

CdS-Modified DNA Sensor for Direct  
Signal-Amplified Sensing of DNA Hybridization\*XIA Qing<sup>1,2</sup>, LIU Jin-huai<sup>1,2\*</sup>

(1. Laboratory of Bionic and Nanotechnology, Institute of Intelligent Machines, Chinese Academy of Science, Hefei 230031, China; 2. Department of Automation, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

**Abstract:** The CdS nanospheres with special walnut-like surface are prepared by solvothermal method and characterized first, then the mercapto group-linked probe DNA was covalently immobilized onto the CdS layer and exposed to ODN target for hybridization. Sensitive electrical readouts coupled with Cyclic Voltammogram (CV) and Differential Pulse Voltammogram (DPV) techniques show significant increased responses. The sensor is able to robustly discriminate the DNA hybridization responses with good sensitivity and stability and the selectivity of the sensor is tested using a series of matched and certain-point mismatched sequence with concentration grads ranging from  $10^{-6}$   $\mu$ M to  $10^1$   $\mu$ mol/L. The peak values are almost linear with the minus logarithm of target DNA concentrations with detection limit  $<1$  pmol/L. The optimized target DNA concentration at  $10^1$   $\mu$ mol/L for the signal amplification is obvious.

**Key words:** DNA sensor; CdS nanoparticles; cyclic voltammogram; differential pulse voltammogram

EEACC: 7230J

基于特殊形貌 CdS 纳米颗粒修饰的  
DNA 传感器在 DNA 杂交信号检测中的应用\*夏青<sup>1,2</sup>, 刘锦淮<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国科学院合肥智能机械研究所仿生纳米传感器实验室, 合肥 230031; 2. 中国科学技术大学自动化系, 合肥 230026)

**摘要:** 用水热法制备出具有特殊核桃状外表的纳米小球修饰在玻碳电极的表面, 通过 5'端巯基修饰的探针 DNA 共价结合在 CdS 层敏感层上形成共聚物, 再与靶 DNA 杂交, 利用循环伏安法(CV)和差分脉冲伏安法(DPV)研究修饰电极的电化学行为。修饰 CdS 纳米颗粒的电极检测得到的 DNA 杂交信号有明显的增强, 峰电流强度值与靶 DNA 浓度值的负对数具有较好的线性关系, 信号增强的最大值在靶 DNA 浓度为  $10^1$   $\mu$ mol/L 时得到。传感器灵敏度提高, 检测下限可达 1 pmol/L 以下。

**关键词:** DNA 传感器; CdS 纳米颗粒; 循环伏安法; 差分脉冲伏安法

中图分类号: TP212.2

文献标识码: A

文章编号: 1004-1699(2008)08-1307-07

近年来, 人类基因学研究的迅速发展迫切需要制备出快速, 便携, 灵敏的生物传感器来实现对基因表述过程的实时监测和对基因表述产物性质的测定。有效的 DNA 信号传感系统可以应用于生物医学工程, 疾病预防与治疗, 新型食品的研发, 环境监测与治理等多个研究领域, 因此受到越来越多化学, 生物, 电子等诸多学科科研工作者的关注。前人研

究表明: 具有较大的有效比表面积和大量活性催化位点的功能化纳米电极材料的采用是提高电极催化活性和检测灵敏度的有效手段。CdS 作为典型的 II-VI 族半导体, 具有电、光、磁和催化方面的优良性质, 可以作为传感器信号增强的载体材料。国内外研究多采用诸如放射化学, 比色法, 声学, 化学发光<sup>[1-4]</sup>和表面等离子体共振<sup>[5]</sup>等作为传感器的采集

**基金项目:** 国家重点基础发展计划(973 子项目资助)(2007CB93660); 国家自然科学基金一重点基金资助(10635070); 国家自然科学基金资助(60574094, 60574095)

**收稿日期:** 2008-01-16 **修改日期:** 2008-04-11

信号手段。目前,由生物化学,分析化学和电子学等多学科技术交叉产生的,可一步完成且无需标记的电化学基因检测方法成为研究的热点。其中电化学检测手段因其价格便宜,结果可靠,灵敏度高,检测限低,可微型化的优点正引起人们的广泛关注<sup>[6]</sup>。

