



基于核苷酸代谢 的细胞电化学方法 及其应用

袁 星 武冬梅 李锦莲 朱晓琳 等 著



科学出版社

基于核苷酸代谢的细胞电化学 方法及其应用

袁 星 武冬梅 李锦莲 朱晓琳 等 著



科学出版社

北 京

内 容 简 介

细胞电化学是基于电化学原理、实验方法与生物学技术相互结合,对细胞进行分析和表征,可用来揭示细胞结构-功能关系和外源物质对细胞功能的影响。近年来,细胞电化学的发展为体外毒理学评价提供了新的理论与方法。本书总结了作者近十年的研究成果,从核苷酸代谢角度揭示了细胞电化学响应机理,重点阐述了各种细胞电化学检测系统的建立及其在抗癌药物筛选、环境污染物毒性检测中的应用。

本书具有系统性、学术性和实用性,可供环境科学、毒理学、医学与生物学等领域的科研工作者、技术人员以及研究生参考与借鉴。

图书在版编目(CIP)数据

基于核苷酸代谢的细胞电化学方法及其应用/袁星等著. —北京:科学出版社, 2016

ISBN 978-7-03-048682-0

I. ①基… II. ①袁… III. ①细胞生物化学-电化学-研究 IV. ①Q26

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 127394 号

责任编辑:霍志国/责任校对:张小霞

责任印制:徐晓晨/封面设计:东方人华

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京教图印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016年6月第一版 开本:720×1000 B5

2016年6月第一次印刷 印张:12 插页:3

字数:240 000

定价:80.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

21 世纪以来,化学、医学、生物和材料科学等学科的快速发展与相互融合,为毒理学提供了新的发展机遇。随着社会需求和减少(reduction)、优化(refinement)、替代(replacement)为核心的“3R”理论的提出,发展有效的体外毒理学评价方法已成为现代毒理学研究的重要方向之一。细胞电化学是采用电化学方法检测细胞生理活动过程中的电荷转移变化,以反映细胞生理状态变化规律的新领域。近十多年来,细胞电化学法在体外毒理学检测中的应用,开辟了体外毒理学研究的新方向。

本书总结了作者近十年的研究工作,从细胞电化学机理研究出发,揭示了细胞电化学信号来源,建立了从单信号到多信号的细胞电化学检测系统,并将细胞电化学方法应用到抗癌药物筛选,环境雌激素、氯酚类化合物、重金属等污染物的毒性检测,旨在推进细胞电化学在体外毒理学评价领域的发展与应用。

全书共分 10 章,第 1 章概述了细胞电化学基本原理及研究进展。第 2~3 章为细胞电化学响应机理,其中第 2 章为活细胞的电化学响应机理,第 3 章为细胞质的电化学行为。第 4 章为细胞电化学检测方法在环境雌激素毒性评价中的应用。第 5 章为原位细胞电化学检测系统的建立与应用。第 6~8 章为多信号细胞电化学检测系统的建立与应用,其中第 6 章为双信号细胞电化学检测系统的建立与应用,第 7 章为三信号细胞电化学检测系统的建立与应用,第 8 章为基于酶催化的四信号细胞电化学检测系统的建立与应用。第 9 章为聚钙黄绿素修饰玻碳电极的制备与应用。第 10 章为电化学微检测系统的构建及应用。

本书的主要研究成果是在国家自然科学基金面上项目(批准号:51178092、

81273132)的支持下完成的,在此表示感谢!

全书由东北师范大学袁星和佳木斯大学武冬梅策划、组织撰写和审稿、统稿,主要撰写人员有李锦莲(佳木斯大学)、朱晓琳(东北师范大学)、秦洪伟(渤海大学)、崔继文(佳木斯大学)、朱冠宇(首都医科大学)。

