

DOI: 10.13208/j.electrochem.140442

Artical ID:1006-3471(2015)01-0022-07

Cite this: *J. Electrochem.* 2015, 21(1): 22-28

Http://electrochem.xmu.edu.cn

“金标银染”放大技术的羟基自由基灵敏检测

杨 妍^{1,2}, 喻 鹏¹, 张小华^{1*}, 陈金华^{1*}

(1. 湖南大学化学化工学院, 化学生物传感与计量学国家重点实验室, 湖南 长沙 410082;

2. 南阳师范学院化学与制药工程学院, 河南 南阳 473061)

摘要: 本文采用银染增强金纳米粒子(AuNPs)为信号因子, 构建了一种新型的灵敏检测羟基自由基($\cdot\text{OH}$)的 DNA 电化学传感器. 首先, 巯基化的 DNA1 通过 Au—S 键自组装于金基底电极表面. 然后, 由 Fenton 反应产生的 $\cdot\text{OH}$ 可引起电极表面 DNA1 自组装层的氧化损伤裂解, 未损伤的 DNA1 可与功能化 AuNPs 上的 DNA2 杂交. 利用 AuNPs 对银离子的催化还原反应, 将银原子沉积在 AuNPs 的周围, 形成一层银外壳, 再用差分脉冲伏安法(DPV)技术对沉积的银进行电化学检测, 从而实现 $\cdot\text{OH}$ 的定量分析. 研究表明, 在最优实验条件下, 该传感器检测 $\cdot\text{OH}$ 的线性范围为 $0.2 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测下限为 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. 该传感器有较好的重复性、选择性, 并在抗氧化剂抗氧化能力评估方面具有潜在应用价值.

关键词: 羟基自由基; DNA 损伤; 金纳米粒子; 银染增强; 电化学传感器

中图分类号: O646

文献标识码: A

活性氧是生物有氧代谢过程的一副产品, 主要包括超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$), 过氧化氢(H_2O_2)和羟基自由基($\cdot\text{OH}$). 其中, $\cdot\text{OH}$ 是最活泼的活性氧物种, 能引起严重的 DNA、蛋白质和体液氧化损伤、脂质过氧化和细胞毒作用等^[1-4]. 在正常生理情况下, 体内 $\cdot\text{OH}$ 一般处于不断产生与清除的动态平衡之中, 维持在正常生理水平上. 但在疾病或某些外源性药物的作用下, $\cdot\text{OH}$ 会快速地增加, 导致氧化应激和抗氧化防御之间的平衡失调, 从而在毒理学和病理学上导致机体的衰老和疾病的产生^[5-7]. 因此, 跟踪和检测 $\cdot\text{OH}$ 对病理研究和疾病预防有重要意义.

目前, $\cdot\text{OH}$ 检测方法主要包括荧光法、电子自旋共振法及高效液相色谱法等^[8-10]. 然而这些方法仪器昂贵、成本高, 难以实现常规监测. 电化学方法易于操作、响应速率快、价格低廉、能耗低, 且易于小型化^[11-12]. 文献曾报道过 $\cdot\text{OH}$ 引起的 DNA 损伤分析及抗氧化剂评估等^[13-15], 但针对 $\cdot\text{OH}$ 浓度的检测研究甚少. 最近, 作者课题组^[16]构建了一种生物条形码放大的 DNA 电化学传感器, 实现了 $\cdot\text{OH}$ 的检测, 但检测灵敏度仍不高. 针对 $\cdot\text{OH}$ 检测的

DNA 电化学传感器还有待深入研究. 此外, “金标银染”放大技术由于具有操作简便、对响应信号放大明显等特点, 在电化学生物传感(如手性氨基酸检测、电化学免疫分析和 DNA 分析)等方面得到了较好的应用^[17-19]. “金标银染”放大技术的基本原理为利用金纳米颗粒(AuNPs)对银离子的催化还原反应, 将银原子沉积在 AuNPs 的周围, 形成一层银外壳, 再采用差分脉冲伏安法(DPV)等电化学技术对沉积的银进行检测, 从而实现目标物的灵敏分析. 但应用“金标银染”放大技术进行 $\cdot\text{OH}$ 的电化学检测目前尚未见报道.

