

# 电化学可卡因适体传感器的研制<sup>\* 1</sup>

华梅, 徐凤, 徐全清, 谭琳, 杨光明, 陶满兰, 杨云慧

(云南师范大学 化学化工学院, 云南 昆明 650092)

**摘要:**采用自组合法将带巯基的捕获 DNA 探针固定到金电极表面, 利用杂交反应将可卡因适体固定到电极上制得可卡因适体传感器. 以钌联吡啶为电活性指示剂, 检测适体与目标分析物——可卡因特异性结合后, 电化学活性物质钌联吡啶的电信号的降低, 实现对可卡因的定量检测. 考察了缓冲液的 pH, 扫描速度, DNA 探针及适体固定时间等条件对传感器测定可卡因信号响应的影响. 结果表明在 pH 7.4 时该传感器检测的范围为  $2 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-3}$  mol/L, 检测下限为  $6 \times 10^{-5}$  mol/L. 该传感器稳定性好, 抗干扰能力强.

**关键词:**电化学; 可卡因; 适体传感器; 钌联吡啶

**中图分类号:** O 657.15    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0258-7971(2010)01-0086-06

适体是一段由 25~80 个碱基组成的单链寡核苷酸片段, 可以是 DNA 也可以是 RNA<sup>[1]</sup>, 也称为核酸适体、适配体、适配子等. 通过 SELEX (Systematic evolution of ligand by exponential enrichment)<sup>[2-3]</sup> 技术筛选得到的适体不仅具有类似抗体对目标分子高亲和力和高特异性, 分子量小、结构简单、易合成和可进行连接性修饰等优点, 而且具有反应速度快、可反复使用和长期保存等优点. 核酸适体与配体间的亲和力(解离常数在皮摩和纳摩之间)要强于抗原抗体之间的亲和力. 核酸适体所结合的靶分子包括酶、生长因子、抗体、基因调节因子<sup>[4-5]</sup>、细胞黏附分子、植物凝集素、完整的病毒颗粒、病原菌等, 作用范围非常广泛.

将适体作为分子识别元件固定在信号转换器上可制成适体生物传感器. 它主要是由接受器(Receptor)、换能器(Transducer)和电子线路(electronic control circuit)3 部分组成<sup>[6]</sup>. 按照检测方法不同, 适体生物传感器可分为: 电化学适体传感器、光学适体传感器和质量型适体传感器等. 电化学适体传感器与适体的高特异性、高选择性结合, 具有

选择性好、灵敏度高、响应快、操作简便、价格低廉等优点.

电化学适体生物传感器是将适体作为分子识别物质固定在电极上, 根据适体与目标分析物——配体结合前后电化学信号的变化来进行检测的分析器件. 其过程一般包括以下 4 步: 一是适体的固定化; 二是适体识别目标物, 即适体与目标物的结合; 三是识别的指示, 即如何将适体识别目标物信息转换为可测定的电化学信号; 四是电化学信号的测量<sup>[7]</sup>. 电化学适体生物传感器根据是否需要标记, 分为非标记型和标记型 2 种. 非标记型指不需标记适体, 直接根据适体识别前后所引起电阻、电流或电位的变化进行检测的传感器. 这类传感器的优点是无需标记、操作简单、实时检测方便、假信号率低, 对适体的活性没有损伤; 缺点是灵敏度较低. 标记型是指对适体进行标记, 根据识别前后标记物电化学信号的变化进行检测<sup>[8]</sup>. 标记物分为 3 种: 一是电活性物质, 如: 二茂铁<sup>[9]</sup>、亚甲蓝等; 二是酶, 如: 辣根过氧化物酶、葡萄糖脱氢酶; 三是纳米粒子, 如: 铂纳米粒子、量子点纳米粒

\* 收稿日期: 2009-07-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20865006); 云南省自然科学基金资助项目(2006B0028M); 云南省教育厅自然科学基金资助项目(07Z10087).

作者简介: 华梅(1986-), 女, 云南人, 硕士生, 主要从事电化学及生物传感器方面的研究.

通讯作者: 杨云慧(1963-), 女, 教授, 博士, E-mail: yyhui2002@yahoo.com.cn.

