

巯基修饰单链 DNA 在纳米金薄膜电极上自组装、杂交和取向的电化学交流阻抗谱

魏旭 郝青丽* 陆路德 汪信 杨绪杰

(南京理工大学材料化学实验室 南京 210094)

摘要 利用电化学交流阻抗技术对 SH-ssDNA 在纳米金薄膜电极表面的自组装、杂交和取向进行了系统表征。探讨了 SH-ssDNA 的组装时间、浓度和链长对其自组装的影响,自组装 15 h 时电荷传递电阻 R_{ct} 最大,表面覆盖率最高;研究了 SH-ssDNA 的浓度、链长以及其与互补 DNA 的杂交方式对杂交反应的影响。结果发现,随着单链浓度的增加,杂交后 R_{ct} 的变化值逐渐降低,当 SH-ssDNA 为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时 R_{ct} 值比杂交前增加了 16%。通过对阻抗谱数据模拟和分析,表明 SH-ssDNA 以垂直竖立取向在金电极表面形成均匀致密单分子层,杂交效率与 SH-ssDNA 的覆盖率密切相关。

关键词 交流阻抗谱,SH-ssDNA,自组装,杂交,取向

中图分类号:O657.1

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2010)08-0970-08

DOI:10.3724/SP.J.1095.2010.90772

经典的 DNA 电化学生物传感器通常是由一个固定有已知序列 DNA 片断的固体电极(DNA 探针)、电活性杂交指示剂和电化学分析仪构成。通过电话性指示剂将探针 DNA 与目标 DNA 杂交反应信息转化为可检测到电化学信号,确定目标 DNA 的存在。因而,已知序列 DNA 在固体电极上的固定是构建 DNA 电化学生物传感器的关键步骤之一,DNA 探针的制备质量(取向、构造及表面密度)与 DNA 电化学生物传感器的灵敏性、选择性和稳定性具有密切的关系^[1]。

DNA 在金电极表面的固定常见有 2 种方式^[2]。一是采用含有特定官能团($-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 等)的二硫化物、硫化物和 $-\text{SH}$ 化合物先行在金电极表面自组装成单分子层(SAM),再在 SAM 上共价键合或吸附固定 DNA,制备 DNA 探针;二是利用 $\text{S}-\text{Au}$ 键将 $-\text{SH}$ 修饰单链(ss)或双链(ds)DNA 直接组装在金电极表面,随着 $-\text{SH}$ 修饰 DNA 的合成、分离和提纯技术的提高,现已成为制备 DNA 探针的常用方法之一。通常用来表征 DNA 在金电极表面固定、杂交的方法主要有循环伏安法(CV)、X 射线光电子能谱(XPS)、电化学扫描隧道显微技术(EC-STM)及表面增强拉曼光谱(SERS)^[3-4]、椭圆光度法、 ^{32}P 放射性标记法和电化学计时库仑法(CC)^[1,5]、石英晶体微天平(QCM)、原子力显微镜(AFM)和傅里叶变换红外分光光度法(FTIR)^[6-8]等方法。用电化学交流阻抗法(EIS)表征电极表面自组装单分子层及构建非标记 DNA 杂交传感器是目前流行的研究方向之一^[9-11],已广泛用于电极表面修饰层的表征^[10,12],但用 EIS 表征电极表面单分子层取向的研究未见报道。本文用电化学交流阻抗技术系统研究了 SH-ssDNA 在纳米金薄膜电极上的自组装性能、取向和杂交反应。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

实验用不同序列寡聚核苷酸购自上海生工生物工程技术有限公司,序列如下:(1)14 个碱基探针 DNA:5'-HS(CH₂)₆-GCA AAG GGT CGT AC-3';互补目标 DNA:5'-GTA CGA CCC TTT GC-3';(2)36 个碱基探针 DNA:5'-HS(CH₂)₆-TCC CCC GGG CTG CAG GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC-3';互补目标 DNA 链:5'-GAT AAG CTT GAT ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GGA-3';(3)80 个碱基探针 DNA:

2009-11-12 收稿,2009-12-30 修回

江苏省科技支撑计划(BE2009159, BK2006201)和南京理工大学卓越计划紫金之星(2008)资助项目

通讯联系人:郝青丽,女,博士,副教授;E-mail:haoqingli@yahoo.com;研究方向:功能材料与电化学

5'-HS(CH₂)₆-GCA AAG GGT CGT AC GGG GGG TTT TTT GGG GGG TTT TTT GGG GTT TTG GCC ATA TAG GCC TTT TGG CCT ATA TGG CCT TTT-3'; 互补目标 DNA 链:5'-AAA AGG CCA TAT AGG CCA AAA GGC CTA TAT GGC CAA AAC CCC AAA AAA CCC CCC AAA AAA CCC CCC GT ACG ACC CTT TGC-3'。铁氰化钾、亚铁氰化钾等化学试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

