

Highly Sensitive Detection of HIV Based on Nafion-AuNPs Composite Film Modified DNA Electrochemical Biosensor

Zhejian Li*, Xuemei Fan, Shumin Wang, Ping Liu, Yimeng Wang, Qian Liu

College of Chemical Engineering and Modern Materials, Shangluo University, Shangluo Shaanxi
Email: *Zhejian2621@163.com

Received: Nov. 4th, 2017; accepted: Nov. 17th, 2017; published: Nov. 27th, 2017

Abstract

AuNPs was immobilized on the glass carbon electrode via the film forming by Nafion. The developed AuNPs/Nafion/GCE electrode was a good platform of DNA immobilization and hybridization. Electrochemical impedance was applied to label-free detection of the target DNA according to the increase of the electron transfer resistance (*Ret*) of the electrode surface after the hybridization of the probe DNA with the target DNA. Under optimal conditions, the DNA biosensor showed a wide linear response to human immunodeficiency virus (HIV) gene in the range of $1.0 \times 10^{-11} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L, with a detection limit of 3.0×10^{-12} mol/L of complementary target.

Keywords

AuNPs, DNA, Electrochemical Impedance, HIV Gene

基于Nafion-AuNPs复合膜的电化学传感器用于HIV基因的高灵敏检测

李哲建*, 樊雪梅, 王书民, 刘萍, 王毅梦, 刘倩

商洛学院化学工程与现代材料学院, 陕西 商洛
Email: *Zhejian2621@163.com

收稿日期: 2017年11月4日; 录用日期: 2017年11月17日; 发布日期: 2017年11月27日

摘要

将合成制备的纳米金粒子(AuNPs), 通过Nafion (全氟代磺酸酯)的成膜效应将纳米金固定在玻碳电极*通讯作者。

文章引用: 李哲建, 樊雪梅, 王书民, 刘萍, 王毅梦, 刘倩. 基于 Nafion-AuNPs 复合膜的电化学传感器用于 HIV 基因的高灵敏检测[J]. 分析化学进展, 2017, 7(4): 228-233. DOI: 10.12677/aac.2017.74030

(GCE)表面,制得的AuNPs/Nafion/GCE修饰电极成为DNA固定和检测的良好平台。以电化学交流阻抗法检测目标DNA,目标DNA的单链与固定于电极表面的单链DNA探针杂交后使电极表面的电子传递电阻增大,以此作为检测信号可以高灵敏度地测定目标DNA。电化学阻抗法检测人类免疫缺陷病毒(HIV)基因片段的线性范围为 $1.0 \times 10^{-11} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L,检测限为 3.0×10^{-12} mol/L。

关键词

纳米金, DNA, 电化学交流阻抗, 人类免疫缺陷病毒基因

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

艾滋病(AIDS),是由人类免疫缺陷病毒(HIV)感染所引起的一种严重的传染性免疫缺陷性疾病。而 HIV 感染的实验室诊断是艾滋病预防控制工作的重要组成部分,因此建立高灵敏度实用的检测方法用于监测、诊断或血液筛查,对控制艾滋病的流行显得尤为重要[1]。目前临床上应用最为普遍的 HIV 血液筛查方法是基于显色反应的 ELISA 法[2],它主要针对血液中的检测蛋白(如:抗原或抗体),由于显色反应的灵敏度有限,其检测 HIV 感染窗口期较长,因此 ELISA 方法显然不能满足现阶段对艾滋病早期筛查的需要。

病毒核酸是 HIV 感染后出现最早的检测指标。随着分子生物学技术的应用,核酸检测法已成为 HIV 感染早期检测的重要手段。目前常用的测定方法有逆转录 PCR 实验(RT-PCR)、核酸序列扩增实验(NASBA)、分支 DNA 杂交实验等[3] [4],但检测过程中仍有操作温度要求苛刻,操作复杂,扩增效率高但易发生错配等缺点。电化学 DNA 生物传感器是进行 DNA 结构分析和检测的重要手段[5] [6]。它具有较高的灵敏度,快速、操作简便、无污染的特点。因此构制高灵敏免标记型的 DNA 电化学生物传感器仍是当前的研究热点。