子、金纳米粒子等。标记型的优点是灵敏度高,缺点是识别物需要标记、操作步骤多、较繁琐。

可卡因是当今毒品滥用中最广泛的一种,它对中枢神经系统产生的兴奋作用,是导致滥用的重要原因。小剂量的可卡因可使心律缓慢,剂量增大后则心律增快,呼吸急促,可出现呕吐、震颤、痉挛、惊厥等现象。如果大剂量,则可导致死亡。一剂 70 mg 的纯可卡因,可以使体重 70 kg 的人当场丧命。可卡因对人体有如此大的威胁,因此,研究新型、灵敏的可卡因检查方法对于禁毒、戒毒具有非常重要的意义。

目前已报道的可卡因检测方法有:化学分析法、高效毛细管电泳法<sup>[10]</sup>、核磁共振光谱法<sup>[11]</sup>、电化学发光法<sup>[12]</sup>、比色法<sup>[13]</sup>等。这些方法操作复杂、仪器昂贵、不利于现场检测。基于适体的高特异性、高选择性以及电化学传感器的实时易操作性,可将可卡因适体与传感器结合起来用电化学的方法检测可卡因。Brian R. Baker 等人结合适体与电化学检测方法设计了用于掺杂样品和生物液体检测可卡因的非标记型生物传感器<sup>[14]</sup>。Li Yan 等人设计了用电化学方法检测可卡因的电化学发光适体传感器<sup>[15]</sup>。

钉联吡啶<sup>[16]</sup>是以对乙烯基苯撑齐聚体为桥的双 2'-6'-2''-三联吡啶配体,经过分步配位,得到双核三联吡啶钉(II)配合物。

本文采用自组合法将带巯基的捕获 DNA 探针固定到金电极表面,利用杂交反应将可卡因适体固定到电极上制得可卡因适体传感器。利用钉联吡啶做为电化学指示剂,采用适体传感器测定适体与目标分析物结合后双核三联吡啶钉(II)配合物的氧化电位下的电信号。此传感器可用于可卡因样品的测定,具有较高的稳定性、灵敏度和实用性。

## 1 实验

**1.1 试剂和仪器** CHI660C 电化学分析仪(中国上海辰华仪器公司)。使用三电极体系:修饰过可卡因适体的金电极为工作电极,饱和 KCl 甘汞电极(SCE)为参比电极,铂电极为对电极。

文中所用寡核苷酸序列根据文献<sup>[17]</sup>设计,由宝生物公司(中国,大连)合成。2种寡核苷酸序列分别为:① DNA 捕获探针:3'-SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CCC TCT GTT CCT ATT -5';② 可卡因适体:5'-GGG AGA CAA GGA TAA ATC CTT CAA TGA AGT

GGG TCT CCC -3'。可卡因购自北京公安部物证鉴定中心,巯基乙酸(TGA, HSCH<sub>2</sub>COOH)购于天津市天达净化材料精细化工厂,钉联吡啶[Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>购于 Sigma 公司,实验过程中使用的其他试剂均为分析纯,所用水均为二次蒸馏水。测定可卡因时,使用的支持电解液为 0.01 mol/L PBS 磷酸缓冲液(pH 7.4)由 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 和 NaCl 配制。

**1.2 适体传感器的制备** 将金电极( $\phi = 1$  mm)在均相砂纸上打磨,接着用 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 悬浊液将电极表面抛光成镜面,电极再依次放入无水乙醇、二次蒸馏水中各超声洗涤 5 min,用 0.1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 底液在 +1.2 ~ -1.2 V 扫描 7~8 次,晾干备用。

将 10  $\mu$ L DNA 探针涂在预处理好的金电极上,常温下培育 1 h。用 PBS 缓冲液清洗,晾干后将 10  $\mu$ L 巯基乙酸滴在电极上,培育 1 h 以封闭非特异性位点。用 PBS 缓冲液清洗后,最后滴加 10  $\mu$ L 可卡因适体,于 37  $^{\circ}$ C 培育 1 h,制成可卡因适体传感器<sup>[18]</sup>。电极不用时,置于冰箱中 4  $^{\circ}$ C 保存。

**1.3 实验原理及流程** 可卡因适体与电极表面固定的捕获探针发生杂交反应后形成双链,在钉联吡啶溶液中培育一段时间,即得到嵌入了电化学活性物质的适体传感器。将此传感器用于可卡因的检测,可卡因与其适体特异性结合,适体从传感器上脱落,导致传感界面上双链量减少,从而使电化学活性物质钉联吡啶的量也随之减少,导致电信号的降低,信号降低的程度与可卡因的浓度成正比,从而实现可卡因的定量检测。

