基因突变检测中的应用	7
1.3.1 纳米金新型基因芯片检测系统.....	7
1.3.2 生物传感器检测系统.....	9
1.3.3 光学检测系统.....	11
1.4 本课题的选题意义和研究内容	14
1.4.1 选题意义.....	14
1.4.2 研究内容.....	14
第二章 纳米金的制备及表征	15
2.1 引言	15
2.2 试剂及仪器	15
2.2.1 试剂.....	15
2.2.2 仪器.....	16
2.3 实验方法	17
2.3.1 5 nm纳米金的制备.....	17

2.3.2	13 nm纳米金的制备	17
2.3.3	50 nm纳米金的制备	17
2.4	纳米金的表征	17
2.4.1	5 nm纳米金的表征	18
2.4.2	13 nm纳米金的表征	19
2.4.3	50 nm纳米金的表征	21
2.5	讨论	24
2.6	本章小结	26
第三章	纳米金与DNA相互作用的研究	27
3.1	引言	27
3.2	试剂及仪器	27
3.2.1	试剂.....	27
3.2.2	仪器.....	29
3.3	实验方法	30
3.3.1	纳米金溶液的稳定性.....	30
3.3.2	纳米金与单链DNA的相互作用	30
3.3.3	纳米金与脱氧核苷酸的相互作用.....	30
3.3.4	纳米金与多聚脱氧核苷酸的相互作用.....	31
3.3.5	纳米金与双链DNA的相互作用	32
3.4	结果与讨论	33
3.4.1	纳米金溶液的稳定性.....	33
3.4.2	纳米金与单链DNA的相互作用	36
3.4.3	纳米金与脱氧核苷酸的相互作用.....	38
3.4.4	纳米金与多聚脱氧核苷酸的相互作用.....	41
3.4.5	单链DNA对纳米金保护作用的可逆性.....	47
3.4.6	纳米金与双链DNA的相互作用	49
3.5	本章小结	52
第四章	纳米金检测人p53 基因突变的研究	53
4.1	引言	53

4.2 试剂与仪器	54
4.2.1 试剂.....	54
4.2.2 仪器.....	55
4.3 基于HCl诱导纳米金聚集的基因突变检测	56
4.3.1 原理.....	56
4.3.2 方法.....	56
4.3.3 结果.....	57
4.4 基于NaCl诱导纳米金聚集的基因突变检测	63
4.4.1 原理.....	63
4.4.2 方法.....	63
4.4.3 结果.....	64
4.5 讨论	70
4.6 小结	71
第五章 总结与展望	72
5.1 结论	72
5.2 展望	73
参考文献.....	74
硕士期间研究成果.....	86
致 谢.....	87

Table of contents

Chinese Abstract	I
English Abstract	II
Charppter 1 Introduction	1
1.1 Gold nanoparticles introduction	1
1.1.1 Definition of gold nanoparticles	1
1.1.2 Property of gold nanoparticles	2
1.1.3 Preparation of gold nanoparticles	3
1.1.4 Interaction between gold nanoparticles and DNA	4
1.2 p53 gene introduction	4
1.2.1 The relation between p53 gene and tumour	4
1.2.2 The research on p53 gene	5
1.2.3 The detection p53 gene mutation	6
1.3 Application of gold nanoparticles in gene mutation detection	7
1.3.1 The novel microarray detection system based gold nanoparticles.....	7
1.3.2 The biossensor detection system	9
1.3.3 The optical detection system.....	11
1.4 Significance and Contents of The Research	14
1.4.1 Significance.....	14
1.4.2 Contents	14
Charppter 2 Preparation and characterization of gold nanoparticles	15
2.1 Introduction	15
2.2 Reagents and instruments	15
2.2.1 Reagents.....	15
2.2.2 Instruments.....	16
2.3 Methods	17
2.3.1 Preparation of 5 nm gold nanoparticles	17

