

半胱氨酸封闭剂为电化学探针的 非标记型核酸适配体传感器

杨绍明* 查文玲 李 红 孙 清 刘 斌 郑龙珍

(华东交通大学基础学院化学化工系 南昌 330013)

摘 要 采用半胱氨酸为封闭剂和氧化还原电化学探针,制备了一种新型的非标记型电化学核酸适配体传感器,并用于测定凝血酶。利用电化学阻抗对传感器的组装过程进行了监测。用循环伏安法和差分脉冲伏安法研究了该传感器的电化学行为。探讨了凝血酶孵育时间、测试 pH 值对传感器响应的影响。该传感器对凝血酶在 10.0 ~ 10000 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好的线性响应,检测限为 2.47 $\mu\text{g/L}$ 。

关键词 半胱氨酸,封闭剂,氧化还原探针,核酸适配体,生物传感器

中图分类号:O657.1

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2013)05-0549-06

DOI:10.3724/SP.J.1095.2013.20299

凝血酶是一种普遍存在于哺乳动物中的凝结蛋白,人的凝血酶由分子量 31 kDa 的 A 链和 5.7 kDa 的 B 链通过双硫键组成。凝血酶不仅能将纤维蛋白原转化为不溶的纤维蛋白而形成纤维蛋白凝胶,同时又具有类似于激素的特性能影响血小板的活性。过多的凝血酶将诱发血栓并在心血管疾病中扮演着重要角色^[1],而过少的凝血酶又将导致流血不止。凝血酶含量的检测对于疾病诊断和药物研究均十分重要^[2-3]。传统凝血酶的检测方法主要是利用抗原-抗体之间的免疫反应,近年来,由人工合成、不依赖于动物或细胞获得的核酸适配体在检测凝血酶方面的研究受到了极大关注^[4-5]。与抗体比较,核酸适配体对靶分子具有高度亲和力、专一性的识别能力和空间位阻小等优点,核酸适配体还具有分子量小、可重复利用和稳定性良好等优点^[6-7]。

电化学核酸适配体传感器,由于其具有简单、快速、灵敏、成本低廉和易于实现微型化等优点,近年来受到众多研究者的青睐^[8-10]。根据是否采用标记物产生检测信号,电化学核酸适配体传感器可分为标记型和非标记型。标记型核酸适配体传感器的标记过程复杂、花费高,而且在一定程度上会影响适配体和目标分子的结合亲和力^[11]。因此,构建简单、价廉和灵敏的非标记型电化学核酸适配体传感器具有重要的意义。

L-半胱氨酸(Cys)是自然存在的唯一具有自由巯基的氨基酸^[12],通过巯基可以非常牢固的自组装于金表面。目前,半胱氨酸在金电极表面组装的报道主要集中在研究半胱氨酸作为连接剂固定纳米粒子和生物分子,及作为电化学催化剂检测底物。Wang 等^[13]研究了尿酸在 Cys 组装膜修饰电极上的电化学行为。付崇岗等^[14-15]研究发现,半胱氨酸在金电极表面的组装膜在 0.2 V 附近有一对稳定的氧化还原峰,并研究了其对抗坏血酸的电催化作用。

在制备电化学核酸适配体传感器时,2-巯基乙醇、6-巯基己醇、己硫醇和牛血清白蛋白常用作封闭剂,封闭电极表面未被核酸适配体覆盖的空余位点,防止传感器表面上的非特异性吸附^[16-17]。使用上述封闭剂的电化学核酸适配体传感器需另引入氧化还原电化学探针来检测适配体传感器结合目标分子前后的信号变化。本文采用半胱氨酸这种新型的封闭剂防止电极表面的非特异性吸附,同时,以封闭剂半胱氨酸作为氧化还原电化学探针,来检测适配体传感器结合目标分子前后的信号变化,构建非标记型电化学核酸适配体传感器,并用该传感器研究检测凝血酶的性能。

2012-07-06 收稿,2012-08-27 修回

国家自然科学基金(21065004)、江西省自然科学基金(2009GQH0022)和江西省教育厅科技项目(GJJ12304)资助

通讯联系人:杨绍明,副教授;Tel:0791-7046336;Fax:0791-7046320;E-mail:yangsm@yahoo.cn;研究方向:化学/生物传感器

