

# 电化学 DNA 生物传感器研究的应用进展\*

黄 强 刘红英 方 宾\*\*

(安徽师范大学化学与材料科学学院 化学生物传感安徽省重点实验室 芜湖 241000)

**摘 要** 电化学 DNA 生物传感器因快速、灵敏、低耗和易于操作等优点在基因序列测定中受到了广泛的关注,已逐渐成为分子生物学和生物技术研究的重要领域。具有电活性的小分子和纳米材料因它们独特的性质,已被应用于电化学 DNA 生物传感器中。本文介绍了电化学 DNA 生物传感器的基本概念和分类,综述了近年来电活性小分子和纳米材料在电化学 DNA 生物传感器中的应用进展,并对此领域的未来发展做了展望。

**关键词** 电化学 DNA 生物传感器 电活性小分子 纳米材料

**中图分类号:** O657.1; O629.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-281X(2009)05-1052-08

## Development of Electrochemical DNA Biosensors

Huang Qiang Liu Hongying Fang Bin\*\*

(Anhui Key Laboratory of Chemo-Biosensing, School of Chemistry and Materials Science,  
Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

**Abstract** Owing to the advantages of high sensitivity, rapid response, easy handling and low cost, the electrochemical DNA biosensor has received much attention in the field of genic sequence detection and has gradually become an important field in the study of molecular biology and biological research. Electroactive molecules and nano materials have been applied to the electrochemical DNA biosensors because of their special properties. Here, the principle and classification of the electrochemical DNA biosensors are introduced, and the applications of electroactive molecules and nano materials in electrochemical DNA biosensors in recent years are reviewed. A prospect for the future development in this field is also briefly given.

**Key words** electrochemical DNA biosensors; electroactive molecules; nano materials

<b>Contents</b>	DNA biosensors
1 Principle of electrochemical DNA biosensors	3.1 Use of metal nanoparticles
2 The applications of electroactive molecules in electrochemical DNA biosensors	3.2 Use of semiconductor and oxide nanoparticles
2.1 Non-labeling hybridization indicator as recognition element	3.3 Use of magnetic microspheres
2.2 Labeling hybridization indicator as recognition element	3.4 Use of other nano materials
3 The applications of nano materials in electrochemical	4 Outlook

DNA 作为一种十分重要的生物大分子,是遗传信息的载体,基因表达的物质基础。研究 DNA 的结构和功能,可以从分子水平上了解生命现象的本质,

收稿: 2008 年 5 月, 收修改稿: 2008 年 8 月

\*国家自然科学基金项目(No. 20675001)资助

\*\*通讯联系人 e-mail: binfang.47@yahoo.com.cn

但这需要多学科的参与以及发展一些新的理论和新的研究手段。

电化学分析技术因在快速、灵敏、简便、无毒、低成本和活体检测应用等方面具有无可比拟的优势,使其在临床病理诊断、环境检测、药物分析等领域日益受到重视和关注<sup>[1,2]</sup>。DNA 的电化学研究始于 20 世纪 60 年代,早期的工作主要集中于 DNA 的基本电化学行为的研究<sup>[3]</sup>。随着极谱学的发展,其它电分析化学方法也用于 DNA 的研究,其范围已经扩大到 DNA 的结构和形态、DNA 探针及传感器的研究。

生物传感器是指用固定化的生物材料或生物体本身作为敏感元件的传感器。若以 DNA 或 DNA 辅材为敏感元件,电化学电极为信号转换器,以电势或电流等为特征检测信号的生物传感器就是电化学 DNA 生物传感器。这是近年来发展迅速、颇为新颖的一类生物传感器。因具有灵敏度高、便捷快速、不破坏样品、不受溶液颜色影响、便于微型化等优点,已成为人们关注的一个热点领域,具有很大的研究和应用价值。本文就电化学 DNA 生物传感器的有关进展做一综述。

## 1 电化学 DNA 生物传感器基本原理

两条来源不同的单链 DNA 分子如果完全互补,则可以通过氢键特异性结合而形成双螺旋结构,这就是 DNA 分子的杂交。由于单链 DNA 与其互补靶系列杂交具有高度的序列选择性,若将该单链 DNA 修饰在电极上,则该修饰电极具有极强的分子识别功能。即在适当的温度、酸度、离子强度下,电极表面的 DNA 探针分子能与靶序列选择性地杂交,形成双链 DNA,从而导致电极表面结构的改变。根据杂交前后电极上单链 DNA 和双链 DNA 的性能差异,采用电化学的方法把识别结果转化为可测的电信号,从而实现 DNA 结构的识别和浓度的测定,这就是电化学 DNA 生物传感器的工作原理<sup>[4]</sup>。

可检测的电化学信号,可以是由检测体系中不同的物质发生氧化还原所形成的。电化学检测 DNA 可以分为直接检测和间接检测。直接检测的依据在于 DNA 与电极表面存在直接电子转移,而且 DNA 的一些组分包括碱基和核糖在一定电势窗口下也是有电化学活性的。如 DNA 分子中鸟嘌呤发生氧化还原反应时不破坏氢键,因此可以利用 DNA 分子本身电信号的变化来进行检测。间接检测则是通过外加入的一些氧化还原媒介来实现电子传递,借助于这些与 DNA 选择性结合的有电化学活性的

指示剂来进行杂交检测。这些有电化学活性的指示剂(杂交指示剂)可以是具有电活性的小分子物质,也可以是一些具有电活性的纳米材料。由于直接检测方法一般需要在 DNA 本身的结构中含有电化学活性的基团,这在一定程度上限制了该类传感器的拓展应用。而间接检测法因其可供选择的杂交指示剂种类很多,应用范围广泛,近年来得到了长足发展。下面就间接检测法中采用的两类杂交指示剂在电化学 DNA 生物传感器研究方面的应用进展进行介绍。

