

DNA 分子荧光探针

陈秀英 彭孝军*

(大连理工大学精细化工国家重点实验室 大连 116012)

摘 要 介绍了各种 DNA 荧光探针的结构特征、荧光性质和与 DNA 的作用方式, 概述了 DNA 探针在生物分子分析方面的应用, 并展望了 DNA 荧光探针的发展趋势和应用前景。

关键词 荧光探针 DNA 花菁染料 光稳定性 量子点

DNA Fluorescence Probes

Chen Xiuying, Peng Xiaojun*

(State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116012)

Abstract The structure characters, fluorescence properties and the functional ways of the various kinds of probes for DNA, including some applications on the detection of biomolecules, were reviewed, and the trends and prospect on the progress of DNA fluorescence probes were discussed too.

Key words Fluorescence probe, DNA, Cyanine, Photostability, Quantum dot

DNA 是生命遗传的重要物质, DNA 分子的定量分析和特异识别对基因组学、病毒学、分子生物学等相关学科的发展具有十分重要的意义。由于生物分子自身的荧光较弱, 目前多采用荧光探针法检测。荧光探针法较传统的同位素检测速度快, 重复性好, 用样量少, 无辐射, 在 DNA 自动测序、抗体免疫分析、疾病诊断、抗癌药物分析等方面已得到广泛应用^[1,2]。DNA 荧光探针的灵敏度是影响检测结果的重要因素, 因而开发更灵敏的荧光探针, 同时避免生物荧光背景的干扰已成为目前研究的热点。下面对 DNA 分子荧光探针的结构、功能及对 DNA 的分析应用技术方面作一介绍。

1 吖啶、菲啶类

吖啶、菲啶类染料是应用最早的核酸荧光探针, 它们通过嵌入或静电吸引与 DNA 分子结合, 使 DNA 的荧光大大增强, 是序列非特异的小分子探针。



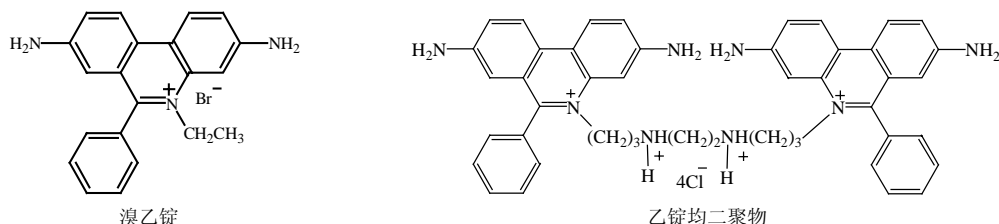
陈秀英 女, 28 岁, 博士生, 现从事生物探针方面的研究。*联系人 E-mail: pengxj@chem.dlut.edu.cn

教育部重大项目和国家自然科学基金项目(20128005, 20376010)

2003-11-10 收稿, 2004-02-27 接受

吡啶的基本结构为二苯并吡啶, 在水溶液中呈弱碱性。1940 年, 发现当吡啶橙与酸性物质连接或存在于酸性物质中时, 其特征光谱会发生一定的变化, 至此一直被用于生物体的染色。吡啶橙可与 DNA 或 RNA 作用, 与双链 DNA(dsDNA)结合后的荧光激发/发射波长分别为 502/538nm(水)^[3]。为提高染料稳定性及荧光强度, 大量的吡啶衍生物被合成。Pavel 等^[4]合成了系列硫代吡啶, 并用毛细管液相色谱对其定量纯化分析。Naofumi^[5]合成了 10-羧甲基吡啶酯, 其荧光及稳定性都有很大提高, 同时含有的羧基活性基可与生物分子共价结合。Cao 等^[6]在吡啶橙给体与番红 T 受体之间建立了荧光共振能量转移(FRET)定量测定 DNA 的方法, 其中给体的最大发射波长要与受体的吸收波长重叠, 对小牛胸腺 DNA 的检测限为 $2.6 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该法虽然灵敏度较高, 但易受到牛血清白蛋白和人血清白蛋白的干扰。一些吡啶的络合物, 会对小沟及 DNA 序列特异识别, 有望成为 DNA 的转录抑制剂, 控制核酸的表达^[7,8]。对位氨基取代的喹吡啶化合物对三链 DNA 有高度的稳定作用及选择性, 而且该类化合物表现出光活性, 成为 DNA 的光切断剂^[9]。

