

文章编号: 1000-5862(2012)02-0180-05

新型凝血酶电化学传感器的制备

叶树虹, 郑文平, 赵素彩, 曾 丽, 余 琦, 李 成, 宋永海, 汪 莉*

(江西师范大学化学化工学院, 江西 南昌 330022)

摘要: 制备了金纳米粒子-核酸适体/凝血酶/巯基乙醇修饰的金电极, 测试了该修饰电极检测凝血酶含量的性能指标. 利用电化学技术研究了电极的构造对检测凝血酶含量的影响, 探究了最佳实验条件. 研究表明, 在最佳的实验条件下构筑的修饰电极检测凝血酶的线性范围为 1.0~10.0 nmol/L, 检测限为 0.2 nmol/L, 并模拟了实际样品进行检测. 该方法简便迅速, 有较高的检测灵敏度、较好的重复性和抗干扰性.

关键词: 核酸适配体; 金纳米颗粒; 凝血酶; 传感器

中图分类号: O 646

文献标志码: A

0 引言

凝血酶是生命体内重要而关键的蛋白质酶之一, 由于其在血液凝固和炎症等生理、病理过程中发挥重要作用而常用于毛细血管出血的局部止血和外科手术后的组织愈合. 衡量凝血酶凝血机制的重要指标是它的浓度及活性, 其浓度与活度也对揭示肿瘤的发生机制及作为早期诊断、疗效及愈后判断的依据具有重大意义^[1]. 在血液中凝血酶的浓度约为 nmol/L 数量级, 因此建立灵敏的检测方法是非常必要的^[2-3].

近年来, 基于核酸适体的凝血酶电化学传感器能高效、灵敏地检测凝血酶, 吸引了研究者的广泛关注. 核酸适体是通过指数富集配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术从人工构建的随机单链寡核苷酸文库里筛选出来的单链 DNA 或 RNA^[4], 它具有独特的 3 维结构, 能高效、特异性地识别和结合无机离子、生物大分子甚至药物等靶分子^[5-6]. 与传统的传感器识别元素相比, 它具有较高的稳定性、较好的重复性和可操作性^[7]. 但是核酸适体特异性结合凝血酶不能直接应用于传感器, 通常要将其转换成光、电等可测量的信号. 根据结合前后的电阻变化^[8]、质量变化^[9]、电流变化^[10]以及光变化^[11]构筑一系列的电化学传感器.

本研究首先将凝血酶通过物理吸附组装到 6-巯基乙醇修饰的金电极表面, 再将该电极放入核酸适体标记的金纳米颗粒(AuNPs)的溶液中培养, 然后将修饰在电极表面上的 AuNPs 在电化学反应池中氧化成 Au³⁺, 最后通过反向阴极扫描测定还原的 Au³⁺, 从还原峰电流计算出凝血酶的浓度. 这种利用核酸适体检测凝血酶的电化学方法设计简单, 不影响其与凝血酶的结合, 得到了较好的实验结果.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

电化学实验是在 CHI 660C 电化学工作站上完成的(上海辰华). 试验中使用了电极体系的电化学反应池, 以铂电极为对电极, 饱和甘汞电极(SCE)为参比电极, 金电极(Au)为工作电极. 本实验采用差分脉冲伏安法(DVP). Lameda 35 UV-Vis 光谱仪, SB 2200 型超声仪.

凝血酶(Thrombin, TB, Sigma), 6-巯基乙醇(6-Mercapto-1-hexanol, MCH, 97%, Sigma), 带巯基的核酸适体(aptamer, apt, 序列: 5'-SH-(CH₂)₆-TTC CAA CGG TTG GTG TGG TTG G-3', 宝生物公司), 柠檬酸钠, 氯金酸, 0.1 mol/L HCl, 10 mmol/L Tris-Acetate-EDTA buffer (TAE-NaCl, 含 10 mmol/L Tris-Acetate-EDTA, 50 mmol/L NaCl), 1.0 mol/L PBS (1.0 mol/L NaH₂PO₄ + 1.0 mol/L Na₂HPO₄), 所有试

收稿日期: 2011-11-23

基金项目: 国家自然科学基金(20905032, 21065005), 江西省自然科学基金(2008GZH0028), 江西省教育厅科技项目(GJJ10389), 电分析化学国家重点实验室基金(2008003)和江西师范大学大学生学术课题资助项目.

