

基于纳米金膜和稳定 Y 型结构的 DNA 电化学传感器

董晓娅^{a,b} 赵伟伟^a 孙国宝^a 徐静娟^{*,a} 陈洪渊^a

(^a 南京大学化学与化工学院 生命分析化学国家重点实验室 南京 210093)

(^b 江苏大学农业工程研究院 镇江 212013)

摘要 利用纳米金膜(GNF)和稳定的 Y 型 DNA 成功构建了一种具有良好选择性和较低检测限的 DNA 传感器. 首先将金电极快速氧化后还原制成 GNF, 利用 Au—S 键将捕获探针 DNA (c-DNA)有效地固定到 GNF 电极表面, 在目标物存在的情况下, 将其与标记有亚甲基蓝(MB)的指示探针(r-DNA)杂交形成 Y 型结构. 利用 GNF 独特的纳米性质和形成的 Y 型 DNA 结构特点, 使 MB 接近 GNF, 从而提高了电子传递速率, 以差分脉冲伏安法(DPV)实现 DNA 特定序列的检测, 检测线性范围为 $1.0 \times 10^{-12} \sim 1.0 \times 10^{-9}$ mol/L, 检测下限为 2.4×10^{-13} mol/L. 与传统的传感器相比, 本方法提高了选择性, 减小了背景电流. 此外, 该传感器表现出良好的重现性和稳定性.

关键词 电化学生物传感器; 金纳米膜; Y 结构 DNA; 亚甲基蓝; DNA 传感器

An Electrochemical DNA Biosensor Based on Gold Nanofilm and Stable Y Junction Structure

Dong, Xiaoya^{a,b} Zhao, Weiwei^a Sun, Guobao^a Xu, Jingjuan^{*,a} Chen, Hongyuan^a

(^a State Key Lab of Analytical Chemistry for Life Science, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093)

(^b Key Laboratory of Modern Agriculture Equipment and Technology, Jiangsu University, Zhenjiang 212013)

Abstract On the basis of gold nanofilm (GNF) electrode and Y junction structure of DNA, a simple and facile single-step DNA sensing protocol with improved sensitivity and lower detection limit was successfully developed. The GNF was prepared via rapid electrooxidization of the gold surface followed by the chemical reduction of the produced gold oxide layer. The capture probe DNA (c-DNA) was firstly immobilized onto GNF electrodes via Au—S bonding, for the subsequent forming of Y junction structure with target DNA (t-DNA) and reporter probe DNA (r-DNA) labeled with methylene blue (MB). Harnessing the unique properties of GNF would allow the improved contact of MB with the electrode surface and hence boost the interfacial electron communication. Experimental results of differential pulse voltammetry (DPV) showed that the peak current of the prepared biosensor was linear with the target DNA concentration from 1.0×10^{-12} to 1.0×10^{-9} mol/L and the proposed strategy could detect the target DNA down to the level of 2.4×10^{-13} mol/L. Comparing with the traditional electrochemical sensors, the present protocol enabled the generation of electrochemical signal from scratch and possessed an improved selectivity against even a single base mismatch. Besides, this DNA sensor exhibited fairly good reproducibility, stability and reusability.

Keywords electrochemical biosensor; gold nanofilm; Y junction structure of DNA; methylene blue; DNA biosensor

1 引言

特定序列 DNA 杂交检测技术在法医检测、亲子鉴定、遗传性疾病的诊断以及传染病源的检测中起到非常重要的作用^[1]. 因此, 低能耗、高灵敏的 DNA 传感器的研制引起了人们的高度关注. 目前已开发了许多基于光学、压电以及电化学等^[2-9]技术的 DNA 传感器. 电化学传感器由于其本身简单、便携、高灵敏等特点, 在实际应用中展现出其独特的优越性能. 电化学 DNA 传感器

的报道有通过催化银沉积或通过纳米标记(碳纳米管、纳米金球、纳米银球、磁珠以及量子点)等进行信号放大检测^[6,10-17]. 尽管这些方法在一定程度上改善了灵敏度, 但是这些方法均需要外加试剂, 或者需要复合材料的制备以及繁琐的操作步骤.

电化学方法中基于 DNA 杂交引起结构转变的无试剂、两步操作的传感器得到快速发展. 广义而言, 这些 DNA 电化学传感器可以归为两类^[18-21]. 第一类是信号湮灭型传感器, 这类传感器通过目标 DNA 与电极表面

* E-mail: xujj@nju.edu.cn; Tel./Fax: 025-83597294

Received April 11, 2012; published May 3, 2012.

Project supported by 973 Program (No. 2012CB932600), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21025522, 21135003) and the National Natural Science Foundation of China for Creative Research Groups (No. 21121091).

项目受国家重点基础研究发展计划(973 计划, No. 2012CB932600)、国家自然科学基金(Nos. 21025522, 21135003)和国家自然科学基金委创新研究群体项目(No. 21121091)资助.

