



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104555913 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201510044281. 5

G01N 33/531(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 01. 28

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号

(72) 发明人 孙秀兰 孙嘉笛 张银志

(74) 专利代理机构 北京爱普纳杰专利代理事务所(特殊普通合伙) 11419

代理人 张勇

(51) Int. Cl.

B82B 3/00(2006. 01)

B82Y 30/00(2011. 01)

B82Y 40/00(2011. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页

序列表3页 附图3页

(54) 发明名称

一种银包金纳米棒的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种银包金纳米棒的制备方法及应用,属于食品质量检测分析技术领域。本发明通过制备 Au@Ag 纳米棒,利用其表面增强荧光性,成功应用于检测大肠致病菌 E. coli 0157:H7eaeA 基因,与传统方法相比,极大的降低了检测限、提高了灵敏度和并获得了良好的稳定性。利用荧光增强-减弱原理,建立了大肠致病菌 E. coli 0157:H7eaeA 基因检测标准曲线,线性范围在 10^{-17} - 10^{-11} M 之间,相关系数为 $R^2 = 0.9947$,检测限为 3.33×10^{-18} M(S/N = 3)。本发明特异性良好,通过加标实验,eaeA 基因回收率为 98.36% - 101.67%,且其稳定性良好,可应用于水中大肠致病菌 E. coli 0157:H7eaeA 基因的检测,具有非常广泛的应用前景。

1. 一种银包金纳米棒的制备方法,其特征在于,所述方法是:将利用种子生长法制备好的金纳米棒溶液和 CTAB 溶液混合后,向其中依次加入 AgNO_3 溶液、抗坏血酸溶液、NaOH 溶液于 25-30°C 下过夜。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述方法包括:在每 20ml 浓度为 0.02-0.08mol/L 的 CTAB 溶液中,添加 10-20ml 浓度为 15-30nmol/L 的金纳米棒溶液,搅拌,依次添加 1000-4000 μL 浓度为 2-8mmol/L 的 AgNO_3 溶液、500-800 μL 浓度为 0.1-0.5mol/L 的抗坏血酸溶液、1000-3000 μL 浓度为 0.1-0.5mol/L 的 NaOH 溶液,搅拌、静置,即合成得到 Au@Ag 纳米棒。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述方法中分别使用不同长度的金纳米棒合成得到的长度分别为 30nm、40nm、50nm 的 Au@Ag 纳米棒,所使用的 AgNO_3 溶液的体积分别是 1250 μL , 2500 μL 和 3750 μL 。

4. 根据权利要求 1-3 任一所述方法得到的 Au@Ag 纳米棒。

5. 权利要求 4 所述 Au@Ag 纳米棒在食品或者水体检测方面的应用。

6. 权利要求 4 所述 Au@Ag 纳米棒在基因检测方面的应用。

7. 一种利用权利要求 4 所述 Au@Ag 纳米棒检测基因的方法,其特征在于,所述方法包括:(1) 在 Au@Ag 纳米棒上修饰寡核苷酸探针,然后加入荧光染料 cy3 修饰的核苷酸进行杂交,得到修饰好的 Au@Ag - DNA 杂交溶液;(2) 测定步骤 1 得到的杂交溶液上清液的荧光强度;(3) 将不同浓度的目标基因加入到步骤 1 制备的 Au@Ag - DNA 杂交溶液中,反应、离心、测定上清液的荧光强度,计算得到不同浓度目标基因加入后荧光强度的变化量;(4) 绘制目标基因浓度与荧光强度变化量的标准曲线;(5) 将待测样品添加到步骤 1 制备的杂交溶液中,测定荧光强度,计算荧光强度变化量,再根据步骤 4 得到的标准曲线,计算待测样品中目标基因的浓度。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述步骤 (1) 具体是:先在 Au@Ag 纳米棒的表面修饰巯基十一烷酸,然后用 EDC/NHS 活化羧基基团,接着用氨基修饰的寡核苷酸与活化好的巯基十一烷酸偶联,最后在 PBS 条件下,与荧光染料 cy3 连接的部分核苷酸杂交。

9. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述步骤 (1) 中寡核苷酸探针的序列是 SEQ ID NO. 1 所示的序列。

10. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述步骤 (1) 使用的是长度为 50nm 的 Au@Ag 纳米棒,使用的荧光染料 cy3 修饰的核苷酸的序列是 SEQ ID NO. 4 所示的序列。

一种银包金纳米棒的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种银包金纳米棒的制备方法及应用,属于食品质量检测分析技术领域。

背景技术

[0002] 大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 为埃希氏菌属 (*Escherichia*) 代表菌,是人和许多动物肠道中最主要且数量最多的一种细菌,主要寄生在大肠内。它侵入人体一些部位时,可引起感染,如腹膜炎、胆囊炎、膀胱炎及腹泻等。人在感染大肠杆菌后的症状为胃痛、呕吐、腹泻和发热。感染可能是致命性的,尤其是对孩子及老人。

[0003] 大肠杆菌的致病物质主要是:(1) 侵袭力:包括 K 抗原和定居因子;(2) 内毒素:含有内毒素的大肠杆菌的细胞壁内具有内毒素活性,脂多糖层的脂类 A 是毒性部位;(3) 肠毒素:肠毒素对热稳定性不同,分为耐热和不耐热两种。不耐热肠毒素对热不稳定,65℃时 30 分钟即可失去活性,而耐热性肠毒素对热稳定,100℃加热 20 分钟仍不被破坏,分子量较小,免疫原性弱。所致疾病包括:(1) 肠道外感染:多为内源性感染,以泌尿系统感染为主,如尿道炎、膀胱炎、肾盂肾炎。也可引起腹膜炎、胆囊炎、阑尾炎等;(2) 急性腹泻,其中由肠出血性大肠杆菌 (*Enterohemorrhagic E. coli*, EHEC) 是指能引起出血性肠炎、溶血性尿毒综合征的一类大肠杆菌,可产生志贺样毒素。EHEC 的主要菌型是 O157:H7,还包括 O26:H11、O111 等。