作者简介: 汪 莉(1975-), 女, 江西南昌人, 教授, 博士, 主要从事表面电化学、生物电化学研究.

剂均为分析纯, 使用前未经纯化.

1.2 实验过程

1.2.1 AuNPs的制备 量取10 mL超纯水于玻璃器皿中, 加热至沸腾后加入5 mL 0.024 mol/L的氯金酸溶液, 在快速均匀搅拌的同时加入5 mL的0.1 mol/L柠檬酸钠溶液. 此时不要停止加热和搅拌, 可观察到溶液颜色由原来的灰色变为蓝色, 然后又由蓝色又变为紫色, 最后变为酒红色. 这时停止加热但要继续搅拌, 直到溶液冷却至室温, 取溶液进行离心, 去除上清液. 溶液需在4 °C条件下保存.

1.2.2 核酸适体标记的AuNPs的制备 将带有巯基的核酸适体加入到1.0 mL的AuNPs溶液中, 在4 °C的冰箱中放置24 h, 使核酸适体中的巯基与AuNPs进行充分反应. 将反应液离心, 弃去上层清液. 用1.0 mol/L的PBS溶液洗涤沉淀, 再离心除去未反应的过量核酸适体, 即制得核酸适体标记的AuNPs (Au NPs-apt). 将制得的Au NPs-apt放入4 °C冰箱中保存备用.

1.2.3 修饰电极的制备 将抛光的金电极浸入到1.0 mmol/L MCH+1.0 mol/L PBS 溶液中活化, 使MCH通过Au—S键合到金电极表面形成自组装单层膜. 电极活化后需在凝血酶缓冲溶液中进行恒温培养. 再将电极浸入到Au NPs-apt溶液中进行培养, 制得修饰电极, 如图1所示.

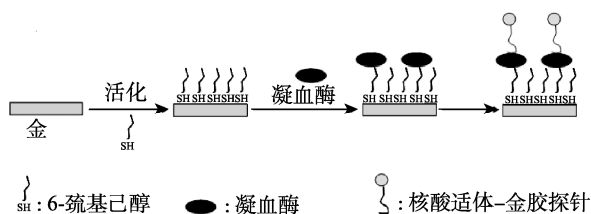


图1 电极修饰示意图

1.2.4 电化学扫描 在电化学反应池中加入 10.0 mL 0.1 mol/L 的 HCl 溶液, 在 1.25 V 恒电位下预氧化 2 min, 使 AuNPs 氧化成 Au^{3+} , 然后立即在 0.25~0.80 V 电位窗下用差分脉冲伏安法进行反向阴极扫描, 得到 Au^{3+} 还原的差分脉冲伏安曲线.

2 结果与讨论

2.1 Au NPs-apt 紫外-可见吸收光谱表征

图2中的 a、b、c 曲线分别为 AuNPs、核酸适体和 AuNPs-apt 的 UV-Vis 吸收光谱图. 由图2可知, AuNPs 在约 518 nm 处有特征紫外吸收峰(曲线 a). 而带有巯基的核酸适体在约 254 nm 处有吸收峰(曲线 b), 该峰为典

型的寡聚核苷酸的 UV-Vis 吸收峰. 当 AuNPs 与核酸适体反应一定时间后, 核酸适体通过巯基自组装到 AuNPs 表面, 粒子半径增大使吸收峰由 518 nm 处红移到约 528 nm 处. 在 254 nm 处产生新的寡聚核苷酸的吸收峰(曲线 c), 说明核酸适体已标记了 AuNPs.

