

2010' Dissertation for Master

School Code: 10269

Student's Number: 51070606028

East China Normal University

**Study on the colorimetric and electrochemical detection
for SNPs and thrombin protein based on Au nanoparticles
and G-quadruplex-based DNazymes**

Department: Chemistry

Major: Analytical Chemistry

Research Field: Electrochemical Biosensors

Supervisor: Assistant Professor Cheng Guifang

Professor He Pingang, Fang Yuzhi

Student's Name: Shen Bijun

April, 2010, Shanghai



华东师范大学学位论文原创性声明



郑重声明：本人呈交的学位论文《新型纳米金胶和 DNA 酶的传感技术对核酸和蛋白检测的应用研究》，是在华东师范大学攻读硕士/博士（请勾选）学位期间，在导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确说明并表示谢意。

作者签名：沈碧君

日期：2010 年 4 月 24 日

华东师范大学学位论文著作权使用声明

《新型纳米金胶和 DNA 酶的传感技术对核酸和蛋白检测的应用研究》系本人在华东师范大学攻读学位期间在导师指导下完成的硕士/博士（请勾选）学位论文，本论文的研究成果归华东师范大学所有。本人同意华东师范大学根据相关规定保留和使用此学位论文，并向主管部门和相关机构如国家图书馆、中信所和“知网”送交学位论文的印刷版和电子版；允许学位论文进入华东师范大学图书馆及数据库被查阅、借阅；同意学校将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于（请勾选）

1. 经华东师范大学相关部门审查核定的“内部”或“涉密”学位论文*，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。
2. 不保密，适用上述授权。

导师签名：程李芳

本人签名：沈碧君

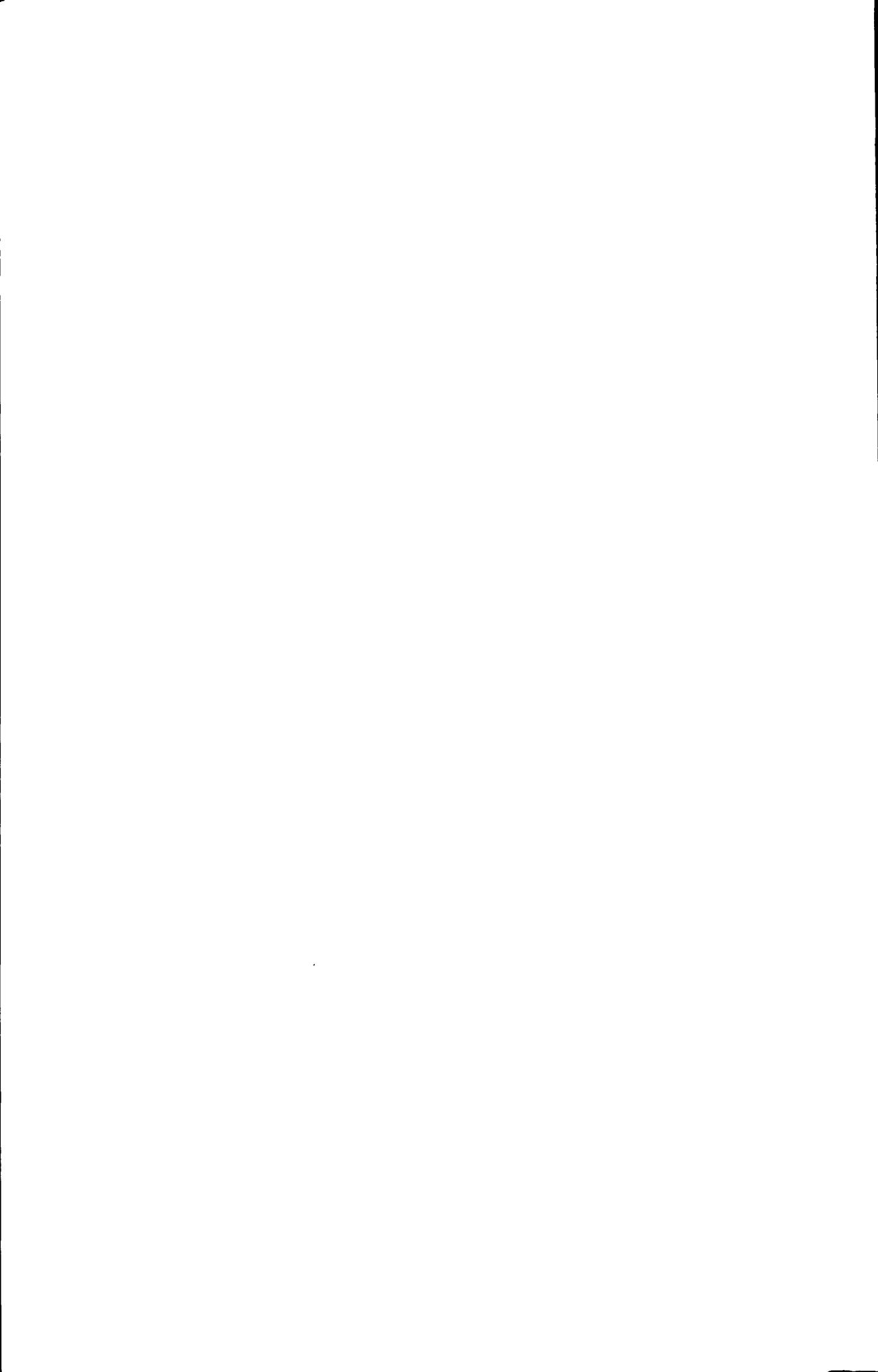
2010 年 4 月 24 日

* “涉密”学位论文应是已经华东师范大学学位评定委员会办公室或保密委员会审定过的学位论文（需附获批的《华东师范大学研究生申请学位论文“涉密”审批表》方为有效），未经上述部门审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权）。



沈碧君硕士学位论文答辩委员会成员名单

姓名	职称	单位	备注
徐通敏	教授	华东师范大学	主席
王清江	教授	华东师范大学	委员
楚清脆	副教授	华东师范大学	委员



新型纳米金胶和 DNA 酶的传感技术对核酸和蛋白检测的应用 研究

论 文 摘 要

随着人类基因组计划(HGP)的顺利完成和后基因组时代的到来,基因诊断已经成为分子生物学和生物技术研究的重要领域。脱氧核糖核酸(DNA)是生命体内的基因物质,具有传递遗传信息等功能,若在结构上稍有变动、差错、缺失或增多,就可能会导致遗传性状的改变或各种疾病的出现,因此对DNA的分析检测有助于生命科学的研究、生命活动和信息传递规律的调节。蛋白质是一类重要的生物标志物,它的分析检测在生物学、医学诊断等领域具有非常重要的意义。如果基因突变在外显引起有功能意义的突变,会导致所编码的蛋白质的表达、结构和功能的发生改变,从而影响人类的生命活动,导致基因疾病的产生。生命科学的飞速发展对基因和蛋白的检测提出越来越高的要求,开发出更灵敏,稳定和简便的生物检测技术是目前生命科学研究的热点所在。而新兴发展的以Watson-Crick碱基互补配对原则为基础的DNA生物传感器为分子生物学研究提供了全新的基因检测技术,受到生物分析工作者的高度重视。

分子信标的提出正是建立在DNA碱基互补配原则的基础上,以其独特的茎-环结构,在选择性、灵敏度和特异性方面更加优于普通的直链探针,因此其在基因检测领域的应用越来越广泛。迄今为止,经过研究者们不断地改进,分子信标的功能更是得到了快速的发展,在PCR实时监控、基因突变快速分析、活体细胞动态分析及DNA与蛋白质相互作用研究等各种领域中开辟了新的途径。

纳米技术的出现为生物传感器的发展提供了无穷想象的空间,基于纳米金胶的比色传感技术以其方便、快速和肉眼可见的优势在DNA生物传感器中得到了广泛的应用。纳米金胶的良好生物相容性、简单的合成条件、大的比表面积、低廉的成本以及所具有的特殊的光学性质为比色技术的发展注入了强大的生命力,提高了比色检测的灵敏度和稳定性。

随着核酸研究的深入和体外筛选技术(SELEX)的建立,核酸适体技术使抗原抗体的反应发生了新的革命性变化,在蛋白组学到来的时代以其众多的优越性弥补并逐渐替代抗体在蛋白检测中的应用。电化学核酸适体传感器结合了电化学高灵敏度、



轻巧便宜、携带方便、耗能少、易微型化等优势 and 核酸适体对蛋白的高结合力和特异性更是成为当今生物学医学领域的前沿性课题和方向。

G-四分体结构的 DNA 酶也是基于核酸适体-配体的思想通过 SELEX 技术筛选出来的一种新型的 DNA 酶。它是一类卟啉铁与其适体构成的具有 G-四分体结构的仿辣根过氧化酶的配合物, 适体为一段富含 G 碱基的寡聚核苷酸序列。自 1998 年, Sen 小组提出这类 DNA 酶以来, 它高灵敏的催化性质、易于构建、易于合成的优点, 在比色和电致发光中得到了极大的发展。

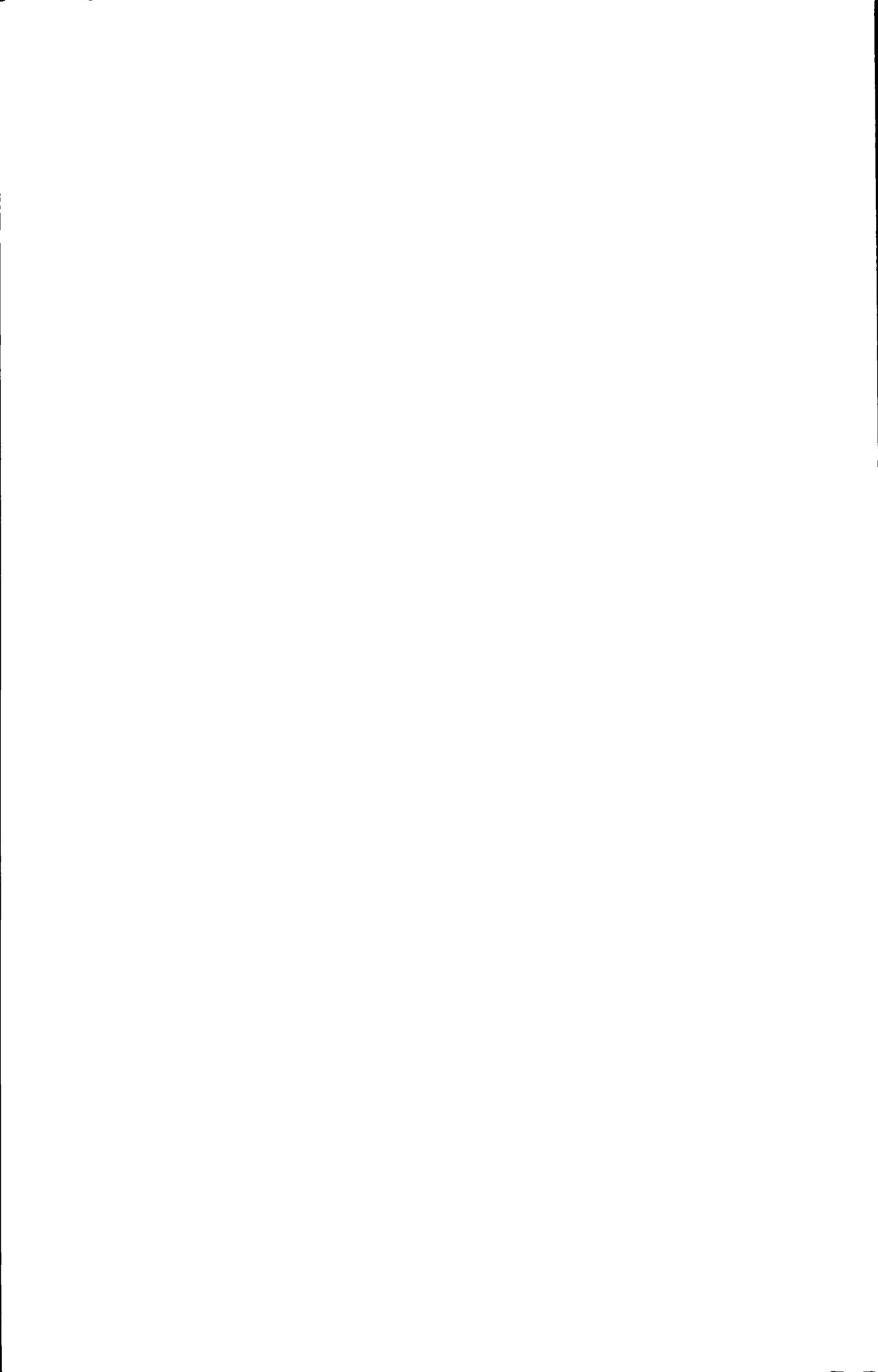
本文的创新之处就是利用了纳米金胶, DNA 酶等简单易操作, 并且廉价的的各种技术结合, 建立多种检测核酸和蛋白的传感器, 发展了新的基因诊断技术手段。论文主要内容如下:

第一章 绪 论

SELEX 技术的发展促进了核酸适体的发展, 这其中也包括 G-四分体结构的 DNA 酶发展。本章首先介绍了 DNA 生物传感器尤其是电化学核酸适体传感器、分子信标技术及纳米金胶在比色检测中的分类和应用, 着重介绍了分子信标技术, DNA 酶等的发展及应用, 阐明了本论文研究的理论基础和选题依据。最后提出本论文的目的意义及创新之处。

第二章 分子信标标记的纳米金胶比色探针 for 寡聚核苷酸序列单碱基多态性的识别

分子信标(MB)是一种相比于普通直链探针更灵敏地能检测单碱基错配的茎环结构的探针, 因此广泛被应用在各种基因突变的检测上。本文介绍了一种利用分子信标高灵敏、高特异性识别力和纳米金凝聚变色的光学特性, 设计的新型的识别单碱基多态性的比色检测方法。利用纳米金胶的自组装技术将巯基修饰的分子信标探针固定到金胶表面制得新型纳米金胶探针(AuNPs-MB), 当加入不同的目标序列(完全互补序列或单碱基错配序列)与之杂交时, 使金胶表面构象改变及引起金胶体系熵焓的差异性: 即在适当盐度条件下, 导致金胶不同程度的聚集, 从而实现对单碱基错配几率和不同位点的识别。最后, 将该比色传感体系应用在对 P53 基因的检测上, 同样能够有效区分野生型和突变型 P53 基因, 实现对单碱基多态性的识别。实验结果显示, 利用该金胶比色方法, 操作简单, 成本低廉, 对单碱基错配在混合目

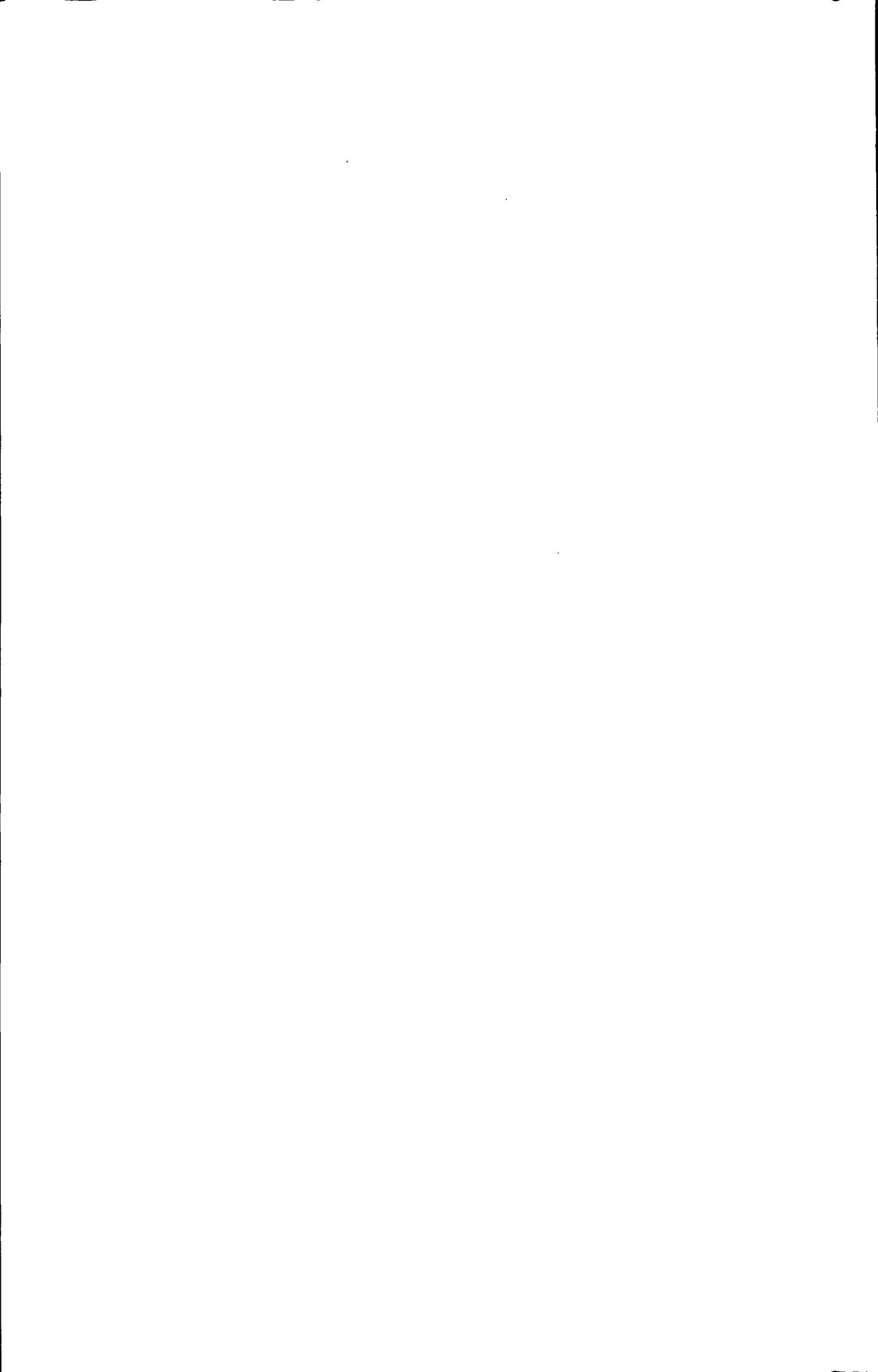


标体系中的分辨率能达到至少 5%。

第三章 基于 G-四分体结构的 DNA 酶电化学核酸适体传感器信号扩增检测凝血酶

本文构建了一种结合核酸适体技术和 DNA 酶的特性,以凝血酶蛋白作为研究对象的高效、高灵敏度、特异性识别蛋白质的电化学催化检测的方法。凝血酶的核酸适体是一段富含 G 碱基的寡聚核苷酸序列,它被证实能与卟啉铁配位形成一定的 G-四分体结构,当其结合目标凝血酶时,该结构就会进一步转化成牢固的 DNA 酶超分子结构,表现出与辣根过氧化物酶相似的催化特性,能对双氧水进行很强的催化氧化,从而应用在电化学上对双氧水的催化氧化来检测凝血酶蛋白。该方法通过将 DNA 酶固定在金电极表面,结合电化学的高灵敏度,在有双氧水存在的情况下,得到催化电流与凝血酶浓度对数值在 $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$ mol/L 范围内线性相关,检测限可以达到 6×10^{-11} mol/L,相关系数为 $r=0.994$,对凝血酶蛋白的检测限可达到 6×10^{-11} M。并且该方法对凝血酶蛋白具有很好的特异性,其它蛋白如牛血清白蛋白、溶菌酶等均对凝血酶的检测基本无干扰。此新型的生物传感器制备简单,灵敏度和特异性高,为凝血酶的检测提供了一种新的手段。

关键词: SNPs, 纳米金胶, 分子信标, P53, 电化学催化, DNA 酶, 核酸适体



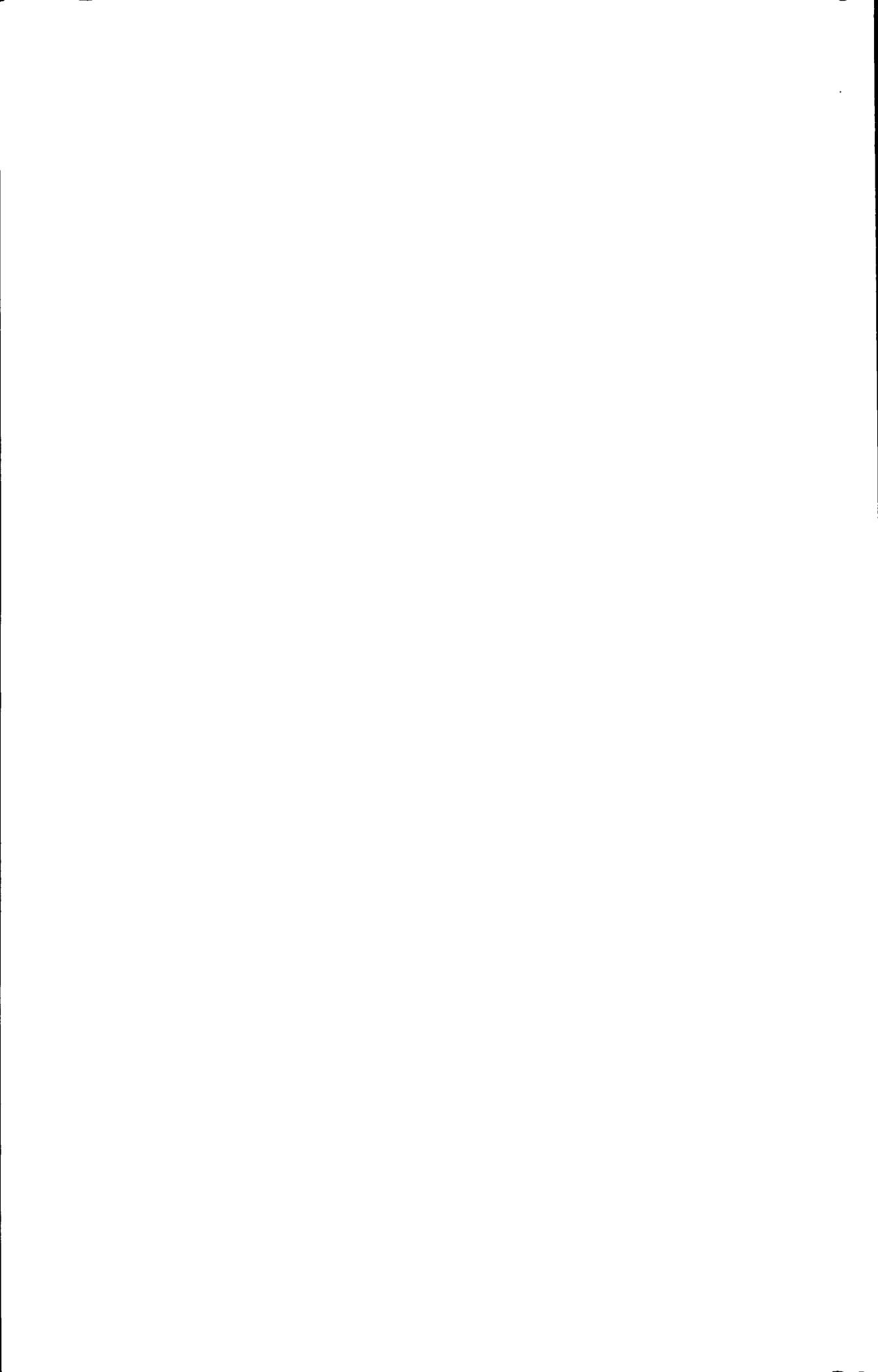
Study on the colorimetric and electrochemical for SNPs and thrombin detection based on Au nanoparticles and G-quadruplex-based DNazymes

ABSTRACT

As the human genome project has uncovered the full sequence of human genomes, the analysis of the variations among individual genomes has attracted considerable interest in a wide range of areas including molecular diagnostics, environmental monitoring, and antibiotechnology. Protein is a type of important biomarkers, which plays a key role in life sciences, medical diagnostics. Many detection techniques have been developed relying upon target hybridization with radioactive, which create disposal problems, require specially trained personnel and have a short shelf life. There is a considerable requirement for rapid, low-cost, and sensitive detection of specific DNA and protein for the clinical diagnosis of genetic and pathogenic diseases. DNA biosensor, a new conception of genome detection based on Watson-Crick base match principle, is of great advantages such as easy handling, quick detection, favorable selectivity and no pollution. Nowadays, it has become one of the most important methods in DNA detection.