[0004] 传统检测检测大肠致病菌 *E. coli* O157:H7 的方法:1) 常规检测方法:铺板培养法、计数法、生化检测、显微镜、流式细胞仪和发光法。2) 免疫学检测方法:免疫印迹法和酶联免疫分析法;3) 分子生物学检测方法:聚合酶链式反应 (PCR) 以及 DNA 微阵列。

[0005] 然而,传统检测细菌的方法是由形态学表征或者生化分析来完成的,它们不能够在细菌种类上提供准确的结论以至于不能实现菌株水平上的鉴别以及从环境中分离的细菌检测;同时试验进行以及数据处理都是非常耗时,不能满足细菌检测所需要的快速、准确的实时监测。PCR 方法受样品影响比较大,特别在食源性有害微生物检查中,食品中的成分(糖类、酸类、油脂等物质)会干扰反应的正常进行,而检测的环境,中间处理环节也会带来一些 PCR 反应抑制剂,从而使 PCR 呈现较高的假阳性和假阴性率。ELISA 虽然具有很高的灵敏性和可重复性,但也存在致病菌样本量大,操作繁琐,试剂盒价格昂贵,成本高,准确性差和操作复杂而需专业培训等缺陷。生物传感器方法虽然其稳定性好、精度高,但是普遍存在仪器价格昂贵的缺点,不能满足大规模样品中致病菌的检测需求,商业化的进展很慢。

[0006] 产志贺毒素大肠杆菌 (*Shiga toxin—producing Escherichia coli*, STEC) 不仅能引起人类腹泻,还可引起严重的出血性肠炎 (*hemorrhagic colitis*, HC) 和溶血性尿毒症 (*haemolytic uraemic syndrome*, HUS)。尤其是肠出血性大肠杆菌 (*enterohemorrhage Escherichia coli*, EHEC) O157:H7 菌株在报道的感染中占主导地位。*eaeA*、*stx2* 和 *hlyA* 基因是 STEC 致病的主要毒力基因,*E. coli* O157:H7 的黏附定植能力是肠出血性大肠杆菌 (EHEC O157:H7) 的重要体现,其对上皮细胞的黏附作用与染色体上的 *eaeA* 基因有关。对于

大肠致病菌 0157:H7 来说, eaeA 基因是致病的一个毒力基因之一。如果能够快速、灵敏检测出大肠致病菌 0157:H7 中的毒力基因 eaeA, 那么就对预防出血性肠炎等疾病具有重要意义。

[0007] 本发明制备了 Au@Ag 纳米棒, 并利用其表面增强荧光的效应, 成功应用于检测大肠致病菌 E. coli 0157:H7eaeA 基因。

发明内容

[0008] 针对现有检测大肠致病菌 E. coli 0157:H7 方法的不足, 以及 eaeA 基因对肠出血性疾病的毒力作用影响, 本发明提供了一种用于检测该基因的新方法。首先制备 Au@Ag 纳米棒, 然后在其表面修饰寡核苷酸探针, 再与荧光染料 cy3 连接的部分核苷酸杂交, 构建了检测大肠致病菌 E. coli 0157:H7eaeA 基因的生物传感器。本发明结合 Au@Ag 纳米棒具有好的单分散性以及长度的可调控性, 在紫外和近红外区有宽的等离子吸收, 且比 Au 纳米棒有尖而强的纵向等离子体振动谱带等特点, 利用表面增强荧光的效应, 首次建立了 Au@Ag 纳米棒检测大肠致病菌 eaeA 基因的生物传感器, 具有低检测限、高灵敏度、稳定性好等特点。

[0009] 本发明的第一个目的是提供一种银包金纳米棒的制备方法, 其特征在于, 所述方法是: 将利用种子生长法制备好的金纳米棒溶液和 CTAB 溶液混合后, 向其中依次加入 AgNO_3 溶液、抗坏血酸溶液、NaOH 溶液于 25-30°C 下过夜。

[0010] 所述方法包括: 在每 20ml 浓度为 0.02-0.08mol/L 的 CTAB 溶液中, 添加 10-20ml 浓度为 15-30nmol/L 的金纳米棒溶液, 搅拌, 依次添加 1000-4000 μL 浓度为 2-8mmol/L 的 AgNO_3 溶液、500-800 μL 浓度为 0.1-0.5mol/L 的抗坏血酸溶液、1000-3000 μL 浓度为 0.1-0.5mol/L 的 NaOH 溶液, 搅拌、静置, 即合成得到 Au@Ag 纳米棒。

[0011] 所述方法合成的 Au@Ag 纳米棒, 在本发明的一种实施方式中, 分别选择了不同长度的金纳米棒, 从而分别合成长度为 30nm, 40nm, 50nm 的 Au@Ag 纳米棒。

[0012] 所述方法合成得到的长度分别为 30nm、40nm、50nm 的 Au@Ag 纳米棒所使用的 AgNO_3 溶液的体积分别是 1250 μL , 2500 μL 和 3750 μL 。

[0013] 本发明的第二个目的是提供一种按上述方法得到的 Au@Ag 纳米棒。

[0014] 本发明的第三个目的是提供一种所述 Au@Ag 纳米棒的应用方法。

[0015] 所述应用方法, 在本发明的一种实施方式中是用于检测 eaeA 基因。

[0016] 所述方法, 是在 Au@Ag 纳米棒上修饰寡核苷酸探针, 寡核苷酸探针与荧光染料 cy3 连接的部分核苷酸杂交后, 荧光信号增强。当目标 DNA 出现时, 探针与目标 DNA 结合, 此时荧光减弱, 从而根据荧光增强-减弱原理将其应用于大肠致病菌 E. coli 0157:H7eaeA 基因的检测。