金纳米粒子(AuNPs)具有较高的电子密度、介电特性及与生物分子的良好结合性且不减小生物分子活性的特点,因而被广泛应用于生物标记、医药开发等领域。纳米材料用于修饰电极材料具有促进电子传递、强吸附性、催化某些物质等特性,在电化学传感方面具有独特的优势[7] [8]。本文通过室温固相法制备纳米 AuNPs,通过 Nafion 的成膜效应将 AuNPs 固定在玻碳电极表面。利用固定在 Nafion-AuNPs 表面的 DNA 序列作为探针,以电化学阻抗法对 HIV 基因片段进行了高灵敏检测。

2. 实验部分

2.1. 仪器与试剂

CHI650D 电化学工作站(上海辰华仪器公司);透射电子显微镜(TEM) (JEOL, JEM-2100, 日本);电化学实验采用三电极体系,玻碳电极(GCE, $\Phi = 2$ mm)及其修饰电极为工作电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极,铂丝电极为对电极。

21 个碱基的探针 DNA 序列(ssDNA): 5'-ACTGCTAGAGATTTCCACAT-3';完全匹配的目标 DNA 序列: 5'-ATGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3';不匹配的目标 DNA 序列: 5'-GCCGTTTGCGAATGTGGAAAA-3';基因片段由大连宝生物工程有限公司合成, PAGE 纯化。DNA 的固定液用 10 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液(含有 1 mmol/L EDTA, pH = 8.0)配制;DNA 杂交液用 10 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液(含有 1 mmol/L

EDTA, 0.1 mol/L NaCl, pH = 8.0)配制。Nafion(全氟代磺酸酯), 氯金酸和柠檬酸钠购自 Sigma 公司。磷酸盐缓冲溶液(PBS), 用磷酸二氢钾和磷酸氢二钠配制; 其它试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

2.2. 实验方法

2.2.1. 金纳米粒子的合成

根据文献[9] [10]合成金纳米粒子。取 50 mL 0.04%的氯金酸溶液加热, 沸腾后立即加入 5.6 mL 1%的柠檬酸三钠溶液, 溶液的颜色由淡黄色变为紫红色, 最终变为红色, 继续加热和搅拌 12 min, 观察到溶液颜色纯正且浓时, 停止加热后, 继续搅拌溶液 15 min 后至溶液呈室温。最后, 将该溶液转入棕色试剂瓶中于 4℃保存备用。

2.2.2. AuNPs/Nafion/GCE 修饰电极的制备

将玻碳电极在 0.03 μm Al_2O_3 磨粉中研磨抛光打磨并超声清洗并用氮气吹干待用。取 100 μL 0.5% Nafion 与 200 μL 粒径约为 10 nm 的 AuNPs 混合, 超声 30 min。取 5 μL AuNPs/Nafion 混合后的溶液均匀滴到处理好的玻碳电极表面, 待电极表面形成一层均匀的薄膜后, 即得 AuNPs/Nafion/GCE 修饰电极。

2.2.3. ssDNA 在电极表面的固定

5 μL 的探针 DNA 溶液(2.0×10^{-6} mol/L)滴加至 AuNPs/Nafion/GCE 修饰电极的表面, 冰箱中放置 12 小时, 取出后置于 pH7.0 的 PBS 中清洗 3 min, 再用水清洗以除去未固定的 ssDNA, 即得 ssDNA 修饰电极, 记为 ssDNA/AuNPs/Nafion/GCE。

2.2.4. ssDNA 电极杂交

将 5 μL 完全匹配的目标 DNA 的杂交液滴加至 ssDNA/AuNPs/Nafion/GCE 修饰电极的表面, 35℃下杂交 50 min, 之后电极用 pH7.0 的 PBS 清洗以除去未杂交的 DNA, 即得杂交修饰电极, 记为 dsDNA/AuNPs/Nafion/GCE。

