



原创性声明

本人郑重声明:所呈交的学位论文,是本人在导师的指导下,独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外,本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体,均已在文中以明确方式标明。本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名: 刘清茂 日期: 2010.5.25

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解山东大学有关保留、使用学位论文的规定,同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版,允许论文被查阅和借阅;本人授权山东大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索,可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

(保密论文在解密后应遵守此规定)

论文作者签名: 刘清茂 导师签名: 王智 日期: 2010.5.25

目 录

摘 要	I
Abstract.....	III
符 号 说 明	V
第 1 章 绪 论	1
第一节 核酸荧光和共振光散射探针的研究进展	1
1. 核酸荧光探针	1
2. 核酸共振光散射探针	3
第二节 蛋白质荧光探针的研究进展	5
1. 近红外荧光探针	5
2. 有机染料探针	6
3. 稀土离子和稀土离子络合物荧光探针	6
4. 荧光衍生化试剂	6
第三节 纳米粒子在生物大分子分析中的应用	6
1. 贵金属纳米粒子	7
2. 发光量子点	10
3. 有机高分子纳米微球	11
4. 荧光纳米球乳液	11
5. 上转换纳米粒子	12
6. 大分子纳米粒子	12
7. 纳米生物复合探针	13
第四节 金霉素性质及测定方法	14
第五节 本论文的研究目的和研究内容	15
1. 研究目的	15
2. 研究内容	15
第 2 章 金霉素-纳米金-核酸共振光散射体系的研究及分析应用	16
1. 实验部分	16
2. 结果与讨论	18
3. 机理探讨	24
4. 结论	29

第 3 章 纳米金-异金霉素-核酸体系的荧光猝灭效应及分析应用	30
第一节 纳米金-异金霉素体系的研究及分析应用	31
1. 实验部分	31
2. 结果与讨论	32
3. 机理探讨	36
4. 结论	39
第二节 异金霉素-核酸体系的荧光猝灭效应及分析应用	40
1. 实验部分	40
2. 结果与讨论	40
3. 结论	45
第三节 纳米金-异金霉素-核酸体系的荧光猝灭效应及分析应用	46
1. 实验部分	46
2. 结果与讨论	47
3. 机理探讨	52
4. 结论	56
第 4 章 亚甲基兰-SDBS-蛋白质体系的同步荧光增强效应及分析应用	57
1. 实验部分	58
2. 结果与讨论	59
3. 机理探讨	65
4. 结论	70
参考文献	71
致 谢	88
硕士期间发表论文	89

摘 要

核酸与蛋白质是生命的物质基础。核酸是生物的基本遗传物质,参与着生命活动的各个阶段。蛋白质是生物体含量最丰富的高分子物质,肩负着各种生理功能,是生物性状的直接表达者。因此研究核酸和蛋白质与小分子相互作用,建立高灵敏度、低检出限的核酸和蛋白质的定量测定方法,不但对新型的药物设计、药理和毒性的研究提供帮助,而且在临床检测等方面也具有重要意义,因此成为当前生物分析化学研究的前沿和热点之一。

本论文以荧光和共振光散射技术为主要研究手段,结合多种分析技术寻找新的核酸和蛋白质探针,建立了灵敏的定量检测新方法,并进行了机理研究和探讨。本文共四部分。

论文第一部分综述了荧光和共振光光谱探针以及纳米粒子在核酸和蛋白质生物大分子分析中的研究进展。

论文第二部分,研究了金霉素、纳米金和核酸的相互作用。研究表明:核酸的加入,可使得金霉素-纳米金的共振光散射强度显著增强,且体系共振光散射增强程度与核酸的浓度在一定范围内具有良好的线性关系,据此建立了定量测定核酸的新方法。fsDNA 和 smDNA 的线性范围分别为: $5.0 \times 10^{-8} \sim 1.5 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$ 和 $6.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$, 检出限分别为 $1.2 \times 10^{-9} \text{ g mL}^{-1}$ 和 $1.5 \times 10^{-9} \text{ g mL}^{-1}$, 并成功应用于实际样品中 DNA 的定量测定。体系的相互作用机理研究表明: CTC-AuNPs 与 fsDNA 之间发生了长距组装作用,导致了体系共振光散射强度的增强。

论文第三部分,研究了异金霉素、纳米金和核酸的荧光猝灭作用。研究发现,核酸的加入可以使异金霉素-纳米金体系的荧光发生猝灭,由此建立了一种测定核酸的简单、灵敏的荧光方法。在最佳实验条件下,核酸浓度与荧光强度猝灭程度之间具有良好的线性关系,fsDNA 和 ctDNA 线性范围分别为: $1.0 \times 10^{-8} \sim 2.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$ 和 $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.6 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$, 检出限分别为 $3.2 \times 10^{-9} \text{ g mL}^{-1}$ 和 $4.0 \times 10^{-9} \text{ g mL}^{-1}$ 。机理研究表明:异金霉素能吸附在纳米金表面,产生表面荧光增强效应,而异金霉素-纳米金与核酸之间主要以沟槽式结合,同时存在静电作用。

论文第四部分,研究了亚甲基兰-SDBS 和蛋白质的相互作用,建立了定量测定蛋白质的同步荧光方法。在最佳实验条件下,MB-SDBS-蛋白质体系同步荧光强度的增强程度与蛋白质的浓度在一定范围内呈良好的线性关系,BSA 和 EA 的线性范围分别是: $8.0 \times 10^{-8} \sim 4.0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$ 和 $1.0 \times 10^{-7} \sim 3.5 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$,检出限分别达到 $8.9 \times 10^{-9} \text{ g mL}^{-1}$ 和 $1.0 \times 10^{-8} \text{ g mL}^{-1}$ 。该方法具有稳定性好,操作简单和灵敏度高等特点。机理研究表明:MB 二聚体的解聚,MB-SDBS-BSA 复合物的形成以及 BSA-SDBS 提供的疏水微环境是该体系同步荧光增强的主要原因。

本论文的主要特点:

- 1、利用核酸对金霉素-纳米金的共振光散射强度增强作用,建立了灵敏度高,稳定性好的定量测定核酸的共振光散射新方法,探讨其相互作用机理。
- 2、研究了核酸对异金霉素-纳米金体系的荧光猝灭机理,建立了测定核酸的新方法。
- 3、利用同步荧光技术,研究了蛋白质对 MB-SDBS 体系的荧光增强作用,建立了测定生物背景干扰小的蛋白质的近红外同步荧光分析新方法,并应用多种技术探讨了体系的作用机理。

关键词:金霉素,异金霉素,纳米金,亚甲基兰,十二烷基苯磺酸钠,核酸,蛋白质,荧光,共振光散射

Abstract

Nucleic acids and proteins are basic of life. Nucleic acids are the genetic material, they play an important role in the action of every stage (growth, up-growth, and so on). Proteins are the most abundant in organism, and they almost attach themselves to all life action. So it is of special value to study the interaction of small molecules and biomolecules, the quantitative analysis of nucleic acids and proteins with high sensitivity and low detection limit are important in life science, biochemical medicament, food analysis and clinical analysis, which is helpful to design the new type of drug and study the toxicity of drug. This project is the forward position and hot point in biochemical and biophysical researches.

Based on the fluorescence and resonance light scattering (RLS) as the primary technique, this thesis focus on the development of new probes for nucleic acids and proteins and to establish sensitive methods for the quantitative determination of them, with multiple techniques to study the interaction mechanism. The main conclusions are listed as follows:

In the first section, we summarize the recent development of fluorescent probes for nucleic acid, protein and the analytical applications. The progress of nanoparticles in the analysis of nucleic acid and protein is also commented.

In the second section, the interaction between CTC, AuNPs and nucleic acids are studied. From the research, we find that when DNA is added to CTC-AuNPs, resonance light scattering is enhanced. Based on this, a new resonance light scattering method for the determination of nucleic acids is proposed. Under optimum conditions, the enhanced resonance light scattering intensity is proportion to the concentration of nucleic acids in the range of 5.0×10^{-8} - 1.5×10^{-5} g mL⁻¹ for fish sperm DNA (fsDNA) and 6.0×10^{-8} - 1.0×10^{-5} g mL⁻¹ for smDNA, their detection limits ($S/N = 3$) are 1.2×10^{-9} g mL⁻¹, 1.5×10^{-9} g mL⁻¹, respectively. The interaction mechanism is considered that there exists long range assembly effect of the system.

In the third section, the fluorescence quenching effect of iCTC-AuNPs-DNA is studied. It is found that DNA can quench the fluorescence intensity of iCTC-AuNPs. Under optimum conditions, there are linear relationships between the quenching extent of fluorescence and the concentration of DNA in the range of 1.0×10^{-8} - 2.0×10^{-6} g mL⁻¹ for fsDNA, 1.0×10^{-8} - 1.6×10^{-6} g mL⁻¹ for ctDNA. The detection limits ($S/N=3$) of

fsDNA and ctDNA are $3.2 \times 10^{-9} \text{ g mL}^{-1}$ and $4.0 \times 10^{-9} \text{ g mL}^{-1}$, respectively. The interaction mechanism investigation indicates that there exist the groove and electrostatic interaction.

In the fourth section, it is found that protein can enhance the synchronous fluorescence intensity of MB-SDBS. Under optimum conditions, the enhanced synchronous fluorescence intensity is proportion to the concentration of proteins in the range of 8.0×10^{-8} – $4.0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$ for BSA, 10.0×10^{-8} – $3.5 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$ for EA. The detection limits ($S/N = 3$) of BSA and EA are $8.9 \times 10^{-9} \text{ g mL}^{-1}$, $10.0 \times 10^{-9} \text{ g mL}^{-1}$, respectively. Samples are satisfactorily determined. The fluorescence enhancement of the system originates from the deaggregation of some MB dimer and the formation of an MB–SDBS–BSA complex, as well as the hydrophobic microenvironment provided by BSA and SDBS.

The chief characteristics of this thesis are as follows:

1. It is found that fsDNA can enhance the resonance light scattering intensity of CTC-AuNPs system and provide a stable, sensitive and highly stable against fluorescent photobleaching fluorimetric method for the determination of nucleic acids, the mechanism of the system was also discussed in detail.

2. It is found that DNA can obviously quench the fluorescence intensity of iCTC-AuNPs, this method is simple, stable and quick. The fluorescence quenchment mechanism was also discussed in detail.

3. It is found that protein can enhance the fluorescence intensity of MB-SDBS system and provide a new fluorimetric method with less influence of bimolecular background for the determination of proteins. The synchronous fluorescence enhancement mechanism was also discussed in detail.

Key Words: Chlortetracycline; Isochlorotetracycline; Au nanoparticles; Methylene blue; Sodium dodecylbenzene sulfonate; nucleic acids; protein; Fluorescence; Resonance Light Scattering

符号说明

AuNPs: 金纳米粒子

iCTC: 异金霉素

fsDNA: 鲑鱼精子脱氧核糖核酸

ctDNA: 小牛胸腺脱氧核糖核

BSA: 牛血清蛋白

OP: 乳化剂

CTAB: 十六烷基三甲基溴化铵

SDBS: 十二烷基苯磺酸钠

SLS: 十二烷基硫酸钠

B-R: Britton-Robinson

CD: 圆二色光谱

CTC: 金霉素

MB: 亚甲基蓝

smDNA: 鲑鱼精子脱氧核糖核酸

yRNA: 酵母核糖核酸

EA: 鸡蛋清蛋白

SDS: 十二烷基磺酸钠

CPB: 十六烷基溴化吡啶

TEM: 透射电子显微镜

Tris: 三羟甲基胺基甲烷

HMTA: 六次甲基四氨

ξ : 电动电势

第1章 绪 论

蛋白质和核酸是生命的最基本物质。根据化学组成不同,核酸可分为核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)。DNA是储存、复制和传递遗传信息的主要物质基础, RNA在蛋白质合成过程中起着重要作用。核酸是基本的遗传物质,并且在蛋白质的生物合成上占重要位置,因而在生长、遗传、变异等一系列重大生命现象中起决定性的作用。近年来,随着生物学向分子层次的发展以及临床诊断中的证明,人们发现许多重大疾病的发生(如遗传病、艾滋病、癌症等),都与体内的核酸的变化紧密相关[1]。组成蛋白质的基本单位是氨基酸,氨基酸通过脱水缩合形成肽链。蛋白质是由一条或多条多肽链组成的生物大分子,每一条多肽链有二十至数百个氨基酸不等,各种氨基酸按一定的顺序排列。蛋白质具有各种不同的生理功能,维持着生物体的新陈代谢[2-5]。

核酸和蛋白质的定量检测是生物化学和其它交叉学科中经常涉及到的分析任务,也是现代药物分离提纯和质量检测中的分析项目之一。在众多的测定生物大分子的方法中,探针技术以其自身的诸多优越性得到大家的重视,成为研究蛋白质和核酸结构、功能、定性定量的重要手段,这对生物学在分子层面上的发展和临床应用等有重要的意义[6, 7]。正因如此,生物大分子探针的研究已经成为前沿和热门课题之一。

下面主要介绍核酸和蛋白质荧光和共振光散射探针的研究现状以及发展趋势。

第一节 核酸荧光和共振光散射探针的研究进展

核酸定量分析的方法有很多,如免疫分析法等。众多方法中,由于荧光分析法和共振光散射法具有方法简单、灵敏度较高等特点,人们不断发现和研究新的荧光和共振光散射探针。本节中对核酸的荧光探针和共振光散射探针进行了综述。

1. 核酸荧光探针

核酸的内源荧光很弱,因此直接用其天然荧光存在局限性[8, 9],因此人们一直在探索利用探针来研究核酸。荧光探针之所以在核酸检测中应用广泛,主要是由于荧光分析方法具有灵敏度高、可测定参数多(如光谱、峰位、荧光偏振、荧

光寿命、荧光强度)等优点,常用的核酸荧光探针有:有机染料探针、金属离子探针、金属配合物探针和光化学探针等。

1.1 有机染料探针

有机染料作为核酸荧光探针研究起步比较早,发展速度很快。有机染料与核酸的结合区位于核酸的碱基、磷酸骨架以及戊糖环部分。核酸与小分子的结合位点主要由平行堆积的碱基、聚合的阴离子磷酸骨架以及两条核苷酸链形成的大沟、小沟组成。作用方式主要有非共价键结合和共价键结合。非共价键结合又可分为表面结合(Outside binding)、沟槽结合(Groove binding)和嵌插结合(Intercalation binding)3种模式[10-12]。小分子与DNA的共价键结合的序列特异性识别能力比非共价键结合作用要强的多。

早期的有机染料主要分为:吖啶类[13, 14], 菲啶类[15], 吩噻嗪类染料[16] 花菁染料[17], 二苯并咪唑染料[13]等。随着研究的不断深入,人们发现早期的这些染料很多具有剧毒性,容易发生诱变,因而寻找无毒或低毒染料探针研究成为热点之一。许多药物小分子具有很强的荧光性,将其作为荧光探针,不仅可以实现对核酸的测定,还有助于从分子水平上了解药物的作用机理,为药物设计提供更为有效的理论指导。

小檗碱(黄连素)属于异喹啉生物碱,其对溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌、淋球菌和弗氏、志贺氏痢疾杆菌均有抗菌作用,并有增强白血球吞噬作用。小檗碱的盐酸盐(俗称盐酸黄连素)已广泛用于治疗胃肠炎、细菌性痢疾等。贺吉香[18]等研究发现黄连素在Tris-HCl缓冲溶液中有微弱的荧光,加入ctDNA以后荧光峰显著增强,这是由于黄连素能专一的插入到DNA双螺旋的碱基之间,二者之间形成络合物。

柔红霉素(DNR)是一种典型的蒽环类抗癌药物[19],其与单链DNA作用时,最优先的作用位点为CpG,其次为ApG,再次为ApC与双链DNA作用时,DNR最先嵌入(CpG)₂碱基对之间,然后再嵌入(TpG), (CpA)和(CpT), (ApG)碱基对之间。此法可用于G碱基未配对DNA链的检测[20]。

已报道的药物荧光探针还有利凡诺(RVN)[21]、苯并噻嗪[22]、博来霉素[23]等。

由于传统的有机荧光染料容易受到生物样品本底荧光和散射光的干扰,对生物的损伤很大[24],因此双光子激发性质的有机小分子的合成和应用备受关注。刘玲芝[25]等设计并合成了一种双光子激发荧光染料 TP-COOH,通过生物素-链亲和素桥联技术,将其作为能量供体用于均相竞争法检测 DNA。

1.2 金属离子及其配合物荧光探针

根据发光类型可将金属离子及其配合物荧光探针分为金属离子发光和配体发光的金属配合物荧光探针。

目前,人们在核酸分析中常用的金属离子荧光探针主要是稀土离子。这是由于稀土离子不仅具有光谱窄、Stocks 位移大、激发态寿命长等优点,而且与生物大分子间的亲和力大 [26-28]。金属离子与配体形成络合物发射金属离子的荧光须满足条件为:金属离子的发光电子能级在配体 T_1 能级之下。此时,可能发生电子从配体三重态向金属离子激发态的非辐射跃迁,然后发生 $M^* \rightarrow M + h\nu$ 的辐射跃迁,发射金属离子的敏化荧光[29-31]。

而当金属离子的发光电子能级在配体 S_1 能级之上时,金属离子与配体形成的络合物则发射的是配体分子的荧光。主要有蒽醌类化合物、黄酮类化合物、喹诺酮类化合物、羧酸络合物、八面体钌的配合物、金属卟啉类化合物[32-36]。

核酸与金属配合物相互作用的研究一直是人们关注的课题之一,其中配体大部分是临床药物,这在生物、医学领域具有重要意义。

1.3 光化学荧光探针

光化学荧光分析是一种建立在光化学反应基础上的荧光分析技术。当某些物质吸收了紫外-可见辐射,引起诸如光加成、光分解、光氧化还原及光异构等光化学反应。这些反应导致物质的结构或性质发生了变化,形成荧光发射功能团,使物质能够发射强的荧光。

李文友等人利用核酸对维生素 K_3 和 9,10-蒽醌-2-磺酸钠(AQS) 等光化学荧光探针荧光强度的变化的影响,实现了对 DNA 和 RNA 的测定[37],提高了核酸检测的灵敏度。

2. 核酸共振光散射探针

共振光散射技术是一种在普通荧光分光光度计上进行测量的光散射技术。其原理是：当采用相等的激发和发射波长同时扫描激发和发射单色器所得的同步光谱($\Delta\lambda=0$)，即为散射粒子的共振光散射光谱，后来又发展了二级共振光散射光谱技术。上世纪80年代Knoll等研究了以染料键合DNA进行光散射标记[38]，尽管如此共振光散射技术真正得到人们关注和应用是在1993年，Pasternack等使用普通的荧光分光光度计获得了共振光散射光谱[39]。

该技术被用来研究小分子物质与核酸和蛋白质之间的相互作用，并已成为检测蛋白质和核酸的灵敏探测技术之一。目前用于核酸分析的共振光散射探针主要有：有机染料，阳离子表面活性剂，金属离子络合物及金属离子等。

2.1 有机染料探针

有机染料主要可以分为核酸水溶性卟啉化合物[40]、三苯甲烷类阳离子染料[41, 42]、噻嗪类染料[43]以及醌亚胺类染料[44-48]。以上的共振光散射探针大多含有大的共轭体系和高的摩尔吸光系数的生色团，在溶液中多以阳离子的形态存在，加入核酸后，它们与其以静电引力和疏水作用力结合形成大的离子缔合物，同时发生生色团的聚集作用，导致共振光散射强度的增强[49]。近年来，随着生命科学的发展，人们更关注于药物类染料与核酸相互作用的研究，并且发现药物染料与核酸也存在着共振光散射猝灭现象。吕文娟等[50]提取大黄中的有效成分大黄酸，发现核酸对大黄酸481nm处共振光散射信号的猝灭现象，通过计算机模拟对大黄酸分子与核酸分子结合前后分子平面性的变化进行了考察，探讨了分子平面性变化与共振散射光猝灭之间的关系，建立了测定核酸的共振光散射新方法。

2.2 阳离子表面活性剂探针

表面活性剂由于其具有亲水基和亲油基的双重性质，也被应用于核酸的共振光散射测定。我们课题组报道了单独利用阳离子表面活性剂CTAB和CPB作为共振光散射探针来研究核酸的方法，并探讨了其作用机理[51]。刘绍璞等[52]研究了CTAB、CPB、TPB、CDBAC和Zeph等五种阳离子表面活性剂对核酸的测定，并

探讨了反应机理及影响共振光散射强度的因素。陈展光等以两性离子表面活性剂十二烷基二甲基甜菜碱(BS-12)为共振光散射探针,进行了核酸测定[53]。

2.3 金属离子配合物及金属离子探针

贾贞等[54]研究了 Eu^{3+} -TTA-Phen-核酸体系中的共振光散射猝灭效应,同时,作对体系的相互作用机理进行了研究。杨传孝[55]等研究发现在酸性介质中, Al^{3+} 与DNA分子表面的磷酸根通过静电作用相结合,形成较大的粒子,导致共振光散射增强光谱,建立了共振光散射法测量痕量DNA的新方法。陶玉龙等研究了 Fe^{3+} 与DNA的共振光散射光谱,研究了适宜的反应条件。体系的最大散射峰位于320.0 nm处,共振光散射的增强强度与DNA的浓度呈线性关系,建立了一种定量测定DNA的简便、快速的新方法[56]。此外,此类型探针还有:镧的混配物[57],铁(II)与邻菲咯啉、联吡啶的混配物[58]等。

第二节 蛋白质荧光探针的研究进展

蛋白质是生命活动的物质基础,对蛋白质的检测在生命科学中具有重要作用。蛋白质在340~350nm有荧光发射,但其内源荧光在灵敏度方面存在局限性,需要通过外源荧光性质的研究来达到灵敏的测定蛋白质含量的要求。目前,常见的荧光探针主要有:有机染料,荧光衍生化试剂,稀土离子及其螯合物荧光探针和近红外荧光探针等。

1. 近红外荧光探针

随着荧光技术在生物样品检测中的不断应用,人们发现传统的可见光区荧光染料由于生物体及其组织在可见光的激发下自身也会发射荧光,灵敏度和准确性受到很大限制。近红外荧光染料的发射在600—1000nm,而生物分子在此区域内没有吸收,对荧光的干扰较小,因此近红外荧光染料非常适合生物样品的分析检测。常用的近红外荧光染料有:菁染料、含有四吡咯基团染料和噻嗪/噁嗪染料[59, 60]等。菁染料可通过活性反应基团与抗体或抗原蛋白质结合[61],形成染料-蛋白质结合物,从而进行检测。常用的是五甲川和七甲川菁染料。一些对溶剂敏感的部位菁与蛋白共价结合,用于研究活细胞中蛋白构型的变化[62],标记巯基和氨基的

系列Cy5近红外菁染料在蛋白质组学上也初露头角[63, 64]。

含有四吡咯基团染料探针主要用于研究生物蛋白质的结构、性能与功能[65]。

噻嗪类染料和噁嗪类染料均含有可用于进行标记的氨基基团, 合成较容易、分子较小。目前常用的这类染料主要有耐尔蓝(XI)[66], 耐尔红[67, 68]、亚甲基蓝(XII)[69, 70]、噻嗪750[71]等。

二氟化硼-二吡咯甲烷(BODIPY)荧光染料具有较高的摩尔吸光系数、较高的荧光量子产率、荧光对溶剂的极性和pH均不敏感、荧光光谱峰窄、荧光寿命长和光稳定性好等特点。近年来一些含有不同活性功能基团的BODIPY也相继被合成[72-74]。

此外, 还有一些近红外量子点和上转换纳米粒子荧光探针(见本章第三节)。

2. 有机染料探针

有机染料与蛋白质通过共价键或者非共价键结合, 利用染料的荧光强度增强或者猝灭程度在一定范围内与蛋白质浓度成正比, 实现对蛋白质的定量测定[75-90]。

3. 稀土离子和稀土离子络合物荧光探针

某些稀土离子本身具有优良的荧光特性, 因此可以用来测定蛋白质。我们课题组在研究铈(III)和铽(III)及其配合物作为蛋白质荧光探针做了大量工作[91-93]。

4. 荧光衍生化试剂

蛋白质分子一般具有两个可供衍生化的功能基团: 氨基和羧基。常用的衍生化试剂有 5-氟喹啉-3-羧基乙醛、4-(N, N-二甲基胺基-磺酰基)-7-氟-2, 1, 3-苯并二唑等[94-96]。

第三节 纳米粒子在生物大分子分析中的应用

自电子扫描隧道显微镜发明以来, 人们开始在纳米领域认识和研究问题。纳米粒子通常是指粒径大小在 1-100 nm 范围内的微粒子。其存在纳米效应, 可以概括为: 小尺寸效应、量子尺寸效应和表面与界面效应。由于存在这些独特的效应, 纳米粒子在光、磁以及化学活性等方面与本体物质产生显著差异[97-99]。将纳米粒子应用于生物分析, 面临的首要问题是生物大分子与纳米粒子的耦联。生物分

子与纳米粒子通过以下方式耦联：第一是直接法，纳米粒子与蛋白质和核酸本身的官能团或衍生的官能团在表面进行连接；第二是间接法，把纳米粒子表面改性修饰，衍生出能够方便连接蛋白质和核酸的官能团[100-102]。

目前，用于蛋白质和核酸的纳米颗粒主要有：贵金属纳米粒子，发光量子点，有机高分子纳米溶胶，微乳液荧光纳米粒子，上转换纳米粒子，生物大分子纳米粒子，纳米生物复合探针等。

1. 贵金属纳米粒子

金属纳米粒子的原子和电子结构不同于相同化学成分的金属粒子，其具有优良的电学、磁学、光学、热学、催化等性能。下面重点对贵金属纳米金和银在蛋白质和核酸分析中的应用进行综述。

1.1 金纳米粒子

纳米金是指直径为1~100nm的金微小颗粒，具有一定金原子数的八面体结构，它与普通的金具有不同的特性，一般为分散在水中的水溶胶，故又称胶体金。纳米金具有较好的免疫活性、催化活性、光电特性等等。其在生物分子的检测中具有较高的选择性和灵敏度，应用前景广阔。

