

端粒酶活性检测方法研究进展

郭林燕, 阳明辉*

(中南大学化学化工学院, 湖南长沙 410083)

摘要: 人体端粒酶是一种核糖核蛋白复合物, 在生物体内, 以其自身的 RNA 为模板, 通过催化添加端粒重复序列 TTAGGG 至染色体末端。由于在绝大多数癌症中端粒酶活性与恶性肿瘤之间存在着较大的关联, 其在肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用, 因而对端粒酶活性的检测可为癌症的诊断、预测以及临床治疗提供重要依据。该文总结了近几年来针对端粒酶活性几种不同的检测方法, 重点强调了几种机体内原位检测方法, 并适当的进行了分析比较。

关键词: 端粒酶; G-四联体; 恶性肿瘤; 分析检测

Recent research on monitoring telomerase activity

Guo Lin-yan, Yang Ming-hui*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract: Human telomerase is a ribonucleoprotein complex, which functions as a telomere terminal transferase by catalytic adding telomere repeat TTAGGG to the end of chromosome using its RNA as the template. Due to a very strong association between telomerase activity and malignancy in nearly all types of cancer, telomerase plays a key role in the tumor occurrence as well as development. Monitoring telomerase activity is believed to be important for cancer diagnosis, prediction and provides an important basis for clinical treatment. This review summarizes recent development for detection of telomerase activity, with emphasis placed on in situ detection.

Key words: telomerase; G-quadruplex; in situ; analysis detection

0 引言

端粒, 是一种核蛋白, 由短的富含鸟嘌呤的串联重复序列组成, 在人类细胞中真核染色体的末端形成帽状结构, 以抑制不必要的降解、重组或端到端的融合^[1]。在一些体细胞中, DNA 复制循环后, 因 DNA 聚合酶的不完全复制而使得端粒逐渐缩短, 当长度达到一个临界值时, 细胞便会停止分裂到达衰老阶段^[2]。端粒作为维持染色体复制过程完整性必不可少的组成, 由于其缩短或加帽蛋白缺乏会造成不利的后果, 包括形成染色体异常, 细胞衰老和细胞凋亡^[3-5]。

端粒酶是一种核糖核蛋白逆转录酶, 由一个基本的催化亚基和 RNA 模板以及端粒相关蛋白

一起维持端粒长度和功能^[6-8]。通过其逆转录酶活性及其内在的 RNA 作为模板催化添加端粒重复序列(TTAGGG)_n 至染色体 DNA 的 3' 端^[9], 由于其富含鸟嘌呤(Guanine, G)序列, 在生理条件下, 端粒 DNA 形成了一种分子间和分子内的鸟嘌呤四联结构。研究发现, 在超过 85% 的人类恶性肿瘤中端粒酶具有异常高的活性, 如乳腺癌, 结肠癌, 肺癌, 前列腺癌, 卵巢癌, 胃癌和皮肤癌等。而在正常体细胞中, 端粒酶的表达是被抑制或成缺失状态^[10-12]。由于癌细胞中过度表达的端粒酶会维持端粒的长度, 使得细胞无限制地增生而不会衰老, 因此科学家认为端粒酶在肿瘤的形成过程中起着关键作用。端粒酶的这种特性使得其在癌症早期诊断、预测和治疗领域成为一种重

* 通信联系人, E-mail: yangminghui@csu.edu.cn, Tel: 0731-88836356

要的生物标志物^[13-16]。除此之外,端粒酶和端粒的结构在研究其它疾病、基因调节、细胞/机体老化和哺乳类动物的克隆方面也起到了至关重要的作用^[17-18]。鉴于此,高灵敏度的检测端粒酶活性方法对于疾病机理研究和临床诊断显得尤为重要^[19]。

1 端粒酶活性的传统检测方法

近年来,已经开发出多种测定端粒酶活性的方法^[5,20-21],而 Kim 开发的以聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)为基础的端粒重复序列扩增法(Telomeric Repeat Amplification Protocol, TRAP)因其超高的灵敏度已被发展为端粒酶活性的标准分析方法^[22]。

1.1 TRAP 分析法的原理

TRAP 法是一个单管反应,首先,从细胞或组织中提取端粒酶合成端粒重复序列,接着从外源添加端粒链引物,然后将这些延伸后的产品作为模板进行 PCR 扩增,随后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定,最后使用密度测定法进行定量^[23],从而实现端粒酶活性的检测。

1.2 TRAP 分析法的不足

TRAP 分析法能够实现高通量高灵敏度的检测^[24-25],无疑是一个功能强大的测定方法,但保留着 PCR 放大技术带来的缺点。此外,TRAP 法需要使用昂贵的设备和试剂,相当耗时^[26]。再加上抑制端粒酶活性已被提议作为人类癌症治疗的潜在方法,而 TRAP 在筛选有效的端粒酶抑制剂如 G-四联体配体时易受 PCR-派生产物的影响,因此,该方法存在很多局限性。

1.3 TRAP 分析法的发展

为了克服 TRAP 分析法的上述缺点,不断有新的改善过的 PCR 步骤被提出来。包括采用 TRAP 法结合 PCR 后杂交协议的化学发光探针、荧光染料或生物素化的引物来测量 PCR 扩增双链 DNA 的数量^[27-29]。例如 2010 年,Plaxco 等利用引物修饰金纳米粒子来检测高浓度细胞溶解物中端粒酶的活性,这种方法虽然比传统的 TRAP 法在特异性和灵敏性方面有所提高,但是这种以凝胶为基础的方法仍然耗时且需要丰富的专业知识^[30]。

2 端粒酶活性的最新检测方法

为替代传统的 TRAP 分析法,研究者们已经开发了许多 PCR-free 分析方法并将之应用到端粒酶活性的检测中,例如光学传感器、表面等离子共振、电致化学发光、电化学检测和指数等温扩增分析等^[31-35]。

2.1 紫外吸收法

纳米金由于其自身较高的消光系数和粒径依赖型的光学性能在构建生物传感平台方面显示出极大的应用潜力,被广泛应用到众多领域的检测^[36-39]。基于纳米金的分析方法主要优点就是分子识别行为可以转换成颜色改变,继而可以通过肉眼观察或者利用紫外可见光谱简单测定出来。因此,该文简要列举了两个例子来说明其在端粒酶活性检测方向的应用。

Willner 等^[40]开发了一种利用端粒酶产生的端粒-氯化血红素/G-四联体催化氧化 L-半胱氨酸诱导纳米金聚集的方法来定量分析端粒酶活性,其反应原理如图 1。端粒是富含鸟嘌呤核苷的折叠核酸链,在 K⁺和氯化血红素的存在下,端粒单元自组装成氯化血红素/G-四联体结构,表现出辣根过氧化物酶催化活性^[41]。端粒-氯化血红素/G-四联体结构能催化硫醇类物质(例如 L-半胱氨酸)氧化成二硫化物(例如胱氨酸)^[42]。L-半胱氨酸能促进 Au 纳米颗粒的聚集,伴随着紫外吸收的变化,从红色(单个金纳米粒子)变为蓝色(团聚的金纳米粒子),该过程被用来定量分析端粒酶活性。从 293T 肿瘤细胞中提取端粒酶,当存在脱氧核糖核苷三磷酸混合物(dNTPs)和合适的引物探针时,所述调聚反应将催化端粒-氯化血红素/G-四联体链的生成,用以控制 L-半胱氨酸介导的纳米金的聚集。因此,聚合的程度由端粒酶的浓度控制。该方法检测限能检测到 27 细胞/ μL 中端粒酶活性。并且此方法是灵敏度高,检测时间相对较短(3h),以及无需进行复杂的处理和昂贵的仪器。

此外,Xia 等^[43]设计了一个拥有四个检测色状态(如蓝色、紫色、红色和沉淀)的双功能纳米金(GNP)探针,用于双向直接、准确简单的检测尿液中端粒酶活性,并成功地将应用于膀胱癌

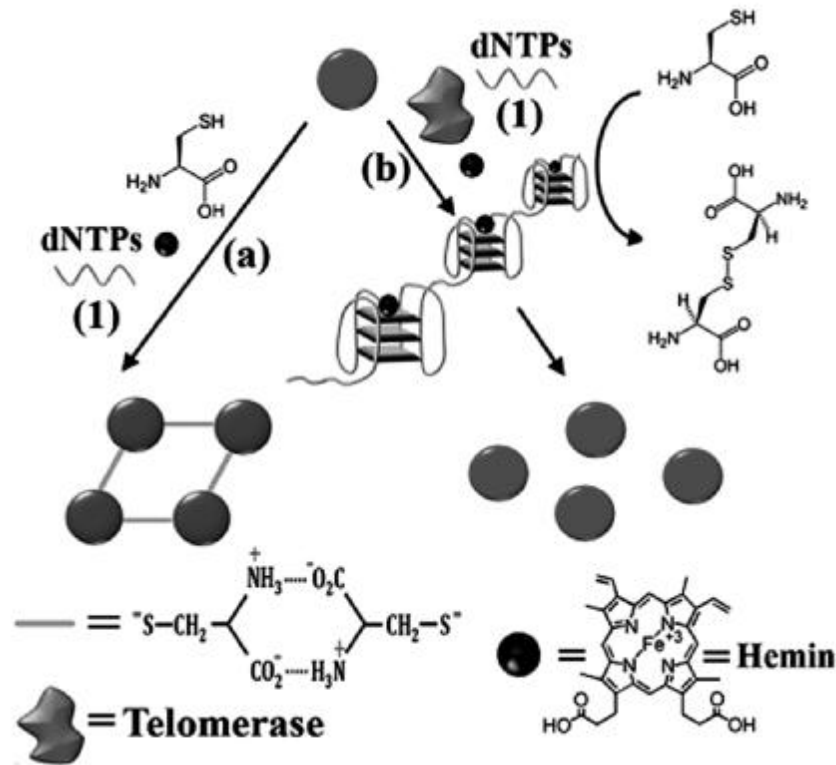


图 1 基于氯化血红素/端粒-G 四联体控制的 L-半胱氨酸介导纳米金团聚检测端粒酶活性机理图
Fig.1 Analysis of telomerase activity by following the hemin/telomere-G-quadruplex-controlled L-cysteine mediated aggregation of Au NPs

的无痛诊断,反应机理如图 2。根据数轴理论,首先定义红色 GNP 探针为原点,它代表尿提取物中端粒酶无活性。正方向对应于相对高浓度活性端粒酶,在该系统中 GNP 探针组装明显,产生沉淀。负方向对应于相对低浓度(紫色)和无端粒酶存在(蓝色)的样品。四个检测状态可以通过肉眼或紫外-可见光谱来区分。沉淀和紫色状态代表膀胱癌患者,而蓝色和红色状态代表正常个体。相比于传统比色法,具有优良的辨别能力,并且准确简洁,避免大量的操作和复杂的仪器。此外,该系统稳定性极强,探针保存一个月后依然可以区分。因此,这种具有良好的精度、成本、选择性、稳定性和适用性的检测系统在端粒酶活性和膀胱癌甚至其它癌症的诊断方面具有广阔的应用前景。

2.2 等温扩增法

2013 年,Weizmann 等^[44]开发了一种新颖的指数等温扩增端粒重复序列(exponential isothermal amplification of telomere repeat, EXPIATR)分析法,这是一种简单、灵敏、可靠的

检测细胞提取物中端粒酶活性的方法。

如图 3 所示,此法基于 DNA 等温扩增这样一个策略,通过链置换扩增激发,使用限制性内切酶刻痕于一个识别位点,并利用聚合酶多次复制和重置目标,实现 25 min 的超快检测。这种方法不仅具有 TRAP 的优越性,还在此基础上有了一定的提升。它放弃了昂贵的热循环协议,使该法更加廉价且在临床上更加通用,此外其检测时间相较于其他方法大大缩短。由于高通量、等温、即用型等特点,EXPIATR 在未来临床试验使用中显示出了巨大潜力。

此后,Zhang 等^[45]提出了一种利用端粒诱导两级等温扩增介导化学发光的分析方法检测单细胞水平的端粒酶活性。如图 4,存在端粒酶时,端粒重复序列 (TTAGGG)_n 被加到端粒酶基底引物的 3' 端,这可以转化成链置换扩增的模板^[46-47],用来生成短寡核苷酸、DNA 酶和 (TTAGGG)_n 中的端粒重复序列。短寡核苷酸可以充当一个新的触发点来结合游离的端粒酶基底引物,从而启动一个恒温指数扩增反应^[48-50],生

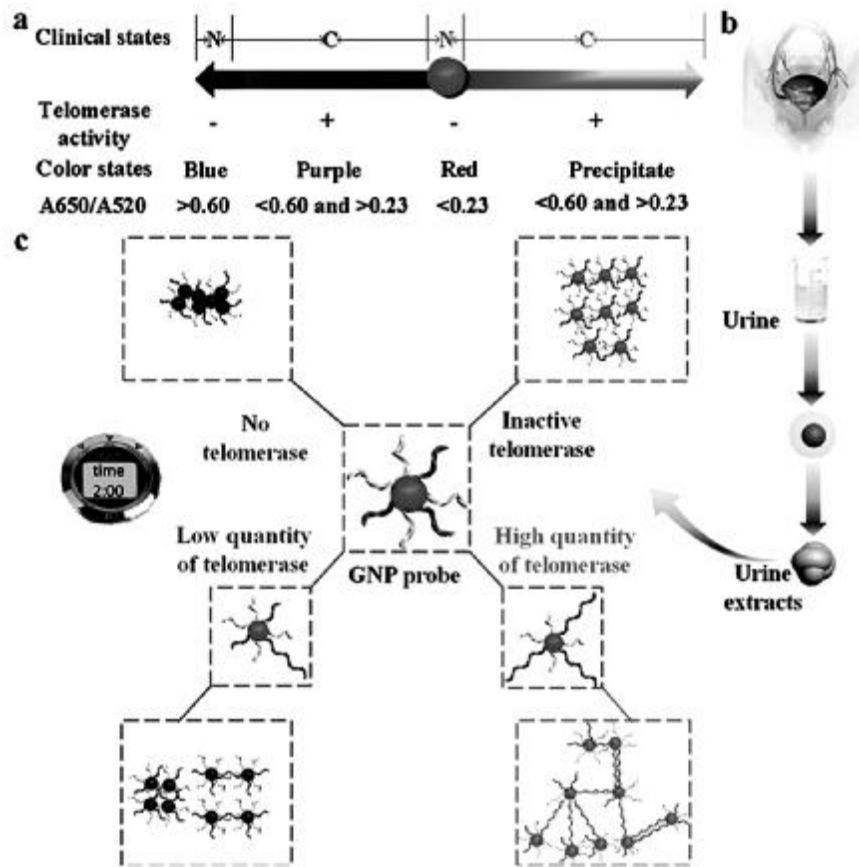


图 2 (a)膀胱癌的无痛临床估计计数轴理论;(b)端粒酶提取尿样;(c)端粒酶检测原理图

Fig.2 (a) The number axis theory for clinical estimate of bladder cancer without pain. (b) Telomerase extraction from urine samples. (c) The scheme for telomerase detection

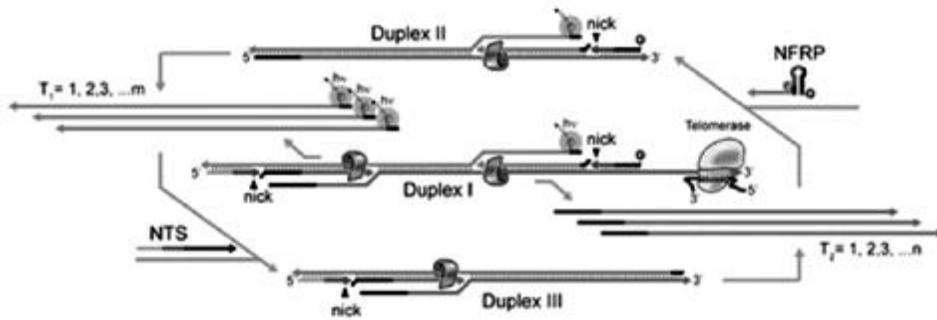


图 3 EXPIATR 测定的原理图

Fig.3 Schematic diagram of the EXPIATR assay

成大量的催化 DNA 酶。无论是 DNA 酶还是富含 G 的端粒重复单元都可以与血红素相互作用,形成催化血红素-G-四联体纳米结构,在鲁米诺与过氧化氢共存时,可以催化产生化学发光信号。而在缺乏端粒酶时,两阶段等温扩增不能启动,所以观察不到化学发光信号。

该方法与 TRAP 相比,更简单、更灵敏、更快

速,而且不需要热循环、洗涤和分离步骤^[27]。而与 EXPIATR 分析相比,该方法有一个突出的优点就是成本低,它不需要使用昂贵的荧光标记核苷酸^[44]。由于两阶段等温扩增的扩增效率高、灵敏度高以及化学发光测定法的动态范围宽等优点,该方法能够灵敏地检测到从单一的 HeLa 癌细胞中提取的端粒酶活性,而不需要任何标记的

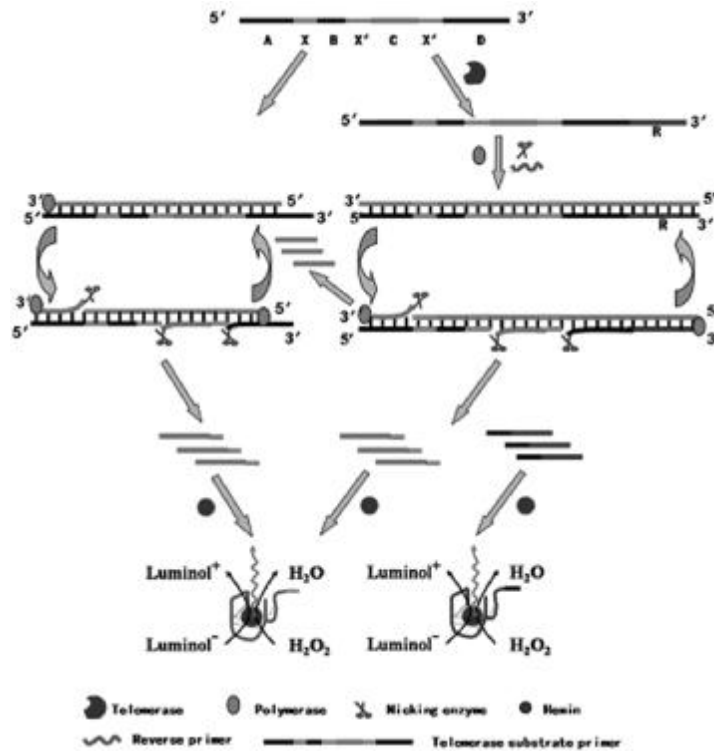


图4 端粒诱导两级等温扩增介导化学发光检测端粒酶活性原理图

Fig.4 Schematic illustration for the detection of telomerase activity using telomeres-induced two-stage isothermal amplification-mediated chemiluminescence assay

DNA 探针。上述方法可进一步用于筛选抗癌药物,并且可能提供一种有前途的方法来发现新的抗癌药物。

2.3 电化学分析法

电化学法由于其自身的高灵敏度、操作简单、反应迅速和成本低廉等优点在分析端粒酶活性方面正越来越备受关注^[51-54]。

Ozsoz 等^[31]开发了一种基于鸟嘌呤氧化信号来检测端粒酶活性的免标记电化学分析法,如图5所示,这种分析技术利用一次性电极——碳石墨电极作为电化学传感器。通过以端粒重复序列扩增为基础的 PCR 分析法,将鸟嘌呤的氧化信号作为端粒酶活性的量度来进行电化学检测。此分析法是第一个免标记的电化学分析法,相较于其他检测方法,如表面等离子共振和石英晶体微天平具有快速,简单,廉价而且无放射性等优点。并且无需标记,使其适用于临床样品的定量测定。然而这种方法也存在 PCR 分析法的固有局限性,为用于常规分析,有必要开发一种不依赖于易产生误差的 PCR 的分析方法。

研究表明,生物传感器中使用电化学阻抗法

(Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) 有着诸多优点,如高灵敏度、高精密度、检测速度快以及可实现实时监测等^[55-58], Lin 等^[59]开发了一种基于免标记的电化学阻抗法来检测端粒酶活性,反应原理如图6所示。该方法检出限能够测定 1000 HeLa 细胞中端粒酶的活性。首先将硫醇化的 DNA 引物固定到金表面上,然后在 dNTPs 的存在下与端粒酶一起孵育进行延伸反应。随着端粒酶活性的增强,延长的 DNA 引物可阻断 Au 电极表面 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 电子的转移,导致阻抗逐渐增大。该方法没有涉及 PCR 和任何信号放大技术,因此不存在和这些技术相关的缺陷。同时还发现,阻抗值与 $10^3\sim 10^5$ 范围内的 HeLa 细胞中端粒酶活性呈对数线性相关。由于其简单的和方便的操作,在癌症的临床诊断方面显示出潜在的应用。

Cunci 等^[60]利用免标记电化学阻抗法也制备了生物传感芯片实现原位检测癌细胞中端粒酶的活性。首先将能与端粒酶特异性结合的单链 DNA 探针修饰在金电极阵列表面,接着利用 EIS 实现端粒酶活性检测。

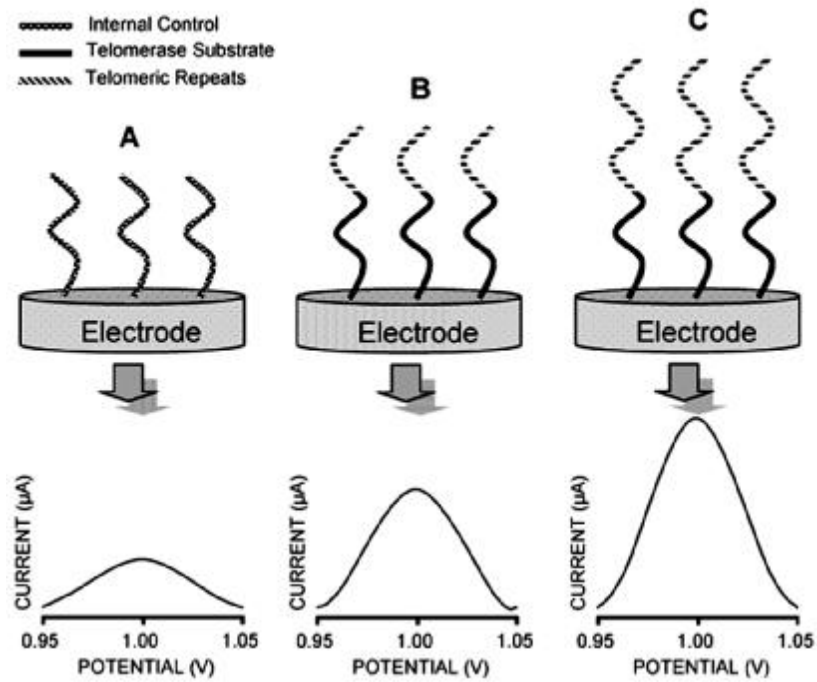


图 5 分别来自端粒酶阳性细胞提取的热灭活的阴性(A)、中度(B)和强端粒酶活性(C)的 PCR 产物的鸟嘌呤氧化信号示意图

Fig.5 Schematic illustration of guanine oxidation signals of PCR products from (A) heat inactivated negative controls, telomerase positive cell extracts with (B) moderate, and (C) strong telomerase activity

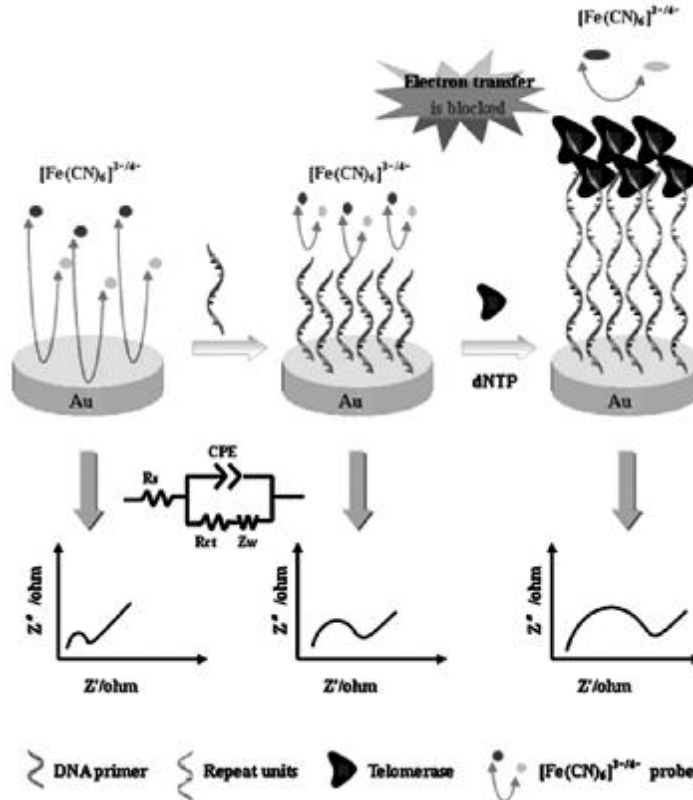


图 6 基于 EIS 方法的端粒酶活性分析原理图

Fig.6 Illustration for the protocol of telomerase activity analysis based on EIS method

为了进一步提高电化学检测的灵敏度,通常会考虑降低背景或放大信号,因而核酸外切酶 III 被用来减少背景信号^[61-62],但蛋白酶本身具有检测相对昂贵和复杂的缺点。因此,仍然急需合适的方法来放大信号。杂交链反应(Hybridization Chain Reaction, HCR)是一种无酶、室温线性放大的方法,它操作简单,而且只使用了 DNA 单链,成本效益高^[63],两个 DNA 发夹探针可以稳定地共存于杂交溶液中。但引入的引发剂会触发两个探针的交替杂交形成有缺口的双螺旋。因此,它已被广泛应用在 DNA、miRNA、小分子、蛋白质和

细胞的放大检测^[64-67],并已取得了一系列令人满意的结果。然而,HCR 尚未用于端粒酶的检测。对此,Zhang 等^[68]开发了一种基于金纳米粒子触发模拟 HCR 来产生无酶双信号扩增以检测端粒酶活性的电化学传感器。如图 7,在该检测方法中,使用了 AuNPs 和两个发夹探针。AuNPs 作为初始放大元件,不仅在电极上与端粒重复序列杂交以扩增信号,而且还启动了随后的二次扩增,利用两个发夹探针模拟 HCR^[69]。如果细胞提取物的端粒酶活性呈阳性,AuNPs 就可以被捕获到电极上,从而触发两个发夹探针产生有缺口双螺旋交

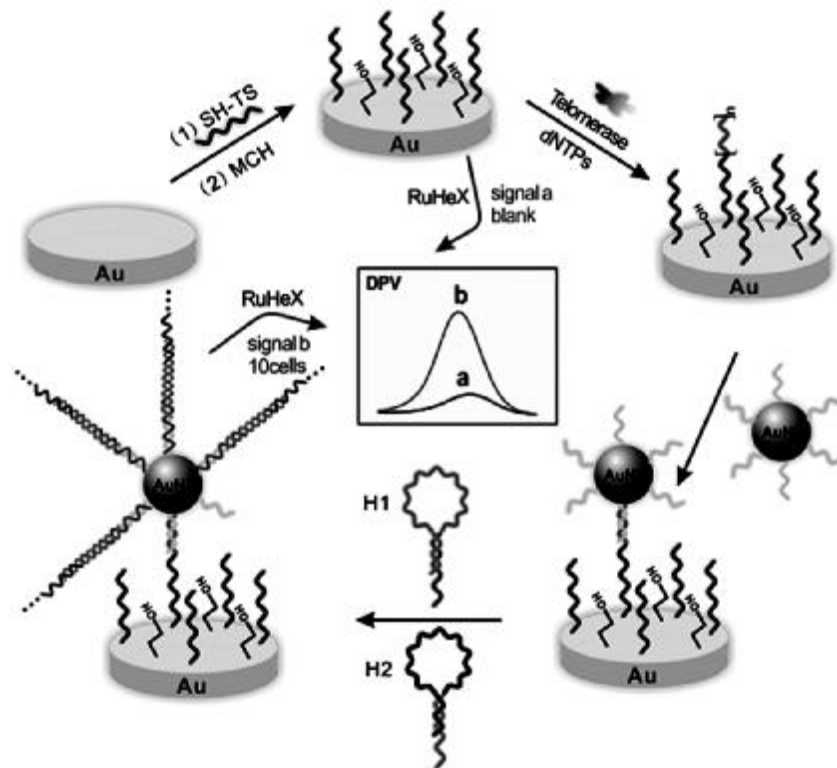


图 7 基于 SNAs AuNPs 触发模拟 HCR 双信号扩增的电化学检测端粒酶活性原理图

Fig.7 Schematic illustration of SNAs AuNPs triggered mimic-HCR dual signal amplification electrochemical assay for telomerase activity detection

替杂交反应,导致大量的三氯化六铵合钨通过静电相互作用被插入到双螺旋 DNA 的长链,从而在合适的电位产生电化学信号。用这种方法,不仅可以降低检测限至两个 HeLa 细胞,能实现 10~10000 个细胞范围内的端粒酶活性检测,同时还能成功地评估不同细胞内端粒酶的活性。该方法具有较高的灵敏性,而且使用了两步信号扩增,操作简单,可用于临床细胞提取物中端粒酶活性的检测。

另一方面,均相电化学是一种免固定化的方法,其中,探针 DNA 与靶 DNA 之间的杂交,以及酶的识别都发生在溶液相,而不是在电极的表面上。因此具有简单,响应快速,识别效率高的优点^[70-74]。利用这些优点,已经开发了许多均相电化学法用于各种目标,如 DNA,小生物分子和金属离子的检测^[71,73-74]。Li 等提出了一种基于 T7 核酸外切酶辅助目标循环扩增的均相电化学检测法,实现端粒酶活性的简单、快速、高灵敏度的

测定^[75]。如图 8 所示,在此方法中,设计了一个 5' 端亚甲基蓝(MB)标记的发夹探针,它可以与端粒酶反应产物杂交,然后被 T7 核酸外切酶切割,释放大量的 MB 标记的单核苷酸以引起电化学信号的显著增强。充分利用了 T7 启动辅助目标

循环的高扩增效率优势,该测定法能够检测单细胞水平的端粒酶活性,这是优于一般检测方法的。此外,测定是在均匀的溶液中进行,无需复杂的修饰或固定过程,其具有操作简单,反应快速和识别效率高的优点,这对基于端粒酶的癌症早

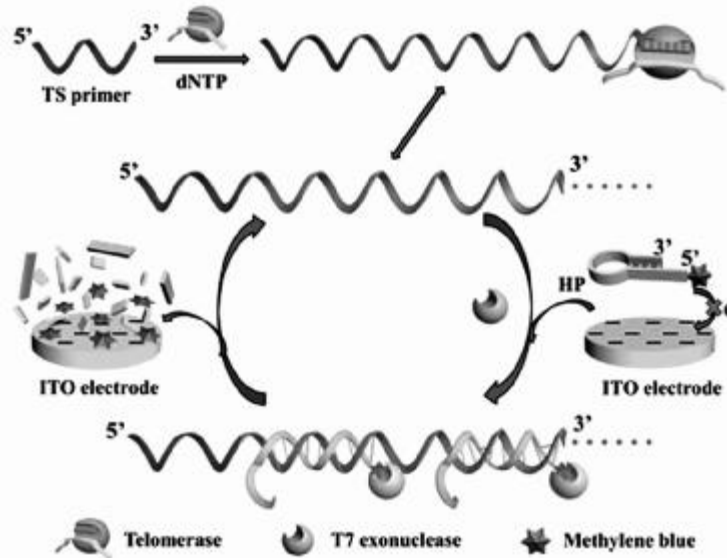


图 8 基于 T7 核酸外切酶辅助目标回收扩增的电化学均相分析法检测端粒酶活性的原理图
Fig.8 Principle of the homogeneous electrochemical strategy for the detection of telomerase activity based on T7 exonuclease-aided target recycling amplification

期诊断具有极大的临床应用前景。

2.4 电化学发光检测法

电化学发光(ECL)作为一个高灵敏度的检测技术,集合了电化学方法与化学发光法两者的优点,已在药物分析,临床诊断,环境和食品分析,免疫测定法以及 DNA 检测方面引起了相当大的关注^[76-82]。

鲁米诺因其电化学发光性能在生物传感检测方面应用广泛^[83-84],而早期已有报道显示纳米金能够增强鲁米诺的电化学发光强度^[85-86]。鉴于鲁米诺与纳米金结合形成的复合物的特殊性质,Xu 等研究了一种可见电化学发光分析方法来分析端粒酶的活性^[87]。利用端粒酶反应后生成的 G-四联体脱氧核酶和鲁米诺在微阵列芯片上共同修饰纳米金,作为催化放大信号来提高鲁米诺-双氧水系统的化学发光信号,从而实现端粒酶活性的多通路检测。该方法通过一种简便灵敏的视觉方式来达到检测 313~10000 范围内的 HL-60 癌细胞的目的。

此后,Xu 等又设计了一种新颖的双电位

ECL 信号检测方法检测癌细胞中端粒酶的活性^[88]。首先将 CdS 量子点修饰在玻碳电极表面,接着将巯基修饰的端粒酶引物经由 Cd-S 作用固定到 CdS 量子点上,这种引物在端粒酶和 dNTPs 的存在下可以被延伸,而延伸部分则与鲁米诺-纳米金标记的捕获 DNA 发生杂交,从而导致硫化镉量子点的 ECL 发光强度增强,这种增强的发光强度来源于两处,一处是硫化镉量子点被纳米金表面等离子共振诱导产生的-1.25 V,另一处则是来自于鲁米诺的一个新的电致化学发光信号-0.45 V。这双电位信号检测方法可以检测 100~9000 cell 范围内的 HL-60 细胞提取的端粒酶活性。这种方法不同于 ECL 比例感测方法,两个激发电位的 ECL 强度之比可用于灵敏地检测目标 DNA 的浓度^[89-90]。

2.5 荧光法

Majerska 等^[91]设计了一种新颖的不需要使用放射性材料和高纯度端粒酶样品的免 PCR 端粒酶分析法——一种基于等温循环链置换聚合反应的荧光分析法,反应原理如图 9。该方法以端粒

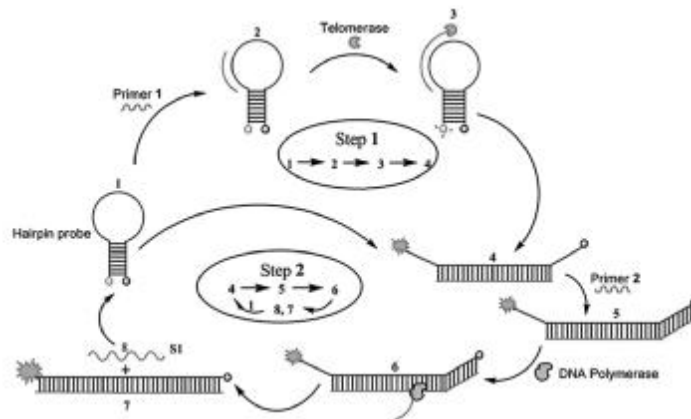


图9 端粒酶活性的荧光放大分析

Fig.9 Fluorescence amplification assay of telomerase activity

酶引物在端粒酶存在时的延伸反应、发夹荧光探针的固有信号转导机制和聚合酶的链置换特性为基础,采用放大荧光法来检测癌细胞中端粒酶活性。此处的发夹荧光探针不仅可以用作荧光信号载体,还可成为端粒延伸反应的模板。当端粒酶存在时,发夹探针的“茎”被打开,从而根据荧光的增强来确定端粒酶活性。用此方法可检测到 HeLa 细胞中的提取的端粒酶活性相当于 40~1000 个细胞。打开的探针退火后,引发聚合反应,该方法能检出从细胞提取的端粒酶活性当量下降至 4 个 HeLa 细胞。这表明目前荧光战略在癌症的早期诊断生化分析方面具有巨大潜力。

众所周知 SYBR Gree (SG) 是用于 DNA 染色的敏感荧光染料。利用 SG 与单、双链 DNA 的不同相互作用可鉴别单链 DNA 和双链 DNA 的结构^[84]。大量的研究表明,在 K^+ 存在时富含鸟嘌呤的单链 DNA 可以折叠成一个 G-四联体结构^[92-94]。也有其他报告表明,SG 可以插入这些 G-四联体结构中使荧光强度显著增加^[95]。基于上述特点,Chung 等^[96]开发了一种利用 SG 将端粒酶活性转换成荧光信号的免 PCR 分析法。该法是将 TS 寡核苷酸引物与肿瘤细胞中的端粒酶提取物在 dNTPs 的存在下一起孵育,接着 TTAGGG 重复单元在 TS 引物的 3' 端连续合成,以形成一个更长的单链 DNA 分子。在 K^+ 存在下,被端粒酶延伸的端粒重复单元能形成 G-四联体。此时加入 SG 会导致荧光强度的急剧增强。然而,在细胞提取物中没有端粒酶活性或有端粒酶抑制剂的存在下,TS 引物是不伸长的,因此,加入的 SG 不能使荧光强度发生变化。

