微纳电化学传感界面的构建及其用于单细胞实时监测

齐昱婷[†], 张芙莉[†], 田思玉, 杨小柯, 刘艳玲, 黄卫华^{*}

武汉大学化学与分子科学学院, 武汉 430072

[†]同等贡献

^{*}通讯作者, E-mail: whhuang@whu.edu.cn

收稿日期: 2020-10-24; 接受日期: 2020-12-10; 网络版发表日期: 2020-12-18

国家自然科学基金(编号: 21725504, 21675121, 21721005, 21804101)资助项目

摘要 细胞是生物体形态结构和生命活动的基本单位. 常规检测群体细胞的方法往往会掩盖细胞间的个体差异, 因此亟需发展高效的单细胞分析策略, 深入研究细胞生命活动过程, 揭示疾病发生发展机制, 推动个体化诊疗. 超微电化学传感器具有尺寸小、灵敏度高、时空分辨率高等特点, 在单细胞实时动态监测方面发挥了非常重要的作用. 目前, 微纳电化学传感器在电极制备、高性能传感界面构建、理论分析等方面已取得重要进展, 且在单细胞实时监测及相关细胞机制研究方面取得突破. 然而, 单细胞内环境复杂、活性分子浓度低且随时空高度动态变化, 这对微纳电化学传感器的灵敏度和选择性等综合性能提出了更高要求. 我们课题组长期从事基于微纳电化学传感的单细胞与亚细胞实时动态监测研究, 本文主要介绍了我们近10年来在该领域的研究进展, 并对未来的挑战与机遇进行了探讨.

关键词 微纳电化学传感器, 高性能传感界面, 单细胞, 亚细胞, 实时监测

1 引言

细胞是生物体结构和功能的基本单位, 大量生命活动在细胞甚至亚细胞层面发生. 以细胞为对象开展研究, 有助于深入探索生命活动的规律并揭示生命现象的本质. 然而, 即使是同种类型细胞, 其物质组成、结构和功能也会存在个体差异, 而这些差异往往是引发疾病的关键因素^[1,2]. 当前的常规检测方法主要对群体细胞进行统计, 得到的平均结果无法反映细胞间的异质性, 且样本提取处理后无法进行原位分析检测,

难以反映真实的细胞状态信息. 而针对单细胞的分析检测有助于我们了解不同细胞内物质组成和能量代谢的差异, 从而揭示生理、病理条件下的分子机制, 为疾病的预防、诊断和药物评估提供强有力的理论及实验依据^[3-6]. 然而, 单细胞尺寸小, 内部组分含量低; 胞内结构和物质组成极为复杂, 干扰目标分子的准确分析; 此外, 某些生化过程只能在胞内特定的空间和有限的时间内发生, 常规手段难以有效监测该类过程^[6,7]. 因此, 亟需发展灵敏度高、特异性好和时空分辨率高的单细胞分析方法.

引用格式: Qi YT, Zhang FL, Tian SY, Yang XK, Liu YL, Huang WH. Construction of micro-nano electrochemical sensing interfaces for real-time monitoring of single cells. *Sci Sin Chim*, 2021, 51: 359–373, doi: 10.1360/SSC-2020-0206

微纳电极是指一维尺寸为微米至纳米级的一类电极, 超微的尺寸结构使其具有以下特点: (1)待测物在电极表面呈球形或半球形扩散, 传质速率快, 有效提高了法拉第电流; (2)双电层电容和时间常数小, 充电电流小, 提高了检测灵敏度, 并可快速建立稳态扩散层, 研究快速和暂态的电化学反应; (3)电流在纳安级别甚至更低, 故溶液电压降较小, 有利于在高阻抗介质体系进行检测; (4)可在微米甚至纳米级限域空间开展无损电化学实验。这些特点赋予微纳电极高灵敏度、高时空分辨率等独特优势, 可以实现对单细胞水平信号分子传递、胞内信号转导、瞬态反应等动态过程的实时监测。

随着纳米科学技术逐步发展, 微纳电极的制备技术不断提升, 不同材料和尺寸的微纳电极被相继制备开发, 且已被广泛用于单细胞和亚细胞的检测, 为生命科学研究提供了有力的工具。然而, 单细胞内环境复杂多变, 部分靶标分子浓度极低, 胞内生化反应多局限在亚细胞水平且在极短时间内发生, 这大大增加了微纳传感器准确获取目标分子实时动态信息的难度。我们课题组长期从事基于微纳电化学传感的单细胞与亚细胞实时动态监测研究, 鉴于此, 本文总结了近10年来在微纳电化学传感器领域的研究进展, 重点介绍了高性能微纳电化学传感界面的构建策略及其在单细胞与亚细胞实时监测方面的应用, 最后探讨微纳电化学传感器进一步发展应用的挑战与机遇。

2 微纳传感界面的构建

由于微纳传感器与单细胞尺寸相当, 微纳电极在单细胞及亚细胞水平生命活动的实时监测方面已经取得大量突破^[3,4,7~9]。但随着研究方向的不断拓展和研究问题的深入, 对单细胞甚至亚细胞水平生命活动的进一步监测需要传感器具有更优异的综合性能, 例如, 检测复杂细胞基质或胞内环境中含量极低(低于nmol/L)分子, 需要传感器具有更高的灵敏度和选择性; 平面微电极常需将细胞直接培养在电极表面进行原位检测, 要求传感界面具有优异的生物相容性; 对细胞生命活动进行长时间检测, 需要传感器具有更高的稳定性(如抗污染能力或自清洁能力)。基于此, 我们在高性能传感界面构建方面进行了较为系统的探索, 下面将分别从提高灵敏度、提高选择性、增强生物相容性以及

解决电极毒化四个方面介绍本课题组具有代表性的微纳传感界面构建策略。

2.1 高灵敏度传感界面的构建

常用构建高灵敏度传感界面的方法包括: 选择高电活性基底电极材料^[10~15], 在电极表面修饰高催化活性材料^[16,17]以及构建具有纳米结构的高比表面积传感界面。

纳米材料(如纳米颗粒、纳米管、纳米线等)因具有较高的比表面积和较快的电子传递速率, 常被修饰在微纳传感器表面以提高灵敏度。贵金属纳米颗粒(如金、银、铂等)表面原子数占比较大, 导致其表面原子配位不全, 存在大量悬键和不饱和键, 因此具有大量活性位点, 对许多化学反应都具有高催化性能。我们课题组^[18~21]在电极表面电化学沉积铂纳米颗粒(Pt NPs)以提高检测性能。Pt NPs对H₂O₂具有高催化性能, 其催化活性与纳米颗粒结构有关, 然而传统电化学沉积法难以控制纳米颗粒的尺寸和形貌。为此, 我们在碳纤维微米电极表面修饰全氟磺酸(Nafion)膜, 随后采用电化学还原生成Pt NPs, 使其限制在Nafion膜形成的纳米孔或纳米通道中, 形成清晰、均匀且具有高比表面积的修饰层, 如图1(A)所示, 该传感器对H₂O₂有着较高的检测灵敏度, 检出限约为5 nmol/L^[22]。除此之外, 金属纳米颗粒的形貌也显著影响其催化性能, 为了寻找具有较高催化活性的纳米结构, 本课题组采用光化学还原法, 以ZnO纳米棒(ZnO NRs)为光催化剂, 氯金酸为前驱体, 通过在反应体系中加入不同的添加剂(如氨水、对苯二胺、碳酸铵等), 在氧化铟锡(ITO)电极表面可控生长不同结构的纳米金(图1(B)), 结果显示密集型金纳米颗粒对NO具有最强的电化学响应, 表明该类金纳米结构能够为NO氧化提供丰富的活性位点^[23]。碳纳米材料也常被用作传感器修饰材料, 碳纳米管(CNTs)具有优异的导电性能和催化性能, 是构建传感界面的理想材料。通过精确控制修饰过程, 我们课题组分别在碳纤维电极盘面^[24]和金纳米管^[25](图1(C))表面均匀修饰CNTs, 提升电极对NO的检测灵敏度。

同时, 新型纳米材料的迅速发展为构建具有高比表面积纳米结构的微纳传感界面提供了更多可能。为使高长径比的纳米线结构竖直排列在传感器表面, 最大程度地暴露纳米结构的活性位点^[26], 我们与华中科技大学霍开富教授课题组合作^[27], 通过气相沉积法

图 1 高灵敏度传感界面构建. (A) Nafion 作为模板制备 Pt NPs 修饰碳纤维微电极的原理图^[22]; (B) 光化学还原法制备的不同纳米金结构的电镜表征图, 从左到右依次为: 金纳米颗粒、密集型金纳米颗粒以及金纳米链结构^[23]; (C) CNT/Au NT 纳米复合结构的示意图和电镜表征图(内插图)^[25]; (D) TiC/C 纳米线阵列电极的电镜表征图^[27]; (E) TiC/C/Pt NPs 微米电极高放大倍数和低放大倍数(内插图)的电镜表征图^[28]; (F) NPG/Pt NPs 微米电极电镜表征图^[29] (网络版彩图)

Figure 1 Sensing interface fabrication to promote electrode sensitivity. (A) Schematic diagram showing the fabrication of Pt NPs-modified carbon fiber microelectrodes using Nafion as the template [22]; (B) SEM images of different nanostructured Au synthesized by photochemical reduction, representing Au NPs, dense Au NPs and Au chains, respectively [23]; (C) Schematic diagram and SEM image (inset) of CNT/Au NT nanocomposites [25]; (D) SEM image of TiC/C nanofiber array electrodes [27]; (E) High-magnification and low-magnification (inset) SEM images of the TiC/C/Pt NPs microelectrodes [28]; (F) SEM image of the NPG/Pt NPs microelectrode [29] (color online).