溴乙锭是应用较广的菲啶类探针, 溴乙锭可结合单链(ssDNA)、双链及多链 DNA, 与核酸结合后, 荧光增强 20~30 倍, 激发波长红移 30~40nm, 发射波长发生蓝移, Stokes 位移较大。双嵌入剂乙锭均二聚物(Ethidium homodimer, EthD)的嵌入部分使染料分子与 DNA 之间形成十



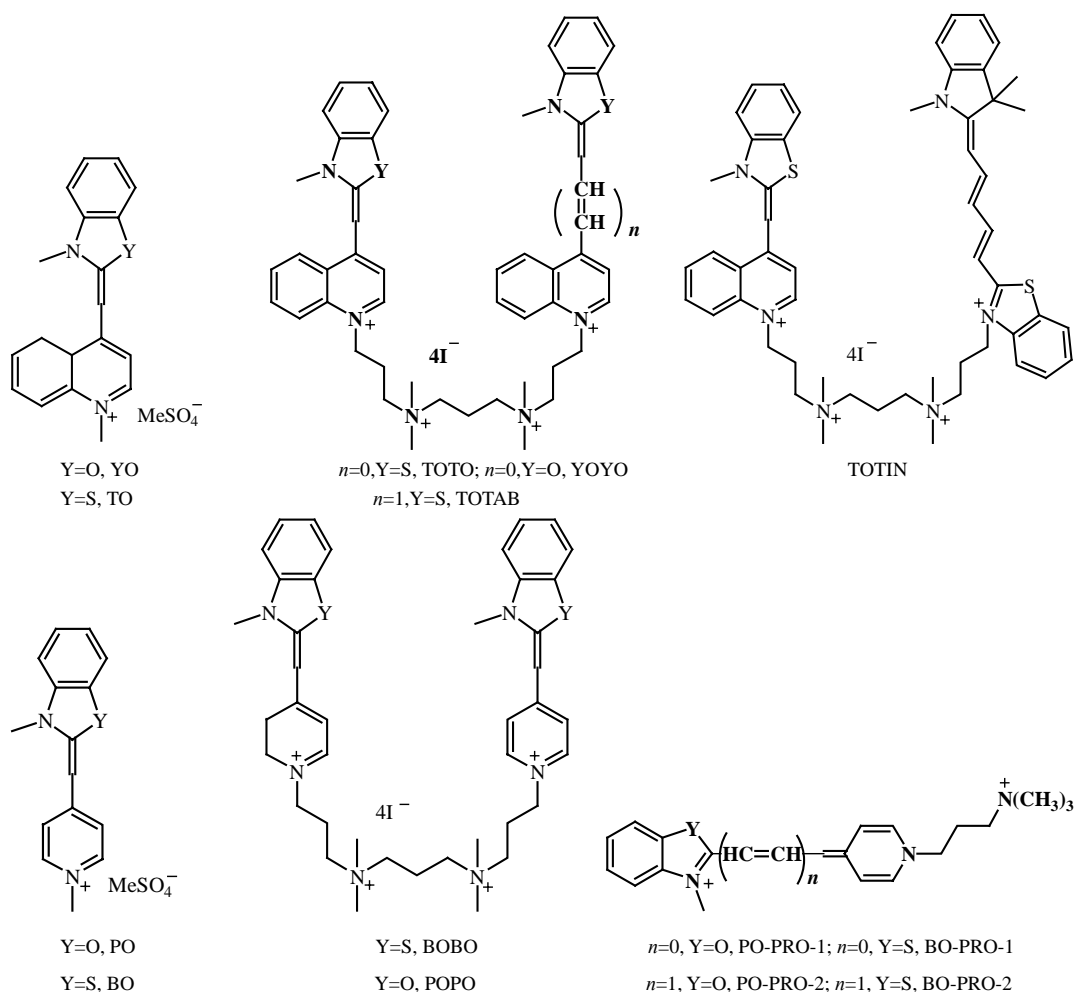
分牢固的亲合力, 连接常数约 10^{11} (溴乙锭仅为 10^5), 同时对三链 DNA 有高亲和作用, 因而更利于应用到抗体、抗癌药物的基因水平的研究。Gherghi 等^[10]用汞滴电极研究了溴乙锭、吡啶橙与 dsDNA 的作用, 结果显示它们的作用方式完全不同。利用 488nm 氩离子激光激发和共聚焦荧光成像扫描系统对 EthD 与 DNA 的复合物检测, 琼脂糖凝胶电泳后, 检测灵敏度可达 pg(10^{-12} g)级^[11]。溴乙锭探针研究 dsDNA 与树枝状大分子(Dendrimer)的相互作用^[12], 对于细胞修复、分子识别等基因生命学有深远意义。富含碱基 G 的 ssDNA 可以形成分子内四链结构, 溴乙锭的一些衍生物可以增加 DNA 四链结构的稳定性并作为研究四链结构的荧光探针^[13]。它们的一些光谱性质见表 1^[3,14,15]。