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

人的凝血酶 (HTB) (10 U/mg, 北京鼎国昌盛生物技术有限公司); 凝血酶适配体 (TBA), 5'-HS-(CH₂)₆-CCAACGGTTGCTGTGTTGG-3' (HPLC 纯化, 生工生物工程(上海)有限公司); L-半胱氨酸 (含量 > 98.5%, 上海蓝季科技发展有限公司); 辣根过氧化物酶 (HRP, ≥ 250 U/mg, 上海三杰生物技术有限公司); 牛血清白蛋白 (BSA, 组分 V, 上海晶纯实业有限公司); 其它试剂均为分析纯。

CHI660C 型电化学工作站 (上海辰华仪器公司); 三电极体系 (铂电极为对电极, Ag/AgCl 为参比电极, 2 mm 直径金电极为工作电极)。

1.2 修饰电极的制备

将金电极先用平均粒径为 0.05 μm 的 Al₂O₃ 砂浆抛光打磨, 然后用蒸馏水清洗, 再于 Piranha 溶液 (V(浓 H₂SO₄):V(30% H₂O₂) = 3:1) 中浸泡 5 min, 取出洗涤, 再于 0.1 mol/L H₂SO₄ 中进行循环伏安扫描, 扫描范围为 1.4 ~ -0.2 V, 直至得到稳定的可重复的循环伏安曲线, 得到的金电极蒸馏水洗后直接用于组装。

将预处理后的金电极浸入 4 ℃ 中保存的 1 μmol/L 的凝血酶适配体中组装 1 h, 取出后用蒸馏水洗净后浸入 0.5 g/L L-半胱氨酸溶液中组装 10 h。

1.3 电化学检测

将制得的金-凝血酶适配体-(L-半胱氨酸) (Au-TBA-Cys) 电极置于 pH = 5.4 的 HAc-NaAc 缓冲溶液中, 使用三电极系统, 采用循环伏安法 (CV) 和差分脉冲伏安法 (DPV) 进行扫描, 用蒸馏水清洗后浸入 pH = 5.4 的 HAc-NaAc 缓冲溶液配制的凝血酶溶液中孵育 40 min 后采用 CV 和 DPV 进行扫描。

电化学阻抗谱 (EIS) 是在含有 0.1 mol/L KCl 的 5 mmol/L K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ (体积比 1:1) 氧化还原探针溶液中测定得到 (振幅: 0.005 V, 频率范围: 1 ~ 10⁵ Hz), 并通过 Zsimpwin 软件拟合而成。

2 结果与讨论

2.1 电化学阻抗谱表征

EIS 为一种研究修饰电极表面性质的有效方法, 常用于电极上组装过程的表征^[18]。图 1 为采用电化学阻抗对 Au-TBA-Cys 电极的组装过程进行表征的阻抗谱图, 在电化学阻抗谱中, 高频区的半圆部分受电子转移控制, 半圆的直径对应于电子转移阻抗 R_{ct} (见图中等效电路图), 低频区的直线部分受扩散控制。随着组装过程的进行电化学阻抗也随之发生变化, 裸金电极呈现一个很小的半圆, 说明是受扩散控制过程 (图 1a); 当组装适配体之后, 半圆直径变大, 说明带负电的适配体能很顺利的通过 Au-S 键组装上电极而阻碍带负电氧化还原探针的电子传递 (图 1b); 再组装 L-半胱氨酸后, 半圆直径变小, 虽然半胱氨酸的等电点为 5^[15], 在阻抗测试溶液中半胱氨酸分子带负电荷, 但由于半胱氨酸与金电极形成 Au-S 键会改变半胱氨酸分子的电子共轭性质, 使半胱氨酸分子中的氨基带正电荷有效促进负电荷探针在电极表面反应^[19]。

2.2 核酸适配体传感器的电化学性质

2.2.1 扫速对修饰电极的影响 图 2A 为 Au-TBA-

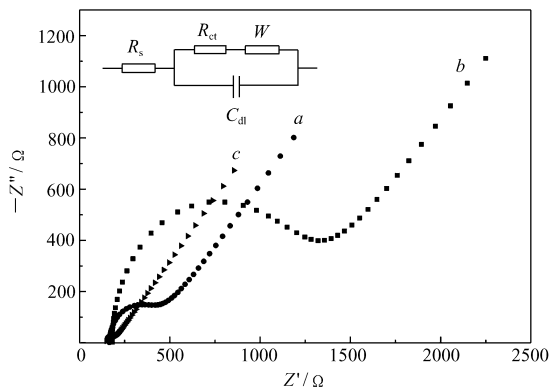


图 1 电极在 5 mmol/L K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (1:1) 含 0.1 mol/L KCl 溶液中的电化学阻抗图

