

以奈米微粒篩檢特定鹼基序列之 DNA

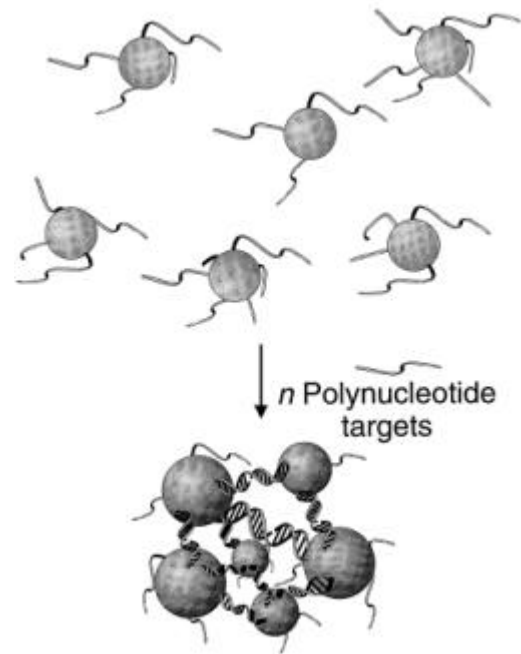
清華大學化學系 陳俊顯

一、前言

當溶液中懸浮之金微粒(colloidal gold)的直徑約為奈米(nanometer)尺寸時，通常會顯現顏色，這是所謂 surface plasmon absorption 的吸收現象。倘使吸收的波長是在可見光的範圍，溶液便會顯示出吸收波長的互補色。這種吸收的現象與微粒的大小相關，較大的顆粒的吸收峰會位於較長的波長，當顆粒相鄰的距離極近或顆粒群聚成團，吸收的波峰會往更長的波長偏移。以懸浮微粒從分散到變成聚集而言，倘使粒徑大小約略在 13 nm 左右，顏色約為紅色，顏色在微粒聚集後呈現藍色，以目視便可察覺奈米微粒的溶液有明顯的顏色變化。利用這樣特點，Mirkin 的實驗室(Northwestern University)於 1997 開啟了一門研究的新領域，他們將單股 DNA 修飾到金奈米微粒的表面上，用以定性地判別待測樣品中的 DNA 片段是否與奈米微粒上的已知 DNA 序列完全互補。如圖一顯示的，互補的 DNA 樣品會與奈米微粒上的 DNA 形成雙股螺旋狀，使微粒聚集，造成顏色上的變化。

二、含 DNA 之金奈米微粒的製作方法

以化學合成法製作金奈米微粒的方法有兩大類，在這個領域運用的，主要是由 Sutherland 發展，經 Natan 改良的製程。合成的過程摘要如下：在圓底燒瓶中劇烈地攪拌 HAuCl_4 ，加熱到些微沸騰時，快速地將還原劑(sodium citrate)對著攪拌溶液的漩渦處倒入，持續加熱 10 分鐘，移除加熱器之後再攪拌 15 分鐘。待溶液回復至室溫，經過濾可得粒徑均勻之奈米微粒。調整金離子與還原劑的比率可以調整粒徑的大小，金的比率越大所得的粒徑越大。這個反應的還原劑(citrate, $\text{HOC}(\text{CO}_2^-)_3$)在反應過後形成 CO_2 、 HCO_2H 、 $\text{O}=\text{C}(\text{CH}_2\text{CO}_2^-)_2$ 、 $\text{O}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CO}_2^-$ 。一般咸信，微粒的外層是尚未完全還原的金一價離子，會吸引溶液中的 citrate、氯離子與帶負電的離子，使得整個奈米微粒是帶負電荷。由於微粒帶電荷，所以會溶於水溶液。因為粒子帶相同電荷，相互間的



圖一 上圖表示在未加入待測的 DNA 之前，這些 13 nm 的金奈米微粒是分散的，溶液呈現紅色。下圖顯示在加入鹼基對互補的 DNA 片段後，這些待測的 DNA 會與金微粒上的 DNA 形成雙股螺旋狀，進而連結金微粒，使之呈現聚集狀態，溶液變成藍色。(本圖承 The American Association for the Advancement Science 允許，自 Science, 277, 1078 (1997)摘錄。)

斥力會避免粒子因碰撞而成長，因此這些微粒可以穩定地懸浮於溶液中。

將金奈米微粒修飾上 DNA 的方法，是先將 DNA 末端修飾成含硫醇或雙硫(disulfide、dithiane 等)，利用硫原子與金之間的作用力很強的特色，把過量的修飾過之 DNA 與金奈米微粒混合於水溶液中，以硫金鍵取代吸附的陰離子，反應所需的時間約為 24 小時。接下來以磷酸鹽調整溶液的 pH 到 7，並且逐漸地增強溶液離子強度至 0.3 M NaCl，最後以離心方式純化含 DNA 之金奈米粒子。離心管下方的紅色稠狀物是金微粒，除去離心管上方的溶液將可除去被置換出來的 citrate、未反應之 DNA