由于细胞电化学是一门新兴的交叉学科分支,涉及多方面的基础知识,作者水平有限,书中难免有疏漏与错误之处,诚请广大读者批评指正。

袁 星

2016年5月

目 录

前言

第 1 章 细胞电化学基本原理及研究进展	1
1.1 电化学生物传感器概述	1
1.1.1 生物传感器的原理及分类	1
1.1.2 电化学生物传感器的原理及分类	2
1.2 细胞电化学基本原理及其研究进展	4
参考文献	6
第 2 章 活细胞的电化学响应机理	13
2.1 PC-3 细胞的电化学信号来源	14
2.1.1 MWCNTs/GCE 的制备	14
2.1.2 PC-3 细胞在 MWCNTs/GCE 上的电化学行为	14
2.1.3 PC-3 细胞电化学信号来源分析	15
2.1.4 细胞分泌时间对 PC-3 细胞电化学行为的影响	17
2.1.5 PC-3 细胞电活性物质的确定	18
2.2 MCF-7 细胞的电化学信号来源	23
2.2.1 MCF-7 细胞在 MWCNTs/GCE 上的电化学行为	23
2.2.2 MCF-7 细胞电化学信号来源分析	24
2.2.3 MCF-7 细胞电活性物质的确定	25
2.3 活细胞的电化学响应机理	26
参考文献	27
第 3 章 细胞质的电化学行为	29
3.1 超声波裂解法获得的细胞质电化学行为	30
3.1.1 超声波裂解法获得的 MCF-7 细胞质电化学行为	30
3.1.2 MCF-7 细胞质电化学信号来源分析	31
3.1.3 MCF-7 细胞质电化学信号描述细胞生长	33
3.1.4 抗癌药物作用时间对 MCF-7 细胞质电化学信号的影响	34

3.1.5	抗癌药物作用剂量对 MCF-7 细胞质电化学信号的影响	36
3.1.6	电化学法评价抗癌药物敏感性	37
3.2	加热灭活法获得的细胞质电化学行为	40
3.2.1	加热灭活法获得的细胞质电化学行为	40
3.2.2	细胞质电化学信号来源分析	41
3.2.3	PC-3 细胞质电化学信号描述细胞生长	41
3.2.4	抗癌药物作用时间对 PC-3 细胞质电化学信号的影响	41
3.2.5	抗癌药物作用剂量对 PC-3 细胞质电化学信号的影响	43
3.2.6	细胞电化学法评价抗癌药物敏感性	45
	参考文献	46
第 4 章	细胞电化学法评价环境雌激素效应	48
4.1	MCF-7 细胞去内源性雌激素前后电化学行为研究	48
4.1.1	MCF-7 细胞去内源性雌激素前后电化学行为比较	48
4.1.2	内源性雌激素对 MCF-7 细胞内嘌呤含量的影响	50
4.1.3	内源性雌激素对 MCF-7 细胞嘌呤外分泌的影响	52
4.2	细胞电化学法评价环境雌激素对细胞增殖的影响	53
4.2.1	环境雌激素对去激素 MCF-7 细胞电化学信号的影响	53
4.2.2	环境雌激素对 MCF-7 细胞内嘌呤含量的影响	53
4.2.3	环境雌激素作用时间对细胞电化学信号的影响	56
4.2.4	环境雌激素作用剂量对细胞电化学信号的影响	57
4.2.5	细胞电化学法评价环境雌激素对细胞增殖的影响	57
	参考文献	59
第 5 章	原位细胞电化学检测系统	61
5.1	原位细胞电化学检测系统的建立	61
5.1.1	原位裂解与传统裂解细胞的电化学行为比较	61
5.1.2	原位裂解的细胞电化学信号归属	63
5.1.3	原位裂解温度对细胞电化学信号的影响	66
5.1.4	电化学法描述细胞生长	67
5.2	原位细胞电化学法评价重金属类污染物毒性	69
5.2.1	Gr/GCE 的制备	69
5.2.2	细胞悬浮液的电化学行为	69

