

可用于食品安全检测的电化学核酸传感器研究初探

高铭徽, 赵利霞* (中国科学院生态环境研究中心环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085)

摘要 [目的] 研究电化学生物传感器在食品安全检测的应用, 构建电化学 DNA 生物传感器。[方法] 在氧化铟锡电极上引入环氧硅烷化试剂, 与氨基化寡核苷酸反应, 共价固定核酸探针, 用电化学方法和 X 射线光电子能谱(XPS)进行表征。[结果] 5 mmol/L 铁氰化钾 $K_3Fe(CN)_6$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 三联吡啶钉 $Ru(bpy)_3^{2+}$ 溶液的电化学循环伏安法扫描表明氧化铟锡(ITO)电极成功修饰。0.5 cm^2 电极上铺展 10 μl 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 寡核苷酸, 固定总量为 4 pmol, 固定产率为 8%。XPS 验证了电化学试验结果, Si2p 和 N1s 特征峰强度分别增加了 38.89%、16.67%。[结论] 共价固定得到的 DNA 传感器基底表面, 可以提高探针的牢固度及耐用性, 稳定性好, 具灵活性, 杂交活性高, 易于再生, 能被广泛用作环境监测、食品分析的生物传感器基底电极。

关键词 生物传感器; DNA 固定; 食品安全; 电化学

中图分类号 TS201.6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)28-13451-02

Preliminary Study on Electrochemical DNA Biosensor Applied for Food Safety Inspection

GAO Ming-hui et al (State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085)

Abstract [Objective] The paper aimed to study on Electrochemical DNA Biosensor applied for the food safety inspection, and electrochemical DNA biosensor was established. [Method] Introducing epoxy silanization reagent at the electrode of tin-topped indium oxide (ITO), reacting of amination oligonucleotide, nucleic acid probe was covalently immobilized, electrochemical method and x-ray photoelectron spectroscopy (XPS) were characterized. [Result] The electrochemistry cyclic voltammetry of solution with 5 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ and 50 $\mu\text{mol/L}$ $Ru(bpy)_3^{2+}$ scan showed that the epoxy group reagents can be modified into ITO electrode successfully. 10 μl 0.5 $\mu\text{mol/L}$ oligonucleotide was spread at the 0.5 cm^2 electrode, amino functionalized oligonucleotide, the total amount was about 4 pmol, the immobilization rate was 8%. X-ray electron spectroscopy complemented the electrochemical detection, the intensity of the peak of Si2p and N1s had been increased by 38.89%、16.67%. [Conclusion] The covalent DNA immobilization method was stable and robust, and easy to hybridize with its complementary target. The DNA biosensor can be widely used in environmental monitoring and food safety analysis.

Key words Biosensor; DNA immobilization; Food safety analysis; Electrochemistry

生物传感器特异性好、分析速度快、成本低, 在食品安全检测领域有着重要的应用价值。食品安全问题主要集中在转基因食品潜在危害、微生物危害、化学性危害、生物毒素、食品掺假等方面。目前用于食品安全检测的标准方法精确, 测定结果可靠, 同时也存在着检测时间较长、过程繁琐、成本高等不足。因此, 迫切需要研究和开发一些快速、方便、可靠的食品安全检测技术。电化学生物传感器分析技术具有选择性好、灵敏度、分析速度快、成本低、能在线检测等优点, 它作为一种检测手段已经成为食品安全检测的重要发展趋势^[1-4]。而构建电化学生物传感器的关键步骤是实现基底电极的固定。化学键共价法固定牢靠、稳定、便于使用。笔者采用化学共价法固定了 DNA, 成功制备了电化学 DNA 生物传感器的基底电极。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 CHI440A 电化学工作站 - Ag/AgCl 参比电极, Pt 对电极(上海辰华); 纯水仪(Biocel); 电热恒温鼓风干燥箱马弗炉(天津中环实验电炉有限公司); TS-1 型脱色摇床(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 空气等离子体(南京苏曼电子有限公司); pH5-3C 型精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司); 移液枪(德国 Eppendorf 公司); 9 cm 玻璃表面培养皿; 20 ml 玻璃移液管; 密封盒。3-(2, 3 环氧丙氧)丙基三甲氧基硅烷(Sigma Aldrich, USA); 寡核苷酸序列: 5'-NH₂-TTTTTTTTTTCGGGTAACGTCAATATTAACCTTA-CTCCC-3' (简称 NH₂-oligo)(上海英骏生物技术公司); 三联

吡啶钉; 磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钠缓冲液(150 mmol/L, pH 值 8.5); 铁氰化钾; 蒸馏甲苯; 丙酮; 异丙醇; 氧化铟锡(ITO)导电玻璃(深圳伟光公司)。

