上海交通大學

SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY

学士学位论文

THESIS OF BACHELOR

论文题目：基于电化学手段的NADH高灵敏度检测

学生姓名：李宗霖

学生学号：5100809148

专　　业：生物医学工程

指导教师：丁显廷

学院(系)：生物医学工程

基于电化学手段的 NADH 高灵敏度检测

摘要

研究证实，NADH（烟酰胺腺嘌呤二核苷酸）作为所有生物新陈代谢过程中重要的辅酶，其含量与包括癌症肿瘤、帕金森综合症在内的多种疾病以及细胞衰竭与死亡、单体细菌菌数等有直接相关性，因此对细胞内 NADH 含量进行高灵敏度的检测便能为相关疾病的早期诊断和相关细菌的检测提供新的途径。在比较传统 NADH 检测方法的优劣后，利用 NADH 自身的氧化还原特性，本研究最终采用电化学手段，通过构造新型复合电极，利用经典“三电极”结构以实现 NADH 的高灵敏度检测。受 DNA 折纸术的启发，在构造新型复合电极时，为增加电极表面有效接触面积，本研究采用 DNA 四面体与金电极表面复合结构，再通过加入氨基化石墨烯碎片，增加电极导电性，最终通过 AFM 证实金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极搭建成功。将复合电极反复用于 NADH 检测后发现，该复合电极能成功将 NADH 的氧化电压降低至 0.3V，电极检测下限为 0.1nM，上限为 1uM，线性检测范围为 1nM-1uM，灵敏度为 0.226 (uA/lg（C_{NADH} ）*cm^2)，电极再生性和选择性良好。为改良电极检测限，本研究尝试引入金纳米粒子，搭建金电极-金纳米粒子-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极，经过反复实验证实，该复合电极能将 NADH 检测下限降低至 0.1fM，上限增加至 100uM，线性检测范为 1pM-1nM 和 10pM-100uM，灵敏度为: 1.305 (uA/lg（C_{NADH} ）*cm^2) 和 0.200(uA/lg（C_{NADH} ）*cm^2)。实验证明，本研究搭建的复合电极能真正实现 NADH 的高灵敏度检测，为后续相关研究打下坚实基础。

关键词：NADH 检测，电化学，金电极，DNA 四面体，氨基化石墨烯

A NOVEL ELECTRODE FOR NADH HIGH-SENSITIVITY DETECTION BY ELECTROCHEMICAL METHOD

ABSTRACT

Previous study has confirmed, NADH, as an important coenzyme for all biological metabolic processes, is related to a variety of diseases including cancers, Parkinson's disease. NADH is also highly correlated to cell failure and death caused by a number of bacteria and other bacteria monomers. Therefore, to detect cellular NADH level with high sensitivity can provide a new way for the early diagnosis and detection of bacteria related diseases. Compared with conventional detection methods such as high performance liquid chromatography (HPLC), enzymatic cycling method and fluorescence method, in this paper, we take advantage of NADH redox properties, through the new composite electrode structure, by using classical "three-electrode" configuration to achieve high -sensitivity detection of NADH. Inspired by the DNA origami, in this study, we constructed new composite electrode, by combining DNA tetrahedron with the gold electrode surface in order to increase the effective contact area. Then the electrode's conductivity is increased by adding amino-graphene fragments. The gold electrode-DNA tetrahedron-amino-graphene composite electrode structures were further visualized and confirmed by AFM imaging. Repeated experiments using the composite electrode to detect NADH confirms that our sensor can successfully reduce NADH oxidation voltage to 0.3V, the lower limit of detection is 0.1nM, while the upper limit is 1uM. Our sensor has linear detection ranges from 1nM to 1uM and sensitivity of 0.226 (uA/lg（C_{NADH}）*cm^2）. The selectivity and regeneration of the electrode are both good. To improve the detection limit for the electrode, we further incorporated gold nanoparticles, trying to build a gold electrode-gold nanoparticle-DNA tetrahedron– amino-graphene composite electrode. Our repeated experiment confirmed that the detection limit of NADH can be further reduced down to 0.1fM and up to 100uM, while the linear detection range expands from 1fM to 1pM and from 10pM to 100uM, and sensitivity is increased to1.305 (uA/lg（C_{NADH}）*cm^2) and 0.200 (uA/lg（C_{NADH}）*cm^2). The novel sensor we developed here could serve as a highly sensitive probe for NADH detection, which would further benefit the field of NADH related disease diagnostics.

Key words: NADH detection, electrochemical, gold disc, DNA tetrahedron,amino-graphene

目 录

第一章 绪论 1
1.1 NADH 简介 1
1.1.1 NADH 概述 1
1.1.2 辅酶 NADH 1
1.1.3 NADH 与疾病 1
1.2 NADH 检测手段 2
1.2.1 高效液相色谱法（HPLC） 2
1.2.2 酶循环法 2
1.2.3 荧光法 2
1.2.4 电化学检测方法 3
1.3 DNA 电化学传感器 4
1.3.1 DNA 电化学传感器构成 4
1.3.2 DNA 电化学传感器的应用 4
1.3.2.1 疾病检测 4
1.3.2.2 环境监测 4
1.3.3 DNA 传感器的改良 5
1.3.3.1 DNA 四面体结构的提出 5
1.3.3.2 DNA 四面体结构的应用 5
1.3.3.3 四面体结构的制备与优势 5
1.4 石墨烯 6
1.4.1 石墨烯概述 6
1.4.2 石墨烯-贵金属纳米粒子复合修饰电极 6
1.4.3 石墨烯-金属氧化物/半导体复合修饰电极 6
1.4.4 石墨烯-有机材料复合修饰电极 7
1.4.5 石墨烯-离子液体复合修饰电极 7
1.4.6 创新型石墨烯修饰电极 7
1.5.本论文主要研究 7
第二章 DNA 四面体搭建 8
2.1 实验试剂与仪器 8
2.1.1 实验试剂 8
2.1.2 实验仪器 9
2.2 实验方法与步骤 9
2.2.1 溶液配制 9
2.2.2 DNA 四面体搭建 10
2.2.3 DNA 凝胶电泳 11
2.3 实验结果与讨论 12
2.4 本章小结 13
第三章 金电极-DNA 四面体复合 13

3.1 实验试剂与仪器 13
3.1.1 实验试剂 13
3.1.2 实验仪器 13
3.2 实验方法与步骤 14
3.2.1 溶液配制 14
3.2.2 电极物理抛光处理 14
3.2.3 电极化学处理 14
3.2.4 超声清洗电极 14
3.2.5 电化学验证 14
3.2.6 SAM 过程探索 14
3.2.7 DNA 四面体最佳浓度探索 14
3.2.8 DNA 四面体在金电极表面自组装 14
3.3 实验结果与讨论 14
3.3.1 金电极打磨验证 15
3.3.2 SAM 过程探索 15
3.3.3 DNA 四面体溶液最佳浓度探索 16
3.3.4 DNA 四面体在金电极表面的自组装 18
3.4 本章小结 18
第四章 金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合 19
4.1 实验试剂与仪器 19
4.1.1 实验试剂 19
4.1.2 实验仪器 19
4.2 实验方法与步骤 19
4.2.1 溶液配制 19
4.2.2 氨基化石墨烯分散条件探索 19
4.2.3 金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合条件探索 19
4.3 实验结果与讨论 20
4.3.1 氨基化石墨烯分散条件探索 20
4.3.2 金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合条件探索 21
4.4 本章小结 22
第五章 基于复合电极的 NADH 检测 23
5.1 实验试剂与仪器 23
5.1.1 实验试剂 23
5.1.2 实验仪器 23
5.2 实验方法与步骤 23
5.2.1 溶液配制 23
5.2.2 AFM 验证电极搭建 24
5.2.3 复合电极改变 NADH 氧化电压的探索 24
5.2.4 NADH 检测限与线性检测区间探索 24
5.2.5 复合电极再生性验证 24
5.2.6 复合电极选择性验证 24
5.3 实验结果与讨论 24
5.3.1 AFM 验证复合电极搭建结果 24
5.3.2 复合电极对 NADH 氧化电压的影响 28

5.3.3 NADH 检测限和线性检测范围 30
5.3.4 复合电极的再生性 32
5.3.5 复合电极的选择性 33
5.4 本章小结 34
第六章 复合电极优化 35
第七章 结论 37
参考文献 38
谢辞 44

第一章 绪论

1.1 NADH 简介

1.1.1 NADH 概述

NADH 是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（Nicotinamide adenine dinucleotide，NAD^+）的还原形式，NAD^+作为一种转递质子（更准确来说是氢离子）的辅酶，在所有生物的新陈代谢中都发挥着重要作用。它可以被还原，最多携带两个质子（NADH + H^+）。

NAD^+在氧化乙醇，在糖酵解、糖异生、三羧酸循环及呼吸链中发挥着不可替代的作用。中间产物会将脱下的氢递给 NAD，使之成为 NADH + H^+。而 NADH + H^+则会作为氢的载体，在呼吸链中通过化学渗透偶联的方式，合成 ATP。同时，作为细胞内重要的辅酶，在脂肪、蛋白质和糖类这三大类构成生物体的主要物质中，NADH 也参与其物质代谢的绝大部分氧化还原反应[1]。

1.1.2 辅酶 NADH

还原型辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(reduced form of nicotinamide-adenine dinucleotid ,NADH)可以促进多糖、蛋白、核酸的合成和代谢,在增加物质转运和调控的同时，能活化生物体内多酶系统，改善代谢功能[2][3]。

据不完全统计，自然界中超过 400 种的脱氢酶以 NAD^+作为辅酶，如常见的甲醛脱氢酶(formaldehyde dehydrogenase, FALDH)、甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, FDH)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)、谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GLDH)、丙三醇脱氢酶(glycerol dehydrogenase, GlyDH)、3-羟基丁酸脱氢(3-hydroxybutyrate dehydrogenase, 3-HBDH)、苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase,G6PDH)等[4]。

在脱氢酶催化反应中,作为电子和氢的受体，NAD^+反应后生成还原型辅酶 NADH，这种再生具有及其重要的意义。从生物学的角度讲，可循环用于众多生物合成反应； 从化学检测的角度讲，如果能采用适当的方法测定生成的 NADH, 则可提供一个分析脱氢酶反应的通用平台，与数百种脱氢酶构成测定相应底物的检测体系[5][6]。

1.1.3 NADH 与疾病

NADH 是细胞能量代谢所必需的辅酶，其分子量为 770.8D，等电点为 3.0.它既是一种重要的生化试剂，也能作为一种生化药物发挥细胞保护作用。研究发现细胞 NADH 荧光水平持续下降极大可能的预示着细胞代谢衰竭和细胞死亡发生[7]。Obi-Tabot[8]等研究发现 ,可逆的缺氧损伤早期往往出现 NADH 荧光强度增加,说明为氧化磷酸化损伤 ,当损伤不可逆时，往往伴随着 NADH 荧光强度下降。

在癌症肿瘤方面，Qianru[9]研究发现，乳腺癌细胞中 NADH 的聚集浓度是正常乳腺细胞的 1.8 倍，两种细胞中自由 NADH 和酶联 NADH 的比率也不同。Weihong[10]研究推测 NADH 可能是肿瘤化疗过程中的重要调节剂。其团队[10]发现 NADH 可显著提高人胃癌细胞对丝裂霉素的化疗敏感性且明显降低氟尿嘧啶、鬼臼乙叉甙、顺铂、表阿霉素的肿瘤细胞抑制率。

Brambilla[11]等研究发现有机物叔丁基过氧化氢可导致细胞功能损失,而线粒体内 NADH

能抑制线粒体膜电位下降 ， 对线粒体功能起保护作用。Fernande[12]等研究表明，NADH 在与铬反应形成相对稳定的铬-NADH 复合物后，可以抑制 ROS 产生，进而保护细胞免受重金属铬酸盐诱导的血红蛋白氧化和过氧化损伤。此外，细胞内的 NADH 不仅与 ROS 水平、Ca^{2+}水平等有关，还可以下调 p53 抑癌基因表达，甚至也还能上调 bcl-2 凋亡抑制基因的表达。同时，NADH 可以一边抑制 caspase-3 和 caspase-8 激活，一边阻止 Cytc 释放到胞质并保护 PARP，阻断顺铂等引起的细胞损伤与凋亡[13]。

同时，研究表明，NADH 在延缓轴突变性的方面发挥着重要的作用[14]，而轴突变形是神经退行性疾病发病的重要原因之一。神经退行性疾病（neurodegenerative disease, ND）主要包括阿尔茨海默病（Alzheimer disease, AD）、帕金森病（Parkinson disease, PD）、亨廷顿病（Huntington disease, HD）等，是原发性神经元退行性病变或凋亡，影响患者的认知功能和运动功能乃至导致死亡为主要特征的一类疾病，其中多数发病较晚，进展缓慢[错误!未定义书签。]。研究发现，帕金森综合征患者中，脑内四氢生物喋呤和二氢喋呤还原酶明显减少,这样也为临床上将 NADH 用于细胞保护治疗提供了相应的理论基础[15]。

此外,相关研究证实，NADH 含量在特定单位菌体胞内恒定[16][17]， 细菌菌数与 NADH 含量呈正相关关系，诸如发酵过程细胞浓度及其生长代谢状态状况的各种参数等则可通过测定 NADH 来监测[18]。

鉴于 NADH 的含量与包括癌症肿瘤、帕金森综合症在内的多种疾病以及细胞衰竭与死亡、单体细菌菌数等有直接相关性，对细胞内 NADH 含量进行检测就有可能为相关疾病的早期诊断和相关细菌的检测提供新的途径。

1.2 NADH 检测手段

目前已有测定 NAD^+和 NADH 采用的方法有高效液相色谱法（HPLC）、酶循环法、荧光法及电化学检测方法。

1.2.1 高效液相色谱法（HPLC）

高效液相色谱作为一种重要的分析方法，广泛的应用于化学和生化分析中，常用于医药品、化学、环保、生命科学、与食品工业的研究上。它是一种色谱分析技术，用来分离混合物，以确认并量化各个成分的比例。该方法通过泵加压样品使之通过填充有吸附剂的压力柱，导致样品的各个成分因而分离。

Hongping[19]等在已有方法的基础上进行改良创新，用 HPLC 同时测定了肌肉中腺嘌呤核苷酸和 NADH。但是发酵液中的蛋白质以及反应过程中积累的盐离子及对测定均有较大干扰，导致检测灵敏度降低，实验过程中对检测样品的处理也会对结果产生较大的影响[20]。

1.2.2 酶循环法

酶循环法利用乙醇、乙醛、吩嗪乙基硫酸盐、噻唑蓝和甲簪等物质，当体系中存在辅酶 NAD^+和 NADH 时，在乙醇脱氢酶(ADH)催化作用下，辅酶即可不断参加循环反应，直至底物消耗完。该体系在 570 nm 下的吸光值不断发生变化因为反应过程中不断生成蓝色的物质甲簪(Formazan)[21]。样品中辅酶浓度与酶反应速率在一定温度和反应时间内，呈良好的线性关系。利用这个原理，比较所得结果与标准品的反应速率，便能够较为准确测得样品中辅酶的浓度，实现对于辅酶的检测[22]。

骆冰[22]等通过基于珠磨破碎、辅以加酸或碱并加热的萃取模式，采用合适的酶循环反应体系，建立了高效的胞内 NADH 检测方法。李建[23]等通过酶循环法测定了厌氧发酵有机酸体系中的 NADH 浓度。

酶循环法操作简便但是循环次数多，过程繁琐且耗时较长

1.2.3 荧光法

$NADH+H^+$在 260nm 和 340nm 处各有一光线吸收峰，而 NAD^+则只有 260nm 一处吸收峰，这

是很多代谢试验中，测量代谢率的物理依据,也是区别两者的重要属性。

在相关条件下，NADH 的量与其释放的荧光强度信号成正比[24]。据此，Renault G[25]等为了对离体生物器官的新陈代谢进行了研究，采用激光感生 NADH 使之激发荧光进而进行检测。同时，根据 Piston [26]等通过对葡萄糖代谢过程的的研究证实，在线粒体和细胞质中，NADH 的浓度与荧光强度有好的定量关系。Qianru[9]等则采用双光子自体荧光动力学成像的方法对 NADH 在乳腺癌细胞和正常癌细胞中的浓度进行了较为直观的检测与表征。

此外，单位菌体胞内 NADH 含量恒定[16][17]，细菌菌数与 NADH 含量应呈正相关关系。据此，用荧光法检测 NADH 浓度，可实现对发酵过程细胞浓度和其生长代谢状态的各种参数的进一步监测[18]。

荧光法相对成本更高，对于设备的要求较高，降低了使用的可能性[22]。

1.2.4 电化学检测方法

电化学检测法以其对物质检测有更好的灵敏度、更高的响应性和快速的在线分析能力近年来广受关注[27]。20 世纪 80 年代人们开始对 NADH 的电化学氧化再生和测定的研究。

电化学检测法的原理是利用物质在氧化还原反应中电子的转移,将其转变为电流信号进而表征被检测物质的浓度。

NADH在电极表面的直接电化学氧化一般经历（1）NADH失去一个电子生成自由基$NADH^+$（2）$NADH^+$进一步脱氢生成自由基NAD（3）NAD再失去一个电子生成NAD^+ 三个过程。据此，在两电极之间施加一恒定电位,当电活性组分(NADH)经过电极表面时发生氧化还原反应(电极反应)，电量（Q）的大小符合法拉第定律：

$$Q=nFN \tag{2-1}$$

因此，反应的电流（I）为：

$$I=nFdN/dt(1\text{-}2) \tag{2-2}$$

(其中，n为每摩尔物质在氧化还原过程中转移的电子数，F为法拉第常数， N为物质的摩尔数，t为时间)

当流动相的流速一定时，dN/dt与组分在流动相中的浓度有关。通过对电流（I）的检测即可实现对NADH浓度的检测[4]。

由于NADH 在裸电极表面具有很高的过电势(> + 1 V)， 易引起被分析样品中尿酸、抗坏血酸等物质的干扰，同时二聚等副反应严重， 容易引起电极表面中毒。如何降低NADH氧化过电势成为研究者们的首要目标[28]。

