

文章编号: 1004-0374(2009)03-0461-06

纳米金探针在基因检测中的应用

周 政

(华南理工大学广州汽车学院物理教研组, 广州 510800)

摘 要: 传统的核酸分析中常采用放射性元素、荧光色素以及酶标记等基因探针, 这些探针都存在一些不足之处。近年来, 纳米金探针作为一种新型的基因探针, 已引起了广泛的关注。该探针具有优良的光谱特征和光化学稳定性, 对核酸的非特异吸附性小, 与核酸等生物大分子结合后不改变生物分子的活性。将纳米金探针用于基因检测, 具有操作简便、快速、安全、实验成本低等优点。本文就纳米金探针的发展过程、纳米金探针的制备、检测原理及其在基因分析中的应用等几个方面作了系统而全面地概述, 同时介绍了纳米金探针的最新研究进展, 并对其发展前景作了简要评述。

关键词: 纳米金探针; 基因检测; 检测模式分析

中图分类号: Q67; Q781 **文献标识码:** A

The application of gold nanoparticles probe in gene detection

ZHOU Zheng

(Teaching and Research Group of Physics, College of Guangzhou Auto, South China University of Technology, Guangzhou 510800, China)

Abstract: Traditional methods for gene analysis often use the radioactive, the fluorescent, or the enzymatic probes. These probes all have some disadvantages. Recently, gold nanoparticles as a new kind of gene probe have attracted wide attention. It has excellent spectral character and photochemical stability, and has little nonspecific absorption to the nucleic acids. The bioactivity of biomacromolecule wouldn't be changed after absorption on gold nanoparticles. The application of gold nanoparticles probe in gene detection has many advantages, such as simple, rapid, safe and inexpensive. This paper introduced the preparation of the gold nanoparticles probe, the detection principle, the application and the latest research progress of the probe.

Key words: gold nanoparticles probe; gene detection; detection mode analysis

随着人类基因组计划的初步完成, 功能基因的筛选和分析将成为今后的研究重点。在传统的基因分析中, 需要用到各种标记探针, 如放射性元素标记、荧光色素标记及酶标记等探针, 采用这些探针进行检测除了操作复杂、费时外, 它们各自都还存在着一些不足之处: 放射性元素探针虽然灵敏度较高, 却存在着放射性危害等安全隐患; 荧光色素探针价格昂贵, 且存在着光漂白、光解等缺点; 酶标记探针中的酶本身容易失活, 不便长期保存^[1]。因此, 发展一种安全、价格低廉、方便实用的新型

基因探针是许多分子生物学家的目标。

纳米金颗粒具有优良的光学、电学性质和生物亲和性等特殊性质。将纳米金与生物活性分子结合制成的探针, 在生物大分子的分析检测中已逐渐受到关注。20世纪90年代中期, Mirkin等^[2]首次将纳米金探针应用于基因检测, 该探针就以其较高的

收稿日期: 2009-01-13; 修回日期: 2009-03-27

通讯作者: Tel: 020-36903090; E-mail: zhouzh879@gmail.com

灵敏度和选择特异性显示了良好的应用前景。随后, Mirkin小组在纳米金探针的应用上又开展了一系列具有开创性的工作, 其中尤以在基因序列的识别和点突变检测^[3-7]、组装超分子结构物质^[8-10]、免疫检测^[11]等方面的研究较为突出。目前, 这种新型的基因探针在基因表达^[12]、单核苷酸多态性分析^[13,14]等领域的应用研究已成为热门话题。初步的研究结果预示着纳米金探针在医学、生物学等研究领域将有广泛的应用前景。

1 利用纳米金探针检测的基本原理

纳米粒子指尺寸 $<100\text{nm}$, 并具有由于尺寸效应而表现出独特的物理、化学及生物性质的一类粒子。当普通物质的尺寸降低到纳米数量级时, 会导致物质的光、电、磁、热及化学活性等性质与本体物质有明显的不同。表面效应、体积效应、量子尺寸效应及量子隧道效应等等是纳米级物质的基本特性^[15]。

