高等学校化学学报
CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES
综合评述

# 基于纳米电极的单细胞内生物分子电化学分析

刘　康，潘荣容，江德臣
（南京大学化学化工学院，生命分析化学国家重点实验室，南京 210092）

**摘要**　单细胞分析能够更加精准地获取生物学信息，避免因平均化分析而丢失单细胞异质性特征，这对于研究阐明细胞代谢和信号通路至关重要．基于纳米电极的电化学分析技术因其高选择性、高灵敏度和高时空分辨率的优点而被广泛用于单细胞分析．本文综合评述了利用纳米电极对单细胞内部生物分子进行定量分析的最新研究进展，介绍了其在生物学研究中的应用，并对该领域面临的问题和未来发展进行了总结与展望．

**关键词**　单细胞；单细胞器；生物分子；电化学分析；纳米电极
**中图分类号**　O657　　**文献标志码**　A　　doi: 10.7503/cjcu20240027

# Electrochemical Analysis of Intracellular Molecules at Single Cells Based on Nanoelectrodes

LIU Kang, PAN Rongrong, JIANG Dechen*
(*State Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science*, *School of Chemistry and Chemical Engineering*, *Nanjing University*, *Nanjing* 210092, *China*)

**Abstract**　Single-cell analysis enables more accurate acquisition of biological information and avoids the loss of single-cell heterogeneity features from averaging analysis, which is essential for studies to elucidate cell metabolism and signaling pathways. Electrochemical analysis techniques based on nanoelectrodes are widely used in single-cell analysis because of their high selectivity, high sensitivity and high spatiotemporal resolution. In this review, the latest research progress of the quantitative analysis of intracellular biomolecules in single cells using nanoelectrodes is reviewed. Moreover, its application in biological research and the challenges are introduced.

**Keywords**　Single cell; Single organelle; Biomolecule; Electrochemistry; Nanoelectrode

## 1　引　　言

细胞是生物体结构和功能的基本单位[1]．针对细胞开展分析是生命科学、诊断学和制药工业等领域的基础[2,3]．传统的细胞研究方法大多基于细胞群体的平均测量建立，能够识别复杂代谢、信号和转录网络中的成分和相互作用．虽然针对细胞群体的测量可以简洁地获取研究对象的总体状态[4]，但这些方法均假定某一类型的细胞在生物功能上完全相同．近年来，研究结果表明，同一类型细胞群体中的单个细胞之间存在显著差异．这种差异在胚胎发育、细胞分化和疾病进展的生理过程中起重要作用．因此，只有在单细胞水平开展精细化研究，才能够更加精准地获取生物学信息，避免因平均化分析而丢失单细胞异质性特征，这对于研究阐明细胞代谢和信号通路至关重要[5~9]．

收稿日期: 2024-01-17. 网络首发日期: 2024-03-12.
基金项目：国家杰出青年科学基金(批准号：22025403)资助．
联系人简介：江德臣，男，博士，教授，主要从事单细胞电化学分析方面的研究．E-mail: dechenjiang@nju.edu.cn
Supported by the National Science Fund for Distinguished Young Scholars, China(No.22025403).

虽然单细胞分析意义重大，但微米级别的单个活细胞尺寸小，且具有内部成分复杂、目标分子含量低和动力学过程复杂的特点，因此在单细胞水平进行研究极具挑战．从分析方法的角度来说，单细胞检测技术需要具有高选择性、高灵敏度和高时空分辨率的优点．同时，研究方法需要尽量避免对单个活细胞的侵袭性检测，以保证检测结果的准确性[10]．在过去的几十年中，多种检测技术被用于单个活细胞的分析．荧光成像技术是单细胞分析最主要的手段，其利用荧光探针与细胞内目标生物分子结合后荧光强度或者光谱的变化获取待测分子的相关信息[11~14]．超分辨荧光显微镜的问世有效解决了光学成像的衍射极限问题，更高空间分辨率(10 nm)的单细胞荧光成像使得亚细胞研究成为可能[15~17]．然而，该技术很难实现高时间和高空间分辨共存的单细胞成像分析，且荧光探针标记会对细胞的生理活性产生影响．

基于纳米电极的电化学分析方法兼具高时间和高空间分辨检测能力，可对单个活细胞进行高时空分辨分析．当纳米电极扎入单个活细胞内部，胞内生物分子会在电极表面发生电化学氧化还原反应，产生相应的电化学信号．由于纳米电极尺寸可小至10 nm，故该技术的空间识别能力强，对待测细胞的活性影响较小[18]．加之，纳米电极表面物质扩散传输效率极高，使其具有高时间分辨分析单细胞的能力[19]．若将纳米电极置于距单个活细胞数微米处，还可以检测到活细胞外排的内源性分子[20,21]．由于前期已经有大量综述总结了单细胞外电化学检测，因此本文将仅对单细胞内电化学检测进行探讨，分析各种电化学分析方法的基本原理和检测过程．

本文将从3个方面对基于纳米电极的单细胞检测相关研究进行综述．第一部分是单细胞质的电化学检测，即将纳米电极扎入单细胞中，对胞浆中游离的电活性和非电活性分子进行检测；第二部分是基于碰撞的细胞内单囊泡分析，即将纳米电极扎入细胞质中，对细胞中的囊泡碰撞到电极表面后释放的电活性分子进行电化学检测；第三部分是细胞内单细胞器捕获及电化学分析，即通过提高纳米电极的精准定位能力，对细胞中特定的单个细胞器进行捕获，以实现对单个细胞器的电化学检测．本文系统总结了纳米电极在单细胞内的电化学检测技术，旨在为构建新型单细胞电化学检测方法、拓展电化学技术应用领域提供新思路．