2.2.5. 电化学检测

在含 0.1 mol/L KCl 的 5.0 mmol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 溶液中, 用电化学工作站记录各修饰玻碳电极的循环伏安和电化学阻抗谱。交流阻抗记录的外加电压为 0.24 V, 频率变化范围为 100 kHz~0.1 Hz。

3. 结果与讨论

3.1. 金纳米粒子的 TEM 分析

图 1 是对制备好的金纳米粒子进行的 TEM 谱图。从图中可以看出得到的样品是纳米级的, 形状为圆球状, 表面较光滑, 粒径约为 10 nm。

3.2. 电化学传感器的可行性检测

电化学交流阻抗技术是在频率变化过程中测量电极表面阻抗值的变化。从图 2 中曲线 a、b、c 的交流阻抗图可以看到, 曲线 a、b、c 的交流阻抗图中的半圆弧部分依次增大, 也就是所对应的表面电子传递电阻(R_{et})增大。这是因为, 当匹配目标 HIV-DNA 的浓度增大时, 其电极表面的阻抗值增大, 交流阻抗图中的半圆弧部分也就增大。由此可以很容易地用电化学工作站检测出不同浓度目标 HIV-DNA 的阻抗值。因此, 本实验是可行的。

3.3. 杂交条件的优化

本文对 DNA 杂交时间和杂交温度进行了优化。在适当的条件下, ssDNA/AuNPs/Nafion/GCE 修饰电

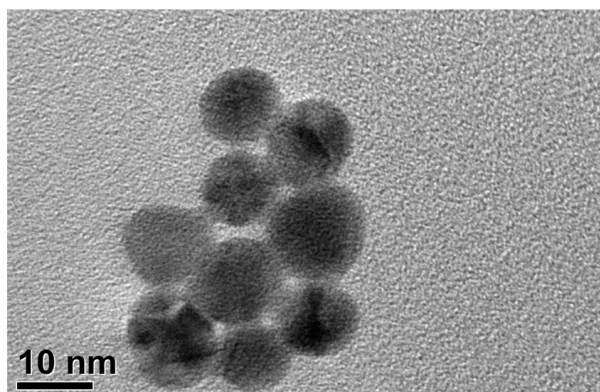
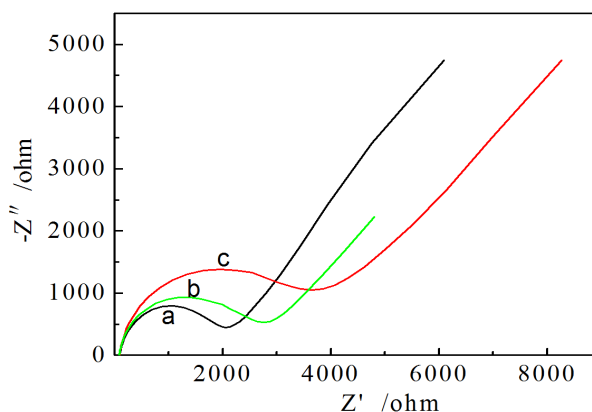


Figure 1. TEM of gold nanoparticles

图 1. 金纳米粒子的 TEM 图



a: 0 mol/L; b: 1.0×10^{-10} mol/L; c: 1.0×10^{-8} mol/L

Figure 2. Nyquist diagrams for different concentrations of the DNA sequence

图 2. 不同目标物浓度的生物传感器的交流阻抗图谱

极和 1.0×10^{-6} mol/L 的目标 DNA 在不同的温度(如 15°C 、 25°C 、 35°C 、 45°C 、)杂交不同的时间(如 20, 30, 40, 50 或 60 min), 记录在 $5.0 \text{ mmol/L } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 溶液中 ssDNA/AuNPs/Nafion/GCE 修饰电极杂交前后的交流阻抗图, 计算杂交前后表面电子传递电阻变化值(ΔRet)。表面电子传递电阻变化越大, 杂交反应越好。实验结果表明, 杂交在 35°C 和 40 min 时进行, ΔRet 最大。因此, 优化的杂交温度为 35°C , 杂交时间为 40 min。