2 菁类染料

2.1 TOTO 类

吡啶橙、溴乙锭类染料虽然与核酸结合稳定, 但未结合的染料自身的荧光会造成高的荧光背景, 干扰检测, 同时溴乙锭具有很大毒性。TOTO 和 YOYO 是由 Glazer 等开发的一类对 dsDNA 具有高度亲和力的不对称菁染料^[16,17]。染料在溶液中无荧光, 降低了检测过程中的荧光背景干扰。与 dsDNA 结合后发生强烈的荧光, 荧光增强约 1000 倍, 染料分子与 DNA 的碱基对最大比例可达 1/4, 在琼脂糖凝胶和丙烯酰胺凝胶电泳中稳定。它们分别由单体噻唑橙 TO 和噻唑黄 YO 通过一个多亚甲基胺柔性链连接成二聚体。YOYO 是 TOTO 的类似物, 只是其中用苯并噻

唑替换了苯并噻唑。改变多亚甲基链两端的染料分子,可以得到不同的异二聚体 TOTAB、TOTIN 等。该类染料还有 POPO、BOBO 以及不对称单亚甲基菁染料 PO-PRO、BO-PRO、TO-PRO、YO-PRO 等,共轭链碳数增加,吸收及发射波长产生红移。Rye 等认为 ssDNA-TOTO 复合物稳定性及光谱性质的变化在于 TOTO 头部基团与单链碱基之间的堆积作用和链上两个阳离子正电荷与 DNA 骨架上的负电荷之间的库仑力共同作用的结果^[18]。TOTO 可高选择性地用于 dsDNA 的非序列特异性的检测,它对所有的 dsDNA 表现出极高的亲和作用,但更易嵌入 dsDNA 的(5'-CTAG-3')₂ 位,大约是 100 倍的选择性,其次是(5'-CTGA-3')₂ 位,大约 50 倍的选择性^[19]。Jason 等^[20]用溶液粘度测定法和原子力显微镜解释了 TOTO 与 DNA 的双嵌入作用。



与 DNA 的高度嵌合使这类染料荧光极大增强, 广泛用于 DNA 的染色。利用激光激发共聚焦荧光凝胶扫描检测系统, 琼脂糖凝胶电泳, TOTO 及 YOYO 与 dsDNA 复合物的检测限是 4pg, 较传统的溴乙锭染色用量低 500 倍^[21]。Zhu 等^[22]利用毛细管电泳分离 DNA 碎片, TOTO 染色后灵敏度可达到每区带 2~4amol(10^{-18} mol)碱基对。Stephan 等以共聚焦扫描荧光检测的方法, 对 TOTO 染色过的微量 DNA 碎片尺寸定量分析, 不同长度的 DNA 碎片荧光强度不同, 可检测到长度为 2~14kbp(bp, 指碱基对)的碎片, 不确定度为 7%~14%。该法采用玻璃覆盖的载片, 表

面涂有廉价的聚赖氨酸等涂层,具有很好的应用前景^[23]。YOYO-1 可以作为新的 DNA 缩合作用探针,弱酸性(pH5.7)条件下, YOYO 嵌入的单个 DNA 分子(~48.5kbp)被破坏成直径为 100~150nm 的环状结构,用光捕捉可观测到单个与缩合的 DNA 分子之间的构象转化,达到 150ms 的时间分辨^[24]。Claire 等^[25]发现,在 DNA 存在时 YO 和 YOYO 会产生光漂白,其原因主要在于氧化的碱基 8-氧代-7,8-二羟基脱氧鸟嘌呤能使嵌入的 YOYO 荧光猝灭。

TOTAB、TOTIN、噻唑橙和溴乙锭异二聚物 TOED1、TOED2、荧光素和溴乙锭异二聚物 FED 等可用于研究在给体与受体之间的能量转移。与 dsDNA 结合后,给体荧光团发射的荧光约 90%被猝灭,而受体荧光团的荧光较同样条件下的单体荧光增强 100 倍以上,提高了分析灵敏度。用于 DNA 自动序列分析中,单一波长的光源激发染料对,经过 FRET 过程后,在不同波长下发射,因而实现了单一光源激发多色检测。TOTO 类染料虽然价格贵,但标记快速,接近生理 pH 条件,对生物分子的功能活性影响小。染料与 dsDNA 结合后的性质见表 1。