One recent development is molecular beacons (MBs) that are highly selective in their recognition of oligonucleotides. Traditional MBs are doubly end-labeled oligonucleotides that exist in solutions as stable stem-loop structures and utilize fluorescence of a reporter dye combined with a proximate quencher attached to 3' end. MBs are now extensively employed in areas such as genetic screening, biosensor development and the detection of single-nucleotide polymorphisms (SNPs).

To achieve the desired simplicity, low-cost and sensitivity, colorimetric detection using gold nanoparticles (AuNPs) has been attracting considerable interests, because AuNPs aggregation accompanied by the surface plasmon shift can be clearly recognized with the naked eye. The ease of synthesizing of AuNPs and the possibility to couple of



different functionalities make AuNPs as a convenient tool for the sensing of metal ions, proteins and oligonucleotides.

Aptamers are synthetic DNA/RNA oligonucleotides isolated for their ability to selectively bind to various biomolecules through SELEX. As alternative to antibodies, aptamers have many advantages including high binding affinity, convenient automated-synthesis, ease-of labeling, and high stability. Up to now, many aptasensors have been developed include optical and electrochemical aptasensors. Electrochemical aptasensors have attracted substantial attention because of their high sensitivity, simple instrumentation, low production cost, fast response and portability in the development of aptasensors.

Since the first report by Sen and his co-workers in 1998, G-quadruplex-based DNAzymes which have also been identified by SELEX has received great attention. The folded guanine-rich oligonucleotides that serve as an aptamer for hemin could self assemble to form G-quadruplex structure. After binding with hemin, the resulting supramolecular complex mimics horseradish peroxidase(HRP) and catalyzes the H₂O₂-mediated oxidation of 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfome acid (ABTS) and luminal. These G-quadruplex-based DNAzymes have shown great potential as a novel kind of catalytic label for the development of various biosensors owing to its high catalytic activity, easy synthesis and construction.

The goal of present study is to design novel techniques with high sensitivity and selectivity. This paper has combines the excellent characteristics of AuNPs and DNAzymes to provide alternative candidates for DNA and protein detection. The dissertation includes three parts:

Chapter One: introduction

Aptamers are artificial oligonucleic acids which are selected through SELEX to bind specific target molecules. Guanine-rich oligonucleotides are one kind of these aptamers which can bind hemin to form G-quadruplex-based DNAzymes. In the beginning of this



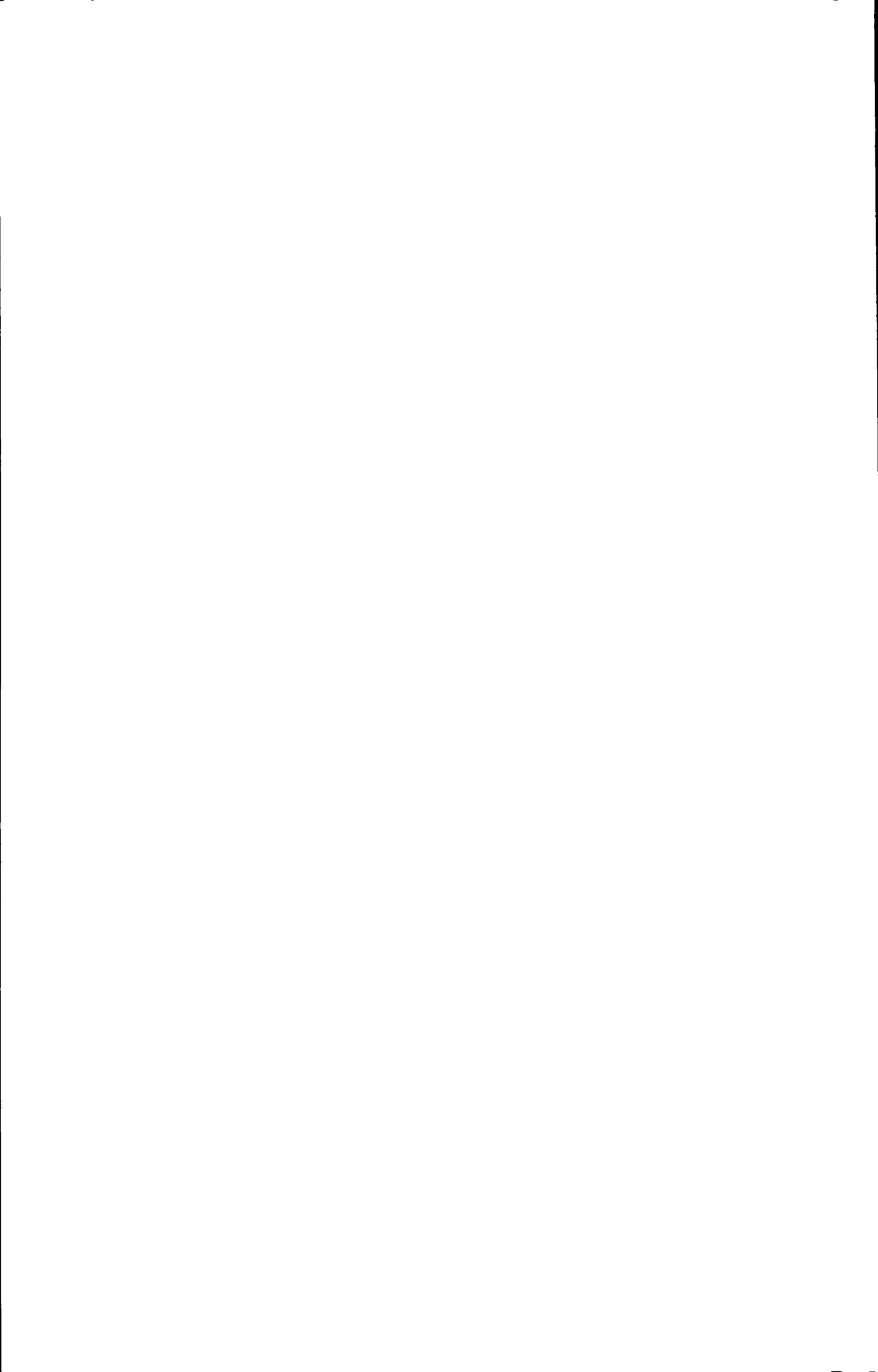
dissertation, the importance of the DNA and protein detection was introduced, together with the development of DNA biosensor. Secondly, the concepts and applications of AuNPs-based colorimetric biosensing events, molecular beacon and electrochemical aptasensors were described in detail to provide the theoretical principle for this paper. At last the purpose and innovation of the dissertation were pointed out.

Chapter Two: Label-Free Molecular Beacon-Functionalized Gold Nanoparticles as Colorimetric Probes for Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) detection

Compared with the traditional linear DNA probe, molecular beacon shows higher selectivity and specificity due to its conformation variations between stem-loop and stretched structure in detection of mutations in oligonucleotides. We reported a new colorimetric SNPs detection method by combining optical properties of gold nanoparticles and molecular beacon with the high specificity and sensitivity. The thiolated molecular beacons were attached to AuNPs via well-established self-assembled monolayer chemistry. A perfectly matched target and the single-base mismatched target can be completely discriminated by causing the change of entropic and steric conformation at certain concentration of $MgCl_2$. The color of the gold nanoparticle solution containing perfectly matched target is blue and the color of the gold nanoparticle solution containing single base mutation target is red. At last, we applied this method in P53 gene detection. The results indicated that it was possible to accurately determine SNPs as low as 5%. The proposed approach has a great potential for realizing an accurate, sensitive, rapid and low cost method of SNPs detection.

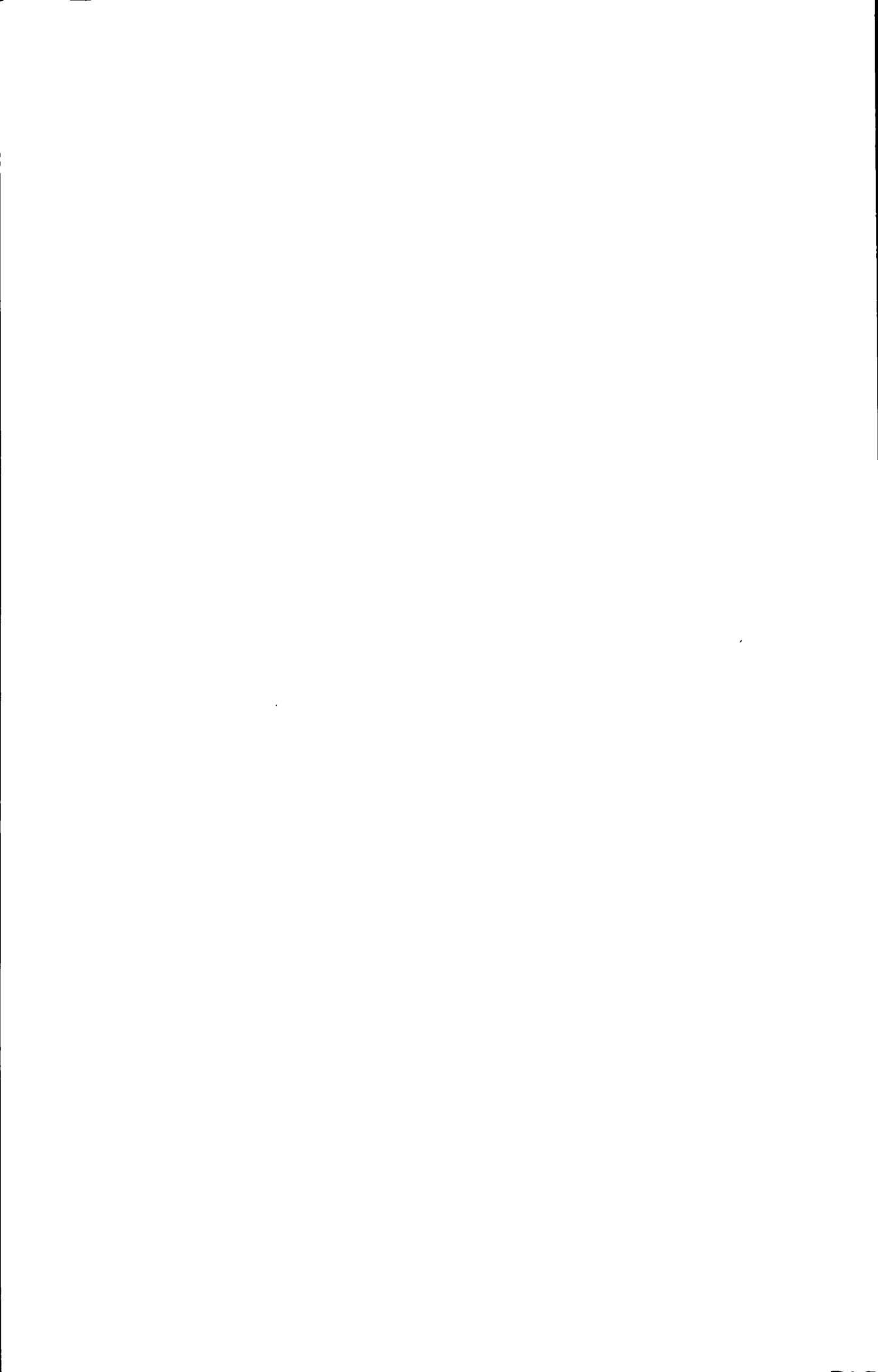
Chapter Three: G-Quadruplex-Based DNazymes aptasensor for the Amplified Electrochemical Detection of Thrombin

A novel G-quadruplex-based DNazymes aptasensor for the amplified electrochemical detection of thrombin has been described. The aptasensor utilized a



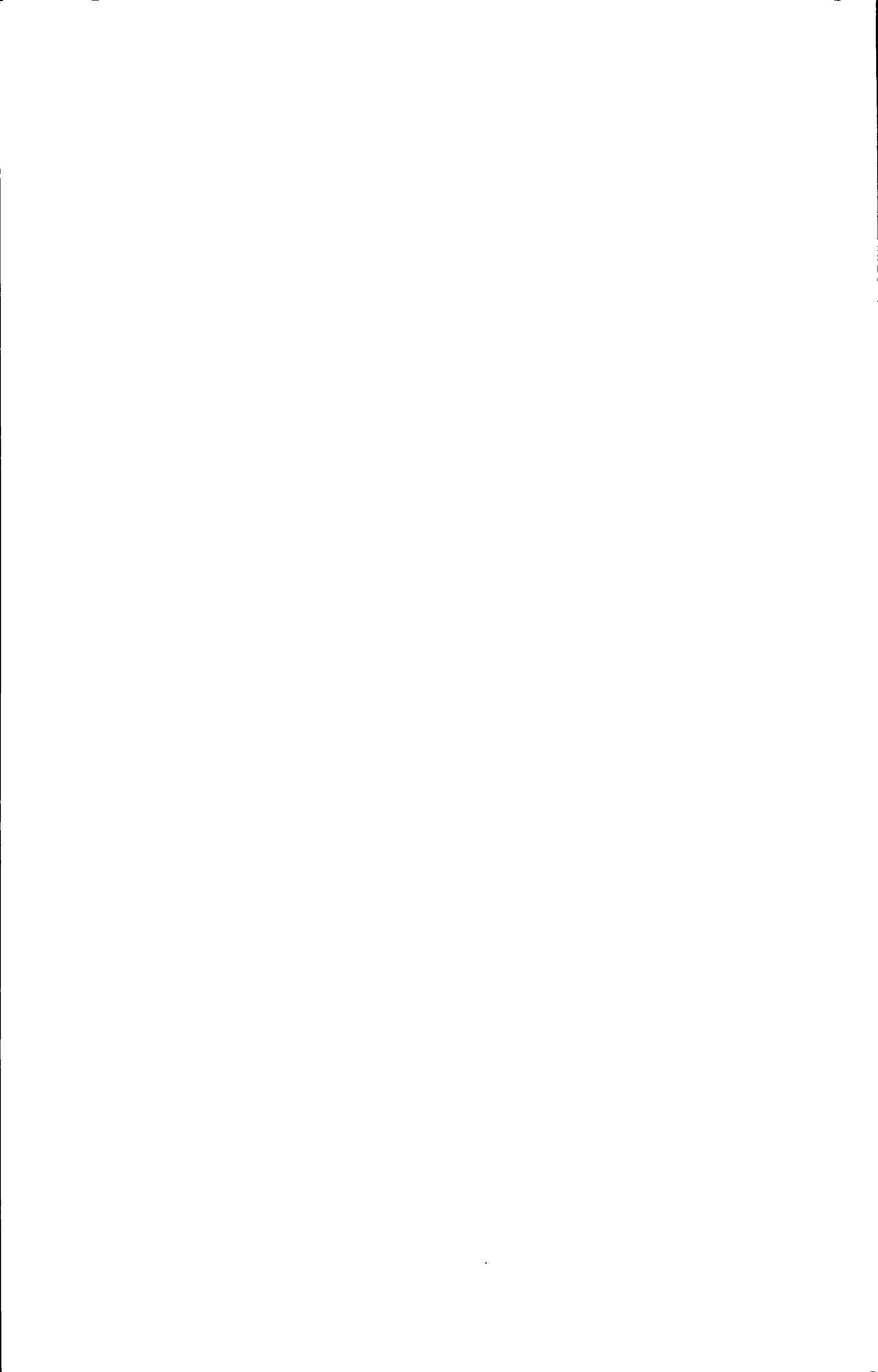
combination of hemin and guanine-rich thrombin-binding aptamer (TBA) to form the horseradish peroxidase (HRP)-mimicking DNAzymes with peroxidase catalytic activity. In the presence of thrombin, the enzyme activity could be extensively promoted, thereby providing the amplified electrochemical readout signals for detecting thrombin. This aptasensor exhibited high sensitivity and selectivity for thrombin determination, which enabled the analysis of thrombin with a detection limit of 6×10^{-11} M. On the basis of results, this method will serve as a versatile tool for proteins and other biomolecule detection.

KEY WORDS: SNPs, Au nanoparticles, Molecular beacon, P53, Electrochemical catalysis, G-quadruplex-based DNAzyme, Aptamer



目 录

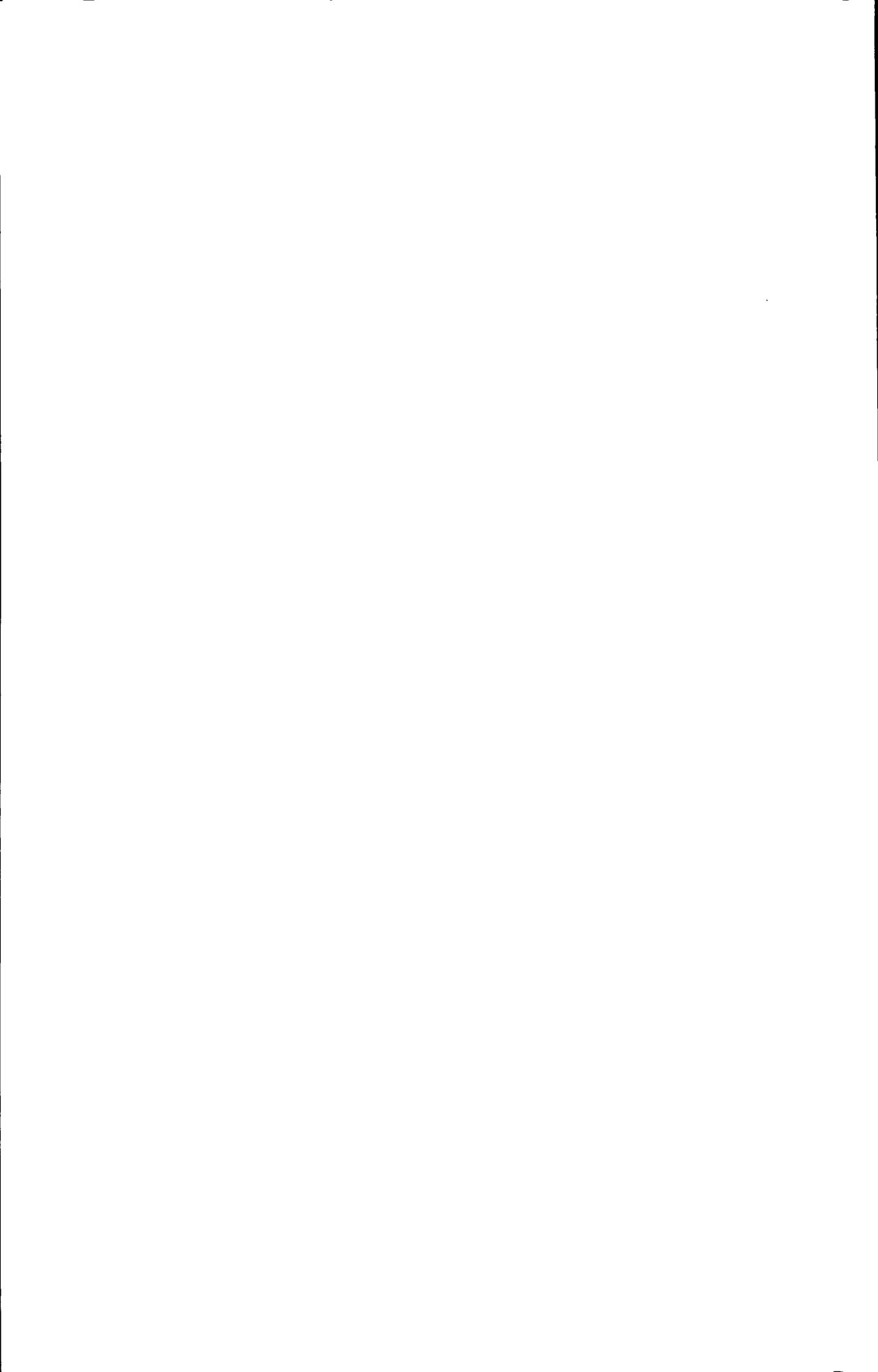
第一章 绪论	1
一. 纳米金胶在 DNA 生物传感器中的应用	2
二. 分子信标技术的原理和应用	5
1. 分子信标的结构和原理	6
2. 分子信标的应用	7
3. 分子信标的展望	11
三. 核酸适体生物传感器及其研究进展	11
3.1 核酸适体电化学生物传感器的原理	12
3.2 核酸适体电化学生物传感器的展望	16
四. DNA 酶在蛋白和 DNA 检测中的应用	17
4.1 G-四分体 DNA 酶的结构和性质	17
4.2 DNA 酶化学发光生物传感器中的应用	18
4.3 DNA 酶在比色检测中的应用	18
4.4 DNA 酶的展望	19
五. 本论文的目的和意义	20
1. 分子信标标记的纳米金胶比色探针对寡聚核苷酸序列单碱基多态性的识别	20
2. 基于 G-四分体结构的 DNA 酶电化学核酸适体传感器信号扩增检测凝血酶	21
参考文献	21
第二章 分子信标标记的纳米金胶比色探针对寡聚核苷酸序列单碱基多态性的识别	26



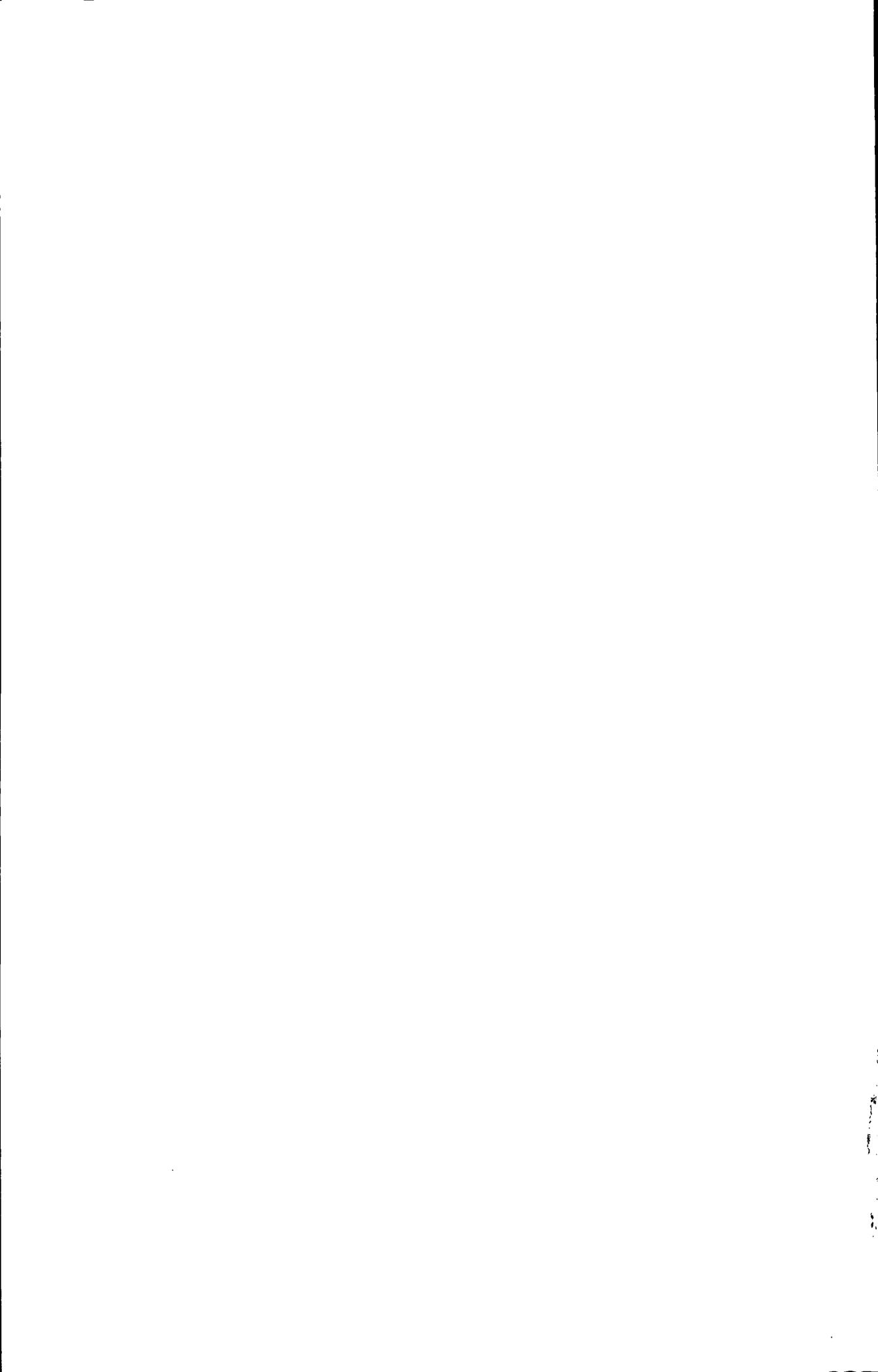
一. 引言.....	26
二. 实验部分.....	28
2.1 试剂与仪器.....	28
2.2 实验方法.....	32
三. 结果与讨论.....	34
3.1 金胶表面探针密度的估计.....	34
3.2 AuNPs-MB1 检测体系中 $MgCl_2$ 浓度的影响.....	35
3.3 AuNPs-MB1 的选择性.....	37
3.4 AuNPs-MB1 的 SNPs 定量检测.....	39
3.5 对 P53 基因的 SNPs 的识别.....	41
四. 结论.....	42
参考文献.....	43