2.3.2	Preparation of 13 nm gold nanoparticles	17
2.3.3	Preparation of 50 nm gold nanoparticles	17
2.4	Characterization of gold nanoparticles.....	17
2.4.1	Characterization of 5 nm gold nanoparticles	18
2.4.2	Characterization of 13 nm gold nanoparticles	19
2.4.3	Characterization of 50 nm gold nanoparticles	21
2.5	Discussion	24
2.6	Summary.....	26
Chapter 3 The interaction between gold nanoparticles and DNA.....		27
3.1	Interaction	27
3.2	Reagents and instruments.....	27
3.2.1	Reagents.....	27
3.2.2	Instruments.....	29
3.3	Methods.....	30
3.3.1	Stability of gold nanoparticles	30
3.3.2	The interaction between gold nanoparticles and ssDNA.....	30
3.3.3	The interaction between gold nanoparticles and deoxyribonucleoside	30
3.3.4	The interaction between gold nanoparticles and polydeoxyribonucleo- side.....	31
3.3.5	The interaction between gold nanoparticles and dsDNA	32
3.4	Results and discussion	33
3.4.1	Stability of gold nanoparticles	33
3.4.2	The interaction between gold nanoparticles and ssDNA.....	36
3.4.3	The interaction between gold nanoparticles and deoxyribonucleoside	38
3.4.4	The interaction between gold nanoparticles and polydeoxyribonucleo- side.....	41
3.4.5	The reversible reaction of ssDNA in protecting gold nanoparticles ..	47

3.4.6	The interaction between gold nanoparticles and dsDNA	49
3.5	Summary	52
Chapter 4 Detection of p53 gene mutation based gold nanoparticles		
.....		53
4.1	Introduction	534
4.2	Reagents and instruments	54
4.2.1	Reagents.....	54
4.2.2	Instruments.....	55
4.3	Detection of gene mutation based HCl-induced aggregation of gold nanoparticles	56
4.3.1	Principle	56
4.3.2	Methods.....	56
4.3.3	Results.....	57
4.4	Detection of gene mutation based NaCl-induced aggregation of gold nanoparticles	63
4.4.1	Principle.....	63
4.4.2	Methods.....	63
4.4.3	Results.....	64
4.5	Discussion	70
4.6	Summary	71
Chapter 5 Conclusion and Prospect		72
5.1	Conclusion	72
5.2	Prospect	73
References		74
Research achievements		86
Acknowledgements		87

摘 要

纳米金由于具有独特的理化性质及良好的生物亲和效应，不仅在催化、自组装、微电子、传感器等领域表现出广阔的应用前景，而且在生物医学领域，如生物标记、核酸检测、药物传输、转录调控、酶活性调控等方面都有重要的潜在应用价值，因此受到越来越广泛的关注。纳米金已成为基因工程重要的工具之一。本文主要对纳米金与核酸的相互作用及在人 p53 基因突变检测中的应用进行研究和探讨。

纳米金的制备是其应用的基础。由于影响因素很多，要制备大小、形状可控，粒径分布均一的纳米金并不容易。本研究采用不同的还原方法和调整还原剂的浓度制备出了 3 种粒径分别为 5 nm、13 nm、50 nm 的纳米金溶液，颜色分别呈棕黄色、酒红色和土黄色。通过紫外-可见分光光度计、透射电子显微镜和 Zeta 电位-粒径分析仪对其进行表征结果表明，所制备的纳米金形貌均接近圆形，粒径均一，分散性较好。

纳米金良好的生物亲和效应是其在生物标记、核酸检测及基因工程应用的基础。对纳米金与核酸的相互作用进行深入研究，有利于阐明相关的作用机理并进一步拓宽纳米金在生物医学领域的应用。本论文选用粒径为 13 nm 的纳米金，从多个角度，研究了其与核酸的相互作用情况结果表明，纳米金在加入适量 NaCl 或 NaOH 时会发生一定程度的聚集，加入适量 HCl 后会发生溶解。单链 DNA 吸附到纳米金表面形成保护层，使得纳米金在加入 NaCl 或 NaOH 时不再发生聚集，处于分散状态，加入 HCl 后不再发生溶解。脱氧核苷酸对纳米金保护作用的强弱依次为 dATP > dGTP > dCTP > dTTP。多聚脱氧核苷酸对纳米金保护作用的强弱依次为 poly A₃₀ > poly G₃₀ > poly C₃₀ > poly T₃₀。单链 DNA 对纳米金的保护作用强度与其长度成正比。