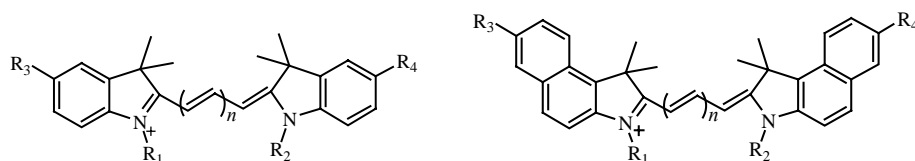
表 1 染料与 dsDNA 结合后的荧光性质
Tab.1 Fluorescence properties of dyes coupled with dsDNA

染料	量子产率	最大激发/发射波长/nm	荧光增强倍数	连接常数	$\epsilon \times 10^4 / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	信噪比	参考文献
吖啶橙	0.43	502/538	1.5	3.1×10^4	5.3(DMSO 或 DMF)	1.2	[3]
溴乙锭	0.15	526/604	21	1.5×10^5	0.32(DMSO 或 DMF)	1.3	[3]
YOYO-1	0.52	491/509	460	6×10^8	9.9(DMSO 或 DMF)	3.9	[3]
TOTO-1	0.34	514/533	1400	1.1×10^9	11.7(DMSO 或 DMF)	—	[3]
TOTIN		吸收波长 506;547 发射波长 531;673	36		7.9;14.64(甲醇)		[14]
TOTAB		吸收波长 507;636 发射波长 532;658	126		7.76;10.1(甲醇)		[14]
POPO-1		434/456			9.2(水或甲醇)		[15]
BOBO-1		462/481			11.4(水或甲醇)		[15]
PO-PRO-1		435/455			5.0(水或甲醇)		[15]
BO-PRO-1		462/481			5.8(水或甲醇)		[15]

ϵ 值由 DNA-染料复合物在水或甲醇中与单体染料对照的结果

2.2 花菁染料

2.2.1 花菁染料的特点 嵌入式荧光染料对 DNA 序列不能特异识别,且其最大发射波长一般小于 600nm,然而生物分子在紫外区有弱荧光,为避免生物分子的自荧光,开发近红外荧光染料已成为研究的热点。花菁染料的摩尔吸收系数大,荧光发射波长范围宽,一般在 600~1000nm 的近红外区,可大大避免生物自身的荧光背景干扰,与成本较低的激发光源如半导体激光器匹配,用于 DNA 自动测序、聚合酶链反应(PCR)检测及抗体免疫分析等。由 Waggoner 等^[26]开发的一类多甲川类花菁染料,当中间的共轭双键数 n 是 1、2、3 时,分别为 CY3、CY5、CY7 系列菁



染料。每增加一个共轭双键,最大吸收波长红移 100nm,共轭双键数越多,染料越不稳定。苯并噻唑或苯并吡啶取代吡啶环后,最大吸收发生红移。近红外菁染料共价标记具有特异性,标

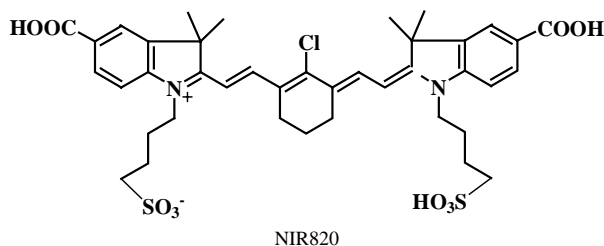
记更稳定,贮存期长。

2.2.2 光稳定性 活性氧如单线态氧、超氧化物、过氧化物等氧化还原活性物质被认为是荧光团产生光降解而褪色的主要原因。花菁染料的光漂白是由于单线态氧对多亚甲基链的攻击。为了提高染料的光稳定性,常将母体中的多亚甲基链改变为方酸环、环戊烯、环己烯等刚性环结构,或在分子外部共价引入或掺杂环糊精等^[27,28]。姚祖光等发现染料用含氯环己烯取代亚甲基链结构并将吡啶的 1 位用大体积的芳环取代后,染料的光稳定性会显著增强^[29]。