DNA 生物传感器<sup>[7-9]</sup> 是进行核酸的结构分析和检测的重要手段,主要依赖于探针与目标分析物之间高特异性的生物识别过程<sup>[10]</sup>,即 DNA 分子间的特异性互补配对规律,实现对特定序列 DNA 的快速识别和检测,通过与能量转换器的整合或耦联,提供关于氧化还原标记物的可测信号输出<sup>[11]</sup>。其中可采用的氧化还原标记物包括金属络合物<sup>[12]</sup>,有机多层聚合物<sup>[13]</sup>,碳纳米管<sup>[14]</sup>,酶标记物<sup>[15]</sup>等等。就目前研究水平而言,如何实现能量转换和信号增强<sup>[16]</sup>仍是传感器领域中的前沿性课题。

Wang<sup>[17]</sup>和其它一些实验小组<sup>[18]</sup>利用功能导电聚合物以及聚吡咯薄膜修饰电极,固定纳米材料实现信号增强。本文水热法制备出 CdS 纳米球,因其核桃状外表具有巨大的比表面积的特性,可通过滴涂,使其直接牢固的吸附在玻碳电极表面。再利用探针 DNA 末端修饰的巯基与 CdS 之间的共价作用形成 CdS-寡链脱氧核苷酸共聚物,将探针 DNA 结合到电极表面,以实现与靶 DNA 的杂交。通过未用 CdS 修饰的裸玻碳电极与 CdS 修饰的功能化电极的电化学检测信号之间的比较,得到后者明显的信号增强效果。大量实验进一步论证了与靶 DNA 浓度相关的信号变化的产生机理。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

氯化镉 ( $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ ), 硫代硫酸钠 ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), 聚四乙烯基吡咯烷酮 (PVP, K30) 和无水乙醇均购于国药集团化学试剂有限公司 (SCRC), 试剂均为分析纯, 所用水为二次蒸馏水。各种特定序列的寡链脱氧核苷酸由上海生工生物工程公司定制。序列信息如下:

• 探针 DNA 序列

5'-SH-AGGCTCCTGGCGCACT-3'

• 完全配对的靶 DNA 序列

5'-AGTGCGCCAGGAGCCT-3'

• 单位点错配的靶 DNA 序列

5'-AGCGCGCCAGGAGCCT-3'

• 双位点错配的靶 DNA 序列

5'-AGCCCCGCCAGGAGCCT-3'

所有的 DNA 保存在 TE 缓冲液中: 0.1 mol 的

Tris-HCl 缓冲液 + 1.0 mmol 乙二胺四乙酸 (pH 7.6), 不用时冷冻保存。

场发射扫描电镜 (FESEM) (Sirion 2000, FEI, Ltd. USA)。多功能 X 射线衍射仪 (XRD) (X'Pert Pro MPD, Philips, Ltd. Holand)。X 射线源光电子能谱 (XPS) (ESCALAB MK II spectrometer, VG Co., United Kingdom)。LK 2005 电化学工作站 (天津兰科仪器有限公司)。三电极系统: 饱和甘汞电极 (SCE) 为参比电极, 铂片电极为对电极, 玻碳电极为工作电极。

### 1.2 CdS 纳米颗粒的制备

分别称取 0.5 mmol 的  $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$  和 0.5 mmol 的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 加入 30 mL 去离子水搅拌 15 min, 其溶解并分布均匀后, 加入 0.04 g PVP 再搅拌 15 min, 加入一定量的去离子水使得溶液的总体积达到 50 mL, 再搅拌均匀, 密封反应釜在 160°C 下反应 12 h。反应完毕, 自然冷却后分别用去离子水和无水乙醇清洗几次, 得到的沉淀在真空干燥箱内 60°C 干燥 6 h。

### 1.3 电极的预处理及修饰

$\varphi = 3$  mm 的玻碳电极用  $\text{Al}_2\text{O}_3$  粉末 (0.05  $\mu\text{mol/L}$ ) 在麂皮上打磨至光亮, 并依次在无乙醇, 1 mol/L 盐酸溶液, 1 mol/L 丙酮, 去离子水中超声清洗 5 min。用去离子水将上述制得的 CdS 纳米颗粒配制成  $1.16 \times 10^{-6}$  mol/L 溶液, 超声均匀后, 形成黄色透明液体。将 5  $\mu\text{L}$  上述修饰液滴涂到处理好的玻碳电极表面, 静置, 自然晾干。

探针 DNA 的固定: 取 5  $\mu\text{L}$   $10^{-6}$  mol/L 5' 端修饰巯基的探针 DNA 液滴于 CdS 修饰的玻碳电极表面, 20°C 下自然晾干, 用缓冲液漂洗, 20°C 静置晾干。