标记有氧化还原电活性探针的 DNA 杂化后, 改变 DNA 的构型, 使标记的氧化还原活性物质远离电极表面, 减小法拉第电流^[22~25]. 如用亚甲蓝(MB)标记茎环结构适配体, 当与干扰素分子结合后适配体发生构型转变, 使 MB 远离电极表面, 降低了氧化还原活性物质与电极界面的电子转移效率, 通过检测电流的减小量实现干扰素的高灵敏检测^[26,27]. 第二类是将标记有二茂铁(Fc)的发卡式探针 DNA 通过金硫键组装到金电极上, 与目标 DNA 杂交后, 探针茎环结构打开, Fc 和电极之间电子传递距离增加, 电流减小, 实现 DNA 的测定^[28]. 第二类是信号增强型传感器. 与前一类相比, 这类传感器中氧化还原标记物从电极的远端移动到近端, 这种距离的改变导致电子传递效率的变化, 通过检测电活性分子氧化还原电流的增量, 可以方便快速地指示杂交反应的发生, 并确定目标 DNA 的浓度^[29~34]. 例如, 将标记有 MB 的假结三级结构探针固定在金电极表面, 通过与目标 DNA 的杂化, MB 靠近电极界面, 增强了电子的转移速率^[30,31]. Immoos 等^[32]通过聚乙二醇连接 c-DNA 和 r-DNA 形成三嵌段, 三嵌段 DNA 链的一端标记有 Fc, 与目标物杂交后三嵌段 DNA 构型变化, 缩短了 Fc 与电极表面的距离, 提高了 Fc 与电极表面的电子转移速率, 实现了对目标 DNA 的检测. 最近, Zhang 等^[33]利用 Y 型结构 DNA 和 Fc 作为电活性标记物发展了一种简单的检测方法, 但是由于电极表面没有封闭, 这种方法中存在一定的背景电流, 这在目标浓度较低的情况下, 会降低实验结果的可靠性.

本工作以原位制备的纳米金膜为组装基底, 以 MB 为电活性标记物, 制备出了一种背景电流小、线性范围宽、选择性好的 DNA 电化学传感器. 传感器的构建过程及响应原理如图 1 所示. 首先将裸金电极在 5 V 电压下氧化, 然后将其在葡萄糖中还原形成 GNF, c-DNA 通过金硫键自组装到 GNF 修饰电极表面以构成修饰界面, 接着用巯基乙醇(MCH)封闭活性位点, 之后与同时含有 t-DNA 和标记有 MB 的 r-DNA 的被测溶液接触时, t-DNA 便同时与 r-DNA 和 c-DNA 进行杂交形成三组分的 Y 型结构, 其中 r-DNA 中的 MB 被固定到 GNF 电极界面, 最后用 DPV 检测到 MB 的伏安电流. 其电流大小与构成 Y 型结构数量有关, 即与 t-DNA 的含量有关. 若待测溶液中仅存在 r-DNA, 由于形不成稳定的 Y 型结构, 而且电极表面被 MCH 封闭, 没有非特异性吸附的干扰, 使背景电流趋向于零.

2 结果与讨论

2.1 DNA 传感器的电化学生物性能

图 1 是基于 GNF 和 Y 型结构 DNA 传感器的制备和对目标的检测过程. 经过氧化过的金电极在葡萄糖溶液中还原后, 在其表面修饰 c-DNA, 其中 c-DNA 的两端分别与 t-DNA 的一端和 r-DNA 的一端互补. r-DNA 也包

含两部分, 一部分含 8 个碱基与 t-DNA 互补, 一部分含 7 个碱基与 MB 标记的 c-DNA 互补. 当试液中不含 t-DNA 时, r-DNA 和 c-DNA 杂化不稳定, 使 MB 不能结合到 GNF 修饰电极表面. 当试液存在 t-DNA 的情况下, c-DNA 与 t-DNA 和 r-DNA 杂交形成稳定的 Y 型结构, 标记于 r-DNA 一端的 MB 结合到电极表面, MB 接近 GNF 修饰电极表面, 提高了 MB 和 GNF 修饰电极之间的电子转移速率. 由于电极表面的 MB 是通过与 t-DNA 杂交而固定到电极表面的, 所以 t-DNA 的量与 MB 的量有依从的比例关系, 因此可以通过检测 MB 的电化学信号实现 t-DNA 检测.

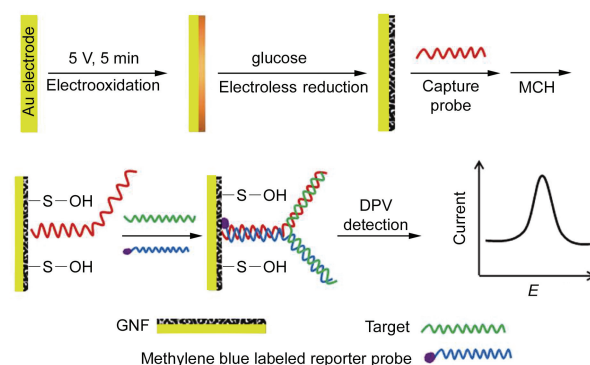


图 1 DNA 传感器的构建及检测示意图

Figure 1 Schematic diagram for preparation procedure of DNA sensor and detection strategy