2.2.3 染料的标记(标记试剂的生成) 将染料标记在一定序列的寡核苷酸上可获得具有特异性的寡核苷酸探针,同时运用荧光 PCR 扩增技术,可得到高灵敏度的探针。

花菁染料与寡核苷酸的共价标记位一般在吡啶环的 R_1 位上, R_1 位的活性基团通过琥珀酰亚胺酯活化后,与连接臂的一端结合,连接臂的另一端与寡核苷酸的核糖或碱基共价连接。活性基团一般为含羧基的取代基,为提高染料的水溶性及稳定性,常在吡啶环的 R_3 、 R_4 位引入水溶性基团,如磺酸基等。有的在 R_3 、 R_4 位引入活性基,而在 R_1 、 R_2 位引入磺酸基。也可采用邻苯二甲酰亚胺酯或异硫氰酸酯。一般寡核苷酸的多处标记会使荧光信号增强^[30],但由于染料之间及染料与核酸间的聚集(Aggregation),多处标记后的寡核苷酸会发生一些性质的变化,如降低了探针的稳定性和荧光亮度。同时,寡核苷酸的尺寸很小,因此要想增强探针的灵敏度,必须考虑改变荧光团的结构以抑制染料的聚集。连接臂的长度也会影响探针的灵敏性,连接臂过短,会影响探针的稳定性及后面的杂交检测。Waggoner 等^[31]经过体外实验,获得了优化探针,即每隔 6 个碱基通过连接臂标记一个 CY3 染料。

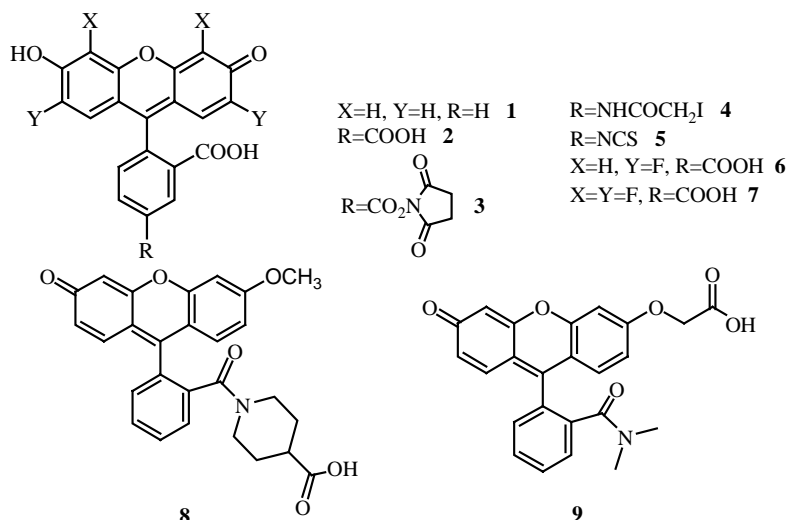
2.2.4 应用 花菁染料广泛用于 DNA 自动测序和核酸、蛋白质及抗体的标记等。Duthie 等^[32]合成了菁染料 CY5、CY5.5 标记的二脱氧核糖三磷酸酯结构用于单色 DNA 测序。James 等^[33]合成了近红外花菁染料异氰酸酯和琥珀酰亚胺酯作为生物探针标记试剂,但酯化反应收率及纯度都很低。郑洪等^[34]以近红外花菁染料的荧光猝灭测定核酸,测定范围是 $0.08 \sim 1.2 \mu\text{g/mL}$ 。Yang 等^[35]将羧基引入近红外花菁染料,毛细管电泳激光诱导荧光检测,可以处理并检测 0.8amol 的染料。由于染料水溶性好,需高效液相色谱(HPLC)分离,因而限制了其应用。Wellington 等^[36]用三步合成了稳定性较好的近红外菁染料 NIR820(激发与发射波长分别为 790 和 820nm),并避免了 HPLC 分离,使产品分离能力达到克量级,解决了标记用染料的合成及纯化问题,促进了生物标记试剂的发展。



3 荧光素和罗丹明类

荧光素 1 是 1871 年由 Von Bayer 合成的,最大吸收/发射在 492/511nm(水中),量子产率为 $0.92(\text{pH} > 8)$ ^[37]。由于荧光强度大,大量的荧光素衍生物被合成并用作荧光检测试剂。如 5(6)-

羧基荧光素 **2**、5(6)-羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 **3**、5-碘乙酰胺荧光素 **4**、荧光素异硫氰酸酯 **5** 等是应用最广泛的荧光衍生试剂,用于病毒学、细胞学及免疫组织化学。将荧光素共价连接到核酸、寡核苷酸、药物、蛋白质及其它分子来合成探针,用于基因病毒的检测及表达^[38]。荧光素也存在一些缺点:如荧光素共轭体不稳定,荧光测试仪的强激光,使之发生不可逆转的光漂白,



