

微阵列电化学生物传感器研究进展

贺敏娟¹ 崔华莉²

(1 西安市五二四子校 陕西 西安 710021 2 延安大学化学与化工学院 陕西 延安 716000)

摘要: 本文简要介绍了微阵列电化学生物传感器的基本原理和分类, 评述了微阵列电化学生物传感器的研究进展。

关键词: 微阵列; 电化学; 生物传感器

中图分类号: Q523, TP212 文献标识码: A

Current Development of Microarray Electrochemical Biosensors

HE Min-juan, CU Hua-li

(Xi'an 524 middle school, Xi'an 710021, Shaanxi, China)

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China)

ABSTRACT: Electrochemical biosensors based on microarray are developing very fast in recent years, which is one of the important ways to realize the miniaturization and integration of biosensors. The principle, specification of microarray electrochemical sensor is described. Current development of microarray electrochemical biosensors is reviewed in detail.

Key words: Microarray; Electrochemistry; Biosensor

在生命科学研究和医学临床检测中, 需要对各种各样的生物大分子进行选择性的测定, 据初步估计, 全世界每年要进行数亿次免疫学和遗传学病理检验, 每年在新药筛选中国际上要投入几千亿美元, 传统的检测方法往往需要烦琐费时的分离, 复杂昂贵的仪器设备, 灵敏度低, 分析速度慢且劳动强度大。建立高选择性、灵敏、简单、快速的分析方法和廉价的小型化分析装置, 一直是一个重要的研究课题^[1]。生物芯片因其具有体积小、重量轻、便于携带、无污染、分析自动化、分析速度快、所需样品和试剂微量等诸多优点, 在包括高通量药物筛选、环境监测、临床监测、空间生物学、现场分析、生物战争试剂检测、高效 DNA 测序等等方面表现出迷人的应用前景^[2-3]。近年来, 国内外黄钦文等^[4]介绍了微阵列电极以及作为信号转换器在电化学生物传感器中应用的有关进展情况, 特别是在基因研究中的应用。漆红兰等^[5]简要介绍了电化学 DNA 生物传感器的原理和分类, 对纳米粒子在电化学 DNA 生物传感器研究中的应用进行了详细评述。Joerg 等^[9]介绍了一种微阵列连续检测的电化学生物芯片技术。本文拟简要介绍微阵列电化学生物传感器的基本原理和分类, 评述微阵列电化学生物传感器方面的研究进展。

1 微阵列电化学生物传感器原理和分类

电化学生物传感器是具有电化学信号转换器的生物传感器, 一般认为它是一个化学修饰电极。以电导、半导体或者离子导电的材料构成电化学电极作为信号转换器, 涂上一层生物化学薄膜作为敏感元件, 最后以电信号为特征检测信号。根据电信号测定方式的不同, 一般可分为电流式、电位式和电导式三类, 电流式和电位式占主导地位。

生物芯片主要指通过平面微细加工技术在固体芯片表面构建的微流体分析单元和系统, 使这些分析过程连续化、微型化、集成化和信息化, 以实现细胞、蛋白质、核酸以及其他生物组分的准确、快速、大信息量的检测, 其基本特征和最大优势是多种单元技术在微小平台上的灵活组合和大规模集成, 高通量是大规模集成的一种形式。生物芯片主要分为两大类, 一类是生物电子芯片, 用于生物计算机等生物电子产品的制造。另一类是生物分析芯片, 用于各种生物大分子、细胞、组织的操作以及生物化学反应检测。在生命科学仪器中通常是后面一类芯片。生物分析芯片按功能微结构在载体上分布的不同又可以分为二维分析芯片和三维分析芯片。二维分析芯片依赖固定在载体表面的生物分子完成生化反应检测。最常见的二维芯片是二维阵列芯片 (Microarray), 包括基因芯片、蛋白芯片和其它微阵列芯片。三维芯片又称芯片实验室 (lab on a chip, LOAC), 是在载体内部加工微通道、样品池、反应仓、以及各种控制和检测元件的具有一定空间结构的微芯片。二维芯片相对比较简单, 容易加工, 国内外在此方面进行了大量的研究^[2,3,6,7]。

