

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 19120051403055

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

**DNA 聚合酶催化制备 Metal-DNA 和非标记型 II-VI 族半
导体发光纳米晶生物传感体系研究**

**Generation of Metal-DNA by DNA Polymerase Catalysis and
Label-free Biosensing Nanohybrid Systems Based on II-VI Group
Semiconductor Photoluminescent Nanocrystals**

余 涛

指导教师姓名: 江云宝 教 授 (厦门大学)

谢剑炜 教 授 (军事医学科学院)

专 业 名 称: 分 析 化 学

论文提交日期: 2010 年 7 月

论文答辩时间: 2010 年 7 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 7 月

**Generation of Metal-DNA by DNA Polymerase Catalysis and
Label-free Biosensing Nanohybrid Systems Based on II-VI Group
Semiconductor Photoluminescent Nanocrystals**



A Dissertation Submitted to the Graduate School in Partial Fulfillment of
the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy

By Tao Yu

Supervised by

Prof. Yun-Bao Jiang

Department of Chemistry

Xiamen University

June 2010

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密（ ），在 年解密后适用本授权书。
2. 不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

中文摘要.....	i
英文摘要.....	iv
第一章 前言	
1.1 基于 DNA 分子的纳米结构	1
1.2 金属 DNA.....	2
1.2.1 金属 DNA 的结构特点.....	2
1.2.2 T-Hg-T 结构的结构特点	3
1.3 聚合酶应用于非天然 DNA 合成.....	5
1.3.1 DNA 双链一级结构特点.....	8
1.3.2 KF 的结构与功能.....	9
1.3.3 KF 结构中部分关键氨基酸残基.....	15
1.4 纳米晶的基本概念和基本效应.....	17
1.4.1 纳米晶的基本特性.....	17
1.4.2 NCs 在分析化学和生命科学领域的应用	19
1.4.3 生物功能分子与纳米晶的偶联方法	21
1.4.4 纳米晶的技术瓶颈.....	22
1.5 本研究的目的意义和内容.....	23
第二章 KF (exo-) 识别催化 T-Hg-T 结构制备金属 DNA 的研究	
2.1 前言.....	25
2.2 实验部分.....	26
2.3 结果与讨论.....	31
2.4 结论.....	78

第三章 PCR 体系识别催化 T-Hg-T 结构制备金属 DNA 的研究	
3.1 前言	80
3.2 实验部分	80
3.3 结果与讨论	81
3.4 结论	87
第四章 非标记型纳米晶/适配子传感体系检测溶菌酶的研究	
4.1 前言	88
4.2 实验部分	91
4.3 结果与讨论	94
4.4 结论	102
第五章 非标记型纳米晶/乙酰胆碱酯酶传感体系检测神经类化学战 剂和有机磷类农药的研究	
5.1 前言	103
5.2 实验部分	108
5.3 实验结果	111
5.4 反应原理及讨论	120
5.5 结论	125
总结与展望	126
参考文献	127
缩写	152

攻读博士学位期间发表论文目录.....154

致谢.....155

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese..... i

Abstract in English..... iv

Chapter 1 Introduction

1.1 Brief Introduction to Nanostructure based on DNA..... 1

1.2 Metal DNA..... 2

1.2.1 Brief introduction to Metal DNA Character..... 2

1.2.2 Brief introduction to T-Hg-T Character..... 3

1.3 Unnatrual DNA Synthesis by DNA Polymerase Reaction..... 5

1.3.1 Brief introduction to DNA duplex primary structure..... 8

1.3.2 Brief introduction to structure and function of KF..... 9

1.3.3 Brief introduction to part of key amino acids of KF..... 15

1.4 II-VI Group Semiconductor Photoluminescent Nanocrystals..... 17

1.4.1 Brief introduction to II-IV group semiconductor nanocrystals..... 17

1.4.2 Application of nanocrystals in analytical and life science fields..... 19

1.4.3 Bioconjugation strategy of biomolecules and nanocrytals..... 21

1.4.4 Drawbacks of nanocrytals..... 22

1.5 Significance, Objective and Contents of the Dissertation..... 23

Chapter 2 Generation of M-DNA by the Reaction of KF(exo-)

Recongizing and Catalyzing T-Hg-T Duplex

2.1 Introduction..... 25

2.2 Experiment..... 26

2.3 Results and Discussion..... 31

2.4 Conclusions..... 78

Chapter 3 Generation of M-DNA by the PCR System Recongnizing and Catalyzing T-Hg-T Duplex