本文采用“金标银染”放大技术构建了用于 $\cdot\text{OH}$ 检测的电化学 DNA 传感器(图 1). 通过 Fenton 反应产生的 $\cdot\text{OH}$ 对电极表面的 DNA1 产生氧化损伤, 没有损伤的 DNA1 可以通过碱基互补配对与功能化金纳米颗粒上的 DNA2 杂交, 再通过金纳米颗粒催化银染法放大响应信号, 实现 $\cdot\text{OH}$ 的高灵敏度检测.

1 实验

1.1 试剂与仪器

收稿日期: 2014-08-04, 修订日期: 2014-09-25 * 通讯作者, Tel: (86-731)88821848, E-mail: chenjinhua@hnu.edu.cn; mickxyie@hnu.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 21275041, No. 21235002, No. 21221003)资助

DNA1 (5'-SH-(CH)₆-GGT CCG CTT GCT CTC GC-3') 和 DNA2 (5'-SH-(CH)₆-CGG GCG AGA GCA AGC GGA-3') (上海生物工程). 6-巯基-1-己醇 (MCH, 99%, Sigma-Aldrich). AuNPs (粒径约为 13 nm) 溶液由柠檬酸盐还原氯金酸法制得^[20], 4 °C 冰箱中储存待用. ·OH 由 EDTA 螯合的过渡金属 Fe²⁺ (FeSO₄) 催化 H₂O₂ 发生 Fenton 反应产生 (Fe²⁺ (EDTA):H₂O₂ = 1:6, by mole) 以 Fe²⁺ 浓度近似表示 ·OH 的浓度)^[16, 21]. 银染溶液现配^[20, 22]. 实验用水为超纯水. 其他试剂均为分析纯.

由金电极 (φ = 2 mm)、饱和甘汞参比电极 (SCE) 和铂辅助电极组成传统的三电极体系, 通过饱和 KNO₃ 溶液的盐桥, 将参比电极与电解质溶液隔开. 使用 CHI660B 电化学工作站 (上海辰华) 测试电极的循环伏安 (CV) 曲线、电化学阻抗 (EIS) 谱图和差分脉冲伏安 (DPV) 曲线. EIS 频率范围 0.1 Hz ~ 100 kHz, 振幅 0.005 V, CV 电位区间 -0.10 ~ 0.55 V, 扫速 0.05 V·s⁻¹. 电解质溶液为 0.1 mol·L⁻¹ KCl + 5 mmol·L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{3-/4-} (1:1, by volume) 水溶液. 使用 UV-2100 紫外-可见分光光度仪表征功能化的金纳米颗粒.

1.2 DNA2 功能化金纳米粒子

先将 AuNPs 溶液 (2 mL) 与 DNA2 (2 OD) 混合, 然后向该混合液中缓慢加入一定量的 0.1 mol·L⁻¹ NaCl 和 10 mmol·L⁻¹ PBS (pH 7.4) 溶液. 室温下搅拌 24 h, 14000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 即得 DNA2 功能化金纳米粒子 (DNA2-AuNPs). 再将所得的 DNA2-AuNPs 样品转移于 2 mL 缓冲溶液 (30

mmol·L⁻¹ PBS (pH 7.4) + 233 mmol·L⁻¹ NaCl + 8.5 mmol·L⁻¹ KCl + 1.7 mmol·L⁻¹ MgCl₂ + 1.7 mmol·L⁻¹ CaCl₂) 中即可^[21, 23].

1.3 传感界面构建和羟基自由基电化学检测

Au 基底电极依次用 0.5 μm 和 0.05 μm Al₂O₃ 粉抛光, 无水乙醇和超纯水超声清洗各 5 min, 除去金电极表面吸附的 Al₂O₃ 粉末. 处理的 Au 基底电极置于 0.5 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 溶液中循环伏安扫描 (-0.3 ~ 1.5 V, 扫速 0.1 V·s⁻¹), 直至 Au 特征循环伏安曲线稳定. 而后超纯水冲洗干净, 氮气吹干备用.

