

湖南大学

硕士学位论文

基于核酸适配体的生物传感器的研究

姓名：康燕

申请学位级别：硕士

专业：分析化学

指导教师：俞汝勤

20080601

摘 要

蛋白质是生物体内含量最高，功能最重要的生物大分子。常规的蛋白质检测方法一般是基于传统的抗原-抗体之间的免疫反应进行的，由于抗原和抗体之间的特异性反应，免疫传感器具有很好的专一性和选择性。然而，近年来以适配体作为识别元件的蛋白质检测技术越来越受到人们的关注。适配体（aptamer）一词来源于拉丁语 aptus，即 to fit，适合的意思。核酸适配体是一类通过 SELEX 技术体外筛选而获得的，对蛋白质有很好的识别能力，核酸适配体对蛋白质的亲和力和特异性可与蛋白质的抗体相媲美，解离常数通常在纳摩尔到皮摩尔之间，且与抗体相比具有许多优越性。如核酸适配体是体外人工化学合成，合成简单，稳定性、重现性好，容易修饰，可以按需要对序列中的核苷酸定点标记各种官能团和报告基团，如荧光基团，各种酶，电活性物质等。便于核酸适配体的固定化和信号的检测，检测目标广泛等。本文基于核酸适配体的上述优点，在传统的免疫传感器的基础上，构建了一系列适配体生物传感器。具体内容如下：

（1）在第二章中报道了一种无标记电化学方法来检测凝血酶。在这个工作中，我们引进了一种新的夹心电化学方法，采用抗体作为捕获探针，适配体作为检测探针，亚甲基蓝作为电活性物质嵌入适配体中来获取电信号，不需要对探针进行任何修饰，传感器对凝血酶的线性响应范围是 1-60nM，检测下限是 0.5nM。（2）在第二部分的夹心模式的基础上，在第三章中，报道了一种基于适配体的酶放大方法来检测免疫球蛋白 E（IgE）。生物素化抗 IgE 适配体作为检测探针，亲和素标记的碱性磷酸酯酶与电极表面的适配体上的生物素相连，碱性磷酸酯酶催化抗坏血酸磷酸酯水解成强还原剂抗坏血酸，将溶液中的银离子还原成银单质，沉积到电极表面。沉积的银的量与电极表面固定的 IgE 成正比，用溶出伏安法来定量。（3）在第四章中报道了一种基于目标物诱导适配体置换技术的无标记电化学检测方法，用来检测腺苷。利用适配体与目标物的强亲和力，将电极表面与捕获探针杂交的互补链置换下来，使嵌入在双链中的电活性物质亚甲基蓝量减少，从而使电信号发生变化。（4）在第五章里，我们用一种简单的荧光方法来检测 IgE，通过荧光基团标记的适配体与目标物先反应一段时间，再将淬灭基团标记的适配体的互补链(QDNA)与之反应，检测反应前后的荧光强度，通过强度的减弱程度来对 IgE 定量。此方法检测蛋白质的线性范围宽，下限低。

关键词：适配体；电化学；凝血酶；IgE；腺苷；荧光

Abstract

Protein is the most abundant and important macromolecule in our body. Conventional methods for detecting protein are based on traditional immunoassay. Because the reactions of antigen-antibody are highly specific, immunosensors possess great sensitivity and selectivity. However, recent decades have seen the increasing interest in developing the method of detecting protein based on aptamer. The word, aptamer, comes from Latin aptus, to fit. Aptamers are selected from SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) and have good recognition ability to proteins. The affinity and specificity between aptamers and protein is as well as those between antibodies and antigens. The dissociation constant of these is $10^{-9} \sim 10^{-12}$. Comparing to antibodies, aptamers own great advantages, including easy synthesis, good stability, ease modification and so on. It is facile to label the nucleic acid with different kinds of functional and report groups, such as fluorescence and electroactive groups. Therefore, it facilitates the immobilization of nucleic aptamer. In this article, we created a series of biosensors based on aptamers. The details are as following:

(1) In the second chapter, we report a label-free electrochemical method to detect thrombin. In this work, we introduced a new kind of sandwich method to detect protein, utilizing antibody as the capturing probe, aptamer as the detecting probe and methylene blue as the electroactive substance intercalating in the nucleic acid, avoiding previous labeling. The sensor shows the linear response for thrombin in the range of 1-60nM with a detection limit of 0.5nM.

(2) Based on the principle of antibody-aptamer sandwich in the second part, we reported a new kind of electrochemical sensor, utilizing the enzyme linked aptamer assay to detect immunoglobulin E (IgE). In this method, the biotinylated anti-IgE aptamer is used as the detection probe. The specific interaction of streptavidin-conjugated alkaline phosphatase to the surface-bound biotinylated detection probe mediates a catalytic reaction of ascorbic acid 2-phosphate substrate to produce a reducing agent ascorbic acid. Then, silver ions in the solution can be reduced, leading to the deposition of metallic silver on the electrode surface. The amount of deposited silver, which is determined by the amount of IgE target bound on the electrode surface, can be quantified using the stripping voltammetry.

(3) A label-free electrochemical sensor based on target-induced displacement is reported with adenosine as the model analyte. Owing to the high affinity of aptamer

binding to target, aptamer can displace the DNA which has bound to the capturing probe on the surface of the electrode, leading to the decreasing signal of the electroactive MB.

(4) We have designed a novel and simple fluorescence method to detect IgE. We labeled the aptamer with a fluorescence reporter group and its complementary DNA with a quencher (QDNA). After the aptamer reacting with IgE and QDNA, we measured the fluorescence intensity each step.

Key words: Aptamer; Electrochemical; Thrombin; IgE; Adenosine; Fluorescence.

湖南大学

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的论文是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的科研成果。除了文中特别加以标注引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写的成果作品。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

作者签名：

日期： 年 月 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权湖南大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于

1、保密□，在_____年解密后适用本授权书。

2、不保密□。✓

(请在以上相应方框内打“√”)

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

第1章 绪言

生物传感器技术是一门多学科交叉的技术，它是在化学传感技术的基础上发展起来的，而电化学生物传感又是生物传感技术里面研究的比较多的一个领域，它具有灵敏度高，设备简单，价格低廉，检测目标物广泛和响应速度快等特点，因此，在基础研究，环境检测，材料，食品和药物分析等领域具有广泛的应用。

生物传感器一般都由敏感膜，换能器和信号处理器三部分组成。根据所用敏感材料的不同，生物传感器可以分为酶传感器，免疫传感器，核酸传感器，细胞传感器等。而基于适配体的免疫传感器是近年来研究的一个热点，它是用适配体作为识别元件来特异性地检测其相应的靶物质。与以前的传感器相比，基于适配体的传感器有许多优点，它容易获得，选择性和灵敏度高，亲和力高，容易体外合成等，因此，它在生物传感中具有很大的应用价值。

1.1 适配体的筛选技术—SELEX 技术

适配体是一类通过指数富集配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术筛选出来的一类DNA或RNA寡聚核苷酸。SELEX技术是20世纪90年代初建立的一项新的体外筛选技术，利用此项技术，可以从随机的、库容为 10^{15} 左右的寡核苷酸库中筛选到与靶目标物高度结合的序列，然后通过数轮的筛选、分离和扩增，得到我们需要的DNA或RNA，即核酸适配体(aptamer)。美国科罗拉多大学(University of Colorado)的Tuerk^[1]等首先运用此项技术筛选到噬菌体T4 DNA聚合酶的RNA序列后，科研工作者在这个领域开展了广泛的研究工作。为生物、化学和医学领域的研究提供了高效的检测手段。

SELEX技术的基本思路^[2-6]是:(1)通过体外化学合成，建立一个单链寡核苷酸随机序列库，库容量的大小由文库随机序列数决定，一般是 10^{15} 左右，每条核酸链会在两端设计一个序列不变区，在中间设计一个序列可变区组成，可变区满足靶目标的碱基序列需求，不变区是进行PCR扩增所必须的。(2)在一定条件下,将这个库与靶目标反应一定时间，反应完后则库中存在核酸链、核酸链—靶物质复合体、靶物质，通过一定的物理分离方法，如硝酸纤维素膜过滤亲合法 (nitrocellulose filter binding), 亲和色谱法 (affinity chromatography)、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (electrophoresis on native polyacrylamide gels) 等，把核酸链—靶物质复合物分离出来。(3)通过一定的方法把适配体从适配体—靶物质复合物中分离出来。(4)把分离出来的适配体进行PCR扩增，变性成单链，进行再一轮的筛选，反复循环进行这个过程。(5)对最终得到的适配体进行克隆、测序。总个筛选过程简单，快速，

经济，实用，可定时定量完成，一个典型的筛选过程一般需要对其进行8-12轮的反复筛选，耗时4-6周。随着分离技术越的多样化和高效性，此项技术的筛选周期也越来越短。如Shaun等^[7]将SELEX技术与毛细管电泳结合(如 Figure1所示)，在几天之内就筛选到了IgE的配体，极大地缩短了筛选周期。用SELEX技术筛选适配体，它具有高分辨率和高解离常数，用它代替抗体进行蛋白质分析时，由于分子量小，它在体内具有更好的渗透能力，而且没有免疫原性。SELEX技术对靶目标的性质没有限制，到目前为止，已经筛选出蛋白质、金属离子、有机燃料、药物、氨基酸、多肽、细菌等的适配体。此筛选过程完全在体外进行，不涉及任何动物和细胞的应用。

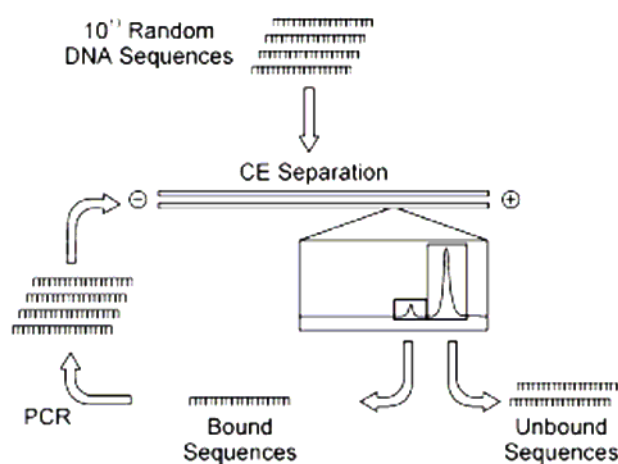


Figure 1. Schematic of CE-SELEX. A library of ssDNA molecules is incubated with the target molecule. Capillary electrophoresis is used to isolate bound sequences. Binding sequences are PCR amplified and purified giving an enriched ssDNA pool, suitable for further rounds of selection. High-affinity aptamers are typically obtained after two to four rounds of selection.

1.2 适配体的优点及其与靶物质的作用原理

适配体与其靶物质的结合通常是基于其核酸链的三维结构和本身的柔韧性。在溶液中，单链核酸链在空间上可以朝不同的方向延伸，形成各种各样的空间构像。在与靶物质结合时，通过核酸链内某些碱基相互之间的互补配对，范德华力，静电作用和氢键作用等，核酸链会折叠形成一些适合靶物质结合的稳定的空间结构，如 G-四螺旋，发夹，假结，凸环等。这样形成的适配体结构与靶物质之间有较大的接触面积，能与靶物质的紧密结合，具有高亲和力和高特异性。

适配体用于生物传感器具有很大的优势，主要体现在以下几个方面：

(1) 可以通过化学方法快速合成，成本低，周期短 常规的用来检测蛋白质的免疫分析方法所需的抗体要依赖于细胞或是动物才能获得，至少要3~6个月，周期长，成本高。而适配体筛选过程一般只需2~3个月，快的在两三周内就能获得。

在筛选过程中结合一些目前先进的分离技术，能在几天之内完成筛选过程，如 Bowser^[8]等在SELEX技术中采用毛细管电泳进行分离，经过2-4轮的筛选就得到了HIV-1的适配体。适配体一旦筛选出来后，合成起来就非常容易。

(2) 容易进行修饰 适配体一般是一段单链的寡聚核苷酸，对其进行修饰简单容易，且也不会影响它的生物活性。如在其一端修饰巯基、生物素，氨基等用于固定，修饰一些电活性、光活性物质或是酶等都已经非常成熟容易。

(3) 特异性高，识别能力强 由于适配体与其靶分子有很大的接触面积，能够分辨出靶分子结构上的细微差别，即使是靶分子上有一个官能团的差异也能区分开来。例如茶碱分子在结构上比咖啡因少一个甲基，在用抗体检测两者时不能完全区分，而核酸适配体则能特异性地识别茶碱，咖啡因不干扰。此外，一种称之为镜像适配体的新一代适配体还能区分镜像体。

(4) 性质稳定，分子结构简单 这两个优势主要是相对抗体而言的，适配体在用于蛋白质检测时，常常能够模拟抗体，用适配体做传感界面，再生比抗体容易。但抗体的蛋白质本质决定了它容易变性，保存时间短，活性容易受温度、pH值等外界条件的影响，而且抗体蛋白的免疫原性也很难克服。适配体是一段核酸链，它能在冷冻条件下保存数年，即使在高温、高盐浓度、络合剂等的作用下使其变性，这种变性过程也是可逆的，在适当条件下可以恢复其活性，而且目前也没有文献报道它具有免疫原性。

1.3 适配体生物传感器

1.3.1 光学适配体生物传感器

光学适配体生物传感器是测量适配体与靶物质作用时引起的光学信号变化的一类传感器，这些光学信号根据其原理不同，有荧光、化学发光、磷光、反射、折射等，应用范围很广泛。如Bai^[9]等将发光物质 $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ 嵌入到IgE适配体中，当这种化合物单独存在于水溶液中时，它是不发光的，而当适配体存在时，由于它能嵌入到适配体的三维结构中，与碱基发生相互作用，发出光信号。目标物与适配体结合前后，会引起适配体的三维结构发生改变，从而引起 $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ 的发光强度发生相应的变化，信号一般情况下能增强4倍左右，成功地检测了IgE。随后，基于类似的原理，Wang^[10]等又用这种光学物质嵌入到ATP的适配体中，高特异性地检测了小分子物质ATP。Li^[11]等报道了一种荧光检测方法，他们设计了两个方案来检测目标物，一个是用适配体先和一个在链中间标记了荧光基团的核酸链杂交，此时，利用碱基自身的淬灭作用，荧光淬灭，当适配体与目标物结合后，标记了荧光基团的核酸链被置换下来，发出荧光。另一个方案是将与适配体杂交的核酸链在两端分别标记荧光基团和淬灭基团，且两端有

一定长度的碱基互补，当目标物存在时，核酸链被置换下来，互补端结合成双链，荧光淬灭。利用这两个方案来检测ATP和凝血酶，都取得了很好的结果。由于光学染料很容易获得，信号大部分是在均相中检测，灵敏度高，检测下限低，光化学技术的应用越来越广泛，但是它的不足之处依然存在，如荧光技术就存在背景信号高、荧光寿命短、容易发生光漂白和易受干扰等。

1.3.2 电化学适配体传感器

电化学适配体传感器由于其设备简单、能耗低，使用方便、方法灵活多样、易微型化等优点，一直是分析化学工作者重点研究的领域。根据其测量信号产生的原理，大致可以分为电压型、电流型和阻抗型。在这些方法中，电流型适配体传感器由于检测的电信号灵敏、易获得，是研究中比较活跃的一个领域。对于电流型适配体传感器，根据设计思路，目前常见的有适配体信标法(Aptamer beacon)和夹心法。为了将电极表面适配体与靶物质的识别反应转换成电信号，通常需要在电极表面的生物活性分子上修饰上我们需要的酶，如碱性磷酸酯酶、过氧化物辣根酶、葡萄糖氧化酶等，通过催化其相应的底物来产生电信号，或者直接连接上电活性物质，如亚甲基兰、中性红、二茂铁等，通过这些物质在电极表面发生氧化还原反应，测定其产生的电流信号。将酶联适配体技术与其他一些放大技术相耦合，可以显著地提高检测的灵敏度。楚^[12]等研究开发了一种高灵敏度的电流型适配体传感器，这个方法是采用抗体和适配体夹心，然后将碱性磷酸酯酶修饰到适配体上，再通过滚环扩增放大电信号，低检测极限地检测了血小板生长因子。Plaxco^[13]等报道了一种基于适配体分子开关类型的检测方案，快速、方便，用以检测小分子物质可卡因。当没有目标物时，亚甲基兰标记的适配体处于打开状态，电活性物质远离电极表面，没有电信号产生。而当目标物存在时，适配体与目标物结合，电活性物质接触电极表面，产生电信号。基于阻抗变化的电化学适配体传感器，由于具有高灵敏度、无需标记、简单、方便等优点，一直受到人们的普遍关注。Dong^[14]等采用阻抗技术，结合纳米金的放大作用，高灵敏地检测了固定在金电极表面的凝血酶的含量。

1.3.3 压电适配体传感器

压电适配体传感器是基于以质量效应为主的非标记型传感器，它检测物质本身质量变化产生的信号变化，响应灵敏。它是基于压电晶体的响应频率变化与晶体表面均匀吸附的刚性物质质量之间存在线性关系，从而对待测物进行定量。压电传感技术可分为压电气相传感技术和压电液相传感技术。在液相中进行反应，再于气相中进行测量的压电气相传感技术，由于其本身易受环境湿度、水化和溶剂滞留等因素干扰，分析过程也较为繁琐和费时，而且不停地在气液相中交替进行，对物质的活性也有一定程度的影响。为了满足日常快速分析的要求，压电液

相传感技术随应产生。压电液相传感技术能直接于液相中进行测定，并能实时、连续检测适配体—目标物反应的动态过程，在临床疾病标志物的定量分析中获得了非常广泛的应用。Liss等^[15]采用压电技术实现了IgE适配体对IgE的实时检测，由于适配体的小尺寸和非蛋白本质，他们在基质表面能组装成一层致密的、高定向的分子层，与用IgE抗体检测相比，用适配体组装能将线性范围扩展10倍，并且在数周内都能保持它的活性，稳定性好，且容易再生，具有很大的应用前景。

1.4 适配体分子的固定

适配体传感器的固定基质一般有金属、玻璃、石墨以及在这些基底上修饰上的纳米粒子、纳米线阵列、导电聚合物薄膜等。如何有效地将适配体分子固定在基底上，是适配体传感器性能优劣的前提和关键环节。常用的固定方法集中在自组装法、表面富集法、组合法、共价修饰法和生物素-亲和素反应法。

1.4.1 自组装法

自组装法是基于分子的自组装作用，能够在基底表面组装成一层高度有序的单分子膜的方法。由于适配体分子容易进行化学修饰，在通常情况下一般是在适配体分子的一端修饰上合适的功能基团，通过这些基团将适配体分子固定在基底上。在金基底上，常用的固定方法一般就是在适配体分子的 5'端修饰上带巯基（-SH）的化合物，这种化合物的巯基在金基底表面形成化学键（Au-S），在基底上形成一层自组装膜。Plaxco^[13]等将一个修饰了亚甲基兰的可卡因适配体通过巯基自组装组装在金电极表面，这样形成的单分子膜稳定有序，非常利于后面的反应进行，检测获得的电化学信号也非常灵敏。

1.4.2 电化学富集法

由于适配体分子在溶液中带有一定的负电荷，当对电极（如碳糊电极）表面施加一定大小的正电位时，溶液中的适配体分子就会富集在电极表面，从而结合到电极表面。这个方法操作简单，需要的时间短，效率很高。

1.4.3 亲和交联法

适配体在基底表面的固定，可以通过生物素-亲和素等亲和作用系统间接固定化。生物素(又称为辅酶R或维生素H) 是一环状有如尿素的化学物质，具有一硫酚(Thiophene)的结构环，是生物体内广泛存在的各种羧化酶的辅酶，一端的羧基可以与抗体、酶、DNA、蛋白质等通过共价键相连。亲和素又称抗生物素蛋白，它由四个分别能与生物素结合的亚基组成。亲和素与生物素之间有极强的亲和力，亲和常数非常高，是抗原抗体反应的百万倍，具有高度特异性和稳定性。生物素

活化后,可以很容易地用于生物大分子如抗体,适配体等的标记,接着可以通过固定化的亲和素将生物大分子如适配体等固定在基底表面。通常这种方法简便,条件温和,高效,不会干扰固定后的生物分子的活性。链霉亲生物素(streptavidin)的特性非常类似于亲和素,可取代亲和素用于涉及到生物素-亲和素的系统中。Minunni等^[16]将HIV-1 转录反式激活因子用生物素-亲和素法固定在石英晶体金电极表面,实现了适配体的压电技术检测。Centi^[17]等用生物素标记凝血酶适配体,用亲和素修饰磁性微珠,通过生物素和亲和素的特异性反应,将适配体固定在了磁性微珠上,用来检测凝血酶浓度。Neikirk等^[18]报道了一种将生物素化的适配体固定在亲和素覆盖的琼脂糖微珠上,用于制备适配体阵列来检测蛋白质。对该传感器性能指标进行检测,结果显示该传感器敏感性、选择性、重复性良好,认为可以将此固定技术普遍推广应用。

1.4.4 共价键合法

共价键合法是通过化学试剂将适配体分子以共价键形式固定在电极表面的一种固定方法。先要对电极表面进行处理或是修饰,如电沉积一层纳米金膜,或是在表面自组装一层含氨基或是羧基的单分子层,从而引入氨基或羧基官能团,然后用一些偶联剂,如乙基-3-二甲基碳二亚胺作,以羧基氨基键的形式可以将适配体分子固定在电极表面。Bang^[19]等通过 EDC/NHS 活化固定在电极表面的十一硫醇酸,将带氨基的凝血酶适配体分子固定在了电极表面,从而成功地检测了凝血酶含量。Lindner^[20]等将(3-氨基丙烷基)三甲氧基硅烷修饰在玻璃表面,再用戊二醛作交联剂,在 NaBH_3CN 作用下,将氨基修饰的 IgE 适配体分子固定在玻璃基底上。这样固定的适配体稳定性非常高,很利于后面的反应。