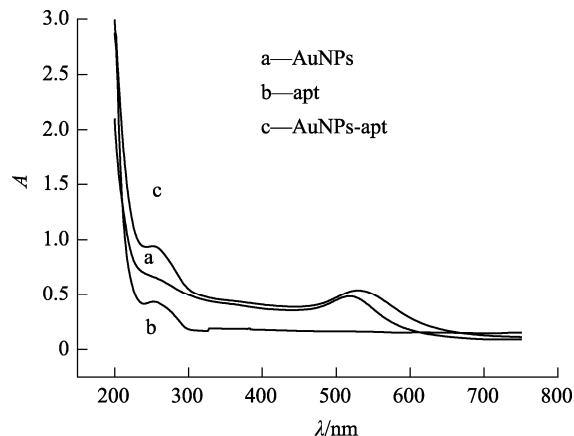


图2 UV-Vis 光谱图

2.2 实验条件的优化

2.2.1 电极活化时间的选择 图3为修饰电极在 1 mmol/L MCH+ 1.0 mol/L PBS 溶液中活化时间对传感器检测凝血酶性能的影响. 具体实验方案为: 将抛光的金电极浸入到 1 mmol/L MCH+ 1.0 mol/L PBS 溶液中活化, 取出后再将修饰有 MCH 的电极浸入到 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 凝血酶的 TAE+NaCl 溶液中, 在 37 °C 恒温槽中恒温培养 2 h, 再将电极浸入到 Au NPs-apt 溶液中进行培养; 最后将修饰好的电极放在 10 mL 0.1 mol/L HCl 溶液中, 在 1.25 V 恒电位下预氧化 2 min, 使 AuNPs 氧化成 Au^{3+} ; 然后立即在 0.25~0.80 V 电位窗下用差分脉冲伏安法进行反向阴极扫描, 得到 Au^{3+} 还原的差分脉冲伏安曲线, 如图3所示. 由图3可知, 随着培养时间的增加, Au^{3+} 的还原峰电流增大, 当培养时间为 2.5 h 时达到最大. 由图3的插图可知, 继续延长培养时间, Au^{3+} 还原峰的电流会逐渐减小. 这可能是由于随着金电极在 1 mmol/L MCH+ 1.0 mol/L PBS 溶液中的浸泡培养时间的增加, 电极表面的 MCH 也增加, 从而使凝血酶更多地固载到了电极表面, 使吸附到电极表面上的 AuNPs-apt 增加. 但是随着吸附到表面上的凝血酶进一步增加, 导致电极表面的凝血酶形成致密的单层膜. 由于受到空间位阻效应的影响, 凝血酶与核酸适体相互作用的效率下降, 因此固定到表面上的 AuNPs-apt 反而减少, 导致差分脉冲电流减小. 为了得到凝血酶最佳的检测效果, 在本实验中选择活化时间为 2.5 h.

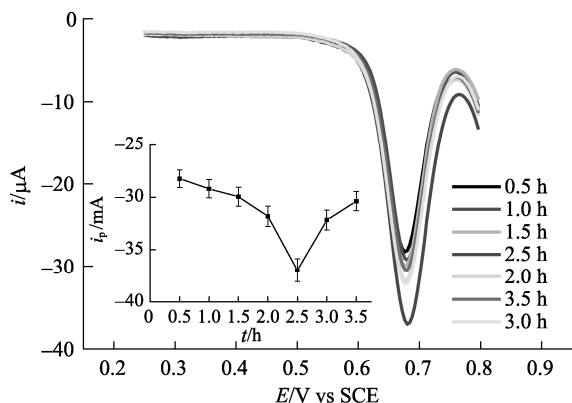


图3 金电极在 1.0 mmol/L MCH+1.0 mol/L PBS 溶液中培养时间对检测凝血酶的影响

2.2.2 电极凝血酶 (TAE+NaCl) 中培养时间的选择 图4为活化后的电极在凝血酶 (TAE+NaCl 培养液) 中培养时间对传感器检测凝血酶性能的影响. 由图4可知, 当培养时间从最初的15 min 逐渐增加时, Au^{3+} 的还原峰电流不断增加. 当培养时间达到1 h 时, Au^{3+} 的还原峰电流达到最大. 当培养时间再进一步增加, 还原峰电流就会逐渐减小, 这可能是由于在37 °C 时培养1 h 后, 固定到电极表面的凝血酶与溶液中的凝血酶已达到平衡. 当培养时间进一步增加, 会导致电极表面的凝血酶分子过于致密而影响凝血酶与核酸适体的相互作用或导致吸附的凝血酶脱落. 因此, 本实验选择在凝血酶培养液中培养的最佳时间为1 h.