## 2 电活性小分子在电化学 DNA 生物传感器中的应用

根据电活性小分子在电化学 DNA 生物传感器中引起的电化学信号变化的原理不同,可将其分为两类:一类是以非标记型电活性小分子杂交指示剂作为识别元素;另一类是将具有电活性的小分子标记在 DNA 探针上,利用杂交前后探针上小分子的氧化还原电流的变化进行 DNA 检测。

### 2.1 非标记型杂交指示剂作为识别元素

具有电活性的杂交指示剂与单链 DNA 和双链 DNA 以不同的结合能力或结合方式相互作用,它对双链 DNA 比对单链 DNA 有更高的特异性结合能力,可用来有效地区分单链 DNA 和双链 DNA。一般地说,双链 DNA 与指示剂的相互作用为静电作用和内部疏水作用,而单链 DNA 主要是静电作用<sup>[5]</sup>。目前使用的非标记型杂交指示剂主要包括有机染料、荧光素和药物小分子等。

有机染料和具有强荧光性质的有机化合物是常见的一类电化学杂交指示剂。这类化合物一般都具有较大的萘式刚性平面,并带有  $-\text{OH}$ 、 $=\text{O}$ 、 $=\text{NH}$ 、 $-\text{N}$  等电化学活性基团。目前常见的染料类杂交指示剂有灿烂甲酚蓝、亚甲基蓝、麦尔多拉蓝和吡啶酮衍生物等。Jiao 等<sup>[6]</sup>运用电化学方法研究了灿烂甲酚蓝与 DNA 的相互作用,DNA 的加入使得灿烂甲酚蓝原有的氧化还原峰电流降低,峰电位负移,此为二者在试验条件下生成了一种非电活性活性的超分子化合物所致。该方法可用于 DNA 浓度的检测,其线性范围为  $8.0 \times 10^{-7} - 6.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。Ozsoz 等<sup>[7]</sup>采用计时电位法和差示脉冲伏安法对亚甲基蓝与固定在碳糊电极上的小牛胸腺 DNA 的结合进行了研究,结果表明亚甲基蓝是一种 DNA 生物传感器的有效电活性杂交指示剂。Lin 等<sup>[8]</sup>采用亚甲基蓝作为杂交指示剂,对与慢性脊髓

性白血病相关的 18-碱基 DNA (CML DNA) 序列进行了伏安测定,固定在玻碳电极表面的单链 DNA 可以选择性地与溶液中互补的 CML DNA 结合,从而使得作为杂交指示剂的亚甲基蓝的峰电流有了显著的增大,并用于 DNA 浓度的测定,在  $1.25 \times 10^{-7}$ — $6.75 \times 10^{-7}$  mol/L 范围内呈线性关系,检测限为  $5.9 \times 10^{-8}$  mol/L。

作为杂交指示剂的药物小分子大多属于蒽环霉素家族的成员,典型的有道诺霉素和阿霉素等。这类化合物由一个平坦的疏水四环素环和一个六碳氨基糖组成,二者之间通过糖苷键相连。在生理条件下,这类化合物都带有正电,与 DNA 作用时,分子碳环部分通过嵌插模式作用于 DNA 螺旋结构中的碱基对,而氨基糖部分与 DNA 外围的磷酸骨架发生静电作用<sup>[9]</sup>。Hashimoto 等<sup>[10]</sup>利用这种杂交指示剂进行电化学基因检测,发现可以通过电活性小分子道诺霉素峰电位的移动,很好地区分双链和单链 DNA,并且其电流密度相当高,可检测到  $10^{-8}$  g/ml 的靶基因序列。Pariante 等<sup>[11]</sup>用 3,4-DHS 和 2,5-DHS 这两个含有平面芳环的化合物作为杂交指示剂,相比较单链 DNA,它们能更有效地结合双链 DNA。光谱表征了这两种化合物均可与双链 DNA 的小沟结合;电化学测试表明 3,4-DHS 聚集在双链 DNA 层。该法可用来检测 DNA 浓度,在  $8.9$ — $22.2$   $\mu\text{mol/L}$  范围内呈线性关系,检测限为  $8.3 \pm 0.4$   $\mu\text{mol/L}$ 。

二茂铁是优良的电媒介体,我们以聚噻吩/二茂铁作为探针指示剂,将已知的带巯基的单链 PNA 片段固定于修饰电极上。因 PNA 缺少磷酸骨架,不能吸附带正电荷的聚噻吩/二茂铁,但杂交后的 PNA-DNA 可以吸附聚噻吩/二茂铁,产生很强的杂交信号,可以很好地识别互补的单链 DNA<sup>[12]</sup>。Won 等<sup>[13]</sup>制备了聚苯胺修饰电极,其表面在发生 DNA 杂交前呈中性,杂交后带负电荷。这样带负电荷的杂交指示剂二茂铁二羧酸在杂交前后在电极表面可引起电流变化,由此可以进行 DNA 的测定。

另外,一些过渡金属络合离子可以与 DNA 的磷酸骨架或碱基结合,常用来作为杂交指示剂。如  $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 、 $[\text{Co}(\text{bpy})_3]^{3+}$  和  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$  等,它们能与 DNA 发生沟槽嵌入作用,并和磷酸骨架上的电荷发生静电作用。通过它们与 DNA 杂交前后产生不同的电信号来指示 DNA 的杂交情况。Mikkelsen 等<sup>[14]</sup>利用二吡啶钴离子与带负电荷的 DNA 骨架的静电结合能力,通过伏安法实现了 DNA 杂交检测。他们将 DNA 探针通过酰胺反应固定到碳糊电极表