金纳米粒子的制备方法较多[103]，主要有：（1）Turkevich-Frens法[104]，是最传统的制备纳米金的方法，制备的金纳米粒径在10~100 nm范围内。该方法制备程序简单，纳米金粒子分散性好，易于表面修饰[105]；（2）Brust-Schiffrin法，以四正辛基溴化铵为相转移剂，以烷基硫醇为稳定剂， NaBH_4 为还原剂，制备粒径为1~8 nm的纳米金粒子[106, 107]；（3）聚合物保护法：通常采用 NaBH_4 为还原剂，配体采用聚合物，制备的纳米金粒径小于10 nm[108, 109]。

金纳米粒子作为特殊标记物进行生化分析的研究始于20世纪60年代。1962年开始用金纳米标记细胞进行电子显微镜研究，1971年Taylor将金纳米微粒引入电镜免疫技术中，从而金纳米微粒开始用于免疫标记技术。现阶段应用主要可分为：光学探针，电化学探针，生物传感器。

胶体金在可见区有特征等离子体共振吸收，且其吸收峰的等离子共振常随着尺寸的变化而发生频移，溶液的颜色从橘红色到紫红色发生相应变化，有利于肉

眼以及光学显微镜的观察。Crumbliss发现金氧化还原酶可以附着在纳米金表面,且活性并没有改变[110];人们发现不同的pH值下,纳米金粒子会诱导BSA的构象发生变化,且在pH值较高时,蛋白质二级和三级的结构变化更大[111]。美国西北大学的Mirkin-Letstinger小组和加州大学Berkeley的Alivisatos-Schultz小组一直处于金纳米光探针免疫研究的前沿。Mirkin-Letstinger小组将金纳米粒子标记到DNA分子上以后,发现DNA分子依然保持与其互补链进行杂交的能力,过程是热力学可逆的且没有被破坏[112]。Dai等[113]结合动态光散射(DLS)技术,建立了简单且无需分离和信号放大步骤的一步测定DNA的方法,检出限约1 pmol/L。

在DNA诱导金纳米粒子自组装为金纳米线方面,Andrea和Ca'rdenas等分别作出了研究。二者不同的是:Andrea是用4-(二甲氨基)嘧啶(DMAP)修饰纳米金,与未经修饰的ctDNA发生静电作用,自组装为纳米线[114];而Ca'rdenas等则是将DNA进行硫醇化的修饰,与未经修饰的纳米金相互作用后影响纳米金的尺寸和形貌,又发现未经修饰的DNA也有这种模版功能[115]。

金本身是非常优良的导电材料,而在纳米金标记免疫检测过程中会出现纳米金的大量聚集,这会使体系的电导增强,从而运用电导检测反应成为可能。一般由免疫亲和反应引起的导电性的改变比较微弱,难以进行电检测,但通过纳米金的修饰进行免疫反应后,形成抗原-抗体-纳米金的复合体,该复合体有序聚集成量子点阵列,改变了电荷输送途径并提高了导电性,从而实现了免疫反应的电检测[116]。Hill和Ambrosi采用编码技术检测核酸和蛋白质(人抗IgG)。Hill等[117]将AuNPs用DNA修饰,建立了一种新的快速、精确地检测DNA生物条形码分析方法。Ambrosi等[118]侧重于探针的优化,他们制备了一种双编码AuNPs(DC-AuNPs)探针,可对人抗IgG进行检测,检出限较低。

纳米金不仅与蛋白质和核酸有很好的吸附性[119],而且其具有良好的导电性、生物相容性,小尺寸效应、量子隧道效应及高的表面化学活性等特殊的物理化学性质,能大大减小电子给体与受体间的距离,提高电子与电极之间的传递速率,在提高生物传感器性能方面有着重要的应用。Zhang等[120]研制出一种脱氧核糖核酸计时电量传感器,该传感器为三明治结构。Wang等[121]研制出了可以灵敏和选择性检测 α -凝血酶和人血浆中的蛋白,原理是:Aptamer-AuNPs 比色传感器。

此外,利用功能化金纳米粒子表面增强拉曼效应[122]检测蛋白质、酶的活性检测和动力学参数分析[123]以及细胞分析等方面均有报道[124-125],不仅如此,金纳米在药物等小分子的检测,表面活性剂临界胶束浓度的获得等方面也有应用[126-127]。

1.2 银纳米粒子

纳米银具有优异的理化特性、高电子密度、较好的生物相容性,在生物分析检测、疾病诊断与治疗中发挥着重要的作用。近年来,人们越来越关注纳米银的制备以及生物应用。目前制备银纳米粒子的方法主要是化学还原法和电化学方法,真空沉积法、超临界法和反微乳液法等。

在HTAB的存在下,Dabin[128]等利用银镜反应在120℃的水溶液中通过控制HTAB和银氨溶液浓度合成了不同形状的银纳米粒子。该方法操作简单,纳米粒子尺寸均一,排列有序。

纳米银粒子特有的纳米效应可引起光学增强效应。Dootz[129]等利用银纳米粒子的表面增强拉曼散射效应(SERS)研究了聚乙烯亚胺(PEI)和DNA的微观结构,对体系SERS的影响因素进行了探讨。由于拉曼增强条件苛刻,表面荧光增强得到更多的关注。Aslan[130]等制备了一种具有表面荧光增强效应的银岛膜,用于RNA的定量测定,检出限可达 10^{-16} mol。

刘春华[131]等建立了一种简单的制备纳米银粒子的新方法。此种纳米银粒子具有荧光,ctDNA可使其发生荧光猝灭,从而实现DNA的测定。Shen等[132]运用多种手段,研究牛血红蛋白与银纳米粒子的相互作用。

Aiguo[133]等利用多种检测技术研究了CTAB-纳米金-纳米银以核酸为模版的自组装行为,该研究在催化以及传感器方面得到了应用。

韦小玲[134]等以柠檬酸三钠作还原剂,采用微波高压合成法制备了粒径约为20nm的银纳米微粒。用银纳米微粒标记羊抗人IgG制备了IgG的免疫纳米银探针(AgGIgG)。在pH为6.0的磷酸盐缓冲溶液及聚乙二醇(PEG)-6000和KCl存在下,利用体系在485nm处的共振散射峰增强,实现了血清IgG的定量分析。

我们课题组利用银岛膜增强效应测定了蛋白质[135]。还发现纳米银-铝在核

酸加入后共振光散射强度显著增强,这是由于AgNPs、Al(III)和fsDNA三者通过静电作用形成网状结构聚集体,体系共振光散射强度增强[136]。

2. 发光量子点

量子点(quantum dots, QDs)是一种由II-VI族或III-V族元素组成的,是一种准零维(quasi-zero-dimensional)的,尺寸在其激子波耳半径以内的纳米材料[137]。1998年Alivisatos和Nie[138, 139]两个小组成功地解决了量子点水溶性和生物兼容性的问题,而后人们又开始对量子点进行荧光标记。由于QDs本身具有激发光谱宽而连续、发射光谱窄而对称、发光效率高、光化学稳定性好、不易发生光漂白、发射光颜色与粒径大小关联等优点,被广泛应用于蛋白质及DNA检测、细胞标记成像等领域[140-142]。

量子点在常规的荧光检测中的应用主要是荧光猝灭法。严拯宇将 ZnS 纳米颗粒经过 L-半胱氨酸表面修饰后[143],建立了 DNA 的定量分析方法。研究发现在 pH 值近中性时 DNA 浓度在 20~600 $\mu\text{g/L}$ 时对纳米荧光探针具有猝灭作用,且具有很好的线性关系,认为 DNA 与 L-半胱氨酸-ZnS 纳米粒子存在静电作用。

美国华盛顿的Goldman研究小组研究出一种QDs-抗体偶联物,他们利用免疫荧光检测方法先后完成了毒素B等的检测,该QDs-抗体偶联物具有实时检测和定量分析同步性的优点[144, 145]。

荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)技术也常用于量子点的生物分析。FRET是通过分子间的电偶极相互作用,将供体激发态能量转移到受体激发态的过程,供体荧光强度降低,而受体可以发生敏化荧光或荧光猝灭[146]。Wang等[147]分别用不同颜色量子点标记蛋白质和抗牛血清白蛋白抗体(IgG),利用二者的夹心型竞争反应,从荧光强度的变化达到检测BSA的浓度的目的。

Han等[148]利用不同颜色的QDs标记多色编码微珠与遗传物质条带连接,用于DNA杂交检测,在DNA的测序方面取得了突破性进展,Ghazani等[149]将组织微阵列技术、光谱分析技术与QDs相结合,发展了一种用于定量测定肿瘤中蛋白质表达的新方法。

量子点做为一种新兴的生物探针,其应用范围还在不断的扩大。但是它无法取代传统的有机小分子荧光探针,只能作为现有的有机小分子荧光探针的有力补充。因为它对活体组织的潜在毒性,生物相容性都有待进一步的探讨。

3. 有机高分子纳米微球

有机高分子微球指的是至少有一相尺度达到纳米级尺寸的有机高分子材料。它是以聚苯乙烯、聚烷基氰基丙烯酸酯等为微粒介质材料,在微粒表面键合或吸附荧光素(Fluorescein,如FITC等)、罗丹明(如Rhodamine 6G)、菁色素(Cy染料)等荧光物质的纳米微粒[150-152]。

用聚苯乙烯等高分子材料包裹 β -二酮铈荧光配合物的纳米高分子荧光微粒[153-154],采用时间分辨荧光方法,应用于前列腺特异抗原(PSA)的免疫检测,可以获得很高的检测灵敏度。Nie等用乳胶将其包埋,形成了耐漂白,发光稳定的乳胶荧光团,该乳胶荧光团可以与蛋白质直接作用,实现对其的测定[155]。

王伦[156-159]与其工作小组先后合成了功能性高分子聚合物纳米粒子,不但完成了蛋白质和核酸的测定,还实现了癌症干细胞原癌基因在核酸中磷酸位点的鉴定[160-162]。

杨安树等采用开环聚合法合成了不同分子量的单甲氧基聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸(MePEG-PLGA)两嵌段共聚物,通过自乳化溶剂扩散法(SED)制备了不同表面特性和粒径的MePEG-PLGA纳米粒(MePEG-PLGA-NPs),较系统地研究了血清蛋白吸附、调理作用与MePEG-PLGA-NPs表面MePEG修饰、粒径之间的关系,巨噬细胞吞噬与MePEG-PLGA-NPs表面MePEG修饰、粒径以及血清蛋白吸附、调理作用之间的关系,以阐明高分子纳米载药系统长循环机制。同时,制备了载TNF- α 拮抗肽(TNF-BP)的MePEG-PLGA-NPs,并对其载药性能、体外药物释放行为和生物活性等方面进行了研究[163-164]。

4. 荧光纳米球乳液

荧光纳米球乳液的制备分为油包水或者水包油等方式。该微球可以减少发色基团由于互相碰撞而产生的能量损失,且不易分解,发光稳定。

2003年Tan的研究小组建立了一种超高灵敏度的DNA检测方法,2004年,该研究小组报道了用核壳型荧光纳米粒子为探针的快速(20分钟以内),高灵敏度(可以

检测到单个病原菌)定量检测病原菌-大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) 0157:H的方法。他们将纳米粒子标记到抗体上,通过抗原-抗体反应进行病原菌的识别[165-166]。

此类核壳型荧光纳米微粒仍然存在缺陷,如背景干扰严重,Stokes位移较近等等,依然需要人们的改进。

5. 上转换纳米粒子

上转换荧光纳米粒子是指可在长波长光激发下发出短波长光的发光粒子,是反Stokes效应[167]。它一般采用镱(Yb^{3+})作为敏化剂,铒(Er^{3+})、铥(Tm^{3+})、钬(Ho^{3+})作为发光中心, $\text{Yb}^{3+}\text{-Er}^{3+}$, $\text{Yb}^{3+}\text{-Tm}^{3+}$ 或 $\text{Yb}^{3+}\text{-Ho}^{3+}$ 必须成对存在。

荷兰的Tanke小组率先开展了上转换荧光粒子作为生物分子探针的研究工作。1999年他们将粒径为200~400 nm,经过表面修饰上的转换荧光粒子进行荧光成像观察[168]。后来他们又将上转换荧光粒子作为标记物应用于DNA芯片的荧光检测[169-170]以及DNA捕捉。在国内,清华大学陈德朴教授的研究组在提高上转换纳米粒子荧光量子产率等方面做了许多有益的探索和研究[171-172]。

6. 生物大分子纳米粒子

自血清类蛋白质纳米粒子于1978年被报道[173]以来,人们将研究主要集中在两个方面:一、作为药物载体;二、制备工艺的优化。第一个方面,Langer等通过调整pH值,在其表面进行硫醇化和mPEG修饰,获得预定平均大小的微粒和窄的粒径分布(<300nm),同时提高了蛋白质纳米微粒在体内的主动靶向性;第二个方面,Weber[174]发现脱水剂在去溶剂化过程中可以控制微粒大小,其稳定性需要用热变性法解决。我们实验组发现利用去溶剂法制得荧光增强的牛血清白蛋白纳米粒子,研究发现:该纳米粒子可以选择性识别fsDNA,并对其作用机理进行了深入探讨,发现是串珠型[135]。

壳聚糖是甲壳素部分脱乙酰化而得到的一种直链大分子生物多糖[175],其可以通过静电作用与其它物质形成纳米粒子,经过表面修饰具有水溶性,可以作为蛋白质的药物载体[176-178]。陈艳晶[179]等研究了壳聚糖与DNA分子的相互作用,

认为二者通过氢键疏水作用力以及静电作用结合。利用光散射法实现了对核酸的测定。

7. 纳米生物复合探针

纳米技术与生物技术结合的优势日趋明显, 纳米生物复合探针有传统探针无法比拟的优越性而越来越受到人们的重视和关注[180]。例如: 纳米金通过静电吸附抗体, 与寡核苷酸共价结合制备双标记纳米金生物探针, 斑点免疫和杂交实验证明, 纳米金表面标记的IgG和SS-DNA具有良好生物学活性。双标记纳米金生物探针在超微量蛋白质的检测中具有应用价值[181]。纳米金-DNA和纳米金-DNA-蛋白质复合探针也已开发出来, 这些探针可以用于核酸的检测, 而后者亦可以用于蛋白质的检测[182, 183]。

Kawaguchi研究小组[184-185]利用热敏性的甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)和N-异丙基丙烯酰胺(NIPAM)的共聚微凝胶为核, 在核表面原位合成金纳米粒子, 形成了PGMA/PNIPAM/Au和PGMA/PNIPAM/Au/Ag多层核-壳结构复合微球, 制备得到的负载有纳米金属的多层核-壳的杂化微凝胶表现出丰富多彩的颜色, 而且通过调节纳米粒子的尺寸, 杂化微凝胶的颜色变化是可逆的。Xu等[186]在水相中合成了含有聚N-异丙基丙烯酰胺/聚乙烯亚胺(PNIPAM/PEI)的核-壳结构微凝胶, 然后利用金纳米颗粒与氨基的配位作用将其组装于微凝胶表面, 得到PNIPAM/PEI/Au三组分杂化微凝胶。另外, 若以两种不同组分单体合成的共聚微凝胶为模板, 无需通过表面改性或修饰处理, 在其壳层和外壳层实施相应的反应, 可以得到多种含有不同组分的核-壳复合微球材料。

张捷等[187]研究了富勒烯(C_{60})对聚合酶链式反应(PCR)的影响。随着 C_{60} 浓度的增加, PCR扩增被显著抑制。 C_{60} 一方面会抑制DNA聚合酶的活性, 且浓度越高, 抑制作用越大, 另一方面又会损伤DNA单链模板, 降低DNA单链模板起始浓度, 从而造成PCR产物量的降低。有机荧光体与单壁碳纳米管非共价作用产生强的荧光猝灭, 杨荣华等基于荧光多肽与单壁碳纳米管自组装原理构建了荧光增强型生物传感探针, 实现了对单碱基错配DNA的检测[188]。我们课题组研究了量子点对染料-核酸体系的荧光增强和增稳作用, 应用L-Cys-NZnS与桑色素体系加入核酸后荧光增强效应, 进行对核酸的测定[189]。

纵观之,随着纳米生物技术的不断进步,生物分析新技术必将随之发展壮大。

第四节 金霉素性质及测定方法

1948年由Duggar[190]等从金色链霉菌(*Streptomyces aureofaciens*)中分离出了第一个天然四环素类抗生素金霉素。其作用机制主要是抑制细菌蛋白质的生物合成。

由于金霉素在制备过程中异物污染的可能性较大以及性质不稳定,其分解产物常使其失效,金霉素的测定一直是医疗以及生物领域的重点研究。金霉素分子结构中含有两个酚基和烯醇基的共轭双键体系,可直接应用紫外分光光度法测定含量[191]。目前测定金霉素、土霉素、四环素时按照国标 GB/T5009.116-2003 方法,色谱柱: ODC-C18(5 微米)6.2mm*15cm,流动相: 乙腈+0.01mol/L 磷酸二氢钠(用30%硝酸调 pH 2.5) =35+65。

金霉素中含有 C₁₁、C₁₂, β -一二酮系统,本身荧光较弱,与一些金属离子如铝、钙、镁等反应时形成螯合物,能大大提高荧光强度,可用于金霉素的荧光测定[192]。魏小琴等[193]利用共振光散射的方法对金霉素进行了测定。

王珉[194]等发现在 CTMAB 中加入金霉素完全碱解产物异金霉素可以使荧光增强,并在一定范围内荧光增强程度与异金霉素浓度呈线性关系,以此实现对金霉素的测定。

在硫酸介质中, $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ - KMnO_4 - $\text{Mn}(\text{II})$ 体系能与金霉素反应产生化学发光,发光强度与金霉素的浓度成正比,其线性范围为 $4.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$ [195],将金霉素碱解成异金霉素,然后与 $[\text{Cu}(\text{HIO}_6)_2]^{5-}$ 发生作用,线性范围是 0.1-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$,检测限为 $5.3 \times 10^{-8} \text{ g mL}^{-1}$ [196]。

用ODS色谱柱,370nm处测定猪粪便中的金霉素,检出限为 3.5 mg kg^{-1} [197],人们将金霉素碱解,然后色谱分离,得到355/389nm处的信号,线性范围是 $0.02 \sim 4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ [198]。

金霉素的测定方法必将随着生命科学的发展而发展。

第五节 本论文的研究目的和研究内容

1. 研究目的

对核酸和蛋白质光谱探针的研究与应用一直是人们的焦点。目前,对分析化学的研究来说,新技术的开发,灵敏的、稳定的、低毒无毒的光谱探针的研制是非常重要的和有意义的工作。

本论文的研究目的是在前人研究基础上,建立核酸和蛋白质灵敏、快速和简便的分析方法,探讨纳米粒子与核酸、蛋白质之间的相互作用机理。

2. 研究内容

(1) 研究了金霉素-纳米金-核酸体系的共振光散射光谱特性,对实际样品中核酸含量进行了测定,提出了该体系的作用机理。

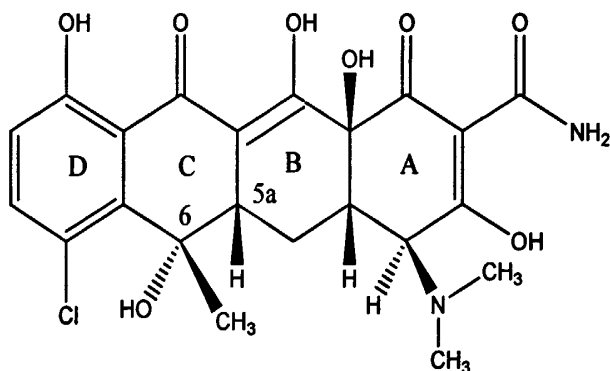
(2) 研究了异金霉素-纳米金-核酸体系的荧光特性,用于拟南芥中核酸的定量测定,并对该体系的作用机理进行了探讨。

(3) 研究了亚甲基兰-十二烷基苯磺酸钠-蛋白质体系的同步荧光增强效应,对实际样品进行了测定,利用紫外吸收光谱、圆二色光谱等多种实验技术探讨了该体系的机理。

第2章 金霉素-纳米金-核酸共振光散射体系的研究及分析应用

纳米金具有较好的免疫活性、催化活性、光电特性等等。其在生物分子的检测中具有较高的选择性和灵敏度，应用前景广阔。

金霉素是四环素类抗生素中的一种，其结构如 **Scheme 1** 所示。其临床主要用于治疗支原体、衣原体、立克次体和布氏杆菌等致病原引起的交叉感染或混合感染，如肺炎支原体感染、泌尿生殖道感染、早期霍乱、流行性麻疹伤寒等[199]。



Scheme 1 The structure of chlortetracycline

金霉素以游离和盐类形式存在时比较稳定，水溶液中对酸、碱和各种氧化剂均不稳定，容易发生差向异构化和降解反应。在 $\text{pH} < 2$ 时，金霉素 6 位上的-OH 和 5a 上的氢发生消去反应。

本文对金霉素-纳米金-核酸体系的相互作用进行了研究。研究表明，当向金霉素-纳米金中加入核酸时，体系的共振光散射强度显著增强，其增强程度与核酸在一定范围内成良好的线性关系，从而建立了测定核酸的新方法。机理研究表明：纳米金-金霉素与核酸之间发生长距组装作用，导致了共振光散射强度的增强。

1. 实验部分

1.1 试剂

金霉素标准液(CTC, $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$): 准确称取 0.0224g 金霉素(中国药品生物制品检定所)溶于 40 mL 1.0 mol L^{-1} 稀盐酸中，定容至 50mL，该溶液需要避光储存在 $0-4^\circ\text{C}$ 的冰箱中。

鲑鱼精子脱氧核糖核酸(fsDNA, Sigma 公司)($1.0 \times 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$): 准确称取 fsDNA 0.0100 克于小烧杯中, 用 0.05 mol L^{-1} NaCl 溶液将其溶解, 然后转移到 100mL 的容量瓶中, 用 0.05 mol L^{-1} NaCl 溶液定容至刻度。静置一周后使用, 使用时用蒸馏水逐级稀释。

酵母核糖核酸储备液(yRNA, Sigma 公司)($1.0 \times 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$): 配制同 fsDNA。静置一周后使用。

鲑鱼精子脱氧核糖核酸(smDNA, Sigma 公司)($1.0 \times 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$): 配制同 fsDNA。静置一周后使用。

小牛胸腺脱氧核糖核酸(ctDNA, 北京华美生物工程公司)($1.0 \times 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$): 配制同 fsDNA。

金纳米粒子溶液($1.0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$): 量取 5 mL 0.1% HAuCl_4 (国药集团化学试剂有限公司) 溶于 40 mL 超纯水中, 搅拌加入 2 mL 柠檬酸三钠溶液(1%), 煮沸 10 分钟, 定容至 50 mL。该溶液需要储存在 $0-4^\circ\text{C}$ 的冰箱中。

所有试剂均为分析纯, 用三次蒸馏水配制。

1.2 仪器

LS-55 荧光/磷光/发光分光光度计(PE, 美国);

U-4100 紫外吸收分光光度计(Hitachi, 日本);

SZCL 数显智能控温磁力搅拌器(予华, 巩义);

Delat320-S 型 pH 酸度计(Mettler Toledo, 上海);

JASCO J-810 圆二色光谱仪(日本)。

1.3 实验过程

于 10mL 比色管中加入 0.5 mL 缓冲溶液, 20 μL AuNPs, 90 μL CTC, 100 μL fsDNA, 用三次蒸馏水定容至 5mL 刻度, 振荡摇匀, 放置 15min。用 1cm 荧光比色池, 激发和发射狭缝宽度分别为 10nm 和 2.5nm, 波长扫描速度为 1000nm/min, 以 $\Delta\lambda=0$ 测定核酸加入前后体系的共振光散射强度, $\Delta I_{\text{RLS}} = I_{\text{RLS}}^0 - I_{\text{RLS}}$ (I_{RLS}^0 和 I_{RLS} 分别表示核酸加入前后金霉素纳米金体系的共振光散射强度, $\Delta I_{\text{RLS}} = I_{\text{RLS}}^0 - I_{\text{RLS}}$)。

2. 结果与讨论

2.1 共振光散射光谱

体系的共振光散射光谱如图1所示,由图1可以看出,核酸能够增强金霉素的共振光散射强度,其最大散射峰位于360 nm;纳米金也能够增强CTC的共振光散射强度,但其最大散射峰位于390 nm附近;将纳米金加入到金霉素-核酸中,CTC-fsDNA 体系的共振光散射强度得到进一步增强,这说明AuNPs, CTC, 核酸之间存在相互作用。因此,选用AuNPs-CTC 作为共振光散射探针对抗菌肽进行进一步研究。

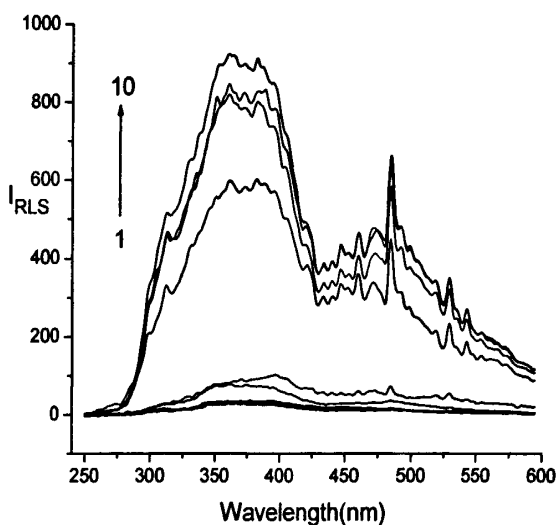


Fig. 1 Resonance light scattering spectra

1. CTC; 2. fsDNA; 3. AuNPs; 4. AuNPs - fsDNA; 5. CTC-fsDNA
6. AuNPs-CTC; 7. AuNPs-CTC-yRNA; 8. AuNPs-CTC-smDNA
9. AuNPs-CTC-fsDNA; 10. AuNPs-CTC-ctDNA

Conditions: CTC: $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; AuNPs: $2.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; fsDNA: $2.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$; citric acid -sodium citrate (pH=4.13).