2.2.3 凝血酶培养液的选择 图5为在电极的活化时间和凝血酶培养液的培养时间都为最佳的条件下, 不同凝血酶的培养液对传感器性能的影响. 实验中, 选择了以下几种培养液: TAE-NaCl, TAE- Mg^{2+} , PBS, PBS- Mg^{2+} , PBS- Mg^{2+} - Ca^{2+} - K^{+} . 由图5可知, 在TAE- Mg^{2+} 、PBS、PBS- Mg^{2+} 培养液中培养时电化学信号均较小,

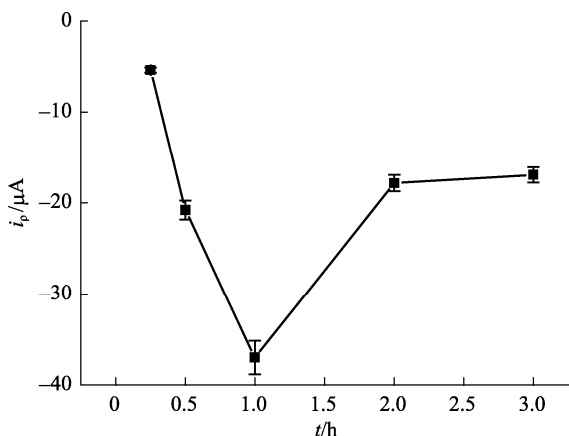


图4 修饰电极在TAE+NaCl 溶液中培养时间对检测凝血酶的影响

在 PBS- Mg^{2+} - Ca^{2+} - K^{+} 中培养时电化学信号较大, 而在 TAE-NaCl 中培养时电化学信号最大. 可能是由于在 TAE-NaCl 中培养时凝血酶更能保持其原有的结构, 从而有利于其与核酸适体的结合. 因此本实验选择 TAE-NaCl 为凝血酶的培养液.

2.2.4 凝血酶培养温度的选择 图6为凝血酶的培养温度对传感器性能的影响. 由图6可知, 从298 K 开始, 逐渐提高培养温度, 电化学信号也逐渐增大. 培养温度在303~310 K 时, 电化学信号变化不大. 当培养温度超过310 K 时, 电化学信号急速下降. 可能是由于在303~310 K 温度区间更适合凝血酶在电极表面的结合. 温度太低酶的活性不高, 而温度较高时会使酶发生变性, 从而影响凝血酶与适体的结合. 本实验选择306 K 为凝血酶的培养温度.

2.2.5 电极在 AuNPs-apt 中培养时间的选择 图7为修饰电极在 AuNPs-apt 中培养时间对传感器性能的影响. 由图7可知, 当培养时间为6 h 时, 电化学信号最大, 因此本实验选择6 h 为修饰电极在 AuNPs-apt 中培养的最佳时间.