近来,随着纳米技术的不断成熟,基于纳米材料的探针在生物相关领域的应用逐渐增加。由于纳米材料特殊的物理和化学性能,许多荧光检测法均采用纳米粒子作为荧光探针来实现端粒酶的检测,例如,介孔二氧化硅纳米粒子 (Mesoporous Silica Nanoparticle, MSN) 具有独特的孔隙结构,生物相容性,且易于功能化等优点^[97-98]。此外,MSN 还拥有较大的孔体积和表面积,可以负载大量的分子^[99]。

因此, Ju 等^[100]利用 MSN 负载荧光素作为荧光探针实现细胞内端粒酶活性原位“开-关”的成像技术。如图 10,用 MSN 组装特殊设计的 DNA

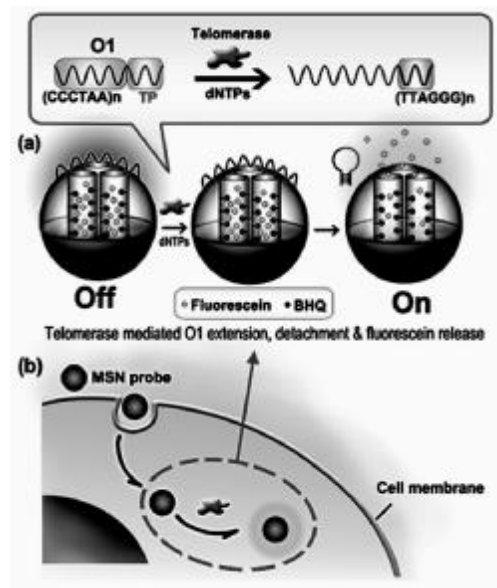


图 10 基于 MSN 探针的细胞内端粒酶分析示意图

Fig.10 Schematic illustration of MSN probe-based intracellular analysis of telomerase

作为探针的生物门。当存在端粒酶时,在 DNA 的 3' 端原位合成了端粒重复序列,致使 DNA 从 MSN 表面脱离释放负载在 MSN 孔隙中的荧光素,从而触发荧光的释放,实现了原位检测细胞内端粒酶活性的目的。当前,大多数检测方法都使用细胞提取物来分析端粒酶活性,因此很难在原位检测和提供单细胞水平的端粒酶信息。该方法的问世正弥补了这一缺陷。因 MSN 无毒、无干扰、特异性强,可以用来作为细胞内传递工具,当细胞吞入 MSN 后,细胞内端粒酶能激活荧光,通

过观察信号,即可获得端粒酶活性的原位轨道,以监测药物对端粒酶活性的影响,从而探索出合适的抑制药物。但是,该方法也存在其固有缺陷,引物 DNA 的表面吸附易受周围环境影响,导致荧光素的非特异性释放,以产生一定程度的背景。

近来, Ju 等^[101]又针对上述不足,设计了一个智能囊泡试剂盒实现原位成像和检测细胞质内端粒酶活性,机理如图 11 所示。

试剂盒中含有 TS 引物和 Cy5 标记的分子信

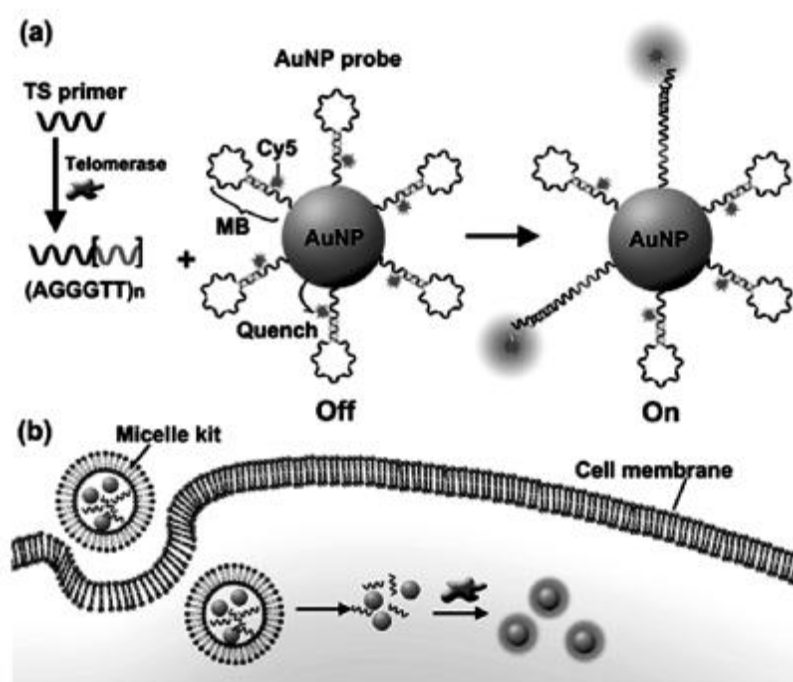


图 11 (a)端粒酶触发 TSP 伸长引起探针的荧光恢复;(b)内化囊泡试剂盒对端粒酶的原位检测
Fig. 11 (a) Telomerase-triggered TSP elongation and following fluorescence recovery of probe. (b) Internalization of vesicle kit for in situ detection of telomerase

标(MB)功能化的纳米金^[102-106],通过将其联合封装在脂质体内,从而实现细胞内递送^[107]。之后,囊泡试剂盒转染到细胞质中,释放的 TS 引物可以在端粒酶存在下得到一定的延伸,在 DNA 的 3' 末端产生端粒重复序列,它与组装在探针表面的 MB 环互补。因此,一旦杂交,MB 就会被打开,将荧光状态从“关”切换为“开”。荧光信号强弱取决于端粒酶活性,从而达到了原位追踪细胞质内端粒酶活性的目的。在每个 HeLa 细胞, BEL 肿瘤细胞和 QSG 正常细胞内,用该方法评估得到的细胞质内端粒酶活性分别为 3.2×10^{-11} , 2.4×10^{-11} , 8.6×10^{-13} IU, 这充分证明该方法能够在单细胞水

平区分肿瘤细胞和正常细胞。相较于当前存在的其他方法,这种囊泡试剂盒可以通过“一步孵化”实现原位检测,并且,由于纳米金的高效率荧光共振能量转移,从而具有较低的荧光背景。因此上述方法是一种成本低廉、操作简便、灵敏度高的方法,还可以用于动态监测细胞质内端粒酶活性,在癌症的诊断、治疗和端粒酶相关药物的发现与筛选方面成为一种良好的分析工具。

3 结语

关于端粒酶活性的检测方法还有很多未详细列举出来,例如, Mirkin 等开发出一种基于寡

核苷酸功能化的金纳米粒子的生物条形码,以改善端粒酶的检测^[108]。Willner 等使用 Zn(II)-卟啉化合物作为荧光团结合到 G-四联体上,以检测端粒酶活性^[109]。

然而,上述大多数策略因为 TS 引物的固定化、成本高、灵敏度低和操作复杂等问题在应用时或多或少受到了限制。此外,当前的大多数检测方法都使用细胞提取物来分析端粒酶活性,于临床应用较为不符,而能够实现原位分析和动态监测细胞内端粒酶活性的检测方法则凤毛麟角。端粒酶活性的检测对癌症的早期诊断具有重要的生物学意义,对临床上癌症的预警和治疗这一复杂科学问题的研究起到促进作用。因此,对端粒酶活性分析的简单、灵敏、低成本的原位实时监测和抑制剂筛查技术仍然是当前亟待解决的问题。

参考文献

- [1] Blackburn E H, Szostak J W. The molecular structure of centromeres and telomeres [J]. Annual review of biochemistry, 1984, 53(1): 163-194.
- [2] Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence [J]. The Journal of cell biology, 2011, 192(4): 547-556.
- [3] Harley C B, Futcher A B, Greider C W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts [J]. Nature, 1990, 345(6274): 458-460.
- [4] Hastie N D, Dempster M, Dunlop M G, et al. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing [J]. Nature, 1990, 346(6287): 866-873.
- [5] Counter C M, Avilion A A, LeFeuvre C E, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity [J]. The EMBO Journal, 1992, 11(5): 1921-1929.
- [6] Bodnar A G, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells [J]. Science (New York, N.Y.), 1998, 279(5349): 349-352.
- [7] Perry P J, Jenkins T C. Recent advances in the development of telomerase inhibitors for the treatment of cancer [J]. Expert Opinion on Investigational Drugs, 1999, 8(12): 1981-2008.
- [8] Ulaner G A, Hu J F, Vu T H, et al. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts [J]. Cancer research, 1998, 58(18): 4168-4172.
- [9] Cech T R. Life at the end of the chromosome: Telomeres and telomerase [J]. Angewandte Chemie -International Edition, 2000, 39(1): 34-43.
- [10] Holt S E, Wright W E, Shay J W. Regulation of telomerase activity in immortal cell lines [J]. Molecular and cellular biology, 1996, 16(6): 2932-2939.
- [11] Shay J W, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer [J]. European journal of cancer (Oxford, England : 1990), 1997, 33(5): 787-791.
- [12] Greider C W. Telomerase activity, cell proliferation, and cancer [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95 (1): 90-102.
- [13] Agrawal A, Dang S, Gabrani R. Recent Patents on Anti-Telomerase Cancer Therapy [J]. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery, 2012, 7(1): 102-117.
- [14] Shay J W, Zou Y, Hiyama E, et al. Telomerase and cancer [J]. Human Molecular Genetics, 2001, 10(7): 677-685.
- [15] Williams S C P. No end in sight for telomerase-targeted cancer drugs [J]. Nature Medicine, 2013, 19(1): 6-6.
- [16] Zhou X M, Xing D. Assays for human telomerase activity: progress and prospects [J]. Chemical Society Reviews, 2012, 41(13): 4643-4656.
- [17] Artandi S E, DePinho R A. Telomeres and telomerase in cancer [J]. Carcinogenesis, 2010, 31(1): 9-18.
- [18] Cong Y S, Shay J W. Actions of human telomerase beyond telomeres [J]. Cell Research, 2008, 18 (7): 725-732.
- [19] De Cian A, Lacroix L, Douarre C, et al. Targeting telomeres and telomerase [J]. Biochimie, 2008, 90(1): 131-155.
- [20] Nemos C, Rémy-Martin J P, Adami P, et al. Improved TRAP-silver staining versus conventional radioactive TRAP assays: quantification of telomerase activity during immortalization and in pathological human endometrium [J]. Clinical Biochemistry, 2003, 36(8): 621-628.
- [21] Wen J M, Sun L B, Zhang M, et al. A non-isotopic method for the detection of telomerase activity in tumour tissues: TRAP-silver staining assay [J]. Molecular Pathology, 1998, 51(2): 110-112.
- [22] Savovsky E, Akamatsu K, Tsuchiya M, et al. Detection of telomerase activity by combination of TRAP method and scintillation proximity assay (SPA) [J]. Nucleic acids research, 1996, 24(6): 1175-1176.
- [23] Piatyszek M, Kim N, Weinrich S, et al. Detection of telomerase activity in human cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) [J]. Method in

- cell science, 1995, 17(1): 1-15.
- [24] Herbert B S, Hochreiter A E, Wright W E, et al. Nonradioactive detection of telomerase activity using the telomeric repeat amplification protocol [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(3): 1583-1590.
- [25] Zuo X L, Xia F, Patterson A, et al. Two-Step, PCR-Free Telomerase Detection by Using Exonuclease III -Aided Target Recycling[J]. *Chembiochem*, 2011, 12(18): 2745-2747.
- [26] Krupp G, Kühne K, Tamm S, et al. Molecular basis of artifacts in the detection of telomerase activity and a modified primer for a more robust 'TRAP' assay[J]. *Nucleic acids research*, 1997, 25(4): 919-921.
- [27] Herbert B-S, Hochreiter A E, Wright W E, et al. Nonradioactive detection of telomerase activity using the telomeric repeat amplification protocol[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(3): 1583-1590.
- [28] Hirose M, Abe-Hashimoto J, Ogura K, et al. A rapid, useful and quantitative method to measure telomerase activity by hybridization protection assay connected with a telomeric repeat amplification protocol[J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1997, 123(6): 227-344.
- [29] Wu Y-Y, Hruszkewycz A M, Delgado R M, et al. Limitations on the quantitative determination of telomerase activity by the electrophoretic and ELISA based TRAP assays[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2000, 293(1-2): 199-212.
- [30] Xiao Y, Dane K Y, Uzawa T, et al. Detection of Telomerase Activity in High Concentration of Cell Lysates Using Primer-Modified Gold Nanoparticles[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(43): 15299-15307.
- [31] Eskiocak U, Ozkan-Ariksoysal D, Ozsoz M, et al. Label-free detection of telomerase activity using guanine electrochemical oxidation signal [J]. *Analytical chemistry*, 2007, 79(22): 8807-8811.
- [32] Takata M, Kerman K, Nagatani N, et al. Label-free bioelectronic immunoassay for the detection of human telomerase reverse transcriptase in urine[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2006, 596(2): 109-116.
- [33] Wu L, Wang J, Ren J, et al. Ultrasensitive Telomerase Activity Detection in Circulating Tumor Cells Based on DNA Metallization and Sharp Solid-State Electrochemical Techniques [J]. *Advanced Functional Materials*, 2014, 24(18): 2727-2733.
- [34] Sharon E, Freeman R, Riskin M, et al. Optical, Electrical and Surface Plasmon Resonance Methods for Detecting Telomerase Activity[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(20): 8390-8397.
- [35] Tian L, Weizmann Y. Real-Time Detection of Telomerase Activity Using the Exponential Isothermal Amplification of Telomere Repeat Assay[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(5): 1661-1664.
- [36] Liu J, Lu Y. Preparation of aptamer-linked gold nanoparticle purple aggregates for colorimetric sensing of analytes[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(1): 246-252.
- [37] Zhang X, Servos M R, Liu J. Instantaneous and quantitative functionalization of gold nanoparticles with thiolated DNA using a pH-assisted and surfactant-free route [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(17): 7266-7269.
- [38] Li H, Huang J, Lv J, et al. Nanoparticle PCR: Nanogold-Assisted PCR with Enhanced Specificity [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, 44(32): 5100-5103.
- [39] Shen H, Hu M, Yang Z, et al. Polymerase chain reaction of Au nanoparticle-bound primers[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50(18):2344-2350.
- [40] Sharon E, Golub E, Niazov-Elkan A, et al. Analysis of telomerase by the telomeric hemin/G-quadruplex-controlled aggregation of au nanoparticles in the presence of cysteine[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(6): 3153-3158.
- [41] Freeman R, Sharon E, Teller C, et al. DNAzyme-Like Activity of Hemin-Telomeric G-Quadruplexes for the Optical Analysis of Telomerase and its Inhibitors [J]. *Chembiochem*, 2010, 11(17): 2362-2367.
- [42] Golub E, Freeman R, Willner I. Hemin/G-Quadruplex-Catalyzed Aerobic Oxidation of Thiols to Disulfides: Application of the Process for the Development of Sensors and Aptasensors and for Probing Acetylcholine Esterase Activity [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(24): 12126-12133.
- [43] Duan R, Wang B, Zhang T, et al. Sensitive and Bidirectional Detection of Urine Telomerase Based on the Four Detection-Color States of Difunctional Gold Nanoparticle Probe[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(19): 9781-9785.
- [44] Tian L, Weizmann Y. Real-time detection of telomerase activity using the exponential isothermal amplification of telomere repeat assay [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(5): 1661-1665.
- [45] Yuefei W, Renliang H, Wei Q, et al. Kinetically

- controlled self-assembly of redox-active ferrocene-diphenylalanine: from nanospheres to nanofibers [J]. *Nanotechnology*, 2013, 24(46): 465603.
- [46] Connolly A R, Trau M. Isothermal detection of DNA by beacon-assisted detection amplification[J]. *Angewandte Chemie*, 2010, 49(15): 2697-2863.
- [47] Guo Q, Yang X, Wang K, et al. Sensitive fluorescence detection of nucleic acids based on isothermal circular strand-displacement polymerization reaction[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(3): 1-6.
- [48] Jia H, Li Z, Liu C, et al. Ultrasensitive Detection of microRNAs by Exponential Isothermal Amplification [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49(32): 5498-5501.
- [49] Van Ness J, Van Ness L K, Galas D J. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(8): 4504-4509.
- [50] Zhang Y, Hu J, Zhang C-y. Sensitive Detection of Transcription Factors by Isothermal Exponential Amplification-Based Colorimetric Assay[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(21): 9544-9549.
- [51] Hou T, Liu X, Wang X, et al. DNAzyme-guided polymerization of aniline for ultrasensitive electrochemical detection of nucleic acid with bio-bar codes-initiated rolling circle amplification[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 190: 384-388.
- [52] Liu X, Chen M, Hou T, et al. A novel electrochemical biosensor for label-free detection of uracil DNA glycosylase activity based on enzyme-catalyzed removal of uracil bases inducing strand release [J]. *Electrochimica Acta*, 2013, 113: 514-518.
- [53] Sato S, Kondo H, Nojima T, et al. Electrochemical Telomerase Assay with Ferrocenylnaphthalene Diimide as a Tetraplex DNA-Specific Binder [J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(22): 7304-7309.
- [54] Eskiocak U, Ozkan-Ariksoysal D, Ozsoz M, et al. Label-Free Detection of Telomerase Activity Using Guanine Electrochemical Oxidation Signal[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(22): 8807-8811.
- [55] Gao Z, Deng H, Shen W, et al. A Label-Free Biosensor for Electrochemical Detection of Femtomolar MicroRNAs [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(3): 1624-1630.
- [56] Bonanni A, Pumera M. Graphene Platform for Hairpin-DNA-Based Impedimetric Genosensing[J]. *ACS Nano*, 2011, 5(3): 2356-2361.
- [57] Guo S, Wen D, Zhai Y, et al. Platinum Nanoparticle Ensemble-on-Graphene Hybrid Nanosheet: One-Pot, Rapid Synthesis, and Used as New Electrode Material for Electrochemical Sensing [J]. *ACS Nano*, 2010, 4 (7): 3959-3968.
- [58] Basuray S, Senapati S, Aijian A, et al. Shear and AC Field Enhanced Carbon Nanotube Impedance Assay for Rapid, Sensitive, and Mismatch-Discriminating DNA Hybridization[J]. *ACS Nano*, 2009, 3(7): 1823-1830.
- [59] Yang W, Zhu X, Liu Q, et al. Label-free detection of telomerase activity in HeLa cells using electrochemical impedance spectroscopy[J]. *Chemical Communications*, 2011, 47(11): 3129-3131.
- [60] Cunci L, Vargas M M, Cunci R, et al. Real-Time Detection of Telomerase Activity in Cancer Cells using a Label-Free Electrochemical Impedimetric Biosensing Microchip[J]. *RSC Advances*, 2014, 4(94): 52357-52365.
- [61] Wu L, Wang J, Ren J, et al. Ultrasensitive Telomerase Activity Detection in Circulating Tumor Cells Based on DNA Metallization and Sharp Solid-State Electrochemical Techniques [J]. *Advanced Functional Materials*, 2014, 24(18): 2727-2733.
- [62] Zhang Z, Wu L, Wang J, et al. A Pt-nanoparticle electrocatalytic assay used for PCR-free sensitive telomerase detection[J]. *Chemical Communications*, 2013, 49(85): 9986-9988.
- [63] Dirks R M, Pierce N A. Triggered amplification by hybridization chain reaction[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(43): 15275-15278.
- [64] Huang J, Wu Y, Chen Y, et al. Pyrene-Excimer Probes Based on the Hybridization Chain Reaction for the Detection of Nucleic Acids in Complex Biological Fluids [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50 (2): 401-404.
- [65] Huang J, Gao X, Jia J, et al. Graphene Oxide-Based Amplified Fluorescent Biosensor for Hg²⁺ Detection through Hybridization Chain Reactions[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(6): 3209-3215.
- [66] Zhang B, Liu B, Tang D, et al. DNA-Based Hybridization Chain Reaction for Amplified Bioelectronic Signal and Ultrasensitive Detection of Proteins [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(12): 5392-5399.
- [67] Choi J, Routenberg Love K, Gong Y, et al. Immuno-Hybridization Chain Reaction for Enhancing Detection of Individual Cytokine-Secreting Human Peripheral Mononuclear Cells [J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83 (17): 6890-6895.

- [68] Wang W J, Li J J, Rui K, et al. Sensitive electrochemical detection of telomerase activity using spherical nucleic acids gold nanoparticles triggered mimic-hybridization chain reaction enzyme-free dual signal amplification[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(5): 3019-3026.
- [69] Zhang J, Song S, Zhang L, et al. Sequence-Specific Detection of Femtomolar DNA via a Chronocoulometric DNA Sensor(CDS): Effects of Nanoparticle-Mediated Amplification and Nanoscale Control of DNA Assembly at Electrodes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(26): 8575-8580.
- [70] Liu S, Lin Y, Wang L, et al. Exonuclease III-Aided Autocatalytic DNA Biosensing Platform for Immobilization-Free and Ultrasensitive Electrochemical Detection of Nucleic Acid and Protein [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(8): 4008-4015.
- [71] Luo X, Lee T M-H, Hsing I M. Immobilization-Free Sequence-Specific Electrochemical Detection of DNA Using Ferrocene-Labeled Peptide Nucleic Acid[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(19): 7341-7346.
- [72] Wang X, Liu X, Hou T, et al. Highly sensitive homogeneous electrochemical assay for methyltransferase activity based on methylation-responsive exonuclease III-assisted signal amplification[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015, 208: 575-580.
- [73] Xuan F, Luo X, Hsing I M. Ultrasensitive Solution-Phase Electrochemical Molecular Beacon-Based DNA Detection with Signal Amplification by Exonuclease III-Assisted Target Recycling[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(12): 5216-5220.
- [74] Xuan F, Luo X, Hsing I M. Conformation-Dependent Exonuclease III Activity Mediated by Metal Ions Reshuffling on Thymine-Rich DNA Duplexes for an Ultrasensitive Electrochemical Method for Hg^{2+} Detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(9): 4586-4593.
- [75] Liu X, Li W, Hou T, et al. Homogeneous electrochemical strategy for human telomerase activity assay at single-cell level based on t7 exonuclease-aided target recycling amplification [J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87 (7): 4030-4036.
- [76] Richter M M. Electrochemiluminescence (ECL) [J]. *Chemical Reviews*, 2004, 104(6): 3003-3036.
- [77] Miao W J. Electrogenated chemiluminescence and its biorelated applications[J]. *Chemical Reviews*, 2008, 108 (7): 2506-2553.
- [78] Zhang H-R, Xu J-J, Chen H-Y. Electrochemiluminescence Ratiometry: A New Approach to DNA Biosensing [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(11): 5321-5325.
- [79] Zhou H, Zhang Y Y, Liu J, et al. Efficient quenching of electrochemiluminescence from K-doped graphene-CdS: Eu NCs by G-quadruplex-hemin and target recycling-assisted amplification for ultrasensitive DNA biosensing [J]. *Chemical Communications*, 2013, 49 (22): 2246 - 2258.
- [80] Zhang H-R, Xia X-H, Xu J-J, et al. Sensitive cancer cell detection based on Au nanoparticles enhanced electrochemiluminescence of CdS nanocrystal film supplemented by magnetic separation[J]. *Electrochemistry Communications*, 2012, 25: 112-115.
- [81] Tian C Y, Xu J J, Chen H Y. A novel aptasensor for the detection of adenosine in cancer cells by electrochemiluminescence of nitrogen doped TiO_2 nanotubes[J]. *Chemical Communications*, 2012, 48(66): 8234-8236.
- [82] Wang J, Shan Y, Zhao W-W, et al. Gold Nanoparticle Enhanced Electrochemiluminescence of CdS Thin Films for Ultrasensitive Thrombin Detection [J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(11): 4004-4011.
- [83] Rose A L, Waite T D. Chemiluminescence of Luminol in the Presence of Iron (II) and Oxygen: Oxidation Mechanism and Implications for Its Analytical Use[J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(24): 5909 - 5920.
- [84] Chai Y, Tian D, Wang W, et al. A novel electrochemiluminescence strategy for ultrasensitive DNA assay using luminol functionalized gold nanoparticles multi-labeling and amplification of gold nanoparticles and biotin-streptavidin system[J]. *Chemical Communications*, 2010, 46 (40): 7560-7562.
- [85] Cui H, Zou G-Z, Lin X-Q. Electrochemiluminescence of Luminol in Alkaline Solution at a Paraffin-Impregnated Graphite Electrode [J]. *Analytical Chemistry*, 2003, 75 (2): 324-331.
- [86] Tian D, Duan C, Wang W, et al. Ultrasensitive electrochemiluminescence immunosensor based on luminol functionalized gold nanoparticle labeling[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25(10): 2290-2295.
- [87] Zhang H R, Wang Y Z, Wu M S, et al. Visual electrochemiluminescence detection of telomerase activity based on multifunctional Au nanoparticles modified with G-quadruplex deoxyribozyme and luminol[J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(83): 12575-12579.
- [88] Zhang H R, Wu M S, Xu J J, et al. Signal-on dual-potential electrochemiluminescence based on luminol-gold bifunctional nanoparticles for telomerase detection [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(8): 3834-3840.

- [89] Branchini B R, Rosenberg J C, Ablamsky D M, et al. Sequential bioluminescence resonance energy transfer – fluorescence resonance energy transfer-based ratiometric protease assays with fusion proteins of firefly luciferase and red fluorescent protein[J]. *Analytical Biochemistry*, 2011, 414(2): 239–245.
- [90] Takeuchi M, Nagaoka Y, Yamada T, et al. Ratiometric Bioluminescence Indicators for Monitoring Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate in Live Cells Based on Luciferase –Fragment Complementation [J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(22): 9306–9313.
- [91] Majerska J, Sykora E, Fajkus J. Non –telomeric activities of telomerase[J]. *Molecular Biosystems*, 2011, 7(4): 1013–1023.
- [92] Hu K, Huang Y, Zhao S, et al. Ultrasensitive detection of potassium ions based on target induced DNA conformational switch enhanced fluorescence polarization[J]. *Analyst*, 2012, 137(12): 2770–2773.
- [93] Qin H, Ren J, Wang J, et al. G-Quadruplex-Modulated Fluorescence Detection of Potassium in the Presence of a 3500-Fold Excess of Sodium Ions[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(19): 8356–8360.
- [94] Huang C-C, Chang H-T. Aptamer-based fluorescence sensor for rapid detection of potassium ions in urine[J]. *Chemical Communications*, 2008, 12: 1461–1463.
- [95] Xu H, Gao S, Yang Q, et al. Amplified Fluorescent Recognition of G-Quadruplex Folding with a Cationic Conjugated Polymer and DNA Intercalator[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2010, 2(11): 3211–3216.
- [96] Quach Q H, Jung J, Kim H, et al. A simple, fast and highly sensitive assay for the detection of telomerase activity [J]. *Chemical Communications*, 2013, 49 (59): 6596 – 6598.
- [97] Climent E, Martínez-Mañez R, Sancenón F, et al. Controlled Delivery Using Oligonucleotide -Capped Mesoporous Silica Nanoparticles [J]. *Angewandte Chemie*, 2010, 122(40):7439–7441.
- [98] Niu D, Ma Z, Li Y, et al. Synthesis of Core-Shell Structured Dual-Mesoporous Silica Spheres with Tunable Pore Size and Controllable Shell Thickness[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132 (43): 15144 – 15147.
- [99] Slowing I, Trewyn B G, Lin V S Y. Effect of Surface Functionalization of MCM-41 -Type Mesoporous Silica Nanoparticles on the Endocytosis by Human Cancer Cells [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(46): 14792–14793.
- [100] Qian R, Ding L, Ju H. Switchable fluorescent imaging of intracellular telomerase activity using telomerase -responsive mesoporous silica nanoparticle[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(36): 13282–13285.
- [101] Qian R, Ding L, Yan L, et al. Smart vesicle kit for in situ monitoring of intracellular telomerase activity using a telomerase-responsive probe[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(17): 8642–8648.
- [102] Llevot A, Astruc D. Applications of vectorized gold nanoparticles to the diagnosis and therapy of cancer [J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(1): 242–257.
- [103] Duncan B, Kim C, Rotello V M. Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems [J]. *Journal of Controlled Release*, 2010, 148(1): 122–127.
- [104] Li F, Zhang H, Dever B, et al. Thermal Stability of DNA Functionalized Gold Nanoparticles [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2013, 24(11): 1790–1797.
- [105] Giljohann D A, Seferos D S, Patel P C, et al. Oligonucleotide Loading Determines Cellular Uptake of DNA-Modified Gold Nanoparticles[J]. *Nano Letters*, 2007, 7 (12): 3818–3821.
- [106] Seferos D S, Giljohann D A, Hill H D, et al. Nano -Flares: Probes for Transfection and mRNA Detection in Living Cells[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(50): 15477–15479.
- [107] Dalby B, Cates S, Harris A, et al. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications[J]. *Methods*, 2004, 33(2): 95–103.
- [108] Zheng G, Daniel W L, Mirkin C A. A New Approach to Amplified Telomerase Detection with Polyvalent Oligonucleotide Nanoparticle Conjugates[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130 (30): 9644–9645.
- [109] Zhang Z, Sharon E, Freeman R, et al. Fluorescence Detection of DNA, Adenosine -5' -Triphosphate (ATP), and Telomerase Activity by Zinc(II)-Protoporphyrin IX/ G-Quadruplex Labels[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(11): 4789–4797.

信号放大策略在电化学生物传感器中的应用

陈颖

(西南大学化学化工学院, 重庆 400715)

摘要: 近年来,快速、简单、灵敏的生物分子检测在临床诊断、食品分析、生物恐怖主义的防御和环境监测等方面变得日益重要。电化学生物传感器由于具有简单、灵敏、成本低并可广泛运用于不同领域的固有优势而受到越来越多的关注。为了实现高灵敏的生物检测,不同信号放大方法被用于传感器的构建中。该文简单介绍了电化学生物传感器的基本原理,并重点概括了广泛运用于电化学生物传感器中的信号放大策略。

关键词: 电化学; 生物检测; 信号放大策略

The application of signal amplification strategies in electrochemical biosensors

Chen Ying

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Rapid, simple and sensitive determination of biomolecules has become increasingly important in clinical diagnosis, food analysis and bioterrorism/environmental monitoring over the past few years. Electrochemical biosensor has gained increasing interest due to its inherent advantages such as simplicity, sensitivity and low cost in cooperation with the comprehensive applications in different fields. Various signal amplification methods have been reported to achieve high sensitivity for biomolecules determination. In this article, we briefly introduce the fundamentals of the electrochemical biosensor, and emphatically summarize the popular signal amplification strategies applied in electrochemical biosensors.

Key words: electrochemistry; biodetection; signal amplification strategy

0 引言

电化学生物传感器是将生物分子作为目标物识别敏感元件固定于电极表面,生物分子间的特异性识别作用通过电极进行信号转换,以电阻、电位、电流或电容等物理量形式作为特征检测信号输出,从而完成对目标物的定性或者定量分析任务的一类装置。依据传感器输出特征物理信号所产生方式的不同,电化学生物传感器一般可归为生物催化型和亲和型传感器两个大类:前者感受器部位元件采用能特异性识别目标分子的酶、细胞或组织等并催化底物生成电活性物质;后者则是基于生物识别元件与目标分子间的特异性结合作用,例如抗原-抗体、适体-目标分

子、生物素-亲和素之间及 DNA 碱基互补配对等相互作用。电化学生物传感器性能的好坏可以通过传感器的动力学线性范围、检测限、重现性、选择性及响应时间等参数来评估。

1 信号放大策略在电化学生物传感器中的应用

临床诊断中对痕量及超痕量生物分子检测的要求使得科研工作者致力于提高传感器灵敏度的研究,随着纳米技术的飞速发展以及多种生物技术的兴起,学科间进一步交叉渗透融合,各种信号放大方法相继出现并成功运用于生物分析,电化学生物传感器的灵敏度不断提高,甚至达到单分子检测水平。下面就各类近年来广泛运

用的信号放大策略分别作简要介绍。

1.1 酶催化放大技术

酶(enzyme)是一类由生命体产生的具有生理调节功能的蛋白质,参与机体代谢及各种转化反应,特定的酶只对特定底物发生高效的催化作用,酶的这种专一性在一定程度上确保了传感器的选择性,其高效性也对灵敏度有所贡献。在生物分析中,通常将酶作为标记物间接指示目标分子浓度,常用标记酶有碱性磷酸酯酶(ALP)、辣根过氧化物酶(HRP)及葡萄糖氧化酶(GOD)等。此外,酶催化法一般要与纳米材料放大技术联用,借助其大比表面积实现酶的大量固载,并通过其优良的导电性促进电子传递,进一步提高酶对底物的转化率,以达到增强灵敏度的目的。根据酶的催化作用所产生变化的区别,酶催化放大信号主要通过以下两种途径:酶催化产物沉积法和多酶催化底物循环增强法。

酶催化产物沉积法是指酶催化形成不溶于水的有机物附着于电极表面,使得传感界面性质发生改变,通过电化学阻抗谱、循环伏安法、计时电位法等技术进行检测的一类分析方法。Akter等^[1]使用碳纳米管固载 HRP 作为二抗标记物,一抗固定在碳纳米管/纳米金复合材料表面,通过夹心免疫法捕获目标抗原继而结合二抗,二抗标记物 HRP 催化底物 4-氯-1 萘酚生成难溶性沉淀附着于电极表面,阻碍电子传输,电流信号减小,实现对前列腺抗原 PSA 的高灵敏分析,并成功运用于人血清实际样品的检测(图 1)。Wang 等^[2]同样利用 HRP 对底物的催化作用,由于底物转化与过氧化氢浓度相关,通过生成不同量有机产物对 CdS 量子点的电致化学发光淬灭作用的差别构建了过氧化氢传感器。

将酶作为信号标记物,通过检测酶在催化反应中产生的催化电流也可指示目标分子的浓度。

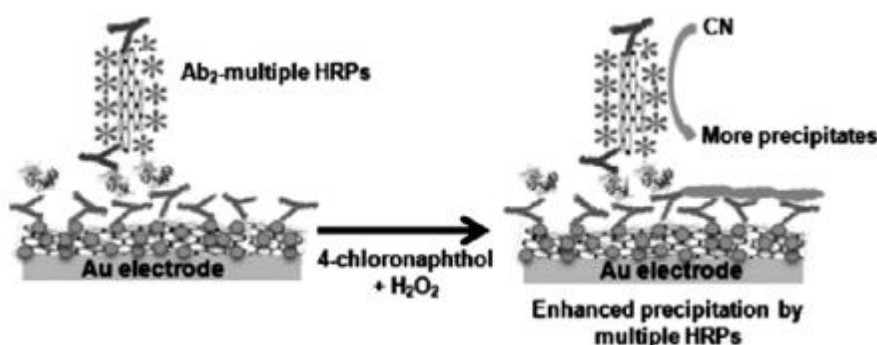


图 1 基于多酶催化的 PSA 免疫传感器原理示意图^[1]

Fig.1 Schematic illustrations of the multiple-HRP strategy-based PSA immunosensor^[1]

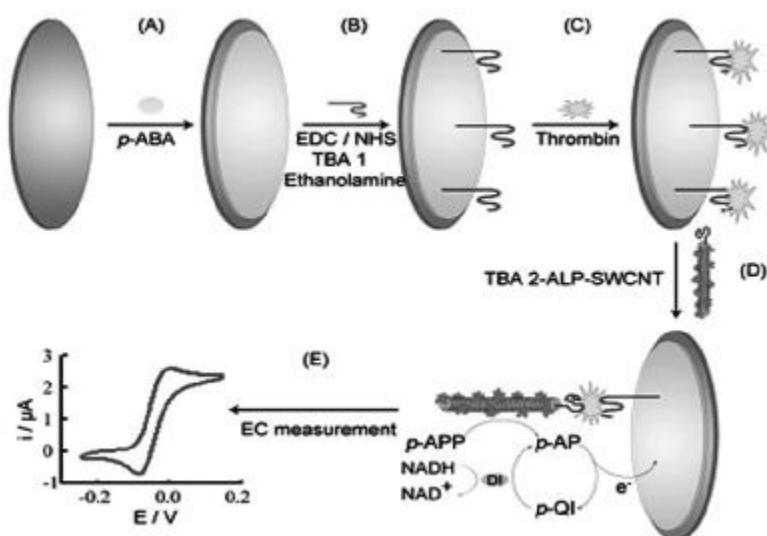
Caruana 等^[3]在微电极上电沉积一层高聚物充当电子媒介并固定捕获探针,与标记了 HRP 的目标序列互补杂交后,检测 HRP 对 H₂O₂ 的电化学还原催化电流即可实现对特异性 DNA 的分析。研究表明通过多种酶催化电活性物质的氧化还原循环体系可以有效增强电流响应信号^[4-6],也就是之前提到的多酶催化底物循环增强法,该方法可以显著提高传感器的灵敏度。Xiang 等^[7]通过 ALP 和辅酶对底物的催化产生增强的氧化还原循环电流信号构建凝血酶传感器(图 2)。

