

特 约 来 稿

脱氧核糖核酸分子设计在电化学生物传感器中的应用

刘 刚^{1,2} 万 莹² 邹子英¹ 任淑贞^{* 1} 樊春海^{* 2}

¹(上海市计量测试技术研究院, 上海 201203)

²(中国科学院上海应用物理研究所物理生物学实验室, 上海 201800)

摘 要 基于特殊 DNA 序列的构型变化的电化学生物传感器是一种高灵敏、高特异性的生物分析方法。固定在电极表面的特殊 DNA 探针(茎环、核酸适配体、四聚体等)因为目标物质的结合而发生构型变化,从而产生可检测的电化学信号,这种策略操作简便而且特异性强,引起了研究者的广泛关注。本文总结了目前基于基因构型变化的电化学生物传感器的发展历程。

关键词 电化学传感器; 基因传感器; 核酸适配体; 分子信标; 评述

1 引 言

为了满足对脱氧核糖核酸(DNA)序列或者蛋白的快速、便捷、高灵敏度和高选择性检测的需要,人们研究了各种的 DNA 传感器:包括光学传感器^[1,2]、电化学传感器、质量传感器^[3,4]和声学传感器^[5]等,其中电化学基因传感器因为灵敏、快速、低成本和低能耗等显著的特点受到广泛关注。

采用电化学方法检测 DNA 杂交可以通过引入一个具有电化学活性的插入剂作为信号基团,该基团特异性插入 DNA 双链的分子,通过检测这种插入基团的电化学氧化还原信号,可以感知 DNA 杂交反应的发生^[6~8]。Barton 和合作者通过电化学催化将插入剂的氧化还原反应放大,大大提高了这种 DNA 传感器的灵敏度,从而实现了单碱基错配的检测。但是插入剂基团难免会发生非特异的吸附,从而导致较大的本底信号^[9]。为了降低 DNA 传感器的本底信号,三明治夹心法 DNA 传感器被研发出来并最终得以商业化^[10,11]。夹心法 DNA 传感器需要引入两条分别与目标 DNA 两端杂交的探针,一条用于组装在电极表面,另一条用于电化提供学活性基团,或者能够催化电化学反应的酶,当有目标 DNA 存在时,通过 3 条 DNA 通过杂交形成三明治夹心结构,信号探针上的电化学活性基团或者酶提供可以被检测的电化学信号。

尽管以往的 DNA 传感器在灵敏度和特异性方面得到了较大的提高,实现了对 $10^{-12} \sim 10^{-15}$ mol/L 的目标 DNA 的高灵敏检测^[12~18],但是为了达到这样的灵敏度,传统的 DNA 传感器需要采用多种插入剂^[19]和复杂的催化放大步骤,或者需要引入一个信号探针序列。而基于 DNA 构型变化设计的生物传感器是一类操作简单、无标记的生物传感器^[20,21],该策略首先在电极表面固定一条特殊的 DNA 探针,目标物质的存在和结合将导致电极表面 DNA 探针构型发生变化,进而诱发一个可检测的电流信号变化。这种传感器操作简便,与传统生物传感器相比,是一种快速、无标记,并且操作方便、易实现重复使用的生物传感平台。

2 电化学生物传感器的基本类型

基于 DNA 构型变化设计的电化学生物传感器的核心部分是一条固定于电极表面的特殊 DNA 探针,当 DNA 探针与目标分子结合之后,会发生明显的构型改变,根据不同的检测原理,可以将这类传感器分成两种:一种是基于探针构型发生变化之后,导致探针一端的电化学修饰与电极的距离发生改变,或者说与电极接触的几率发生改变,从而影响电流信号大小;另外一种是基于扩散控制的电化学反应对

2010-10-18 收稿; 2011-03-20 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20725516)、国家质检总局科技计划项目(No. HOORJ906)和上海市科委科研计划项目(No. 10142201700)资助

* E-mail: fchh@sinap.ac.cn; rensz@simt.com.cn

表面探针的组装状态的敏感性,当电极表面的 DNA 探针的构型发生改变,组装层的厚度和密度发生改变,从而影响电化学扩散过程,使电流信号发生明显改变。

第一种传感器是在溶液相分子信标(Molecular beacon)基础上发展起来的。分子信标检测的核心内容是 DNA 杂交前后探针两端距离发生的明显改变。分子信标(图 1)是一种可以特异性识别核酸序列的荧光探针,它的中间一段可以与目标 DNA 特异性结合,称为环(Loop)区;它的两边可以相互杂交,称为茎(Stem)区。分子信标两端分别修饰一个荧光基团和一个淬灭基团。这种荧光探针通过与核酸靶分子进行杂交后发生构象的变化而发出荧光^[22,23]。分子信标具有背景信号低、灵敏度高、特异识别性强、操作简单、不必与未反应的探针分离即可实时检测,可用于活体分析等优点,因此提出之后很快在生物化学分析、生物医学研究和临床诊断中获得广泛的应用。

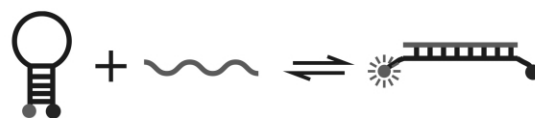


图 1 分子信标结构示意图

Fig. 1 Schematic diagrams of molecular beacon

受到溶液相分子信标的启发,2004 年, Fan 等^[24]成功设计了基于 DNA 构型变化的固相电化学 DNA 传感器(Electrochemical DNA, E-DNA)(图 2)。这种 E-DNA 体系由一条两端自配对形成茎环结构的 DNA 探针构成,探针一端修饰有巯基,用于组装于金电极表面,另一端修饰有具有电化学活性的标记作为信号基团,二茂铁基团(Ferrocene)和亚甲基蓝(Methylene blue)是常用的信号基团。无目标 DNA 存在时,电极表面的 DNA 探针两端互补形成茎环结构,从而将自由端的电化学活性基团拉近到电极表面,产生有效的电子传递过程。当加入目标 DNA 之后,探针的环区和目标 DNA 杂交形成更为稳定的刚性双链的结构,破坏原来的茎环结构,使电化学活性基团远离电极表面,降低由于电子传递产生的法拉第电流,而这种电流的降低与电极表面杂交反应的数量呈正比关系。该传感器成功实现了 10 pmol/L DNA 灵敏检测。该传感器虽然在灵敏度和信号模式(它属于信号抑制模式)等方面还存在需要改进之处,但是这种传感机制的提出为电化学 DNA 生物传感器的发展带来了新的思路。

