



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102887479 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 16

(21) 申请号 201210254407. 8

(22) 申请日 2012. 07. 20

(30) 优先权数据

61/510, 056 2011. 07. 20 US

(73) 专利权人 香港理工大学

地址 中国香港九龙红磡

(72) 发明人 李铭鸿 黄冠锋 叶社平

(74) 专利代理机构 深圳市顺天达专利商标代理

有限公司 44217

代理人 郭伟刚

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

审查员 赵洪涛

权利要求书2页 说明书11页

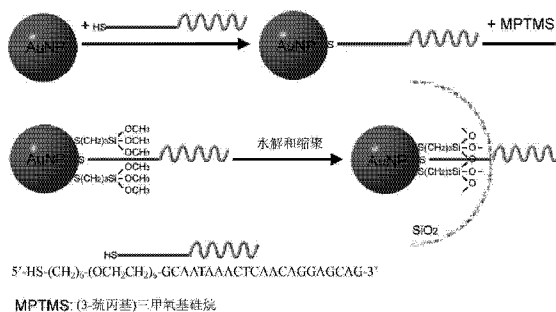
序列表3页 附图12页

(54) 发明名称

高分子-纳米颗粒共轭物及使其稳定的方法、分析系统及治疗剂载体

(57) 摘要

一种使高分子与纳米颗粒间的共轭物稳定的方法, 通过在高分子链已经吸附到纳米颗粒表面后在纳米颗粒表面形成薄的加强层来实现。稳定的共轭物可在大范围的应用中使用, 例如体外诊断、体内成像和治疗, 这些应用需要在各种苛刻条件或严酷条件下进行。



1. 一种使高分子与纳米颗粒间的共轭物稳定的方法,其特征在于,包括以下步骤:
  - (a) 将多个高分子吸附到纳米颗粒的表面;以及
  - (b) 当所述高分子已经吸附到所述纳米颗粒的所述表面上之后,在所述纳米颗粒的所述表面包覆至少一个加强层。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述加强层是使用MPTMS形成的二氧化硅。
3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法还包括步骤(c):在所述步骤(a)之前使所述高分子功能化,以便能够使所述高分子吸附到所述纳米颗粒的所述表面上。
4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述步骤(c)是对AuNP和AgNP的硫醇修饰。
5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述高分子选择自由寡核苷酸、适配子、siRNA、多肽、蛋白质和PEG组成的组。
6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述纳米颗粒是金属材料、金属氧化物材料或半导体材料。
7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述金属材料的纳米颗粒是金纳米颗粒。
8. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述金属材料的纳米颗粒是银纳米颗粒。
9. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述高分子是寡核苷酸。
10. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述加强层是由低聚物形成的交联聚合物。
11. 一种高分子-纳米颗粒共轭物,其特征在于,包括:
  - (a) 具有外表面的纳米颗粒;
  - (b) 覆盖所述纳米颗粒的所述外表面的加强层,以及
  - (c) 多个高分子,所述多个高分子是与所述纳米颗粒的所述表面直接吸附的链的形式,以便所述高分子的链的一部分在所述加强层内。
12. 根据权利要求11所述的共轭物,其特征在于,所述高分子是生物分子或聚合物,所述纳米颗粒是金属、金属氧化物或半导体。
13. 根据权利要求12所述的共轭物,其特征在于,所述生物分子是寡核苷酸。
14. 根据权利要求12所述的共轭物,其特征在于,所述金属是金或银。
15. 根据权利要求11所述的共轭物,其特征在于,所述加强层是采用MPTMS形成的二氧化硅。
16. 根据权利要求11所述的共轭物,其特征在于,所述加强层是由低聚物形成的交联聚合物。
17. 一种分析系统,其特征在于,包括酶和权利要求11的共轭物,所述共轭物用于显示所述酶催化的反应的进展。
18. 根据权利要求17所述的分析系统,其特征在于,所述系统还包括DNA引物,其中所述酶是Taq DNA聚合酶,所述共轭物是寡核苷酸-AuNP,以及所述DNA引物具有与所述寡核苷酸-AuNP共轭物互补的序列。
19. 根据权利要求17所述的分析系统,其特征在于,所述系统还包括DNA引物,其中所述酶是Taq DNA聚合酶,所述共轭物是寡核苷酸-AgNP,以及所述DNA引物具有与所述寡核

昔酸-AgNP 共轭物互补的序列。

20. 一种治疗剂载体,其特征在于,包括治疗剂和权利要求 11 的共轭物,所述共轭物用于运载所述治疗剂。

21. 根据权利要求 20 所述的治疗剂载体,其特征在于,所述共轭物是寡核苷酸-AuNP,所述治疗剂与 AuNP、或所述寡核苷酸、或与所述寡核苷酸-AuNP 互补的序列连接或键合。

22. 根据权利要求 20 所述的治疗剂载体,其特征在于,所述共轭物是寡核苷酸-纳米颗粒,所述纳米颗粒是金属氧化物材料或半导体材料,所述治疗剂与所述寡核苷酸-纳米颗粒连接或键合。

## 高分子 - 纳米颗粒共轭物及使其稳定的方法、分析系统及 治疗剂载体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及纳米生物技术领域的高分子功能化纳米材料。特别地,本发明涉及寡核苷酸 - 金纳米颗粒共轭物和寡核苷酸 - 银纳米颗粒共轭物。

### 背景技术

[0002] 由于米尔金 (Mirkin) 及其同事开发出的寡核苷酸 - 纳米颗粒共轭物的示例,这种共轭物已引起了相当大的兴趣;其中米尔金及其同事在 1990 年代使用寡核苷酸 - 金纳米颗粒 (AuNP) 共轭物展示了 DNA 比色检测技术。寡核苷酸提供靶序列特异性识别能力,AuNP 对与靶标的杂交作出反应、给予溶液颜色变化。由于其典型的表面等离子体共振 (SPR) 吸收带 (吸收峰约为 520nm),分散的寡核苷酸 - AuNP 共轭物呈红色。一旦与靶标杂交,两组共轭物的交联导致颗粒团聚 (particle aggregation),颗粒间距离的下降引起 SPR 吸收带的红移,因此溶液颜色变为紫色。替代性地,前田 (Maeda) 及其同事设计了非交联方法:当单组共轭物在适当的盐浓度 (即 0.5-2.5M 氯化钠 (NaCl)) 下与完全互补的靶标杂交后,其发生团聚。使用特别设计的序列 (例如, DNA 酶和适配子),寡核苷酸 - AuNP 共轭物用于检测许多非核酸分析物,包含金属离子、小分子、蛋白质和细胞。作为另一示例,寡核苷酸 - 银纳米颗粒 (AgNP) 共轭物也用于高灵敏度的比色检测,这是由于其消光系数比 AuNP 更大。除了诊断以外,已证实这些寡核苷酸 - 纳米颗粒共轭物、尤其 AuNP 对治疗 (例如基因和化学药物的传递) 以及 DNA- 模板化纳米结构的建立非常有用。

[0003] 制备寡核苷酸 - AuNP 共轭物和寡核苷酸 - AgNP 共轭物最常见的方法是将单硫醇修饰的寡核苷酸化学吸附到纳米颗粒的表面。但已知的是,化学吸附的寡核苷酸对热解吸和含硫醇的小分子的置换反应较敏感;所述含硫醇的小分子例如酶促反应缓冲液中经常使用的成分——二硫苏糖醇 (DTT) 和巯基乙醇。如果没有解决的话,这一稳定性问题将严重限制其应用。例如,当很大一部分的寡核苷酸从 AuNP 表面解吸时,将发生颗粒团聚,并因此使得溶液颜色甚至在缺少任何靶标的情况下变为紫色。在 0.1M DTT 中,这在几分钟内发生。为了解决这一问题,米尔金及其同事制备了具有类固醇环状二硫化物 (steroid cyclic disulfide) 和硫醇三己酯锚定物 (trihexylthiol anchor) 的共轭物,其对 DTT 体现出极为增强的稳定性 (分别在 2 小时和 8 小时内无团聚)。但是,由于这些寡核苷酸的合成需要非标准的、具有较低偶联收率 (coupling yield) 的亚磷酰胺,这些寡核苷酸昂贵许多。鉴于此,格拉汉姆 (Graham) 及其同事报导了合成硫辛酸修饰的寡核苷酸:通过标准 3'-氨基 - 修饰 C7 可控孔度玻璃固体载体和具有硫辛酸的 N- 羟基琥珀酰亚胺酯的合成;而刘 (Liu) 及其同事报导了通过氨基修饰的寡核苷酸与二硫化碳之间的反应合成二硫代氨基甲酸盐修饰的寡核苷酸。这两种键合有二硫化物 (disulfide-linked) 的共轭物在 DTT 中具有与键合有类固醇环状二硫化物的共轭物相似的稳定性。与硫醇 - 金 (S-Au) 键相似的是,硫醇修饰的寡核苷酸可通过硫醇 - 银 (S-Ag) 键与 AgNP 结合、但具有较低的结合亲和力。三环二硫化物和硫辛酸成功地用于增强寡核苷酸 - AgNP 共轭物的稳定性。

[0004] 就热解吸而言, S-Au 键和 S-Ag 键是热不稳定的。对单硫醇键合的寡核苷酸 -AuNP 共轭物而言, 寡核苷酸解吸容易在高于 70°C 的温度发生。这抑制了它们在高温处理中的应用。一个示例即为聚合酶链反应 (PCR), 其是使特定 DNA 序列扩增使用最广泛的方法, 并在许多应用中起到重要作用, 所述许多应用包含临床诊断、环境监督、食品监管、法医分析、生物战剂检测以及生物学研究。它涉及三个温度下的重复循环, 即用于模板 / 扩增子变性的 94°C、用于引物退火的约 55°C 以及用于引物延伸的 72°C。特定序列的数量在每个热循环中加倍, 因此单拷贝的模板以百万计 (20 个循环) 至十亿计 (30 个循环) 拷贝的扩增子结束。已报导了采用寡核苷酸 -AuNP 共轭物对 PCR 产物进行高灵敏度的比色检测。但是, 由于共轭物无法耐受热循环过程, 在扩增后期开管添加共轭物是无法避免的, 这造成较高风险的携带污染。与 PCR 期间寡核苷酸解吸相关联的是, Taq DNA 聚合酶非特性吸附到暴露的 AuNP 表面, 并因此抑制了扩增反应。

[0005] 鉴于前述稳定性问题、以及本领域中可用溶液的复杂性和高成本, 明显需要一种易于实现且低成本的、使寡核苷酸 -AuNP 共轭物和寡核苷酸 -AgNP 共轭物稳定的新方法。

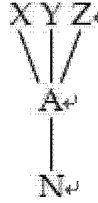
### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种易于使用、有效且成本低的使寡核苷酸与 AuNP 或 AgNP 间的共轭物稳定的方法。作为本发明的另一目标, 提供了高度稳定的寡核苷酸 -AuNP 共轭物和寡核苷酸 -AgNP 共轭物, 其能够在各种苛刻条件下使用 (例如苛刻的化学条件和高温), 并对特定应用而言是必需的。

