

基于二茂铁增强 ABEI 电致化学发光对 8-OH-dG 的检测^①

王丽娟 赵若南 赵雅楠 魏思敏 贾丽萍 王怀生

(聊城大学 化学化工学院, 山东 聊城 252059)

摘 要 制备了一种基于二茂铁增强 ABEI 的电化学发光测定 8-OH-dG 的电化学适配体传感器. 8-OH-dG 的适配体一部分与固定在金电极上的 cDNA 互补配对, 另一部分与末端修饰二茂铁的 pDNA 互补配对. 由于二茂铁的引入, ABEI 的电化学发光信号将显著增强. 然而, 当 8-OH-dG 存在时, 其可以诱导富 G 序列适配体形成紧密的 G-四倍体结构, 电极表面引入的二茂铁数量减少, 导致 ABEI 的电化学发光信号降低. 在最佳实验条件下, ABEI 发光强度与 8-OH-dG 浓度的对数呈线性关系, 线性范围为 1 nM-100 μ M, 检出限为 0.33 nM. 已将该方法应用于人体尿液中 8-OH-dG 的检测, 结果满意, 因此该方法在临床检测中具有潜在的应用价值.

关键词 电化学发光; 8-羟基-2'-脱氧鸟嘌呤核苷; 核酸适配体

中图分类号 O646

文献标识码 A

0 引言

DNA 的氧化损伤是由单线态氧, 羟基自由基, 超氧化物阴离子和过氧化氢等活性氧攻击 DNA 分子引起的. 8-羟基-2'-脱氧鸟苷(8-OH-dG)是活性氧攻击鸟嘌呤碱基第 8 位碳原子的过程中的主要产物^[1]. 它通过血液运输, 不需要进一步新陈代谢, 便会随尿液排出, 因此尿液中 8-OH-dG 的浓度与 DNA 的氧化损伤程度密切相关^[2]. 许多研究表明, 8-OH-dG 与某些疾病如癌症, 糖尿病和神经系统疾病有更密切的关系^[3]. 因此, 尿样中 8-OH-dG 的检测是非常重要的. 目前检测 8-OH-dG 最常用的方法是高效液相色谱法(HPLC)^[4,5]和酶联免疫吸附分析法(ELISA)^[6,7]. 尽管用 HPLC 技术检测 8-OH-dG 具有灵敏度和准确度高的优点, 但是需要高度专业化的操作, 仪器设备比较昂贵, 检测过程较为繁琐. ELISA 可在实验室中操作, 方便简捷, 成本低, 但是后续计算工作繁琐耗时. 因此, 建立一种灵敏度高, 选择性好, 操作简单的方法对于 8-OH-dG 的临床检测非常重要.

核酸适配体(Apt)是通过体外筛选技术, 从核酸分子文库中获得的寡核苷酸片段^[8,9], 可以是 RNA, 也可以是单链 DNA 或双链 DNA. Apt 能与目标物高特异性、高选择性结合, 其与靶分子的结合和抗原-抗体的作用相似. 但是 Apt 具有优于抗体的许多特性, 如适用范围广、与靶分子亲和力高、制备简单、特异性强、高度稳定等. 由于 Apt 可以结合多种靶分子且亲和力和特异性强, 所以被广泛用作荧光^[10], 电化学^[11-13]和电化学发光^[14,15]等生物传感应用的识别元件. 8-OH-dG 的特异性适配体在 2009 年已通过 SELEX 方法筛选得到^[2]. 8-OH-dG 的适配体富含 G 序列, 8-OH-dG 可以诱导其构象从单链结构转换为紧密的 G-四倍体结构. 基于适配体来构建检测 8-OH-dG 的传感器已有报导, 但为数不多^[16-18]. 目前所报道的检测方法大多是基于光学检测. 电化学生物传感器因响应快速、灵敏度高、选择性好、操作简单、成本低等优点而受到广泛关注和应用, 将其与核酸适配体结合, 已成为继电化学免疫传感器和 DNA 电化学传感器后的又

① 收稿日期: 2018-06-26

基金项目: 国家自然科学基金资助课题(21405070, 21375055, 21427808)资助

通讯作者: 贾丽萍, 女, 汉族, 博士, 副教授, 研究方向: 电分析化学, E-mail: jialiping@lcu.edu.cn.

一研究热点,但基于适配体构建的 8-OH-dG 的电化学传感器却鲜有报导^[19,20].