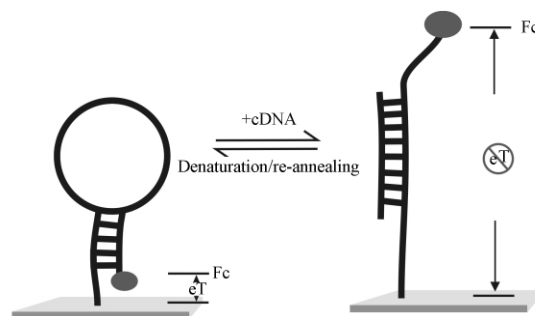


图 2 E-DNA 生物传感器示意图

Fig. 2 Schematic diagram of initial E-DNA biosensor

核心部分是茎环结构探针,该探针与目标 DNA 杂交前后结构发生明显改变。该方法成功实现了 10 pmol/L DNA 的检测。Kernel of sensor is a stem-loop probe, which will dramatically change its configuration. 10 pmol/L DNA detection was achieved.

近年来,核酸适配体(Aptamer)被设计成 DNA 探针,大大促进了该类传感器的发展。核酸适配体^[25]是一段 DNA(脱氧核糖核酸)或者 RNA(核糖核酸)序列,是利用体外筛选技术——指数富集的配体系统进化技术(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX),从核酸分子文库中得到的寡核苷酸片段^[26~29]。核酸适配体能与多种目标物质高特异性、高选择性地结合,因此被广泛应用于生物传感器领域^[30,31]。当核酸适配体与目标物质发生特异性结合时,核酸适配体自身的构型会随之发生变化。研究者把核酸适配体应用为探针,开发了很多基于核酸适配体的构型变化的电化学传感器,又称为 E-AB(Electrochemical aptamer-based)传感器,与电化学检测方法的结合使之具备便携化、操作简单、成本低等特点,所以 E-AB 传感器提高了核酸适配体在传感器领域的应用。

将核酸适配体探针应用到 E-DNA 传感器的设想最早是在 2003 年的美国科学院院刊(PNAS)论文中提出^[24],并于 2005 年在 Plaxco 实验室实现^[32]。该传感器将一段能够特异性和凝血酶结合的 DNA 序列(即凝血酶核酸适配体)两端分别修饰一个巯基和一个亚甲基蓝基团,利用巯基和金之间的共价结合,将凝血酶核酸适配体组装到金电极表面。在待测样品中无凝血酶时,核酸适配体呈松散的单链状态,末端的亚甲基蓝基团处于一定程度的自由状态,有机会接触到金电极表面,继而发生有效的电子传递过程,此时可以检测到一定的法拉第电流信号;当有目标物质凝血酶存在的时候,核酸适配体和凝血酶特异性结合,核酸适配体构型发生变化,末端修饰的 MB 基团和电极之间的距离发生变化,导致法拉

第电流减小。利用这种信号电流的减小,可以灵敏检测到 6.4 nmol/L 凝血酶,而且通过实验证明该探针不但可以重复利用,而且可以应用于血清样品的实际检测。这种传感策略有很多类似的应用,例如 Radi 等^[33]利用类似策略成功检测了 0.1 mmol/L K^+ ; Lai 等^[34]使用 E-AB 策略成功检测了 50 pmol/L 血小板源性生长因子(图3)。

核酸适配体 DNA 探针可以经过设计分成两段,而在靶标存在时可以使其粘合起来从而实现生物传感^[35]。最近 Zuo 等^[36]将核酸适配体 DNA 探针分成两段,一段固定在电极表面,一段修饰有亚甲基蓝基团。当目标分子存在时,两段 DNA 分别和目标分子结合形成“夹心结构”,亚甲基蓝被拉近电极表面,并产生可检测的法拉第电流信号(图4)。这种检测策略很像生物分析中常用的双抗体夹心检测,但对于某些小分子,难以提供双抗体需要的足够的结合位点,而核酸适配体却能够识别自己特异性的目标小分子。实验证明,分成两段的一条核酸适配体序列可以与目标分子形成稳定夹心结构,即使在电极表面,其结合常数也与溶液中相当。Zuo 的策略^[36]取得了很好的检测效果,其信号增益最高达到 1200%,这比之前的 E-AB 传感器有很大的提高。

以往的 E-AB 传感器使用一条探针,即使没有目标物质的存在,信号修饰基团始终在电极表面,这可能造成成本升高,而 Zuo 的策略^[36]在牺牲一定操作便捷性的前提下,实现了检测效果的大幅度提高。2010 年 Du 等^[37]通过层层重叠(Layer-by-layer)的方法,首先将二茂铁-聚乙烯和纳米金胶混合组装于电极表面,然后在其上组装可卡因核酸适配体片段 1,继而进行可卡因的捕获。当体系中存在可卡因分子和核酸适配体片段 2 时,它们会和探针形成三聚体(图4),并且对二茂铁的电化学信号产生影响,通过检测 DPV(微分脉冲伏安分析)信号,实现了 0.1 mmol/L 可卡因的灵敏检测。

第二类基于 DNA 构型设计的生物传感器,是利用了 DNA 构型变化对溶液中的电化学信号分子(例如铁氰化钾)扩散过程的影响。很早以前,研究者就发现电极表面的 DNA 探针杂交前后,表面的组装情况发生变化,可以影响电化学信号分子的扩散,宏观上导致电流信号的改变^[38]。而最早将 DNA 分子构型改变引入这种传感机理的,是 DNA 分子纳米仓的研究。2007 年, Mao 等^[39]提出将具有特殊序列的 DNA 单链探针固定到电极表面,这种探针末端的 i-motif 结构对溶液 pH 值改变很敏感,当 pH 值改变,这种探针构型发生相应变化,利用 DNA 探针堆积效果,可以将电化学信号分子限制在电极表面的组装层内部(图5)。这种宏观上可以观察到的电流信号改变,证明所有的 DNA 探针非常迅速的对 pH 值改变作出响应,并且相互之间协同一致。

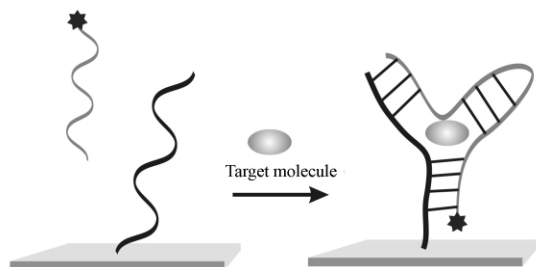


图4 基于一条核酸适配体探针的夹心法电化学检测策略^[37]