第三章 基于 G-四分体结构的 DNA 酶电化学核酸适体传感器信号扩增检测凝血酶

.....	44
一. 引言.....	44
二. 实验部分.....	46
2.1 试剂与仪器.....	46
2.2 实验过程.....	47
三. 结果与讨论.....	47
3.1 电化学交流阻抗和循环伏安对传感器的表征.....	48
3.2 传感器电化学行为的研究.....	50
3.3 TBA/Hemin/Thrombin 电极的对 H_2O_2 的电催化还原.....	52
3.4 凝血酶的定量检测.....	53
3.5 传感器对凝血酶检测的特异性.....	54



四. 结论.....	55
参考文献.....	56
附录.....	58
致谢.....	60



第一章 绪 论

2002年2月初,由美国制定并发起的最庞大的基因组研究计划“人类基因组计划”被报道已完成99%的基因序列的测定。从这时起,生物学被重新划分为前基因组和后基因组两部分,并且以揭示基因组的功能及调控机制为目标的后基因组时代宣告正式到来。功能基因组研究成果不仅具有巨大的科学意义,而且有着十分光明、广泛的应用前景^[1,2]。基因实质上是DNA大分子中的各功能片段,不同的基因具有不同的碱基序列。DNA分子序列中的微小改变将导致基因突变及多态性,如一个或几个核苷酸的取代、缺失或插入DNA序列,就会导致遗传性状的改变或各种疾病的出现^[3,4],其中单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)是频率最高、信息含量最多的一种变异,占所有多态性的90%以上。由于SNPs具有数量多、分布广和稳定遗传等特点,跟许多疾病都直接相关,如 β -地中海贫血、乳腺癌等肿瘤等,是决定人类疾病易感性和药物反应差异的主要因素。因此,SNPs的灵敏、快速、方便特异分析检测对于疾病的临床诊断和治疗将起到极其重要的作用。

在人类基因组DNA中不到1000个碱基就存在一个单碱基突变,如果这种突变发生在外显引起有功能意义的突变,会导致所编码的蛋白质的表达发生变化,结构和功能的改变,影响人类的生命活动,导致基因疾病的产生^[5-7]。对蛋白质结构和功能的研究不仅能够反应基因的突变,而且将直接阐明生命在生理或病理条件下的变化机制,因而蛋白质组学是后基因组科学研究的核心内容之一。蛋白质的定量检测是研究蛋白质的基础,对蛋白质结构和功能研究,人体营养健康研究,疾病诊断以及药物、食品及临床分析中有重要意义。生命科学的飞速发展对蛋白质的检测提出越来越高的要求,开发出更灵敏,稳定和简便的蛋白质检测技术是目前生命科学研究的热点所在。

材料科学、生命科学、电子技术、生物技术等许多新技术的开发,为发展高灵敏度、高特异性的基因和蛋白的分析检测方法注入了活力,其中基于Waston-Crick模型的碱基互补配对原则发展起来的各种DNA生物传感技术,相比于传统的DNA凝胶电泳法,DNA生物传感器免去了放射性标记的危险性,节省了电泳操作的繁杂性,具有操作简便、快速灵敏、选择性好、无污染等特点,并具有分子识别、分离纯化基因等功能^[8-11],引起了国内外生物分析工作者的广泛关注,成为现代分析化

学中最有生命力的一个崭新分支^[12-15]。

一、纳米金胶在 DNA 生物传感器中的应用

纳米材料享有“21 世纪最有前途的材料”的美誉，被公认为是跨世纪材料研究领域的热点。纳米材料的表面效应、量子尺寸效应等使它呈现特殊的电学、光学和化学等性质，为生物传感器的发展提供了无穷的想象空间^[16-18]。纳米金胶 (AuNPs)

(图 1) 由于具有独特的光学性质 (表面等离子体吸收和共振光散射)、易进行表面修饰以及良好的生物相容性，因此功能化 AuNPs 的应用领域不断被拓宽，特别是在生物分析和生物医药等领域的应用引起了人们广泛关注^[17,19]。

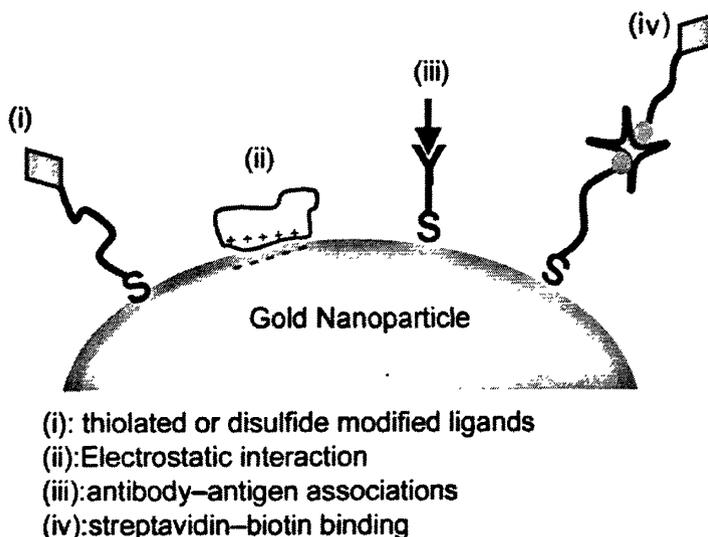


Fig.1. Schematic representation of formation of gold nanoparticle probes.

纳米金胶特殊的光学性质体现在 510-550 nm 可见光谱范围内有一吸收峰，并且吸收波长随纳米金胶的直径增大而增加。而其表观颜色依次呈现出淡橙黄色 (< 5 nm)、葡萄酒红色、深红色和蓝紫色变化。这一独特的光学性质为其在构建比色传感器中奠定了重要的基础^[20-23]。自 1997 年美国西北大学的 Mirkin 小组^[24,25]最早将两段不同的探针 DNA 分子通过金硫键修饰到金胶表面 (图 2)。当目标不存在时，金胶分散良好显示红色；当溶液中加入目标 DNA 由于其两端能与探针分子互补，

因此拉近两个金胶颗粒，形成三明治桥联结构，金胶的颜色就会显示紫色，随着目标 DNA 分子的增加，会逐渐变成蓝色，为金胶在 DNA 分子的检测上开辟了新的方法。

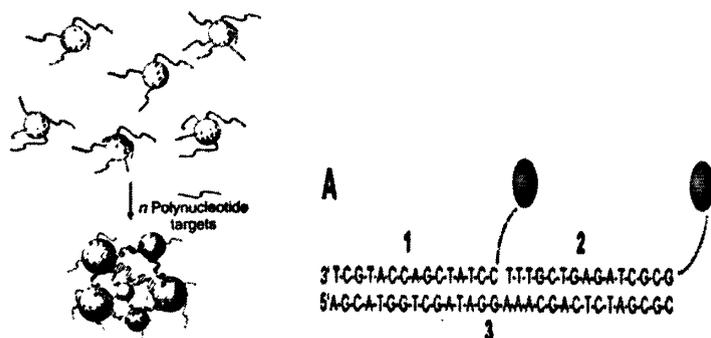


Fig.2. Schematic representation of the concept for generating aggregates signaling hybridization of nanoparticle-oligonucleotide conjugates with oligonucleotide target molecules.

Maeda 研究小组^[26,27]发现了不经过桥联结构的金胶同样能发挥区分检测不同序列的寡聚核苷酸的目的。当不同目标与探针分子进行杂交后，通过调节盐度（图 3），在 0.5 M NaCl 存在下，完全互补序列的金胶出现很明显的聚集现象，金胶的特征峰位红移到 560 nm 处；在一碱基错配存在下，金胶始终保持良好的分散，因而能对完全互补序列和一碱基错配序列进行很好的区分。

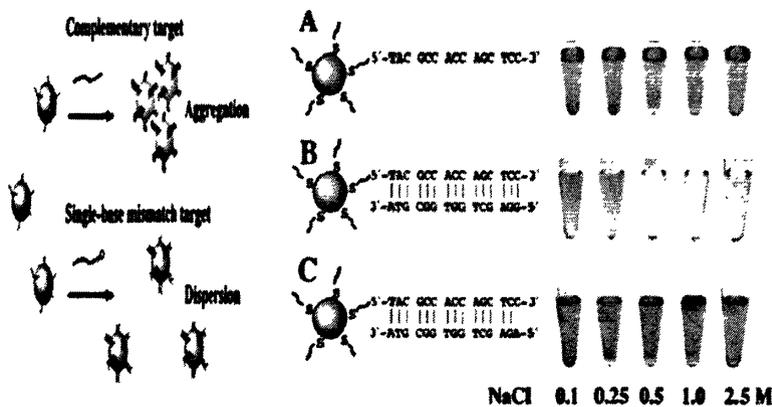


Fig.3. Aggregation behaviors of the DNA-gold nanoparticles at various NaCl concentrations at room temperature: (A) without a target DNA, (B) with the complementary target, and (C) with a target containing a single base mismatch at its 5' terminus.

同时, Li 小组^[28]在 Maeda 小组研究的基础上意外发现金胶上修饰的 DNA 在巯基己醇占位的情况下, 相与目标分子作用后形成折叠或发卡结构, 相比于直链型 DNA 修饰的金胶, 这种构象的改变更利于金胶在一定盐度下的分散, 并且这个过程是可逆的可控过程, 促进了金胶在生物分析中的进一步应用^[29]。Fan 小组^[30]报道了将不同荧光标记的分子信标探针修饰到金胶表面, 提出了一种新型的纳米探针 (nanoMB) 的概念 (图 4), 并且通过比较发现经过占位的有分子信标修饰的金胶具有很好的耐盐性, 不太容易聚集, 而未经过占位修饰的 Au-NanoMB 耐盐能力比较差, 然后通过金胶对荧光标记物的荧光猝灭, 用于多色检测不同目标。

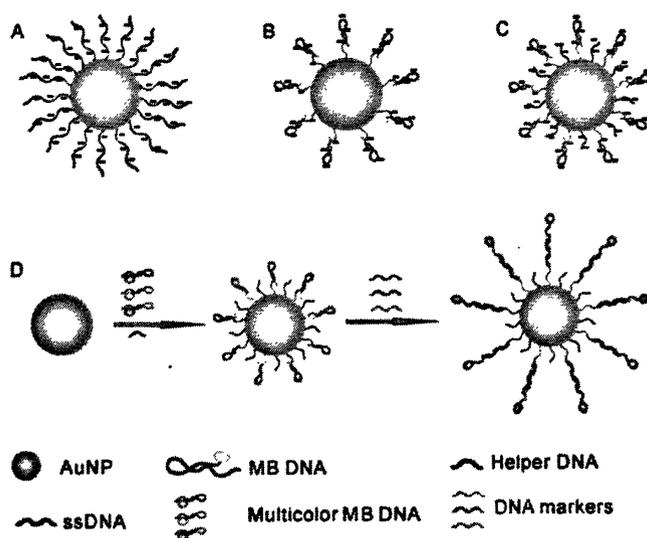


Fig.4. Assembly of nanoMBs: A) AuNPs with densely loaded linear probes; B) AuNPs with stem-loop probes; C) AuNPs stem-loop probes and helper oligonucleotides; D) AuNPs with multicolor stem-loop probes and helper oligonucleotides

Yu^[31]等利用这种方法 (图5), 通过纳米金凝集变色效应, 将普通探针和识别探针固定在金胶表面, 当它们与目标链杂交时, 纳米金会发生团聚, 溶液的颜色从红色变为紫灰色, 当待测的突变型的基因DNA存在时, DNA连接酶会发生连接反应。

反之,当存在单碱基错配的时候,缺口就不能被封闭从而用来检测 K-ras 癌基因的第12位密码子的单碱基突变。

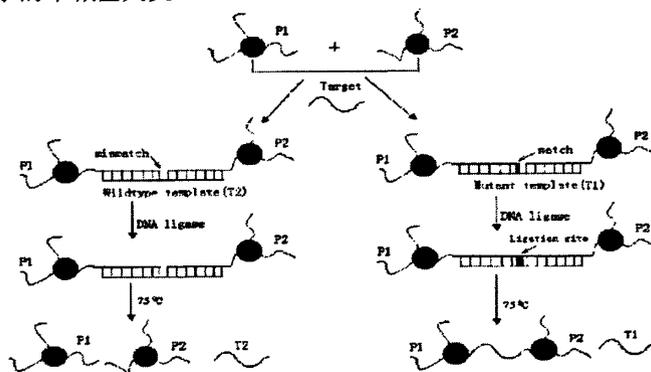


Fig.5. Illustration of the Au nanoparticle assembly and ligase reaction-based assay

由于纳米金的良好生物相容性和独特的光学性质,为DNA、蛋白等生物分子的检测提供了便捷的方法,在生物医学、分子生物学等的生物标记分析领域中具有广泛和重要的应用,同时也是当今各国所关注的研究前沿及重要发展方向。

二、分子信标技术的原理和应用

许多新的生物技术的开发,为发展高灵敏度、高特异性的生物分析检测方法注入了活力,其中利用DNA分子间的特异性互补配对规律发展起来的各种DNA生物传感技术,引起了国内外生物分析工作者的广泛关注。核酸是生物化学、分子生物学、分子遗传学和基因工程研究的重要物质基础。在基因时代和蛋白质时代,人们迫切需要一种具有高灵敏度和高亲和力的生物分子探针,用以进行定性和定量检测。1996年,美国国家卫生研究所的Tyagi和Kramer^[32]提出一种设计非常巧妙的荧光分子探针(molecular beacon, MB),并因此建立了分子信标技术,很快这种技术就广泛地应用于医学、生物学、分子生物学、临床医学和化学等诸多领域。分子信标的特异性体现在它的发卡式结构,较普通的单链寡核苷酸探针更稳定,有更好的选择性和杂交特异性,而且操作简便、灵敏度高,可以识别单碱基错配的寡核苷酸。在临床诊断、基因检测等领域,分子信标也越来越显示出它的优势。近年来,人们对分子信标的结构作了诸多改进,发展出很多具有更多特性的新型分子信标。随着分

子信标的发展,该技术也必将在更多领域中发挥出它的优势。

1.分子信标的结构和原理

分子信标(图6)它是具有“环茎”结构的短链寡聚核苷酸序列,包括环部(loop)和茎部(stem)两部分。Loop环上的寡聚核苷酸序列大概含20个碱基,是分子信标的基因识别部分,它能与目标基因自发地进行杂交。茎部是一段5-7对碱基互补的发夹结构(hairpin)。在分子信标茎部5'端和3'端通过连接臂(linker)连接上荧光基团(fluorophore,一般为荧光素、四甲基罗丹明等)和猝灭基团(quencher,一般为4-二甲基对氨基偶氮苯-苯甲酸,DABCYL)。当MB与目标分子完全匹配的时候,loop环与靶分子杂交被打开,导致荧光基团和猝灭基团距离拉开,体系荧光信号大大增强;而当MB与靶分子存在错配的时候,不易发生构象改变,就不会产生荧光,从而实现单碱基突变的实时和特异性检测。分子信标独特的茎-环结构决定了分子信标技术的高特异性,它可以灵敏地将完全互补和错配的序列区分开。茎-环结构的存在使分子信标存在两个稳定态:当处于自由态时,其茎部自身形成杂交稳定态;当有互补的目标序列存在时,探针与目标序列形成双链杂交稳定态。由于分子信标杂交前后环状区与目标分子的双链结构之间存在热力学平衡关系,因此它的杂交特异性明显高于常规的线状探针。调节分子信标序列的长度恰到好处,可以使得其与完全互补目标物杂交后,形成的双链比分子信标自身环茎结构来得稳定。但是如果目标序列中有错配碱基存在时,探针-目标序列双链结构的稳定性则不及信标自身的环茎结构,信标则不会打开,从而对分子信标的荧光不会发生任何的影响产生信号。这样,分子信标就成为一个灵敏的“分子开关”,只在完全互补的目标序列存在时“发光”,在错配目标序列存在时则不给出信号,靶序列即使只有一个碱基的改变、缺失、插入,分子信标都能检测出来。因此分子信标对核酸分子的分辨率达到一个碱基^[33-35],其灵敏度和特异性可以根据不同的应用目的通过调整GC含量来达到优化MB,使环与靶分子杂交体的稳定性大于MB本身的茎端杂交的稳定性。

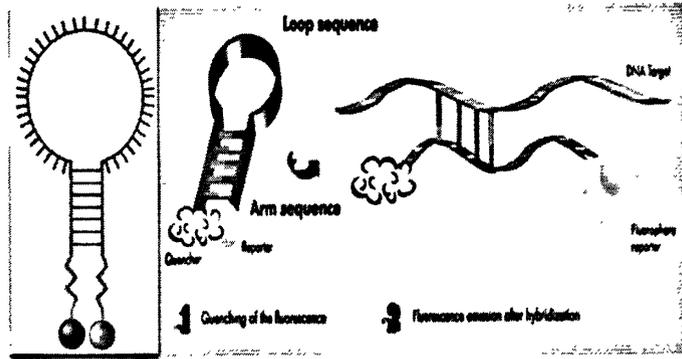


Fig. 6. A typical structure of molecular beacon and hybridization of molecular beacon

2. 分子信标的应用

分子信标问世后，人们在传统的分子信标的基础上进行诸多改进，使其性能不断提高，新型的分子信标也不断问世被应用于各种领域。按照检测方法的不同，可以大体将其分为传统荧光分子信标与新型电化学分子信标两大类。

Tyagi 等^[36]在继传统的分子信标发明后，又设计了一种荧光波长转移型分子信标（如图 7 所示），通过荧光共振能量转移的原理，使荧光发射基团将能量以荧光的形式放出。这种新型的分子信标不仅可以通过选择不同波长的荧光发射基团使其发出不同颜色的荧光，而且具有较大的 Stokes 位移，解决了传统分子信标因激发波长和发射波长差别较小，从而使一部分激发光通过反射和散射到达检测器，影响灵敏度的问题。

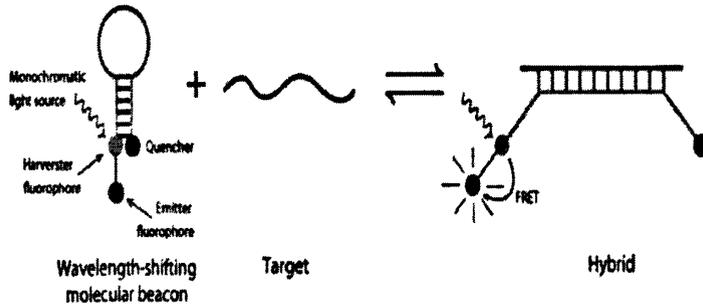


Fig. 7. Wavelength-shifting molecular beacon

Musundi 等^[37]在分子信标末端分别标记上荧光供体 Cy5 和荧光受体 Cy5.5，设计出一种可用于等位基因特异性识别的引物探针（图 8）。

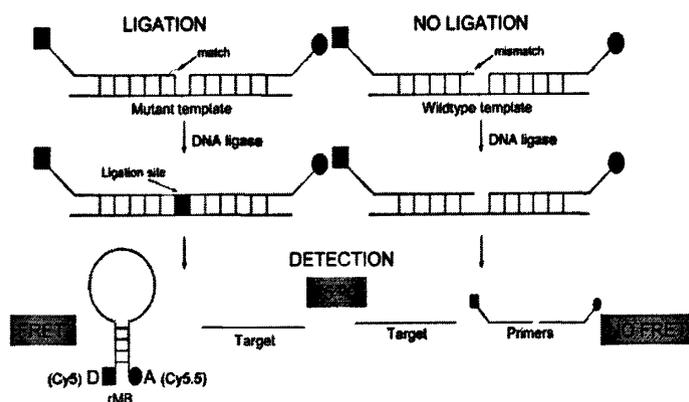


Fig.8. Illustration of the LDR sp FRET assay in which two allele-specific primers are labeled at their 3' - and 5' -ends with fluorescent dyes.

Fujimoto 等^[38]利用一种大环的花类有机物作为荧光基团，当其以单体形式存在时发射一种荧光（如图 9 所示）；当两个分子互相靠近时， π 轨道的交叠，形成双聚体导致荧光波长发生位移。此种方法弥补了基于 FRET 原理的荧光分子对受细胞生物分子的光化学活性干扰的问题，提高了信噪比。该类型分子信标不仅可以得到高的灵敏度，而且因不需任何淬灭剂比传统的分子信标在合成上简单、便宜。

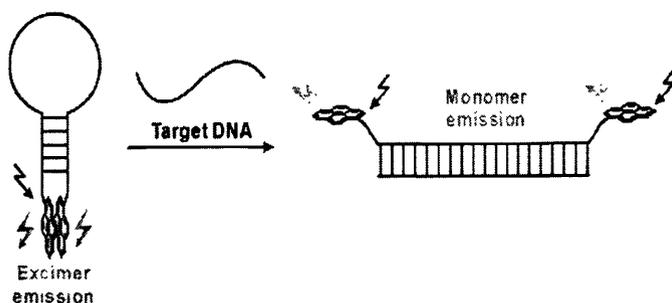


Fig .9. Excimer-Monomer molecular beacon

Erdem 等^[39]报道了以水溶性的金属酞菁染料 (Pc's) 作为 H-二聚体的分子信标 (H-dimer-based MB), 当信标以茎-环形式存在时, 两端连接的大的有机荧光基团分子通过分子内的作用力聚合形成 H-二聚体, 无荧光信号产生; 当与目标反应时, 二聚体打开, 以单体形式存在, 荧光信号产生。四甲基罗丹明^[40]及其异硫氰酸酯 (5-TRITC)^[41]、N-羟基丁二酰亚胺酯化的二氰基亚甲基二氢咪喃 (DCDHF) 染料^[42]等都被报道具有这类相似的性质, 该类型的信标具有更高的淬灭效率, 可以达到 97% 以上。

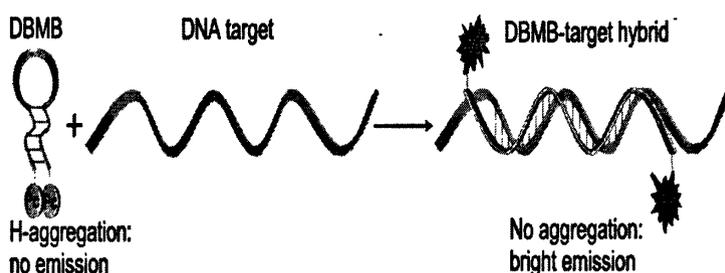


Fig. 10. Dimer-Based MB probes assay using Pc dyes and the structures of Pc1, Pc2 molecules

由于电化学的高灵敏度使发卡式 DNA 电化学分子信标的研究成为电化学分子探针的一类代表。探针杂交前后构型的变化将引起标记物与电极表面距离的变化, 根据其对电子传递的影响所引起的电信号变化对目标物进行检测。Fan 小组^[43]和 Mao 小组^[44]报道了一种典型的电化学分子信标 (如图 11 所示)。二茂铁作为电化学活性基团二茂铁标记在电化学分子信标一端, 在没有目标的存在下, 二茂铁非常接近电极表面, 产生很强的氧化还原信号; 当特异结合目标后, 茎-环结构打开, 二茂铁远离电极表面, 因此电信号发生改变, 达到检测 DNA 和蛋白的目的。

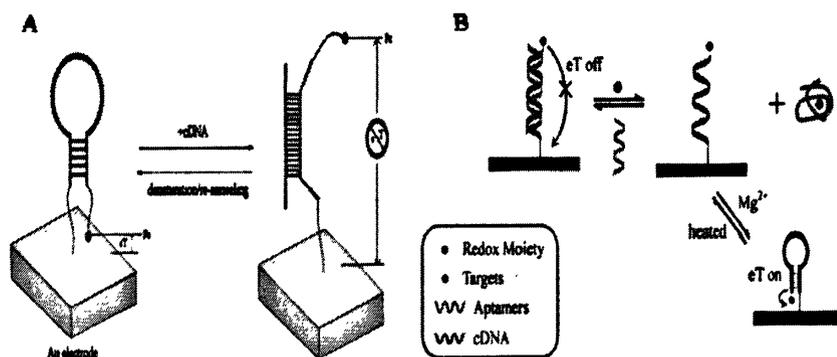


Fig. 11. An immobilized electrochemical molecular beacon

我们小组^[45]首次研制了无需固定、类似荧光分子信标的电化学活性开关的分子信标，实现在溶液均相中检测目标 DNA 的目的，通过在设计的茎环结构的分子信标两端修饰上蒽醌结构的电化学标记物胭脂红酸（CA），利用它在茎环结构中互相靠近，氢键结合成二聚体，使其电化学活性减弱，“电化学开关闭合”；加入目标 DNA 后与分子信标杂交形成刚性的双链结构，胭脂红酸分子恢复单体结构，“电化学开关打开”，从而能够检测到电化学信号（图 12A），是分子信标在电化学上应用的一个重要突破。

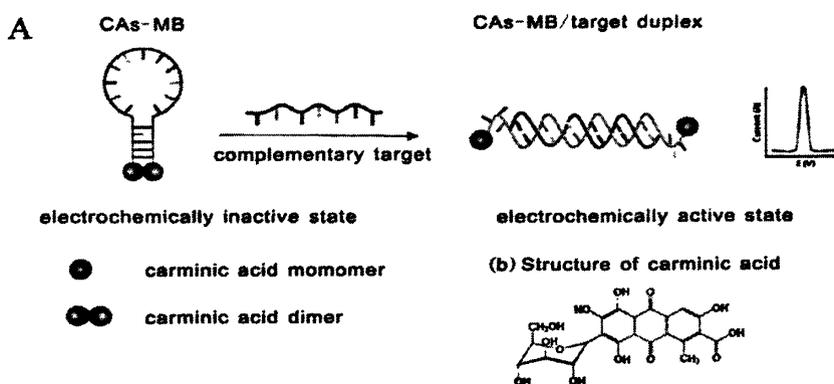


Fig.12A. Schematic representation of the DNA and thrombin detection by CAs-MB.