本实验我们以 8-OH-dG 适配体为桥梁连接捕获 DNA(cDNA)和末端修饰二茂铁的探针 DNA(Fe-pDNA),形成一种“夹心型”的结构,基于二茂铁对 N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺(ABEI)电化学发光增强的原理,根据 8-OH-dG 加入前后电化学发光信号的变化对 8-OH-dG 的含量进行检测.实验结果表明,制备的传感器对 8-OH-dG 的检测线性范围宽(1 nM-100 μ M),检出限低(0.33 nM),具有良好的选择性和高的灵敏度,有望用于 8-OH-dG 的临床检测.

1 实验部分

1.1 药品与试剂

3-(2-甲酰乙基)膦盐酸盐(TCEP),巯基己醇(MCH),N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺(ABEI),三羟甲基氨基甲烷(Tris),8-羟基-2'-脱氧鸟苷(8-OH-dG),鸟嘌呤和鸟嘌呤核苷自美国 Sigma-Aldrich 公司.尿素,尿酸和抗坏血酸购自阿拉丁公司(中国上海). $K_3Fe(CN)_6$ 、 $K_4Fe(CN)_6$ 、NaCl、KCl、 H_2SO_4 、 H_2O_2 (30%)、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、 $Zn(NO_3)_2$ 、 $MgCl_2$ 、 $Cu(NO_3)_2$ 均购自天津化学试剂公司.所有试剂均为分析纯,没有进一步纯化.实验用水为 Milli-Q 超纯水.实验中使用的所有寡核苷酸均由上海生工有限公司合成,其序列列于表 1.

表 1 实验中所用的 DNA 序列

名称	序列(5'到 3')
cDNA	SII-(CH ₂) ₆ -TTT ACC CCC ATA TGA TCT GTC CCA CCC CCT GGC ACA GAG
Aptamer	GCG GGC GAT CGG CGG GGG GTG CGT GCG CTC TGT GCC AGG GGG TGG GAC AGA TCA TAT GGG GGT GCT
pDNA	Fe-CGC ACG CAC CCC CCG CCG ATC GCC CGC ATT GTC TAG GAT TCG

1.2 实验仪器

所有电化学测量均在 CHI760C 电化学工作站上进行(上海辰华仪器公司),电化学三电极体系由铂丝作对电极,Ag/AgCl(3M KCl)作参比电极,金电极作为工作电极.RFL-1 型超微弱化学发光/生物发光检测仪(西安瑞迈分析仪器有限公司)用于接收和检测电化学发光信号.

1.3 实验步骤

1.3.1 DNA 样品的预处理.为防止 DNA 粉末粘在管壁,使用前需先离心,离心完毕,立即加入一定量的 Tris-HCl 缓冲溶液(25 mM Tris 碱,100 mM NaCl 和 5 mM $MgCl_2$,pH 7.4),配制成 10 μ M 的溶液,在振荡器上震荡 5 min 后,放入 95 $^{\circ}C$ 水中加热 5 min.对于巯基修饰的 cDNA,为防止巯基形成二硫键,需加入 2 mM 的 TCEP.之后迅速放入 4 $^{\circ}C$ 水中冷却 15 min,最后在室温下孵育 25 min,放在 4 $^{\circ}C$ 下保存.

1.3.2 金电极的处理.首先,将金电极用 0.3 μ m 的 Al_2O_3 抛光液抛光,用超纯水冲洗干净,然后,分别在超纯水、无水乙醇中超声 10 min,最后,在 0.5 M H_2SO_4 溶液中于 -0.2-+1.6 V 的电位范围内进行循环伏安扫描,直到循环伏安曲线稳定为止.最后用超纯水冲洗干净,氮气吹干,待用.

1.3.3 传感器的构建.在上述处理完的金电极表面滴涂 6 μ L 1.0 μ M 的 cDNA,室温下孵育 2 h,然后滴涂 6 μ L 1.0 mM 的 MCH 溶液,室温下孵育 0.5 h,以封锁电极表面活性位点并使 cDNA 在电极表面排列的更规则.紧接着,滴涂 6 μ L 1.5 μ M 的 8-OH-dG 适配体,室温下孵育 1.5 h,之后在电极表面滴涂 6 μ L 1.0 μ M 的 pDNA,室温下孵育 3 h.以上步骤中每一步修饰完后,都用 Tris-HCl 缓冲溶液清洗电极.

1.3.4 8-OH-dG 的检测.首先往组装好的电极表面滴加不同浓度的 8-OH-dG,室温下反应 0.5 h,然后将电极浸入到 5 mL 含有 1 mM H_2O_2 、26.6 μ M ABEI 的 PBS 混合溶液(pH 8.0)检测发光强度.参数设置:循环伏安扫描电位为 0-0.65 V,扫速为 100 $mV \cdot s^{-1}$,光电倍增管电压为 800 V.