[0007] 根据本发明的一个方面, 提供使高分子与纳米颗粒间的共轭物稳定的方法, 包括以下步骤: (a) 将多个高分子化学吸附 / 吸附到纳米颗粒的表面; 以及 (b) 当高分子已经化学吸附 / 吸附到纳米颗粒的表面上之后, 在颗粒表面包覆 (coating) 薄的加强层 (reinforcement layer) / 包封层 (entrapment layer) (单层或数层)。对寡核苷酸 -AuNP 共轭物和寡核苷酸 -AgNP 共轭物而言, 加强层优选为使用 (3- 巯丙基) 三甲氧基硅烷 (之后表示为 “MPTMS”) 形成的二氧化硅层。如果必要的话, 可使高分子功能化, 以便其能够充分化学吸附 / 吸附到纳米颗粒表面; 例如, 对寡核苷酸进行硫醇修饰。在结合此方法所公开的本发明中, 寡核苷酸作为高分子而金 (Au) 和银 (Ag) 作为纳米颗粒材料表现为用于阐述本发明原理的示例, 本领域普通技术人员在实践本发明时可发现其他高分子和纳米颗粒材料。例如, 可使用其他生物聚合物 (例如, 适配子、小干扰 RNA (siRNA) 和多肽 / 蛋白质) 和合成聚合物 (例如, 聚乙二醇 (PEG)), 连同一起可使用其他金属、金属氧化物 (例如氧化铁) 和半导体的 (例如 CdSe/ZnS 核 / 壳) 纳米颗粒。只要使用的高分子可化学吸附 / 吸附 / 键合 / 依附到使用的纳米颗粒上, 并且该依附需要是稳定的, 那么本发明的方法是可适用的。示例性的键包含硫醇 -Au、氨基 -Au、硫醇 -Ag、二元醇 - 氧化铁、氨基 - 氧化铁、羧基 - 氧化铁和硫醇 -CdSe/ZnS。应该注意的是, 本发明适用于不同形状 / 形式的纳米材料, 例如纳米颗粒、核 / 壳、纳米壳和纳米棒。本发明的中心在于, 加强层 / 包封层以与纳米颗粒表面的高结合亲和力为特征, 并且其形成了高分子 - 纳米颗粒共轭物表面的交联网络。以使用 MPTMS 形成的二氧化硅层为例, MPTMS 分子的巯基基团化学吸附到 AuNP/AgNP 空缺的表面位点 (即没有由高分子占据的位置), 随后三甲氧基硅烷基团水解和缩聚, 形成单个或数个二氧化硅单层。这一薄的交联二氧化硅网络包封并加强了化学吸附的寡核苷酸的 S-Au/

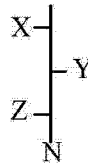
Ag 键,从而增强共轭物的化学稳定性和热稳定性。本发明中采用 MPTMS 形成的二氧化硅层的厚度小于  $-(\text{CH}_2)_6-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_6-$  间隔段的长度,优选小于 5nm。事实上,本领域普通技术人员可设想出其他加强型化学品。此处给定两种通用类型的加强前体分子来阐释该概念。第一个与 MPTMS 前体相似,具有以下结构:

[0008]



[0009] 其中 A 是诸如硅和碳的中心原子。应该理解的是,中心原子的效价不需要限制为 4。N 是具有与感兴趣的纳米材料的高亲和力的化学基团。应该注意的是,可以有多于一个的 N 基团与中心原子键合。X、Y 和 Z 基团(至少两个)可形成交联,从而包封高分子-纳米颗粒共轭物的各键合。可采用诸如化学手段、光手段和热手段的不同交联机制。第二类型的加强分子是具有以下结构的低聚物:

[0010]



[0011] 一个示例是低聚糖(丙烯酸琥珀酰亚胺)(oligo(acryloxysuccinimide)),其中 X、Y 和 Z 是琥珀酰亚胺基团,随后其与具有至少两个氨基基团的分子(例如,己二胺)化学交联。交联反应可通过双组分方法、或通过低聚物分子间的直接相互作用来实现;其中双组分方法即指首先使具有与纳米材料高亲和力的分子固定化,随后添加可与第一分子交联的另一分子,从而形成薄的加强层。

[0012] 根据本发明的另一方面,提供在苛刻条件下高度稳定的高分子-纳米颗粒共轭物。该高分子-纳米颗粒共轭物包含纳米颗粒、覆盖纳米颗粒外表面的加强层以及多个直接附在纳米颗粒表面的高分子;高分子直接附在纳米颗粒表面是因为加强层是在高分子已经附在颗粒表面后才形成的,这样所述高分子链的一部分在加强层内,其随后可对纳米颗粒表面施加锚定高分子的作用。优选地,高分子是寡核苷酸,可使寡核苷酸预功能化从而更好地附在纳米颗粒表面。纳米颗粒由金或银形成。

[0013] 稳定的共轭物可用于体外诊断平台,例如闭管比色 PCR 和其他等温扩增反应(尤其是在反应缓冲液中具有含硫醇的稳定剂的那些反应)。它们也可用于体内成像和药物传递系统。目前存在许多基于高分子-纳米颗粒共轭物的纳米造影剂和载药纳米载体。高分子可提供识别能力(例如寡核苷酸、适配子、多肽和抗体)和治疗功能(例如 siRNA)、延长血液循环(例如 PEG)、且充当造影剂和/或药物分子的载体。纳米颗粒可能具有固有的影像对比功能(例如 AuNP 用于 X-射线成像、氧化铁纳米颗粒用于磁共振成像、以及 CdSe/ZnS 用于荧光成像)和治疗功能(例如,用于光过热的金纳米壳和金纳米棒),且充当造影剂和/或药物分子的载体。

[0014] 在本公开所附的并成为本公开的一部分的权利要求中特别指出了描述本发明特

性的、具备新颖性的各个特征。为更好的理解本发明、其运行优势以及使用其实现的特定目标,应该参考其中阐述和描述了本发明优选实施例的附图和以下描述。

#### 附图说明

[0015] 图 1 是寡核苷酸 -AuNP 共轭物和二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物在 10mM DTT 中的稳定性测试结果。(A) 为寡核苷酸 -AuNP 共轭物的 UV- 可见光谱、(B) 为二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物的 UV- 可见光谱。(A) 中的箭头表明 600nm 处的吸收随时间增加。(C) :以 (A) 和 (B) 中 600nm 处的吸收相对时间作点状图。

[0016] 图 2 是在 10mM DTT 中从寡核苷酸 -AuNP 共轭物和二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物解吸的寡核苷酸的量作为培养时间 (incubation time) 的函数的点状图。

[0017] 图 3 是寡核苷酸 -AuNP 共轭物和二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物在 2mM 氰化钠 (NaCN) 中的稳定性测试的示意图。(A) 为寡核苷酸 -AuNP 共轭物的 UV- 可见光谱、(B) 为二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物的 UV- 可见光谱。箭头表明 522nm 处的吸收随时间减小。(C) :以 (A) 和 (B) 中 522nm 处的吸收相对时间作点状图。

[0018] 图 4 是以二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物作为本发明的特定实施例的制备程序的示意图。

[0019] 图 5 的 (A) 是二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物的杂交诱导的团聚试验的示意图 ;以及 (B) 是二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物的 UV- 可见光谱图 :其中 (1) 是 (杂交前) 在 DTT 中培养 3h ;(2) 是杂交后与互补靶标一起保持 10min ;以及 (3) 变性 / 去杂交后在 94°C 下保持 1min。

[0020] 图 6 是寡核苷酸 -AgNP 共轭物和二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AgNP 共轭物在 10mM DTT 中的稳定性测试结果。(A) 为寡核苷酸 -AgNP 共轭物的 UV- 可见光谱、(B) 为二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AgNP 共轭物的 UV- 可见光谱。箭头表明 SPR 峰 (即,对寡核苷酸 -AgNP 共轭物和二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AgNP 共轭物而言其分别为 410nm 和 414nm) 处的吸收随时间减小。(C) :以 (A) 和 (B) 中在 SPR 峰处的吸收相对时间作点状图。

[0021] 图 7 是寡核苷酸 -AgNP 共轭物和二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AgNP 共轭物在 2mM NaCN 中的稳定性测试结果。(A) 为寡核苷酸 -AgNP 共轭物的 UV- 可见光谱、(B) 为二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AgNP 共轭物的 UV- 可见光谱。箭头表明 SPR 峰处的吸收随时间减小。(C) :以 (A) 和 (B) 中在 SPR 峰处的吸收相对时间作点状图。

[0022] 图 8 是二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AgNP 共轭物的 UV- 可见光谱图,其中 : (1) 在杂交前 ;(2) 杂交后在存在 10  $\mu$  M DTT 的情况下与互补靶标一起保持 10min ;以及 (3) 在变性 / 去杂交后在 94°C 保持 1min。

[0023] 图 9 的 (A) 是 94°C 下、1 $\times$ PCR 缓冲液中从寡核苷酸 -AuNP 共轭物和二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物解吸的寡核苷酸的量相对培养时间所作的点状图 ;以及 (B) 是在具有 5  $\mu$  M DTT 的 1 $\times$ PCR 缓冲液中从寡核苷酸 -AuNP 共轭物和二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物解吸的寡核苷酸的量相对 PCR 循环数量所作的点状图。

[0024] 图 10 的 (A) 是不同 AuNP 对 PCR 扩增的作用结果的凝胶电泳图。所使用的模板为  $\phi$  X174 (各反应中有 10<sup>7</sup> 个拷贝), PCR 产物的长为 151 个碱基对 (bp)。栏 M :标记物 ;奇数栏是没有模板的阴性样品,而偶数栏是具有模板的阳性样品 ;栏 1 和 2 :没有 AuNP 的对照 ;

栏 3 和 4 :无覆盖的 AuNP ;栏 5 和 6 :二氧化硅修饰的 AuNP ;栏 7 和 8 :寡核苷酸 -AuNP 共轭物 ;栏 9 和 10 :二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物。混合物中  $MgCl_2$  和 AuNP 的浓度分别为 6mM (除了对照中为 1.5mM 以外) 和 2.5nM。(B) 是 (A) 中样品 9 和 10 在 PCR 后 40 分钟时的紫外 - 可见光谱图。

[0025] 图 11 是闭管 PCR 比色检测平台的示意图。

### 具体实施方式

[0026] 关于各附图,以下提供一些特定实施例的描述,从而描述本发明的细节并阐述本发明所潜在的原理,采用本发明的原理本领域普通技术人员能够想到在本发明范围内的其他变形。

