

基于长程电子传递的 DNA 直接电化学检测

赵洪桃 张志洁 鞠焱先*

(南京大学化学系, 生命分析化学教育部重点实验室, 南京 210093. *联系人, E-mail: hxju@nju.edu.cn)

人类基因组计划和遗传疾病基因的识别对分子诊断产生了深远的影响^[1]. 疾病的基因诊断必然要求 DNA 的快速、准确测定. 电化学 DNA 传感器为此提供了十分有前景的平台^[2,3]. 近年来, DNA 中长程电子传递机理的阐述已证明碱基堆积的扰动对电荷传递的影响十分敏锐^[4,5]. 因此, DNA 的长程电荷传递在 DNA 传感器研制与单核苷酸形态分析方面具有巨大的应用前景^[7~10]. 以 DNA 长程电荷传递效率为信号, Barton 等^[9~11]发展了一种电化学检测碱基错配的方法. 他们用巯基修饰的双链 DNA 自组装成生物识别界面, 当双链完全配对时, 电活性嵌入试剂如道诺霉素产生高分辨的电化学信号, 然而 DNA 双链中存在单碱基错配时电化学响应显著降低^[8].

二茂铁标记寡核苷酸在 DNA 传感方面已引起很大的关注^[11,12]. Long 等^[12]证明二茂铁标记的双链 DNA 能通过双螺旋将电子传递到电极表面. 以 EBV (Epstein-Barr 病毒) DNA PCR 扩增产物链作为二茂铁基团与电极之间电子传递的分子导线, 本文提出了一种 DNA 序列检测的直接电化学方法(图 1).

PER 5 (5' CTT TAG AGG CGA ATG GGC GCC A) 和 PER 6 (5' TCC AGG GCC TTC ACT TCG GTC T) 两端均含羟基, 是 EBV 的特定上、下游引物, 构成 Bam H1W (495 bp) 特征保留片段. PCR 扩增按文献^[13]进行. 电化学 DNA 传感器按如下步骤制备: 首先将处理好的金电极在含 10 mmol/L 巯基丙酸(MPA)的 20 mmol/L

巯基丙磺酸钠(MPS)溶液中浸泡 12 h. MPS 分子单层可防止 DNA 碱基与电极表面接触, 利于探针 DNA 的杂交反应^[14]. 二次水冲洗后, 滴加 5 μ L 5 mmol/L 碳二亚胺(EDC)和 8 mmol/L N-烷基磺基琥珀酰亚胺(NHS)水溶液. 自然晾干后, 在 1.25 μ mol/L PER 5 溶液中浸泡 12 h. 二次水清洗后, 放入含 5 mmol/L EDC 和 8 mmol/L NHS 的 1 mmol/L 二茂铁单羧酸溶液中 12 h, 使已共价固定的寡核苷酸末端羟基共价连接到活化的二茂铁单羧酸的羧基上. 用二次水反复清洗, 以除去表面吸附的二茂铁单羧酸, 即得 Fc-ssDNA-MPA/MPS 修饰金电极.

图 2 是固定在电极表面探针 DNA 的 X 射线光电子光谱(XPS)光谱. XPS 谱图上出现了 P2p 和 N1s 峰, 它们是探针 DNA 固定在电极表面的最好证明. 该单层显示出很小的 S2p 峰, 它来自 MPA 和 MPS 的混合自组装. XPS 光谱也显示出 C1s 和 O1s 峰.

图 3-2 为 Fc-ssDNA-MPA/MPS 修饰金电极在 0.05 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中的循环伏安响应. 与图 3-1 相比, 可观察到一对准可逆的氧化还原峰, 峰电位差为 101 mV, 式量电位为 +135 mV(vs. SCE). 由二茂铁单羧酸的循环伏安图计算得到的式量电位为 +286 mV. 当二茂铁基团与寡核苷酸(20 bp)末端共价键合后, 二茂铁基团的式量电位负移至 +135 mV, 与文献^[15]报道一致, 表明二茂铁基团已共价键合到单链探针 DNA 上. 单链 DNA 在电极表面缺乏碱

