基于核酸适配体和纳米材料的凝血酶蛋白特异性识别电化学生物传感器

郑 静① 林 莉① 程圭芳① 王安宝② 谭雪莲① 何品刚①* 方禹之①*

(① 华东师范大学化学系, 上海 200062; ② 中国科学院上海硅酸盐研究所, 上海 200050)

摘要 介绍了一种结合核酸适配体技术和纳米技术,以凝血酶蛋白为研究对象的高效、高灵敏、特异性识别蛋白质的电化学生物传感器. 利用金纳米颗粒标记的核酸适配体以及被固定在磁性纳米颗粒上的核酸适配体与凝血酶蛋白同时结合形成磁性颗粒/凝血酶/纳米金胶的三明治结构, 利用磁性分离, 将金胶纳米颗粒特异性地吸着到电极表面, 通过检测电极上金胶的电化学信号, 实现对凝血酶靶蛋白的检测. 这种生物传感器对凝血酶蛋白具有很高的特异性识别能力, 其检测不受其他蛋白质如牛血清白蛋白等存在的干扰, 可应用于实际血浆中凝血酶的检测. 由于利用磁性纳米颗粒使得分离、富集和测定在同一个自制的电化学反应池中进行, 其操作不仅简单, 而且检测的灵敏度得到提高. 该蛋白质生物传感器的线性范围为 $5.6\times10^{-12}\sim1.12\times10^{-9}$ mol/L, 检测限可以达到 1.42×10^{-12} mol/L.

关键词 核酸适配体 纳米材料 凝血酶 电化学 传感器

1 引言

随着人类基因组计划(HGP)的顺利完成, 人类进入了后基因组时代, 生命科学从确定核酸(DNA, RNA)序列层次深入到功能基因组研究和蛋白质组学研究上来[1]. 如何构建高速度、高通量、集约化、有特异性的高灵敏蛋白质检测技术是目前蛋白质组学研究所面临的紧迫任务[2,3]. 而基于抗体-抗原反应识别蛋白质的传统技术受到了以下两方面的限制: (ⅰ) 不是所有的蛋白质分子都能得到与之相对应的专一、高效结合的抗体; (ⅱ) 生物体细胞内蛋白质含量极低, 检测灵敏度不够. 所以, 到目前为止还难以构建起完全以抗体为识别元件的高灵敏蛋白质检测技术用于蛋白质组学研究[4,5]. 与此相比较, 核酸适配体(DNA aptamer)技术正成为一种新型的蛋白质识别技术[6,7].

核酸适配体(也称适配子)是一类能与蛋白质等靶物质特异性结合的寡聚核苷酸片段, 对目标分子具有高度亲和力和专一性的识别能力[8,9]. 核酸适配

收稿日期: 2005-12-07; 接受日期: 2006-08-06
* 联系人, E-mail: yzfang@chem.ecnu.edu.cn, pghe@chem.ecnu.edu.en

体通常可由组合化学合成, 具有化学稳定性好, 易保存等优点. 而由生物有机体产生的抗体对外界温度敏感, 活性保存期有限, 且固定时活性易受损. 因此, 基于核酸适配体识别不同疾病基因蛋白质分子的蛋白质传感器的研究和发展相应的诊断技术受到人们极大的关注 [10]. 目前国外已有利用比色法 [11]、荧光检测法 [12]、晶体石英微天平方法 [13]、电化学方法 [14~17] 等的基于核酸适配体的蛋白质检测技术报道, 并且相关的蛋白质识别技术正在迅速地发展.

纳米磁性粒子作为一种新型的亲和性固相载体功能纳米材料, 作为基因载体有着优越的特性, 在生物检测和药物分析上有着重要的应用 [18,19]. 我们课题组 [20]用自制的纳米磁性颗粒, 研究了基于磁性分离的DNA生物传感器, 实现了对DNA互补和错配的识别和检测. 金胶有很大的比表面积和很好的生物相容性, 是一种应用广泛的抗原、抗体和细胞标记物 [21,22], 由于有优异的电化学响应, 作为电化学标识记, 可提高电化学生物传感器的灵敏度 [23]. 在本文中, 介绍一种结合核酸适配体技术和纳米技术, 以凝血酶(thrombin)蛋白为研究对象的高效、高灵敏、特异性识别蛋白质的电化学生物传感器. 凝血酶蛋白与核酸适配体有 2 个特异性结合位点, 相对应有 2 个核酸适配体 [24]. 在实验过程中, 核酸适配体 I 被固定在纳米磁性颗粒表面, 核酸适配体 II 用纳米金胶标记. 在一定条件下, 核酸适配体 I 和核酸适配体 II 分别能与凝血酶蛋白特异性相结合形成磁性纳米颗粒/凝血酶/金胶三明治结构(图 1). 然后, 在磁场的存在下, 形成的磁性纳米颗粒/凝血酶/金胶三明治结构磁颗粒被吸着在电极表面, 而未反应的金胶很容易被洗去. 最后, 通过检测电极上金胶的电化学信号, 实现对凝血酶靶蛋白的检测. 核酸适配体 I 和 II 与凝血酶蛋白具有高度亲和力和特异性 [25]; 同时, 在磁场的存在下, 磁性纳米颗粒不仅起到分离作用, 而且又可使检测物富集在电极表面; 金胶又能进一步放大电化学信号 [26], 因此由这种方法制备的蛋白质电化学生物传感器具有很高的特异性和灵敏度. 就我们所查阅的资料, 目前尚未见有利用磁性纳米颗粒/蛋白质/金胶三明治结构的原理构建蛋白质电化学生物传感器的报道.