2 微阵列电化学生物传感器的研究进展

生物分析芯片点阵中的每一个单元都是一个传感器的探头, 所以生物分析芯片技术也为生物传感技术^[7]。将化学和生物非电类信号转换为电信号进行检测的电化学生物传感器, 具有选择性好、易微型化、操作简便、功耗小, 成本低、不受光程和样品浑浊度影响的特点, 特别是它与目前的微电子机械系统技术兼容, 因此, 它在生物分析芯片发展过程显示出了诱人的应用前景^[8]。现在, 它已经被广泛应用于核酸片段、神经递质、人体代谢产物、氨基酸、多肽、糖、炸药、有机污染物等组分的分析^[9-12]。美国国立卫生研究院、能源部、国防部、司法部等政府机构, 斯坦福大学、MIT、阿尔贡实验室等著名科研

作者简介: 贺敏娟, (1976-), 女, 本科, 中学教师

E-mail: huanjiao@163.com

(收稿日期: 2006-04-23 接受日期: 2006-05-30)

机构,以及 Affymetrix、Hyseq、Nanogen、Incyte、Caliper 等著名生物芯片技术公司、英国剑桥大学、欧亚大公司如 Generic Co. UK、Sequenom 等也正在从事该领域的研究。我国正式进入生物芯片研究领域是在 1998 年,现已取得一定的研究成果。联合基因公司、中国科学院对、清华大学生物芯片中心均进行了大量的研究。但是,目前研究的生物分析芯片仍然存在着许多难以解决的问题,例如技术成本昂贵、复杂、检测灵敏度较低、重复性差、分析范围较狭窄等问题。这些问题主要表现在样品的制备、探针合成与固定、分子的标记、数据的读取与分析等几个方面^[4]。

2.1 微阵列电化学生物传感器

由于微阵列电极具有优异的电化学特性,以微阵列各类化学传感器发展相当迅速,现正朝着微型化、集成化和智能化的方向发展。生物传感器是利用了生物活性材料的高选择性和灵敏性的特殊种类化学传感器,1966 年,Updike 和 Hicks 研制成功了葡萄糖传感器,标志着化学传感器向生物领域拓展^[13]。进入 90 年代,利用集成电路加工技术制造微阵列生物传感器已经成为令人关注的研究方向。Yon Hin 和 Zhu Jianzhong 等人都报道了在微阵列电极上固定葡萄糖氧化酶制作微型葡萄糖传感器^[14,15],Dill^[16]等使用微电极阵列进行了电化学免疫测定。

最近几年,电化学生物传感器中使用芯片和电化学方法探测寡核苷酸(基因探针)的结合成为迅速发展的领域。其中,电化学 DNA 传感器近几年发展迅速。电化学 DNA 生物传感器是指用固定化 DNA 作为分子识别物质的电化学生物传感器。该传感器是将作为分子识别物质的寡核苷酸、单链 DNA(ss-DNA)或双链 DNA(ds-DNA)固定在作为换能器的电极上,然后将与互补 DNA(cs2DNA)、药物、化合物、自由基等相互作用的生物学信号转变为电化学信号而进行检测的器件^[17]。电化学 DNA 生物传感器,根据是否标记电活性物质可分为标记型和非标记型两类。非标记型电化学 DNA 生物传感器是利用 DNA 杂交前后 DNA 本身碱基的电化学信号(如电流、电容、电阻或频率等)的变化而进行检测的传感器。标记型电化学 DNA 生物传感器是利用具有电化学活性的物质指示 DNA 杂交前后电化学信号的变化而进行检测的传感器。Liepold 等^[18]建立了一种在生命科学和诊断学中非标记低成本电化学检测 DNA 阵列的技术。基于印制电路板技术制造了 96 个电极阵列,每个电极活性面积范围在 10^4m^2 。He 等^[19]基于电化学杂交和检测建立了 DNA 阵列生物传感器,首先通过自组装将 DNA 捕获探针固定到平板印刷金阵列电极上,通过抗生素蛋白-碱性磷酸酶结合生物素标记的 DNA 片段,最终通过~ 萘酚磷酸水解的电流信号测量目标 DNA。该法可以提高杂交速度,同时测定多组分样品。