[0027] 对这一特定实施例而言,采用以下材料和仪器。

[0028] 购买自西格玛 - 奥德里奇 (Sigma-Aldrich) (美国密苏里州圣路易斯) 的盐酸 (HCl)、硝酸 ( $HNO_3$ )、四氯金酸溶液 ( $HAuCl_4$ )、二水合柠檬酸三钠、DTT、七水合磷酸氢二钠 ( $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ )、一水合磷酸二氢钠、NaCl、2- 巯基乙醇、MPTMS、氯化钾 (KCl)、磷酸二氢钾 ( $KH_2PO_4$ )、NaCN、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、硼酸、乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA) 和溴化乙锭。购买自密理博 (Millipore) (美国马萨诸塞州比尔里卡) 的硝化纤维膜 ( $0.8 \mu m$ )。所有寡核苷酸均购买自综合基因技术公司 (Integrated DNA Technologies) (美国爱荷华州科勒尔维尔),且其均为 HPLC 纯。脱盐柱 (Illustra MicroSpin G-25) 购买自通用电气医疗集团 (美国新泽西州皮斯卡塔韦)。直径为 30nm 的 AgNP (派尔高生物纯 (PELCO BioPure) 包有柠檬酸盐的银溶胶) 购买自泰德佩拉 (Ted Pella) (美国加利福尼亚州瑞丁城)。PCR 中使用的所有溶液采用英杰公司 (Invitrogen) (美国加利福尼亚州卡尔斯巴德) 的无 DNase/RNase 的超纯蒸馏水制备。除非另有说明,所有 PCR 试剂和凝胶电泳试剂也购买自英杰公司。所有试剂按收到的原样使用。所有溶液采用来自 Milli-Q 锋锐型 A10 系统 (Milli-Q Advantage A10 System) (密理博) 的超纯水制备。

[0029] 使用 Ultrospec2100proUV/ 可见分光光度计 (通用电气医疗集团) 测量 UV- 可见光谱。采用艾本德微型离心机 5415D (德国艾本德) 进行离心。采用精巧型恒温混匀器 (Thermomixer compact) (艾本德) 进行振荡。使用应用生物系统 7500 实时 PCR 系统 (美国加利福尼亚州卡尔斯巴德应用生物系统公司) 进行实时荧光测量。使用 GeneAmp PCR 系统 9700 (应用生物系统公司) 进行加热或 PCR。使用 ChemiGenius<sup>2</sup> 凝胶成像系统 (美国马里兰州弗雷德里克凝胶成像分析系统公司) 进行凝胶图像可视化 / 记录。

### [0030] 15nm AuNP 的合成

[0031] AuNP 的合成基于细微调整后的纳丹 (Natan) 及其同事所描述的方案 (格拉巴, K. C.、弗里曼, R. G.、霍梅尔, M. B. 以及纳丹, M. J. (1995)。金溶胶单层的制备和表征, 分析化学, 67, 735-743 (Grabar, K. C., Freeman, R. G., Hommer, M. B. and Natan, M. J. (1995) Preparation and characterization of Au colloid monolayers. Anal. Chem., 67, 735-743))。AuNP 合成中使用的所有玻璃器皿和磁性搅拌棒采用王水 (浓 HCl 和  $HNO_3$  体积比为 3 : 1 的混合物; 由于王水有害且具有高腐蚀性, 其必须在通风橱中小心处理) 清洗、用水冲洗并在烘箱中干燥。伴随剧烈搅拌回流煮沸 30mL 0.01wt% 的  $HAuCl_4$  溶液。然后迅速添加 3mL 1wt% 的柠檬酸钠。溶液颜色在数分钟内从淡黄色变为深红色。持续加热和搅



拌 10min, 随后在搅拌下冷却至室温; 然后使该溶液滤过 0.8  $\mu\text{m}$  的硝化纤维膜。测量制备好的 AuNP 的 UV- 可见光谱。根据海瑟 (Haiss) 及其同事所报导的方法, 可由吸收数据确定 AuNP 的大小和浓度 (海瑟, W.、范青, N. T. K.、阿维亚德, J. 和弗尼, D. G. (2007)。由 UV- 可见光谱确定金纳米颗粒的大小和浓度, 分析化学, 79, 4215-4221 (Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J. and Fernig, D. G. (2007) Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. Anal. Chem., 79, 4215-4221))。通过计算 SPR 峰处的吸收 ( $A_{\text{SPR, AuNP}}$ ) 与 450nm 处吸收 ( $A_{450, \text{AuNP}}$ ) 的比率, 确定该工作中使用的 AuNP 的大小约为 15nm。AuNP 溶液的浓度 ( $c_{\text{AuNP}}$ , 以 M 计) 由以下计算式确定:

$$[0032] \quad c_{\text{AuNP}} = A_{450, \text{AuNP}} / \epsilon_{450, \text{AuNP}}$$

[0033] 其中,  $\epsilon_{450, \text{AuNP}}$  是 15nm AuNP 在 450nm 处的摩尔消光系数 (即  $2.18 \times 10^8 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )。

[0034] 制备寡核苷酸-AuNP 共轭物和寡核苷酸-AgNP 共轭物

[0035] 寡核苷酸-AuNP 共轭物的制备基于细微调整后的米尔金及其同事所描述的方案 (斯多霍夫, J. J.、埃勒加尼安, R.、缪斯克, R. C.、米尔金, C. A. 和灵斯格, R. L. (1998)。使用金纳米颗粒探针一锅法合成比色分化的、具有单碱基缺失的多核苷酸, 美国化学会志, 120, 1959-1964 (Storhoff, J. J., Elghanian, R., Mucic, R. C., Mirkin, C. A. and Letsinger, R. L. (1998) One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. J. Am. Chem. Soc., 120, 1959-1964))。该方法在本领域中是已知的。未修饰的寡核苷酸如序列表中序列 1 所示。特别地, 在 0.2M 的磷酸二氢钠缓冲液 (pH8.2) 中采用 0.1M DTT 处理硫醇修饰的寡核苷酸 5' -HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-GCAATAAACTCAACAGGAGCAG-3' 30min。根据制造商的说明使这一活化的寡核苷酸溶液 (即具有断开的二硫键) 通过脱盐柱得到纯化。在那之后立即使纯化的寡核苷酸与 AuNP 混合, 两者的最终浓度分别为 1.75  $\mu\text{M}$  和 3.5nM。培养 16h 后采用 0.3M NaCl/10mM 磷酸二氢钠 (pH7.4) 使它们老化 24h。接下来将该溶液在 13,200rpm 的速度下离心 30min, 从而去除过量的寡核苷酸。弃上清液, 并使红色的油状沉淀 (即寡核苷酸-AuNP 共轭物) 重分散于 10mM 磷酸二氢钠缓冲液中 (pH7.4)。再次离心溶液并重新分散于水中。测量制备好的寡核苷酸-AuNP 共轭物的 UV- 可见光谱, 并采用以下计算式确定颗粒浓度:

$$[0036] \quad c_{\text{AuNP-共轭}} = c_{\text{AuNP}} \times (A_{\text{SPR, AuNP-共轭}} / A_{\text{SPR, AuNP}})$$

[0037] 使用 3'-6-FAM- 标记的序列 (5' -HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-GCAATAAACTCAACAGGAGCAG-6-FAM-3') , 以确定固定化的寡核苷酸密度。在 NaCl (0.3M) 和磷酸二氢钠 (10mM, pH7.4) 中, 在 1,400rpm 的振荡下采用 2-巯基乙醇 (12mM) 处理寡核苷酸-AuNP 共轭物 (2.5nM) 24h, 从而从 AuNP 表面释放化学吸附的寡核苷酸, 随后对收集的上清液进行离心 (13,200rpm 的速度下进行 30min) 和荧光测量。参考标准曲线确定化学吸附的寡核苷酸的量, 且相应计算固定化的寡核苷酸的密度 (即位于每个 AuNP 的寡核苷酸的量,  $n_{\text{总 AuNP-共轭物}}$ )。

[0038] 寡核苷酸-AgNP 共轭物的制备基于细微调整后的格雷汉姆及其同事所描述的方案 (汤普森, D. G.、恩莱特, A.、福尔兹, K.、史密斯, E. 和格雷汉姆, D. (2008)。使用寡核苷酸-银纳米颗粒共轭物的超灵敏 DNA 检测, 分析化学, 80, 2805-2810 (Thompson, D. G., Enright, A., Faulds, K., Smith, E. and Graham, D. (2008) Ultrasensitive DNA detection using oligonucleotide-silver nanoparticle conjugates. Anal. Chem., 80,

2805-2810))。活化且纯化的寡核苷酸与 AgNP 混合,两者的最终浓度分别为 12.5  $\mu$ M 和 6.25nM。培养 16h 后,以 1h 的间隔、通过添加 0.33M NaCl/11.11mM 磷酸二氢钠 (pH7.4) 使它们相继达到 2、4、8、16、32、64、100、150 和 300mM 的 NaCl。最终的混合物培养 24h。接下来使该溶液如上述般离心和重分散。应该注意的是,寡核苷酸-AgNP 共轭物的颜色为黄色。测量制备好的寡核苷酸-AgNP 共轭物的 UV-可见光谱,并由以下计算式确定颗粒浓度:

$$[0039] \quad c_{\text{AgNP-共轭物}} = c_{\text{AgNP}} \times (A_{\text{SPR, AgNP-共轭物}} / A_{\text{SPR, AgNP}})$$

[0040] 其中,来自制造商的  $c_{\text{AgNP}}$  和相应的  $A_{\text{SPR, AgNP}}$  是可以使用的。

[0041] 制备二氧化硅修饰的寡核苷酸-AuNP 共轭物和二氧化硅修饰的寡核苷酸-AgNP 共轭物

[0042] 使寡核苷酸-AuNP 共轭物与 MPTMS 混合,两者的最终浓度分别为 1nM 和 0.1mM;使寡核苷酸-AgNP 与 MPTMS 混合,两者的最终浓度分别为 0.25nM 和 0.1mM。在 1,400rpm 振荡该混合物 24h,然后提供 10mM 的磷酸二氢钠 (pH7.4)。在那之后,使它们再次如上述般离心和重分散。测量制备好的二氧化硅修饰的寡核苷酸-AuNP 共轭物和二氧化硅修饰的寡核苷酸-AgNP 共轭物的 UV-可见光谱,并由以下计算式确定它们的颗粒浓度:

$$[0043] \quad C_{\text{硅-AuNP-共轭物}} = c_{\text{AuNP}} \times (A_{\text{SPR, 硅-AuNP-共轭物}} / A_{\text{SPR, AuNP}})$$

$$[0044] \quad C_{\text{硅-AgNP-共轭物}} = c_{\text{AgNP}} \times (A_{\text{SPR, 硅-AgNP-共轭物}} / A_{\text{SPR, AgNP}})$$

[0045] 使用荧光标记的寡核苷酸-AuNP 共轭物,从而确定二氧化硅修饰的寡核苷酸-AuNP 共轭物的寡核苷酸密度。收集 MPTMS 处理的共轭物的上清液,进行荧光测量以确定在二氧化硅包覆步骤后所置换的寡核苷酸的量。通过从固定化数量减去置换数量得到二氧化硅修饰的寡核苷酸-AuNP 共轭物的寡核苷酸密度 ( $n_{\text{总, 二氧化硅-AuNP-共轭物}}$ )。