实验流程如图 1 所示。

**1.4 实验方法** 将传感器浸入 10 mL 含 40  $\mu$ mol/L 钉联吡啶的 0.01 mol/L PBS 溶液中,室温下搅拌 10 min。用 0.01 mol/L PBS 缓冲液搅拌清洗 5 min 后,将 10  $\mu$ L 可卡因样品液滴加在传感器界面上,于 37  $^{\circ}$ C 下培育 1 h<sup>[19]</sup>。

电化学实验在 CHI 660C 型电化学分析仪(中国上海辰华仪器公司)上进行。本实验采用线性扫描法(LSV)和循环伏安法(CV)测量电化学活性物质钉联吡啶的氧化峰电流。扫描参数为:扫描速度 100 mV/s;扫描电压范围 0~1 500 mV。交流阻抗谱(IMP)是不同修饰阶段的电极在含 5 mmol/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 mmol/L K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 及 0.1 mol/L KCl 底液中获得<sup>[20]</sup>。

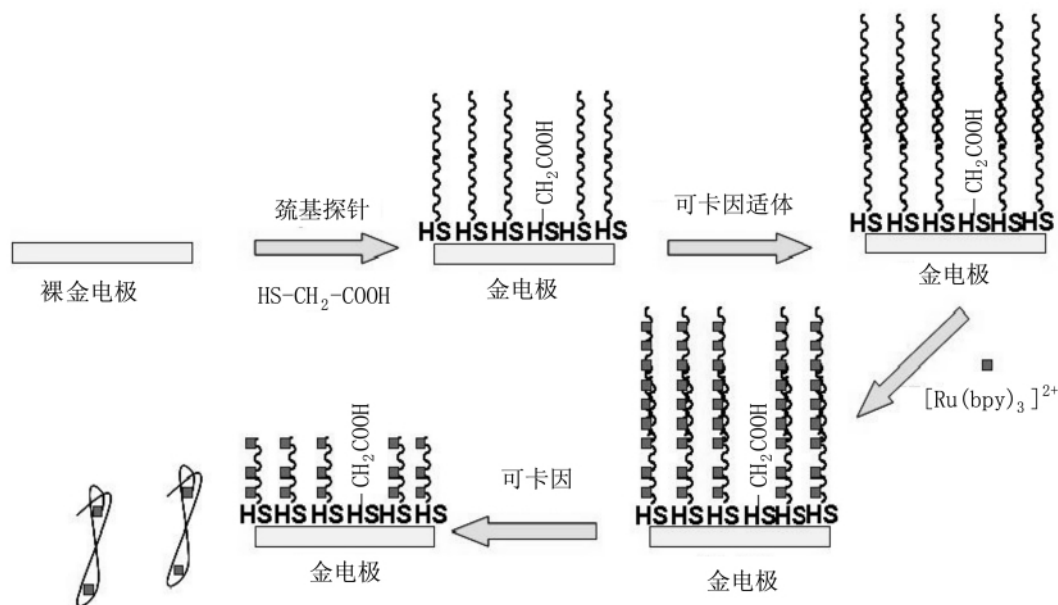


图 1 实验流程示意图

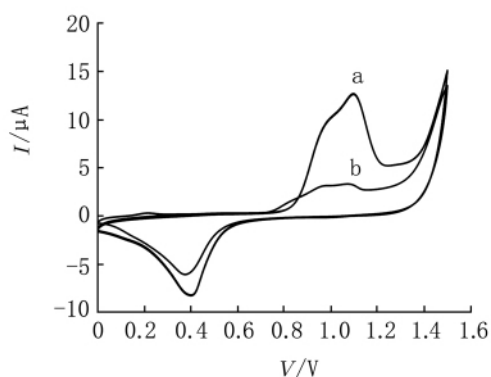
Fig. 1 Scheme of experimental procedure

## 2 结果与讨论

**2.1 有无可卡因对电极响应电流的影响** 考察了有无可卡因对电极响应电流的影响(见图 2). 结果表明,有可卡因时,电流信号降低. 在可卡因存在下,可卡因与适配体之间的特异性亲和反应会将适配体探针从其与捕获探针的双链模式中置换下来,导致传感界面上双链量的减少,从而使作用的钉联

吡啶量相应减少,最终表现为电化学信号的降低. 验证了可卡因与适体结合后电流信号为 signal off 型.