## 2　基于纳米电极的单细胞电化学检测

单细胞电化学分析装置通常包括功能化纳米电极、荧光显微镜、三维显微操作平台及电化学工作站．在对单个细胞内部生物分子进行研究时，大多需将待测细胞培养至贴壁状态，并将培养基替换为缓冲溶液以降低电流噪音．随后，在显微镜视野下寻找单个活细胞，通过三维显微操作平台将纳米电极针尖移动至细胞附近．最后，将纳米电极扎入活细胞中，进行电化学相关检测．相比于检测细胞外排生物分子，这种分析方法具有较高的时空分辨率，可以检测细胞内多种生物分子．

为了实现单个活细胞内生物分子的电化学分析，Mirkin等[22]率先利用直径约20 nm的铂纳米电极和扫描电化学显微镜(SECM)技术，将纳米电极定位至单个活细胞中，对细胞中的氧化还原物质进行了检测(图1)．由于电极尖端的半径比细胞小了约1000倍，因此电极可以穿透细胞膜并在细胞质中移动，不会明显损坏细胞膜．通过这种方式，确定了活细胞膜上的电荷转移速率，评估了膜电位，并以纳米级的分辨率测量了细胞中的氧化还原性质．该工作首次将纳米电极用于研究活细胞内电活性生物分子的性质，为单细胞电化学检测开创了重要的研究方向．

氧化应激是重要的致癌因子．它包括细胞内产生的高水平活性氧/活性氮(ROS/RNS)，具体包括过氧化氢($H_2O_2$)、过氧亚硝酸盐($ONOO^-$)、一氧化氮(NO)和亚硝酸盐离子($NO_2^-$)．为了对正常细胞和癌细胞中ROS/RNS的确切性质和含量进行表征，Mirkin等[23]开发了一种镀铂碳纳米电极，并在电极上施加4种特定脉冲电压，分别提取单个活细胞ROS/RNS 4种组分的电化学信号[图2(A)和(B)]．利用该检测技术，对未癌变的正常乳腺细胞(MCF-10A)和转移性癌细胞(MDA-MB-231和MDA-MB-468)的ROS/RNS分子进行了电化学检测．实验结果显示，在癌细胞中会以连续爆发的形式产生大量的RNS．在未癌变的正常乳腺细胞中，ROS/RNS浓度极低而无法测量．然而，在用DAG-内酯处理细胞以激活蛋

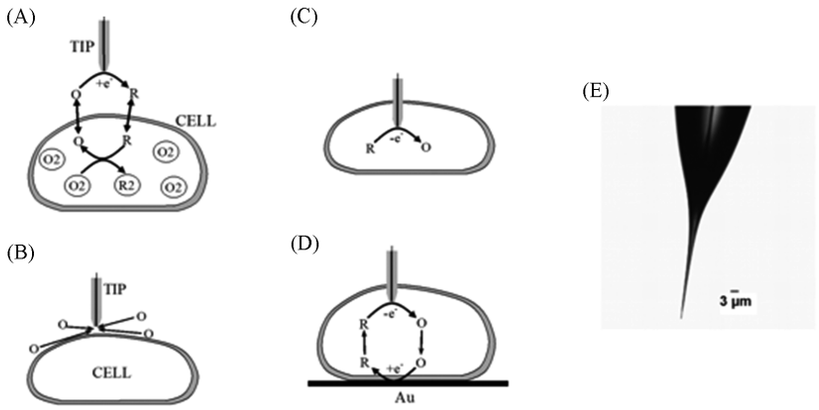



**Fig. 1 Schematic diagrams of the SECM experiments with single cells(A—D) and an optical micrograph of a typical nanotip used in such experiments(E)[22]**

(A) The tip is positioned in the solution close to the cell surface. Positive feedback is due to bimolecular electron transfer between hydrophobic redox mediator (O/R) and cell-bound redox moieties (O2/R2); (B) the lipid cell membrane is impermeable for a hydrophilic redox mediator. Negative feedback is due to the hindered diffusion of redox species to the tip electrode; (C) nanoelectrode voltammetry inside the cell; (D) positive feedback is produced by mediator regeneration by way of electron transfer at the underlying Au surface.

Copyright 2008, National Academy of Science.