2.2 实验最佳条件的选择

2.2.1 pH 值的影响和缓冲溶液的选择

溶液 pH 对体系共振光散射强度的影响如 Fig. 2 所示。由 Fig. 2 可见，当溶液的 pH 在 3.49—4.70 范围内时，体系的 ΔI_{RLS} 达到最大并保持基本稳定。在本文中，固定 pH 为 4.13 ± 0.05 ，研究了不同缓冲溶液 citric acid - sodium citrate, Na_2HPO_4 —citric acid, NaAc—HAc, formic acid-NaOH 和 B-R 对体系共振光强度的影响，以 citric acid - sodium citrate 的共振光散射强度增强程度为 100，如 Table 1 所示。结果表明，citric acid -sodium citrate 的效果最好(0.5 mL)。

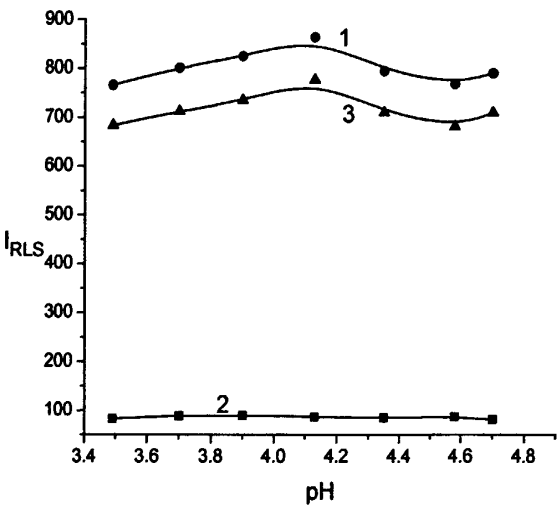


Fig. 2 Effect of pH

1: I_{RLS} ; 2: I_{RLS}^0 ; 3: ΔI_{RLS}

Conditions: CTC: $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; AuNPs: $2.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; fsDNA: $2.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$; citric acid - sodium citrate.

Table 1 Choice of buffer solution

Buffers	Citric acid-sodium citrate	Na_2HPO_4 -citric acid	B-R	formic acid-NaOH	NaAc—HAc
$\Delta I_{RLS}(\%)$	100	95.3	93.0	94.7	80.9

2.2.2 金霉素浓度的影响

改变金霉素溶液的浓度,测定体系的共振光散射强度变化,结果如 Fig. 3 所示。由 Fig. 3 可以看出,当金霉素溶液浓度在 $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 时,体系的共振光散射强度达到最大,浓度继续增加,其共振光散射强度逐渐降低。因此,本文固定金霉素溶液的浓度为 $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 做进一步研究。

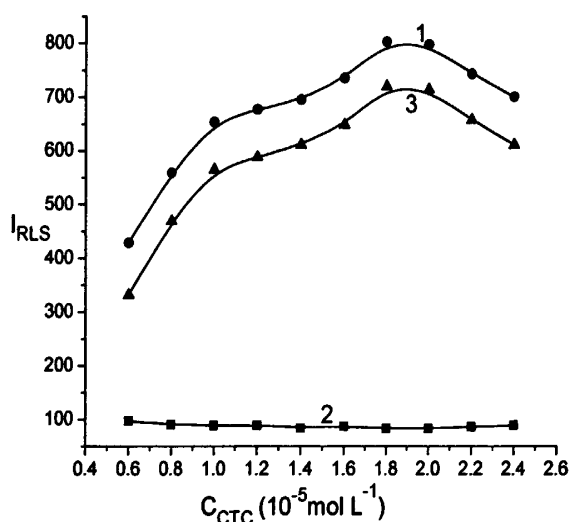


Fig. 3 Effect of the concentration of CTC

1: I_{RLS} ; 2: I_{RLS}^0 ; 3: ΔI_{RLS}

Conditions: AuNPs: $2.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; fsDNA: $2.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$;
citric acid -sodium citrate(pH=4.13).

2.2.3 纳米金浓度的影响

研究了纳米金对体系共振光散射强度的影响,结果表明随着纳米金浓度的增大,纳米粒子增多,空白的共振光散射强度增大,当纳米金的浓度达到 $2.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$ 时体系的 ΔI_{RLS} 达到最大,同时体系的空白很小。故本文中选择纳米金的浓度为 $2.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$ 。

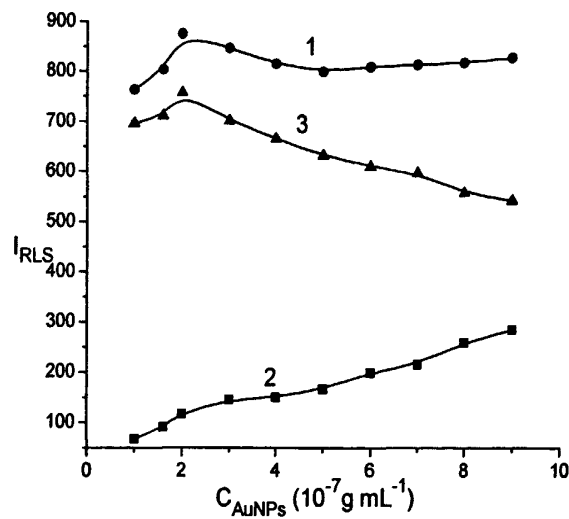


Fig. 4 Effect of the concentration of AuNPs

1: I_{RLS} ; 2: I_{RLS}^0 ; 3: ΔI_{RLS}

Conditions: CTC: $1.8 \times 10^{-5} mol L^{-1}$; fsDNA: $2.0 \times 10^{-6} g mL^{-1}$;
citric acid - sodium citrate(pH=4.13).

2.2.4 试剂加入顺序的影响及稳定性实验

在选定的实验条件下,实验了不同试剂加入顺序对体系 ΔI_{RLS} 的影响,如 Table 2 所示。结果表明,试剂的加入顺序对体系的共振光散射强度影响较大,其最佳加入顺序为 citric acid -sodium citrate(pH=4.13), AuNPs, CTC, fsDNA。

在最佳实验条件下,研究了反应时间和稳定性的关系,结果表明该体系孵育 15 分钟后其 ΔI_{RLS} 达到最大,并且在 2.5 个小时内保持基本不变。因此该体系具有较好的稳定性。

Table 2 Effect of adding sequence

Adding	sequence	$\Delta I_{RLS}(\%)$
Buffer+AuNPs+CTC+fsDNA		100
Buffer+AuNPs+fsDNA+CTC		87.2
Buffer+fsDNA+CTC+AuNPs		91.0
Buffer+fsDNA+AuNPs+CTC		85.7
Buffer+CTC+AuNPs+fsDNA		88.9
Buffer+CTC+fsDNA+AuNPs		97.4
fsDNA+CTC+AuNPs+Buffer		43.3.
fsDNA+AuNPs+CTC+Buffer		39.9
CTC+AuNPs+fsDNA+Buffer		49.1
CTC+fsDNA+AuNPs+Buffer		45.1
AuNPs+fsDNA+CTC+Buffer		63.2
AuNPs+CTC+fsDNA + Buffer		55.9

Conditions: CTC: $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; AuNPs: $2.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; fsDNA: $2.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$; citric acid -sodium citrate (pH=4.13).

2. 2. 5 干扰实验

在最佳实验条件下，固定 fsDNA 的浓度为 $5.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$ ，对常见的氨基酸及其它生物分子等干扰物质的影响进行了实验。在相对误差 $\pm 5\%$ 内，上述物质所允许的最大浓度如 Table 3 所示。结果表明，大部分氨基酸和金属离子对该体系的干扰较小。

Table 3 Interference from foreign substance

Foreign substance	Concentration coexisting $\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	Change of $I_{\text{RLS}}(\%)$
K^+, Cl^-	30	-4.3
Na^+, Cl^-	50	-5.1
$\text{Ca}^{2+}, \text{Cl}^-$	13	-3.7
$\text{Na}^+, \text{SO}_4^{2-}$	15	-5.1
$\text{Zn}^{2+}, \text{Cl}^-$	6.0	3.5
$\text{Fe}^{3+}, \text{Cl}^-$	0.25	4.7
$\text{Fe}^{2+}, \text{SO}_4^{2-}$	0.5	4.1
$\text{Cu}^{2+}, \text{SO}_4^{2-}$	0.7	3.8
$\text{Mg}^{2+}, \text{SO}_4^{2-}$	10.0	3.9
Trp	20	-4.0
Cys	45	-4.0
Pro	18	-4.3
DL-Glu	14	4.5
Tyr	12	4.8
L-His	21	-4.9
L-Asp	9.0	5.0
L-Phe	95	-4.6
GMP	3.0	5.0
AMP	5.0	4.8
CMP	35	-3.8
UMP	23	-4.6
TMP	48	-4.0
BSA	$0.45 \mu\text{g mL}^{-1}$	-3.9
EA	$0.10 \mu\text{g mL}^{-1}$	-4.3

Conditions: CTC: $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; AuNPs: $2.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; fsDNA: $5.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; citric acid - sodium citrate (pH=4.13).

2.3 分析应用

2.3.1 工作曲线与检出限

在最佳实验条件下，建立了核酸的浓度与 ΔI_{RLS} 之间的线性关系，并进行了回归分析，其结果如 Table 4 所示；在线性范围内选定核酸浓度为 $2.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$ ，测定该体系的共振光散射强度，求得 7 次的相对标准偏差为：RSD= 0.5%。可以看出该方法具有较高的灵敏度和稳定性。

Table 4: Analytical parameters of this method

Nucleic acid	Linear range(g mL ⁻¹)	r ^a	LOD ^b (ng mL ⁻¹)
fsDNA	5.0×10^{-8} - 1.5×10^{-5}	0.999	1.2
smDNA	6.0×10^{-8} - 1.0×10^{-5}	0.998	1.5

a: Correlation coefficient b: limit of detection

2.3.2 实际样品测定

用标准加入法测定了实际样品拟南芥中核酸的含量。实际样品按照 CTMAB 法由拟南芥的粒状胚芽中提取。由 Biophotometer(Eppendorf Co.)仪器测得样品中 DNA 的含量为 $700 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ，样品稀释 2000 倍后用本法检测。五次测得的平均值为 690 g/mL ，相对标准偏差为 2.8%(n=5)。由此可以认为本法适用于实际样品中痕量核酸的定量测定。

3. 机理探讨

3.1 紫外吸收光谱

体系的紫外吸收光谱如 Fig. 5 所示。由 Fig. 5 (a) 可以看到，CTC 在 275 nm 和 450nm 处有两个较强的吸收峰，根据共振光散射理论，散射光谱中 360nm 处共振光散射峰来自于金霉素在 275nm 和 450nm 的分子吸收带。

加入 fsDNA 后，CTC 在 275 nm 和 450nm 处的吸收峰的强度略有降低但吸收峰没有移动；在 Fig. 5 (b) 中可以看出在 CTC-AuNPs 中加入 fsDNA 时，CTC-AuNPs 在 275 nm 和 450nm 处的吸收峰强度有所增强且并没有发生显著红移。根

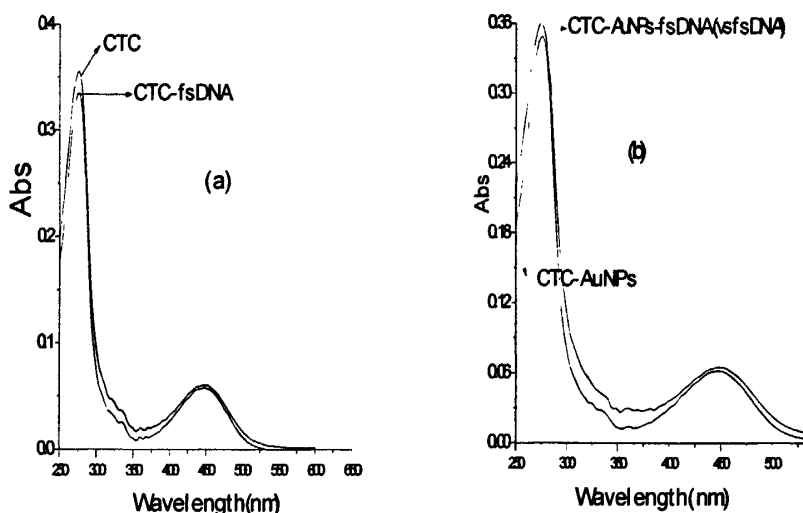


Fig. 5 Absorption spectra of the system

Conditions: CTC: $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; AuNPs: $2.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; fsDNA: $2.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$; citric acid-sodium citrate(pH=4.13).

据文献, 当小分子与 DNA 之间存在嵌入式结合方式时, 在吸收光谱中会出现随着 DNA 的加入引起小分子的吸收光谱红移和减色效应[200]。由此我们认为, CTC-AuNPs 与 DNA 之间不是插入式结合作用。

3.2 核酸构象的变化

圆二色谱 (CD 谱) 对手性分子的内部构象变化十分敏感, 近年来已被成功应用到生物大分子构象变化的研究[201-203], CD 谱可以提供核酸的一级结构信息。已知核酸 CD 光谱图中 275 nm 处强的正峰是由于 DNA 的碱基对堆积而产生的, 在 245 nm 处的负峰是由于 DNA 的双螺旋结构而产生的。

由 Fig. 6 可见, 当 CTC 加入到 fsDNA 中时, 正峰强度有所降低, 这主要是由于 CTC 对 fsDNA 碱基发生堆积; 当 AuNPs 加入到 fsDNA 中时, fsDNA 的碱基堆积以及螺旋结构均发生变化。当三者共存时, fsDNA 的正峰和负峰强度均显著增强, 并向短波方向移动, 且负峰的变化程度大于正峰, 说明 CTC-AuNPs 对 fsDNA 的螺旋度的影响大于碱基堆积程度。

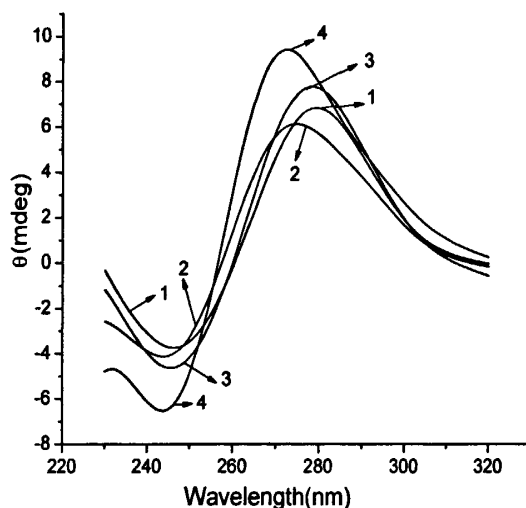


Fig. 6 the CD spectra of CTC-AuNPs and DNA system

(1) fsDNA; (2) CTC-fsDNA; (3) AuNPs-fsDNA; (4) CTC-AuNPs-fsDNA

Conditions: CTC: $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; AuNPs: $2.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; fsDNA: $5.0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$; citric acid - sodium citrate (pH=4.13).

3.3 离子强度影响

NaCl溶液中的 Na^+ 可以与DNA主链上的磷酸根基团之间发生静电作用,这种作用会影响DNA的双螺旋结构,降低其解旋能力,进而影响反应体系的共振光散射强度。文献认为[205-206] 在低离子浓度,当有机小分子与核酸的摩尔比达到一定值时,有机分子将会在核酸表面进行长距组装,诱导核酸超螺旋结构的形成。而有机分子在核酸表面进行排列、堆积,会导致共振光散射强度的增强。

Fig. 7可以看出, CTC- AuNPs体系共振光散射强度受盐离子浓度的影响不大,而CTC- AuNPs-fsDNA 体系的共振光散射强度则随着盐离子浓度的增加而出现明显的变化。当NaCl浓度低于 $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 时,随着其浓度的增加, DNA解旋能力降低,更有利于CTC-AuNPs在核酸表面的长距组装,诱导超螺旋结构的生成;而NaCl浓度大于 $2.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 时,随着其浓度的增加,核酸螺旋结构趋于稳定,

CTC-AuNPs在核酸表面进行排列、堆积达到饱和，因此共振光散射强度增强程度趋于稳定。

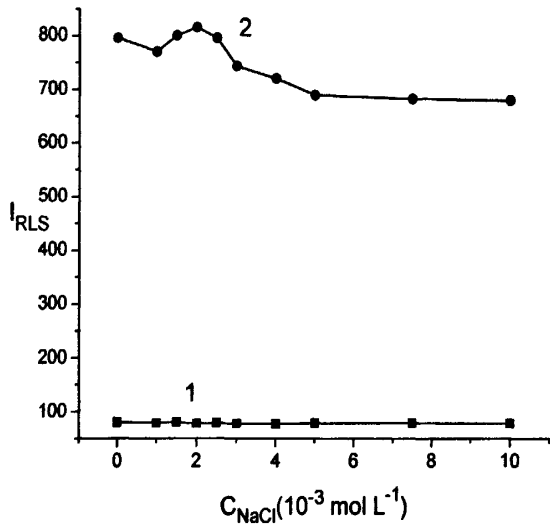


Fig. 7 Effect of ionic strength on the system

1. CTC-AuNPs; 2. CTC- AuNPs -fsDNA;

Conditions: CTC: $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; AuNPs: $2.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; fsDNA: $2.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$; citric acid-sodium citrate(pH=4.13).

3.4 DNA 变性实验

通过控制 DNA 的变性温度，研究了核酸与金霉素和纳米金之间的作用。将两份 fsDNA 样品（A 和 B），A 保持在室温下；将 B 在 100°C 下加热 5 分钟，然后用冰水冷却 10 分钟，置于室温。这样处理后 A 是自然状态下的 DNA，具有丰富的螺旋结构，B 是完全变性后的 DNA，其双链结构完全破坏，不具有螺旋结构。

DNA 的变性实验如 Fig. 8 所示。由图可知，经完全变性后的 fsDNA 对 CTC-AuNPs 共振光散射强度也有增强作用，但增强作用不及自然状态下的 fsDNA。我们认为：单链的 fsDNA 与 CTC-AuNPs 之间也存在长距组装作用，但是没有自然状态下 fsDNA 增强效果明显，说明 CTC-AuNPs 在核酸表面的长距组装作用受到核酸双螺旋结构的影响。

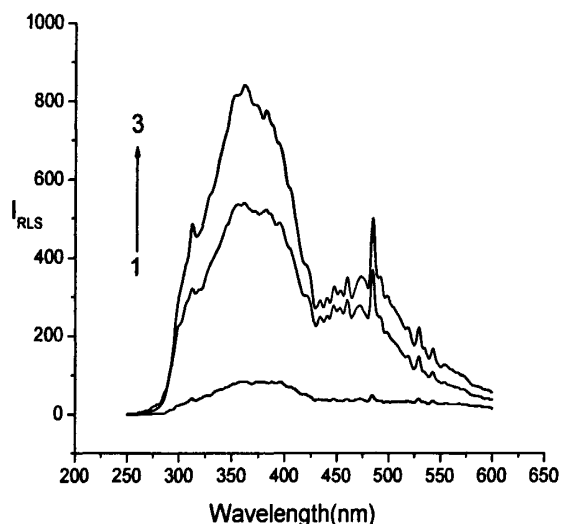


Fig. 8 the fluorescence of CTC- AuNPs in melting experiment

1. CTC-AuNPs; 2. CTC- AuNPs -fsDNA (B); 3. CTC- AuNPs -fsDNA (A)

Conditions: CTC: $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; AuNPs: $2.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; fsDNA: $2.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$; citric acid -sodium citrate(pH=4.13).

3.5 透射电镜(TEM)

由体系的 TEM 图(Fig. 9 a)可以看出, 柠檬酸钠还原法制得的纳米金的颗粒分散比较均匀, 且粒径比较小, 在 10nm 左右; 当加入金霉素后, 两者之间发生了部分聚集, 粒径变大(Fig. 9 b)。从 Fig. 9 c 可以看出, 在还原以后的纳米金中, 加入 fsDNA 后, 纳米金附着在核酸上, 产生吸附作用。Fig. 9 d 显示出, 当三者混合时, CTC-AuNPs 以核酸为模板, 附着在核酸表面, 三者形成较大聚集体。

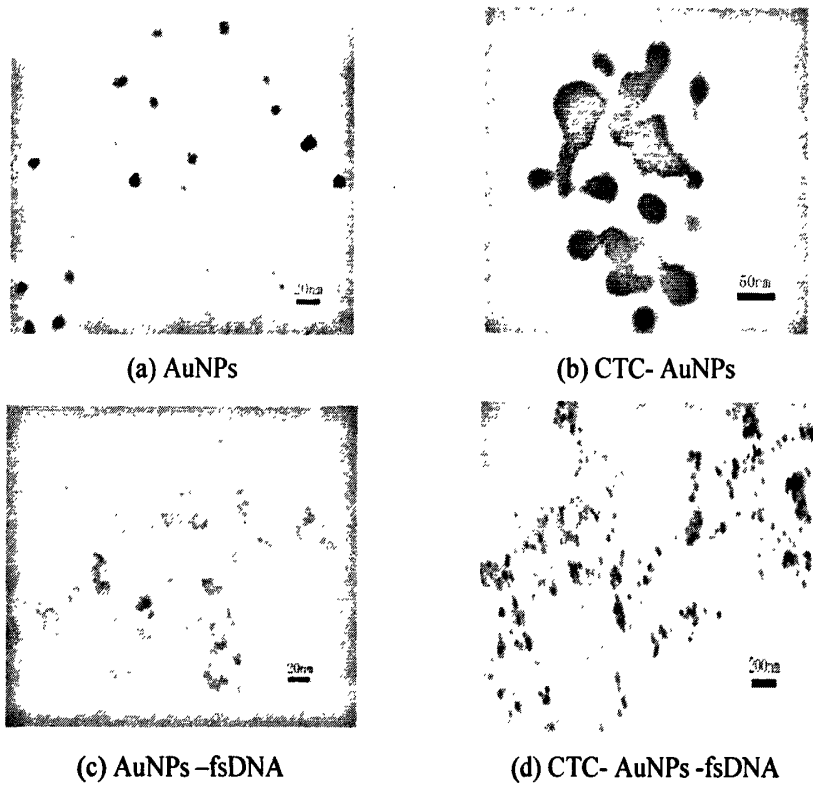


Fig. 9 Transmission electronic microscopy

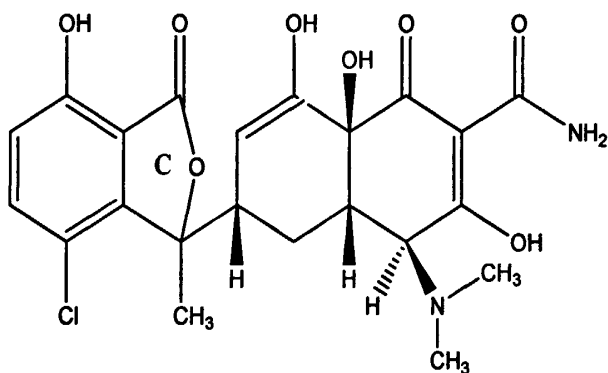
4. 结论

本章研究了金霉素-纳米金-核酸体系的共振光散射增强效应，建立了测定核酸的新方法。该方法具有灵敏度高，稳定性好的优点。机理研究表明，纳米金-金霉素与核酸之间发生长距组装作用，导致了共振光散射强度增强。

第3章 纳米金-异金霉素-核酸体系的荧光猝灭效应及分析应用

金霉素是含有四并苯或萘并苯的衍生物,属四环素类抗生素。临床主要用于治疗支原体、衣原体、立克次体和布氏杆菌等致病原引起的感染或混合感染,如肺炎支原体感染、泌尿生殖道感染、早期霍乱、流行性麻疹伤寒等。

金霉素以游离和盐类形式存在时比较稳定,水溶液中对酸、碱和各种氧化剂均不稳定,容易发生差向异构化和降解反应。在强碱中发生碱解反应,生成内酯结构化合物异金霉素,异金霉素的荧光强度大于金霉素,如 Scheme 1 所示。



Scheme 1 The structure of Isochlorotetracycline

本文对异金霉素-纳米金-核酸体系的相互作用进行了研究。研究表明,当向异金霉素-纳米金中加入核酸时,体系的荧光强度降低,其降低程度与核酸在一定范围内成良好的线性关系,从而建立了测定核酸的新方法,并通过圆二色光谱、紫外吸收光谱等手段研究了体系的相互作用机理。研究表明,纳米金-异金霉素与核酸之间存在沟槽式和静电式结合方式。

第一节 纳米金-异金霉素体系的研究及分析应用

金霉素不仅用于预防和治疗畜禽疾病,也可用于癌症的诊断和治疗[207]。但它对人体有一定的毒副作用,容易引起胃部不适,如恶心、呕吐、上腹饱胀及食欲减退等。目前,金霉素被用在动物等的疾病治疗,因此在动物和鱼类产品中残留量受到严格控制,而现有的分析技术有其局限性,故金霉素的痕量分析仍是一项重要的工作。

目前,纳米粒子与金霉素的研究工作只是采用共振光散射的方法[208]。而纳米金对金霉素的荧光强度的影响较小,因此我们将金霉素碱解,利用纳米金对其碱解产物—异金霉素的荧光增强效应来实现对金霉素的定量测定。

1. 实验部分

1.1 试剂

金纳米粒子溶液($1.0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$): 取 5 mL 0.1% HAuCl_4 (国药集团化学试剂有限公司)溶于 40mL 过 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜超纯水中,加热 5 分钟后,搅拌加入 2 mL 柠檬酸三钠溶液(1%),煮沸 10 分钟,定容至 50mL。该溶液需要储存在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 的冰箱中。

异金霉素标准液(iCTC, $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$): 准确称取 0.0224g 金霉素(中国药品生物制品检定所)溶于 40mL 氢氧化钠溶液 (0.25 mol L^{-1})中,搅拌煮沸 25 分钟,用 $1.0 \times 10^{-1} \text{ mol}$ 的稀 HCl 调 pH 值于 7.00,定容至 50mL,该溶液需要储存在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 的冰箱中。

所有试剂均为分析纯,用三次蒸馏水配制。

1.2 仪器

LS-55 荧光/磷光/发光分光光度计(美国, PE);

UV-4100 紫外吸收分光光度计(日本, Hitachi);

透射电子显微镜: JEM100-CXII(JEOL);

SZCL 数显智能控温磁力搅拌器(予华, 巩义);

Delat320-S 型 pH 酸度计(Mettler Toledo, 上海)。

1.3 实验过程

于 10mL 比色管中加入 20 μL 纳米金溶液和适量异金霉素, 用三次蒸馏水定容至 5mL 刻度, 振荡摇匀, 放置 15min。激发和发射狭缝宽度均为 10 nm, 波长扫描速度为 500 nm/min, 用 1cm 荧光比色池, 分别以 313 nm 和 350 nm 为激发波长, 在发射波长 418 nm 处测定其荧光强度 $\Delta I_f = I_f - I_0$ (I_0 和 I_f 分别表示异金霉素加入前后体系的荧光强度)。

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱

体系的激发和发射光谱如 Fig. 1 所示。由 Fig. 1 中可以看出, 在波长 313 nm 和 350 nm 激发下, 异金霉素具有特征荧光峰, 最大发射峰在 418 nm 处。当加入纳米金粒子后, 异金霉素 350 nm 处的激发荧光强度得到增强, 而 313 nm 处激发荧光强度无明显变化。由此, 选择激发波长为 350 nm 来研究异金霉素与纳米金粒子的相互作用。

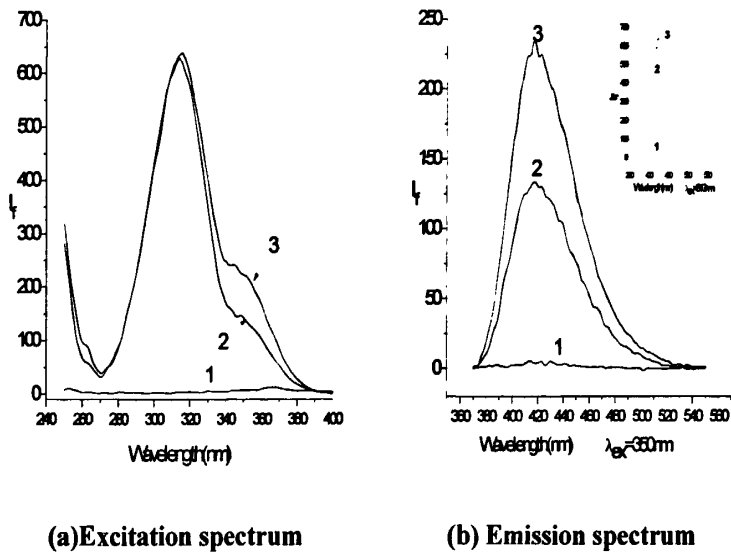


Fig. 1 Fluorescence Spectra

(1) AuNPs; (2) iCTC; (3) AuNPs-iCTC;

Conditions: AuNPs: $2.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; iCTC: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

2.2 实验最佳条件的选择

2.2.1 pH 值的影响和缓冲溶液的选择

溶液 pH 对体系荧光强度的影响如 Fig. 2 所示。由图可见，当溶液的 pH 在 6.80-7.20 范围内时，体系的 ΔI_f 达到最大并保持稳定。本文固定 pH 为 7.00，研究了不同缓冲溶液 Tris-HCl，HTMA-HCl，citric acid - Na_2HPO_4 和 B-R 以及不加缓冲溶液对体系荧光强度的影响如 Table 1。结果表明，不加缓冲效果好。

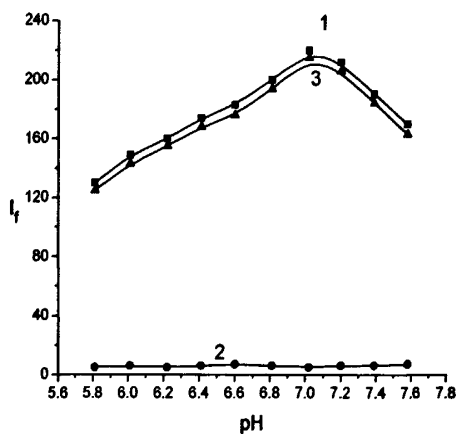


Fig. 2 Effect of pH

1: I_f ; 2: I_0 ; 3: ΔI_f

Conditions: AuNPs: $2.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; iCTC: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; Buffer: B-R.