面,在较低盐浓度的电解液中加入了  $100 \mu\text{mol/L}$  的钴离子,发现当杂交反应发生后,钴离子的法拉第电流和充电电流都增大且电位负移了约  $30 \text{mV}$ 。电位负移是由于指示剂与双链 DNA 特异性结合后被固定在电极表面 DNA 层中,电流的增大则是由于杂交后电极表面 DNA 的密度增大,静电吸附的钴离子的量随之增加所致。Garcia 等<sup>[15]</sup>制备了双功能的钌配合物五氨基钌 [3-(2-苯基萘-9-乙烯基)-嘧啶] ( $\text{RuL}$ ),配体中的芳环赋予配合物嵌插特征,使其对双链 DNA 具有更有效的结合作用,金属氧化还原中心可以作为杂交指示剂。在金电极表面固定螺旋菌中的巯基捕获探针序列制备了生物传感器,用于螺旋菌中的互补目标序列的检测,线性范围  $106$ — $708 \text{pmol/L}$ 。

## 2.2 标记型杂交指示剂作为识别元素

标记了电活性杂交指示剂的核苷酸与电极表面的靶基因选择性地杂交反应,在电极表面形成带有电活性官能团的杂交分子,通过测定其电信号可以识别和检测 DNA 分子。

Korri Yousoufi 等<sup>[16]</sup>用带有二茂铁的吡咯和羧酸的吡咯聚合,与二茂铁相连的吡咯有一个易离去的酯基,用氨基标记探针代替这个酯基,通过检测二茂铁的氧化还原信号来判断杂交的发生。Fang 等<sup>[17]</sup>将杂交指示剂氨基二茂铁和醛基二茂铁标记在变性小牛胸腺 DNA 片段上制备成二茂铁标记 DNA 探针。该探针在石墨电极上有良好的电化学反应,重现性好,寿命长。Qu 等<sup>[18]</sup>设计了一种灵敏度高、特异性好的电化学分子信标杂交检测方法。将一段一端修饰巯基另一端标记有一个亚甲基蓝分子的捕获探针自组装到金电极表面,这段探针具有类似于荧光分子信标的茎环结构。在未发生杂交反应时,探针处于茎环构型,末端标记的亚甲基蓝分子处于电极的远端;而当溶液中含有靶序列时,由于杂交反应的发生使茎环结构打开,形成双链 DNA,末端标记的亚甲基蓝分子就会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发生变化,通过检测亚甲基蓝分子氧化还原电流的变化可以方便快速地指示杂交反应的发生。这种方法将分子信标引入到电极表面,而且不需要任何杂交后处理和外加指示剂,可以方便、直接地指示杂交的进行。Mao 等<sup>[19]</sup>将两端互补的单链 DNA 的末端分别标记上二茂铁和巯基后,与相应的核酸适体 (ATP 和凝血酶结合的适配体) 杂交形成双链 DNA,再将其自组装到金电极表面构建电化学适配体传感器。加入目

标 DNA, 电极表面的核酸适体就从相应的双链 DNA 解旋进入溶液, 互补 DNA 就可以通过两端互补序列杂交形成发夹结构。这种核酸适体造成互补 DNA 构象的变化, 使得互补 DNA 上二茂铁引起电流的改变, 可用于核酸适体的识别和测定。

Xiao 等<sup>[20]</sup> 同样基于探针杂交前后构型的变化, 设计了一种靶取代后信号增强的杂交检测方法, 将一段与捕获探针部分互补并一端修饰亚甲基蓝的“信号探针”与捕获探针先杂交, 这时亚甲基蓝处于电极的远端, 当靶序列与捕获探针杂交后, 被靶序列“竞争取代”下来的亚甲基蓝端会游近电极表面产生更快的电子传递反应。这种方法的检测限为  $10^{-12}$  mol/L。Fang 等<sup>[21]</sup> 将电化学活性物质溴乙锭标记在人工合成的含有 21 个碱基的寡聚 DNA 片段上, 制备了溴乙锭标记 DNA 探针, 用电化学方法将待测样品 DNA 片段固定在石墨电极表面后与溴乙锭标记的 DNA 探针进行杂交反应, 从而实现了靶序列 DNA 片段的识别和测定。Kim 等<sup>[22]</sup> 将末端修饰了巯基的捕获 DNA 共价键合在金电极表面, 再与末端修饰了二茂铁的信号 DNA 进行杂交形成双链 DNA。溶液中的目标 DNA 就会与捕获 DNA 竞争信号 DNA。完全匹配的目标 DNA 取代捕获 DNA 与信号 DNA 杂交, 而单个碱基错配的目标 DNA 不能取代捕获 DNA, 从而达到识别的目的。

### 3 纳米材料在电化学 DNA 生物传感器中的应用

在宏观领域和微观领域之间的介观领域——即纳米尺度范围内进行研究的纳米科技成为近年来研究的热点, 开辟了人类科学研究的一个全新层次。纳米材料的表面效应、体积效应、量子尺寸效应、宏观量子隧道效应、催化性质<sup>[23]</sup> 等, 导致了既异于传统的体相材料又异于分子、原子等微观物质的独特性能。此外, 纳米材料还具有制备简单、尺寸可控、表面易于修饰、表征简便等优点, 为电化学生物传感器测定 DNA 开辟了一条新的道路。将纳米材料引

入电化学 DNA 生物传感器中进行标记, 可以根据 DNA 杂交前后纳米材料本身引起的电化学信号变化差异来实现对 DNA 的识别和测定。

#### 3.1 金属纳米粒子

金属纳米粒子由于制备简单, 性能优良, 在多个领域得到了广泛的应用。其中, 金和银纳米粒子由于其良好的生物相容性和电化学性能, 在电化学 DNA 生物传感器中受到了广泛关注。