[0017] 所述方法包括: (1) 在 Au@Ag 纳米棒表面上修饰寡核苷酸探针, 然后与加入荧光染料 cy3 修饰的核苷酸进行杂交, 得到修饰好的 Au@Ag-DNA 杂交溶液; (2) 测定步骤 1 得到的杂交溶液上清液的荧光强度 F_{Ag} ; (3) 将不同浓度的目标基因序列加入到步骤 1 制备的 Au@Ag-DNA 杂交上清液中, 反应、离心、测定上清液的荧光强度 F_s , 最后根据公式 $F_{\text{Ag}}-F_s/F_{\text{Ag}}$ 计算荧光强度的变化得到不同浓度目标基因加入后荧光强度的变化值 $F_{\text{Ag}}-F_s/F_{\text{Ag}}$; (4) 绘制目标基因浓度与荧光强度变化值的标准曲线; (5) 将待测样品添加到步骤 1 制备的杂交溶液中, 测定荧光强度, 然后根据公式 $F_{\text{Ag}}-F_s/F_{\text{Ag}}$ 计算荧光强度的变化值, 最后根据步骤 4 得到的

标准曲线,计算待测样品中目标基因的浓度。

[0018] 所述步骤(1)中 Au@Ag 纳米棒,在本发明的一种实施方式中,是采用长度为 50nm 的 Au@Ag 纳米棒。

[0019] 所述步骤(1)中寡核苷酸探针,在本发明的一种实施方式中,是 5'-H₂N-C₆-GCGAGG AACGCCGATACCATTACTTATAACCGCGACGCCTCGC-3' (探针序列是 SEQ ID NO. 1),可用于检测大肠致病菌 E. coli 0157:H7 的 eaeA 基因。

[0020] 所述步骤(1),在本发明的一种实施方式中,包括:首先在 Au@Ag 纳米棒的表面修饰巯基十一烷酸,然后用 EDC/NHS 活化羧基基团,接着用氨基修饰的寡核苷酸与活化好的巯基十一烷酸偶联,最后在 37°C, PBS 条件下,与荧光染料 cy3 连接的核苷酸杂交。

[0021] 所述步骤(1),在本发明的一种实施方式中,对荧光染料 cy3 修饰的核苷酸的碱基数进行了优化,是先选用荧光染料 cy3 修饰的不同碱基数的核苷酸进行杂交,选取荧光增强效果最强的作为最终使用的经荧光染料 cy3 修饰的核苷酸。

[0022] 所述步骤(1),在本发明的一种实施方式中,选用的荧光染料 cy3 修饰的核苷酸是:5'-cy3-GGTATAAGTAATGGTATCGGCGTT-3' (即核苷酸序列如 SEQ ID NO. 4 所示)。

[0023] 所述步骤(2)中荧光强度,与没有杂交前 cy3 连接的部分核苷酸荧光强度有差异,这是根据荧光染料 cy3 与 Au@Ag 纳米棒表面的距离而决定的,不同碱基数连接的荧光染料 cy3 与 Au@Ag 纳米棒杂交后,有荧光增强或荧光减弱的效应。在本发明的一种实施方式中,选择荧光增强最大的那条碱基核苷酸链(距离为 10nm),用于实验中的荧光增强信号。

[0024] 所述步骤(3)中, Au@Ag - DNA 杂交上清液与目标序列结合,在 37°C, PBS 条件下, Au@Ag 表面修饰的探针与原有的 cy3 修饰的寡核苷酸分离,那么荧光染料 cy3 修饰的寡核苷酸与 Au@Ag 纳米棒表面的距离增加,即超过 10nm,此时荧光减弱。根据公式 $F_{Ag}-F_s/F_{Ag}$ 计算荧光强度的变化,其变化量与目标基因序列的浓度呈正比,最后绘制目标基因浓度与荧光强度变化值标准曲线。其中 F_{Ag} 表示 Au@Ag 纳米棒荧光增强时的荧光强度, F_s 表示荧光染料 cy3 修饰的寡核苷酸与目标序列竞争后离开 Au@Ag 纳米棒表面荧光减弱时的荧光强度。

[0025] 所述标准曲线,在本发明的一种实施方式中,用于检测大肠致病菌 E. coli 0157:H7 的 eaeA 基因,为 $y = 95.97x + 1992.49$,目标 DNA 浓度在 10^{-17} - 10^{-11} M 之间具有良好的线性关系,相关系数为 $R^2 = 0.9947$,检测限为 3.33×10^{-18} M (S/N = 3)。

[0026] 所述方法,在本发明的一种实施方式中,用于检测大肠致病菌 E. coli 0157:H7 的 eaeA 基因,包括是:(1) Au@Ag 纳米棒的制备;(2) Au@Ag 纳米棒表面修饰羧基基团;(3) 带有羧基基团的 Au@Ag 纳米棒与氨基化的茎环寡核苷酸偶联;(4) 修饰好寡核苷酸的 Au@Ag 纳米棒与荧光染料 cy3 修饰的核苷酸序列在 37°C, PBS 条件下杂交,利用荧光光谱仪 F-7000 测定杂交上清液荧光强度;(5) 向上一步杂交好的上清液中加入互补目标序列即 eaeA 基因序列,测定荧光强度,根据公式 $F_{Ag}-F_s/F_{Ag}$ 计算荧光强度的变化,其变化量与目标 DNA 的浓度呈正比;(6) 将待测样品加入步骤 4 的杂交溶液中,根据荧光强度变化和步骤 5 得到的正比关系,计算待测样品中目标序列的浓度。