1.2 纳米材料放大技术

酶放大技术受到酶活性等因素影响,一般稳定性差且成本高,因此研究不同类型的功能化纳米材料(如金属纳米材料、量子点、碳纳米材料、磁

性纳米材料、高分子聚合物等)在生物传感器中的运用近年来备受关注。由于其优良的生物相容性、高的比表面积、良好的化学稳定性、催化性能及导电性等,纳米材料能大大提高传感器的分析性能,有效放大检测信号,并具有稳定识别探针或生物传感界面的作用。

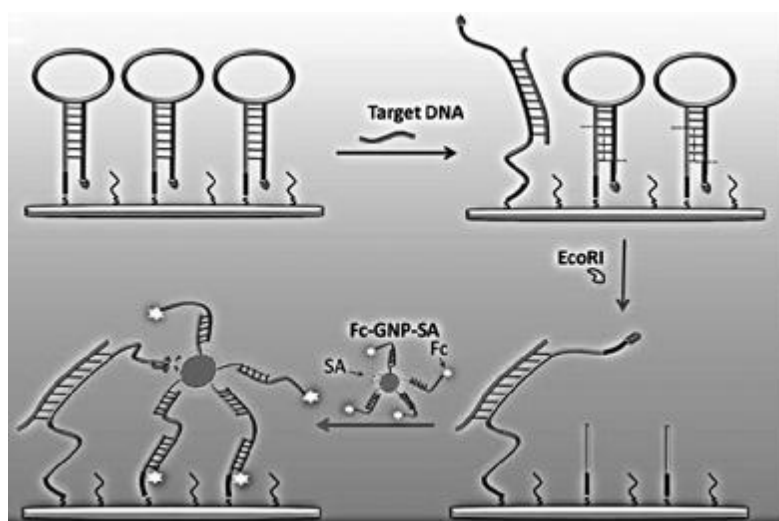
纳米材料可以作为电极材料使用,在通过不同分析原理构建高性能电化学传感平台以检测目标分子中发挥着重要的作用。Yang 等^[8]通过一步电化学法合成了石墨烯/聚黄尿酸纳米复合材料作为 DNA 捕获探针固载材料,用电化学阻抗法实现了高灵敏 DNA 检测。他们还合成了磺化聚苯胺/石墨烯复合材料,作为一种新型电极材料,通过其直接电化学达到检测 DNA^[9]的目的。

图 2 双重信号放大凝血酶传感器原理示意图^[7]Fig.2 Illustration of the dual amplified protocol for ultrasensitive thrombin detection^[7]

与此类似的策略也报道用于构建基于水溶性电活性染料偶氮红功能化石墨烯的免标记电化学 DNA 生物传感器^[10]。此外,其他材料,例如汞膜/碳纳米管^[11]或生物兼容性好的纳米结构的氧化镁/壳聚糖膜^[12]等也用作先进电极材料构建高性能电化学生物传感器。

以金纳米颗粒和碳纳米材料为代表的各种纳米材料作为大量酶、寡核苷酸及氧化还原探针等信号分子的优良载体广泛使用。Qiu 等^[13]采用纳米金为信号分子载体,发夹形 DNA 为捕获探

针,该探针茎部含有限制性内切酶(EcoRI)特异性识别位点。如图 3 所示,由于 EcoRI 酶的高效高保真性,只有在目标物不存在时会在发夹形捕获探针茎部的识别位点发生催化剪切反应,降低背景信号。目标物存在时可以通过杂交打开发夹形捕获探针,引起剪切位点变形,迫使生物素标记远离电极表面,通过生物素-链霉亲和素特异性结合作用捕获修饰了大量二茂铁(Fc)信号探针的纳米金颗粒以产生信号。此外,Fc 可以通过与经 EcoRI 酶处理过的捕获探针残基杂交拉近与

图 3 协同放大信号的 DNA 传感器原理示意图^[13]Fig.3 Schematic illustrations of the cooperative amplification-based genosensor^[13]

电极表面的距离,促进界面电子传递,进一步增强信号。该传感器实现了检测限低至 zeptomole 级的超灵敏分析,且具有 7 个数量级的宽动态范围。Wang 等^[14]在纳米金表面修饰了两种 DNA 信号探针:一种与目标序列互补,另一种非互补,该非互补探针的存在可以降低目标 DNA 和修饰于纳米金上的互补探针之间的交叉反应,从而提高该夹心 DNA 传感器的灵敏度。

新近发展的一些纳米材料可通过自身大量的信号物质直接用作电活性标记物,结合有效测定纳米标记物的方法,可以轻松构建超灵敏的电化学生物分析策略。较为典型的代表是量子点,这种准零维纳米材料具有优越的光学和电化学生物特性,可直接检测其荧光或电致化学发光信号,也可通过酸溶解后检测其金属离子的伏安峰,因

此被广泛运用于光学和电化学生物分析中。早期的研究工作中,一般将量子点作为单个信号标记物直接修饰生物分子^[15-17],灵敏度有限,而后发展的使用碳纳米管、石墨烯等载体原位生成或共价键合量子点的方法^[18-20]可以有效降低 ECL 发光电位且提高信号分子固载量,该复合物在传感器构建过程中充当电极材料或信号标记物显著降低了分析检测限。Jie 等^[21]合成了一种树枝状的量子点纳米簇,借助碳纳米管/纳米金的协同放大作用和金磁纳米易于分离富集的特点,通过夹心模式构建传感器可显著放大 ECL 和电化学信号,分别实现了对 DNA 的 ECL 分析和癌细胞的电化学分析(图 4)。

使用具有酶催化活性的纳米材料也是电化学生物传感器中放大信号的新方法。Zhang 等^[22]

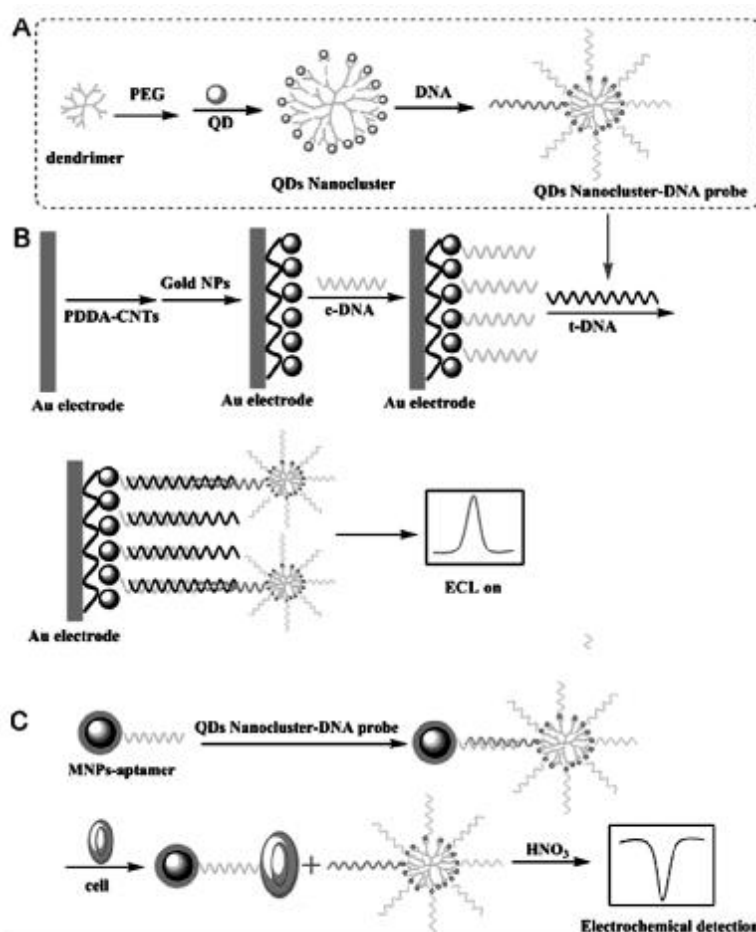


图 4 (A) 树枝状 QDs 纳米簇-DNA 复合物的制备,(B) ECL DNA 传感器构建原理示意图,和(C)基于金磁纳米的电化学癌细胞传感器原理示意图^[21]

Fig.4 (A) Preparation of the dendrimer nanoclusters/QDs-DNA probe, (B) fabrication of the ECL biosensor for DNA detection, and (C) electrochemical detection of cancer cells based on the Fe₃O₄@Au-aptamer^[21]

构建了一个基于纳米金自催化生长为导电桥梁放大检测 DNA 杂交的高灵敏带隙-电化学生物传感器。如图 5 所示,目标 DNA 存在时,与捕获探针杂交形成 dsDNA,由于静电作用不能吸附到纳米金表面,此时的纳米金具有葡萄糖氧化模拟

酶的催化活性,纳米金在葡萄糖和氯金酸底液中经自催化作用增大半径尺寸,致使纳米金最终生长形成金膜,导电性显著提高。相反,没有目标物存在时,单链 DNA 捕获探针通过核苷酸碱基-金相互作用吸附于纳米金表面,使其催化活性完全

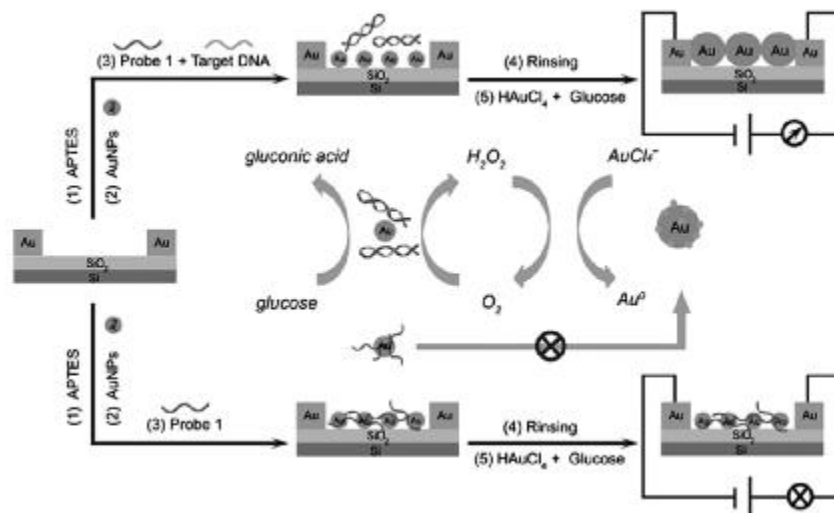


图 5 基于纳米金自催化生长作为导电桥梁的带隙-电化学生物 DNA 传感器原理示意图^[22]

Fig.5 Schematic diagram of the gap-electrical biosensor strategy based on self-catalytic growth of unmodified AuNPs as conductive bridges for DNA hybridization detection^[22]

钝化。

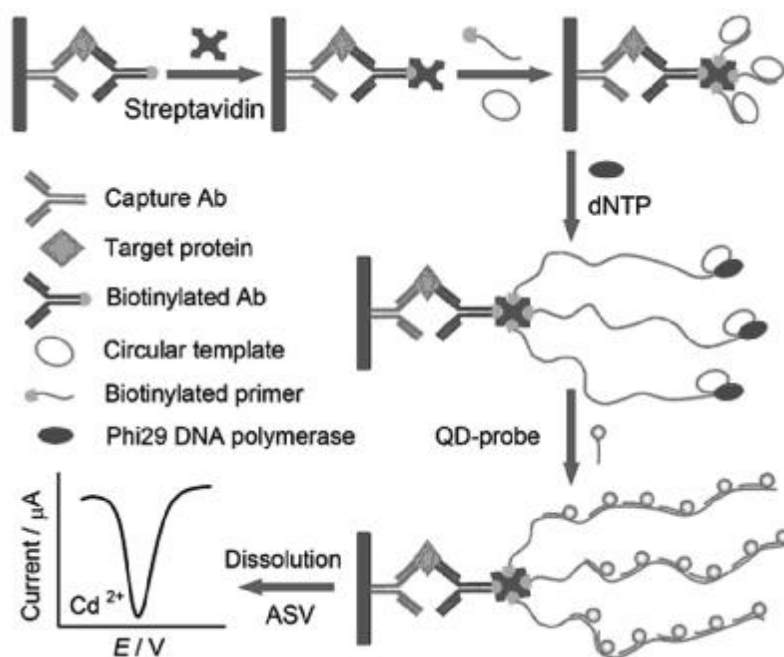
归纳而言,纳米材料主要通过四种方式实现对目标分子的放大分析:(1)利用纳米材料构建电极传感界面具有的优越导电性及生物相容性,降低电化学反应能垒,增强响应信号;(2)利用纳米材料的大比表面积增加电活性物质、催化活性酶或仿酶(模拟酶)的固载量,从而放大响应信号;(3)利用纳米材料自身产生的特征峰电流或电致化学发光信号实现对目标物的放大检测;(4)利用纳米材料自身催化活性及导电性促进电子传递的速率,进而增强检测信号。

1.3 DNA 等温扩增放大技术

聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR)是一种高效率的体外核酸扩增技术,具有快速、灵敏和特异性高等特点,广泛应用于生物学领域,但由于需要昂贵的仪器设备提供温度循环以及专业的技术人员,因此检测成本较高。随着分子生物学和生物化学的迅猛发展,一些在等温条件下的新型核酸扩增技术相继出现,该类技术的关键是不需要进行变温操作,在恒温条件下即

可实现 DNA 扩增,在一定程度上克服了 PCR 的缺点。DNA 等温扩增技术的典型代表是发明于 1998 年的滚环扩增技术 (rolling circle amplification, RCA),该技术以病原生物体滚环复制为模型,实现了恒温条件下以环状 DNA 为模板短单链 DNA 为引物的核酸快速复制,产生一段含有大量重复序列单元的长单链 DNA,该重复单元与模板 DNA 互补。由于 RCA 具有操作简单、快速、高效、灵敏度高、特异性高和可定量分析等优点已经广泛用于临床和微生物分子诊断领域。Cheng 等利用 RCA 的信号放大作用,采用夹心免疫模式构建了血管内皮生长因子(VEGF)传感器^[23],二抗上标记生物素,通过亲和素结合生物素标记的引物,在模板 DNA 和原料脱氧核苷三磷酸(dNTP)存在下发生 RCA 反应产生长单链,继而与大量修饰互补短 DNA 链的量子点结合,最后检测量子点的溶出峰实现对 VEGF 的高灵敏分析(图 6)。

2000 年,Notomi 等建立了环介导等温扩增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP),该

图 6 基于 RCA 放大的 VEGF 传感器原理示意图^[23]Fig.6 Schematic representation of the VEGF sensor with RCA for amplification^[23]

方法使用一种具有自动链置换活性的 *Bst* DNA 聚合酶,通过两条特异的外部引物和两条特异的内部引物,在等温(60~65°C)的条件下进行靶序列特异性扩增,且具有特异、灵敏、快速、简便等特点^[24]。一般来说,通过比较 LAMP 扩增反应中产生的白色焦磷酸镁沉淀的混浊度,或加入染料可实现对初始靶序列的定量分析^[25]。最近, LAMP 扩增反应产物也可用电化学方法检测,实现对生化分子的检测。Sun 等^[26]在离子液体修饰的基底电极上固定特异性单链捕获探针构造了一个电化学 DNA 生物传感器,使用电化学杂交指示剂亚甲基蓝 (MB) 检测基于杂交的 LAMP 扩增子。Nakamura 等^[27]发展了一种使用染料 Hoechst 33258 作为杂交指示剂检测 LAMP 产物的电化学 DNA 芯片传感器。利用适体和相应目标分子的关系转换可以建立基于 LAMP 放大的非 DNA 分析平台。Xie 等^[28]报道了 LAMP 放大的电化学方法用于赫曲霉毒素 A(OTA)的检测。如图 7 所示,首先将 OTA 适体的互补链自组装于纳米金修饰玻璃碳电极表面,己硫醇封闭后与 OTA 适体杂交形成部分互补的 DNA 双链体,没有目标物时,OTA 适体可以进行 LAMP 扩增反应生成大量双链结合反应底液中的 MB,致使游离 MB 减少,DPV 检

测信号较小;当目标物 OTA 出现时,它会与其适体形成络合物从而将适体从电极表面带走, LAMP 反应的引物减少,扩增产物减少,反应液中游离的 MB 相应增加,DPV 检测信号增大,以此进行定量分析,实验表明该传感器对 OTA 检测限为 0.3 pmol/L。

2006 年,Willner 课题组提出了一种内切酶放大的链置换 DNA 等温扩增法 (strand displacement amplification, SDA)^[29-30]。该方法依赖于目标物沿着模板链聚合形成核酸内切酶可识别位点,经内切酶切割产生 3'-OH 缺口,继而再次被聚合酶识别沿着 3'端到 5'端方向聚合,置换出之前的扩增产物并再次形成可识别切割位点,如此进行“切割-聚合-置换”循环反应,游离出大量聚合剪切的单链 DNA 产物,从而实现 DNA 扩增。该方法具有扩增效率高且操作简单的优点,具有生化分析方面的应用潜力^[31-32]。Yang 等^[33]结合 SDA 和杂交链式反应 (hybridization chain reaction, HCR) 的双重信号放大能力设计了一种电化学检测 miRNA 的方法。如图 8 所示,目标 miRNA 存在时,可以沿着模板 DNA 序列聚合形成限制性内切酶识别位点和扩增产物,被内切酶切割后再次形成聚合酶识别缺口并聚合置换出

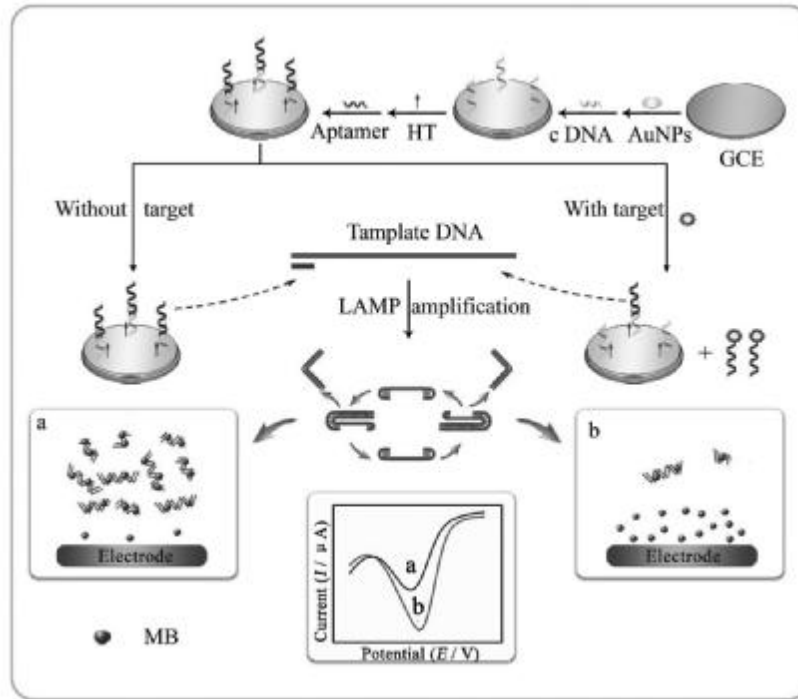


图 7 LAMP 放大的电化学方法用于 OTA 检测原理示意图^[26]

Fig.7 Schematic illustration of OTA detection principle using electrochemical method based on LAMP^[26]

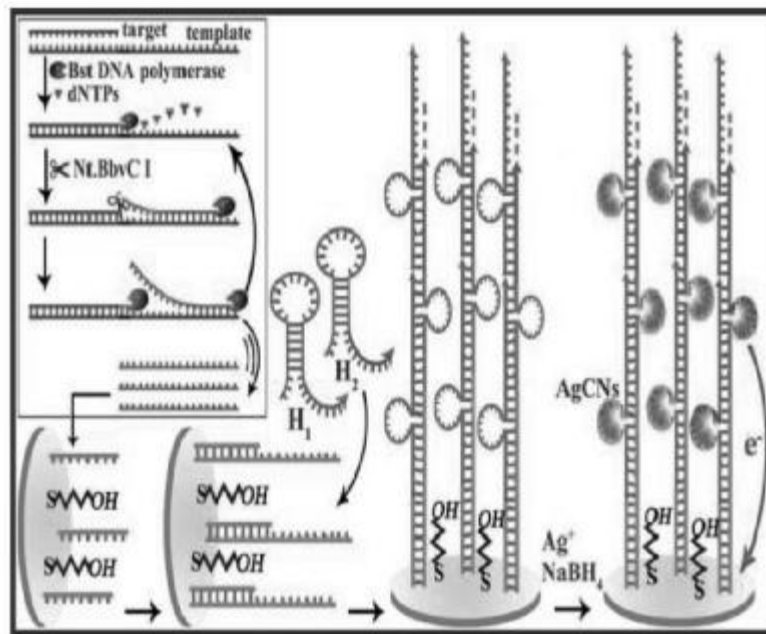


图 8 基于 SDR 和 HCR 放大的电化学方法用于 miRNA 检测原理示意图^[33]

Fig.8 Schematic illustration of miRNA detection principle based on SDR and HCR Amplifications^[33]

之前形成的扩增产物,如此在聚合酶和内切酶交替作用下产生大量扩增 DNA 产物,该扩增产物作为 HCR 的引发剂促使形成大量含环状富 C 序

列的双链 DNA,并以此为 DNA 模版原位生成银纳米簇产生电化学信号。

1.4 DNA 自组装放大技术

自组装是指基本结构单元,如分子、纳米粒子、生物大分子或微米尺度物质,在一定条件下依赖分子间非共价作用力(氢键、范德华力、静电力、疏水作用力、 π - π 堆积作用等)自发地形成一种稳定有序结构的过程。DNA 自组装是一种严格遵循碱基互补配对原则的自下而上(bottom-up)的分子自发组装技术,区别于活细胞中 DNA 作为遗传信息载体的功能,此处的 DNA 充当构建纳米结构材料基元的角色。通过对碱基序列进行合理设计,可以实现 DNA 纳米结构的精密控制,并作为信号放大手段运用于电化学生物传感器。Pierce 等^[34]提出的杂交链式反应(hybridization chain reaction, HCR),其实质是一种链置换驱动的 DNA 自组装,该反应在等温无酶条件下进行,通过一段单链寡核苷酸引发两条分别含有粘性末端的发夹形单体交叠杂交组装成一段延展的带有缺口的双链 DNA。HCR 组装特异性高,相当于 DNA 扩增,但却不需要聚合酶等酶的参与,操作简单。此外,产物易于与双链指示剂结合或设

计带有功能化侧链的双链产物而达到放大检测信号的目的,目前相关研究非常热门。

Ge 等^[35]展示了一个结合 HCR 放大作用和四面体 DNA 纳米结构探针的超灵敏 miRNA 检测平台。在该方案中,三维四面体 DNA 纳米结构作为固定捕获探针的支架更容易接近目标 miRNA 而增加反应性,由于发夹形单体修饰了生物素,通过 HCR 形成的触须状 DNA 纳米线便含有大量生物素,可以捕获大量亲和素修饰的催化酶,从而有效放大检测信号(图 9)。实验表明,四面体 DNA 纳米结构和 HCR 产物的协同效应可以大大提高检测 DNA 和 miRNA 的灵敏度。事实上,大多数报道的电化学生物传感器都是与其他放大技术联用构建的。Zhuang 等^[36]结合 HCR 放大与银纳米探针采用电化学方法实现了高灵敏的 DNA 检测。由于目标物引发发夹形单体自组装形成生长的 DNA 纳米结构,使得大量银纳米探针不需要银增强底物和生物活性的酶就可以直接固定其上,在施加的电位下纳米银产生强电化学信号从而进行定量分析(图 10)。在优化的实验

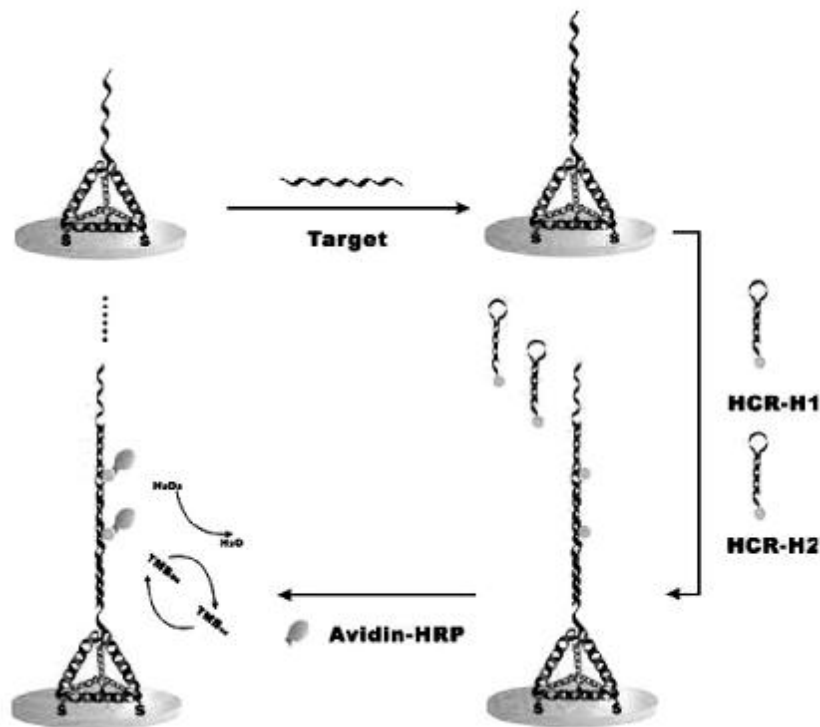


图 9 基于四面体 DNA 纳米结构和 HCR 放大的电化学 DNA 检测原理示意图^[35]

Fig.9 Schematic illustration of electrochemical DNA detection based on tetrahedral DNA nanostructure and HCR amplification^[35]

条件下,目标传感器对人类免疫缺陷病毒(HIV)特异性 DNA 序列的检测表现出良好的电化学性能,检测限低至 0.5 fmol/L。通过单链 DNA 间的交

叠组装也可以形成类似于 HCR 产物的超夹心 DNA 纳米结构。Xia 等^[37]采用 MB 修饰 DNA 探针分子与目标物进行级联杂交形成超夹心结构

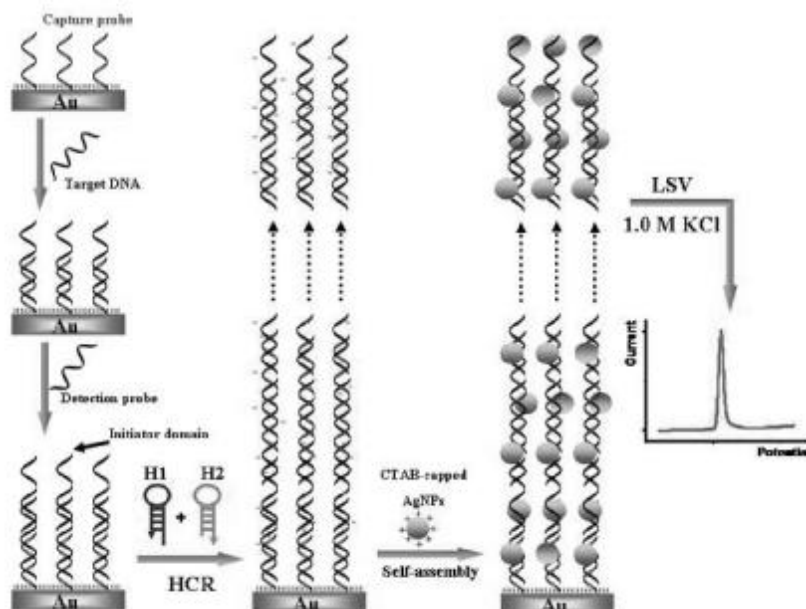


图 10 基于 HCR 放大和银纳米探针的电化学 DNA 检测原理示意图^[36]

Fig.10 Schematic illustration of electrochemical DNA detection principle based on HCR amplification and silver nanotags^[36]

实现信号放大,报道了一种电化学高灵敏 DNA 检测法(图 11)。Yin 等^[38]也通过超夹心 DNA 组装放大方法,向生成的长双链 DNA 中嵌入双链指示剂 MB,分别实现了对 DNA 和三磷酸腺苷

(ATP)的检测。

1.5 目标物循环放大技术

目标物循环一般是利用核酸切酶的剪切作用,将被捕获的目标物释放游离出来,并参与和未作用 DNA 探针的下一轮结合-剪切过程,如此循环,使得单个目标分子不断重复利用,即目标分子与 DNA 探针按照 1:n 比例反应,达到 n 倍放大检测信号的效果,是近几年来发展迅速的一种信号放大技术,在高灵敏生物分析中广泛使用^[39-42]。根据对 DNA 底物作用方式和切割位置的不同,核酸切酶主要分为限制性内切酶及核酸外切酶。

限制性内切酶是可以识别特异的碱基序列并在识别位点或其周围进行切割的一类酶,可分为识别具回文序列的双链 DNA 并对两条 DNA 均剪切的一类,和识别特异性双链但只剪切其中一条单链的一类。Chen 等^[43]将包含一段富 G 序列的 DNA 捕获探针通过金硫键组装于电极表面,目标 DNA 与其杂交产生后限制性内切酶识别位点,在限制性内切酶催化剪切作用下释放出目标 DNA,游离出的目标物又能参与下一个杂

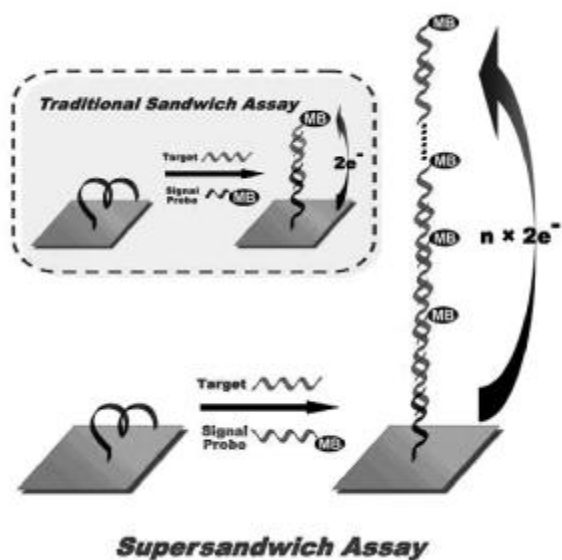


图 11 电化学超夹心 DNA 检测原理示意图^[37]

Fig.11 Schematic illustration of the electrochemical DNA supersandwich assay^[37]

交-剪切过程,如此循环,使得电极表面固定的捕获探针大量转化为仅保留富 G 序列的短 DNA 链,易于与卟啉铁(hemin)结合形成 hemin/G 四倍体 DNA 酶,可以催化过氧化氢介导的四甲基联苯胺的氧化,从而产生增强的催化电流信号,达到检测目的(图 12)。Zhou 等^[44]也利用限制性内切酶辅助目标 DNA 循环在电极表面形成大量 hemin/G 四倍体 DNA 酶,该 DNA 酶通过催化 H_2O_2 的还原竞争共反应试剂,从而淬灭电极材料石墨烯/量子点复合物的 ECL 发射,实现了 DNA 的高灵敏分析。限制性内切酶能否发挥作用依赖于特异性识别位点的形成,这要求目标 DNA 具有相应的特殊序列,限制了其适用范围,为了解

决这一问题,可向体系中引入一条辅助探针,通过捕获探针、辅助探针及目标 DNA 间的相互杂交形成 Y 型结构^[45-46],酶切位点位于 Y 结构上的辅助探针/捕获探针双链分枝,从而扩大可检测 DNA 对象,具有普适性。Bai 等^[47]结合纳米材料与酶辅助目标物循环放大技术的优点,设计了一种电化学适配体传感器用于内毒素(LSP)的超灵敏检测。如图 13 所示,首先通过 LPS 结合固定在金磁纳米表面的适配体,置换出之前杂交好的互补链 DNA1 作为间接目标物检测,释放的 DNA1 和辅助探针共同被发夹形捕获探针捕获形成 Y 型结构和识别位点,在限制性内切酶作用下促使 DNA1 循环利用产生大量被剪短的能

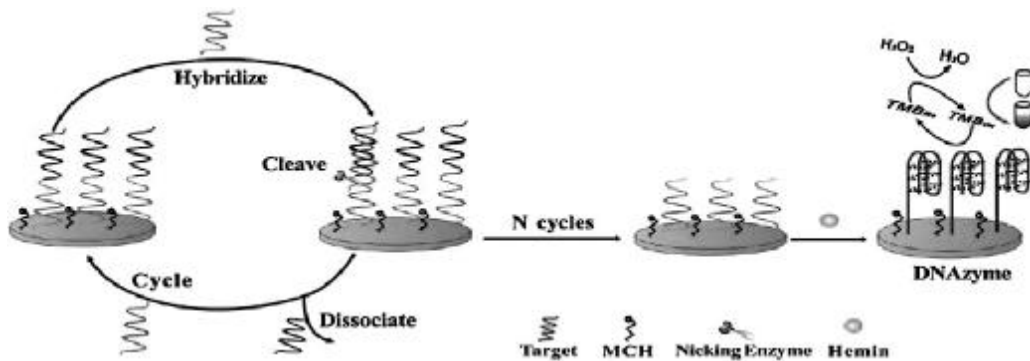


图 12 基于酶辅助目标物循环电化学 DNA 检测原理示意图^[43]

Fig.12 Schematic illustration of the electrochemical DNA assay based on nuclease-assisted target recycling^[43]

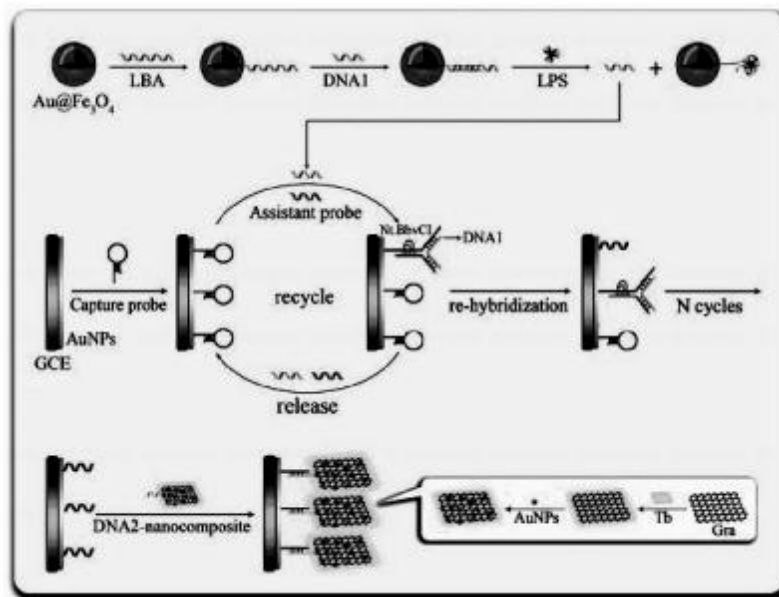


图 13 电化学适配体传感器原理示意图^[47]

Fig.13 Schematic illustration of the electrochemical aptasensor^[47]

与 DNA2 杂交的 DNA 片段, 通过 DNA2 上修饰的甲苯胺蓝-石墨烯(Tb-Gra)复合物产生增强的电化学检测信号。当 LPS 不存在时, 电极表面组装的捕获探针呈发夹形闭合构型, 不能与 DNA2 杂交, 因此背景信号较低。结果表明, 该传感器对 LPS 检测限为 8.7 fg/mL, 远远低于之前文献报道。

核酸外切酶是指能够从分子链的末端顺次水解磷酸二酯键生成单核苷酸的酶, 作用底物可以是双链 DNA 也可以是单链 DNA, 作用方向可以沿 3'→5'端, 也可以沿 5'→3'端。由于该类酶不要求特殊的目标碱基序列, 因此在基于酶辅助目标物循环检测方案的构建上具有较强的灵活性, 常用的有核酸外切酶 III(Exo III)、外切酶 I(Exo I) 和 λ 外切酶(λ Exo)等^[48-51]。Wu 等^[52]设计了一种