1.2 试验方法 电极的制备: 氧化铟锡(ITO)电极切割成 0.5 cm × 2.5 cm 的小片, 用家用洗涤剂、丙酮、异丙醇超声洗涤 10 min; 在干燥箱里干燥, 等离子体表面处理预氧化后, 浸没在浓度为 1% 的 3-甲基环氧硅烷化的甲苯溶液中, 在培养皿里均匀摇动反应 1 h。反应后的电极清洗干净, 用氮气吹干。环氧硅烷化试剂修饰后的电极, 简称为 ITO/GOP。将 10 μl DNA, 均匀铺展在电极上, 置于密封湿盒中, 室温反应 30 min, 再置于 80 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。清水洗干净, 氮气吹干。寡核苷酸固定后的电极, 简称为 ITO/GOP/ NH₂-oligo。

2 结果与分析

2.1 ITO/GOP 电极的电化学试验和 X 射线光电子能谱试验 经过等离子体处理的 ITO 电极, 表面有羟基(-OH)。浸没在含有环氧硅烷化试剂的反应溶液中, ITO 电极上形成硅羟基, 随后环氧基团()与氨基(-NH₂)修饰的寡核苷酸共价结合, 从而固定核酸探针(图 1)。ITO 电极化学反应前后, 会影响铁氰化钾的电化学活性。由图 2 可知, 铁氰化钾在电极表面的可逆的氧化还原峰的电位和大小、峰电流的大小都发生了变化, 说明修饰电极影响了铁氰化钾在表面的电化学过程, 环氧硅烷化试剂在 ITO 表面形成分子修饰膜。由图 3 可知, 和 3-甲基环氧硅烷化试剂反应后, 电极上会引入硅(Si)元素, Si2p 特征峰强度增加了 38.89%, 说明 ITO 修饰电极已成功制备。

2.2 ITO/GOP/NH₂-oligo 电化学试验和 X 射线光电子能谱试验 电活性物质三联吡啶钉溶液中, 核酸探针固定后, 溶液中三联吡啶钉 $Ru(bpy)_3^{2+}$ 与 DNA 碱基中鸟嘌呤 G 发

作者简介 高铭徽(1982-), 女, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 研究方向: 生物传感器及生物检测。* 通讯作者。

收稿日期 2009-05-26

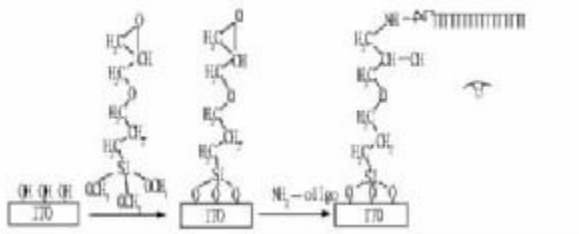


图1 ITO/GOP 与 ITO/GOP/ NH₂-oligo 结构示意图

Fig.1 Structural diagram of ITO/GOP and ITO/GOP/ NH₂-oligo

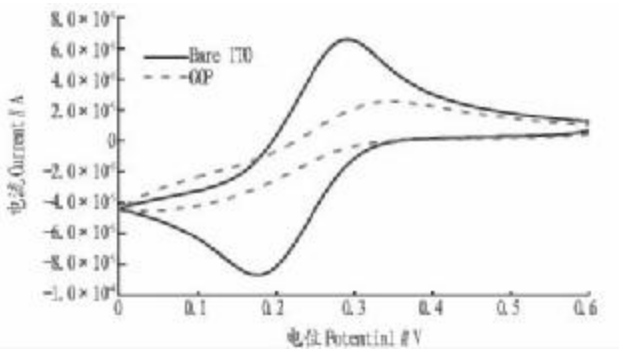


图2 GOP 修饰电极在 5 mmol/L 铁氰化钾 K₃Fe(CN)₆ 中的循环伏安图

Fig.2 Cyclic voltammogram of modified electrode in 5mM K₃Fe(CN)₆

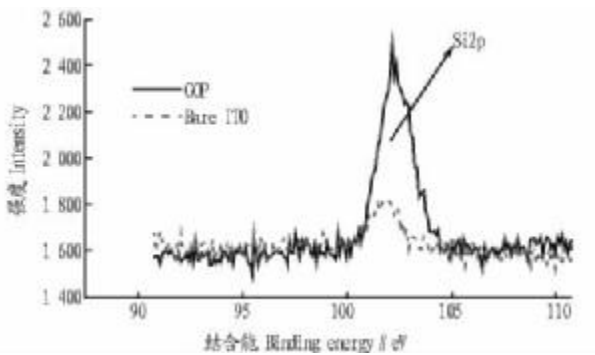


图3 GOP 修饰电极的 XPS 图谱

Fig.3 XPS spectra of GOP modified electrode

生氧化催化介导作用,加速了电极表面的电子传递过程,钌配合物的电化学信号会升高^[5]。从图 4 中可以看出,ITO/GOP 电极相对于未修饰 ITO 电极,在 Ru(bpy)₃²⁺ 的电流略有下降,这是 GOP 修饰电极影响电活性物质的电化学过程所致;核酸探针修饰的电极,相对于未修饰电极,氧化电流有较高的上升,且在 +1.0 V 处,出现 1 个新峰。该现象表明,核酸探针成功地固定至电极表面,因此得到增加的氧化电流。至此,电化学 DNA 生物传感器的基底电极 ITO/GOP/ NH₂-oligo 成功制备。