Table 1 Choice of buffer solution

Buffers	Water	Tris-HCl	B-R	HTMA-HCl	Citric acid - Na_2HPO_4
$\Delta I_f(\%)$	100	90.2	94.1	56.3	50.7

2.2.2 纳米金浓度的影响

纳米金浓度对体系荧光强度的影响如 Fig. 3 所示。由图 3 可见，当纳米金的浓度在 $2.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$ 时，体系的 ΔI_f 达到最大且基本保持稳定。因此，固定纳米金的浓度为 $2.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$ 做进一步研究。

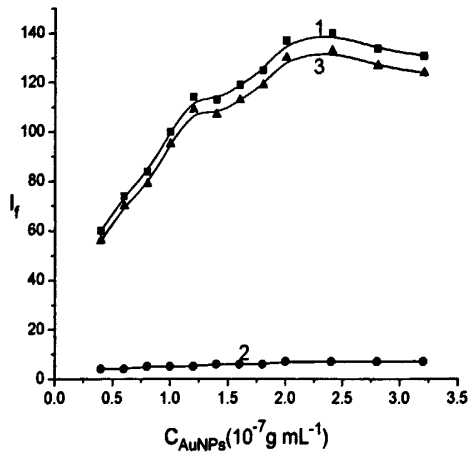


Fig. 3 Effect of the concentration of AuNPs

1: I_f ; 2: I_0 ; 3: ΔI_f

Conditions: iCTC: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

2.2.3 稳定性实验

在最佳实验条件下,研究了反应时间和稳定性的关系,结果表明,该体系孵育30分钟后其 ΔI_f 达到最大,并且在1.5小时内保持基本不变。

2.2.4 干扰实验

在 iCTC 浓度为 $5.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ 的条件下,研究了金属离子和氨基酸对体系荧光强度的影响。实验结果如 Table 2 所示。由实验结果可知,除了 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 及 Al^{3+} 有较大的影响之外,其它大部分的金属离子及氨基酸对体系的影响很小。

Table 2 Interference from foreign substances

Foreign substance	Concentration coexisting ($\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)	Change of I_f (%)
Na^+, Cl^-	42	-4.2
K^+, Cl^-	26	-3.8
$\text{Zn}^{2+}, \text{Cl}^-$	3.5	4.2
$\text{Fe}^{3+}, \text{Cl}^-$	0.2	4.5
$\text{Fe}^{2+}, \text{SO}_4^{2-}$	0.5	5.0
$\text{Na}^+, \text{CO}_3^{2-}$	20	-4.3
$\text{Ba}^{2+}, \text{Cl}^-$	8.0	4.3
$\text{Al}^{3+}, \text{NO}_3^-$	0.6	4.8
L-His	60	-3.2
Cys	$12(\mu\text{g mL}^{-1})$	-3.5
DL-Glu	$70(\mu\text{g mL}^{-1})$	-3.7

Conditions: AuNPs: $2.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; iCTC: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

2.3 分析应用

2.3.1 工作曲线与检出限

在最佳实验条件下，建立了异金霉素的浓度与体系荧光强度的增加程度 ΔI_f 之间的对应关系，并进行了线性回归分析，其结果如 Table 3 所示。

Table 3: Analytical parameters of this method

CTC	Linear range (mol L^{-1})	Linear regression equation (mol L^{-1})	r^a	LOD ^b (mol L^{-1})
CTC	$8.0 \times 10^{-9} - 1.2 \times 10^{-5}$	$\Delta I_f = 3.71 + 8.08 \times 10^7 C$	0.999	1.5×10^{-9}

a: Correlation coefficient

b: limit of detection

2.3.2 合成样品测定

利用标准加入法对合成样品进行了测定。对尿液中的金霉素进行检验，样品回收率在 98%~105% 之间。可以看出，本文提供的方法的精密度和准确度均比较满意。

3 机理探讨

3.1 异金霉素的形成

依据文献报道，金霉素在碱解时，C 环打开，转化成无活性化合物，该化合物具有内酯结构，在水中的吸光度会有所降低。Fig. 4 中可以看出，异金霉素碱解后与金霉素相比，吸收峰由 230 nm 和 270 nm 红移到 240 nm 和 280 nm 且吸收强度降低明显，而在 365 nm 处吸收峰完全消失，这是由于金霉素 C 环被碱性物质破坏的原因。

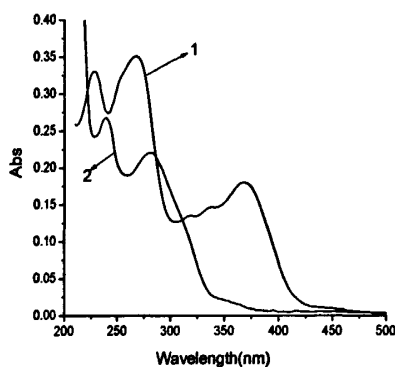


Fig. 4 Absorption spectra of CTC and iCTC

1: CTC; 2: iCTC

Conditions: CTC: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; iCTC: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

3.2 异金霉素与纳米金的相互作用

由 Fig. 5 可知，随着纳米金粒子浓度的不断增大，异金霉素的紫外吸收不断增强，且在 240 nm 和 285 nm 处的吸收峰均有蓝移现象，而在荧光光谱中随着纳米金粒子浓度的增加，荧光强度不再增强，且略有下降趋势。

柠檬酸钠还原法制备的纳米金颗粒，由于表面电子和溶液发生交换作用，使得纳米金表面带正电荷，它吸附溶液中的 OH^- 和柠檬酸根使其表面形成双电层

[104], 同时纳米金具有很大比表面积, 其表面能够与某些有机物形成共价键且具有吸附作用。我们认为异金霉素所含有的基团(羟基, 氨基)可以在纳米金表面发生吸附作用。根据理论[10], 荧光通常是发生在具有刚性结构和平面结构的 π 电子共轭体系分子中, 随着 π 电子共轭度和分子平面度的增加, 荧光量子产率也将有很大程度的增加。当荧光物质表面接近贵金属表面时会导致偶极的变化而改变发射比率、空间分布和能量辐射。荧光团振动偶极受到贵金属场的感应会导致荧光团入射场的变化, 从而引起辐射衰变比率的变化。异金霉素分子吸附到纳米金表面, 一方面使异金霉素的刚性化程度有所增加, 提高荧光量子产率; 另一方面由于吸附的作用, 显著降低了异金霉素分子与分子、异金霉素分子与纳米金表面之间由于碰撞过程所导致的荧光猝灭效应。

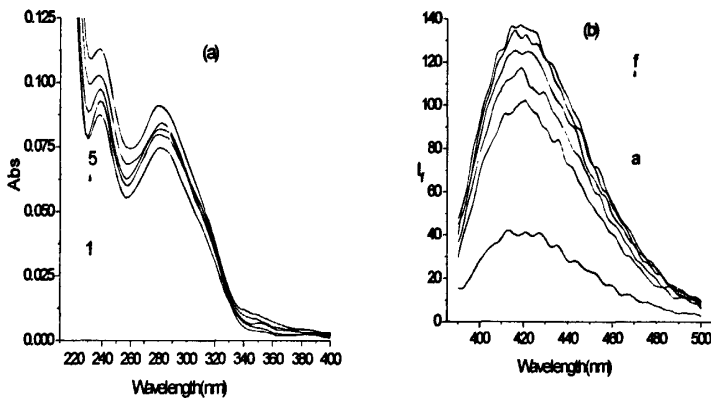


Fig. 5 Absorption and fluorescence spectra of iCTC and AuNPs

(1)–(5) The concentrations of AuNPs are 0.0, 2.0×10^{-7} , 3.0×10^{-7} , 4.0×10^{-7} and $5.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$, respectively.

(a)–(f) The concentrations of AuNPs are 0.0, 1.0×10^{-7} , 1.6×10^{-7} , 2.0×10^{-7} , 3.0×10^{-7} and $3.5 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$, respectively.

Conditions: iCTC: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

随着加入纳米金溶液量的增加, 其荧光增强作用表现为从逐渐增强到基本稳定。可认为其主要原因是: 异金霉素量是一定的, 其弛豫过程中过剩能量转移到了纳米金表面, 同时随着溶液中纳米金浓度的增加和分子间的碰撞增强, 纳米金与异金霉素的激发态分子之间发生电荷转移加剧。

3.3 纳米金的紫外吸收光谱

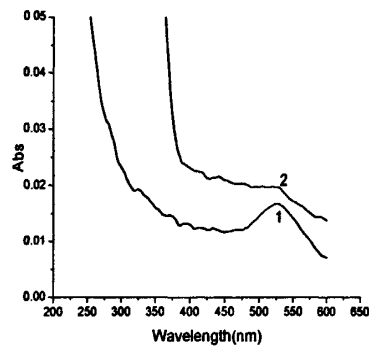


Fig. 6 Absorption spectra of AuNPs.

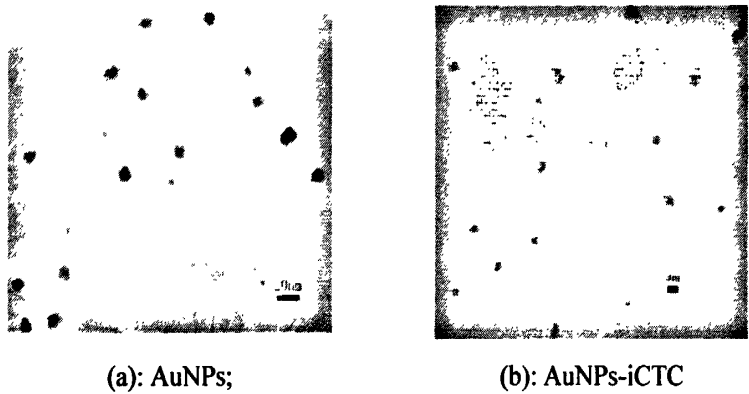
1: AuNPs; 2: AuNPs-iCTC

Conditions: AuNPs: $2.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$; iCTC: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$

Fig. 6 中纳米金颗粒在 520 nm 出现吸收峰，为纳米金的等离子体共振吸收，异金霉素加入导致其吸收度显著增加，基线升高，认为可能是发生纳米金表面对异金霉素吸附所引起的。下面的 TEM 可以证实。

3.4 透射电镜(TEM)

从电镜照片(Fig. 7)中可以看出，合成的纳米金大小均匀，分散性良好，粒径大小在 10nm 左右，这跟文献报道相一致。加入异金霉素后，发现粒径显著变化，为 25nm 左右，且具有良好的分散性。这与异金霉素和纳米金发生了表面吸附作用的结论相一致。



(a): AuNPs; (b): AuNPs-iCTC

Figure 7 The TEM images of AuNPs and iCTC

4 结论

本节研究了异金霉素-纳米金体系的荧光增强效应，建立了测定金霉素的新方法。机理研究表明，纳米金-异金霉素之间发生了表面吸附作用，产生了金属粒子表面荧光增强效应。

第二节 异金霉素-核酸体系的荧光猝灭效应及分析应用

1. 实验部分

1.1 试剂

鲑鱼精子脱氧核糖核酸(fsDNA, Sigma 公司)($1.0 \times 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$): 准确称取 fsDNA 0.0100 克于小烧杯中, 用 0.05 mol L^{-1} NaCl 溶液将其溶解, 然后转移到 100mL 的容量瓶中, 用 0.05 mol L^{-1} NaCl 溶液定容至刻度, 使用时用蒸馏水逐级稀释。缓冲溶液配制如前所述。

所有试剂均为分析纯, 用三次水配制。

1.2 仪器

LS-55 荧光/磷光/发光分光光度计(PE, 美国)。

SZCL 数显智能控温磁力搅拌器(予华, 巩义)。

Delat320-S 型 pH 酸度计(Mettler Toledo, 上海)。

1.3 实验过程

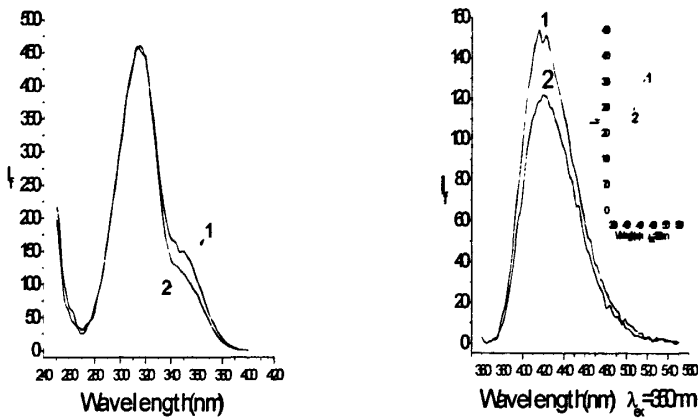
于 10mL 比色管中加入适量核酸和 50 μL 异金霉素, 用三次蒸馏水定容至 5mL 刻度, 振荡摇匀, 放置 15min。用 1cm 荧光池, 激发和发射狭缝宽度分别为 10nm 和 2.5nm, 波长扫描速度为 500nm/min, 分别以 313nm 和 350nm 为激发波长, 在发射波长 418nm 处测定体系的荧光强度 $\Delta I_f = I_0 - I_f$ (其 I_0 和 I_f 分别表示核酸加入前后异金霉素溶液的荧光强度)。

2. 结果与讨论

2.1 荧光光谱

由 Fig. 1 可以看出, 异金霉素有两个激发峰, 强峰在 313 nm 处, 弱峰在 350 nm 处, 发射峰位于 418 nm 处。加入 fsDNA, 异金霉素在 313 nm 处的激发峰荧光强

度基本没有变化，而在 350 nm 处的激发峰荧光强度降低；这说明异金霉素和核酸之间存在着相互作用，可以选用激发波长为 350 nm 来做进一步研究。



(a)Excitation spectra($\lambda_{em}=418nm$) (b) Emission spectra ($\lambda_{ex}=350nm$)

Fig. 1 Fluorescence Spectra

(1) iCTC; (2) iCTC-fsDNA

Conditions: iCTC: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; fsDNA: $1.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$

2.2 实验最佳条件的选择

2.2.1 pH 的影响和缓冲溶液的选择

研究发现溶液的 pH 在 6.80-7.20 范围内时,体系的 ΔI_f 达到最大并保持稳定(Fig. 2)。在本文中固定 pH 为 7.02 ± 0.05 , 研究了不同缓冲溶液 Tris-HCl, HTMA-HCl, citric acid - Na_2HPO_4 和 B-R 以及不加缓冲溶液对体系荧光强度的影响,以不加缓冲溶液体系荧光猝灭程度为 100 计,结果见 Table 1。结果表明,不加缓冲溶液效果最好。

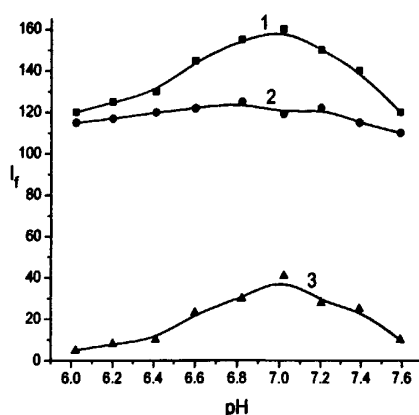


Fig. 2 Effect of pH

1: I_0 ; 2: I_f ; 3: ΔI_f

Conditions: iCTC: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; fsDNA: $1.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$; Buffer: B-R.

Table 1 Choice of buffer solution

Buffers	Water	Tris-HCl	B-R	HTMA-HCl	citric acid - Na_2HPO_4
$\Delta I_f(\%)$	100	63.4	44.1	89.5	70.2

2.2.2 异金霉素浓度的影响

从 Fig. 3 中可以看出,随着异金霉素浓度的增大,其荧光不断增强,加入 fsDNA 后,荧光强度具有明显的猝灭,虽然体系空白随异金霉素浓度的增加显著增强,但 ΔI_f 在 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 后变化较小,考虑 I_0 / I_f 的影响,选择异金霉素的浓度 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 进一步研究。

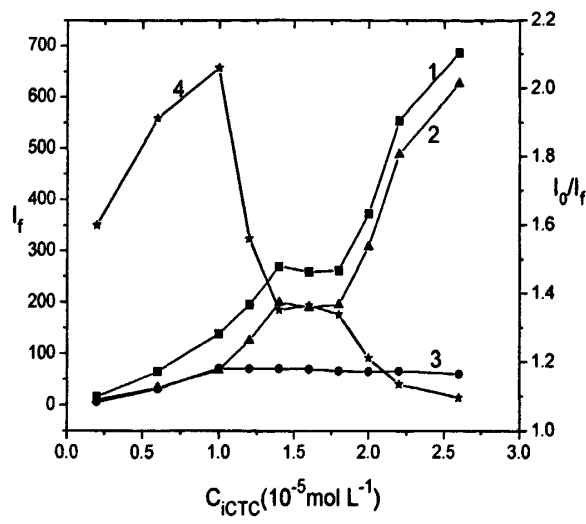


Fig. 3 Effect of iCTC concentration

1: I_0 ; 2: I_f ; 3: ΔI_f ; 4: I_0/I_f

Conditions: fsDNA: $1.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$.

2.2.3 稳定性实验

在选定的实验条件下，研究了反应时间和稳定性的关系，结果表明该体系孵育 25 分钟后其 ΔI_f 达到最大，并且在 2.5 个小时内保持基本不变。

2.2.4 干扰实验

在选定实验条件下，固定 fsDNA 浓度为 $5.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$ ，研究了金属离子和氨基酸对体系荧光强度的影响。实验结果如 Table 2 所示。由实验结果可知，除了 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 及 Al^{3+} 有较大的影响外，其它大部分的金属离子及氨基酸对体系的影响较小。

Table 2 Interference from foreign substances

Foreign substance	Concentration coexisting ($\times 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$)	Change of $I_f(\%)$
Na^+, Cl^-	38	-3.7
K^+, Cl^-	30	-3.5
$\text{Zn}^{2+}, \text{Cl}^-$	4.5	3.8
$\text{Fe}^{3+}, \text{Cl}^-$	0.4	5.0
$\text{Fe}^{2+}, \text{SO}_4^{2-}$	0.5	4.9
$\text{Mg}^{2+}, \text{SO}_4^{2-}$	25	4.8
$\text{Ca}^{2+}, \text{Cl}^-$	25.0	4.2
$\text{Al}^{3+}, \text{NO}_3^-$	0.9	4.2
$\text{NH}_4^+, \text{Cl}^-$	4.0	3.2
$\text{Na}^+, \text{SO}_4^{2-}$	10.0	-3.9
L-Ala	25	-4.2
L-phe	12	-3.4
DL-Thr	52	-4.7

Conditions: fsDNA: $5.0 \times 10^{-7} \text{g mL}^{-1}$; iCTC: $1.0 \times 10^{-5} \text{mol L}^{-1}$.

2.3 分析应用

2.3.1 工作曲线与检出限

在最佳实验条件下，建立了核酸浓度与体系荧光强度猝灭间的对应关系，并进行了回归分析（Table 3），结果表明体系 ΔI_f 与核酸浓度具有良好的线性关系，测定检出限为 $2.7 \times 10^{-8} \text{g mL}^{-1}$ 。

Table 3: Analytical parameters of this method

DNA	Linear range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Liner regression equation ($\text{g mL}^{-1} \text{ } n=3$)	r^a	LOD ^b (g mL^{-1})
fsDNA	0.060-0.100	$\Delta I = 0.55 + 5.83 \times 10^7 C$	0.998	2.7×10^{-8}
	0.100-3.00	$\Delta I = 2.90 + 2.77 \times 10^7 C$	0.997	

a: Correlation coefficient b: limit of detection

2.3.2 实际样品的测定

用标准加入法测定了实际样品拟南芥中核酸的含量。实际样品按照 CTMAB 法由拟南芥的粒状胚芽中提取[209]。由 Biophotometer(Eppendorf Co.)仪器测得样品中 DNA 的含量为 $700\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ，样品稀释 2000 倍后用本法检测。五次测得的平均值为 688 g/mL ，相对标准偏差为 $3.4\%(n=5)$ 。由此认为本法适用于实际样品中痕量核酸的定量测定。

3. 结论

本文发现，核酸的加入可以使异金霉素的荧光强度猝灭($\lambda_{\text{ex}}=350\text{nm}$)，由此建立了一种测定核酸的简单、灵敏的荧光方法。在最佳实验条件下，体系荧光强度的猝灭和核酸的含量在一定范围内成线性关系，并成功的应用于实际样品中核酸的测定。

第三节 纳米金-异金霉素-核酸体系的荧光猝灭效应及分析应用

研究发现纳米金可以增强异金霉素的荧光, 核酸对纳米金-异金霉素体系的荧光强度也有明显的猝灭作用。通过优化实验条件, 发现异金霉素-纳米金体系对核酸有更好的猝灭效果。因此, 选择了 iCTC - AuNPs 作为探针来检测核酸, 对其作用机理进行了探讨。

1. 实验部分

1.1 试剂

金纳米粒子溶液($1.0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$): 取 5 mL 0.1% HAuCl_4 (国药集团化学试剂有限公司) 溶于 40mL 超纯水中, 搅拌加入 2 mL 柠檬酸三钠溶液(1%), 煮沸 10 分钟, 定容至 50mL, 该溶液需要储存在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 的冰箱中, 其它试剂同上。

其它试剂皆为分析纯, 实验用水均为三次蒸馏水。

1.2 仪器

LS-55 型荧光分光光度计(PE, 美国);

SZCL 数显智能控温磁力搅拌器(予华, 巩义);

Delat320-S 型 pH 酸度计(Mettler Toledo, 上海);

UV-4100 紫外吸收分光光度计(Hitachi, 日本);

JASCO J-810S 圆二色光谱仪(日本);

Powereach JS-94J 型微电泳仪(上海中晨数字技术仪器有限公司)。

1.3 实验过程

在 10mL 比色管中, 依次加入 200 μL AuNPs($1.0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$), 适量的核酸溶液, 40 μL iCTC($1.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), 用三次蒸馏水定容至 5mL 刻度, 振荡摇匀, 放置 20-30min。用 1cm 荧光池, 激发和发射狭缝宽度分别为 10nm 和 2.5nm, 波长扫描速度为 500nm/min, 分别以 350nm 为激发波长, 在发射波长 418nm 处测定体系的荧光强度 $\Delta I_f = I_0 - I_f$ (其 I_0 和 I_f 分别表示核酸加入前后 iCTC - AuNPs 溶液的荧光强度)。

2. 结果与讨论

2.1 荧光光谱

由前一节得出以 313nm 为激发波长，核酸加入后对异金霉素 418nm 处的荧光强度影响不大，因此本研究直接选择激发波长为 350nm。由 Fig.1 可以看出，AuNPs 可以大大增强 iCTC 的荧光强度，其特征峰位于 418nm，而 fsDNA 的加入能猝灭 iCTC-AuNPs 的荧光强度。这说明 iCTC、AuNPs、fsDNA 存在着相互作用，iCTC-AuNPs 能被用来研究和检测核酸。

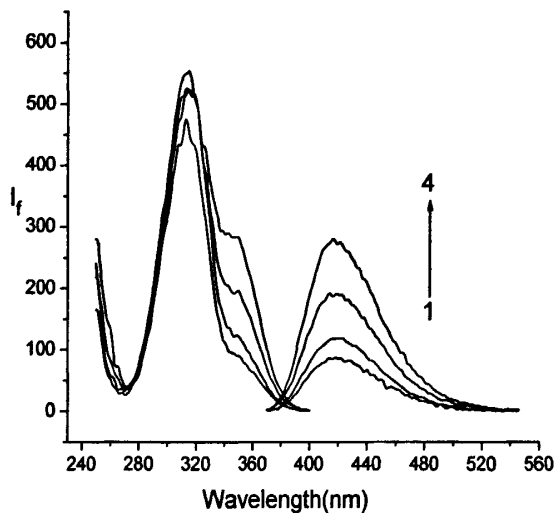


Fig. 1 The Fluorescence spectra of the system

(1) iCTC - fsDNA; (2) iCTC; (3) iCTC - AuNPs - fsDNA; (4) iCTC - AuNPs.