[0027] 所述步骤(5)中待测样品可以是以下任意一种:直接从食品或者他材料中抽提的菌体的 DNA,或者菌体 DNA 经 PCR 的扩增产物。后者由于片段长度更短,其检测效果比前者更好。

[0028] 本发明的有益效果:

[0029] (1) 摸索出了一套新型的制备 Au@Ag 纳米棒的方法,与现有的制备方法相比,该方法制备得到的 Au@Ag 纳米棒,其长径比分布均匀,产量高,均一性好,分散性好。同时得到了不同长径比的 Au@Ag 纳米棒需要添加不同体积的 AgNO₃ 溶液。采用 50nm 的 Au@Ag 纳米棒荧光增强效果最好,同时 Au@Ag 纳米棒比 Au 纳米棒具有好的单分散性以及大小的可调控性,用于基因检测,具有稳定性高、可重复性高,检测的灵敏度高、线性范围宽等优点。

[0030] (2) 由于只有分子在金属表面或其附近才能产生极大的增强现象,本发明选用 5'-cy3-GGTATAAGTAATGGTATCGGCGTT-3' 所示的含有 24 个碱基数的荧光染料 cy3 修饰的寡核苷酸,调整荧光染料 cy3 与 Au@Ag 纳米棒的距离,从而使荧光增强或减弱的效应最明显,保证了检测大肠致病菌 E. coli 0157:H7 的灵敏度。

[0031] (3) 本发明的 Au@Ag 纳米棒用于检测 E. coli 0157:H7 的 eaeA 基因,其检测限可达 3.33×10^{-18} M,具有灵敏度高、重现性好、快速、特异性强、便捷等特点,结合探针的使用,选择性好。

附图说明

[0032] 图 1: Au 纳米棒和 Au@Ag 纳米棒 TEM(透射电镜图);其中 A、B、C 为不同长度的 Au 纳米棒, D、E、F 为不同长度的 Au@Ag 纳米棒;

[0033] 图 2: Au@Ag 纳米棒检测大肠致病菌 E. coli 0157:H7 eaeA 基因原理图;

[0034] 图 3: 修饰寡核苷酸前后 Au@Ag 纳米棒紫外吸收图;注: a 表示 Au@Ag 纳米棒的紫外吸收图; b 表示 Au@Ag 纳米棒修饰上巯基十一烷酸后的紫外吸收图; c 表示 Au@Ag 纳米棒修饰上巯基十一烷酸和寡核苷酸后的紫外吸收图;

[0035] 图 4: 不同碱基数的 cy3-DNA 与 Au@Ag 表面寡核苷酸杂交后荧光变化图;

[0036] 图 5: 大肠致病菌 E. coli 0157:H7 eaeA 基因检测标准曲线图;

[0037] 图 6: Au@Ag 纳米棒检测大肠致病菌 E. coli 0157:H7 生物传感器特异性试验;其中 a: 完全互补目标序列; b: 单碱基错配序列; c: 完全错配序列;

[0038] 图 7: 不同长度的 Au@Ag 纳米棒荧光增强效果图。

具体实施方式

[0039] 为了能够更清楚地理解本发明的技术内容,特举以下实施例详细说明,其目的在于更好地理解本发明的内容而非限制本发明的保护范围。

[0040] 实施例 1 Au@Ag 纳米棒的合成

[0041] 首先,称取 0.364g CTAB,将其充分溶解在 20mL 水中,然后,在 27°C 搅拌的状态下,向 CTAB 水溶液中加入 10mL 金纳米棒溶液,持续搅拌 2min 后,分别按照以下顺序向反应体系中加入 3mM AgNO₃, 650 μL 浓度为 0.1M 的 VC, 1200 μL 浓度为 0.1M 的 NaOH,持续搅拌 5-10min 后静置过夜,反应温度为 27°C。

[0042] 注:根据所合成 Au@Ag 纳米棒大小的不同,选择 AgNO₃ 溶液的体积也有所不同,即选择 AgNO₃ 溶液的体积分别是 1250 μL, 2500 μL 和 3750 μL。

[0043] 图 1 为 Au 纳米棒和 Au@Ag 纳米棒 TEM(透射电镜图)。本发明对不同长度的 Au 纳米棒(图 A、B、C)进行了包银实验,得到了不同长度的 Au@Ag 纳米棒(D、E、F),根据图下方的比例尺,经过包银实验,Au@Ag 纳米棒的长度分别为 30nm, 40nm 和 50nm。由图 1 可以看

出,得到的 Au@Ag 纳米棒长径比分布均匀,产量高,均一性好,分散性好。

[0044] 实施例 2 Au@Ag 纳米棒用于 eaeA 基因检测

[0045] Au@Ag 纳米棒检测大肠致病菌 *E. coli* 0157:H7eaeA 基因原理图如图 2 所示。在 Au@Ag 纳米棒上修饰寡核苷酸探针,寡核苷酸探针与荧光染料 cy3 连接的部分核苷酸杂交后,荧光信号增强。当目标 DNA 出现时,探针与目标 DNA 结合,此时荧光减弱,从而根据荧光增强-减弱原理将其应用于大肠致病菌 *E. coli* 0157:H7eaeA 基因的检测。

[0046] 具体方法如下:

[0047] (1) Au@Ag 纳米棒表面修饰 MUDA

[0048] 首先,将合成的长度为 50nm 的 Au@Ag 纳米棒 8500rpm 离心 25℃,然后,根据配体交换反应原理,在其表面修饰上巯基十一烷酸 (MUDA),每小时向 3mL 纯化后的 Au@Ag 纳米棒溶液中加入 33 μ L, 0.1M MUDA,持续 3 小时后,将修饰上 MUDA 的 Au@Ag 纳米棒 8500rpm 离心 25min 后吸取多余未连上的 MUDA,最后将沉淀溶解在 1mL 去离子水中。

