

金纳米粒子动态光散射技术的应用研究进展

周宝青, 占忠旭, 黄楠, 李凡, 许恒毅*

(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘要: 动态光散射(Dynamic light scattering, DLS)作为颗粒粒径分析方法, 具有免分离、易操作、检测成本低、数据易处理等优点; 功能化的金纳米粒子除具有本身粒子属性外, 还能特异性识别待检物, 明显放大检测物光散射信号, 可通过DLS技术快速、特异、灵敏检测目标物。该文综述了金纳米粒子DLS技术在目标物分析与检测中应用的研究进展, 并对动态光散射技术在应用过程存在的问题进行了讨论, 旨在为其实际应用提供一定参考。

关键词: 金纳米粒子; 动态光散射技术; 检出限; 样本检测; 综述

中图分类号: O433.4; G353.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2017)12-1536-05

Research Progresses on Application of Dynamic Light Scattering with Gold Nanoparticles

ZHOU Bao-qing, ZHAN Zhong-xu, HUANG Nan, LI Fan, XU Heng-yi*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Dynamic light scattering(DLS), as a conventional analysis method by particle size, has the advantages of free separation, easy operation, low test costs and easy data processing etc. Functionalized AuNPs, in addition to their own particle properties, could also specifically identify the target, significantly amplify the light scattering signals from the target, and ultimately achieve a fast, specific and sensitive detection on the target through the DLS technique. In this paper, research progresses on the application of DLS with gold nanoparticles in detection on the target were reviewed. Some problems in the application process of DLS technique were discussed, which was intended to provide some reference for its practical application.

Key words: AuNPs; dynamic light scattering; limit of detection; sample detection; review

动态光散射(Dynamic light scattering, DLS)是一种常规的分析技术, 广泛应用于粒子粒径大小及分布情况的分析^[1]。自1970年起, 该方法已作为一种实用的分析方法应用于目标物分析和检测^[2]。商业化的常规DLS检测设备虽然具有易于操作、检测成本低、数据处理容易等优点^[3], 但存在检测灵敏度低、特异性差等缺点, 限制了其在实际样品检测中的应用。纳米材料(金、银、量子点等)作为理想的光散射增强剂, 经过修饰后能显著增强DLS信号^[4-5], 其中金纳米粒子(AuNPs)因其特殊的物理化学性质(高摩尔消光系数、表面增强拉曼散射等)和良好的生物相容性得到越来越多研究者的青睐^[6]。通过静电吸附、Au-S或Au-N键等作用, 蛋白质、核酸、无机物等可稳定修饰在AuNPs表面构建功能化金探针, 将其与DLS技术结合, 应用于样品检测, 具有特异性好、灵敏度高等优点。本文综述了基于AuNPs的DLS技术的检测原理及其在样品检测中的应用进展, 并对其存在的问题进行了讨论, 旨在为实际应用提供参考。

1 动态光散射技术测量颗粒直径的原理

DLS技术又称时间相关的光散射技术^[7], 是一种实时监控待检物散射光强度变化的技术。由于待检物溶液中的分子不停地做布朗运动, 其粒子散射光的相位发生变动, 导致散射光强度在时间上表现为在平均光强附近的随机波动。研究表明, 粒子散射光强度的涨幅频率与其粒径相关, 粒径越大, 涨

收稿日期: 2017-05-15; 修回日期: 2017-06-20

基金项目: 江西省青年科学家(井冈之星)培养对象项目(2014BCB23004)

* 通讯作者: 许恒毅, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品生物技术, Tel: 0791-88304447-222-9520, E-mail: kidyxu@163.com

落越慢^[8]。因此，通过测量散射光强度的涨落变化或频移情况，可同时获得颗粒粒径的相关动态参数，进而计算出粒子的粒径，其测量范围为1 nm~5 μm^[8]。图1为动态光散射实验装置图，其基本流程为：在固定散射角下，聚焦后的激光照射样品池中的颗粒，颗粒发出的散射光通过光探测器输出相应光信号，经过放大/甄别器和相关器处理，得到颗粒光强自相关函数，最后经计算机处理即可获得颗粒水化粒径及其分布情况。