3.4. DNA 生物传感器的选择性

通过用探针 DNA/ZnO/CHIT/GC 修饰电极与完全匹配的目标 DNA 和多个碱基不匹配的目标 DNA 杂交来研究 DNA 电化学生物传感器的选择性。ssDNA/AuNPs/Nafion/GCE 修饰电极与完全匹配的目标 DNA 杂交后的 ΔRet (杂交前后电子传递电阻的变化值)为 1500Ω , 与多个碱基不匹配的目标 DNA 序列杂交后的反应信号仅仅为它的 18% (ΔRet 为 270Ω)。结果表明, DNA 生物传感器有很好的选择性, 具有能识别完全匹配的目标 DNA 序列和不匹配的目标 DNA 序列的能力。

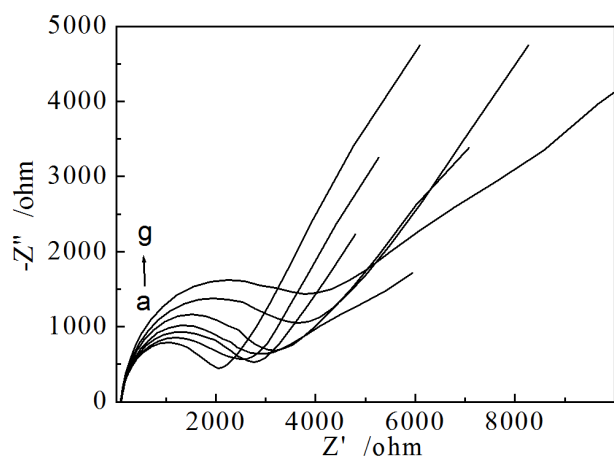
3.5. 电化学生物传感器性能测定

DNA 杂交反应会使电极界面的负电荷增加, 由于电荷的排斥阻碍了 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 扩散到电极表面,

导致阻抗谱图发生变化, 因此可以通过阻抗方法构建免标记型的电化学 DNA 生物传感器。因为电化学阻抗技术对电极界面性质的变化非常敏感, 所以其在 DNA 杂交检测方面的应用越来越受到人们的重视[8] [9]。图 3 显示了用 ssDNA/AuNPs/Nafion/GCE 传感器以电化学交流阻抗方法检测 HIV 基因片段的检测结果。曲线 a-g 为 DNA 探针电极与不同浓度的目标 DNA 杂交后, 所测得的电化学交流阻抗图, 随着浓度的增大, 高频部分半圆弧所对应的表面电子传递电阻 R_{et} 值也逐渐增大。以与目标 DNA 杂交得 dsDNA/AuNPs/Nafion/GCE 电极的电化学交流阻抗图的 R_{et} (ssDNA/AuNPs/Nafion/GCE 修饰电极与目标 DNA 杂交前后阻抗的差值) 的增加作为检测信号对 HIV 基因片段进行检测。以三次平行测量的 R_{et} 的差值 ΔR_{et} 的平均值对 HIV 的浓度的负对数作图, 如图 4 所示, ΔR_{et} 平均值与 HIV 基因片段的浓度的对数值在 1.0×10^{-11} mol/L 到 1.0×10^{-6} mol/L 浓度范围内呈较好的线性关系, 相关系数 $r = 0.9905$, 检出限为 3.0×10^{-12} mol/L。

3.6. 传感器的重现性和稳定性

作者通过研究 7 支按相同方法制备的探针修饰电极与目标 DNA (1.0 nmol/L) 杂交前后表面电子传递



a-g: 0.0, 1.0×10^{-11} , 1.0×10^{-10} , 1.0×10^{-9} , 1.0×10^{-8} , 1.0×10^{-7} , 1.0×10^{-6} (mol/L)

Figure 3. Nyquist diagrams for ssDNA/AuNPs/Nafion/GCE before and after hybridization with different concentrations of the DNA sequence

