

• 研究论文 •

## 未修饰的纳米金结合等位特异性扩增来检测 K-ras 基因点突变

周 政 朱德斌 邢 达\*

(华南师范大学激光生命科学研究所 广州 510631)

**摘要** 将等位基因特异性扩增的特异性与纳米金特殊的光学性质相结合, 发展了一种新的基因点突变检测方法. 以肿瘤中常见的 K-ras 癌基因第 12 位密码子作为点突变检测对象, 采用突变型引物对待测序列进行等位特异性扩增. 突变型样品扩增产物中大部分是双链 DNA; 而野生型样品由于不能被顺利扩增, 产物中大部分是单链 DNA. 以纳米金颗粒作为报告基团, 向两种不同基因型扩增产物中依次加入纳米金胶和盐溶液, 野生型基因扩增产物中的单链引物被吸附到纳米金颗粒表面, 使得纳米金在适宜浓度的盐溶液中不发生聚集; 突变型样品扩增产物中的双链 DNA 由于与纳米金颗粒间存在静电斥力而不能被吸附到纳米金颗粒表面, 纳米金在该浓度的盐溶液中发生聚集, 导致两种基因型的混合液在吸收光谱和颜色方面均存在显著差异, 从而实现了检测基因点突变的目的. 该检测方法直观、快速、简便, 实验成本低, 能够检测到 pmol 量级的样品, 为点突变检测提供了一种实用的新方法.

**关键词** 纳米金; 表面等离子峰; 等位特异性扩增; 点突变

## Detection of K-ras Point Mutation by Unmodified Gold Nanoparticles and Allele-specific Amplification

ZHOU, Zheng ZHU, De-Bin XING, Da\*

(Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631)

**Abstract** A novel method for point mutation detection was developed. This approach combined the optical properties of gold nanoparticles with the specificity of allele-specific amplification (ASA). K-ras oncogene was studied for its possible point mutation at codon 12. In ASA, only the mutant K-ras gene can be amplified using the mutant-specific primers. Thus, the mutant amplification products were made of mostly double-stranded DNA, while the wild-type products were made of mostly unconsumed single-stranded DNA. Unmodified gold nanoparticles were used as reported groups. The amplification products were mixed with the gold colloid, followed by addition of salt solution. Because single- and double-stranded DNA have different electrostatic interactions with gold nanoparticles, only the gold nanoparticles in the wild-type mixtures did not aggregate due to the adsorption of ss-strand DNA. Therefore, the two kinds of genotype mixtures gave different absorption spectra and colors were observed easily by naked eyes. This new method is rapid, simple, low cost, and will offer a broad application for point mutation detection.

**Keywords** gold nanoparticle; surface plasmon peak; allele-specific amplification; point mutation

基因点突变分析是分子生物学的一个重要话题. 在传统的点突变检测方法中, 常采用各种标记探针, 如放射性元素探针、荧光色素探针及酶标记探针等; 或采用

各种染色方法, 例如溴化乙锭(ethidium bromide, EB)染色. 这些技术大都存在着操作复杂、费时或费用昂贵等缺点, 因此发展一种简便、快速、低成本的基因检测方

\* E-mail: xingda@scnu.edu.cn; Fax: +86-20-85216052; Tel.: +86-20-85210089.

Received September 14, 2005; revised January 19, 2006; accepted March 8, 2006.

国家重大基础研究前期专项(Nos. 60378043, 30470494)和广东省自然科学基金(Nos. 015012, 04010394)资助项目.

法具有重要意义<sup>[1-4]</sup>.