Conditions: AuNPs: $4.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; iCTC: $8.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; fsDNA: $1.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$.

2.2 最佳实验条件的选择

2.2.1 pH 的影响和缓冲溶液的选择

溶液 pH 对体系荧光强度的影响如 Fig. 2 所示。由图可见，当溶液的 pH 值在 7.00 时，体系的 ΔI_f 达到最大。实验选取 pH 值为 7.00。

在 pH 值为 7.00 ± 0.05 的情况下, 研究了不同缓冲溶液 Tris-HCl, HTMA-HCl, citric acid - Na_2HPO_4 和 B-R 以及不加缓冲溶液对体系荧光强度的影响如 Table 1。结果表明, 不加缓冲溶液效果最好。

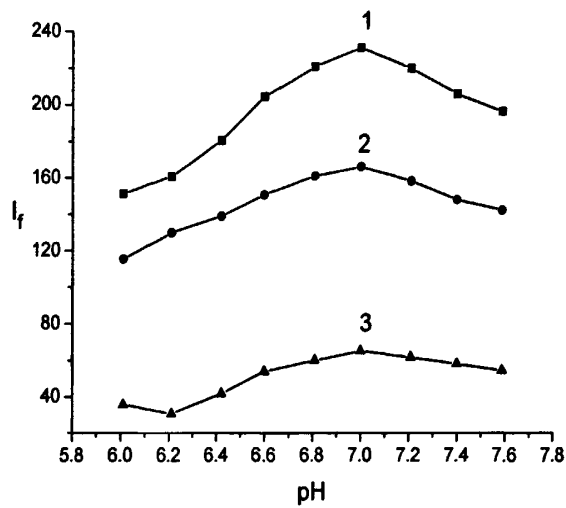


Fig. 2 Effect of pH

1: I_0 ; 2: I_f ; 3: ΔI_f

Conditions: AuNPs: $4.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; iCTC: $8.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; fsDNA: $1.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$

Table 1 Choice of buffer solution

Buffers	Water	Tris-HCl	B-R	HTMA-HCl	citric acid - Na_2HPO_4
$\Delta I_f(\%)$	100	54.1	62.5	91.7	89.6

Conditions: AuNPs: $4.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; iCTC: $8.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; fsDNA: $1.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$.

2. 2. 2 异金霉素浓度的影响

由 Fig. 3 可以看出, 随着异金霉素浓度的增大, 体系的 ΔI_f 值不断增大。但此时信号值也很大, 考虑 I_0/I_f 在增大到一定程度后就基本保持不变, 此时 I_f 值也较低。因此, 本文选择异金霉素的浓度为 $8.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 进行研究。

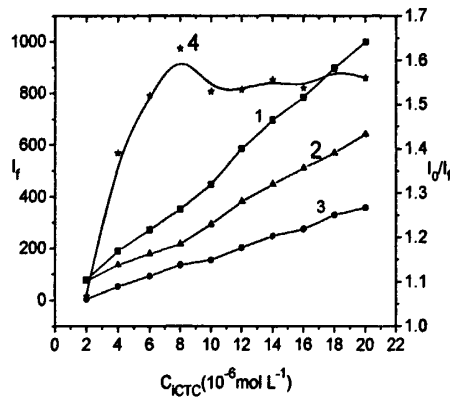


Fig.3 Effect of the concentration of iCTC

1: I_0 ; 2: I_f ; 3: ΔI_f ; 4: I_0/I_f

Conditions: AuNPs: $4.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; fsDNA: $1.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$.

2.2.3 纳米金浓度的影响

在本文的实验条件下,研究了纳米金对体系荧光强度的影响,结果如 Fig.4 所示。可以看出,随着纳米金浓度的增大,体系荧光猝灭的程度也随之增大,当纳米金浓度达到 $4.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$ 时,体系的 ΔI_f 达到最大,而纳米金浓度继续增大时,荧光猝灭的程度又减小了,故本文选择纳米金浓度为 $4.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$ 。

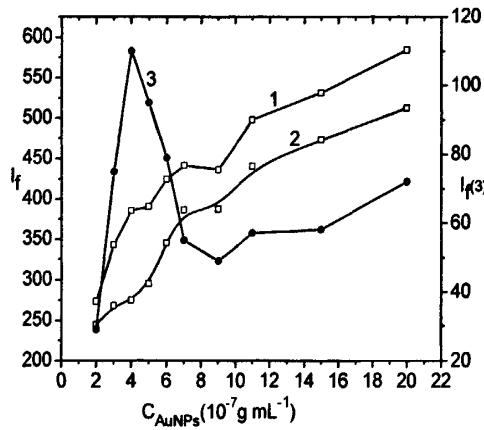


Fig.4 Effect of the concentration of AuNPs

1: I_0 ; 2: I_f ; 3: ΔI_f

Conditions: iCTC: $8.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; fsDNA: $1.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$.

2.2.4 试剂加入顺序的影响及稳定性实验

实验了不同试剂加入顺序对体系 ΔI_f 的影响(Table 2)。结果表明, 试剂的加入顺序对体系的荧光强度有一定的影响, 其最佳加入顺序为 fsDNA, AuNPs, iCTC。

在最佳实验条件下, 研究了反应时间和稳定性的关系, 结果表明该体系孵育 30 分钟后其 ΔI_f 达到最大, 并且在 2.0 个小时内保持基本不变。因此该体系具有较好的稳定性。

Table 2 Effect of adding sequence

Adding sequence	ΔI_f (%)
fsDNA+AuNPs+iCTC	100
fsDNA+iCTC+AuNPs	78.5
iCTC+AuNPs+fsDNA	57.1
iCTC+fsDNA+AuNPs	80.7
AuNPs+fsDNA+iCTC	96.4
AuNPs+iCTC+fsDNA	98.8

Conditions: AuNPs: $4.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; iCTC: $8.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; fsDNA: $1.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$.

2.2.5 干扰实验

在最佳实验条件下, 固定fsDNA的浓度为 $5.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$, 对常见的氨基酸及其它生物分子等干扰物质的影响进行了实验。实验结果如Table 3所示。由实验结果可知, 除了 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 有较大的影响外, 其它大部分的金属离子及氨基酸对体系的影响较小。这表明, 绝大多数物质对该方法的干扰较小。

Table 3 Interference from foreign substance

Foreign substance	Concentration coexisting ($\times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$)	Change of I_f (%)
K $^{+}$, Cl $^{-}$	15	-3.0
Ca $^{2+}$, Cl $^{-}$	10	-4.0
Al $^{3+}$, NO $_3^{-}$	17	4.0
NH $_4^{+}$, Cl $^{-}$	6.5	4.7
Na $^{+}$, SO $_4^{2-}$	9.0	-4.3
Ba $^{2+}$, Cl $^{-}$	8.0	-4.5
Na $^{+}$, Cl $^{-}$	45	-4.9
Mg $^{2+}$, SO $_4^{2-}$	15	5.0
Zn $^{2+}$, Cl $^{-}$	6.0	4.0
Na $^{+}$, CO $_3^{2-}$	20	-4.9
Fe $^{3+}$, Cl $^{-}$	0.3	-3.5
Fe $^{2+}$, SO $_4^{2-}$	0.4	-4.1
L-Asp	60	-4.5
L-His	65	-3.7
L-Phe	18	3.2
Cys	15	-4.5
DL-Glu	75	-3.8
DL-Thr	70	-5.1
BSA	45(μ g mL $^{-1}$)	4.2
EA	50(μ g mL $^{-1}$)	4.8

Conditions: AuNPs: 4.0×10^{-7} g mL $^{-1}$; iCTC: 8.0×10^{-6} mol L $^{-1}$; fsDNA: 5.0×10^{-7} g mL $^{-1}$.

2.3 分析应用

2.3.1 工作曲线与检出限

在最佳实验条件下，建立了核酸(fsDNA, ctDNA)的浓度与 ΔI_f 之间的线性关系，并进行了回归分析，其结果如 Table 4 所示：

从表中可以看出, fsDNA, ctDNA 的线性范围分别为: 1.0×10^{-8} - 2.0×10^{-6} g mL⁻¹, 和 1.0×10^{-8} - 1.6×10^{-6} g mL⁻¹, 检出限分别为 3.2×10^{-9} g mL⁻¹ 和 4.0×10^{-9} g mL⁻¹。

Table 4 Analytical parameters of this method

DNA	Linear range (g mL ⁻¹)	Liner regression equation (g mL ⁻¹)	r ^a	LOD ^b (g mL ⁻¹)
fsDNA	1.0×10^{-8} - 1.0×10^{-7}	$\Delta I=20.80+1.60\times10^3C$	0.998	3.2×10^{-9}
	1.0×10^{-7} - 2.0×10^{-6}	$\Delta I=45.47+3.70\times10^3C$	0.999	
ctDNA	1.0×10^{-8} - 1.6×10^{-6}	$\Delta I=21.51+4.91\times10^3C$	0.997	4.0×10^{-9}

a: Correlation coefficient b: limit of detection

2.3.2 实际样品的测定

用标准加入法测定了实际样品中核酸的含量。仪器测得样品中 DNA 的含量为 700ng μL⁻¹, 样品稀释 2000 倍后用本法检测。五次测得的平均值为 692 g/mL, 相对标准偏差为 2.1%(n=5)。由此认为本法适用于核酸的定量测定。

3. 机理探讨

3.1 体系吸收光谱

从体系的紫外吸收光谱(Fig. 5)可以看出, 加入AuNPs后, 核酸在265nm处的吸收峰强度降低(see insert in Fig. 5), 这是因为金纳米粒子与fsDNA发生相互作用, 引起核酸构象变化, 从而引起了其吸收峰的变化, 这在前面的TEM照片中也可以证明。加入纳米金以后, 异金霉素在240nm和280nm处的吸收峰强度增加; 而加入核酸后, 两处吸收峰强度均降低; 当二者同时加入到异金霉素后, 两处吸收峰强度降低但峰位并未发生明显移动。

当存在 π - π^* 跃迁的药物小分子与fsDNA发生相互作用后, 产生 π 电子的堆积使小分子易于插入到DNA碱基之间, 这时小分子的 π 轨道由于其 π 空轨道与碱基的 π 轨道发生耦合而导致部分填充电子, 这使得其荷电跃迁(MLCT)的几率减小, 产生减

色效应[210-211],并伴随着吸收峰红移[212]。本实验中没有发生红移减色效应,因此我们认为iCTC-AuNPs与fsDNA之间不是插入式结合。

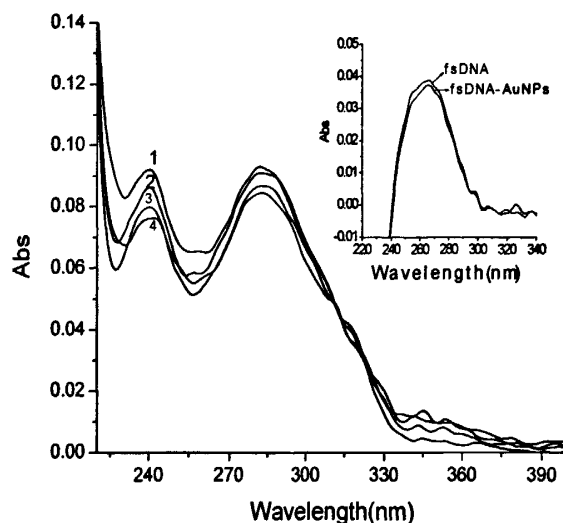


Fig. 5 Absorption spectra of the system

- (1) iCTC-AuNPs; (2) iCTC; (3) iCTC-fsDNA(vs. fsDNA);
(4) iCTC-AuNPs-fsDNA (vs. fsDNA).

Conditions: AuNPs: $4.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; iCTC: $8.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; fsDNA: $1.0 \times 10^{-6} \text{ g}$.

3.2 离子强度影响

NaCl 溶液中的 Na^+ 可以与 DNA 主链上的磷酸根基团之间发生静电作用,这种作用会影响 DNA 的双螺旋结构,降低其解旋能力,近而影响反应体系的荧光强度。

本文通过改变NaCl溶液的量来控制体系离子强度大小,从Fig. 6可以看出,随着NaCl浓度的升高,iCTC-AuNPs荧光强度降低,表明离子强度的增加可以降低纳米金对异金霉素的荧光表面增强效应;同时,iCTC-AuNPs-fsDNA体系的荧光强度亦随NaCl浓度的升高而降低,但二者降低程度均很小。

依据文献报导[213],小分子与核酸大多在A-T富集的小沟槽结合,它们通过与胸腺嘧啶碱基C-2上的羰基氧或腺嘌呤碱基N-3上的氮形成氢键与A-T碱基结合。由此我们认为,iCTC-AuNPs易与核酸的碱基结合,iCTC-AuNPs与fsDNA之间存在沟槽式结合。

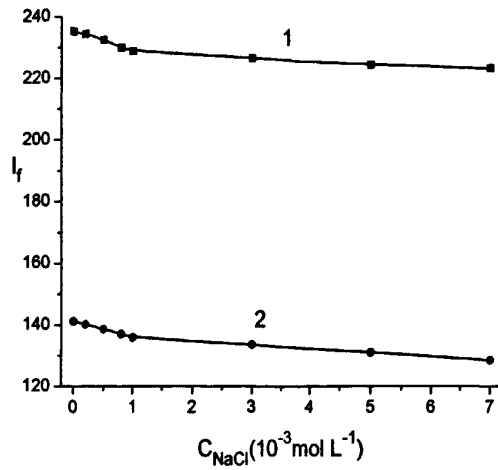


Fig. 6 Effect of ionic strength on the system

(1): iCTC - AuNPs; (2) iCTC - AuNPs - fsDNA.

Conditions: AuNPs: $4.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; iCTC: $8.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; fsDNA: $1.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$.

3.3 体系的 ξ 电势

体系的 ξ 电势如 Fig. 7 所示。随着 iCTC 的加入 AuNPs - fsDNA 体系的电势由负值到正值。推测带正电的 iCTC 与带负电的 AuNPs - fsDNA 存在静电作用。

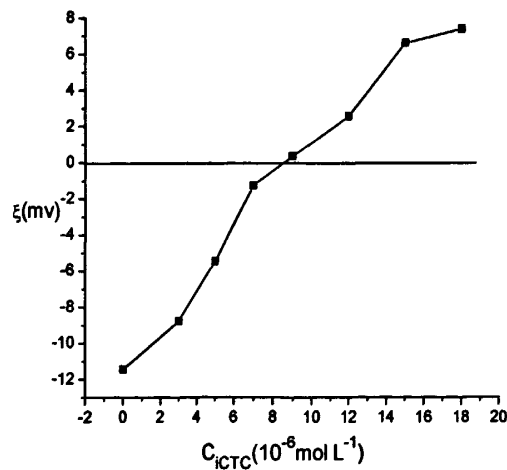


Fig. 7 ζ of the system

Conditions: AuNPs: $4.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; fsDNA: $1.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$.

3.4 DNA 变性实验

利用荧光光谱,研究了不同形态DNA与iCTC - AuNPs之间的相互作用。将三份fsDNA样品(A, B和C)分别控制在三个不同的温度:A保持在室温下;将B和C分别在82℃(略低于fsDNA的 T_m 熔化温度,即 $T_m=87^\circ\text{C}$)下和100℃下加热5分钟,然后用冰水冷却 10min,置于室温[214]。处理后,A是自然状态下的DNA,具有丰富的螺旋结构,C是完全变性后的DNA,其双链结构完全破坏,不具有螺旋结构,而B在接近几处热变性,其双链结构部分破坏,螺旋结构介于A和C之间。

从 Fig. 8 中可以看出,完全变性后的 fsDNA 对 iCTC - AuNPs 也有猝灭作用,但不是很明显,可以推测 iCTC - AuNPs 与 fsDNA 之间存在静电作用。

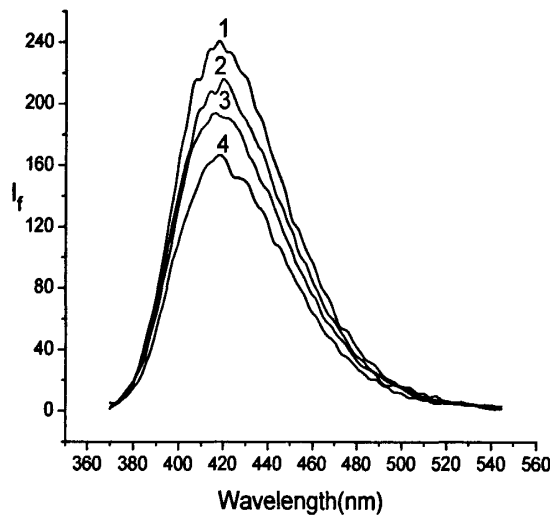


Fig. 8 Fluorescence of the system in melting experiment

- (1) iCTC - AuNPs; (2) iCTC - AuNPs - fsDNA (C);
(3) iCTC - AuNPs - fsDNA (B); (4) iCTC - AuNPs - fsDNA (A).

Conditions: AuNPs: $4.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; iCTC: $8.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; fsDNA: $1.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$.

3.5 圆二色光谱

CD 谱可以提供核酸的一级结构信息。DNA 分子中碱基对的堆积产生 275 nm 处的正峰,双螺旋结构产生 245 nm 处的负峰。

由 Fig. 9 可见, 当 iCTC 加入到 fsDNA 中时, 正负峰强度均有所升高且正峰有所红移; 当 AuNPs 加入到 fsDNA 中时, fsDNA 的碱基堆积以及螺旋结构均发生变化。当三者共存时, fsDNA 的正峰和负峰强度均显著增强, 并向长波方向移动, 且正峰的变化程度大于负峰, 说明 iCTC-AuNPs 对 fsDNA 的碱基堆积程度的影响大于螺旋度。

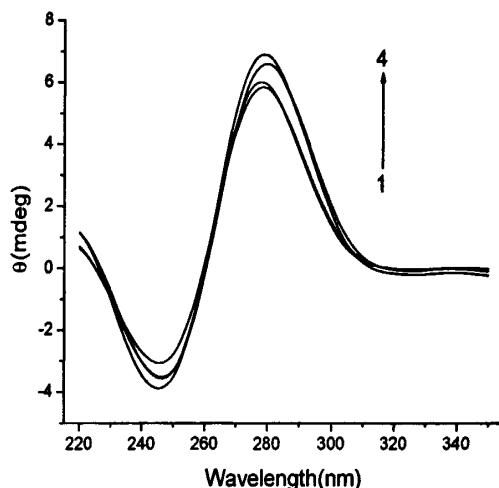


Fig.9 The Far-UV CD spectra of the system

(1) fsDNA; (2) AuNPs - fsDNA; (3) iCTC - fsDNA; (4) iCTC - AuNPs - fsDNA.

Conditions: AuNPs: $4.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; iCTC: $8.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; fsDNA: $5.0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$.

4. 结论

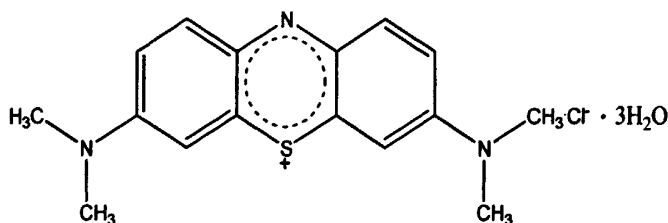
本文研究了纳米金-异金霉素-核酸体系的荧光猝灭效应, 建立了测定核酸的简单、灵敏的荧光方法。通过加入纳米金, 发现纳米金-异金霉素-核酸体系比异金霉素-核酸体系具有如下优点: 一、异金霉素最佳用量减少; 二、干扰物质少; 三、线性范围宽; 四、检出限低。但纳米金-异金霉素-核酸体系比异金霉素-核酸体系稳定性低。利用多种分析技术研究了体系的相互作用机理。由于异金霉素能在纳米金表面发生吸附作用, 产生表面荧光增强效应, 从而增加了纳米金-异金霉素-核酸体系体系的空白强度, 导致灵敏度的提高。机理研究表明, 异金霉素-纳米金与核酸之间发生沟槽式结合, 同时存在静电作用。

第4章 亚甲基蓝-SDBS-蛋白质体系的同步荧光 增强效应及分析应用

蛋白质的分析应用在生命分析中有重要作用。但是蛋白质的内源荧光较弱，不能满足微量分析的要求，因此，人们聚焦于外源荧光的研究，进而可以获取更多蛋白质分子信息。

近年来，近红外荧光染料引起广泛的关注。近红外荧光染料的发射在 600—1000nm，而生物分子在此区域内没有吸收，对荧光的干扰较小，因此近红外荧光染料非常适合生物样品的分析检测[215-217]。

MB 是一种近红外荧光染料，其作为光敏化剂在光动力学疗法领域中具有潜在的价值[218]。由于其有平面分子结构(Scheme 1)，MB 与生物大分子很容易结合[219-220]。



Scheme 1 The structure of MB

研究表明，SDBS 可以猝灭 MB 的荧光，加入蛋白质以后，荧光强度增强。基于该现象，建立了一种利用同步荧光技术测定蛋白质的方法。同步荧光技术不仅可以避免 MB 在 667nm 瑞利散射峰的影响，而且可以提供窄的发射峰，因而是一种好的定量检测方法[221]。本方法具有较好的稳定性和较高的灵敏度，机理研究表明 MB 二聚体的解聚，MB-SDBS-BSA 复合物的形成以及 BSA-SDBS 提供的疏水微环境是该体系同步荧光增强的原因。

1 实验部分

1.1 试剂

蛋白质溶液 ($1.0 \times 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$): 准确称取牛血清白蛋白 (BSA, Amesco), 鸡蛋清白蛋白 (EA, Sigma) 0.0100g 于小烧杯中, 加入三次水搅拌溶解, 然后转移到 100mL 容量瓶中, 用三次水定容至刻度。该溶液保存在 $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中。

亚甲基兰(MB)溶液($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$): 准确称取次甲基兰 0.0373 克于小烧杯中, 用三次水溶解后转移至 100 mL 容量瓶中, 然后定容至刻度, 避光保存。使用时用三次水稀释为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 的工作溶液。

SDBS 溶液($1.0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$): 准确称取十二烷基苯磺酸钠 (德国进口分装) 0.8712g, 用三次水使其溶解, 转移到 250mL 容量瓶中, 定容到刻度。

六次甲基四胺—盐酸 (HMTA—HCl) (10%)缓冲溶液: 称量 20.0 克 HMTA 试剂 (上海试剂厂), 溶于 180mL 三次水中, 然后用 1.0 mol/L 的盐酸调节不同 pH 值的一系列溶液。

1.2 仪器

LS-55 荧光分光光度计 (PE, 美国);

U-4100 紫外吸收分光光度计 (Hitachi, 日本);

JASCO J-810 圆二色光谱仪 (日本);

Delat320-S 型 pH 酸度计 (Mettler Toledo 上海);

Powereach JS-94J 型微电泳仪 (上海中晨数字技术仪器有限公司);

表面张力仪 (Processer Tensionmeter-K12, German Krüss Corp.).

1.3 实验过程

于 10mL 比色管中加入适量 HTMA-HCl、MB、SDBS、BSA, 用三次蒸馏水定容至刻度, 振荡摇匀。用 1cm 荧光比色池, 在 $\Delta\lambda = 15\text{nm}$ 时测定其荧光强度。(激发和发射狭缝宽度均为 10 nm , 波长扫描速度为 500nm/min)。蛋白质加入后,

MB-SDBS 体系荧光强度的增加用 $\Delta I_f = I_f - I_0$ 表示, I_0 和 I_f 分别表示加入蛋白质前后体系的荧光强度。

2. 结果与讨论

2.1 同步荧光光谱

MB(1); MB-BSA (2)MB-SDBS-BSA (3); MB-SDBS (4);体系的发射光谱和同步荧光光谱如 Fig 1 所示。从 Fig 1(a)可以看到 MB 最大发射波长为 683nm, 而 667nm 处有一个散射峰, 该峰对 683nm 处的荧光峰的强度和位移有很大影响, 为了避免该问题, 采用同步荧光的方法, $\Delta\lambda=15\text{nm}$ 时测定其荧光强度, Fig 1(b)中可以看出 SDBS 可以猝灭 MB 在 667nm 处的同步荧光强度, 加入蛋白质以后, 该处荧光强度得到增强, 且与蛋白质在一定的浓度范围内成正比。本文中固定波长为 667nm, 研究了三者之间的相互作用。

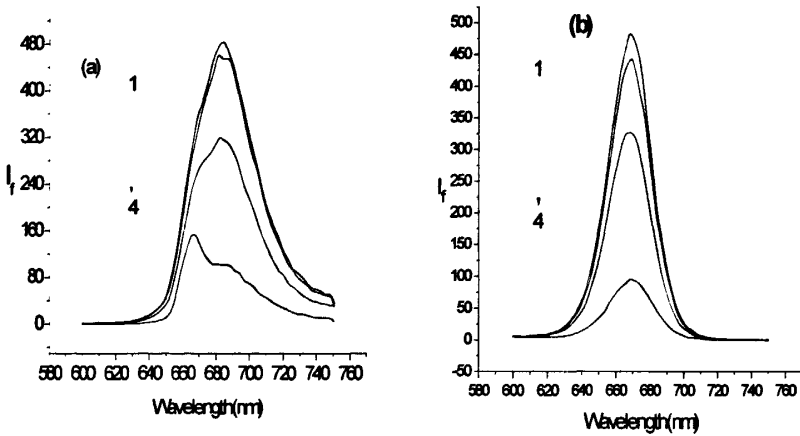


Fig 1 Emission Spectra (a) and Synchronous fluorescence Spectra (b)
(1)MB; (2)MB-BSA; (3)MB-SDBS-BSA; (4) MB-SDBS

Conditions: HMTA: 1.0% (pH=6.80); MB: $1.4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; SDBS: $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; BSA: $1.0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$.