图 3. ssDNA/AuNPs/Nafion/GCE 与不同浓度目标 DNA 杂交的交流阻抗图

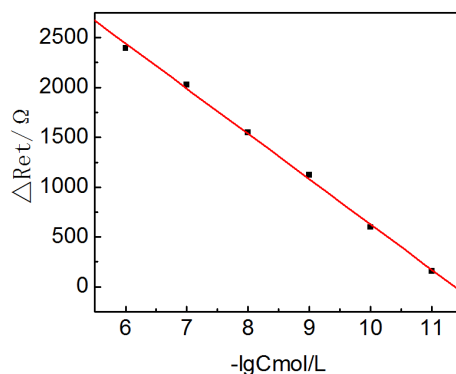


Figure 4. The plot of ΔR_{et} vs. the negative logarithm of the DNA concentration

图 4. ΔR_{et} 和 DNA 浓度负对数的线性关系图

电阻的变化值(ΔR_{et})考察 DNA 传感器的重复性, 5 次测定结果的 RSD 为 4.9%。说明所构制的 DNA 传感器有良好的重现性。构制的 DNA 生物传感器冰箱中 4℃ 下储存, 20 天后检测信号没有太大变化, 表明传感器有很好的稳定性。

4. 结论

本文利用 Nafion 的成膜作用和金纳米粒子的信号放大作用, 构建了稳定、灵敏的电化学传感分析新方法。制得的 DNA 生物传感器, 完成了 HIV 基因的快速检测。该传感器具有选择性好、灵敏度高、稳定性好等优点, 而且该传感器制备方法简单, 且无需标记, 有望为检测人类免疫缺陷病毒(HIV)基因片段提供有益的借鉴。

基金项目

本文系商洛市科技局项目(SK2015-37)、陕西省教育厅项目(16JS028)和商洛学院项目(15sky024)资助。

参考文献 (References)

- [1] 程力惠, 李毅群, 刘仲明, 等. 人类免疫缺陷病毒基因的碳糊电极快速检测[J]. 分析测试学报, 2003, 22(2): 75-77.
- [2] 王保珍, 杜晓燕, 郑晶, 等. 铂电极表面生物素——亲和素固载单链脱氧核糖核的电化学传感器[J]. 分析化学, 2005, 33(6): 789-792.
- [3] 漆红兰, 李延, 李晓霞, 等. 适体传感器研究新进展[J]. 化学传感器, 2007, 27(3): 1-8.
- [4] 孙伟, 尚智美, 杨茂霞, 等. 巯基乙酸自组装膜 DNA 电化学传感器对转基因 NOS 的定量检测[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(10): 1859-1861.
- [5] Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P. *et al.* (2002) Voltammetric Determination of DNA Hybridization Using Methylene Blue and Self-Assembled Alkanethiol Monolayer on Gold Electrodes. *Analytica Chimica Acta*, **462**, 39-47. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00308-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00308-2)
- [6] 张尧, 张正秀, 何洪斌, 等. 人类免疫缺陷病毒感染合并肾脏病载脂蛋白 L1 基因突变检测[J]. 实用医院临床杂志, 2017, 14(2): 25-28.
- [7] Pall, W.Y., Thordarson, J.J., Gooding, S.P., *et al.* (2007) Carbon Nanotubes for Biological and Biomedical Applications. *Nanotechnology*, **18**, 1-12.
- [8] 姜灵彦, 刘传银, 蒋丽萍, 等. 纳米材料修饰电极及其在电分析化学中的应用[J]. 化学研究与应用, 2004, 16(5): 615-618.
- [9] Lesniak, M.A., Roth, J., *et al.* (1973) Human Growth Hormone Radioreceptor Assay Using Cultured Human Lymphocytes. *Nature*, **241**, 20-22. <https://doi.org/10.1038/newbio241020a0>
- [10] Duff, D.G., Baikera, A. and Edwards, P.P. (1993) A New Hydrosol of Gold Clusters. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **1**, 96-98. <https://doi.org/10.1039/c39930000096>

Hans 汉斯

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2163-1557, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: aac@hanspub.org