與其它離子。這些顆粒呈現黏稠狀的原因是由於微粒的外層是有機類的 DNA 之緣故，這些金微粒可以回溶到適當 pH 與離子強度的水溶液中。金微粒在溶液中的濃度之估算如下：先以 TEM(transmission electron microscope)測量粒徑的平均大小，假設金原子的堆積方式與單晶相同，估算出每顆奈米微粒所含的金原子數目，再使用 ICP-AES(inductively coupled plasma coupled with atomic emission spectroscopy)測得溶液中金元素的濃度，換算後可得奈米粒子的濃度。

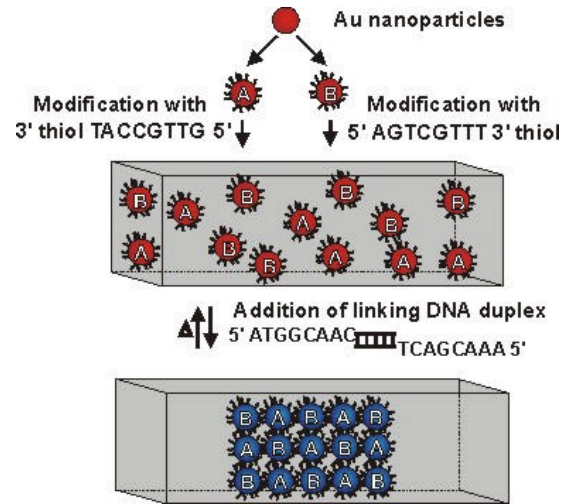
三、以金奈米微粒辨識 DNA 片段的方法

如果有兩種金微粒，所修飾的是兩種完全互補的 DNA 片段，將兩者混合於溶液中，溶液仍然呈現紅色，類似圖二上方的圖，表示這些粒子無法辨識彼此，因此仍呈分散狀。如果在溶液中加入兩種 DNA，他們有某個段落是完全互補、可進行這個段落的雙股結合，餘下單股的部分會各自與互補的金奈米微粒結合，形成聚集現象，使溶液自紅色轉成藍色。圖二下方的圖表示經過一段時間，結合的奈米微粒增多，使晶格狀的聚集增大後，會呈現金的沈澱，加熱可以破壞 DNA 之間的作用力，使形成的沈澱又回溶到溶液中。Mirkin 證明了適當地控制溫度，用以影響兩股 DNA 間的氫鍵形成的能力，可使這種方法辨識的能力增強。例如含 30 個鹼基對的 DNA 片段中，即使只有一個鹼基與金微粒上的 DNA 不互補，也可以被這個方法辨識出。

Mirkin 也證明這個方法可以應用於真實疾病的檢測，他們以炭疽桿菌傳染病(Anthrax)為例，這是具有 141 個鹼基對的 DNA。他們所使用的奈米粒子則有兩種，分別帶有 141 鹼基對中相鄰的 15 個鹼基對。檢測時，溶液先加熱，使 Anthrax DNA 的雙股分離，然後加入阻礙這雙股 DNA 復原的試劑，以及帶有 DNA 的金奈米微粒。由於奈米微粒的鹼基對較短，抓到單股 Anthrax DNA 的速率較快，倘若待測樣品內含有 Anthrax DN，溶液便會呈現藍色，否則金微粒會維持分散狀態，使溶液保持紅色。

四、其它應用

DNA 的檢驗可以不在燒杯等容器內，在平面上也可觀察待測 DNA 片段是否與奈米微粒上的 DNA 完全互補，這樣的方式會使得檢



圖二 將金微粒修飾成帶有 A、B 兩類 DNA 片段的奈米粒子，於溶液中置入首尾與 A、B 互補的 DNA，會使的溶液中的金奈米微粒聚集，形成週期性的晶格。這樣的聚集和分散可以藉由加熱、冷卻而顯現可逆現象。(本圖承 Professor Mirkin 同意使用，自 <http://www.chem.nwu.edu/~mkngrp/dnasubgr.html> 網站下載。)

驗較為便利。所使用的平板可以是 reverse-phase silica gel，實驗的方式是在選定的溫度條件，自含有待測的 DNA 與奈米微粒溶液中，取出極微量的體積，滴在 silica gel 板上，所顯現的顏色會與他們在溶液相是分散或群聚的型態相同。換言之，當他們在較高的溫度時，呈現分散狀態與紅色，當滴在 gel 之後，即使溫度回復到室溫，他們也會因為 DNA 與 gel 的作用力，使奈米粒子不會因群聚而變色。