将 10 μL 5 μmol·L⁻¹ 巯基化的 DNA1 溶液 (30 mmol·L⁻¹ PBS, pH 7.4) 滴涂于已处理的金基底电极表面并室温下搁置 16 h, 然后将该修饰电极置于 1 mmol·L⁻¹ MCH 溶液中浸泡 1 h 以封闭金基底电极上未结合的活性位点, 即得 MCH/DNA1/Au 电极. 该电极在 Fenton 溶液 (Fe²⁺ (EDTA):H₂O₂ = 1:6, by mole) 中浸泡 30 min, 使溶液中产生的 ·OH 与 DNA1 完全反应. 然后又滴涂 20 μL DNA2-AuNPs 溶液在 ·OH 反应后的 MCH/DNA1/Au 电极上, 室温下搁置 2 h, 即得 DNA2-AuNPs/MCH/DNA1/Au 电极. 为放大检测信号, 将 DNA2-AuNPs/MCH/DNA1/Au 电极避光浸泡于银染溶液中 10 min, 然后用大量的水冲洗电极, 去除多余的银染溶液. 传感器制备过程中, 每步操作之后均用 10 mmol·L⁻¹ PBS 缓冲溶液 (pH 7.4) 冲洗电极, 并用氮气吹干.

将经银染放大处理的 DNA2-AuNPs/MCH/DNA1/Au 电极在 0.1 mol·L⁻¹ 的 KNO₃ 溶液中测试 DPV 曲线, 电位扫描范围 -0.1 ~ 0.3 V, 振幅 0.05 V,

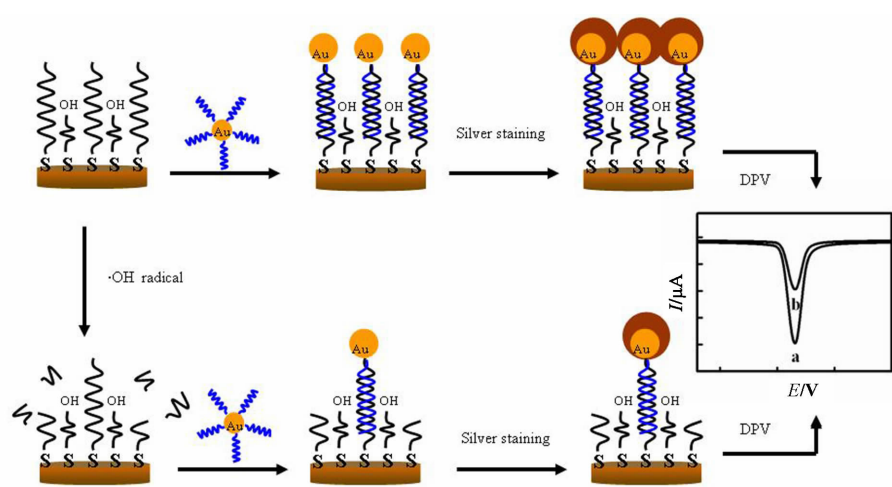


图 1 “金标银染法”放大技术的羟基自由基检测示意图
Fig. 1 Schematic illustration of the amplification detection of hydroxyl radical based on silver-enhanced gold nanoparticle label

脉冲宽度 0.05 s, 脉冲周期 0.2 s, DPV 响应信号为电极上银纳米颗粒的氧化电流. 所有实验均重复 3 次及以上, 金基底电极的每一步修饰均使用 EIS 和 CV 技术进行表征.

2 结果与讨论

2.1 AuNPs 的紫外-可见光谱表征

使用紫外-可见光谱表征 AuNPs 和 DNA2-AuNPs 样品, 如图 2 所示. 粒径约 13 nm 的 AuNPs 在 520 nm 处有一特征紫外吸收峰, DNA2-AuNPs 的吸收峰则在 522 nm 附近. 该紫外吸收峰位置的微小变化说明, 在 AuNPs 上修饰 DNA 虽影响了 AuNPs 的分布, 但并未改变 AuNPs 的固有特性.

2.2 传感界面的电化学表征

不同电极在 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4} (1:1) + 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KCl}$ 溶液中的交流阻抗谱图和循环伏安曲线如图 3 所示. 在法拉第阻抗谱图低频区的线性部分对应着电极的扩散控制过程, 高频区的半圆部分对应着电子转移控制过程. 如果电荷转移速率比较快, 阻抗谱图中可能只存在线性部分. 相反, 比较慢的电荷转移过程的阻抗谱图中则出现一个较大的半圆, 半圆的直径等于电极上电子转移电阻 (R_{ct}). 从图 3A 中可以看到, 裸金电极半圆直径很小 ($R_{\text{ct}} = 124 \Omega$, 曲线 a), 表明其有比较好的电子转移能力. DNA1 通过 Au—S 键自组装得到 DNA1/Au 电极, 带负电的 DNA1 能有效地阻碍 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4}$ 探针与电极之间的电子传递, 使电子转移阻力增加 ($R_{\text{ct}} = 2601 \Omega$, 曲线 b). 为消除电极表面未结合位点的非特异性吸附效应, 采用 MCH 封闭 DNA1/Au 电极, 即得 MCH/DNA1/Au 电极, 其