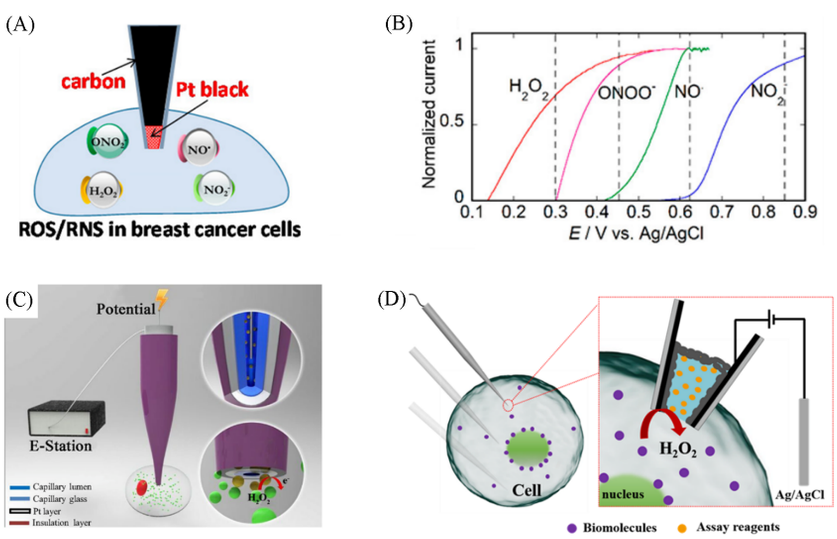



**Fig. 2 Detection of electroactive(A, B) and non-electroactive(C, D) molecules in single cell**

(A) Intracellular detection of ROS/RNS; (B) normalized oxidation voltammograms of $H_2O_2$ (red curve, 1 mmol/L, pH≈7.4), $ONOO^-$(purple curve, 1 mmol/L, pH≈10), NO·(green curve, 1 mmol/L of NO· DEA-NONoate donor, pH≈7.4), and $NO_2^-$(blue curve, 1 mmol/L, pH≈7.4). Voltammograms were recorded at different platinized tips with $a$≈100 nm and normalized by their plateau currents. Vertical dashed lines indicate optimal detection potentials for each ROS/RNS species(B)[23]; (C) schematic of the nanokit used for the single-cell electrochemical analysis[30]; (D) the schematic liquid-phase modified nanopipette for the detection of intracellular molecules in one living cell. The black and silver regions at the inner surface of nanopipette are carbon and Pt layers, respectively[31].

(A, B) Copyright 2017, American Chemical Society; (C) Copyright 2016, National Academy of Science; (D) Copyright 2023, Chinese Chemical Society.

白激酶(PKC)后，正常细胞内出现了强烈的氧化爆发. 以上结果表明，癌细胞内ROS/RNS的产生与其转移活性有关；而PKC与细胞内氧化应激之间存在一定联系. 该工作进一步发展了活细胞内ROS/RNS电化学检测技术，通过施加不同的电压来区分ROS/RNS中的不同组分；并以此在单细胞水平阐述了细

胞内氧化应激与疾病的关系，具有重要的化学生物学意义.

在此基础上，本课题组[24]开发了一种高灵敏度的含限域空间的铂碳纳米电极. 纳米腔的存在使得ROS在铂(Pt)表面产生更频繁的碰撞，加速电子转移，从而将检测极限降低到1 nmol/L. 利用该电极研究了CT 26细胞三维模型中3个区域(增殖区、静止区和坏死核心)的ROS，发现3D癌细胞模型中氧化应激与二维(2D)细胞中观察到的现象明显不同. 这一发现为2D和3D细胞代谢的差异性提供了直接证据，并可以开拓细胞电化学分析的研究方向，在生命研究中获得更多真实分子信息.

除了以上电化学分析方法，研究人员还通过开发各种电极和检测方法对细胞质中游离的ROS/RNS进行研究. Amatore等[25]通过在纳米腔电极中进行电化学镀铂，制备了半径约80 nm的铂纳米电极，对单个活巨噬细胞中ROS/RNS进行了检测. Zhang等[26]采用高选择性和稳定性的普鲁士蓝(PB)和聚乙烯二氧噻吩(PEDOT)改性碳纤维纳米电极，实时监测单个SH-SY5Y活细胞中$H_2O_2$的动态变化. Huang等[27,28]提出了一种简单而通用的策略合成仿生分子催化剂(BMCs)功能化纳米线，以构建一系列用于活细胞内电化学检测的纳米传感器. 该方法将不同的BMC-PEDOT复合材料组装在导电纳米线上，BMC固有的催化活性与导电聚合物优异的电子转移能力相结合，使纳米传感器能够高灵敏和高选择性地检测各种生物分子. 应用磺化钴酞菁功能化纳米传感器，该工作实现了单个活细胞内谷胱甘肽(GSH)水平及其氧化还原稳态的实时电化学监测. 作者将磺化钴酞菁功能化纳米线与铂纳米线结合，开发出一种新型双线纳米传感器(DWNS)，并将其应用于同步监测单个活细胞中瞬时ROS的生产以及GSH系统的快速抗氧化过程. 同步检测结果表明，GPX1酶作为GSH抗氧化系统的一员，可以在亚秒时间尺度内快速启动，并参与MCF-7细胞中白藜芦醇(RSV)诱导的ROS消除过程. 然而，这种ROS消除过程是短暂的，只持续几秒钟，剩余的ROS留在细胞中，并被其它抗氧化系统消除[29].

随着对细胞生物学更加深入的理解，人们对单细胞电化学检测技术有了更高的要求，需要实现单细胞中非电活性分子(核酸、蛋白、脂质等)的检测. 本课题组[30]开发了一种包含生物检测试剂盒的纳米毛细管电极. 通过对毛细管外层镀铂并进行绝缘处理，可在毛细管尖端保留环状的铂检测区域. 纳米毛细管中空的结构使得液态试剂盒组分可以保留在其中[图2(C)]. 当纳米电极扎入活细胞后，对毛细管内银丝施加一定电压以启动电化学泵，使管内飞升量级的试剂盒组分泵入细胞中并与目标分子或酶发生反应. 副产物$H_2O_2$在铂环上发生电化学氧化，产生额外的电荷以进行定量分析. 通过这种技术，分别将葡萄糖氧化酶和鞘磷脂酶活性检测试剂盒引入纳米毛细管电极，实现在单个J774细胞中检测葡萄糖含量和鞘磷脂酶(SMase)活性. 该纳米试剂盒策略可以将各种生物试剂盒组分保留在毛细管内并保持其活性，对添加的生化试剂数量没有限制，可极大地扩展单细胞电化学分析对非电活性分子的检测范围. 在更进一步的工作中，我们[31]利用铂碳纳米毛细管电极尖端的表面张力固定液态试剂盒层于电极表面，实现70 nm空间分辨率的单个活细胞中生物分子的实时定量分析[图2(D)]. 利用高空间分辨率和实时定量分析的优势，揭示了神经鞘磷脂酶在单个活CT 26细胞中的不均匀分布. 这一新型的液态酶修饰策略将为电化学传感器的设计开辟了新的方向.