CHI660B 型电化学工作站(上海辰华);电化学实验采用传统的三电极体系:工作电极为自制纳米金薄膜电极,参比电极为饱和甘汞电极(SCE),对电极为螺旋状铂丝。

1.2 DNA 修饰纳米金薄膜电极的制备

1.2.1 纳米金薄膜电极的制备及处理 磁控溅射法自制纳米金薄膜电极^[13]。电极面积约 0.4 mm², Au 晶体具有(111)面取向优势,表面粗糙度小于 10 nm。将制备好的纳米金薄膜电极依次用甲苯、丙酮、V(氯仿):V(乙醇)=1:1 的溶液浸泡 5 min,再超声清洗 5 min,挥发干燥,用 V(H₂O₂):V(H₂SO₄)=1:3 溶液浸泡 5 min,超声清洗 2 min,然后用二次蒸馏水超声清洗 2 次,每次 10 min, N₂ 气吹干备用。

1.2.2 SH-ssDNA 修饰纳米金薄膜电极(SH-ssDNA/Au)的制备 将 SH-ssDNA 用固定杂交溶液(含有 0.001 mol/L EDTA、0.05 mol/L NaCl、0.02 mol/L Tris-HCl 水溶液, pH = 7.0)稀释至所需浓度,取此探针溶液 0.5 μL 滴加到备用金薄膜电极表面,高湿度、室温下自组装合适的时间,然后用大量的二次蒸馏水清洗 15 min,除去未共价组装上的 DNA,自然干燥,即得到用 SH-ssDNA 修饰的探针金薄膜电极。

1.2.3 dsDNA 修饰纳米金薄膜电极的制备 1)将 SH-ssDNA 修饰探针电极放置在 1.0 × 10⁻¹² mol/L 互补链 DNA 缓冲溶液中,40 ℃ 杂交反应 60 min;2)将 SH-ssDNA 与同浓度互补链 DNA 在 40 ℃ 下杂交反应 60 min,再滴加到电极表面自组装 15 h。电极用二次蒸馏水浸泡 10 min,再用大量二次蒸馏水冲洗 15 min,除去未参与特异性杂交反应的残余 DNA,得到巯基修饰的双链 DNA(SH-dsDNA),自然晾干作为电化学实验用电极。

1.3 电化学交流阻抗法(EIS)

将 SH-ssDNA 修饰的纳米金薄膜电极作为工作电极,在 Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ 电解质溶液(0.01 mol/L K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆](摩尔比 1:1)+0.05 mol/L KCl+0.02 mol/L Tris-HCl)中做电化学测定,得到交流阻抗图谱。交流阻抗测量参数:初始电位 0.2 V,频率范围 1 × 10⁵ ~ 5 × 10⁻¹ Hz;静止时间为 5 s,用 Zview2 软件模拟分析阻抗数据。

2 结果与讨论

2.1 SH-ssDNA 在纳米金薄膜电极上自组装过程的 EIS 表征

电化学交流阻抗谱法(Electrochemical impedance spectroscopy, EIS)是以小振幅正弦波电位为扰动信号的电测量方法,同时又是一种频率域的测量方法^[14]。本实验用 SH-ssDNA 和杂交反应后 SH-dsDNA 修饰的纳米金薄膜电极作为工作电极,在 Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ 溶液体系下得到交流阻抗谱(Nyquist 图),并用经典 Randles 等效电路 R(C(RW))模拟整个电化学系统,包括电解质溶液电阻 R_s,工作电极表面电荷传递电阻 R_{ct}, Warburg 阻抗 Z_w, 电极表面的双电层电容 C_{dl} 等参数。Nyquist 图谱由相连的圆弧和斜线两部分构成,高频区测得圆弧部分由电子传递过程控制,其直径大小与 R_{ct} 值相等^[15]。比较裸金薄膜电极、SH-ssDNA/Au 和 SH-dsDNA/Au 表面电荷传递电阻 R_{ct} 的变化,表征 SH-ssDNA 在纳米金薄膜电极上自组装和杂交反应过程。

2.1.1 组装时间对 SH-ssDNA/Au 的 EIS 影响 按本文 1.2.2 节所述方法配制 1 μmol/L 14 个碱基 SH-ssDNA 溶液,滴加在纳米金薄膜电极表面,分别自组装 3、6、10 和 15 h。将 SH-ssDNA 修饰的金电极作为工作电极,在 Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ 电解质溶液中测量电化学交流阻抗谱,并同裸金薄膜电极交流阻抗谱比对,结果见图 1。裸金薄膜电极阻抗谱只在高频区出现微小的圆弧,频率范围内基本是一条 45° 直线(图 1 曲线 a),表明 [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 不受阻碍很容易直达电极表面发生氧化还原反应,此反应是受扩散控制的过程。当带有负电荷磷酸骨架的 SH-ssDNA 通过 S—Au 键自组装在金电极表面后会引引起电极界面性质的变化。随着自组装时间的延长,SH-ssDNA 组装在电极表面的数量越来越多,电极表面的负电荷明显增多,同性相斥原理,阻碍了同为负电荷的电化学活性物质 [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 到达电极

表面进行电荷传递的进程,导致电极表面电荷传递电阻 R_{ct} 增加, Nyquist 图中高频区圆弧直径随着自组装时间的增加而增大(图 1 曲线 $b \sim$ 曲线 e)。SH-ssDNA 自组装 10 h 与自组装 6 h 相比, R_{ct} 值的变化有一明显突跃,表明 SH-ssDNA 在自制纳米金薄膜电极表面自组装密度增大,自组装时间不宜低于 10 h,本实验条件下,自组装时间 15 h 时 R_{ct} 值最大,电极表面 SH-ssDNA 的量最多,故以下实验自组装时间均为 15 h。