[0049] (2) MUDA-Au@Ag 表面修饰茎环探针

[0050] 首先,将 1mL MUDA-Au@Ag 纳米棒与 1mL 0.1M 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC HCl) 在 pH4.5 下搅拌 3h,用于活化羧基基团。然后,按摩尔比 1:2 分别向体系中加入 0.1M N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 和氨基化的茎环探针 5'-H₂N-C₆-GCGAGGAACGC CGATACCATTACTTATACCGCGACGCCTCGC-3' (探针序列如 SEQ ID NO. 1 所示) 室温下持续搅拌过夜。最后,将溶液 12000rpm 离心 10min,吸取上清液后溶解在 TE 缓冲液 (pH7.4) 中。修饰寡核苷酸前后 Au@Ag 纳米棒紫外吸收情况如图 3 所示,可以看出修饰寡核苷酸前后 Au@Ag 纳米棒还能保持原有的形态和性质。

[0051] (3) Au@Ag-MUDA-DNA 表面荧光增强的制备

[0052] 分别向 MUDA-Au@Ag-DNA 中加入不同碱基数的荧光染料 cy3 修饰的单链 DNA (如图 4 所示),终浓度为 10⁻⁷M。该混合物在 PBS 缓冲液 (pH7.4), 37℃ 下杂交反应 2h,最后 12000rpm 离心 10min,此时上清液用来测定荧光强度。

[0053] 由图 4 可以看出,当含有 24 个碱基 (序列如 SEQ ID NO. 4 所示) 时荧光增强效果最强,由于三个碱基大约 1nm,而该序列与茎环探针 (序列如 SEQ ID NO. 1 所示) 部分互补,茎环探针的直链部分有 6 个碱基,说明荧光染料与 Au@Ag 纳米棒的距离在 10nm 左右荧光增强效果最强。

[0054] 最后选择荧光增强的 5'-cy3-GGTATAAGTAATGGTATCGGCGTT-3' 来进行下一步的实验。

[0055] (4) 荧光增强-减弱模式下检测目标物大肠致病菌 *E. coli* 0157:H7eaeA 基因的制备

[0056] 使用序列如 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3 所示的引物进行 PCR 扩增,然后得到不同浓度的 eaeA 基因 (浓度范围在 10⁻²⁰M-10⁻⁸M 之间) 分别加入到 Au@Ag-DNA 杂交后的溶液中, 37℃ 下,与 cy3-DNA 竞争反应 2h。最后 12000rpm 离心 10min 获得上清液。竞争掉的 cy3-DNA 量取决于目标 eaeA 基因的浓度,此时,测定上清液荧光强度,由于距离的增大,荧光减弱,从而根据上述公式, $F_{Ag}-F_s/F_{Ag}$ 计算荧光强度的变化,其变化量与大肠致病菌 *E. coli* 0157:H7eaeA 基因的浓度呈正比, F_{Ag} 表示 Au@Ag 纳米棒荧光增强时的荧光强度, F_s 表示 cy3-DNA 与目标 DNA 竞争后离开 Au@Ag 纳米棒表面后荧光减弱时的荧光强度。

[0057] 因此,根据以上原理,以 eaeA 基因的浓度为横坐标,荧光强度变化量为纵坐标,建立了大肠致病菌 E. coli O157:H7 eaeA 基因检测标准曲线(如图 5 所示)。标准曲线方程为: $y = 95.97x + 1992.49$, 线性范围在 10^{-17} 至 10^{-11} M 之间,相关系数为 $R^2 = 0.9947$,检测限为 3.33×10^{-18} M ($S/N = 3$)。

[0058] 将待测样品添加到第 (3) 步杂交反应后的上清溶液中,竞争反应,离心测定上清的荧光强度,然后根据公式 $F_{Ag} - F_s / F_{Ag}$ 计算荧光强度的变化值,最后根据标准曲线,计算即可待测样品中目标 eaeA 基因的浓度。待测样品可以是直接从食品、水体或者其他材料中抽提的菌体的 DNA,或者菌体 DNA 经 PCR 的扩增产物。

[0059] 本发明的方法检测基因,具有检测限低,灵敏度高,线性范围宽等优点。

[0060] 实施例 3 Au@Ag 纳米棒的性能分析

[0061] (1) 稳定性

[0062] 用本发明制备的不同批次的 Au@Ag 纳米棒,检测大肠致病菌 E. coli O157:H7 的 eaeA 基因。结果如表 1 所示。结果发现基因回收率在 98.36-101.67%,误差小,说明本发明的 Au@Ag 纳米棒以及检测方法,稳定性、可重复性都很好。

[0063] 表 1 检测大肠致病菌 E. coli O157:H7 eaeA 基因回收率及误差结果

[0064]

样品	背景浓度 (mol L^{-1})	加标浓度 (mol L^{-1})	检出浓度 ($\text{mean} \pm \text{SD}$) (mol L^{-1})	回收率 (%)	RSD (%)
E.coli O157:H7	0.60×10^{-14}	0.62×10^{-14}	$1.20 \times 10^{-14} + 0.01 \times 10^{-14}$	98.36	0.83
E.coli O157:H7	0.60×10^{-14}	0.58×10^{-14}	$1.17 \times 10^{-14} + 0.001 \times 10^{-14}$	99.41	0.086
E.coli O157:H7	0.60×10^{-14}	0.60×10^{-14}	$1.21 \times 10^{-14} + 0.01 \times 10^{-14}$	101.67	1.64

