

金电极自组装基因分子膜的制备及电化学检测

黎媛萍^{1,2,3}, 曾光明^{1,3}, 汤琳^{1,3}, 陈耀宁^{1,3}, 章毅^{1,3}, 刘灿^{1,3}, 李贞^{1,3}, 庞娅^{1,3}

(1. 湖南大学 环境科学与工程学院, 长沙 410082;

2. 湖南城市学院 化学与环境工程学院, 益阳 413000;

3. 湖南大学 环境生物与控制教育部重点实验室, 长沙 410082)

摘要: 采用分子自组装技术制备巯基修饰的基因分子膜修饰金电极, 用于竞争式杂交检测黄孢原毛平革菌木素过氧化物酶编码基因。通过差分脉冲伏安法、循环伏安法、交流阻抗法和电流—时间曲线法优化自组装时间和信号探针的最佳响应浓度, 研究目标基因的线性检测范围和再生性能。结果表明: 修饰金电极最优自组装时间为 15 h, 信号探针的最佳响应浓度为 0.51×10^{-6} mol/L, 目标基因的线性检测范围为 $7.51 \times 10^{-12} \sim 1.05 \times 10^{-9}$ mol/L, 检测下限为 7.51×10^{-13} mol/L。该修饰电极具有良好的再生性能。

关键词: 修饰金电极; 自组装单分子膜; 基因; 竞争杂交; 电化学检测

中图分类号: T

文献标志码: A

Preparation and electrochemical determination of gold electrode modified with thiolated capture probe through self-assembling

LI Yuan-ping^{1,2,3}, ZENG Guang-ming^{1,3}, TANG Lin^{1,3}, CHEN Yao-ning^{1,3},
ZHANG Yi^{1,3}, LIU Can^{1,3}, LI Zhen^{1,3}, PANG Ya^{1,3}

(1. College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China;

2. College of Chemistry and Environmental Engineering, Hunan City University, Yiyang 413000, China;

3. Key Laboratory of Environmental Biology and Pollution Control (Hunan University),
Ministry of Education, Changsha 410082, China)

Abstract: A gold electrode with thiolated capture probe through self-assembling based on the competitive hybridization for detection of target sequence of lignin peroxidase (*lip*) gene of *Phanerochaete chrysosporium* was developed. Following hybridizations with competitively hybridized with the target nucleic acid and biotinylated response probe, streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) conjugate was applied to the electrode. The electrochemical behavior was analyzed by cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy, current—time curve and differential pulse voltammetry. The results show that the best time for self-assembling is 15 h, and the optimum concentration of response probe is 0.51×10^{-6} mol/L. A good linear correlation between the current and the concentration of the target nucleic acid concentration is found in the concentration range from 7.51×10^{-12} mol/L to 1.05×10^{-9} mol/L. The detection limit is 7.51×10^{-13} mol/L. The modified electrode exhibits high sensitivity, precision, stability and reproducibility.

Key words: modified gold electrode; self-assembled monolayer; gene; competitive hybridization; electrochemical determination

电极修饰是电化学检测过程中的关键步骤, 自组装膜修饰电极是基于分子的自组装作用, 在固体表面

自然形成高度有序的单分子层膜^[1-2], 在电极修饰的研究中备受关注。制备修饰电极的基因分子膜, 一般是

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT0719); 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET-11-0129); 国家自然科学基金资助项目(50608029, 50808072, 50978088); 湖南大学中央高校基本科研业务费专项资金资助项目; 湖南省优秀博士学位论文科研项目

收稿日期: 2012-04-23; **修订日期:** 2012-09-25

通信作者: 曾光明, 教授, 博士; 电话: 0731-88822754; E-mail: zgming@hnu.cn

利用带巯基(—SH)的化合物在金电极表面上形成自组装单分子膜的特性来固定核酸基因^[3-4],形成的膜表面结构高度有序,稳定性好,有利于杂交检测,并获得环境目标样品中的相关生物信息。