2.1.2 SH-ssDNA 的浓度对 SH-ssDNA/Au 的 EIS 影响 分别配制 0.5、1、5 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 14 个碱基 SH-ssDNA 溶液,在纳米金薄膜电极表面自组装 15 h,用 0.01 mol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 电解质溶液测量其 EIS,结果如图 2 所示。

由图 2 可知,单位时间内随着自组装浓度的增加,在金电极表面修饰的 SH-ssDNA 数量就越多,电极表面的负电性增大,阻碍了 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 在电极表面进行电子传递的进程,引起电极表面电荷传递电阻 R_{ct} 增加。与裸金电极阻抗谱相比较(图 2 曲线 a), Nyquist 图中高频区圆弧直径随着自组装浓度的增加而增大(图 2 曲线 $b \sim$ 曲线 e),此结果可证明,SH-ssDNA 已成功组装在纳米金薄膜电极表面。

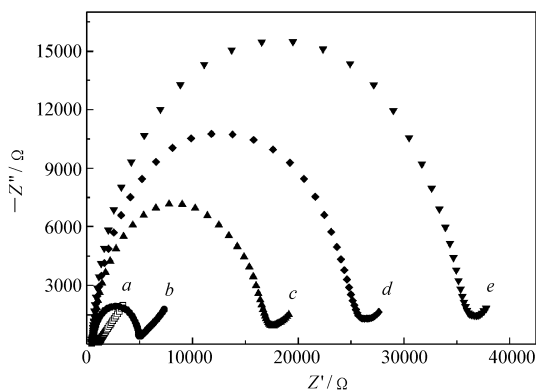


图 2 裸金电极和不同浓度的 SH-ssDNA/Au 在 0.01 mol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的 0.02 mol/L Tris-HCl(含有 0.05 mol/L KCl)溶液中的交流阻抗 Nyquist 图

Fig. 2 Nyquist diagrams of EIS for bare Au electrode(a) and SH-ssDNA/Au electrodes assemble in 0.5(b), 1(c), 5(d) and 10(e) $\mu\text{mol/L}$ 14-base DNA and 0.02 mol/L Tris-HCl containing 0.01 mol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ and 0.05 mol/L KCl solution

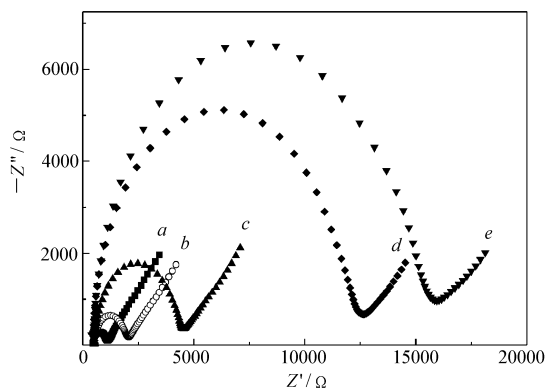


图 1 裸金电极和不同组装时间的 SH-ssDNA/Au 在 0.01 mol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的 0.02 mol/L Tris-HCl(含有 0.05 mol/L KCl)溶液中的交流阻抗 Nyquist 图

Fig. 1 Nyquist diagrams of EIS for bare Au electrode(a) and SH-ssDNA/Au electrodes for different assembling time in 0.02 mol/L Tris-HCl containing 0.01 mol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ and 0.05 mol/L KCl solution(b . 3 h, c . 6 h, d . 10 h, e . 15 h)

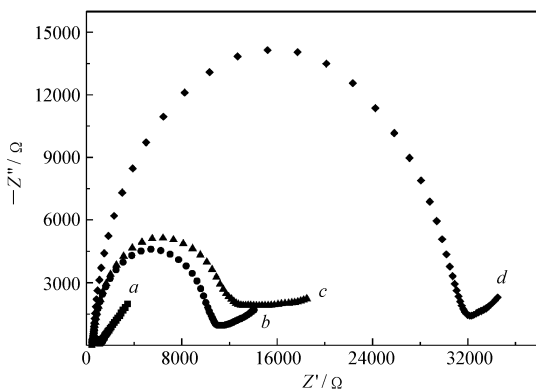


图 3 裸金电极和不同链长的 SH-ssDNA/Au 在 0.01 mol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的 0.02 mol/L Tris-HCl(含有 0.05 mol/L KCl)溶液中的交流阻抗 Nyquist 图

Fig. 3 Nyquist diagrams of EIS for bare Au electrode(a) and SH-ssDNA/Au electrodes with different lengths in 0.02 mol/L Tris-HCl containing 0.01 mol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ and 0.05 mol/L KCl solution (b . 14 base DNA, c . 36 base DNA, d . 80 base DNA)

2.1.3 SH-ssDNA 链长对 SH-ssDNA/Au 的 EIS 影响 配制 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 14、36 和 80 个碱基的 SH-ssDNA 溶液(不同链长),在纳米金薄膜电极表面自组装 15 h 后测量 EIS。图 3 为不同链长的 SH-ssDNA/Au 在 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 电解质溶液中得到的电化学交流阻抗谱。同浓度不同链长的 SH-ssDNA 修