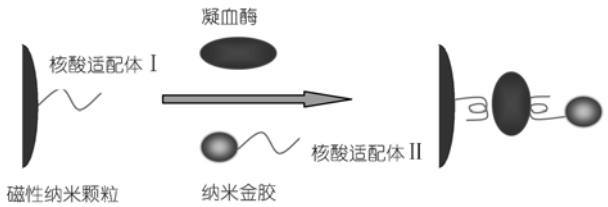

图 1 识别凝血酶反应的三明治结构示意图

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CHI832 电化学分析仪(CHI 公司, 美国), 三电极系统分别为: 玻碳电极为工作电极, Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂丝为辅助电极; Varian Cary UV50 型紫外-可见分光光度计(美国 Varian 公司); JSM-6700F 场发射电子显微镜(SEM) (JEOL, 日本); JEM-100CX 透射电子显微镜(TEM) (JEOL,日本).

带氨基的核酸适配体 I (英骏上海生物制品有限公司): 5′H_2N-$(CH_2)_6$-ATAGGTTGGTGTGGTTGG; 带巯基核酸适配体 II (英骏上海生物制品有限公司): 5′SH-$(CH_2)_6$-AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT; 带巯基非核酸适配体(non-aptamer)(英骏上海生物制品有限公司): 5′SH-GAGCGGCGCAACATTT-CAGGTCGA; 凝血酶(thrombin) (北京鼎国生物技术有限责任公司); 牛血清白蛋白(BSA) (北京鼎国生物技术有限责任公司); 带羧基磁性纳米颗粒(平均粒径为 100 nm) (Chemicell 公司); 乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC) (上海申能博彩生物制品有限公司); 咪唑(光耀化学公司, 中国江苏); 柠檬酸三钠溶液(上海试剂一厂); 四氯金酸溶液(上海试剂一厂); PBS(0.1 mol/L NaCl 磷酸缓冲溶液(PH=7.3)), Tris-HCl 溶液.

其他所有试剂均为分析纯, 实验用水为超纯水(Aquapro 公司生产的实验室级专用超纯化水机制得, 比电阻达到 13 MΩ • cm).

2.2 实验方法

2.2.1 在磁性颗粒上固定核酸适配体 I

将 100 μL 带羧基磁性纳米颗粒(50 mg/mL)用

PBS 缓冲溶液(pH=7.3)洗涤 3 次后, 加入 4.3 mg 咪唑, 超声 30 min. 5′端带氨基核酸适配体Ⅰ(2 OD, 约 66 μg), 溶于 500 μL PBS 缓冲溶液(pH=7.3)中, 加入 4.6 mg 的 EDC, 和羧基磁性纳米颗粒的咪唑溶液在室温下反应 8 h. 在磁场下分离, 每次用 500 μL PBS 溶液洗涤, 共 3 次, 除去未反应的核酸适配体Ⅰ. 将固定有核酸适配体分子Ⅰ的磁性颗粒分散于 500 μL PBS 溶液中, 保存于 4℃低温下.

2.2.2　标记核酸适配体Ⅱ的金胶探针制备

金胶的制备参照文献[27], 所有玻璃器皿均用王水浸泡过夜处理, 洗涤干净. 将 1 mL 1%(质量分数)的四氯金酸溶液加入 100 mL 亚沸蒸馏水中, 加热至沸, 在剧烈搅拌下快速加入 2.5 mL 1%(质量分数)的柠檬酸三钠溶液(四氯金酸溶液和柠檬酸三钠溶液事先均需要用 0.22 μm 孔径的滤膜过滤). 在沸腾情况下搅拌 30 min, 这期间溶液颜色变化由灰-蓝-紫, 最后为酒红色. 移去热源再搅拌 10 min, 将金胶溶液置于棕色瓶中在 4℃低温条件下保存, 数月有效. 所制备的金胶其平均粒径为 10 nm.