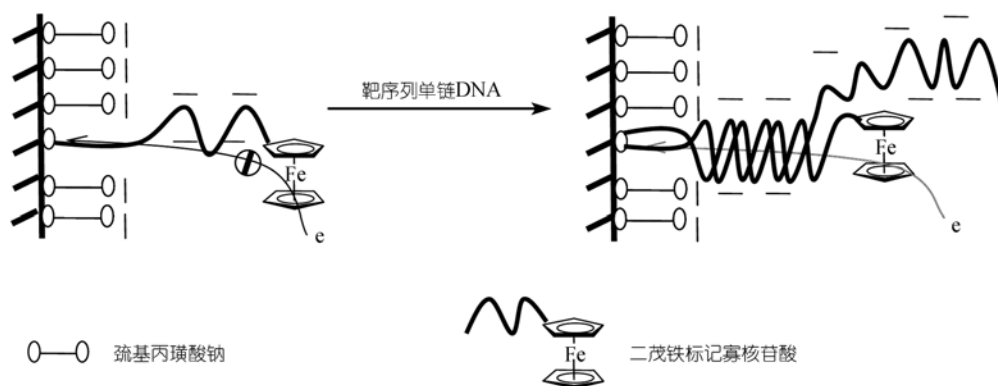


图 1 DNA 生物传感器检测原理

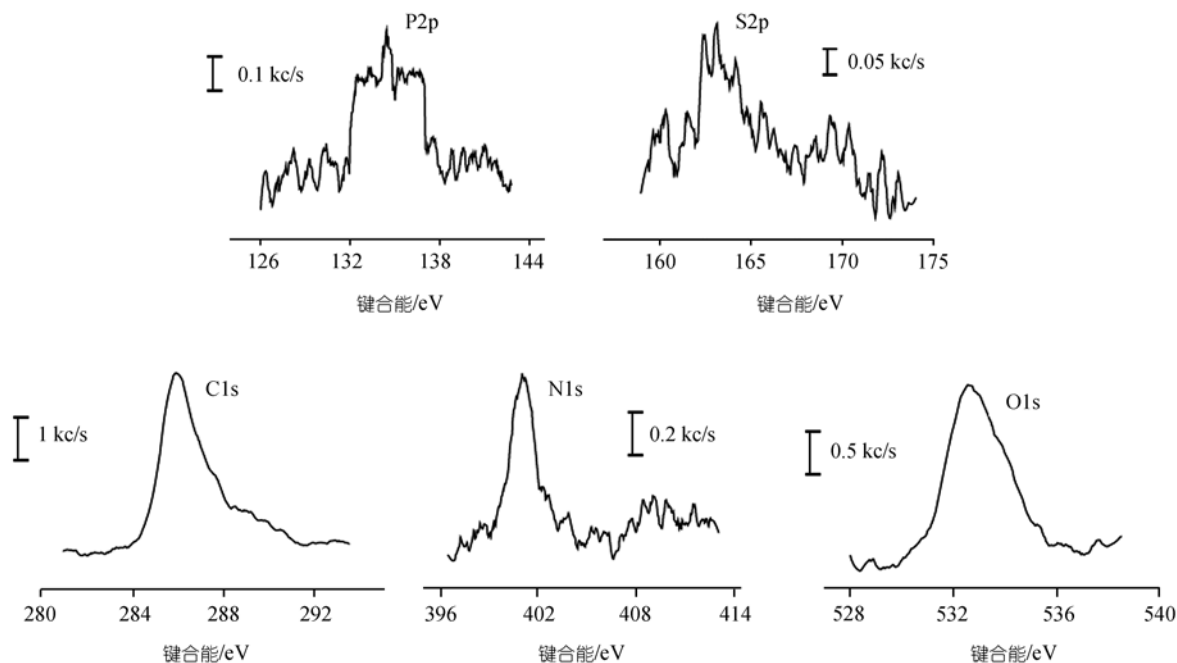


图2 ss-DNA-MPA/MPS 修饰金电极的 XPS 光谱表征

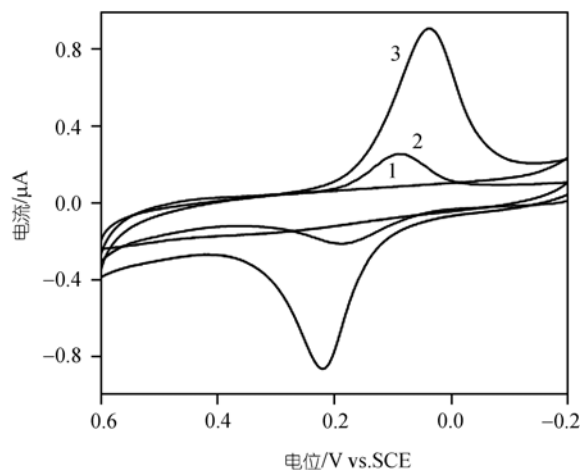


图3 0.05 mol/L pH 7.4 PBS 缓冲溶液中的循环伏安响应

1, 裸金电极; 2, Fc-ssDNA-MPA/MPS修饰金电极;
3, Fc-ssDNA-MPA/MPS修饰金电极与其互补的EBV PCR
扩增产物杂交 2 h. 扫速为 $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

基堆积的完整性, DNA 的电荷传递效率极大减弱^[9,16,17], 微弱的电化学信号来源于标记在柔性单链 DNA 上的部分二茂铁基团与电极表面上自组装单层缺陷的直接接触^[8,16].

当 Fc-ssDNA-MPA/MPS 修饰电极和 EBV PCR 产物杂交后, 二茂铁的电化学响应显著增大(图3-3和3-2), 阳极与阴极峰电流分别增大了 364.9%和 329.2%,