Fig. 1 EIS response of the electrode in 5 mmol/L K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (1:1) in 0.1 mol/L KCl solution

a. Au; b. Au-TBA; c. Au-TBA-Cys

Cys 电极在 0.01 ~ 1 V/s 扫速下的循环伏安曲线,图 2B 为峰电流对扫速的关系图,发现氧化和还原电流大小与扫速成正比,由此可知,*L*-半胱氨酸的氧化还原是一个受表面控制的过程。

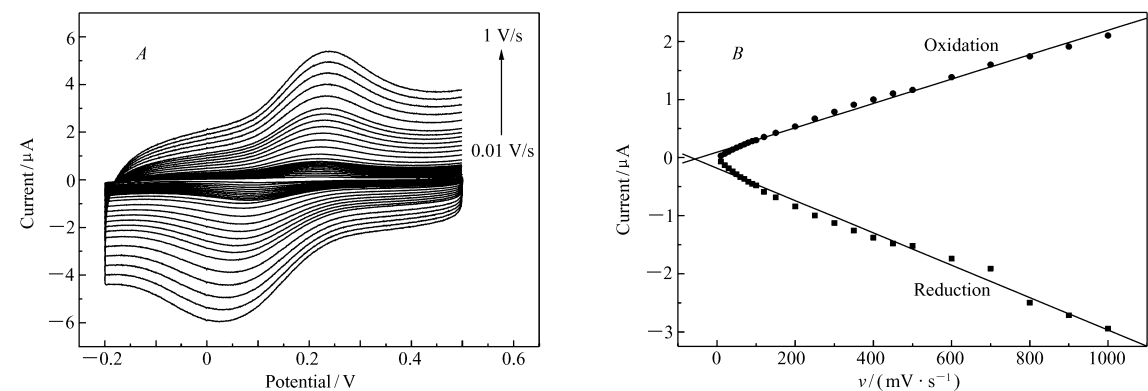


图 2 Au-TBA-Cys 电极在不同扫速下的循环伏安曲线(A)和峰电流与扫速的关系(B)

Fig.2 Cyclic voltammograms of the Au-TBA-Cys electrode at different scan rates(A) and relationship between peak current and scan rate(B)

2.2.2 凝血酶的检测原理 用循环伏安法和电化学阻抗谱表征了该传感器对凝血酶的结合行为,如图 3A所示,将 Au-TBA-Cys 电极浸入 5000 μg/L 凝血酶溶液中孵育 40 min 后进行 CV 测试,发现 CV 电流大幅下降。另外,用 EIS 对凝血酶与适配体结合过程进行了表征,EIS 中半圆的直径对应于电子转移阻抗 R_{et} ,它控制着氧化还原探针在电极表面的电子传递速度。从图 3B 可见,Au-TBA-Cys 电极结合凝血酶后,半圆直径明显变大,说明凝血酶在凝血酶适配体的存在下能很好的组装到电极表面并对电极表面产生影响,阻碍电子传递。

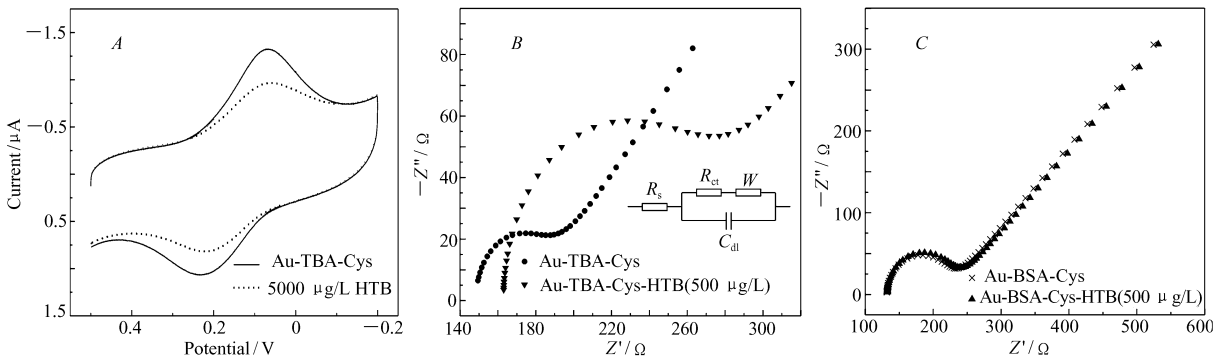


图 3 Au-TBA-Cys 电极与 HTB 结合的循环伏安曲线(A)和电化学阻抗谱(B),Au-BSA-Cys 电极与 HTB 结合的电化学阻抗谱(C)