将 1 OD(约 33 μg) 带巯基核酸适配体Ⅱ溶解于 1 mL 的金胶溶液中, 静置 16 h, 使核酸适配体Ⅱ中巯基与金胶充分自组装. 然后, 将金胶标记的核酸适配体Ⅱ探针溶液在 12000 转离心分离 20 min, 离心分离后取出上层清液, 用 0.1 mol/L NaCl 磷酸缓冲溶液(PH=7.3)洗涤沉淀, 再离心分离, 以除去未反应的过量核酸适配体Ⅱ, 所制得的金胶标记的核酸适配体Ⅱ探针用 0.1 mol/L PBS 缓冲溶液(pH=7.3)稀释成一定浓度, 保存于 4℃低温下.

2.2.3　凝血酶的识别与磁性分离和富集

取 2 μL 固定有核酸适配体Ⅰ的磁性纳米颗粒悬浮液, 78 μL 的 PBS (1 mmol/L Mg^{2+}, pH=7.3)溶液和 10 μL 标记核酸适配体Ⅱ的金胶探针溶液于自制的电化学反应池(图 2)中, 加入 10 μL 的一定浓度的凝血酶溶液, 在室温条件下培育反应 20 min. 凝血酶蛋白与核酸适配体Ⅰ和Ⅱ特异性结合形成磁性纳米颗粒/凝血酶/金胶三明治结构的磁性颗粒. 然后, 在反应池底部加一块磁铁, 在外磁场作用下, 磁性分离沉淀, 每次用 100 μLPBS 洗涤, 洗涤 5 次, 以除去未与凝血酶结合的金胶探针, 最后三明治结构的磁性颗粒吸着在电化学反应池底部的工作电极上待测定.

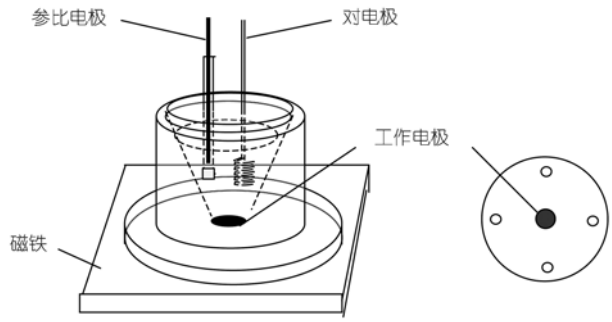

图 2　电化学反应池示意图

2.2.4　电化学测定

在磁性吸着有三明治结构的磁性颗粒的电化学反应池中加入 1 mL 0.1mol/L 盐酸溶液, 插入参比电极和辅助电极. 在+1.25 V 恒电位预氧化 120 s, 使金胶颗粒中的金原子氧化成 Au(Ⅲ)离子, 随后立即进行反向阴极扫描, 获得 Au(Ⅲ)电化学还原的差分脉冲伏安(DPV)曲线.

3　结果与讨论

3.1　金胶标记的核酸适配体Ⅱ探针的表征

金胶溶液显酒红色, 其可见区域的最大吸收波长为 525 nm. 我们在相同条件下分别测定金胶溶液和金胶标记的核酸适配体Ⅱ探针溶液的紫外-可见吸收光谱, 其紫外-可见吸收曲线如图 3 所示.

由图 3 曲线 2 可知, 核酸适配体Ⅱ通过巯基自组装到金胶上后, 金胶在 525 nm 的特征吸收峰(图 3 曲线 1)没有变化, 但在 260 nm 处出现 DNA 的特征紫外吸收峰. 此峰证明了金胶已经标记到核酸适配体 II 上.

3.2　凝血酶蛋白与核酸适配体形成的三明治结构

按照 2.2.3 的实验条件, 制备两份样品. 样品(a)中加入 10 μL 1.12×10^{-6} mol/L 的凝血酶蛋白, 样品(b)作为对照不加凝血酶, 在相同的实验条件下培育洗