3.1 Introduction.....80
 3.2 Experiment.....80
 3.3 Results and Discussion.....81
 3.4 Conclusions.....87

Chapter 4 A label-Free NCs/Aptamer nanobrid system for Lysozyme

4.1 Introduction.....88
 4.2 Experiment.....91
 4.3 Results and Discussion.....94
 4.4 Conclusions.....102

Chapter 5 A label-Free NCs/AChE nanobrid system for Nerve agents and Pesticides

5.1 Introduction.....103
 5.2 Experiment.....108
 5.3 Results.....111
 5.4 Mechanism and Dicsussion....120
 5.5 Conclusions.....125

Conclusions and Prospect.....126

References.....127

Abbreviation.....152

Publication List.....154

Acknowledgements.....155

摘要

纳米技术与分析化学的交叉使其体现出新的生命力。基于纳米结构设计的纳米分子机器 (nano molecular machine) 和纳米器件 (nano-device) 也许将是下一代传感器, 电子元件, 分子自组装及信息处理装置的核心组成部件。利用聚合酶催化生成具有天然 DNA 形式的纳米结构是这一领域的一个热点, 但是生物聚合的方法制备具有金属特性的 M-DNA 的研究工作尚未见报道。纳米晶的材料学特性与生物反应的高效性, 特异的相结合是目前传感领域的重点发展方向, 而目前这方面的研究多将生物分子偶联于纳米晶表面, 这对设计及构建传感体系带来一定困难。基于对目前纳米结构研究的认识及纳米晶在分析化学领域的广泛应用, 本论文从荧光的技术手段研究聚合酶催化制备 M-DNA 和构建非标记型纳米晶/生物识别单元的传感体系两个方向开展研究工作, 为解决上述两个问题提供有益的启示。

论文共分五章, 包括如下内容:

第一章为前言。首先概述了具有 DNA 结构纳米结构的发展历程和发展方向, 简要介绍聚合酶在制备纳米结构领域方面的应用研究, 同时还探讨了 M-DNA 的研究现状和发展前景及面临的挑战。最后, 综述了 II-VI 族半导体发光纳米晶 (NCs) 的基本光物理性质和与生物分子偶联的方法及技术缺陷。

第二章介绍了一个利用荧光手段建立的可对聚合酶催化效率进行灵敏检测的表征平台, 并利用此平台对聚合酶 KF (exo-) 识别催化位于不同位置的 T-Hg-T 双链结构生成新链的催化效率进行灵敏测定。据我们所知, 这是首次利用聚合酶生物催化的方法制备具有 M-DNA 结构 DNA 双链的研究工作。该研究不但在原理上证明了聚合酶催化的方法可以用于 M-DNA 的制备, 而且还分别考察了聚合酶小沟识别区 (MGR) 内、小沟识别区外、小沟识别区内外协同作用下对 T-Hg-T 双链的识别催化特点。另外, 本研究还对在聚合过程中生成 T-Hg-T 双链的研究工作进行了初期探索。这些研究作为将对生物催化反应拓展到其它类型 M-DNA 的合成奠定了基础。同时, 本研究所设计的表征体系对 Hg^{2+} 表现出较好

的响应特性。

第三章的实验结果表明, Taq 和 Pfu 这两种应用 PCR 体系的聚合酶, 同样具有对 T-Hg-T 结构双链的识别和催化能力。由于 PCR 体系下的聚合反应理论上具有无限的扩增能力, 是生物制备目的 DNA 产物的最高效手段, 因此本章的研究结果意味着, 这一制备具有 T-Hg-T 结构 M-DNA 的生物合成方法可以应用于大规模制备, 这为此类合成方法走向实际应用提供了技术基础。

针对当前基于纳米晶所构建的生物传感体系中, 将生物分子标记于纳米晶表面的连接过程暴露出的反应步骤多、条件较苛刻且对纳米晶光学性能和生物分子功能有一定影响等问题, 本论文在第四、五章介绍了两种非标记型纳米晶/生物分子新型传感体系, 以期将这种具有简单、条件温和、对纳米晶和生物分子的特性没有影响的传感体系拓展到其它重要目标分子的识别与传感研究。

第四章将表面带有正电荷的 TCh-CdTe NCs 与可识别溶菌酶的适配子构成一种非标记型传感体系, 通过测定溶菌酶与适配子结合所引起的 NCs 表面适配子数量的改变, 可对溶菌酶进行识别, 其检测限达到了 71 nM ($1.07 \mu\text{g mL}^{-1}$)。该体系一方面通过静电作用实现了纳米晶与适配子之间的非标记型耦合, 另一方面利用了纳米晶发光特性受表面电荷影响的特点直接实现了传感。