DNA 杂交: 不同浓度梯度 ( $10^{-6}$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $10^{-5}$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $10^{-4}$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $10^{-3}$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $10^{-2}$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $10^{-1}$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $10^0$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $10^1$   $\mu\text{mol/L}$ ), 不同种类 (完全配对的靶 DNA 序列, 单位点错配的靶 DNA 序列, 双位点错配的靶 DNA 序列) 的靶 DNA 液滴于上述电极表面, 20°C 下反应 2 h 后, 用 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液漂洗 3 s, 去除未杂交的 DNA 得到一系列样品。

电化学检测: 循环伏安法在 0.1 mol/L PBS + 0.1 mol/L NaCl 缓冲液 (pH 7.0) 中进行, 0.01 mol/L  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  作为氧化还原指示物。起始电位为 -0.5 V, 终止电位为 1.0 V (vs. Ag/AgCl), 扫描速度为 50 mV/s。差分脉冲伏安法在相同的环境下进行测定, 电势区间为 0.2~0.9 V,

脉冲幅度为 25 mV, 脉冲宽度为 60 ms, 扫描速度为 20 mV/s。

通过更新玻碳电极表面, 重复上述处理步骤进行多次重复实验。图 1 是实验过程的模式图, 通过 CdS 对电极的修饰导致了 DNA 杂交电化学信号的增强。

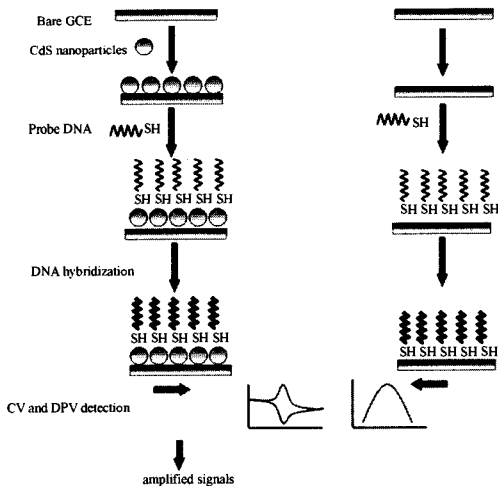


图 1 CdS 修饰电极检测 DNA 杂交过程的传感器响应。(左)杂交进行前,玻碳电极在与靶 DNA 杂交前修饰一层 CdS-寡链脱氧核苷酸共聚物,再与靶 DNA 杂交。(右)裸电极电化学测定靶 DNA 与探针寡链核苷酸的杂交信号。

## 2 结果与讨论

### 2.1 CdS 纳米颗粒和以之构建的 DNA 传感器的表征

前人曾经在溶液中成功地使硫代乙二酸通过巯基结合在 CdS 纳米颗粒表面, 再与 5' 端修饰氨基的探针 DNA 通过共价键形成 CdS-DNA 共聚物<sup>[19]</sup>。由于本文合成的 CdS 纳米颗粒特殊的表面特性, 可令其有效地吸附在预处理后的裸电极表面, 且不易洗脱。在此基础上实现 DNA 杂交检测, 构造出性能更为优越的 DNA 传感器。

图 2 为利用 XRD 研究 CdS 纳米晶粒的晶体结构、结晶性能和取向生长。在本实验中, 水热法合成的 CdS 纳米晶粒是六角纤锌矿结构, 经过计算, 晶胞常数为  $a = 4.141 \text{ \AA}$ ,  $c = 6.718 \text{ \AA}$ , 与标准卡片 (JCPDS card No. 41-1049) 一致。与标准卡片对照发现: (100), (002), (101), (110), (112), (202) 面的衍射峰分明, 说明颗粒结晶较为完善。其中 (101) 面衍射峰的强度与半高全宽较大, 由结晶时 PVP 覆盖造成的 CdS(101) 面的优势生长和颗粒组成单元较小的晶粒尺寸导致。

由图 3 可见, CdS 纳米颗粒具有均匀的球形有序结构, 颗粒多层排列, 堆积紧密, 直径在 400 nm

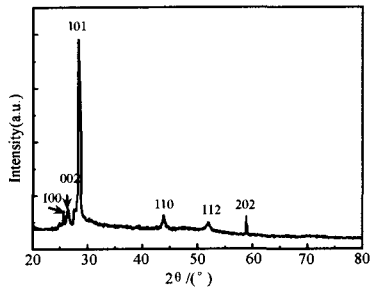
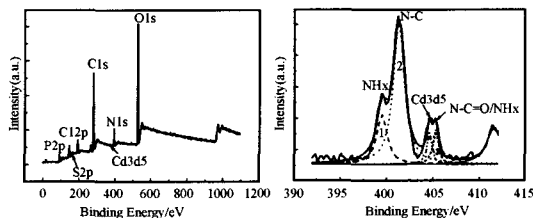


