

doi:10.3969/j.issn.1672-5425.2014.09.019

流动注射聚离子敏感膜电极检测三磷酸腺苷

雷佳宏^{1,2}, 丁家旺¹, 秦伟¹

(1. 海岸带环境过程与生态修复重点实验室 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东烟台 264000;

2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:以核酸适体为识别分子、以经鱼精蛋白活化的聚离子敏感膜电极作为信号识别单元,构建了一种检测三磷酸腺苷(ATP)的流动注射分析方法。核酸适体与鱼精蛋白之间的静电作用能够引起电极电位的变化,核酸适体与ATP的相互作用使核酸适体的形态发生一定的变化,这种变化能够阻止核酸适体与鱼精蛋白之间的作用,据此实现对ATP的电位检测。结果表明,在电流为10 nA、载液流速为2.0 mL·min⁻¹、进样量为80 μL的优化条件下,本方法对ATP检测的线性范围为2.0~12.0 μmol·L⁻¹,检出限为1.4 μmol·L⁻¹。本方法亦可用于对其它聚阴离子检测。

关键词:生物传感器;三磷酸腺苷(ATP);流动注射分析;核酸适体;聚离子敏感膜电极

中图分类号:O 657.99

文献标识码:A

文章编号:1672-5425(2014)09-0071-05

三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)广泛存在于各种生物体中,参与蛋白质、糖、脂肪等的代谢过程,并为生物体的生命活动直接提供能量^[1-2];此外,ATP在环境分析、药物分析、临床诊断等方面也有着广泛的应用^[3-4]。因此,对ATP准确快速的检测具有重要意义。

目前,ATP的检测方法有层析法、电泳法^[5]、HPLC法^[6]、质谱法^[7]、荧光素酶法^[8]、生物发光法^[9]以及电化学方法^[10-11]等。其中,电化学方法因具有灵敏度高、易于操作等优点,得到了广泛应用;而核酸适体由于其稳定、价廉,成为快速检测ATP的理想分子识别体。研究发现,核酸适体富含磷酸根基团,能够与聚阳离子鱼精蛋白发生较强的静电作用^[12]。将鱼精蛋白作为指示分子,利用聚离子敏感膜电极能够对核酸适体进行间接电位检测^[11,13]。

聚离子敏感膜电极由Meyerhoff课题组首先提出^[14-15],其原理是聚离子在离子对协助作用下发生相界面转移,并产生类稳态的电位响应^[16-17]。Bakker课题组发展了可逆的聚阳离子敏感膜电极,利用脉冲电流技术调控聚阳离子进入或离开敏感膜,实现了电极的循环使用^[18]。最近,Meyerhoff课题组将基于脉冲

电流调控的聚离子敏感膜电极作为流动注射检测器,实现了对鱼精蛋白和肝素等聚离子的连续检测^[19]。作者所在课题组也建立了基于恒电流调控主离子释放的流动注射聚离子传感模式,并应用于血液中肝素的连续检测。目前,流动注射型聚离子传感模式未见应用于对核酸适体及其目标物质的检测。

本研究首次建立了以核酸适体作为识别分子、以聚离子敏感膜电极作为信号识别单元检测ATP的流动注射分析方法。

1 实验

1.1 试剂与仪器

三磷酸腺苷(ATP)、聚氯乙烯(PVC)、邻硝基苯辛基醚(*o*-NPOE)、四(十二烷基)-四(4-氯苯基)硼酸铵(ETH 500)、二壬基萘磺酸(DNNS, 50%庚烷溶液)、鱼精蛋白、三羟甲基氨基甲烷(Tris), Sigma-Aldrich公司;四氢呋喃(THF)、浓盐酸(HCl)、氯化钠(NaCl)等,中国国药集团。

核酸适体,其碱基序列如下:5'-ACCTGGGG-GAGTATTGCGGAGGAAGGT-3'^[13],上海生物生工有限责任公司。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(41176081,21207156)