[0046] 化学稳定性试验

[0047] 在具有 10mM DTT 或 2mM NaCN 的磷酸盐缓冲液中 (PBS:137mM NaCl、2.7mM KCl、4.3mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  和 1.4mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH7.4) 进行寡核苷酸-AuNP 共轭物和二氧化硅修饰的寡核苷酸-AuNP 共轭物 (2.5nM)、以及寡核苷酸-AgNP 共轭物和二氧化硅修饰的寡核苷酸-AgNP 共轭物 (0.1nM) 的化学稳定性试验。在不同时间间隔记录 UV-可见光谱和溶液颜色。使用 3'-FAM-标记的寡核苷酸-AuNP 共轭物和二氧化硅修饰的 3'-FAM-标记的寡核苷酸-AuNP 共轭物在 DTT 中进行寡核苷酸解吸的荧光表征。收集上清液用于荧光测量,从而确定在 3h 处理结束时解吸的寡核苷酸的量 ( $n_{\text{解吸-2h}}$ )。由以下计算式确定不同培养时间从共轭物解吸下来的寡核苷酸的量 (以总的固定化数量  $n_{\text{总}}$  为依据,即寡核苷酸-AuNP 共轭物的  $n_{\text{总, AuNP-共轭物}}$ 、以及二氧化硅修饰的寡核苷酸-AuNP 共轭物的  $n_{\text{总, 二氧化硅-AuNP-共轭物}}$ ):

$$[0048] \quad \%_{\text{解吸, t}} = (F_t / F_{3h}) \times (n_{\text{解吸, 2h}} / n_{\text{总}}) \times 100\%$$

[0049] 其中  $\%_{\text{解吸, t}}$  是在时间 t 解吸的寡核苷酸的百分数,  $F_t$  和  $F_{3h}$  分别是在时间 t 和 3h 时的荧光读数。应该注意的是,  $n_{\text{总, AuNP-共轭物}}$  和  $n_{\text{总, 二氧化硅-AuNP-共轭物}}$  的值不同。

[0050] 杂交试验

[0051] 二氧化硅修饰的寡核苷酸-AuNP 共轭物 (3.125nM) 在具有 10mM DTT 的 PBS 中培养 3h。然后添加 0.5M NaCl 和 0.2  $\mu$ M 的互补靶标 (5'-CTGCTCCTGTTGAGTTTATTGC-3', 序列 2),使最终的共轭物浓度为 2.5nM。允许杂交进行 10min。最后,将该溶液在 94 $^{\circ}$ C 加热 1min。在杂交前后以及在热变性后记录 UV-可见光谱和比色结果。对二氧化硅修饰的寡核苷酸-AgNP 共轭物 (0.1nM) 而言,与 DTT (10  $\mu$ M)、PBS 和 0.5M NaCl 一起添加互补靶标

(0.5  $\mu$  M)。如上述般进行杂交和变性。

#### [0052] 热稳定性试验

[0053] 使用 3' -FAM- 标记的寡核苷酸 -AuNP 共轭物和二氧化硅修饰的 3' -FAM- 标记的寡核苷酸 -AuNP 共轭物在不同温度设定下进行热稳定性试验。恒温条件下 (即 94 $^{\circ}$ C、72 $^{\circ}$ C 或 55 $^{\circ}$ C), 样品包含未修饰的或二氧化硅修饰的共轭物 (2.5nM)、1 $\times$ PCR 缓冲液 (50mM KCl、20mM Tris-HCl, pH8.4) 和 MgCl<sub>2</sub> (6mM)。2h 内每 10 分钟获取荧光信号。在那之后, 离心样品 (13,200rpm 速度下进行 30min) 并收集上清液用于荧光测量, 从而确定在 2h 热处理结束时解吸的寡核苷酸的量 ( $n_{\text{解吸-2h}}$ )。由以下计算式确定在不同培养时间从共轭物解吸下来的寡核苷酸的量 (以总的固定化数量  $n_{\text{总}}$  为依据):

$$[0054] \quad \%_{\text{解吸}, t} = (F_t / F_{2h}) \times (n_{\text{解吸}, 2h} / n_{\text{总}}) \times 100\%$$

[0055] 其中  $\%_{\text{解吸}, t}$  是在时间  $t$  解吸的寡核苷酸的百分比,  $F_t$  和  $F_{2h}$  分别是在时间  $t$  和 2h 的荧光读数。对 PCR 热循环而言, 样品包含未修饰的或二氧化硅修饰的共轭物 (2.5nM)、1 $\times$ PCR 缓冲液、MgCl<sub>2</sub> (6mM) 和二硫苏糖醇 (5  $\mu$  M)。所使用的热循环曲线 (thermal cycling profile) 与下一 PCR 阶段中描述的相同。在每个循环的延伸步骤采集荧光信号。热循环之后以 13,200rpm 离心样品 30min, 并收集上清液用于荧光测量, 从而确定在 PCR 结束时解吸的寡核苷酸的量 ( $n_{\text{解吸-PCR 终点}}$ )。由以下计算式确定不同循环数量下从共轭物解吸下来的寡核苷酸的数量 (以总的固定化数量  $n_{\text{总}}$  为依据):

$$[0056] \quad \%_{\text{解吸-循环}} = (F_{\text{循环}} / F_{\text{PCR 终点}}) \times (n_{\text{解吸-PCR 终点}} / n_{\text{总}}) \times 100\%$$

[0057] 其中  $\%_{\text{解吸-循环}}$  是在特定周期解吸的寡核苷酸的百分比,  $F_{\text{循环}}$  和  $F_{\text{PCR 终点}}$  分别是在特定循环和 PCR 结束时的荧光读数。

#### [0058] PCR

[0059] PCR 混合物包含 1 $\times$ PCR 缓冲液、MgCl<sub>2</sub> (6mM)、dNTP (每份 0.2mM)、引物 1 (与互补靶标相同: 0.2  $\mu$  M 的 5' -CTGCTCCTGTTGAGTTTATTGC-3', 序列 3)、引物 2 (0.2  $\mu$  M 的 5' -GCGAACAATTCAGCGGCTTTA-3', 序列 4)、Taq DNA 聚合酶 (0.025 单位 /  $\mu$  L)、模板 ( $\phi$ X174、10<sup>7</sup> 拷贝) 或无模板对照、以及纳米颗粒 (2.5nM 的无覆盖型 AuNP、二氧化硅修饰的 AuNP、寡核苷酸 -AuNP 共轭物或二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物)。所用的热循环曲线指 94 $^{\circ}$ C 保持 1min (初始变性)、25 个 94 $^{\circ}$ C 保持 5s 的循环 (变性)、55 $^{\circ}$ C 保持 5s (退火)、72 $^{\circ}$ C 保持 30s (延伸) 以及 72 $^{\circ}$ C 保持 2min (最终延伸)。在从热循环仪取出样品前使其冷却至室温。PCR 之后 40min 记录比色结果和 UV- 可见光谱。

[0060] 通过凝胶电泳技术分析 PCR 产物。将该产物 (8  $\mu$  L) 与 Bluejuice 凝胶加样缓冲液 (2  $\mu$  L) 混合, 然后加到有琼脂糖凝胶 (3%) 的 0.5 $\times$ TBE 缓冲液 (45mM Tris、45mM 硼酸、1mM EDTA, pH8.0) 的孔中。使凝胶在 120V 下电泳 1.5h, 随后用 0.5  $\mu$  g/mL 的溴化乙锭染色 10min, 使结果可视化。

#### [0061] 试验结果

[0062] 本领域已知的是, DTT 容易置换化学吸附到 AuNP 表面的单硫醇修饰的寡核苷酸, 进而导致不可逆的颗粒团聚。如图 1A 所示, 这引起了 SPR 吸收带的红移和加宽, 使得 520nm 处的吸收略微减小且在较长波长 (600-650nm) 的吸收大量增加。溶液颜色在几分钟内从红色变为浅紫色。在一鲜明对比中, 如果采用 MPTMS 处理单硫醇修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物, 即使在 10mM 的 DTT 中培养 24h, 二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物的 UV- 可见光谱

(图 1B) 和溶液颜色保持不变。虽然不受任何作用理论 (theory of action) 的约束, 但应该相信的是, MPTMS 处理可能在寡核苷酸 -AuNP 共轭物表面形成了薄的二氧化硅包覆, 这种包覆将寡核苷酸以更大强度锚定到所述表面。600nm 处的吸收相对培养时间的点状图清楚揭示了二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物在 DTT 中极大增强的稳定性 (图 1C)。从这些结果可清楚看出, 本发明中二氧化硅加强的共轭物与采用双齿键 (bidentate linkage) 和三齿键 (tridentate linkage) 制备的共轭物相当, 后者在 10mM DTT 中分别稳定 1-3h 和 8h。

[0063] 采用荧光染料 (6-FAM) 标记寡核苷酸, 并在 DTT 培养期间进行荧光测量, 从而定量表征置换反应。本领域中已知的是, 如果寡核苷酸处于束缚态, 由于 AuNP 使得 6-FAM 的发射有效猝灭, 荧光信号将较低; 一旦寡核苷酸从 AuNP 表面解吸, 该信号增加。已经发现在 10mM 的 DTT 中培养 10min 后, 54% 的寡核苷酸从未修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物上解吸下来, 而 0% 的寡核苷酸从二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物上解吸下来 (图 2)。在培养 3h 后, 解吸数量分别增加到 97% 和 17%。该结果清楚表明采用 MPTMS 处理后, S-Au 键变得对 DTT 的配体交换反应更有抵抗力。

[0064] 采用 NaCN 实现 AuNP 核的氧化溶解, 从而进一步支持存在的二氧化硅层。采用 2mM NaCN 使得寡核苷酸 -AuNP 共轭物溶液在小于 1min 的时间内变为无色 (图 3A 中 SPR 吸收峰明显削弱), 而二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物溶液在培养 24h 后保持为红色 (图 3B 中 SPR 吸收峰下降 23%)。522nm 处的吸收相对培养时间的点状图表示: 二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物对抗 AuNP 氧化溶解的化学稳定性显著增强 (图 3C)。这些数据提供了二氧化硅包覆有效充当氰化物反应剂和 / 或  $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$  产物的扩散势垒的证据。事实上, 这一包覆有可能也妨碍了 DTT 接近 AuNP 表面, 并因此妨碍了 DTT 与化学吸附的寡核苷酸的 S-Au 键相互作用 / 置换化学吸附的寡核苷酸的 S-Au 键。