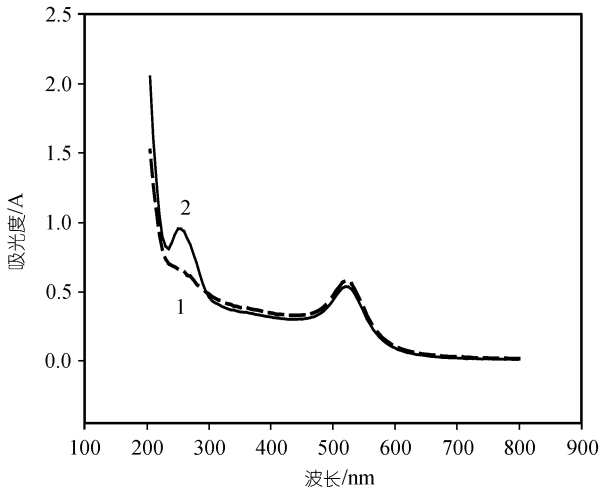

图 3 金胶(1, 虚线) 和金胶标记的核酸适配体 II 探针(2, 实线)的紫外-可见吸收光谱图

涤后, 用 600 μL 蒸馏水稀释, 取 30 μL 滴到 SEM 铜基座上干燥, 进行 SEM 观察. 如图 4 所示, 在有凝血酶蛋白的样品中, 可以明显地看到在磁性纳米颗粒上附着有许多粒径为 10 nm 左右的金胶颗粒(图 4(a)), 而未加蛋白的样品虽然有团簇的磁性纳米颗粒, 但是几乎看不到金胶颗粒(图 4(b)). 这显然说明了在磁性纳米颗粒/凝血酶/金胶的三明治结构中金胶颗粒通过凝血酶被固定在磁性纳米颗粒上. 磁性纳米颗粒在 SEM 图中看上去有些团簇现象可能是因为在制备样品的干燥过程中磁性纳米颗粒团簇在一起了, 因为相同的磁性纳米颗粒在 TEM 图中分散得较好(见图 4(b)插图).

3.3 凝血酶蛋白与核酸适配体形成三明治结构的最佳培育条件

在溶液中, 核酸适配体通常是以G-四分体结构形态与凝血酶蛋白结合, 不同的介质条件会影响其G-四分体结构形态的形成 [28]. 在实验中, 我们选择了Tris-HCl, PBS和含Mg^{2+}的PBS分别作为培育介质, 在相同的培育时间进行培育, 结果发现在Tris-HCl介质中培育电化学信号最小, 因为金胶探针在Tris-HCl介质中不能长时间稳定存在, 而含Mg^{2+}的PBS介质中培育电化学信号最大, 这是因为Mg^{2+}能稳定核酸适配体和凝血酶结合时的G-四分体结构, 所以在实验中选择含Mg^{2+}的PBS作为培育介质. 并且发现 15 min 的培育时间即能保证核酸适配体与凝血酶蛋白进行充分结合, 信号在 15 与 25 min之间有一个相对平坦的区域, 而在 25 min之后, 有下降的趋势. 所以在实验中，选择 20 min 的培育时间.

3.4 核酸适配体对凝血酶蛋白的特异性识别

核酸适配体对凝血酶蛋白的结合是非常有特异性. 换言之, 只有特殊序列的寡聚核苷酸片段的核酸适配体才能与凝血酶蛋白结合, 而能与凝血酶蛋白结合的核酸适配体基本不能与其他的蛋白分子结合. 为了证实所研究的蛋白质电化学生物传感器对凝血酶蛋白具有特异性识别能力, 我们分别考察了金胶标记的核酸适配体 II 探针的电化学响应; 在没有凝