使用电化学 DNA 传感器对 DNA 杂交进行探测具有快速、简单以及测试费用低的特点。但还需要注意的是错配的识别、信号放大以及非特定吸附。换能器的微型化、集成化和智能化,既是挑战也是发展趋势。这对于成本、速度、样品/反应剂的消耗、简化过程以及自动化具有重要意义。

2.2 纳米微阵列电化学生物传感器

近年来,将纳米材料引入生物分析芯片研究中已成为生物分析芯片的一个研究热点。纳米材料以其独特的量子尺寸

效应、表面效应和宏观量子隧道效应等特性,显示出体材料不具备的导电特性和光电催化特性,激发了科学家极大的研究热情。纳米材料,特别是新型的纳米生物材料和纳米复合材料由于其特殊的结构层次,具有极强的吸附能力、良好的定向能力和生物兼容性,为生物分析芯片的研究和应用开辟了一个广阔的研究天地^[21-24]。利用纳米阵列电极为基体制作生物传感器,非常有利于实现传感器的微型化、集成化、便于进行在体连续监控、活体细胞检测、临床疾病诊断、药理研究等,可以为酶工程、基因工程、细胞工程等提供新的研究工具和手段。最近,利用电子束光刻法制作的 Au 纳米插指阵列电极作为换能器,研制了电化学 DNA 生物传感器^[21],在电极表面上通过共价键合固定巯基化修饰的单链 DNA 作为分子识别物,选用氧化还原介体 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 作杂交指示剂,对单链 DNA 和双链 DNA 皆可进行测定。研究表明,用纳米阵列电极制作的 DNA 生物传感器的响应和灵敏度优于常规电极。

2.3 微阵列电化学发光生物传感器

电化学发光法兼有电化学和化学发光法的双重优点,特别是近年来发展起来的电化学发光生物芯片分析,因具有极低的检测限和极宽的线性范围等优点,在研究细菌、克隆基因、PCR 探针和检测 PCR 产物(10^{-18}mol)已显示极强的竞争力。结合电化学和发光成像技术的电化学发光成像技术具有通过时间积分,可定量检测微弱发光信号,以及特别适合对阵列型分析单元实现同步实时检测的特点。以钉联吡啶络合物为代表的电化学发光标记探针,恰好具有可长时间持续发光的特点。将以上两者加以结合,特别适合对多通道、微弱发光信号的检出。如将以上的信号发生和采集模式应用在芯片上,不仅解决了阵列型分析单元同步信号采集的困难,更可以发挥发光信号积分成像检测和电化学发光连续发光所带来的信号放大作用。这一点对多通道阵列型芯片,实现微体积、低浓度分析对象的高灵敏度检测是极具吸引力的,已引起国内外学者极大的研究兴趣^[20-21]。

3 展望

微阵列电化学生物传感器是迅速崛起的一门物理学、微电子技术、生化技术与生命科学等众多学科领域交叉综合的学科。微阵列电化学或电化学发光生物传感器已取得了一系列的研究成果,但仍存在由于电极小型化而带来的检测信号变小,信噪比变小,用电子线路放大难以提高信噪比,从而导致的检测灵敏度低的问题。此领域的研究还处于初级阶段,许多应用仍在开发之中,而且理论研究尚需进一步深入。但是,它显示出来的诸多优点,对生物传感器的微型化有一定的促进作用;对生理医学和临床医学上的实体分析方面的进一步发展均有重要意义。

参考文献

- [1] Ahuja SK, Ferreira GM, Moreira AR. Utilization of enzymes for environmental applications [J]. Crit Rev Biotechnol, 2004, 24(2-3): 125-54
- [2] Qari MH. High throughput coagulation analyzers review [J]. Comb Chem High Throughput Screen. 2005, 8(4):353-60
- [3] Wick I, Hardinan G. Biochip platforms as functional genomics tools for drug discovery [J]. Curr Opin Drug Discov Devel. 2005, 8(3): 347-54
- [4] 黄钦文,李斌,黄美浅,等.微阵列电极电化学生物传感器[J].传