1.5 本文工作设想

本论文在查阅了相关化学生物传感器文献的基础上,结合本实验室原有的实验基础,针对目前蛋白质和小分子检测方法中存在的一些问题,结合电化学、荧光和适配体的优点,发展了一些较快、较简便的电化学和荧光传感技术,具体内容主要包括以下几个方面:

(1) 传统的免疫分析中抗体获得较难,且又容易变性失活。考虑到适配体在蛋白质检测中能够完全模拟抗体功能,且适配体又具有许多抗体不曾有的优点,将适配体引入免疫夹心分析中用于取代抗体,能很好地解决这个问题。另外,尽管对适配体的标记相对简单,但总个标记过程还是耗时又费力的,鉴于此,我们考虑用一种无需标记的方法来构建一个检测凝血酶的生物传感器。考虑到壳聚糖优异的成膜性、极强的吸附能力和良好的生物相容性以及纳米粒子优异的电子转移能力,我们将金纳米粒子分散到壳聚糖中用作固定抗体的界面来放大电化学信号。

(2) 基于上面类似的夹心原理，并结合酶联适配体分析，将碱性磷酸酯酶连接到电极表面，选择抗坏血酸作为底物，酶催化底物得到的还原剂抗坏血酸将银沉积到电极表面，检测银的氧化电流，从而对 IgE 进行定量。

(3) 基于适配体与其靶目标的高亲和力以及亚甲基兰能直接嵌入到单双链中的原理，我们用靶目标将在电极表面杂交的腺苷适配体链置换下来，从而使电极表面固定的核酸链减少，嵌入核酸链中的亚甲基兰的量相应减少，从而获得前后的电流变化值。

(4) 将适配体信标应用于蛋白质的检测，把分子信标结构设计上的优势与适配体结合起来，在适配体上修饰荧光基团，与目标物 IgE 反应后，再与标记上淬灭基团的互补链反应，使荧光强度减小。采用这个方法，简单、快速地实现了 IgE 的检测。

第 2 章 基于适配体和抗体的电化学凝血酶检测

2.1 前言

常规的蛋白质检测方法是基于传统的免疫分析法，利用抗原抗体间的特异性反应为基础，将抗原或是抗体上标记上酶、荧光素、放射性物质等，来实现对蛋白质的高灵敏度检测。然而，抗体的获得需要的时间长，制备过程复杂，修饰过程更是耗时耗力，且由于它的蛋白质本性，一旦变性，就不能恢复其活性。适配体，从随机核酸序列库里筛选出来的一类 DNA/RNA 寡聚核苷酸链^[1,21]，广泛应用于各种目标物质的检测，如蛋白质、细胞、金属离子，天然有机分子等。大量研究表明，适配体在蛋白质分析中能够模拟抗体的功能^[22~23]，且与抗体相比，适配体拥有一些它独特的优点，与蛋白质的高亲和性和特异性，容易在体外化学合成，从而摆脱了抗体对动物体的依赖，又由于它的核酸本质，容易在它的两端修饰上活性物质，如电化学活性物质、光学染料、酶以及其他我们需要的物质等，对适配体而言，将化学生物传感过程转变成可检测的信号是很容易实现的。

在适配体众多的目标待测物中，蛋白质的研究是其中的一个重点。最近的报道中，基于适配体的蛋白质检测系统大部分集中在光学^[24~31]、石英微平衡^[15,32]和电化学方法^[33~39]。Heydu^[25]等报道了一种快速、均相检测凝血酶的荧光方法，他们将两个分别标记上了荧光基团和淬灭基团的凝血酶适配体与凝血酶在液相中培育一段时间，使适配体与凝血酶充分反应，两个适配体均与凝血酶结合，距离靠近，互补链段发生杂交，荧光淬灭，通过荧光强度的减弱程度，来对凝血酶进行定量。对于电化学检测方法，目前报道过的最简便的方法就是适配体信标，它的设计原理与分子信标很类似，例如，Lai 等^[35]用电话活性物质标记适配体的一端，用巯基标记适配体信标的另一端，固定在电极表面，通过适配体与靶物质在结合前后的构型发生翻转，实现了对血小板生长因子的分子开关检测功能。这样的检测系统非常简单和灵敏，但是要采用这种检测方法，要求目标物的适配体的构型必须要能在识别反应发生前后发生翻转才行。然而，目前筛选出来的具有这种功能的适配体并不是很多，这个方法的使用在一定程度上受到限制。而夹心方法对适配体构型上几乎没有什么要求，是近期来蛋白质检测的研究焦点。然而，除了极少数的几种蛋白质已经筛选到了两种不同类型的适配体，且具有两个以上的结合位点^[39~40]外，一般的目标物还只筛选出了一种适配体。先前报道的用于蛋白质检测的夹心方法主要集中在常规的抗体夹心免疫分析，通常是将其中的一个抗体

通过适当的方法固定在电极表面，另一个抗体标记上一种酶或是其他合适的活性物质，在与目标物反应后，在一定的条件下来获得我们需要的信号。尽管这种免疫夹心方法十分经典，也用来分析检测了很多种物质，然而，这种方法本身存在着很大的不足，抗体的修饰过程非常困难，耗时耗力，而且标记后也可能影响其生物活性。鉴于上述的这些原因，我们采用了另一种夹心模式来电化学检测蛋白质，采用抗体作捕获探针，适配体取代抗体来做检测探针^[41~42]。与常规的获得电信号的方法不同的是，我们直接将电活性物质亚甲基蓝嵌入目标物的适配体中，避免了标记过程，省时省力。另外，由于采用多克隆抗体来作捕获探针，抗体上有很多能与目标物结合的位点，这样就减小了它和适配体同时与目标物位点结合的竞争力，从而有利于适配体的竞争性吸附，这样就增强了适配体结合的几率。另外，由于亚甲基蓝容易嵌入到核苷酸中，所以采用抗体来固定能有效的降低背景信号。第三，在蛋白质分析中，要获得一个抗体和一个适配体来夹心相对要容易很多。且还结合了抗体和适配体双重的特异性来检测，选择性更高。

在我们的这个工作中，我们采用凝血酶来作为模型分析物。凝血酶是一种重要的蛋白质，它是机体凝血系统中的一种重要组成因子，在机体受到创伤时的止血机制中发挥了重要作用。凝血酶在体内以凝血酶原(prothrombin)形式存在，在一定条件下凝血酶原被激活并转化为有活性的一种蛋白质水解酶。凝血酶的获得一般是在动物血浆中或人血浆中制备凝血酶原，再经激活物激活而成为凝血酶。其激活方式较多，一般采用凝血因子 Xa、凝血因子 V、 Ca^{2+} 和磷脂进行激活，也有采用蛇毒、25% 柠檬酸钠、脑粉和肺提取液来进行的。凝血酶在临床上，常以干粉或溶液局部涂于伤口及手术处，控制毛细血管血液渗出，多用于骨出血、扁桃腺摘除和拔牙时出血等。凝血酶局部止血效果好，且无副作用。目前凝血酶的应用范围正日渐扩大，由单纯的局部外敷发展到外科手术、耳鼻喉、口腔、妇产、泌尿及消化道等部位出血止血，亦可作为多种外用止血药物的重要原料，将广泛应用于临床。同时，除了传统的凝血作用外，凝血酶在脑血管病中的作用也日益受到重视，目前的研究表明，凝血酶在脑出血、脑缺血中有毒性作用，在中枢神经系统正常发育和损伤保护中也有重要作用。临床研究体现出小剂量可产生神经保护作用，而大剂量则具有细胞毒性作用，因此，实现对凝血酶的高效、快速定量检测具有很大的现实意义。

为了改善电极的导电性，我们采用了金纳米粒子和具有很好的生物相容性的壳聚糖构成复合膜来固定抗体。由于纳米粒子具有很大的比表面积，用它来修饰电极可以固定上更多的抗体，又由于它^[43~46]能够明显地减小电子转移距离，促进电子转移，因此可以明显地改善电极的导电性能。壳聚糖^[47~50]是甲壳质经过脱乙

酰基而得到的一种天然的聚阳离子多糖，不溶于水和碱溶液中，可溶于低浓度无机酸或某些有机酸，在水溶液中质子化后带正电，具有很强的吸附性。由于它优秀的成膜能力和含有丰富的氨基官能团，它被广泛应用于修饰电极来固定蛋白质，如酶和抗体^[50~51]等。正是由于金纳米粒子和壳聚糖的这些独特的性质，在这个工作中，我们通过电沉积氯金酸和壳聚糖的混合溶液，制备了纳米金-壳聚糖复合膜^[47]修饰的电极来固定凝血酶的多克隆抗体，并取得了很好的效果。

2.2 实验部分

2.2.1 试剂与仪器

凝血酶适配体的碱基序列为 5'-GACAGACGATGTGCTGACTACTGGTTGGTGAGGTTGGGTAGTCAGCACATCGTCTGTC-3'，由大连宝生物公司根据我们的设计而合成。纯化的羊抗人凝血酶多克隆抗体，溶解在 10mM HEPES, 0.05M 的氯化钠，50% 的甘油的，pH 7.4 的混合溶液中，购自 Biodesign 公司(美国)。人的凝血酶冻干粉来自于 R&D 公司（美国）。壳聚糖（75—85% 脱乙酰作用）和 $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 购自 Sigma 公司（美国）。戊二醛溶液（25%）购自长沙化学试剂公司。牛血清白蛋白(BSA), 羊抗人 IgG, 亚甲基兰（MB），铁氰化钾，氯化镁，氯化钾是从常规的化学试剂公司获得的。检测缓冲液是 10mM Tris-HCl (pH7.4, 包含 10mM KCl 和 10mM MgCl_2)，冲洗缓冲液是 10mM Tris-HCl (pH 7.4, 含 10mM KCl, 10mM MgCl_2 and 0.1M NaCl).所有的试剂在使用前都没有经过进一步的纯化，二次水使用贯穿始终。

差示脉冲伏安(Differential Pulse Voltammetry)和循环伏安实验(Cyclic Voltammetry)是在一台 CHI 760B 电化学工作站（上海辰华仪器公司）上进行的。常规的三电极系统，玻碳电极（3.0mm 直径）作为工作电极，铂电极作为辅助电极，饱和甘汞电极作为参比电极。纳米金-壳聚糖复合膜的扫描电镜图是在一台 JSM-5600LV 显微镜（日本）上获得。

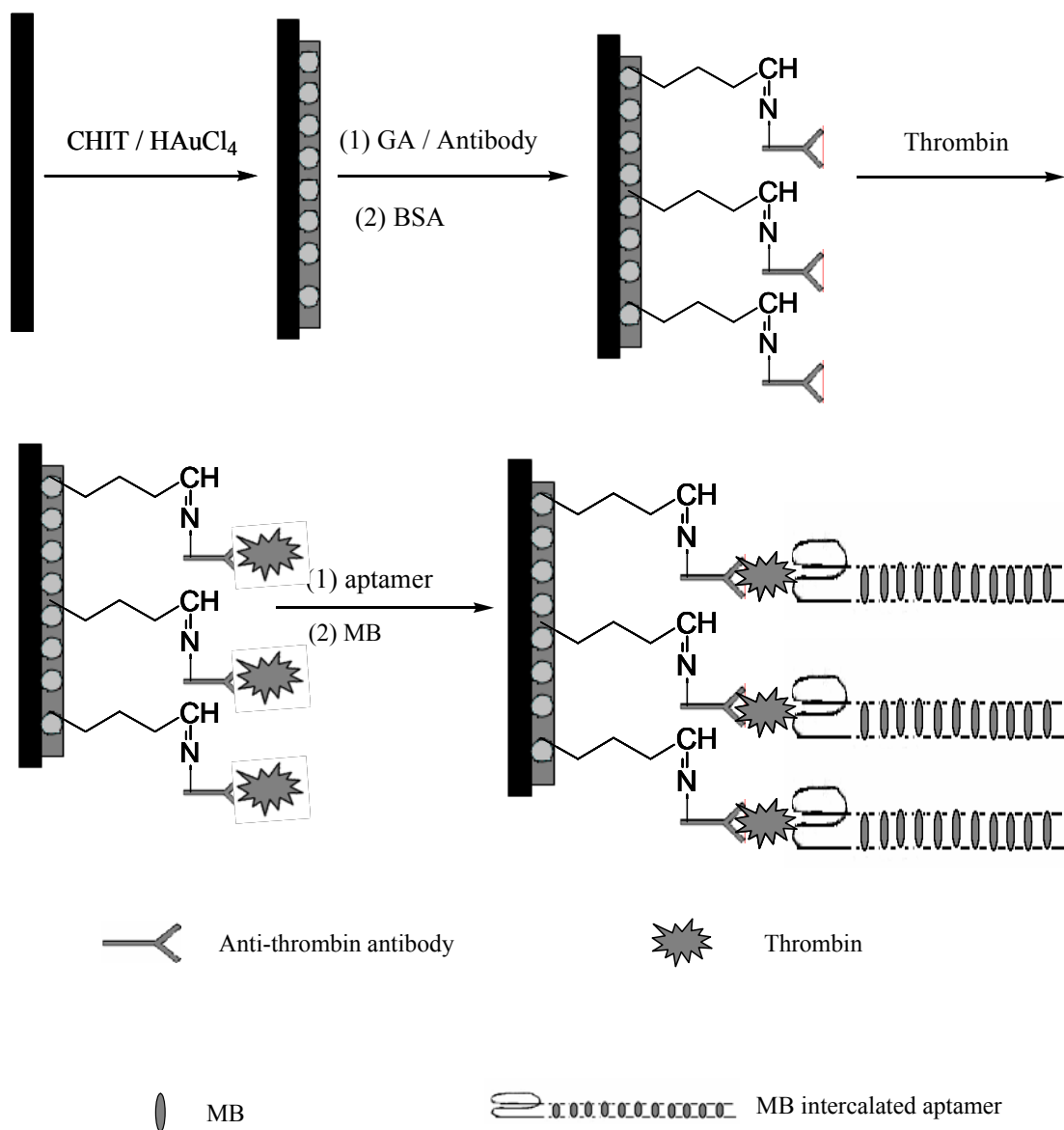


Figure 2.1 schematic representations of the principle for the sensing steps

2.2.3 纳米金-壳聚糖复合膜的制备

在对玻碳电极表面进行修饰之前，依次用 $0.3\mu\text{m}$ 和 $0.05\mu\text{m}$ 的铝粉打磨，然后分别在乙醇和二次水中各超声清洗 10min。紧接着，将处理好的电极在一定电位下恒电位沉积一定时间，沉积液是将适当比例的壳聚糖(CHIT)和 HAuCl_4 混合，超声 20min 左右，至完全混合均匀。电沉积好后，立即将电极在水中浸 1 分钟左右，然后放在室温下过夜干燥。

2.2.4 免疫传感界面的构建

将 $10\mu\text{L}$ 稀释好的戊二醛溶液 (2.5%) 滴到纳米金-壳聚糖复合膜修饰的电极

表面，在冰箱中反应一个小时。再将 10 μ L 450 μ g/mL 的羊抗人凝血酶抗体滴到电极表面与交联剂戊二醛在 37 $^{\circ}$ C 下反应 1h。没有反应的戊二醛上的醛基用 2% BSA 在 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h，然后分别用缓冲液和去离子水彻底冲洗干净。

2.2.5 电化学检测凝血酶

Figure 2.1是这个方案的原理图，当抗体连接到电极表面上后，将10 μ L不同浓度的凝血酶样品溶液滴到电极表面，然后在37 $^{\circ}$ C的恒温箱中培育1h。然后将10 μ L经过淬火处理的170nM的适配体滴加到电极表面，在相同条件下又反应1h。每一步反应完全后，都将电极表面放在缓冲液中搅拌清洗10min。最后，将电极放到20 μ M MB溶液中搅拌反应15min，反应完后，用缓冲液将非特异性吸附的MB在搅拌条件下反复清洗几次。在 CHI 760B电化学工作站上获取 DPV（脉冲幅度20mV，脉冲宽度0.05s）信号。

2.3 结果与讨论

2.3.1 优化和表征纳米金-壳聚糖复合膜

在这个工作中，通过电沉积适当比例的 CHIT 和 HAuCl₄ [29] 的混合溶液，我们已经构建了一个非常好的抗体固定界面。在电沉积的过程中，HAuCl₄ 在一定电位下还原成金纳米粒子同时随着壳聚糖一起沉积到电极表面，形成一层稳定的复合膜。我们将得到的纳米金-壳聚糖复合膜用 SEM 表征，Figure 2.2 就是电极表面复合膜的 SEM 图。从图上可以看出，复合膜上有很多微孔，大部分的孔里面都填充上了纳米粒子，说明 HAuCl₄ 在我们选择的电位下成功还原成纳米粒子。同时，还可以看出，纳米粒子在膜中分布得十分均匀，其中填充的纳米粒子的尺寸大部分分布在直径 50nm 左右。

在沉积膜的过程中，我们讨论了不同的沉积参数对实验结果的影响。我们考察了 CHIT 和 HAuCl₄ 的混合浓度比例、沉积时间和沉积电压这几个影响因子。Figure 2.3A 描述的是不同浓度的 CHIT 对实验结果的影响，从图上可以看出，当壳聚糖的浓度是 0.05% 时，我们得到了最大的响应结果。原因可能是由于壳聚糖的浓度越大，在相同的条件下在电极表面形成的复合膜越厚，从而妨碍了电极表面电子的转移，降低了电极的导电性。另一方面，如果壳聚糖浓度过低，则形成的复合膜不稳定，容易从电极表面脱落，不利于反应的有效进行，因此我们最终选择的壳聚糖浓度是 0.05%。Figure 2.3B 描述的是 HAuCl₄ 浓度的影响，HAuCl₄ 的浓度能强烈地影响到膜中纳米粒子的大小和含量，随着 HAuCl₄ 含量的增加，响应信号也逐渐增加，在 250mg/L 时达到最大响应值。HAuCl₄ 含量越高，还原

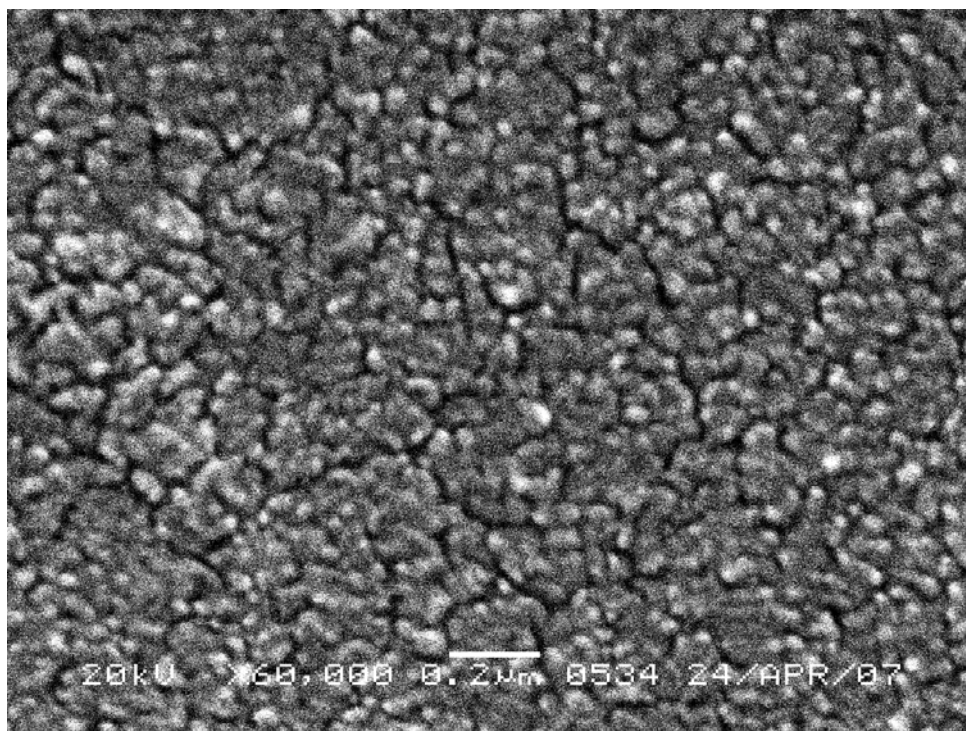


Figure 2.2 SEM image of nanogold-chitosan composite film on glassy carbon electrode

出来的纳米粒子越多，电极的导电性越好，能固定的抗体也相对越多。当含量过高时，沉积出来的纳米粒子的尺寸会太大，效果反而不理想。对于电沉积时间和电压，从 Figure 2.3(C, D)上可以看出，信号分别在 4min 和 -2V 的条件下达到最大值，在此电位下，我们还能获得较大的沉积速度。为了进一步证实修饰上复合膜后的电极的导电性能是否得到明显改善，我们用 CV 图对其进行了表征，Figure 2.4 上 a、b、c 三条曲线分别代表的是裸玻碳电极、纳米金-壳聚糖复合膜修饰电极以及修饰了抗体后的电极的 CV 信号，比较这三个图的峰电流，我们可以看到，当电极表面修饰上了这层膜后(Figure 2.4b)，CV 图上的峰电流显著增加，电极的导电性质得到了极大的改善。修饰上抗体后(Figure 2.4c)，峰电流下降，说明抗体连接在了电极表面，由于抗体的存在阻碍了电极表面电子的转移。

