



基于信号增强的电化学发光适配体传感器检测三磷酸腺苷

姚武, 崔朋, 胡晓倩

引用本文:

姚武, 崔朋, 胡晓倩. 基于信号增强的电化学发光适配体传感器检测三磷酸腺苷[J]. *发光学报*, 2020, 41(6): 744–752.

YAO Wu, CUI Peng, HU Xiao-qian. Electrochemiluminescent Aptasensor Based on Signal Enhancement for Determination of Adenosine Triphosphate[J]. *Chinese Journal of Luminescence*, 2020, 41(6): 744–752.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.3788/fgxb20204106.0744>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

CdSe/ZnS电化学发光法测定去甲肾上腺素

Electrochemiluminescent Determination of Norepinephrine by CdSe/ZnS Quantum Dot Modified Gold Electrode

发光学报. 2018, 39(7): 1024–1028 <https://doi.org/10.3788/fgxb20183907.1024>

光电化学生物传感器研究

Research of Photoelectrochemical Biosensors

发光学报. 2019, 40(1): 58–66 <https://doi.org/10.3788/fgxb20194001.0058>

基于适配体-表面等离子共振的生物传感技术及应用

Research and Application of Biosensing Technology Based on Aptamer-Surface Plasmon Resonance

发光学报. 2017, 38(8): 1039–1046 <https://doi.org/10.3788/fgxb20173808.1039>

基于贵金属纳米簇的电化学发光传感器在生命分析中的应用

Application in Life Analysis of Electrochemiluminescent Sensor Based on Noble Metal Nanocluster

发光学报. 2017, 38(5): 675–684 <https://doi.org/10.3788/fgxb20173805.0675>

利用聚丙烯酸钠-Nafion混合膜增强三联吡啶钌掺杂SiO₂纳米粒的电化学发光信号及其生物标记

Electrochemiluminescence Signal Enhancement of Ru(bpy)₃²⁺-doped SiO₂ Nanoparticles Based on Sodium Polyacrylate-Nafion Mixing Membrane and Their Bio-labeling

发光学报. 2016, 37(3): 310–314 <https://doi.org/10.3788/fgxb20163703.0310>

文章编号: 1000-7032(2020)06-0744-09

基于信号增强的电化学发光适配体传感器检测三磷酸腺苷

姚 武^{1*}, 崔 朋¹, 胡晓倩²

(1. 黄山学院 化学化工学院, 安徽 黄山 245041; 2. 黄山学院 生命与环境科学学院, 安徽 黄山 245041)

摘要: 基于三磷酸腺苷(ATP)适配体与ATP分子作用后可以显著增强电化学发光信号的性能,研究了一种用于ATP含量检测的电化学发光适配体(ECL-aptamer)传感器。通过电沉积方法获得纳米金电极。3'端标记联吡啶钌发光分子的探针DNA通过5'端修饰的巯基自组装到纳米金电极表面,然后与5'端标记二茂铁分子的ATP核酸适配体互补杂交,形成刚性线性的双链DNA,由此构建的传感器产生较弱的电化学发光(ECL)信号。该传感器在ATP溶液中孵化后,由于ATP分子与ATP适配体强的特异性结合,使得适配体分子与探针DNA分子解离,从电极表面脱落进入溶液,此时电极表面的探针DNA在强电解质溶液中可以形成发卡型的茎环结构,产生显著增强的ECL信号。ECL信号强度与ATP浓度的对数值呈线性关系,线性范围为 $10.0 \sim 1.0 \times 10^5$ pmol/L,相关系数 $r=0.9959$,检测限为5.0 pmol/L。该传感器的灵敏度与检测范围高于目前已报道的结果,显示出了ATP检测的应用潜力。

关键词: 电化学发光; 适配体; 生物传感器; 三磷酸腺苷

中图分类号: O657 文献标识码: A DOI: 10.3788/fjxb20204106.0744

Electrochemiluminescent Aptasensor Based on Signal Enhancement for Determination of Adenosine Triphosphate

YAO Wu^{1*}, CUI Peng¹, HU Xiao-qian²

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Huangshan University, Huangshan 245041, China;

2. College of Life and Environment Sciences, Huangshan University, Huangshan 245041, China)

* Corresponding Author, E-mail: yaowu92@sohu.com

Abstract: Based on the property that the electrochemiluminescence (ECL) signal could be significantly enhanced after adenosine triphosphate (ATP) aptamers interacted with ATP molecules, an ECL aptasensor was developed to detect ATP. A nano-Au electrode was obtained by electrodeposition method. The probe DNA with 3'-terminal labeled by ruthenium complex was self-assembled to the surface of the nano-Au electrode with the sulfhydryl group modified on the 5'-terminal, and then hybridized with the ATP aptamer which 5'-terminal was labeled by ferrocene molecule, to form rigid linear double-stranded DNA. Thus, the constructed sensor produced weak ECL signal. After incubation in an ATP solution, the aptamer molecules could dissociate from the probe DNA and fall off from the electrode surface due to the strong specific binding of ATP molecules and ATP aptamer, and the probe DNA on the electrode surface could form hairpin like stem ring structure, resulting in a stronger ECL signal. The linear range of ECL intensity and the logarithm of the ATP concentration was $10.0 \sim 1.0 \times 10^5$ pmol/L with a detection limit of 5.0 pmol/L, and the correlation coefficient

收稿日期: 2020-03-24; 修订日期: 2020-04-16

基金项目: 安徽省自然科学基金面上项目(11040606M41); 安徽省高校自然科学基金重点研究项目(KJ2016A683)资助

Supported by Natural Science Foundation of Anhui Province(11040606M41); Key Research Program of Natural Science Project in Colleges and Universities of Anhui Province(KJ2016A683)

was 0.995 9. The sensitivity and detection range of the sensor are higher than those reported so far, which shows the potential application of ATP detection.