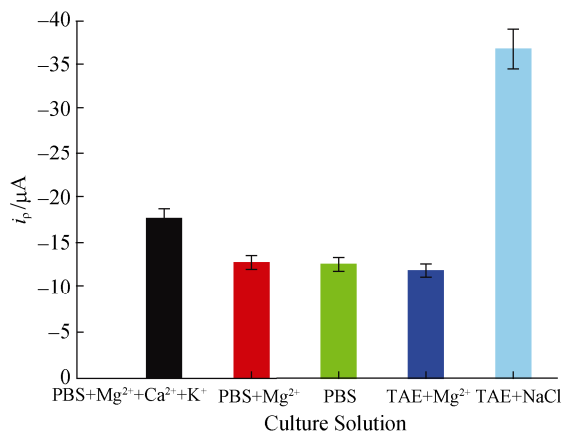


图5 凝血酶培养液的优化

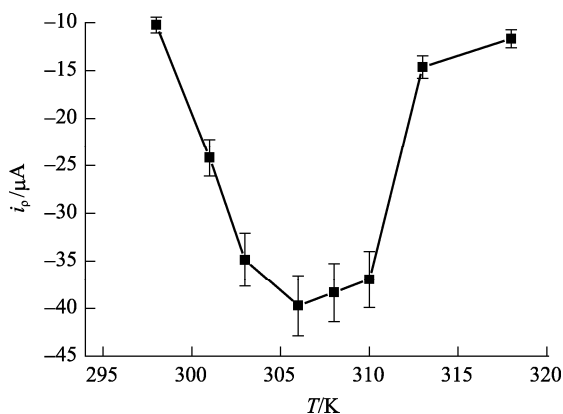


图6 凝血酶培养温度的对检测凝血酶的影响

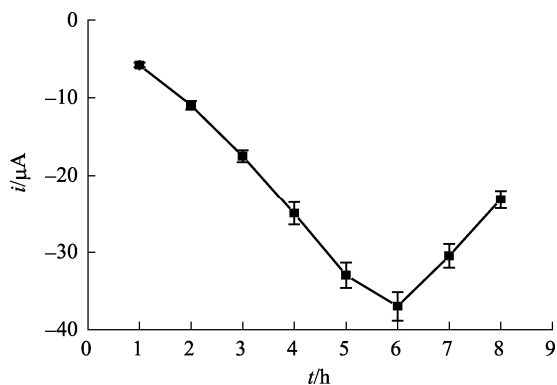


图 7 AuNPs-apt 中培养时间对检测凝血酶的影响

2.3 凝血酶的定量检测

本实验将一系列不同浓度的凝血酶在最佳实验条件下进行电化学检测。由图8可知,随着凝血酶浓度的增大,修饰电极还原峰面积也在逐渐增大。当凝血酶的浓度达到一定程度后,浓度继续增大,电极的还原峰面积将会变化平缓呈现平台。该传感器对凝血酶检测的线性范围为 1.0~10.0 nmol/L,这说明该传感器在较低范围内对凝血酶有较好的响应。其检测限为 0.2 nmol/L。当凝血酶浓度较高时,可以先将凝血酶稀释到适宜浓度再进行测定。

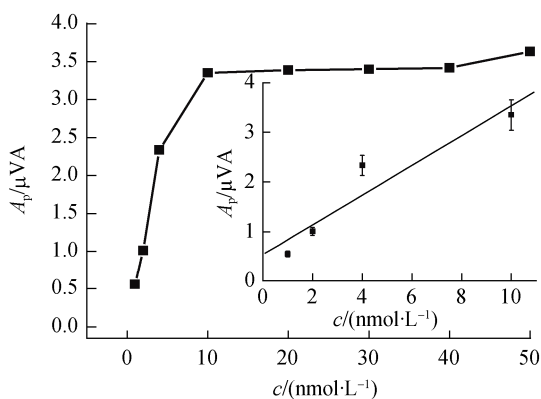


图 8 凝血酶的浓度与电极氧化面积的关系曲线图

2.4 特异性和重复性

本实验还研究了 SO_4^{2-} 和 NO_3^- 硝酸根离子等无机离子对传感器检测凝血酶的干扰,结果表明这些离子对检测结果无干扰。该电极对 2 nmol/L 凝血酶连续进行 7 次测定,相对标准偏差为 5.8%。

2.5 样品分析

为了考察该传感器实际应用的可能性,模拟实际样品进行了检测。在空白缓冲溶液中,分别加不同浓度的凝血酶标准溶液,用本文构建的传感器进

行检测,结果如表 1 所示。回收率为 98.0%~101.3%,说明该法的精确性、重复性较好,具有实际应用的价值。

表 1 缓冲溶液中凝血酶回收率

| | 加标量/(nmol·L ⁻¹) | 检测量/(nmol·L ⁻¹)* | 回收率/% |
|----------|-----------------------------|------------------------------|-------|
| Thrombin | 1.0 | 0.98 | 98.0 |
| | 3.0 | 3.04 | 101.3 |
| | 5.0 | 4.97 | 99.4 |
| | 8.0 | 7.95 | 99.4 |
| | 10.0 | 10.06 | 101.0 |