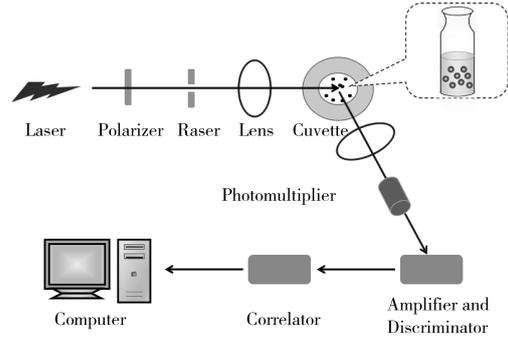


图1 动态光散射实验装置图
Fig. 1 The experimental equipment of DLS

2 金纳米粒子动态光散射技术在目标物分析与检测中的应用

AuNPs - DLS 技术是利用功能化 AuNPs 探针特异性捕获目标物，AuNPs 发生聚集导致其粒径变化，采用 DLS 技术实时、灵敏、分析其变化情况，从而定量检测目标物^[11]。

根据 AuNPs 探针聚合方式的不同，基于 AuNPs - DLS 技术建立的常见检测方法主要可分为直接聚合与间接聚合两类。直接聚合是利用功能化修饰 AuNPs 探针特异性识别目标物聚集，结合 DLS 进行分析的检测方法，主要利用的聚合方式包括抗原抗体反应、碱基互补配对、核酸适配子特异性识别等。该类方法检测时间短、特异性好、灵敏度高，广泛用于蛋白质^[12]、核酸^[13]和食源性致病菌^[14]的检测。间接聚合是指通过目标物所带电荷破坏 AuNPs 之间的静电平衡导致 AuNPs 聚集，结合 DLS 进行间接分析的方法，其主要利用的聚合方式为静电相互作用。相比直接聚合，该类方法检测时间更短、成本更低，主要用于环境中重金属离子的检测^[15]，但其检测灵敏度较低、特异性较差。图2归纳了近年来功能化金纳米粒子不同聚合方式结合 DLS 技术在目标物检测中应用的原理，表1总结了 AuNPs - DLS 技术在样品检测中的应用。

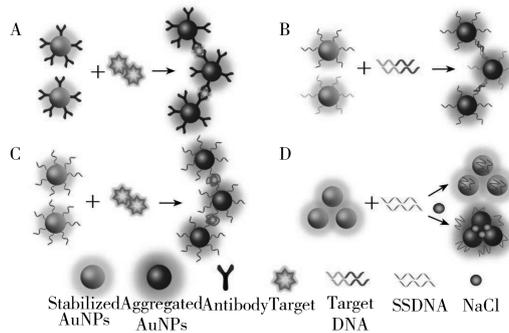


图2 功能化金纳米粒子的聚合方式

Fig. 2 The aggregation methods of functionalized AuNPs

- A. antigen - antibody reaction (基于抗原 - 抗体反应); B. complementary base pairing (基于碱基互补配对); C. aptamer specific recognition (基于核酸适配子特异性识别); D. electrostatic interaction (基于静电相互作用)

表1 AuNPs - DLS 技术在不同样本检测中的应用

Table 1 The application of AuNPs - DLS technology for the detection of different samples

Method	Application	Combination	Advantage	Disadvantage	Target	Limit of detection	Reference
直接聚合法	抗体包被的 AuNPs - DLS 技术	抗原 - 抗体反应	能均相检测、操作简单、特异性好、灵敏度高	抗体功能化探针合成困难、单克隆抗体制备工作量大、受环境影响大、可产生假阳性结果	前列腺特异抗原	0.5 ng/mL	[16]
					前列腺特异抗原	1 fmol/L	[17]
					乙肝表面抗原	0.005 IU/mL	[12]
					单增李斯特菌	22 CFU/g	[14]