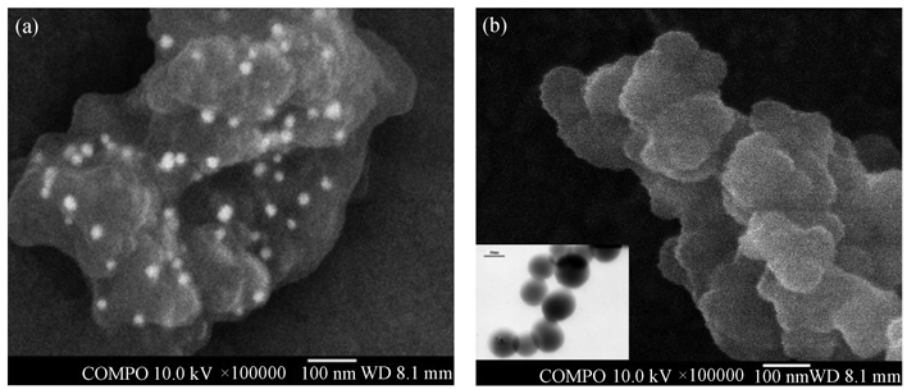

图 4 磁性纳米颗粒/凝血酶/金胶形成的三明治结构的 SEM 图
(a) 有凝血酶蛋白; (b) 无凝血酶蛋白. 插图: 磁性纳米颗粒的 TEM 图

血酶蛋白的情况下, 核酸适配体Ⅰ与金胶标记的核酸适配体Ⅱ探针作用后的电化学响应; 凝血酶蛋白与核酸适配体Ⅰ和金胶标记的核酸适配体Ⅱ特异性结合后的电化学响应; 牛血清白蛋白与核酸适配体Ⅰ和金胶标记的核酸适配体Ⅱ作用后的电化学响应; 牛血清白蛋白共存下凝血酶蛋白与核酸适配体Ⅰ和金胶标记的核酸适配体Ⅱ特异性结合后的电化学响应; 以及凝血酶蛋白与非核酸适配体寡聚核苷酸片段作用后的电化学响应. 图 5(a)曲线 1 为金胶标记的核酸适配体Ⅱ探针在玻碳电极上的 DPV 曲线, 由图可知金胶探针的 Au(Ⅲ)在+0.45 V(vs. Ag/AgCl)具有的特征电化学还原峰(峰电流 ip=6.743×10^{-6} μA). 图 5(a)曲线 2 是在没有凝血酶蛋白的情况下仅核酸适配体Ⅰ与金胶标记的核酸适配体Ⅱ探针作用后的 DPV 曲线, 在+0.45 V 几乎没有电化学信号产生, 因为标记金胶的核酸适配体Ⅱ不会与固定在磁性颗粒上的核酸适配体Ⅰ发生反应, 而不能被磁场吸着到电极上. 图 5(a)曲线 3 为 2.24×10^{-10} mol/L 凝血酶蛋白与核酸适配体Ⅰ和金胶标记的核酸适配体Ⅱ特异性结合后的 DPV 曲线, 在+0.45 V 具有明显的 Au(III)还原峰(ip=4.534×10^{-6} μA), 这证明凝血酶蛋白与核酸适配体Ⅰ和Ⅱ特异性结合形成磁性颗粒/凝血酶/纳米金胶的三明治结构, 被磁场吸着在玻碳电极上. 图 5(b)是+0.45 V Au(Ⅲ)还原峰的峰电流值柱状图. 由图 5(b)可知, 浓度比凝血酶高 10^9 倍牛血清白蛋白与核酸适配体Ⅰ和Ⅱ作用, 只有非常小的峰电流(图 5(b)柱 4); 牛血清白蛋白共存下凝血酶蛋白与核酸适配体Ⅰ和金胶标记的核酸适配体Ⅱ特异性结合后的峰电流与没有牛血清白蛋白存在下的峰电流没有明显的变化(比较图 5(b)柱 5 和 3), 这些都说明核酸适配体与牛血清白蛋白没有特异性结合, 而且牛血清白蛋白的存在对于核酸适配体与凝血酶蛋白的结合没有影响. 图 5(b)柱 6 显示, 当金胶标记的核酸适配体 II 由非核酸适配体寡聚核苷酸片段替代后, 凝血酶蛋白与核酸适配体Ⅰ和金胶标记的非核酸适配体Ⅱ作用所产生的峰电流也很小, 这证明只有特定的核酸适配体才能捕获凝血酶蛋白. 因此, 以上的实验结果证实了这种蛋白质电化学生物传感器对凝血酶蛋白具有很高的特异性识别能力.

3.5　核酸适配体与凝血酶结合的配位比和解离常数

为研究在这种三明治结构中核酸适配体与凝血酶结合的配位比和结合的能力,以核酸适配体Ⅱ为例, 固定凝血酶蛋白的浓度(2.24×10^{-11} mol/L), 改变金胶标记的核酸适配体Ⅱ的量, 在同样的实验条件下, 以 DPV 的峰电流值与核酸适配体Ⅱ/凝血酶 的浓度比

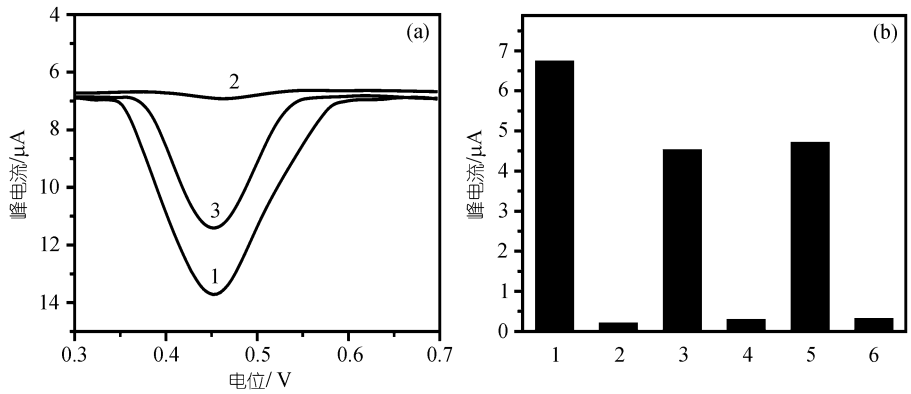

图 5　核酸适配体与凝血酶蛋白结合后的电化学响应

(a) Au(Ⅲ)电化学还原的差分脉冲伏安图; (b) Au(Ⅲ)还原峰的峰电流值柱状图. 1, 金胶标记的核酸适配体 Ⅱ探针; 2, 在没有凝血酶蛋白的情况下, 核酸适配体Ⅰ与金胶标记的核酸适配体Ⅱ探针作用; 3, 2.24×10^{-10} mol/L 凝血酶蛋白与核酸适配体Ⅰ和金胶标记的核酸适配体Ⅱ特异性结合; 4, 1.12×10^{-1} mol/L 牛血清白蛋白与核酸适配体Ⅰ和金胶标记的核酸适配体Ⅱ特异性结合; 5, 1.12×10^{-6} mol/L 牛血清白蛋白存在下, 2.24×10^{-10} mol/L 凝血酶蛋白与核酸适配体Ⅰ和金胶标记的核酸适配体Ⅱ特异性结合; 6, 2.24×10^{-10} mol/L 凝血酶蛋白与核酸适配体Ⅰ和金胶标记的非核酸适配体的作用

值作图, 如图 6 所示, 随着核酸适配体Ⅱ用量的增加, DPV 的峰电流值逐渐增加, 随后到达一个平台, 其转折点即为化学计量点, 从图 6 可以得出, 核酸适配体Ⅱ与凝血酶结合的配位比为 1∶1, 与文献[29]报道的一致.