目前,利用白腐菌对木质素进行生物降解已成为环境领域的研究热点,黄孢原毛平革菌是白腐菌中的代表菌株,具有较强的降解木质素能力。它所产生的木素过氧化物酶在木质素的分解中起着关键作用^[5-6],对其编码基因的快速准确检测有利于深入了解降解过程。用于杂交识别的自组装基因膜修饰电极电化学检测方法可实现对木素过氧化物酶编码基因的快速检测,操作简便,具有较好的应用前景。

本文作者利用巯基和金电极之间的化学键作用,将巯基修饰的单链基因探针自组装于金电极表面制备了捕获探针修饰金电极;将黄孢原毛平革菌木素过氧化物酶编码基因作为检测的目标基因,使用生物素标记信号探针,两者竞争与捕获探针杂交。采用了差分脉冲伏安法、循环伏安法、交流阻抗法和电流—时间曲线法等一系列电化学分析方法^[7-8],通过自组装时间和信号探针最佳响应浓度的优化,目标基因的线性检测范围的确定,以及修饰电极的再生性能研究,最终建立了该自组装基因分子膜修饰金电极用于检测黄孢原毛平革菌木素过氧化物酶编码基因的分析方法,以期用于木质素生物降解过程中基因的快速痕量检测。

1 实验

1.1 实验仪器

CHI660B 电化学工作站(上海辰华仪器公司),其三电极系统如下: $\phi 0.5$ mm的自制金电极为工作电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极,铂丝为对电极。

1.2 实验材料

磷酸缓冲溶液 PB(Na_2HPO_4 , 1/15 mol/L; KH_2PO_4 , 1/15 mol/L; pH=6.98 及 7.38)。DNA 杂交液: $2\times$ SSC 缓冲溶液(0.3 mol/L NaCl, 0.03 mol/L $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH=8.0)。电极浸洗液: Tris-Cl 缓冲溶液(0.1 mol/L 三羟甲基甲烷(Tris), 0.1 mol/L HCl, pH=8.0)。Piranha 溶液: $V(98\% \text{H}_2\text{SO}_4):V(30\% \text{H}_2\text{O}_2)=3:1$ (体积比); 0.5 mol/L H_2SO_4 溶液; 5 mmol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (铁氰化钾溶液), 0.1 mol/L KCl 溶液, 1 mmol/L 巯基己醇(MCH), 1 mmol/L 对苯二酚, 0.5 mmol/L H_2O_2 。所有试剂均为分析纯或优级纯试剂,所有溶液均用超纯水配制。HRP-SA 溶液由 PB(pH=6.98)稀释配制。

本研究所用低聚核苷酸序列为自行设计^[9],采用 Clustal X 对 NCBI Gene Bank 中黄孢原毛平格菌的 10 个 lip 序列进行了比对,然后用 Primer Premier 5.0 设计了捕获探针、目标基因和信号探针,由上海生工生物技术有限公司合成。捕获探针 $S_1(5'\rightarrow 3': \text{HS}-(\text{CH}_2)_6\text{TTGTTGACGAAGGACTGCCA})$ 含有 20 个碱基,5'端用 $(\text{CH}_2)_6\text{-SH}$ 修饰。信号探针 $S_2(5'\rightarrow 3': \text{TGGCAGTCCTTCGTCAACAA-Biotin})$ 和目标基因 $S_3(5'\rightarrow 3': \text{TGGCAGTCCTTCGTCAACAA})$ 也含有 20 个碱基,均能和捕获探针互补杂交,前者 5'端用生物素修饰。辣根过氧化物酶标记链亲和素(HRP-SA)购自北京鼎国生物技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 金电极的制备