循环伏安(CV)能够提供电极表面发生的氧化还原反应信息. 图 2 中曲线 a 和 c 分别是修饰有 c-DNA 的裸

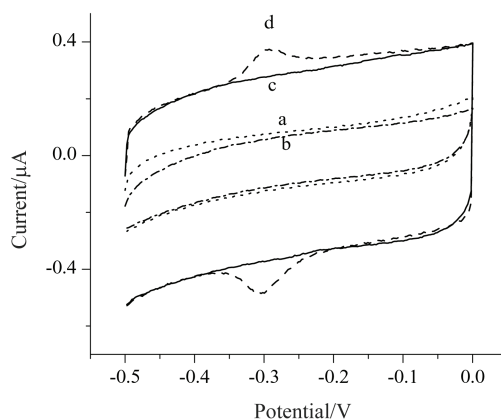


图 2 裸金电极在 20 mmol/L Tris-HCl 的空白溶液(a)和含 1.0×10^{-11} mol/L 目标(b)中的 CV 图及 GNF 电极在 20 mmol/L Tris-HCl 的空白溶液(c)和含 1.0×10^{-11} mol/L 目标(d)中的 CV 图(扫速为在 20 mmol/L Tris-HCl 的空白溶液(a)和含 1.0×10^{-11} mol/L 目标(b)中的 CV 图)

Figure 2 CV responses of bare gold electrode in 20 mmol/L Tris-HCl buffer (a), bare gold electrode in 1.0×10^{-11} mol/L target (b), GNF electrode in 20 mmol/L Tris-HCl buffer (c) and GNF electrode in 1.0×10^{-11} mol/L target (d) (Scan rate: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$)

金电极和 GNF 电极在 t-DNA 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$, r-DNA 浓度为 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 的情况下于 20 mmol/L 的 Tis-HCl 缓冲溶液中的循环伏安响应. 曲线 b, d 是 GNF 电极在 t-DNA 浓度为 1.0×10^{-11} mol/L, r-DNA 浓度为 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 的情况的循环伏安响应. 由图 2 可知, 在没有 t-DNA 的情况下, 裸金电极和 GNF 电极上均没有 MB 的氧化还原信号产生. 当存在 t-DNA 时, 在裸金电极上几乎看不到 MB 的氧化还原峰, 而在 GNF 电极上呈现一对明显的准可逆氧化还原峰, 其氧化峰电位位于 -0.29 V, 还原峰电位位于 -0.30 V. 在以前的实验中^[16], 我们已经通过原子力显微镜证明 GNF 修饰电极的三维结构使得 GNF 电极具有高的比表面积, 有利于提高捕获探针的固定量, 增强电化学信号. 另外, 图 2 这一结果也表明, 只有三组分同时存在下, Y 构型才能够形成, 才可以产生 MB 的电化学信号.

2.2 传感器界面构建的表征

DNA 传感器构建过程分别用 CV 和电化学交流阻抗技术(EIS)来考察. 如图 3A 所示, GNF 修饰电极在 0.15 和 0.23 V 处出现一对明显的氧化还原峰(曲线 a), 当 c-DNA 和 MCH 组装到 GNF 修饰电极表面后, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 探针分子的氧化还原峰电流减小(曲线 b), 当与 t-DNA 和 r-DNA 杂交后, 峰电流进一步减小, 氧化还原电位差进一步增加(曲线 c), 这是由于 t-DNA 和 r-DNA 的引入增加了带负电荷的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 与带负电荷的 DNA 磷酸骨架之间的排斥.

采用 EIS 进一步对电极表面自组装过程进行表征. 图 3B 中插图为等效电路图, 其中电荷转移阻抗(R_{ct})和物质传递阻抗(Z_w)与双电层电容(C_{dl})平行. 图 3B 中曲线 a 几乎是一条直线, 这表明 GNF 修饰电极有利于氧化还原探针在电极表面的电子传递. 当电极表面组装上 c-DNA 并用 MCH 封闭之后(曲线 b), 阻抗曲线上出现半圆, 该半圆的直径反映界面电子转移的阻力, 表明组装过 c-DNA 单分子层后, 电子在该界面表现出了较大的界面电子转移阻力. 当与 t-DNA 与 r-DNA 杂交后(曲线 c), 电极界面产生更大的电化学阻抗, 这是由于杂交后的电极界面上, DNA 磷酸基团密度更大, 进一步阻碍电极表面电子转移. 这一结果与循环伏安的结果一致.

2.3 实验条件的优化

c-DNA 的组装密度对杂交效率有一定的影响, 为了获得较高的杂交效率和较快杂交速度, 我们对 c-DNA 的组装浓度进行优化. 图 4A 是固定 t-DNA 浓度为 2.0×10^{-11} mol/L, r-DNA 浓度 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 的情况下, c-DNA 浓度对电化学信号响应的情况. 随着 c-DNA 浓度的增加, 电化学信号逐渐增大, 在 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大值平台, 因此选择 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 作为 c-DNA 的固定浓度.