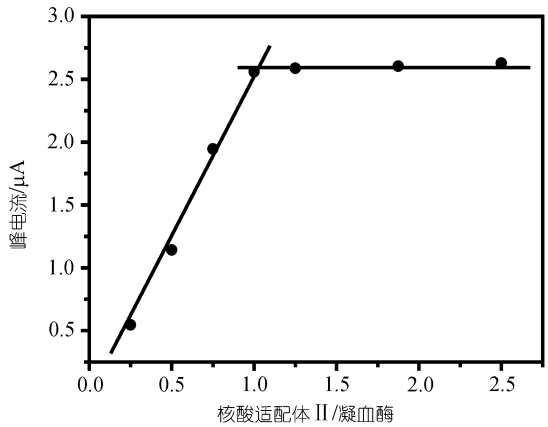

图 6 核酸适配体Ⅱ/凝血酶浓度(2.24×10^{-11} mol/L)比值与 DPV 的峰电流值的关系图

核酸适配体Ⅱ与凝血酶蛋白特异性结合的结合常数可 根据如下推导求得:

	凝血酶 +	核酸适配体 =	凝血酶-核酸适配体
起始	c_{th}^0	c_{a}^0	0
平衡	$c_{\mathrm{th}}^0-c_{\text{th-a}}$	$c_{\mathrm{a}}^0-c_{\text{th-a}}$	$c_{\text{th-a}}$

其中, c_{th}^0 代表凝血酶蛋白的起始浓度, c_{a}^0 代表核酸适配体的起始浓度, $c_{\text{th-a}}$ 代表核酸适配体Ⅱ与凝血酶蛋白特异性结合后产物的浓度.

复合物的形成常数 K 可表示为

$$K=\frac{c_{\text{th-a}}}{(c_{\mathrm{th}}^0-c_{\text{th-a}})(c_{\mathrm{a}}^0-c_{\text{th-a}})}. \tag{1}$$

由于实验中核酸适配体Ⅱ的量很小, 很多的凝血酶蛋白还是以原来的游离形式存在, 所反应掉的凝血酶蛋白的浓度相对于总的浓度可以忽略不计, 即

$$c_{\mathrm{th}}^0-c_{\text{th-a}}=c_{\mathrm{th}}^0. \tag{2}$$

所以 K 可以表示为

$$K=\frac{c_{\text{th-a}}}{c_{\mathrm{th}}^0(c_{\mathrm{a}}^0-c_{\text{th-a}})}, \tag{3}$$

其中 i_{pt} 为金胶标记的核酸适配体Ⅱ与凝血酶蛋白结合后测得的 DPV 的峰电流, i_{p_∞} 为核酸适配体Ⅱ浓度大大过量时所能达到的最大的 DPV 峰电流, i_{p0} 为溶液中无核酸适配体Ⅱ时测得的背景值, k 表示峰电流值与该复合物的浓度之间关系的系数, 在一定的浓度范围内，可得

$$i_{\mathrm{p_t}}-i_{\mathrm{p_0}}=kc_{\text{th-a}}, \tag{4}$$

$$i_{\mathrm{p}_\infty}-i_{\mathrm{p_0}}=kc_{\mathrm{th}}^0. \tag{5}$$

所以

$$c_{\text{th-a}}=\frac{i_{\mathrm{p_t}}-i_{\mathrm{p_0}}}{i_{\mathrm{p}_\infty}-i_{\mathrm{p_0}}}c_{\mathrm{th}}^0. \tag{6}$$

把(6)代入方程(3)可推出

$$\frac{i_{\mathrm{p_t}}-i_{\mathrm{p_0}}}{i_{\mathrm{p}_\infty}-i_{\mathrm{p_0}}}=\frac{K}{1+Kc_{\mathrm{th}}^0}c_{\mathrm{a}}^0. \tag{7}$$

改变加入的核酸适配体Ⅱ的量, 测得复合物的峰电流值 $i_{\mathrm{p_t}}$, 以 $i_{\mathrm{p_t}}-i_{\mathrm{p_0}}/i_{\mathrm{p}_\infty}-i_{\mathrm{p_0}}$ 对 c_{a}^0 作图, 如图 7 所示, 根据所得的直线斜率, 计算核酸适配体Ⅱ与凝血酶的结合常数为 1.354×10^{10}.