目前, 纳米金(gold nanoparticles, Au-nps)作为一种新型的色团报告分子已被应用于基因检测中. 一方面, 纳米金具有高的消光系数. 例如, 粒径为 13 和 50 nm 的金颗粒在波长为 520 nm 处的消光系数分别为  $2.7 \times 10^8$  和  $1.5 \times 10^{10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 它比常规有机发光团分子的消光系数高 3~5 个数量级<sup>[5]</sup>; 另一方面, 纳米金的光学性质依赖于粒子直径以及间距, 由于纳米金胶颜色与粒子的聚集程度有密切关系, 根据其聚集程度的不同, 颜色可由酒红色逐渐变成粉色, 紫色或灰色等<sup>[6,7]</sup>. 纳米金表面修饰一段寡核苷酸序列制成纳米金探针, 在靶基因序列识别及单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分析中取得了显著的效果<sup>[8,9]</sup>, 其中 Mirkin 等<sup>[10-12]</sup>在纳米金探针的应用上开展了一系列具有开创性的工作. Rothberg 等<sup>[13]</sup>在 2004 年发展了一种新颖的纳米金比色基因检测(colorimetric detection)方法. 该法直接采用纳米金作为比色报告基团, 根据单链 DNA (single-stranded DNA, ss-DNA)和双链 DNA (double-stranded DNA, ds-DNA)与纳米金存在不同的静电作用, 即可实现对特定基因序列的识别及单核苷酸多态性的分析. 该法的检测原理如图 1 所示. 单链和双链 DNA 具有不同的结构, 因此与纳米金存在不同的静电作用力; 单链 DNA 与纳米金之间存在的范德华力使单链 DNA 能够被吸附到纳米金颗粒表面, 且吸附的速率与单链长度及环境温度有关; 而双链 DNA 由于其骨架中带负电的磷酸根基团( $\text{PO}_4^{3-}$ )暴露在外, 与表面带负电荷的纳米金颗粒之间存在静电斥力, 使双链不能被吸附到纳米金颗粒表面. 表面吸附了 DNA 的纳米金能在较高浓度的盐溶液中不发生聚集. 因此, 纳米金在盐溶液的调控下能够比色识别单链和双链 DNA, 进而达到判断基因是否发生杂交及分析单核苷酸多态性的目的<sup>[14]</sup>.

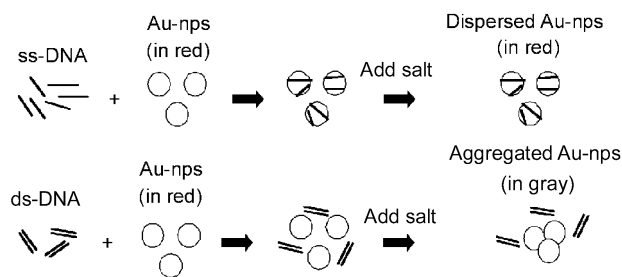


图 1 纳米金识别单链和双链 DNA 过程示意图

Figure 1 The scheme for differentiating between single- and double-stranded oligonucleotides by Au-nps

等位基因特异性扩增(Alelle-specific amplification, ASA)是利用 DNA 延伸过程中 3'端碱基的特殊重要性所设计的扩增技术, 用于对已知突变基因进行检测, 是聚

合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术应用的. 等位特异性扩增的原理为: 当引物 3'末端碱基与模板互补时, DNA 延伸, 产生扩增产物; 若模板中存在与引物错配的碱基, 则导致样品中无扩增产物产生. 根据此原理设计不同的上游引物就可以检测出突变基因, 并可鉴定出基因突变的方式. 在本文中, 通过设计突变型上游引物, 该引物的 3'末端碱基与突变型 DNA 互补, 而与野生型 DNA 不互补. 对于突变型样品, 引物能顺利延伸, 扩增产物中含有大量的双链 DNA. 对于野生型样品, 引物不能顺利延伸, 从而无法扩增出双链 DNA, 溶液中大部分是未被消耗完的单链引物. 当加入能比色识别单链和双链 DNA 的纳米金胶后, 不同基因型的混合液在颜色及光谱上会存在差异, 从而实现检测基因点突变的目的.