采用金或银纳米粒子来标记 DNA 进行杂交反应, 酸溶纳米粒子, 检测金或银离子的含量, 达到识别和测定 DNA 浓度的目的。3 种途径可用来直接或间接测定 DNA, 如图 1 所示。Ozsoz 等<sup>[24]</sup> 将目标 DNA 修饰在石墨电极上, 与溶液中标记有金胶的探针 DNA 进行杂交, 采用差分脉冲伏安法直接在 +1.20V 测定金的氧化峰, 从而测定 DNA 的浓度 (图 1A)。而在第二种方法中, 是采用阳极溶出伏安法测定酸溶后得到的金属离子的含量。Limoges 等<sup>[25]</sup> 用金纳米粒子标记了 406 碱基对的人细胞巨化病毒的单链 DNA (HCMV DNA) 进行杂交反应, 采用阳极溶出伏安法测定氢溴酸溶解得到的金离子, 间接测定了 DNA 含量, 检测限可达 5 pmol/L (图 1B)。Tamiya 等<sup>[26]</sup> 将金纳米粒子修饰的单链 DNA 与金标记的大肠杆菌单链 DNA 结合的蛋白进行杂交, 通过检测杂交在电极表面的结合蛋白上金的氧化信号来测定目标 DNA。Fang 等<sup>[27]</sup> 利用银纳米粒子作为寡核苷酸的标记物, 将其与目标 DNA 杂交后, 通过阳极溶出伏安法在碳纤维超微电极上测定标记探针释放出的银离子的含量来检测 DNA 的浓度。Li 等<sup>[28]</sup> 利用 Au-S 作用将金胶标记的目标寡聚核苷酸键合在表面修饰了半胱胺的金电极上, 与银纳米粒子标记的寡聚核苷酸探针杂交, 再在碳纤维微电极上对杂交定向的银纳米粒子进行阳极溶出伏安法测定。Ribeiro 等<sup>[29]</sup> 利用石墨电极易处理的优点, 发展了一种改进的 DNA 电化学传感测定方法。首先将氨基连接的 DNA 结合到银纳米粒子上, 然后吸附到电极表面。在优化的实验条件下, 得到更灵敏和更具有

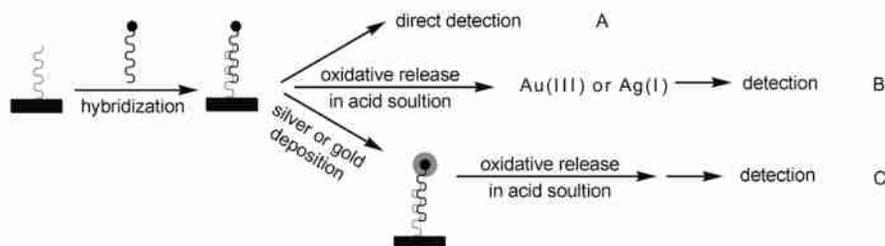


图 1 基于金或银纳米粒子电化学测定 DNA 方法示意图

Fig. 1 Scheme of Au or Ag nanoparticle-based protocols for electrochemical detection of DNA

选择性的银和鸟嘌呤信号。将该法与其他文献报道的方法进行了分析比较,具有明显的优势。

为了进一步提高检测的灵敏度,可在作为标记物的金或者银纳米粒子表面进一步沉积大量金或者银,再采用溶出伏安法来测定金属离子的含量,一般可将检测限降低 2—3 个数量级(图 1C)。Fang 等<sup>[30]</sup>在玻碳电极表面修饰一层壳聚糖后,通过静电作用吸附寡聚核苷酸,然后与标记了金纳米粒子的目标 ssDNA 杂交,可以区分互补和错配的 DNA。再在金纳米粒子表面电沉积银,采用差分脉冲伏安法来检测沉积在杂交电极表面大量的银,从而使互补 DNA 的检测限降低为 50 pmol/L。Hsing 等<sup>[31]</sup>测定 DNA 时在标记的金纳米粒子表面沉积银,使其在金电极表面进行信号增强,但是金电极对沉积的银非常敏感,就会带来非特异性的电信号。为此,他们在 ITO 电极表面首先修饰了多层聚丙烯胺盐酸盐和聚磺酸苯乙烯等聚电解质,减弱了电极表面的银离子的非特异性信号,使得传感器对 DNA 测定表现出更高的灵敏度和更好的选择性。Murielle 等<sup>[32]</sup>在微阱的底部吸附单链 DNA 后与金纳米粒子标记的互补单链 DNA 进行杂交,然后采用阳极溶出伏安法在印刷电极表面通过检测氧化的金来测定 DNA 浓度。可在金纳米粒子表面进一步沉积金,然后通过自身催化还原表面的金来增强杂交信号,但是这种方法的非特异性电流响应的重现性比较差。为了克服这个缺点,他们在介质中加入了聚乙二醇和氯化钠作为催化过程的聚集剂,使得放大的标记全部保持在微阱的底部,目标 DNA 的检测限低至 600 amol/L。

采用金或银纳米粒子来标记 DNA 进行杂交反应,除了通过检测溶解后金或银离子的含量来测定 DNA,还可在杂交过程中引入电活性小分子,通过对小分子含量的检测来达到测定 DNA 的目的。Fan 等<sup>[33]</sup>将捕获 DNA 探针自组装到金电极表面,在金纳米粒子表面结合受体 DNA,通过互补的目标 DNA 与两者在侧面杂交,得到了三明治型的结构。因为每个金纳米粒子可以结合几百个受体 DNA,因此对目标 DNA 的测定得到了很大的扩增,使检测限达到 fmol/L。相反,如果没有目标 DNA 参与杂交,那么在电极表面仅仅只有未杂交的捕获 DNA,这时加入电活性物质  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  作为指示剂,它可以与 DNA 的阴离子磷酸盐骨架之间进行静电结合,可以直接表征电极表面所结合的捕获 DNA 的量,从而可以使 DNA 电化学传感器达到重现性好、稳定性高、再生能力强等优点<sup>[33]</sup>。类似地,Willner 等<sup>[34]</sup>将金纳米粒