2 结果与讨论

2.1 传感器的设计原理

8-OH-dG 适配体传感器的设计原理如图 1 所示,巯基修饰的 cDNA 通过 Au-S 键固定在金电极表面,8-OH-dG 的适配体一部分与 cDNA 互补配对,另一部分与末端修饰 Fe 的 pDNA 互补配对.电极修饰完

后,插入到含有 H_2O_2 和 ABEI 的 PBS 缓冲液中,测定其发光信号,根据文献报道^[21],二茂铁(Fe)可以催化 H_2O_2 产生 $OH\cdot$ 自由基, $OH\cdot$ 自由基进而催化 ABEI 的电化学发光反应,因此能够显著增强 ABEI 的电化学发光信号.当体系中没有 8-OH-dG 存在时,Fe- ρ DNA 通过与适配体杂交引入到电极表面,ABEI 的电化学发光增强.但是当体系中有 8-OH-dG 存在时,由于 8-OH-dG 可以诱导富 G 序列适配体形成紧密的 G-四倍体结构,从而使适配体从电极表面脱落,因此电极表面引入的 Fe 数量减少,导致 ABEI 的电化学发光信号降低.根据电化学发光信号的变化可以测定 8-OH-dG 的含量.

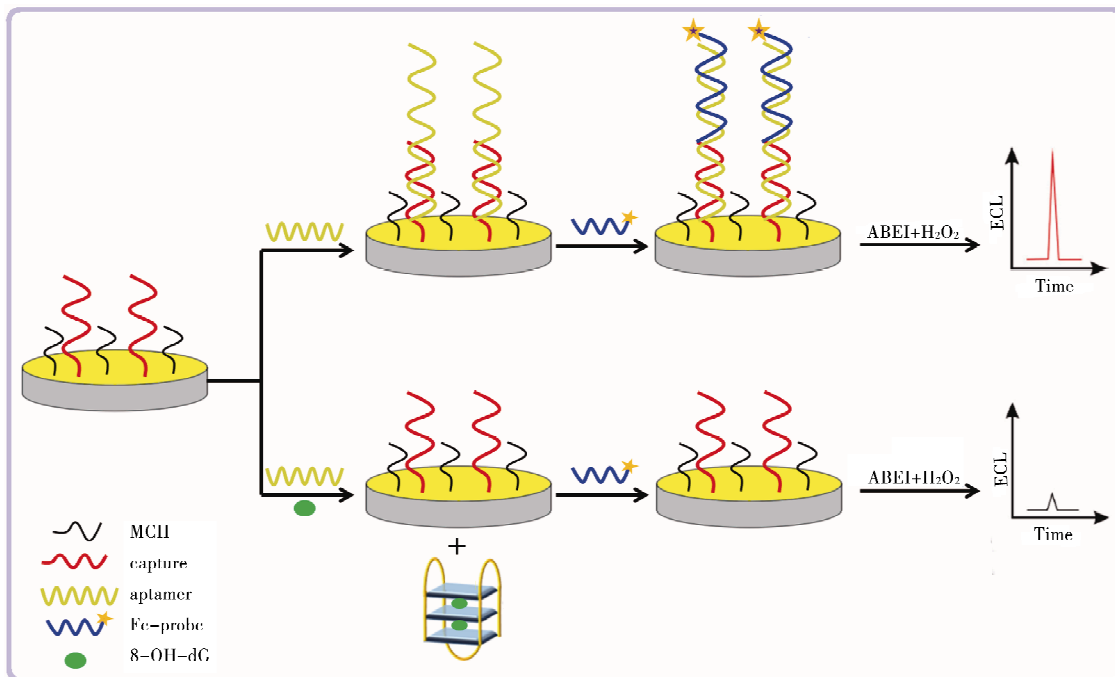


图 1 电化学发光传感器设计示意图

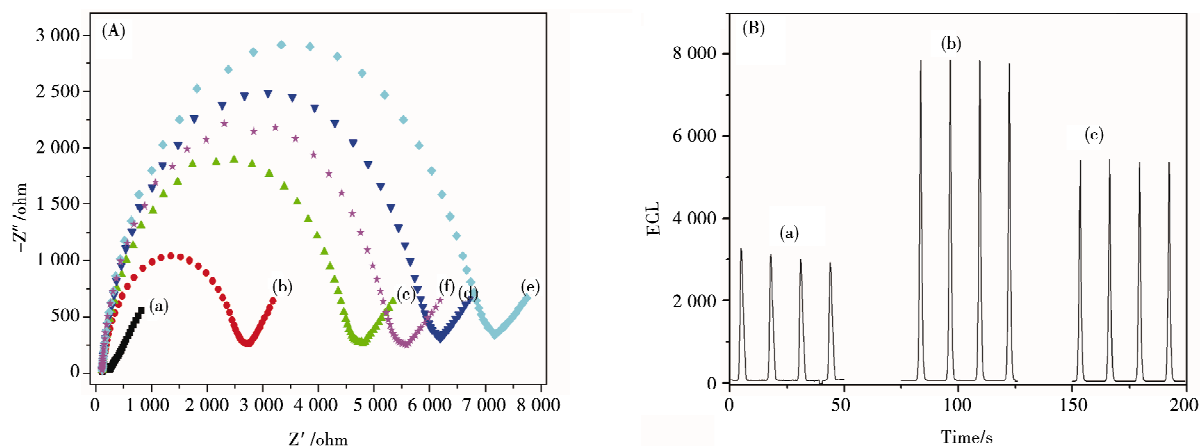


图 2 (A)不同修饰电极的 EIS 谱图(a)金电极,(b) $cDNA/Au$,(c) $MCH/cDNA/Au$,(d) $Apt/MCH/cDNA/Au$,(e) $Fe-\rho DNA/Apt/MCH/cDNA/Au$,(f) $8-OH-dG/Fe-\rho DNA/Apt/MCH/cDNA/Au$; (B)不同修饰电极在 $1\text{ mM } H_2O_2 + 26.6\ \mu\text{M ABEI}$ 溶液中的 ECL: (a) 金电极不存在 8-OH-dG,(b) $Fe-\rho DNA/Apt/MCH/cDNA/Au$,(c) $8-OH-dG/Fe-\rho DNA/Apt/MCH/cDNA/Au$

2.2 传感器的可行性分析