当金颗粒的尺寸降低到纳米量级时, 表现出独特的光学和电学性质。由于纳米微粒尺寸小, 电子能级发生分裂。能级之间的间距与粒径大小有关, 当能级的间距不同时, 具有不同的等离子共振吸收带, 当电子从低能级向高能级跃迁时需要吸收特定波长的光, 导致溶液呈现出不同的颜色。纳米金颗粒的粒径越大, 吸收谱线越靠近红端。因此, 溶液的颜色随着粒径的增大而逐渐由红色变成蓝灰色。纳米金粒径与其等离子吸收峰的关系如图1所示。而当纳米金粒径分别为 5nm 、 24.5nm 、 41nm 、 71.5nm 、 80 (含 >80) nm 时, 其溶液外观颜色分别为橙、橙红、红、紫灰、金色^[16]。

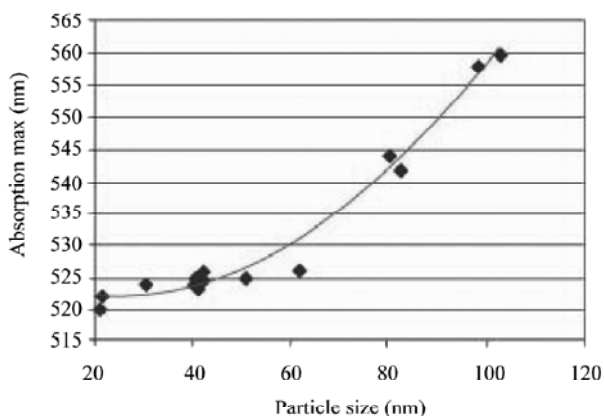


图1 纳米金粒径与等离子吸收峰的关系

在正常情况下, 纳米金颗粒表面带有负电荷, 粒子之间的静电斥力超过粒子间的范德华力, 因此, 粒子之间保持一定的间距, 溶液保持稳定状态。而当外界条件改变时, 例如降低温度, 或向其中加入电解质溶液, 均可导致粒子之间发生聚集, 从而使其表面等离子共振吸收带发生红移。溶液颜色也随着聚集程度的加强, 而逐渐由红色变成蓝色, 这就是采用比色法进行基因检测的基本原理^[3]。

2 纳米金探针的制备

2.1 柠檬酸三钠还原法制备纳米金溶液^[17]

不同粒径的纳米金颗粒可以通过还原氯金酸制得。常用的还原剂有柠檬酸钠、鞣酸、抗坏血酸、白磷、硼氢化钠等。由于粒径为 13nm 的纳米金颗粒易于制备, 制得的产物粒径偏差小($\pm 2\text{nm}$), 且其吸收光谱在 520nm 附近呈一尖锐的吸收峰。因此, 该粒径的纳米金颗粒常被用于制备基因探针。

纳米金(13nm)溶液的制备过程如下: 取 0.01% 氯金酸水溶液 100mL 加热至沸, 边搅动边准确加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 0.7mL , 金黄色的氯金酸水溶液在 2min 内变为紫红色, 继续煮沸 15min , 冷却后以蒸馏水恢复到原体积。如此制备的纳米金颗粒粒径为 13nm , 其可见光区最高吸收峰在 520nm 附近。表面带有的柠檬酸根离子使粒子之间保持一定的间距, 溶液保持稳定状态, 颜色呈红色。

2.2 纳米金探针的制备^[3,18]

纳米金探针的制备过程为: 先合成一段一端带巯基($-\text{SH}$)标记的寡核苷酸, 加入纳米金溶液并在室温下孵育 24h 。由于 Au-S 共价键的形成而使寡核苷酸牢固地连接到金颗粒表面上。再加入合适盐浓度的磷酸盐缓冲溶液(PBS), 在室温下放置 10h 以上。最后将混合体系以 1400r/min 离心 30min , 弃上清, 将油红色沉淀物置于含 0.01% 叠氮的PBS中, 即制得表面修饰了寡核苷酸的纳米金探针。

3 纳米金探针的不同检测模式及其在基因检测中的应用

基因检测主要包括基因序列识别和点突变分析两大内容。基因序列识别在基因诊断中具有重要意义。点突变检测在诊断遗传性疾病、确定癌基因激活、抑癌基因失活以及与药物抗性相关的突变中发挥着重要作用^[19]。将纳米金探针应用在基因检测中, 不但可以简化实验步骤, 还可大大降低检测成本。