**2.2 不同修饰电极界面的交流阻抗行为** 电化学交流阻抗常被用于电极修饰过程中界面变化的表征<sup>[21]</sup>. 图 3 为传感器制备过程中各界面在含 5 mmol/L  $K_3Fe(CN)_6$ , 5 mmol/L  $K_4Fe(CN)_6$ , 0.1 mol/L KCl 的溶液中的交流阻抗曲线. 曲线 a 为裸金电极的阻抗图,表明电子传递到电极表面只受扩



a: 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.4);  
b: 含有 0.005 mol/L 可卡因的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4)

图 2 适体传感器在不同溶液中的循环伏安行为

Fig. 2 Cyclic voltammograms of the aptamer sensor at different solution (a: in PBS (pH 7.4) without cocaine; b: in PBS (pH 7.4) containing cocaine scan rate 100 mV/s)

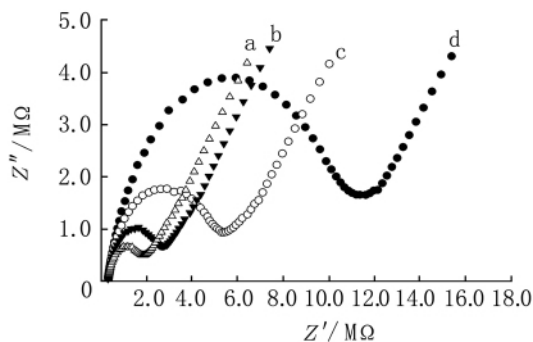


图 3 不同修饰电极界面的交流阻抗图

Fig. 3 Impedance spectra ( $Z_{im}$  vs  $Z_{re}$ , Nyquist plot) by using different modified electrodes (a: bare Au; b: Au/capture probe; c: Au/capture probe/TGA; d: Au/capture probe/TGA/apptamer)

散控制,电阻较小. 曲线 b 为 Au/DNA 探针复合膜修饰后的电极阻抗图,出现了较高的阻抗值 ( $R_{et} = 2\ 500\ \Omega$ ). 说明 DNA 对电子传递有阻碍. 曲线 c、曲线 d 分别为 Au/DNA 探针/巯基乙酸复合膜修饰后的电极、Au/DNA 探针/巯基乙酸/适体 (aptamer) 复合膜修饰后的电极界面的阻抗图,由图可看出阻抗值都剧增 ( $R_{et} = 5\ 000\ \Omega$ ,  $R_{et} = 11\ 000\ \Omega$ ). 结果表明 DNA 探针和适体都得到了很好的固定.

2.3 扫描速度对电极响应电流的影响 改变不同的扫描速度,考查了传感器在与  $40\ \mu\text{mol/L}$  钌联吡啶作用后在缓冲溶液中的循环伏安行为. 结果见图 4-5 (图 4 从内至外扫描速度分别为  $20\ 40\ 60\ 80\ 100\ \text{mV/s}$ ). 从图 5 中可以看出,氧化还原电流与扫描速度的平方根 ( $v^{1/2}$ ) 成线性关系,说明此电流为

扩散控制电流<sup>[22]</sup>.

2.4 实验条件的优化

2.4.1 pH 值对电极响应的影响 实验考察了 pH 值从 6.8 到 8.0 范围内传感器的响应电流值,结果表明在 pH 为 7.4 时电极的响应最好,如图 6 所示. 所以本实验选用 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲溶液作为测试底液.

2.4.2 DNA 捕获探针固定时间对电极响应的影响 实验考察了 DNA 捕获探针固定时间对电极响应电流的影响. 从图 7 可以看出,当探针固定时间小于 60 min,随着时间的增加,传感器的响应电流逐渐增加,超过 60 min 后,响应电流逐渐减小,所以 DNA 探针固定的最佳固定时间为 60 min.