为了证实设计原理的可行性,我们用电化学阻抗图谱(EIS)对电极的每一步组装进行了表征.交流阻抗图一般由半圆和线性两部分组成.半圆部分在高频区,反映界面电荷转移电阻的大小.线性部分在低频区,反映界面电荷的扩散过程.如图 2A 所示,裸金电极(曲线(a))的圆弧半径非常小,表明界面电荷转移电阻很小, $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 在金电极表面的传递速度快.当 $cDNA$ 固定在电极表面后,由于带负电的 $cDNA$ 与 $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 之间的排斥作用使得 $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 在电极表面的电子传递受阻,因而阻抗增大(曲线(b)).同

样,往电极表面连接组装 MCH、Apt、 p DNA 后,阻抗持续增大(曲线(c),(d),(e)).然而,当往 Fc- p DNA/Apt/ c DNA 电极表面滴加一定浓度的 8-OH-dG 时,阻抗显著降低(曲线(f)),这是由于 Apt 与 8-OH-dG 之间有很强的亲和作用,在 8-OH-dG 存在下,Apt 将由单链结构转变为 G-四倍体结构,因而从电极表面脱离.

此外,我们还测定了裸金电极,8-OH-dG 存在和不存在时自组装电极在 H_2O_2 和 ABEI 溶液中的发光强度.如图 2(B)所示,在裸金电极表面,ABEI 的电化学发光强度较弱;当金电极表面被 Fc- p DNA/Apt/ c DNA 修饰时,由于二茂铁的引入,ABEI 的电化学发光信号显著增强(曲线(b)).当往 Fc- p DNA/Apt/ c DNA 电极表面滴加一定浓度的 8-OH-dG 时,其可以诱导富 G 序列适配体形成紧密的 G-四倍体结构,因此适配体从电极表面脱落,夹心型的 Fc- p DNA/aptamer/ c DNA 结构被破坏,电极表面 Fc 数量减少,导致 ABEI 的电化学发光信号降低(曲线(c)).以上实验结果证明了实验的可行性.