2.2 实验最佳条件的选择

2.2.1 pH 值的影响和缓冲溶液的选择

溶液 pH 对体系荧光强度的影响如 Fig 2 所示。由图可见，当溶液的 pH 在 6.25-7.68 范围内时，体系的 ΔI_f 达到最大并保持稳定。在本文中固定 pH 为 6.80，研究了不同缓冲溶液 Tris-HCl，HTMA-HCl， $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 和 B-R 以及不加缓冲溶液对体系荧光强度的影响如 Table 1。结果表明，HMTA-HCl 的效果最好 (0.5mL)。

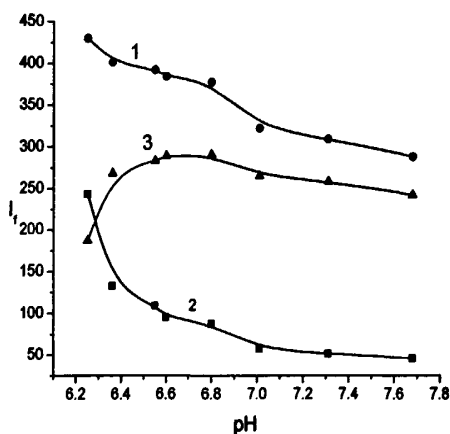


Fig 2 Effect of pH

1: I_f ; 2: I_0 ; 3: ΔI_f

Conditions: MB: $1.4\times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$; SDBS: $1.2\times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$; HTMA: 1.0%; BSA: $1.0\times 10^{-5}\text{ g mL}^{-1}$.

Table 1Choice of buffer solution

Buffers	HTMA-HCl	Tris-HCl	B-R	Water	$\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$
$\Delta I_f(\%)$	100	64.8	24.1	75.6	23.5

2.2.2 次甲基兰浓度的影响

改变 MB 溶液的浓度，测定体系的荧光强度变化，结果如 Fig 3 所示。由图可以看出，当 MB 溶液浓度在 $1.4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 时，体系的荧光强度达到最大。因此，本文固定 MB 溶液的浓度为 $1.4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 。

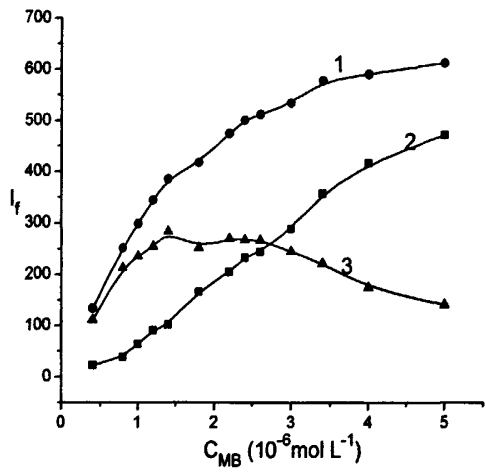


Fig 3 Effect of the concentration of MB

1: I_f ; 2: I_0 ; 3: ΔI_f

Conditions: SDBS: $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; HTMA: 1.0% (pH=6.80);

BSA: $1.0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$.

2.2.3 表面活性剂的影响

研究了表面活性剂对体系荧光的影响，结果如 Table 2 所示。从表 2 可以看出阳离子和非离子表面活性剂（如 CPB，CTAB 和 OP）与阴离子表面活性剂对体系的 ΔI_f 有不同影响。阴离子表面活性剂能够增加体系的 ΔI_f ，其中 SDBS 使体系 ΔI_f 增加的程度最大，并且不同浓度的 SDBS 对体系的荧光强度也有很大的影响(见 Fig 4(a))。实验结果表明随着 SDBS 浓度的增大，荧光增加的程度也随之增大，当 SDBS 的浓度达到 $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 时体系的 ΔI_f 达到最大。而 SDBS 的浓度继续增大时，荧光增加的程度又减小了，故本文中选择 SDBS 的浓度为 $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 。

Table 2 Effects of surfactants

surfactants	SDBS	SLS	SDS	CPB	CTAB	OP
$\Delta I_f(\%)$	100	82	14	3	10	5

Note: the concentrations of the surfactants are $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

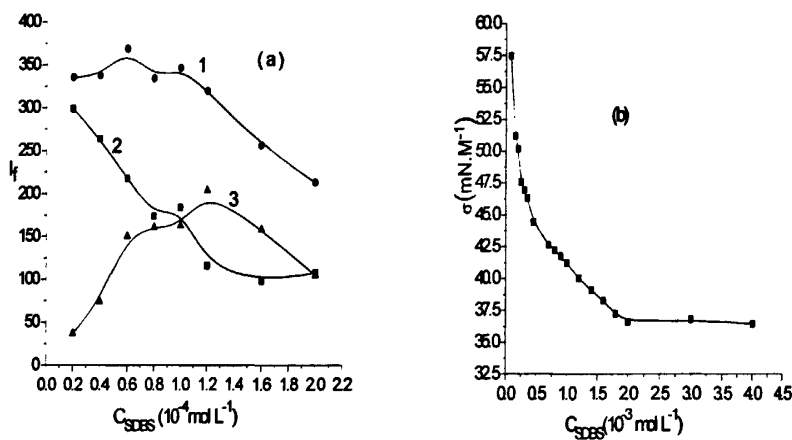


Fig 4 Effect of SDBS

1: I_f ; 2: I_0 ; 3: ΔI_f

Conditions: HMTA: 1.0% (pH=6.80); MB: $1.2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$;
BSA: $1.0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$

Fig 4(b)是 SDBS 的表面张力曲线，可以看出 SDBS 的临界胶束浓度为 $1.8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ，该浓度远远大于本试验所选的浓度。因此，在本试验中 SDBS 是以预胶束或者单分子状态存在的。

2.2.4 试剂加入顺序的影响及稳定性实验

实验了不同试剂加入顺序对体系 ΔI_f 的影响。结果表明，试剂的加入顺序对体系的荧光强度有一定的影响，其最佳加入顺序为 HMTA-HCl, MB, SDBS, BSA。在最佳实验条件下，研究了反应时间和稳定性的关系，结果表明该体系孵育 20 分钟后其 ΔI_f 达到最大，并且在 2 个小时内保持基本不变。因此该体系具有较好的稳定性。

2.2.5 干扰实验

在 BSA 浓度为 $5.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$ 的条件下, 研究了金属离子和氨基酸以及其他生物分子对体系荧光强度的影响。

Table 3 Interference from foreign substances

Foreign substance	Concentration coexisting ($\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)	Change of I_f (%)
K^+, Cl^-	25	-3.9
$\text{Ca}^{2+}, \text{Cl}^-$	15	-4.2
$\text{Al}^{3+}, \text{NO}_3^-$	0.5	5.0
$\text{NH}_4^+, \text{Cl}^-$	3.5	3.7
$\text{Na}^+, \text{SO}_4^{2-}$	8.0	-4.6
$\text{Ba}^{2+}, \text{Cl}^-$	6.0	-4.2
Na^+, Cl^-	40	-4.9
$\text{Mg}^{2+}, \text{SO}_4^{2-}$	20	5.1
$\text{Zn}^{2+}, \text{Cl}^-$	4.0	4.1
$\text{Na}^+, \text{CO}_3^{2-}$	15	-4.9
$\text{Fe}^{3+}, \text{Cl}^-$	0.3	-4.5
$\text{Fe}^{2+}, \text{SO}_4^{2-}$	0.4	-5.1
L-Asp	75	-4.1
L-His	70	-3.4
L-Phe	15	3.9
Cys	10	-3.5
DL-Glu	80	-3.5
DL-Thr	60	-5.1
yRNA	50($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4.5
fsDNA	45($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4.6
ctDNA	65($\mu\text{g mL}^{-1}$)	4.4

Conditions: MB: $1.4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; SDBS: $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; BSA: $5.0 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$; HMTA: 1.0% (pH=6.80).

实验结果如 Table 3 所示。由实验结果可知,除了 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 及 Al^{3+} 有较大的影响之外,其他大部分的金属离子及氨基酸对体系的影响很小。这表明,绝大多数物质对该方法的干扰较小。

2.3 分析应用

2.3.1 工作曲线与检出限

在最佳实验条件下,建立了蛋白质(BSA 和 EA)的浓度与 ΔI_r 之间的线性关系,并进行了回归分析,其结果如 Table 4 所示:

Table 4: Analytical parameters of this method

Proteins	Linear range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Liner regression equation (g mL^{-1} $n=3$)	r^a	LOD ^b (ng mL^{-1})	LOQ ^c (ng mL^{-1})
BSA	0.080-40.0	$\Delta I=103.8+1.98\times 10^7C$	0.998	8.9	29.7
EA	0.100-35.0	$\Delta I=99.5+1.88\times 10^7C$	0.997	10	33.3

a: Correlation coefficient b: limit of detection c: limit of quantification

2.3.2 实际样品测定

为了验证该方法的可靠性,对鸡蛋蛋清中 EA 的含量用标准加入法进行了测定。并且与紫外吸收光谱分析方法[222]进行了对照,紫外样品和本方法的样品是将蛋清分别稀释 10 倍和 100 倍,结果如 Table 5 所示。可以看出,本文提供的方法的精密度和准确度均比较满意。

Table 5 The results of samples determination

Samples	Methods	Concentration (mg mL^{-1})	Average (mg mL^{-1})	RSD (%)
EA	Proposed method	100.9, 100.8, 101.2, 97.7, 101.1	100.3	1.5
	UV method	100.6, 101.6, 97.6, 98.2, 99.2	99.4	1.7

RSD: relative standard deviation

3. 机理探讨

3.1 MB 二聚体的形成

MB 是一种具有杂环芳香结构的阳离子染料,其聚集行为可以从吸收光谱和同步荧光光谱的变化得到解释[223],如 Fig 5 所示。从 Fig 5 中,可以看出随着 MB 浓度的增大,MB 在 664nm 处的紫外吸收峰蓝移到 661nm,而 610nm 处的吸收峰强度不断增强。定义 $\beta = A_{661}/A_{610}$,其中 A_{661} 和 A_{610} 为 MB 661nm 和 610nm 处的吸收峰强度。显然,随着 MB 浓度的增大, β 值逐渐降低。由同步荧光光谱可以看出,随着 MB 浓度的增加,其在 667nm 处的同步荧光强度增强,当浓度大于 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 时,其同步荧光强度降低且伴随着荧光峰红移。以上现象表明,MB 在高浓度时可以形成二聚体化合物[224]。

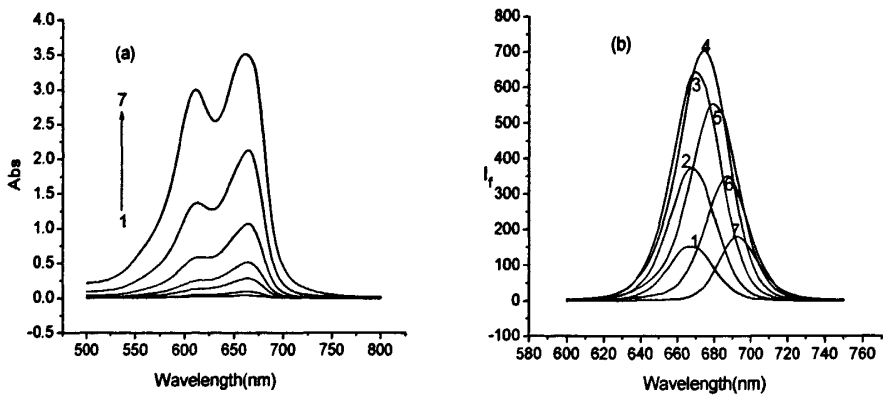


Fig 5 The aggregation of MB

(a) The absorption spectra of MB ; (b) The synchronous fluorescence spectra of MB

(1)-(7) the concentrations of MB are (8.0×10^{-7} , 2.0×10^{-6} , 5.0×10^{-6} , 1.0×10^{-5} , 2.0×10^{-5} , 4.0×10^{-5} , 8.0×10^{-5}) mol L^{-1}

Conditions:HMTA: 1.0% (pH=6.80)

由 MB 的结构式可以看出,其属于 D- π -A 型分子。‘-N(CH₃)₂’和‘-NH⁺’分别是电子给体和受体,二者由苯环相连接起来,所以 MB 分子既是电子给体又是电子受体。‘-N(CH₃)₂’ (电子给体(D)) 和‘-NH⁺’ (电子受体(A)) 通过共轭体系相连,具有较高的 HOMO(最高被占用分子轨道)能级和较低的 LUMO (分子最低空余轨道) 能级,其第一激发态为分子内电荷转移(ICT)激发态,其偶极矩远大于基态。

MB 在高浓度时, 其分子内电荷转移 (ICT) 增强, D- π -A 分子吸收光能以后电子从给体转移到受体, 容易生成 $D^+-\pi-A$ 和 $D-\pi-A^-$ (或 $D^+-\pi-A^-$), 使得 ICT 激发态发生较大变形, 进而导致了紫外吸收峰蓝移和同步荧光峰红移, 这些现象表明 MB 的这种聚集属于 H-聚集[225, 226]。

实验中 MB 的浓度为 $1.4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, 以单分子存在的。当 SDBS 加入到 MB 中时, MB 在 661nm 处的吸收峰强度降低, 同时 β 值降低 (Fig 6)。以上现象表明 SDBS 可以促使 MB 二聚体的形成, 这是由于 SDBS 分子在溶液中形成了预胶束, 与此同时, 水分子在表面活性剂分子或是预胶束周围形成一个有序区域, 即所谓“冰山结构” (iceberg 结构), 导致溶剂的性质向着有利于 MB 二聚体形成的方向变化[227]。

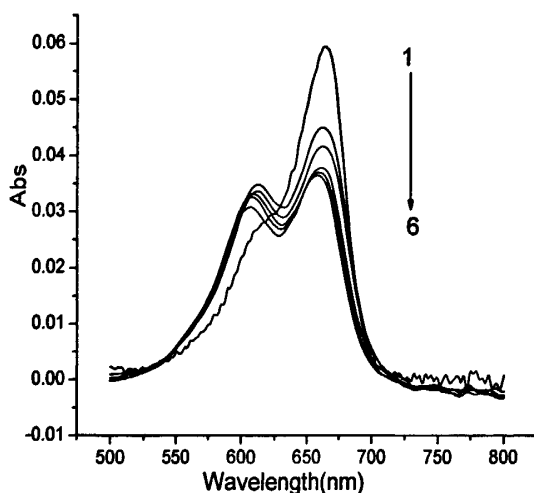


Fig 6 Absorption spectra of MB and SDBS

(1)-(6) the concentrations of SDBS are (0.0, 6.0×10^{-5} , 8.0×10^{-5} , 1.0×10^{-4} , 1.2×10^{-4} , 1.4×10^{-4}) mol L^{-1}

Conditions: HMTA 1.0% (pH=6.80); MB: $1.4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; BSA: $1.0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$.

3.2 MB 二聚体的解聚和 MB-SDBS-BSA 复合物的形成

从 Fig 7 中可以看出, 当 BSA 加入到 MB 中, MB 在 661nm 处的吸收峰强度降低, 610nm 处的峰基本上没有变化; 当 SDBS 加入到 MB 中, MB 在 661nm 处的吸收峰强度降低而在 610nm 处强度增加。当二者同时加入到 MB 中, 可以看出 $\beta_{\text{MB}} > \beta_{\text{MB-BSA}} > \beta_{\text{MB-SDBS-BSA}} > \beta_{\text{MB-SDBS}}$ 。这表明 BSA 抑制了 MB 二聚体的形成,

导致了部分二聚体的解聚。这是由于 BSA 和 SDBS 可以形成带负电荷的化合物，同时带正电荷的 MB 通过静电作用力和疏水作用力溶于 BSA-SDBS 分子簇（负电），此时 BSA、SDBS 和 MB 具有强的结合作用。

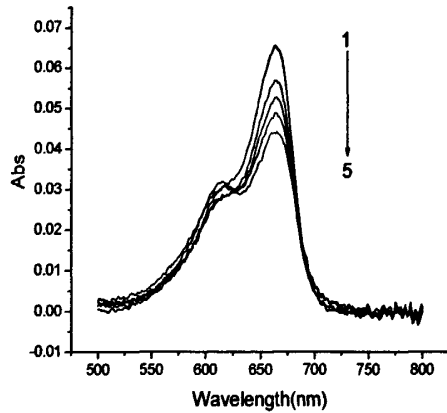


Fig 7 Absorption spectra of the system

(1) MB; (2) BSA-MB; (3) MB-SDBS-BSA($1.0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$);

(4) MB-SDBS-BSA($5.0 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$); (5) MB-SDBS

Conditions: HMTA: 1.0% (pH=6.80); MB: $1.4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; SDBS: $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

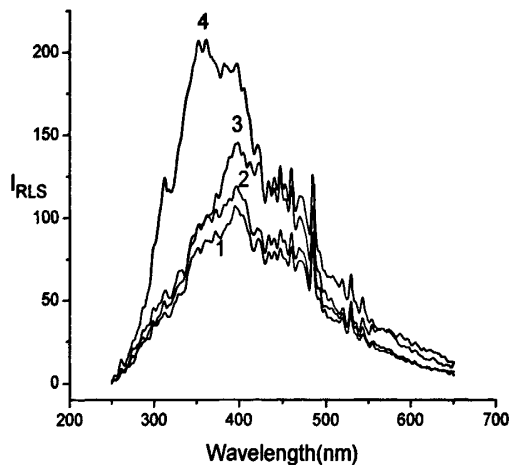


Fig 8 Resonance light Scattering spectrum

(1) MB; (2) MB-SDBS; (3) MB-BSA; (4) MB-SDBS-BSA

Conditions: HMTA: 1.0% (pH=6.80); MB: $1.4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; SDBS: $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; BSA: $1.0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$.

上述结论可以在共振光散射光谱中得到验证。从 Fig 8 可以看出当 SDBS 和 BSA 分别加入到 MB 溶液中时, 其共振光散射的强度有了不同程度的增强, 特别是 MB-SDBS-BSA 体系的共振光散射强度最大, 这表明 MB-SDBS-BSA 体系中生成了一个大的复合物[228]。

体系的 ξ 电势同样被考察。从 Fig 9 中可以看出 SDBS-BSA 的 ξ 值为-14.66mV, 随着 MB 的加入 ξ 值增大且达到正值。因此在 MB-SDBS-BSA 体系中带负电荷的 SDBS-BSA 和带正电荷的 MB 形成了一个大的复合物。

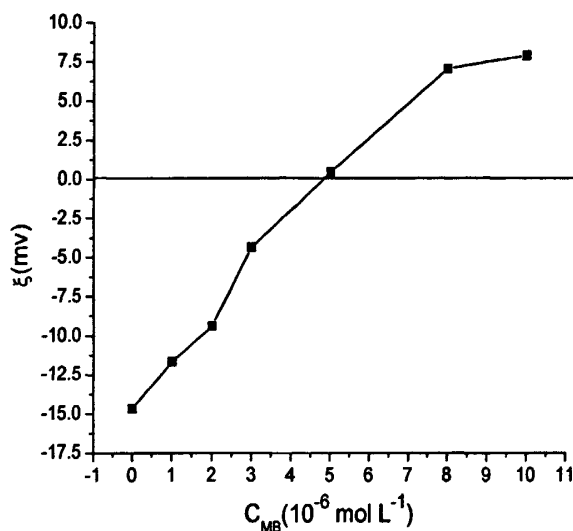


Fig 9 The ξ of the system

Conditions: HMTA: 1.0% (pH=6.80); SDBS: $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$;
BSA: $1.0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$.

3.3 BSA 二级结构的变化

远紫外圆二色光谱能够定量地研究蛋白质以及蛋白质与其它分子相互作用时二级结构发生的变化。蛋白质 CD 谱中的双负峰是 α -螺旋的体现, 肽链处于 α -螺旋时的 $n-\pi^*$ 跃迁形成 220nm 处的峰, 而 208-209nm 处的负峰是 α -螺旋肽键的 $\pi-\pi^*$ 跃迁的贡献[229]。该体系的 CD 谱如 Fig 10 所示。利用 Yang 方程处理了光谱数据, 得到了其变化的结构信息。 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲的变化如 Table

6 所示。可以看出, SDBS、MB 和 MB-SDBS 加入到蛋白质中, 四种结构均发生变化, 说明 MB、SDBS 和 BSA 之间存在着强的相互作用。

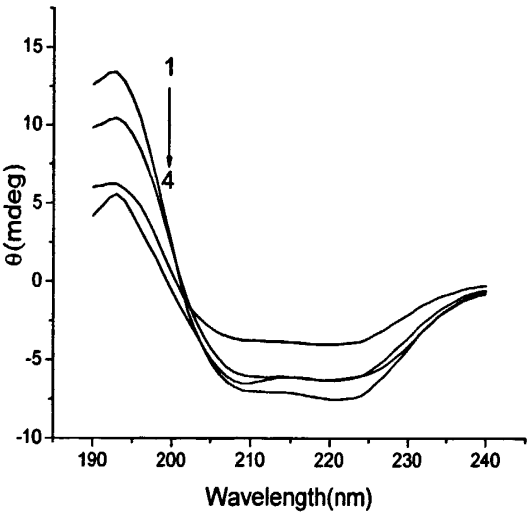


Fig 10 The Far-UV CD of the system

(1) BSA; (2) BSA-MB; (3) BSA-SDBS; (4) MB-SDBS-BSA

Conditions: HMTA: 1.0% (pH=6.80); MB: $1.4\times10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$; SDBS: $1.2\times10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$; BSA: $1.0\times10^{-5}\text{ g mL}^{-1}$.

Table 6 Comparison of BSA secondary structure in the presence of different components

	α -helix (%)	β -sheet (%)	β -turn (%)	Random (%)
BSA	34.7	38.1	1.2	26.0
BSA-MB	33.1	36.3	5.0	25.6
BSA-SDBS	27.2	16.3	19.9	36.7
BSA-MB-SDBS	30.2	42.9	0.1	26.8

3.4 体系的微环境

芴探针荧光光谱中的第一个和第三个峰的比值 (I_1/I_3) 是一个特征值, 可表征芴分子周围微环境的极性[230, 231]。 I_1/I_3 值越大, 疏水性越差, 体系的极性如 Table

7 所示。可以看出, 加入 SDBS 和 BSA 后, MB 体系的疏水性增强, 从而同步荧光得到增强。

Table 7 Comparison of the polarity

medium	H ₂ O	SDBS	BSA	SDBS-BSA
I ₁ /I ₃	1.690	1.663	1.640	1.315

Table 8 Comparison of fluorescence polarization

medium	H ₂ O	SDBS	BSA	SDBS-BSA
P	0.053	0.132	0.143	0.209

通过 P 方程: $\eta = \frac{2P}{0.46 - P}$, 体系的微粘度可以通过荧光偏振计算出来[232]。

P 值越大, 表明体系的微粘度越大。体系的 P 值如 Table 8 所示。可以看出 BSA-SDBS 体系为 MB 提供最大的微黏度, 使体系同步荧光得到增强。

从 Table 7, 8 可以看到, BSA-SDBS 体系有两个作用: 一、提供较小极性和较大微黏度的疏水环境; 二、提高体系的荧光量子产率, 这是由于疏水环境能够减少 MB-SDBS-BSA 与水分子之间的碰撞, 从而减少体系的能量损失。以上两个作用都导致 MB-SDBS-BSA 体系的同步荧光强度增强。

4. 结论

本章利用 MB 的近红外荧光, 结合其二聚体现象, 采用同步荧光技术建立了一种蛋白质的测定方法。该方法具有较好的稳定性和较高的应用价值。同时, 还研究了 MB-SDBS-BSA 体系的同步荧光增强效应作用机理。该研究对蛋白质和染料相互作用机理将有更深入的了解, 同时对细胞中荧光成像的一些问题的解决具有重要的意义。

参考文献

- [1] 慈云祥, 常文保, 帖建科. 化学发光在脱氧核糖核酸探针杂交技术中的应用. 分析化学, 1992, 20(9): 1100-1106.
- [2] H. S. Rye, M. Dabora, M. A. Quesada, R. A. Mathies, A. N. Glazer. Fluorometric Assay Using Dimeric Dyes for Double-and Single-Stranded DNA and RNA with Picogram Sensitivity[J]. Anal. Biochem, 1993, 208 (1): 144-150.
- [3] B. Kiera, H. S. Thomas, M. L. Wendy, A. C. James, et al. A Luminescent Ruthenium Complex for Ultrasensitive Detection of Proteins Immobilized on Membrane Supports[J]. Anal. Biochem., 1999, 276(2): 129-143.
- [4] K. Amelie, N. Per-Åke. Dual Labeling of a Binding Protein Allows for Specific Fluorescence Detection of Native Protein. Anal. Biochem, 2001, 295(1): 22-30.
- [5] G. Sadanand, M. Sergey, O. Jerzy, R. Kenneth. Ultrasensitive Fluorescence-Based Detection of Nascent Proteins in Gels. Anal. Biochem, 2000, 279(2): 218-225.
- [6] 赵长春, 于俊生, 章杰兵. 药物与 DNA 的相互作用研究: I. 小檗碱作为 DNA 的发光开关及 pH 的影响[J]. 无机化学学报, 1997, 13(3): 325-329.
- [7] 李志良, 毕琼斯, 李俊忠, 林辉祥, 俞汝勤. 新型钼抗癌配合物初步筛选与作用机制的荧光法研究[J]. 化学学报, 1997, 55(8): 766-772.
- [8] S. Udenfriend, P. Zaltzman. Fluorescence characteristic of purines, pyrimidines and their derivatives: measurement of guanine in nucleic acid hydrolyzates [J]. Anal. Biochem, 1962, 3(1): 49-59.
- [9] C. Z. Huang, Y. F. Li, S. Y. Tong. Spectrofluorimetry of Nucleic Acids on the Their Ternary Complexes of Aluminum(III)/8-Hydroxyquinoline[J]. Anal. Lett, 1997, 30(7): 1305-1309.
- [10] 陈国珍. 荧光分析法 (第二版) [M]. 科学出版社, 1990, 81-90.
- [11] L. J, Ber G. The fluorescence of dye-nucleic acid complexes[J]. J. Luminescence, 1981, 22 (3): 221~265.
- [12] Kumar C V, Asuncion E H. DNA binding studies and site selective fluorescence sensitization of an anthryl probe[J]. J. Am. Chem. Soc., 1993, 115(19): 8547~8553.
- [13] 慈云祥, 常文保, 李元宗, 吕年青. 分析化学前沿[M]. 科学出版社, 1991, 31-46.
- [14] 唐宏武, 陈蓓, 陈观铨, 曾云鹏. 吖啶橙-细胞 DNA 荧光抑制法筛选抗癌药物[J]. 高等学校化学学报, 1997, 18(12): 1960-1962.
- [15] J. Yguerabide, A. Ceballos. Quantitative fluorescence method for continuous measurement of DNA hybridization kinetics using a fluorescent intercalator[J]. Anal. Biochem, 1995, 228(2): 208-220.

