

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.09.017

硅包银纳米颗粒的制备及其光散射法检测腺苷^①

李靖云¹, 韩国斌¹, 刘建萍², 李原芳¹

1. 发光与实时分析教育部重点实验室/西南大学 化学化工学院, 重庆 400715; 2. 重庆第 48 中学, 重庆 400700

摘要: 将腺苷的核酸适配体设计成两段 DNA 链, 一段修饰在硅包银纳米颗粒上, 另一段修饰在磁性颗粒上. 利用腺苷与其核酸适配体的特异性结合, 通过检测磁性分离后上清液中硅包银纳米颗粒的光散射信号变化, 实现了腺苷检测. 方法的线性范围为 $8.0 \times 10^{-6} \sim 5.0 \times 10^{-4}$ mol/L, 线性相关系数(r)为 0.981 8, 其他的核苷不干扰测定.

关键词: 硅包银纳米颗粒; 磁性颗粒; 光散射; 腺苷; 核酸适配体

中图分类号: O657

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)09-0113-05

银纳米颗粒(AgNPs)具有独特的局域表面等离子体共振(Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR)性质^[1-2]. 但是它们在溶液中稳定性较差, 同时表面修饰困难. 而 SiO₂ 具有良好的化学稳定性和光学通透性, 并且 SiO₂ 比 AgNPs 更易于进行表面功能化修饰^[3-4]. 因此, 本研究利用 AgNPs 强烈的 LSPR 特性和 SiO₂ 光透性好、易于修饰的特点, 制备了 Ag@SiO₂NPs 作为光散射(Light Scattering, LS)探针, 并结合磁性颗粒(Magnetite Particles, MPs)在外磁场作用下易于分离的特点, 设计了一种分析检测腺苷的新方法. 即将腺苷的核酸适配体裁剪为两段 DNA 单链^[5], 一段修饰在 Ag@SiO₂NPs 上, 另一段修饰在 MPs 上. 当体系中不存在腺苷时, Ag@SiO₂NPs 与 MPs 之间不能通过 DNA 链发生相互结合, 在进行磁分离后, Ag@SiO₂NPs 依然分散在溶液中, 此时, 上清液表现出较强的 LS 信号; 而当有腺苷存在时, Ag@SiO₂NPs 与 MPs 上的 DNA 链通过腺苷发生相互作用, 两者结合, 此时再进行磁分离, Ag@SiO₂NPs 就会与 MPs 一同从溶液中分离, 上清液的 LS 信号减弱. 通过对溶液中 Ag@SiO₂NPs 的 LS 信号的监测, 实现了腺苷的检测.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

F-4500 荧光分光光度计(日本日立公司); UV-3010 紫外-可见分光光度计(日本日立公司); S-4800 型扫描电子显微镜(SEM, 日本日立公司); SZCL-控温磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司).

DNA₁: 5'-NH₂-TTT TTT TTT TAC CTG GGG GAG TAT-3', DNA₂: 5'-NH₂-TTT TTT TTT

① 收稿日期: 2016-10-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(21175109).

作者简介: 李靖云(1986-), 女, 湖南长沙人, 硕士研究生, 主要从事发光分析研究.

通讯作者: 李原芳, 教授.

TTG CGG AGG AAG GT-3', DNA₃: 5'-NH₂-TTT TTT TTT TCT TAC GGT GGG GCA ATT-3'(上海生物工程有限公司); 腺苷(Adenosine)、鸟苷(Guanosine)、胸苷(Thymidine)(上海蓝季科技发展有限公司); 正硅酸乙酯(TEOS)、三乙基氨基硅烷(APTES)、牛血清白蛋白(BSA)(美国 Sigma-Aldrich 公司); pH=7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液(50 mmol/L); 实验用水均为二次蒸馏水, 所用无机试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 Ag@SiO₂ NPs 的制备与修饰

Ag@SiO₂ NPs 的制备^[3, 6]: 称取 9 mg AgNO₃ 溶于 50 mL 水中, 在剧烈搅拌下, 加入 1 mL 1% 的柠檬酸三钠溶液并剧烈搅拌 1 h. 将制备好的 AgNPs 于棕色广口瓶中避光储存. 测得 AgNPs 的吸收峰约在 428 nm 处(图 1), 统计其平均粒径约为 (60±3) nm(图 1(a)). 取一定量的 AgNPs 加入到 100 mL 无水乙醇中, 搅拌加入 2 mL