Fig. 4 A new electrochemical sandwich assay approach based on single aptamer sequences and capable of detecting small molecule targets^[37]

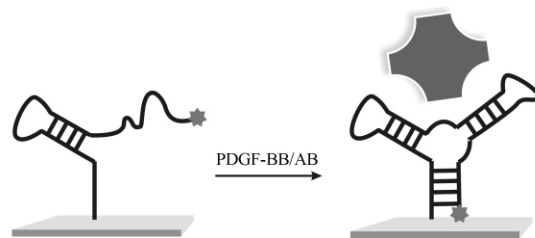


图3 将一端修饰 MB 基团的核酸适配体 DNA 组装到电极表面,构建以血小板源性生长因子蛋白为目标物质的 E-AB 生物传感器^[34]

Fig. 3 Electrochemical aptamer (E-AB)-based platelet-derived growth factor (PDGF) sensor fabricated by self-assembly of an methylene blue (MB)-labeled aptamer on a gold electrode surface^[34]

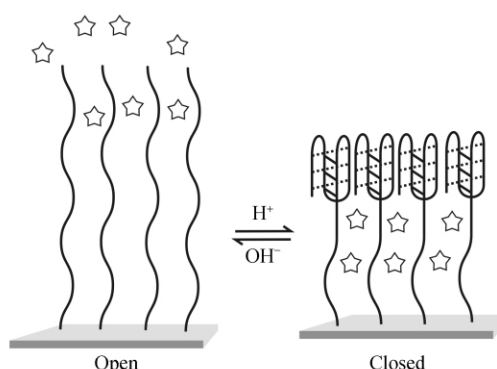


图5 DNA 纳米仓工作原理

Fig. 5 Working principle of switching DNA nanocontainer

G 四面体(G-quadruplex)也是一个很好的例子,富含鸟嘌呤(Guanine)的 DNA 序列在某些金属阳离子作用下可以形成四面体结构,当组装到电极表面,这种构型变化也可以用来控制电化学信号分子扩散。Zhang 等^[40]首先在电极表面组装富含鸟嘌呤的 DNA 探针(图 6),当加入 K^+ ,探针折叠形成四面体结构,由于构型发生明显变化,自组装层的厚度和密度发生变化,从而影响系统中 $Fe(CN)_6^{4-}$ 在电极表面的扩散,通过电化学分析成功实现了 K^+ 的无标记检测。此后 Zhang 等^[41]采用同类方法实现了 Tb^{3+} 的检测。

上述第二类基于 DNA 构型变化的电化学生物传感器,利用对电极表面扩散过程的影响,成功地实现了无标记检测,具有重复利用的前景,但是需要对 DNA 探针的组装状态进行精密控制,而且该类传感器对反应速度有较高要求,需要探针的构型变化迅速并一致,这样才能形成可以检测的电流信号变化。而且这类检测策略的特异性不高,因此该方法的发展受到一定限制。

而第一类基于 DNA 构型变化的电化学生物传感器,利用的是电化学标记与电极表面距离的改变,不但灵敏度更高,而且不需要添加外源试剂,可以直接用于实际样品的检测,符合电化学生物传感器发展需求。该策略具有更好的普适性,因此在后来的发展中吸引了更多的科研兴趣,成为基于构型变化设计的电化学生物传感器的主要发展方向。因此本文中主要综述了第一类传感策略。

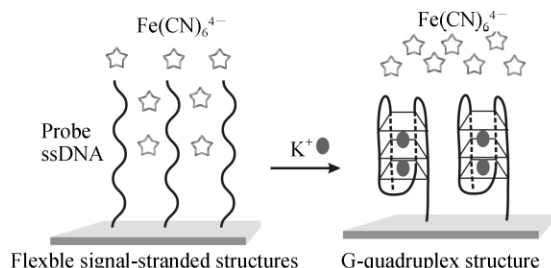


图 6 无标记 K^+ 电化学生物传感器原理示意图

Fig. 6 Schematic diagram of reagentless K^+ electrochemical biosensor

3 分析机理与条件优化

对于第一类基于 DNA 构型变化的电化学生物传感器,检测的核心内容是电化学标记物与电极表面的距离的改变,当距离达到足够远,就会破坏隧穿电流所需要的距离,从而实现对电流信号的抑制^[24, 42]。研究者也基于该类传感器提出了一系列新的设计,以实现不同的传感策略,但是 DNA 探针末端和电极表面距离的调控始终是该类传感器的关键。研究者通过试验探索,提出了提高检测信噪比的不同优化方法。

首先是控制探针组装密度。DNA 探针是 E-DNA 传感器的重要组成部分,它们在电极表面的状态直接影响到目标物质的结合,因此对探针在电极表面的组装密度(单位面积上组装的探针的量)的控制对传感策略的优化和机理的研究有重要意义。Ricci 等^[43]对探针组装密度做了详尽的研究,对于 E-DNA 传感器,信号抑制比例与目标 DNA 的存在有直接关系,研究发现信号抑制比例随探针密度的改变呈现有规律的变化:在密度较小时,得到的信号抑制比例随探针密度的增加而略有减小,可能这种减小是由于探针数量的增加造成对目标 DNA 的空间排斥,影响杂交效率;当组装密度继续增加,超过一个转折点之后,信号抑制比例明显随探针密度增加而增大(图 7)。

经过计算,处于这个转折点的探针密度,相当于探针之间的距离接近探针的长度(约 8 nm)。显然,当探针密度增大到超过转折点,即探针之间的距离小于探针本身的长度,探针和目标 DNA 杂交形成双链之后, DNA 分子的堆积阻止了刚性的双螺旋结构倒伏到电极表面,而且随着探针密度的增加,双链倒伏的几率减小。这个结果说明,探针组装密度低时,信号抑制不够大的主要原因是即使发生杂交反应,但双链有机会倒伏在电极表面,使电化学修饰物与电极表面接触并发生电子传递,产生假阳性信号。White 等^[44]研究了 E-AB 传感器的条件优化。可卡因传感器和凝血酶传感器是两种经典的 E-AB 传感器,以这两种传感器为例,Plaxco 等研究了探针表面组装密度和组装层厚度等条件对检测效果的影响。他们发现,当探针之间的距离估算值与适配体大小相当时,检测效果最好,这与理论预期十分吻合。