r-DNA 的浓度也是影响杂化效率的一个重要因素,

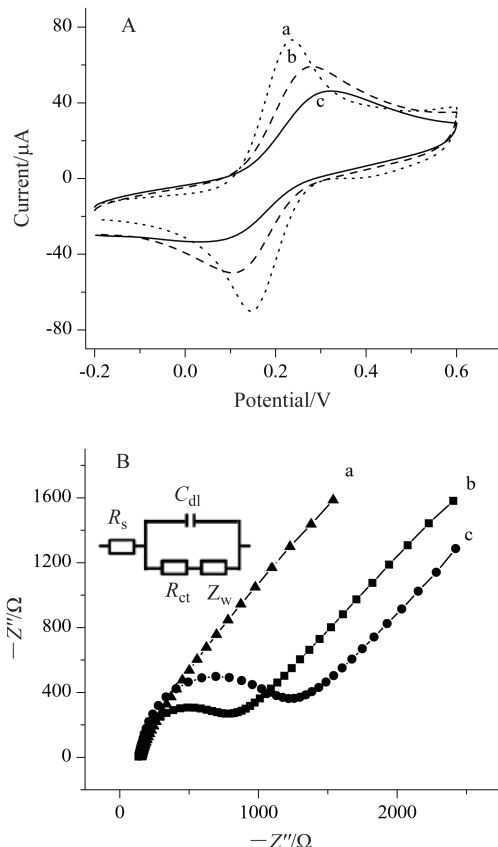


图 3 (A) GNF 电极(a)、修饰有 c-DNA 和 MCH 的 GNF 电极(b)及 t-DNA 和 r-DNA 杂交的 GNF 电极(c)在含有 5.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的 0.1 mol/L KNO_3 溶液中的 CV 图和(B) GNF 电极(a)、修饰有 c-DNA 和 MCH 的 GNF 电极(b)及 t-DNA 和 r-DNA 杂交的 GNF 电极(c)在含有 5.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的 0.1 mol/L KNO_3 溶液中的 EIS 图(插图为等效电路图)

Figure 3 (A) CVs of GNF electrode (a), capture probe and MCH immobilized electrode (b), hybridized with target and reporter probe (c) in 0.1 mol/L KNO_3 containing 5.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ as redox probe (scan rate: 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) and (B) Nyquist plots corresponding to GNF electrode (a), after immobilization of capture probe and MCH (b) and (b) hybridization with target DNA and reporter probe (c) in 0.1 mol/L KNO_3 containing 5.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (the inset shows the equivalent circuit applied to fit the electrochemical impedance spectroscopy)

考察了 r-DNA 浓度从 0.5~3.0 $\mu\text{mol/L}$ 时对电化学信号的影响. 结果如图 4B 所示, 电化学信号随着 r-DNA 浓度的增加而增加, 当 r-DNA 浓度为 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 电化学信号达到最大值, 这是由于增加 r-DNA 浓度, 有利于其与 c-DNA, t-DNA 的碰撞机率, 有利于三者的杂交. 此后再增加 r-DNA 浓度, 体系的电化学信号不再显著增强. 因此, 选择 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 作为杂交时 r-DNA 的浓度.

杂交时间是影响 DNA 杂交效率的又一因素, 通常由 DNA 传质和杂交反应动力学控制. 图 4C 考察了杂交时间对电化学信号的响应情况. 随着杂交时间的增加, 电化学信号逐渐增大, 在 60 min 时到达最大值平台, 因此杂交时间选择为 60 min.

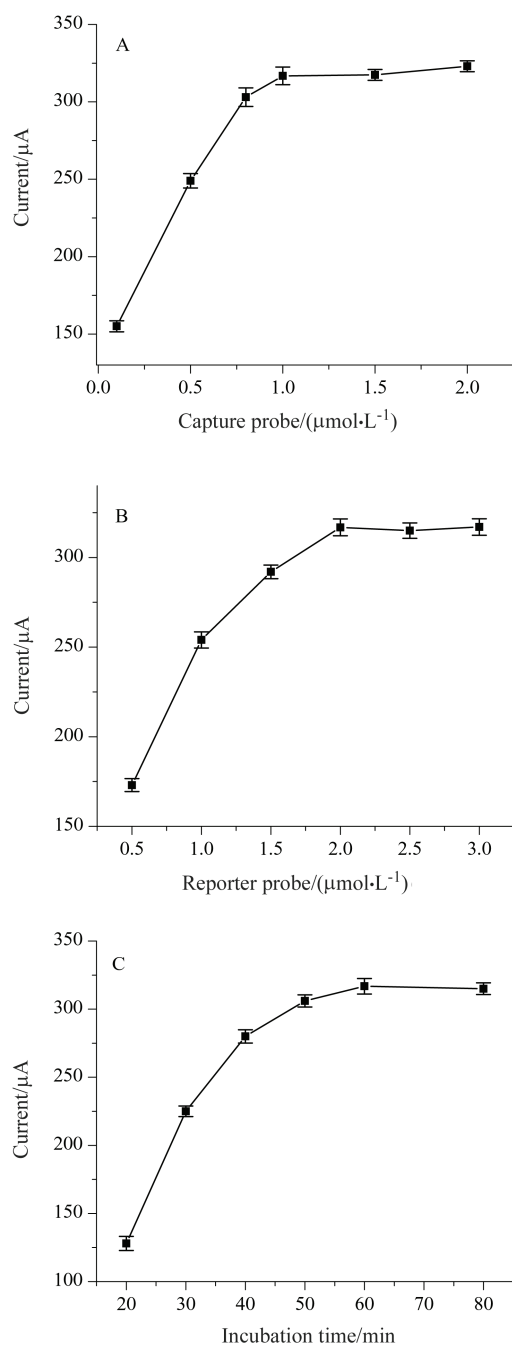


图4 在目标DNA浓度为 2.0×10^{-11} mol/L的Tris-HCl (20 mmol/L, pH 7.4)中, c-DNA 的浓度(A)、r-DNA 的浓度(B)以及杂交时间(C)对DPV 响应的影响(S.D.=3)