基于 Exo III 辅助目标物循环的电化学免标记法用于检测 DNA。传感界面的构建是通过自组装巯基 DNA 捕获探针和巯基己醇混合单分子膜制备的, 当没有目标 DNA 时, 通过电极表面 DNA 的负电性磷酸骨架吸附大量正电性电活性分子六氨合钌(RuHex)产生较强的电化学还原峰, 当有目标物时, 可以与 DNA 捕获探针杂交形成平末端的双链 DNA 结构, Exo III 沿 3'→5' 方向逐步催化去除捕获探针的单核苷酸而释放出目标 DNA, 释放出的 DNA 可与其他未被剪切的捕获探针杂交致使捕获探针的催化降解, 如此循环, 单个目标分子就能导致 n 个捕获探针被催化剪切, 减少 RuHex 的静电吸附量, 电化学信号相应减小并以此为定量依据(图 14)。

此外, 通过聚合酶辅助引物扩增的链置换反

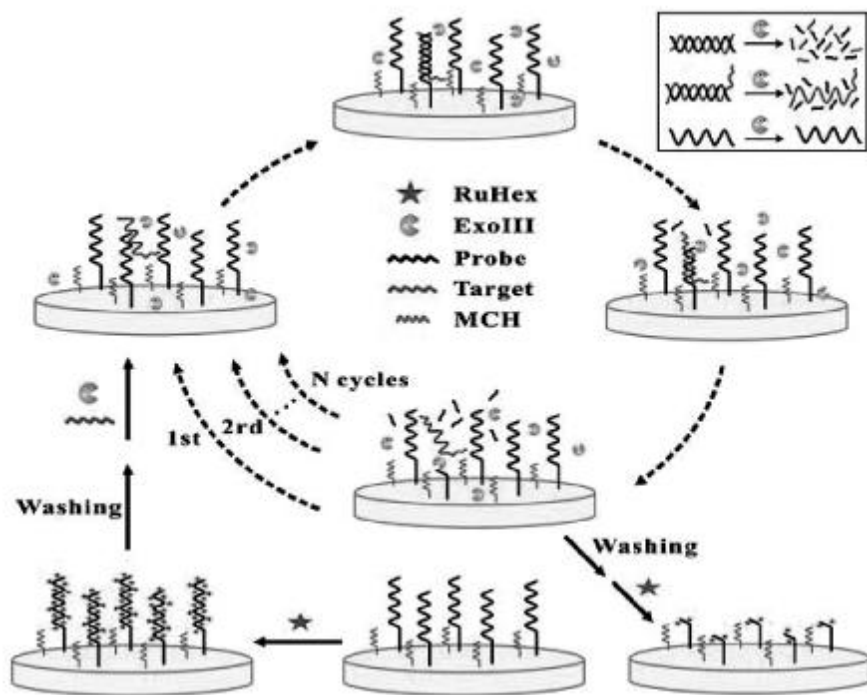


图 14 通过 Exo III 辅助目标物循环的免标记电化学 DNA 传感器原理示意图^[52]

Fig.14 Schematic illustration of the label-free electrochemical DNA sensor via Exo III-aided target DNA recycling for sequence-specific detection of DNA^[52]

应也能实现目标物的循环。该方法的基本原理是: 首先将 DNA 模板设计成发夹形构象以钝化其与引物 DNA 的结合位点, 通过适体-目标物特异性结合或者 DNA 杂交打开发夹形 DNA 模板, 裸露出可结合引物位点, 与引物 DNA 杂交后在聚合酶和脱氧核苷三磷酸 (dNTP) 作用下进行

DNA 扩增反应, 产生延展的 DNA 产物能置换出之前与模板 DNA 结合的目标物, 被释放的目标物可以再次结合钝化的 DNA 模板, 发生下一轮聚合-置换反应, 以此达到目标物重复利用的目的^[53]。Cheng 等^[54]将包含 VEGF 适体的发夹形捕获探针组装于金电极表面, 目标物 VEGF 与其结

合打开发夹结构暴露出引物 DNA 的互补序列继而与引物杂交,在聚合酶和 dNTP 作用下以捕获探针为模板发生引物扩增反应,形成与捕获探针完全互补序列置换出 VEGF,释放的目标物参与下一个循环的聚合-置换反应,最后使得电极表面的发夹形捕获探针与引物扩增产物形成完全互补双链体结构,该引物 DNA 上标记有生物素,

可结合亲和素修饰的磷酸酶(ST-AP),产生增强的酶催化信号(图 15)。Zhang 等^[55]通过目标 DNA 打开发夹形捕获探针诱导循环的引物扩增反应,产生大量扩增产物与发夹形捕获探针形成双链杂交结构,使原本靠近电极表面的光敏剂远离电极,光电信号减小从而实现了目标 DNA 的灵敏分析(图 16)。

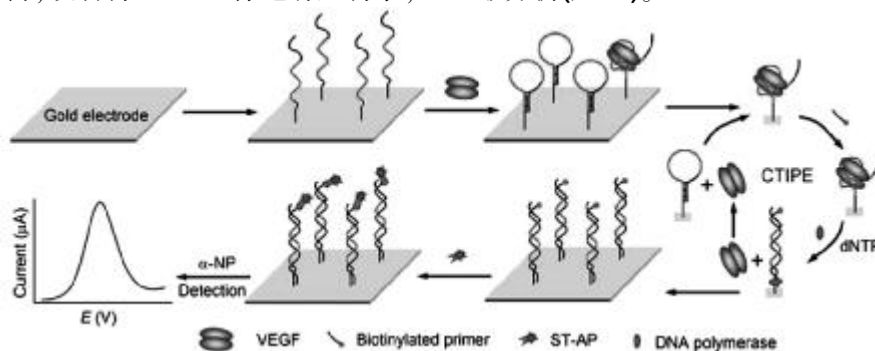


图 15 基于循环的目标物诱导引物扩增的电化学适体传感器原理示意图^[54]

Fig.15 Schematic presence of electrochemical aptasensor based on cyclic target-induced primer extension^[54]

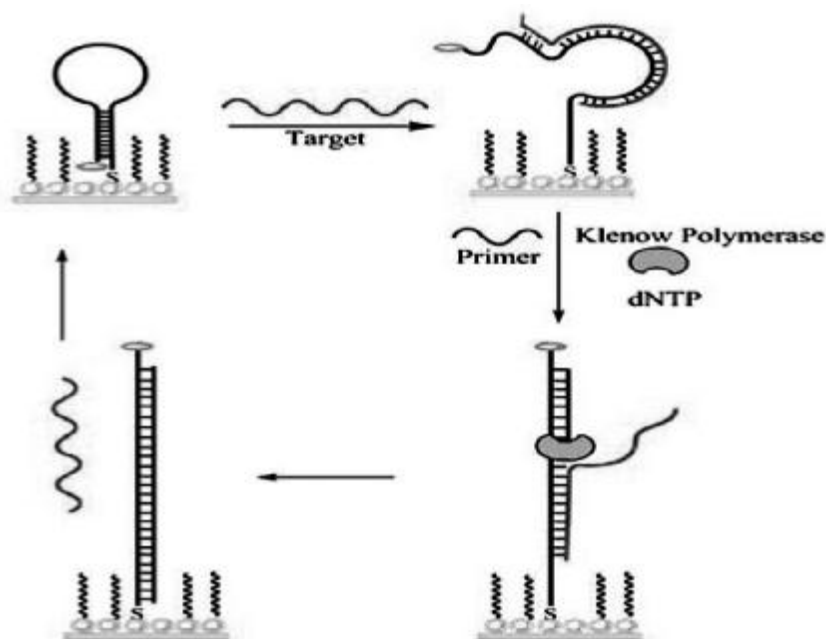


图 16 基于等温链置换反应的光电化学 DNA 传感器原理示意图^[55]

Fig.16 Principle of the photoelectrochemical DNA biosensor based on isothermal circular strand-displacement polymerization reaction^[55]

参考文献

[1] Akter R, Rahman M A, Rhee C K. Amplified electrochemical detection of a cancer biomarker by enhanced precipitation using horseradish peroxidase attached on carbon nanotubes [J]. Analytical Chemistry, 2012, 84

(15): 6407-6415.

[2] Wang J, Zhao W W, Tian C Y, et al. Highly efficient quenching of electrochemiluminescence from CdS nanocrystal film based on biocatalytic deposition[J]. Talanta, 2012, 89: 422-426.

[3] Caruana D J, Adam H. Enzyme-amplified amperometric

- detection of hybridization and of a single base pair mutation in an 18-base oligonucleotide on a 7- μm -diameter microelectrode [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121 (4): 769-774.
- [4] Kwon S J, Yang H, Jo K, et al. An electrochemical immunosensor using p-aminophenol redox cycling by NADH on a self-assembled monolayer and ferrocene-modified Au electrodes [J]. *Analyst*, 2008, 133 (11): 1599-1604.
- [5] Limoges B, Marchal D, Mavr e F, et al. High amplification rates from the association of two enzymes confined within a nanometric layer immobilized on an electrode: modeling and illustrating example[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128 (18): 6014-6015.
- [6] Limoges B, Marchal D, Mavr e F, et al. Theory and practice of enzyme bioaffinity electrodes. Chemical, enzymatic, and electrochemical amplification of in situ product detection [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130 (23): 7276-7285.
- [7] Xiang Y, Zhang Y Y, Qian X Q, et al. Ultrasensitive aptamer-based protein detection via a dual amplified biocatalytic strategy [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25 (11): 2539-2542.
- [8] Yang T, Li Q, Meng L, et al. Synchronous electrosynthesis of poly (xanthurenic acid)-reduced graphene oxide nanocomposite for highly sensitive impedimetric detection of DNA[J]. *ACS Applied Materials Interfaces*, 2013, 5(9): 3495-3499.
- [9] Yang T, Meng L, Wang X, et al. Direct electrochemical DNA detection originated from the self-Redox signal of sulfonated polyaniline enhanced by graphene oxide in neutral solution [J]. *ACS Applied Materials Interfaces*, 2013, 5(21): 10889-10894.
- [10] Guo Y X, Guo Y J, Dong C. Ultrasensitive and label-free electrochemical DNA biosensor based on water-soluble electroactive dye azophloxine-functionalized graphene nanosheets[J]. *Electrochimica Acta*, 2013, 113: 69-76.
- [11] Serpi C, Voulgaropoulos A, Girousi S. Use of mercury film glassy carbon electrode modified with multiwalled carbon nanotubes in electrochemical analysis of DNA[J]. *Electroanalysis*, 2013, 25(5): 1256-1262.
- [12] Patel M K, Ali M A, Zafaryab M, et al. Biocompatible nanostructured magnesium oxide-chitosan platform for genosensing application[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 45: 181-188.
- [13] Qiu L, Qiu L, Wu Z S, et al. Cooperative amplification-based electrochemical sensor for the zeptomole detection of nucleic acids[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85 (17): 8225-8231.
- [14] Wang Z J, Zhang J, Zhu C F, et al. Amplified detection of femtomolar DNA based on a one-to-few recognition reaction between DNA-Au conjugate and target DNA[J]. *Nanoscale*, 2014, 6: 3110-3115.
- [15] Huang H P, Zhu J J. DNA aptamer-based QDs electrochemiluminescence biosensor for the detection of thrombin[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 25 (4): 927-930.
- [16] Huang H P, Li J J, Tan Y L, et al. Quantum dot-based DNA hybridization by electrochemiluminescence and anodic stripping voltammetry [J]. *Analyst*, 2010, 135 (7): 1773-1778.
- [17] Huang H P, Jie G F, Cui R J, et al. DNA aptamer-based detection of lysozyme by an electrochemiluminescence assay coupled to quantum dots [J]. *Electrochemistry Communications*, 2009, 11(4): 816-818.
- [18] Cheng L X, Liu X, Lei J P, et al. Low-Potential Electrochemiluminescent sensing based on surface unpassivation of CdTe quantum dots and competition of analyte cation to stabilizer[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(8): 3359-3364.
- [19] Wang T, Zhang S Y, Mao C J, et al. Enhanced electrochemiluminescence of CdSe quantum dots composited with graphene oxide and chitosan for sensitive sensor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, 31(1): 369-375.
- [20] Tian C Y, Zhao W W, Wang J, et al. Amplified quenching of electrochemiluminescence from CdS sensitized TiO₂ nanotubes by CdTe-carbon nanotube composite for detection of prostate protein antigen in serum[J]. *Analyst*, 2012, 137(13), 3070-3075.
- [21] Jie G F, Zhang J, Jie G X, et al. A novel quantum dot nanocluster as versatile probe for electrochemiluminescence and electrochemical assays of DNA and cancer cells [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 52: 69-75.
- [22] Zhang J, Nie H, Wu Z, et al. Self-catalytic growth of unmodified gold nanoparticles as conductive bridges mediated gap-electrical signal transduction for DNA hybridization detection[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86 (2): 1178-1185.
- [23] Cheng W, Yan F, Ding L, et al. Cascade signal amplification strategy for subattomolar protein detection by rolling circle amplification and quantum dots tagging [J]. *Ana-*

- lytical Chemistry, 2010, 82(8): 3337-3342.
- [24] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): E63.
- [25] Zhang X Z, Lowe S B, Gooding J J. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification(LAMP)[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 61: 491-499.
- [26] Sun W, Qin P, Gao H, et al. Electrochemical DNA biosensor based on chitosan/nano-V₂O₅/MWCNTs composite film modified carbon ionic liquid electrode and its application to the LAMP product of *Yersinia enterocolitica* gene sequence [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25 (6): 1264-1270.
- [27] Nakamura N, Ito K, Takahashi M, et al. Detection of six single-nucleotide polymorphisms associated with rheumatoid arthritis by a loop-mediated isothermal amplification method and an electrochemical DNA chip[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79 (24): 9484-9493.
- [28] Xie S B, Chai Y Q, Yuan Y L, et al. Development of an electrochemical method for Ochratoxin A detection based on aptamer and loop-mediated isothermal amplification [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 55: 324-329.
- [29] Weizmann Y, Beissenhertz M K, Cheglakov Z, et al. A virus spotlighted by an autonomous DNA machine[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, 45 (44): 7384-7388.
- [30] Beissenhertz M K, Elnathan R, Weizmann Y, et al. The aggregation of Au Nanoparticles by an Autonomous DNA machine detects viruses[J]. *Small*, 2007, 3(3): 375-379.
- [31] Liu Y Q, Zhang M, Yin B C, et al. Attomolar ultrasensitive microRNA detection by DNA-scaffolded silver-nanocluster probe based on isothermal amplification[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(12): 5165-5169.
- [32] Zhang M, Liu Y Q, Yu C Y, et al. Multiplexed detection of microRNAs by tuning DNA-scaffolded silver nanoclusters[J]. *Analyst*, 2013, 138(17): 4812-4817.
- [33] Yang C, Shi K, Dou B, et al. In Situ DNA-templated synthesis of silver nanoclusters for ultrasensitive and label-free electrochemical detection of microRNA [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7 (2): 1188-1193.
- [34] Dirks R M, Pierce N A. Triggered amplification by hybridization chain reaction[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(43), 15275-15278.
- [35] Ge Z, Lin M, Wang P, et al. Hybridization chain reaction amplification of microRNA detection with a tetrahedral DNA nanostructure-based electrochemical biosensor[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(4): 2124-2130.
- [36] Zhuang J Y, Fu L B, Xu M D, et al. Sensitive electrochemical monitoring of nucleic acids coupling DNA nanostructures with hybridization chain reaction [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 783: 17-23.
- [37] Xia F, White R J, Zuo X, et al. An electrochemical super-sandwich assay for sensitive and selective DNA detection in complex matrices[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132: 14346-14348.
- [38] Yin B C, Guan Y M, Ye B C. An ultrasensitive electrochemical DNA sensor based on the ssDNA-assisted cascade of hybridization reaction[J]. *Chemical Communications*, 2012, 48(35): 4208-4210.
- [39] Zhu Z, Gao F L, Lei J P, et al. A Competitive strategy coupled with endonuclease-assisted target recycling for DNA detection using silver-nanoparticle-tagged carbon nanospheres as labels [J]. *Chemistry-A European Journal*, 2012, 18(43), 13871-13876.
- [40] Chen J H, Zhang J, Li J, et al. An ultrahighly sensitive and selective electrochemical DNA sensor via nicking endonuclease assisted current change amplification [J]. *Chemical Communications*, 2010, 46(32): 5939-5941.
- [41] Zhou H, Zhang Y Y, Liu J, et al. Efficient quenching of electrochemiluminescence from K-doped grapheme-CdS: Eu NCs by G-quadruplex-hemin and target recycling-assisted amplification for ultrasensitive DNA biosensing[J]. *Chemical Communications*, 2013, 49(22): 2246-2248.
- [42] Guo Y S, Jia X P, Zhang S S. DNA cycle amplification device on magnetic microbeads for determination of thrombin based on graphene oxide enhancing signal-on electrochemiluminescence [J]. *Chemical Communications*, 2011, 47(2): 725-727.
- [43] Chen J, Zhang J, Guo Y, et al. An ultrasensitive electrochemical biosensor for detection of DNA species related to oral cancer based on nuclease-assisted target recycling and amplification of DNAzyme[J]. *Chemical Communications*, 2011, 47(28): 8004-8006.
- [44] Zhou H, Zhang Y Y, Liu J, et al. Efficient quenching of electrochemiluminescence from K-doped graphene-CdS:Eu NCs by G-quadruplex-hemin and target recycling-assisted amplification for ultrasensitive DNA biosensing[J]. *Chemical Communications*, 2013, 49(22): 2246-2248.

- [45] Nakayama S, Yan L, Sintim H O. Junction probes -sequence specific detection of nucleic acids via template enhanced hybridization processes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(38): 12560-12561.
- [46] Kong R M, Zhang X B, Zhang L L, et al. Molecular beacon-based junction probes for efficient detection of nucleic acids via a true target-triggered enzymatic recycling amplification [J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 83(1): 14-17.
- [47] Bai L J, Chai Y Q, Pu X Y, et al. A signal-on electrochemical aptasensor for ultrasensitive detection of endotoxin using three-way DNA junction-aided enzymatic recycling and graphene nano hybrid for amplification[J]. *Nanoscale*, 2014, 6(5): 2902-2908.
- [48] Cui L, Ke G, Wang C, et al. A cyclic enzymatic amplification method for sensitive and selective detection of nucleic acids[J]. *Analyst*, 2010, 135(8): 2069-2073.
- [49] Zuo X, Xia F, Xiao Y, et al. Sensitive and selective amplified fluorescence DNA detection based on exonuclease III-aided target recycling [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(6): 1816-1818.
- [50] Wu Z, Zhen Z, Jiang J H, et al. Terminal protection of small-molecule-linked DNA for sensitive electrochemical detection of protein binding via selective carbon nanotube assembly [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(34): 12325-12332.
- [51] Hsieh K, Xiao Y, Tom Soh H. Electrochemical DNA detection via exonuclease and target-catalyzed transformation of surface-bound probes [J]. *Langmuir*, 2010, 26(12): 10392-10396.
- [52] Wu D, Yin B C, Ye B C. A label-free electrochemical DNA sensor based on exonuclease III-aided target recycling strategy for sequence-specific detection of femtomolar DNA [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 28(1): 232-238.
- [53] Guo Q, Yang X, Wang K, et al. Sensitive fluorescence detection of nucleic acids based on isothermal circular strand-displacement polymerization reaction[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(3): e20.
- [54] Cheng W, Ding S, Li Q, et al. A simple electrochemical aptasensor for ultrasensitive protein detection using cyclic target-induced primer extension [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, 36(1): 12-17.
- [55] Zhang X, Xu Y, Zhao Y, et al. A new photoelectrochemical biosensors based on DNA conformational changes and isothermal circular strand-displacement polymerization reaction[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 39(1): 338-341.

金属有机框架材料在化学传感器中的应用

尚树川, 孔令强, 蔡婷婷, 康琪, 申大忠*

(山东师范大学化学化工与材料科学学院, 山东济南 250014)

摘要: 金属有机框架(metal-organic frameworks, MOFs)是一类由金属离子(簇)与有机桥联配体通过自组装连接而成的具有纳米孔穴的超分子晶体材料。它们具有极大的比表面积、可调控的孔径和拓扑结构、良好热稳定性和化学稳定性等优点,在化学传感方面有良好的应用前景。该文综述了近年来 MOFs 化学传感器方面的研究进展,侧重于光学、电化学、微天平、光电流等类型 MOFs 传感器的信号传导策略及其在检测挥发性有机物、金属离子、DNA、蛋白质及其它重要生物分子的分析应用。

关键词: 金属有机框架; 光学; 电化学; 微天平; 综述

Recent progress in applications of metal-organic frameworks in sensors

Shang Shu-chuan, Kong Ling-qiang, Cai Ting-ting, Kang Qi, Shen Da-zhong*

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract: Metal-organic frameworks(MOFs) are a class of hybrid materials self-assembled from organic bridging ligands and metal ion/cluster connecting points. As nanoporous, supramolecular materials, MOFs have unique chemical and physical properties, such as ultrahigh surface area, tunable structure, and high thermal and chemical stability. These characteristics make MOFs very attractive for chemical sensing. That short-focused article reports on recent efforts and progress in MOFs-based sensors with an emphasis on the design of functional MOFs and signal-transduction strategy, including optical, electrochemical, microbalance, and photoelectrochemical schemes, for analytical applications in detection of volatile organic compounds, metal ions, DNA, proteins, and other important biomolecules.

Key words: MOFs; optical; electrochemical; microbalance; review

0 引言

金属有机框架 (metal-organic frameworks, MOFs)是由金属离子(簇)与含氧或氮的有机配体通过自组装连接而成的具有周期性网状结构的晶体材料,具有超大的比表面积和孔容积、可调的孔径和拓扑结构、良好的热稳定性和化学稳定性等优点^[1]。在近年来,有关 MOFs 材料的研究领域发展迅猛,人们不仅设计合成了各种结构与性质的 MOFs 材料,而且开发了它们在气体储存、催

化剂、吸附与分离等方面的应用^[2-5]。此外,MOFs 材料独特的光电特性及其它性质,使它们成为研制高性能化学传感器的重要敏感材料^[6-8],该文选取部分有代表性的研究工作,简要介绍近几年来 MOFs 在化学传感器方面的研究和应用进展。

1 基于 MOFs 的光学传感器

MOFs 具有丰富的多孔拓扑结构,当它们与待测物相互作用时,如果其结构或性质发生变化能引起荧光或颜色变化,为开发基于 MOFs 的光

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21175084, 21275091)

* 通信联系人, E-mail: dzshen@sdu.edu.cn

学传感器提供了有利条件。例如,以镧系金属离子为中心离子的很多 MOFs, 具有优良的固体荧光特性,待测物与之作用引起荧光光谱或强度的改变,而 MOFs 所具有类似分子筛空间结构,使它们对目标分子的尺寸和分子结构具有一定的选择性,这种性质可用于金属离子以及小分子的传感监测^[9]。因此,基于 MOFs 发光特性的传感分析是目前化学传感器领域中较为活跃的研究方向之一。

快速检测炸药及其类似物质关系到国家安全和环境保护。Pramanik 等^[10]报道了一种可用于选择性检测高能炸药及其它芳香烃的 MOFs,它具有发达的三维多孔结构和很强的发光特性,含有吸电子基的化合物可使其荧光猝灭,而含有供电子基的化合物则使其荧光增强,并通过分子轨道理论对该现象进行了讨论分析。Campagnol 等^[11]在导电基底上以电化学方法合成了含 Tb 的发光 MOFs 膜,其荧光强度随 2,4-二硝基甲苯(DNT)浓度的增加而下降,可用于炸药的测定,检测下限约为 0.01 mmol/L。Gole 等^[12]合成了三种发光的 Zn 基 MOFs,配体中的芳香环结构能够增强 MOFs 中的 π -电子密度。基于荧光猝灭原理,这些富电子高发光性的 MOFs 可用于检测爆炸性硝基化合物。当这些 MOFs 分散在乙醇中时具有很强的荧光,存在硝基化合物时发生了荧光猝灭。与其它缺电子芳烃比较,所制备的三种 MOFs 对硝基化合物如 DNT、TNT 和 TNB 有较高的选择性,对 TNT 的检测限达到 $10^{-7}\%$ 水平,且能重复使用。Nagarkar 等^[13]设计合成了一种多孔 Zr-MOFs,其荧光也可被 TNT 猝灭,选择性很高,其它硝基苯类化合物的干扰较小,可用于水相中 TNT 的传感检测。

挥发性有机物 (volatile organic compounds, VOCs),是指沸点介于 50~250 °C 的化合物,室温下饱和蒸气压超过 0.001 大气压,在常温下能够以蒸气形式存在于空气中的一类有机物,它们对人体健康有很大的危害,灵敏快速地检测 VOCs 是一项重要的环境分析任务。Lu 等^[14]利用光的干涉效应,不仅制备了随膜厚度变化的 MOFs 色阶条带,而且将其应用于丙烷浓度测定。Li 等^[15]设计合成了一种 Ln-MOF,它与 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)蒸气接触,由 DMF 与配体相互作用产生强

的荧光,且对 DMF 具有选择性的响应,当用水蒸气去除 DMF 后,其荧光猝灭。Shustova 等^[16]制备了两种在高温下仍旧具有很强的荧光的 MOFs, $Zn_2(tcpe)$ 与 $Mg(dhbdc)$,在常温下, $Zn_2(tcpe)$ 对多种分析物包括 NH_3 、三乙胺、乙二胺、 N_2 、N,N-二乙基甲酰胺与 H_2O 都有响应,当温度升高到 100 °C,这种 MOF 对 NH_3 具有很高的选择性,而对其它分析物无响应。Zhang 等^[17]报道了一种 2D 层状具有宽通道的 MOFs,这种特殊结构展示了很高的气体吸附性,吸附多种 VOCs 后具有荧光应答响应,在化学传感方面有良好的应用前景。Wan 等^[18]通过水热法合成了钇掺杂的 MOF-5,并制备了基于催化发光的气体传感材料,当异丁醇接触这种材料的表面时,可观察到催化发光。在优化条件下,该传感器对异丁醇的检测下限为 3.7 mg/L,与 MOF-5 相比,钇掺杂的 MOF-5 对异丁醇有更好的催化发光响应。Liu 等^[19]采用以四苯基乙烯为母体的配体与 Zn^{2+} 反应,制备出多孔的 $[Zn_2(TCPPE)]$,该 MOFs 具有很强的荧光,当它吸附 VOCs 后,或发射峰蓝移或荧光猝灭,可用于 VOCs 传感监测。

高效测定有机溶剂中水分含量的传感器在化学工业中有大的市场需求。Douvali 等^[20]合成了一种含 Mg^{2+} 的 MOFs,它在微量水(0.05%~5%, V/V)存在下产生荧光,可以用于多种有机溶剂中水分的测定,传感器响应快速可逆,具有良好的可重复使用性。Ohira 等^[21]利用 MOFs (Cu-BTC) 晶体在干燥条件下呈深蓝色而吸附水分后颜色变浅的原理,将 Cu-BTC 作为光导纤维传感器的敏感膜用于工业气体中含水量的测定,检测下限约为 $5 \times 10^{-4}\%$ (V/V),该传感器响应快速、可逆,长期稳定性好。

手性分析是一项具有挑战性的分析测定工作。Wanderley 等^[22]用具有手性的桥联配体合成了一种高度多孔和强荧光的 MOFs,其荧光能被氨基醇与配体间的氢键作用所猝灭,可用于手性氨基醇的传感检测,MOFs 中的微通道对分析物具有富集作用有利于提高检测灵敏度,对映选择性源自 MOFs 中孔穴的手性识别特性,实验测定了四种氨基醇的 Stern-Volmer 常数为 490~31200 L/mol,对映选择比为 1.17~3.12。Qin 等^[23]合成了一种非贯穿的手性多孔多功能的 MOFs,它的荧

光发射峰可通过改变溶剂分子而调控,对质子溶剂与非质子溶剂表现出不同的荧光响应特性。例如,在乙酸中荧光发射峰位于 556 nm,而在正己烷中发射峰蓝移 151 nm 至 405 nm,实验发现发射峰位置与强度和溶剂的介电常数有一定的关联性,该 MOFs 有望用于传感和吸附小分子。

表面增强拉曼散射 (SERS)的信号强度高度地依赖于分析物与纳米结构金属基底之间的相互作用与距离。Kreno 等^[24]利用层层自组装的方法在纳米 Ag 颗粒上生长可控厚度的 $\text{Cu}_3(\text{BTC})_2(\text{H}_2\text{O})_3$ (BTC=均苯三甲酸)膜,可大幅度提高局域表面等离子体共振的检测灵敏度,它对 CO_2 的响应信号是单纯使用纳米 Ag 颗粒的 14 倍。Hu 等^[25]将嵌入 MIL-101 中的金纳米粒子(AuNPs)用于高灵敏 SERS 检测,所制备的 AuNPs/MIL-101 纳米复合材料综合了金纳米粒子的局域表面等离子共振性质和 MOFs 的高吸附性能,使分析物有效地富集在 SERS 活性金属表面的电磁场附近,大幅度地提高了 SERS 基底的响应灵敏度,在所用实验条件下,对罗丹明 6G 和对二氨基联苯的检

测下限分别为 42 和 0.54 fmol,该基底具有良好的响应稳定性和重现性以及分子筛效应。所建立的 SERS 方法用于对苯二胺和 α 胎甲球蛋白的测定,线性范围分别为 1~100 ng/mL 和 1~130 ng/mL,检测下限为 0.1 ng/mL。

离子组分的测定是一项重要的分析工作。Xiao 等^[26]合成了一种含稀土的可发光 Eu-MOF,其微孔结构能够高效灵敏地实现对 Cu^{2+} 识别。He 等^[27]在 MOFs 的配体中引入烷基硫醚单元,所得 MOFs 晶体对 Pd(II)具有选择性的识别作用,低浓度的 Pd(II)即可引起晶体颜色的显著变化,可用于 Pd(II)的显色分析,其响应机制为多个官能团的共同作用,而且负载 Pd 的 MOFs 晶体是一种高效催化剂。Yang 等^[28]研究报道了基于离子交换原理的荧光法测定 Fe^{3+} ,其原理如图 1 所示, MIL-53(Al)具有强荧光而 MIL-53(Fe)荧光很弱,当 MIL-53(Al)中的 Al^{3+} 与溶液中的 Fe^{3+} 进行离子交换,使 MIL-53(Al)发生荧光淬灭,实现了对水溶液中 Fe^{3+} 的选择性与灵敏检测,其线性范围在 3~200 $\mu\text{mol/L}$,检测下限为 0.9 $\mu\text{mol/L}$ 。

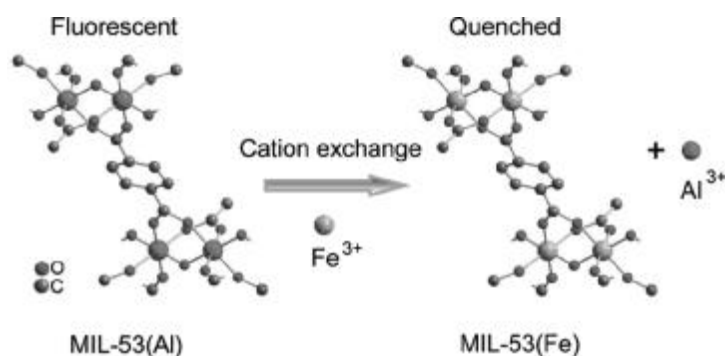


图 1 基于离子交换原理荧光法检测 Fe^{3+} 原理示意图^[28]

Fig.1 Schematic Illustration of the Cation Exchange Mechanism for the Use of MIL-53(Al) as a Fluorescent Probe for Sensing Fe^{3+} ^[28]

Zhao 等^[29]将带正电的 MOFs 与带负电的 ZnO 量子点结合在一起设计成一种能够检测磷酸盐的荧光传感器,通过电子转移使 ZnO 量子点发生荧光淬灭,而加入磷酸根离子以后可以阻止这种淬灭并使 ZnO 量子点恢复荧光,荧光强度与磷酸根离子的浓度相关,磷酸根阻止 ZnO 量子点荧光淬灭的机理在于破坏 MOFs 的结构进而阻止 MOFs 与 ZnO 的结合。该传感器具有良好的响应灵敏度,线性范围在 0.5~12 $\mu\text{mol/L}$ 之间,检测下限是 53 nmol/L。

Lin 等^[30]将具有强荧光且带有胺基末端的碳量子点 (BPEI-CQDs) 组装到 ZIF-8 中去,合成一种新的荧光化 MOFs。这种新的荧光化 MOFs 不仅具有卓越的荧光活性、对 BPEI-CQDs 灵敏的选择性,而且基于 MOFs 的吸附特性,能够对目标分析物进行大量并且选择性地富集(见图 2)。这种 BPEI-CQDs/ZIF-8 复合物可用作制备检测 Cu^{2+} 的超灵敏高选择性的传感器,其检测范围是 2~1000 nmol/L,检测下限达 80 pmol/L,并且已经成功应用于检测环境水样中的 Cu^{2+} 浓度。

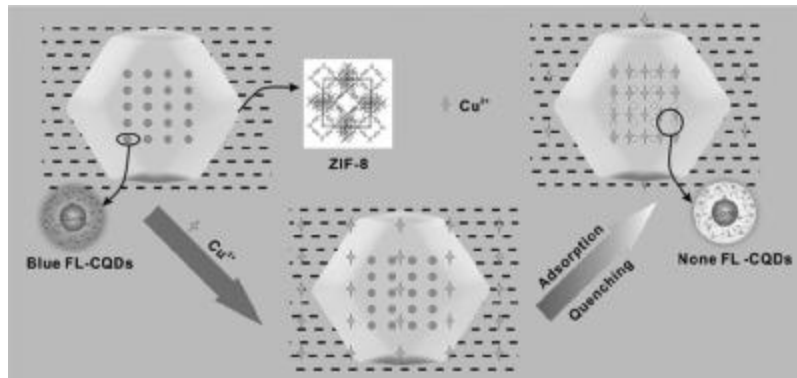


图2 基于碳量子点/ZIF-8 荧光探针传感 Cu^{2+} 原理图^[30]

Fig.2 Concept and process for sensing Cu^{2+} based on fluorescence of carbon quantum dots in ZIF-8^[30]

Hao 等^[31]合成了一种氧化石墨烯(GO)修饰的具有高荧光性能的 Zn-MOFs, 该材料具有良好的水分散性, 当水溶液中有 Cu^{2+} 时, Zn-MOFs 中的配体与 Cu^{2+} 作用会发生荧光猝灭, 因此可用来检测溶液中的 Cu^{2+} 含量, 响应快速且选择性高, 检测下限可达到 $1 \mu\text{mol/L}$ 。Carboni 等^[32]合成了两种具有 Zr-OXO 二级结构单元的 MOFs, 配体分别是顺丁烯二酸(MOF-1)和正交琥珀酸(MOF-2), 利用 MOF-2 在 Mn^{2+} 的水溶液中的荧光猝灭, 对 Mn^{2+} 检测下限可达到 8 nmol/L 。Song 等^[33]在纳米 SiO_2 表面合成一层 ZIF-8 薄膜, 合成多孔 $\text{SiO}_2@ZIF-8$ 材料。这种纳米材料对 Cu^{2+} 展现出非常好的吸附性和富集性, 其中咪唑基团中的 N 原子起到了非常大的作用。 Cu^{2+} 浓度在 $10\text{-}500 \text{ nmol/L}$ 范围内, 荧光信号呈现良好的线性, 检测下限可达到 3.8 nmol/L , 还可检测环境水样中的

痕量的 Cu^{2+} 。

近年来, MOFs 材料在生物分析中的应用备受关注。Fang 等^[34]利用 DNA 嵌入染料与 MOFs 进行无标记的、灵敏的荧光方法识别特定序列 DNA, 以 MIL-101 作为淬灭平台, 可以降低 DNA 探针复合物中荧光染料 SYBR Green (SG) 的背景荧光。其机理如图 3 所示: MIL-101 通过 $\pi\text{-}\pi$ 堆叠, 以及静电相互作用, 强烈吸附 DNA 探针复合物中的 SG, 使 SG 染料的荧光强度大大降低。当加入靶 DNA 后形成的双链 DNA 将远离 MIL-101 表面, 而 SG 染料则以嵌入与小沟结合的方式与双链 DNA 结合, 使 SG 染料的荧光强度大大增强, 检测下限达 73 pmol/L , 大大低于碳纳米管与氧化石墨烯平台, MIL-101 的引入, 使信噪比提高了 8 倍。