(续表 1)

Method	Application	Combination	Advantage	Disadvantage	Target	Limit of detection	Reference
	DNA 修饰的 AuNPs - DLS 技术	碱基互补配对	特异性、重复性好, 灵敏度高	DNA 修饰不稳定、目标物结合不可控	单链 DNA	0.1 pmol/L	[18]
					双链 DNA	593 fmol/L	[19]
	核酸适配子功能化 AuNPs - DLS 技术	核酸适配子特异性识别	与目标物结合效率高、特异性好、受环境影响小	特异性核酸适配子筛选复杂、探针合成不稳定	腺苷	7 nmol/L	[20]
					三聚氰胺	2.0 mg/mL	[21]
间接聚合法	基于静电相互作用 AuNPs - DLS 技术	静电相互作用	操作简单、无需修饰、检测灵敏度高	特异性较差、受环境影响因素较大	Hg ²⁺	0.43 nmol/L	[22]
					Pb ²⁺	6.2 pmol/L	[23]

2.1 直接聚合

2.1.1 基于抗原-抗体反应 作为一种高效、特异的生物学捕获方式, 抗原抗体反应广泛应用于生物传感器检测方法中。通常, 功能化探针通过抗原抗体反应特异性识别目标物并发生聚集, 利用 DLS 技术可定量检测^[24]。基于抗原抗体反应聚合方式的 AuNPs - DLS 检测方法因高效、灵敏、特异等优点已被广泛应用在临床诊断、疾病预防、食源性致病菌检测等方面。Liu 等^[16]首先合成了抗体包被的不同形状 AuNPs 探针, 构建一步均相双抗夹心模式特异捕获前列腺特异抗原, 结合 DLS 技术实现定量检测, 该方法无需分离、样品用量少, 检出限为 0.5 ng/mL。为了进一步提高前列腺特异抗原的检测灵敏度, Li 等^[17]通过逐步偶联法分别将聚乙二醇、二氧化锰及抗前列腺结合抗体修饰到 AuNPs 表面, 形成“Ab₂ - MnO₂ - pGNPs”聚合物探针, 与目标抗原特异性结合后固定在 96 孔板中, 利用 DLS 技术进行检测, 其检出限为 1 fmol/L, 相比之前的检测方法, 其灵敏度提高了 4 个数量级。Huang 等^[14]首次建立了基于免疫磁富集和多抗修饰 AuNPs 探针的 DLS 技术定量检测食源性致病菌的方法。该方法检测时间短, 能特异性捕获生菜中的单增李斯特菌, 回收率为 74.4% ~ 123.4%, 在实际加标样品中的检出限为 22 CFU/g。

2.1.2 基于碱基互补配对 DNA 是一类带有遗传信息的生物大分子, DNA 之间严格按照碱基互补配对原则进行组装形成功能化结构。在核酸检测过程中, 基于碱基互补配对原则设计的核酸修饰的 AuNPs 探针, 能特异识别 1 个碱基错配, 利用 DLS 技术分析 AuNPs 探针聚集后粒径的微小变化, 可达到快速、灵敏、特异的检测目的。Du 等^[18]合成了多种单链 DNA (Single-stranded DNA, ssDNA) 修饰的金探针, 当目标 DNA 存在时, 功能化金探针特异捕获目标 DNA 发生聚集, 结合 DLS 技术分析, 可实现一步均相检测靶 DNA 的目的, 其检测时间短(10 min), 最低检出限为 0.1 pmol/L。Dai 等^[25]首次利用大粒径 AuNPs 探针结合 DLS 技术检测靶 DNA, 最低检出限达 1 pmol/L, 相比传统的比色法灵敏度提高了 3 个数量级。有研究报道, 基于碱基互补配对原则, ssDNA 除了能形成双链螺旋结构以外, 一些特殊碱基序列构成的 DNA 单链还能形成类似于“麻花状”的三螺旋结构^[26-27]。基于三螺旋结构 DNA 的金探针聚合反应是以 Double-stranded DNA (dsDNA) 为骨架所形成, 相比 ssDNA, 其 dsDNA 具有制备简单、保存过程中不易降解等优点。基于这种特殊的三螺旋碱基互补配对原则, Miao 等^[19]利用只含“G - A”碱基组合的特殊 ssDNA 合成具有两种不同 ssDNA 修饰的 AuNPs 探针, 当靶 DNA 存在时, 通过这种特殊碱基结合方式捕获靶 DNA 形成聚合物, 利用 DLS 技术定量检测 dsDNA 分子。该检测方法可特异性识别 1 个碱基错配, 其灵敏度高, 检出限为 593 fmol/L。