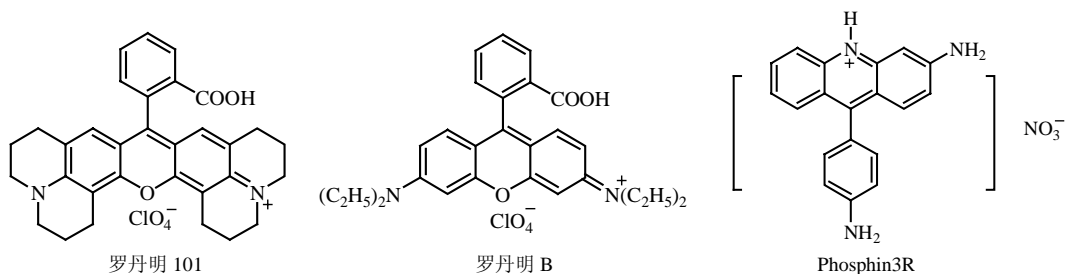
导致荧光信号的迅速下降;荧光素在水溶液中以离子形式存在,吸收及荧光性质易受 pH 影响;与标记物共轭连接后,易发生猝灭。Sun 等^[38]在荧光素分子中引入氟使其光稳定性有很大提高并降低了离子化的 pH。Gao 等^[39]合成了光稳定性好的含单羧基的荧光素衍生物,其中 **8** 的稳定性是 **1** 和 BODIPY 荧光染料的 10 倍,但是荧光强度却较 **1** 下降了 4 倍。它们的光谱性质见表 2^[38]。

表 2 荧光素的光谱性质
Tab.2 Spectral properties of fluoresceins

荧光素衍生物	吸收/发射波长/nm	量子产率	$\epsilon/(L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1})$
1	492/517(水)	0.92	90000
2	492/516	0.92	84700
6	492/517	0.92	-
7	510/534	0.59	78100

pH 9.0 磷酸缓冲溶液

罗丹明染料由于分子呈刚性平面,有较高的荧光量子产率,故荧光较强,已成为商品化染料;但 Stokes 位移较小,吸收区域的低能量部分与发射区的高能量部分重叠,导致染料的激发辐射损失。常见的有罗丹明 B、罗丹明 6G、罗丹明 101、德克萨斯红等。Zhu 等^[40]合成了 Phosphin3R

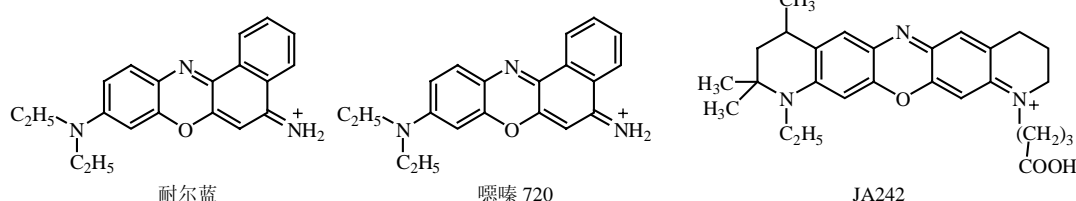


探针,该探针成本较低,是一种基于荧光猝灭来快速检测核酸的荧光染料,最大激发/发射波长

为 468/505nm。核酸存在时, 荧光会显著猝灭, 对小牛胸腺 DNA 的检测限为 5.0ng/mL, 沙门杆菌的检测限是 6.0ng/mL。

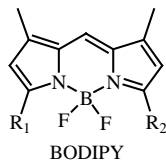
4 噻嗪和噁嗪类染料

这类染料分子结构简单, 合成方便, 但荧光量子产率较低, 限制了其应用。主要有耐尔蓝、耐尔红和噁嗪 750 等。耐尔蓝通过与 DNA 作用, 染料的荧光被猝灭, 通过荧光强度的减弱来检测 DNA 的含量。JA242 噁嗪染料与发夹结构寡核苷酸端基连接形成智能探针(Smart probe), 杂交前被茎杆结构处互补的鸟嘌呤残基所高度猝灭。当与特异的靶序列结合时, 发夹打开, 染料与鸟嘌呤分离, 荧光增强约 6 倍, 可以检测 pmol (10^{-12} mol) 级的核酸浓度^[41]。



5 BODIPY(Boron dipyrromethene difluoride)染料

BODIPY 染料荧光量子产率高, 荧光波长范围宽, 可以通过调节 R_1 、 R_2 取代基, 获得不同的荧光发射波长, 一般用于荧光共振能量转移探针。BODIPY 荧光标记的 G 三磷酸酯核苷类似物作为 G 蛋白亲和探针(Affinity probe), 毛细管电泳激光诱导荧光检测, 检测限为 2nmol^[42]。