2.3 实验条件的优化

为了提高传感器的分析性能,我们对实验条件进行了优化.如图 3(A)所示,ABEI 的发光强度随着适配体浓度的增大而增大,当浓度大于 $1.0 \mu\text{M}$ 时 ECL 趋于稳定.这是因为随着适配体浓度的增大,和电极表面的 c DNA 杂交的数目增多,从而使固定到电极表面的 Fc- p DNA 增多,因此 ABEI 的电化学发光强度增大.实验中适配体浓度选为 $1.0 \mu\text{M}$. c DNA 与适配体的杂交时间对实验也有较大影响,如图 3(B)所示,随着孵育时间的延长,ABEI 的发光强度逐渐增强,1.5 h 之后趋于稳定,所以,选择 1.5 h 的孵育时间.由于 H_2O_2 的浓度对发光强度的影响很大,所以我们对其进行了优化,如图 3(C)所示,ABEI 的发光强度随 H_2O_2 浓度的增加逐渐增强,浓度大于 1.0mM 时趋于稳定,所以,实验中选用的 H_2O_2 浓度为 1.0mM .

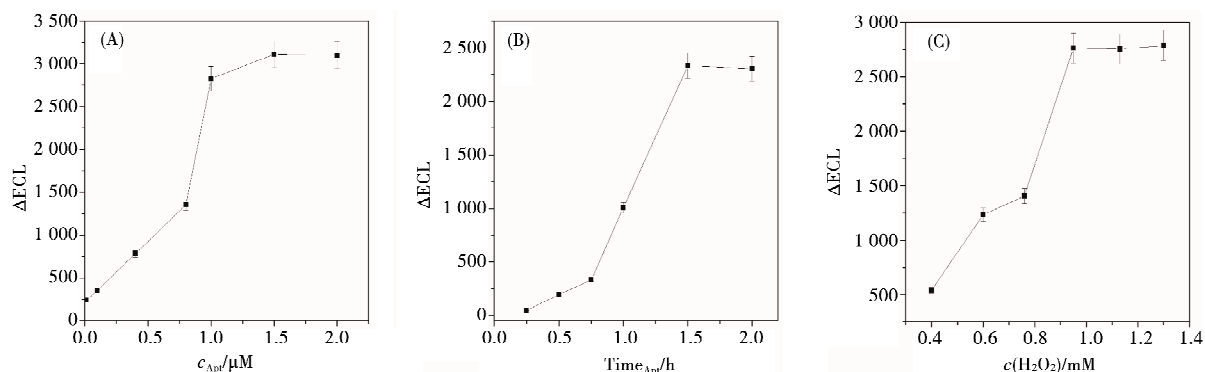


图 3 实验条件优化 (A)适配体浓度; (B)适配体孵育时间; (C) H_2O_2 浓度

2.4 传感器对 8-OH-dG 的分析检测

在优化的实验条件下,我们对 8-OH-dG 进行定量检测.如图 4(A)所示,发光强度随着 8-OH-dG 浓度的增加而减弱.当 8-OH-dG 浓度在 1nM - $100 \mu\text{M}$ 范围内,发光强度与 8-OH-dG 浓度的对数有较好的线性关系图 4(B),线性相关系数为 $R = -0.9967$,检出限为 0.33nM ($S = 3N$).将本方法和文献报道的其他方法进行了比较,结果列于表 2.对比可以看出,本方法的线性范围较宽,检测限低,因此有望用于实际样品中痕量 8-OH-dG 的检测.

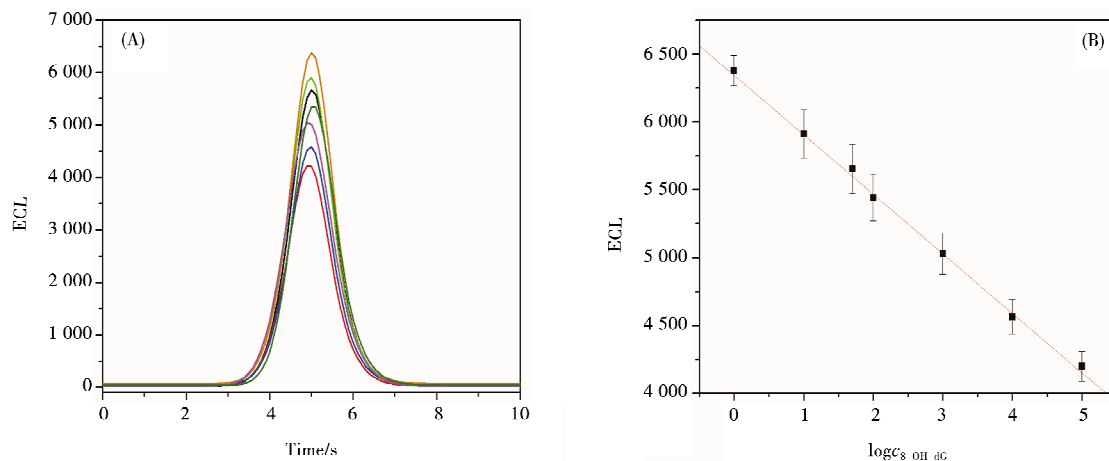


图 4 (A)不同 8-OH-dG 浓度下 ECL(从上到下: 1nM , 10nM , 50nM , 100nM , $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$); (B)电化学发光强度与 $\log c_{8\text{-OH-dG}}$ 之间的线性关系图