2.3.2 离子强度对适配体与凝血酶结合能力的影响

很多文献^[52~55]都已经报道了离子强度能够强烈地影响适配体与凝血酶的结合能力，当适配体结合到凝血酶时，在 K^+ , Rb^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} or Ba^{2+} 存在的情况下，适配体将会折叠成稳定的 G-四螺旋结构^[52]，这样就能促进适配体选择性地识别目标物凝血酶。在这个工作中，我们系统地研究了 K^+ 和 Mg^{2+} 对二者结合能力的影响。Figure 2.5A 描述了不同浓度的 K^+ 的影响，当 Mg^{2+} 的浓度维持在 10mM 稳定不变时，随着 K^+ 浓度的增加，电化学响应逐渐减小，这可能是由于当 K^+ 浓度比较小

时，有利于适配体形成 G-四螺旋结构的复合物。然而，这种复合物是以高负电荷状态^[55]存在的，在这种情况下，可能高含量的 K^+ 能够中和 G-四螺旋复合物的负电荷，从而妨碍了带正电荷的 MB 接近电极表面。综合考虑各种因素，我们最终选择了 10mM 的 K^+ 浓度。对于 Mg^{2+} 浓度的影响，我们得到的响应信号如 Figure 2.5B 所示。从图上可以看到，电信号开始是随着 Mg^{2+} 浓度的增加而逐渐增强，当浓度为 10mM 时达到最大，随后又逐渐减小。这是因为在这个浓度下，形成的适配体的 G-四螺旋结构最稳定。

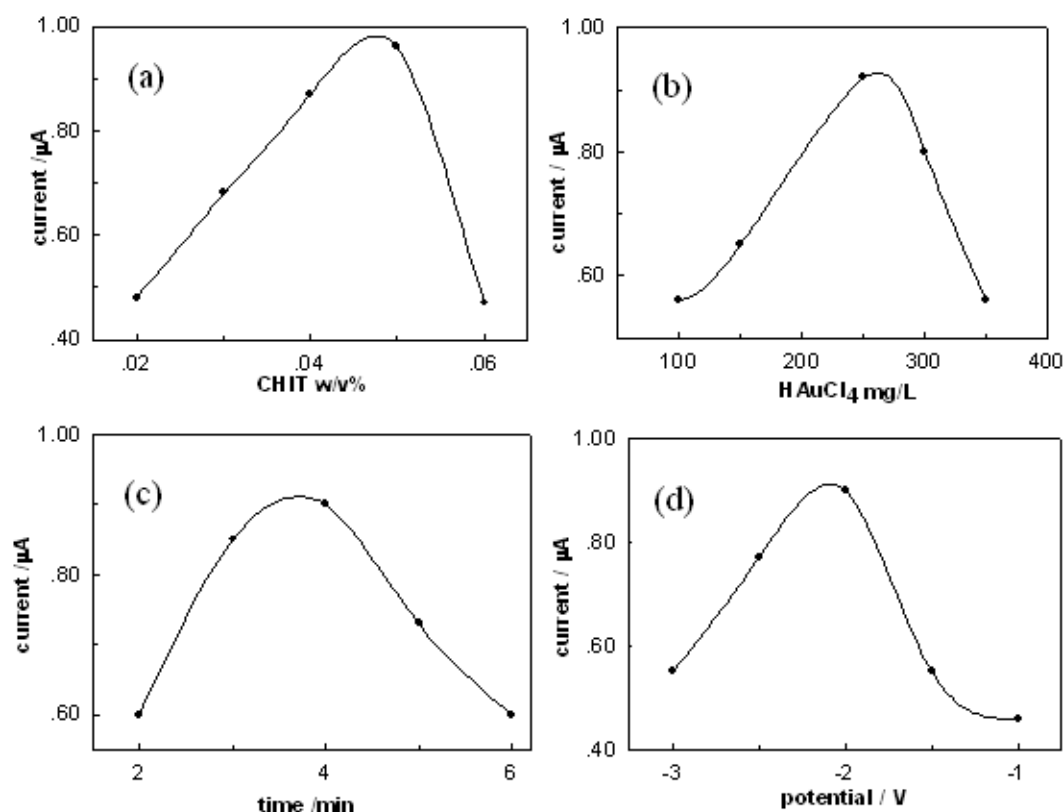


Figure 2.3 (a) Effect of CHIT concentration on the sensor to 60nM thrombin in Tris-HCl buffer. Electrochemical deposition conditions: H AuCl₄ concentration 250 mg L⁻¹, electrochemical deposition time 240s, applied potential -2V; (b) Effect of H AuCl₄ concentration. Electrochemical deposition conditions: the same as (a) with 0.05% CHIT; (c) Effect of deposition time. Electrochemical deposition conditions: the same as (b) with 250mg L⁻¹ H AuCl₄; (d) Effect of applied potential. Electrochemical deposition conditions: the same as (c) with electrochemical deposition time of 240s.

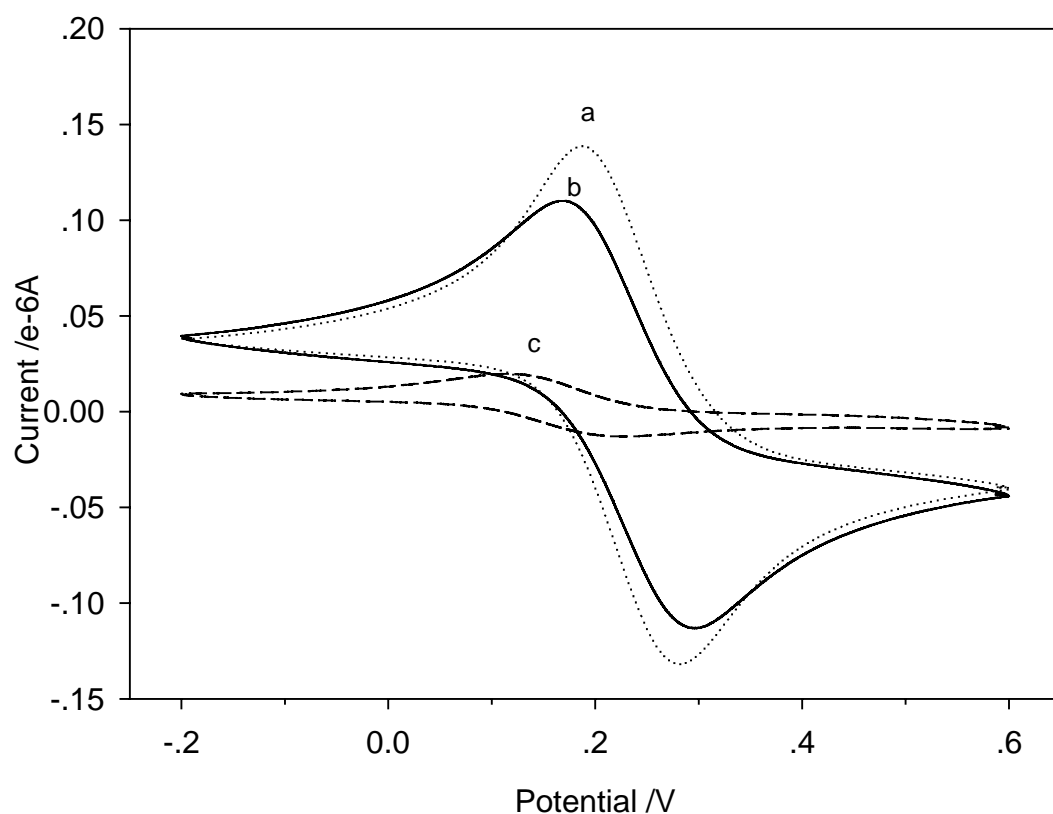


Figure 2.4 Cyclic voltammetric curves of nanogold-chitosan/GCE (a); bare GCE (b); antibody/nanogold-chitosan/GCE(c). Supporting electrolyte:10mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ containing 0.2M KCl; Scan rate 100mV s^{-1} .

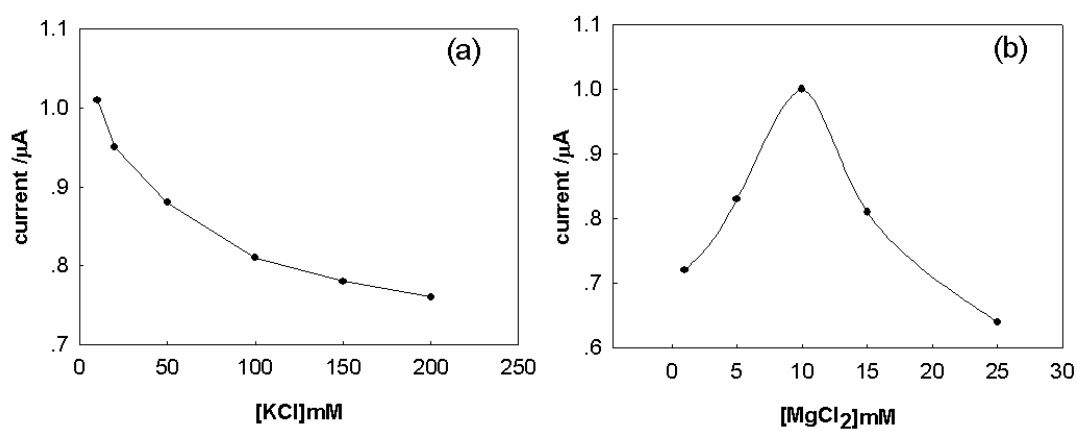


Figure 2.5 Electrochemical response of the sensor as a function of KCl (a) and MgCl_2 (b) concentration.

2.3.3 电极的响应性能

在这个工作中，凝血酶的适配体的设计方式如下：(58-mer, 5'-GACAGACGATGTGCTGACTACTGGTTGGTGAGGTTGGGTTAGTCA GCACATCGT CTGTC-3')，其中黑体部分是凝血酶的原适配体^[56]，沿着两端增加的碱基是相互配对的。电活性物质 MB 已经广泛报道了能直接嵌入单链或是双链的 DNA^[57-63]中，在我们的实验中，我们直接将 MB 嵌入到互补的双链 DNA 当中，然而，MB 是带正电荷的，因此它能非特异性地吸附到蛋白质或是带负电荷的适配体上。为了缓解这种非特异性吸附，我们用 2% 的 BSA 封闭抗体上的非特异性位点。另外，我们用高离子强度的缓冲液彻底冲洗电极(10mM Tris-HCl, pH7.4, 包含 10mM KCl, 10mM MgCl₂ and 0.1M NaCl)。Figure 2.6 显示的是电极对不同浓度的凝血酶的响应信号，从图上可以看出，电极峰电流强度随着凝血酶的浓度增加而增加。检测凝血酶的线性区间大约在 1.0-60.0nM，线性相关因子是

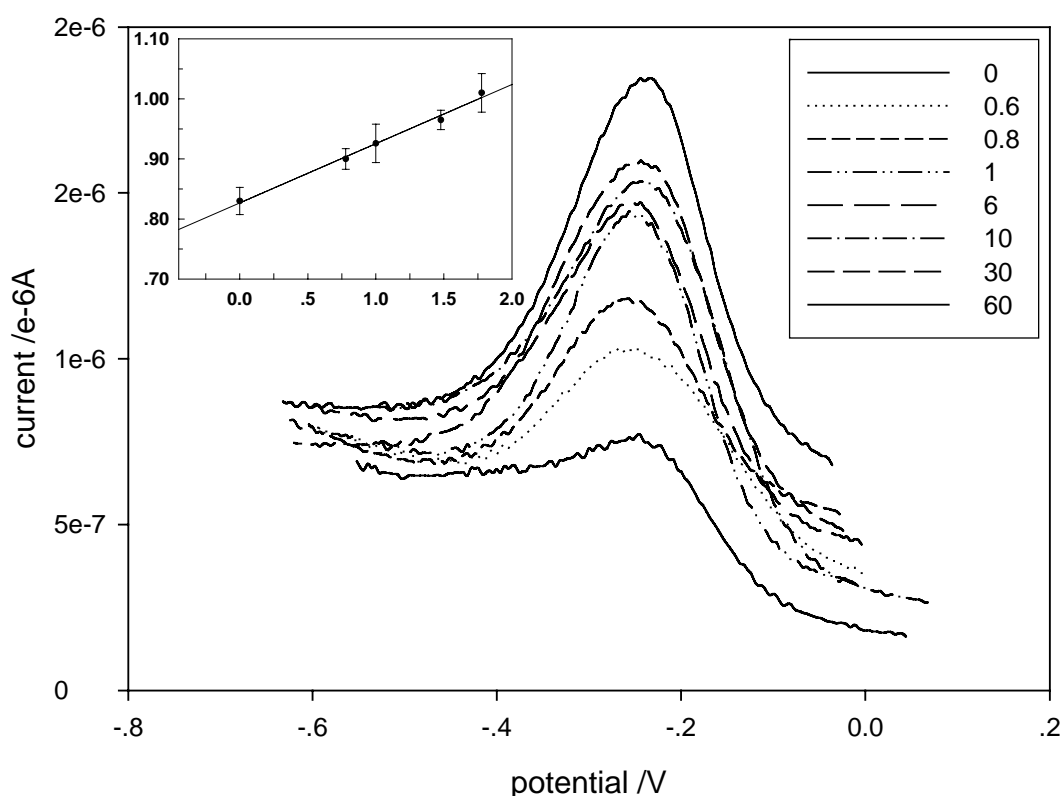


Figure 2.6 The sensor response to different concentrations of thrombin in Tris-HCl buffer. Amplitude 20mV, pulse width 0.05s. The inset plot is the calibration curve of DPV signal vs logarithm of thrombin concentration.

0.996, 回归方程是 $y=8.27x+0.98$ (x 是凝血酶浓度的对数值 (nM) 和 y 是电流响应信号), 传感器的检测下限是 0.5nM。

为了证实这个传感器的特异性, 我们实施了一组对照试验。Figure 2.7 是传感器对空白, 10ng/mL 羊抗人 IgG, 2% BSA 和 60nM 凝血酶的响应信号。空白信号大约在 0.28 μ A 左右, 从图上可以看出, 电极有比较好的选择性。

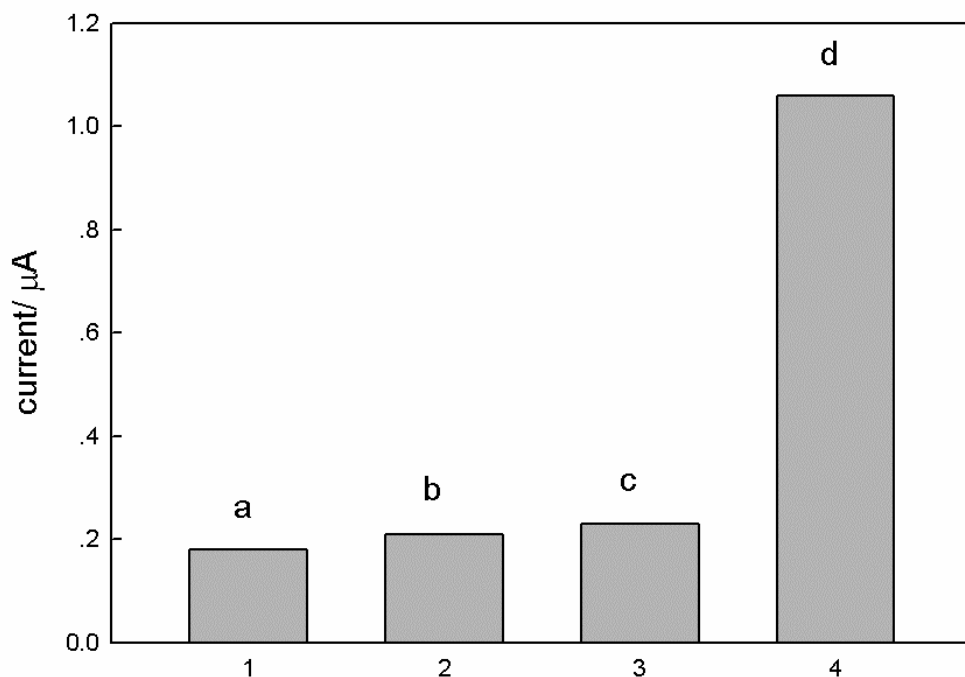


Figure 2.7 Comparison of the DPV response to different substances. (a) blank; (b) 10ng mL⁻¹ goat anti-human IgG; (c) 2% BSA; (d) 60nM thrombin. All of these experiments were carried out under the optimized conditions.

2.4 小结

本文研制了一种基于纳米金-壳聚糖复合膜为固定界面, 利用抗体和适配体作为夹心元素, MB 作为电化学活性标记物的新型电化学传感器。这种传感器充分利用了纳米金大的比表面积、良好的导电性能以及壳聚糖优良的成膜性能和生物相容性, 构建了一个很好的固定界面。在这种抗体适配体的夹心模式中, 用适配体代替了传统免疫分析中的抗体检测探针, 使这个方法更加灵活。而且还由于结合了抗体和适配体二者的特异性, 实现了凝血酶的高选择性检测。将电活性物质

亚甲基兰直接嵌入到适配体中，避免了对其进行修饰，使整个检测过程简单化。对目标物而言，夹心元素抗体和适配体的获得比较容易，这个方法为其他的蛋白质的检测提供了新的平台。

第3章 基于适配体酶放大的电化学免疫传感器

3.1 前言

蛋白质的检测在基础研究和临床检测中都具有非常重要的作用，而酶联免疫分析又是目前在免疫分析中检测蛋白质的最普遍的方法之一^[64~65]。它是70年代在放射免疫分析的基础上发展起来的一种新的免疫方法，这个方法是将酶催化底物的放大作用和抗原抗体免疫反应的高亲和力、高特异性结合起来的分析方法。在这种分析方法中，一般采用的是在二抗上标记一个能催化底物产生颜色变化、化学发光、电信号变化或是荧光等的酶，通过标记这些物质，采用相应的检测仪器，就能检测到信号。在这些方法中，基于光学测定的免疫分析需要笨重的、复杂的仪器和精密的维护，这样就限制了他们的户外使用。然而，电化学方法由于它灵敏度高、检测简单、能耗低、仪器要求不高，因此电化学免疫传感器在原位检测中具有很大的应用前景。常规的电化学免疫分析系统检测到的电信号一般是来自于一些二抗上标记的酶的催化作用获得的，比如在二抗上标记碱性磷酸酯酶(ALP)和过氧化物辣根酶(HRP)^[66~67]。由于这些电话性物质容易从电极表面扩散流失，这些方法的灵敏度就受到限制。另外，二抗的标记相对比较困难，大部分带标记的二抗在市场上比较难获得，通常需要在实验室自己标记。抗体的标记过程耗时耗力，步骤繁多，更重要的是，标记可能会影响抗体的亲和性，这些都局限了夹心模式免疫传感器的开发。

适配体是短的DNA或RNA寡聚核苷酸链，这些核酸链能高特异性和高亲和力地连接到很多目标物上，包括小分子，蛋白质和细胞^[68~72]。自从适配体筛选技术指数富集配体系统进化(SELEX)^[73~74]出现后，适配体已经广泛被用作不同目标物分子新的分子识别和检测配体^[4,75]。由于它们突出的优点，如良好的温度稳定性、保存期限很长等。在不影响它们结合亲和力的前提下，适配体容易与不同的目标分子在我们需要的位置结合，而且还可适用于不同的目标物，包括有毒的和弱免疫原性的，不同批量样品之间的差异也很微小，基于这些特点，适配体已经成为了一种非常有潜力的抗体的替代物。到目前为止，大量的基于适配体的分析方法已经建立起来了^[35,76~77]。为了对常规的酶联免疫分析(ELIA)进行进一步的完善，酶联适配体分析(ELAA)和混合的ELIA/ELAA夹心分析也被提出来了^[40,78~82]。这种方法结合了抗体和适配体两者的特异性，与传统的ELIA相比，大大地改善了这种分析方法的选择性。另外，由于这种对适配体的尾端修饰方法远离了识别位点，它的亲和能力几乎不受修饰的影响。

为了解决上面提到的问题，在这篇文章里面，我们介绍了一种新的电化学免

疫传感器，在采用适配体的基础上，用一种酶催化银沉积放大电信号的方法来检测。免疫球蛋白 E (IgE) 被用作模型分析物，IgE 又称为反应素，是血清中含量最少的一类免疫球蛋白，只占血清总量的 0.001%。在人体内的正常含量为 100-900ng/mL。含量高于或低于这个值都会引发相关疾病。过高时会有过敏性哮喘、季节性过敏性鼻炎、特应性皮炎等。过低时会导致复合性免疫缺陷病、无 γ -球蛋白血症等。在这个检测体系中，多克隆抗体作为捕获探针，通过一层半胱胺自组装膜固定在电极表面，生物素化的 IgE 适配体代替传统的生物素化的抗体，作为检测探针来组成一种新型的夹心模式。这种夹心方法结合了抗体和适配体两者的亲和力，能够实现高特异性分析。亲和素化的碱性磷酸酯酶 (ALP) 和生物素化的适配体相连，从而连接到电极表面。ALP 催化抗坏血酸磷酸盐水解成一种强的还原剂抗坏血酸，将底液中的银离子还原成银，沉积到电极表面。沉积的银的量与电极表面的 IgE 的量成正比，再通过银单质的溶出伏安检测电流信号。酶催化银单质的沉积避免了一般的电活性产物的扩散，能够使银富集到电极表面。用这个免疫传感器，能够实现高特异性和高灵敏度的蛋白质检测。