为了进一步确认核酸探针修饰到了 ITO/GOP 电极上,笔者进行了 X 光电子能谱分析(XPS)。由于核酸中含有 N 元素,因此,ITO/GOP/ NH₂-oligo 的特征元素是 N。从图 5 可以明显看出,相比于环氧 GOP 修饰的电极,固定了 NH₂-oligo 的电极上有显著的 N1s 的峰, N1s 特征峰强度增加了 16.67%,这说

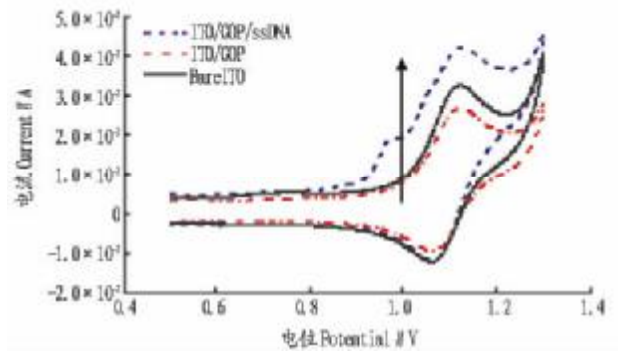


图4 10 μmol/L Ru(bpy)₃²⁺ 在裸 ITO、ITO/GOP、ITO/GOP/ NH₂-oligo 上的循环伏安图

Fig.4 Cyclic voltammogram of 10 μmol/L Ru(bpy)₃²⁺ at unmodified ITO、ITO/GOP、ITO/GOP/ NH₂-oligo

明核酸探针成功固定在 GOP 修饰电极表面,这与上述电化学检测方法得到的结论一致,实现了电化学 DNA 生物传感器基底电极的构建。

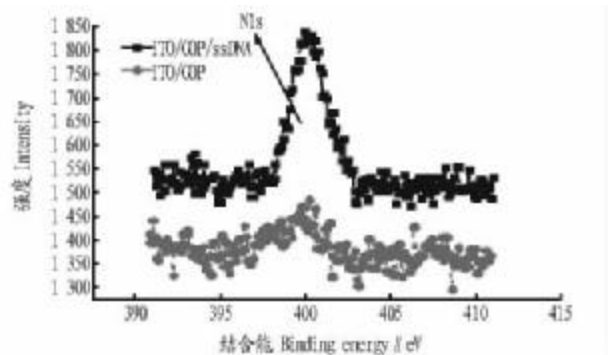


图5 ITO/GOP/ NH₂-oligo 修饰电极的 XPS 图谱

Fig.5 XPS spectra of ITO/GOP/ NH₂-oligo modified electrode

3 结论

(1) 铁氰化钾的电化学循环伏安图说明修饰了环氧硅烷化电极影响了电化学活性物质在表面的电化学过程;通过 ITO/GOP 的 XPS 光电子能谱,修饰电极上引入了三甲基环氧硅烷化试剂,说明环氧硅烷化试剂成功修饰到 ITO 表面; ITO/GOP 电极制备成功。

(2) 三联吡啶钌催化核酸中的鸟嘌呤 G 得到的催化电流,表明在 GOP 修饰电极上成功地固定了核酸探针;同时, ITO/GOP/ NH₂-oligo 的 X 射线光电子能谱上 N1s 特征峰表明,电极上成功固定了核酸。这说明电化学 DNA 生物传感器的基底表面已经成功构建。

参考文献

[1] 许春向. 生物传感器材及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 1993: 1-9.
 [2] ALOCILJA E C, RADKE S M. Market analysis of biosensors for food safety [J]. Biosens Bioelectron, 2003, 18: 841-846
 [3] ADNYI N, VARADI M, KIM N, et al. Development of new immunosensors for detection of contaminants in food [J]. Curr Appl Phys, 2006, 6: 279-286.
 [4] ISUMI K. Biosensor for environmental monitoring [J]. Chemical Sensors, 1991, 7(1): 2-8.
 [5] GORE M R, SZALAI V A, ROPP P A, et al. Detection of attomole quantities of DNA targets on gold microelectrodes by electrocatalytic nucleobase oxidation [J]. Anal Chem, 2003, 75: 6586-6592.