6 其它类别探针

6.1 稀土元素探针

稀土离子也是一类核酸探针的检测试剂。在水溶液中仅有 Tb(III)和 Eu(III)发出荧光, 与 DNA 配合后仍保留荧光性能, 可特异识别核苷酸。Tb(III)和 Eu(III)与一些小分子配体配合, 由于配体本身性质、中心离子-配体成键及溶剂等因素影响, 使配合物的激发态寿命达到 ms 级, 并发出窄而强的荧光。Tb(III)和 Eu(III)与小分子的配合物探针通过共价键与靶 DNA 共价结合后多用于实时定量荧光 PCR 反应产物的分析及杂交测试。该类探针要求稀土配合物易于合成并且足够稳定, 同时荧光发射强度大。Nurmi 等^[43]用 Tb(III)和 Eu(III)标记的探针进行实时同步扩增及前列腺特异抗原的测定, 信噪比要高于传统的 TaqMan 探针, 而循环阈值则降低。

6.2 量子点荧光探针

量子点荧光探针是由 II-IV 族和 III-V 族元素组成的半导体纳米颗粒, 将核酸连接到量子点的表面, 做成探针, 通过体外杂交常规荧光(FISH)分析, 发现染色体的异常及变异, 可取代一些有机荧光染料进行生物分子检测。研究较多的有 CdSe、CdTe、ZnS 等。量子点探针可以在有机溶剂中制备, 但须经过一定的化学修饰, 使其表面具有一定的水溶性基团, 同时又具备一些

与生物分子偶连的活性基团,因而反应条件苛刻,步骤复杂,成本较高。尽管在水溶液中制备的成本低,但量子点的荧光产率低,尺寸分布较大。目前较多采用在有机溶剂中合成。在强激光下易发生光漂白,是有机类荧光染料最普遍的缺陷。量子点探针较传统的有机荧光染料具有一定的优越性。首先,荧光光谱范围宽,通过改变纳米晶体材料和尺寸,获得的激光诱导荧光光谱范围在 400nm~2 μ m;其次,荧光光谱范围可调,稳定性好,荧光寿命长,且可用单一波长的激发光源同时激发不同大小尺寸的量子点,得到不同荧光发射波长的检测信号,相对于有机荧光染料的单一光源激发得到单一荧光发射信号,降低了实验成本并简化了分析步骤。1998 年,Bruchez 等^[44]制备了 CdSe-ZnS 核-壳结构的纳米晶体,之后又增加了 SiO₂ 层,使其具有水溶性,同时 SiO₂ 经过修饰后可以与生物分子结合,量子产率高且稳定。Nie 等^[45]将量子点的表面连接上巯基乙酸,使量子点不仅具有水溶性,同时可与生物分子连接。Pathak 等^[46]将量子点表面用众多的羟基修饰,解决了量子点探针杂交过程中的水溶性问题,同时降低了量子点表面大分子的非特异连接,稳定性也大大增加。以上量子点都是在有机溶剂中合成的,林章碧等^[47]以巯基乙酸为稳定剂,在水溶液中,合成了尺寸为 3nm 的 CdTe 半导体纳米粒子。总之,量子点荧光探针用于生物荧光标记,是一个具有广阔应用前景的领域。

7 结语

目前, DNA 荧光探针要解决的问题是提高灵敏度,增强光稳定性,降低合成成本。不同的 DNA 荧光探针各有优缺点,有机类染料中近红外染料具有一定的优势,尤其是近红外菁染料将会更多的被合成并应用于生物分子的检测,其光稳定性有待提高。量子点探针作为一个新兴的领域,必将受到越来越多的重视。相信不久的将来,随着新型、性能优异的荧光探针的开发,人类将能够实现对一些生物过程运用多种方法、多种参数进行实时观测、动态研究,这将极大地推动基因组学及相关学科的发展。