[0065] 注:该实验为回收率实验,背景浓度一致,变量为加标浓度。

[0066] (2) 特异性

[0067] 用本发明制备的 Au@Ag 纳米棒,检测含有不同的基因序列,其中包括与寡核苷酸探针部分完全互补的目标序列 (5' -CGTCGCGGTATAAGTAATGGTATCGGCGTT-3', 即如 SEQ ID NO. 5 所示)、单碱基错配序列 (5' -CGTCGCGGTATAAGTCATGGTATCGGCGTT-3', 即如 SEQ ID NO. 6 所示)、完全错配目标序列 (5' -GTTCTGACTGCTGATGATTGTA AGGTAACA-3', 即如 SEQ ID NO. 7 所示)。结果如图 6 所示。从图中可以看到,当加入完全互补目标序列以后,荧光强度最小,即荧光强度减弱最大(变化量最大),当加入完全错配目标序列后,荧光强度减弱最小,可以说明,构建的 Au@Ag 纳米棒生物传感器特异性好。

[0068] 实施例 4 不同长度的 Au@Ag 纳米棒的荧光增强效果

[0069] 在合成的不同长度的 Au@Ag 纳米棒 (30nm、40nm、50nm) 表面修饰了寡核苷酸,以及与荧光染料 cy3 修饰的寡核苷酸杂交,测定荧光强度,结果如图 7 所示。结果发现,长度为 50nm 的 Au@Ag 纳米棒荧光增强效果最好。因此,本实验就利用了该长度的 Au@Ag 纳米棒来检测大肠致病菌 O157:H7,可有效提高检测的灵敏度。

[0070] 实施例 5 Au@Ag 纳米棒的合成

[0071] 在每 20ml 浓度为 0.02mol/L 的 CTAB 水溶液中,在 25°C 条件下,添加 20ml 浓度为

15nmol/L 的金纳米棒溶液, 搅拌, 依次添加 1000 μ L 浓度为 2mmol/L 的 AgNO_3 溶液、500 μ L 浓度为 0.3mol/L 的抗坏血酸溶液、1000 μ L 浓度为 0.2mol/L 的 NaOH 溶液, 搅拌、静置, 即合成得到 Au@Ag 纳米棒。

[0072] 实施例 6 Au@Ag 纳米棒的合成

[0073] 在每 20ml 浓度为 0.08mol/L 的 CTAB 溶液中, 在 30 $^{\circ}$ C 搅拌条件下, 添加 15mL 浓度为 30nmol/L 的金纳米棒溶液, 搅拌, 依次添加 4000 μ L 浓度为 8mmol/L 的 AgNO_3 溶液、800 μ L 浓度为 0.5mol/L 的抗坏血酸溶液、3000 μ L 浓度为 0.5mol/L 的 NaOH 溶液, 搅拌、静置过夜, 即合成得到 Au@Ag 纳米棒。

[0074] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上, 但其并非用以限定本发明, 任何熟悉此技术的人, 在不脱离本发明的精神和范围内, 都可做各种的改动与修饰, 因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

[0001]

序列表

<110> 江南大学

<120> 一种银包金纳米棒的制备方法及应用

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 1

gcgaggaacg ccgataccat tactatacc gcgacgcctc gc

42

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 2

ggcggataag acttcggcta

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成

[0002]

<400> 3	
cgttttggca ctatttgccc	20
<210> 4	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<400> 4	
ggiataaglia atggatcgg cgtt	24
<210> 5	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<400> 5	
cgtegcggta taagtaatgg tateggcgtt	30
<210> 6	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<400> 6	
egtegcggta taagtcatgg tateggcgtt	30

[0003]