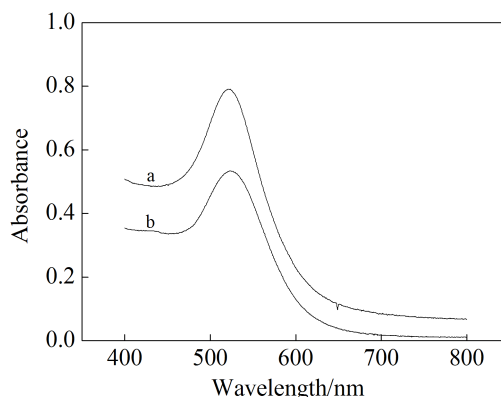


图 2 AuNPs(a)和 DNA2-AuNPs(b)的紫外-可见光谱图

Fig. 2 UV-visible spectra of AuNPs (a) and DNA2-functionalized AuNPs (b)

R_{ct} 值进一步增加 ($R_{\text{ct}} = 6226 \Omega$, 曲线 c). 而后 MCH/DNA1/Au 电极的 DNA1 与功能化 AuNPs 上的 DNA2 进行杂交, 可得 DNA2-AuNPs/MCH/DNA1/Au 电极, 其 R_{ct} 有显著的增加 ($R_{\text{ct}} = 10517 \Omega$, 曲线 d). DNA2 与 DNA1 的杂交使电极表面连接了更多带负电荷的 DNA, 且 DNA2-AuNPs 的空间位阻较大, 进一步阻碍了电极与 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4}$ 之间的电子转移. 这表明, 通过图 1 所示步骤已成功构建了 DNA2-AuNPs/MCH/DNA1/Au 电极.

不同传感电极的循环伏安曲线如图 3B 所示. 裸 Au 电极的循环伏安曲线呈现出 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4}$ 的准可逆氧化还原峰, 电极依次修饰了 DNA1、MCH、DNA2-AuNPs 后, 循环伏安曲线的氧化还原峰电位差 (ΔE_p) 逐增, 而氧化还原峰电流趋减. 这表明随着自组装步骤的进行, 电极表面的电子转

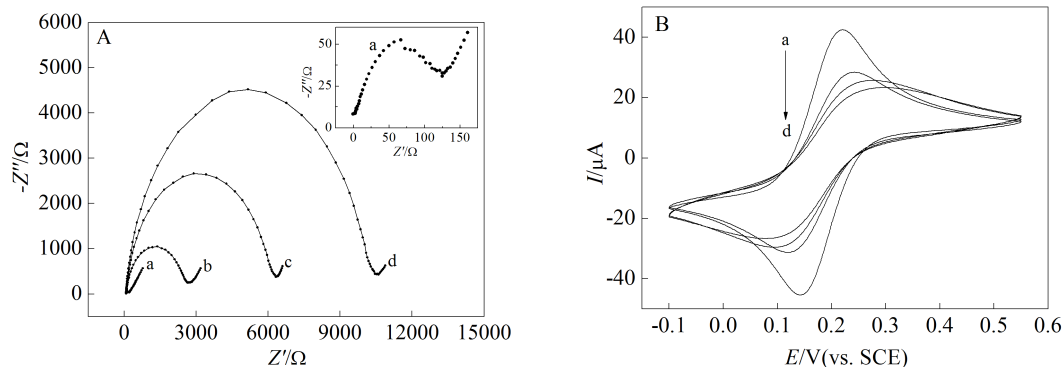


图 3 裸 Au(a)、DNA1/Au(b)、MCH/DNA1/Au(c)和 DNA2-AuNPs/MCH/DNA1/Au(d)电极的电化学阻抗谱图(A)和循环伏安曲线(B)

Fig. 3 Nyquist plots (A) and cyclic voltammograms (B) of the different electrodes

a. Bare gold electrode; b. DNA1/Au electrode; c. MCH/DNA1/Au electrode; d. DNA2-AuNPs/MCH/DNA1/Au electrode