表明与目标序列 DNA 杂交后形成的有序碱基堆积有效地改善了 DNA 的长程电荷传递效率, 使二茂铁基团和电极间可进行电子交换, 从而增加了电流信号. 这一现象和嵌入试剂与单、双链 DNA 的作用是一致的^[16]. 与未和 EBV PCR 产物杂交之前相比, 杂交后二茂铁基团的峰电位差增加到 181 mV, 表明杂交后二茂铁基团与电极间的电子传递情况与单链不同. 用 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 小牛胸腺单链 DNA 作为对照, 在相同方式下杂交后峰电流并没有增加. 所以, 该传感器允许高灵敏、高选择性地识别目标 DNA 序列.

与 Anne 等人^[15]提出的 DNA 链移动机制不同, 本文的现象与文献^[8~10,12,16]报道的结论一致, 杂交后获得的双链 DNA 的碱基堆积比单链 DNA 更有序, 因此改善了 DNA 的长程电子传递效率, 使二茂铁基团和电极之间能够进行有效的电子传递, 导致了峰电流的增大. 此外, 由于电极表面修饰的 MPS 负电荷与单链 DNA 磷酸骨架上负电荷之间的排斥, 单链 DNA 在电极表面呈直立状态, 当与 495 bp 的待测 DNA 杂交后, 高密度的 DNA 可能会使二茂铁基团与电极之间的距离缩短, 而导致电流的增加^[11], 这一影响有利于高灵敏的 DNA 靶序列检测.

杂交后的传感器用 80 °C 热水洗涤 30 min 可实现再生. 再生的传感器的峰电流比未杂交之前的传感

器峰电流略大, 而与 EBV PCR 产物再次杂交后, 峰电流再次显著增加(图 4), 可重复用于 DNA 靶序列的直接电化学检测.