5.2.3	重金属类污染物作用时间对细胞电化学信号的影响	70
5.2.4	重金属类污染物作用剂量对细胞电化学信号的影响	70
5.2.5	重金属类污染物细胞毒性的电化学评价	73
5.3	原位细胞电化学法评价氯酚类污染物毒性	75
5.3.1	氯酚类污染物作用时间对细胞电化学信号的影响	75
5.3.2	氯酚类污染物作用剂量对细胞电化学信号的影响	76
5.3.3	氯酚类污染物细胞毒性的电化学评价	78
	参考文献	81
第 6 章	双信号细胞电化学检测系统	83
6.1	双信号细胞电化学检测系统的建立	83
6.1.1	MWCNTs-IL/GCE 的制备	83
6.1.2	细胞悬浮液在 MWCNTs-IL/GCE 上的电化学行为	84
6.1.3	细胞双电化学信号的归属	87
6.1.4	双信号细胞电化学行为的影响因素	92
6.1.5	双信号电化学法描述细胞生长	98
6.2	双信号细胞电化学法评价氯酚类污染物毒性	98
6.2.1	氯酚类污染物作用时间对细胞电化学信号的影响	98
6.2.2	氯酚类污染物作用剂量对细胞双电化学信号的影响	100
6.2.3	氯酚类污染物细胞毒性的双信号电化学评价	102
6.3	双信号电化学法检测药物对细胞的增殖与抑制作用	102
6.3.1	MCF-7 细胞去内源性雌激素前后电化学行为比较	102
6.3.2	金雀异黄素作用时间对 MCF-7 细胞电化学信号影响	104
6.3.3	金雀异黄素作用剂量对 MCF-7 细胞电化学信号影响	106
6.3.4	双信号电化学法评价金雀异黄素对 MCF-7 细胞的增殖作用	106
6.3.5	双信号电化学法评价金雀异黄素对 MCF-7 细胞的抑制作用	106
	参考文献	109
第 7 章	三信号细胞电化学检测系统	111
7.1	腺嘌呤和次黄嘌呤信号分离的细胞电化学检测系统	111
7.1.1	RGI/GCE 的制备与再生	111
7.1.2	嘌呤标准品在 RGI/GCE 上的电化学行为	112
7.1.3	腺嘌呤和次黄嘌呤信号分离的细胞电化学检测系统的建立	115

7.1.4	三信号细胞电化学法评价甲基-硝基-亚硝基胍对 BALB/3T3 细胞的影响	117
7.2	鸟嘌呤和黄嘌呤信号分离的电化学检测系统	119
7.2.1	POM@3DGF-GCE 的制备	119
7.2.2	嘌呤标准品在 POM@3DGF-GCE 上的电化学行为	120
7.2.3	鸟嘌呤和黄嘌呤信号分离的细胞电化学检测系统的建立	123
	参考文献	126
第 8 章	基于酶催化的细胞电化学检测系统	129
8.1	黄嘌呤氧化酶对 MCF-7 细胞中嘌呤催化作用的电化学研究	129
8.2	基于酶辅助的嘌呤电化学检测系统的建立	131
8.3	酶辅助的电化学法检测 MCF-7 细胞中的嘌呤含量	134
8.4	酶辅助的嘌呤电化学检测系统评价环磷酰胺对 MCF-7 细胞的毒性	136
	参考文献	137
第 9 章	聚钙黄绿素修饰玻碳电极的制备与应用	139
9.1	聚钙黄绿素修饰玻碳电极的制备	139
9.1.1	PCA/GCE 的制备	139
9.1.2	PCA/GCE 制备条件的优化	140
9.1.3	PCA/GCE 的表征	141
9.2	嘌呤与尿酸在 PCA/GCE 上的伏安行为	144
9.2.1	嘌呤在 PCA/GCE 上的伏安行为	144
9.2.2	PCA/GCE 对尿酸和嘌呤的电化学检测	146
9.2.3	扫速对尿酸和嘌呤在 PCA/GCE 上的电化学行为影响	147
9.2.4	pH 对尿酸和嘌呤在 PCA/GCE 上的电化学行为影响	148
9.2.5	尿酸和嘌呤在 PCA/GCE 上的同时检测	150
9.2.6	PCA/GCE 的重现性、稳定性和抗干扰性	151
9.2.7	PCA/GCE 在实际尿样分析中的应用	153
9.3	MCF-7 细胞在 PCA/GCE 上的伏安行为	154
9.3.1	MCF-7 细胞在 PCA/GCE 上的伏安行为	154
9.3.2	pH 对 MCF-7 细胞在 PCA/GCE 上伏安行为的影响	154
9.3.3	扫速对 MCF-7 细胞在 PCA/GCE 上伏安行为的影响	156