[0065] 在之前的研究中, AuNP 上首先生长厚的二氧化硅壳层 (75nm), 随后采用醛基基团进行表面功能化, 然后进行氨基修饰的寡核苷酸的共价吸附。由于该厚的二氧化硅壳层, 不管是否有潜在的高化学稳定性, 不存在对靶标杂交作出反应的颜色变化。在本发明中, 硫醇修饰的寡核苷酸首先化学吸附到 AuNP 表面, 随后采用 MPTMS 形成薄的二氧化硅包覆 (单层或数个单层) (图 4)。这一薄二氧化硅包覆法起初由马尔瓦尼及其同事开发出来, 从而使 (没有寡核苷酸的) 亲玻璃体 (vitrophilic) 的 AuNP 表面着色, 以用于控制较厚的二氧化硅壳层的后续生长。使用前田的非交联法测试本发明中二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物的杂交诱导的颜色变化性能。在杂交前, 二氧化硅修饰的寡核苷酸 -AuNP 共轭物在具有 10mM DTT 的 PBS 中培养 3h。与图 1B 的结果一致的是, 其在 522nm 处的 SPR 吸收峰保持稳定。一旦添加互补靶标和 0.5M NaCl, SPR 吸收峰移动到 549nm (图 5), 且溶液颜色在 10min 内从红色变为紫色。其解释如下: 相比单链配对物 (counterpart), 双链共轭物对盐诱导的团聚的稳定性更低。在 94°C 加热双链共轭物溶液 1min, 以使去杂交生效, 从而进一步证实这种杂交诱导的颜色变化。如同所预期的一样, SPR 吸收峰回移 (525nm), 且溶液颜色恢复为红色。

[0066] 除了寡核苷酸 -AuNP 共轭物以外, 新发展的二氧化硅加强法可应用于其他类型的、具有与 S-Au 相似的键的共轭物。使用 S-Ag 键已成功制备寡核苷酸 -AgNP 共轭物, 但由于其低的结合亲和力, 其在高盐浓度下稳定性有限 (不多于 0.3M 的 NaCl, 与寡核苷

酸-AuNP 共轭物高于 2.5M 相比)。寡核苷酸-AgNP 共轭物对 DTT 置换也不稳定。但是,通过本发明可极大地改善稳定性。如图 6A 所示,分散的寡核苷酸-AgNP 共轭物在 410nm 处体现出特征性的 SPR 吸收峰、并呈黄色。当添加 10mM DTT 后,颗粒团聚在数分钟内发生。410nm 处的吸收急剧减小,而较长波长 (>500nm) 处的吸收增加,且在约 700nm 处出现新的吸收峰。对二氧化硅修饰的寡核苷酸-AgNP 共轭物而言,置换反应较缓慢(相比未修饰的共轭物减少了 77%,培养 30 分钟后其 SPR 吸收峰强度减少 20%)(图 6B)。SPR 吸收峰强度相对培养时间的点状图阐释了二氧化硅包覆对抵抗 DTT 诱导的颗粒团聚所提供的显著改进(图 6C)。事实上,二氧化硅修饰的寡核苷酸-AgNP 共轭物的稳定性优于本领域所报导的采用双齿键制备的共轭物。但是,二氧化硅修饰的寡核苷酸-AgNP 共轭物的稳定性比二氧化硅修饰的寡核苷酸-AuNP 共轭物的稳定性低很多。由于 S-Ag 键的低结合亲和力可能造成较不紧凑的二氧化硅层,这是可以理解的。同样对二氧化硅修饰的寡核苷酸-AgNP 共轭物实施通过 NaCN 进行的 AgNP 溶解的稳定性测试和杂交测试(分别是图 7 和图 8)。就稳定化效果而言,各结果与二氧化硅修饰的寡核苷酸-AuNP 共轭物的结果一致。

[0067] 由于以上例示的稳定化效果最可能由在纳米颗粒的表面上形成了薄的二氧化硅层造成,当需要以简单和低成本方式改进稳定化时,该方法可在没有调整或细微调整的情况下容易地延伸到高分子与纳米颗粒间的其他共轭物;其中所述薄的二氧化硅层可以将寡核苷酸物理锚定到表面上,并且可充当避开使吸附不稳定的试剂的障碍物。例如,它可延伸到体外诊断中使用的共轭物,特别是需要 DTT 或巯基乙醇作为稳定剂的酶促反应;其可延伸到体内成像和诊断应用中使用的共轭物。

[0068] 就热稳定性而言,在 1×PCR 缓冲液中在 94℃ 下培养 2h 后,66%和 15%的寡核苷酸分别从未修饰的和二氧化硅修饰的寡核苷酸-AuNP 共轭物的 AuNP 表面解吸下来(图 9A)。当在具有 5 μ M DTT 的 1×PCR 缓冲液中经受 PCR 热循环后,未修饰的和二氧化硅修饰的寡核苷酸-AuNP 共轭物的解吸寡核苷酸的量分别为 34%和 15%。

[0069] 另一重要问题在于,酶在 AuNP 表面的非特异性吸附造成对酶促反应的抑制。例如,PCR 混合物中包含的 2.5nM 的无覆盖型 AuNP 抑制扩增反应(图 10A;栏 4、无 PCR 产物带)。有趣的是,当采用 MPTMS 处理 AuNP 时观察到 PCR 产物带(栏 6),其强度可与对照相提并论(栏 2、没有 AuNP)。因此明显的是,二氧化硅表面与 Taq DNA 聚合酶的相互作用可忽略。类似于无覆盖型 AuNP,寡核苷酸-AuNP 共轭物的 PCR 受抑制(栏 8)。这可由寡核苷酸的热解吸和随后的 Taq DNA 聚合酶吸附到暴露的 AuNP 表面来解释。对二氧化硅修饰的寡核苷酸-AuNP 共轭物而言,PCR 产物带强度与没有 AuNP 时的强度相似(栏 10 相对于栏 2)。这得益于二氧化硅包覆所提供的增强的热稳定性和 PCR 兼容性。

[0070] 利用二氧化硅修饰的寡核苷酸-AuNP 共轭物的热稳定性、杂交诱导的颜色变化性能和 PCR 兼容性开发出闭管 PCR 比色检测平台(图 11)。反应混合物与标准混合物几乎相同,除了额外的二氧化硅修饰的寡核苷酸-AuNP 共轭物和略微升高的 MgCl<sub>2</sub> 浓度。在缺失模板(即 φ X174)时,引物 1 在 PCR 后保持完整且与绑定 AuNP 的序列(AuNP-bound sequence)杂交,从而导致颗粒团聚和溶液颜色变为紫色。与绑定 AuNP 的序列不互补的其他引物(引物 2)不会促成或影响溶液颜色变化。在存在模板时,两个引物均得以延伸,并产生双链扩增子(151 个碱基对长)。因此,引物 1 不再可用于触发团聚,溶液保持为红色。如所预期的一样,闭管 PCR 比色检测平台中阴性样品和阳性样品的概念验证结果分别是紫色和红色。

事实上,两个样品在 PCR 刚好结束时都是红色。通过 UV-可见分光光度计监控颜色差别。阴性样品中的颗粒团聚经历了轻微的红移,其 SPR 吸收峰从 520nm 移到 530nm,其 520nm 处的吸收伴随减小且 650nm 处的吸收增加(图 10B)。

[0071] 虽然已描述和指出将本发明的基础性新颖特征应用于优选实施例,但应该理解的是,本领域技术人员可在没有背离本发明的精神的情况下,可以所阐述的实施例的形式及细节做出各种删减、替换和变化。本发明并不受限于上述作为示例呈现的各实施例,而是可以在所附权利要求所限定的本发明的范围内以各种方式进行调整。

[0072] 相关申请的交叉引用

[0073] 本申请享有 2011 年 7 月 20 日申请的、申请号为 No. 61/510,056 的美国临时申请的权利,该专利申请的内容在此全文引用,以供参考。

[0001]

序列表

<110> 香港理工大学

<120> 高分子-纳米颗粒共轭物及使其稳定的方法、分析系统及治疗剂载体

<130>

<150> US61/510,056

<151> 2011-07-20

<160> 4

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

GCAATAAACT CAACAGGAGC AG

22

[0002]

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

CTGCTCCTGT TGAGTTTATT GC

22

<210>3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

CTGCTCCTGT TGAGTTTATT GC

22

<210>4

[0003]



<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

GCGAACAATT CAGCGGCTTT A

21

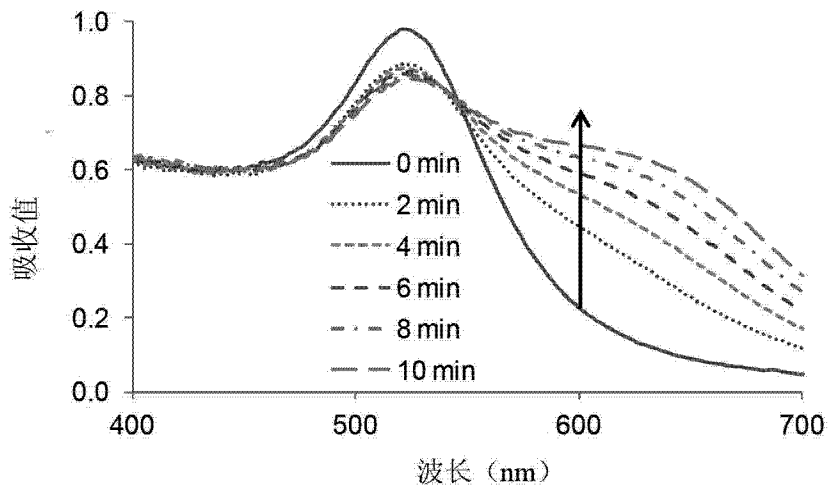


图 1(A)

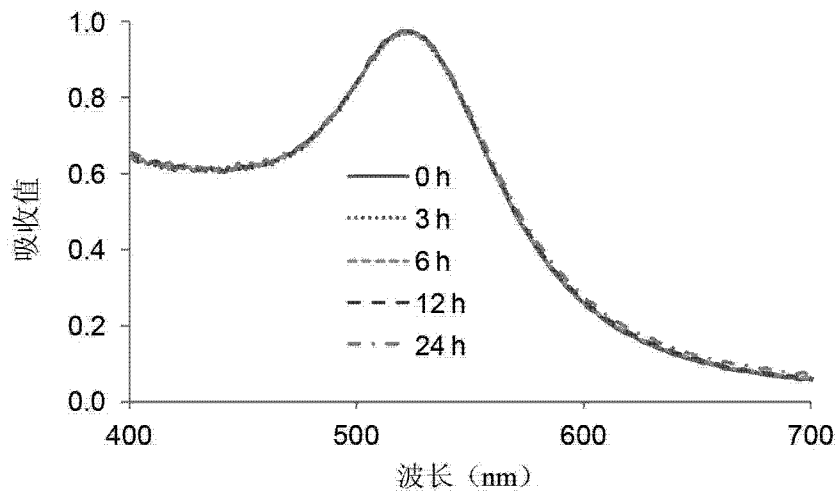


图 1(B)

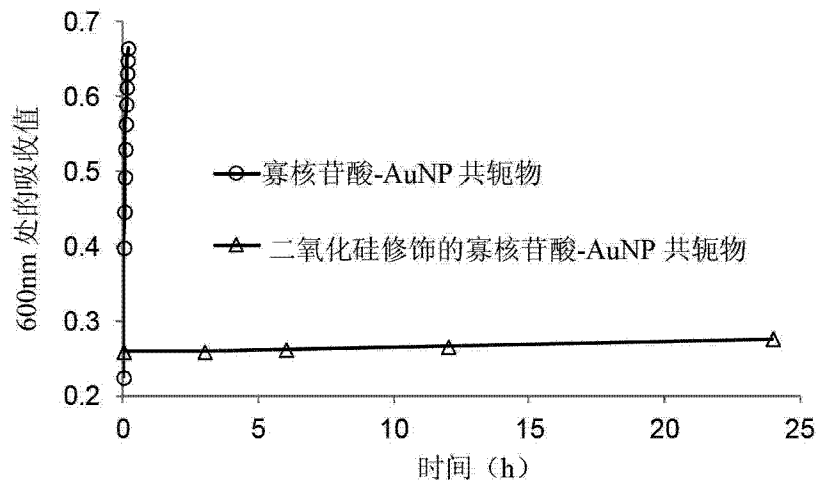


图 1(C)