3.1 固相检测模式及其应用

Taton等^[5]创立了一种将纳米金探针用于识别靶

基因的固相检测模式。该模式采用预化学处理过的普通玻片或硅片等作为固相支持物。检测流程如图2所示。

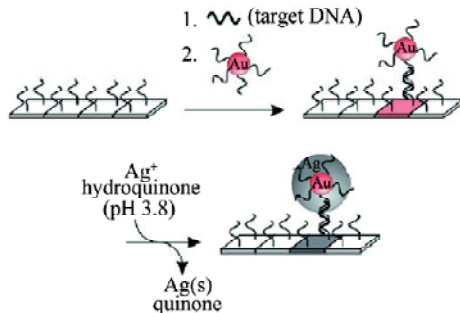


图2 纳米金探针结合银增强法的固相检测模式

在固相支持物上修饰一段与靶基因序列一端互补的寡核苷酸链,我们称其为捕获探针;加入待测样品,与支持物上的捕获探针进行杂交;将未杂交上的核酸洗去;加入表面修饰了寡核苷酸链的纳米金(13nm)探针,该寡核苷酸链序列与靶基因的另一端互补;纳米金探针与靶基因杂交并冲洗后,在固相支持物上形成一种由捕获探针、靶基因、纳米金探针三种成分组成的夹心结构。最后,在存在靶基因的区域将出现红色斑点。为了增强检测信号,可以在固相支持物上滴入由坏血酸和硝酸银溶液组成的银增强液。由于纳米金颗粒具有催化性^[15],能催化溶液中的 Ag^+ 还原成银,被还原出来的银附着在金颗粒的表面形成一层银壳,起到增强信号的作用。在没有金颗粒的区域,只有极少的银离子存在,从而保证了银染色的特异性。信号的强弱与靶基因的量成正比。靶基因越多,支持物表面被固定的纳米金颗粒越多,形成的银壳越厚,检测信号越强。

Taton等^[5]将这种检测模式用于单核苷酸多态性分析,具体过程如下:针对目的碱基,分别设计四条具有四种不同碱基的捕获探针;按上述流程在支持物上形成由捕获探针、靶基因、纳米金探针三种成分组成的夹心结构,如图3所示。随后,逐渐升高反应体系的温度,与目的碱基错配的捕获探针先与靶基因发生变性,经过冲洗后,靶基因与纳米探针均被洗掉;而与目的碱基配对的捕获探针仍和靶基因及纳米金探针保持夹心结构,固定在固相支持物上。因此,当加入银增强液时,存在错配碱基的固相支持物上无银壳出现,而配对碱基处可见明显

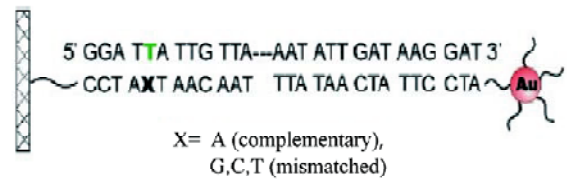


图3 单核苷酸多态性分析的夹心结构

的银壳。

Taton等^[5]的结果显示这种检测模式的灵敏度能够达到 100pmol/L 。Cao等^[20]报道了一种基于纳米金标记的拉曼分光DNA检测方法,在这种方法中银作为拉曼表面增强因子沉积在金颗粒表面,检测银放大后的光散射,可达到 fmol/L 级的检测灵敏度。同时,Storhoff等^[21]和Alexandre等^[22]采用这种检测模式进行基因检测时,能检测到 fmol 量级的靶基因,其检测灵敏度超过了传统的荧光探针。该检测模式操作简便、安全、快速、成本低,在DNA序列分析中具有广阔的应用前景。

3.1.1 纳米金结合表面等离子共振法检测DNA 基于纳米金特殊的光学性质,Yao等^[23]将表面等离子共振(surface plasmon resonance,SPR)结合纳米金检测DNA,使检测灵敏度达到了 10^{-18}mol/L 。表面等离子共振是一种物理光学性质,它是一种沿着金属和电介质界面传播的电磁波。SPA对与金属表面邻近的介质的折射率的变化很敏感,金属表面邻近介质的折射率不同,SPA就会不同。ssDNA探针固定在金属表面以及靶序列与探针序列的杂交都会引起金属表面邻近的电介质改变。利用纳米金对表面激元共振的增强作用,可以使金标后的DNA检测灵敏度提高1000倍^[24]。