9.3.4 富集电位、时间对 MCF-7 细胞在 PCA/GCE 上伏安行为的 影响	157
9.3.5 MCF-7 细胞浓度与伏安响应之间的关系	159
9.4 电化学法评价环磷酰胺对 MCF-7 细胞的毒性效应	159
9.4.1 环磷酰胺作用剂量对 MCF-7 细胞毒性的影响	159
9.4.2 电化学法检测环磷酰胺的细胞毒性	161
参考文献	161
第 10 章 电化学微检测系统的构建及其在抗癌药物筛选中的应用	164
10.1 PT/PGE 电化学微检测系统的构建	164
10.1.1 PT/PGE 的制备	164
10.1.2 PT/PGE 电化学微检测系统构建	165
10.1.3 聚合圈数对 PT/PGE 电催化性能的影响	165
10.1.4 制备液 pH 对 PT/PGE 电催化性能的影响	166
10.1.5 苏氨酸浓度对 PT/PGE 电催化性能的影响	167
10.1.6 电极长度对 PT/PGE 电催化性能的影响	167
10.2 PT/PGE 的表征	168
10.2.1 PT/PGE 的循环伏安曲线	168
10.2.2 PT/PGE 的形貌表征	169
10.2.3 PT/PGE 的电化学表征	170
10.3 MCF-7 细胞在电化学微检测系统上的电化学行为研究	171
10.3.1 MCF-7 细胞在微检测系统上的电化学行为	171
10.3.2 MCF-7 细胞在微检测系统中检测条件的优化	171
10.3.3 MCF-7 细胞浓度与伏安响应之间的关系	174
10.4 基于电化学微检测系统评价环磷酰胺的细胞毒性	175
10.4.1 环磷酰胺作用剂量对细胞活性的影响	175
10.4.2 基于电化学微检测系统的细胞毒性曲线	176
参考文献	177

第 1 章 细胞电化学基本原理及研究进展

1.1 电化学生物传感器概述

1.1.1 生物传感器的原理及分类

生物传感器是在现代生物技术与化学、微电子学等多学科交叉形成的生物传感器技术的基础上发展起来的^[1-3]。1962 年 Clark 与 Lyons 首次在氧电极的基础上提出了酶传感器的原理与设计。1967 年 Updike 和 Hicks 将葡萄糖氧化酶包裹在聚丙烯酰胺胶体中加以固化, 再与氧化电极组装到一起, 研制出世界上第一支生物传感器, 即葡萄糖氧化酶电极, 用于定量检测血清中的葡萄糖含量, 标志着生物传感器的诞生^[4]。生物传感器以其体积小、检测响应快、灵敏度和准确度高、样品一般不需要预处理、可连续在线检测以及成本低等优点, 广泛应用于医疗检测、环境监测、食品制造与分析、发酵过程等领域^[5]。目前国内外已成功开发了检测大气成分、抗生素、农药残留、生物毒素与有害微生物的生物传感器^[6-11], 部分已经开始普及。随着生物传感技术的进步和生物传感器在检测中的应用, 生物传感技术已引起越来越多科研工作者的关注。

生物传感器由分子识别元件(生物活性材料)和可将生物学信息转换成光信号或电信号的信号转换器组成。分子识别元件即固定化的生物敏感材料, 包括酶、蛋白质、微生物、DNA 及生物膜等。当利用生物传感器进行物质检测时, 待测物质经扩散作用进入生物活性材料, 经过分子识别, 发生生物学反应, 产生的信息继而由相应的物理或化学换能器转换成可定量和可处理的光、电等信号, 再经二次仪表放大并输出, 便可确定待测物浓度^[12-14]。