移速率越来越慢。

2.3 实验可行性

如图 4 所示,未与 $\cdot\text{OH}$ 反应的 MCH/DNA1/Au 电极经与 DNA2-AuNPs 杂交并银染放大处理后的 DPV 响应信号 I_a 为 $19.8\ \mu\text{A}$ (曲线 a),与 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\cdot\text{OH}$ 反应后的 MCH/DNA1/Au 电极经与 DNA2-AuNPs 杂交并银染放大处理后的 DPV 响应信号 I_b 为 $9.7\ \mu\text{A}$ (曲线 b)。由此可看出, MCH/DNA1/Au 电极中的 DNA1 经 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\cdot\text{OH}$ 氧化损伤后,引发 DNA1 链断裂,引起电极上 DNA2-AuNPs 减少,在接下来的银染反应中金催化沉积银的量也随之减少,从而导致其 DPV 响应电流明显降低,其

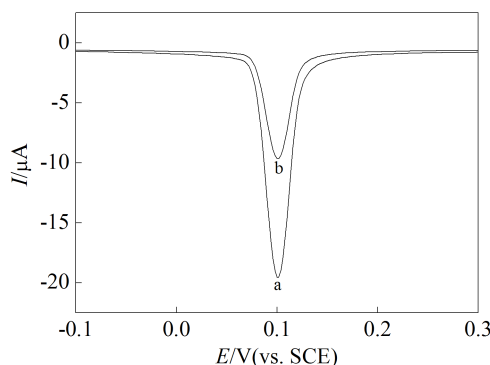
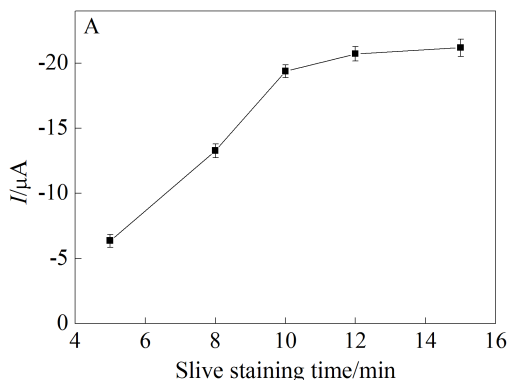


图 4 MCH/DNA1/Au 电极与 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\cdot\text{OH}$ 反应前(a)和后(b)经 DNA2-AuNPs 杂交并银染放大后的 DPV 响应信号

Fig. 4 DPV responses of MCH/DNA1/Au electrode before (a) and after (b) interacted with $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\cdot\text{OH}$ and then further modified with silver-enhanced DNA2-AuNPs



电流变化值 ($\Delta I = I_a - I_b$) 为 $10.1\ \mu\text{A}$ 。这表明,所设计的该 DNA 电化学传感器用于 $\cdot\text{OH}$ 检测是可行的。

2.4 实验参数优化

银染时间和 $\cdot\text{OH}$ 与 MCH/DNA1/Au 电极反应时间对 DNA2-AuNPs/MCH/DNA1/Au 电极 DPV 响应信号的影响如图 5 所示。随着银染时间的增加,金催化银的沉积量随之增加,其 DPV 响应信号也增大。当时间太长时,银染溶液中 Ag^+ 会与电极上带负电荷的 DNA 链发生非特异性吸附,导致 Ag 单独成核,造成干扰,故控制银染时间非常重要。DNA2-AuNPs/MCH/DNA1/Au 电极随着银染时间增加,其 DPV 响应信号随之增加,10 min 之后 DPV 响应信号没有明显变化 (图 5A),故选取 10 min 为银染时间。从 $\cdot\text{OH}$ 与 MCH/DNA1/Au 电极反应时间对 DNA2-AuNPs/MCH/DNA1/Au 电极 DPV 响应信号的影响 (图 5B) 可看出,随着 $\cdot\text{OH}$ 与电极反应时间增加,DPV 响应信号逐渐减小,30 min 趋于稳定,故选取 30 min 为 $\cdot\text{OH}$ 与 MCH/DNA1/Au 电极的反应时间。