3.2 液相检测模式及其应用

根据检测原理的不同,液相检测模式可分为两种,现分别叙述如下:

3.2.1 基于DNA/纳米金三维网络结构的比色检测模式及其应用 Mirkin等^[3]于1997年提出了一种高特异性的靶基因检测模式。在该检测模式中,以表面修饰了多条相同序列的寡核苷酸链的纳米金粒子为探针。需要用到两种修饰不同寡核苷酸序列的探针,我们称其中一种为探针1,另一种为探针2。探针1和探针2上的寡核苷酸序列不互补,但它们却分别与靶基因序列的两端互补。因此,向探针中加入靶基因进行杂交后,探针1和探针2上的寡核苷酸链不仅分别按特定顺序与靶基因结合,而且形

成一个聚合网络, 每一个纳米探针上都连接有多个较短的双链片断。纳米粒子的光学性质部分依赖于它们在聚合网络中的距离, 当此距离远大于粒子的平均直径时显红色, 大致相等时显蓝色。杂交能使粒子间距缩短, 形成纳米粒子的聚合物, 从而导致体系产生相应的颜色变化, 此过程如图 4 所示。因此, 随着杂交的进行, 体系的颜色将逐渐由红色变成蓝色, 根据颜色的变化即可判断体系中是否含有靶基因。在该检测模式中, 纳米探针比传统探针具有更好的选择特异性, 其检测灵敏度能够达到 fmol 级。Reynolds 等^[25]采用粒径较大 (50nm 或 100nm) 的纳米金探针进行基因检测, 也取得了较为理想的结果。

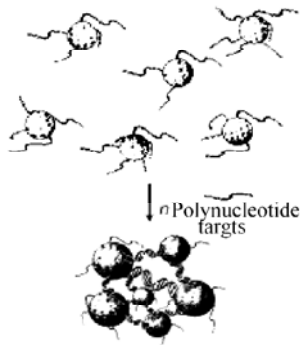


图 4 纳米金粒子表面修饰的寡核苷酸和靶基因杂交引起粒子聚集示意图

双链 DNA 的熔解曲线半峰宽 (full width at half maximum) 一般为 12°C 左右。而与纳米金颗粒共价连接的双链 DNA, 其熔解曲线半峰宽一般只有 4°C 左右, 且曲线形状更为陡直。因此, 与纳米金颗粒连接的双链 DNA 对于由碱基错配引起的变性温度的改变更为敏感^[26]。据此, 研究人员将其应用于点

突变检测^[3, 27]; 在形成了三维网络结构的体系中, 逐渐升高体系温度, 当温度升高到一定程度时, 存在错配碱基的双链 DNA 开始变性。纳米粒子之间的距离随着双链 DNA 的变性重新恢复到聚集之前的距离 ($>15\text{nm}$), 溶液的颜色也逐渐恢复到红色; 而完全互补的双链 DNA 在该温度下仍保持稳定状态, 纳米金颗粒之间仍维持一种稳定的三维网络结构, 溶液保持蓝色。在该检测中, 由单个碱基错配引起的颜色变化非常明显。因此, 可采用该法进行点突变检测。

3.2.2 基于纳米金颗粒和 DNA 之间静电相互作用的比色法检测模式及其应用 Rothberg 等^[28, 29]设计了一种无需对纳米金颗粒表面进行修饰的基因检测模式, 其检测的基本原理: 纳米金溶液由于粒子间存在静电斥力而保持稳定状态。当向其中加入少量的电解质溶液 (如 NaCl 溶液) 时, 由于电解质溶液能屏蔽掉纳米颗粒之间的静电斥力, 导致粒子间发生聚集, 溶液颜色由红色变成蓝色。单链 DNA 与纳米金颗粒之间由于存在范德华力而能够被吸附到颗粒表面, 表面吸附了单链 DNA 的纳米金颗粒能在较高浓度的电解质溶液中保持稳定状态^[30]; 而双链 DNA 由于其骨架中带负电的磷酸根基团 (PO_4) 暴露在外, 与表面带负电的纳米金颗粒之间存在静电斥力, 不能被吸附到纳米金颗粒表面。因此, 分别向纳米金溶液中加入单链 DNA 或双链 DNA 后, 再加入一定浓度的盐溶液时, 加入了单链 DNA 的混合液颜色保持红色; 而加入了双链 DNA 的混合液颜色由红色变成蓝色, 如图 5 所示。