收稿日期:2014-04-21

作者简介:雷佳宏(1989-),女,河北石家庄人,硕士研究生,研究方向:电位型生物传感器,E-mail:jhlei@yic.ac.cn;通讯作者:秦伟,博士,研究员,E-mail:wqin@yic.ac.cn。

E2695 型高效液相色谱仪,美国 Waters;760 D 型电化学工作站,上海辰华;PHSJ-3F 型雷磁 pH 计,上海精科;CASCADE-BIO 型超纯水系统,美国颇尔;XS105DU 型精密电子天平,梅特勒-托利多。

1.2 聚离子敏感膜电极的制备与活化

聚离子敏感膜电极的膜组分如下:12.0 mg DNNS、12.0 mg ETH 500、60.0 mg PVC、122.0 mg *o*-NPOE。将称好的膜组分溶于 3.0 mL THF 中并搅拌 2 h,倒入直径 3.6 cm 并固定于玻璃板上的玻璃圆环中,室温下挥干 THF 成膜。用打孔器将膜切割成直径 6.0 mm 的小圆片,并用 THF 粘在 PVC 管的末端,得到聚离子敏感膜电极。

电极内充液与活化液为含有 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 鱼精蛋白的 Tris-HCl 缓冲溶液 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $\text{pH} = 7.4$, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 下同),电极需在活化液中活化 12 h 后使用;电极不用时于 4°C 下保存。

1.3 核酸适体与 ATP 的作用

核酸适体使用前经 95°C 加热 5 min,然后置于冰上 10 min,以保证其构象的柔韧性^[20]。将 $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 核酸适体与一定浓度的 ATP 于 37°C 孵育 30 min,孵育过程中需不断搅拌,以促进核酸适体与 ATP 的作用。

1.4 电位检测

采用流动注射分析与电位法相结合的手段,将电位检测装置固定于流动分析系统中。检测系统包括载流系统、进样系统和电位检测系统。其中,载流系统和进样系统由高效液相色谱仪实现;电位检测系统(图 1)由喷壁式流通池、电化学工作站和三电极体系(工作电极为聚离子敏感膜电极,参比电极为 Ag/AgCl 电极,辅助电极为铂丝电极)构成;载液经载流系统进入

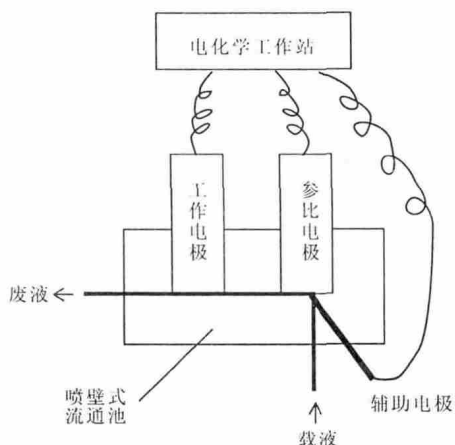


图 1 电位检测系统示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the potentiometric FIA system

流通池,样品溶液经进样系统进入流通池;载液为 Tris-HCl 缓冲溶液,样品溶液为含有一定浓度核酸适体或其与 ATP 的复合物的 Tris-HCl 缓冲溶液,载液与样品溶液流出流通池后即为废液。电位检测采用计时电位模式,设置阳极电流为 10 nA,初始极性为阳性。

2 结果与讨论

2.1 电位检测原理

经鱼精蛋白活化后的聚离子敏感膜电极,在施加恒定阳极电流条件下,电极外表面处的鱼精蛋白会产生一个稳定的由膜相到溶液相的主离子通量,使电极表面鱼精蛋白含量维持在恒定水平,从而得到稳定的基线电位;当分析物(如核酸适体)进入检测池,与电极表面的鱼精蛋白发生作用并形成稳定的复合物,界面处主离子浓度的减少会促使溶液相中的 Na^+ 进入膜相,引起电极电位的变化;当分析物流出检测池后,在阳极电流的作用下,电极表面被消耗的主离子迅速得到补充,使电极电位恢复初始状态,实现电极的在线更新与循环使用。