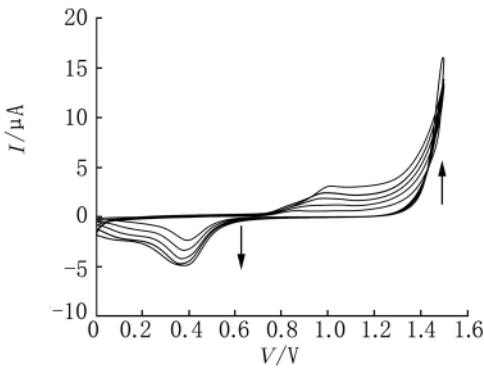


图 4 扫描速度对电极响应电流的影响 (图中从内至外分别是扫描速度为  $20\ 40\ 60\ 80\ 100\ \text{mV/s}$  的循环伏安行为)

Fig. 4 The effect of scan rates on electrode response to current (from inner to outer curve:  $20\ 40\ 60\ 80\ 100\ \text{mV/s}$ )

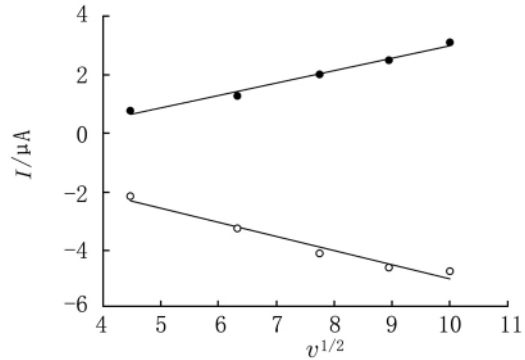


图 5 氧化还原电流与扫描速度的平方根 ( $v^{1/2}$ ) 的线性曲线

Fig. 5 Linearity of peak current vs.  $v^{1/2}$

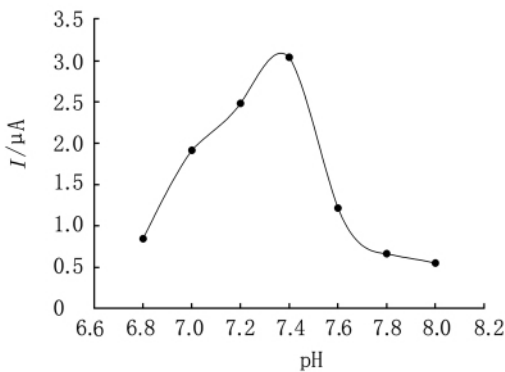


图 6 pH 对电极响应的影响

Fig. 6 Effect of pH on the response of aptamer sensor

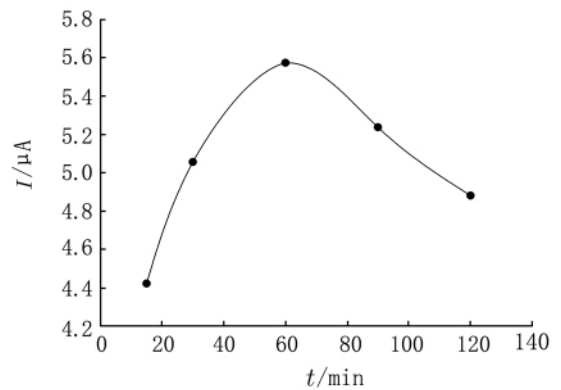


图 7 DNA 探针固定时间对电极响应的影响

Fig. 7 Effect of the immobilizing time of capture probe on the aptamer sensor

2.4.3 适体固定时间对电极响应的影响 实验考察了适体固定时间对电极响应电流的影响. 从图 8 可以看出, 传感器响应电流在 0 ~ 60 min 之间有一个最高点, 随后电流随着时间的增加而缓慢减小, 结合 DNA 探针固定的最佳时间, 适体固定的最佳固定时间确定为 60 min.

