

含有偶氮苯单体的肽核酸寡聚体自组装膜电化学传感器在DNA序列检测方面的应用

刘胜^{①②}, 陈焱^①, 李进都^{①②}, 张浩波^{①②}, 王金清^{①*}, 杨生荣^①

① 中国科学院兰州化学物理研究所固体润滑国家重点实验室, 兰州 730000;

② 中国科学院研究生院, 北京 100039

* 联系人, E-mail: jqwang@lzb.ac.cn

收稿日期: 2008-04-28; 接受日期: 2008-05-29

国家自然科学基金(批准号: 50572107)和中国科学院“百人计划”资助项目

摘要 利用自组装技术首次将含有偶氮苯单体的肽核酸寡聚体($\text{NH}_2\text{-TNT}_4$, N-PNAs)与DNA的杂交体(N-PNAs/DNA)固定在金电极表面。以 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/3^-$ 氧化还原电对为探针, 利用循环伏安法、示差脉冲伏安法和电化学阻抗谱初步研究了N-PNAs修饰的金电极以及与DNA形成的杂交体在紫外光照射前后体系的电化学行为。结果表明, 伴随着紫外光照射时间的增加, 氧化还原电流减小, 电子在电极表面的传输能力下降, 据此可以推断 PNAs/DNA 杂交体的构象发生了转变, 证明可以通过紫外光的照射来调节 PNAs/DNA 杂交体的结构。

关键词

偶氮苯单体
肽核酸
杂交
金电极
电化学传感器

考虑到大规模的基因检测需要快速、准确、简便和便宜的技术和设备, 而电化学方法正好可以满足上述要求, 因此利用电化学方法检测DNA已经成为一个非常具有吸引力的研究课题^[1]。在过去的几十年里, 对电化学DNA传感方式的研究主要是着眼于DNA在电极表面的自组装, 而近年来基于肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)^[2]在电极表面的组装也引起了人们极大的兴趣。这是因为PNA是DNA的类似物, 它用N-(2-氨基乙基)甘氨酸骨架代替了DNA的糖-磷酸酯骨架作为重复的结构单元(图1), 它与互补核酸之间的结合仍遵循碱基互补配对原则, 甚至比天然核苷酸具有更高的亲和性。Zatsepin等人报道了将PNA组装的电极通过石英微天平、表面等离子共振和电化学等方式检测DNA^[3]。另外, Degefa等人^[4]利用电化学检测方法也研究了PNA修饰的电极借助多电荷电活性物质作为杂交指示剂对目标DNA的分子识

别。因此, 通过构建电化学生物传感器对DNA/PNAs杂交相互作用进行控制已经成为当前研究的一大热点。

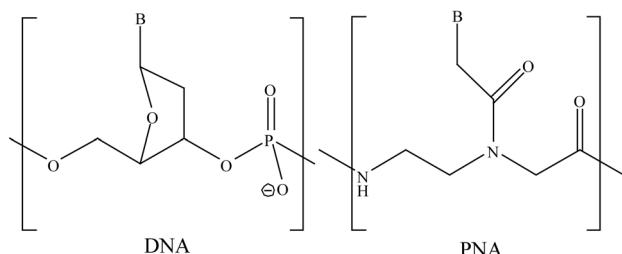


图1 DNA 和 PNA 的结构

偶氮苯是一类比较常用的光致发光分子^[5], 它的结构可以通过光照来调节。对于偶氮苯在分子记忆和光转换方面的应用, 近来引起了研究者们越来越

多的关注。业已发现, 在紫外光的照射下, 偶氮苯从稳定的反式结构会转变为顺式, 然后在可见光的照射下顺式偶氮苯又可发生可逆的变换。根据这个原理, 我们设想可以把含有偶氮苯的PNA单体插入到肽核酸寡聚体中, 然后通过光照来改变PNAs的构象, 依此来调节和控制PNAs/DNA杂交体的结构, 通过杂交体构象的改变来研究电子在电极表面传输过程中杂交体结构变化对电子传输的影响。在本研究中, 我们将本实验室首次合成的含有偶氮苯单体的肽核酸寡聚体(NH₂-TNT₄, N-PNAs)组装到了金电极表面, 然后利用电化学循环伏安法、电化学阻抗谱和示差脉冲伏安法对N-PNAs自组装膜以及N-PNAs/DNA杂交体在紫外光照射下的电化学行为进行了研究, 并且对实验现象和结果进行了详细而深入的分析和讨论。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器: CHI660(上海辰华仪器公司), 电化学阻抗仪 1260+273A(英国 Solartron 公司), 366 nm 紫外光源利用紫外灯(160 W)透过 366 nm 的滤光片来获得。