若核酸适体先与其目标物质(如 ATP)作用形成复合物,以复合物形式存在的核酸适体进入检测池后不再与鱼精蛋白发生相互作用,使峰电位 (E_b) 值降低,可以实现对目标物质的检测。

2.2 检测条件的选择

以 $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 核酸适体为检测对象,对流动注射分析方法的检测条件进行优化。

2.2.1 电流对电极性能的影响(图 2)

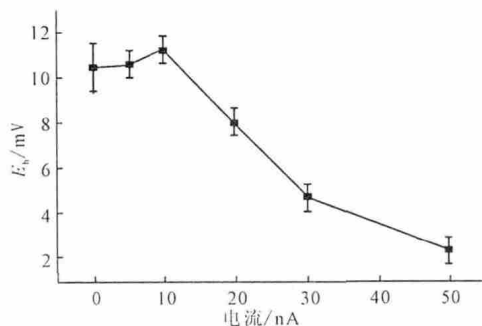


图 2 电流对电位响应的影响

Fig. 2 Effects of the current on potential responses

零电流条件下,鱼精蛋白由内充液扩散至聚离子敏感膜表面的速率较慢,使敏感膜表面的鱼精蛋白含量降低;外加电流的作用能够促进鱼精蛋白在敏感膜内的迁移,使鱼精蛋白在敏感膜表面的含量增加,从而产生更大的峰电位;由于聚离子敏感膜电极的电位响

应校准曲线呈 S 形,当敏感膜表面的鱼精蛋白含量超出一定浓度范围后,电极变得不灵敏,对低浓度待测物质响应较小。由图 2 可知,在 10 nA 电流下,电极表现出最佳的响应性能。因此,电流选用 10 nA。

2.2.2 载液流速对电极性能的影响(图 3)

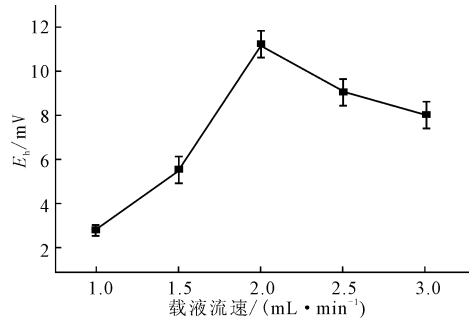


图 3 载液流速对电位响应的影响

Fig. 3 Effects of the flow rate on potential responses

由图 3 可知,随着载液流速的加快,峰电位值升高。这是因为,载液流速加快,水相中以及水-膜界面处聚离子迁移速率加快,促进鱼精蛋白与核酸适体的作用,从而产生较大的峰电位;当流速超过 2.0 mL · min⁻¹时,核酸适体与鱼精蛋白的作用时间缩短,使得峰电位值降低。因此,载液流速选用 2.0 mL · min⁻¹。

2.2.3 进样量对电极性能的影响(图 4)

由图 4 可知,随着进样量的增加,峰电位值升高。

这是因为,进样量增加,敏感膜界面处被消耗的鱼精蛋

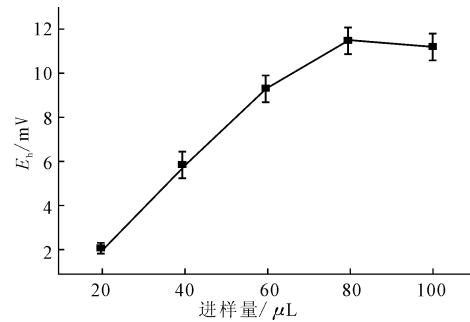


图 4 进样量对电位响应的影响

Fig. 4 Effects of the sample volume on potential responses

白量增加,从而引起峰电位值升高;当进样量达到 80 μL 后,鱼精蛋白的消耗量达到饱和,峰电位值不再升高。因此,进样量选用 80 μL。

2.3 电极对核酸适体的连续检测

在电流 10 nA、载液流速 2.0 mL · min⁻¹、进样量 80 μL 的优化条件下,电极对不同浓度的核酸适体的电位检测结果如图 5 所示。图中 EMF 表示电极电位值, E_b 表示电极电位变化值(即峰高), ΔE_b 表示待测物所引起的电极电位峰高值与背景溶液所引起的电极电位峰高值之差,即扣除背景溶液影响后的峰高值。