根据生物活性物质的类别, 生物传感器可以分为酶传感器、免疫传感器、DNA 传感器、细胞传感器、组织传感器和微生物传感器等; 根据生物敏感物质相互作用的类型, 可分为亲和型和代谢型 2 种; 根据所监测的物理量、化学量或生物量, 可分为热传感器、光传感器和胰岛素传感器等; 根据检测原理, 可分光学生物传感器、压电生物传感器和电化学生物传感器。

1.1.2 电化学生物传感器的原理及分类

电化学生物传感器是由酶、抗原、抗体、激素等生物成分或细胞、细胞器、组织等生物体本身作为分子识别元件，固体电极、气敏电极、离子选择性电极等作为信号转换器，以电流或者电势为检测信号的生物传感器。其工作原理如图 1-1 所示：被测物通过扩散进入生物敏感材料，经过分子识别，发生生物化学反应，产生的信息被相应的转换器转换成可定量和可处理的电信号，此信号强度与被测物浓度相关^[15]。

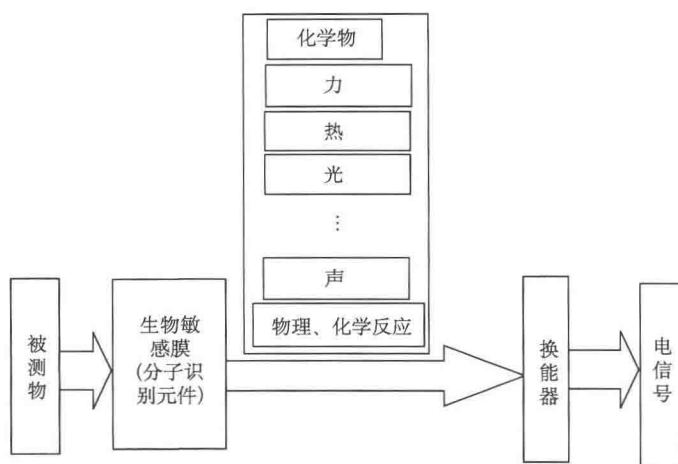


图 1-1 电化学生物传感器工作原理图

按照传感器分子识别元件上敏感生物材料不同，可将电化学生物传感器进行分类，除电化学细胞传感器外，还包括电化学酶传感器、电化学免疫传感器、电化学 DNA 传感器、微生物电极传感器等^[16]。

(1) 电化学酶传感器

电化学生物传感器中，酶传感器是最先被发明的，其典型应用为葡萄糖的检测。目前酶传感器广泛应用于食品安全、环境监测、重金属和农药检测等领域^[17-21]。新型纳米技术和材料科学在电化学酶传感器上的成功应用，进一步推动了电化学酶传感器的发展。近年来，基于特定酶的活性抑制原理而设计的生物传感器在农药残留分析方面受到关注。我国利用农药对靶标酶活性的抑制作用研制出丁酰胆

碱酯酶和乙酰胆碱酶传感器,对有机磷农药残留进行测定,使酶抑制法的检测灵敏度和准确度又有很大提高^[22]。但现阶段胆碱酯酶等生物材料在固定化过程中活性容易失活问题还没有很好解决,影响了这一技术的推广应用^[23]。

(2) 电化学免疫传感器

电化学免疫传感器是用抗体和抗原作为分子识别元件,利用它们之间的免疫化学反应进行污染物测定的一类生物传感器^[24-31]。抗体中有对抗原结构进行特殊识别、结合的部位,免疫系统细胞暴露在抗原物质(如有机污染物)时,根据“匙-锁”模型,抗体可与其独特的抗原高度专一地可逆结合^[32-39]。若将抗体固定在固相载体上,即可从复杂的基质中富集抗原污染物,达到测定污染物浓度的目的。20 世纪 80 年代中期以前,免疫传感器还主要应用于医学诊断实验,而且多数用于大分子。在环境监测和分析领域中的应用,大部分还处于开发和研制阶段,目前世界上广泛使用的方法是免疫测定试剂盒^[40-41]。