三电极系统: 金圆盘电极($\Phi=2$ mm)为工作电极, Ag | Ag⁺电极为参比电极, 铂丝为对电极。

试剂: 浓硫酸(分析纯, 白银良友化学试剂有限公司), H₂O₂ (化学纯, 三木集团), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC, 中国医药集团上海化学试剂公司), N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, 中国医药集团上海化学试剂公司), N-PNAs由本实验室合成¹⁾, DNA

(A₆): 5'-AAAAAA-3'(北京赛百盛基因技术有限公司), 3-巯基丙酸(3-mercaptopropionic acid, MPA, Alfa Aesar), PB 缓冲液(pH=7.4)根据文献[6]制备获得, [Fe(CN)₆]^{4-/3-}指示剂溶液的配制: 在 0.2 mol·L⁻¹ PB 缓冲液中加入相同摩尔数的K₃Fe(CN)₆ 和K₄Fe(CN)₆, 使其摩尔深度为 2.5 mol·L⁻¹。

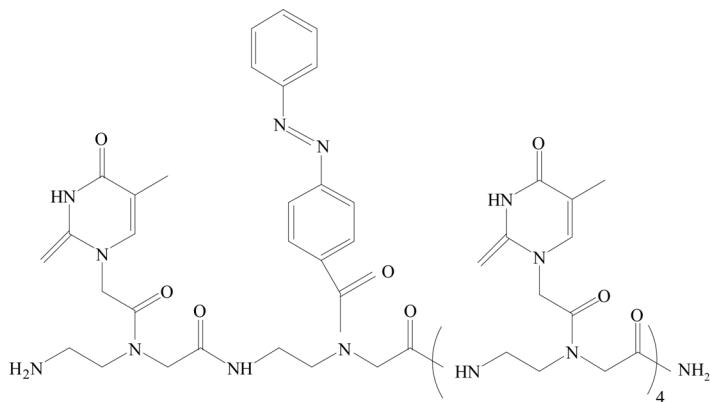
1.2 金电极预处理

金电极首先用 0.05 μm 氧化铝粉打磨平, 随后浸入到 Piranha 溶液(V/V: 30% H₂O₂/98% H₂SO₄=1/3。注意: Piranha 溶液具有强氧化性, 操作应十分小心)中浸泡 1 min, 取出后分别用二次水、无水乙醇充分洗涤, 氮气吹干后置于 0.1 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 溶液中, 在电势范围-0.3 V~1.5 V 下, 以 Ag/Ag⁺为参比电极, 扫速 100 mV·s⁻¹, 进行电化学清洗, 清洗 30 min 直至得到稳定的循环伏安曲线; 最后超声处理 5 min, 水和乙醇充分洗涤后氮气吹干, 即可得到表面清洁的裸金电极^[1]。

1.3 N-PNAs 在金电极表面的组装及与 DNA 的杂交

N-PNAs 在金电极表面的组装及同 DNA 的杂交过程如图 2 所示: 首先将已处理好的裸金电极浸入到新鲜制备的 20 mmol·L⁻¹ 疏基丙酸(MPA)溶液(V/V 乙醇/水=75/25)中组装 10 min, 取出后利用二次水和无水乙醇充分洗涤, 随后将组装了疏基丙酸的电极浸入到含有 2 mmol·L⁻¹ EDC 和 5 mmol·L⁻¹ NHS 的 50 mmol·L⁻¹ 的 PB 缓冲溶液中(pH=7.4)反应 1 h, 取出后

1) The singly charged signal ([M+H]⁺=1671.72) of the mass-tagged fulllength N-PNAs was detected and the molecular structure of N-PNAs could be deduced as follows