图 2 PVP 浓度为 0.12 g/50 mL, 镉源与硫源的物质的量之比为 1:1, 反应时间为 12 h, 反应温度为 160°C 时制备得到的 CdS 纳米颗粒的 XRD 图

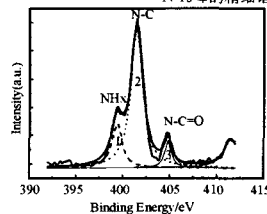
左右。由片状及短棒状结构组成的颗粒核桃褶皱状表面清晰可见, 其外表的多重沟壑极大的提高了颗粒的比表面积, 增加了颗粒表面有效吸附位点, 是一种潜在的优质吸附剂和催化剂, 为其作为一种信号放大材料的应用奠定了基础。



图 3 PVP 浓度为 0.12 g/50 mL, 镉源与硫源的物质的量之比为 1:1, 反应时间为 12 h, 反应温度为 160°C 时制备得到的 CdS 纳米颗粒的 SEM 图



(a) 宽程扫描得到的经过 CdS 修饰和 DNA 杂交的硅片 (110) XPS 图谱 (b) 经过 CdS 修饰的硅片形成 CdS-探针 DNA 共聚物层未与靶 DNA 杂交时样品 N 1s 峰的精修谱线图



(c) 经过 CdS 修饰的硅片形成 CdS-探针 DNA 共聚物层与靶 DNA 杂交后样品 N 1s 峰的精修谱线图

图 4 分峰时采用 Lorentzian 拟合方法

以洁净硅片 (110) 代替经预处理的玻碳电极表面, 重复修饰电极步骤, 制备样品, 并用缓冲液多次漂洗后静置晾干。XPS 测试利用带有铝/镁双阳极 X 射线源, 获得元素内壳层的光电子能谱。高分辨扫描谱和全谱的通过能分别为 20 eV 和 70 eV, 扫描步长

分别为 0.1 eV 和 1.0 eV。图 4(a) 显示的是通过宽程扫描得到的样品的 XPS 图谱。在 168 eV 处的 S 2p 电子结合能和 404.79 eV 处 Cd 3d<sub>5</sub> 的电子结合能强度清晰可见, 意味着经过漂洗, CdS 纳米颗粒仍然较可牢固的吸附。来源于碱基的 N 1s 和 P 2p 的存在间接说明 CdS-探针 DNA 共聚物可以生成, 而对两种元素峰强度进行去卷积、量化处理得到的元素的原子分数在 DNA 杂交前后的数量变化可以反映出 DNA 杂交过程是否进行, 计算表明: N 元素在 DNA 杂交前后的原子分数分别为 6.54% 和 9.24%, N 元素含量的增加说明靶 DNA 成功固定在修饰电极表面, 为 DNA 杂交可以在构建的电极表面进行提供有力的论据。图 4(b), 4(c) 是形成的 CdS-探针 DNA 共聚物层与靶 DNA 杂交前后样品 N 1s 峰的精细谱线图。利用 Lorentzian 多峰拟合方法进行分峰可得到如下结果: ① 电子结合能在 399.34 eV 处的 NH<sub>x</sub> 峰; ② 电子结合能在 401.24 eV 处的 -N-C-峰; ③ 电子结合能在 404.86 eV 处的 N-C=O/NH<sub>3</sub><sup>+</sup> 峰。XPS 测试中可被检测的无损地出射电子仅来自于样品表面 1~4 nm 或 8 nm 处, 这就解释了 DNA 杂交后 Cd 3d<sub>5</sub> 峰消失的原因。

## 2.2 不同靶 DNA 浓度下杂交的电化学响应研究

针对杂交时间的预实验表明: 杂交时间小于 2 h, 峰电流值随杂交时间增加而增加, 说明杂交量增加, 超过 2 h 以后, 杂交量基本达到饱和。裸电极 (曲线 b) 的循环伏安曲线的还原峰电位  $E_{pc}$  和氧化峰电位  $E_{pa}$  为 0.016 V 和 0.452 V。图 5 所示的 CdS 纳米颗粒修饰的玻碳电极 (曲线 a) 的循环伏安曲线的还原峰电位  $E_{pc}$  和氧化峰电位  $E_{pa}$  分别 0.083 V 和 0.379 V, 氧化峰负移, 还原峰正移, 两峰电位差 ( $\Delta E_p$ ) 较裸电极明显减少, 可以看到在 CdS 纳米颗粒修饰的玻碳电极检测到的 DNA 杂交的氧化还原峰电流值相对于裸电极显著增强, 说明电化学反应可逆性良好, 导电性增强, 与前人研究结果一致<sup>[13]</sup>。由此可以判断, 纳米 CdS 的吸附增加了 DNA 在电极上的吸附量, 使 DNA 杂交信号强度有明显增强。设定扫速后, 在测试液中连续扫描 10 圈, 峰形没有发生明显变化, 可见吸附的 CdS 颗粒没有脱落, CdS-探针 DNA 共聚物的固定比较稳定。