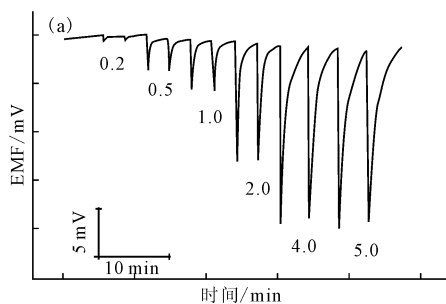


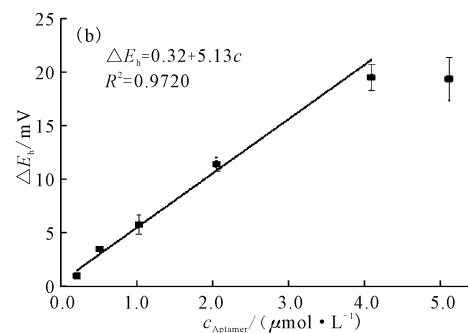
图 5 不同浓度(μmol · L⁻¹)的核酸适体的电位响应

Fig. 5 Potential responses to aptamer at different concentrations(μmol · L⁻¹)

由图 5 可知,在 0.2~4.0 μmol · L⁻¹ 浓度范围内,电极峰电位变化值与核酸适体浓度呈良好的线性关系,线性方程为: $\Delta E_b = 0.32 + 5.13c$ (其中 ΔE_b 表示峰电位变化值, mV; c 表示核酸适体的浓度, μmol · L⁻¹), 相关系数 $R^2 = 0.9720$ 。本方法对 2.0 μmol · L⁻¹ 核酸适体进行测定的相对标准偏差为 1.9% ($n = 5$)。

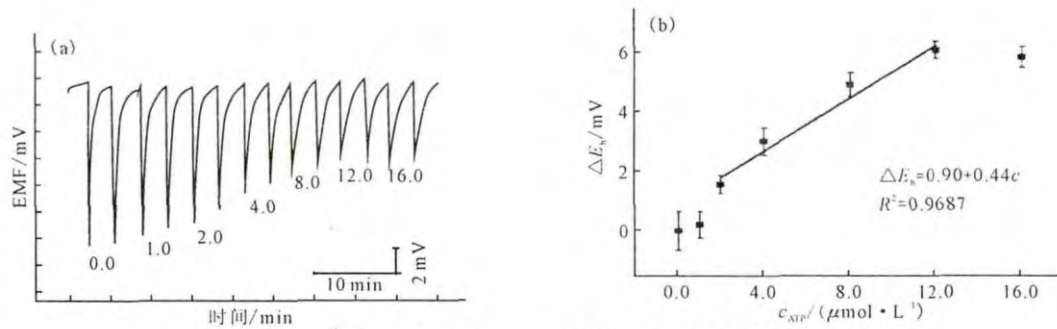
2.4 电极检测 ATP 的工作曲线

以 2.0 μmol · L⁻¹ 核酸适体为指示分子,对不同



浓度的 ATP 进行检测,结果见图 6。

由图 6 可知,在 2.0~12.0 μmol · L⁻¹ 浓度范围内,电极峰电位变化值与 ATP 浓度呈良好的线性关系,其线性方程为: $\Delta E_b = 0.90 + 0.44c$ (其中 ΔE_b 表示峰电位变化值, mV; c 表示 ATP 样品浓度, μmol · L⁻¹), 相关系数 $R^2 = 0.9687$ 。此时,电极的检出限为 1.4 μmol · L⁻¹。本方法对 8.0 μmol · L⁻¹ ATP 进行测定的相对标准偏差为 6.3% ($n = 5$)。