单细胞中RNA表达的信息有助于人们了解疾病发生的遗传调控回路和分子机制. 为了对单个活细胞中的RNA进行表征，Xu等[32,33]将纳米毛细管的离子电流整流特性与双特异性核酸酶辅助杂交链反应相结合，开发了一种简单实用的细胞内纳米传感器. 作者在纳米毛细管内壁修饰DNA发夹，特异性识别并捕获目标RNA，形成双碱基错配DNA双相. DNA发夹识别捕获的过程可以提高毛细管内壁表面的负电荷密度，导致离子通过纳米孔的离子电流整流(ICR)响应发生显著变化. 利用该纳米电极，实现了对非恶性乳腺癌细胞、转移性乳腺癌细胞和非转移性乳腺癌细胞中致癌miR-10b表达水平分化的系统研究，并评估了不同药物的效果. 随后，该课题组[34]将这种纳米传感器与光电化学结合，进一步提高信噪比，在单个细胞水平揭示了正常乳腺MCF-10A和肿瘤MCF-7细胞中miR-21水平的差异. 这种电化学方法提供了一个通用且可扩展的电化学平台来检测细胞内核酸分子. 除了以上研究工作外，研究者们还在设计更多的功能化修饰纳米电极，优化电化学检测灵敏度及检测极限，实现了对单细胞中更多分子(如ATP、蛋白激酶和细胞色素c等生物分子)的检测[35~39].

## 3 基于碰撞检测的单细胞生物囊泡分析

囊泡是生物细胞内重要的分子传递介质. 生物体内电信号转化为化学信号的信号转导和神经元通信是通过胞吐作用这一基本过程进行的. 对囊泡的运输过程及其内部化学分子进行研究有助于深入理解细胞通讯机制. 在胞吐过程中, 动作电位触发充满神经递质的囊泡与细胞膜融合, 并将这些分子释放到细胞外环境; 而在静息阶段, 神经递质被储存在大小形状基本一致的突触囊泡中.

为了实现活细胞内囊泡中神经递质分析, Ewing等[40]开发出一种基于碳纳米电极的细胞内囊泡冲击电化学细胞术(IVIEC). 该研究利用火焰刻蚀碳纤维尖端的策略开发了一种尖端直径50~100 nm的锥形电极, 该电极具有良好的电化学特性, 在0.1 mmol/L的多巴胺中观察到约1.5~2.5 nA的极限电流平台. 长锥形的锥度和较小的尖端直径使得纳米电极可以扎入细胞膜内, 而不会对细胞造成明显损伤. 细胞质内的囊泡可以吸附到电极表面, 随后破裂释放出其中的神经递质被电化学氧化用于定量分析. 该课题组用这种技术测量了单个PC12细胞中囊泡神经递质的含量, 发现只有一小部分神经递质会在胞吐过程中被释放. 而在正常的胞吐过程中, 囊泡并没有完全打开, 从而导致囊泡内容物的不完全排出. 单细胞安培法(SCA)是一种高时间分辨率的电化学检测方法[41]. 纳米电极被置于单个活细胞细胞膜附近, 胞吐过程中被外泄的神经递质在电极上被氧化. 通过分析由此产生的电流信号, 可以获得关于胞吐过程中递质释放量和形成融合孔的定量和动态信息. 为了更全面的理解神经递质释放的基本原理和过程, 该课题组将此方法结合单细胞安培法, 用以研究囊泡神经递质从细胞内到胞吐至细胞外的全过程. 利用IVIEC和SCA, 结合钙成像技术, 该课题组[42]研究了短间隔重复刺激对模型细胞系胞吐和囊泡含量的影响(图3). 研究发现, 以$K^+$离子对细胞进行短时间的重复刺激会导致细胞内钙水平显著下降, 从而导致细胞的囊泡分泌减少; 而每个囊泡释放的儿茶酚胺量增加. 储存在单个囊泡内的总神经递质含量在几次刺激后减少, 导致释放分数增加. 该工作结合IVIEC和SCA, 在单细胞水平研究了重复刺激对纳米囊泡含量和递质释放比例的影响, 揭示了胞吐作用的可塑性机制, 为神经生理学的单细胞电化学研究开创了重要的技术[43~54].