纳米金比色法结合等位特异性扩增技术应用于 *K-ras* 基因点突变检测中^[31], 能够检测到 pmol 量级的样品。这种检测模式无需对探针进行标记, 省去了复杂的探针制作过程, 且具有操作简便、快速、结果直观、实验成本低及无需使用特殊仪器等优

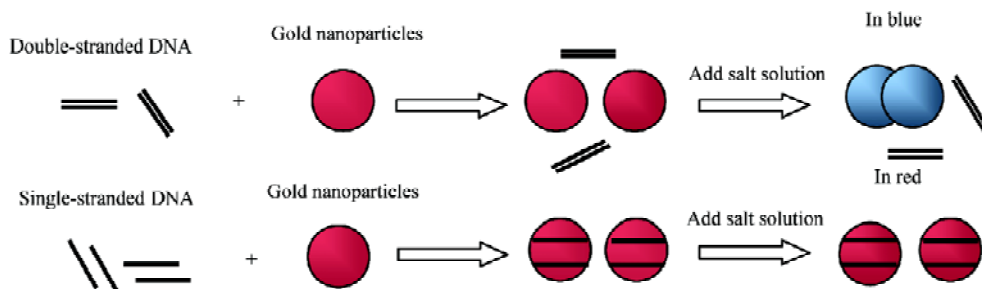


图 5 比色法检测单链 DNA 和双链 DNA 示意图

点, 显示了该方法在临床检测上的巨大潜力。

3.2.3 纳米金结合电化学分析方法检测DNA 基于纳米金特殊的介电特性, 将纳米金结合电化学方法用于DNA检测吸引了各个国家的研究人员的兴趣。Sun等^[32]用电化学方法定量检测了花椰菜花叶病毒(cauliflower mosaic virus, CAMV) 35S启动子基因序列, 灵敏度达到pmol/L。蔡宏等^[33]以金胶为标记物将其标记于人工合成的5'端巯基修饰的寡聚核苷酸片断上, 制成具有电化学活性的金胶标记DNA电化学探针。在一定条件下使其与固定在玻碳电极表面的靶序列进行杂交反应, 利用ssDNA与其互补链杂交的高度序列选择性和极强的分子识别能力, 以及纳米金胶的电化学活性, 实现对特定序列DNA片断的电化学检测以及对DNA碱基突变的识别。

根据单链DNA探针杂交前后构型的改变, 导致电化学信号的变化来研究DNA的杂交, 从而研制出许多新型的DNA电化学传感器。石英晶体微天平(QCM)是通过测定振子基频共振频率的变化来检测微小的质量变化的, 检测灵敏度达到纳克级。Pang等^[34]以ssDNA修饰的金纳米粒子为放大探针, 通过靶标分子与固定在QCM电极上的探针杂交形成dsDNA后, 在高温下变性, 发现与探针存在单个碱基错配的靶基因的震荡频率不变, 而与探针完全配对的靶基因震荡频率减少。根据这一发现, 实现了对 β 地中海贫血基因的点突变检测。Castañeda等^[35]利用纳米金结合微分脉冲伏安法, 用于检测乳腺癌基因BRCA1。基于纳米金标记的阳极溶出伏安法(SWSV)检测甲状腺乳头状肿瘤基因BRAF, 灵敏度达到了amol/L量级^[36]。

将纳米金与电化学方法结合起来的这种新型生物传感器(chronocoulometric DNA sensor, CDS), 检测灵敏度能达到10 fmol/L, 远远超过了传统荧光的检测灵敏度。同时该生物传感器大大缩短了实验时间, 使需要3d才能完成的实验缩短到2h内完成^[37]。

4 结论与展望

纳米金探针在光谱特征、光化学稳定性, 以及对靶基因选择特异性等方面都超过了传统的荧光探针, 将其应用于基因检测, 可弥补传统探针的不足。纳米金探针液相检测模式操作简便、耗时短、费用低廉, 为检测朝简单化和实用化方向发展提供了条件。在固相检测模式中, 以纳米金颗粒的散射