采用自制金电极($\phi 0.5$ mm)作为工作电极^[10]。截取长度为 1.5 cm 的 $\phi 0.5$ mm 金丝(纯度 $>99.99\%$),在其末端缠绕 10 cm 长的铜丝。截取长度为 5 cm、内径为 2 mm 的干燥洁净热熔玻璃管,将其一端置于酒精喷灯火焰的外焰上灼烧,当尖端玻璃在高温下熔融呈水滴状时,迅速将末端缠绕有铜丝的金丝插入其中,使熔融态的玻璃包裹住金丝。灼烧过程中需不断转动玻璃管使其受热均匀,确保金丝和玻璃间不会形成气泡。灼烧完成后,离开火焰的瞬间,迅速将灼烧过的玻璃管倒置,熔融态的玻璃因重力作用缓慢向下流并冷却,保证金丝被玻璃紧密包裹。将初步制成的电极在 0~6 号金相砂纸上依次画圈打磨,直至裸露的金盘与外裹的玻璃同一平面,表面光亮无划痕。将所制金电极浸入水中数小时,观察玻璃管内壁是否潮湿,考察其是否漏水,同时用万能表检测导电性。制得的电极既不漏水又具有良好的导电性,用 A-B 胶将玻璃管后端封闭,以固定铜丝并防止后续实验管内渗水。

1.3.2 金电极的预处理

用 $0.5 \mu\text{m} \text{Al}_2\text{O}_3$ 糊进行抛光至电极表面光洁;将电极浸入 Piranha 溶液中浸泡 3 h,以去除电极上的杂质;以 0.5 mol/L H_2SO_4 溶液为底液,在 $-0.8\sim 1.0$ V 范围内,以 100 mV/s 的扫描速度进行循环伏安法(CV)扫描,电化学处理直至电流达到稳态。电化学处理完毕后,以铁氰化钾溶液(5 mmol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}+0.1$ mol/L KCl)为底液进行循环伏安法(CV)和交流阻抗法(EIS)扫描。

1.3.3 捕获探针 S_1 在金电极上的自组装

滴取 $4 \mu\text{L} 14.7 \mu\text{mol/L}$ 的巯基修饰捕获探针 S_1 溶液(HS-ssDNA)到金电极表面^[11]。于 4°C 通过巯基—金化学键作用自组装成膜,每隔 1 h 取出,依次用 Tris

缓冲溶液、超纯水浸洗电极表面以除去非特异性吸附,以铁氰化钾溶液(5 mmol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ +0.1 mol/L KCl)为底液进行差分脉冲伏安法(DPV)扫描,优化自组装时间,制备巯基自组装基因分子膜修饰金电极(HS-ssDNA/Au 电极)。

1.3.4 信号探针 S_2 最佳响应浓度的优化

实验过程如图 1 所示。将制备好的 HS-ssDNA/Au 电极浸入 400 μL 的 1 mmol/L 巯基乙醇(MCH)中,于室温下封闭 1 h^[11];用 Tris 缓冲溶液、超纯水浸洗后,浸入 400 μL 信号探针 S_2 检测液中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 1 h,制得双链 DNA 修饰金电极(HS-dsDNA/Au);用 Tris 缓冲溶液、超纯水浸洗电极;将 HS-dsDNA/Au 浸入 400 μL 稀释度为 1:500(HRP-SA:PB(pH=6.98)的体积比)的辣根过氧化物酶标记亲和素(HRP-SA)溶液中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培育 30 min,运用生物素和链亲和素之间的特异性作用将 HRP 标记在基因链上。在 S_1 、HRP-SA 浓度固定的条件下,改变 S_2 的浓度,以含有 1 mmol/L 对苯二酚的磷酸缓冲溶液 PB(pH=7.38)为底液,在 -0.4~0.6 V 范围内进行循环伏安法(CV)扫描,寻找对苯二酚的最佳还原电位。在最佳还原电位下,在含 0.5 mmol/L H_2O_2 底液中采用电流-时间曲线法($i-t$)记录电流跃迁值,优化 S_2 最佳响应浓度。

1.3.5 目标基因 S_3 检测

实验过程如图 1 所示。将制备好的 HS-ssDNA/Au 电极浸入 400 μL 的 1 mmol/L 巯基乙醇(MCH)中,于室温下封闭 1 h;用 Tris 缓冲溶液、超纯水浸洗后,浸入 400 μL 含 0.51 $\mu\text{mol/L}$ 信号探针 S_2 及不同浓度的目标基因 S_3 混合检测液中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 1 h,在 S_2

浓度保持为 0.51 $\mu\text{mol/L}$ 时的最佳响应值情况下,让 S_3 与 S_2 竞争与 S_1 杂交,然后进行封闭和酶标记,检测过程同步骤 1.3.4。根据不同浓度目标基因的电流跃迁值,测定工作曲线。