(CVD)在钛铝钒合金丝(Ti6Al4V)表面原位生长竖直排列的纳米线, 制备了TiC/C纳米线阵列电极(图1(D)), 该电极对NO有着优异的电化学响应(检出限0.6 nmol/L). 利用化学还原法在纳米线表面制备尺寸均匀的Pt NPs, 制备了TiC/C/Pt NPs微米盘电极(如图1(E)所示), 进一步提高纳米线阵列电极的灵敏度. 该电极对植物生长素吲哚乙酸(IAA)具有优异的电化学检测性能, 检出限为1 nmol/L, 比传统电化学方法检出限低一个数量级, 拓宽了电流法检测IAA的浓度范围^[28].

此外, 通过调控电化学合金化/去合金化过程, 我们可以制备具有纳米级孔径的多孔金(NPG)结构^[29,30]. 基于此, 我们构建了自支撑的三维NPG微电极, 并通过电沉积方法将小粒径Pt NPs(5~10 nm)均匀负载在巯基乙胺预处理的NPG骨架表面, 如图1(F)所示. NPG高比表面积及连续骨架结构提高了Pt NPs的负载量, 两种纳米结构共同促进电子传输过程, 使NPG/Pt NPs微电极对H₂O₂有着卓越的电催化还原能力, 检出限低至0.3 nmol/L, 为当时所报道的电化学传感器检测限最低值^[29].

2.2 高选择性传感界面的构建

由于细胞基质和胞内环境极其复杂, 具有电化学

活性的生物分子可能干扰传感器对目标分析物的检测, 因此需要提高电化学传感界面的选择性^[31~34]. 常用方法包括: (1)利用不同物质氧化还原电位差异, 通过施加特定的电位区分目标物^[35~41]; (2)利用尺寸排阻或静电作用排除干扰物; (3)在传感器表面修饰具有特异性催化作用的材料, 提高对目标分子的选择性.

利用尺寸排阻作用和静电作用提高选择性的常用方法是在传感器表面引入膜结构, 如Nafion等, 这种高分子膜结构表面的负电基团可有效阻止阴离子接触传感界面. 通过将CNTs和Nafion膜修饰在电极表面, 我们制备了对NO具有高灵敏度和高选择性的电化学传感器. 通过对比传感器对不同分子的响应信号发现, NO的电流响应约为同浓度亚硝酸盐和抗坏血酸的600倍和400倍^[24]. 另外, 我们在纳米线电极表面修饰带正电的导电聚合物聚3,4-乙烯二氧噻吩(PEDOT)膜, 通过静电作用促进带负电的目标分子还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)在电极表面聚集, 从而实现了对NADH高选择性的电化学检测^[42].

金属卟啉类分子对NO具有独特的催化性能, 通过在微电极阵列表面修饰金属卟啉(图2(A-a)), 我们实现了对NO的高选择性检测(图2(A-b))^[43]. 生物分子的特异性识别能力远远高于无机材料, 酶型电化学传感器

图 2 高选择性传感界面构建. (A)金属卟啉和硼酸共功能化石墨烯微电极阵列活性区域的示意图. 灰色、绿色、粉色分别代表还原氧化石墨烯、卟吩氯化铁和3-氨基苯硼酸(a), 以及选择性表征图, 干扰物的浓度均为2 μmol/L(b)^[43]; (B)谷氨酸微型传感器制备过程的示意图^[44]; (C)葡萄糖纳米线传感器的结构示意图及其检测葡萄糖的机理^[19] (网络版彩图)

Figure 2 Sensing interface fabrication to promote electrode selectivity. (A) Schematic illustration of the structure in the active electrode area. The gray, green and pink features represent rGO, FeTCP and APBA respectively (a), and selective profile of the electrode to different interference at the concentration of 2 μmol/L (b) ^[43]; (B) Schematic diagrams showing the fabrication processes of the glutamate micro-sensor ^[44]; (C) Schematic diagrams showing the structure of the glucose nanowire sensor and the mechanism of glucose detection ^[19] (color online).

通过将酶固定在传感器表面, 利用其特异性识别和催化能力实现对目标分子(包括电活性分子和非电活性分子)的特异性检测. 我们利用共价交联将谷氨酸氧化酶修饰在表面沉积Pt NPs的碳纤维电极表面, 通过检测酶促反应副产物 H_2O_2 实现非电活性谷氨酸的定量分析, 从而构建了高灵敏、高选择性检测谷氨酸分子的酶型超微电化学传感器(传感界面构建过程如图2(B)所示). 该传感器校正曲线与经典的酶促反应动力学吻合^[44,45], 线性范围为1~200 μmol/L, 检出限约为0.87 μmol/L. 利用类似的构建方法和检测原理(图2(C)), 我们在纳米线电极表面修饰Pt NPs和葡萄糖氧化酶(GOD), 制备对葡萄糖具有优异电化学响应的纳米线传感器^[19].

2.3 生物相容传感界面的构建

为了实现活细胞在电极表面的原位培养及实时监测, 电极界面除了需要具有足够的灵敏度和选择性外, 还需要具备较强的生物相容性, 增强细胞粘附能力并维持细胞正常生理功能^[46~48]. 常用增强生物相容性的方法是在传感器表面包埋细胞外基质蛋白(如黏连蛋白、胶原等)或修饰高分子聚合物(如多聚赖氨酸), 但大分子蛋白或者聚合物的引入会阻碍电子在传感器表面的传递, 导致灵敏度降低. 随着研究的深入, 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸短肽(细胞外基质蛋白能够被细胞识别的最小结构单元)和细胞粘附小分子(如单糖、3-氨基苯硼酸)被相继发现, 这些小分子在增强细胞粘附的

同时不显著改变传感器灵敏度, 被广泛用于高细胞相容性电化学传感界面的构建^[49~52].

生理条件(pH为7.2~7.4)下, 3-氨基苯硼酸的硼酸基团会与细胞膜表面糖类的多元醇官能团发生脱水反应, 实现细胞在材料表面的粘附. 利用该特点, 我们将3-氨基苯硼酸(提高生物相容性)与石墨烯(提高灵敏度)、金属卟啉(提高对NO的选择性和灵敏度)复合, 构筑了基于金属卟啉和硼酸功能化的石墨烯微电极阵列(图2(A-a)). 该策略显著增强了电极的生物相容性, 且人脐静脉内皮细胞在其表面增殖较快, 并维持高活性. 同时, 该传感平台对NO具有极高的响应能力和选择性, 检出限低至55 pmol/L. 此外, 由于硼酸和多元醇形成醇酯的反应与溶液pH密切相关, 我们通过调节pH引起醇酯的水解, 使细胞从电极表面释放, 从而实现电极的重复利用. 结果显示, 电极循环使用5次后, 电化学性能较为稳定, 依然维持在初始状态的80%左右^[43].

2.4 抗污及祛污传感界面的构建

在细胞分析过程中, 传感器表面易受污染而被毒化, 引起传感器毒化的主要原因是电极表面被非电活性物质覆盖, 导致活性位点减少, 其中非电活性物质主要包括以下三类: (1)电化学氧化还原反应产物. 一些信号分子发生氧化还原反应后, 生成的非电活性物质(如NADH氧化形成氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸— NAD^+ 、 H_2S 氧化生成单质硫、儿茶酚胺等酚类化合物氧化后形成聚合物)吸附在电极表面, 并随着反应

时间的增长而逐渐累积; (2)非电活性生物大分子. 在细胞检测过程中, 培养基或细胞分泌的非电活性分子(如基质蛋白)会吸附在电极表面; (3)机体对外植入电极产生排异反应, 在电极表面形成胶质疤痕, 导致电极活性位点减少.