Key words: electrochemiluminescence; aptamer; biosensor; adenosine triphosphate

1 引 言

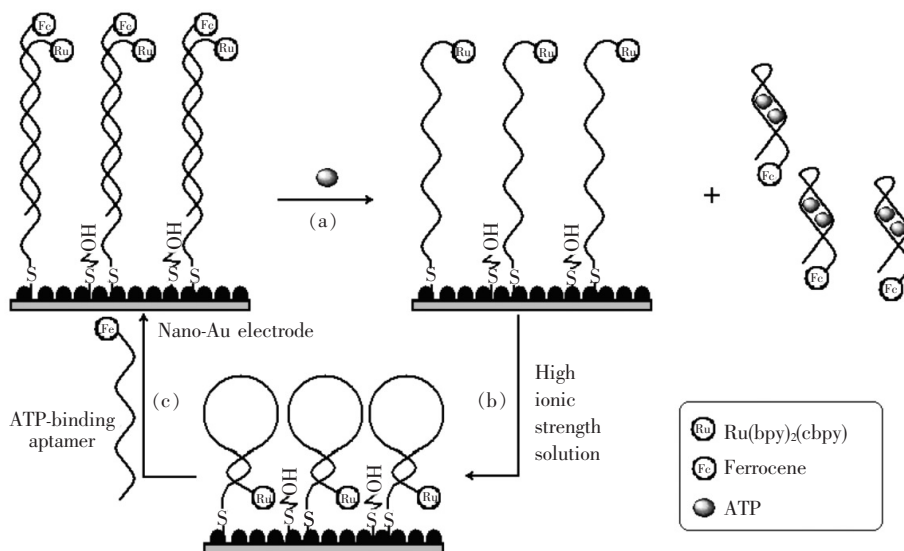
电化学发光(Electrochemiluminescence, ECL)是基于电极反应产物之间或电极反应产物与体系中组分之间进行化学反应,使得发光信号分子产生激发态,然后发光信号分子从激发态跃迁回基态而产生的一种光辐射,是通过电化学反应直接或间接引发的化学发光现象^[1-2]。由于 ECL 分析技术是电化学分析和化学发光分析技术结合的产物,兼具二者的特点和优势,因此得到了国内外众多学者的广泛关注,相关研究和应用得到了长足的发展,特别是在检测传感器研究方面得到了比较广泛的应用。

适配体(Aptamer)是通过体外筛选、指数富集的系统进化技术(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)获得,可以折叠成特定三维结构,通过空间构型互补以及静电、氢键等作用与靶分子特异性结合的一段单链寡核苷酸序列(DNA 或 RNA)^[3-5]。适配体与靶分子之间的分子识别功能与抗体抗原相似,但适配体作用的靶分子范围更广,且具有核酸自身稳定性强、变性复性快速可逆、易功能化修饰与标记等诸多优点,已在生命、医学、化学、环境等众多领域得到应用。

近年来,人们把适配体的分子识别功能和电化学发光的信号指示功能结合起来,构建出一系列功能各异、性能优越的电化学发光适配体型

(ECL-aptamer)传感器。该类传感器已被广泛研究应用于 miRNA^[6]、蛋白^[7-10]、酶^[11-13]、毒素^[14-16]、肿瘤细胞^[17-20]、肿瘤坏死因子^[21]、金属离子^[9,22]等的分析检测。但该类型传感器应用于三磷酸腺苷(ATP)的含量检测少有报道^[23-24]。ATP 适配体寡核酸链可以显著增强溶液中 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 分子的 ECL 信号。当 ATP 分子与适配体作用后, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 分子的 ECL 信号明显减弱。Xu 研究组^[23]借助该现象建立了 ATP 含量的检测方法,检测限为 100 nmol/L,检测线性范围为 0.2 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 。Ju 小组^[24]利用 ATP 适配体互补 DNA 和 G 四链体 DNA 核酸酶双标记纳米金颗粒。当 ATP 的量越多,能够通过适配体杂交连接到电极表面的纳米金颗粒数量就越少, DNA 核酸酶催化还原溶液中作为量子点 ECL 共反应物的溶解 O_2 也越少,则电极表面量子点的 ECL 信号越强。据此建立的电化学发光适配体型传感器用于 ATP 含量检测,检测限为 7.6 nmol/L,检测线性范围为 8 ~ 2 000 nmol/L。

本文在前期工作^[25]的基础上,借助纳米金电极增加探针 DNA(pDNA)组装量和二茂铁分子猝灭联吡啶钉 ECL 信号,建立了一种灵敏度更高、检测范围更宽的电化学发光适配体型 ATP 检测传感器。两端含 6 个互补碱基的单链 pDNA,先通过 3' 分子端修饰的氨基标记上电化学发光信号



联吡啶钌,再利用 5'端修饰的巯基自组装到纳米金电极表面。电极表面的 pDNA 与通过 5'端修饰的氨基标记二茂铁分子的 ATP 适配体杂交形成刚性线形的双链 DNA,从而构建出电化学发光适配体型 ATP 检测传感器。在 ATP 分子与适配体作用之前,传感器表面的 pDNA 与互补 ATP 适配体呈刚性线形的双螺旋结构,使得 pDNA 3'端的联吡啶钌分子远离纳米金电极表面,导致 ECL 信号较弱。同时,又由于适配体 5'端标记的二茂铁分子对联吡啶钌分子的电化学发光具有猝灭作用,使得此时的 ECL 信号更弱。当 ATP 与适配体作用形成适配体-ATP 复合物离开电极表面,而后电极表面的 pDNA 在高离子强度溶液中形成发夹型的茎环构象,使得 ECL 信号分子联吡啶钌与金电极表面靠近,产生显著增强的 ECL 信号,如示意图(用于 ATP 检测的电化学发光适配体传感器原理图)(a)、(b)所示。ECL 信号的增强幅度与 ATP 浓度的对数值具有良好的线性关系,从而可以对 ATP 的含量进行高灵敏度的检测,并获得更宽的检测范围。如示意图(c)所示,形成颈环结构的 pDNA 可以重新与 ATP 适配体杂交形成刚性线形的双链 DNA 结构,使得该传感器具有再生性能。