1.3.6 自组装膜修饰金电极的再生

将杂交检测后的金电极浸在 80 $^{\circ}\text{C}$ 的热水中 3 min,使杂交产物解链,然后迅速浸入 0 $^{\circ}\text{C}$ 的冰水中浸泡 30 s,使解链后信号探针和目标基因脱落,而捕获探针仍通过 S—Au 键固定在金表面,自组装膜修饰金电极实现再生为后续实验循环所用。此过程用交流阻抗法(EIS)表征。

2 结果与讨论

2.1 自组装时间与响应信号的关系

巯基化合物在 Au 表面的自组装动力学分为两步:首先是快速的吸附过程,在几分钟内完成,厚度达极限值的 80%~90%;第二步为较慢的表面重组过程,一般持续数小时,厚度逐渐达到极限值,表面结构高度有序,稳定性好^[12-14]。

如图 2 所示,随着自组装时间的增加,HS-ssDNA/Au 的差分脉冲伏安法(DPV)还原峰电流不断降低,说明不断有 HS-ssDNA 吸附于金表面并完成自组装基因分子层^[15]。当自组装时间大于 15 h,电流趋于稳定。将自组装固定 15 h 后的 HS-ssDNA/Au 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存一周后再检测,电流基本没有衰减,响应信号比较稳定,说明形成稳定的、完整有序分子层。

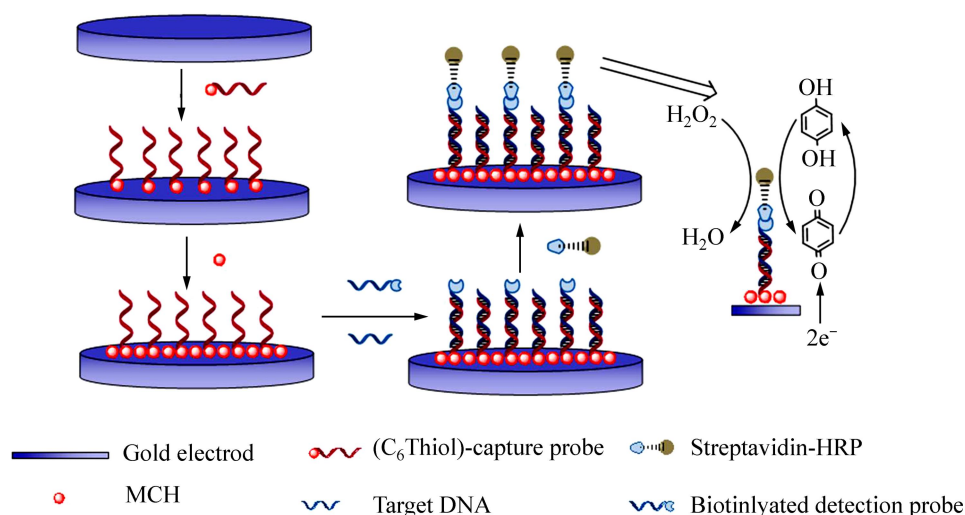


图 1 自组装膜修饰金电极电化学竞争式杂交检测 DNA 原理示意图

Fig. 1 Illustration of hybridization and competitive detection procedure by self-assembled monolayer of gold electrode

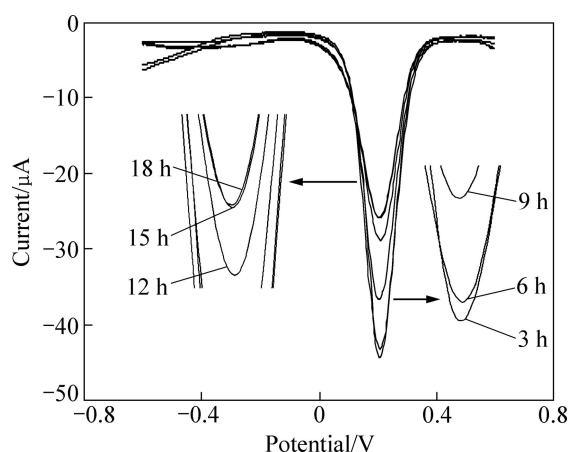


图2 不同自组装时间条件下的 HS-ssDNA/Au 电极的差分脉冲伏安曲线

Fig. 2 DPV curves of HS-ssDNA/Au in 0.1 mol/L KCl solution containing 5.0 mmol/L ferricyanide at different self-assembled times