3.2 实验部分

3.2.1 试剂与仪器

生物素化的 IgE 适配体由大连宝生物公司合成，序列如下：5'-GGG GCA CGT TTA TCC GTC CCT CCT AGT GGC GTG CCC C-biotin-3'。人的 IgE 血清和羊抗人 IgE 多克隆抗体购自于 Biodesign(美国)。亲和素标记的碱性磷酸酯酶 (SA-ALP) 和牛血清白蛋白 (BSA) 由北京鼎国公司提供，半胱胺和戊二醛 (25%) 购自于 Sigma (美国)。抗坏血酸磷酸酯购自 Express Technology (日本)。所有化学药品都是分析纯，在使用前没有经过进一步的纯化，所用的溶液均用二次水制备，所用缓冲溶液是 10mM 的磷酸二氢钾/磷酸氢二钠缓冲液(PBS, pH7.4)，其中含 1mM 的 $MgCl_2$ 。

线性扫描伏安 (LSV) 和循环伏安 (CV) 测定是在一台 CHI 760B (上海辰华仪器公司) 电化学工作站上完成的。常规的三电极系统包含一个直径为 2.0 毫米的金电极作为工作电极，铂电极作为辅助电极，饱和甘汞电极(SCE)作为参比电极。压电实验是在一台 LK98A 型微机电化学分析系统 (天津市兰力科化学电子高技术有限公司)；CN3165 型高分辨计数器 (石家庄无线电四厂)；9MHz，AT-切型石英晶体双面镀金电极 (晶片直径 12mm，电极直径 6mm，北京晨兴无线电器材厂)，为获得溶液中的稳定振荡，晶体采用单封闭型；振荡电路为自制 TTL-LC 电路。

3.2.3 抗体在金电极表面的固定

金电极依次用 0.3 和 0.05 微米的铝粉打磨，然后在超纯水和乙醇中超声清洗。随后，金电极用 piranha 溶液浸泡一段时间，用水冲洗，然后在 0.5M 的 H_2SO_4 中在 0 到 0.6V 的范围内扫 20 分钟，对表面进行处理。最后，电极用水冲洗干净，氮气干燥。

将预处理好的金电极立即浸入到 10mM 的半胱胺中，在冰箱中(4 °C)过夜组装，形成一层自组装膜(SAM)，再与 2.5%的戊二醛溶液在 37 °C 下反应一个小时。随后，电极与 10 μL 的 750 $\mu\text{g/mL}$ 的 IgE 多克隆抗体在 37 °C 恒温箱中培育一个小时，电极表面没有反应的醛基用 2%的 BSA 在 37 °C 下封闭一小时，随后分别用缓冲液和水冲洗。

3.2.4 基于生物素化适配体识别和酶催化放大的免疫分析

将一系列包含不同浓度纯化的 IgE 抗原样品滴到抗体修饰的电极表面，在 37 °C 恒温箱中培育一个小时，分别用缓冲液和水冲洗。随后，将 10 μL 1.7 μM 热处理过的生物素化的适配体滴加到电极表面，在 37 °C 下培育 1h，每进行一步反应后，电极在 PBS 中搅拌洗 10min。

10 μL SA-ALP 溶液(将原液用含 2%BSA 的 10mM pH7.4 PBS 按 1: 100 稀释)滴到电极表面，在 37 °C 的恒温箱中培育 30min。在用 PBS 彻底清洗以后，将电极浸入到由 50mM 的甘氨酸 (pH9.18)，1mM AgNO_3 和 1mM 抗坏血酸磷酸盐组成的溶液中在 37 °C 反应 20min，反应完后，电极用水冲洗。

3.2.5. 电化学检测

用线性扫描伏安 (LSV)，从 0 到 0.9V 的范围内，用 100mV/s 的扫描速度，在含 0.6M KNO_3 作支持电解质的 0.1M HNO_3 溶液中进行检测。

3.3 结果与讨论

3.3.1. 电化学免疫传感器的原理

Figure 3.1 所示是这个工作中检测 IgE 的电化学免疫传感器的原理图，首先在处理好的电极表面自组装一层半胱胺膜，用戊二醛作为交联剂，将 IgE 多克隆抗体作为捕获探针固定到电极表面，在与 IgE 的样品溶液培育一段时间以后，再将生物素化的适配体与待分析物反应，随后通过生物素-亲和素特异性反应将亲和素标记的碱性磷酸酯酶 (SA-ALP) 连接到电极表面，通过酶催化银沉积^[12,83]来实现信号放大。抗坏血酸磷酸盐是一种非还原性的试剂，但是，在电极表面 ALP 酶的催化下，它能够转化成一种强还原剂抗坏血酸^[84]。抗坏血酸能够还原溶液中的银离子成金属银，沉积到电极表面。沉积的银离子的量与固定在电极表面的 IgE

成正比。然后，用线性扫描伏安对沉积的银进行测定，从而对 IgE 进行定量。

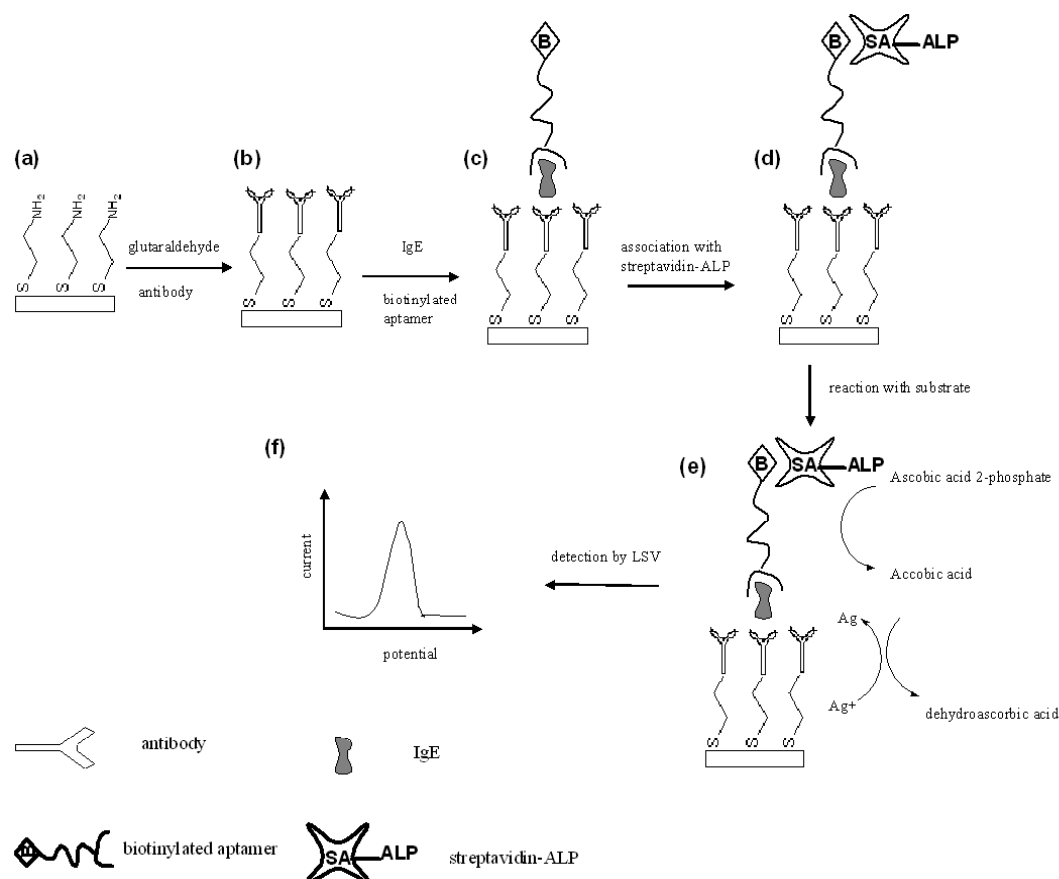


Figure 3.1 Schematic outline of the electrochemical immunosensor with aptamer-based enzymatic amplification including (a) formation of SAM with cysteamine on the gold electrode; (b) immobilization of IgE polyclonal antibody on the gold electrode; (c) capture of IgE and association with biotinylated IgE-aptamer; (d) association with streptavidin-ALP; (e) reaction with substrate solution; and (f) silver detection by LSV.

3.3.2 试验条件的优化

3.3.2.1 IgE 多克隆抗体浓度的影响

抗体在电极表面的固定量是构成这个生物传感器的一个非常重要的因素。本文研究了抗体的浓度对这个传感器响应值的影响，从 Figure 3.2 上我们可以看到传感器的响应值刚开始是随着抗体浓度的增加而增加，在 $750 \mu\text{g/mL}$ 时达到最大值，当浓度持续增加时，信号反而降低。这可能是由于当抗体浓度高时，它到达电极表面的速度就相对要快，固定速度也相对要快。然而，当浓度太高时，免疫反应的空间位阻就会增加，因此，我们选择的抗体浓度是 $750 \mu\text{g/mL}$ 。

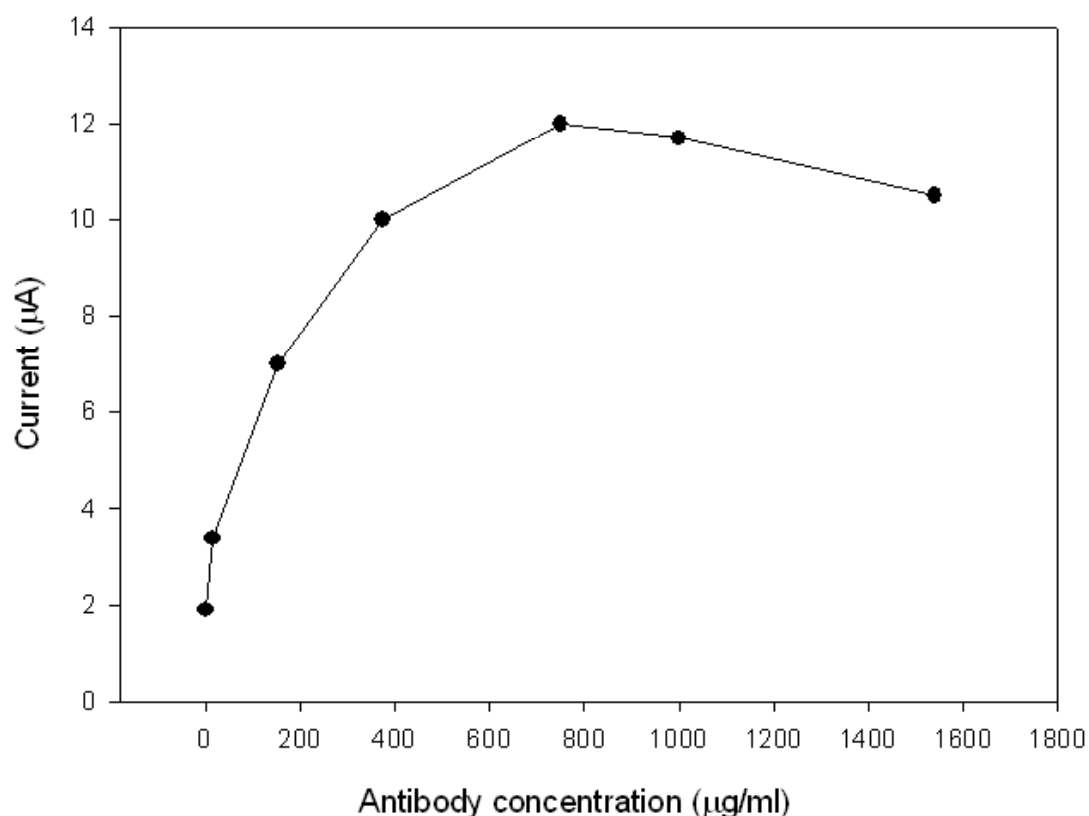


Figure 3.2 Effect of the concentration of anti-human IgE polyclonal antibody on the peak current in the presence of 10nM IgE.

3.3.2.2. SA-ALP 酶稀释比例的影响

实验表明 SA-ALP 酶的稀释比例会明显地影响免疫传感器的空白值 (Figure 3.3 虚线) 和信号响应 (Figure 3.3 实线)。从图上很明显的就能看到, 当稀释比例在 1: 300 到 1: 100 之间时, 响应信号急剧上升, 当稀释比例再增加时, 信号增加的幅度就慢慢减缓了。同时, 从图上还可以看出, 当稀释比例小时, 信号值很大, 但空白响应值也相应比较大, 信噪比不高。很明显, 当稀释比例是 1: 100 时, 对这个反应所需要的酶的含量已经达到了饱和值。为了得到最优的响应信号和背景信号比值, 我们最终选择了 1: 100 的稀释比例。

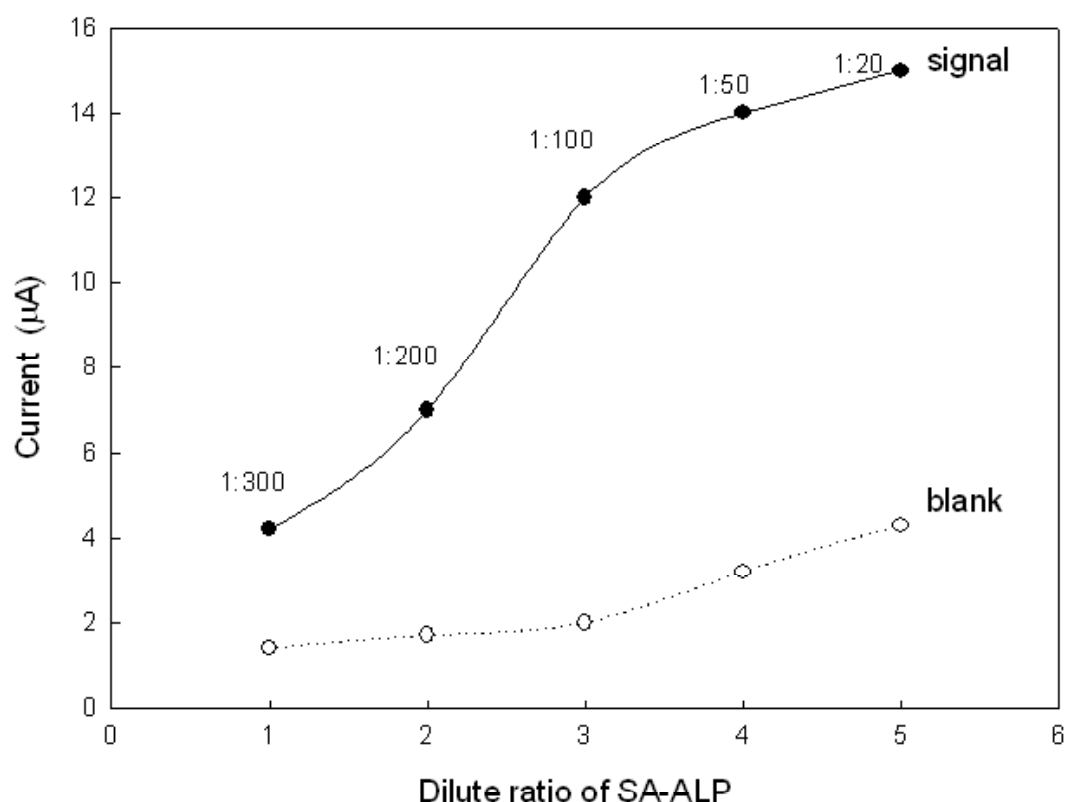


Figure 3.3 Effect of SA-ALP dilution ratio. The blank response is shown as the dot line (...) and the signal response shown as the solid line (—) in the presence of 10nM IgE.

3.3.2.3 Mg^{2+} 浓度的影响

据报道说高的离子强度有利于适配体结合到 IgE 上^[85]，先前报道的结果指明在金属离子的存在下，IgE 和适配体之间的结合强度会减弱，而且，二价离子的影响比一价离子更强^[86]。因此，我们选择了 Mg^{2+} 离子作代表来研究二价离子对响应信号的影响，结果如 Figure 3.4 所示。从图上可以看出，当镁离子浓度是 1mM 时响应值达到最大，当离子浓度从 1mM 上升到 20mM 时，传感器的信号值反而下降，这个影响可能是由于高浓度的 Mg^{2+} 能够影响适配体的构型，降低 IgE 和适配体的亲和力。因此，1mM 的 Mg^{2+} 的浓度是我们这个工作中的最优化离子浓度。

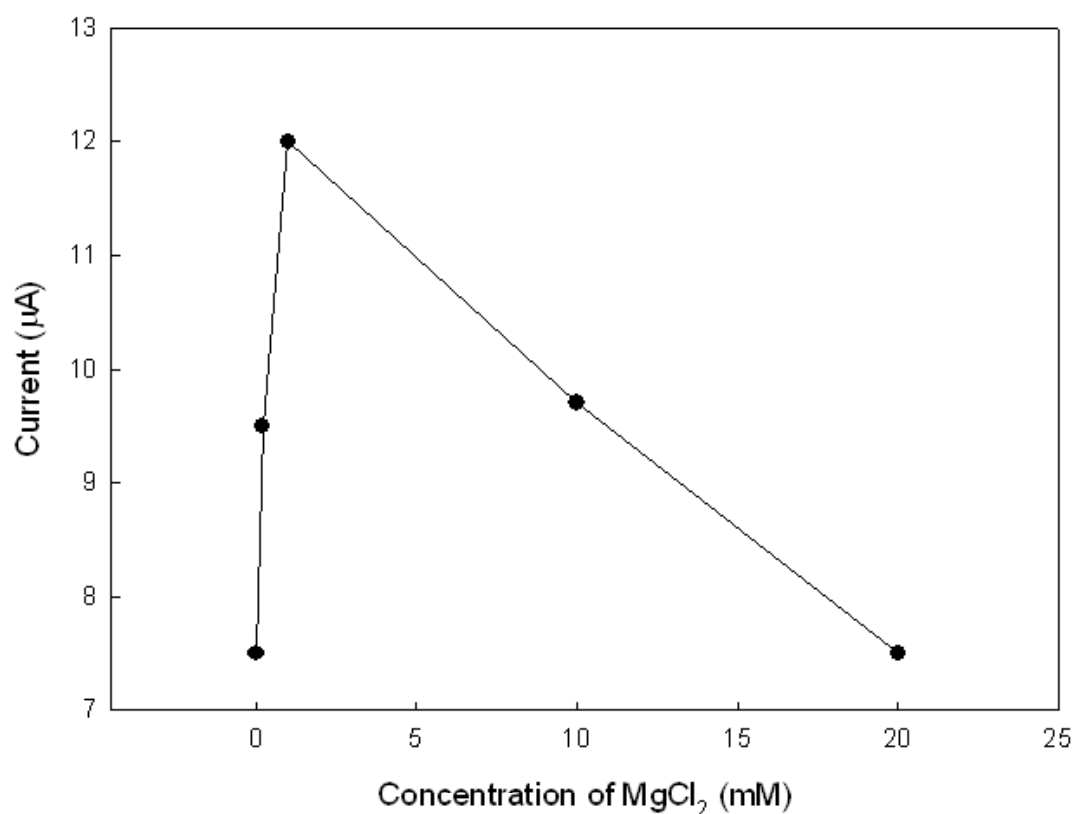


Figure 3.4 Effect of concentration of Mg^{2+} on the peak current in the presence of 10nM IgE.