同时我们小组^[46]还将此分子信标应用在检测蛋白的电化学传感器上，将凝血酶的核酸适体设计的分子信标固定到磁纳米颗粒的表面，在纳米磁颗粒的作用下，富

集到电极表面，几乎无电化学信号，当目标蛋白结合分子信标后，表现出电化学活性，使凝血酶的检出限达到 42.4 pM（图 12B）。

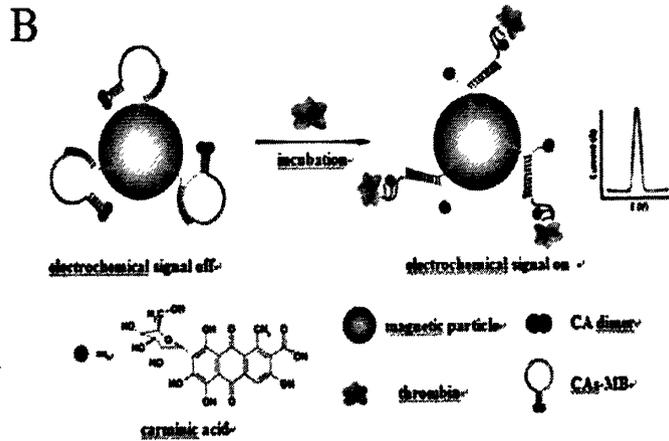


Fig.12B. Schematic representation of the DNA and thrombin detection by CAs-MB/MNB.

3.分子信标的展望

为了满足基因组学和蛋白质组学的发展，对分子信标的固定化也成了必然的发展趋势。新型分子信标的不断问世，大大拓展了分子信标的应用领域，在对基因的检测特别是基因突变和单核苷酸多态性方面缩短了检测时间，提高了灵敏度和特异性，既可定性又可定量。因此，结合纳米技术等其它先进技术，必然会促进分子信标技术的发展，对基于分子信标的 DNA 生物传感器研究和应用开发更具有重要的科学意义。

三、核酸适体生物传感器及其研究进展

1990年，美国的Szostak J和Gold L等实验室各自独立建立核酸文库^[47]，并逐步发展成一种从核酸文库里筛选出与配体高效、专一结合的 DNA 或 RNA 片段的指数富集配体系统进化（Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX）技术，由此技术筛选出的分子称为核酸适体。核酸适体不但和抗体一样能与靶分子高效、专一地结合（图13），而且具有许多连抗体都无法比拟的优点，如分

子量小、配体广泛、无免疫原性、体外筛选不依赖动物或细胞和可进行多种修饰等^[48]。利用核酸结构的多样性,可使它与各种配体产生高选择性的结合。它在核酸结构的多样性、蛋白质/DNA 相互作用等的研究及医学诊断和治疗、传感器、分子开关等方面的应用引起了人们的极大兴趣。核酸适体生物传感器,一般可以分为光学、压电和电化学核酸适体生物传感器。

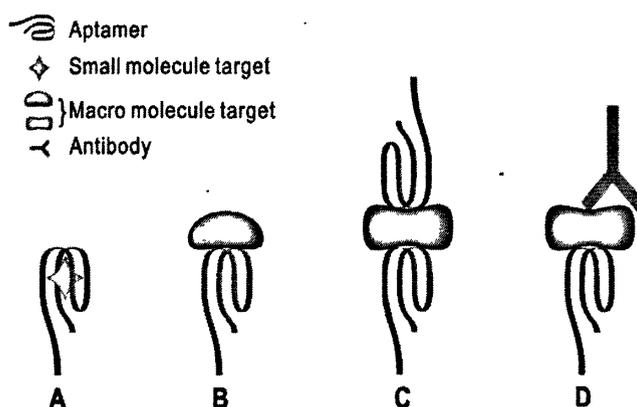


Fig.13. Aptamer-based assay formats. (A) Small-molecule target buried within the binding pockets of aptamer structures; (B) single-site format; (C) dual-site (sandwich) binding format with two aptamers; (D) “sandwich” binding format with an aptamer and an antibody.

3.1 核酸适体电化学生物传感器的原理

核酸适体电化学生物传感器是指将适体作为分子识别物质固定在电极表面,根据适体与目标分析物结合前后引起的电化学信号的变化来进行检测的电化学传感器^[49-51]。适体电化学生物传感器可以根据是否需要进行标记,分为非标记型和标记型两类。

3.1.1 非标记型电化学适体生物传感器

非标记型指对适体不进行标记,直接根据适体结合目标分子前后引起的电阻、电流或电位的变化进行检测的传感器。这类传感器就具有操作简单、无需标记、假阳性信号低等优点,缺点就是灵敏度都较低。目前,非标记型电化学适体传感器

大多是基于适体与目标分子结合前后引起的法拉第阻抗的变化的^[52-54]。阻抗法是以 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 等作为氧化还原探针,根据适体与蛋白或者其它生物分子结合前后电子传递电阻的变化值对蛋白进行检测。Sullivan等人^[55]利用修饰凝血酶适体的电极,利用检测凝血酶与适体结合前后对电极表面的电子的阻碍程度,达到检测凝血酶的目的,对其检出限为2.0 nM,并且用2 M NaCl溶液能对电极进行再生。Ma等^[56]构建了IgE适体电化学传感器,将巯基乙胺和发卡式的IgE适体通过自组装作用固定在金阵列电极上,对IgE定量检测的检出限为0.1 nM。实验中利用原子力显微镜对适体的结合能力进行了表征,并发现适体的DNA序列决定了其与蛋白结合的特异性。Yao小组等^[57]在金电极表面利用两条凝血酶的核酸适体,构成三明治结构,其中一条进行金胶修饰,通过对金胶表面的放大和表面活性剂的修饰,层层扩增阻抗的信号,使对凝血酶的检出限达到fM。

3.1.2 标记型电化学适体生物传感器

标记型适体电化学生物传感器是基于适体分子识别前后适体构象的变化,导致标记在适体上的电活性物质电荷转移效率发生改变,引起检测的电流信号的变化。这类传感器的优点在于灵敏度高,但是操作过程复杂繁琐,需要进行标记,成本较高。

3.1.2.1 电活性物质标记

二茂铁(ferrocene, Fc)和亚甲基蓝(methylene blue, MB)等高活性的电活性分子已被广泛应用于蛋白和适体等的标记上。Hegger和Plaxco研究小组构建了许多亚甲基蓝标记的信号放大型(signal-on)^[58,59]和信号抑制型(signal-off)适体传感器^[60,61],他们将两端分别修饰了巯基与亚甲基蓝的32个碱基的凝血酶适体自组装到金电极表面^[62](图14.A),凝血酶加入前,单链的核酸适体柔性很大致使末端的MB靠近或接触电极表面,产生电化学信号;而当凝血酶结合适体后,G-四分体结构形成,核酸适体呈现刚性,使MB与电极之间距离增大或电解质传质受阻,电化学信号降低,藉此构建了signal-off型电化学适体传感器。信号的衰减程度与凝血酶浓度相关,因而能对凝血酶进行定量检测,检测下限达 $6.4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由于这类传感器容易产生假阳性信号,所以Mao等^[63]对其进行了改进,发展了另外一种抑制型传感器,当与目标结合后,与适体互补的Fc-DNA离开电极,造成信号的衰减,这在一定程度上也抑制了假阳性信号(图14.B)。Dong小组^[64]将MB作为电信号的指示

剂，利用它能嵌入双链DNA的结构，用金胶作为扩增信号的物质，用来检测目标腺苷（ATP）的检出限能达到0.1 nm。

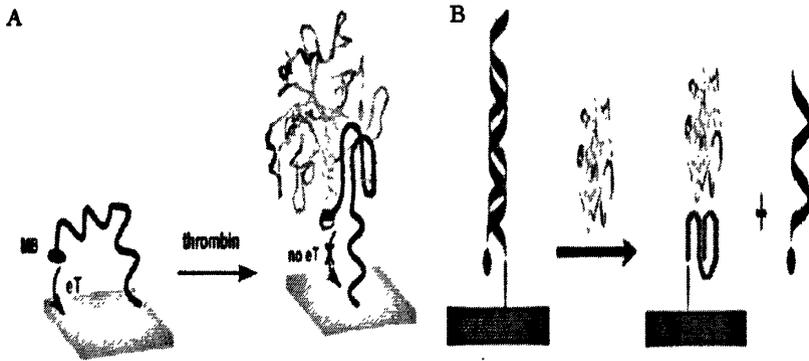


Fig.14. Schemes of several “signal-off” electrochemical aptasensors.

Plaxo小组又在signal-off传感器基础上设计了signal-on型适配传感器，避免了前者的假阳性和信号难以放大的限制^[65]。他们将适配和与其互补的序列形成刚性双链结构固定在金电极表面，这时MB分子远离电极表面，电化学信号很弱，但是当目标凝血酶与适配结合后，由于其结合力大于双链DNA之间的碱基配对能力，使互补序列电化学信号增强，并且电极再生性良好，对凝血酶可检测到3 nM比同类型的signal-off型灵敏度更高。由于二茂铁在一定程度上与亚甲基蓝不同，不能与双链核酸结构形成共轭结构而实现长程电子传递，因此只能检测到极微弱的电流信号。Yu小组^[66]提出一种新的构象开关型的适配传感器，将适配修饰上二茂铁，并与葱醌类标记物进行比较。当采用二茂铁作为标记物时，能够利用目标作为开关，当目标结合适配后，开关被打开，电子经过双链DNA的传递是导通的，二茂铁的信号能被检测出来；反之，目标不存在时，电子传递受阻，检测不到二茂铁的信号。

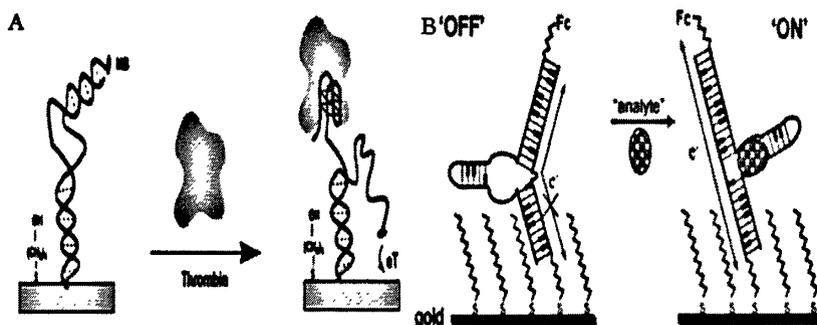


Fig.15. Schemes of several “signal-on” electrochemical aptasensors.

Fan等^[67]将两端分别修饰了巯基和二茂铁的ATP适体与其互补链杂交形成双链结构自组装至金电极表面，构建了signal-on型ATP适体传感器。双链结构的刚性，超过了电子最大隧穿距离（ $> 10 \text{ nm}$ ），ATP不存在时无法检测到电信号。

3.1.2.2 纳米粒子标记

随着纳米技术的发展，纳米粒子大的比表面积、良好的导电性以及催化能力一直被用作电化学标记物。Bakker等^[68]将CdS纳米粒子标记的凝血酶适体以“三明治”形式固定到金电极表面，利用过氧化氢将 Cd^{2+} 溶出，借助镉离子选择性电极来检测溶出的 Cd^{2+} ，对凝血酶的检测下限达 $0.14 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。我们小组郑静等^[69]采用磁纳米粒子/凝血酶/纳米金胶的三明治结构，利用磁性分离和对纳米金胶的溶出指示信号检测凝血酶，得到了较高的灵敏度。Pt纳米粒子^[70]以其独特的金属催化性质，标记在适体上被用来构建凝血酶适体/凝血酶/铂纳米粒子标记的凝血酶适体传感器，通过Pt纳米粒子对双氧水的催化，放大信号电化学催化检测凝血酶。

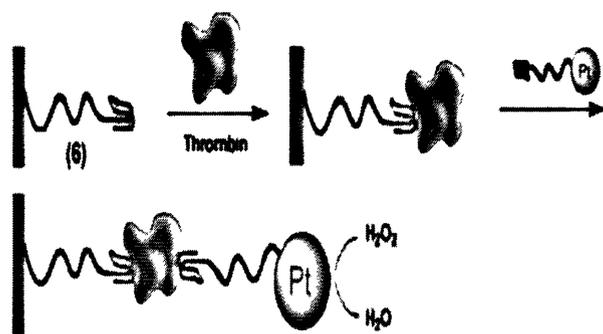


Fig.16. Scheme depicting the analytical procedure for using the Pt-NPs in the analysis of thrombin.

3.1.2.3 酶标记

酶标记的适体传感器综合了适体和酶的优点,对疾病相关蛋白质的检测更具有特色和优势^[71-74]。酶标记的适体传感器对于一些具有适体双结合位点的蛋白质,如凝血酶、PDGF等都是适用的,可以通过构建“适体-目标蛋白质-酶联适体”的“三明治”结构的适体传感器进行目标的识别检测。Mascini小组^[74]利用磁纳米颗粒上组装上亲和素标记的适体,在凝血酶存在下成功构建凝血酶的三明治结构,最后将碱性磷酸酯酶标记到磁纳米颗粒表面,利用其产生催化电流高灵敏度检测凝血酶(图17.A)。Katakis等^[75]依次将巯基化凝血酶适体、凝血酶、生物素标记抗凝血酶适体和亲合素标记的辣根过氧化物酶(HRP)固定在金电极表面,构建一个经典“三明治”结构,借助钼中介体来检测标记的HRP对过氧化氢的催化氧化,可间接检测凝血酶,检测下限达80 nM(图17.B)。

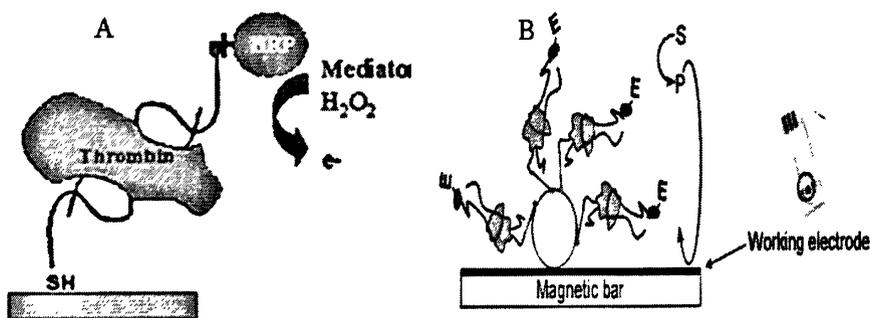


Fig.17. Schemes of enzyme-linked electrochemical aptasensors “sandwich” structure on a Au electrode surface of (A) HRP (B) Alkaline-phosphatase

3.2 核酸适体电化学生物传感器的展望

核酸适体在各类蛋白等生物分子的检测中,展现了无穷的魅力,能用抗体进行蛋白检测的技术,几乎都能用适体技术来取代。并且使人们意识到核酸不仅能作为遗传信息的存储和转运载体,而且可以作为各种功能分子。将生物分子如蛋白质、

核酸作为感受器，是当代生物传感器发展的主流。各种纳米材料，DNA 酶的产生等为核酸适体传感器的建立提供了更加灵敏，快速的，稳定的方法，不断优化和改进核酸适体在电极表面的构象变化，发展更多的标记手段，以及通量实时检测蛋白等是电化学核酸适体的发展目标。相信随着 SELEX 技术的不断完善和改进，适体商品化的种类增多，适体电化学传感器的应用范围会更加广阔。

四、DNA 酶在蛋白和 DNA 检测中的应用

随着人们对核酸的深入研究和 SELEX 技术的发展，各种 DNA 酶被逐渐筛选出来，并以其廉价、易修饰、稳定不易失活以及能大量合成等优势，逐渐取代了 RNA 酶和蛋白酶，开创了一种新的分析化学的检测的领域^[76-79]。

4.1 G-四分体 DNA 酶的结构和性质

大多数的 DNA 酶是以 DNA 序列作为基底，成本相对还是比较昂贵。Sen 小组^[80,81]于 1998 年最先提出了一种 G-四分体结构的 DNA 酶（如图 18 所示），它是以卟啉铁作为基底，一段富含 G 碱基的寡聚核苷酸序列（PS2.M）与其配位结合的配合物，这类富含 G 碱基的寡聚核苷酸也因此被称为卟啉铁的核酸适体。这种 G-四分体结构的 DNA 酶的性质类似于辣根过氧化酶，在双氧水存在下能对鲁米诺（luminol）或 2,2'-连氮-双（3-乙基苯并噻唑-6-磺酸）（ABTS）进行催化，这种催化能力较游离的 Hemin 高出两个数量级左右。

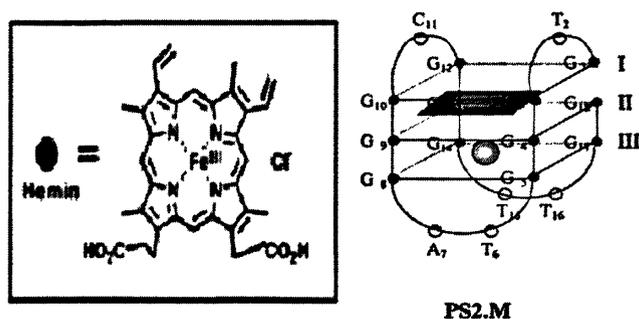


Fig.18. Proposed hemin structure and guanine-quadruplex model for the folded and catalytically active structure of the PS2.M-hemin complex (deoxyribozyme)

4.2 DNA 酶化学发光生物传感器中的应用

由于 G-四分体结构的 DNA 酶在双氧水的存在下能对 luminol 进行很强的催化, 因此通过检测发光的强度能够将该 DNA 酶应用在催化标记的发光生物传感器上。Willner 小组对此类 DNA 酶作了许多相关研究, 提出了一种新的富含 G 碱基的寡聚核苷酸序列 PW17, 并将其应用于 DNA 的检测中^[82,83]。他们^[84]通过在金电极表面固定巯基修饰的探针分子 DNA I, 同时利用金胶比表面积大等特点组装上多条富含 G 碱基的序列 PW17 探针 DNA II, 在目标的存在下, 构建三明治结构, 将 DNA II 修饰到金基底表面后利用其与卟啉铁 hemin 形成 DNA 酶, 信号扩增催化检测 Luminol 的发光从而计算目标 DNA 的量 (图 19)。

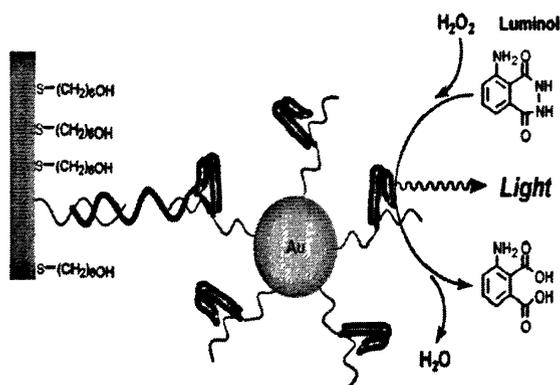


Fig.19. Amplified Chemiluminescence Detection of DNA Using DNAzyme-Functionalized AuNPs

Dong 等^[85]利用类似的方法, 通过将凝血酶的一段适体 I 修饰上巯基, 固定在金电极表面, 另一段适体 II 包含一段卟啉铁的适体富含碱基 G, 通过凝血酶的作用也有效地固定在金基底表面, 后培育卟啉铁使适体 II 能形成 DNA 酶结构, 发光检测凝血酶。Lu 等^[86]在磁纳米颗粒上构建三明治结构, 利用磁性分离降低背景, 成功利用 DNA 酶发光检测 0.1 nmol/L DNA。Li 等^[87]通过酰胺反应将 DNA 酶固定在生物膜上, 利用 DNA 酶的热稳定性良好, 催化发光检测双氧水。

4.3 DNA 酶在比色检测中的应用

比色检测法一直以其肉眼可见,操作方便等优势发展迅速,但是其灵敏度往往比较低,而基于 DNA 酶的比色手段检测不仅为比色的检测提供了一种新的手段,而且能在一定程度上提高灵敏度^[88-91]。Willner 小组^[92]设计了无需任何标记廉价的适体-DNA 酶联合的传感器用于检测小分子,将各核酸适体在设计时包含一段 DNA 酶序列,实验证明能对溶菌酶的检测限达到 10^{-13} mol/L,对 AMP 的检测能达到 6×10^{-6} mol/L,相比于其它的比色传感方法灵敏度都有很大的提高,甚至接近于 100 倍。Dong 小组^[93]也在 DNA 酶方面作了很多研究,他们发现凝血酶的核酸适体能够结合 hemin 形成 G-四分体结构,具有 DNA 酶的催化性质,并且当适体进一步结合凝血酶后,这种 DNA 酶的催化性质能得到大大地增强,以此为凝血酶的比色检测又增加了一种新的方法(如图 20)。Park 小组^[94]将比色法检测 DNA 的方法进行了进一步改进,探针 DNA I 固定在磁纳米颗粒与固定在金胶上的探针 DNA II,在分别于目标杂交后形成三明治结构,然后培育一定浓度的 hemin,在进行磁性分离后,去除溶液中多余的 hemin 降低背景,催化 ABTS 检测目标 DNA 至 50 fmol/L。

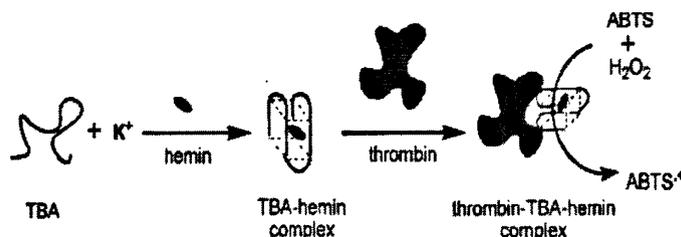


Fig.20. Colorimetric approach to sensing thrombin based on the DNzyme formation between hemin, TBA and the target protein.