光变化作为检测信号, 能大大提高检测灵敏度^[38]。目前, 纳米金探针在免疫分析、临床病原体检测、单细胞分析、基因芯片分析技术和药物运输^[39-41]中也得到迅速发展。

纳米金是纳米粒子中应用较为成熟的纳米探针。除了纳米金探针, 其他纳米探针, 如半导体纳米晶体(semiconductor nanocrystals)^[42]、磁性纳米传感器(magnetic nanosensors)^[43]、发光量子点(quantum dot)^[44]等也越来越受到重视, 在分子生物学和医学领域中同样具有广阔的应用前景。随着研究的深入, 在芯片上实现样品检测的自动化和智能化, 是纳米探针技术结合生物分析技术发展的最终目标。正如美国伯明翰大学的菲利普教授所说的: “纳米技术最终目的还在于生物本身”。这些新型的纳米探针在生物基础研究中的应用, 为更好的理解生物系统提供了一种新的手段和新的思维方式, 在解决人类重大疾病的诊断、治疗和预防中将发挥更重大的作用。

[参 考 文 献]

- [1] 姜忠义, 成国祥. 纳米生物技术. 北京: 化学工业出版社, 2003: 156-9
- [2] Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, et al. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 1996, 382(6592): 607-9
- [3] Elghanian R, Storhoff JJ, Mirkin CA. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*, 1997, 277(5329): 1078-80
- [4] Storhoff JJ, Elghanian R, Mucic RC, et al. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. *J Am Chem Soc*, 1998, 120(9): 1959-64
- [5] Taton TA, Mirkin CA, Letsinger RL. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science*, 2000, 289(5485): 1757-60
- [6] Taton TA, Lu G, Mirkin CA. Two-color labeling of oligonucleotide arrays via size-selective scattering of nanoparticle probes. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(21): 5164-5
- [7] Park SJ, Taton TA, Mirkin CA. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. *Science*, 2002, 295(5559): 1503-6
- [8] Alivisatos AP, Johnsson KP, Peng X, et al. Organization of nanocrystal molecules' using DNA. *Nature*, 1996, 382(6592): 609-12
- [9] Mucic RC, Storhoff JJ, Mirkin CA, et al. DNA-directed synthesis of binary nanoparticle network materials. *J Am Chem Soc*, 1998, 120(48): 12674-5
- [10] Mirkin CA. Programming the assembly of two- and three-dimensional architectures with DNA and nanoscale inorganic