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 7

gttcgactgc tgatgattgt aaggtaaca

29

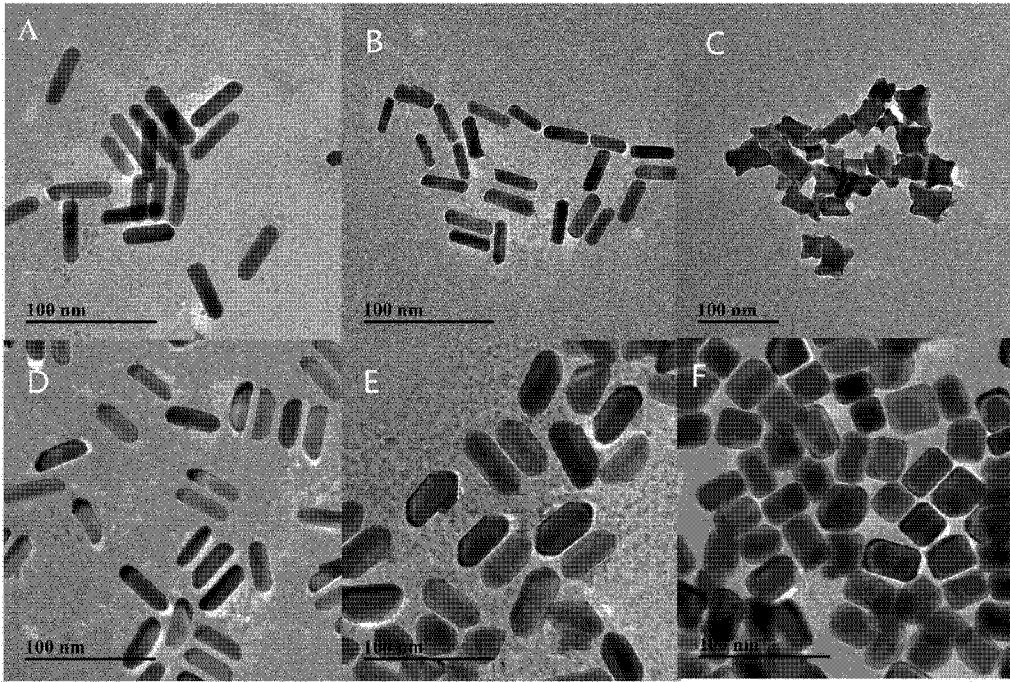


图 1

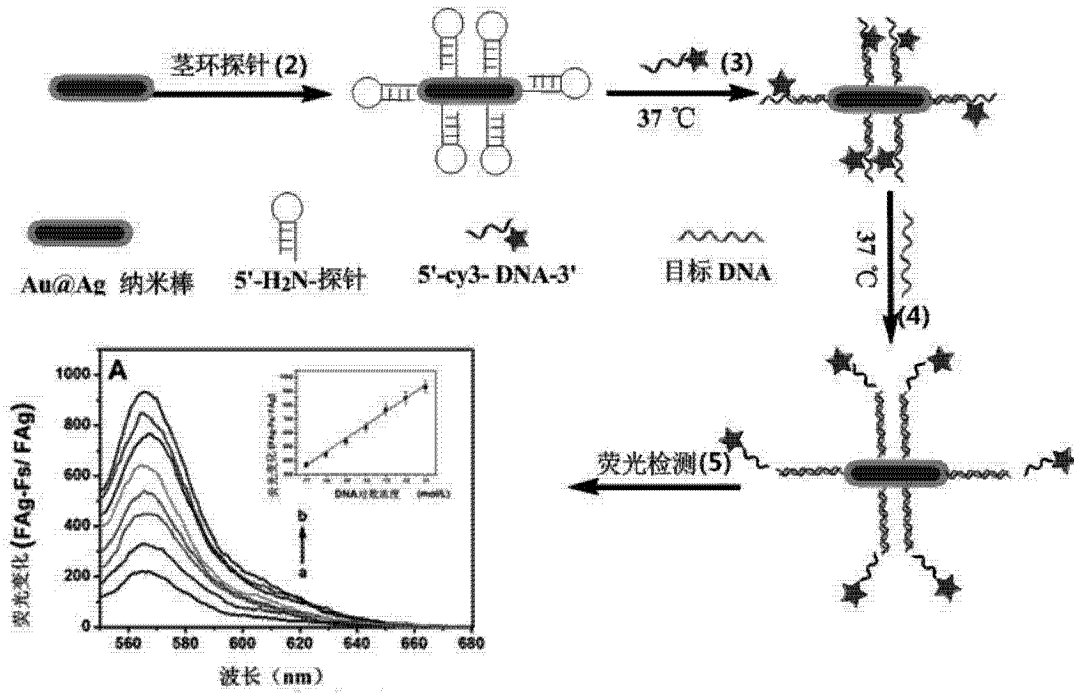


图 2

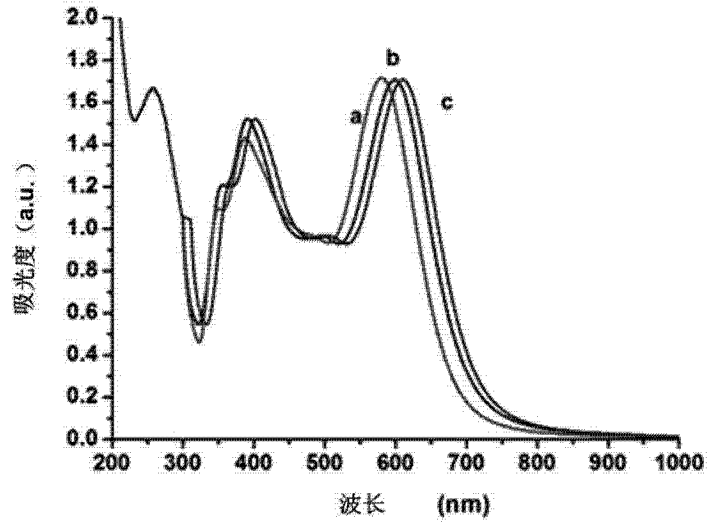


图 3

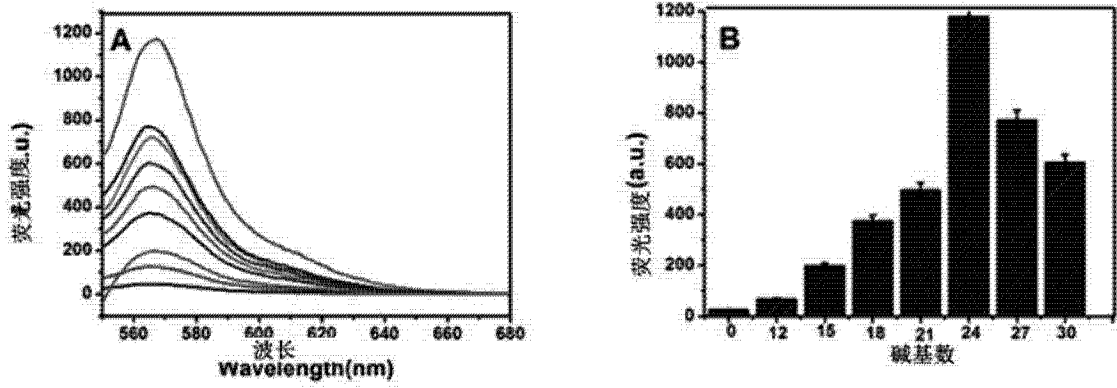


图 4

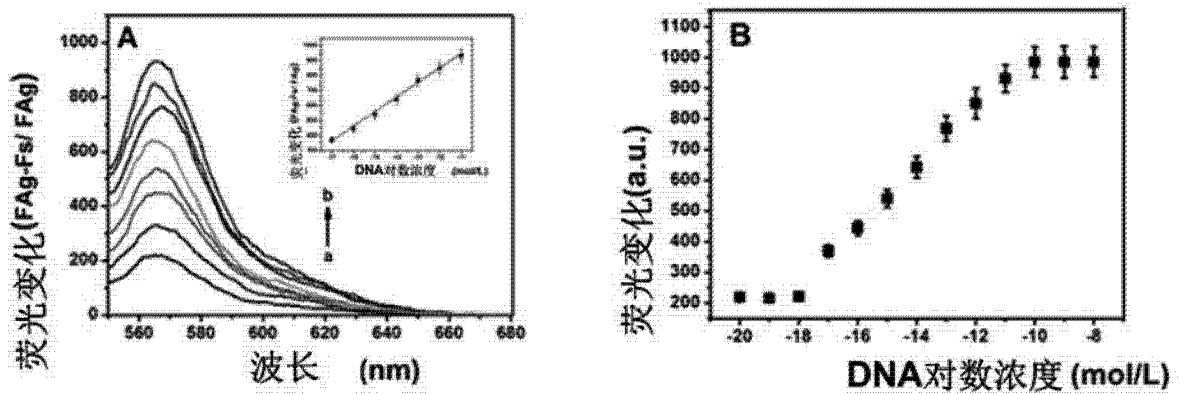


图 5

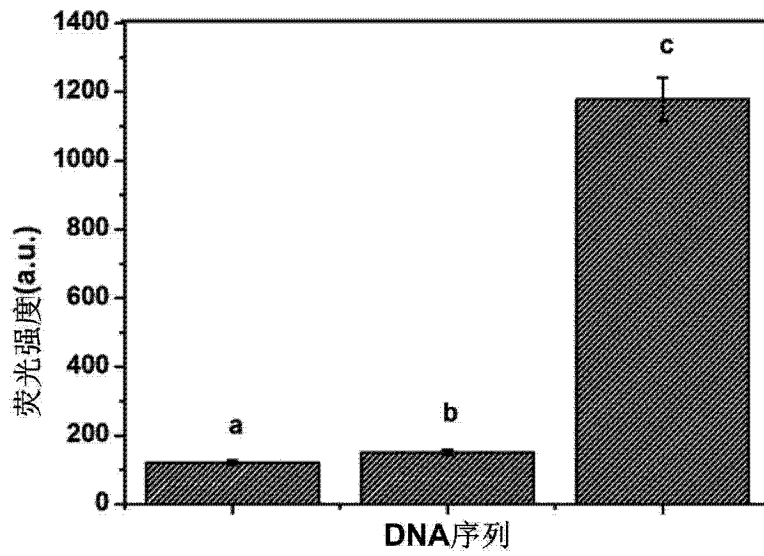


图 6

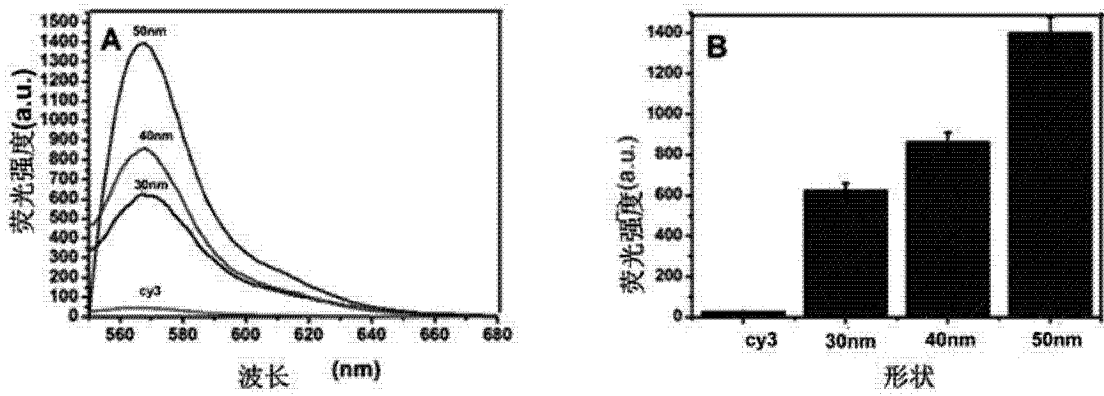


图 7

专利名称(译)	一种银包金纳米棒的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN104555913A	公开(公告)日	2015-04-29
申请号	CN201510044281.5	申请日	2015-01-28
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	孙秀兰 孙嘉笛 张银志		
发明人	孙秀兰 孙嘉笛 张银志		
IPC分类号	B82B3/00 B82Y30/00 B82Y40/00 G01N33/569 G01N33/531		
代理人(译)	张勇		