Figure 4 Influences of capture probe concentration (A), reporter probe concentration (B) and specific binding time (C) on DPV response to 2.0×10^{-11} mol/L target DNA in Tris-HCl (20 mmol/L, pH 7.4) (S.D.=3)

2.4 传感器的性能

用差分脉冲伏安法(DPV)在杂交时间 60 min, r-DNA 浓度为 $2.0 \mu\text{mol/L}$ 的条件下, 对不同浓度的 t-DNA 进行检测(图 5A). 随着 t-DNA 浓度的增加, 电流随之增大, 在一定浓度范围内, t-DNA 浓度的对数与电流呈线性关系, 线性范围从 $1.0 \times 10^{-12} \sim 1.0 \times 10^{-9}$

mol/L(图 5B 中直线 a), 线性回归系数为 0.998, 最低检测限为 2.4×10^{-13} mol/L.

在相同的实验条件下, 我们利用光滑表面的金电极为基底做了对照实验(图 5B 中直线 b). 利用光滑表面的金电极构建的传感器中峰电流与 t-DNA 浓度的对数成线性增加, 检测的线性范围在 $1.0 \times 10^{-11} \sim 1.0 \times 10^{-9}$ mol/L, 检测限为 4×10^{-12} mol/L. 这一对照结果表明, 用 GNF 修饰电极构建的传感器比光滑表面的金电极构建的传感器在检测限方面降低了接近 1 个数量级, 线性范围增加了 1 个数量级. 与其它标记氧化还原物的方法^[24,27,34]相比, 该传感器表现出了较宽的线性范围和较低检测限.

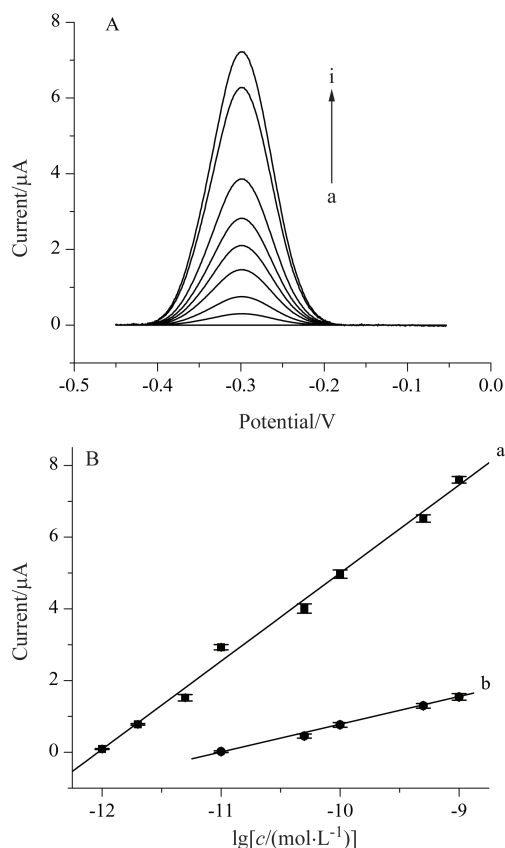


图5 (A)含有 $2.0 \mu\text{mol/L}$ 的 r-DNA 和不同浓度的 t-DNA 的 DPV 响应 (a 到 i 的浓度分别是 $0, 1.0 \times 10^{-12}, 2.0 \times 10^{-12}, 5.0 \times 10^{-12}, 1.0 \times 10^{-11}, 5.0 \times 10^{-11}, 1.0 \times 10^{-10}, 5.0 \times 10^{-10}, 1.0 \times 10^{-9}$ mol/L) 和 (B) GNF 制备的传感器(a)和裸金电极制备的传感器(b)的响应电流对浓度对数的关系 (S.D.=3)

Figure 5 (A) DPV responses for different concentration of target DNA with $2.0 \mu\text{mol/L}$ reporter probe (target concentration from a to i: $0 \text{ mol/L}, 1.0 \times 10^{-12} \text{ mol/L}, 2.0 \times 10^{-12} \text{ mol/L}, 5.0 \times 10^{-12} \text{ mol/L}, 1.0 \times 10^{-11} \text{ mol/L}, 5.0 \times 10^{-11} \text{ mol/L}, 1.0 \times 10^{-10} \text{ mol/L}, 5.0 \times 10^{-10} \text{ mol/L}, 1.0 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$) and (B) Linear relationship between the peak current and the logarithm of the target DNA with GNF modified sensor (a) and bare gold sensor (b) (S.D.=3)

为考察传感器的特异性, 我们考察了该传感器对空白溶液、 1.0×10^{-10} mol/L 单碱基错配 DNA 序列、

1.0×10^{-10} mol/L 完全错配和 2.0×10^{-12} mol/L 的目标物的响应情况. 从图 6 中可以看出, 空白溶液中传感器的信号完全可以忽略, 说明没有非特异性吸附的干扰; 完全错配 DNA 序列的响应比较小, 单碱基错配 DNA 序列虽然有一定的响应, 但明显比 t-DNA 的响应信号低的多. 由此可见, 该 DNA 生物传感器具有良好的选择性.