图6 不同浓度($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的ATP的电位响应Fig. 6 Potential responses to ATP at different concentrations($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

3 结论

提出了一种检测ATP的流动注射分析方法。经鱼精蛋白活化的聚离子敏感膜电极被放置在流动分析系统中,可对核酸适体及其目标物质进行电位检测;外加阳极电流能够促进电极表面所消耗的鱼精蛋白的补充,使电极能够快速恢复。本方法的选择性依赖于核酸适体对目标物质的选择性,使用不同的核酸适体作为识别分子,可以实现对不同目标物质的检测。在电流为10 nA、载液流速为 $2.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 、进样量为 $80\ \mu\text{L}$ 的优化条件下,本方法对ATP检测的线性范围为 $2.0\sim 12.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,检出限为 $1.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本方法亦可应用于其它聚阴离子(如肝素、透明质酸钠等)的检测。

参考文献:

- [1] HARDIE D G, HAWLEY S A. AMP-Activated protein kinase: The energy charge hypothesis revisited[J]. *Bioessays*, 2001, 23(12): 1112-1119.
- [2] MANFREDI G, YANG L, GAJEWSKI C D, et al. Measurements of ATP in mammalian cells[J]. *Methods*, 2002, 26(4): 317-326.
- [3] ISHIDA A, YOSHIKAWA T, NAKAZAWA T, et al. Enhanced firefly bioluminescence assay of ATP in the presence of ATP extractants by using diethylaminoethyl-dextran[J]. *Analytical Biochemistry*, 2002, 305(2): 236-241.
- [4] EGUCHI Y, SHIMIZU S, TSUJIMOTO Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis[J]. *Cancer Research*, 1997, 57(10): 1835-1840.
- [5] FU C G, SONG L N, FANG Y Z. Determination of adenosine phosphate by co-electroosmotic capillary electrophoresis with amperometric detection[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 399(3): 259-263.
- [6] KIM J, LEE J. Observation and quantification of self-associated adenosine extracted from royal jelly products purchased in USA by HPLC[J]. *Food Chemistry*, 2011, 126(1): 347-352.
- [7] HUANG Y F, CHANG H T. Analysis of adenosine triphosphate and glutathione through gold nanoparticles assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(13): 4852-4859.
- [8] CRUZ-AGUADO J A, CHEN Y, ZHANG Z, et al. Ultrasensitive ATP detection using firefly luciferase entrapped in sugar-modified sol-gel-derived silica[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(22): 6878-6879.
- [9] KAMIDATE T, YANASHITA K, TANI H, et al. Firefly bioluminescent assay of ATP in the presence of ATP extractant by using liposomes[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(1): 337-342.
- [10] OUYANG H X, LIU Q Y, LIANG A H, et al. Nanocatalytic resonance scattering spectral detection of trace ATP using labeled-free nanosilver as probe[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2011, 69(20): 2493-2498.
- [11] PRIETO M C, MAKI A H, BALHORN R. Analysis of DNA-protamine interactions by optical detection of magnetic resonance[J]. *Biochemistry*, 1997, 36(39): 11944-11951.
- [12] DURUST N, MEYERHOFF M E. Determination of DNA and its binding to protamine using potentiometric polyion sensors[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2006, 602(1): 138-141.
- [13] DING J, CHEN Y, WANG X, et al. Label-free and substrate-free potentiometric aptasensing using polycation-sensitive membrane electrodes[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(4): 2055-2061.
- [14] MA S C, YANG V C, MEYERHOFF M E. Heparin-responsive electrochemical sensor: A preliminary study [J]. *Analytical Chemistry*, 1992, 64(6): 694-697.
- [15] MA S C, YANG V C, FU B, et al. Electrochemical sensor for heparin: Further characterization and bioanalytical applications [J]. *Analytical Chemistry*, 1993, 65(15): 2078-2084.
- [16] FU B, BAKKER E, YUN J H, et al. Response mechanism of polymer membrane-based potentiometric polyion sensors[J]. *Analytical Chemistry*, 1994, 66(14): 2250-2259.
- [17] FU B, BAKKER E, YANG V C, et al. Extraction thermodynamics of polyanions into plasticized polymer membranes doped with lipophilic ion-exchangers: A potentiometric study[J]. *Macromolecules*, 1995, 28(17): 5834-5840.
- [18] SHVAREV A, BAKKER E. Reversible electrochemical detection of nonelectroactive polyions[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(37): 11192-11193.
- [19] BELL-VLASOV A K, ZAJDA J, ELDOURGHAMY A, et al. Polyion selective polymeric membrane-based pulstode as a detector in flow-injection analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86

