# 第二章

一、序言

创新点

序言：铅离子的危害-电化学检测-信号放大策略-CHA

材料：信号探针-类过氧化物酶（参考文献）

1.本实验利用催化发夹自组装装置（CHA）和多孔碳负载铂纳米颗粒（PtNPs@CS）材料作为信号放大平台。目前，使用CHA信号放大策略检测Pb2+的文献中都是使用Pb2+特异性的DNAzyme来达到检测Pb2+的目的。而利用Pb2+的核酸适配体（Pb2+-Apt）与CHA信号放大策略结合的方式检测Pb2+的传感器目前还没有报道。

2.铂纳米颗粒（PtNPs）具有类过氧化物酶的作用，可以催化H2O2的氧化。但是由于PtNPs易团聚，在溶液中的分散性差，因此常常需要引入其他材料来改善其分散性。借助多孔碳纳米材料制备的多孔碳负载铂纳米颗粒（PtNPs@CS）具有良好的分散性、导电性和生物相容性。因此，可以将PtNPs@CS引入到传感器中，可以加速催化H2O2的氧化从而使氢锟（HQ）转化为苯醌（BQ），实现信号的增强。

二、实验材料与仪器、方法

表1 实验所用的DNA序列

|  |  |
| --- | --- |
| Name | Sequence (5’-3’) |
| Apt  c-DNA  HP1  bio-HP2 | GGGTGGGTGGGTGGGTAT  TCATACCCACCCACC TTTTGGGTGGGTATGACCACCGCCCACCCA  bio-TATGACCACCTGGGTGGGCGGTGGTCATACCCAC |

本实验所用的DNA序列均在生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

实验仪器

本实验采用三电极系统：金电极（AuE，Φ=3 mm），Ag/AgCl电极为参比电极，铂电极为对电极。交流阻抗（EIS）参数设置：电位为0.19 V，扫描速率为5 mV/s，扫描范围为0.1~10 kHz，在5 mmol/L的[Fe(CN)6]3-/4- (含0.05 mmol/L KCl) 溶液中检测。差分脉冲法（DPV）参数设置：扫描区间为-0.4~0.2 V，扫描速率为50 mV/s，在PBS（pH 7.4）缓冲液中进行检测。

实验方法

1.金电极的处理

首先，将金电极放入食人鱼溶液（98% H2SO4：30% H2O2=3:1）浸泡20 min，使用超纯水清洗电极。其次，将电极放入含有0.05 µm氧化铝粉的打磨机中进行抛光处理，并使用超纯水清洗电极以去除电极表面的氧化铝粉。之后将电极分别放入超纯水、无水乙醇和超纯水中进行超声清洗，在干燥的氮气（N2）下吹干。最后，将清洗好的电极放入含有0.5mol/L的H2SO4溶液中进行活化（参数设置：扫描电位 -0.4~0.8 V，扫描速率100mV/s，扫描圈数40圈），取出活化好的电极，使用超纯水清洗，并用干燥的N2吹干备用。