饰金电极, 相当于电极表面的单分子层厚度不同, 随着 SH-ssDNA 链长的增加, 单分子层厚度也随之增加, 负电性的电化学活性物质 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 到达电极表面完成电子传递的路程也相应延长, 与裸金薄膜电极阻抗谱相比, Nyquist 图中高频区圆弧直径随着 SH-ssDNA 链长的增加而增大, 也即 R_{ct} 值增大 (图 3 曲线 $a \sim$ 曲线 d)。图中 36 个碱基 SH-ssDNA/Au 的 R_{ct} 值和 14 个碱基 SH-ssDNA/Au 的 R_{ct} 值相比变化幅度较小, 80 个碱基 SH-ssDNA/Au 的 R_{ct} 值远大于 14 和 36 个碱基 SH-ssDNA/Au 的 R_{ct} 值, 证明 SH-ssDNA 通过 S—Au 键自组装在金电极表面过程中链长 (膜层厚度) 的变化对界面结构的规律性影响。

2.2 SH-ssDNA 探针与互补目标 DNA 杂交反应的 EIS 表征

自组装在纳米金薄膜电极表面的 SH-ssDNA 探针能识别溶液中的互补 DNA 链, 并与之发生特异性杂交反应, 形成双螺旋结构的双链 DNA, 使电极表面的负电荷数量成倍增加, 静电排斥力增大; 同时, 电极表面单分子层结构更加致密, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 更难以到达电极表面发生氧化还原反应, 完成电子交换传递过程, 导致杂交前后电极表面电荷传递电阻 R_{ct} 的显著差异, 用于表征 SH-ssDNA 与互补目标 DNA 杂交反应。

2.2.1 SH-ssDNA 探针浓度对杂交反应的影响 配制 0.5、1 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 14 个碱基 SH-ssDNA 溶液, 在纳米金薄膜电极表面自组装 15 h, 制得系列 SH-ssDNA/Au 探针; 按照本文 1.2.3 节 (1) 所述方法与 1.0×10^{-12} mol/L 互补 DNA 发生杂交反应, 得到不同浓度的 SH-dsDNA/Au (SH-ssDNA + ssDNA), 再在 0.01 mol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 电解质溶液中检测杂交前后电极的 EIS, 结果如图 4 所示。

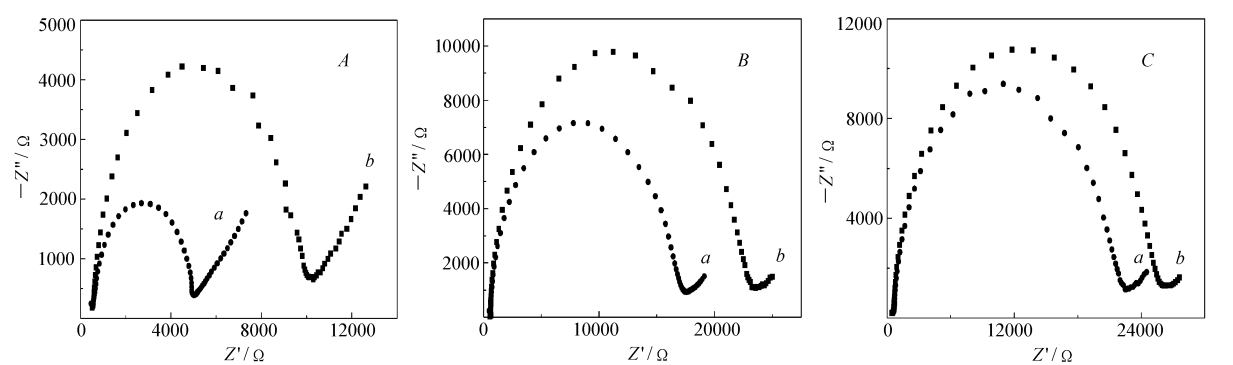


图 4 不同组装浓度 SH-ssDNA 与 1.0×10^{-12} mol/L 互补 DNA 杂交反应前后在 0.01 mol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的 0.02 mol/L Tris-HCl (含有 0.05 mol/L KCl) 溶液中的交流阻抗 Nyquist 图

Fig. 4 Nyquist diagrams of EIS for SH-ssDNA with different concentrations before or after hybridization with 1.0×10^{-12} mol/L complementary DNA in 0.02 mol/L Tris-HCl containing 0.01 mol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ and 0.05 mol/L KCl solution

$c(\text{SH-ssDNA})/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: A. 0.5; B. 1; C. 5; a. SH-ssDNA/Au; b. SH-dsDNA/Au

图 4 显示杂交前后电极表面电荷传递电阻 R_{ct} 值均随着 SH-ssDNA 浓度的增加而增大, 表明随着 SH-ssDNA 浓度的增大, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 在 SH-dsDNA 和杂交后修饰电极上的传递性均变得更差, 更难以到达电极表面发生氧化还原反应, 这种杂交前后 R_{ct} 值的差异证明了 SH-ssDNA 和互补 DNA 的特异性杂交反应; 但 R_{ct} 值变化幅度随着 SH-ssDNA 浓度的增加反而减小, SH-ssDNA 为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 杂交后 SH-dsDNA/Au 的 R_{ct} 值增加幅度是杂交前 SH-ssDNA/Au 的 1 倍 (图 4A), SH-ssDNA 为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时 R_{ct} 值比杂交前增加了 36% (图 4B), SH-ssDNA 为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时 R_{ct} 值仅增加了 16% 左右 (图 4C), 说明杂交效率与 SH-ssDNA 在金电极表面的覆盖率密切相关, 并非覆盖率越高杂交效率越好, 大浓度高密度有可能阻碍 SH-ssDNA 与互补 DNA 的杂交反应, 本实验结果表明在较低的浓度 (覆盖率) 下, 杂交前后 R_{ct} 值差异较大, 灵敏度较高。