2.5 电极对可卡因的响应性能 我们在最优的实

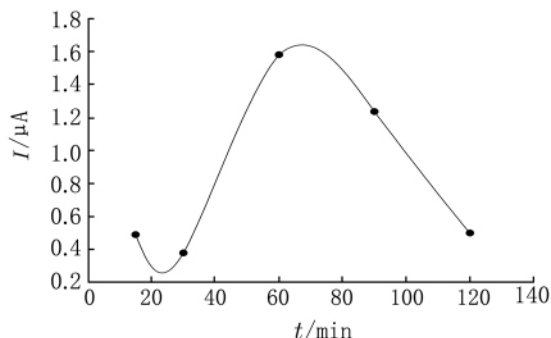
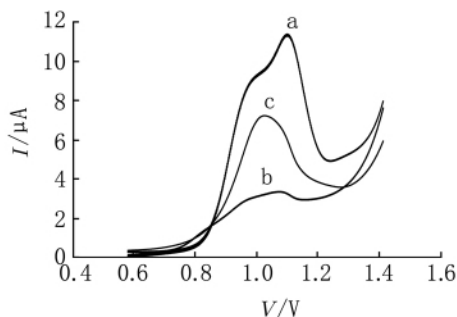


图 8 适体固定时间对电极响应的影响

Fig. 8 Effect of the immobilizing time of aptamer on the aptamer sensor

2.6 抗干扰试验 为考察电极的特异性, 选择了人体中最可能的干扰物质来考察可卡因适体的抗干扰情况. 从图 10 中可看出 4 mmol/L 的抗坏血酸与没有结合可卡因的电信号相比, 电流变化不大, 而与 600 μmol/L 可卡因相比电流相差较大, 这说明抗坏血酸基本上不干扰测定, 传感器对可卡因具有较高的选择性.



a: 0 mmol/L 可卡因; b: 600 μmol/L 可卡因;  
c: 4 mmol/L 抗坏血酸

图 10 传感器的特异性

Fig. 10 Specificity of the aptamer sensor (a: 0 mmol · L<sup>-1</sup> cocaine; b: 600 μmol · L<sup>-1</sup> cocaine; c: 4 mmol · L<sup>-1</sup> ascorbic acid)

验条件下, 测得了传感器对不同浓度的可卡因响应的校正曲线. 从图 9 中可以看出, 传感器在  $2 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-3}$  mol/L 范围内具有良好的线性关系. 线性方程为  $I/10^{-7} \text{ A} = -2.357 \log(c/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})) + 11.40$ , 相关系数为 0.9519. 根据  $3\sigma$  规则, 估计可卡因的检测下限为  $6 \times 10^{-5}$  mol/L.

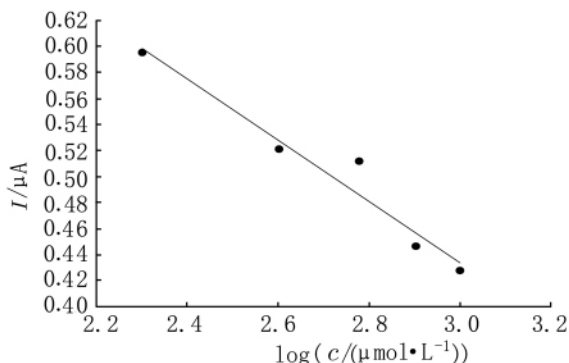


图 9 传感器在不同浓度下的校正曲线

Fig. 9 The calibration curves of aptamer sensor in different cocaine concentration

2.7 传感器的重现性及稳定性 传感器对可卡因的测定有很好的重现性, 对 400 μmol/L 的可卡因样品连续进行 5 次测定, 相对标准偏差为 2.6%. 此外, 该传感器界面具有很好的稳定性, 连续再生 10 次之后, 仍能保持原来响应的 95.8%. 传感器不用时保存在 4 °C 的缓冲溶液中.

2.8 回收率测定 用传感器进行可卡因加标回收率的测定, 测定结果列于表 1. 结果令人满意, 说明该传感器能用于可卡因的测定.

表 1 可卡因回收率的测定

Tab. 1 Recovery determination of cocaine

加入浓度 / (μmol · L <sup>-1</sup> )	回收浓度 / (μmol · L <sup>-1</sup> )	回收率 / %	平均回收率 / %
700	652.3	93.2	
500	447.2	89.4	91.2
200	182.1	91.0	

### 3 结论

可卡因适体与电极表面固定的捕获探针发生杂交反应后形成双链, 在钉联吡啶溶液中培育一段

时间,即得到嵌入了电化学活性物质的适体传感器。将此传感器用于可卡因的检测,可卡因与其适体特异性结合,适体从传感器上脱落,导致传感界面上双链量减少,从而使电化学活性物质钉联吡啶的量也跟着减少,导致电信号的降低,信号降低的程度与可卡因的浓度成正比,从而实现可对可卡因的定量检测。实验考察了缓冲液的pH,扫描速度,DNA探针及适体固定时间等条件对传感器测定可卡因的信号响应的影响。此传感器用于样品中可卡因的测定,灵敏度高,抗干扰能力强,该传感器制作简单,所需成本低,使用寿命长。