实验中与探针 DNA 完全配对的靶 DNA 杂交的循环伏安曲线如图 6(a) 所示, 与探针 DNA 具有单位点误配的靶 DNA 杂交循环伏安曲线如图 6(b) 所示, 双位点误配的靶 DNA 杂交差分脉冲曲线如图 6(c) 所示。在现有的实验条件下, 氧化还原指示剂  $K_3[Fe(CN)_6]$  的氧化峰电流或还原峰电流 (图 6

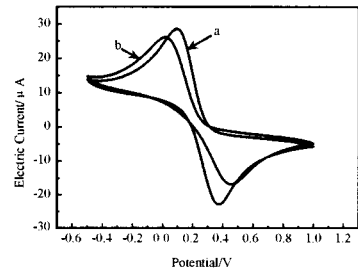


图 5 CdS 修饰玻碳电极循环伏安法检测 DNA 杂交 (曲线 a), 裸电极检测 DNA 杂交 (曲线 b)。用于杂交的靶 DNA 浓度为 0.01  $\mu\text{mol/L}$ , 杂交温度为 20 $^{\circ}\text{C}$ , 杂交时间为 2 h。

(a), (b) 随着靶 DNA 浓度的增加有规律的减小, 峰电流与靶 DNA 浓度在  $10^{-6}$   $\mu\text{mol/L}$  到  $10^{-1}$   $\mu\text{mol/L}$  之间具有良好的线性关系。通常 DNA 固定在电极表面和 DNA 杂交后都会使  $[Fe(CN)_6]$  在电极上的电化学反应受阻, DNA 的磷酸基骨架是带负电荷, 与  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  相互排斥。因此, 随着 DNA 的杂交, 在电极表面 DNA 浓度的增加, 相互排斥的作用也越强,  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  的氧化还原电流下降, 这在相关文献中有报道<sup>[12-13]</sup>。完全配对 (图 6(a)) 的 DNA 杂交循环伏安曲线比不完全配对 (图 6(b)) 曲线, 氧还峰形更加可逆。随着靶 DNA 浓度的升高, 电位正移, 且不完全配对组较完全配对组 DNA 杂交后, 电位偏移更加显著。

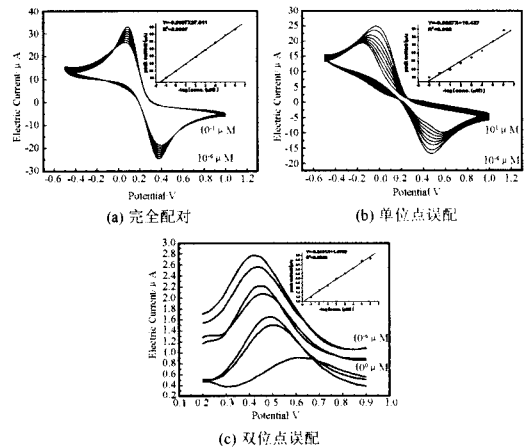


图 6 CdS 修饰玻碳电极循环伏安法和差分脉冲伏安法检测 DNA 杂交信号。用于杂交的靶 DNA 浓度梯度为  $10^{-6}$   $\mu\text{mol/L}$  到  $10^1$   $\mu\text{mol/L}$ , 杂交温度为 20 $^{\circ}\text{C}$ , 杂交时间为 2 h。实验的 3 种靶 DNA 分别为: (a) 完全配对 (b) 单位点误配, (c) 双位点误配。

DNA 电化学探针对于特定序列 DNA 的检测是建立在碱基严格互补配对的基础上的。将待测的 ssDNA 片段固定于玻碳电极表面, 而探针寡聚核苷酸片段的序列是已知的, 只有当待测序列与之完全互补配对时, 它们才能形成牢固的双螺旋链。一旦