针对纳米晶表面可偶联的生物大分子数量有限, 不利于响应信号放大的问题, 第五章的研究工作旨在设计一种可将纳米晶表面多价性特性与生物反应灵敏性结合在一起的非标记型生物传感体系。该研究以有机磷化合物为检测对象, 将 TGA-CdS NC 的发光特性与乙酰胆碱酯酶催化能力受有机磷化合物抑制的物性结合起来, 构建了一个非标记型的传感体系, 在此体系中, 乙酰胆碱酯酶催化反应的底物和产物, 硫代乙酰胆碱、硫胆碱均为小分子化合物, 且二者都通过静电作用与纳米晶结合, 但是其对纳米晶发光信号改变的机理各不相同。四种神经毒剂和一种有机磷类农药被用于此传感体系的评价, 实验现象证明该体系对五种靶分子均表现出良好的响应特性, 检测限达到了 10^{-11} M 量级。在这一过程中, 不涉及任何生物大分子与纳米晶之间的结合反应, 从根本上杜绝了耦合过程可能导致的不利因素, 更好地发挥了小分子化合物与纳米晶分子反应的多价性, 因而具有更好的应用前景。

关键词 纳米结构 II-VI 族半导体发光纳米晶 聚合酶 Metal-DNA
T-Hg-T 小沟识别区 有机磷化合物 适配子 溶菌酶 非标记

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

The cross of nanotechnology and analytical chemistry refreshes the latter field. The nanostructure-based nanomolecular machines and nanodevices are considered as the potential core-hardware in the next generation of sensors, electronic devices, self-assembled material and information output equipments. In present, a highlighted researching aspect is the construction of nanostructures with the natural duplex DNA formation from polymerase catalysis, among them the production of metal DNA(M-DNA) with the metal characteristics by bio-engineering is still a challenge and no relevant report is published. The combination of the unique optical features of nanocrystals(NCs) and high selectivity, high efficiency of biomolecule reactions is expected to be one of most interesting trends in sensing field. However, current conjunction approaches of the biomolecules towards the surface of nanocrystals are of inconvenience, *i.e.*, the inert properties of the nanocrystals and biomolecules are affected, while the coupling procedures are complicated and tedious. Based on the understanding of such challenges on development of nanostructures and nanohybrid systems, two part of researches are evolved in this dissertation, one is a construction of M-DNA by polymerase catalysis with a fluorescence sensing platform, another is a generation of novel label-free recognition and sensing nanohybrid systems.

The dissertation consists of five chapters.

Chapter 1 introduces in general the history and trends in the development of nanostructures. A brief introduction of the applications of polymerase catalytic reaction on the construction of nanostructures is focused. The state-of-art and challenges on M-DNA material are discussed. Fundamental photophysical properties of II-VI group semiconductor photoluminescent NCs, bioconjunction methods on NCs are also summarized.

Chapter 2 presents a fluorescence sensing platform for evaluating the catalysis efficiency of polymerases. The catalysis and recognition capability of polymerase KF(exo-) on the T-Hg-T DNA duplex are described. To our knowledge, it is the first

report on engineering M-DNA architecture shown as DNA duplex from a biocatalyzing way. This work provides a proof-of-principle on biosynthesis of M-DNA. The role of MGR on the catalysis efficiency for T-Hg-T duplex is discussed in detail, including the location of T-Hg-T duplex in MGR, out MGR and across MGR. Furthermore, the formation process of generating T-Hg-T duplex in the KF(exo-) catalysis reaction is initiated. Our research will promote an extension applied on other types of M-DNA. Meanwhile, a good response on Hg^{2+} sensing is observed with such a fluorescent platform.

Chapter 3 proves that other two polymerases applied in PCR system, Taq and Pfu, can also generate new DNA sequence with T-Hg-T duplex. It was well known that PCR is the most efficient way in amplifying target DNA sequences because of its chain reaction characteristics, the bioengineering M-DNA platform described in this chapter can thus be applied into large-scale production of M-DNA. It paves the way in practical use of M-DNA biosynthesis.

Considering the major drawbacks occurred in the conjugating preparation of biomolecules towards the surface of nanocrystals in current NCs/biomolecule assays, such as laborious manipulation, time-consuming processes, the decline of optical characteristics of NCs and function of biomolecules, two types of convenient, label-free bioassays in chapter 4 and 5 are described, without damages on nanocrystals and biomolecules' functions. This concept can be expanded to other designs of NCs/biomolecule assays in sensing of other target molecules.