另一種應用方式，是以容易進行的反應使待測 DNA 樣品與玻璃載玻片表面產生共價鍵結，再將此玻片與帶有 DNA 之金奈米粒子的溶液接觸。控制溶液在某特定溫度，可以使玻片上與奈米微粒上的 DNA 完全互補時，金奈米微粒才會留在晶片表面。再藉由化學還原方法將銀鍍到金奈米微粒上，可以使訊號強度增強兩個數量級，遠高於目前使用的螢光方法。將 DNA 修飾在載玻片的過程是先使用含胺基的有機矽分子(如 N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilane, EDA)與玻璃表面的 hydroxyl 官能基進行共價結合，將玻璃轉換成帶胺基的表面，再以 SMPB(succinimidyl 4-(maleimidophenyl)butyrate)與胺形成醯胺鍵，所製成的表面官能基容易與硫醇分子形成共價

鍵。在浸泡的溶液中，末端為硫醇的 DNA 便可以容易地與玻璃片表面形成共價鍵結。

金奈米微粒的分散與聚合也可用來檢視 DNA 單雙股結合與分離的溫度 (nature-denature)。以 30 個鹼基對的 DNA 為例，顏色對溫度的敏感性可使肉眼觀察到 0.5 °C 的差異，明確地說，在奈米微粒的幫助下，溶液在 58 °C 是藍色的、58.5 °C 是紫色，而升到 59 °C 則呈現紅色。倘使沒有奈米微粒，以 UV 光譜測量 DNA 形成單股的變化，所得的溫度範圍長達 30 °C。

這個方法有定量 DNA 的可能，原有的困擾是奈米顆粒聚集後，會形成沈澱，所以無法經由比爾定律的吸收度來定量待測 DNA 的濃度。Mirkin 發現如果將兩種帶有 DNA 的奈米粒子的混合比率調到 5 : 1，顆粒聚集的程度便會維持在一定的大小，也就不會產生沈澱。可能是因為其中一種粒子含量較少，當他們都被另一種奈米粒子粒徑包覆之後，聚集的粒徑便無法再增大。他們同時將粒徑由 13 nm 加大到 50 nm，發現吸收係數也會增加兩個數量級而增強偵測的靈敏度。

五、有關 surface plasmon absorption 的現象

在結束這個研究領域的報導之前，筆者想簡略說明 surface plasmon 這個名稱的意思。所謂 plasma 是指高密度的陽離子或陰離子，在這個領域是指材料內的導電帶電子。之所以名稱內有 surface 是因為當材料的尺寸縮小，表面對一些現象的重要性就明顯增加。以材料的電子能階方面的性質而言，尺寸越小，導電帶的電子移動空間越短、能量的波動方程式的解越受

邊界條件 (boundary conditions) 影響、材料的能階密度 (density of states) 也隨之變小，從連續的能帶變成不連續的。因為這些變化引起的顏色現象，最早是由 Faraday 指出，Mie 解 Maxwell's equation 以說明可見光波被奈米尺寸粒子吸收的現象。簡單地說，金屬材料的導電帶內之電子的平均自由徑約為數十個奈米長，當材料的尺寸縮小到奈米尺寸，電子的移動便會受限制，例如電子的移動在材料邊界 (亦即表面) 會類似散射般地改變行進方向。以能階方式來講，這個現象使金奈米粒子內的能階有不連續的性質。金奈米材料內的導電帶電子與光的電磁波能量有交互作用，在兩者產生共振現象的波長，便有吸收的現象，也就是 surface plasmon absorption。這個理論可以解釋吸收峰的半波寬的變化，但目前對於粒子大小與吸收峰位置之相關性的解釋仍未臻完善。

參考文獻

- [1] C. A. Mirkin, *Inorg. Chem.*, **39**, 2258 (2000).
- [2] W. S. Sutherland and J. D. Winefordner, *J. Colloid. Interface Sci.*, **48**, 129 (1992).
- [3] K. C. Grabar, R. G. Freeman, M. B. Hommer and M. J. Natan, *Anal. Chem.*, **67**, 735 (1995).
- [4] L. M. Demers, C. A. Mirkin, R. C. Mucic, R. A. Reynolds, III, R. L. Letsinger, R. Elghanian and C. Viswanadham, *Anal. Chem.*, **72**, 5535 (2000).
- [5] P. Mulvaney, *Langmuir*, **12**, 788 (1996).
- [6] S. Link and M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 8410 (1999).