其次,优化分析方法也是得到更大信噪比的重要途径。基于 DNA 构型变化设计的生物传感器的另一个重要理论基础是,在电极表面的 DNA 探针在与目标物质结合之后,其柔性或者说可弯曲性发生显著改变。众所周知,自由单链、具有二级结构的 DNA 链、与目标物质结合之后的核酸适配体、DNA 双螺

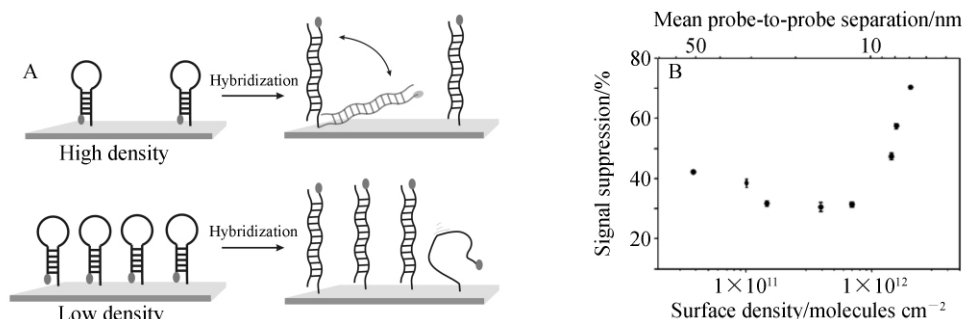


图7 A: 当电极表面 DNA 组装密度小,即使杂交之后双链也容易发生倒伏,影响电流信号抑制比例;当组装密度大时,虽然会影响到 DNA 杂交效率,但是依靠 DNA 堆积效果,双链 DNA 不会倒伏,所以电流信号抑制比例增大;B: E-DNA 传感器信号抑制比例与探针表面组装密度的关系,其中转折点处的 DNA 密度对应的 DNA 探针分子间距离正好与探针长度相当^[43]

Fig. 7 A: Double-stranded DNA may have chance to lie down and let the redox label collide with electrode surface and transfer the electrons for a low density, but when the DNA density is high in contrast, the double-stranded DNA will be stopped by the molecular crawling effect leading to a higher signal suppression. B: E-DNA signaling is dependent on the molecular density of the probe DNA, the signal suppression gets to a turning point at a mean DNA separation which is corresponding to the length of the target-probe duplex^[43]

旋等具有完全不同的柔性,影响了探针上的电化学修饰的自由度^[45],从而改变电化学反应中的电子传递速率。White 等^[46]采用 SWV(方波伏安)分析方法考察了多种此类生物传感器,利用 SWV 方法对电子传递速率的敏感性,研究了 SWV 扫描频率对信噪比的影响,发现扫描频率的改变不仅对信噪比大小有重要影响,甚至会改变传感模式,在超过(或低于)某个极限频率时,传感器会从信号增益模式(Signal-on)变成信号衰减模式(Signal-off),或者发生相反的变化。

4 信号增益(Signal-on)模式

早期的 E-DNA 传感器是信号衰减(Signal-off)模式,即杂交反应发生会导致电化学氧化还原电流的减小。从一开始研究者就注意到这种模式有不能避免的弊端:首先,这种信号减小模式的传感器会受到假阳性的影响,例如不可避免地存在于样品中的污染物会降解 DNA 探针。其次,这种模式下,目标 DNA 杂交所带来的电化学信号抑制最多也只能达到本底信号的 100%,所以 Signal-off 传感器的灵敏度会受到限制。为了改进 E-DNA 检测策略,研究者提出了新的信号增益(Signal-on)模式,即当目标物质存在时,电化学氧化还原信号会相应的增加,这种 Signal-on 模式的传感器,理论上可以实现阳性信号的任意倍数的增长,而且很好地避免了假阳性的产生。

第一种实现信号增益模式的方法,就是通过 DNA 探针设计^[47]。最早的 Signal-on 模式的 E-DNA 是由 Immoos 等提出的^[48],这种 E-DNA 传感器使用的探针是用由一段 PEG(聚乙二醇)连接两段 DNA 片段组成,下端用于电极表面固定,上端修饰有具有电化学活性的二茂铁基团,目标 DNA 不存在时,E-DNA 探针是以自由松散的结构存在,探针末端的二茂铁基团远离金电极表面;而当目标 DNA 存在时,会同时和两段 DNA 探针杂交配对,形成环状结构,将探针末端的二茂铁基团拉近到电极表面,最多可以产生 600% 的阳性电流信号增益。

Wu 等^[49]利用连接酶作用设计了一种新的信号增益模式 DNA 电化学传感器,他们将茎环结构探针分成两段,一段是固定到电极表面的捕获探针,另一段是修饰有二茂铁基团的信号探针,目标 DNA 可以和两条探针分别杂交,形成一条有切口的 DNA 双链,这时连接酶就可以将两条探针连接起来,在去除目标 DNA 之后,探针两端互补形成茎环结构,将二茂铁带到电极表面,并传输电子产生电流信号;如果没有目标 DNA 或者在切口位置存在错配,信号探针就将在清洗步骤被清除。该传感器是信号增益模式,而且通过连接酶作用原理,很好地消除了本底信号,实现了单碱基错配的检测。Zhang 等^[50]在腺苷酸适配体探针序列上添加了一段 EcoRI 限制性内切酶识别序列,在没有目标物质的情况下,电极表面的 DNA

探针自身形成茎环结构,并形成一个酶切位点,在内切酶作用下,探针被切断,从而将末端修饰的二茂铁基团去除;当腺苷酸和适配体结合导致探针构型改变,酶切位点被破坏,通过二茂铁的电化学反应可进行腺苷酸的灵敏检测。

Zhang 等^[51]利用两个适配体探针对同一个目标蛋白分子的同时识别,提出了亲和依赖表面杂交检测策略,成功构建了血小板源性生长因子-B(PDGF-BB)的信号增益模式电化学生物传感器。该传感器采用一条特殊的 DNA 探针,探针的 3' 端是一段 PDGF 适配体,可以和目标蛋白特异性结合;而探针 5' 端修饰有二茂铁基团,用来输出电化学信号。首先在电极表面组装一条 8 个碱基长的短链 DNA 捕获探针,捕获探针可以和适配体探针的 5' 末端互补杂交,但是由于互补片段长度太短,所以熔炼温度低于 20 °C,难以稳定。但是在目标蛋白存在的情况下,两条适配体探针可以同时和蛋白结合形成三聚体,然后再和电极表面的捕获探针同时杂交,这样可以达到更高的稳定性。杂交反应发生之后,二茂铁修饰被带到电极表面,传递电子而产生可检测的电流信号(图 8)。这类传感器的探针设计非常精巧和复杂,而探针的制备也有一定难度。