故选择最优自组装时间为 15 h。

2.2 信号探针 S_2 最佳响应浓度

恰当的信号探针量 S_2 才能反应准确的检测信号。当 S_2 量不足时, 部分捕获探针 S_1 未能与 S_2 杂交, 在后续测定目标基因时, 此部分 S_2 与无信号标记的目标基因 S_3 杂交, 导致此部分杂交信号不被检出; 当 S_2 量过饱和时, 过饱和部分的 S_2 与 S_3 竞争杂交的信号同样未能被准确反映。两者均影响竞争杂交检测的灵敏性。因此必须优化 S_2 的最佳响应浓度。如图 3 所示, 当 S_2 的浓度在 $0.07 \sim 0.51 \mu\text{mol/L}$ 之间时, 电流—时间曲线法($i-t$)^[16]的电流跃迁值不断快速攀升, 相对于金

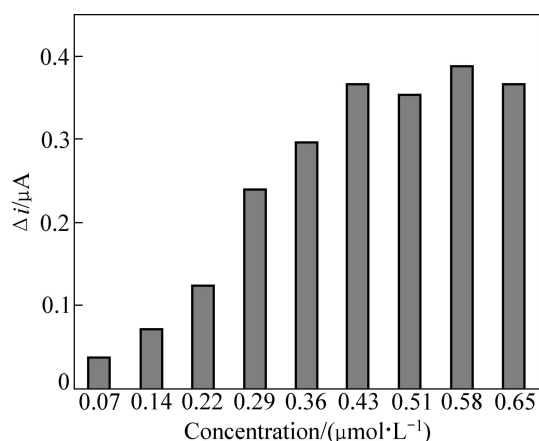


图3 不同 S_2 浓度下电流—时间曲线法的电流跃迁值

Fig. 3 Electrical current response in current—time curve to detection probe under different concentration

表面固定的 S_1 而言, 此阶段 S_2 的量仍然不足; 当 S_2 浓度大于 $0.51 \mu\text{mol/L}$ 时, 电流跃迁值逐渐趋于稳定, 此阶段 S_1 和 S_2 的量恰好完全杂交, 处于动态平衡。因此, 本文作者以 $0.51 \mu\text{mol/L}$ 作为信号探针 S_2 的最佳响应浓度。

2.3 金电极杂交检测的电化学表征

采用循环伏安法表征杂交检测过程。结果表明随着实验过程每一步骤的推进, 峰电流值逐渐降低, 峰电位差逐渐增大, 说明金表面电子传递受阻加剧, 氧化还原反应不可逆性增加, 分析认为是由金表面附着膜层增厚所致^[1, 17]。 S_1 在金表面自组装成膜后, S_2 、 S_3 通过杂交依次附着在金表面上。随着金表面上附着的物质不断增加, 膜层不断增厚, 阻碍电子传递的作用越大, 因此电阻不断增大, 电流逐渐减小。

2.4 修饰电极的线性检测范围

电流—时间曲线法表征线性检测工作曲线^[16]。在 S_2 浓度保持为 $0.51 \mu\text{mol/L}$ 的情况下, 让 S_3 与 S_2 竞争与修饰电极上的 S_1 杂交。 S_3 与 S_2 具有相同的核苷酸序列, 都能与捕获探针完全杂交。由于 S_2 的 3'端连接生物素, 能通过生物素和亲和素之间的特异性结合与辣根过氧化物酶标记链亲和素(HRP-SA)相连, 而 S_2 的 3'端未连接生物素则不能通过上述作用标记上辣根过氧化物酶(HRP)。通过 S_2 与 S_1 杂交作用留在修饰电极上的 HRP 保持了较高的酶催化活性, 检测底液中的对苯二酚能够有效地在酶与电极之间转移电子。对苯二酚为 HRP 的电子媒介, 在 HRP 催化下 H_2O_2 将对苯二酚氧化成苯醌, 加入 H_2O_2 后产生明显的还原电流跃迁响应值^[3]。由于 HRP 催化产物产生的还原电流与酶的量成正比, 进而与修饰电极表面 HRP 标记的 S_2 量成正比。因此在一定的浓度范围内, 随着 S_3 浓度的增加, 通过碱基相互作用杂交结合在修饰电极上的 S_3 量增多, 因此与 S_1 结合的 S_2 量相应减少, 即辣根过氧化物酶标记量也相应减少, 因此电流跃迁值随目标基因 S_3 浓度增大而减小, 如图 4 所示。