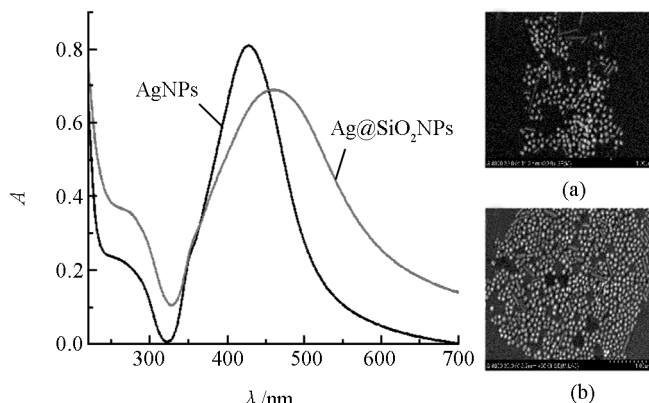


图 1 AgNPs 与 Ag@SiO₂ NPs 的吸收图及 SEM 图

氨水. 继续搅拌并向溶液中加入 5 mL 10 mmol/L 的 TEOS, 待反应 24 h 结束后, 测得其吸收峰位于 462 nm 处(图 1). Ag@SiO₂ NPs 平均粒径约为 (83±3) nm, 硅壳平均厚度约为 (11±3) nm(图 1(b)). 取一定量 Ag@SiO₂ NPs 在搅拌下逐滴加入 200 μL APTES, 反应 30 min 结束后洗去多余的 APTES, 最后将产物干燥. Ag@SiO₂ NPs 的修饰: 将上述干燥产物重新超声分散于 5 mL 水中, 再加入 500 μL 25% 的戊二醛, 充分反应 1 h 后, 产物用 Tris-HCl 洗涤 3 次, 之后加入 500 μL DNA₂, 37 °C 孵育过夜, 结束后产物用 Tris-HCl 洗去未连接的 DNA₂, 之后用 BSA 在 37 °C 孵育 30 min, 封闭未反应的醛基活性位点, 最后用 Tris-HCl 洗去多余的 BSA, 定容至 5 mL, 于 4 °C 温度下保存备用。

1.2.2 MPs 的制备与修饰

MPs 的制备^[7-8]: 称取 2.7 g FeCl₃ · 6H₂O 和 1.8 g FeSO₄ · 7H₂O 溶于 100 mL 水中, 在 80 °C 水浴中搅拌 15 min 后, 加入 2.8 g NaOH, 待生成 Fe₃O₄ 后继续搅拌 30 min, 反应完全后洗去未反应的原料, 产物用无水乙醇定容至 100 mL. 取 4 mL MPs 于 25 mL 无水乙醇中, 搅拌下先加入 1 mL TEOS 再加入 500 μL 氨水, 继续反应 2 h 后洗去多余的原料. 重新分散后, 在搅拌下加入 250 μL APTES, 反应 30 min 后用无水乙醇洗去多余的 APTES, 最后将 MPs 干燥并收集固体待用. 取 10 mg 上述固体 MPs 分散于 4 mL 水中, 然后加入 1.6 mL 水与 400 μL 25% 的戊二醛混合液, 30 min 反应结束后, 用水洗去多余的戊二醛, 再向 MPs 溶液中加入 400 μL 的 DNA₁, 定容至 4 mL, 密封后以 37 °C 孵育过夜; 将反应的 MPs 用 Tris-HCl 清洗 3 次, 之后用 BSA 在 37 °C 孵育 30 min, 封闭未反应的醛基活性位点, 最后用 Tris-HCl 洗涤 3 次, 定容至 4 mL, 4 °C 储存. 使用相同的方法, 在 MPs 上修饰 DNA₃.