(3) 电化学 DNA 传感器

电化学 DNA 传感器是由一个支持 DNA 片段(探针)的电极和检测电化学活性识别元素构成^[42-43]。在适当温度、pH、离子强度下,电极表面的 DNA 探针分子能与靶序列选择性地杂交,形成双链 DNA(ds-DNA),从而导致电极表面结构的改变。这种杂交前后的结构差异,可以通过具有电活性的杂交指示剂识别,从而达到检测靶序列(或特定基因)的目的^[44-50]。DNA 传感器可用于受感染微生物的核酸序列分析、微量污染物的检测以及污染物与 DNA 之间相互作用的研究,同时为揭示污染物毒性作用机理提供了可能^[51-53]。

(4) 微生物电极传感器

微生物电极传感器是将活细胞作为探测单元,利用微生物的新陈代谢机能进行污染物的检测和分析^[54-59]。1977 年, Karube 首次将土壤中微生物用骨胶原膜固定在氧电极上测定污水的生化耗氧量。目前,国内外已研制和应用用于环境监测的微生物传感器有十多种,已见报道的有水质监测的 BOD 传感器、硝酸盐微生物传感器、酚类物质及阴离子表面活性剂传感器和水体富营养化监测传感器,以及有利于大气和废气监测的亚硫酸盐、亚硝酸盐、氨、甲烷及 CO₂ 微生物传感器等。微生物传感器未来在环境监测领域将呈现出较为广阔的应用前景^[60]。

1.2 细胞电化学基本原理及其研究进展

由于在单个细胞水平上进行的研究,可以获得反映细胞生理状态和过程更为精确、更为全面的信息,还可以使人们能更好地了解细胞群体中某些特殊的细胞功能,更深入认识细胞个体差异、细胞间相互作用和信息传递以及神经传递质、药物或毒物刺激的生理影响。因此,细胞分析特别是单细胞分析技术的研究与发展具有重大的意义,已经成为分析科学中的一个新兴的前沿领域。

细胞电化学是基于电化学原理、实验方法与细胞、分子生物学技术相互结合,对细胞进行分析和表征,研究或模拟细胞荷电粒子或电活性粒子能量传递的运动规律,揭示细胞结构-功能关系和外源分子对细胞功能影响的一个新的研究领域^[61]。细胞电化学研究可以在细胞水平上深入认识生命体系的运动规律,并为揭示生命过程提供科学依据和研究方法^[62, 63],为疾病的诊治,抗癌,抗衰老药物的设计,药物副作用的控制,食品、医疗、发酵、环保等微生物检测或监控,农作物的生长,动物的快速繁殖提供科学实验依据。

细胞作为电化学活体在电极上能给出明显的电化学伏安响应。细胞不同于电化学质点的显著特点是细胞本身是一个电化学生体,细胞内所发生的一系列生化反应及生理过程所涉及的电子产生与传递都会影响并改变其表面的静电分布。所有活细胞的表面都存在化学信号,这是因为在各种细胞生命活动中往往伴随着氧化还原反应以及离子成分和浓度的改变。活细胞的氧化还原中心可在电势扫描中产生响应,贯穿细胞膜的蛋白质与细胞构成一个氧化还原体系。将一个活细胞比作一个电化学动力学体系,在活细胞的各种界面上都存在电子的能级跃迁和电子传递。目前研究发现细胞的电化学行为主要包括细胞与染料分子之间的能量传递、细胞的介电行为、细胞的电化学阻抗、细胞的光电行为、细胞的电氧化行为。

(1) 细胞与染料分子之间的能量传递

一些有机染料(如亚甲基蓝、硫堇等)分子能穿透细胞膜,与细胞内氧化还原系统相互作用得到还原。利用电化学电极做检测器时,染料分子可作为电化学探针,在细胞内氧化还原中心与电极之间传递能量。这种装置可以形成一种电化学传感器,用回路上的电流大小可以反映细胞的生长状态。

(2) 细胞的介电行为

由于细胞膜上膜蛋白的差异性,以及细胞膜上与膜蛋白相关的细胞生理状态的差异性,使细胞的介电性有很大的不同。其中,正常乳腺组织与其癌组织的介电性有非常大的差别,因此该方法可用于对癌组织的识别。