以目标基因浓度为横坐标, 以电流跃迁响应值为纵坐标, 绘出修饰金电极检测黄孢原平革菌木素过氧化物酶编码基因的低浓度段工作曲线, 如图 5 所示。其线性检测范围为 $7.51 \times 10^{-12} \sim 1.05 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$, 线性回归方程为 $y = -143.98x + 0.2522$, 其中 y 代表电流跃迁值(μA), x 代表 S_7 的浓度($\mu\text{mol/L}$); 可决系数 $R^2 = 0.9964$, 误差线来源于 3 次重复平行实验。结果表明, S_3 与 S_2 存在竞争关系, S_3 浓度越高, S_2 与修饰电极上的 S_1 杂交结合越少, 辣根过氧化物酶在修饰电极

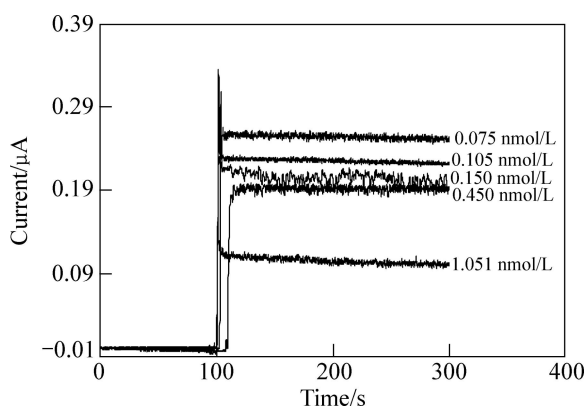


图4 不同 S_3 浓度下的电流—时间曲线($i-t$)

Fig. 4 Current—time curve of target nucleic acid under different concentrations and detection probe ($0.51 \mu\text{mol/L}$) at 37°C for 1 h, using PBS (pH 7.38) containing 0.5 mmol/L H_2O_2 and 1 mmol/L hydroquinone

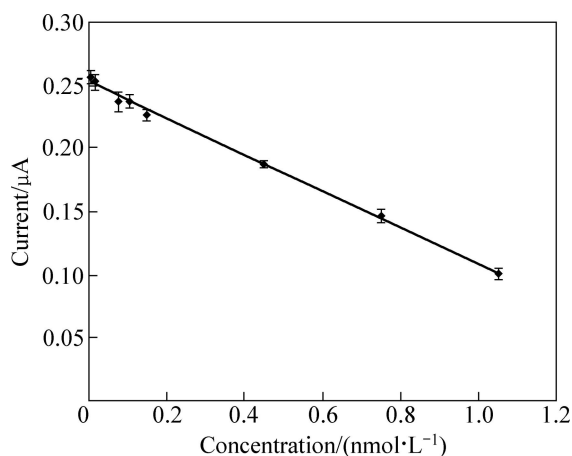


图5 目标基因检测工作曲线

Fig. 5 Calibration curve of current response to target DNA under optimal experimental conditions

上的标记量就越少,因此电流跃迁响应值越小。检出下限是 $7.51 \times 10^{-13} \text{ mol/L}$ 。

2.5 自组装膜修饰金电极的再生性能

根据交流阻抗图原理分析^[17-18],如图6所示,捕获探针 S_1 能有效识别溶液中的互补序列 S_2 和 S_3 ,杂交生成的 dsDNA 增加了修饰电极表面荷负电量,同时电极表面修饰层的结构变得更为稠密,进一步阻碍了 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 与电极表面电子交换,因此电极阻抗不断增大。这种界面阻抗增加是核酸功能化电极的特性。再生处理后的自组装膜修饰金电极电阻跟封闭后的原修饰电极电阻相差无几。在同样的实验条件下,将其继续用于新一轮杂交实验后的阻抗也与上一轮杂