- building blocks. *Inorg Chem*, 2000, 39(11): 2258-72
- [11] Cao YC, Jin R, Nam JM, et al. Raman-dye-labeled nanoparticle probes for proteins. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(48): 14676-7
- [12] Huber M, Wei TF, Muller UR, et al. Gold nanoparticle probe-based gene expression analysis with unamplified total human RNA. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(18): e137
- [13] Murphy D, O'Brien P, Redmond G. Sub-picomole colorimetric single nucleotide polymorphism discrimination using oligonucleotide-nanoparticle conjugates. *Analyst*, 2004, 129(10): 970-4
- [14] Ihara T, Tanaka S, Chikaura Y, et al. Preparation of DNA-modified nanoparticles and preliminary study for colorimetric SNP analysis using their selective aggregations. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(12): e105
- [15] 刘吉平, 郝向阳. 纳米科学与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 10-6
- [16] Haynes CL, Van Duyne RP. Nanosphere lithography: a versatile nanofabrication tool for studies of size-dependent nanoparticle optics. *Phys Chem B*, 2001, 105(24): 5599-611
- [17] Grabar KC, Freeman RG, Hommer MB, et al. Preparation and characterization of Au colloid monolayers. *Anal Chem*, 1995, 67(4): 735-43
- [18] Taton TA. Preparation of gold nanoparticle-DNA conjugates. [M]// current protocols in nucleic acid chemistry. New York: John Wiley & Sons, 2002: 12. 2. 1-12. 2. 11
- [19] Zhu DB, Xing D, Shen XY, et al. High sensitive detection of presenilin-1 point mutation based on electrochemiluminescence. *Chin Sci Bull*, 2003, 48(16): 1741-4
- [20] Cao YC, Jin R, Mirkin CA. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*, 2002, 297(5586): 1536-40
- [21] Storhoff JJ, Marla SS, Bao P, et al. Gold nanoparticle-based detection of genomic DNA targets on microarrays using a novel optical detection system. *Biosens Bioelectron*, 2004, 19(8): 875-83
- [22] Alexandre I, Hamels S, Dufours, et al. Colorimetric silver detection of DNA microarrays. *Anal Biochem*, 2001, 295(1): 1-8
- [23] Yao X, Li X, Toledo F, et al. Sub-attomole oligonucleotide and p53 cDNA determinations via a high-resolution surface plasmon resonance combined with oligonucleotide-capped gold nanoparticles signal amplification. *Anal Biochem*, 2006, 354(2): 220-8
- [24] 张阳德. 纳米生物分析化学与分子生物学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 26-9
- [25] Reynolds RA, Mirkin CA, Letsinger RL. Homogeneous, nanoparticle-based quantitative colorimetric detection of oligonucleotides. *J Am Chem Soc*, 2000, 122(15): 3795-6
- [26] Jin RC, Wu GS, Mirkin CA, et al. What controls the melting properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies? *J Am Chem Soc*, 2003, 125(6): 1643-54
- [27] Li J, Jiang JH, Xu XM, et al. Simultaneous identification of point mutations via DNA ligase-mediated gold nanoparticle assembly. *Analyst*, 2008, 133(7): 939-45
- [28] Li HX, Lewis R. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(39): 14036-9
- [29] Li HX, Lewis R. Label-free colorimetric detection of specific sequences in genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(35): 10958-61
- [30] Sato K, Hosokawa K, Maeda M. Rapid aggregation of gold nanoparticles induced by non-cross-linking DNA hybridization. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(27): 8102-3
- [31] 周政, 朱德斌, 邢达. 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. *化学学报*, 2006, 64(12): 1279-83
- [32] Sun W, Zhong J, Qin P, et al. Electrochemical biosensor for the detection of cauliflower mosaic virus 35S gene sequences using lead sulfide nanoparticles as oligonucleotide labels. *Anal Biochem*, 2008, 377(2): 115-9
- [33] 蔡宏, 王延琴, 何品刚, 等. 基于纳米金胶标记DNA探针的电化学DNA传感器研究. *高等学校化学学报*, 2003, 24(8): 1390-14
- [34] Pang L, Li J, Jiang J, et al. DNA point mutation detection based on DNA ligase reaction and nano-Au amplification: a piezoelectric approach. *Anal Biochem*, 2006, 358(1): 99-103
- [35] Castañeda MT, Merkoçi A, Pumera M, et al. Electrochemical genosensors for biomedical applications based on gold nanoparticles. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22(9-10): 1961-7
- [36] Liao KT, Cheng JT, Li CL, et al. Ultra-sensitive detection of mutated papillary thyroid carcinoma DNA using square wave stripping voltammetry method and amplified gold nanoparticle biomarkers. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(7): 1899-904
- [37] Zhang J, Song S, Wang L, et al. A gold nanoparticle-based chronocoulometric DNA sensor for amplified detection of DNA. *Nat Proto*, 2007, 2(11): 2888-95
- [38] Storhoff JJ, Lucas A, Garimella V, et al. Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colorimetric scatter of gold nanoparticle probes. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(7): 883-7
- [39] Joshi HM, Bhumkar DR, Joshi K, et al. Gold nanoparticles as carriers for efficient trans-mucosal insulin delivery. *Langmuir*, 2006, 22(1): 300-5
- [40] Ghosh P, Han G, De M, et al. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(11): 1307-15
- [41] Hussain MA, Agnihotri A, Siedlecki CA. AFM imaging of ligand binding to platelet integrin α IIb- β 3 receptors reconstituted into planar lipid bilayers. *Langmuir*, 2005, (21): 6979-86
- [42] Bruchez M, Moronne M, Gin P, et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, 1998, 281(5385): 2013-6
- [43] Josephson L, Perez JM, Weissleder R. Magnetic nanosensors for the detection of oligonucleotide sequence. *Angew Chem Int Ed*, 2001, 40(17): 3204-6
- [44] Chan WC, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 1998, 281(5385): 2016-8