3.3.3 免疫传感器的分析性能

Figure 3.5 显示的是基于适配体酶放大免疫传感器的线性扫描响应值，传感器对 BSA 的响应值在 Figure 3.3 中用虚线给出。在抗体固定在电极表面上以后，修饰好的电极在 2% 的 BSA 中培育，然后与 SA-ALP 酶连接，发生银沉积反应。沉积上的银在含 0.6 M KNO_3 的 0.1 M HNO_3 溶液中用 LSV 检测。从图上我们能看到这个传感器对 BSA 的响应值仅仅为 2 μA （四次反应的标准偏差是 0.15 μA ），实验表明充足的冲洗以及挑选合适的封闭剂能够有利于降低非特异性响应。将这个值和 Figure 3.3 中实线对应的响应值相比，0.1nM IgE 对应的信号值大约是 7.5 μA （四次重复试验值的标准偏差是 0.35 μA ）。这个试验结果表明来自于非特异性吸附的电流值非常小，不会干扰 0.1nM 的 IgE 的测定。

Figure 3.5 中的插图示出的是免疫传感器的校正曲线，从图中我们可以看到峰电流值与 IgE 在 0.1nM 到 100nM 的范围内线性相关。线性回归方程是 $i_p = 7.41 + 0.463 C$ （ i_p , 峰电流, C , IgE 浓度），线性相关系数是 0.9962。由 3σ （ σ 是空白信号的标准偏差）规则可以计算得到检测极限是 0.02nM，这个低的检测极限比以前报道的值要更加灵敏^[15,85]。

为了证实这个传感器的特异性，我们还研究了这个传感器对其他的几种蛋

白质的影响，如 IgA, IgM 和 IgG，响应结果如 Figure3.6 所示。从图上可以看出，传感器对这几种蛋白质的响应信号接近空白信号。也就是说，对于干扰蛋白质，对我们的响应没有明显的影响，这个传感器表现了高的特异性，这可能是由于结合了抗体和适配体两者的特异性，从而使得传感器的选择性提高。

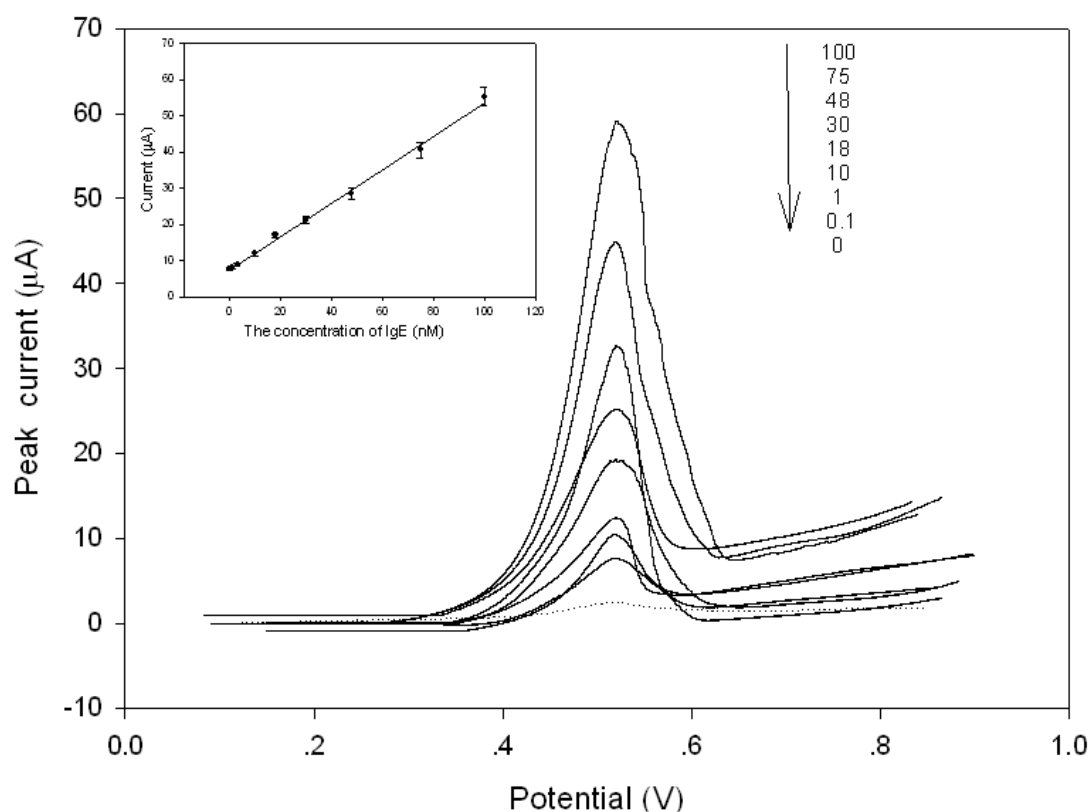


Figure 3.5 Linear sweep voltammetry responses of this sensor to different concentrations of human IgE (concentrations from 0 to 100 nM) in $\text{HNO}_3\text{-KNO}_3$ at a scan rate of 50mVs^{-1} . The inset shows the calibration curve for the detection of human IgE. Error bars represent S.D, $n=4$.

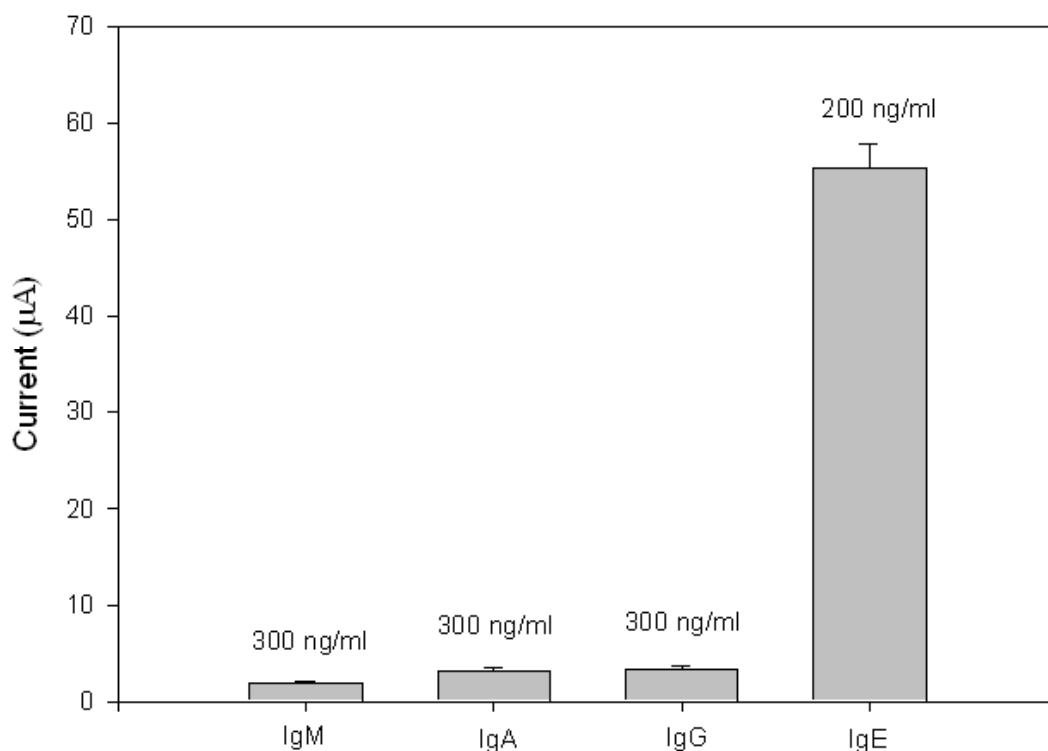


Figure 3.6 Specificity of the fabricated immunosensor. The concentration of IgE was 200ng/ml and the concentration of IgG, IgA and IgM were 300ng/ml. The results were the averages of four experiments.

3.4 小结

基于适配体的酶放大方法，我们开发了一个高灵敏和高特异性的电化学免疫传感器。这个方法利用了生物素化的适配体代替传统的生物素化的抗体来作为检测探针，在检测过程中结合了抗体和适配体两者的活性，后者的活性不受标记的影响。酶催化银沉积用来放大信号，提高免疫传感器的灵敏度。结果表明这个方法提供了高的灵敏度和特异性。考虑到各种各样的蛋白质都有适配体，并且可以在适配体的不同位置进行修饰，这个方法为很多种蛋白质的方法检测提供了平台。这个传感器在免疫分析中的超灵敏检测方面具有很大的潜力。

第 4 章 基于目标物诱导适配体置换技术对纳摩尔级腺苷的无标记电化学检测

4.1 前言

核酸适配体是经人工筛选出来的寡核苷酸片断,对于蛋白质、小分子甚至细胞^[88~89]等各种靶分子具有高度的特异性和亲和力。到目前为止,已有大量的核酸适配体作为识别探针用于检测凝血酶^[77,81~82]、免疫球蛋白 E (IgE)^[9, 20]、血小板衍生生长因子 (PDGF)^[29, 90]等分析物。由于核酸适配体具有靶分子广,容易合成和储存,以及在标记、固定化、信号传导和再生、多功能性等抗体所不及的优点,它在化学界引起了越来越广泛的关注。近年来已发展了各种以核酸适配体作为识别元素的电化学^[37, 76]、石英晶振^[15]、光学^[28, 32, 91]生物传感器。其中,基于电化学检测方法的核酸适配体传感器凭借其高灵敏度和易检测性,在蛋白质与小分子检测方面具有巨大的发展前景。大部分的电化学适配体传感器采用的传导机理是目标物键合诱导核酸适配体的构象发生变化,通过电极表面适配体上标记的氧化还原活性物质与电极表面距离的变化,从而调制电流信号的变化,如基于目标物诱导链置换或分子信标变构开关,用于检测 PDGF^[36]、可卡因^[13]、凝血酶^[37, 92]和 ATP^[34, 93]的无试剂适配体传感器。这些传感器对于靶分子的确定具有较高的选择性和灵敏性,但是在合成具有氧化还原活性物质标记的适配体探针时需要复杂的标记过程和特效试剂,从而限制了它们的常规应用。因此,应致力于发展无标记和低成本的适配体生物传感器^[34, 94~95]。

在本工作中,我们设计了一种基于适配体/捕获探针双链结构的目标物诱导适配体置换方法,以亚甲基兰 (MB) 为电化学活性指示剂的无标记可再生电化学适配体传感器。本文中我们选择腺苷作为模型分析物,腺苷是核苷酸中的一种重要组成物质,凭借其在生物进程中^[96~97]的重要性而引起人们的兴趣。亚甲基兰作为一种电化学活性指示剂,据报道它是以一种独特的方式^[98~99]与单链 DNA 和双链 DNA 相互作用。亚甲基兰不仅能够嵌入核酸双链中,还能与鸟嘌呤碱基键合^[60, 100]。由于亚甲基兰的峰电流能够反映杂交反应程度,它已被广泛用于 DNA 传感器^[101~102]和分子信标变构开关的适配体传感器中^[13, 36, 92, 103]。亚甲基兰具有很低的成本和良好的氧化还原特性,因此我们选择它为该适配体传感器的电化学活性指示剂。通过适配体与表面固定化捕获探针的杂交反应形成双链,接下来双链与亚甲基兰反应,从而获得适配体传感器。随着腺苷的引入,适配体与腺苷之间的反应

将适配体从捕获探针上置换下来，导致传感界面上双链量和核酸量的减少，从而使吸附在核酸链上的亚甲基蓝量相应减少，最终表现为电化学信号的降低。实验表明亚甲基蓝的电流信号与腺苷的浓度在 5 至 1000 nM 范围内存在线性相关，线性范围跨度达三个数量级，检测下限达 1 nM。相对于其他核苷，该适配体传感器表现出良好的特异性。该传感器容易再生，在两周内具有良好的稳定性。

4.2 实验部分

4.2.1 试剂与仪器

寡核苷酸根据文献[20]设计，由宝生物公司（中国，大连）合成。两种寡核苷酸序列分别为：1) 捕获探针：3'-SH-(CH₂)₃-tct ctt gga ccc-5'; 2) 32-碱基腺苷适配体：5'-aga gaa cct ggg gga gta ttg cgg agg aag gt-3'。腺苷，胞嘧啶，尿苷，鸟苷均从 Generay Biotech Co Ltd. 购得。巯基乙醇（MCE，98%，Sigma Aldrich 公司），1,6-巯基己醇（HDT，≥97%，Fluck, Switzerland），亚甲基蓝（MB，长沙化学试剂公司）以及其余化学药品均为分析纯，使用前未作进一步纯化。0.1 M PBS 缓冲液(含 10 mM Na₂HPO₄，10 mM NaH₂PO₄，0.1 M NaCl，pH 7.4)用于溶解各种浓度的样品及所有的 DNA 序列。实验用水为超纯水（Barnstead/Thermolyne 公司生产的超纯水机制得，电阻不小于 18.3MΩ.cm）

电化学实验在 CHI 760B 型电化学工作站（中国上海辰华仪器公司）上进行。实验采用常规的三电极系统，金电极(99.99%, polycrystalline gold rod, 直径 2 mm) 作工作电极，饱和甘汞电极作参比电极，铂电极作为对电极。

4.2.3 20nm 金纳米颗粒的制备

金纳米颗粒的制备参照文献^[104]的方法，有微小改动。使用的玻璃器皿均用新配制的王水溶液(HNO₃/HCl, 体积比 1:3)浸泡,再用二次蒸馏水彻底冲洗。在快速搅拌下向 100mL 含 0.01% HAuCl₄ 的回流液中加入 1 mL 1.0%的柠檬酸三钠溶液，混合物在沸腾状态下继续维持 10 分钟，当溶液颜色变为深酒红色时，即制得金纳米颗粒。

4.2.4 传感界面的制备

将金电极依次用直径 0.3 微米和 0.05 微米的氧化铝粉末抛光处理，再依次用二次水、乙醇、二次水分别超声清洗 5 分钟。然后将电极在新制的 piranha 溶液中浸泡 20 分钟，最后用二次水冲洗并用氮气吹干。

将清洗好的电极立即浸入 5mM 巯基己醇的乙醇溶液中，4°C 反应 1 小时，使金电极表面组装上一层巯基己醇分子^[105]。用无水乙醇和二次水清洗后，在金电极表面滴加 50 μL 金纳米颗粒溶液，37°C 恒温反应 12 小时，形成纳米金层。然后在

修饰电极表面滴加 10 μ L 的 1 μ M 的捕获探针，反应 1 小时后滴加 10 μ L 的 1 mM MCE 封闭电极表面的非特异性位点，获得最佳的核酸取向。最后，在修饰好的电极表面滴加 10 μ L 的 2 μ M 的腺苷适配体，37 $^{\circ}$ C 恒温与固定在电极表面的捕获探针培育 1 小时后即获得传感界面。电极不使用时，保存于 4 $^{\circ}$ C 下 PBS 缓冲液中。

4.2.5 试样的电化学检测与传感界面的再生

将传感界面浸入含 80 μ M MB 的 0.1 M PBS 溶液中，于室温下均匀搅拌 10 分钟。用 0.1 M PBS 缓冲液清洗 5 分钟后，将 50 μ L 待测样品滴加在传感界面上，于 37 $^{\circ}$ C 下反应 1 小时。用差示脉冲伏安法 (DPV) 测量 MB 的还原峰电流。扫描参数为：脉冲幅度 20 mV，阶梯电位 50 mV，脉冲宽度 5 ms，脉冲周期 0.2 s，电压范围 0 ~ -0.5 V。

循环伏安法 (CV) 和交流阻抗谱 (IMP) 在含 0.2 M KCl 的 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ 溶液中进行，扫描速度为 100 mV/s。所有实验均在室温下进行(18 \pm 2 $^{\circ}$ C)。

实验流程如 Figure 4.1 所示，将电极浸入 2 μ M 腺苷适配体中，在 37 $^{\circ}$ C 下反应 1 小时，可实现传感界面的再生。

4.3 结果与讨论

4.3.1 修饰电极的电化学特性

在含 0.2 M KCl 的 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ 溶液中，用循环伏安法扫描可获得修饰电极的电化学特性。如 Figure 4.2 所示，按照纳米金修饰电极(Figure 4.2a)，捕获探针/纳米金修饰电极(ssDNA, Figure 4.2b)和适配体/捕获探针/纳米金修饰电极(dsDNA, Figure 4.2c)的顺序，可观察到峰电流依次减小，峰间距增大。这可能是因为电极表面组装的捕获探针 DNA 序列带有负电荷，其自组装单层阻碍了铁氰化物向电极表面的扩散，适配体序列与捕获探针杂交进一步减小了电子传递效率，从而引起电流逐渐减小。这个现象也表明，电极表面形成了由捕获探针和适配体组成的双链结构的传感界面。随着腺苷的引入(Figure 4.2d)，可观察到峰电流又有稍微的增加，大小处于 dsDNA 修饰电极和 ssDNA 修饰电极的二者峰电流之间。这个结果表明适配体序列对腺苷有高度的特异性亲和力，在不干扰捕获探针固定化的前提下，适配体成功地被腺苷所置换，从传感界面上分离。被置换下来的适配体可以减小聚阴离子化 DNA 序列与带负电荷的氧化还原离子对之间的静电排斥。

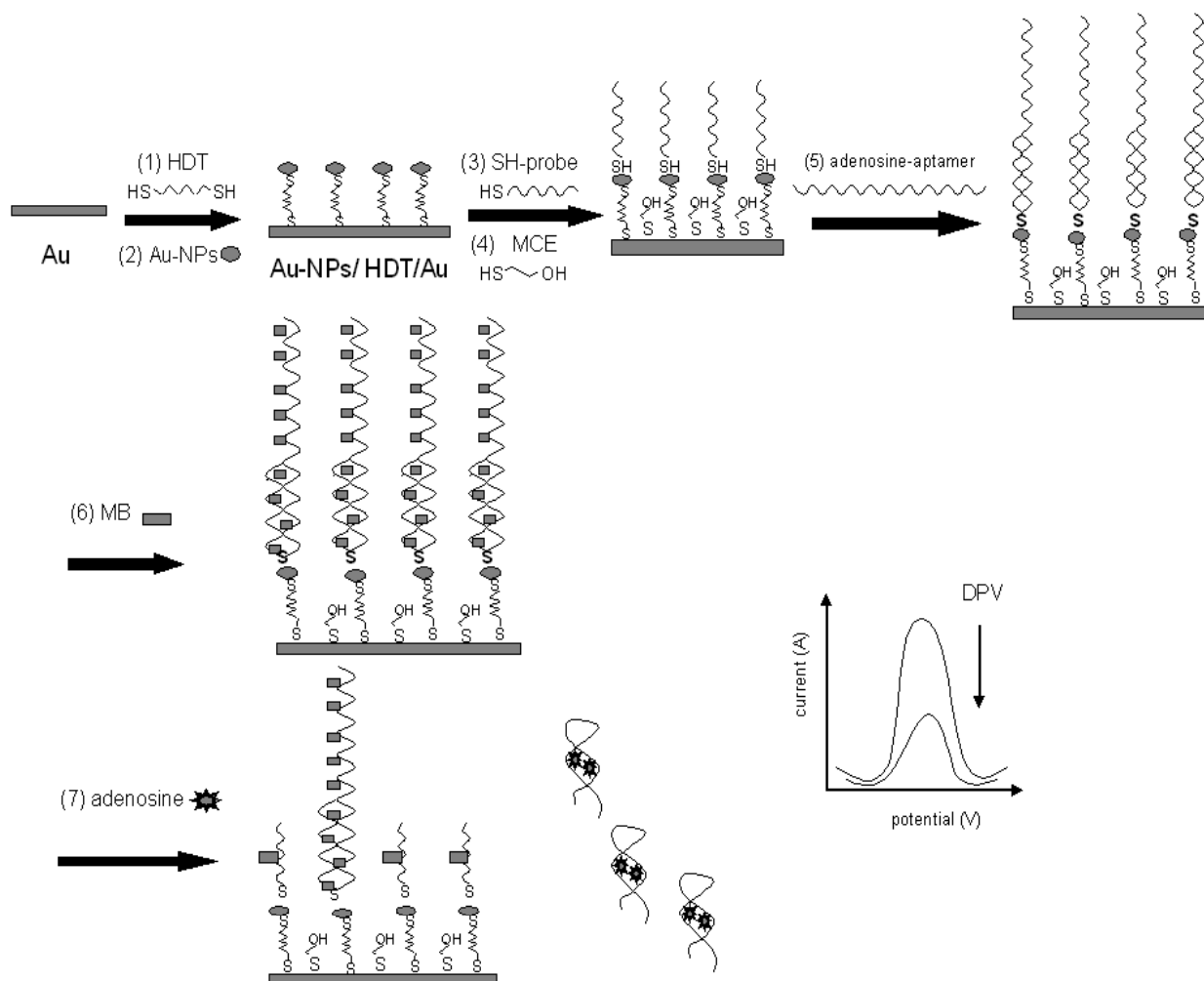


Figure 4.1 Schematic outline of the label-free electrochemical sensor for adenosine based on target-induced aptamer displacement

4.3.2 固定化界面

固定化界面能够影响传感器的性能。通过阻抗(Figure 4.3a)和 DPV(Figure 4.3b)的响应,可以比较两种不同的固定化界面。如 Figure 4.3a 所示, a 和 b 分别代表捕获探针自组装的裸金电极和纳米金/HDT 修饰的金电极,捕获探针自组装时间为 1 小时。从图上可以看出,修饰了纳米金的电极自组装上捕获探针以后阻抗的增加幅度明显比裸金电极上增加幅度大,这可能是由于电极表面带负电的捕获探针的自组装有效地减小了 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 阴离子的响应,并使电子传递阻抗加大,而阻抗的变化可以反映出固定化的捕获探针的量,阻抗的变化越大,说明组装上的捕获探针越多,因此,我们可以看出纳米金/HDT 修饰的电极上能够固定更多的捕获探针。Figure 4.3b 表明相比于裸金电极,使用修饰有纳米金/HDT 的固定化界面所获得的 MB 的响应信号更强。这可能是因为金纳米颗粒具有很高的比表面积,不仅能够