表 2 不同方法对 8-OH-dG 检测的结果比较

方法	线性范围	检出限	参考文献
Aptasensor	1.75 nM-3.675 μ M	0.315 nM	[1]
Immunosensor	0.7-700 nM	0.3 nM	[3]
ss-DNA/GNs/GCE	5.6 nM-1.155 μ M	0.872 nM	[22]
ER-GO/Nafion/GCE	0.07-33 μ M	1.12 nM	[23]
CNT-PEI/GCE	0.5-30 μ M	100 nM	[24]
Flow immunosensor	0-0.53 μ M	10.98 nM	[25]
ECL Aptasensor	1 nM-100 μ M	0.33 nM	present

2.5 适配体传感器的选择性检测

传感器的选择性对于实际样品的检测非常重要。如图 5 所示,只有体系中加入 8-OH-dG 时才能观察到发光强度的明显降低,而在 8-OH-dG 类似物如尿酸、抗坏血酸、鸟嘌呤、鸟苷和尿素存在下发光强度则没有明显变化。尿酸和 8-OH-dG 的结构类似,具有相似的电化学响应和相邻的氧化峰,在 8-OH-dG 的直接电化学检测中,尿酸对实验的干扰难以消除。然而,在这项工作中,由于适配体的高特异性,可以消除尿酸的干扰。此外,一些常见的金属离子如 Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} 和 Na^+ , 即使比 8-OH-dG 的浓度高 10 倍,也没有干扰。实验结果表明,所制备的传感器具有良好的选择性。

2.6 实际样品的检测

本工作以尿液作为检测对象验证所制备的适配体传感器的实用性。将尿液样品以 12 000 r/min 离心约 5 min, 收集上清液进行测定,如表 3 所示,通过向尿样中加入 8-OH-dG 标液,测回收率。结果表明,该适配体传感器在实际应用中具有很大的应用价值。

4 结论

本项工作基于核酸适配体对 8-OH-dG 的特异性结合作用,通过核酸适配体将二茂铁修饰的探针 DNA 引入到电极表面,由此增强 ABEI 的电化学发光。而 8-OH-dG 的存在会导致固定到电极表面的核酸适配体数目减少,从而使富集在电极表面的二茂铁数目减少,因此 ABEI 的电化学发光强度将会降低。ABEI 的电化学发光强度与 8-OH-dG 的浓度呈反比,由此建立了一种检测 8-OH-dG 的传感器。该传感器对 8-OH-dG 的检测线性范围宽(1 nM-100 μ M),检出限低(0.33 nM),并显示出良好的选择性和较高的灵敏度。更重要的是,该方法已经成功应用于尿液中 8-OH-dG 的测定,表明该法在临床检测中具有潜在应用。

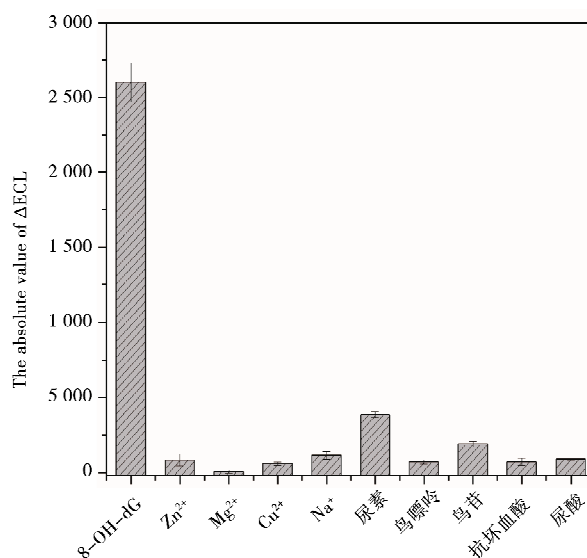


图 5 适配体传感器的选择性研究

表 3 人尿样中 8-OH-dG 的含量及回收率的测定

样品	测定值	回收率
尿液	-	-
尿液+10 nM	10.71 nM	107.1%
尿液+100 nM	95.50 nM	95.50%

参 考 文 献

- [1] Shi S S, Jia L P, Ma R N, et al. A label-free electrochemical aptasensor for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine detection [J]. J Electroanal Chem, 2015, 759:107-112.
- [2] Miyachi Y, Shimizu N, Ogino C, et al. Selection of a DNA aptamer that binds 8-OHdG using GMP-agarose[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19: 3619-3622.