2 实 验

2.1 试剂和仪器

三磷酸腺苷(ATP)、三磷酸胞苷(CTP)、ATP 适配体以及与适配体互补的探针 DNA(pDNA)均购于上海生工生物工程技术和服务有限公司。5'端氨基修饰的 ATP 核酸适配体碱基序列为 5'-NH₂-(CH₂)₆-GCA CCT GGG GGA GTA TTG CGG AGG AAG GT-3',其互补的 pDNA 序列为 5'-HS-(CH₂)₆-GCA CCT TCC TCC GCA ATA CTC CCC CAG GTG C-(CH₂)₆-NH₂-3'。pDNA 序列的两端为 6 个互补的碱基,以利于形成茎环结构的分子构象,5'端是巯基修饰,用于 pDNA 在纳米金电极上通过 Au-S 键进行自组装。二-(2,2'-联吡啶)-4'-甲基-4-羧基联吡啶合钌(II)琥珀酰胺酯-二-六氟磷酸盐(Ru(bpy)₂(cbpy)NHS)购于 Fluka 化学试剂公司,三-(2-羧基乙基)膦盐酸盐(TCEP)、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)和 2-巯基乙醇(ME)购于 Alfa Aesar 中国(天津)有限公司,三丙基胺(TPA)购于 ACROS 化学试剂公司,

N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)购自百灵威化学试剂公司,二茂铁甲酸(Fc-COOH)购于江苏威特化工厂。所有其他试剂均为分析纯,未纯化使用。

CHI660c 型电化学工作站(上海辰华仪器公司)用于控制电极反应,BPCL-2-KIC 型超微弱发光分析仪(中科院北京生物物理研究所)用于电化学发光信号采集,日立 U-3010 型紫外分光光度计(Hitachi,Japan)用于测定紫外-可见光谱。

2.2 探针 pDNA-Ru 和 aptamer-Fc 的合成

按照文献[26]方法合成联吡啶钌标记的探针 DNA(pDNA-Ru)和二茂铁标记的适配体(aptamer-Fc),合成产物用紫外-可见光谱表征。

2.3 ECL-aptamer 传感器的构建

金电极用 α -Al₂O₃ 粉抛光成镜面后,再分别在高纯水、无水乙醇、高纯水中超声清洗,然后在 0.50 mmol/L 的 H₂SO₄ 溶液中进行循环伏安扫描,扫描电位为 -0.2 ~ 1.7 V,扫速为 0.1 V/s,直到出现典型且稳定的金电极扫描特征曲线。取出金电极,用高纯水清洗干净,并用高纯氮气吹干。该电极再在 3.0 mmol/L HAuCl₄ (0.10 mol/L KNO₃) 溶液中,在 -0.2 V 电位下进行恒电位电解 60 s,得纳米金电极。取出电极用高纯水冲洗干净后,重新在 0.50 mol/L 的 H₂SO₄ 溶液中以相同电位范围和扫速进行循环伏安扫描,直到出现典型且稳定的金电极扫描特征曲线,取出后用高纯水清洗干净,并用高纯氮气吹干待用。

将处理干净并吹干的纳米金电极迅速插入 500 μ L 1.0 μ mol/L 的 pDNA-Ru 溶液中,在室温下浸泡 12 h,pDNA-Ru 通过金硫键自组装上纳米金电极表面,用 10.0 mmol/L 的 PBS(pH = 7.4)淋洗电极表面,洗去没有键合的探针 pDNA-Ru。该电极再在 2.0 mmol/L ME(10.0 mmol/L PBS, 1.0 mol/L NaCl,pH = 7.4)溶液中浸泡钝化 1 h,除去非特异性键合的 pDNA-Ru 和封闭没有键合上探针 DNA 的纳米金电极表面位点。该修饰电极再浸入 500 μ L 0.50 μ mol/L 的 aptamer-Fc 溶液(10.0 mmol/L PBS,0.10 mol/L NaCl,5.0 mmol/L MgCl₂,pH = 7.4)中,于 37 $^{\circ}$ C 孵化 1 h,探针 pDNA-Ru 与 aptamer-Fc 杂交生成刚性线形的双螺旋 DNA(ds-DNA-Ru-Fc)。所得电极用 10.0 mmol/L PBS(pH = 7.4)溶液淋洗后作为 ECL-aptamer 传感器待用,并用循环伏安曲线和电化学阻抗谱对其进行表征。

2.4 电化学发光信号检测

ECL-aptamer 传感器在 500 μL 不同浓度的 ATP 溶液 (10.0 mmol/L PBS, 0.10 mol/L NaCl, pH = 7.4) 中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵化 40 min 后,经 10.0 mmol/L PBS (pH = 7.4) 缓冲溶液清洗,室温浸泡在 1.0 mol/L NaCl (10.0 mmol/L PBS, 5.0 mmol/L MgCl_2 , pH = 7.4) 溶液 30 min。电极取出后用 0.10 mol/L 的 PBS 缓冲溶液淋洗电极表面,再在 2.0 mL 0.10 mol/L TPA (0.10 mol/L PBS, pH = 7.4) 溶液中,于 0 ~ 0.75 V 电位范围、100 mV/s 扫速下进行循环伏安扫描,同时记录电化学发光信号。