K-ras 基因是一种分子量为 21 kD, 由 188~189 个氨基酸组成的癌基因. K-ras 基因点突变通常与腺瘤或癌的形成有关, 例如, 约 50% 的结直肠癌中存在 K-ras 点突变; 胰腺癌中 K-ras 基因的突变率高达 70%~100% 等<sup>[15]</sup>, 所以对 K-ras 基因点突变的检测在诊断相关的腺瘤或癌中具有重要的临床意义.

本文首次将等位特异性扩增技术与纳米金比色法相结合, 用于分析 K-ras 基因密码子 12 是否发生点突变, 希望发展一种更为简便、快速的基因点突变检测方法.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

纳米金胶(平均粒径为 15 nm)购自华美生物公司, 在不用时应于 4 °C 低温避光保存; 其它常用试剂为市售分析纯; 实验用水为自制三次蒸馏水; 磷酸缓冲盐溶液(PBS,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )采用三次蒸馏水配制; 吸收光谱仪(Lambda35 Uv-vis spectrometer)为 Perkin-Elmer 公司产品; 引物序列由上海生物工程公司合成.

### 1.2 纳米金及其聚集的吸收光谱分析

在一个微量比色皿(5 mm)中加入纳米金胶(100  $\mu\text{L}$ )和三次蒸馏水(60  $\mu\text{L}$ ); 在另一同等规格的比色皿中加入纳米金胶(100  $\mu\text{L}$ )和  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS ( $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl, 60  $\mu\text{L}$ )组成的混合液, 以三次蒸馏水做本底, 分别记录两种混合液的吸收光谱.

### 1.3 等位特异性扩增

突变型上游引物序列为 tgg tag ttg gag ctg t; 下游引物序列为 act cat gaa aat ggt cag ag. 以 293 细胞基因组 DNA 为野生型模板, SW480 结肠癌细胞基因组 DNA 为突变型模板进行扩增. 其中 dNTP 和 Taq 酶的终浓度分别为  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 0.5 U. 扩增条件为 95 °C 预变性 3

min; 95 °C 变性 1 min, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 循环 35 次; 72 °C 延伸 5 min. 反应体系均为 20  $\mu\text{L}$ .

#### 1.4 K-ras 基因点突变检测

在两种扩增产物(15  $\mu\text{L}$ )中分别加入 35  $\mu\text{L}$  纳米金胶, 充分混匀并置于 70 °C 的水浴中加热 2 min; 再向其中加入 17  $\mu\text{L}$  PBS (10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ , 0.2 mol $\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl); 最后将混合液置于光程为 5 mm 的微量石英比色皿中, 以三次蒸馏水为本底, 记录两者混合液的吸收光谱.

## 2 结果和讨论

### 2.1 不同浓度的盐溶液对纳米金聚集程度的影响

正常情况下, 纳米金颗粒表面带负电荷, 粒子相互之间的静电斥力使粒子之间保持一定的间距, 金溶胶保持稳定状态, 颜色呈酒红色, 并在 520 nm 附近存在一个显著的特征吸收峰. 当外界条件改变, 例如降低温度, 或向其中加入盐溶液时, 可使纳米金颗粒之间的静电斥力被屏蔽掉了, 粒子之间的范德华力(Van der Waals force)占主导作用, 纳米金颗粒相互吸引而发生聚集. 聚集的纳米金颗粒的表面等离子吸收带发生红移, 造成溶液颜色由红色变成蓝(灰)色<sup>[16]</sup>, 同时吸收带还发生宽化现象. 造成这些现象出现的原因主要有小尺寸效应、量子尺寸效应、尺寸分布效应和界面效应等<sup>[17]</sup>.

图 2 给出了纳米金在不同盐浓度下的聚集程度的吸收光谱图. 从图中可以看出, 离散的纳米金在 521 nm 处呈现一个显著的特征吸收峰; 而发生聚集的纳米金等离子吸收峰(surface plasmon peak)峰型变宽, 且其峰位随着聚集程度的不同, 发生程度不等的红移. 同时由于在 700 nm 区域的吸收强度显著增加, 肉眼能观察到颜色由红色逐渐向蓝(灰)色过渡的现象.