存在错配或缺失,都会对双链的形成和稳定性产生极大影响。比较同一靶 DNA 浓度下完全配对组和不完全配对组 CV 曲线(图 6(a),(b))的峰电流值可知,完全配对杂交后的电信号绝对强度和增强幅度大于不完全配对组。图 7 柱状图显示:同一靶 DNA 浓度下,修饰电极信号增强百分比(%)=(CdS 修饰电极的输出信号值-裸电极检测输出信号值)/裸电极检测输出信号值×100%。内插图反映了修饰电极信号增强值(μA)=CdS 修饰电极的输出信号值/裸电极检测输出信号值。在前述的实验条件下,与修饰 CdS 的裸电极检测杂交过程相比,完全配对的杂交过程具有更强的信号响应值(增强绝对值)和信号增强百分比(增强相对值)。三种靶 DNA 信号增强的最大值均在 10<sup>-6</sup> μmol/L 的浓度下获得,随着靶 DNA 浓度的增加,信号增强相对值和绝对值均逐步减小。比较相同靶 DNA 浓度下完全配对的和不完全配对的 DNA 杂交过程的响应曲线的峰电流值大小以及峰形状的差异可知:在 CdS 层上通过单链 DNA 互补配对形成的标准双螺旋结构将更有效的实现电极表面电荷传递, DNA-CdS 共聚体和结合在其表面的探针 DNA 负电性磷酸骨架所带有的更多负电荷,对从缓冲液到玻碳电极表面的自由电荷转移造成的巨大空间位阻,导致电化学响应信号的增强和检测灵敏度的提高。因此该 DNA 杂交电化学传感器的序列选择性可以通过改变靶 DNA 种类和靶 DNA 浓度的系列实验进行研究。

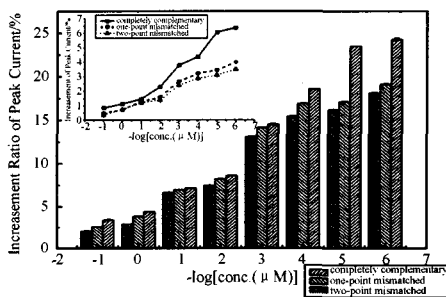


图 7 相对于裸电极检测值,不同浓度三种靶 DNA 杂交循环伏安曲线峰电流的增强百分比。靶 DNA 浓度梯度为 10<sup>-6</sup> μmol/L ~ 10<sup>1</sup> μmol/L。内插图曲线显示峰电流增强的绝对值(μA)。

如图 7 所示:靶 DNA 浓度是影响传感器响应信号增强程度的关键因素,直接影响到在电化学反应中测试液中单位量的氧化还原指示剂物质 K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]可转移的电荷数目。指示剂与 DNA 的结合方式主要有以下两种:① 与 DNA 分子的带负电荷的核糖磷酸骨架之间的静电作用。② 与 DNA 沟槽

的嵌入作用。由 Cottrell 方程,Fick 定律和 Nernst 方程推导可得到下列关系式;

$$i_p = 269A \cdot n^{3/2} \cdot D_R^{1/2} \cdot C_R^* \cdot v^{1/2} \quad (1)$$

$$i_p \propto n \quad (2)$$

其中:*i<sub>p</sub>*峰电流值;*A*电极有效面积(cm<sup>2</sup>);*D<sub>R</sub>*与电极面积相关的扩散系数(cm<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup>);*C<sub>R</sub><sup>\*</sup>*与指示物浓度相关的氧化还原物内在浓度值(mol·dm<sup>-3</sup>);*v*扫描速度(V·s<sup>-1</sup>);*n*测试液中单位量的氧化还原指示剂物质 K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]可通过界面转移的自由负电荷数目(mol<sup>-1</sup>)。从上述关系式中可以得出:将 *AD<sub>R</sub><sup>1/2</sup>C<sub>R</sub><sup>\*</sup>v<sup>1/2</sup>* 视为常数,峰电流值与测试液中单位量的氧化还原指示剂物质 K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]可转移的电荷数目成正比。考虑到制备的 CdS 纳米颗粒的浓度和其在滴涂在电极表面后的浓缩过程,CdS-靶 DNA 共聚物可近似的视作完全覆盖在有效电极表面。由于 CdS 纳米颗粒携带负电荷<sup>[12]</sup>,由此形成的界面相对于裸电极,负电荷密度极大提高,增强了与带负电的氧化还原指示物 K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]由于静电排斥造成的电荷转移位阻,同时 CdS-探针 DNA 共聚物对靶 DNA 杂交配对造成的空间位阻减弱了指示剂与 DNA 沟槽的嵌入作用,以上因素均直接影响指示剂与 DNA 的结合。因此,测试液中电荷通过电极表面时需要克服上述诸多因素造成的位阻,界面电荷密度提高,可与 DNA 结合的氧化还原指示物 K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]减少,测试液中 K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]可通过界面转移的自由负电荷数目明显增加,导致峰电流值的增强。