第二种实现信号增益模式的方法是取代法。取代法的引入使得 Signal-on 模式的 E-DNA 传感器有了新的发展。在 2006 年, Xiao 等提出了另一种 Signal-on 传感器^[52],这种传感器在电极表面固定双链 DNA 探针, DNA 双螺旋结构具有刚性结构,修饰于 DNA 探针末端的电化学活性基团远离电极表面。即在没有目标 DNA 存在的情况下,捕获探针和信号探针分别在上端和下端互补杂交,中间存在一段错配区域;当目标 DNA 存在时,目标 DNA 和捕获探针的上端互补杂交,从而将信号探针修饰有亚甲基蓝的一端取代下来,产生一段半游离的单链 DNA,增加了亚甲基蓝和电极表面接触的机会,提高了电化学氧化还原电流。这种 Signal-on 传感器得到最大 700% 的阳性电流信号增益,相应的检测灵敏度也达到了 400 fmol/L。但是采用取代法也给 E-DNA 传感器带来了不可避免的问题:这种传感器不能重复利用,因为在信号探针和捕获探针的互补杂交不够稳定,试图破坏目标 DNA 和捕获探针的杂交的同时,也会破坏两种探针之间的杂交;而且实验证明这种传感器在较为复杂的实际体系中的使用也受到严重的限制。

Xiao 等^[53]提出了一种新颖的基于部分取代法的 E-DNA 传感器,这种传感器的设计源于 RNA “假结”(一种 RNA 三级结构,一个茎环结构的环区又和茎末端的多余的 DNA 片段互补形成第二个茎环)。当目标 DNA 不存在时,组装于电极表面的探针形成“假结”结构,修饰在探针末端的亚甲基蓝被固定于远离电极表面的环区域,当发生目标 DNA 和环区杂交反应时,修饰有亚甲基蓝的探针末端被取代下来,“假结”结构被打开,产生一段自由的探针末端,使得亚甲基蓝有机会接近电极表面,发生电子传递反应。这种传感器操作方便、可重复利用,而且实验证明该策略在血清直接检测过程中仍然有足够的选择性,但是这种传感器只得到 100% 的阳性电流信号增益,检测灵敏度只达到 2 nmol/L。Xiao 等的工作通过引入取代法,实现了信号增益的传感模式,但是这些工作始终没能完全脱离对探针的复杂改造,限制了该类传感器的灵敏度和分析方法的普适性。

Zuo 等^[54]将取代法应用到 E-AB 传感器中,提出“目标响应电化学核酸适配体开关”传感器(TREAS, target-responsive electrochemical aptamer switch)灵敏检测 ATP(图 9),这种 E-AB 传感器在多方面得到改良和提高。核酸适配体修饰有巯基和二茂铁基团,和配对的 DNA 杂交之后,利用金和巯基之间的共价键将双链组装到电极表面,这是由于刚性双链螺旋的限制,二茂铁基团远离金电极,破坏了电子传递过程;当有目标物质 ATP 存在时,由于 ATP 和核酸适配体的结合常数更大,所以 ATP 取代配对 DNA 的位置而与核酸适配体结合, DNA 双螺旋变成核酸适配体三级结构,二茂铁基团被拉近电极表面,发生电子传递过程。这种传感器是信号增益模式,而且有更加明确的开和关的定义,这种传感器普

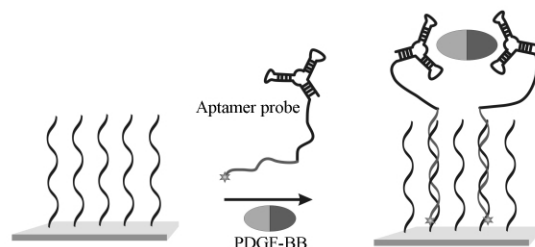


图 8 基于亲和依赖表面杂交检测策略的电化学生物传感器

Fig. 8 Electrochemical detection strategy based on proximity-dependent surface hybridization assay

适性得到大大的提高,因为这种传感器适用于各种核酸适配体,而不像以前的 E-AB 传感器需要根据不同的核酸适配体的构型变化重新设计传感策略。该方法可以灵敏检测 10 nmol/L ATP,而且具有很好的特异性,在同样浓度的 GTP,UTP 和 CTP 混合溶液中未发现明显非特异信号。2008 年,Lu 等^[55]开发了类似的方法。最近,Zhou 等^[56]利用三维有序大空纳米金膜电极和量子点,实现了适体 DNA 取代法检测 ATP,并且灵敏度得到进一步提高。

第三种实现信号增益的方法是利用空间位阻效应。Liu 等提出了一种新的 Signal-on 传感器^[57],这种新的策略采用酶催化的电化学氧化还原反应作为信号(图 10)。首先通过共价连接,在电极表面固定一层链霉亲和素,具有茎环结构的探针一端修饰有生物素,利用链霉亲和素和生物素之间的特异性结合,将探针固定到电极表面;探针另一端修饰有地高辛。当没有目标 DNA 存在时,探针形成茎环结构,末端的地高辛受到松散环区 DNA 以及电极表面的共同的空间保护作用,而不能与溶液中的物质发生反应;当目标 DNA 与探针的环区杂交,茎环被破坏,变成刚性双螺旋结构,探针末端的地高辛可以自由与溶液中的修饰有地高辛抗体的辣根过氧化物酶结合,从而产生基于辣根过氧化物酶的催化电流。这种新的 Signal-on 传感器,不但避免了复杂的 DNA 探针结构设计,而且实现了高灵敏度 DNA 检测,检测灵敏度达到 10 fmol/L。经过实验验证,这种传感器可以成功检测 PCR 扩增产物,使用 0.03 ng 模板扩增的产物能够被检出。而且通过采用集成化电化学芯片,实现了多样品同时检测。Mao 等也研究了类似的生物传感策略,并实现了单碱基错配检测^[58]。Wei 等采用类似的方法实现了对白细胞间介素 mRNA 的 0.4 fmol/L 的灵敏检测,在不需借助 PCR 扩增的条件下,对内源 mRNA 的检测灵敏度可以达到临床口腔诊断的需求^[59]。