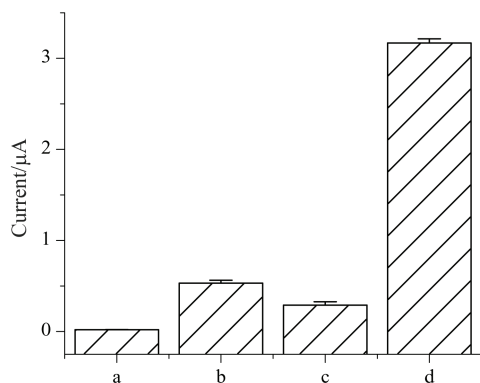


图 6 指示探针的浓度为 $2.0 \mu\text{mol/L}$ 时传感器在空白溶液(a), 1.0×10^{-10} mol/L 的单碱基错配 DNA (b), 1.0×10^{-10} mol/L 的完全错配 DNA (c) 和 2.0×10^{-12} mol/L 的目标 DNA (d) 中 DPV 响应的比较(S.D.=3)
Figure 6 Comparison of DPV responses for blank (a), 1.0×10^{-10} mol/L one-base mismatched DNA (b), 1.0×10^{-10} mol/L non-complementary DNA (c) and 2.0×10^{-12} mol/L target DNA (d) with $2.0 \mu\text{mol/L}$ reporter probe (S.D.=3)

传感器的再生能力是传感器的重要性能指标之一. 我们将组装了巯基 DNA 并通过 MCH 封闭后的 GNF 修饰电极与 t-DNA 和 r-DNA 杂交, 检测其电化学信号, 然后将该传感器反复变性-杂交, 对其再生能力进行考察. 变性时, 如果条件过于温和, 可能造成解链不完全而对下次测量产生干扰; 相反, 如果条件过于剧烈, 则会对表面 c-DNA 的数量和杂交能力产生影响. 因此, 选择适当的变性条件以对传感界面的重现性进行评价是至关重要的. 使 DNA 变性的因素有高温、酸碱变性等, 其中酸变性或碱变性的条件较为剧烈, 不容易控制, 可能造成 c-DNA 失活或者脱落. 所以本实验选取控制温度变性的方法. 一般来说金-硫键可以承受 90°C 左右的高温, 为了确保自组装层的稳定, 我们选择了变性温度为 80°C , 变性时间为 10 min. 图 7A, 7B 是修饰有 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 的 c-DNA 的电极分别与以缓冲溶液和以血清为底液的 t-DNA 和 r-DNA 杂交后, 进行反复高温变性及杂交的实验结果. 本传感器经过 3 次变性后, 最终信号分别为原信号的 83.9% 和 82.3%. 在缓冲溶液中测定结

果表明该方法具有较好的再生能力. 血清溶液中测定结果表明, 该方法与没有用 MCH 封闭的方法^[33]相比, 具有较强的抗干扰能力.

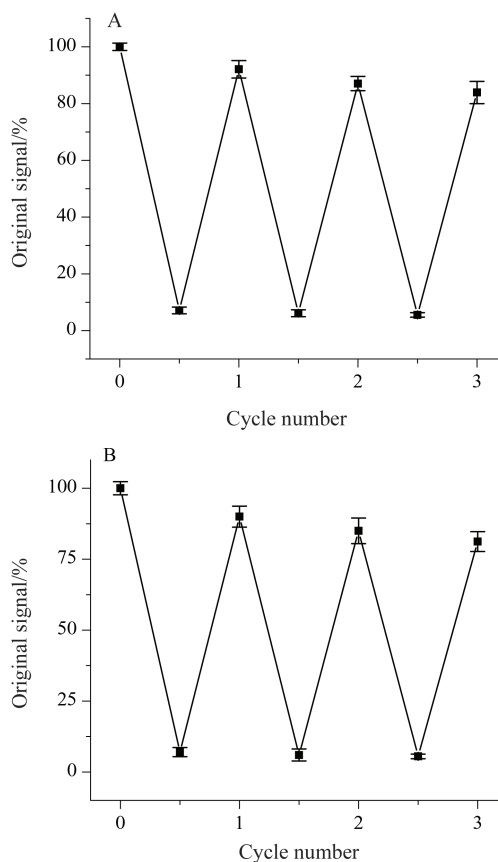


图 7 目标浓度均为 2.0×10^{-11} mol/L 时传感器在缓冲溶液(A)和血清(B)中的重现性

Figure 7 Reusability of the sensor challenged with 2.0×10^{-11} mol/L target in buffer (A) and in blood serum (B)

稳定性是评估传感器性能的另一重要指标. 为了考察所构建的 DNA 传感器的稳定性, 对浓度为 2.0×10^{-11} mol/L 的 t-DNA 进行连续 9 次测定, 得到的相对标准偏差(RSD)为 2.8%. 另外, 将该传感器放在冰箱 1 周后进行检测, 发现电流的减小量几乎可以忽略.