(8):4041-4046.

matographic assays for thrombin [J]. Analytical Chemistry, 2008,80(19):7586-7593.

[20] ZHAO Q, Li X, SHAO Y H, et al. Aptamer-based affinity chro-

Flow Injection Biosensors for Determination of ATP Based on Polyion-Sensitive Membrane Electrode

LEI Jia-hong^{1,2}, DING Jia-wang¹, QIN Wei¹

(1. Key Laboratory of Coastal Zone Environmental Processes and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264000, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: A flow injection analysis (FIA) system for determination of adenosine triphosphate (ATP) was developed. The polyion-sensitive membrane electrodes were used for potentiometric detection and the aptamers were used for molecular recognition. The electrostatic interaction between aptamer and protamine could cause potential response on the electrodes. Interaction between aptamer and ATP changed the forms of aptamer, which prevented the interaction between aptamer and protamine. Based on that, the concentration of ATP could be determined by potential detection. Results showed that, under optimized conditions (current of 10 nA, flow rate of 2.0 mL · min⁻¹, sample volume of 80 μL), the proposed method showed a good linear relationship to ATP in the concentration range from 2.0 to 12.0 μmol · L⁻¹. The detection limit was calculated to be 1.4 μmol · L⁻¹. This method can also be used for the determination of other targets.

Keywords: biosensor; adenosine triphosphate (ATP); FIA; aptamer; polyion-sensitive membrane electrode

(上接第70页)

[16] WANG C Y, XIANG B R, ZHANG W. Application of two-dimensional near-infrared (2D-NIR) correlation spectroscopy to the discrimination of three species of *Dendrobium* [J]. Journal of Chemometrics, 2009, 23(9): 463-470.

[17] KIM H, KIM D, BANG S Y. Extensions of LDA by PCA mix-

ture model and class-wise features [J]. Pattern Recognition, 2003, 36(5): 1095-1105.

[18] 李玉榕, 项国波. 一种基于马氏距离的线性判别分析分类算法 [J]. 计算机仿真, 2006, 23(8): 86-88.

Rapid Identification of Different Kinds of Chinese Herbs and Processed Products by Near Infrared Spectroscopy and Pattern Recognition Method

YANG Tian-ming, WU Yan, SU Rui, FU Hai-yan, YANG Chen, ZHANG Lu, HUANG Guo-zhen

(College of Pharmacy, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract: Seven kinds of Chinese herbs and processed products were rapidly identified by near infrared diffuse reflectance spectroscopy (NIRDRS) combined with PCA-Mahalanobis distance discriminant analysis. The near infrared diffuse reflectance spectra of seven kinds of Chinese herbs and processed products were pre-processed by multiplicative scatter correction (MSC) and followed by PCA-Mahalanobis distance discriminant analysis treatment. Perfect classification ratio with 100% was obtained for the MSC fingerprint information of the NIRDRS based on PCA-Mahalanobis distance model, which indicated that the model had good classification predictive ability. PCA-Mahalanobis distance discriminant analysis can extract otherness of MSC fingerprint information to identify the different kinds of similar Chinese herbs and processed products as a simple, rapid, accurate and green method.

Keywords: NIR spectroscopy; multiplicative scatter correction; PCA-Mahalanobis distance discriminant analysis; Chinese herbs