### 2.2 不同浓度的单链 DNA 吸附对纳米金在一定浓度的盐溶液中聚集程度的影响

由于纳米金的粒径很小, 具有大量的自由表面, 所以纳米微粒具有优异的吸附性能. 短片段单链 DNA 能被吸附到纳米金表面, 且单链 DNA 被吸附到纳米金表面后, 具有使纳米金在一定浓度的盐溶液中保持稳定状态的作用. 从图 3 可以看出, 加入的单链 DNA 量越多, 纳米金溶胶在相同浓度的盐溶液中越难发生聚集; 而表面吸附少量单链 DNA 或者没有单链 DNA 吸附的纳米金溶胶在该浓度的盐溶液中立即发生不同程度的聚集.

### 2.3 纳米金结合等位特异性扩增比色检测 K-ras 基因点突变

向等位特异性扩增产物中依次加入纳米金溶胶, 适量的 PBS 溶液后, 测量两者的吸收光谱, 得到的结果如

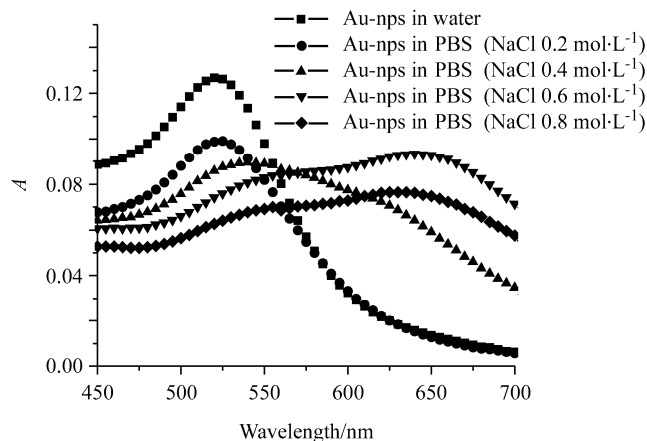


图 2 纳米金胶(100  $\mu\text{L}$ )在三次蒸馏水(60  $\mu\text{L}$ )及不同盐浓度的 PBS (10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ , 30  $\mu\text{L}$ )中的紫外-可见吸收光谱

**Figure 2** UV-vis absorption spectra of gold colloid (100  $\mu\text{L}$ ) in water and different salt concentration of PBS (10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ , 30  $\mu\text{L}$ )

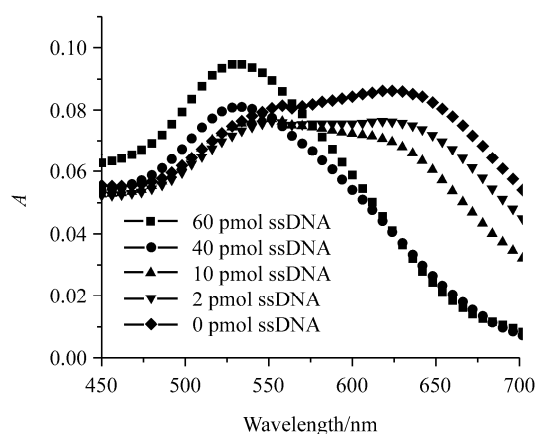


图 3 不同量单链 DNA 的吸附对纳米金在一定浓度的盐溶液中聚集的影响

**Figure 3** The effect of ssDNA adsorption on the salt-induced aggregation of Au-nps

图 4 所示. 结果显示: 野生型与突变型样品中的纳米金在吸收光谱及颜色上存在明显的差别. 在野生型样品中, 纳米金的等离子特征吸收峰位于 526 nm 处, 与纯纳米金的等离子吸收峰的峰位及峰形均大致相当, 说明纳米金颗粒在一定浓度的盐溶液中没有发生明显的聚集现象<sup>[18]</sup>. 这种现象归结为: 在扩增野生型模板时, 由于引物中错配碱基的存在, 导致引物不能被延伸, 所以扩增产物中存在大量未被消耗的单链引物. 这些单链引物被吸附到纳米金颗粒表面后, 提高了纳米金在盐溶液中的稳定性<sup>[14]</sup>. 在突变型样品中, 纳米金的特征吸收峰位于 540 nm, 比野生型中的纳米金的等离子吸收峰红移了 16 nm, 并且在 700 nm 区域的吸收强度显著增加, 这证明了纳米金已发生明显的聚集<sup>[7]</sup>. 纳米金聚集的原因