2.5 羟基自由基的检测

MCH/DNA1/Au 电极与不同浓度的 $\cdot\text{OH}$ 反应后,经 DNA2-AuNPs 杂交并银染放大处理后的 DPV 响应信号曲线由图 6A 示出。从图 6 中可以看出,DPV 响应信号随着 $\cdot\text{OH}$ 浓度的增加而减小 (图 6A)。DPV 峰电流差值 ΔI 和 $\cdot\text{OH}$ 浓度的对数在 $0.2 \sim 200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 成线性关系 (图 6B),线性回归方程 $\Delta I/\mu\text{A} = 4.9069[\lg(C_{\cdot\text{OH}}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}))] + 5.7687 (R^2$

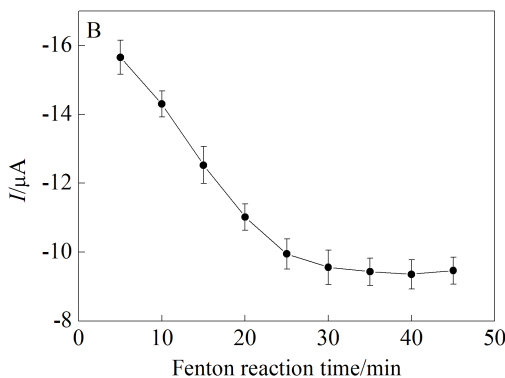


图 5 银染时间(A)和 $\cdot\text{OH}$ 与 MCH/DNA1/Au 电极反应时间(B)对 DNA2-AuNPs/MCH/DNA1/Au 电极 DPV 响应信号的影响 ($C_{\cdot\text{OH}} = 5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Fig. 5 The influence of silver staining time (A) and the reaction time between $\cdot\text{OH}$ and the MCH/DNA1/Au electrode (B) on the DPV responses of the DNA2-AuNPs/MCH/DNA1/Au electrode ($C_{\cdot\text{OH}} = 5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

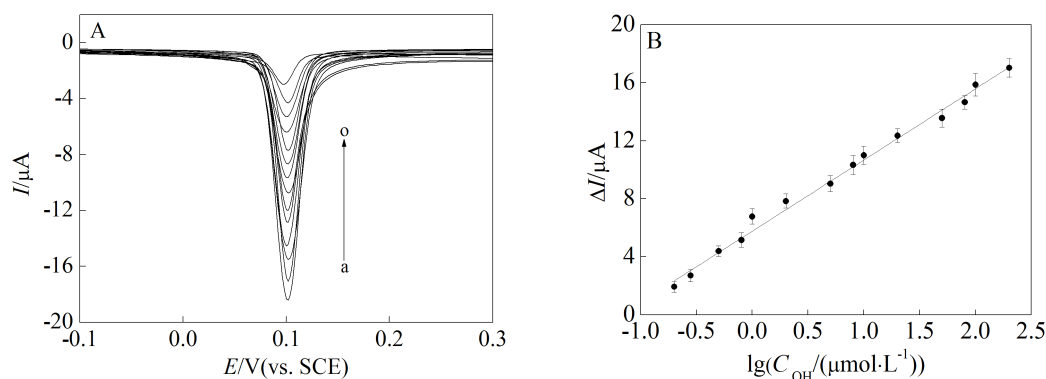


图 6 A. MCH/DNA1/Au 电极与不同浓度 $\cdot\text{OH}$ 反应后经 DNA2-AuNPs 杂交并银染放大处理的 DPV 响应曲线 ($C_{\cdot\text{OH}}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: 0, 0.2, 0.3, 0.5, 0.8, 1, 2, 5, 8, 10, 20, 50, 80, 100, 200 (a \rightarrow o)); B. DPV 峰电流差值 (ΔI) 与 $\cdot\text{OH}$ 浓度对数之间的校正曲线

Fig. 6 A. DPV responses of the MCH/DNA1/Au electrode interacted with different concentrations of $\cdot\text{OH}$ further modified with silver-enhanced DNA2-AuNPs (the concentrations of $\cdot\text{OH}$ are 0, 0.2, 0.3, 0.5, 0.8, 1, 2, 5, 8, 10, 20, 50, 80, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (from a to o)); B. The linear fitting plot of the DPV peak current difference (ΔI) as a function of the logarithm of $\cdot\text{OH}$ concentration