解决电极毒化的方法包括抗污染和祛污染. 为了降低干扰分子在电极表面吸附的程度, 研究人员发展了多种抗电极污染的方法^[53-55], 包括在电极表面修饰带电荷的聚合物^[42,56]、使用抗污染电极材料和具有尺寸排阻效应的多孔结构等. 我们课题组通过在电极表面修饰带正电的PEDOT, 利用静电排斥作用降低NADH氧化产物NAD⁺在电极表面的吸附^[42]. 此外, 集成具有静电排斥作用的PEDOT和具有尺寸排阻效应的纳米多孔金结构的NPG@PEDOT电极, 具有优异的抗污能力, 有效防止了生物大分子和H₂S氧化产物单质硫在基底电极表面的聚集, 使其在H₂S检测中保持良好的稳定性^[30].

电极祛污染的方法可以分为物理方法和化学方法. 物理方法通过抛光等方式除去电极表层材料以清除污染物, 但对微纳电极结构破坏较大. 化学方法包

括施加电压清除表面污染物的电化学活化方法以及通过光催化剂将电极表面污染物降解的光致清洁方法^[57,58]. 光催化剂清除电极表面污染物的原理如图3(A-a)所示: 光催化剂价带和导带之间存在能带间隙, 当照射光的能量大于等于能带间隙时, 价带电子会发生带间跃迁, 形成光生电子(e⁻)/空穴(h⁺)对, 吸附在光催化剂表面的溶解氧俘获电子生成超氧阴离子, 而吸附在催化剂表面的水或氢氧根离子则与空穴反应生成氢氧自由基, 这些高活性自由基可降解传感器表面污染物实现电极更新. 我们将半导体光催化剂TiO₂与高导电性和高催化性能的还原氧化石墨烯(rGO)和金纳米颗粒结合, 有效克服了TiO₂导电性不足的缺点, 制备了具有光致清洁能力和优异电化学性能的Au/rGO@TiO₂-ITO电极(如图3(A-b)所示). 分别用5-羟色胺(5-HT)、多聚赖氨酸(PLL)、胶原蛋白以及培养基四种介质对电极进行毒化再通过紫外照射进行活化, 结果显示电极被介质污染后, 仍可通过紫外照射实现电极的有效活化更新, 并且维持较高电化学活性, 如图3(A-c)所示^[59]. 由于紫外光对生物组织和环境伤害较大, 我们进一步将具有优异光催化降解性能的紫外光

图 3 抗污及祛污传感界面构建. (A)光照自清洁的机理图(a), 光致自清洁传感器示意图(b), 蓝色、黄色、红色分别代表rGO、TiO₂和金纳米颗粒, 以及三次循环再生后传感器的再生效率统计图(c), 黑线、红线、蓝线、紫线分别表示5-HT、PLL、胶原和培养基污染^[59]; (B)电极污染后可见光照射再生的示意图(a), PEDOT@CdS/TiO₂纳米复合物的TEM表征图(b), 以及初始(黑色)、5-HT污染(红色)以及可见光照射再生(蓝色)的PEDOT@CdS/TiO₂/ITO电极在1 mmol/L铁氰化钾溶液中的循环伏安曲线(c)^[60] (网络版彩图)

Figure 3 Sensing interface fabrication to solve the problem of electrode fouling. (A) Schematic illustration of the formation of free radicals for photocatalytically renewing with absorbing light (a), schematic diagram showing the structure of photocatalytically renewable electrochemical sensors (b); blue, yellow and red features representing rGO, TiO₂ and Au NPs, respectively. And recovery efficiency of the renewable electrochemical sensor after three cycles, black line, red line, blue line, and purple line representing 5-HT, PLL, collagen, and CCM fouling, respectively (c) [59]; (B) Schematic diagram showing electrode renewal by visible light irradiation after fouling (a), the TEM image of PEDOT@CdS/TiO₂ nanocomposites (b), and cyclic voltammograms of origin (black), fouled by 5-HT (red), and recovered by visible light irradiation condition (blue) of PEDOT@CdS/TiO₂/ITO electrode in 1 mmol/L K₃[Fe(CN)₆] (c) [60] (color online).

催化剂 TiO_2 和光催化性能较弱的可见光催化剂 CdS 联用形成高效异质结催化剂结构, 并利用导电聚合物PEDOT修饰层提高传感器的电化学性能及生物相容性, 成功构建了对生物样本损伤较小的可见光自清洁传感器(图3(B)), 实现了细胞培养及检测过程中传感器表面的同步清洁与更新^[60,61].

以上介绍了本课题组通过多种改性和修饰策略构建功能化微纳传感界面的方法, 这些方法有效提升了电化学传感器的综合检测能力, 为单细胞甚至亚细胞水平生理过程的实时监测奠定了基础. 下文将根据传感器的尺寸, 分别介绍我们课题组利用微米电极和纳米电极在单细胞以及亚细胞水平探测的研究进展.

3 微米电极单细胞监测

微米电极因与单细胞尺寸相当, 被广泛用于单细胞释放活性物质的动力学研究. 根据检测对象不同, 下面将分别介绍我们课题组构建的微米电极在动物细胞和植物细胞信号分子释放实时监测方面的进展.

3.1 单个动物细胞的实时监测

动物细胞间通讯是维持哺乳动物复杂机体正常生理功能的关键因素. 研究信号分子(如活性氧^[29,35]、神经递质^[10,62,63]、 NO ^[27,43,59]、 H_2S ^[30]等)的胞间通讯, 有助于我们理解细胞内物质和能量代谢途径、氧化应激机制以及神经信号转导过程.

H_2S 是生命体重要的气体信号分子, 参与多种生理及病理过程, 例如神经传导、血压调节、代谢调节、抗炎反应及缺血再灌注等. 我们利用具有优异抗污性能的NPG@PEDOT微电极对单个HeLa细胞释放的 H_2S 进行了实时监测^[30](图4(A-a)). 实验结果表明, HeLa细胞经半胱氨酸刺激后, 安培电流信号迅速上升, 这是由于半胱氨酸经胞内胱硫醚- γ -裂解酶催化分解生成 H_2S . 然而, 将细胞与PAG(胱硫醚- γ -裂解酶的抑制剂)孵育后再外加半胱氨酸刺激液, 并没有明显的电流响应产生, 证明检测的电流信号来自于细胞释放的 H_2S , 如图4(A-b)所示. 本工作首次实现了单细胞水平 H_2S 释放的电化学实时检测, 拓展了电化学方法在单细胞信号分子检测中的应用范围, 并为后期 H_2S 相关生理及病理学研究奠定了方法学基础.

通过胞吐作用释放的神经递质是神经元之间传递

图4 微米电极用于实时监测单个动物细胞释放信号分子. (A)电化学监测单个HeLa细胞释放 H_2S 的显微图(a)和安培曲线图(b)^[30], (B)安培监测单个海马神经元曲张体胞吐释放谷氨酸的示意图(a)和单个囊泡谷氨酸释放量的统计图(b)^[45]; (C)具有高纵横比环形结构以及环绕细胞培养室的聚二甲基硅氧烷(PDMS)微柱结构的微流控芯片示意图(a)以及培养在微流控芯片中单个PC12细胞被高钾溶液刺激后电极记录的安培电流响应图(b)^[48](网络版彩图)

Figure 4 Real-time monitoring of signaling molecules released from single animal cell. (A) Microscopy image (a) and amperometric response (b) showing the electrochemical monitoring of H_2S release from single HeLa cell^[30]; (B) Schematic diagrams showing the process of amperometric monitoring of glutamate exocytosis from single hippocampal varicosity (a) and representative histograms of logarithm of released glutamate amounts quantified from single vesicles (b)^[45]; (C) Schematic diagram showing the microdevice with high aspect ratio circle and PDMS micropillars around the cell culture chamber (a), and amperometric recordings from single PC12 cell cultured in microdevice stimulated by highly-concentrated K^+ solution (b)^[48] (color online).