其他公开文献	CN104555913B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种银包金纳米棒的制备方法及应用，属于食品质量检测分析技术领域。本发明通过制备Au@Ag纳米棒，利用其表面增强荧光性，成功应用于检测大肠致病菌E.coli O157:H7eaeA基因，与传统方法相比，极大的降低了检测限、提高了灵敏度和并获得了良好的稳定性。利用荧光增强-减弱原理，建立了大肠致病菌E.coli O157:H7eaeA基因检测标准曲线，线性范围在 10^{-17} - 10^{-11} M之间，相关系数为 $R^2 = 0.9947$ ，检测限为 3.33×10^{-18} M(S/N = 3)。本发明特异性良好，通过加标实验，eaeA基因回收率为98.36%–101.67%，且其稳定性良好，可应用于水中大肠致病菌E.coli O157:H7eaeA基因的检测，具有非常广泛的应用前景。

样品	背景浓度 (mol L ⁻¹)	加标浓度 (mol L ⁻¹)	检出浓度 (mean±SD)(mol L ⁻¹)	回收率 (%)	RSD (%)
E.coli O157:H7	0.60×10^{-14}	0.62×10^{-14}	$1.20 \times 10^{-14} \pm 0.01 \times 10^{-14}$	98.36	0.83
E.coli O157:H7	0.60×10^{-14}	0.58×10^{-14}	$1.17 \times 10^{-14} \pm 0.001 \times 10^{-14}$	99.41	0.086
E.coli O157:H7	0.60×10^{-14}	0.60×10^{-14}	$1.21 \times 10^{-14} \pm 0.01 \times 10^{-14}$	101.67	1.64