(3) 细胞的电化学阻抗

将电化学电极置入细胞培养瓶中,在细胞的生长过程中,细胞伪足吸附于电极表面。细胞贴壁时阻抗增加,细胞直立运动时阻抗降低。细胞这种生理学的运动变化,能够反映细胞代谢及健康状况。有研究者利用电化学阻抗图谱跟踪了贴壁细胞生长的形貌变化^[64]。还有学者研究了二氯化锌、二氯化镉、氧化砷等环境毒物对中国仓鼠肺成纤维细胞(V79)的损伤,并根据细胞损伤后电化学交流阻抗图谱的变化来检测毒物对细胞活性的作用^[65-68]。

(4) 细胞的光电行为及其应用

不同动物细胞在白光照射下具有光电响应,光电流的大小与细胞活性相关。不同细胞的光电流存在差异,药物或毒物也会对细胞的光电流产生影响。因此,细胞光电行为可以反映细胞的健康状态,并用于抗癌药物作用的分析。已有研究者利用光电化学方法评价了抗癌药物对细胞活性的影响^[69-72]。

(5) 细胞的电氧化行为及其应用

细胞作为电化学活性体在电极上能给出明显的电化学响应。当细胞与电极表面接触时,细胞内发生的一系列生化反应及生理过程会影响其氧化电流的大小,因此可以通过电流信号的变化评价细胞生长、发育、衰老过程,以及药物或环境污染物的作用。

其中,细胞的电化学氧化行为在微生物细胞生长状态分析、肿瘤细胞生长及药物抑制作用分析、配体与受体之间相互作用分析、细胞聚集状态分析等领域呈现出广阔的应用前景。然而,对于活细胞产生电化学信号的机制研究相对来说少有报道,只有部分学者推测两种可能机理:①细胞的伏安响应可能来源于细胞内部或细胞膜上的某种酶^[73, 74];②细胞的电化学响应可能是与活细胞的氧化系统有关,或者是由于细胞质中的电活性物质(如离子、蛋白、核酸、代谢产物等)快

速通过细胞膜而产生的^[75]。上述机理基本是人们通过经验推测得到的,几乎没有相关的实验来证实这个机理的正确性,并存在如下问题。一方面,酶的活性位点通常被包裹在蛋白质内部,导致电化学性质是惰性的,通常需要用纳米粒子或者类生物膜将其固定到电极表面才能观察到电化学响应,一般情况下很难检测到电化学信号,因此细胞的电化学行为来自于酶的可能性非常小。另一方面,由于细胞膜具有绝缘性和选择透过性,并非简单的半透膜,细胞质中的电活性物质主要通过转运过程实现由细胞内部到达细胞外部,因此电刺激是否能使其快速通过细胞膜还需要进一步研究。

2005年,鞠焜先采用 HPLC 和 LC-MS 证实了鸟嘌呤在细胞质中的存在,并且发现鸟嘌呤具有和活细胞相似的电化学行为,由此提出活细胞的伏安响应可能与细胞质中鸟嘌呤的氧化反应有关^[76]。陈金华发现了电活性粒子不仅存在于细胞膜上,而且还存在于细胞内部和细胞外部,并将其归因于细胞膜渗透性的变化。然而对于这一现象的机理没有做进一步的研究^[77]。上述研究是目前对于细胞电化学机理较为清晰的解释,为从核苷酸代谢角度深入研究细胞电化学响应机理奠定了基础。

另一方面,在细胞电化学领域中,构建具有生物相容性和高灵敏度的修饰电极也成为研究热点之一。特别是纳米材料的出现,使活细胞的固定技术和作为细胞传感器的修饰电极的构建研究得到快速发展,因此可以在细胞电化学研究中获得更强的电化学响应信号。目前,细胞电化学领域修饰电极的研究有碳纳米管修饰电极^[63, 78, 79]、金胶纳米粒子修饰碳糊电极^[80]、聚苯胺修饰丝网印刷碳电极^[81]、金胶纳米修饰的白血病 K562 细胞微孔纤维素膜电极^[82]、金胶纳米-壳聚糖复合凝胶修饰电极^[83]、ZnO 纳米球/碳量子点修饰电极^[84]、石墨烯氧化物/聚-L-赖氨酸修饰电极^[85]、还原石墨烯修饰电极^[86]、功能化石墨烯修饰电极^[87]、硅纳米线修饰电极^[88]等。纳米粒子的使用加速了电极和细胞间的电子传递,提高了细胞的伏安响应,增加了检测灵敏度。