3 结果与讨论

3.1 pDNA-Ru 和 aptamer-Fc 的表征

合成的探针 pDNA-Ru 用紫外-可见光谱进行表征,如图 1 所示。图 1 中曲线 a、b、c 分别为探针 pDNA、 $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{cbpy})\text{NHS}$ 和 pDNA-Ru 的紫外-可见吸收光谱。插图是 pDNA-Ru 在 400 ~ 500 nm 范围吸收光谱曲线的放大,其中 448 nm 的吸收峰与 $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{cbpy})\text{NHS}$ 的 452 nm 吸收峰对应,是联吡啶钉金属离子到配体电子转移的特征吸收带,说明联吡啶钉已经被标记到探针 pDNA 链上。

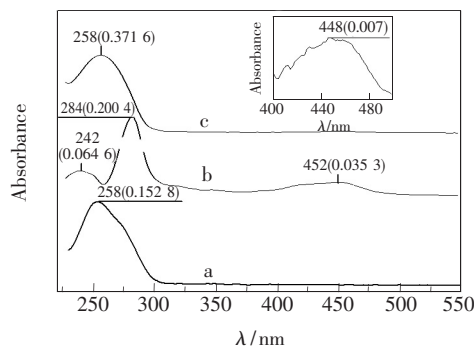


图 1 pDNA (a)、 $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{cbpy})\text{NHS}$ (b) 和 pDNA-Ru (c) 的紫外-可见吸收光谱。插图: pDNA-Ru 在 400 ~ 500 nm 范围吸收光谱曲线的放大。注:“258 (0.371 6)”含义为吸收峰波长 258 nm,相对于基线的吸光度值 0.371 6。

Fig. 1 UV-Vis absorption spectra of pDNA (a), $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{cbpy})\text{NHS}$ (b) and pDNA-R (c). Inset: amplification of the absorption spectrum curve of pDNA-Ru in the range of 400 – 500 nm. Note: “258 (0.371 6)” means that the absorption peak wavelength is 258 nm, and the absorbance is 0.371 6.

合成的 aptamer-Fc 同样用紫外-可见光谱进行表征,结果如图 2 所示。图 2 中曲线 a、b、c 分别为 aptamer、Fc-NHS 和 aptamer-Fc 的紫外-可见吸收光谱。插图是 aptamer-Fc 在 400 ~ 500 nm 范围吸收光谱曲线的放大,其中 450 nm 的吸收峰与二茂铁琥珀酰胺酯的 450 nm 吸收峰对应,说明二茂铁分子已经被标记到适配体分子上。

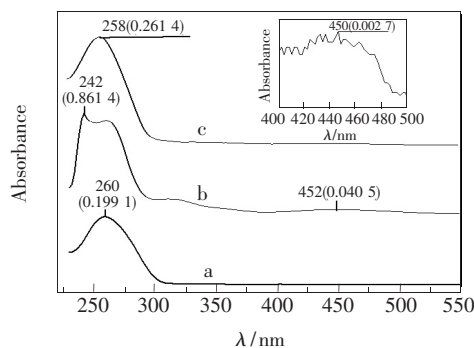


图 2 aptamer (a)、Fc-NHS (b) 和 aptamer-Fc (c) 的紫外-可见吸收光谱。插图: aptamer-Fc 在 400 ~ 500 nm 范围吸收光谱曲线的放大。注:“258 (0.261 4)”含义为吸收峰波长 258 nm,相对于基线的吸光度值 0.261 4。

Fig. 2 UV-Vis absorption spectra of aptamer (a), Fc-NHS (b) and aptamer-Fc (c). Inset: amplification of the absorption spectrum curve of aptamer-Fc in the range of 400 – 500 nm. Note: “258 (0.261 4)” means that the absorption peak wavelength is 258 nm, and the absorbance is 0.261 4.

3.2 ECL-aptamer 传感器的表征

用电化学探针 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 的循环伏安 (CV) 行为和电化学阻抗谱 (EIS) 对 pDNA-Ru 与 aptamer-Fc 的杂交过程和适配体与 ATP 分子作用结合过程进行表征。图 3 (a) 是纳米金电极在不同阶段 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 的循环伏安曲线。可以看出,和裸纳米金电极相比,探针 pDNA-Ru 修饰纳米金电极,并在 ME 溶液 (10.0 mmol/L PBS, 1.0 mol/L NaCl, pH = 7.4) 中钝化后, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 探针的氧化还原峰电流减小,峰电位差增大 (图 3 (a), a 和 b)。这是由于 pDNA-Ru 固定到电极表面后,因探针 DNA 链带负电荷的磷酸骨架与带负电荷的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 离子之间存在静电排斥作用,减少了 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 探针与电极表面的电荷传递。当该修饰电极浸泡在 0.50 $\mu\text{mol/L}$ 的 aptamer-Fc 溶液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵化 1 h 后, pDNA-Ru 和

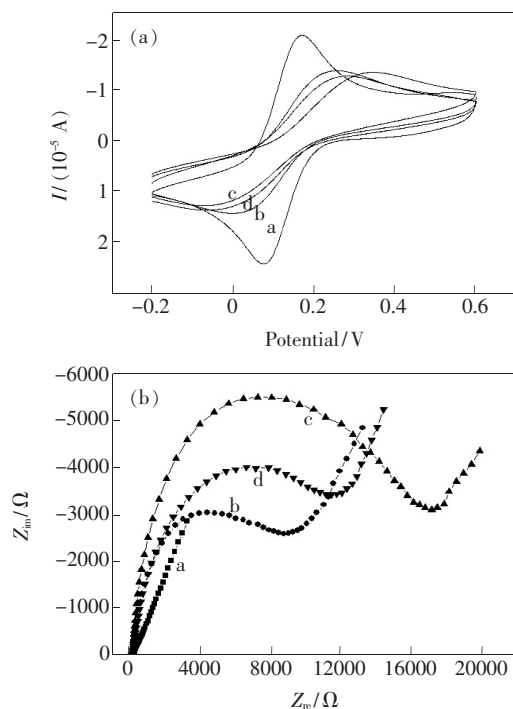


图 3 不同阶段的纳米金电极在 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 溶液中的循环伏安图(a)和电化学阻抗图(b)。a: 裸纳米金电极, b: pDNA-Ru 修饰的纳米金电极, c: ds-DNA-Ru-Fc 修饰的纳米金电极, d: ds-DNA-Ru-Fc 与 ATP 作用后的纳米金电极。