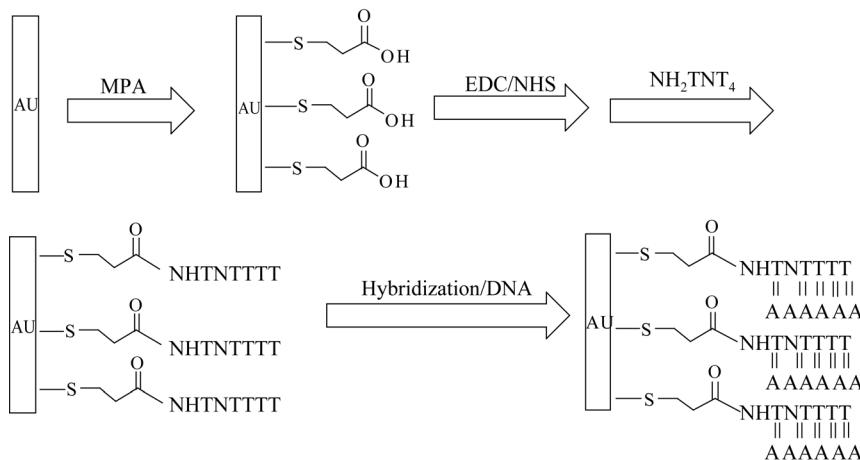


图 2 N-PNAs 与 DNA 杂交体在修饰的金电极上的组装示意图

用 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PB 缓冲液充分洗涤，接着将金电极倒置；然后将 $20 \mu\text{L} 4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ N-PNAs 的乙酸缓冲溶液($0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=4.8$)置于金电极上组装 1 h ，在这个过程中，电极被置于一个密封的塑料管中以防溶液挥发；最后用 PB 缓冲液充分洗涤，得到 N-PNAs 修饰的金电极。

N-PNAs/DNA 的杂交：将 $20 \mu\text{L} 4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DNA (A_6) 的 PB 缓冲液($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.4$)置于组装有 N-PNAs 的金电极上进行杂交反应， 2 h 后用 PB 缓冲液冲洗电极，得到 N-PNAs/DNA 杂交体修饰的金电极。

1.4 N-PNAs 与 DNA 杂交前后以及紫外光照射后的电化学行为研究

以组装有 N-PNAs/DNA 的金电极为工作电极， Ag/Ag^+ 电极为参比电极，铂丝电极为辅助电极，以 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/^{3-}$ (1 : 1) 氧化还原电对为探针，使用 366 nm 的紫外光分别照射组装了 N-PNAs/DNA 的金电极 $10, 15, 20, 25, 30, 35 \text{ min}$ 后，在 PB 缓冲液中分别测量体系的循环伏安曲线、示差脉冲伏安曲线和电化学阻抗谱。

2 结果与讨论

利用循环伏安方法对 N-PNAs/DNA 杂交体修饰的金电极进行了表征，实验结果如图 3 所示。可以发现，一个准可逆的氧化还原反应出现了，组装有偶氮苯单体的 PNAs 寡聚体与单碱基错配的 DNA(A_6) 杂交

之后， $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/^{3-}$ 指示剂探针的阳极峰电流和阴极峰电流开始变小。另外，阳极峰电位相对于 N-PNAs 修饰的金电极的阳极峰电位发生了正移，而阴极峰电位则相对于 N-PNAs 修饰的金电极的阴极峰电位发生了负移，峰间距离由最初的 140 mV 逐渐加大，我们认为这可能是由于杂交后 DNA 骨架上的负电荷与指示剂 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/^{3-}$ 上的负电荷产生相互排斥作用以及空间位阻增大致使金电极表面自组装单层膜抑制了溶液中的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/^{3-}$ 向金电极表面的扩散^[14]。随后对组装 N-PNAs/DNA 杂交体的金电极用 366 nm 的紫外光进行了照射，分析发现：伴随着照射时间

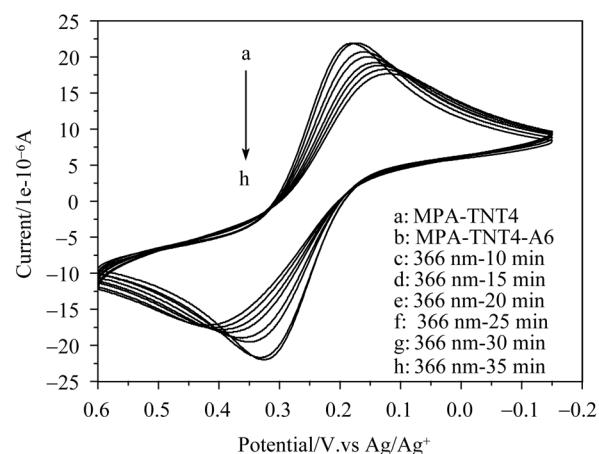


图 3 N-PNAs/DNA 杂交体修饰的金电极在杂交前后和紫外光照射不同时间下的循环伏安曲线
(箭头代表紫外光照射时间增加的方向，从 a→h)