2.5 样品分析

为考察本体系应用于复杂样品中 t-DNA 的情况, 我们分别向血清、唾液和细胞溶出物中加入一定量 t-DNA 进行检测, 检测结果如表 1 所示. 与经典的发卡结构探针针对实际样品中目标物检测体系^[22,24]比较, 该方法对复杂样中的基质同样具有较强的抗干扰能力.

表 1 血清、唾液和细胞溶出物中目标 DNA 的检测结果($n=5$)

Table 1 Assay results of target DNA in blood serum, saliva sample and cell lysate ($n=5$)

样品名称	加入量/ $(10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$	检测量/ $(10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$	回收率/%
血清	20.0	20.1 ± 1.0	100.7
唾液	20.0	20.7 ± 1.3	103.3
细胞溶出物	20.0	19.5 ± 0.4	97.7

3 结论

研制的基于 GNF 和 Y 型结构的 DNA 电化学生物传感器具有线性范围宽、抗干扰能力强以及性能稳定等优点. GNF 界面的纳米结构增加了检测灵敏度和传感器 Y 型结构的设计和表面 MCH 封闭大大消除了背景电流; 同时, 这种构型的传感器还能够很好的区分单碱基错配 DNA, 通过设计, 该传感器有望应用于其它特定序列 DNA 的检测.

4 实验部分

4.1 试剂

葡萄糖、三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)、巯基乙醇(MCH)均购自 Sigma 公司(美国). DNA 序列均购自于上海生工生物工程技术有限公司, 碱基序列如下: 5'端修饰巯基的 c-DNA 序列: 5'-HS-(CH₂)₆-AAAA-GATCAAATTGGTGGACTCTAAAA-3'; 3'端修饰亚甲基蓝(MB)的 r-DNA 序列: 5'-TCTGAAGCTTTGATCG-TGTA-(CH₂)₆-methylene blue-3'; t-DNA 序列: 5'-AGA-GTCCACCAAGCTTCAGATTAG-3'; 单碱基错配序列 DNA: 5'-AGAGTCCACCAAGCTTGAGATTAG-3'; 完全错配序列 DNA: 5'-AGAGTTCACCAAGCATGAGATTAG-3'; 缓冲溶液: DNA 固定液为 10 mmol/L Tris-HCl 和 1.0 mmol/L EDTA (pH 7.4); DNA 杂化液为 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 其中含 0.50 mol/L 的 NaCl; 淋洗液为 10 mmol/L Tris-HCl 含 100 mmol/L 的 NaCl; 电化学检测液为 20 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.4), 所有溶液均由超纯水配制.

电化学测量均在 Autolab PGSTAT-30 仪器(Eco Chemie BV, Utrecht, The Netherlands)上操作. 电化学测定采用三电极体系, 以铂丝电极为对电极, 饱和甘汞电极(SCE)为参比电极, GNF 电极为工作电极. 在 5.0 mmol/L 的[Fe(CN)₆]^{3-/4-}(其中含 0.10 mmol/L 的 KNO₃)溶液中进行 EIS 测量. 20 mmol/L 的 Tris-HCl(pH 7.4)溶液中进行 CV 和 DPV 测试.

4.2 GNF 修饰电极的制备

GNF 电极的制备方法根据文献制得^[35]. 具体操作步骤如下: 金盘电极首先用 3500 目的 SiC 砂纸打磨, 然后将打磨后的金电极浸于 0.10 mol/L pH 7.4 PBS 中, 于 5.0 V 下氧化 5 min. 电极表面呈橙红色. 随后, 将电极浸入 1.0 mol/L 温度为 4 °C 的葡萄糖中还原 10 min, 电极表面由橙红色变黑, 生成一层均匀多孔的纳米金膜.

4.3 DNA 在电极表面的自组装和杂交

把制备好的 GNF 修饰电极浸于 1.0 μmol/L c-DNA 固定液中 16 h, 以超纯水冲洗后浸入 100 μL 浓度为 1.0 mmol/L 的 MCH 溶液 1 h, 使电极表面形成有序的 c-DNA 层. 经 MCH 处理后的 GNF 电极再分别用淋洗液和超纯水冲洗, 除去电极表面非特异性吸附杂质. 37 °C

条件下, 将电极浸入 100 μL 含有 2.0 μmol/L 的 r-DNA 和一定浓度 t-DNA(或者单碱基错配 DNA、完全错配 DNA)的杂交溶液中, 杂交 60 min 后用大量的淋洗液冲洗电极表面, 然后进行电化学检测.

