

玻璃纳米孔洞电极的制备及对环糊精单分子的检测

李国霞 张志翔 林祥钦*

(中国科学技术大学化学系,合肥 230026)

摘 要 采用玻璃毛细管融封后打磨,直接得到了纳米孔洞玻璃电极。此电极洞壁厚实坚固,容易操作,电流噪声低,可实现对 β -环糊精单个分子的检测。发现单个环糊精分子可以产生清晰分辨的两种幅度的电流脉冲,提出是环糊精在孔洞内的两种取向造成的。脉冲幅度与孔洞尺寸密切相关。在 (10 ± 5) nm 的孔洞电极上可以得到 2 ~ 5 pA 的响应脉冲。研究了电压大小与方向的影响,结果表明,电渗流对检测影响显著。在电渗流方向与环糊精扩散方向相反的条件下,100 ~ 600 mV 电极电位即可产生良好的脉冲信号,但平均脉冲宽度随电极电位的增大呈线先增大后减小的趋势,约在 300 mV 电位下脉冲宽度最大。

关键词 玻璃纳米孔洞; 孔洞电极; 单分子检测; β -环糊精; 电化学

1 引 言

单分子检测^[1]不同于传统的检测方法,是对一个分子的组成与内部结构(例如 DNA、RNA 长链分子的长度、碱基对的数量、碱基对的排列顺序等)进行研究。单分子检测法也可以根据单位时间内出现的电流脉冲数对分子的浓度进行检测。纳米孔洞分析开创了使用电化学手段进行单分子检测与研究的新领域,不仅在基因测序上^[2]具有重要的用途,在生物传感、调制跨膜传输、构建超分子结构、单分子化学等领域也得到了有效的应用^[3]。现在常用的纳米孔洞主要有蛋白孔洞^[4~6]和固体材料纳米孔洞^[7,8]。固体纳米孔洞因具有坚固稳定、几何形状有选择、表面性质可进行修饰调整等优点而备受关注。制备固体纳米孔洞的方法主要有聚焦离子束雕刻和 Track-刻蚀法^[9,10],但均需要昂贵的设备。近年,Gao 等报道了 HF 刻蚀玻璃毛细管尖端的制作方法^[11]。本研究采用砂纸打磨融封毛细管的方法,制备了有良好单分子响应的玻璃孔洞电极,本方法避免了 HF 对孔洞外口的腐蚀扩张作用,并对影响该玻璃孔洞电极性能的参数进行了考察。

2 实验部分

2.1 纳米孔洞电极的制作

依次用无水乙醇与二次蒸馏水将硼酸盐玻璃毛细管(外径 1.5 mm,内径 0.86 mm,南京六合泉水教学实验器材厂)清洗干净后,用烘箱烘干待用。用 PN-30 毛细管控制机(日本 Narishige 公司)将毛细管拉开,尖端细丝截去,取锥形尖端部分(锥角大约为 60°),在酒精灯上灼烧,融合成直径约 0.4 mm 的半球。在光学显微镜(日本 Olympus 公司)下观测空腔的长度和角度,可见在球内部形成了逐渐收缩的锥形空腔,收缩锥角度约 1 ~ 3°,长度约 20 ~ 30 μ m,如图 1b 和 1c 所示。依次使用 800 ~ 4000 #金相砂纸小心打磨此半球的前端,直至锥形空腔的尖端在顶端开口,即得到了带有纳米孔洞的毛细管。为了便于电流测量,使用一支塑料移液管套(爱思进医用塑料有限公司)热封接在毛细管后端,并与一支 Ag/AgCl 电极相接,即为纳米孔洞电极。

2.2 实验方法

在 CHI660A 电化学工作站驱动 CHI200 微电流放大器(上海辰华仪器有限公司 配法拉第笼)进行电化学测定。使用两电极系统,如图 1 所示:将两个 Ag/AgCl(饱和 KCl)电极分别安置在纳米孔洞的两侧,施加电压并收集电流记录信号。在这样的安排下,所施加的电极电位正好等于孔洞从内到外的电压

ΔE 。电化学池中本体溶液使用经超声和真空脱气处理过的 1.0 mol/L NaCl 溶液, 同样的溶液用微量注射器加入到孔洞电极内, 并确保没有气泡残留在纳米通道内。接通电源即可进行伏安检测, 以通过电流的大小判断纳米孔洞是否导通, 从伏安斜率可计算电导, 并根据 White 等提出的算式^[12] 估计孔洞的出口半径 a_p 。若孔洞开口过小, 可继续打磨扩大孔径。

$$a_p = \frac{G_p}{\kappa} \left(\frac{1}{\pi \tan \theta} + \frac{1}{4} \right) \quad (1)$$