- [16] 郭良洽, 叶芳贵, 林旭聪, 谢增鸿. 甲苯胺蓝荧光猝灭法测定核酸[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(1): 121-124.
- [17] P. L. Southwick, L. A. Ernst, E. W. Tauriello, S. R. Parker, R. B. Mujumdar, S. R. Mujumdar, H. E. A. Clever, A. S. Waggoner. Cyanine Dye Labeling Reagents-Carboxymethylindocyanine Succinimidyl Esters [J]. Cytometry, 1990, 11(3): 418-422.
- [18] 贺吉香, 江崇球, 高明霞. 盐酸小檗碱与脱氧核糖核酸相互作用的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2003, 23(4): 755-758.
- [19] Murphy G., Lawrence W. J., L enhard R. American Society Textbook of Clinical Oncology, 2nd Edn. [M]. Atlanta: American Cancer Society, 1995, 203-210.
- [20] 程圭芳, 张冬梅, 丁敏, 屈海云. 柔红霉素与 DNA 作用的序列特异性研究[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(8): 1395-1399.
- [21] W. Y. Li, J. G. Xu, X. Q. Guo, Q. Z. Zhu, Y. B. Zhao. Study on the interaction between rivanol and DNA and its application to DNA assay[J]. Spectrochim. Acta. A., 1997, 53(5): 781-787.
- [22] M. A. Martin, B. B. Castillo, J. C. Menéndez. Spectrofluorimetric study of benzo[a]quinolizidines as potential fluorescent probes for DNA[J]. Anal. Lett., 1991, 24(8): 1503-1515.
- [23] A. Blaskó, K. A. Browne, T. C. Bruice. Microgonotropens and Their Interactions with DNA V. Structural Characterization of the 1:1 complex of d(CGCAAATTT-GCG)₂ and Tren-Microgonotropen-b by 2D NMR Spectroscopy and Restrained Molecular Modeling[J]. J. Am. Chem. Soc., 1994, 116 (9): 3726-3737.
- [24] Liu L Z, Shao M, Liu Z H, et al. Homogeneous Immunoassay Based on Two-Photon Excitation Fluorescence Resonance Energy Transfer[J]. Anal. Chem, 2008, 80 (20): 7735-7741.
- [25] 刘玲芝, 董小虎, 刘志洪等. 双光子激发荧光共振能量转移均相检测 DNA[J]. 分析化学, 2009{A01}:123-123.
- [26] P. Hurskainen. Nucleic acid labelling employing lanthanide chelate[J]. J. Alloy. Compd., 1995, 225(1-2): 489-491.
- [27] G. Z. Justo, P. Livotto, N. Durann. Chemical and photochemical generated carbon-centered radical intermediate and its reaction with deoxiribonucleic acid[J]. Radical biology and Medicine., 1995, 19(4): 431-440.
- [28] F. E. Rossetto, E. Nieboer. The interaction of metal ions with synthetic DNA: Induction of conformational and structural transitions[J]. J. Inorg. Biochem., 1994, 54(3): 167-186.

- [29] X. J. Liu, Y. Z. Li, Y. X. Ci. Time-resolved fluorescence studies of the interaction of the Eu³⁺ complexes of tetracycline analogues with DNA [J]. Anal. Chim. Acta., 1997, 345(1-3): 213-217.
- [30] Y. X. Ci, Y. Z. Li, X. J. Liu. Selective Determination of DNA by Its Enhancement Effect on the Fluorescence of the Eu-Tetracycline Complex [J]. Anal. Chem., 1995, 67(11): 1785-1788.
- [31] R. T. Liu, J. H. Yang, X. Wu. Study of the interaction between nucleic acid and oxytetracycline-Eu³⁺ and its analytical application[J], J. Lumin., 2002, 96 (2-4): 201-209.
- [32] J. Zhou, G. Q. Gong, Y. N. Zhang, J. Q. Qu, L. F. Wang, J. W. Xu. Quercetin-La(III) complex for the fluorimetric determination of nucleic acids [J]. Analytica Chimica Acta, 1999, 381(1): 17-22.
- [33] L. L. Shen, L. A. Mitscher, P. N. Sharma. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials : A cooperative drug - DNA binding model [J]. Biochem, 1989, 28(9): 3886-3894.
- [34] 林旭聪, 谢增鸿, 郭良洽, 林坚, 陈国南. 铜(II)-8-羟基喹啉-核酸三元荧光体系的研究与应用[J]. 光谱实验室, 2003, 20(6): 810-814.
- [35] L. G. Marzilli, D. L. Banville, G. Zon, W. D. Wilson. Pronounced H-1 and P-31 NMR spectral changes on meso-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porphyrin binding to poly[d(G-C)].poly[d(G-C)] and to 3 tetradecaoligodeoxyri-bonucleotides: evidence for symmetric, selective binding to 5'CG3' sequences[J]. J. Am. Chem. Soc., 1986, 108 (14): 4188-4192.
- [36] L.S.Lin, Z.K..He, G.W.Song, D.Yuan, Y.E.Zeng. A novel method for determination of DNA by use of molecular "Light Switch" complex of Ru(bipy)₂(dppx)²⁺ [J]. Anal.Chim. Acta., 2000, 403 (1-2): 209-217.
- [37] W. Y. Li, X. Q. Guo, J. G. Xu, Q. Z. Zhu, Y. B. Zhao. Determination of DNA using sodium 9,10-anthraquinone-2-sulfonate as an in situ photo- chemical fluorescence probe [J]. Anal. Chim. Acta, 1997, 340 (1-3): 291-296.
- [38] D.A. Knoll, V. Bloomfield. Light scattering labels of DNA: Resonance enhancement from Bound dyes[J]. Biochem., 1984, 23(14):3358-3359.
- [39] R.F. Pasternack, C. Bustamante, P. T. Collings, A. Giannetto, E. J. Gibbs. Porphyrin assemblies on DNA as studied by a resonance light-scattering technique[J]. J.Am.Chem. Soc. 1993, 115 (13):5393-5399.
- [40] M. J. Carvlin, R. J. Fiel. Intercalative and nonintercalative binding of large cationic porphyrin ligands to calf thymus DNA[J]. Nucl Acid Res, 1983,11:6121-6139.
- [41] Y. Liu, C. Q. Ma, K. A. Li. Rayleigh light scattering study on the reaction of nucleic acids and methyl violet[J]. Anal. Biochem., 1999, 268 (2):187-192.

- [42] Y. Liu, C. Q. Ma, K. A. Li. Simple and sensitive assay for nucleic acids by use of Rayleigh light scattering technique with rhodamine B[J]. *Anal. Chim. Acta.*, 1999, 379 (1-2): 39-44.
- [43] L. H. Chen, Y. T. Nie, L. Z. Liu, Shen H X. Determination of nucleic acids on the basis of enhancement effect of resonance light scattering of toluidine blue[J]. *Analytical Letters*, 2003, 36 (1): 107-122.
- [44] C. Z. Huang, Y. F. Li, X. D. Liu. Determination of nucleic acids at nanogram levels with safranin T by a resonance light-scattering technique [J]. *Anal. Chim. Acta.*, 1998, 375(1): 89-97.
- [45] Zhang W J, Xu H P, Wu S Q, et al. Determination of nucleic acids with crystal violet by a resonance light-scattering technique [J]. *Analyst*, 2001, 126 (4): 513-517.
- [46] C. Z. Huang, Y. F. Li., S. Y. Tong. Assembly of methylene blue on nucleic acid template as studied by resonance light-scattering technique and determination of nucleic acids at nanogram levels [J]. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1999, 72 (7): 1501-1508.
- [47] Zhang W J, Xu H P, Xia C X, et al. Resonance light scattering for the determination of nucleic acids with methyl violet[J]. *Anal Lett*, 2001, 34 (4): 553-568.
- [48] C. Z. Huang, Y. F. Li, X. H. Huang, M. Li. Interaction of Janus Green B with double stranded DNA and the determination of DNA based on the measurement of enhanced resonance light scattering [J]. *Analyst*, 2000, 125 (7): 1267-1272.
- [49] R. F. Pastenack, P. J. Collings. Resonance light scattering: A new technique for studying chromophore aggregation[J]. *Science*, 1995, 269 (5226): 935-939.
- [50] 吕文娟, 陈兴国, 胡之德. 大黄酸与核酸作用的共振光散射特征及机理研究[J]. *兰州大学学报*, 2006, 42 (4): 61-65.
- [51] 刘绍璞, 胡小莉, 罗红群, 范莉. 阳离子表面活性剂与核酸反应的共振 Rayleigh 散射光谱特性及其分析应用[J]. *中国科学 B 辑*, 2002, 32 (1): 18-26.
- [52] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid [J]. *Anal Biochem*, 1985, 150 (1): 76-85.
- [53] 陈展光, 丁卫锋, 韩雅莉. 两性离子表面活性剂作为共振光散射探针测定脱氧核糖核酸 [J]. *分析化学*, 2005, 33 (4): 519-522.
- [54] Z. Jia, J.H. Yang, X. Wu, C.X. Sun, S.F. Liu, F. Wang, Z.S. Zhao. The sensitive determination of nucleic acids using resonance light scattering quenching method[J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 2006, 64 (3): 555-559.
- [55] 杨传孝, 李原芳, 奉萍. 铝离子与核糖核酸作用的共振光散射研究[J]. *分析化学*, 2002, 30 (4): 473-477.
- [56] 陶玉龙, 敖登高娃. 铁 (III) 与脱氧核糖核酸作用的共振瑞利散射光谱研究[J]. *分析测试学报*, 2007, 26 (6): 876-879.

- [57] 肖忠柏, 蔡朝霞, 李玲, 刘立明, 宋功武. La-phen-邻苯二甲酸混配化合物与 DNA 作用的共振光散射光谱及分析应用[J]. 分析科学学报, 2003, 19 (4):317-320.
- [58] 李玲, 宋功武, 方光荣, 信玲, 李本军. 共振光散射探针铁的混配物的合成及其在脱氧核糖核酸测定中的应用[J]. 分析化学, 2003, 31(10): 1277-1277.
- [59] A. J. G. Mank, H. T. C Vander Laan, H. Lingeman, C. Gooijer, U. A. Th. Brinkman, N. H. Velthorst. Visible diode laser-induced fluorescence detection in liquid chromatography after precolumn derivatization of amines [J]. Anal. Chem., 1995, 67(10): 1742-1748.
- [60] T. Imasaka, T. Fuchigami, N. Ishibashi, Micellar. Electrokinetic capillary chromatography of porphinato chelates as a spectrophotometric approach to sub-femtomole detection of metal chelates [J]. Anal. Sci., 1991, 7 (3): 491-498.
- [61] Williams R J ,Peralta J M ,Tsang V C W ,Narayanan N, Casay M, Lipowska M ,Strekowski L, Patonay G. Temperature Dependence of the Mid-Infrared OH Spectral Band in Liquid Water[J]. Appl. Spectrosc, 1997, 51(9) :1269-1275.
- [62] Touthkine A , Kraynov V ,Hahn K. Solvent-Sensitive Dyes to Report Protein Conformational Changes in Living Cells [J]. J . Am. Chem. Soc., 2003 ,125 (14):4132-4145.
- [63] Greengauz, Robert s O, Stoeppler H, Nomura S ,Yamaguchi H ,Goldenring J R ,Podolsky R H , Lee J R ,Dynan W S. Saturation labeling with cysteine-reactive cyanine fluorescent dyes provides increased sensitivity for protein expression profiling of laser-microdissected clinical specimens[J]. Proteomics, 2005, 5 (7) :1746-1757.
- [64] Karp N A, Kreil D P, Lilley K S. Determining a significant change in protein expression with DeCyder™ during a pair-wise comparison using two-dimensional difference gel electrophoresis [J]. Proteomics, 2004, 4 (5): 1421-1432.
- [65] 陈小兰, 李东辉, 许金钩. 用四氨基铝酞菁共振光散射技术测定纳克级核酸[J]. 高等学校化学学报, 2001,22 (6):901-904.
- [66] Chen Q Y,Li D H ,Zhao Y,Yang H H ,Zhu Q Z ,Xu J G. Interaction of a novel red-region fluorescent probe, Nile blue, with DNA and its application to nucleic acids assay[J]. Analyst, 1999, 124 :901-906.
- [67] Polverini E ,Cugini G,Annoni F ,Abbruzzetti S ,Viappiani C ,Gensch T. Molten Globule Formation in Apomyoglobin Monitored by the Fluorescent Probe Nile Red[J]. Biochemistry , 2006 ,45 (16) :5111-5121.
- [68] Hungerford G,Rei A ,Ferreira M I C. Studies on the interaction of Nile red with horseradish peroxidase in solution[J]. FEBS J., 2005, 272 (23) :6161-6169.
- [69] D' Amico F. A polychromatic staining method for epoxy embedded tissue: a new combination of methylene blue and basic fuchsin for light microscopy[J]. Biotech. Histochem., 2005, 80 (5-6): 207-210.

- [70] Hu Y J, Liu Y, Zhao R M, Dong J X, Qu S S. Spectroscopic studies on the interaction between methylene blue and bovine serum albumin[J]. J. Photochem. Photobio. A, 2006, 179 (3):324-329.
- [71] Kaneta T, Saito Y, Imasaka T. Indirect detection of amino-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons in cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography combined with diode laser-induced fluorometry [J]. J. Chromatogr. A, 1999, 831 (2):285-292.
- [72] Luo Y, Prestwich G D. Hyaluronic Acid-N-hydroxysuccinimide: A Useful Intermediate for Bioconjugation[J]. Bioconjugate Chem., 2001, 12 (6):1085-1088.
- [73] Luo Y, Prestwich G D. Synthesis and Selective Cytotoxicity of a Hyaluronic Acid-Antitumor Bioconjugate[J]. Bioconjugate Chem, 1999, 10 (5):755-763.
- [74] Basaric N, Baruah M, Qin W, Metten B, Smet M, Dehaen W, Boens N. Synthesis and spectroscopic characterisation of BODIPY[®] based fluorescent off-on indicators with low affinity for calcium[J]. Org. Biomol. Chem., 2005, 3 :2755-2761.
- [75] T.H. Steinberg, R.P. Haugland, V. Singer. Applications of sypro orange and sypro red protein gel stains[J]. Anal. Biochem., 1996, 239 (2): 238-245.
- [76] 刘保生, 高静, 杨更亮. 吖啶橙罗丹明 6G 荧光共振能量转移及其罗丹明 6G 荧光猝灭法测定蛋白质[J]. 分析化学, 2005, 33 (4):546-548.
- [77] A.Q. Gong, X.S. Zhu, Y.Y. Hu, S.H. Yu. A fluorescence spectroscopic study of the interaction between epristeride and bovin serum albumine and its analytical application[J]. Talanta, 2007, 73 (4):668-673.
- [78] 朱英贵, 高峰, 章丽, 谢筱娟, 王伦. 新荧光试剂 1-甲酰基苯并三唑缩邻氨基苯酚的合成及其在蛋白质测定中的应用[J]. 分析化学, 2005, 33 (5): 743-743.
- [79] Cui FL, Fan J, Li JP, Hu ZD. Interactions between 1-benzoyl-4-p- chlorophenyl thiosemicarbazide and serum albumin: investigation by fluorescence spectroscopy [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2004, 12 (1): 151-157.
- [80] Chen Y, Yao MN, Tang YJ, Li YQ. Determination of protein with TPPS by total internal reflection synchronous fluorescence spectroscopy [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2005, 25 (12): 2048-2051.
- [81] A. Sukowska, J. Równicka, B. Bojko, W. Sukowski. Interaction of anticancer drugs with human and bovine serum albumin [J]. Journal of Molecular Structure, 2003, 651-653:133-140
- [82] C.Q. Jiang, L. Luo. Spectrofluorimetric determination of human serum albumin using a doxycycline-europium probe[J]. Anal. Chim. Acta, 2004, 506 (2): 171-175.
- [83] Anna Sukowska. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin [J]. Journal of Molecular Structure, 2002, 614 (1-3): 227-232.

- [84] Claire Dufour, Olivier Dangles. Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1721(1-3): 164-173.
- [85] Y.J. Luo, H.X. Shen. Study on Acridine Orange dimer as a new fluorescent probe for the determination of protein [J]. *Anal. Commun.*, 1999, 36 (4): 135-138.
- [86] 陈鸿琪, 夏闽. 荧光染料吖啶红作测定蛋白质的生物探针[J]. *理化检验·化学分册*, 2001, 37 (2): 53-55.
- [87] 高峰, 朱吕青, 汪乐余, 王伦. 灿烂甲酚蓝与表面活性剂的作用及其在蛋白质测定中的应用[J]. *分析化学*, 2002, 30 (3): 324-326.
- [88] J. C. Garcia-Borron, J. Escribano, M. Jimenez and J. L. Iborra. Quantitative determination of tryptophanyl and tyrosyl residues of proteins by second-derivative fluorescence spectroscopy [J]. *Analytical Biochemistry*, 1982, 125 (2): 277-285.
- [89] 高峰, 朱吕青, 王伦. 耐尔蓝-十二烷基苯磺酸钠-蛋白质体系的荧光反应及其分析应用[J]. *分析化学*, 2003, 31(9): 1085-1088.
- [90] 张明翠, 汪乐余, 李玲, 陈红旗, 张德兴, 王伦. 新荧光试剂 5-(4-羧基苯偶氮)-8-水杨醛缩氨基喹啉荧光增敏法测定人血清蛋白质[J]. *分析化学*, 2004, 32 (3): 74-76.
- [91] C. X. Sun, J. H. Yang, X. Wu. The fluorescent enhancement effect in terbium-gadolinium-protein-cetylpyridine bromide system and its application for the determination of protein at nanogram level [J]. *Biochimie*, 2004, 86 (8): 569-578.
- [92] C. Y. Guo, X. Wu, J. H. Yang, F. Wang, Z. Jia, D. H. Ran, J. H. Zheng. Determination of proteins using fluorescence enhancement of Tb³⁺- Benzoylacetone-Sodium Dodecyl Benzene Sulfonate-protein system[J], *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 2006, 181(1): 50-55.
- [93] D. M. Pinto, E. A. Arriaga, D. Craig, C. A. Boulet et al. Picomolar assay of native proteins by capillary electrophoresis precolumn labeling, submicellar separation, and laser-induced fluorescence detection [J]. *Anal. Chem.*, 1997, 69 (15): 3015-3021.
- [94] S. Stegehuis, U. R. Tjaden, C. M. B. Van den Beld, J. Van der Greef. Bioanalysis of the neuropeptide des-enkephalin- γ -endorphin by high-performance liquid chromatography with on-line sample pretreatment using gel permeation and solid-phase isolation [J]. *J. Chromatogr. A.*, 1991, 549: 185-193.
- [95] T. Toyooka, M. Ishibashi, T. Terao. Sensitive determination of n-terminal prolyl peptides by high-performance liquid-chromatography with laser-induced fluorescence detection [J]. *J. Chromatogr. A.*, 1994, 661(1-2): 105-112.

- [96] K. Ou, M. R. Wilkins, J. X. Yan, A. A. Gooley, Y. Fung, D. Sheumack, K. L. Williams. Improved high-performance liquid chromatography of amino acids derivated with 9-fluorenylmethyl chloroformate [J]. *J. Chromatogr. A*, 1996, 723(2): 219-225.
- [97] Zhang Lide, Mou Jimei. *Nanomaterial Science* [M]. Shenyang:Liaoning Science and Technology Press, 1994:1-111.
- [98] Zhang Zhi, Cui Zuolin. *Nanotechnology and Nanomateria*[M]. Beijing: National Defense Industry Press, 2000: 1-65.
- [99] Xue Qunji, Xu Kang. *Nanochemistry*[J]. *Progress in Chemistry*, 2000, 12 (4):431-444.
- [100] J. Kreuter. *Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy* [M]. Boca Raton: CRC Press, 1992, 36-37.
- [101] R. Mahtab, J. P. Rogers, C. P. Singleton, et al. Preferential Adsorption of a“Kinked”DNA to a Neutral Curved Surface: Comparisons to and Implications for Nonspecific DNA-Protein Interactions [J]. *J Am Chem Soc*, 1996, 118 (30): 7028-7032.
- [102] R. Mahtab, H. H. Harden, C. J. Murphy. Temperature and Salt-Dependent Binding of Long DNA to Protein Sized Quantum Dots: Thermodynamics of “Inorganic Protein”-DNA Interactions [J]. *J Am Chem Soc*, 2000, 122 (1): 14-17.
- [103] 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.
- [104] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions [J]. *Nature*, 1973, 241: 20~22.
- [105] Rosi N L, Mirkin C A. Nanostructures in Biodiagnostics [J]. *Chem.Rev.*, 2005, 105 (4): 1547~1562.
- [106] Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin D J, Whyman R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system [J]. *J.Chem.Soc., Chem.Commun.*, 1994, (7): 801~802.
- [107] Brust M, Fink J, Bethell D, Schiffrin D J, Kiely C J. Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles [J]. *J.Chem. Soc., Chem.Commun*, 1995, (16): 1655~1656.
- [108] Wang Z.X, Tan B, Hussain I, Schaeffer N, Wyatt M.F, Brust M, Cooper A I. Design of Polymeric Stabilizers for Size-Controlled Synthesis of Monodisperse Gold Nanoparticles in Water[J]. *Langmuir*, 2007, 23 (2): 885~895.
- [109] Schaeffer N, Tan B, Dickinson C, Rosseinsky M J, Cooper A I, Levy R et al. Fluorescent or not? Size-dependent fluorescence switching for polymer-stabilized gold clusters in the 1.1–1.7 nm size range [J]. *Chem.Commun.*, 2008, (34): 3986–3988.

- [110] A. L. Crumbliss. Colloidal gold as a biocompatible immobilization matrix suitable for the fabrication of enzyme electrodes by electrodeposition [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, 40 (4): 483-490.
- [111] L. Shang, Y. Z. Wang, J. G. Jiang, S. J. Dong. pH-Dependent Protein Conformational Changes in Albumin: Gold Nanoparticle Bioconjugates: A Spectroscopic Study [J]. *Langmuir*, 2007, 23 (5): 2714-2721.
- [112] R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, et al. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles [J]. *Science*, 1997, 277 (22): 1078-1080.
- [113] Dai Q, Liu X, Coutts J, Austin L, Huo Q. A One-Step Highly Sensitive Method for DNA Detection Using Dynamic Light Scattering [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130 (26): 8138-8139.
- [114] O. Andrea, G. Fionn, B. Paul, N. Lorraine, et al. DNA-Templated Assembly of Conducting Gold Nanowires between Gold Electrodes on a Silicon Oxide Substrate [J]. *Chem. Mater.* 2005, 17 (8): 1959-1964.
- [115] M. Ca'rdenas, J. Barauskas, K. Schille'n, J. L. Brennan, M. Brust, T. Nylander. Thiol-Specific and Nonspecific Interactions between DNA and Gold Nanoparticles, *Langmuir*, 2006, 22 (7): 3294-3299.
- [116] 蔡强, 吴维明, 陈裕泉. 纳米金的电检测方法与免疫检测中的应用 [J]. *传感技术学报*, 2003, 16 (2): 124-127, 131.
- [117] Hill H D, Vega R A, Mirkin C A. Nonenzymatic Detection of Bacterial Genomic DNA Using the Bio Bar Code Assay [J]. *Anal. Chem.*, 2007, 79 (23): 9218-9223.
- [118] Ambrosi A, Castañeda M T, Killard A J, Smyth M R, Alegret S, Merkoci A. Double-Codified Gold Nanolabels for Enhanced Immunoanalysis [J]. *Anal. Chem.*, 2007, 79 (14): 5232-5240.
- [119] S. H. Brewer, W. R. Glomm, M. C. Johnson, M. K. Knag, S. Franzen. Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces, *Langmuir*, 2005, 21 (20): 9303-9307.
- [120] Zhang J, Song S, Wang L, Pan D, Fan C. A gold nanoparticle-based chronocoulometric DNA sensor for amplified detection of DNA [J]. *Nat. Protoc.*, 2007, 2 (11): 2888-2895.
- [121] Wang Y, Li D, Ren W, Liu Z, Dong S, Wang E. Ultrasensitive colorimetric detection of protein by aptamer-Au nanoparticles conjugates based on a dot-blot assay [J]. *Chem. Commun.*, 2008, (22): 2520-2522.
- [122] Manimaran M, Jana N R. Detection of protein molecules by surface-enhanced Raman spectroscopy-based immunoassay using 2-5 nm gold nanoparticle labels [J]. *J. Raman Spectrosc.*, 2007, 38 (10): 1326-1331.