2.2.2 SH-ssDNA 探针链长对杂交反应的影响 分别配制 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 14、36 和 80 个碱基的 SH-ssDNA 溶液 (不同链长), 在纳米金薄膜电极表面自组装 15 h, 制得系列 SH-ssDNA/Au 探针; 依照本文 1.2.3 节 (1) 方法, 分别与相同链长的 1.0×10^{-12} mol/L 互补链 DNA 杂交, 制备不同链长的 SH-dsDNA/Au, 然后

在 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 电解质溶液中测量杂交前后电化学交流阻抗谱,结果见图 5。

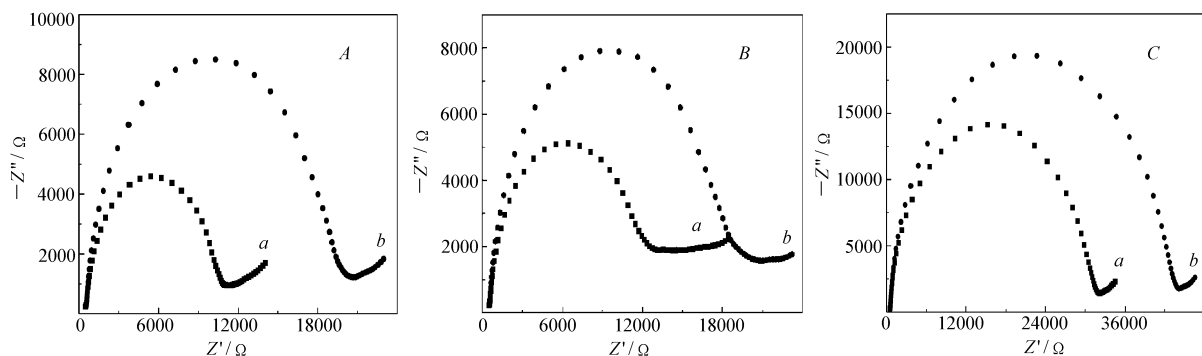


图 5 不同长度 1 $\mu\text{mol/L}$ SH-ssDNA/Au 与互补 DNA 杂交反应前后在 0.01 mol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的 0.02 mol/L Tris-HCl(含有 0.05 mol/L KCl)溶液中的交流阻抗 Nyquist 图

Fig. 5 Nyquist diagrams of EIS for 1 $\mu\text{mol/L}$ SH-ssDNA with different lengths before or after hybridization with 1.0×10^{-12} mol/L complementary DNA in 0.02 mol/L Tris-HCl containing

0.01 mol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ and 0.05 mol/L KCl solution

(A. 14 base DNA; B. 36 base DNA; C. 80 base DNA; a. SH-ssDNA/Au; b. SH-dsDNA/Au)

随着 SH-ssDNA 链长的增加,杂交前后电极表面电荷传递电阻 R_{ct} 值均有显著增加(图 5),表明 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 随着单分子层厚度的增加,在 DNA 磷酸骨架负电荷排斥力增大和传递距离增加的共同影响下,很难到达电极表面发生氧化还原反应,可利用这种杂交前后 R_{ct} 值的差异表征 SH-ssDNA 和互补 DNA 的特异性杂交反应;同时,杂交前后 R_{ct} 值变化幅度随着 SH-ssDNA 链长的增加反而减小,SH-ssDNA 链长为 14 个碱基时,杂交后 SH-dsDNA/Au 的 R_{ct} 值增加幅度最大(图 5A),SH-ssDNA 为 36 个碱基时 R_{ct} 值增加幅度次之(图 5B),SH-ssDNA 为 80 个碱基时 R_{ct} 值增加幅度最小(图 5C)。短链 SH-ssDNA(14 个碱基),类似于 DNA 覆盖率较低的情况,杂交前后 R_{ct} 值差异较大,灵敏度较高。长链 SH-ssDNA(80 个碱基)与高覆盖率情况相似,同性电荷相斥与空间位阻影响了杂交效率,杂交前后 R_{ct} 值差异最小,杂交反应检测灵敏度也随之降低。SH-dsDNA 的这种阻碍氧化还原反应进行的特点,可以用来表征已组装了 HS-ssDNA 的探针电极是否与溶液中的互补链结合,从而达到测序的目的。

2.2.3 杂交方式对杂交反应的影响 图 6 和图 7 分别考察了 SH-ssDNA 探针电极与互补 DNA 的 2 种杂交方式对杂交反应的影响。图 6 为不同浓度的 SH-ssDNA 探针电极与 1.0×10^{-12} mol/L 互补 DNA 采用本文 1.2.3 节(1)所述的杂交方式得到的 SH-dsDNA/Au 在 0.01 mol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 电解质溶液中的 EIS 图(图 4 中所有曲线 b)。结果显示,随着 SH-ssDNA 浓度的增加,SH-dsDNA/Au 的电极表面电荷传递电阻 R_{ct} 值也明显增大(图 6 曲线 a、曲线 b),表明 SH-ssDNA 修饰金电极表面疏密度(表面覆盖率)还能保证杂交反应的正常进行;当 SH-ssDNA 浓度增加至 5 $\mu\text{mol/L}$ 时,SH-dsDNA/Au 的电极表面电荷传递电阻 R_{ct} 值与 1 $\mu\text{mol/L}$ 时相差很小(图 6 曲线 c),说明此时 SH-ssDNA 组装在金电极表面的密度(表面覆盖率)已影响到探针 DNA 与目标 DNA 的杂交效率。