电子媒介体曾经一度是研究者们的宠儿。电子媒介体是人工合成的有机化合物， 能参与某些生化反应并加速反应中电子传递的速率。在电子媒介体的参与下辅酶的电化学氧化反应的通式如下[4]：

$$NADH + Mox \rightarrow NAD^+ + Mred \tag{2-3}$$

$$Mred \rightarrow e^- + Mox \tag{2-4}$$

被用作辅酶电化学氧化反应的电子媒介体的有机化合物已有很多,包括：二茂铁及其衍生物[29]、有机染料分子(甲苯胺蓝[30]、奈尔蓝A[31]、亚甲基蓝[32]、普鲁士蓝[33][34]、劳氏紫[35]、凡拉明蓝[36]、麦尔多拉蓝[37]、醌类[38]、四氰基对二次甲基苯醌(TCNQ)，四硫富瓦烯(TTF)、吩噻嗪及其衍生物[39]、苯胺类(四甲基联苯胺[40]、苯基偶氮苯胺[41]、聚邻苯二胺[42])、生物分子(鸟嘌呤[43]或其碱基衍生物[44]、拟雌烷[45])、3, 4-二羟基苯甲醛[46]等。除此之外,NADH氧化酶和纳米材料对电极的修饰也能起到降低NADH过电势提升电极稳定性的作用。

利用电化学检测方法在检测成本、检测灵敏度与检测可操作性上的优势，本文旨在对电

化学手段检测 NADH 的探讨与改良。

1.3 DNA 电化学传感器

随着生物学、医学和化学等学科的迅猛发展，核酸分析在生物化学和分子生物学研究中有极为重要的意义，在环境监测和临床疾病的检测上均得到了广泛应用。DNA 传统的分析方法是用 ^{125}I 和 ^{32}P 等放射性同位素标记 DNA 探针，但由于放射性物质的使用受限，监测手段的发展也受到限制[47]。近年来，DNA 电化学传感器以其操作简便、快速、灵敏等优势[48][49]，利用电极表面杂交反应特异性识别 DNA 片段的电化学方法，引发了研究者们极大的兴趣，得到了迅猛的发展[50]。

1.3.1 DNA 电化学传感器构成

DNA 电化学传感器主要由电化学识别物质和固定 DNA 的电极和两部分组成，起着选择性识别特异靶基因作用的 DNA 被固定在用作换能器的电极表面;杂交过程因为碱基互补配对原则而具有极高的特异度和敏感度[47]。换能器将生物学信号转变成可检测的光、电、声波等物理信号，根据这些物理信号可以测得靶基因是否存在和含量多少[51]。由于换能器的不同形成各种类型的 DNA 传感器，其中以电化学换能器研究最多。电化学传感器主要通过杂交指示剂将生物学信号转化为电化学信号进行表征。

1.3.2 DNA 电化学传感器的应用

1.3.2.1 疾病检测

Wang[52]等通过氧化阳极法，以$Co(Phen)_3^{3+}$作指示剂，固定两个长度分别为27和36碱基且与结核杆菌(Mycobateria tuberculosis)基因DR区相对应的DNA探针在碳糊电极表面，利用计时电位分析法，实现了DNA传感器用于结核杆菌诊断的初步探索[52]。

武汉病毒研究所[53]用化学免疫法固定乙型肝炎病毒(HBV)的DNA探针，用来与牛肠磷酸酶(CAP)标记的互补探针杂交，利用光动力计测量杂交带人的CAP释放出的光强度，验证了DNA传感器进行HBV诊断的可行性[53]。吴少慧等人[54]通过阳极氧化法，充分利用石英晶体的特性，通过将HBV的DNA探针固定在镀金的石英晶体表面，成功组装能满足临床HBV诊断要求且性能稳定的石英晶体传感器。日本的Hashimoto等人[55]为用电化学方法检测血清HBV DNA的竞争性PCR扩增产物，通过将巯基标记的HBV 探针自组装在金和钛电极表面，实验结果表明该方法在监测过程中不受血清中其它DNA成份的干扰，具有良好的特异检测性[55]。

Wan[56]在固定电压下，以碳糊电极为基底电极，将 ssDNA 固定在活化的电极表面进行杂交及指示剂的嵌入，用计时电位溶出法进行电化学分析，为辅助血液 HIV-1DNA 筛选，提供可靠保证。Bianchi[57]等用化学免疫法制成 I 型艾滋病毒(HIV-1)DNA 表面等离子体传感器，该方法以其操作简单、快速准确且杂交后的传感器经酸变性后还可重复使用的优势闻名。

Hashimoto[48]等用 DNA 探针修饰的金电极，采用电化学活性染料 Hoechst33258 进行致癌基因检测。Millan[58]等用十八胺或十八酸修饰碳糊电极，用亚毫摩尔量 $Co(bpy)_3(ClO_4)_3$，$Os(bpy)_3Cl_3$或 $Co(phen)3(ClO_4)_3$作为杂交指示剂，成功检测胞囊纤维变性基因。Zhou[59]等用静电吸附、自组装和化学免疫三种方法组合制成石英晶体传感器，在检测 B-地中海贫血症患者血清的 PCR 扩增产物时准确率非常高。

Xingyan[60]等人采用核酸分子杂交技术，以道诺霉素(DRN)为杂交指示剂，将单链DNA(ssDNA—1)共价固定在石墨电极表面，使电极表面的ssDNA—1与溶液中互补的ssDNA—2杂交形成双链DNA(dsDNA)．具有电化学活性的DRN在杂交过程中能够嵌入DNA的双螺旋结构中，形成DNA电化学传感器，成功检测在不同致突变剂作用下的DNA结构的变异、

1.3.2.2 环境监测

鉴于人类诸多疾病均以环境为载体进行传播，若能及时发现环境中病原物的存在，就可以尽早进行疾病预防，避免环境中的病原微生物或基因诱变剂对人类健康的威胁。近年来，

利用DNA传感器简便、快捷、准确的优点，用其监测环境中的病原微生物和基因诱变剂成为研究者们研究的热点[51]。

Marrazza[61]等将小牛胸腺DNA在一定电压下固定到电极表面，利用小牛胸腺DNA与水样中污染物的嵌入反应，用计时电位溶出分析法分析鸟嘌呤的氧化峰的方法检测水样中的道诺霉素、联苯和黄曲霉毒素，制成用于环境监测的生物传感器。该课题组也将沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis)的特异性探针吸附在经过屏蔽蚀刻处理后的石墨电极上，用计时电位计检测探针与合成互补探针的杂交信号[61]，成功制备检铡的质量浓度最低限至0.2mg/L的生物传感器。

Fojta[62]等利用离子型自由基对DNA链进行攻击时引起起DNA链的断裂，改变传感器的伏安特性曲线的原理制成DNA电化学汞传感器，通过伏安计监测氢氧根自由基浓度，发现它的灵敏度足用来对工业废水中的自由基进行监控。

1.3.3 DNA 传感器的改良

与常规的核酸检测相比，DNA传感器有可以进行液相杂交检测、可以进行DNA实时（real-time）检测、可以对活体内核酸动态进行检测、可以进行DNA的大量智能化检测、灵敏度高、特异性强、无污染等优点。但在响应时间的缩短和灵敏度的提高上仍有待改进[63]。同时如何将DNA有效的固定在电极表面也成为研究者们研究的热点。

1.3.3.1 DNA 四面体结构的提出

DNA在电极表面的有效固定经历了从简单的巯基单链DNA耦合的一维探针到DNA局部互补形成二维圆环的耦合探针到DNA四面体三维探针的演变[64]。随着Pei[65]等首次提出四面体DNA的理念并成功搭建四面体探针（tetrahedron-structured probe，TSP）到现在，对四面体DNA探针的改良与应用层出不穷。

1.3.3.2 DNA 四面体结构的应用

Pei[65]等采用传统“三明治”检测手段，将DNA四面体结构与辣根过氧化物酶（HRP）相结合使用，搭建出一种可通过双氧水的氧化还原引发的电流变化的高灵敏度检测目标DNA的E-DNA传感器。该课题组[65]同时也将抗凝血酶适配子作为探针与DNA四面体结合，制备出一种可以检测低至100pm凝血酶的生物传感器。进一步研究后，Pei等[66]通过抗体与TSP的结合实现了DNA传感器对于特异性蛋白的检测功能。Yanli等[67]通过DNA四面体结构与可卡因适配子的结合实现了蛋白免疫、低检测限、高灵敏度的可卡因生物传感器。Na[68]等通过四面体DNA实现了对DNA调节的电荷传输（charge transport，CT）的动力学研究。Hao[69]等充分利用四面体DNA的结构特性，创新性的用DNA四面体纳米结构搭建数字电路中的“与”、“或”、“非”、“异或”门等逻辑电路基本元件。Jiang[70]等利用四面体DNA结构制成智能靶向给药纳米载体，很好的解决了单独裸露DNA不能通过细胞膜进入细胞的问题。

1.3.3.3 四面体结构的制备与优势

四面体DNA由三条55个核苷酸长度硫醇化的DNA片段和一条80个核苷酸长度硫醇化的DNA片段通过碱基互补配对组成[71]。实验中将四条DNA片段加入缓冲液中，加热至95℃2分钟后迅速冷却至4℃[71]，通过碱基互补配对，可自组装成带探针的四面体结构。而后再将混合液滴加在金电极表面，通过硫巯键将四面体DNA有效稳固的固定在电极表面，制成生物电极。与传统的一维、二维结构相比，3维四面体结构极大的增强了人们控制电极探针表面密度、探针方向和表面钝化的能力[64]，同时独特的四面体立体结构也可增加溶液与电极的接触面积。

利用DNA四面体结构稳定性高、接触面积大、空间结构丰富等特性，本文尝试将其作为支架，鉴于DNA不能导电，为增加电极的导电能力，我们尝试引入热门纳米材料石墨烯，将石墨烯碎片吸附在四面体之间，以实现NADH的高灵敏度检测。

1.4 石墨烯

1.4.1 石墨烯概述

2004 年，英国曼彻斯特大学物理学家安德烈·海姆和康斯坦丁·诺沃肖洛夫，通过反复撕裂粘有石墨片的胶带，偶然获得越来越薄的石墨薄片，而其中部分样品仅由一层碳原子构成。这种单层碳原子便是石墨烯。“在二维石墨烯材料的开创性实验”为由，鉴于其成功地在实验中从石墨中分离出石墨烯，证实石墨烯这种物质的单独存在性，两人共同获得 2010 年诺贝尔物理学奖[72]。

石墨烯（Graphene）是一种由碳原子以 sp^2 杂化轨道组成六角型呈蜂巢晶格的平面薄膜，是一种只有一个碳原子厚度的二维材料[73]。它可以被包装成零维（0D）的富勒烯，卷成了一维（1D）的纳米管或堆叠成三维（3D）的石墨[74]。近年来石墨烯纳米毯[75]、纳米片[76]、片晶[77]、纳米纤维[78]纳米带[79]和量子点[80]等也陆续被应用于电化学研究。

石墨烯是目前世上最薄却也是最坚硬的纳米材料[81]，只吸收 2.3%的光[82]；导热系数高达 5300 W/m·K，常温下其电子迁移率超过 15000 cm^2/V·s，是目前世上已发现材料中电阻率最小的[73]。

利用石墨烯导热系数高于金刚石和碳纳米管，电子迁移率高于比纳米碳管和硅晶体，电阻率低于铜和银的种种优势，可以将之被用于修饰电化学电极，以提高电化学传感器检测的灵敏度和检测精度。

然而，一维平面的石墨烯本身易发生卷曲、团聚、层间的堆叠，其在溶剂中的分散性也受到限制，使得单一组分的石墨烯无法满足电化学检测的所有要求，因此有必要通过将其与其他材料复合，借助不同组分的协同作用进一步改善石墨烯的电学、化学和电化学性质，拓展和增强石墨烯的电化学效应[83]。

1.4.2 石墨烯-贵金属纳米粒子复合修饰电极

石墨烯和贵金属纳米粒子（NPs）复合修饰电极因为贵金属纳米粒子极大的比表面积、强反应性和导电性、表面活性位点多等优点[83]近年来受到了研究者们的青睐。贵金属如金（Au）、铂（Pt）、钯（Pd）等贵金属纳米粒子已被广泛用作电催化剂[84-87]，在此基础上，石墨烯贵金属纳米粒子复合材料修饰电极也为蛋白质和酶等生物分子的固定提供了与本体相似的微环境，保持其酶促和电化学活性[83]。

Niu[88]等发现石墨烯与 AuNPs 复合后对双氧水和氧气的电催化活性明显增大。Jingjing[89]等将石墨烯、金纳米粒子和 Hb 有效结合，修饰后的玻碳电极在对亚硝酸盐的检测上拥有较好的线性相应范围和低检测限的优势。Li[90]和 Ramaprabhu[91]等在石墨烯-AuNP 复合电极上进一步吸附葡萄糖氧化酶（GOD），证实石墨烯-AuNP 复合材料保留了 GOD 的生物活性。Zhang[91]等利用石墨烯-PdNP 杂化修饰电极对葡萄糖电催化氧化高的电化学活性制备出高稳定性、高选择性的葡萄糖检测传感器。Raj[92]等在石墨烯纳米毯上修饰 PtNPs，得到的 GNS-Pt 杂化材料在检测双氧水和胆固醇上非常灵敏且选择性好。

1.4.3 石墨烯-金属氧化物/半导体复合修饰电极

金属氧化物/半导体 NPs 具有较大的比表面积和独特的电子可调性质，将石墨烯与之复合后得到的材料具有卓越的电催化、电化学传感和电化学能量转换性质[83]。

Wang[93]等发现，由于石墨烯和硫化镉（CdS）NPs 在葡萄糖氧化酶（GOD）催化反应中起到的协同作用，二者复合后显示出对 GOD 更快的电子转移性质，制德的传感器对葡萄糖的检测显示出优异的分析性能。Liu[94]等利用氧化锌（ZnO）纳米球优异的生物相容性和电子传输特性，将石墨烯、ZnO 和血红蛋白（Hb）制备生物复合膜用于检测双氧水，得到一个灵敏度高、再生性好、稳定性强的传感器结构。Li[95]等成功合成出一种新型的电催化 MnO_2/氧化石墨烯杂化纳米结构来实现双氧水的无酶检测。

Yan[96]发现，用石墨烯修饰的玻碳电极（GCE）可将多巴胺、抗坏血酸、尿酸的氧化还原峰电压分离，进而可实现三者的同时检测。在此基础上，Fan[97]等利用 TiO_2 能增强酶的催化活性和促进酶与电极之间直接电子转移的能力，用简单的水热合成法制备石墨烯- TiO_2 纳米复合材料修饰 GCE,明显抑制抗坏血酸和尿酸的氧化，对多巴胺的氧化显示出显著的电子转移动力学和电催化活性。

1.4.4 石墨烯-有机材料复合修饰电极

Chen[98]等首创 CS 复合膜和石墨烯复合以固定 Hb 的生物传感器结构，其对双氧水显示出长期的生物电催化活性。Chen[99]等在石墨烯/Nafion 薄膜上固定 GOD 后修饰 GCE，在检测葡萄糖上有很好的线性相应与稳定性。Huang[100]等利用聚苯胺（PANI）导电性高、环境稳定性和生物相容性好的优势，将石墨烯和 PANIws 修饰 GCE，制备出一种对互补 DNA 序列检测表现出快速的电流响应、高灵敏度和良好的贮存稳定性的 DNA 生物传感器。同时，鉴于普鲁士蓝（PB）对双氧水还原的快速催化，Niu[101]等通过电沉积 PB 于石墨烯基质上，得到了石墨烯-PB 修饰 GCE 新型复合电极，其对双氧水的还原显示出优异的电催化活性。

1.4.5 石墨烯-离子液体复合修饰电极

离子液体（ionic liquid，IL）由带正、负电荷的离子组成，是一种液态的离子化合物，多指在低于 100℃ 时呈液体状态的熔盐[83]。Niu[102]等利用 IL 良好的导电性、热学和电化学稳定性、生物相容性、较宽的电化学窗口、易与其他物质分离和可以循环利用[103-105]等优点首先对粒子液体进行聚乙醇胺功能化，而后将之与石墨烯复合，搭建石墨烯-IL 复合电极，其在对氧气和双氧水的还原上表现出较好的电催化活性。同时，该课题组[106]也发现石墨烯-IL/CS 修饰电极在检测烟酰胺嘌呤二核苷酸（NADH）时，可以成功地大幅度地降低 NADH 的氧化过电势，引入乙醇脱氢酶（ADH）后，借助 NADH 的中转作用，制备出高灵敏度、低检测限的乙醇检测器。

1.4.6 创新型石墨烯修饰电极

Fei[107]等将石墨烯粉末通过静电吸引吸附在聚二甲硅氧烷微圆柱上，此“3D”石墨烯结构在增大接触面积的同时，充分利用石墨烯的强导电性，在检测苯酚上拥有极低的检测限

DNA 是一种常见的天然生物大分子，和纳米材料之间的复合也是今年来材料学领域研究的热点，在酶的固定和直接电化学研究上也有所突破[83]。Li[108]等首次制备出 DNA-石墨烯分散纳米毯，对低聚核苷酸的超灵敏检测具有优异的选择性。该课题组[109]还将生物相容性的单链 DNA（ss-DNA）与石墨烯复合，设计出一种可以实现氧化还原酶的有效固定的新型电化学平台，并尝试将其应用于生物传感的实际应用中。

1.5 本论文主要研究

NADH 的含量与多种疾病的相关性使得 NADH 的检测成为近年来的热门课题。电化学检测手段以其在检测成本、检测灵敏度与检测可操作性上的优势于传统检测方法中脱颖而出。为降低 NADH 氧化过电势，利用 DNA 四面体结构稳定性高、接触面积大、空间结构丰富等特性以及石墨烯高导电率、低电阻率等特性，本文尝试构建一种 NADH 高灵敏度检测复合电极，其搭建主要包括三个步骤（如图 1-1 所示）：