的增加, $[Fe(CN)_6]^{4-3-}$ 的阳极峰电流和阴极峰电流进一步减小, 而且电位分别继续发生正移和负移, 阴极峰电位和阳极峰电位之间的距离也不断加大, 说明紫外光的照射减小了电子在自组装膜修饰的金电极表面和溶液之间的传输能力, 同时也证明了 N-PNAs/DNA 杂交体结构在紫外光的照射下构象发生了部分的改变, 这是由于在紫外光的作用下, 原先插入到碱基对之间的反式偶氮苯变为非平面的顺式偶氮苯, 双链体结构被破坏, 从而阻碍了电子在碱基对之间的传输, 最后导致金电极表面电子传输能力的下降。

更为丰富的有关电极阻挡电子传输的信息可以通过电化学阻抗谱来获得。在本工作中我们利用电化学阻抗谱来重点研究 N-PNAs 同目标 DNA 的杂交传感性和含有偶氮苯单体的自组装膜修饰的电极对电子传输的影响, 电化学阻抗谱的测量还是以 $[Fe(CN)_6]^{4-3-}$ 为电活性指示剂来完成。图 4 展示了 N-PNAs/DNA 杂交体修饰的金电极在杂交前后与紫外光照射之后的电化学阻抗谱(Nyquist plots, Z' versus Z'' , 分别代表阻抗谱的实部和虚部)。图中每一个阻抗谱图分别由在高频区的一个半圆弧和在低频区的一条直线部分来构成, 它们分别代表着电子的传输过程和分散过程。这些图谱可以用 Randles 等效电路来模拟, 其中在等效电路中含有溶液电阻(R_s)、电荷转移电阻(R_{ct})、常相位角元件(CPE)和 Warburg 阻抗(Z_w)^[8], 半圆弧的直径代表了电子在电极表面的 R_{ct} 。从图 4 中我们看到 N-PNAs 同 DNA 杂交之后半圆弧的直径(也就是代表电子在电极表面的转移电阻, R_{ct})在变大, 这个变化应该归于电活性指示剂 $[Fe(CN)_6]^{4-3-}$ 和电极表面的 DNA 的静电排斥作用和空间位阻作用的共同影响, 上述影响阻挡了电子在电极表面的传输。在紫外光的照射下, 伴随着时间的增加, R_{ct} 在不断的增加, 说明电极表面对电子的阻挡能力在增加, 这与前面对循环伏安曲线的分析是一致的。

另外, 我们也研究了体系在杂交前后和紫外光照射后的示差脉冲伏安曲线(differential pulse voltammetry, DPV)。从图 5 中可以清楚地看出: 随着紫外光照射时间的增加, DPV 的电流峰值在逐渐地降低, 说明 N-PNAs/DNA 杂交体组装金电极的表面导电能

力在下降, 由此也可以间接证明金电极表面自组装薄膜的构象发生了变化, 证实了用紫外光照射来调节和控制含有偶氮苯单体的 PNAs/DNA 杂交体结构是可以实现的, 这同时为我们用 DPV 来检测 PNAs/DNA 杂交提供了理论依据。

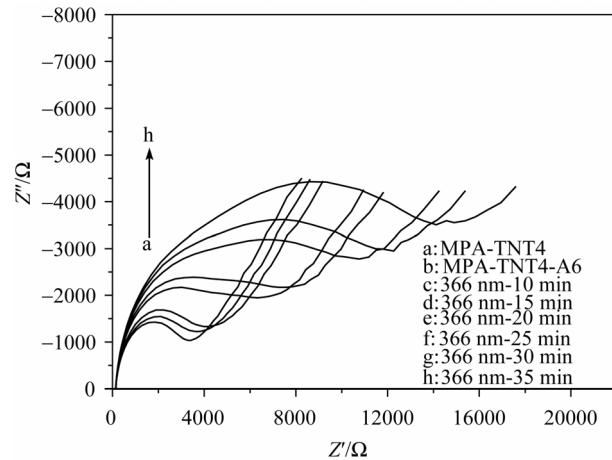


图 4 N-PNAs/DNA 杂交体修饰的金电极在杂交前后和紫外光照射不同时间下的电化学阻抗谱

(箭头代表紫外光照射时间增加的方向, 从 a→h)