纳米金与 DNA 的相互作用为基因突变检测提供了新的思路。本研究利用单链 DNA 和双链 DNA 与纳米金不同的作用效果，成功建立了 2 种检测方法，分别对 p53 基因的热点突变逐一检测。该检测方法具有简便、快速、低成本等特点，有望在临床上对基因突变进行快速检测。

关键词：纳米金；金纳米粒子；DNA；基因突变；相互作用

Abstract

Gold nanoparticles (GNPs) have many unusual chemical and physical properties such as unique optical effects, novel electrical effects and excellent biological affinity. Gold nanoparticles not only are widely used in the catalysis, self-assembly, microelectronics, sensors fields, but also show broad prospects in the biomedical field, such as biological label, nucleic acid detection, gene amplification, drug delivery, and transcription regulation. Therefore, gold nanoparticles have attracted considerable attention in recent years and become an important tool in genetic engineering. This article mainly studied the interaction of gold nanoparticles with single-stranded DNA and application in the detection of human p53 gene mutations.

The synthesis and characterization of gold nanoparticles is very important for both fundamental and applied research. It is difficult to obtain stable and controlled gold nanoparticles in size and shape due to many factors. Through introducing different reducing methods and changing the concentration of reducing agent, we successfully synthesized three kinds of gold nanoparticles of 5 nm, 13 nm, and 50 nm in size, which colors appeared brown, red, and yellow, respectively. The shape and size of gold nanoparticles were characterized by UV-Vis absorption spectrum and transmission electron microscope (TEM).

The excellent bioaffinity is the foundation for the application of gold nanoparticles in biolabel, nucleic acid detection, and genetic engineering. The research of the interaction between gold nanoparticles and DNA is important for realizing the mechanism of the interaction and boarding the application of gold nanoparticles in biomedical fields. We choosed gold nanoparticles of 13 nm in this research. The experimental data showed that gold nanoparticles could aggregate after adding NaCl or NaOH and dissolve after acidification with HCl. Both processes were irreversible. If the same particles were incubated with single strand DNA(ssDNA), GNPs-ssDNA complex were stable against NaCl-induced or NaOH-induced aggregation and assembled only when HCl was added, but redispersed when NaOH

was added. Four different types of dNTPs exhibited different binding affinity to gold nanoparticles in the order of dATP > dGTP > dCTP > dTTP. The order of the polynucleotides was consistent with dNTPs (poly A₃₀ > poly G₃₀ > poly C₃₀ > poly T₃₀). Moreover, longer ssDNA had stronger protective effect to gold nanoparticles.

Gold nanoparticles are unique tools for biomolecule detection and provide novel idea for gene mutation detection. Based on the different binding affinities between single-strand DNA and double-strand DNA(dsDNA) to gold nanoparticles, two novel methods were established to detect the p53 gene mutations successfully.

Key words: gold nanoparticles; nanogold; deoxyribonucleotide; DNA; gene mutation

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 绪论

纳米技术是一门新型技术，是研究结构尺寸在 0.1~100 nm 范围内材料的特殊性质及其应用，并探索在纳米尺度内物质运动的新现象和新规律，是物理、化学、材料科学、生命科学及信息科学发展的新领域。许多化学和生物反应的过程也发生在纳米尺度层面上。探测纳米尺度内物理、化学和生物性质的变化，将加深对生命科学的理解。利用纳米技术，人们已经可以操纵单个的生物大分子，因此纳米技术被认为是有可能引发第二次生物学革命的重要技术之一。纳米技术和生物技术都是 21 世纪关键的高新技术，两者的结合将共同有力地推进 21 世纪科学的快速发展。纳米生物技术是纳米技术和生物技术交叉渗透而形成的一门新技术，是利用纳米技术来解决和研究生物学问题。我国的纳米生物技术研究主要集中在纳米生物材料技术、纳米诊断与治疗技术、纳米生物器件等方面^[1]。