信息的重要媒介, 任何微小改变都会引起神经系统功能紊乱, 导致诸如神经退行性疾病等严重的神经系统疾病. 因此研究突触囊泡胞吐动力学过程对于深入理解神经系统功能、疾病诊断和相关药物研发具有极其重要的意义. 目前, 超微电化学传感器对胞吐过程的研究主要集中在电活性神经递质释放动力学的检测^[10,64-70], 而针对非电活性神经递质(如谷氨酸)研究较少^[71-74]. 谷氨酸是一种参与记忆形成的兴奋性非电活性神经递质, 然而, 过量的谷氨酸具有神经毒性, 会

引起神经细胞损伤甚至凋亡, 导致癫痫、帕金森综合征、阿尔茨海默病等多种神经退行性疾病. 我们课题组通过构建酶型超微电化学传感器, 首次实现了原代海马区神经元谷氨酸胞吐释放动力学过程的实时监测, 并发现谷氨酸胞吐释放过程与神经递质儿茶酚胺类似, 具有量子释放特点^[44]. 随后, 我们使用阿尔茨海默症相关蛋白 β -淀粉样蛋白(A β)孵育原代海马神经元, 利用谷氨酸酶型传感器检测不同处理条件下谷氨酸胞吐释放情况(图4(B-a)), 结果发现随着处理时间的增长(30~300 min), 单个囊泡释放的谷氨酸分子数呈先上升后下降, 如图4(B-b)所示. 通过进一步的研究发现, A β 可能通过改变I型囊泡谷氨酸转运体的表达影响囊泡内谷氨酸的装载量, 进而影响囊泡释放谷氨酸数目^[45]. 由以上结果推测, 在阿尔茨海默症早期, A β 会引起谷氨酸胞吐释放量上升, 从而过度激活突触后谷氨酸受体, 产生神经毒性, 引起神经细胞的损伤甚至凋亡. 我们通过构建超微电化学传感器对胞吐过程进行分析, 为神经元生理和病理过程研究提供了方法学基础.

体内细胞时刻处于复杂的微环境, 因此对培养细胞的准确检测依赖于其生存微环境的成功构建. 微流控芯片技术通过结构设计、表面生物功能化以及流体的精确控制, 可以实现体内生理微环境的模拟^[75,76]. 为此, 我们将微电极阵列与微流控芯片技术集成(图4(C-a)), 实现了无剪切力模式下鼠嗜铬细胞瘤(PC12)长期自动化增殖及分化培养, 并将芯片与微电极阵列集成实时监测PC12细胞生长过程中多巴胺的释放^[48](图4(C-b)), 这种微流控系统与微电极阵列集成的装置通过对细胞微环境进行重构与模拟, 可用于接近生理条件下细胞生长和发育过程的实时原位监测和研究.

3.2 单个植物细胞的实时监测

超微电化学传感器在动物细胞信号分子实时原位探测等领域取得了重要进展, 然而针对单个植物细胞信号分子实时探测的研究较少. 基于此, 我们课题组开展了一系列利用超微电化学传感器检测单个植物细胞信号分子释放的研究.

氧爆发在植物生长发育、疾病防御、信号转导中发挥着重要的作用, 有研究表明 H_2O_2 在植物抗病过程中可能作为信号分子, 传递抗病信息, 进而激发植物细胞内多种防卫反应以获得抗药性. 利用Pt NPs修饰的碳纤维微米电极, 我们实现了苯并噻二唑刺激条件

下单个植物原生质体氧爆发的实时动态监测. 通过对检测的电化学信号(图5(A))分析发现, 原生质体氧爆发时 H_2O_2 呈量子释放, 并且转基因植物原生质体具有更强的抗药性和更长的氧爆发持续时间^[22]. 除此之外, 我们利用TiC/C/Pt NPs微米盘电极实现了油菜单个原生质体生长素IAA释放的实时动态监测^[28], 安培监测结果表明, IAA以胞吐的形式被释放到胞外环境, 其释放具有量子释放特点. 通过对胞吐释放的安培峰进一步分析发现油菜原生质体IAA释放过程存在两种不同的囊泡胞吐模式, 如图5(B-b)所示, 即全融合(full collapse fusion, FCF, 红色柱状图)模式和“kiss and run”(K&R, 蓝色柱状图)模式. 前者囊泡膜与细胞膜完全融合, 一次释放囊泡所有内含物, 后者囊泡膜与细胞膜形成瞬时融合孔, 释放部分囊泡内含物后脱离细胞膜. 后者这种暂态的囊泡融合方式利于囊泡在体内快速循环, 增加IAA的释放和回收效率(如图5(B-a)所示). 该研究作为探究生长素极性运输和输出的机理提供

图 5 微米电极用于实时监测单个植物细胞释放信号分子. (A) 苯并噻二唑刺激条件下单个植物细胞原生质体氧爆发的安培曲线, 内插图为本原生质体显微图^[22]; (B) 单个原生质体胞吐释放IAA过程的示意图(a)和对简单事件(红色)和复杂事件(蓝色)安培信号的峰电流幅值、半峰宽、峰电量的统计对比图(b)^[28] (网络版彩图)

Figure 5 Real-time monitoring of signaling molecules released from single plant cell. (A) Amperometric signals showing the transient oxidative microburst events from a living protoplast evoked by BTH, and microscopy image of a protoplast (inset) ^[22]; (B) Schematic diagrams showing the amperometric monitoring of IAA efflux from single protoplasts by vesicular exocytosis (a), and histograms of I_{peak} , $T_{1/2}$, Q of simple (red) and complex (blue) IAA release events (b) ^[28] (color online).

了新的思路和方法。

4 纳米电极单细胞监测

相较于微米电极, 纳米电极具有更高的空间分辨率, 可以实现对细胞膜表面不同区域、突触间隙囊泡释放、细胞内胞质以及特定细胞器的监测, 从而为深入研究细胞通讯机制和胞内代谢提供有力工具。基于此, 我们课题组先后开发了碳纤维纳米电极和纳米线电极, 并将其用于突触间隙、单细胞以及亚细胞监测。

4.1 突触内实时监测

突触是神经元之间功能上发生联系以实现信息传递的关键部位。在化学突触信息传递的过程中, 囊泡内的神经递质以量子释放形式释放到突触间隙(20~40 nm), 随即扩散至突触后膜, 与后膜上特殊受体结合引发突触后电位。随着人们对神经系统研究的不断深

入, 对于突触内囊泡运输、递质传递过程、胞吐动力学的理解也逐渐完善, 但对突触囊泡胞吐方式以及突触后电位的传递过程等仍存在争议。除此之外, 突触间隙尺寸小、信号分子数量少、胞吐速度快(毫秒级)且动力学复杂的特点, 导致突触间隙信号分子实时、原位、定量监测极为困难, 从而限制研究的进一步深入。

为此, 我们课题组利用火焰刻蚀方法发展了一种新型锥状碳纤维纳米电极(CFNE)^[77], 该电极尖端活性区域直径仅有50~200 nm, 长度约为1~2 μm (图6(A-a))。利用该纳米电极, 我们首次实现了纳米级突触间隙神经递质释放的实时动态监测。随后, 我们结合微流控芯片技术, 构建了交感神经元(SCG)和平滑肌细胞(SMC)形成的通讯网络^[78], 并使用CFNE实时探测SCG-SMC间隙内单个囊泡胞吐事件(图6(A-b)), 同时将纳米玻璃电极探入SMC内部检测突触后电位响应, 在接近体内真实条件下实现突触间隙信息传递的原位

图 6 碳纤维纳米电极用于单个突触间隙的胞吐释放检测。(A)CFNE电镜表征图(a)电极插入突触间隙明场照片(b), 高钾刺激后安培信号图及“简单峰”和“复杂峰”信号放大图(c)^[77]; (B)CFNE插入DA神经元突触明场照片(a), 未处理DA神经元及哈巴昔、6-OHDA、哈巴昔预处理后6-OHDA孵育条件下DA神经元胞吐释放多巴胺分子电量统计图(b), CFNE检测药物调控下DA神经元突触间隙胞吐释放的示意图及猜测机理(c)^[82] (网络版彩图)

Figure 6 CFNE for monitoring of individual vesicular exocytosis inside single synapses. (A) SEM image of CFNE (a), bright-field photomicrograph showing the tip of CFNE inside a synapse between a varicosity of SCG neuron and smooth muscle cell (b), and high K^+ -induced amperometric spikes and representative simple and complex events (c) ^[77]; (B) Bright-field photomicrograph displaying a nanoelectrode tip inside a synapse of DAergic neurons (a), histograms showing the charge of dopamine molecules induced by untreated neurons, harpagide-treated neurons, 6-OHDA-treated neurons and pre-treated with harpagide before exposure to 6-OHDA (*** $P \leq 0.001$; n.s.: not significant) (b), and schematic of CFNE monitoring of vesicular exocytosis inside an individual DAergic neurons synapse under different drug stimulation and possible mechanism (c) ^[82] (color online).