- [123] Xu X, Han M S, Mirkin C.A. A Gold-Nanoparticle-Based Real-Time Colorimetric Screening Method for Endonuclease Activity and Inhibition [J]. *Angew.Chem.Int.Ed.*, 2007, 46 (19): 3468-3470.
- [124] Kneipp J, Kneipp H, McLaughlin M, Brown D, Kneipp K. In Vivo Molecular Probing of Cellular Compartments with Gold Nanoparticles and Nanoaggregates [J]. *Nano.Lett.*, 2006, 6 (10): 2225-2231.
- [125] Souza G, Christianson D, Staquicini F, Ozawa M. Networks of Gold Nanoparticles and Bacteriophage as Biological Sensors and Cell Targeting Agents [J]. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 2006, 103 (5): 1215-1220.
- [126] Li D, Wieckowska A, Willner I. Optical Analysis of Hg^{2+} Ions by Oligonucleotide-Gold-Nanoparticle Hybrids and DNA-Based Machines [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47 (21): 3927-3931.
- [127] 刘玫瑰, 曹春, 曹名, 朱昌青. 发光金纳米粒子测定曲霉 X-100 及其临界胶束浓度[J]. *分析化学*, 2009, 37 (10): 1503-1506.
- [128] Y. Dabin, W. W. Y. Vivian. Hydrothermal-Induced Assembly of Colloidal Silver into Various Nanoparticles on the Basis of HTAB-Modified Silver Mirror Reaction [J]. *J. Phys. Chem. B*, 2005, 109 (12): 5497-5503.
- [129] R. Dootz, J. J. Nie, B.Y. Du, S. Herminghaus, T. Pfohl. Raman and Surface Enhanced Raman Microscopy of Microstructured Polyethylenimine/DNA Multilayers [J]. *Langmuir*, 2006, 22 (4): 1735-1741.
- [130] K. Aslan, J. Huang, G. M. Wilson, C. D. Geddes. Fluorescent Core-Shell $Ag@SiO_2$ Nanocomposites for Metal-Enhanced Fluorescence and Single Nanoparticle Sensing Platforms [J]. *J. Am. Chem. Soc*, 2007, 129 (6): 1524-1525.
- [131] C.H.Liu, X.P Yang, H.Y Yuan, Z.D.Zhou, D.Xiao. Preparation of silver nanoparticle and its application to the determination of ct-DNA [J]. *Sensors*, 2007, 7 (5): 708-718.
- [132] Shen Xing-Can, Liu Xin-Yan, Liang Hong, Lu Xin. Spectroscopic Studies of Interaction between Bovine Hemoglobin and Ag Nanoparticles. *Acta Chimica Sinica*.2006, 64 (6): 469-474.
- [133] A. Wu, W. L. Cheng, Z. Li, J. G. Jiang, E. Wang. Electrostatic-assembly metallized nanoparticles network by DNA template [J]. *Talanta*, 2006, 68 (3): 693-699.
- [134] 韦小玲, 张玉兰, 蒋治良.一种检测痕量 IgG 的免疫纳米银共振散射光谱探针[J]. *光谱学与光谱分析*, 2009, 29 (6): 1640-1642.
- [135] 孙长侠. 蛋白质与其他物质的相互作用以及分析应用的研究. 山东大学博士论文, 2005:62-63.

- [136] Haiping Zhou, Xia Wu, Jinghe Yang. Study on the interaction of nucleic acids with silver nanoparticles—Al(III) by resonance light scattering technique and its analytical application[J]. *Talanta*, 2009, 78 (3): 809-813.
- [137] Alivisatos A P. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots [J]. *Science*, 1996, 271: 933-937.
- [138] Bruchez M J, Moronne M, Gin p, Weiss S, Alivisatos P A. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. [J]. *Science*, 1998, 281: 2013-2016.
- [139] Chan W C W, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. [J]. *Science*, 1998, 281: 2016-2018.
- [140] Ebenstein Y, Gassman N, Kim S, et al. Lighting Up individual DNA binding protein with quantum dots[J]. *Nano Lett*, 2009, 9 (4): 1598-1603.
- [141] Yum K, Na S, Xiang Y, et al. Mechanochemical delivery and dynamic tracking of fluorescent quantum dots in the cytoplasm and nucleus of living cells [J]. *Nano Lett*, 2009, 9 (5): 2193-2198.
- [142] Yong Ken-Tye, Hu R, Roy I, et al. Tumor targeting and imaging in live animals with functionalized semiconductor quantum rods [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2009, 1 (3): 710-719.
- [143] 严拯宇, 庞代文, 邵秀芬, 戴美玲, 彭博, 胡育筑. 功能性硫化锌纳米荧光探针与 DNA 的相互作用[J]. *中国药科大学学报*, 2005, 36 (5): 432-435.
- [144] Lingerfelt B M , Mattoussi H, Goldman E R, et al. Preparation of quantum dots biotinconjugates and their use in immunochromatography assays[J]. *Anal Chem*, 2003, 75 (16): 4043-4049.
- [145] Goldman E R, Clapp A R, Anderson G P, et al. Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents [J]. *Anal Chem*, 2004, 76 (3): 684-688.
- [146] 赵亮亮. 纳米粒子与生物大分子相互作用的研究及其分析应用. 山东大学硕士论文, 2008, 30-40.
- [147] Wang S, Mamedova N , Kotov N A , et al. A ntigen-antibody immunocomplex from CdTe nanoparticle bioconjugates [J]. *Nano Lett*, 2002, 2 (8) : 817-822.
- [148] Han M, Gao X, Su J Z, et al. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19 (7): 631-635.
- [149] Ghazani A A, Lee J A, Klostranec J, et al. High throughput quantification of protein expression of cancer antigens in tissue microarray using quantum dot nanocrystals [J]. *Nano Lett*, 2006, 6 (12): 2881-2886.
- [150] M. Charreyre, P. Zhang, M. A. Winnik, C. Pichot, C. Graillat. Adsorption of rhodamine 6G onto polystyrene latex particles with sulfate groups at the surface [J]. *J. Colloid. Interface Sci.*, 1995, 170 (2): 374-382.

- [151] R. Meallet-Renault, P. Denjean, R. B. Pansu. Polymer beads as nano-sensors [J]. *Sensors and Actuators B*, 1999, 59 (2-3): 108-112.
- [152] H. Gao, Y. Zhao, S. Fu, B. Li, M. Li. Preparation of a novel polymeric fluorescent nanoparticles[J]. *Colloid Polym. Sci.*, 2002, (280): 653-660.
- [153] H. Härmä, T. Soukka, T. Lövgren. Europium nanoparticles and time-resolved fluorescence for ultrasensitive detection of prostate-specific antigen [J]. *Clin Chem.* 2001, 47: 561-568.
- [154] T. Soukka, K. Anttonen, H. Härmä, A. M. Pelkkikangas, P. Huhtinen, T. Lövgren. Highly sensitive immunoassay of free prostate-specific antigen in serum using europium (III) nanoparticle label technology [J]. *Clin. Chim. Acta*, 2003, 328 (1-2):45-58.
- [155] J. R. Taylor, M. M. Fang, S. Nie. Probing specific sequences on single DNA molecules with bioconjugated fluorescent nanoparticles [J]. *Anal. Chem.*, 2000, 72 (9): 1979-1986.
- [156] Chen Hongqi, Wang Lun, Wang Leyu, et al. Preparation of novel composite nanoclusters and their application in the ultrasensitive detection of proteins[J]. *Analitica Chimica Acta*, 2004, 521(1):9 - 15.
- [157] Wang Lun, Chen Hongqi, Wang Leyu, et al. Preparation and application of a novel composite nanoparticle as a protein fluorescence probe [J]. *Analytical Letters*, 2004, 37 (2):213 - 223.
- [158] Wang Lun, Xia Tingting, Wang Leyu, et al. Preparation and application of a novel core-shell organic nanoparticle as a fluorescence probe in the determination of nucleic acids [J]. *Microchim Acta*, 2005, 149 (3-4):267- 272.
- [159] Wang Lun, Bian Guirong, Wang Leyu, et al. Fluorescence determination of DNA with 1-pyrenebutyric acid nanoparticles coated with β -cyclodextrin as a fluorescence probe [J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 2005, 61(6):1201-1205.
- [160] Galan J. A., Guo M, Sandchez E. E., Cantu E, Rodriguez-Acosta A, Perez J. C., Tao W. A. Quantitative analysis of snake venom by soluble polymer-based isotope labeling[J]. *Mol. Cell. Proteomics*, 2008, 7 (4): 785-799.
- [161] Tao W. A., Wollscheid B, O'Brien R, Eng J, Li X, Bodenmiller B, Watts J, Hood L and Aebersold R. Quantitative phosphoproteome analysis using a dendrimer conjugation chemistry and mass spectrometry [J]. *Nature Methods*, 2005, 2 (8) : 591-598.
- [162] He X. C., Yin T, Grindley J. C., Tao W. A., Dirisina R, Li L, et al. PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis[J]. *Nature Genetics*, 2007, 39 (2): 189-198.
- [163] Anshu Yang, Lin Yang, Wei Liu, Zhuoya Li, Huibi Xu, Xiangliang Yang. Tumornecrosis factor alpha blocking peptide loaded PEG-PLGA nanoparticles: preparation and in vitro evaluation [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 331 (1):123-132.
- [164] 杨安树, 刘卫, 李卓娅, 徐辉碧, 杨祥良. 载肿瘤坏死因子拮抗肽 PEG-PLGA 纳米粒与血清蛋白作用研究[J]. *中国新药杂志*, 2008, 17 (13): 1140-1144.

- [165] X. Zhao, R. Tapeç, W. Tan. Ultrasensitive DNA detection using highly fluorescent bioconjugated nanoparticles [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125 (38): 11474-11475.
- [166] X. Zhao, L. R. Hilliard, S. J. Mechery, Y. Wang, R. P. Bagwe, S. Jin, W. Tan. A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles [J]. *PNAS*. 2004, 101 (42): 15027-15032.
- [167] 衣光舜. 上转换荧光纳米粒子的合成及其在生物标记中的应用研究. 清华大学博士学位论文, 2003, 40-50.
- [168] H. J. M. A. A. Zijlmans, J. Bonnet, J. Burton, K. Kardos, T. Vail, R. S. Niedbala, H. J. Tanke. Detection of cell and tissue surface antigens using up-converting phosphors: a new reporter technology [J]. *Anal. Biochem.*, 1999, 267 (1): 30-36.
- [169] F. van de Rijke, H. Zijlmans, S. Li, T. Vail, A. K. Raap, R. S. Niedbala, H. J. Tanke. Up-converting phosphor reporters for nucleic acid microarrays [J]. *Nat. Biotechnol.* 2001, 19: 273-276.
- [170] P. Corstjens, M. Zuiderwijk, A. Brink, S. Li, H. Feindt, R. S. Niedbala, H. Tanke. Use of up-converting phosphor reporters in lateral-flow assays to detect specific nucleic acid sequences: a rapid, sensitive DNA test to identify human papillomavirus type 16 infection [J]. *Clin. Chem.*, 2001, 47: 1885-1893.
- [171] G. Yi, B. Sun, F. Yang, D. Chen, J. Cheng. Synthesis and characterization of high-efficient up-conversion phosphors: ytterbium and erbium co-doped lanthanum molybdate [J]. *Chem. Mater.*, 2002, 14 (7): 2910-2914.
- [172] H. Lu, G. Yi, S. Zhao, D. Chen, L. Guo, J. Cheng. Synthesis and characterization of multi-functional nanoparticles possessing magnetic, up-conversion fluorescence and bio-affinity properties [J]. *J. Mater. Chem.*, 2004, 14: 1336-1341.
- [173] J.J. Marty, R.C. Oppenheimer, P. Speiser. Nanoparticles-A New Colloidal Drug Delivery System [J]. *Pharm Acta Helv*, 1978, 53 (1):17-23.
- [174] C. Weber, S. Reiss and K. Langer. Preparation of surface modified protein nanoparticles by introduction of sulfhydryl groups [J]. *Int J Pharm*, 2000, 211 (1-2): 67-78.
- [175] Janes K A, Calvo P, Alonso M J. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules[J]. *Adv. Drug Del. Rev.*, 2001, 47 (1): 83-97.
- [176] Aspdén T J, Mason J D, Jones N S, Aspdén T J, Skaugrud O, Illum L. Chitosan as a nasal delivery system: The effect of chitosan on in vitro and in vivo mucociliary transport rates [J]. *J. Pharm. Sci.*, 1997, 86 (4): 509-513.
- [177] Tobio M, Gerf R, Sanchez A, Langer R, Alonso M J. Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration [J]. *Pharm. Res.*, 1998, 15 (2): 270-275.

- [178] Wang Chun, Yang Liansheng, Fu Xiong. Preparation and characterization of water-soluble chitosan nanoparticles as BSA delivery system [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2006, 25 (12): 1431-1435.
- [179] 陈艳晶, 杨景和, 苏震. 壳聚糖与 DNA 相互作用的研究及分析应用[J]. 南昌大学学报, 2006, (30): 1085-1086.
- [180] Katz, E. and Willner. I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems, properties, and applications [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2004, 43 (45): 6042-6108.
- [181] 李富荣, 乔飞燕, 孔小丽, 周汉新, 齐晖, 任莉莉. 抗体和寡核苷酸双标记纳米金生物探针的制备及生物学特性[J]. 高等学校化学学报, 2009, (301): 60-63.
- [182] Zhang, J., Song, S., Zhang, L., Wang, L., Wu, H., Pan, D., and Fan, C. Sequence-Specific Detection of Femtomolar DNA via a Chronocoulometric DNA Sensor (CDS): Effects of Nanoparticle-Mediated Amplification and Nanoscale Control of DNA Assembly at Electrodes [J]. J. Am. Chem. Soc., 2006. 128 (26): 8575-8580.
- [183] Li J., Song S.P., Liu X.F., Wang L. H., Pan D., Huang Q., Zhao Y. and Fan C. Enzyme-Based Multi-Component Optical Nanoprobers for Sequence-Specific Detection of DNA Hybridization[J]. Adv.Mater. 2008, 20 (3): 497-500.
- [184] Suzuki, D.; Kawaguchi, H. Modification of Gold Nanoparticle Composite Nanostructures Using Thermosensitive Core-Shell Particles as a Template [J]. Langmuir, 2005, 21 (18): 8175-8179.
- [185] Suzuki, D., Kawaguchi, H. Gold Nanoparticle Localization at the Core Surface by Using Thermosensitive Core-Shell Particles as a Template [J]. Langmuir, 2005, 21 (25): 12016-12024.
- [186] Xu J, Zeng F, Wu S Z, Liu X X, Hou C, Tong Z. Gold nanoparticles bound on microgel particles and their application as an enzyme support [J]. Nanotechnology, 2007, 18 (26): 265704.
- [187] 张捷, 林燕, 汪畅, 梁勇, 江桂斌, 周群芳. 富勒烯对 PCR 反应的抑制作用[J]. 环境科学学报, 2008, 28 (12): 2573-2577.
- [188] Yang, RH; Tang, ZW; Yan, JL, et al. Noncovalent assembly of carbon nanotubes and single-stranded DNA: An effective sensing platform for probing biomolecular interactions [J]. Anal. Chem, 2008, 80 (19): 7408-7413.
- [189] Liangliang Zhao, Xia Wu, Honghong Ding and Jinghe Yang, Fluorescence enhancement effect of morin-nucleic acid-L-cysteine-capped nano-ZnS system and the determination of nucleic acid[J]. Analyst, 2008, 133 (7):896-902.
- [190] US, Dugger .B.M.(Ameriean Cyanamid Co.), 1949, 2482055.

- [191] Kuhne M, Ebrecht, A. Residues Vet. Drugs Food. Proc. 2nd Euroresidue Conf., 1993, (2): 429-429
- [192] Alwarthan A A, et al. Spectrophotometric determination of oxytetracycline by flow injection [J]. Analyst, 1991, 116 (2): 183-186.
- [193] 魏小琴. 共振瑞利散射光谱法测定四环素类抗生素的新方法研究. 西南大学硕士学位论文, 2006, 60-70.
- [194] 王珉, 凌飞. 碱性降解 CTMAB 增敏荧光法测定金霉素[J]. 安徽化工, 2001, 27 (3): 46-47.
- [195] Han Heyou, He Zhike, Zeng Yun e. Chemiluminescence Determination of Tetracyclines Using a Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) and Potassium Permanganate System [J]. Anal. Sci. 1999, 15 (5): 467-470.
- [196] Li Baoxin, Zhang zhujun, Liu wei. Flow-injection chemiluminescence determination of chlortetracycline using on-line electrogenerated $[\text{Cu}(\text{HIO}_6)_2]_5^-$ as the oxidant [J]. Talanta, 2001, 55 (6): 1097-1102.
- [197] Sunderland Julie, Lovering, Andrew M, Anne A, et al. Determination by HPLC of chlortetracycline in pig faeces [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2003, 52 (1): 135-137.
- [198] Mary C. Carson, Maureen A. Ngoh, Stephen W. Hadley. Confirmation of multiple tetracycline residues in milk and oxytetracycline in shrimp by liquid chromatography-particle beam mass spectrometry [J]. J. Chromatogr. Biomed., 1998, 712 (1-2): 113-128.
- [199] 黎朝, 王尊本. 金霉素的化学发光分析法研究[J]. 分析化学, 1998, 26 (5): 556-560.
- [200] Kumar CV, Barton JK, Turro NJ. Photophysics of ruthenium complexes bound to double helical DNA [J]. J Am Chem Soc, 1985, 107 (19): 5518-5523.
- [201] Song Y M, Yang P J, Wang L F, et al. Study on the interactions between $\text{Sm}(\text{RA})_2 \cdot \text{Ac} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and DNA [J]. Acta Chimica Sinica, 2003, 61 (8): 1266-1270.
- [202] Z. L. Zhang, W. M. Huang, J. L. Tang, E. K. Wang, S. J. Dong. Conformational transition of DNA induced by cationic lipid vesicle in acidic solution, spectroscopy investigation [J]. Biophysical Chemistry, 2002, 97 (1): 7-16.
- [203] Y. L. Zhou, Y. Z. Li. Studies of interaction between poly(allylaminehydrochloride) and double helix DNA by spectral methods [J]. Biophysical Chemistry, 2004, 107 (3): 273-281.
- [204] Song Y M, Zhang X R, W J X, Wu Q. The interactions between berberine and ethidium bromide with DNA[J]. Journal of Northwest Normal University (Natural Science), 2006, 42 (5): 63-67.
- [205] 黄承志, 李原芳, 李念兵等. 耐尔蓝硫酸盐在核酸分子表面的长距组装及核酸的三波长共振散射测定[J]. 分析化学, 1999, 27 (11): 1241-1247.

- [206] Huang C Z, L I K A. Tong S Y. Spectrophotometry of nucleic acids by their effect on the complex of cobalt (II) with 4-[(5-chloropyridyl) azo]-1 , 3-diamino-benzene [J] . Anal Chim Acta, 1997, 345 (1-3) :235-242.
- [207] 张锦坤, 陆廉贞. 内科讲座:肠胃疾病(第一版). 人民卫生出版社, 1981, 184-184.
- [208] 陈粤华. 用金纳米微粒作探针共振瑞利散射法测定药物的新方法研究. 西南大学硕士论文, 2005, 55-60.
- [209] J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maintis. Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd ed (M). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, 9.16-9.19.
- [210] 张黔玲, 刘剑洪, 张培新, 任祥忠, 李翠华, 洪伟良, 刘建忠, 计亮年. 配体形状对多吡啶铜(II)配合物与DNA作用的影响[J]. 无机化学学报, 2005, 21 (3), 344-348.
- [211] Tysoes A, Morgan J, Bakert C, et al. Spectroscopic investigation of differential binding modes of A- and A- Ru(bpy)₂(ppz)²⁺ with calf thymus DNA [J]. J Phys Chem, 1993, 97 (8):1707- 1711.
- [212] 张国文等. 山姜素与脱氧核糖核酸的相互识别研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28 (8): 1910-1913.
- [213] 吴会灵, 杨梵原, 张重杰, 何锡文. 小分子与核酸相互作用的研究进展[J]. 分析化学评述与进展, 2004, 32 (9): 1256-1261.
- [214] 王飞.蛋白质和核酸与小分子的相互作用及其分析应用的研究. 山东大学博士论文, 2006, 87-88.
- [215] C.X. Sun, J.H. Yang, L. Li, X. Wu, Y. Liu, S.F. Liu. Advances in the study of luminescence probes for proteins [J]. J. Chromatogr. B. 2004, 803 (2): 173-190.
- [216] Y.B. Wang, J.H. Yang, X. Wu, L. Li, S.N. Sun, B.Y. Su. Progress of spectral probes for nucleic acids [J]. Anal. Lett., 2003, 36 (10): 2063-2094.
- [217] 宋小磊, 白净.近红外荧光散射断层成像的研究进展[J]. 国外医学:生物医学工程分册, 2005, 28 (2): 70-75.
- [218] 王君等. 超声波照射激活亚甲基蓝(MB)声动力损伤牛血清白蛋白(BSA) [J]. 应用化学, 2008, 25 (12): 1399-1403.
- [219] H.Zhu, C.L. Tong. Synchronous fluorescence determination of DNA based on the interaction between methylene blue and DNA [J]. Anal. Chim. Acta, 2007, 587 (2): 187-193.
- [220] 易平贵, 商志才. 荧光光谱法研究亚甲基蓝与蛋白质的结合反应[J]. 光谱学与光谱分析, 2001, 21 (6): 826-828.
- [221] M.K. Bahng, C. Mukarakate, D.J. Robichaudand, M.R. Nimlos. Current technologies for analysis of biomass thermochemical processing: A review [J]. Anal. Chim. Acta, 2009, 651 (2):117-138.

- [222] X.L.Xu. Experiment of biochenmistry [M].Beijing: Medical Technology of China Press, 1994, 31-31.
- [223] G.C. Zhao, J.J. Zhu, H.Y. Chen. Spectroscopic studies of the interactive model of methylene blue with DNA by means of β -cyclodextrin [J]. Spectrochim. Acta A, 1999, 55 (5): 1109-1117.
- [224] X.Z.Feng, Z.Lin, L.J.Yang, C.Wang, C.L.Bai. Investigation of the interaction between acridine orange and bovine serum albumin [J]. Talanta, 1998, 47 (5):1223-1229.
- [225] 陈思光, 杜社亮等. D- π -A 分子 H-聚集体的电子光谱[J]. 高等学校化学学报, 2001, 22 (2): 245-248.
- [226] 杨文胜等. 含有识别基团的两亲性给-受体型分子的聚集行为 [J]. 中国科学: B 辑, 2001, 31:161-166.
- [227] H.S. Franks, M.W. Evans. Free volume and entropy in condensed systems. III. Entropy in binary liquid mixtures; partial molal entropy in dilute solutions; structure and thermodynamics in aqueous electrolytes [J]. J.Chem.Phys., 1945, 13: 507-532.
- [228] Q.E.Cao, Y.K.Zhao, X.J.Yao, Z.D.Hu, Q.H.Xu. The synthesis and application of 1-(o-nitrophenyl)-3-(2-thiazolyl)triazene for the determination of palladium(II) by the resonance enhanced Rayleigh light-scattering technique [J]. Spectro Acta Part A, 2000, 56 (7): 1319-1327.
- [229] 沈星灿, 梁宏等. 圆二色光谱分析蛋白质构象的方法及研究进展[J]. 分析化学评述与进展, 2004, 32 (3): 388-394.
- [230] H.E. Edwards, J.K. Thomas. A fluorescence-probe study of the interaction of cycloheptaamylose arenes and amphiphilic molecules [J]. Carbohydr. Res., 1978, 65 (2): 173-182.
- [231] A. Nakajima. A study of the system of pyrene and β -cyclodextrin in aqueous solution utilizing the intensity enhancement phenomenon [J]. Spectrochim. Acta A, 1983, 39 (10): 913-915.
- [232] F.G. Sánchez, A.N. Díaz, M.M.L.Guerrero. Simultaneous determination of glycols based on fluorescence anisotropy [J]. Anal. Chim. Acta, 2007, 582 (1): 92-97.

致 谢

首先深深地感谢我的导师——吴霞教授！本论文工作从选题、实验到撰写都是在吴霞教授的悉心指导和严格要求下完成的，工作中每一步进展和成绩的取得无不凝聚着的导师的智慧和心血。吴老师严谨求实、富于创新的治学作风，一丝不苟的治学态度使我终生受益，并教我迈出了科研工作的第一步。非常感谢吴老师所给予的学习和生活上的指导和帮助。论文完成之际，谨向吴老师的辛勤培育致以崇高的敬意和衷心的感谢，祝愿吴老师身体健康，工作顺利！

感谢杨景和教授在实验过程和论文完成工作中给予的指导和帮助，杨老师对科研精益求精、严谨治学的态度，顽强的敬业精神，渊博的知识，平易近人的高贵品质给我留下了深刻的印象，使我不仅学到了很多知识，也懂得了很多做人的道理。在此对杨老师致以衷心的感谢！

非常感谢化学与化工学院的各位领导和老师，感谢你们为我创造的良好学习环境和科研条件。在论文完成过程中，徐桂英、郭玉梅、毛宏志等老师为我提供了诸多帮助与方便，在此表示感谢。

感谢本实验室的丁红红、赵亮亮、徐巍、周海平、曹迎华、张凤菊、孟凡会、李秀珍等师兄师姐师妹们给我的关怀和帮助，在与你们的朝夕相处中，我无时无刻不感到集体的快乐与温暖，感谢你们的鼓励！深深怀念实验室中度过的每一天！感谢跟我在山大一起求学的张少华、李媛媛、黄延敏、陈辉室友，愿大家永远快乐！

深深感谢我的亲人们，尤其是一直支持我的母亲！三年前母亲送我来山大的情景历历在目，而今我即将踏出校园。母亲的爱一直是我漫漫求学路上最坚强的后盾。

玉兰已谢，芙蓉未浓，别了山大！

刘潇戛

2010年5月19日

硕士期间发表论文

1. Xiaoyu Liu, Xia Wu and Jinghe Yang, Protein determination using methylene blue in a synchronous fluorescence technique, *Talanta*, 2010, 81(3): 760.
2. 刘潇戡, 吴霞, 杨景和, 同步荧光增强效应测定蛋白质, *分析化学*, 2009, 37(A01): 319.
3. Hongfei Jiang, Guilan Wang, Wenzhu Zhang, Xiaoyu Liu, Jingli Yuan, et al, Preparation and Time-Resolved Luminescence Bioassay Application of Multicolor Luminescent Lanthanide Nanoparticles, *J Fluoresc.* 2010, 20(1): 321.

学位论文评阅及答辩情况表

论文评阅人	姓 名		专业技术 职 务	是否博导 (硕导)	所 在 单 位		总体评价 ※
	杨景和		教授	是	山东大学		A
	智伟		教授	是	济南大学		A
答辩委员会成员	姓 名		专业技术 职 务	是否博导 (硕导)	所 在 单 位		
	主席	杨景和	教授	是	山东大学		
	委 员	智伟	教授	是	济南大学		
		刘淑清	教授	是	山东大学		
		黄锡荣	教授	是	山东大学		
		周广军	副教授	是	山东大学		
	员						
答辩委员会对论文的 总体评价※			A	答辩秘书	刘淑芳	答辩日期	2010.5.25
备注							

※ 优秀为“A”；良好为“B”；合格为“C”；不合格为“D”。