- [3] Zhang T T, Zhao H M, Fan X F, et al. Electrochemiluminescence immunosensor for highly sensitive detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine based on carbon quantum dot coated Au/SiO₂ core-shell nanoparticles [J]. *Talanta*, 2015, 131: 379-385.
- [4] Koide S, Kinoshita Y, Ito N, et al. Determination of human serum 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) by HPLC-ECD combined with solid phase extraction (SPE) [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878: 2163-2167.
- [5] Domijan A M, Peraica M. Determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine using HPLC with electrochemical detection [J]. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2008, 59: 277-282.
- [6] Cooke M S, Singh R, Hall G K, et al. Evaluation of ELISA and LC-MS/MS methodology for the analysis of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine in saliva and urine [J]. *Free Radical Bio Med*, 2006, 41: 1829-1836.
- [7] Yoshida R, Ogawa Y, Kasai H. Urinary 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine values measured by an ELISA correlated well with measurements by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *Cancer Epidem Biomar*, 2002, 11: 1076-1081.
- [8] Yao W, Wang L, Wang H Y, et al. An aptamer-based electrochemiluminescent biosensor for ATP detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24: 3269-3274.
- [9] Ellington A D, Szostak J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. *Nature*, 1990, 346: 818-822.
- [10] Romanov V, Sidorenko V, Rosenquist T A, et al. A fluorescence-based analysis of aristolochic acid-derived DNA adducts [J]. *Anal Biochem*, 2012, 427: 49-51.
- [11] Lu Y, Li X C, Zhang L M, et al. Aptamer-based electrochemical sensors with aptamer-complementary DNA oligonucleotides as probe [J]. *Anal Chem*, 2008, 80: 1883-1890.
- [12] Zhu Y, Chandra P, Song K M, et al. Label-free detection of kanamycin based on the aptamer-functionalized conducting polymer/gold nanocomposite [J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, 36: 29-34.
- [13] Yang C Y, Wang Q, Xiang Y, et al. Target-induced strand release and thionine-decorated gold nanoparticle amplification labels for sensitive electrochemical aptamer-based sensing of small molecules [J]. *Sensor Actuat B*, 2014, 197: 149-154.
- [14] Wang J, Shan Y, Zhao W W, et al. Gold nanoparticle enhanced electrochemiluminescence of CdS thin films for ultrasensitive thrombin detection [J]. *Anal Chem*, 2011, 83: 4004-4011.
- [15] Deng L, Du Y, Xu J J, et al. An off-on-off electrochemiluminescence approach for ultrasensitive detection of thrombin [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 59: 58-63.
- [16] Wang J C, Wang Y S, Xue J H, et al. An ultrasensitive label-free assay of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine based on the conformational switching of aptamer [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 58: 22-26.
- [17] Liu Y J, Wei M, Zhang L Q, et al. Chiroplasmonic assemblies of gold nanoparticles for ultrasensitive detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human serum sample [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(12): 6509-6514.
- [18] Lv Y Q, Chen S Y, Shen Y F, et al. Competitive multiple-mechanism-driven electrochemiluminescent detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(8): 2801-2804.
- [19] Liu H, Wang Y S, Wang J C, et al. A colorimetric aptasensor for the highly sensitive detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine based on G-quadruplex-hemin DNAzyme [J]. *Anal Biochem*, 2014, 458: 4-10.
- [20] Wang J C, Wang Y C, Xue J H, et al. An ultrasensitive label-free assay of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine based on the conformational switching of aptamer [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 58: 22-26.
- [21] Jiang X Y, Wang H J, Wang H J, et al. Signal-Switchable Electrochemiluminescence System Coupled with Target Recycling Amplification Strategy for Sensitive Mercury Ion and Mucin 1 Assay [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(18): 9243-9250.
- [22] Jia L P, Liu J F, Wang H S. Electrochemical performance and detection of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine at single-stranded DNA functionalized graphene modified glassy carbon electrode [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 67: 139-145.
- [23] Jia L P, Wang H S. Electrochemical reduction synthesis of graphene/Nafion nanocomposite film and its performance on the detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the presence of uric acid [J]. *J Electroanal Chem*, 2013, 705: 37-43.
- [24] Gutiérrez A, Gutiérrez S, García G, et al. Determination of 8-Hydroxy 2'-Deoxyguanosine Using Electrodes Modified with a Dispersion of Carbon Nanotubes in Polyethylenimine [J]. *Electroanalysis*, 2011, 23: 1221-1228.
- [25] Zhu X N, Shah P, Stoff S, et al. A paper electrode integrated lateral flow immunosensor for quantitative analysis of oxidative stress induced DNA damage [J]. *Analyst*, 2014, 139: 2850-2857.

zation[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2002, 36(5): 367-376.