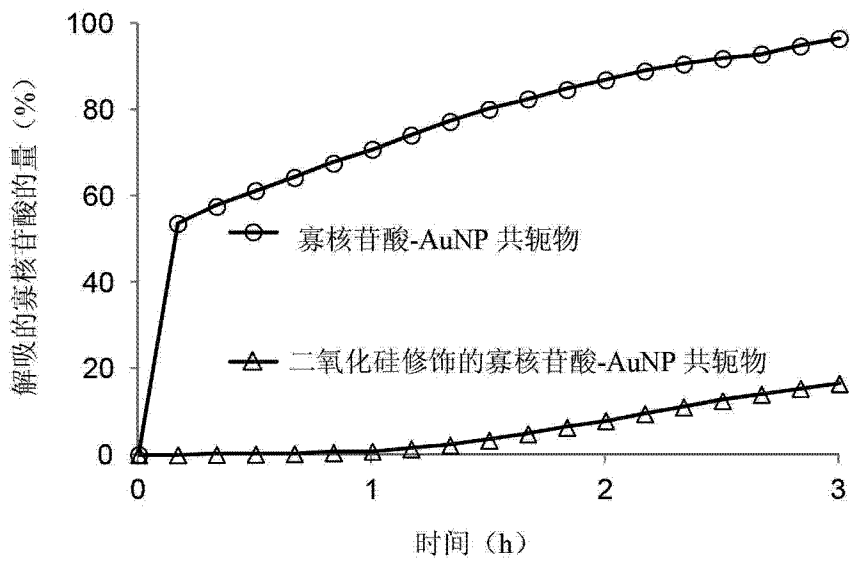


图 2

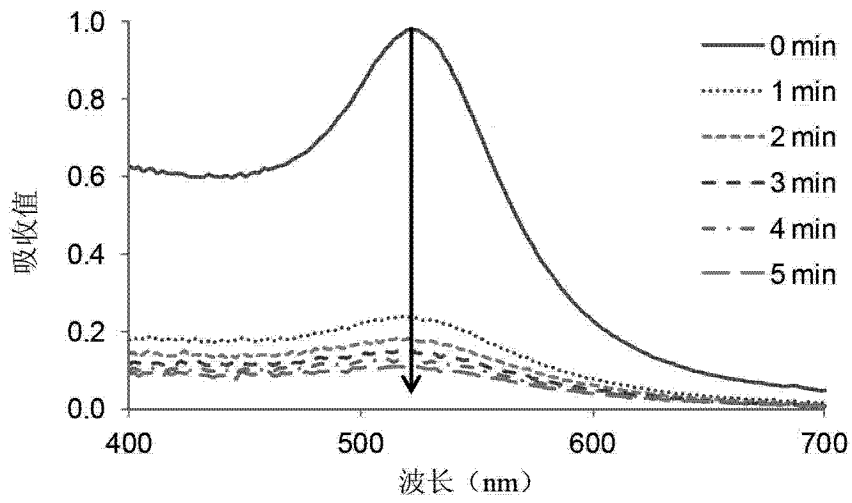


图 3(A)

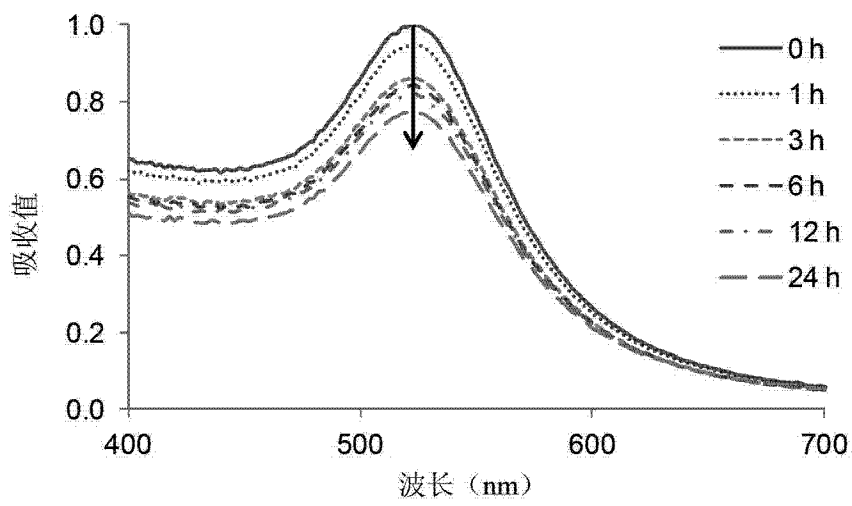


图 3(B)

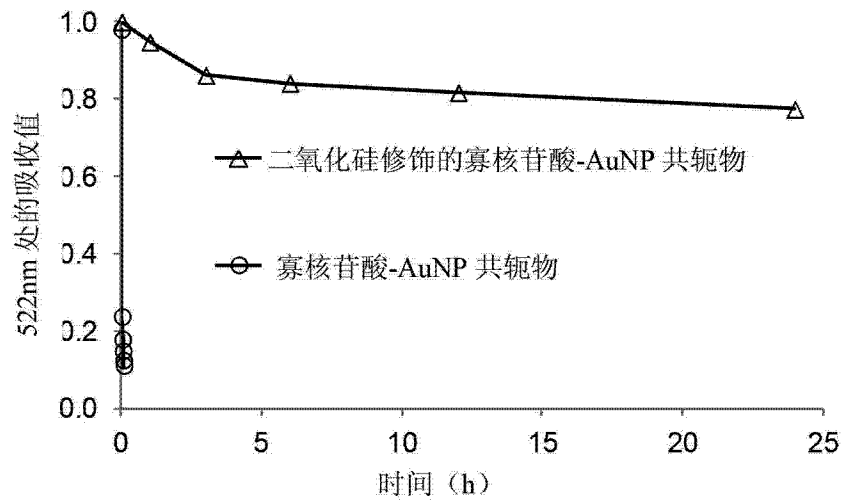


图 3(C)

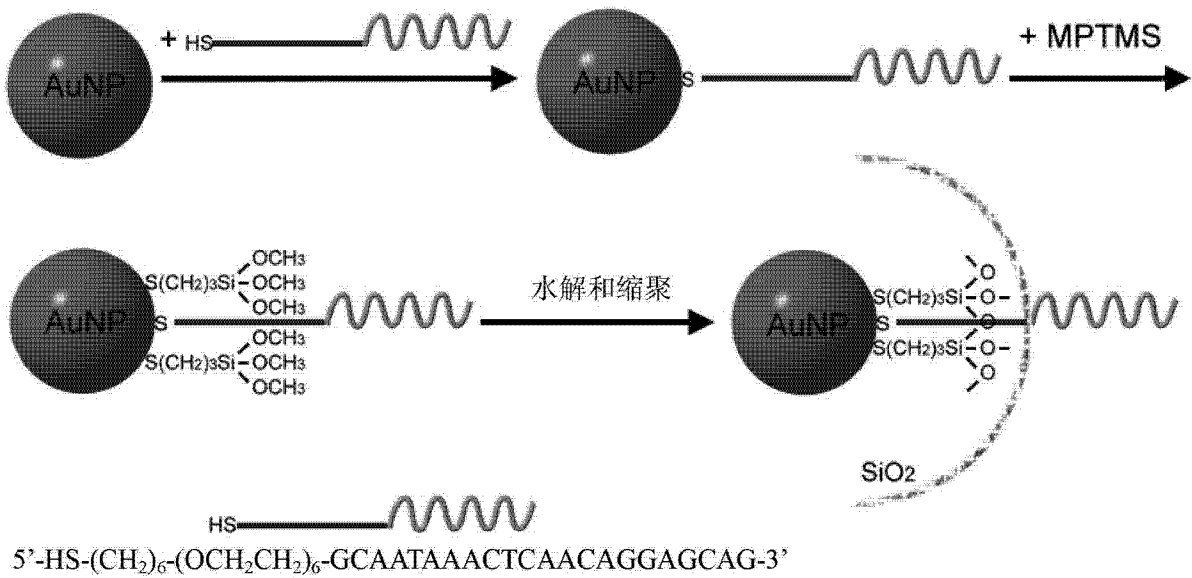


图 4

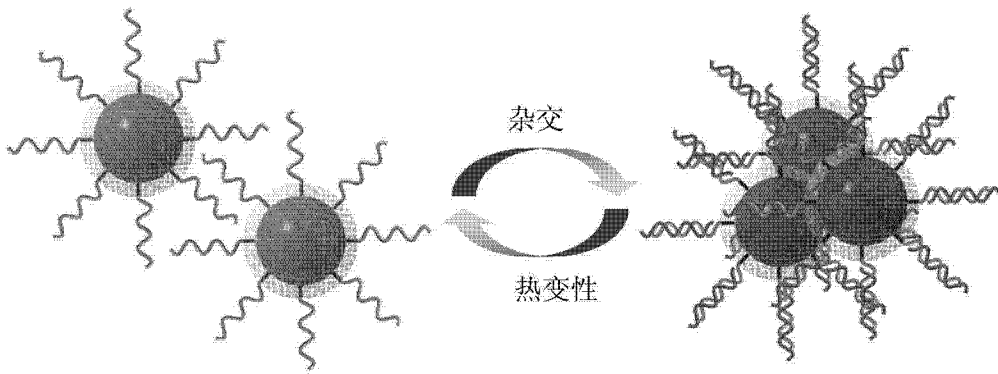


图 5(A)

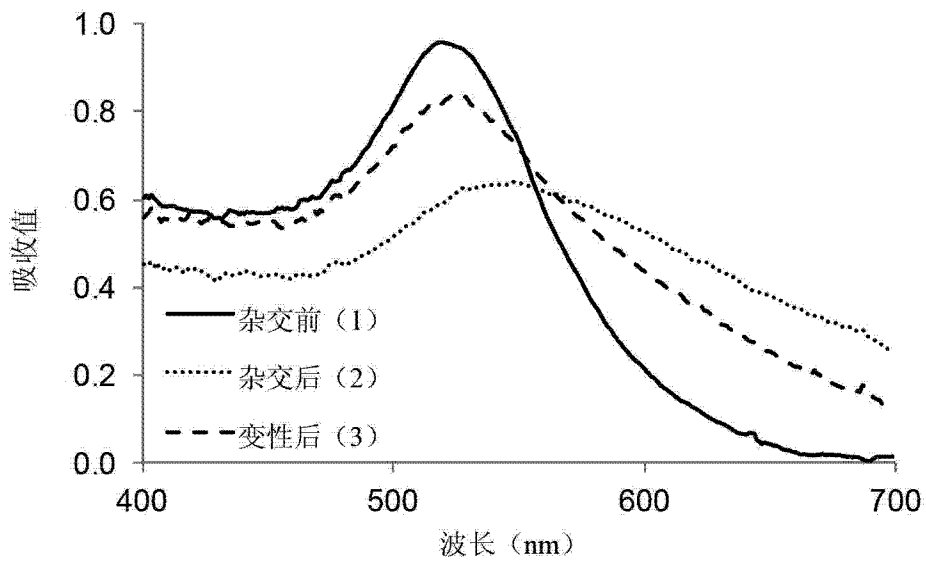


图 5(B)