Fig.3 Cyclic voltammety curves (A) and EIS spectra (B) of Au-TBA-Cys electrode before and after HTB combination, EIS spectra of Au-BSA-Cys electrode before and after HTB combination(C)

将凝血酶适配体用 BSA 代替构建了 Au-BSA-Cys 电极,采用 EIS 对其与凝血酶的非特异性吸附进行了表征。如图 3C 所示,Au-BSA-Cys 电极在凝血酶溶液中孵育后,其阻抗没有发生变化,说明封闭剂半胱氨酸可有效消除凝血酶的非特异性吸附。

结合 CV 和 EIS 表征,电化学核酸适配传感器的检测原理示意图如图 4 所示。在结合凝血酶前,电极表面的 *L*-半胱氨酸分子可以很顺利的发生氧化还原反应,产生信号。结合凝血酶后,凝血酶覆盖在电极表面,阻碍 *L*-半胱氨酸分子的电子的传递路径,信号减小。

2.3 实验条件的优化

实验中考察了孵育时间和孵育液 pH 值对传感器的影响。

图 5 所示为传感器在 500 μg/L 凝血酶中的孵育时间与 DPV 峰电流关系图。从图 5 可见,孵育时间

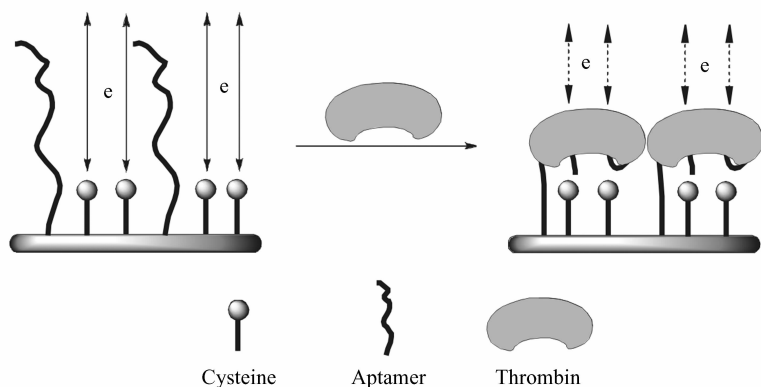


图4 适配体传感器的工作原理示意图

Fig. 4 Working mechanism of the aptasensor

达到 40 min 时, DPV 峰电流下降至趋于稳定的值, 说明凝血酶与适配体的作用基本饱和, 在同时考虑效率和效果两个方面的情况下, 选择 40 min 作为孵育时间。

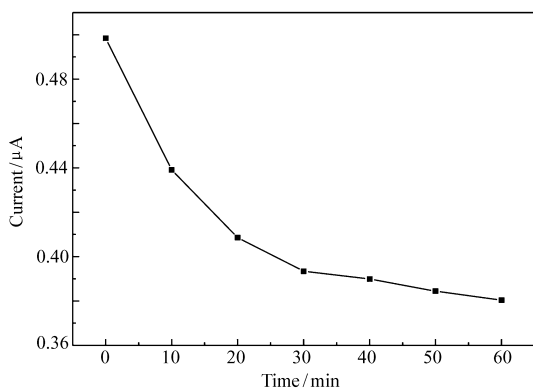


图5 孵育时间对适配体传感器电流响应的影响

Fig. 5 Influence of the incubation time on the current response of the aptasensor