2.1.3 基于核酸适配子特异性识别 核酸适配子是一类通过体外筛选技术 (SELEX) 经过反复筛选得到的一段与靶物质有高亲和力与特异性的寡核苷酸, 不仅拥有类似单克隆抗体功能, 而且具有成本低、热稳定性好、环境耐受能力强等特点^[28]。近年来, 基于核酸适配子特异性识别的 AuNPs 探针结合 DLS 检测技术因操作简单、灵敏度高、特异性好、适应性强等优点, 主要用于疾病诊断、食品安全检测^[29]等领域。Yang 等^[20]首先合成“劈开型”腺苷核酸适配子包被的 AuNPs 探针, 功能化的 AuNPs 探针特

异性捕获腺苷受体形成腺苷-适配子聚合物, 通过 DLS 技术分析聚合物的粒径变化, 定量检测腺苷的浓度, 检出限为 7 nmol/L, 相比传统的比色法, 提高了 5 个数量级; 与抗体功能化探针相比, 该探针合成成本低、环境耐受能力强。Wu 等^[21]合成了含特定碱基序列的 ssDNA 功能化 AuNPs 探针, 通过氢键的结合作用, 该 ssDNA 上特定的胸腺嘧啶六联体结构与三聚氰胺单体分子特异性结合形成多聚体, 利用 DLS 技术分析多聚物粒径变化, 从而快速、灵敏检测三聚氰胺。该方法检测三聚氰胺耐受环境(温度、pH 值、食品基质)的干扰, 检出限最低可达 2.0 mg/mL。

2.2 间接聚合

静电相互作用是维持胶体体系稳定的主要作用, 主要包括静电引力和静电斥力。均相胶体溶液中, 粒子之间因表面所带同性电荷相互排斥而保持相对稳定状态。实际应用中, 未修饰的 AuNPs 探针处于高浓度盐(NaCl)缓冲溶液中, 其表面的电层被破坏, 粒子之间的静电斥力变弱, AuNPs 探针之间发生聚合, 而一些待检目标物具有稳定 AuNPs 的作用, 如 ssDNA 在伸展状态下通过 Au—N 键包被在 AuNPs 表面, 使其保持良好的分散性^[30]。基于静电相互作用的 AuNPs 探针结合 DLS 技术因操作简单、无需修饰、检测成本低等优点而广泛应用于重金属离子的检测。Xiong 等^[22]成功构建了基于 AuNPs 探针 DLS 技术灵敏检测 Hg^{2+} 的生物传感器。未经修饰的 AuNPs 直接加入反应体系, 当不存在 Hg^{2+} 时, AuNPs 由于 ssDNA 的保护作用保持稳定状态^[5]; 而 Hg^{2+} 存在时, Hg^{2+} 与 ssDNA 发生特异性结合, 其 ssDNA 构象发生变化形成发卡结构、二聚体等, 此时 AuNPs 探针裸露在高盐溶液中发生明显聚合, 结合 DLS 技术分析聚合物的粒径变化可定量检测 Hg^{2+} 。该方法无需合成功能化 AuNPs 探针, 其最低检出限为 0.43 nmol/L。Miao 等^[23]利用 Pb^{2+} 特异识别 dsDNA 发生聚合, 同样构建了基于静电相互作用 AuNPs 探针结合 DLS 技术一步检测 Pb^{2+} 的方法, 该方法特异性好, 能很好地应用于实际水样中 Pb^{2+} 含量的检测, 最低检出限达 6.2 pmol/L, 回收率为 95.12%~104.76%。与传统比色法相比^[31], 该方法检测灵敏度更高; 相比电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)等定量分析方法^[32-33]的检测成本更低, 操作更快速便捷。