Chapter 4 describes a construction of a label-free nanohybrid system, which is composed of a positively charged TCh-CdTe NC and an anti-lysozyme aptamer. The signal response is altered in good accordance with the change of the aptamer amount on the surface of NCs, and a limit of detection (LOD) of lysozyme was reached as 71 nM ($1.07 \mu\text{g mL}^{-1}$). Here, the electrostatic interaction between NCs and aptamer plays a significant role in both the aptamer conjunction and transduction events, namely, aptamer can be absorbed on the surface of NCs by electrostatic interaction and acts as a signal transducer reflecting the target molecule induced transformation changes on

the luminescence.

Focused on the challenge of the limited amount of biomolecules conjugated on the surface of NCs therefore it is difficult to amplify the response signal, chapter 5 demonstrates a new label-free NCs/biomolecule assay in combination of the high sensitivity of bioreactions and the multivalency of NCs. Particularly, a nano hybrid for organophosphorus compounds (OPs) by integrating the inhibition activity of acetylcholinesterase and photoluminescent characteristics of TGA-CdS NCs is described. In this assay, the substrate (acetylthiocholine) and the product of acetylcholinester (thiocholine) are small organic compounds, both inclined to adsorb onto the surface of NCs by electrostatic interactions but with different mechanism on the photoluminescence. The assay described in this chapter exhibited excellent responses for four nerve agents and one OP pesticide, and a LOD was achieved as low as 10^{-11} M level. No bioconjugation between biomolecules and NCs is involved in such a process, possible effects on the nature of NCs and biomolecule are avoided as a result, and the merit of multivalent reaction between small molecule and NCs can be fully exerted. This nano hybrid strategy is expected to be of general applicability on detection and sensing a series of target species.

Keywords

Nanostructure, II-VI group semiconductor photoluminescence nanocrystals, Polymerase, Metal-DNA, T-Hg-T, Minor-groove recognition, Organophosphorus compound, Aptamer, Lysozyme, Label-free

第一章 绪论

1.1 基于 DNA 分子的纳米结构

基于纳米结构(nanostructure)设计的纳米分子机器(nano molecular machine)和纳米器件(nano-device)也许是下一代传感器、信息处理装置、电子元件、化学反应控制装置及分子组装器件的核心组成¹。生物分子, 历经生物进化过程中的淘汰和选择, 实现了结构与功能统一的最大化, 较多的生物分子由于具有较好的自组装特性(self-assembly), 而受到纳米领域的青睐², 其中, 核酸分子也许是构成纳米结构最好的一种模型分子, 自然界中核酸分子在复制过程所表现出的碱基的单纯性、互补法则的恒定性和专一性、遗传信息的多样性及构象上的特殊性和拓扑靶向性都是纳米技术所需要的材料特性^{3,4}。

生命体系中蕴涵着难以计数的信息, 作为这些信息可稳定遗传, 可有序表达, 可准确调控的载体, 核酸分子结构的完美性不言而喻^{5,6}, 构建具有核酸结构特征的纳米结构已成为此领域最受重视的研究方向之一。较之于 RNA 分子, DNA 分子更受关注, 这是因为 DNA 分子不但具有与 RNA 分子相同的结合法则, 而且 DNA 双螺旋结构具有的高机械刚性、在分子间相互作用中表现出的特异性和可设计性、且 DNA 分子人工合成费用较低、物理化学性质十分稳定且不易降解。

上述这些特质使得对 DNA 分子的改造更加容易, 研究表明 DNA 分子经过设计, 易于形成多种多样的确定几何构型的纳米结构, 一个极好的佐证就是改造结构骨架后的 DNA 分子, 具有识别配体和催化反应的能力⁷⁻⁹, 这样一种双链直径仅 2nm, 但长度可以跨越微观和宏观的材料分子所具备的材料特性使其深受纳米结构研究领域重视也是顺理成章的。

事实上, DNA 分子为一个理想的超分子骨架体系, 可以在不同空间、区域的设计中, 组装多种化学基团, 行使复杂功能。以 DNA 分子为骨架结构的纳米结构已经用于设计纳米机器人等具有较复杂结构和功能的纳米装置¹²⁻³⁵; 具有 DNA 骨架特征的纳米结构在以构建具有行使逻辑运算功能的纳米器件研究中也已获得了成功¹⁰⁻²⁵; 有关 DNA 分子为骨架构成的平面网格(lattice)或可溶性的

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