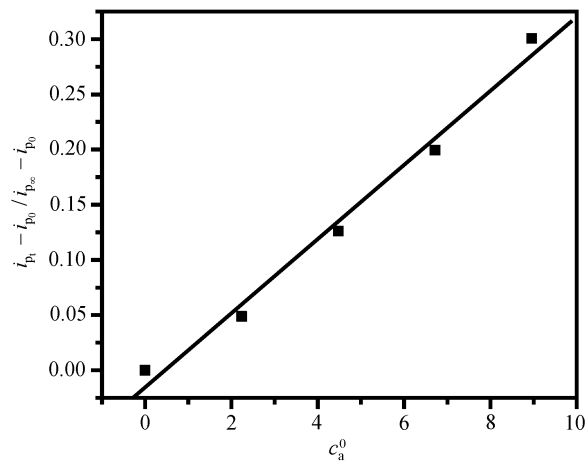

图 7 核酸适配体的浓度与 DPV 的峰电流的关系图

3.6 样品的检测

3.6.1 线性范围和检测限

将一系列不同浓度的凝血酶按 2.2.3 的实验条件与标记核酸适配体Ⅱ的金胶探针和固定有核酸适配

表 1　血样中凝血酶的测得值和加入回收率

血浆稀释后测出的浓度 /mol • L^{-1}	加入值 /mol • L^{-1}	测得值 /mol • L^{-1}	回收率 /%	原血浆中测出的浓度/mol • L^{-1}	
				本法	荧光法
3.90×10^{-10}	1.12×10^{-10}	4.94×10^{-10}	92.86	1.17×10^{-7}	9.87×10^{-8}

体 I 的磁性颗粒培育、磁性分离和富集, 按 2.2.4 的实验条件进行电化学检测. 结果显示, 随着凝血酶浓度的增大, 金胶的 DPV 峰电流值逐渐增大, 其线性范围为 5.60×10^{-12}~1.12×10^{-9} mol/L. 回归方程为 $Y = 19.99X - 3.017$(其中 $X = \log(C_{th}^{0} / \mathrm{pmol}\cdot\mathrm{L}^{-1})$; Y 为 DPV 峰电流值, 单位μA), 线性相关系数为 0.9930, 对凝血酶的最低检测下限为 1.42×10^{-12} mol/L. 对样品重复测定 10 次, 测得其相对标准偏差 RSD 为 3.29%.

3.6.2　实际样品的检测

取 100 μL 血浆, 加入 0.25%胰酶 10 μL, 加入 3.85×10^{-3} mol/L鱼精DNA 10 μL, 加入钙离子使得溶液中的钙离子浓度保持为 1.0 mmol/L, 然后将样品稀释 300 倍, 取 10 μL按 2.2.3 的实验方法进行检测. 结果如表 1 所示, 测出经胰酶激活后的血浆中凝血酶的浓度为 1.17×10^{-7} mol/L, 与用荧光法 [30]测得的结果相吻合.

4　结论

本文介绍了一种由具有电化学活性的金纳米颗粒标记的核酸适配体以及被固定在磁性纳米颗粒上的核酸适配体与凝血酶蛋白同时结合形成磁性颗粒/凝血酶/纳米金胶的三明治结构所构建的蛋白质电化学生物传感器. 实验证实这种生物传感器对凝血酶蛋白具有很高的特异性识别能力, 对凝血酶蛋白的检测不受其他蛋白质例如牛血清白蛋白存在的干扰. 实验测得核酸适配体 II 与凝血酶的结合配位比和结合常数分别为 1∶1 和 1.354×10^{10} mol/L. 利用自制的电化学反应池, 使得分离、富集和测定在同一个反应池中进行, 其操作不仅简单, 而且能使被测物质富集在玻碳电极表面,使得检测的灵敏度得到提高. 此传感器对凝血酶蛋白的检测线性范围为 5.60×10^{-12}~1.12×10^{-9} mol/L, 下限达到 1.42×10^{-12} mol/L, 用于人血样中实际样品的检测, 结果与用荧光法测得的结果相吻合, 回收率令人满意. 预计这种蛋白质电化学生物传感器技术可进一步发展用于其他特定蛋白质的识别、检测, 并有望在疾病的医疗诊断和治疗中得到应用.

参　考　文　献

1 Fields S. Proteomics in genomeland. Science, 2001, 291(5507): 1221—1224[DOI]

2 Service R F. Searching for recipes for protein chips. Science, 2001, 294(5549): 2080—2082[DOI]

3 Murphy M B, Fuller S T, Richardson P M, Doyle S A. An improved method for the *in vitro* evolution of aptamers and applications in protein detection and purification. Nucleic Acids Res, 2003, 31(18): 1—8[DOI]

4 Abbott A. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. Nature, 1999, 402(6763): 715—720[DOI]

5 Blobel G, Wozniak R W, Structural biology: proteomics for the pore. Nature, 2000, 403(6772): 835—836[DOI]

6 Ellington A D, Szostak J W. *In vitro* selection of RNA molecular that bind specific ligands. Nature, 1990, 346(467): 818—822 [DOI]