Yang 等^[35]合成了 Co-BTC, 因其催化性能可

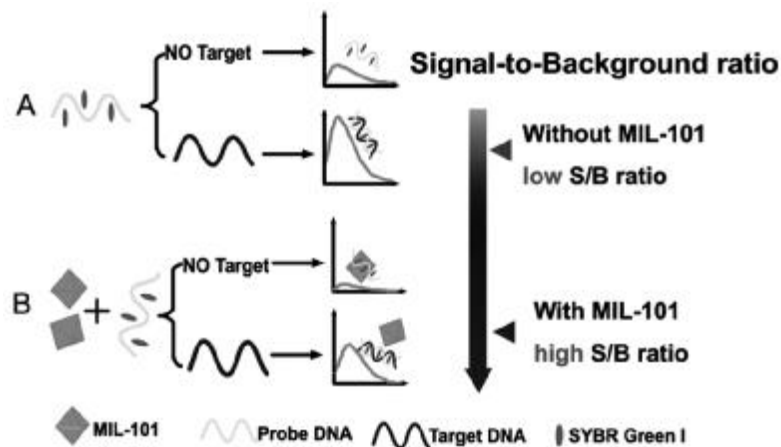


图3 利用 DNA 嵌入染料在无 MIL-101(A)及有 MIL-101 时降低背景信号(B)检测靶 DNA 示意图^[34]

Fig.3 Schematic illustration of using DNA- intercalating dye without (A) or with MIL-101 as a low background signal platform (B) for the detection of target^[34]

提高鲁米诺的化学发光强度,其机理有可能是在 Co-MOFs 活性金属位点与氧自由基之间形成了过氧化氢类似物。Co-MOFs-鲁米诺体系能够用于检测 L-半胱氨酸,在优化条件下,L-半胱氨酸的检测范围为 0.1~10 $\mu\text{mol/L}$,检测下限达 18 nmol/L。Liu 等^[36]利用聚乙烯亚胺作为连接器将金纳米粒子 (AuNPs) 通过静电吸引组装到 Fe-MIL-88 表面,所得杂化材料 Au@Fe-MIL-88 具有类过氧化物酶活性。单链 DNA 很容易吸附在其表面,降低它的类过氧化物酶活性,加入靶 DNA 能够使其活性复原 (见图 4),且复原度与加入靶 DNA 的浓度成正比,该传感的线性范围是 30~150 nmol/L,检测下限是 11 nmol/L,可用于无标记比色方法检测 DNA 杂交。

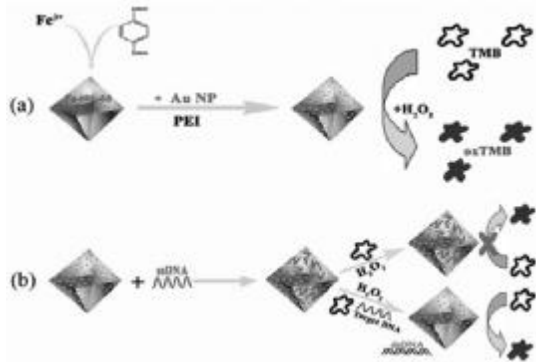


图 4 Au@Fe-MIL-88 的制备(a)与检测 DNA 原理(b)示意图^[36]

Fig.4 Schematic illustration of the proposed preparation method of Au@Fe-MIL-88 hybrids (a) and their application in the detection DNA (b)^[36]

Zhu 等^[37]报道 HKUST-1 可高效催化鲁米诺与 H₂O₂ 这一化学发光反应,它能促进自由基的生成和电子转移过程,使发光强度提高 90 倍,而多巴胺的存在导致发光强度下降,据此可用于测定多巴胺,检测下限为 2.3 nmol/L。Xiong 等^[38]合成了一种混合价态的 Ce-MOFs,该化合物具有类氧化酶活性,基于该物质良好的催化活性,构建了一种简易灵敏的比色测定方法用于高通量检测血清样品中生物巯基化合物。Tian 等^[39]报道了一种基于 Fe-MOFs 的纳米棒的 DNA 荧光传感器,该传感器的检测下限为 10 pmol/L,可识别单点突变,从“混合到检测”的时间为 4 min,并讨论了纳米结构的组成对传感器响应特性的影响以及中心金属离子与配体的协同作用。

此外,纳米粒径的 MOFs 优良的荧光特性可进行成像分析^[40]。硫化氢被认为是人体生理学和病理学过程中第三重要的气体信号传导分子,由于 H₂S 的高反应活性和扩散性,实时检测活体生物样本中 H₂S 的浓度变化具有重要意义,Ma 等^[41]以具 3D 纳米孔径 Cu-MOFs 作为检测 H₂S 的荧光探针,它具有良好的生物兼容性,而且响应快速,灵敏度高,选择性好,在生理 pH 条件下可选择性识别 H₂S,可用于活体细胞共聚焦成像分析。

2 基于 MOFs 的电化学传感器

利用 MOFs 材料大的比表面积和催化活性,可以改善电化学传感器的响应性能。Hou 等^[42]用 ZIF-8 模板合成 Co₃O₄ 纳米粒子,将 Co₃O₄@ZIF-8 修饰到玻碳电极上,通过循环伏安法,实现了对葡萄糖和双氧水的高灵敏检测,检测下限分别达 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.8 $\mu\text{mol/L}$ 。Hosseini 等^[43]将负载 Au-SH-SiO₂ 纳米粒子的 Cu-MOFs 用于修饰玻碳电极检测 L-半胱氨酸,结果表明 Au-SH-SiO₂@Cu-MOFs 对 L-半胱氨酸具有良好的催化活性,其氧化过电位明显下降而峰电流显著增加,测定 L-半胱氨酸的线性范围为 0.02~300 $\mu\text{mol/L}$,检测下限为 8 nmol/L。Ma 等^[44]以 ZIF-70 作为基质设计了一种检测体内葡萄糖的电化学传感器,其原理如图 5 所示,即利用 ZIF-70 催化氧化电极表面的亚甲基绿 (MG),产物与葡萄糖脱氢酶 (GDH) 和葡萄糖的酶催化反应产物 NADH 反应,以此检测葡萄糖,该传感器在葡萄糖浓度为 0.1~2 mmol/L 范围内有良好的线性。

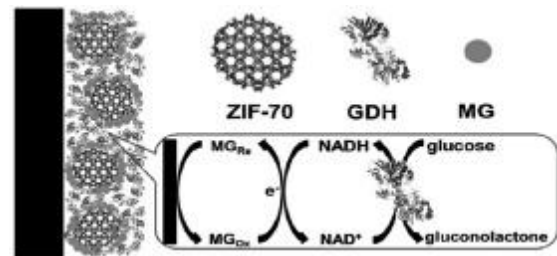


图 5 基于 ZIF-70 生物传感器原理示意图^[44]

Fig.5 Schematic illustration of the proposed ZIF-70-based biosensor^[44]

Wang 等^[45]以 MOF-5 修饰的玻碳电极先自溶液中吸附富集 Pb²⁺后再用溶出伏安法测定

Pb^{2+} , 在优化的实验条件下, 校正曲线的线性范围为 $0.01 \sim 1 \mu\text{mol/L}$ ($r^2=0.9981$), 检测下限为 5 nmol/L 。Wang 等^[46]通过循环伏安法研究了多壁碳纳米管与金属有机纳米复合材料掺杂型材料 $\text{MWCNTs@Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的电流信号对铅的响应, 其检测下限可达 $7.9 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$ 。Wang 等^[47]以胺基功能化的 $\text{NH}_2\text{-Cu}_3(\text{BTC})_2$ MOFs 制备修饰电极检测溶液中痕量的铅, 它利用 $\text{NH}_2\text{-Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的吸附特性将溶液中的铅离子富集在电极表面, 然后进行电化学检测, 在优化条件下, 修饰电极的线性范围为 $0.01 \sim 0.5 \mu\text{mol/L}$, 检测下限为 5 nmol/L 。Zhang 等^[48]合成了一种 Cu-MOFs , 并将其混合在大孔径碳材料(MPC)的空穴内(Cu-MOFs-MPC), 比较了 Cu-MOFs 、MPC 和 Cu-MOFs-MPC 的稳定性, 结果表明这些材料具有均匀的结构和稳定的化学性质, 在水中能稳定存在, 在 pH 为 7.4

的磷酸缓冲液中有稳定的电化学性质。利用 Cu-MOFs-MPC 作为探针检测抗坏血酸和血红蛋白的含量, 检测下限分别达 $3.5 \mu\text{mol/L}$ 、 $0.04 \mu\text{mol/L}$ 。

Ling 等^[49]设计了一种基于卟啉 MOFs 与三螺旋分子开关信号传导的电化学 DNA 传感器(图 6), streptavidin 功能化的 Zr-卟啉 MOF (PCN-222@SA) 具有很高的电催化还原 O_2 的活性, 因为存在较大的空间位阻, 所设计的纳米探针与固定在玻碳电极表面的 biotin 标记的三螺旋之间的相互作用被阻塞, 当存在目标 DNA 时, 它与三螺旋中的辅助 DNA 杂交, 导致三螺旋分子结构解体, 因此远离电极的末端 biotin 被激活从而很容易接近信号纳米探针 (PCN-222@SA), 传感器表面引入纳米探针能显著放大氧还原的电催化电流, 结合 DNA 循环放大技术, 该传感器的响应灵

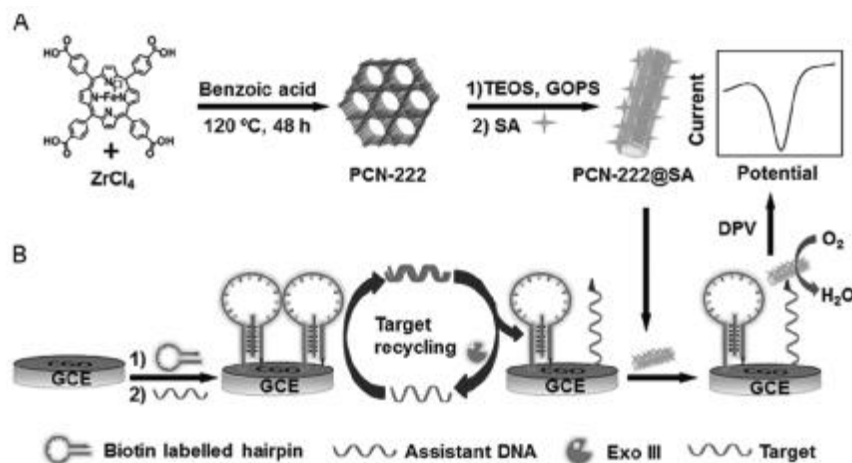


图 6 (A) PCN-222@SA 纳米探针的合成, (B) 电化学策略结合滚环放大检测 DNA^[49]

Fig.6 (A) Synthesis of PCN-222@SA composite, and (B) electrochemical strategy coupling with target recycling amplification for DNA sensing^[49]

敏度进一步提高, 检测下限可达 0.3 fmol/L 。

Guo 等^[50]在金电极表面电解含纳米金的对氨基磺酚溶液, 并以三硝基甲苯(TNT)为模板分子, 获得了分子印迹型微孔 MOFs 用于提高电化学 TNT 传感器的响应灵敏度与选择性, 在优化的实验条件下, 检测下限达到 0.04 fmol/L , 而且对 DNT 有很高的选择性。基于同一思路, 该课题组^[51]还报道了分子印迹微孔 MOFs 测定抗肿瘤药物(吉西他滨), 检测下限为 3 fmol/L 。Xu 等^[52]将预先合成的 Pt 纳米粒子 (Pt NPs) 加入到一种 Zr-MOF (UiO-66) 中, 制备复合材料 Pt NPs@UiO-

66, Pt NPs@UiO-66 具有很好的晶体结构, Pt NPs 很好地分散在了具有八面体结构的 UiO-66 框架中, 为氧化还原反应提供了更多的电活性位点, 该电极对过氧化氢具有优异的电催化活性, 选择性良好, 线性范围扩展为 $5 \mu\text{mol/L} \sim 15 \text{ mmol/L}$, 检测下限为 $2 \mu\text{mol/L}$, 为提高非酶电化学传感器的抗干扰能力提供了一种新途径。Yang 等^[53]以水热法合成了一种新的 Co-MOFs 并将其用于电化学修饰电极测定 H_2O_2 , 线性范围为 $5 \mu\text{mol/L} \sim 9 \text{ mmol/L}$, 检测下限为 $3.8 \mu\text{mol/L}$, 此外还发现该 Co-MOF 具有很高的类过氧化氢酶活性, 可

催化 H_2O_2 产生自由基,使底物对苯二酸氧化并产生颜色变化。Wang等^[54]合成了一种Cu-MOFs,以它作为电化学生物传感媒介,选用酪氨酸酶为模型酶用于灵敏快速测定双酚A,Cu-MOFs的高比面积有利于酶及双酚A的吸附,进而提高传感器的响应灵敏度,所研制的传感器响应时间为11s,线性范围0.05~3 $\mu\text{mol/L}$,检测下限为13nmol/L。

除最常用的电流响应模式外,其它类型的电化学生物传感器与MOFs的结合也有不少文献报道。Zhan等^[55]在导电玻璃上以电化学方法制备ZnO纳米棒,以此为锌源与二甲基咪唑进行水热法合成反应制备ZIF-8层,获ZnO@ZIF-8膜,并构成光电流传感器,利用ZIF-8的孔径筛选作用,提高传感器的选择性,如 H_2O_2 可以透过ZIF-8的孔洞与ZnO接触,而抗坏血酸(AA)则不能进入ZIF-8的孔中,因此ZnO@ZIF-8膜的光电流随 H_2O_2 浓度增加而增加,而随抗坏血酸浓度增加而下降,其检测原理如图7所示。Xu等^[56]将MOFs与电化学发光(ECL)相结合以含吡啶的配体和 Zn^{2+} 合成了具有氧化还原活性的MOFs,它的结构不受电荷的影响具有电化学稳定性,在与共反应剂进行电子传递过程中产生强的ECL信号,显示了MOFs的选择性渗透、电荷选择性、催化选择性等优点,并应用于血液样品中可卡因的测定。

由于大多数MOFs材料本身的导电性较低,因此MOFs作为功能材料在电学传感器中的应用报道较少。Campbell等^[57]设计合成了 $\text{Cu}_3(\text{HITP})_2$,它是一种导电性较强的2D MOFs,其电

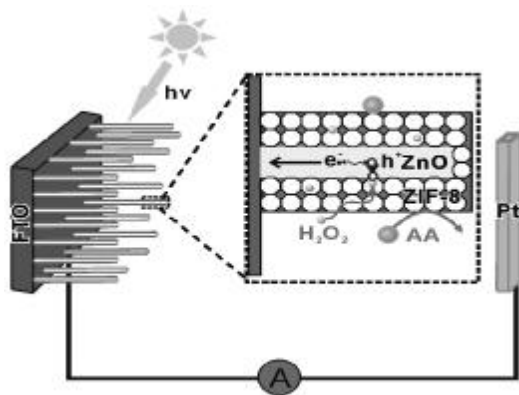


图7 ZnO@ZIF-8光电流传感器原理示意图^[55]

Fig.7 Schematic illustration of the proposed ZnO@ZIF-8 based photoelectrochemical sensor^[55]

导率达到0.2S/cm,将 $\text{Cu}_3(\text{HITP})_2$ 分散液滴涂在两测量电极之间,即可构建成化学电阻型传感器,它与氨气接触时电导率明显增加,该阻抗响应可逆,对氨的检测灵敏度达到 $1 \times 10^{-4} \%$ 水平,通过与相同结构的 $\text{Ni}_3(\text{HITP})_2$ 比较, $\text{Cu}_3(\text{HITP})_2$ 中Cu上的位点对氨的响应起关键作用。Gassensmith等^[58]报道了一种基于MOFs电化学阻抗变化的 CO_2 传感器,其原理是利用所合成MOFs中自由伯羟基与气相中的 CO_2 反应生成烷基碳酸酯,在MOFs内的化学吸附过程将伴随形成C-O键的动力学过程,当在孔穴中充填醇作为反应介质时,所得MOFs具有很高的质子电导率,键合 CO_2 使其离子电导率降低550倍,该现象可用于定量测定 CO_2 浓度。Davydovskaya等^[59]研究了基于Cu-BTC MOF为敏感材料的功函数型气体传感器用于乙醛测定,并讨论了气体分子与敏感层之间的可能反应机理。

Allendorf等^[60]用微悬臂传感器监测了由吸附引起柔性MOFs结构变化所产生的应力变化,他们试验了HKUST-1吸附乙醇和 CO_2 有较敏感的应力响应,而吸附 N_2 和 O_2 的应力变化很小,有望开发基于化学应力的气体传感器。Robinson等^[61]以自动的层层组装方法将MOF(Cu-BTC)沉积在石英表面声波传感器表面,所研制的传感器对水气有高灵敏度响应,检测范围为0.00003%~1.5%(V/V),性能优于目前许多商用湿度传感器,Cu-BTC层直接共价键合在氧化硅表面,它可加热到 100°C 以上不分解,有利于解吸膜孔中的水,并讨论了膜厚度对响应灵敏度的影响。Chen等^[62]以ZIF-67膜替代传统的半导体氧化物(SnO_2 , ZnO , In_2O_3 , NiO)膜制备阻抗型甲醛气敏传感器,可使工作温度从使用无机氧化物的 $200\sim 400^\circ\text{C}$ 降至 150°C ,而ZIF-67的高比表面积有利于提高响应灵敏度,在所用条件下,该传感器对甲醛的响应灵敏度最高,检测下限为0.0005%,不过该传感器对甲醇和丙酮也有响应,而对氨和甲烷的响应灵敏度很低。

Venkatasubramanian等^[63]分析了MOFs在微悬臂传感器中的响应机理,在 SiO_2 、 Al_2O_3 和 Si_3N_4 的表面键合MOFs膜,研究了MOFs的杨氏模量、泊松比、密度等参数对传感器响应的影响,结果表明,提高杨氏模量与泊松比能够提高传感器的

响应信号,而 MOFs 的密度对传感器的响应几乎无影响。Yim 等^[64]利用 ZnO 纳米棒作为金属离子源,在硅质微悬臂梁上合成纳米多孔 ZIF-8 膜层,该膜可用于检测甲醇、乙醇、1-丙醇蒸气,当醇类蒸气在 ZIF-8 层进行吸附-解析时,同时测定共振频率的变化与臂梁的偏向。能够引起该框架结构变化的醇蒸气浓度排序是 1-丙醇>乙醇>甲醇。这种趋势是由于不同的醇需要不同浓度去诱导 ZIF-8 框架结构的“开-关”效应。依赖于醇蒸气分子量的吸附与解析动力学曲线可以用来从混合醇蒸气中分离目标醇。Deep 等^[65]以胺基功能化氧化铜为基底制备纳米结构的 Cd-MOFs,并用于杀虫剂的免疫传感分析,所建立的对硫磷电化学阻抗传感器的响应范围为 0.1~20 ng/mL,对其他有机磷化合物有良好的选择性。

3 石英晶体微天平表征 MOFs 的吸附特性

石英晶体微天平 (quartz crystal microbalance, QCM) 作为一种高灵敏度的质量型传感器,在电化学、溶液化学、生物传感器等领域中有关界面传质过程的监测方面获得广泛的应用。QCM 的技术优势之一是无需进行标记处理,信号连续直观。MOFs 发达的孔穴结构使它们具有很强的吸附能力,吸附质量则可用 QCM 实时传感检测。气体在多孔材料中吸附特性的表征最常用的方法是使用吸附仪直接测定吸附前后的质量变化,但该方法设备投资和运行成本通常很高,另外需要较大的样品用量(通常 >100 mg)。QCM 在测定表面质量变化方面具有一定的技术优势,如灵敏度高,能检测纳克级的质量变化,响应速度快,能实现实时动态传感监测,而且测定的是质量变化,无需进行标记处理。以 QCM 研究材料的吸附特性,仅需数微克的样品即可,而且热传导和传质速率快,这样可以避免使用大取样吸附方法时传热与传质不均的问题。因此,近年来利用 QCM 研究 MOFs 吸附特性的文献报道逐渐增多。

Biemmi 等^[66]报道了利用自组装单层膜法在功能化的 QCM 表面上沉积上一层 HKUST-1 膜,研究不同厚度的 MOFs 膜对水蒸气的吸附行为。Ameloot 等^[67]利用电化学法在 QCM 表面上沉积 $\text{Cu}_3(\text{btc})_2$ 膜,并监测该膜吸附水蒸气的过程,结果表明,该膜对水蒸气的吸附为可逆吸附,吸附容

量可达 25%~30%膜质量。小分子与 MOFs 之间的扩散常数可以用 MOFs 修饰的 QCM 来测量。Zybaylo 等^[68]利用液相外延法在 QCM 金电极上沉积了高度有序的 Cu-BTC 薄膜,通过测量吡啶吸附的动力学曲线,测得在室温下吡啶的扩散系数为 $1.5 \times 10^{-19} \text{ m}^2/\text{s}$,吡啶与 Cu-BTC 中 Cu(II)位点的相应的结合能是 18 kcal/mol,与通过量子化学计算得出的结论一致。

Huang 等^[69]研究了 MIL-101 MOFs 膜在大气压条件下对 VOCs 的吸附特性,测定了相关的吸附热力学参数,结果表明 MIL-101 比活性炭具有更高的吸附容量与吸附平衡常数。Khoshaman 等^[70]将 MOFs 用电喷雾涂覆在 QCM 上,在干燥的空气中检测丙酮、四氢呋喃、异丙醇,并与传统的滴涂法相比较,结果表明,电喷雾方法能够提高 QCM 谐振的稳定性,对丙酮、四氢呋喃、异丙醇三种挥发性有机气体的最小检测浓度分别是 0.005%, 0.001% 和 0.0002%。Venkatasubramanian 等^[71]以 QCM 测定了 CO_2 , CH_4 和 N_2 在两种小孔径 MOFs (Cu-hfipbb 和 ZIF-90) 上的吸附特性,其吸附强度顺序为 $\text{CO}_2 > \text{CH}_4 > \text{N}_2$,它们在两种 MOFs 上的吸附等温线存在差异,与其分子大小与孔径有关。Liu 等^[72]利用 QCM 监测了表面附着金属有机框架层的生长过程,在 Au 基底上先修饰一层胺基,然后利用液相外延的方法生长多层有序 $[\text{Cu}(\text{ndc})-(\text{dabco})_0.5]$,由于胺基的作用,使薄膜分子层由非活性变为了能够键合异硫氰酸荧光素的活性分子层。Béard 等^[73]采用分步沉积法在金电极表面沉积疏水的 $[\text{Zn}_4\text{O}(\text{dmcapz})_3]_n$ 膜,以 QCM 监测该 MOFs 膜对烷基醇、苯、苯胺、二甲苯等小分子的吸附过程,并通过在配体连接臂中引入烷基侧链的方法调控其吸附选择性。

Brutschy 等^[74]用电喷雾把不同孔径的有机笼状化合物沉积到 QCM 上,研究了对芳香族溶剂的超亲作用。Liu 等采用层层组装液相外延生长法制备了手性 MOFs 薄膜,研究了 (2R,5R)-2,5-己二醇与 (2S,5S)-2,5-己二醇的对映选择性吸附^[75],他们还在 QCM 表面定向生长 [100] 和 [001] 向外的 $[\text{Cu}_2(\text{ndc})_2(\text{dabco})]$ MOF 膜,比较了几种 VOCs 在不同晶面上的吸附差异,与 MOFs 晶体不同方向晶面中孔径大小差异相吻合^[76]。Shekhah 等^[77]研究了在 OH⁻功能化 Au 表面上的

液相外延生长定向 ZIF-8 薄膜过程以及在饱和蒸气压条件下对五种烷基醇的吸附与解吸的动力学过程。Tsotsalas 等^[78]研究了分子在 MOFs 纳米孔穴中的脱附过程,揭示了吸附剂的化学性质对脱附动力学有明显的影响,提出分子与 MOFs 框架间的强相互作用将导致客体分子聚集形成一种临时性的亚稳态,从而引起脱附速率下降。Wannapaiboon 等^[79]在金基底上利用逐步液相外延沉积法合成出 $[Zn_4O(L)_3]_n$ 自组装单层膜,整个沉积和结晶过程利用 QCM 和 X-射线衍射监测,监测过程发现不同的结晶机理。通过 QCM 监测其吸附不同结构的有机溶剂分子,研究了 MOFs 孔径对吸附的影响。Davydovskaya 等^[80]在室温下联合 QCM 与开尔文探针以 Cu-BTC 膜检测甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇,两种方法都可以达到对 1×10^{-4} %水平醇类物质的检测,实验研究了醇链长度、几何结构以及它们的极性对吸附的影响,结果表明,在干燥环境下,醇类吸附在不饱和的 Cu 位点上,短链醇更易吸附在 Cu-BTC 上,然在潮湿环境中,醇类溶解在 Cu-BTC 膜表面的水层中,长链醇更易吸附。Hou 等^[81]以 QCM 监测了一种新的多孔 Cu-MOF 吸附小分子的动力学过程,该 MOF 对极性溶剂如甲醇、乙醇、丙酮等吸附量较大,对非极性分子如苯、甲苯、乙苯、氯苯的吸附则较小,结合分子构型讨论了小分子的吸附差异。

为克服腐蚀性组分对 QCM 电极腐蚀所造成的对传感器寿命以及吸附量测定可靠性的不利影响,Kang 等^[82]采用一种气隔电极式 QCM 监测了 I_2 蒸气在 ZIF-8 上的吸附与转移动力学过程,在所设计的吸附实验装置中,QCM 的激励电极置于吸附池之外不与 I_2 分子接触,利用两个并联组合的 QCM 传感器同时监测了 ZIF-8 膜和石英表面吸附碘的过程,也试验了 QCM 与吸光度测定的联用以提供吸附无分子结构方面的信息。同时,还设计了两个串联组合的 QCM 传感器用于监测碘在两个 ZIF-8 膜之间的转移。

4 结论

MOFs 由金属离子(簇)与有机配体桥联自组装而成,通过设计各种配体以及与多种金属离子组合,可以合成出成千上万种性质各异的新材

料,MOFs 家族在不断发展壮大之中。MOFs 材料的高比表面积以及可以调控的多孔结构尺寸与化学环境,为改进化学传感器的响应性能提供了新的机遇,特别是功能化的 MOFs 与生物传感相结合,在手性分析、化学成像、生物分析方面的研究与探索已备受关注。MOFs 材料的性质是影响传感器响应特性的关键性因素之一,虽然已报道的 MOFs 传感器很多,但很多研究仍然停留在材料合成、结构与性质表征,在实际应用中仍面临诸多挑战,如检测灵敏度、选择性等指标有待进一步提高等。因此,新材料的开发与有效利用、与生物识别与信号放大技术相结合将是 MOFs 传感器研究的主要方向。

参考文献

- [1] Zhou H C, Long J R, Yaghi O M. Introduction to metal-organic frameworks [J]. Chem. Rev., 2012, 112: 673-674.
- [2] Stock N, Biswas S. synthesis of metal-organic frameworks (MOFs): routes to various of topologies, morphologies, and composites [J]. Chem. Rev., 2012, 112: 933-969.
- [3] Jeong Y L, Omar K F, Roberts J, et al. Metal-organic framework materials as catalysts [J]. Chem. Soc. Rev., 2009, 38: 1450-1459.
- [4] Li J R, Sculley J, Zhou H C. Metal-organic frameworks for separations [J]. Chem. Rev., 2012, 112: 869-932.
- [5] De C J B, Peterson G W. Metal-organic frameworks for air purification of toxic chemicals [J]. Chem. Rev., 2014, 114: 5695-5727.
- [6] Gu Z Y, Yang C X, Chang N A, et al. Metal-organic frameworks for analytical chemistry: From sample collection to chromatographic separation [J]. Accounts Chem. Res., 2012, 45: 734-745.
- [7] Kreno L E, Leong K, Farha O K, et al. Metal-organic framework materials as chemical sensors [J]. Chem. Rev., 2012, 112: 1105-1125.
- [8] Lei J P, Qian R C, Pinghua Ling, et al. Design and sensing applications of metal-organic framework composites [J]. Trends. Anal. Chem., 2014, 58:71-78.
- [9] Meyer L V, Schöfeld F, Müller-Buschbaum K. Lanthanide based tuning of luminescence in MOFs and dense frameworks - from mono- and multimetal systems to sensors and films [J]. Chem. Commun., 2014, 50: 8093-8108.
- [10] Pramanik S, Zheng C, Zhang X, et al. New microporous metal-organic framework demonstrating unique selectivi-

- ty for detection of high explosives and aromatic compounds[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011,133:4153-4155.
- [11] Campagnol N, Souza E R, De Vos D E, et al. Luminescent terbium-containing metal-organic framework films: new approaches for the electrochemical synthesis and application as detectors for explosives [J]. *Chem. Commun.*, 2014, 83: 12545-12547.
- [12] Gole B, Arun K B, Mukherjee P S. Modification of extended open frameworks with fluorescent tags for sensing explosives: competition between size selectivity and electron deficiency [J]. *Chem. Eur. J.*, 2014, 20:2276-2291.
- [13] Nagarkar S S, Desai A V, Ghosh S K. A fluorescent metal-organic framework for highly selective detection of nitro explosives in the aqueous phase [J]. *Chem. Commun.*, 2014, 50: 8915-8918.
- [14] Lu G, Hupp J T. Metal-organic frameworks as sensors: A ZIF-8 based fabry-perot device as a selective sensor for chemical vapors and gases [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132: 7832-7833.
- [15] Li Y, Zhang S, Song D. A luminescent metal-organic framework as a turn-on sensor for DMF vapor [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52:710-713.
- [16] Shustova N B, Cozzolino A F, Reineke S, et al. Selective turn-on ammonia sensing enabled by high-temperature fluorescence in metal-organic frameworks with open metal sites [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135: 13326-13329.
- [17] Zhang M, Feng G, Song Z, et al. Two-dimensional metal-organic framework with wide channels and responsive turn-on fluorescence for the chemical sensing of volatile organic compounds [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136: 7241-7244.
- [18] Wan X Y, Song H J, Zhao D, et al. A Y-doped metal-organic framework-based cataluminescence gas sensor for isobutanol [J]. *Sens. Actuators B*, 2014, 201: 413-419.
- [19] Liu X G, Wang H, Chen B, et al. A luminescent metal-organic framework constructed using a tetraphenylethene-based ligand for sensing volatile organic compounds [J]. *Chem. Commun.*, 2015, 51:1677-1680.
- [20] Douvali A, Tsipis A C, Eliseeva S V, et al. Turn-on luminescence sensing and real-time detection of traces of water in organic solvents by a flexible metal-organic framework [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, 54:1651-1656.
- [21] Ohira S I, Miki Y, Toru Matsuzaki T, et al. A fiber optic sensor with a metal organic framework as a sensing material for trace levels of water in industrial gases [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2015, 886: 188-193.
- [22] Wanderley M M, Wang C, Wu C D, et al. A chiral porous metal-organic framework for highly sensitive and enantioselective fluorescence sensing of amino alcohols [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134: 9050-9053.
- [23] Qin L, Zheng M X, Guo Z J, et al. One non-interpenetrated chiral porous multifunctional metal-organic framework and its applications for sensing small solvent molecules and adsorption [J]. *Chem. Commun.*, 2015, 51:2447-2449.
- [24] Kreno L E, Hupp J T. Metal-organic framework thin film for enhanced localized surface plasmon resonance gas sensing [J]. *Anal. Chem.*, 2010, 82:8042-8046.
- [25] Hu Y, Liao J, Wang D, et al. Fabrication of gold nanoparticle-embedded metal-organic framework for highly sensitive surface-enhanced Raman scattering detection[J]. *Anal. Chem.*, 2014, 86:3955-3963.
- [26] Xiao Y Q, Cui Y J, Zheng Q, et al. A microporous luminescent metal-organic framework for highly selective and sensitive sensing of Cu^{2+} in aqueous solution [J]. *Chem. Commun.*, 2010, 46:5503-5505.
- [27] He J, Zha M, Cui J, et al. Convenient detection of Pd(II) by a metal-organic framework with sulfur and olefin functions[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135:7807-7810.
- [28] Yang C X, Ren H B, Yan X P. Fluorescent metal-organic framework MIL-53(Al) for highly selective and sensitive detection of Fe^{3+} in aqueous solution [J]. *Anal. Chem.*, 2013, 85: 7441-7446.
- [29] Zhao D, Wan X Y, Song H J. Metal-organic frameworks (MOFs) combined with ZnO quantum dots as a fluorescent sensing platform for phosphate [J]. *Sens. Actuators B*, 2014, 197: 50-57.
- [30] Lin X M, Gao G M, Zheng L Y, et al. Encapsulation of strongly fluorescent carbon quantum dots in metal-organic frameworks for enhancing chemical sensing [J]. *Anal. Chem.*, 2014, 86: 1223-1228.
- [31] Hao L Y, Song H J, Su Y Y, et al. A cubic luminescent graphene oxide functionalized Zn-based metal-organic framework composite for fast and highly selective detection of Cu^{2+} ions in aqueous solution [J]. *Analyst*, 2014, 139: 764-770.
- [32] Carboni M, Lin Z K, Abney C W, et al. A metal-organic framework containing unusual eight-connected zirconium-oxo secondary building units and orthogonal carboxylic acids for ultra-sensitive metal detection [J]. *Chem. Eur. J.*,

- 2014, 20: 14965-14970.
- [33] Song Y H, Hu D Q, Liu F F, et al. Fabrication of fluorescent SiO_2 @zeolitic-imidazolate framework-8 nanosensor for Cu^{2+} detection [J]. *Analyst*, 2015, 140: 623-629.
- [34] Fang J M, Leng F, Zhao X J, et al. Metal-organic framework MIL-101 as a low background signal platform for label-free DNA detection [J]. *Analyst*, 2014, 139: 801-806.
- [35] Yang N, Song H J, Wan X Y, et al. A metal(Co)-organic framework-based chemiluminescence system for selective detection of L-cysteine [J]. *Analyst*, 2015, 140: 2656-2663.
- [36] Liu Y L, Fu W L, Li C M, et al. Gold nanoparticles immobilized on metal-organic frameworks with enhanced catalytic performance for DNA detection [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2015, 861: 55-61.
- [37] Zhu Q, Chen Y, Wang W, et al. A sensitive biosensor for dopamine determination based on the unique catalytic chemiluminescence of metal-organic framework HKUST-1 [J]. *Sens. Actuators B*, 2015, 210: 500-507.
- [38] Xiong Y H, Chen S H, Ye F G, et al. Synthesis of a mixed valence state Ce-MOF as an oxidase mimetic for the colorimetric detection of biothiols A [J]. *Chem. Commun.*, 2015, 51: 4635-4638.
- [39] Tian J, Liu Q, Shi J, et al. Rapid, sensitive, and selective fluorescent DNA detection using iron-based metal-organic framework nanorods: Synergies of the metal center and organic linker [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2015, 71: 1-6.
- [40] Liu D, Lu K, Poon C, et al. Metal-organic frameworks as sensory materials and imaging agents [J]. *Inorg. Chem.*, 2014, 53:1916-1924.
- [41] Ma Y, Su H, Kuang X, et al. Heterogeneous nano metal-organic framework fluorescence probe for highly selective and sensitive detection of hydrogen sulfide in living cells [J]. *Anal. Chem.*, 2014, 86: 11459-11463.
- [42] Hou C T, Xu Q, Yin L, et al. Metal-organic framework templated synthesis of Co_3O_4 nanoparticles for direct glucose and H_2O_2 detection [J]. *Analyst*, 2012, 137: 5803-5808.
- [43] Hosseini H, Ahmar H, Dehghani A, et al. A novel electrochemical sensor based on metal-organic framework for electro-catalytic oxidation of L-cysteine [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2013, 42: 426-429.
- [44] Ma W J, Jiang Q, Yu P, et al. Zeolitic-imidazolate framework based electrochemical biosensor for in vivo electrochemical measurements [J]. *Anal. Chem.*, 2013, 85: 7550-7557.
- [45] Wang Y, Wu Y C, Xie J, et al. Metal-organic framework modified carbon paste electrode for lead sensor [J]. *Sens. Actuators B*, 2013, 177: 1161-1166.
- [46] Wang Y, Wu Y C, Xie J, et al. Multi-walled carbon nanotubes and metal-organic framework nanocomposites as novel hybrid electrode materials for the determination of nano-molar levels of lead in a lab-on-valve format [J]. *Analyst*, 2013, 138:5113-5120.
- [47] Wang Y, Ge H L, Wu Y C, et al. Construction of an electrochemical sensor based on amino-functionalized metal-organic frameworks for differential pulse anodic stripping voltammetric determination of lead [J]. *Talanta*, 2014, 129: 100-105.
- [48] Zhang Y F, Nsabimana A, Zhu L D, et al. Metal-organic frameworks/macroporous carbon composites with enhanced stability properties and good electrocatalytic ability for ascorbic acid and hemoglobin [J]. *Talanta*, 2014, 129:55-62.
- [49] Ling P, Lei J, Ju H. Porphyrinic metal-organic framework as electrochemical probe for DNA sensing via triple-helix molecular switch [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2015, 71: 373-379.
- [50] Guo Z Z, Florea A, Cristea C, et al. 1,3,5-Trinitrotoluene detection by a molecularly imprinted polymer sensor based on electropolymerization of a microporous-metal-organic framework [J]. *Sens. Actuators B*, 2015, 207: 960-966.
- [51] Florea A, Guo Z Z, Cristea C, et al. Anticancer drug detection using a highly sensitive molecularly imprinted electrochemical sensor based on an electropolymerized microporous metal organic framework [J]. *Talanta*, 2015, 138: 71-76.
- [52] Xu Z D, Yang L Z, Xu C L. Pt@UiO-66 heterostructures for highly selective detection of hydrogen peroxide with an extended linear range [J]. *Anal. Chem.*, 2015, 87: 3438-3444.
- [53] Yang L Z, Xu C L, Ye W C, et al. An electrochemical sensor for H_2O_2 based on a new Co-metal-organic framework modified electrode [J]. *Sens. Actuators B*, 2015, 215:489-496.
- [54] Wang X, Lu X, Wu L, et al. 3D metal-organic framework as highly efficient biosensing platform for ultrasensitive and rapid detection of bisphenol A [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2014, 65:295-301.