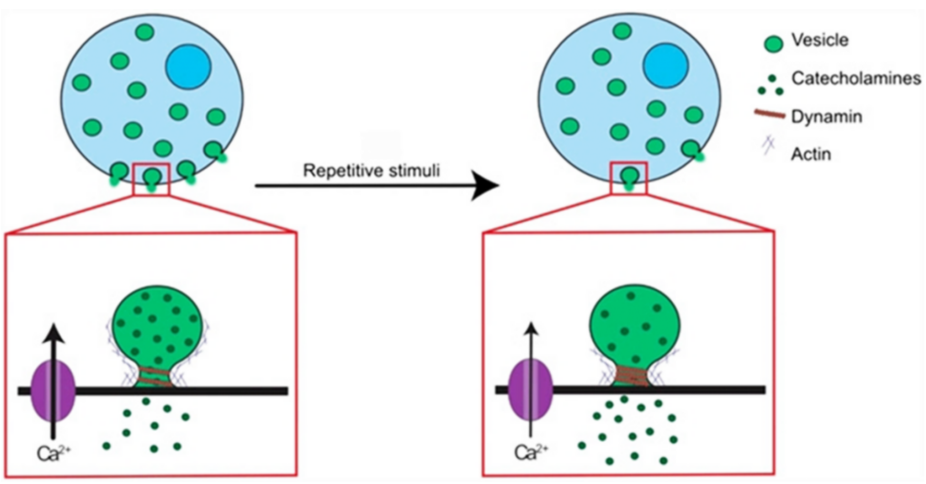



**Fig. 3 Scheme proposed for the effect of repetitive stimuli on cells and vesicles[42]**

Copyright 2019, National Academy of Science.

Huang等[55]利用直径约300~500 nm的碳化硅核-壳(SiC@C)圆柱形纳米线电极, 定量检测了活巨噬细胞内吞噬溶酶体中ROS/RNS分子. 为了能够对ROS/RNS分子进行定量分析, 他们采用电化学方法在纳米线针尖修饰Pt颗粒(Pt-SiC@C). 该电极具有优异机械韧性和由超薄碳壳提供的优异电化学性能, 拥有亚毫秒尺度时间分辨率, 且对$H_2O_2$的检出限低至100 μmol/L(图4). 当该电极被置于细胞中时, 根据囊泡冲击电化学细胞术(IVIEC)的原理, 类似囊泡结构的溶酶体碰撞至电极表面, 其单层膜结构被电极上施加的电压所击穿, 内部的待测分子随即释放出来, 在电极表面发生氧化反应而被电化学

检测[56~58]. 利用这种技术，该课题组[59]定量测量了活体巨噬细胞吞噬溶酶体中的ROS/RNS. 在后续的工作中，他们将该方法与Mirkin等[23]提出的四步计时安培法结合，研究了RAW 264.7巨噬细胞吞噬溶酶体中4种主要ROS/RNS($ONOO^-$，$H_2O_2$，NO和$NO_2^-$)的亚毫秒动力学. 研究结果表明，在持续的炎症情况下，吞噬溶酶体主要产生$ONOO^-$，NO和$NO_2^-$，产量大致相等；相比之下，$H_2O_2$产生量较少，这与一般的医学和生物学观点相反. 该结果首次揭示了当吞噬溶酶体从持续炎症状态切换到稳态状态时，NADPH氧化酶(NOX)(主要产生超氧化物离子)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)(主要产生一氧化氮)的相对活性发生了巨大变化. 这项工作中提出的电化学方法为人们深入理解细胞内溶酶体吞噬行为机制提供了可靠的手段，为单细胞电化学检测领域提供了新的思路.

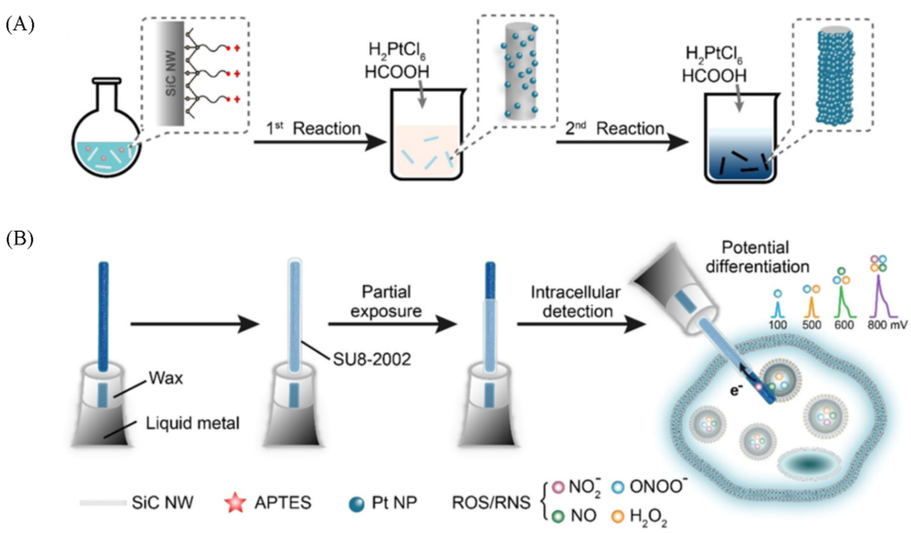



**Fig. 4 Two-step electroless plating of SiC@Pt NWs(A) and mounting a SiC@Pt NW at the tip of a nanopipette for intracellular differential measurement of four primary ROS/RNS ($ONOO^-$, $H_2O_2$, NO and $NO_2^-$) at four different electrochemical potentials(B)[59]**

Copyright 2022, American Chemical Society.