### 2.3 灵敏度,稳定性和检测限

表 1 检测不同靶 DNA 杂交过程的 DNA 传感器灵敏度与检测限比较

靶 DNA 种类	灵敏度 /μA · (lg μmol/L) <sup>-1</sup>	检测下限/mol/L
无 CdS 标记的靶 DNA	完全配对	1.15 × 10 <sup>-12</sup>
	单位点误配	3.23 × 10 <sup>-12</sup>
	双位点误配	6.78 × 10 <sup>-12</sup>
CdS 标记的靶 DNA	完全配对	6.05 × 10 <sup>-14</sup>
	单位点误配	9.51 × 10 <sup>-14</sup>
	双位点误配	3.39 × 10 <sup>-13</sup>

实验构建的 DNA 传感器基于对可测峰电流值的评估得出的检测下限通过下列数理统计方法计算得到

$$DL = 3.3\delta \cdot S^{-1} \quad (3)$$

其中:*S*为循环伏安法测定中,lg [配对靶 DNA 浓度]与阴极峰电流强度值之间线性回归方程的斜率值(即灵敏度)。δ为回归分析中的标准偏差值。*N*为重复性实验次数(*N*=10)。灵敏度根据裸电极和 CdS 纳米颗粒修饰电极检测的循环伏安曲线阴极峰

(氧化峰)电流值与不同种类靶 DNA 浓度值负对数值之间的线性回归方程的斜率进行估算。从表 1 可知: CdS 修饰电极相比裸电极对 DNA 杂交的信号检测具有更高的灵敏度, 并使检测下限进一步降低(大约降低 19 倍)。CdS 修饰电极后使电极表面物理性质发生改变, 前人研究表明<sup>[12]</sup>, 根据电子跃迁机理, 在 DNA 杂交过程中, CdS 半导体纳米颗粒自身的理化特性阻碍了导带电子向电极表面的跃迁。

在相同的实验条件下, 对同一实验电极表面进行更新, 修饰和信号检测, 重复 20 次以上。与第一次测定相比, 循环伏安曲线和差分脉冲曲线的峰电流强度和峰电流电位值均无明显的偏差。将固定了 CdS 的电极在室温下保存 7 d 后再用于 DNA 杂交测定, 循环伏安曲线阴极峰电流强度值大小约为第一次测定时的 96.1%, 可见制备的电极具有良好的稳定性。

### 3 结论

本文先用水热法合成具有大比表面积, 呈现核桃褶皱状外表花纹的 CdS 纳米颗粒, 将其牢固吸附在玻碳电极表面, 再与经过特殊末端修饰的探针 DNA 共价结合生成 CdS-DNA 共聚物层来修饰电极。XPS 测试表明 CdS 成功的固定在电极表面且不易脱落, 通过氮峰的性质变化论证了 CdS 靶 DNA 与探针 DNA 杂交的可行性。对靶 DNA 浓度相关的电化学实验得到的信号分析可知: 同一靶 DNA 浓度条件下, 相对于裸电极而言, 经过 CdS 修饰后的电极可以得到显著增强的杂交信号, 靶 DNA 浓度为  $10^{-6}$   $\mu\text{mol/L}$  时, 增强相对值可达 23%, 在  $10^{-6}$   $\mu\text{mol/L}$   $\sim 10^1$   $\mu\text{mol/L}$  的浓度范围内, 靶 DNA 浓度越低, 信号增强的程度越大。经过增强后的循环伏安曲线阴极峰电流强度(差分脉冲伏安法中峰电流强度)与靶 DNA 浓度的负对数值之间呈现良好的线性关系。CdS 纳米颗粒兼具的半导体性质与纳米结构的物化性质, 增大了杂交反应的空间位阻以及与负电性的 CdS 与氧化还原指示物  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  之间的电荷斥力, 导致可通过界面转移的电荷量降低, 实现了相对于未修饰 CdS 的裸电极检测的电化学信号增强。该 DNA 传感器的灵敏度提高, 检测下限降低, 性能稳定, 为研究生物分子的相互作用提供了有效的技术手段, 但是该方法对几种 DNA 分子都有响应, 对于如何提高 DNA 杂交检测的特异性将进一步进行研究。

### 参考文献:

[1] Piuino P A E, Krull U J, Hudson R H E, et al. Fiber Optic

Biosensor for Fluorimetric Detection of DNA hybridization[J], *Anal Chim Acta*, 1994, 288: 205-214.