这类传感器的核心是利用了组装层与电极表面共同形成的空间位阻效应^[60],探针末端接近电极表面时,相当于与本体溶液隔离,不能接近溶液中的电化学标记分子;只有当探针与目标物质结合导致构型发生变化,探针末端的亲和基团才能捕获溶液中的电化学标记分子,并产生相应的电流信号。这种方法不但巧妙实现了信号增益模式,而且在灵敏度和实用性方面都有很好的表现。通过引入适当的信号放大手段,例如纳米粒子信号扩增,将会进一步提高检测灵敏度。

5 结 语

基于 DNA 构型变化的电化学生物传感器,大多不需要外源试剂,设计和使用非常方便,适合于现场检测,代表了生物传感器发展的一个重要方向。DNA 核酸适配体的筛选过程较抗体的制备更简单方便,而 DNA 分子合成和纯化技术的发展更方便了探针设计,这些都大大促进了 DNA 构型变化在电化学生物传感领域的应用。而且这种方法具有广泛的普适性,通过修改探针序列或者引入不同的核酸适配体,便能够广泛适用于从小分子到蛋白,甚至细胞^[52]等待测物质。与传统的电化学方法不同,E-DNA 生

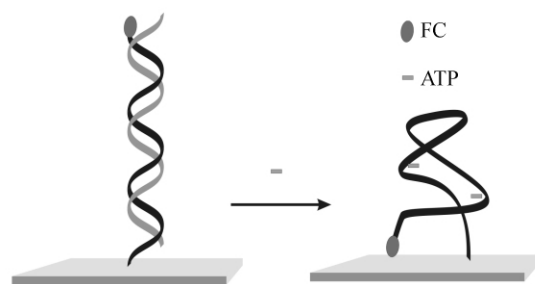


图9 一开始核酸适配体探针和互补 DNA 杂交形成刚性双链,二茂铁基团远离电极表面,此时传感器处于关闭状态,当 ATP 存在并与探针结合,探针发生构型变化,电化学修饰靠近电极,产生电化学信号,此时传感器处于打开状态

Fig. 9 In the initial state, the adenosine triphosphate (ATP) aptamer forms a duplex and ferrocene is distal to the electrode surface (et OFF; et stands for electron transfer); after reaction with ATP, the aptamer forms a tertiary structure with ATP and liberates its complementary strand. Ferrocene is proximal to the electrode surface (et ON) in this state

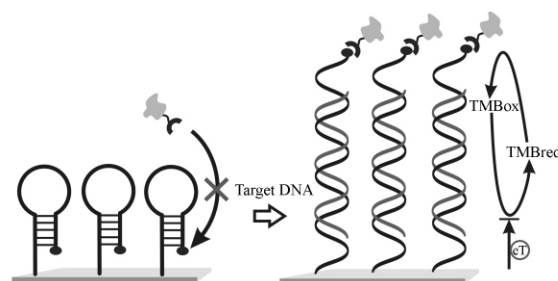


图10 酶催化 DNA 电化学生物传感器示意图

Fig. 10 Scheme for enzyme-based E-DNA sensor

物传感器主要依赖探针的构型变化,因此避免了由于非特异性吸附造成的本底信号,可以达到足够高的特异性。很多 E-DNA 电化学生物传感器实现了对实际样品的检测。E-DNA 电化学生物传感器将有可能在医疗诊断、军事反恐和环境监测等领域得到广泛应用。未来这一类传感器研究可能集中在几个方面:(1) 目前很多基于核酸适配体的传感器信噪比相对较低,根本原因是现有的适配体与目标物质的亲和常数较小,因此需要通过探针筛选和反应条件优化,实现探针与目标物质更好、更特异的结合;(2) 通过多种 DNA 探针的同时组装和协同作用^[61],可以实现多目标物质同时检测,例如 Xia 等^[62]在电极表面同时组装了可卡因适体探针和以 *gyrB* 基因为目标的茎环探针,利用目标物质结合导致的探针构型变化,并结合尿素的解链作用,成功提出了一种异或逻辑门设计;(3) 研究新的探针组装方法和信号放大方法,进一步提高检测的灵敏度。在这方面,新型纳米材料的应用已经成为研究热点^[63~66]。最新的研究表明,很多纳米材料在应用到电化学 DNA 传感器领域时,具有特殊的优势或表现出很好的应用前景。本课题组发现,当 DNA 杂交过程发生在尺度只有 100 nm 左右的针尖纳米电极表面时,电化学检测的本底信号大大降低,而且由于空间位阻减小,DNA 杂交效率得到提高^[67]。如果将纳米电极与适配体探针结合起来,必将提高检测性能,而且有可能应用到微小环境中(例如细胞内)实时检测;纳米金^[35, 68, 69]有很好的信号放大性能^[70~73],已经在生物传感器中广泛应用^[23, 74~76],如果应用于基于 DNA 构型变化的电化学生物传感器,可以进一步提高检测灵敏度;单层石墨烯^[77]和碳纳米管^[78~80]等碳纳米材料具有很好的 DNA 组装性能,单层石墨烯可以应用于 DNA 杂交检测以及 DNA 构型变化的区分^[81],如果应用于 DNA 电化学传感器,将有可能提高 DNA 组装效果或研究无标记检测方法。