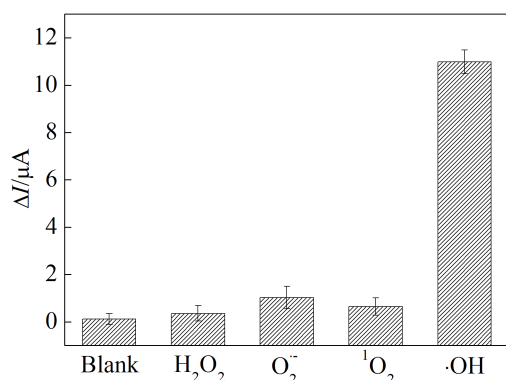


图 7 所发展传感电极对 H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, $^1\text{O}_2$ 和 $\cdot\text{OH}$ 检测的选择性

Fig. 7 Selectivity of the developed electrode to H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, $^1\text{O}_2$ and $\cdot\text{OH}$

$= 0.9918$), 检测限为 $50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($S/N=3$). 与其他检测 $\cdot\text{OH}$ 的电化学传感器相比, 基于“金标银染”放大技术的 DNA 电化学传感器极大地提高了检测灵敏度, 其检测限远低于最近发展的基于生物条形码放大的 DNA 电化学传感器 ($3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[16] 和一些光电传感器获得的检测限 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[24] 和 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[25]).

2.6 选择性和重现性

生物体系中可能共存其他活性氧 (如 H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $^1\text{O}_2$), 因此, 有必要考察该电化学 DNA 传感器的选择性, 结果如图 7 所示. 相对于 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \cdot\text{OH}$, 分别与 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $^1\text{O}_2$ 反应后的

MCH/DNA1/Au 电极经 DNA2-AuNPs 杂交并银染放大获得的响应信号均非常小, 充分说明该传感器具有比较好的选择性. 此外, 10 支相同的 MCH/DNA1/Au 电极对 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \cdot\text{OH}$ 的检测, 其响应信号的标准误差为 4.3 %, 表明该传感器具有很好的重现性.

3 结 论

基于“金标银染”放大技术, 构建了一种高灵敏检测 $\cdot\text{OH}$ 的新型电化学 DNA 传感器. 在优化条件下, 该电化学 DNA 传感器对 $\cdot\text{OH}$ 检测表现出了极佳性能, 检测范围宽 ($0.2 \sim 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 检测限低 ($50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 具有良好的选择性和重现性. 此外, 该电化学传感器有望在抗氧化剂抗氧化性能评估方面获得应用.

参考文献(References):

- [1] Mello L D, Hernandez S, Marrazza G, et al. Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2006, 21(7): 1374-1382.
- [2] Valko M, Izakovic M, Mazur M, et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2004, 266(1/2): 37-56.
- [3] King P, Anderson V, Edwards J, et al. A stable solid that generates hydroxyl radical upon dissolution in aqueous solutions: Reaction with proteins and nucleic acid[J]. Journal of the American Chemical Society, 1992, 114 (13): 5430-5432.