（1)将三条 55 个核苷酸长度硫醇化的 DNA 片段和一条 55 个核苷酸长度未硫醇化的 DNA 片段通过碱基互补配对自主装成 DNA 四面体结构

（2）将组装好的 DNA 四面体结构通过硫巯键固定在打磨好的金电极表面，增加电极有效接触面积

（3）引入氨基化石墨烯薄膜，将氨基化石墨烯碎片吸附在 DNA 四面体之间，利用石墨烯大 π 键的电子储存能力增加电极导电能力

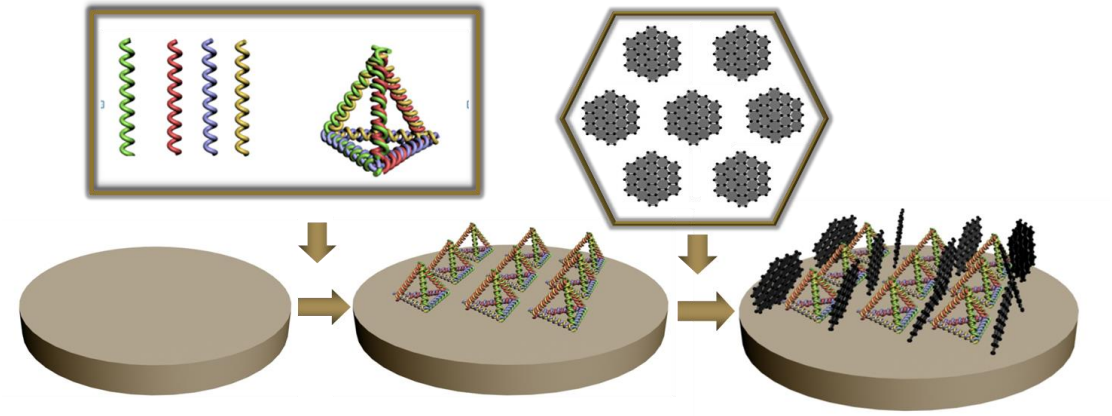


图 1-1 金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极搭建步骤示意图

将此金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极用于 NADH 检测，探究其在检测过程中的相关电化学特性。

第二章 DNA 四面体搭建

2.1 实验试剂与仪器

2.1.1 实验试剂

浓盐酸	国药集团化学试剂有限公司
NaOH	国药集团化学试剂有限公司
NaCl	Acros 公司
KCl	Vetec 公司
Na_2HPO_4	Acros 公司

KH2PO4	Adamas 公司
$MgCl_2$ $6H_2O$	Adamas 公司
PH 缓冲液 PH4.01	Hach 公司
PH 缓冲液 PH7.00	Hach 公司
PH 缓冲液 PH10.01	Hach 公司
三(2-羧乙基)膦 盐酸盐（Tris）	Acros 公司
乙二胺四乙酸（EDTA）	Greagent 公司
高温硅油	Acros 公司
琼脂糖	Bio-Rad 公司
HydraGreen™	HydraGene 公司
DNA	Takara 公司，HPLC 纯化
20bp DNA Ladder Marker	Takara 公司
50bp DNA Ladder Marker	Takara 公司
100bp DNA Ladder Marker	Takara 公司
溴酚蓝	上海博彩生物科技有限公司
TAE 缓冲液	上海双螺旋生物科技有限公司

2.1.2 实验仪器

PGC 453E 电子分析天平	ADAM 公司
PB-10 pH 计	Sartorius 公司
漩涡振荡器	ABSON 公司
C-MAG HS7 加热磁力搅拌器	IKA 公司
ETS-D5 电子接触式温度计	IKA 公司
Rocker300A 真空过滤装置	Rocker 公司
尼龙（Nylon）滤膜 0.22μm 47mm	Rocker 公司
Direct-Pure 2-Pass RO 10 纯水系统	Rephile 公司
移液器（0.5-5ml）	Eppendorf 公司
移液器（100-1000μl）	Eppendorf 公司
移液器（20-200μl）	Eppendorf 公司
移液器（0.5-10μl）	Eppendorf 公司
8Z0438 高温灭菌锅	SANYO 公司
720BR/02387 化学发光检测系统	Bio-Rad 公司
EPS-300 数显式稳压稳流电泳仪	上海天能科技有限公司
HE-120 多功能水平电泳槽	上海天能科技有限公司

2.2 实验方法与步骤

2.2.1 溶液配制

（1）PBS 缓冲液配制：称量 8g NaCl，0.2gKCl，1.42g Na_2HPO_4，0.27g KH_2PO_4 置于 1L 烧杯中；加入 800ml DI water，搅拌均匀；调节 pH 至 7.4；容量瓶定容至 1L；使用真空过滤装置过滤；高温灭菌，室温保存。

（2）Tris 缓冲液配制：称量 121.1g Tris 置于 1L 烧杯中；加 入 800mL DI water，搅拌均匀；用调节 pH 至 8.0；容量瓶定容至 1L，使用真空过滤装置过滤；高温灭菌，室温保存。

（3）TE 缓冲液配制：称量 146.12gEDTA 置于 1L 烧杯中；加入 800ml DI water，搅拌均匀；调节 pH 至 8.0；容量瓶定容至 1L；将 10ml 1M 的 Tris、2ml 0.5M 的 EDTA 和 800ml

DI water 混合，调 pH 至 8.0，容量瓶定容至 1L，使用真空过滤装置过滤；高温灭菌，室温保存。

（4）TM 缓冲液配制：称量 10.15g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$，与 20ml 1M 的 Tris 和 800ml DI water 混合均匀；调节 pH 至 8.0；容量瓶定容至 1L；使用真空过滤装置过滤；高温灭菌，室温保存。

2.2.2 DNA 四面体搭建

（1）特异性设计 7 条 DNA 单链分子，每条含 55 个碱基序列。

A 链：5’-ACATTCCTAAGTCTGAAACATTACAGCTTGCTACACGAGAAGAGCCGCCATAGTA-3’

B 链：5’-HS-C_6-TATCACCAGGCAGTTGACAGTGTAGCAAGCTGTAATAGATGCGAGGGTCCAATAC-3’

C 链：5’ -HS-C_6-TCAACTGCCTGGTGATAAAACGACACTACGTGGGAATCTACTATGGCGGCTCTTC-3’

D 链：5’ -HS-C_6-TTCAGACTTAGGAATGTGCTTCCCACGTAGTGTCGTTTGTATTGGACCCTCGCAT-3’

B_1 链：5’- TATCACCAGGCAGTTGACAGTGTAGCAAGCTGTAATAGATGCGAGGGTCCAATAC-3’

C_1 链：5’ - TCAACTGCCTGGTGATAAAACGACACTACGTGGGAATCTACTATGGCGGCTCTTC-3’

D_1 链：5’ -TTCAGACTTAGGAATGTGCTTCCCACGTAGTGTCGTTTGTATTGGACCCTCGCAT-3’

（2）将设计好的 4 条 DNA 单链（$AB_1C_1D_1$ ，ABCD）分子排列组合，溶于 TCEP/TM 缓冲液，配置成 15 组 50μL 溶液，每组溶液成分如表 2-1、表 2-2 所示。

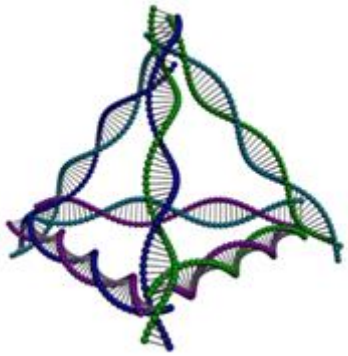
表 2-1　无巯基 DNA 混合溶液（单位：μL）

序号	A 链	B_1 链	C_1 链	D_1 链	TM	TCEP
1	2	0	0	0	43	5
2	0	2	0	0	43	5
3	0	0	2	0	43	5
4	0	0	0	2	43	5
5	2	2	2	0	39	5
6	2	2	0	2	39	5
7	2	0	2	2	39	5
8	0	2	2	2	39	5
9	2	2	0	0	41	5
10	2	0	2	0	41	5
11	2	0	0	2	41	5
12	0	2	2	0	41	5
13	0	2	0	2	41	5
14	0	0	2	2	41	5
15	2	2	2	2	37	5

表 2-2　巯基化 DNA 混合溶液（单位：μL）

序号	A 链	B 链	C 链	D 链	TM	TCEP
1	2	0	0	0	43	5
2	0	2	0	0	43	5
3	0	0	2	0	43	5
4	0	0	0	2	43	5
5	2	2	0	0	41	5
6	2	0	2	0	41	5
7	2	0	0	2	41	5
8	0	2	2	0	41	5
9	0	2	0	2	41	5
10	0	0	2	2	41	5
11	2	2	2	0	39	5
12	2	2	0	2	39	5
13	2	0	2	2	39	5
14	0	2	2	2	39	5
15	2	2	2	2	37	5

（3）将上述混合液振荡 2 分钟，然后在 95℃加热 2 分钟并 30 秒迅速冷却到 4℃。搭建的 DNA 四面体结构示意图如图 2-1 所示。



、

图 2-1 DNA 四面体结构示意图

2.2.3 DNA 凝胶电泳

（1）凝胶液配制：取 50×TAE 缓冲液，稀释为 1×TAE 缓冲液，取 50mL 置于锥形瓶，加入 0.9 g 琼脂糖，溶匀后置于微波炉加热至琼脂糖全部融化为液体，摇动混匀，配制成 1.8%琼脂糖凝胶液，加入 1μL 核酸染色剂 HydraGreen 染色。

（2）凝胶：洗净晾干电泳槽内有机玻璃内槽，置内槽于水平位置，放入制胶玻璃板并在固定位置放好梳子。将琼脂糖凝胶液冷却到 65℃左右后，摇动混匀缓慢倒入内槽玻璃板上形成均匀胶层。将整个凝胶装置置于室温环境中 35 分钟，待凝胶完全凝固后，垂直向上轻拔梳子，取出凝胶及内槽，放入电泳槽中，添加稀释好的 1×TAE 电泳缓冲液直至其没过

胶板。

（3）加样：在最左边泳道加入 6μL 20bp DNA Ladder Marker，在最右边泳道加入 6μL 50bp DNA Ladder Marker。取 5μL DNA 样品（15 组），分别与 1μL 溴酚蓝混合均匀，用 10μL 移液器将所得混合液分别加入各泳道之中。

（4）电泳：设置电压 100V，放置好电泳盖，保证正（红色）负（黑色）极正确接通，通电开启电泳，样品逐渐开始从负极向正极方向移动。当染色样品移动到距离胶板下 2/3 处时，停止电泳。

（5）紫外检测：取出凝胶片，置于发光检测系统中，开启紫外光照射，观察染色 DNA 在紫外光下的荧光条带分布情况，调整视野和曝光等参数，通过凝胶成像系统进行拍照并保存。

2.3 实验结果与讨论

$AB_1C_1D_1$ 搭建无巯基 DNA 四面体结构的琼脂糖凝胶电泳实验结果如图 2-2 所示，其中最左侧为 100bp DNA Ladder Marker 梯度，从图中可以看出 3-6 列单链 DNA 碱基数低于 100bp；10-15 列两条单链 DNA 随机组合的碱基数位于 100bp 与 200bp 之间且接近 100bp；7-9 列三条单链 DNA 随机组合的碱基数同样位于 100bp 与 200bp 之间，但明显高于两条单链 DNA 组合，接近 200bp；16-18 列四条单链 DNA 组合的碱基数位于 200-300bp 之间,接近 200bp，完全符合理论值。

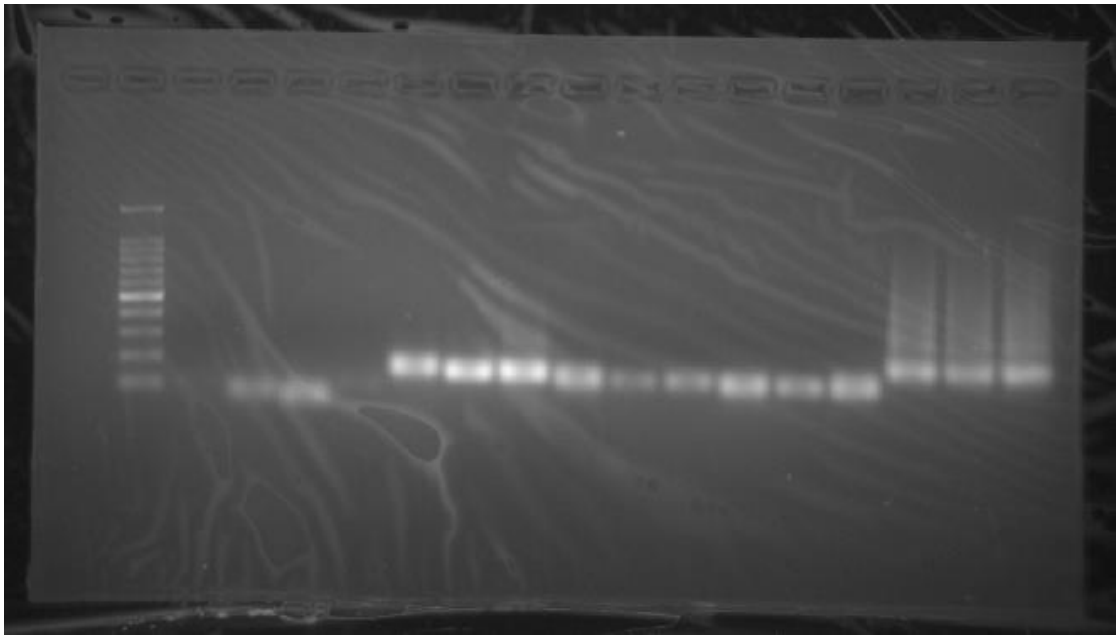


图 2-2 无巯基 DNA 四面体凝胶电泳结果

ABCD 搭建巯基化 DNA 四面体结构的琼脂糖凝胶电泳实验结果如图 2-3 所示，其中最左侧为 20bp DNA Ladder Marker，右侧为 50bp DNA Ladder Marker。如图所示，2-5 列单链 DNA 碱基数近似平行于 50bp；6-11 列两条单链 DNA 随机组合的碱基数位于略高于 100bp；12-15 列三条单链 DNA 随机组合的碱基数同样位于 150bp 与 200bp 之间；16 列四条单链 DNA 组合的碱基数位于 200-250bp 之间，完全符合理论值，证明了 TCEP 能有效阻止巯基 S-S 键的形成，降低其对四面体结构在金电极表面自组装的影响。

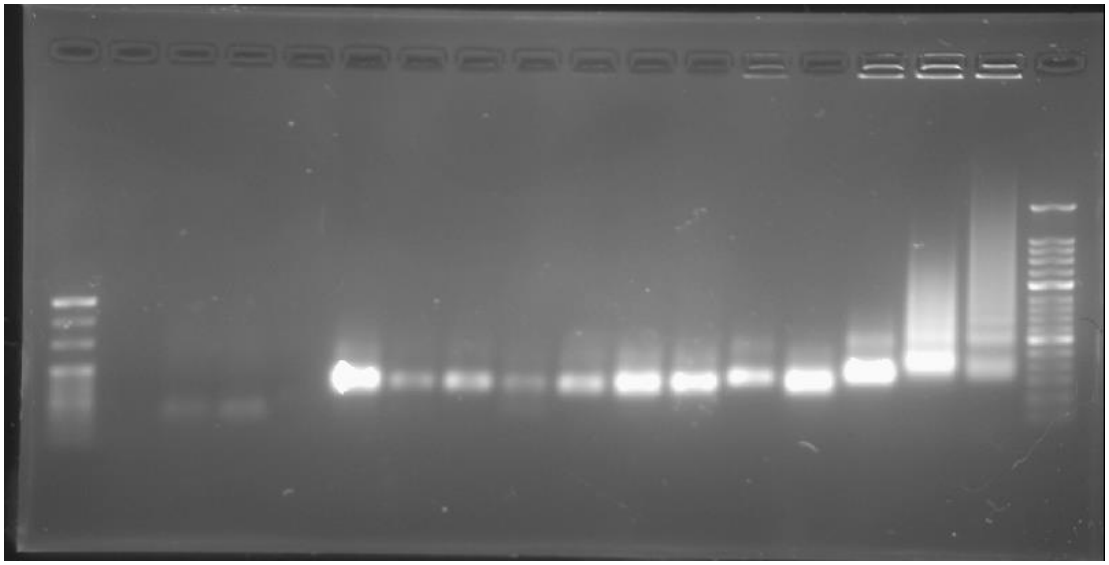


图 2-3 巯基化 DNA 四面体凝胶电泳结果

2.4 本章小结

本章通过碱基互补配对的无巯基和巯基化的四条 DNA 基因序列搭建 DNA 四面体结构，并用 DNA 琼脂糖凝胶电泳实验验证了四面体结构的成功搭建。并且验证了双硫键在 TCEP 的存在下对四面体结构的影响减弱，为下一步四面体在金电极表面的自组装提供了基础。

第三章 金电极-DNA 四面体复合

3.1 实验试剂与仪器

3.1.1 实验试剂

浓硫酸	国药集团化学试剂有限公司
35% H_2O_2	Acros 公司
乙腈	Acros 公司
$K_3Fe(CN)_6$	Adamas 公司
KCl	Vetec 公司
TCEP	Acros 公司

3.1.2 实验仪器

CHI660E 电化学工作站	上海辰华仪器公司
CHI101 2mm 直径金盘电极	上海辰华仪器公司
CHI111 Ag/AgCl 参比电极	上海辰华仪器公司
CHI115 铂片对电极	上海辰华仪器公司
CHI120 电极抛光材料	上海辰华仪器公司
CHI220 简单电极架	上海辰华仪器公司
SB-5200D-300 超声波清洗器	宁波新芝生物科技股份有限公司
移液器（0.5-5ml）	Eppendorf 公司

移液器（100-1000μl）	Eppendorf 公司
移液器（20-200μl）	Eppendorf 公司
移液器（0.5-10μl）	Eppendorf 公司
PGC 453E 电子分析天平	ADAM 公司
MP-1B 金相试样磨抛机	上海万衡精密仪器有限公司

3.2 实验方法与步骤

3.2.1 溶液配制

（1）“食人鱼”溶液：用 98%的浓 H_2SO_4 与 35%的 H_2O_2 按体积比 3:1 混合配制

（2）1 mol/L 稀硫酸：用 1.6mL 98%浓 H_2SO_4 +28.4mL DI 水配制

（3）2mmol/L$K_3Fe(CN)_6$ in 0.1mol/L KCl 溶液：用 0.0329g $K_3Fe(CN)_6$ + 0.3725g KCl 定容至 50mL 配制而成

3.2.2 电极物理抛光处理

将金电极垂直放置于 MP-1B 金相试样磨抛机磨盘上，调节转速为 200r/min，物理打磨电极表面氧化层，直到电极表面如镜面般光滑。

3.2.3 电极化学处理

将物理打磨好的金工作电极浸泡在食人鱼溶液中 10 分钟后用去离子水冲洗干净

3.2.4 超声清洗电极

将化学处理后的电极浸泡在去离子水中，超声清洗 5 分钟后，再将电极浸泡在乙腈溶液中，超声清洗 5 分钟

3.2.5 电化学验证

将处理好的电极置于 1mol/L 的稀硫酸中，采用循环伏安法，扫描电压范围 0-1.5V，扫面速率 100 mV/s，扫描 20 圈，通过观察所得图像以验证电极打磨成功。