Fig. 3 CV(a) and EIS(b) of the modified electrode at different stages in $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ solution. a: bare nano-Au electrode, b: pDNA-Ru modified nano-Au electrode, c: ds-DNA-Ru-Fc modified nano-Au electrode, d: ds-DNA-Ru-Fc modified nano-Au electrode after incubation in an ATP solution.

aptamer-Fc 杂交生成形成刚性线形的双螺旋 DNA 链(ds-DNA-Ru-Fc), 此时由于纳米金电极表面的负电荷进一步增多, 阻碍了 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 探针的电化学反应, 导致 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 峰电流的进一步减小和峰电位差的进一步增大(图 3(a), c)。当该电极浸泡在 10.0 nmol/L ATP 溶液(10.0 mmol/L PBS, 0.10 mol/L NaCl, pH = 7.4) 中 37 °C 孵化 40 min, 并在 1.0 mol/L NaCl(10.0 mmol/L PBS, 5.0 mmol/L MgCl_2 , pH = 7.4) 溶液中作用 30 min 后, 这时 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ 的峰电流显著增大, 峰电位差显著减小。这表示在 ATP 分子存在时, 适配体与 ATP 作用生成适配体-ATP 复合物, 从电极表面解离(图 3(a), d)。

图 3(b) 是纳米金电极在不同阶段的电化学阻抗曲线。纳米金电极组装探针 pDNA-Ru 并在

ME 溶液中钝化后, 电荷转移电阻增加(图 3(b), a 和 b)。当电极表面的 pDNA-Ru 和 aptamer-Fc 杂交后, 电荷转移电阻进一步增大(图 3(b), c)。当电极在 ATP 溶液中孵化后, 电荷转移电阻减小(图 3(b), d)。电荷转移电阻的变化规律和循环伏安曲线的结果一致, 进一步证明了 pDNA-Ru 在纳米金电极表面的组装、pDNA-Ru 和 aptamer-Fc 的杂交、适配体从电极表面的解离等过程。

3.3 ECL-aptamer 传感器的电化学发光行为

图 4 是 ECL-aptamer 传感器与 ATP 分子作用前后 ECL 信号的变化过程。曲线 a 表明裸纳米金电极没有 ECL 信号产生, 组装了 pDNA-Ru 并在 ME 溶液中钝化后, pDNA-Ru 形成发夹型的茎环结构, 使得联吡啶钌分子靠近电极表面, 产生很强的 ECL 信号(图 4, b)。该修饰电极在 0.50 $\mu\text{mol/L}$ aptamer-Fc 溶液中 37 °C 孵化 1 h, pDNA-Ru 和 aptamer-Fc 杂交形成刚性线形的双螺旋 DNA 链(ds-DNA-Ru-Fc), 由于 pDNA 3' 端标记的联吡啶钌分子远离纳米金电极表面, 且适配体 5' 端标记的二茂铁分子靠近联吡啶钌分子, 对联吡啶钌的 ECL 信号具有猝灭作用, 导致 ECL 信号显著降低(图 4, c)。当 ECL-aptamer 传感器浸泡在 100.0 nmol/L ATP 溶液中, 由于 ATP 分子与适配体分子存在更强的相互作用, 生成适配体-ATP 复

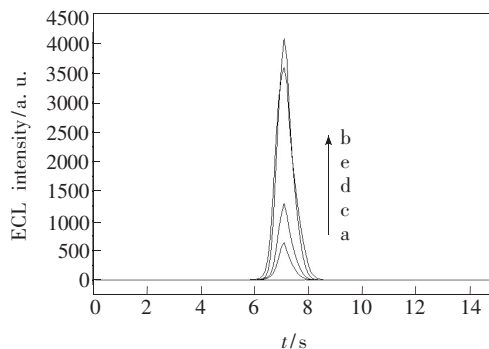


图 4 ECL-aptamer 传感器在不同阶段的 ECL 发光曲线。a: 裸纳米金电极, b: pDNA-Ru 修饰的纳米金电极, c: ds-DNA-Ru-Fc 修饰的纳米金电极, d: ds-DNA-Ru-Fc 与 ATP 作用后的纳米金电极, e: 在 1.0 mol/L 氯化钠溶液中孵化后的纳米金电极。

Fig. 4 ECL profiles of the ECL-aptamer biosensor at different stages. a: bare nano-Au electrode, b: pDNA-Ru modified electrode, c: ds-DNA-Ru-Fc modified electrode; d: ds-DNA-Ru-Fc modified electrode after incubation in an ATP solution, e: resulting electrode incubated in 1.0 mol/L NaCl solution.