4.4 DNA 酶的展望

近几年来, G-四分体 DNA 酶作为催化标记基团,以其本身是核酸的性质,在某种程度上减少了对蛋白等分子的特异性吸附,能进一步提高检测的灵敏度和特异性。同时,该 DNA 酶的核酸序列可以按照需要设计,甚至任意裁剪,无疑扩大了它的应用领域。Hemin 与富含 G 碱基的 DNA 序列具有很强的结合能力,这就免去了很多传感器需要进行标记的步骤和成本,有望用于各种传感器的设计中。

五、本论文的目的和意义

随着人类基因组计划的顺利完成以及蛋白质组学研究的启动,科学家们逐渐揭开疾病的机理,并将其应用于疾病的医疗诊断和治疗之中。蛋白质和核酸是组成生命的主要生物大分子。核糖核酸(DNA)作为生命体内的基因物质,承载着大多数生物体的遗传信息。如果它在结构上稍有变动、差错、缺失或增多,就可能会导致遗传性状的改变或各种疾病的出现。蛋白质作为生命物质基础,参与生命体的每一步反应和活动。因此对特定序列 DNA 的检测和相关蛋白的检测日益引起人类的重视,对基因筛选、遗传疾病的早期诊断和治疗具有十分深远的意义。

DNA 生物传感器的迅速发展克服了传统分析方法放射性危害等缺点,以更简单,选择性更好、灵敏度更高等特点备受国内外研究领域的广泛重视 DNA 酶尤其是 G-四分体结构的 DNA 酶和核酸适体都是经过 SELEX 技术筛选出来的与靶分子具有特异性结合的核酸分子,成为近几年生物传感技术的热点,为生命科学研究提供了更有利的手段和方法。

纳米材料享有“21 世纪最有前途的材料”的美誉,因其独特的表面效应、微尺寸效应、量子效应和宏观量子隧道效应等物化性质,其电学、磁学、光学和化学性质也会发生显著的变化,呈现出常规材料不具备的优越性能。纳米材料的介入为传感器的发展提供了无穷的想象空间,可以广泛地应用于敏感分子的固定、信号的检测和放大。纳米金颗粒一直以来以其合成方法简单,比表面积大,生物相容性好和独特的光学性质等优势,在生物体系中的应用具有良好的应用前景,尤其是利用其特殊的光学性质构建新型比色方法,在 DNA、免疫、酶、糖等各方面得到了极大的发展。

本论文的研究目的为:结合纳米金胶技术在比色传感技术上的成熟应用和分子信标技术的高特异性识别目标 DNA 的能力,发展更加灵敏方便的单核苷酸多态性的比色检测方法;利用 G-四分体 DNA 酶与核酸适体技术结合构建电化学核酸适体催化传感器,以发展高灵敏度的新型的生物传感器。本论文的研究内容主要集中在以下两方面:

1. 分子信标标记的纳米金胶比色探针对寡聚核苷酸序列单碱基多态性的识别

分子信标是近几年快速发展的利用核酸杂交技术对核酸分子进行检测的新技

术,对医学、分子生物学和环境科学等诸多领域的发展有着非常重要的意义。本文拟将纳米金胶技术和分子信标技术结合,构建一种新型的比色检测单核苷酸多态性的传感技术。本章通过纳米金胶的自组装技术,将分子信标修饰到金胶表面,制备得到金胶纳米探针,应用于单核苷酸碱基的突变识别,有望实现对 DNA 链中的单碱基突变进行快速、灵敏和准确的识别,并可对单碱基不同位点碱基突变进行区分,并且该传感技术也将为 PCR 扩增检测单核苷酸多态性的应用提供新的平台。

2.基于 G-四分体结构的 DNA 酶电化学核酸适体传感器信号扩增检测凝血酶

G-四分体结构的 DNA 酶是一种卟啉铁与其富含 G 碱基的适体配合形成的化合物,它的催化性质类似于辣根过氧化物酶 (HRP)。本研究拟将该 DNA 酶与电化学核酸适体技术结合,利用凝血酶的核酸适体富含 G 碱基与卟啉铁结合形成的结构在凝血酶的作用下形成 DNA 酶催化性质增强的特点,构建信号扩增的核酸适体电化学传感器用于凝血酶的检测。该传感器将实现对凝血酶特异性,高灵敏度的识别,并且能免去电化学标记,有助于被应用于其它蛋白等生物分子的分析识别上。

参 考 文 献

- [1] L. E. Hood, M. W. Hunkapiller, L. M. Smith. *Genomics*. 1987, 1, 201.
- [2] 程介克.《分析科学学报》.1994, 10, 65.
- [3] J. Lian, L.Y. Wang, S. Liu, et al.*Chin. J. Med. Gene*. 2004, 21 (1), 14.
- [4] Z. L. Chen, H. Y. Gu. *Science*. 1993, 262 (5132), 377.
- [5] L. Eric. *Genom e Res*. 2001, 11, 927-929.
- [6] F. S. Collins, M. S. Guyer, A. Charkravarti. *Science*. 1997, 278, 1580-1581.
- [7] P. Y. Kwok, Q. Deng, H. Zakeri, *et al.* *Genomics*. 1996, 31, 123-126.
- [8] U. Andre, A.E.P. Paul, H.E. Robert, *et al.* *Nucleic Acid. Res*. 1997, 25(20), 4139.
- [9] S. Sawata, E. Kai, K. Ikebukuro, *et al.* *Biosens. & Bioelectron*. 1999, 14(4), 397.
- [10] D. Bryan, S.J. Aylwin, D. Newman, *et al.* *J. Mol. Endocrinol.*, 1999, 22(3), 241.
- [11] T. Schwarz, D. Yeung, E. Hawkins, *et al.* *Trends Biotechnol*. 1991, 9(10), 339.
- [12] J. D. Watson, F. H. Crick. *Nature*. 1953, 171, 137.

- [13] H. Du, C. M. Strohahl, J. Camera, B. L. Miller, T. D. Krauss. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 7932-7940.
- [14] E. Palecek, *Trends Biotechnol.* 2004, 22,55-58.
- [15] J. Zhang, R. J. Lao, S. P. Song, Z. Y. Yan, C. H. Fan. *Anal. Chem.* 2008, 80(23), 9029-9033.
- [16] Niemeyer C.M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40(22):4128-4158.
- [17] Daniel M.C., Astruc D., *Chem. Rev.*, 2004, 104(1):293-346.
- [18] 金利通,鲜跃仲,化学传感器,2006,26(1):3-12
- [19] Katz E., Willner I., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43(45):6042-6108.
- [20] A. P. Xin, Q. P. Dong, C.Xiong, L. S. Ling. *Chem.Commun.* 2009, 1658-1660.
- [21] Y. C. Cao, R. C. Jin, C. S.Thaxton, C. A.Mirkin. *Talanta.* 2005, 67, 449-455.
- [22] R. Kanjanawarut , X.D. Su, *Anal. Chem.* 2009, 81(15), 6122-6129.
- [23] H. X. Li , L. J. Rothberg. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 10958-10961.
- [24] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff. *Nature.* 1996, 382, 607-609.
- [25] R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin. *Science.* 1997, 277, 1078-1081.
- [26] KaeSato,Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 8102-8103.
- [27] KaeSato,Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda, *Nucleic Acids Research.* 2005, 33(1), e4.
- [28] W. A. Zhao, W. Chiuman, Y. F. Li, *et al. J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 3610- 3618.
- [29] W. A. Zhao, W. Chiuman, M. A. Brook, Y. F. Li. *ChemBioChem.* 2007, 8, 727-731.
- [30] S. P. Song, Z. Q. Liang, J. Zhang,L. H. Wang, G. X. Li, and C. H. Fan . *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 8670-8674.
- [31] J. Li, X. Chu, G. Shen, *et al. Nucleic Acids Res.* 2005, 33 (19), e168
- [32] S. Tyagi, F. R. Kramer. *Nature Biotechnology.* 1996, 14(3), 303-308.
- [33] K. E. Templeton, *et al. Journal of Clinical Microbiology.* 2004, 42(4), 1564-1569.
- [34] R. Kota, T. A. Holton, R. J. Henry. *Plant Molecular Biology Reporter.* 1999, 17, 363-370.
- [35] Fang Wei, Bin Sun, Wei Liao, *et al. Biosensors and Bioelectronics.* 2003, 18, 1149-1155.
- [36] T. Sanjay, A. E. Salvatore, R. K. Fred. *Natu. Biotech.* 2000, 18, 1191.
- [37] M.B. Wabuye, H. Farquar, W. Stryjewski, *et al. J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 6937.
- [38] K. Fujimoto, H. Shimizu, M. Inouye. *J. Org. Chem.* 2004, 69, 3271.

- [39] Irina V. Nesterova, S. Sibel Erdem, *et al.* J. Am. Chem. Soc. 2009, 131 (7), 2432-2433.
- [40] S. Bernacchi, Y. Mely. Nucleic Acids Res. 2001, 29, e62 / 1-e62 / 8.
- [41] L. C. Brousseau. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128(35), 11346-11347.
- [42] N. R. Conley, A. K. Pomerantz, *et al.* J. Phys. Chem. B. 2007, 111 (28), 7929-7931.
- [43] C. H. Fan, K. W. Plaxco, A. J. Heeger. Proc. Natl. Acad. Sci. 2003, 100, 9134.
- [44] Y. Lu, X. C. Li, L. M. Zhang, P. Yu, L. Su, and L. Q. Mao. Anal. Chem. 2008, 80 (6).
- [45] J. K. Wu, C.H. Huang, F. Zhang, P. G. He, Y. Z. Fang. Electrochem. Commun. 2009, 11, 177-180.
- [46] G. F. Cheng, B. J. Shen, F. Zhang, J. K. Wu, Y. Xu, P. G. He, Y. Z. Fang. Biosens. Bioelectron. 2010, xxx, xxx-xxx(in the press).
- [47] J. Hernando, Martijn van der Schaaf, *et al.* J. Phys. Chem. A. 2003, 107, 43-52. 1883-1890.
- [48] S. D. Jayasena. Clin. Chem. 1999, 45 (9), 1628-1650.
- [49] D. Xu, X. Yu, Z. Liu, W. He, Z. Ma. Anal. Chem. 2005, 77(16), 5107-5113.
- [50] A. E. Radi, J. L. AceroSanchez, E. Baldrich, C. K. O'Sullivan. Anal. Chem. 2005, 77(19), 6320-6323.
- [51] K. Ikebukuro, C. Kiyohara, K. Sode. Biosensors and Bioelectronics. 20(10), 2168-2172.
- [52] M. C. Rodriguez, A. N. Kawde, J. Wang. Chem. Commun. 2005, 4267-4269.
- [53] Y. Xu, L. Yang, X. Y. Ye, P. G. He, Y. Z. Fang. Electroanalysis 18. 2006, 15, 1449-1456.
- [54] Noemi de-los-Santos-Alvarez, Mari'a Jesu sLobo-Castan ˜o ´n, Arturo J. Miranda-Ordieres, Paulino Tunon-Blanco. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 3808-3809.
- [55] A. E. Radi, J. L. AceroSanchez, E. Baldrich, C. K. O'Sullivan. Anal. Chem. 2005, 77, 6320-6323.
- [56] D. K. Xu, D. W. Xu, X. B. Yu, Z. H. Liu, W. He, Z. Q. Ma. Anal. Chem. 2005, 77, 5107-5113.
- [57] C. Y. Deng, J. H. Chen, L. H. Nie, Z. Nie, S. Z. Yao. Anal. Chem. 2009, 81 (24), 9972-9978.
- [58] B. R. Baker, R. Y. Lai, M. S. Wood, *et al.* J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 3138-3139.
- [59] Y. L. Zhang, Y. Huang, J. H. Jiang, *et al.* J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 15448-15449.
- [60] Z. S. Wu, M. M. Guo, S. B. Zhang, *et al.* Anal. Chem. 2007, 79, 2933-2939.
- [61] K. Feng, C. Sun, Y. Kang, *et al.* Electrochem. Commun. 2008, 10, 531-535.
- [62] Y. Xiao, A. A. Lubin, A. J. Heeger, K. W. Plaxco. Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 5456-5459.
- [63] Y. Lu, N. N. Zhu, P. Yu, L. Q. Mao. Analyst. 2008, 133, 1256-1260.
- [64] Y. Du, B. L. Li, F. Wang, S. J. Dong. Biosensors and Bioelectronics. 2009, 24, 1979-1983.

- [65] Y. Xiao, X. G. Qu, K. W. Plaxco, A. J. Heeger. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 11896-11897.
- [66] Y. C. Huang, B. X. Ge, D. Sen, H. Z. Yu. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130 (25), 8023-8029.
- [67] X. L. Zuo, S. P. Song, J. Zhang, D. Pan, L. H. Wang, C. H. Fan. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129 (5), 1042-1043.
- [68] Apon Numnuam, Karin Y. Chumbimuni-Torres, Yun Xiang, Ralph Bash, Panote Thavarungkul, Proespichaya Kanatharana, Erno Pretsch, Joseph Wang, Eric Bakker. *Anal. Chem.* 2008, 80, 707-712.
- [69] 郑静 (Zheng J), 林莉 (Lin L), 程圭芳 (Chen G F), 王安宝 (Wang A B), 谭雪莲 (Tan X L), 何品刚 (He P G), 方禹之 (Fang Y Z). *中国科学 B 辑. 化学 (Sci. China Ser. B: Chem.)*. 2006, 36, 485—492.
- [70] R. Polsky, R. Gill, L. Kaganovsky, I. Willner. *Anal. Chem.* 2006, 78, 2268-2271.
- [71] K. I. Papamichael, M. P. Kreuzer, G. G. Guilbault. *Sens. Actuators B.* 2007, 121, 178-186.
- [72] S. Centi, G. Messina, S. Tombelli, I. Palchetti, M. Mascini. *Biosens. Bioelectron.* 2008, 23 (11), 1602-1609.
- [73] K. Ikebukuro, C. Kiyohara, K. Sode. *Biosens. Bioelectron.* 2005, 20, 2168-2172.
- [74] S. Centi, S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini. *Anal. Chem.* 2007, 79, 1466-1473.
- [75] M. Mir, M. Vreeke, I. Katakis. *Electrochem. Commun.* 2006, 8, 505-511.
- [76] R. R. Breaker. *Chem Rev.* 1997, 97(22), 371-390.
- [77] J. W. Liu, Y. Lu. *Anal. Chem.* 2003, 75, 6666-6672
- [78] J. W. Liu, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 6642-6643
- [79] J. H. Lee, Z. D. Wang, J. W. Liu, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 14217-14226.
- [80] P. Travascio, Y. F. Li, D. Sen. *Chem. Biol.* 1998, 5(9), 505-517.
- [81] P. Travascio, P. K. Witting, A. G. Mauk, D. Sen. *J. Am. Chem. Soc.* 123(7), 1337-1348.
- [82] Y. Xiao, V. Pavlov, R. Gill, T. Bourenko, I. Willner. *Chem Bio Chem.* 2004, 5, 374.
- [83] V. Pavlov, Y. Xiao, R. Gill, A. Dishon, M. Kotler, I. Willner. *Anal. Chem.* 2004, 76, 2152-2156.
- [84] T. Niazov, V. Pavlov, et al, *Nano Lett.* 2004, 4(9), 1683-1687.
- [85] T. Li, S. J. Dong, E. K. Wang. *Chem. Commun.* 2008, 5520-5522.
- [86] Z. J. Cao, Z. X. Li, Y. J. Zhao, Y. M. Song, J. Z. Lu. *Analytica. Chimica. Acta.* 2006, 557, 152-158.
- [87] W. W. Chen, B. X. Li, C. L. Xu, L. Wang. *Biosens. Bioelectron.* 2009, 24, 2534-2540.

- [88] D. Li, A. Wieckowska, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 3927.
- [89] De-MingKong, NaWang, Xiao-XuanGuo, Han-XiShen *Analyst*, 2010, 135, 545–549.
- [90] C. Teller, S. Shimron, I. Willner. *Anal. Chem.* 2009, 81, 9114–9119.
- [91] T. Li, S. J. Dong, E. K. Wang. *Anal. Chem.*, 2009, 81(6), 2144–2149.
- [92] D. Li, B. Shlyahovsky, J. Elbaz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 5804–5805.
- [93] T. Li, S. J. Dong, E. K. Wang. *Chem. Commun.* 2008, 3654–3656.
- [94] R. Z. Fu, T. H. Li, H. G. Park. *Chem. Commun.* 2009, 5838–5840.

第二章 分子信标标记的纳米金胶比色探针对于寡聚核苷酸序列单碱基多态性的识别

摘要 分子信标(MB)是一种相比于普通直链探针更灵敏地能检测单碱基错配的茎环结构的探针,因此广泛被应用在各种基因突变的检测上。本文介绍了一种利用分子信标高灵敏、高特异性识别力和纳米金凝聚变色的光学特性,设计的新型的识别单碱基多态性的比色检测方法。利用纳米金胶的自组装技术将巯基修饰的分子信标探针固定到金胶表面制得新型纳米金胶探针(AuNPs-MB),当加入不同的目标序列(完全互补序列或单碱基错配序列)与之杂交时,使金胶表面构象改变及引起金胶体系熵焓的差异性:即在适当盐度条件下,导致金胶不同程度的聚集,从而实现单碱基错配几率和不同位点的识别。最后,将该比色传感体系应用在对P53基因的检测上,同样能够有效区分野生型和突变型P53基因,实现对单碱基多态性的识别。实验结果显示,利用该金胶比色方法,操作简单,成本低廉,对单碱基错配在混合目标体系中的分辨率能达到至少5%。

关键词: 纳米金胶 比色 单碱基多态性 分辨率

一 引言

人类许多遗传疾病的产生与基因片段的变异有着密切的关联,其中单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)是频率最高、信息含量最多的一种变异,占所有多态性的90%以上^[1-3]。传统的单核苷酸多态性的检测主要有基于等位基因特异性杂交^[4]、引物延伸^[5]、寡聚核苷酸特异性连接^[6]以及内切酶酶切的荧光分析技术^[7]等。这些方法大多基于内切酶、连接酶等活性酶技术,并且对产物需要进行分离,需要昂贵的试剂与仪器,操作时间长,并且对相关技术人员的专业素质要求高,难以在偏远地区进行推广应用。近几年来,各种纳米技术的发展成为灵敏、廉价和方便地检测SNPs关注的热点^[8,9]。纳米金胶(AuNPs)更是以其良好的生物相容性、特殊的光学性质,促进了比色传感技术的迅速发展^[10-16],为基因检测提供了新的平台。

Mirkin 研究小组^[14, 15]最早利用纳米金胶进行比色法检测特定DNA序列,为

DNA 序列的检测研究和应用开辟了一个新领域。他们通过“Au-S”键将两种不同的 DNA 探针分子组装到金胶表面,金胶分散良好表现为红色。当靶基因分别与探针杂交互补后形成交联网状结构,金胶的光学性质也因此而发生改变,溶液由红色变为紫色或蓝色,紫外吸收峰也发生相应的红移。由于突变靶基因的熔链温度 T_m 值下降,与完全互补的靶基因区别非常明显,以此达到区分和检测靶基因的目的。随着金胶性质研究的深入^[17-20],Maeda 小组^[21,22]发现了非交联金胶比色法快速识别端点基因突变的规律,当金胶表面的直链 DNA 探针分子与完全互补序列和突变序列的目标分别杂交后,引起金胶的不同的聚集和沉降。而这种仅具端点突变的识别力,限制了它在复杂的实际样品和 PCR 扩增上的应用。

分子信标(MB)是一种具有茎环结构的寡聚核苷酸探针,相对于普通的单链寡聚核苷酸探针具有更好的选择性和杂交特异性,可以高灵敏地进行单碱基错配的识别,尤其被广泛应用在临床诊断、基因检测等领域^[24]。因此,基于直链寡聚核苷酸链修饰的金胶探针的局限性和金胶表面的 DNA 的构象改变即由单链变为发卡型结构,会大大提高该金胶纳米探针抵抗外来盐诱导聚集的能力^[23]。我们设想将分子信标(MB)修饰到金胶表面,制备一种新型的纳米金胶探针(AuNPs-MB),用于基因碱基突变的比色识别。实验设计原理如下图所示。分子信标通过金硫键组装到平均粒径约为 13nm 的金胶表面,经过巯基乙醇占位除去非特异性吸附的 DNA,为信标形成发卡结构提供足够的空间,以此保护金胶溶液在 $MgCl_2$ 浓度下的稳定性。相同盐度下,AuNPs-MB 通过与不同 DNA 序列的杂交改变表面构象和电荷量,引起金胶的不同程度的聚集、沉降和溶液颜色改变,有望缩短检测时间^[21],以达到快速区分和识别单碱基多态性的目的。同时,由于利用了分子信标的特异杂交的性质,本文提出的方法不仅能对不同位点的碱基突变进行区分,并有望实现非端点碱基突变的识别。

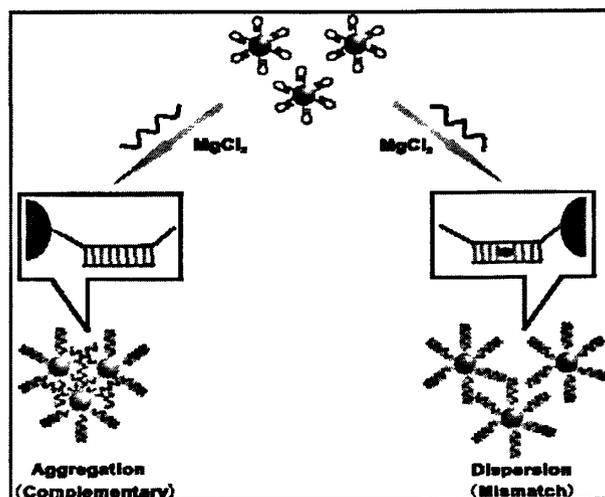


Fig.1. Schematic representation of the principle of the SNPs detection based on AuNPs-MB probes.