3.2.6 SAM 过程探索

将成功打磨好的电极置于 2mM $K_3Fe(CN)_6$ in 0.1M KCl 溶液中，采用循环伏安法，扫描电压范围-0.3-0.6V，扫面速率 100 mV/s，扫描 2 圈，取第二圈数据；然后将电极浸泡在 0.25uM 带巯基的 DNA 四面体溶液中，分别在隔 10 分钟、30 分钟、60 分钟、120 分钟、180 分钟、240 分钟和 12 小时后将电极取出，置于 2mM $K_3Fe(CN)_6$ in 0.1M KCl 溶液中，采用循环伏安法，扫描电压范围-0.3-0.6V，扫面速率 100 mV/s，扫描 2 圈，取各自第二圈数据，作图比较。

3.2.7 DNA 四面体最佳浓度探索

将成功打磨好的电极置于 2mM $K_3Fe(CN)_6$ in 0.1M KCl 溶液中，采用循环伏安法，扫描电压范围-0.3-0.6V，扫面速率 100 mV/s，扫描 2 圈，取第二圈数据；然后将三个电极分别浸泡在 250nM、25nM、2.5nM 带巯基的 DNA 四面体溶液中，12 小时后取出，再置于 2mM $K_3Fe(CN)_6$ in 0.1M KCl 溶液中，采用循环伏安法，扫描电压范围-0.3-0.6V，扫面速率 100 mV/s，扫描 2 圈，取各自第二圈数据，作图比较。

3.2.8 DNA 四面体在金电极表面自组装

将成功打磨好的电极置于 2mM $K_3Fe(CN)_6$ in 0.1M KCl 溶液中，采用循环伏安法，扫描电压范围-0.3-0.6V，扫面速率 100 mV/s，扫描 2 圈，取第二圈数据；然后将电极浸泡在 0.25uM 带巯基的 DNA 四面体溶液中，180 分钟后取出，再置于 2mM $K_3Fe(CN)_6$ in 0.1M KCl 溶液中，采用循环伏安法，扫描电压范围-0.3-0.6V，扫面速率 100 mV/s，扫描 2 圈，取第二圈数据；比较两次结果，验证自主装成功。

3.3 实验结果与讨论

3.3.1 金电极打磨验证

随着扫描圈数的不断增加，金电极的循环伏安曲线逐渐趋于稳定，由图 3-1 中知，其在 1.2V 附近有氧化峰，在 0.8-1.0V 之间有一个很尖锐的还原峰，证明电极物理打磨良好，金电极表面的金原子排列整齐，可以进行下一步实验。

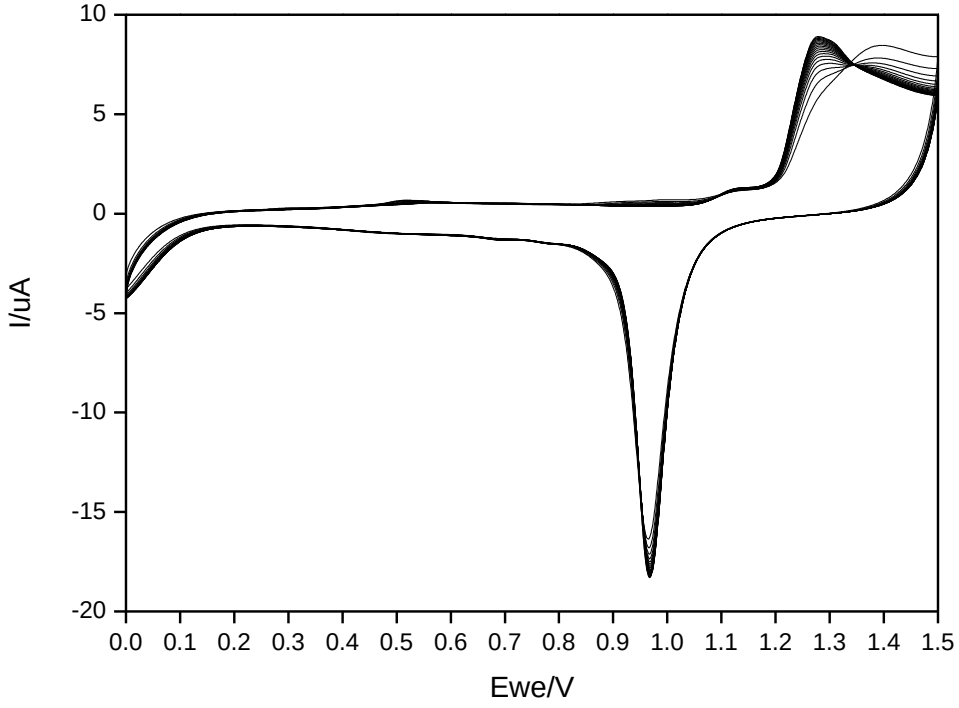


图 3-1 裸金电极在 1M 硫酸中的循环伏安图（0-1.5V，20 圈，100mV/s）

3.3.2 SAM 过程探索

为探讨带巯基的 DNA 四面体与金电极表面的金原子的自组装过程，在固定 DNA 四面体溶液浓度为 250nM 的前提下，我们做了不同时间下的电极检测。铁离子的氧化还原与电极表面的金原子数息息相关，循环伏安图中氧化还原电流的大小正比于电极表面的金原子数量，故而可以通过其氧化还原峰的高低定性的表征电极表面情况。由图 3-2 可知，前两个小时内，峰值不断下降，表明在此期间，DNA 四面体迅速与电极表面的金原子结合，导致可用金原子数量逐渐减少，铁离子氧化还原电流减小；3 小时时峰值又有所回升，且在这之后均保持不变，表明 2 小时后迅速吸附作用结束，电极表面达到一种过饱和状态，开始自我调整，脱落少数存在的纯物理吸附和部分吸附的 DNA 四面体，使得峰值略微上升，之后带到一个平衡状态，峰值稳定不变。由此我们可以确定 250nM 带巯基 DNA 四面体与金电极的 SAM 最佳持续时长为 3 小时，为之后重复进行四面体搭建确定实验参数之一。

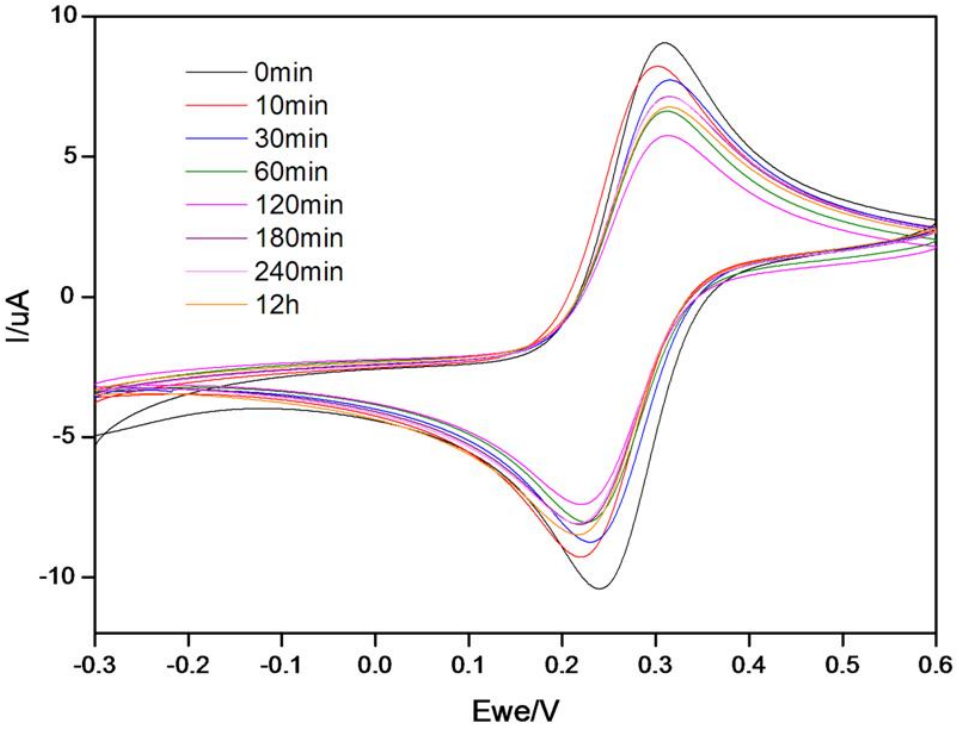


图 3-2 不同时间下金电极- DNA 四面体复合电极在
2mM $K_3Fe(CN)_6$ in 0.1M KCl 溶液中的循环伏安图（-0.3-0.6V，100mV/s）

3.3.3 DNA 四面体溶液最佳浓度探索

DNA 四面体溶液浓度直接影响电极表面 DNA 四面体与金原子的复合密度。为探讨最佳 DNA 四面体浓度，本试验分别做了 250nM、25nM 和 2.5nM 三个 DNA 四面体浓度梯度的对比试验。比较图 3-3、图 3-4、图 3-5 可知，在与不同浓度的 DNA 四面体复合后，铁离子的氧化还原峰都有所降低，表明金电极表面的金原子与 DNA 四面体复合成功。但从下降幅度看，浸泡在 DNA 四面体溶液浓度为 2.5nM 和 25nM 的电极检测效果没有浸泡在 DNA 四面体溶液浓度为 250nM 的电极明显。由此我们确定在 2.5nM、25nM 和 250nM 三个浓度梯度下，我们配制 DNA 四面体溶液的最低限为 250nM。

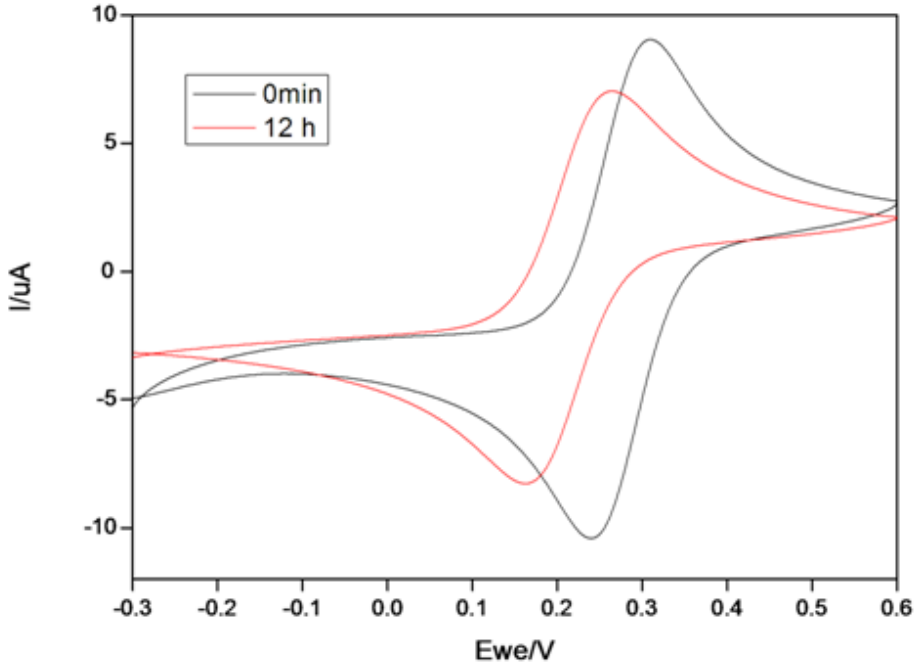


图 3-3 金电极与 250nM DNA 四面体溶液中浸泡 12h 后在 2mM $K_3Fe(CN)_6$ in 0.1M KCl 溶液中的循环伏安图（-0.3-0.6V，100mV/s）

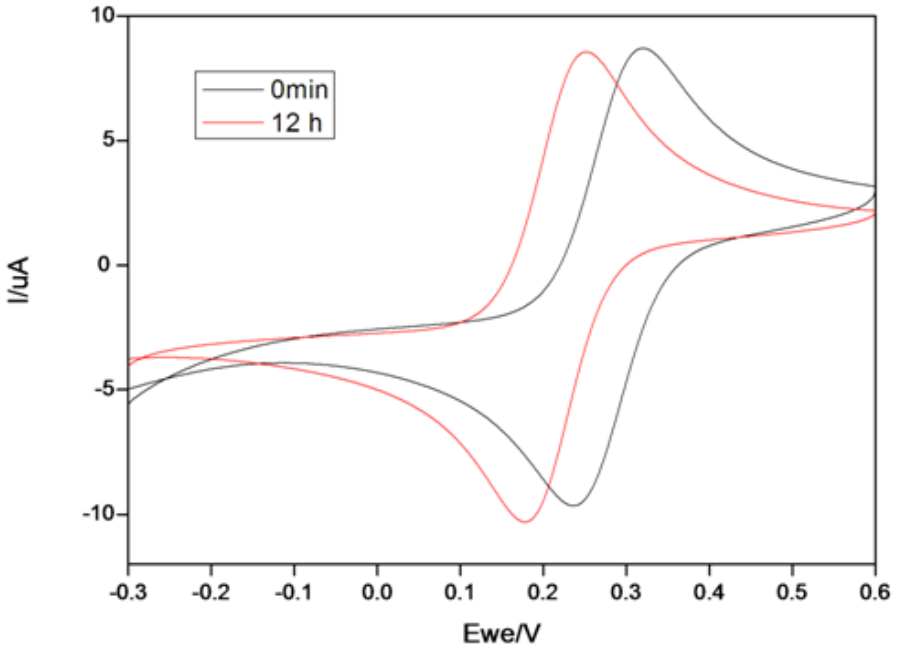


图 3-4 金电极与 25nM DNA 四面体溶液中浸泡 12h 后在 2mM $K_3Fe(CN)_6$ in 0.1M KCl 溶液中的循环伏安图（-0.3-0.6V，100mV/s）

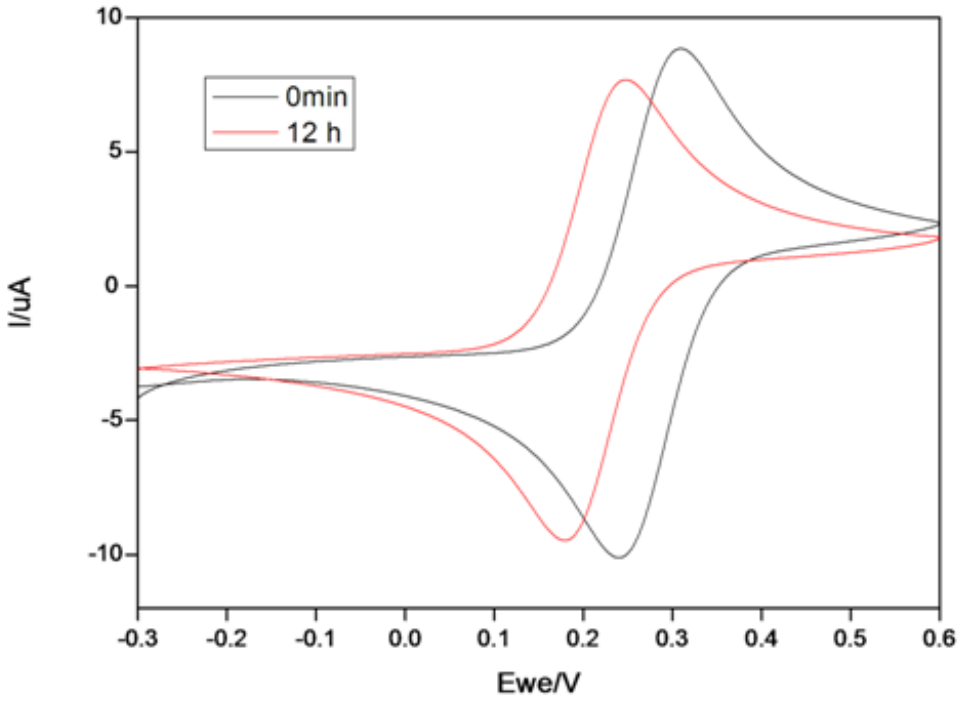


图 3-5 金电极与 2.5nM DNA 四面体溶液中浸泡 12h 后在 2mM $K_3Fe(CN)_6$ in 0.1M KCl 溶液中的循环伏安图（-0.3-0.6V，100mV/s）

3.3.4 DNA 四面体在金电极表面的自组装

鉴于后续实验需要反复搭建 DNA 四面体，为保证每次搭建的同一性，根据上述实验结论，我们将最终四面体搭建的实验条件确定为，配制好 DNA 四面体溶液，稀释到 250nM，打磨成功的金电极，然后浸泡在 DNA 四面体溶液中 3h，置于 2mM $K_3Fe(CN)_6$ in 0.1M KCl 溶液中，若获得的循环伏安图中铁离子的氧化还原峰与浸泡前相比大幅降低，则证明 DNA 四面体在金电极表面自组装成功，可进行后续实验。

3.4 本章小结

鉴于后续实验需要反复搭建 DNA 四面体，为保证每次搭建的同一性，根据本章实验结论，最终将四面体搭建的实验条件确定：配制 DNA 四面体溶液，稀释至 250nM，成功打磨金电极，浸泡在 250nM DNA 四面体溶液中 3h，以 2mM $K_3Fe(CN)_6$ in 0.1M KCl 溶液作为电解液，若获得的循环伏安图中铁离子的氧化还原峰与浸泡前相比大幅降低，则证明 DNA 四面体在金电极表面自组装成功，可进行后续实验。

第四章 金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合

4.1 实验试剂与仪器

4.1.1 实验试剂

XF005-4 进口氨基化石墨烯 TEPA(四氨基)	先丰纳米

4.1.2 实验仪器

CHI660E 电化学工作站	上海辰华仪器公司
CHI101 2mm 直径金盘电极	上海辰华仪器公司
CHI111 Ag/AgCl 参比电极	上海辰华仪器公司
CHI115 铂片对电极	上海辰华仪器公司
CHI220 简单电极架	上海辰华仪器公司
移液器（0.5-5ml）	Eppendorf 公司
移液器（100-1000μl）	Eppendorf 公司
移液器（20-200μl）	Eppendorf 公司
移液器（0.5-10μl）	Eppendorf 公司
透射电子显微镜 Tecnai G2 Spirit Biotwin	FEI 公司
超声粉碎机 DH95-IIDN	上海狄昊实业发展有限公司
TGL 台式高速离心机	上海精密仪器有限公司