2.材料制备及表征

3. PtNPs@CS-SA/HP2/cDNA/MCH/HP1/AuE传感器的制备

4.不同修饰电极的电化学表征（EIS）

5.传感器的电化学行为

6.实验条件的优化

HP1浓度的优化

HQ浓度的优化

材料孵育时间的优化

7.标曲

在最优实验条件下制备的传感器中加入不同浓度的（）铅离子标准溶液，测定差分脉冲电流值，研究峰电流与铅离子浓度之间的关系，建立标准曲线。

8.特异性、稳定性、重复性

9.实际样品的检测

三、结果与讨论

1.基于PtNPs@CS-SA/HP2/cDNA/MCH/HP1/AuE传感器的Pb2+检测原理

图1显示了基于PtNPs@CS-SA/HP2/cDNA/MCH/HP1/AuE传感器的检测原理。将适体链Apt与其互补的c-DNA链按相同比例在DNA杂交缓冲溶液中杂交一段时间后，溶液中形成双链DNA结构。在Pb2+存在的情况下，由于适体链Apt与Pb2+结合形成G-四链体结构，从而使c-DNA链从双链体结构中脱落。将巯基修饰的发夹DNA（HP1）通过Au-S键固定在金电极上，之后加入MCH 封闭未结合位点。将含有适体链Apt、c-DNA及不同浓度的Pb2+加入到MCH/HP1/AuE上，脱落的c-DNA可以与MCH/HP1/AuE上的HP1结合从而打开发夹结构从而暴露隐藏的序列进一步与生物素化的HP2（bio-HP2）结合。由于bio-HP2与HP1结合的碱基序列比c-DNA与HP1结合的碱基序列多，因此c-DNA从电极上释放出来，可进行下一步杂交过程，因此在此循环扩增过程后电极上会留有大量HP1/bio-HP2双链体。最后，利用生物素与链霉亲和素（SA）之间的特异性结合，将材料PtNPs@CS-SA固定到HP2/cDNA/MCH/HP1/AuE中后，将电极放入含有H2O2与氢锟（HQ）的PBS缓冲溶液中。由于PtNPs@CS-SA材料可以加速催化在H2O2存在下的HQ的氧化，从而使电信号增强，实现Pb2+的检测。

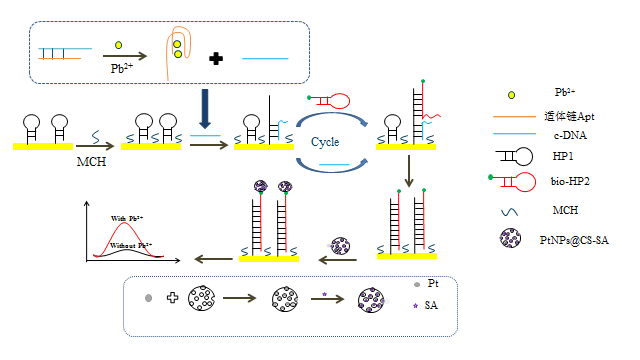


图1. 实验原理图

2.材料的表征

由图2可以看出，将裸电极与PtNPs@CS-SA材料修饰的电极分别放入含有HQ和H2O2的PBS缓冲溶液中，测得的峰电位分别为 -0.14 V（曲线c）和0.108 V（曲线a），表明当在电极上添加修饰材料PtNPs@CS-SA时，材料可以催化H2O2的氧化导致HQ转化为BQ。而将修饰电极分别放入仅含HQ溶液中，测得的峰电流为59.57 µA（曲线b），测得的峰电流为HQ的信号，比PtNPs@CS-SA材料催化H2O2导致HQ转化为BQ的测得的峰电流（103.3 µA）小了43.37 µA。这说明材料催化H2O2的氧化从而加速了HQ转变为BQ的能力，并且大大的增强了电信号。



图2. PtNPs@CS-SA材料的催化作用 (a)裸电极+HQ+H2O2；(b)修饰电极+HQ；(c)修饰电极+HQ+H2O2

3. PtNPs@CS-SA/HP2/cDNA/MCH/HP1/AuE传感器的交流阻抗表征

对不同修饰电极在5 mmol/L的[Fe(CN)6]3-/4- (含0.05 mmol/L KCl) 溶液中的交流阻抗，结果如图所示。AuE (a)的阻抗值为137 Ω，表明电极有良好的导电性能。HP1/AuE (b) 的阻抗值增大到2024 Ω，这是由于DNA上含有带负电荷的磷酸基团，与溶液中带负电的[Fe(CN)6]3-/4-相互排斥，从而导致电阻增大。 MCH/HP1/AuE (c)的阻抗值为3397 Ω，这是由于MCH 的引入起到封闭电极表面未结合位点的作用。cDNA/MCH/HP1/AuE (d)的阻抗值为3618 Ω，这是由于随着cDNA的引入，电极表面HP1的发夹结构被打开，cDNA与HP1杂交，带负电的磷酸基团负电荷密度增大，说明cDNA成功的与电极表面的HP1杂交修饰到电极上。HP2/cDNA/MCH/HP1/AuE (e)的阻抗值为4015 Ω，这是因为HP2的引入，HP1与HP2杂交的碱基数目更多，导致cDNA 从电极表面脱落，说明HP2被成功的修饰到电极上。PtNPs@CS-SA/HP2/cDNA/MCH/HP1/AuE (f) 的阻抗值减小为1081 Ω，这是由于加入PtNPs@CS-SA后，材料表面的SA与电极表面生物素修饰的HP2 (bio-HP2) 特异性结合，从而使PtNPs@CS-SA成功的修饰到电极表面。由于PtNPs@CS-SA纳米材料有促进电极表面电子转移的作用，因此PtNPs@CS-SA/HP2/cDNA/MCH/HP1/AuE的阻抗值减小。