子和电活性小分子亚甲基蓝的作用相结合,Franzen 等<sup>[35]</sup>将金纳米粒子和  $\text{FeCl}_2$  的作用相结合,Fang 等<sup>[36]</sup>通过修饰在电极表面的金纳米粒子来固定含巯基的单链 DNA,并提高固定的量,通过电极表面单链 DNA 与溶液中标记有二茂铁的互补 DNA 的相互作用,实现对 DNA 浓度的测定。

### 3.2 半导体纳米粒子和氧化物纳米粒子

半导体纳米粒子因其独特的电子可调节性能使其在光化学领域中有了长足的发展。近年来,半导体纳米粒子也被应用到电化学 DNA 生物传感器上,主要为 CdS、ZnS 和 PbS。Jiao 等<sup>[37]</sup>将目标 DNA(胭脂仙人掌合酶(NOS)终止基因序列)通过巯基乙醇自组装到金电极表面,再与标记有巯基乙酸修饰的 CdS 的单链 DNA 探针进行杂交。硝酸溶解结合的 CdS,采用灵敏的阳极溶出伏安法测定  $\text{Cd}^{2+}$  来检测 DNA 浓度。该法具有很高的灵敏度和很好的选择性,线性范围为  $8.0 \times 10^{-12} - 4.0 \times 10^{-9}$  mol/L,检测限为  $2.75 \times 10^{-12}$  mol/L。Travas-Sejdic 等<sup>[38]</sup>将目标 DNA 寡核苷酸(ODN)通过电聚合吡咯固定到电极表面后与探针 DNA 杂交,再在探针上结合 CdS 纳米粒子,通过交流阻抗进行杂交的表征,灵敏度明显增强。线性范围为 3.7—370 nmol/L,检测限为 ~1 nmol/L。同样的方法可以拓展到 ZnS 和 PbS。这些半导体材料的使用,不仅可以测定单一的 DNA,还可以采用电化学译码技术,根据  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  溶出电位的差异,实现 3 类 DNA 目标分子的同时测定。Gothelf 等<sup>[39]</sup>在同一金电极表面结合三种捕获 DNA,分别与 CdS、ZnS、PbS 纳米粒子标记的分别连接有不同受体 DNA 进行杂交,利用 3 种金属离子溶出电位的不同,将 3 种纳米粒子溶解后,采用阳极溶出伏安法测定 3 种离子的含量,实现了 3 种单链 DNA 的同时测定。如果电极表面只有一个捕获 DNA,则只会出现一种金属离子的溶出峰。在同一金电极表面固定两种捕获 DNA 后,与标记有 CdS、PbS 的受体 DNA 进行杂交,溶出伏安法测定得到  $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  的溶出峰。若在杂交时,加入一个目标 DNA 与标记有 PbS 的受体 DNA 进行竞争,溶出伏安的结果是只有  $\text{Cd}^{2+}$  一个溶出峰,表明目标 DNA 与标记有 PbS 的受体 DNA 优先进行杂交,而使得标记有 PbS 的受体 DNA 不能与金电极上固定的捕获 DNA 进行杂交,因此在溶出时就不会有  $\text{Pb}^{2+}$  的溶出峰,表现出显著的选择性。

除了半导体纳米粒子在电化学 DNA 生物传感器中得到了广泛的应用,最近也有文献报道了氧化

物纳米粒子在电化学 DNA 生物传感器的应用。Xia 等<sup>[40]</sup>在金电极表面修饰半胱氨酸后自组装上表面氨基修饰的硅纳米球。因为二氧化硅纳米粒子的特殊性能和大的表面积,使得结合单链 DNA 的量为  $1.6 \times 10^{-8} \text{ mol/cm}^2$ ,再将其进行杂交,来测定互补 DNA。Tsang 等在 ITO 电极表面首先通过电沉积一层致密的约 200—500nm 厚度的氧化锆,阻抗表征比原有的 ITO 表面的电导性能更好。表面硅烷化再接一层氨基用以固定巯基单链 DNA,再与溶液中的单链 DNA 进行杂交。结果表明,与互补 DNA 杂交后由于表面电子云密度减少,使得阻抗明显降低,而与错配 DNA 杂交后阻抗降低很少,由此可以达到对 DNA 的测定<sup>[41]</sup>。

### 3.3 磁性微球

磁性微球具有特殊的磁导向性,其表面可以连接生化活性功能基团,使其在核酸分离、临床诊断、靶向药物、细胞分离和酶的固定化等领域已经有了广泛的应用研究。而将磁性微球和纳米材料相结合应用到电化学 DNA 生物传感器中,必将显著提高传感器的灵敏度,简化操作步骤,缩短检测时间,提高检测的通量。

Piskinb 等<sup>[42]</sup>将含有四氧化三铁的磁性聚合物表面通过羧基修饰上抗生蛋白链菌素,将生物素肌苷修饰的探针 DNA 固定到磁性纳米粒子的表面,与目标 DNA 进行杂交。通过鸟嘌呤的氧化信号来测