References

- 1 Cao Y C, Jin R, Mirkin C A. *Science*, **2002**, 297(5586): 1536 ~ 1540
- 2 Gaylord B S, Heeger A J, Bazan G C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2002**, 99(17): 10954 ~ 10957
- 3 Endo T, Kerman K, Nagatani N, Takamura Y, Tamiya E. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(21): 6976 ~ 6984
- 4 Cooper M A, Dultsev F N, Minson T, Ostanin V P, Abell C, Klennerman D. *Nat. Biotechnol.*, **2001**, 19(9): 833 ~ 837
- 5 Ray A, Norden B, Kasemo B. *Langmuir*, **2001**, 17(26): 8305 ~ 8312
- 6 Carter M T, Bard A J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109(24): 7528 ~ 7530
- 7 Rodriguez M, Bard A J. *Anal. Chem.*, **1990**, 62(24): 2658 ~ 2662
- 8 Millan K M, Mikkelsen S R. *Anal. Chem.*, **1993**, 65(17): 2317 ~ 2323
- 9 Kelley S O, Boon E M, Barton J K, Jackson N M, Hill M G. *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27: 4830 ~ 4837
- 10 Yu C J, Wan Y, Yowanto H, Li J, Tao C, James M D, Tan C L, Blackburn G F, Meade T J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123(45): 11155 ~ 11161
- 11 Umek R M, Lin S W, Vielmetter J, Terbruggen R H, Irvine B, Yu C J, Kayyem J F, Yowanto H, Blackburn G F, Farkas D H, Chen Y P. *J. Mol. Diagn.*, **2001**, 3(2): 74 ~ 84
- 12 Gore M R, Szalai V A, Ropp P A, Yang I V, Silverman J S, Thorp H H. *Anal. Chem.*, **2003**, 75(23): 6586 ~ 6592
- 13 Le Floch F, Ho H A, Harding-Lepage P, Bedard M, Neagu-Plesu R, Leclerc M. *Advanced Materials*, **2005**, 17(10): 1251 ~ 1254
- 14 Gibbs J M, Park S J, Anderson D R, Watson K J, Mirkin C A, Nguyen S B T. *Science*, **1997**, 277: 1078 ~ 1081
- 15 Kim E, Kim K, Yang H, Kim Y T, Kwak J. *Anal. Chem.*, **2003**, 75(21): 5665 ~ 5672
- 16 Kerman K, Kobayashi M, Tamiya E. *Meas. Sci. Technol.*, **2004**, 15: R1 ~ R11
- 17 Wang J, Polsky R, Merkoci A, Turner K L. *Langmuir*, **2003**, 19(4): 989 ~ 991
- 18 Hwang S, Kim E, Kwak J. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(2): 579 ~ 584
- 19 Ting B P, Zhang J, Gao Z, Ying J Y. *Biosensors and Bioelectronics*, **2009**, 25(2): 282 ~ 287
- 20 Miranda-Castro R, de los Santos-Alvarez N, Lobo-Castanon M J, Miranda-Ordieres A J, Tunon-Blanco P. *Electroanalysis*, **2009**, 21(19): 2077 ~ 2090
- 21 Li D, Song S P, Fan C H. *Accounts Chem. Res.*, **2010**, 43(5): 631 ~ 641
- 22 Tyagi S, Kramer F R. *Nat. Biotechnol.*, **1996**, 14(3): 303 ~ 308

- 23 Song S , Liang Z , Zhang J , Wang L , Li G , Fan C. *Angewandte Chemie (International Ed.)* , **2009** , 48(46) : 8670 ~ 8674
- 24 Fan C , Plaxco K W , Heeger A J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , **2003** , 100(16) : 9134 ~ 9137
- 25 Song S P , Wang L H , Li J , Zhao J L , Fan C H. *Trac-Trend Anal. Chem.* , **2008** , 27(2) : 108 ~ 117
- 26 Ellington A D , Szostak J W. *Nature* , **1990** , 346(6287) : 818 ~ 822
- 27 Tuerk C , Gold L. *Science* , **1990** , 249(4968) : 505 ~ 510
- 28 Joyce G F. *Nature* , **2002** , 418: 214 ~ 221
- 29 Krum H , Jackson B , Conway E L , Howes L G , Johnston C I , Louis W J. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* , **1992** , 20(3) : 451 ~ 457
- 30 Hamaguchi N , Ellington A , Stanton M. *Anal. Biochem.* , **2001** , 294(2) : 126 ~ 131
- 31 Dittmer W U , Reuter A , Simmel F C. *Angewandte Chemie (International ed)* , **2004** , 43(27) : 3550 ~ 3553
- 32 Xiao Y , Lubin A A , Heeger A J , Plaxco K W. *Angewandte Chemie (International ed)* , **2005** , 44(34) : 5456 ~ 5459
- 33 Radi A E , O'Sullivan C K. *Chem. Commun.* , **2006** , (32) : 3432 ~ 3434
- 34 Lai R Y , Plaxco K W , Heeger A J. *Anal. Chem.* , **2007** , 79(1) : 229 ~ 233
- 35 Zhang J , Wang L , Pan D , Song S , Boey F Y , Zhang H , Fan C. *Small* , **2008** , 4(8) : 1196 ~ 1200
- 36 Zuo X , Xiao Y , Plaxco K W. *J. Am. Chem. Soc.* , **2009** , 131(20) : 6944 ~ 6945
- 37 Du Y , Chen C , Yin J , Li B , Zhou M , Dong S , Wang E. *Anal. Chem.* , **2010** , 82(4) : 1556 ~ 1563
- 38 Mao Y , Luo C , Deng W , Jin G , Yu X , Zhang Z , Ouyang Q , Chen R , Yu D. *Nucleic Acids Research* , **2004** , 32(19) : e144
- 39 Mao Y , Liu D , Wang S , Luo S , Wang W , Yang Y , Ouyang Q , Jiang L. *Nucleic Acids Research* , **2007** , 35(5) : e33
- 40 Zhang J , Wan Y , Wang L H , Song S P , Li D , Fan C H. *Electrochem. Commun* , **2008** , 10(9) : 1258 ~ 1260
- 41 Zhang J , Chen J H , Chen R C , Chen G N , Fu F F. *Biosensors & Bioelectronics* , **2009** , 25(2) : 378 ~ 382
- 42 Immoos C E , Lee S J , Grinstaff M W. *Chembiochem.* , **2004** , 5(8) : 1100 ~ 1103
- 43 Ricci F , Lai R Y , Heeger A J , Plaxco K W , Sumner J J. *Langmuir* , **2007** , 23(12) : 6827 ~ 6834
- 44 White R J , Phares N , Lubin A A , Xiao Y , Plaxco K W. *Langmuir* , **2008** , 24(18) : 10513 ~ 10518
- 45 Ikeda R , Kobayashi S , Chiba J , Inouye M. *Chemistry* , **2009** , 15(19) : 4822 ~ 4828
- 46 White R J , Plaxco K W. *Anal. Chem.* , **2009** , 82(1) : 73 ~ 76
- 47 Xiao Y , Lou X H , Uzawa T , Plakos K J I , Plaxco K W , Soh H T. *J. Am. Chem. Soc.* , **2009** , 131(42) : 15311 ~ 15316
- 48 Immoos C E , Lee S J , Grinstaff M W. *J. Am. Chem. Soc.* , **2004** , 126(35) : 10814 ~ 10815
- 49 Wu Z S , Jiang J H , Shen G L , Yu R Q. *Hum Mutat* , **2007** , 28(6) : 630 ~ 637
- 50 Zhang S B , Hu R , Hu P , Wu Z S , Shen G L , Yu R Q. *Nucleic Acids Research* , **2010** , 38(20) : 1 ~ 8
- 51 Zhang Y L , Huang Y , Jiang J-H , Shen G-L , Yu R-Q. *J. Am. Chem. Soc.* , **2007** , 129(50) : 15448 ~ 15449
- 52 Xiao Y , Lubin A A , Baker B R , Plaxco K W , Heeger A J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , **2006** , 103(45) : 16677 ~ 16680
- 53 Xiao Y , Qu X , Plaxco K W , Heeger A J. *J. Am. Chem. Soc.* , **2007** , 129(39) : 11896 ~ 11897
- 54 Zuo X , Song S , Zhang J , Pan D , Wang L , Fan C. *J. Am. Chem. Soc.* , **2007** , 129(5) : 1042 ~ 1043
- 55 Lu Y , Li X C , Zhang L M , Yu P , Su L , Mao L Q. *Anal. Chem.* , **2008** , 80(6) : 1883 ~ 1890
- 56 Zhou J J , Huang H P , Xuan J , Zhang J R , Zhu J J. *Biosensors & Bioelectronics* , **2010** , 26(2) : 834 ~ 840
- 57 Liu G , Wan Y , Gau V , Zhang J , Wang L , Song S , Fan C. *J. Am. Chem. Soc.* , **2008** , 130(21) : 6820 ~ 6825
- 58 Mao X , Jiang J , Xu X , Chu X , Luo Y , Shen G , Yu R. *Biosens. Bioelectron.* , **2008** , 23(10) : 1555 ~ 1561
- 59 Wei F , Wang J , Liao W , Zimmermann B G , Wong D T , Ho C M. *Nucleic Acids Research* , **2008** , 36(11) : e65
- 60 Wei F , Ho C M. *Anal. Bioanal. Chem.* , **2009** , 393(8) : 1943 ~ 1948
- 61 Xie S N , Walton S P. *Biosensors & Bioelectronics* , **2010** , 25(12) : 2663 ~ 2668
- 62 Xia F , Zuo X , Yang R , White R J , Xiao Y , Kang D , Gong X , Lubin A A , Vallee-Belisle A , Yuen J D , Hsu B Y , Plaxco K W. *J. Am. Chem. Soc.* , **2010** , 132(25) : 8557 ~ 8559
- 63 Gerasimov J Y , Lai R Y. *Chem. Commun.* , **2010** , 46(3) : 395 ~ 397
- 64 Wu Z , Zhen Z , Jiang J H , Shen G L , Yu R Q. *J. Am. Chem. Soc.* , **2009** , 131(34) : 12325 ~ 12332
- 65 Ding C , Ge Y , Lin J M. *Biosens. Bioelectron.* , **2009** , 25(6) : 1290-1294