二 实验部分

2.1 试剂与仪器

2.1.1 仪器

Cary 50 型紫外-可见分光光度计(Varian, 美国); PHS-3C pH 计(上海精科仪器有限公司); HZQ-C 型空气浴振荡器(哈尔滨东联电子科技有限公司, 中国黑龙江); Eos450Dx 型数码相机(Canon, 日本); H1650-W 型高速离心机(湖南湘仪科学仪器厂); FL-7000 型荧光分光光度计(HITACHI, 日本东京); JEM-100CX 透射电子显微镜(JEOL, 日本)

2.1.2 试剂

六水合氯化镁和无水柠檬酸三钠(99.9%) (上海国药集团化学试剂有限公司); 三水合氯金酸(99.99%), 巯基己醇, 巯基乙醇(上海 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA 有限公司); 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl) (中国医药集团化学试剂有限公司); 所用试剂均为分析纯, 实验室用水为二次蒸馏水。

人工合成的寡聚核苷酸序列(HPLC 纯化, 上海生工生物工程技术公司)(序列见

表 1):

Table 1: Molecular beacon-functionalized gold nanoparticles probes and their target sequences

名称	序列	备注
P1	5'-HS-(CH ₂) ₆ T ₁₀ - <u>GCGAGTTTTTTT/TTTTTTTCTCGC</u> -3'	人工设计合成的突变型探针 1
S	5'-GAAAAAAAACAAAAAA-3'	探针 1 的碱基错配序列 (定义为: 野生型目标)
S1	5'-GAAAAAAAAAIAAAAAA-3'	突变探针 1 的环部顶端 A 完全错配序列 (定义为: 突变型目标 1)
S2	5'-GAAAAAAAAAGAAAAAA-3'	突变探针 1 的环部顶端 T 碱基错配序列 (突变型目标 2)
S3	5'-GAAAAAAAAATAAAAAA-3'	突变探针 1 的环部顶端 T 碱基错配序列 (突变型目标 3)
S4	5'-GAACAAAACAAAAAA-3'	突变探针 1 的环部任意位点碱基错配序列 (突变型目标 4)
P2	5'-HS-(CH ₂) ₆ T ₁₀ - <u>CGCTCCCTGGTGGCGTAGATGAGCG</u> -3'	P53 基因突变型探针 2
T1	5'-ATCTACGGCACCAGG-3'	野生型 P53 基因
T2	5'-ATCTACGCCACCAGG-3'	突变型 P53 基因
P3	5'-HS-(CH ₂) ₆ T ₁₀ - <u>GCGAGTTTTTTT/TTTTTTTCTCGC</u> -FAM-3'	荧光探针 3(与突变型探针 1 序列相同)

P4	5'-HS-(CH ₂) ₆ T ₁₀ GACGGTTTTTTTTTTTTTTCTCGC-3'	直链探针 4 (与探针 1 碱基数量含量一致)
----	---	-------------------------

^a下划线部分是茎部互补序列；^bT₁₀ 代表 10 个 T 碱基提供一定的组装空间；^c斜体的碱基代表错配碱基。

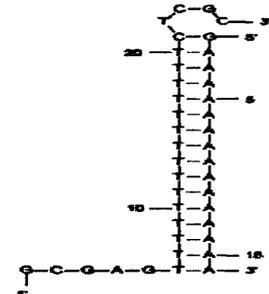
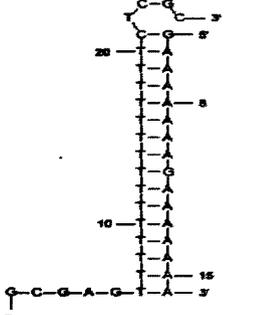
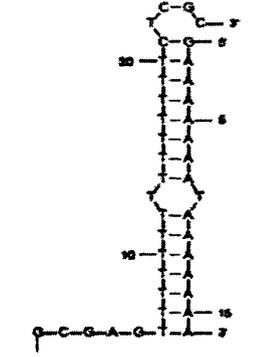
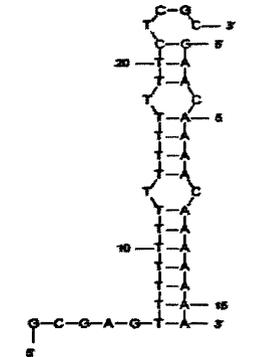
2.1.3 DNA 结构的预测

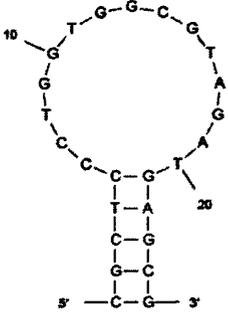
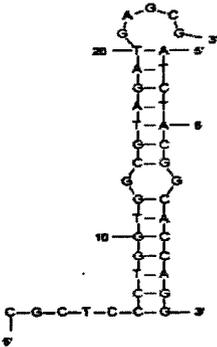
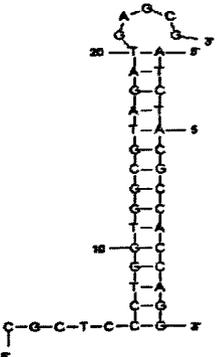
各寡核苷酸序列的结构分别通过权威网站预测得到，网址为：

<http://dinamelt.bioinfo.rpi.edu>

Table 2: The structures of molecular beacon-functionalized gold nanoparticles probes and after hybridization with target sequences

名称	预测结构
(1) ss(P1): $T_m = 55.2^\circ\text{C}$ $\Delta S = -144.4$ $\Delta G = -2.6$ $\Delta H = -47.4$	
(2) ds (P1-S): $T_m = 33.1^\circ\text{C}$ $\Delta S = -314.3$ $\Delta G = -6.6$ $\Delta H = -104.1$	

<p>(3) ds (P1-S1):</p> <p>$T_m = 41.7^\circ\text{C}$</p> <p>$\Delta S = -360.6$</p> <p>$\Delta G = -9.7$</p> <p>$\Delta H = -121.6$</p>	
<p>(4) ds (P1-S2):</p> <p>$T_m = 33.4^\circ\text{C}$</p> <p>$\Delta S = -320.5$</p> <p>$\Delta G = -6.7$</p> <p>$\Delta H = -106.1$</p>	
<p>(5) ds (P1-S3):</p> <p>$T_m = 33.3^\circ\text{C}$</p> <p>$\Delta S = -327.8$</p> <p>$\Delta G = -6.6$</p> <p>$\Delta H = -108.3$</p>	
<p>(6) ds (P1-S4):</p> <p>$T_m = 20.3^\circ\text{C}$</p> <p>$\Delta S = -178.8$</p> <p>$\Delta G = -4.5$</p> <p>$\Delta H = -60.0$</p>	

<p>(7) ss (P2):</p> <p>$T_m = 55.4^\circ\text{C}$</p> <p>$\Delta S = -130.3$</p> <p>$\Delta G = -2.4$</p> <p>$\Delta H = -42.8$</p>	
<p>(8) ds (P2-T1):</p> <p>$T_m = 55.8^\circ\text{C}$</p> <p>$\Delta S = -323.7$</p> <p>$\Delta G = -14.5$</p> <p>$\Delta H = -114.9$</p>	
<p>(9) ds (P2-T2):</p> <p>$T_m = 59.6^\circ\text{C}$</p> <p>$\Delta S = -335.0$</p> <p>$\Delta G = -16.1$</p> <p>$\Delta H = -120.0$</p>	

2.2 实验方法

2.2.1 纳米金胶的制备

纳米金胶的制备参照文献采用柠檬酸三钠热还原 HAuCl_4 的方法^[25]。所有的玻璃器皿均用王水浸泡过夜,再用 12mol/L 的氢氧化钠水溶液浸泡 2h, 洗涤干净备用。将 98ml 三次蒸馏水和 2 ml 50mM 氯金酸溶液混合, 快速搅拌下加热至亚沸状态(即产生回流时), 迅速加入 10 ml 38.8mM 的柠檬酸三钠溶液, 混合物加热至沸腾后, 继续搅拌 20min(此间溶液由淡黄色转为无色, 然后变灰黑色, 最后成酒红色), 除去热源后继续搅拌至室温下慢慢冷却。将冷却后的金胶溶液置于干净的棕色玻璃瓶中于 4℃ 冰箱中避光保存备用, 数月有效。

取一定量的制备好的金胶溶液加水稀释至 1 ml, 测定该金胶溶液的最大吸收波长 λ_{max} 为 520 nm 和在该波长下的吸光度值, 根据 $\epsilon_{\text{Au}}^{520} = 2.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ^[26], 可知所制备的纳米金胶平均粒径为 13 nm, 其液浓度为 10.8 nM。

2.2.2 AuNPs-MB 探针的制备

AuNPs-MB 探针的制备参照文献^[23,26], 首先将 1 OD 探针 DNA (~3.5nmol) 溶解在 350 μL 的三次蒸馏水中, 振荡 15min, 使其充分溶解后, 转移入 1200 μL 10.8 nM 的金胶溶液中, 混合均匀后置于摇床中培育 12h。然后在上述的溶液中依次加入 17.5 μL 1 M Tris-HCl 缓冲液(pH=7.5)和 157.5 μL 1M NaCl 水溶液, 继续振荡培育 12h。之后又加入 9 μL 1 M Tris-HCl 缓冲液(pH=7.5)和 90 μL 5M NaCl 水溶液, 待最后培育 18h 取出, 置于冰箱中 4℃ 避光保存 18h。

将组装后的金胶探针溶液, 在 13000 rpm/min 离心 30 min, 弃去上清液后, 用三蒸水洗涤, 离心 30 min 分离, 弃去上清洗液, 如此重复 3 次, 其目的是将游离的 DNA 去除。将洗涤后的金胶探针分散在 600 μL 20 mM Tris-HCl (pH = 7.5, 100 mM NaCl) 溶液中, 加入 2.5 μL 1mM 的巯基乙醇(最终浓度为 4 μM)溶液(10mM Tris-HCl, pH=7.5) 混匀, 避光占位 30 min。然后加入 600 μL 乙酸乙酯摇匀静置, 萃取多余的巯基乙醇, 弃去乙酸乙酯相。重复三次。再次离心分离, 去除上清液, 加三蒸水洗涤分离一次后, 加入 600 μL 20 mM Tris-HCl(pH = 7.5, 100 mM NaCl), 混合避光于 4℃ 冰箱中保存。

2.2.3 金胶表面探针密度的估算

金胶表面分子信标覆盖量的计算参照文献^[27], 将与突变型探针 P1 序列相同的相同荧光探针 P3 按照实验方法 2.2.2 进行组装和巯基乙醇处理后, 加入 1 M 巯基乙醇水溶液使金胶溶液的巯基乙醇浓度为 12 mM, 进行振荡培育 18 h (文献验证的最

佳培育时间), 保证金胶上修饰的荧光探针都能被完全取代。离心取上清液, 用 Tris-HCl 缓冲液稀释进行荧光检测。配制一系列一定浓度的荧光探针的溶液(所需溶液应与上述荧光检测的溶液的 pH 和离子强度一致, 以保证荧光基团 FAM 的环境的一致性), 分别测得各溶液的荧光发射图谱, 将最大发射波长 $E_m=518 \text{ nm}$ 与浓度作图, 得到标准曲线, 从而计算金胶表面的探针密度。

2.2.4 光度检测

分别取 225 μL AuNPs-MB 溶液(最后浓度 $1.3 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$), 分别加入 456 μL 20 mM Tris-HCl (pH = 7.5, 100 mM NaCl, 4 mM MgCl_2) 的缓冲溶液, 19 μL 10 mM 的不同目标 DNA(最后浓度 $2.7 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$) 与不同体积的 1M MgCl_2 溶液混匀, 测定 0—30 分钟时间段内该溶液在 400—800 nm 的吸收光谱。分别记录各样品在 520 nm 和 600 nm 处的吸收峰值, 以 $I = A_{600}/A_{520}$ 来衡量金胶纳米颗粒的聚集程度(其中, I_0 和 I_x 分别代表单独 AuNPs-MB 溶液和与目标杂交的 AuNPs-MB 溶液), 将 I 对时间 t 作图, 可以得到金胶颗粒聚集程度随时间变化的动力学曲线。

三 结果与讨论

3.1 金胶表面探针密度的估算

金胶表面探针密度的估算不仅方便计算探针的浓度, 而且能够反映金胶表面探针分子的构象^[23,28]。实验中, 我们设计了两端分别修饰荧光基团 FAM 和巯基的寡聚核苷酸探针序列(P3: FAM-DNA-SH), 按照 2.2.3 的实验条件最后离心得到含有荧光探针的上清液, 稀释至一定浓度检测荧光强度, 结果如图 2A 虚线所示。标准溶液的配制采用浓度范围为 $1 \times 10^{-7} \text{ mol/L} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 的含一定量巯基乙醇的荧光 FAM-DNA-SH 的 Tris-HCl 缓冲液中, 荧光强度如图 2A 曲线 a→f 所示。以荧光强度对 P3 溶液的浓度作图, 如图 2B, 得到线性良好的浓度与荧光强度的标准曲线。根据标准曲线估算, 每个金胶表面荧光探针的覆盖量为 47 ± 5 条, 这与纳米探针(NanoMB)修饰的金胶的覆盖量 44 ± 5 条接近^[28], 约为直链探针修饰量(96 条)的二分之一左右^[23]。我们认为这是由分子信标的茎环结构存在位阻引起的, 使金胶表面的覆盖量相对于直链探针要少很多, 说明所得金胶表面的探针呈现预期的茎环结构, 如表 2(1)。

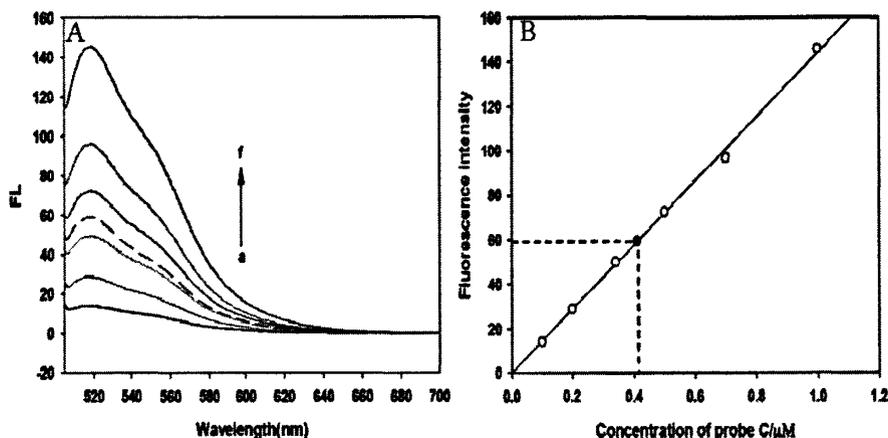


Fig.2. A: Fluorescence emission spectra of different concentrations of FAM-DNA (a to f: 1×10^{-7} mol/L \sim 1×10^{-6} mol/L) and AuNPs- MB-FAM (red dash line)
B: Calibration plot derived from the fluorescence spectra at $E_m=518$ nm

3.2 AuNPs-MB1 检测体系中 $MgCl_2$ 浓度的影响

我们详细考察了突变型探针 P1 (AuNPs-MB1) 对野生型目标 S 和突变型目标在 $MgCl_2$ 浓度分别为 2.6 mM (图 3A)、40 mM (图 3B), 60 mM (图 3C) 和 90 mM (图 3D) 作用下的识别能力。发现随着 $MgCl_2$ 的浓度增加, AuNPs-MB1 溶液的 I_0 值几乎保持不变, 这表明表面修饰的 MB1 的茎-环结构的位阻和 DNA 骨架的静电排斥使金胶纳米颗粒稳定分散在溶液中。当 S 和 S1 目标分别与 AuNPs-MB1 进行杂交后, 金胶溶液出现不同程度的聚集、沉降, 其中与突变型目标 (S1) 杂交后的金胶溶液沉降较野生型目标 (S) 的明显, I 值随时间的变化更加显著, 在 40 mM $MgCl_2$ 存在时能够达到最大区分。所以本实验选择 40 mM $MgCl_2$ 作为最佳区分盐度。

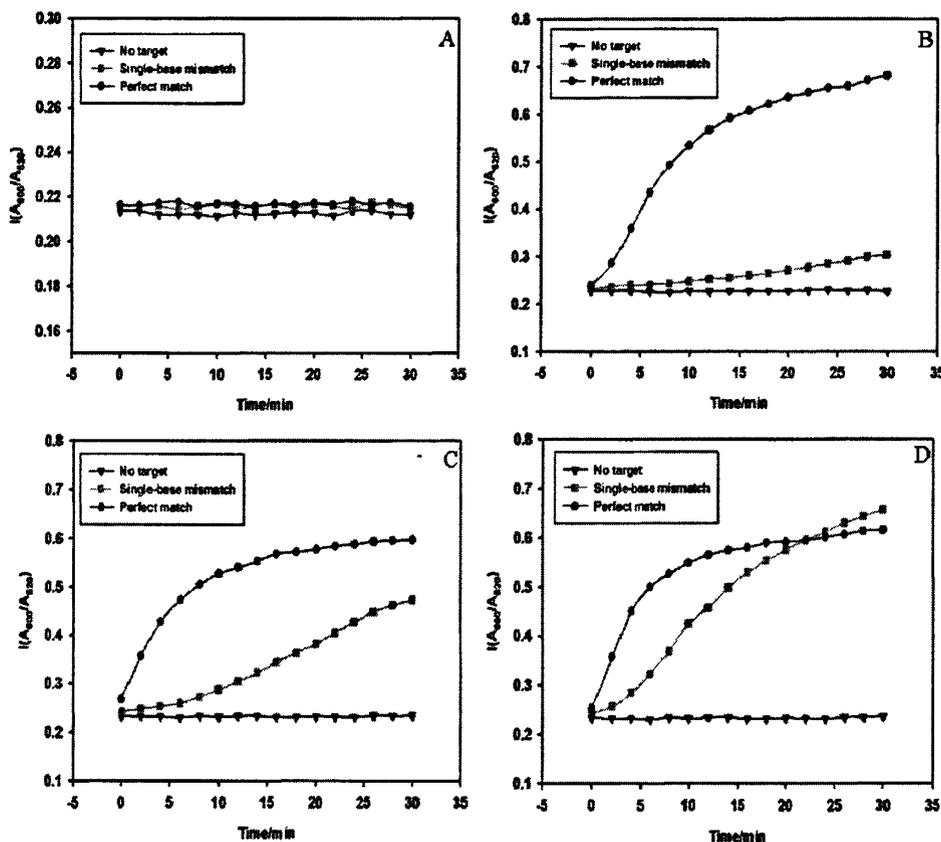


Fig.3. Effects of target DNAs and concentrations of $MgCl_2$ on the stabilization of AuNPs-MB colloids. The samples in (A):2.6mM $MgCl_2$; (B)40mM $MgCl_2$; (C)60 mM $MgCl_2$; (D)90 mM $MgCl_2$

纳米金胶的非交联聚集是一个涉及多种因素的复杂过程^[23]。迄今为止，金胶纳米颗粒之间的范德华力和由于 DNA 分子修饰所产生的双电层结构，会在一定的介质溶液中互相影响从而引起金胶团聚和分散。在金胶表面的探针密度和电荷量固定的条件下，我们推测：由于金胶表面分子信标的茎环结构的空位阻效应，克制了微粒之间的范德华力，并减弱了 Mg^{2+} 对双电层的影响，保持 AuNPs-MB 溶液的稳定分散，使其在实验的盐度范围内基本不受影响。而当不同目标与探针分子杂交后，金胶表面形成刚性的 DNA 双螺旋结构，这种构象改变降低金胶颗粒之间的排斥力，

即静电排斥和空间位阻排斥,从而导致金胶纳米颗粒的聚集和沉降,可能结构如表 2(1, 3) 所示。同时,比较不同的目标杂交前后两者的熵变,可以看到,突变型目标 S1 与 AuNPs-MB1 杂交后熵值变化 ΔS 减小 216.2, 这比野生型目标 S 引起的熵改变明显,因而金胶体系更不稳定,金胶溶液更易聚集^[22],因此序列 S 的 I 随着时间和盐度的变化没有序列 S1 明显。

3.3 AuNPs-MB1 的选择性

3.3.1 与直链探针 (AuNPs-L) 的选择性比较

我们通过设计与分子信标 (MB1) 碱基数量和含量一致的直链探针 (L) 进行比较,考察了 MB 的高特异性识别单碱基错配和完全互补序列的能力。实验结果如表 3 所示,在最佳 40 mM MgCl₂ 盐度下, AuNPs-L 对完全互补与单碱基错配目标的金胶聚集信号指标 ($I_S - I_0$) 和 ($I_{S1} - I_0$) 仅为 0.0073 和 0.0739,基本不能实现对单碱基错配序列与完全互补序列的识别。相对 AuNPs-MB1 而言,其 ($I_S - I_0$) 和 ($I_{S1} - I_0$) 分别为 0.076 和 0.4548,完全可以实现单碱基错配序列与完全互补序列的识别。这充分说明了具有茎环构象的分子信标探针比普通的直链探针具有更高的特异性。

Table 3: The value I (A600/A520) of molecular beacon and linear lignonucleotides functionalized gold nanoparticles probes and after hybridization with target sequences

	AuNPs-MB1			AuNPs-L		
	Free of AuNPs-MB1	hybridization with S	hybridization with S1	Free of AuNPs-L	hybridization with S	hybridization with S1
I	0.2260	0.3020	0.6808	0.2583	0.2656	0.3322

3.3.2 AuNPs-MB1 SNPs 不同种类碱基变异的选择性考察

在最佳的 40 mM MgCl₂ 下,我们分别对 AuNPs-MB1 和加入 S、S1 目标 (S1 是 S 序列的碱基 C ↔ A 突变) 的金胶溶液作了紫外和 TEM 等表征,结果如图 4 所

示。不加任何目标的 AuNPs-MB1 溶液分散性最良好, 金胶溶液呈现红色(图 4A-1), 在 520 nm 处出现 13 nm 直径的金胶的特征吸收峰(图 4B 红色虚线)。而当加入目标 S1 后, 金胶溶液在 600 nm 处的吸收值明显升高, 520 nm 的吸收值降低, 吸收峰红移至 535 nm, 表现为明显的团聚(图 4C)和沉降(图 4A-2)。根据图 3B, 30 min 作为最大的区分时间, 我们计算得到突变型的 I_{S1-I_0} 信号是野生型 I_{S-I_0} 的 6.3 倍左右, 表明分子信标修饰的金胶探针具有良好的基因突变识别能力。

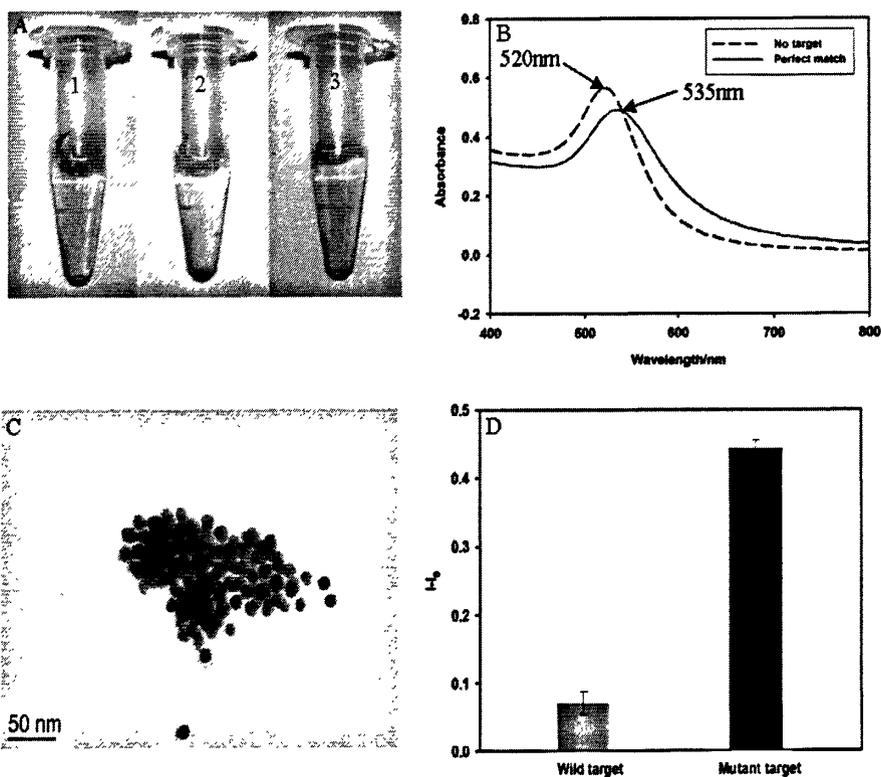


Fig.4. (A) Photographs of AuNPs probes (1), mutant target (2), wild target (3) after the addition of 40mM MgCl₂. (B) Visible spectra of AuNPs probes solutions before (dash line) and after the addition of mutant target with 40mM MgCl₂. (C) TEM image of aggregates of AuNPs-LMB with mutant target. Photographs, spectra, and TEM were taken at 30min after the addition of 40mM MgCl₂. (D) SNPs detection capability of AuNPs-MB1

同时我们研究了 40 mM MgCl₂ 盐度下, SNPs 的碱基 C↔G (S2), C↔T (S3)

间的变异。当 AuNPs-MB1 分别与突变型目标 S1、S2 和 S3 杂交后，引起的金胶的团聚也有明显差别，分别取 30 min 时的 I 值，得到结果如表 4 所示。可以看到，对于 S1 的区别信号 ($I_{S1}-I_0$) 是 S2 的区别信号 ($I_{S2}-I_0$) 的 4.9 倍，是 S3 信号 ($I_{S3}-I_0$) 的 4.2 倍。这可能是由于 G 碱基和 T 碱基突变与引起的 AuNPs-MB1 杂交后引起的金胶体系的熵变值没有 A 碱基明显，因而使金胶的聚集行为存在差异，从而能达到区分不同碱基突变识别的目的。说明该方法能够满足现代单核苷酸多态性多态性检测的需求。

Table 4: The value I (A_{600}/A_{520}) and entropic effect of molecular beacon-functionalized gold nanoparticles probes and after hybridization with target sequences

	Free of AuNPs-MB1	Mutation site (18 th base)			Mutation site (13 th base)
		hybridization with S1 (C ↔ A)	hybridization with S2 (C ↔ G)	hybridization with S3 (C ↔ T)	hybridization with S4 (A ↔ C)
		ΔS	-144.4	-360.6	-320.5
I (A_{600}/A_{520})	0.2260	0.6808	0.3180	0.3348	0.2632

I 为三次实验平均值， ΔS 是通过权威网站（同表 2）预测得到。

3.3.3 SNPs 不同位点碱基变异的选择性识别考察

基于分子信标较普通的直链寡聚核苷酸探针具有更高的特异性和灵敏度，我们检验了在 40 mM MgCl₂ 盐度下碱基在不同位点发生错配时对金胶的稳定性的影响。探针与目标杂交后的构象如表 2(3, 6)，实验结果如表 4 所示。通过比较突变型目标 S1 和 S4 引起的金胶在 30 min 时的 I 值，可以看到随着的突变位点的不同，I 值随时间变化的规律不同，突变位点越靠近金胶表面，I 值越小金胶体系就越稳定。主要可能是由于金胶表面的 DNA 的构象不同，导致位阻不同引起的。我们设计的分子信标对不同目标碱基的错配具有良好的识别和区分能力。

3.4 AuNPs-MB1 的 SNPs 定量检测

等位基因频率 (allele frequency) 的定量测定对于研究 SNPs 与疾病的相关关系具有重要的意义。我们通过考察等位基因频率 (allele frequency) 与 I 值之间的关系来定量测定等位基因频率。突变型目标 S1 和野生型目标 S 按照不同比例 (0, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1) 混合以组成测定等位基因频率的系列样品, 混合目标的总浓度保持 270nM 不变。将上述配制的样品溶液分别与 AuNPs-MB1 进行杂交, 调节盐度为 40mM MgCl₂, 用紫外可见分光光度计跟踪检测。聚集动力学如图 5 所示, 随着突变型目标含量增加, 金胶纳米颗粒的聚集也随之增大, 可以看到, AuNPs-MB1 能够检测出 5% 的等位基因频率, 即在浓度是突变型目标 19 倍的野生型目标存在下, AuNPs-MB1 依然能检测出突变型目标。表明 AuNPs-MB1 能够实现良好的 SNPs 定量检测, 在一定程度上能够满足复杂实际样品的分析。

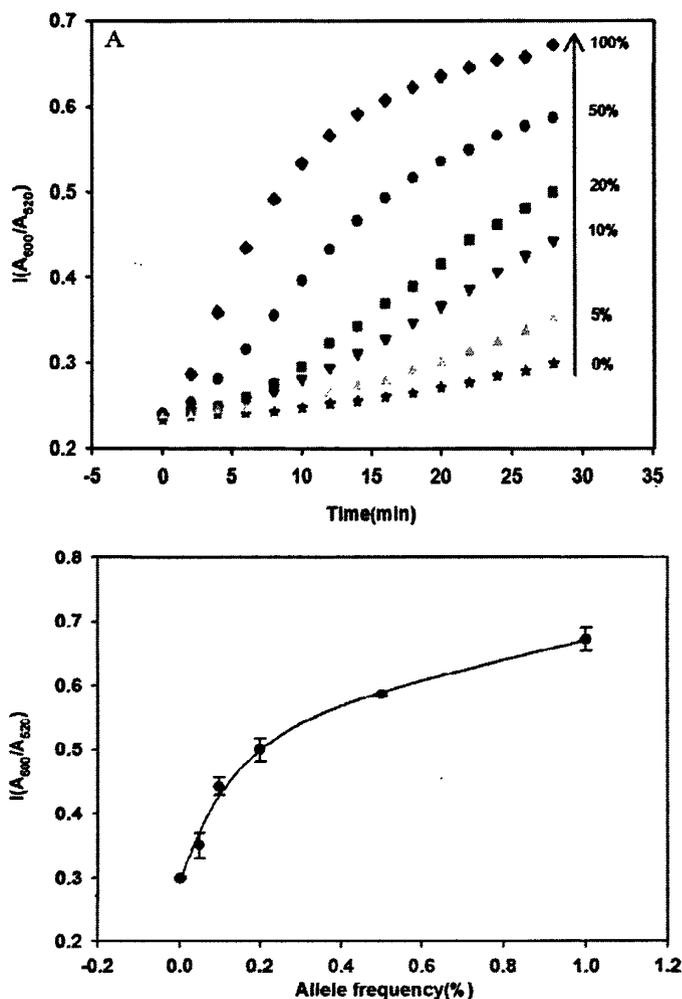


Fig.5. (A) Kinetics of aggregation of the mixture of mutant target and wild target at different allele frequencies after the addition of 40mM $MgCl_2$. (B) Plot of A_{600}/A_{520} as a function of allele frequencies. The total concentration of mutant target and wild target is 270 nM.