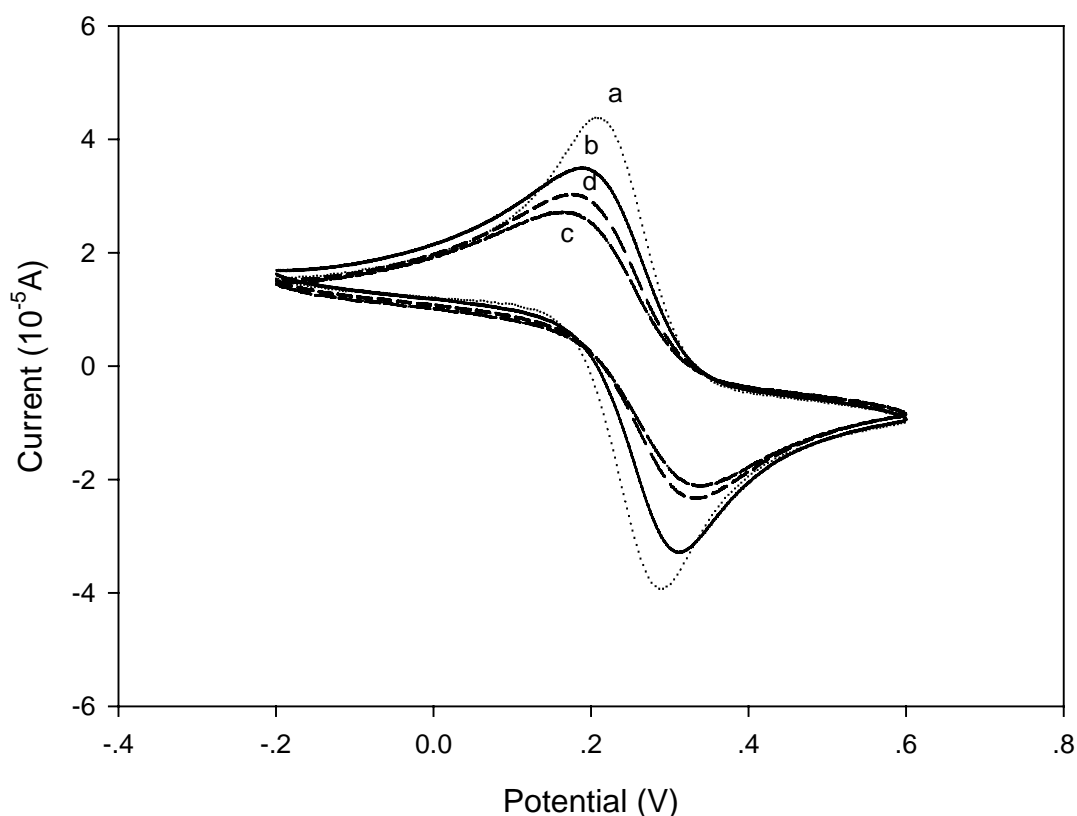


Figure 4.2 Cyclic voltammograms in 10 mM $K_3Fe(CN)_6$ solution containing 0.2 M KCl. of the electrode modified by (a) nano Au; (b) capture probe/nano Au; (c) aptmer/capture probe/nano Au; (d) (c) treated with adenosine

增加捕获探针的固定化位点，而且能够促进电子传递，鉴于这个原因，我们选择纳米金/HDT 界面来固定捕获探针。根据早先报道的方法^[36]，可得知这样组装在修饰电极上的捕获探针的表面覆盖度大约为 3.9×10^{13} DNA strands/cm²

4.3.3 试验条件的优化

在纳米金/HDT 修饰的金电极表面，捕获探针的自组装时间能够在很大程度上影响固定化的捕获探针的量。Figure 4.4 显示了捕获探针自组装时间对信号的影响。从图上得知，随着自组装时间的增加，响应信号也随之逐渐增大，到 60 分钟时，信号达到最强，响应趋于稳定。这表明此时捕获探针在电极表面的自组装已经达到饱和，因此，我们选择的捕获探针的最佳自组装时间为 60 分钟。适配体与捕获探针的杂交时间同样会影响响应信号。杂交反应进行约 60 分钟时，响应信号不再显著增加，强度逐渐趋于平稳。为了保证充分的杂交并获得更强的信号，我们选择杂交时间为 60 分钟。

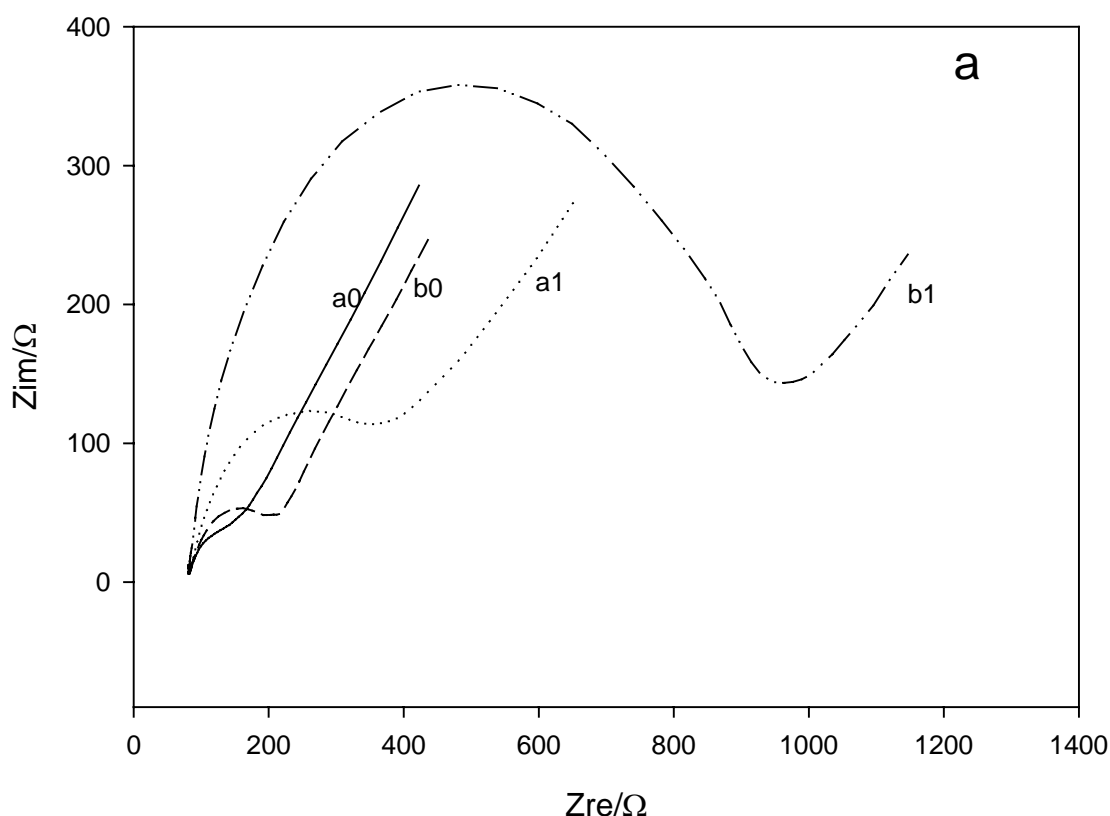


Figure 4.3 a. Impedance spectra (Zim vs Zre, Nyquist plot) by using different modified electrodes. (a0) bare gold electrode; (a1) capture probe self assembled on bare gold electrode; (b0) nano Au/HDT modified gold electrode; (b1) capture probe self assembled on nano Au/HDT modified gold electrode. The frequency changed from 0.1Hz to 100000Hz and the amplitude was 5.0mv.

4.3.4 腺苷检测的灵敏度与选择性

通过在相同实验条件下传感界面与不同浓度的腺苷进行反应来研究实验方案的选择性。如 Figure 4.5a 所示，线性回归曲线涵盖了 5 nM 至 1000 nM 的浓度范围，可用方程 $I/10^{-8}A = -0.7455 \log(C/nM) + 2.939$ 表达，线性相关系数为 0.9979，对腺苷的检测下限达 1nM。此传感器对腺苷的线性范围和检测下限与先前报道的^[94]相同或略好。

为了证实这个传感器的选择性，我们用这个传感器对其他核苷进行了检测。在相同条件下分别加入 1mM 的胞嘧啶，鸟嘌呤和尿嘧啶，加入前后传感器的电流变化幅度很小，与加入 1 μ M 的腺苷的变化相比，这些干扰物质存在下信号的变化几乎可以忽略，响应结果如 Figure 4.5b 所示，这表明该方案对于腺苷具有高度的特异性，能够将腺苷与其相似物区分开，而如此良好的选择性应归因于腺苷适配体的高度特异性。

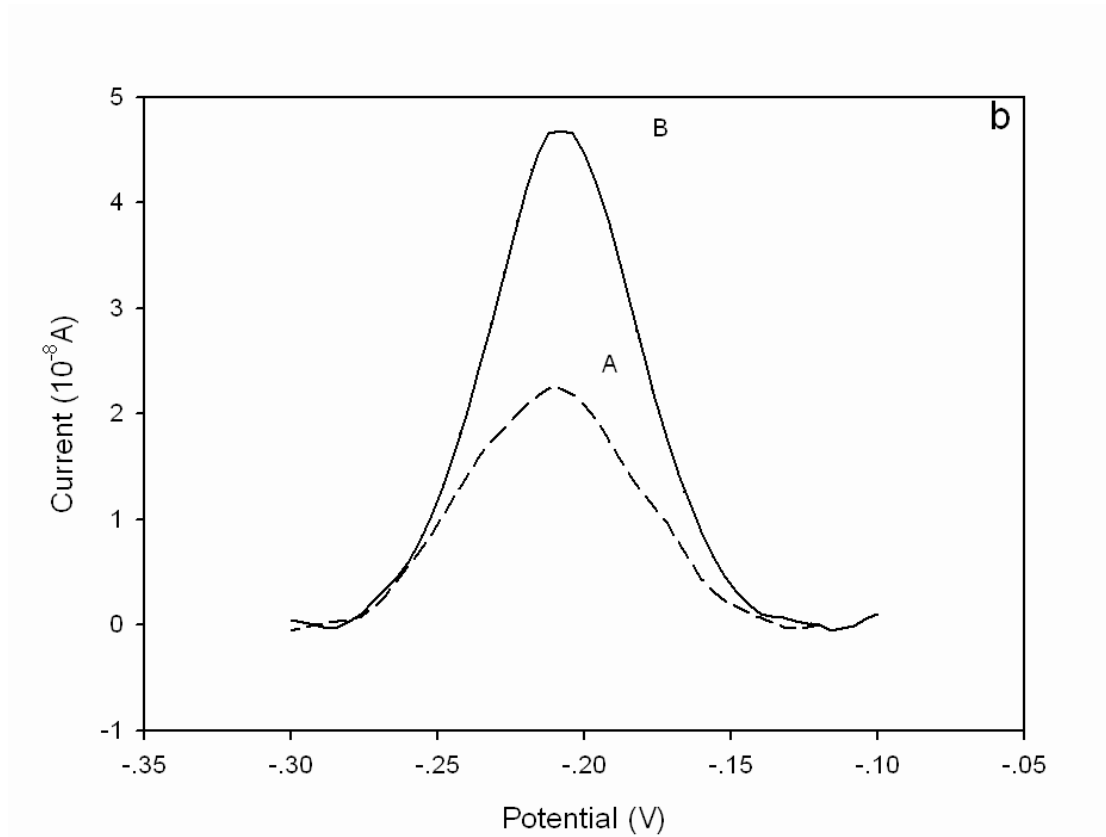


Figure 4.3 b. Influence of different immobilization interfaces. A. capture probe was immobilized on the interface of bare gold electrode; B. capture probe was immobilized on the gold electrode modified with HDT and gold nanoparticles.

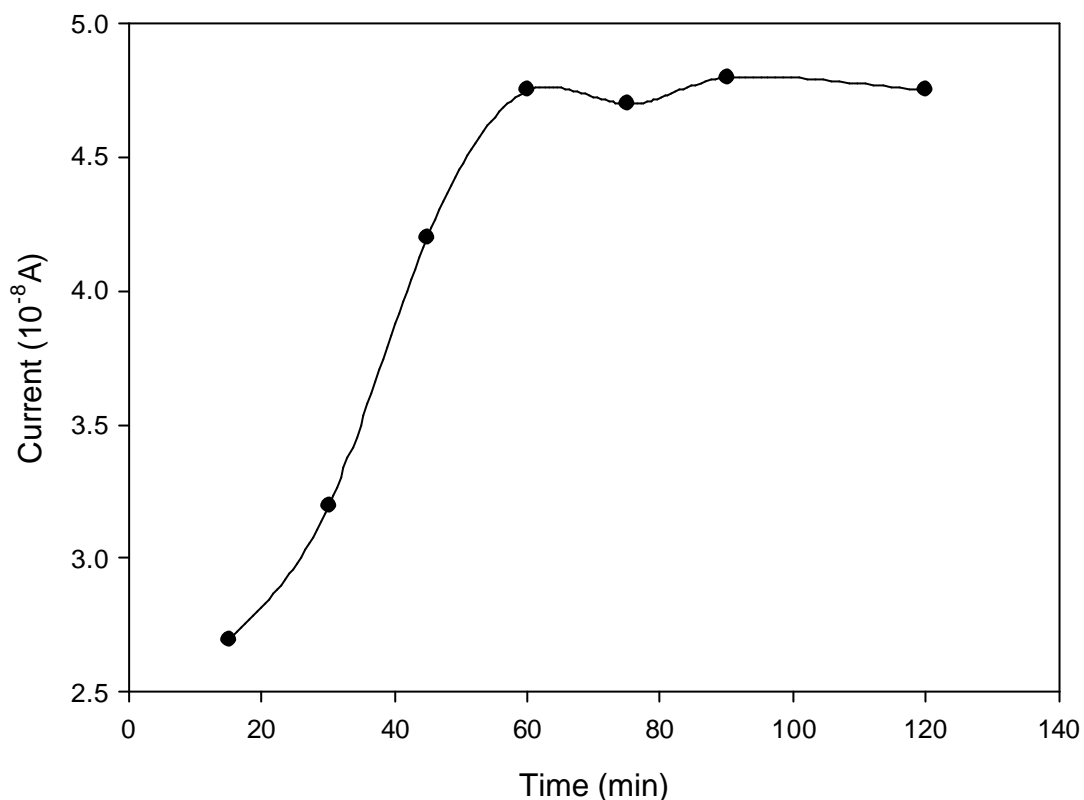


Figure 4.4 Effect of the immobilization time of capture probe on the nano Au modified electrode.

4.3.5 传感界面的再生性与稳定性

传感界面的再生性与稳定性是适配体传感器优点的两个重要方面。在这个方案中，传感界面可以通过将电极浸入适配体溶液 1 小时再生。在我们的再生试验中，可以观察到再生后的适配体传感器能够获得原始信号的 96%。再生 10 次之后，仍能保持原始信号的 90%。将电极保存在 4°C 下 0.1M PBS 缓冲液中，通过两周内不断检测相同浓度的腺苷来研究传感器的稳定性。检测信号未观察到显著变化，表明制作的传感器在储存时具有良好的稳定性。

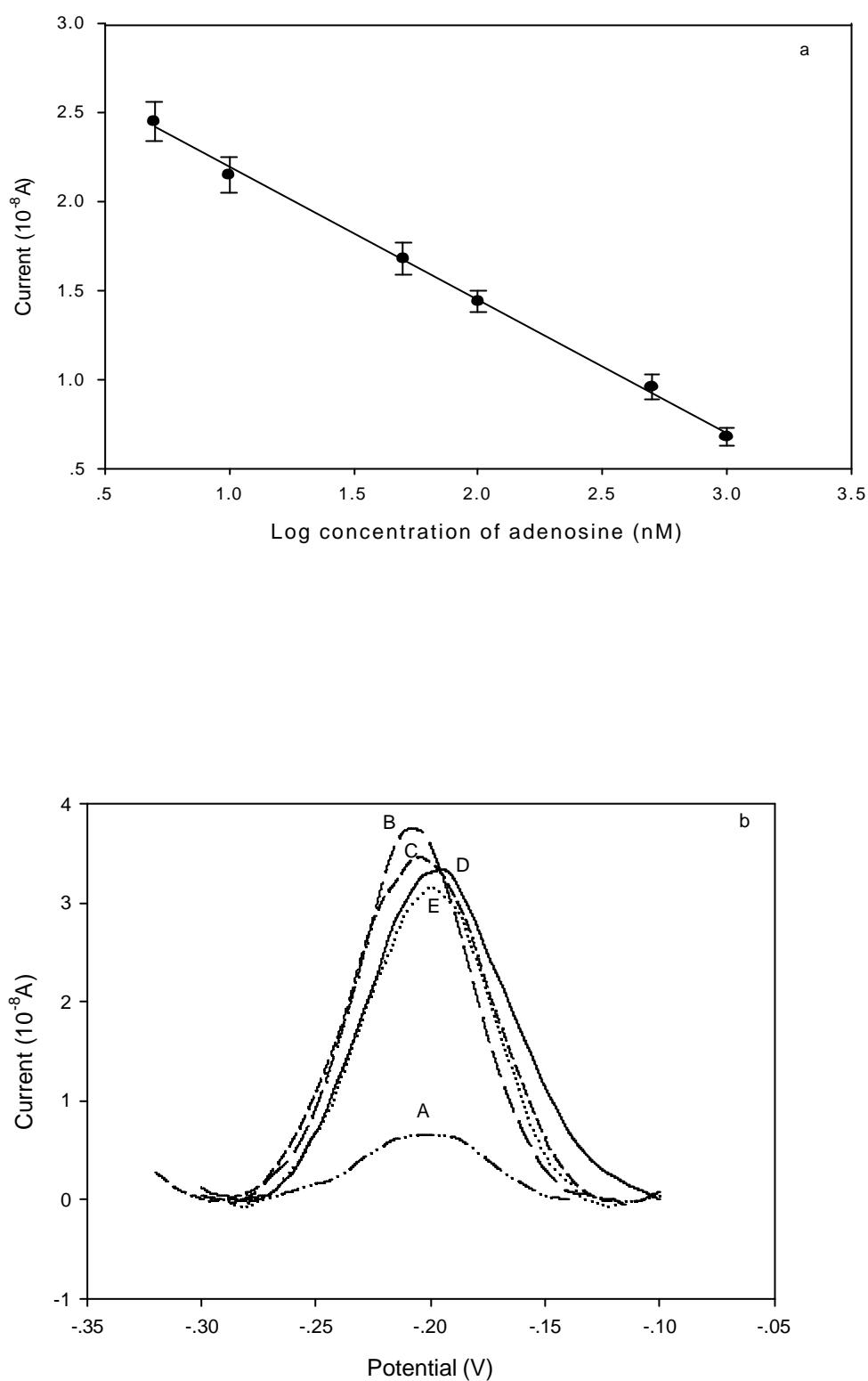


Figure 4.5(a) Calibration curve for the detection of adenosine. Peak currents are averages for four experiments. (b) Specificity of the sensing system. A: 1 μ M adenosine; B: 0 μ M adenosine; C: 1 mM uridine; D: 1 mM guanosine; E: 1 mM cytidine

4.4 小结

本文介绍了一种以腺苷为检测对象的无标记可再生电化学传感界面。原理是基于目标物诱导适配体置换方法，将适配体从适配体/捕获探针双链结构中置换下来，通过电化学活性指示剂亚甲基兰在单双链中嵌入量的差异，从而获得检测信号的变化。亚甲基兰的峰电流与腺苷的浓度在 5 nM~1000 nM 范围内具有良好的线性关系，检测下限达 1 nM。作为电化学传感器，该方法不需要昂贵的仪器与试剂。制得的传感器具有许多显著的优点，包括高度的特异性，宽的线性范围，简便易行的步骤和低成本，传感界面稳定且容易再生。该方法对构建基于适配体的生物传感器阵列用于检测各种蛋白质和小分子，具有广阔的前景。

第 5 章 基于目标 IgE 竞争结合的荧光传感器

5.1 前言

适配体是单链DNA、RNA或是修饰过的有能力形成特定的结构而与目标物结合的核酸分子。他们是通过SELEX^[1, 21](systematic evolution of ligands by exponential enrichment)技术反复筛选而获得的。由于适配体的出现,DNA 或RNA不仅能够用来检测核酸目标物,还能够用来检测非核酸目标物,包括蛋白质、细胞、金属离子、小分子^[106~109]等,大大地拓宽了核酸分子作为分子识别元件的应用范围。近年来,已经有很多将分子识别信号转换成电化学、压电、荧光等的文章被报道^[110~113]。在这些方法中,基于荧光信号转换的方法一直受到广泛的关注,因为它检测方便,方法多样,一般是在均相中测量,而且还能很容易地获得批量的荧光基团和淬灭基团来对核酸链进行修饰。因此,设计荧光传导机理的适配体是近期研究的焦点^[114~120]。

标准的DNA和RNA适配体本身没有荧光信号产生,他们是在筛选出来后再修饰上我们需要的荧光报告基团,从而获得光信号。一个理想的设计方案应该包括下面三个主要的特征:第一,这个方法应该很容易应用到任何给定的适配体而不依赖于它的尺寸和空间结构性质。这一条是非常重要的,因为不同目标物的适配体有不同的碱基数和长度,且还有丰富的二级和三级结构。在不同的环境中,它们的二级结构是不确定的、可以随时变化且大部分适配体的三级结构目前还很难获得。第二,这个方法应该能够设计出一个具有很大信号变化幅度,并且能够快速、实时地实现信号转换的适配体。适配体在与目标物结合后表现出很大的光增强幅度,这种检测方法的灵敏度和准确度符合要求。这种实时的信号传导能力使得我们能够快速实现样品的检测,如高通量检测。第三,适配体在修饰了报告基团后不能明显地影响它对目标物的结合能力、特异性和亲和力。

根据上面提到的这几点原则,目前报道的基于荧光检测手段的蛋白质分析方案主要有两种类型:一种是单报告基团的检测方法。Jhaveri^[110]等报道了一种用单荧光基团标记ATP的适配体,用来检测ATP的方法。它是在一个适配体分子上标记上一个荧光基团,这个荧光基团在适配体碱基自身的淬灭作用下,荧光强度降低。当适配体与目标分子反应后,荧光基团被释放出来,荧光增强。这种标记方法尽管很简单,但是标记的位置难选择,背景信号一般也比较高,不是一种常用的方法。另一种是双标记的设计方案,也是目前应用得比较多的一类标记方法。这种标记方法类似于分子信标,一般是将一个荧光基团和一个淬灭基团分别标记