- 感器技术, 2004, 23(2): 1- 3
- [5] 漆红兰, 张成孝. 纳米粒子在电化学 DNA 生物传感器研究中的应用[J]. 化学进展, 2005, 17(5): 911- 915
- [6] Schasfoort RB, Proteomics- on- a- chip: the challenge to couple lab- on- a- chip unit operations [J]. Expert Rev Proteomics. 2004, 1(1): 123- 32
- [7] Orazio PD, Biosensors in clinical chemistry[J]. Clin Chim Acta. 2003, 334: 41- 69
- [8] Tumer FF. Biosensors- - Sense and Sensitivity [J]. Science, 2000, 17, 290: 1315- 1317
- [9] Joerg A, Grunwald T, Nebling E, et al. Electrical biochip technology- a tool for microarrays, and continuous monitoring[J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 377: 521- 527
- [10] Gooding JJ, Wibowo R, Liu J, et al. Protein electrochemistry using aligned carbon nanotube arrays [J]. J Am Chem Soc, 2003, 125: 9006- 9007
- [11] Lacher NA, Garrison KE, Martin RS, et al. Microchip capillary electrophoresis/ electrochemistry [J]. Electrophoresis, 2001, 22(11): 2526- 36
- [12] Nebling E, Grunwald T, Albers J, et al. Electrical Detection of Viral DNA Using Ultramicroelectrode Arrays[J]. Anal. Chem. 2004, 76: 689- 696
- [13] 朱建中, 张国雄. 生物电化学传感器的微型化集成化和智能化[J]. 科技通讯, 1994, (1): 54- 60
- [14] Yon Hin BFY, Sethi RS, Lowe CR. Multi- analyte microelectronic biosensors[J]. Sensors & Actuators B, 1990, 1: 550- 554
- [15] Zhu Jianzhong, Wu Jiali, Tian Chengyun, et al. Microarray H₂O₂ electrode as base elements of high response glucose sensors [J]. Sensors & Actuators B, 1994, 20: 17- 22
- [16] Dill K, Montgomery DD, Ghindilis AL, et al. Immunoassays based on electrochemical detection using microelectrode arrays [J]. Biosensors and Bioelectronics 2004, 20: 736- 742
- [17] Wang J. Nanoparticle- based electrochemical DNA detection [J]. Anal. Chim. Acta, 2003, 500: 247- 257
- [18] P Liepold, H Wieder, H Hillebrandt, et al. DNA- arrays with electrical detection: A label- free low cost technology routine use in life sciences and diagnostics [J]. Bioelectrochemistry, 2005, 67: 143- 150
- [19] He W, Yang QJ, Liu ZH, Yu XB, et al. DNA Array Biosensor Based on Electrochemical Hybridization and Detection [J]. Analytical Letters, 2005, 38: 2567- 2578
- [20] Richter MM, Electrochemiluminescence (ECL) [J]. Chem Rev, 2004, 104(6): 3003- 3036
- [21] Marquette CA, Thomas D, Degiuli A, et al. Design of luminescent biochips based on enzyme, antibody, or DNA composite layers [J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 377: 922- 928
- [22] Park SJ, Taton TA, Mirkkin CA, Array- based electrical detection of DNA with nanoparticle probes [J]. Science, 2002, 295: 1503- 1506
- [23] Popovtzer R, Neufeld T, Biran D, et al. Novel integrated electrochemical nano- biochip for toxicity detection in water[J]. Nano Lett, 2005, 5(6): 1023- 1027
- [24] 廖鹏飞, 夏金兰, 聂珍媛, 等. 磁性微球的制备及在生物分离应用中的研究进展[J]. 生物磁学, 2005, 5(4): 47- 51

(上接第 62 页)