- [4] Cadet J, Delatour T, Douki T, et al. Hydroxyl radicals and DNA base damage [J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1999, 424(1): 9-21.
- [5] Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee R K. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis [J]. Current Science, 1999, 77(5): 658-666.
- [6] Raha S, Robinson B H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2000, 25(10): 502-508.
- [7] Loeb L A, Wallace D C, Martin G M. The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(52): 18769-18770.
- [8] Newton G L, Milligan J R. Fluorescence detection of hydroxyl radicals [J]. Radiation Physics and Chemistry, 2006, 75(4): 473-478.
- [9] Pou S, Ramos C L, Gladwell T, et al. A kinetic approach to the selection of a sensitive spin trapping system for the detection of hydroxyl radical [J]. Analytical Biochemistry, 1994, 217(1): 76-83.
- [10] Pritsos C A, Constantinides P P, Tritton T R, et al. Use of high-performance liquid chromatography to detect hydroxyl and superoxide radicals generated from mitomycin C [J]. Analytical Biochemistry, 1985, 150(2): 294-299.
- [11] Yu J, Ge L, Huang J, et al. Microfluidic paper-based chemiluminescence biosensor for simultaneous determination of glucose and uric acid [J]. Lab on A Chip, 2011, 11(7): 1286-1291.
- [12] Liu Y, Hu N. Electrochemical detection of natural DNA damage induced by ferritin/ascorbic acid/H₂O₂ system and amplification of DNA damage by endonuclease Fpg [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2009, 25(1): 185-190.
- [13] Labuda J, Bučková M, Heilerova L, et al. Detection of antioxidative activity of plant extracts at the DNA-modified screen-printed electrode [J]. Sensors, 2002, 2(1): 1-10.
- [14] Huang J, Li T, Chen Z, et al. Rapid electrochemical detection of DNA damage and repair with epigallocatechin gallate, chlorogenic acid and ascorbic acid [J]. Electrochemistry Communications, 2008, 10(8): 1198-1200.
- [15] Zu Y, Liu H, Zhang Y, et al. Electrochemical detection of *in situ* DNA damage with layer-by-layer films containing DNA and glucose oxidase and protection effect of catalase layers against DNA damage [J]. Electrochimica Acta, 2009, 54(10): 2706-2712.
- [16] Wu L, Yang Y, Zhang H, et al. Sensitive electrochemical detection of hydroxyl radical with biobarcode amplification [J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 756: 1-6.
- [17] Wang Y, Yin X, Shi M, et al. Probing chiral amino acids at sub-picomolar level based on bovine serum albumin enantioselective films coupled with silver-enhanced gold nanoparticles [J]. Talanta, 2006, 69(5): 1240-1245.
- [18] Chen Z, Peng Z, Luo Y, et al. Successively amplified electrochemical immunoassay based on biocatalytic deposition of silver nanoparticles and silver enhancement [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2007, 23(4): 485-491.
- [19] Lin L, Liu Y, Tang L, et al. Electrochemical DNA sensor by the assembly of graphene and DNA-conjugated gold nanoparticles with silver enhancement strategy [J]. Analyst, 2011, 136(22): 4732-4737.
- [20] Deng C, Chen J, Nie Z, et al. Impedimetric aptasensor with femtomolar sensitivity based on the enlargement of surface-charged gold nanoparticles [J]. Analytical Chemistry, 2008, 81(2): 739-745.
- [21] Huang W T, Xie W Y, Shi Y, et al. A simple and facile strategy based on Fenton-induced DNA cleavage for fluorescent turn-on detection of hydroxyl radicals and Fe²⁺ [J]. Journal of Materials Chemistry, 2011, 22(4): 1477-1481.
- [22] Huang Y, Wang T H, Jiang J H, et al. Prostate specific antigen detection using microgapped electrode array immunosensor with enzymatic silver deposition [J]. Clinical chemistry, 2009, 55(5): 964-971.
- [23] Huang C C, Chiu S H, Huang Y F, et al. Aptamer-functionalized gold nanoparticles for turn-on light switch detection of platelet-derived growth factor [J]. Analytical Chemistry, 2007, 79(13): 4798-4804.
- [24] Jia S P, Liang M M, Guo L H. Photoelectrochemical detection of oxidative DNA damage induced by Fenton reaction with low concentration and DNA-associated Fe²⁺ [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2008, 112(14): 4461-4464.
- [25] Liang M M, Guo L H. Photoelectrochemical DNA sensor for the rapid detection of DNA damage induced by styrene oxide and the Fenton reaction [J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(2): 658-664.

Sensitive Detection of Hydroxyl Radical Based on Silver-Enhanced Gold Nanoparticle Label

YANG Yan^{1,2}, YU Peng¹, ZHANG Xiao-hua^{1*}, CHEN Jin-hua^{1*}

(1. *State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China*; 2. *College of Chemistry and Pharmaceutical engineering, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, Henan, China*)

Abstract: A novel DNA-based electrochemical sensor has been successfully constructed for sensitive detection of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) based on the silver-enhanced gold nanoparticle label. Thiolated DNA1 was firstly immobilized on the gold electrode through Au—S bonds. The $\cdot\text{OH}$ generated from Fenton reaction could induce serious oxidative damage of the DNA1 layer on the electrode surface. Then DNA2-functionalized gold nanoparticles (DNA2-AuNPs) were linked on the electrode through the hybridization between DNA2 and undamaged DNA1. Based on the catalytic reduction of silver ion by AuNPs, a silver layer was formed on the surface of AuNPs. The quantitative assay of $\cdot\text{OH}$ was carried out by differential pulse voltammetry (DPV) detection of the deposited silver. Under the optimization conditions, the developed DNA-based biosensor could detect $\cdot\text{OH}$ quantitatively with wide linear range ($0.2 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and low detection limit ($50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), and exhibited satisfactory selectivity and reproducibility. This electrochemical biosensor could have potential application in the evaluation of antioxidant capacity.

Key words: hydroxyl radical; DNA damage; gold nanoparticle; silver-enhancement; electrochemical sensor