在适配体分子的两端或者用两条不同的链，一条标记荧光基团，另一条标记淬灭基团，这样标记的适配体我们通常叫做适配体信标。适配体信标在与目标物结合后，构型发生翻转，荧光强度发生变化。Yamamoto 等^[114]第一次报道了一个RNA适配体信标来检测HIV的Tat蛋白。他们刚开始时将这个适配体分子分成两个分子，其中半个通过在两端各加一些互补的碱基，形成一个分子信标形状，并且在两端分别标记上荧光基团和淬灭基团，另半个适配体分子就是一段普通的核酸链。在没有目标物存在时，两个适配体分子相互独立地存在，形成发夹结构的半个适配体分子的荧光淬灭。当引入目标物时，目标物与发夹结构的适配体分子以及另半个分子共同发生作用，发夹打开，荧光极大地增强。这个方案设计成功主要是依赖于该目标物的适配体有一个独特的二级结构，且包含一段很长的延伸了的成对的核苷酸链，可以在适当情况下将适配体分成两段，而且还要求适配体分子的结构在修饰后还能保持与原来相似的亲和力，可是对于那些没有这样的二级结构的适配体分子，却很难用这种方法实现检测。Nutiu^[91]等报道了另一种形式的标记方法来检测目标物，他们设计了三条不同的核酸链，一条在5'端修饰荧光素，另一条在3'端修饰淬灭基团（DABCYL），这两条链同时与第三条核酸链互补，第三条链中有一段序列是目标物的适配体序列，当目标物不存在时，三条链相互杂交，荧光淬灭。当目标物加到溶液中后，由于适配体与目标物的亲和力很强，目标物会取代淬灭基团标记的核酸链而与适配体结合，荧光基团释放出来，荧光增强。他们用这个方法成功地检测了ATP和凝血酶，可是这个方法在设计上比较复杂，要用到的核酸链很多，步骤繁琐，成本高。

先前报道的这些方法大部分在设计适配体的链结构时或者是要求适配体有特殊的二级结构，或者是设计了几条辅助检测的核酸链。本文中，我们设计了一种新型的简单快速的荧光适配体探针来检测蛋白质。我们在能特异性地识别目标物的适配体分子上标记上一个荧光报告基团，再将目标物加入其中与之充分反应，然后将另一条与适配体分子的碱基序列互补的修饰上淬灭基团核酸链加入到前两者混合物中，这样，没有与目标物结合的适配体分子就会与互补链杂交，从而发生荧光淬灭，通过反应前后荧光强度的减小幅度来对溶液中的目标物定量。这个方法设计原理简单，目标物应用范围广泛。在本工作中，我们是采用IgE作为模型分析物，选择性高，灵敏度好。IgE的线性检测范围处于175pM到35nM之间，为其他的蛋白质检测提供了一个新的平台。

5.2 实验部分

5.2.1 试剂与仪器

荧光基团标记的IgE适配体FDNA序列：5'(FITC)-GGGGC ACG TTTA TCCG

TCCC TCCT AGTGGC,与之互补的淬灭剂标记的核酸QDNA序列5'-GGACGGAT AAACGTG CC CC(DABCYL)-3',由大连宝生物公司合成。人的IgE血清购自于Biodesign(USA)。磷酸二氢钾,磷酸氢二钠, MgCl_2 均购自于长沙的试剂公司,所有化学药品都是分析纯,在使用前没有经过进一步的纯化,所用的溶液均用二次水制备,所用缓冲溶液是10mM的磷酸二氢钾/磷酸氢二钠缓冲液(PBS,pH7.4),包含1mM 的 MgCl_2 。

日本产的 F-4500 型荧光光度计用于荧光测定。

5.2.3 实验步骤

传感器的响应原理如 Figure 5.1 所示,将适量 PBS 缓冲液和 $2\mu\text{l}$ 1mM 镁离子溶液依次加入荧光杯中,再用微量注射器加入适量的 $5\mu\text{M}$ FDNA,维持最终的浓度 $0.1\mu\text{M}$ 。放置 10min 稳定后测荧光值,在 517nm 处有最大发射峰值,再加入适量 IgE 溶液,37℃ 反应 30min 后,待荧光稳定后测其荧光值,然后加入适量 $10\mu\text{M}$ QNA,维持最终的浓度是 $0.2\mu\text{M}$,全部加入后的总体积是 $260\mu\text{l}$,在 37℃ 的恒温箱中反应,每隔 30min 测一次荧光值,测三到四次,取其稳定值(90~120min)作为最终响应值。

5.3 结果和讨论

5.3.1 传感系统对待测物的响应

适配体与蛋白质结合紧密,亲和力很强,离解常数通常在纳摩尔到皮摩尔之间。在我们的检测体系中,我们是先使蛋白质IgE与FDNA适配体充分反应,稳定后,检测其荧光强度。再将淬灭基团标记的与适配体序列互补的一条链QDNA加入到待测液中,它便会与没有和蛋白质反应的适配体FDNA杂交,从而使FDNA发生荧光淬灭。Figure 5.2是加入3.5nM IgE后的现象图,从图上可以看出,加入IgE后的荧光强度与FDNA的原始强度没有很大的变化,但在加入QDNA后,强度显著降低。IgE浓度越低,荧光淬灭程度就越大,反应前后的荧光强度差值越大。反之,则荧光差值越小,这是因为IgE的含量越高,溶液中与之结合的适配体越多,从而与带淬灭基团的链杂交的量就越少,荧光减弱程度就小。我们用荧光减弱的相对程度对IgE的浓度作图,如Figure 5.3所示,得到这个传感系统对IgE的线性图。线性区间175pM到35nM之间,检测下限是0.1nM。

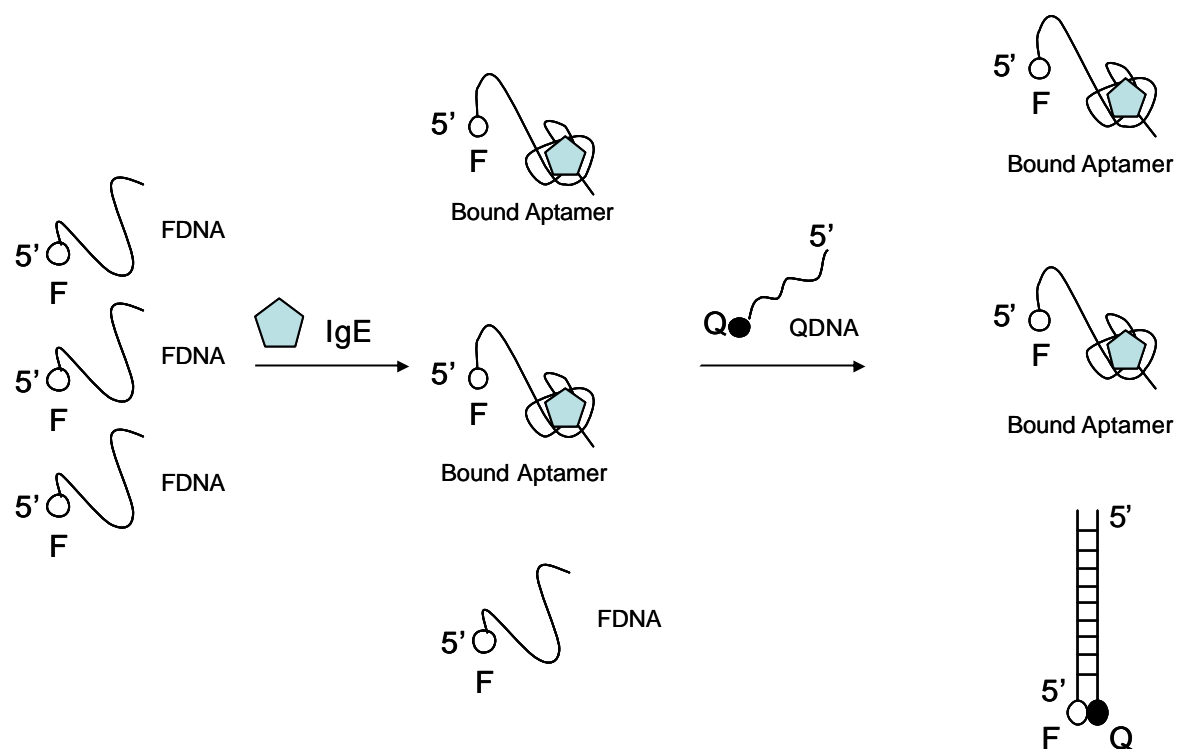


Figure 5.1 Schematic representations of the principle for the sensing steps

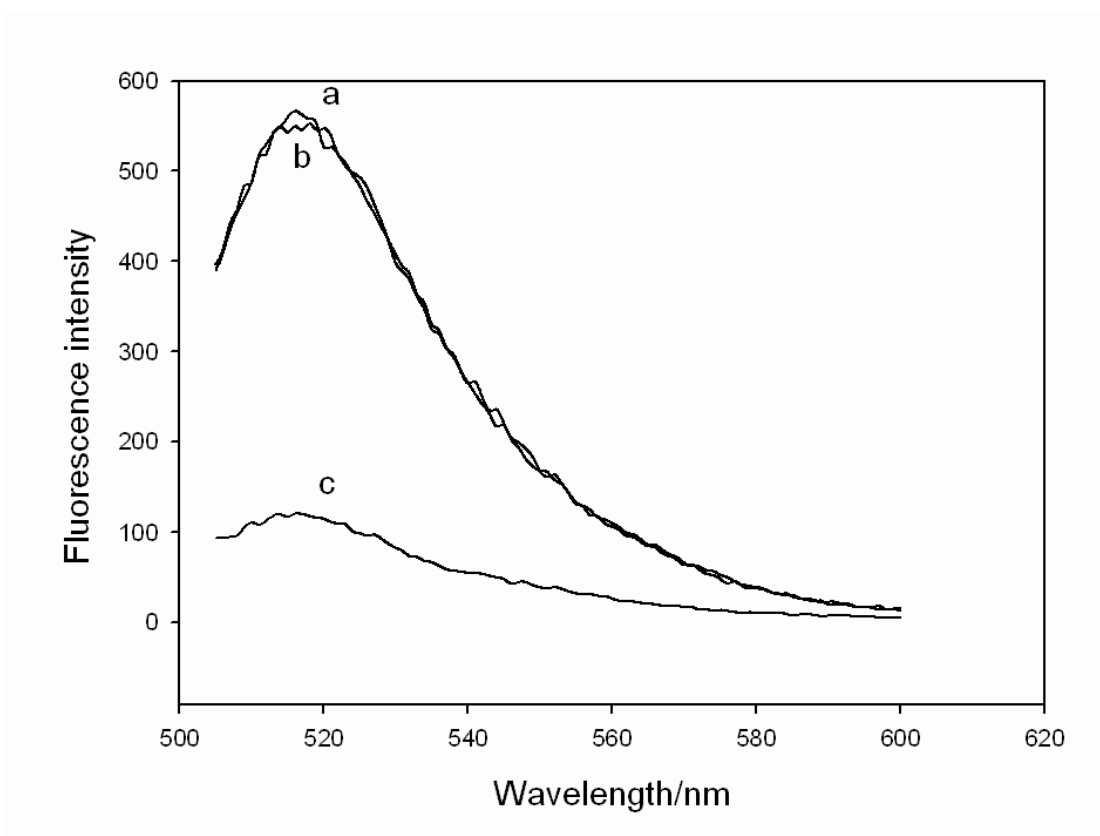


Figure 5.2 The fluorescence response of each step. The original fluorescence intensity (a), fluorescence after addition of 3.5nM IgE (b), addition of QDNA (c).

5.3.2 传感系统的选择性

我们将这个传感装置分别与不同的蛋白质反应，得到了这个传感装置的选择性响应图(Figure 5. 4)。从图上可以看出，加入了35nM的IgE和QDNA稳定以后的荧光信号 (Figure 5. 4b) 明显小于最开始的FDNA的荧光强度 (Figure 5. 4 a),说明有部分的FDNA与IgE结合了，从而使得淬灭程度减小了。而当加入对照物0.4mg/ml IgG(c), 0.02 μ M thrombin(d), 2% BSA(e)以后，荧光信号很弱，基本被淬灭。说明这几种物质几乎没有与我们的FDNA适配体反应，适配体基本上都与加入的QDNA结合了，因此荧光强度显著下降，与空白值基本持平，此传感系统对对照物几乎没有响应，从而说明这个传感系统的选择性非常好。

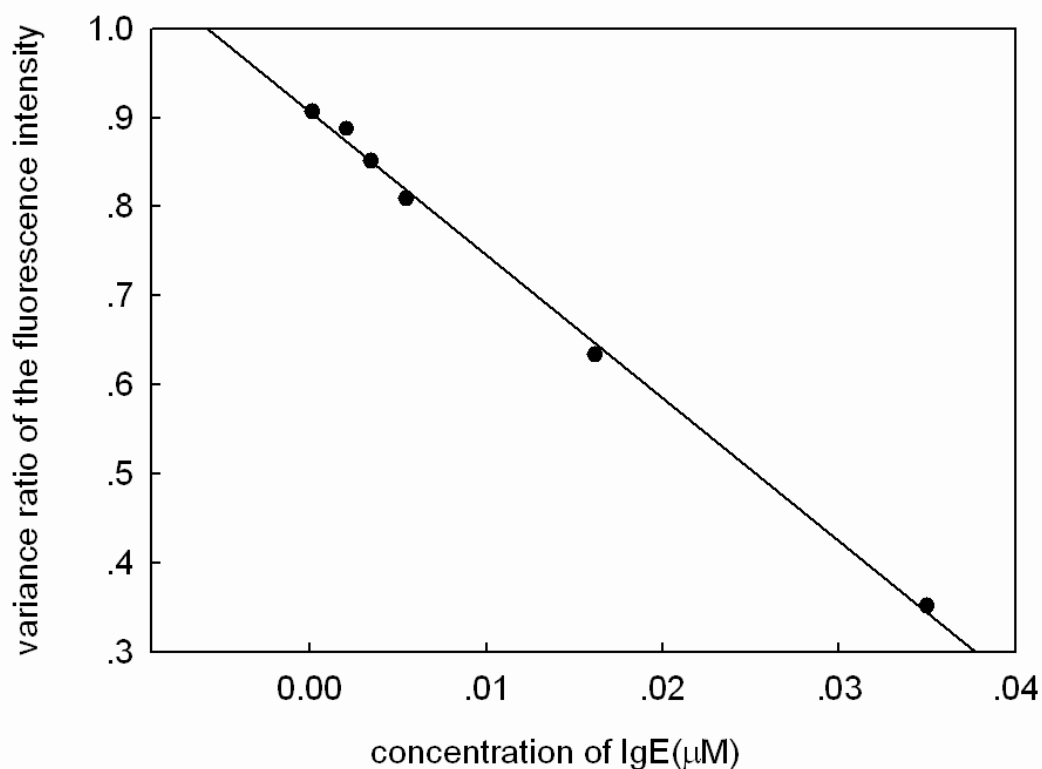


Figure 5.3 The calibration curve of the variance ratio of fluorescence intensity vs IgE concentration

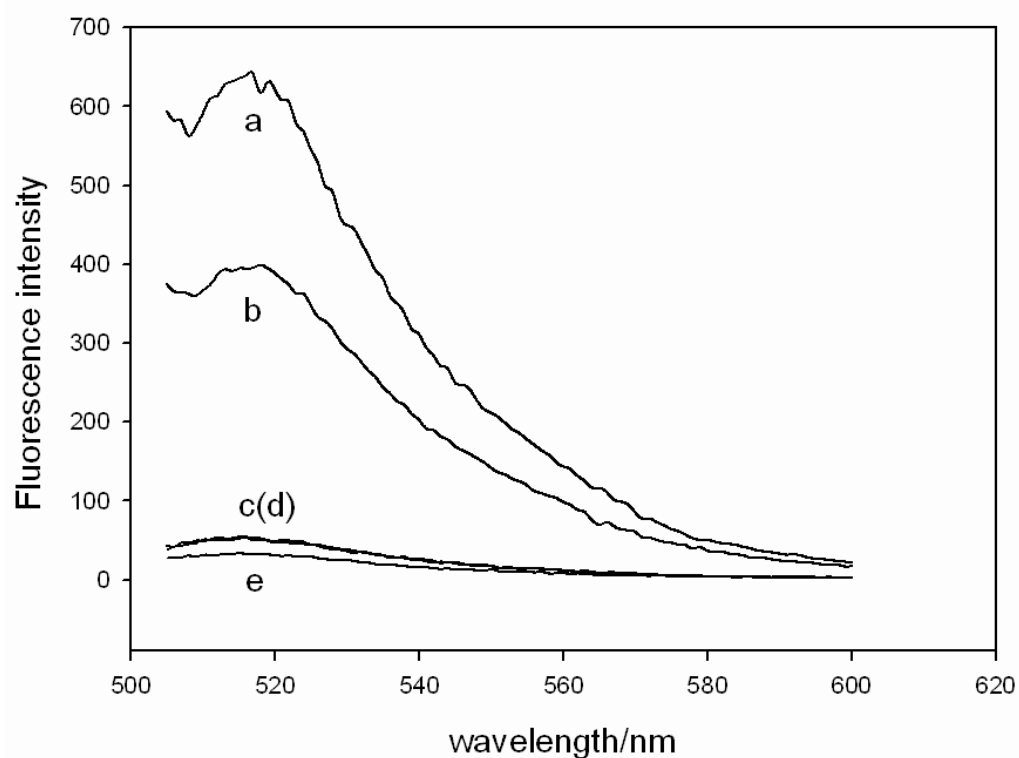


Figure 5.4 Selectivity of this sensor. Fluorescence intensity of the sensor to different substances. The original signal (a); addition of 35nM IgE(b); addition of IgG(c); addition of thrombin (d); addition of BSA(e)

5.4 小结

本文章构建了一个简单的荧光传感体系。将标记了荧光基团的适配体与目标物蛋白质和淬灭剂标记的互补链竞争反应，然后通过荧光信号强度的减小程度来对目标物定量。此方法简单快速、耗时少，检测灵敏度高，线性范围宽，为更多的已经筛选出适配体的蛋白质检测提供了新的平台。

结 论

基于当前蛋白质检测技术中存在的难点，在传统的检测技术的基础上，本研究论文发展了一系列的新的检测技术来检测蛋白质。在传感界面的构建，信号传导模式等方面，进行了一些改进，综合以上研究工作的结果，可以得出以下的结论：

首先，建立了一种基于抗体和适配体夹心模式的电化学蛋白质检测技术。这种夹心模式用一个适配体取代抗体，充分结合了抗体和适配体两者的特异性，选择性高，灵敏度好，为大部分的蛋白质检测提供了新的平台。由于是将电活性物质直接嵌入到检测探针中，无须事先对其进行标记，耗时少，成本低。这个方法是对适配体进行修饰来获得电信号，简单，快速，是对传统的免疫分析的一个改进。另外，为了改善电极的导电性和传感系统的生物兼容性，我们构建了一个特别的界面，即金纳米粒子-壳聚糖复合膜界面。研究表明，这个传感系统对凝血酶具有很好的响应能力。根据类似的夹心原理，我们又将这个夹心模式应用于另一种蛋白质的检测。在上一个工作的基础上，我们还结合了酶联适配体放大技术，放大了电信号。用这个体系检测 IgE，线性范围宽，灵敏度好。通过这两个工作表明，这种夹心模式能很好地取代传统的夹心免疫分析，是以后蛋白质实用检测技术发展的重要趋势。

其次，构建了一种基于目标物诱导适配体置换技术的无标记电化学检测方法，用来检测腺苷。这个方法思路简单，检测灵敏快速，稳定性好。传感基底是在金电极表面用 1,6-巯基己醇自组装一层单分子膜，其中巯基己醇可以作为金纳米颗粒层组装的媒介，增加捕获探针的表面负载量，用来增强信号。这个检测技术一个很大的优点就是传感界面可以通过将电极浸入适配体溶液 1 小时再生，所以，实用性很强。

再次，由于分子信标适配体结构上独特的优势，我们通过适当的改善，设计了一个简单的荧光方法，通过荧光基团标记适配体与目标物和淬灭基团标记互补链分步反应，比较信号来定量。

参考文献

- [1] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, 249(4968): 505 - 510
- [2] Vant H B, Payano B A, Davis R H, et al. The mathematics of SELEX against complex targets. *Journal of molecular biology*, 1998, 278(3): 579-597
- [3] Brody E N, Gold L. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 2000, 74(1): 5-13
- [4] Osborne S E, Ellington A D. Nucleic acid selection and the challenge of combinatorial chemistry. *Chemical Reviews*, 1997, 97(2): 349-370
- [5] Famulok M, Mayer G, Blind M. Nucleic acid aptamers-from selection in vitro to applications in vivo. *Accounts of Chemical Research*, 2000, 33(9): 591-599
- [6] Forst C V. Molecular evolution: a theory approaches experiments. *Journal of Biotechnology*, 1998, 64(1):101-118
- [7] Mendonsa S D, Bowser M T. In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(18): 5387-5392
- [8] Mosing R K, Mendonsa S D, Bowser M T. Capillary electrophoresis-SELEX selection of aptamers with affinity for HIV-1 reverse transcriptase. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(19):6107-6112
- [9] Jiang Y, Fang X, Bai C. Signaling aptamer/protein binding by a molecular light switch complex. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(17): 5230-5235
- [10] Wang J, Jiang Y, Zhou C, et al. Aptamer-based ATP assay using a luminescent light switching complex. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(11):3542-3546
- [11] Li N, Ho C M. Aptamer-based optical probes with separated molecular recognition and signal transduction modules. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(8):2380-2381
- [12] Zhou L, Ou L, Chu X, et al. Aptamer-based rolling circle amplification: a platform for electrochemical detection of protein. *Analytical Chemistry*, 2007, 79 (19): 7492 -7500
- [13] Baker B R, Lai R Y, Wood M S, et al. An electronic, aptamer-based small-molecule sensor for the rapid, label-free detection of cocaine in adulterated samples and biological fluids. *Journal of the American Chemical Society*, 2006,