1.2.3 实验方法与步骤

在 2 mL 离心管中依次加入 Tris-HCl 缓冲液, Ag@SiO₂ NPs, BSA, MPs, NaCl 溶液以及不同量的腺苷, 最后定容至 500 μL. 溶液旋涡混匀反应 40 min 后磁性分离, 取上清液在荧光分光光度计上以 λ_{em}=λ_{ex} 同步扫描激发和发射单色器测定其散射光谱图, 激发和发射狭缝宽度均为 5.0 nm.

2 结果与讨论

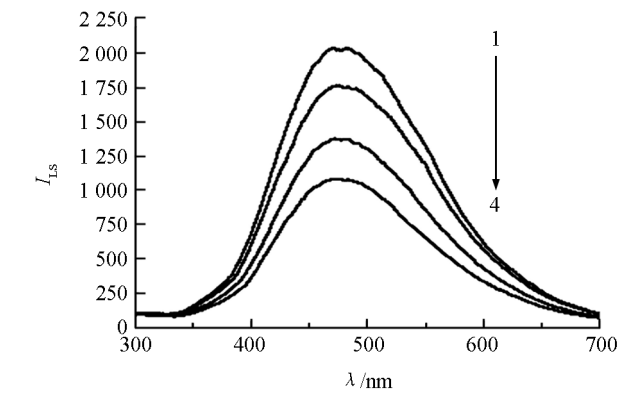
2.1 Ag@SiO₂NPs 光散射光谱图

如图 2 所示, Ag@SiO₂NPs 表现出较强的 LS 信号(图 2 中线 1), 当向体系中加入一定浓度的腺苷时, 腺苷与分别修饰在 Ag@SiO₂NPs 和 MPs 上的 DNA 链相结合, 形成核酸适配体与腺苷的复合物. 通过磁场作用, Ag@SiO₂NPs 与 MPs 一同从溶液中分离, 上清液中的 LS 强度减弱(图 2 中线 2~4).

2.2 实验条件优化

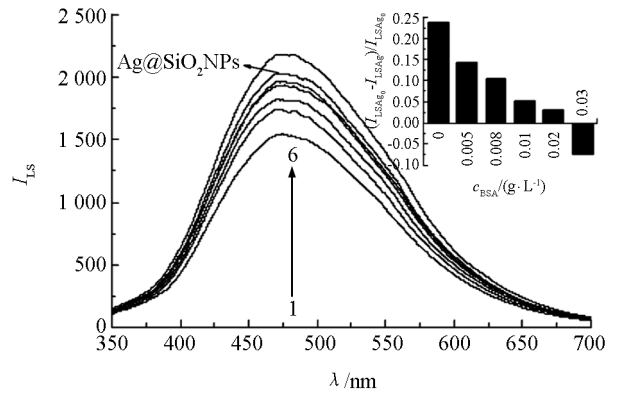
2.2.1 BSA 用量的优化

在检测过程中发现, Ag@SiO₂NPs 和 MPs 之间存在一定的非特异性吸附. 因此, 通过加入适量的 BSA 避免非特异性吸附, 稳定体系的 LS 信号. 如图 3 所示, 在无腺苷存在, 也不加入 BSA 的条件下, 单独 Ag@SiO₂NPs 的 LS 强度明显高于磁分离后上清液中 Ag@SiO₂NPs 的强度. 但随着 BSA 的加入, 磁分离后上清液中 Ag@SiO₂NPs 的 LS 强度逐渐与单独 Ag@SiO₂NPs 的接近. 而当 BSA 质量浓度达到 0.03 g/L 时, 强度超过单独 Ag@SiO₂NPs, 说明此时 BSA 过量. 同时, 用 Ag@SiO₂NPs 的散射强度(I_{LSAg^0})减去加入不同量 BSA 后体系散射强度(I_{LSAg})的差值与 Ag@SiO₂NPs 的散射(I_{LSAg^0})相比的比值关系, 即: $(I_{LSAg^0} - I_{LSAg})/I_{LSAg^0}$, 也衡量了 BSA 对体系稳定性的影响(图 3 中的嵌入图). 实验最终选择加入 BSA 的质量浓度为 0.02 g/L.