其中, G_p 是实验中测定到的电导值, κ 是支持电解质溶液的电导率 (1.0 mol/L NaCl 的电导率为 $9 \Omega^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$); θ 是纳米孔洞收缩锥角度的 $1/2$ 。

检测环糊精时, 将适量环糊精 (美国 Alfa Aesar 公司, 溶于 1.0 mol/L NaCl) 溶液用微量注射器加入到电化学池中, 稍静置后进行检测。

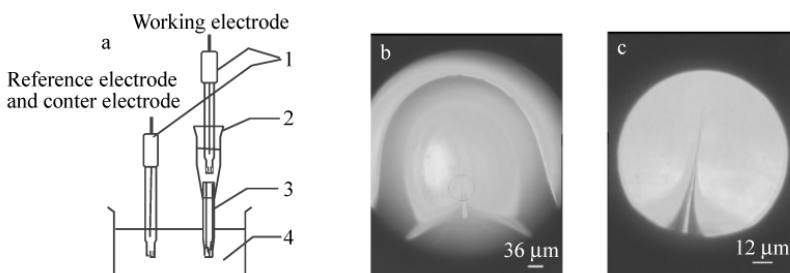


图 1 (a) 纳米孔洞电极和单分子电化学检测装置示意图; (b) 融合的毛细管尖端的熔融球, 有一段逐渐变窄的微腔封闭在其中; (c) 微腔部分 (图 b 中圆圈) 的放大图

Fig. 1 (a) Experimental setup with glass nanopore electrode; (b) Optical micrograph of a spherical terminal with a gradually narrowed cavity; (c) Local enlargement of circle region in (b)

1. Ag/AgCl (饱和 KCl) 电极 Ag/AgCl (Sat. KCl); 2. 塑料管接口 (Plastic pipet connector); 3. 纳米孔洞玻璃电极头部 (Nanopore capillary of the electrode); 4. 电化学池 (Electrolyte solution in the cell)。

3 结果与讨论

3.1 β -CD 的单分子响应

β -CD 分子具有固定的分子大小和可络合的性质, 可作为单分子检测的分子探针^[13~17]。图 2 是在孔径约 10 nm 的孔洞电极上施加 100 mV 电压下得到的时间-电流响应曲线。由图 2 可见, 脉冲幅度为 2~5 pA、宽度为 1~2 s 清晰的阳极电流脉冲响应信号。产生脉冲信号的原因是单个环糊精分子进入孔洞, 使电极电阻瞬间增大, 电流下降所致。与相关研究类似, 由于布朗运动影响, 单分子检测得到的脉冲宽度通常不一致。本方法制备的玻璃电极的平均厚度较大, 使该电极信号的噪声水平比较低 ($< 1 \text{ pA}$)。

研究发现 β -CD 信号清楚显现出 3 级主要的脉冲台阶 (图 2)。水平 1 应是洞口完全打开的最大电流水平, 约为 41 pA, 以水平线 1 为基线进行脉冲高度测量。出现低阶脉冲 (高度约为 3.4 pA) 和高阶脉冲 (高度约为 6.0 pA) 的现象可能是 β -CD 分子进入孔洞中两种取向产生的。图 3A 显示了 β -CD 的侧面对孔洞产生的低阶脉冲, 图 3B 显示了当 β -CD 的正面对孔洞产生的高阶脉冲。两种状态阻挡电流的面积可以根据分子尺寸计算, 分别为 1.2 和 1.8 nm², 二者之比为 1:1.5。这与两脉冲高度之比 1:1.7 相符合 (β -CD 分子为具有中空疏水腔的环形分子, 大端直径为 1.53 nm, 台高为 0.79 nm^[18])。而图 2 中 “*” 号标记的脉冲是孔洞中的环糊精分子与电渗流冲撞而发生翻转的现象。图 2 还出现一个不太稳定的台阶 (水平 2), 可归因于图 3C 所示的情形, 即一个 β -CD 分子准备进入纳米孔洞时, 在洞口边上碰撞、徘徊时对电流通路的部分阻挡时产生的信号。就平均的脉冲宽度约为 1.5 s 而言, 与采用其它固体纳米孔洞电极的方法 (如采用 Track-etched 法制备的纳米通道^[19]) 相比, 产生的信号宽很多。