- [55] Zhan W W, Kuang Q, Zhou J Z, et al. Semiconductor@metal-organic framework core-shell heterostructures: a case of ZnO@ZIF-8 nanorods with selective photoelectrochemical response [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135:1926-1933.
- [56] Xu Y, Yin X B, He X W, et al. Electrochemistry and electrochemiluminescence from a redox-active metal-organic framework [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2015, 68:197-203.
- [57] Campbell M G, Sheberla D, Liu S F, et al. Cu₃(hexaiminotriphenylene)₂: an electrically conductive 2D metal-organic framework for chemiresistive sensing [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, 54: 4349-4352.
- [58] Gassensmith J J, Kim J Y, Holcroft J M, et al. A metal-organic framework-based material for electrochemical sensing of carbon dioxide [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136:8277-8282.
- [59] Davydovskaya P, Pohle R, Tawil A, et al. Work function based gas sensing with Cu-BTC metal-organic framework for selective aldehyde detection [J]. *Sens. Actuators B*, 2013, 187:142-146.
- [60] Allendorf M D, Houk R J T, Andruszkiewicz L, et al. Stress-induced chemical detection using flexible metal-organic frameworks [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130: 14404-14405.
- [61] Robinson A L, Stavila V, Zeitler T R, et al. Ultrasensitive humidity detection using metal-organic framework-coated microsensors [J]. *Anal. Chem.*, 2012, 21:7043-7051.
- [62] Chen E X, Yang H, Zhang J. Zeolitic imidazolate framework as formaldehyde gas sensor [J]. *Inorg. Chem.*, 2014, 53: 5411-5413.
- [63] Venkatasubramanian A, Lee J H, Stavila V, et al. MOF@MEMS: design optimization for high sensitivity chemical detection [J]. *Sens. Actuators B*, 2012, 168: 256-262.
- [64] Yim C Y, Lee M, Kim W, et al. Adsorption and desorption characteristics of alcohol vapors on a nanoporous ZIF-8 film investigated using silicon microcantilevers [J]. *Chem. Commun.*, 2015, 51: 6168-6171.
- [65] Deep A, Bhardwaj S K, Paul A K, et al. Surface assembly of nano-metal organic framework on amine functionalized indiumtin oxide substrate for impedimetric sensing of parathion [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2015, 65: 226-231.
- [66] Biemmi E, Darga A, Stock N, et al. Direct growth of Cu₃(BTC)₂(H₂O)₃-xH₂O thin films on modified QCM-gold electrodes—Water sorption isotherms [J]. *Micro. Mesop. Mater.*, 2008, 114: 380-386.
- [67] Ameloot R, Stappers L, Franssaer J, et al. Patterned growth of metal-organic framework coatings by electrochemical synthesis [J]. *Chem. Mater.*, 2009, 21 :2580-2582.
- [68] Zybaylo O, Shekhah O, Wang H, et al. A novel method to measure diffusion coefficients in porous metal-organic frameworks [J]. *Chem. Chem. Phys.*, 2010, 12: 8093-8098.
- [69] Huang C Y, Song M, Gu Z Y, et al. Probing the adsorption characteristic of metal-organic framework MIL-101 for volatile organic compounds by quartz crystal microbalance [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2011, 45: 4490-4496.
- [70] Khoshaman A H, Bahreyni B. Application of metal-organic framework crystals for sensing of volatile organic gases [J]. *Sens. Actuators B*, 2012, 162: 114-119.
- [71] Venkatasubramanian A, Navaei M, Bagnall K R, et al. Gas adsorption characteristics of metal-organic frameworks via quartz crystal microbalance techniques [J]. *J. Phys. Chem. C*, 2012, 116: 15313-15321.
- [72] Liu B, Ma M Y, Zacher D, et al. Chemistry of SURMOFs: layer-selective installation of functional groups and post-synthetic covalent modification probed by fluorescence microscopy [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133: 1734-1737.
- [73] Bétard A, Wannapaiboon S, Fischer R A. Assessing the adsorption selectivity of linker functionalized, moisture-stable metal-organic framework thin films by means of an environment-controlled quartz crystal microbalance [J]. *Chem. Commun.*, 2012, 48:10493-10495.
- [74] Brutschy M, Schneider M W, Mastalerz M, et al. Porous organic cage compounds as highly potent affinity materials for sensing by quartz crystal microbalances [J]. *Adv. Mater.*, 2012, 24: 6049-6052.
- [75] Liu B, Shekhah O, Arslan H K, et al. Enantiopure metal-organic framework thin films: oriented SURMOF growth and enantioselective adsorption[J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51: 807-810.
- [76] Liu B, Tu M, Fischer R A. Metal-Organic framework thin films: crystallite orientation dependent adsorption [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52:3486-3489.
- [77] Shekhah O, Eddaoudi M. The liquid phase epitaxy method for the construction of oriented ZIF-8 thin films with controlled growth on functionalized surfaces [J]. *Chem. Commun.*, 2013, 49: 10079-10081.
- [78] Tsotsalas M, Hejcik P, Sumida K, et al. Impact of molec-

- ular clustering inside nanopores on desorption processes [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135: 4608-4611.
- [79] Wannapaiboon S, Tu M, Fischer R A. Liquid phase heteroepitaxial growth of moisture-tolerant MOF-5 isotype thin films and assessment of the sorption properties by quartz crystal microbalance [J]. *Adv. Funct. Mater.*, 2014, 24: 2696-2705.
- [80] Davydovskaya P, Ranft A, Lotsch B V, et al. Analyte detection with Cu-BTC metal-organic framework thin films by means of mass-sensitive and work-function-based readout[J]. *Anal. Chem.*, 2014, 86: 6948-6958.
- [81] Hou C, Bai Y L, Bao X, et al. A metal-organic framework constructed using a flexible tripodal ligand and tetranuclear copper cluster for sensing small molecules [J]. *Dalton Trans.*, 2015, 44: 7770-7773.
- [82] Kang Q, Zhu X L, Ma X L, et al. Response of an electrodeless quartz crystal microbalance in gaseous phase and monitoring adsorption of iodine vapor on zeolitic-imidazolate framework-8 film [J]. *Sens. Actuators B*, 2015, 220 : 472-480.

《化学传感器》编辑部声明

凡向本刊所投稿件,视为作者将该论文的复制权、发行权、信息网络传播权、翻译权、汇编权等权利转让给本刊。本刊已加入中国学术期刊网络出版总库、万方数据数字化期刊群,被中国期刊全文数据库、中国核心期刊(遴选)数据库收录。凡被本刊录用的稿件将同时通过因特网进行网络出版或提供信息服务。稿件一经刊用,付给作者的稿酬包括印刷版、光盘版和网络版等各种使用方式著作权使用费。

基于明胶-碳纳米管构建癌胚抗原免疫传感器的研究

朱宇萍*, 冯晓清

(内江师范学院化学化工学院, 四川内江 641112)

摘要: 利用纳米金与明胶-碳纳米管 (MWCNTs) 复合物固载癌胚抗体制得较高灵敏度的电流型癌胚抗原 (CEA) 免疫传感器。首先将制得的明胶-碳纳米管复合物修饰在金电极表面成膜, 再利用明胶中丰富的氨基吸附纳米金, 并通过静电吸附作用吸附癌胚抗体(anti-CEA)。实验过程中采用循环伏安法对电极的修饰过程及响应性能进行表征。结果表明, 制得的免疫传感器对癌胚抗原有良好的电流响应, 其线性范围为 0.1-80.0 ng/mL, 检出下限为 0.03 ng/mL。

关键词: 免疫传感器; 癌胚抗原; 纳米金; 碳纳米管; 明胶

Study on construction of An immunosensor for carcinoembryonic based on carbon nanotube-gelatin composite

Zhu Yu-ping*, Feng Xiao-qing

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Neijiang Normal University, Neijiang 641112, China)

Abstract: A highly sensitive amperometric immunosensor for the determination of carcinoembryonic antigen (CEA) was constructed with the comprised of gelatin, multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs). At first, place the prepared gelatin-carbon nanotube composites on the gold electrode surface. Then, absorb the nano-Au by the numerous amino of gelatin and anti-CEA by electrostatic adsorption on its surface successively. In the experiment, the preparing process of the immunosensor was characterized by the cyclic voltammetry. The results show that the immunosensor present highly sensitivity, with a linear range of 0.1-80.0 ng/mL and a detection limit of 0.03 ng/mL.

Key words: immunosensor; CEA; nano-Au; MWCNTs; gelatin

0 前言

免疫传感器是生物传感器诸多分类中的一类, 它利用抗体与抗原之间的免疫应答机理, 将其中之一修饰到换能器内(或表面), 能够对复杂体系中相应的免疫组分进行检测。由于它具有选择性好、灵敏度高、分析速度快、成本低以及容易在线活体检测等优点, 在临床医学、环境工业、食品加工及生产产业等方面都有着重要应用^[1]。目前, 对人体血清中癌胚抗原的检测大部分以临床实验为主。传统免疫方法有放射免疫法、酶联免疫法、荧光免疫分析法, 但这些分析方法存在一

些弊端, 如操作复杂、耗时, 仪器设备精密度要求高, 有潜在危险或材料昂贵^[2]。与上述检测癌胚抗原的传统方法相比较, 电化学免疫分析方法具有操作简便, 选择性强, 成本较低且省时, 还可直接检测等优点^[1]。近年来, 免疫传感器的研究已十分普遍, 其构建方式被研究者们广泛关注。

纳米材料由于具有优异的化学和物理性能, 如较高的比表面积, 较高的表面自由能、吸附浓缩效应。这些优良的性能有利于提高敏感分子的吸附能力和生化反应的速率, 因此被广泛运用于生物传感器^[3]。

纳米金颗粒(nano-Au)具有比表面积大、表面

基金项目: 四川省教育厅科研项目(15ZA0292)

* 通信联系人, Tel: 13696067037, E-mail: judy20060830@163.com

反应活性高、表面活性中心多、催化效率高、吸附能力强等性能。良好的生物相容性和稳定性,可用于固载和标记生物蛋白质^[4]。此外,蛋白质分子带正电荷可以通过静电吸附作用结合带负电荷纳米金,并能够保持蛋白质的生物活性^[5],因而可利用纳米金吸附癌胚抗体(anti-CEA),制得灵敏度较高的免疫传感器。

碳纳米管(MWCNTs)是一种可用于修饰电化学传感器的优良纳米材料。这是由于其比表面积大,易于向修饰电极中引入多种官能团,使MWCNTs应用于修饰电极中能够降低电极的氧化过电势、增加氧化峰的电流值、改善电化学传感器的性能、提高选择性和灵敏度等^[6]。

明胶(Gelation)是肽分子聚合物,分子量一般在几万到几十万,既具有酸性又具有碱性,是一种两性物质。其分子在结构上有大量的羟基、羧基和氨基,这就使得明胶具有极强的亲水性,且明胶不溶于有机溶剂和冷水,具有较好的成膜能力^[7]。

结合 Gelation 和 MWCNTs 的优点,将明胶溶于温水中,作为 MWCNTs 的分散介质。碳纳米管能够很好的被明胶包裹,并均匀的分散在整个基体中^[8]。明胶还能够使纳米材料表面氨基(-NH₂)功能化,以便联结其它成分^[7]。制备明胶-碳纳米管复合物(Gelation-MWCNTs)并将其修饰在金电极表面。碳纳米管可有效增大比表面积,明胶含有大量-NH₂且具有较好的成膜能力,形成的明胶-碳纳米管复合物能够大量的吸附纳米金,能固载更多的癌胚抗体。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器:CHI660C 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)、BRANSONIC200 超声清洗仪(德国)、AB204--S 电子天平(瑞士 Mettler-toledo 公司)、MP230 酸度计(瑞士 Mettler-toledo 公司)、金电极($\Phi=4$ mm)、铂电极、饱和甘汞电极、恒温水浴锅、所有玻璃仪器均用铬酸洗液浸泡,再超声洗涤并晾干。

试剂:癌胚抗原定量检测试剂(博赛生物有限公司)、明胶、碳纳米管、氯金酸、柠檬酸三钠、固体

K₃Fe(CN)₆、K₄Fe(CN)₆、KCl、NaH₂PO₄、Na₂HPO₄·12H₂O、无水乙醇等。实验用水均为去离子水。

1.2 免疫传感器的制备

1.2.1 Gelation-MWCNTs 复合物的制备

称取 0.05 g Gelation 固体颗粒加入 2 mL 去离子水,在 50 °C 水浴中加热并振荡,使明胶溶解。趁热加入约 5 mg MWCNTs 充分混合,超声 0.5 h 后即制得 Gelation-MWCNTs 复合物^[9]。

1.2.2 nano-Au 颗粒的制备

在 100 mL 去离子水中加入 1 mL 1% (w) HAuCl₄ 溶液,煮沸,再迅速加入 4 mL 1% (w) 柠檬酸钠(Na₃C₆H₅O₇)溶液,继续煮沸 15 min,冷却至室温,即得 nano-Au 颗粒,该颗粒粒径为 16 nm^[10]。取 3 mL 制得的纳米金溶液离心沉降 5 min 后,用滴管吸走上层清液,既得浓缩 nano-Au,保存在 4 °C 冰箱中备用。

1.2.3 修饰电极的制备

依次用 0.3 μ m、0.5 μ m 的 Al₂O₃ 糊将金电极($\Phi=4$ mm)抛光成镜面,用去离子水冲洗除去表面的抛光粉,依次用去离子水、无水乙醇、去离子水超声清洗 5 min,室温下晾干备用。

将所制得的 Gelation-MWCNTs 复合物用微量取量计取出 10 μ L 滴涂于预处理好的电极表面,待其电极表面成膜后,再取 20 μ L 浓缩 nano-Au 溶胶滴涂在上述修饰电极表面,自然晾干。将修饰好的电极置于癌胚抗体(anti-CEA)溶液中,在 4 °C 下放置 16 h。最后将修饰好的电极浸泡在 0.25% (w) 的牛血清白蛋白(BSA)溶液中约 30 min,使电极上的非特异性吸附位点封闭,即制得癌胚抗原免疫传感器。将其置于 4 °C 冰箱中,备用。图 1 为免疫传感器制备过程示意图。

1.3 检测方法

实验对电极的制备过程采用三电极体系以循环伏安法(Cyclic voltammograms)进行表征。饱和甘汞电极为参比电极,铂电极为对电极,被修饰的金电极为工作电极,电极表征在 5 mmol/L K₃Fe(CN)₆ + K₄Fe(CN)₆ + 0.1 mol/L KCl + 0.1 mol/L PBS(pH=7.4)溶液中进行,循环伏安法电位区间为 -0.2~0.6 V,扫描速率为 50 mV/s,实验温度若未做说明均为 25 °C。

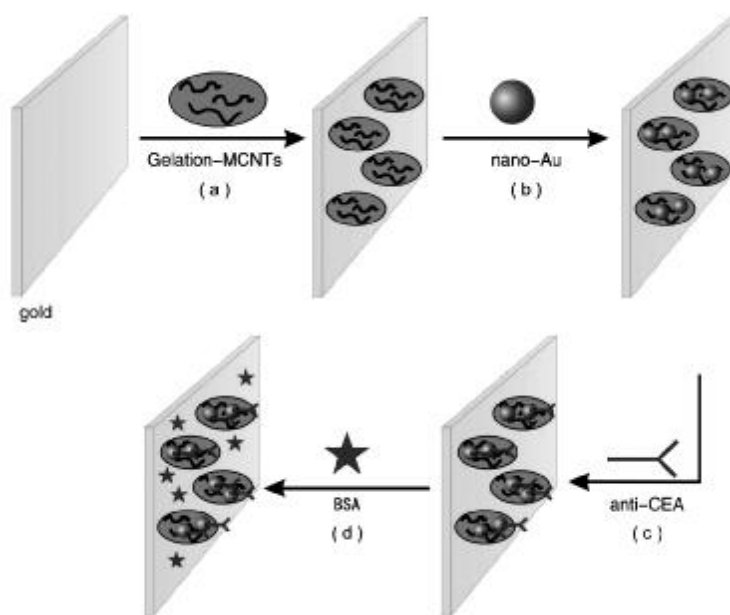


图 1 免疫传感器的制备过程示意图

Fig.1 Schematic diagram of the stepwise immunosensor construction process

2 结果与讨论

2.1 电极在修饰过程的电化学表征

对电极修饰过程中不同阶段的电化学特性用 CV 进行表征,结果见图 2。曲线 a 是裸金电极在铁氰化钾溶液中的 CV 表征图。从图中可见,曲线 a 出现一对准可逆的氧化还原峰,这是由于测试底液中含有 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 氧化还原电对;将

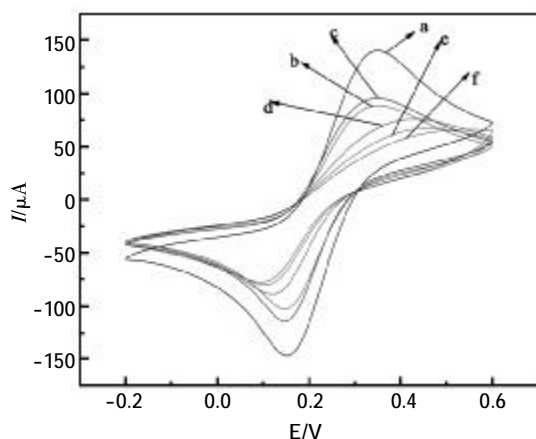


图 2 电极修饰过程的循环伏安表征

(a)裸 Au 电极; (b)Au/MWCNTs-Gelatin; (c) Au/MWCNTs-Gelatin/nano-Au; (d)Au/MWCNTs-Gelatin/nano-Au/anti-CEA; (e)Au/MWCNTs-Gelatin/nano-Au/anti-CEA/BSA; (f)孵育 20 ng/mL CEA

Fig.2 Cyclic voltammograms of different electrodes

Gelatin-MWCNTs 复合物滴涂于金电极表面后,由于复合物中 Gelatin 在一定程度上阻碍了电子传递,导致氧化峰电流有所降低^[9](图 2b);通过明胶表面上的 $-\text{NH}_2$ 将 nano-Au 吸附到修饰电极上,由于 nano-Au 有利于电子在电极与测试底液中传输,从而使氧化峰电流升高^[10](图 2c);由于 nano-Au 与 anti-CEA 之间存在着静电吸附作用,故可利用 nano-Au 使 anti-CEA 固定在电极表面。因蛋白质大分子在一定程度上阻碍了电子的传输,氧化峰的电流值减小^[11](图 2d);再利用 BSA 封闭电极表面的非特异性吸附位点,氧化峰电流继续降低(图 2e);最后将修饰好的免疫传感器在 20 ng/mL 的 CEA 抗原中孵育一定时间,当溶液中 CEA 和电极表面的 anti-CEA 特异性结合后,生成的抗原-抗体复合物使修饰电极表面的电子传输通道部分堵塞,因而其响应电流进一步下降^[11](曲线 f)。

2.2 实验条件的优化

2.2.1 扫描速度的优化

将修饰电极置于 pH 为 7.4 的 5 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 + \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 + 0.1 \text{ mol/L KCl}$ 的测试底液中,分别于 50、100、150、200、300、400、500、600 mV/s 的扫描速度下进行扫描,见图 3。还原峰电流值与扫描速度的平方根两者之间成反比例关系,即扫

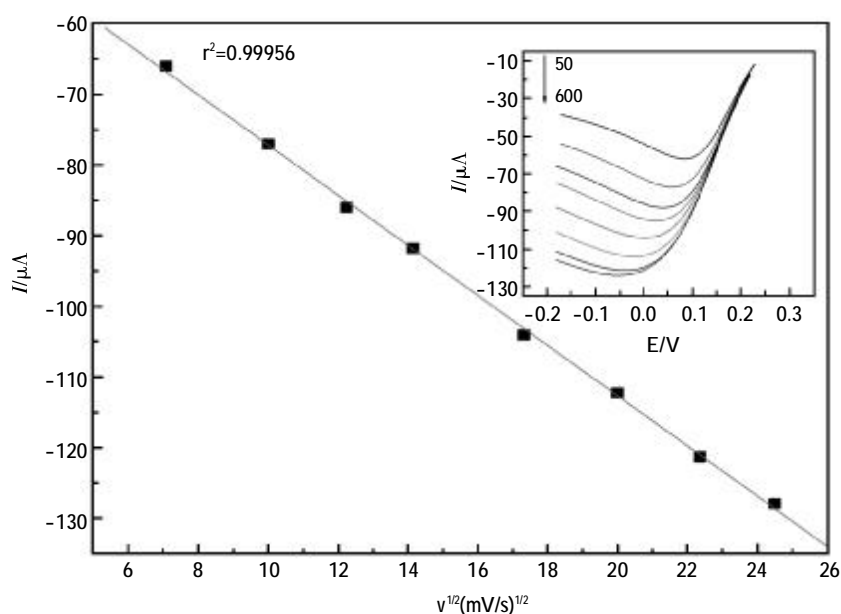


图3 修饰电极峰电流与扫速的关系曲线,插图为不同扫速下的循环伏安图

Fig.3 plot of peak current vs scan rate;

Inset: Cyclic voltammograms of the immunoelectrode at different rate

描速度越大,其还原峰电流值越小,反之则越大。这就表明电极上的氧化还原反应要受扩散过程的影响^[11]。

2.2.2 缓冲溶液 pH 的优化

测试底液的 pH 对抗原抗体的活性和亲和力均有影响。pH 过低会使抗原-抗体缔合物解离;而 pH 接近蛋白质的等电点时,会引起蛋白质的自凝现象,造成假阳性结果。因此,维持测试底液适当的 pH 是抗原与抗体的结合的必要条件之一^[12]。实验选择测试底液 pH 值分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.4、8.0 下用 CV 法表征其对应的峰电流值(见图 4)。当 pH 在 4.0~7.4 的范围时,pH 越大,还原峰的峰电流值越大。当 pH 大于 7.4 后,若继续增加 pH 值,还原峰电流值又会降低。因此实验选择测试底液 pH 为 7.4。

2.2.3 抗原孵育温度的优化

温度对抗原抗体的免疫反应具有重要的影响。温度低时,免疫蛋白活性较低,免疫反应速度缓慢,时间较长;温度较高时,免疫蛋白活性增加,免疫反应速度较快,时间较短;但当温度过高时,免疫蛋白会失活,故控制适当的温度对免疫反应有重要的影响^[9]。图 5 为免疫传感器分别在 15、20、25、30、35、37、40、45 °C 温度下孵育 20 ng/mL 抗原的还原峰电流值与温度的关系。由图

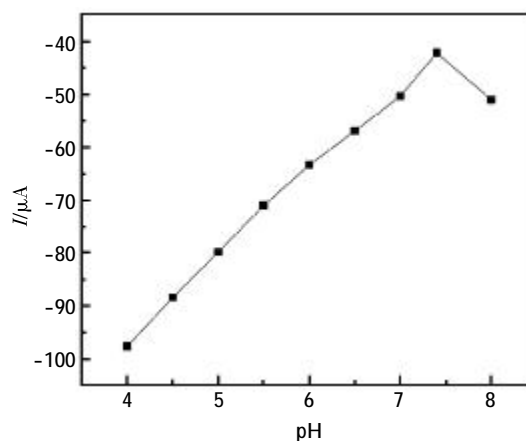


图4 pH 值对免疫传感器的影响

Fig.4 The effect of pH on the response of immunosensor

可见孵育温度为 30 °C 时还原峰电流值最小,此时癌胚抗体对抗原结合的较快且较稳定,响应曲线较好,因此该免疫传感器最佳孵育温度为 30 °C。但在实际应用中由于考虑到免疫传感器的保存问题,长期置于 30 °C 的工作环境下,蛋白质大分子易失活,故实际操作中一般选择 25 °C 为工作温度。

2.2.4 抗原孵育时间的优化

抗原孵育的时间直接影响抗原与抗体结合的程度^[11]。对同一支修饰电极在 20 ng/mL 的 CEA 中分别孵育 3、5、8、10、12、15、20、25 min,然后进

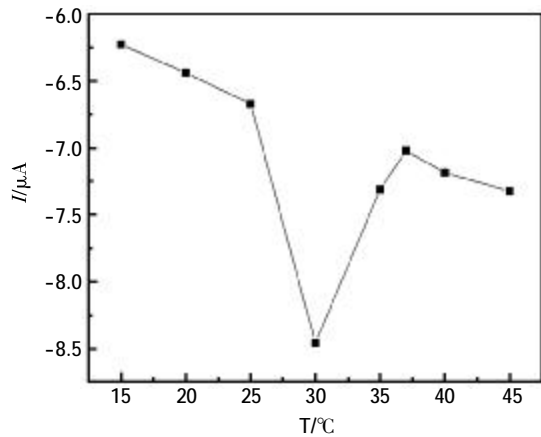


图5 不同孵育温度下免疫电极的响应峰电流值
Fig.5 The effect of incubation temperature on the response of the immunosensor

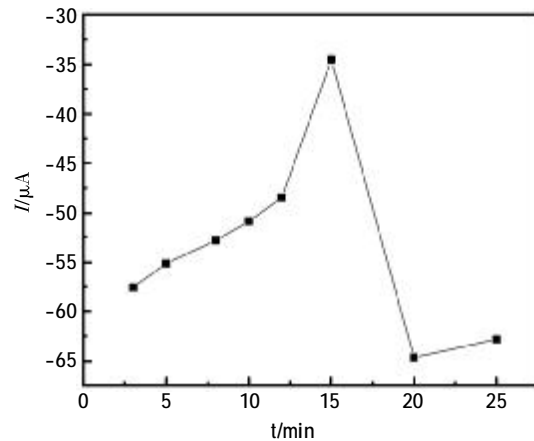


图6 峰电流值与孵育时间的关系
Fig.6 The effect of incubation time on the response of the immunosensor

行 CV 表征。还原峰电流与孵育时间的关系见图 6。由图可知,当孵育时间为 15 min 时,还原峰具有最大峰电流值,即抗原与抗体反应最充分,电极上结合的抗原量达到饱和,因此实验的最佳孵育时间为 15 min。

2.3 免疫传感器的响应特性

2.3.1 免疫传感器对 CEA 抗原的响应曲线

在最优化的条件下,将免疫电极依次孵育浓

度为 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 ng/mL 的 CEA 抗原溶液,并用 CV 表征,测得其还原峰电流与浓度的关系。图 7 为该免疫传感器还原峰电流值与抗原浓度的对数值呈线性关系。线性关系式为 $I = -89.87194 + 8.62307 \lg c$; 相关系数 $r^2 = 0.99963$; 检出范围为 0.1~80.0 ng/mL; 检出限为 0.03 ng/mL。在一定浓度范围内,浓度越高,抗体与抗原结合的越多,则电极表面的电子传输通

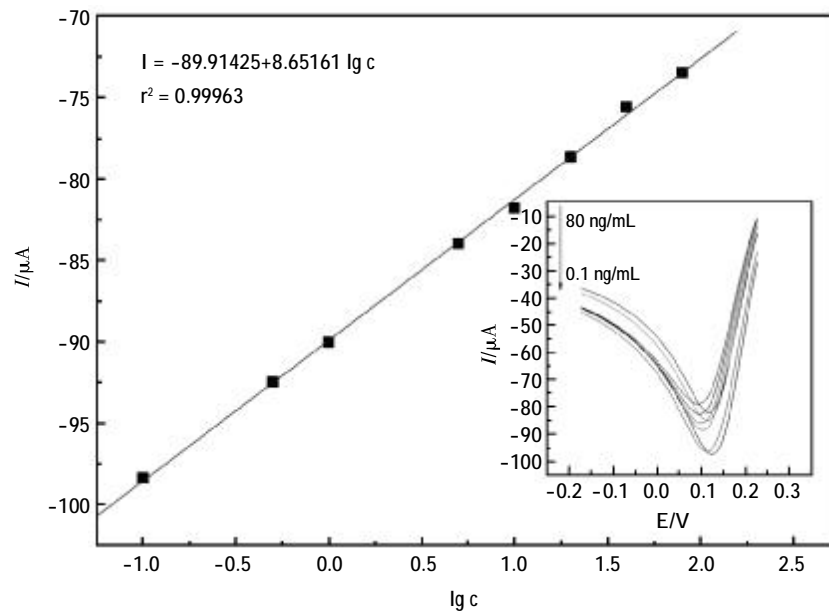


图7 峰电流响应值与浓度的关系曲线(插图免疫传感器在不同浓度 CEA 下的循环伏安图)

Fig.7 Linear relationship between the peak current and Cyclic voltammograms of the immunoelectrode in different concentration of CEA

Insert: Cyclic voltammograms of the immunoelectrode in different concentration of CEA

道阻塞的越多,则还原峰峰电流值增加^[11]见图 7 插图。

2.3.2 免疫传感器的选择性

模拟人体环境存在的 L-谷氨酸($C_5H_9NO_4$)、甘氨酸($C_2H_5NO_2$)、牛血清蛋白等干扰物质与 CEA 抗原的混合溶液,将制备好的同一免疫传感器先后置于只含 20 ng/mL CEA 抗原标准溶液和含 20 ng/mL CEA 抗原以及干扰物质的混合溶液中依次孵育 15 min,分别进行 CV 表征见图 8。曲线 a 表示有干扰物质存在时的响应曲线,b 表示无干扰物质存在时的响应曲线,两者并无明显差别,故该免疫传感器具有良好的选择性。

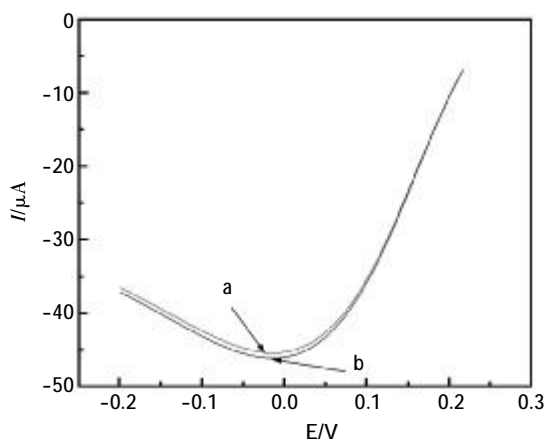


图 8 干扰物质对免疫电极响应曲线的影响
a: 20 ng/mL CEA 抗原+干扰物质;b: 20 ng/mL CEA 抗原
Fig.8 Effects of interfering substances on the response curve of the Immunosensor

3 结论

实验首先制得 Gelation-MWCNTs 复合物,通过 Gelation 表面的 $-NH_2$ 结合 nano-Au,再利用 nano-Au 静电吸附 anti-CEA 成功制备了癌胚免疫传感器。该传感器具有灵敏度高、制作简单、响应时间快、选择性强、检测下限低,成本低等特点。此外,实验中采用的原料明胶价廉易得且无

污染,取代了一般用于电化学免疫传感器中较贵的原料。在实验中,以 CEA 作为免疫物质模型,实现了对 CEA 的定量检测。同时该方法也可应用于其他免疫物质的测定,在临床诊断方面有着潜在的应用价值。

参考文献

- [1] 张海锋, 张小水, 王丽娟, 等. 生物传感器的研究现状、应用及前景[J]. 计测技术, 2006, 26: 92-96.
- [2] Tobi M, O'Kieffe D, Trujillo N, et al. Steinberg WM. Detection of carcinoembryonic antigen in colonic effluent by specific anti-CEA monoclonal antibodies [J]. Cancer Lett., 1992, 67(5):47-54.
- [3] 缪煌清, 刘仲明, 官建国. 纳米技术在生物传感器中的应用[J]. 传感器技术, 2002, 21(7): 61-64.
- [4] 刘艳, 王卫芬. 纳米金在电化学免疫传感器中的应用[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2010, 7(3):460-462.
- [5] 王潇蕤, 周敬良, 张艳丽, 等. 基于纳米金增强吸附伏安分析的电化学免疫传感技术用于蛋白分子检测[J]. 化学传感器, 2009, 29 (2): 18-24.
- [6] 李玲, 王海燕, 孙东艳. 基于碳纳米管的脂质体电化学发光免疫传感器检测人体免疫球蛋白 G[J]. 分析化学研究简报, 2010, 38(9):1329-1332.
- [7] 郭玮. 浅谈明胶[J]. 中国科技词语, 2012, 4(2):40- 45.
- [8] 巩方玲, 黄明智. 明胶表面活性的研究[J]. 明胶科学与技术, 2000, 20(3):314-315.
- [9] 易斌, 陈小华, 陈传盛. 新型明胶基碳纳米管骨架活性炭的制备[J]. 湖南大学学报(自然科学版), 2010, 3: 57-61.
- [10] 朱宇萍, 袁若, 柴雅琴, 等. 基于碳纳米管/L-半胱氨酸/ $Fe_3O_4@Au$ 纳米复合材料的电流型甲胎蛋白免疫传感器的研究[J]. 分析化学, 2012, 40(3): 359-364.
- [11] 朱宇萍, 袁若, 柴雅琴, 等. 基于纳米金与牛血清蛋白-二氧化钛复合物固定甲胎蛋白免疫传感器的研究[J]. 内江师范学院学报, 2011, 26(4): 45- 46.
- [12] 闵丽根, 袁若, 柴雅琴, 等. 基于纳米金与碳纳米管-纳米铂-壳聚糖纳米复合物固定癌胚抗原免疫传感器的研究[J]. 化学学报, 2008, 66(14): 1676-1680.

铂掺杂 L-缬氨酸聚合膜对普萘洛尔的识别研究

陈 翠, 李 洋, 傅英姿*
(西南大学化学化工学院, 重庆 400715)

摘 要: 该文将氯铂酸与 L-缬氨酸按一定比例混合, 通过循环伏安法在玻碳电极表面电沉积形成铂掺杂 L-缬氨酸聚合膜, “一步”构建一个简单的手性传感平台, 以普萘洛尔自身为氧化还原探针, 采用差分脉冲伏安法研究了该手性传感平台与普萘洛尔对映异构体之间的相互作用。结果表明: 该传感平台与普萘洛尔产生相互作用, 并与 R-普萘洛尔作用更强, 能成功用于普萘洛尔的电化学识别。

关键词: 手性表面; 普萘洛尔; 电化学; 手性识别

Chiral recognition of propranolol based on Pt doped L-valine polymer

Chen Cui, Li Yang, Fu Ying-zi*
(School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: In this work, chloroplatinic acid and L-valine (L-val) were mixed by a certain percentage, and then the L-val platinum-doped polymeric films were synthesized on the glassy carbon electrode (GCE) surface with “one-step” strategy, building a simple chiral sensing nanoplatform, and used to electrochemical identify of propranolol enantiomers (R- or S-PRO) successfully. Differential pulse voltammetry (DPV) technique was used to study the effect between this chiral interface and propranolol enantiomers, which propranolol was treated as redox probes. In addition, the recognition was considerably affected by the interface. The results showed that this chiral interface has a stronger interact with R-PRO, and it was efficacious to achieve the selective recognition of propranolol enantiomers.