监测. 实验结果表明, 50%以上的事件具有“复杂峰”信号特征(图6(A-c)), 并且这些“复杂峰”事件的特征峰信号符合K&R释放规律, 同时还发现胞吐释放热点区域集中在突触间隙内. 平滑肌电生理检测结果证明突触前细胞释放的神经递质可有效诱导SMC突触后膜电位响应, 且SCG-SMC间隙释放去甲肾上腺素的主要模式是由融合孔闪烁介导的复杂胞吐模式, 进一步数据模拟计算表明融合孔闪烁开孔半径约为1.2 nm. 由此, 我们利用研发的CFNE建立了突触间隙探测的新方法.

在此基础上, 我们利用CFNE初步研究了突触相关神经系统疾病药物作用机理. 目前市售的神经退行性疾病相关药物往往存在稳定性低, 渗透性低, 药代动力学不可控和易于酶促降解的问题, 不能有效地阻止和减缓神经元损伤. 具有神经活性和良好药代动力学的天然产物小分子则有望被用于临床治疗^[79-81], 但是天然产物小分子对神经元的保护、修复作用机制并不明确. 鉴于此, 我们首先采用神经毒素6-OHDA孵育原代多巴胺能(DA)神经元, 构建帕金森疾病模型, 并采用CFNE检测其突触间隙内多巴胺的释放^[82]. 实验结果发现经过6-OHDA损伤后, 神经递质释放量急剧下降, 表明基于DA神经元损伤的帕金森疾病模型构建成功. 随后, 我们研究了天然产物小分子哈巴昔对DA神经元的保护作用. 研究结果发现哈巴昔孵育DA神经元后, 递质释放量上升, 胞吐事件频率增加; 经哈巴昔预处理处理的神经元能有效抗衡6-OHDA损伤作用, 维持突触囊泡正常释放功能, 如图6(B-b)所示. 荧光成像结果证实了哈巴昔通过减少细胞内活性氧水平来抑制胞内 α -突触核蛋白单体磷酸化过程, 从而增强突触释放功能(图6(B-c)). 这项工作首次实现中枢神经元突触间隙神经递质释放的实时监测, 对天然产物小分子保护中枢神经元突触功能的机理做出初步解释, 为帕金森病预防、治疗和药物评估提供了新思路.

4.2 活细胞内实时监测

目前, 胞内检测的纳米电化学传感器大多数是基于碳纤维、玻璃纳米管等材料的锥形电极. 随着电极不断刺入细胞内部, 这类锥形电极对细胞损伤逐渐增加. 另一方面, 受材料或活性面积限制, 这类电极难以进一步修饰, 且在电极刺入细胞过程中电极表面容易被污染、毒化从而降低电化学性能. 纳米线状或管状材料是制备纳米电极的理想材料, 然而少数具有电化

学活性、尺寸均一的纳米线或纳米管(如Ag纳米线、Au纳米线、碳纳米管)因缺乏机械刚性, 难以刺穿韧性的细胞膜, 进行胞内检测.

针对以上问题, 我们提出基于单根SiC半导体纳米线(SiC NW)制作核壳结构纳米电极的新方法: 以机械强度高的SiC NW为基底, 通过CVD法在其表面沉积导电碳层, 制备了核壳型SiC@C NWE. 该电极直径约400~600 nm, 长度可调控在5~10 μ m, 在胞内检测时对细胞伤害小, 为开展胞内信号分子及代谢过程研究提供了有力的工具^[21].

巨噬细胞内活性氧(ROS)和活性氮(RNS)的调控对杀伤病原体和维持细胞稳态极其重要. 我们采用局部镀铂的方法在SiC@C NWE尖端3 μ m区域电化学沉积Pt NPs, 构建出SiC@C/Pt NWE(图7(A-a)). 我们将SiC@C/Pt NWE插入巨噬细胞内部, 监测单个吞噬溶酶体内ROS/RNS含量. 根据Ewing课题组^[83]报道的胞内囊泡电化学计数法(IVIEC), 在施加足够电位时, 与电极接触的脂质体囊泡会发生破裂, 其内含物会迅速在电极表面氧化(如图7(A-b)所示), 产生峰状电流信号. 我们的实验结果发现, 单个吞噬溶酶体内ROS/RNS的分子数量存在较大差异, 统计结果呈正态分布, 说明吞噬溶酶体在不同成熟阶段ROS/RNS含量存在较大差异性. 进一步对峰状信号分析发现, 只有25%的信号与经典的囊泡碰撞特点相符, 而75%的信号在下降阶段出现明显的拖尾(图7(A-c))^[20]. 这一现象表明, 吞噬溶酶体可能存在快速(<1 ms)的ROS/RNS稳态调控机制, 即在电极表面氧化消耗的同时仍会产生ROS/RNS. 我们利用SiC@C/Pt NWE首次实现对巨噬细胞内吞噬溶酶体中ROS/RNS亚毫秒级监测, 该电极为检测胞内氧化应激过程提供了有利的检测手段, 为深入研究不同生理病理条件下巨噬细胞ROS/RNS稳态调控过程提供了重要定量依据.

细胞内许多反应过程限域在细胞膜或细胞器等亚细胞区域, 因此针对特定区域进行监测, 能够更为真实地反映细胞内各种细胞器原位生命活动. 例如, 线粒体是细胞进行有氧呼吸的主要场所, 同时也是胞内生成ROS的重要细胞器^[84,85]. 当前, 许多抗癌药物通过诱导ROS释放以杀死癌细胞^[86]. 近年来有研究表明抗癌药物紫杉醇可诱导线粒体ROS产生, 但其对线粒体的作用位点尚不清晰^[87-89]. 针对此问题, 我们将SiC@C/Pt NWE定位到线粒体, 首次实现单细胞水平监测紫杉醇

图 7 SiC@C纳米线电极用于胞内检测。(A)SiC@C/Pt NWE电镜表征图(a), 检测巨噬细胞吞噬溶酶体内ROS/RNS的示意图(b), 安培检测信号图和肩峰叠加指数下降特征信号峰(75%事件)的放大图及推测机理示意图(c) [20,21]; (B)SiC@C/Pt NWE检测线粒体ROS的示意图(a), 紫杉醇及电子传递抑制剂(DPI, AMA和NaN₃)诱导下NIH 3T3细胞释放ROS的电量统计图(b) [18]; (C) CNTs@PEDOT NWE检测线粒体释放NADH的示意图(a), 白藜芦醇诱导下MCF-7细胞, MCF-10A细胞和预孵育环孢霉素A(CsA)4 h的MCF-7细胞释放NADH的电量统计图(b) [42] (网络版彩图)

Figure 7 Single SiC@C NWEs for intracellular detections. (A) SEM image of a SiC@C/Pt NWE (a), schematic of a SiC@C/Pt NWE inserted into a macrophage with a phagolysosome bursting onto it (b), and amperometric traces recorded after inserting a SiC@C/Pt NWE into a RAW 264.7 macrophage, a spike displaying a clear shoulder superimposed onto its exponential decay branch (75% of events) and possible mechanism of ROS/RNS homeostasis inside a phagolysosome shown below (c) [20,21]; (B) Schematic of a SiC@C/Pt NWE positioning to the intracellular mitochondria for detection of the ROS released (a), and histograms showing the charge of ROS release induced by paclitaxel only and after incubated the NIH 3T3 cell with inhibitors of the respiratory chain DPI, AmA, and NaN₃ ($n=5$; *** $P<0.001$, ** $P<0.01$) (b) [18]; (C) Schematic of amperometric monitoring of NADH from intracellular mitochondria with a CNTs@PEDOT-NWE (a), and histograms showing the charge of NADH release stimulated by resveratrol from MCF-7 cells, MCF-10 A cells and MCF-7 cell pretreated with cyclosporine A (CsA) for 4 h ($n=7$, *** $P<0.001$) (b) [42] (color online).