合物, aptamer-Fc 从电极表面脱落, 消除了二茂铁分子对联吡啶钉 ECL 信号的猝灭作用, 导致 ECL 信号增强(图 4, d)。此时的 ECL-aptamer 传感器再在高离子强度溶液(1.0 mol/L NaCl, 10.0 mmol/L PBS, 5.0 mmol/L MgCl₂, pH = 7.4)中作用 30 min, 单链 pDNA-Ru 再次形成茎环结构, ECL 信号基本恢复至与 aptamer-Fc 杂交之前的强度水平(图 4, e)。

3.4 实验条件优化

实验研究了探针 pDNA-Ru 自组装时间对 ECL 信号的影响, 结果如图 5 所示。随着自组装时间的延长, ECL 信号逐渐增强。当自组装时间为 12 h 时达到最大, 而组装时间过长, 反而使 ECL 信号明显减弱。故实验选用 12 h 作为自组装时间。

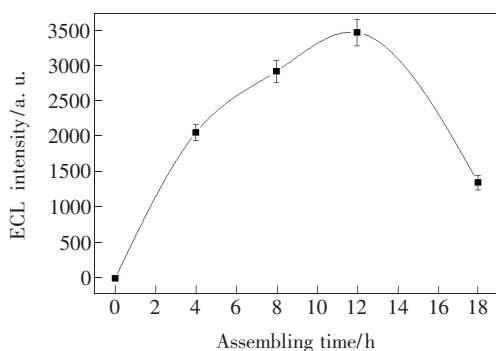


图5 pDNA-Ru 自组装时间对 ECL 强度的影响

Fig. 5 Dependence of the ECL intensity on the self-assembly time of pDNA-Ru

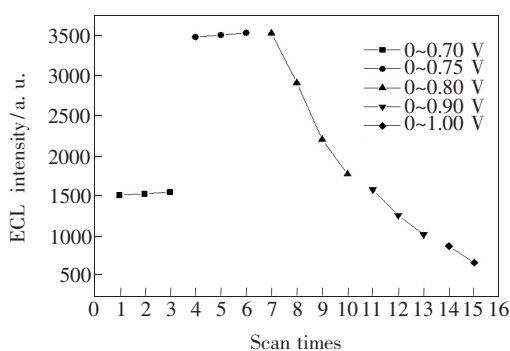


图6 电解电位范围对 ECL 强度和重复性的影响

Fig. 6 Dependence of the ECL intensity and reproducibility on the applied potential

实验考察了不同电解电位范围对 ECL 信号强度和重复性的影响, 结果如图 6 所示。电位范围在 0 ~ 0.75 V 时, 产生的信号较强, 连续测定 3 次, 信号强度稳定。故实验选用 0 ~ 0.75 V 的循

环伏安电解电位范围。

实验也考察了 ECL-aptamer 传感器与 ATP 的相互作用时间对传感器电化学发光信号的影响, 结果如图 7 所示。随着相互作用时间从 10 min 增加到 30 min, 发光信号逐渐增大。作用时间达到 40 min 后, 发光信号基本保持稳定。故实验选用 40 min 作为相互作用时间。

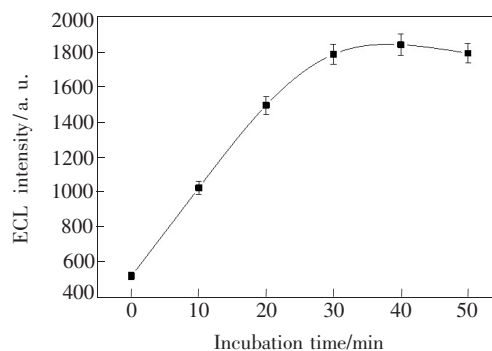


图7 ECL-aptamer 传感器与 ATP 的作用时间对传感器电化学发光信号的影响

Fig. 7 Dependence of the ECL decreased intensity of the ECL-aptamer sensor on the interaction time with ATP

3.5 ATP 的电化学发光检测

在优化实验条件下, 与不同浓度的 ATP 相互作用后, ECL-aptamer 传感器会产生不同强度的电化学发光信号。如图 8 所示, 电化学发光信号强度随 ATP 浓度的增大而增加, 且与 ATP 浓度的对

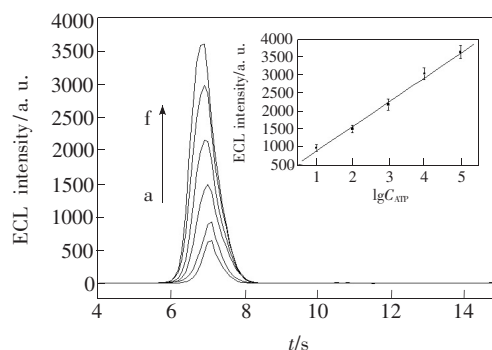


图8 ECL-aptamer 传感器在不同浓度 ATP 溶液孵化后的 ECL 曲线。ATP 溶液浓度为: a ~ f; 0, 0.01, 0.10, 1.0, 10.0, 100.0 nmol/L。插图: ECL 信号强度与 ATP 浓度对数值之间的线性曲线。

Fig. 8 ECL profiles for the ECL-aptamer biosensors after incubated in ATP solutions with different concentrations. Inset: the calibration curve of the dependence of ECL intensity on the logarithm of different concentrations of ATP. The concentrations of ATP were (from a to f) 0, 0.01, 0.10, 1.0, 10.0, 100.0 nmol/L.