总之,利用新型纳米材料制备高催化性能的纳米修饰电极,对细胞的电化学行为进行深入研究,揭示细胞电化学氧化的内在机理,构建新的细胞电化学检测方法及应用研究,已成为细胞电化学领域发展的主要方向。

参 考 文 献

- [1] K. R. Rogers, L. R. Williams. Biosensors for environmental monitoring: A regulatory

- perspective[J]. TrAC, 1995, 14(7): 289-294.
- [2] 翟俊辉, 杨瑞馥. 生物芯片、生物传感器和生物信息学[J]. 生物技术通报, 2002, 13(3): 209-213.
- [3] E. B. Bahadir, M. K. Sezginürk. Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses[J]. Analytical Biochemistry, 2015, 478: 107-120.
- [4] 徐书法, 国占宝, 曹坦, 等. 生物传感器及其在食品安全检测中的应用[J]. 现代科学仪器, 2008, (6): 101-105.
- [5] V. Perumal, U. Hashim. Advances in biosensors: principle, architecture and applications[J]. Journal of Applied Biomedicine, 2014, 12(1): 1-15.
- [6] C. I. L. Justino, A. C. Freitas, A. C. Freitas, et al. Sensors and biosensors for monitoring marine contaminants[J]. Trends in Environmental Analytical Chemistry, 2015, 6: 21-30.
- [7] P. T. Charles, P. R. Gauger, C. H. Patterson, et al. On-site immunoanalysis of nitrate and nitroaromatic compounds in groundwater[J]. Environmental Science and Technology, 2000, 34(21): 4641-4650.
- [8] Y. K. Huang, H. Zhang, X. J. Chen, et al. A multicolor time-resolved fluorescence aptasensor for the simultaneous detection of multiplex *Staphylococcus aureus* enterotoxins in the milk[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2015, 15: 170-176.
- [9] Z. M. Tahir, E. C. Alciija. A disposable membrane strip immunosensor [M]. Proceedings of IEEE SENSORS 2002, Orlando, FL, USA, 2002: 12-14.
- [10] 马莉萍, 毛斌, 刘斌, 等. 生物传感器的应用现状与发展趋势[J]. 传感器与微系统, 2009, 28(4): 1-4.
- [11] D. Omanović, C. Garnier, K. Gibbon-Walsh, et al. Electroanalysis in environmental monitoring: tracking trace metals-a mini review[J]. Electrochemistry Communications, 2015, 61: 78-83.
- [12] 张先恩. 生物传感技术原理与应用[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1991.
- [13] M. Ammam. Electrochemical and electrophoretic deposition of enzymes: principles, differences and application in miniaturized biosensor and biofuel cell electrodes[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 58: 121-131.
- [14] M. C. Frost, M. E. Meyerhoff. Implantable chemical sensors for real-time clinical monitoring: progress and challenges[J]. Current opinion in Chemical Biology, 2002, 6(5): 633-641.
- [15] 陈文静. 电化学生物传感器的研制与应用[D]. 郑州: 河南大学硕士学位论文, 2010.
- [16] 覃柳, 刘仲明, 邹小勇. 电化学生物传感器研究进展[J]. 中国医学物理学杂志, 2002, 24(1): 60-62.
- [17] K. Sigmundsson, G. Masson, R. Rice, et al. Determination of active concentrations and association and dissociation rate constants of interacting biomolecules: an analytical solution to the theory for kinetic and mass transport limitations in biosensor technology and its experimental verification[J]. Biochemistry, 2002, 41(26): 8263.
- [18] L. C. Glark, C. Lyons. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery[J].