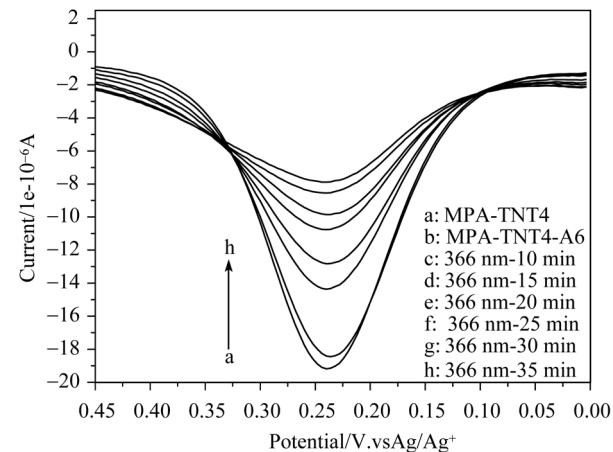


图 5 N-PNAs/DNA 杂交体修饰的金电极在杂交前后和紫外光照射不同时间下的示差脉冲伏安曲线

(箭头代表紫外光照射时间增加的方向, 从 a→h)

3 结论

首先利用自组装方法将含有偶氮苯单体的肽核酸寡聚体通过与巯基丙酸反应吸附于金电极上, 然

后使之与单碱基错配的 DNA 进行了杂交, 最后以 $[Fe(CN)_6]^{4-/-3-}$ 为电活性指示剂, 利用循环伏安法、电化学阻抗谱和示差脉冲伏安法对杂交前后以及紫外光照射杂交体不同时间后体系的电化学行为进行了研究。结果发现: 在静电作用和空间位阻作用的共同影响下, 杂交后电极表面电子的传输能力降低; 另外, 由于 PNAs 中含有可以发生顺反异构的偶氮苯,

利用紫外光对杂交体系进行照射后发现偶氮苯由稳定的反式构象转变为顺式构象, 以致 PNAs/DNA 杂交双链体结构被部分破坏, 杂交双链体传输电子能力降低, 使电极表面的位阻加大, 从而引起了电子在溶液和电极表面的传输能力进一步降低, 证实了在肽核酸寡聚体中插入偶氮苯单体确实可以通过紫外光照射来控制与 DNA 的杂交行为。

参考文献

- Steichen M, Decrem Y, Godfroid E, Buess-Herman C. Electrochemical DNA hybridization detection using peptide nucleic acids and $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ on gold electrodes. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22(9-10): 2237—2243 [[DOI](#)]
- Nielsen P E, Egholm M, Berg R H, Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, 1991, 254(5037): 1497—1500 [[DOI](#)]
- Zatsepin T S, Andreev S Y, Hianik T, Oretskaya T S. Ferrocene-containing nucleic acids. Synthesis and electrochemical properties. *Russ Chem Rev*, 2003, 72(6): 537—554 [[DOI](#)]
- Degefa T H, Kwak J. Electrochemical impedance sensing of DNA at PNA self assembled monolayer. *J Electroanal Chem*, 2008, 612 (1): 37—41 [[DOI](#)]
- Kurihara M, Nishihara H. Azo- and quinone-conjugated redox complexes—photo- and proton-coupled intramolecular reactions based on $d-\pi$ interaction. *Coord Chem Rev*, 2002, 226(1-2): 125—135 [[DOI](#)]
- 王美佳, 纪小会, 王连英, 刘敏, 刘艳梅, 白玉白, 李铁津, 李景虹. DNA 在纳米金标上的组装、杂交、检测与银增强. *物理化学学报*, 2003, 19(9): 879—882
- Ozkan D, Erdem A, Kara P, Kerman K, Gooding J J, Nielsen P E, Ozsoz M. Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylene blue on self-assembled alkanethiol monolayer modified gold electrodes. *Electrochim Commun*, 2002, 4(10): 796—802 [[DOI](#)]
- Park S M, Yoo J S. Electrochemical impedance spectroscopy for better electrochemical measurements. *Anal Chem*, 2003, 75(21): 455A—461A