4.2 实验方法与步骤

4.2.1 溶液配制

氨基化石墨烯溶液：取 5mg 氨基化石墨烯 TEPA(四氨基)粉末，溶于 20mL DI 水中，配制 0.25mg/mL 氨基化石墨烯溶液

4.2.2 氨基化石墨烯分散条件探索

（1）取 20mL 0.25mg/mL 氨基化石墨烯溶液，用超声粉碎机超声粉碎 4 小时，取 10mL 上清液，均匀置于 10 个 1.5mL 小离心管中，离心 20 分钟，离心转速 3000r/min，再取每个离心管上清液制备氨基化石墨烯分散液，再取 50uL 上清液送往上海交通大学分析测试中心进行 TEM 检测。

（2）取 20mL 0.25mg/mL 氨基化石墨烯溶液，用超声粉碎机超声粉碎 6 小时，取 10mL 上清液，均匀置于 10 个 1.5mL 小离心管中，离心 20 分钟，离心转速 3000r/min，再取每个离心管上清液制备氨基化石墨烯分散液，再取 50uL 上清液送往上海交通大学分析测试中心进行 TEM 检测。

（3）取 20mL 0.25mg/mL 氨基化石墨烯溶液，用超声粉碎机超声粉碎 8 小时，取 10mL 上清液，均匀置于 10 个 1.5mL 小离心管中，离心 20 分钟，离心转速 3000r/min，再取每个离心管上清液制备氨基化石墨烯分散液，再取 50uL 上清液送往上海交通大学分析测试中心进行 TEM 检测。

4.2.3 金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合条件探索

取实验 3 成功制备的金电极-DNA 四面体复合电极，取超声粉碎 8 小时，3000r/min 离心 20 分钟后的氨基化石墨烯溶液 10uL，均匀滴加在金电极-DNA 四面体复合电极上，15 分

钟后，将电极冲洗干净置于 2mM $K_3Fe(CN)_6$ in 0.1M KCl 溶液中，采用循环伏安法，扫描电压范围-0.3-0.6V，扫面速率 100 mV/s，扫描 4 圈，取自第四圈数据，然后再滴加 10uL 超声粉碎 8 小时，3000r/min 离心 20 分钟后的氨基化石墨烯溶液，15 分钟后再次进行相同条件的循环伏安检测，如此重复 5 次，作图分析。

4.3 实验结果与讨论

4.3.1 氨基化石墨烯分散条件探索

比较图 4-1、图 4-2、图 4-3 可知，随着超声粉碎时间的增加，氨基化石墨烯碎片尺寸减小，重叠数量减少。为使氨基化石墨烯能成功镶嵌在 DNA 四面体之间，石墨烯碎片尺寸应该在 100nm 以下，图 4-3 显示，超声粉碎 8 小时，3000r/min 离心 20 分钟后所得氨基化石墨烯碎片已经小于 100nm，满足后续实验要求。为保证后续实验的同一性，在此确定本试验中氨基化石墨烯溶液的分散条件为：超声粉碎 8 小时，3000r/min 离心 20 分钟。

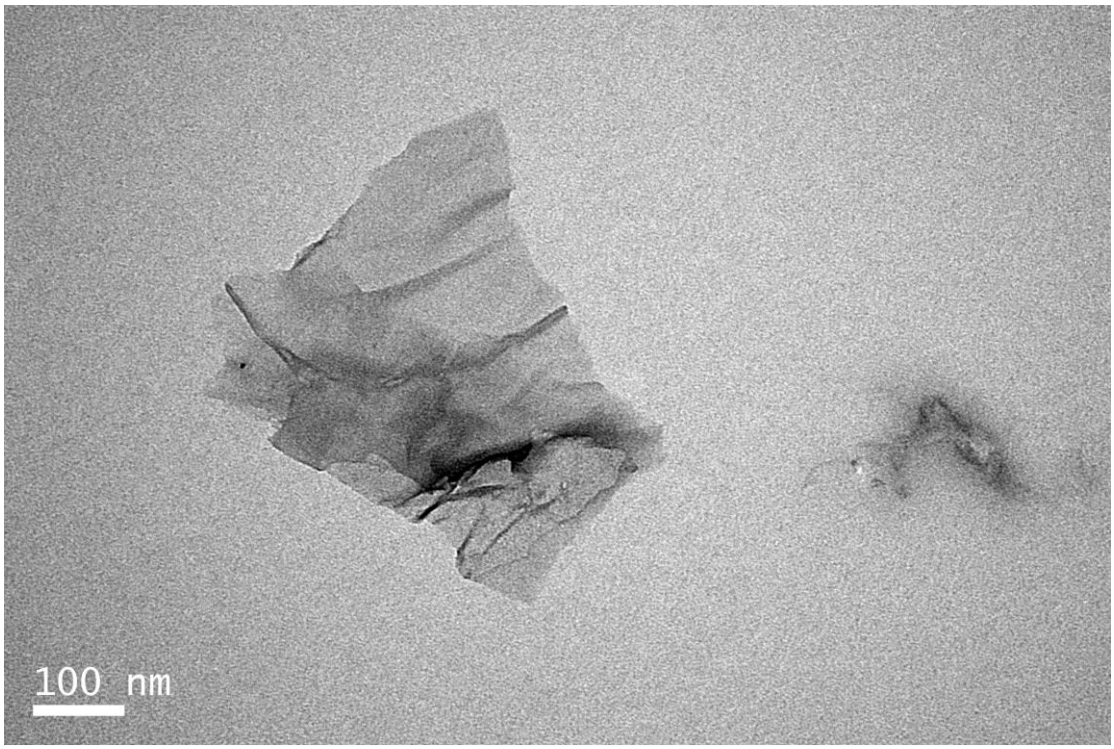


图 4-1 超声粉碎 4 小时，3000r/min 离心 20 分钟后氨基化石墨烯溶液透射电子显微镜图

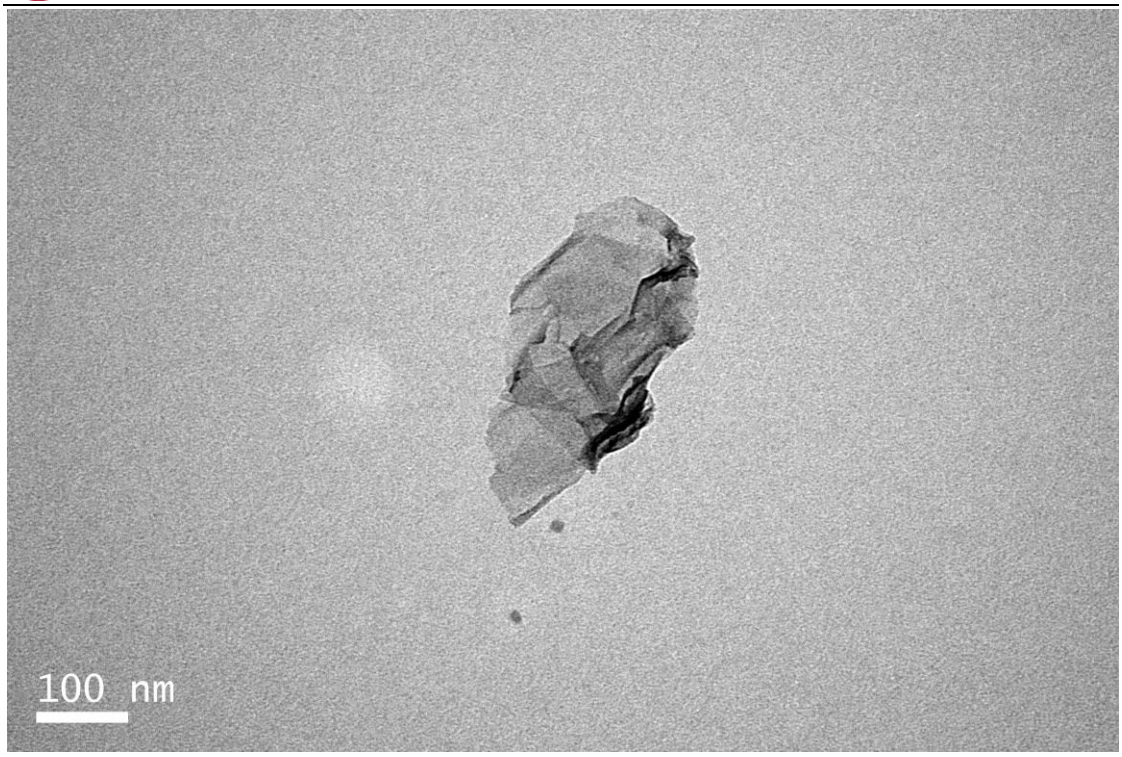


图 4-2 超声粉碎 6 小时，3000r/min 离心 20 分钟后氨基化石墨烯溶液透射电子显微镜图

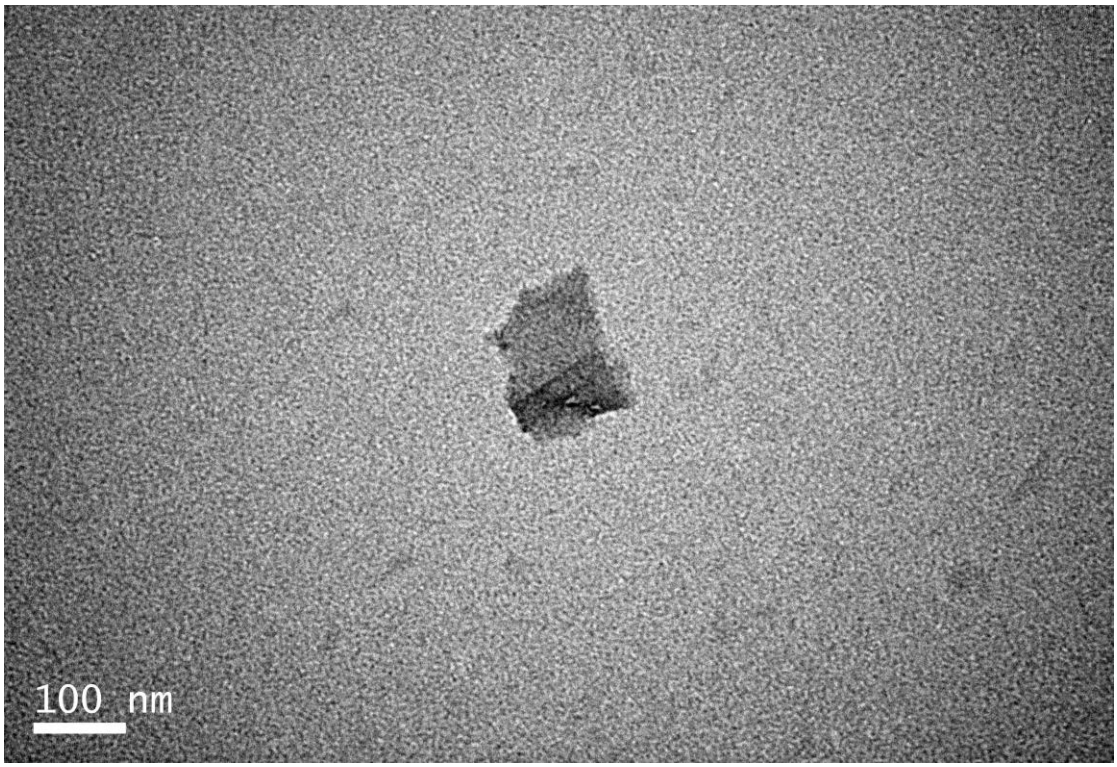


图 4-3 超声粉碎 8 小时，3000r/min 离心 20 分钟后氨基化石墨烯溶液透射电子显微镜图

4.3.2 金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合条件探索

氨基化石墨烯带正电荷，DNA 带负电荷，二者由于静电吸引可相互结合；石墨烯中的大π键可以看作是电子仓库，石墨烯的加入可极大增强电子传输能力，增加氧化还原电流；故而滴加 10uL 超声粉碎 8 小时，3000r/min 离心 20 分钟后的氨基化石墨烯溶液 15 分钟后，

电极在铁溶液中循环伏安图的氧化还原峰大幅增加。接着通过图 4-4 可知，随着时间的累积，峰值逐渐增加，表明电极表面氨基化石墨烯的吸附逐渐增多，60 分钟后，峰值略有下降，表明此时电极表面吸附的氨基化石墨烯已经饱和，继续加入氨基化石墨烯并不能增强电极电子传输能力。因此，为保证每次实验的同一性和实验条件的最优性，特将氨基化石墨烯和金电极-DNA 四面体电极复合的条件确定为，成功搭建金电极-DNA 四面体复合电极后，每 15 分钟滴加 10uL 超声粉碎 8 小时，3000r/min 离心 20 分钟后的氨基化石墨烯溶液于电极上，累积 4 次，即可得到复合效果最优的金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极，用于后续实验

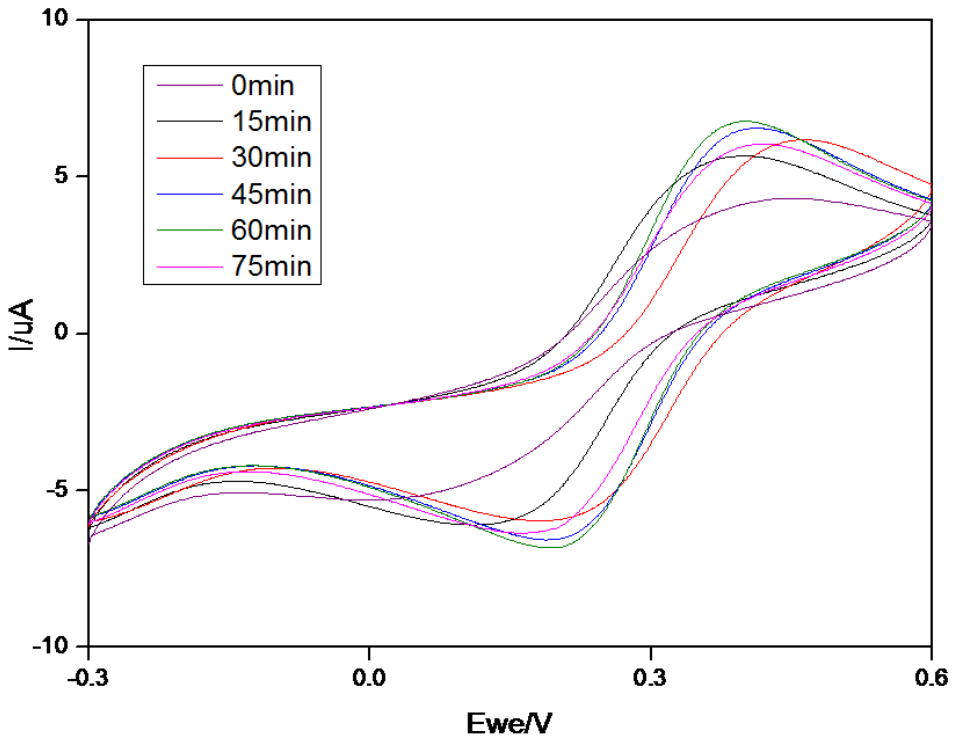


图 4-4 不同时间金电极- DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极在 2mM $K_3Fe(CN)_6$ in 0.1M KCl 溶液中的循环伏安图（-0.3-0.6V，100mV/s）

4.4 本章小结

本章主要探索氨基化石墨烯超声分散条件和氨基化石墨烯与金电极-DNA 四面体复合电极的复合条件。根据实验结果，最终确定氨基化石墨烯分散条件为，配制 20mL 0.25mg/mL 氨基化石墨烯溶液，超声粉碎 8 小时，3000r/min 离心 20 分钟后取上清夜。同时，通过实验验证，最终确定氨基化石墨烯与金电极-DNA 四面体复合电极的方式为，成功搭建金电极-DNA 四面体符合电极后，每 15 分钟滴加 10uL 已成功分散的氨基化石墨烯溶液，累积滴加四次即可。

第五章 基于复合电极的 NADH 检测

5.1 实验试剂与仪器

5.1.1 实验试剂

NaCl	Acros 公司
KCl	Vetec 公司
Na_2HPO_4	Acros 公司
KH_2PO_4	Adamas 公司
PH 缓冲液 PH4.01	Hach 公司
PH 缓冲液 PH7.00	Hach 公司
PH 缓冲液 PH10.01	Hach 公司
NADH	Acros 公司

5.1.2 实验仪器

PGC 453E 电子分析天平	ADAM 公司
PB-10 pH 计	Sartorius 公司
漩涡振荡器	ABSON 公司
C-MAG HS7 加热磁力搅拌器	IKA 公司
Rocker300A 真空过滤装置	Rocker 公司
尼龙（Nylon）滤膜 0.22μm 47mm	Rocker 公司
Direct-Pure 2-Pass RO 10 纯水系统	Rephile 公司
移液器（0.5-5ml）	Eppendorf 公司
移液器（100-1000μl）	Eppendorf 公司
移液器（20-200μl）	Eppendorf 公司
移液器（0.5-10μl）	Eppendorf 公司
8Z0438 高温灭菌锅	SANYO 公司
CHI660E 电化学工作站	上海辰华仪器公司
CHI101 2mm 直径金盘电极	上海辰华仪器公司
CHI111 Ag/AgCl 参比电极	上海辰华仪器公司
CHI115 铂片对电极	上海辰华仪器公司
CHI120 电极抛光材料	上海辰华仪器公司
CHI220 简单电极架	上海辰华仪器公司
MULTIMODE NANOSCOPE	美国 DI 公司

5.2 实验方法与步骤

5.2.1 溶液配制

（1）PBS 缓冲液配制：称量 8g NaCl，0.2gKCl，1.42g Na_2HPO_4，0.27g KH_2PO_4 置于 1L 烧杯中；加入 800ml DI water，搅拌均匀；调节 pH 至 7.4；容量瓶定容至 1L；使用真空过滤装置过滤；高温灭菌，室温保存。

（2）NADH 溶液配制：称量 0.036g NADH 粉末，加入 5mL PBS 缓冲液，配制成 10mM

NADH，再依次取样用 PBS 缓冲液稀释配制浓度为 0.1nM、1nM、100nM、1uM 和 10uM 的 NADH 溶液。

5.2.2 AFM 验证电极搭建

制备印刷电极样品四个，分别为：裸金电极、金电极- DNA 四面体复合、金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯 30min 复合以及金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯 75min 复合，送往上海交通大学分析测试中心，用美国 DI 公司的 MULTIMODE NANOSCOPE 进行大气下的 AFM 检测，比较所得结果，验证复合电极的搭建。