按本文 1.2.3 节(2)所述条件,将不同浓度 SH-ssDNA(0.5、1、5 $\mu\text{mol/L}$)分别与相同浓度的互补 DNA 杂交后得到相应浓度的 SH-dsDNA,再将其固定组装成 SH-dsDNA/Au 电极,在 0.01 mol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 电解质溶液中测试其交流阻抗谱图,结果如图 7 所示。结果显示,随着 SH-ssDNA 浓度的增加,SH-dsDNA/Au 的电极表面电荷传递电阻 R_{ct} 值依次降低(图 7 曲线 a、b、c),这一结果与图 6 的相反。这可能是由于随着杂交得到的 SH-dsDNA 浓度增大,双链 DNA 分子间同性电荷排斥力增大,同时空间位阻也增大,使得 SH-dsDNA 分子的巯基端到达电极表面的机会减小,从而导致组装在金电极表面修饰上的双链 DNA 分子层覆盖率降低,电极表面电荷传递电阻 R_{ct} 值就越小(图 7 曲线 c);相反,SH-dsDNA 浓度越低,越容易在电极表面形成单分子层,表面电荷传递电阻 R_{ct} 值就越大(图 7 曲线 a、b)。

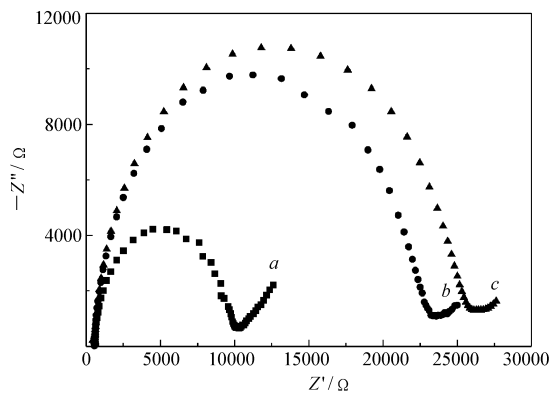


图 6 不同浓度 SH-ssDNA 探针与 1.0×10^{-12} mol/L 互补 DNA 杂交后在 0.01 mol/L $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 的 0.02 mol/L Tris-HCl (含有 0.05 mol/L KCl) 溶液中的交流阻抗 Nyquist 图
Fig. 6 Nyquist diagrams of SH-dsDNA/Au with different concentrations hybridized with 1.0×10^{-12} mol/L complementary DNA in 0.02 mol/L Tris-HCl containing 0.01 mol/L $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ and 0.05 mol/L KCl solution
 $c(\text{SH-ssDNA})/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: a. 0.5; b. 1; c. 5

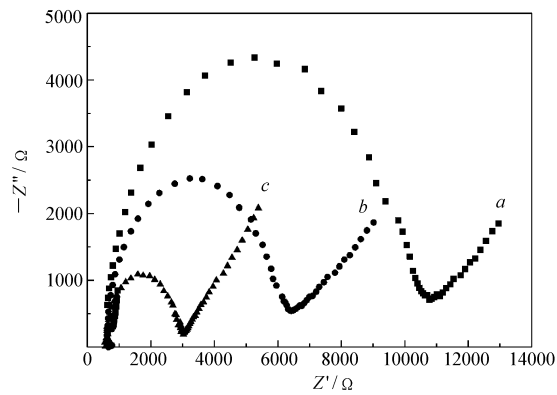


图 7 由不同浓度的 SH-dsDNA 固定所得的修饰电极在 0.02 mol/L Tris-HCl (含有 0.01 mol/L $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 和 0.05 mol/L KCl) 溶液中的交流阻抗 Nyquist 图
Fig. 7 Nyquist diagrams of electrodes modified with SH-dsDNA with different concentrations in 0.02 mol/L Tris-HCl containing 0.01 mol/L $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ and 0.05 mol/L KCl solution
 $c(\text{SH-dsDNA})/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: a. 0.5; b. 1; c. 5

2.3 SH-ssDNA 在纳米金薄膜电极表面自组装取向交流阻抗谱表征

杨秀荣^[9]实验小组利用拟合阻抗谱得到的膜层电学参数表征了金电极表面自组装多层膜,基本原理如下:

在含有氧化还原电对的电解质体系下所测量的双电层电容(C_{dl})是由裸金电极状态的电容(C_{bare})和电极表面修饰层电容(C_{ads})串联在一起构成的,可以用方程式(1)表示三者之间的关系:

$$1/C_{dl} = 1/C_{bare} + 1/C_{ads} \tag{1}$$

在一定电位范围内可以认为裸金状态的电容值是恒定的,那么双电层电容值的大小就仅与修饰层的性质有关;对一定厚度的膜层而言,可以认为是一平板电容器模型,其电容 C_{ads} 可用下式表示:

$$C_{ads} = \varepsilon \varepsilon_0 / d \tag{2}$$

式中, ε 为修饰层的介电常数, ε_0 为真空介电常数, d 为修饰层的厚度。从式(2)看出,随着膜层厚度 d 的增加,必然会导致修饰层电容 C_{ads} 的减小,根据式(1),相应的就会引起双电层电容 C_{dl} 的减小,也即随着组装层数的增加,拟合参数呈现规律性变化。本文则利用此原理表征了 SH-ssDNA 在自制纳米金薄膜电极上的自组装单分子层取向。

对于 SH-ssDNA,在金薄膜电极上的自组装单分子层主要应该有 3 种取向:一是 SH-ssDNA 链与金电极表面非特异性吸附而倒伏在电极表面;二是通过 S-Au 键垂直竖立在金电极表面(或随着链长的增加具有一定的角度);三是以上 2 种方式的混合形式。为便于比对,按本文 1.2.2 节所述方法制备了 1 $\mu\text{mol/L}$ 14、36 和 80 个碱基的不含有 SH—的 ssDNA(互补 DNA)修饰的纳米金薄膜电极(自组装 15 h),在 0.01 mol/L $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ 电解质溶液中测量交流阻抗,用 Zview2 软件拟合 Randles 等效电路,得到各实验条件下的电学参数(表 1)。

首先,假设自组装在金电极表面的 SH-ssDNA 为倒伏取向,则自组装分子层结构排列应是杂乱无序的,代表膜层厚度变化的参数双电层电容值 C_{dl} 和表面电荷传递电阻 R_{ct} 值应随自组装浓度的增加而变化无常。但表 1 实验数据显示,相同链长不同浓度 SH-ssDNA/Au 的 C_{dl} 未呈现规律性变化, R_{ct} 值却随浓度的增加而增加。说明随着 SH-ssDNA 自组装浓度的增加,膜层厚度未发生规律性变化,但金电极表面单位面积上的 SH-ssDNA 覆盖率增加了,膜层的致密性提高,从而使离子/电子的通透性下降,氧化还原

表 1 不同 SAM 修饰纳米金薄膜电极的交流阻抗谱拟合数据
Table 1 Electrical parameters of nano-Au thin film electrode
modified with different SAM obtained by fitting EIS data

SAM	R_s/Ω	$C_{dl}/\mu\text{F}$	$R_{ct}/\text{k}\Omega$
Concentration of SH-ssDNA/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)			
0.5	563.9	2.28×10^{-2}	4.25
1	603.9	3.16×10^{-2}	15.63
5	667.3	2.65×10^{-2}	20.22
10	589.0	3.05×10^{-2}	33.46
Concentration of SH-ssDNA + ssDNA/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)			
0.5	564.0	2.26×10^{-2}	9.02
1	603.1	3.21×10^{-2}	21.26
5	568.8	3.53×10^{-2}	23.57
Concentration of SH-dsDNA/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)			
0.5	835.5	2.73×10^{-2}	9.29
1	668.2	3.21×10^{-2}	5.45
5	602.8	1.17×10^{-2}	2.27
Length of ssDNA			
Bare Au electrode	460.1	2.81×10^{-2}	0.59
14	409.7	3.18×10^{-2}	0.69
36	324.2	1.76×10^{-2}	0.23
80	379.3	2.35×10^{-2}	1.59
Length of SH-ssDNA			
14	535.4	1.81×10^{-2}	10.03
36	563.5	1.77×10^{-2}	11.87
80	578.9	1.57×10^{-2}	29.70
Length of SH-ssDNA + ssDNA			
14	564.3	1.58×10^{-2}	18.45
36	568.4	1.54×10^{-2}	17.73
80	599.3	1.47×10^{-2}	40.97

反应的阻碍变大, R_{ct} 值随浓度的增加而增加, 呈现规律性变化; 同样, 2 种不同方式杂交反应后的 SH-dsDNA 修饰金电极的 C_{dl} 也未随自组装浓度的增加而减少, 而 R_{ct} 值呈现出规律性变化, 表明杂交反应也未使膜层厚度发生变化, 据此推测, 在实验浓度范围内的 SH-ssDNA 自组装膜应是垂直取向, 为排列有序的单分子层, 链长不变的情况下厚度为一定值。

其次, 表 1 中相同浓度不同链长非巯基标记 ssDNA 实验数据 C_{dl} 和 R_{ct} 值不随链长的增加(膜层厚度增加)而减小或增加, 均未发生规律性变化, 同裸金薄膜电极数据相比变化不大。说明不含有 SH—的 ssDNA 只能依靠非特异性吸附作用杂乱无序地平卧在电极表面, 且极易清洗, 不易在金薄膜电极表面残留, 进一步排除了 SH-ssDNA 在金薄膜电极表面倒伏取向趋势。

最后, 只有 SH-ssDNA 以垂直取向在电极表面形成均匀致密单分子层, 随着膜层厚度 d 的增加(链长增加), 其对应的 C_{ads} 才会减小, 从而使修饰电极的双电层电容 C_{dl} 减小。表 1 的模拟实验数据显示, 随着 SH-ssDNA 链长的增加, 杂交前后的 C_{dl} 和 R_{ct} 数据均呈现规律性变化, C_{dl} 值越来越小, R_{ct} 值越来越大。实验数据和理论推测相吻合, 证明 SH-ssDNA 通过 S—Au 键以垂直取向在金薄膜电极表面形成均匀致密单分子层。