3.2 电压方向的影响

由于 β -CD 分子为电中性, 通过纳米通道的推动力主要有压力差、浓差扩散、电渗流。孔洞电极内

外液面的固定高度差为 2 ~ 3 cm。由于只在电化学池中(孔洞电极外)加入 β -CD, 因而使该分子保持着从孔外向孔内的扩散梯度。玻璃内表面因硅羟基的存在而带负电荷, 因而当施加正电位时电渗流方向为由电极内部向外部流动, 施加负电位则相反。考察了变换电位符号对 β -CD 检测的影响(图 4)。由图 4 可见, 电位为 +100 mV 时, 在 100 s 内出现 4 个 β -CD 单分子脉冲(1 ~ 4), 脉冲宽度平均约为 15 s; 电位转换为 -100 mV, 经过约 50 s 的平衡过程后, 也连续出现 4 个 β -CD 的单分子脉冲(5 ~ 8), 脉冲宽度减小到约 4 s。这是由于正电位下电渗流从内向外流, 推挡 β -CD 向孔内扩散而使保留时间延长即脉冲宽度增大; 而负电位下电渗流转而从外向内流, 不仅可以促进 β -CD 向洞内运动, 而且加速了电极内部环糊精分子的转移, 使保留时间缩短。

另外, 由于环糊精分子在电极内部的累积, 必然使扩散梯度下降。所以在 100 mV 条件下, 脉冲 1 ~ 4 越来越低, 这也是孔洞电极在连续测定过程中失效的原因。可见, 玻璃孔洞电极内电渗流的方向对检测有很大影响。脉冲幅度的大小与孔洞极与分子之间的匹配关系密切相关。与图 2 电极相比, 这支电极的电阻大而脉冲幅度却小, 应当是孔洞直径较大, 但锥角较小、通道较长的缘故。

3.3 电压大小的影响

将电渗与 β -CD 扩散方向设置成相反方向, 可以有效地增大单个分子在纳米孔洞中的保留时间, 增加了对该分子进行操作和分析的可能性, 也降低了对仪器的采样率要求。本研究考察了电渗流与 β -CD 扩散方向相反时, 不同电压下的电流响应曲线, 如图 5 所示。

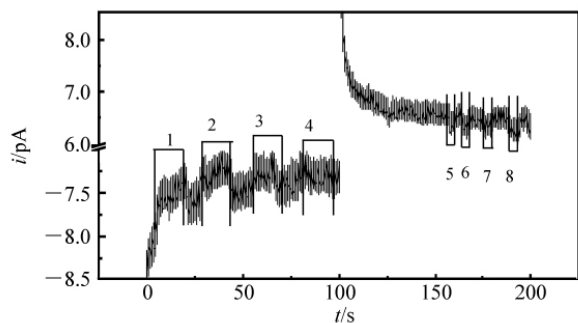


图 4 双电位阶跃下的计时电流响应曲线

Fig. 4 Current-time response of nanopore electrode with double potential step

$E_0 = 0$ V, $E_1 = 100$ mV, $E_2 = -100$ mV. 阶跃宽度(width): 100 s. 其它条件同图 2 (The other conditions are the same as Fig. 2)。

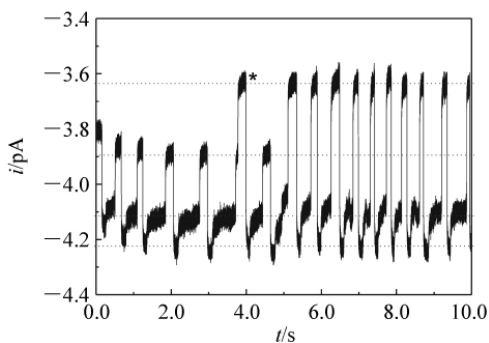


图 2 玻璃纳米孔洞电极在 1.0 mol/L NaCl 中的计时电流响应曲线

Fig. 2 Chronoamperometric responses of the glass nanopore electrode in 1.0 mol/L NaCl

β -CD: 1.2 mol/L. 电极电位(The applied electrode potential): +100 mV. 纳米孔洞直径(The pore diameter): 10 ± 5 nm.