4.4 实际样品的处理

人白血病 HL60 细胞株由南京鼓楼医院提供. 该细胞置入含 10% 的胎牛血清、60 μg/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基的培养瓶内培养, 培养箱的温度为 37 °C, CO₂ 的含量为 5%. 48 h 后, 移出细胞并在 1000 r/min 的速度下离心 5 min 后收集, 然后用无菌磷酸盐缓冲液(pH=7.4)清洗两次. 细胞数目通过 Petroff Hausser 计数测定. 所得的细胞经过反复冻融后在 3000 r/min 的转速下离心 10 min, 收集上清液并在其中加入 2.0×10⁻¹¹ mol/L 的 t-DNA 和 2 μmol/L r-DNA. 牛血清蛋白和唾液分别用 50 mmol/L Tris-HCl (含 0.5 mol/L 的 NaCl)溶液稀释一倍并加入一定量的 t-DNA 和 2 μmol/L 的 r-DNA. 在 37 °C 条件下, 修饰有 c-DNA 的电极浸入样品溶液中杂交 60 min 后淋洗. 最后将所得传感器在浓度为 20 mmol/L 的 Tris-HCl 溶液中进行电化学测定.

References

- [1] Heller, M. J. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2002**, *4*, 129.
- [2] Taton, T. A.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Science* **2000**, *289*, 1757.
- [3] Boon, E. M.; Ceres, D. M.; Drummond, T. G.; Hill, M. G.; Barton, J. K. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1096.
- [4] Shan, Y.; Xu, J. J.; Chen, H. Y. *Chem. Commun.* **2009**, 905.
- [5] Fan, C. H.; Plaxco, K. W.; Heeger, A. J. *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 186.
- [6] Chen, Z. P.; Peng, Z. F.; Luo, Y.; Qu, B.; Jiang, J. H.; Zhang, X. B.; Shen, G. L.; Yu, R. Q. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 485.
- [7] Park, S. J.; Taton, T. A.; Mirkin, C. A. *Science* **2002**, *295*, 1503.
- [8] Tombelli, S.; Mascini, R.; Braccini, L.; Anichini, M.; Turner, A. P. F. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 363.
- [9] Ye, M.; Zhang, Y. Y.; Li, H. T.; Zhang, Y. Q.; Tan, P.; Tang, H.; Yao, S. Z. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2339.
- [10] Hu, K. C.; Lan, D. X.; Li, X. M.; Zhang, S. S. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9124.
- [11] Loaiza, O. A.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Pividori, M. I.; Garcia, P.; Pingarron, J. M. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8239.
- [12] Miranda-Castro, R.; De-Los-Santos-Alvarez, P.; Lobo-Castanon, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tunon-Blanco, P. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4050.
- [13] Ting, B. P.; Zhang, J.; Gao, Z. Q.; Ying, J. Y. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *25*, 282.
- [14] Wang, J.; Liu, G. D.; Jan, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3010.
- [15] Chen, S. T.; Zhang, X. L.; Zhang, Q. H.; Tan, W. H. *Nanoscale Res. Lett.* **2009**, *4*, 1159.
- [16] Dong, X. Y.; Mi, X. N.; Wang, B.; Xu, J. J.; Chen, H. Y. *Talanta* **2011**, *84*, 531.
- [17] Dong, X. Y.; Mi, X. N.; Zhao, W. W.; Xu, J. J.; Chen, H. Y. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 3654.
- [18] Li, D.; Song, S. P.; Fan, C. H. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 631.
- [19] Lubin, A. A.; Plaxco, K. W. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 496.
- [20] Uzawa, T.; Cheng, R. R.; White, R. J.; Makarov, D. E.; Plaxco, K. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16120.
- [21] Farjami, E.; Clima, L.; Gothelf, K.; Ferapontova, E. E. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1594.
- [22] Lubin, A. A.; Lai, R. Y.; Baker, B. R.; Heeger, A. J.; Plaxco, K. W. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5671.
- [23] Kang, D.; Zuo, X. L.; Yang, R. Q.; Xia, F.; Plaxco, K. W.; White, R.

- J. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9109.
- [24] Xiao, Y.; Lubin, A. A.; Heeger, A. J.; Plaxco, K. W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 5456.
- [25] Ricci, F.; Lai, R. Y.; Plaxco, K. W. *Chem. Commun.* **2007**, 3768.
- [26] Immoos, C. E.; Lee, S. J.; Grinstaff, M. W. *Chem. Biochem.* **2004**, *5*, 1100.
- [27] Liu, Y.; Tuleouva, N.; Ramanculov, E.; Revzin, A. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8131.
- [28] Fan, C. H.; Plaxco, K. W.; Heeger, A. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 9134.
- [29] Lai, R. Y.; Plaxco, K. W.; Heeger, A. J. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 229.
- [30] Xiao, Y.; Qu, X. G.; Plaxco, K. W.; Heeger, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11896.
- [31] Cash, K. J.; Heeger, A. J.; Plaxco, K. W.; Xiao, Y. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 656.
- [32] Immoos, C. E.; Le, S. J.; Grinstaff, M. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10814.
- [33] Zhang, Y. L.; Wang, Y.; Wang, H. B.; Jiang, J. H.; Shen, G. L.; Yu, R. Q.; Li, J. H. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1982.
- [34] Jin, Y.; Yao, X.; Liu, Q.; Li, J. H. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1126.
- [35] Zhao, W.; Xu, J. J.; Shi, C. G.; Chen, H. Y. *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 773.

(Zhao, C.)