数值在 10.0 pmol/L ~ 100.0 nmol/L 范围内呈现良好的线性关系,线性回归方程为 $I_{\text{ECL}} = 201 + 672.8 \lg C$ (C 单位为 pmol/L),相关系数为 0.995 9,检测限达到 5.0 pmol/L。在最佳实验条件下,可以检测到 500 μL 溶液中 5.0 fmol 的 ATP。

实验结果表明,与相关文献结果比较,该 ECL-aptamer 传感器具有更高的灵敏度和更宽的线性范围,如表 1 所示。

表 1 不同检测方法的线性范围和检测限

Tab. 1 Linear ranges and detection limits of different detection methods

检测方法	线性范围	检测限	文献
荧光	2 ~ 18 mmol/L	7.0 $\mu\text{mol/L}$	[27]
荧光	50 pmol/L ~ 1.0 nmol/L	26 pmol/L	[28]
电化学	1 ~ 200 nmol/L	0.6 nmol/L	[29]
电化学	10 nmol/L ~ 100 $\mu\text{mol/L}$	1.9 nmol/L	[30]
电化学发光	10 nmol/L ~ 50 mmol/L	5.3 nmol/L	[31]
电化学发光	0.2 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$	100 nmol/L	[23]
电化学发光	8 ~ 2 000 nmol/L	7.6 nmol/L	[24]
电化学发光	10.0 ~ 1.0×10^5 pmol/L	5.0 pmol/L	本文

3.6 ECL-aptamer 传感器的选择性和再生性

为考察该 ECL-aptamer 传感器对 ATP 的选择性响应,进行了传感器对 CTP(ATP 的类似物)的响应实验。同样条件下,该传感器分别在空白溶液、0.10 nmol/L ATP、0.10 nmol/L CTP 和 0.10 nmol/L 混合溶液(ATP/CTP)中的孵化,并测量 ECL 信号。从图 9 结果中可以看出,只有 ATP 组分使得 ECL-aptamer 传感器产生了明显的电化学发光信号增强,说明该传感器对 ATP 具有良好的选择性。

实验也考察了传感器再生使用的性能。传感器用于检测 100.0 nmol/L ATP 溶液后,用 10.0 mmol/L 的 PBS($\text{pH} = 7.4$)淋洗电极表面,再浸入

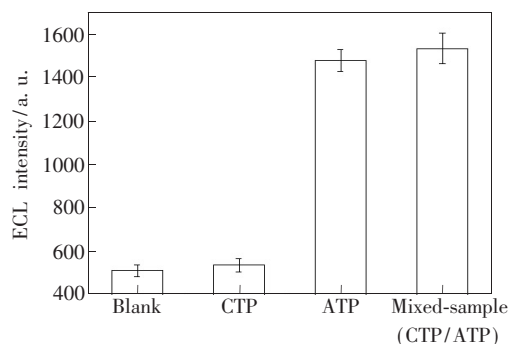


图 9 ECL-aptamer 传感器分别在空白溶液、CTP 溶液、ATP 溶液和混合溶液(CTP/ATP)中孵化后的 ECL 信号强度比较。

Fig. 9 Comparison of the ECL intensity of the ECL-aptamer biosensor when incubated with blank, CTP and mixed-sample(CTP/ATP).

500 μL 0.50 $\mu\text{mol/L}$ 的 aptamer-Fc 溶液(10.0 mmol/L PBS, 0.10 mol/L NaCl, 5.0 mmol/L MgCl_2 , $\text{pH} = 7.4$)中,于 37 $^\circ\text{C}$ 孵化 1 h。所得电极又重新用于 100.0 nmol/L ATP 溶液的检测,ECL 信号可以恢复到原来的 90%。区别于其他类型的传感器,该传感器的再生不需要高温过程。实验结果表明,该传感器具有较好的再生性能。

4 结 论

本文基于 ATP 适配体与 ATP 分子作用后可以显著增强传感器 ECL 信号的性能,利用与 ATP 适配体完全互补且标记联吡啶钉的 DNA 作为传感探针,适配体作为识别元件,构建了一种电化学发光适配体型传感器。该传感器用于 ATP 含量的检测,检测限为 5.0 pmol/L,检测线性范围为 10.0 ~ 1.0×10^5 pmol/L,与已报道结果相比具有更低的检测限和更宽的检测范围。该传感器构建方法为其他基于适配体的电化学发光传感器构建提供了参考。

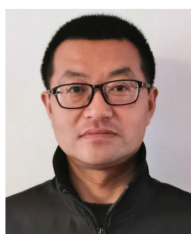
参 考 文 献:

- [1] KRICKA L J, STANLEY P E. Electrochemiluminescence: 1996-1998 [J]. *Luminescence*, 1999, 14(2): 113-118.
- [2] RICHTER M M. Electrochemiluminescence (ECL) [J]. *Chem. Rev.*, 2004, 104(6): 3003-3036.
- [3] TUERK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. *Science*, 1990, 249(4968): 505-510.
- [4] YANG Q, GOLDSTEIN I J, MEI H Y, et al. DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95(10): 5462-5467.
- [5] 杜斌,童朝阳,刘志伟,等. 基于适配体-表面等离子共振的生物传感技术及应用 [J]. *发光学报*, 2017, 38(8):