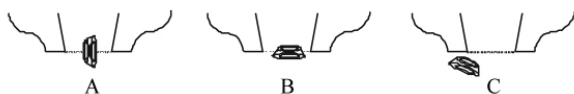


图 3 环糊精分子进入纳米通道的几种模式示意图

Fig. 3 β -CD molecules going into the nanopore

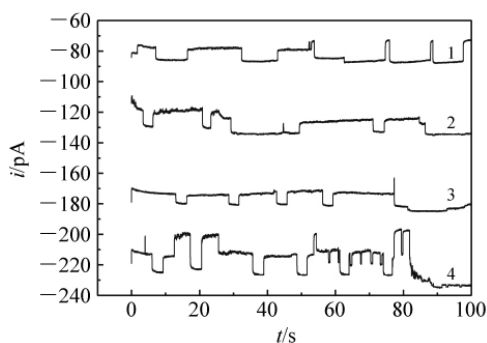


图 5 玻璃纳米电极的计时电流响应曲线

Fig. 5 Chronoamperometric responses of the glass nanopore electrode at applied potentials

施加电位(Applied potentials, mV): (1) 200; (2) 300; (3) 400; (4) 500. 其它条件同图 2 (The other conditions are the same as Fig. 2)。

图 5 使用与图 2 相同的电极, 显示了在不同正电位下的时间-电流曲线。在各电位下脉冲信号重现双台阶现象, 但当电位大于 500 mV 时, 电流脉冲平台上时常出现狭小缝隙, 显现出不稳定现象。高电压下电渗流增强, 纳米通道壁上电双层可能出现重叠现象^[20-21], 制造出更多的紊流, 使环糊精分子通过

孔洞时产生脉冲平台分裂。

图 6 为对 600 s β -CD 单分子产生的电流脉冲进行统计所得,图 6a 显示,脉冲宽度和脉冲间隔都随施加电位提高先增加后减小,宽度最大出现在 +300 和 +200 mV 附近。这一现象表明,电渗流与扩散的平衡,应该在电位 +200 ~ +300 mV 之间。扩散与温度、压力差及纳米通道中储留的 β -CD 分子的浓度密切相关,电渗流的大小与电压、支持电解质的性质及浓度、孔洞表面的性质相关。本研究只是初步证明了可以通过调控电位找到平衡点。

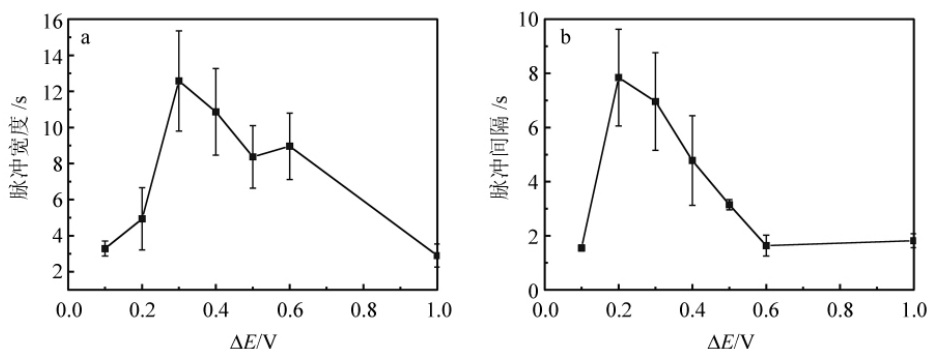


图 6 不同电位下玻璃纳米电极上 β -CD 单分子电流脉冲的宽度 (a) 与脉冲间隔 (b) 与电位的关系

Fig. 6 Pulse width (a) and interval of the current pulses (b) for β -CD path through glass nanopore electrode at different potentials

E : from +100 mV to +1000 mV; $\Delta E = E$, ΔE 为孔洞从内到外的电位差 (ΔE is the potential difference between inside and outside of the electrode nanopore); 其它条件与图 2 相同 (The other conditions are the same as in Fig. 2)。

4 结 论

本文使用玻璃毛细管融封后打磨,成功制作了单分子检测性能良好的纳米孔洞电极。通过改变电位的方向与大小对 β -CD 在纳米通道中的行为进行了研究。结果发现 β -CD 分子在纳米孔洞有两个相对稳定的取向,因而能产生两种幅度的脉冲信号,且取向可能发生突然转换而产生出台阶分裂现象。该电极在正或负电位下都可能得到单个分子的脉冲信号。发现玻璃纳米孔洞电极具有显著的电渗流作用。而在电渗流与扩散梯度的相反情况下,有可能通过调节电位来控制 β -CD 单个分子在通道内的保留时间。