纳米材料是指在三维空间中至少有一维处于纳米尺度范围，按照维数，纳米材料的基本单元可以分为三类：(1) 零维，指在空间有三维都处于纳米尺度，如：纳米尺度的颗粒、原子团簇等；(2) 一维，指在空间有两维处于纳米尺度，如：纳米线、纳米棒、纳米管等；(3) 二维，指在三维空间中有一维在纳米尺度，如：超薄膜、多层膜等^[2]。当物质到纳米尺度成为纳米材料以后物质的性质不同于大块物质，会发生很大改变而出现一些特殊的性质，如熔点、磁性、电容性、导电性、发光性及水溶性都有重大变化，产生新的理化性质。因此，纳米材料受到越来越多的重视。纳米材料的研究势必把物理、化学、生物等领域的许多学科推向新的层次，同时会给本世纪科学的发展带来新的挑战与机遇。

1.1 纳米金概述

1.1.1 纳米金的定义

金是重金属，但当其尺寸减小到纳米尺度时，即显示出极好的生物相容性，不仅对人体无害，而且在食品、药品、化妆品等领域得到了广泛应用。例如用于食品及饮品可以起到防腐和保健的功效；添加到化妆品如各种美容面膜中可以起

到美白、抗衰老、润肤的作用；还可用来生产各类生活日用品，如纳米金香皂、各种饰品和艺术品。另外，纳米金在生物医学领域，如基因转运、转录调控、药物传输及酶活性调控等方面均有重要的应用价值。

纳米金(gold nanoparticles, GNPs)是指直径介于 1~100 nm 之间的金颗粒。微小的金颗粒由于表面带负电在溶液中相互排斥而均匀稳定分散，呈胶体状态，故又称胶体金。纳米金由一个基础金核（原子金 Au）及包围在外的双离子层构成，紧连在金核表面的是柠檬酸根离子（ $C_6H_5O_7^{3-}$ ），外层离子 H^+ 则分散在溶液中^[3]，如图 1-1 所示。在电子显微镜下可观察纳米金的颗粒形态，较小的金颗粒基本呈圆球形，较大的金颗粒（一般指大于 30 nm）多呈椭圆形。

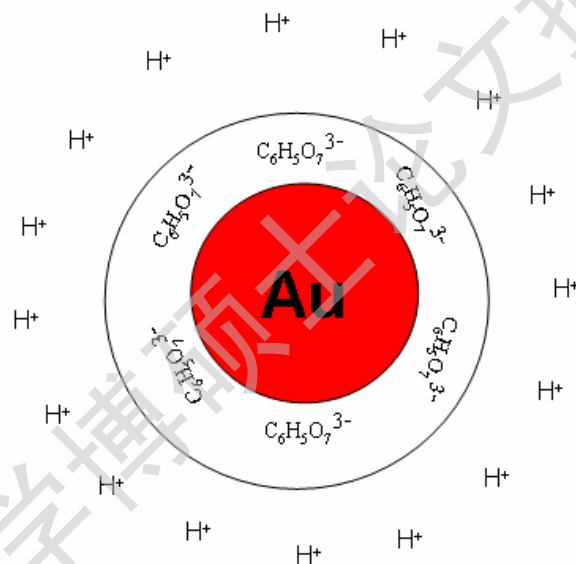


图 1-1 纳米金结构示意图

Figure 1-1 The structure scheme of gold nanoparticles

1.1.2 纳米金的性质

近年来，生物、医学、化学、物理等学科领域的研究人员都对纳米金产生了浓厚的兴趣。纳米金之所以成为研究的热点，主要因为与常规的大块金相比，纳米金具有非常独特的物理性质和化学性质，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、量子尺寸效应、宏观量子隧道效应和介电效应等。（3）具有独特的电学效应、光学效应、磁学效应（光吸收和光散射）、催化效应和特殊的生物亲和效应^[4]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库