- 1039-1046.
- DU B, TONG Z Y, LIU Z W, *et al.*. Research and application of biosensing technology based on aptamer-surface plasmon resonance [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2017, 38(8):1039-1046. (in Chinese)
- [6] NIE Y M, YUAN X D, ZHANG P, *et al.*. Versatile and ultrasensitive electrochemiluminescence biosensor for biomarker detection based on nonenzymatic amplification and aptamer-triggered emitter release [J]. *Anal. Chem.*, 2019, 91(5):3452-3458.
- [7] JIANG X Y, WANG H J, WANG H J, *et al.*. Electrochemiluminescence biosensor based on 3-D DNA nanomachine signal probe powered by protein-aptamer binding complex for ultrasensitive mucin 1 detection [J]. *Anal. Chem.*, 2017, 89(7):4280-4286.
- [8] WU M S, YUAN D J, XU J J, *et al.*. Sensitive electrochemiluminescence biosensor based on Au-ITO hybrid bipolar electrode amplification system for cell surface protein detection [J]. *Anal. Chem.*, 2013, 85(24):11960-11965.
- [9] JIANG X Y, WANG H J, WANG H J, *et al.*. Signal-switchable electrochemiluminescence system coupled with target recycling amplification strategy for sensitive mercury ion and mucin 1 assay [J]. *Anal. Chem.*, 2016, 88(18):9243-9250.
- [10] HAN Z L, SHU J N, LIANG X, *et al.*. Label-free ratiometric electrochemiluminescence aptasensor based on nanographene oxide wrapped titanium dioxide nanoparticles with potential-resolved electrochemiluminescence [J]. *Anal. Chem.*, 2019, 91(19):12260-12267.
- [11] XIA H, LI L L, YIN Z Y, *et al.*. Biobar-coded gold nanoparticles and DNAzyme-based dual signal amplification strategy for ultrasensitive detection of protein by electrochemiluminescence [J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, 7(1):696-703.
- [12] SHAO K, WANG B R, YE S Y, *et al.*. Signal-amplified near-infrared ratiometric electrochemiluminescence aptasensor based on multiple quenching and enhancement effect of graphene/gold nanorods/G-quadruplex [J]. *Anal. Chem.*, 2016, 88(16):8179-8187.
- [13] LIU J Q, HE D G, LIU Q Q, *et al.*. Vertically ordered mesoporous silica film-assisted label-free and universal electrochemiluminescence aptasensor platform [J]. *Anal. Chem.*, 2016, 88(23):11707-11713.
- [14] WANG C Q, QIAN J, WANG K, *et al.*. Nitrogen-doped graphene quantum dots@ SiO₂ nanoparticles as electrochemiluminescence and fluorescence signal indicators for magnetically controlled aptasensor with dual detection channels [J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, 7(48):26865-26873.
- [15] GE J J, ZHAO Y, LI C L, *et al.*. Versatile electrochemiluminescence and electrochemical “On-Off” assays of methyltransferases and aflatoxin B1 based on a novel multifunctional DNA nanotube [J]. *Anal. Chem.*, 2019, 91(5):3546-3554.
- [16] ZHAO M, CHEN A Y, HUANG D, *et al.*. MoS₂ quantum dots as new electrochemiluminescence emitters for ultrasensitive bioanalysis of lipopolysaccharide [J]. *Anal. Chem.*, 2017, 89(16):8335-8342.
- [17] GUO Y S, SHANG X X, LIU F, *et al.*. Novel enhancer for luminol-AuNP electrochemiluminescence and decoration on RNA membranes for effective cytosensing [J]. *ACS Appl. Bio Mater.*, 2018, 1(5):1647-1655.
- [18] JIE G F, WANG L, YUAN J X, *et al.*. Versatile electrochemiluminescence assays for cancer cells based on dendrimer/CdSe-ZnS-quantum dot nanoclusters [J]. *Anal. Chem.*, 2011, 83(10):3873-3880.
- [19] ZHOU B, QIU Y Y, WEN Q Q, *et al.*. Dual electrochemiluminescence signal system for *in situ* and simultaneous evaluation of multiple cell-surface receptors [J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, 9(3):2074-2082.
- [20] SHI H W, ZHAO W, LIU Z, *et al.*. Temporal sensing platform based on bipolar electrode for the ultrasensitive detection of cancer cells [J]. *Anal. Chem.*, 2016, 88(17):8795-8801.
- [21] GAO H F, WANG X F, LI M, *et al.*. Ultrasensitive electrochemiluminescence aptasensor for assessment of protein heterogeneity in small cell population [J]. *ACS Appl. Bio Mater.*, 2019, 2(7):3052-3058.
- [22] LEI Y M, HUANG W X, ZHAO M, *et al.*. Electrochemiluminescence resonance energy transfer system: mechanism and application in ratiometric aptasensor for lead ion [J]. *Anal. Chem.*, 2015, 87(15):7787-7794.
- [23] HU L Z, BIAN Z, LI H J, *et al.*. [Ru(bpy)₂dppz]²⁺ electrochemiluminescence switch and its applications for DNA interaction study and label-free ATP aptasensor [J]. *Anal. Chem.*, 2009, 81(23):9807-9811.
- [24] LIU Y T, LEI J P, HUANG Y, *et al.*. “Off-On” electrochemiluminescence system for sensitive detection of ATP *via* target-induced structure switching [J]. *Anal. Chem.*, 2014, 86(17):8735-8741.
- [25] YAO W, WANG L, WANG H Y, *et al.*. An aptamer-based electrochemiluminescent biosensor for ATP detection [J].

Biosens. Bioelectron., 2009, 24(11):3269-3274.

- [26] YAO W, WANG L, WANG H Y, *et al.*. An electrochemiluminescent DNA sensor based on nano-gold enhancement and ferrocene quenching [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2013, 40(1):356-361.
- [27] ZHANG B Z, WEI C Y. The sensitive detection of ATP and ADA based on turn-on fluorescent copper/silver nanoclusters [J]. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, 412(11):2529-2536.
- [28] XUE N, WU S J, LI Z B, *et al.*. Ultrasensitive and label-free detection of ATP by using gold nanorods coupled with enzyme assisted target recycling amplification [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2020, 1104:117-124.
- [29] LI X, YANG J M, XIE J Q, *et al.*. Cascaded signal amplification *via* target-triggered formation of aptazyme for sensitive electrochemical detection of ATP [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2018, 102:296-300.
- [30] WU L, ZHANG X H, LIU W, *et al.*. Sensitive electrochemical aptasensor by coupling “signal-on” and “signal-off” strategies [J]. *Anal. Chem.*, 2013, 85(17):8397-8402.
- [31] HUANG Y, LEI J P, CHENG Y, *et al.*. Target-assistant Zn^{2+} -dependent DNAzyme for signal-on electrochemiluminescent biosensing [J]. *Electrochim. Acta*, 2015, 155:341-347.



姚武(1968 -),男,安徽黄山人,博士,教授,2009年于安徽师范大学获得博士学位,主要从事药物分析和生物传感器方面的研究。
E-mail: yaowu92@sohu.com