在该研究领域中，Mirkin等[60,61]构建了一种电阻脉冲-电化学分析方法. 他们通过化学气相沉积将碳镀在纳米毛细管内壁，制成了一种内壁导电、外壁绝缘的碳纳米毛细管电极. 溶液中的脂质体囊泡穿过纳米毛细管的尖端进入管内时，会阻碍针尖碳表面上的电化学反应，产生电流下降信号. 当该脂质体与碳纳米毛细管(CNP)电极内壁的碳表面发生碰撞时，会释放其中的电活性物质. 该物质会在电极表面发生电化学反应，产生上升的法拉第电流信号. 分析该信号可以推算出释放的分子数量. 这种新技术不仅能够对脂质体囊泡进行计数，还可以对单个脂质体中的电活性分子进行定性和定量分析. 他们将该电极与SECM技术结合，在单个活细胞中完成了高空间分辨的电化学检测实验. 该工作不仅实现了单个活细胞中多巴胺、ROS/RNS等电活性物质的高灵敏度检测，还通过在不同电位下进行随时间变化的定量安培测量，确定了细胞质囊泡中4种关键ROS/RNS的相对浓度及其动态变化，阐明了未转化和转移的人乳腺细胞中ROS/RNS的化学来源和生成速率. 该方法为亚细胞水平采样和对其中重要生物分子的分析提供了重要的技术手段.

## 4 细胞内单细胞器捕获及电化学分析

在单细胞器水平进行动态分析是精细化理解细胞活动的重要手段. 鉴于目前大多采用破碎细胞提取细胞器进行研究的策略无法在单细胞器水平获得其异质性和空间信息，因此，精准测定单细胞器中分子的化学信息也是分析化学领域的重要难题之一.

本课题组[62]开发了一种内置电化学检测器的纳米毛细管电极，实现了对活细胞内单个溶酶体的提取及其酶活性的电化学分析. 在毛细管尖端内侧设计一个超微电化学检测表面，并将β-葡萄糖苷酶试

剂盒组分装载到管内[图5(A)]. 利用毛细管内的电渗流将活细胞内的单个溶酶体抽取到管中，溶酶体内特有的β-葡萄糖苷酶会与管内试剂盒组分发生酶催化反应，产生$H_2O_2$从而用于确定β-葡萄糖苷酶的活性. 通过这种技术，可对同一个细胞内的多个溶酶体进行逐个取样和检测，发现同一个细胞内不同溶酶体之间的酶活性具有均质性；而对多个同种细胞内单个溶酶体进行逐个取样和检测时，发现不同个细胞间单个溶酶体中酶活性具有异质性. 这种能够对靶向细胞器内酶活性进行分析的方法，可直接用于研究亚细胞水平上酶的活性和分布情况，并为亚细胞水平分子的均/异质性提供科学数据.

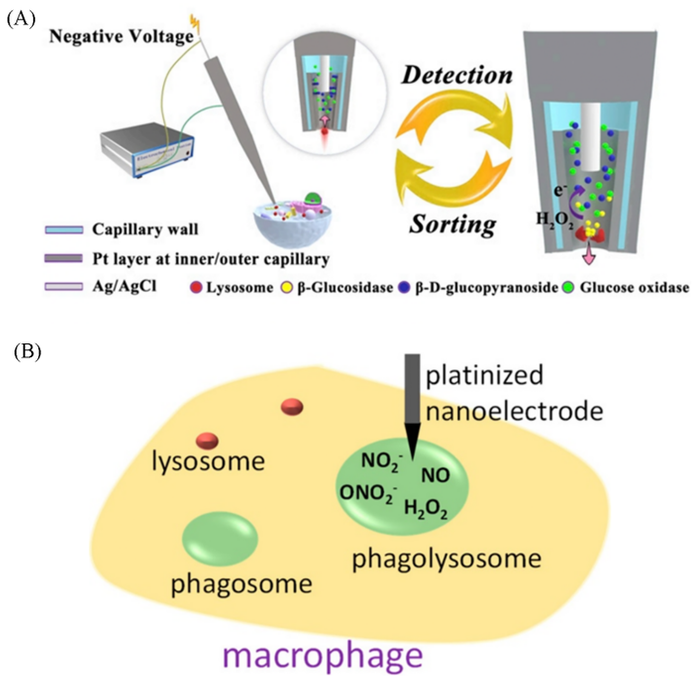



**Fig. 5　Detection of single organelle based on nanoelectrodes**

(A) Scheme of electrochemical setup for the detection of glucosidase activity in isolated single lysosomes from a single cell. The capillary coated with a Pt layer(dark shading) and an Ag/AgCl wire(light shading) inserted in the capillary is connected with an electrochemical station. Circle: amplified view of capillary tip with a Pt layer at the edge of the inner surface and the outer surface of the capillary to sort one lysosome(labeled in red). The arrow exhibits the flow direction of buffer with the lysosome. Crosssection view is used to illustrate Pt layer at the inner capillary and kit reaction. (Right) Displaying the release of glucosidase after the lysis of lysosome, the generation of hydrogen peroxide from kit reactions and the following electrochemical detection of hydrogen peroxide at the tip(dark shading). The arrow exhibits the flow direction of previously loaded glucosidase and generated reaction debris outside the capillary[62]; (B) phagolysosome penetration with a 65 nm radius platinized nanotip[63]. (A) Copyright 2018, National Academy of Science; (B) Copyright 2019, American Chemical Society.

为了对单个细胞器进行检测，Mirkin等[63]使用IFN-γ/LPS刺激RAW 264.7巨噬细胞，模拟体内刺激激活，将细胞中的溶酶体涨大. 随后，他们利用铂化碳纳米电极对细胞内单个吞噬溶酶体中ROS/RNS($ONOO^-$，$H_2O_2$，NO和$NO_2^-$)4种分子的生成速率进行检测、表征和定量分析[图5(B)]. 通过四步计时安培法监测单个吞噬溶酶体中4种主要ROS/RNS的时间依赖性浓度，证明了其产生率的高度可变性. 这种内在的可变性揭示了吞噬作用的复杂性.