3 总结与展望

AuNPs 结合 DLS 技术的检测方法具有操作便捷、特异性好、灵敏度高等优点, 在临床诊断、疾病预防、食源性致病菌检测、环境监测等领域得到了广泛的应用。通过比较不同聚合方式 AuNPs 结合 DLS 技术在样本检测中的应用发现, 该方法在实际应用中尚存在一些问题, 需要不断研究和改进: ①尽管 AuNPs 结合 DLS 技术能灵敏检测目标物, 但反应体系中复杂基质的存在易造成假阳性结果, 因此可结合一些富集手段(如免疫磁富集技术)去除体系中的杂质干扰, 从而更加精确地检测目标物^[34]; ②目前报道的 AuNPs 结合 DLS 技术用于样本的检测均通过功能化金探针直接或间接捕获待检物, 其检测灵敏度受到一定的限制, 可结合杂交链式反应(HCR)、构建人工模拟酶等信号放大方式进一步提高灵敏度; ③目前, AuNPs 结合 DLS 的生物传感器方法主要利用 AuNPs 作为捕获探针载体, 形式较为单一, 有文献报道结合多种纳米材料或金属材料的检测方法, 其检测信号强度能明显增大^[8]。因此, 在今后的研究中, 可以尝试结合多种纳米材料如磁珠、量子点^[35]、银纳米粒子等用于样品检测的研究, 从而实现超灵敏检测。随着检测技术向快速简便、高灵敏度方向发展, 基于 AuNPs-DLS 技术的生物传感器方法必将得到更广泛的关注与应用。

参考文献:

- [1] Goldburg W I. *Am. J. Phys.*, **1999**, 67(12): 1152-1160.
- [2] Xu R L. *China Powder Industry*(许人良. 中国粉体工业), **2012**, (5): 13-16.
- [3] Zheng T Y, Bott S, Huo Q. *ACS Appl. Mater. Inter.*, **2016**, 8(33): 21585-21594.
- [4] Wang Z X, Ma L. *Coord. Chem. Rev.*, **2009**, 253(11): 1607-1618.
- [5] Wang Y X, Bo H Y, Lin K, Wang X, Gao Q. *J. Instrum. Anal.* (王云香, 薄红艳, 蔺凯, 王晓, 高强. 分析测试学报), **2011**, 30(7): 804-807, 812.
- [6] Raschke G, Kowarik S, Franzl T, Sönnichsen C, Klar T A, Feldmann J, Nichtl A, Kürzinger K. *Nano Lett.*, **2003**, 3(7): 935-938.
- [7] Sartor M. *Dynamic Light Scattering*. University of California, San Diego, **2003**: 2-21.