Key words: chiral interface; propranolol; electrochemical; chiral recognition

0 引言

普萘洛尔(propranolol, PRO), 是一种 β -肾上腺素受体拮抗剂, 在临床上常常用于心绞痛、心律失常、高血压以及甲状腺功能亢进等症的治疗, 但是严重心功能不全、窦性心动过缓, 或者重度房室传导阻滞和支气管哮喘等患者禁止使用。它的两种对映异构体药效差别很大, S-PRO 的活性比 R-PRO 高 100 倍^[1], 因此单独服用 S-PRO 比服用 R-PRO 或者普萘洛尔的外消旋体的治疗效果更好。目前, 已经有许多方法对普萘洛尔对映体进行检测和识别, 包括液相色谱技术^[2]、毛

细管电泳技术^[3]、拉曼散射^[4]和室温磷光^[5]等方法, 但这些技术的成本高, 操作复杂, 对测试样品的要求也比较高, 因此发展一个简单、灵敏的手性识别 PRO 对映体的方法仍然十分重要。

氨基酸具有氨基和羧基, 能通过电聚合的方式修饰在电极表面上, 使得聚合物的表面高度有序并且具有手性, 其特有的 α -螺旋结构能与手性物质的对映异构体之间产生不同的作用, 从而达到识别目的。聚合氨基酸表面稳定且易于控制, 这种手性表面用于手性氨基酸和药物的分离已见报道^[6-9]。纳米铂是继纳米金、纳米银之后发展起来的一种金属纳米材料, 具有较高的电子密

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21272288)资助

* 通信联系人, E-mail: fyzc@swu.edu.cn

度、较好的介电特性和良好的催化作用,能提高表面的电子传输速率、增强检测信号。将氯铂酸与 L-缬氨酸按一定比例混合,在特定的电势范围内,在玻碳电极表面沉积得到铂掺杂 L-缬氨酸聚合膜修饰玻碳电极(Pt-PLV/GCE)。

实验将氯铂酸与 L-缬氨酸按一定比例混合,采用“一步法”通过循环伏安法在玻碳电极表面电沉积形成铂掺杂 L-缬氨酸聚合膜,构建了一个简单的手性感应平台,用于对普萘洛尔的电化学识别。以普萘洛尔自身为氧化还原探针,采用差分脉冲伏安法研究该手性表面与普萘洛尔对映异构体之间的作用,并比较了不同界面对识别普萘洛尔的影响。该传感平台构建简单、成本低、灵敏度高、耗时少,有望在以后传感器的设计中得到更多的应用。

1 实验部分

1.1 实验试剂和材料

R-(S)-普萘洛尔盐酸盐(R-(S)-PRO, >98%)购于 Sigma 公司(St.louis, MO, 美国), L-缬氨酸(L-Val, >98%)购自梯希爱化成工业发展有限公司(上海, 中国), 氯铂酸六水合物(铂含量 37.5%)购于阿拉丁试剂公司(上海, 中国), 硝酸(HNO_3 , 69.2%)、硝酸钾购自化学试剂公司(重庆, 中国)。含有 0.1 mol/L 氯化钾的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(PBS, pH7.0)作为实验支持溶液, 不同浓度、不同 pH 值的 S-PRO 和 R-PRO 由对应 pH 的 PBS 配制。其它化学试剂均为分析纯, 无需二次处理即可直接

使用, 所有实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 仪器

循环伏安法(CV)测试以及差分脉冲伏安法(DPV)均在 CHI 440A 电化学工作站(上海辰华, 中国)上进行, 标准的三电极体系由铂丝电极作为对电极, 裸玻碳电极或者修饰的玻碳电极作为工作电极, 饱和甘汞电极(SCE)作为参比电极组成。所有实验均在室温下进行(25.0 ± 0.5) °C。

1.3 玻碳电极的预处理

玻碳电极($\Phi = 4.00$ mm)连续用 1.0, 0.3 和 0.05 μm 的 Al_2O_3 抛光粉抛光后用二次蒸馏水冲洗干净, 接着分别在二次蒸馏水、乙醇、二次蒸馏水中按先后顺序超声清洗 5 min, 完全冲洗干净之后, 将玻碳电极浸入 1 mol/L 的硫酸中循环伏安扫描 15 圈(电位范围为 $-0.275 \sim 1.675$ V, 扫速为 0.1 V/s)进行活化, 拿出后洗净晾干, 备用。

1.4 手性表面的构建

用经预处理好的玻碳电极作为工作电极, 甘汞电极(SCE)作为参比电极, 铂丝电极作为对电极, 组成三电极体系, 在新鲜配制的聚合液(含有 2.5×10^{-3} mol/L 氯铂酸、 1.25×10^{-3} mol/L L-缬氨酸、0.135 mol/L 硝酸和 0.35 mol/L 硝酸钾)中静置 10 s, 在 $-0.9 \sim 2.2$ V 的电位范围进行循环伏安扫描 8 圈(扫速为 0.18 V/s), 一步共聚制得铂掺杂 L-缬氨酸手性聚合膜修饰的玻碳电极(记为 Pt-PLV/GCE), 修饰电极制成后取出用二次蒸馏水冲洗干净, 室温下晾干备用。图 1 给出了手性纳米复合表面的逐步构建过程。

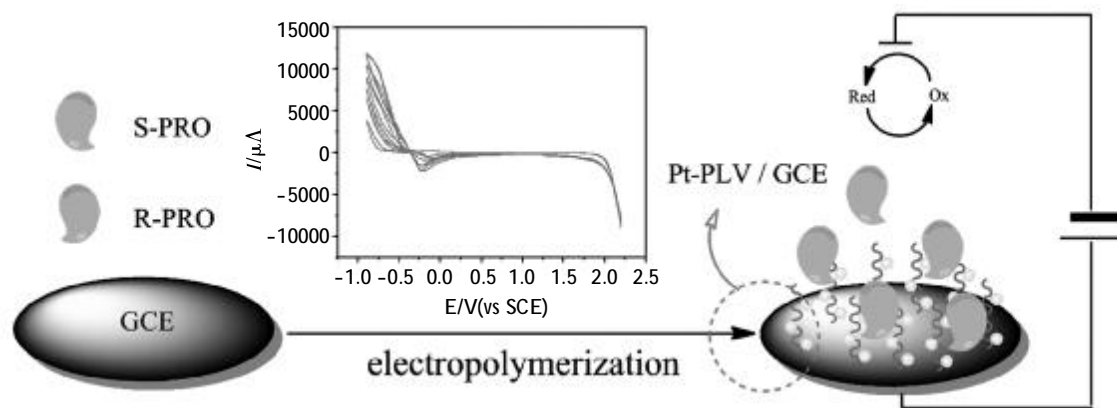


图 1 手性表面的构建

Fig.1 The fabrication of chiral interface

1.5 电化学测试

手性表面的电化学特性测试在 5.0×10^{-3} mol/L 的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ (含有 0.1 mol/L 氯化钾, pH = 7.0 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液作为支持电解质) 中进行。循环伏安测试中, 除特别说明, 扫速均为 0.1 V/s, 扫描范围为 -0.2 ~ 0.6 V。差分脉冲伏安测试(DPV)中扫描范围为 0.7 ~ 1.5 V, 脉冲周期设定为 0.5 s, 所有试验均在室温下进行。

2 结果与讨论

2.1 手性表面的电化学特性

图 2 为玻碳电极电聚合过程的循环伏安曲线, 在 0.25 V 附近出现一个峰值, 并随着聚合的进行越来越明显。不同修饰表面在 5.0×10^{-3} mol/L 的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ (pH=7.0) 中的电化学行为如图 3 所

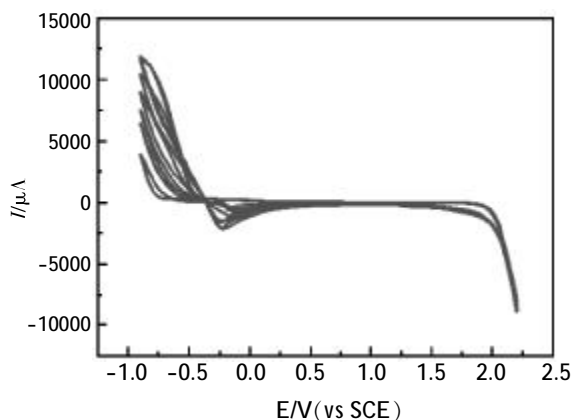


图 2 手性表面的电聚合过程

Fig.2 The polymerization process of chiral interface

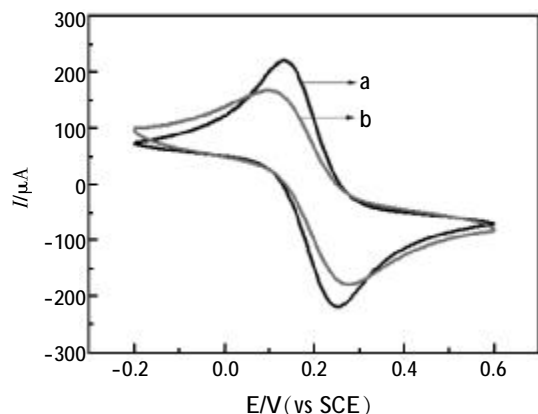


图 3 不同电极表面在 5.0×10^{-3} mol/L 的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ (pH = 7.0) 中的循环伏安图:

a. 裸玻碳电极, b. Pt-PLV/GCE

Fig.3 Cyclic voltammograms of the different electrodes in 5.0 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ (pH = 7.0): a. GCE, b. Pt-PLV/GCE

示。 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 在裸玻碳电极表面呈现一对标准的氧化还原峰(曲线 a), 峰电流为 $221.2 \mu\text{A}$, 而铂掺杂 L-缬氨酸手性聚合膜修饰到玻碳电极表面之后, 峰电流降低了大概 $55 \mu\text{A}$ (RSD = 0.95%, 曲线 b)。

2.2 铂掺杂 L-缬氨酸手性聚合膜与 PRO 对映异构体的选择性作用

采用差分脉冲伏安技术探讨了铂掺杂 L-缬氨酸手性聚合膜与 PRO 对映异构体在 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中的选择性作用。如图 4 所示, S-PRO 和 R-PRO 均在 1.1 V 左右出现了一个明显的峰, 这是由普萘洛尔对映异构体在铂掺杂 L-缬氨酸手性聚合膜修饰玻碳电极表面自身的氧化还原得到的。与 S-PRO 和 R-PRO 作用的峰电流

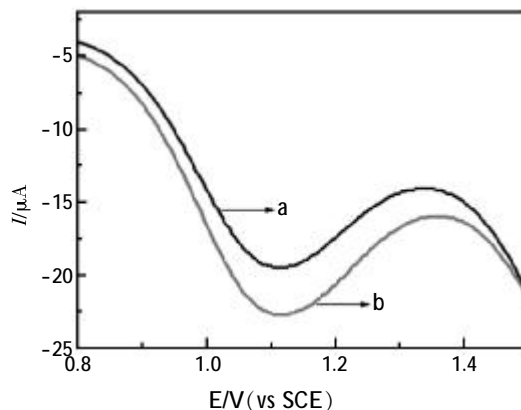


图 4 Pt-PLV/GCE 在含有 5×10^{-3} mol/L PRO 的 0.1 mol/L PBS 中的差分脉冲伏安图: a. S-PRO, b. R-PRO
Fig.4 DPVs of Pt-PLV/GCE in 0.1 mol/L PBS containing 5 mmol/L S-PRO (a) and R-PRO (b)

分别为 $-19.5 \mu\text{A}$ (曲线 a) 和 $-22.7 \mu\text{A}$ (曲线 b), PRO 对映体之间的电流差 (ΔI) 为 $3.2 \mu\text{A}$ 。表明 PRO 对映异构体均与铂掺杂 L-缬氨酸手性聚合膜发生作用, 其中与 R-PRO 作用的电流响应信号更强, 即 Pt-PLV/GCE 手性表面对 PRO 对映异构体有选择性识别作用。

2.3 聚合圈数对实验的影响

研究了电聚合圈数对铂掺杂 L-缬氨酸手性聚合膜性质的影响。图 5 给出了聚合圈数与循环伏安电流响应的关系, 随着聚合圈数的增加电流信号响应逐渐减小, 在 8 圈之后电流信号趋于稳定, 这是因为聚 L-缬氨酸在玻碳电极表面会阻碍电子的传输, 因此电流逐渐减小, 而 8 圈时铂掺杂 L-缬氨酸聚合膜的含量达到饱和。因此, 实验

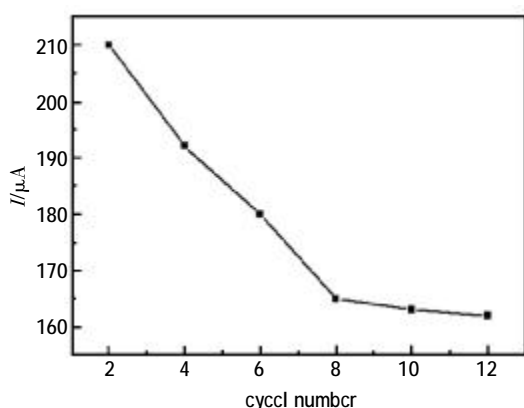


图 5 聚合圈数的优化图

Fig.5 Optimization image of polymerization circle number

选择铂掺杂 L-缬氨酸的聚合圈数为 8 圈。

3 结论

实验在玻碳电极表面构建了铂掺杂 L-缬氨酸手性聚合膜,用于与普萘洛尔对映异构体作用。纳米铂的加入放大了信号,L-缬氨酸作为手性选择剂,Pt-PLV/GCE 与 S-PRO 和 R-PRO 的相互作用呈现不同的电流响应,可以对普萘洛尔对映异构体进行手性识别。该手性表面的构建简单、耗时少,为以后手性氨基酸的聚合研究提供一定理论支持。

参考文献

[1] Chen L S, Li K L, Zhu H, et al. A chiral electrochemical sensor for propranolol based on multi-walled carbon nanotubes/ionic liquids nanocomposite [J]. *Talanta*, 2013,

105: 250-254.

- [2] Aboul-enein H Y, Abou-basha L I, Bakr S A. Direct enantioselective separation of some propranolol analogs by HPLC on normal and reversed cellulose chiral stationary phases [J]. *Chirality*, 1996, 8: 153-156.
- [3] Mart'nez-Pla J J, Mart'in-Biosca Y, Sagrado S, et al. Fast enantiomeric separation of propranolol by affinity capillary electrophoresis using human serum albumin as chiral selector: application to quality control of pharmaceuticals [J]. *Anal Chim. Acta.*, 2004, 507: 171-178.
- [4] Bodoki E, Oltean M, Bodoki A, et al. Chiral recognition and quantification of propranolol enantiomers by surface enhanced Raman scattering through supramolecular interaction with 3-cyclodextrin [J]. *Talanta*, 2012, 101: 53-58.
- [5] Wei Y L, Kang H, Ren Y F, et al. A simple method for the determination of enantiomeric composition of propranolol enantiomers [J]. *Analyst*, 2013, 138: 107-110.
- [6] Lee N H, Frank C W. Separation of chiral molecules using polypeptide modified poly (vinylidene fluoride)membranes [J]. *Polymer*, 2002, 43: 6255-6266.
- [7] Higashi N, Koga T, Fujii Y, et al. Specific binding of α -Amino acid onto poly (L-glutamic acid)monolayers: effects of helicity and lateral helix distribution [J]. *Langmuir*, 2001, 13: 4061-4066.
- [8] Ulbricht M. Advanced functional polymer membranes [J]. *Polymer*, 2006, 47: 2217-2262.
- [9] Fireman-Shoresh S, Turyan I, Mandler D, et al. Chiral electrochemical recognition by very thin molecularly imprinted sol gel films [J]. *Langmuir*, 2005, 21: 7842-7847.

盐卤水中的氨(铵)含量的电位法快速测定

陈敬平¹, 代 鹵¹, 徐卫华², 宫 维², 张为之², 王赧胤^{1*}

(1. 扬州大学化学化工学院, 江苏扬州 225002)

(2. 中国石油化工股份有限公司江苏石油勘探局采输卤管理处, 江苏扬州 225009)

摘 要: 采用氨电极, 构建了一种对江苏油田采输卤处精制卤水生产中氨(铵)含量的快速分析方法。研究了盐卤水环境下各个因素对测定结果的影响, 包括温度、pH 值、干扰离子、有机胺、响应时间和测定精密度。实验结果表明, 氨电极法对卤水中氨(铵)的测定简便、快速, 检测灵敏度高, 精确度好。

关键词: 卤水; 氨电极; 氨; 铵

Rapid potentiometric determination of ammonia (ammonium) in brine based on ammonia electrode

Chen Jing-ping¹, Dai Xin¹, Xu Wei-hua², Gong Wei², Zhang Wei-zhi², Wang Cheng-yin^{1*}

(1. College of chemistry and chemical Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225002, China)

(2. Bureau of brine extraction and transportation, Jiangsu oilfield branch company, Sinopec, Yangzhou 225009, China)

Abstract: An ammonia electrode was used to construct a kind of rapid analysis method for Determination of ammonia/ammonium content in brine in order to control the quality of purified brine. Some effects on the testing in brine by using the electrode were investigated, including testing temperature, time, pH value, interfering matters, organic amines, and precision. The experimental results revealed the proposed analysis method had simple and rapid, sensitive, precise and accurate advantages.

Key words: brine; ammonia electrode; ammonia; ammonium

0 引言

为了确保氯碱工业生产中的安全, 需要对卤水进行精制, 其中包括去除其中的氨(铵)^[1-2]。通常方法是加入次氯酸钠溶液进行氧化^[3-4], 然后通过用亚硫酸钠除去过量的次氯酸钠。在除氨(铵)的过程中, 需要检测卤水中氨(铵)的量, 以判断除氨(铵)的效果。目前, 常见的氨含量测定方法主要有纳氏试剂分光光度法^[5]、水杨酸分光光度法^[6]、蒸馏中和滴定法^[7]、离子色谱法^[8]、酶法^[9]、荧光法^[10]等。纳氏试剂分光光度法和水杨酸分光光度法在用于卤水中氨的检测时, 加入显色剂后会产生沉淀使溶液浑浊, 如果使用分光光度法测定卤水中的氨, 需要对卤水进行蒸馏处

理, 使操作步骤变得繁琐; 蒸馏中和滴定法需要蒸馏, 耗时长, 测定的数据稳定性不好; 卤水中含有大量的氯离子, 会对离子色谱分析产生干扰; 酶法和荧光法及其它方法大多数操作繁琐, 耗时长, 难以实现快速检测。氨电极法^[11-13]一般不需对样品进行过多的前处理, 具有线性范围宽、操作简便的优点, 且不受悬浮物、浊度及色度的影响, 是目前比较快速、灵敏的测定方法。但能否够用于高浓度卤水中氨的检测, 未见报道。该实验研究, 采用氨电极, 构建了一种对江苏油田采输卤处精制生产卤水中氨(铵)含量的快速分析方法。调查了盐卤水环境下各个因素对测定结果的影响, 包括温度、pH 值、有机胺和响应时间等。实验结果表明, 氨电极法对卤水中氨(铵)的测定简

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21375116)

* 通信联系人, E-mail: wangcy@yzu.edu.cn, 电话: 0514-87975590-9217

便、快速,检测灵敏度高,精确度好。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

EL-104 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司,上海),PHS-25 型酸度计(江苏江分电分析仪器有限公司,泰州),85-1 型磁力搅拌器(南京科尔仪器设备有限公司,南京),501 型氨电极(江苏江分电分析仪器有限公司,泰州),数控恒温水浴锅(上海实验仪器厂,上海)。

氯化铵,氯化钠,氢氧化钠,浓硫酸,次氯酸钠,硝酸钠(均为购置于国药集团化学试剂有限公司,A.R.);亚硝酸钠(上海试剂三厂,A.R.),乙胺(上海试剂三厂,C.P.);卤水及精制卤水(江苏石油勘探局采输卤管理处淮安站提供,浓度 297 g/L)。

1.2 氨电极的准备

按照生产厂家使用说明组装氨电极,并与电位显示装置连结。首先检测氨电极透气膜是否安装妥当:向 50 mL 去离子水中加入一滴饱和氢氧化钠溶液,若氨电极的读数高于 -50 mV,说明透气膜安装良好。然后将电极清洗至空白电位:盛有去离子水约 50 mL 的烧杯放在磁力搅拌器盘上,将电极浸没在去离子水中(前端透气膜与去离子水间不能有气泡,清洗期间可更换去离子水)。当读数在 12 ~ 22 mV 时,可认为电极清洗达到要求。

1.3 卤水中氨含量的测定

采用浓度 297 g/L 的 NaCl 溶液作为模拟卤

水溶液,用其配制含 NH_4Cl 的标准溶液作为测试液。准确移取待测卤水溶液 20.00 mL 于小烧杯中,将氨电极接入酸度计上,并将氨电极浸入待测溶液,采用温度校正,磁力搅拌,滴入 2~3 滴 1.0 mol/L NaOH 溶液,记录响应的电位值,对同一样品溶液至少平行测定三次,取平均值。

2 结果与讨论

2.1 实验条件的优化

2.1.1 pH 值的影响

pH 值是影响氨电极使用的一个主要因素。在酸碱平衡体系中,同时存在多种酸碱组分,这些组分的浓度,随溶液中 H^+ 浓度的变化而变化。溶液中某酸碱组分的平衡浓度占其总浓度的分数,为分布分数,以 δ 表示。 NH_4^+ 、 NH_3 的分布公式分别为:

$$\delta_{\text{NH}_4^+} = \frac{[\text{H}^+]}{K_a + [\text{H}^+]}, \quad \delta_{\text{NH}_3} = \frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]}$$

K_a 为解离常数(只与温度有关),氨离子的解离常数为 $K_a = 5.5 \times 10^{-10}$,由此公式可以计算出理论上 NH_4^+ 、 NH_3 的分布曲线(如图 1a)。实验采用适宜浓度的氯化铵溶液,使用直接电位法,通过氨电极,测定不同 pH 值下的电位值,得到盐卤水溶液(297 g/L NaCl)中 NH_3 含量随 pH 值的变化关系(如图 1b)。在高浓度盐卤水中, NH_4^+ 、 NH_3 的分布曲线与纯水体系相比,电位响应变化趋势一致。与水溶液介质相同,当 pH 值大于 11 时,卤水介质中的氨(铵)主要以 NH_3 的形式存在,占 99%

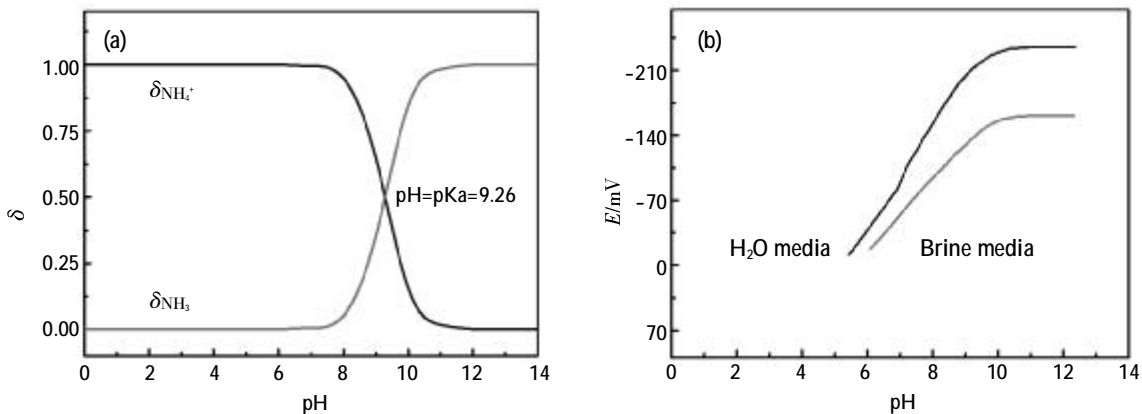


图 1 (a) 不同 pH 水溶液中 NH_3 和 NH_4^+ 的分布曲线(理论计算), (b) 不同 pH 水溶液和模拟盐卤水介质条件下 1.0×10^{-3} mol/L NH_4^+ 的电位响应

Fig.1 (a) Theoretical distribution curves of NH_3 and NH_4^+ in aqueous solution, (b) Potential responses of 1.0×10^{-3} mol/L NH_4^+ in aqueous solution and in brine with different pH values

以上。因此,氨电极用于卤水中氨(铵)的测定 pH 值应该大于 11。

2.1.2 测试温度

氨电极是基于 pH 玻璃电极为指示电极,因此随着温度的上升,指示电极的电位值将随之变化。根据能斯特方程,对于溶液每 1 °C 的温度变化,将引起电位 0.1984 mV 变化。氨电极的使用温度为 5~45 °C。实验中用恒温水浴控制反应的温度,使用氨电极检测不同温度下卤水环境下的 1.0×10^{-3} mol/L NH_4Cl 标准溶液的电位值。由表 1 可知,温度每升高 2 °C,氨电极电位会有 0~1 mV 的变化。因此,温度的变化会使电位值有变化,所以在使用氨电极测量时,要确保环境温度稳定。

表 2 不同浓度铵溶液测定时间对响应电位的影响

Tab.2 Effect of testing time on response potential for different concentration solutions

测定时间 (s)	铵的浓度 c (mol/L)	电位值 (V)	铵的浓度 c (mol/L)	电位值 (V)	铵的浓度 c (mol/L)	电位值 (V)
30	1.0×10^{-2}	-135	1.0×10^{-3}	-76	1.0×10^{-4}	-48
60		-150		-95		-63
120		-167		-117		-80
180		-169		-118		-82
240		-170		-120		-85
300		-170		-120		-85

透渗透膜并使电极内部氢离子浓度发生变化需要一定的时间。该时间是随着试样中氨浓度升高而减少的。因此,在实际测量时要根据试样中氨浓度来确定响应时间。该实验响应时间为 2~5 min 即可。

2.2 电极的使用注意事项

2.2.1 电极填充液及半渗透膜状态

在氨电极使用过程中,电极填充液有可能因蒸发或缓慢渗漏,而使填充液体积减少;或因使用时间过长,填充液浓度发生变化,使电极性能下降,导致测量结果发生漂移。电极在使用过程中因长期接触试样,渗透膜会被逐渐沾上污染物,并且测量仪在测量过程中如果吸入空气,就会使渗透膜上的微孔堵塞,致使氨气透过渗透膜的速度降低,造成电极响应时间变慢,影响测量精度。因此在实际使用过程中如果发现电极响应时间变慢、测量结果漂移或读数不稳定,就需要检查填充液和电极膜是否正常,否则需要补充填充液和更换电极膜(购买电极都配备)。

表 1 卤水介质中,不同温度下 1.0×10^{-3} mol/L NH_4Cl 的卤水溶液的电位值

Tab.1 Potential values of the ammonia electrode for 1.0×10^{-3} mol/L solution under different temperatures

温度/°C	22	24	26	28
电位/mV	-120	-120	-121	-121

2.1.3 响应时间

使用氨电极考察 1.0×10^{-2} 、 1.0×10^{-3} 、 1.0×10^{-4} mol/L 三组不同浓度氯化铵溶液的响应时间对响应电位的影响。由表 2 可知,氨电极对于低浓度氯化铵溶液需要略长的响应时间。这是因为氨穿

2.2.2 电极的重现性与稳定性

用氨电极分别测定卤水介质中 6.0×10^{-5} 、 1.0×10^{-3} 、 1.0×10^{-2} mol/L 的氯化铵溶液的电位值,每个浓度的氯化铵溶液测三次,取平均值。40 d 后,用同一支氨电极再次进行测定,测定结果如表 3。用同一支氨电极在 1.0×10^{-4} mol/L 的氯化铵溶液中重复测试,每次测三次,取平均值,平行测定五次,每次测量时间间隔约为半个小时。测定结果如表 4。由表 3、4 可知,用同一支氨电极间隔一个多月测量同一系列浓度的氯化铵溶液,通过两次电位值的对比,可以看出氨电极的稳定性总体上良好;氨电极在连续平行测定 5 次的电位值变化很小,说明稳定性较好。因此,该氨电极可以用于卤水中氨(铵)含量的检测,且具有良好的重现性及稳定性。

2.3 干扰物质的影响

2.3.1 金属离子的干扰

通常情况下,溶液中离子态的部分金属离子,如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ 等,无法穿过氨电极

表 3 卤水中氨电极间隔 40 d 后响应结果对比

Tab.3 Testing result comparison of the ammonia electrode in brine at different times

氯化铵浓度 (mol/L)	6.0×10^{-5}	1.0×10^{-3}	1.0×10^{-2}
首次测定结果 (mV)	-74	-118	-169
40 d 后测定结果 (mV)	-76	-120	-167

表 4 卤水介质中氨电极对同一试样重复测定结果 (1.0×10^{-4} mol/L 的氯化铵溶液)

Tab.4 Repetitive testing results of ammonia electrode in brine

实验组数	1	2	3	4	5
电位值 (mV)	-88	-88	-87	-88	-88

的透气膜,因此对氨电极无明显干扰。但是,氨能与许多金属离子形成配合物,如铜、镍、钴、镉及锌离子,可能导致测量数值偏低。但是当将测试样的 pH 大于 11 后,上述重金属离子在碱性溶液中均形成氢氧沉淀而不影响测定。

2.3.2 其他物质的干扰

原卤水中可能含有少量的有机胺、硝酸根、亚硝酸根,且卤水除氨过程中含过量的次氯酸钠。通过实验在卤水介质中分别加入一定量的上

述物质,记录了氨电极电位的变化(表 5)。从表 5 中可以看出,EDTA、尿素、硝酸根、亚硝酸根、次氯酸钠对氨电极无影响,但是乙胺对氨电极有明显影响。因为乙胺属于挥发性有机胺,可穿过透气膜,使氨电极内液 pH 改变,从而使电位值改变。在氨电极的使用中,应注意可能存在的碱性挥发性物质对实验的影响。氨电极的透气膜的材料为聚四氟乙烯,该材料性能稳定,抗氧化性强,次氯酸钠溶液对其无影响。

表 5 加入不同量干扰物质后氨电极电位值 (1.0×10^{-4} mol/L 的氯化铵溶液)

Tab.5 Corresponding potential values after interferences were added into, respectively

干扰物	干扰物的浓度 (mol/L)	电位值 (mV)	干扰物的浓度 (mol/L)	电位值 (mV)
EDTA		88		87
乙胺		-333		-333
尿素	0.010	88	0.030	87
硝酸钠		88		88
亚硝酸钠		88		88
次氯酸钠		88		87

2.4 卤水中铵含量标准曲线

图 2 为不同浓度的氯化铵溶液随氨电极电位的变化关系曲线。当氯化铵的浓度在 1.0×10^{-5} ~ 1.0×10^{-1} mol/L 时,氨电极电位与铵离子浓度的负对数值呈线性关系,氨电极电位与铵离子浓度的关系式为: $E(\text{mV}) = 41.69 \log c (\text{mol/L}) - 249.8$, $r = 0.997$ 。铵离子浓度的检测下限为 1.0×10^{-5} mol/L。采用标准加入试验,获得该电极在卤水介质中对铵离子的测定回收率为 97.1% ~ 105.3%。

2.5 实际样品的测定

实际样品来自于中国石化集团江苏石油勘探局采输卤管理处提供的精制卤水。按照上述实验步骤及优化条件测定卤水中氨(铵)的结果见

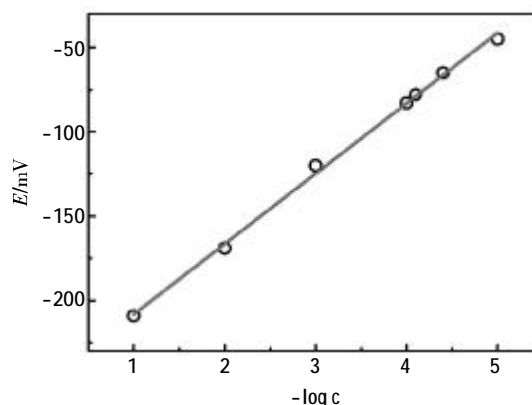


图 2 卤水介质中氨电极电位值与铵浓度负对数的工作曲线

Fig.2 Standard curve of the ammonia electrode for determination of ammonia in brine

表 6(重复 7 次实验结果的平均值)。氨电极法对三个样品的实验结果的相对平均偏差为 1.3%、

1.2%、1.0%。样品也采用纳氏分光光度法进行测试对比,结果与氨电极法接近,说明该氨电极法

表 6 实际精制卤水样品中氨(铵)的测试结果(n = 7)

Tab.6 Testing results of ammonia content in the real samples

	生产样品 1	生产样品 2	生产样品 3
氨电极法(mg/L)	1.70	2.37	2.29
纳氏分光光度法(mg/L)	1.71	2.16	1.94

可以快速准确测定卤水中氨(铵)的含量。

3 结论

该研究使用氨电极法作为检测方法,研究了高浓度卤水中氨(铵)的测定影响因素。实验结果表明氨电极在高浓度卤水环境下可以准确测定其中的氨(铵)含量。该方法可适合于精制卤水生产中氨(铵)的快速检测,符合生产质量控制要求。

参考文献

- [1] 党德海,张丽红. 关于卤水除氨的探讨[J]. 氯碱工业, 2006,42 (11): 17.
- [2] 陈传金,邵文祖. 氯碱生产中氯化钾盐水除氨的探讨[J]. 无机盐工业, 2008, 40(9): 39-41.
- [3] 张胜利,刘丹,曹臣. 次氯酸钠脱除废水中氨氮的研究[J]. 工业用水与废水, 2009, 40(3): 23-26.
- [4] 胡凌云,周钢. 卤水除铵处理中次氯酸钠控制技术[J]. 中国井矿盐, 2008, 39(5): 5-7.
- [5] HJ 535-2009, 水质氨氮的测定纳氏试剂分光光度

法[S].

- [6] HJ 536-2009, 水质氨氮的测定水杨酸分光光度法[S].
- [7] HJ 537-2009, 水质氨氮的测定蒸馏-中和滴定法[S].
- [8] Aomura Y, Kobayashi Y, Miyazawa Y, et al. Application of copper sulfate pentahydrate as an ammonia removal reagent for the determination of trace impurities in ammonia by gas chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(11): 1838-1844.
- [9] 柳畅先,华崇理,孙小梅. 水中氨氮的酶法测定[J]. 分析化学, 1999, 27(6): 712-714.
- [10] 王宁,王聪,哈谦,等. 基于荧光法的海水氨氮测量方法研究[J]. 海洋技术, 2010, 29(4): 20-22.
- [11] Sun P, Jiang Y D, Xie G Z, et al. Layer-by-layer assembly carbon nanotubes thin film based gas sensors for ammonia detection[J]. *Science China Information Sciences*, 2011, 54(12): 2680-2686.
- [12] Fu TX. Silver sulfide-based sensor for the selective determination of ammonia at room temperature[J]. *Electrochimica Acta*, 2014, 121: 168-174.
- [13] 陈雨艳,钱蜀,张丹,等. 氨气敏电极法测定废水中的氨氮[J]. 辽宁化工, 2010, 39(7): 783-785.

基于二氧化硅-壳聚糖纳米复合物构建免疫传感器的研究

朱宇萍*, 许琼

(内江师范学院化学化工学院, 四川内江 641112)

摘要: 首先制备二氧化硅(SiO_2)-壳聚糖(chitosan, Cs)纳米复合物。将其修饰在玻碳电极表面,利用纳米 SiO_2 高的表面能和多孔结构吸附电子媒介体硫堇(Thi)。通过Thi中的氨基吸附纳米金(nano-Au),从而固载甲胎蛋白抗体(anti-AFP),并用牛血清白蛋白(BSA)封闭非特异性吸附位点,成功制得一种新型的甲胎蛋白免疫传感器。在最优实验条件下,该免疫传感器在检测范围:0.01~1.0 ng/mL和5~200 ng/mL内呈现良好线性关系,检测下限为0.003 ng/mL。结果表明,该免疫传感器灵敏度高,制备方法简易。

关键词: 免疫传感器; 甲胎蛋白; 二氧化硅; 壳聚糖; 纳米复合物

An immunosensor based on silica - chitosan nano composites

Zhu Yu-ping*, Xu Qiong

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Neijiang Normal University, Neijiang 641112, China)

Abstract: First, the preparation of silica -chitosan nano composites. Then modify the surface of glassy carbon electrode, using nano silicon dioxide high porous structure and surface energy of adsorption electronic media body thionine. Through thionine amino adsorption of nanometer gold, which immobilized AFP antibody, using bovine serum albumin closed nonspecific adsorption sites, successfully obtained a new kind of AFP immune sensor. Under the optimal experimental conditions, the immune sensor detection range in 0.01 ~ 1.0 ng/mL and 5~200 ng/mL show good linear relations, detecting limit was 0.003 ng/mL. Results show that the sensor sensitivity, simple preparation method.