5.2.3 复合电极改变 NADH 氧化电压的探索

（1）用成功搭建的金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极作为工作电极，铂片电极作为对电极，Ag/AgCl 电极作为参比电极构成经典三电极结构，置于配制好的 1mM NADH 溶液中，采用循环伏安法，扫描电压范围-0.5-1.2V，扫面速率 100 mV/s，扫描 1 圈,再将工作电极换为打磨成功的裸金电极，在 1mM NADH 溶液中，采用循环伏安法，扫描电压范围-0.5-1.2V，扫面速率 100 mV/s，扫描 1 圈，比较两次所得，探索复合电极对 NADH 氧化电压的影响。

（2）配制 1nM NADH 溶液，分别用金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极和裸金电极作为工作电极，采用微分脉冲伏安法，扫面电压从 0V 开始，上限由（1）中结果决定，进一步验证与确立复合电极对 NADH 氧化电压的影响。

5.2.4 ADH 检测限与线性检测区间探索

依次取 10mL 成功配制的 0.1nM、1nM、100nM、1uM、10uM 的 NADH 溶液作为电解液，用成功搭建的金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极作为工作电极，铂片电极作为对电极，Ag/AgCl 电极作为参比电极构成经典三电极结构，采用微分脉冲伏安法，扫面电压范围为 0-0.5V，比较分析所得微分脉冲伏安法曲线。

5.2.5 复合电极再生性验证

配制 1nM NADH 作为电解液，用搭建成功的金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极作为工作电极，铂片电极作为对电极，Ag/AgCl 电极作为参比电极构成经典三电极结构，采用微分脉冲伏安法，扫面电压范围为 0-0.5V，获得原始微分伏安法曲线，再用 PBS（PH=7.4）溶液，冲洗浸泡电极 5 分钟后，用所得电极重复上述步骤，获得微分脉冲伏安法曲线，如此重复四次，共计 60 分钟，作图分析、比较所得结果。

5.2.6 复合电极选择性验证

配制 1nM NADH 作为电解液，用搭建成功的金电极-DNA 四面体-石墨烯复合电极作为工作电极，铂片电极作为对电极，Ag/AgCl 电极作为参比电极构成经典三电极结构，采用微分脉冲伏安法，扫面电压范围为 0-0.5V，获得原始微分伏安法曲线；取 100uL 50x 细胞裂解液，加入 500uL 10nM NADH 溶液和 4400uL PBS 溶液，配制 1nM NADH 的模拟细胞环境溶液，用复合电极作为工作电极，铂片电极作为对电极，Ag/AgCl 电极作为参比电极构成经典三电极结构，采用微分脉冲伏安法，扫面电压范围为 0-0.5V，获得模拟细胞环境下的微分脉冲伏安法图，将两次结果作图比较。

5.3 实验结果与讨论

5.3.1 AFM 验证复合电极搭建结果

从图 5-1、图 5-2、图 5-3、图 5-4 的对比可知，DNA 四面体的成功复合增加了表面的粗糙度，从微观的角度证实 DNA 四面体的成功搭建和与金电极表面的成功复合。金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯（30min 浸泡）复合电极表面粗糙度与金电极-DNA 四面体复合电极的粗糙度相比略微增加，表明超声分散后的氨基化石墨烯碎片成功填补四面体缝隙；由于电极表面积有限，氨基化石墨烯的复合在浸泡 60min 后达到饱和，继续滴加氨基化石墨烯溶液

并不能增加电极有效解除面积，故而浸泡氨基化石墨烯溶液 75min 后，电极表面粗糙度并未增加，反而略微减小。据此，AFM 结果从微观的角度证实金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极的搭建成功，可以进行 NADH 检测；同时也证实了第四章关于氨基化石墨烯浸泡时间对于电极有效面积的影响的论述。

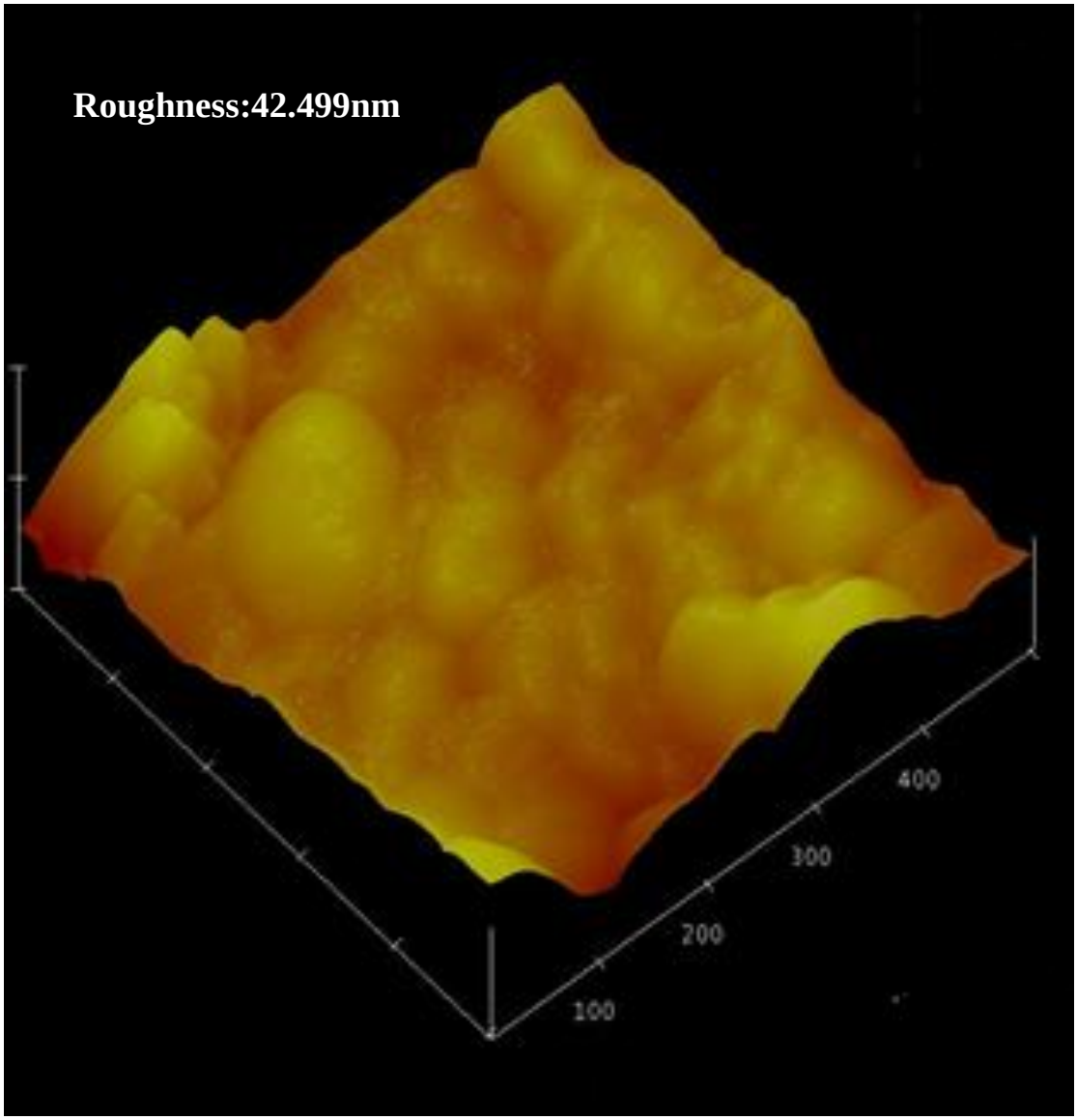


图 5-1 裸金电极表面大气下的 AFM 图

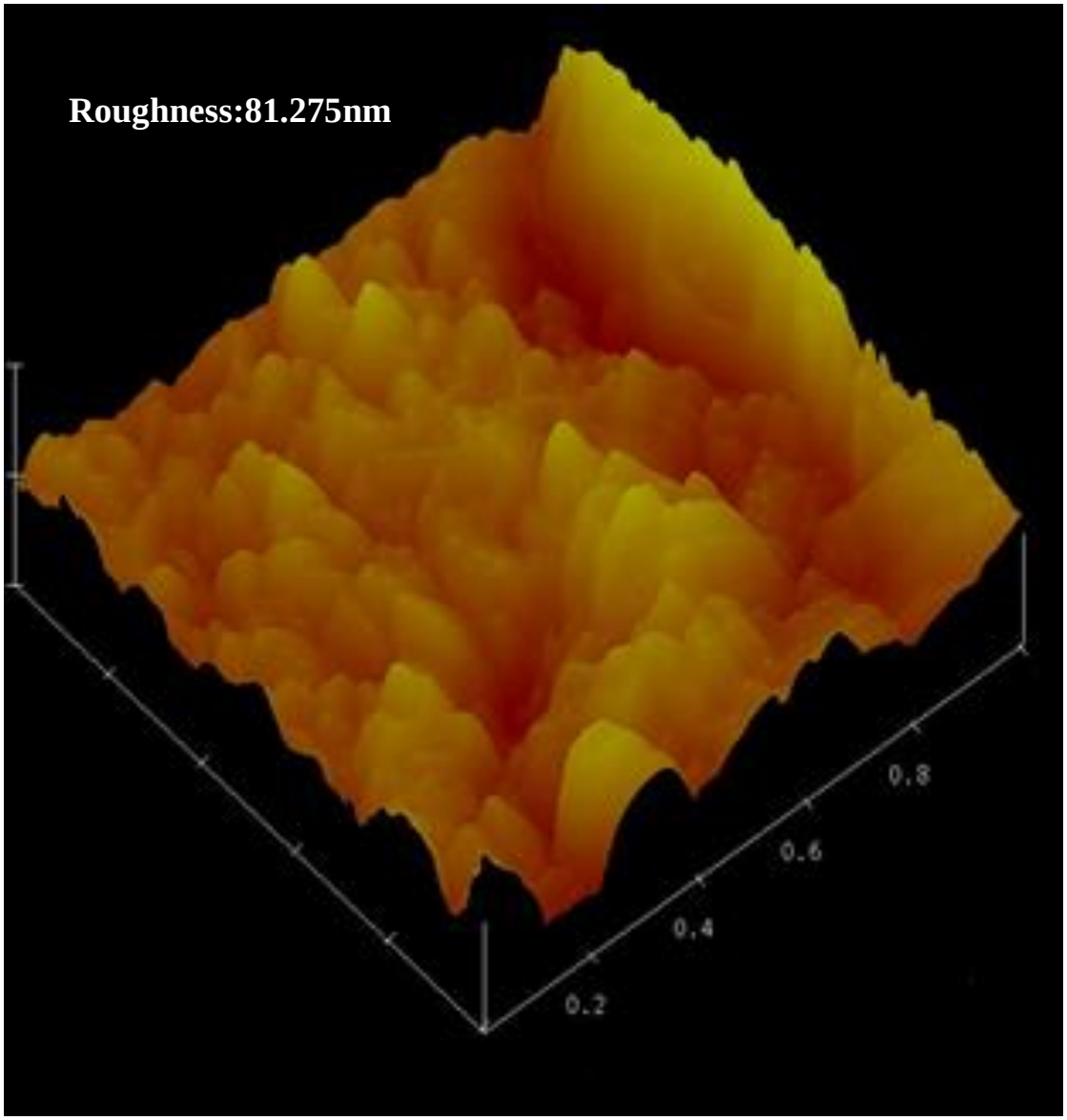


图 5-2 金电极-DNA 四面体复合电极表面大气下 AFM 图

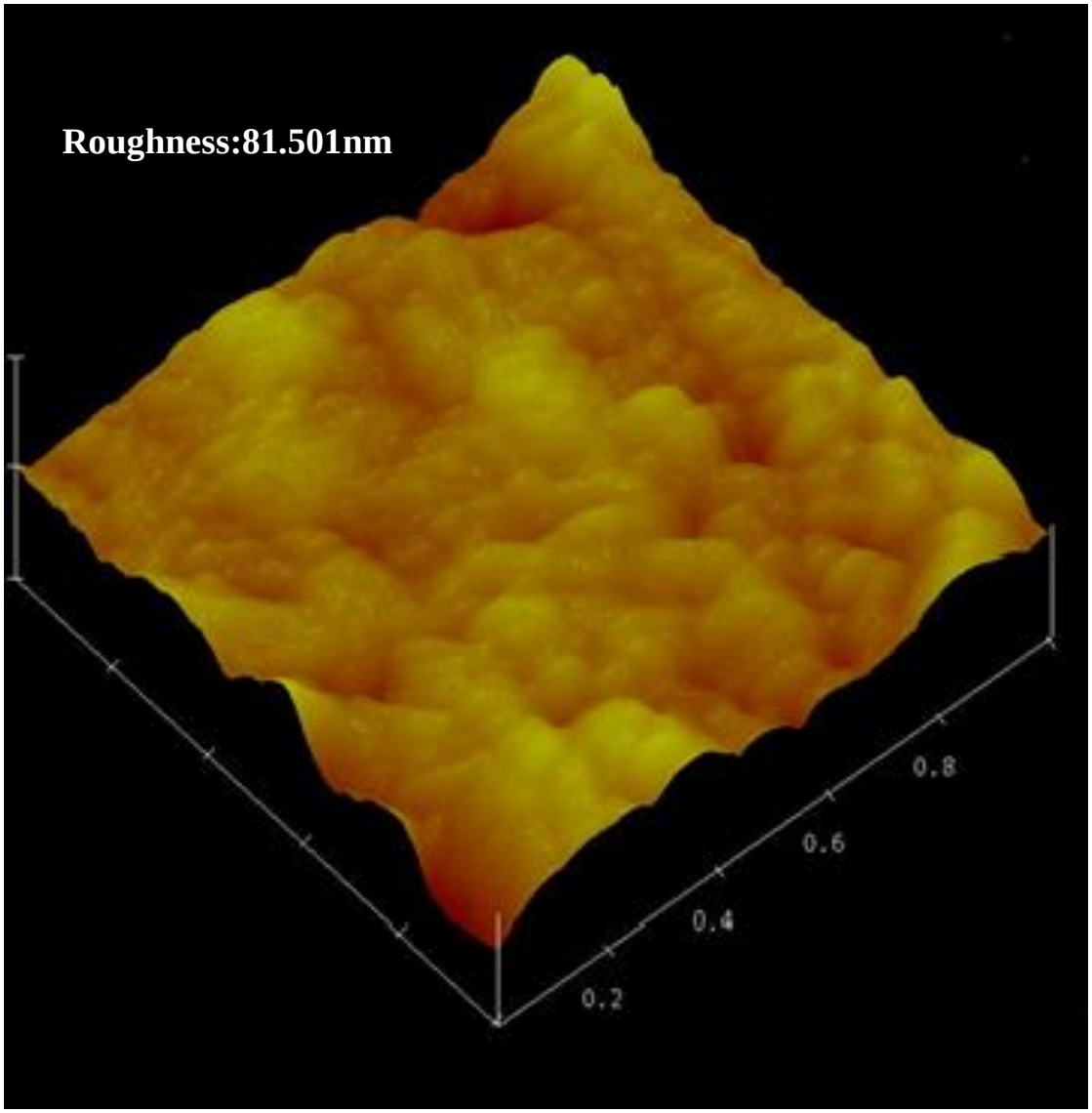


图 5-3 金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯（30min 浸泡）复合电极表面大气下 AFM 图

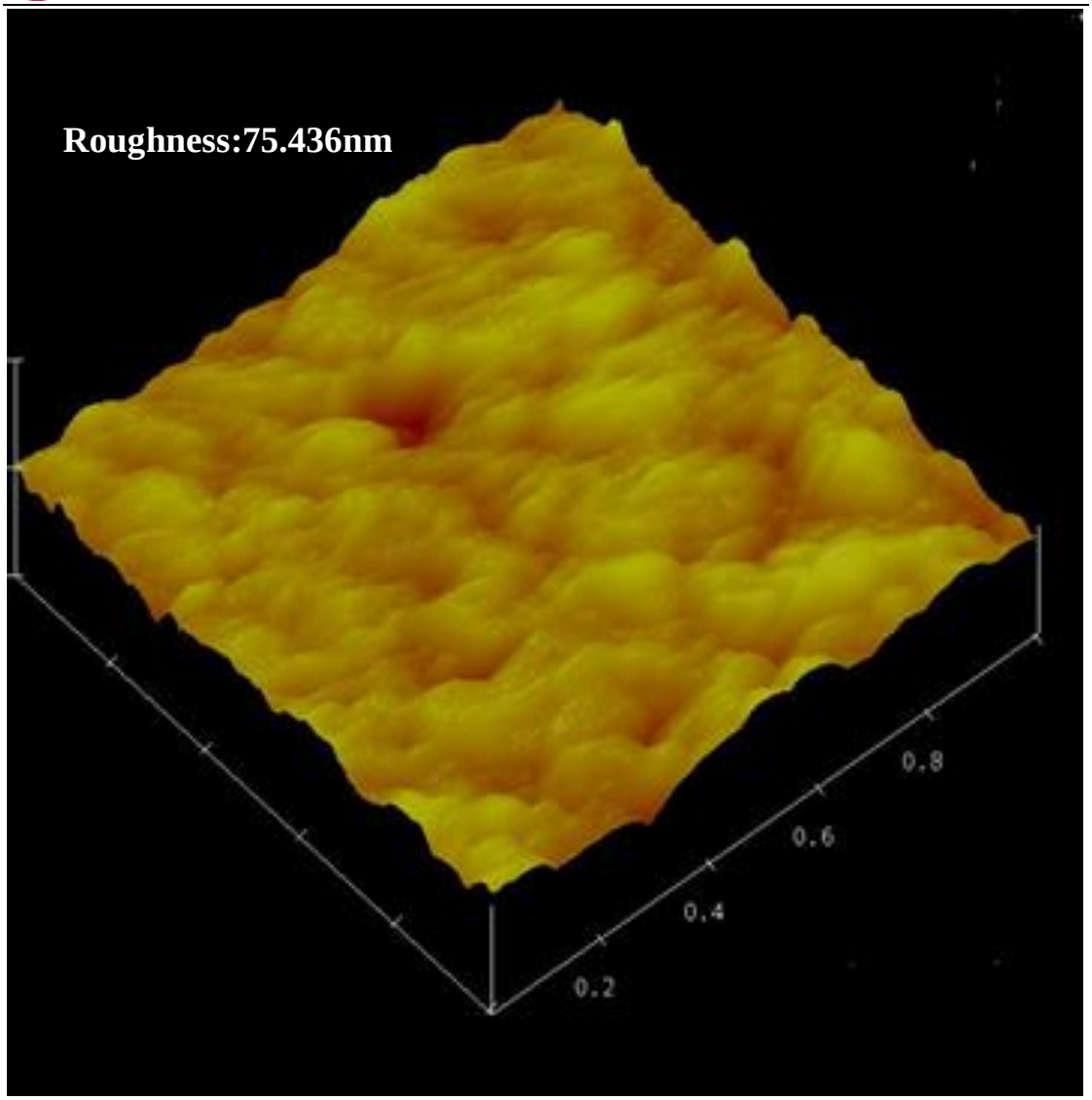


图 5-4 金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯（75min 浸泡）复合电极大气下 AFM 图