4.3 自主神经系统介导心律失常的机制

控制心脏收缩节律和强度的自主神经系统由交感神经系统和副交感神经系统两部分组成, 这是心血管系统的基本特征。自主神经系统在介导长 QT 综合征中的作用是非常明确的, LQT1 的患者大多数(62%) 在运动过程中出现晕厥、心脏停搏、猝死症状, 仅 3% 是在休息或睡觉时出现症状。而 LQT2 和 LQT3 的患者较少(13%) 在运动中出现症状, 而较多(29% 和 39%) 在休息和睡眠时出现症状。Brugada 综合征常发生于睡眠中, 故被称为睡眠死亡。自主神经系统在离子通道病心律失常中的机制至今不清楚。LQT3 型心脏事件可以发生于交感神经兴奋时(运动, 13%) 也可以发生于副交感神经兴奋时(睡眠)。有人认为 cAMP 依赖的蛋白激酶(PKA) 可能在 LQT1 型心律失常中起重要作用。当交感神经兴奋时, KCNQ1 或 KCNE1 变异者有发生致死性心律失常的高风险, 很明显, 这是通过 cAMP 由蛋白激酶旁路介导的。对于自主神经系统介导 SCN5A 型离子通道病的机制所知甚少, 植物神经通过何种机制而诱发介导钠通道病致死性心律失常, 植物神经兴奋影响钠通道的机制目前尚不清楚, 这些均有待进一步研究。对 SCN5A Δ /+ 和 SCN5A+/- 鼠模型的研究, 对阐明钠通道病和心律失常相互关系的机制, 以及开发针对这种疾病的有效治疗措施均有意义^[15]。

离子通道的研究已成为生命科学中一个重要的领域, 很有可能其他一些遗传异常最终也被证实是离子通道疾病, 如同时给予相应的基因治疗或其他干预措施, 将导致遗传性疾病诊断和治疗的巨大变化。

参考文献

- [1] 李俊敏, 刘朝晖, 尚忠林. 细胞膜上的离子通道[J]. 河北师范大学

学报(自然科学版), 2005, 29(5): 519- 522

- [2] 余瀛鳌. 中医临床文献研读点津[J]. 中医文献杂志, 2006, 1: 2- 5
- [3] 刘彦华, 才丽平. 肾脏 AQP2 表达及穿梭调节的分子机制[J]. 国外医学生理病理学分册, 2004, 24(5): 463- 466
- [4] 李洪军, 王颖, 王伟, 等. 基因突变与遗传性肾性尿崩症[J]. 中国实验诊断学, 2005, 9(3): 472- 473
- [5] 夏家辉, 张华莉, 廖晓东, 等. 人神经元电压门控钙通道 γ - 3 基因的克隆[J]. 科学通报, 2000, 45(12): 1284- 1285
- [6] 张月华, 吴希如. 钙离子通道与人类遗传病[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(7): 547- 550
- [7] 许贤平, 杨晓苏. 偏头痛与离子通道[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(12): 859- 861
- [8] 夏圣梅, 孙洪波, 郭枫, 等. 遗传性共济失调的头部 MR 影像 1 例[J]. 中国医学影像技术, 2005, 21(3): 494
- [9] 汤熙翔, 夏家辉. 钙通道与人类遗传病[J]. 国外医学遗传学分册, 2000, 23(3): 134- 136
- [10] 王维治, 黄煜敏. 钙通道与神经肌肉疾病[J]. 中华神经科杂志, 1999, 32(2): 111- 113
- [11] 毕建中, 王萍, 李大年, 等. 发作性共济失调与离子通道病的研究进展[J]. 中华神经科杂志, 2004, 37(6): 569- 570
- [12] 崔长琮, 陈新. 积极开展心血管离子通道病的基础和临床研究[J]. 中华心律失常学杂志, 2004, 8(6): 325- 326
- [13] 范珊, 栗建国, 雷江文, 等. 长 QT 间期综合症的分析[J]. 云南医药, 2004, 25(6): 509- 510
- [14] 葛郁芝, 周萍, 吴志婷. 遗传性心律失常疾病及治疗- 心律失常离子通道蛋白质转运的分子生物学[J]. 中国心血管病研究杂志, 2006, 4(3): 236- 239
- [15] 雷鸣, 孙思. 钠离子通道病致心律失常的机制研究进展[J]. 临床心血管病杂志(china), 2005, 21(4): 246- 248