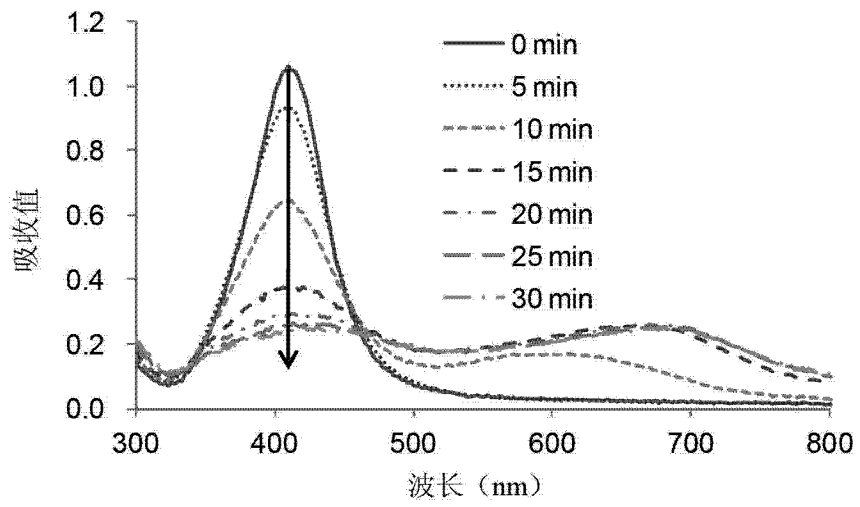


图 6(A)

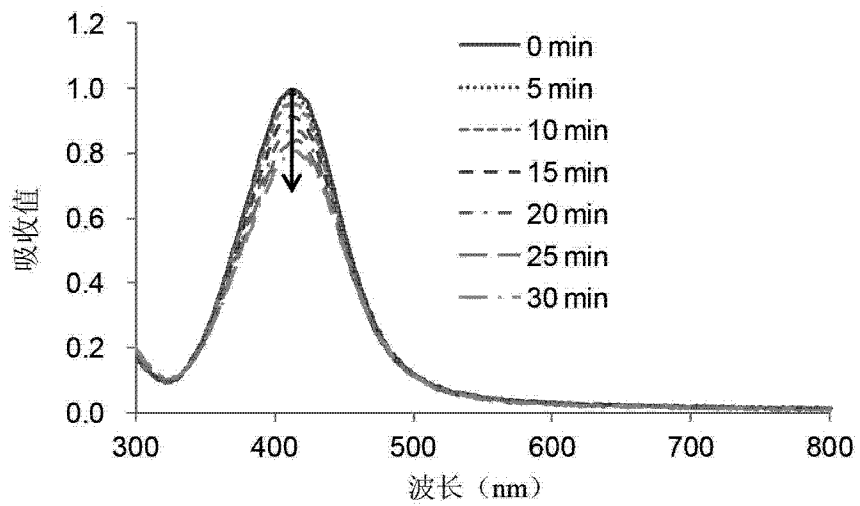


图 6(B)

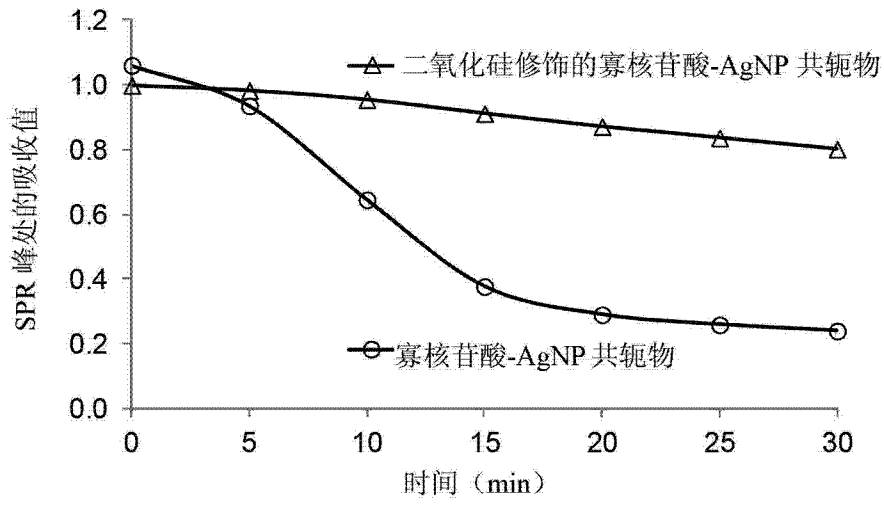


图 6(C)

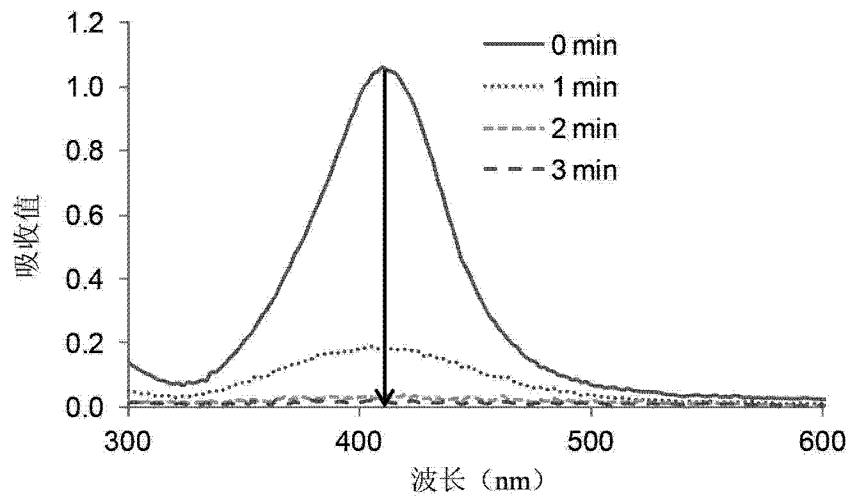


图 7(A)



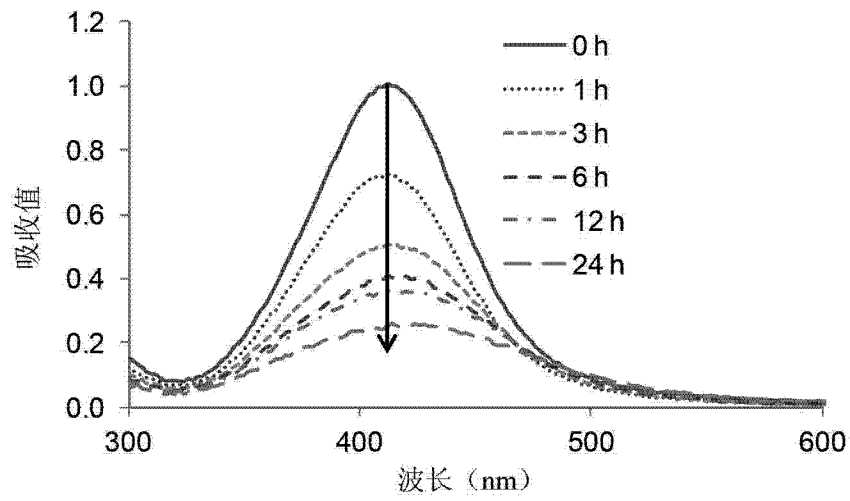


图 7(B)

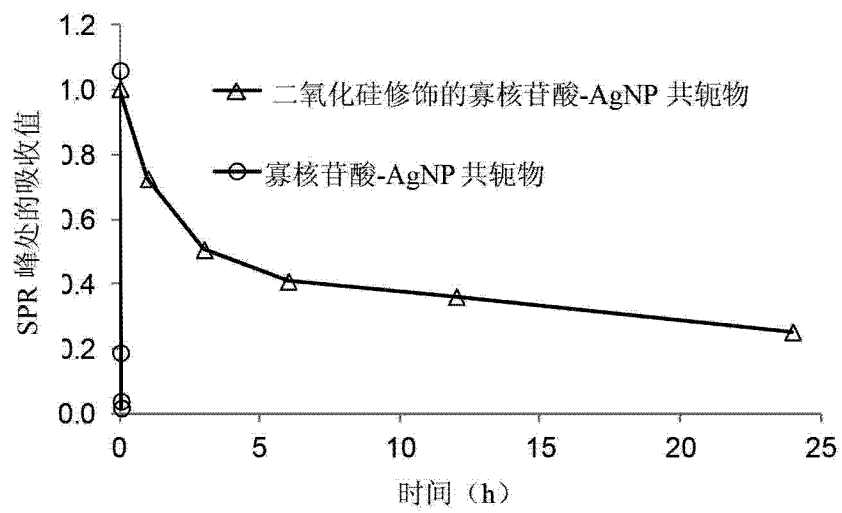


图 7(C)

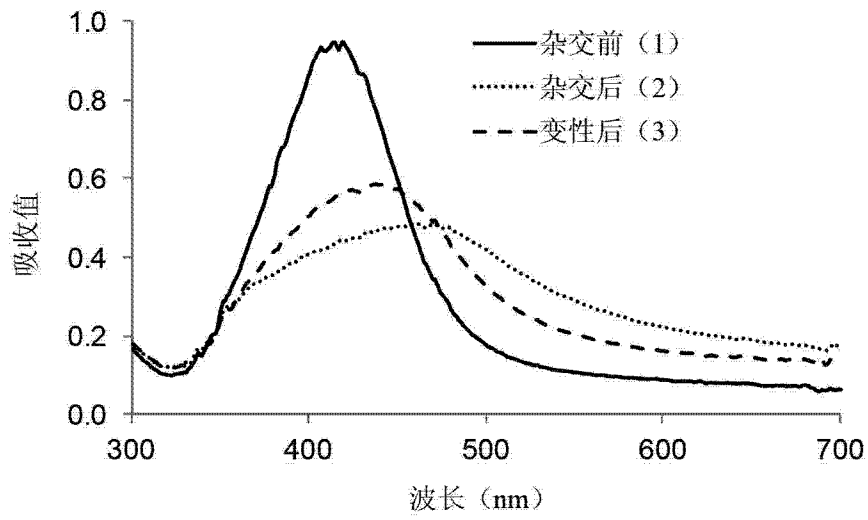


图 8

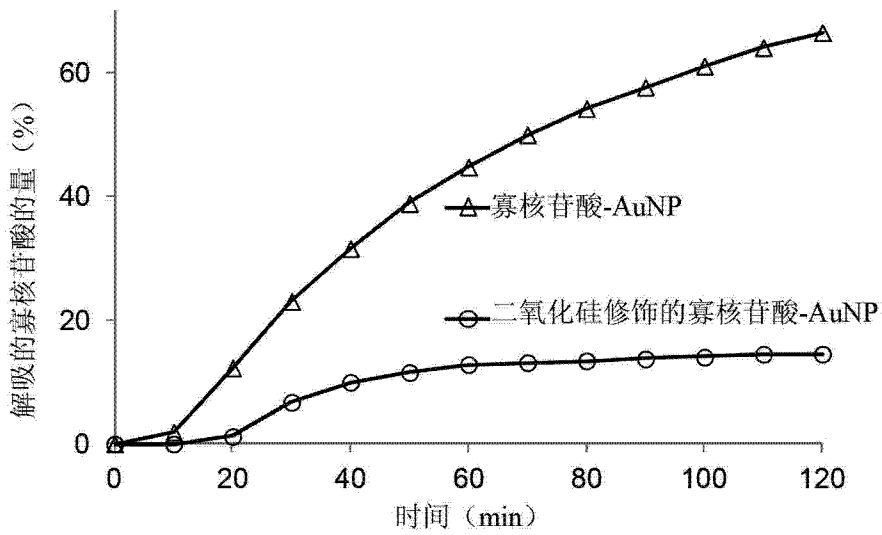


图 9(A)