定杂交 DNA 的序列和选择性。如果是互补杂交,鸟嘌呤的氧化电流为 71nA,错配的为 14nA,完全不互补的为 9nA。该法的检测限为 43.11pmol/ml。Wang 等在磁性纳米粒子表面结合单链 DNA 后与目标 DNA 进行杂交,再在目标 DNA 上连接金纳米粒子,然后将这些粒子用磁场吸附到厚膜碳电极表面,用电化学方法测定金离子还原电流。电流信号还可以通过沉积银到纳米粒子表面进行扩增<sup>[43]</sup>,区分互补的、3 个碱基错配的、非互补的 DNA。线性范围为 20—150ng/ml,检测限为 150pg/ml<sup>[44]</sup>。Merkoci 等<sup>[45]</sup>设计了两种测定 DNA 的磁性传感器。一种是先将单链 DNA 固定在顺磁性磁球表面,再与标记有金纳米粒子的单链 DNA 杂交;另一种是三明治结构。连接有磁球的单链 DNA 与目标 DNA 杂交,目标 DNA 再与有金纳米粒子标记的单链 DNA 杂交。将这两种杂交后的 DNA 吸附到磁性石墨环氧树脂复合电极表面,对金进行直接检测来测定 DNA。Merkoci 等<sup>[46]</sup>将目标 DNA 固定在磁球的表面,再与标记有 1 1 的金量子点的 DNA 进行杂交;或者与标记有 1 4 的金量子点的 DNA 进行杂交。再将杂交后的 DNA 通过磁性吸附到磁性石墨环氧树脂复合电极表面,对金量子点进行伏安测定来检测 DNA 浓度。该法优点是不需要溶解,直接伏安法测定金量子点,而且金量子点-DNA 与磁性粒子-DNA 的结合不会产生相通的三维网状的金-DNA 双磁球,降低了检测限,如图 2 所示。

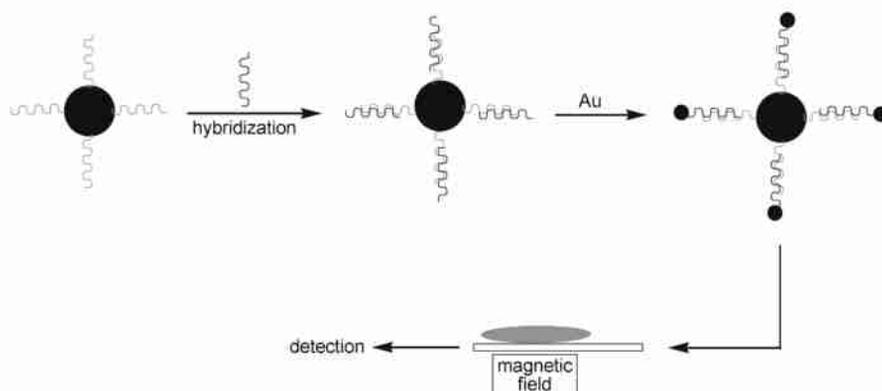


图 2 固态磁感应电化学测定 DNA 杂交示意图<sup>[46]</sup>

Fig. 2 Schematic of the magnetically induced solid-state electrochemical detection of DNA hybridization<sup>[46]</sup>

### 3.4 其它纳米材料

除了以上提及的纳米材料之外,一维纳米材料,或者将其它纳米材料与纳米粒子或电活性小分子相结合来进行 DNA 测定,同样也可以提高检测的灵敏度,降低检测限。报道的材料有碳纳米管、聚苯胺纳

米管阵列、聚苯乙烯球和硅纳米球等。我们制备的聚硫堇/纳米金/多壁碳管修饰电极实现了对单链 DNA 中 G 与 A 的识别和同时测定<sup>[47]</sup>。Wang 等<sup>[48]</sup>将 CdS 通过疏水作用结合在丙酮活化的碳纳米管上,采用三明治结构的 DNA 杂交方式,通过溶解

CdS 来测定 DNA。扫描电子显微镜表征每个碳纳米管上结合约 500 个 CdS,因此 DNA 的检测限降低了 500 倍。溶液中存在 250 倍的非互补 DNA 时对检测基本没有影响。Yang 等<sup>[49]</sup>将  $ZnO_2$  纳米粒子结合在多壁碳管上,通过壳聚糖修饰在玻碳电极表面,结合寡聚核苷酸后再进行杂交,采用道诺霉素为指示剂,差示脉冲伏安法测定电流变化。与单独将寡聚核苷酸结合到电极表面相比,该法表现出很高的灵敏度。线性范围为  $1.49 \times 10^{-10} - 9.32 \times 10^{-8}$  mol/L,检测限为  $7.5 \times 10^{-11}$  mol/L。He 等<sup>[50]</sup>将铂纳米粒子和多壁碳管结合起来构建了一个很灵敏的 DNA 电化学生物传感器。将铂纳米粒子和多壁碳管分散在 Nafion 溶液中滴涂到玻碳电极的表面。寡聚核苷酸上的氨基与多壁碳管上羧基之间的相互作用将单链 DNA 固定在电极表面,然后与溶液中的 DNA 进行杂交,再用差示脉冲伏安法来测定嵌插到杂交后得到的双链 DNA 中的道诺霉素。一方面由于多壁碳管可以促进电子的传递,另一方面铂纳米粒子对化学反应具有很高的催化活性,使制备的电化学 DNA 生物传感器的灵敏度得到了显著的提高,其检测限为  $1.0 \times 10^{-11}$  mol/L。Fang 等<sup>[51]</sup>制备了掺杂了  $[Co(bpy)_3]^{3+}$  的纳米硅球,将其表面共价结合了单链 DNA,再与修饰在玻碳电极表面的互补单链 DNA 进行杂交。采用差示脉冲伏安法检测  $[Co(bpy)_3]^{3+}$  的电流变化来测定 DNA。因为硅纳米球内掺杂了许多  $[Co(bpy)_3]^{3+}$ ,因此电流信号得到了增强,DNA 的检测限减低,为  $2.0 \times 10^{-10}$  mol/L。Wang 等<sup>[52]</sup>在标记有单链 DNA 的聚苯乙烯球表面固载金纳米粒子后,与结合在磁性微球表面的 DNA 进行杂交,采用阳极溶出伏安法测定溶解的金离子,检测限可达 5ng/ml;若在金纳米粒子上沉积大量的金进行扩增,则结果可以增大 100 倍。Chang 等<sup>[53]</sup>将 21 个碱基对长度的寡核苷酸探针固定在高度有序聚苯胺纳米管阵列的石墨电极上,构建了超灵敏的电化学生物传感器。测定的检测限为 1.0fmol/L,在 37.59fmol/L 的浓度条件下在 1 个碱基对错配的 DNA 中识别完全互补的 DNA,可用于单核苷多形态分析和单突变检测。