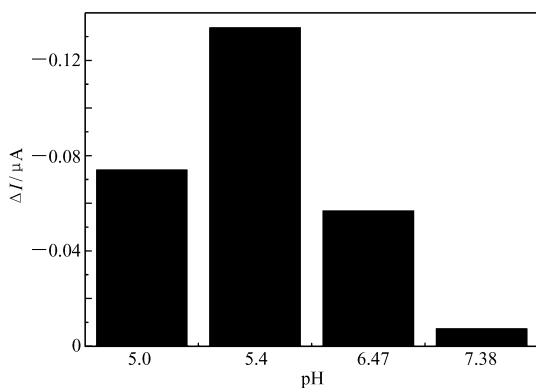


图6 pH值对适配体传感器性能的影响

Fig. 6 Effect of pH on the performance of the aptasensor

图6为通过改变测试底液的pH值,考察传感器对500 μg/L凝血酶的DPV效果图。实验发现pH值为5.4时,传感器的性能最好,电流响应最大。这可能是由于半胱氨酸的等电点约为5^[15], pH值为5.4时,可以形成稳定的含有较多电活性的半胱氨酸膜。在pH=4.6时半胱氨酸的峰不稳定。pH值太高或太低,由于分子间静电力和氢键作用的减小,双层膜中的第二层半胱氨酸分子将逐渐脱落。因此,选择pH=5.4的醋酸缓冲液作为检测凝血酶的测试溶液。

2.4 电化学核酸适配体传感器的性能

图7为优化条件下传感器对不同浓度凝血酶检测的DPV图。在10.0~10000 μg/L的范围内有响应。20000 μg/L的凝血酶与10000 μg/L的凝血酶电流值几乎重合,证明此传感器在10000 μg/L的凝血酶中已经接近饱和。

图8为DPV电流差值数据对凝血酶浓度的关系图,插图为电流差值对lg ρ的关系图^[17,20-21]。从图8可以看出,凝血酶浓度在10.0~10000 μg/L范围内ΔI-lg ρ具有很好的线性关系,线性相关系数R=0.995,线性方程为ΔI=0.03846-0.06105lg ρ

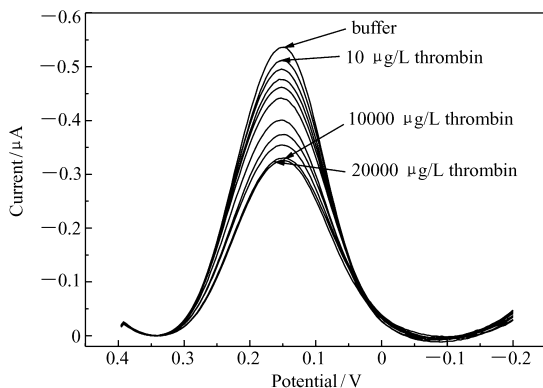


图7 传感器对不同浓度凝血酶的DPV响应图

Fig. 7 DPV responses of the sensing interface to thrombin at different concentrations

(ΔI 单位为 μA , ρ 的单位为 $\mu g/L$)。检测限为 $2.47 \mu g/L$ ($S/N=3$)。

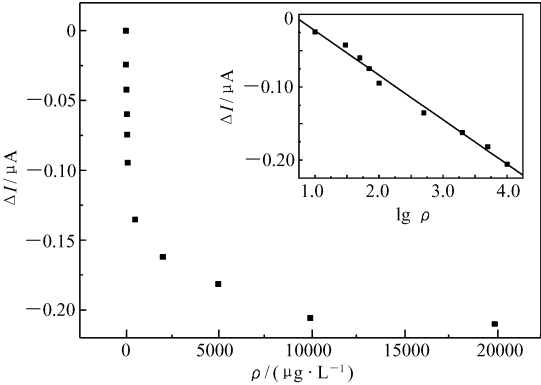


图 8 传感器对不同浓度凝血酶响应(插图为电流响应对 $\lg \rho$ 的线性拟合图)
Fig.8 Relative responses of the sensor to thrombin at different concentrations (inset: linear range from $10.0 \mu g/L$ to $10000 \mu g/L$)

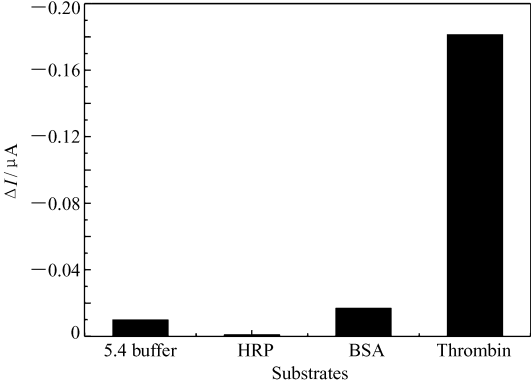


图 9 传感器对不同物质的响应
Fig.9 Control experiment for Buffer $5000 \mu g/L$ HRP, $5000 \mu g/L$ BSA and $5000 \mu g/L$ thrombin