Key words: immunosensor; AFP; SiO_2 ; chitosan; nano composite

0 引言

电化学免疫传感器具有高特异性、高灵敏度、精确测量、操作简单、分析快速、便宜和仪器小型化等优势,是生物化学分析的研究热点。在临床诊断,医疗保健,环境监测,食品安全等领域得到广泛应用^[1]。修饰材料的选择及其固载方法是成功制备免疫传感器的关键^[2]。

纳米二氧化硅(SiO_2)粒径小,具有三维网状结构。它比表面积大、表面吸附力强、表面含有丰

富的羟基^[3]。并具有生理惰性,能保证生物分子的活性^[4]。因此,在免疫传感器领域被广泛应用。有研究将金属纳米材料与其它纳米材料制备成纳米复合物,用于免疫传感器的研究。使得免疫传感器峰电流信号增强,稳定性提高^[5]。硫堇(Thi)分子中含有两个氨基,带正电,是良好的电子媒介体,可作氧化还原探针。同时,在酸性条件下,Thi单体分子可以聚合形成多孔高聚复合膜,这种多孔高聚硫堇复合膜的稳定性好,比表面积大,是优良的固定基质。可将其用于增强抗体的

基金项目:四川省教育厅科研项目(15ZA0292)

* 通信联系人, Tel:13696067037, E-mail:judy20060830@163.com

吸附量,提高免疫传感器的灵敏度^[6]。壳聚糖(Chitosan;Cs)是甲壳素(Chitin)脱去其中一部分乙酰基后的产物,具有优异成膜性、透气性、吸附性和渗透性,作为一种良好的成膜材料在传感器研究领域被广泛应用^[7]。金属纳米颗粒则具有高的催化性、选择性^[8]、生物相容性好、吸附性强^[6]等特点,广泛应用于免疫传感器的研究。纳米金是典型的金属纳米材料。实验首先制备纳米SiO₂,并将它与Cs制备成纳米复合物。再将其修饰在玻碳(GCE)电极表面。然后利用纳米SiO₂高的表面能和多孔结构^[9],以及所含羟基与氨基反应,吸附电子媒介体Thi^[6]。Thi带有双功能团,带正电,可吸附带负电的纳米金颗粒,从而吸附甲胎蛋白抗体蛋白质(anti-AFP)。该制备方法操作简便,成功率高。制备的甲胎蛋白免疫传感器灵敏度高,选择性强。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI660C 电化学工作站(上海辰华仪器公司),BRANSONIC200 超声清洗仪(德国BRANSONUL-TRASCHALL公司),FA2004A 电子天平(上海精天电子仪器有限公司),TL-5.0W 台式离心机(上海市离心机械研究所有限公司)。

氨水(体积分数 25%),无水乙醇,正硅酸乙酯(TEOS),氯金酸(武汉兴众诚股份有限公司),柠檬酸三钠(成都科龙化工试剂厂),磷酸二氢钠,磷酸氢二钠,氯化钾,硫堇(青岛正业试剂仪器有限公司),以上试剂如未加说明,均为分析纯。壳聚糖,甲胎蛋白诊断试剂盒(郑州博赛生物技术股份有限公司),牛血清白蛋白(BSA),去离子水。

1.2 纳米金的制备

将 0.0300 g 氯金酸溶于 100 mL 去离子水中,加热至沸腾,搅拌下滴加 1%(w)的柠檬酸钠溶液 2 mL(先滴加 6 滴,搅拌,沸腾 2 min 后继续滴加剩余溶液)。持续沸腾 15 min 后,停止加热。继续搅拌至室温,得到玫红色纳米金溶胶^[10]。

1.3 纳米二氧化硅的制备

将 12 mL 体积分数为 25%的氨水和 100 mL 无水乙醇混合。在 35 °C,超声条件下,以 0.4 mL/min 的速度滴入 6 mL TEOS,滴加完后再超声 5 min 即得粒径均一的纳米二氧化硅纳米粒子^[11]。

以 10000 r/min 进行高速离心 10 min,倒掉上清液,用去离子水洗涤至亚中性,最后用去离子水定容至刚开始体积,保存待用。

1.4 二氧化硅-壳聚糖纳米复合物的制备

将 0.0100 g Cs 溶于 5 mL 醋酸中,室温搅拌至溶解。用 NaOH 溶液调节 pH 在 4.0~5.0。将已制备好的纳米 SiO₂ 溶液 5 mL,加入其中,搅拌 8 h,即得 SiO₂-Cs 纳米复合物。

1.5 免疫传感器制备过程

玻碳电极(GCE, $\Phi=4$ mm)经 0.3 μm , 0.05 μm 的 Al₂O₃ 糊抛光后用蒸馏水冲洗干净。再依次用去离子水,无水乙醇,去离子水分别超声 5 min 后取出,室温下晾干备用。取制备好的 SiO₂-Cs 纳米复合物 10 μL ,用微量取样器滴加在处理过的电极表面。室温下自然晾干后,向该修饰电极表面滴加 10 μL Thi,室温下晾干。将上述电极表面滴涂 20 μL nano-Au 溶胶,室温下晾干。最后,将其浸泡在 anti-AFP 溶液中 6 h 后取出,用 BSA 封闭 30 min,最后用去离子水洗涤晾干。在 4 °C 条件下保存备用。修饰电极制备过程如图 1。

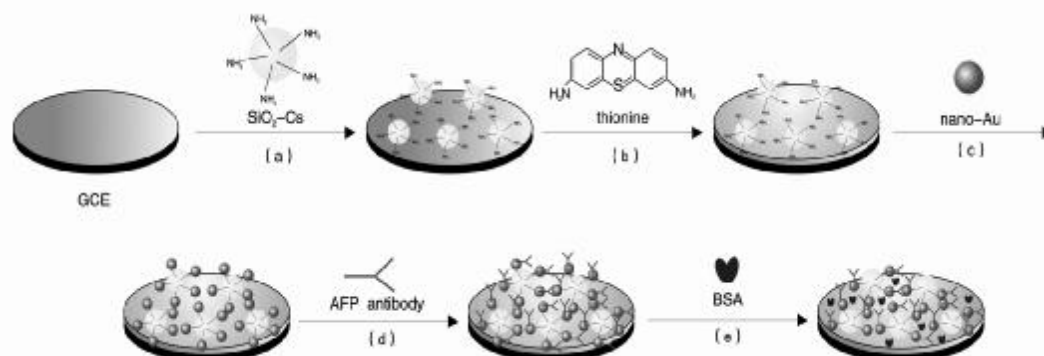


图 1 免疫传感器的制备过程

Fig.1 Immune sensor preparation process

1.6 检测方法

用循环伏安法(Cyclic Voltammetry, CV)对免疫传感器不同过程进行扫描。工作采用三电极体系,其中修饰电极为工作电极,甘汞电极为参比电极,铂电极为对电极。实验时以 0.1 mol/L (pH6.0)磷酸缓冲液(PBS)作为测试底液,在-0.4 V ~ 0.2 V 电压范围内扫描,扫描速度为 50 mV/s。不另加说明,温度均为 25 ℃。

2 实验结果与讨论

2.1 电极在不同修饰过程的电化学表征

利用电化学工作站(CHI660C)中 CV 技术对电极在不同修饰过程中进行表征,见图 2。图 2 中曲线 a 为裸(GCE)电极。由于玻碳电极不导电,测试底液中无电活性物质,此时没有出现氧化还原峰^[12]。曲线 b 为电极表面修饰了 SiO₂-Cs 纳米复合物的 CV 图。SiO₂-Cs 纳米复合物不利于电子传输,因此也没有出现氧化还原峰。曲线 c 为修饰了 Thi 之后的 CV 图。从图中明显可见,电压在-0.2 V~-0.1 V 范围内出现了一对可逆的氧化还原峰,此峰为 Thi 特征峰^[7],因为 Thi 是一种良好的电子媒介体。同时也表明 Thi 成功修饰在电极表面。曲线 d 为修饰了 nano-Au 之后的 CV 图。由图可见,氧化还原峰峰电流值明显增大。这是由于 nano-Au 能促进电子传输,使得峰电流值

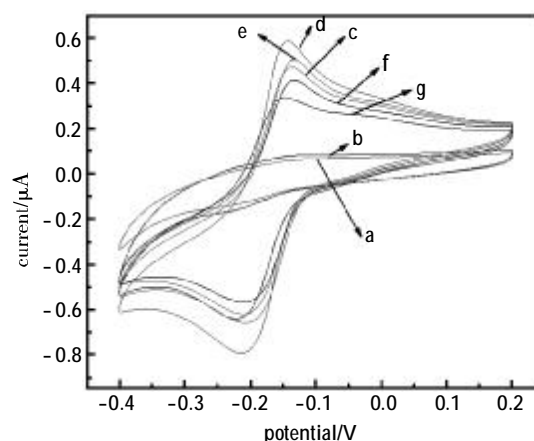


图 2 修饰电极制备过程的循环伏安图

Fig.2 Cyclic voltammograms of the immunoelectrode preparation process

(a)GCE;(b)SiO₂-Cs/GCE;(c)Thi/SiO₂-Cs/GCE;(d)nano-Au/Thi/SiO₂-Cs/GCE;(e)anti-AFP/nano-Au/Thi/SiO₂-Cs/GCE;(f)BSA/anti-AFP/nano-Au/Thi/SiO₂-Cs/GCE;(g)AFP/BSA/anti-AFP/nano-Au/Thi/SiO₂-Cs/GCE

增大^[12];曲线 e、f、g 分别为浸泡 anti-AFP、BSA, 孵育 20 ng/mL AFP 之后的 CV 图。可以看出氧化还原峰值逐渐减小。这是由于 anti-AFP、BSA、AFP 均为蛋白质大分子,会阻碍电子传输,使得峰电流值下降^[13]。

图 3 为免疫传感器在 0.1 mol/L (pH= 6.0)的 PBS 中,扫速分别为 50、100、150、200、250、300、350、400 mV/s(从内到外)下的 CV 图。由图可见,

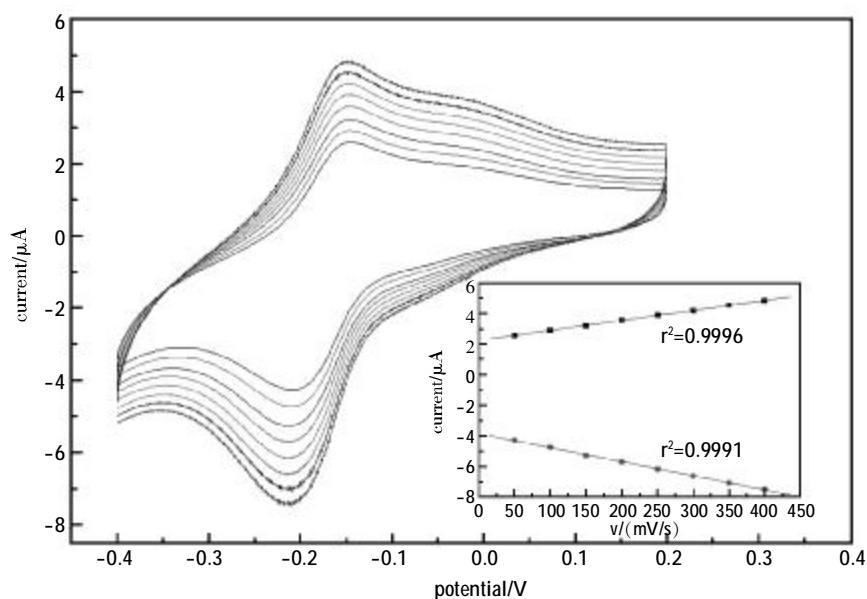


图 3 免疫电极在不同扫速下的循环伏安图

Fig.3 Cyclic voltammograms of the immunoelectrode at different scan rate

随着扫速的增大,氧化还原峰值不断增加。在 50~400 mV/s 扫速范围内氧化还原峰电流值与扫速均呈良好线性关系(见插图),相关系数分别为: 0.9996 和 0.9991,说明电极氧化还原受表面吸附的影响^[6]。

2.2 实验条件的优化

2.2.1 测试底液酸度的选择

测试底液的 pH 将影响抗体、抗原的活性,同

时还会影响抗原抗体特异性结合。试验用 CV 扫描了测试底液 PBS 的 pH 在 4.0~8.0 范围内,免疫传感器的响应性能。图 4 为免疫传感器在不同 pH 值下扫描的 CV。由图可得,随着 pH 逐渐增大,氧化还原峰电流值逐渐减小。并且,pH 值达到 6 以后,电流值趋于平稳。同时,氧化峰、还原峰电位随着 pH 的增大负移。说明 H⁺浓度大有利于电子媒介体 Thi 发生氧化还原反应^[14]。但酸度

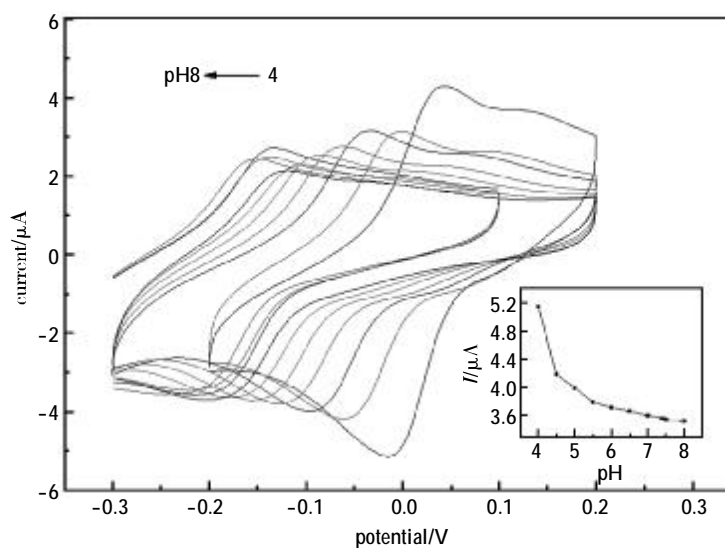


图 4 免疫电极在不同 pH 值下的循环伏安图

Fig.4 Cyclic voltammograms of the immunoelectrode in different pH

太大会影响生物分子的活性。因此,实验选择 pH 为 6.0。

2.2.2 孵育时间的选择

免疫反应受孵育时间的影响。在实验中,将

已制备好的修饰电极放入 20 ng/mL AFP 抗原溶液中孵育,依次测定孵育时间分别为 1、3、5、7、10、12、15、20 min CV 图。图 5 插图即为孵育不同时间后所测循环伏安图,可看出随着时间的增

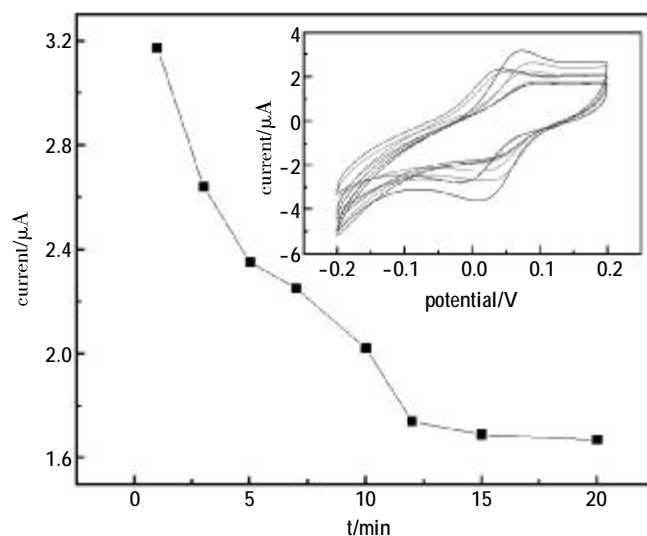


图 5 免疫传感器在不同孵育时间下的 CV

Fig.5 Cyclic voltammograms of the immunoelectrode in different incubation time

长,氧化峰电流值逐渐减小,峰电流值变化较大。但在 12 min 以后,峰电流变化较小,说明此时免疫反应达到平衡,抗体吸附抗原达到饱和^[15]。故选择 12 min 为最佳孵育时间。

2.2.3 孵育温度的选择

抗体,抗原的活性同样也受温度的影响。实验中固定抗原浓度为 20 ng/mL, 测试底液 pH=

6.0, 孵育时间 12 min, 改变孵育温度, 用 CV 扫描。从图 6 中可见, 在一定温度范围内随着温度的升高, 氧化峰值减小。说明在适宜温度范围内, 温度越高越有利于吸附抗原。但当温度达到 35 °C 后, 峰电流值基本不变, 说明此时免疫反应达到平衡^[10]。考虑温度过高, 会影响蛋白质活性, 选择室温 25 °C 作为反应条件。

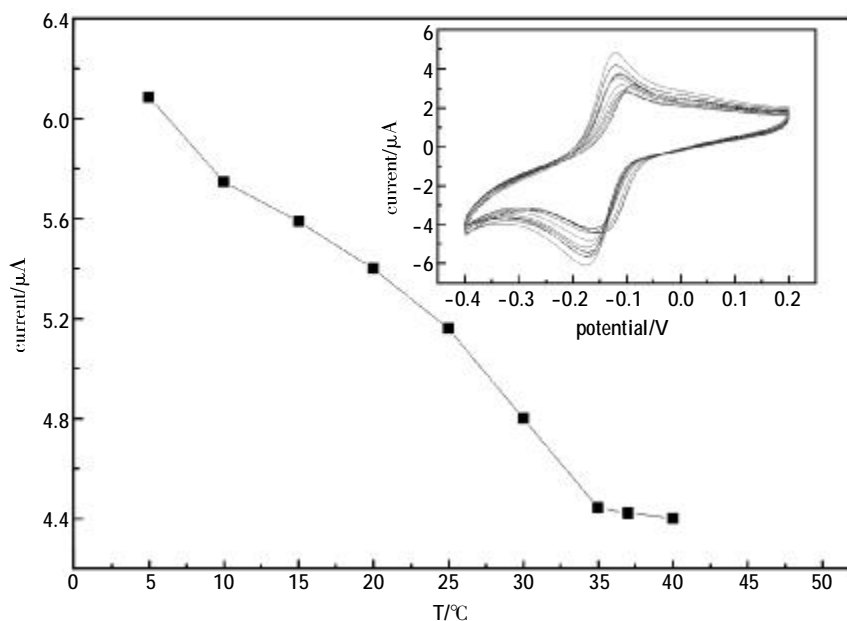


图 6 免疫传感器在不同温度下的循环伏安图

Fig.6 Cyclic voltammograms of the immunoelectrode in different temperature

2.3 免疫传感器的性能

2.3.1 免疫传感器的检测范围和检出限

在最优实验条件下, 测试免疫传感器检测范围和检出限。配制成不同浓度的抗原溶液(0.01~200 ng/mL), 由低浓度到高浓度, 将免疫传感器依次孵育不同浓度抗原 12 min 后, 取出用 CV 表征。图 7 插图即为在不同浓度抗原中孵育后的 CV 图, 随着浓度的增大, 氧化还原峰降低。同时, 从图 7 可知 AFP 抗原浓度分别在 0.01~1.0 ng/mL 和 5~200 ng/mL 范围内, 峰电流与抗原浓度成良好线性关系。线性方程分别为: $\text{Current} = -1.51082 c + 6.94359$ 和 $\text{Current} = -0.00639 c + 5.44035$, 相关系数分别为 0.9901 和 0.9712, 检出下限为 0.003 ng/mL。说明该传感器检测范围宽, 灵敏度高。主要是 Thi 和 nano-Au 的协同作用, 促进了电子传输。

2.3.2 免疫传感器的选择性和抗干扰性

为了检测免疫传感器的选择性和抗干扰性, 实验将免疫传感器分别置于只含 AFP 抗原 100 ng/mL 溶液与含有 BSA、赖氨酸、谷氨酸和抗坏血酸等干扰蛋白质的 100 ng/mL AFP 抗原溶液中浸泡 12 min 后, 取出依次用 CV 表征。从图 8 中可以看出两次扫描峰电流值相差很小, 说明该免疫电极具有良好的选择性和抗干扰性。

3 结论

实验用 SiO₂-Cs 纳米复合物、Thi 共同修饰电极构建了检测范围广, 灵敏度高, 抗干扰性强的 AFP 免疫传感器。与其他传统固载方法相比, 该方法具有如下优点: (1) 纳米 SiO₂ 具有的三维网状结构, 增加了抗体吸附量; (2) Thi 的引入, 简化了实验步骤, 提高了免疫传感器的灵敏度; (3) 利

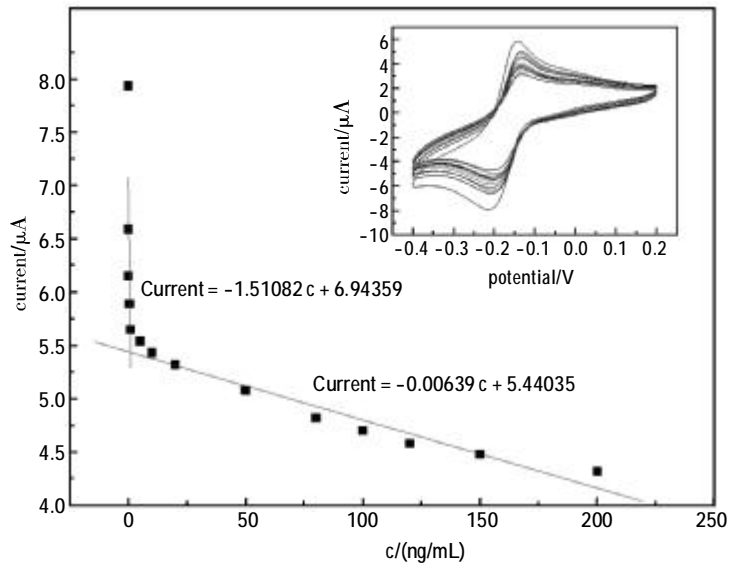


图 7 不同浓度抗原下循环伏安图

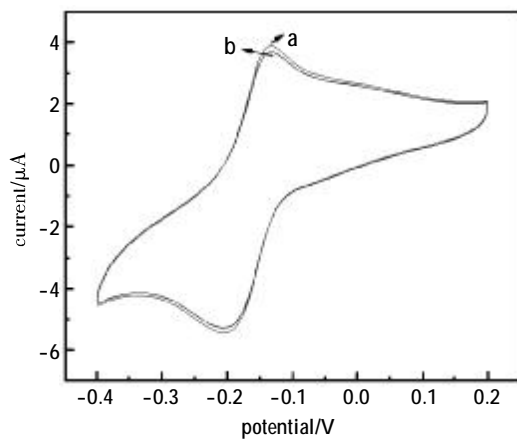
Fig.7 Cyclic voltammograms of the immunoelectrode in different AFP concentration
浓度: 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 80, 100, 120, 150, 200 ng/mL

图 8 (a) 加有干扰物的循环伏安图 (b) 只有 AFP 抗原的循环伏安图

Fig.8 (a) Cyclic voltammograms of the immunoelectrode have other protein molecules. (b) Cyclic voltammograms of the immunoelectrode only have AFP

用 Cs、Thi 和 nano-Au 及抗体蛋白质之间的静电吸附,提高了实验成功率,同时也增加了抗体吸附量。该传感器的制备过程中可操作性强,同时该传感器也可应用于其他免疫体系的检测,在临床医学方面有潜在应用价值。

参考文献

[1] 贾立永,郑磊,王前,等.电化学免疫传感器及其在临床检验中的应用进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010,

31(11): 1329-1330.

[2] 蒋文,袁若.纳米材料在电化学生物传感器及生物电分析领域中的应用[J]. 分析测试学报, 2011, 30(11): 1200-1206.

[3] 禹坤. 纳米二氧化硅的生产及应用现状[J]. 现代技术陶瓷, 2005, 4: 28-32.

[4] 李曦,刘连利,王莉莉. 纳米二氧化硅的研究现状与进展[J]. 渤海大学学报(自然科学版), 2006, 27(4): 304-308.

[5] Yang M H, Yang Y, Yang H F. Layer-by-layer self-assembled multilayer films of carbon nanotubes and platinum nanoparticles with polyelectrolyte for the fabrication of biosensors[J]. Biomaterials, 2006, 27 (2):246-255.

[6] 安海珍,袁若,柴雅琴,等.基于聚硫堇、DNA/纳米银复合物共修饰癌胚抗原免疫传感器的研究[J]. 化学学报, 2008, 66(6):633-638.

[7] 闵丽根,袁若,柴雅琴,等.基于纳米金与碳纳米管-纳米铂-壳聚糖纳米复合物固定癌胚抗原免疫传感器的研究[J]. 化学学报, 2008, 66(14): 1676-1680.

[8] Nara yanan R, EL-sayed M A. Effect of colloidal catalysis on the nanoparticle size distribution: dendrimer -Pd vs PVP-Pd nanoparticles catalyzing the suzuki coupling reaction[J]. J. Phys. Chem.B., 2004, 108(25):8572-8580.

[9] Zhuo Ying, Yuan Ruo, Chai Yaqin, et al. Enhancement of carcinoembryonic antibody immobilization on gold electrode modified by gold nanoparticles and SiO₂/Thion-

- ine nanocomposite [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2009, 628(1-2): 90-96.
- [10] 欧朝凤,袁若,柴雅琴,等.基于巯基/碳纳米管修饰电极的过氧化氢生物传感器[J].*分析化学研究简报*, 2007, 35(7):1011-1014.
- [11] 范艳玲,刘艺芳,吕雪莉,等.硅酸乙酯为原料反相微乳液法制备纳米二氧化硅[J].*化学工业与工程*, 2010, 27(5):378-410.
- [12] 冉小琪,袁若,柴雅琴,等.基于纳米金、铁氰化镍纳米颗粒共修饰的电流型甲胎蛋白免疫传感器的研究[J].*化学传感器*, 2010, 30(1):36-41.
- [13] 朱宇萍,袁若,柴雅琴,等.基于碳纳米管/L-半胱氨酸/ Fe_3O_4 @Au 纳米复合材料的电流型甲胎蛋白免疫传感器的研究[J].*分析化学*, 2012, 40: 359-364.
- [14] Liu Ya xi, Yuan Ruo, Chai Ya qin, et al. Preparation of a composite film electrochemically deposited with chitosan and gold nanoparticles for the determination of α -1-fetoprotein[J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2010, 33(5): 613-618.
- [15] 柴荣,袁若,柴雅琴,等.邻氨基苯甲酸膜及纳米金固定的亚甲基蓝为介体的乙型肝炎免疫传感器[J].*西南大学学报(自然科学版)*, 2007, 29(9): 52-56.

DNA 甲基化转移酶活性的免标记电化学研究

陈丹萍, 戴宗*

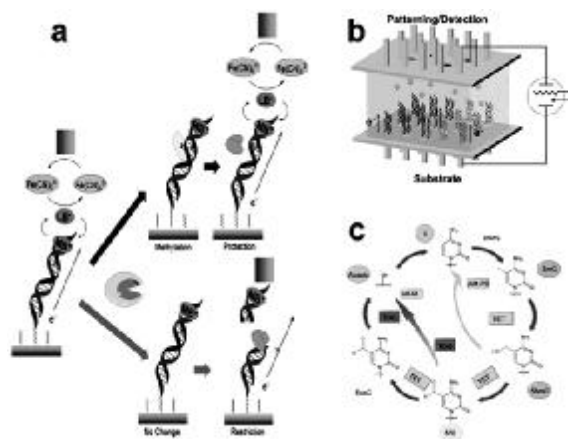
(中山大学化学与化学工程学院, 广东广州 510275)

DNA 甲基化是指 DNA 在甲基转移酶 (DNMTs) 作用下, 催化底物 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM), 转移一个甲基至胞嘧啶的 C5 位置, 生成 5-甲基胞嘧啶 (5-mC) 的过程。作为重要的表观遗传修饰方式之一, DNA 甲基化与胚胎发育、染色体结构、基因印记等密切相关。异常甲基化修饰通常与人类各种疾病紧密联系, 成为众多疾病的生物标记。深入研究 DNA 甲基化修饰形成及控制机制在疾病诊断、药物筛选、细胞重编程、全能细胞研究等方面具有重要意义。

DNA 甲基化是一个可逆过程, 其去甲基化机制目前还没有被完全了解。实现 DNA 甲基化修饰及控制的核心研究内容之一为对甲基化修饰过程中相关酶功能的研究。2014 年, 美国科学院院士, 加州理工学院 Jacqueline K. Barton 教授课题组, 在美国科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA) 上报道了一种独特的多路复用电化学检测系统, 测定人类结肠肿瘤活性组织 DNMT1 酶活性^[1]。该电化学检测平台包括两个电极阵列, 每个阵列有 15 个电极, 其中, 被固定在底部电极阵列的 DNA 双链通过顶部电极中亚甲基蓝的电催化反应得到检测。该方法采用甲基化敏感性限制性内切酶将 DNA 甲基化状态转化为一种电信号。当甲基转移酶存在时, 电极上半甲基化的 DNA 双链会被彻底甲基化, 没有甲基转移酶存在的情况下, 半甲基化的 DNA 双链无法进一步甲基化。因此, 在加入甲基化限制性内切酶时, 完全甲基化的电化学信号仍保持不变, 而半甲基化状态的 DNA 双链将会被限制性内切酶剪切, 使得电信号显著下降。

该双电极传感平台能够有效区分结肠肿瘤组织和邻近的健康组织, 表现出较好的临床诊断

应用前景。此外, 该方法应用了免标记电化学检测技术, 较好地克服了常规技术的局限性, 并可结合其他限制性内切酶, 进一步拓展到 DNA 甲基化修饰的其他衍生物的检测。如结合近期美国哈佛大学医学院 Yi Zhang 教授课题组提出的 DNA 主动去甲基化的可能过程^[2], 对 DNA 主动去甲基化途径中各种酶功能及活性的研究, 加深对甲基化形成机制方面的理解。



(a)多复通路电化学检测平台检测 DNA 甲基转移酶活性的原理图。(b)多复通路电化学检测平台示意图。
(c)5-甲基胞嘧啶主动去甲基化过程

参考文献

- [1] Furst A L, Muren N B, Barton J K, et al. Label-free electrochemical detection of human methyltransferase from tumors [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2014, 111 (42): 14985-14989.
- [2] Kohli R M, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation [J]. Nature, 2013, 502 (7472): 472-479.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21175158, 21422510)

* 通信联系人, E-mail: daizong@mail.sysu.edu.cn

《化学传感器》征稿启事

《化学传感器》是经国家科委批准,由中国仪器仪表学会主办的专业科技刊物。1981年创刊,国内外公开发行,国内统一刊号 CN32-1406/TP,国际标准刊号 ISSN1008-2298,本刊的主要任务是交流有关化学传感器的研制、理论研究、在各个领域的应用、仪器及与微机联用技术等方面的学术论文,促进化学传感器在各生产科技部门的普及与推广应用。是冶金、地质、卫生防疫、环境保护、食品检验、生理医学、化工、农业、国防、科研、大专院校等一切从事化学分析、工业过程控制与自动检测的科技工作者的理想工具,得力助手。

1 征稿内容

a.化学及生物传感器进展评述;b.化学传感技术基础理论;c.新型敏感材料;d.新型化学传感器研究(离子敏、气敏、光敏、生物敏、温敏、热敏、电化学压电晶体及表面声波、基于微生物技术的薄膜及厚膜传感器等);e.化学传感器在各领域的新应用;f.敏感器件制造技术;g.传感器的信号处理;h.化学传感器的产业化;i.化学传感器测量仪与自动控制系统。

2 投稿须知(为使来稿格式符合国家科技期刊格式标准,特向广大作者提出相关要求,请务必配合)

2.1 来稿一律用电子邮件(附件)发送到 chxj.jy@163.com(同时抄送至 sensor@jiangfen.com.cn)。稿件以文本(*.TXT)或 WORD(*.DOC)格式存贮发送,邮件中附上作者的详细联系方式和通讯地址。来稿不退,请作者自留底稿。

2.2 请勿一稿两投。编辑部收稿后,10天内发出收稿通知。来稿审阅一般需2个月时间,3个月以上未收到本部的处理意见者,作者可自行改投他刊。

2.3 计量单位一律采用国家法定计量单位。各种符号应符合国家标准(所有的字母和符号必须分清大小写、正斜体、上下角)。

2.4 本刊不发表涉及保密的稿件,涉及者应有单位证明。作者对来稿文责自负。

2.5 稿件要求论点明确、内容充实、条理清楚、术语准确、文字精练、数据可靠、文字、标点使用规范。论文应以第三人称写出,文中不应出现“本文、我们、作者”之类的词语。

2.6 稿中作者不止一位时,请确定一位联系人(姓名右上角加*号),注明地址、邮政编码、电话及E-mail地址。

2.7 基金项目指文章产出的资助背景,项目名称应按国家有关部门规定的正式名称填写;多项基金项目应依次列出,中间用“;”隔开,每个项目后给出编号,用()括起。写在论文首页下方。

2.8 中文题名不应超过20个汉字。并应译成相对应的英文题名,英文题名仅仅第一单词的第一字母大写。

2.9 中国作者的英译名用汉语拼音,姓氏首字母大写;名字首字母大写,双名中间加“-”。不同工作单位的,在姓名的右上角加注阿拉伯数字序号,中间用“,”隔开。所有作者的工作单位,均应包括单位名称(院校给到系),所在省、市名及邮政编码。多作者的工作单位名称之前加与作者姓名序号相同的数字,工作单位的英译文给出全称,不能用缩写词(系名除外)。还应在邮政编码之后加“China”。

2.10 中文摘要为200~300字。摘要的内容应包括目的、方法、结果和结论;综述文章可写指示性摘要。英文摘要应与中文相对应。中文摘要前加“摘要:”;英文摘要前加“Abstract:”。

2.11 关键词:3~8个关键词,中间用“;”隔开。中、英文关键词应一一对应。中文前冠以“关键词:”,英文前冠以“Key words:”。

2.12 文章中的图表及公式

2.12.1 每篇文章的图表一定要有图序、图题、表序、表题,并要有对应的英译文(图释或说明语只标出中文并排在图题之上)。

2.12.2 坐标图四周加方框,纵坐标的标值线在左竖线框内,横坐标在下横线框内。方框的左侧和下侧分别标出该坐标的物理量名称、符号和单位。表格用三线表(只有三条横线,没有竖线)。

2.12.3 公式中的符号第一次出现时,应加注表示的物理意义(物理量符号在式中、图表中、正文中均使用斜体);并应加注单位(单位用正体标出)。

2.13 参考文献

2.13.1 作者,三名以内的,全部列出;超过三名时,只列出三名,中间皆用逗号分开,后面加“等。”。

2.13.2 非正式出版物不宜列入参考文献。“论文集”无出版地,出版者,不可作为参考文献。

2.13.3 参考文献中的作者,应姓在前,名在后,姓后不加逗号,缩写字不加缩写点。

2.13.4 参考文献在正文中标出引用位置。用方括号标在引用词语末的右上方。

2.13.5 参考文献类型及其标识:

2.13.5.1 参考文献类型及其标识:

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

2.13.5.2 对于专著、论文集中的析出文献,其文献类型标识采用单字母“A”;对于其他未说明的文献类型,采用单字母“Z”。

2.13.5.3 对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献,以下列双字母作为标识:

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

2.13.5.4 电子文献的载体类型及其标识

对于非纸张型载体的电子文献,当被引用为参考文献时需在参考文献类型标识中同时标明其载体类型。请采用双字母表示电子文献载体类型:磁带(magnetic tape)——MT,磁盘(disk)——DK,光盘(CD-ROM)——CD,联机网络(online)——OL,并以下列格式表示包括了文献载体类型的参考文献类型标识:

[文献类型标识/载体类型标识]

如:[DB/OL]——联机网上数据库(database online)

[DB/MT]——磁带数据库(database on magnetic tape)

[M/CD]——光盘图书(monograph on CD-ROM)

[J/OL]——网上期刊(serial online)

[EB/OL]——网上电子公告(electronic bulletin board online)

2.13.6 文后参考文献编排格式:(格式中的符号,必须严格使用括号中的符号)

a. 专著、论文集、学位论文、报告

[序号] 作者名(.) 文献题名 {专著[M]; 论文集[C]} (.) 出版地(:) 出版者(,) 出版年(.) 起止页码(.)

[序号] 作者名(.) 文献题名[学位论文[D]; 报告[R]] (.) 收藏地(:) 收藏者(,) 出版年(.) 起止页码(.)

b. 期刊文章

[序号] 作者名(.) 文章名[J]. 期刊名(,) 年(,) 卷(期)(:) 起止页码(.)

c. 论文集中析出的文献

[序号] 析出文章作者(.) 析出文章名[A]. 原主要责任者(任选)(.) 原文献题名[C]. 出版地(:) 出版者(,) 出版年(.) 析出文献起止页码(.)

d. 报纸文章

[序号] 作者名(.) 文章名[N]. 报纸名(,) 出版日期(版次)(.)

e. 国际、国家标准

[序号] 标准编号(,) 标准名称[S].

f. 专利

[序号] 专利所有者(.) 专利题名[P]. 专利国别(:) 专利号(,) 出版日期(.)

g. 电子文献

[序号] 作者名(.) 电子文献题名[电子文献及载体类型标识](.) 电子文献的出处或可获得的地址(,) 发表或更新日期/引用日期(任选)(.)

本刊地址:江苏省泰州市姜堰区姜堰大道 66 号

电话:0523-88819706

http://www.jiangfen.com.cn

邮政编码:225500

传 真:0523-88819768

E-mail: chxj.jy@163.com

sensor@jiangfen.com.cn

《化学传感器》编辑部