### 参考文献:

- [1] ELLINGTON A E, SZOSTAK J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. *Nature*, 1990, 346(6287):818-822.
- [2] TUERK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment [J]. *Science*, 1990, 249(4968):505-510.
- [3] HAMULA C L A, GUTHRIE J W, ZHANG H Q, et al. Selection and analytical application of aptamers [J]. *Trends in Analytical Chemistry* 2006, 25(7):681-691.
- [4] 刘晓静,刘韧,顾长国.核酸适体的研究进展[J].*生理科学进展* 2004, 35(4):374-378.
- [5] 王成刚.核酸适体技术研究进展[J].*生物医学工程学杂志* 2006, 23(2):463-466.
- [6] IKEBUKURO K, KIYOHARA C, SODE K. Novel electrochemical sensor system for protein using the aptamers in sandwich manner[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 20(10):2168-2172.
- [7] 张成孝,李晓霞,李延.适配体及其在临床检测和药物筛选分析中的应用[C]//*陕西药物分析学术研讨会论文集*.西安:西安交通大学,2006.
- [8] 李晓霞,申丽华,漆红兰.适体电化学生物传感器研究进展[C]//*陕西药物分析学术研讨会论文集*.西安:陕西师范大学,延安:延安大学,2007.
- [9] 陈灿辉,叶华,李红.二茂铁及其衍生物的电化学研究进展[J].*化工时刊* 2004, 18(10):1-4.
- [10] 金琦芸,梁晨,郭幼梅,等.高效毛细管电泳同时分析尿中20种碱性药物与毒物[J].*中国临床药理学杂志* 2003, 12(6):285-288.
- [11] 核磁共振波谱法检测药物.现代药物分析与评价新技术新方法新标准指导手册[M].北京:中国科技文化出版社,2005.
- [12] STOJANOVIC M N, Paloma de Prada, LANDRY D W. Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine [J]. *J Am Chem Soc* 2001, 123(4):928-4931.
- [13] LIU Jue-wen, LU Yi. Fast colorimetric sensing of adenosine and cocaine based on a general sensor design involving aptamers and nanoparticles [J]. *Angew Chem Int Ed* 2006, 45:90-94.
- [14] BAKER B R, LAI R Y, WOOD M S, et al. An electronic aptamer-based small-molecule sensor for the rapid label-free detection of cocaine in adulterated samples and biological fluids [J]. *Journal of the American Chemical Society* 2006, 128(10):3138-3139.
- [15] LI Yan, QI Hong-lan, PENG Ya-ge, et al. Electrogenerated chemiluminescence aptamer-based biosensor for the determination of cocaine [J]. *Electrochemistry Communications* 2007, 9:2571-2575.
- [16] 陈学刚,程延祥,耿延侯,等.双核三联吡啶钌(II)配合物的合成及其光谱和电化学性质[J].*应用化学* 2006, 20(5):465-470.
- [17] LI Jue-wen, Mazumdar Debapriya, KIU Yi. A simple and sensitive "dipstick" test in serum based on lateral flow separation of aptamer-linked nanostructures [J]. *Angew Chem Int Ed* 2006, 45(7):955-7959.
- [18] FENG Ke-jun, SUN Chen-hu, KANG Yan, et al. Label-free electrochemical detection of nanomolar adenosine based on target-induced aptamer displacement [J]. *Electrochemistry Communications*, 2008, 10(4):531-535.
- [19] YAN Fei, Erdem Arzum, Meric Burcu, et al. Electrochemical DNA biosensor for the detection of specific gene related to *Microcystis* species [J]. *Electrochemistry Communications* 2001, 3(5):224-228.
- [20] DING S N, XU J J, ZHANG W J, et al. Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-Zirconia-Nafion composite modified electrode applied as solid-state electrochemiluminescence detector on electrophoretic microchip for detection of pharmaceuticals of tramadol, lidocaine and ofloxacin [J]. *Talanta* 2006, 70(3):572-577.
- [21] CHENG Z L, WANG E K, YANG X R. Electrochemical impedance detection of DNA hybridization based on dendrimer modified electrode [J]. *Biosensors and Bioelectronics* 2007, 22:1716-1722.
- [22] 卢旭晓,杜霞,薛玲,等.碳纳米管和纳米氧化锌修饰的尿酸传感器的研制[J].*云南大学学报:自然科学版* 2007, 29(S1):216-221.