5.3.2 复合电极对 NADH 氧化电压的影响

从图 5-5 中可以明显看到，复合电极成功将 NADH 氧化电压由 1V 降低至 0.6V 左右，同时，为了能更准确的探究复合电极对于 NADH 氧化电压的降低程度，本实验采用了精度更高的微分脉冲伏安法，根据循环伏安图的结果，我们设定电压范围为 0-0.5V, 实验结果如图 5-6 所示。

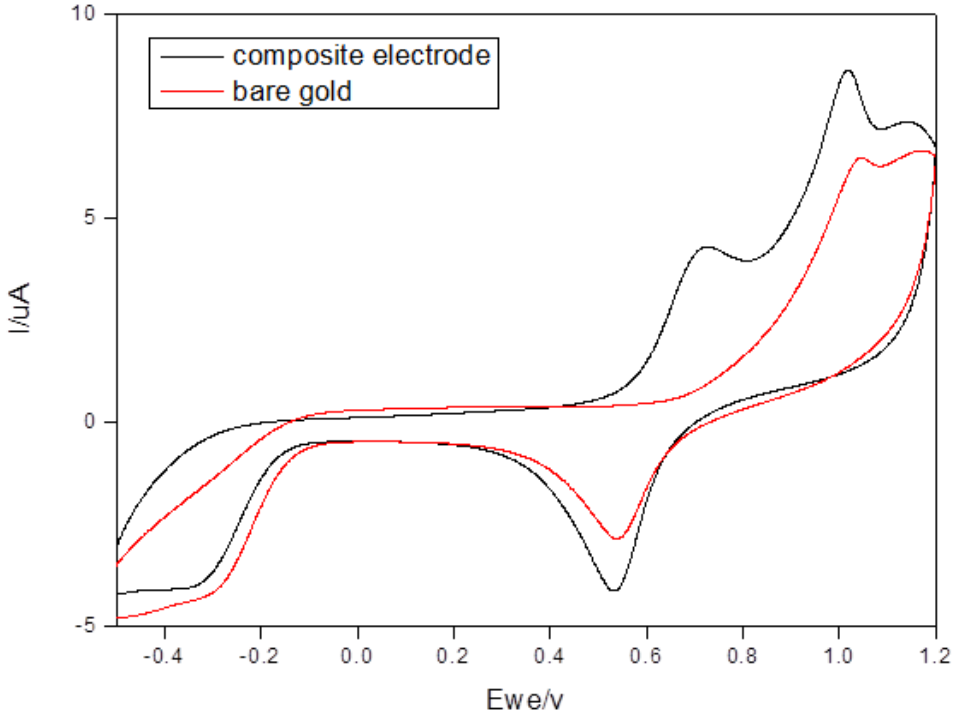


图 5-5 复合电极和裸金电极在 1mM NADH 溶液中的循环伏安图（-0.5-1.2V，100mV/s）

从图 5-6 知，复合电极成功将 NADH 氧化电压降低至 0.3V 附近，而裸金电极在 0 至 0.5V 区间范围内不能使 NADH 得到氧化。由此可证明，复合电极能将 NADH 接近 1V 的氧化电压降低至 0.3V，极大的改善了 NADH 的氧化环境，避免氧化电压过高引发的二聚等副反应。同时也为之后探索复合电极用于检测 NADH 的检测限和线性检测区间确立了微分脉冲伏安法的电压范围。

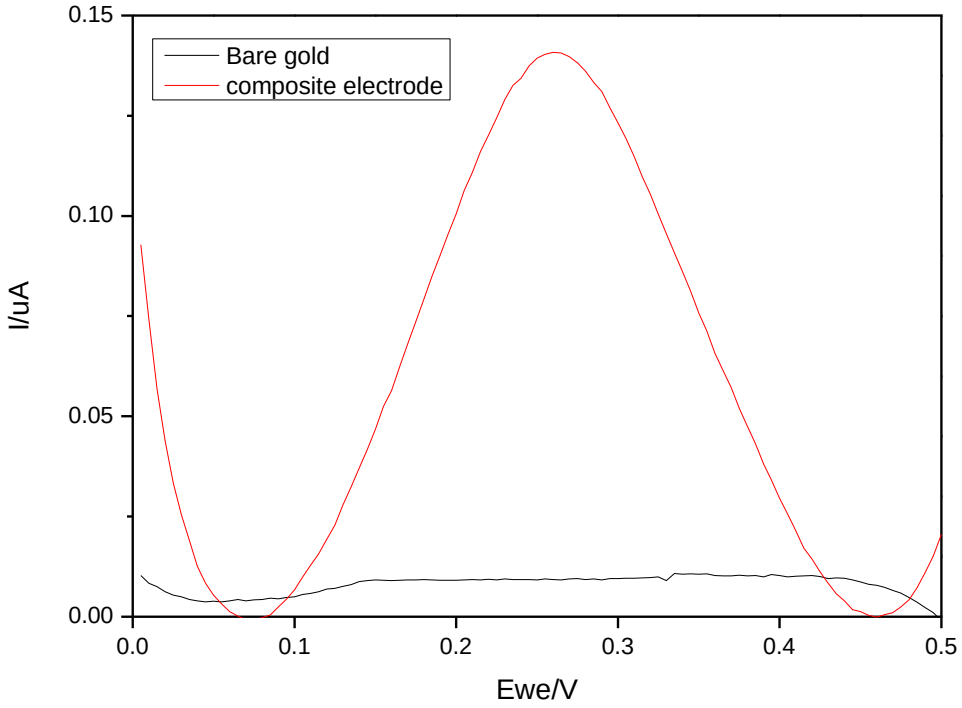


图 5-6 复合电极和裸金电极在 1nM NADH 溶液中的微分脉冲伏安法图
（减去复合电极在 PBS 中的微分脉冲伏安法曲线）

5.3.3 NADH 检测限和线性检测范围

由图 5-7 知，随着 NADH 浓度的增加，微分脉冲伏安法曲线的峰值逐渐增加，且峰值位置均在 0.3V 附近，再一次证明复合电极成功将 NADH 氧化电压降低至 0.3V。为更清楚地分析复合电极在检测 NADH 时的线性检测范围，以 lg（C_{NADH} ）为横坐标，峰值电流为纵坐标，做散点图并分段线性拟合，如图 5-8 所示。

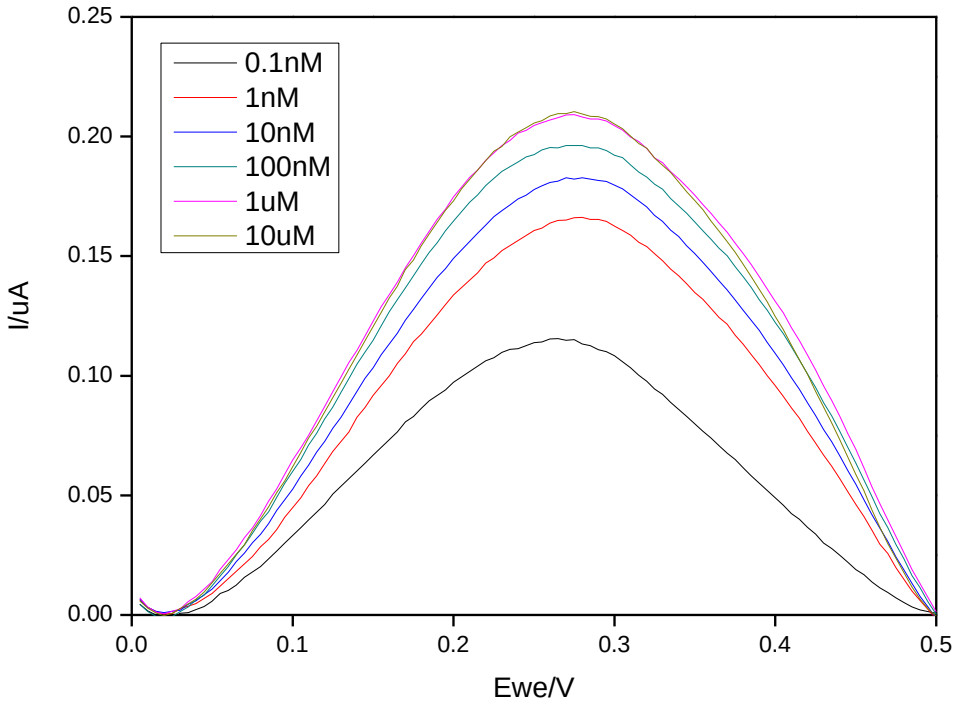


图 5-7 复合电极在不同浓度 NADH 溶液中的微分脉冲伏安法图
（减去复合电极在 PBS 中的微分脉冲伏安法曲线）

观察散点图分散情况可知，当 NADH 浓度为 0.1nM 时，曲线上升迅速，当 NADH 浓度从 1nM 到 1uM，上升趋势略微放缓，但是曲线线性好，当 NADH 浓度达到 1uM 后，随着 NADH 浓度增加，电流峰值不再增加，说明在 NADH 浓度为 1uM 时电极表面已经达到饱和，随着 NADH 浓度增加，电流将不再增加，复合电极丧失对 NADH 浓度的表征意义。由此可知，金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极对于 NADH 浓度的检测下限为 0.1nM，上限为 1uM，线性检测范围为 1nM 至 1uM，灵敏度为 0.226 (uA/lg（C_{NADH} ）*cm^2)。

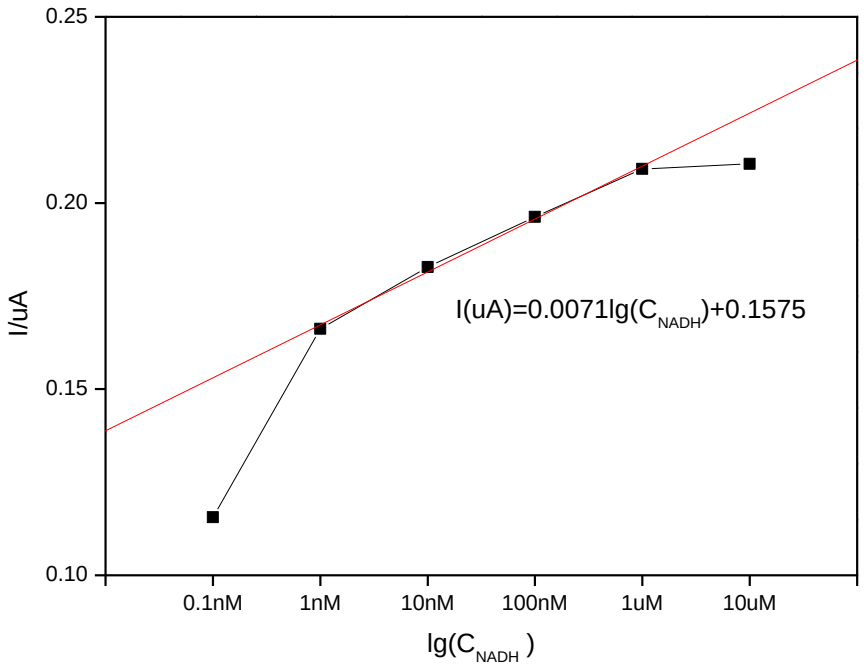


图 5-8 复合电极对 NADH 的检测性能线性拟合图

5.3.4 复合电极的再生性

由图 5-9 知，用 PBS（PH=7.4）冲洗浸泡电极不同时间后，将处理后的电极作为工作电极，铂片电极作为对电极，Ag/AgCl 电极作为参比电极构成经典三电极结构，用 1nM NADH 作为电解液体，在不同的冲泡时间下所得到脉冲伏安法图的曲线不尽相同，不过峰值的变化并不明显。为了更准确的表征电极再生性，做柱状统计图如图 5-9 所示，从误差线的大小和相关统计数据可证明，复合电极的再生性良好，在一定条件下可多次重复使用。

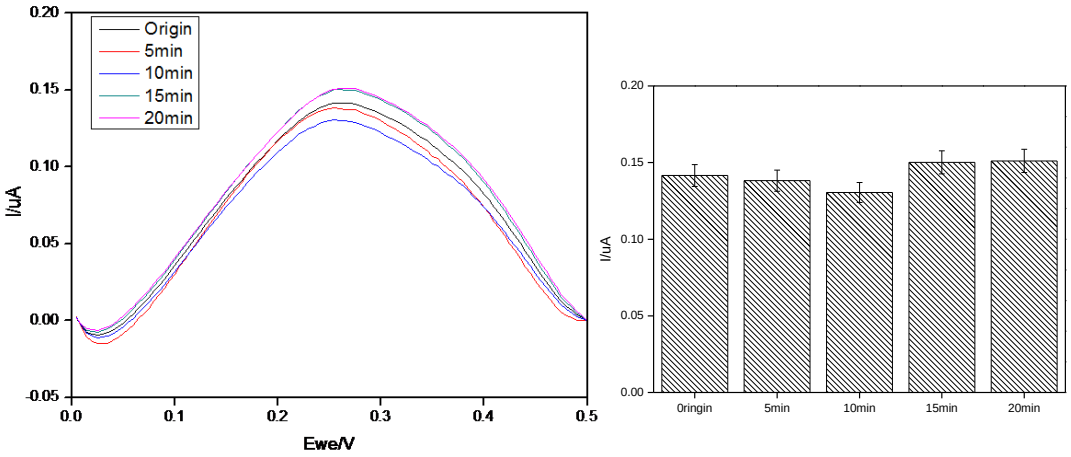


图 5-9 复合电极在 PBS 冲洗浸泡不同时间后在 1nM NADH 溶液中的微分脉冲伏安法图（减去复合电极在 PBS 中的微分脉冲伏安法曲线）和柱状分布图

5.3.5 复合电极的选择性

用 PBS 稀释高浓度细胞裂解液作为电解液，以模拟真实细胞环境。由图 5-10 知，在模拟细胞环境中，复合电极对于 NADH 检测结果与在实验环境中结果一致，二者的微分脉冲伏安法图吻合，证明复合电极对于 NADH 的选择性良好，检测过程中不会受到常与 NADH 共存的干扰物的影响。

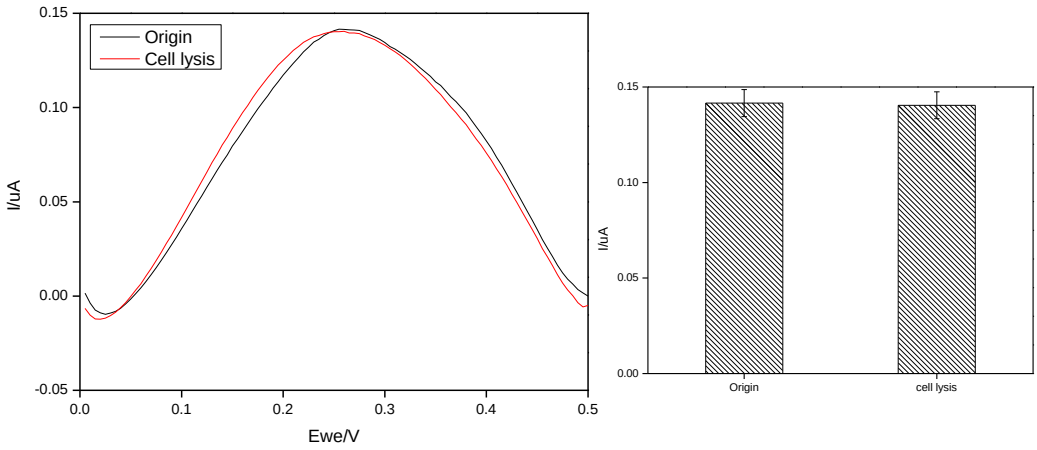


图 5-10 复合电极在 PBS 配制的 1nM NADH 中与用 PBS 稀释的细胞裂解液配制的 1nM NADH 中的微分脉冲伏安法图（减去复合电极在 PBS 中的微分脉冲伏安法曲线）和柱状分布图

5.4 本章小结

本章通过采用 AFM，从微观的角度观察并且证实了金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极的成功搭建，也印证了第四章关于氨基化石墨烯滴加时间对于电极构造的影响的探讨。随后，通过反复将金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极用于 NADH 的检测，证实该复合电极能成功将 NADH 的氧化电压由 1V 降低至 0.3V；同时证实复合电极对于 NADH 浓度的检测下限为 0.1nM，上限为 1uM，线性检测范围为 1nM 至 1uM，灵敏度为 0.226 (uA/lg（C_{NADH} ）*cm^2)，复合电极的再生性良好，选择性强。初步实现 NADH 高灵敏度检测的目标。

第六章 复合电极优化

前几章实验证实，金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极成功降低 NADH 氧化电压至 0.3V 左右，电极选择性和再生性良好，能初步实现 NADH 高灵敏度的检测目标，但是该复合电极的检测限和线性检测范围并不十分理想，为优化该复合结构，在已有实验基础上，本实验尝试引入金纳米粒子。将打磨成功后的金电极作为工作电极，铂片电极作为对电极，Ag/AgCl 电极作为参比电极构成经典三电极结构，以 $HAuCl_4$ 溶液为电解液，通过电化学沉积法制备金电极-金纳米粒子复合电极，而后再按照 DNA 四面体复合、氨基化石墨烯复合的顺序制备金电极-金纳米粒子-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极，之后将成功搭建的金电极-金纳米粒子—DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极作为工作电极，铂片电极作为对电极，Ag/AgCl 电极作为参比电极构成经典三电极结构，重复进行 NADH 检测限和线性检测范围实验步骤，作图分析，结果如图 6-1、图 6-2 所示。