其实,无论是采用电活性小分子作为杂交指示剂,还是将具有诸多优势的纳米材料引入或是电活性小分子和纳米材料配合使用到 DNA 的识别和测定中,电化学 DNA 生物传感器的研究目标始终是提高检测的灵敏度,改善识别的选择性,将对设计 DNA 序列的测定发展到生物实体(如病源基因)的测定。近年来电化学工作者们也正是在朝着这些方

向努力。在提高灵敏度方面,采用提取杂交前后电流、电势、阻抗等信号变化,或与电化学 DNA 生物传感器与酶联催化作用相结合使得检测的灵敏度有了明显的提高<sup>[13,54,55]</sup>。在改善选择性方面,在传感器表面采用三明治结构进行 DNA 的杂交也是提高识别选择性的一个有效途径<sup>[15,45,56,57]</sup>。在病源基因的测定方面,目前已经采用电化学 DNA 生物传感器研究的有急性呼吸病病毒(SARS)<sup>[58]</sup>、急性髓细胞白血病(AML)的 PML-RAR 融合基因<sup>[59]</sup>、大肠杆菌<sup>[60]</sup>、乳癌基因<sup>[13,45]</sup>和囊肿性纤维化基因<sup>[45]</sup>等,均取得了较好的研究结果。

## 4 展望

电化学 DNA 生物传感器作为一种新型的生物传感器,尽管研究时间不长,但已受到国内外专家的广泛关注,开辟了电化学与分子生物学交叉学科的新领域。尤其是将新兴发展的纳米材料与电化学 DNA 生物传感器相结合,实现了高灵敏度、高选择性、多目标 DNA 同时检测,更是为电化学 DNA 生物传感器的研究提供了无穷的发展空间。今后电化学 DNA 生物传感器的研究应用将主要集中在以下几个方面:(1)不断开发新的杂交指示剂,或与电催化联用来制备形式多样的电化学 DNA 生物传感器;(2)将其他分析技术应用到电化学 DNA 生物传感器中,扩大电化学 DNA 生物传感器的应用领域;(3)设计更简单的制备方法来构建电化学 DNA 生物传感器,能够很好地检测实际样品;(4)致力于电化学 DNA 生物传感器的微型化和自动化研究,实现高效、快速、低耗、便携的检测特定基因。

总之,电活性的杂交指示剂,尤其是与纳米材料的结合,为电化学 DNA 生物传感器的发展带来了新的机遇与挑战,其与生命科学的有机结合将为生命科学的发展带来更多的惊喜。

## 参 考 文 献

- [1] Vercoutere W, Akeson M. *Cur. Opin. Chem. Biol.*, 2002, 6: 816—822
- [2] Thorp H H, March T. *Trends Biotechnol.*, 1998, 16: 117—121
- [3] Palecek E. *Nature*, 1960, 188: 656—657
- [4] 马丽(Ma L), 白燕(Bai Y), 刘仲明(Liu Z M), 刘芳(Liu F). 传感器技术(*Journal of Transducer Technology*), 2002, 21: 58—61
- [5] 汪庆祥(Wang Q X), 袁显龙(Yuan X L), 焦奎(Jiao K), 谢江坤(Xie J K), 张波(Zhang B). *化学进展(Progress in Chemistry)*, 2007, 19: 1007—1015
- [6] 王振永(Wang Z Y), 焦奎(Jiao K), 孙伟(Sun W), 李清军(Li