References

- 1 Howorka S, Siwy Z. *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38 (8): 2360 ~ 2384
- 2 Blow N. *Nat. Methods*, **2008**, 5(3): 267 ~ 274
- 3 Bayley H, Martin C R. *Chem. Rev.*, **2000**, 100(7): 2575 ~ 2594
- 4 de Zoysa R S S, Jayawardhana D A, Zhao Q T, Wang D Q, Armstrong D W, Guan X Y. *J. Phys. Chem. B*, **2009**, 113(40): 13332 ~ 13336
- 5 Hall A R, van Dorp S, Lemay S G, Dekker C. *Nano Lett.*, **2009**, 9(12): 4441 ~ 4445
- 6 Vlassiounk I, Apel P Y, Dmitriev S N, Healy K, Siwy Z S P. *Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, 106(50): 21039 ~ 21044
- 7 Nagoshi K, Honda J, Sakaue H, Takahagi T, Suzukia H. *Rev. Sci. Instrum.*, **2009**, 80(12): 125102
- 8 Vlassiounk I, Kozel T R, Siwy Z S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131(23): 8211 ~ 8220
- 9 Rhee M, Burns M A. *Trends Biotechnol.*, **2007**, 25(4): 174 ~ 181
- 10 Dekker C. *Nat. Nanotechnol.*, **2007**, 2(4): 209 ~ 215
- 11 Gao C L, Ding S, Tan Q L, Gu L Q. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(1): 80 ~ 86
- 12 Zhang B, Galusha J, Shiozawa P G, Wang G L, Bergren A J, Jones R M, White R J, Ervin E N, Cauley C C, White H S. *Anal. Chem.*, **2007**, 79(13): 4778 ~ 4787
- 13 Wang D Q, Zhao Q T, de Zoysa R S S, Guan X Y. *Sensor Actuat B*, **2009**, 139(2): 440 ~ 446

- 14 Chen M , Khalid S , Sansom M S P , Bayley H P. *Natl. Acad. Sci. USA* , **2008** , 105(17) : 6272 ~ 6277
- 15 Astier Y , Braha O , Bayley H. *J. Am. Chem. Soc.* , **2006** , 128(5) : 1705 ~ 1710
- 16 Gurnev P A , Harries D , Parsegian V A , Bezrukov S M. *Chemphyschem* , **2009** , 10(9-10) : 1445 ~ 1449
- 17 Ervin E N , Kawano R , White R J , White H S. *Anal. Chem.* , **2008** , 80(6) : 2069 ~ 2076
- 18 Szejtli J. *Chem. Rev.* , **1998** , 98(5) : 1743 ~ 1753
- 19 Talaga D S , Li J L. *J. Am. Chem. Soc.* , **2009** , 131(26) : 9287 ~ 9297
- 20 Bratko D , Daub C D , Leung K , Luzar A. *J. Am. Chem. Soc.* , **2007** , 129(9) : 2504 ~ 2510
- 21 Choi Y S , Kim S J. *J. Colloid. Interf. Sci.* , **2009** , 333(2) : 672 ~ 678

Fabrication of Glass Nanopore Electrodes and Its Application in Single Molecule Detection of β -Cyclodextrin

LI Guo-Xia , ZHANG Zhi-Xiang , LIN Xiang-Qin*

(Department of Chemistry , University of Science and Technology of China , Hefei 230026)

Abstract Nanopores are increasingly utilized as the tools for single-molecule detection. A new and simple way was developed to prepare nanopore electrodes by polishing the fused glass capillaries on sandpapers. The prepared nanopore electrodes can be used to detect single β -cyclodextrin molecule detection with high signal-to-noise ratio , which was mechanically strong and easy to handle. Two clearly distinguishable current pulse amplitudes corresponding to the two orientations between β -cyclodextrin and pores were firstly found. Pulse amplitude was closely related to size of the pore , for example , 2 – 5 pA response pulse can be gained with 10 $\pm$ 5 nm electrode. The analysis of applied electrode potential about values and directions showed that the electroosmosis flow has significant effects on detections. When the direction of electroosmosis was opposite to the one of diffusion gradient , the electrode can always produce excellent signals from 100 mV to 600 mV. The average pulse , however , showed a trend of first increase and then decrease , and reached the largest at the potential of about 300 mV.

Keywords Glass nanopores; Nanopore electrode; Single molecule detecting; β -Cyclodextrin; Electrochemistry

(Received 28 January 2010; accepted 23 July 2010)

《稀土元素及其分析化学》

该书详述了稀土元素的基本性质、稀土化合物的性质与合成、稀土化学反应的基本原理与应用以及稀土分析化学的基本知识。全书内容包括稀土元素的电子结构和镧系收缩、磁学和光学性质、各价态化合物的性质、制备、分析及分析方法；稀土金属的性质和制备；稀土配位化学和稀土元素配合物的某些规律性。附所有稀土基本性质。

该书可作为有关院校稀土工程、冶金和化学、化工、材料类相关专业本科生及研究生的教学用书，也可作为有关人员学习稀土知识的参考资料。

该书由李梅、柳召刚等编著，化学工业出版社出版，定价 39.00 元。