交后的阻抗相差不大,说明经过再生处理,原有的杂交链已解开脱落而捕获探针 S_1 仍固定于金电极表面,仍能循环利用于杂交检测,由此可得,该修饰电极具有良好的再生性能。

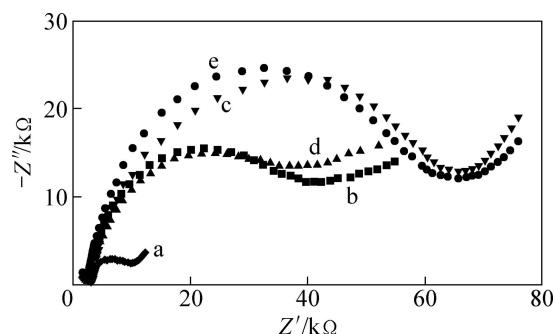


图6 修饰电极再生前后交流阻抗对比图

Fig. 6 Electrochemical impedance spectra (Nyquist plots) of electrodes: (a) Bare gold electrode; (b) Gold electrode modified with CP ($14.7 \mu\text{mol/L}$) for 15 h and 1 mmol/L MCH; (c) Modified gold electrode with target nucleic acid (0.45 nmol/L) and DP ($0.51 \mu\text{mol/L}$) for 1 h at 37°C ; (d) Regeneration of modified gold electrode after step (c); (e) Regenerated modified gold electrode used in hybridization under the same condition of step (c), using 0.1 mol/L KCl solution containing 5.0 mmol/L ferricyanide, with frequency range of $0.01-105 \text{ Hz}$, bias potential of $+0.08 \text{ V}$ and AC amplitude of 5 mV

3 结论

1) 巯基修饰的捕获探针 S_1 在金电极表面自组装 15 h 后形成稳定有序的分子膜,具有稳定的电化学性能。信号探针 S_2 的浓度为 $0.51 \mu\text{mol/L}$ 时,能与修饰金电极表面的 S_1 达到饱和杂交的动态平衡,能准确反映黄孢原毛平革菌木素过氧化酶编码基因的检测信号,因此以 S_2 浓度 $0.51 \mu\text{mol/L}$ 为最佳响应浓度,确保竞争杂交检测的灵敏性。

2) 在目标基因 S_3 浓度范围为 $7.51 \times 10^{-12} \sim 1.05 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 时,电化学响应信号随 S_3 浓度增大而减小,并形成线性关系。表明 S_3 与 S_2 形成竞争关系, S_3 浓度越高, S_2 与修饰电极上的 S_1 杂交结合越少,辣根过氧化物酶在修饰电极上的标记量就越少,因此电化学信号越小,验证了其具有竞争杂交检测机制。

4) 再生处理后的修饰金电极电阻跟封闭后的原修饰电极电阻相差无几,说明该电极再生性能良好。检出下限为 $7.51 \times 10^{-13} \text{ mol/L}$ 可实现目标基因的低浓