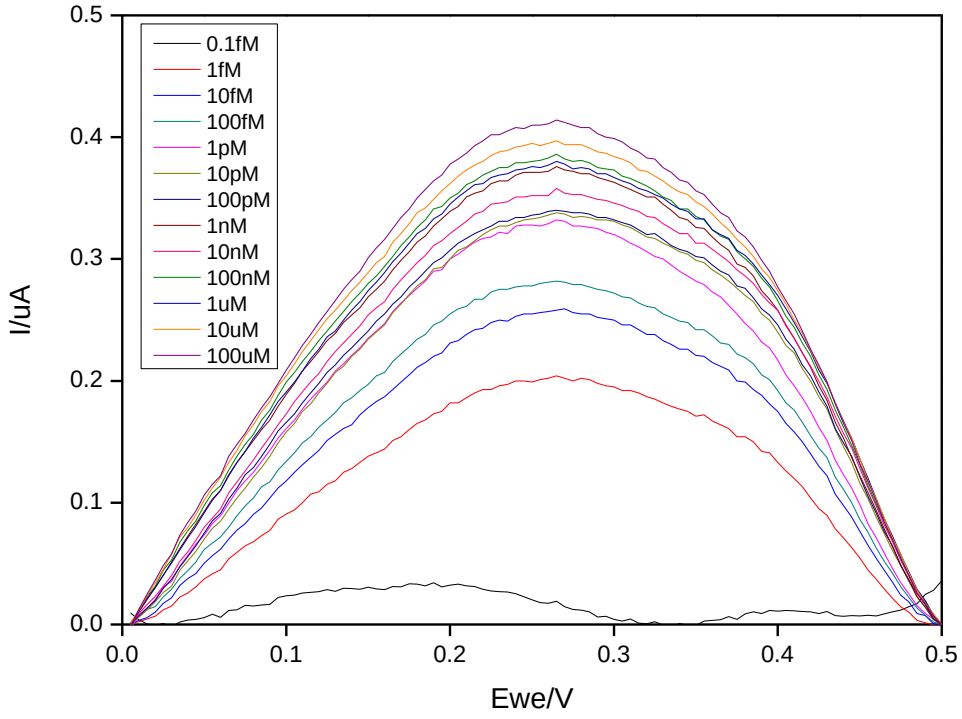


图 6-1 金电极-金纳米粒子-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极在不同浓度 NADH 溶液中的微分脉冲伏安法图（减去复合电极在 PBS 中的微分脉冲伏安法曲线）

图 6-1 知，随着 NADH 浓度的增加，微分脉冲循环伏安法曲线的峰值逐渐增加，但是增加的幅度并不一致，为更准确更直观的表征其特征，特重复第五章中的分析作图方法，得到图 6-2。分析可知，金纳米粒子的引入使得复合电极的检测下限降低到 0.1fM，检测上限增加至 100uM，但是观察曲线，发现其走势呈明显的两段线性。由于 NADH 在电极表面的氧化还原分为两个步骤，首先是 NADH 与电极表面的吸附，然后再是 NADH 在电极表面被氧化还原产生电流。当溶液中 NADH 的浓度较低时，电极表面并未达到饱和，NADH 能迅速吸附到电极上,氧化还原,然后脱落,因而此时复合电极检测出的氧化电流大小主要由 NADH 电化学氧化还原特性决定；当 NADH 浓度达到 1pM 以后，吸附脱落成为影响氧化电流大小的主要因素，故而曲线斜率下斜，曲线呈现出两端线性分布。由此可知，复合电极对于 NADH 浓度的线性检测范围分为两段，1fM 至 1pM，10pM 至 100uM，灵敏度分别为 1.305 (uA/lg（C_{NADH} ）*cm^2)和 0.200 (uA/lg（C_{NADH} ）*cm^2)。

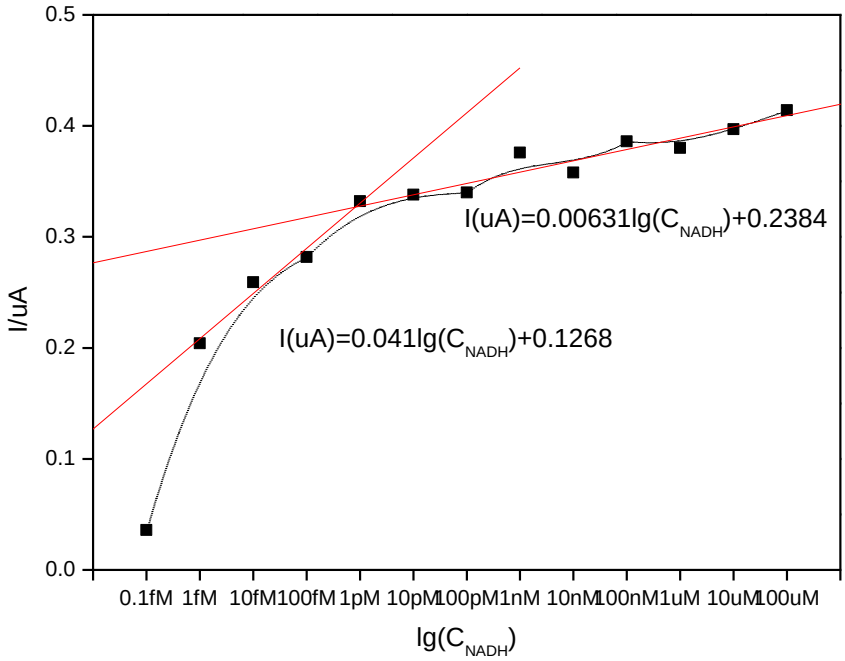


图 6-2 金电极-金纳米粒子-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极对 NADH 的检测性能线性拟合图

第七章 结论

基于 NADH 近年来在癌症表征和代谢性疾病监测上的实用性和重要性日趋变大，对 NADH 高灵敏度的检测方式极为有意义。本实验摒弃传统高效液相色谱法、免疫蛋白法和荧光法，从电化学手段入手，试图构建一种新型 NADH 高灵敏度检测结构，以寻找一种高效、高灵敏度、简单且低成本的检测方式。受 DNA 折纸术的启发，本实验选择 DNA 四面体结构与金电极的复合作为基底，以增大有效接触面积，再引入氨基化石墨烯碎片，增加电极导电性，探讨此新型复合结构对在检测 NADH 时的各种特性。

通过 DNA 四面体结构的搭建，到 DNA 四面体与金电极复合，再到氨基化石墨烯的超声分散与复合等步骤，本实验成功搭建金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极，并通过 AFM 成功证实复合电极的搭建成功，之后将复合电极用于 NADH 的检测。多次重复性实验结果证实，金电极-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极成功将 NADH 的氧化电压降低至 0.3V，电极的再生性和选择性良好，检测下限为 0.1nM，上限为 1uM，线性检范围为 1nM 至 1uM，检测灵敏度为 0.226 (uA/lg（C_{NADH} ）*cm^2)。为提升检测限和灵敏度，本实验尝试引入金纳米粒子构成金电极-金纳米粒子-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极，将该电极用于 NADH 检测，最终将检测下限降低至 0.1 fM，上限增加至 100 uM，线性检测范围分别为 1fM-1pM 和 10pM-100uM，检测灵敏度分别为 1.305 (uA/lg（C_{NADH} ）*cm^2) 和 0.200 (uA/lg（C_{NADH} ）*cm^2)。

表 7-1 汇总整理了近年来不同石墨烯复合电极用于 NADH 检测时的各项参数。通过比较可知，本研究构建的金电极-金纳米粒子-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合电极在线性检测范围和检测限上都有明显优势，真正实现 NADH 的高灵敏度检测，为后续活体细胞中低浓度 NADH 检测芯片的开发奠定了理论基础并提供相关研究思路，具有较大的理论价值。

表 7-1 不同复合电极用于 NADH 检测性能参数比较

复合材料	NADH 氧化电压	线性检测范围	检测限	灵敏度 (uA / lg（C_{NADH} ）*cm^2)
金电极-石墨烯复合	0.40 V	20-160 uM 160-480 uM	6.0 uM	1.011 1.432
石墨烯-聚酯劳式紫复合	0.40 V	0.01-3.9 mM	0.1 uM	2.155
石墨烯-离子液体复合	0.33 V	0.25-2 mM	-	1.570
石墨烯-四氧化三铁复合	0.05 V	2-15 uM	0.4 uM	2.050
碳纳米管	-	0.30-750 uM	-	-
金电极-金纳米粒子-DNA 四面体-氨基化石墨烯复合	0.30 V	1 fM-1 pM 10 pM-100 uM	0.1 fM	1.305 0.200

参考文献

[1] 错误!未找到引用源。

谢辞

通过这一阶段的努力，我的毕业论文《基于电化学手段的 NADH 高灵敏度检测》终于完成了，这意味着大学生活即将结束。

非常感谢我的导师丁显廷老师对我毕业设计的大力支持以及在科研学术上、生活上、演讲技巧上等各方面对我的谆谆教诲与言传身教；非常感谢指导博士后苏文琼学姐这几月来对我的指导与帮助，让我从一个对应用化学了解甚少的门外汉变成一个可以独立完成实验操作的实验员，感谢您的辛苦付出；感谢刘硕鹏同学在试验过程中对我的帮助与支持，在我不能去徐汇的时候帮忙实验室的搭建与试剂仪器的采购，能有幸和你一起完成毕业设计，我很开心。感谢实验室所有师兄师姐对实验的帮助支持与对我的包容，很期待未来和大家一起共度的研究生生活。

感谢大学四年学习期间所有教过我的老师，三尺讲台，是你们的辛苦付出让我的本科生活硕果累累；感谢一直以来支持我帮助我的同学，大学里的相知相聚都是一种缘分，很荣幸认识大家；感谢四年来遇到的所有人，经历的所有事，大学生活因你们而丰富，我的人生因你们而精彩。

感谢我的父母，感谢这 22 年的养育与教导，感谢对我的无私支持，愿你们永远健康！最后要感谢的，当然还是我自己，在大学期间一步一个脚印，踏实向前，永不放弃。愿接下来的研究生生活更加美好！

A NOVEL ELECTRODE FOR NADH HIGH-SENSITIVITY DETECTION BY ELECTROCHEMICAL METHOD

Previous study has confirmed, NADH, as an important coenzyme for all biological metabolic processes, is related to a variety of diseases including cancers, Parkinson's disease and other metabolic diseases. NADH is also highly correlated to cell failure and death caused by a number of bacteria and other bacteria monomers. Take breast cancer for example. The concentration of NADH in normal breast epithelial cell is (99 ± 37) μM, while in breast cancer cell it is (168 ± 49) μM. Also the ratio of free NADH to enzyme-bound NADH in normal breast epithelial cell is (0.18 ±0.08) to (0.82 ±0.08), while in breast cancer cell the ratio is (0.25 ±0.08) to (0.75 ±0.08). So it is meaningful to find an effective way to detect NADH with high sensitivity. Conventional detection methods for NADH include high performance liquid chromatography, enzymatic cycling method and fluorescence method. High-performance liquid chromatography (HPLC; formerly referred to as high-pressure liquid chromatography), is a technique in analytic chemistry used to separate the components in a mixture, to identify each component, and to quantify each component. The main disadvantage of high performance liquid chromatography is that the sensitivity of high performance liquid chromatography is low, failing to obtain the effective detection of NADH concentration. Enzymatic cycling method is complicate and time-consuming, while fluorescence method is expensive and inconvenient. Compared with all the three conventional detection methods, we take advantage of NADH redox properties, through the new composite electrode structure, using classical "three- electrode" configuration to achieve high -sensitivity detection of NADH. When constructing new composite electrode, inspired by the DNA origami, our study combines a latest researched structure, the DNA tetrahedron, which is self-assembled through the principle of complementary base pairing by four cleverly designed single-stranded DNA, with the gold electrode surface in order to increase the effective active area, and then by adding amino-graphene fragments between the DNA tetrahedron, which are known as segments of carbon monolayer with massive stored electrons and a remarkably high electron mobility, the electrode's conductivity is increased. We hope that this newly-constructed gold electrode-DNA tetrahedron-amino-graphene composite electrode can achieve the purpose of high-sensitivity detection of NADH.

In order to construct the composite electrode, firstly we need to construct DNA tetrahedron.We prepare three kinds of buffer (TM, TE, PBS) before (weighing, dissolving, adjusting the value of PH, filtering, high temperature sterilization), then mix all the buffers and four kinds of DNA solution together according to what Chunhai's paper teaches us, heat the mixture to 95℃ for 2 minutes, cool it down to 4℃ ,and store it in the refrigerator. Then agarose gel electrophoresis is used to get to know whether the DNA tetrahedron self-assembles successfully or not. After several experiments, we optimize the experimental condition of agarose gel electrophoresis by dying the gel using 1μL HydraGreen before it solidifies. Finally we get

perfect images from the 720BR/02387 chemiluminescence detection system for the result of agarose gel electrophoresis, which prove the fact that the DNA tetrahedron is successfully constructed.

Secondly we need to combine the DNA tetrahedron on gold disc electrode. After physical polish, piranha immersion, and ultrasonically clean, the gold disc electrode is ready, which is proved by the cyclic voltammogram of the electrode in the electrolyte of 1 M H_2SO_4 (the voltage ranges from 0 to 1.5 V, 20 cycles, scan rate is 100 mV/s).Then the process of self-assemble is on via immersing the polished electrode in the prepared DNA tetrahedron solution. And through the cyclic voltammogram of the composited electrode before and after immersed in DNA tetrahedron solution in the electrolyte of 2mM $K_3Fe(CN)_6$ in 0.1 M KCl, (voltage ranges from –0.3V to 0.6V, scan rate is 100mV/s), self-assembling is proved to be work out with the decrease of redox peaks of Fe in the cyclic voltammogram. In order to optimize the experiment condition, we have tried some parallel experiments changing the concentration of the solution of DNA tetrahedron. And it turns out that the best concentration of DNA tetrahedron among 250nM, 25nM and 2.5nM is 250nM, which is proved by the cyclic voltammogram of the three the same electrodes immersed in three different concentration of DNA tetrahedron solution in the electrolyte of 2mM $K_3Fe(CN)_6$ in 0.1 M KCl, (voltage ranges from –0.3V to 0.6V, scan rate is 100mV/s),for the biggest decline of the redox peaks of Fe in the cyclic voltammogram while immersed in 250nM DNA tetrahedron solution. Also the process of self-assembling is researched, and the results show that immersing the electrode in DNA tetrahedron solution for three hours makes the most stable active area of the electrode for the combination of DNA tetrahedron and bare gold disc electrode, with the balance of DNA tetrahedron adsorption and shedding on the surface of gold disc electrode. So according to the result of these exploratory experiments, we standardize the condition of making the process of self-assembled monolayer of DNA tetrahedron on gold surface by setting down the concentration of immersed DNA tetrahedron solution to 250nM and the self-assembling time to three hours.

Thirdly we need to insert amino-grapheme fragments among DNA tetrahedrons on the electrode, which needs the appropriate size of amino-graphene fragments. In order to get suitable amino-grapheme fragments, the 0.25mg/mL prepared amino-grapheme solution is divided into three groups, then every of them are ultrasonic concussed for four hours, six hours and eight hours. After concussion, all of the three groups are centrifuged for 20 minutes in the centrifugal machine at the speed of 3000 rad per minute. In order to know the accurate dimensions of the amino-graphene fragments, we take samples of the three groups and send them to Instrumental Analysis Center of SJTU to have TEM test. According to the TEM images of all the three groups of amino-grapheme, we standardize the condition of grapheme dispersion by setting down the ultrasonic concussion time for the 0.25mg/mL graphene to eight hours and the time of centrifugation to 20 minutes at the speed of 3000 rad per minute, for the fact that the longer the time of ultrasonic concussion last, the smaller the grapheme fragments are, and they are already around 100nm wide when concussed for eight hours, which meets the requirement of experiment . Also, we have tried parallel experiments to find the best way to add grapheme solution on the electrode. Through the cyclic voltammogram of bare gold disc electrode incubation in 250nM TSPs for 3 hours with different time added 10uL 0.25mg/mL graphene in the electrolyte of 2mM $K_3Fe(CN)_6$ in 0.1 M KCl,(voltage ranges from –0.3V to 0.6V, scan rate is 100mV/s),it turns out that the best way is to add 10uL 0.25mg/mL grapheme on the electrode for four times at every 15

minutes.

Ultimately in order to testify the successfully construction of gold electrode-DNA tetrahedron-amino-graphene composite electrode, which cannot be observed by our eyes, we prepare four kinds of print electrodes, divide them into four groups, the first one is bare gold, the second one is gold disc with combination of DNA tetrahedron, the third one is gold disc with combination of DNA tetrahedron and amino-graphene added for two times, and the last one is gold disc with combination of DNA tetrahedron and amino-graphene added for five times. Then they are sent to Instrumental Analysis Center of SJTU to have AFM test. Finally, according to the AFM images, it is confirmed that the gold electrode-DNA tetrahedron-amino-graphene composite electrode structures successfully with the biggest value of the roughness of each print electrode.

Then repeated experiments using the composite electrode to detect NADH confirms that it can successfully reduce NADH oxidation voltage to 0.3V, which can effectively reduce the side effect of impurity, and the lower limit of detection is 0.1nM, while the upper limit is 1uM, the linear detection ranges from 1nM to 1uM, the sensitivity is 0.226 (uA/lg（C_{NADH} ）*cm^2）, and the selectivity and reproducibility of the electrode are both good. Since the detection limit and the linear detection range of the gold-DNA tetrahedron–graphene composite electrode are not as good as we expect, we have tried some ways to optimize it. After continuous attempts, it turns out that gold nanoparticle works out, because it can increase the roughness of electrode surface and can also help make the electronic transmission more easily. We have tried many ways to deposit gold nanoparticles on gold disc electrode. Ultimately, we standardize the process of experiment to that before combining DNA tetrahedron on gold disc electrode, electrochemical deposition method is used with chlorauric acid as electrolyte to deposit gold nanoparticles on bare gold disc electrode, then DNA tetrahedron and grapheme are added the same way as before.

Our repeated experiment confirmed that as for the gold disc-gold nanoparticles-DNA tetrahedron-amino-graphene electrode, the detection limit of NADH can be further reduced down to 0.1fM and up to 100uM, while the linear detection range expands from 1fM to 1pM and from 10pM to 100uM, and sensitivity is increased to 1.305 (uA/lg（C_{NADH} ）*cm^2）and 0.200 (uA/lg（C_{NADH} ）*cm^2).

The novel sensor we developed here could serve as a highly sensitive probe for NADH detection, which would further benefit the field of NADH related disease diagnostics.