曲线 1~4(腺苷, 10^{-4} mol/L): 0, 0.1, 1, 3; Ag@SiO₂NPs: 6.83×10^{-12} mol/L; MPs: 0.5 g/L; BSA: 0.02 g/L; NaCl: 0.3 mol/L; pH=7.4; 时间, 40 min.

图 2 磁性分离后上清液的光散射光谱图



曲线 1~6(BSA g/L): 0, 0.005, 0.008, 0.01, 0.02, 0.03; Ag@SiO₂NPs: 6.83×10^{-12} mol/L; MPs: 0.5 g/L; NaCl: 0.3 mol/L; pH=7.4; 时间, 40 min.

图 3 BSA 的浓度对 Ag@SiO₂NPs 的影响

2.2.2 NaCl 浓度的优化

对 NaCl 浓度考察时发现, 当溶液中有腺苷存在时, 随着 NaCl 浓度的增大, 体系的 LS 强度随之降低, 说明 Ag@SiO₂NPs 随 MPs 分离的量逐渐增多, 并在 NaCl 的终浓度达到 0.3 mol/L 时, LS 强度降低达到最大值. 因此, 实验选择 NaCl 浓度为 0.3 mol/L.

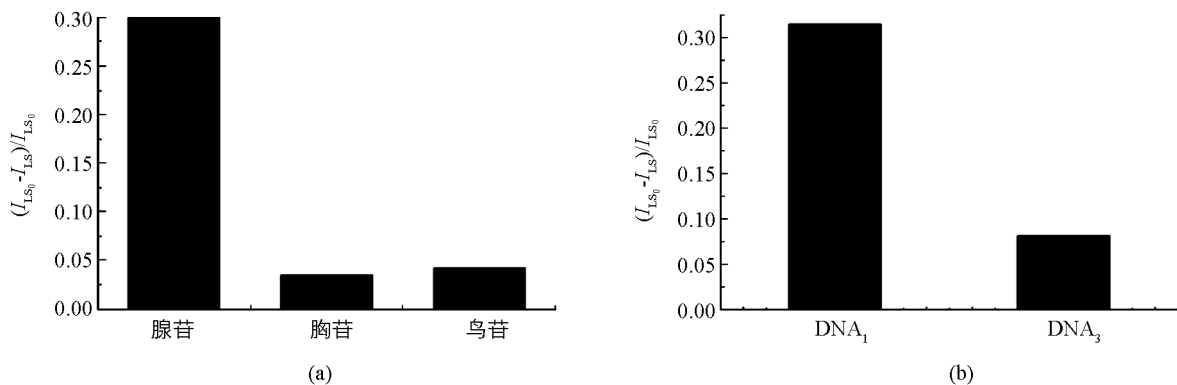
2.2.3 反应时间的优化

在考察时间对反应体系的影响时发现, 当反应时间达到 40 min 时, 体系的散射强度趋于稳定. 因此, 实验选择 40 min 作为体系的反应时间.

2.3 选择性实验

在优化条件下, 考察了体系选择性. 从图 4 可以发现, 用不同核苷(图 4(a))进行实验, 体系并不会产

生有意义的 LS 信号降低. 同样, 如果选用非腺苷的核酸适配体的 DNA₃(图 4(b))时, 即便体系中有腺苷存在, LS 信号响应值依然很低. 实验证实此分析方法对检测腺苷具有较好的选择性.



Adenosine, Thymidine, Guanosine: 1.0×10^{-4} mol/L; DNA₁, DNA₃: 1.0×10^{-6} mol/L; Adenosine: 1.0×10^{-4} mol/L; Ag@SiO₂NPs: 6.83×10^{-12} mol/L; MPs: 0.5 g/L; BSA: 0.02 g/L; NaCl: 0.3 mol/L; pH=7.4; 时间, 40 min.

图 4 不同核苷(A)和不同 DNA(B)对体系的响应结果

3 分析参数

在优化条件下, Ag@SiO₂NPs 在 475 nm 左右的散射强度的降低值(ΔI_{LS})与腺苷的浓度(c)在 $5.0 \times 10^{-4} \sim 8.0 \times 10^{-6}$ mol/L 之间有良好的线性关系: $\Delta I_{LS} = 666.50 + 505.18 \log c$, 线性相关系数 $r = 0.9818$.