参考文献

- [1] J W Richard, M P Jose, T Victor et al. *Applied Spectroscopy*, 1997, 51:836~843.
- [2] K Licha, C Hennesius, A Becke et al. *Bioconjugate Chem.*, 2001, 12:44~50.
- [3] S Gurrieri, K S Wells, L D Johnson et al. *Anal. Biochem.*, 1997, 249:44~53.
- [4] P Coufal, Z Bosáková, E Tesarová et al. *J. Chromatography B*, 2002, 770:183~189.
- [5] S Naofumi. *Tetrahed. Lett.*, 1996, 37:8519~8522.
- [6] Y Cao, X W He, Z Gao et al. *Talanta*, 1999, 49:377~383.
- [7] E Kimura, H Kitamura, K Ohtani et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122:4668~4677.
- [8] E J Fechter, P B Dervan. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125:8476~8485.
- [9] P Marie, P David, B Alexandre et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123:9283~9292.
- [10] I Ch Gherghi, S T Girousi, A N Voulgaropoulos. *Talanta*, 2003, 61:103~112.
- [11] G N Alexander, P Konan, A Richard. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biochem.*, 1990, 87:3851~3855.
- [12] W Chen, N J Turro, D A Tomalia. *Langmuir*, 2000, 16:15~19.
- [13] F Koeppl, J F Riou, A Laoui, et al. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29:1087~1096.
- [14] S C Benson, Z X Zeng, A N Glazer. *Anal. Biochem.*, 1995, 231:247~255.
- [15] 张华山, 王 红, 赵媛媛 编著. 分子探针与检测试剂. 北京: 科学出版社, 2002:322.
- [16] S C Benson, R A Mathie, A N Glazer et al. *Nucleic Acids Research*, 1993b, 21:5720~5726.
- [17] S C Benson, P Singh, A N Glazer. *Nucleic Acids Research*, 1993a, 21:5727~5735.
- [18] H S Rye, A N Glazer. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23:1215~1222.
- [19] J P Jacobsen, J B Pedersen, L F Hansen et al. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23:753~760.
- [20] J A Bordelon, K J Feierabend, S A Siddiqui et al. *J. Phys. Chem. B*, 2002, 106:4838~4843.

- [21] H S Rye, S Yue, D E Wemmer. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20:2803~2812.
- [22] H P Zhu, S M Clark, S C Benson et al. *Anal. Chem.*, 1994, 66:1941~1948.
- [23] L Stephan, R Michael, R Thomas et al. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31:e138.
- [24] L K Christopher, P B Gregrewood, T C Daniel et al. *Nano. Lett.*, 2003, 3:1387~1389.
- [25] K Claire, A BjoIm, T Eimer. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123:7985~7995.
- [26] B M Ratnakar, A ELauren, R M Swati et al. *Bioconjugate Chem.*, 1993, 4:105~111.
- [27] V S R Tata, B H Jeffrey, B Christopher. *Tetrahedron*, 1998, 54:10627~10634.
- [28] R Guether, M V Reddington. *Tetrahed. Lett.*, 1997, 38:6167~6170.
- [29] 陈 欣, 姚祖光. 高等学校化学学报, 1996, 17:1613~1616.
- [30] 马立人, 蒋中华 主编. 生物芯片. 北京: 化学工业出版社, 2000:50~51.
- [31] J B Randolph, A S Waggoner. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25:2923~2929.
- [32] R S Duthie, I M Kalve, S B Samols et al. *Bioconjugate Chem.*, 2002, 13:699~706.
- [33] J H Flanagan Jr., S H Khan, S Menchen. *Bioconjugate Chem.*, 1997, 8:751~756.
- [34] 郑 洪, 李东辉, 吴 敏 等. 福州大学学报(自然科学版), 1999, 27:122~123.
- [35] C M Yang, O Shimelis, X J Zhou et al. *J. Chromatography A*, 2002, 979:307~314.
- [36] W Pham, W F Lai, R Weissleder et al. *Bioconjugate Chem.*, 2003, 14:1048~1051.
- [37] W C Sun, K R Gee, D H Klauber et al. *J. Org. Chem.*, 1997, 62:6469~6475.
- [38] S Arttamangkul, M K Bhalgat, R P Haugland et al. *Anal. Biochem.*, 1999, 269:410~417.
- [39] J X Gao, P G Wang, R W Giese. *Anal. Chem.*, 2002, 74:6397~6401.
- [40] Q Z Zhu, H H Yang, D H Li et al. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 394:177~184.
- [41] J P Knemeyer, N Marmé, M Sauer. *Anal. Chem.*, 2000, 72:3717~3724.
- [42] E E Jameson, J M Cunliffe, R R Neubig et al. *Anal. Chem.*, 2003, 75:4297~4304.
- [43] J Nurmi, T Wikman, M Karp et al. *Anal. Chem.*, 2002, 74:3525~3532.
- [44] M Jr Bruchez, M Moronne, P Gin et al. *Science*, 1998, 281:2013~2016.
- [45] W C W Chan, S Nie *Science*, 1998, 281:2016~2018.
- [46] P Srikant, C Soo-Kyung, A Norman. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123:4103~4104.
- [47] 林章碧, 苏星光, 张 皓 等. 高等学校化学学报, 2003, 24:216~220.