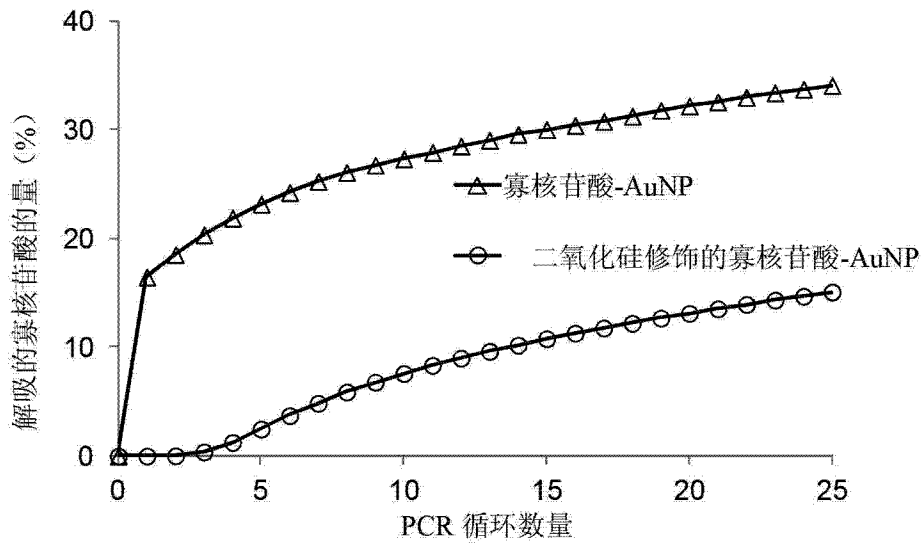


图 9(B)

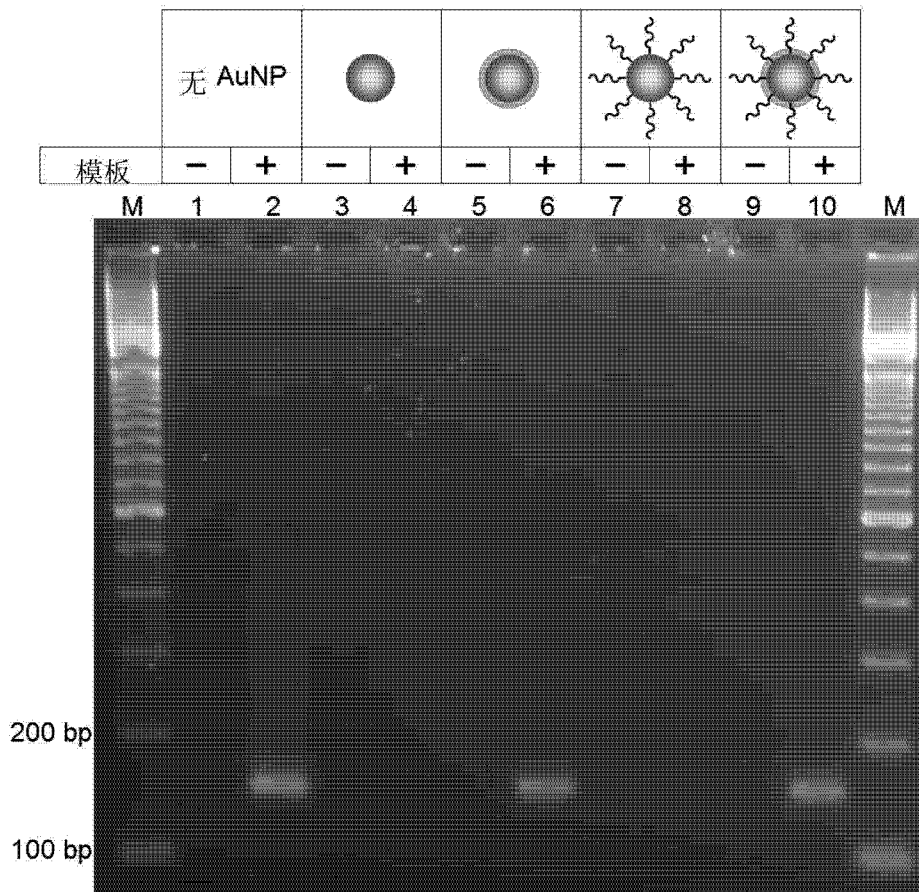


图 10(A)

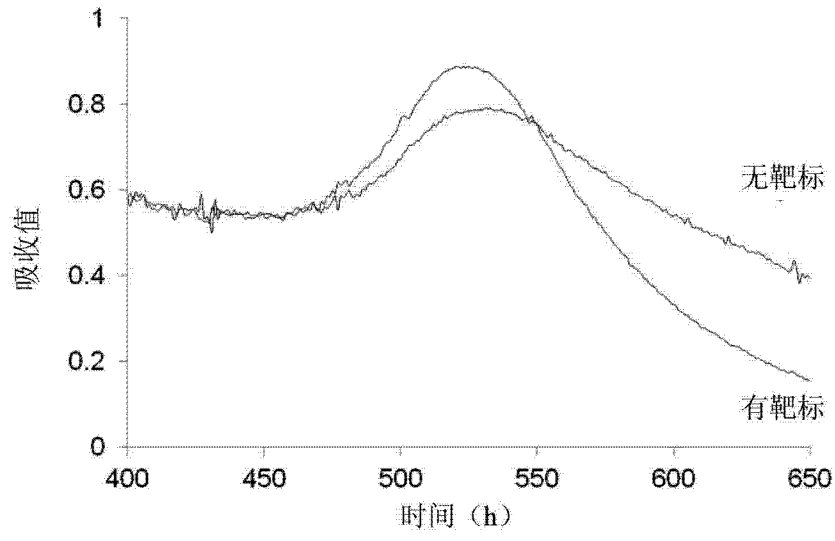


图 10(B)

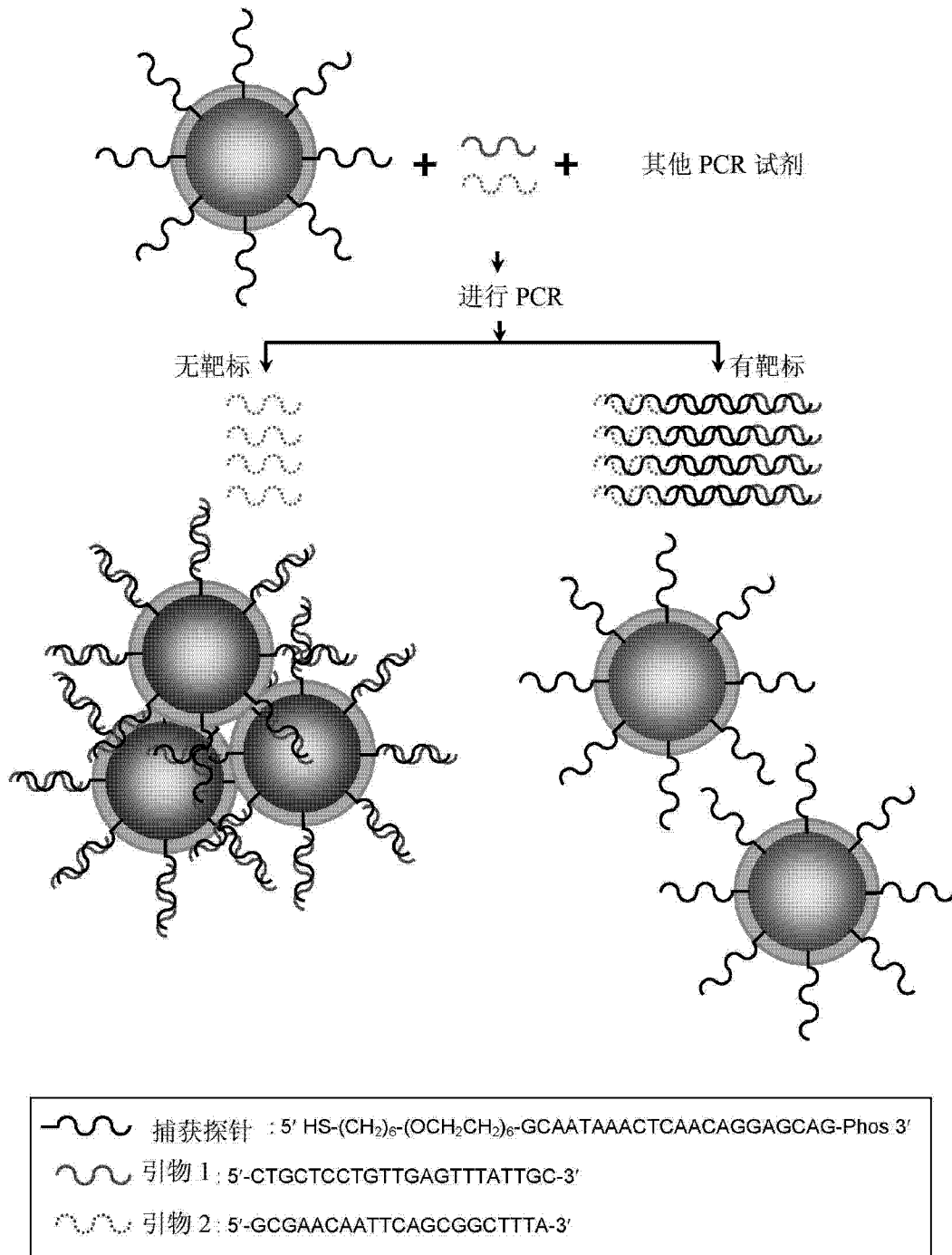


图 11