为了进一步提高单细胞器分析的空间分辨率和原位检测能力，在之前溶酶体提取检测的工作基础上，本课题组[64]基于点击化学的高效性设计了一种尖端带有二苯并环辛炔的新型纳米电极，以实现与含有叠氮基三苯基膦的线粒体膜的靶向快速结合. 单个线粒体在纳米电极尖端的共价结合使得膜的一小部分被隔离在玻璃毛细管电极内. 因此，线粒体中活性氧(ROS)的释放将被毛细管内部铂表面电化学氧化和检测，不受胞质中其它物质的干扰. 对单线粒体释放ROS的动态跟踪揭示了线粒体内独特的“ROS诱导ROS释放”机制. 使用纳米电极对RSL3诱导的铁死亡进行了的研究，结果表明线粒体中的谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)不参与RSL3诱导的ROS生成过程. 这一策略克服了复杂细胞内环境中

单个特殊细胞器动态测量的现有挑战，为亚细胞分析领域中的电分析方法开辟了新方向.

## 5 总结与展望

近年来迅猛发展的微/纳米电极技术为单细胞电化学检测领域带来了许多新的可能，使传统的单细胞外检测发展至单细胞内检测，能够被检测的分子种类越来越多，时空分辨率也不断提升. 然而仍然有许多挑战需要应对，如：如何在获取单细胞信息的同时提高检测通量；如何进一步扩充单细胞电化学检测物质种类，以获取更加多元化的细胞内信息；如何缩短单个活细胞内纳米电化学测量所需的时间，降低电极表面电化学氧化对待测物质的消耗等. 随着研究的进一步深入和新兴材料的研发与多学科的交叉融合，以上这些问题必将被解决，从而促进单细胞微/纳米电极电化学检测技术，为生物检测和医学科学等领域的发展提供助力.

## 参 考 文 献

[1] Yang Q., Huang X., Gao B., Gao L., Yu F., Wang F., *Analyst*, **2022**, *148*(1), 9—25
[2] Dittrich P. S., Tachikawa K., Manz A., *Anal. Chem.*, **2006**, *78*(12), 3887—3908
[3] El-Ali J., Sorger P. K., Jensen K. F., *Nature*, **2006**, *442*(7101), 403—411
[4] Altschuler S. J., Wu L. F., *Cell*, **2010**, *141*(4), 559—563
[5] Shoemaker G. K., Lorieau J., Lau L. H., Gillmor C. S., Palcic M. M., *Anal. Chem.*, **2005**, *77*(10), 3132—31327
[6] Oh-hora M., *Immunol. Rev.*, **2009**, *231*(1), 210—224
[7] Colman-Lerner A., Gordon A., Serra E., Chin T., Resnekov O., Endy D., Pesce C. G., Brent R., *Nature*, **2005**, *437*(7059), 699—706
[8] Spiller D. G., Wood C. D., Rand D. A., White M. R., *Nature*, **2010**, *465*(7299), 736—745
[9] Ferrell J. E., Machleder E. M. Jr., *Science*, **1998**, *280*(5365), 895—898
[10] Coralli C., Cemazar M., Kanthou C., Tozer G. M., Dachs G. U., *Cancer Res.*, **2001**, *61*(12), 4784—4790
[11] Cohen D., Dickerson J. A., Whitmore C. D., Turner E. H., Palcic M. M., Hindsgaul O., Dovichi N. J., *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif)*, **2008**, *1*, 165—190
[12] Thompson M. A., Lew M. D., Moerner W. E., *Annu. Rev. Biophys.*, **2012**, *41*, 321—342
[13] Prabhakar A., Puglisi E. V., Puglisi J. D., *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **2019**, *11*(1), a032714
[14] Sengupta B., Chaudhuri A., Das N., Sen P., *Protein Pept. Lett.*, **2017**, *24*(11), 1073—1081
[15] Xu K., Babcock H. P., Zhuang X., *Nat. Methods*, **2012**, *9*(2), 185—188
[16] Huang B., Bates M., Zhuang X., *Annu. Rev. Biochem.*, **2009**, *78*, 993—1016
[17] Betzig E., Patterson G. H., Sougrat R., Lindwasser O. W., Olenych S., Bonifacino J. S., Davidson M. W., Lippincott-Schwartz J., Hess H. F., *Science*, **2006**, *313*(5793), 1642—1645
[18] Adams K. L., Puchades M., Ewing A. G., *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif)*, **2008**, *1*, 329
[19] Forster R. J., *Chemical Society Reviews*, **1994**, *23*(4), 289—297
[20] Sulzer D., Pothos E. N., *Rev. Neurosci.*, **2000**, *11*(2/3), 159—212
[21] Amatore C., Arbault S., Guille M., Lemaître F., *Chem. Rev.*, **2008**, *108*(7), 2585—2621
[22] Sun P., Laforge F. O., Abeyweera T. P., Rotenberg S. A., Carpino J., Mirkin M. V., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2008**, *105*(2), 443—448
[23] Li Y., Hu K., Yu Y., Rotenberg S. A., Amatore C., Mirkin M. V., *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*(37), 13055—13062
[24] Liu K., Liu R., Wang D., Pan R., Chen H. Y., Jiang D., *Anal. Chem.*, **2022**, *94*(38), 13287—13292
[25] Wang Y., Noël J. M., Velmurugan J., Nogala W., Mirkin M. V., Lu C., Guille Collignon M., Lemaître F., Amatore C., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2012**, *109*(29), 11534—11539
[26] Zhang S., Qin H., Cheng S., Zhang Y., Gao N., Zhang M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, *62*(16), e202300083
[27] Wu W. T., Jiang H., Qi Y. T., Fan W. T., Yan J., Liu Y. L., Huang W. H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*(35), 19337—19343
[28] Wu W. T., Chen X., Jiao Y. T., Fan W. T., Liu Y. L., Huang W. H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, *61*(15), e202115820
[29] Jiao Y. T., Kang Y. R., Wen M. Y., Wu H. Q., Zhang X. W., Huang W. H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, *62*(51), e202313612
[30] Pan R., Xu M., Jiang D., Burgess J. D., Chen H. Y., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2016**, *113*(41), 11436—11440
[31] Liu K., Liu R., Wang D., Pan R., Chen H. Y., Jiang D., *CCS Chem.*, **2023**, *5*(6), 1285—1292
[32] Wang H. Y., Ruan Y. F., Zhu L. B., Shi X. M., Zhao W. W., Chen H. Y., Xu J. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*(24), 13244—13250
[33] Shi X. M., Xu Y. T., Wang B., Li Z., Yu S. Y., Dong H., Zhao W. W., Jiang D., Chen H. Y., Xu J. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, *62*(29), e202302930
[34] Wang H. Y., Xu Y. T., Wang B., Yu S. Y., Shi X. M., Zhao W. W., Jiang D., Chen H. Y., Xu J. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, *61*(47), e202212752