诱导线粒体ROS的释放, 并对其作用机制进行相关研究, 如图7(B-a)所示 [18]。结果表明, 紫杉醇直接作用于线粒体复合物IV, 以此阻碍呼吸电子传递链中电子的有效传递, 引发ROS的大量产生(图7(B-b))。相比正常细胞, 癌细胞对紫杉醇更为敏感且产生更多ROS, 该现象与紫杉醇特异性杀伤癌细胞的临床结果吻合。

线粒体功能障碍会导致线粒体通透性转换孔(mPTP)打开, 释放NADH, 最终导致能量代谢中断甚至细胞死亡, 因此NADH常被认为是线粒体功能障碍的标志物 [90,91]。然而单个活细胞中原位监测线粒体NADH释放仍然存在很大挑战。为此, 我们在已有的SiC@C NWE表面修饰PEDOT包覆的CNTs, 成功制备出功能化的CNTs@PEDOT NWE, 并将其用于胞内线粒体NADH的实时监测, 如图7(C-a)所示 [42]。白藜芦醇是一种葡萄提取物, 具有抗氧化、抗炎症和抗癌的作用, 但是白藜芦醇促癌细胞凋亡的机理仍不明确 [92]。我们的研究表明, 白藜芦醇可诱导内质网Ca²⁺释放, 促使癌细胞线粒体mPTP打开并伴随大量NADH泄

露, 导致癌细胞线粒体功能失常, 最终引起癌细胞凋亡, 而mPTP打开抑制剂环孢霉素A(CsA)可以有效抑制NADH的泄露。除此之外, 白藜芦醇对正常细胞MCF-10A几乎没有影响(图7(C-b)), 从而表明白藜芦醇在癌症治疗方面具有潜在应用价值。上述研究为细胞器水平的实时动态监测提供了新方案, 有助于进一步在细胞器水平深入研究疾病的发生发展过程以及化疗药物的作用机理。

细胞通过一系列有序的生化反应来维持其内部正常的代谢水平, 针对单细胞内代谢研究有助于理解生理病理状态变化。例如葡萄糖作为生物体内主要的能量来源参与诸多生命代谢过程, 正常生理条件下, 机体可以通过体液调节维持血糖的正常水平; 而在病理条件下, 调控机制遭到破坏, 必须通过药物协助以维持正常血糖水平 [93]。因此, 在单细胞水平实时监测葡萄糖, 对于理解疾病与葡萄糖代谢之间的相关性尤为重要。我们利用具有高选择性、高灵敏度和高时空分辨率的酶型葡萄糖纳米线电极, 考察了肝细胞(LO2)

内产生胰岛素拮抗前后胞内葡萄糖水平变化, 定量监测新型降糖药物人成纤维生长因子1(FGF1)对胞内葡萄糖的调节作用^[19]. 结果表明, FGF1可以促使细胞摄取葡萄糖从而缓解胰岛素拮抗作用, 证明其潜在的血糖调节机制. 酶型纳米传感器拓宽了单细胞水平电化学检测的对象, 为研究药物调控的胞内机制提供了新思路.

5 总结与展望

微纳电化学传感器在单细胞检测领域展现出独特的优越性和广阔的应用前景, 受到研究人员的广泛关注, 已逐渐成为当前生命分析领域的研究热点. 当前国内外研究者在微纳传感界面构建、微纳电化学理论研究及其生物医学应用等方面取得了重要进展和突破, 已有大量优秀的综述论文从不同角度对此进行了介绍和总结^[3,5,74,94-97]. 本文主要介绍了本课题组在微纳电化学传感器单细胞分析方面的研究工作. 首先, 我们采用不同策略在微纳电极表面进行修饰和改性, 构建出高灵敏度、高选择性、生物相容性良好以及抗毒化的微纳传感器. 分别将其成功用于单个动物和植物细胞释放信号分子的实时定量监测, 且在某些信号分子(如生长素、谷氨酸等)释放模式及其调控机制方面获取了一些新的发现. 为实时监测亚细胞或细胞器水平活性分子的动态变化, 我们进一步构建了碳纤维纳米电极和单根纳米线电极, 成功实现突触间隙内以及胞内的原位监测, 获得了突触间隙神经递质胞吐模式、吞噬溶酶体ROS/RNS平衡机制等细胞生命过程的新认知. 上述研究结果为在单细胞与亚细胞水平深入研究生理和病理过程、揭示疾病发生发展机制、促进个体化诊疗以及药物筛选等领域提供了新思路和研究方法.

尽管在微纳电极的构建和单细胞实时监测等方面已涌现出大量优秀的工作, 但其发展和开拓仍面临诸多挑战. 结合国内外的研究状况、生物医学需求以及我们对该领域的理解, 我们认为未来可在以下方面进一步取得突破:

(1)微纳电极制备新技术开发: 微纳电极制备需要精细化操作, 对设备要求高, 且制作过程较为繁琐, 尤其是纳米电极制备往往涉及到基底材料刻蚀和导电层沉积等一系列操作, 且通常每次仅能对单根电极进行功能化修饰. 因此, 需要发展更为简便的电极制备方

法, 例如在SiC半导体纳米线表面通过化学反应直接包覆导电层, 实现导电纳米线的批量制备, 简化单根纳米线电极的构建过程.

(2)电化学传感性能提升: 尽管目前在高性能电化学传感界面构建方面已经取得重要进展, 但传感器在灵敏度、选择性以及稳定性等方面仍需进一步提升. 开发新型电极材料或修饰材料(如单原子催化剂^[98-102]、新型复合材料等), 发挥不同修饰材料或基团的协同作用, 有望构建多功能、高性能传感界面. 此外, 当前大部分电化学检测对象仅局限于电化学活性物质^[96], 可以通过在电极表面修饰功能化基团, 将目标分子信息转换为可测的电化学信号, 拓宽电化学传感器的检测范围.

(3)新型检测模式构建: 研究生理病理条件下复杂的调控机制需要构建新型检测模式, 辅助人们深入理解生命现象. 例如生物机械力在诱导和调控细胞生命活动中发挥重要作用, 然而传统的刚性电极无法顺应细胞形变, 已有柔性电极又难以实现可控的单细胞检测^[25,97,103]. 因此需要构建柔性微纳电化学传感器, 开展机械力诱导单细胞内信号转导过程的机制研究.

(4)分析技术联用: 将微纳电化学传感器与其他分析技术结合, 组成联用分析平台, 可以提升数据维度, 实现多维信息的同步获取^[104]. 例如将荧光成像和电化学分析结合, 同时发挥荧光可视化和电化学高时空分辨率的优势, 对复杂信号转导通路的探索具有极其重要的意义^[105-108]. 纳米孔道技术可在限域空间内灵敏探测靶标流经孔道的离子电流扰动信号, 具有极高的检测灵敏度^[109-115], 将其与纳米电化学传感器结合用于单细胞分析, 有望获取更加丰富的信息. 除此之外, 电化学与拉曼光谱、质谱等联用可以进一步提升定性定量能力.

(5)生物医学问题深入探索: 生命体内细胞受到多种信号调控, 其胞内信号转导机制极其复杂. 尽管人类对自身机能的认知不断深入, 但仍有大量问题尚不明确. 因此, 利用微纳电化学传感器, 在单细胞及细胞器水平深入开展信号通路研究将会深化对生理病理过程的认识, 为药物研发、疾病预防和早期诊断提供基础. 例如生命活动依赖于细胞间通讯和与信号调控, 神经细胞信号传递受到胞间正向调控和负向反馈调节, 但其具体过程和机制尚未明确. 利用纳米电化学传感器在纳米级突触间隙开展研究, 将有望深入理解神经系

统的功能, 对神经疾病的预防和治疗具有极其重要的意义. 此外, 开展空间分辨的单细胞分析, 通过对同一组织不同位置的大量单细胞分析数据进行统计, 可将大量单细胞分析的信息还原到其原本的空间位置, 探索细胞异质性并重构组织的结构与功能特征, 也将是未来单细胞分析的重要发展方向之一.

可以预见, 随着微纳电化学传感器制备技术和检测性能的提升, 新型检测模式的构建和联用技术的开发, 其在单细胞检测的应用范围将会进一步拓宽, 为单细胞层面深入理解生命动态过程提供更加有力的工具, 对疾病诊断和药物开发等更多领域提供新的视野和思路, 进一步推动生物学的发展.