度检测。基于该修饰金电极所建立的分析方法有望用于木质素生物降解过程中基因的快速痕量检测。

REFERENCES

- [1] MUTHURASU A, GANESH V. Electrochemical characterization of Self-assembled Monolayers (SAMs) of silanes on indium tin oxide (ITO) electrodes—Tuning electron transfer behaviour across electrode-electrolyte interface[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012, 374(1): 241–249.
- [2] QU D, UOSAKI K. Formation of continuous platinum layer on top of an organic monolayer by electrochemical deposition followed by electroless deposition[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2011, 662: 80–86.
- [3] SONG Y, WAN L, WANG Y, ZHAO S, HOU H, WANG L. Electron transfer and electrocatalytics of cytochrome *c* and horseradish peroxidase on DNA modified electrode[J]. *Bioelectrochemistry*, 2012, 85: 29–35.
- [4] RAJ M A, REVIN S B, JOHN S A. Selective determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in the presence of ascorbic acid using 4-(dimethylamino)pyridine capped gold nanoparticles immobilized on gold electrode[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, 87(2): 353–360.
- [5] SINGH D, ZENG J, LASKAR D D, DEOBALD L, HISCOX W C, CHEN S. Investigation of wheat straw biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2011, 35(3): 1030–1040.
- [6] ADAV S S, RAVINDRAN A, SZE S K. Quantitative proteomic analysis of lignocellulolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* on different lignocellulosic biomass[J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(5): 1493–1504.
- [7] LIU A, CHEN X, WANG K, WEI N, SUN Z, LIN X, CHEN Y, DU M. Electrochemical DNA biosensor based on aldehyde-agarose hydrogel modified glassy carbon electrode for detection of PML/RARa fusion gene[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011, 160(1): 1458–1463.
- [8] TAVANA T, KHALILZADEH M A, KARIMI-MALEH H, ENSAFI A A, BEITOLLAHI H, ZAREYEE D. Sensitive voltammetric determination of epinephrine in the presence of acetaminophen at a novel ionic liquid modified carbon nanotubes paste electrode[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2012, 168: 69–74.
- [9] STUARDO M, V SQUEZ M, VICUNA R, GONZ LEZ B. Molecular approach for analysis of model fungal genes encoding ligninolytic peroxidases in wood-decaying soil systems[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 38(1): 43–49.
- [10] 卢毅屏, 蒋小辉, 冯其明, 欧乐明, 张国范. 常温酸性条件下黄铜矿的电化学行为[J]. *中国有色金属学报*, 2007, 17(3): 465–470.
- LU Yi-ping, JIANG Xiao-hui, FENG Qi-ming, OU Le-ming, ZHANG Guo-fan. Electrochemical behavior of chalcopyrite at normal temperature in acidic solution[J]. *The Chinese Journal of Nonferrous Metals*, 2007, 17(3): 465–470.
- [11] TANG L, ZENG G, SHEN G, LI Y, LIU C, LI Z, LUO J. Sensitive detection of lip genes by electrochemical DNA sensor and its application in polymerase chain reaction amplicons from *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009(24): 1474–1479.
- [12] WANG Z, LI H, CHEN J, XUE Z, WU B, LU X. Acetylsalicylic acid electrochemical sensor based on PATP-AuNPs modified molecularly imprinted polymer film[J]. *Talanta*, 2011, 85(3): 1672–1679.
- [13] MAZLOUM-ARDAKANI M, HEIDARI M M, SALEHPOUR E. Digestion of restriction enzyme for the detection of single-base mismatch in DNA[J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 421(1): 125–129.
- [14] KURALAY F, CAMPUZANO S, HAAKE D A, WANG J. Highly sensitive disposable nucleic acid biosensors for direct bioelectronic detection in raw biological samples[J]. *Talanta*, 2011, 85(3): 1330–1337.
- [15] LIU S, YAN J, HE G, ZHONG D, CHEN J, SHI L, ZHOU X, JIANG H. Layer-by-layer assembled multilayer films of reduced graphene oxide/gold nanoparticles for the electrochemical detection of dopamine[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2012, 672: 40–44.
- [16] HUANG T, OU W, FENG B, HUANG B, LIU M, ZHAO W, GUO Y. Researches on current distribution and plate conductivity of valve-regulated lead-acid batteries[J]. *Journal of Power Sources*, 2012, 210: 7–14.
- [17] VISWANATHAN S, RANI C, RIBEIRO S, DELERUE-MATOS C. Molecular imprinted nanoelectrodes for ultra sensitive detection of ovarian cancer marker[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, 33(1): 179–183.
- [18] THIRUPATHIRAJA C, KAMATCHIAMMAL S, ADAIKKAPPAN P, SANTHOSH D J, ALAGAR M. Specific detection of *Mycobacterium sp. genomic* DNA using dual labeled gold nanoparticle based electrochemical biosensor[J]. *Analytical Biochemistry*, 2011, 417(1): 73–79.

(编辑 何学锋)