7 Bullock T L, Sherlin L D, Perona J J. Tertiary core rearrangements in a tight binding transfer RNA aptamer. Nat Struct Biol, 2000, 7(6): 497—504[DOI]

8 Herman T, Patel D J. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. Science, 2000, 287(5454): 820—825[DOI]

9 Brody E N, Gold L. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. Rev Mol Biotechnol, 2000, 74(1): 5—13[DOI]

10 Tombelli S, Minunni M, Mascini M. Analytical applications of aptamers. Biosens Bioelectron, 2005, 20(12): 2424—2434[DOI]

11 Stojanovic M N, Landry D W. Aptamer-based colorimetric probe for cocaine. J Am Chem Soc, 2002, 124(3): 9678—9679[DOI]

12 Merino E J, Weeks K M. Fluorogenic resolution of ligand binding by a nucleic acid aptamer. J Am Chem Soc, 2003, 125(41): 12370—12371[DOI]

13 Liss M, Petersen B, Wolf H, Prohaska E. An aptamer-based quartz crystal protein biosensor. Anal Chem, 2002, 74(17): 4488—4495 [DOI]

14 Xu D, Xu D, Yu X, Liu Z, He W, Ma Z. Label-free electrochemical detection for aptamer-based array electrodes. Anal Chem, 2005, 77(16): 5107—5113[DOI]

15 Kazunori I, Chiharu K, Koji S. Novel electrochemical sensor system for protein using the aptamers in sandwich manner. Biosens Bioelectron, 2005, 20(10): 2168—2172[DOI]

16 Radi A -E, Acero Sanchez J L, Baldrich E, O'Sullivan C K. Reus-

able impedimetric aptasensor. Anal Chem, 2005, 77(19): 6320—6323 [DOI]

17 Kawde A N, Rodriguez M C, Lee T M H, Wang J. Label-free bioelectronic detection of aptamer-protein interactions. Electrochem Commun, 2005, 7(5): 537—540[DOI]

18 Wang J, Kawde A-N. Magnetic-field stimulated DNA oxidation. Electrochem Commun, 2002, 4(4): 349—352[DOI]

19 Wang J, Xu D, Polsky R. Magnetically-induced solid-state electrochemical detection of DNA hybridization. J Am Chem Soc, 2002, 124(16): 4208—4209[DOI]

20 Cheng G F, Zhao J, Tu Y H, He P G, Fang Y Z. A sensitive DNA electrochemical biosensor based on magnetite with a glassy carbon electrode modified by multi-walled carbon nanotubes in polypyrrole. Anal Chim Acta, 2005, 533(1): 11—16[DOI]

21 Maxwell D J, Taylor J R, Nie S. Self-Assembled nanoparticle probes for recognition and detection of biomolecules. J Am Chem Soc, 2002, 124(32): 9606—9612[DOI]

22 Mirkin C A, Letsinger R L. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. Nature, 1996, 382(6592): 607—609[DOI]

23 Cai H, Xu Y, He P G, Fang Y Z. Colloid Au-enhanced DNA immobilization for the electrochemical detection of sequence-specific DNA. J Electroanal Chem, 2001, 510(1): 78—85[DOI]

24 Pavlov V, Xiao Y, Shlyahovsky B, Willner I. Aptamer-functionalized Au nanoparticles for the amplified optical detection of thrombin. J Am Chem Soc, 2004, 126(38): 11768—11769[DOI]

25 Wang X L, Li F, Su Y H, Sun X, Li X B, Schluesener H J, Tang F, Xu S Q. Ultrasensitive detection of protein using an aptamer-based exonuclease protection assay. Anal Chem, 2004, 76(19): 5605—5610 [DOI]

26 Pumera, M, Castaneda M T, Pividori M I, Eritja R, Merkoci A, Alegret S. Magnetically triggered direct electrochemical detection of DNA hybridization using Au_{67} quantum dots as electrical tracer. Langmuir, 2005, 21(21): 9625—9629[DOI]

27 Doron A, Katz E, Willner I. Organization of Au colloids as monolayer films onto ITO glass surfaces: application of the metal colloid films as base interfaces to construct redox-active monolayers. Langmuir, 1995, 11(4): 1313—1317[DOI]

28 Ho H -A, Leclerc M. Optical sensor based on hybrid aptamer/conjugated polymer complexes. J Am Chem Soc, 2004, 126(5): 1384—1387[DOI]

29 Heyduk E, Heyduk T. Nucleic acid-based fluorescence sensors for detecting proteins. Anal Chem, 2005, 77(4): 1147—1156[DOI]

30 徒永华, 程圭芳, 林莉, 郑静, 何品刚, 方禹之. 基于核酸适配体的新型荧光纳米生物传感器测定凝血酶的研究. 高等学校化学学报, 2006, 27(12)