- [23] 王永生,于贵瑞,程淑兰,等. 中国东部南北样带典型针叶林土壤酶活性分布格局[J]. *生态学报*, 2015, 35(11): 3636-3642.
- [24] 崔芸萍,赵桂琴,刘欢. 除草剂对燕麦田土壤脲酶和碱性磷酸酶活性的影响[J]. *中国草地学报*, 2014, 36(1): 37-43.
- [25] 邱莉萍,刘军,王益权,等. 土壤酶活性与土壤肥力的关系研究[J]. *植物营养与肥料学报*, 2004, 10(3): 277-280.
- [26] 周克琴,韩秉进,张秋英,等. 生防菌 BRF-1 和 BRF-2 对大豆根腐病和产量的影响[J]. *大豆科学*, 2012, 31(5): 801-803.
- [27] 曾庆宾,李涛,王昌全,等. 微生物菌剂对烤烟根际土壤脲酶和过氧化氢酶活性的影响[J]. *中国农学通报*, 2016, 32(22): 46-50.
- [28] 刘素慧,刘世琦,张自坤,等. EM 对连作大蒜根际土壤微生物和酶活性的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2011, 17(3): 718-723.
- [29] 孙中华,赵铂锤,陈仕红,等. 枯草芽孢杆菌 B67 对黄瓜幼苗生长发育的影响[J]. *中国瓜菜*, 2017, 30(2): 15-18.
- [30] 李俊,徐艳琪,刘肖肖. 枯草芽孢杆菌 FXX-3 对棉花的促生作用[J]. *农业开发与装备*, 2017(8): 100-101.

Effect of Biocontrol *Bacillus* Strains on Enzyme Activities in Rhizosphere Soil and Yield of *Pinellia Ternata*

YAN Yang¹ LIU Yue-jing¹ LI Xiao-jing¹ HAN Jun² CHEN Fang¹

(1. School of Pharmacy, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China; 2. Institute of BioPharmaceutical Research, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract The effects of three strains of *Bacillus subtilis* B579, *Bacillus amyloliquefaciens* 9-2 and *Bacillus subtilis* 2-1 on the key enzyme activities in rhizosphere soil and yield of *Pinellia ternata* were studied by field experiments. The results of the study showed that 4 kinds of enzyme activities related to soil fertility, such as catalase, alkaline phosphatase, urease and chitinase, were significantly increased in *Pinellia ternata* rhizosphere soil. The yield of the biocontrol bacteria treatment group was significantly higher than the control group and the blank group.

Key words biocontrol bacteria; soil enzyme activity; promoting effect; yield

(上接第 66 页)

An Electrochemical Aptasensor for the Detection of 8-OH-dG based on Ferrocenesence Enhanced ABEI Electrochemiluminescence

WANG Li-juan ZHAO Ruo-nan ZHAO Ya-nan WEI Si-min

JIA Li-ping WANG Huai-sheng

(School of Chemistry, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract In this work, an aptasensor was prepared for the determination of 8-OH-dG based on ferrocenesence enhanced ABEI electrochemical luminescence. The aptamer of 8-OH-dG is partially complementary paired with the capture DNA immobilized on the gold electrode, and the other part is complementary paired with the ρ DNA of the terminally modified ferrocenesence. Due to the introduction of ferrocenesence, the electrochemiluminescence signal of ABEI will be significantly enhanced. However, in the presence of 8-OH-dG, the conformation of Apt changed from single-stranded structure to tight G-quadruplex structure, and the number of ferrocenesence introduced on the surface of the electrode decreases, the electrochemiluminescence signal of ABEI also decrease. Under the optimal experimental conditions, the logarithm of ABEI luminescence intensity was linear with the logarithm of 8-OH-dG concentration in the range from 1nM to 100 μ M with the detection limit of 0.33 nM. This method is applied to the detection of 8-OH-dG in human urine with satisfactory results, so this method has potential application value in clinical detection.

Key words electrochemiluminescence; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; aptamer