2.5 干扰和稳定性

L-半胱氨酸修饰电化学核酸适配体传感器分别在 $pH=5.4$ 的醋酸缓冲溶液中, $pH=5.4$ 的醋酸缓冲溶液配制的浓度为 $5000 \mu g/L$ 的 HRP、BSA 和凝血酶中孵育 40 min 的响应对比见图 9。从图 9 可知, 空白、同浓度下辣根过氧化物酶和牛血清蛋白等对凝血酶传感器的干扰均非常小, 传感器的抗干扰能力强。

此电化学核酸适配体传感器室温保存于 $pH=5.4$ 的缓冲溶液中, 每隔 2 d 在 $pH=5.4$ 的缓冲溶液中测试 1 次, 14 d 后信号为原来的 93.6% 。说明此电化学核酸适配体传感器的稳定性很好。重复制备 5 个电极测定 5 次 $500 \mu g/L$ HTB, 相对标准偏差为 5.8% 。

3 结 论

采用半胱氨酸新型封闭剂封闭电极表面未被核酸适配体覆盖的空余位点, 防止传感器表面上的非特异性吸附, 同时利用封闭剂为氧化还原电化学探针, 构建了非标记型核酸适配体传感器。电化学阻抗谱表征了传感器的组装过程, 循环伏安法和差分脉冲法研究了传感器的电化学行为, 结果表明, 该传感器可有效地检测凝血酶。该传感器对凝血酶在 $10.0 \sim 10000 \mu g/L$ 范围内呈良好的线性响应, 检测限为 $2.47 \mu g/L$ 。该传感器具有良好的抗干扰性、稳定性和重现性。

参 考 文 献

[1] Stubbs M T, Bode W. A Player of Many Parts; the Spotlight Falls on Thrombin's Structure[J]. *Thromb Res*, 1993, **69**(1): 1-58.
[2] Centi S, Tombelli S, Minunni M, et al. Aptamer-based Detection of Plasma Proteins by an Electrochemical Assay Coupled to Magnetic Beads[J]. *Anal Chem*, 2007, **79**(4): 1466-1473.
[3] Wang C, Hossain M, Ma L, et al. Highly Sensitive Thermal Detection of Thrombin Using Aptamer-functionalized Phase Change Nanoparticles[J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, **26**(2): 437-443.
[4] Yuan Y, Yuan R, Chai Y, et al. A Novel Label-free Electrochemical Aptasensor for Thrombin Based on the {Nano-Au/thionine}_n Multilayer Films as Redox Probes[J]. *Anal Chim Acta*, 2010, **668**(2): 171-176.
[5] Du Y, Chen C, Li B, et al. Layer-by-layer Electrochemical Biosensor with Aptamer-appended Active Polyelectrolyte Multilayer for Sensitive Protein Determination[J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, **25**(8): 1902-1907.
[6] Sassolas A, Blum L J, Leca-Bouvier B D. Electrochemical Aptasensors[J]. *Electroanalysis*, 2009, **21**(11): 1237-1250.
[7] Hianik T, Wang J. Electrochemical Aptasensors-Recent Achievements and Perspectives [J]. *Electroanalysis*, 2009, **21**(11): 1223-1235.
[8] Lai R Y, Plaxco K W, Heeger A J. Aptamer-Based Electrochemical Detection of Picomolar Platelet-Derived Growth Factor