3.5 对 P53 基因的 SNPs 的识别

为检验该比色方法的普适性, 我们根据文献^[28]设计了一段 P53 基因序列的突变型探针 P2 及相应的野生型基因 T1 和突变型基因(T2), 并对它们的结构进行预测, 见表 2 (6, 7, 8), 制得相应的金胶探针为 AuNPs-MB2。盐度优化结果表明, 该 AuNPs-MB2 在 2.6 mM $MgCl_2$ 的盐度下就能最大程度的区分 T1 和 T2; 而且其识别

T2 的信号 ($I_2 - I_0$) 是 T1 ($I_1 - I_0$) 的 9.5 倍 (图 6)。与 AuNPs-MB1 相比, 该探针所需盐度比较低, 这可能与 DNA 序列中不同的碱基与金胶表现不同的亲和力^[29,30], 导致了金胶表面探针的构象和熵变差异。T 碱基在碱基中与金胶的亲和力最强, 因此较利于金胶的稳定性, 而基因 P53 序列中 G 碱基含量多于 T 碱基, 相应的耐盐度能力比 AuNPs-MB1 要低, 在较低盐度的 $MgCl_2$ 的缓冲溶液中就能达到区分, 这进一步证明了本比色方法具有通用性, 仅需通过适当的盐度控制就可以实现不同序列基因片段中的 SNPs 识别。

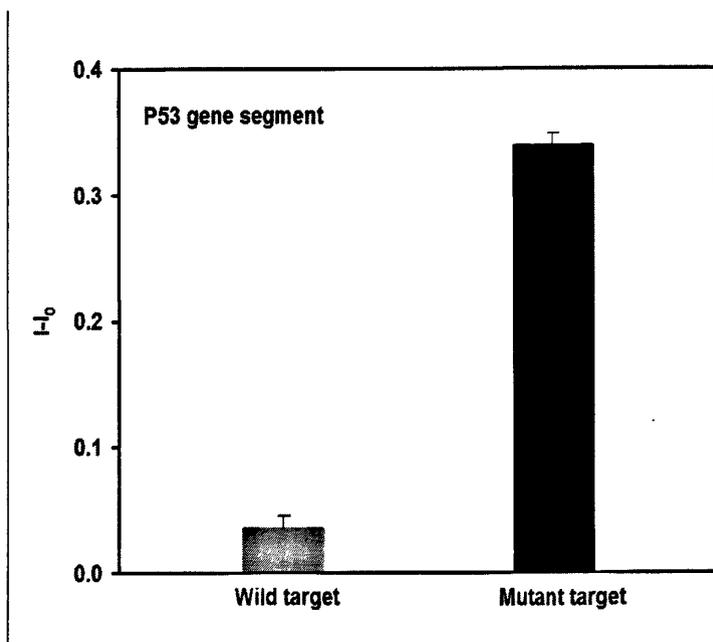


Fig.6. SNPs detection of P53 gene segment.

四 结论

本文报道了一种基于分子信标和纳米金胶比色的快速的灵敏的 SNPs 的检测方法。实验结果表明, 将荧光分子信标移植到比色检测中同样能够发挥其高特异性和高灵敏度的优势, 与纳米金胶技术的结合更是发挥了如下优势: 1) 与荧光检测相比, 实验方法无荧光背景干扰, 无需昂贵的检测设备; 2) 纳米金胶技术无论是合成还是组装等技术都很成熟, 无需专业人员就能进行分析应用; 3) 本方法在室温下仅用肉眼即可识别, 简单快速; 避免了繁杂的操作, 简化了实验步骤。因此, 该比色传感

技术为医学诊断和基因识别提供了一种新的方法,有望结合 PCR 实时技术实现高灵敏的单核苷酸多态性的识别。

参考文献

- [1] L. Eric, *Genom e Res.* 2001, 11, 927-929.
- [2] F. S. Collins, M. S. Guyer, A. Charkravarti. *Science.* 1997, 278, 1580-1581.
- [3] P. Y. Kwok, Q. Deng, H. Zakeri, *et al.* *Genomics.* 1996, 31, 123-126.
- [4] E. Pennisi, *Science.* 1998, 280 :1692-1693.
- [5] B. Hoogendoorn, M. J. Owen, P. J. Oefner, N. Williams, J. Austin, M. C. O'Donvan, *Hum. Genet.* 1999, 104, 89.
- [6] M. B. Wabuyele, H. Farquar, W. Styjowski, *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125(23):6937-6945
- [7] 张阵阵, 薛磊, 赵敏等, *海军医学杂志.* 2007, 28(2):136-138.
- [8] G. D. Liu, Y. H. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 10394-10401.
- [9] X. J. Xue, W. Xu, F. Wang, X. G. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 11668-11669.
- [10] H. X. Li, L. Rothberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004, 101, 14036-14039.
- [11] S. J. Chen, Y. F. Huang, C. C. Huang, K. H. Lee, Z. H. Lin, H. T. Chang, *Biosens. Bioelectron.* 2008, 23, 1749-1753.
- [12] R. Kanjanawarut, X. D. Su, *Anal. Chem.* 2009, 81(15), 6122-6129.
- [13] J. Zhang, L. H. Wang, D. Pan, S. P. Song, C. H. Fan, *et al.* *small.* 2008, 4(8): 1196-1200.
- [14] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature.* 1996, 382, 607.
- [15] R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, *Science,* 1997, 277, 1078.
- [16] S. Link, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B.* 1999, 103, 8410.
- [17] C. W. Liu, Y. T. Hsieh, C. C. Huang, Z. H. Lin, H. T. Chang, *Chem. Commun.* 2008, 2242-2244.
- [18] L. H. Wang, Juan Zhang, X. Wang, Q. Huang, D. Pan, S. P. Song, C. H. Fan, *Gold Bulletin.* 2008, 41(1):37-41.
- [19] K. Cho, Y. Lee, C. H. Lee, K. Lee, S. W. Joo, *et al.* *J. Phys. Chem. C.* 2008, 112, 8629-8633.
- [20] 莫志宏, 郭昆鹏, 杨小超, *分析化学(FEN XI HUA XUE)研究简报.* 2008, 36, 518~520.
- [21] KaeSato, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 8102-8103.
- [22] KaeSato, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda, *Nucleic Acids Research.* 2005, 33(1), e4.

- [23] W. A. Zhao, W. Chiunan, M. A. Brook, Y. F. Li, *et al*, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130(11), 3610-3618.
- [24] D. M. Kong, L. Gu, H. X. Shen, H. F. Mi, *Chem. Commun.* 2002, 854-855.
- [25] Junwen Liu, Yi Lu *Nature Protocols*, 2006, 1(1):246-252.
- [26] Jin, R.; Wu, G.; Li, Z.; Mirkin, C. A.; Schatz, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 1643-1654.
- [27] L.M. Demers, C.A. Mirkin, R. Mucic, R.A. Reynolds, *et al*, *Anal. Chem.* 72, 5535-5541.
- [28] S. P. Song, Z. Q. Liang, J. Zhang, G. X. Li, C. H. Fai, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 8670-8674.
- [29] R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, *Science*, 1997, 277, 1078.
- [30] J. J. Storhoff, R. Elghanian, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *Langmuir*, 2002, 18, 6666.

第三章 基于 G-四分体结构的 DNA 酶电化学核酸适体传感器信号扩增检测凝血酶

摘要 本文介绍了一种结合 G-四分体结构的 DNA 酶和电化学核酸适体技术,以凝血酶蛋白(Thrombin)为研究对象的高灵敏信号扩增的电催化适体传感器。该传感器利用了一种催化性质类似于辣根过氧化酶(HRP)的 DNA 酶,它是卟啉铁与富含 G-碱基的凝血酶的核酸适体(TBA)组成的 G-四分体结构型的活性酶。在金电极表面,成功构建这样的酶结构后,证实凝血酶蛋白的存在下,这种 DNA 酶的催化活性能大大增强,因而可以作为凝血酶检测的依据。该凝血酶的核酸适体对凝血酶具有很高的特异性识别能力,其检测不受其他蛋白如牛血清白蛋白等的影响,可应用于实际样品的检测。同时由于利用电催化的高灵敏度,该传感器对凝血酶的检测限能达到 $6 \times 10^{-11} \text{M}$, 可望为凝血酶蛋白及其它生物分子的检测提供一种多样化的手段。

关键词: DNA 酶 核酸适体 凝血酶 G-四分体 电化学

一、引言

1990年,美国的 Gold^[1]和 Szostak^[2]研究小组分别构建了一类通过指数富集配基系统进化技术(SELEX)技术,这种以组合化学为基础的新技术开始为人们所熟知。通过该技术得到的 DNA 酶,取代了 RNA 酶在催化 RNA 的裂解和 DNA 的连接反应上^[3, 4],这无疑为分析化学检测手段的改革注入了新的活力。与 RNA 酶和蛋白酶相比, DNA 酶的稳定、廉价、能批量合成和易修饰等特点使其在生物传感器中得到了广泛的应用。Lu 小组采用特定片段的 DNA 酶,利用重金属离子与其特异性位点的相互作用,进行酶切后实现比色检测 Pb^{2+} ^[5, 6]和 UO_2^{2+} ^[7]等,该方法灵敏度高,特异性好,为重金属离子的检测开辟了新的方向。但是,以上的这些酶都是以 DNA 作为基底,成本相对还是比较昂贵。基于以上的设想,研究者们发现有些 DNA 酶是可以卟啉环的金属配合物作为基底,这在一定程度上既能降低 DNA 酶的成本又增强了 DNA 酶的稳定。1998年, Sen 小组^[8]就通过 SELEX 技术筛选出了以卟啉铁作为基底的一类新型的 DNA 酶,它的核酸适体是一段富含 G 碱基的寡聚核苷酸序列,卟啉铁与之结合能形成 G-四分体结构,这段寡聚核苷酸可以是 24 个碱

基的 PS5.M, 也可以是 18 个碱基的 PS2.M 序列。这种结构的 DNA 酶表现出同辣根过氧化酶(HRP)相似的催化性质, 在双氧水存在下能催化鲁米诺(luminol)发光, 也能催化 2,2'-连氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(ABTS)生成绿色的 ABTS^{•+}氧化产物, 这种催化能力较游离的卟啉铁高出近两个数量级, 因此被作为一种特殊的标记物用于构建比色和电致发光传感器进行信号扩大检测蛋白和 DNA 等各种生物分子^[9-12]。随着这种 DNA 酶研究的深入, 一系列富含 G 碱基的寡聚核苷酸适配体, 例如: PW17^[13]、ARGO100^[14]和 TBA^[15]等, 被证实均能与卟啉铁形成 G-四分体的超分子 DNA 酶结构。Williner 小组率先利用开发了 PW17 序列与卟啉铁结合形成 DNA 酶应用于比色和发光检测 DNA^[16,17]、Hg²⁺^[18]、AMP^[19]和端粒酶的活性^[20], 并拓展到基于 Pb²⁺和 L-组氨酸的 DNA 酶分子检测 Pb²⁺和 L-组氨酸^[21]。无论是灵敏度还是检测限, 都收到令人满意的结果。Dong 小组也不断开发和拓展这种卟啉铁的核酸适体, 他们发现一些 K⁺^[22]和凝血酶^[15]的适体(TBA)富含 G 碱基也能与卟啉铁形成 G-四分体结构, 未结合凝血酶之前, 卟啉铁与 TBA 之间的亲和常数 $K_d=37 \pm 2 \mu\text{M}$, 而当凝血酶结合 TBA 后增强了酶结构的稳固性 $K_d=23 \mu\text{M}$, 提高了酶的催化活性, 从而能达到检测凝血酶蛋白的目的。

随着后基因组时代的到来, 蛋白的检测在蛋白组学和医学诊断中发挥着越来越重要的作用。凝血酶蛋白作为一种丝氨酸蛋白酶, 在癌症标识中有着举足轻重的地位, 因而高灵敏度, 高选择性的核酸适体传感器的开发成为研究者们关注的热点。电化学核酸适体传感器一直以其高的灵敏度, 操作简单、便携和对样品浑浊度要求低等优势在众多传感器中突显。但是, 目前电化学传感器很多都需要在适体上标记一定的电化学活性物质或酶, 如: 二茂铁、亚甲基蓝和辣根过氧化酶等^[23-25]。而这些标记的步骤往往会使操作比较繁琐、效率低而且也耗成本。

本文以此为基础, 首次提出了一种新型的无需标记的酶传感器, 利用 G-四分体 DNA 酶仿辣根过氧化酶建立的高灵敏和低成本的信号扩大识别凝血酶的电化学催化方法。由于该 DNA 酶的 G-四分体形成条件已经被深入研究, 所以在酶的固定方面相比于之前的 HRP 标记的适体传感器, 就可以避免 HRP 标记的步骤和成功性以及降低成本, 实现无需标记的催化信号放大的检测。传感器的设计原理如下图 1 所示, 巯基修饰的凝血酶的适体先通过自组装的方式固定到金电极表面^[26], 然后经过巯基己醇占位后, 置于含有一定浓度的卟啉铁缓冲液中进行培育, 使之形成折叠的

酶结构，制备得到适体传感器。将所得的适体传感器在适当条件下与目标凝血酶进行培育，由于适体与凝血酶之间的高亲和力的结合，使生成的酶结构更加稳固，适体与卟啉铁之间亲和力也得到增加，通过双氧水存在下的 DNA 酶的催化还原峰的升高证明该酶的催化活性也有很大程度的提高。说明凝血酶的量直接与 DNA 酶活性的提高和酶的数量增加与否有关，因此，可以通过其在双氧水中的催化还原峰的强度来实现间接检测凝血酶的目的。

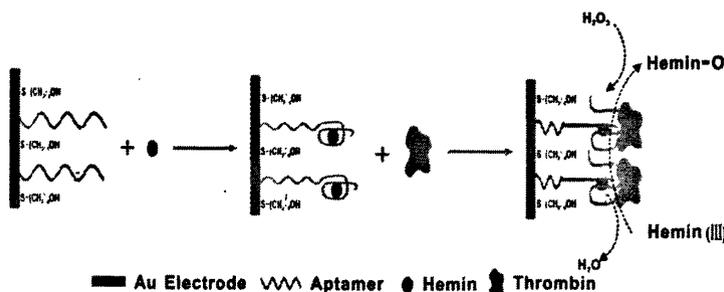


Fig.1. Schematic of the thrombin detection based on DNAzymes

二、实验部分

2.1 试剂与仪器

2.1.1 仪器

电化学工作站 832, 660C; 三电极体系(金电极工作电极, Ag/AgCl 参比电极, Pt 对电极), 电极架 (上海辰华仪器有限公司); 85-1A 型磁力搅拌器 (河南巩义市予华仪器有限责任公司); 氮气钢瓶。

2.1.2 试剂:

带巯基的核酸适体(Aptamer 5'-HS-(CH₂)₆GGTTGGTGTGGTTGG-3') (上海生工生物技术服务有限公司); 牛血清白蛋白(BSA 北京鼎国生物科技有限公司); 溶菌酶 (Lysozyme 上海申能博彩生物科技有限公司); 凝血酶 (Thrombin 上海晶天生物科技有限公司); 巯基己醇(MCH), 卟啉铁(Hemin 上海 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA 有限公司); 30% H₂O₂, 二甲亚砜(DMSO), 曲拉通 X-100, 铁氰化钾 K₃[Fe(CN)₆]

(上海国药集团化学试剂有限公司); 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl) (中国医药集团化学试剂有限公司)。

所用试剂均为分析纯, 实验室用水为二次蒸馏水。

2.2 实验步骤

2.2.1 传感器的制备

将 aptamer 溶于 200 mM Tris-HCl (pH=7.4)的溶液中得到 0.1 M 的溶液, 在 90 °C下变性 10 min 达到解开 DNA 内部结构的目的。Hemin 母液(0.01 M)溶解于 DMSO 中, 在-20° C下保存, 所需浓度分别用缓冲液稀释(25 mM HEPES, pH=7.4, 20 mM KCl, 200 mM NaCl, 0.05%(w/v) Triton X-100 and 1%(v/v) DMSO)。金电极用 0.05 μm 的氧化铝粉末打磨后, 分别在水、乙醇和水中各超声 5 分钟, 在 1 M 的 H₂SO₄ 溶液中进行电化学循环伏安扫描, 直到出现金的特征峰, 扫描范围为 (-0.2~1.5V)。处理好的电极表面经氮气吹干浸于 200 mM Tris-HCl (pH=7.4) 0.1 μM aptamer 溶液中, 4°C 组装 16h。洗涤之后在 1 mM MCH 溶液中(10 mM Tris-HCl, pH=7.4)占位 2h。电极经过再次洗涤后经 hemin(0.5 μM)培养 1h (25 mM HEPES, pH=7.4, 20 mM KCl, 200 mM NaCl, 0.05%(w/v) Triton X-100 and 1%(v/v) DMSO), 得到适体传感器。

2.2.2 凝血酶的识别

将上述制备好的适体传感器分别浸入到不同浓度的 thrombin 溶液在中在 37°C 培育 0.5 h(pH=7.4 Tris-HCl, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂)。

2.2.3 电化学检测

缓冲液洗涤后转移到预先通 30min 氮气的一定浓度的双氧水的电解质溶液中 (10 mM HEPES, pH=8.0, 50 mM NaCl, C_{H2O2}=18 μM) 在 0.2~0.8V(vs. Ag/AgCl) 的电压范围, 扫速 0.1 V/s 进行电化学循环伏安检测。电化学测定均在氮氛下进行。

2.2.4 电化学阻抗检测

交流阻抗检测液为含有 0.01 mol/L K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (1:1)的 0.1 mol/L KCl 溶液。交流阻抗检测参数为: 偏电位 0.21 V, 频率范围 10⁵ Hz ~1 Hz。

三、结果与讨论

3.1 电化学交流阻抗和循环伏安对传感器的表征

交流阻抗法是在频率变化过程中测量电极表面阻抗值的方法,可以提供电极与溶液界面多种性质,包括电极阻抗(impedance),表面电子传递电阻(R_{et})等大量数据信息。所以电化学交流阻抗(EIS)能够较灵敏、直接地反映电极表面的状况,在进行法拉第交流阻抗测量时,当阻抗测试液中含有电化学活性物质如[Fe(CN)₆]^{3-/4-},电路的Nyquist图谱(即所得阻抗值的虚部Z_m对其实部Z_{re}作图)呈现为相连的半圆和斜线两部分,其中高频区测得的半圆部分由电子传递过程控制,其直径大小等于电极R_{et}的数值。我们采用CHI660C电化学工作站,对金电极表面经过不同修饰过程进行了阻抗图(Nyquist)图谱的表征。实验结果如下图1所示,图1a是裸金电极EIS的Nyquist曲线,曲线在高频部分显示出较小半径的圆弧,表明裸电极电阻较小(R_{et}=200 Ω),说明电极表面电子传递很快,几乎不受阻碍。当组装上核酸适体和巯基乙醇后,由于适体的磷酸骨架带负电荷与[Fe(CN)₆]^{3-/4-}产生静电排斥作用,阻碍[Fe(CN)₆]^{3-/4-}到达金电极表面进行电子交换,高频区的圆弧半径相比于裸电极增加很多,所以电极的阻抗分别增加到1195 Ω和1650 Ω左右(图2b, 2c),并且由于巯基乙醇占据了空余的电极的位点所以曲线c的半径圆弧大于曲线b的。最后电极经过进一步1 μM 凝血酶培育后,凝血酶与适体通过特异性的结合,使阻抗值达到R_{et}=3 KΩ左右(图2d),凝血酶蛋白本身是不带电的,这可能是由于凝血酶蛋白的庞大体积覆盖在电极表面,使电子更难到达金电极表面,表明凝血酶能够通过实验方法成功结合适体而被固定在电极表面^[27]。

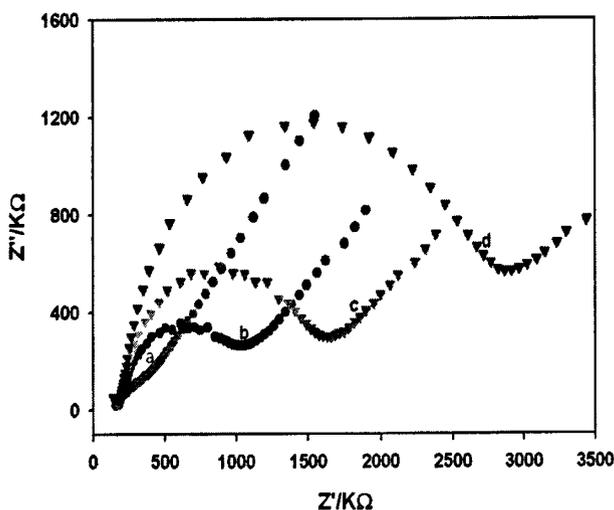


Fig.2. Electrochemical impedance spectra of the bare Au electrode(a), the Au/TBA electrode(b), the Au/TBA/MCH electrode(c),the Au/TBA/MCH/thrombin electrode(d) in aqueous solution containing $5\text{mM} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ and 0.1 M KCl . The concentration of thrombin was $1\mu\text{M}$.