- [8] Yang L Y. *The Detection Research of Ion and Micromolecule Base on Dynamic Light Scattering of Nano-particles*. Changsha: Hunan University(杨丽燕. 基于纳米颗粒动态光散射技术的离子与小分子的检测研究. 长沙: 湖南大学), **2012**.
- [9] Siddiq M, Wu C, Li B. *J. Appl. Polym. Sci.*, **1996**, 60(11): 1995 – 1999.
- [10] Lu D P, Guan R. *Chinese Journal of Colloid & Polymer*(鲁德平, 管蓉. 胶体与聚合物), **2000**, 18(2): 41 – 43.
- [11] Lai Y H, Koo S, Oh S H, Driskell E A, Driskell J D. *Anal. Methods – UK*, **2015**, 7(17): 7249 – 7255.
- [12] Wang X H, Li Y, Quan D Q, Wang J D, Zhang Y H, Du J, Peng J C, Fu Q X, Zhou Y, Jia S Z, Wang Y L, Zhan L S. *Anal. Biochem.*, **2012**, 428(2): 119 – 125.
- [13] Zhang Y, Fei W W, Jia N Q. *Nanoscale Res. Lett.*, **2012**, 7(1): 564 – 569.
- [14] Huang X L, Xu Z D, Mao Y, Ji Y W, Xu H Y, Xiong Y H, Li Y B. *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, 66: 184 – 190.
- [15] Miao X M, Ling L S, Cheng D, Shuai X T. *Analyst*, **2012**, 137(13): 3064 – 3069.
- [16] Liu X, Dai Q, Austin L, Coutts J, Knowles G, Zou J H, Chen H, Huo Q. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130(9): 2780 – 2782.
- [17] Li C, Ma J H, Fan Q X, Tao Y Q, Li G X. *Chem. Commun.*, **2016**, 52(50): 7850 – 7853.
- [18] Du B A, Li Z P, Liu C H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45(47): 8022 – 8025.
- [19] Miao X M, Xiong C, Wang W W, Ling L S, Shuai X T. *Chem. – Eur. J.*, **2011**, 17(40): 11230 – 11236.
- [20] Yang X H, Huang J H, Wang Q, Wang K M, Yang L J, Huo X Q. *Anal. Methods – UK*, **2011**, 3(1): 59 – 61.
- [21] Wu L, Chen K, Lu Z C, Li T T, Shao K, Shao F, Han H Y. *Anal. Chim. Acta*, **2014**, 845: 92 – 97.
- [22] Xiong C, Ling L S. *Talanta*, **2012**, 89: 317 – 321.
- [23] Miao X M, Ling L S, Shuai X T. *Anal. Biochem.*, **2012**, 421(2): 582 – 586.
- [24] Zhang S Y, Moustafa Y, Huo Q. *ACS Appl. Mater. Inter.*, **2014**, 6(23): 21184 – 21192.
- [25] Dai Q, Liu X, Coutts J, Austin L, Huo Q. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130(26): 8138 – 8139.
- [26] Yan H L, Xiong C, Yuan H, Zeng Z X, Ling L S. *J. Phys. Chem. C*, **2009**, 113(40): 17326 – 17331.
- [27] Sau S P, Kumar P, Anderson B A, Østergaard M E, Deobald L, Paszczynski A, Sharma P, Hrdlicka P J. *Chem. Commun.*, **2009**, (44): 6756 – 6758.
- [28] Mo L T, Li J, Liu Q L, Qiu L P, Tan W H. *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 89: 201 – 211.
- [29] Dong L L, Tan Q W, Ye W, Liu D L, Chen H F, Hu H W, Wen D, Liu Y, Cao Y, Kang J W, Fan J, Guo W, Wu W Z. *Sci. Rep. – UK*, **2015**, 5: 15552.
- [30] Ma L N, Liu D J, Wang Z X. *Chin. J. Anal. Chem.* (马立娜, 刘殿骏, 王振新. 分析化学), **2014**, 42(3): 332 – 336.
- [31] Liu J W, Lu Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125(22): 6642 – 6643.
- [32] Ochsenkühn – Petropoulou M, Ochsenkühn K M. *Frese. J. Anal. Chem.*, **2001**, 369(7): 629 – 632.
- [33] Luo S Z, Zhao J L, Chen H Y, Yang T. *J. Instrum. Anal.* (罗世忠, 赵金龙, 陈怀银, 杨涛. 分析测试学报), **2016**, 35(1): 23 – 27.
- [34] Huang X L, Xu H Y, Xiong Y H, Qu F, Yang L. *Food Sci.* (黄小林, 许恒毅, 熊勇华, 曲锋, 杨林. 食品科学), **2014**, (11): 280 – 285.
- [35] Liu K L, Dong Y M, Su J X, Wang G L. *J. Instrum. Anal.* (刘康丽, 董玉明, 束军仙, 王光丽. 分析测试学报), **2014**, 33(8): 899 – 904.