- [2] Okahata Y, Matsunobu Y, Ijiro K, et al. Hybridization of Nucleic Acids Immobilized on a Quartz Crystal Microbalance [J], *J Am Chem Soc*, 1992, 114: 8299-8300.
- [3] Immoos C E, Lee S J, Grinstaff M W, Conformationally Gated Electrochemical Gene Detection [J], *Chem Bio Chem*, 2004, 5: 1100-1103.
- [4] Cao Y C, Jin R, Mirkin C A, Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection [J], *Science*, 2002, 297: 1536-1540.
- [5] Livache T, Guedon P, Brakha C, et al. Polypyrrole Electrospotting for the Construction of Oligonucleotide Arrays Compatible with a Surface Plasmon Resonance Hybridization Detection [J], *Synth Met* 2001, 121: 1443-1444.
- [6] Wang J, Liu G, Merkoci A, Electrochemical Coding Technology for Simultaneous Detection of Multiple DNA Targets [J], *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 3214-3215.
- [7] Palecek E, Jelen F, Electrochemistry of Nucleic Acids and Development of DNA Sensors [J], *Crit Rev Anal Chem*, 2002, 32: 261-270.
- [8] Kerman K, Kobayashi M, Tamiya E, Recent trends in Electrochemical DNA Biosensor Technology [J], *Meas Sci Technol*, 2004, 15: R1-R11.
- [9] Lucarelli F, Marrazza G, Turner A P F, et al. Carbon and Gold Electrodes as Electrochemical Transducers for DNA Hybridization Sensors [J], *Biosens Bioelectron*, 2004, 19: 515-530.
- [10] Willner I, Baron R, Willner B, Integrated Nanoparticle-Biomolecule Systems for Biosensing and Bioelectronics [J], *Biosens Bioelectron*, 2007, 22: 1841-1852.
- [11] Millan K M, Sequence-Selective Biosensor for DNA Based on Electroactive Hybridization Indicators [J], *Anal Chem*, 1993, 65: 2317-2323.
- [12] Peng H, Soeller C, Cannell M B, et al. Electrochemical Detection of DNA Hybridization Amplified by Nanoparticles [J], *Biosens Bioelectron*, 2006, 21: 1727-1736.
- [13] Travas-Sejdic J, Peng H, Cooney R P, et al. Amplification of a Conducting Poly-Based DNA Sensor Signal by CdS Nanoparticles [J], *Curr Appl Phys*, 2006, 6: 562-566.
- [14] Dai P H, Aligned Carbon Nanotube-DNA Electrochemical Sensors [J], *Chem Commun*, 2004, 3: 348-349.
- [15] Takenaka S, Yamashita K, Takagi M, Uto Y, Kondo H, DNA Sensing on a DNA Probe-Modified Electrode Using Ferrocenyl naphthalene Diimide as the Electrochemically Active Ligand [J], *Anal Chem*, 2002, 72: 1334-1341.
- [16] Wang J, Xu D, Kawde A N, et al. Metal Nanoparticle-Based Electrochemical Stripping Potentiometric Detection of DNA Hybridization [J], *Anal Chem*, 2001, 73: 5576-5581.
- [17] Wang J, Jiang M, Fortes A, et al. New Label-Free DNA Recognition Based on Doping Nucleic-Acid Probes within Conducting Polymer films [J], *Anal Chim Acta*, 1992, 402: 7-12.
- [18] Gerard M, Malhotra A, Malhotra B D, Application of con-

ducting polymers to Biosensors [J], Biosens Bioelectron, 2002, 17: 345-359.

[19] Xu Y, Cai H, He P G, et al. Probing DNA Hybridization by

Impedance Measurement Based on CdS-Oligonucleotide Nanoconjugates[J], Electroanalysis, 2004, 16:150-155.



**夏 青**(1984-),女,汉族,中国科学技术大学自动化系硕士研究生,研究方向为检测技术与自动化装置, honeyxia@mail.ustc.edu.cn



**刘锦淮**(1957-),男,汉族,现任中国科学院合肥智能机械研究所研究员、中国科学技术大学博士生导师。近年来主要从事纳米敏感材料、化学与生物传感器、真空微电子传感器件、X-射线检测与处理技术的研究。先后承担了国家重点科技攻关项目,国家“863”高技术计划项目,国家“973”子课题项目,国家自然科学基金面上基金与重点基金 15 项, jhliu@iim.ac.cn