- Directly in Blood Serum[J]. *Anal Chem*, 2007, **79**(1):229-233.
- [9] Ikebukuro K, Kiyohara C, Sode K. Novel Electrochemical Eensor System for Protein Using the Aptamers in Sandwich Manner[J]. *Biosens Bioelectron*, 2005, **20**(10):2168-2172.
- [10] Mir M, Vreeke M, Katakis I. Different Strategies to Develop an Electrochemical Thrombin Aptasensor[J]. *Electrochem Commun*, 2006, **8**(3):505-511.
- [11] Wang L, Zhu C, Han L, *et al.* Label-free, Regenerative and Sensitive Surface Plasmon Resonance and Electrochemical Aptasensors Based on Graphene[J]. *Chem Commun*, 2011, **47**(27):7794-7796.
- [12] Santos E, Avelle L B, Scurtu R, *et al.* L-Cysteine Films on Ag(111) Investigated by Electrochemical and Nonlinear Optical Methods[J]. *Chem Phys*, 2007, **342**(1/3):236-244.
- [13] Wang Y. An Innovative Electrochemical Approach for Voltammetric Determination of Levodopa Using Gold Nanoparticles Doped on Titanium Dioxide Nanotubes[J]. *Microchim Acta*, 2011, **172**(3/4):419-424.
- [14] FU Chonggang, SU Changhua, SHAN Ruifeng. Electrocatalytic Oxidation and Determination of Ascorbic Acid on the L-Cysteine Self-Assembled Bilayer Modified Gold Electrode Surface[J]. *Chinese J Anal Chem*, 2004, **32**(10):1349-1352 (in Chinese).
傅崇岗, 苏昌华, 单瑞峰. L-半胱氨酸自组装膜修饰金电极对抗坏血酸的电催化作用及其测定[J]. *分析化学*, 2004, **32**(10):1349-1352.
- [15] FU Chonggang, SU Changhua, SHAN Rifeng. Electrochemical Properties of L-Cysteine Self-Assembly Membrane Modified Gold Electrode[J]. *Acta Phys Chim Sin*, 2004, **20**(2):207-210 (in Chinese).
傅崇岗, 苏昌华, 单瑞峰. L-半胱氨酸自组装膜修饰金电极的电化学特性[J]. *物理化学学报*, 2004, **20**(2):207-210
- [16] SHANGGUAN Li, QI Honglan, LING Chen. Label-free and Sandwich Aptamer-based Electrochemical Biosensor for the Determination of Cocaine[J]. *Acta Chim Sin*, 2011, **69**(18):2196-2200 (in Chinese).
上官莉, 漆红兰, 凌晨. 非标记夹心式电化学可卡因适体传感器的研究[J]. *化学学报*, 2011, **69**(18):2196-2200.
- [17] Yuan Y, Gou X, Yuan R, *et al.* Electrochemical Aptasensor Based on the Dual-amplification of G-Quadruplex Horseradish Peroxidase-mimicking DNA Zyme and Blocking Reagent-Horseradish Peroxidase[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, **26**(10):4236-4240.
- [18] Katz E, Alfonta L, Willner I. Chronopotentiometry and Faradaic Impedance Spectroscopy as Methods for Signal Transduction in Immunosensors[J]. *Sens Actuators B*, 2001, **76**(1/3):134-141.
- [19] Li Q, Gao H, Wang Y, *et al.* Studies on Self-Assembly Monolayers of Cysteine on Gold by XPS, QCM, and Electrochemical Techniques[J]. *Electroanalysis*, 2001, **13**(16):1342-1346.
- [20] Kang Y, Feng K J, Chen J W, *et al.* Electrochemical Detection of Thrombin by Sandwich Approach Using Antibody and Aptamer[J]. *Bioelectrochemistry*, 2008, **73**(1):76-81.
- [21] Bai L, Yuan R, Chai Y, *et al.* Platinum-gold Alloy Nanoparticles and Horseradish Peroxidase Functionalized Nanocomposite as a Trace Label for Ultrasensitive Electrochemical Detection of Thrombin[J]. *Anal Chim Acta*, 2011, **698**(1/2):14-19.

Label-free Aptamer Biosensor Based on Cysteine Blocker as the Electrochemical Redox Probe

YANG Shaoming*, ZHA Wenling, LI Hong, SUN Qing, LIU Bin, ZHENG Longzhen
(Department of Chemistry and Chemical Engineering, School of Basic Sciences,
East China Jiaotong University, Nanchang 330013, China)

Abstract A novel label-free electrochemical aptamer biosensor was developed by using cysteine blocker as the electrochemical redox probe, and was used for the determination of thrombin. Electrochemical impedance spectroscopy was used to monitor the self-assembly process of aptamer biosensor. The electrochemical behaviors of the biosensor were characterized by the cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry. The effects of the incubation time and test pH were investigated on the response of aptamer biosensor. The biosensor shows a good linear range of 10.0 ~ 10000 $\mu\text{g/L}$ for thrombin with a detection limit of 2.47 $\mu\text{g/L}$.

Keywords cysteine, blocker, redox probe, aptamer, biosensor