归结于: 引物在 Taq 酶的作用下, 使自身得到延伸, 最后得到的扩增产物是与引物浓度成正比, 且数量呈线性增长的双链 DNA. 由于双链 DNA 与纳米金之间的静电斥力使它们不被吸附到纳米金颗粒表面<sup>[8]</sup>, 在加入盐溶液后, 纳米金颗粒立即发生聚集. 由于体系的颜色依赖于纳米金的光学性质, 而纳米金的聚集改变了它的光学性质, 所以混合液颜色及吸收光谱都产生了相应的变化. 同时通过肉眼能观察到两种基因类型的混合液在颜色上的差别, 野生型混合液为红色, 突变型混合液为灰色.

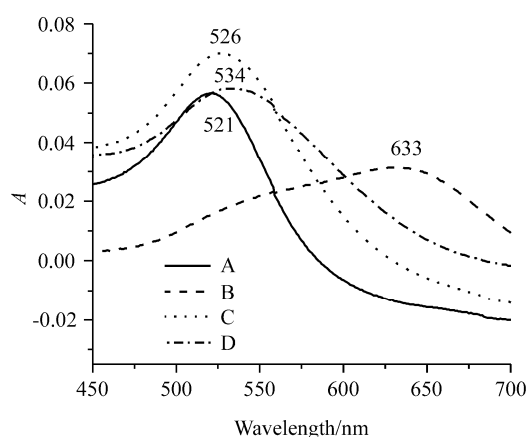


图4 四种混合液的吸收光谱图

Figure 4 The absorption spectra of four mixtures

(A) dispersed gold colloid (35  $\mu\text{L}$ ); (B) aggregated gold colloid (35  $\mu\text{L}$ ) in NaCl (4  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 30  $\mu\text{L}$ ); (C) the mixture of gold colloid (35  $\mu\text{L}$ ), mutant PCR product (15  $\mu\text{L}$ ) and NaCl solution (4  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 30  $\mu\text{L}$ ); (D) the mixture of gold colloid (35  $\mu\text{L}$ ), wild-type PCR product (15  $\mu\text{L}$ ) and NaCl solution (4  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 30  $\mu\text{L}$ )

根据 Rotherg 等的理论<sup>[13,14]</sup>, (D)与(B)两者混合液中的纳米金应该有同等程度的聚集. 但从结果中我们不难发现, 与(D)相比(B)中的纳米金的吸收峰发生了更大程度的红移, 这说明(B)中纳米金发生了更大幅度的聚集. 对此现象的解释是虽然双链较单链 DNA 与纳米金有较差的粘附性, 但还是有少量的双链 DNA 能被吸附到纳米金颗粒的表面, 从而在一定程度上保持纳米金在盐溶液中的稳定性<sup>[19]</sup>. 对于单链和双链 DNA 与纳米金之间存在着不同的吸附作用, 其机理目前还不是十分清楚. 可能的原因如下: 一是双链比单链 DNA 具有更高的表面电荷密度, 所以双链 DNA 与纳米金之间的静电斥力要比单链 DNA 与纳米金之间的静电斥力大得多. 二是短片段单链 DNA 在水溶液中更容易展开, 使其中的碱基易于与纳米金接触, 而碱基中包含的氮原子与纳米金有很好的亲和力. 三是双链 DNA 能形成稳定的双螺旋结构, 这种结构较具刚性, 使双链 DNA 不容易覆盖到纳米金表面; 而单链 DNA 形成的卷曲结构, 较具柔性,

比较容易覆盖到纳米金表面<sup>[20]</sup>.