- 66 Mi L J , Zhang X , Yang W C , Wang L H , Huang Q , Fan C H , Hu J. *J. Nanosci. Nanotechnol.* , **2009** , 9(4) : 2247 ~ 2255
- 67 Liu G , Sun C F , Li D , Song S P , Mao B W , Fan C H , Tian Z Q. *Advanced Materials* , **2010** , 22(19) : 2148 ~ 2150
- 68 Wang J , Wang L H , Liu X F , Liang Z Q , Song S P , Li W X , Li G X , Fan C H. *Advanced Materials* , **2007** , 19(22) : 3943 ~ 3049
- 69 Zhang J , Song S , Wang L , Pan D , Fan C. *Nature Protocols* , **2007** , 2(11) : 2888 ~ 2895
- 70 Li J , Song S P , Liu X F , Wang L H , Pan D , Huang Q , Zhao Y , Fan C H. *Advanced Materials* , **2008** , 20(3) : 497 ~ 500
- 71 Zhu Z , Su Y , Li J , Li D , Zhang J , Song S , Zhao Y , Li G , Fan C. *Anal. Chem.* , **2009** , 81(18) : 7660 ~ 7666
- 72 Li J , Song S P , Li D , Su Y , Huang Q , Zhao Y , Fan C H. *Biosensors & Bioelectronics* . **2009** , 24(11) : 3311 ~ 3315
- 73 Zhang J , Song S P , Zhang L Y , Wang L H , Wu H P , Pan D , Fan C H. *J. Am. Chem. Soc.* , **2006** , 128(26) : 8575 ~ 8580
- 74 Li X M , Liu J M , Zhang S S. *Chem. Commun.* , **2010** , 46(4) : 595 ~ 597
- 75 Wang L H , Liu X F , Hu X F , Song S P , Fan C H. *Chem. Commun.* , **2006** , (36) : 3780 ~ 3782
- 76 He S J , Li D , Zhu C F , Song S P , Wang L H , Long Y T , Fan C H. *Chemical Communications* , **2008** , (40) : 4885 ~ 4887
- 77 Zuo X L , He S J , Li D , Peng C , Huang Q , Song S P , Fan C H. *Langmuir* , **2010** , 26(3) : 1936 ~ 1939
- 78 Chen H , Zuo X , Su S , Tang Z , Wu A , Song S , Zhang D , Fan C. *Analyst* , **2008** , 133(9) : 1182 ~ 1186
- 79 Zuo X L , Peng C , Huang Q , Song S P , Wang L H , Li D , Fan C H. *Nano. Res.* , **2009** , 2(8) : 617 ~ 623
- 80 Luo C , Zuo X , Wang L , Wang E , Song S , Wang J , Fan C , Cao Y. *Nano. Lett.* , **2008** , 8(12) : 4454 ~ 4458
- 81 He S , Song B , Li D , Zhu C , Qi W , Wen Y , Wang L , Song S , Fang H , Fan C. *Advanced Functional Materials* , **2010** , 20(3) : 453 ~ 459

Deoxyribonucleic Acid Molecular Design for Electrochemical Biosensors

LIU Gang^{1, 2} , WAN Ying² , ZOU Zi-Ying¹ , REN Shu-Zhen^{* 1} , FAN Chun-Hai^{* 2}

¹(Shanghai Institute of Measurement and Testing Technology , Shanghai 2102053)

²(Laboratory of Physical Biology , Shanghai Institute of Applied Physics ,

Chinese Academy of Sciences , Shanghai 201800)

Abstract A new electrochemical biosensors based on the DNA configuration switch was represented in this review. Special DNA probes (stem-loop or aptamers etc.) on the electrode surface dramatically change their configuration on the combination of target molecular giving birth to a detectable electrochemical signal. This strategy attracts extensive research interesting for its easier operation and less unspecific absorption , To this day , its analysis performance has been markedly developed with an expanding application. Here , we summarize the history of these sensors.

Keywords Eletrochemical biosensor; Deoxyribonucleic acid biosensor; Aptamer; Molecular beacon; Review

(Received 18 October 2010; accepted 20 March 2011)