参考文献

- Altschuler SJ, Wu LF. *Cell*, 2010, 141: 559–563
- Spiller DG, Wood CD, Rand DA, White MRH. *Nature*, 2010, 465: 736–745
- Amatore C, Arbault S, Guille M, Lemaître F. *Chem Rev*, 2008, 108: 2585–2621
- Oomen PE, Aref MA, Kaya I, Phan NTN, Ewing AG. *Anal Chem*, 2019, 91: 588–621
- Chen HY. *Sci China Chem*, 2020, 63: 564–588
- Zheng XT, Li CM. *Chem Soc Rev*, 2012, 41: 2061–2071
- Zhang J, Zhou J, Pan R, Jiang D, Burgess JD, Chen HY. *ACS Sens*, 2018, 3: 242–250
- Ren L, Mellander LJ, Keighron J, Cans AS, Kurczy ME, Svir I, Oleinick A, Amatore C, Ewing AG. *Quart Rev Biophys*, 2016, 49: e12
- Schulte A, Schuhmann W. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 8760–8777
- Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ J, Viveros OH. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 10754–10758
- Wang K, Xiao T, Yue Q, Wu F, Yu P, Mao L. *Anal Chem*, 2017, 89: 9502–9507
- Park J, Galligan JJ, Fink GD, Swain GM. *Anal Chem*, 2006, 78: 6756–6764
- Kim IK, Chung HT, Oh GS, Bae HO, Kim SH, Chun HJ. *MicroChem J*, 2005, 80: 219–226
- Huang WH, Pang DW, Tong H, Wang ZL, Cheng JK. *Anal Chem*, 2001, 73: 1048–1052
- Elliott JM, Birkin PR, Bartlett PN, Attard GS. *Langmuir*, 1999, 15: 7411–7415
- Adams KL, Jena BK, Percival SJ, Zhang B. *Anal Chem*, 2011, 83: 920–927
- Barlow ST, Louie M, Hao R, Defnet PA, Zhang B. *Anal Chem*, 2018, 90: 10049–10055
- Jiang H, Zhang XW, Liao QL, Wu WT, Liu YL, Huang WH. *Small*, 2019, 15: 1901787
- Liao QL, Jiang H, Zhang XW, Qiu QF, Tang Y, Yang XK, Liu YL, Huang WH. *Nanoscale*, 2019, 11: 10702–10708
- Zhang XW, Oleinick A, Jiang H, Liao QL, Qiu QF, Svir I, Liu YL, Amatore C, Huang WH. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 7753–7756
- Zhang XW, Qiu QF, Jiang H, Zhang FL, Liu YL, Amatore C, Huang WH. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 12997–13000
- Ai F, Chen H, Zhang SH, Liu SY, Wei F, Dong XY, Cheng JK, Huang WH. *Anal Chem*, 2009, 81: 8453–8458
- Xu JQ, Duo HH, Zhang YG, Zhang XW, Fang W, Liu YL, Shen AG, Hu JM, Huang WH. *Anal Chem*, 2016, 88: 3789–3795
- Du F, Huang W, Shi Y, Wang Z, Cheng J. *Biosens Bioelectron*, 2008, 24: 415–421
- Liu YL, Qin Y, Jin ZH, Hu XB, Chen MM, Liu R, Amatore C, Huang WH. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 9454–9458
- Chen R, Hu L, Huo K, Fu J, Ni H, Tang Y, Chu PK. *Chem Eur J*, 2011, 17: 14552–14558
- Li LM, Wang XY, Hu LS, Chen RS, Huang Y, Chen SJ, Huang WH, Huo KF, Chu PK. *Lab Chip*, 2012, 12: 4249–4256
- Liu JT, Hu LS, Liu YL, Chen RS, Cheng Z, Chen SJ, Amatore C, Huang WH, Huo KF. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 2643–2647
- Xiao C, Liu YL, Xu JQ, Lv SW, Guo S, Huang WH. *Analyst*, 2015, 140: 3753–3758
- Hu XB, Liu YL, Zhang HW, Xiao C, Qin Y, Duo HH, Xu JQ, Guo S, Pang DW, Huang WH. *ChemElectroChem*, 2016, 3: 1998–2002
- Tsai TC, Guo CX, Han HZ, Li YT, Huang YZ, Li CM, Chen JJ. *Analyst*, 2012, 137: 2813–2820
- Li S, Zhu A, Zhu T, Zhang JZH, Tian Y. *Anal Chem*, 2017, 89: 6656–6662
- Xu H, Zhou S, Jiang D, Chen HY. *Anal Chem*, 2018, 90: 1054–1058
- Hou H, Jin Y, Wei H, Ji W, Xue Y, Hu J, Zhang M, Jiang Y, Mao L. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 18996–19000
- Amatore C, Arbault S, Bruce D, de Oliveira P, Erard M, Vuillaume M. *Chem Eur J*, 2001, 7: 4171–4179

- 36 Amatore C, Arbault S, Bouton C, Coffi K, Drapier JC, Ghandour H, Tong Y. *ChemBioChem*, 2006, 7: 653–661
- 37 Wang Y, Noël JM, Velmurugan J, Nogala W, Mirkin MV, Lu C, Guille Collignon M, Lemaître F, Amatore C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 11534–11539
- 38 Li Y, Sella C, Lemaître F, Guille Collignon M, Thouin L, Amatore C. *Electroanalysis*, 2013, 25: 895–902
- 39 Li Y, Sella C, Lemaître F, Guille-Collignon M, Thouin L, Amatore C. *Electrochim Acta*, 2014, 144: 111–118
- 40 Li Y, Hu K, Yu Y, Rotenberg SA, Amatore C, Mirkin MV. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 13055–13062
- 41 Hu K, Li Y, Rotenberg SA, Amatore C, Mirkin MV. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 4564–4568
- 42 Jiang H, Qi YT, Wu WT, Wen MY, Liu YL, Huang WH. *Chem Sci*, 2020, 11: 8771–8778
- 43 Liu YL, Wang XY, Xu JQ, Xiao C, Liu YH, Zhang XW, Liu JT, Huang WH. *Chem Sci*, 2015, 6: 1853–1858
- 44 Qiu QF, Zhang FL, Tang Y, Zhang XW, Jiang H, Liu YL, Huang WH. *Electroanalysis*, 2018, 30: 1054–1059
- 45 Yang XK, Tang Y, Qiu QF, Wu WT, Zhang FL, Liu YL, Huang WH. *Anal Chem*, 2019, 91: 15123–15129
- 46 Wang J, Trouillon R, Lin Y, Svensson MI, Ewing AG. *Anal Chem*, 2013, 85: 5600–5608
- 47 Liu X, Barizuddin S, Shin W, Mathai CJ, Gangopadhyay S, Gillis KD. *Anal Chem*, 2011, 83: 2445–2451
- 48 Li LM, Wang W, Zhang SH, Chen SJ, Guo SS, Français O, Cheng JK, Huang WH. *Anal Chem*, 2011, 83: 9524–9530
- 49 Hu XB, Liu YL, Wang WJ, Zhang HW, Qin Y, Guo S, Zhang XW, Fu L, Huang WH. *Anal Chem*, 2018, 90: 1136–1141
- 50 Guo CX, Ng SR, Khoo SY, Zheng X, Chen P, Li CM. *ACS Nano*, 2012, 6: 6944–6951
- 51 Zhong X, Bai HJ, Xu JJ, Chen HY, Zhu YH. *Adv Funct Mater*, 2010, 20: 992–999
- 52 Sudibya HG, Ma J, Dong X, Ng S, Li LJ, Liu XW, Chen P. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 2723–2726
- 53 Liu X, Zhang M, Xiao T, Hao J, Li R, Mao L. *Anal Chem*, 2016, 88: 7238–7244
- 54 Liu X, Xiao T, Wu F, Shen MY, Zhang M, Yu HH, Mao L. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 11802–11806
- 55 Feng T, Ji W, Tang Q, Wei H, Zhang S, Mao J, Zhang Y, Mao L, Zhang M. *Anal Chem*, 2019, 91: 10786–10791
- 56 Yang X, Kirsch J, Olsen EV, Fergus JW, Simonian AL. *Sens Actuat B-Chem*, 2013, 177: 659–667
- 57 Wang YW, Liu YL, Xu JQ, Qin Y, Huang WH. *Anal Chem*, 2018, 90: 5977–5981
- 58 Hu L, Huo K, Chen R, Gao B, Fu J, Chu PK. *Anal Chem*, 2011, 83: 8138–8144
- 59 Xu JQ, Liu YL, Wang Q, Duo HH, Zhang XW, Li YT, Huang WH. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 14402–14406
- 60 Duo HH, Xu JQ, Liu YL, Jin ZH, Hu XB, Huang WH. *J Electroanal Chem*, 2016, 781: 371–376
- 61 Duo H, Liu Y, Wang Y, Tang Y, Huang W. *Acta Chim Sin*, 2017, 75: 1091–1096 (in Chinese) [度欢欢, 刘艳玲, 王雅文, 汤匀, 黄卫华. 化学学报, 2017, 75: 1091–1096]
- 62 Puthongkham P, Venton BJ. *Analyst*, 2020, 145: 1087–1102
- 63 Yue Q, Li X, Wu F, Ji W, Zhang Y, Yu P, Zhang M, Ma W, Wang M, Mao L. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 11061–11065
- 64 Cahill PS, Wightman RM. *Anal Chem*, 1995, 67: 2599–2605
- 65 Chen G, Gavin PF, Luo G, Ewing AG. *J Neurosci*, 1995, 15: 7747–7755
- 66 Kennedy RT, Huang L, Aspinwall CA. *J Am Chem Soc*, 1996, 118: 1795–1796
- 67 Hochstetler SE, Puopolo M, Gustincich S, Raviola E, Wightman RM. *Anal Chem*, 2000, 72: 489–496
- 68 Wu WZ, Huang WH, Wang W, Wang ZL, Cheng JK, Xu T, Zhang RY, Chen Y, Liu J. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 8914–8915
- 69 Wang K, Zhao X, Li B, Wang K, Zhang X, Mao L, Ewing A, Lin Y. *Anal Chem*, 2017, 89: 8683–8688
- 70 Zhang N, Zhao W, Xu CH, Xu JJ, Chen HY. *Chem Commun*, 2019, 55: 3461–3464
- 71 Wang Y, Mishra D, Bergman J, Keighron JD, Skibicka KP, Cans AS. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10: 1744–1752
- 72 Ganesana M, Triantopoulos E, Maniar Y, Lee ST, Venton BJ. *Biosens Bioelectron*, 2019, 130: 103–109
- 73 Wang Y, Fathali H, Mishra D, Olsson T, Keighron JD, Skibicka KP, Cans AS. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 17507–17511
- 74 Pan C, Wei H, Han Z, Wu F, Mao L. *Curr Opin Electrochem*, 2020, 19: 162–167
- 75 Sun X, Gillis KD. *Anal Chem*, 2006, 78: 2521–2525
- 76 Dittami GM, Rabbitt RD. *Lab Chip*, 2010, 10: 30–35
- 77 Li YT, Zhang SH, Wang L, Xiao RR, Liu W, Zhang XW, Zhou Z, Amatore C, Huang WH. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 12456–12460
- 78 Li YT, Zhang SH, Wang XY, Zhang XW, Oleinick AI, Svir I, Amatore C, Huang WH. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 9313–9318
- 79 Dakas PY, Parga JA, Höing S, Schöler HR, Sterneckert J, Kumar K, Waldmann H. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 9576–9581