- Q J). 青岛科技大学学报(Journal of Qingdao University of Science and Technology(Natural Science Edition)), 2005, 26: 5—8
- [7] Kara P, Kagan K, Ozkan D, Meric B, Erdem A, Ozkan Z, Ozsoz M. *Electrochem. Commun.*, 2002, 4: 705—709
- [8] Lin X H, Wu P, Chen W, Zhang Y F, Xia X H. *Talanta*, 2007, 72: 468—471
- [9] Wang A H J, Ughetto G, Quigley G, et al. *Biochemistry*, 1987, 26: 1152—1163
- [10] Hashimoto K, Ito K, Ishimori Y, et al. *Anal. Chem.*, 1994, 66: 3830—3836
- [11] Revenga-Parra M, García T, Lorenzo E, Pariente F. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22: 2675—2681
- [12] Fang B, Jiao S, Li M, Qu Y, Jiang X. *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 23: 1175—1179
- [13] Won B Y, Yoon H C, Park H G. *Analyst*, 2008, 133(1): 100—104
- [14] Millan K M, Mikkelsen S R. *Anal. Chem.*, 1993, 65: 2317—2323
- [15] Garcia T, Revenga-Parra M, Abruna H D, Pariente F, Lorenzo E. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 77—84
- [16] Korri-Yousoufi H, Bouchra M. *Anal. Chim. Acta*, 2002, 469: 85—92
- [17] 徐春(Xu C), 蔡宏(Cai H), 何品刚(He P G), 方禹之(Fang Y Z). 高等学校化学学报(*Chem. J. Chin. Univ.*), 2001, 22: 1492—1495
- [18] Xiao Y, Qu X, Plaxco K W, Heeger A J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129: 11896—11897
- [19] Lu Y, Li X, Zhang L, Yu P, Su L, Mao L. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 1883—1890
- [20] Xiao Y, Lubin A A, Baker B R, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103: 16677—16680
- [21] 徐春(Xu C), 何品刚(He P G), 方禹之(Fang Y Z). 高等学校化学学报(*Chem. J. Chin. Univ.*), 2000, 21: 1187—1190
- [22] Kim K, Yang H, Park S H, Lee D, Kim S, Lim Y T, Kim Y T. *Chem. Commun.*, 2004, 1466—1467
- [23] Willner I, Willner B. *Pure Appl. Chem.*, 2002, 74: 1773—1783
- [24] Ozsoz M, Erdem A, Kerman K, Ozkan D, Tugrul B, Topcuoglu N, Ekren H, Taylan M. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 2181—2187
- [25] Authier L, Gossiorc C, Brossier P, Limoges B. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 4450—4456
- [26] Kerman K, Morita Y, Takamura Y, Ozsoz M, Tamiya E. *Anal. Chim. Acta*, 2004, 510: 169—174
- [27] Cai H, Xu Y, Zhu N, He P, Fang Y. *Analyst*, 2002, 127: 803—808
- [28] Wang M J, Sun C Y, Wang L Y, Ji X H, Bai Y B, Li T J, Li J H. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, 33: 1117—1125
- [29] Karadeniz H, Erdem A, Caliskan A, Pereira C M, Pereira E M, Ribeiro J A. *Electrochem. Commun.*, 2007, 9: 2167—2173
- [30] Cai H, Wang Y, He P, Fang Y. *Anal. Chim. Acta*, 2002, 469: 165—172
- [31] Lee T M H, Li L L, Hsing I M. *Langmuir*, 2003, 19: 4338—4343
- [32] Rochelet-Dequaire M, Limoges B, Brossier P. *Analyst*, 2006, 131: 923—929
- [33] Zhang J, Song S P, Zhang L Y, Wang L H, Wu H P, Pan D, Fan C H. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128: 8575—8580
- [34] Li D, Yan Y, Wieckowska A, Willner I. *Chem. Commun.*, 2007, 3544—3546
- [35] Moses S, Brewer S H, Kraemer S, Fuierer R R, Lowe L B, Agbasi C, Sauthier M, Franzen S. *Sens. Actuators B*, 2007, 125: 574—580
- [36] Cai H, Xu C, He P, Fang Y. *J. Electroanal. Chem.*, 2001, 510: 78—85
- [37] Sun W, Zhong J, Zhang B, Jiao K. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 389: 2179—2184
- [38] Peng H, Soeller C, Cannell M B, Bowmaker G A, Cooney R P, Travas-Sejdic J. *Biosens. Bioelectron.*, 2006, 21: 1727—1736
- [39] Hansen J A, Mukhopadhyay R, Hansen J O, Gøthelf K V. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128: 3860—3861
- [40] Zhang D, Chen Y, Chen H Y, Xia X H. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, 379: 1025—1030
- [41] Shrestha S, Yeung C M Y, Mills C E, Lewington J, Tsang S C. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46: 3855—3859
- [42] Erdem A, Sayar F, Karadeniz H, Guven G, Ozsoz M, Piskin E. *Electroanalysis*, 2007, 19: 798—804
- [43] Wang J, Xu D, Kawde A N, Polsky R. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 5576—5581
- [44] Wang J, Xu D, Polsky R. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124: 4208—4209
- [45] Castaneda M T, Merkoci A, Pumera M, Alegret S. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22: 1961—1967
- [46] Pumera M, Castaneda M T, Pividori M I, Eritja R, Merkoci A, Alegret S. *Langmuir*, 2005, 21: 9625—9629
- [47] Liu H Y, Wang G F, Chen D L, Zhang W, Li I, Fang B. *Sens. Actuators B*, 2008, 128: 414—421
- [48] Wang J, Liu G, Rasul J M, Zhu Q. *Electrochem. Commun.*, 2003, 5: 1000—1004
- [49] Yang Y, Wang Z, Yang M, Li J, Zheng F, Shen G, Yu R. *Anal. Chim. Acta*, 2007, 584: 268—274
- [50] Zhu N N, Chang Z, He P G, Fang Y Z. *Anal. Chim. Acta*, 2005, 545: 21—26
- [51] Zhu N N, Cai H, He P G, Fang Y Z. *Anal. Chim. Acta*, 2003, 481: 181—189
- [52] Kawde A N, Wang J. *Electroanalysis*, 2004, 16: 1—2
- [53] Chang H, Yuan Y, Shi N, Guan Y. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 5111—5115
- [54] Wang Z, Yang Y, Leng K, Li J, Zheng F, Shen G, Yu R. *Anal. Lett.*, 2008, 41: 24—35
- [55] Pan J. *Biochem. Eng. J.*, 2007, 35: 183—190
- [56] Metfies K, Huljic S, Lange M, Medlin L K. *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 20: 1349—1357
- [57] Miranda-Castro R, de los Santos-Alvarez P, Lobo-Castanon M J, Miranda-Ordieres A J, Tunon-Blanco P. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 4050—4055
- [58] Diaz-Gonzalez M, de la Escosura-Muniz A, Gonzalez-Garcia M B, Costa-Garcia A. *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 23: 1340—1346
- [59] Lin X H, Wan H Y, Zhang Y F, Chen J H. *Talanta*, 2008, 74: 944—950
- [60] Berganza J, Olabarria G, Garcia R, Verdoy D, Rebollo A, Arana S. *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22: 2132—2137