*表中所列数据为 3 次测量的平均值。

3 结论

利用核酸适体标记的 AuNPs 与固载在电极表面上的凝血酶相互作用,将修饰在电极表面上的 AuNPs 氧化成 Au^{3+} ,通过反向阴极扫描还原 Au^{3+} ,利用其还原峰电流计算出凝血酶的浓度构建了高灵敏、重复性好的凝血酶电化学传感器。该实验操作简单、快速,并能特异性地检测凝血酶。结果表明,在最佳的实验条件下构筑的凝血酶传感器检测凝血酶的线性范围为 1.0~10.0 nmol/L。本方法构建的传感器,只要改变适体-AuNPs 探针中的核酸适体部分,即可有望用于其它蛋白质的分析,为蛋白质的检测提供了新的思路 and 手段。

4 参考文献

- [1] Tu Yonghua, Cheng Guifang, Lin Li, et al. Detection of thrombin with a novel nanobiosensor based on aptamer fluorescence [J]. Chem J Chinse U, 2006, 27(12): 2266-2270.
- [2] Zheng Jing, Cheng Guifang, He Pingang, et al. An aptamer-based assay for thrombin via structure switch based on gold nanoparticles and magnetic nanoparticles [J]. Talanta, 2010, 80 (5): 1868-1872.
- [3] Tao Bing, Liu Xiangjun, Cheng Xiaohong, et al. Bifunctional combined aptamer for simultaneous separation and detection of thrombin [J]. Biosens Bioelectron, 2010, 25(6): 1487-1492.
- [4] Wu Zaisheng, Guo Mengmeng, Zhang Songbai, et al. Reusable electrochemical sensing platform for highly sensitive detection of small molecules based on structure-switching signaling aptamers [J]. Anal Chem, 2007, 79(7): 2933-2939.
- [5] Mir M, Vreeke M, Katakis I. Different strategies to develop an electrochemical thrombin aptasensor [J]. Electrochem Commun,

- 2006, 8(3): 505-511.
- [6] Wu Zaisheng, Zheng Fan, Shen Guoli, et al. A hairpin aptamer-based electrochemical biosensing platform for the sensitive detection of proteins [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(15): 2950-2955.
- [7] Tombelli S, Minunni M, Mascini M. Analytical application of Aptamers [J]. *Biosens Bioelectron*, 2005, 20(12): 2424-2434.
- [8] Cai Hong, Lee Thomas Minghung, Hsing I-Ming. Label-free protein recognition using an aptamer-based impedance measurement assay [J]. *Sens Actuat B*, 2006, 114: 433-437.
- [9] Bini A, Minunni M, Tombelli S, et al. Analytical performance of aptamer-based sensing for thrombin detection [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(7): 3016-3019.
- [10] He Pingli, Shen Li, Cao Yunhe, et al. Ultrasensitive electrochemical detection of proteins by amplification of aptamer-nanoparticle bio bar codes [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(21): 8024-8029.
- [11] Huang Haiping, Zhu Junjie. DNA aptamer-based QDs electrochemiluminescence biosensor for the detection of thrombin [J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 25(4): 927-930.

The Preparation of the Novel Electrochemical Biosensor for Thrombin Detection

YE Shu-hong, ZHENG Wen-ping, ZHAO Su-cai, ZENG Li, YU Qi, LI Cheng, SONG Yong-hai, WANG Li*

(College of Chemistry & Chemical Engineering, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China)

Abstract: This work prepared an AuNPs-aptamer/thrombin/6-mercapto-1-hexanol modified Au electrode and measured some parameters for the electrochemical detection of thrombin. Electrochemical technique was used to investigate the construction of the modified electrode and its effects on thrombin detection and explored the optimal experiment conditions. The results indicated that the modified electrode showed a good linear relationship between the peak current and the concentration of thrombin in the range of 1.0~10.0 nmol/L with a detection limit of 0.2 nmol/L. And the modified electrode was applied in the detection of analogous thrombin samples. It was found that the resulted sensor had high sensitivity, good reproducibility and anti-interference.

Key words: aptamer; AuNPs; thrombin; biosensor

(责任编辑: 刘显亮)