本文用电化学交流阻抗法系统研究了 SH-ssDNA 在自制纳米金薄膜电极表面自组装过程、单分子层取向及探针 DNA 与目标 DNA 的杂交反应。分析了不同组装时间、不同组装浓度、不同链长 SH-ssDNA/Au 在 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 的 Tris-HCl 溶液中杂交前后交流阻抗谱图和模拟数据, 表明 SH-ssDNA 通过 S—Au 键以垂直竖立取向在纳米金薄膜电极表面形成均匀致密单分子层; 随着组装时间的延长、组装浓度的提高, SH-ssDNA 在金电极表面的表面密度(覆盖率)增大; 但杂交效率并非随着覆盖率的增加而提高。相反, 随着分子间同性电荷排斥力增大及空间位阻的增加, 杂交反应效率还有降低的趋势。

参 考 文 献

- 1 Lao R J, Song S P, Wu H P, Wang L H, Zhang Z Z, He L, Fan C H. *Anal Chem*[J], 2005, **77**: 6475
- 2 Lucarelli F, Marrazza G, Turner A P F, Mascini M. *Biosens Bioelectron*[J], 2004, **19**: 515
- 3 Zhang Z L, Pang D W, Zhang R Y. *Bioconjugate Chem*[J], 2002, **13**: 104
- 4 Zhang R Y, Pang D W, Zhang Z L, Yan J W, Yao J L, Tian Z Q, Mao B W, Sun S G. *J Phys Chem B*[J], 2002, **106**: 11233
- 5 Herne T M, Tarlov M J. *J Am Chem Soc*[J], 1997, **119**: 8916
- 6 Huang E, Zhou F M, Deng L. *Langmuir*[J], 2000, **16**: 3272
- 7 Hianik T, Gajdos V, Krivanek R, Oretskay T, Metev V, Volkov E, Vadgama P. *Bioelectrochemistry*[J], 2001, **53**: 199
- 8 Kimura-Suda H, Petrovykh D Y, Tarlov M J, Whitman L J. *J Am Chem Soc*[J], 2003, **125**: 9014
- 9 CHENG Zhi-Liang(程志亮), YANG Xiu-Rong(杨秀荣). *Chinese J Anal Chem*(分析化学)[J], 2001, **29**: 6
- 10 Strutwolf J, O'Sullivan C K. *Electroanalysis*[J], 2007, **19**: 1467
- 11 XU Ying(徐颖), YANG Lin(杨琳), YE Xiao-Yan(叶晓燕), HE Pin-Gang(何品刚), FANG Yu-Zhi(方禹之). *J East China Norm Univ*(Nat Sci)(华东师范大学学报(自然科学版))[J], 2006, (4): 39
- 12 Bardea A, Patolsky F, Dagan A, Willner I. *Chem Commun*[J], 1999, (1): 21
- 13 WEI Xu(魏旭), CHENG Rong-En(程荣恩), HAO Qing-Li(郝青丽), LU Lu-De(陆路德), WANG Xin(汪信), YANG Xu-Jie(杨绪杰). *Chem Ind Eng Pro*(化工进展)[J], 2006, **25**: 1193
- 14 Bard A J, Faulkner L R, Auths. SHAO Yuan-Hua(邵元华), ZHU Guo-Yi(朱国逸), DONG Xian-Dui(董献堆), ZHANG Bai-Lin(张柏林) Trans(译). *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*(电化学方法原理和应用)[M], Chapt. 10(第10章). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2005: 267
- 15 SHI Mei-Lun(史美伦). *AC Impedance Spectroscopy Principium and Applications*(交流阻抗谱原理及应用)[M], Chapt. 1(第1章). Beijing(北京): Defense Industry Press(国防工业出版社), 2001: 10

Electrochemical Impedance Spectroscopy Study of SH-ssDNA Self-Assembling, Hybridization and Orientation on Thin-film Nano-gold Electrode

WEI Xu, HAO Qing-Li*, LU Lu-De, WANG Xin, YANG Xu-Jie

(Materials Chemistry Laboratory, Nanjing University of Science & Technology, Nanjing 210094)

Abstract The self-assembling, hybridization and orientation of SH-ssDNA on the surface of thin-film nano-gold electrodes were characterized systematically by means of the electrochemical impedance technique. The effects of assembling time, concentration and the length of SH-ssDNA on its self-assembling were investigated. The R_{ct} and surface coverage reached the highest values when assembling time was 15 h. The influences of the concentration and length of SH-ssDNA and its hybridization method with complementary DNA on the hybridization reaction were also studied. The result shows the change of R_{ct} decreases with the increase of the SH-ssDNA concentration. The R_{ct} was increased by 16% when the concentration of SH-ssDNA was 5 $\mu\text{mol/L}$. The data simulation and analysis of impedance spectroscopy indicated that a unique self-assembled monolayer of SH-ssDNA was formed with an upright orientation on the nano-Au electrode surface. The result shows the hybridization efficiency is closely associated with the coverage of SH-ssDNA.

Keywords electrochemical impedance spectroscopy, SH-ssDNA, self-assembling, hybridization, orientation