为了进一步研究电极表面 DNA 酶结构的形成和凝血酶与卟啉铁培养的先后顺序对本实验是否能够成功催化的重要性, 我们分别设计了空白实验进行比较。所有的电化学检测均在 $18\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ 的 HEPES 缓冲液中进行, 卟啉铁的浓度和培育时间均保持一致, 实验结果如图 3 所示。金电极在经过核酸适体和巯基己醇占位后在 $18\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ 的已除氧的 HEPES 缓冲液中进行电化学扫描, 得到曲线 a, 然后该电极经过 $0.5\mu\text{M}$ 卟啉铁培育后再进行扫描(曲线 b), 通过比较曲线 a 和曲线 b 可以明显看到曲线 b 在 $E=-0.380\text{ V}$ 左右出现了卟啉铁的还原峰, 这可能是由于卟啉铁与适体能形成折叠的酶结构使卟啉铁修饰到电极表面^[15]在双氧水中产生氧化还原峰。原因可能是由于卟啉铁培养的溶液中存在 K^+ , 导致凝血酶的适体能够与 K^+ 形成 G-四分体结构, 为卟啉铁提供嵌入的环境, 从而产生一定的电化学信号。然后将此传感器在 $1\mu\text{M}$ 凝血酶溶液中进行培育, 使得适体能够充分与凝血酶结合, 得到的电化学扫描曲线如 c 所示, 可以发现曲线 c 相对于曲线 b 出现的还原峰显著。这充分证明, 凝血酶蛋白的存在前后, 对适体与卟啉铁的亲和常数产生了影响, 由 $K_d=37\pm 2\mu\text{M}$ 降低至 $K_d=23\mu\text{M}$, 凝血酶与适体之间的高亲和力加固了 G-四分体结构, DNA 酶的

催化活性也因此而得到提高,对DNA酶的催化性质也有着很大地促进作用,从而能够有效地利用该方法进行电化学催化检测凝血酶。核酸适体通常是以G-四分体的结构与凝血酶蛋白结合的,那么先形成稳固的G-四分体是否更有利于卟啉铁的嵌入及电化学催化性质的提高,我们将凝血酶与卟啉铁的培育顺序进行了前后调换。同等条件下,将表面组装适体后的金电极先进行 $1\mu\text{M}$ 凝血酶的培育后再在 $0.5\mu\text{M}$ 卟啉铁的溶液中培育,得到的循环伏安曲线如图3d所示。由图比较可知,DNA酶卟啉铁的还原峰没有图3c改变大,这可能是由于凝血酶在电极表面的存在阻碍了卟啉铁的嵌入,导致其催化氧化峰电流的降低。所以本实验中,选择卟啉铁先于凝血酶培养,这也与文献^[15]相吻合。

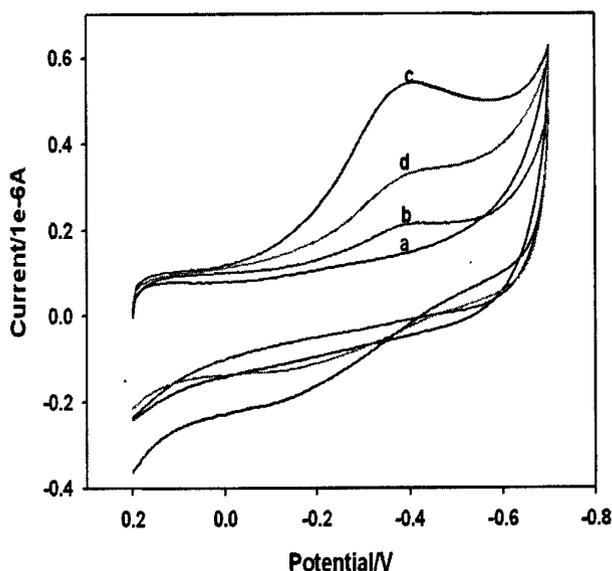


Fig.3. Cyclic voltammograms of TBA(a), TBA/Hemin(b), TBA/Hemin/Thrombin(c) and TBA/Thrombin/Hemin(d) Au electrodes in deoxygenated 10mM HEPES, pH=8.0, 20mM KCl and 100mM NaCl buffer containing $18\mu\text{M}$ H_2O_2 . Scan rate: 0.1V/s.

3.2 传感器电化学行为的研究

本实验采用循环伏安法研究了 TBA/Hemin/Thrombin 电极在已除氧的 10 mM

HEPES 缓冲溶液中(pH=8.0)中不同扫描速度时的循环伏安曲线。结果如图 4 所示, 随着扫描速率由 60 至 250 mV/s 增大时, 卟啉铁的还原峰电流随着扫速的增加呈线性增加, 线性相关系数达到 0.9937, 但是氧化峰表现不明显, 可能是由于卟啉铁的氧化还原在金电极表面由于 G-四分体构象的缘故离电极表面有一定的距离, 不能彻底发挥氧化还原的特征, 部分符合电极表面薄膜特征之一。

同时根据Laviron方程^[28]: $Q=nFA\Gamma^*$ (1)

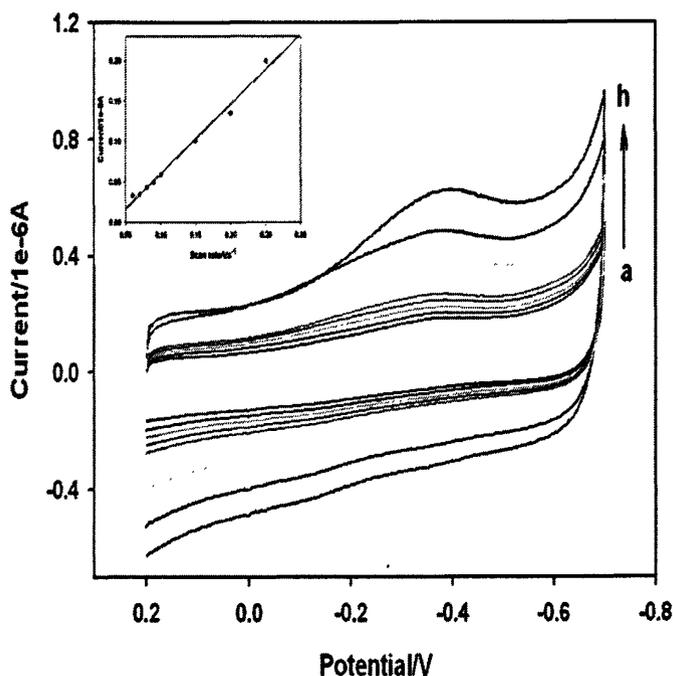


Fig. 4. Cyclic voltammograms of TBA/Hemin/Thrombin modified GCE in 10mM pH=8.0 HEPES with different scan rates (curve a to h: 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 V/s).

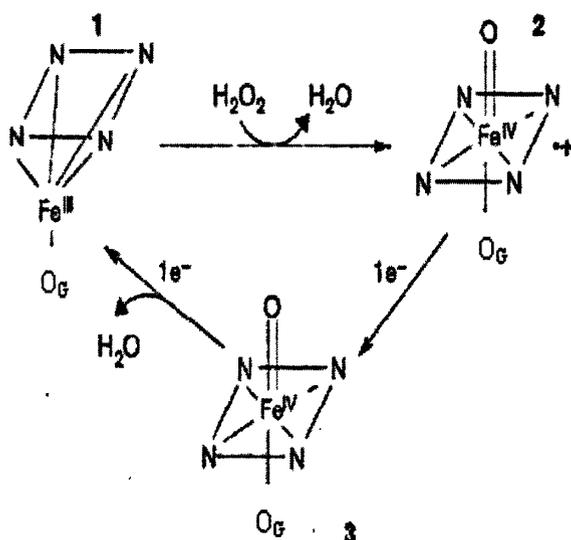
Inset: the cathodic peak current of DNAzyme vs. scan rate

其中, Γ^* 是电极反应物的表面覆盖度(mol/cm^2), A 是电极面积(cm^2), Q 是电量(C), 可通过伏安图的峰面积求得。符号 n 、 F 分别为电子转移数和法拉第常数。根据公式(1), 可以求得修饰电极的DNA酶的覆盖量 Γ^* 值为 $3.49 \times 10^{-11} \text{ mol}/\text{cm}^2$ 。

3.3 TBA/Hemin/Thrombin 电极的对 H_2O_2 的电催化还原

本实验采用循环伏安法研究了修饰DNA酶的金电极对双氧水的还原的电催化。如图4所示,将一定量的 H_2O_2 加入到除氧的0.01 M 的HEPES溶液中(图5b),与溶液中不存在 H_2O_2 时的循环伏安曲线发生了明显的改变(图5a)。其中在电位 $E=-0.380$ V 出现了 Fe^{III}/Fe^{II} 氧化还原过程的典型特征峰。

其反应机理如下^[29]:



还原峰电流随着 H_2O_2 的浓度的增加而增加,在双氧水的浓度在 $3.6 \sim 14.4 \mu\text{M}$ 范围内作图,呈现良好的线性关系, $I(\mu\text{A}) = 0.105 + 0.006[H_2O_2](\mu\text{M})$, 线性相关系数为 0.986,说明 DNA 酶已经成功固定在电极表面,并对 H_2O_2 有良好的电催化还原作用^[30]。由于米歇尔常数能够良好地反应酶与底物之间的亲和力,所以根据 Lineweaver-Burk 方程^[31] $1/I_{ss} = 1/I_{max} + K_m/I_{max}C_{H_2O_2}$, 求得该线性方程的斜率和截距,计算得到米氏常数 $K_m = 234 \mu\text{M}$ 小于部分文献报道^[32, 33],说明 DNA 酶与 H_2O_2 之间存在良好的亲和性。

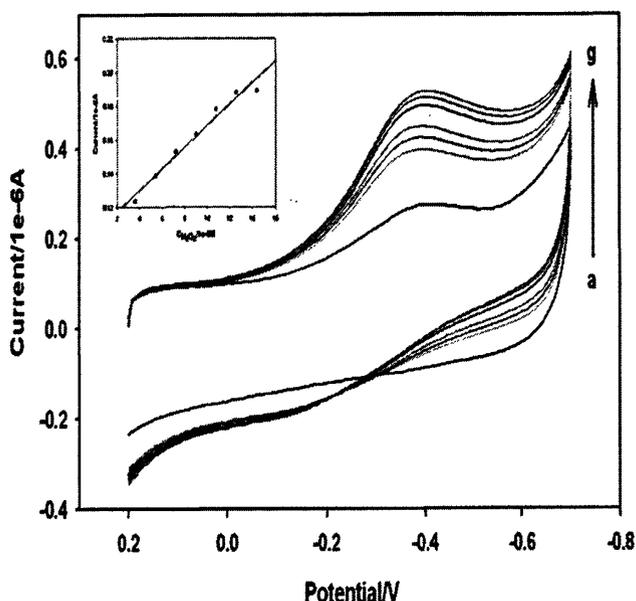


Fig.5. Cyclic voltammograms of anti-thrombin aptasensor in 10mM HEPES(pH=8.0), 20mM KCl and 100mM NaCl buffer, under N_2 at 0.1V/s before (a) and after the addition of (3.6, 5.4, 7.2, 9.0, 10.8, 12.6, 14.4) $\times 10^{-6}$ M H_2O_2 (curve b to g). Inset: the plot of the catalytic current vs. the H_2O_2 concentration.

3.4 凝血酶的定量检测

为了定量的检测凝血酶，按照实验条件，将适体传感器置于不同浓度的凝血酶中进行培育后，分别进行电化学信号的检测。结果如图 6 所示，在加入凝血酶后，峰电流逐渐增加，并且随着凝血酶浓度的增加而增加。这就说明凝血酶的加入使得凝血酶-核酸适体-卟啉铁的平衡更多地偏向 DNA 酶结构的形成，因而表现的催化性质也越来越强。将峰电流对凝血酶浓度的对数作图，在凝血酶浓度在 $10^{-10} \sim 10^{-6}$ mol/L 范围内呈现良好的线性，线性回归方程为 $I(\times 10^{-7}A)=3.768+0.333\text{Log}C_{\text{thrombin}}$ ，线性相关系数为 0.993，最低检测限为 6×10^{-11} mol/L(S/N)，说明该传感器对凝血酶具有很高的灵敏度。

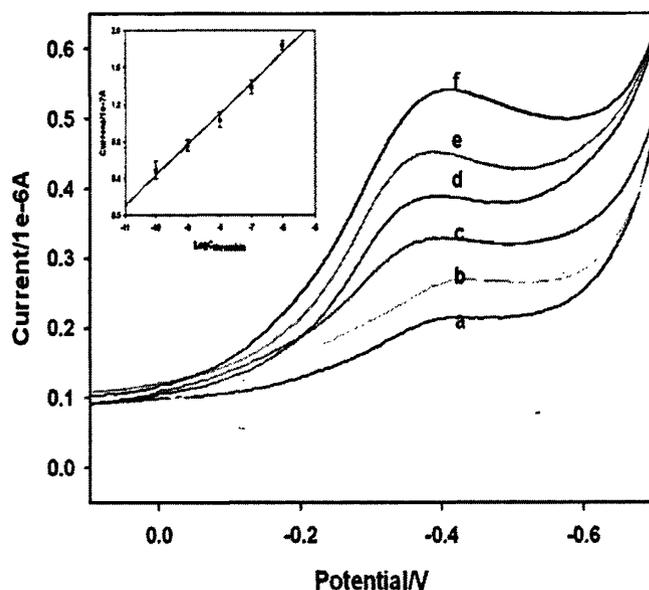


Fig.6. Cyclic voltammograms of aptasensor corresponding to analysis of different concentrations of thrombin. All experiments were performed in 10mM HEPES (pH=8.0), 100mM NaCl and 20mM KCl containing 18 μ M H₂O₂ under N₂; scan rate: 0.1V/s.

Inset: Calibration plot of peak currents response as a function of logarithm of thrombin concentrations derived from the cyclic voltammograms: (a) 0 M, (b)1 \times 10⁻¹⁰ M, (c) 1 \times 10⁻⁹ M,(d) 1 \times 10⁻⁸ M, (e) 1 \times 10⁻⁷ M, (c) 1 \times 10⁻⁶ M.

3.5 传感器对凝血酶检测的特异性

由于凝血酶与其适体结合能形成特别的 G-四分体结构, DNA 酶才能发挥催化的作用, 其它蛋白的存在对于核酸适体与凝血酶的结合没有影响^[34]。在实验中, 我们采用牛血清白蛋白(BSA)和溶菌酶(Lysozyme)代替凝血酶检验适体传感器对凝血酶的特异性。实验结果如图 7 所示, 蛋白浓度均是 1 μ M 时, 牛血清白蛋白和溶菌酶响应峰值, 电化学响应值与不加凝血酶的信号基本相同, 并且远远低于相应的 1 μ M 凝血酶的电化学响应值。由此可见, 溶液中其他蛋白的存在基本上不影响凝血酶的检测, 说明我们构建的 G-四分体 DNA 酶的电化学传感器对凝血酶检测表现良

好的特异识别能力。

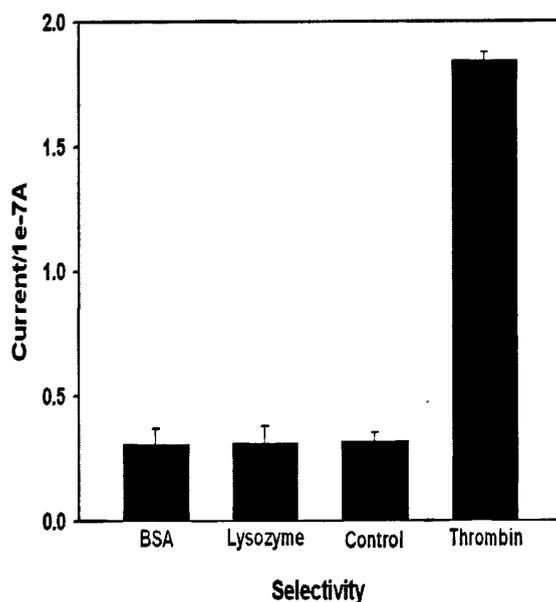


Fig.7. The variations of the peak currents of the aptasensors after incubation with 1 μ M BSA, Lysozyme, control and Thrombin respectively for 30min at 37 $^{\circ}$ C in 20 mM Tris-HCl (pH=7.4), containing 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂ and 1mM MgCl₂

四、结论

综上所述, 本文以凝血酶为研究对象, 利用 G-四分体的 DNA 酶进行电催化实现信号扩增。富含 G 碱基的凝血酶的核酸适体, 能同卟啉铁结合形成折叠的 DNA 酶结构, 表现一定的催化性质。然而当凝血酶结合适体形成 G-四分体后, 致使 DNA 酶发挥出更强催化性质。正是基于这种 G-四分体 DNA 酶的催化, 相比于辣根过氧化酶标记的核酸适体传感器, 实验方法更加简单、快速, 进一步降低了电化学标记的成本。同时, 该方法的高灵敏度也可以用于其它目标蛋白的识别和检测, 为蛋白的分析提供一个新的途径, 并且我们将进一步研究不同的电极修饰, 以完善 G-四分体结构的 DNA 酶在电化学上的氧化还原让其发挥更有效果的催化, 可望有效地用于蛋白组学和癌症的诊断和治疗上。

参考文献

- [1] C. Tuerk, L. Gold. *Science*. 1990, 249(4968), 505-510.
- [2] A. D. Ellington, J. W. Szostak. *Nature*. 346 (30), 818-822.
- [3] R. R. Breaker. *Chem Rev*. 1997, 97(22), 371-390.
- [4] R. A. Kamin, G. S. Wilson. *Anal. Chem*. 1980, 52, 1198.
- [5] J. W. Liu, Y. Lu. *Anal. Chem*. 2003, 75, 6666-6672.
- [6] J. W. Liu, Y. Lu. *J. Am. Chem. Soc*. 2003, 125, 6642-6643.
- [7] J. H. Lee, Z. D. Wang, J. W. Liu, Y. Lu. *J. Am. Chem. Soc*. 2008, 130, 14217-14226.
- [8] P. Travascio, Y. F. Li, D. Sen. *Chem. Biol*. 1998, 5(9), 505-517.
- [9] Y. Xiao, V. Pavlov, R. Gill, T. Bourenko, I. Willner. *ChemBioChem*. 2004, 5, 374-379.
- [10] W. W. Chen, B. X. Li, C. L. Xu, L. Wang. *Biosens. Bioelectron*. 2009, 24, 2534-2540.
- [11] T. Li, S. J. Dong, E. K. Wang. *Chem. Commun*. 2007, 4209-4211.
- [12] D. M. Kolpashchikov. *J. Am. Chem. Soc*. 2008, 130 (10), 2934-2935.
- [13] T. Niazov, V. Pavlov, *et al.* *Nano Letters*. 2004, 4 (9), 1683-1687.
- [14] T. Li, S. J. Dong, E. K. Wang. *Anal. Chem*. 2009, 81, 2144.
- [15] T. Li, S. J. Dong, E. K. Wang. *Chem. Commun*. 2008, 3654.
- [16] Y. Xiao, V. Pavlov, R. Gill, T. Bourenko, I. Willner. *ChemBioChem*. 2004, 5, 374.
- [17] I. Willner, Z. Cheglakov, Y. Weizmann, E. Sharon. *Analyst*. 2008, 133, 923.
- [18] D. Li, A. Wieckowska, I. Willner. *Angew. Chem*. 2008, 120, 3991.
- [19] J. Elbaz, B. Shlyahovsky, I. Willner. *Chem. Commun*. 2008, 1569.
- [20] D. Li, B. Shlyahovsky, J. Elbaz, I. Willner. *J. Am. Chem. Soc*. 2007, 129, 5804.
- [21] V. Pavlov, Y. Xiao, R. Gill, A. Dishon, M. Kotler, I. Willner. *Anal. Chem*. 2004, 76, 2152.
- [22] T. Li, S. J. Dong, E. K. Wang. *Chem. Commun*. 2009, 580-582.
- [23] Y. Xiao, A. A. Lubin, A. J. Heeger, K. W. Placxo. *Angew. Chem*. 2005, 117, 5592.
- [24] Y. Lu, X. C. Li, L. M. Zhang, L. Q. Mao. *Anal. Chem*. 2008, 80, 1883.
- [25] C. H. Fan, K. W. Placxo, A. J. Heeger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003, 100, 9134.
- [26] S. Centi, S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini. *Anal. Chem*. 2007, 79, 1466-1473.
- [27] X. X. Li, L. H. Shen, D. D. Zhang, C. X. Zhang. *Biosens. Bioelectron*. 2008, 3, 1624.
- [28] E. Laviron, *J. Electroanal. Chem*. 1979, 100, 263.

- [29] T. Li, S. J. Dong, E. K. Wang. *Chem. Asian J.*. 2009, 4(6), 918-922.
- [30] R. Polsky. *Langmuir*. 2007, 23(2), 364-366.
- [31] R. A. Kamin, G. S. Wilson. *Anal. Chem.* 1980, 52, 1198.
- [32] B. Q. Wang, S. J. Dong. *Talanta*. 2000, 51, 565.
- [33] Q. L. Wang, G. X. Lu, B. J. Yang. *Biosens. Bioelectron.* 2004, 19, 1269.
- [34] Tu Yong-Hua(徒永华), Cheng Gui-Fang(程圭芳), Lin Li(林莉), et al. *Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报)[J]*, 2006, 27(12):2266-2270.

附硕士研究生期间发表和待发表的论文

1) **G-Quadruplex-Based DNAzymes Aptasensor for the Amplified Electrochemical Detection of Thrombin**

Bijun Shen, Qi Wang, Dan Zhu, Juanjuan Luo, Guifang Cheng*, Pingang He*,

Yuzhi Fang

Electroanalysis, submitted

2) **基于 G-四分体结构的 DNA 酶传感器电化学检测凝血酶**

第十届中国化学会分析化学年会暨第十届全国原子光谱学术会议

《分析化学增刊》第三分册, 2009, 37, F011

沈碧君, 王琪, 程圭芳, 何品刚*, 方禹之

3) **A new electrochemically active-inactive switching aptamer molecular beacon to detect thrombin directly in solution**

Biosens. Bioelectron. 2010, doi:10.1016/j.bios.2010.03.008

Guifang Cheng*, **Bijun Shen**, Fan Zhang, Jikui Wu, Ying Xu, Pingang He*, Yuzhi

Fang

4) **基于金胶的选择性聚集实现 p53 基因的电化学超灵敏检测**

郑静, 沈碧君, 程圭芳, 冯婉娟, 何品刚, 方禹之

《高等学校化学学报》, 2009, 30(11): 2170-2174

5) **Polythymine Oligonucleotide-Modified Gold Electrode for Voltammetric Determination of Mercury(II) in Aqueous Solution**

Electroanalysis, 2010, 22(4): 479-482

Jikui Wu, Lanying Li, **Bijun Shen**, Guifang Cheng, Pingang He, Yuzhi Fang

6) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ 核壳纳米粒子的制备、表征及在 DNA 电化学传感器中的应用

第十届全国电分析化学学术会议 438

黄翠华, 李兰英, 沈碧君, 程圭芳, 何品刚*, 方禹之

致 谢

值此论文完成之际，心中感慨万千，然而涌上心头更多的是源自心底的诚挚谢意。我首先要感谢方禹之教授和何品刚教授，本论文是在两位教授的精心指导下完成的。衷心感谢方老师三年来在学术上对我的谆谆教诲和悉心指导，先生渊博的学识和严谨细致的科学态度是我学习的楷模，将激励着我在今后的学习和工作中不断进步；何老师幽默风趣，学识广博，三年来不仅对我的学习和研究工作给予了无微不至的指导和关心，并且对我的组织能力进行了培养，他宽阔的胸襟、勇于创新的科学精神和严于律己的研究态度深深感染着我，值得我学习终身。

同时也要感谢金利通教授、叶建农教授和徐通敏教授对我的指导和帮助，在此向各位老师致以深深的谢意！

这里特别要感谢的是程圭芳老师，本论文是在程老师的直接指导下完成的。这三年里，从论文的选题、实验的开展到论文的撰写修改及定稿，每一个过程中都倾注了程老师大量的心血和精力。尤其是在毕业论文的撰写期间，她不辞辛劳地为我反复修改，给我莫大的帮助和指导。同时，在生活上程老师也给予了我热诚的关怀和照顾，让我在这三年中无论是在专业知识和实验技能还是为人处世上都得到更多的提高和锻炼，在此深深感谢程老师三年来的教导！

感谢王清江老师、张文老师、鲜跃仲老师、施国跃老师、宗俊老师、楚清脆老师和徐颖老师等各位分析组老师的关心和帮助。感谢吴继魁博士、李兰英、章仁毅、成磊、崔静、王琪和以及我的同年级同学和室友在实验和论文的写作中给予的大力支持和协助。我会永远怀念和你们在一起的日子。感谢 B1312、B1402、B522、B520 实验室的各位师兄师姐师弟师妹及已经毕业的常竹、林莉、张帆、谭雪莲、冯婉娟、黄翠华、曹美玲等师姐们对我学习和工作上的热情帮助和关心，我的研究生三年真是由于你们的存在，让我更加充实和快乐！感谢你们陪伴我度过三年的研究生时光！

最后我要感谢我的家人，感谢他们无论何时都理解我支持我，并鼓励我不断取得进步，他们的支持是我最大的动力。

沈碧君

2010年4月于华师大