- 80 Xu J, Lacoske MH, Theodorakis EA. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 956–987
- 81 Tang G, Dong X, Huang X, Huang XJ, Liu H, Wang Y, Ye WC, Shi L. *Neuroscience*, 2015, 303: 389–401
- 82 Tang Y, Yang XK, Zhang XW, Wu WT, Zhang FL, Jiang H, Liu YL, Amatore C, Huang WH. *Chem Sci*, 2020, 11: 778–785
- 83 Li X, Majdi S, Dunevall J, Fathali H, Ewing AG. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 11978–11982
- 84 Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13: 780–788
- 85 Friedman JR, Nunnari J. *Nature*, 2014, 505: 335–343
- 86 Yang B, Chen Y, Shi J. *Chem Rev*, 2019, 119: 4881–4985
- 87 Lisse TS, Middleton LJ, Pellegrini AD, Martin PB, Spaulding EL, Lopes O, Brochu EA, Carter EV, Waldron A, Rieger S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E2189–E2198
- 88 Varbiro G, Veres B, Gallyas F Jr, Sumegi B. *Free Radical Biol Med*, 2001, 31: 548–558
- 89 Bernardi P, Rasola A, Forte M, Lippe G. *Physiol Rev*, 2015, 95: 1111–1155
- 90 Mayevsky A, Barbiro-Michaely E. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41: 1977–1988
- 91 Zhao Y, Yang Y. *Free Radical Biol Med*, 2016, 100: 43–52
- 92 Keylor MH, Matsuura BS, Stephenson CRJ. *Chem Rev*, 2015, 115: 8976–9027
- 93 Gasser E, Moutos CP, Downes M, Evans RM. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13: 599–609
- 94 Xiao T, Wu F, Hao J, Zhang M, Yu P, Mao L. *Anal Chem*, 2017, 89: 300–313
- 95 Hu K, Liu YL, Oleinick A, Mirkin MV, Huang WH, Amatore C. *Curr Opin Electrochem*, 2020, 22: 44–50
- 96 Zhang X, Hatamie A, Ewing AG. *Curr Opin Electrochem*, 2020, 22: 94–101
- 97 Liu YL, Huang WH. *Angew Chem Int Ed*, 2020, doi:10.1002/anie.202007754
- 98 Yang XF, Wang A, Qiao B, Li J, Liu J, Zhang T. *Acc Chem Res*, 2013, 46: 1740–1748
- 99 Zhu C, Fu S, Shi Q, Du D, Lin Y. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 13944–13960
- 100 Wang A, Li J, Zhang T. *Nat Rev Chem*, 2018, 2: 65–81
- 101 Jiao L, Yan H, Wu Y, Gu W, Zhu C, Du D, Lin Y. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 2565–2576
- 102 Zhou M, Jiang Y, Wang G, Wu W, Chen W, Yu P, Lin Y, Mao J, Mao L. *Nat Commun*, 2020, 11: 3188
- 103 Liu YL, Jin ZH, Liu YH, Hu XB, Qin Y, Xu JQ, Fan CF, Huang WH. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 4537–4541
- 104 Bentley CL, Edmondson J, Meloni GN, Perry D, Shkirskiy V, Unwin PR. *Anal Chem*, 2019, 91: 84–108
- 105 Amatore C, Arbault S, Chen Y, Crozatier C, Lemaître F, Verchier Y. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 4000–4003
- 106 Zheng XT, Hu W, Wang H, Yang H, Zhou W, Li CM. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26: 4484–4490
- 107 Huang F, Lin M, Duan R, Lou X, Xia F, Willner I. *Nano Lett*, 2018, 18: 5116–5123
- 108 Wang Y, Jin R, Sojic N, Jiang D, Chen HY. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 10416–10420
- 109 Long Z, Zhan S, Gao P, Wang Y, Lou X, Xia F. *Anal Chem*, 2018, 90: 577–588
- 110 Fu K, Bohn PW. *ACS Cent Sci*, 2018, 4: 20–29
- 111 Ying YL, Long YT. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 15720–15729
- 112 Zhu Z, Wang D, Tian Y, Jiang L. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 8658–8669
- 113 Lu S, Wu X, Li M-, Ying Y, Long Y. *View*, 2020, 1: 20200006
- 114 Ying YL, Wang J, Leach AR, Jiang Y, Gao R, Xu C, Edwards MA, Pendergast AD, Ren H, Weatherly CKT, Wang W, Actis P, Mao L, White HS, Long YT. *Sci China Chem*, 2020, 63: 589–618
- 115 Yu RJ, Ying YL, Gao R, Long YT. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 3706–3714

Construction of micro-nano electrochemical sensing interfaces for real-time monitoring of single cells

Yu-Ting Qi[†], Fu-Li Zhang[†], Si-Yu Tian, Xiao-Ke Yang, Yan-Ling Liu, Wei-Hua Huang^{*}

College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

[†]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author (email: whhuang@whu.edu.cn)

Abstract: Cell is the basic structural and biological unit of organisms. Conventional methods for detecting population cells often conceal individual differences between cells. Therefore, efficient single-cell analysis strategies are urgently needed for in-depth studies of cell life activities, revealing the mechanism of disease developments, and promoting individualized diagnosis and treatment. Micro-nano electrochemical sensors play an important role in real-time dynamic monitoring of single cells, due to its small size, high temporal and spatial resolution. At present, micro-nano electrochemical sensors have made important progress in the electrode preparation, high-performance sensing interface construction, theoretical analysis and breakthroughs have been made in single-cell real-time monitoring and related mechanism research. However, complex internal environment, low concentration of active molecules, and dynamic changes in time and space put forward higher requirements on the sensitivity and selectivity of micro-nano electrochemical sensors for single cell detection. Our research group has been engaged in the construction of micro-nano electrochemical sensing interface and its application in real-time dynamic monitoring of single cells and subcellular structures. This feature article mainly introduces our research progress in this field in the past 10 years, and discusses challenges and opportunities in the future.

Keywords: micro-nano electrochemical sensor, high-performance sensing interface, single cell, sub-cell, real-time monitoring

doi: [10.1360/SSC-2020-0206](https://doi.org/10.1360/SSC-2020-0206)