图3. 不同修饰电极在5 mmol/L的[Fe(CN)6]3-/4- (含0.05 mmol/L KCl) 溶液中的交流阻抗图谱。(a) AuE ; (b) HP1/AuE ; (c) MCH/HP1/AuE; (d)cDNA/MCH/HP1/AuE ; (e)HP2/cDNA/MCH/HP1/AuE; (f)PtNPs@CS-SA/HP2/cDNA/MCH/HP1/AuE

4. PtNPs@CS-SA/HP2/cDNA/MCH/HP1/AuE传感器对Pb2+的检测

在相同的实验条件下，使用PtNPs@CS-SA/HP2/cDNA/MCH/HP1/AuE传感器对Pb2+检测的结果如图4所示。当Pb2+不存在时，峰电流值为0.8 µA (a)，当Pb2+存在时，测得的峰电流值为5.84 µA (b)，电流值增大了5.04µA。这是由于当Pb2+不存在时，cDNA与Apt通过碱基互补配对结合，形成Apt-cDNA复合物，不会从Apt表面脱落。因此cDNA不能到达电极表面与HP1修饰的电极结合，CHA循环扩增不能进行，电流信号较低。当Pb2+存在时，Apt与Pb2+结合形成G四联体结构，导致cDNA从Apt-cDNA复合物中脱落下来，与电极表面修饰的HP1结合，从而打开HP1的发夹结构。随着bio-HP2的引入，由于bio-HP2与HP1杂交互补的碱基数目更多，导致cDNA从HP1中脱落。脱落的cDNA可以与电极表面未打开发夹结构的HP1结合，触发CHA循环扩增，从而打开电极表面更多的发夹结构HP1，形成更多的bio-HP2/HP1复合物。最后，随着PtNPs@CS-SA材料的引入，材料表面修饰的SA 可以与电极表面生物素修饰的HP2(bio-HP2) 特异性结合，从而使PtNPs@CS-SA材料成功的修饰到电极表面。PtNPs@CS-SA材料可以催化存在下的HQ的氧化，从而产生电信号，导致电流的增强，实现Pb2+的检测。



图4.不含Pb2+ (a)和含有1 µmol/L的Pb2+ (b)在含有10 mM HQ和10 mM H2O2的PBS缓冲溶液中的差分脉冲曲线图

5. HP1浓度的优化

不同的实验条件对传感器的性能有不同的影响，为了提高传感器的分析性能，对不同的实验条件进行了优化，包括HP1浓度的优化、HQ 浓度的优化以及材料孵育时间的优化。

不同浓度的HP1（2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 µM）对传感器的影响结果如图5所示，随着HP1浓度的增加，电流逐渐增大。当HP1的浓度增大到3.5µM时，电流值达到最大为4.0 µA。随着HP1浓度的继续增大，电流值逐渐减小。这是由于随着HP1浓度的增加，电极表面的HP1浓度过大，阻碍了电极表面的电子转移。因此选取HP1的浓度为3.5µM。



图5. 不同HP1浓度对传感器的影响

6. HQ浓度的优化

不同浓度的HQ（2、4、6、8、10、12、14 mM）对传感器的影响结果如图6所示。随着HQ浓度的增加，电流值逐渐增大。当HQ的浓度为10mM时，电流值达到最大，电流值为5.84 µA。随着HQ浓度的继续增加，电流值趋于稳定。因此，选取10 mM作为HQ的最佳浓度。



图6. 不同HQ浓度对传感器的影响

7. 材料孵育时间的优化

材料不同的孵育时间（60、80、100、120、140、160 min）对传感器的影响结果如图7所示。随着孵育时间的增加，电流值逐渐增大，当孵育时间为120 min时，电流值达到最大。随着孵育时间的继续增大，电流值趋于平缓并略微减小。因此，选取120 min为材料的最佳孵育时间。



图7. 材料的孵育时间对传感器的影响

标曲



特异性