128(10): 3138-3139

- [14] Li B, Wang Y, Wei H, et al. Amplified electrochemical aptasensor taking AuNPs based sandwich sensing platform as a model. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 23(7): 965-970
- [15] Liss M, Petersen B, Wolf H, et al. An aptamer-based quartz crystal protein biosensor. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(17): 4488-4495
- [16] Barletta J M, Edelman D C, Constantine N T. Lowering the detection limits of HIV-1 viral load using real time immuno-PCR for HIV-1 p24 antigen. *American Journal of Clinical Pathology*, 2004, 122 (1): 20-27
- [17] Centi S, Messina G, Tombelli S, et al. Different approaches for the detection of thrombin by an electrochemical aptamer-based assay coupled to magnetic beads. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 23(11):1602-1609
- [18] Kirby R, Cho E J, Gehrke B, et al. Aptamer-based sensor arrays for the detection and quantitation of proteins. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(14): 4066-4075
- [19] Bang G S, Cho S, Kim B G. A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 21 (6): 863–870
- [20] Stadtherr K, Wolf H, Lindner P. An aptamer-based protein biochip. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(11): 3437-3443
- [21] Ellington A D, Szostak J W, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, 1990, 346(6287): 818-822
- [22] Drolet D W, Moon-McDermott L, Romig TS. An enzymelinked oligonucleotide assay. *Nature Biotechnology*, 1996, 14(8): 1021 - 1025
- [23] Kotia R B, Li L, McGown L B. Separation of nontarget compounds by DNA aptamers. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(4): 827-831
- [24] Pavlov V, Shlyahovsky B, Willner I. Fluorescence detection of DNA by the catalytic activation of an aptamer/thrombin complex. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(18): 6522-6523
- [25] Heyduk E, Heyduk T. Nucleic acid-based fluorescence sensors for detecting proteins. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(4): 1147-1156
- [26] Lin C X, Katilius E, Liu Y, et al. Self-assembled signaling aptamer DNA arrays for protein detection. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, 45(32): 5296-5301
- [27] Ho H A, Leclerc M, Optical sensors based on hybrid aptamer/conjugated polymer complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(5): 1384-1387
- [28] Wang X L, Li F, Su Y H, et al. Ultrasensitive detection of protein using an

- aptamer-based exonuclease protection assay. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(19): 5605-5610
- [29] Li J W, Fang X H, Tan W H. Molecular aptamer beacons for real-time protein recognition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 292(1): 31-40
- [30] Heckel A, Mayer G. Light regulation of aptamer activity: an anti-thrombin aptamer with caged thymidine nucleobases. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(3): 822-823
- [31] Pavlov V, Xiao Y, Shlyahovsky B, et al. Aptamer-functionalized Au nanoparticles for the amplified optical detection of thrombin. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(38): 11768-11769
- [32] Evans-Nguyen K M, Fuierer R R , Fitchett B D, et al. Changes in adsorbed fibrinogen upon conversion to fibrin. *Langmuir*, 2006, 22(11): 5115-5121
- [33] Bang G S, Cho S, Kim BG. A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 21(6): 863-870
- [34] Floch F L, Ho H A, Leclerc M. Label-free electrochemical detection of protein based on a ferrocene-bearing cationic polythiophene and aptamer. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(13): 4727-4731
- [35] Lai RY, Plaxco KW, Heeger A J Aptamer-based electrochemical detection of picomolar platelet-derived growth factor directly in blood serum. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(1): 229-233
- [36] Radi A E, Sa´nchez J L A, Baldrich E, et al. Reagentless, reusable, ultrasensitive electrochemical molecular beacon aptasensor. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(1): 117-124
- [37] Sa'nchez J L A, Baldrich E, Radi A E G, et al. Electronic 'off-on' molecular switch for rapid detection of thrombin, *Electroanalysis*, 2006, 18(19-20): 1957-1962
- [38] Xiao Y, Lubin A A, Heeger A J, et al. Label-free electronic detection of thrombin in blood serum by using an aptamer-based sensor. *Angewandte Chemie*, 2005, 117(34): 5592 –5595
- [39] Zhang Y L, Huang Y, Jiang J H, et al. Electrochemical aptasensor based on proximity-dependent surface hybridization assay for single-step, reusable, sensitive protein detection. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(50):15448-15449
- [40] Ikebukuro K, Kiyohara C, Sode K. Novel electrochemical sensor system for protein using the aptamers in sandwich manner. *Biosensors and Bioelectronics*,

- 2005, 20(10): 2168-2172
- [41] Wang H, Yang X B, Bowick G C, et al. Identification of proteins bound to a thioaptamer probe on a proteomics array. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 347(3): 586-593
- [42] Baldrich E, Restrepo A, O'Sullivan C K. Aptasensor development: elucidation of critical parameters for optimal aptamer performance. *Analytical Chemistry*, 2004, 76 (23): 7053-7063
- [43] Wang P, Li Y X, Huang X, et al. Fabrication of layer-by-layer modified multilayer films containing choline and gold nanoparticles and its sensing application for electrochemical determination of dopamine and uric acid. *Talanta*, 2007, 73(3):431-437
- [45] Mao X, Jiang J H, Luo Y, et al. Copper-enhanced gold nanoparticle tags for electrochemical stripping detection of human IgG. *Talanta*, 2007, 73(3): 420-424
- [46] Zhang S, Huang F, Liu B H, et al. A sensitive impedance immunosensor based on functionalized gold nanoparticle-protein composite films for probing apolipoprotein A-I. *Talanta*, 2007, 71(2): 874-881
- [47] Du Y, Luo X L, Xu J J, et al. A simple method to fabricate a chitosan-gold nanoparticles film and its application in glucose biosensor. *Bioelectrochemistry* 2007, 70(2): 342-347
- [48] Luo X L, Xu J J, Zhang Q, et al. Electrochemically deposited chitosan hydrogel for horseradish peroxidase immobilization through gold nanoparticles self-assembly. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 21(1):190-196
- [49] Xue M H, Xu Q, Zhou M, et al. In situ immobilization of glucose oxidase in chitosan-gold nanoparticle hybrid film on prussian blue modified electrode for high-sensitivity glucose detection. *Electrochemistry Communications*, 2006, 8(9): 1468-1474
- [50] Zhang S B, Wu Z S, Guo M M, et al. A novel immunoassay strategy based on combination of chitosan and a gold nanoparticle label. *Talanta*, 2007, 71(4): 1530-1535
- [51] Li XY, Jin L J, Mcallister T A. Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2007, 55(8): 2911-2917
- [52] Kankia B I, Marky L A. Folding of the thrombin aptamer into a G-quadruplex with Sr^{2+} : stability, heat, and hydration. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123(44): 10799-10804

- [53] Hianik T, Ostatná V, Sonlajtnerova M, et al. Influence of ionic strength, pH and aptamer configuration for binding affinity to thrombin. *Bioelectrochemistry*, 2007, 70(1):127-133
- [54] Hamaguchi N, Ellington A, Stanton M. Aptamer beacons for the direct detection of proteins. *Analytical Biochemistry*, 2001, 294(2): 126-131
- [55] Vairamani M, Gross M L. G-Quadruplex formation of thrombin-binding aptamer detected by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(1): 42-43
- [56] Bock L C, Griffin L C, Latham J A, et al. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, 1992, 355(6360): 564-566
- [57] Tuite E, Norden B. Sequence-specific interactions of methylene blue with polynucleotides and DNA: A spectroscopic study. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, 116(17): 7548-7556
- [58] Tuite E, Kelly J M. The interaction of methylene blue, azure B, and thionine with DNA: formation of complexes with polynucleotides and mononucleotides as model systems. *Biopolymers*, 1995, 35(5): 419-433
- [59] Kara P, Kerman K, Ozkan D, et al. Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA. *Electrochemistry Communications*, 2002, 4(9): 705-709
- [60] Lin X H, Wu P, Chen W, et al. Electrochemical DNA biosensor for the detection of short DNA species of Chronic Myelogenous Leukemia by using methylene blue. *Talanta*, 2007, 72(2): 468-471
- [61] Rohs R, Sklenar H, Lavery R. Methylene blue binding to DNA with alternating GC base sequence: a modeling study. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(12): 2860-2866
- [62] Meric B, Kerman K, Ozkan D, et al. Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue. *Talanta*, 2002, 56(5): 837-846
- [63] Qi Z M, Matsuda N, Takatsu A, et al. In situ investigation of coadsorption of myoglobin and methylene blue to hydrophilic glass by broad and time-resolved optical waveguide spectroscopy. *Langmuir*, 2004, 20(3): 778-784
- [64] Nakane P K, Pierce G B. Enzyme-labeled antibodies: preparation and localization of antigens. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*, 1966, 14 (12): 929-931
- [65] Avrameas S, Uriel J, Method for labeling antigens and antibodies with enzymes and their application in immunodiffusion 24G5. *Paris Compt Rend Acad Sci*,

- 1966,262 (24): 2543-2545
- [66]Katz E, Alfonta L, Willner I. Chronopotentiometry and faradaic impedance spectroscopy as methods for signal transduction in immunosensor. *Sensors and Actuators B*, 2001, 76(1-3): 134-141
- [67]Crew A, Alford C, Cowell D C C, et al. Development of a novel electrochemical immuno-assay using a screen printed electrode for the determination of secretory immunoglobulin A in human sweat. *Electrochimica Acta*, 2007, 52 (16): 5232-5237.
- [68] Jayasena S. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical Chemistry*, 1999, 45(9):1628-1650
- [69] Patel D, Suri A. Structure, recognition and discrimination in RNA aptamer complexes with cofactors, amino acids, drugs and aminoglycoside antibiotics. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 2000, 74(1):39-60
- [70] Clark S L, Remcho V T. Aptamers as analytical reagents. *Electrophoresis*, 2002, 23(9):1335-1340
- [71] Luzi E, Minunni M, Tombelli S, et al. New trends in affinity sensing - aptamers for ligand binding. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2003, 22(11):810-818
- [72] Kyung M Y, Sang H L, Aesul I, et al. Aptamers as functional nucleic acids: in vitro selection and biotechnological applications. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2003, 8 (2):64-75
- [73] Joyce G F. Amplification, mutation and selection of catalytic RNA. *Gene*, 1989 82(1):83-87
- [74] Robertson D L, Joyce G F. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature* 1990, 344(6265):467-468
- [75] Hamula C, Guthrie J, Zhang H, et al. Selection and analytical applications of aptamers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2006, 25(7):681-691
- [76]M Mir, M Vreeke, I Katakis. Different strategies to develop an electrochemical thrombin aptasensor. *Electrochemistry Communications*, 2006, 8(3):505-511
- [77]Radi A, Sanchez J A, Baldrich E, et al. Reusable impedimetric aptasensor. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(19): 6320-6323
- [78]Drolet D, Moon-McDermott L, Romig T. An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nature Biotechnology*, 1996, 14(8):1021-1025
- [79]Rye P, Nustad K. Immunomagnetic DNA aptamer assay. *BioTechniques*, 2001, 30(2):290-295
- [80]Yang X, Li X, Prow T, et al. Immunofluorescence assay and flow-cytometry selection of bead-bound aptamers. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(10): 54-61

- [81]Centi S, Tombelli S, Minunni M, et al. Aptamer-based detection of plasma proteins by an electrochemical assay coupled to magnetic beads. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(4):1466-1473
- [82]Polsky R, Gill R, Kaganovsky L, et al. Nucleic acid-functionalized Pt nanoparticles: catalytic labels for the amplified electrochemical detection of biomolecules. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(7):2268-2271
- [83]Chen Z P, Peng Z F, Jiang J H, et al. An electrochemical amplification immunoassay using biocatalytic metal deposition coupled with anodic stripping voltammetric detection. *Sensors and Actuators B*, 2007, 129(1):146-151
- [84]Kokado A, Arakawa H, Maeda M. New electrochemical assay of alkaline phosphatase using ascorbic acid 2-phosphate and its application to enzyme immunoassay. *Analytica Chimica Acta*, 2000, 407(1-2): 119-125
- [85]Fang X, Cao Z, Beck T, et al. Molecular aptamer for real-time oncoprotein platelet-derived growth factor monitoring by fluorescence anisotropy. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(23): 5752-5757
- [86]Jiang Y, Zhu C, Ling L, et al. Specific aptamer-protein interaction studied by atomic force microscopy. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(9): 2112-2116
- [87]Xu D, Xu D W, Yu X B, et al. Label-free electrochemical detection for aptamer-based array electrodes. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(12): 5107-5113.
- [88]Herr J K, Smith J E, Medley C D, et al. Aptamer-conjugated nanoparticles for selective collection and detection of cancer cells. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(9): 2918-2924
- [89]Hermann T, Patel D J. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* 2000,287 (5454): 820-825
- [90]Yang L, Fung C W, Cho E J, et al. Real-time rolling circle amplification for protein detection. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(9): 3320-3329
- [91]Nutiu R., Li Y. Structure-switching signaling aptamers. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(16): 4771-4778
- [92]Xiao Y, Piorek B D, Plaxco K W, et al. A reagentless signal-on architecture for electronic, aptamer-based sensors via target-induced strand displacement. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(51): 17990-17991
- [93]Wu Z S, Guo M M, Zhang S B, et al. Reusable electrochemical sensing platform for highly sensitive detection of small molecules based on structure-switching signaling aptamers. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(7): 2933-2939
- [94]Zayats M, Huang Y, Gill R, et al. Label-free and reagentless aptamer-based

- p>
sensors for small molecules.
- Journal of the American Chemical Society*
- , 2006, 128(42): 13666-13667
- [95] Kawde A N, Rodriguez M C, Lee T M H, et al. Label-free bioelectronic detection of aptamer–protein interactions. *Electrochemistry Communications*, 2005, 7(5): 537-540
- [96] Zhang J H, Belardinelli L, Jacobson K A, et al. Persistent activation by and receptor reserve for an irreversible A1-adenosine receptor agonist in DDT1 MF-2 cells and in guinea pig heart. *Molecular Pharmacology*, 1997, 52(3): 491-498
- [97] Kloor D, Yao K, Delabar U, et al. Simple and sensitive binding assay for measurement of adenosine using reduced S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Clinical Chemistry*, 2000, 46(4): 537-542
- [98] Kerman K, Ozkan D, Kara P, et al. Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 462(1): 39-47
- [99] Erdem A, Kerman K, Meric B, et al. Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus. *Analytica Chimica Acta*, 2000, 422(2): 139-149
- [100] Erdem A, Kerman K, Meric B, et al. Methylene blue as a novel electrochemical hybridization indicator. *Electroanalysis*, 2001, 13(3): 219-223
- [101] Pänke O, Kirbs A, Lisdat F. Voltammetric detection of single base-pair mismatches and quantification of label-free target ssDNA using a competitive binding assay. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22(11): 2656-2662
- [102] Jin Y, Yao X, Liu Q, et al. Hairpin DNA probe based electrochemical biosensor using methylene blue as hybridization indicator. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22(6): 1126-1130
- [103] Hianik T, Ostatná V, Zajacová Z, et al. Detection of aptamer–protein interactions using QCM and electrochemical indicator methods. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005, 15(2): 291-295
- [104] Huang M F, Kuo Y C, Huang C C, et al. Separation of long double-stranded DNA by nanoparticle-filled capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(1): 192-196
- [105] Colvin V L, Goldstein A N, Alivisatos A P. Semiconductor nanocrystals covalently bound to metal surfaces with self-assembled monolayers. *Journal of the American Chemical Society*, 1992, 114(13): 5221-5230
- [106] Bagalkot V, Zhang L, Levy-Nissenbaum E, et al. Quantum dot-aptamer conjugates

- for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer. *Nano Letters*, 2007, 7(10): 3065-3070
- [107] Babendure J R, Adams S R, Tsien R Y. Aptamers switch on fluorescence of triphenylmethane dyes. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(48): 14716-14717
- [108] Li Y, Geyer R, Sen D. Recognition of anionic porphyrins by DNA aptamers. *Biochemistry*, 1996, 35(21): 6911-6922.
- [109] Merino E J, Weeks K M. Fluorogenic resolution of ligand binding by a nucleic acid aptamer. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(41): 12370-12371
- [110] Jhaveri S D, Kirby R, Conrad R, et al. Designed signaling aptamers that transduce molecular recognition to changes in fluorescence intensity. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, 122(11): 2469-2473
- [111] Zuo X, Song S, Zhang J, et al. A Target-responsive electrochemical aptamer switch (TREAS) for reagentless detection of nanomolar ATP. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(5): 1042-1043
- [112] Lu Y, Li X, Zhang L, et al. Aptamer-based electrochemical sensors with aptamer-complementary DNA oligonucleotides as probe. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(6): 1883-1890
- [113] Ferapontova E E, Olsen E M, Gothelf K V. An RNA aptamer-based electrochemical biosensor for detection of theophylline in serum. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(13): 4256-4258
- [114] Yamamoto R, Baba T, Kumar P K, Molecular beacon aptamer fluoresces in the presence of Tat protein of HIV-1. *Genes to Cells*, 2000, 5 (5): 389-396
- [115] Stojanovic M N, de Prada P, Landry D W. Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123 (21): 4928-4931
- [116] Jhaveri S, Rajendran M, Ellington A D. In vitro selection of signaling aptamers. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(12): 1293-1297
- [117] Choi J H, Chen K H, Strano M S. Aptamer-capped nanocrystal quantum dots: A new method for label-free protein detection. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(49): 15584-15585
- [118] Huang Y F, Chang H T, Tan W. Cancer cell targeting using multiple aptamers conjugated on nanorods. *Analytical Chemistry*, 2008; 80(3): 567-572
- [119] Gokulrangan G, Unruh J R, Holub D F, et al. DNA aptamer-based bioanalysis of

- IgE by fluorescence anisotropy. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(7): 1963-1970
- [120] Huang C C, Chiang C K, Lin Z H, et al. Bioconjugated gold nanodots and nanoparticles for protein assays based on photoluminescence quenching. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(5): 1497-1504

致 谢

本论文是在俞汝勤院士和沈国励教授悉心指导和亲切关怀下完成的，在论文的选题，实验的开展以及最后的撰写过程中，每一个工作都凝集着导师们的心血和汗水。在实验室的三年学习中，导师们渊博的知识，严谨的治学态度，虚怀若谷的情操和诲人不倦的良师风范使我受益匪浅。能够有幸从师于俞汝勤教授和沈国励教授，是我一生的骄傲和财富，在此表示衷心的感谢！

本论文的完成特别得益于蒋健晖教授的科研指导与帮助,在此表示深深的感谢！同时还要感谢实验室吴海龙老师、楚霞老师、宦双燕老师、吴朝阳老师、王桦老师、张小兵老师和周敬良老师等对我学习的大力帮助和热心指导。感谢实验室的全体博士生和硕士生，特别是封科军、陈计伟、晋小勇、渠凤丽、丁艳军、刘雪萍、张艳等博士和金雪芳、卢海霞、李元娜、周殿明、李波、曹莹、梁毅、孙晨虎以及实验室其它同学的学术讨论及帮助。

感谢我的家人对我的理解和支持！

感谢所有关心、支持我的亲人和朋友！

附录 A 攻读学位期间所发表的学术论文目录

- [1] Yan Kang, Kejun Feng, Jiwei Chen, Jianhui Jiang, Guoli Shen, Ruqin Yu, Electrochemical detection of thrombin by sandwich approach using antibody and aptamer. *Bioelectrochemistry*. In Press.
- [2] Kejun Feng, Yan Kang, Jing-Jin Zhao, Ya-Li Liu, Jian-Hui Jiang, Guo-Li Shen, Ru-Qin Yu. Electrochemical immunosensor with aptamer-based enzymatic amplification. *Analytical Biochemistry*, In Press.
- [3] Kejun Feng, Chenhu Sun, Yan Kang, Jiwei Chen, Jian-Hui Jiang, Guo-Li Shen, Ru-Qin Yu, Label-free electrochemical detection of nanomolar adenosine based on target-induced aptamer displacement. *Electrochemistry Communications*, 2008, 10(4): 531-535

基于核酸适配体的生物传感器的研究

作者: [康燕](#)
学位授予单位: [湖南大学](#)

本文读者也读过(9条)

1. [徒永华](#) [基于核酸适配体的纳米荧光生物传感器对蛋白质的研究](#)[学位论文]2006
2. [彭晓丽](#) [基于凝血酶与腺苷核酸适配体功能化纳米探针识别的分析方法研究](#)[学位论文]2008
3. [李艳芬](#) [电化学核酸适配体传感器](#)[学位论文]2011
4. [封科军](#) [基因检测和点突变识别的DNA探针及适配体生物传感新方法研究](#)[学位论文]2008
5. [谢海燕](#), [陈薛钗](#), [邓玉林](#), [Xie Haiyan](#), [Chen Xuechai](#), [Deng Yulin](#) [核酸适配体及其在化学领域的相关应用](#)[期刊论文]-[化学进展](#) 2007, 19(6)
6. [文艳清](#) [适配体Au、CdTe纳米粒子功能化修饰及凝血酶电化学传感研究](#)[学位论文]2010
7. [张月侠](#) [蛋白质寡核苷酸适配体的筛选与应用研究](#)[学位论文]2009
8. [李玉佩](#) [基于核酸适配体与金纳米粒子探针检测凝血酶的共振光散射分析](#)[学位论文]2008
9. [欧艺](#) [基于核酸适配体的细菌内毒素液相和固-液相检测方法研究](#)[学位论文]2010

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Thesis_D111255.aspx