4 结 论

本研究制备出以 AgNPs 为核、SiO₂ 为壳的复合纳米颗粒. 这种纳米颗粒不仅克服了 AgNPs 易聚集, 不易修饰的缺点, 还保持了 AgNPs 所固有的强散射信号. 运用制备的 Ag@SiO₂NPs 作为散射信号探针, 结合 MPs 易于分离的优势, 设计了基于磁性分离检测腺苷的新方法. 对比 AgNPs, Ag@SiO₂NPs 作为散射探针具有更好的稳定性和易于表面功能化的优点, 有望在分析检测、细胞成像等领域得到更广泛的应用.

参考文献:

- [1] LIU Yue, HUANG Cheng-zhi. Screening Sensitive Nanosensors Via the Investigation of Shape-Dependent Localized Surface Plasmon Resonance of Single Ag Nanoparticles [J]. Nanoscale, 2013, 5(16): 7458—7466.
- [2] HUANG Jing-tao, YANG Xiao-xi, ZENG Qiao-ling, et al. A Simple Green Route to Prepare Stable Silver Nanoparticles with Pear Juice and a New Selective Colorimetric Method for Detection of Cysteine [J]. Analyst, 2013, 138(18): 5296—5302.
- [3] HU Ping-ping, ZHENG Lin-ling, ZHAN Lei, et al. Metal-Enhanced Fluorescence of Nano-Core-Shell Structure Used for Sensitive Detection of Prion Protein with a Dual-Aptamer Strategy [J]. Anal Chim Acta, 2013, 787: 239—245.
- [4] OTARI S V, YADAV H M, THORAT N D, et al. Facile One Pot Synthesis of Core Shell Ag@SiO₂ Nanoparticles for Catalytic and Antimicrobial Activity [J]. Materials Letters, 2016, 167: 179—182.
- [5] LI Fan, ZHANG Juan, CAO Xu-ni, et al. Adenosine Detection by Using Gold Nanoparticles and Designed Aptamer Sequences [J]. Analyst, 2009, 134(7): 1355—1360.

- [6] LIU Shu-hua, HAN Ming-yong. Silica-Coated Metal Nanoparticles [J]. Chem Asian J, 2010, 5(1): 36–45.
- [7] HU Po, HUANG Cheng-zhi, LI Yuan-fang, et al. Magnetic Particle-Based Sandwich Sensor with DNA-Modified Carbon Nanotubes as Recognition Elements for Detection of DNA Hybridization [J]. Anal Chem, 2008, 80(5): 1819–1823.
- [8] LI Chun-mei, ZHAN Lei, ZHENG Lin-ling, et al. A Magnetic Nanoparticle-Based Aptasensor for Selective and Sensitive Determination of Lysozyme with Strongly Scattering Silver Nanoparticles [J]. Analyst, 2016, 141(10): 3020–3026.

Preparation of Ag@SiO₂ Nanoparticles and Detection of Adenosine by Light Scattering

LI Jing-yun¹, HAN Guo-bin¹, LIU Jian-ping², LI Yuan-fang¹

1. Education Ministry Key Laboratory on Luminescence and Real-Time Analysis/ School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. Chongqing Forty-Eighth Middle School, Chongqing 400700, China

Abstract: Silver nanoparticles (AgNPs) have the property of strong localized surface plasmon resonance scattering, but their stability and functionality are inferior. To solve these problems, silica-coated silver (Ag@SiO₂) nanoparticles were prepared by packing a SiO₂ layer on AgNPs. Then a new method was designed for adenosine detection by using Ag@SiO₂ NPs with separation of magnetic particles (MPs). It was found that a linear relationship ($\Delta I_{\text{LS}} = 666.50 + 505.18 \log c$) was obtained between the value of ΔI_{LS} and the concentration of adenosine in the range of $5.0 \times 10^{-4} - 8.0 \times 10^{-6}$ mol/L with a correlation coefficient (r) of 0.981 8. Moreover, no obvious effects were detected of other nucleosides on the analysis of adenosine.

Key words: Ag@SiO₂ nanoparticle; magnetite particle; light scattering; adenosine; aptamer

责任编辑 潘春燕