2005 23(4):152-161.

[11] Gabriela Chiosis ,Henri Huezo ,Neal Rosen ,et al. 17AAG:Low target binding affinity and potent cell activity – finding an explanation [ J ]. Mol Cancer Ther , 2003 2:123-129.

[12] LU xu ,Julie L Eiseman ,Merrill J Egorin ,et al. Physiologically – based pharmacokinetics and molecular phar-

macodynamics of 17 – (allylamino) – 17 – demethoxy-geldanamycin and its active metabolite in tumor – bearing mice [ J ]. J. Pharmacokinet Pharmacodyn 2003:30 (3):185-219.

[13] Len Neckers. Heat shock protein 90:the cancer chaperone [ J ]. J Biosci 2007:32(3):517-530.

## Hsp90 inhibitor ,17 – AAG ,abrogates breast cancer cells growth through EGFR and IGFR – 1 pathway

FENG Wei-yang<sup>1</sup> , ZHAO Xi-long<sup>2</sup> , HUANG You-guang<sup>1,3</sup> , LI Shu-de<sup>1</sup> , LI Yi-jin<sup>1</sup>

( 1. Faculty of Basic Medicine Science ,Kunming Medical University Kunming 650032 ,China;  
 2. Kunming General Hospital of PLA ,Kunming 650032 ,China;  
 3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100039 ,China)

**Abstract:**17 – (demethoxy) ,17 – allylamino geldanamycin (17 – AAG) suppresses growth in some cancers by inhibiting Heat shock protein 90 (Hsp90). We examined in vitro the effects of 17 – AAG mediated Hsp90 inhibition on human breast cancer cell lines ,MDA – MB – 231 and BT474. Cell viabilities were determined by SRB method to account IC<sub>50</sub>; EGFR ,IGFR – 1 and G2/M cell cycle checkpoint proteins cdc2 were examined by Western blotting to determine the pathway of the roles of 17 – AAG in breast cancers. We found that MDA – MB – 231 and BT474 treated with 17 – AAG versus untreated controls showed decreased cell viability. Cells treated with 17 – AAG also showed a decrease in EGFR ,IGFR – 1. The results suggest that 17 – AAG could obviously abrogate MDA – MB – 231 and BT474 cell growth and facilitate the two cell lines apoptosis through EGFR and IGFR – 1 pathway.

**Key words:**breast cancer;Hsp90;17 – AAG

\*\*\*\*\*

(上接第 91 页)

## The preparation of electrochemical cocaine aptamer sensor

HUA Mei ,XU Feng ,XU Quan-qing ,TAN Lin ,YANG Guang-ming ,TAO Mang-lan ,YANG Yun-hui

(Chemistry and Chemical Engineering College ,Yunnan Normal University ,Kunming 650092 ,China)

**Abstract:**In this paper ,capture DNA probe with mercapto – group was immobilized on a surface of gold electrode via self – assembly. Then ,cocaine aptamer biosensor was constructed by immobilization of cocaine aptamer on the electrode through hybridization. Using tris (2,2' – bipyridyl) dichlororuthenium ( II ) hexahydrate as electroactive indicator ,the quantitative determination of cocaine was carried out ,based on the decrease of electrical signal of tris (2,2' – bipyridyl) dichlororuthenium ( II ) hexahydrate after the combination of aptamer with target cocaine. The effects of scan rates ,pH ,the immobilizing time of capture probe and aptamer on the signal were investigated. The results showed that the biosensor exhibits linear response to cocaine in the range of  $2 \times 10^{-4}$ — $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L with a detection limit of  $6 \times 10^{-5}$  mol/L. The biosensor has some advantages ,such as high stability and specificity. This sensor has been used to determine cocaine in a real serum sample.

**Key words:**electrochemistry ;cocaine ;aptamersensor ;Tris(2,2' – bipyridyl) dichlororuthenium ( II ) hexahydrate