[35] Zheng J., Li X., Wang K., Song J., Qi H., *Anal. Chem.*, **2020**, *92*(16), 10940—10945
[36] Zhang H., Zhao T., Huang P., Wang Q., Tang H., Chu X., Jiang J., *ACS Nano*, **2022**, *16*(4), 5752—5763
[37] Marquitan M., Ruff A., Bramini M., Herlitze S., Mark M. D., Schuhmann W., *Bioelectrochemistry*, **2020**, *133*, 107487
[38] Huang F., Lin M., Duan R., Lou X., Xia F., Willner I., *Nano Lett.*, **2018**, *18*(8), 5116—5123
[39] Duan Z., Ouyang Y., Fu Y., Huang F., Xia F., Willner I., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, *62*(18), e202301476
[40] Li X., Majdi S., Dunevall J., Fathali H., Ewing A. G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*(41), 11978—11982
[41] Ren L., Pour M. D., Majdi S., Li X., Malmberg P., Ewing A. G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*(18), 4970—4975
[42] Zhu W., Gu C., Dunevall J., Ren L., Zhou X., Ewing A. G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, *58*(13), 4238—4242
[43] Wang Y., Gu C., Patel B. A., Ewing A. G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*(44), 23552—23556
[44] Wang Y., Gu C., Ewing A. G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, *61*(20), e202200716
[45] Larsson A., Majdi S., Oleinick A., Svir I., Dunevall J., Amatore C., Ewing A. G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *59*(17), 6711—6714
[46] Hu K., Relton E., Locker N., Phan N. T. N., Ewing A. G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*(28), 15302—15306
[47] Hu K., Le Vo K. L., Hatamie A., Ewing A. G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, *61*(1), e202113406
[48] He X., Ewing A. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, *144*(10), 4310—4314
[49] Gu C., Larsson A., Ewing A. G., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2019**, *116*(43), 21409—21415
[50] Barut I., He X., Sener E., Sämfors S., Ewing A. G., Fletcher J. S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, *62*(15), e202217993
[51] Yue Q., Wang K., Guan M., Zhao Z., Li X., Yu P., Mao L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, *61*(14), e202117596
[52] Yue Q., Li X., Wu F., Ji W., Zhang Y., Yu P., Zhang M., Ma W., Wang M., Mao L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *59*(27), 11061—11065
[53] Wu F., Yu P., Mao L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, *62*(1), e202208872
[54] Wei S., Wu F., Liu J., Ji W., He X., Liu R., Yu P., Mao L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, *62*(52), e202315681
[55] Zhang X. W., Qiu Q. F., Jiang H., Zhang F. L., Liu Y. L., Amatore C., Huang W. H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*(42), 12997—13000
[56] Zhang X. W., Oleinick A., Jiang H., Liao Q. L., Qiu Q. F., Svir I., Liu Y. L., Amatore C., Huang W. H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, *58*(23), 7753—7756
[57] Yang X. K., Zhang F. L., Wu W. T., Tang Y., Yan J., Liu Y. L., Amatore C., Huang W. H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*(29), 15803—15808
[58] Yang X. K., Zhang F. L., Jin X. K., Jiao Y. T., Zhang X. W., Liu Y. L., Amatore C., Huang W. H., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2023**, *120*(19), e2219994120
[59] Qi Y. T., Jiang H., Wu W. T., Zhang F. L., Tian S. Y., Fan W. T., Liu Y. L., Amatore C., Huang W. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, *144*(22), 9723—9733
[60] Pan R., Hu K., Jiang D., Samuni U., Mirkin M. V., *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*(50), 19555—19559
[61] Pan R., Hu K., Jia R., Rotenberg S. A., Jiang D., Mirkin M. V., *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, *142*(12), 5778—5784
[62] Pan R., Xu M., Burgess J. D., Jiang D., Chen H. Y., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2018**, *115*(16), 4087—4092
[63] Hu K., Li Y., Rotenberg S. A., Amatore C., Mirkin M. V., *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*(11), 4564—4568
[64] Liu K., Zhang Z., Liu R., Li J. P., Jiang D., Pan R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, *62*(34), e202303053

(Ed.: N, K)