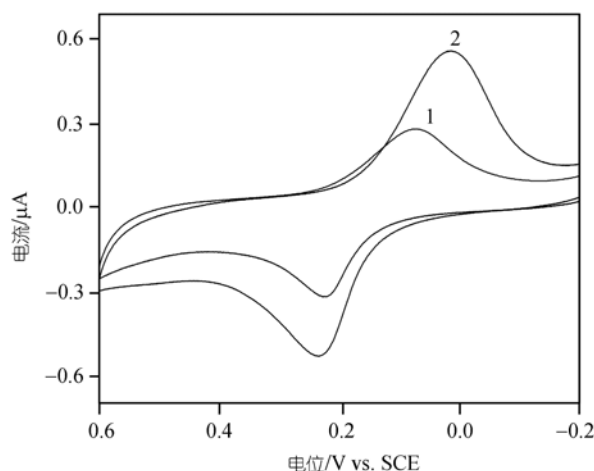


图 4 0.05 mol/L pH 7.4 PBS 缓冲溶液中的循环伏安响应
1, 杂交后的传感器用 80 二次水清洗 30 min; 2, 体系 1 与 EBV PCR 产物再杂交. 扫速为 $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

该方法制备简单、操作简便、检测速度快、可微型化. 因而, 该传感器可以方便地与 PCR 芯片技术相结合, 实现芯片检测.

致谢 本工作为国家杰出青年科学基金(批准号: 20325518)和国家自然科学基金(批准号: 20275017)资助项目.

参 考 文 献

- 1 International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, 409(6822): 860~921[DOI]
- 2 Paleck E, Fojta M. Detecting DNA hybridization and damage. *Anal Chem*, 2001, 73(3): 74A~83A
- 3 Drummol/Lond T G, Hill M G, Barton J K. Electrochemical DNA sensors. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(10): 1192~1199[DOI]
- 4 Kelley S O, Barton J K. Electron transfer between bases in double helical DNA. *Science*, 1999, 283(5400): 375~381 [DOI]
- 5 Giese B, Amaudrut J, Kohler A K, et al. Direct observation of hole transfer through DNA by hopping between adenine bases and by tunnelling. *Nature*, 2001, 412(6844): 318~320[DOI]
- 6 Pascaly M, Yoo J, Barton J K. DNA mediated charge transport: Characterization of a DNA radical localized at an artificial nucleic acid base. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(31): 9083~9092[DOI]
- 7 Okamoto A, Tanaka K, Saito I. Rational design of a DNA wire possessing an extremely high hole transport ability. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(17): 5066~5071
- 8 Kelley S O, Boon E M, Barton J K, et al. Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(24): 4830~4837[DOI]
- 9 Kelley S O, Jackson N M, Hill M G, et al. Long-range electron transfer through DNA films. *Angew Chem Int Ed*, 1999, 38(7): 941~945[DOI]
- 10 Boon E M, Ceres D M, Drummol/Lond T G, et al. Mutation detection by electrocatalysis at DNA-modified electrodes. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(10): 1096~1100[DOI]
- 11 Fan C H, Plaxco K W, Heeger A J. Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(16): 9134~9137[DOI]
- 12 Long Y T, Li C Z, Sutherland T C, et al. A comparison of electron-transfer rates of ferrocenyl-linked DNA. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(29): 8724~8725[DOI]
- 13 Fares F, Habib M, Verniol C, et al. In situ amplification of the Epstein-Barr virus genome in cell suspensions. *J Virol Methods*, 1998, 71(2): 211~218[DOI]
- 14 Levicky R, Herne T M, Tarlov M J, et al. Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers on gold: a neutron reflectivity study. *J Am Chem Soc*, 1998, 120(38): 9787~9792[DOI]
- 15 Anne A, Bouchardon A, Moiroux J. 3'-ferrocene-labeled oligonucleotide chains end-tethered to gold electrode surfaces: novel model systems for exploring flexibility of short DNA using cyclic voltammol/Letry. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(5): 1112~1113[DOI]
- 16 Wong E L S, Gooding J J. Electronic detection of target nucleic acids by a 2,6-disulfonic acid anthraquinone intercalator. *Anal Chem*, 2003, 75(15): 3845~3852[DOI]
- 17 Hartwich G, Caruana D J, de Lumley-Woodyear T, et al. Electrochemical study of electron transport through thin DNA films. *J Am Chem Soc*, 1999, 121(46): 10803~10812[DOI]

(2005-04-30 收稿, 2005-06-06 收修改稿)