### 3 结论

本文首次将纳米金与等位特异性扩增技术结合用于检测 K-ras 基因密码子 12 发生的点突变. 该试验结合了纳米金独特的光学性质和等位特异性扩增技术的特异性, 能检测到约 1.5 pmol K-ras 基因片段中存在的点突变. 这种方法具有操作简便、快速、检测成本低、检测结果直观等优点. 传统的纳米金探针用于基因检测时, 需要对寡核苷酸进行巯基(SH)修饰, 通过 Au-S 化学键的形成将寡核苷酸连接到纳米金的表面<sup>[14]</sup>; 而本文直接采用纳米金作为报告基团, 无需对基因序列进行化学修饰, 依据纳米金和双链及单链 DNA 存在不同的静电作用而达到检测基因点突变的目的, 进一步简化了实验步骤和节省了试验成本. 本文希望通过这种模拟试验, 展示一种更为简便、快捷的基因点突变检测方法, 为点突变检测提供一种新手段.

### References

- Zhu, D. B.; Xing, D.; Shen, X. Y.; Yan, G. H. *Chin. Sci. Bull.* **2003**, 48, 1424 (in Chinese). (朱德斌, 邢达, 沈行燕, 闫贵虹, 科学通报, **2003**, 48, 1424.)
- Zhu, D. B.; Xing, D.; Shen, X. Y.; Liu, J. F.; Chen, Q. *Bio-sens. Bioelectron.* **2004**, 20, 448.
- Zhu, D. B.; Xing, D.; Shen, X. Y.; Liu, J. F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 324, 964.
- Zhu, D. B.; Xing, D.; Shen, X. Y.; Liu, J. F. *Chem. J. Chin. Univ.* **2005**, 26, 1248 (in Chinese). (朱德斌, 邢达, 沈行燕, 刘晋峰, 高等学校化学学报, **2005**, 26, 1248.)
- Jin, R.; Wu, G.; Li, Z.; Mirkin, C. A.; Schatz, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1643.
- Sato, K.; Hosokawa, K.; Maeda, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8102.
- Storhoff, J. J.; Lazarides, A. A.; Robert, C. M.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4640.
- Martin, H.; Tai, F. W.; Uwe, R. M. *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, e137.
- Ihara, T.; Tanaka, S.; Chikaura, Y. *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, e105.
- Taton, T. A.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Science* **2000**, 289, 1757.
- Yun, W.; Charles, C.; Rong, C. J.; Mirkin, C. A. *Science* **2002**, 297, 1536.
- Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. *Nature* **1996**, 382, 607.
- Li, H. X.; Lewis, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**,

- 101, 14036.
- 14 Li, H. X.; Lewis, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10958.
- 15 Zeng, Y.-X. *Oncology*, Ed.: Zhao, W., People's Medical Publishing House, Beijing, **1999**, p. 42 (in Chinese). (曾益新, 肿瘤学, 编辑: 赵蔚, 人民卫生出版社, 北京, **1999**, p. 42.)
- 16 Elghanian, R.; Storhoff, J. J.; Mirkin, C. A. *Science* **1997**, *277*, 1078.
- 17 Yang, Z.-Y. *Nanotechnology*, Ed.: Feng, C.-S., China Machine press, Beijing, **2003**, p. 96 (in Chinese).
- (杨志伊, 纳米科技, 编辑: 冯春生, 机械工业出版社, 北京, **2003**, p. 96.)
- 18 Storhoff, J. J.; Robert, E.; Robert, C.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1959.
- 19 Sandstrom, P.; Boncheva, M.; Akerman, B. *Langmuir* **2003**, *19*, 753.
- 20 Li, H.-K.; Huang, J.-H.; Lv, J.-H.; An, H.-J.; Zhang, X.-D.; Zhang, Z.-Z.; Fan, C.-H.; Hu, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 2256.

(A0509138 DING, W. F.; FAN, Y. Y.)